

オリゴヌクレオチドの イオンペア逆相 LC/DAD 分析

カラム、システムの不活性化を検証

著者

澤田 有司

栗原 絵里奈

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

オリゴヌクレオチドは、リン酸を含む分析種であるため HPLC カラムとシステムの金属と相互作用します。このためオリゴヌクレオチド分析では、金属吸着による回収率の低下、ピーク形状悪化が occurs。この金属吸着を抑制する方法として、HPLC カラムとシステムの不活性化が有効です。このアプリケーションノートは、金属を含まないメタルフリー仕様の HPLC カラム、生体分子に対して不活性な金属を使うバイオコンパチブル (BIO) 仕様の HPLC 配管、移動相に添加する不活性化剤を検証しました。この結果、メタルフリー仕様のカラム (Poroshell CS-C18 PEEK-lined)、BIO 仕様の HPLC 配管 (MP35N 製)、不活性化剤 (ピークシャープナー) の添加は、オリゴヌクレオチド分析で見られる金属吸着の抑制と良好なピーク形状に有効であることがわかりました。

はじめに

オリゴヌクレオチド分析のイオンペア逆相分析では、高温、高圧、高 pH の条件で利用可能な HPLC カラムが必要です。また、リン酸を含む分析種であるオリゴヌクレオチドは、HPLC カラムと HPLC システムで利用されている金属 SUS と相互作用します。

アジレントでは、オリゴヌクレオチド分析専用カラム AdvanceBio Oligonucleotide と LC/MS 分析に適した Poroshell CS-C18 が高温、高圧、高 pH の条件で利用できます (図 1)。特に、Poroshell CS-C18 は、粒子表面が正に荷電しているため、シリカ系カラムでみられる残存シラノールの影響を抑制することができます。この結果、LC/MS に適した低いイオン強度の移動相で幅広い分析種が保持分離できます。さらに、Poroshell CS-C18 は、接液面をメタルフリー化した PEEK-lined カラムも利用できます。

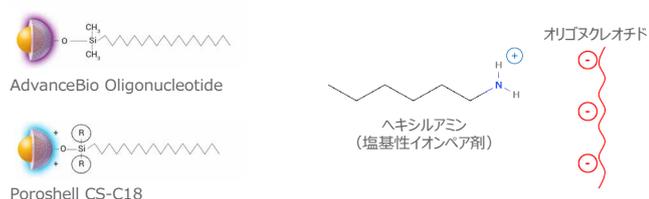


図 1. オリゴヌクレオチド分析に利用したカラムと移動相

本アプリケーションノートでは、メタルフリー仕様のカラム (PEEK-lined カラム)、生体分子に不活性な金属を利用する BIO 仕様 (MP35N 製) の HPLC 配管、移動相に添加する不活性化剤 (製品名: ピークシャープナー、化合物名: メドロロン酸) を使用したオリゴヌクレオチドのイオンペア逆相 LC/DAD を検証しました (表 1)。

表 1. 試験内容

試験番号	カラム配管	カラム種類	不活性化剤
1	SUS	AdvanceBio Oligonucleotide	不使用
2	SUS	Poroshell CS-C18	不使用
3	メタルフリー	Poroshell CS-C18	不使用
4	SUS	AdvanceBio Oligonucleotide	添加
5	SUS	Poroshell CS-C18	添加
6	メタルフリー	Poroshell CS-C18	添加

不活性化剤: ピークシャープナー

システム

表 2. 装置構成

型番	装置名
G7117B	Agilent 1290 Infinity II Diode Array Detector (DAD)
G7167A	1290 Infinity II マルチサンブラ
G7120A	1290 Infinity II ハイスピードポンプ

実験方法

材料

標準品はアジレントの DNA 標準品を使用しました (表 3)。移動相はアジレントの InfinityLab Ultra-Pure LC/MS 用溶媒を使用しました (表 3)。イオンペア剤ヘキシルアミンは関東化学から購入しました (表 3)。サンプル測定には、アジレントのバイアル、バイアルキャップ、インサートを使用しました (表 3)。

表 3. 試薬と消耗品

メーカー	型番	品名
アジレント	P/N 5190-9029	DNA ladder standard, oligos at 15, 20, 25, 30, 35, and 40 mer, 1 mL
アジレント	P/N 5191-4498	超純水
アジレント	P/N 5191-4496	アセトニトリル
アジレント	P/N 5182-0717	一体型セプタム付きポリプロピレン スクリューキャップ
アジレント	P/N 5188-6535	スクリューバイアル, 2 mL, 茶色
アジレント	P/N 5181-8872	不活性化ガラスインサート
関東化学	18051-30	ヘキシルアミン

分析条件

表 4 の条件で LC/DAD 分析しました。各試験番号の条件 (表 1) で、測定を 3 回行い、クロマトグラムと各ピークの symmetry factor からオリゴヌクレオチドの金属吸着による回収率の低下とピーク形状の悪化を確認しました。

