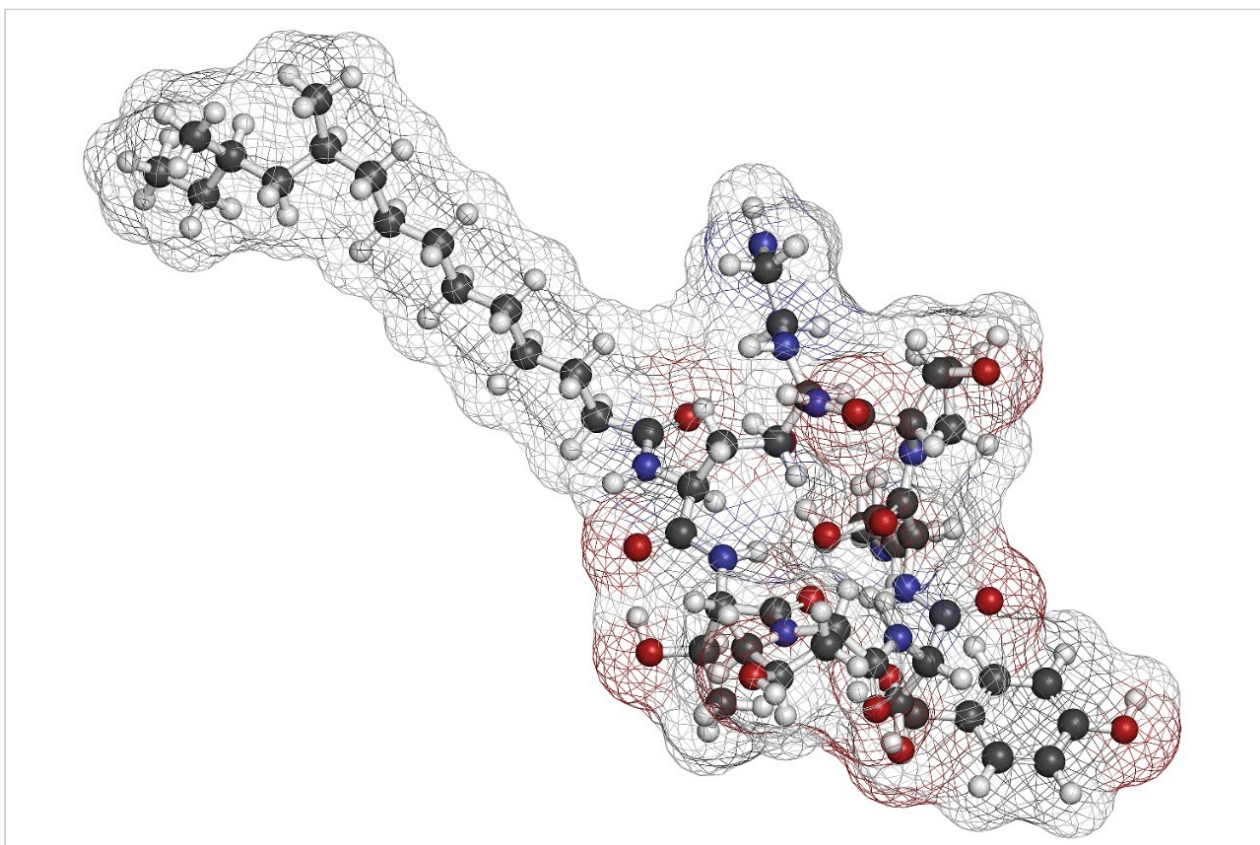


应用纪要

MaxPeak高性能表面技术改善游离N-糖的HILIC分析

Xiaoxiao Liu, Matthew A. Lauber

Waters Corporation



摘要

不锈钢色谱柱硬件对金属敏感化合物的色谱分析可能具有不利影响，此类化合物可能因发生吸附和次级相互作用

用而表现出不对称峰形且回收率不佳，尤其是严苛的低离子强度条件下的分离情况。为解决这一问题，我们开发出MaxPeak高性能表面(HPS)，该技术可提供一种高效的表面屏障，用于防止分析物与色谱柱的金属表面发生不良相互作用。在游离N-糖的分析中，酸性N-糖可能会出现这些问题，例如含有多个唾液酸或磷酸化甘露糖残基的游离N-糖。在某些生物治疗药物中，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。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)和质谱法进行分析。在某些情况下，使用该技术分析酸性N-糖难以在保持MS兼容性的同时获得良好的峰形和回收率。使用搭载MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier BEH Amide糖基分析柱，通过超高压HILIC色谱法回收高度唾液酸化和磷酸化糖基现已成为可能，该方法对于色谱柱老化无任何依赖或要求。

