

超高效液相色谱法用于抗体中唾液酸的测定

LC-170

摘要：建立超高效液相色谱法测定抗体中唾液酸 N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac) 和 N-羟乙酰神经氨酸 (Neu5Gc) 含量的分析方法。利用三氟乙酸水解释放出抗体中的唾液酸，以 4, 5-亚甲二氧基-1, 2-邻苯二胺盐 (MDB) 为衍生化试剂，避光衍生，采用 LC-30A 结合荧光检测器在 11 min 内进行检测。实验结果表明：空白溶剂对唾液酸测定无明显影响；Neu5Ac 与 Neu5Gc 分别在 0.02~20 μmol/L 和 0.008~8 μmol/L 浓度范围内线性关系良好，线性相关系数均大于 0.999，准确度范围分别在 96.6%~104.5% 与 96.5%~102.4% 之间；高低浓度样品平行测定 6 次，二者保留时间 RSD 为 0.34%~0.67%，峰面积 RSD 为 0.33%~1.31%，仪器精密度良好；Neu5Ac 与 Neu5Gc 的检出限分别为 0.0012 μmol/L 和 0.002 μmol/L，定量限分别为 0.004 μmol/L 和 0.0067 μmol/L。该方法分析快速、重复性好、灵敏度高，可用于抗体类药物中唾液酸含量的分析。

关键词：唾液酸 抗体 超高效液相色谱 荧光

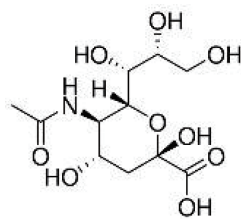
近年来，单克隆抗体作为治疗性抗体在生物制药领域发展得越来越快，主要应用于恶性肿瘤、自身免疫性疾病、病毒感染、中枢神经紊乱等治疗领域。单克隆抗体是一类以免疫球蛋白 G 的结构为基础的大分子蛋白质类药物，它具有复杂的结构特征，主要由 Fab 和 Fc 两大功能区组成，在 Fab 或 Fc 特定的位点存在糖基化修饰。糖基化修饰是评价抗体的关键质量属性之一，它不仅对维持单抗的结构有重要作用，且一些特定的糖基化修饰类型及不同的糖基化修饰程度会对抗体的安全性特征产生影响，如核心岩藻糖基化、半乳糖基化、唾液酸化、甘露糖基化等。

唾液酸 (sialic acid, SA) 是一个由九碳酮基酸性单糖及其衍生物组成的大家族。目前，唾液酸家族成员已经超过 50 个化合物，但在生物制药领域应用的哺

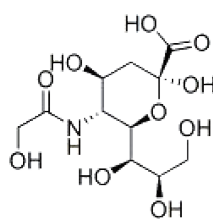
乳动物表达系统中主要存在两种类型的唾液酸，分别是 N-乙酰神经氨酸 Neu5Ac、和 N-羟乙酰神经氨酸 Neu5Gc。有研究表明 Fc 段唾液酸含量越高，与 FcRs 的结合活性就越低，

从而导致抗体依赖细胞毒性 (ADCC) 降低，其与细胞表面抗原的结合活性也随之降低，因此生物药生产过程中需要密切监测唾液酸。

唾液酸本身不具有荧光，但其在酸性条件下能与 4, 5-亚甲二氧基-1, 2-邻苯二胺盐 (MDB) 衍生液反应生成 MDB 衍生物，该衍生物能产生荧光信号，从而被荧光检测器检测到。本文利用岛津超高效液相色谱 LC-30A 结合荧光检测器建立了抗体中唾液酸 Neu5Ac 和 Neu5Gc 含量测定的方法，供生物制药领域相关人员参考。



Neu5Ac结构图



Neu5Gc结构图

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30ACMP 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, FCV-14AH 柱后切换阀, CBM-20A 系统控制器, RF-20Axs 荧光检测器, LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

柱温: 40°C

色谱柱: Inspire PFP 2.1 mm I.D. ×150 mm L,
2 μm

激发波长: 373 nm, 发射波长: 448 nm

流动相: A, 水; B, 乙腈

洗脱方式: 采用梯度洗脱, B 相初始浓度为 8%

流速: 0.4 mL/min

时间程序见表 1, 2 min 之前及 5.6 min 之后出峰的
样品溶液切换至废液

进样体积: 1 μL

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
5.00	Pumps	Pump B Conc.	8
5.50	Pumps	Pump B Conc.	90
8.00	Pumps	Pump B Conc.	90
8.01	Pumps	Pump B Conc.	8
11.00	Controller	Stop	

