

在环保型GlycoWorks™ RapiFluor-MS™标记的N-糖样品制备中用DMSO替代DMF

Stephan M. Koza, Balasubrahmanyam Addepalli, Caitlin M. Hanna, Matthew A. Lauber, Steve Shiner

Waters Corporation

摘要

欧盟欧洲化学品管理局2023年关于使用N,N-二甲基甲酰胺(DMF)的限制文件中强调, DMF对使用者和环境而言的风险明显高于二甲基亚砜(DMSO)。因此, 本文介绍了在快速GlycoWorks N-糖分析流程的RapiFluor-MS标记反应步骤和最终样品稀释步骤中, 用DMSO有效替代DMF用作助溶剂的方法。本文展示了低唾液酸化水平的单克隆抗体, 以及具有高度天线性和多重唾液酸化N-寡糖的牛胎球蛋白的N-糖谱分析结果。此外, 本文还重点介绍了在GlycoWorks流程中使用DMSO时的一些注意事项。

优势

使用DMSO代替DMF的更安全、更环保的GlycoWorks快速N-糖样品前处理流程。

简介

Waters™ GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖标记试剂盒 (例如用户指南715004903EN <<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715004903en.pdf>>) 提供了一种快速简便的方法, 能够标记游离N-糖, 以进行灵敏的荧光和质谱检测 (图1)。该流程包括PNGase F快速释放N-糖, 然后用RapiFluor-MS (RFMS)标记得到的糖胺。然后通过定量HILIC-SPE纯化步骤从RFMS标记的N-糖中去除反应副产物。整

这个过程需要1~2小时，具体取决于样品数量，可选择使用手动或自动流程，适用于各种样品¹⁻³。

在2015年发布的初始版本中，研究人员发现，在乙腈:水混合物中，N,N-二甲基甲酰胺(DMF)作为RFMS标记N-糖的样品助溶剂可提供优势。因此，在最终样品中使用DMF作为共溶剂，并使用无水DMF溶解RFMS标签。使用无水溶剂溶解RFMS至关重要，因为水可以与RFMS反应。

但是，随着人们对DMF可能对分析人员和环境带来的不良影响认识的深入了解，以及欧盟欧洲化学品管理局(echa.europa.eu)于2023年12月对DMF使用的限制，研究人员对一种采用DMSO一对一替代DMF的GlycoWorks流程进行了评估。本总结将重点比较在RFMS标记步骤中使用无水DMF或DMSO，以及使用试剂级DMF或DMSO作为N-糖（RFMS标记并经HILIC SPE纯化）的助溶剂时的GlycoWorks流程。

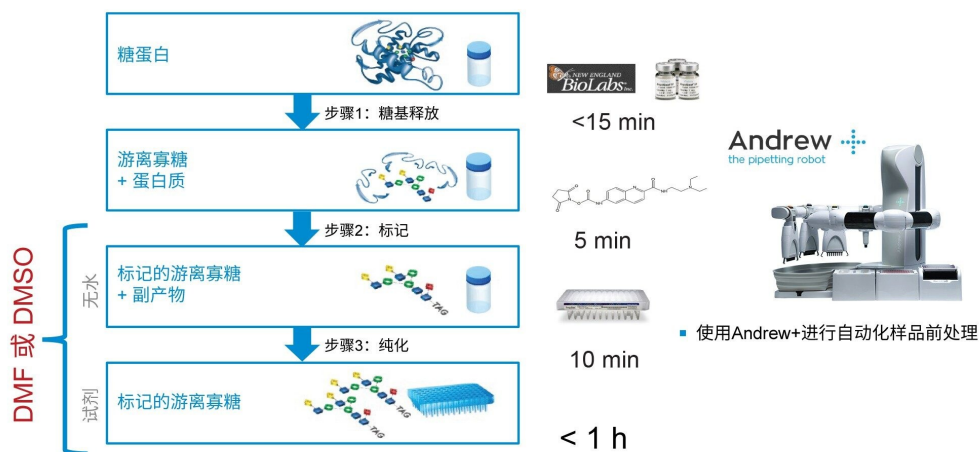


图1.图中突出显示了Waters GlycoWorks RapiFluor-MS方案。DMF或DMSO在RFMS标记步骤（步骤2）需要作为助溶剂，以及在SPE纯化后用于样品稀释（步骤3）。步骤2需要无水溶剂，而步骤3则不需要无水溶剂。

