

LCMS for Biopharm Analysis

## 蛋白质药物 液质分析

- 完整蛋白表征
- 肽图及修饰
- 单抗代谢定量
- ADC
- 寡糖分析
- 二硫键解析
- 残留宿主细胞蛋白鉴定与定量

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

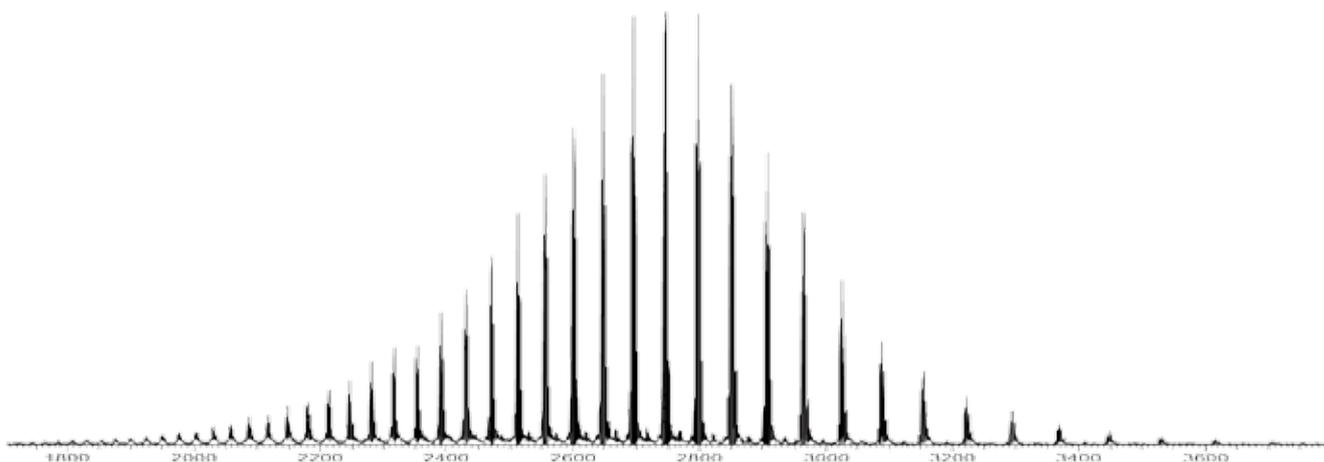
# Orbitrap — 最稳定的超高分辨质谱



工欲善其事，必先利其器

《论语·卫灵公》

- 完整蛋白质及 Lysine – ADC 分析..... 1
- 肽图及修饰 ..... 5
- 糖基化 ..... 9
- 二硫键 ..... 17
- 蛋白质药物代谢..... 21
- 残留宿主细胞蛋白 ..... 28
- Cystine - ADC ..... 31
- Orbitrap 特点简介 ..... 36



## 整体水平蛋白质药物的质谱表征

整体分子量测定是蛋白质药物产品（如单抗）研发与质控中最常进行的分析项目，而ESI-Orbitrap MS（电喷雾离子化-静电场轨道阱质谱）已经成为最常用的测量方法之一。而另一种常见质谱技术MALDI-TOF（基质辅助激光解析-飞行时间质谱）无法进行此项分析，其原因是由于：在MALDI条件下，蛋白将主要形成单电荷离子，而目前最尖端的TOF型质谱在高质荷比范围分析中（10万m/z以上范围），分辨率也仅有数千。因此当面对质量巨大的蛋白质药物离子时（如单抗分子量近15万），TOF分辨率明显不足，不但无法进行分子量的精确测定，甚至连单抗的糖型也根本无法辨别（图1）。在ESI（电喷雾离子化）条件下，蛋白分子将携带多电荷，以单抗为例，其将携带40-70个左右的电荷，信号落入2500-3500m/z范围内。在此质荷比区域内，Orbitrap分辨率可达几万，因此可从容进行此项分析。实验时，蛋白首先在高效液相色谱中通过C4反相色谱柱进行脱盐，然后在电喷

雾离子源实现蛋白离子化，离子化的蛋白进入质谱，产生原始质谱数据，数据将通过去卷积软件计算出蛋白质的质量。与TOF原理完全不同，Orbitrap采用傅里叶变换进行离子质量分析，在低质荷比区域，其分辨率可达40万以上，而TOF分辨率仅为数千。在2000-4000m/z范围，两者分辨率近似，但由于原理的不同，Orbitrap更易于实现基线分离——也就是说即使在分辨率一致的情况下，相比TOF，Orbitrap可获得更为清晰的质谱原始数据（图2）<sup>[1-3]</sup>。高质量的原始数据为分析结果提供了保证。在完整单抗分析中，Orbitrap准确度一般为10ppm内（以单抗分子量15万计算，10ppm约相当于1.5Da），而TOF为20-30ppm左右。Orbitrap不仅准确度高，更由于在硬件中伴有离子蓄积设计，而使灵敏度更高（TOF质谱受到分析原理的局限，不能大量蓄积离子分析，在一定程度上影响了其灵敏度）。在图3中，Orbitrap数据清晰地显示出单抗9种不同的糖型组合，主要峰的质量误差在10ppm之内。

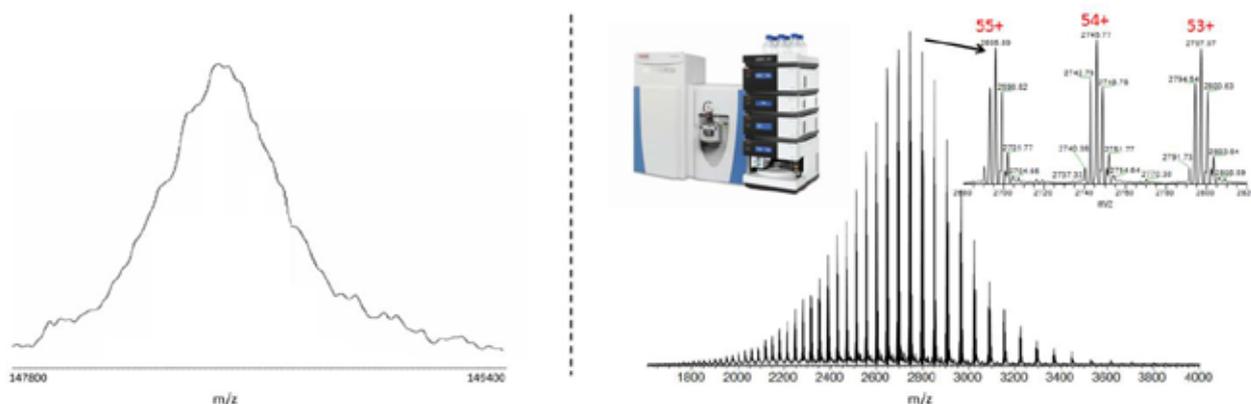


图1：单抗全分子量原始质谱图对比，左为MALDI-TOF，右为ESI-Orbitrap数据。其中在对高质荷比离子进行采集时，由于灵敏度原因，TOF只能采用离子的线性飞行模式（此模式下分辨率仅为数千），而无法采用分辨率更高的反射飞行模式（分辨率可达5万）。

在单抗类药物中，抗体-化学药物偶联物（Antibody-Drug Conjugate, ADC）利用抗体对靶细胞的特异性结合能力，输送高细胞毒性化学药物，来实现对癌变细胞的有效杀伤。目前，经FDA已批准上市的ADC药物有三种，分别为Mylotarg™、Adcetris™、Kadcyla™，分别治疗急性髓系白血病，霍奇金淋巴瘤，以及HER2阳性的转移性乳腺癌。全分子量测量技术也可用于ADC药物的DAR（Drug to Antibody Ratio）值分析。图4为某ADC药物去糖基化后，Orbitrap分析结果，其中偶联了不同数量化学药物的质谱信号清晰明确，有利于准确计算DAR值（图4中，未标示的峰为Free Linker信号）。

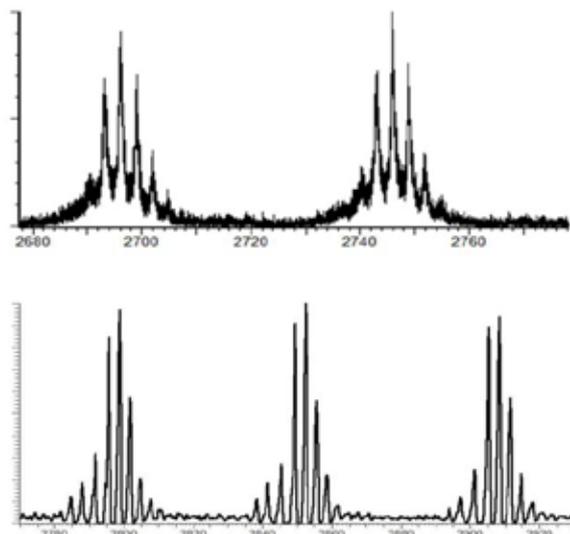


图2: TOF（上）与Orbitrap（下）采集单抗全分子量原始质谱对比图。

在Orbitrap平台上还具有一项独特的分析方法——Top Down（至上而下）技术。Top Down是在完整蛋白的状态下，直接对蛋白整体进行碎裂，通过碎片分析获得蛋白结构信

息（图5）。在蛋白药物分析中，可用于电荷异质性分析的快速方法开发，以及肽图序列信息验证。

Q Exactive分辨率可达14万，其在对经过

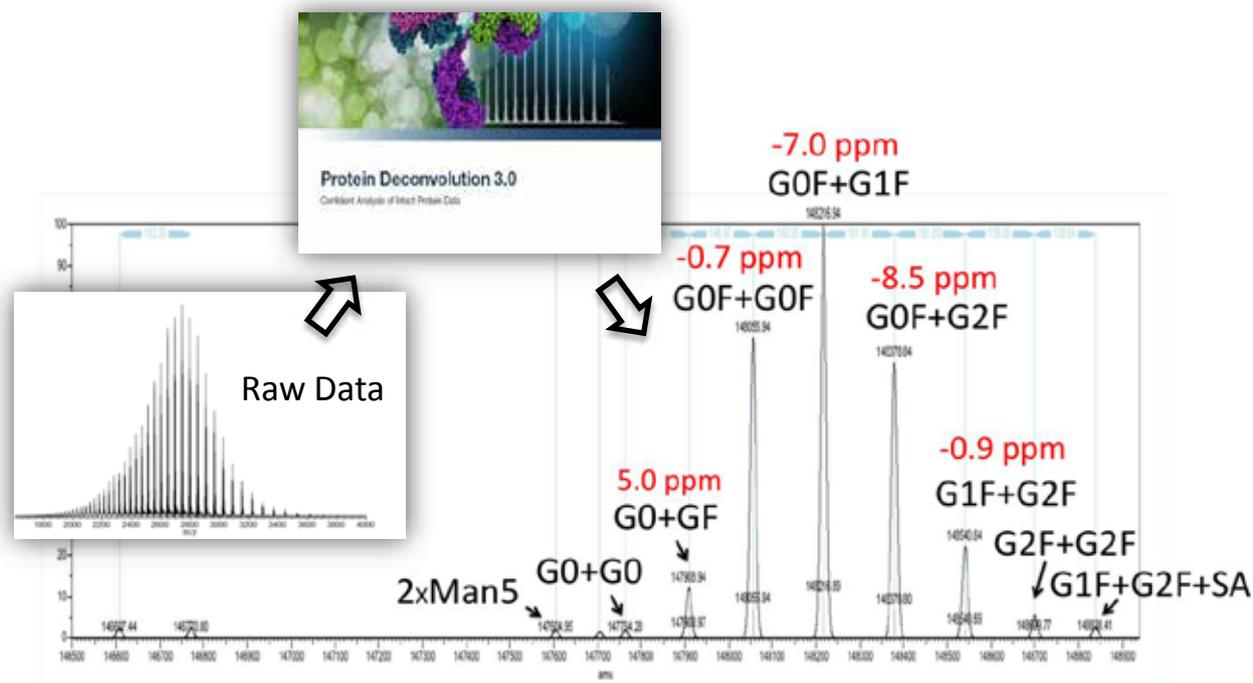


图3: Orbitrap原始数据通过Protein Deconvolution软件去卷积后得到的单抗全分子量分析结果。

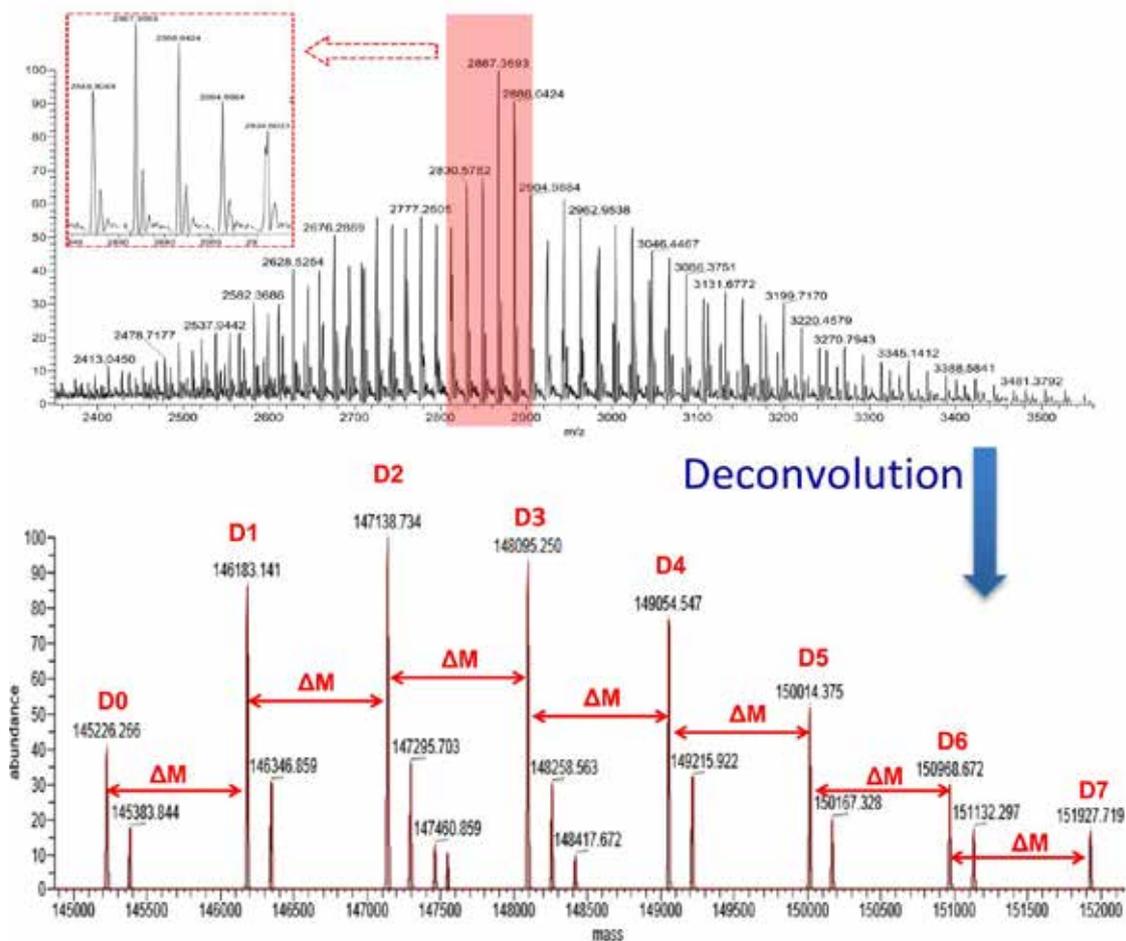


图4: Orbitrap采集Lysine-Linked ADC药物原始数据及去卷积结果

木瓜蛋白酶及还原快速处理后的，分子量约为2.5万Da的重链Fab与轻链Fab部分进行分子质量测量时，原始质谱数据可实现同位素分辨，因而可进行同位素质量计算（在全单抗分子下，目前各种类型质谱数据仅可做平均分子量测算）。同位素质量精度较平均分子量更为精准。在图6中，单抗重链Fab与轻链Fab的分析准确度分别达到了惊人的2.7ppm与0.9ppm（以Da计算，质量误差约在小数点后第二位）。如前所述，加之Top Down提供的丰富的碎片信息，此项技术被用于可用于电荷异质性分析的快速方法开发，以及肽图序列信息快速验证工作<sup>[3]</sup>。

基于Orbitrap的全分子量分析工作，可在数分钟内完成。但事实上，这项看似简单的分析工作，却蕴含了对质谱准确性、分辨率、灵敏度、稳定性的多项挑战，却也正好是Orbitrap强大性能的集中体现。Orbitrap系列质谱也正是基于这样的品质，为其使用者提供了最有力的技术保证。

#### Reference

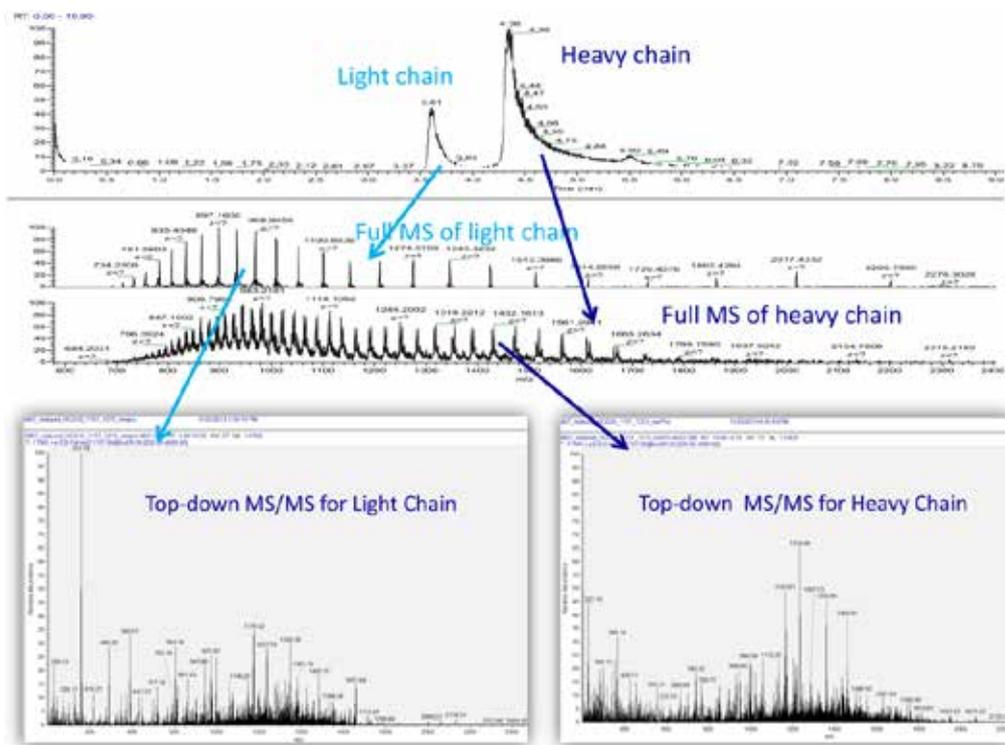
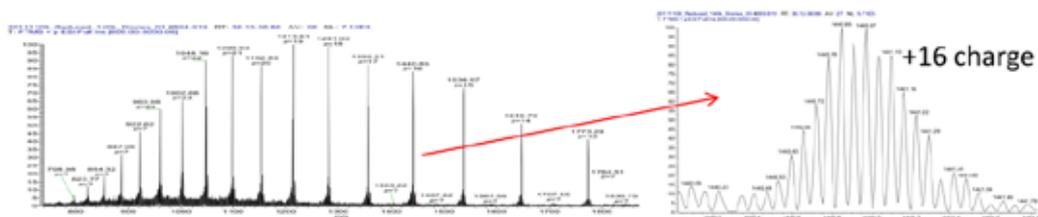


图5：使用Top Down技术分析单抗轻重链。



Fab	Measured	Expected	Error (ppm)
H	24133.8700	24133.7937	2.7
L	23025.3342	23025.3125	0.9

图6：Orbitrap对单抗重链Fab与轻链Fab分析数据。

1. A Complete Workflow Solution for Intact Monoclonal Antibody Characterization Using a New High-Performance Benchtop Quadrupole Orbitrap LC-MS/MS. *Thermo Application Note*
2. Automated MAb Workflow: from Harvest Cell Culture to Intact Mass Analysis of Variants. *Thermo Application Note. Thermo Application Note*
3. LC/MS Analysis of the Monoclonal Antibody Rituximab Using the Q Exactive Benchtop Orbitrap Mass Spectrometer. *Thermo Application Note*
4. Improving Intact Antibody Characterization by Orbitrap Mass Spectrometry. *Thermo Application Note*

## 蛋白质药物肽图分析简介

在蛋白质药物产品的质控要求中，需要对蛋白氨基酸序列进行确证，对相关修饰进行鉴定以及定量——即肽图分析。肽图的液质实验流程主要包括：蛋白的变性、二硫键的还原与烷基化、以及蛋白酶酶解（通常使用胰蛋白酶 Trypsin）、液质联用数据采集、数据处理几个步骤（图1）。在这个流程中，Orbitrap 型质谱以其超高分辨、高质量精度、高灵敏、高稳定性成为业内推崇的质谱分析平台。除此之外，考虑到生物制药应用的特殊需求，根据蛋白物质谱分析特点，Thermo Fisher与世界级制药领军企业Amgen联合开发了 PepFinder™ 软件。实际上，PepFinder来源于Amgen内部的自制的肽图分析软件，因此其功能设计从一开始就听从了一线分析人员的切实需求<sup>[1,2]</sup>，而Thermo Fisher的加入，则使软件底层对质谱数据处理的性能大大提高。因此，PepFinder一经公开发布，就受到了业内的极大关注与好评。

