

## オリゴヌクレオチドの LC/MS 分析における 金属イオン対策

Agilent ウルトライナート HPLC カラムハードウェアと生体適合性に優れた LC 機器によって望ましくない金属との相互作用の抑制

### 著者

Andrew Coffey,  
Andrea Angelo P. Tripodi,  
Anne Blackwell, and  
Jordy Hsiao  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

金属イオンは、一般的な HPLC カラムや、ステンレス部品を含む機器に広く存在しています。鉄イオンは、分析対象物の吸着からサンプルの酸化に至るまで、幅広い問題を引き起こす可能性があります。これらの問題の回避策または解決策には時間とコストがかかる場合があります。場合によっては一時的な効果しか得られない不必要なコンディショニング手順を伴う場合があります。ステンレス製の部品を、不活性化コーティングが施されたものや、MP35N などの鉄含有量が大幅に少ない金属に置き換えることで、クロマトグラフィー性能を改善し、生産性を向上させることができます。オリゴヌクレオチドは、アルカリ金属イオン、特にナトリウムやカリウムを含む付加物を形成する場合があります。ワークフローにおいて、これらのイオンを排除または低減するように注意しなければ、質量スペクトル分析が複雑化する可能性があります。

## はじめに

液体クロマトグラフィー (LC) と質量分析 (MS) によるオリゴヌクレオチドの分析には、いくつかの手法が用いられます。最も一般的に用いられるのは、イオンペア逆相 (IP-RP) クロマトグラフィーです。オリゴヌクレオチドは、リン酸骨格に起因する強い負電荷を帯びているため、適切なイオンペア試薬として疎水性アミンが使用されます<sup>1</sup>。

従来は、トリエチルアミンなどのアミンを酢酸と組み合わせることにより、プロトン化を実施してきましたが、この場合、MS 検出器においてきわめて高いイオン抑制が生じます。ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) を使用する方法もあります。この物質は、プロトン化に対して十分な酸性度を維持するだけでなく、揮発性が高いため、イオン抑制を大幅に低減します。HFIP は、アセトニトリル (ACN) と混和しないため、有機溶媒としてメタノールを使用する必要があります。しかし、HFIP は PFAS (ペルフルオロアルキル化合物およびポリフルオロアルキル化合物) と呼ばれる化合物群に属しており、一般的に「永遠に残る化学物質」として知られています。このアプリケーションノートでは、イオンペア逆相メソッドを用いて得られた結果と、HFIP を使用する必要がないイオンペアフリーの代替メソッドを用いて得られた結果を比較します<sup>2</sup>。ここでは、HILIC のような MS に対応したイオンペアフリーの代替メソッドについては検討していませんが、大量注入を必要としない状況では有用である可能性があります<sup>3</sup>。

イオンペア試薬を使用する場合においても、負に帯電したオリゴヌクレオチドと正に帯電した金属イオンとの間に、望ましくない二次的な相互作用が生じる可能性があります。このような相互作用による影響はさまざまですが、サンプル回収率の低下、ピークテーリング、あるいは付加物の形成による分析結果の複雑化を引き起こす可能性があります。これらの概念については、本文書の残りの部分でさらに詳しく考察します。

## 実験方法

### 試薬および調製

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) を備えた Milli-Q Integral システムで生成しました。その他の試薬 (イオンペア試薬および緩衝液塩を含む) はすべて、可能な限り HPLC グレード以上であるか、または MS グレードの溶媒や試薬を使用しました。

また、アルカリ金属イオン付加物の形成を抑制するために、1 L の Bio 溶媒ボトル (ポリプロピレン製、部品番号 9301-6028) も使用しました。

### サンプル調製

カスタムで合成されたオリゴヌクレオチドには、25 mer DNA、50 mer DNA、完全にチオール化された DNA/RNA ハイブリッド分子が含まれていました (表 1)。

分析前に、サンプルを超純水に溶解して、濃度を 1 mg/mL にしました。

### 使用装置

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B)、Agilent InfinityLab サーモスタット付属
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7115A)、標準フローセル付属
- Agilent 6545XT AdvanceBio 四重極飛行時間型 LC/MS システム (G6545BA)

### ソフトウェアおよびデータ処理

- 機器コントロール用 Agilent MassHunter Acquisition ソフトウェア、バージョン 10 以降
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェア、バージョン 12

表 1. このアプリケーションで調査したオリゴヌクレオチド

名称	分子式	モノアイソトピック質量 (Da)	平均質量 (Da)
25 mer DNA	C <sub>244</sub> H <sub>310</sub> N <sub>86</sub> O <sub>152</sub> P <sub>24</sub>	7,619.287	7,622.927
50 mer DNA	C <sub>481</sub> H <sub>612</sub> N <sub>179</sub> O <sub>295</sub> P <sub>49</sub>	15,131.553	15,138.743
完全にチオール化されたハイブリッド	C <sub>188</sub> H <sub>243</sub> N <sub>65</sub> O <sub>104</sub> P <sub>18</sub> S <sub>18</sub>	6,207.597	6,216.012

## メソッド条件

### イオンペア逆相

LC パラメータ																			
カラム	Altura Oligo HPH-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm (部品番号 227205-702) Agilent AdvanceBio Oligonucleotide, 2.1 × 0 mm, 2.7 μm (部品番号 659750-702)																		
移動相	A) 10 mM ヘキシルアミン + 50 mM HFIP の 5:95 メタノール/水溶液 B) 10 mM ヘキシルアミン + 50 mM HFIP の 90:10 メタノール/水溶液																		
カラム温度	60 °C																		
注入量	0.5~2.0 μL																		
標準のグラジエント	流量: 0.6 mL/min, 0.21 mL/min <table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A%</th> <th>B%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>50</td><td>50</td></tr> <tr><td>1</td><td>50</td><td>50</td></tr> <tr><td>11</td><td>20</td><td>70</td></tr> <tr><td>12</td><td>50</td><td>50</td></tr> <tr><td>16</td><td>50</td><td>50</td></tr> </tbody> </table>	時間(分)	A%	B%	0	50	50	1	50	50	11	20	70	12	50	50	16	50	50
時間(分)	A%	B%																	
0	50	50																	
1	50	50																	
11	20	70																	
12	50	50																	
16	50	50																	
Q-TOF パラメータ																			
イオン化モード	ネガティブ																		
ガス温度	300 °C																		
乾燥ガス	8 L/min																		
ネブライザ圧力	35 psi																		
シースガス温度	350 °C																		
シースガス	8 L/min																		
キャピラリ電圧	3,500 V																		
ノズル	1,000 V																		
フラグメンタ電圧	200 V																		
スキマ電圧	65 V																		
オクタポール RF 電圧	750 V																		

