[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

*Rapi*Fluor-MS標識*N*型糖鎖HILIC分離のUPLC⇔HPLC間での分析法移管

Stephan M Koza, Matthew A Lauber, and Kenneth J Fountain
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- *Rapi*Fluor-MS™ 標識糖鎖分離のUPLC ⇔ HPLC間でのシームレスな分析法移管
- ACQUITY UPLC® Glycan BEH Amide、130 Å、1.7 µm および XBridge® Glycan BEH Amide ***XP***、130 Å、2.5 µm カラムは UPLC® および HPLC 糖鎖分析に高い分離能を提供

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC BEH Glycan BEH Amide、130 Å、1.7 µm カラム

XBridge Glycan BEH Amide ***XP***、130 Å、2.5 µm カラム

Alliance® HPLC システム
ACQUITY UPLC H-Class Bio システム

Empower® 3 および MassLynx® (v4.1) ソフトウェア

Waters® *Rapi*Fluor-MS Glycan Performance Test Standard

キーワード

HILIC クロマトグラフィー、UPLC、HPLC、分析法移管、*N* 型糖鎖、*Rapi*Fluor-MS

はじめに

2009 年にウォーターズは、糖鎖の高分離を実現するためにデザインされた革新的な UPLC HILIC カラムを発表しました。このカラムテクノロジーは最適化したアミド基を結合した粒子径 1.7 µm、ポアサイズ 130 Å のエチレン架橋型ハイブリッド(BEH) パーティクルを採用し、低分子中性構造から高度にシアル酸が付加された構造までの幅広い *N* 型糖鎖について卓越した分離を実現します [1]。この UPLC カラムに追加して、HPLC ベースの粒子径 2.5 µm の XBridge Glycan BEH Amide カラムも発売し、2-AB 標識 *N* 型糖鎖分析において UPLC 分離と同等の選択性が得られることを実証しました [2]。2015 年、ウォーターズは、迅速かつ効率的なサンプル前処理ワークフローと卓越した蛍光および MS 感度を提供する革新的な標識試薬 *Rapi*Fluor-MS を発表しました [3]。

本研究では、粒子径 1.7 µm および 2.5 µm の Glycan BEH Amide カラムにより、UPLC および HPLC に対応する条件下での *Rapi*Fluor-MS 標識糖鎖分離の移管性について実証します。粒子径(dp)、カラム長さ、カラム内径からなる標準の LC 分析法移管の原理を用いて、少し大きい粒子径のカラムにより、HPLC に対応する圧力で、サンプルロード量、移動相使用量、(最も重要な点として) 分析時間は増加しますが、同等のクロマトグラフィープロファイルと相対的な定量を実現できることを紹介します。

実験方法

分析条件

LC 条件

LC システム： Waters Alliance HPLC もしくは ACQUITY UPLC H-Class Bio システム

検出： Alliance HPLC 2475 蛍光（FLR）検出器
ACQUITY UPLC FLR 検出器（ACQUITY flow cell）
波長：励起 265 nm、蛍光 420 nm

カラム： ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide、130 Å、1.7 µm、2.1×150 mm（製品番号 186004742）

XBridge Glycan BEH Amide ***XP***、130 Å、2.5 µm、3.0 × 150 mm（製品番号 186008039）と XBridge Glycan BEH Amide ***XP***、130 Å、2.5 µm、3.0 × 75 mm（製品番号 186008038）を連結。カラムは 0.005×1.75 UPLC SEC コネクションチューブ（製品番号 186006613）を用いて連結。

カラム温度： 60℃

サンプル温度：10℃

注入量： UPLC：1.2 µL、HPLC：3.7 µL

流速： 0.5 mL/min
（グラジエントの高水比率洗浄工程は 0.25 mL/min）

移動相 A： 50 mM ギ酸アンモニウム緩衝液、pH4.4
（LC/MS グレードの水を用いて 100 倍濃縮液（製品番号：186007081）より調製）

移動相 B： LC/MS グレードアセトニトリル

グラジエント：

時間 UPLC/HPLC (minutes)	流速 UPLC/HPLC (mL/minute)	% A (50 mM amm. formate, pH 4.4)	%B (Acetonitrile)
0.0/0.0	0.40/0.56	25	75
35.0/77.2	0.40/0.56	46	54
36.5/80.5	0.20/0.28	100	0
39.5/87.1	0.20/0.28	100	0
43.1/95.1	0.20/0.28	25	75
47.6/105.0	0.40/0.56	25	75
55.0/121.3	0.40/0.56	25	75

