

LC/UV および LC/MS による オリゴヌクレオチド分析のための 各種イオンペア試薬の評価

著者

Gerd Vanhoenacker, Cindy
Lecluyse, Griet Debyser, Pat
Sandra, Koen Sandra
RIC Biologics
Belgium

Sonja Schipperges, Sonja
Schneider, Udo Huber
Agilent Technologies, Inc.
Germany

概要

オリゴヌクレオチド (ON) の LC/UV および LC/MS 分析に対する各種イオンペア試薬 (アミンおよび酸性対イオン) の影響について検討しました。アミンの種類と対イオンの濃度が、ON のリテンションと分解能に重要な役割を果たし、MS データに強く影響します。荷電状態と付加体の生成は、移動相の組成の影響を受けます。本アプリケーションノートでは、ON の分析条件の最適化に多くの変数が利用できることを示します。分析は、DAD および Agilent 6530 LC/Q-TOF による UV 検出を備えた Agilent 1290 Infinity II LC システムで実施しました。

はじめに

合成 ON は盛んに開発が進められており、さまざまな疾患の治療に利用されています。ON 治療薬は主に、核酸塩基、リボースまたはデオキシリボース糖（それぞれ RNA または DNA）、およびリン酸からなる短い直鎖ポリマーです。^{1,2} ON にはさまざまなサイズと形のものが、治療効果を変更、強化し、特定の標的に対する特異性を高め、安定性、デリバリー、取り込みなどを改善するために、化学修飾されることがよくあります。ON の種類は幅広く、低分子干渉 RNA (siRNA)、マイクロ RNA (miRNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO)、アプタマーなどのさまざまなクラスが生成されています。

ON は通常、ヌクレオチドを事前に定義されたサイズ（つまり、ヌクレオチドの数 (n)）まで 1 つずつ追加することによって鎖を延長する多段階プロセスで製造されます。合成はさまざまな方法で行うことができ、一般に支持担体と保護基の使用を伴います。ON 合成に関わるすべてのステップで、不純物が発生する可能性があります。よくある不純物には、反応が不完全なショートマー（例えば、n-1、n-2）があります。サイクル数が増えるとターゲット ON の収量は低下します。あるいはロングマー（例えば、n + 1）も形成され、脱アミノ化または脱プリン化、酸化（典型的にはグアニン）、およびその他の望ましくない反応から他の不純物も生じる可能性があります。製造時に混入する不純物に加えて、ON の保管が分解生成物につながる可能性があります。

主生成物の分析、純度の決定、不純物の定量化・同定などの ON の分析は、化合物の性質とサイズのために容易ではありません。近年、合成 ON の種類と LC による分析に関する包括的なレビューが発表されています。¹ ON は

本来、非常に極性の高い生成物であり、多くのアニオン基（通常、各ヌクレオチドに 1 つのリン酸基を含む）を有しています。ON が修飾されていない場合、または化学修飾による極性全体への影響が小さい場合（一般的にあてはまります）、従来の逆相 LC では十分なリテンションが得られないため、他のモードを適用する必要があります。アニオン交換クロマトグラフィー (AEX)、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC)、混合モードクロマトグラフィー (MMC)、イオンペア液体クロマトグラフィー (IPLC)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) など、さまざまな LC モードが ON の特性解析に適用されてきました。^{1,2} 上記の組み合わせは、多次元で使用されることもあります。これは、包括的な 2D-LC³ または（複数の）ハートカット 2D-LC 設定で行うことができます。⁴ 要求される分析 (QA/QC であるか R & D であるか) に応じて、UV ベースの検出器または質量分析計を適用します。

ON 分析には、IPLC が群を抜いて最もよく使われる LC モードです。IPLC では、逆相固定相がイオンペア試薬を含む移動相と組み合わせられます。これらの試薬は通常、アニオン性 ON と相互作用して疎水性ペアを形成するアミンです。このペアはその後、逆相カラムに保持され、ON の長さ、種類、および化学修飾の有無に応じて分離されます。

移動相を適切に選択することが極めて重要です。移動相は、アミン系イオンペア試薬と酸性対イオンを決められた濃度と比率で正確に、水中で混合することによって調製します。この組み合わせにより、必要な ON の保持が実現できます。メタノールやアセトニトリルなどの有機溶媒を用いることで溶出が促進され、グラジエント溶出により分離能の面で最良の結果がもたらされます。特定のサンプルに対する結果は、選択した固定相、移動相添

加剤の濃度と種類、カラム温度、およびサンプル特性の複雑な相互作用によって決まります。クロマトグラフィーが移動相の組成によって影響を受けるだけでなく、LC/MS を使用する場合、MS データ（感度、荷電状態、付加イオンなど）も移動相の組成によって大きく影響されます。

さまざまなグループが、ON のクロマトグラフィーや質量分析の挙動に対する移動相の組成の影響を調査してきました。⁵⁻⁹ メソッドを注意深く開発することで、分離能と感度の大幅な改善が可能です。ただし、数多くの種類がある ON に対して、最適に機能する一般的な単一の条件セットを特定することは、不可能だと考えられます。個々の ON に対して、イオンペア試薬の種類と濃度、対イオンの種類と濃度、および双方の添加剤の濃度比を最適化することにより、分離を最大化し、MS 検出を向上させることができます。

本アプリケーションノートでは、Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムを使用し、さまざまな移動相で得られた結果を示します。分析は、ダイオードアレイ検出 (DAD) および 6530 LC/Q-TOF を使用した 1290 Infinity II LC システムで実施しました。異なる移動相の組み合わせがクロマトグラフィーおよび質量分析の結果に与える影響を、DNA および RNA ON 参照サンプルおよび数種類の治療用 ON により評価しました。データは、ON 分析で従来より使用されてきた移動相に代わる移動相があることを示しています。これらの代替移動相は、同等以上の性能を示すだけでなく、大幅に低いコストで分析を実施できます。

実験方法

試料調製

次のアミンと酸は、Sigma-Aldrich（セントルイス、ミズーリ州、米国）から購入しました：トリエチルアミン（TEA）、*n*-ブチルアミン（BA）、ジブチルアミン（DBA）、*n*-ヘキシルアミン（HA）、酢酸トリエチルアンモニウム（TEAA）、酢酸（AA）、および1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール（HFIP）。アセトニトリル（HPLC-S）、メタノール（ULC/MS）、および水（ULC/MS）は、Biosolve（ファルケンスワルト、オランダ）から入手しました。サンプルは、ジエチルピロカーボネート（DEPC）処理水（Thermo Fisher Scientific、ウォルサム、マサチューセッツ州、米国）で希釈しました。

