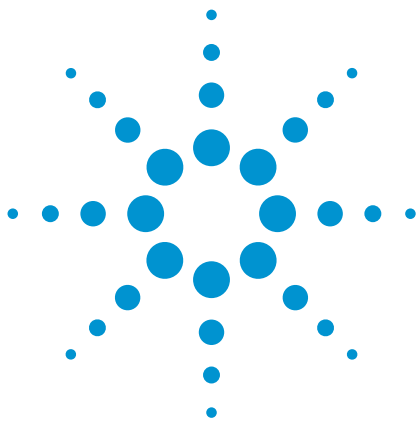




使用 Agilent HPLC-Chip 和 Q-TOF 质谱联用技术进行聚乙二醇及聚乙二醇化治疗性蛋白质的分析

应用简报

作者

Ravindra Gudihal 及 Suresh Babu CV
安捷伦科技公司（印度）
印度班加罗尔

Ning Tang
安捷伦科技公司
美国加利福尼亚州圣克拉拉市

Sundaram Palaniswamy、
Umamaheshwari S 及 Suneel Basingi
Gangagen 生物技术公司
印度班加罗尔

摘要

聚乙二醇化的多肽和蛋白质为生物治疗药物的详细结构表征带来了重大挑战，其主要原因是聚乙二醇 (PEG) 的异质性。本应用简报展示了一种联用 Agilent 1260 Infinity HPLC-Chip 和 Agilent 6520 精确质量飞行时间液质联用系统对聚乙二醇及聚乙二醇化蛋白质进行分析的方法。其中，使用了一种电荷剥离剂（三乙胺）作为电喷雾后添加剂，有助于简化质谱图，从而更好地进行结果解释。结果显示，聚乙二醇及聚乙二醇化蛋白质的质谱图质量均得到了改善。



Agilent Technologies

前言

聚乙二醇化是生物制药业使用的一种重要共价修饰，用以提高蛋白质的治疗价值。³ 聚乙二醇化指的是聚乙二醇与治疗性蛋白质的化学结合。已知这种修饰可以增加蛋白质药物的半衰期。但是，由于聚乙二醇分子本身的异质性，聚乙二醇化反应会导致产品出现异质性。因此，在产品发布前分析聚乙二醇试剂及聚乙二醇化蛋白质药物是非常重要的。液相色谱/质谱

(LC/MS) 技术是一种强大灵敏的技术，可用于表征这类复杂而存在异质性的产品。本研究联用 C8 填充的微流控 HPLC Chip 及 Q-TOF/MS 系统对完整的聚乙二醇化治疗性蛋白质样品和聚乙二醇试剂进行了分析。其中，利用 HPLC-chip 对聚乙二醇及聚乙二醇化蛋白质进行分离和洗脱，然后通过 HPLC-chip 纳流电喷雾尖端产生喷雾。采用了一种经过修改的基于 ESI-MS 的电荷剥离方法^{1,2}。电荷剥离

剂三乙胺 (TEA) 由仪器中的校准液输送系统 (CDS) 导入，该系统通常用于增加参考质量 (图 1)。添加胺类化合物可减少聚乙二醇化蛋白质的电荷数，从而改善质谱图使之易于解释。结果表明，所研究的聚乙二醇化治疗性蛋白质以及聚乙二醇试剂本身均具有异质性。聚乙二醇化后，完整蛋白质分析显示出多重峰，每个峰之间的质量偏移约为 44 Da，即乙二醇的质量。

