

利用 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶快速酶切分析中国仓鼠卵巢细胞表达的西妥昔单抗抗原结合区的聚糖比例

程倩, 贾戴辉, 张博慧, 许俊彦*, 邵喆*, 黄应峰, 邹洵

(宝船生物医药科技(上海)有限公司, 上海 201203)

摘要:西妥昔单抗具有较复杂的糖基化修饰,在抗原结合片段(Fab)和可结晶片段(Fc)的重链上都含有2个N-糖基化位点,其中Fab段的糖基化最为复杂,要研究清楚该位点的糖基化修饰,开发专一性切糖技术和稳定的聚糖比例分析方法是当前迫切需要解决的难题。以中国仓鼠卵巢(CHO)细胞表达的西妥昔单抗为研究对象,使用 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(Endo F2)开发了一种快速Fab段聚糖释放的方法,利用超高效液相色谱-高分辨质谱(UPLC-HRMS)进行了定性和聚糖比例分析。第一步对抗体原液进行非变性酶切,抗体原液经超纯水稀释后,加入糖苷酶Endo F2进行酶切,通过质谱对质量数的解析,结果表明Endo F2酶切时间5 min, Fab段的聚糖就能完全切除,而Fc段的聚糖不受影响,实现了快速酶切,而且切糖具有很好的专一性。第二步对Fab段聚糖进行比例分析,将释放的聚糖经对氨基苯甲酰胺(2-AB)荧光标记后使用超高效液相色谱联用荧光检测器(FLR)进行检测,在亲水作用色谱(HILIC)柱上得到良好的分离并可以进行稳定地聚糖比例分析。3次独立试验结果表明,酶切后的质谱图基本一致,且聚糖的比例结果也基本一致,表明Endo F2酶切方法和聚糖比例分析方法都具有较好的稳定性和可靠性。此外,通过测定来自两个不同工艺生产的样品,数据显示两者的糖谱上具有非常明显的差异,表明利用开发的方法可以实现对抗体生产工艺进行监测研究,对抗体生产工艺的评估具有非常重要的意义。

关键词:超高效液相色谱;高分辨质谱;糖基化;糖苷酶;西妥昔单抗

中图分类号:O658

文献标识码:A

文章编号:1000-8713(2022)02-0175-07

Analysis of glycan ratio of Chinese hamster ovary cell-cetuximab antigen-binding segment via rapid enzyme digestion with endo- β -N-acetylglucosaminidase F

CHENG Qian, JIA Daihui, ZHANG Bohui, XU Junyan*, SHAO Zhe*, HUANG Yingfeng, ZOU Xun

(Dragonboat Biopharmaceutical (Shanghai), Co., Ltd, Shanghai 201203, China)

Abstract: The N-glycosylation of proteins is a typical post-translational modification. Compared with other monoclonal antibodies, N-glycosylation modification in cetuximab is more complicated. Because cetuximab contains two N-glycosylation sites, one is located on the antigen-binding fragment (Fab) and the other is on the crystallizable fragment (Fc) of the heavy chain (HC). Among the two, the glycosylation of the Fab segment is more complicated. As this segment is located in the hypervariable region (VH), it may affect the affinity of the antibody antigen and cause other issues. Therefore, it is necessary to study glycosylation modification at this site. This modification is particularly challenging, necessitating the development of specific glycan cutting technology and a stable glycan ratio analysis method.

In this study, cetuximab expressed in Chinese hamster ovary (CHO) cell was used as the

收稿日期:2021-05-20

* 通讯联系人.Tel: (021) 50276381-605, E-mail: junyan.xu@dragonboatbio.com(许俊彦); Tel: (021) 50276381-603, E-mail: zhe.shao@dragonboatbio.com(邵喆).

基金项目:浦东新区科技发展基金项目资助(PKX2019-S09).

Foundation item: Foundation of Pudong New Area Science and Technology Development (No. PKX2019-S09).

