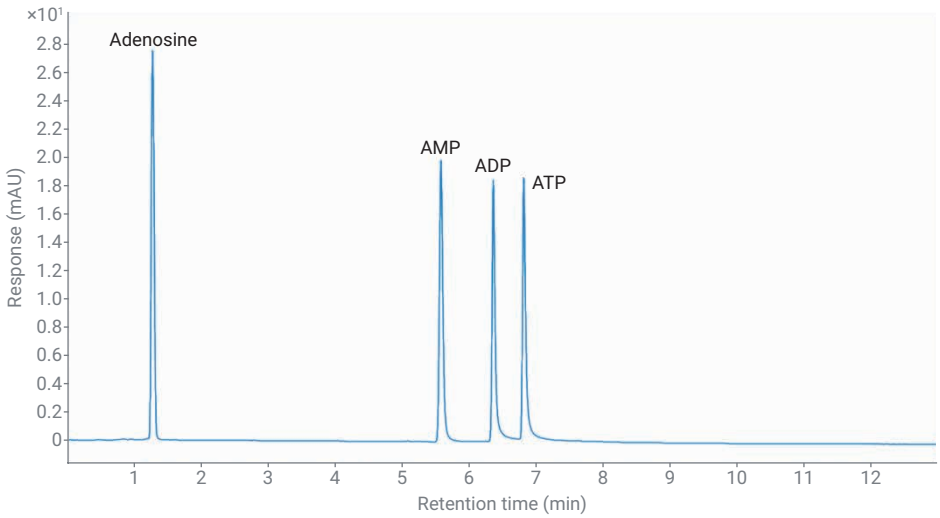
アプリケーションノート

バイオ医薬品

4 種類の LC システムにおけるヌクレオチド分析の比較研究

バイオシステム対ステンレスシステム



著者

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.

概要

リン酸化化合物は、ステンレスベースの液体クロマトグラフィー（LC）システムでは分析が困難な分子です。ピーク形状不良やサンプルロスがあると、データ品質が影響を受ける可能性があり、その結果生成されたデータの信頼性が低下するおそれがあります。このアプリケーションノートでは、アデノシンと 3 つの対応するヌクレオチドを、4 つの異なる Agilent LC システム（2 つの低吸着 LC システムと 2 つのステンレスベースのシステム）で分析しました。ピーク形状とサンプルロスに関して、4 つのシステムの性能を比較し、評価しました。低吸着バイオ LC システムはいずれもデータの再現性が高く、ステンレス LC システムよりも明らかに優れた性能を示しました。

はじめに

クロマトグラフィー担当者は、対称的なガウス曲線のピーク形状を持つベースライン分離されたピークを得ようと努力します。ピークの対称性と高い回収率が得られれば、LC システムが正常に動作しているということです。正常に動作する LC システムは、サンプルとクロマトグラフィー表面の間に望ましくない、または予測できない相互作用がないシステムであると考えられます。吸着相互作用があると、非対称ピークやピークテーリングなどピーク形状が変化することが多く、また分析されたサンプルの回収率が大幅に低下することがあります。[1,2]

リン酸基と流路内の鉄含有ステンレス成分との相互作用が、ピークテーリングとサンプルロスにつながる可能性があるため、リン酸化化合物はステンレスシステムにとって特に困難な分析対象です。ヌクレオチドは、この種の相互作用に特に敏感です[3]。ただし、ペプチド、糖、脂質、糖鎖などの他のリン酸化化合物についても同様であることが述べられています[4]。

リン酸化サンプルとステンレス部品との相互作用を防ぐための 1 つの方法として、コンディショニング手順を実行して極性表面基を不活性化し、LC システムから溶出する金属の量を減らすことが考えられます。ただし、これらの手順では、多くの場合、強力な金属キレート剤または酸性溶液を用いて時間のかかる面倒なフラッシングを一晩実施する必要があり、LC システムの損傷や生産性の低下を招き、機器の寿命が短くなるおそれがあります。

Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC、Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC、Agilent 1290 Infinity II Bio LC などの低吸着 LC システムを使用すると、分析対象物の回収率が向上し、面倒なコンディショニング手順を実行することなく望まない相互作用を抑制できます。[2]このアプリケーションノートでは、4 種類の Agilent LC システム（2 つの低吸着 LC システムと 2 つのステンレスベースのシステム）で PEEK ライナ付き HILIC カラムを用いて、アデノシンとそのリン酸誘導体の分析におけるサンプルロス、ピーク形状、再現性を比較します。

