アプリケーションノート

医薬品とバイオ医薬品

不活性な流路でのヌクレオチドの HPLC-DAD 分析

Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システムと PEEK ライナ付 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラム

著者

Koen Sandra,
Jonathan Vandenbussche, Gerd Vanhoenacker, Ruben t' Kindt, and Pat Sandra
Research Institute for Chromatography (RIC),
President Kennedypark 26,
Kortrijk, Belgium

Sonja Krieger, Sonja Schneider, and Udo Huber
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

概要

ヌクレオチドなどのリン酸化合物は、ステンレス製部品と相互作用し、HPLC や LC/MS 分析において回収率の問題が生じることが知られています。このアプリケーションノートでは、Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システムと PEEK ライナ付 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムを用いたヌクレオチドの分析について説明します。この装置構成で達成される不活性な流路により、分析困難なリン酸化溶質の回収率が大幅に向上します。

はじめに

リン酸化合物のクロマトグラフィー分析は非常に困難です。リン酸基は流路でステンレス製部品と相互作用し、ピーク幅が広がり、ピークの損失が発生します。この現象は、特にリン酸化ペプチド、糖リン酸、ヌクレオチドの分析で示されてきました[1～6]。しかし、アジレントは先ごろ、サンプル流路全体がメタルフリーの場合、リン酸化グリカンを適切に分析できることを実証しました[7]。そのために、Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システムと PEEK ライナ付 HILIC カラムを用いました。本書では、分析困難なリン酸化化合物の分析例を拡張するために、ヌクレオチド分析を紹介します。従来のヌクレオチド分析では一般的に、金属とリン酸塩の錯体の形成を防ぐための対策が取られます。この対策には、高 pH 値での機器の運転、イオンペア試薬の使用、リン酸や炭酸塩によるステンレス製部品の処理、または金属キレート剤の移動相への添加があります。本書では、1260 Infinity II バイオイナート LC と PEEK ライナ付 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムを用いた、完全に不活性な流路でのヌクレオチド分析について説明します。

実験方法

材料

アセトニトリルと水はBiosolve（ファルケンスワールト、オランダ）から入手しました。酢酸アンモニウム、水酸化アンモニウム、ヌクレオシド、ヌクレオチドは、Merck（ダルムシュタット、ドイツ）から購入しました（図 1）。

サンプル前処理

ヌクレオチドとヌクレオシドは、濃度 100 ppm で水に溶解しました。

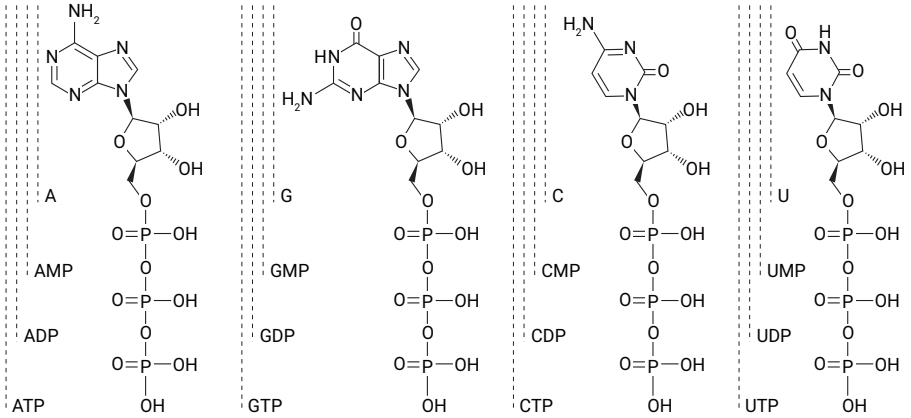

図 1. 今回の調査で使用したヌクレオシドとヌクレオチド。A：アデノシン、G：グアノシン、C：シチジン、U：ウリジン

装置構成

HILIC-DAD 測定は、次の装置構成で実施しました。

Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システム：

- 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 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット（G7116A）、バイオイナート熱交換器（オプション #019）を搭載
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 WR（G7115A）、バイオイナート標準フローセル（10 mm、オプション #028）付き

