



# 采用新型 HILIC 色谱柱实现快速 N 连接糖基化分析

## 应用简报

生物制药

### 作者

James Martosella、Oscar Potter、  
Danny Mancheno 和 Jia Liu  
安捷伦科技有限公司

### 前言

重组单克隆抗体治疗药物 (mAb) 是最大的一组治疗性蛋白药物。此类治疗性药物的有效性高度依赖于 mAb 正确的糖基化模式，且迄今为止，所有批准的治疗性 mAb 均为免疫球蛋白 G (IgG) [1]。人类 IgG 的每个重链上均含有一个保守的 N 连接糖基化位点 [2]。N 连接糖基化是一种极为重要且非常复杂的翻译后修饰，需要在糖蛋白药物开发、加工和生产的每个阶段对其进行控制、监测与了解 [3]。此外，治疗性蛋白的安全性、有效性和血清半衰期等特性也会因糖基化模式的不同而受到影响。因此，糖基化模式分析是表征治疗性糖蛋白（尤其是 mAb）的一个重要部分。

虽然已有多种不同的方法用于糖基化分析。但是，大部分的方法均基于酶解蛋白，从 mAb 中释放多糖，然后通过标记试剂（例如 2-氨基苯甲酰胺，2-AB）进行进一步的衍生化 [4]。由于糖基缺少发色团，所以荧光检测前需先采用 2-AB（中性）标签标记。而由于标记后的多糖结构极为亲水，因此将亲水相互作用色谱（通常称为 HILIC）作为首选的分离技术。采用配合荧光检测的 HILIC 分离是一种非常稳健的糖基化分析方法，同时 HILIC/LC 还可与质谱联用，以获得重要的质量及结构信息。



**Agilent Technologies**

在本应用简报中，我们介绍了 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱，这是一种亚 2 μm HPLC 色谱柱，具有新型 HILIC 酰胺化学技术，用于高通量糖基化分析。与现有的 HPLC 色谱柱技术相比，该色谱柱及方法可增强多糖的分离，且减少了 40% 的洗脱时间。为了阐释 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱的实用性，我们以 2-AB 标记后的人类 IgG N 连接糖链样品为例进行研究。

## 材料与方法

### 条件，超高分离度

色谱柱: Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (部件号 859700-913)  
 多糖文库: 安捷伦 2-AB 标记的人类 IgG N 连接糖链, 200 pmol (部件号 5190-6996)  
 洗脱液: A) 100 mM 甲酸铵, pH 4.5  
 B) ACN  
 进样量: 2 μL, 溶液为 70/30 乙腈/水

采用相同的条件评价不同梯度下的快速分离。

工作流程见图 1。

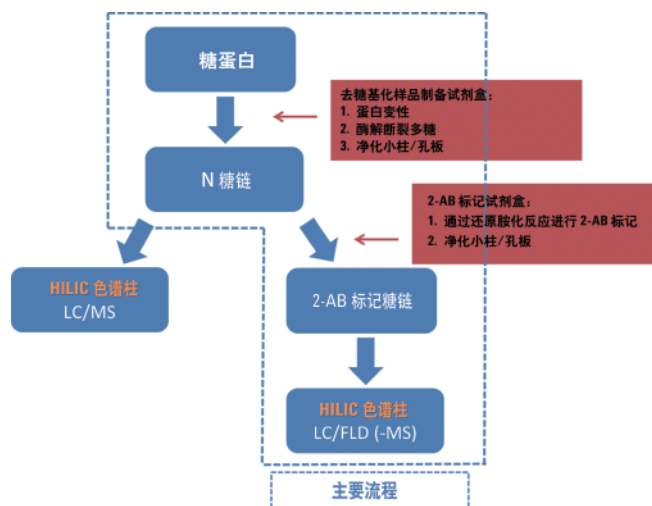


图 1. 采用 Agilent AdvanceBio 糖谱分析 HILIC 色谱柱及荧光检测进行 2-AB 标记人类 IgG 糖基化分析的总工作流程解决方案

表 1. 快速分离 2-AB 标记的人类 IgG N 连接糖链所得的分离结果

色谱柱	平均 RT (min)	RS 2,1	RS 3,2	RS 4,3	RS 6,5	平均 PW (min)	Bp (bar), 20% B	色谱峰容量
糖谱分析色谱柱	3.93	1.63	1.70	3.05	2.09	0.059	298	135

