SHIMADZU
Excellence in Science

Application Note

No. 110

医薬

超臨界流体クロマトグラフィーを用いたオリゴ核酸中の脱アミノ体分析

林田 桃香

Pharmaceutical

■要旨

超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）は、移動相に用いる二酸化炭素の極性から高極性化合物であるオリゴ核酸への適用は難しいと考えられてきましたが、先行研究[1]で4-merのDNAが分析可能なことが分かりました。本研究では4-merよりも長いオリゴ核酸への適用可能性を検証しました。またSFCの分離特性を評価するために既存法のイオンペア逆相クロマトグラフィー（IP-RPLC）でも分離が難しい脱アミノ体の分離に応用しました。オリゴ核酸合成後の精製にSFCを応用することを想定し、試料には保護基のジメトキシトリチル(DMTr)基を持つ配列と持たない配列を用いました。

モディファイア組成を検討した結果、オクチルアミンを含むモディファイアを用いることで18-merの修飾オリゴ核酸のピークを検出することができました。脱アミノ体分離を目的に分析条件を検討した結果10-、18-merの目的物質とその脱アミノ体を分離することができました。

本書はJournal of Chromatography Aに掲載された原著論文[2]の内容を元に記載しています。

1. はじめに

核酸医薬は新しいモダリティの1種で、オリゴ核酸を有効成分とする医薬品です。このオリゴ核酸は主にホスホロアミダイト固相合成法によって製造されます（図1）。この合成法では、通常、3′末端から5′末端に向けてホスホロアミダイトとのカップリング反応を行い、塩基伸長を行います（図1-1、2）。4,4′-ジメトキシトリチル（DMTr）基で保護された形になりますが、カップリングが進行しなかった配列の5′位は以降の反応に関与しないようアセチル基などでキャップ化されます（図1-4）。次の塩基をカップリングする際はDMTr基を脱保護後（図1-5）、次のホスホロアミダイトとカップリングさせます（図1-2）。この工程を繰り返すことで任意の配列を合成することが可能です。

完全長まで伸長させたあとは固相から切り出し、精製しますが、その精製方法は2通りあります（図2）。1つ目はDMTr基が結合したまま切り出したDMTr結合（DMTr-on）オリゴ核酸を液体クロマトグラフィー（LC）で精製する方法で、2つ目は固相に担持された状態で脱保護し、DMTr基が外れた状態（DMTr-off）で固相から切り出しオリゴ核酸をLCで精製する方法です。いずれの精製方法でも合成過程で生成される多くの不純物を完全に除去することは困難であり、そのため不純物解析をすることが重要です。例えば脱アミノ体は切り出しや脱保護で使用される塩基性条件によって主にシトシン塩基のアミノ基がヒドロキシ基に置換される不純物です。脱アミノ化したシトシンはウラシルへと変換されるためオフターゲット効果を起こす可能性があります。分離方法としてIP-RPLCがよく用いられますが、目的物質と脱アミノ体は極性が類似しているため、配列によってはIP-RPLCでも分離が困難です。

SFCは移動相の主成分に加圧した二酸化炭素を用いる分析手法です。二酸化炭素を含む移動相は液体と比べて粘性が低く拡散性が高いため、高い分離能を示します。またSFCは分取へのスケールアップも容易で、更に分取した際

の画分は二酸化炭素が気化するため、ほぼ有機溶媒となり後処理も簡便なことから分取用途によく使われます。

SFCで用いる加圧二酸化炭素は低極性な化学的性質を持つため、高極性化合物を分析することは難しいと考えられてきましたが、共溶媒（モディファイア）の組成やその二酸化炭素との混合比率の最適化により高極性化合物も分析できるようになってきました[3]。先行研究[1]では2-アミノエタノールを含むモディファイアを用いることで4-merDNAが分析できました。しかし高極性の配列ではピークのテーリングが見られたことから、高極性配列の分析に適用するには更に分析条件を最適化する必要があることが分かりました。そこで疎水性の高いアルキルアミンであるオクチルアミンをモディファイアに添加することで、より疎水性の高いイオン対を形成させ、オリゴ核酸の移動相に対する溶解性を向上させてピーク形状を改善できると考えました。

本研究ではモディファイア組成を検討し、5-、10-、15-、18-merの配列に対してSFCが適用可能か評価しました。またその分離能を評価するために脱アミノ体の分離に応用しました。疎水性の高いDMTr基により分析するのが容易になると想定して、評価にはDMTr-on、off配列を用い、これらの保持挙動の違いも評価しました。

2. 実験

SFC、IP-RPLCの分析条件は表2–表6に示しました。先行研究[1]で2-アミノエタノールを40 mmol/L以上添加すると良好なピーク形状を示したことから今回は50 mmol/Lに濃度を固定しました。またモディファイアのpHを中和するために同じ濃度の酢酸もモディファイアに添加しました。カラムも先行研究同様にShim-pack™ Diol IIカラム（以降Diol IIカラム）を使用しました。

