

Technical Report

逆相イオンペアクロマトグラフィー (RP-IP) によるオリゴヌクレオチド分析における分析条件の最適化

Optimization of analytical conditions for oligonucleotide separation by Reversed-Phase Ion-Pair (RP-IP) chromatography

細井 千尋¹、藤村 大樹¹、松本 恵子¹

Abstract:

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との相互作用により薬効を發揮します。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などによる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。HPLCによる分離・精製で一般的に用いられる逆相イオンペアクロマトグラフィーでは、使用するイオンペア試薬や有機溶媒の種類や濃度などの分析条件検討が必須となります。本稿では、伸長不良の不純物を想定し、鎖長の異なるオリゴヌクレオチドを分離することを目的として、逆相イオンペアクロマトグラフィーによる分離条件の最適化を行いました。

Keywords: オリゴヌクレオチド、核酸医薬品、Nexera™ XS inert

1. 背景

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との相互作用により薬効を發揮します。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、抗体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などによる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。

HPLCによる分析の場合、一般的に用いられるモードのひとつに逆相イオンペアクロマトグラフィー (RP-IP) があります。RP-IPでは、移動相に使用する有機溶媒、イオンペア試薬の種類や濃度により分離パターンが変化します。その変化の挙動は配列中の塩基構成や鎖長、修飾核酸の有無などによって異なることから、目的配列の分離に適した条件に最適化することが重要です。

本稿では、鎖長の異なるオリゴヌクレオチドを分離することを目的として、分離条件の最適化を行った例をご紹介します。分析には、超高速液体クロマトグラフ Nexera XS inert システムを用いました。

2. 測定試料と測定条件

移動相に添加するイオンペア試薬とその濃度、使用する有機溶媒について検討し、その後、分離条件の最適化を行いました。イオンペア試薬にはトリエチルアミン (TEA) もしくはジブチルアミン (DBA)、有機溶媒にはアセトニトリルもしくはメタノールを選択しました。DBAは常温の精製水に容易に溶解しないため、精製水に添加後、冷蔵で一晩静置しました。これにより冷却するとともにDBAの分散を促したうえで、攪拌し溶解させました。

分析対象は、チミン塩基が連続したオリゴヌクレオチド (dT(x)、xは塩基数) とし、鎖長の異なる6配列を調製準備しました。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。各試料5 μmol/Lとなるよう水に溶解し、オリゴヌクレオチド混合試料を調製しました。オリゴヌクレオチドに多数含まれるリン酸基は、システム中の配管などの金属材料に吸着し、キャリアオーバーやピークテーリングを引き起こします。本分析には、サンプル流路に金属を使用せず、吸着抑制を追求したイナート

UHPLCシステムである Nexera XS inert を使用しました。また分析カラムには、金属製ボディの内側をPEEKで覆い吸着抑制したメタルフリーカラムを使用しました。

Table 1 分析条件

System	: Nexera XS inert
Column	: Shim-pack™ Scepter C18-120 [metal free] (150 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm) *1
Mobile phase A	: 10 mmol/L Triethylammonium acetate (TEAA) pH6.0 or 10 mmol/L di-n-butylammonium acetate (DBAA) pH6.0
Mobile phase B	: Acetonitrile or methanol
Flow rate	: 1.0 mL/min
(B Conc.)	: 10-100% (0-20 min) → 100% (20-25 min) → 10% (25.01-35 min)
Column temp.	: 35 °C
Injection volume	: 5 μL
Detection	: UV 260 nm (SPD-M40), UHPLC inert cell
Vial	: Shimadzu 1.1 mL sample vial *2

*1 P/N: 227-31076-03, *2 P/N: 228-21283-91

3. 結果

3-1. イオンペア試薬および移動相有機溶媒の検討

イオンペア試薬と有機溶媒の組み合わせについて検討しました。結果をFig. 1に示します。イオンペア試薬にTEAを使用した場合、いずれの有機溶媒との組み合わせにおいても複数のピークが重なり、十分な分離が得られませんでした。イオンペア試薬にDBAを使用した場合、TEAの場合に比べ分離の改善が見られました。最も各成分が分離し、シャープなピークが得られたDBAとメタノールの組み合わせが最適と判断し、これら移動相の組み合わせを用い、以降の条件検討を行いました。

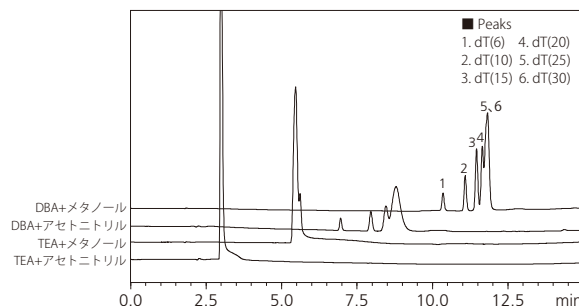


Fig. 1 オリゴヌクレオチド混合試料のクロマトグラム

3-2. イオンペア試薬の濃度検討

イオンペア試薬にDBA、有機溶媒にメタノールを使用し、イオンペア試薬の濃度の変化による分離への影響について検討しました。グラジエント条件は、3-1の条件を調整しました。分析条件をTable 2に、クロマトグラムをFig. 2に示します。イオンペア試薬の濃度が低い場合においても、良好なピーク形状で分離することができました。イオンペア試薬の濃度に対する各ピークの見分け度をTable 3に示します。イオンペア試薬の濃度の上昇につれ分析時間が長くなる一方、分離度に大きな変化が見られなかったことから、DBAの濃度は10 mmol/Lが妥当であると判断しました。

