

トリフルオロエタノールを移動相中の添加剤として使用したイオン対逆相クロマトグラフィーによるオリゴヌクレオチドの分離

Separation of Oligonucleotides by Ion-pairing reversed phase chromatography using Trifluoroethanol as an Additive in the Mobile phase

核酸医薬品は、ペプチド医薬品と共に次世代医薬品の 1 つとして注目されており、数個から百数十個が連なったヌクレオチドにより構成されています。合成オリゴヌクレオチドの品質管理では、合成工程における生成物の確認や純度確認工程における不純物検知のために HPLC 法が汎用されています。質量分析計を検出器として使用する場合、イオン対逆相クロマトグラフィーが一般的に用いられます。特に、分析種と充填剤間における相互作用の制御と検出感度の向上を目的として、トリエチルアミン (TEA) とヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) を添加剤とした移動相が多用されています。しかし、HFIP は、HPLC で汎用される溶媒の中で最も高価な試薬の 1 つであるため、代替法の 1 つとして、アルキルアンモニウム酢酸塩を用いるメソッドが提案されていますが、イオン化阻害の影響による感度低下に課題がありました。

今回、HFIP の代替溶媒として、同じフッ素系アルコールであるトリフルオロエタノール (TFE) の使用を検討した結果を紹介します。電気陰性度が高いフッ素原子を含むフッ素系アルコールは、双極子モーメントが大きいため、その構造中のアルコール性水酸基が酸性水酸基のように作用することが知られています。TFE を酸として使用し、種々のアルキルアミンと組み合わせた移動相を用いて、イオン化阻害の影響とオリゴヌクレオチドの分離選択性について評価しました。

移動相に添加するアルキルアミンとして、炭素数が 3~8、log*P*_{ow} 値が 0.48~2.83 である 8 種類を検討しました。イオン化阻害の確認は、20 mer のオリゴヌクレオチドを分析種とし、アルキルアミンとフッ素系アルコールを含む分析種溶液を検出器に直接注入する方法により行いました。検出器は、TripleTOF® 5600+ (SCIEX) を使用し、ESI (ネガティブ) をイオン化法としました。

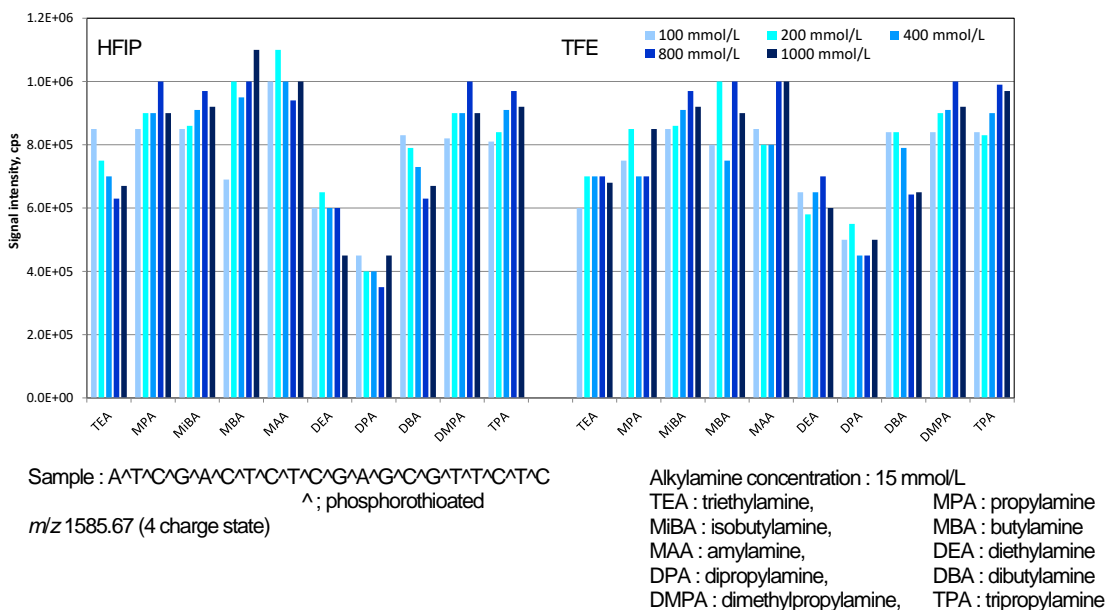


図1 フッ素系アルコールとアミンを含む試料溶媒を直接注入した場合のシグナル強度の比較

アルキルアミン濃度を 15 mmol/L、フッ素系アルコール濃度を 100~1000 mmol/L の濃度に調製した種々の溶媒 (50 %アセトニトリル水溶液) を用いてシグナル強度を比較した結果を図 1 に示します。アルキルアミンの種類やフッ素系アルコールの濃度を变化させた場合も、フッ素系アルコールの種類によるシグナル強度の差異は認められませんでした。ESI におけるイオン化阻害は、分析種の共存成分が酸として働く効果と帯電液滴の表面張力が大きくなることで液滴の分裂が阻害される効果との組み合わせで起こることが知られており、今回の結果は、TFE と HFIP の酸としての緩衝効果が同等であり、いずれの溶媒でも液滴の表面張力を大きくする作用が小さいことを示すものと考えられます。