除最基本的肽段序列确认、覆盖率分析、修饰位点鉴定与定量、错配二硫键发现、图谱对比、CID/HCD/ETD碎片解析等功能外，PepFinder还独具未知修饰发现、氨基酸突变查找功能<sup>[1-5]</sup>。这两项功能可以帮助大家快速发现序列变异，避免可能出现的巨大的质量风险。不仅如此，PepFinder还有更多贴心的功能设计，如内置了CHO细胞系糖型，并可一键选择进入糖肽分析流程；再如，除具有肽段鉴定可信度评价功能外，还可智能显示多肽的理论质谱碎片，并用于与实验图谱直观对比，以辅助分析，并可快速提高分析员质谱解析水平。这些功能不但减少工作强度，也降低了对分析员理解质谱数据深度的要求<sup>[6-11]</sup>。更具情怀的是，对于氨基酸固定修饰设置，不同于其它类似软件（固定修饰只可精确至某一类氨基酸），在PepFinder中，可以精确到特定的某个氨基酸位点。此功能对于蛋白药的某些特殊分析需求提供了极大的便利。

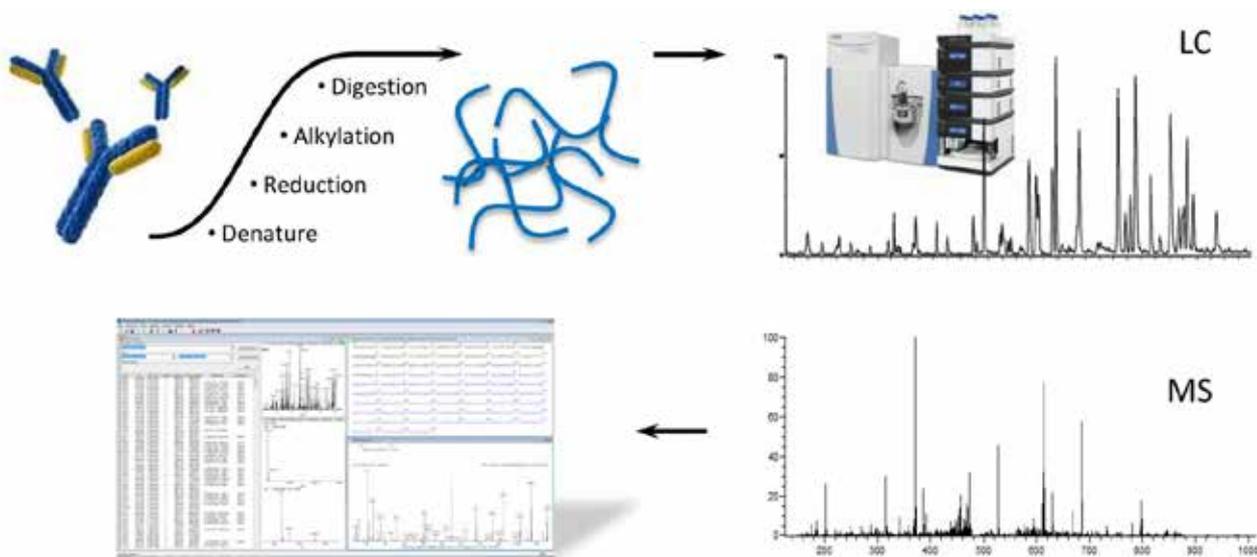


图1:蛋白药物的肽图分析流程

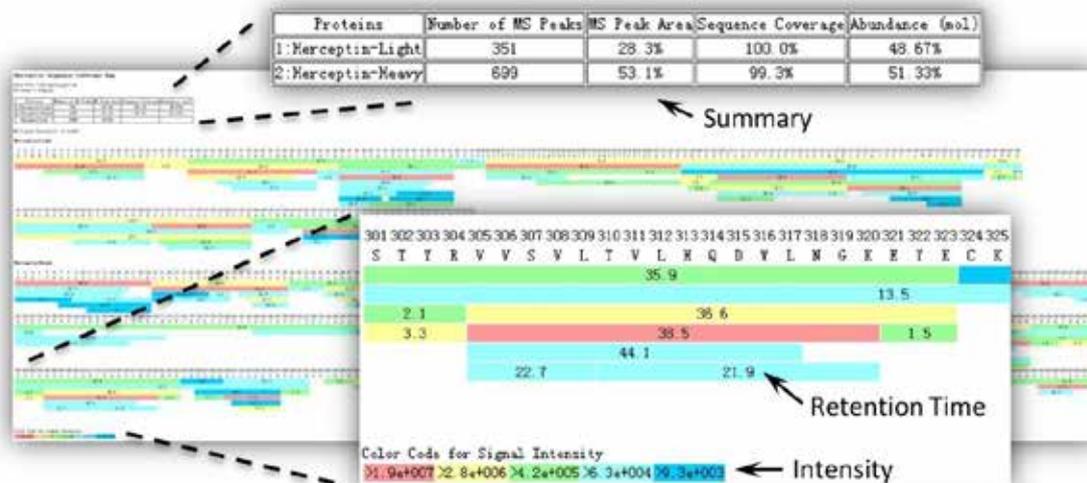


图2: PepFinder肽图覆盖率显示界面

图2为PepFinder的氨基酸序列鉴定覆盖率结果显示图。相较于其它类似软件，PepFinder的覆盖率显示方法更适用于蛋白药物肽图分析，其中不仅包括了结果总结与具体的鉴定情况，还含有鉴定序列的色谱保留时间与强度信息。这些便捷的信息显示为某些情况下的肽图方法开发，指出了优化方向。

修饰的鉴定与定量也是肽图分析中的必须项目。Orbitrap具有卓越的灵敏度与准确性，配合PepFinder软件，使此项分析工作不再繁重。图3中，为一蛋白药物某肽段中色氨酸残基(W)的正常形式与双氧化形式的二级鉴定图谱。其中双氧化形式肽段丰度仅为总量的0.13%，但仍得到了高质量的碎片与定量信息。

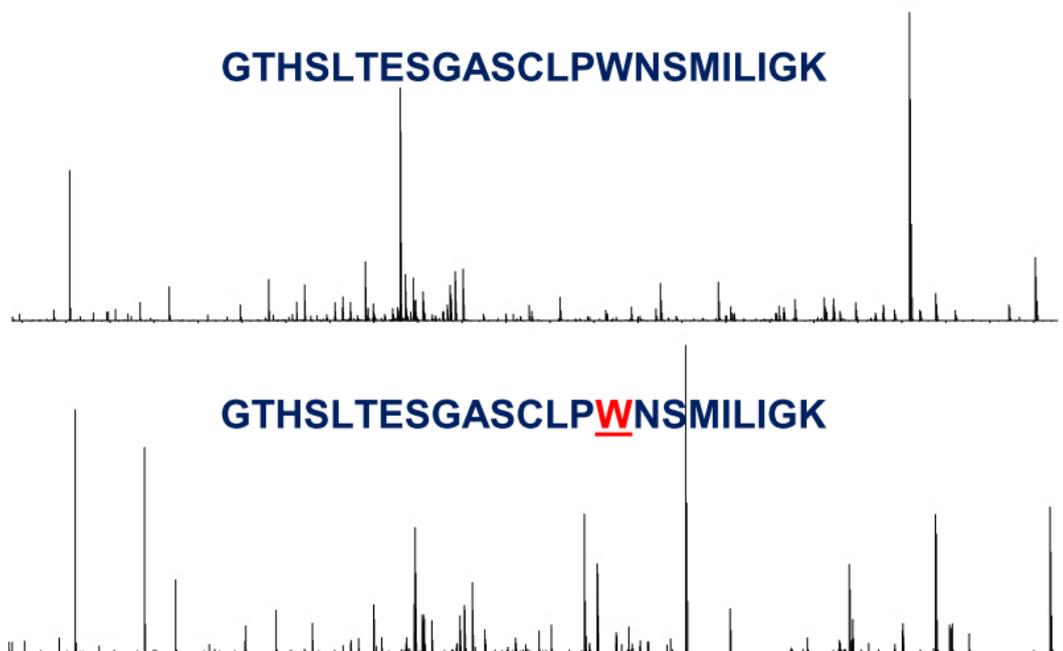


图3: 某肽段色氨酸残基(W)的正常形式与双氧化形式的二级鉴定图

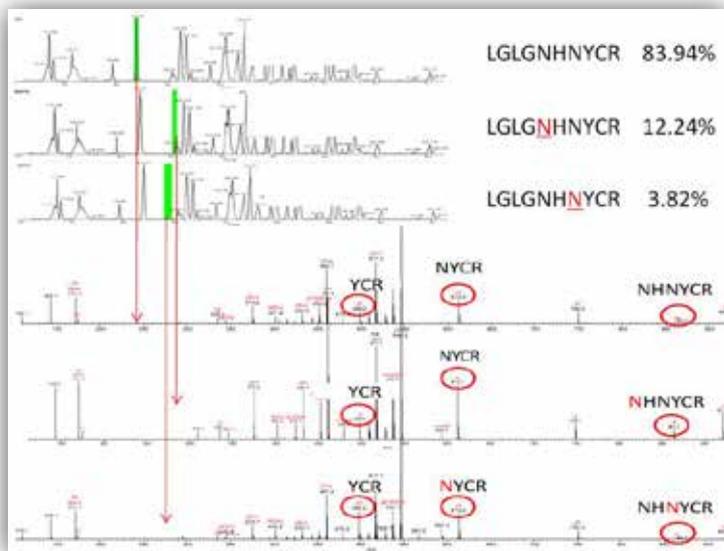


图4: N-deamidation鉴定与定量

图4为另一常见的多肽修饰——脱氨基(deamidation)。在此例中,同一个肽段内含有两个天冬酰胺(N),通过液质分析,不但实现了对脱酰胺化肽段的鉴定与定量,而且对于不同位置的脱酰胺化,Orbitrap都采集到了高质量的二级碎片信息,使之得以分辨。

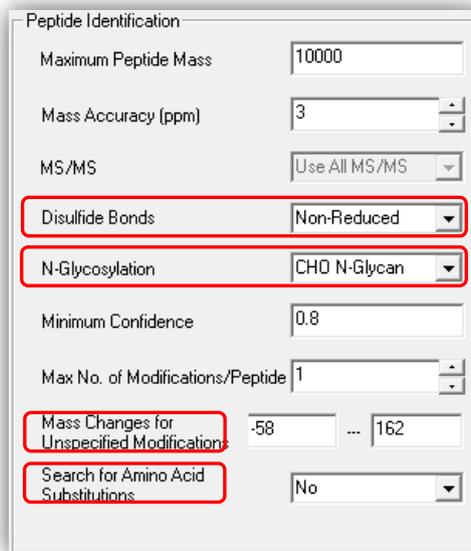


图5: PepFinder检索设置部分界面

图5显示了针对蛋白质药物分析的一些特殊参数设置,如二硫键检索、CHO细胞系糖肽检索、未知修饰发现、氨基酸突变鉴定等功能。这些功能有助于提高分析人员的工作效率,降低数据分析难度,更可以帮助及时发现可能导致蛋白药物质量问题的潜在风险。

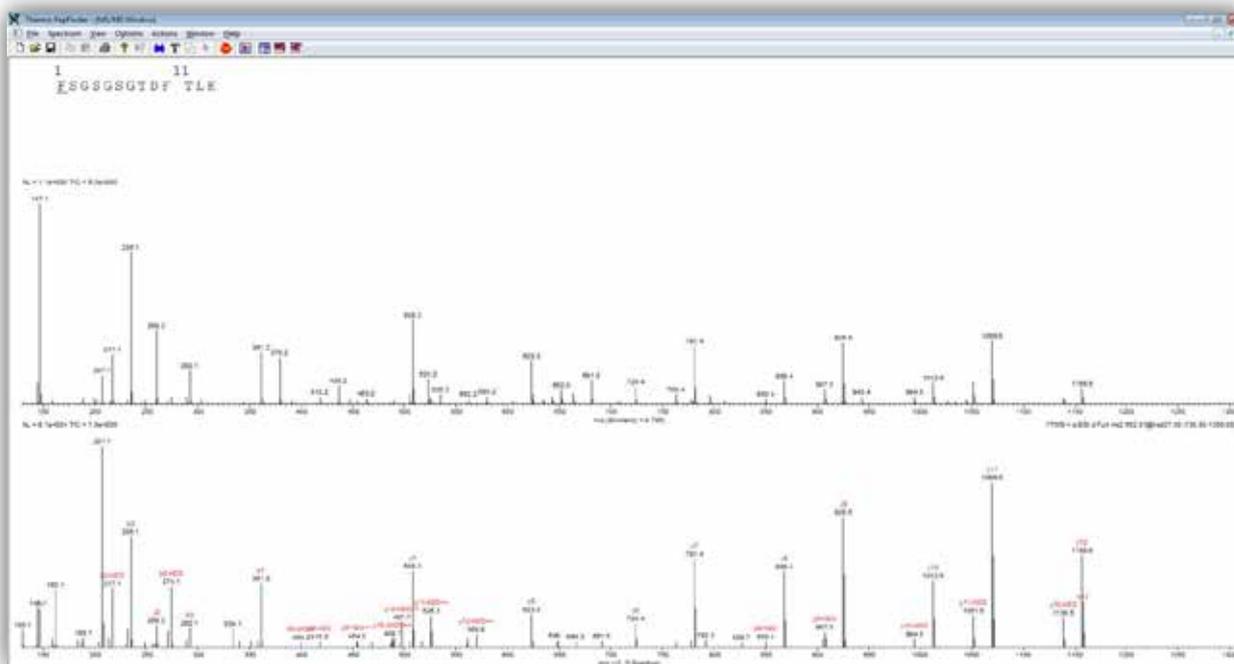


图6: PepFinder预测理论碎片图谱(上)与实验图谱(下)对比界面。

质控部门的工作要求其成员能熟练进行多种不同的分析实验操作。相对于其它技术而言，质谱分析更为复杂，难度相对较大。为了提升工作效率、降低质谱使用进入门槛，Orbitrap系列质谱采用了尽可能简化的操作界面设计，即使没有质谱操作经验的人员，也可以在一个工作日内掌握仪器的日常维护、校正、采集方法设置等操作。但是对于质谱数据分析工作来说，不可能一蹴而就，而是需要经验积累的。为了帮助使用者能更快地具备丰富的质谱分析经验，PepFinder特意设置了理论图谱功能（图6）。此功能可根据肽段的氨基酸序列，通过Kinetic Model计算出肽段的理论碎片图谱<sup>[6-11]</sup>，并与实验图谱对比显示。这样就为实验人员提供了最为直观的质

谱图谱观察途径，可辅助判断图谱质量，并可帮助分析者快速积累质谱分析经验。

肽图分析是蛋白质药物研发及质控最为常用的分析手段之一。其可以提供最为精细的序列结构及修饰信息，因此参与到了细胞株筛选、细胞培养、纯化、制剂工艺优化等各个阶段。在每次分析中，都需要从肽图数据中挖掘出大量重要的信息，使其成为质控与研发分析中较为繁重的一项工作。PepFinder直接基于Amgen的一线分析需求进行设计开发，并经过了多年的内部使用，因此成为蛋白质物质谱数据分析中不可多得的优秀软件。PepFinder与Orbitrap系列质谱的联合运用已成为业内公认的高端实验分析平台。

## Reference

### Data Collection, Identification/Quantification of Modifications

1. Z. Zhang, Automated Precursor Ion Exclusion During LC/MS/MS Data Acquisition for Optimal Ion Identification, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2012, 23(8), 1400-1407.
2. Z. Zhang, Large-scale Identification and Quantification of Covalent Modifications in Therapeutic Proteins. *Anal. Chem.* 2009, 81(20), 8354-8364.

### Spectral Processing, Charge/Mass Determination, RT Alignment

3. Z. Zhang and J. S. Mcelvain, Optimizing spectroscopic signal-to-noise ratio in analysis of data collected by a chromatographic / spectroscopic system, *Anal. Chem.* 1999, 71(1), 39-45.
4. Z. Zhang and A. G. Marshall, A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray-to-charge ratio spectra, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998, 9, 225-233.
5. Z. Zhang, Retention time alignment of LC/MS data by a divide-and-conquer algorithm, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2012, 23(4), 764-772.

### ETD/ECD Fragments Prediction, Protein Mass Calculation

6. Z. Zhang, Prediction of low-energy collision-induced dissociation spectra of peptides, *Anal. Chem.* 2004, 76(14), 3908-3922.
7. Z. Zhang, Prediction of low-energy collision-induced dissociation spectra of peptides with three or more charges, *Anal. Chem.* 2005, 77(19), 6364-6373.
8. Z. Zhang and B. Shah, Prediction of collision-induced dissociation spectra of common N-glycopeptides for glycoform identification. *Anal. Chem.* 2010, 82, 10194-10202.
9. Z. Zhang, Prediction of collision-induced dissociation spectra of peptides with post-translational or process-induced modifications. *Anal. Chem.* 2011, 83, 8642-8651.
10. Z. Zhang, Prediction of Electron-transfer/Capture Dissociation Spectra of Peptides. *Anal. Chem.* 2010, 82, 1990-2005.
11. Z. Zhang, H. Pan and X. Chen, Mass Spectrometry for Structural Characterization of Therapeutic Antibodies. *Mass Spectrom. Reviews* 2009, 28(1), 147-176

## 液质联用在蛋白质药物糖基化分析中的应用

糖基化对蛋白药物的疗效，稳定性，免疫原性具有重要影响。以单克隆抗体为例，常见的N-糖型主要为G0F、G1F、G2F、G1F-GlcNAc、G0F-GlcNAc等；如果出现OligoMan、Gal-a-1,3-Gal、NGNA、Xyl-1,2 Fuc-1,3等糖型，则会影响免疫原性或半衰期，需要避免；另一方面，可以细胞工程及分子生物学技术，提高A-Fuc，GlcNAc bisecting，G2F，Hyper Sialylation(NANA)的含量，以增强ADCC，CDC，Anti-inflammatory 等效能。寡糖为非模板合成，并呈树状结构，其结构极其复杂，仅由6种单糖组成的寡糖链，其理论结构即达到惊人的 $10^{12}$ 种。这就要求用于寡糖的分析设备具有强悍的分析性能。Thermo Fisher开发了一系列

简单、高效的液相色谱-质谱表征方法，涵盖了从糖链结构分析、到糖基化位点鉴定、再到糖肽解析的完整分析流程（图2）。

### 一、寡糖链分析

N-糖链（由天冬酰胺连接寡糖）结构分析包括寡糖链释放、标记、液质联用分析和数据处理四个步骤（图2）<sup>[1]</sup>。寡糖链释放根据不同的糖基化类型选择不同的方法，N-糖链主要使用PNGase F。衍生化标记步骤可以增强寡糖的质谱响应。其中，还原末端标记2-AB等苯胺或杂环化合物还可使寡糖链通过荧光检测，全甲基化标记增强寡糖链的疏水性，实现反相分离检测。以Q-Exactive为代表的Orbitrap超

