

使用ACQUITY Premier BEH C₁₈ AX糖基分析专用柱和装配ACQUITY Premier产品的BioAccord系统对促红细胞生成素进行游离寡糖分析

Ximo Zhang, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

高度唾液酸化糖基的丰度和结构可能影响许多糖基化生物治疗药物的清除率和体内活性，因此需要采用准确的分析表征和监测方法以确保药品质量。游离寡糖表征广泛应用了结合荧光和质谱检测的亲水作用色谱法(HILIC)，但在传统的HILIC分离中，高度唾液酸化糖基的丰度、异质性和各种异构体会限制色谱分离能力。本研究展示了如何通过装配ACQUITY Premier产品的集成式LC-FLR-MS BioAccord系统内使用混合模式色谱法，利用分析物电荷来改善荧光标记的高度唾液酸化糖基的色谱选择性和检测。

优势

装配ACQUITY Premier产品的BioAccord系统和混合模式ACQUITY Premier BEH C₁₈ AX糖基分析专用柱有助于：

- 改善高度唾液酸化、高度复杂糖基的色谱分离度
- 相比传统HILIC方法改善高度唾液酸化糖基的电荷糖谱
- 使用FLR和MS检测改善高度唾液酸化糖基的灵敏度
- BioAccord系统的碎裂能力为化合物归属提供了额外的糖基结构信息

简介

蛋白质糖基化修饰在生物治疗药物的安全性和有效性方面起重要作用，蛋白质连接的糖基可能直接影响药品的清除率和免疫反应¹。鉴于糖基化所起的作用，且超过50%的市售蛋白质类生物治疗药物为糖基化药物，因此人们为开发糖基修饰蛋白质的分析和监测方法付出了大量努力。其中，依赖释放和标记策略的方法仍占主要地位，因为这些方法具有出色的分离能力和灵敏度。但是，由于此类样品中所含糖基的结构复杂性和异质性，用既有方法分析糖蛋白（例如含有高度支化和唾液酸化结构的促红细胞生成素(EPO)）仍然充满挑战。

mAb糖基分析中广泛使用的传统标记游离寡糖HILIC方法不具备足够高的选择性和有效的色谱分离能力，无法充分分离复杂的EPO N-糖。当下做法是首先使用弱阴离子交换技术分离荧光标记糖基，然后对每种分离出的馏分进行HILIC分离²。离子交换分离主要基于电荷，因为唾液酸在生理pH下含有负电荷，类似于磷酸盐基团。两阶段分离方法不仅需要更长的开发时间，每个样品的分析成本也更高。混合模式色谱法（IEX和RP）可对2AB标记糖基改善高度唾液酸化糖基的峰分离度，但是由于MS响应低，此类方法主要与FLR检测联用³。

沃特世近期推出了Premier系列混合模式色谱柱：ACQUITY Premier BEH C₁₈ AX糖基分析专用柱，其采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术，该技术已被证明可通过稳定的屏障层减少金属敏感分析物的分析物/表面相互作用⁴。该色谱柱结合沃特世成熟的RapiFluor-MS (RFMS)糖基标记技术，可提高FLR-MS灵敏度，从而有可能解决与分析高度支化和唾液酸化糖蛋白相关的挑战。

本研究评价了使用ACQUITY Premier C₁₈ AX色谱柱开发的方法及该方法分析RFMS标记的唾液酸化结构的能力。除RFMS标记技术和ACQUITY Premier C₁₈ AX色谱柱以外，还将使用BioAccord系统和ACQUITY系统对标记的糖基及其片段进行质量数确认（图1）。该配置由ACQUITY Premier液相色谱系统组成，能够使金属敏感分析物（例如酸性糖基）获得理想色谱性能，同时还搭配了ACQUITY RDa质谱检测器进行质谱检测。在碎裂模式下运行时，该系统可生成同时包含母离子和碎片离子数据的交替谱图，这是一种非数据依赖型采集(DIA)模式，可提供全长糖基及相关碎片离子的质量数组成数据，以进一步协助判断糖基结构归属。