优势

- 新型ACQUITY Premier BEH Amide糖基分析柱搭载MaxPeak HPS技术，在新色谱柱上进行首次进样即可实现所需性能和更高的糖基回收率
- 准确分析高度唾液酸化和磷酸化糖基，无需进行耗时的色谱柱老化和钝化步骤
- 与常规的不锈钢硬件色谱柱相比，该色谱柱分析唾液酸化糖基的保留时间重现性更为出色
- MS级甲酸铵浓缩液和RapiFluor-MS糖基性能测试标准品有助于建立一种易于实施的游离N-糖分析方法

简介

由于生物治疗药物领域的发展脚步不断前进，业界对于加快产品关键质量属性(CQA)的准确监测始终具有较高要求。糖基化属于一类CQA，可影响药物稳定性、疗效和免疫原性。糖基分析首选快速游离寡糖样品前处理结合HILIC色谱分离技术¹。但是，由于酸性糖基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。在流动相中加入低浓度高离子强度的螯合剂有助于避免这一问题，但这些分离条件的MS兼容性较差，可能导致使用ESI MS进行糖基表征时出现问题。通过上样大量分析物进行色谱柱钝化是解决这一难题的另一种思路，但这种方法受限于耗时的色谱柱老化工作和过多的样品用量。很多时候，色谱柱钝化是可逆且不可重现的，因此无法可靠地实现所需的色谱性能。为直接解决这一问题，我们开发出MaxPeak高性能表面(HPS)并在制造ACQUITY Premier色谱柱时加以运用^{2,3}。这些表面采用有机-无机杂化硅胶材料制成，可用作一种高效的表面屏障，防止酸性糖基与色谱柱内的金属表面发生不良次级相互作用。本应用仔细考察了ACQUITY Premier BEH Amide糖基分析柱与常规不锈钢色谱柱在钝化前后的色谱柱性能。所得数据证明，搭载MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier色谱柱对游离寡糖分离表现出明显优势：回收率提升、获得更出色的重现性，并且无需进行色谱柱老化。

实验

样品描述

- RapiFluor-MS唾液酸化糖基性能测试标准品（沃特世，部件号：186008660 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186008660-rapifluor-ms-sialylated-glycan-performance-test-standard.html>>）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。 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186008660-rapifluor-ms-sialylated-glycan-performance-test-standard.html>>
- RapiFluor-MS糖基性能测试标准品（沃特世，部件号：186007983 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186007983-rapifluor-ms-glycan-performance-test-standard.html>>）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。
- 胎球蛋白溶液制备方式为：将10 mg牛胎球蛋白溶于1 mL水中，得到的最终浓度为10 mg/mL。
- 使用GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖分析试剂盒按照《维护和使用手册》(715004793EN <<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715004793en.pdf>>)中所述的方案对15 μg 半乳糖苷酶的N-糖进行糖基释放、标记和纯化处理¹。游离寡糖的最终浓度约为0.5 pmol/ μL 。

色谱柱初期性能测试样品列表示例：

用途	样品名称	进样体积
空白样	空白水样	1 μL
分析 - 糖基第1次进样	RapiFluor-MS 糖基性能测试标准品 (8 pmol/ μL)	1 μL
分析 - 糖基第2次进样		1 μL
分析 - 糖基第3次进样		1 μL
分析 - 糖基第4次进样		1 μL
老化和钝化	胎球蛋白溶液(10 mg/mL)	1 μL
空白样	空白水样	1 μL
分析（钝化后）- 糖基第5次进样	RapiFluor-MS 糖基性能测试标准品 (8 pmol/ μL)	1 μL