实验

GlycoWorks样品前处理和分析步骤按照用户指南720005470EN <

<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005470en.pdf>> 和715004903EN <

<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715004903en.pdf>> 中概述的步骤进行。其他相关详

细信息随所示数据一起提供。

结果与讨论

RFMS标记和标记的N-糖样品稀释

RFMS标记步骤中有三个注意事项。首先，标记流程的产量应最大化，并且不应区分不同糖型。此外，应尽量避免过度标记，或者说尽可能避免生成带有多个标记的N-糖。之前的研究已经证明了通过GlycoWorks RFMS流程使用无水DMF溶解RFMS时获得的N-糖谱的准确性¹，且使用无水DMSO代替DMF获得了相当的标记结果（图2）¹。本研究使用无水DMSO或DMF溶解RFMS试剂，对单克隆抗体(NISTmAb™)和牛胎球蛋白混合物进行了分析。这种糖蛋白混合物用于涵盖各种N-糖，范围从mAb中丰度更高的低天线性中性形式，到胎球蛋白中存在的高天线性、高度唾液酸化的形式。值得注意的是，图2中比较的样品在HILIC分析之前未经HILIC-SPE纯化，因此无法更清楚地确定标记步骤中的任何差异。

在标记流程中使用DMSO也产生了相对较低水平的过度标记N-糖（图3）。这一点通过LC-MS分析完整单克隆抗体标准品（P/N: 186006552 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186006552-intact-mab-mass-check-standard.html>> -1）生成的单标记和双标记主要FA2糖型得到了证明。使用HILIC-SPE纯化这些样品，得到的水相样品在HILIC分析之前用含有相应助溶剂的溶液稀释（请参阅用户指南715004903EN），以尽可能地提高痕量级双标记FA2游离寡糖的LCMS检测能力。

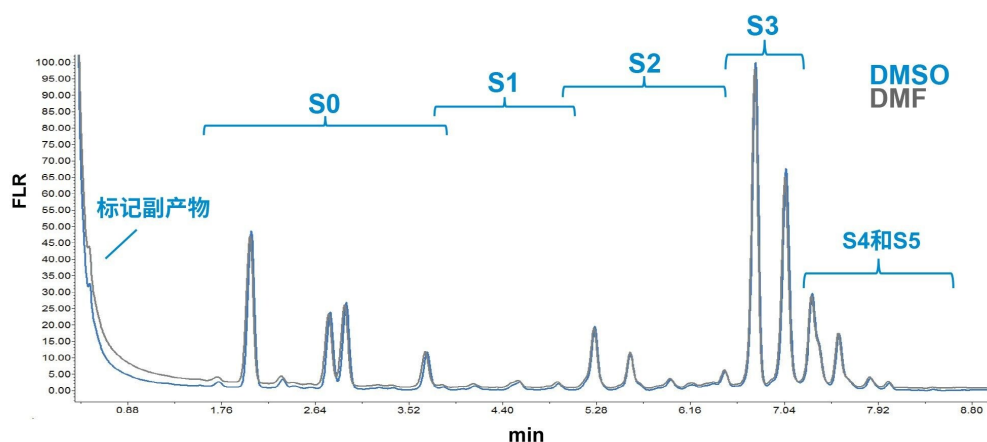


图2. NISTmAb (NIST RM 8671)和牛胎球蛋白(Sigma-Aldrich PN:F3004)混合物 (每种大约 1 mg/mL) 的HILIC-FLR N-糖谱, 每个游离寡糖包含0到5个唾液酸(S0~S5)。样品依据用户指南720005470EN使用RapiGest™进行变性处理, 通过PNGase F进行去N-糖基, 并用溶于DMF或DMSO中的RFMS进行标记。使用ACQUITY™ Premier UPLC™ BEH™ Amide, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 × 50 mm游离寡糖分析专用柱 (P/N: 186004740) 对1 μL粗制样品进行直接HILIC分析, 流速为1.0 mL/min, 分析梯度为10分钟。其他条件请参见用户指南715004903EN。

