

15 種の非誘導体化糖類および シアル酸 USP 標準液の分離

Agilent AdvanceBio MS スペントメディアカラムと TOF MS 分析

著者

Richard Hurteau
Agilent Technologies, Inc.
Wilmington, DE, USA

概要

糖類とシアル酸は、バイオプロセッサからのスペントメディアにおける一般的な成分であり、モノクローナル抗体などの治療用タンパク質の製造工程でモニタリングされます。このアプリケーションノートでは、Agilent AdvanceBio MS スペントメディアカラムと HILIC テクノロジーを用いて、これらの典型的なスペントメディア成分の USP 標準液を分離します。Agilent 6230 飛行時間型 (TOF) LC/MS を用いることで、高価で時間を要する誘導体化を実施することなく分析しました。

はじめに

糖類とシアル酸は、モノクローナル抗体 (mAb) 製品やその他の治療用タンパク質の生産において、きわめて重要な役割を果たします^{1,2,3}。従来の HPLC による炭水化物の分離には、SEC または陽イオンリガンド交換の炭水化物カラムが用いられます。これらは高温加熱され、屈折率 (RI) 検出器とともに用いられますが、これは炭水化物が UV 検出のための発色団を欠くためです。RI 検出器はグラジエントメソッドと互換性がないため、炭水化物の混合物を分離する場合には制約があります。蒸発光散乱検出器 (ELSD) も炭水化物分析に用いられますが、一定の制約があります⁴。エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) は、RI や ELSD 検出器よりも高感度です⁵。誘導体化手順も、炭水化物の LC/MS 分析や GC/MS 分析に用いられてきましたが、これには時間と手間を要します。

AdvanceBio MS スペントメディアカラムは、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) テクノロジーによって、一糖類と二糖類の複雑な溶液を分離します。ESI 検出器の感度と組み合わせることで、一糖類と二糖類を直接、迅速かつ正確に特性解析ことができ、時間と煩雑な誘導体化が不要になります。AdvanceBio MS スペントメディアカラムとともに、Agilent 1260 Infinity II LC システムと、Agilent 6230 Accurate-Mass TOF LC/MS システムを検出器として使用しました。このシステムの有効性は 15 種の USP 標準液一式を分離することで評価しました。標準液は USP から無償でご提供いただいたものです。この一式には、一糖類および二糖類、5 種の異性体 2 組、および 3 種のシアル酸などが含まれていました。

実験方法

試薬と実験方法

サンプル

USP 標準液	USP カタログ番号
ガラクトース (200 mg)	1287700
KDN (100 mg) (3-デオキシ-D-glycero-D-galacto-2-ノスロソ酸)	1354852
ラクトース-水和物 (500 mg)	1356701
ラクツロース (1 g)	1356803
マルトース-水和物 (500 mg)	1375025
マンノサミン塩酸塩 (300 mg)	1375160
マンノース (500 mg)	1375182
N-アセチルノイラミン酸 (200 mg)	1612619
N-グリコリルノイラミン酸 (200 mg)	1294284
スクロース (100 mg)	1623637
タガトース (200 mg)	1642904
キシロース (1 g)	1722005
フルクトース (125 mg)	1286504
エピラクトース (200 mg)	1236801
ブドウ糖 (500 mg)	1181302

溶媒および消耗品

- Fisher Scientific 製の LC/MS グレードのギ酸アンモニウム、アセトニトリル、水酸化アンモニウム
- Agilent バイアル、スクリュートップ、茶色、認定、2 mL、100 個
バイアルサイズ: 12 × 32 mm (12 mm キャップ) (p/n 5188-6535)
- Agilent 圧着スクリュューキャップ、PTFE/白シリコンセプタム (p/n 5190-7021)
- USP から入手した USP 標準液

カラム

AdvanceBio MS スペントメディア 100 Å、
2.1 × 100 mm (p/n 675775-901)

LC システム

- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートクォータナリポンプ (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートマルチサンブラ (G5668A)
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A)

