

## MS 対応の逆相/陰イオン交換ミックスマードカラムによる酸性糖鎖分離能の向上

---

Xiaoxiao Liu, Matthew A. Lauber

Waters Corporation

---

### 要約

グリコシル化は、特定のバイオ医薬品の安定性、有効性、免疫原性に影響を与えるため、しばしば重要品質特性とみなされます。グリコシル基を慎重にモニターおよび管理するために、N 型糖鎖はしばしば、遊離させて親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）により分析し、蛍光検出器または質量分析計で検出します。一方、このアプローチの導入には、複数の課題がありました。特に、酸性糖鎖の回収が不完全で、MS のレスポンスを高める糖鎖標識のための電荷に基づく分離が欠落していました。ここでは、新型のミックスマード陰イオン交換 RPLC 固定相を使用して、様々なチャージ状態のクラスの分離および酸性糖鎖の更なる分離を実現しました。MaxPeak High Performance Surfaces（HPS）テクノロジーと組み合わせることで、この新型固定相および ACQUITY Premier Glycan BEH C<sub>18</sub> AX カラムは、これらの短所に対処し、酸性 N 型糖鎖の分析性能の向上をもたらします。

### アプリケーションのメリット

- *RapiFluor*-MS 標識および 2-AB 標識の両方で誘導体化された酸性 N 型糖鎖に最適化した電荷に基づく分離
- 新型の ACQUITY Premier Glycan BEH C<sub>18</sub> AX カラムと HPS テクノロジーにより、初回の使用時から回収率の向上と性能の最適化を実現
- 市販の AX RPLC カラムよりも優れた分離能と MS 対応性
- 再現性と酸性糖鎖の分離を確実に得るために QC テスト済みの固定相バッチを使用
- MS グレードの移動相濃縮液とシステム性能チェック用標準試料を組み込むことで、完全な電荷に基づく分離ソリューションを実現

- サンプル前処理の消耗品と手順を HILIC モードの分離と共有

---

## はじめに

酸性 N 型糖鎖は、バイオ医薬品の安定性、有効性、免疫原性に影響を与えるため、しばしば重要品質特性とみなされます。例えば、シアル酸化糖鎖は抗炎症効果に影響を与え<sup>1</sup>、マンノース-6-リン酸型糖鎖はリソソームへのターゲティングを容易にします<sup>2</sup>。幅広く採用されているアプローチの 1 つとして、N 型糖鎖を酵素で遊離させ、迅速に誘導体化してから、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) で分離し、蛍光検出器または質量分析計で検出します<sup>3</sup>。糖鎖プロファイルについて、電荷に固有の情報をより直接的に確認したい場合があります。しかし、ポジティブイオンモードの効果を高めるために、最近導入された *RapiFluor-MS* などの標識用に最適化した、電荷に基づくメカニズムによる LC 分離は、まだ開発されていません。市販されている陰イオン交換ミックスモードのカラムの数はわずかですが、MS レスポンスを強化し、迅速な標識タグを行うために取敢て最適化されているものは、1 つもありません。更に、市販のオプションは主に金属製ハードウェアで製造されており、このことは酸性糖鎖における回収が一般的に不完全であることを意味しています。

これらの問題を解決するために、新型 ACQUITY Premier Glycan BEH C<sub>18</sub> AX カラムが開発されて適用され、酸性 N 型糖鎖の分析が改善されました。最適化したイオン性のモディファイヤーを使用し、陰イオン交換 RPLC 固定相 (95 Å、1.7 μm) であるこの新型のミックスモードを使用することで、効果的な電荷に基づいた分離が得られると共に、従来の標識および MS の効果を高める標識で誘導体化された酸性糖鎖の分離をさらに高めています。更に、カラムの製造に High Performance Surface テクノロジーを採用し、これによって酸性化合物でのクロマトグラフィー分析中のサンプルのロスが最小限に抑えられることが実証されています<sup>4</sup>。

---

## 実験方法

### サンプルの説明

- *RapiFluor-MS* シアル化糖鎖性能試験標準試料 (製品番号: [186008660](#) <<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186008660>>) は、標準試料 1 バイアルを 50 μL の水に再溶解し、最終濃度が 8 pmol/μL になるように調製しました。
- *RapiFluor-MS* 糖鎖性能試験標準試料 (製品番号: [186007983](#) <<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186007983>>) は、標準試料 1 バイアルを 50 μL