表 1

サンプルバイアル： ポリプロピレン 12 × 32 mm
スクリューネックバイアル 300 µL
（製品番号：186002640）

データ管理： MassLynx（v4.1）UPLC、Empower Pro（v3）HPLC

サンプル詳細

Waters *Rapi*Fluor-MS Glycan Performance Test Standard（製品番号：186007983、400 pmole/vial）を水に溶解して濃度 20 pmole/µL に調製。

結果および考察

UPLC⇔HPLC カラム間での糖鎖 HILIC 分析法の移管計算

HILIC ベースの *N* 型糖鎖分離分析法をある LC システムとカラムから別の LC システムとカラムに移管するには、主要な考慮点が 2 つあります。最も重要なのは、2 つのカラムのケミストリーおよびポアサイズが同等である点です。適切なカラムの種類を選択したら、粒子径サイズに従って分離を適切に移管する必要があります。一般的に、適切な移管は、カラム長さと粒子径の比率（L/dp）を一定に保つことで実現できます。カラムサイズと粒子径を決定すると、グラジエントへの変更が計算できます。本研究では、粒子径 1.7 µm、2.1 × 150 mm の Glycan BEH Amide カラムから粒子径 2.5 µm の XBridge Glycan BEH Amide への移管で、粒子径の比率が 1.47（2.5/1.7）であるため、約 50% 長いカラム長（225 mm）が必要です。実際には、225 mm のカラム長は 150 mm カラムと 75 mm カラムを適切なコネクターを用いて接続することで容易に構成できます。カラム長に加えて、適切なカラム内径を選択することも重要です。HPLC システムでは UPLC システムに比べて拡散が大きい（バンド拡散、HPLC：30 µL、UPLC：10 µL）ため、カラム外バンド拡散の影響を最小限にするために比較的大きい内径のカラムを用いる必要があります。例えば 3 mm 内径の HPLC カラムにより、一般的な 4.6 mm 内径カラムを用いた場合よりも移動相消費量を低減しながら、HPLC システムでほぼ最適な分離を達成できます。

そこで 3.0 × 225 mm の効果的なカラムサイズを選択し、一般的な分析法移管の原理を用いて HPLC 分離のために適切なグラジエントを計算しました（グラジエントは表 1 を参照）[4]。表 2 は様々な移管分析法と用いる Glycan BEH Amide カラムについて、対応するカラム長さ、分析時間と、移動相およびサンプル消費量について概略を示しています。この表は UPLC 分離の提供する 2 つの顕著な利点を強調しています。短い分析時間（55% 以上低減）と移動相消費量の低減（68% 以上低減）です。UPLC 分離では、必要なサンプルロード量も少なくなるため（68% 以上低減）、サンプル量が限られている場合に有用です。この比較において、移動相消費量は上記した表 1 を元に決定しました。この計算結果を元に、粒子径 2.5 µm で内径 3.0 mm の XBridge カラムを低バンド拡散（29 µL）HPLC で用いた場合に対する UPLC の利点は明らかです。

粒子径 (µm)	カラム長さ (mm)	カラム内径 (mm)	流速 (mL/min.)	分析時間 (min.)	移動相 (mL)	サンプル (µL)
1.7	150	2.1	0.4	55	20	1.2
2.5	225	3.0	0.56	121.3	62	3.7
2.5	225	4.6	1.32	121.3	146	8.8
3.5	300	4.6	0.93	229.2	194	11.6

表 2

UPLC および HPLC の *Rapi*Fluor-MS 標識 *N* 型糖鎖プロファイルの比較

ACQUITY UPLC H-Class システムを用いた粒子径 1.7 µm、2.1 × 150 mm の Glycan BEH Amide カラムから、Alliance HPLC システムで粒子径 2.5 µm、内径 3.0 mm でトータルカラム長 225 mm（150 mm + 75 mm）の XBridge カラムへのスケーリングに関する有効性を定性的に実証しました（図 1）。*Rapi*Fluor-MS Glycan Performance Test Standard（プールしたヒト IgG から切り出した *N* 型糖鎖）について標準化した時間範囲でどちらのクロマトグラムも同等のプロファイルを示しました。この例では、HPLC での分析時間は約 2.2 倍です。

