

CE-MS 分析肝素类寡糖和低分子量肝素

目的

通过用电渗流泵驱动同轴鞘流液 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源,首次利用在线 CE-MS 系统开展对肝素类寡糖和低分子量肝素 (LMWHs) 的研究。

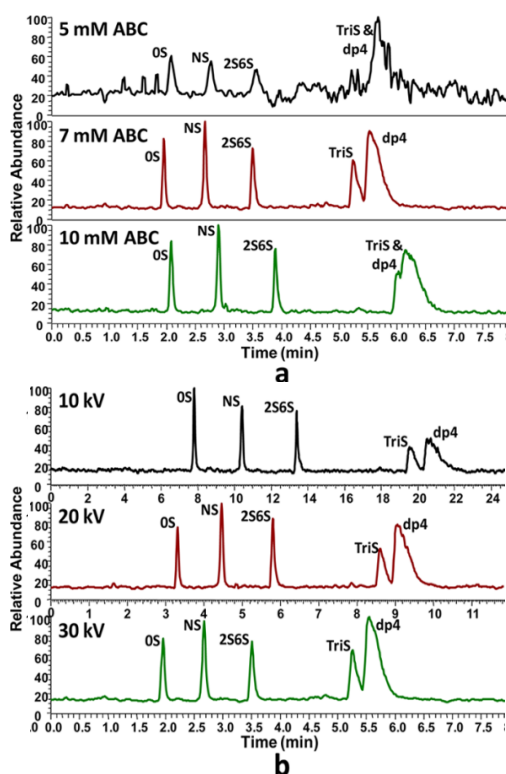
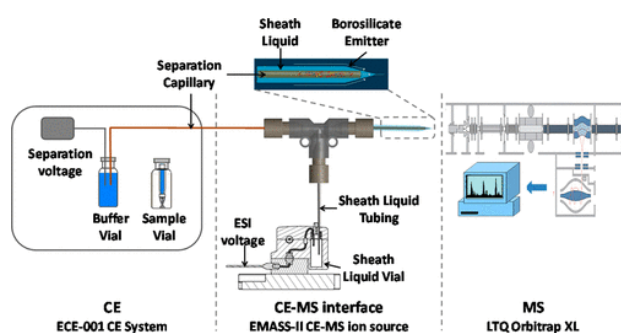


图1. CE-MS 分析二糖标准品和全硫化四糖标准品混合物。(a) 在不同浓度碳酸氢铵缓冲液下 CE-MS 分析结果。(b) 在不同分离电压下 CE-MS 分离结果。OS、NS、2S6S 及 TriS 代表不同程度硫化的二糖标准品, dp4 代表全硫化的四糖标准品。

背景

肝素是一类高度硫酸化的线性多糖,也被称为糖胺聚糖 (GAGs), 是分析中最具挑战性的生物聚合物。多种分离技术与质谱 (MS) 联用方法的开发, 为复杂GAGs的快速分离, 结构解析和准确定量提供了技术保证。以往对肝素分析的方法依赖于液相色谱 (LC) 与MS联用, 这一技术存在诸多不足, 比如分离时间长, 对寡糖分离能力差, 洗脱剂与质谱不兼容以及需要对寡糖进行衍生化等。毛细管电泳技术 (CE) 具有高效的分离效率, 在众多生物活性分子的分析中已得到广泛的应用, 目前已被用来分析 GAGs。CE 和 MS 通过离线联用也已成功应用于 LMWHs 的分析鉴定。虽然 MS 兼容的 CE 分离缓冲液已经发展了数十年, 但是由于缺乏高性能的 CE-MS 联用离子源, 对肝素进行在线 CE-MS 分析一直是个难题。

在本应用中, 我们使用了新型基于电渗流泵的 CE-MS 联用技术, 对 GAGs 寡糖进行 CE-MS 分析。CE 分离使用了易挥发的碳酸氢铵缓冲液, 电喷雾所用鞘流液为甲醇-甲酸溶液。在线分析高度硫酸化的肝素寡糖, 从简单二糖 (图1、图2) 到相对复杂的 LMWHs (图3), 都可以在 10 分钟内快速完成。使用正极分离模式 CE 和正离子模式电喷雾质谱, 可以获得卓越重现性 (峰面积相对标准偏差为 3.6-5.1%, 出峰时间相对标准偏差 0.2-0.4%) 和极好的灵敏度 (定量限为 2.0-5.9ng/mL, 检测限为 0.6-1.8 ng/mL)。

解决方案

仪器试剂:

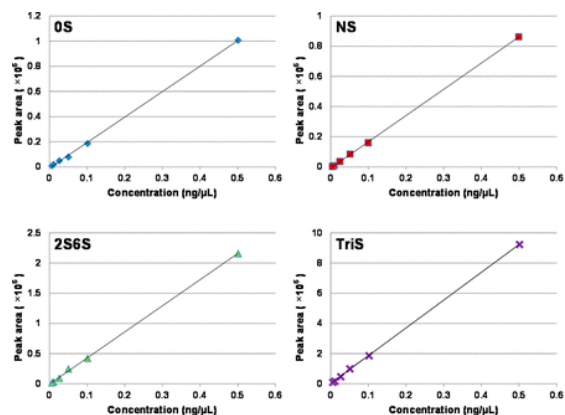
CMP Scientific ECE-001 型毛细管电泳仪。EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源 (CMP Scientific, P/N: EM3001-T)。分离毛细管为 50cm 裸管 (外径 360/200 μm , 内径 50/40 μm)。BGE 为 7mM 碳酸氢铵水溶液。SL 为 0.5% 甲酸与 50% 甲醇混合液。

实验方法:

样品在 0.2psi 压力下进样 5s。分离电压设定为 +30kV。喷嘴尺寸为外径 1.0mm, 内径 0.75mm, 末端开口 15 μm 。喷嘴末端距质谱进样口距离调节至 2mm。

质谱参数:

质谱为 Thermo LTQ-Orbitrap XL。质谱分析在正离子模式下进行。传输毛细管电压为 45V, 温度为 200 $^{\circ}\text{C}$ 。S-Lens 电压为 100V。质谱分辨率为 30,000。其它参数采用默认值。



Disaccharide	Retention time (min)	Ion observed (m/z)	Interpretation	Linear equations	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
OS	2.1	380.12	$[\text{M} + \text{H}]^+$	$y = 2.0x - 0.0079$ $R^2 = 0.9994$	1.4	4.8
NS	3.0	435.09	$[\text{M} + \text{NH}_4]^+$	$y = 1.7x - 0.0069$ $R^2 = 0.9999$	1.8	5.9
2S6S	4.1	574.08	$[\text{M} - \text{H} + 2\text{NH}_4]^+$	$y = 4.3x - 0.0058$ $R^2 = 0.9996$	1.0	3.4
TriS	7.1	612.03	$[\text{M} - \text{H} + 2\text{NH}_4]^+$	$y = 18.4x + 0.014$ $R^2 = 0.9999$	0.6	2.0

图2. 对四种二糖标准品进行定量分析。表中列出的是四种二糖标准品的电泳时间、主要离子、线性方程、LOD 及 LOQ。

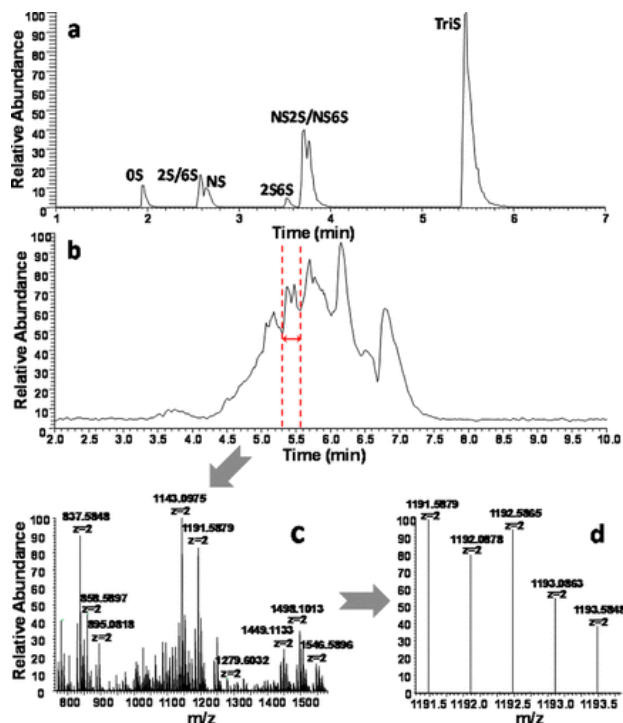


图3. 对 LMWH 一依诺肝素进行 CE-MS 分析。(a) 依诺肝素经酶解后得到的二糖成分的提取离子电泳图。(b) 完整依诺肝素总离子电泳图。(c) b 图中标记区域质谱图。(d) $m/z=1,191.5897$ 处放大的质谱图。

结论

使用 ECE-001 型毛细管电泳仪和基于电渗流泵驱动同轴鞘流液原理的 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 开发出在线 CE-MS 系统对肝素类寡糖和低分子量肝素的分析方法。实验表明, 在线 CE-MS 系统具有灵敏度高、分析速度快、鉴定能力强、定量准确等特点, 可以满足肝素类生物分子定性和定量分析的需要。

www.evergauge.cn

www.cmpscientific.com

永道致远科学技术有限公司

上海市浦东新区康新公路3399弄26号楼218室