### イオンペアフリー逆相

LC パラメータ																									
カラム	Altura Oligo HPH-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm (部品番号 227205-702) Agilent AdvanceBio Oligonucleotide, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm (部品番号 659750-702)																								
移動相	A) 20 mM 重炭酸アンモニウム B) メタノール																								
カラム温度	75 °C																								
注入量	0.5~1.0 μL																								
グラジエント (0.4 mL/min)	流量: 0.4 mL/min <table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A%</th> <th>B%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>95</td><td>5</td></tr> <tr><td>1</td><td>95</td><td>5</td></tr> <tr><td>21</td><td>65</td><td>35</td></tr> <tr><td>23</td><td>10</td><td>90</td></tr> <tr><td>25</td><td>10</td><td>90</td></tr> <tr><td>27</td><td>95</td><td>5</td></tr> <tr><td>32</td><td>95</td><td>5</td></tr> </tbody> </table>	時間(分)	A%	B%	0	95	5	1	95	5	21	65	35	23	10	90	25	10	90	27	95	5	32	95	5
時間(分)	A%	B%																							
0	95	5																							
1	95	5																							
21	65	35																							
23	10	90																							
25	10	90																							
27	95	5																							
32	95	5																							
グラジエント (0.8 mL/min)	流量: 0.8 mL/min <table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A%</th> <th>B%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>95</td><td>5</td></tr> <tr><td>0.5</td><td>95</td><td>5</td></tr> <tr><td>5</td><td>65</td><td>35</td></tr> <tr><td>6</td><td>10</td><td>90</td></tr> <tr><td>7</td><td>10</td><td>90</td></tr> <tr><td>8</td><td>95</td><td>5</td></tr> <tr><td>10</td><td>95</td><td>5</td></tr> </tbody> </table>	時間(分)	A%	B%	0	95	5	0.5	95	5	5	65	35	6	10	90	7	10	90	8	95	5	10	95	5
時間(分)	A%	B%																							
0	95	5																							
0.5	95	5																							
5	65	35																							
6	10	90																							
7	10	90																							
8	95	5																							
10	95	5																							
Q-TOF パラメータ																									
イオン化モード	ポジティブ																								
ガス温度	300 °C																								
乾燥ガス	12 L/min																								
ネブライザ圧力	30 psi																								
シースガス温度	400 °C																								
シースガス	12 L/min																								
キャピラリ電圧	3,000 V																								
ノズル	1,000 V																								
フラグメンタ電圧	180 V																								
スキマ電圧	65 V																								
オクタポール RF 電圧	750 V																								

## 結果と考察

図1および2は、オリゴヌクレオチドのイオンペア逆相分析時に直面する可能性のある課題を示しています。図1は、希釈したオリゴヌクレオチド溶液を繰り返して注入し、UV 検出を行った際に観察されたピーク面積を示しています。特に、ステンレス製のカラムへの初回注入では、露出した金属イオンサイトに対して負に帯電したオリゴヌクレオチドが吸着することにより、ピーク面積が大幅に減少する場合があります。注入を繰り返すことにより、ピーク面積は増加する可能性があります。図2は、さまざまな注入量における MS ピーク面積レスポンスを示しています。ウルトライナートコーティングのカラムを使用するとピーク面積が改善され、感度と精度が向上することは明らかです。これは、サンプル中に存在する微量成分や不純物を同定しようとする際に、特に重要となる可能性があります。

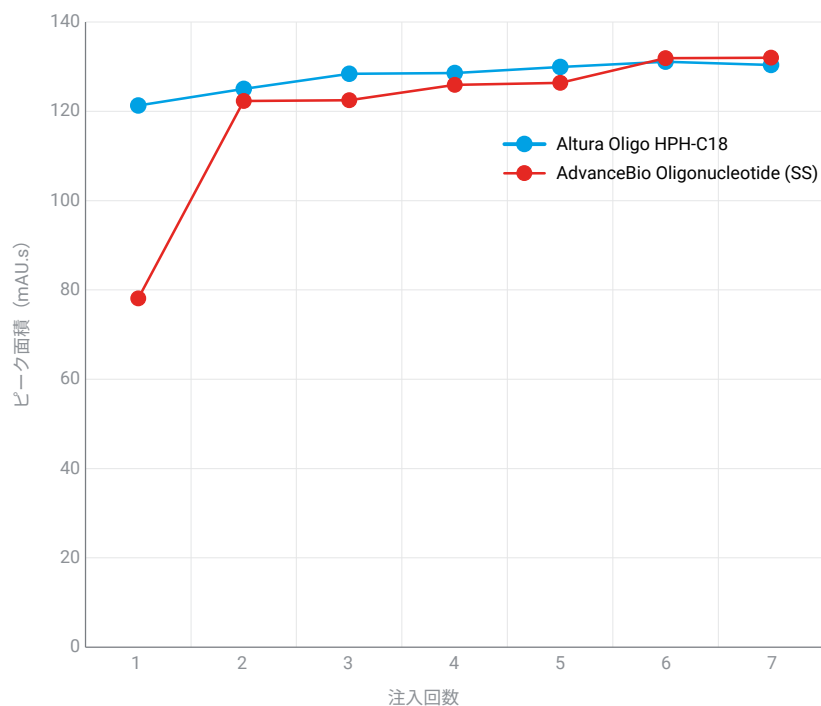


図1. オリゴヌクレオチドの回収率：ウルトライナートコーティングの Altura カラムとステンレス製の Agilent AdvanceBio カラムの比較

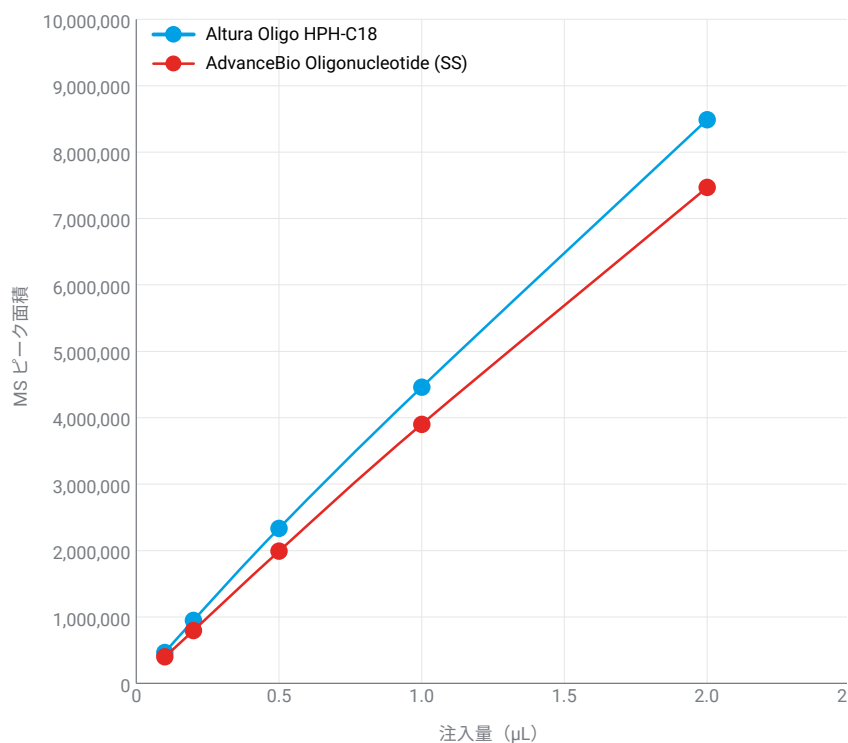


図2. オリゴヌクレオチドのピーク面積と注入量の関係：ウルトライナートコーティングの Altura カラムとステンレス製の Agilent AdvanceBio カラムの比較

