

分离 15 种未衍生化的多糖和唾液酸 USP 标准品

使用 Agilent AdvanceBio MS Spent Media 色谱柱与
TOF MS 检测

作者

Richard Hurteau
安捷伦科技有限公司
Wilmington, DE, USA

摘要

多糖和唾液酸是生物处理器中所用培养基的常见组分，需要在治疗性蛋白质（如单克隆抗体）的生产过程中对其进行监测。本应用简报使用采用 HILIC 技术的 Agilent AdvanceBio MS Spent Media 色谱柱分离所用培养基中这些典型组分的 USP 标准品。使用 Agilent 6230 飞行时间 (TOF) LC/MS 分析上述化合物，无需昂贵且耗时的衍生化步骤。

前言

多糖和唾液酸在单克隆抗体 (mAb) 产品和其他治疗性蛋白质的生产中具有关键作用^{1,2,3}。传统 HPLC 碳水化合物分离包括 SEC 或阳离子配体交换糖分析柱。它们需要加热到较高温度并与示差折光 (RI) 检测器配合使用, 因为碳水化合物缺少进行紫外检测所需的发色团。在分离碳水化合物混合物时 RI 检测器具有局限性, 因为它们与梯度方法不兼容。蒸发光散射检测器 (ELSD) 也可用于碳水化合物分析, 但也存在某些限制⁴。电喷雾电离质谱 (ESI-MS) 比 RI 或 ELSD 检测灵敏度更高⁵。衍生化步骤也用于碳水化合物的 LC/MS 和 GC/MS 分析, 但耗时费力。

AdvanceBio MS Spent Media 色谱柱采用亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 技术分离复杂的单糖和二糖溶液, 结合高灵敏度的 ESI 检测器, 可直接、快速且准确地表征单糖和二糖, 无需耗时费力的衍生化步骤。AdvanceBio MS Spent Media 色谱柱与 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统配合使用, 以 6230 TOF LC/MS 作为检测器。通过对 15 种 USP 标准品 (由 USP 捐赠) 的分离来评估该系统的有效性。这些标准品包括单糖、二糖、两组五种异构体和三种唾液酸。

实验部分

材料与amp;方法

样品

USP 标准品	USP 目录号
半乳糖 (200 mg)	1287700
KDN (100 mg) (3-脱氧-D-甘油-D-半乳糖-2-尤罗索尼克酸)	1354852
一水合乳糖 (500 mg)	1356701
乳果糖 (1 g)	1356803
一水合麦芽糖 (500 mg)	1375025
甘露胺盐酸盐 (300 mg)	1375160
甘露糖 (500 mg)	1375182
N-乙酰神经氨酸 (200 mg)	1612619
N-羟乙酰神经氨酸 (200 mg)	1294284
蔗糖 (100 mg)	1623637
塔格糖 (200 mg)	1642904
木糖 (1 g)	1722005
果糖 (125 mg)	1286504
依匹乳糖 (200 mg)	1236801
右旋葡萄糖 (500 mg)	1181302

溶剂和消耗品

- LC/MS 级甲酸铵、乙腈和氢氧化铵购自 Fisher Scientific
- 安捷伦样品瓶, 螺口, 棕色, 经认证, 2 mL, 100/包。样品瓶规格: 12 × 32 mm (12 mm 瓶盖) (部件号 5188-6535)
- 安捷伦固定螺口盖, 带 PTFE/白色硅胶隔垫 (部件号 5190-7021)
- USP 标准品由 USP 捐赠

色谱柱

AdvanceBio MS Spent Media 100 Å,
2.1 × 100 mm (部件号 675775-901)

液相色谱系统

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性四元泵 (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 multisampler (G5668A)
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)

