

イオン交換クロマトグラフィーを用いた オリゴヌクレオチド分析における 移動相pH変化が分離に与える影響と対応策

細井 千尋、鈴木 里沙

ユーザーベネフィット

- ◆ 短鎖オリゴヌクレオチドを塩基単位で再現よく分離できます。
- ◆ 目的のオリゴヌクレオチドを、化学合成過程で使用される保護基などの不純物とも分離することができます。
- ◆ 移動相のpH変化を管理することで安定した分析結果を得ることができます。

■はじめに

アンチセンスオリゴヌクレオチドなどに代表される核酸医薬品は、細胞内外の標的遺伝子などの相互作用により薬効を発揮します。従来の低分子医薬品と異なり、遺伝子レベルで疾病原因を抑制することから、抗医薬品に次ぐ次世代医薬品として注目されています。核酸医薬品は主に化学合成により製造されますが、その合成工程で伸長不良や保護基の除去不良などによる多くの不純物を生じるため、目的のオリゴヌクレオチドの適切な分離・精製が大きな課題となっています。

本稿では、合成目的の配列のオリゴヌクレオチドと鎖長の異なる配列を合成工程由来の不純物と想定し、リン酸基などを含む金属配位性化合物の吸着を抑制するために設計されたイナートUHPLCシステム“Nexera XS inert”を用いたイオン交換クロマトグラフィーにより分離した例をご紹介します。さらに、移動相pH変化の分析結果への影響について検討した結果についてもご報告します。

■測定試料と測定条件

分析対象のオリゴヌクレオチドの配列を表1に示します。20 merのオリゴヌクレオチドを合成目的の配列とし、表1に示す1～4の3'側が欠損した鎖長の異なる4配列を、伸長不良の不純物として準備しました。いずれも未修飾の一本鎖DNAであり、化学合成品（HPLC精製）を使用しました。これらの計5配列はそれぞれ5 μmol/Lとなるように水に溶解し、オリゴヌクレオチド混合試料を調製しました。

イオン交換クロマトグラフを用いて分析する場合には、塩を添加した移動相の勾配により、塩濃度やpHを変化させることで分離、溶出させます。本分析では、水酸化ナトリウム水溶液に溶出力の高い過塩素酸ナトリウムを加えた移動相を用いました（表2）。

■オリゴヌクレオチドの分析

イオン交換クロマトグラフィーではオリゴヌクレオチド中のリン酸基の数、すなわち負電荷の差に基づいて分離されます。そのため、一般的に鎖長の短いものから長いものへと順に溶出します。図1に、5配列のオリゴヌクレオチド混合試料のクロマトグラムを示します。各オリゴヌクレオチドが、塩基単位で鎖長ごとに分離されました。

■再現性

表1に示す16～20 merのオリゴヌクレオチド混合試料を6回繰り返し分析した場合の保持時間と面積の相対標準偏差（%RSD）を表3に示します。いずれも1%以下となり、良好な再現性が得られました。

表1 分析対象試料

	Sequence (5'→3')	Length (mer)
1	TCTTGTTACATGAAA	16
2	TCTTGTTACATGAAAT	17
3	TCTTGTTACATGAAATC	18
4	TCTTGTTACATGAAATCC	19
5	TCTTGTTACATGAAATCCC	20

表2 分析条件

System	: Nexera XS inert
Column	: Shim-pack™ Bio IEX Q-NP (100 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm)*1
Mobile phase A	: 10 mmol/L NaOH
Mobile phase B	: 10 mmol/L NaOH containing 1 mol/L NaClO ₄
Flow rate	: 0.8 mL/min
Time program	: 25-32.5%(0-15 min)→100%(15-20 min)→ (B Conc.) 25%(20-25 min)
Column temp.	: 30 °C
Injection volume	: 4 μL
Detection	: UV 260 nm (SPD-M40), Standard cell
Vial	: Shimadzu 1.1 mL sample vial*2

*1 P/N : 227-31003-03, *2 P/N : 228-21283-91

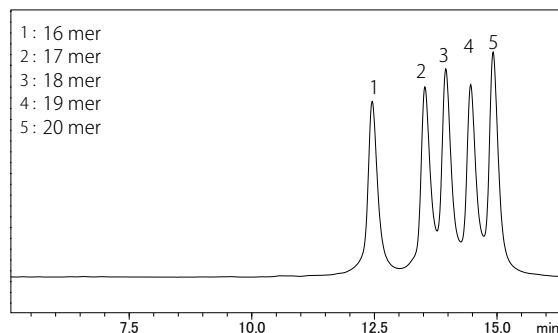


図1 オリゴヌクレオチド混合試料のクロマトグラム

表3 6回繰り返し分析における各成分の相対標準偏差（%RSD）

Length (mer)	保持時間	面積値
16	0.138	0.224
17	0.105	0.335
18	0.098	0.494
19	0.085	0.161
20	0.075	0.307

■ 不純物を含む混合試料の分析

5配列のオリゴヌクレオチドのうち、1配列のみ脱塩精製品、そのほか4種はHPLC精製したものを用いて、各試料5 μmol/Lとなるよう混合し、不純物を含む試料として調製しました。