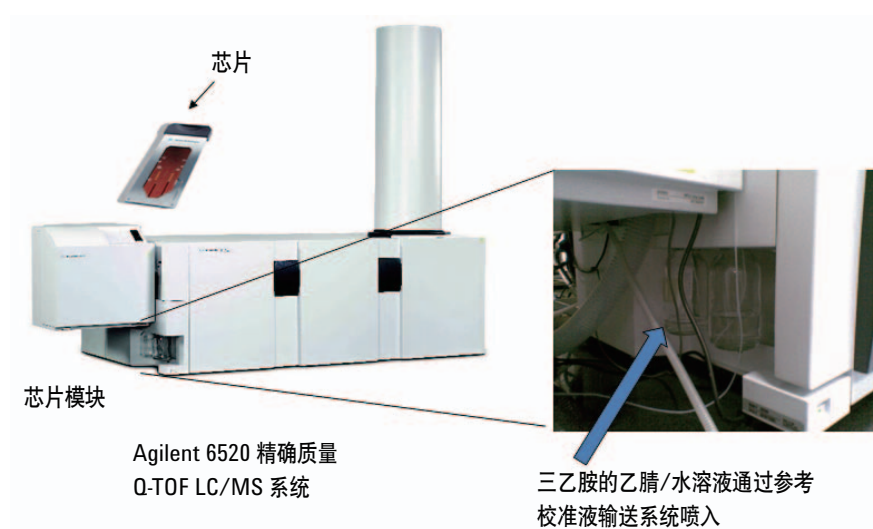


图 1. 基于微流体的 HPLC-Chip 系统与 Agilent 6520 精确质量 Q-TOF 液质系统联用。展开图显示了用于喷入三乙胺溶液的校准液输送系统

实验部分

材料与方法

治疗性蛋白质样品来自 Gangagen 生物技术公司。对硝基苯碳酸盐 (mPEG PNP, 10 kDa) 来自 Creative PEG works 公司。三乙胺及甲酸购自西格玛奥德里奇公司。分析中使用 LC/MS 级别的纯水及乙腈。治疗性蛋白质的聚乙二醇化通过与 10 kDa 对硝基苯碳酸盐 (mPEG PNP) 以 1:5 的摩尔比反应来实现。利用阳离子交换柱去除反应混合物中未反应的聚乙二醇。然后采用线性 NaCl 梯度洗脱结合的单聚乙二醇化蛋白质。

在本研究中, Agilent HPLC Chip/MS 接口 (部件号 G4240A) 与 6520 精确质量飞行时间液质联用系统联接。电荷减少试剂由仪器中的校准液输送系统 (CDS) 导入, 如图 1 所示。实验使用的 LC 及 MS 参数如表 1 所示。

表 1. LC/MS 条件

HPLC-Chip 条件	
HPLC-Chip	5 μ m, Agilent ZORBAX 300SB-C8 (300 Å) 色谱柱, 40 nL 富集柱及 75 mm $\times$ 43 mm 分析柱
进样体积	1 μ L (洗针进样, 针冲洗口启动 5 秒)
样品控温	5 °C
流动相 A	0.1% 甲酸的水溶液
流动相 B	含 0.1% 甲酸的 90% 乙腈水溶液
上样	在 3% B 下利用 Agilent 1260 Infinity 毛细管泵进样
梯度程序	0 分钟 $\rightarrow$ 3% B 30 分钟 $\rightarrow$ 50% B 32 分钟 $\rightarrow$ 95% B 34 分钟 $\rightarrow$ 95% B 34.1 分钟 $\rightarrow$ 3% B
停止时间	36 分钟
冲洗体积	4 μ L
流速:	从 Agilent 1260 Infinity 毛细管泵 (部件号 G1382A) 至富集柱为 3 μ L/min, 从 Agilent 1260 Infinity 纳流泵 (部件号 G2225) 至分析柱为 600 nL/min
Q-TOF MS 条件	
离子模式	正离子模式, HPLC-Chip
干燥气温度	350 °C
干燥气体流速	5 L/min (氮气)
毛细管电压	1900 V
碎裂电压	300 V (聚乙二醇化蛋白), 250 V (仅聚乙二醇)
锥孔体电压	65 V
Oct RF Vpp	750 V
采集参数 MS 模式	高分辨率下采集数据 (3200 m/z), 4 GHz, 仅 MS 模式, 质量范围为 300–2200 m/z
数据分析	利用 Agilent MassHunter 定性分析软件及 Agilent MassHunter BioConfirm 软件对 LC/MS 所得的数据进行分析

结果与讨论

电喷雾后添加 TEA 进行聚乙二醇的 LC/MS 分析

图 2 展示了通过电喷雾后添加不同浓度的 TEA 所得的 10 kDa mPEG PNP 主峰的

LC/MS 质谱图。未在电喷雾后添加 TEA 时，聚乙二醇高度带电且所有的价态离子呈现窄分布。此时很难通过解卷积方法从这些数据中获取聚乙二醇的分子量分布（图 3A）。观察图谱可知，解卷积后的谱图分辨率不足，且不具有界限清晰的