Agilent 1260 Infinity II LC システム：

- Agilent 1260 Infinity II クォータナリポンプ（G7111B）
- Agilent 1260 Infinity II バイアルサンプラ（G7129A）
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット（G7116A）
- Agilent 1260 Infinity II 多波長検出器（G7165A）、標準フローセル（10 mm、オプション #018）付き

Agilent OpenLab CDS バージョン 2.1 ソフトウェアを使用しました。

メソッド

パラメータ	設定値
カラム	InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z、ステンレス製、2.1 × 100 mm、2.7 µm（p/n 685775-924） InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z、PEEK ライナ付、2.1 × 100 mm、2.7 µm（p/n 675775-924）
移動相 A	10 mM 酢酸アンモニウム、pH 9
移動相 B	アセトニトリル/100 mM酢酸アンモニウム、pH 9（90:10）（v/v）
グラジエント	0 ～ 12 分: 90 ～ 48 % B 12 ～ 13 分：48 % B 13 ～ 13.1 分：48 ～ 90 % B 13.1 ～ 22 分：90 %B
流量	0.4 mL/min
カラム温度	35 °C
注入量	1 µL
検出	260 nm、バンド幅 4 nm、リファレンスなし、10 Hz

結果と考察

最近のアプリケーションノートでは、ステンレス製機器でのアデノシン三リン酸（ATP）の分析時における著しいピークテーリングや面積減少が示されました。この問題の原因は、リン酸鉄の錯体の形成であると仮定されました。一方、Agilent 1260 Infinity バイオイナートクオータナリ LC のメタルフリー流路を用いた場合、正規分布のピーク形状と完全な回収率が得られました[6]。先行研究では、カラムの効果については説明されていません。近年、ステンレス製ハウジングに PEEK ライナ付カラムが採用されるようになり、分析困難な溶質の LC 分析を完全に不活性な流路で実施する機会が広がりました。

図 2 から図 5 に、ステンレス製および PEEK ライナ付 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムを 1260 Infinity II バイオイナート LC および 1260 Infinity II LC に取り付けて、さまざまなヌクレオチドやヌクレオシドを分析した結果を示します。ステンレス製カラムと PEEK ライナ付カラムでは、ヌクレオチドの分析結果が明らかに異なりました。非リン酸化ヌクレオシドアデノシン、シチジン、グアノシン、ウリジンは、両方のカラムで等しく適切に分析され、同等のカラム品質を示しました。しかし、リン酸化合物は、ステンレス製カラムではピークテーリングが生じ、回収率が低下します。また、リン酸基が多くなるほど、回収率は低下します。これらの分析データから分かるように、機器自体もピーク形状や回収率に無視できない影響を与えます。

1260 Infinity II バイオイナート LC に取り付けた PEEK ライナ付 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムを用いると、すべてのヌクレオチドでピーク形状と回収率の向上がみられました。このことから、流路から金属部品をすべて除去すること（機器とカラムの不活性化）