実験方法

装置

Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システムは、次のモジュールで構成されています。

- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートポンプ（G5654A）
- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートマルチサンプラ（G5668A）、Agilent InfinityLab サンプルサーモスタット（G5668A #101）付き
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット（G7116A）、バイオイナート標準フロー熱交換器付き
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 WR（G7115A）、10 mm（G4212-60007）、バイオイナート標準フローセル付き

Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC システムは、次のモジュールで構成されています。

- Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ（G7131C）
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンプラ（G7137A）、サンプルサーモスタット付き（オプション #101）
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット（G7116B）、イナート仕様の標準フロー熱交換器（G7116-60071）付き
- Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器（G7114B）、イナート仕様のミクロフローセル、3 mm、2 µL、RFID タグ（G1314-60189）付き

Agilent 1290 Infinity II LC システムは、次のモジュールで構成されています。

- Agilent 1290 Infinity II フレキシブルポンプ（G7104A）
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンプラ（G7167B）、サンプルサーモスタット（オプション #101）付き
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット（G7116B）、標準フロー熱交換器付き
- Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器（G7114B）、ミクロフローセル、3 mm、2 µL（G1314-60187）付き

Agilent 1260 Infinity II LC システムは、次のモジュールで構成されています。

- Agilent 1260 Infinity II クォータナリポンプ（G7111B）
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンプラ（G7167A）サンプルサーモスタット（オプション #101）付き
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット（G7116A）、標準フロー熱交換器付き
- Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器（G7114B）、ミクロフローセル、3 mm、2 µL（G1314-60187）付き

ソフトウェア

Agilent OpenLab CDS バージョン 2.5 以降

カラム

InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z、
2.1 × 150、2.7 µm、PEEK-ライニング
（部品番号 673775-924）

試薬

すべての溶媒は LC グレードを使用しました。アセトニトリル（ACN）は Merck（ダルムシュタット、ドイツ）から購入しました。超純水は、0.22 µm メンブレンユースポイントカートリッジ（Millipak、Merck-Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国）を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。酢酸アンモニウムおよび、水酸化アンモニウム、アデノシン、アデノシン 5 '- 一リン酸、アデノシン 5 '-二リン酸ナトリウム塩、アデノシン 5 '- 三リン酸二ナトリウム塩水和物は、Sigma-Aldrich（シュタインハイム、ドイツ）から入手しました。

サンプル

アデノシン、アデノシン 5 '- 一リン酸、アデノシン 5 '- 二リン酸ナトリウム塩、アデノシン 5 '- 三リン酸二ナトリウム塩水和物を温水に溶解し、80、133、200、400 µM の濃度で混合して等モル濃度にしました。

注：アデノシンは、冷水への溶解度が低く、温水に最もよく溶解します。

バッファの調製

100 mM 酢酸アンモニウムストックソリューションを調製し、pH を pH9 に調整しました。調製した原液を 0.2 µm メンブレンフィルタでろ過しました。1 L の溶出液 A を調製するのに、100 mL のストックソリューションを 900 mL の水と混合しました。溶出液 B は、ストックソリューション 100 mL を 900 mL のアセトニトリルと混合して調製しました。

メソッド

表 1. クロマトグラフィー条件

パラメータ	設定値
溶媒	A）10 mM 酢酸アンモニウム、pH 9 B）ACN:100 mM 酢酸アンモニウム、pH 9（9:1（v:v））
グラジエント	0 分：90 %B 12 分：50 %B 13 分：50 %B ポストタイム 10 分間
流量	0.400 mL/min
温度	35 °C
検出	260 nm 20 Hz
注入	注入量：1 µL サンプル温度：10 °C ニードル洗浄：水で 3 秒間

結果と考察

HPLC 装置から溶出する金属イオンは、PEEK ライナ付き分離カラムの性能に影響を与える可能性があるため、このアプリケーションでは分析の順序が重要な要素となります。最初に、完全に PEEK ベースの低吸着システムである 1260 Infinity II バイオイナート LC で分析を開始しました。次に、低吸着な MP35N ベースのシステムである 1260 Infinity II Prime Bio LCで分析を実施しました（MP35N はニッケルコバルトベースの合金）。3 番目の分析は第 1 のステンレスベースのシステムである 1290 Infinity II LC で行い、続いて 4 番目のシステムである 1260 Infinity II LC で分析しました。まったく同じ溶媒、サンプル、そして何より、すべての実験で同じカラムを使用したことが重要な点です。リン酸化化合物サンプルの分解を防ぐために、すべてのサンプルを新たに調製し、10 °Cに冷却しました。すべての分析は 3 日以内に連続して実施しました。

