

## 使用与MS兼容的阴离子交换反相分离技术提高酸性游离寡糖的分离能力

---

Xiaoxiao Liu, Matthew A. Lauber

Waters Corporation

---

### 摘要

在某些生物治疗药物中，糖基化通常被指定为关键质量属性，因为它们会影响稳定性、疗效和免疫原性。为小心控制并监测这些基团，通常先使药物产生游离N-糖，再以亲水作用色谱法(HILIC)进行分析，并利用荧光或质谱法进行检测。但是，在尝试实施此方法时遇到诸多挑战，特别是酸性游离寡糖的回收不完全，以及使用基于电荷的方法不足以分离用于增强MS响应的游离寡糖标记。本文利用新型混合模式阴离子交换RPLC固定相，实现不同电荷态的类别分离，为酸性游离寡糖提供更高的分离度。在MaxPeak高性能表面(HPS)技术的加持下，这种新型固定相结合ACQUITY Premier BEH C<sub>18</sub> AX糖基分析专用柱克服了原有缺点，提高了对酸性N-糖的分析能力。

### 优势

- 基于电荷的分离针对经过RapiFluor-MS和2-AB标记衍生化处理的酸性N-糖进行了优化
- 采用HPS技术的新颖ACQUITY Premier BEH C<sub>18</sub> AX糖基分析专用柱可提高分析物回收率，即使是初次使用也能获得出色性能
- 与其他市售AX RPLC色谱柱相比，具有更高的分离度和MS兼容性
- 经过QC测试的固定相批次可确保重现性和酸性游离寡糖分离度
- 与MS级流动相浓缩液和系统性能检查标准品集成，提供一套完整的基于电荷的分离解决方案
- 与HILIC模式分离共享样品制备消耗品和程序

---

## 简介

在生物治疗药物中，酸性N-糖通常被指定为关键质量属性，因为它们会影响稳定性、疗效和免疫原性。例如，唾液酸化游离寡糖改变抗炎作用<sup>1</sup>，甘露糖-6-磷酸游离寡糖则促进溶酶体靶向作用<sup>2</sup>。一种广泛应用的方法是，首先通过酶促释放游离N-糖并快速衍生化处理，再利用亲水作用色谱(HILIC)进行分离并通过荧光或质谱法进行检测<sup>3</sup>。有时需要更直接地确定有关糖谱的电荷特定信息。但尚未开发出一种LC分离技术，能够针对近期推出的正离子模式增强标记（如RapiFluor-MS）优化基于电荷的分离机制。虽然有几款市售的阴离子交换混合模式色谱柱，但这些色谱柱尚未针对MS增强快速标记进行明确的优化。此外，市售选件主要采用金属硬件制成，意味着酸性游离寡糖的不完全回收非常常见。

为解决这些问题，沃特世开发出新型ACQUITY Premier BEH C<sub>18</sub> AX糖基分析专用柱，用于改进酸性N-糖的分析。这种新型混合模式阴离子交换RPLC固定相(95 Å, 1.7 μm)及其优化的可电离改性剂已得到应用，可使基于电荷的分离有效发挥作用，并对传统标记和MS增强标记衍生化的酸性游离寡糖提供更高的分离度。此外，该色谱柱在制造时采用高性能表面技术，经证明能够在酸性分析物的色谱分析过程中大幅减少样品损失<sup>4</sup>。

---

## 实验

### 样品描述

- RapiFluor-MS唾液酸化游离寡糖性能测试标准品（部件号：[186008660](#) <<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186008660>>）的制备方式为：将1瓶标准品复溶于50 μL水中，得到最终浓度为8 pmol/μL的溶液
- RapiFluor-MS游离寡糖性能测试标准品（部件号：[186007983](#) <<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186007983>>）的制备方式为：将1瓶标准品复溶于50 μL水中，得到最终浓度为8 pmol/μL的溶液
- AdvanceBio 2-AB牛胎球蛋白N-糖库（安捷伦，部件号：DP1812601）的制备方式为：将1瓶标准样品复溶于20 μL水中，得到最终浓度为10 pmol/μL的溶液