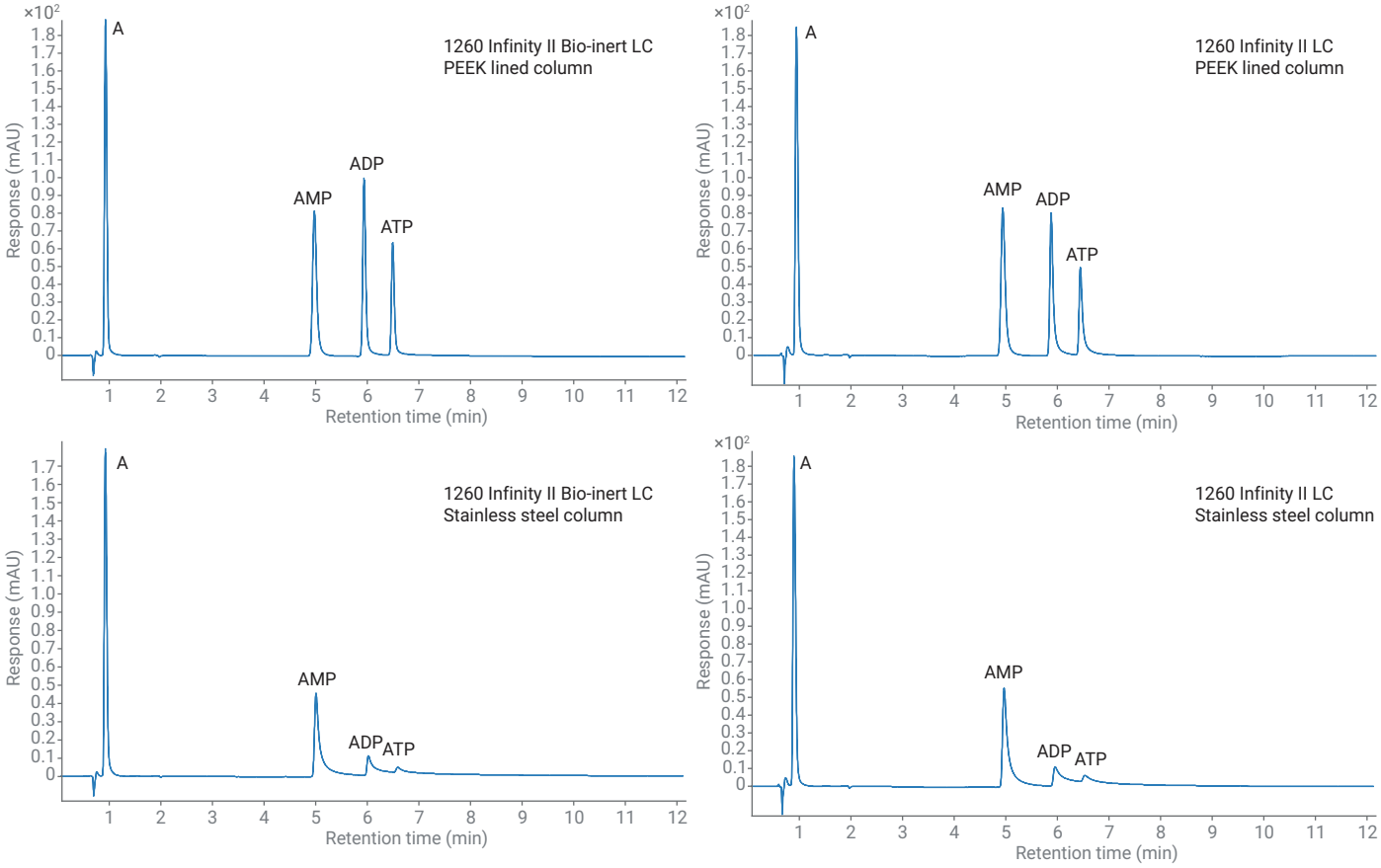

図 2. 1260 Infinity II バイオイナート LC および 1260 Infinity II LC に取り付けたステンレス製および PEEK ライナ付 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムでのアデノシン（A）、AMP、ADP、ATP の HILIC-DAD クロマトグラム

