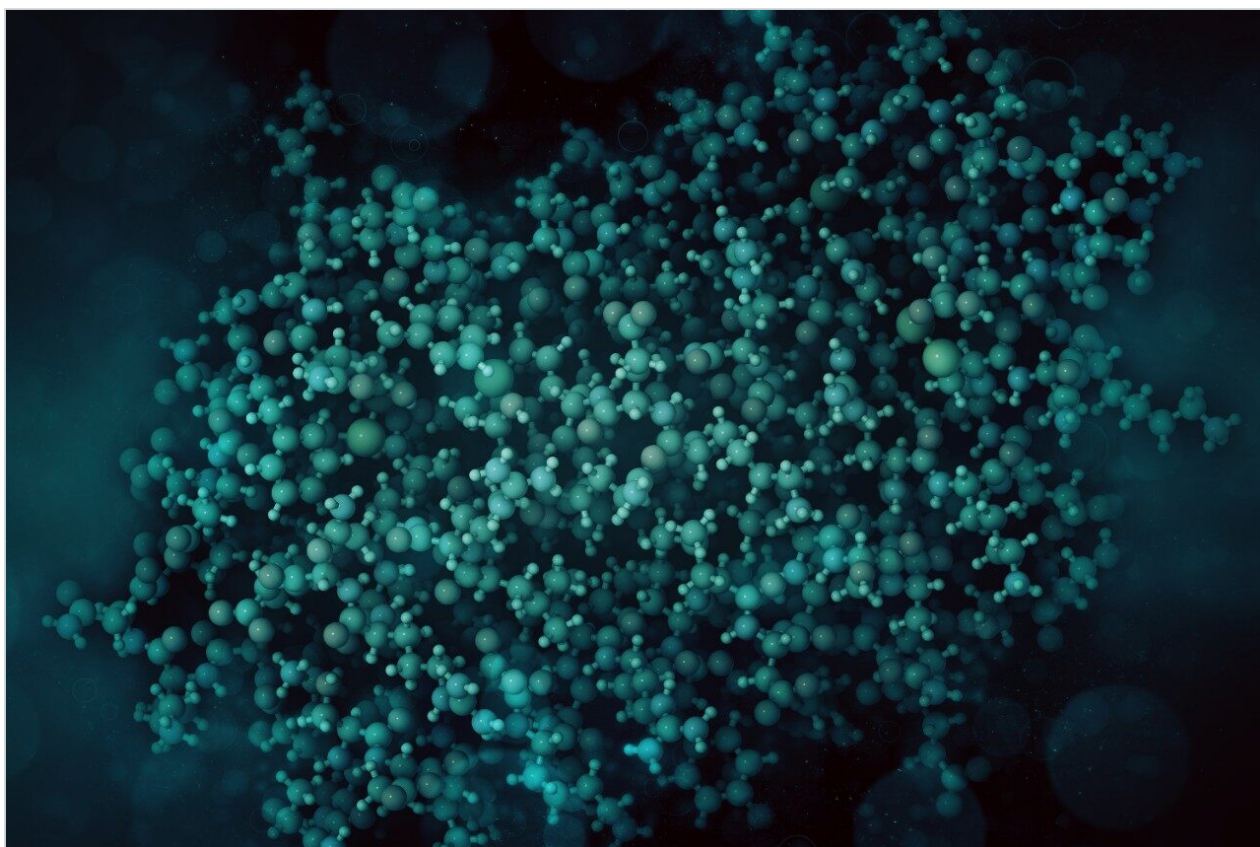


应用纪要

使用ACQUITY Premier CSH色谱柱改善促红细胞生成素(EPO)唾液酸化O-糖肽的回收率和峰形

Samantha Ippoliti, Ying Qing Yu, Weibin Chen

Waters Corporation



这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

通过LC-MS进行肽图分析是一项强大的表征技术，常用于蛋白质序列确认、翻译后修饰(PTM)分析和相对定量。为促进深入表征，分析人员需要在样品前处理和数据采集过程中获得足够高的色谱峰分离度并尽量减少分析物损失。这一目标对于某些肽（例如唾液酸化O-糖肽）而言可能愈发具有挑战性，因为这些肽可能会在样品前处理和实验过程中同遇到的表面发生非特异性相互作用而表现出吸附损失。具体而言，高度唾液酸化糖肽可能吸附至色谱柱和液相色谱系统中的金属表面，导致峰拖尾和分析物损失。本应用简报展示了采用MaxPeak高性能表面的ACQUITY Premier色谱柱的优势，及其在生物制剂的表征中改善唾液酸化O-糖肽的分离度和回收率的能力。