TOF MS

Agilent 6230 TOF LC/MS

仪器条件: 缓冲液流速设置为 0.4 mL/min, 柱温 35 °C, 冷却器设置为 4 °C

方法开发

将 USP 标准品溶于 50% 乙腈得到各种标准溶液。采用 ESI 负离子模式，使用以下缓冲液体系：10 mmol/L 甲酸铵，pH 10 和 10% 100 mmol/L 甲酸铵的 90% 乙腈溶液。为了将糖类端基异构体分离成一个峰，并使糖类带有一个电荷以便进行 TOF MS 检测，选择 pH 10。在 pH 10 条件下，色谱图中仅存在少量化合物。由于许多化合物的 pKa 约为 12，将甲酸铵 pH 值升至 11.0。在 pH 11.0 条件下，可观察到所有化合物（表 1 和表 2，图 1-4）。将 pH 值调至高于 11.0 可能会缩短色谱柱的使用寿命。

结果与讨论

在 62.5% 的乙腈中配制每种化合物的混合样品。使用方法 1 可在 13 分钟内分离所有 15 种化合物，该方法采用 18 分钟的平缓梯度（图 3，表 2）。等度方法无法将混合物分离。

MS 参数	
电离模式	ESI 负离子模式
气体温度	200 °C
气体流速	10 L/min
雾化器	40 psi
鞘气温度	300 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	3000 V
喷嘴电压	0 V
锥孔电压	65 V
Oct RF Vpp	750 V
采集参数	数据在 2 GHz 的扩展动态范围内采集。 MS 质量数范围：m/z 50-1000

表 1. USP 标准品和保留时间

	化合物	分子量	保留时间
1	木糖	150.13	2.197
2	塔格糖	180.16	2.606
3	果糖	180.16	2.99
4	甘露糖	180.16	3.618
5	甘露胺盐酸盐	215.63	3.724
6	右旋葡萄糖	180.16	3.947
7	半乳糖	180.16	4.242
8	蔗糖	342.3	7.316
9	依匹乳糖	342.3	8.467
10	一水合麦芽糖	342.3	12.02
11	乳糖	342.3	12.11
12	N-乙酰神经氨酸	309.27	12.584
13	一水合乳糖	343.3	13.84
14	KDN	268.2	13.91
15	N-羟乙酰神经氨酸	325.27	14.957

