

2D-LC/MS を用いた合成核酸のイオン交換分離およびオンライン脱塩



Author

内藤 厚子

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

イオン交換クロマトグラフィーによるオリゴヌクレオチドの分析は、その合成プロセスの管理において重要です。しかし、イオン交換クロマトグラフィーでは通常不揮発性塩を含む緩衝液を移動相に用いるため、LC に質量分析計を接続し MS 検出を行うことは困難です。

本アプリケーションノートでは、2次元 LC/MS (2D-LC/MS) を用いた合成オリゴヌクレオチドの測定を紹介します。1次元目 (1D) でイオン交換クロマトグラフィーによるオリゴヌクレオチドの分離、2次元目 (2D) で逆相クロマトグラフィーによるオリゴヌクレオチドピーク中の不揮発性塩の脱塩を行い、イオンクロマトグラフィーの各ピークについてのマススペクトルが得られました。

Key words : 2D-LC、合成核酸、オリゴヌクレオチド、イオン交換、脱塩、ハートカット

システム

Agilent InfinityLab 2D-LC Solution

バイナリポンプ (G7112B, for 1D Pump)
 ハイスピードポンプ (G7120A, for 2D Pump)
 マルチサンプラ (G7167B)
 マルチカラムサーモスタット (G7116B)
 + 2ポジション/6ポートバルブ
 ダイオードアレイ検出器 (G7115A)
 バルブドライブ (G1170A)
 + 2D-LCバルブ (G4236A)
 + マルチハートカットバルブキット (G4242A)

Agilent 6545XT Q-TOF MS

分析条件

試料調製

Oligonucleotide Resolution Standard (Agilent Parts No. 5190-9028, Sequence; 14-21 mer, 表1 参照) を超純水 1000 μ Lに溶解し、試料としました。

表1. Oligonucleotide Resolution Standard 試料

Sequence Name	Sequence	Molecular Weight (Da, averatg)	Amount (nmole)
14mer	rCrArCrUrGrArArUrArCrArArU	4398.0	2
17mer	rUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrArArU	5338.6	2
20mer	rUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrArArU	6278.9	2
21mer	rGrUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrArArU	6624.4	4

表2. 測定条件

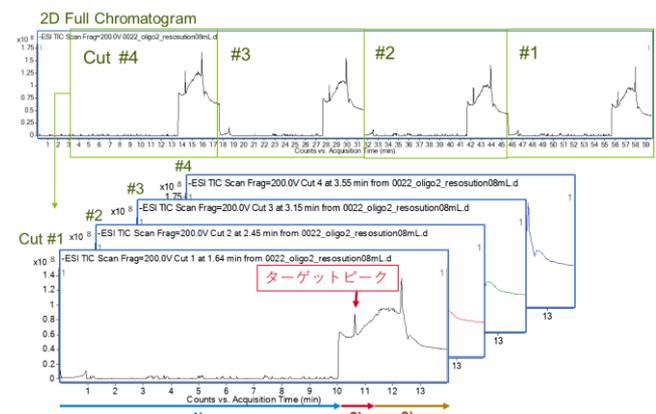
1D 測定条件	
カラム	Agilent Bio SAX 4.6x50 mm, 1.7 μ m (Parts No. 5190-2461)
移動相	A; 20 mM Tris-HCl (pH9.0) B; 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH9.0)
流速	0.8 mL/min
グラジエント	B; 45%(0 min)→70%(5 min)
カラム温度	40 °C
注入量	5 μ L
検出	260 nm

2D 測定条件	
カラム	Agilent AdvanceBio Oligonucleotide 2.1x50 mm, 2.7 μ m (Parts No. 659750-702)
移動相	A; 10 mM Triethylamine, 200 mM HFIP B; Methanol
流速	0.8 mL/min
2D-LCモード	ハートカット (タイムベース)
グラジエント (at 2D time)	B; 5%(0 min)→5%(10 min)→60%(11 min) →80%(11.1 min)→80%(12 min) →5%(12.1 min)→5%(14 min)
カラム温度	40 °C
ダイバータバルブ	to waste (0 min at 2D time) → to MS (10 min at 2D time)

