

利用超高效液相色谱仪连接荧光检测器和四极杆飞行时间质谱仪对曲妥珠单抗游离 N 糖进行分离与鉴定

LCMS-QTOF-035

摘要： 本文利用岛津超高效液相色谱仪 Nexera LC-40XR 连接荧光检测器 RF-20A XS 及四极杆飞行时间质谱 LCMS-9030 联用系统建立了单抗游离 N 糖的分离与鉴定方法，对曲妥珠单抗的 N 糖进行了定性与定量分析。该方法使用 PNGaseF 酶将 N 糖从单抗中释放出来，并利用 2- 氨基苯甲酰胺（2-AB）进行标记，之后使用荧光检测器 RF-20A XS 与四极杆飞行时间质谱 LCMS-9030 进行检测，荧光检测器的峰面积用于 N 糖的相对定量，高分辨质谱得到的精确质量数可对各峰进行定位。连续进样 6 针，色谱中所有峰的峰面积和保留时间的 RSD 均小于 3%，质谱中各糖型的质量数偏差均小于 2 ppm，最后通过峰面积计算出了各个糖型的丰度比。该方法稳定可靠，峰面积和保留时间的重复性及质量准确度均符合要求。

关键词： RF-20A XS LCMS-9030 Nexera LC-40XR 单克隆抗体 游离 N 糖

在众多的蛋白质翻译后修饰中，糖基化修饰是最重要和最复杂的修饰之一，也是评价抗体的关键质量属性之一。根据糖基化的修饰位点可将糖基化分为 N 位糖基化和 O 位糖基化。动物细胞分泌的免疫球蛋白中 N 位的糖基化是最普遍的糖基化修饰，同时也是研究最多的一种糖基化修饰。以 IgG1 为例，其重要的糖基化修饰位点位于 Fc 端，且根据其末端精细结构（长度、分支及单糖排列）的不同又可分为复合型、杂合型和高甘露糖型。

单抗药物功能的实现与其糖基化修饰密切相关，糖基化修饰会影响蛋白的性能，如构象、稳定性、溶

解度、药物代谢动力学、活性及免疫原性等。2020 版《中国药典》第三部新增了《3130- 单抗 N 糖谱测定法》，作为指导原则，进一步完善了生物制品全过程质量控制的要求。

本文利用岛津超高效液相色谱仪 Nexera LC-40XR 连接荧光检测器 RF-20A XS 以及四极杆飞行时间质谱 LCMS-9030 建立了单抗游离 N 糖的分离与鉴定方法，对曲妥珠单抗的 N 糖进行了定性与定量分析，方法稳定可靠，峰面积和保留时间重复性及质量数准确度均符合要求，分析检测方法供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪连接荧光检测器和四极杆飞行时间质谱。具体配置为：

系统控制器：CBM-40lite

脱气机：DGU-403

输液泵：LC-40AB XR

自动进样器：SIL-40C XR

柱温箱：CTO-40C

质谱仪：LCMS-9030

荧光检测器：RF-20A XS

色谱工作站：LabSolutions LCMS Ver. 5.99

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：酰胺基键合硅胶填充色谱柱，150 mm x 2.1 mm I.D., 1.7 μm

流动相：A 相 -50 mM 甲酸铵水溶液 B 相 - 乙腈

流速：0.5 mL/min

柱温：60°C

进样量：5 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 78%，时间程序见表 1

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
38.5	Pump	B.Conc	55.9
39.5	Pump	B.Conc	20.0
44.5	Pump	B.Conc	20.0
46.5	Pump	B.Conc	78.0
60.0	Controller	Stop	

荧光检测器条件:

激发波长: 330 nm

数据速率: 1 pts/s

发射波长: 420 nm

增益: 1

LCMS-9030 质谱条件:

