

PROCÉDURE DE CARTOGRAPHIE DES GLYCANES

COLONNES AGILENT ADVANCEBIO GLYCAN MAPPING de 1,8 μm



Dans ce document, les chimistes chargés des applications d'Agilent font part de leurs recommandations pour obtenir un système de LC optimal et le configurer pour la caractérisation de biomolécules. Ils vous proposent également une méthode générique pour débiter vos analyses, ainsi que la manière de l'optimiser, si nécessaire, pour répondre à vos besoins particuliers de séparation.

Pour plus d'informations sur les applications, rendez-vous sur www.agilent.com/chem/advancebio

Système UHPLC Agilent 1290 Infinity

Les produits AdvanceBio Glycan Mapping incluent la préparation des échantillons, des étalons marqués et non marqués et des colonnes de 1,8 μm et 2,7 μm .

Colonne AdvanceBio Glycan Mapping, 1,8 μm , stable jusqu'à 1200 bars

Description	Référence
2,1 x 100 mm	858700-913
2,1 x 150 mm *	859700-913
Précolonnes Fast Guard, 2,1 mm, 1,8 μm	651750-913

* Taille de colonne initiale recommandée

La pente est de 1,25 %/mL pour les deux gradients. Il peut être nécessaire d'ajuster les points de départ et de fin pour des échantillons contenant différents types de glycanes afin d'atteindre une résolution maximale. Par exemple, pour les meilleurs résultats avec des glycanes de taille importante, il peut être nécessaire d'utiliser un gradient de 75 à 55 % d'acétonitrile.

Phases mobiles

Éluant A : formiate d'ammonium 100 mM, pH 4,5
Éluant B : acétonitrile (qualité spectrométrie de masse)

Détection (G1321B)

Détecteur à fluorescence Agilent 1260 Infinity, excit. 260 nm, émiss. 430 nm, cellule 8 μL

Compartiment colonne (G1316C)

À 40 °C, la durée de vie des colonnes est plus longue ; à 60 °C, les pics sont plus précis mais la durée de vie est considérablement réduite. La température peut altérer la sélectivité et la résolution.

Injection d'échantillons (G4226A)

Injection de 1 à 2 μL pour une résolution maximale. Il faut d'abord dissoudre les échantillons dans de l'eau puis arriver à un rapport 70:30 d'acétonitrile/eau. Utiliser un refroidisseur.

Pompe (G4220A)

0,5 mL/min pour des séparations haute résolution ; jusqu'à 1,0 mL/min pour des séparations rapides. Le nettoyage en phase aqueuse doit TOUJOURS être fait à un débit réduit.

Gradient recommandé pour une résolution optimale

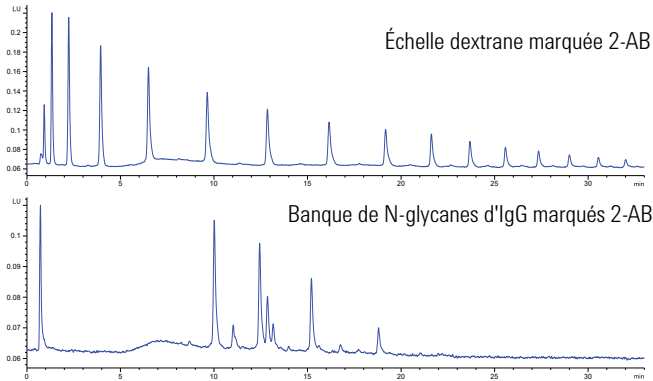
Temps	Éluant A	Éluant B	Débit
0	20 %	80 %	0,5 mL/min
32	40 %	60 %	0,5 mL/min
33	80 %	20 %	0,5 mL/min
35	80 %	20 %	0,5 mL/min
36	20 %	80 %	0,5 mL/min
45	20 %	80 %	0,5 mL/min

Gradient recommandé pour séparations rapides

Temps	Éluant A	Éluant B	Débit
0	25 %	75 %	1,0 mL/min
12	40 %	60 %	1,0 mL/min
12,5	80 %	20 %	0,5 mL/min
13,5	80 %	20 %	0,5 mL/min
14	25 %	75 %	0,5 mL/min
15	25 %	75 %	1,0 mL/min
20	25 %	75 %	1,0 mL/min

