

## 离子交换色谱-质谱(IEX-MS)法实用仪器注意事项

---

Andrew Schmudlach, Samantha Ippoliti, Julien Bourquin, Matthew A. Lauber

Waters Corporation



这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

---

## 摘要

过去，由于需要使用高浓度非挥发性盐，用于蛋白分析的离子交换色谱(IEX)与质谱(MS)不兼容。用兼容质谱的挥发性盐代替传统盐后，IEX-MS已成为现实。因此，对于流动相变化需要了解新的注意事项。本应用简报旨在从仪器角度提供IEX-MS实用指南。

## 优势

- 提高IEX-MS灵敏度、稳定性并缩短停机时间
- 减少系统和色谱柱污染

---

## 简介

离子交换色谱是一种在质谱领域日益受到关注的分离技术。由于使用含盐水溶液，该技术面临着独特的挑战。除先前有关流动相和样品前处理的注意事项以外<sup>1</sup>，同时考虑液相色谱(LC)和质谱仪(MS)也很重要。

使用水性流动相可能导致微生物生长和污染，对色谱性能和仪器使用寿命产生不利影响。必须借助良好的实验室卫生清洁和维护习惯来避免这种持续存在的严重问题。熟悉其他天然水性分离方法（例如体积排阻色谱法(SEC)）的人员应该非常清楚避免污染的需求。简单的标准化清洗程序有助于确保IEX-MS获得理想性能。此外，如果将单台仪器用于多种色谱模式，专用部件也可以带来显著改善。

---

## 结果与讨论

### 大幅减少微生物生长

天然的MS兼容型离子交换缓冲液通常为含有乙酸铵的铵溶液，例如Waters IonHance CX-MS缓冲液（部件号：186009280 <<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009280>>，186009281 <<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009281>>）。通常将此类溶液作为优先选择的原因有很多<sup>2</sup>。需要考虑以下事实：这些溶液具有足以促进微生物生长的有利条件。简单地将制得的水性溶液视为带有在制备时即启动的计时器即可。通常建议不要将水性流动相（例如，稀释和制备的IonHance CX-MS缓冲液）于室温下在系统中放置一周以上，因为存在微生物污染的危险。在制备时，包

装浓缩液中的抑菌乙腈浓度被稀释至可能导致微生物增殖的水平。因此，制得缓冲液后，建议在溶液不装入液相色谱系统时将其冷藏（即4 °C）。制备的缓冲液可冷藏大约1个月。

除流动相以外，系统和色谱柱也可能受到微生物污染。一旦色谱柱受到污染，应将其丢弃。为防止这种情况发生，建议按照制造商的建议储存色谱柱，并在任何不使用期间（例如周末）使用强有机溶剂的水溶液（例如，70%异丙醇与30% 18.2 MΩ水）灌注用过的液相色谱管路。定期（例如每周一次）用有机溶液冲洗有助于防止微生物菌落在液相色谱系统中滋生。如果系统受到污染，使用强有机溶剂和/或酸（例如20%磷酸）可能有助于缓解这种情况。

流动相入口过滤器是超多孔结构，为微生物生长提供了理想的环境。建议在执行天然LC-MS分析时从液相色谱管路末端移除入口过滤器。可以将管路末端简单放置在流动相容器中，同时特别注意仅使用高品质溶剂和流动相试剂。