表 4. 分析条件

パラメータ	分析
HPLC カラム	AdvanceBio Oligonucleotide 2.1x50 mm, 2.7 μm (P/N 659750-702) Agilent InfinityLab Poroshell CS-C18, 2.1x50 mm, 2.7 μm (P/N 699775-942) メタルフリー仕様: Agilent InfinityLab Poroshell CS-C18, 2.1x50 mm, 2.7 μm, PEEK-lined (P/N 679775-942)
HPLC 配管: インジェクターからカラム	BIO 仕様: Quick Turn Capillary MP35N 0.12 x 500 mm (P/N 5500-1598) 接続両端は、ゼロデッドボリューム接続可能な Quick Turn fitting (P/N 5067-5966) で接続
移動相	移動相 A: 100 mM ヘキシルアミン水溶液 + 6% 酢酸 移動相 A (不活性化剤使用): 100 mM ヘキシルアミン水溶液 + 6% 酢酸 + 0.1% ピークシャープナー (P/N 5191-3940, 25 mL; 5191-4506, 50 mL) 移動相 B: アセトニトリル溶液
流速	0.6 mL/分
グラジエント	%B: 0 分, 2.9%; 10 分, 47%; 11 分, 90%; 13 分, 90%; 14 分, 29%; 20 分, 29%.
注入量	2 μL
カラム温度	50 °C
DAD 検出	260/4 nm (リファレンス 355/20 nm) ピーク幅 > 0.025 min (10 Hz)

結果および考察

DNA 標準品を表 1 の 6 種類の試験内容で各 3 回測定しました。この 6 種類の条件では BIO 仕様 (MP35N 製) の HPLC 配管を使用しました。

まず、移動相 A に不活性化剤 (ピークシャープナー) を使用していない試験番号 (1) - (3) のクロマトグラムを比較しました (図 2)。この結果、最も良好なピークと回収率を示したのはメタルフリーカラムの Poroshell CS-C18 PEEK-lined でした (図 2、試験番号 (3)、測定 1-3)。接液面を非金属の PEEK 素材にした Poroshell CS-C18 PEEK-lined は、金属吸着するオリゴヌクレオチドの分析にきわめて有効でした。一方、SUS 製の AdvanceBio Oligonucleotide と Poroshell CS-C18 では顕著な金属吸着を示しました (図 2、試験番号 (1) - (2))。

次に、移動相に不活性化剤を添加した試験番号 (4) - (6) のクロマトグラムを比較しました。SUS 製の AdvanceBio Oligonucleotide と Poroshell CS-C18 では顕著な金属吸着の抑制効果が確認できました (図 3、試験番号 (4) - (5))。メタルフリーカラムの Poroshell CS-C18 PEEK-lined は、変化がありませんでした。

試験番号 (1) - (6) の測定 1-3 でピーク形状を定量的に比較するために symmetry factor を計算しました (図 4)。この結果、SUS 製カラムの試験番号 (1) - (2) では顕著なテーリング傾向 (symmetry factor > 1.4-4.7) を示しますが、ピークシャープナー添加した試験番号 (4) - (5) では、実用レベルに改善しました (symmetry factor > 0.9-1.6)。メタルフリーカラムの Poroshell CS-C18 PEEK-lined は、良好な結果が得られました (symmetry factor > 1.1-1.3)。