図2に、脱塩精製品を含む混合試料とHPLC精製品のみを含む混合試料ブランクのクロマトグラムを示します。目的のオリゴヌクレオチドが分離できていることに加え、遊離の保護基などの不純物や不完全長のオリゴヌクレオチド鎖などの不純物との分離も確認されました。

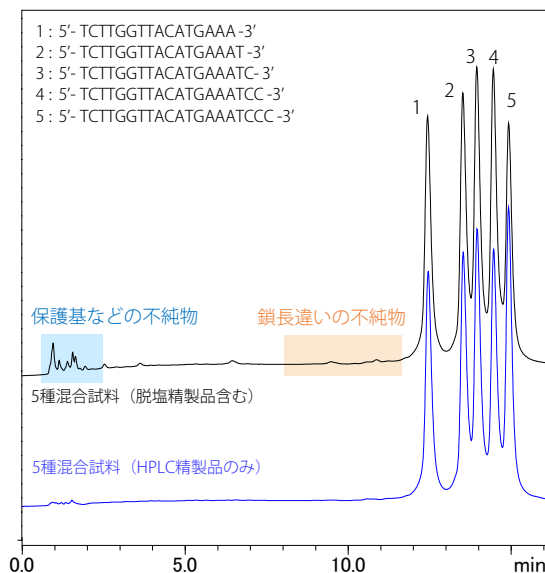


図2 不純物を含むオリゴヌクレオチド混合試料のクロマトグラム

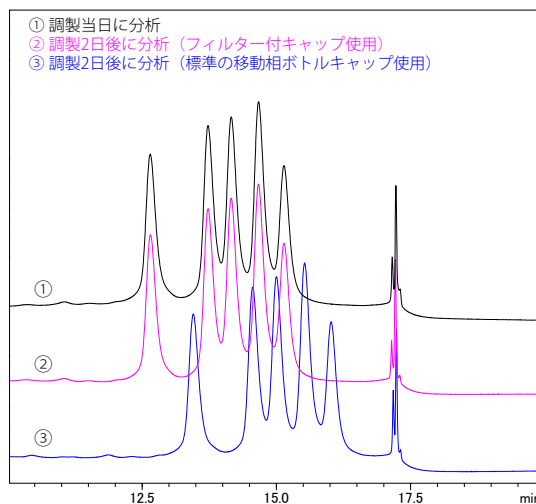


図3 移動相調製当日および2日後におけるオリゴヌクレオチド混合試料のクロマトグラム

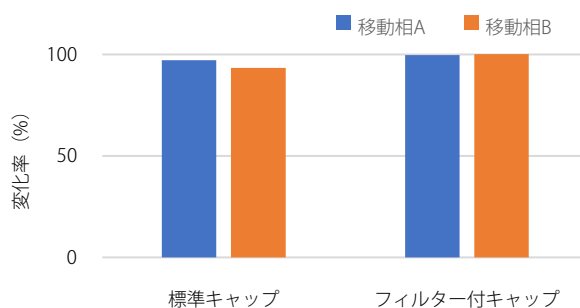


図4 移動相調製当日に対する、調製2日後のpH変化率

■ 移動相のpH変化が保持時間に与える影響

先述のとおり、オリゴヌクレオチドをイオン交換クロマトグラフィーを用いて分析する場合には、塩基性移動相に塩化ナトリウムなどの塩を添加し、塩濃度を変化させることで分離、溶出させます。塩基性の移動相は、空気中の二酸化炭素を取り込み、pHが変化することが知られています。イオン交換クロマトグラフィーでは、分析種の電荷の違いに基づき分離するため、移動相のpHのわずかな変化が分析結果に大きな影響を与える可能性があります。したがって安定した分析結果を得るためには、移動相のpH変化を抑制することが重要です。

そこで、標準の移動相ボトルキャップおよび移動相の揮発を抑制するフィルターが付属された密封性の高い移動相ボトル用キャップを使用し、移動相調製当日、2日経過後にそれぞれ分析を行いました。各日におけるオリゴヌクレオチド混合試料のクロマトグラムを図3に、各移動相のpHについて、調製当日の値を100とした変化率を図4に示します。

標準の移動相ボトルキャップを使用した場合、移動相調製当日(①)と比較してpHの変化に伴い保持時間が平均8%増加(③)した一方、フィルター付キャップを使用した場合には保持時間がほぼ変化しませんでした(②)。フィルター付キャップの使用により移動相pHの変化が抑制でき、安定した分析結果が得られることがわかりました。

■ まとめ

本稿ではイオン交換クロマトグラフィーによるオリゴヌクレオチドの分析例を紹介しました。本分析では、化学合成過程で生じる保護基などの不純物、および不完全な合成により生じる鎖長の異なるオリゴヌクレオチドと、目的のオリゴヌクレオチドを再現性良く分離することをNexera XS inertおよびShim-pack Bio IEXを用いることで達成致しました。また、移動相のpH変化は分析の保持時間に影響を与えるため、安定した分析を行うには移動相のpH管理が重要となります。

NexeraおよびShim-packは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00227-JP 初版発行：2022年 2月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。
<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただけますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022