

生物兼容液相色谱仪与多角度光散射检测器联用测定曲妥珠单抗主成分及聚集体分子量

LC-295

摘要： 本文采用岛津生物兼容液相色谱仪 Nexera Bio 联合多角度光散射检测器测定单抗药物主成分及聚集体分子量，为推断单抗药物聚集体状态提供依据。本实验采用体积排阻色谱对样品进行分离，紫外和多角度光散射检测器进行检测，通过色谱图得知，此曲妥珠单抗药物无聚集体，多角度光散射检测器测得主成分分子量为 159,722 Da，与理论值偏差为 0.17%。此分子量测定方法操作简便，快速，成本低，可用于单抗药物主成分及聚集体分子量的测定。

关键词： 多角度光散射检测器 曲妥珠单抗 绝对分子质量

随着 1997 年第一个人源化单克隆抗体药物的投放市场，单抗以特异性高、副作用小、纯化工艺简单等优势在治疗癌症、肿瘤、免疫性疾病等领域得到了快速的发展。但单抗药物的化学不稳定性和环境因素影响，可能会产生聚集体，且聚集体是不可逆的，其不仅会降低单抗药物的功效，而且还可以刺激免疫原性反应，导致治疗中的各种不良事件，所以单抗聚集体分析显得尤为重要。

本文采用体积排阻色谱 (SEC) 和多角度光散射检测器 (MALS) 测定曲妥珠单抗主成分及其聚集体分子量，为推断单抗药物聚集体状态提供依据。SEC 根据不同分子大小在填料孔隙中的差异化扩散实现主成分及其聚集体的分离，MALS 可以在无分子量对照品的情况下测定化合物绝对分子质量，测量范围为 1 万~500 万 Da，分子量涵盖范围广，且操作简便快速。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津生物兼容液相色谱系统 (Nexera Bio)。具体配置为：

系统控制器：CBM-20A

脱气机：DGU-20A_{5R}

输液泵：LC-20AD_{XR}

自动进样器：SIL-20A_{XR}

柱温箱：CTO-20AC

检测器 1：SPD-M20A

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.98

检测器 2：MALS*

MALS*：多角度光散射检测器

1.2 分析条件

色谱柱：SHIMSEN Ankylo SEC-300 (300 mm × 7.8 mm I.D., 3.0 μm)

岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 380-01215-10

流动相：A 相：50 mM 磷酸盐缓冲液 + 300 mM NaCl (pH=6.8)

B 相：乙腈

流速：0.8 mL/min

柱温：30°C

进样体积：10 μL

检测波长：260 nm

洗脱方式：等度洗脱，B 相浓度为 10%。

■ 标准溶液和样品配制方法

牛血清蛋白（BSA）标准溶液：称取牛血清蛋白 2.050 mg，用超纯水定容至 1 mL，浓度为 2.050 mg/mL。

曲妥珠单抗溶液：将曲妥珠单抗药物用超纯水稀释，稀释后浓度为 5.500 mg/mL。

■ 结果与讨论

3.1 MALS 测定分子质量原理

当分子被激光照射时，散射光的强度与其分子量有直接相关，这种关系可以用光散射 Rayleigh 方程来进行描述。当从 10° 角来测量低浓度样品光散射强度时，Rayleigh 方程可以简化为： $R_{LALS}=k_{opt} \times c \times Mw$ 。其中， R_{LALS} 为 10° 角散射光强，可由 MALS 检测器检测得到； k_{opt} 为光散射常数； c 为浓度，单位为 mg/mL； Mw 为分子量。

如需得到分子量分布，还需浓度型检测器计算不同分子量的占比，所以本文将紫外检测器与 MALS 连用，得到不同分子量占比，计算数均分子量 M_n 、Z 均分子量 M_z 及分子量分布指数。

MALS 测定分子量还需计算仪器响应常数，一般采用已知分子量的同类型标准溶液计算得到，本实验标准溶液为牛血清蛋白溶液。

3.2 牛血清蛋白标准溶液谱图

分析牛血清蛋白标准溶液，已知分子量为 66500 Da，得到谱图如图 1 所示。从图可知，紫外谱图有 3 个峰，最大峰为 BSA 主成分，其余两峰为多聚体。通过 SECview 软件计算得到主成分含量为 79.98%，主成分浓度为 1.643 mg/mL，MALS 仪器响应常数为 8.5523×10^{-7} ，紫外仪器响应常数为 1.2443×10^6 。