experimental research object. Based on the digestion with endo- β -*N*-acetylglucosaminidase F2 (Endo F2), an experimental method was developed that can quickly release Fab glycans. Qualitative and glycan ratio analyses were carried out by ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UPLC-HRMS). The test was divided into two steps: in the first step, a non-denaturing (native state) glycosidase excision test was performed on the CHO-cetuximab drug substance. The drug substance was diluted to 1.0 mg/mL by adding ultrapure water, following which 1.0 μ L of Endo F2 was directly added to 100 μ L of the drug substance for enzyme digestion at 37 $^{\circ}$ C. Through HRMS, the data were deconvoluted to obtain the accurate mass of the drug substance. The results showed that when the digestion time of Endo F2 was 5 min, the glycans in the Fab segment could be completely removed, whereas those in the Fc segment were not affected. Rapid enzyme cutting of the Fab glycans was realized; simultaneously, it was concluded that this method was also very specific for the removal of Fab glycans. In the second step, an accurate ratio analysis test was performed on Fab glycans excised from CHO-cetuximab. The released Fab glycans were precipitated with ice ethanol, the supernatant was centrifuged and spin-dried, and then labeled with *para*-aminobenzyl (2-AB). 2-AB labeling could make glycans have fluorescent detectable signals, and after reconstitution in 70% acetonitrile aqueous solution, was detected by UPLC coupled with a fluorescence detector (FLR). Good chromatographic peak separation was obtained using a hydrophilic interaction chromatography (HILIC) column. Thus, the test enabled stable glycan ratio analysis.

The molecular weight results for three independent Endo F2 digestion cycles for 5 min showed that the masses after digestion were similar; subsequently, glycan ratio analysis was performed based on HILIC. The results of three independent glycan ratio analysis experiments were also similar, indicating that the rapid enzyme digestion of Endo F2 followed by glycan ratio analysis after 5 min of digestion yielded good stability and reliability. Data obtained by measuring the samples produced using two different processes employed by our company showed that there were distinct differences in the glycan profiles of the two processes, especially in terms of the sialic acid glycoforms. These results prove that the method developed in this study can accurately analyze the ratio of glycans. Monitoring the antibody production process is important and meaningful for the evaluation of the process.

Key words: ultra performance liquid chromatography (UPLC); high resolution mass spectrometry (HRMS); glycosylation; glycosidase; cetuximab

治疗性单克隆抗体 (mAb) 药物是以一类 γ 型免疫球蛋白为结构基础的大分子蛋白类药物,而西妥昔单抗 (cetuximab, 商品名爱必妥) 是最早上市的被美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的抗表皮生长因子受体 (EGFR) 单克隆抗体,用于转移性结直肠癌和头颈鳞状细胞癌的治疗。默克公司生产

的原研药采用的细胞系为小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0), 该细胞系在糖基化的表达过程中会形成 *N*-羟乙基神经氨酸 (NGNA) 与 α -半乳糖 (α -Gal), 据文献^[1,2] 报道, SP2/0 表达的西妥昔单抗在临床上的副作用主要是出现严重的超敏反应, 具体表现如呼吸困难、胸闷、皮肤瘙痒和视觉障碍等。而经中国仓鼠

引用本文:程倩,贾戴辉,张博慧,许俊彦,邵喆,黄应峰,邹洵. 利用 β -*N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶快速酶切分析中国仓鼠卵巢细胞表达的西妥昔单抗抗原结合区的聚糖比例. 色谱, 2022, 40(2): 175-181.

CHENG Qian, JIA Daihui, ZHANG Bohui, XU Junyan, SHAO Zhe, HUANG Yingfeng, ZOU Xun. Analysis of glycan ratio of Chinese hamster ovary-cetuximab antigen-binding segment via rapid enzyme digestion with endo- β -*N*-acetylglucosaminidase F. Chinese Journal of Chromatography, 2022, 40(2): 175-181.

卵巢(CHO)细胞表达的西妥昔单抗,虽具有相同的氨基酸序列,但在糖基的组成和种类上存在很大差异,主要表现为形成 *N*-乙酰神经氨酸(NANA)的唾液酸化糖型修饰,且不再含有 α -Gal,大大降低了潜在的免疫原性风险^[3-5]。

截至目前,已上市的单克隆抗体药物绝大多数都是含有 2 个糖基化位点,且对称分布于两条重链上^[6-8]。而已上市西妥昔单抗是唯一一个具有 4 个糖基化位点的单抗药物,其中抗原结合片段(Fab)的 2 个糖基化位点位于高可变区(VH),可结晶片段(Fc)的 2 个糖基化位点位于恒定区 2(CH2)。西妥昔单抗由 SP2/0 细胞表达,糖基化更加复杂,并伴随大量的唾液酸化,导致其具有显著的电荷异质性^[9,10]。目前国内外许多研究者开始开发以 CHO 细胞表达的西妥昔单抗,相比于 SP2/0 细胞表达,在 Fab 和 Fc 段的糖基化修饰上会有比较大的差异,特别是 Fab 段,不再含有 α -Gal 和 NGNA,取而代之的是大量的 NANA。这种聚糖种类的变换以及聚糖含量不同的差异,对生物学活性及功能的影响,甚至在临床上的表现,还在进一步研究当中^[11-14]。