优势

- 与不锈钢色谱柱相比，减少了非特异性样品吸附
- 改善了样品回收率、液相色谱峰对称性和保留时间重现性

简介

在生物制药行业，肽图分析通常是药品表征和质量控制的关键分析方法之一。因此，要对这些蛋白质分析物实现准确表征、监测和比较，必须采用稳定耐用且可重现的方法。对于大多数肽，目前所用的技术即可满足这些需求，但在某些情况下，酸性肽¹（例如磷酸化肽²和唾液酸化糖肽）仍然面临挑战，它们在某些条件下会表现出较差的峰形和较低的回收率。在使用甲酸作为流动相添加剂的典型反相分离中，这些肽通常带有净负电荷，因此容易通过类似于路易斯酸/碱的相互作用而在色谱柱和液相色谱系统的金属表面发生非特异性吸附，从而导致色谱峰拖尾和分析物损失，进而产生不准确和重现性较差的结果。为解决这些问题，沃特世开发出一系列采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术的ACQUITY Premier色谱柱，该技术提供了一层表面屏障，有助于减轻与金属表面的不必要相互作用³。

本研究考察了采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱与传统不锈钢色谱柱相比，在唾液酸化糖肽的回收率和峰形方面的色谱性能。鉴于促红细胞生成素(EPO)具有动态糖基化谱图和作为治疗性生物分子的临床相关性，故将其用于本案例研究。

结果与讨论

作为一种小分子糖蛋白，EPO含有3个N-糖基化位点和1个O-糖基化位点（图1），因此更容易表现出由金属表面相互作用引起的色谱干扰。胰蛋白酶酶解的O-糖肽(T13)有四种形式：T13无糖基化形式、T13 + HexNAc(1)Hex(1)形式、T13 + HexNAc(1)Hex(1)NeuAc(1)（单唾液酸化）形式和T13 + HexNAc(1)Hex(1)NeuAc(2)（双唾液酸化）形式。本研究在使用BioAccord系统（ACQUITY UPLC I-Class与ACQUITY RDa检测器联用）分析EPO（一种候选生物类似药）样品之前，对其进行了变性、还原、烷基化和胰蛋白酶酶解处理。为便于比较色谱性能，在60 °C下使用常规方法在采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱（ACQUITY Premier CSH C₁₈, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 x 100 mm, 部件号：186009488 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186009488-acquity-premier-peptide-csh-c18-column-130a-17--m-21-x-100-mm-1-.html>>）和等效的不锈钢色谱柱（ACQUITY UPLC CSH C₁₈, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 x 100 mm, 部件号：176002141 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/176002141-acquity-uplc-csh-c18-column-130a-17--m-21-mm-x-100-mm-3-pk.html>>）上分离肽酶解物（上样量0.5 μg）。简言之，在使用甲酸(FA)的RPLC分离中，表面带电杂化(CSH)填料被证明能够改善峰形并增加肽的峰容量。配制的标准流动相为含有0.1%甲酸的水溶液（流动相A）和含有0.1%甲酸的乙腈溶液（流动相B）。采用的分离梯度为流动相B在50 min内由1%增加至35%。在正离子ESI模式下采集m/z 50–2000范围内的MS数据。将ACQUITY RDa质谱离子源设置为毛细管电压1.2 kV、锥孔电压30 V、脱溶剂气温度350°C、能量梯度60~120 V，以在数据非依赖型采集模式(DIA)下进行碰撞诱导碎裂。