図 1 に、Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システムの最初の分析結果を示します。4 つのピークはすべてベースライン分離されています。ピーク形状も良好で、リテンションタイム（RT）と面積の相対標準偏差（RSD）も極めて優れていました。HILIC は逆相クロマトグラフィーと比較して、望ましくない二次相互作用が起こりやすいため、ピーク形状の点で問題が生じる場合があることに留意する必要があります。[6]要求の厳しい HILIC クロマトグラフィーを考慮すると、ピーク形状は良好で、テーリングも最小限に抑えられました。

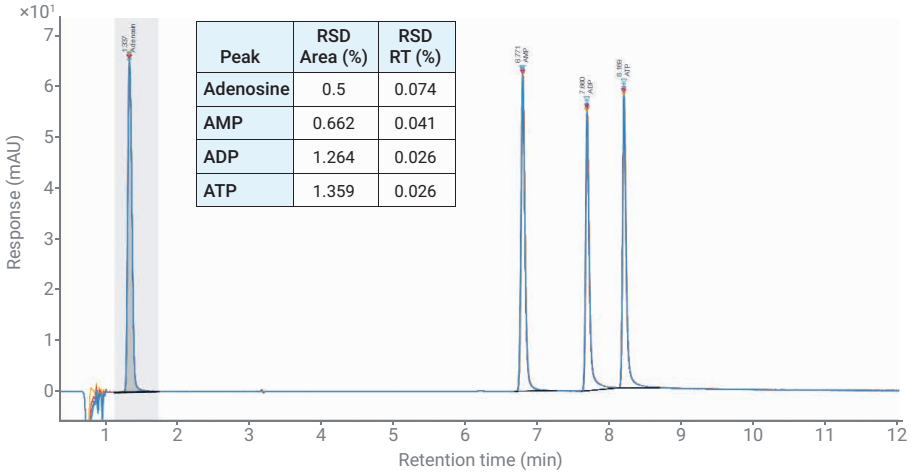
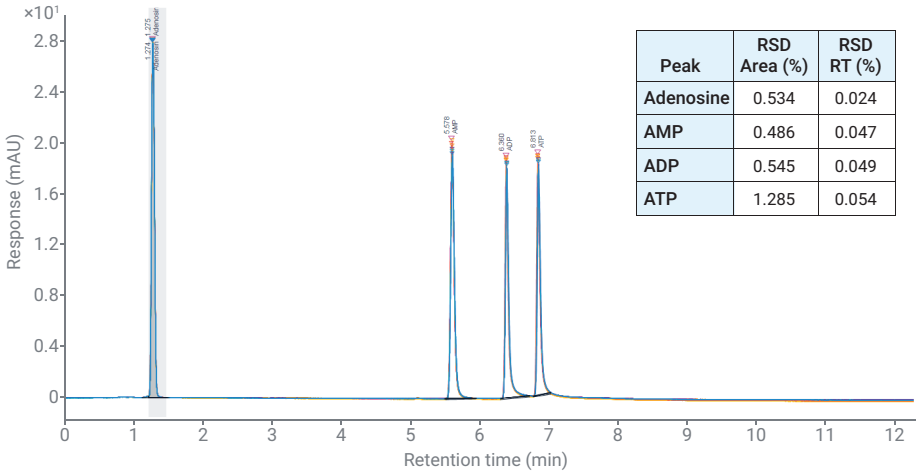