サンプル

- 標準混合物：
 - DNA ラダー標準（部品番号 5190-9029）
 - RNA 分解能標準（部品番号 5190-9028）
- サンプル：
 - 治療用 ON は、地元のバイオテクノロジー企業から入手しました。

移動相の前処理

酢酸移動相は、酢酸とそれぞれのアミンの等モル溶液としました。500 mL を調製するために、酢酸を約 450 mL の水に加えて混合しました。それぞれのアミンを加えて混合し、水を加えて完全に 500 mL としました。この溶液の pH は、少量の酢酸またはそれぞれのアミンを添加して注意深く調整しました。

100 mM TEAA、pH 7	酢酸：3 g トリエチルアミン：5.06 g
100 mM HAA、pH 7	酢酸：3 g ヘキシルアミン：5.06 g
100 mM DBAA、pH 7	酢酸：3 g ジブチルアミン：6.46 g

HFIP 移動相は次のように調製しました。500 mL を調製するために、既定量の HFIP を約 400 mL の水に加えて混合しました。アミンをそれぞれ加えて混合し、水を加えて完全に 500 mL としました。これらの移動相は pH 調整なしで使用しました。

15 mM TEAA/400 mM HFIP pH 7.8 ~ 7.9	HFIP：33.6 g トリエチルアミン：0.759 g
15 mM TEAA/100 mM HFIP pH 8.6 ~ 8.7	HFIP：8.4 g トリエチルアミン：0.759 g
15 mM TEAA/25 mM HFIP pH 9.4 ~ 9.6	HFIP：2.1 g トリエチルアミン：0.759 g
15 mM HA/25 mM HFIP pH 9.4 ~ 9.6	HFIP：2.1 g ヘキシルアミン：0.759 g
15 mM DBA/25 mM HFIP pH 9.4 ~ 9.6	HFIP：2.1 g ジブチルアミン：0.969 g

サンプル前処理

- DNA ラダー標準（部品番号 5190-9029）を DEPC 水 1 mL に溶解しました。
- RNA 分解能標準（部品番号 5190-9028）を DEPC 水 1 mL に溶解しました。
- サンプルを調製し、DEPC 水で希釈しました。

装置構成

Agilent 1290 Infinity II LC システムを Agilent 6530 LC/Q-TOF と組み合わせて使用しました。

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ（G7120A）
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ（G7167B）、サンプルサーモスタット（オプション 101）
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット（G7116B）
- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器（G7117B）、10 mm InfinityLab Max-Light カートリッジセル（G4212-60008）
- Agilent 6530 LC/Q-TOF（G6530A）、Agilent Jet Stream ESI ソース

ソフトウェア

- LC-DAD 専用
 - データ収集：機器コントロール用 Agilent MassHunter（B.08.00）以降
 - データ解析：Agilent MassHunter Qualitative Analysis（B.07.00）以降
- LC-DAD-MS 用

一般的なメソッド設定

LC-DAD

パラメータ	設定値
カラム	Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチド、2.1 × 50 mm、2.7 µm (部品番号 659750-702)
移動相 A および B	結果と考察セクションを参照
グラジエント	結果と考察セクションを参照
流量	0.6 mL/min
カラム温度	65 °C
検出 (DAD)	260/4 nm (リファレンス 355/20 nm) ピーク幅 > 0.025 min (10 Hz)
注入	2 µL (ニードル洗浄フラッシュポート、3 秒間、メタノール)
インジェクタ温度	12 °C

LC (-DAD)/MS

パラメータ	設定値
カラム	Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチド、2.1 × 50 mm、2.7 µm (部品番号 659750-702)
移動相 A	15 mM アミン/HFIP (25、100、または 400 mM) 水溶液
移動相 B	メタノール
グラジエント	結果と考察セクションを参照
流量	0.6 mL/min
カラム温度	65 °C
検出 (DAD)	260/4 nm (リファレンス 355/20 nm) ピーク幅 > 0.025 min (10 Hz)
注入	2 µL (ニードル洗浄フラッシュポート、3 秒間、メタノール)
インジェクタ温度	6 °C

LC/Q-TOF 設定

ソース設定	Agilent Jet Stream
イオン化モード	ネガティブイオン化
ドライガス温度	300 °C
ドライガス流量	8 L/min
ネブライザ圧力	35 psig
シースガス温度	350 °C
シースガス流量	8 L/min
ノズル電圧	1,000 V
キャピラリー電圧	3,500 V
取り込み設定	
フラグメンタ電圧	200 V
質量範囲	400 ~ 3,200 m/z
取り込みモデル	拡張ダイナミックレンジモード (2 GHz)
スキャン速度	3 スペクトル/秒
データ取り込み	セントロイドおよびプロファイル

結果と考察

UV-DAD 検出用アミン-酢酸移動相

アミン-酢酸の組み合わせは、ON の LC/UV 分析に広く用いられている移動相添加物です。一般に、100 mM 水溶液（アミンと酢酸の等モル溶液）が使用され、分析成分をアセトニトリルによるなだらかなグラジエントを使用して溶出させます。最も一般的な組み合わせは、中性 pH の TEAA バッファ（トリエチルアミン (TEA) と酢酸）です。

TEAA は移動相添加物として一般的に受け入れられていますが、特定の ON に対する性能の点で必ずしも最良の選択肢であるとは限りません。したがって、メソッド開発時には代替のアミンを検討する必要があります。図 1 は、さまざまな移動相を使用した DNA ラダーおよび RNA 分解能参照標準の LC/UV 分析を比較したものです。TEAA 代替品のそれぞれに対するグラジエントは、クロマトグラフィー性能の直接比較を可能にするために、TEAA で得られたリテンションタイムと一致するようにスケールアップしました。

