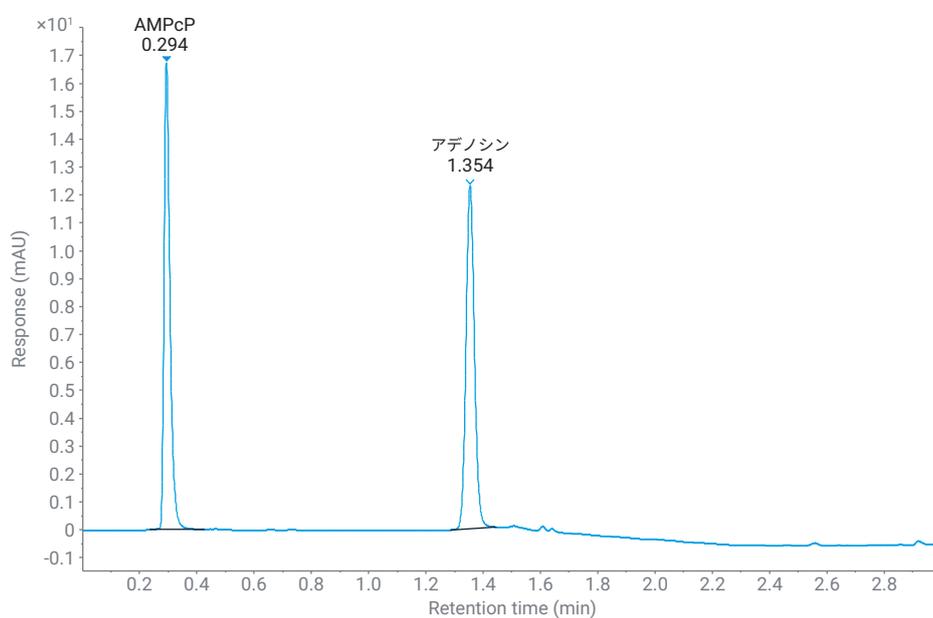


## Agilent 1290 Infinity II Bio LC を用いた 核酸分析における不活性度の実証



### 著者

Sonja Schneider  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

低吸着超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) システムは、金属キレート成分の分析に優先的に選ばれる方法です。このアプリケーションノートは、等モル量のアデノシンと1つの対応する核酸を使用したテストサンプルの分析について紹介します。サンプルは、2つの分子間の面積比を計算して、核酸のリン酸基と LC 金属表面の間の相互作用を明らかにします。Agilent 1290 Infinity II Bio LC は、 $0.95 \pm 0.01$  の比率で、機能的な低吸着システムとして優れた性能を示しました。このシステムは、金属に吸着しやすい化合物の分析において最も信頼性の高いデータを提供しました。

## はじめに

LC システムの不活性度は、クロマトグラフィーの世界では好ましい目標です。ところで不活性度はどのように定義すればよいのでしょうか？不活性な LC システムは、クロマトグラフィーシステム内のサンプルと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と考えることができます。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、また分析サンプルの回収率が大幅に低下することがあります。<sup>1,2</sup>

キレート化分析対象物と金属、特にリン酸基と鉄含有ステンレス成分の間の相互作用は、特に難しい問題です。LC システムの不活性度を実証するために、核酸などの金属と反応しやすい化合物をシステムの不活性度の指標として使用できます。核酸のピークテーリングとサンプル損失に対する鉄含有 LC 流路の大きな影響は、Bio LC とステンレス LC 同等物との比較の中で以前から示されています。<sup>3</sup>

このアプリケーションノートでは、アデノシンとアデノシン二リン酸の非加水分解性類似体（アデノシン 5'- $\alpha$ 、 $\beta$ -メチレン）二リン酸（AMPcP）の等モル混合物を使用した確立されたテストサンプル<sup>4</sup>を使用しました。サンプル結果は、Agilent Infinity II 1290 Bio LC が不活性であること示しています。1290 Infinity II Bio LC システムは、MP35N を主材料として構成されており、流路に鉄含有ステンレス部品は含まれていません。この吸着システムは、バイオクロマトグラフィーで使用される条件向けに特別に設計されています。2M の NaCl、最大 8 M の尿素などの高塩濃度、および 0.5 M NaOH や 0.5 M HCl などの高 pH および低 pH 溶媒でも、腐食のリスクが小さく、優れた再現性と安定性を維持した長期使用が可能です。

## 実験方法

### 機器

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムのモジュール構成は次のとおりです。

- 1290 Infinity II フレキシブルポンプ (G7131A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンプルラ (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)、イナート仕様のマイクロフローセル、3 mm、2  $\mu$ L、RFID タグ (G1314-60189) 付き

### ソフトウェア

Agilent OpenLab CDS バージョン 2.6 以降

### カラム

ACQUITY PREMIER HSS T3 カラム、1.8  $\mu$ m、2.1 mm x 50 mm (部品番号 186009467)

**注：**カラム、サンプル、溶媒、およびその他の境界条件は、参考文献 4 によるものと同じです。

### 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  $\mu$ m 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) を装着した Milli-Q Integral システムで精製しました。酢酸アンモニウムとトリフルオロ酢酸 (TFA) 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

Waters PREMIER AMPcP およびアデノシン標準 (部品番号 186009755)。標準液は水 200  $\mu$ L に再溶解しました。バイアルあたり 3.400  $\mu$ g (7.6 nmol) の AMPcP と 2.140  $\mu$ g (8 nmol) のアデノシンが含まれており、両方の分子はほぼ等モル量です。