図 1. Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC でのヌクレオチドの分離、7 回連続分析

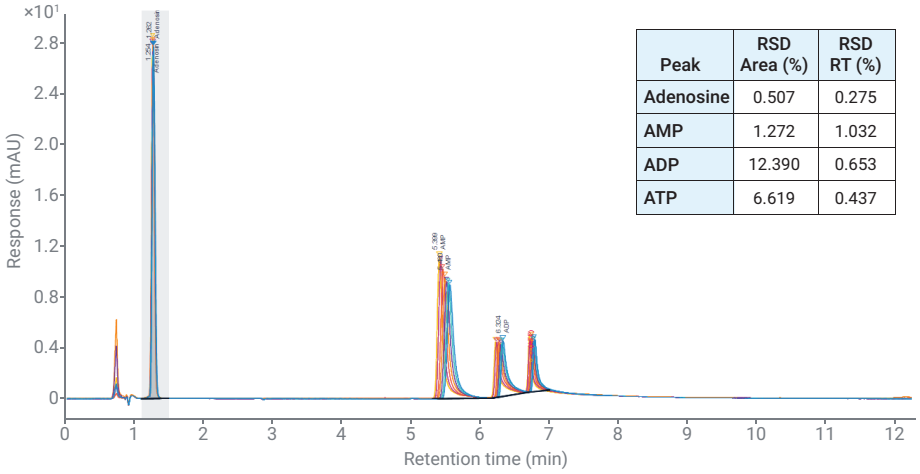
Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC の 2 番目の分析結果を図 2 に示します。1260 Infinity II バイオイナート LC の結果ですでに見られたように、4 つのピークはすべてベースライン分離されており、ピーク形状は良好で、リテンションタイム（RT）と面積の優れた相対標準偏差（RSD）が得られました。アデノシンのピークは、システムが低拡散であることによりピーク形状がよりシャープになるため、3 つのリン酸化ヌクレオチドのピークと比較して強度が高くなっています。ただし、4 つのヌクレオチドピークの面積パーセントは、1260 Infinity II バイオイナート LC での分析のものと同程度であり、ヌクレオチド分析においては 2 つのシステムが同等の性能を示しています。この 1260 Infinity II バイオイナート LC システムでは DAD が使用されていたため、VWD が使用されている他のシステムと比較して、ピーク強度は全体的に高くなりました。

ステンレスベースの 1290 Infinity II LC による 3 番目の分析は、まったく異なって見えます（図 3）。アデノシンのピークは、ピークの高さ/面積および形状に関して前の 2 つのシステムと同程度ですが、3 つのリン酸化ヌクレオチドのピークはまったく異なって見えます。ここでは、アデノシンが内部標準と考えることができます。アデノシンには鉄反応性のリン酸基が含まれていないため、すべての LC システムでまったく同じ挙動になるはずです。対照的に、AMP、特に ADP と ATP は広範囲にテーリングしています。さらにサンプルロスは、分子に結合しているリン酸基が多くなると増加します（図 5 も参照）。ステンレスのキャピラリーからの鉄と他の成分との相互作用が見られます。



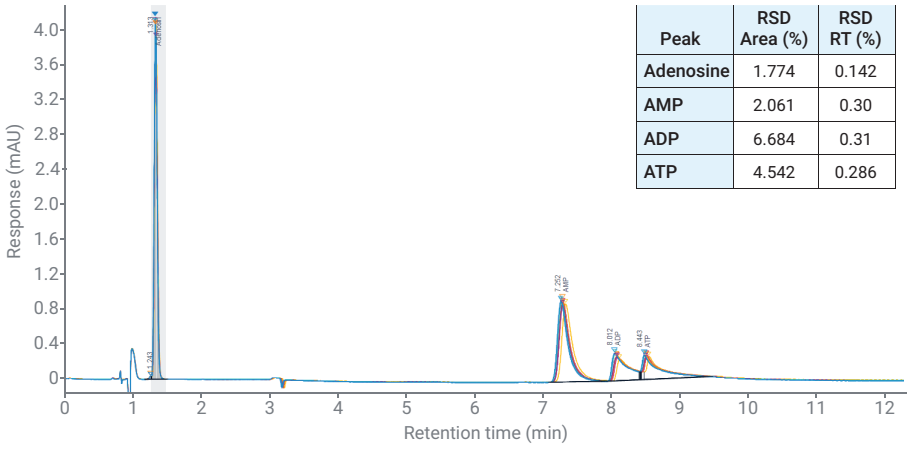
Peak	RSD Area (%)	RSD RT (%)
Adenosine	0.534	0.024
AMP	0.486	0.047
ADP	0.545	0.049
ATP	1.285	0.054

図 2. Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC でのヌクレオチドの分離、7 回連続分析



Peak	RSD Area (%)	RSD RT (%)
Adenosine	0.507	0.275
AMP	1.272	1.032
ADP	12.390	0.653
ATP	6.619	0.437