MS条件を表 1に示します。

表 1　MS分析条件

System	: LCMS™-9030
Polarity	: Negative
Interface temp	: 350 ℃
Nebulizer gas	: 3.0 L/min
Heating gas	: 10.0 L/min
Drying gas	: 10.0 L/min
DL temp	: 250 ℃
Heat block temp	: 400 ℃
Interface Voltage	: -3.5 kV
TOF-MS	: *m/z*150-2000

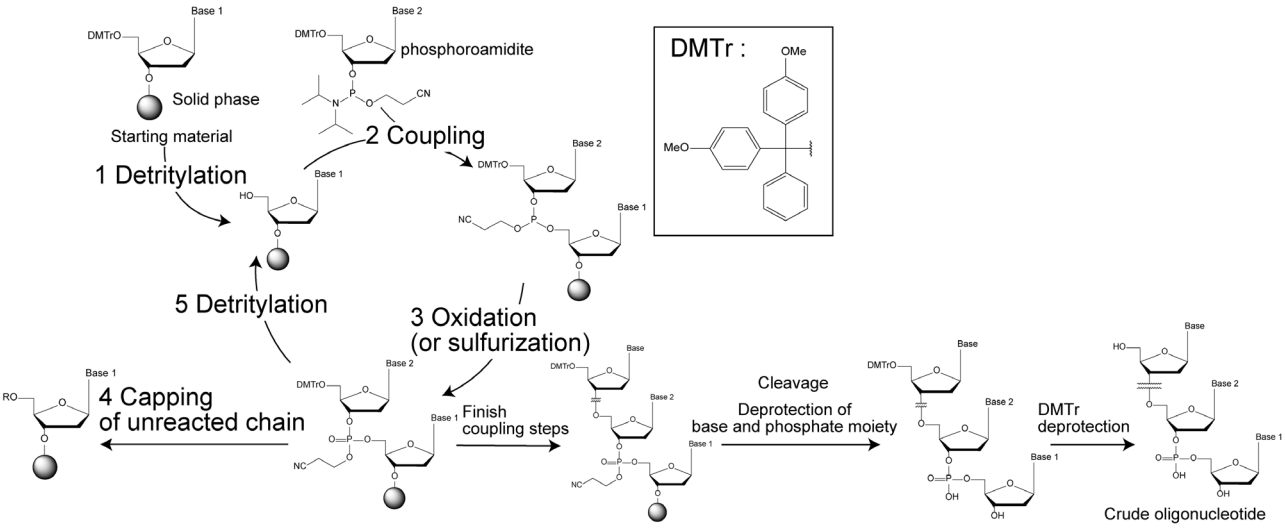


図 1　ホスホロアミダイト法

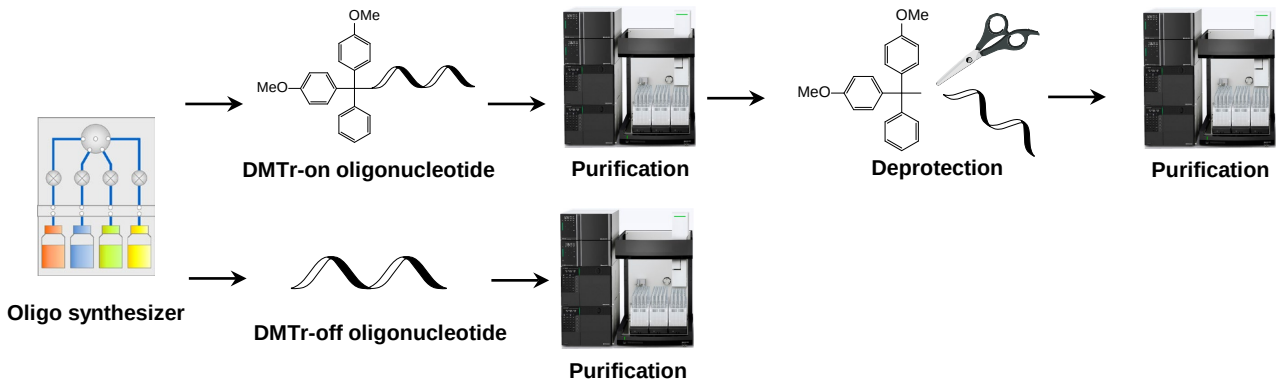


図 2　固相合成の精製方法

3. 結果・考察

3-1. 5-、10-、15-、18-merオリゴ核酸へのSFC適用性評価

まず先行研究[1)]で使用した2-アミノエタノール、もしくは疎水性の高いオクチルアミンを含むモディファイアを用いて5-、10-、15-、18-merのDNA（図3）を分析し、長鎖オリゴ核酸にもSFCが適用可能か評価しました（図4）。2-アミノエタノールを用いた場合、5-merのピークが検出できましたが、10-、15-、18-merは溶出しませんでした。オクチルアミンを用いた場合5-、10-merのピークが検出でき、15-、18-merのピークが検出できませんでした。このことからオクチルアミンの方がより長鎖のオリゴ核酸を分析可能なことが分かりました。続いて2′-*O*-メトキシエチルRNA（2′-MOE）で修飾され、シトシンの代わりに5-メチルシトシンを含む配列を分析し、これらの修飾の保持挙動やピーク形状に対する影響を評価しました。2-アミノエタノールを用いた場合、5-、10-merのオリゴ核酸が検出でき、オクチルアミンを用いた場合5-、10-、15-、18-merのピークが検出できました。このことからDNAより2′-MOE修飾オリゴ核酸の方がSFCの適用性が高いことがわかりました。以前の研究では配列の塩基部の極性に依存して保持時間が変わることを示しました[1)]。