酢酸と、ヘキシルアミン（HAA バッファ）またはジブチルアミン（DBAA バッファ）などの代替アミンとの組み合わせは、参照サンプルの TEAA と比較して大幅に優れたパフォーマンスを示しています。図 1 の挿入図は分析の短時間の詳細を示したのですが、分離効率が低いことは明らかです。メインピークからの不純物の検出と分離が大幅に改善されています。TEAA を使用する場合、DNA ラダー標準は 10 ~ 14 % のアセトニトリルのグラジエントでは 10 分間で溶出されますが、RNA 分離標準はわずか 6 ~ 8 % のアセトニトリルで 12 分間で溶出されます。RNA は、リボース糖に 2'-ヒドロキシルが存在するため、DNA に比べてはるかに早く、またはかなり少ない有機溶媒とともに溶出します。

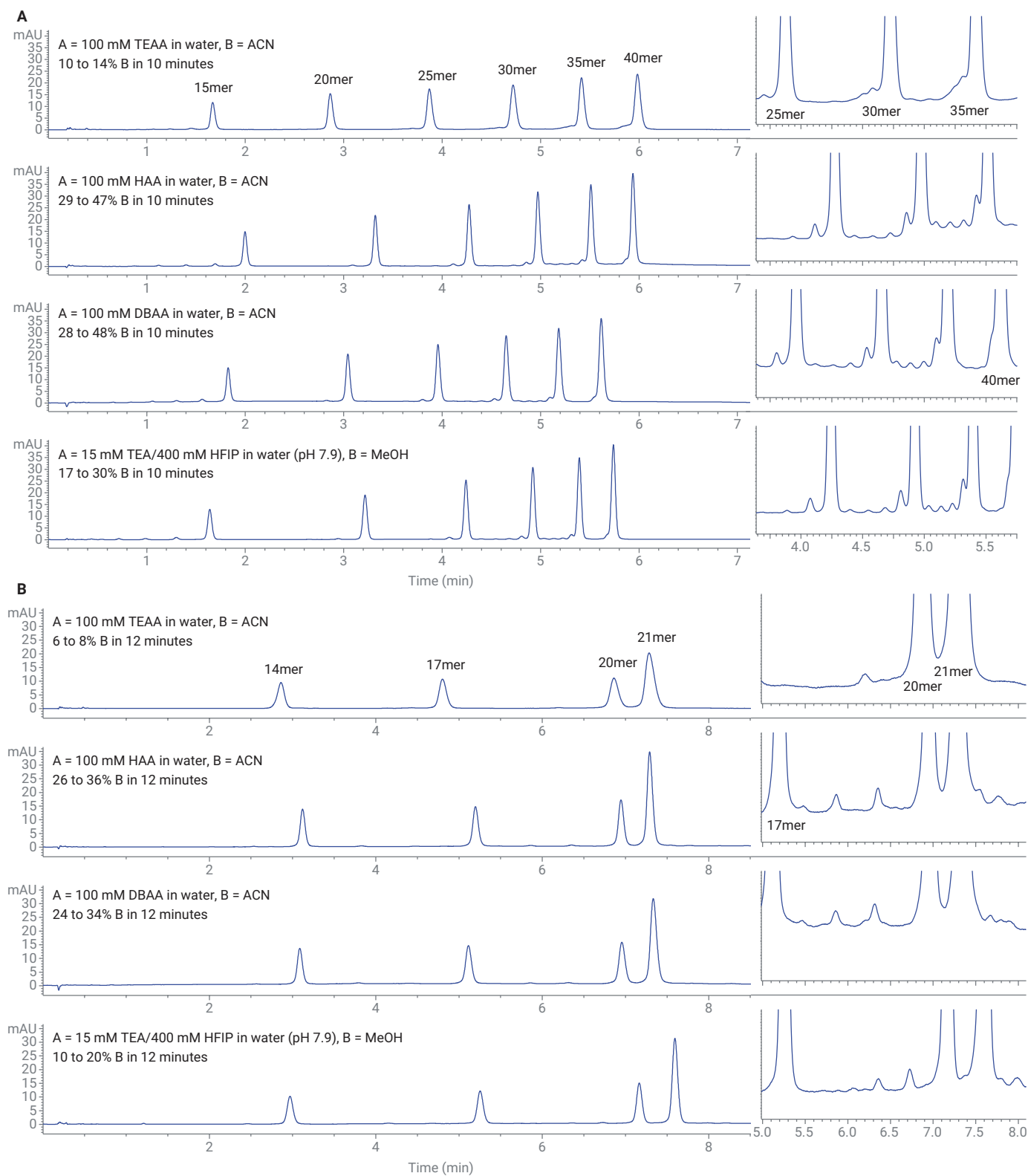


図 1. IPLC 用のさまざまな移動相添加物を使用した 260 nm における LC/UV 分析。(A) DNA ラダー標準、(B) RNA 分解能標準。移動相のグラジエントが図に示されています。その他のメソッドパラメーターについては、実験セクションを参照してください。

HAA および DBAA 移動相を使用した IPLC は、ON の保持がはるかに強いという特徴があり、その結果、これらの条件下では有機溶媒の含有量とグラジエントの勾配を増やさなければなりません。性能向上はこれで本質的に説明されます。これらのデータから、さまざまな移動相添加物の評価をすることが、特定の ON アプリケーションの分離を調整するのに有効なアプローチとなることは明らかです。

UV および MS 検出用アミン-HFIP 移動相

TEAA は IPLC/UV 分析による ON 分析には有用ですが、ネガティブイオン化エレクトロスプレーイオン化 (ESI) MS 検出には適していません。20 年以上前に、Apffel ら^{5,6} が TEAA 移動相を使用した ESI-MS の感度不足について報告しています。彼らは、HFIP がアセトニトリルに溶解しないため、有機溶媒としてメタノールと組み合わせて HFIP を酸性対イオンとして使用することを提案しました。この組み合わせが、ON の LC/MS 分析のリファレンスとなっています。感度が高くなる主な根本的な原因は、添加物の揮発性の違いにあります。HFIP は TEA よりも沸点が低く、エレクトロスプレープロセス中に揮発性の高い HFIP が優先的に蒸発し、生成された液滴内で枯渇します。その結果 pH が上昇してアルカリ性となった条件下では、TEA-ON イオンペアがソースで解離し、ON の検出能力が高まります。⁶ 酢酸は TEA よりも揮発性が低いため、ESI 中の除去効率が低下します。その後、イオンペアの解離が少なくなるか、ソース内で安定化することもあります。これは、MS の感度を劇的に低下させます。