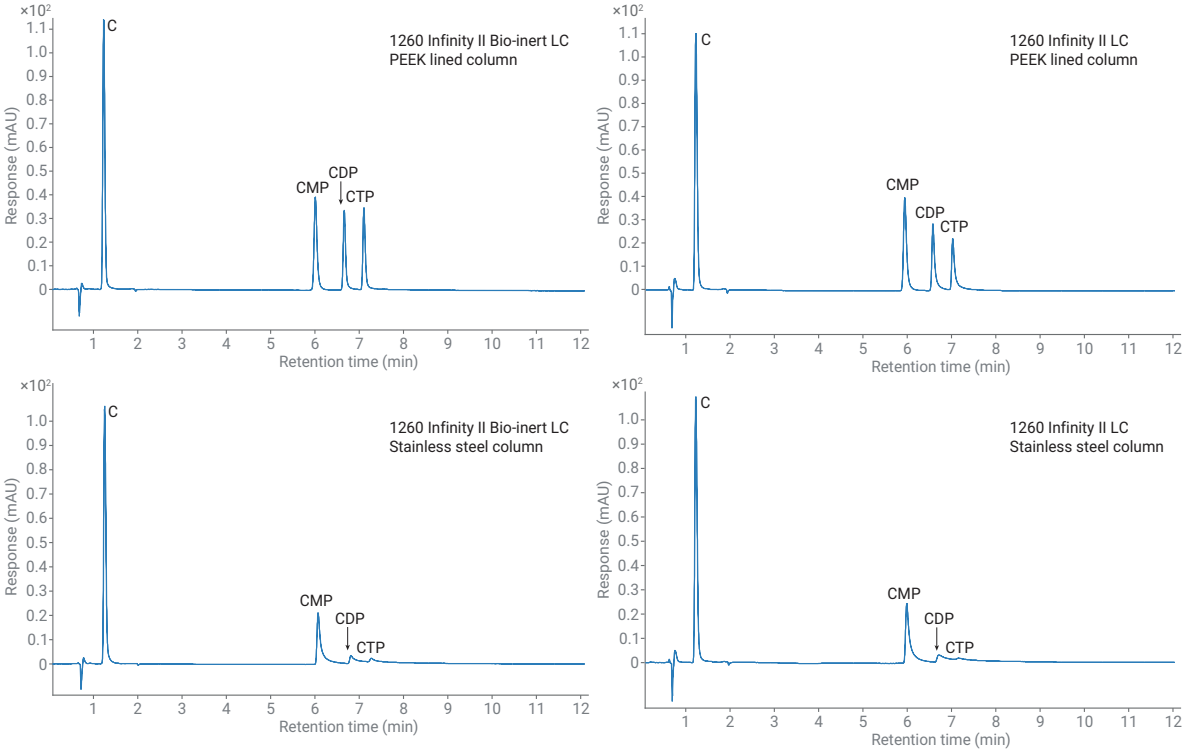

図 3. 1260 Infinity II バイオイナート LC および 1260 Infinity II LC に取り付けたステンレス製および PEEK ライナ付 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムでのシチジン（C）、CMP、CDP、CTP の HILIC-DAD クロマトグラム