色谱峰。增加电喷雾后的 TEA 浓度可改善 mPEG PNP 的电荷态分布。聚乙二醇的电荷态降低后，能在一个较宽的 m/z 范围内产生清晰的电荷态组。

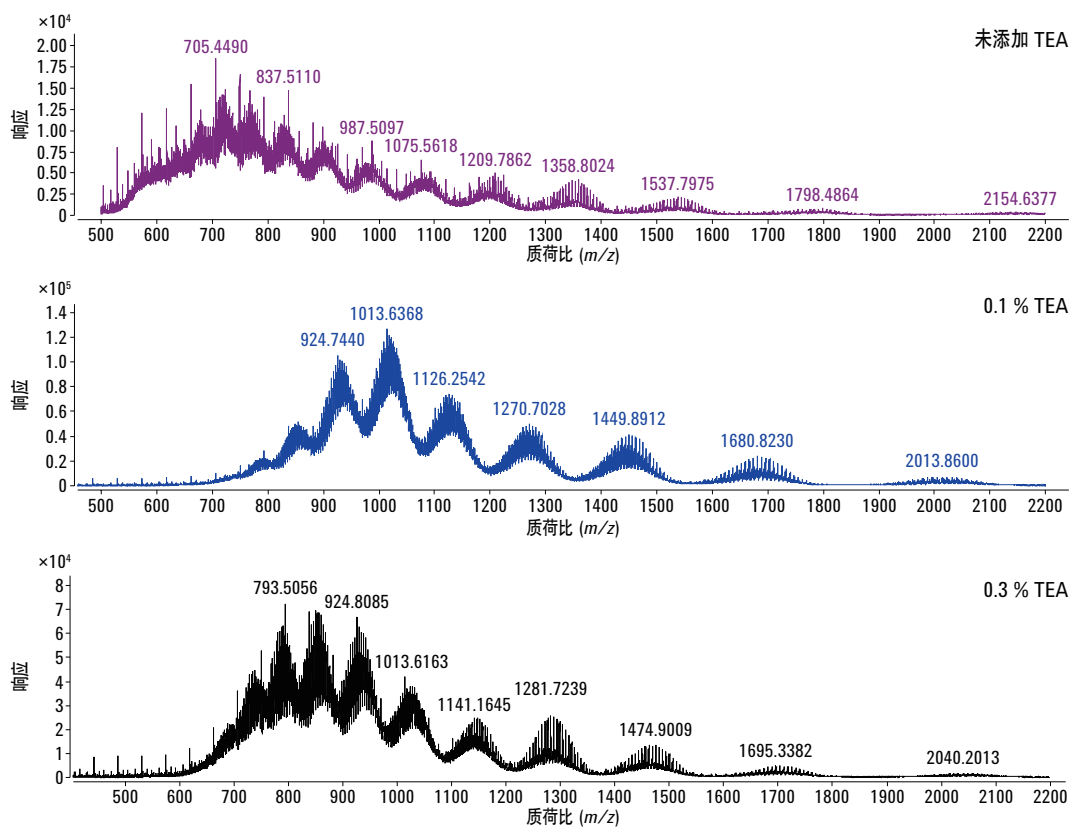
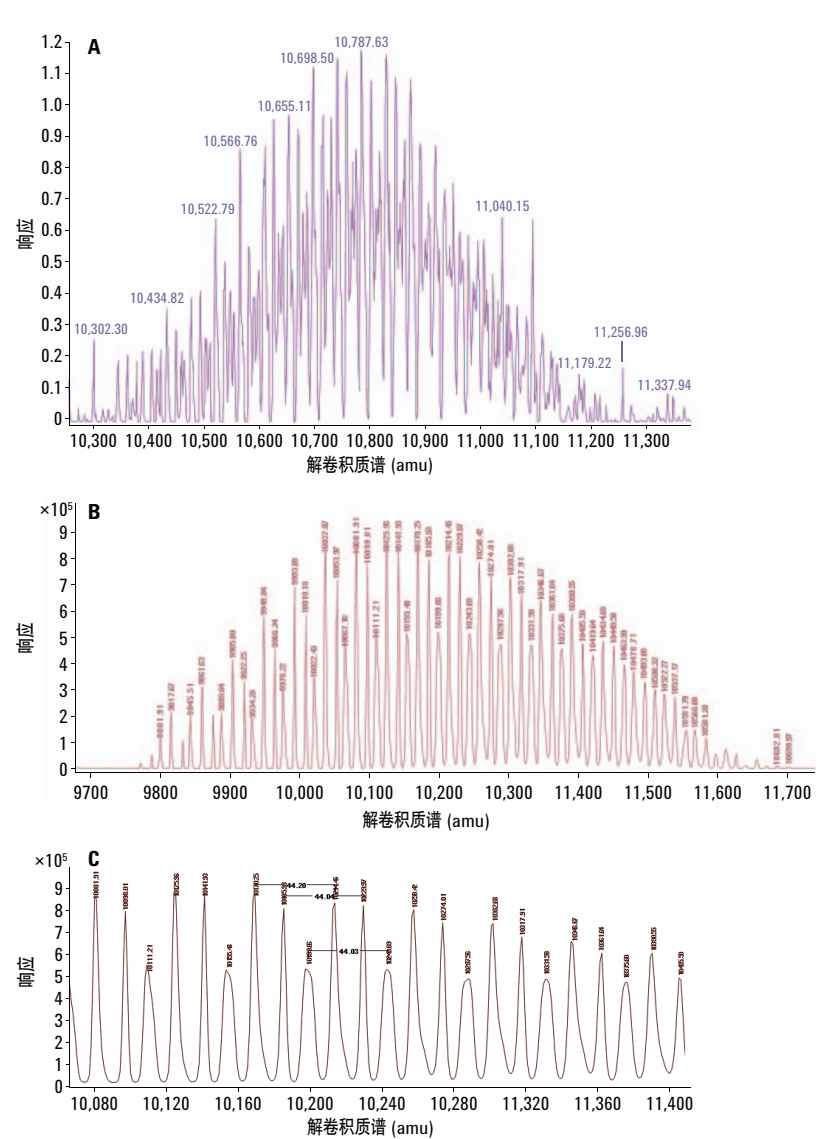