图1.装配ACQUITY Premier产品的BioAccord系统、ACQUITY Premier BEH C₁₈ AX糖基分析专用柱、标准品和流动相浓缩液。利用合规的waters_connect信息学平台控制该系统并进行数据处理和管理。

为记录上述系统的性能，本应用纪要比较了EPO游离N-糖分析中采用混合模式C₁₈ AX LC-FLR-MS与HILIC-FLR-MS所得到的数据。两种色谱柱填料均采用MaxPeak HPS技术尽可能减少标记糖基与金属表面的相互作用。本文展示并讨论了这些填料直接应用于人EPO样品表征时的不同选择性和峰分离度。

实验

样品描述

- RapiFluor-MS (RFMS)糖基性能测试标准品（部件号：[186007983 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186007983-rapifluor-ms-glycan-performance-test-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186007983-rapifluor-ms-glycan-performance-test-standard.html)）。将1瓶标样复溶于20 μL 水中，得到最终浓度为20 pmol/ μL 的溶液。
- 促红细胞生成素(EPO)购自欧洲药典（参比标准品E1515000），糖基释放前将缓冲液更换为Milli-Q水。另外的EPO样品购自StemCell Inc.（部件号：78007），经复溶得到浓度为1.5 mg/mL的样品。乙酸铵购自Sigma-Aldrich。根据RFMS快速入门方案([720005470EN < https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005470en.pdf>](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005470en.pdf))，从15 μg EPO中释放出N-糖，使用GlycoWorks RFMS N-糖试剂盒（部件号：[176004082 <](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/176004082)

<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/application-kits/176004082-glycoworks-rfms-n-glycan-kit---8-x-12.html>) 进行标记。请注意，快速入门方案中增加了一个淬灭步骤：标记5 min后，向样品混合液中加入5 μL 1 M乙酸铵溶液来淬灭过量的RFMS试剂。使淬灭反应在室温下进行5 min。

液相色谱条件(ACQUITY Premier)

系统：	装配ACQUITY Premier产品的BioAccord系统
液相色谱系统：	ACQUITY Premier BSM UPLC
检测条件：	ACQUITY Premier FLR检测器 ($\lambda_{\text{激发}}=265 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{发射}}=425 \text{ nm}$, 2 Hz)
色谱柱：	1. 混合模式：ACQUITY Premier BEH C ₁₈ AX糖基分析专用柱, 1.7 μm , 95 Å, 2.1 × 150 mm (部件号：186009760) 2. HILIC模式：ACQUITY Premier Amide糖基分析专用柱, 1.7 μm , 130 Å, 2.1 × 150 mm (部件号：186009524)
样品瓶：	采用MaxPeak HPS的QuanRecovery样品瓶, 300 μL (部件号:186009186)
柱温：	60 °C
样品温度：	6 °C
进样量：	1 μL
流动相A：	混合模式：Milli-Q水 HILIC模式：含50 mM NH ₄ HCO ₂ 的Milli-Q水溶液*
流动相B：	混合模式：含100 mM甲酸铵、100 mM甲酸的40/60 (v/v)水/乙腈溶液**

HILIC模式：LC-MS级乙腈

*: HILIC模式下的流动相A通过用1 L水将10 mL甲酸铵浓缩液 (pH=4.4, 部件号: [186007081 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186007081-waters-ammonium-formate-solution--glycan-analysis.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186007081-waters-ammonium-formate-solution--glycan-analysis.html)) 稀释至50 mM制得。

**：混合模式下的流动相B通过用320 mL Milli-Q水和580 mL LC-MS级乙腈将100 mL IonHance Glycan C₁₈ AX甲酸铵浓缩液 (部件号: [186009762 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186009762-ionhance-glycan-c18-ax-ammonium-formate-concentrate.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186009762-ionhance-glycan-c18-ax-ammonium-formate-concentrate.html)) 稀释至100 mM制得。