本文以 CHO 细胞表达的西妥昔单抗为研究对象(CHO-cetuximab),从糖蛋白水平和聚糖水平对其糖基化修饰做了系列研究。主要利用 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(Endo F2),结合质谱对质量数的归属分析,考察了抗体原液经 Endo F2 不同时间处理后的聚糖释放效果。结果显示,Endo F2 对抗体 Fab 段的糖基化位点具有很高的酶切效率,能快速切除 Fab 段的聚糖,而 Fc 段的聚糖不受影响。对经 Endo F2 酶切下来的聚糖,进一步通过对氨基苯甲酰胺(2-AB)标记后使用亲水相互作用色谱柱(HILIC)分离,在超高效液相色谱-荧光检测器(UPLC-FLR)上实现了准确的聚糖比例分析。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

CHO-西妥昔单抗为本公司经 CHO 稳定细胞系表达的西妥昔单抗克隆抗体原液。高分辨质谱仪 Q-Exactive、蛋白质分析软件 Biopharma Finder 3.2 和液相系统 Dionex U3000 均购自 Thermo Scientific 公司(美国);超高效液相色谱 Acquity UPLC H-Class plus 系统、荧光检测器 2475 FLR 均购自 Waters 公司(美国);糖苷酶 Endo F2 购自 Agilent 公司(美国);

N-肽糖苷酶 F(PNGase F)购自 NEB 公司(英国);乙腈(ACN)、2-AB(纯度 $\geq 98\%$)购自 Sigma-Aldrich 公司(美国);甲酸胺购自 Honey Well 公司(美国);超纯水 Milli-Q 系统购自 Millipore 公司(美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 释放抗体 Fab 和 Fc 聚糖

Endo F2 酶切^[15]:将抗体原液用超纯水稀释至 1.0 mg/mL,然后取 100 μ L,加入 Endo F 21.0 μ L,快速混匀后于 37 $^{\circ}$ C 下孵育 16 h。取 50 μ L 用于 LC-MS 分析,剩余 50 μ L 加入 150 μ L 预冷的冰乙醇,于 -20 $^{\circ}$ C 条件下沉淀蛋白质,以 13 000 r/min 离心 5 min 后取上清液用于聚糖的定性分析。

PNGase F 酶切^[15,16]:将抗体原液用 8 mol/L 盐酸胍变性稀释至 1.0 mg/mL,然后取 100 μ L,加入 PNGase F 2.0 μ L,快速混匀后于 37 $^{\circ}$ C 下孵育 16 h。其余操作同 Endo F2 酶切。

1.2.2 Fab 聚糖的快速释放以及荧光标记

将抗体原液用超纯水稀释至 1.0 mg/mL,然后取 100 μ L,加 1.0 μ L Endo F2 酶,快速混匀后于 37 $^{\circ}$ C 下孵育 5 min。取 50 μ L 用于 LC-MS 分析,剩余 50 μ L 加入 150 μ L 预冷的冰乙醇,于 -20 $^{\circ}$ C 放置 40 min,沉淀蛋白质,以 13 000 r/min 离心 5 min 后取上清液,经真空浓缩干燥仪彻底干燥,加入 2-AB 标记液于 65 $^{\circ}$ C 避光标记 3 h(使聚糖具有荧光信号),用 50 μ L 70% 乙腈水溶液复溶,然后进行 UPLC-FLR 聚糖比例的分析^[15]。

1.2.3 LC-MS 分析

采用 Waters BioResolve RP mAb 多苯色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 2.7 μ m),流动相 A 和 B 分别为 0.1% (v/v) FA 水溶液和含 0.1% (v/v) FA 的乙腈溶液,流速 0.4 mL/min。梯度洗脱程序为 0~2 min, 10% B; 2~6 min, 10% B~90% B。

质谱采用正离子模式,喷雾电压设为 3.8 kV,毛细管加热温度 320 $^{\circ}$ C,辅助气温度 350 $^{\circ}$ C,鞘气压力 40 arb,辅助气压力 10 arb,一级质谱扫描质荷比(m/z)范围 1 800~5 000。采用 BioPharma Finder 3.2 软件对原始谱图进行去卷积化处理, m/z 处理范围:2 000~4 000;输出质量数范围:130 000~160 000。