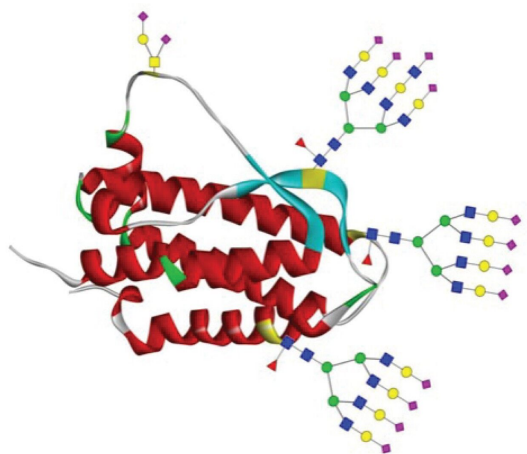


图1.促红细胞生成素(EPO)的结构，展示了存在N-糖基化和O-糖基化的示例

利用目标肽中最强电荷态的提取离子色谱图(XIC)评估O-糖基化肽的峰形和回收率。图2显示了表1中预期质量数下各个XIC的叠加图。峰1（绿色）对应于T13核心O-糖物质(+HexNAc(1)+Hex(1))，峰2（黑色）对应于无糖基化T13肽，峰3（红色）对应于单唾液酸化T13物质，峰4（蓝色）对应双唾液酸化T13物质。所得XIC色谱

图表明，当使用结合MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱时，所有XIC峰的灵敏度（检测器响应）均得到显著改善。所有物质的峰面积增加至少1.5倍，表明使用结合MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱时，总体上提高了O-糖基化肽的回收率。值得注意的是，观察到双唾液酸化T13 O-糖肽的峰面积增加了3倍，表明该色谱柱技术能够显著提高唾液酸化糖基的回收率，这些唾液酸化糖基可能更容易受到金属引起的吸附干扰的影响。预计O-糖肽的MS信号增强将有助于提高LC-MS分析中用于肽鉴定和结构解析的MS/MS数据的质量，在肽丰度较低的情况下尤其如此。