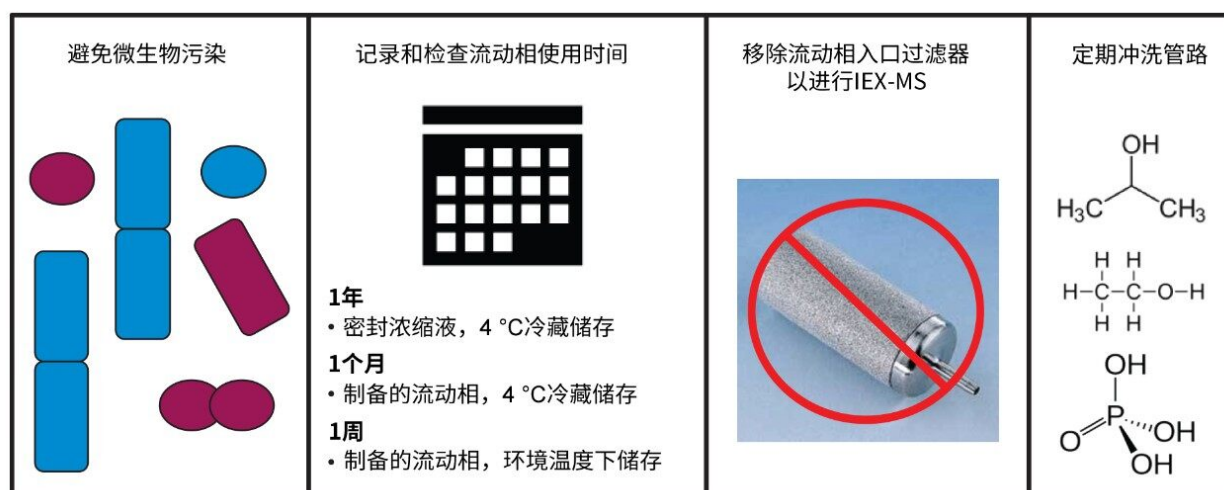


图1.在使用水性流动相（即IonHance CX-MS缓冲液）时有助于防止LC-MS系统受到微生物污染的基本规则。记录并监测流动相的使用时间非常重要。密封浓缩液的有效期为1年；制备的流动相可冷藏1个月；制备的流动相在环境条件下可使用1周。确保从液相色谱管路末端移除所有沉子。最后，定期用强有机溶剂或酸冲洗液相色谱系统，确保系统中不存在微生物菌落。

## 采用专门的管路应对多种色谱模式

如果使用LC-MS系统进行多种色谱分离，请注意三氟乙酸(TFA)似乎对IEX-MS的性能有不利影响。从系统中冲出TFA可能要花费大量时间。因此，如果可能的话，建议使用专门的液相色谱管路进行反相和IEX分析（例如，A1/B1用于含TFA的反相分析，A2/B2用于IEX-MS分析）。此外，使用专门的PEEK毛细管将色谱柱连接至TUV并从TUV连接至质谱仪，能够使反相色谱与IEX之间的过渡更容易，并提高IEX-MS的灵敏度。专用PEEK管路的配置可实现分离模式之间的快速无缝转换，而无需花费大量时间进行清洗。

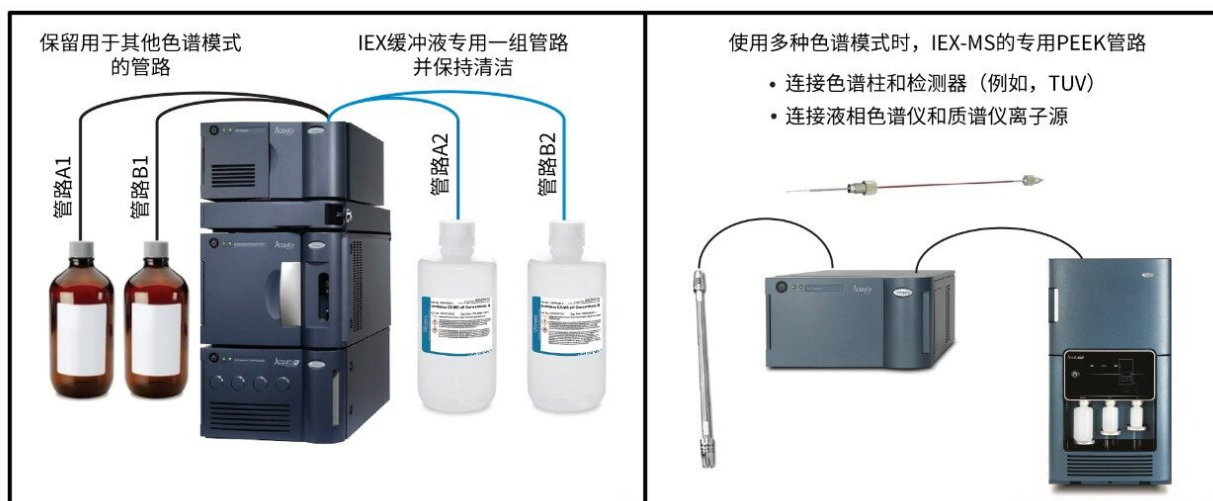


图2.为了在使用多种色谱模式的系统上获得理想性能，建议保留专用于IEX-MS的液相色谱管路和PEEK管路。专用PEEK管路可避免繁琐、耗时的清洗工作，为IEX-MS提供一种更简单直接的“即插即用”式方法。

## 液相色谱冲洗

如前文所示，IEX-MS对污染高度敏感。为确保理想性能，建议定期清洗液相色谱仪，尤其是在IEX和其他分离技术均使用LC-MS系统的情况下。如果系统仅用于IEX-MS分析，则建议每月使用25%/25%/25%/25%的水/乙腈/异丙醇/甲醇溶液冲洗一次，并在每次将系统切换至不同色谱模式时进行冲洗。

## 液相色谱流速

使用2.1 mm内径的色谱柱进行IEX-MS分析时，液相色谱操作流速可以在50~250  $\mu\text{L}/\text{min}$ 之间变化。研究证明，在ESI-MS中使用较低的流速对于生物分子的检测具有优势。使用较高的流速则可能对色谱分离度产生不良影响。当改变流速时，应注意在 $\Delta\text{pH}/\Delta\text{CV}$ （色谱柱体积）方面以合理的梯度斜率进行分离。

