

オリゴヌクレオチド -カラム温度による分離改善-

Oligonucleotide -Using High Temperature HPLC for Improved Analysis-

近年注目される核酸医薬品は、一般的に核酸あるいは修飾型核酸を化学合成により直鎖状に結合させて製造します。このとき分離困難なn-1欠損体が生じるため、これらの分離が重要な課題となります。今回は逆相イオン対クロマトグラフィー(IP-RP-HPLC)により、オリゴヌクレオチド混合物について分析を行いました。L-column3 C18 2 μm をカラム温度60℃で使用することにより n-1欠損体を10分以内で良好に分離することができました。また、L-column3 は非常に耐久性が高いため、長期間の繰り返し分析を行っても非常に安定した保持とピーク形状が得られます。

Key words : Octadecyl silanized silica gel, IP-RP-HPLC, Oligonucleotide, UHPLC
Column : L-column3 C18 (USP category: L1)

[Analytical conditions]

Column : L-column3 C18 (2 μm, 12 nm); 2.1 mm I.D. × 50 mm L.; Cat. No. 813140
Eluent : A: 100 mM TEAA (Triethylamine acetate buffer) pH 7.0/CH₃CN (80/20); B: 100 mM TEAA pH 7.0
[40℃] A/B, 50/50-56/44-61/39 (0-2-10 min)
[50℃] A/B, 48/52-54/46-60/40 (0-2-10 min)
[60℃] A/B, 46/54-52/48-59/41 (0-2-10 min)
Flow rate : 0.5 mL/min
Temperature : 40℃, 50℃, 60℃
Detection : UV 265 nm
Injection volume : 1 μL
System : NEXERA (SHIMADZU CORPORATION)
Mixer volume : 180 μL
Sample : Waters MassPREP OST Standard (10 μmol/L each) in TE buffer pH 8.0 ※
※: 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0

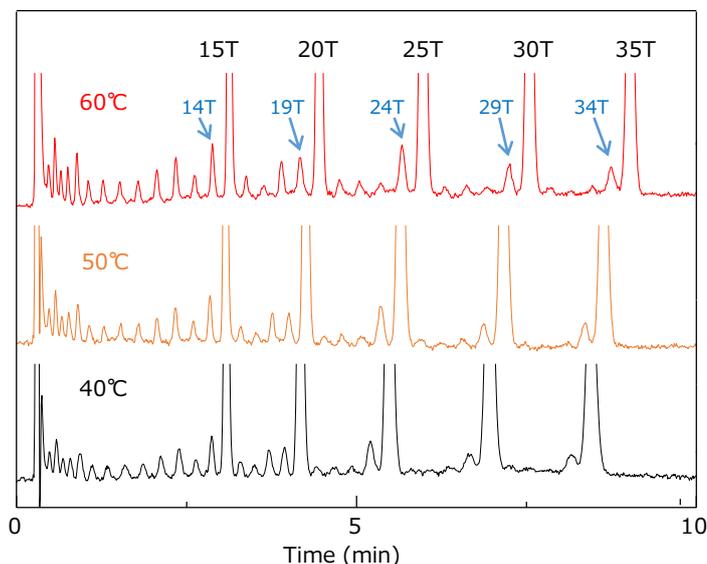


Fig. 1 Effect of column temperature.

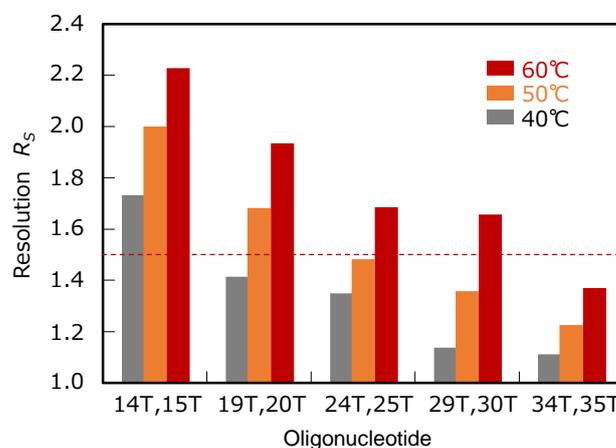


Fig. 2 Resolution $R_s(n-1,n)$ of Oligonucleotides depending on column temperature.

