

親水性相互作用クロマトグラフィーを用いたオリゴヌクレオチドの分離

Separation of Oligonucleotides by Hydrophilic interaction chromatography

既報 T/I No.199 では、トリフルオロエタノール (TFE) を添加した移動相を用いたオリゴヌクレオチドのイオン対逆相クロマトグラフィー (IP-RPC) による分離例を紹介しました。HPLC を用いた合成オリゴヌクレオチドの分析では、IP-RPC とは異なる分離を得る目的で、イオン交換クロマトグラフィー (IEC) と RPC を組み合わせた 2D-LC が用いられる場合があります。本報では、分離選択性を変える手法の 1 つとして、移動相にイオン対試薬を必要とせず、高極性化合物の保持が得られる特長を有する親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) を用いた例を紹介します。

分析カラムとして、カルバモイル基を官能基とした TSKgel Amide-80 2 μ m を使用しました。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。HILIC と IP-RPC によるオリゴデオキシチミジンのクロマトグラムの比較を図 1 に示します。いずれのモードにおいても、重合度が高い程保持が大きくなりますが、S 化修飾体に関しては、S 化されることで疎水性が高くなるため、IPC-RPC では保持が強くなるのに対して、HILIC では保持が弱くなる傾向を示しました。

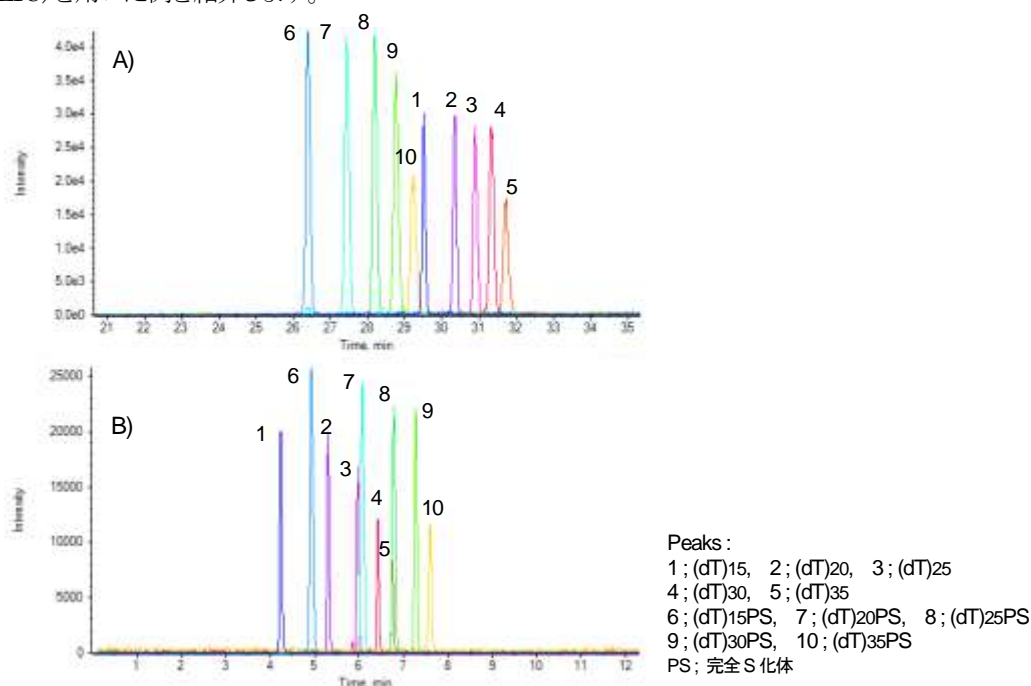


図 1 オリゴデオキシチミジン (非 S 化、S 化) のクロマトグラムの比較 (A: HILIC 条件、B: IP-RPC 条件)

- A) Column: TSKgel Amide-80 2 μ m (2.0 mm I.D. x 15 cm, 2 μ m)
 Eluent: A; 50 mmol/L ammonium formate (pH 4.8)
 B; acetonitrile
 Gradient: B conc. (0 min) 98% → (40-42 min) 40% → (42.5-55 min) 98%
 Flow rate: 0.2 mL/min Column temp.: 50 °C Injection vol.: 5 μ L
- B) Column: TSKgel ODS-120H (2.0 mm I.D. x 7.5 cm, 1.9 μ m)
 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 μ L

