

2021.11.9

JASIS2021 新技術説明会



核酸分析の新提案！

逆相モードによるHPLC分析例のご紹介

株式会社 大阪ソーダ

TEL: 06-6110-1598 FAX: 06-6110-1612

E-mail: silica@osaka-soda.co.jp

URL: <https://sub.osaka-soda.co.jp/HPLC/>

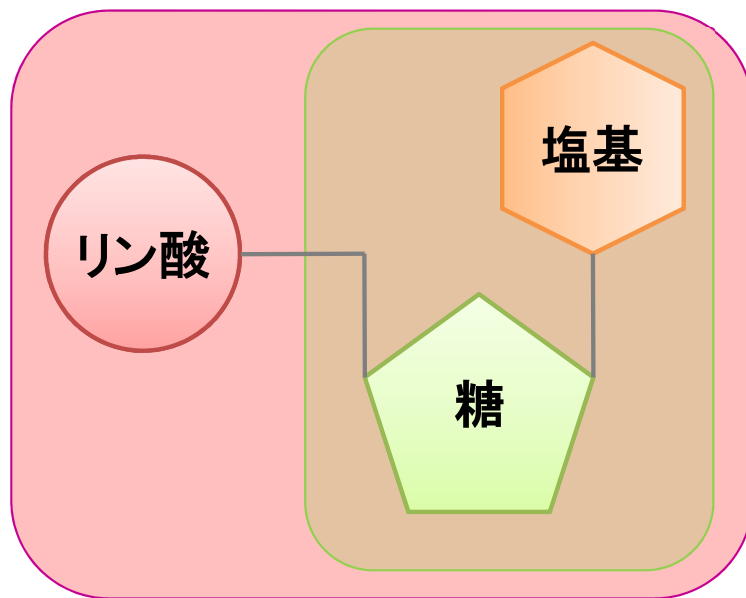
核酸

核酸は、デオキシリボ核酸(DNA)及びリボ核酸(RNA)の総称です。
塩基、糖、リン酸からなるヌクレオチドがホスホジエステル結合で連なったあらゆる生物の細胞核内に存在する生体高分子です。