## 结果与讨论

### 快速分离

1.8 μm 粒径的 AdvanceBio 糖谱分析 HILIC 色谱柱可提供极快的糖基化分析，整个分析可在 10 min 内完成（图 2 和表 1）。表 2 列出了 IgG 样品中各个色谱峰归属及主要的糖链结构。

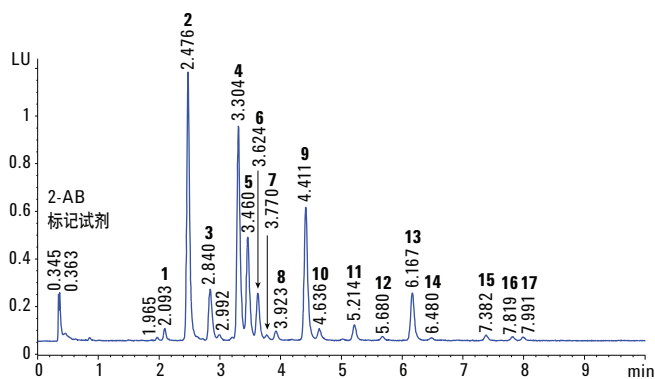


图 2 条件

梯度:	时间 (min)	% B	流速 (mL/min)
	0	75	1.0
	12	60	1.0
	12.15	40	0.5
	12.5	40	0.5
	12.9	75	0.5
	13.05	75	1.0
	15	75	1.0

图 2. Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱可在 10 min 内快速分离 2-AB 标记的人类 IgG N 连接糖链

表 2. IgG 各个色谱峰归属及主要的糖链结构

色谱峰	糖链	结构	色谱峰	糖链	结构
1	G0		10	G2FB	
2	G0F		11	G1FS1	
3	G0FB		12	A1	
4	G1F		13	A1F	
5	G1F'		14	A1FB	
6	G1FB		15	A2	
7	G1FB Man6		16	A2F	
8	G2		17	A2FB	
9	G2F				

果糖  
 半乳糖  
 甘露糖  
 N-乙酰葡萄糖胺  
 N-乙酰神经氨酸

### 超高分离度分离

1.8 μm 粒径的 AdvanceBio 糖谱分析 HILIC 色谱柱可在分析时间略微增加的情况下，提供超高的分离性能（图 3 和表 3）。在该分离中，2-AB 标记的人类 IgG N 连接糖链得到了高度分离，并实现高灵敏度检测。

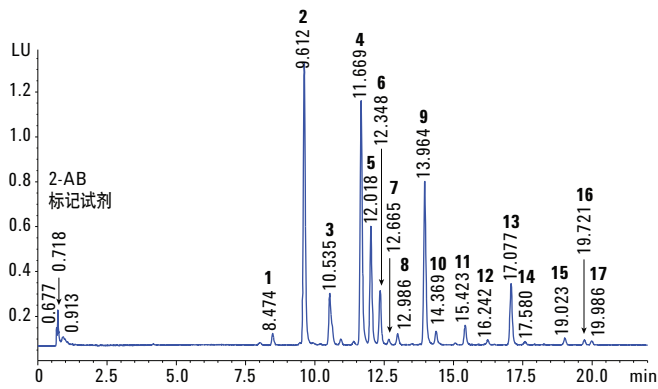


图 3 条件

柱温:	55 °C		
梯度:	时间 (min)	% B	流速 (mL/min)
	0	80	0.5
	25	60	0.5
	26	0	0.5
	27	80	0.5
	30	80	0.5
检测器:	荧光, 激发波长 = 260 nm, 发射波长 = 430 nm		
仪器:	Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统, 配有 Agilent 1260 Infinity 荧光检测器		

图 3. 采用安捷伦 1.8 μm AdvanceBio 糖谱分析 HILIC 色谱柱对 2-AB 标记的人类 IgG N 连接糖链实现超高分离度的分离

表 3. 2-AB 标记的人类 IgG N 连接糖链的高分离度分离结果

色谱柱	平均 RT (min)	RS 2,1	RS 3,2	RS 4,3	RS 6,5	平均 PW (min)	Bp (bar), 20% B	峰容量
糖谱分析色谱柱	12.7	2.60	2.90	5.43	2.81	0.0741	298	221