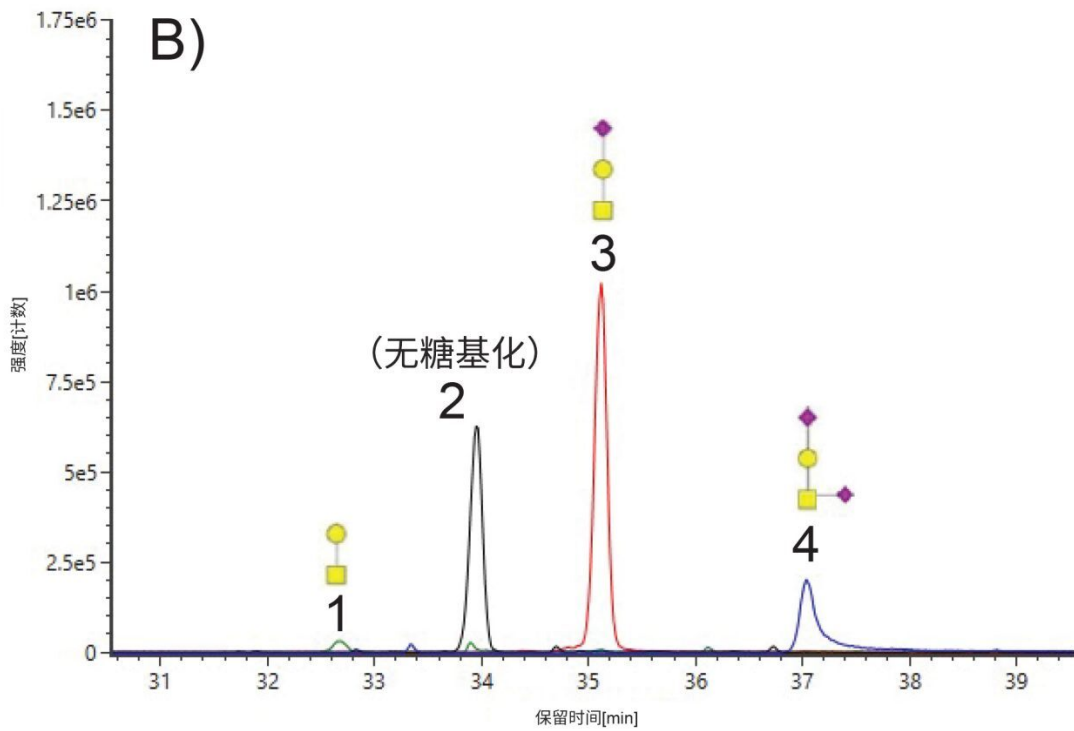
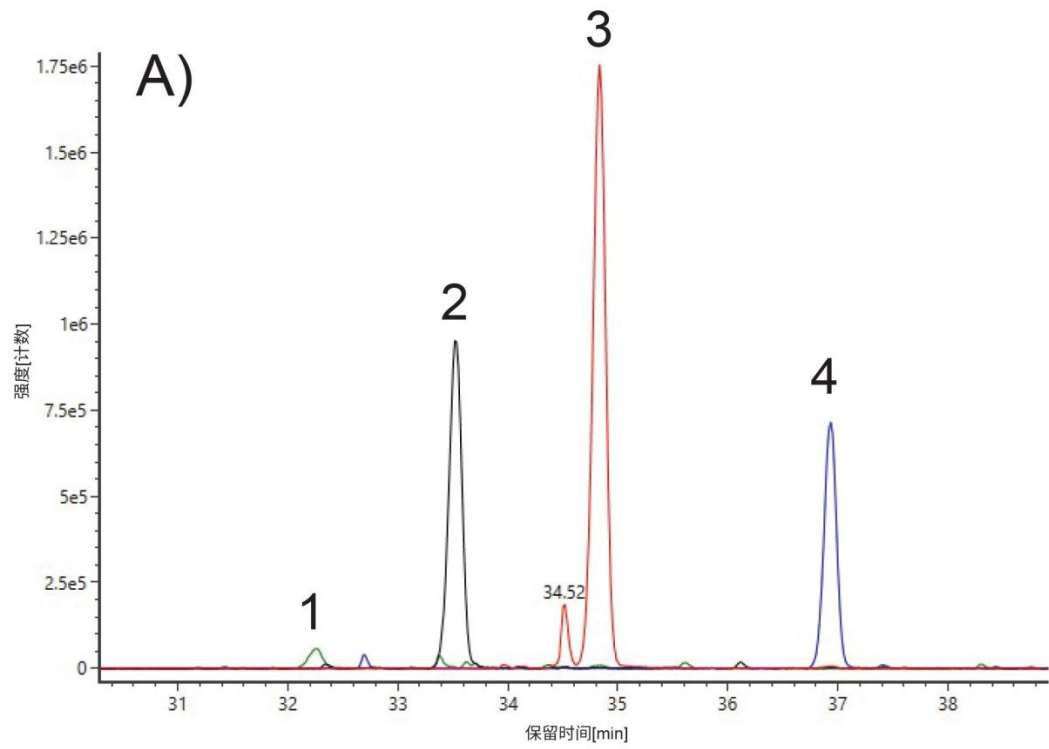


图2.采用A) ACQUITY Premier CSH色谱柱和B)不锈钢ACQUITY CSH色谱柱获得的T13 O-糖肽(EAISPPDAASAAPLR)的提取离子色谱图叠加图

肽 T13: EAISPPDAASAAPLR	预期质量数 (M+H ⁺)	电荷	预期m/z
无糖基化	1465.7645	2	733.3859
		3	489.2597
+ HexNAc(1)Hex(1) 	1830.8967	2	915.9520
		3	610.9704
+ HexNAc(1)Hex(1)NeuAc(1) 	2121.9921	2	1061.4997
		3	708.0022
+ HexNAc(1)Hex(1)NeuAc(2) 	2413.0876	2	1207.0474
		3	805.0340