しかし、DNAと2′-MOE修飾オリゴ核酸は極性に大きな差はなく、2′-MOE以外の修飾核酸でも分析を行いましたが、その保持時間は配列の極性とは一致しませんでした。このことから糖部に関しては塩基部とは異なる保持メカニズムを示すことが分かりました。SFCで分析可能な配列を明らかにするには更なる研究が必要です。しかしながらSFCを用いて10-mer以上の長さのオリゴ核酸を分析した例は他になく、初めての事例です。

表 2　図 4の分析条件

System	: Nexera™ UC
Column	: Shim-pack UC-Diol II (150 mm×4.6 mm I.D.、3 μm*1)
Column oven temp.	: 35 ℃
Injection vol.	: 1 μL of 100 μmol/L oligonucleotide dissolved in methanol and water (95:5、*v/v*)
Mobile phases	: A) CO_2 B) 50 mmol/L 2-aminoethanol/octylamine and 50 mmol/L acetic acid in methanol and water (95:5、*v/v*)
B conc.	: 20% (0–2 min)、20–60% (2–20 min)、60% (20–24 min)、60–20% (24–25 min)、20% (25–30 min)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Back pressure	: 10 MPa、50 ℃
Detection	: MS (Table 1)

*1 特注品

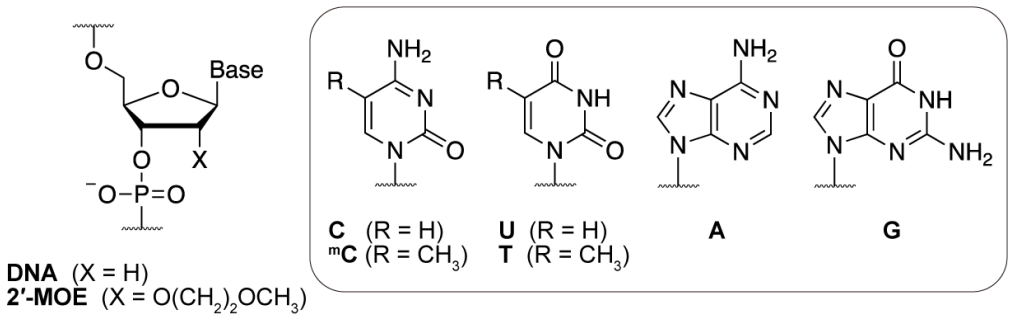
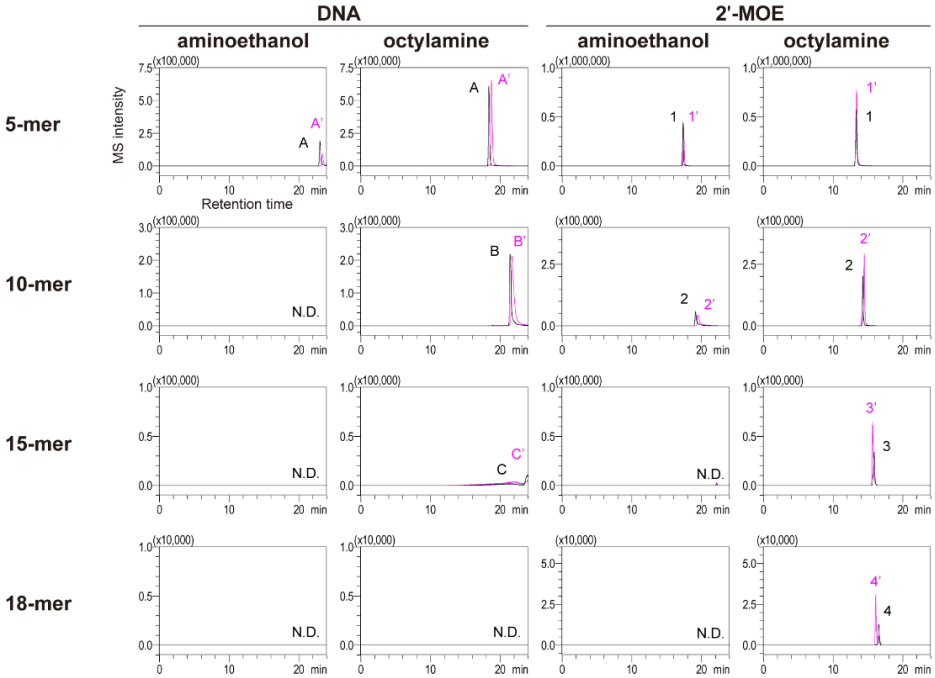