## 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) 水中の 10 mM 酢酸アンモニウム B) 90 % ACN + 10 % 水、10 mM 酢酸アンモニウム、0.1 % TFA
グラジエント	0 分 : 5 % B 3 分 : 95 % B ストップタイム : 3 分 ポストタイム : 5 分
流量	0.400 mL/分
温度	35 °C
検出	260 nm 20 Hz
注入	注入量 : 1 $\mu$ L サンプル温度 : 10 °C ニードル洗浄 : 水で 3 秒間

## 結果と考察

アデノシンと AMPcP を含む確立されたテストサンプルを使用して、1290 Infinity II Bio LC の不活性度を分析しました。核酸には電子が豊富なリン酸基があるため、露出した鉄含有金属サイトに吸着するリスクが高くなります。サンプルには、ニュートラル/ネガティブコントロールプローブとしてアデノシンが、核酸の例として AMPcP が含まれています。アデノシンは AMPcP と同じ分子構造塩基を持っていますが、金属表面に吸着しやすいリン酸部分が付いていません。この等モルの組成を用いて、ピーク面積を比較し、比率を決定することができます。最適な不活性システムでは、使用する UV 検出器が同等の性能を示すと仮定すると、両方の分子が流路表面への吸着を示さないため、この比率は約 1 になると考えられます。ステンレスシステムでは通常、AMPcP/アデノシン比は 1 をはるかに下回ります。

図 1 は、不活性カラムハウジングを使用した 1290 Infinity II Bio LC での AMPcP/アデノシンの 5 回の連続分析結果を示しています。したがってこの結果は、LC システムの影響のみを評価するのに使用できます。リテンションタイム (RT) と面積は優れた再現性を示し (図 1)、さらに AMPcP/アデノシンの面積比は 0.95 となりました。この値は、1290 Infinity II Bio LC システムが、核酸および類似のリン酸化化合物を高い信頼性で分析するのに最適であることを示しています。

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。

DE05871705

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, June 22, 2022

5994-4893JAJP

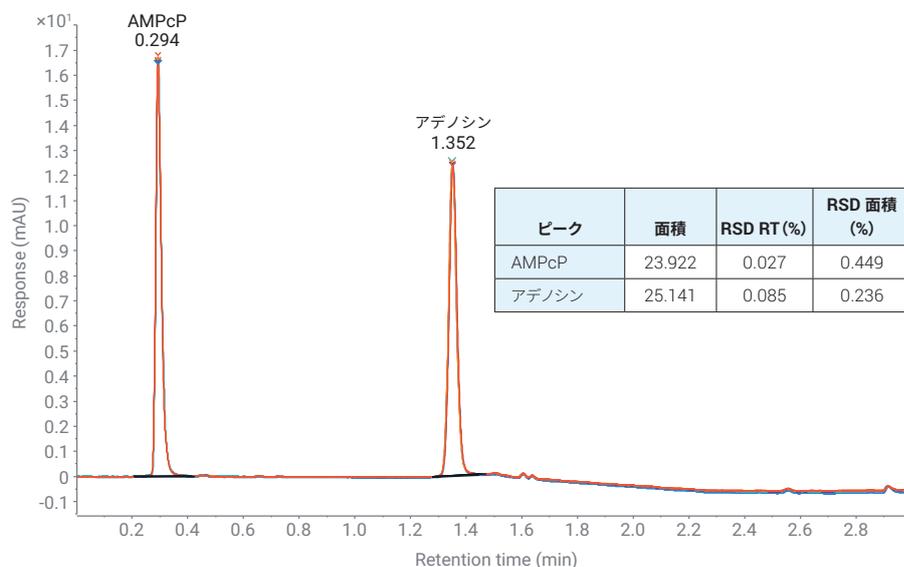


図 1. Agilent 1290 Infinity II Bio LC でのテストサンプルの 5 回連続分析の重ね表示。AMPcP/アデノシンの面積比は 0.95 でした。

## 結論

MP35N を主な素材とする低吸着 LC システムである Agilent 1290 Infinity II Bio LC は、鉄と反応しやすいリン酸化核酸の分析に優れた性能を示します。中性標準として等量のアデノシンを使用し、鉄に反応性の高い成分として AMPcP を使用したサンプルを用いて、LC 金属表面への吸着量を決定しました。結果として得られた比率は 0.95 で、1290 Infinity II Bio LC は、低吸着相互作用に関して優れた性能を発揮しただけでなく、RT および面積の高い再現性も実現しました。1290 Infinity II Bio LC システムは、金属表面と高い親和性を持つ核酸および同等の化合物の再現性のある分析に強く推奨されます。このシステムは、LC の構成部品にサンプルが失われるリスクを最小限に抑え、生成されたデータの信頼性と信用を高めます。

## 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. *Mass Spectrometry Applications in Separation Sciences* **2005**, 28(14), 1823-1830.
2. Fekete, S. Defining Material Used in Biopharmaceutical Analysis. *LCGC Europe*, LCGC Europe-06-01-**2021**, 34(6), 245-248.
3. Schneider, S. 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*, 5994-4392JAJP, **2021**.
4. Patel, A. et al. PREMIER Standards to Investigate the Inertness of Chromatographic Surfaces. *Waters Corporation application note*, 720007105EN, **2021**.