

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効率的な分離条件の探索と最適化

細井 千尋、安藤 恵美子

ユーザーベネフィット

- ◆ LabSolutions™ MD を活用することで、移動相スクリーニングや各種パラメータの検討など、LCメソッド開発にかかる作業を大幅に省力化できます。
- ◆ AIアルゴリズムにより、習熟度によらずグラジエント条件の最適化が可能です。
- ◆ 鎖長の異なる配列等、不純物を含むオリゴヌクレオチドの最適分離条件検討に役立ちます。

■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、主に化学合成により製造されますが、合成工程で伸長不良や欠損が生じ、目的と異なる鎖長の化合物が不純物として生じます。これらをLCで分離・精製する場合、逆相イオンペアクロマトグラフィー (RP-IP) が利用されます。しかし、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、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となります。

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、RP-IPでの分離条件の最適化を行いました。分析法開発支援ソフトウェアであるLabSolutions MDを活用し、「移動相の初期スクリーニング」、「移動相のpHとオープン温度の最適化」、「グラジエント最適化」の3段階において条件探索を効率的に実施した事例をご紹介します。

■分析対象試料

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11配列 (dT(6)、(10)、(15)-(20)、(25)、(30)、(40)) を準備しました。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。

■移動相の初期スクリーニング

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)、ジブチルアミン (DBA) およびヘキシルアミン (HA) をpH調整のため酢酸水溶液として使用しました。有機溶媒にはアセトニトリルおよびメタノールを使用しました。高濃度のDBAおよびHAは常温の精製水に容易に溶解しないため、精製水に添加、一晚静置後よく攪拌し、酢酸水を加えながら溶解させました。

分析試料は7配列 (dT(6)、(10)、(15)、(20)、(25)、(30)、(40)) 混合溶液とし、イオンペア試薬とその濃度、有機溶媒の組合せ計18通りについて、表1の分析条件を用いて検討しました。

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合せにおいても複数のピークが重なりました (図1)。一方DBA、HAを使用した場合には分離が改善されました。DBA、HAとも濃度が高いほど分離が改善する傾向が見られましたが、特にHAは濃度が高くなるほど調製時に溶解しにくい傾向が見られました。そのため、以降はイオンペア試薬に50 mmol/LのDBAとHA、有機溶媒に引き続きアセトニトリルとメタノールの両方を用いて条件検討を行いました。

表1 分析条件

System	: Nexera XS inert
Column	: Shim-pack Scepter™ Claris C18-120 (100 mm × 2.1 mm I.D., 3 μm) ^{*1}
Mobile phase A	: ①20/50/100 mmol/L TEA acetic acid aqueous solution pH6.5 ②5/20/50 mmol/L DBA acetic acid aqueous solution pH6.5 ③20/50/100 mmol/L HA acetic acid aqueous solution pH6.5
Mobile phase B	: Acetonitrile or Methanol
Flow rate	: 1.0 mL/min
B Conc.	: ①TEA : 10-50%(0-8 min)→100%(8.01-11 min)→10%(11.01-15 min) ②DBA : 20-70%(0-8 min)→100%(8.01-11 min)→20%(11.01-15 min) ③HA : 20-80%(0-8 min)→100%(8.01-11 min)→20%(11.01-15 min)
Column temp.	: 40 °C
Flow rate	: 0.35 mL/min
Injection volume	: 5 μL
Detection	: UV 260 nm (SPD-M40, UHPLC inert cell)
Vial	: TORAST-H Glass Vial ^{†2}

*1 P/N : 227-31210-05, *2 P/N : 370-04300-01 (島津ジーエルシー)