## 性能比较

在相同色谱条件下，与其他供应商 2.1 × 150 mm 配置的色谱柱相比，AdvanceBio 糖谱分析色谱柱可提供更高的分离度、更窄的色谱峰和更高的峰容量，且其分离时间可缩短 40%（图 4 和表 4）。

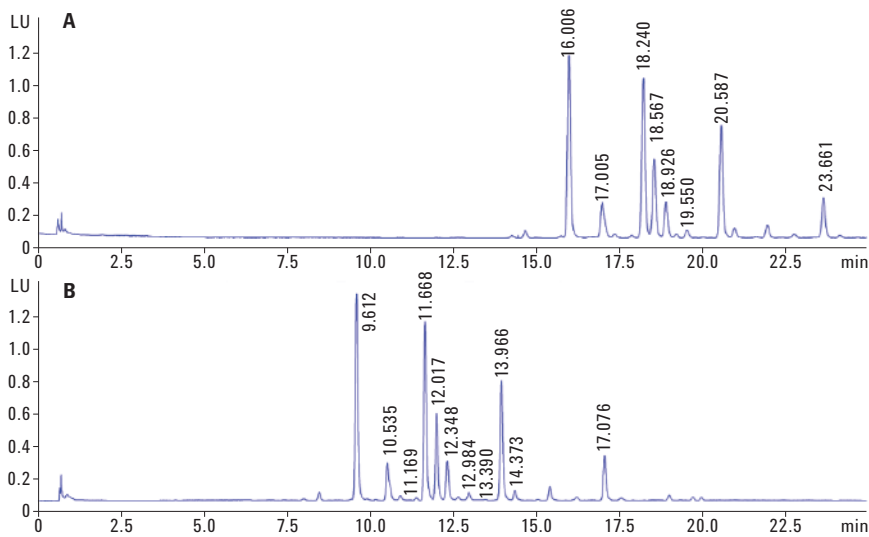


图 4. 与其他供应商相同尺寸的色谱柱在相同条件下比较发现，Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱 (B) 可提供更高的分离度、更窄的色谱峰及更高的峰容量，且分离时间缩短 40%

表 4. Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱与其他供应商色谱柱的比较结果显示其具有更快的分离速度

色谱柱	平均 RT (min)	RS 2,1	RS 3,2	RS 4,3	RS 6,5	平均 PW (min)	Bp (bar), 20% B	峰容量
其他供应商的糖谱分析色谱柱 (A)	20.2	1.77	1.94	3.39	2.10	0.1085	349	214
Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱 (B)	12.7	2.60	2.90	5.43	2.81	0.0741	298	221

在另一项比较中，对两种色谱柱采用类似的条件（梯度偏移调整为 5% B）进行超快速分离。同样的，与其他供应商的 2.1 × 150 mm 配置的色谱柱相比，AdvanceBio 多糖分析色谱柱可提供更高的分离度、更窄的色谱峰、更高的峰容量（图 5 和表 5）。

