

LC-MS による合成オリゴヌクレオチドの分析に対するカラムハードウェアの影響

Dr. Ivan Lebedev¹, Brian Rivera¹, and Dr. Helen Whitby²

¹Phenomenex, Inc., 411 Madrid Ave., Torrance, CA 90501 USA

²Phenomenex Ltd., Queens Avenue, Macclesfield, Cheshire, SK10 2BN, UK

概要

治療用オリゴヌクレオチドは、製薬業界における最近の飛躍的進歩を象徴するものです。新たなドラッグデリバリー技術と連結した合成経路の信頼性の向上により、臨床的に興味を引くオリゴヌクレオチドの標的に関心が高まっています。クロマトグラフィー上では、オリゴヌクレオチドの極性の性質とホスホジエステル骨格に起因する課題が生まれます。この課題に対応するには、イオン対逆相クロマトグラフィー (IP-RPLC) が必要であり、一般的に HFIP などのペルフルオロアルコールとアルキルアミンイオン対で構成される移動相を用います。

IP-RPLC の組成を最適化するとクロマトグラフィー分離を改善できますが、従来の HPLC カラムハードウェアのステンレススチールでは微量金属とキレート結合するオリゴヌクレオチドの性質に対応できません。ここでは 2 つの合成オリゴヌクレオチドのクロマトグラフィーとエレクトロスプレーイオン化の影響について、従来のステンレススチールと BioTi™ (生体不活性流路を提供する多層チタンチューブ) を比較検討します。

図 1 に示すように、LC-MS で二本鎖 RNA を分析すると非特異的と考えられる相互作用が観測されます。これにより、後で溶出するアンチセンス鎖が二峰性のピークとなりますが、フルスキャンと MS/MS データによってこの二峰性が同じ分析対象物であることが確認されます。逆に、生体不活性ハードウェアを使用すると、センス鎖とアンチセンス鎖が明確に分離されるため、図 2 の MS データでは、BioTi ハードウェアのおかげで影響がほとんどまたは全く見られないことが確認されます。BioTi で分析すると、ピーク高とピーク面積が改善された高い感度も観測され、比較的濃度の HFIP とイオン対を用いたオリゴヌクレオチドの特性評価の有用性が示されます。

このイオン化の改善は一本鎖核酸でも観測されます。ヌシネルセンの分析では、BioTi を用いると感度が著しく改善します。ここでは、Biozen Oligo (BioTi に充填) で分析することで、同程度の充填効率と同一バッチの充填剤が充填されたステンレススチールカラムと比較して、感度の桁違いの改善を観測しました (図 3)。

要約すれば、生体不活性ハードウェアを使用すると、オリゴヌクレオチドのクロマトグラフィーの性能と一貫性が改善できるだけでなく、感度の改善も潜在的にもたらされ、定量分析と特性評価の両方が可能になります。

LC 条件 (図 1 と図 2)

Columns: Biozen™ 2.6 µm Oligo (*BioTi*)
Clarity™ 2.6 µm Oligo-XT (*Stainless Steel*)
Dimension: 100 x 2.1 mm
Part No.: [00D-4790-AN](#)
[00D-4746-AN](#)
Mobile Phase: A: 4 mM TEA in Water; 12.5 mM HFIP
B: 4 mM TEA in Methanol; 12.5 mM HFIP
Gradient: 5-30 % B in 14 minutes
Flow Rate: 0.3 mL/min
Injection: 12.5 ng
Temperature: 55° C
Detection: TOF-MS
Sample: siRNA

LC 条件 (図3)

Columns: Biozen 2.6 µm Oligo (*BioTi*)
Clarity 2.6 µm Oligo-XT (*Stainless Steel*)
Dimension: 100 x 2.1 mm
Part No.: [00D-4790-AN](#)
[00D-4746-AN](#)
Mobile Phase: A: 10 mM Hexylamine in Water;
12.5 mM HFIP
B: 10 mM Hexylamine in Methanol;
12.5 mM HFIP
Gradient: 25-75 % B in 14 minutes
Flow Rate: 0.3 mL/min
Injection: 12.5 ng
Temperature: 65° C
Detection: TOF-MS
Sample: Nusinersen