DNA



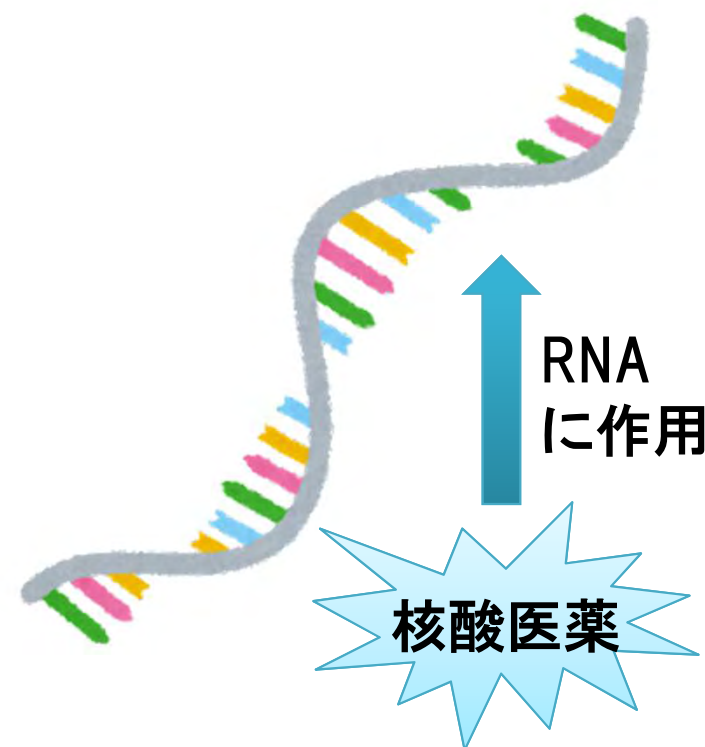
核酸塩基



ヌクレオチド

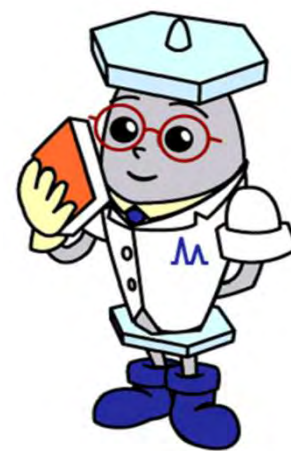
ヌクレオシド

RNA



| 本日の内容