初期のイオンペア逆相実験は、短いグラジエント時間と 0.6 mL/min という高流量を用いて実施しました（「メソッド条件」を参照）。これは成功しましたが、ピーク形状は理想的ではなく（データは示していません）、MS の結果からは、別のタイプの金属相互作用、つまり金属付加が実証されました（図 3 および 4）。

個々の電荷状態に対応する多数のピーク（最大のピークは、 $[M-4]^{4-}$  に対応）の代わりに、ウルトライナート（UI）コーティングの Agilent Altura Oligo HPH-C18 カラムと、ステンレス製の Agilent AdvanceBio Oligonucleotide カラムの両方において、個々の  $\text{Na}^+$  (+22) や  $\text{K}^+$  (+38) などのいくつかのプロトン、および  $[2 \text{Na}^+]$  (+44)、 $[\text{Na}^+ \text{K}^+]$  (+60)、 $[2 \text{K}^+]$  (+76) などのさまざまな組み合わせを置き換える、かなりのレベルのナトリウムおよびカリウム付加物を示しました。

これは、イオン交換により精製されたサンプルや、アルカリ金属イオンを含む溶液に溶解したサンプル中にアルカリ金属イオンが存在している可能性、または単にガラス製器具（ボトル、ボトルフィルタ）の使用によりアルカリ金属イオンが生じている可能性があることを示しています。

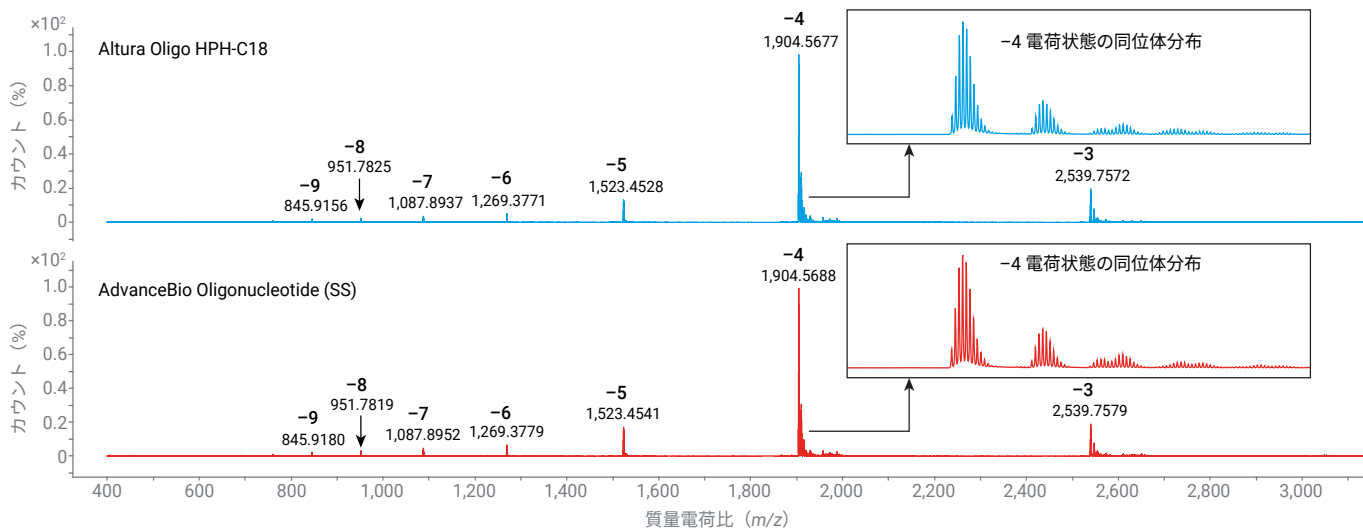


図 3. 25 mer DNA の質量スペクトル

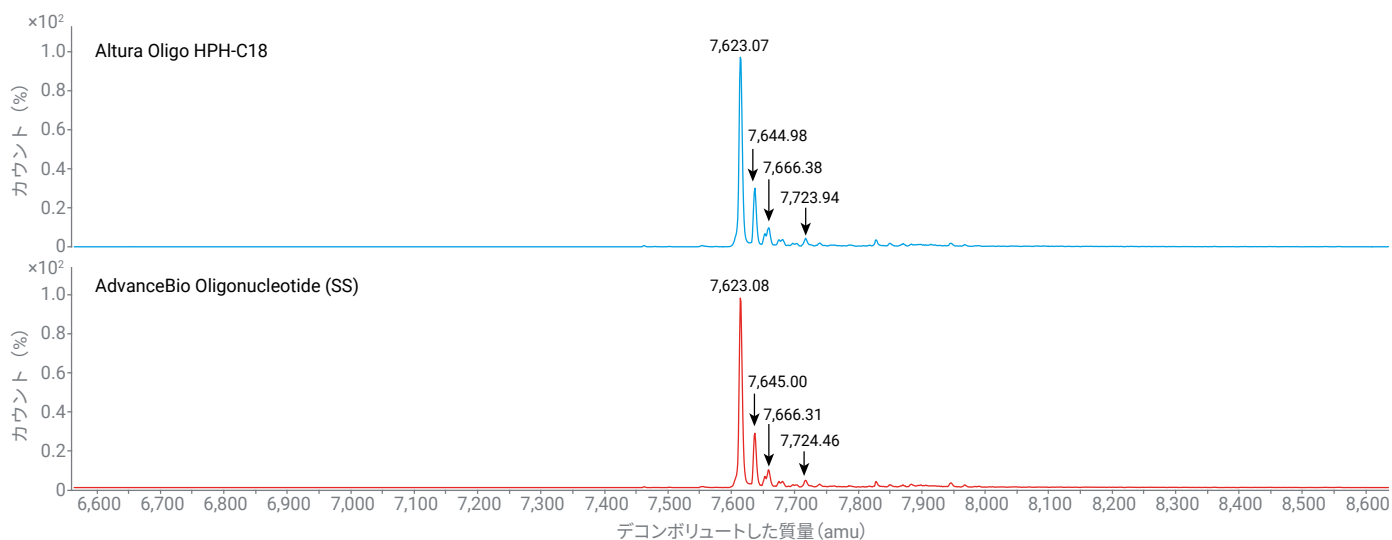


図 4. 平均質量を示す 25 mer DNA のデコンボリュートした質量スペクトル

サンプル調製時に、アルカリ金属イオンを新たに混入させないように細心の注意を払うことや、ポリプロピレン製の溶媒ボトルに切り替えることは、金属付加物の低減に役に立ちます。

さらに、流量を低くすることにより、ピーク形状と不純物の分解能が改善されることが判明しました (図 5A)。また、電荷状態の分布がわずかに変化し、観察される付加物のレベルを低減するのに効果があったことも確認されました (図 5B)。

