

# 岛津高效液相色谱联合三重四极杆质谱测定抗体药物中 2-脱氧-2-氟-岩藻糖的残留

## LCMSMS-617

**摘要：** 本文采用岛津高效液相色谱联合三重四极杆质谱，建立了测定 2-脱氧-2-氟-岩藻糖含量的方法。该方法中，2-脱氧-2-氟-岩藻糖在 5~100  $\mu\text{g/L}$  范围内线性良好，相关系数为 0.9999。精密度实验中，浓度为 10  $\mu\text{g/L}$  2-脱氧-2-氟-岩藻糖的保留时间 RSD% 为 0.40%，峰面积 RSD% 为 6.42%；浓度为 50  $\mu\text{g/L}$  2-脱氧-2-氟-岩藻糖的保留时间 RSD% 为 0.31%，峰面积 RSD% 为 3.94%。实验结果表明，该方法能快速准确地测定 2-脱氧-2-氟-岩藻糖的含量。

**关键词：** 高效液相色谱 三重四极杆质谱 2-脱氧-2-氟-岩藻糖

如果治疗性 IgG1 抗体上 Asn297 的糖基化位点上的岩藻糖基化水平降低，可以增加 Fc 区与效应细胞 Fc $\gamma$ RIIIa 的结合，增强抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 的效果。在动物模型和临床中，ADCC 的增加与体内药效的增加相关。因此，岩藻糖基化水平是控制治疗性抗体生产的重要产品属性。抗体的岩藻糖基化水平可以通过使用岩藻糖基化抑制剂来调节。这种抑制剂具有潜在的优势，它可以利用现有细胞系而无需进行基因改造，只影响岩藻糖基化而不改变其他糖基、蛋白质和细胞的生长属性。

2-脱氧-2-氟-岩藻糖可以在细胞内转化为 GDP-2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖，一种竞争性的  $\alpha$ -1,3-岩藻糖

基化转移酶抑制剂。它可以减少抗体中 IgG 的岩藻糖基化，增强抗体依赖的细胞毒性，从而增加抗体的治疗效果。但是有研究表明 2-脱氧-2-氟-岩藻糖也是一种活性药物，可以与检验点抑制剂联合使用，有效治疗癌症。为防止其对目标抗体药物治疗效果的影响，在纯化过程中需要完全去除残留。因此建立抗体药物中 2-脱氧-2-氟-岩藻糖含量检测的方法对控制药物质量安全性具有重要意义。

本实验使用高效液相色谱联合三重四极杆质谱建立了抗体药物中 2-脱氧-2-氟-岩藻糖含量测定方法，该方法分析速度快，准确度高。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

高效液相色谱联合三重四极杆质谱，配置信息如下：

系统控制器：CBM-20A

输液泵：LC-30AD

质谱仪：LCMS-8050

自动进样器：SIL-30AC

脱气机：DGU-20A<sub>5R</sub>

色谱工作站：Labsolutions Ver. 5.99

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack Scepter C18-120 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9  $\mu\text{m}$ , 岛津 (上海) 实验器材有限公司, PN:227-30001-04)

流动相：A-0.05% 甲酸 - 水溶液；B-0.05% 甲酸 - 乙腈溶液

进样体积：5  $\mu\text{L}$

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

流速：0.3 mL/min

洗针液：甲醇 / 水 = 1:1 (v:v)

洗脱方式：梯度洗脱，B 相起始浓度为 5%，时间程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
2.00	泵	B Conc	5
5.00	泵	B Conc	90
7.00	泵	B Conc	90
7.10	泵	B Conc	5
10.00	控制器	STOP	

质谱条件

离子化模式: ESI, 负离子模式

雾化气流速: 3.0 L/min

接口温度: 300°C

DL 温度: 150°C

碰撞气: 氩气

加热模块温度: 400°C

干燥气流速: 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

接口电压: -1 kV

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

中文名称	英文名称	缩写	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
2-脱氧-2-氟-岩藻糖	2-Deoxy-2-fluoro-L-fucose	2-FF	70763-62-1	211.15	103.05*	20.0	12.0	13.0
					45.10	22.0	24.0	17.0