TOF MS

Agilent 6230 TOF LC/MS

分析条件: バッファ流速 0.4 mL/min、カラム温度 35 °C、冷却器設定温度 4 °C

メソッド開発

個々の標準溶液は 50 % アセトニトリルの USP 標準液から調製しました。ESI ネガティブモードを 10 mM ギ酸アンモニウム、pH 10、および 90 % アセトニトリル中の 10 % 100 mM ギ酸アンモニウムをバッファとして用いました。糖アノマーを 1 つのピークにし、糖に TOF MS での検出のための電荷を与えるために、pH 10 を選択しました。pH 10 では、クロマトグラムにわずかな化合物しか認められませんでした。多くの化合物の pKa が約 12 であるため、ギ酸アンモニウムの pH を 11.0 まで上げました。pH 11.0 では、全化合物が観察されました (表 1 および 2、図 1 ~ 4)。pH 11.0 を超えて調節すると、カラムの寿命が短くなる可能性があります。

結果と考察

各化合物の複合サンプルを 62.5 % アセトニトリル内で調製しました。15 種の化合物はすべて、18 分間の浅いグラジエントを用いるメソッド 1 で、13 分未満で分離しました (図 3、表 2)。イソクラティックメソッドでは混合物を分離できませんでした。

MS パラメータ	
イオン化モード	ESI ネガティブ
ガス温度	200 °C
ガス流	10 L/min
ネブライザ	40 psi
シースガス温度	300 °C
シースガス流量	12 L/min
キャピラリー電圧	3,000 V
ノズル電圧	0 V
スキマー電圧	65 V
Oct RF Vpp	750 V
取り込みパラメータ	データを 2 GHz 拡張ダイナミックレンジで取り込み。 MS マスレンジ m/z 50 ~ 1,000

表 1. USP 標準液とリテンションタイム

	化合物	分子量	リテンションタイム
1	キシロース	150.13	2.197
2	タガトース	180.16	2.606
3	フルクトース	180.16	2.99
4	マンノース	180.16	3.618
5	マンノサミン HCl	215.63	3.724
6	ブドウ糖	180.16	3.947
7	ガラクトース	180.16	4.242
8	スクロース	342.3	7.316
9	エビラクトース	342.3	8.467
10	マルトース-水和物	342.3	12.02
11	ラクツロース	342.3	12.11
12	N-アセチルノイラミン酸	309.27	12.584
13	ラクトース-水和物	343.3	13.84
14	KDN	268.2	13.91
15	N-グリコリルノイラミン酸	325.27	14.957