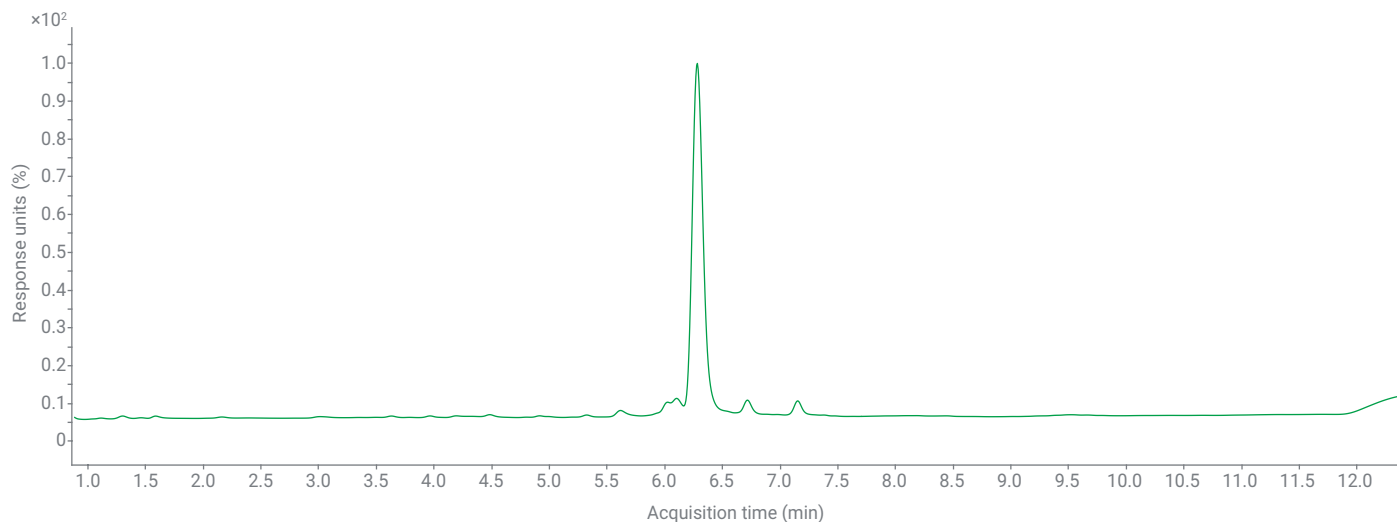


図 5A. イオンペア逆相 (0.21 mL/min) による 25 mer DNA の UV クロマトグラム

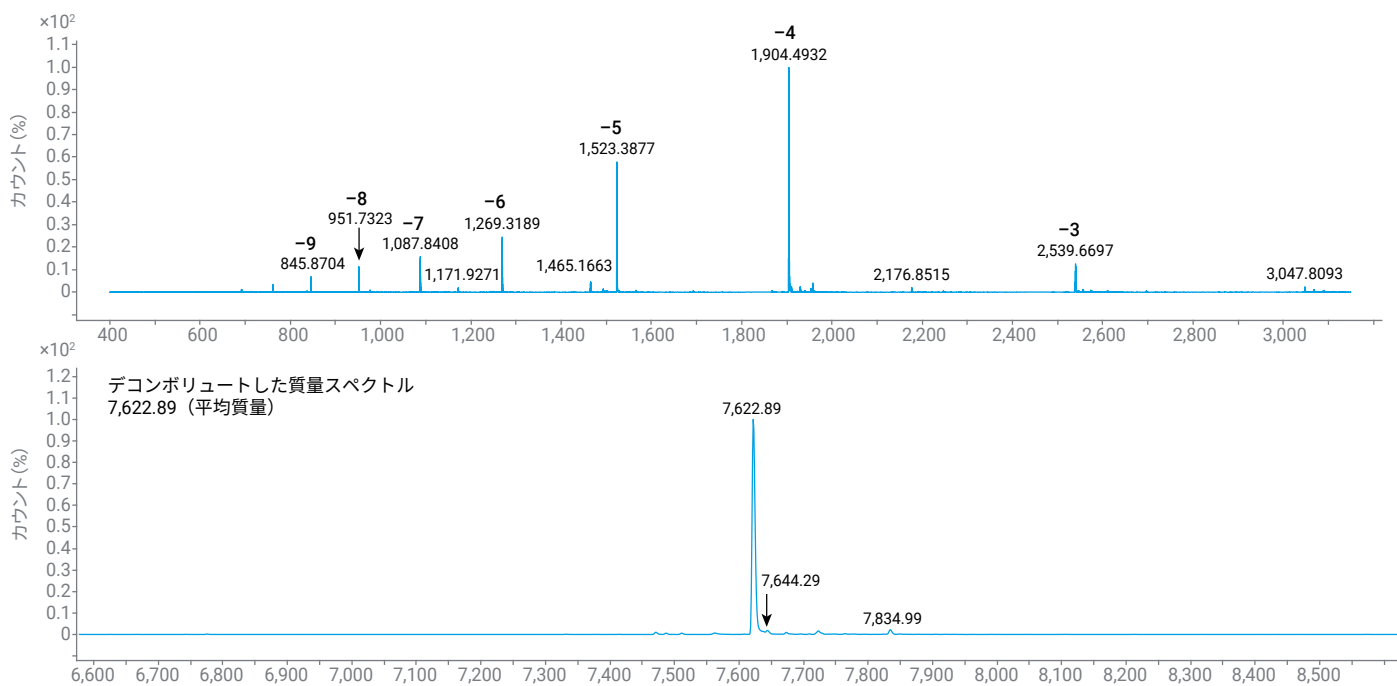


図 5B. イオンペア逆相 (0.21 mL/min) による 25 mer DNA の質量スペクトル (FBF) とデコンボリュートした質量スペクトル

より大きい DNA オリゴヌクレオチドの分析に対しても、同一のグラジエントと低流量を適用しました (図 6A)。

電荷状態の数は、より小さいオリゴヌクレオチドと比較して大幅に増加しており、低い電荷状態 (-5 および -6) の方が、高い電荷状態よりも付加物のレベルが高いという証拠が得られています (図 6B)。さらに、デコンボリュートした質量では、付加物が減少しています。