図 3　DNAと2′-MOEの構造



Peak	Sequence (DNA, 5′-3′)	*m/z*	Rt (min)
A	DMTr-TCACT	[M-2H]$^{2-}$, 868.70	18.4
A′	TCACT	[M-2H]$^{2-}$, 717.64	18.7
B	DMTr-TCACTTTCAT	[M-2H]$^{2-}$, 1626.32	21.4
B′	TCACTTTCAT	[M-2H]$^{2-}$, 1475.26	21.7
C	DMTr-TCACTTTCATAATGC	[M-3H]$^{3-}$, 1600.30	N.D.
C′	TCACTTTCATAATGC	[M-3H]$^{3-}$, 1499.59	N.D.
D	DMTr-TCACTTTCATAATGCTGG	[M-4H]$^{4-}$, 1440.51	N.D.
D′	TCACTTTCATAATGCTGG	[M-4H]$^{4-}$, 1364.98	N.D.

Peak	Sequence (5′-3′)	*m/z*	Rt (min)
1	DMTr-TCACT	[M-2H]$^{2-}$, 1068.31	13.3
1′	TCACT	[M-2H]$^{2-}$, 916.74	13.3
2	DMTr-TCACTTTCAT	[M-3H]$^{3-}$, 1344.69	14.3
2′	TCACTTTCAT	[M-3H]$^{3-}$, 1243.97	14.5
3	DMTr-TCACTTTCATAATGC	[M-4H]$^{4-}$, 1491.63	15.9
3′	TCACTTTCATAATGC	[M-4H]$^{4-}$, 1416.09	15.7
4	DMTr-TCACTTTCATAATGCTGG	[M-5H]$^{5-}$, 1430.15	16.5
4′	TCACTTTCATAATGCTGG	[M-5H]$^{5-}$, 1369.73	16.1

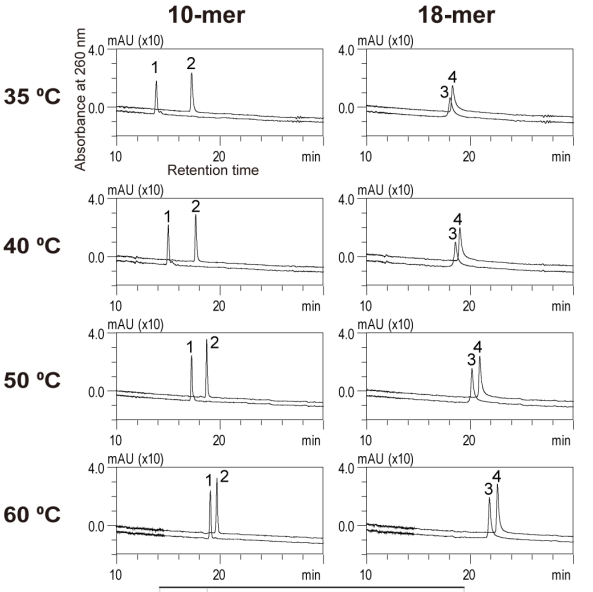
"C" indicates 5-methylcytosine, and the sequences are fully 2′-*O*-MOE modified.

図 4　5-、10-、15-、18-mer DNA、2′-MOE修飾オリゴ核酸の抽出イオンクロマトグラム(EIC)

3-2.脱アミノ体分離を目的にした条件最適化

SFCの脱アミノ体の分離能を評価するため、2′-MOE修飾核酸とその脱アミノ体を用いてカラムオーブン温度と各種モディファイア添加剤を検討しました。評価には核酸医薬でもよく用いられる塩基長を持つ18-merとそのおよそ半分の塩基長の10-merを使用しました。またDMTr-on、-off配列はおおよそ同じ保持時間、ピーク形状を示したことからここではDMTr-on配列のみを使用しました。カラムオーブン温度はIP-RPLCでもピーク形状の改善に重要な要因であることからSFCでも同様か調べました（図5）。10-merでは35℃でピーク形状は良好で脱アミノ体と完全分離していましたが、18-merではピークが太く、脱アミノ体と共溶出していました。温度上昇につれて18-merのピーク幅が小さくなり、50℃以上で脱アミノ体と完全分離が達成できました。このことからカラムオーブン温度には50℃を採用しました。