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.00	0.4	95	5	6
40.00	0.4	77	23	6
40.30	0.4	0	100	6
41.30	0.4	0	100	6
42.00	0.4	95	5	6
49.00	0.4	95	5	6

混合模式

质谱条件 (RDa检测器)

质谱系统: ACQUITY RDa质谱检测器 (图1)

电离模式: ESI+

采集范围: 50–2,000 m/z

毛细管电压:	1.5 kV
锥孔电压(CV):	45 V
碎裂CV:	70-90 V

数据管理

信息学软件: 搭载UNIFI v1.9.4的waters_connect

结果与讨论

HILIC与混合模式色谱

HILIC FLR或FLR-MS方法通常用于分离标记的mAb游离N-糖,因为这些N-糖通常由双天线中性物质组成,只有不到5%的相关糖基为单唾液酸化或双唾液酸化糖基。在HILIC与新型C₁₈ AX色谱柱的性能比较中观察到人源化IgG mAb释放的N-糖存在明显的选择性差异(图2)。HILIC色谱柱主要基于亲水性分离糖基,而C₁₈ AX色谱柱得到的洗脱曲线表明,中性、单唾液酸化和双唾液酸化糖基明显是基于电荷实现初步分离。每组电荷内亲水性更强的糖基比具有相似分支结构的糖基(疏水性驱动)稍早洗脱,例如FA2G1比FA2更早洗脱。还观察到与具有相似分子量的复合型糖基相比,Man5糖基具有更高的亲水性。如图2所示,C₁₈ AX色谱图中Man5 (M5)峰早于A2糖基洗脱,而使用HILIC色谱柱时观察到相反的洗脱顺序(Man5晚于A2洗脱)。除观察到选择性差异外,C₁₈ AX分离得到的峰也比HILIC分离得到的峰窄(平均窄约20%),表明使用混合模式色谱柱可获得更高的峰容量。