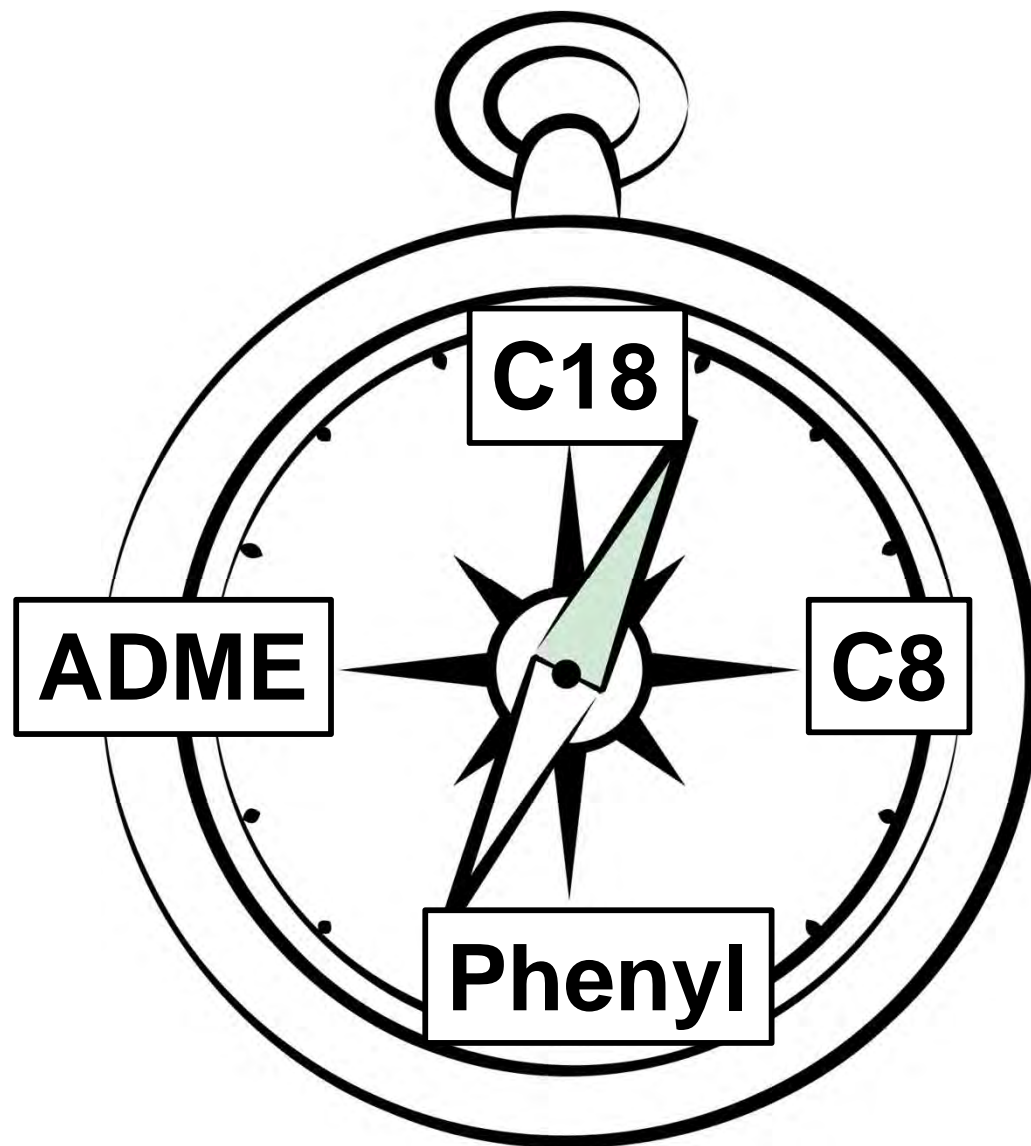
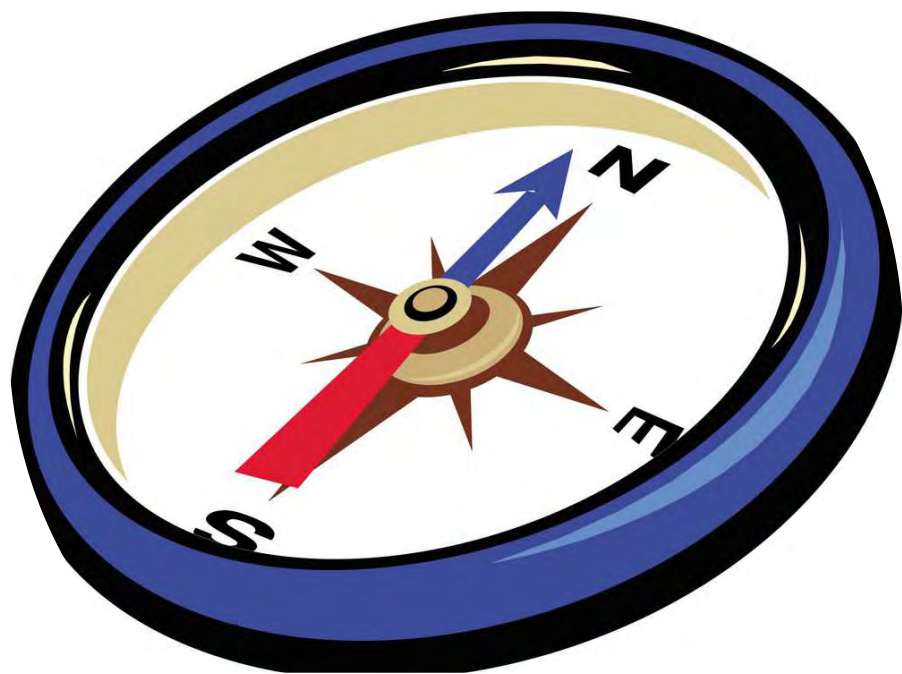
- 核酸塩基の分析
- ヌクレオシドの分析
- ヌクレオチドの分析
- DNA断片の分析
- オリゴ核酸、核酸医薬の分析