图 2. 不同 TEA 浓度下的 10 kDa mPEG-PNP 质谱图

在这些条件下还可轻易观察到含有不同数量乙二醇单元 (44 Da) 的聚乙二醇质量偏移。图 3B 显示了在 0.3% TEA 浓度下，10 kDa mPEG-PNP 的解卷积质谱图。该谱图的展开图（图 3C）中清晰显示了得以良好分辨的聚乙二醇 44 Da 氧乙烯单元。



电喷雾后添加 TEA 进行单聚乙二醇化蛋白质的 LC/MS 分析

图 4 展示了电喷雾后添加 0.3% TEA 时，聚乙二醇化治疗性蛋白质的 LC/MS 质谱图。解卷积后，未经修饰的蛋白质的完整分子量约为 26489，如图 4A 中的插图所示。还可在 26505 左右观察到未修饰蛋白质氧化态的少量存在。在该蛋白质经 10 kDa 聚乙二醇修饰后，可观察到质量从 26 kDa 偏移至 36 kDa，如图 4B 所示。在解卷积谱图的展开图中，可很容易地观察到含有不同数量乙二醇单元 (44 Da) 的聚乙二醇在质量上的异质性。如上述所提及，其中的小峰为未修饰蛋白质的氧化态。由于未观察到其它的聚乙二醇化形式，LC/MS 分析结果还证明了该聚乙二醇化蛋白以单聚乙二醇化形式存在。