表 2. メソッド 1 のパラメータ

メソッド 1		
時間 (分)	%A	%B
0	3	97
15	11	89
15.5	3	97
18	3	37

A = 10 mM ギ酸アンモニウム、pH 11.0

B = 90 % のアセトニトリルに含まれる pH 11.0
の 10 % 100 mM のギ酸アンモニウム

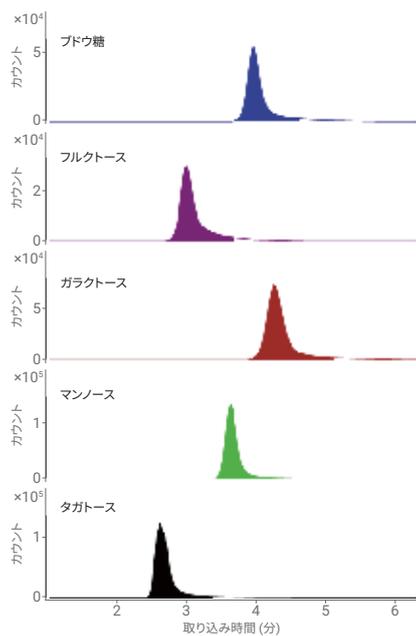


図 1. 6- 炭素単糖類の USP 標準液の分析

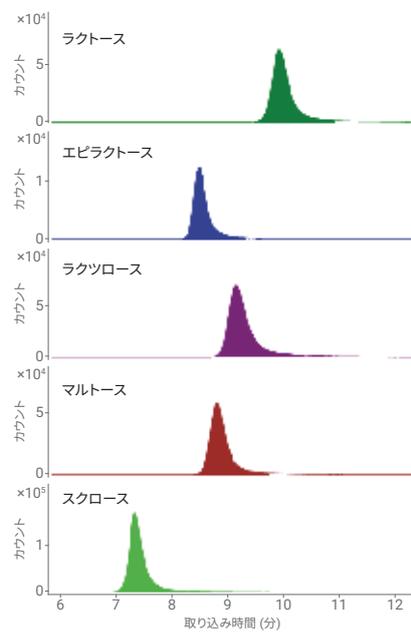


図 2. 二糖類異性体の USP 標準液の分析

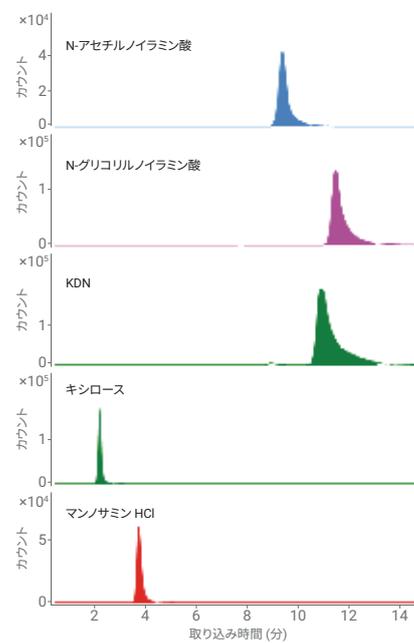


図 3. USP 標準液の分析

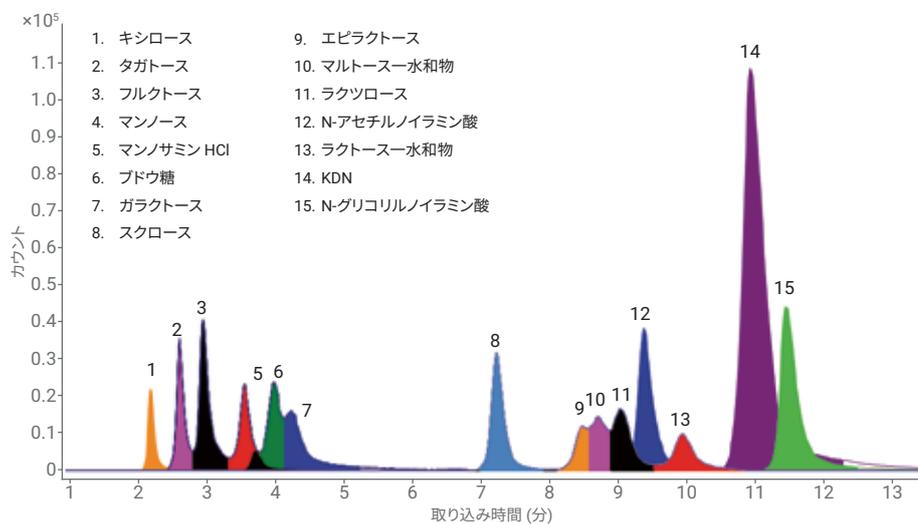


図 4. USP 標準液 15 種の複合サンプルの分離分析

結論

1260 Infinity II LCシステム、AdvanceBio MS スペントメディアカラム、Agilent 6230 Accurate-Mass TOF LC/MS システムを組み合わせると、複合な糖質混合物を迅速に分析することができます。このメソッドでは高感度の ESI-MS を用いるため、手間と時間を要する炭水化物の誘導体化は必要ありません。単純な炭水化物の LC/MS 分析や GC/MS 分析に糖類の誘導体化を用いているラボは、時間とコストを節約し、ラボの生産性を高めることができます。

参考文献

1. Leong, D. S.; *et al.* Evaluation and Use of Disaccharides as Energy Source in Protein-Free Mammalian Cell Cultures. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, article number 45216.
2. Leong, D. S. Z.; *et al.* Application of Maltose as Energy Source in Protein-Free CHO-K1 Culture to Improve the Production of Recombinant Monoclonal Antibody. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, article number 4037.
3. Lin, N.; *et al.* Chinese Hamster Ovary (CHO) Host Cell Engineering to Increase Sialylation of Recombinant Therapeutic Proteins by Modulating Sialyltransferase Expression. *Biotechnol. Prog.* **2015**, *31*(2), 334–346
4. Webster, G. K.; Jensen, J. S.; Diaz, A. R. An Investigation into Detector Limitations Using Evaporative Light-Scattering Detectors for Pharmaceutical Applications. *J. Chromatogr. Sci.* **2004**, *42*(9), 484–490.
5. Mitchell, C. R.; *et al.* Comparison of the Sensitivity of Evaporative Universal Detectors and LC/MS in the HILIC and the Reversed-Phase HPLC Modes. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*(32), 4133–4139.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに
変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2018

Printed in Japan, October 9, 2018

5994-0320JAJP