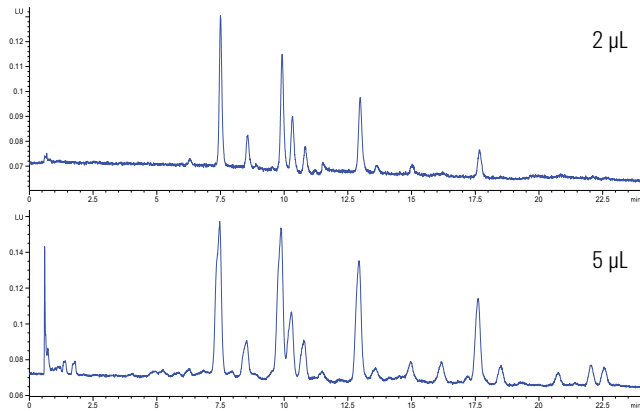


Agilent Technologies



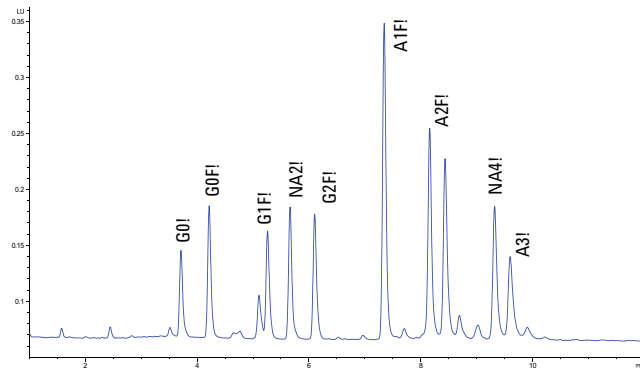
Séparation haute résolution d'une échelle dextrane marquée 2-AB (réf. 5190-6998) et d'une banque de N-glycans d'IgG humains marqués 2-AB (réf. 5190-6996).

Temps	Éluant A	Éluant B	Débit
0	20 %	80 %	0,5 mL/min
32	40 %	60 %	0,5 mL/min
33	80 %	20 %	0,5 mL/min
35	80 %	20 %	0,5 mL/min
36	20 %	80 %	0,5 mL/min
45	20 %	80 %	0,5 mL/min



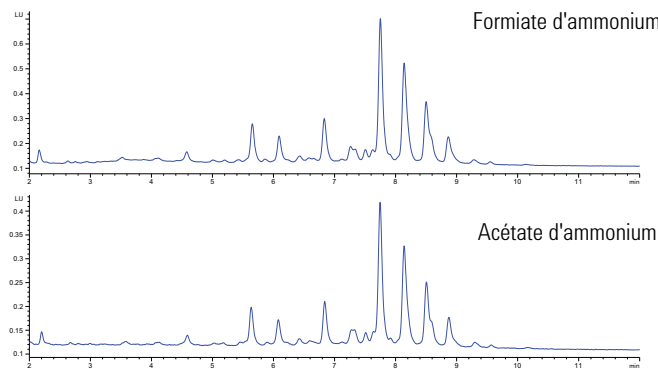
Injection excessive de banque de N-glycans d'IgG humains marqués 2-AB (2 µL vs. 5 µL).

Les échantillons doivent être préparés par dissolution dans de l'eau puis ajout d'acétonitrile afin d'obtenir un rapport final de 30:70 d'eau/acétonitrile. Il faut toujours utiliser des volumes d'injection faibles, même avec la dimension de la colonne réduite (2,1 x 150 mm). La figure à gauche compare les résultats obtenus avec des volumes d'injection de 2 µL et de 5 µL. Dans le deuxième cas, les pics sont plus larges et la résolution baisse.



Séparation rapide de N-glycans marqués 2-AB (essai d'attribution des pics).

Temps	Éluant A	Éluant B	Débit
0	25 %	75 %	1,0 mL/min
12	40 %	60 %	1,0 mL/min
12,5	80 %	20 %	0,5 mL/min
13,5	80 %	20 %	0,5 mL/min
14	25 %	75 %	0,5 mL/min
15	25 %	75 %	1,0 mL/min
20	25 %	75 %	1,0 mL/min



Les glycanes, tels que ceux trouvés dans les fétuines bovines, peuvent être élués avec une phase mobile de formiate d'ammonium ou d'acétate d'ammonium.

Agilent décline toute responsabilité en cas d'erreurs dans le présent document, ainsi qu'en cas de dommages fortuits ou consécutifs à la fourniture, aux performances ou à l'utilisation de ce matériel.

Les informations, descriptions et spécifications de cette publication peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Imprimé aux États-Unis, le 15 août 2015
Numéro de publication 5991-6183FR