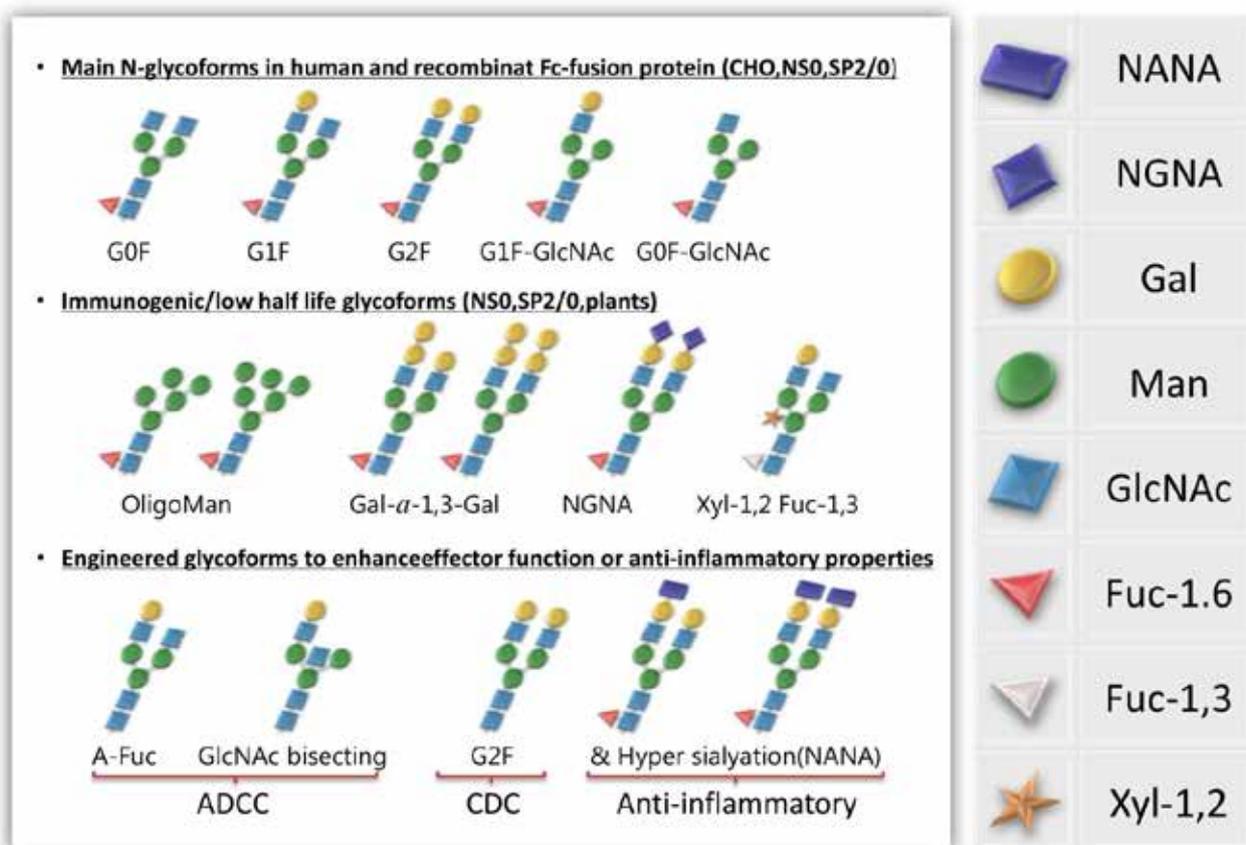


图1:常见的单抗糖链结构以及相关功能活性

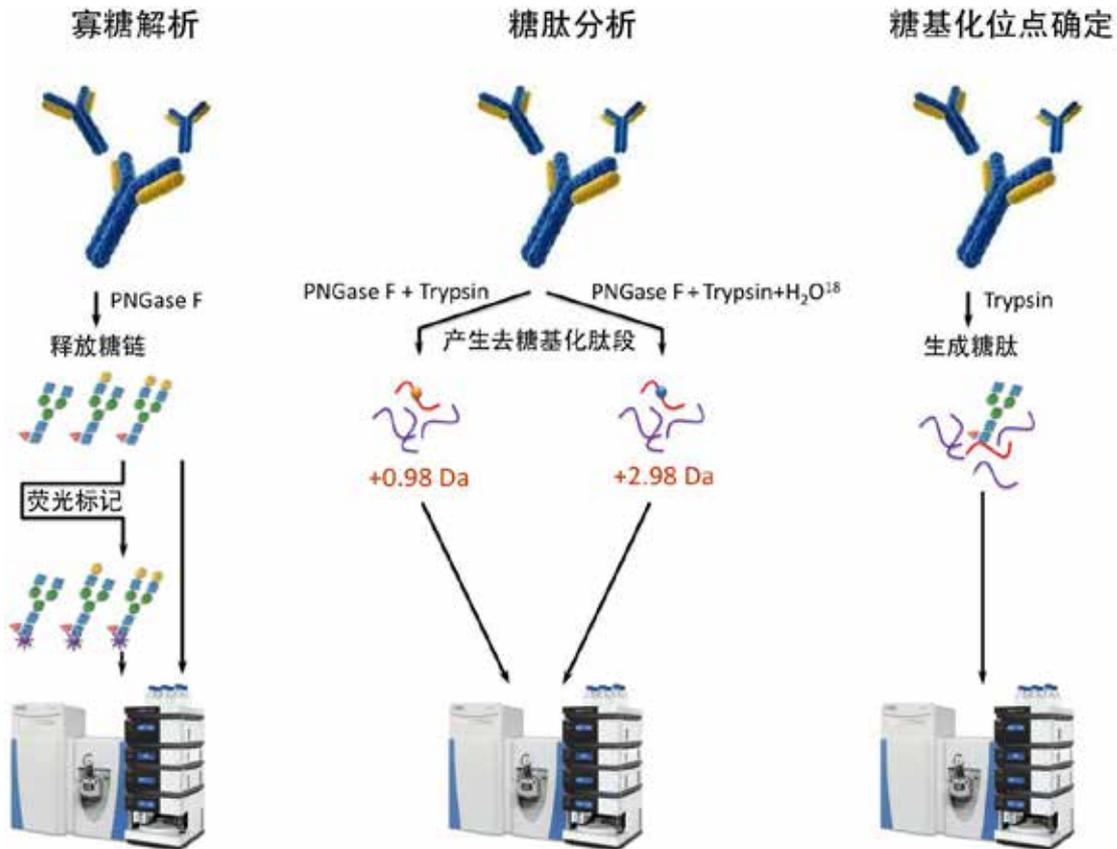


图2: N-连接寡糖链、糖基化位点以及糖肽的液质分析方法总览

高分辨质谱具有高的灵敏度优势，使用其直接分析未标记的糖链也可以取得满意的效果。寡糖碎片质谱可使用SimGlycan™软件进行全自动结构解析，获得寡糖链精细结构信息。

在寡糖色谱分析中，专门为寡糖分离设计的GlycanPac AXH-1/AXR-1色谱柱，结合了弱阴离子交换WAX和亲水相互作用HILIC (AXH-1)/反相RP (AXR-1)两种保留机理，能够高效率地分析复杂寡糖链混合样本。经典的HILIC/RP机理可以根据电荷数、极性、大小实现寡糖链分离，而WAX机理保留和选择带负电荷的寡糖链，对含唾液酸的寡糖链具有很好的分离效果。使用GlycanPac色谱柱分析2-AB标记的牛胎球蛋白(Bovine Fetuin) N-糖链，结果表明寡糖链得到有效分离，特别是对含有唾液酸的

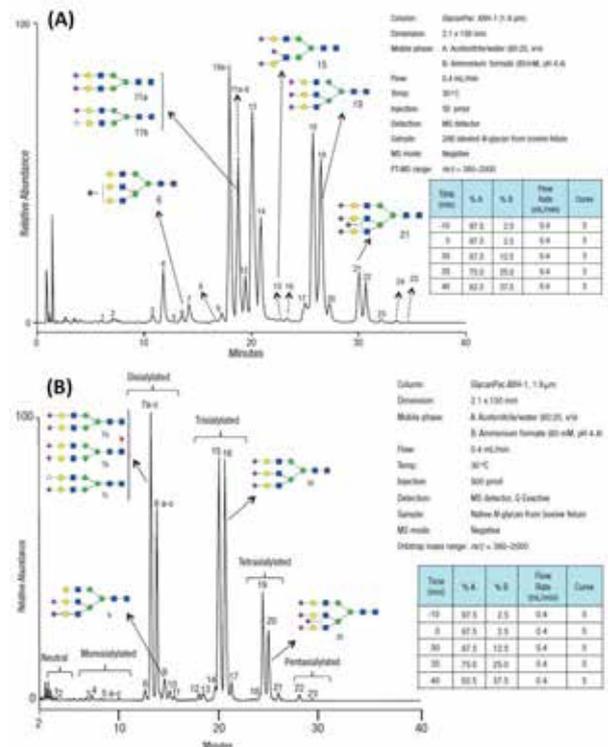


图3: GlycanPac色谱柱分离牛胎球蛋白N-糖链

寡糖的分离效果良好（图3A）。即使分析未标记的天然牛胎球蛋白N-糖链（图3B），仍然获得了理想的分离效果<sup>[2,3]</sup>。

以 Q-Exactive 为代表的静电场轨道阱 Orbitrap 具有10万以上的超高分辨率和amol级的超高灵敏度，结合高能碎裂(HCD)模式，能获得丰富的碎片信息，并高效分辨和检测寡糖。通过牛胎球蛋白三天线复杂型N-糖链的二级质谱分析（图4A）可以看出，即使是寡糖

链没有被标记，谱图仍然获得了丰富的高强度碎片信号，特别是B/Y、C/Z等跨环断裂信息，对寡糖链精细结构的解析具有重要作用。实验在牛胎球蛋白中成功解析了29种不同结构的N-糖链（图4B），其中绝大部分为含唾液酸的寡糖链，证明UHPLC-Orbitrap对复杂寡糖链的强大分析能力<sup>[4]</sup>。GlycanPac 色谱与 Orbitrap 结合还实现了仅糖苷键/构象不同的同分异构寡糖链基线分离与质谱鉴别（图5）<sup>[5]</sup>。

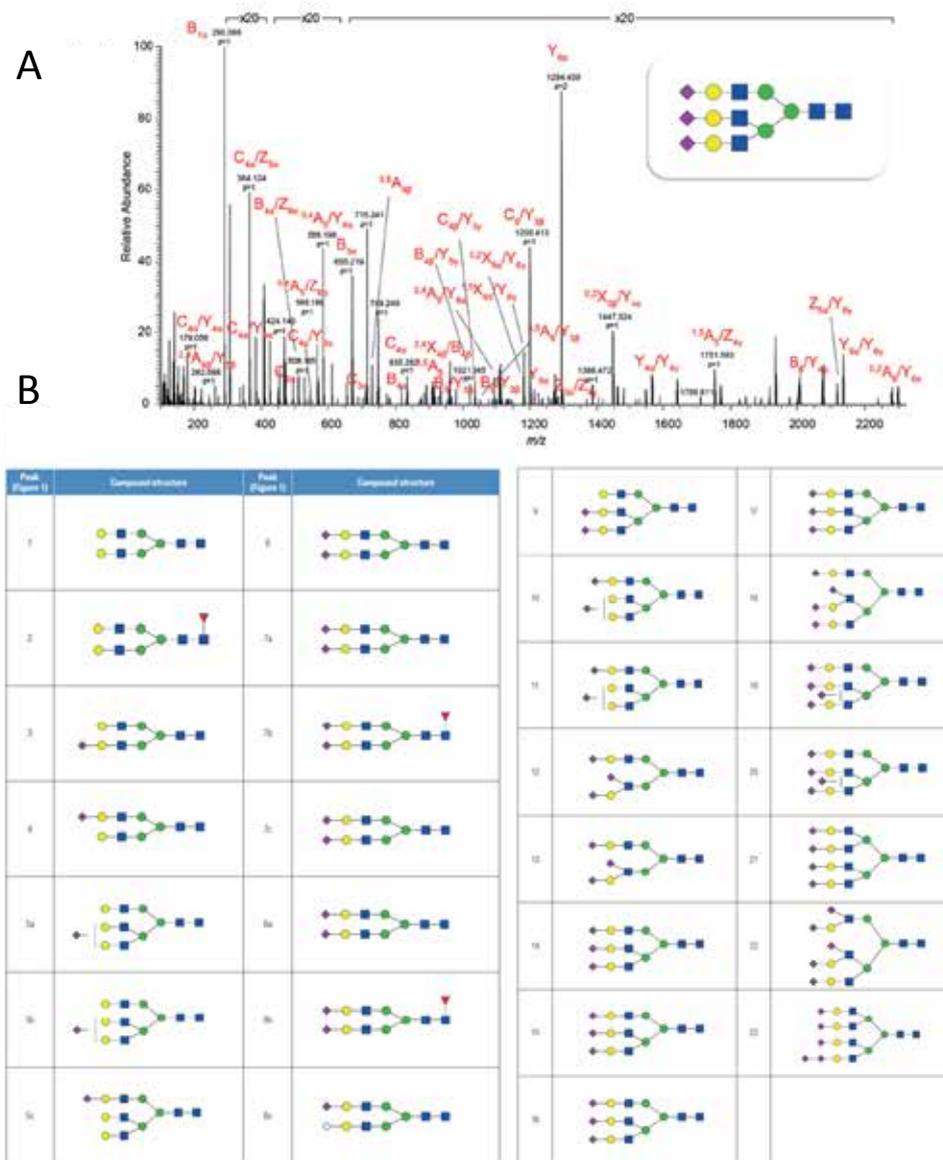


图4：牛胎球蛋白N-糖链二级谱图质谱解析示例(A)与解析结果汇总(B)。

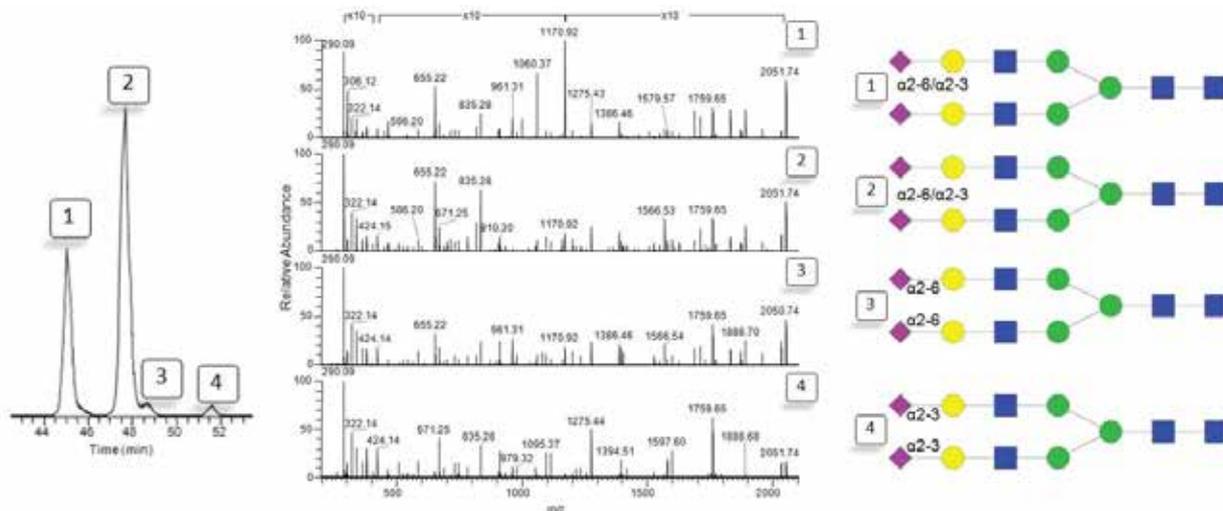


图5: 牛胎球蛋白同分异构寡糖链分离分析

专业糖链结构解析软件SimGlycan™可实现对复杂寡糖链谱图的全自动解析。将实验获得的寡糖链数据与内置数据库中寡糖链的理论碎片谱图匹配，分别获得糖苷键断裂、双糖苷键断裂、跨环断裂、跨环断裂+糖苷键断裂的匹配率（图6），进而计算得到寡糖链的结构解析结果<sup>[6]</sup>。

此外，还可以利用线性离子阱质量分析器的多级功能(MS<sup>n</sup>)，对同分异构寡糖链进行多

级碎裂和检测，获得单糖构象、糖苷键连接等精细结构的更多差异信息，从多角度实现同分异构寡糖链的结构解析和分辨<sup>[7]</sup>。

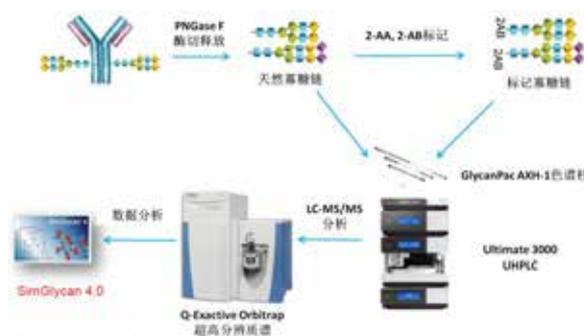


图7: 单抗药物寡糖表征解决方案

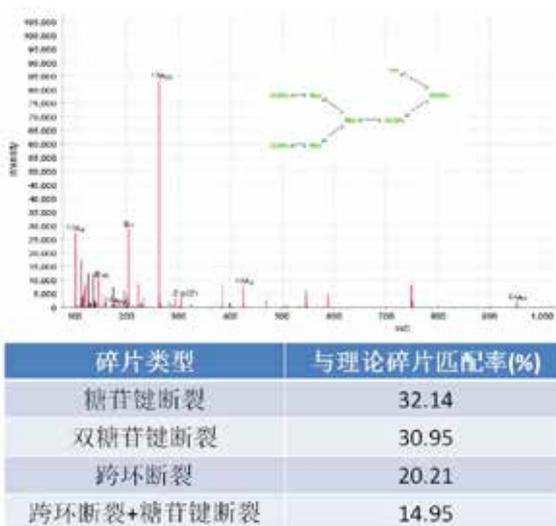


图6: SimGlycan™解析寡糖链谱图

## 二、糖基化位点分析

*N*-糖基化位点鉴定通常使用PNGase F 酶释放糖链，使肽段上产生去糖基化位点，并在肽段上产生去糖基化痕迹：天冬酰胺(N)发生脱氨基化，造成0.9840 Da的质量增加。通过质谱寻找发生+0.9840 Da的天冬酰胺，以及*N*-糖基化保守序列NXS/T (X代表脯氨酸以外的任何氨基酸)过滤，获得可信的鉴定结果（图8）。为了避免天然脱氨基化造成的假阳性，可以

在<sup>18</sup>O水中进行酶切，使去糖基化位点含有一个<sup>18</sup>O，形成+2.9890Da，可与天然脱氨基区分。

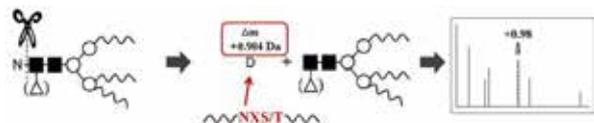


图8: PNGase F 酶切鉴定糖基化位点原理

糖基化位点的发现与确证对质谱的分辨率与灵敏度具有较高要求。Orbitrap由于具有超高分辨率和超高灵敏度，无论对于单抗等纯蛋白样品、还是全细胞蛋白等复杂样品，都是是糖基化位点表征的最佳工具。目前糖基化位点最大的数据集，共从小鼠组织与血浆中注释了6367个糖基化位点<sup>[8]</sup>。该实验采用用PNGase F 释放糖链并标记<sup>18</sup>O方法，使用Orbitrap鉴定糖基化位点，共鉴定到6367个位

点，其中5753个位点是没有记载的新位点。该研究对糖蛋白的研究具有重要意义（图9），也展示出了Orbitrap超群的性能。在相对简单的抗体及其他蛋白药物糖基化位点表征中，Orbitrap更可毫无疑问地胜任此工作<sup>[9]</sup>。

### 三、糖肽分析

糖肽分析前处理简单，能同时鉴定糖基化位点和解析寡糖链结构，并获得位点特异性糖链信息，即微观不均一性。但是糖肽解析比糖链与糖肽分开解析的传统方法更为复杂：寡糖链离子化效率较低；相比肽段骨架更易碎裂，造成肽段骨架难以充分碎裂；谱图非常复杂，传统搜库手段无法处理。HCD高能碎裂相比传统CID能获得更丰富的碎片信息，使糖肽的寡糖链和肽段骨架充分碎裂。Orbitrap

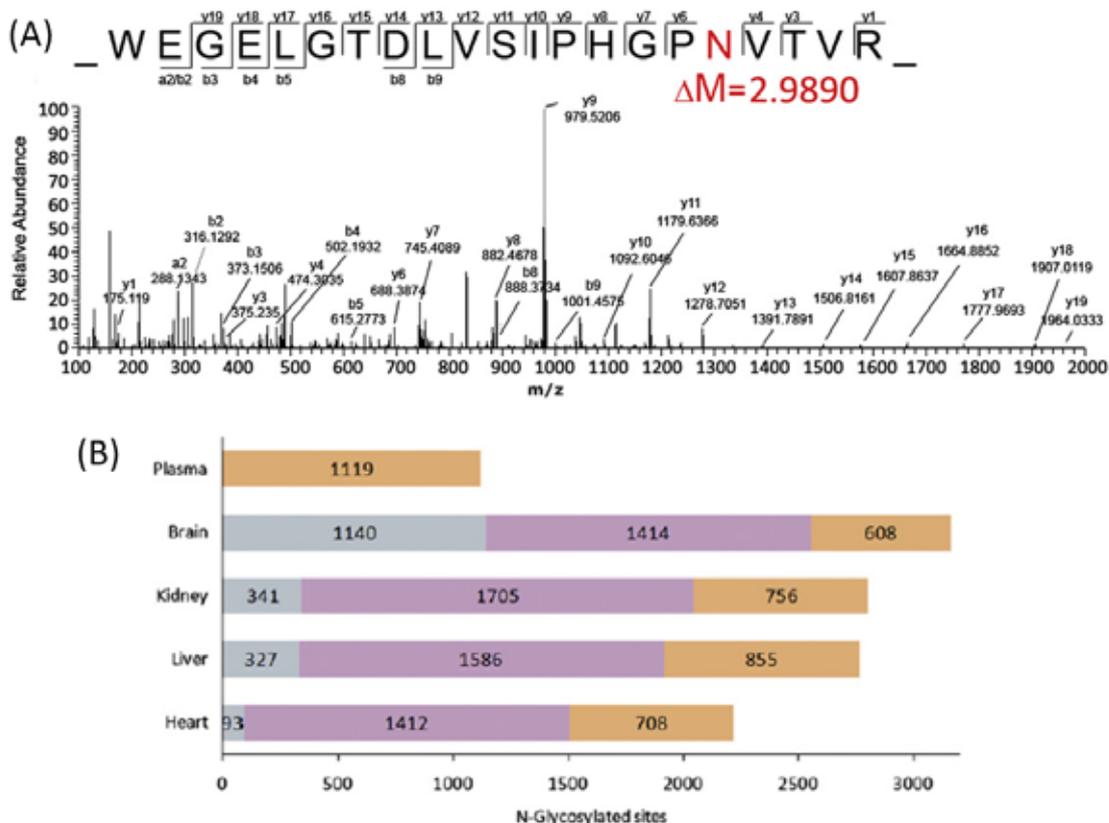


图9: 糖基化位点表征二级匹配谱图示例(A)和小鼠蛋白糖基化分析结果(B)

超高分辨质量分析器能有效分辨糖肽产生的复杂碎片，避免碎片离子间的相互干扰，提高离子化效率较低的寡糖碎片响应。Byonic™可以实现复杂糖肽谱图的全自动数据处理，解析肽段骨架序列和寡糖链结构。

单抗药物利妥昔(Rituximab)经Trypsin酶切后，使用Q-Exactive在线分析，碎裂模式为HCD，并使用Byonic™解析谱图。图10展示了糖肽EEQYNSTYR的谱图解析结果，谱图中存在着丰富的糖肽碎片离子，并获得超高质量精度的可靠匹配，确定糖链结构为GOF。特别是低分子量端的单糖和寡糖碎片，能够作为诊断离子，进一步确证糖肽解析结果<sup>[10,11]</sup>。