## 质谱仪注意事项和维护

虽然使用挥发性水性缓冲液能够在天然液相色谱分离后进行质谱检测，但该技术的灵敏度低于使用酸或碱改性的水/有机流动相的方法。因此，理想的MS调谐参数和精心的系统维护是取得成功的必要条件。有关IEX-MS方法指南和调谐的更多详细信息，请参阅“参考资料”部分的应用纪要<sup>1-4</sup>。

在维护方面，每月检查一次质谱仪离子源外壳是确保未形成盐沉积物的可靠措施。对于ToF和QToF仪器，使用浸泡过MS级甲醇的不起毛薄纸擦拭离子源外壳表面即可完成快速清洁。如果锥孔出现盐沉积物，合适做法是按照所用仪器的操作员概述和维护指南进行清洗。对于BioAccord系统，当系统健康状态显示存在堵塞或灵敏度下降时，需要更换带孔圆片。

专用ESI探头毛细管也会使反相到IEX的转换更平稳。其作用类似于专用的柱后PEEK管路。使用专用ESI探头可实现轻松更换，无需进行大量冲洗以确保IEX-MS获得理想信号。

每年一次的计划内维护(PM)上门服务足以满足仪器使用要求，前提条件是注意保持系统中不存在生物材料或盐积聚。从日常应用角度来看，清洗溶剂（例如IonHance CX-MS缓冲液）、流动相储液瓶（即MS级热塑性塑料）以及确保适当的样品上样至色谱柱更为重要。

最后，建议制备系统适应性测试(SST)样品（例如，人源mAb质量数检查标准品，部件号：[186009125](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009125) <<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009125>>），利用该样品可以监测每次运行的预期信号强度、信噪比和数据质量。如果观察到数据质量下降，则可能需要采用上文所述的任意或所有维护步骤进行系统维护。

## 样品

已经观察到，与进样大体积稀释样品（例如10 µL的1 mg/mL样品）相比，进样小体积高浓度样品（例如1 µL的10 mg/mL样品）往往会得到更出色的数据。因此，建议使用高浓度样品，而不是稀释样品。此外，优先考虑使用操作流动相制备样品。制备流动相时，18.2 MΩ水（例如Milli-Q水）是流动相浓缩液的首选稀释剂。使用玻璃瓶装水可能导致金属离子污染。一般避免使用玻璃流动相瓶、玻璃量筒和玻璃样品瓶，尽量减少盐/金属加合物，最终获得更出色的结果。

---

## 结论

当引入微生物污染时，采用水性流动相的天然LC-MS会对数据质量和仪器健康状态产生不利影响。本文所述的良好卫生规程和建议的维护措施有助于提高数据质量，缩短由污染或盐沉积物引起灵敏度不佳或色谱分离度损失而导致的仪器停机时间。如果您仍然苦于数据质量不佳或仪器污染，请通过[iRequest](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10006027&icid=lg-othr_00041) <[https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10006027&icid=lg-othr\\_00041](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10006027&icid=lg-othr_00041)> 与沃特世技术支持服务部门联系。

---

## 参考资料

1. Schmudlach, A.; Lauber, M. A. Practical Considerations for Optimizing MS Quality During IEX-MS. Waters Application Note, [720006675EN](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=720006675EN) <



<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/Practical-Considerations-for-Optimizing-MS-Quality-during-IEX-MS.html> , Jan 2020.

2. Ippoliti, S.; Schmudlach, A.; Lauber, M. A.; Yu, Y. Q. 使用BioResolve SCX色谱柱、IonHance CS-MS pH浓缩液和BioAccord系统对mAb电荷异构体进行在线IEX-MS分析. 沃特世应用纪要, [720006672ZH](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/online-iox-ms-mab-charge-variants-bioresolve-scx-mab-column-ionhance-cx-ms-ph-concentrates-and-bioaccord-system.html) <  
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/online-iox-ms-mab-charge-variants-bioresolve-scx-mab-column-ionhance-cx-ms-ph-concentrates-and-bioaccord-system.html>> , 2019年9月.
3. Shion, H.; Yu, Y. Q.; Chen, W. Analytical Scale Native SEC-MS for Antibody-Drug Conjugates (ADCs) Characterization. Waters Application Note, [720006368EN](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2018/analytical-scale-native-sec-ms-antibody-drug-conjugates-adcs-characterization.html) <  
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2018/analytical-scale-native-sec-ms-antibody-drug-conjugates-adcs-characterization.html>> , Aug 2018.
4. BioResolve CX pH Concentrates A and B. Waters Care and Use Manual, [720006429EN](https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=135007224&type=USRM) <  
<https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=135007224&type=USRM>> , Jan 2019.

---

## 特色产品

720007144ZH, 2021年2月