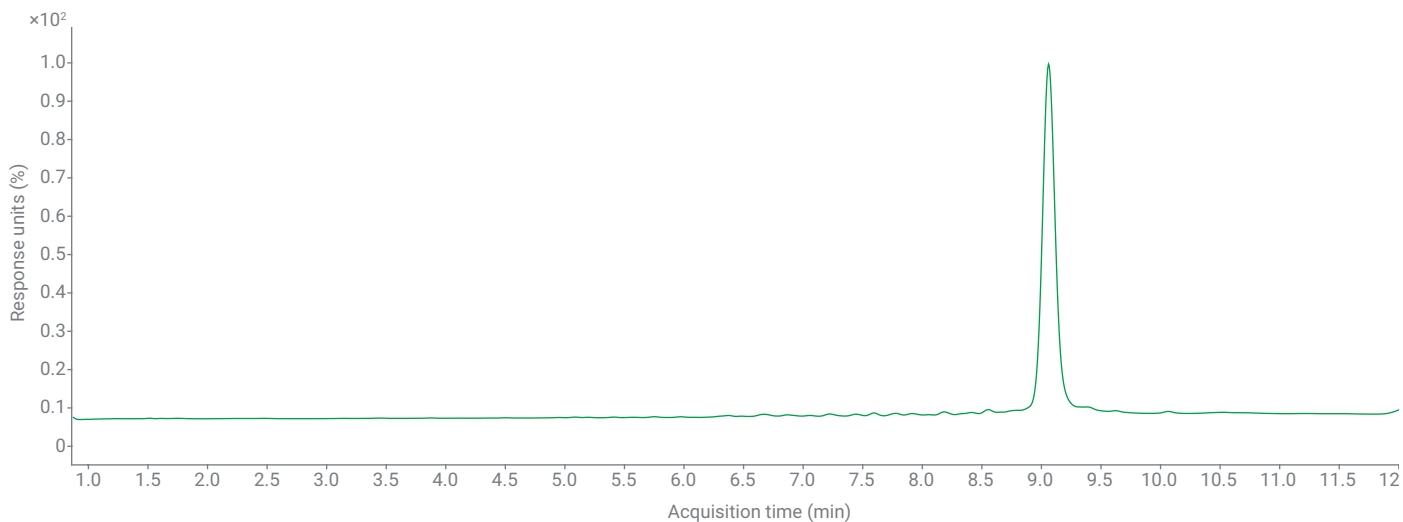


図 6A. イオンペア逆相 (0.21 mL/min) による 50 mer DNA の UV クロマトグラム

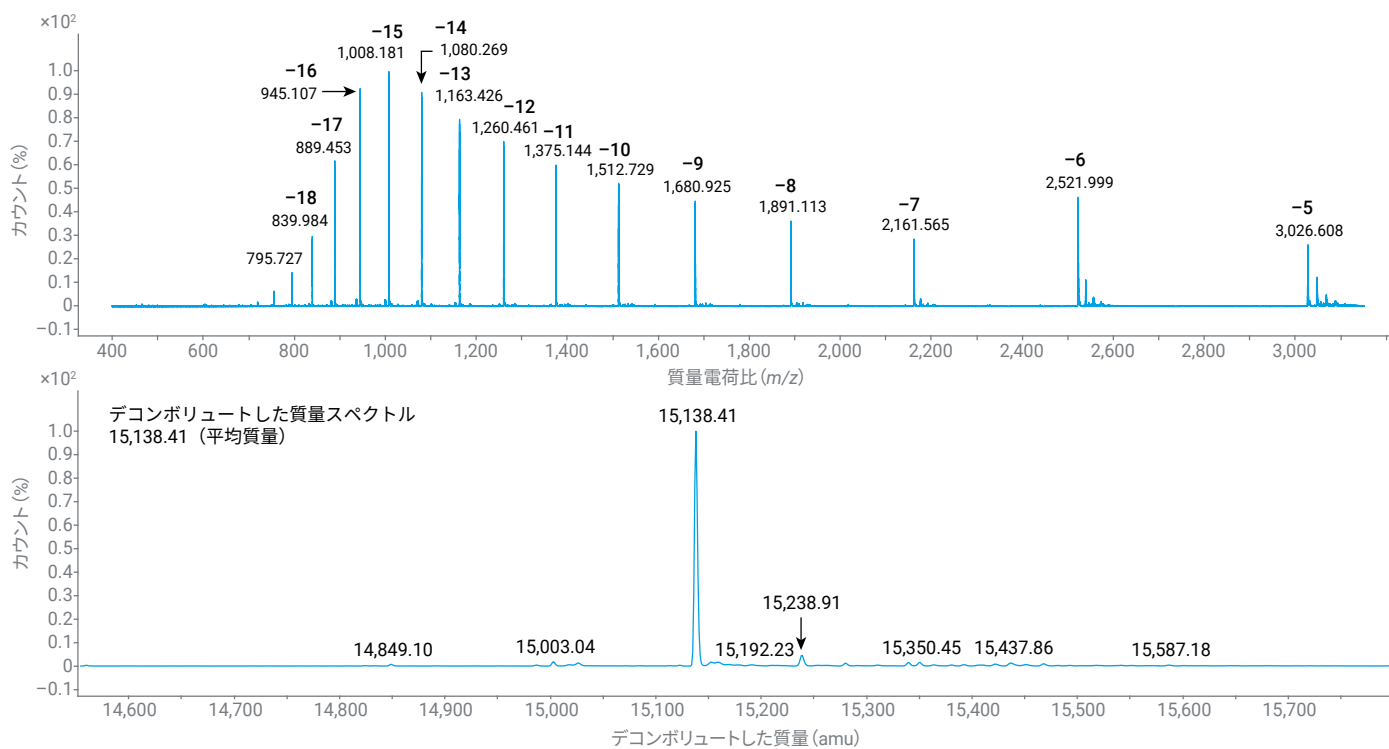


図 6B. イオンペア逆相 (0.21 mL/min) による 50 mer DNA の質量スペクトル (FBF) とデコンボリュートした質量スペクトル

3 番目に試験したオリゴヌクレオチドは、デオキシヌクレオチド塩基とリボヌクレオチド塩基の混合物で構成されていました。さらに、各リン酸基はチオール化されており、これによりエナンチオマー種が形成されます。

20 個のヌクレオチドを含む完全にチオール化されたオリゴヌクレオチドには、19 個のホスホチオエート基と  $2^{19}$  個のジアステレオ異性体が存在します。これにより、非チオール化分子と比較してピーク幅が大幅に広がりますが (図 7A)、各ジアステレオ異性体は同一の質量を持つため、質量スペクトルやデコンボリュートした質量は複雑化しません。