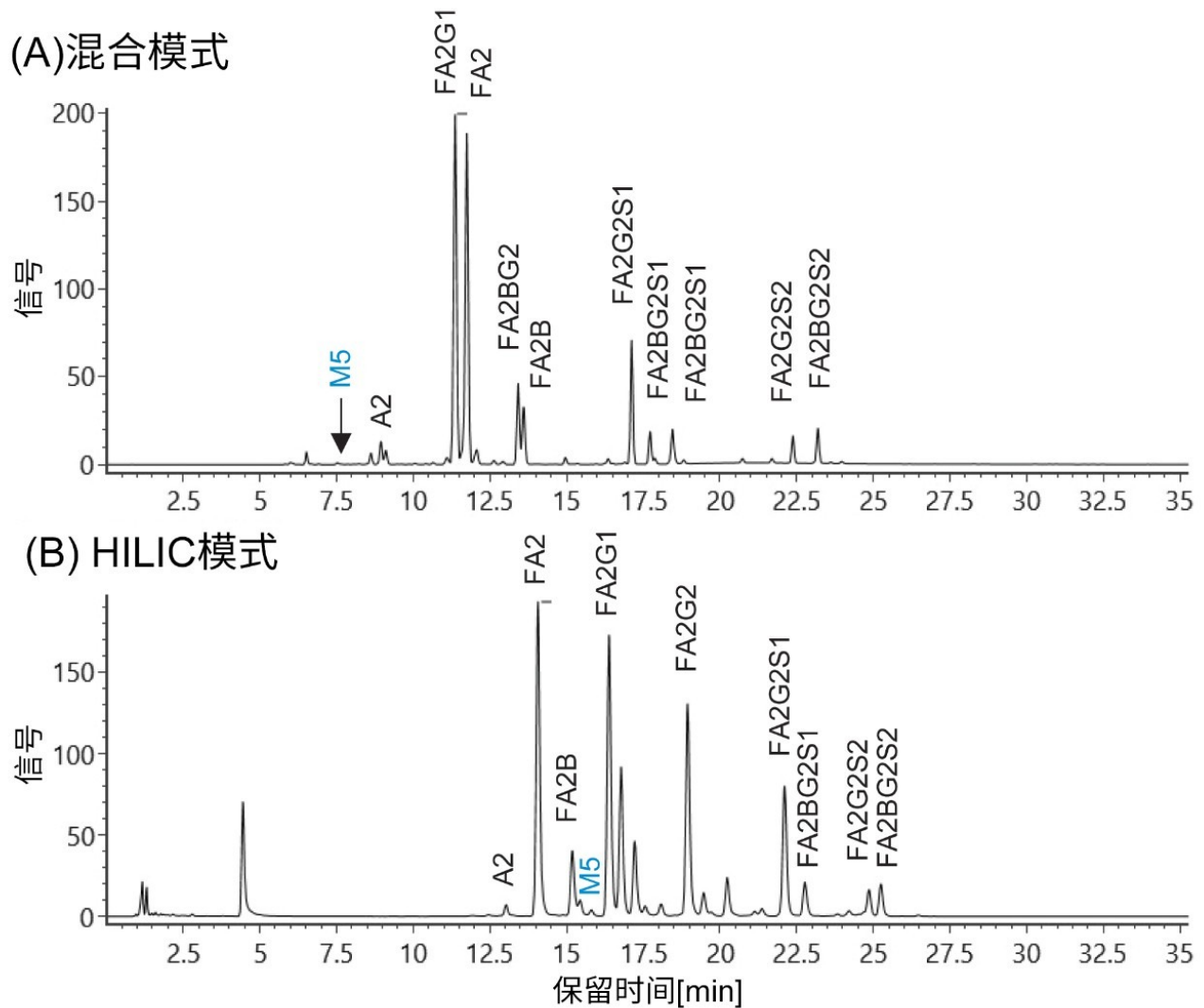
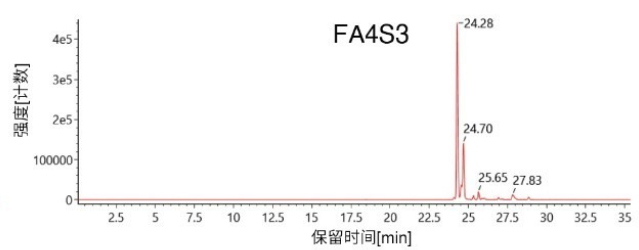
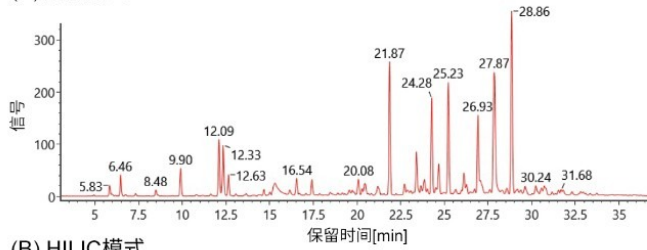


图2.(A)混合模式(C₁₈/AX)分离与(B) HILIC模式分离相比的选择性变化。样品：带有RapiFluor-MS标记的沃特世糖基性能测试标准品。混合模式和HILIC分离均表明Man 5 (M5)的亲水性强于A2（或G0）糖基。

人EPO包含许多高度唾液酸化物质，用其作为具有复杂糖基化谱图的示例分子，评价了C₁₈ AX色谱柱更广泛的适用性。本例中HILIC的分离能力有限，具有各种水平唾液酸并呈现高度支化结构的糖基得到“拥挤的”分离峰。相比之下，C₁₈ AX色谱柱能够增强相同结构的色谱分离能力，因为它能够分离唾液酸结构递增的糖基物质（图3）。同样，观察到C₁₈ AX色谱分离得到的峰宽比HILIC分离得到的峰更窄，表明混合模式色谱柱有可能提高色谱性能，例如对高度唾液酸化样品具有更高的峰容量和柱效。使用优化的方法，EPO中总共82种具有独特质量数的荧光标记N-糖均通过C₁₈ AX色谱柱观察到。经估计，色谱柱中上样的糖基由1 μg EPO蛋白质释放而来。