1.2.4 UPLC-FLR 分析

采用 Waters BEH Amide 亲水色谱柱(150 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m),流动相 A 为 100 mmol/L 甲酸铵溶液(pH 4.5),流动相 B 为乙腈,流速 0.5

mL/min,柱温 60 °C。梯度洗脱程序为 0~18 min, 2% A~22% A; 18~38 min, 22% A~44% A。荧光检测器激发波长 330 nm,接收波长 420 nm。

2 结果与分析

2.1 抗体 Fab 与 Fc 聚糖的释放与分析

糖苷酶 PNGase F 是抗体糖基化研究过程中一种常用的聚糖释放酶,能快速并完全释放聚糖并进行相应的定量研究,特异性地切断糖基化位点天冬酰胺(Asn)和与之相连 N-乙酰葡萄糖胺之间的糖苷键,并将 Asn 转变为天冬氨酸(Asp)^[17,18]。Endo F2 也能实现聚糖的释放,能切断两个 N-乙酰葡萄糖胺之间 β-1,4 键,释放截短的聚糖分子,同时另一个 N-乙酰葡萄糖胺仍保留在糖基化位点的 Asn 上^[19,20]。

CHO-西妥昔单抗蛋白分子为 IgG1 型,且共有 4 个糖基化位点,每条重链的 Fab 段和 Fc 段各有 1 个 N-糖基化位点,可以通过糖苷酶 PNGase F 和 Endo F2 对其切糖,释放出相应的聚糖后进行糖相关分析(见图 1)。

将变性后的抗体经 PNGase F 酶切 16 h 后,使用 LC-MS 检测,经去卷积处理后(见图 2a),测得酶切后抗体分子的质量数为 145 277.66(理论相对分子质量为 145 277.67 Da),说明抗体的聚糖已经被完全切除,同时糖基化位点的 Asn 转变为 Asp。而未变性的抗体经 Endo F2 酶切 16 h 后(见图 2b),测得酶切后抗体分子的质量数为 146 672.05(理论相对分子质量为 146 670.28 Da),说明抗体的聚糖也已经被完全切除,同时糖基化位点上均保留了 GnF。以上结果表明,在相同的酶切时间 16 h 的条件下,Endo F2 与 PNGase F 的变性酶切均能实现

聚糖的完全释放。将释放出来的聚糖,在 HILIC 柱上分离并与质谱进行联用分析,可以实现对抗体全部聚糖的鉴定,可以看到 CHO-西妥昔单抗上有较多的唾液酸化糖型 G2FS1 和 G2FS2,此外两种酶切方式产生的糖谱非常相似(见图 3),说明对聚糖的定性和定量具有一致性的结果。

在以往对西妥昔单抗的糖基化研究中发现, PNGase F 在非变性条件下能切除 Fc 段 Asn 299 位置的糖基,但 Fab 段的 Asn 88 位置的糖基依然存在,而 Endo F2 能在非变性条件下切除 Fab 段的糖基^[18]。这种选择性的切除方式推测是与抗体的空间结构有关,糖苷酶在进攻糖基化位点时需要突破空间位阻才能进行切糖。在本实验中我们发现,使用 Endo F2 在非变性条件下处理 CHO-西妥昔单抗,只要酶切时间足够长,Endo F2 既能完全切除 Fab 段的糖基,也能完全切除 Fc 段的糖基。我们推测抗体的空间位阻效应降低了 Endo F2 对 Fc 段糖的酶切效率,但无法阻止其对 Fc 段糖的酶切,因此我们后续考察了 Endo F2 的不同酶切时间。

2.2 Endo F2 酶切时间的考察

经 Endo F2 酶切 5 min(见图 4a),可以看到只有 I 类质量数,通过对比理论分子量对照表(见附件 S1,详见 <http://www.chrom-China.com>),确定为抗体的 Fab 段 2 个位点均被切除;Fab 段聚糖被切除后均保留了岩藻糖化的 N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)残基(GnF),Fc 段上 2 个位点保留了 G0F、G1F、G2F 之间的聚糖组合。说明 Endo F2 对 Fab 段的酶切效率非常高,5 min 就已经将抗体 Fab 段 2 个位点上的聚糖完全切除,而 Fc 段的聚糖未受影响。酶切 30 min 后可以看到除了有 I 类的质量数,