Table 2 分析条件

System	: Nexera XS inert
Column	: Shim-pack Scepter C18-120 [metal free] (150 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm)
Mobile phase A	: DBAA pH 6.0
Mobile phase B	: Methanol
Flow rate	: 1.0 mL/min
(B Conc.)	: 20-70% (0-20 min) → 100% (20-25 min) → 20% (25-35 min)
Column temp.	: 35 °C
Injection volume	: 5 μL
Detection	: UV 260 nm (SPD-M40), UHPLC inert cell
Vial	: Shimadzu 1.1 mL sample vial

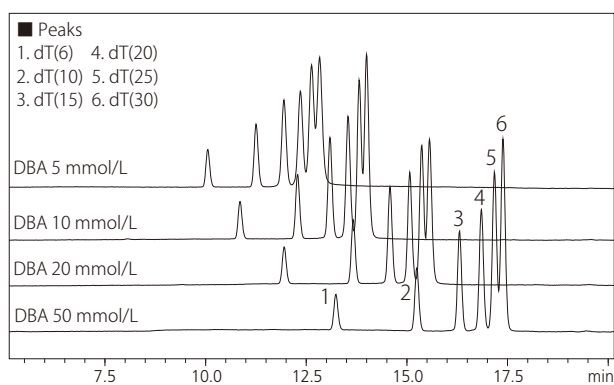


Fig. 2 オリゴヌクレオチド混合試料のクロマトグラム
イオンペア試薬：DBA、有機溶媒：メタノール

Table 3 DBA濃度と各成分の分離度

DBA (mmol/L)	dT(10)	dT(15)	dT(20)	dT(25)	dT(30)
5	5.90	3.18	1.75	1.06	0.701
10	7.08	3.86	2.09	1.22	0.763
20	8.41	4.40	2.30	1.32	0.820
50	9.63	5.09	2.56	1.48	0.937

3-3. 塩基単位でのオリゴヌクレオチドの分析

分析対象のオリゴヌクレオチドを、1塩基ずつ鎖長の異なる11配列を含む、計14配列とし、混合試料を調製しました。分析条件をTable 4に、クロマトグラムをFig. 3に示します。前項の分析条件から移動相の組成とグラジエント条件を変更し、より緩やかにグラジエントをかけることで、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。

また、オリゴヌクレオチド14配列混合試料を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Table 5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。

Table 4 分析条件

System	: Nexera XS inert
Column	: Shim-pack Scepter C18-120 [metal free] (150 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm)
Mobile phase A	: 10 mmol/L DBAA pH 6.0
Mobile phase B	: 10 mmol/L DBAA pH 6.0 / methanol = 20:80
Flow rate	: 1.0 mL/min
(B Conc.)	: 45-65% (0-30 min) → 100% (30-35 min) → 45% (35-45 min)
Column temp.	: 35 °C
Injection volume	: 5 μL
Detection	: UV 260 nm (SPD-M40), UHPLC inert cell
Vial	: Shimadzu 1.1 mL sample vial

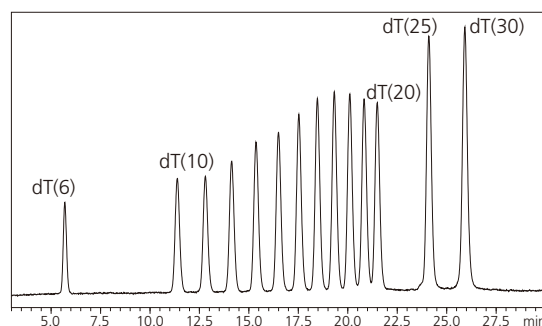


Fig. 3 オリゴヌクレオチド14配列混合試料のクロマトグラム

Table 5 6回繰り返し分析における各成分の相対標準偏差 (%RSD)

No.	保持時間	面積値
dT(6)	0.079	0.760
dT(10)	0.048	0.493
dT(15)	0.038	0.443
dT(20)	0.030	0.867
dT(25)	0.028	0.767
dT(30)	0.028	0.757

4. まとめ

本稿では逆相イオンペア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、Nexera XS inertおよびShim-pack Scepter (メタルフリーカラム) を用い、移動相に使用するイオンペア試薬と有機溶媒を検討し、最適な組み合わせを検討しました。最適な組み合わせはオリゴヌクレオチドの配列により異なりますが、本分析においては、DBAとメタノールが最適であることが分かりました。さらに、移動相組成やグラジエント条件を最適化することで、オリゴヌクレオチドを塩基単位で鎖長ごとに再現性良く分離することができました。

Nexera および Shim-pack は、株式会社島津製作所またはその関係会社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 <https://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。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。

初版発行：2022年3月
© Shimadzu Corporation, 2022