“The CHROMATOGRAPHY COMPASS”

The CHROMATOGRAPHY COMPASS

Traditional COMPASS



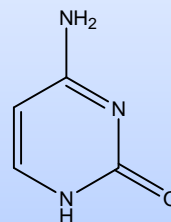
| 本日の内容



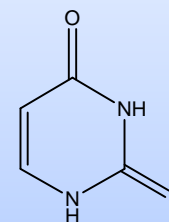
核酸塩基の分析

- ヌクレオシドの分析
- ヌクレオチドの分析
- DNA断片の分析
- オリゴ核酸、核酸医薬の分析

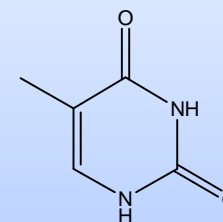
ピリミジン塩基



シトシン

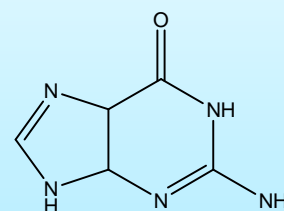


ウラシル

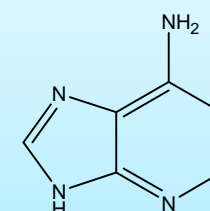


チミン

プリン塩基



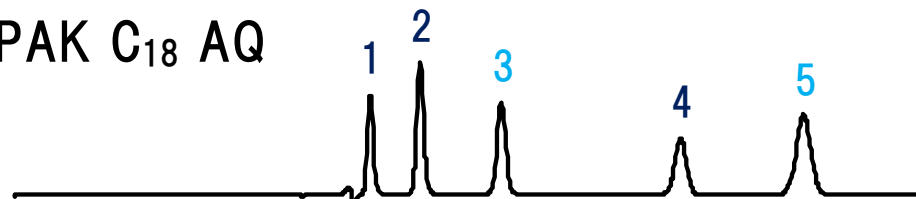
グアニン



アデニン

核酸塩基の分析

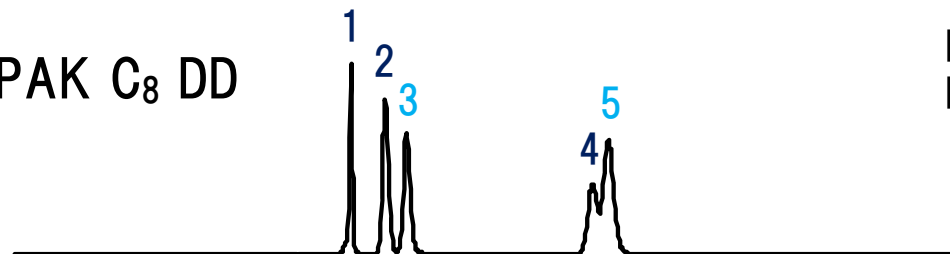
CAPCELL PAK C₁₈ AQ



【HPLC Conditions】

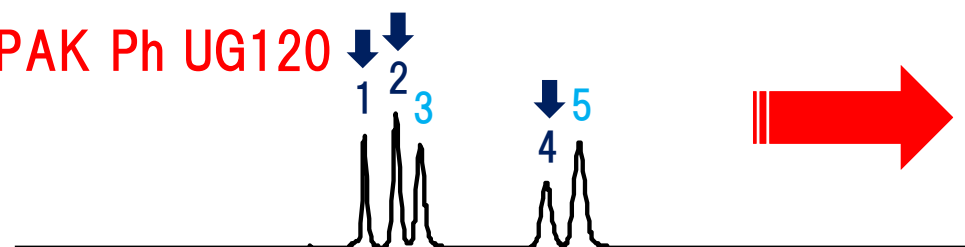
Column size : S5 ; 4.6 mm i.d. x 150 mm
Mobile phase : 10 mmol/L HCOONH₄ / CH₃OH = 90 / 10
Flow rate : 1 mL/min
Temperature : 40 °C
Detection : UV 254 nm
Inj. vol. : 5 μL

CAPCELL PAK C₈ DD



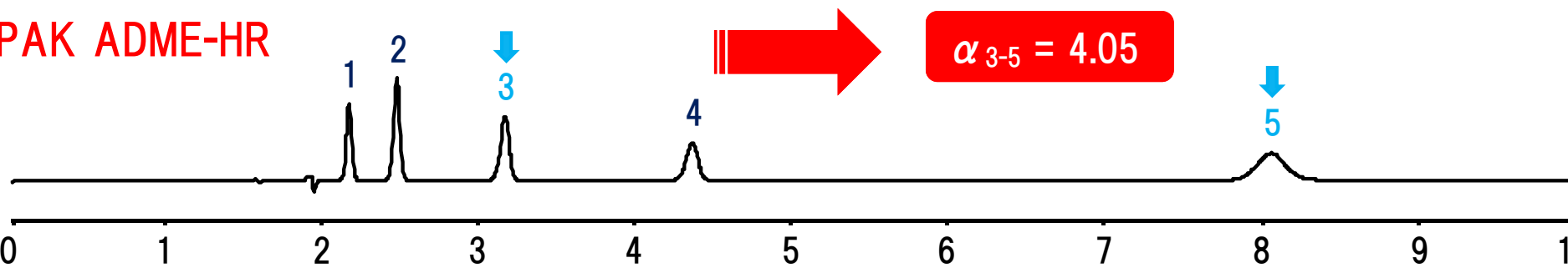
1. Cytosine
2. Uracil
3. Guanine
4. Thymine
5. Adenine

CAPCELL PAK Ph UG120



$$\alpha_{1-2} = 2.20$$
$$\alpha_{1-4} = 7.83$$
$$\alpha_{2-4} = 3.56$$

CAPCELL PAK ADME-HR



$$\alpha_{3-5} = 4.05$$

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
[min]

