

Application News

No.L483

高速液体クロマトグラフィー
High Performance Liquid Chromatography

蛍光検出器 RF-20Axs を用いた 2-AB 化糖鎖の高感度分析

High-Sensitivity Analysis of 2-AB Glycans by RF-20Axs Fluorescence Detector

抗体医薬品中の糖鎖は医薬品の安全性・有効性に影響を与えるため、含まれる糖鎖の種類・量などを調べることが求められます。一方で、培養条件による糖鎖構造の多様性、不均一性は避けることができないため、これらの生産工程における管理が必要となります。

アプリケーションニュース No.L452 では、蛍光検出器を用いたピリジリアミノ化糖鎖 (PA 化糖鎖) の分析例をご紹介しました。今回は 2-アミノベンズアミド化糖鎖 (2-AB 化糖鎖) の分析例をご紹介します。No.L452 と同様、検出には世界最高水準の高感度が可能な蛍光検出器 “RF-20Axs” を用いました。

K. Tanaka *

※ Shimadzu Scientific Instruments, Inc.

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

System	: Prominence
Column	: TSKgel Amide-80 (150 mm L. × 2.0 mm I.D., 3 μm)
Mobile Phase	: A: 50 mmol/L Ammonium formate pH 4.4 B: Acetonitrile
Time Program	: B. Conc. 73 % (0 min) → 60 % (48 min) → 0 % (49 - 53 min) → 73 % (54 - 80 min)
Flow Rate	: 0.4 mL/min (0 - 48 min, 58.01 - 80 min) 0.2 mL/min (48.01 - 58 min)
Column Temp.	: 40 °C
Injection Vol.	: 2 μL
Detection	: Ex 330 nm, Em 420 nm
Flow Cell	: Conventional cell

※移動相 A の調製方法
ギ酸アンモニウム 3.15 g (50 mmol) を 1 L の精製水に溶解し、ギ酸約 340 μL を添加することにより pH を 4.4 に調整しました。

■ 低濃度標準溶液の分析

Analysis of Low Level Standard Solution

今回の検討では 2-AB (2-アミノベンズアミド) で蛍光標識化された糖鎖として、2-AB Man5、2-AB G2、2-AB G2FS1 (Prozyme) を用いました。それらの構造を Fig. 1 に示します。

Table 1 に分析条件を示します。糖鎖は親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) により分離を行いました。Fig. 2 に 0.5 nmol/L 標準溶液を 2 μL (1 fmol) 注入した結果を示します。得られたデータから 1 fmol という極微量注入においても十分な感度を有していることが確認可能です。Table 2 に定量限界 (S/N=3.3) と検出限界 (S/N=10) を示します。

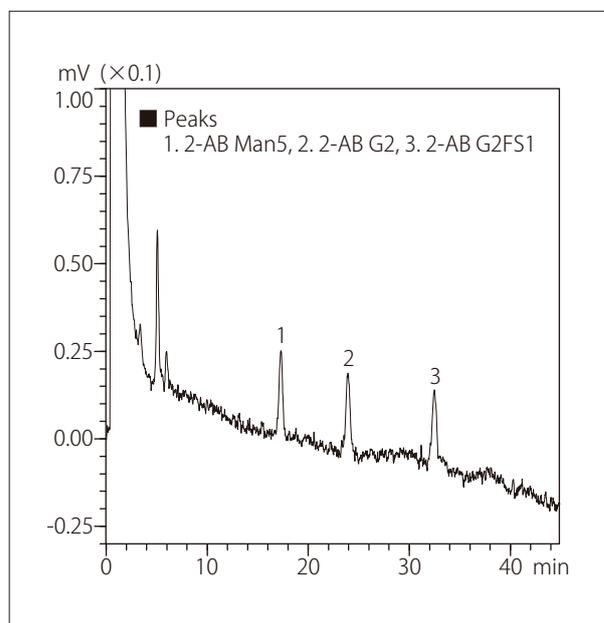


Fig. 2 2-AB 化糖鎖各 1 fmol のクロマトグラム (各 0.5 nmol/L, 2 μL 注入)
Chromatogram of 1 fmol Each of 2-AB-labeled Glycans (0.5 nmol/L each, 2 μL injection)

