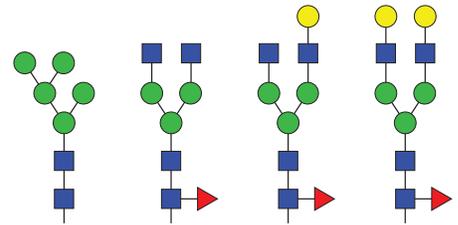


# 使用荧光检测器和可靠的安捷伦 LC/MSD XT 质量选择检测器进行单克隆抗体的 N-糖链分析

## 应用简报

生物治疗药物与生物制剂



## 作者

Oscar Potter、Gregory Staples、  
Jordy Hsaio 和 Te-Wei Chu



安捷伦 LC/MSD XT

## 前言

在产品研制、工艺开发和 QC 过程中监测治疗性蛋白质的 N-糖基化。许多分析人员首先进行酶解释放 N-糖链，然后进行荧光标记以运行 HILIC-FLD 分析。Prozyme 公司的 InstantPC 标签可在 1 小时内进行手动样品前处理，或者使用 Agilent AssayMap Bravo 液体处理平台进行高通量平行处理。使用 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱可在较短的分析周期内完成高分离度分离（请参见 5991-4886CHCN）。

虽然荧光检测是一种常用的检出技术，但分析人员运行 HILIC-FLD 工作流程时可能面临不确定的峰归属难题，特别是对于新样品类型或意外峰。在这种情况下，分析人员可能会求助于发送样品做补充分析（如 LC-Q-TOF 或 MALDI-TOF），但这会浪费时间，并产生额外费用。

我们此前展示了一个改进工作流程，即将 HILIC-FLD 系统与高分离度 Q-TOF 质谱仪在线联用。（请参见 5991-6958EN）。此方法将荧光定量分析的高稳定性优势与质谱法强大的结构解析功能相结合。但是，寻求常规、经济的解决方案的分析人员可能更喜欢使用耐用、体积小、基于单四极杆技术的质量选择检测器 (MSD)。因此，我们展示了一种 HILIC-FLD 系统与耐用、灵敏且可叠放的安捷伦 LC/MSD XT 单四极杆联用的方法。MSD 数据可提供质量信息，以解决难以确定的峰归属问题，并检测共洗脱结构。该方法在低于 600 bar 压力下运行，以保持与各种现有液相色谱系统的兼容性。



Agilent Technologies



图 1. 样品前处理流程图、液相色谱柱以及用于 InstantPC 标记 N-糖链的鉴定和定量分析的仪器

## 实验部分

### 样品前处理

单克隆抗体 (mAb) 样品在我们自己实验室表达 (CHO mAb 1) 或购自 Sigma-Aldrich (SiLu Lite, 部件号 MSQC4) 或 NIST (NIST mAb, 参比物质 8671)。所有样品在处理前均调节至 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 带 InstantPC (96 ct) 的 GlykoPrep-plus 快速 N-糖链样品前处理产品购自 Prozyme 公司 (GPPNG-PC)。利用 AssayMap Bravo 液体处理平台 (G5542A) 对样品进行自动化处理。该方案的最后一步是洗脱到 50  $\mu\text{L}$  带标记的糖链, 以便每  $\mu\text{L}$  的最终样品溶液代表从 1  $\mu\text{g}$  mAb 中释放的 N-糖链。方便的是, 此工作流程具有无需进行任何离心或干燥步骤的优势。

### 色谱条件

#### 泵

Agilent 1260 Infinity II 二元泵 G7112B

#### 流动相 A

50 mM 甲酸, 用氢氧化铵将 pH 调至 4.5

#### 流动相 B

乙腈

#### 进样器

Agilent 1260 Infinity II Multisampler (G7167A), 柱温箱温度设置为 11  $^{\circ}\text{C}$

#### 色谱柱

- AdvanceBio 糖谱分析色谱柱  
1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1  $\times$  100 mm, 使用方法 A
- AdvanceBio 糖谱分析色谱柱  
2.7  $\mu\text{m}$ , 2.1  $\times$  150 mm, 使用方法 B
- AdvanceBio 糖谱分析色谱柱  
1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1  $\times$  150 mm, 使用方法 C