融合蛋白药物通常为糖蛋白，其糖基化比单抗更为复杂。单抗寡糖链结构已研究的较为透彻，但融合蛋白存在诸多未知寡糖链，

这类糖肽的解析普通液质难以胜任。Orbitrap超高分辨率、超高质量精度和灵敏度为未知糖肽解析提供了有效解决方案。实验使用Orbitrap对高度糖基化的一种Fc融合蛋白药物进行了完整糖肽解析。该融合蛋白同时含有多个N-糖和O-糖位点，寡糖链结构未知。以糖肽TKPREEQYNSTYR解析结果为例(图11)，HCD谱图同时获得了丰富的寡糖链碎片和肽段骨架碎片，使用Byonic™得到可靠鉴定结果(图11A)。由于寡糖链存在诸多同分异构体，因此实验进一步使用了SimGlycan™确证寡糖链结构，该寡糖链结构确证为三链高甘露糖型(图11B)。解析结果汇总表明，仅TKPREEQYNSTYR上N317一个位点，就有15种结构各异的寡糖链(图11C)。实验共获得2个N-糖基化位点、16个O-糖基化位点，83种位点特异的寡糖链结构，为该融合蛋白的研究和申报提供了重要表征信息<sup>[12]</sup>。

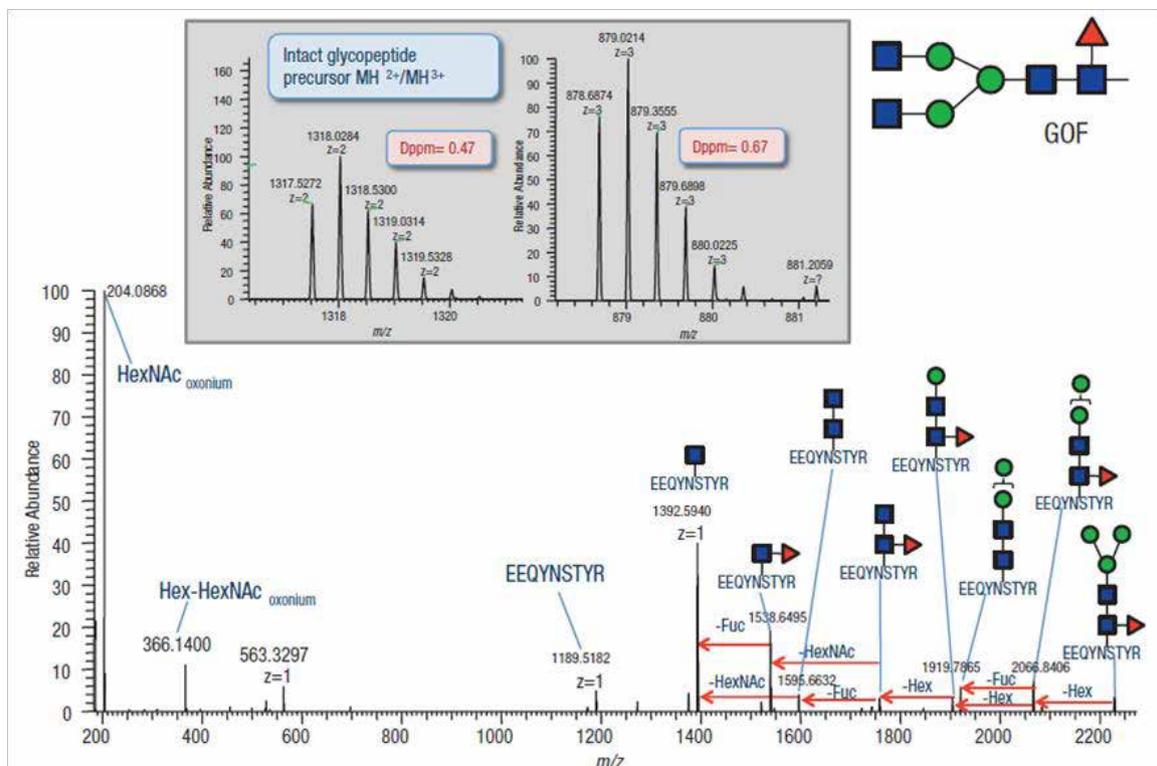


图10: 利妥昔糖肽EEQYNSTYR二级谱图解析

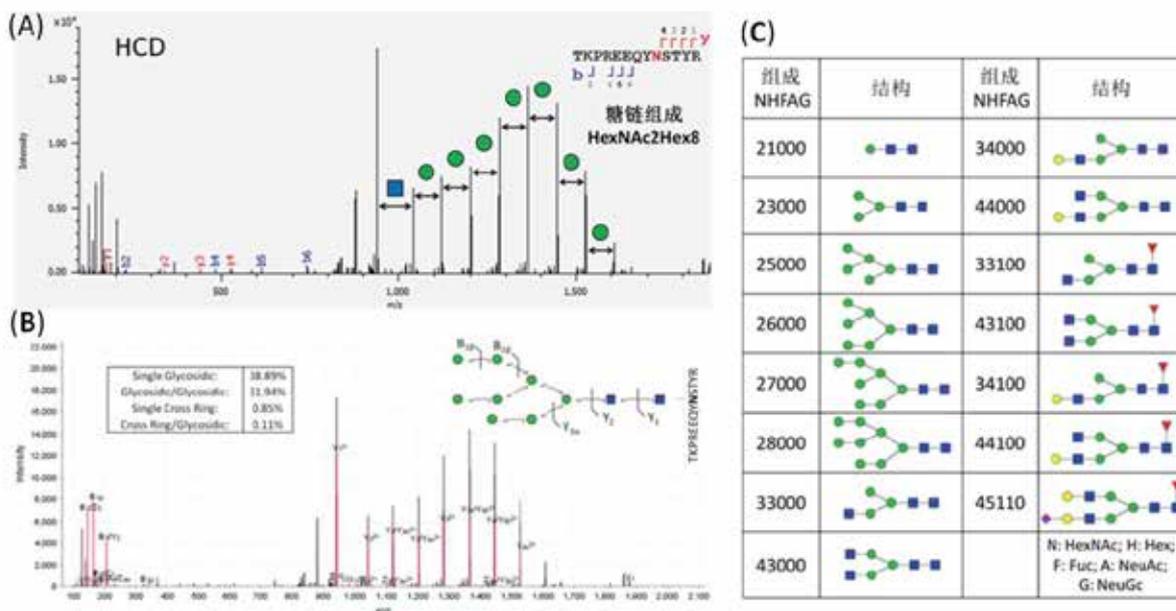


图11: 融合蛋白糖肽使用Byonic™(A)、SimGlycan™(B)解析, 及N317位点寡糖结构汇总(C)

Orbitrap质量分析器与HCD高能碎裂能有效应对复杂未知糖肽解析的挑战。对于一些仍无法解析的极端情况, 还可以利用多级裂解MS<sup>n</sup>获得寡糖链精细结构, 或通过电子传递裂解ETD得到更多肽段骨架碎裂, 获得与HCD互补的结构信息<sup>[12-16]</sup>。

#### 四、ETD与O-Linked糖肽分析

O-Linked糖基化, 主要发生在丝氨酸(S)与苏氨酸(T)残基。在对O-Linked糖基化进行位点分析时, 会遇到较N-Linked糖基化更大的困难。一方面, O-Linked糖基化分析中, 缺乏像N-Linked糖基化分析里使用的PNGases F糖

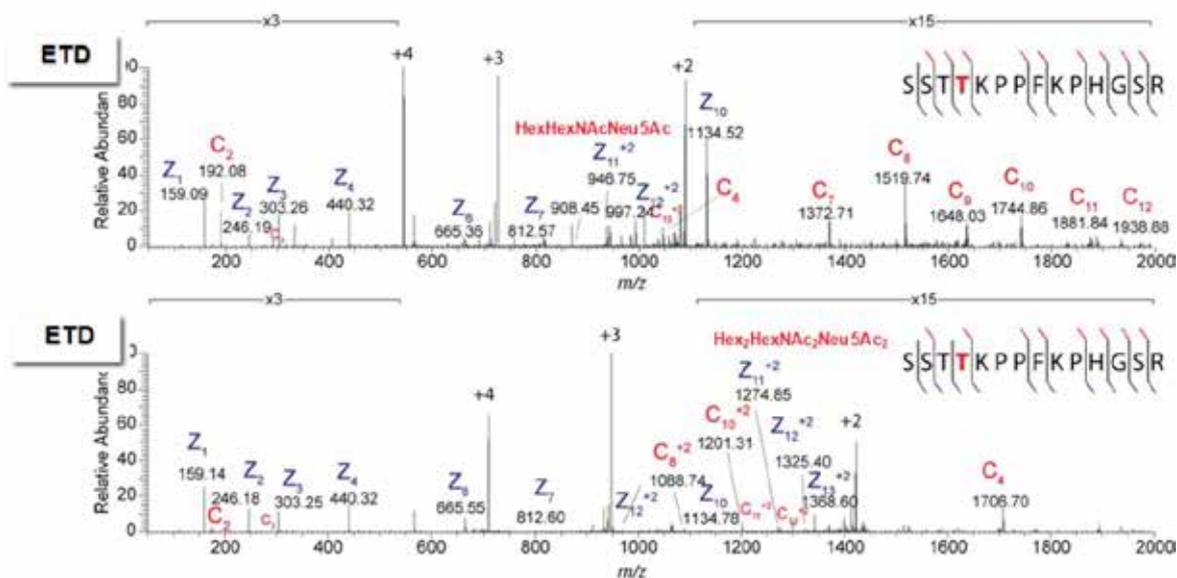


图12: ETD分析O-linked糖肽示例

苷酶，而难以进行去糖基化位点质量标记。另一方面。在多肽序列中，S与T经常密集出现，如果使用常规的碰撞诱导解离（CID）方法，糖苷键将成为主要的断裂碎片，因此难于获得丰富的肽段碎片信息，导致序列及O-Linked糖基化位点分析困难。因此O-Linked糖基化分析需要使用到ETD（电子传递解离）技术。

ETD优先断裂肽段骨架，避免了寡糖链的碎裂，能为O-糖肽提供有效信息。通过ETD分析人血清富组氨酸糖蛋白（HRG）T271-284肽段的两种不同寡糖链结构的O-糖肽，获得了丰富的肽段骨架碎片信息（c/z系列离子），而寡糖链得以有效保留，降低了谱图复杂性，有利于糖基化位点与结构解析（图12）<sup>[17]</sup>。

## Reference

1. Glycomic Profiling of Tissue Sections by LC-MS. *Anal Chem.* 2013 Apr 16;85(8):4074-9.
2. Separation of Labeled and Native N-Glycans on a Novel Mixed-Mode Stationary Phase. *Thermo Application Note*
3. Structural Analysis of Labeled N-Glycans from Proteins by LC-MS/MS Separated Using a Novel Mixed-Mode Stationary Phase. *Thermo Application Note*
4. Integrated LC/MS Workflow for the Analysis of Labeled and Native N-Glycans from Proteins Using a Novel Mixed-Mode Column and a Q Exactive Mass Spectrometer. *Thermo Application Note*
5. An Ultra High Resolution Glycan Column for Isomeric Separation and the Structural Identification of Labeled N-Glycans from Proteins Including Antibodies. *Thermo Application Note*
6. A Complete Workflow Solution for Monoclonal Antibody Glycoform Characterization Combining a Novel Glycan Column Technology and Bench-Top Orbitrap LC-MS/MS. *Thermo Application Note*
7. Automated Glycan Structural Isomer Differentiation Using SimGlycan Software. *Thermo Application Note*
8. Precision Mapping of an In Vivo N-Glycoproteome Reveals Rigid Topological and Sequence Constraints. *Cell.* 2010 May 28;141(5):897-907
9. ADC 单抗药物的分子质量、氨基酸序列、糖基化位点以及ADC 药物结合位点鉴定. *Thermo Application Note*
10. LC/MS Analysis of the Monoclonal Antibody Rituximab Using the Q Exactive Benchtop Orbitrap Mass Spectrometer. *Thermo Application Note*
11. 单抗药物的分子质量、氨基酸序列以及糖基化位点鉴定. *Thermo Application Note*
12. 新一代组合型质谱LTQ-Orbitrap Elite用于复杂糖蛋白完整糖肽结构解析. *Thermo Application Note*
13. Analysis of Glycopeptides Using Porous Graphite Chromatography and LTQ Orbitrap XL ETD Hybrid MS. *Thermo Application Note*
14. Direct approach for qualitative and quantitative characterization of glycoproteins using tandem mass tags and an LTQ Orbitrap XL electron transfer dissociation hybrid mass spectrometer. *Anal Chem.* 2013 Feb 5;85(3):1531-9.
15. Glycoproteomic Analysis of the Secretome of Human Endothelial Cells. *Mol Cell Proteomics.* 2013 Apr;12(4):956-78
16. Characterization of Protein Glycosylation Using ESI ChipTM Static Nanospray IonTrap MSn Mass Spectrometry. *Thermo Application Note*
17. A Fully Automated Workflow for Glycopeptide Analysis. *Thermo Application Note*

## 质谱在蛋白质药物二硫键分析中的应用

二硫键对于稳定蛋白质药物的空间结构，保持其活性具有重大的作用。而在蛋白质药物的生产过程中，由于成本控制的需求，往往追求较大的蛋白质表达浓度，而使发生二硫键错配(disulfide scramble)的可能性有所上升<sup>[1]</sup>。因此，二硫键的连接确证成为蛋白质药物质量表征的必须环节。相对于对角线电泳法、突变分析法、部分还原测序法，以及X晶体衍射和核磁共振等技术，串联质谱在灵敏度、准确性、操作性等多方面独具优势，已经成为二硫键表征的主流方法<sup>[2]</sup>。早期的二硫键液质分析，采用人工对比还原与非还原肽图数据策略（图1），来确定二硫键。这种策略的灵敏度差、分析通量低、不同分析人员造成的分析结果差异较大。近年随着质谱及软件技术的迅猛发展，目前二硫键分析工作，已经进入了直接分析阶段，也就是直接采集非还原蛋白质药物肽图串联质谱数据，并通过化软件自动化查找二硫键。

在二硫键的质谱分析中，碰撞诱导解离（CID）与高能碰撞解离（HCD）是最普遍的

二级碎裂方法。使用HCD/CID作为采集二硫键数据的优点主要有：碎片信号较丰富，且强度较均匀，采集频率快，以及仪器价格经济。图2为链间、链内以及复合型二硫键连接肽段的二级碎片图谱示例<sup>[3]</sup>。

蛋白质药物二硫键分析主要有两种需求，分别是1)对期望二硫键连接的验证；2)对未知（错配）二硫键的发现。在针对第一种需求进行分析时，一般会将预期的二硫键连接方式输入软件。分析软件仅是在提供的连接方式中寻找是否有匹配的质谱信号。第二种需求则是在仅提供蛋白氨基酸序列的情况下，对未知（错配）二硫键进行发现鉴定。由于蛋白质中存在众多的半胱氨酸，而任意两个半胱氨酸都存在形成二硫键的可能性，加之考虑到可能存在的非特异性酶切以及可变修饰等因素，致使各种连接可能性的数目以组合爆炸的规模出现。面对这种严酷的分析要求，软件需具有极强大的数据处理性能。

软件已经成为二硫键分析的关键一环。其，

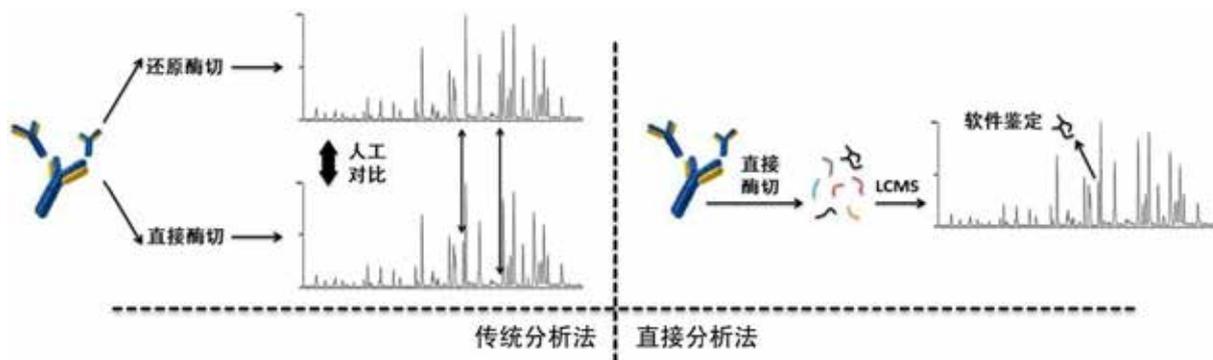


图1:蛋白质二硫键液质分析策略对比

中专门针对Orbitrap系列质谱碎裂特点所设计的软件种类最多，如pLinks<sup>[3,4]</sup>、StavroX<sup>[5]</sup>等，这也从一个侧面说明了Orbitrap型质谱在二硫键分析中已被最为广泛地应用。在这些软件中，较为出色的如pLinks具有了令人振奋的数据分析性能。在进行错配二硫键发现时，pLinks可在考虑肽段N、C两端都为非特异性酶切，并含可变修饰条件下，在几分钟内就可完成二硫键数据检索。Thermo 新近推出的PepFinder作为整合的生物制药软件分析平台，同样具备了未知二硫键检索功能，为分析人员的工作提供了极大的便利。

需要指出的是，二硫键分析实验由于需要在不彻底对蛋白质进行变性（不还原二硫键）的情况下进行，酶切相对普通肽图分析（蛋白质被充分变性后酶切），较难一次得到理想的酶切效果，因此在样品处理方面，需要根据不同的样品，摸索和优化样品处理方法。考虑的因素包括：酶切的时间、多酶酶切选择<sup>[6]</sup>，减少碱性环境、封闭自由半胱氨酸以避免引入错配二硫键等等<sup>[3,7]</sup>。这些都是在实验设计及结果分析中需要特别注意的方面。

此外，二硫键分析还具有一般肽图分析不具有的复杂性，如：链内二硫键<sup>[8]</sup>、多对以上二硫键结构（如cystine Knot and nested disulfide）<sup>[6]</sup>、糖肽形与二硫键同时存在<sup>[9]</sup>、通过二硫键形成的环肽<sup>[10]</sup>等。在这些情况下，单纯使用一种碎裂方法所获得的信息有限，因此ETD与MS<sup>n</sup>等质谱技术就成为了CID/HCD技术的有效补充。

ETD技术作为与CID/HCD并列的多肽碎裂技术，其碎片特性与后两者有着明显的不同。在二硫键碎裂方面，最明显的差异就是，CID/HCD无法打开二硫键，以及含链内二硫肽段在两个半胱氨酸之间的序列区域无法产生

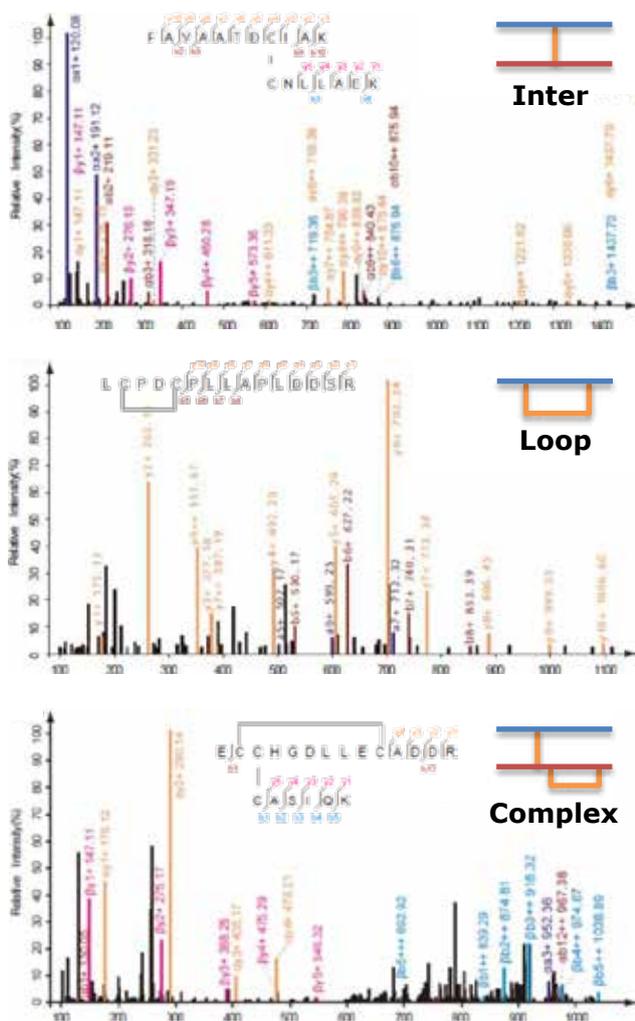


图2：二硫键的二级质谱图示例<sup>[3]</sup>

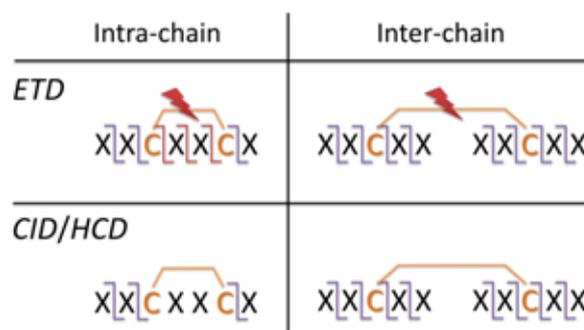


图3：二硫键肽段在不同碎裂方式下的碎裂行为

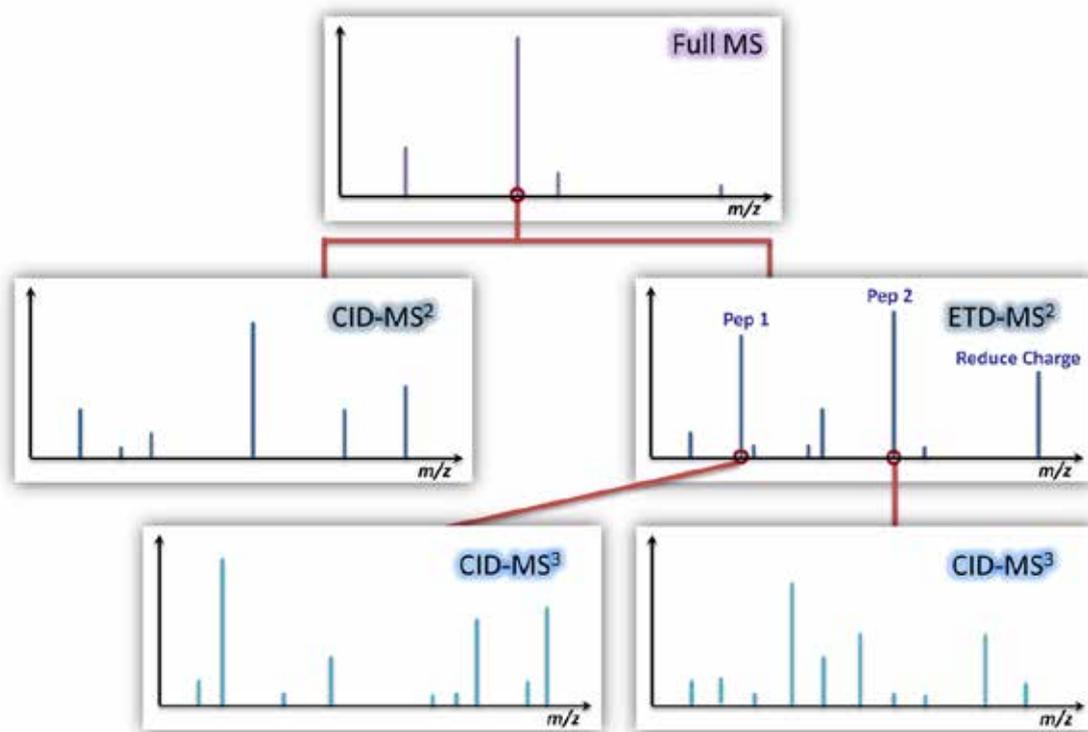


图4：含二硫键肽段的ETD与多级质谱方法策略

碎片。而ETD在这两种情况下都可以产生碎片<sup>[11]</sup>。如图X。显而易见，ETD与CID/HCD产生的碎片信息互补性极高，综合使用将非常有利于最终得到可信的结果<sup>[7]</sup>。