の水に再溶解し、最終濃度が 8 pmol/μL になるように調製しました。

- AdvanceBio 2-AB Bovine Fetuin N-Glycan Library (Agilent、製品番号：DP1812601) は、標準試料 1 バイアルを 20 μL の水に再溶解し、最終濃度が 10 pmol/μL になるように調製しました。

## 分析条件

### LC 条件

システム:	ACQUITY UPLC H-Class Bio
データ取り込み:	MassLynx v4.1
カラム:	ACQUITY Premier Glycan BEH C <sub>18</sub> AX、1.7 μm、2.1 × 150 mm
サンプル温度:	8 °C
サンプル注入量:	1 μL
FLR 波長:	265 Ex/425 Em (RFMS 標識糖鎖) 330 Ex/420 Em (2-AB 標識糖鎖)
カラム温度:	60 °C
シール洗浄溶媒:	30% アセトニトリル/70% 18.2 MΩ 水 v/v (シール洗浄間隔を 5 分に設定)
移動相 A <sup>1</sup> :	18.2 MΩ 水
移動相 B <sup>2</sup> :	10% IonHance Glycan C <sub>18</sub> AX 1 M ギ酸アンモニウム濃縮液含有 40%/60% 水/アセトニトリル (v/v)
アクティブプレヒーター:	有効
スキャンレート:	10 ポイント/秒

フィルタータイムコンスタント:	標準
注入開始でオートゼロ:	Yes
波長の自動ゼロ設定:	ベースラインを維持

1. 水だけの移動相ではバクテリアが増殖する可能性があります。移動相を頻繁（3日に1回）に交換し、溶媒ラインを90/10 アセトニトリル/水で定期的にフラッシュ洗浄することを推奨します。
2. 移動相 B は、100 mL の IonHance Glycan C<sub>18</sub> AX 1 M ギ酸アンモニウム濃縮液を 320 mL の MilliQ 水と 580 mL のアセトニトリルに希釈して調製しました。アセトニトリルの蒸発による性能低下を避けるため、この移動相 B を頻繁（3日に1回）に交換することを推奨します。

## グラジエント - RapiFluor-MS 標識糖鎖 (図 1、2、3)

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	カーブ
0.0	0.4	100	0	初期条件
36.0	0.4	78	22	6
36.3	0.4	0	100	6
37.3	0.4	0	100	6
38.0	0.4	100	0	6
45.0	0.4	100	0	6

## グラジエント - 2-AB 標識糖鎖 (図 4)

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	カーブ
0.0	0.4	100	0	初期条件
36.0	0.4	70	30	6
36.3	0.4	0	100	6
37.3	0.4	0	100	6
38.0	0.4	100	0	6
45.0	0.4	100	0	6

## MS 条件

システム:	Xevo G2-XS QTof
イオン化モード:	ESI、ポジティブ
取り込み範囲:	700-3000 Da
キャピラリー電圧:	2.2 kV
ソースオフセット:	50 V
コリジョンエネルギー:	オフ
コーン電圧:	75 V
脱溶媒ガス:	600 L/時間
イオン源温度:	120 °C
脱溶媒温度:	500 °C