## 柱温箱

Agilent 1260 Infinity II G7116 柱温箱与 G7116-60015 溶剂预加热器温度设置为 40 °C。

使用 100 µm 内径的 SSTL 管线将色谱柱连接至带有 8 µL 流通池 (G1321-60005) 的 Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B)。将检测器设置为 λ 激发 = 285 nm, λ 发射 = 345 nm, PMT 增益 = 10。

## LC/MSD XT 参数

参数	值
<b>离子源</b>	
离子源	正离子模式的安捷伦喷射流
鞘气温度	300 °C, 10.0 L/min
干燥气温度	150 °C, 9.0 L/min
雾化器压力	35 psig
毛细管电压	2500 V 喷嘴电压: 500 V
<b>采集设置</b>	
质量数范围	500–1400 <i>m/z</i>
碎裂电压	100 V
EMV 增益	1.0
步长	0.10
峰宽	0.2

## 软件

OpenLab CDS Chemstation 修订版 C.01.07 SR3

## 试剂

使用的所有试剂和溶剂均达到最高纯度。

## 梯度表

### 方法 A (用于 2.1 × 100 mm 1.8 µm 色谱柱)

#### 时间表

时间 (min)	%A	%B	流速 (mL/min)
0.00	25.0	75.0	0.70
0.50	27.0	73.0	0.70
4.00	28.0	72.0	0.70
9.00	33.0	67.0	0.70
9.20	50.0	50.0	0.70
9.70	50.0	50.0	0.70
10.00	25.0	75.0	0.70
11.50	25.0	75.0	0.70
11.80	25.0	75.0	0.80
14.50	25.0	75.0	0.90
15.30	25.0	75.0	0.70

停止时间 = 18 min

### 方法 B (用于 2.1 × 150 mm 2.7 µm 色谱柱)

#### 时间表

时间 (min)	%A	%B	流速 (mL/min)
0.00	27.0	73.0	0.50
1.00	28.5	71.5	0.50
9.00	29.5	70.5	0.50
22.00	41.0	59.0	0.50
22.50	50.0	50.0	0.80
23.50	50.0	50.0	0.70
23.70	27.0	73.0	0.70
25.00	27.0	73.0	0.70
25.50	27.0	73.0	0.80
27.50	27.0	73.0	0.90
28.00	27.0	73.0	0.50

停止时间 = 30 min

### 方法 C (用于 2.1 × 150 mm 1.8 µm 色谱柱)

时间 (min)	%A	%B	流速 (mL/min)
0.00	22.0	78.0	0.60
0.50	26.0	74.0	0.60
13.00	27.5	72.5	0.60
28.00	39.0	61.0	0.60
28.50	50.0	50.0	0.50
28.60	50.0	50.0	0.40
28.80	22.0	78.0	0.40
31.00	22.0	78.0	0.50
31.50	22.0	78.0	0.55
33.50	22.0	78.0	0.60

停止时间 = 37 min

## 结果与讨论

### 分离

我们在三个不同色谱柱上，针对各种分析周期对典型治疗性 mAb 糖链谱的分离进行了优化。该方法以平缓梯度开始，可最大程度提高大多数治疗性 mAb 样品中常见中性糖链的分离度。为更有效地洗脱分子链更长的酸性糖链结构，采用增大中间阶段的梯度斜率。以上方法均经过精心设计，可将压力保持在 600 bar 以下，既可最大限度提高稳定性，又能与各种液相色谱仪器兼容。所有三种分离方法都显示在图 2 中，我们选择方法 C 进行剩余的实验，因为我们发现方法 C 为三种 mAb N-糖链样品提供了最佳的总体性能。