図 3. Agilent 1290 Infinity II LC でのヌクレオチドの分離、7 回連続分析



Peak	RSD Area (%)	RSD RT (%)
Adenosine	1.774	0.142
AMP	2.061	0.30
ADP	6.684	0.31
ATP	4.542	0.286

図 4. Agilent 1260 Infinity II LC でのヌクレオチドの分離、7 回連続分析

1290 Infinity II LC での分析と同様に、1260 Infinity II LC での分析でも、リン酸化ヌクレオチドの高いサンプルロスと大きなピークテーリングが見られます。図 4 および 5 を参照してください。

図 5 は、分析した 4 つのシステムすべてのサンプルロスに関する結果をまとめたものです。面積ロスは、アデノシンを内部標準として使用し計算しました。アデノシンにはリン酸基が結合していないため、LC の鉄含有部品との相互作用はないと考えられます。したがって、数式を使用して面積ロスを計算しました（式1）。

PEEK ライナ付きキャピラリーと他のバイオイナート材料のみで構成された 1260 Infinity II バイオイナートシステムが標準分析法であると想定しています。カラムや消耗品などの他の要因を排除するために、面積ロスの値は 1260 Infinity II バイオイナートシステムに正規化しました。

第一に、リン酸の量が多いほど鉄ベースの材料との相互作用が強くなり、結合するリン酸基の量とともに面積ロスが増加します。

第二に、面積ロスは SST システムでのみ見られ、2 つのバイオシステムでは面積ロスの違いは見られないことがわかります。したがって、MP35N ベースのシステム、すなわち 1260 Infinity II Prime Bio LC　は、Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC と比較して同程度にヌクレオチド分析に適していると考えることができます。

さまざまな濃度のヌクレオチドを分析することにより、SST ベースの 1290 Infinity II LC におけるサンプルロスに関する濃度の要因の影響を評価しました。図 6 は、リン酸化ヌクレオチドのさまざまな濃度に対する、サンプルロス量（パーセント）を示したものです。4 つの異なる濃度（80、133、200、400 µM）で分析を実施しました。上記のように、サンプルのロスの影響は、ADP と ATP でより顕著になります。例えば低濃度の 80 µM では、ATP の相対サンプルロスは 80% を超えます。5 倍の濃度の 400 µM では、ATP の相対サンプルロスは約 44% まで減少します。つまり、濃度が高いと、LC システムの影響は小さくなりますが、使用したカラム（PEEK ライナ付きと SST）の影響はより大きくなります[3]。

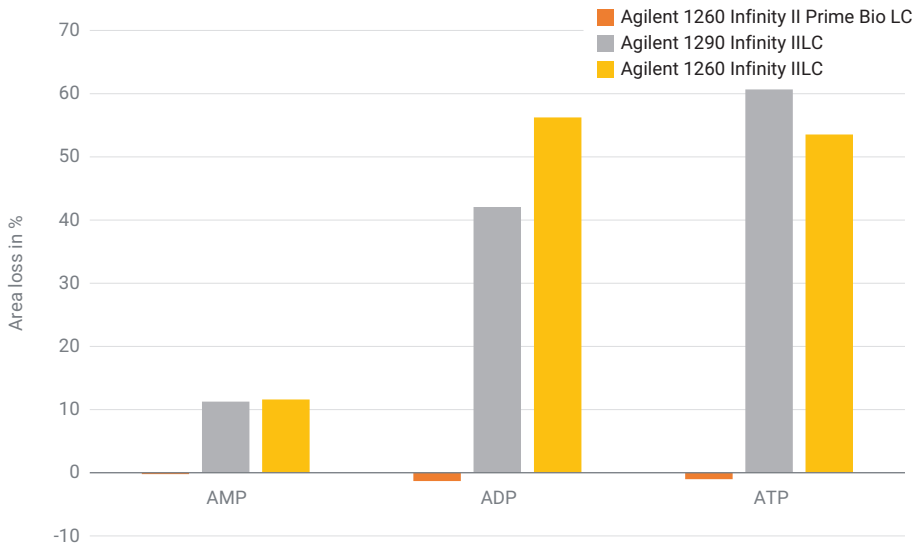
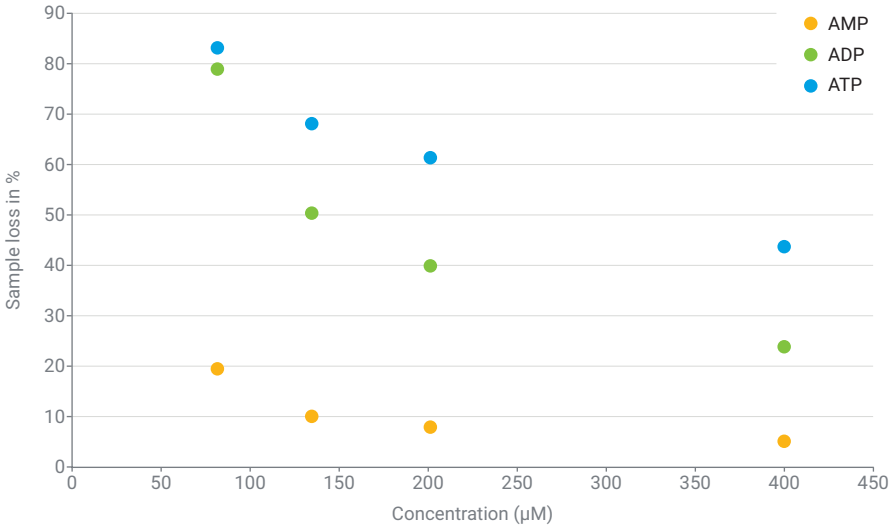