| 本日の内容

□ 核酸塩基の分析



ヌクレオシドの分析



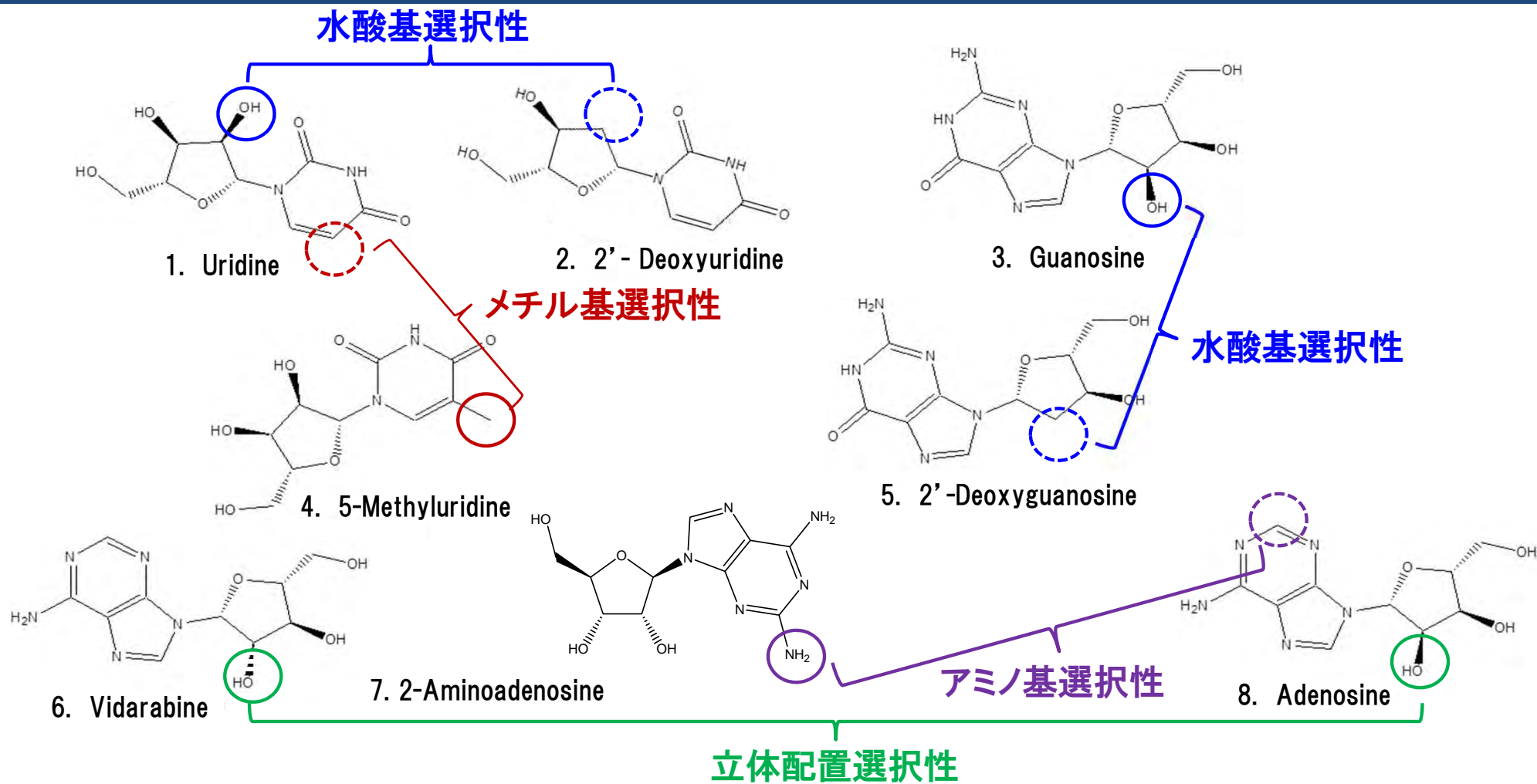
8種類のヌクレオシドを用いたカラム評価

□ ヌクレオチドの分析

□ DNA断片の分析

□ オリゴ核酸、核酸医薬の分析

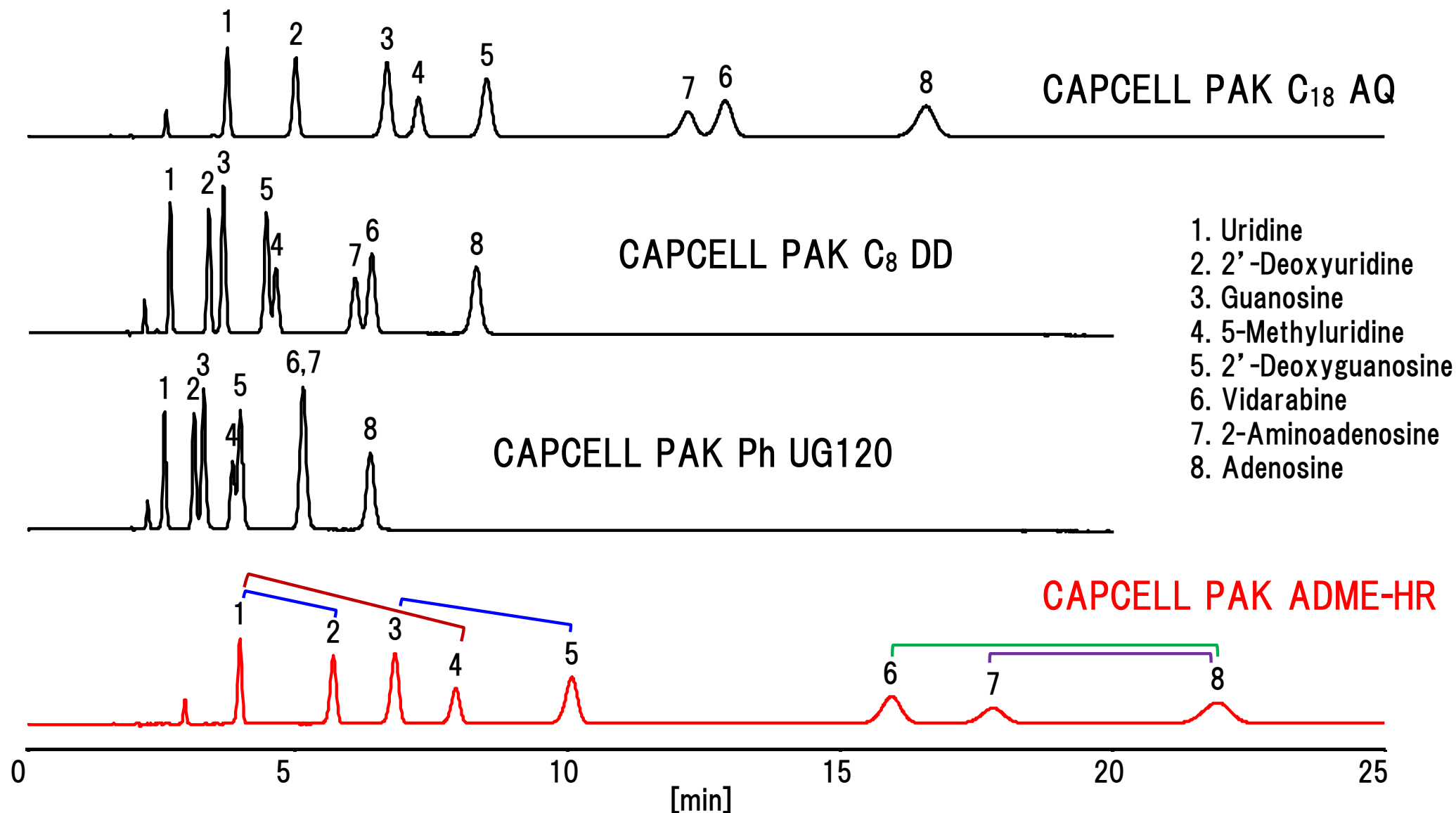
ヌクレオシドの分析



【HPLC Conditions】

Column size	: S5 ; 4.6 mm i.d. x 150 mm
Mobile phase	: 10 mmol/L HCOONH ₄ / CH ₃ OH = 95 / 5
Flow rate	: 1 mL/min
Temperature	: 40 °C
Detection	: UV 254 nm
Inj. vol.	: 5 μL (100 μg/mL each)

ヌクレオシドの分析



ヌクレオシドを用いたカラム評価

評価項目	OH基選択性		CH ₃ 基選択性	立体配置選択性	NH ₂ 基選択性	見かけ保持
	α (2'-dU/U)	α (2'-dG/G)	α (5-MU/U)	α (A/V)	α (A/AA)	RT(A)
CAPCELL PAK C ₁₈ AQ	1.605	1.366	2.694	1.414	1.327	16.346
CAPCELL PAK C₈ DD	1.654	1.466	2.626	1.497	1.401	8.259
CAPCELL PAK Ph UG120	1.755	1.466	2.733	1.377	1.377	6.305
CAPCELL PAK ADME-HR	1.738	1.630	2.703	1.420	1.256	21.919

ADMEカラムは最も保持が大きく、OH選択性(分離)及び適度なCH₃選択性も有しているカラムである。C₈ DDは立体選択性(ジアステレオマーの認識能)及びNH₂基選択性が高いカラムである。