検出	Agilent 6545XT Q-TOF LC/MS
	イオン源 : Dual-ESI
	ドライガス : 350°C, 13 L/min
	ネブライザー圧力 : 60 psig
	キャピラリー電圧 : 3500 V
	極性 : ネガティブ
	スキャン範囲 : m/z 500-3200
	フラグメンター電圧: 200 V
	Acq rate : 1 spectra/s
	リファレンス : m/z: 966.0007

データ採取・解析には、Agilent OpenLab CDS ChemStation、2D-LC アドオン、MassHunter ソフトウェアを用いました。2D-LC アドオンに付属する2D Chromatogram Creator ソフトウェアを用いて、採取したデータを各ハートカットごとの測定データに分割し解析を行いました。分割した測定データには、

- 1) 1D溶解液の不揮発性塩の除去 (脱塩); 図1中に青色で示した時間
 - 2) ターゲットの溶出; 同赤色
 - 3) 2Dカラムの洗浄と再平衡化; 同褐色
- の過程が含まれています (図1)。



- 1) 1次元目から導入された不揮発性移動相の脱塩
- 2) ターゲットピークの溶出
- 3) 2次元目のカラムの洗浄と再平衡化

図1. データ採取・解析の概要

結果・考察

1次元LC (1D-LC) での測定において、各鎖長のオリゴヌクレオチドは5分以内に分離可能でした (図2)。

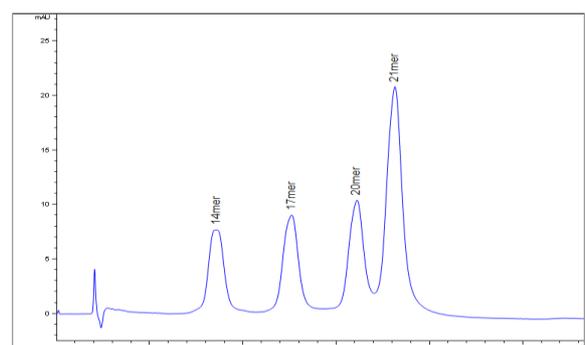


図2. 合成オリゴヌクレオチド (14-21 mer) の1D-LC 分離

図3に1Dクロマトグラム、サンプリングテーブル、および各オリゴヌクレオチドピークのマススペクトルを示しました。各マススペクトルのデコンボリューション結果は、分子量計算値と一致しました（図4）。