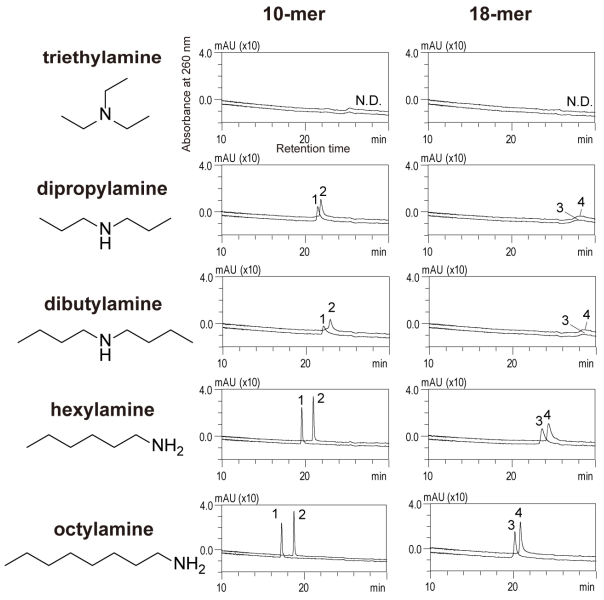
続いてアルキルアミンの最適化を行いました。IP-RPLCではアルキルアミンの選択によって分離能が変わるため、SFCも同様に調べました（図6）。まず同じ炭素数の1-3級アルキルアミン（ヘキシルアミン、ジプロピルアミン、トリエチルアミン）を調べました。トリエチルアミンではピークが検出できず、ジプロピルアミンではブロードなピークが検出され、ヘキシルアミンでは鋭利なピークが検出されました。ヘキシルアミンは3種のアルキルアミンの中で最も疎水性が高いことからアルキルアミンの疎水性がピーク形状に関与したと考え、ヘキシルアミンより疎水性の高い2級アミンのジブチルアミンを用いて分析したころ、ブロードなピークが検出されました。このことから長鎖かつ1級アミンが良好なピーク形状を得るのに重要であることが示唆されました。最終的に評価したアルキルアミンの中で最も良好なピーク形状かつ分離度が最も高かったオクチルアミンを引き続き使用することにしました。



Peak	Sequence (5'-3')
1	DMTr-TCACTTTCAT
2	DMTr-TTACTTTCAT
3	DMTr-TCACTTTCATAATGCTGG
4	DMTr-TTACTTTCATAATGCTGG

"C" indicates 5-methylcytosine, and the sequences are fully 2′-*O*-MOE modified.

図5　カラムオーブン温度35、40、50、60 ℃のときの
目的物質（ピーク1、3）と脱アミノ体（ピーク2、4）分離



Peak	Sequence (5'-3')
1	DMTr-TCACTTTCAT
2	DMTr-TTACTTTCAT
3	DMTr-TCACTTTCATAATGCTGG
4	DMTr-TTACTTTCATAATGCTGG

"C" indicates 5-methylcytosine, and the sequences are fully 2′-*O*-MOE modified.

図6　モディファイアに異なるアルキルアミンを用いたときの
目的物質（ピーク1、3）と脱アミノ体（ピーク2、4）分離

表3　図5の分析条件

System	: Nexera UC
Column	: Shim-pack UC-Diol II (150 mm×4.6 mm I.D.、3 µm*1)
Column oven temp.	: 35、40、50、and 60 ℃
Injection vol.	: 1 µL of 100 µmol/L oligonucleotide dissolved in methanol and water (95:5、*v/v*)
Mobile phases	: A) CO_2 B) 50 mmol/L octylamine and 50 mmol/L acetic acid in methanol and water (95:5、*v/v*)
B conc.	: 30% (0–5 min)、30–60% (5–30 min)、60% (30–35 min)、30% (36–40 min)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Back pressure	: 10 MPa、50 ℃
Detection	: PDA 260 nm