図 1. 標準的な UHPLC ハードウェアを用いた siRNA の LC-MS 分析

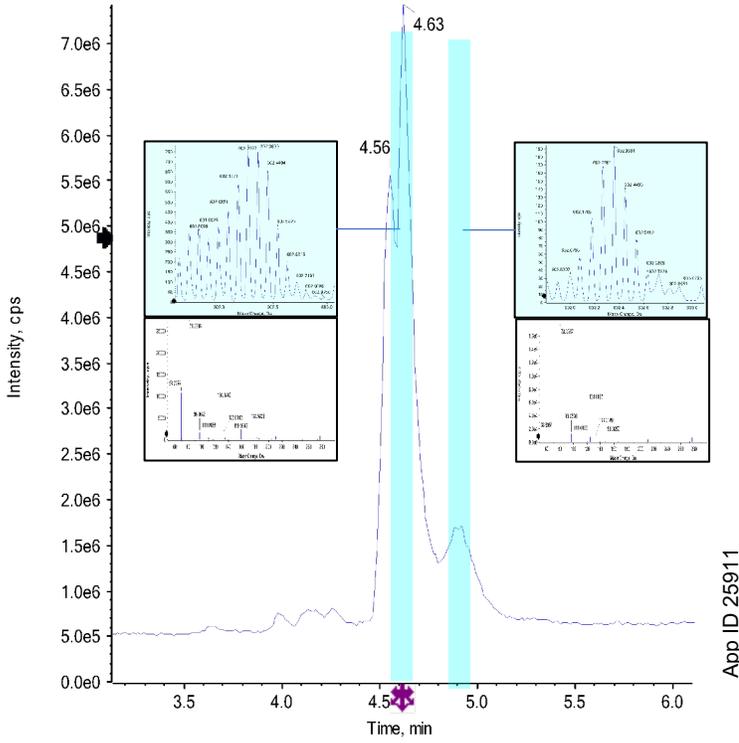


図 2. 生体不活性ハードウェアを用いた siRNA の LC-MS 分析

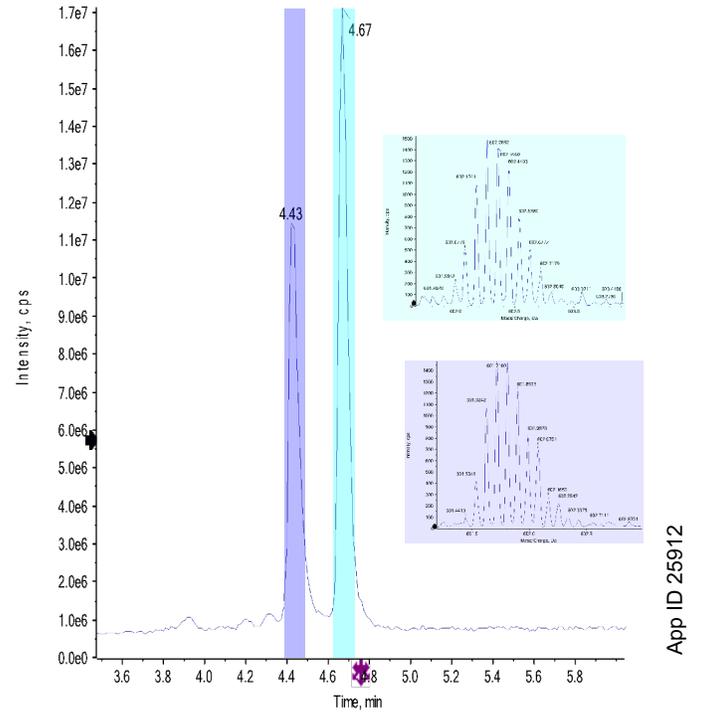
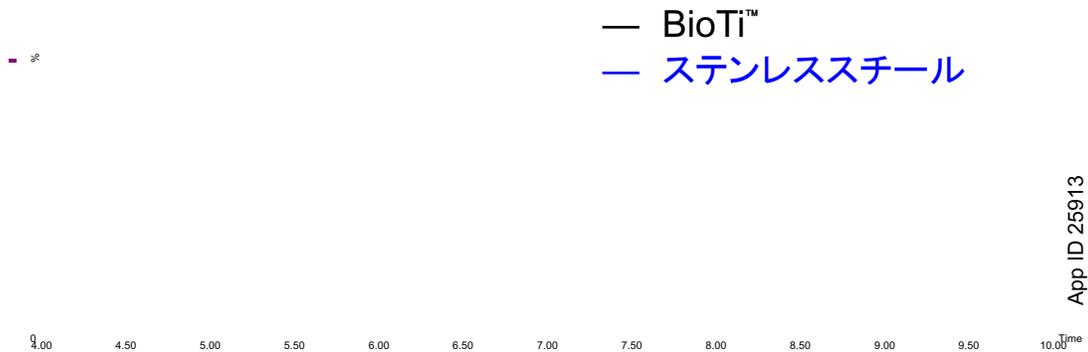