(A)混合模式



(B) HILIC模式

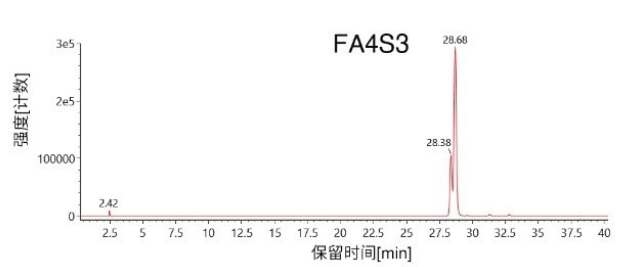
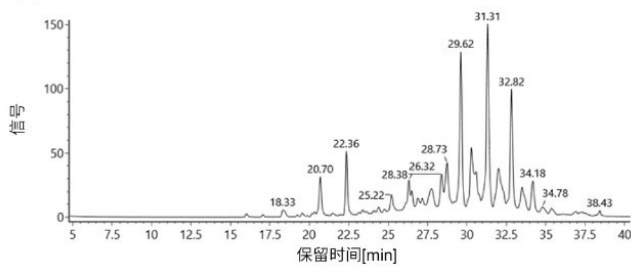


图3.EPO游离寡糖分析比较：(A) HILIC模式分离；(B)混合模式分离。基于电荷的混合模式分离为唾液酸化糖基异构体提供了更高的分离度。例如带有3个唾液酸的岩藻糖基化四天线糖基(FA4S3)的分离。

该方法所用RFMS标记技术的另一个优势在于观察到MS响应增强。在本例中，质谱信号使相对浓度低至0.1%的糖基也能完成质量数确认，整个样品前处理过程（变性、糖基释放以及用RFMS标签标记）仅使用了15 μg EPO作为起始物质。利用糖基FA4S3（包含1个岩藻糖、4个天线分支和3个唾液酸）的提取离子色谱图(XIC)进一步研究了HILIC与C₁₈ AX之间的色谱柱选择性和分离度差异。如图3（右图）所示，两幅XIC中均得到两个分离良好的峰，推测其为结构异构体，但是，仅C₁₈ AX色谱柱使这两种异构体近乎达到基线分离。

使用混合模式色谱柱分离RFMS标记EPO N-糖的电荷分离谱图如图4A所示，其中各种糖基按唾液酸数量分离成不同的组。有趣的是，高甘露糖磷酸化糖基在大小和电荷数量相似的复杂糖基之前洗脱，这一结果可能是因为它们具有更高的亲水性。

此外，还观察到选择性增强带来的色谱分离度增加直接简化了对使用BioAccord系统在碎裂模式下获得的非数据依赖型MS碎片离子谱图的解析。图4B的示例中，碎片离子数据表现出一系列连续的中性单糖损失，支持拟定的糖基组成归属M7P2糖基（包含2个磷酸盐的高甘露糖型）。

