

逆相カラムによるオリゴヌクレオチドの高分離分析

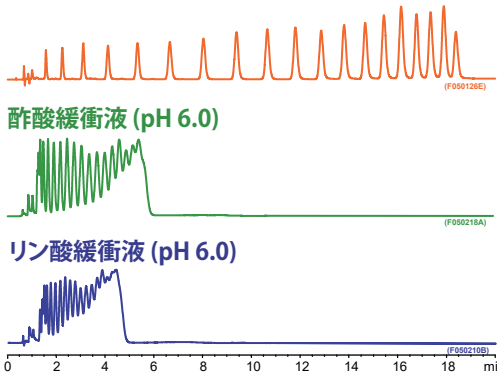
F121018A-2

オリゴヌクレオチド分析に適したイオンペア逆相HPLC

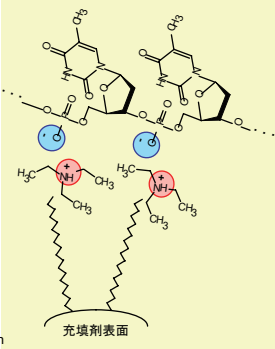
移動相による保持や分離の比較

Oligodeoxythymidylic acid, [d(T)₂₋₂₀]

トリエチルアミン-酢酸緩衝液 (TEAA) (pH 6.0)



イオンペア逆相HPLCによる
オリゴヌクレオチドの保持機構
(模式図)



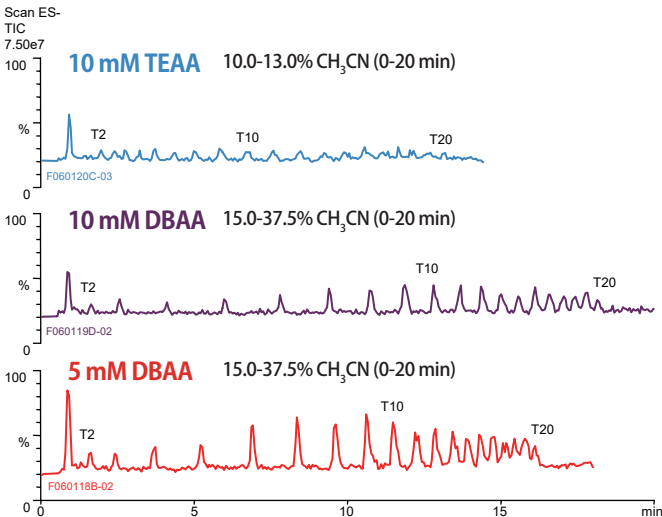
Column	: Hydrosphere C18 (3 μm, 12 nm) 50 X 4.6 mm I.D.	Flow rate	: 1.0 mL/min
Eluent	: A) 100 mM buffer B) 100 mM buffer/acetonitrile (80/20) 50-65%B (0-20 min)	Temperature	: 35°C
		Detection	: UV at 269 nm
		Injection	: 5 μL (5 nmol/mL)

- 3種の緩衝液を用いて、鎖長の異なるオリゴデオキシチミジル酸 [d(T)₂₋₂₀]の分析を同一グラジエント条件下で比較しています。
- 酢酸緩衝液およびリン酸緩衝液では保持が小さく分離不良ですが、トリエチルアミン-酢酸緩衝液では保持が大きく、1塩基の違いが良好に分離されています。
- トリエチルアミン (TEA) やジブチルアミン (DBA) のように、分子内に正の解離基と疎水性官能基を有するイオンペア試薬は、負に解離したオリゴヌクレオチドと電荷として中性のイオンペアを形成することにより、C18のような逆相充填剤への保持を高め、分離を向上させます。

LC/MS分析への適用

イオンペア試薬の種類・濃度による分離やMS感度の比較

Oligodeoxythymidylic acid, [d(T)₂₋₂₀]

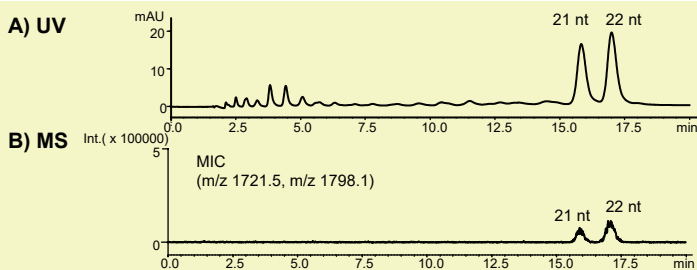


Column	: Hydrosphere C18 (3 μm, 12 nm), 50 X 2.0 mm I.D.
Eluent	: A) 10 mM triethylamine-acetic acid (pH 6.0) B) 10 mM triethylamine-acetic acid (pH 6.0)/acetonitrile (80/20) 50-65%B (0-20 min) A) 10 mM di-n-butylamine-acetic acid (pH 6.0) B) 10 mM di-n-butylamine-acetic acid (pH 6.0)/acetonitrile (50/50) 30-75%B (0-20 min) A) 5 mM di-n-butylamine-acetic acid (pH 6.0) B) 5 mM di-n-butylamine-acetic acid (pH 6.0)/acetonitrile (50/50) 30-75%B (0-20 min)
Flow rate	: 0.2 mL/min
Temperature	: 35°C
Detection	: ESI-negative mode
Injection	: 5 μL (5 nmol/mL)