离子源: ESI⁺

接口电压: 4.0 kV

雾化气流速: 3 L/min

加热模块温度: 350°C

DL 温度: 250°C

加热气流速: 10.0 L/min

接口温度: 400°C

干燥气流速: 10.0 L/min

扫描模式: MS 扫描

扫描范围: 500-2500 m/z

1.3 前处理方法

1) N 糖的酶切

准备 30 kD 的超滤离心管, 加入 150 μ L 的超纯水, 13500 g 离心 5 分钟 (舍弃残留有大体积液体的超滤管, 并处理新的超滤管)。加入 200 μ L 10 mg/mL 的样品溶液至超滤管中, 13500 g 离心 10 分钟, 丢弃下层液体。向上层截留溶液中加入 400 μ L 10 mmol/L 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH7.4), 13500 g 离心 10 分钟, 重复两次, 吸取全部上层截留溶液转移至离心管中。吸取 150 μ L 10 mmol/L 的 PBS 润洗上层超滤管, 并转移至对应的离心管中 (浓度约为 10 mg/mL)。取 25 μ L 置换 PBS 后的溶液, 加入 5 μ L N 糖苷酶 F (PNGase F) 和 70 μ L 10 mmol/L 的 PBS, 总体积为 100 μ L, 混匀并短暂离心, 37°C 水浴下孵育 20 小时。

2) 蛋白去除和 N 糖的标记

2-氨基苯甲酰胺 (2-AB 标记溶液) 的制备: 取 350 μ L 二甲基亚砜 (DMSO) 和 150 μ L 乙酸, 混匀。精密称取 25 mg 2-AB 加入上述溶液中, 充分溶解。精密称取 30 mg 氨基硼氢化钠加入上述溶液中, 充分溶解 (可适当加热)。

向酶切完的溶液中加入三倍体积预冷的乙醇, 涡旋混匀, -20°C 放置 1 小时, 沉淀蛋白。13500 g 离心 10 分钟。吸取适量 (如 360 μ L) 上清液至离心管中离心干燥。待完全干燥后, 加入 10 μ L 2-AB 标记溶液, 涡旋混匀并短暂离心, 65°C 下孵育 2~4 小时。

3) 标记的 N 糖纯化

标记的 N 糖纯化采用固相萃取, 按照说明书进行操作, 对标记的 N 糖进行纯化, 以去除游离的 2-AB, 离心干燥纯化的样品, 用 100 μ L 70% 乙腈溶液复溶。

■ 结果与讨论

2.1 Nexera LC-40 连接 RF-20A XS 连续进样重复性考察

按照前处理方法 1.3 对曲妥珠单抗上连接的 N 糖进行酶切, 酶切下来的游离 N 糖进样分析, 结果如图 1 所示。对仪器的连续进样差异性进行评估, 结果如表 2 显示, 连续进样 6 针, 所有峰的峰面积和保留时间的 RSD 均小于 3%, 仪器及方法重复性良好, 可用于对 N 糖的相对定量。

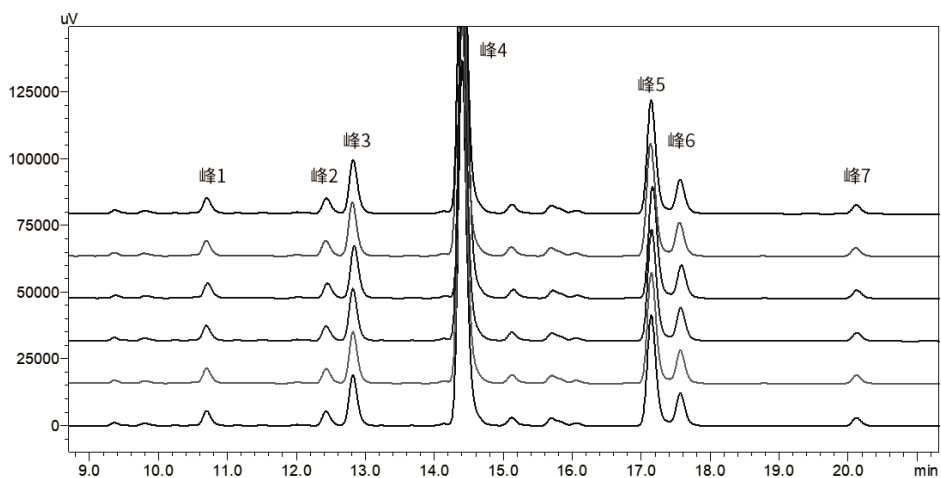


图 1 曲妥珠单抗 N 糖连续进样色谱图

表 2 曲妥珠单抗 N 糖峰面积及保留时间连续进样重复性 (n=6)

峰号	峰面积			保留时间		
	平均峰面积	标准偏差	RSD%	平均保留时间 (min)	标准偏差	RSD%
峰 1	52371	1086	2.075	10.699	0.004	0.036
峰 2	48913	1144	2.339	12.433	0.005	0.039
峰 3	169913	3854	2.268	12.821	0.005	0.042
峰 4	1278049	28948	2.265	14.405	0.006	0.043
峰 5	389980	3491	0.895	17.150	0.008	0.045
峰 6	121318	945	0.779	17.570	0.008	0.045
峰 7	30887	497	1.609	20.124	0.008	0.041