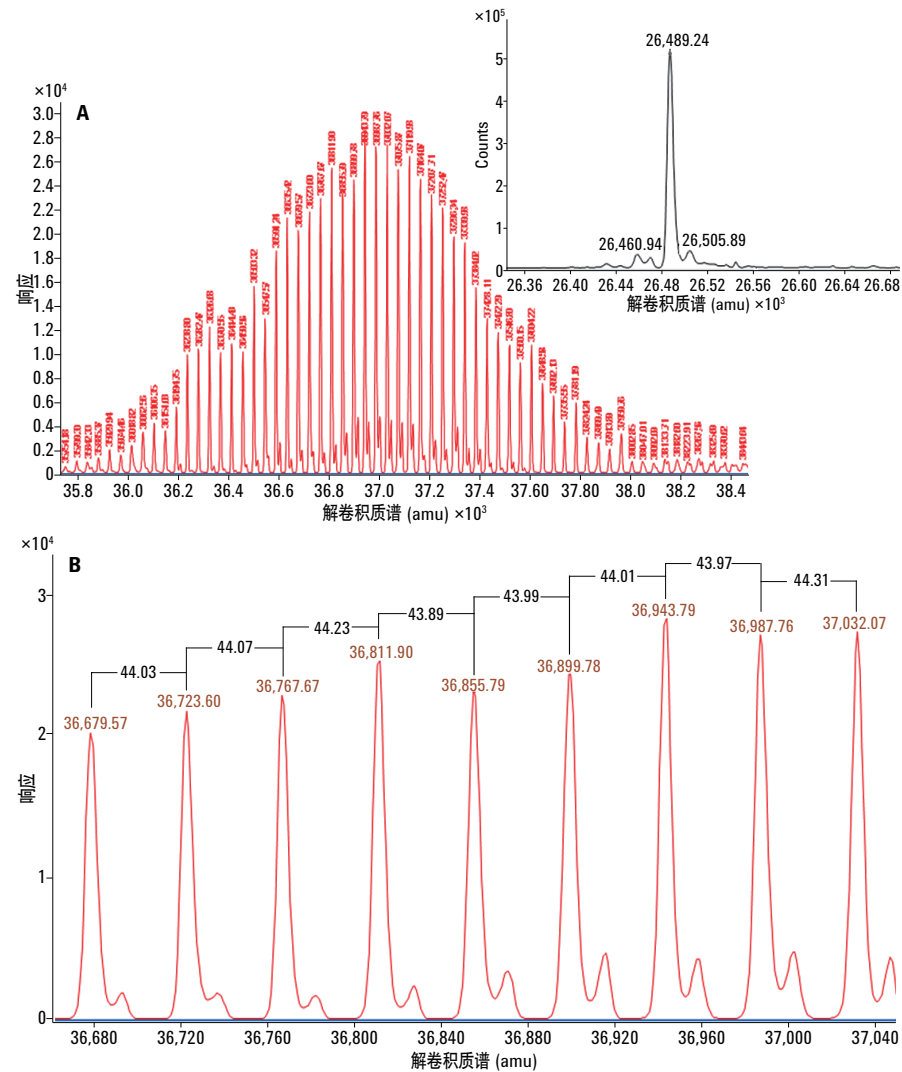


图 4. 0.3% TEA 时 10 kDa 聚乙二醇化治疗性蛋白质的解卷积质谱图 (A)；插图显示了未修饰蛋白质的解卷积质谱图。0.3% TEA 时 10 kDa 聚乙二醇化治疗性蛋白质的解卷积质谱图的展开图，显示出每个乙二醇单元会带来 44 Da 质量差 (B)

结论

本文中开发了一种 LC/MS 方法用以分析聚乙二醇及聚乙二醇化蛋白质。电喷雾后添加胺类可改善质谱图质量，有助于对聚乙二醇化蛋白质的复杂价态进行解卷积。结果表明，所研究的聚乙二醇化治疗性蛋白质以及聚乙二醇试剂本身均具有异质性。聚乙二醇化蛋白质的平均质量及质量分布也很容易测定。

HPLC-Chip 对于完整蛋白质分析具有极佳的灵敏度。联用 HPLC Chip 及高灵敏度高质量精度 Q-TOF 质谱仪，并在电喷雾后添加胺类，是一种用于聚乙二醇及聚乙二醇化蛋白分析的独特配置。通过该方法，只需在开发过程的早期研究与开发阶段使用少量宝贵的治疗性蛋白质，就能对聚乙二醇化蛋白质的反应条件进行优化。

参考文献

1. Huang, L., Gough, P.C., and DeFelippis, M.R. Characterization of Poly(ethylene glycol) and PEGylated Products by LC/MS with Postcolumn Addition of Amines. *Analytical Chemistry*, **2009**, 81(2):567-577.
2. Bagal, D., Zhang, H., and Schnier, P.D. Gas-Phase Proton-Transfer Chemistry Coupled with TOF Mass Spectrometry and Ion Mobility-MS for the Facile Analysis of Poly(ethylene glycols) and PEGylated Polypeptide Conjugates., *Analytical Chemistry*, **2008**, 80 (7):2408-2418.
3. Veronese, F.M., and Pasut, G. PEGylation, successful approach to drug delivery *Drug Discovery Today*, **2005**,10(21):1451-8.

www.agilent.com/chem/QTOF

本资料中的信息如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
中国印制，2012 年 12 月 12 日
5991-1492CHCN



Agilent Technologies