使用常规色谱柱计算糖基回收率(%)：

糖基i的相对回收率(%) = 使用常规色谱柱分析选定糖基i获得的FLR峰面积/使用钝化后的ACQUITY Premier色谱柱分析糖基i获得的FLR峰面积 \times 100%

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY Premier系统(QSM)
数据采集:	MassLynx 4.1版
色谱柱:	ACQUITY Premier BEH Amide糖基分析柱(1.7 μ m, 130 \AA , 2.1 \times 150 mm), 部件号186009524 ACQUITY UPLC BEH Amide糖基分析柱(1.7 \AA , 130 μ m, 2.1 \times 150 mm), 部件号186004742
样品温度	8 $^{\circ}$ C
样品进样体积:	1 μ L
FLR波长:	265 (激发波长) /425 (发射波长)
柱温:	60 $^{\circ}$ C
密封清洗液:	30% ACN/70% 18.2 M Ω 水v/v (密封件清洗间隔设置为5 min)
流动相A:	50 mM甲酸铵, pH 4.4
流动相B:	乙腈 (LC-MS级)
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

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A ¹	%B	曲线
0.0	0.4	25.0	75.0	初始
11.7	0.4	46.0	54.0	6
13.2	0.2	100.0	0	6
14.2	0.2	100.0	0	6
16.4	0.2	25.0	75.0	6
23.0	0.4	25.0	75.0	6

1.本研究使用100%水溶液以便快速完成色谱柱评价，但在实践中建议使用80%流动相A和20%流动相B的温和清洗条件，此举有助于延长色谱柱寿命并维持性能。

质谱条件

质谱系统：	Xevo G2-XS QTof
电离模式：	ESI+
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： MassLynx4.1版

数据处理： UNIFI v.1.8

结果与讨论

为考察配备MaxPeak HPS的ACQUITY Premier色谱柱的初期性能，本研究将8 pmol RapiFluor-MS糖基性能测试标准品四次进样至全新的ACQUITY Premier BEH Amide糖基分析柱。随后以高载样量进样三次10 mg/mL胎球蛋白（一种高度唾液酸化的糖蛋白），进样体积1 μ L，用于色谱柱老化和钝化。经过钝化后，再次进样RapiFluor-MS糖基性能测试标准品以检查色谱柱性能（有关研究中使用的示例样品列表，请参见实验部分）。为进行比较，同时还在全新的常规不锈钢色谱柱上进行了这些测试。此外，对比测试过程中还采用了RapiFluor-MS唾液酸化糖基性能测试标准品。我们在这些实验中统一采用搭载MaxPeak Premier技术的液相色谱系统，旨在尽量减少液相色谱系统硬件对分离的影响。

根据之前发表的一项研究，使用HILIC色谱法可以从糖基性能测试标准品中分离出19种糖基⁴。如图1A所示，使用常规不锈钢色谱柱时，第1次进样仅鉴定出这19种糖基中的13种；7种唾液酸化糖基中有5种无法通过该初始进样检出。此外还比较了常规色谱柱与ACQUITY Premier色谱柱分离糖基获得的相对回收率，这些相对回收率用实验部分中提及的公式根据相关的FLR峰面积计算得出。常规色谱柱与ACQUITY Premier色谱柱相比，高丰度化合物单唾液酸化糖基FA2G2S1的回收率低于40%，在未经老化钝化处理的条件下，无法检出任何双唾液酸化糖基（图1B）。我们注意到，一些中性糖基在常规不锈钢色谱柱上的第1次进样也表现出回收率问题，FA2、FA2G1和FA2G2使用不锈钢色谱柱获得的回收率分别为95%、80%和60%（图1B）。我们认为，使用常规不锈钢色谱柱进行分离时，分析物与金属表面的非特异性结合是导致糖基（尤其是酸性糖基）损失的原因。上述结果表明，即使竭尽全力进行色谱柱老化，这类不良次级相互作用有时仍然难以消除。在这些色谱柱上再进样3次糖基标准品，仍有6种糖基未得到分离（图1A），它们的峰面积仍然很低（图1B）。这些棘手的糖基只能在以高载样量进样胎球蛋白后实现老化钝化，才能得到回收。经过钝化后，可成功检出全部的19种糖基