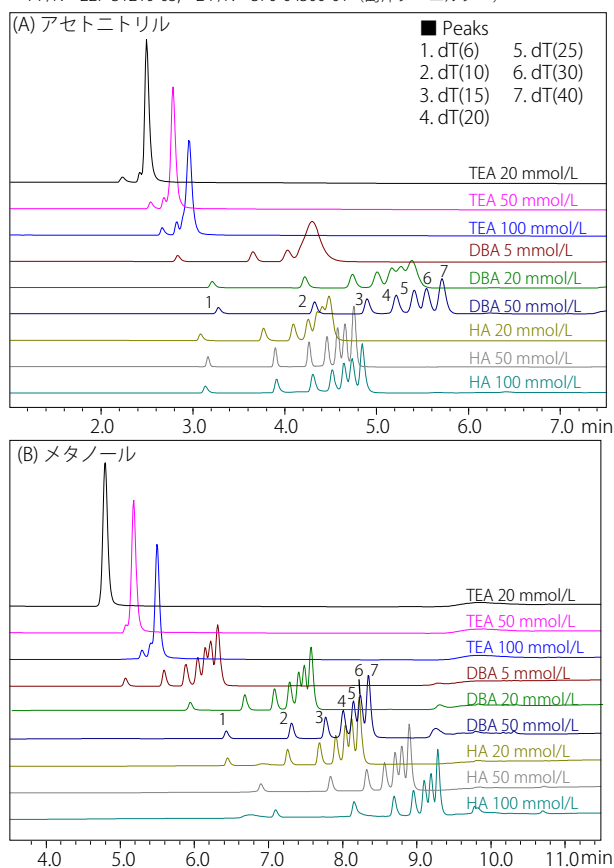


図1 オリゴヌクレオチド7成分混合試料のクロマトグラム
移動相B : (A) アセトニトリル (B) メタノール

■ カラムオープン温度、移動相pHの検討

移動相Aに50 mmol/L DBAと50 mmol/L HA、有機溶媒にアセトニトリルとメタノールを使用し、さらに条件検討を行いました。グラジエントプログラムは表1中②の条件に固定し、カラムオープン温度を40、50、60、70、80℃、移動相AのpHを6.0、6.5、7.0、7.5と変動させ、各組合せを網羅するように分析バッチを作成し、分析しました。これらパラメータの変更や有機溶媒の違いにより、各成分の保持時間が大きく変動することから、LabSolutions MDのピークトラッキングを利用し各ピークを同定しました。同定に使用する情報として、UVスペクトルは核酸配列による差異が小さく不向きであることから、溶出順による同定を実施しました。

縦軸を移動相AのpH、横軸をカラムオープン温度としたデザインスペースを作成し、最小分離度が1.5以上（HA、メタノールの組み合わせのみ1.2以上）となる領域を視覚化しました（図2）。図中の黒点は実測点、赤色領域は分離度が大きい領域、青色領域は分離度が小さい領域をそれぞれ示しています。移動相pHについては、組み合わせる有機溶媒によって至適条件が異なることが示唆されました。またカラムオープン温度については、イオンペア試薬と有機溶媒の組み合わせに関わらず、温度が高いほど分離度が高くなる傾向が示されました。

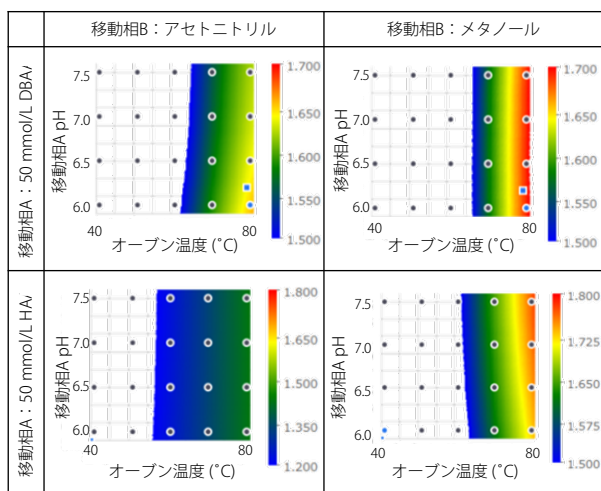


図2 オリゴヌクレオチド7成分混合試料の最小分離度のデザインスペース

■ グラジエント条件の自動最適化

LabSolutions MDのグラジエント条件の自動最適化ワークフローを図3に示します。LabSolutions MDは、独自のAIアルゴリズムを搭載しており、「AIによるグラジエント条件の改良（条件探索）」および「改良された条件での分析（補正分析）」を繰り返すことで分離に関する要求を満たす条件を自動で探索します。