アルキルアミンの種類について検討した結果、 $\log P_{ow}$ 値の増加に従い、保持力が強くなる傾向が認められましたが、TEA の様に、全体の

$\log P_{ow}$ 値が大きくても各炭素鎖が短い場合は、保持力は低下しました。理論段数やシンメトリー係数も合わせて評価した結果、今回検討したアミンの中では、水への溶解性が高く、適当な保持力が得られた DMPA (1,2-ジメチルプロピルアミン、炭素数 5) が適当でした。

TFE 又は HFIP を移動相中の添加剤として使用してオリゴデオキシチミジンを分離したクロマトグラムの比較を図 2 に示します。分離選択性の違いが認められ、特に、非 S 化及び完全 S 化の同鎖長オリゴヌクレオチドの分離において TFE では高い分離選択性を示し、S 化による分析種の疎水性の違いに対する選択性が高いことが判りました。各種オリゴヌクレオチドの分離に適用したクロマトグラムを図 3、4 に示します。20 mer 完全 S 化体 (20FLP) に対して、19 mer (20-(n-1)) と部分 S → O 置換体 (20-O-1、20-O-10、20-O-1,10) が良好に分離されていることが判ります (図 4)。

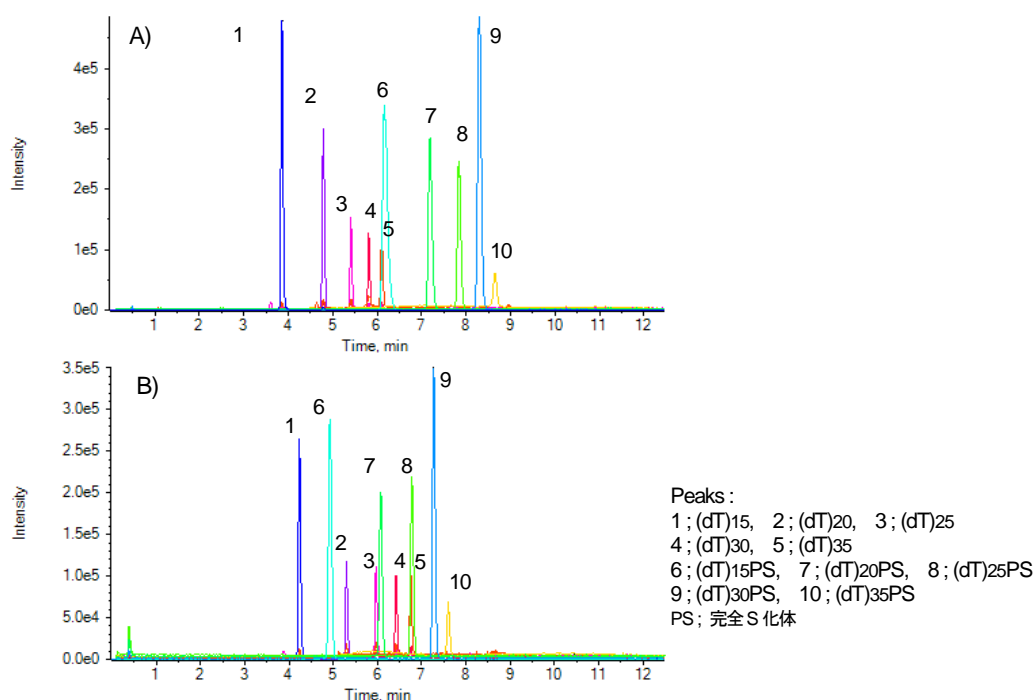


図 2 オリゴデオキシチミジン (非 S 化、S 化) のクロマトグラムの比較 (A: TFE 条件、B: HFIP 条件)

- A) Column : TSKgel ODS-120H (2.0 mmI.D. × 7.5 cm, 1.9 μm)
 Eluent : A ; 10 mmol/L DMPA, 600 mmol/L TFE in water
 B ; 10 mmol/L DMPA, 600 mmol/L TFE in methanol
 Gradient : B conc.(0 min) 5 % → (10-12 min) 25 % → (12.1-20 min) 5 %
 Flow rate : 0.4 mL/min Column temp. : 60 °C Injection vol. : 5 μL
- B) Column : TSKgel ODS-120H (2.0 mmI.D. × 7.5 cm, 1.9 μm)
 Eluent : A ; 15 mmol/L TEA, 400 mmol/L HFIP in (water/methanol=80/20)
 B ; 15 mmol/L TEA, 400 mmol/L HFIP in methanol
 Gradient : B conc.(0 min) 0 % → (10-12 min) 20 % → (12.1-20 min) 0 %
 Flow rate : 0.4 mL/min Column temp. : 60 °C Injection vol. : 5 μL