興味深いことに、UV と併用すると、TEAA と比較してさらに優れたクロマトグラフィー性能が TEA-HFIP の組み合わせで得ることができます。これは図 1 から明らかです。図 1 では、DNA ラダーと RNA 分解能標準の結果を、以前に報告されたアミンとアセテートの組み合わせと比較しています。15 mM TEA と 400 mM HFIP の組み合わせは、一般的に組み合わせの開始点として使用されますが、TEAA と比較して優れた性能を示し、DBAA と HAA をもとにした代替の移動相と同等の性能を示します。TEA-HFIP の移動相のもう 1 つの利点は、TEAA と比較してシーケンス依存性が少なく、ON のリテンションと溶出順序が予測しやすいことです。⁷

ただし、HFIP を使用する本当の利点は、酢酸を使用する場合と比較して、MS 感度が大幅に向上することです。一方で HFIP の欠点は、高品質の HFIP 試薬のコストが高いことです。最適な MS 結果（すなわち、最高の感度と質量スペクトル品質）を得るには、入手可能な最高品質の HFIP を使用し、これらの移動相を毎日調製することが推奨されます。HFIP を大量に使用することを考えると（溶液を 400

mM 調製するのに約 7 g/100 mL が必要）、これらの分析を定期的実施するラボにとって、この消耗品のコストの増加はかなり大きなものになります。したがって、濃度が低い HFIP と移動相の組み合わせを検討することは、分離の最適化のためだけでなく、分析あたりのコストを削減するためにも、メソッド開発の重要な部分となります。

UV および MS を用いて、アミンと HFIP のさまざまな組み合わせを評価する実験を設定しました。適用した移動相および、LC/UV スクリーニング実験中に使用したグラジエントの概要を表 1 にまとめます。前の実験とは対照的に、メタノールのグラジエント勾配はすべての分析で一定としました。15 mM TEA/400 mM HFIP の参照条件のリテンションウィンドウに一致させる試みは行いませんでした。

表 1. アミンと HFIP の組み合わせとテストしたグラジエント

アミン (15 mM)	HFIP 濃度		
トリエチルアミン (TEA)	25 mM	100 mM	400 mM (=リファレンス)
ブチルアミン (BA)			評価せず
ジブチルアミン (DBA) *			
ヘキシルアミン (HA)			
pH バッファ	9.45 ~ 9.55	8.60 ~ 8.70	7.85
適用したグラジエント**			
グラジエント DNA ラダー標準およびサンプル (3 % B/min)	10 ~ 55 % B 15 分	10 ~ 70 % B 20 分	10 ~ 55 % B 15 分
グラジエント RNA 分解能標準 (2 % B/min)	5 ~ 35 % B 15 分	5 ~ 45 % B 20 分	5 ~ 35 % B 15 分

* アミン、特に DBA は、LC および MS ソースを汚染する傾向があります。システムから汚染を除去するには、より広範なクリーンアップ手順が必要になる場合があります。

** 各グラジエントの最後に、洗浄ステップ (90 % B、2 分間) および再調整ステップ (最初の %B、5 分間) を適用しました。

バッファ組成は、IPLC のリテンションに対して大きな影響を及ぼします。図 2 に、テストを行ったスクリーニングの組み合わせを用いて、DNA ラダー標準の LC/UV 分析を実施した結果を示します。ON のリテンションは HFIP 濃度が低下すると一般に減少しますが、アルキルアミン鎖長が長くなるとリテンションは増加します。RNA 分解能標準と治療用 ON についても同様の結果が得られました。アミン酢酸移動相スクリーニングから結論付けられるように、アミン-HFIP を使用した移動相バッファ組成の検討は、特定の ON アプリケーションの条件を最適化するために非常に効果的であることがわかります。

これらのスクリーニング結果に基づいて、移動相の選択を LC/UV/MS を用いて評価しました。デフォルト条件（15 mM TEA および 400 mM HFIP）および代替移動相で得られた LC/MS クロマトグラムを図 3 ～ 6 に示します。グラジエントの開始条件と勾配は、特定の移動相の組み合わせで分析したすべてのサンプルで一定としました。代替の移動相でリテンションが増加するので、次のステップではグラジエントを最適化して、特定のサンプルの分離能、分析時間、および感度を向上させます。これはここでは実施していません。

一般に、参照条件（15 mM TEA/400 mM HFIP）でのクロマトグラフィーは、代替の移動相で行った結果と比較して優れたものではありません。リテンションは一般に、代替の移動相（低濃度の HFIP）で増加します。これは、分解能の向上に効果的です。参照条件と代替条件に同じグラジエント勾配を使用した場合に得られる分解能は、基本的に DNA ラダー標準（図 3）および RNA 分解能標準（図 4）の影響を受けません。図 3 の質量スペクトルは、参照トリエチルアミン条件と比較して、代替のヘキシルアミン移動相では、DNA ラダー標準の電荷エンベロップがより高い荷電種にシフトし、付加体が少ないことを示しています。