2.2 四极杆飞行时间质谱 LCMS-9030 确认曲妥珠单抗样品 N 糖结构信息

对主要的色谱峰使用高分辨质谱进行结构确认，鉴定出包括 G0-GN, G0F-GN, G0, G0F, G1Fa/b, G2F 等七种标记的 N 糖，如图 2 所示。图 3 展示了 2-AB 标记 N 糖的理论结构，表 3 列出了 LCMS-9030 所得到实际质量数与理论质量数的误差，结果显示，质量误差均在 2 ppm 以内，质量数准确度符合要求。

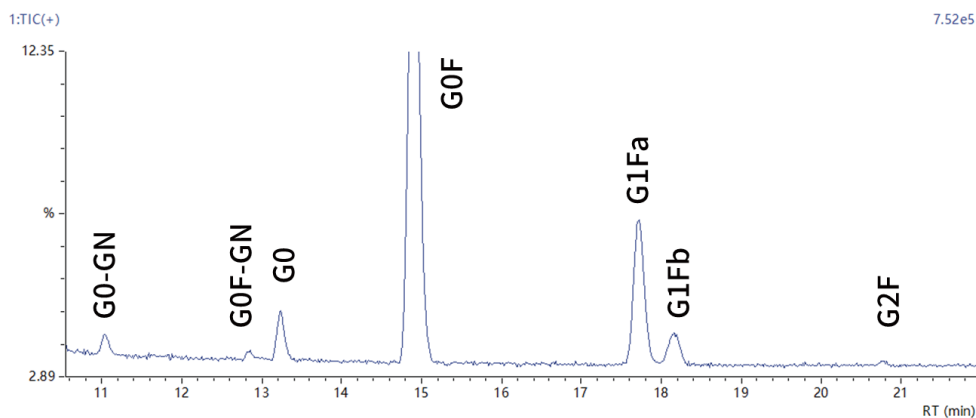


图 2 曲妥珠单抗 2-AB 标记 N 糖的总离子流图

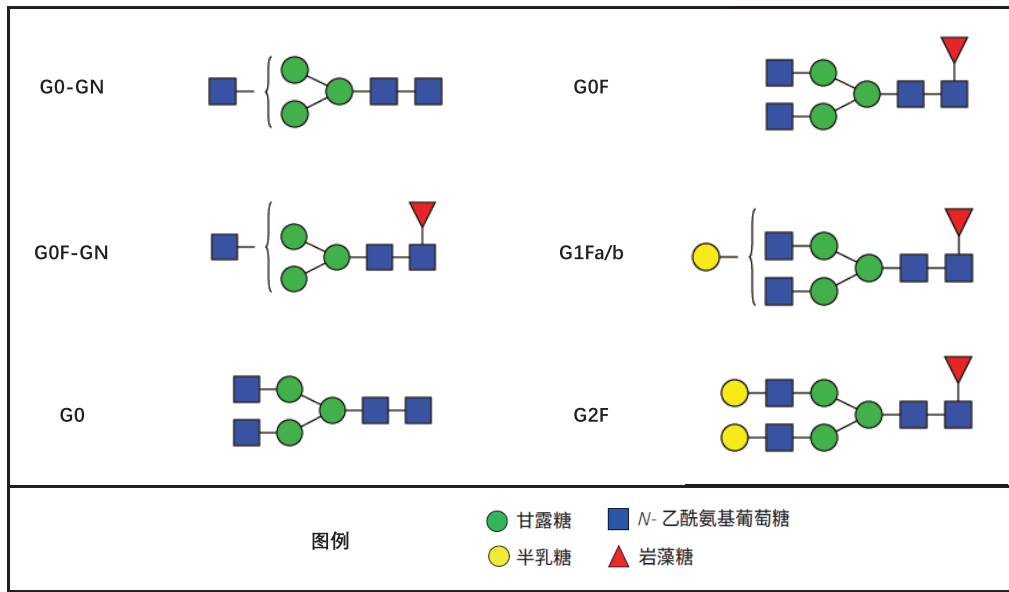


图3 曲妥珠单抗 2-AB 标记 N 糖的理论结构 (GN=GlcNA)