スキャンレート: 2 Hz

## データ管理

クロマトグラフィーソフトウェア: MassLynx v4.1

MS ソフトウェア: MassLynx v4.1

インフォマティクス: UNIFI v.1.8

---

## 結果および考察

ACQUITY Premier Glycan BEH C<sub>18</sub> AX カラムは、RFMS 標識糖鎖の電荷に基づく分離用に設計されており、従来の HILIC 分離と比較して、補完的な選択性を実現しています。他の市販のミックスモードの固定相とは異なり、ACQUITY Premier Glycan BEH C<sub>18</sub> AX は非常に安定したイオン性を持つモディファイヤーおよび結合手順に基づいており、*Rapi Fluor-MS* などの両親媒性基および強塩基性基での MS の効果を高める標識により誘導体化した糖鎖の分離に最適です。図 1 に、ヒト由来 IgG およびウシフェチュイン由来 N 型糖鎖から前処理した RFMS 標識 N 型糖鎖の分離で見られる、このカラムテクノロジーの特別に設計された特性を示しています。ここで、パネル A およびパネル B は、ACQUITY Premier Glycan BEH C<sub>18</sub> AX カラムおよび Glycan BEH Amide カラムで得られたクロマトグラムをそれぞれ示します。両方のカラムケミストリーで、20 を超える RFMS 標識糖鎖が分離されました。ミックスモード分離により、糖鎖が異なるチャージ状態ごとにグループ化され、化合物の正味電荷に伴って保持能が増強しました。このミックスモード分離が、0 ~ 22 mM ギ酸アンモニウムという低イオン強度のグラジエントで達成できました。この条件では、蛍光および質量分析による非常に高感度の直接検出が可能です (図 1C)。この分析戦略を実際に適用したところ、Xevo G2-XS QToF と組み合わせた場合、相対含有量 0.1% 未満の糖鎖が検出でき、絶対検出限界はフェムトモルレベルの範囲内でした。

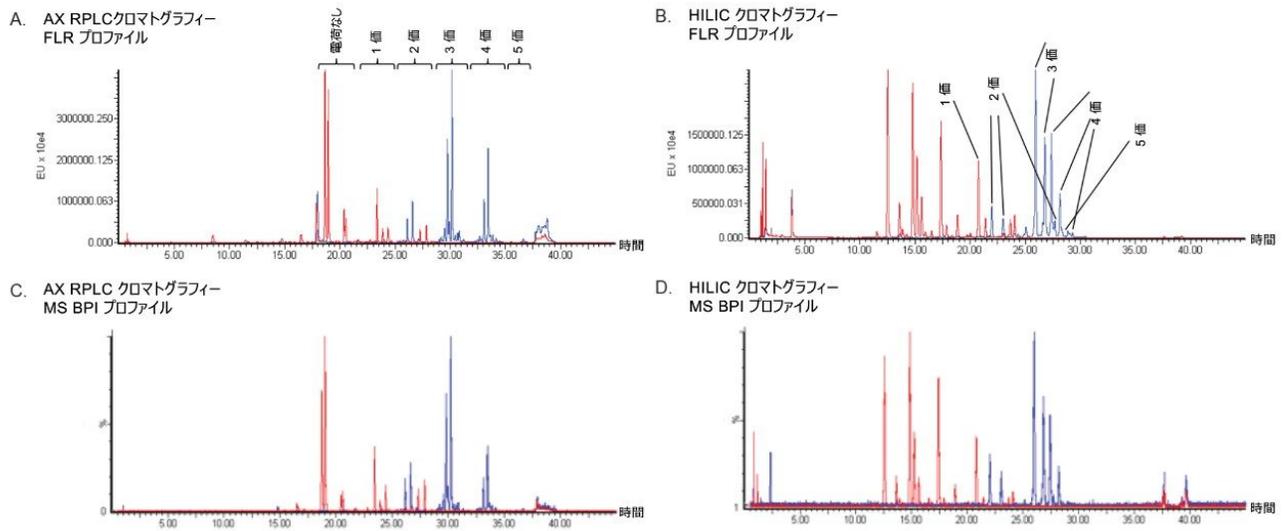


図 1. 別の LC クロマトグラフィーを使用した、ヒト IgG (赤色) およびウシフェチュイン (青色) の RFMS 標識糖鎖の FLR クロマトグラム。カラムの充填には、High Performance Surfaces のステンレスハードウェアを使用しました。図 1 A、C: BEH C<sub>18</sub> AX 固定相と陰イオン交換逆相液体クロマトグラフィー (AX RPLC) ミックスモード分離を使用した、FLR プロファイリング (A) および MS BPI プロファイリング (C)。図 1 B、D: アミド結合 BEH 固定相を用いた HILIC 分離を使用した FLR プロファイリング (B) および MS BPI プロファイリング (D)。