### 方法条件

---

## 液相色谱条件

系统:	ACQUITY UPLC H-Class Bio
数据采集:	MassLynx 4.1版
色谱柱:	ACQUITY Premier BEH C <sub>18</sub> AX糖基分析专用柱, 1.7 μm, 2.1 x 150 mm
样品温度:	8 °C
样品进样体积:	1 μL
FLR波长:	265激发波长/425发射波长 (RFMS标记的游离寡糖) ) 330激发波长/420发射波长 (2-AB标记的游离寡糖) )
柱温:	60 °C
密封清洗液:	30% ACN/70% 18.2 MΩ水v/v (密封件清洗间隔设置 为5 min)
流动相A <sup>1</sup> :	18.2 MΩ水
流动相B <sup>2</sup> :	10% IonHance Glycan C <sub>18</sub> AX 1 M甲酸铵浓缩液 (溶于40%/60%水/乙腈(v/v)中)
主动预加热器:	启用
扫描速率:	10点/秒
滤光器时间常数:	正常

进样开始时自动复零： 是

波长变化时自动复零： 维持基线

1. 纯水流动相可能容易滋生细菌。建议经常（每3天）更换流动相，并定期用90/10乙腈/水混合液冲洗溶剂管路。
2. 流动相B的制备方式为：使用320 mL MilliQ水和580 mL乙腈稀释100 mL IonHance Glycan C<sub>18</sub> AX 1 M甲酸铵浓缩液。建议经常（每3天）更换流动相B，以免乙腈蒸发引起任何潜在的性能变化。

### 梯度 - RapiFluor-MS标记的游离寡糖（图1、 2、 3）

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.4	100	0	初始
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

## 梯度 – 2-AB标记的游离寡糖 (图4)

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.4	100	0	初始
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

## 质谱条件

系统:	Xevo G2-XS QTof
电离模式:	ESI, 正离子
采集范围:	700-3000 Da
毛细管电压:	2.2 kV
电离源补偿:	50 V
碰撞能量:	关
锥孔电压:	75 V
脱溶剂气流速:	600 L/h
离子源温度:	120 °C
脱溶剂气温度:	500 °C

扫描速率： 2 Hz

## 数据管理

色谱软件： MassLynx 4.1版

质谱软件： MassLynx 4.1版

信息学软件： UNIFI v.1.8

---

## 结果与讨论

ACQUITY Premier BEH C<sub>18</sub> AX糖基分析专用柱经过专门设计，可对RFMS标记的游离寡糖进行基于电荷的分离，提供与其他传统HILIC分离互为补充的正交选择性。与其他市售混合模式固定相不同，ACQUITY Premier BEH C<sub>18</sub> AX糖基分析专用柱采用高度稳定的可电离改性剂和键合程序，因此非常适合分离由带有两亲性强碱部分的增强MS响应标记（如*RapiFluor-MS*）衍生化处理的游离寡糖。图1突显了该色谱柱技术的特殊设计属性，通过分离由人IgG和牛胎球蛋白N-糖制备的RFMS标记N-糖可以看出，其中A图和B图分别为使用ACQUITY Premier BEH C<sub>18</sub> AX糖基分析专用柱和BEH Amide糖基分析专用柱获得的色谱图。两种色谱柱填料均能够分离20多种RFMS标记的游离寡糖。借助混合模式分离，可以将游离寡糖按不同的电荷态分组，观察到保留性能随分析物的净电荷增加而提升。利用甲酸铵由0增加至22 mM的低离子强度梯度实现这一混合模式分离，并以荧光和质谱检测进行高灵敏度连续检测（图1C）。事实上，这种分析策略可检测相对丰度低于0.1%的游离寡糖，与Xevo G2-XS QToF联用时，其绝对检测限可低至飞摩尔水平。