表 2. 方法 1 参数

方法 1		
时间 (min)	%A	%B
0	3	97
15	11	89
15.5	3	97
18	3	37

A = 10 mmol/L 甲酸铵，pH 11.0

B = 10% 100 mmol/L 甲酸铵，pH 11.0，溶于 90% 乙腈

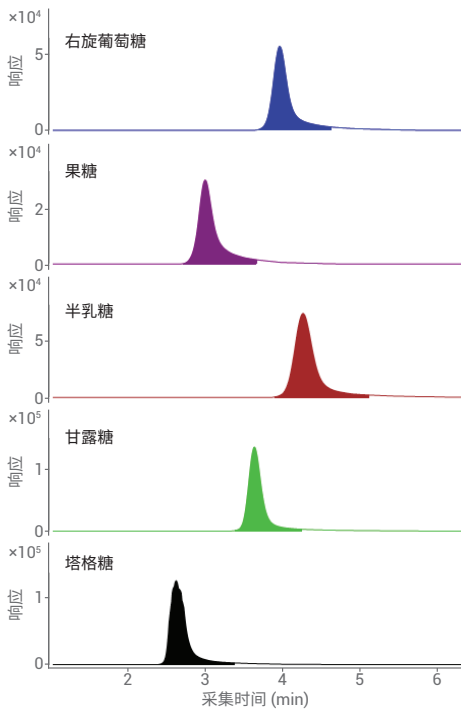


图 1. 单独进样的 6 碳单糖 USP 标准品

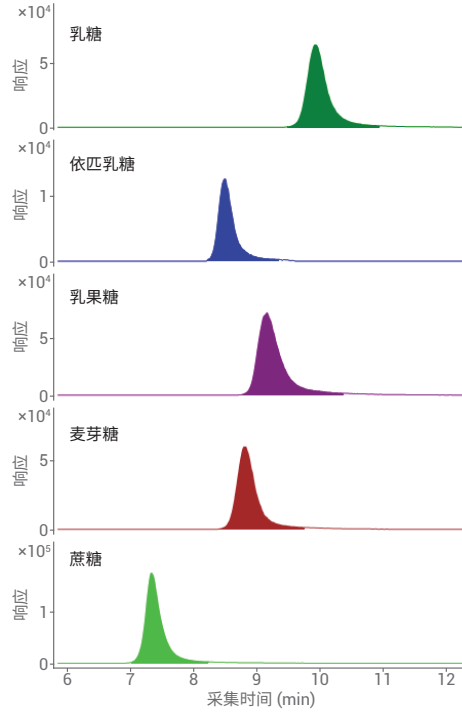


图 2. 单独进样的二糖同分异构体 USP 标准品

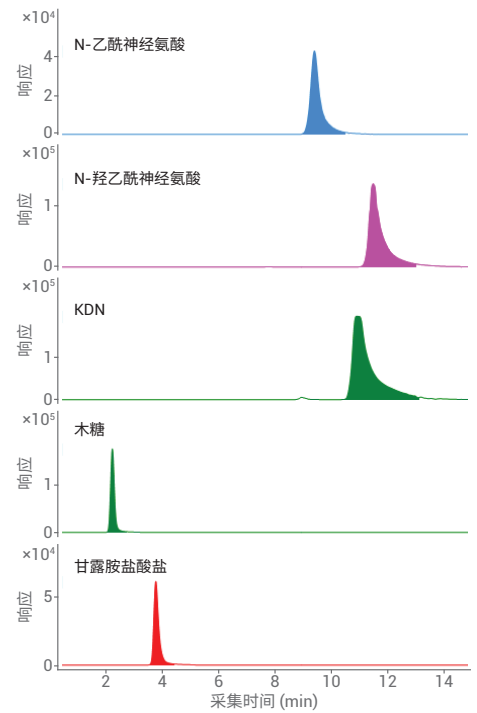


图 3. 单独进样的 USP 标准品

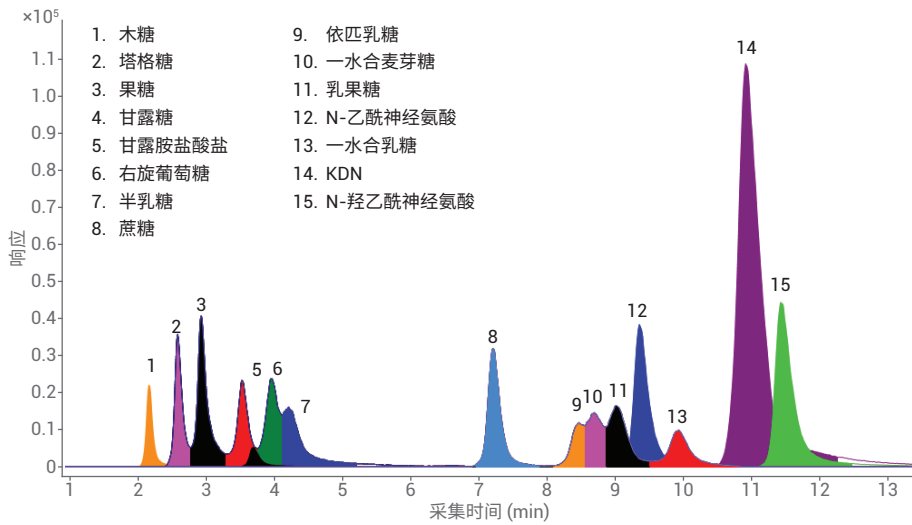


图 4. 分离所有 15 种 USP 标准品的混合样品

结论

1260 Infinity II 液相色谱系统、AdvanceBio MS Spent Media 色谱柱和 6230 TOF LC/MS 结合使用可快速分析复杂的碳水化合物混合物。该方法具有 ESI-MS 的灵敏度，无需耗时费力的碳水化合物衍生步骤，可为目前使用糖类衍生化进行简单碳水化合物 LC/MS 和 GC/MS 分析的所有实验室节省时间和成本，提高实验室效率。

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

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2018
2018年10月9日，中国出版
5994-0320ZHCN