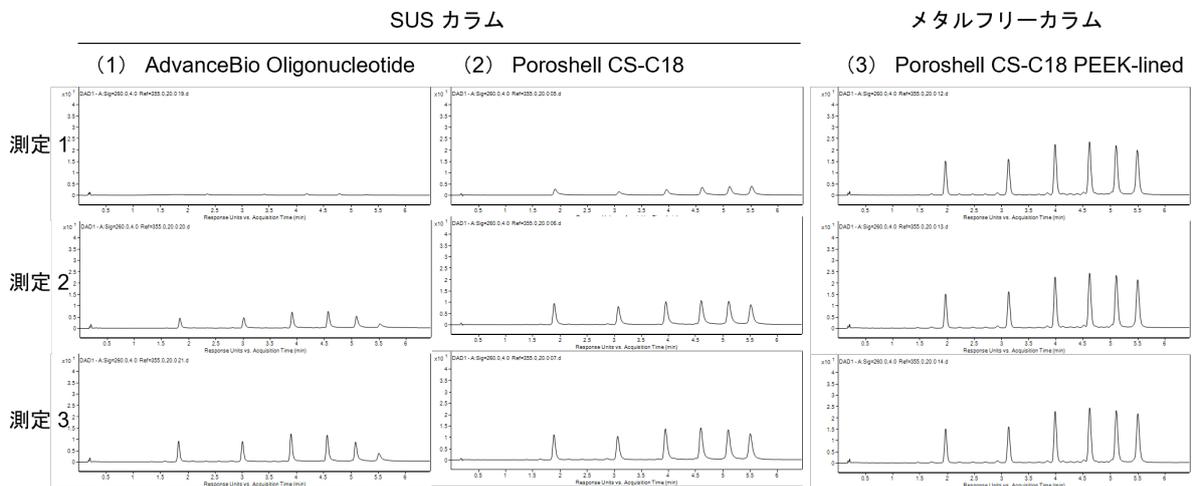


図 2. メタルフリーカラムと SUS カラムの比較

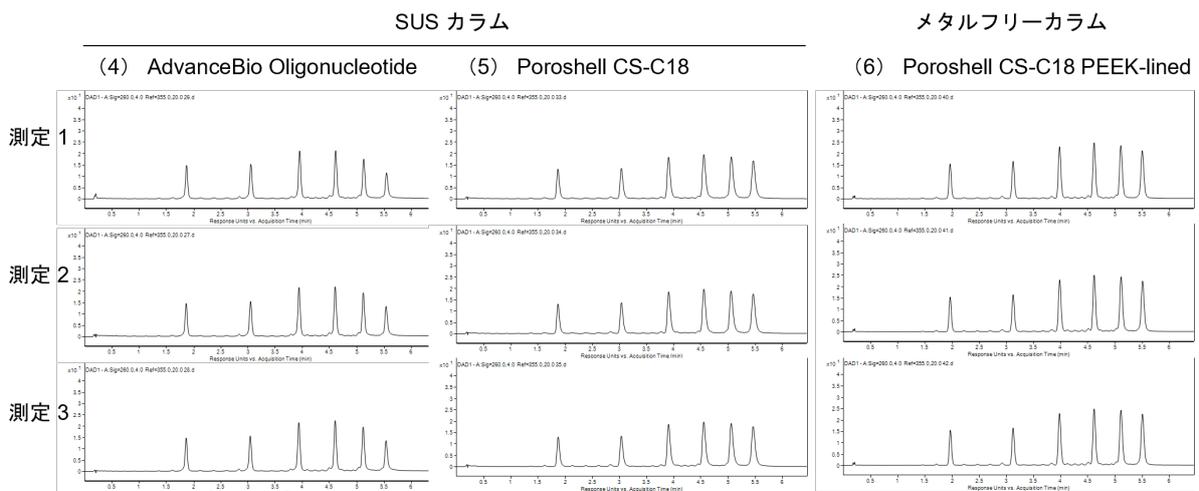


図 3. 移動相に不活性化剤を加えたメタルフリーカラムと SUS カラムの比較

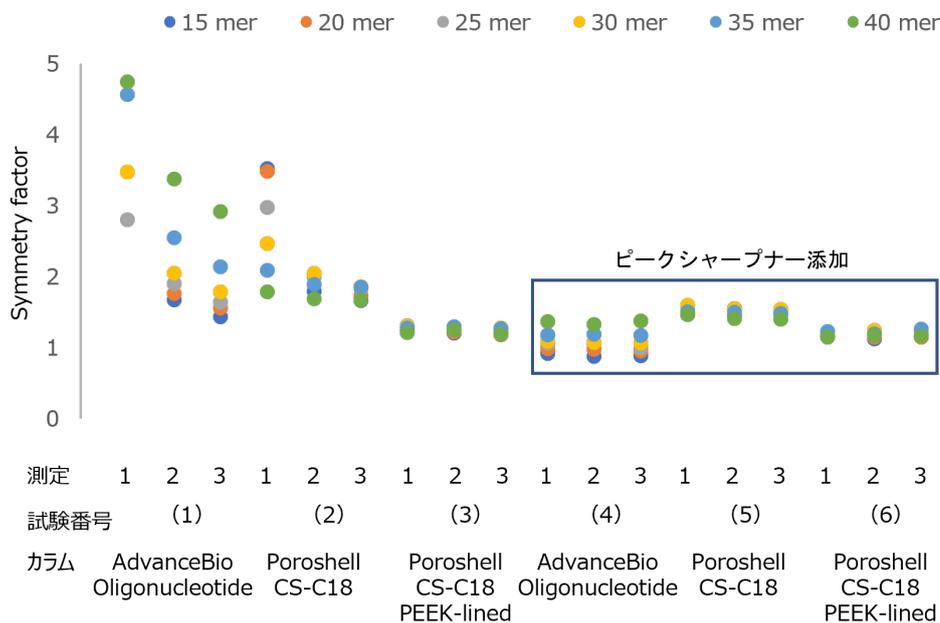


図 4. ピーク形状の比較 (試験番号 1-6)

Symmetry factor = 1, 左右対称; Symmetry factor > 1, テーリングピーク; Symmetry factor < 1, リーディングピーク

結論

本アプリケーションノートでは、オリゴヌクレオチドのイオンペア逆相 LC/DAD を検証しました。この結果、メタルフリーカラム (Poroshell CS-C18, 2.1x50 mm, 2.7 μm, PEEK-lined) と生体分子に不活性な HPLC 配管 (Quick Turn Capillary MP35N 0.12 x 500 mm) を利用すれば、オリゴヌクレオチドの金属吸着を抑制し、良好な回収率とピーク形状で分析できることがわかりました。この条件を利用すれば、あらかじめ実サンプルを複数回測定し、分析種の吸着部位を飽和させるコンディショニングは不要になります。

また、従来の SUS 製カラムを利用する場合は、移動相に不活性化剤 (ピークシャープナー) を添加することで、回収率、ピーク形状が改善することがわかりました。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE47490886

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, November 14, 2022

5994-5542JAJP