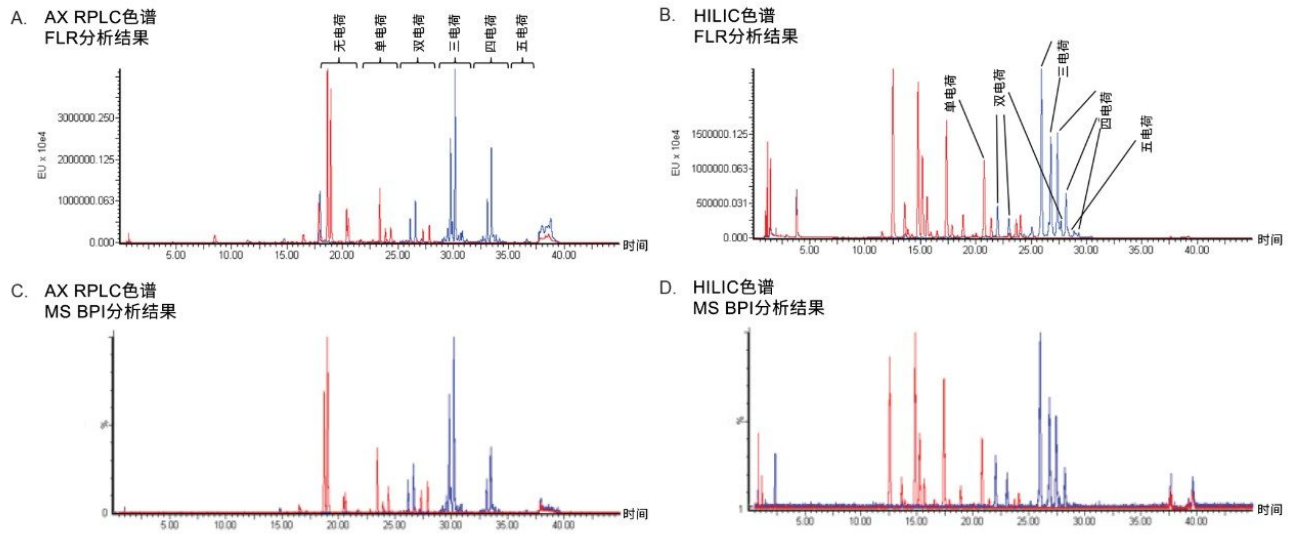


图1.使用不同液相色谱技术分析人IgG（红色）和胎球蛋白（蓝色）中RFMS标记的游离寡糖得到的FLR色谱图。利用具有高性能表面的不锈钢硬件装填所有色谱柱。图1A和图1C：使用BEH C<sub>18</sub> AX固定相进行阴离子交换反相液相色谱(AX RPLC)混合模式分离得到的FLR分析结果(A)和MS BPI分析结果(C)。图1B和图1D：使用酰胺键合BEH固定相进行HILIC分离获得的FLR分析结果(B)和MS BPI分析结果(D)。

由于固定相的RP特性，可以使同一电荷组内的游离寡糖异构体分子获得更高的分离度。例如，N-乙酰神经氨酸(NeuAc)和N-甘氨酸神经氨酸(NeuGc)是哺乳动物细胞中最常见的唾液酸。NeuGc是一种非人类形式的唾液酸，通常被视为生物治疗药物的CQA，因为其具有免疫原性，并在患者接受给药后引起生物药物中和及快速清除<sup>5</sup>。但是，NeuGc与NeuAc相比，仅在N-羟乙酰基中多出一个氧原子，因此使用HILIC色谱法难以将NeuGc-游离寡糖与NeuAc-游离寡糖分离。相比之下，新型BEH C<sub>18</sub> AX糖基分析专用柱可成功分离NeuGc异构体与主要的NeuAc游离寡糖物质。图2显示了使用优化的45 min液相色谱梯度（详情见“实验”部分）和ACQUITY Premier BEH C<sub>18</sub> AX糖基分析专用柱从牛胎球蛋白中分离RFMS标记N-糖的分析结果。将所得色谱图放大10倍（图2B）可以看出，两种丰度最高的A2G2S2物质分别在26.42 min和26.89 min处流出，*m/z* 值为845.69 Da（图2C）。同时，在25.57 min和25.76 min左右流出的两个游离寡糖峰显示*m/z*值为851.03 Da（图2D），对应于包含一个NeuGc和一个NeuAc的A2G2S2物质。A3G3S3和A3S1G3S3观察到类似的洗脱模式，进一步表明，在较高级天线结构中，NeuGc残基取代了NeuAc。使用混合模式色谱法时，可以确认N-羟乙酰基物质将比其对应的N-乙酰基物质更早洗脱，且分离度非常高，可以分离具有不同净电荷状态各游离寡糖物质。