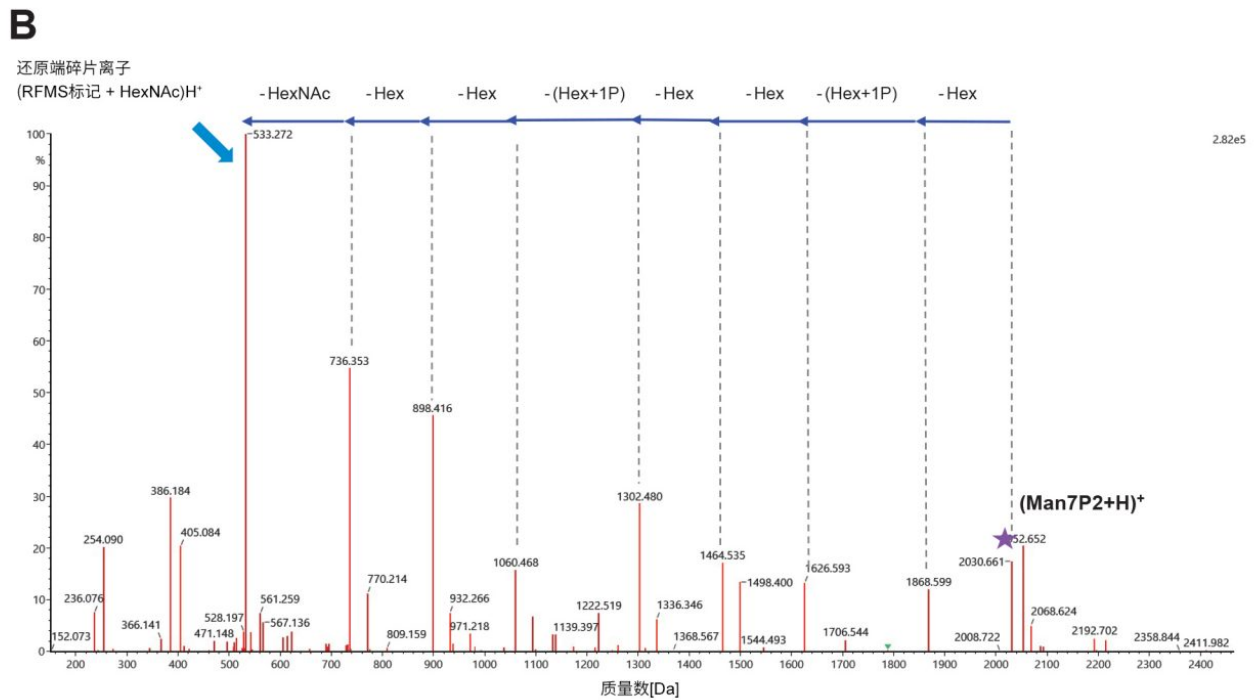
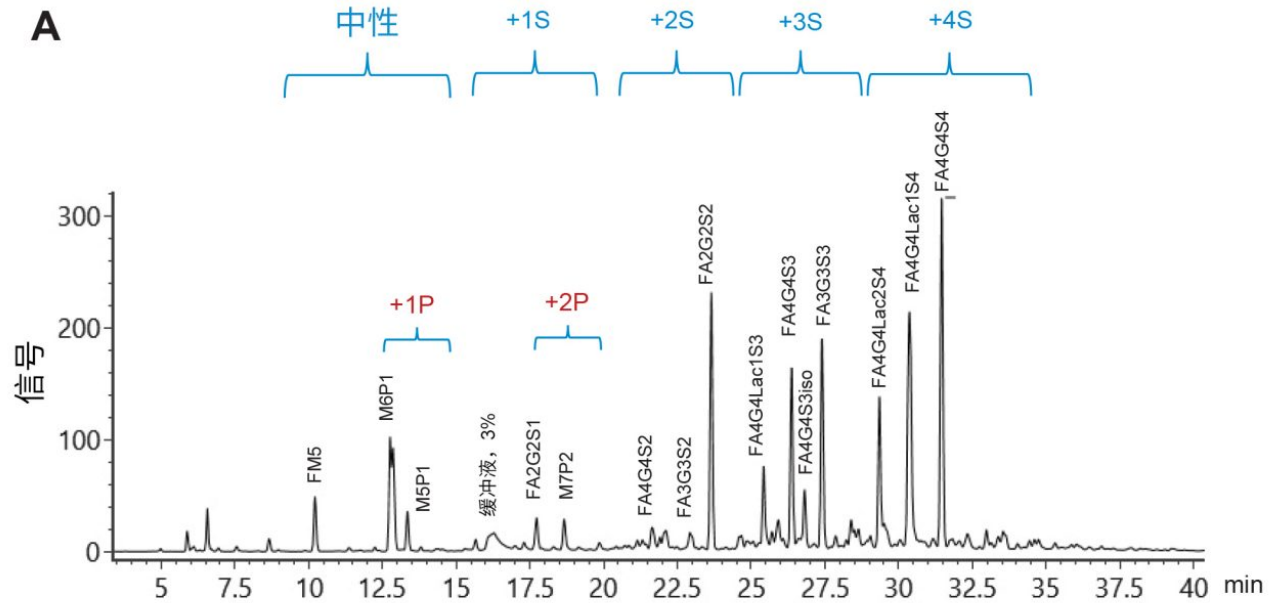