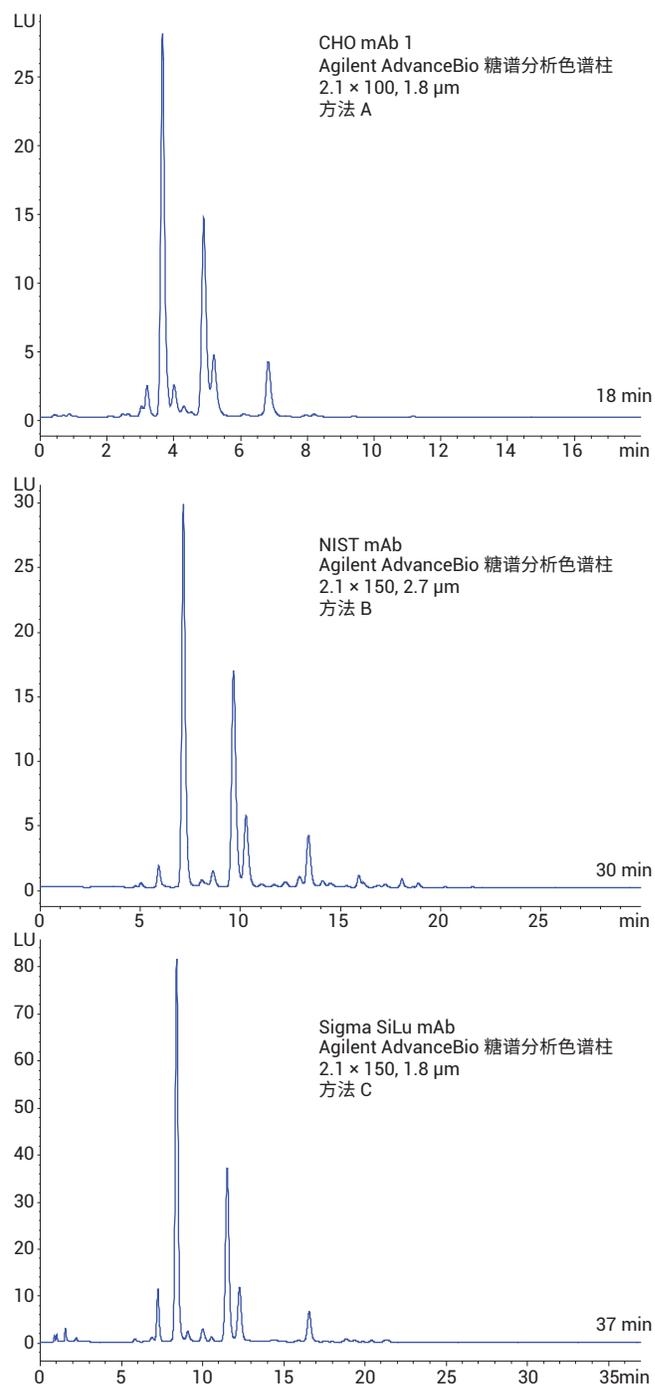


图 2. 使用不同色谱柱规格分离三种 mAb 样品的三种方法

## LC/MSD XT 灵敏度

过去，由于担心灵敏度不高，分析人员一般避免使用单四极杆质谱仪进行 N-糖链的 LC/MS 分析。然而，两项技术创新显著提高了 N-糖链的检测限。第一项技术创新是安捷伦喷射流这一高灵敏度离子源的可用性，该离子源使用超高温鞘气流围绕电喷雾羽流来显著改善电离。第二项创新技术是 Prozyme 公司推出的 InstantPC 标签的可用性，与传统荧光标签相比，InstantPC 标签从根本上提高了电离效率。

我们优化了 MSD 参数，以最大限度提高灵敏度。几乎只观察到 InstantPC 标记 N-糖链的双电荷离子形式，其中有  $[M+2H]^{2+}$ 、少量  $[M+NH_4+H]^{2+}$  和  $[M+H+Na]^{2+}$ 。提高干燥气温度或碎裂电压可引起 N-糖链碰撞诱导解离，从而提供了类似于用 Q-TOF 所能实现的强大结构解析策略（请参见 5991-5253CHCN）。

获得诊断信号的糖链仅占整个糖谱的 0.1%。请注意，将此灵敏度与替代工作流程进行比较时，上述结果是在样品前处理工作流程结束时未增加预浓缩步骤的情况下获得的，因此可节省大量时间。通过干燥样品，然后将其复溶于较小体积的样品基质中，可进一步提高灵敏度。