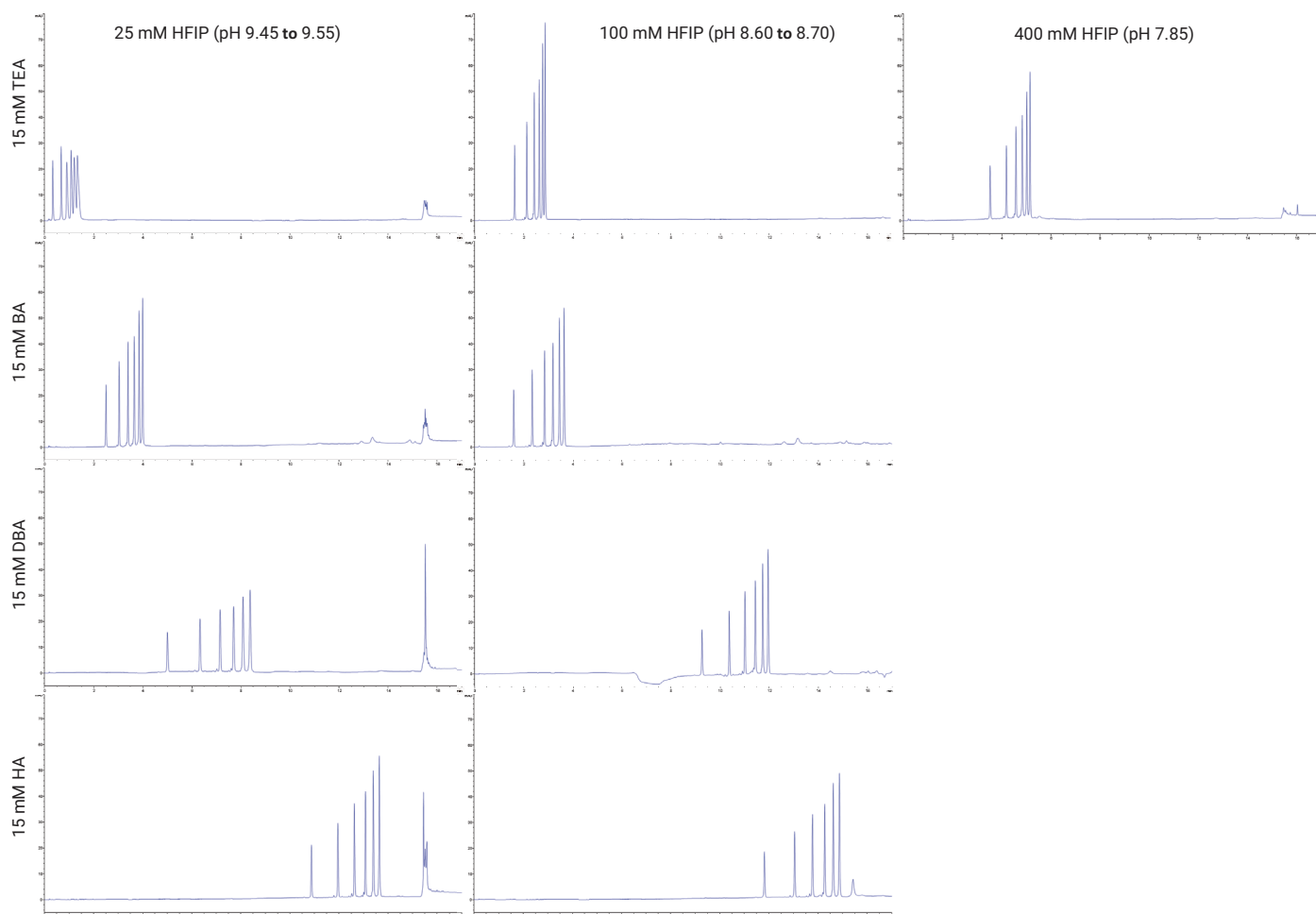


図 2. IPLC 用のさまざまな移動相添加物を使用した、260 nm における DNA ラダー標準の LC/UV 分析。移動相グラジエント：図 1 を参照してください。その他のメソッドパラメータ：実験セクションを参照してください。

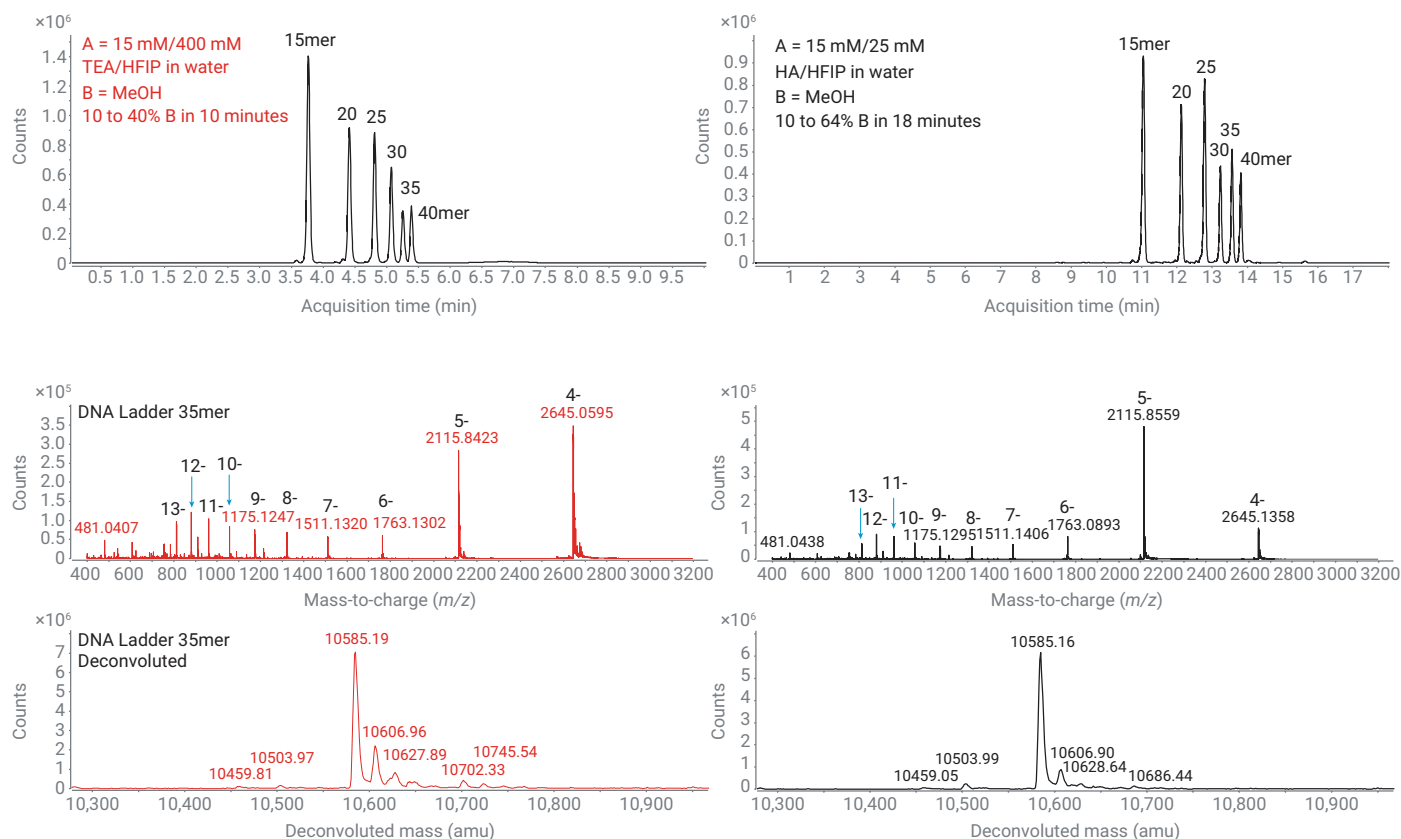


図 3. DNA ラダー標準の LC/MS 分析結果。15 mM TEA/400 mM HFIP 参照条件(左)および 15 mM HA/25 mM HFIP 代替移動相(右)。上: BPC、中: スペクトル 35mer、下: デコンボリュートしたスペクトル 35mer。移動相グラジエント: 図に示されています。その他のメソッドパラメータ: 実験セクションを参照してください。