表1.T13 O-糖肽列表，包括预期质量数和m/z值，用于生成提取离子色谱图(XIC)以供分析。

此外，当使用结合MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱时，还观察到双唾液酸化物质的峰形显著改善。如图3所示，峰不对称性（在10%峰高处计算）降低至1/6 ($As \approx 6$ vs. $As \approx 1$)，唾液酸化糖肽的峰形接近高斯分布。这种新观察到的峰对称性能够实现清晰且可重现的峰积分，从而实现更准确的相对定量。将这些肽图分析实验获得的值与之前分析*的同一批次完整N-糖基释放EPO样品的相对定量结果进行比较。在完整水平上，预计蛋白质不会表现出像肽一样明显的吸附干扰，因为宏观结构的理化性质在洗脱曲线中占主导地位。鉴于此，预计完整水平的O-糖基化谱图能够更准确地代表O-糖基化含量。如表2所示，采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱获得的相对定量值与完整蛋白分析中观察到的值更接近，此现象在双唾液酸化物质分析中更为显著，证明ACQUITY Premier色谱柱相较于正交补充方法能够准确反映样品组成。综上所述，这些结果证明，采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱具有重要价值，能够为简单的O-糖肽的相对定量提供更加耐用且更准确的方法。

*进行RPLC-MS分析之前，使用PNGaseF对之前分析的完整EPO样品进行糖基释放。

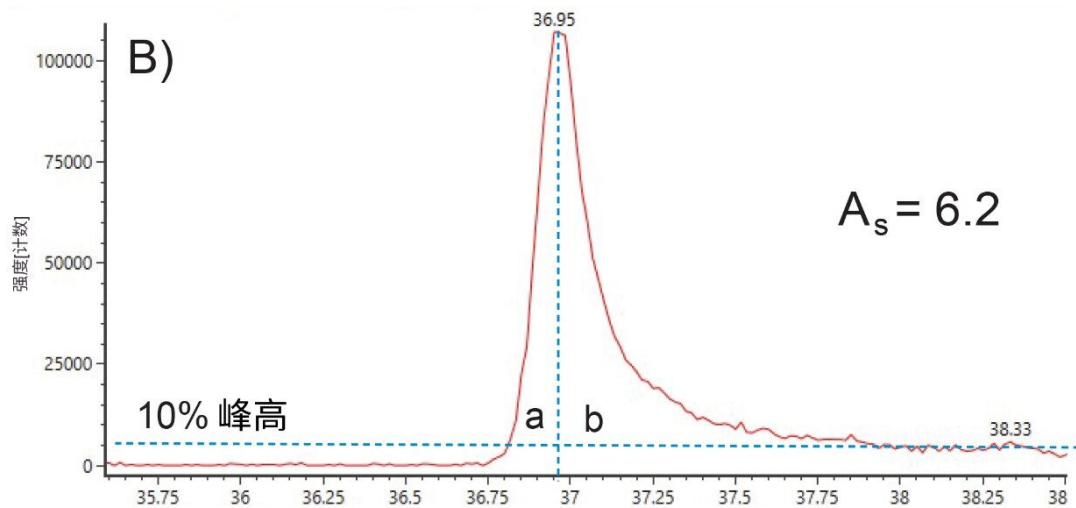
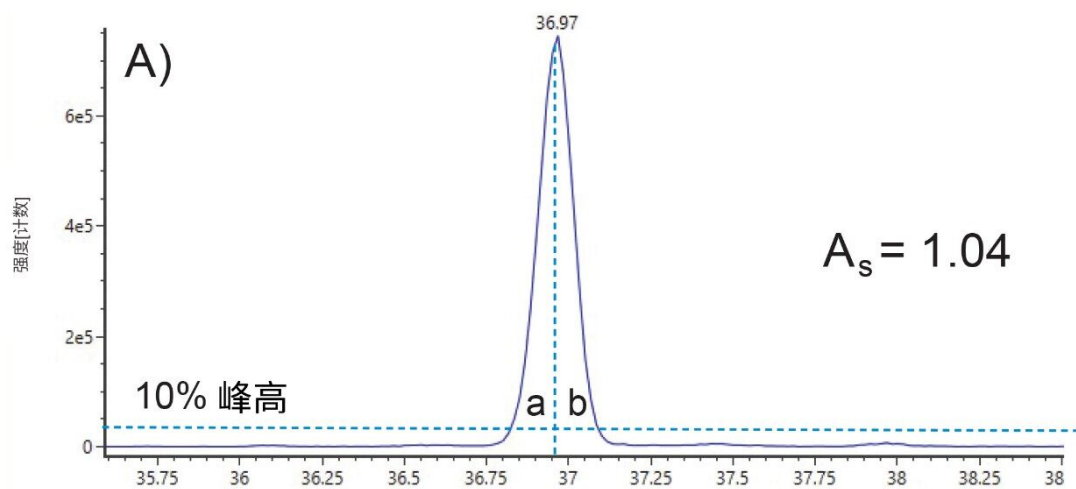