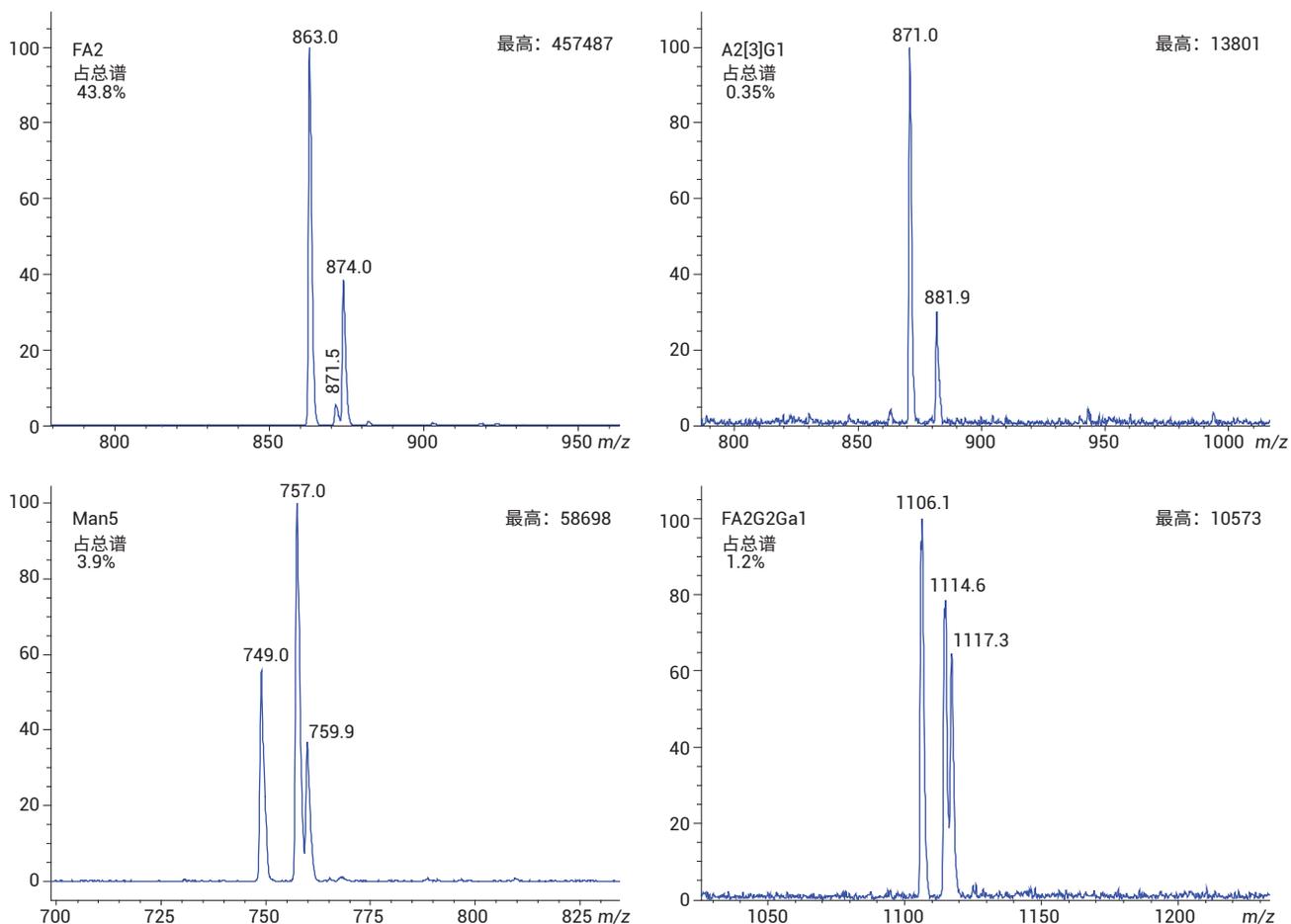


图 3. 3  $\mu$ g mAb 中不同相对丰度水平的四种代表性糖链的质谱。A2[3]G1 的信号仅占糖链谱图的 0.35%，该信号清晰可见，具有高信噪比

## 峰归属

对以上三个样品（使用方法 C）的数据进行积分，使用类似于应用简报 5991-5253CHCN 中所述的方法将各个峰归属至糖链组成。

**注：**与糖链的自由还原末端形式相比，InstantPC 标记会引起 261.1477  $m/z$  的质量数增加。

表 1 显示了在三个样品中检测到的糖链组成。糖链组成形式如下： $HxNxFxSgx + \text{核}$ （其中 H = 半乳糖或甘露糖，N = N-乙酰氨基葡萄糖，F = 岩藻糖，Sg = N-羟乙酰神经氨酸，核 = 三甘露糖苷，这是所有 N-糖链共有的核心结构）。在许多情况下，通过由治疗性 mAb 糖基化模式和 HILIC 保留顺序补充的基本知识，我们可按以上组成推荐糖链结构。由于大多数治疗性 mAb 含有相似的、有限几种常见 N-糖链结构，因此表 1 可作为此工作流程中归属 N-糖链的有用参考。