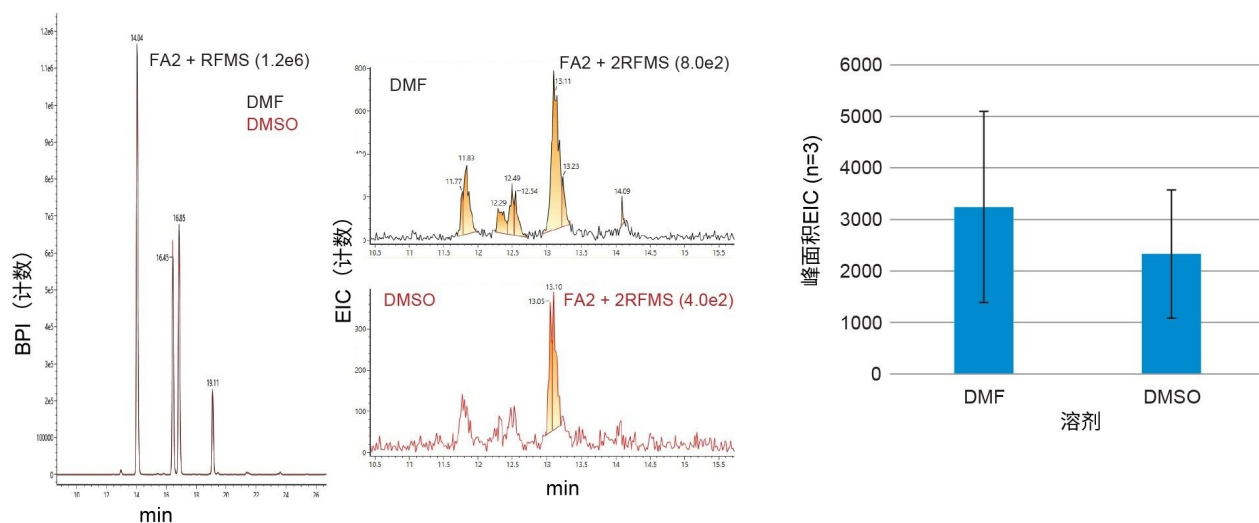


图3.沃特世完整单克隆抗体标准品 (P/N: 186006552-1) 的HILIC-MS (Vion™ Q-ToF)分析, 使用DMF或DMSO进行N-糖RFMS标记和最终样品稀释步骤, 确定RFMS过度标记的程度。过度标记是基于双标记FA2 (m/z 1044.023)的提取离子强度(EIC)来确定的。使用ACQUITY Premier UPLC BEH Amide, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 × 150 mm游离寡糖分析专用柱 (P/N: 186009524) 进行分离, 流速为0.4 mL/min, 分析梯度为35分钟。其他条件请参阅用户指南715004903EN

RFMS标记N-糖样品的稳定性和上样

经过HILIC SPE纯化步骤 (请参阅用户指南720005470EN和715004903EN) 后, 得到含90 μL样品的水相缓冲液。为了尽可能多地将该样品上样至酰胺基HILIC分析柱, 使用310 μL的DMF:ACN 32:68 (v:v)混合溶液稀释样品。此处使用DMF作为助溶剂来提高样品稳定性。但是, 建议在24小时后再重新混合样品, 然后再执行分析 (用户指南715004903EN)。

观察结果表明, 在样品稀释步骤中, DMSO可以有效替代DMF, 但是, 用DMSO:ACN混合溶液稀释的样品上样至酰胺基HILIC分析柱时, 发生强溶剂效应的可能性略高。在本研究中, 前文的标记研究中使用的NISTmAb和牛胎球蛋白混合物中的RapiFluor-MS标记N-糖经过HILIC SPE纯化, 并在HILIC分析之前用含有相应助溶剂的溶液进行稀释。如图4所示, 当对于多种N-糖的标记和样品稀释流程中使用DMF或DMSO时, 获得了相当的HILIC谱图。此外, 三种选定糖型 (中性(FA2)、三唾液酸化(A3G3S3)和四唾液酸化(A3S1G3S3) N-糖) 的定量的相对丰度一致。