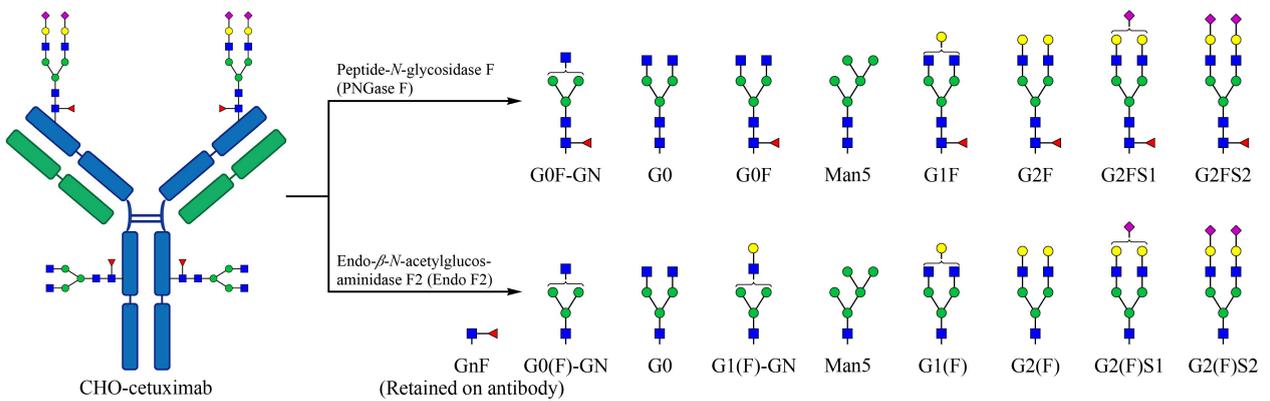


图 1 西妥昔单抗结构及释放的聚糖
Fig. 1 Structure of cetuximab and glycans released from antibody
 CHO: Chinese hamster ovary.

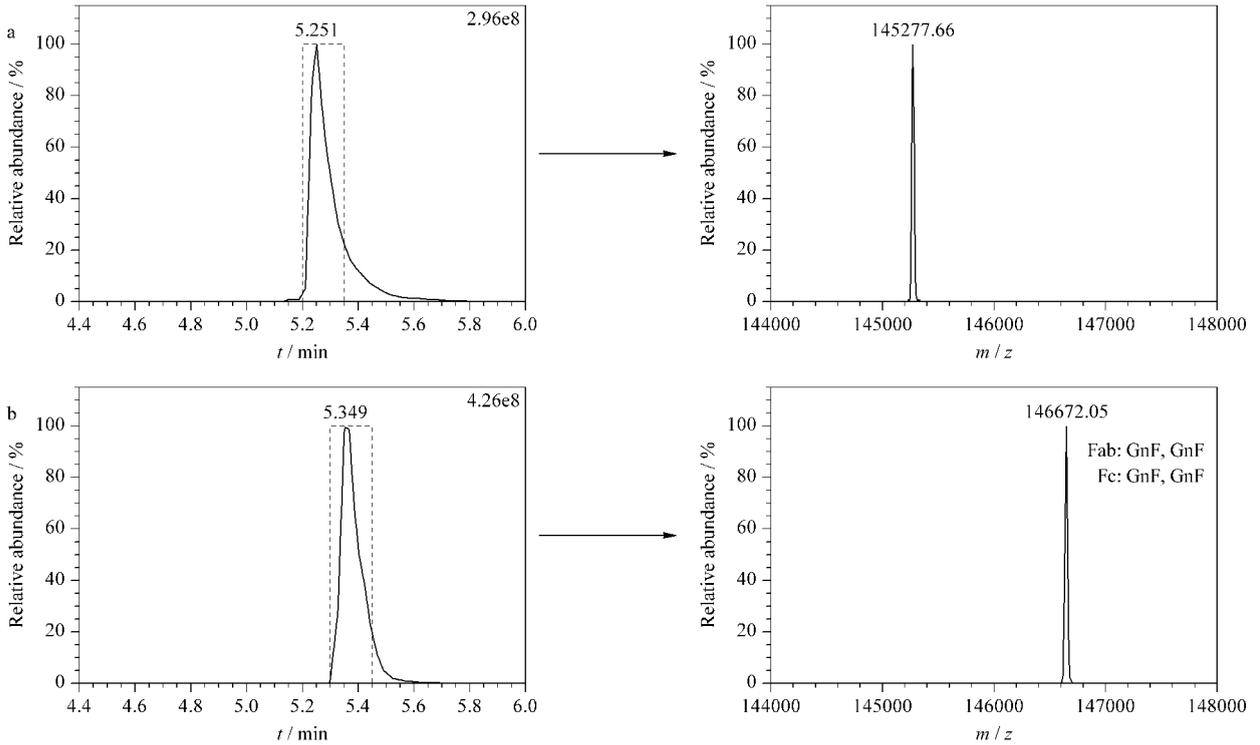


图 2 糖苷酶处理 16 h 后的 TIC 色谱图和去卷积质谱图

Fig. 2 TIC chromatograms and deconvoluted mass spectra after glycosylation 16 h
a. PNGase F; b. Endo F2.