固定相の RP 特性により、同一の電荷グループ内での異性体の糖鎖分子種の更なる分離が実現します。例えば、N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) および N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) は、哺乳類細胞に最も多くみられるシアル酸です。NeuGc はヒトにはないシアル酸の形態なので、免疫原性があり、患者に医薬品を投与した際に、中和や急速なクリアランスを引き起こす可能性があるため、しばしばバイオ医薬品の CQA (重要品質特性) とみなされます<sup>5</sup>。しかしながら、N 型糖鎖グループの NeuGc は、NeuAc よりも酸素原子が 1 つ多いだけであるため、HILIC クロマトグラフィーを使用して NeuGc 糖鎖を NeuAc 糖鎖から分離するのは非常に困難です。一方、新型 Glycan BEH C<sub>18</sub> AX カラムでは、NeuGc バリエーションを主要な NeuAc 糖鎖種から分離することができます。図 2 に示すのは、ウシフェチュイン由来の RFMS 標識 N 型糖鎖の分析において、ACQUITY Premier Glycan BEH C<sub>18</sub> AX カラムで、最適化した 45 分の LC グラジエント (「実験方法」セクションに詳細を記載) を使用した分離です。得られたクロマトグラムを 10 倍に拡大したところ (図 2B)、最も含有量の多い A2G2S2 分析種のうちの 2 つが、26.42 分と 26.89 分に  $m/z$  値 845.69 Da で溶出していることがわかります (図 2C)。一方、約 25.57 分および 25.76 分あたりに溶出した 2 つの糖鎖ピークは  $m/z$  値 851.03 Da を示しており (図 2D)、1 つの NeuGc および 1 つの NeuAc を含む A2G2S2 分析種に対応しています。A3G3S3 および A3S1G3S3 についても同様の溶出パターンが見られ、高次の分岐構造でも NeuAc の代わりに NeuGc 残基が含まれることを示す証拠となっています。ミックスモードクロマトグラフィーでは、N-グリコリル種が

N-アセチル種よりも先に溶出し、正味のチャージ状態が異なっている限り、個々の糖鎖分析種が十分に分離されることが確認されました。

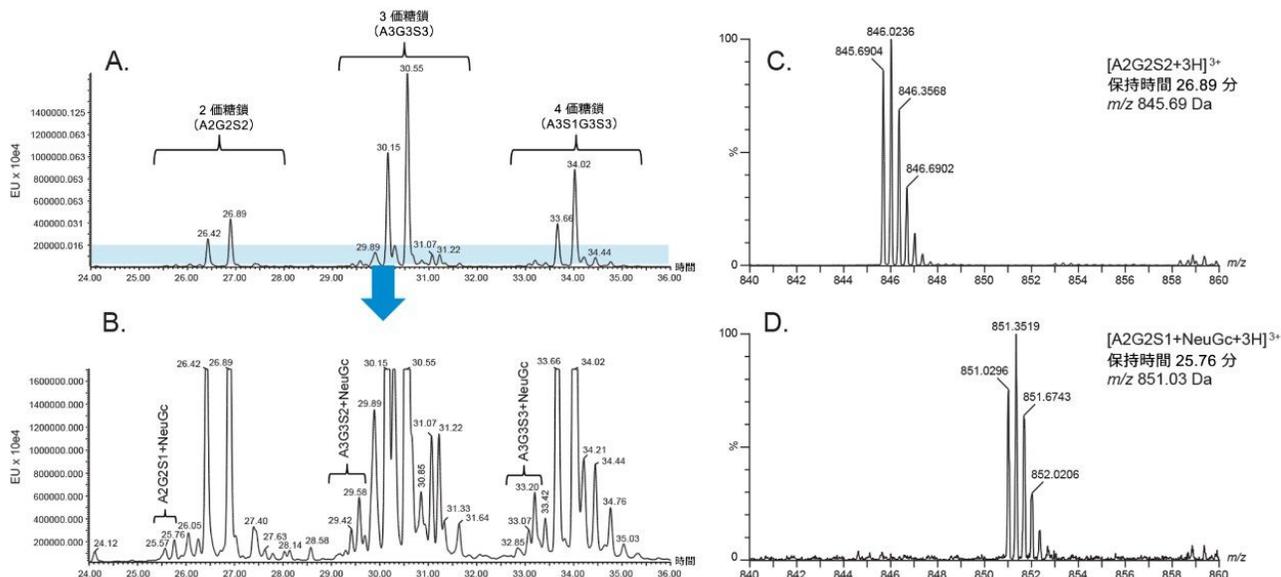


図 2. ミックスモード分離を用いた酸性糖鎖構造バリエーションの分離能の改善。(A) フェチュイン中の RFMS 標識糖鎖の FLR プロファイル。(B) (A) の拡大図。NeuGc と NeuAc の糖鎖分析種が更に分離しています。糖鎖の構造割り当ては、それぞれの分析種の MS スペクトルに基づいて行いました。(C) A2G2S2 の MS スペクトル。(S は NeuAc) (D) A2G2S1+NeuGc の MS スペクトル。