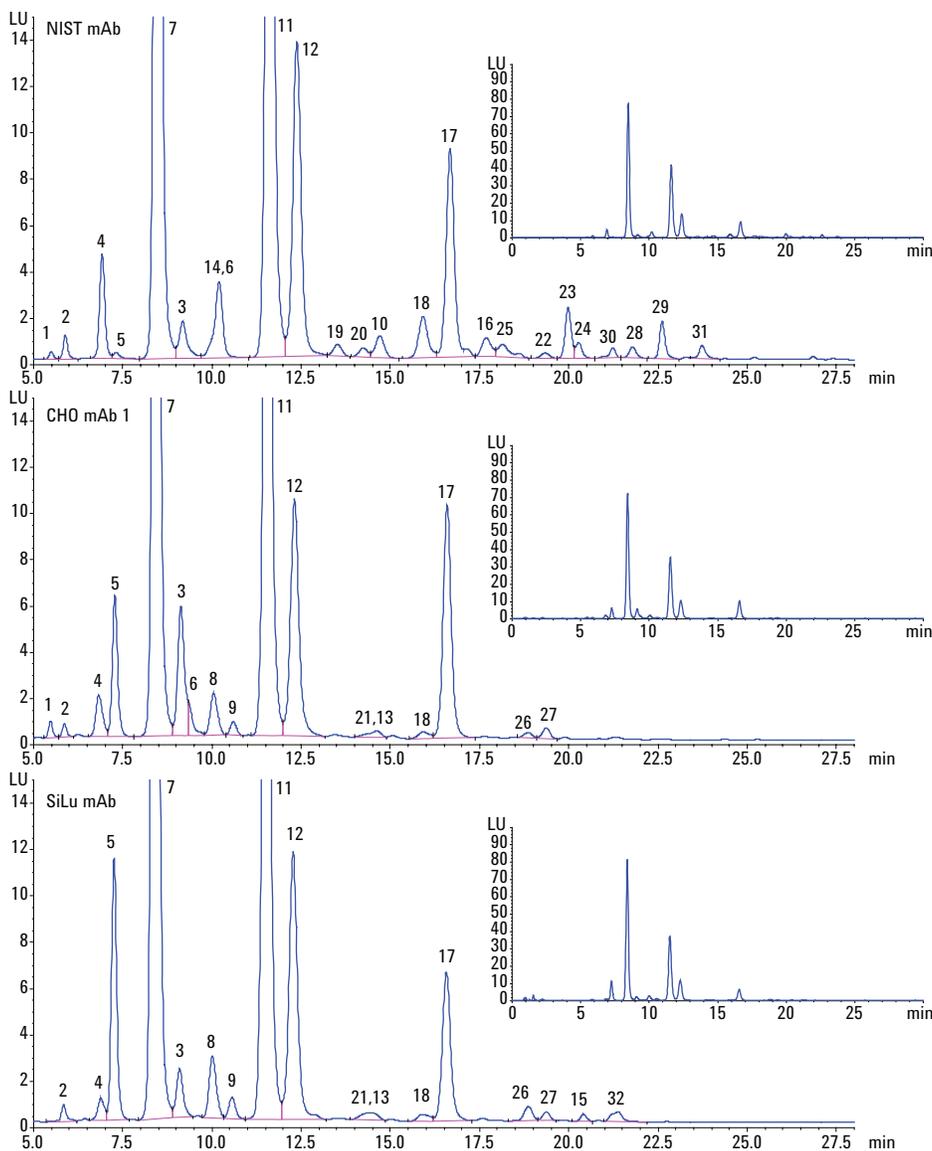


图 4. 三种 mAb N-糖链样品的放大 FLD 色谱图，示出了由方法 C 检测到的主要和次要糖链。插图所示为去放大图。标注参见表 1

表 1.