*1 特注品

表4　図6の分析条件

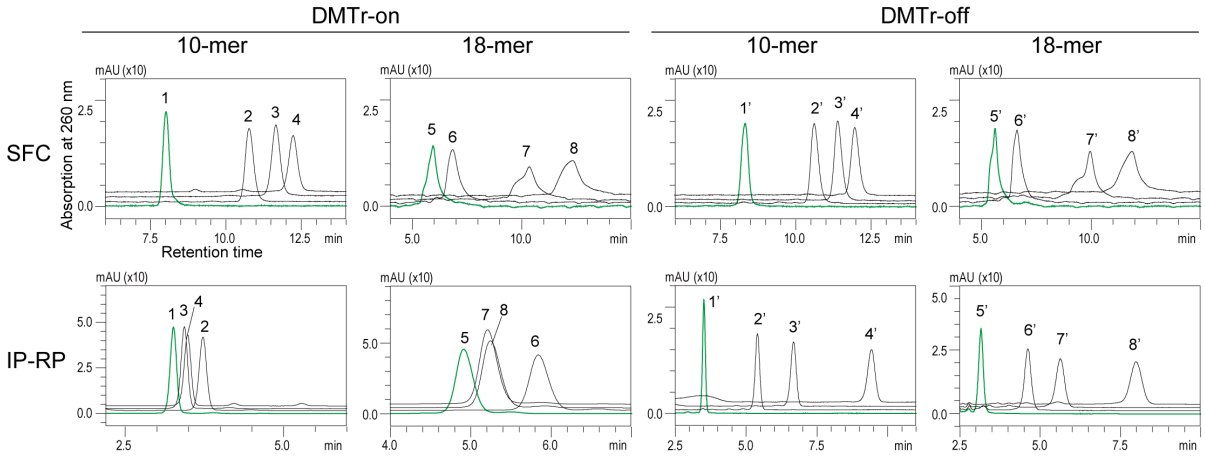
System	: Nexera UC
Column	: Shim-pack UC-Diol II (150 mm×4.6 mm I.D.、3 µm*1)
Column oven temp.	: 50 ℃
Injection vol.	: 1 µL of 100 µmol/L oligonucleotide dissolved in methanol and water (95:5、*v/v*)
Mobile phases	: A) CO_2 B) 50 mmol/L alkylamine and 50 mmol/L acetic acid in methanol and water (95:5、*v/v*)
B conc.	: 30% (0–5 min)、30–60% (5–30 min)、60% (30–35 min)、30% (36–40 min)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Back pressure	: 10 MPa、50 ℃
Detection	: PDA 260 nm

*1 特注品

3-3. 脱アミノ体の分離挙動評価

最後に目的物質とその脱アミノ体の分離能をSFCとIP-RPLCによって評価しました。SFC、IP-RPLCではグラジエントプログラムが保持に与える影響が異なると考え、いずれもアイソクラティック溶離を用いました。IP-RPLCで脱アミノ体の分離が良好だと報告されているプロピルアミンをイオンペア試薬として使用しました[4]。いずれの配列も15分以内に溶出するようにモディファイア比を設定して分析しています。脱アミノ化数の異なる配列を分析するとSFCでDMT-on 10-、18-merいずれも目的物質と分離しました（図7)。IP-RPLCでも同様に分離しましたがSFCの方がIR-RPLCより分離が良好でした。

DMTr-off 10-、18-merいずれもSFCで目的物質と脱アミノ体と分離することができました。SFCではDMTr基の有無に関わらずおおよそ同じ保持時間に溶出していることから、DMTr基よりもオリゴ核酸部分で強くカラムと相互作用していることがわかりました（図8）。 IP-RPLCでもDMTr-off 10-、18-merにおいて脱アミノ体と分離でき、IP-RPLCの方がSFCより分離がよい結果でした。IP-RPLCでDMTr-on配列を分析する場合、疎水性のDMTr基の保持への寄与は大きく、塩基の保持への寄与は小さいと思われます。一方DMTr-off配列は顕著に疎水性の高い官能基を持たないため、塩基の差異を識別して分離することが可能だったと考えられます。



Peak	Sequence (5'-3')
1	DMTr-TCACTTTCAT
2	DMTr-TTACTTTCAT
3	DMTr-TTATTTTCAT
4	DMTr-TTATTTTTAT
5	DMTr-TCACTTTCATAATGCTGG
6	DMTr-TTACTTTCATAATGCTGG
7	DMTr-TTATTTTCATAATGCTGG
8	DMTr-TTATTTTTATAATGCTGG

"C" indicates 5-methylcytosine, and the sequences are fully 2'-*O*-MOE modified.

Peak	Sequence (5'-3')
1'	TCACTTTCAT
2'	TTACTTTCAT
3'	TTATTTTCAT
4'	TTATTTTTAT
5'	TCACTTTCATAATGCTGG
6'	TTACTTTCATAATGCTGG
7'	TTATTTTCATAATGCTGG
8'	TTATTTTTATAATGCTGG

"C" indicates 5-methylcytosine, and the sequences are fully 2'-*O*-MOE modified.