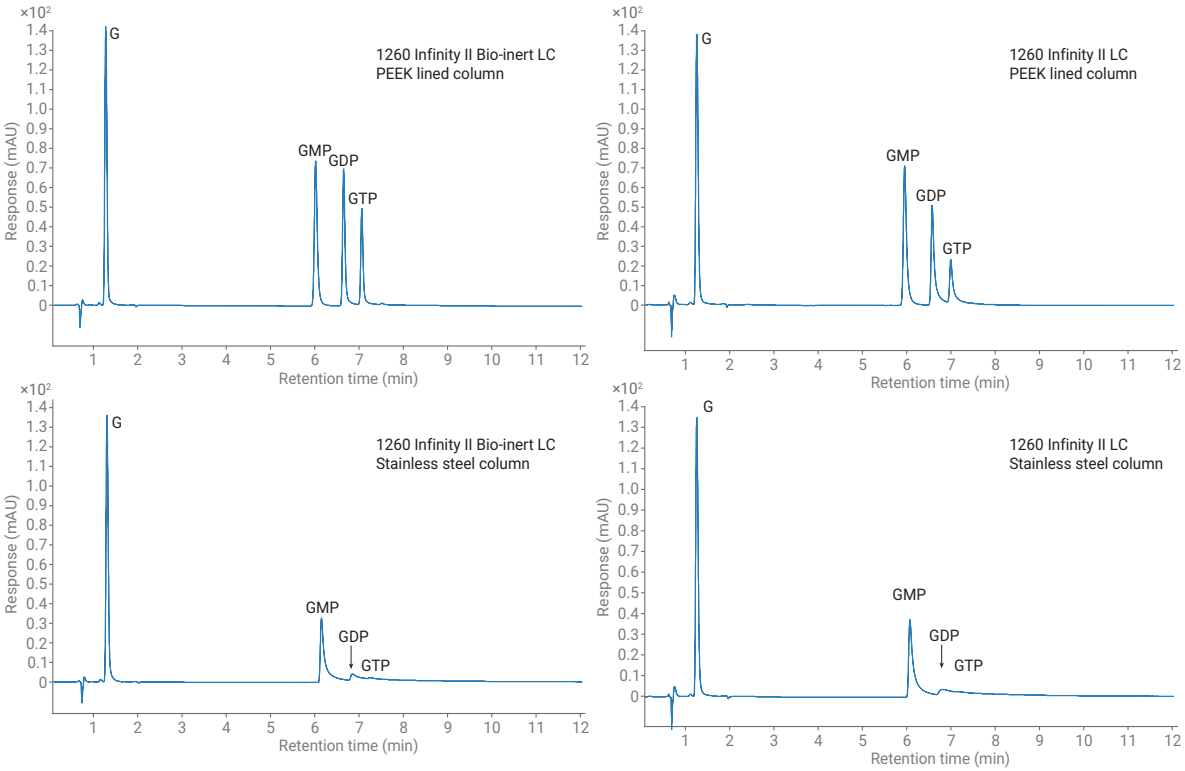

図 4. 1260 Infinity II バイオイナート LC および 1260 Infinity II LC に取り付けたステンレス製および PEEK ライナ付 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムでのグアノシン（G）、GMP、GDP、GTP の HILIC-DAD クロマトグラム