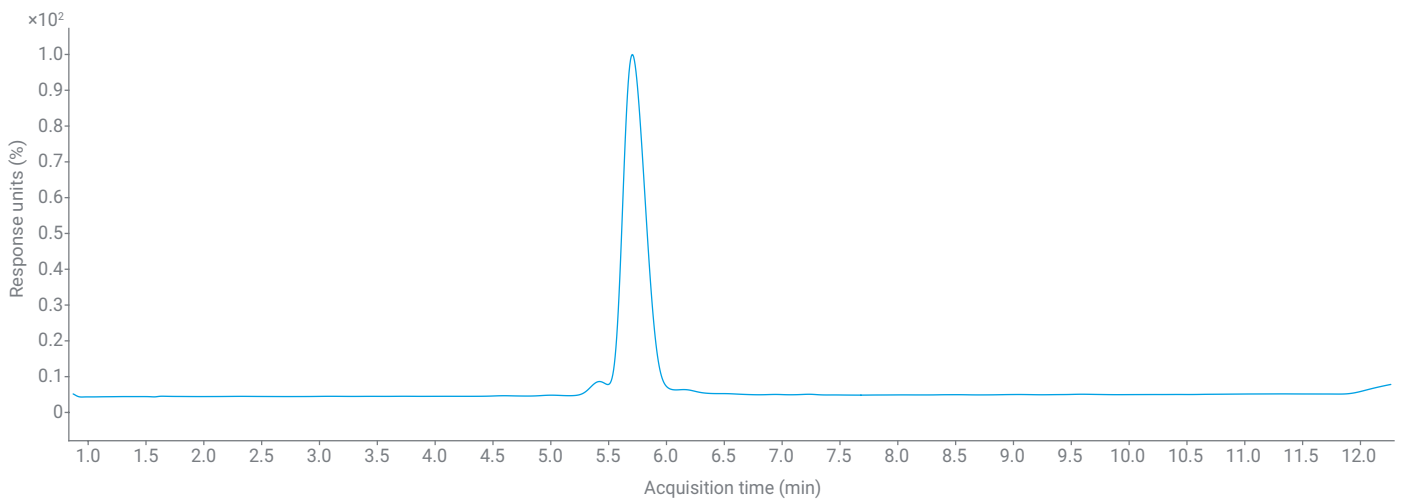


図 7A. イオンペア逆相 (0.21 mL/min) による完全にチオール化されたハイブリッドの UV クロマトグラム

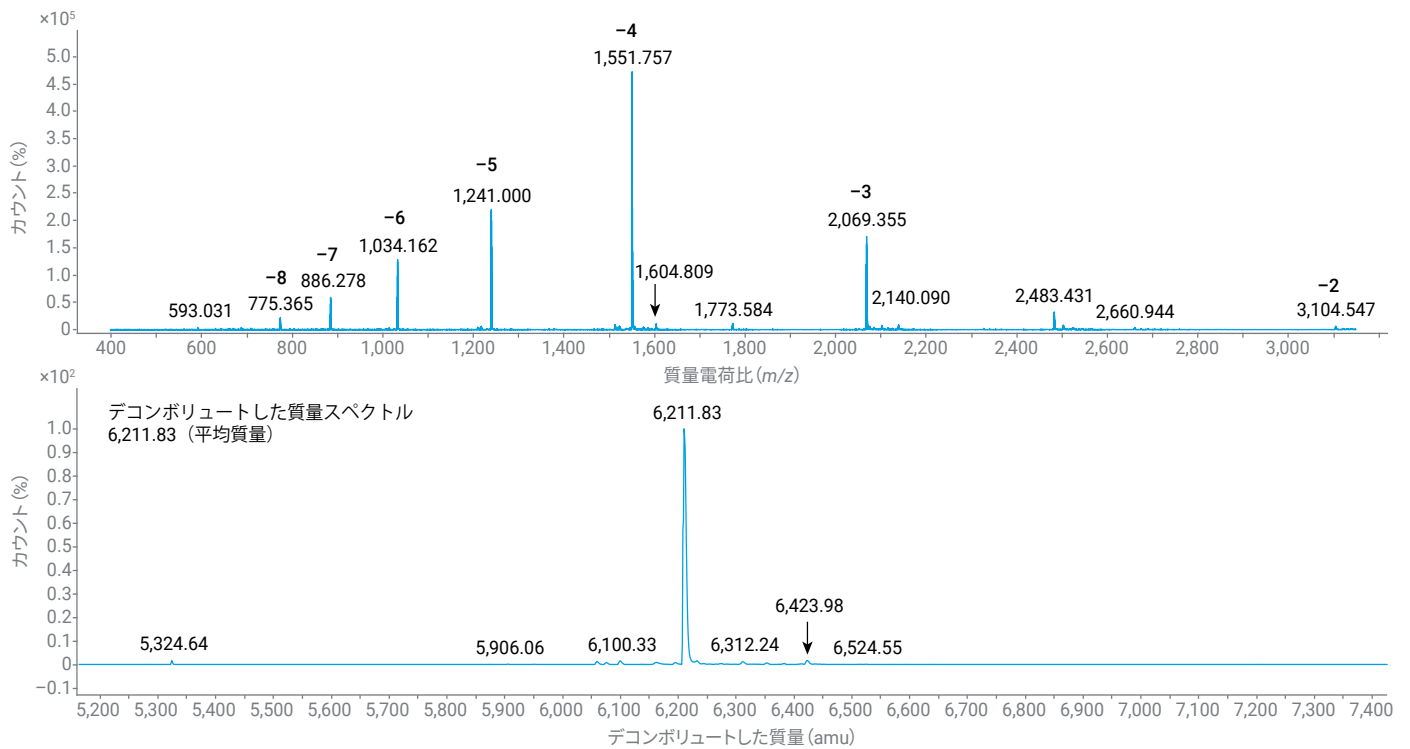


図 7B. イオンペア逆相 (0.21 mL/min) による完全にチオール化されたハイブリッドの質量スペクトル (FBF) とデコンボリュートした質量スペクトル

イオンペア逆相分析の後、同じサンプルについて、同じカラムを使用して、今度はイオンペアフリー条件下で分析を実施しました。

トリエチルアミン/HFIP を使用する代わりに、移動相は、希釈した重炭酸アンモニウム緩衝液で構成しました。カラムで十分なリテンションを得るためには、今までどおり、有機溶媒としてメタノールを使用する必要がありました。

分析を実施する前に、以前に使用したイオンペア試薬の痕跡をすべて除去するために、数回のブランクグラジエントを適用しました。

状況によって、特に HFIP を使用しないようにする必要がある場合は、イオンペアフリー条件を用いることが有利になる可能性があります。

イオンペアフリー条件下では、検出されるイオン種は、負に帯電するのではなく正に帯電するため、感度が向上します。これにより、図 8 に示すように、わずかに異なる電荷状態のエンベロップが生成されます。