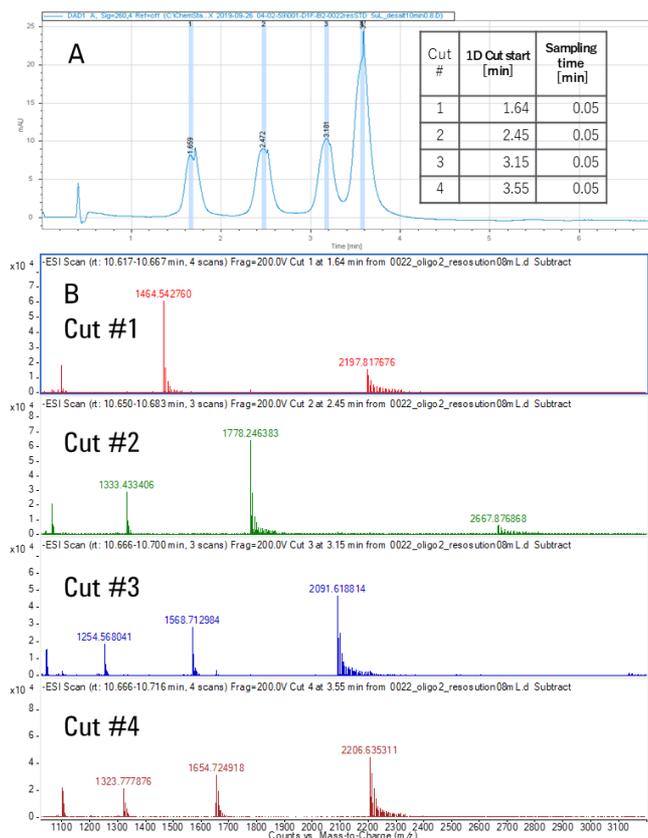


図3. 2D-LC 測定結果

A) 1D クロマトグラム、ハートカットのサンプリングテーブル、
B) ハートカットしたピークのマススペクトル

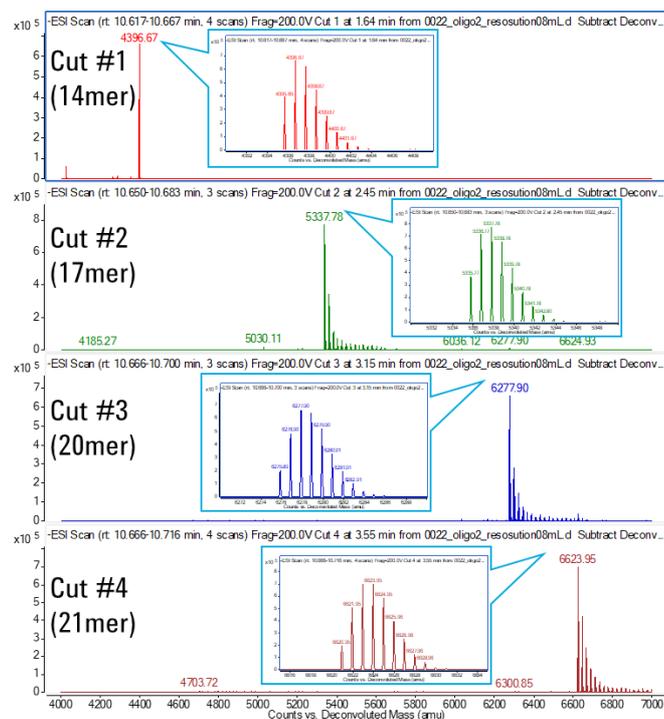


図4. ハートカットしたピークのデコンボリューション結果

本測定条件において、検出されたオリゴヌクレオチドのマススペクトルはナトリウム付加イオンを含んでいました。2D ポンプの流速、および脱塩にかかる時間を長くするようグラジエントプログラムを変更することで、ナトリウム付加体は減少し、シグナル強度も向上しました（図5）。

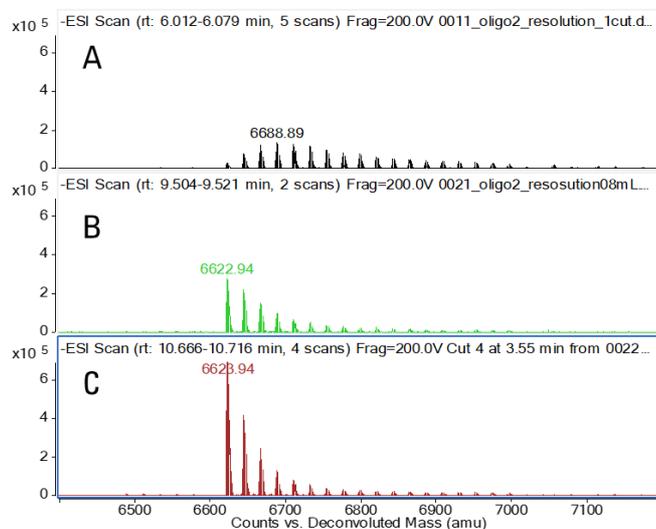


図5. 2次元目ポンプ条件を変更した場合の 21mer 合成オリゴヌクレオチドピークのデコンボリューション結果

A) 2Dポンプ 流速; 0.4 mL/min, 脱塩時間; 1 min,
B) 2Dポンプ 流速; 0.8 mL/min, 脱塩時間; 5 min,
C) 2Dポンプ 流速; 0.8 mL/min, 脱塩時間; 10 min (図4と同様)

まとめ

2D-LC/MSにより、合成オリゴヌクレオチドのイオン交換分離、不揮発性塩の脱塩、MS検出をオンラインで行うことが可能でした。マルチハートカット2D-LC と Q-TOF MSは、合成オリゴヌクレオチドの品質管理に有効なツールであ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ー

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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2020

Printed in Japan, April 16, 2020

DE44223.7705092593

LC-MS-202004NA-001