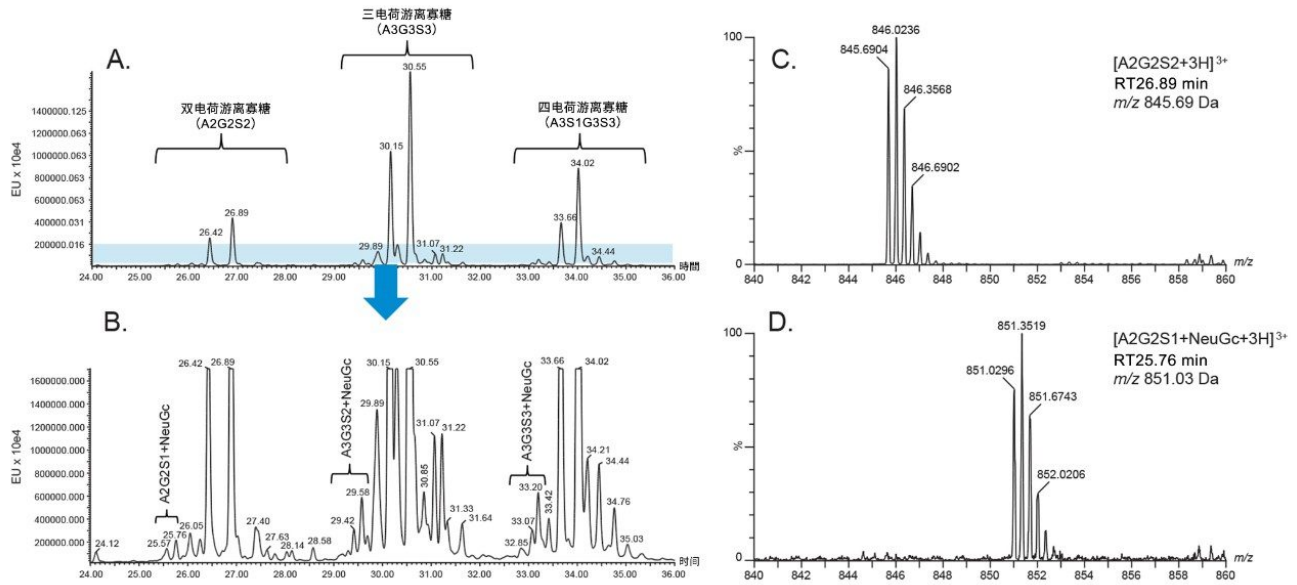


图2.酸性游离寡糖结构异构体的分离度在混合模式分离中得以提高。(A) 胎球蛋白中RFMS标记游离寡糖的FLR分析结果。(B) (A)的放大图，可以看出NeuGc与NeuAc游离寡糖物质之间获得了额外分离。基于各种物质的质谱图对游离寡糖进行的结构归属。(C) A2G2S2的质谱图。(S表示NeuAc) (D) A2G2S1+NeuGc的质谱图。

研究证明，ACQUITY Premier BEH C<sub>18</sub> AX糖基分析专用柱不仅适用于分离RFMS衍生化处理的游离寡糖，还适用于2-AB标记的游离寡糖。分析RFMS和2-AB标记的胎球蛋白N-糖所得到的代表性色谱图见图3。这些物质的保留性能和选择性非常明显，使用相对较低浓度的甲酸铵即可进行调节。另外，借助相同的液相色谱梯度，发现无论使用哪种标记，所得糖谱都相当接近。2-AB标记由于具有弱碱性，因此与固定相的吸附稍强，保留时间增加，与预期一致。使用基于电荷的方法分离带有弱阳离子标记的游离寡糖时，这种新型混合模式色谱柱为与多种不同标记（包括增强MS信号的快速强阳离子标记）偶联的游离寡糖异构体提供了更高的分离度。