RNA 分解能標準の分析では電荷状態のシフトは観察されませんでしたが、ここでも移動相にジブチルアミンを使用する代替条件を使用すると、付加体の少ないよりクリーンなスペクトルが得られます。付加体の生成の減少は、図 3 および図 4 の下部に示されているデコンボリュートしたスペクトルで明瞭に示されています。

治療用 ON サンプル A では、メインピークおよび、このメインピークの前に溶出する多くの不純物ピークが示されています (図 5)。これらのピークは、ショートマーに起因する可能性があります。代替条件を使用すると、メインピークと、メインピークのテールで溶出する不純物 (ロングマーではない) との間の分離度が向上します。これは、HFIP の使用量が約 8 分の 1 で分解能が向上することを意味します。

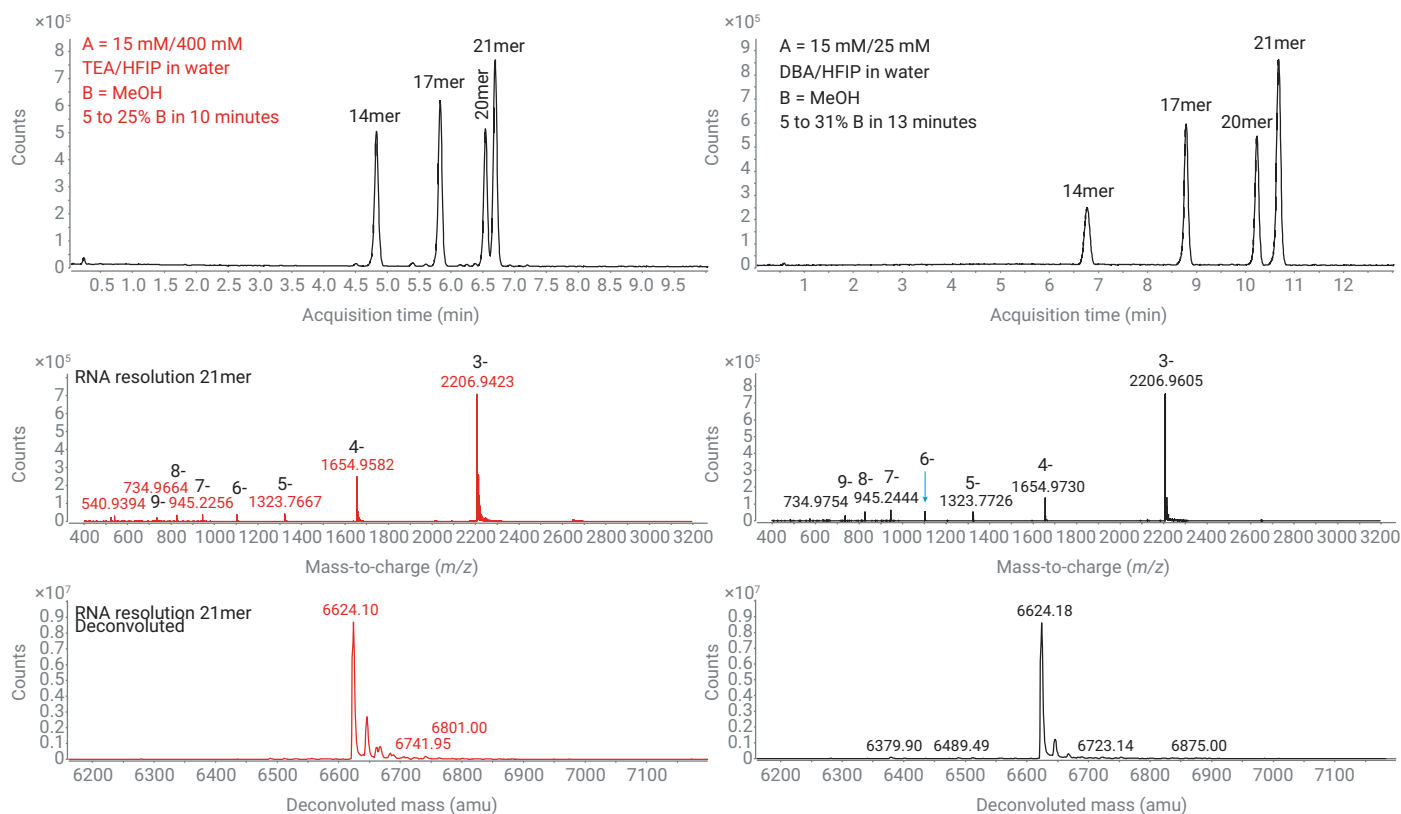


図 4. RNA 分解能標準の LC/MS 分析結果。15 mM TEA/400 mM HFIP 参照条件 (左) および 15 mM DBA/25 mM HFIP 代替移動相 (右)。上: BPC、中: スペクトル 21mer、下: デコンボリュートしたスペクトル 21mer。移動相グラジエント: 図に示されています。その他のメソッドパラメータ: 実験セクションを参照してください。