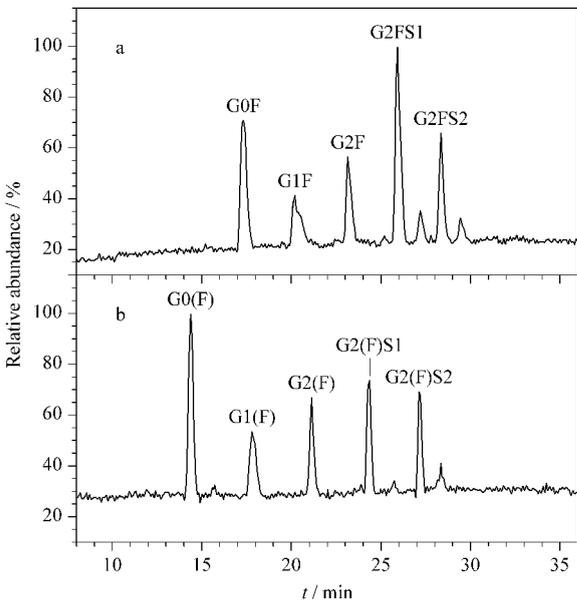


图 3 聚糖的 TIC 色谱图

Fig. 3 TIC chromatograms of glycans
a. PNGase F; b. Endo F2.

除后均保留了 GnF, 而 Fc 段还有 1 个位点保留了 G1-GN、G0F、G1F、G2F。说明酶切时间至 30 min 时, 有一部分抗体的 Fc 段中 1 个位点上的聚糖开始被切除了。进一步延长酶切时间至 300 min 后(见图 4c), 可以看到有 I、II、III 类质量数, III 类质量数确定为抗体的 Fab 段 2 个位点和 Fc 段 2 个位点均被切除; 4 个位点上均保留了 GnF, 相对应的质量数为 146 670. 08。得出 Endo F2 对 Fc 段的酶切效率相对较低, 酶切 300 min 后仍然有较多 Fc 聚糖未完全切除的抗体, 若要完全切除 Fc 段的聚糖则需要更长的时间, 如本实验中的 16 h。

抗体药物的生产工艺非常复杂, 而且批次间的质量属性可能会有一些波动, 尤其是糖型方面, 对西妥昔单抗这种具有复杂糖基化位点的药物, 分析各个位点上的糖基化显得尤为重要。从本实验的结果来看, 使用 Endo F2 酶切 5 min, 抗体的 Fab 段 2 个位点的聚糖完全被切除, 说明该条件下可以专一性地切除 Fab 段位点上的聚糖, 本实验也因此未做更短酶切时间的考察。抗体经 Endo F2 酶切后, 后续可以通过 UPLC-FLR 准确分析 Fab 段位点上的聚糖比例, 对抗体生产工艺的评估具有非常重要的意义。

还有 II 类的质量数(见图 4b), II 类质量数确定为抗体的 Fab 段 2 个位点均被切除和 Fc 段 1 个位点被切除; Fab 段的 2 个位点和 Fc 段的 1 个位点被切