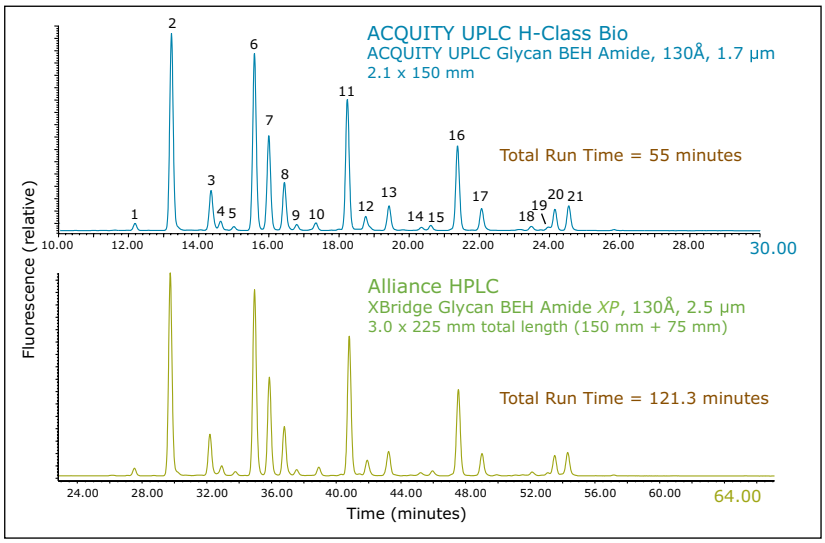

図 1. Waters Glycan Performance Test Standard（製品番号：186007983、400 pmole/vial）を水に溶解して濃度 20 pmole/µL に調製した RapiFluor-MS 標識 N 型糖鎖の UPLC および HPLC HILIC 分離の比較。UPLC および HPLC 分析の注入量はそれぞれ、1.2 µL と 3.7 µL。

これらの分離を定量的にも比較しました。図 2 には、最も豊富に含まれる *N* 型糖鎖 21 種類について相対保持時間の比較を示しました。相対保持時間はピーク 1（図 1）から計算し、HPLC 分離で増加するシステムデュエルボリュームおよびカラムボイドボリュームを補正しました（1.2 分）。図 3 には、保持時間を評価したのと同じ 21 のピークについて 2 つの分離の相対定量値に関する比較を示しています。HPLC 分析での相対存在量が 0.2% であったピーク 19 で最も顕著な違い（35%）で、殆どは違いが 5% 以内と良好な結果を示しました。微量の分析種に対してより正確な定量が必要な場合には、標準物質と比較した結果を報告するのが有効です。全体として、これらデータは *Rapi*Fluor-MS 標識糖鎖の HILIC による分離が UPLC および HPLC 間で容易に移管できることを実証しています。得られたクロマトグラフィープロファイルの同等性は、パーティクル表面の化学的同等性とポア特性の同等性を明確に示しています。

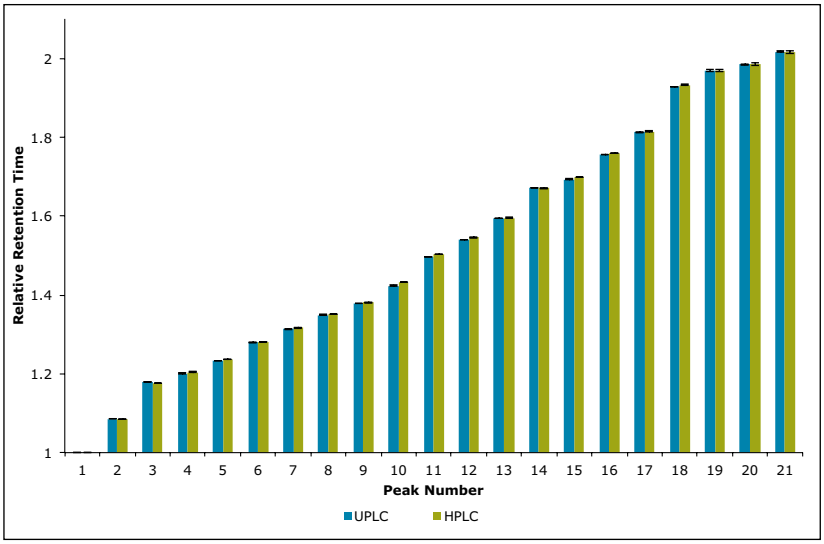

図 2. RapiFluor-MS 標識 N 型糖鎖の UPLC および HPLC HILIC 相対保持時間（n =2）の比較。ピーク番号は図 1 の記載と同じ。相対保持時間はピーク 1 を基準に決定。