図 7　SFCとIP-RPLCを用いた目的物質と脱アミノ体分離

目的物質のピーク1、5、1′、5′（緑線）に対応する脱アミノ体がピーク2-4、6-8、2′-4′、6′-8′（黒線）

表 5　図 7、9のSFC分析条件

System	: Nexera UC
Column	: Shim-pack UC-Diol II (150 mm×4.6 mm I.D.、3 µm*1)
Column oven temp.	: 50 ℃
Injection vol.	: 1 µL of 100 µmol/L oligonucleotide dissolved in methanol and water (95:5、*v/v*)
Mobile phases	: A) CO_2 B) 50 mmol/L octylamine and 50 mmol/L acetic acid in methanol and water (95:5、*v/v*)
B conc.	: 40% (DMTr-on and -off 10-mer)、45% (DMTr-on and -off 18-mer)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Back pressure	: 10 MPa、50 ℃
Detection	: PDA 260 nm

*1 特注品

表 6　図 7、9のIP-RPLC分析条件

System	: Nexera XS
Column	: Shim-pack Scepter C18-120 (150 mm×4.6 mm I.D.、3 µm*1)
Column oven temp.	: 50 ℃
Injection vol.	: 1 µL of 100 µmol/L oligonucleotide dissolved in methanol and water (95:5、*v/v*)
Mobile phases	: A) 10 mmol/L propylamine (pH 9.6、adjusted with acetic acid) in water B) acetonitrile
B conc.	: 30% (0–5 min)、30–60% (5–30 min)、60% (30–35 min)、30% (36–40 min)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Back pressure	: 10 MPa、50 ℃
Detection	: PDA 260 nm

*1 P/N 227-31016-05

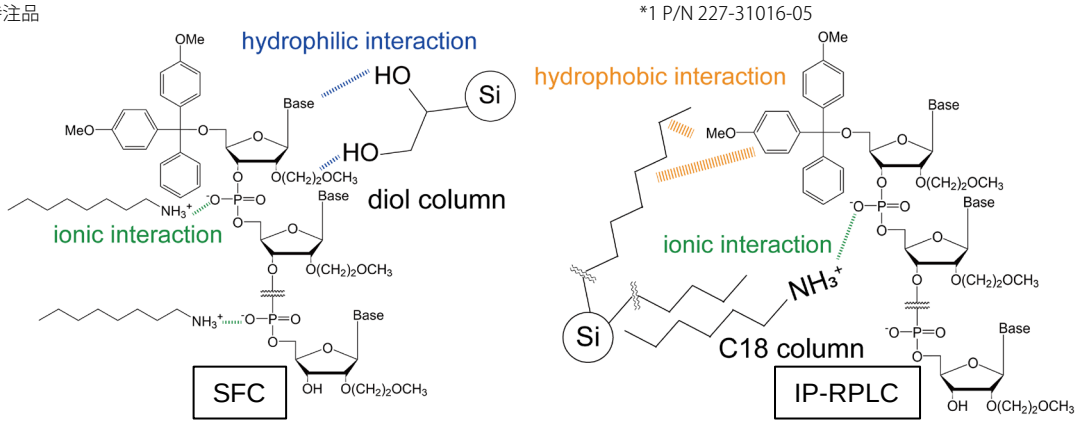


図 8　SFCとIP-RPLCの推測される保持機構

続いて脱アミノ化の位置が異なる配列を目的物質から分離可能か検証しました（図9）。SFCを用いてDMTr-on 10-mer、-off 10-merでは目的物質と脱アミノ体と分離することができました。 DMTr-on 18-mer、-off 18-merでは配列hのみ目的物質と共溶出しましたが、その他の脱アミノ体とは分離することができました。IP-RPLCの場合、DMTr-on 10-merでは目的物質から分離可能な脱アミノ体もありましたが配列dは共溶出しました。またDMTr-on 18-merではSFCでも目的物質と分離できなかった配列hに加えて配列iも分離できませんでした。DMTr-off配列では10-mer、18-merいずれもIP-RPLCは優れた分離を示しました。これらの結果からオリゴ核酸分析においてSFCとIP-RPLCは異なる保持挙動を示すことが分かりました。

4. まとめ

本研究ではまずDMTr-on、-offの5-、10-、15-、18-merをSFCで分析可能か評価し、オクチルアミンを含むモディファイアを使用することで2′-MOEで修飾された配列を分析可能であることを見出しました。核酸医薬に用いられる配列全てに適用するには更なる研究が必要です。例えば典型的な修飾であるホスホロチオアート（PS）修飾はジアステレオマーの部分的な分離に起因してピークが顕著にブロード化することをSFCでも確認しています[5]。配列に含まれるPS修飾の数によっては望む分離が得られないことが予想されるため、分析条件の最適化が必要になります。

続いてDMTr-on、off 10-、18-merとその脱アミノ体を分離可能か評価し、その分離能を既存法であるIP-RPLCと比較しました。SFCではDMTrの有無に関わらず目的物質は同じ保持時間で溶出し、それぞれで脱アミノ体と分離できました。一方、IP-RPLCではDMTr-off配列は目的物質と脱アミノ体と分離は良好でしたがDMTr-on配列では目的物質と脱アミノ体が共溶出する配列もありました。この結果からDMTr基だけでなく疎水性の高い臓器標的リガンドを結合させた核酸における不純物分離にも応用可能性が見出せました。