(包括双唾液酸化糖基)。经过老化钝化处理后，常规不锈钢色谱柱的有效峰容量从50提高至66（图1C）。

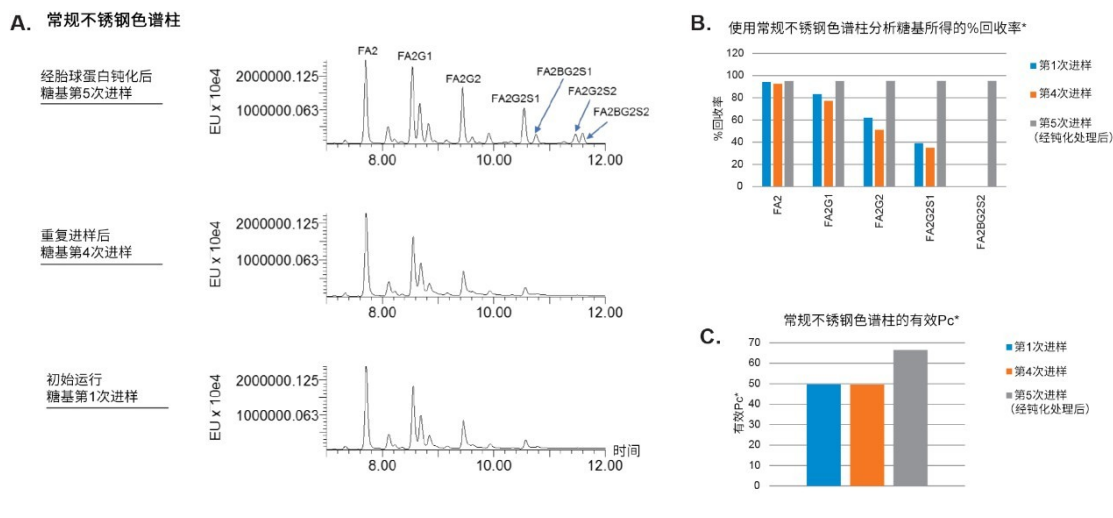
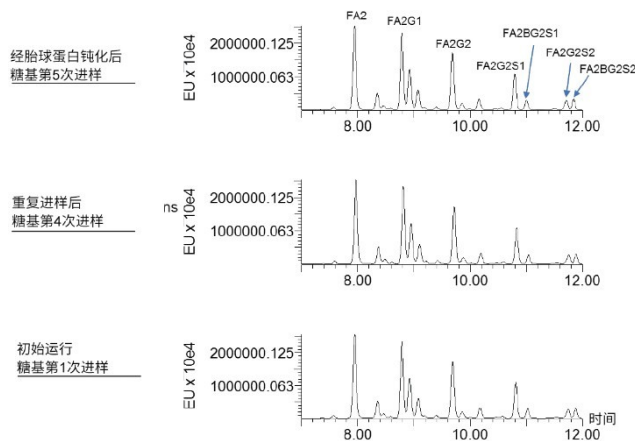


图1.使用常规不锈钢色谱柱时，色谱柱老化对N-糖的HILIC分析的影响。

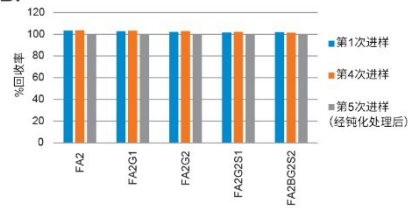
A) RapiFluor-MS糖基性能测试标准品使用BEH Amide常规不锈钢色谱柱(2.1 × 150 mm, 1.7 μm)第1次进样（初始运行）、第4次进样（糖基标准品多次重复进样后）和第5次进样（用胎球蛋白老化 and 钝化处理后）的FLR谱图；B)不同进样中选定糖基的回收率%；C)不同进样中常规色谱柱的有效峰容量(Pc*)。

