

オリゴヌクレオチド分析における HPLC ハードウェア素材の比較



著者

野田 莉帆

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ヌクレオチドが複数結合した化合物であり、近年新しい医薬品のモダリティとして注目されています。オリゴヌクレオチドの分析・精製には HPLC が多用されますが、リン酸基を有する化合物はステンレスを含むシステムと相互作用し、ピーク形状の悪化等を引き起こすことが知られています。HPLC システムにおいて、ステンレス配管の代替として PEEK が用いられますが、特定の条件やサンプルにおいて、オリゴヌクレオチドと PEEK との相互作用が確認されました。一方、不活性な金属で構成されたアジレントの Bio LC では、同条件において吸着等の相互作用は見られませんでした。

分析条件

実験 1. TEAA 条件

システム 1

1290 Infinity II Flexible Pump System
 G7104B フレキシブルポンプ
 G7167B マルチサンブラ
 G7116B マルチカラムサーモスタット
 G7115A ダイオードアレイ検出器 10 mm cell

分析条件

分析条件を表 1 に示します。Triethylammonium acetate buffer (TEAA) 1M pH 7.0 は Sigma-Aldrich より、Acetonitrile は Honeywell より購入しました。

表 1. 分析条件

分析条件 1	
移動相 A	100 mM TEAA in Water
移動相 B	100 mM TEAA in Acetonitrile
流速	0.6 mL/min
B conc.	10-16 % B / 8 min
Column Temp.	60 °C
Injection Vol.	5 µL
UV	260 nm, BW 4 nm
Column	Agilent Poroshell 120 EC-C18 2.1×100 mm, 2.7 µm (PEEKライニング PN : 675775-902, ステンレスハードウェア PN : 695775-902)

サンプル

サンプルは各 2 nmol/mL となるよう超純水で溶解しました。サンプルの配列は表 2 に示します。

サンプル 1 : オリゴヌクレオチドラダー標準 (部品番号 5190-9029)

表 2. 分析条件

	配列
a	TTTTT TTTTT TTTTT
b	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT
c	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT
d	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT
e	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT
f	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT

実験 2. HFIP-TEA 条件

システム 2

1290 Infinity II Bio LC System
 G7131A Bio フレキシブルポンプ
 G7137A Bio マルチサンブラ
 G7116B マルチカラムサーモスタット
 G7117A ダイオードアレイ検出器 10 mm cell

分析条件

分析条件を表 3 に示します。Triethylamine ≥99 % (TEA)、1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol ≥99 % (HFIP) は Sigma-Aldrich より、Methanol (for LC/MS) は Honeywell より購入しました。

表 3. 分析条件

分析条件 2	
移動相 A	100 mM HFIP, 8 mM TEA in Water
移動相 B	Methanol
流速	0.2 mL/min
B conc.	15 % (0 min) - 30 % (5 min) - 50 % (7 min)
Column Temp.	60 °C
Injection Vol.	1 µL
UV	260 nm, BW 4 nm
Column	ガラスライニング L-Column2 ODS 2.0 x 50 mm, 3 µm ステンレスハードウェア Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチド 2.1 x 50 mm, 2.7 µm (PN : 659750-702) PEEK ライニング Agilent AdvanceBio EC-C18 2.1 x 50 mm, 2.7 µm (PN : 679775-902)

サンプル

サンプルは各 2 nmol/mL となるよう超純水で溶解しました。サンプルの配列は表 4 に示します。サンプルは全て株式会社ジーンデザインより購入しました。

表 4. 分析条件

サンプル	配列
2	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT
3	T(L)T(L)T(L)TT TTTTT TTTTT TTT(L)T(L)T(L)
4	T [*]

(L)=LNA, ^{*}=Phosphorothioated

結果

実験 1：TEAA 条件における結果

システム 1、分析条件 1 を用いて、サンプル 1 を分析した結果を示します。図 1 に PEEK ライニングカラム、ステンレスハードウェアカラムで分析した際のクロマトグラムを示します。PEEK ライニングカラムにおいて、ピークのテーリングおよび高さ・面積の減少が確認されました。