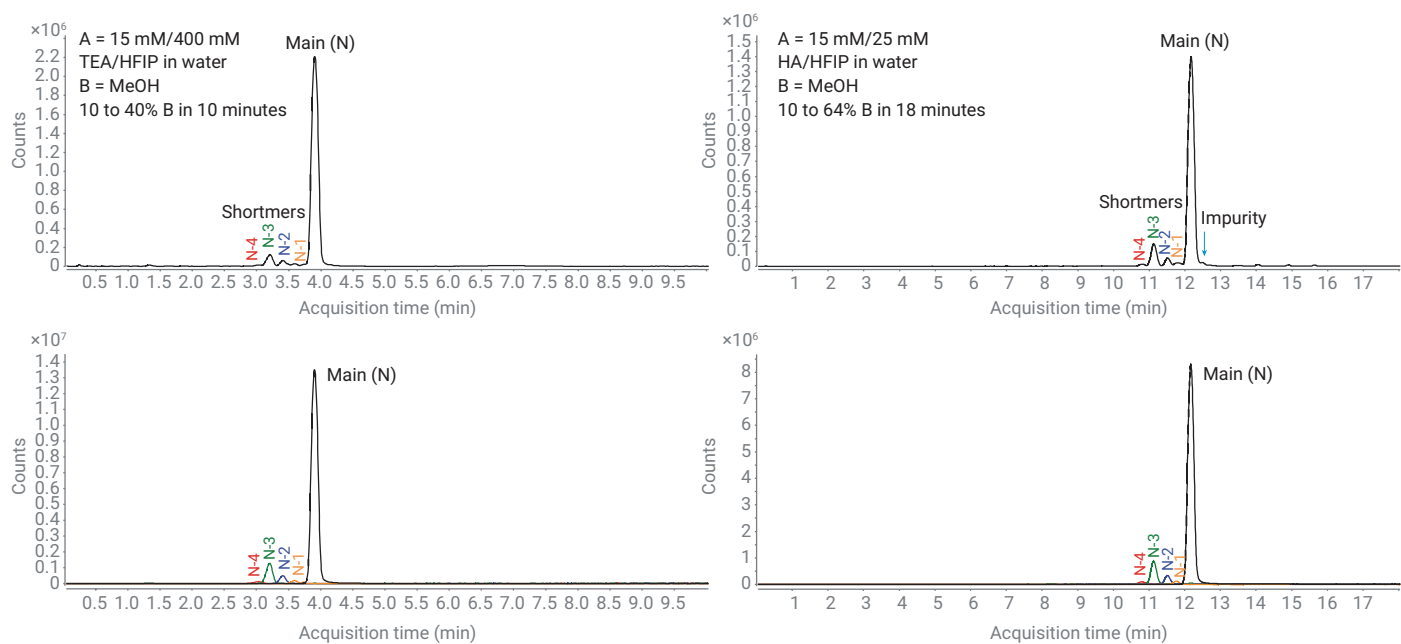


図 5. サンプル A の LC/MS 分析結果。15 mM TEA/400 mM HFIP 参照条件 (左) および 15 mM HA/25 mM HFIP 代替移動相 (右)。上: BPC、下: EIC メインおよびショートマー移動相グラジエント: 図に示されています。その他のメソッドパラメータ: 実験セクションを参照してください。

図 6 に示すのは、薬理的に活性な 21mer および 22mer のアンチセンス鎖 (as) および修飾された 21mer および 22mer のセンス鎖 (ss) で構成される 2 つの二本鎖 siRNA 治療薬 (13.5 ~ 15.0 kDa、0.5 μ M) の混合物である、治療用 ON サンプル B の LC/MS データです。65 $^{\circ}$ C の操作条件下では、二本鎖が解離して一本鎖 (as)RNA と (ss)RNA が生じることに注意してください。代替移動相 (15 mM HA および 25 mM HFIP) を使用すると、デフォルト条件 (15 mM TEA および 400 mM HFIP) と比較して、リテンションが増加し、21mer と 22mer (ss)RNA 間の分離能が大幅に向上します。21 および 22mer (ss) RNA は、細胞への取り込みを実現するために、リガンドで修飾されていることに注意して

ください。これらのクロマトグラフィーの観察は、移動相とグラジエント条件が、その性質、複雑さ、および分析の目的に応じて、任意のタイプの ON サンプルに対して最適化できること、また最適化すべきであることを再度示しています。DNA ラダー標準について以前に観察されたように、質量スペクトルは、代替条件およびより少量の付加体で、電荷エンベロープがより高い荷電種へシフトしていることを示しています。

MS の結果は、HFIP の消費が少ないという利点に加えて、一般的に代替移動相の方が質の高い MS 結果をもたらすことを示しています。特に付加体の生成は、TEA-HFIP 参照条件と比較して大幅に減少しています。付加体の生成は、流路に存在する塩に対する ON

主鎖のリン酸ジエステルの親和性のためであり、ON の IPLC/MS 分析でよく知られた現象です。付加体 (主にナトリウムとカリウム) の量は、いくつかの要因の影響を受けます。移動相、特に HFIP の品質は、付加体の有無に大きな影響を与えます。このため、移動相は新たに調製して使用し、入手可能な最高品質の HFIP を使用することが推奨されます。本実験では純度 99 % 以上の HFIP を使用しました。より高い純度のものが入手可能ですが、それに応じてコストが増加します (約 5 倍)。移動相のボトルや LC システムとキャビラリーはすべて、できる限り清浄にする必要があります。MS スペクトルの品質を向上させ、付加体の量を減らすために、LC システムの前処理または洗浄が必要になる場合があります。