図 5. Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC と比較した面積ロス（パーセント）

式 1.

$$\text{面積ロス} = 100 - \left(\frac{A_{AXP,SS}}{A_{Adenosine,SS}} \times \frac{A_{Adenosine,bio}}{A_{AXP,bio}} \times 100 \right)$$



サンプルロス（%）	80 µM	133 µM	200 µM	400 µM
アデノシン	0	0	0	0
AMP	19.71	10.23	8.13	5.19
ADP	79.12	50.49	39.99	24.11
ATP	83.31	68.15	61.55	43.86

図 6. SST ベースの Agilent 1290 Infinity II LC で分析されたリン酸化ヌクレオチドのサンプルロス

結論

両方の低吸着バイオ LC バージョン（完全なバイオイナート Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC と、MP35N を主な材料として使用するバイオコンパチブル仕様 LC システムである Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC）が、鉄に敏感なリン酸化ヌクレオチドの分析において、時間のかかる不活性化手順を必要とせずに、ほぼ同等の優れた性能を示しました。対照的に、不活性化を行わない場合、ステンレスベースの LC システム（Agilent 1290 Infinity II LC および Agilent 1260 Infinity II LC）は、リン酸化化合物、特に ADP と ATP で大きなテーリングと面積ロスがみられました。SST LC システムはともに、Bio LC システムと比較して、リン酸化化合物の RT と面積の精度が低いことがわかりました。サンプルロスは濃度に大きく依存することが示されました。濃度が低いほど、面積ロスが顕著になります。したがって、両方のバイオ LC システムが、システム部品との相互作用によってサンプル吸着するリスクを最小限に抑えて、より信頼性の高いデータを生成することができ、ヌクレオチドの再現性の高い分析に大いに推奨できます。

参考文献

1. Wakamatsu A.; Morimoto, K.; Kudoh, S. A Severe Peak Tailing of Phosphate Compounds Caused by Interaction with Stainless Steel Used for Liquid Chromatography and Electrospray Mass Spectrometry.J. Sep. Sci. **2005**, 28, 1823-1830.
2. Fekete, S. Defining Material Used in Biopharmaceutical Analysis. LCGC Europe **2021**, 34, 245-248.
3. 不活性な流路でのヌクレオチドの HPLC-DAD 分析.Agilent Technologies application note, publication number 5994-0680JAJP, **2019**.
4. Tuytten, R. et al. Stainless Steel Electrospray Probe: a Dead End for Phosphorylated Organic Compounds? J. Chromatogr. A **2006**, 1104, 209-221.
5. Hsiao, J. J. et al. Improved LC/MS Methods for the Analysis of Metal-Sensitive Analytes Using Medronic Acid as a Mobile Phase Additive. Anal. Chem. **2018**, 90(15), 9457-9464.
6. Heaton, J. C.; McCalley, D. V. Some Factors that Can Lead to Poor Peak Shape in Hydrophilic Interaction Chromatography, and Possibilities for Their Remediation. J. Chromatogr. A **2016**, 1427, 37-44.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カストマコンタクトセンタ

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。

DE83266022

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2021

Printed in Japan, December 2, 2021

5994-4392JAJP

Agilent

Trusted Answers