さらに、(高流量のイオンペア逆相メソッドと比較して) 観察される付加物のレベルが低下しています。

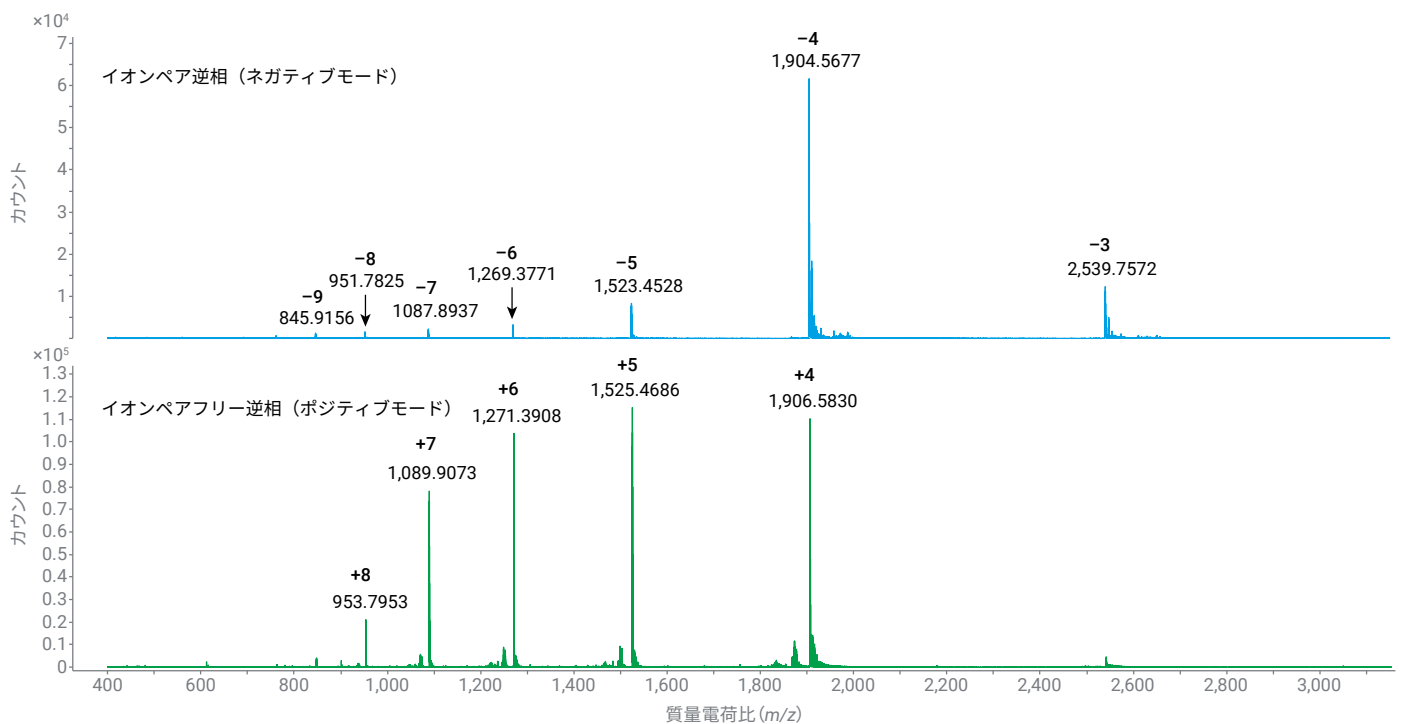


図 8. 25 mer DNA の質量スペクトル：Altura Oligo HPH-C18 カラムを用いたイオンペア逆相とイオンペアフリー逆相の比較

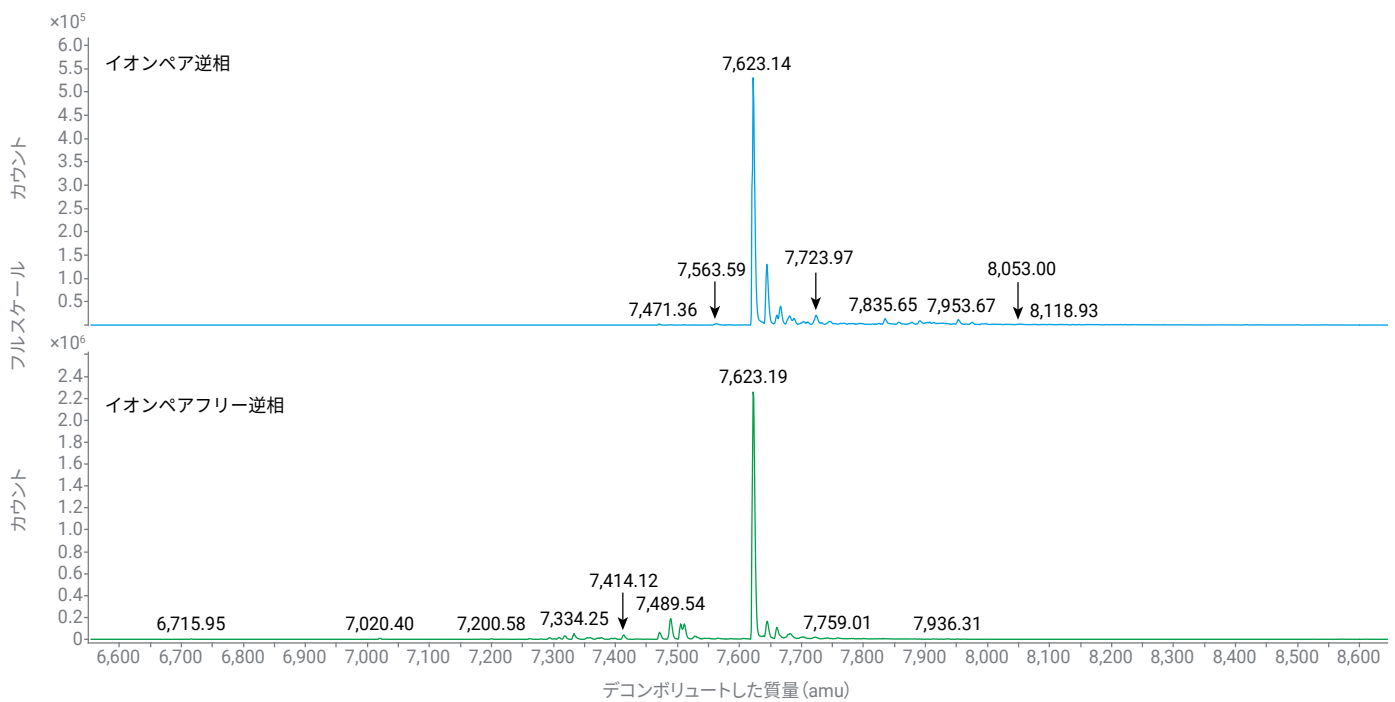


図 9. 25 mer DNA の平均質量のデコンボリュートした質量スペクトル：Altura Oligo HPH-C18 カラムを用いたイオンペア逆相とイオンペアフリー逆相の比較

完全にチオール化されたハイブリッドオリゴヌクレオチドにおいても、同様の挙動が観察されました。+4、+5、+6、+7、および+8の電荷状態のレベルが上昇し（図 10）、観察される付加物のレベルが低下していることが確認されました。

図 11 に示すように、デコンボリュートした質量値は（採用したネガティブモードとポジティブモードの MS 技術の違いを考慮しても）、互いに良好な一致を示しました。