多级质谱也是针对复杂二硫键分析时可以选择的一种方法。Wu等使用ETD对含二硫键肽段进行二级碎裂后，根据其碎片特点进行CID-MS<sup>3</sup>碎片采集（图4），得到了更丰富的碎片信息，这种方法已经广泛应用于多种蛋白质药物产品的分析中<sup>[7, 12]</sup>。

在ETD与MS<sup>n</sup>联用的方法中，对于一级质谱中发现的母离子，平行进行CID与ETD二级信息采集。通过两种碎裂方式产生碎片互补性，可得到更为充分的序列信息。此外，对

于链间二硫键，由于ETD自身特点，在ETD的二级碎片中，常常会出现两种强信号。第一种强信号是由单纯的二硫键断裂（两条肽段分离，但都各自保持完整，表示为Pep1和Pep2）产生的。在这种情况下，可以分别针对Pep1和Pep2采集三级CID碎片。这样就可以分别得到两个肽段各自清晰的碎片信息。显而易见，相对于两种肽段混在一起的MS<sup>2</sup>碎片，MS<sup>3</sup>碎片信息更具针对性，从而大大提高了其鉴定可信度，与碎片覆盖度。二级ETD经常产生的另一种强信号，表面上看是一级母离子减少电荷的形式。而其中实际包含了1) 已发生碎裂，但Pep1与Pep2仍通过非共价键粘附在一起的形式，以及2)真正的单纯减少电荷离子形式。对于后者，可以通过增加活化能以及MS<sup>3</sup>、MS<sup>4</sup>等方法，进一步挖掘序列信息。

串联质谱技术，已经成为蛋白质药物二硫键分析最重要的手段。在Orbitrap及离子阱质谱高质量的数据条件下，加之软件技术的巨

大发展，使得二硫键检索分析实现了快速、准确、高通量的要求，从而使二硫键分析进入了常规化分析时代。

## Reference

1. Safety aspects in the quality control of recombinant products from mammalian cell culture. *J Pharm Biomed Anal.* 1989;7(2):255-66.
2. 仇晓燕 崔劲 刘志强 刘淑莹 蛋白质中二硫键的定位及其质谱分析 *化学进展*, 2008(6): 975-983
3. Shan Lu, Sheng-Bo Fan, Bing Yang, Jia-Ming Meng, Long Wu, Kun Zhang, Yu-Xin Li, Chun-Qing Song, En-Zhi Shen, Pin Li, Jincal Luo, Hai-Tao Wang, Li-Lin Du Rui-Xiang Sun, Si-Min He, Meng-Qiu Dong. Mapping Endogenous Protein Cross-linking Sites from Complex Samples. Paper in preparation.
4. Identification of cross-linked peptides from complex samples. *Nat Methods.* 2012 Sep; 9(9): 904-6.
5. StavroX--a software for analyzing crosslinked products in protein interaction studies. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2012 Jan;23(1):76-87.
6. Complete mapping of a cystine knot and nested disulfides of recombinant human arylsulfatase A by multi-enzyme digestion and LC-MS analysis using CID and ETD. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2013 Jan;24(1):125-33.
7. Characterization and comparison of disulfide linkages and scrambling patterns in therapeutic monoclonal antibodies: using LC-MS with electron transfer dissociation. *Anal Chem.* 2011 Apr 15;83(8):3133-40.
8. Electron transfer dissociation (ETD) of peptides containing intrachain disulfide bonds. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2012 Feb;23(2):310-20.
9. Identification of the unpaired cysteine status and complete mapping of the 17 disulfides of recombinant tissue plasminogen activator using LC-MS with electron transfer dissociation / collision induced dissociation. *Anal Chem.* 2010 Jun 15;82(12):5296-303.
10. Electron transfer dissociation coupled to an Orbitrap analyzer may promise a straightforward and accurate sequencing of disulfide-bridged cyclic peptides: a case study. *J Mass Spectrom.* 2010 Dec;45(12):1477-82.
11. Can metal ions be used as gas-phase disulfide bond cleavage reagents? A survey of coinage metal complexes of model peptides containing an intermolecular disulfide bond. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2007;21(16):2727-33.
12. Mass spectrometric determination of disulfide linkages in recombinant therapeutic proteins using online LC-MS with electron-transfer dissociation. *Anal Chem.* 2009 Jan 1;81(1):112-22.

## 质谱在蛋白质药物代谢分析中的应用

经典的蛋白药物代谢分析采用配体结合实验 (Ligand-Binding Assay, LBA) 技术, 其中以酶联免疫吸附实验法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 为代表, 该技术对设备要求低, 易于操作, 灵敏度高。但 ELISA 方法存在一些缺陷, 如: 受自身抗体干扰、定量范围窄、非特异性结合、交叉反应、以及免疫原性影响等问题。近年来备受关注的串联质谱方法 (LC-MS/MS), 在进行蛋白药物代谢分析中, 可提供卓越的选择性, 良好的准确性、精确性、以及宽定量范围, 并具有开发时间短 (约几周时间), 分析通量高与多重分析能力的特性。因此, 串联质谱法在蛋白药物代谢分析中的应用日渐增多, 并已经形成了系统的分析方案, 可见综述论文<sup>[1,2]</sup>。

蛋白类药物代谢定量液质分析流程如图一。通常情况下, 起始样品量为几至几百微升血液, 分析需经过1) 蛋白纯化, 2) 酶解, 3) 多肽纯化, 4) 色谱分离, 5) 质谱检测以及6) 内标添加等步骤。在实验中, 直接的分析目标并不是完整的蛋白药物本身, 而是它的部分片段——多肽。受到液质分析能力限制, 分子量大于4-5KDa的蛋白药物需要被处理到肽段水平, 并在酶解产生的众多肽段中, 选择序列独特, 可特异性代表蛋白药物的肽段——指纹肽 (Signature Peptide, SP) 作为直接分析对象(多肽类药物采用可直接分析的方法<sup>[3,4]</sup>)。因此在蛋白药物代谢液质分析中, 实际是对指纹肽的确认与定量, 也就是说通过指纹肽代表蛋白进行分析。

与小分子药物代谢质谱分析相同, 对指纹肽的精确定量, 需要相应的内标进行参照。在解析质谱数据时, 通过比较掺入的内标肽与蛋白本身的指纹肽相对量, 并与事先建立好的标准定量曲线对照, 完成定量。内标肽是被选为指纹肽的稳定同位素标记形式 (Stable Isotope Labeled, SIL-), 内标肽与其对应的指纹肽具有相同氨基酸序列, 除质量差别外, 两者具有相同的色谱与质谱行为。此方法被称为同位素稀释-选择/平行反应监测质谱法 (Stable Isotope Dilution - Select/Parallel Reaction Monitoring MS, SID-SRM/PRM-MS)<sup>[5,6]</sup>。

有三种内标肽添加方法: 第一种是在初始样品中直接添加同位素标记的蛋白形式的内标 (SIL-Standard Protein); 第二种是在蛋白纯化后, 加入含有序列长度略长于指纹肽的同位素标记的内标肽 (SIL-Winged standard Peptide); 第三种是在样品酶解后, 加入与指纹肽序列相同的同位素标记的内标肽 (Simple SIL-Standard Peptide)。显而易见, 内标加入的越早, 其与目标蛋白共同经历的处理步骤越多, 各种操作造成的影响越一致, 最终的定量准确度与重现性越好。第三种 Simple SIL-Standard Peptide 是根据参照指纹肽序列合成的, 其差别仅在于内标肽含稳定同位素 (一般使用 C13、N15 等重稳定同位素)。添加这种内标肽的成本最低, 但其实验准确性较差。对于 SIL-Winged standard Peptide 形式的内标肽而言, 除标记同位素外, 其氨基酸序列较相应的指纹肽延长了 N 及 C 端。这样延长的 SIL-Winged Standard Peptide 就可以参与到酶切步

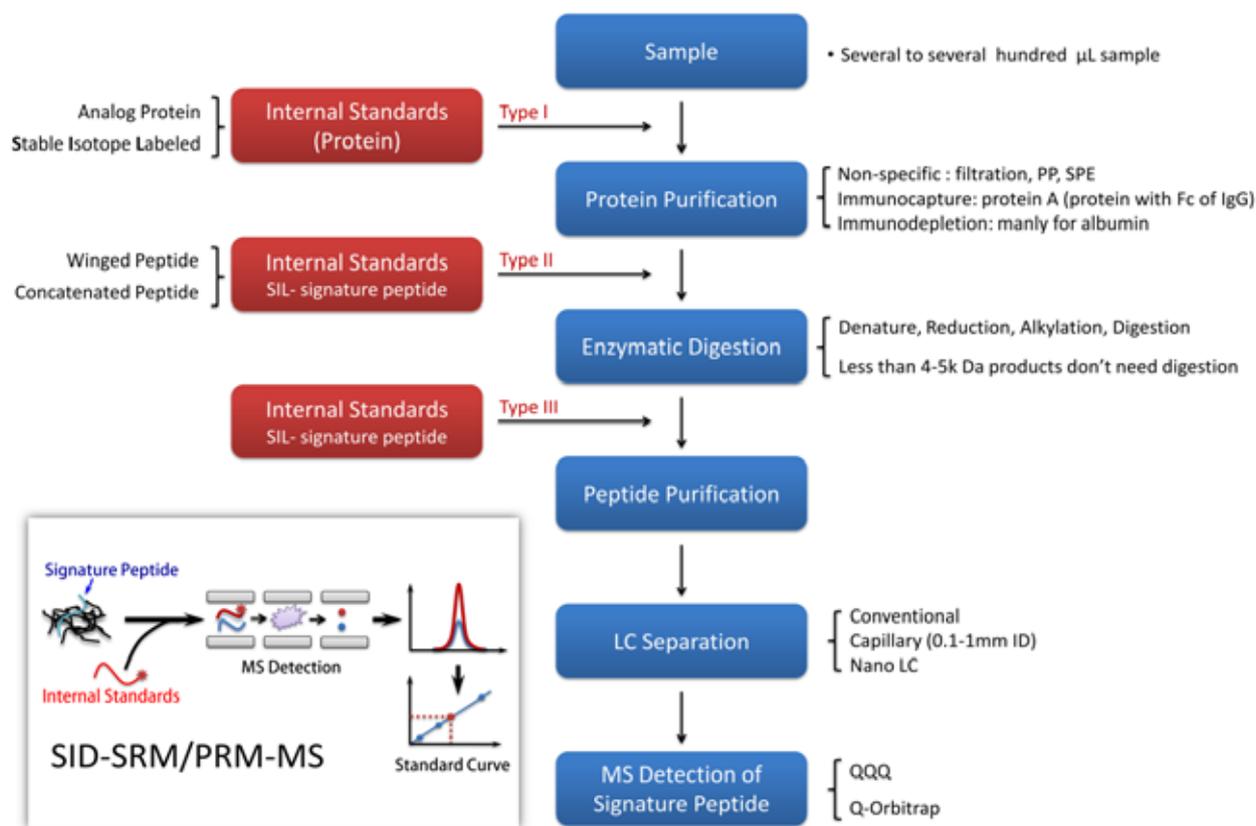


图1: 蛋白药物代谢的液质分析流程

骤，因此其实验可靠性优于简单稳定同位素内标。由于实验中往往需要至少2个以上的内标肽，因此多个内标肽可以连续的方式合成，形成首尾相接的形式（Concatenated Standard Peptide），可在一定程度上降低成本。在这三种内标中，第一种为最佳，因为 SIL-Standard Protein将会与目标蛋白经历完全相同的处理过程，因此可以获得最好的准确性与重现性。

确定指纹肽是整个分析流程的基础，关键的选择因素包括：1）特异性，2）酶切过程中产生速度及重现性，3）在整个操作过程中的化学稳定性，4）色谱中可保留，5）质谱离子化效率高，质谱碎片质量好。指纹肽的选择流程见图二。

在确定指纹肽的特异性时，可使用的软件及数据库工具有：PeptideAtlas、Skyline、BLAST。由于指纹肽需要在全过程保持稳定，因此，除序列特异性外，还需要对其氨基酸组成进行选择，如不能含有不稳定氨基酸残基及序列，如：Methionine、Cystine、Tryptophan，相邻的 Aspartic acid 与 Glycine，在N端的 Glutamine 或 Asparagine 等。为避免 Trypsin漏切，碱性氨基酸相连的情况，如Arg-Arg、Arg-Lys、Lys-Lys，也要被排除。指纹肽的长度在8-15个氨基酸残基比较合适，序列太短难于在色谱上保留，而序列太长可能会有成本及质谱碎裂质量问题。此外，由于Proline残基可以促进产生强的碎片信号，因此优先选择含有Proline的肽段。有一些软件工具可以帮助选择指纹肽，但诸如色谱共洗脱离子抑

制，酶切效率等方面的考察，仍必须通过实验来进行最终确认。指纹肽的数量需要达到2-3个以满足蛋白质谱确证及定量。对于单抗产品来说，由于其与内源性免疫球蛋白的高度的序列同源性，有时非常难于选出多个特异的指纹肽。对于只可选出一个指纹肽的样品来说，可主要使用这个指纹肽进行确认及定量，而其它不能满足全部要求的候选指纹肽也可保留1-2个，作为辅助信息。

除选择指纹肽、添加内标策略选择等环节外，蛋白纯化、酶切条件优化、肽段纯化、液相分离与质谱分析各个环节都对最终结果的灵敏度、重现性有着重要的影响。蛋白纯化步骤可减少基质干扰，提高目标蛋白相对浓度。在这一步可选择技术包括：分子量过滤，蛋白沉淀（Protein Precipitation, PP）、固

相萃取（Solid-Phase Extraction, SPE），白蛋白去除，以及针对含有IgG的Fc片段蛋白药物的Protein A亲和富集。目前在酶切时，大多使用胰蛋白酶（Trypsin），其主要步骤包括蛋白的变性、还原、烷基化、酶切等。需要优化的条件包括酶切缓冲溶液，酶切时间等。多肽富集步骤可以进一步提高指纹肽浓度，有利于实验灵敏度的提高。在蛋白药代谢液质分析中，可选择的色谱方式包括Conventional（色谱柱内径大于1毫米），Capillary（色谱柱内径介于0.1至1毫米），以及Nano LC（纳升液相，色谱柱内径小于0.1毫米）三种。其中色谱柱内径越大，数据的精确度及重现性越好，但灵敏度较差。使用小内径色谱柱的纳升色谱的灵敏度最好，但操作难度较大，色谱分析时间较长。

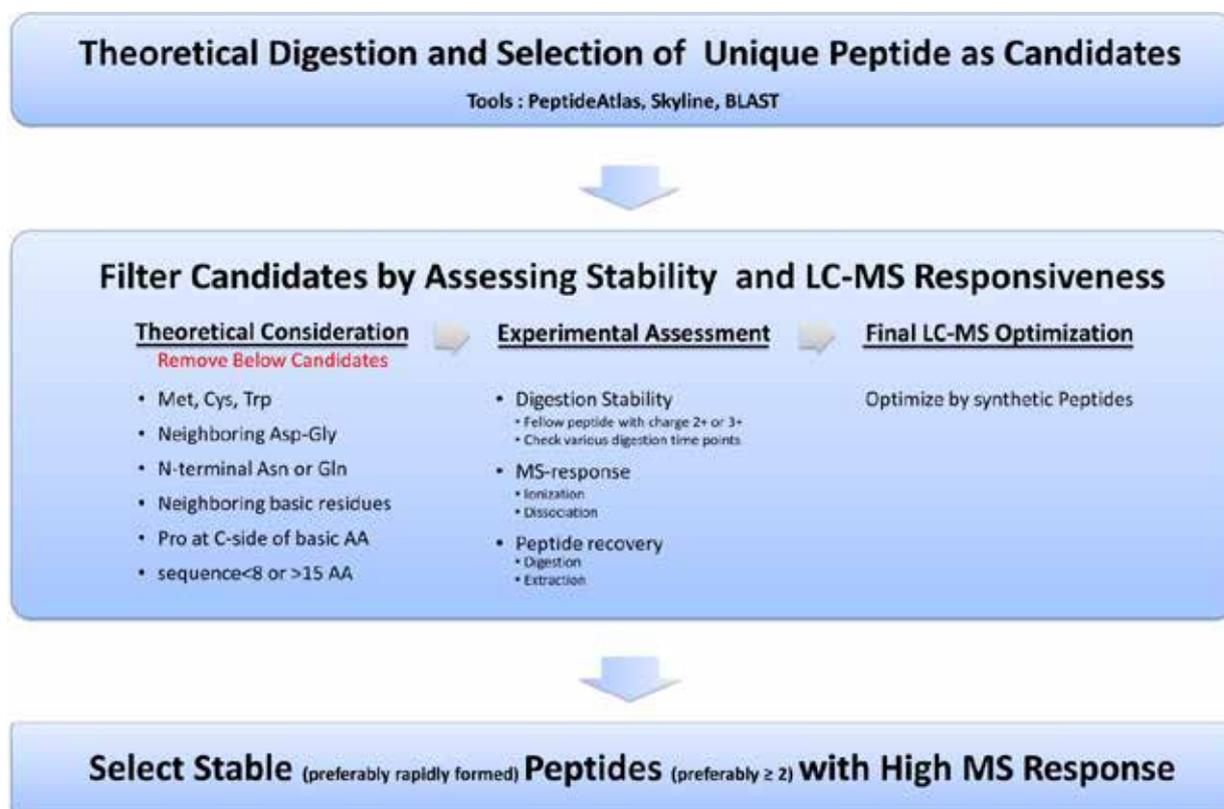


图2：指纹肽的选择流程

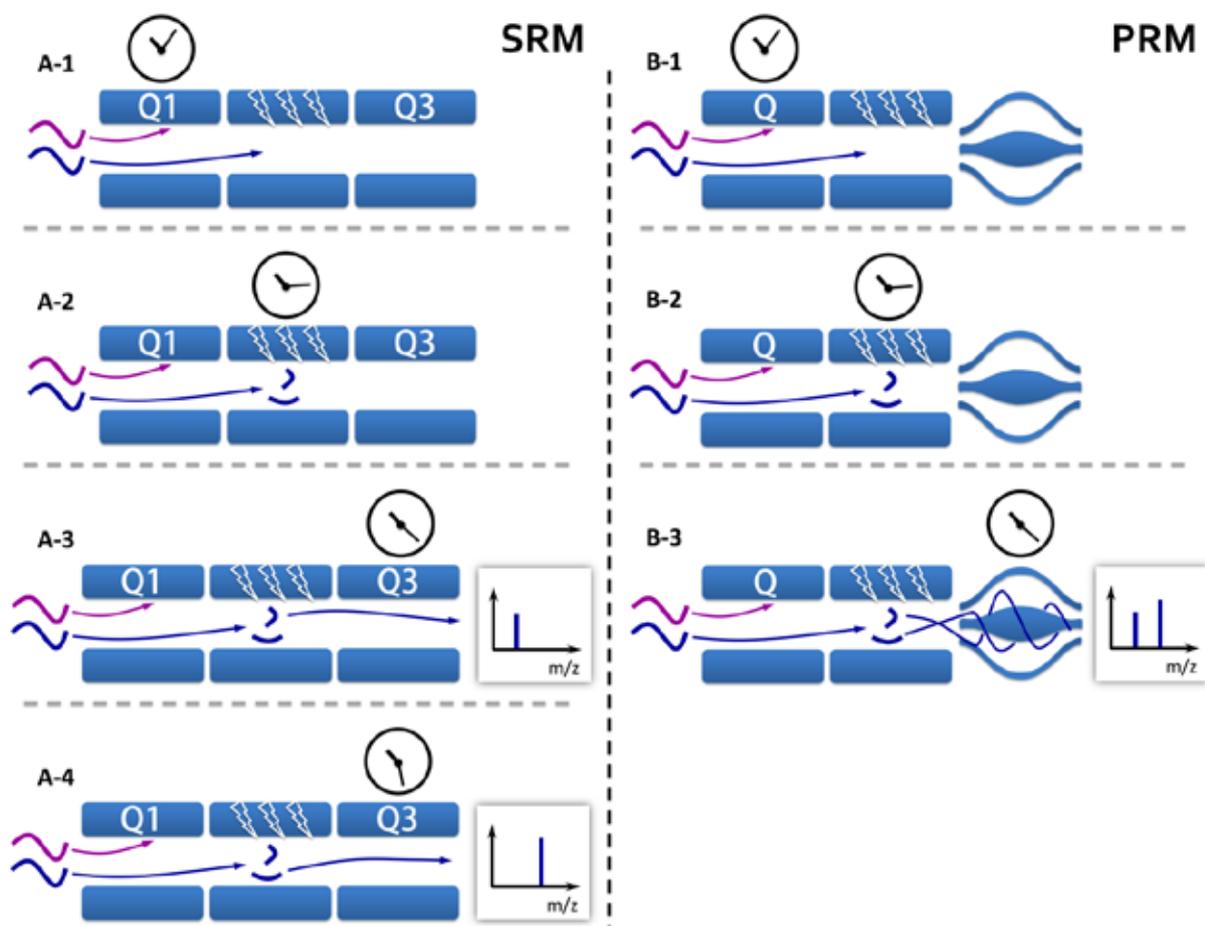


图3: QQQ质谱的选择反应检测法 (A系列), 与Q-Orbitrap质谱的平行反应监测法 (B系列)。

质谱监测是蛋白药物代谢定量分析的最后一环, 也是关键一环。目前通常采用两类质谱进行此类分析: 三重四极杆质谱 (QQQ) 与 四极杆-静电场轨道阱质谱 (Q-Orbitrap)。两种质谱分别使用选择反应监测质谱法 (Select Reaction Monitor, SRM) 与平行反应监测 (Parallel Reaction Monitoring, PRM) 质谱法。