| 本日の内容

□ 核酸塩基の分析

□ ヌクレオシドの分析



ヌクレオチドの分析



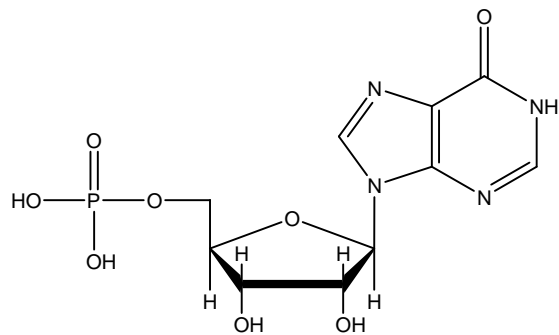
**ATP関連物質の分析
～魚肉中の鮮度(K値)～**

**ATP, ADP, AMPを用いた
カラム評価**

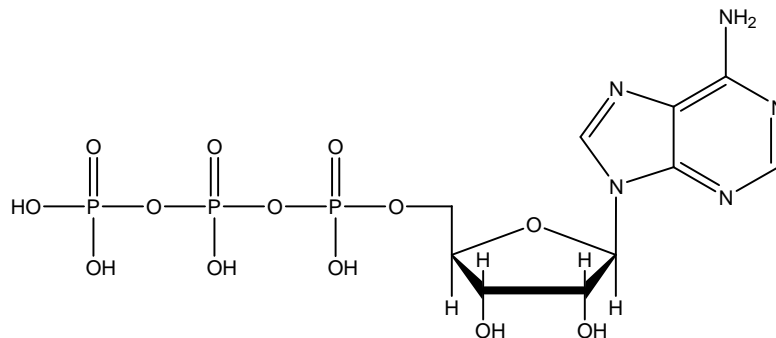
□ DNA断片の分析

□ オリゴ核酸、核酸医薬の分析

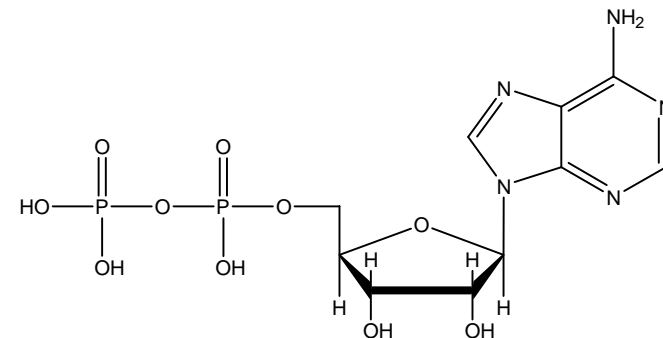
ATP関連物質の分析 ～魚肉中の鮮度(K値)～



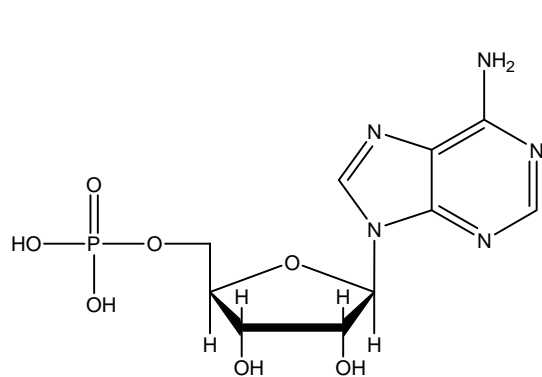
1. イノシン酸 (イノシンーリン酸)
Inosinic Acid (Inosine monophosphate)



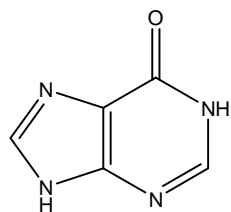
2. アデノシン三リン酸 (ATP)
Adenosine Triphosphate



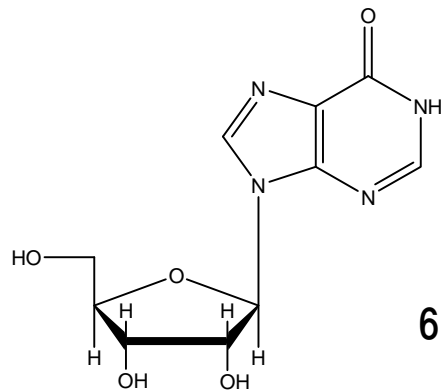
3. アデノシン二リン酸 (ADP)
Adenosine Diphosphate