相比之下，ACQUITY Premier BEH Amide糖基分析柱由于部署了MaxPeak HPS技术，第1次进样就使所有类型的糖基均获得优异的色谱回收率和峰分离度，并且对于色谱柱老化无任何依赖。如图2A所示，经过第1次进样和运行后，全部19种糖基就得到成功分离。令人印象深刻的是，样品中7种唾液酸化糖基全部检出，尽管其中一些糖基的相对丰度低至0.5%。使用ACQUITY Premier色谱柱获得的糖谱在老化钝化前后相当（第1次进样、第4次进样和第5次进样；图2A）。从第1次进样到第5次进样，各糖基的回收率和分离的有效峰容量保持一致（图2B和2C）。另外值得一提的是，使用ACQUITY Premier色谱柱获得的糖谱与使用完全钝化的常规不锈钢色谱柱获得的结果相当（图3）。所有分离的糖基的相对丰度%RSD均小于8%，三个平均数据点来自：(1)钝化后的常规不锈钢色谱柱（第5次进样），(2)钝化后的ACQUITY Premier色谱柱（第5次进样），(3)在ACQUITY Premier色谱柱上的第1次运行（第1次进样）（表1）。这一结果证明，MaxPeak HPS技术使我们获得了准确的糖谱，且杂化表面对分离度或选择性的影响很小。ACQUITY Premier BEH Amide糖基分析柱使糖基回收率显著提升，还免去了色谱柱首次使用时的老化需求。

A. ACQUITY Premier色谱柱



B. 使用ACQUITY Premier色谱柱分析糖基所得的%回收率*



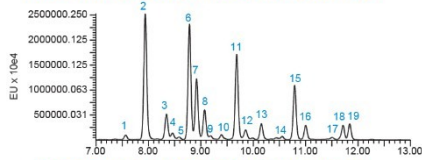
C. ACQUITY Premier色谱柱的有效Pc*



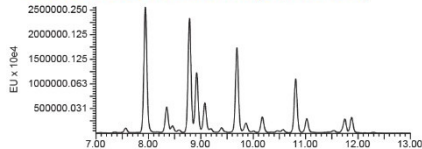
图2.使用ACQUITY Premier色谱柱时，色谱柱老化对N-糖的HILIC分析的影响。

A) RapiFluor-MS糖基性能测试标准品使用ACQUITY Premier BEH Amide色谱柱(2.1 × 150 mm, 1.7 μm)第1次进样（初始运行）、第4次进样（糖基标准品多次重复进样后）和第5次进样（用胎球蛋白老化和钝化处理后的）FLR谱图；B)不同进样中选定糖基的回收率%；C)不同进样中ACQUITY Premier色谱柱的有效峰容量(Pc*)。

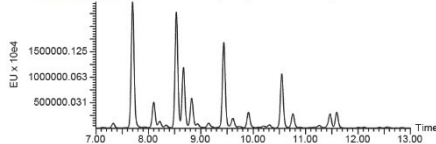
A. ACQUITY Premier Column: Inj.5 (Passivated)



ACQUITY Premier Column: Inj.1 (Initial Run)



Conventional column: Inj.5 (Passivated)



* Sample: Glycan performance test standard, refer to Table 1 for peak annotation.

B.

Glycan profiling with different columns

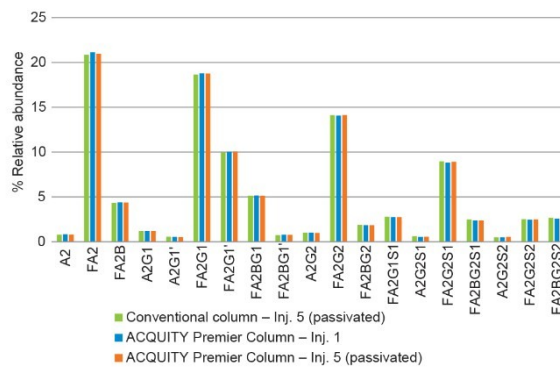


图3.使用钝化后的常规不锈钢色谱柱与ACQUITY Premier HILIC色谱柱所获得的糖谱相当。

A) RapiFluor-MS糖基性能测试标准品使用钝化后的常规不锈钢色谱柱第5次进样（下图）与使用ACQUITY Premier色谱柱第1次进样（中图）和第5次进样（上图）的FLR谱图；B)使用不同色谱柱分离的糖基的相对丰度。