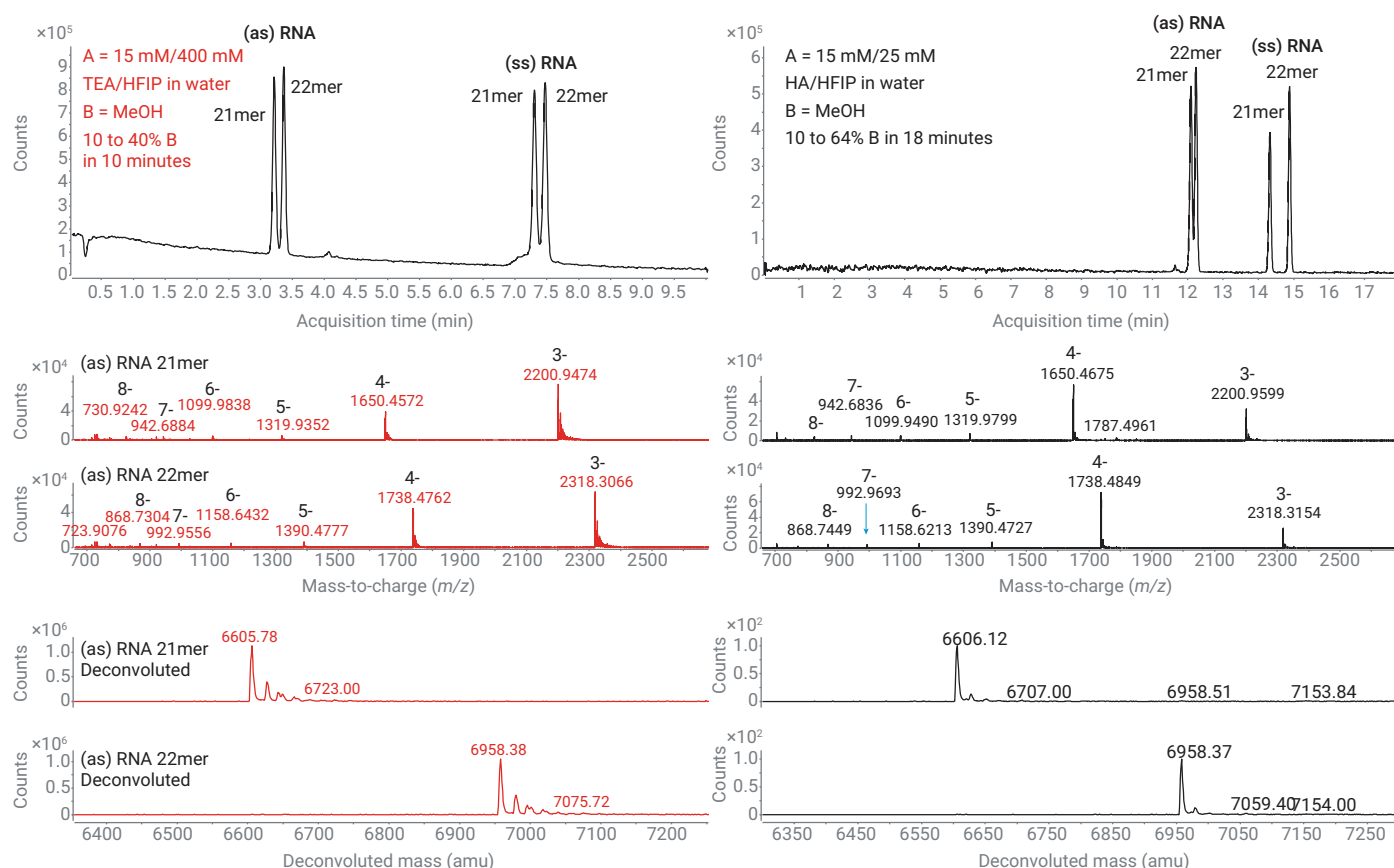


図 6. サンプル B の LC/MS 分析結果。15 mM TEA/400 mM HFIP 参照条件 (左) および 15 mM HA/25 mM HFIP 代替移動相 (右)。上: BPC、中: スペクトル (as) RNA 21mer および 22mer、下: デコンボリュートしたスペクトル (as) RNA 21mer および 22mer。移動相グラジエント: 図に示されています。その他のメソッドパラメータ: 実験セクションを参照してください。

結論

さまざまな ON の分析において、移動相の選択がクロマトグラフィーと質量分析の両方の挙動に重要な役割を果たすことを示す結果が得られました。従来の移動相の組成は、一般的な ON 分析でその価値が実証されていますが、移動相の組成は特定のサンプルに対して最適化できることが実証されました。LC/UV に一般的に使用される酢酸ベースの移動相は、主にトリエチルアミンと酢酸の組み合わせに基づいています。本アプリケーションノートの実験データは、クロマトグラフィーの品質を向上させるには多くの場合、ヘキシルアミンやジブチルアミンなどの代替アミンを使用する方が優れていることを示しました。LC/MS の作業では、感度が向上するため HFIP ベースの移動相が推奨されます。ここでも、アミンの種類と HFIP の濃度が結果に大きく影響します。移動相中の高価な HFIP の濃度を減らすことのもう 1 つの利点は、日常的に ON を分析する場合の分析コストの削減です。

参考文献

1. Goyon, A.; Yehl, P.; Zhang, K. Characterization of Therapeutic Oligonucleotides by Liquid Chromatography. *J. Pharma.Biomed. Anal.* **2020**, 182, 113105.
2. Vanhinsbergh, C. J. Analytical Separation Methods for Therapeutic Oligonucleotides. LC-GC, Chromatography Online, *Advances in Biopharmaceutical Analysis (Special Issue)* **2020**, 33(10), 20–26.
3. Li, et al. Comprehensive Hydrophilic Interaction and Ion-Pair Reversed-Phase Liquid Chromatography for Analysis of Di- to Deca-Oligonucleotides. *J. Chromatogr.A* **2012**, 1255, 237-243.
4. Krieger, S.; Dickhut, C. Direct Analysis of In-Process Oligonucleotides Without Manual Purification. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-9490EN, **2018**.
5. Apffel, A. et al. Analysis of Oligonucleotides by HPLC-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal.Chem.* **1997**, 69, 1320-1325.
6. Apffel, A. et al. New Procedure for the Use of High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Analysis of Nucleotides and Oligonucleotides. *J. Chromatogr.A* **1997**, 777, 3-21.
7. Gilar, M. et al. Ion-Pair Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Oligonucleotides: Retention Prediction. *J. Chromatogr.A* **2002**, 958(1-2), 167-182.
8. McGinnis, A. C.; Grubb, E. C.; Bartlett, M. G. Systematic Optimization of Ion - Pairing Agents and Hexafluoroisopropanol for Enhanced Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Oligonucleotides. *Rapid Commun.Mass Spectrom.* **2013**, 27(23), 2655–2664.
9. Gong, L.; McCullagh, J. S. O. Comparing Ion-Pairing Reagents and Sample Dissolution Solvents for Ion-Pairing Reversed-Phase Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis of Oligonucleotides. *Rapid Commun.Mass Spectrom.* **2014**, 28(4), 339-350.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2021
Printed in Japan, January 4, 2021
5994-2957JAJP
DE44180.3438773148