QQQ质谱结构中串联了四极杆-碰撞池-四极杆三个主要部件。在SRM质谱方法中: 众多肽段经过色谱分离、离子化后, 进入第一个四极杆质量分析器中。在这里将只允许提前设定的, 接近指纹肽质量条件的离子通过,

离子在通过后立即进入碰撞池并发生碎裂。产生的碎片将进入后面的四极杆质量分析器, 只有符合预先设定的符合指纹肽碎裂特点的碎片离子才能通过, 并最终到达检测器产生质谱信号。通过两次质量选择, 指纹肽信号被从复杂的基质中分检出来, 其强度被用于定量 (图3) [5,7,8,9]。

Q-Orbitrap型质谱结构与QQQ质谱的最主要区别是, 最后端的质量分析器改为静电场轨道阱 (Orbitrap)。从信号扫描方式上看, 四极杆质谱在点时间上只能扫描一个信号值, 如果想扫描多个信号, 就需要在不同的信号域间不停地反复进行切换。而 Orbitrap 则可对

进入的所有离子同时进行高分辨、高准确检测。这是其质谱方法被称为平行离子监测的原因（图3）。QQQ进行SRM的主要特点是可进行超高频率的低分辨扫描；而Q-Orbitrap进行的PRM方法特点为可进行高准确、高分辨扫描，但扫描频率一般。

Amelia等详尽地对比了SRM与PRM的各项性能<sup>[6]</sup>。其中，在灵敏度、定量线性、重现性等方面两者没有差别，但PRM在选择准确性与定量范围上优于SRM，而SRM在定量精度上有优势。总体比较，而两者在定量能力上基本一致。但如果从实验流程的角度看，基于Q-Orbitrap的PRM方法还具独特的优点：PRM方法开发简单、时间短。这是因为SRM方法仅可允许个别碎片离子进入检测器，为了得到最好的效果，需要对所有候选的碎片进行选择优化。而PRM在检测中一次性记录了全部的碎片离子，省略了挑选碎片离子的方法开发过程<sup>[6]</sup>，并同时实现了定性与定量。还特别需要指出的是，Q-Orbitrap具有超高分辨优势，背景基质越复杂，其抗噪音能力越强于QQQ质谱<sup>[6]</sup>。显而易见，因为当背景杂质复杂程度加大时，近似内标肽段特性的干扰杂质将越多，而QQQ质谱只具备单位分辨能力（约几百ppm分辨能力），其对杂质的过滤作用就远不如具有高分辨能力的Orbitrap（小于5ppm分辨）质量分析器。

此外，由于Q-Orbitrap为超高分辨串联质谱，因此，除了可对特定多肽进行定量分析外，对于完整蛋白分子量测定、肽图及修饰、二硫键、寡糖及糖肽分析、宿主细胞残留蛋白鉴定与定量等众多分析项目都是Q-Orbitrap型质谱的分析强项。由于一台Q-Orbitrap具备

全面且强大的分析性能，使其性价比远远优于传统的使用Q-TOF与QQQ两台质谱来完成从蛋白表征到定量工作的组合<sup>[6,10-15]</sup>。

目前单抗类药物的给药量一般为1-10mg/kg，在血中的浓度从ug/mL到sub-ng/mL，因此其期望定量限可到sub-ng/mL水平。Mireia等采用附着生物素及抗抗体磁珠的免疫富集技术，使用微升液相与TSQ Vantage Triple Quadrupole质谱联用，实现了血清中7.03 ng/mL到450 ng/mL的单抗的定量<sup>[7]</sup>。Duan等使用纳升液相与TSQ Quantum Triple Quadrupole质谱联用，在血浆中实现了12.9 ng/mL至32.3 μg/mL的单抗定量范围<sup>[9]</sup>，在不同组织中达到了0.156至0.312 μg/g的单抗定量限<sup>[8]</sup>。Paul等在血浆中使用Q-Exactive Quadrupole Orbitrap质谱实现了Cetuximab单抗在血浆中从6.60到660 pmol/mL (19.8 to 1980 fmol on column)的定量<sup>[11]</sup>。Gu等使用PRM法测定大鼠血浆中人重组干扰素含量的实验中，实现了sub-ng/mL定量，定量范围达到6个数量级（图4）<sup>[15]</sup>。

简要说来，使用Q-Orbitrap进行蛋白代谢分析具有如下优点：

- 高灵敏度
- 宽线性范围
- 抗基质噪音能力强
- 同时定性定量
- 方法设置简单
- 无需方法优化

质谱技术可有效地解决ELISA方法做蛋白药物代谢分析时遇到的自身抗体干扰、定量范围窄、非特异性结合、交叉反应、以及免疫原性影响等问题。而且，随着质谱技术的

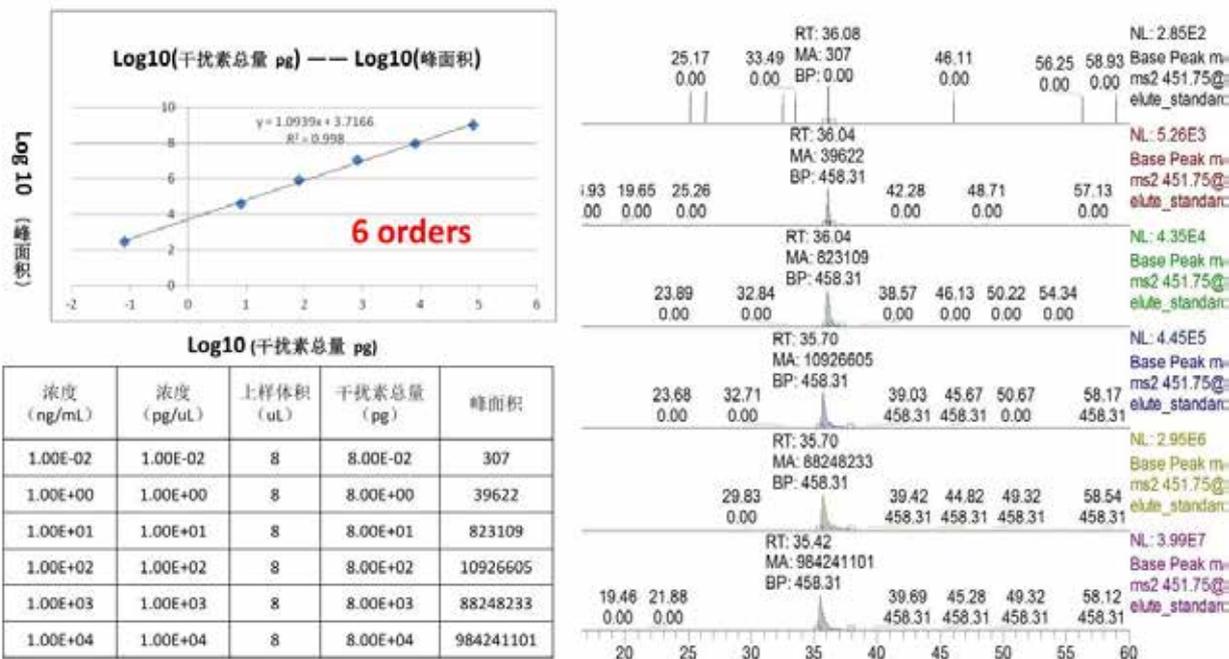


图4: PRM法测定大鼠血浆中人重组干扰素含量

不断发展，特别是以Orbitrap为代表的，性能高，稳定性好，操作简单的质谱的推广应用，以及更高灵敏度的三重四极杆质谱的推出，

加之纳升液相与免疫富集等方法的辅助，蛋白药物代谢分析即将进入全新的技术时代。

## Reference

1. Bioanalytical LC – MS/MS of protein-based biopharmaceuticals. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2013 Jun 15;929:161-79
2. Internal standards in the quantitative determination of protein biopharmaceuticals using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012 Apr 15;893-894:1-14
3. Developing a Method to Protect the Integrity of Racing Using Targeted SRM: Detection and Quantitation of rhEPO/DPO in Horse Plasma. *Application Note* from Thermo Fisher
4. Absolute Quantitation of Targeted Endogenous Salivary Peptides using Heavy Isotope-labeled Internal Standards and High-Resolution Selective Reaction Monitoring Mass Spectrometry. *Application Note* from Thermo Fisher
5. Towards absolute quantification of therapeutic monoclonal antibody in serum by LC-MS/MS using isotope-labeled antibody standard and protein cleavage isotope dilution mass spectrometry. *Anal Chem.* 2008 Jun 1;80 (11): 4200-7
6. Parallel Reaction Monitoring for High Resolution and High Mass Accuracy Quantitative, Targeted Proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2012 Nov;11(11):1475-88
7. Clinical Pharmacokinetic Assessment of an Anti-MAdCAM Monoclonal Antibody Therapeutic by LC-MS/MS. *Anal Chem.* 2012 Jul 17;84(14):5959-67
8. High-Throughput Method Development for Sensitive, Accurate, and Reproducible Quantification of Therapeutic Monoclonal Antibodies in

- Tissues Using Orthogonal Array Optimization and Nano Liquid Chromatography/Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2012 May 15;84(10):4373-82
9. Nano-scale liquid chromatography/mass spectrometry and on-the-fly orthogonal array optimization for quantification of therapeutic monoclonal antibodies and the application in preclinical analysis. *J Chromatogr A.* 2012 Aug 17;1251:63-73
  10. Multiplexing SIMs on a Novel Benchtop Orbitrap MS with a Quadrupole Mass Filter to Increase Sensitivity for Peptide Quantitation. *Thermo Application Note*
  11. Simultaneous Quantitation of a Monoclonal Antibody and Two Proteins in Human Plasma by High Resolution and Accurate Mass Measurements. *Thermo Application Note*
  12. Targeted proteomic quantification on quadrupole-orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics.* 2012 Dec;11(12):1709-23
  13. Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics.* 2011 Sep; 10(9): M111. 011015
  14. A Complete Workflow Solution for Intact Monoclonal Antibody Characterization Using a New High-Performance Benchtop Quadrupole Orbitrap LC-MS/MS. *Thermo Application Note*
  15. 应用 Target MS<sup>2</sup> 方法对大鼠血浆中人重组干扰素进行绝对定量的测试方案 *Thermo Application Note*

## 残留宿主细胞蛋白质的液质分析方法

目前针对重组蛋白质药物中杂质蛋白质的分类主要包含两种：1) 产品相关杂质 (Product-related impurities)；2) 过程相关杂质 (Process-related impurities) [1]。其中产品相关杂质主要是在生产和储存过程中产生，包括母药降解产物、聚合物、翻译后修饰 (脱氨、糖基化、二硫键错配、氧化等)，可通过肽图及修饰、寡糖分析，二硫键解析进行分析。而过程相关杂质主要包括宿主细胞蛋白质 (Host cell protein, HCP)、蛋白质纯化中用到的Protein A等。

重组蛋白质药物一般由哺乳动物细胞表达生产，生物制品中残留的宿主细胞蛋白质 (HCP) 作为外源蛋白质可能在不同程度上引发机体的免疫应答，最终导致过敏反应或其他不良反应，因此必须建立合适的检测HCP的方法监控生物制品的质量。认识残留HCP的风险、建立合适的残留HCP检测方法、控制生物制品的质量显得尤为必要。目前，国际上针对HCP的残留限量尚无统一标准，生物制药公司采用风险控制 (risk management) 来设置HCP的残留限量 [2]。美国 FDA 规定，用一种灵敏度较高的方法检测药品中的 HCP，其含量应该低于检测限 (通常小于100 ppm) [3]。国内来看，《中华人民共和国药典》2010年版三部规定CHO细胞残余蛋白质占总蛋白质含量的0.05%以下 [4]。这提示研发单位在这个研发周期中需要将HCP残留作为重要的质量控制项目。目前针对HCP分析的主要难点在于成分复杂，可能包含上千种残留蛋白质，其动态范围为4至5个数量级；另外，相对重组蛋白质药物，HCP含量较

低 (ppm级别)，对检测方法的灵敏度和动态范围要求较高。

宿主蛋白质检测方法不仅是保证生物制品安全有效的关键，也是生产过程控制和工艺优化的重要参数。目前，宿主蛋白质检测方法常用的HCP分析方法有十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、二维 (2D) 电泳、高效液相层析 (HPLC)、蛋白质印迹 (Western blot) 和酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等 [5]。其中，ELISA 仍然是相对应用较广泛的HCP检测方法，主要是由于其技术相对简单、灵敏度较高，并可提供数字化的定量结果，便于设定检测限度和建立技术规范。但是ELISA方法也存在一系列的缺点，比如动态范围较窄 (<100)，存在抗体交叉反应带来的结果误判，且开发周期长，费用高 (>\$100K)、失败风险高，商品化的试剂盒无法涵盖所有过程特异性的HCP无法发现由于工艺改变等引起的新出现的HCP蛋白质的等问题。

与传统的ELISA方法相比，液相色谱质谱联用 (LC-MS) 方法具有开发时间短 (只需几周)，可特异性地对所有HCP进行确证和定量，对所有杂质蛋白质无偏性检测，且方法动态范围高 (可达6个数量级)，方法调整快等优点。因此液质联用分析HCP已经成为业内关注的热点。但是，HCP实验面对的是蛋白质种类众多、复杂、样品丰度差异巨大的分析对象，并且需要获得蛋白质定性及定量的完整信息，因此对质谱硬件要求极高。但从另一方面看，HCP所面临的复杂体系蛋白质鉴定与定量任务，

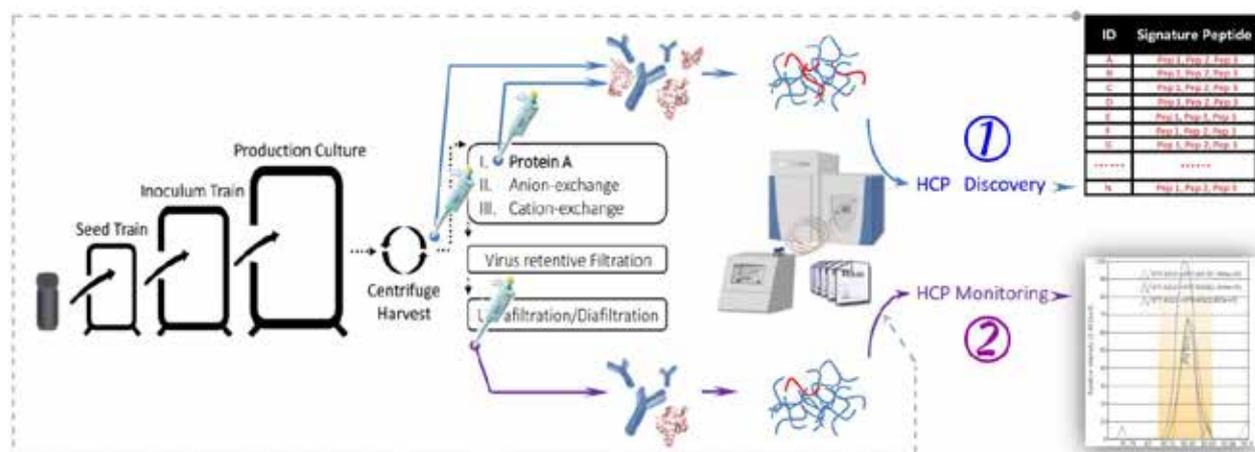


图1: HCP液质分析策略示意图

杂蛋白质组学中的大规模蛋白质鉴定与定量工作的分析任务完全一致。甚至，在蛋白质组学迅猛发展的十年间，实验人员已经对更为复杂的样本体系，如血浆、肝脏、脑、尿等进行了深入分析。因此，完全可以借鉴蛋白质组学积累的丰富的质谱使用经验。

在蛋白质组学研究中，静电场轨道阱 (Orbitrap)，是业内公认的分辨率高、质量精度高、灵敏度高、动态范围宽的质量分析器。其中Q Exactive是四极杆和orbitrap的组合质谱平台，其不但具有异常强大的蛋白质鉴定能力<sup>[6]</sup>，而且Q Exactive还彻底颠覆了传统对高分辨质谱定量能力不足的认识，第一次在一个仪器平台同时兼顾了卓越的定性与定量性能。而且其小巧的体积，简单的操作，维护便捷，使得高分辨质谱能够进入更多的实验室。

图1为单抗产品的HCP液质分析策略示意图。实验分为两个部分。首先是HCP的鉴定与初步定量。在这一步，为了降低实验难度，不需要使用已经完成所有纯化步骤的产品作

为样品，而是使用上游的半成品分析。其中，刚完成离心富集，以及刚经过Protein A纯化得到的中间产品是较为理想的分析对象。这是因为，这两个步骤的样品中，HCP的相对丰度较成品高，而利于HCP的鉴定发现。当获得HCP及其特征肽段的列表后，就可以使用这些信息进入第二步——HCP监控分析。在这一步，目标分析物为最终产品，并采用以对目标蛋白质进行精确定量为目标的定量质谱法——选择离子监控质谱法或平行反应监测质谱法。

在HCP鉴定发现步骤中，主要采用DDA (Data Dependent Acquisition) 质谱法进行蛋白质的鉴定，一级采用全扫描模式，二级谱图根据一级谱图中不同质荷比离子的强度信息 (Top N) 依次进行触发。Q Exactive采集速度高达12Hz，具有极佳的蛋白质鉴定能力。Matthew等以酵母细胞为分析对象，在四小时的分析时间内，Q Exactive可同时鉴定到4,206个蛋白质，动态范围达5个数量级，并且可鉴定到丰度极低的蛋白质 (less than 50 copies/cell)<sup>[7]</sup>。其高通量、宽动态范围、高灵敏度的特点非常适合于重组蛋白质药物中

杂质蛋白质的高通量定性要求。另外，可利用一级质谱图中杂质蛋白质特征肽段的峰面积进行相对定量，这样就可同时完成杂质蛋白质的鉴定和定量。定量方法如iBAQ蛋白绝对定量算法。此方法将所有蛋白多肽的质谱响应强度加权平均，并利用48种标准浓度蛋白测定的校正曲线自动校准，最终获得样本中蛋白的绝对含量，动态范围可达6个数量级相应工作已于2011年发表在了Nature主刊中<sup>[8]</sup>。免费的MaxQuant蛋白分析软件内置了iBAQ定量功能，可以轻松、精确地获得目标蛋白在样品中的相对丰度。

在残留宿主细胞蛋白质分析的第二步（对已鉴定的HCP进行目标监控与定量）实验中，平行反应监测法（PRM）的表现更为突出。PRM法是基于Q Exactive基础的目标蛋白质定量方法。它不但具有高灵敏度、宽线性范围、

抗基质噪音能力强、同时定性定量、方法设置简单、无需方法优化等性能优点<sup>[9]</sup>。加之仅在一个Q Exactive平台就可完成HCP的全部分析任务。因此还具有了高性价比的经济优势。在HCP的质谱分析实例中，Katrin等人使用Orbitrap型质谱监控重组蛋白质药物纯化过程中宿主蛋白质的变化，并在最终药物中鉴定到多种低丰度的宿主蛋白质，对蛋白质纯化方法的优化具有重要参考意义<sup>[10]</sup>。