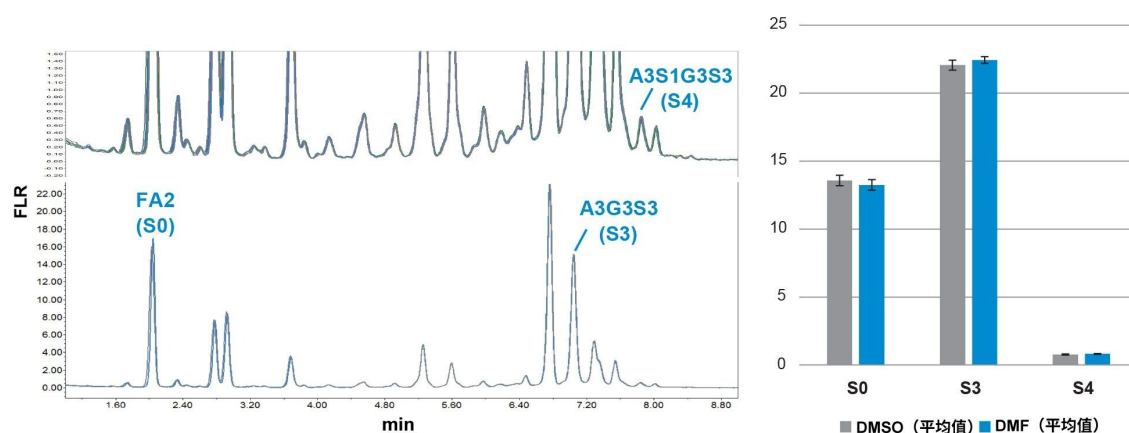


图4.展示了NISTmAb (NIST RM8671)和牛胎球蛋白混合物中三种选定糖型的HILIC-FLR N-糖谱及其相对丰度 ($n = 3$, 误差条为1个SD)。样品前处理遵循用户指南720005470EN, 使用DMF或DMS溶解RFMS, 并作为SPE纯化样品稀释剂的组分。进样体积为4 μ L。其他实验详细信息请参见图2。

实验还观察到, 经DMF和DMSO稀释的样品在6 °C下24小时内的稳定性相当 (图5)。然而, 使用任一种助溶剂时, 观察到稀释剂中的中性N-糖在24小时后对HILIC分析柱表现出强溶剂效应, 但该效应未对定量产生显著影响。HILIC分离中的强溶剂效应会导致弱保留分析物发生谱带展宽, 这是由于破坏了填充颗粒表面的水层, 且该效应会因进样体积增大和样品基质极性增强而加剧。这一特定观察结果可能是由于小填充床体积(2.1 \times 50 mm)酰胺基HILIC色谱柱上4 μ L的进样体积, 再加上样品中的非极性ACN组分发生选择性蒸发损失所致。