図 3. ヌシネルセン比較 (ステンレススチール vs 生体不活性)



異なるカラムサイズやサンプル前処理フォーマットが必要ですか？

大丈夫です！ご利用になれるほとんどのサイズは、www.phenomenex.com でご覧いただけます。もし必要なものがすぐに見つからない場合は、オンラインチャットポータルwww.phenomenex.com/LiveChatからご連絡ください。テクニカルスペシャリストが丁寧に解決策をご案内いたします。

アイルランド t: +353 (0)1 247 5405 eireinfo@phenomenex.com	スウェーデン t: +46 (0)8 611 6950 nordicinfo@phenomenex.com	ポーランド t: +48 22 104 21 72 pl-info@phenomenex.com
アメリカ (米国) t: +1 (310) 212-0555 info@phenomenex.com	スペイン t: +34 91-413-8613 espinfo@phenomenex.com	ポルトガル t: +351 221 450 488 ptinfo@phenomenex.com
イギリス (英国) t: +44 (0)1625-501367 ukinfo@phenomenex.com	スロバキア t: +420 272 017 077 sk-info@phenomenex.com	メキシコ t: 01-800-844-5226 tecnicomx@phenomenex.com
イタリア t: +39 051 6327511 italiainfo@phenomenex.com	タイ t: +66 (0) 2 566 0287 thaiinfo@phenomenex.com	ルクセンブルク t: +31 (0)30-2418700 nlinfo@phenomenex.com
インド t: +91 (0)40-3012 2400 indiainfo@phenomenex.com	チェコ共和国 t: +420 272 017 077 cz-info@phenomenex.com	台湾 t: +886 (0) 0801-49-1246 twinfo@phenomenex.com
インドネシア t: +62 21 5010 9707 indoinfo@phenomenex.com	デンマーク t: +45 4824 8048 nordicinfo@phenomenex.com	中国 t: +86 400-606-8099 cninfo@phenomenex.com
オーストラリア t: +61 (0)2-9428-6444 auinfo@phenomenex.com	ドイツ t: +49 (0)6021-58830-0 anfrage@phenomenex.com	日本 t: +81 (0) 120-149-262 jpinfo@phenomenex.com
オーストリア t: +43 (0)1-319-1301 anfrage@phenomenex.com	ニュージーランド t: +64 (0)9-4780951 nzinfo@phenomenex.com	香港 t: +852 6012 8162 hkinfo@phenomenex.com
オランダ t: +31 (0)30-2418700 nlinfo@phenomenex.com	ノルウェー t: +47 810 02 005 nordicinfo@phenomenex.com	◎ その他の国/地域: 米国本社 t: +1 (310) 212-0555 info@phenomenex.com
カナダ t: +1 (800) 543-3681 info@phenomenex.com	フィンランド t: +358 (0)9 4789 0063 nordicinfo@phenomenex.com	
シンガポール t: +65 800-852-3944 sginfo@phenomenex.com	フランス t: +33 (0)1 30 09 21 10 franceinfo@phenomenex.com	
スイス t: +41 (0)61 692 20 20 swissinfo@phenomenex.com	ベルギー t: +32 (0)2 503 4015 (フランス語) t: +32 (0)2 511 8666 (オランダ語) beinfo@phenomenex.com	

www.phenomenex.com

Phenomenexの製品は世界中どこでもお求めいただけます。他の国・地域の販売代理店については、Phenomenex USA 海外事業部 (jpinfo@phenomenex.com) までお問い合わせください。

保証

あなたの幸せが私たちの幸せです。弊社の商品
 をご使用になり、万が一ご満足いただけない場
 合は、商品到着後45日以内にご連絡ください。

www.phenomenex.com/behappy

規約

Phenomenex の標準規約に従うものとします。詳細は www.phenomenex.com/TermsAndConditions をご覧ください。

商標

Biozen, BioTi, ClarityおよびBE-HAPPYはPhenomenexの商標です。
 研究利用に限定。臨床診断法への利用禁止。

© 2022 Phenomenex, Inc. All rights reserved.