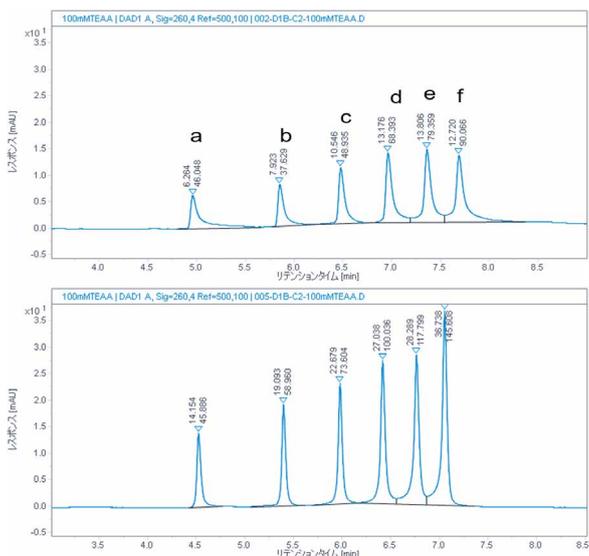


図 1. 上：PEEK ライニングカラム、下：ステンレスハードウェアカラム

次に、ステンレスハードウェアのカラムを用いて、カラムの出口からダイオードアレイ検出器の入り口の配管を PEEK もしくは通常の HPLC で使用されるステンレス配管と比較したクロマトグラムを図 2 に示します。

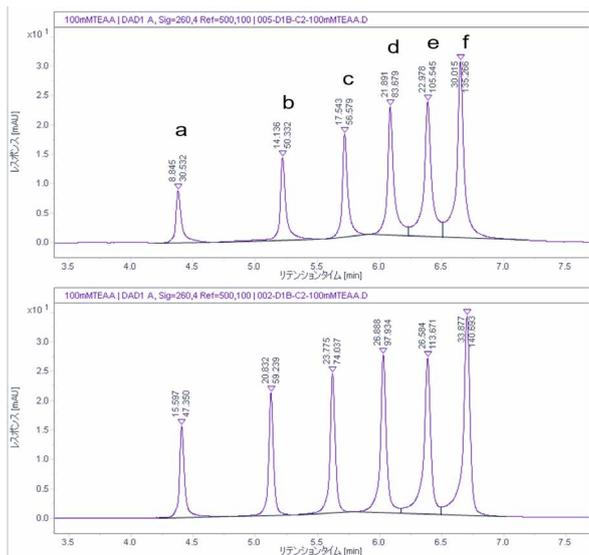


図 2. 上：PEEK 配管 0.18 mm i.d. × 500 mm、下：ステンレス配管 0.17 mm i.d. × 500 mm

カラムの比較と同様に PEEK 配管を用いた場合にテーリングが見られ、ピーク面積・高さ共に減少していることが確認されました。

図 3 に、ステンレスハードウェアのカラムを用いて、カラムの出口からダイオードアレイ検出器の入り口の配管を Bio LC 配管を用いた場合と、ステンレス配管を用いた場合を比較したクロマトグラムを示します。ピーク形状・面積・高さには差は認められませんでした。

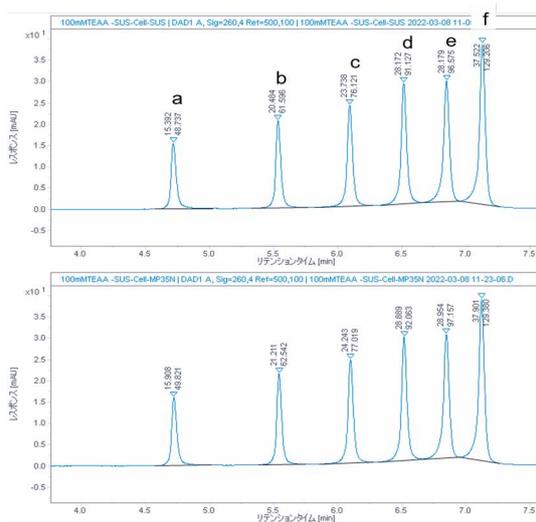


図 3. 上：ステンレス配管 0.17 mm i.d. × 500 mm、下：Bio LC 配管 0.17 mm i.d. × 500 mm

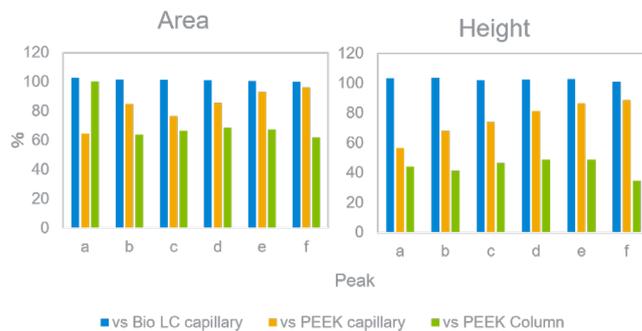


図 4. ステンレス配管・ステンレスハードウェアカラムでの各ピークの値を 100 とした際の面積および高さ比

図 4 に各分析において、通常のステンレス配管・ステンレスハードウェアカラムでの分析結果を 100 とした場合の結果を示します。PEEK 素材を用いた場合、面積は最大 38 %、高さは最大 65 % 減少しました。Bio LC で用いられる配管を使用した際にはすべての値が 100 ~ 103 % でした。