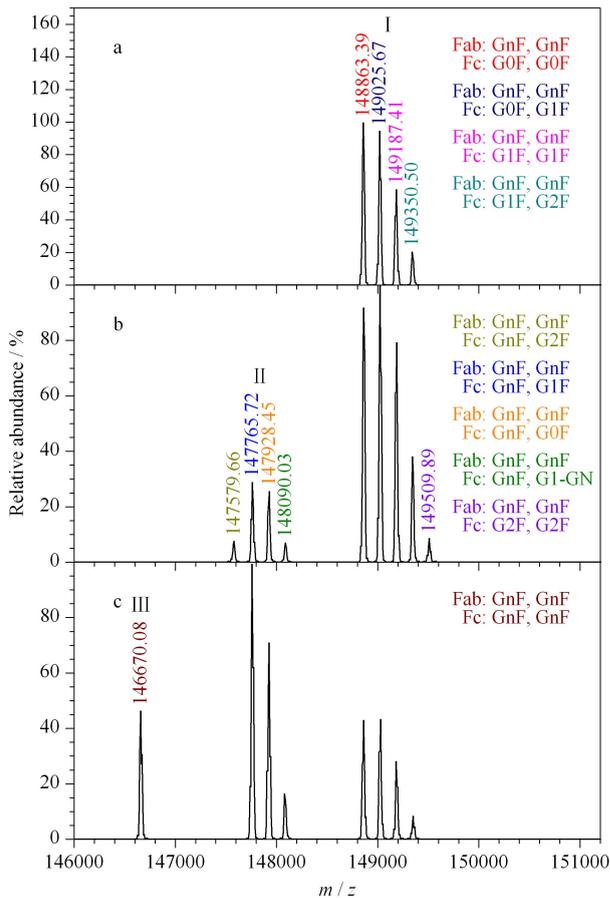


图 4 Endo F2 不同酶切时间的质谱图

Fig. 4 Mass spectra of Endo F2 for different digestion times
a. 5 min; b. 30 min; c. 300 min.

2.3 UPLC-FLR 对 Fab 段聚糖的比例分析

从糖蛋白上释放的聚糖经 2-AB 衍生化后,使用 HILIC 色谱柱在 UPLC-FLR 上可以实现聚糖的比例分析。CHO-西妥昔单抗抗体经 Endo F2 酶切 5 min,释放的聚糖经 2-AB 标记后,在 HILIC 色谱柱上具有良好的分离效果(见图 5),结果展示了 Fab 段的糖基化修饰结果,图 5a 和图 5b 的样品产自两个不同的生产工艺,分别是工艺 I 和工艺 II,其中工艺 II 是在工艺 I 基础上,在 CHO 细胞培养过程中额外加入了适量的糖型调节剂,从而调节了抗体的糖型。从结果可以看出,经不同生产工艺表达的 CHO-西妥昔单抗在 Fab 段的糖谱上具有非常明显的差异。其中还可以看出含唾液酸化的聚糖比例也相差较大,工艺 I 的 G2(F)S1 和 G2(F)S2 的总比例较低,约 25.0%,而工艺 II 的总比例较高,约 41.4%。此外,为了考察本方法的稳定可靠性,我们独立做了 3 次试验,工艺 II 样品的 3 次 Endo F2 酶切后的相对分子质量基本一致(见附图 S1),RSD 值几乎为 0,3 次试验的聚糖在 HILIC 色谱柱上的比例分析谱图也基本一致(见附图 S2),峰面积的 RSD 值均小于 5.0%,表明本方法具有较好的稳定性。