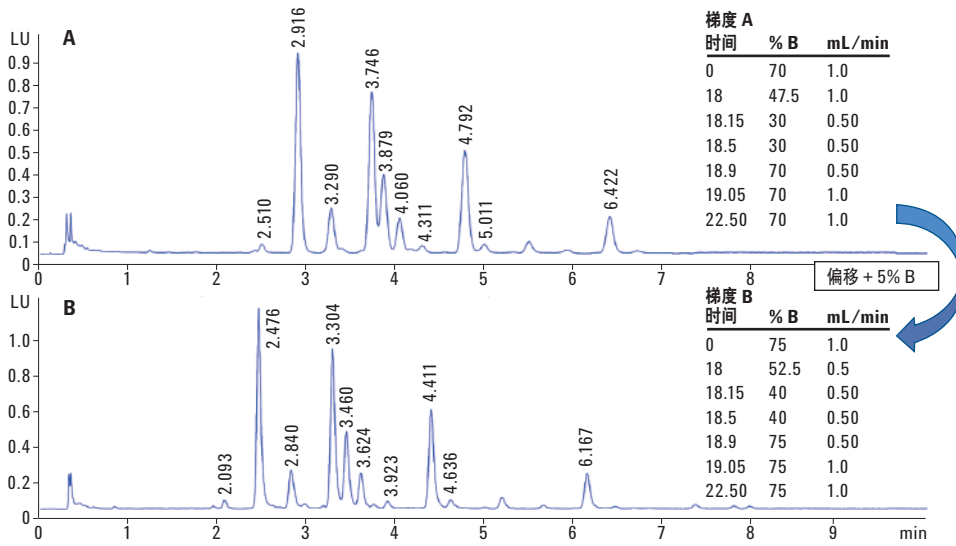


图 5. 超快速分离比较：与配置相同的其他供应商色谱柱相比，相同分离时间内，AdvanceBio 糖谱分析色谱柱 (B) 提供了更高的分离度、更窄的色谱峰、更高的峰容量

表 5. Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱与其他供应商色谱柱的比较结果显示其分离度更高

色谱柱	平均 RT (min)	RS 2,1	RS 3,2	RS 4,3	RS 6,5	平均 PW (min)	Bp (bar), 20% B	峰容量
其他供应商的糖谱分析色谱柱 (A)	4.32	1.02	1.39	1.92	1.59	0.078	375	101
Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱 (B)	3.93	1.63	1.70	3.05	2.09	0.059	298	135

## 化学稳定性

AdvanceBio 糖谱分析色谱柱在温度升高的情况下，仍旧能够表现出绝佳的使用寿命稳定性。图 6 详细比较了 60 °C 下，5000 次进样后的稳定分离性能。比较发现，该色谱柱在重复进样后仍能保持良好的峰形、保留时间和灵敏度。

## 结论

与其他 HPLC 色谱柱技术相比，基于 HLIC 的安捷伦 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱可提供高灵敏度、高效率的糖基化分离且洗脱时间缩短 40%。此外，该色谱柱在至少 5000 个柱体积以内还具有绝佳的化学稳定性。

## 致谢

本研究已在 HPLC 2014 会议（第 41 届高效液相色谱分离及相关技术国际会议）的海报展上展示。本次会议于 2014 年 5 月 11 至 15 日在新奥尔良举办。

## 参考文献

1. R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* **21**, 11 (2005)
2. J. N. Arnold, L. Royle, R. A. Dwek, P. M. Rudd, R. B. Sim, *Adv. Exp. Med. Biol.* **564**, 27 (2005)
3. R. Abès, J. L. Teillaud, *Pharmaceut.* **3**, 146 (2010)
4. L. R. Ruhaak, G. Zauner, C. Huhn, C. Bruggink, A. M. Deelder, M. Wuhrer, *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 3457 (2009)

## 更多信息

这些数据代表典型结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的网站 [www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

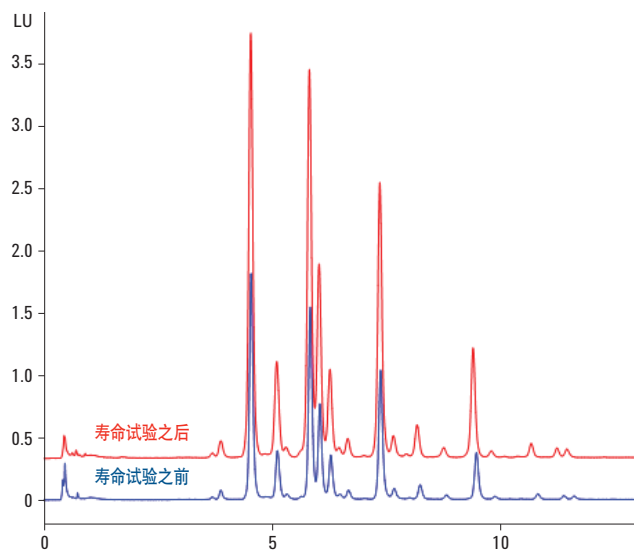


图 6. 寿命试验前后 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱进行糖基化分离所得的叠加图（HILIC QC 条件：10:90 100 mM pH 4.4 甲酸铵：乙腈，流速 0.2 mL/min，4 min，60 °C，胞嘧啶）

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

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。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2014  
2014 年 6 月 30 日，中国印刷  
5991-4886CHCN