5. 謝辞

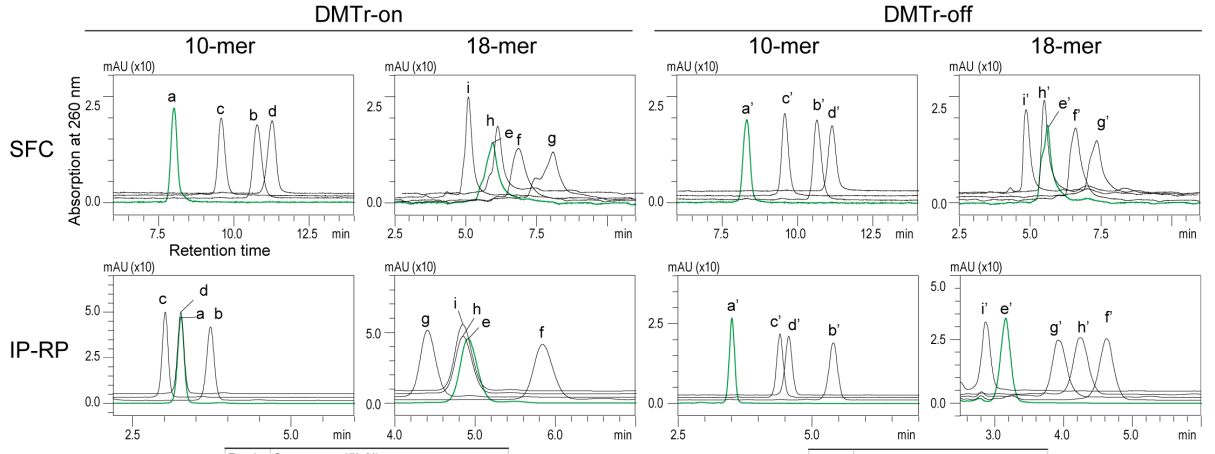
ご指導頂いた大阪大学大学院薬学研究科 小比賀聡教授、山口卓男講師に厚く御礼申し上げます。本研究は AMED 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業「核酸医薬品の製造・精製・分析基盤技術の開発」プロジェクト（代表：小比賀聡）による支援の成果です。

<参考文献>

1) M. Hayashida *et al.*、*J. Chromatogr. A.*、**2023**、1708、464333、DOI: 10.1016/j.chroma.2023.464333
2) M. Hayashida *et al.*、*J. Chromatogr. A.*、**2025**、1744、465731、DIO: 10.1016/j.chroma.2025.465731
3) J. Molineau *et al.*、*J. Pharm. Biomed. Anal.*、**2021**、193、113736、DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113736
4) S. G. Roussis *et al.*、*J. Chromatogr. A.*、**2019**、1594、105-111、DOI: 10.1016/j.chroma.2019.02.026
5) 林田桃香、**2024**,超臨界流体クロマトグラフィーによるオリゴ核酸分析法の開発、大阪大学大学院薬学研究科博士論文、URL: https://hdl.handle.net/11094/96135

<関連アプリケーション>

短鎖オリゴ核酸分析に対する超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）の応用、Application Note No.100



Peak	Sequence (5′-3′)
a	DMTr-TCACTTTCAT
b	DMTr-TTACTTTCAT
c	DMTr-TCATTTTCAT
d	DMTr-TCACTTTTAT
e	DMTr-TCACTTTCATAATGCTGG
f	DMTr-TTACTTTCATAATGCTGG
g	DMTr-TCATTTTCATAATGCTGG
h	DMTr-TCACTTTTATAATGCTGG
i	DMTr-TCACTTTCATAATGTTGG

"C" indicates 5-methylcytosine, and the sequences are fully 2′-*O*-MOE modified.

Peak	Sequence (5′-3′)
a′	TCACTTTCAT
b′	TTACTTTCAT
c′	TCATTTTCAT
d′	TCACTTTTAT
e′	TCACTTTCATAATGCTGG
f′	TTACTTTCATAATGCTGG
g′	TCATTTTCATAATGCTGG
h′	TCACTTTTATAATGCTGG
i	TCACTTTCATAATGTTGG

"C" indicates 5-methylcytosine, and the sequences are fully 2′-*O*-MOE modified.

図 9　SFCとIP-RPLCを用いた目的物質と脱アミノ体分離
目的物質のピークa、e、a′、e′（緑線）で、それぞれに対応する脱アミノ体がピークb-d、f-i、b′-d′、f′-i′（黒線）である。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
https://www.an.shimadzu.co.jp/
初版発行：2025 年 5月

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 UC
超臨界流体抽出／超臨界流体クロマトグラフシステム

関連分野

医薬・バイオ医薬品

核酸・mRNA医薬品

核酸医薬品

新規分析法の開発

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