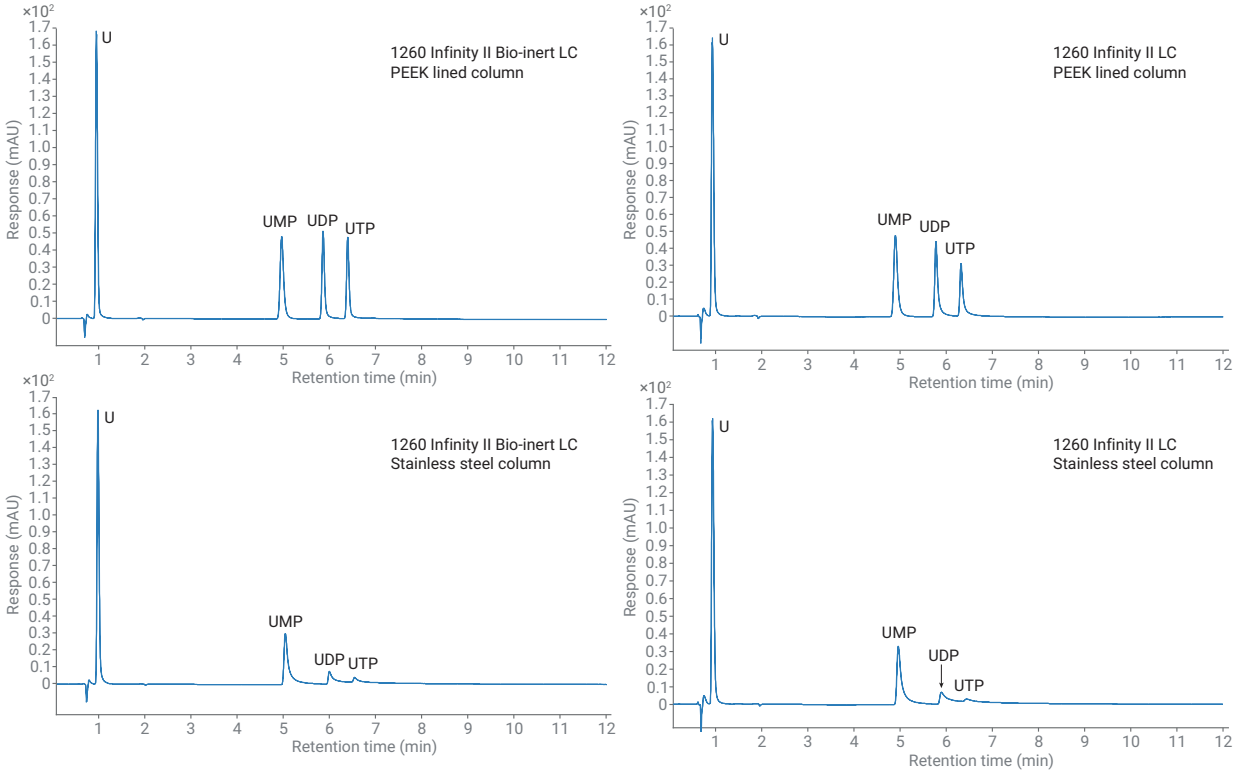

図 5. 1260 Infinity II バイオイナート LC および 1260 Infinity II LC に取り付けたステンレス製および PEEK ライナ付 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムでのウリジン（U）、UMP、UDP、UTP の HILIC-DAD クロマトグラム

が重要であることが分かります。さらに、表 1 のデータもこれらの結果を裏付けています。ステンレス製流路を不活性な流路と比べると、面積回収率の減少がみられます。この減少では、ピーク高さの回収率が大幅に低下し、ピーク形状が悪化しています。

1260 Infinity II バイオイナート LC および 1260 Infinity II LC にステンレス製および PEEK ライナ付 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムを取り付けて、アデノシン AMP、ADP、ATP を 4 回繰り返し分析して得られたリテンションタイム、ピーク面積、面積 %、ピーク高さの relative standard deviation（RSD）値を表 2 に示します。優れた不活性度により、分析困難な溶質の分析において性能指数が向上すると結論付けることができます。図 6 に、表 2 に対応するクロマトグラムを示します。

表 1. 1260 Infinity II バイオイナート LC に取り付けた PEEK ライナ付InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムで分析した異なる溶質のリテンションタイム、ピーク面積、面積 %、ピーク高さと、1260 Infinity II バイオイナート LC および 1260 Infinity II LC に取り付けたステンレス製および PEEK ライナ付 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムで分析した異なる溶質について得られた回収率

化合物	PEEK ライナ付カラムとバイオイナート HPLC システム（完全な不活性）				% 回収率 完全な不活性に対する SS カラム/SS HPLC（面積）	% 回収率 完全な不活性に対する SS カラム/SS HPLC（高さ）	% 回収率 完全な不活性に対する SS カラム/イナート HPLC（面積）	% 回収率 完全な不活性に対する SS カラム/イナート HPLC（高さ）	% 回収率 完全な不活性に対する PEEK ライナ付カラム/SS HPLC（面積）	% 回収率 完全な不活性に対する PEEK ライナ付カラム/SS HPLC（高さ）
	RT（分）	面積	面積 %	高さ						
アデノシン	0.86	633.8	34.6	189.8	106.2	95.8	100.1	95.5	109.1	98.3
AMP	4.91	477.9	26.1	82.1	96.2	66.5	82.3	56.4	108.1	102.6
ADP	5.88	431.2	23.6	100.8	41.3	11.0	35.3	11.7	96.5	80.7
ATP	6.43	288.0	15.7	64.5	49.2	9.9	40.8	8.2	102.5	78.3
シチジン	1.18	379.7	44.2	113.1	110.0	94.7	100.3	94.6	110.8	96.9
CMP	5.98	192.4	22.4	39.1	95.2	61.9	80.9	55.1	109.0	101.9
CDP	6.64	138.7	16.1	33.7	41.5	9.9	35.8	10.9	105.5	85.1
CTP	7.09	148.4	17.3	34.7	30.7	5.7	31.7	7.4	86.1	64.2
グアノシン	1.21	496.0	36.7	139.2	109.1	96.3	100.2	95.4	110.2	98.6
GMP	6.01	360.3	26.7	72.5	90.0	51.5	71.9	44.6	110.0	98.0
GDP	6.65	288.7	21.4	68.6	27.0	5.6	24.2	6.3	101.6	74.2
GTP	7.06	205.6	15.2	48.7	25.8	5.7	27.0	5.0	82.0	48.3
ウリジン	0.88	523.1	42.6	168.5	110.3	96.1	101.1	96.2	111.1	98.0
UMP	4.96	275.5	22.4	48.3	100.1	68.7	87.4	63.1	108.8	100.5
UDP	5.87	222.7	18.1	51.8	50.2	14.0	41.8	15.5	105.3	87.0
UTP	6.41	206.4	16.8	48.1	55.8	7.0	50.6	9.3	89.4	66.4