グラジエント条件はカラム温度毎に分析時間10分で溶出するように調整しました。カラム温度が高いほど分離が改善しました。このように、オリゴヌクレオチドのような分子量の大きな試料では、カラム温度を高温にすることで試料のカラム内での物質移動速度を速め、ピークをよりシャープにすることができます。

[Repeatability conditions]

Column : L-column3 C18 (2 μm , 12 nm); 2.1 mm I.D. \times 50 mm L.; Cat. No. 813140
 Eluent : A: 100 mM TEAA pH 7.0/CH₃CN (80/20); B: 100 mM TEAA pH 7.0
 A/B, 46/54-52/48-59/41 (0-2-10 min)
 Flow rate : 0.5 mL/min
 Temperature : 60°C
 Detection : UV 265 nm
 Injection volume : 1 μL
 System : NEXERA XR (SHIMADZU CORPORATION)
 Mixer volume : 150 μL
 Sample : Waters MassPREP OST Standard (10 $\mu\text{mol/L}$ each) in TE buffer pH 8.0

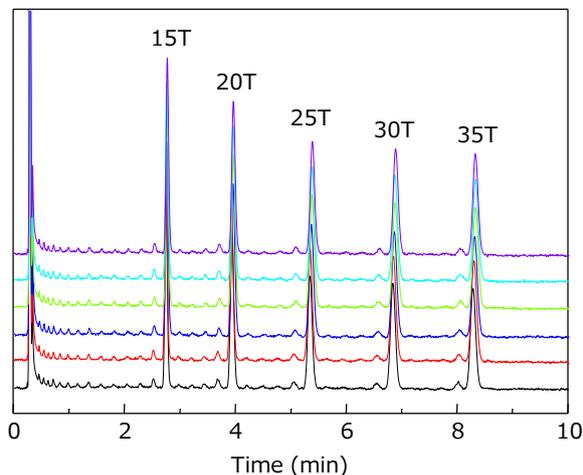


Fig. 3 Repeatability of oligonucleotide analysis.

再現性は非常に良好であることを確認しました。
 ただし、ミキサ容量が小さすぎたり、グラジエント開始時の有機溶媒組成が高すぎると再現性が顕著に悪化するため注意が必要です。

[Long-term repeatability conditions]

Column : L-column3 C18 (3 μm , 12 nm) ; 2.1 mm I.D. \times 50 mm L.; Cat. No. 811140
 Brand C (C18, 3.5 μm , 13 nm); 2.1 mm I.D. \times 50 mm L.
 Eluent : A: CH₃CN; B: 100 mM TEAA pH 7.0
 [L-column3] A/B, 10.5/89.5-13.5/86.5 (0-5 min)
 [Brand C] A/B, 10/90-13/87 (0-5 min)
 Flow rate : 0.2 mL/min
 Temperature : 60°C
 Detection : UV 265 nm
 Injection volume : 1 μL
 System : NEXERA XR (SHIMADZU CORPORATION)
 Mixer volume : 150 μL
 Sample : 15T, 20T, 25T mer 20 $\mu\text{mol/L}$ each in TE buffer pH 8.0

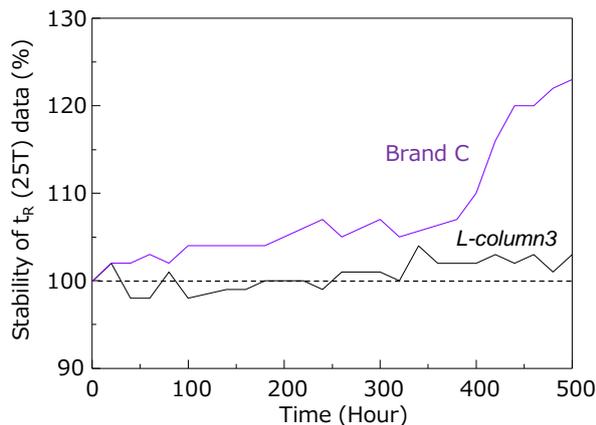
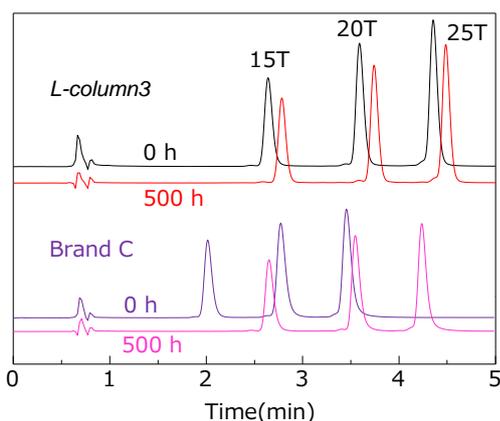


Fig. 4 Long-term repeatability of oligonucleotide analysis.

長期間における繰り返し分析により、カラムの充填剤表面の劣化に起因した保持の遅延が発生することがわかりました。
 L-column3は非常に耐久性が高く、安定した保持が得られます。

2021.7 Oba