1.3 标准品与试剂

N-乙酰神经氨酸与 N-羟乙酰神经氨酸标准品及乙腈均购自 Sigma 公司; 实验用水由 Milli-Q 水净化系统 (Millipore, Ltd.) 制得; 其余试剂均为分析纯。

1.4 标准溶液的配制

取 N-乙酰神经氨酸与 N-羟乙酰神经氨酸标准品各适量, 用水溶解配制成含 100 μmol/L Neu5Ac、40 μmol/L Neu5Gc 的标准储备液。取标准储备液适量, 用水逐级稀释配制 8 个标准曲线点, Neu5Ac 浓度分别为 0.02 μmol/L、0.05 μmol/L、0.1 μmol/L、0.5 μmol/L、1 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L, Neu5Gc 浓度分别为 0.008 μmol/L、0.02 μmol/L、0.04 μmol/L、0.2 μmol/L、0.4 μmol/L、2 μmol/L、4 μmol/L、8 μmol/L。

1.5 样品前处理

单抗样品: 精确移取适量, 用超纯水稀释 10 倍。

分别取上述稀释好的样品溶液和标准曲线溶液各适量, 用等体积的 0.1 mol/L 三氟乙酸溶液 80°C 下进行酸解。取酸解后的样品和标准液加入 MDB 衍生液 50°C 下避光衍生 150 min, 冷却至室温后, 13000 rpm 离心 10 min, 取上清液进行色谱分析。

结果与讨论

2.1 标准品色谱图

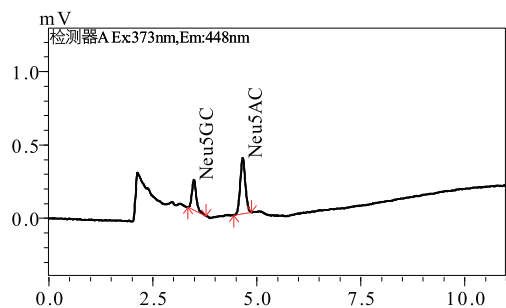


图1 标准品色谱图
(含0.02 $\mu\text{mol/L}$ Neu5Ac与0.008 $\mu\text{mol/L}$ Neu5Gc)

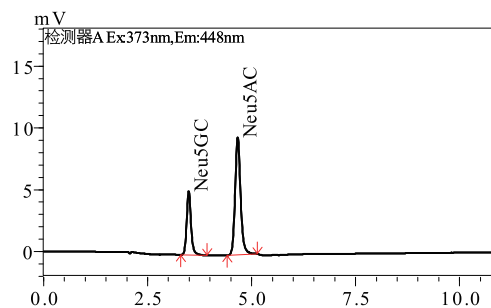


图2 标准品色谱图
(含0.5 $\mu\text{mol/L}$ Neu5Ac与0.2 $\mu\text{mol/L}$ Neu5Gc)

2.2 空白干扰

取空白溶剂适量，按照 1.5 方法和选定的色谱条件处理并测定，见图 3。结果表明，空白溶剂对唾液酸检测无明显影响。

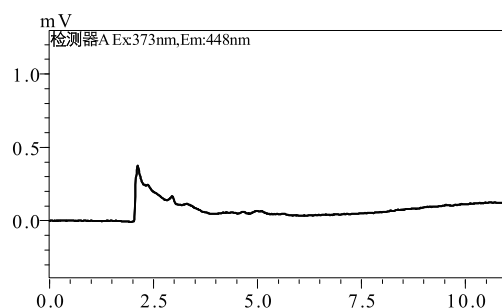


图3 空白溶剂色谱图

2.3 线性关系

将 1.4 配制的 8 个标准曲线点溶液，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，外标法制作校准曲线，线性良好。线性方程、相关系数、线性范围及准确度范围见表 2 和图 4~5。