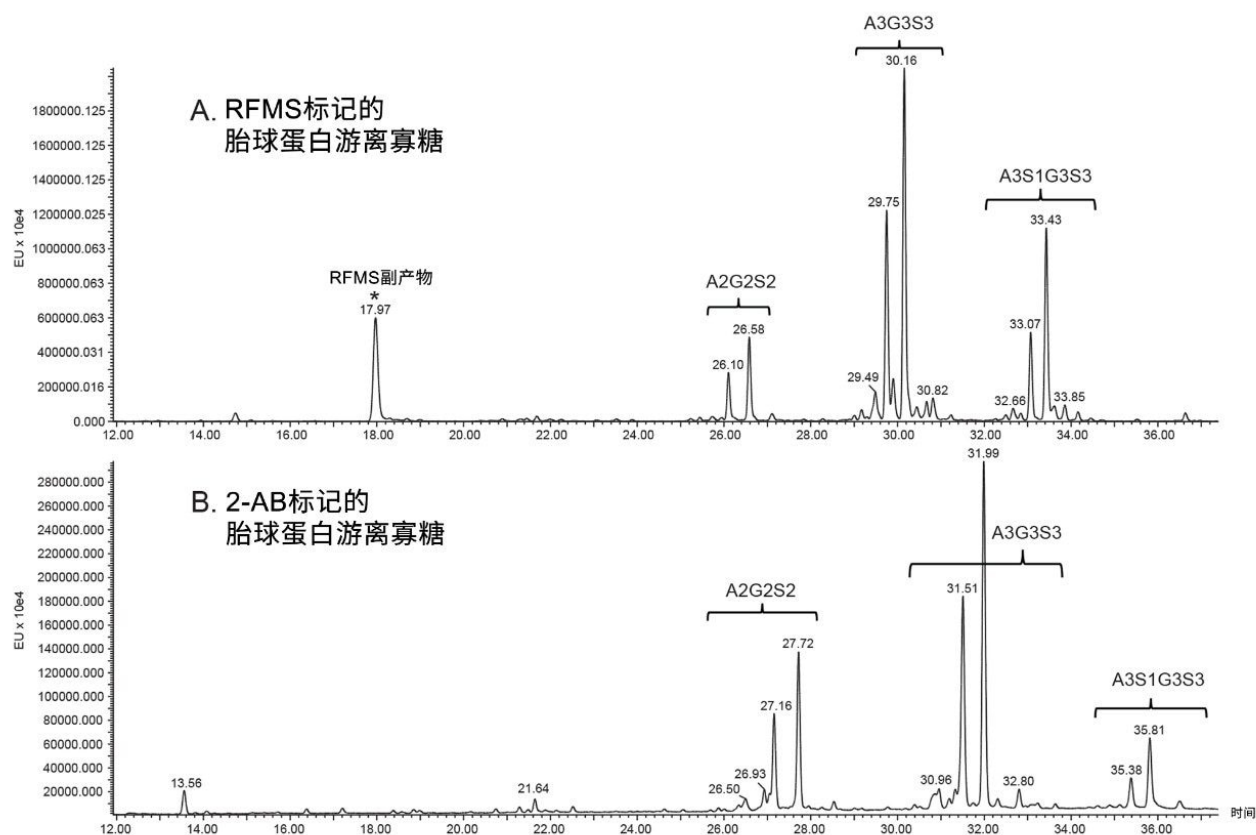


图3.同时适用于2-AB和RFMS标记的游离寡糖。(A) 胎球蛋白中RFMS标记游离寡糖的FLR分析结果。(B) 胎球蛋白中2-AB标记游离寡糖的FLR分析结果。星号(\*)表示标记的副产物峰。

与其他市售工具进行比较可以轻松凸显ACQUITY Premier BEH C<sub>18</sub> AX糖基分析专用柱技术的实用性。为此，我们比较了该色谱柱与市售混合模式色谱柱的性能。图4展示了使用ACQUITY Premier BEH C<sub>18</sub> AX糖基分析专用柱（图4A）与市售替代品（图4B）得到的2-AB标记胎球蛋白游离寡糖的分离结果。由于竞争产品色谱柱对高度唾液酸化的游离寡糖有较强的保留性能，因此本研究应用离子强度更高的梯度（甲酸铵从0升至30 mM）。即使增加了离子强度变化，ACQUITY Premier BEH C<sub>18</sub> AX糖基分析专用柱提供的分离度仍明显高于竞争产品，具体表现在A3G3S3的Rs值分别为3.1和1.1。该测试还表明，从竞争产品混合模式色谱柱上洗脱五唾液酸化游离寡糖需要高于30 mM甲酸铵的离子强度，这对于实现灵敏的MS分析并不理想。