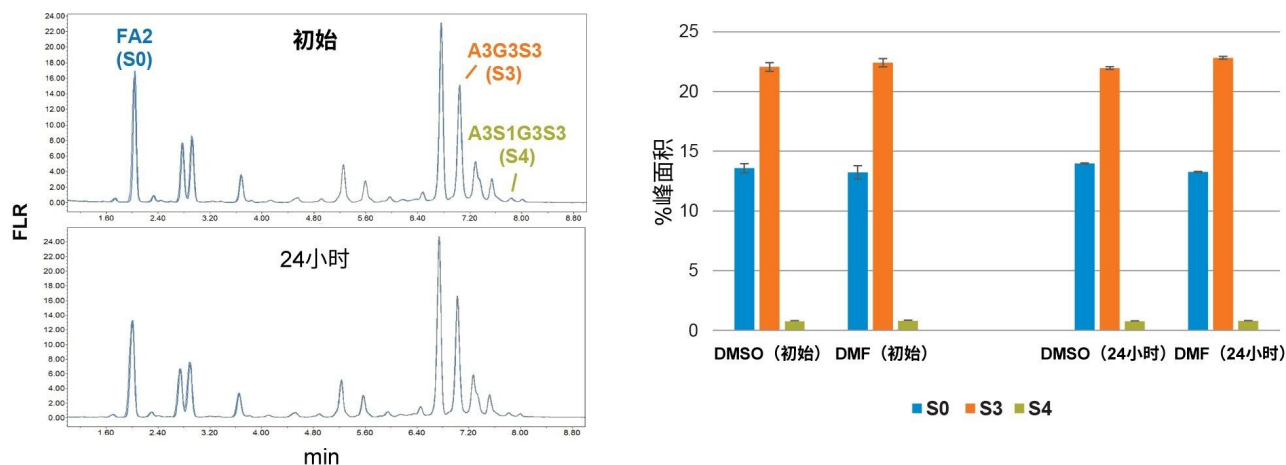


图5.在6 °C下, *NISTmAb*和牛胎球蛋白混合物的HILIC-FLR N-糖谱以及选定相对丰度 ($n = 2$, 误差条为范围) 的初始和24小时样品稳定性时间点。样品前处理和分析如图4所示。有关中性游离寡糖(FA2)峰形变化的讨论, 请参阅正文。

实验中还观察到, 与DMF相比, 稀释剂中含有DMSO的样品观察到的强溶剂效应略强(图5)。这可能是由于DMSO的极性略强(其介电常数为47.2, 而DMF为38.3), 以及样品中助溶剂的浓度较高(25% v/v)。这种差异的影响在图6中清晰可见, 其中进样体积大于5 μL 会导致DMSO稀释的中性糖型产生更明显的峰肩。强溶剂效应会随着进样体积的增加或柱体积的减小而出现。大多数情况下, 在样品稀释剂中使用DMSO不会有问题, 但在HILIC方法中, 进样体积可能需要适当减少。