図3 LabSolutions MDのグラジエント条件自動最適化のワークフロー

鎖長の異なるオリゴヌクレオチド11配列（dT(6)、(10)、(15)–(20)、(25)、(30)、(40)）の混合試料に対し、最小分離度を1.5として、最適なグラジエント条件を自動で探索しました。有機溶媒はメタノール、カラムオープン温度は80℃に固定しました。移動相Aを2条件（50 mmol/L DBA pH7.5、50 mmol/L HA pH 7.5）としてAIアルゴリズムによる補正分析を繰り返し、最終的に各移動相条件にて最小分離度1.5を満たすグラジエント条件が自動探索されました。最適化後の条件でのクロマトグラムを図4に示します。

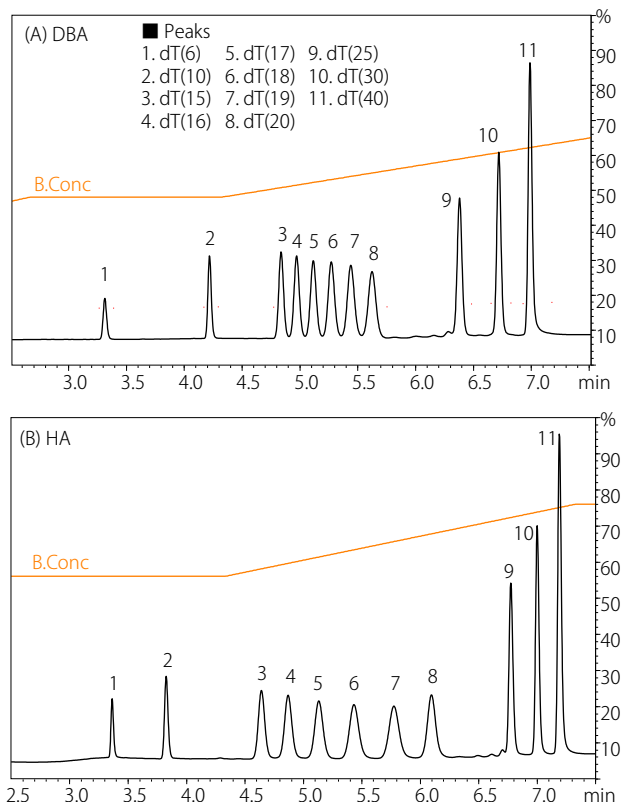


図4 自動探索された条件でのオリゴヌクレオチド11成分混合試料のクロマトグラム
移動相A: (A) 50 mmol/L DBA pH 7.5
(B) 50 mmol/L HA pH 7.5

■ まとめ

鎖長の異なる11配列の混合標準試料をモデルサンプルとし、逆相イオンペアクロマトグラフィーでの分離条件検討を行いました。LabSolutions MDの活用により、イオンペア試薬、移動相pH、およびカラムオープン温度の各項目を網羅的に検討し、また結果を視覚化することで、効率良くこれらの最適条件を探索することができました。さらにLabSolutions MDのグラジエント条件の自動最適化を実施し、数時間で最小分離度1.5を満たすグラジエント条件が自動で探索され、作業の大幅な省力化が可能となりました。

<関連アプリケーション>

1. AIアルゴリズムによるグラジエント条件の自動最適化～機能性成分一斉分析のLCメソッド開発への適用～
[Application News No.01-00664](#)

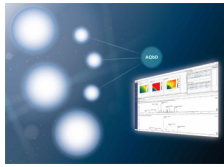
Nexera、LabSolutions、およびShim-pack Scepterは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

▶ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



▶ Nexera XS inert
超高速液体クロマトグラフ



▶ 分析法開発支援システム
分析法開発支援ソフトウェア

関連分野

▶ 医薬・バイオ医薬品

▶ 核酸医薬品

▶ 価格お問い合わせ

▶ 製品お問い合わせ

▶ 技術お問い合わせ

▶ その他お問い合わせ