- TEAやDBAはいずれも揮発性のイオンペア試薬であり、LC/MS分析にも適用できますが、同一塩濃度においてTEAよりもDBAのほうがオリゴヌクレオチドの保持が大きく、MSの検出感度も良好です。
- ジブチルアミン-酢酸緩衝液 (DBAA) の10 mMと5 mMを比較すると、5 mMにおいて保持や一部の分離が低下するものの、MS検出感度は向上しています。

miRNAのLC/MS分析

5'-pUGG AGU GUG ACA AUG GUG UUG-3' (21 nt, MW 6890.1)
5'-pUGG AGU GUG ACA AUG GUG UUG U-3' (22 nt, MW 7196.3)



Column	: YMC-Triart C18 (3 μm, 12 nm), 150 X 2.0 mm I.D.
Eluent	: A) 10 mM di-n-butylamine-acetic acid (pH 7.5) B) 10 mM di-n-butylamine-acetic acid (pH 7.5)/acetonitrile (50/50) 62-72%B (0-20 min)
Flow rate	: 0.2 mL/min
Temperature	: 30°C
Detection	: A) UV at 260 nm B) ESI-negative mode
Injection	: 4 μL (5 nmol/mL)
System	: LC) Shimadzu Prominence MS) Shimadzu LCMS2020

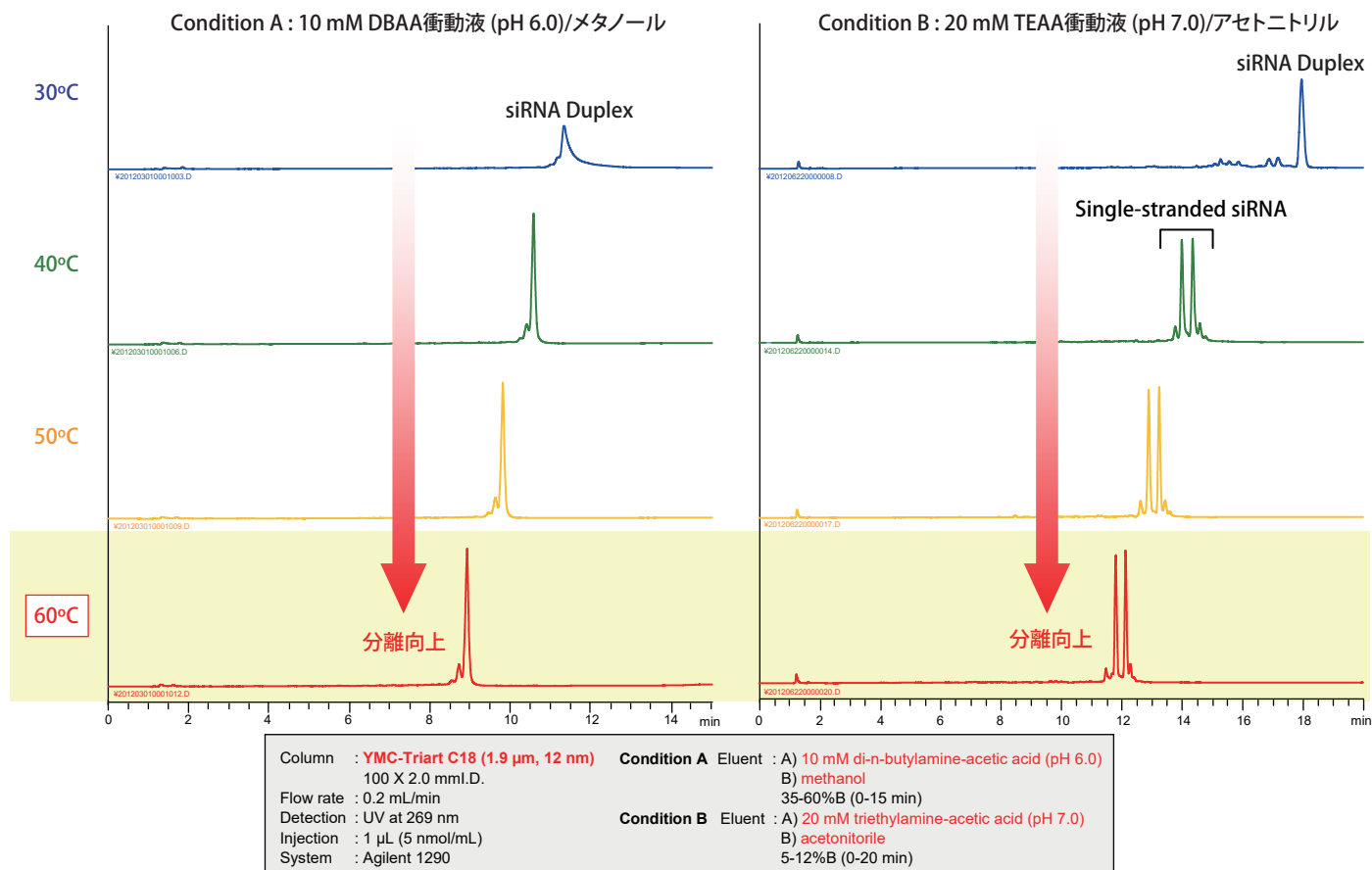
- 10 mM DBAA緩衝液/アセトニトリルを移動相として、miRNAの21 ntと22 ntの混合物を分離しています。1 ntの違いにより良好に分離し、MS検出が可能です。