ACQUITY Premier Glycan BEH C<sub>18</sub> AX カラムは、RFMS 誘導体化糖鎖だけでなく、2-AB 標識糖鎖でも役に立つことが証明されました。RFMS 標識および 2-AB 標識フェチュインの N 型糖鎖それぞれのクロマトグラムを図 3 に示します。これらの分析種の保持能および選択性は明白であり、比較的低濃度のギ酸アンモニウムで達成できるように調整されています。加えて、同じ LC グラジエントでは、使用した標識にかかわらず、糖鎖プロファイルがほぼ同等であることが分かりました。2-AB 標識の塩基性が低いことから、固定相への吸着がわずかに強くなり、保持時間が長くなりましたが、これは予測通りです。糖鎖の電荷に基づく分離は弱陽イオン性標識でタグ付けられており、この新型ミックスモードカラムにより、MS シグナルが強化された、迅速で強陽イオン性標識を含む、多様な標識を結合した異性体の糖鎖の並外れた分離が実現しました。

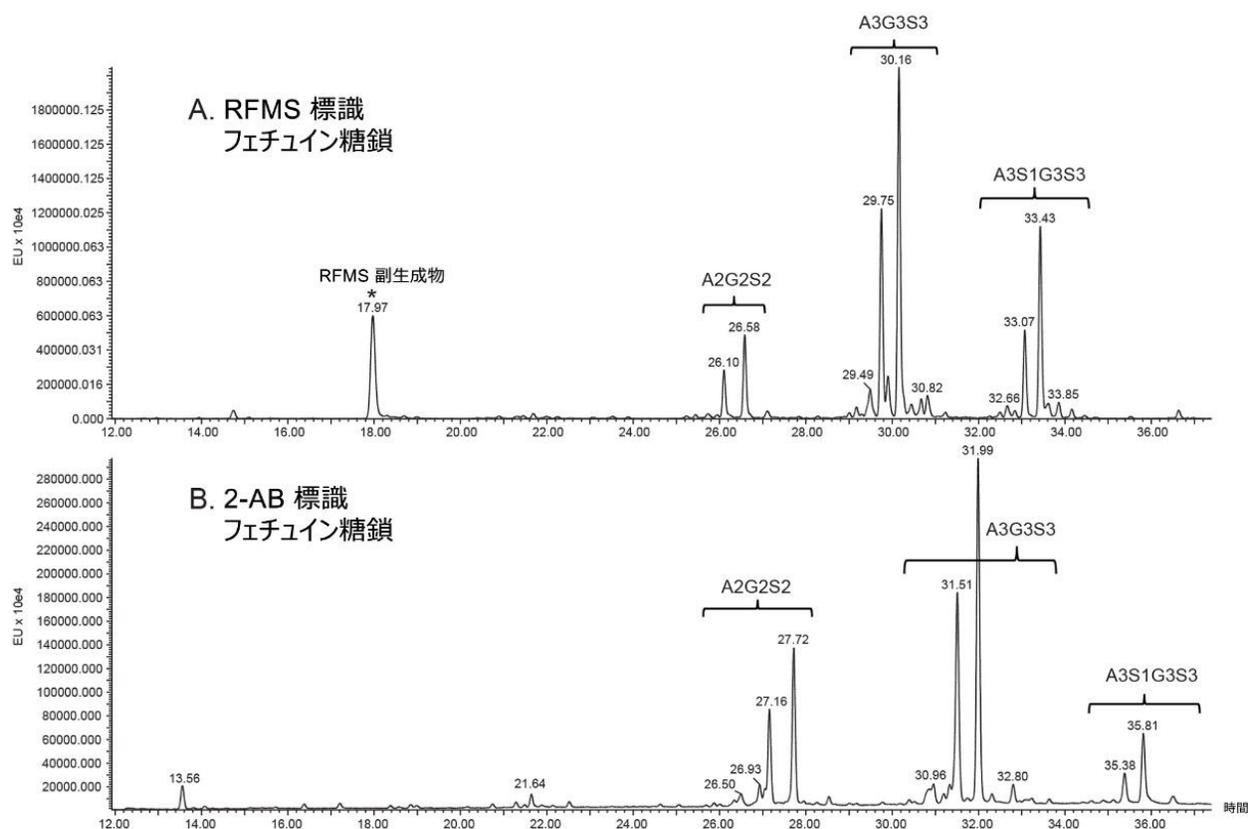


図 3. 2-AB 標識糖鎖および RFMS 標識糖鎖のいずれにも適しています。(A) フェチュイン中の RFMS 標識糖鎖の FLR プロファイル。(B) フェチュイン中の 2-AB 標識糖鎖の FLR プロファイル。アスタリスク (\*) は、標識の副生成物を示しています。