Glycans performance test standard			%Relative abundance			% RSD of glycan profile between conventional vs. ACQUITY Premier Column		
			ACQUITY Premier Column	Conventional column		Avg. rel. abundance	Std. dev.	%RSD
Peak No.	Glycan	RFMS labeled glycan composition	1st injection	5th injection (passivated)	5th injection (passivated)			
1	A2	C67H105O37N9	0.86	0.82	0.80	0.83	0.03	3.83
2	FA2	C73H115O41N9	21.13	20.98	20.84	20.98	0.15	0.69
3	FA2B	C81H128O46N10	4.40	4.38	4.35	4.38	0.03	0.60
4	A2G1	C73H15042N9	1.22	1.20	1.21	1.21	0.01	0.64
5	A2G1'	C73H15042N9	0.54	0.53	0.57	0.55	0.02	4.42
6	FA2G1	C79H125O46N9	18.78	18.77	18.65	18.73	0.07	0.39
7	FA2G1'	C79H125O46N9	10.03	10.05	10.01	10.03	0.02	0.21
8	FA2BG1	C87H138O51N10	5.17	5.15	5.14	5.16	0.02	0.30
9	FA2BG1'	C87H138O51N10	0.80	0.78	0.75	0.78	0.02	2.75
10	A2G2	C79H125O47N9	1.03	1.01	1.04	1.03	0.02	1.74
11	FA2G2	C85H135O51N9	14.07	14.15	14.12	14.11	0.04	0.30
12	FA2BG2	C93H148O56N10	1.87	1.86	1.90	1.88	0.02	1.15
13	FA2G1S1	C90H142O54N10	2.75	2.76	2.80	2.77	0.03	0.92
14	A2G2S1	C90H142O55N10	0.55	0.57	0.64	0.59	0.05	7.95
15	FA2G2S1	C96H152O59N10	8.83	8.92	8.97	8.91	0.07	0.82
16	FA2BG2S1	C104H165O64N11	2.40	2.41	2.49	2.43	0.05	2.07
17	A2G2S2	C101H159O63N11	0.51	0.55	0.51	0.52	0.02	3.70
18	FA2G2S2	C107H169O67N11	2.46	2.49	2.53	2.49	0.03	1.38
19	FA2BG2S2	C115H182O72N12	2.60	2.64	2.67	2.64	0.04	1.35

表1.使用常规不锈钢色谱柱与ACQUITY Premier色谱柱获得的糖谱：钝化前（第1次进样）和钝化后（第5次进样）。

此外，ACQUITY Premier BEH Amide糖基分析柱对磷酸化糖基的分析也具有优异性能。末端带有甘露糖-6-磷酸残基的磷酸化糖基可用作溶酶体酶的信号标记，这对于酶替代疗法的应用至关重要⁵。但是，由于存在磷酸残基，这组分析物极难通过液相色谱分析得到回收，因为它们往往会吸附在金属表面上。为评价MaxPeak HPS色谱柱硬件对磷酸化糖基分析是否有利，本研究利用实验部分所述相同的检测方案分析了半乳糖苷酶释放的N-糖。ACQUITY Premier色谱柱和常规不锈钢色谱柱填充的固定相为同一批次。图4总结了使用不同色谱柱分离单磷酸化糖基Man7-1P的结果。与其他酸性糖基一样，使用常规不锈钢色谱柱时，未应用老化钝化处理之前，无法鉴定出Man7-1P。即使经过胎球蛋白钝化后，常规不锈钢色谱柱对Man7-1P获得的峰响应也仅为ACQUITY Premier色谱柱所得峰响应的大约70%。