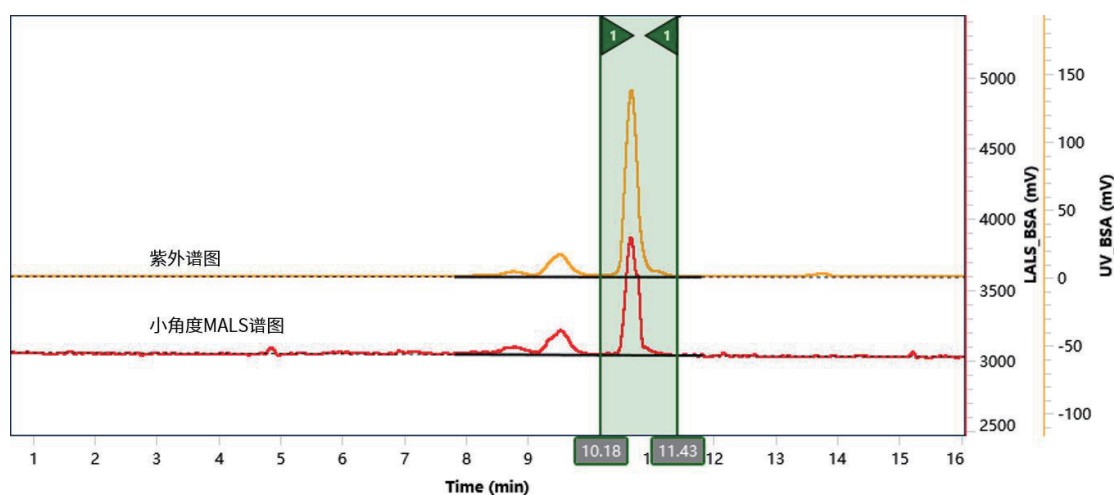


图 1 BSA 溶液谱图

3.3 曲妥珠单抗绝对分子量测定

分析某曲妥珠单抗标准溶液，得到谱图如图 2 所示。从谱图得知，此曲妥珠样品中只含有主成分，无明显聚集体成分。SECview 软件计算主成分重均分子量 M_w 为 159,722 Da，曲妥珠单抗理论分子量为 16,000 Da，偏差为 0.17%。

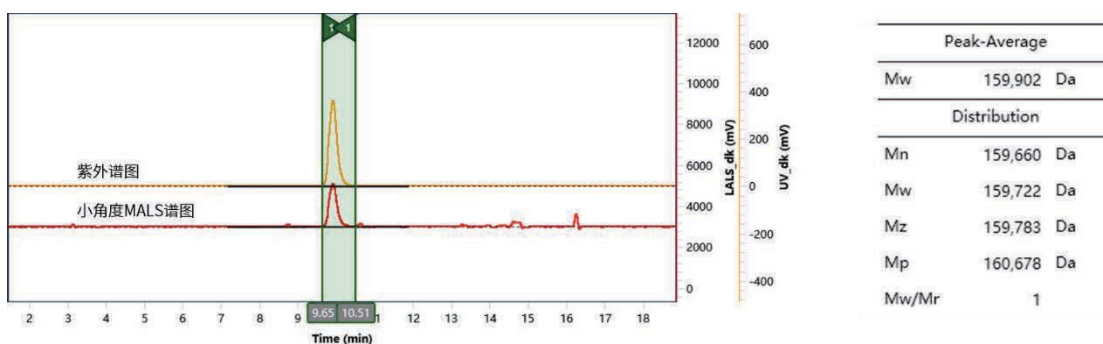


图2 曲妥珠单抗溶液谱图及曲妥珠分子量分布

■ 结论

本文采用岛津生物兼容液相色谱仪 Nexera Bio 联合多角度光散射检测器测定单抗药物主成分及聚集体分子量，为推断单抗药物聚集体状态提供依据。本实验测定某曲妥珠单抗样品分子量，通过色谱图得到，此曲妥珠单抗药物无聚集体，多角度光散射检测器测得主成分分子量为 159,722 Da，与理论值偏差为 0.17%。此分子量测定方法操作简便，快速，成本低，可用于单抗药物主成分及聚集体分子量的测定。

岛津应用云