ACQUITY Premier Glycan BEH C<sub>18</sub> AX カラムテクノロジーの利点は、他の市販ツールと比較すると最もよくわかります。この点について、市販のミックスモードカラムと性能を比較しました。図 4 に、ACQUITY Premier Glycan BEH C<sub>18</sub> AX カラム (図 4A) と、市販の代替品 (図 4B) を用いた場合の 2AB 標識フェチュイン糖鎖の分離を示します。他社製カラムでは、高度にシアル酸化された糖鎖の保持が強いため、この実験では、0 ~ 30 mM ギ酸アンモニウムを用いる高イオン強度のグラジエントを採用しました。イオン強度の変化を加えた場合にも、ACQUITY Premier Glycan BEH C<sub>18</sub> AX の方が、A3G3S3 の Rs 値が 3.1 (1.1 に対して) であることからわかるように、分離能がはるかに上回っていました。また、この実験では、代替のミックスモードカラムでのペンタシアルリ化糖鎖の溶出には、30 mM ギ酸アンモニウムより強いイオン強度が必要であることがわかりました。これは感度の高い MS 分析には望ましくありません。

## 2-AB 標識フェチュイン糖鎖

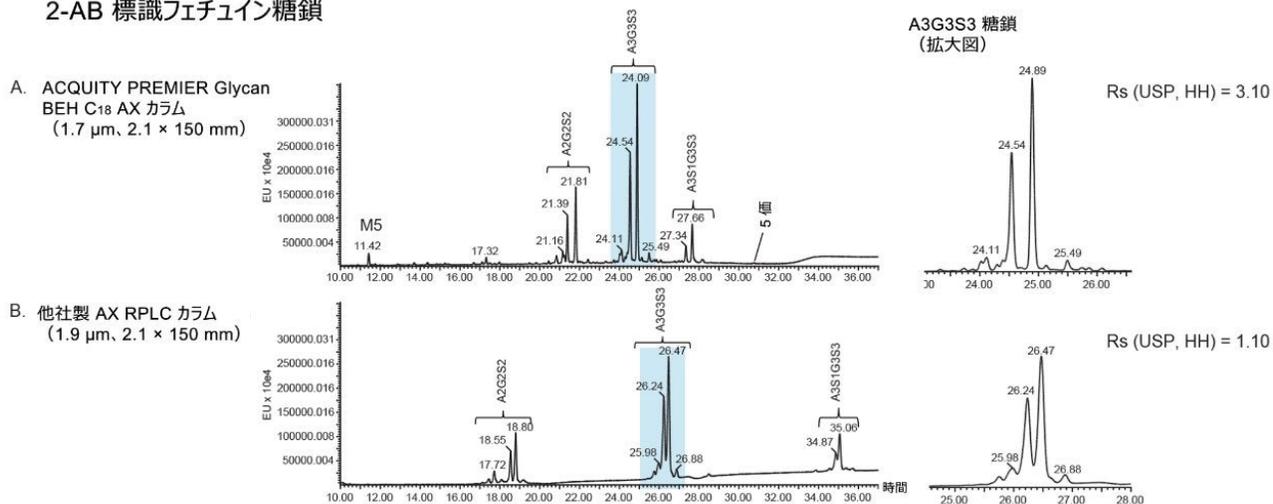


図 4. 標識糖鎖の分離用に調整した固定相。(A) ACQUITY Premier Glycan BEH C<sub>18</sub> AX カラム、および (B) 市販の AX RPLC カラムでの 2-AB 標識フェチュイン糖鎖の FLR プロファイリング。