Courtesy of M. Yamada, SHIMADZU CORPORATION

有機シリカハイブリッドカラムYMC-Triart C18によるオリゴヌクレオチドの高温分析

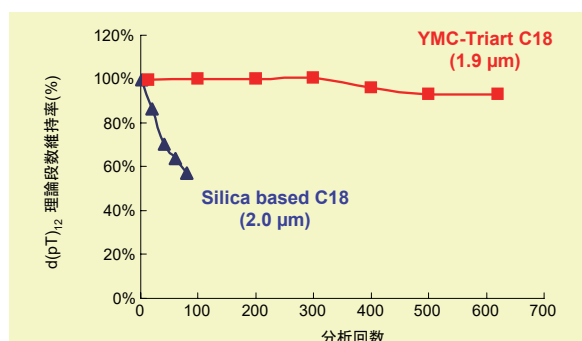
移動相やカラム温度による2本鎖siRNAの分離の分析

Crude synthetic siRNA duplex (19 bp) : 5'-CGU ACG CGG AAU ACU UCG AdTdT-3'
3'-dTdTGCA UGC GCC UUA UGA AGC U-5'



- 有機シリカハイブリッドカラムYMC-Triart C18を用いて、同一の2本鎖siRNAを異なる移動相条件（イオンペアや有機溶剤の種類など）で、それぞれカラム温度を30～60°Cの間で変更して分析した結果を比較しています。
- Condition A, Bともに、カラム温度の上昇に伴ってピーク形状は良好となり、近接した不純物との分離が向上しています。DNAやRNAのような分子の大きな化合物ではペプチドやタンパク質と同様¹⁾、高温条件にすることで物質移動速度が改善し、ピーク形状や分離が向上する傾向にあります。
- Condition Aの全ての温度およびCondition Bの30°Cでは、2本鎖RNAが1ピークとして検出されていますが、Condition Bの40°C以上では、カラム内で変性して生じた1本鎖RNAがそれぞれ分離され2ピークとして検出されています。このように、高温条件で2本鎖から1本鎖に変性させて分析する「変性HPLC (Denaturing HPLC)」は、遺伝子変異解析などの目的で広く用いられています。
- 同じ温度条件下でのCondition AとBにおいて、非変性状態/変性状態に差が見られるように、2本鎖DNAやRNAの変性は温度以外にも、塩のイオン強度（種類、濃度）やpH、溶媒の極性などの影響を受けます。分析対象物や目的（未変性状態での分析、あるいは変性状態での分析）に応じて、カラム温度や移動相条件を最適化することが有効です。

pH 6.0, 65°CにおけるYMC-Triart C18の耐久性



Test condition	Column : 1.9 μ m or 2.0 μ m, 12 nm, 50 X 2.0 mm.I.D.
	Eluent : A) 10 mM di-n-butylamine-acetic acid (pH 6.0) B) methanol
	30-50%B (0-20 min)
	Flow rate : 0.4 mL/min
	Detection : UV at 269 nm
	Temperature : 65°C
	Sample : Oligodeoxythymidylic acid, [d(T) ₂₋₂₀]
	Injection : 1 μ L (5 nmol/mL)
	System : Agilent 1290

- アミン系イオンペア試薬を含む中性の移動相と高温条件の組み合わせは、オリゴヌクレオチドの高分離分析や変性HPLCに最適ですが、このような条件では一般的なシリカ基材の逆相カラムは耐久性が劣り、連続使用は困難です。
- YMC-Triart C18カラムは有機シリカハイブリッド基材に緻密な表面修飾を施しているため、優れた耐久性を示し、オリゴヌクレオチドのHPLC分析に最適です。

1) ペプチド・タンパク質の高温分析に関する技術資料「ペプチド・タンパク質の逆相HPLCにおけるカラム温度の効果 (No. F120726A)」をご用意しております。ご入用の際は弊社ウェブサイトよりダウンロードいただくか、弊社までお問い合わせ下さい。