

逆相クロマトグラフィーを用いたPA化オリゴ糖の迅速分離 —TSKgel Super-ODS/蛍光検出による分離—

糖タンパク質は、細胞表面でのレセプターや表面抗原などの生理的機能を持ち、その糖鎖構造が機能に大きく関与しています。この糖鎖構造の配列決定（推測）の手段の一つとして、糖タンパク質から切り出された糖鎖を誘導體化（ピリジルアミノ化：PA化）してHPLCを用いて、逆相クロマトグラフィー（ODSカラムなど）と順相クロマトグラフィー（TSKgel Amide-80など）で二次元的に分析する手法があります。最近では、さらにイオン交換クロマトグラフィー（TSKgel DEAE-5PWなど）を加え三次元分析を行う手法も報告されるようになってきました。しかし現状では、HPLCでの分析時間が非常に長く（約80分）、迅速分析という点で課題が残されています。ここでは、2ミクロンのODS充填剤、TSKgel Super-ODSを用いたPA化糖の分析について報告します。

図にTSKgel Super-ODSと、TSKgel ODS-80Tsを用いた逆相クロマトグラフィーによるPA化糖の分離の比較を示します。従来用いられている5ミクロンODS-25cmカラムのTSKgel ODS-80Tsでは、12種類のPA化糖の分離に約80分を要していますが、TSKgel Super-ODS（10cmカラム）では、若干選択性は違うものの、ほぼ同様な分離が約15分で得られています。また検出には蛍光検出を用いていますが、試料のカラムへの保持が十分あれば、TSKgel Super-ODSを用いて、2～3倍の感度向上と分析時間の大幅な短縮が期待できます。このように、TSKgel Super-ODSは、UV検出のみならず、蛍光検出でも十分応用できることがわかります。尚、PA化糖の分析条件では、有機溶媒をほとんど含まない溶離液を使用するので、ODSの固化現象が起こりやすい（試料の溶出が早くなる）、数回分離した後、アセトニトリルなどの有機溶媒でカラムを洗浄するのが再現性を良くするポイントとなります。

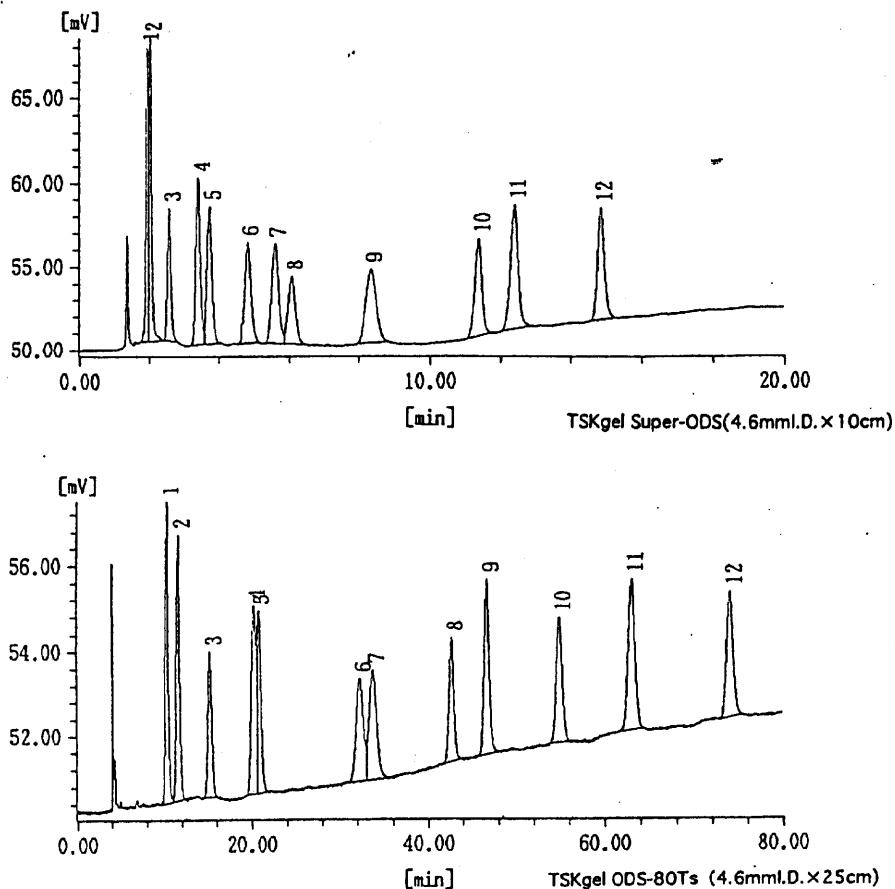


図 ピリジルアミノ化糖の分離

カラム；TSKgel Super-ODS (4.6 mmI.D. x 10 cm), TSKgel ODS-80Ts (4.6 mmI.D. x 25 cm)
 溶離液；A: 100 mM 酢酸-トリエチルアミン (pH 4.0) B: A + 0.5 % ブタノール
 A/B(95/5)→A/B(45/55) リニアグラジエント (25 min: Super-ODS, 100 min: ODS-80Ts)
 流速；1.0 ml/min 温度；40℃ 検出；FS (ex: 320 nm, em: 400 nm)
 試料；ピリジルアミノ化糖 (宝酒造製, 各4 pmol/10 μl)
 PA-Sugar Chain 1. 019, 2. 020, 3. 018, 4. 017, 5. 016, 6. 014,
 7. 012, 8. 004, 9. 013, 10. 005, 11. 015, 12. 010