表 2. 1260 Infinity II バイオイナート LC および 1260 Infinity II LC に取り付けたステンレス製および PEEK ライナ付 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムで 4 回繰り返し分析したアデノシン、AMP、ADP、ATP のリテンションタイム、ピーク面積、面積 %、ピーク高さの RSD

化合物	SS カラムと SS HPLC システム				SS カラムとバイオイナート HPLC システム				PEEK ライナ付カラムと SS HPLC システム				PEEK ライナ付カラムとバイオイナート HPLC システム（完全な不活性）			
	RT（分）	面積	面積 %	高さ	RT（分）	面積	面積 %	高さ	RT（分）	面積	面積 %	高さ	RT（分）	面積	面積 %	高さ
アデノシン	0.10	1.69	2.24	0.80	0.11	0.11	1.98	0.11	0.10	0.44	0.27	0.34	0.06	0.14	0.14	0.23
AMP	0.11	1.62	2.26	2.24	0.18	2.04	0.15	4.07	0.03	0.63	0.11	0.50	0.04	0.14	0.04	0.53
ADP	0.21	10.52	7.00	21.04	0.12	6.65	4.83	14.32	0.04	0.94	0.32	1.21	0.02	0.46	0.32	0.20
ATP	0.28	10.35	6.82	16.91	0.14	5.20	3.34	13.07	0.04	0.96	0.34	1.79	0.02	0.19	0.17	0.32