最後に、ACQUITY Premier Glycan BEH C<sub>18</sub> AX カラムの製造において、注目すべき重要な側面があります。酸性化合物はカラムの金属表面で失われる傾向があるため、酸性化合物の分析は困難でした。それが重大な問題になる場合、キレート添加剤を含む移動相など、MS に適していない移動相条件が用いられる場合もありました。この問題に更に直接的に対処するために、ACQUITY Premier Glycan BEH C<sub>18</sub> AX カラムハードウェアに MaxPeak High Performance Surfaces と呼ばれる専用の不活性表面を装着しました。この処理により、カラム内で酸性糖鎖が好ましくない二次相互作用を起こすのを防ぐバリア層が導入されます。これにより、糖鎖の回収率が著しく向上し、初回使用時のサンプルコンディショニングの要件が排除されました。この HPS テクノロジーにより、リン酸化糖鎖についても画期的な性能が得られたこと、また、リソソーム蓄積疾患の酵素置換療法の分析におけるこのテクノロジーの重要性を更に説明する研究が進行中であることは注目に値します。

## 結論

新型の ACQUITY Premier Glycan BEH C<sub>18</sub> AX カラムは、HILIC に対して補完的なテクノロジーを提供するのに加えて、RapiFluor-MS などの MS の効果を高める標識により、誘導体化された分析種専用最適化された、酸性糖鎖の電荷に基づいた分離を実現しています。このテクノロジーに含まれている、入念に設計された陰イオン交換 RP 固定相は、様々な糖鎖標識での使用に適しており、同一の電荷グループ内での異性体の糖鎖について、更なる分離が得られます。このカラムは、High Performance Surface テクノロジーのメリットを活かすことで、その他の市販製品と比較して、

回収率の向上、および初回使用時の性能の改善を実現しており、複雑かつ重要な糖鎖プロファイルの分析の実現可能性がこれまで以上に高まっています。

---

## 参考文献

1. Varki, A. Sialic Acids in Human Health and Disease. *Trends in Mol. Med.* 2008, 14(8):351-360.
2. Bones, J.; Mittermayr, S.; McLoughlin, N.; Hilliard, M.; Wynne, K.; Johnson, G. R.; Grubb, J. H.; Sly W. S.; Rudd, P. M. Identification of N-glycans Displaying Mannose-6-phosphate and Their Site of Attachment on Therapeutic Enzymes for Lysosomal Storage Disorder Treatment. *Anal Chem.* 2011, 83(13), 5344-52.
3. Lauber, M. A.; Yu, Y. Q.; Brousmiche, D. W.; Hua, Z.; Koza, S. M.; Magnelli, P.; Guthrie, E.; Taron, C.H.; Fountain, K. J. Rapid Preparation of Released N-glycans for HILIC Analysis Using a Labeling Reagent that Facilitates Sensitive Fluorescence and ESI-MS Detection. *Anal Chem.* 2015, 87(10), 5401-9.
4. Lauber, M. A.; Walter, T. H.; DeLano, M.; Jung, M.; Boissel, C.; Gilar, M.; Smith, K.; Birdsall, R.; McDonald, T.; MacLean, J.; Nguyen, J.; Donegan, M.; Lame, M.; Rainville, P.; Belanger, J.; Wyndham, K. Waters Application Note, 720006930EN <<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135074404>> , 2020.
5. Nguyen, D. H.; Tangvoranuntakul, P.; Varki, A. Effects of Natural Human Antibodies Against a Nonhuman Sialic Acid that Metabolically Incorporates into Activated and Malignant Immune Cells. *J. Immunol.* 2005, 175(1), 228-36.

---

## ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio システム <<https://www.waters.com/10166246>>

Xevo G2-XS QToF 四重極飛行時間型質量分析計 <<https://www.waters.com/134798222>>

UNIFI 科学情報システム <<https://www.waters.com/134801648>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

720007038JA、2020年10月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#)  
[環境設定](#)

[プライバシー](#)

[商標](#)

[サイトマップ](#)

[キャリア](#)

[クッキー](#)

[クッキー](#)