\* 代表定量离子对。

1.3 基质标准曲线溶液制备

用水配制 1 mg/mL 对照品储备液, 用水逐级稀释, 分别得到 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 50 mg/L 和 100 mg/L 标准工作溶液。分别取各浓度的标准工作溶液 2 μL, 加入 198 μL 基质配制线性标曲, 得到浓度分别为 5 μg/L, 10 μg/L, 20 μg/L, 50 μg/L 和 100 μg/L 基质标准曲线溶液。

1.4 基质标准曲线溶液和样品前处理

分别准确吸取 50 μL 各浓度的基质标准曲线溶液 (或者样品) 至塑料离心管中, 分别加入 150 μL -80°C 预冷的乙醇, 震荡 3 min, 离心, 取上清液, 得各浓度点溶液上机检测。

■ 结果与讨论

2.1 标准曲线

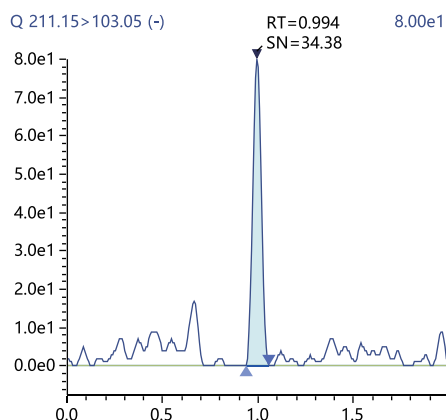


图 1 5 μg/L 基质溶液图谱

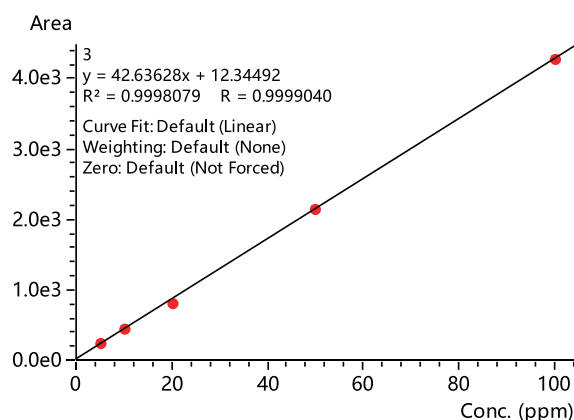


图 2 基质标准曲线

按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，采用外标法建立指数标准曲线，结果如图 2 所示，2- 脱氧 -2- 氟 - 岩藻糖在 5~100  $\mu\text{g/L}$  线性浓度范围内，线性相关性良好，相关系数为 0.9999，准确度为 95.4~109.3%。

## 2.2 精密度实验

按照 1.2 分析条件测定，选择浓度为 10  $\mu\text{g/L}$  和 50  $\mu\text{g/L}$  的 2- 脱氧 -2- 氟 - 岩藻糖基质标准溶液经过与样品相同的前处理得到的溶液分别连续进样测定 6 次。浓度为 10  $\mu\text{g/L}$  2- 脱氧 -2- 氟 - 岩藻糖的保留时间 RSD% 为 0.40%，峰面积 RSD% 为 6.42%，结果见表 3 所示；浓度为 50  $\mu\text{g/L}$  2- 脱氧 -2- 氟 - 岩藻糖的保留时间 RSD% 为 0.31%，峰面积 RSD% 为 3.94%，结果见表 4 所示。实验结果表明，该分析方法具有良好的精密度。

表 3 基质标准溶液 (10  $\mu\text{g/L}$ ) 精密度实验结果 (n=6)