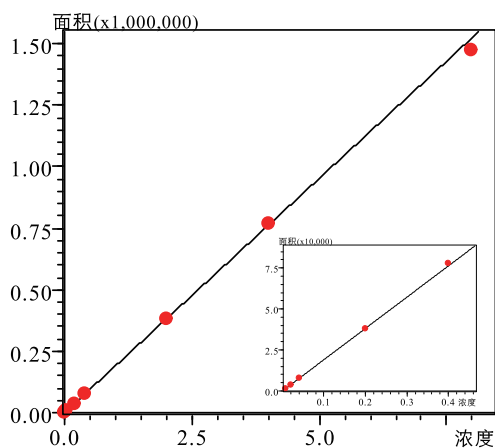


图4 Neu5Gc工作曲线

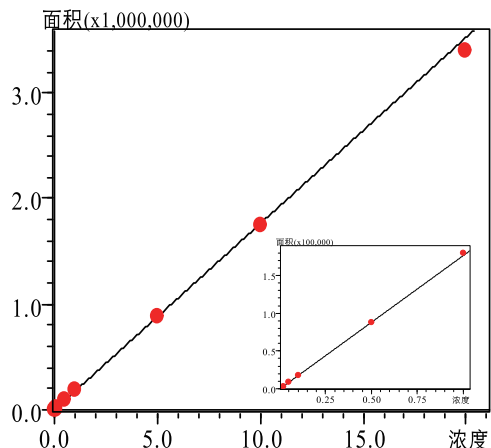


图5 Neu5Ac工作曲线

表2 线性结果

化合物	回归方程	r	线性范围 (μmol/L)	准确度范围 (%)
Neu5Gc	$Y = (190714)X + (9.06411)$	0.9998	0.008~8	96.5~102.4
Neu5Ac	$Y = (176333)X + (-238.615)$	0.9997	0.02~20	96.6~104.5

2.4 精密度考察

配制标准溶液 a 和 b, 分别含 0.008 μmol/L Neu5Gc、0.02 μmol/L Neu5Ac 和 0.4 μmol/L Neu5Gc、1 μmol/L Neu5Ac, 各平行测试 6 次。Neu5Gc 保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.34%~0.46% 和 0.33%~1.31%, Neu5Ac 保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.32%~0.57% 和 0.67%~0.96%, 仪器精密度良好。

表3 精密度结果

化合物	Neu5Gc (a)		Neu5Gc (b)		Neu5Ac (a)		Neu5Ac (b)	
	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积
测定次数								
1	3.499	1642	3.484	77781	4.669	3267	4.665	179931
2	3.486	1549	3.500	78473	4.658	3298	4.694	179933
3	3.480	1570	3.466	78134	4.679	3254	4.634	182608
4	3.498	1534	3.514	78210	4.689	3297	4.710	177179
5	3.495	1542	3.497	78428	4.675	3245	4.691	179773
6	3.497	1625	3.495	78369	4.647	3267	4.686	179964
RSD(%)	0.34	1.31	0.46	0.33	0.32	0.67	0.57	0.96

2.5 灵敏度

对目标物 Neu5Gc 和 Neu5Ac 浓度分别为 0.008 μmol/L 和 0.02 μmol/L 的溶液进行逐级稀释, 进样 1 μL, 根据 S/N=3 和 10 定义其检出限和定量限, 定量限与检出限具体结果如表 5 所示。

表4 定量限检出限结果

化合物	定量限 (μmol/L)	检出限 (μmol/L)
Neu5Gc	0.004	0.0012
Neu5Ac	0.0067	0.002

2.6 样品测定

取衍生好单抗样品 1 μL, 按 1.2 中的分析条件进行测定, 按外标法计算, 测定结果如表 5 所示, 单抗样品分析色谱图如图 6 所示。

表5 样品测定结果

化合物	单抗样品 (μmol/L)
Neu5Gc	0.352
Neu5Ac	12.8

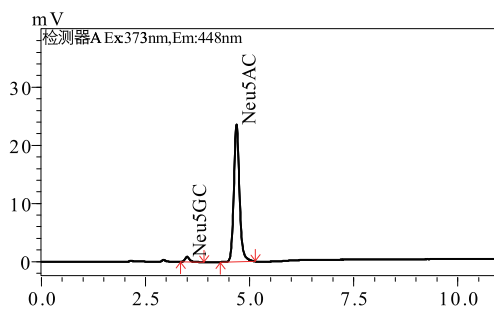


图6 单抗样品唾液酸测定色谱图

■ 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 结合荧光检测器建立了抗体中唾液酸 Neu5Ac 与 Neu5Gc 的含量测定方法。Neu5Ac 与 Neu5Gc 经衍生化处理后在 11 min 内完成分析。该方法分析快速、重复性好、灵敏度高、线性范围宽的特点，能为抗体类药物的质量控制研究提供一个分析手段。