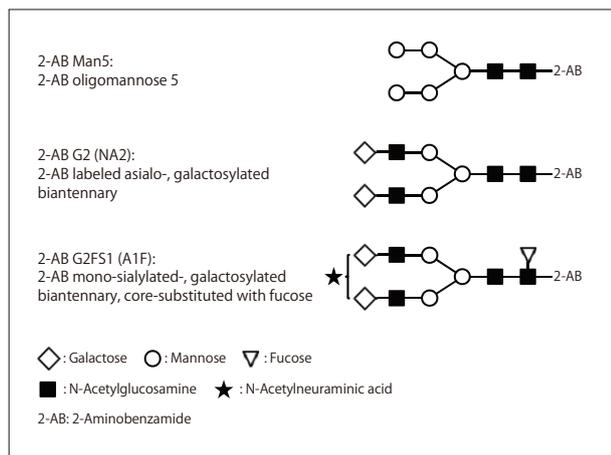


Fig. 1 検討に用いた 2-AB 化糖鎖の構造式
Structures of 2-AB Glycans Used in This Study

Table 2 検出限界と定量限界
Limit of Detection and Quantitation

Glycan standard	LOD (fmol)	LOQ (fmol)
2-AB Man5	0.44	1.33
2-AB G2	0.45	1.36
2-AB G2FS1	0.50	1.48

■再現性と直線性

Repeatability and Linearity

Fig. 3 に 20 nmol/L 標準溶液を 6 回繰り返し分析した結果を、Table 3 に保持時間再現性、ピーク面積再現性 (n=6) を示します。これらから良好な再現性が得られていることがわかります。Fig. 4 には 1 nmol/L から 100 nmol/L の標準溶液を用いて直線性を評価した結果を示します。寄与率 (R^2) 0.999 以上の良好な直線性が得られました。

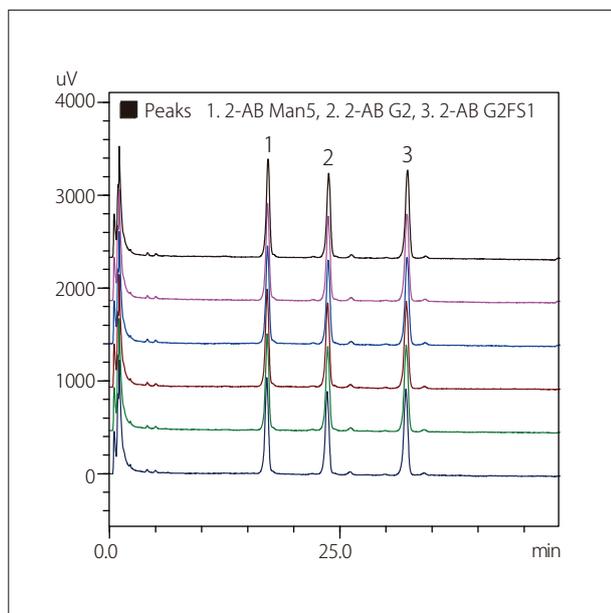


Fig. 3 2-AB化糖鎖各 40 fmol のクロマトグラム (各 20 nmol/L, 2 μ L 注入)
Chromatogram of 40 fmol Each of 2-AB-labeled Glycans
(20 nmol/L each, 2 μ L injection)

Table 3 再現性
Repeatability

Glycan standard	R.T. %RSD	Area %RSD
2-AB Man5	0.273	0.743
2-AB G2	0.245	0.684
2-AB G2FS1	0.196	0.589