图4A.EPO N-糖的C₁₈/AX分离。当电荷 = 0-4时，观察到明显的基于电荷的分离。每组电荷内的糖基结构基于其疏水性进一步分离。请注意，与等电荷的复杂型糖基相比，高甘露糖磷酸化糖基的洗脱时间更早。

B. BioAccord系统可交替产生低能量（母）离子和高能量（碎片）离子谱图，展示高甘露糖双磷酸化M7P2糖基的碎裂数据。标注单糖的连续中性损失以确认糖基组成。MaxEnt 3电荷去卷积谱图中用星号标记出(M+H)⁺母离子。应用优化后的C₁₈ AX液相色谱方法，使用来自多种来源人EPO的糖基进行可比性分析（图5）。两个N-糖样品的电荷分布保持一致，表明所开发的该方法可普遍用于对复杂糖蛋白样品进行基于电荷的比较分析。

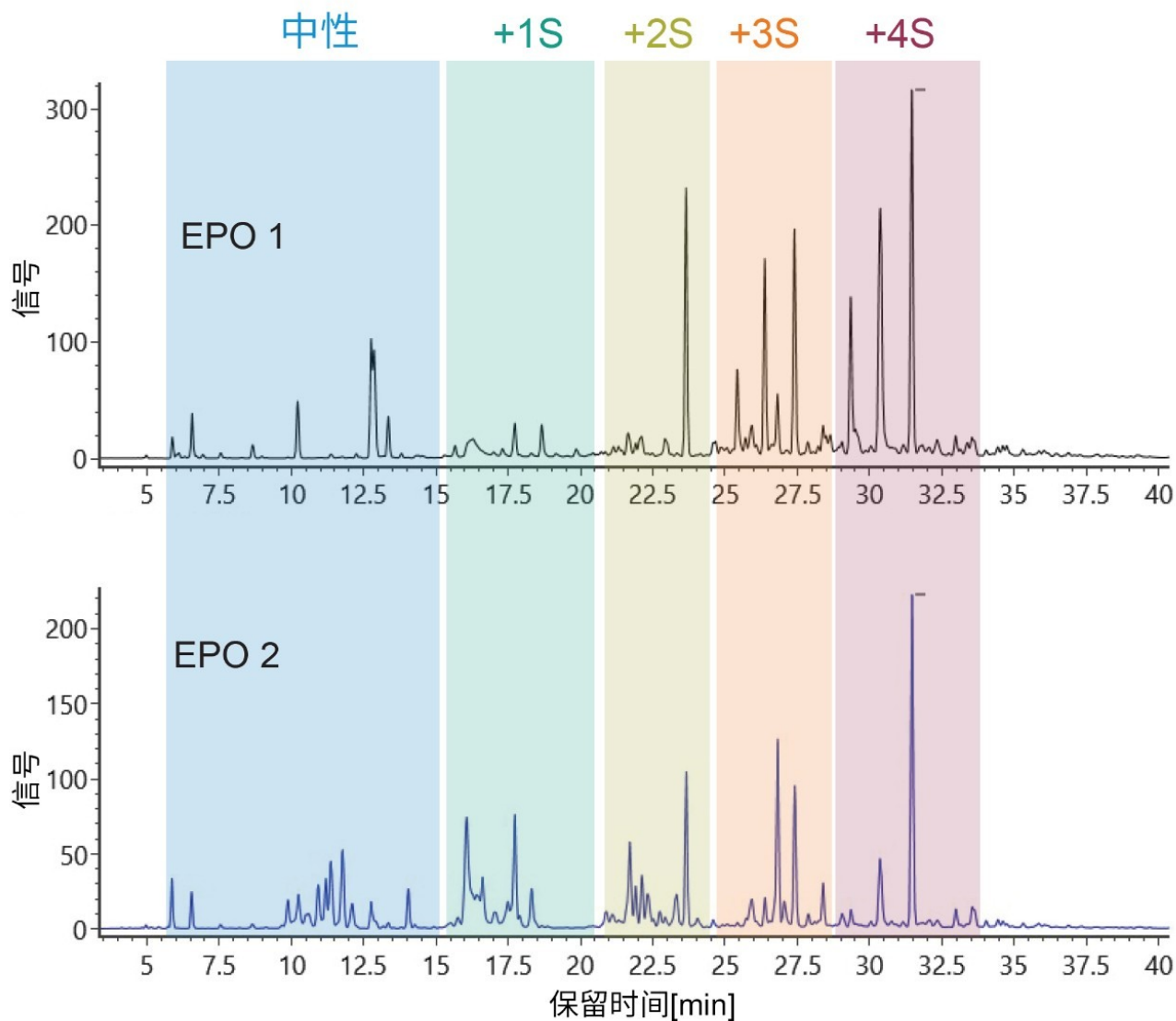


图5.分析两种不同来源EPO的优化C₁₈/AX液相色谱方法

结论

LC-FLR-MS方法在装配ACQUITY Premier液相色谱和ACQUITY Premier C₁₈ AX糖基分析专用柱的BioAccord系统上进行了优化。与传统的HILIC方法相比，新型混合模式C₁₈ AX色谱柱为唾液酸含量较高的复杂N-糖提供了更强的分离能力。优化后的LC-FLR-MS方法能够基于唾液酸数量以及BioAccord系统提供的质量数数据进行明确的基于电荷的分离和组成归属。更多糖基结构则基于相同电荷（基于唾液酸数量）保留时间窗口内的亲水性进一步分离。综上，MaxPeak HPS技术与BioAccord LC-MS系统的SmartMS功能相结合，能够在高度唾液酸化复杂N-糖的分析中生成高质量的峰形、分离度和MS灵敏度数据。

参考资料

1. Zhang P. *et al.* Challenges of Glycosylation Analysis and Control: An Integrated Approach to Producing Optimal and Consistent Therapeutic Drugs. *Drug Discovery Today*, Volume 21, 2016; 5, 740–765.
2. Bones J. *et al.* 2D-LC Analysis of BRP 3 Erythropoietin N-glycosylation Using Anion Exchange Fractionation and Hydrophilic Interaction UPLC Reveals Long poly-N-acetyl Lactosamine Extensions. *Anal. Chem.* 2011 June; 83(11):4154–4162.
3. Udayanath A. *et al.* Separation of 2AB labeled N-glycans from Bovine Fetuin on a Novel Mixed-Mode Stationary Phase. Thermo Fisher Scientific Application Note 2075A.
4. Liu X. 等人. 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. 沃特世应用纪要, [720007038ZH](#), 2020.

特色产品

- [装配ACQUITY Premier的BioAccord LC-MS系统 <
<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135087537>>](#)
- [ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>](#)
- [ACQUITY RDa检测器 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077027>>](#)
- [ACQUITY UPLC FLR检测器 <<https://www.waters.com/514222>>](#)
- [生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>](#)
- [waters_connect <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>>](#)
- [UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>](#)

720007356ZH, 2021年9月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.