表 3 曲妥珠单抗 N 糖分析质量准确度

2-AB N-glycan	实测质量 m/z	理论质量 m/z	质量误差 ppm
G0-GN	1234.4823	1234.4832	-0.729
G0F-GN	1380.5420	1380.5411	0.652
G0	1437.5629	1437.5625	0.278
G0F	1583.6214	1583.6205	0.568
G1Fa/b	1745.6740	1745.6733	0.401
G2F (z=2)	954.3679	954.3667	1.276

2.3 N 糖的相对定量

使用高分辨质谱对糖型进行表征后，如图 4 所示，可对荧光检测器中的各峰进行归属，并通过峰面积确认各个糖型的丰度比，结果如图 5 所示，在所有糖型中，G0F 是占比最高的糖型，比例约为 61%。

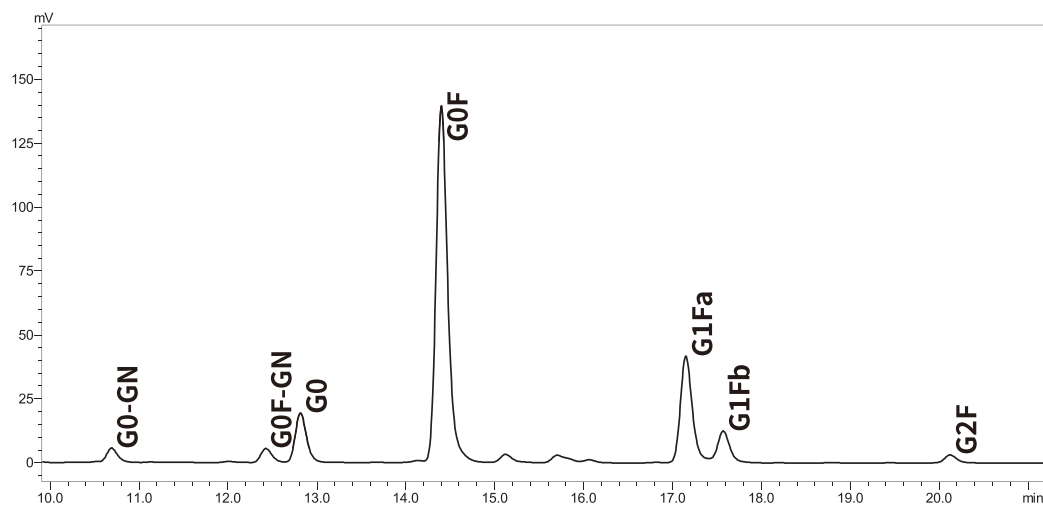


图 4 曲妥珠单抗 2-AB 标记 N 糖荧光色谱图

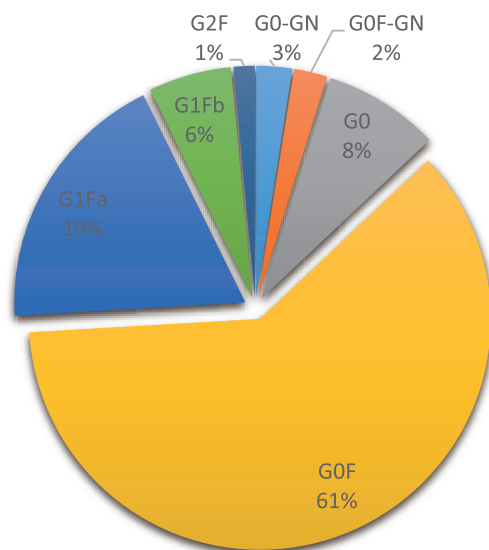


图5 曲妥珠单抗 2-AB 标记各 N 糖型的相对丰度

■ 结论

本文利用岛津超高效液相色谱仪 Nexera LC-40XR 连接荧光检测器 RF-20A XA 和四极杆飞行时间质谱 LCMS-9030 建立了单抗游离 N 糖的分离与鉴定方法，对曲妥珠单抗的 N 糖进行了定性与定量分析，连续进样 6 针，色谱中所有峰的峰面积和保留时间的 RSD 均小于 3%，质谱中各糖型的质量数偏差均小于 2 ppm，最后通过峰面积计算出了各个糖型的丰度比。方法稳定可靠，峰面积、保留时间及质量数准确度均符合要求，可供相关检测人员参考。

岛津应用云