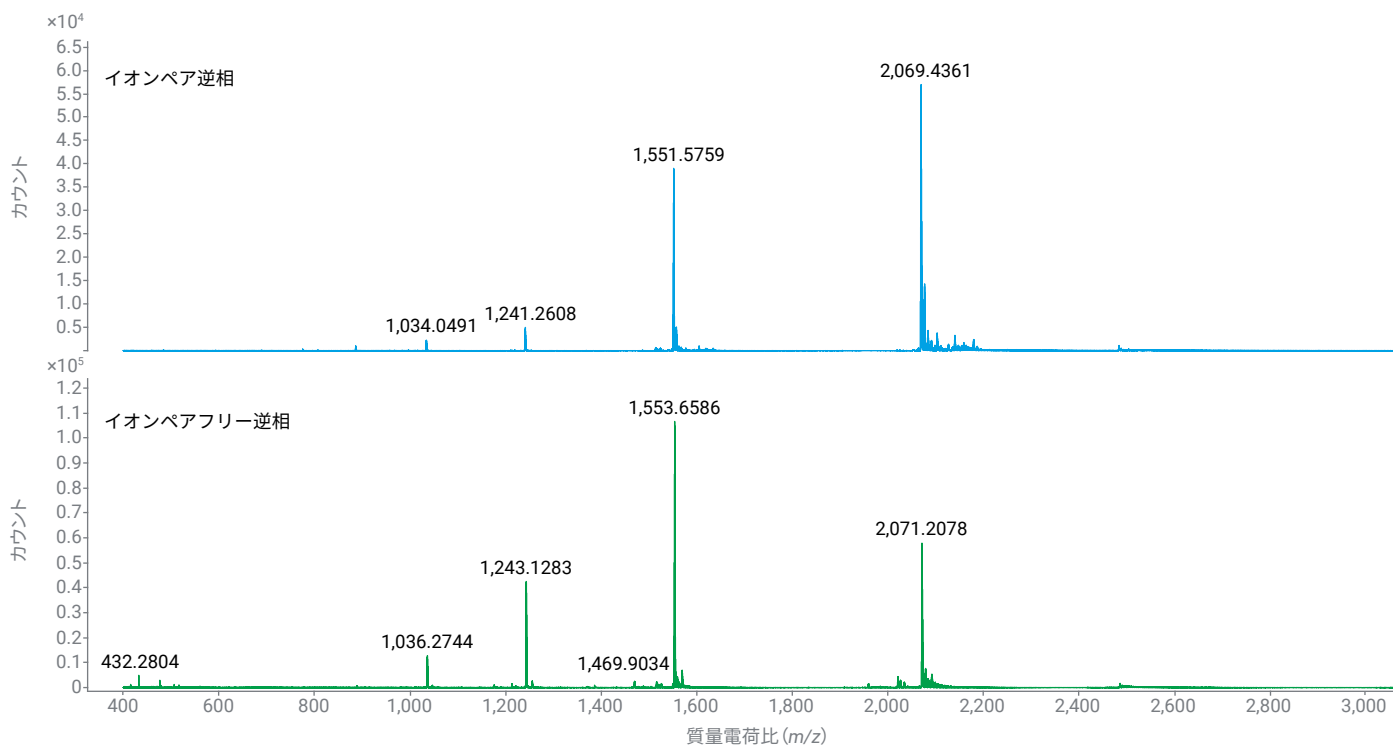


図 10. 完全にチオール化されたハイブリッドの質量スペクトル：Altura Origo HPH-C18 カラムを用いたイオンペア逆相とイオンペアフリー逆相の比較

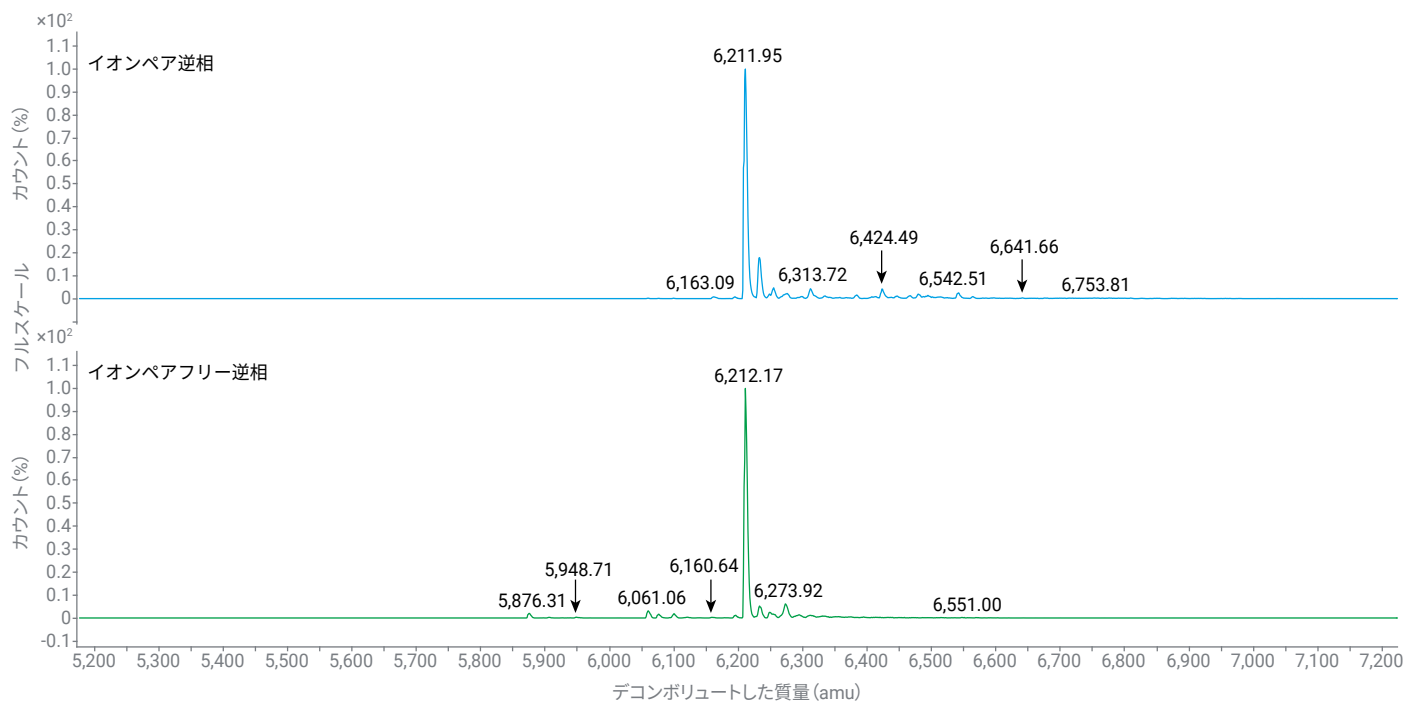


図 11. 完全にチオール化されたハイブリッドの平均質量のデコンボリュートした質量スペクトル：Altura Oligo HPH-C18 カラムを用いたイオンペア逆相とイオンペアフリー逆相の比較

## 結論

このアプリケーションノートでは、ステンレス製の HPLC カラムから Agilent ウルトライナート Altura Oligo HPH-C18 カラムに切り替えることにより、オリゴヌクレオチドのピーク形状とピーク面積を改善できることを実証しました。また、その他の実験の詳細に注意することで、アルカリ金属付加物の影響をさらに低減できます。モノアイソトピックの Find by Formula の結果を表 2 にまとめています。これによると、ウルトライナートの Altura Oligo HPH-C18 カラムを使用することにより、MS の精度が確実に向上することも明らかになっています。

## 参考文献

1. Vanhoenacker, G.; et al. LC/UV および LC/MS によるオリゴヌクレオチド分析のための各種イオンペア試薬の評価, Agilent Technologies application note, publication number 5994-2957JAJ, **2024**.
2. Bertram, L.; Hsiao, J. Analysis of Oligonucleotides Using an Ion-Pairing-Free Reversed-Phase Method with TOF LC/MS, Agilent Technologies application note, publication number 5994-8013EN, **2024**.
3. Hsiao, J.; Bertram, L.; et al. Evaluating HILIC Stationary Phases for Oligonucleotide Separation by LC/MS, Agilent Technologies application note, publication number 5994-8180EN, **2025**.

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://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](mailto: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。

DE-013246

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2025  
Printed in Japan, April 15, 2026  
5994-9018JAJ

表 2. 異なるカラムおよび技術を比較した MS 結果のまとめ

### イオンペア逆相(ヘキシルアミン/HFIP/メタノール)

	モノアイソトピック質量	Altura Oligo HPH-C18		AdvanceBio Oligonucleotide (SS)	
		観察される質量	誤差 (ppm)	観察される質量	誤差 (ppm)
25 mer DNA	7,619.2874	7,619.2917	0.56	7,619.2835	-0.51
50 mer DNA	15,131.5533	15,131.5521	-0.08	15,131.5427	-0.70
完全にチオール化された ON	6,207.5974	6,207.5629	-5.56	6,207.2018	-63.72
完全にチオール化された ON (低流量)	6,207.5974	6,207.5760	-3.52		

### イオンペアフリー逆相(重碳酸アンモニウム/アセトニトリル)

	モノアイソトピック質量	Altura Oligo HPH-C18 (イオンペアフリー)	
		観察される質量	誤差 (ppm)
25 mer DNA	7,619.2874	7,619.2927	0.69
50 mer DNA	15,131.5533	15,131.5605	0.48
完全にチオール化された ON	6,207.5974	6,207.5988	0.22