图3.采用A) ACQUITY Premier CSH色谱柱和B)不锈钢ACQUITY CSH色谱柱得到的双唾液酸化T13 O-糖肽的提取离子色谱图，突出显示了峰不对称性（计算公式： $A_s = b / a$ ，在10%峰高处计算）。

肽 T13: EAISPPDAASAAPLR	相对%		
	ACQUITY Premier CSH C ₁₈	不锈钢CSH C ₁₈	完整N-糖基释放EPO
无糖基化	27.0%	31.0%	29.6%
+ HexNAc(1)Hex(1)	2.9%	3.0%	3.1%
+ HexNAc(1)Hex(1)NeuAc(1)	52.2%	54.6%	50.1%
+ HexNAc(1)Hex(1)NeuAc(2)	17.5%	11.4%	17.9%

表2. T13 O-糖肽和完整N-糖基释放EPO样品的相对定量结果

结论

肽分析物在传统不锈钢LC-MS色谱柱表面的非特异性相互作用和吸附导致分析物回收率低且峰不对称。这为表征金属敏感分析物（例如含有唾液酸化糖基的O-糖肽）带来了巨大挑战。采用MaxPeak高性能表面的Waters ACQUITY Premier色谱柱技术解决了金属引起的吸附干扰挑战。就EPO T13 O-糖肽而言，ACQUITY Premier CSH色谱柱与传统的不锈钢色谱柱相比，总体提高了灵敏度，并显著改善了双唾液酸化T13 O-糖肽的峰形和相对定量结果。对于创建耐用且可重现的方法用于O-糖肽分析而言，这是一个重要里程碑。

参考资料

1. Koshel B, Simeone J, Dao D, Nguyen JM, Rzewuski SC, Lauber MA, Birdsall RE, Yu YQ. 使用基于MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier解决方案避免LC系统钝化需求和提高磷酸化肽回收率. 沃特世应用纪要. 720006921ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/bypassing-lc-system-passivation-requirements-using-acquity-premier-with-maxpeak-hps-technology-for-the-recovery-of-a-phosphorylated-peptide.html>> .2020年5月.
2. Birdsall RE, Kellet J, Ippoliti S, Ranbaduge N, Shion H, Yu YQ. 采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier可提高RPLC-MS方法分析酸性肽的色谱性能. 沃特世应用纪要. 720007003ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/increasing-chromatographic-performance-of-acidic-peptides-in-rplc-ms-based-assays-with-acquity-premier-featuring-maxpeak-hps-technology.html>> .2020年9月.

3. Lauber MA, Walter TH, Gilar M, DeLano M, Boissel C, Smith K, Rainville P, Belanger J, Wyndam K. Low Adsorption HPLC Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces. Waters White Paper 720006930EN <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006930en.pdf>> .Oct 2020.
4. CarboMet. Case Study 2- Erythropoietin EPO. Sabine Flitsch教授, 曼切斯特大学. 2021年2月19日访问. <<https://carbomet.eu/case-studies/erythropoietin-epo/>> <<https://carbomet.eu/case-studies/erythropoietin-epo/>> >.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <

<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

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

UNIFI生物制药平台解决方案 <<https://www.waters.com/waters//nav.htm?cid=10195515>>

720007227ZH, 2021年4月