序号	保留时间 (min)	峰面积
1	0.992	453
2	0.983	427
3	0.988	424
4	0.981	480
5	0.988	405
6	0.987	465
平均值	0.987	442
RSD%	0.40%	6.42%

表 4 基质标准溶液 (50  $\mu\text{g/L}$ ) 精密度实验结果 (n=6)

序号	保留时间 (min)	峰面积
1	0.987	2,182
2	0.987	2,103
3	0.992	2,001
4	0.993	2,104
5	0.993	1,974
6	0.993	2,150
平均值	0.991	2,086
RSD%	0.31%	3.94%

## 2.3 实际样品分析

将 4 个抗体制剂样品按 1.4 样品前处理后，用 1.2 方法进样分析，结果如图 3 ~ 图 6 所示，所测样品中均未检出 2- 脱氧 -2- 氟 - 岩藻糖。

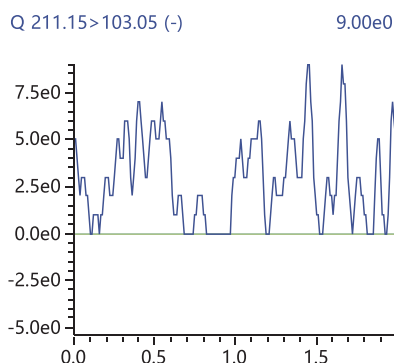


图 3 抗体制剂样品 1 MRM 色谱图

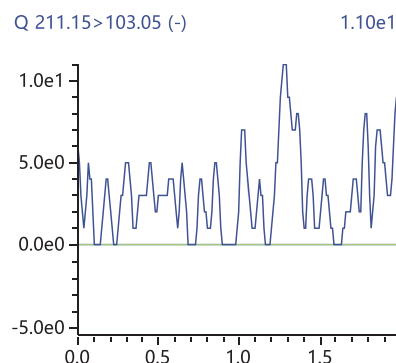


图 4 抗体制剂样品 2 MRM 色谱图

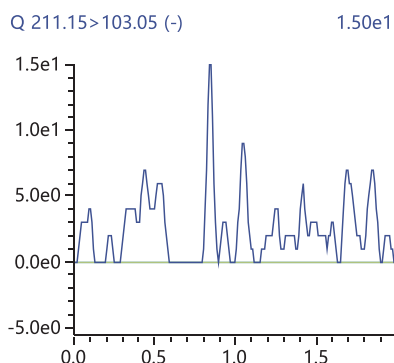


图 5 抗体制剂样品 3 MRM 色谱图

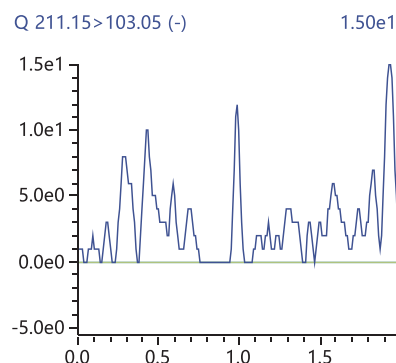


图 6 抗体制剂样品 4 MRM 色谱图

## ■ 结论

本实验使用岛津高效液相色谱串联三重四极杆质谱，建立了测定 2-脱氧-2-氟-岩藻糖含量的方法。结果表明，2-脱氧-2-氟-岩藻糖在 5~100  $\mu\text{g/L}$  范围内线性良好，相关系数为 0.9999。精密度实验中，浓度为 10  $\mu\text{g/L}$  2-脱氧-2-氟-岩藻糖的保留时间 RSD% 为 0.40%，峰面积 RSD% 为 6.42%；浓度为 50  $\mu\text{g/L}$  2-脱氧-2-氟-岩藻糖的保留时间 RSD% 为 0.31%，峰面积 RSD% 为 3.94%。实验结果表明，该方法分析速度快，准确性好，可用于抗体药物中 2-脱氧-2-氟-岩藻糖的残留分析。

岛津应用云