## 2-AB标记的胎球蛋白游离寡糖

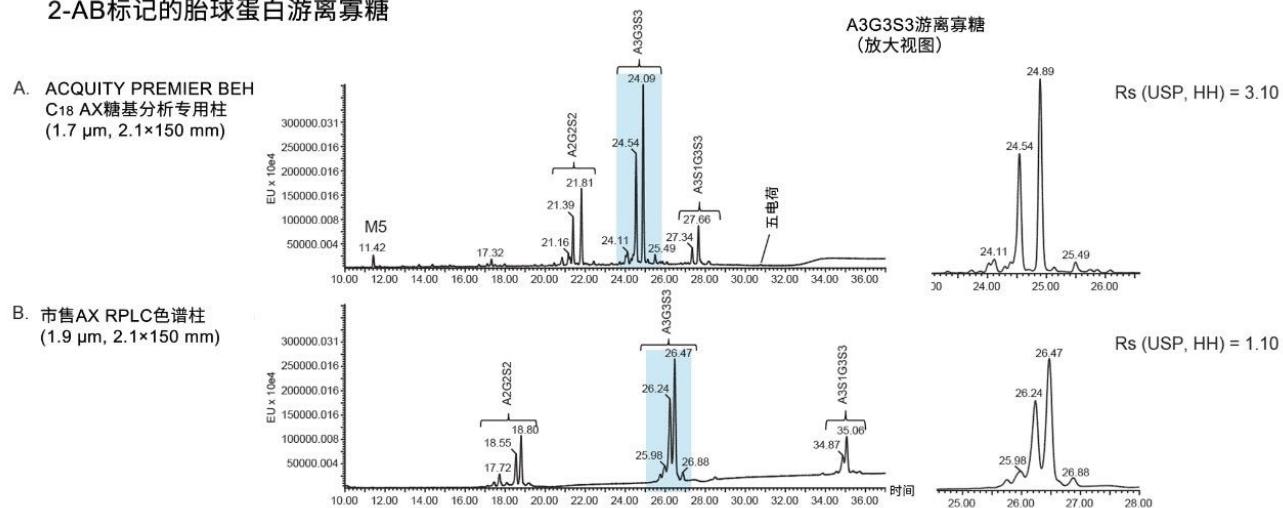


图4.针对标记的游离寡糖分离调整的固定相。使用(A) ACQUITY Premier BEH C<sub>18</sub> AX糖基分析专用柱和(B) 市售AX RPLC色谱柱分离2-AB标记胎球蛋白游离寡糖得到的FLR分析结果。

最后，在ACQUITY Premier BEH C<sub>18</sub> AX糖基分析专用柱的制造中，有一个关键环节值得关注。由于酸性分析物容易在色谱柱的金属表面发生损失，因此分析起来通常非常棘手。由于此问题已经非常关键，一些研究人员通过使用不兼容MS的流动相条件寻求解决方法，例如包含螯合剂添加剂的条件。为了更直接地解决这一问题，ACQUITY Premier BEH C<sub>18</sub> AX糖基分析专用柱硬件配备专用惰性表面，称为MaxPeak高性能表面。这种处理方式会引入一层屏障，防止酸性游离寡糖在色谱柱内部发生不良的二次相互作用。从而显著提高游离寡糖的回收率，并且在首次使用时无需进行样品活化。值得一提的是，该HPS技术还突破了对磷酸化游离寡糖的分析性能，并且正在开展更多研究，以进一步说明其对于溶酶体贮积症的酶替代疗法分析的重要性。

## 结论

除作为HILIC的正交技术以外，新型ACQUITY Premier BEH C<sub>18</sub> AX糖基分析专用柱还可以对酸性游离寡糖实现基于电荷的分离，该方法针对使用增强MS信号标记（如RapiFluor-MS）衍生化处理的物质进行了特有优化。该技术中精心设计的阴离子交换RP固定相适用于不同的游离寡糖标记，并为同一电荷组内的游离寡糖异构体提供了更高的分离度。得益于高性能表面技术，该色谱柱与其他市售产品相比，具有更高的回收率和首次使用性能，使分析复杂但重要的糖谱比以往任何时候都更加可行。

---

## 参考资料

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. 沃特世应用纪要, 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.

---

## 特色产品

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

Xevo G2-XS QToF四极杆飞行时间质谱仪 <<https://www.waters.com/134798222>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

720007038ZH, 2020年10月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号