综上，Q Exactive在一个仪器平台上实现了重组蛋白质药物宿主细胞蛋白质的发现鉴定及定量监测要求，并与专业蛋白质解析软件组成蛋白质药物杂质蛋白质分析完整解决方案，技术流程简单、成熟、通过了大量的高水平研究与实践，非常适合生物制药企业在研发周期中将其作为残留HCP质量控制的质谱分析平台。

## Reference

1. Conference on Harmonisation; Draft guidance on specifications: Test procedures and acceptance criteria for biotechnological l/biological products—FDA. *Notice. Fed. Regist.* 1998;63, 31506–31513
2. Host cell protein analysis in therapeutic protein bioprocessing –methods and applications. *Biotechnol. J.* 2013; 8, 655–670
3. 生物技术药物残留宿主蛋白检测方法的研究进展 *中国生物制品学杂志* 2008;21(9),830-832
4. 国家药典委员会 中华人民共和国药典2010年版三部 2010
5. 系统生物学在生物制品宿主细胞蛋白检测中的应用 *国际生物制品学杂志* 2010;33(5),260-263
6. Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics.* 2011 Sep; 10(9): M111. 011015
7. Systems-wide perturbation analysis with near complete coverage of the yeast proteome by single-shot UHPLC runs on a bench-top Orbitrap. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11(3) M111.013722
8. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature.* 2011 19; 473 (7347): 337-42.
9. Parallel Reaction Monitoring for High Resolution and High Mass Accuracy Quantitative, Targeted Proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2012 Nov;11(11):1475-88
10. Identification and Monitoring of Host Cell Proteins by Mass Spectrometry Combined with High Performance Immunochemistry Testing. *PLOS ONE* 2012; 8(11), 1-11

## 非变性质谱在ADC及单抗糖基化分析中的应用

非变性质谱即天然质谱法（Native Mass Spectrometry），是一种用于分析蛋白高级结构的质谱方法。使用这种方法，不改变蛋白高级结构，因此可获得分析物在天然状态下的结构信息<sup>[1]</sup>，这是Native MS的在蛋白药物分析中的第一个重要特性：非变性分析特性。之所以可以保持蛋白的天然结构，一方面是因为在Native MS分析中，避免了乙腈等有机溶剂的使用，而是采用乙酸铵中性缓冲溶液；另一方面，在离子化时，为了避免了高温及高电压条件，而采用了如纳升静态喷雾等柔和的离子化方式<sup>[2]</sup>。

相对于常见的变性质谱法，在Native MS的原始质谱数据中，蛋白的离子信号移动到了更高的质荷比区域。这是由于在常见的全蛋白分子量测定中（变性质谱法），蛋白在含有乙腈的缓冲液及高温高电压的离子化条件下，其高级结构被破坏，而伸展开来，暴露出了更多的可结合H<sup>+</sup>的部分，因此携带了更多的电荷。对于单抗来说，采用变性质谱法，

其质荷比主要分布于2000m/z至4000m/z，而Native MS条件下，则分布于5000m/z至7000m/z区域（图1）。从图一可以看出，在Native MS图谱中，不但信号的分布区域位于高质荷比区，更重要的是，由于所带电荷数减少，信号分布变得疏离。在复杂样本分析时，疏离的信号分布会降低信号相互覆盖的可能性。这是Native MS在蛋白药物分析中的第二个重要特性：简化图谱特性。

在单抗药物相关分析中，Native MS的非变性分析特性，被用于Cystine Linked ADC（利用还原二硫键形成的抗体-药物偶联物）以及抗体-抗原结合等分析；而Native MS的简化图谱特性则被可用于糖基化定量、双功能抗体、混合抗体等分析项目中。

由于Native MS中样品的质荷比远远高于常见的质谱信号，因此要对质谱硬件进行特殊设计。最新问世的Exactive Plus EMR™质谱，是以超高分辨质量分析器Orbitrap(静电场轨道

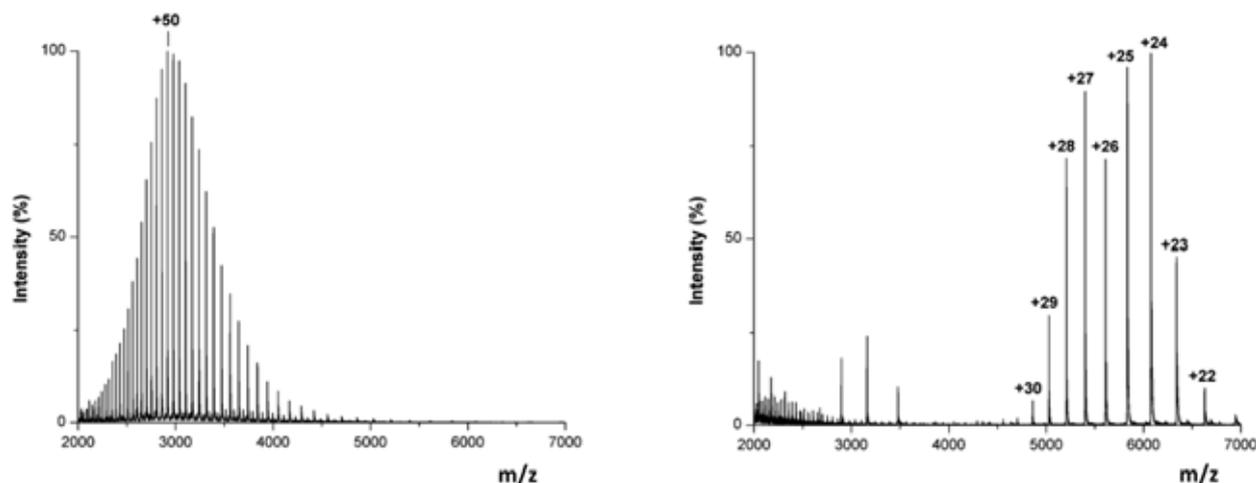


图1:单抗的变性质谱（左）及非变性质谱（右）谱图<sup>[6]</sup>

阱)为基础的, 专为Native MS分析需求所设计的一款仪器, 其质荷比范围可覆盖至20000m/z。Exactive Plus EMR以其超高分辨率、信号基线分辨能力以及超强的稳定性, 不但被广泛应用在蛋白药物分析, 甚至在分子量高达80万Da的蛋白复合体分析中都被采用<sup>[3]</sup> (图2)。

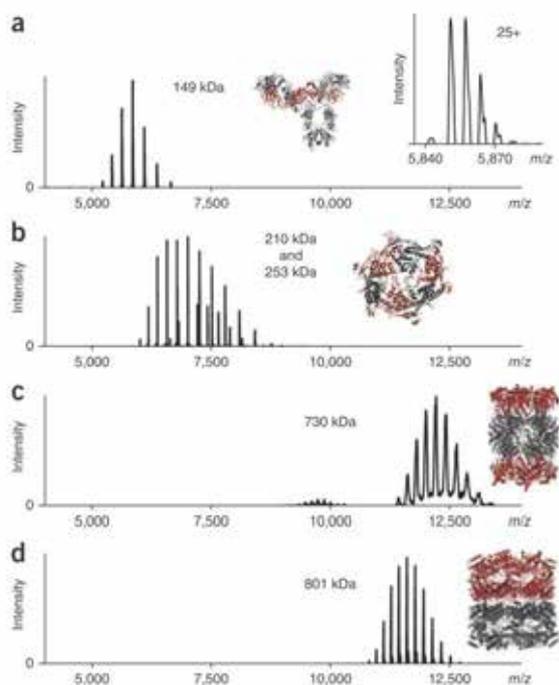


图2: Orbitrap分析大质量蛋白及复合体<sup>[3]</sup>

除高质荷比范围采集能力外, 去除粘附在蛋白上的溶液分子及金属离子也是提高Native MS图谱质量的必要条件。粘附分子或离子的存在会造成蛋白质量变大的假象<sup>[4]</sup> (图3), 从而影响分析准确度。Exactive Plus EMR在离子源以及HCD碰撞池, 为去除粘附分子及离子做了独特的专门化设计<sup>[3]</sup>。不同于其他的高分辨质谱, Exactive Plus EMR允许用户设置一定的HCD碎裂能量以去除粘附分子及离子; 同时, 特有的EMR mode具有Automatically HCD Gas

Control 功能, 可对HCD碰撞池中的N<sub>2</sub>气压进行调节。在Exactive Plus EMR上通过协同优化源内裂解能量、HCD碎裂能量和HCD gas control三个参数, 可尽可能多地除去粘附分子及离子。

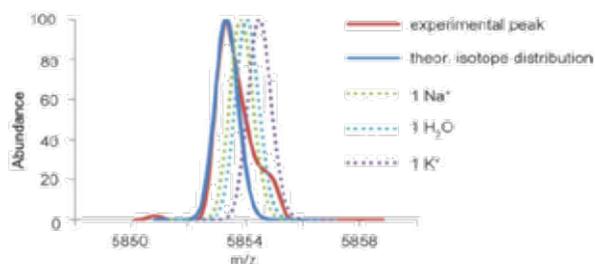


图3: 粘附分子对测量蛋白质量的影响<sup>[4]</sup>

随着单抗药物市场竞争及应对抗体抗药性的需求, 单抗-药物偶联物 (Antibody Drug Conjugate, ADC) 类药物已经成为新型抗体药物开发的一个重要方向。在各种ADC药物中, 通过还原单抗二硫键, 将小分子药物连接到半胱氨酸巯基上而形成的Cystine Linked ADC药物, 由于其较好的结构均一性及更稳定的化学连接形式, 已经成为ADC药物开发的最重要方向。但是, 由于负责连接轻、重链的二硫键被打开, 单抗内各链间依靠非共价结合, 因此, 此类ADC药物的高级结构稳定性差。如果采用常规的质谱方法分析其DAR值 (Drug Antibody Ratio), 各链会发生分离, 导致分析失败。而Native MS的非变性分析特性, 正适用于此。图4为Cystine Linked ADC药物Adcetris进行DAR分析的原始质谱数据 (Adcetris是FDA于2011年批准的用于治疗霍奇金淋巴瘤以及复发性间变性大细胞淋巴瘤ADC药物)<sup>[4]</sup>。图中分别展示了去糖基化与保留糖基化非变性质谱数据, 可以看到, 即使是在样品复杂程度巨大

的含糖链ADC药物的图谱，含相同小分子药结合数量的单抗信号也都被清晰分辨，这就为DAR值的准确计算打下了坚实的基础。

Native MS在单抗寡糖的含量测定分析中具有独特的角度与优点（图5）。在常见的分析方法中，首先是将糖链通过糖苷酶将寡糖从蛋白中释放出来。被释放的寡糖将通过多步处理，使其连接荧光基团。荧光基团的加入是因为寡糖本身无光谱吸收，且离子化效率非常低，不利于质谱分析。标记荧光基团后，可使用荧光检测器分析，并提高其质谱分析的离子化效率。但是荧光标记必须经过多步复杂的样品处理操作，整个实验时间也需要约2天时间。因此此种方法具有工作效率

低，实验成本高，操作难度大等缺点。如果操作经验不足，易造成重现性差等问题。特别是对于含有唾液酸的寡糖，在样品处理时容易丢失，造成实验分析失败。此外，在连接了荧光基团的寡糖中，荧光基团只占了非常小的一部分，对其寡糖离子化效率的提升有限。这也是寡糖在进行液质分析时，采用液相-荧光检测-质谱检测的原因（荧光信号主要负责定量，质谱信号主要负责定性）。既然荧光标记法具有如此多的不足之处，为何其在单抗的寡糖分析中仍被广泛应用？归根结底，无非是因为想克服寡糖检测信号的问题。而单抗上的寡糖其实天然地携带了一个可提升信号的标记基团——抗体肽链部分。抗体分子量近15万Da，而糖链分子量仅为3-4千

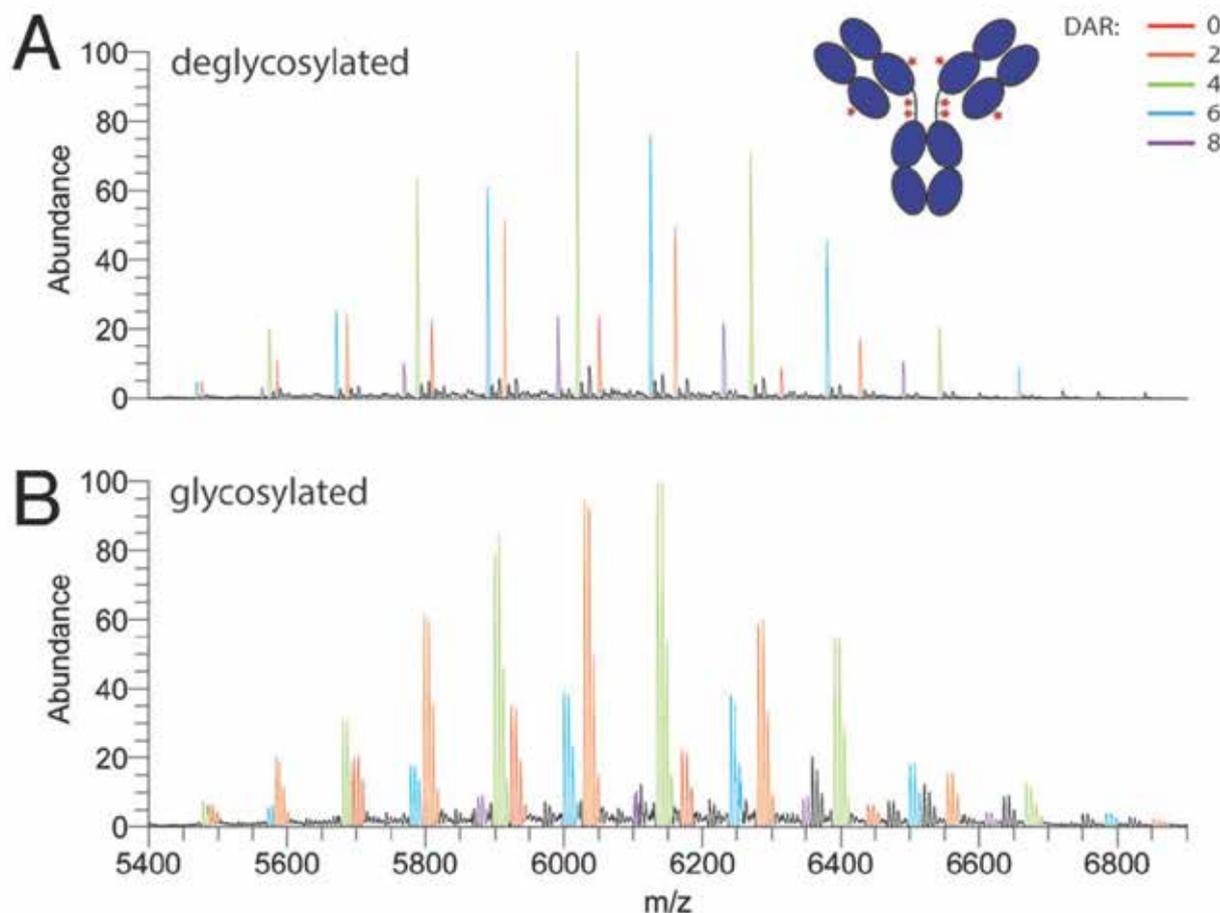


图4: Cystine Linked ADC药物Adcetris 质谱图<sup>[4]</sup>

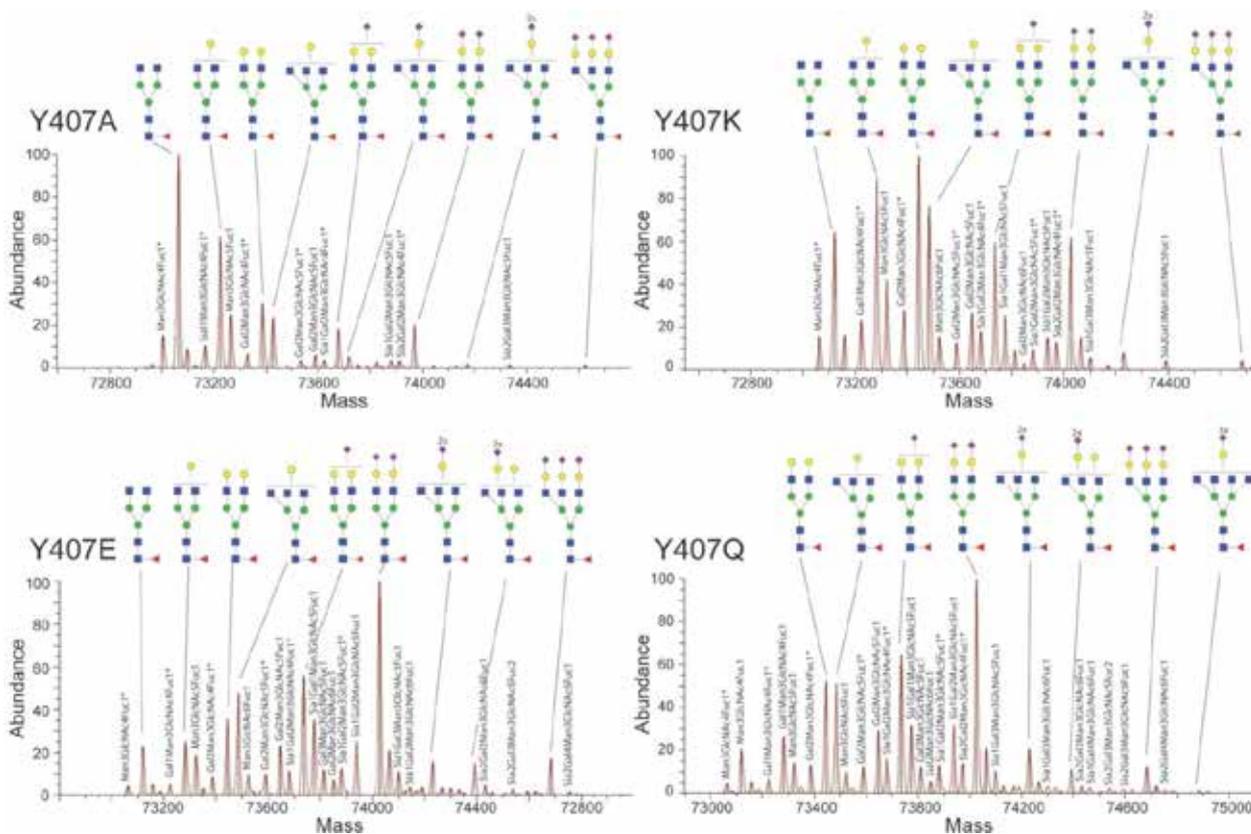


图5：使用Orbitrap在非变性条件下，分析单抗重链糖基化形式<sup>[4]</sup>

Da左右。因此在质谱分析的离子化过程中，单抗的肽链将起到决定性作用。Rosati等的研究，有力的证明了这一点：唾液酸含量是寡糖离子化最大的影响因素，唾液酸越多，寡糖离子化越差，因此会造成不同组成糖链的离子化效率不同，从而造成巨大的寡糖定量分析误差。Rosati等发现，对于单抗，采用Native MS分析，在去除唾液酸前后，其定量结果相同<sup>[4]</sup>。这就证明，在Native MS条件下，唾液酸对抗体离子化效率没有影响，可以得到更为准确的定量结果。除避免了由于离子化效率的影响，Native MS不需要复杂的实验操作，从而极大地提高了实验的重现性和准确度。此外，整个实验时间也大幅缩短，大大提高了工作效率。在应用Native MS对单抗寡糖准确定量的背后，包含了Native MS的简

化图谱特点：Native MS疏离的信号分布会降低不同糖型信号间相互覆盖的可能性，高质量的原始质谱数，是寡糖准确性与定量的保证。类似的应用还有难度更大的混合抗体分析等<sup>[5]</sup>。在Natalie等人的工作中，采用以Orbitrap为基础的Native MS分析15个单抗混合物，并对其定量分析，最大定量分析误差（标准差）仅为1.14%<sup>[5]</sup>

借用生物质谱领军人Heck在2012年Nature Methods上的一段话作为结尾“我们相信，以Orbitrap质谱分析器为基础的非变性质谱法，将会对结构生物学、生物化学、系统生物学、蛋白相互作用网络研究，特别是生物药物表征分析等多个领域产生巨大的影响”<sup>[3]</sup>。

## Reference

1. Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology. *Nat Methods*. 2008 Nov;5(11):927-33
2. Performing Native Mass Spectrometry Analysis on Therapeutic Antibodies. *Methods*. 2014 Jan 1;65(1):11-7
3. High-sensitivity Orbitrap mass analysis of intact macromolecular assemblies. *Nat Methods*. 2012 Nov;9(11):1084-6
4. In-depth qualitative and quantitative analysis of composite glycosylation profiles and other micro-heterogeneity on intact monoclonal antibodies by high-resolution native mass spectrometry using a modified Orbitrap. *mAbs* 2013 November/December 5:6, 917–924
5. Complex mixtures of antibodies generated from a single production qualitatively and quantitatively evaluated by native orbitrap mass spectrometry. *mAbs* 2014 January/February 6:1, 1–7
6. Native intact mass determination of antibodies conjugated with monomethyl Auristatin E and F at interchain cysteine residues. *Anal Chem*. 2012 Mar 20;84(6):2843-9