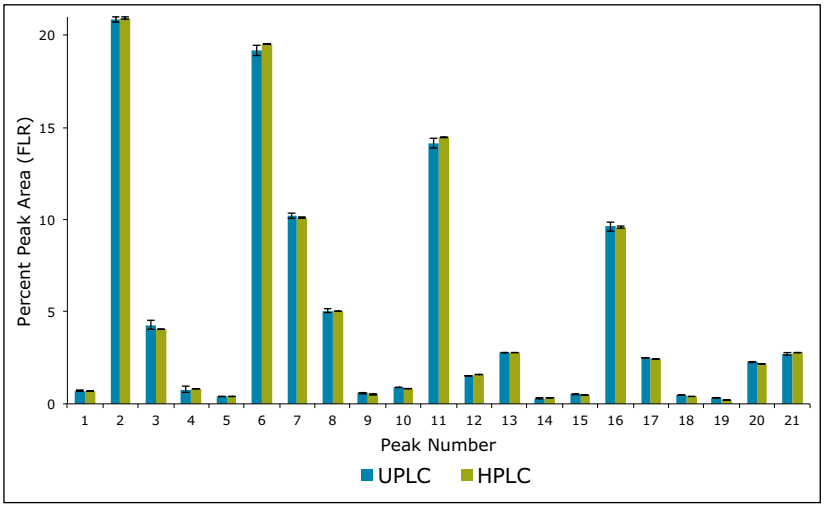

図 3. RapiFluor-MS 標識 N 型糖鎖の UPLC および HPLC HILIC 相対ピーク面積（n =2）の比較。ピーク番号は図 1 の記載と同じ。

結論

これらの結果は、*Rapi*Fluor-MS 標識 *N* 型糖鎖の HILIC 分離が、適切な Glycan BEH Amide カラムを用いて UPLC と HPLC 間でシームレスに移管できることを実証しています。UPLC ベースの分離を用いる利点は、移動相消費量を低減しながらサンプルスループットを飛躍的に向上できる点です。必要なサンプルロード量も低減します。しかしながら、もしラボの装置に制限がある場合には、UPLC と HPLC 分離間で容易に移管できることは非常に有益です。さらに、UPLC から HPLC プラットホームに移管できることは、構造解析や分析法バリデーションのスパイク試験実施のために糖鎖を分画して精製しなければいけない場合にも有用です。

参考文献

1. Beth Gillece-Castro, Kim van Tran, Jonathan E. Turner, Thomas E. Wheat, Diane M. Diehl, N-Linked Glycans of Glycoproteins: A New Column for Improved Resolution. Waters Application Note 720003112en. 2009.
2. Matthew A. Lauber, Stephan M. Koza, Jonathan E. Turner, Pamela C. Iraneta, and Kenneth J Fountain, Amide-Bonded BEH HILIC Columns for High Resolution, HPLC-Compatible Separations of N-Glycans. Waters Application Note 720004857en. 2013.
3. Matthew A. Lauber, Darryl W. Brousmiche, Zhengmao Hua, Stephan M. Koza, Ellen Guthrie, Paula Magnelli, Christopher H. Taron, Kenneth J. Fountain, Rapid Preparation of Released N-Glycans for HILIC Analysis Using a Novel Fluorescence and MS-Active Labeling Reagent, Application Note 720005275en. 2015.
4. Neue, U. D.; McCabe, D.; Ramesh, V.; Pappa, H.; DeMuthc, J. In Transfer of HPLC procedures to suitable columns of reduced dimensions and particle sizes, *Pharmacopeial Forum*, 2009; pp 1622–1626.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌 富山

Waters、UPLC、ACQUITY UPLC、XBridge、Alliance、MassLynx、Empower および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。*Rapi*Fluor-MS は Waters Corporation の商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2015 Waters Corporation. Produced in Japan. 2015年4月 720005344JA PDF