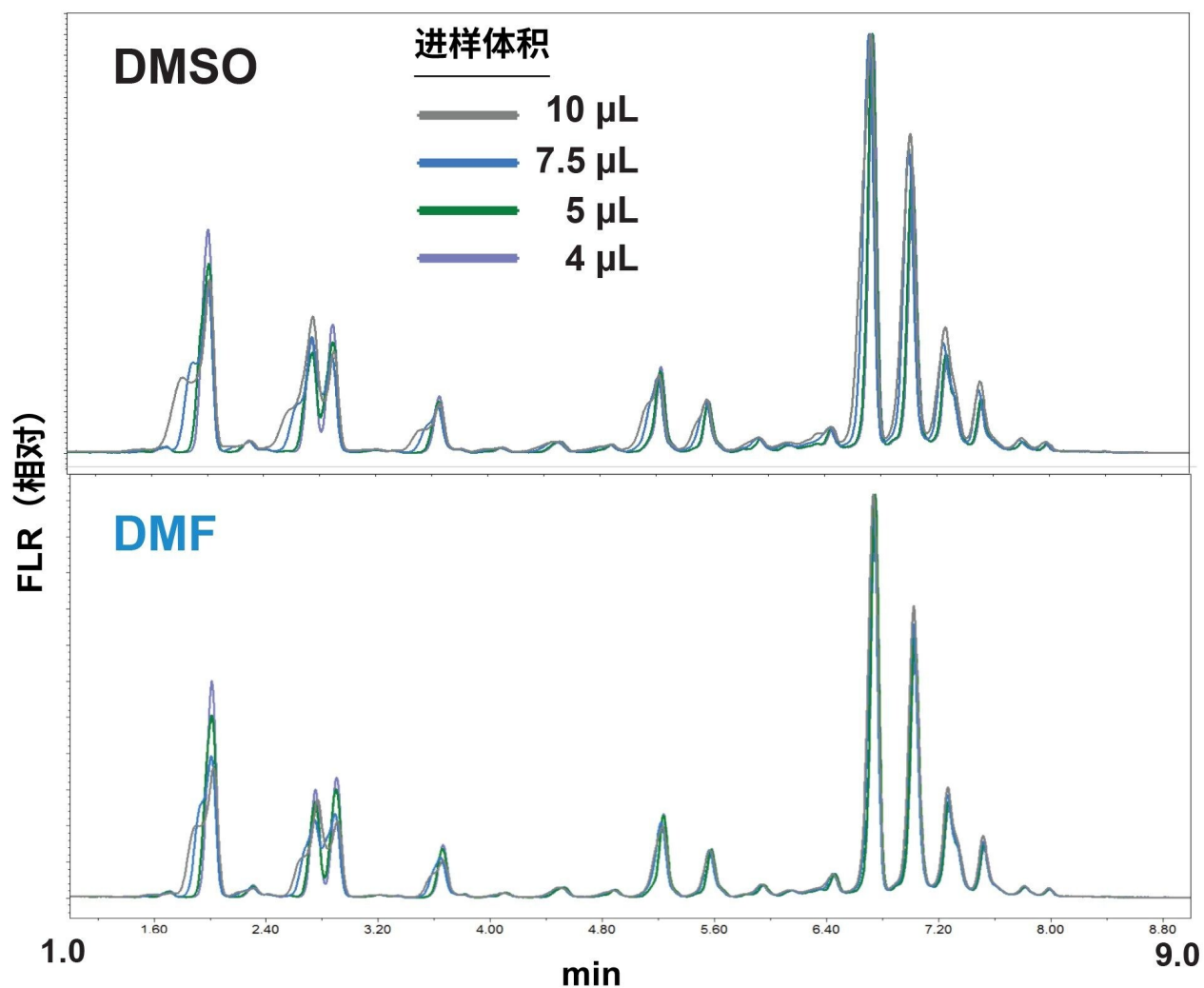


图6.在图4和图5的分析样品中，一系列进样体积下的强溶剂效应。经DMSO稀释的样品中，谱带展宽和峰分裂更为明显。

结论

研究发现，在RapiFluor-MS N-糖GlycoWorks流程中，DMSO可以“一对一”有效替代DMF，用作溶剂和助溶剂。鉴于我们对DMF为实验室安全及环境带来的潜在负面影响有了更深入的了解，尤其是在其使用限制日益增加的

背景下，我们特此撰写了本研究。

研究结果表明，无水DMSO在RapiFluor-MS以及随后的RFMS标记中的溶解作用相当。研究还发现，DMSO还可作为RFMS标记和HILIC SPE纯化N-糖样品稀释剂的有效组分。但是，与使用DMF稀释的样品相比，使用DMSO稀释的样品进行酰胺基HILIC分析时，最大进样体积略有减少。因此，使用DMSO作为稀释剂组分时，可能需要适当减少进样体积。

为进一步证明使用DMSO替代DMF时RFMS GlycoWorks方法的可靠性，我们使用DMSO溶解了RFMS，并同时将DMSO用作HILIC样品稀释剂的组分，成功开发出了一套自动化流程⁴。该流程包含一个透析步骤，用于在不兼容的基质进行样品的缓冲液置换，并在执行RapiFluor-MS GlycoWorks流程之前浓缩样品。

参考资料

1. Lauber, M. A.; Yu, Y.-Q.; Brousmiche, D. W.; Hua, Z.; Koza, S. M.; Magnelli, P.; Guthrie, E.; Taron, C. H.; Fountain, K. J. 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), 5401–5409.
2. Koza, S. M.; McCall, S. A.; Lauber, M. A.; Chambers, E. E. Quality Control and Automation Friendly GlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan Sample Preparation. Waters Application Note [720005506](#), May 2016.
3. Zhang, X.; Reed, C. E.; Birdsall, R. E.; Yu, Y. Q.; Chen, W. High-Throughput Analysis of Fluorescently Labeled N-Glycans Derived from Biotherapeutics Using an Automated LC-MS-Based Solution. *SLAS Technology.* 2020, 24 (4), 380-387.
4. Hanna, C.M.; Koza, S. M., Yu, Y. Q. Automated RapiFluor-MS™ Labeled N-Glycan Sample Preparation for Protein A Purified Monoclonal Antibodies. Waters Application Note [720007854](#), February 2023.

特色产品

[ACQUITY Premier系统 <](#)

<https://www.waters.com/nextgen/global/products/chromatography/chromatography-systems/acquity->

[premier-system.html](#)>

ACQUITY UPLC和ACQUITY Premier FLR检测器 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=514222>>

720008157ZH, 2023年12月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)
[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)