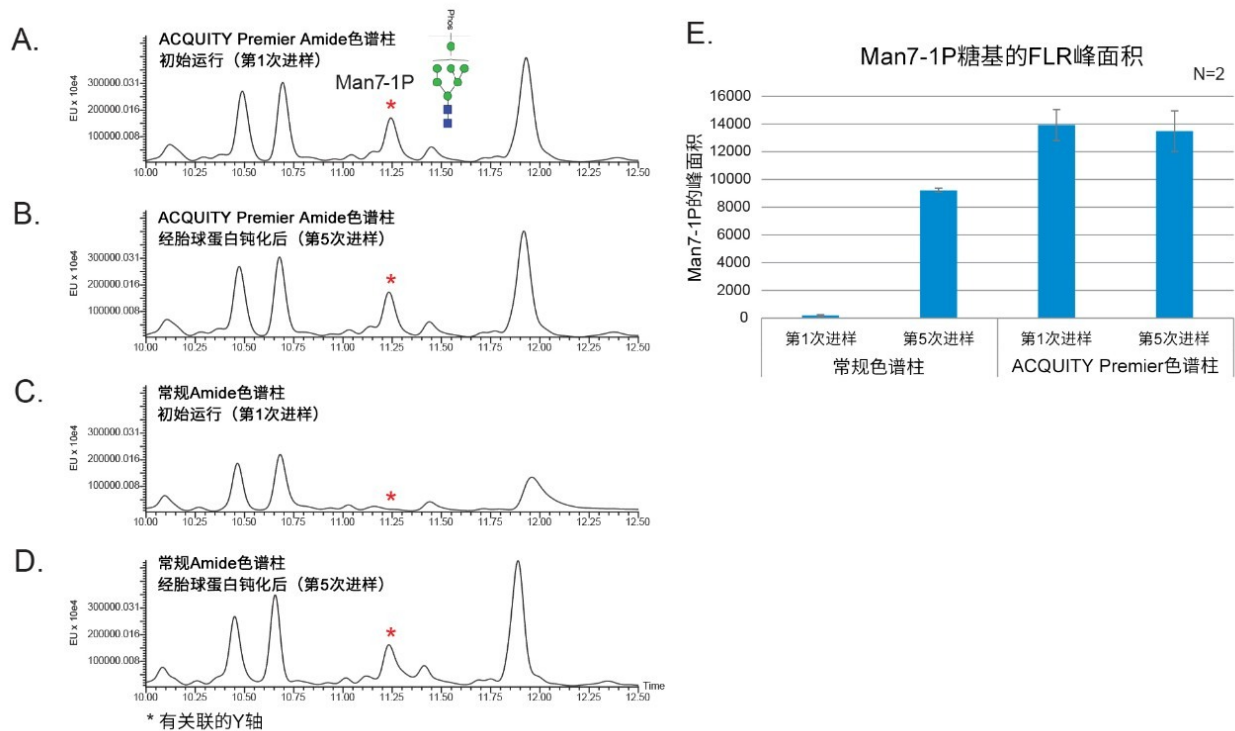


图4.使用ACQUITY Premier BEH Amide糖基分析柱使磷酸化糖基的回收率有所提升。

A)、B)使用ACQUITY Premier BEH Amide糖基分析柱在钝化前后(A vs B)分析单磷酸化糖基 (Man7-1P, 标记有*) 得到的FLR检测结果; C)、D)使用常规不锈钢色谱柱在钝化前后(C vs D)分析单磷酸化糖基 (Man7-1P, 标记有*) 得到的FLR检测结果; E)基于FLR峰面积得到的Man7-1P糖基的回收率。

此外, ACQUITY Premier BEH Amide糖基分析柱还为唾液酸化糖基分析提供了重现性更高的保留时间。重现性评估通过在胎球蛋白钝化后的常规不锈钢色谱柱和ACQUITY Premier色谱柱上连续进样四次唾液酸化糖基性能测试标准品进行。本研究对每种色谱柱都进行了三种钝化处理, 这些色谱柱装填有同一批固定相。记录并计算测试标准品中六种高丰度唾液酸化糖基的保留时间及相应的%RSD值(图5)。如图所示, 使用三种ACQUITY Premier色谱柱获得的糖基保留时间%RSD在0.12~0.22%的范围内, 而使用常规不锈钢色谱柱分析相同的唾液酸化糖基时, 保留时间%RSD增加至1.15~1.96%。