実験 2：HFIP-TEA 条件における結果

システム 2 (Bio LC) を用いて分析条件 2 におけるカラムの比較を行いました。サンプルは 2、3、4 を用いました。サンプル 2 および 3 に関してはカラムの違いによる顕著なピーク高さ・面積の減衰は見られませんが、ホスホロチオアート化修飾されたサンプル 4 においては PEEK ライニングカラムを用いることで明らかなピーク形状の悪化が確認されました。

まとめ

オリゴヌクレオチドの HPLC および LC/MS 分析において多用される条件で、HPLC のハードウェア素材における比較を行いました。分析条件やサンプルによって、オリゴヌクレオチドの PEEK への吸着が見られました。一方、Bio LC で用いられる素材では吸着等の影響は見られませんでした。オリゴヌクレオチドの分析においては、ハードウェア素材の選択が重要であり、今回の検証結果およびその他の文献[1]の結果から、Bio LC が有効であることが示唆されました。

参考

- [1] 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 Agilent Technologies application note, publication number 5994-4392JAJP, 2021.

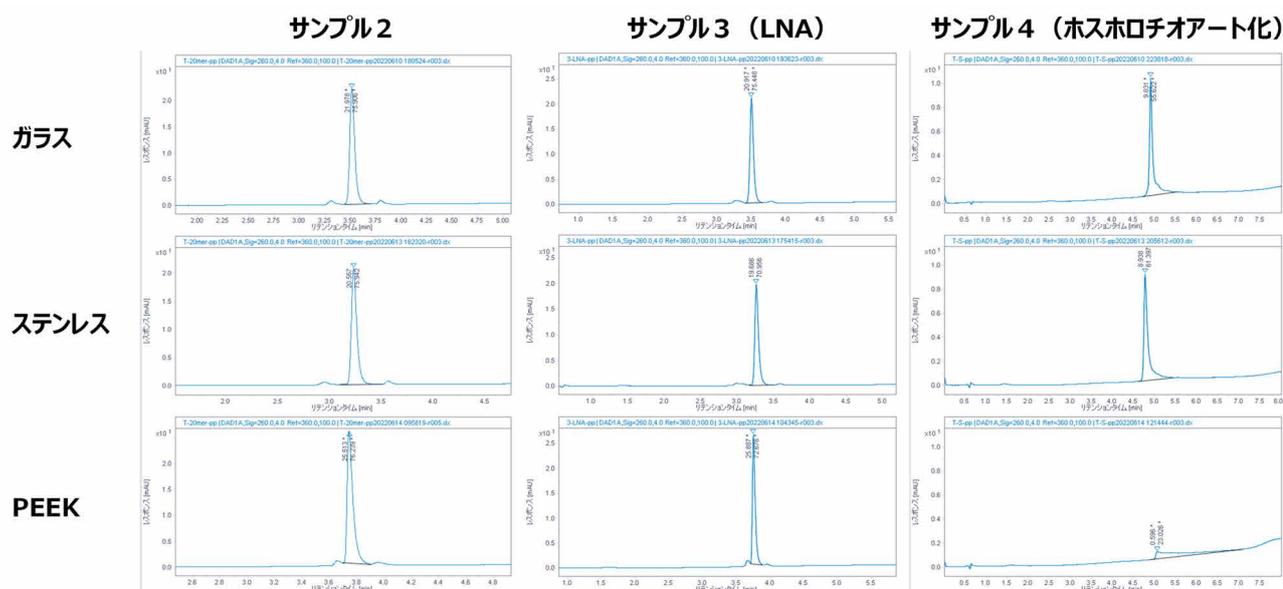


図 5. 各カラムにおけるサンプル 2、3、4 のクロマトグラム

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。

DE35025676

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, August 18, 2022

5994-5246JAJP