ID	观测 [M+2H] <sup>2+</sup>	推测组成	理论 [M+2H] <sup>2+</sup>	推测结构	
				Oxford	其他
1	659.9	F1 + 核	659.774	F1M3	G0F-2GlcNAc
2	688.4	N1 + 核	688.284	A1	G1-GlcNAc
3	748.9	H2 + 核	748.798	M5	Man5
4	761.5	N1F1 + 核	761.313	FA1	G0F-GlcNAc
5	790.0	N2 + 核	789.824	A2	G0
6	842.4	H1N1F1 + 核	842.340	FA1G1	G1F-GlcNAc
7	863.0	N2F1 + 核	862.853	FA2	G0F
8	871.0	H1N2 + 核	870.851	A2[6]G1	G1
9	871.0	H1N2 + 核	870.851	A2[3]G1	G1'
10	923.6	H2N1F1 + 核	923.366	-	-
11	944.0	H1N2F1 + 核	943.879	FA2[6]G1	G1F
12	944.0	H1N2F1 + 核	943.879	FA2[3]G1	G1F'
13	952.0	H2N2 + 核	951.877	A2G2	G2
14	964.7	N3F1 + 核	964.393	FA2B	G0FB
15	991.9	H5 + 核	991.877	M8	Man8
16	996.1	H1N1Sg1F1 + 核	995.885	FA1G1Sg1	G1Sg1F-GlcNAc
17	1025.1	H2N2F1 + 核	1024.906	FA2G2	G2F
18	1025.1	H2N2F1 + 核	1024.906	FA2G1Ga1	G1F + αGal
19	1045.6	H1N3F1 + 核	1045.419	FA2[6]B1G1	G1FB
20	1045.7	H1N3F1 + 核	1045.419	FA2[3]B1G1	G1FB'
21	1089.5	H1N1F1S1 + 核	1089.427	FA1G1S1	G1S1F-GlcNAc
22	1097.7	H1N2F1Sg1 + 核	1097.425	FA2G1Sg1	G1Sg1F
23	1106.1	H3N2F1 + 核	1105.932	FA2G2Ga1	G2F + αGal
24	1106.1	H3N2F1 + 核	1105.932	FA2G2Ga1 异构体	G2F + αGal'
25	1126.5	H2N3F1 + 核	1126.446	FA2BG2	G2FB
26	1170.4	H2N2F1S1 + 核	1170.454	FA2G2S1	A1F
27	1170.4	H2N2F1S1 + 核	1170.454	FA2G2S1 异构体	A1F 异构体
28	1178.7	H2N2F1Sg1 + 核	1178.451	FA2G2Sg1	Ag1F
29	1187.1	H4N2F1 + 核	1186.959	FA2G2Ga2	G2F + (αGal)2
30	1207.7	H3N3F1 + 核	1207.472	FA2BG2Ga1	G2FB + αGal
31	1259.4	H3N2F1Sg1 + 核	1259.477	FA2G2Sg1Gal1	Ag1F + αGal
32	1316.2	H2N2F1S2 + 核	1316.001	FA2G2S2	A2F