抗体的 Fab 区是识别抗原的关键区域,西妥昔单抗 Fab 上的糖基化位点处在抗体重链的可变区,该位点上的糖基化可能参与免疫调节,影响抗原抗

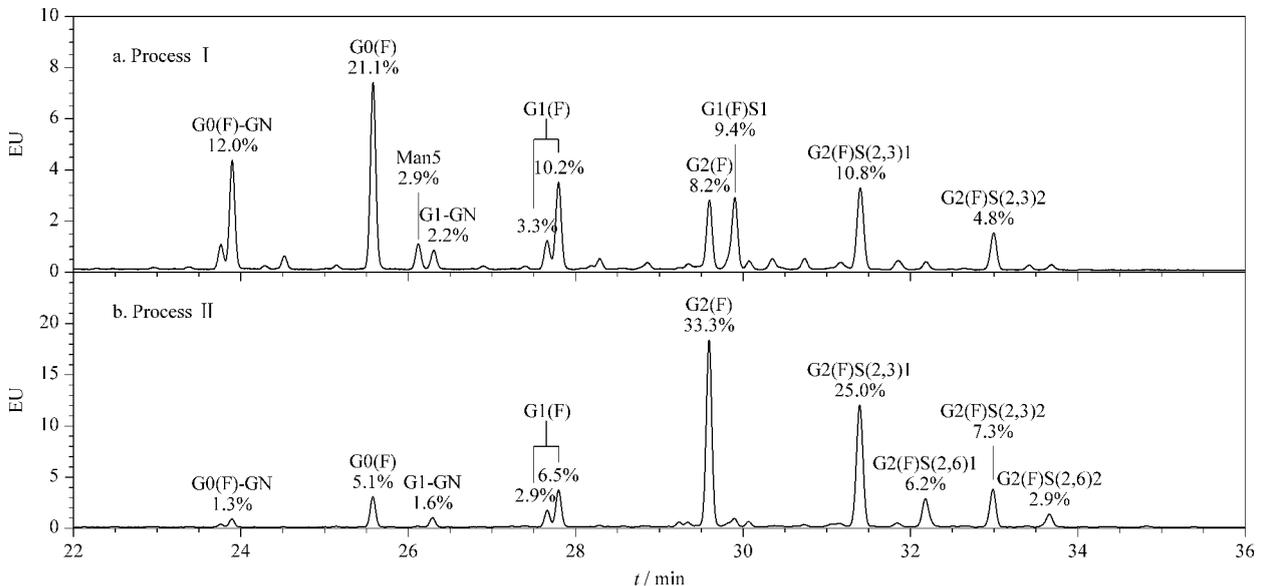


图 5 来自不同生产工艺的 CHO-西妥昔单抗抗体 Fab 段的糖谱

Fig. 5 Glycan profiles of CHO-cetuximab antibody Fab segments from different production processes

G2(F)S1 terminal sialic acid has two linkages, labeled as G2(F)S(2,3)1 and G2(F)S(2,6)1. G2(F)S2 terminal sialic acid also has two linkages, labeled as G2(F)S(2,3)2 and G2(F)S(2,6)2.

体的亲和力,因此对该位点的糖基化修饰分析具有重要的意义。通过 Endo F2 非变性酶切 5 min,结合 2-AB 标记的方法可以实现对 Fab 段聚糖的糖型比例分析,对指导抗体生产工艺的优化起到非常大的帮助。

3 结论

本文针对 CHO 细胞表达的西妥昔单抗,开发了 Endo F2 快速酶切结合 UPLC-FLR 检测的糖型分析方法,不仅对 Fab 段糖基化修饰的分析具有很好的专一性,而且还具有较好的稳定可靠性,大大提高了检测效率。这对研发者研究具体的糖型构成,抗体抗原的亲和力等提供了数据支撑,对经不同细胞表达的,以及经不同的细胞培养工艺生产的西妥昔单抗,研究 Fab 段糖型的变化和电荷异质性提供了一种非常方便、快捷、准确的分析手段,并能够有效指导生产工艺的优化以及后续工艺可比性的研究。

参考文献:

[1] Liu S, Gao W, Wang Y, et al. PLoS One, 2017, 12(1): e0170013

[2] Patel D, Guo X, Ng S, et al. Hum Antibodies, 2010, 19(4): 89

[3] Anumula K R. J Immunol Methods, 2012, 382(1/2): 167

[4] Biacchi M, Gahoual R, Said N, et al. Anal Chem, 2015, 87(12): 6240

[5] Fussl F, Trappe A, Carillo S, et al. Anal Chem, 2020, 92(7): 5431

[6] Cao L, Diedrich J K, Kulp D W, et al. Nat Commun, 2017,

8: 14954

[7] Ruhaak L R, Xu G, Li Q, et al. Chem Rev, 2018, 118(17): 7886

[8] Wada R, Matsui M, Kawasaki N. MAbs, 2019, 11(2): 350

[9] Ambrogelly A, Gozo S, Katiyar A, et al. MAbs, 2018, 10(4): 513

[10] Janin-Bussat M C, Tonini L, Huillet C, et al. Methods Mol Biol, 2013, 988: 93

[11] Pagan J D, Kitaoka M, Anthony R M. Cell, 2018, 172(3): 564

[12] Scallon B J, Tam S H, McCarthy S G, et al. Mol Immunol, 2007, 44(7): 1524

[13] Varadi C, Jakes C, Bones J. J Pharm Biomed Anal, 2020, 180: 113035

[14] Wang L X, Tong X, Li C, et al. Annu Rev Biochem, 2019, 88: 433

[15] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Part 4. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 299
国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 299

[16] Wang D, Nowak C, Mason B, et al. J Pharm Biomed Anal, 2020, 183: 113131

[17] Zhang B H, Jia D H, Cheng Q, et al. Current Biotechnology, 2021, 11(2): 214
张博慧, 贾戴辉, 程倩, 等. 生物技术进展. 2021, 11(2): 214

[18] Lauber M A, Yu Y Q, Brousmiche D W, et al. Anal Chem, 2015, 87(10): 5401

[19] Lattova E, Bryant J, Skrickova J, et al. J Proteome Res, 2016, 15(8): 2777

[20] Wang C, Guo H Z. Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 33(6): 1018
王冲, 郭怀祖. 生物工程学报, 2017, 33(6): 1018