## 超高分辨质量分析器——静电场轨道阱 Orbitrap 简介

Q Exactive质谱硬件结构图如下图1。分析物在Ion Source中经过离子化后，将依次进入四极杆质量分析器(Quadrupole)、C形阱(C-Trap)，以及静电场轨道阱(Orbitrap)。如果需要采集碎片，还将在进入Orbitrap前在高能碰撞池(HCD Collision Cell)中进行碎裂。Orbitrap的功能是进行高精度质量扫描。其不但有高达140,000的超高分辨(顶级ESI-TOF的分辨率一般为50,000左右)与高精度性能，更具有超强的稳定性。如果您询问有Orbitrap使用经验的朋友使用感受，最常听到的一定是“稳定”这两个字。Orbitrap是如何赢得出众的稳定性口碑呢？主要有以下几点原因：

1) 当您看到图1中Q Exactive图的结构时，您可能会惊讶的发现——Orbitrap的体积竟然如此“娇小”。确实Orbitrap质量分析器的内

径与日常使用的硬币差不多。而小的体积正是Orbitrap具有超强稳定性的一个关键因素。我们知道，质谱是必须在高真空下工作的，真空度越好，灵敏度、分辨率、准确度越高。高真空度需要机械泵、分子涡轮泵等一些类真空维持系统的间断高强度工作来实现。Orbitrap仅有TOF体积的几分之一甚至更小，这就极大地降低了真空维持系统的工作压力，从而极大地降低了故障率。

2) Orbitrap的超强稳定性还源于其数据记录模式。从表面看，Orbitrap与TOF的采集频率都为几十赫兹。但实际上，TOF的离子飞行是在纳秒级完成的。但由于单张图谱的信号过于微弱，最终直观看到每一张TOF质谱图都是由上百张图谱叠加而成。不间断地纳秒级数据产出，造成了TOF数据记录系统的巨大的

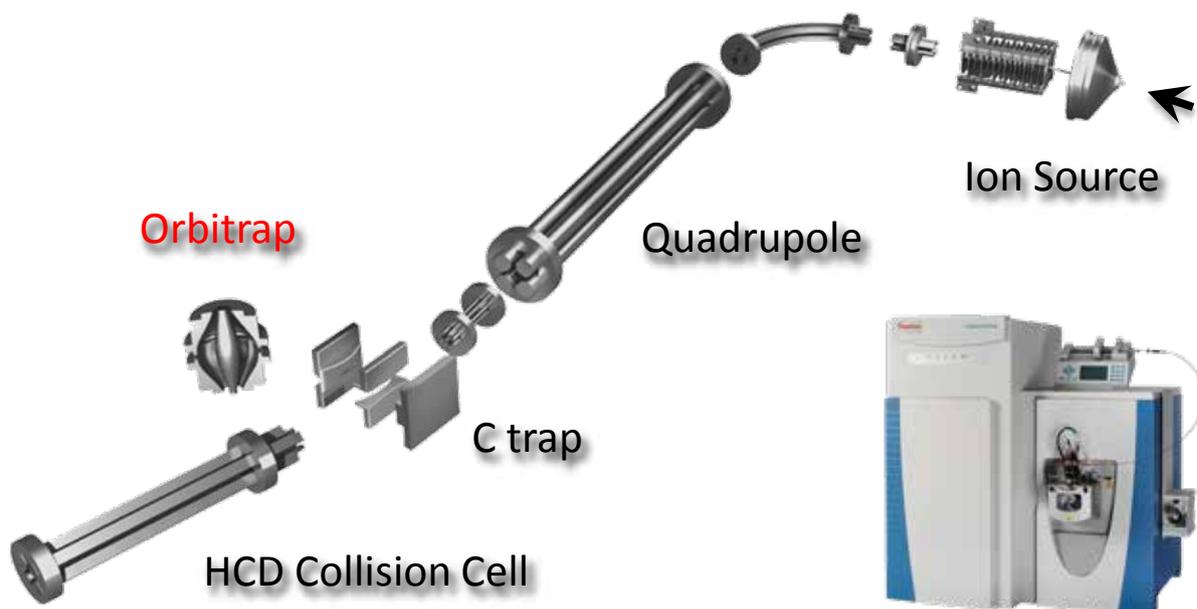


图1： Q Exactive 外观及主要结构示意图

工作压力，这是TOF系统容易在数据采集时发生文件损坏的重要原因。相比之下，Orbitrap采用傅里叶变换算法采集处理数据，数据记录系统的工作强度为毫秒级，因此也具有了更好的系统稳定性。

3) TOF是以离子到达检测器时间差来分辨离子的，这个差别需要精确到皮秒 ( $10^{-12}$  S) 甚至更低。因此环境温度的一点点变化所引起的飞行管金属部件微小的热胀冷缩都会导致飞行距离的改变，以至于巨大地影响离子到达检测器的时间。正因为此，在TOF类仪器设计时，需要用到复杂的温度补偿校正，以及外标或内标的添加。而无论是补偿校正还是标准品添加，都需要通过安装一系列硬件和软件来实现。我们知道，一个仪器组件越多，整体出现故障的概率就越大，所以这也大大地影响了TOF的稳定性。而Orbitrap不存在这些问题，并可在更为宽松的环境条件下保持高稳定性，并且无额外部件引起的故障问题。

以上是从仪器构造及采集方式上比较Orbitrap与TOF的稳定性差异，那么实际中呢？图2中为近年来Nature、Science、Cell系列刊物使用Orbitrap发表论文的数量——达到了惊人

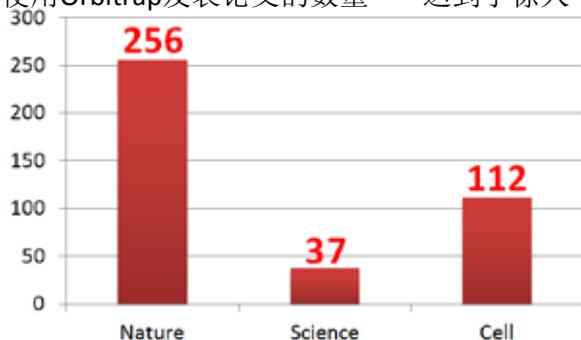


图2：2011-2013 Nature/Science/Cell系列刊物使用Orbitrap发表的蛋白质分析论文统计

的2-3篇/天。我们知道，作为科学领域的顶级刊物，这三个系列期刊对稿件质量要求极高——不但要求数据精准，更要求大量实验的反复验证。如此高频率地顶级文献发表，正证明了Orbitrap面对海量分析任务时，在满足高数据质量的要求下，表现出了超强的稳定性。而稳定性对于生物医药企业成本风险控制的重要性是不言而喻的。

当然，稳定只代表仪器的耐用性，对于仪器性能方面，Orbitrap是否同样能带给分析人员惊喜呢？答案是肯定的。从上面提到的在Nature、Science、Cell系列顶级刊物中，Orbitrap的高频使用率就可见一斑。更为直观的是当对比图谱数据，特别是当比较Orbitrap与TOF二级碎片质谱图谱时，可以发现Orbitrap的碎片信息更为丰富和清晰。这一方面是由Orbitrap的超高分辨能力，以及与之相伴的高准确度所带来的。另一方面，Orbitrap的高灵敏是又一重要原因（高灵敏度是获得高信噪比与高分辨率数据的重要基础）。Orbitrap系列质谱出众的灵敏度源于以下几个因素的综合作用。

1) 如前所述Orbitrap的腔体体积仅为TOF的几十分之一甚至更低。这不但减轻了维持系统的工作压力，更利于获得超高的真空度。相比TOF，Orbitrap内的真空度为 $10^{-10}$ mBar量级，而TOF为 $10^{-6}$ 至 $10^{-7}$ mBar。无论是Orbitrap还是TOF质量分析器，离子在其腔体内进行检测时，都存在待分析离子与残留气体分子碰撞而造成离子损失，从而导致灵敏度降低。相比之下Orbitrap具有高达三个数量级的真空度优势，离子损失大大减少，成为其获得更高灵敏度的重要原因之一。

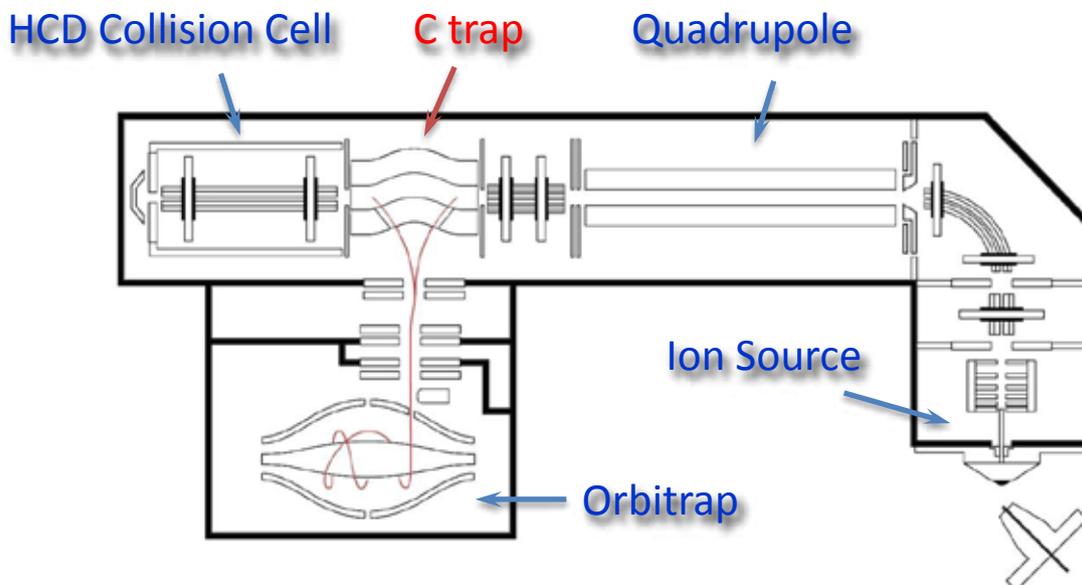


图3: Q Exactive 结构示意图

2) 从仪器结构看, 在Orbitrap系列质谱中, 还存在了一个在TOF类质谱中并不具备的组件——C trap (图3)。C trap组件除了负责向Orbitrap传递离子外, 其还有一个重要的功能: 蓄积离子。在离子进入Orbitrap之前, 先要有C trap对离子进行“点数”。如要对某特定肽段进行分析时, C trap会将此肽段的离子数积蓄到一个设定的数量(如 $10^6$ 个离子)后再传递给Orbitrap。也就是说通过C trap实现了离子浓度的提高。这无疑对高灵敏度起到了巨大的贡献, 这种优势在获取真实样本中的低浓度离子的二级碎片信息上表现地更为明显。而TOF质量分析器, 不能使用类似于C trap的技术将离子大量聚集, 提高离子浓度。这是因为: 1) 在TOF分析起始的瞬间, 不同的离子需要聚中压平在一起, 也就是说需要浓缩在一个极小的空间内, 这样才能保证各种离子在同一个起跑线上, 具有尽可能相同的飞行距离。但由于离子具有同性电荷相互排斥的问题, 因此TOF无法在分析时大量蓄积离子后再做分析; 2) 由于TOF检测器采用

碰撞检测的方式, 大量离子的同时到达很容易造成检测器过饱和, 造成飞行时间计算误差。这是TOF不能通过大量蓄积离子提高灵敏度的又一个原因。

此外, Q Exactive质谱并不存在离子阱质量分析器的“三分之一效应”问题。三分之一效应是指离子阱对某个特定离子进行碎裂

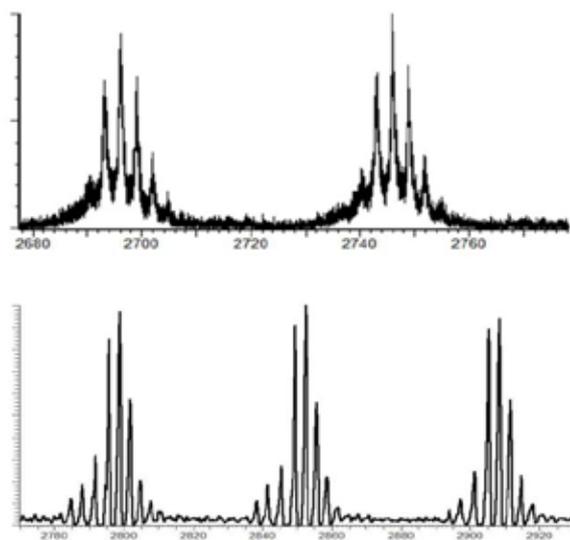


图4: TOF (上) 与 Orbitrap (下) 采集单抗全分子量原始质谱对比图。

并进行碎片质量测量时，碎片质量在母离子质量前三分之一范围内的碎片将无法被记录。这在肽段分析中将可能导致丢失肽段的b1、b2、y1、y2等小质量碎片。而Orbitrap系列质谱，采用了在HCD碰撞池（High Collision Energy Collision Cell）中进行碎裂，在Orbitrap中完成质量扫描的方式。在碎裂及质量扫描的过程中都没有离子阱的参与，因此无三分之一效应。事实上，通过PQD和Trap-HCD技术（Pulsed - Q Dissociation），Thermo也已经解决了离子阱质谱的三分之一效应问题。

3) 信噪比是与灵敏度相辅相成的，而在信噪比指标上，Orbitrap同样具有先天优势。图4是在完整蛋白分析时，TOF与Orbitrap的原始数据对比图。可以发现即使在两者的分辨率近似的数据中，Orbitrap获得了更高的信噪比及图谱质量。这是因为目前最普遍采用的质谱分辨率的计算方法是使用质谱峰的质荷比值除以其峰高一半处的峰宽。如某离子测得质荷比为1000m/z，其质谱峰峰高的一半处峰宽为0.1m/z，则其分辨率为10 000。可以看出在这种公认的质谱分辨率计算方法中，只考虑了质谱峰高一半处的图谱质量，而对更接近信号基线的图谱质量不作考量。而在这一点上正是Orbitrap能够产生卓越的图谱质量的关键因素之一：高信噪比。相似的分辨率，不同的图谱质量是由什么原因造成的呢？当有物质撞击TOF质量分析器飞行管的末端的检测器时，一个信号将被记录。这里需要指出的是，不仅是离子，中性杂质分子的撞击同样会产生信号。观察任何一个ESI-TOF类串联质谱就会发现，在此类质谱结构中，含有多个转弯结构。这些转弯结构最重要的作用

就是在转弯处甩出中性分子，避免对检测器的干扰，否则将会对信噪比产生巨大的影响。（虽然在Orbitrap质谱中也有转弯设计，但这些转弯主要是为了减小仪器长度、简化清洗操作而设计的，并不必考虑中性分子对检测信号信噪比的影响。）这个优势是由Orbitrap检测原理所带来的。当离子进入Orbitrap腔体中，同类离子将发生同步化旋转，根据电磁效应，离子旋转将产生磁场，产生的电磁信号被检测器记录，不同离子电磁信息特征不同，因而被分辨。显而易见，中性分子是不能产生离子那样的电磁效应的，因而不会造成干扰，而使Orbitrap具有更好的信噪比。这是在相近分辨率情况下，Orbitrap之所以能更有效地实现质谱信号基线分辨，获得更高质量质谱数据的一个重要原因。

读到这里，您可能想到了一个词“两全其美”。是的，Orbitrap系列质谱实现了超强稳定性与卓越的性能的统一。于是水到渠成，Orbitrap系列质谱已经成为蛋白质质谱分析领域市场占有率最高的质谱品牌。Orbitrap于2005年推出，恰逢蛋白质组学爆发拐点。十年间，Orbitrap经受住了蛋白质组学表达谱、修饰谱、定量蛋白质组学、结构蛋白质组学，以及糖组学等严酷分析需求的琢磨与考验。这些领域的工作内容不但完全覆盖了蛋白质物质谱分析的所有需求，在分析难度上更是远远超出——蛋白质组学的分析目标蛋白数少则数百多则至万。因此，无论是全蛋白分子量测定、肽图分析、修饰定量、二硫键发现、糖基化解析等针对蛋白药物自身结构的表征分析，还是代谢定量、杂质蛋白鉴定等复杂背景中的质量研究，Orbitrap通过长达十

年的方法开发与经验积累，已经完全具备了各种蛋白质药物所需的全部质谱分析方法与解决方案。并在与其它类型高分辨质谱的比较中表现出了极大的应用优势。

稳定的品质、卓越的性能、全面的应用，Orbitrap的这些优点，无疑会为身在激烈的产业竞争环境中的使用者提供最为有力、最具保障的支持。

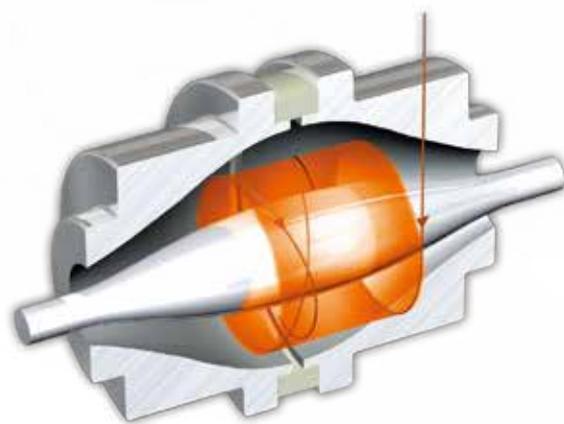
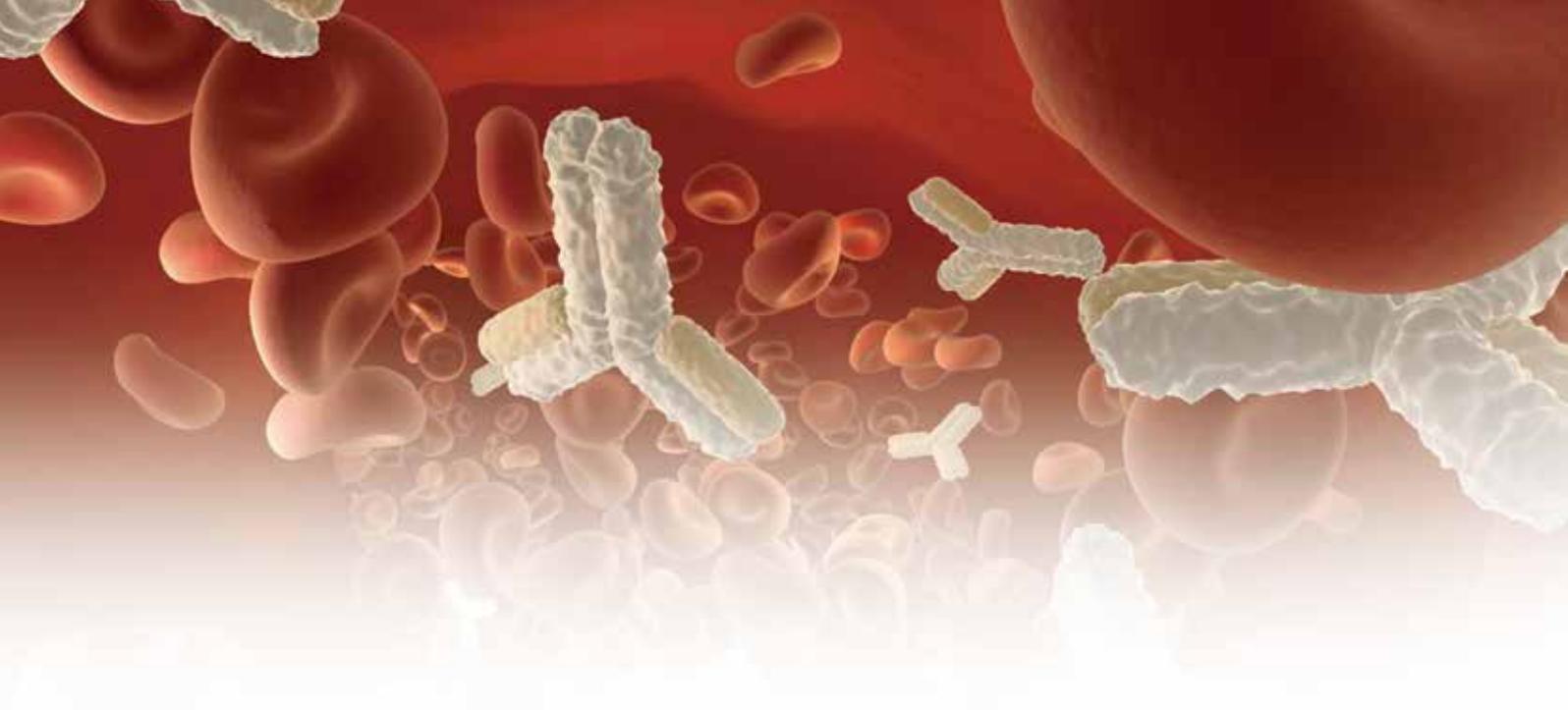
## Reference

1. Parts per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer via Lock Mass Injection into a C-trap. *Mol Cell Proteomics*. 2005, 4(12):2010-21
2. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry. J Mass Spectrom*. 2005, 40(4):430-43.
3. Performance Evaluation of a Hybrid Linear Ion Trap/Orbitrap Mass Spectrometer. *Anal. Chem.*, 2006, 78 (7), 2113–2120
4. *Dynamic Range of Mass Accuracy in LTQ Orbitrap Hybrid Mass Spectrometer. J Am Soc Mass Spectrom*. 2006,17(7):977-82
5. *Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. Mol Cell Proteomics*. 2011, 10(9): M111. 011015
6. Novel Parallelized Quadrupole/Linear Ion Trap/Orbitrap Tribrid Mass Spectrometer Improving Proteome Coverage and Peptide Identification Rates. *Anal. Chem*. 2013, 85 (24), 11710–11714

本册编者：

贾伟、张伟、李静、张晓夕、周岳、顾培明、聂爱英、唐佳

email: Jerry.jia@thermofisher.com



精确 稳定

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

免费服务热线: 800 810 5118  
400 650 5118 (支持手机用户)

**ThermoFisher**  
S C I E N T I F I C