## 结果表

FLD 色谱图中的峰以总糖链谱的相对总和百分比形式列出。图 5 示出了结果。

一些图谱包含代表共洗脱糖链结构的峰。这些共洗脱物包括微量的糖链，仅由 FLD 定量分析就可将这两种结构的组合贡献以峰面积形式显示。

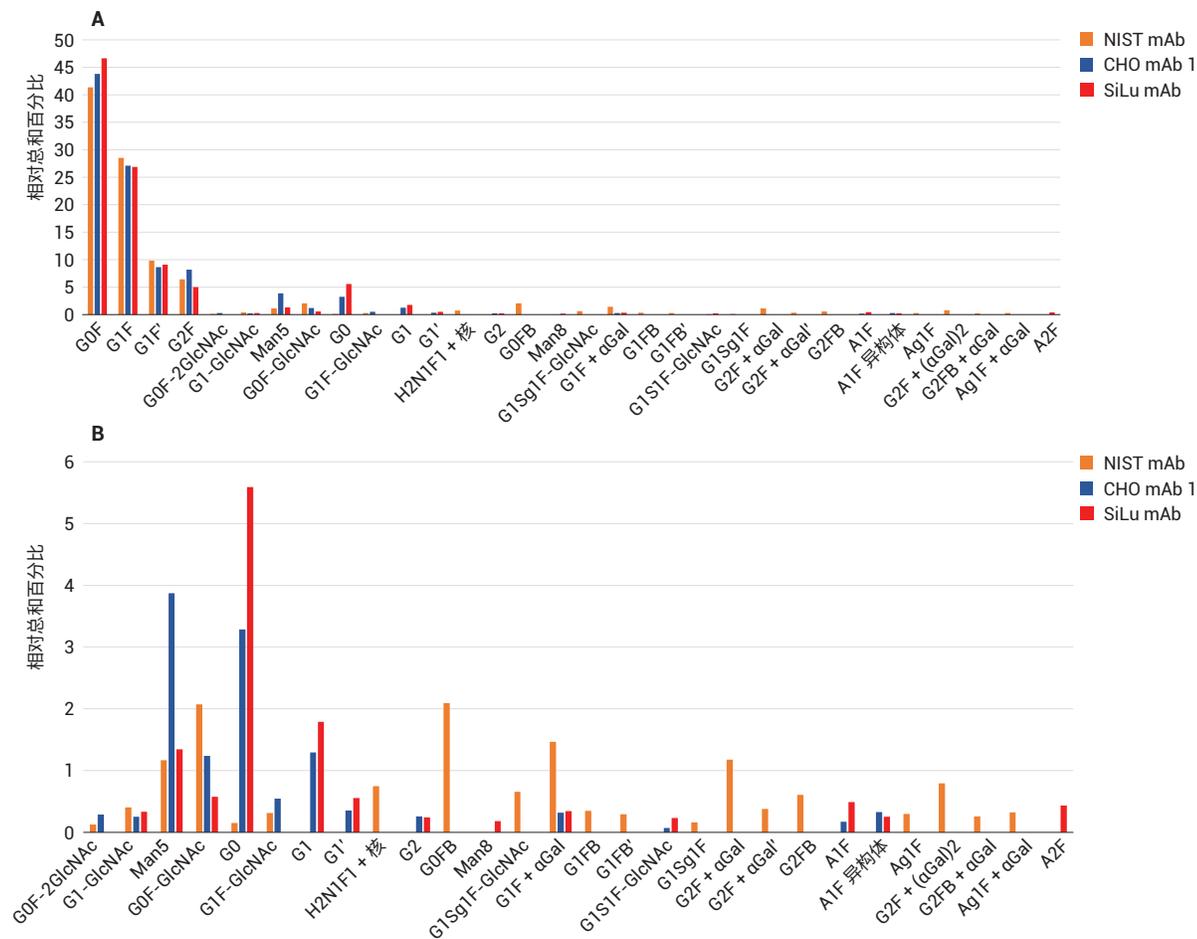


图 5. A) 三种 mAb 样品中 N-糖链的相对丰度。B) 仅显示微量组分的放大图。可轻松检测出低于 1% 的微量糖链

如果分析人员需要对这些低丰度共洗脱结构进行准确的定量分析，我们建议使用 LC/MSD XT 的数据来补充 FLD。质谱图可以在共洗脱 FLD 峰对应的时间段内积分。可以根据此图谱中双电荷 N-糖链离子的组合相对强度将 FLD 面积按比例分配至不同的结构。我们之前已说明 InstantPC 标记的 MS 信号与荧光强度所定义的真实丰度密切相关（请参见 5991-6958EN）。

## 结论

基于单四极杆技术的安捷伦 LC/MSD XT 可与典型的 UHPLC HILIC-FLD 系统在线联用，为每个样品的每个峰提供质谱鉴定选择。将安捷伦喷射流离子源与 InstantPC 糖链标签结合使用，可提供足够的灵敏度，以检测典型抗体样品中主峰和小峰的 MS 信号，而无需浓缩样品。对于典型的单克隆抗体样品，能够可靠地归属糖链结构。虽然本应用简报采用了稳定的荧光法作相对定量检测这一传统的方法，但当存在共洗脱峰的情况下 MS 数据可用于辅助定量分析。

## 更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 [www.agilent.com](http://www.agilent.com)。

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

**800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)**

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017

2017年5月22日，中国出版

5991-8071ZH-CN



**Agilent Technologies**