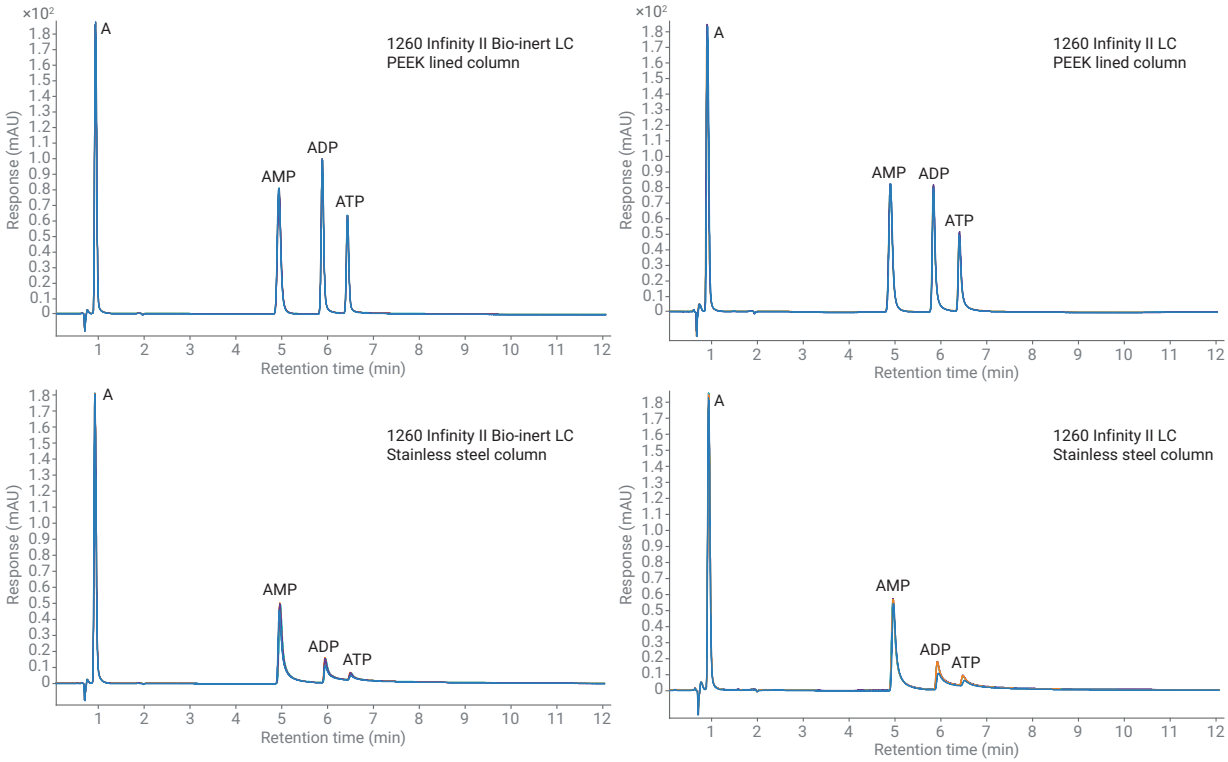

図 6. 1260 Infinity II バイオイナート LC および 1260 Infinity II LC に取り付けたステンレス製および PEEK ライナ付 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムでのアデノシン（A）、AMP、ADP、ATP の 4 回繰り返し注入

結論

このアプリケーションノートでは、1260 Infinity II バイオイナート LC と PEEK ライナ付 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラムを用いたヌクレオチドの分析について説明しました。金属部品のない流路の使用、すなわち機器とカラムの不活性化によって、分析が困難なリン酸化合物であっても分析が可能になることが実証されました。

参考文献

1. Wakamatsu, A.; *et al.* 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(14)*, 1823–1830.
2. Liu, S.; *et al.* Formation of Phosphopeptide-Metal Ion Complexes in Liquid Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry and Their Influence on Phosphopeptide Detection. Rapid Commun. *Mass Spectrom*. **2005**, *19(19)*, 2747-2756.
3. Tuytten, R.; *et al.* Stainless Steel Electrospray Probe: a Dead End for Phosphorylated Organic Compounds? *J. Chromatogr.A* **2006**, *1104*, 209-221.
4. Asakawa, Y.; *et al.* Suppression Effects of Carbonate on the Interaction Between Stainless Steel and Phosphate Groups of Phosphate Compounds in High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr.A* **2008**, 1198–1199, 80–86.
5. Sakamaki, H.; *et al.* Evaluation of Column Hardware on Liquid Chromatography-Mass Spectrometry of Phosphorylated Compounds. *J. Chromatogr.A* **2015**, *1381*, 125-131.
6. Schneider, S. Analysis of Phosphate Compounds with the Agilent 1260 Infinity Bio-Inert Quaternary LC System. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-0025EN, **2012**.
7. Sandra, K.; Vandenbussche, J.; Sandra, P. Analyzing Phosphorylated N-Glycans with Full Recovery on Bio-Inert LC Systems and PEEK-Lined HILIC Columns. *LCGC* **2018**, *31(10)*, 566–571.
8. 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*, 9457–9464.

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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2019

Printed in Japan, April 1, 2019
5994-0680JAJP

Agilent
Trusted Answers