Average retention time (min), n=12

	Conventional steel columns		ACQUITY Premier Glycan BEH Amide Columns	
	Avg. RT ± Std. Dev. (min)	%RSD	Avg. RT ± Std. Dev. (min)	%RSD
Peak 1	10.89±0.13	1.17	10.87±0.01	0.12
Peak 2	11.26±0.13	1.15	11.23±0.01	0.12
Peak 3	12.15±0.15	1.24	12.13±0.02	0.15
Peak 4	12.55±0.18	1.43	12.52±0.02	0.16
Peak 5	12.87±0.21	1.64	12.84±0.02	0.19
Peak 6	13.42±0.26	1.96	13.39±0.03	0.22

* Peak assignment: A2G2S2 (Peak 1 and 2); A3G3S3 (Peak 3 and 4); A3S1G3S3 (Peak 5 and 6)

Example chromatogram of the *RapiFluor*-MS sialylated glycan performance test standard

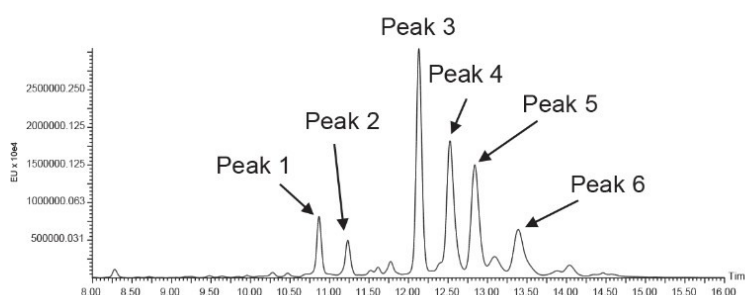


图5.使用钝化处理后的常规不锈钢色谱柱或ACQUITY Premier BEH Amide糖基分析柱分离6种主要唾液酸化糖基得到的柱间保留时间和RSD值。三种常规色谱柱和三种ACQUITY Premier BEH Amide糖基分析柱均经过胎球蛋白钝化，而后分别用于在4次重复进样中分离*RapiFluor*-MS唾液酸化糖基性能测试标准品。唾液酸化糖基分析的示例色谱图见下方。

结论

在各种色谱柱填料中应用MaxPeak高性能表面创新技术可以提高色谱性能（包括使用ACQUITY Premier BEH Amide糖基分析柱在HILIC模式下分离糖基的性能）。本应用纪要展示了糖基分析色谱回收率的提升以及全新水平的开箱即用性能，这些表现在酸性糖基中更为明显。该技术有利于轻松实现更准确的游离寡糖分析，并且可以省去繁琐的色谱柱老化和钝化程序。此外，这些色谱柱可以促进回收具有挑战性的磷酸化糖基，并提高唾液酸化糖基的保留时间重现性。因此，基于LC-MS的游离寡糖分析会更加稳定，随着开发流程中不断出现糖谱日益复杂的蛋白质药物，这一优势变得越来越重要。

参考资料

1. Lauber MA, Yu YQ, Brousmiche DW, Hua Z, Koza SM, Magnelli P, Guthrie E, Taron CH, Fountain KJ. 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.
2. DeLano M, Walter TH, Lauber MA, Gilar M, Jung MC, Nguyen JM, Boissel C, Patel AV, Bates-Harrison and Wyndham K. Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions with Metal Surfaces In UHPLC. *Anal Chem.* 2021;93(14): 5773–5781.
3. Lauber MA, Walter TH, 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, and Wyndham 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>> , 2020.
4. Lauber MA, Morris MF, Brousmiche DW, Koza SM. Robustness of RapiFluor-MS N-Glycan Sample Preparations and Glycan BEH Amide HILIC Chromatographic Separations. *Waters Application Note 720005370EN* <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2015/rapifluor-ms-n-glycan-sample-preparations-and-glycan-beh-amide-hilic-chromatographic-separations.html>> , 2015.
5. Bones J, Mittermayr S, McLoughlin N, Hilliard M, Wynne K, Johnson GR, Grubb JH, Sly WS, Rudd PM. Identification of N-glycans Displaying Mannose-6-phosphate and Their Site of Attachment on Therapeutic Enzymes for Lysosomal Storage Disorder Treatment. *Anal Chem.* 2011 Jul 1;83(13):5344-52.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

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>>

ACQUITY UPLC FLR检测器 <<https://www.waters.com/514222>>

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

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

720007263ZH, 2021年5月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.