■糖鎖混合試料の分析

Analysis of 2-AB Glycan Mixture

糖鎖混合試料として 2-AB Human IgG N-Linked Glycan Library (Prozyme) を分析しました。Fig. 5 に 80 nmol/L の 2-AB Human IgG N-Linked Glycan Library を 2 μ L (160 fmol) 注入した結果を示します。

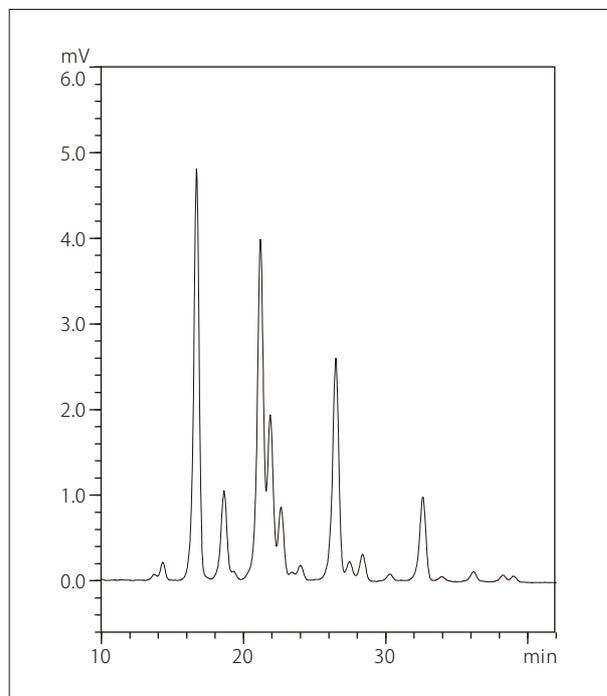


Fig. 5 2-AB Human IgG N-Linked Glycan Library 160 fmol のクロマトグラム
(80 nmol/L, 2 μ L 注入)
Chromatogram of 160 fmol of 2-AB Human IgG N-Linked Glycan
Library (80 nmol/L, 2 μ L injection)

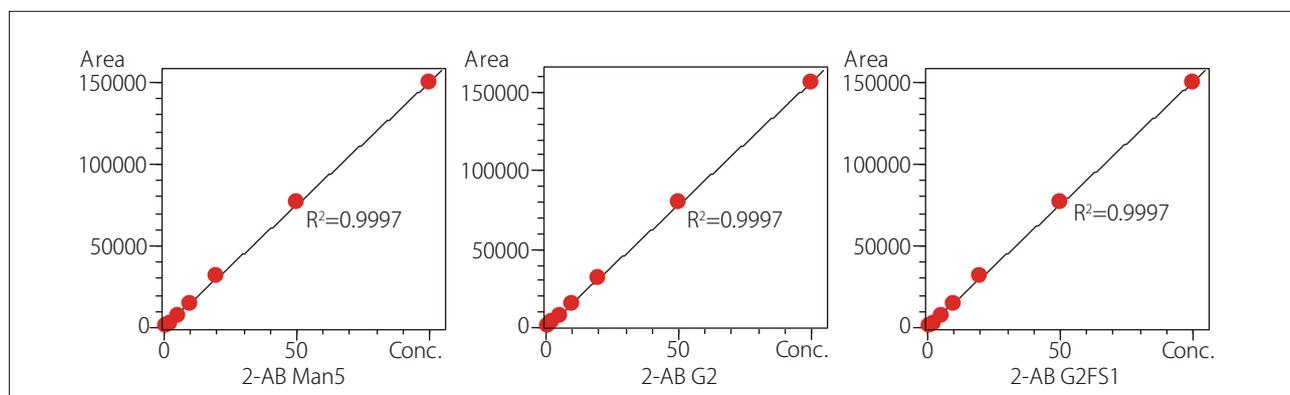


Fig. 4 2 ~ 200 fmol の直線性 (1 ~ 100 nmol/L, 2 μ L 注入)
Linearity from 2 to 200 fmol (1-100 nmol/L, 2 μ L injection)

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2014年11月

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075)813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。