4. アデノシンーリン酸 (AMP)
Adenosine monophosphate



5. ヒポキサンチン
Hypoxanthine

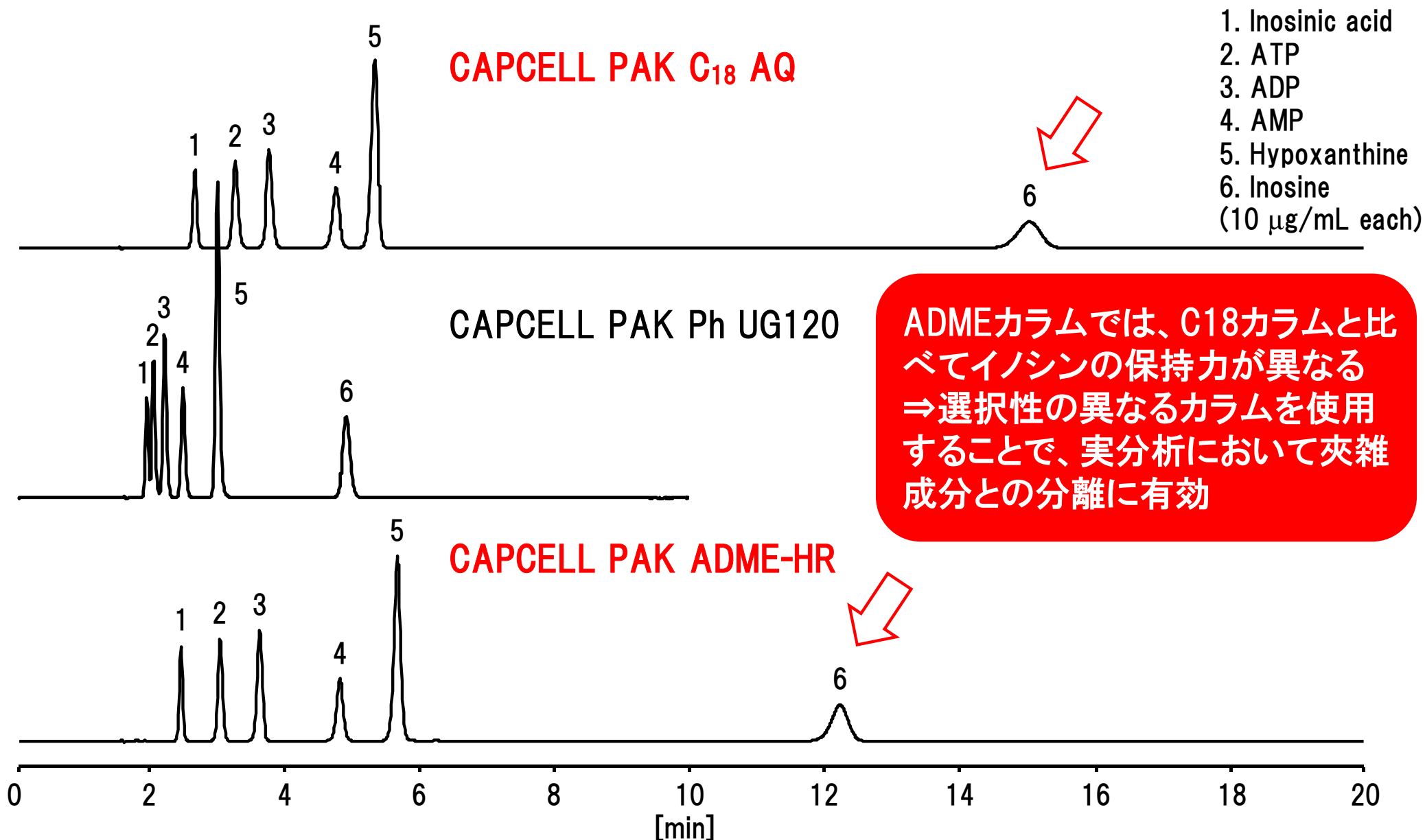


6. イノシン
Inosine

【HPLC Conditions】

Column size	: S5 ; 4.6 mm i.d. x 150 mm
Mobile phase	: 50 mmol/L Phosphate buffer
Flow rate	: 1 mL/min
Temperature	: 40 °C
Detection	: UV 254 nm
Inj. vol.	: 5 µL

ATP関連物質の分析 ～魚肉中の鮮度(K値)～



ATP, ADP, AMP ~他社メタルフリーカラムとの比較~

【HPLC Conditions】

Mobile phase: 10 mmol/mL HCOONH₄ / CH₃CN = 99 / 1

Flow rate : 200 μL/min

Temperature: 40 °C

Detection : UV 260 nm

Inj. vol. : 2 μL

Sample : 1. ATP 2. ADP 3. AMP
(20 μg/mL each)

CAPCELL PAK INERT ADME-HR S3
2.0 mm i.d. x 150 mm

$S_1 = 1.52$



$S_1 = 1.79$



$S_1 = 2.61$



$S_1 = 1.81$



0 1 2 3 4 5 [min]

優れた不活性を有するカラムには、基材に高純度シリカゲルを用い、さらに修飾方法を最適化し配位結合性の影響を最大限低減することが必要となります。

| 本日の内容

- 核酸塩基の分析
- ヌクレオシドの分析
- ヌクレオチドの分析



DNA断片の分析



	制限酵素
φX174 DNA	: HinfI
pBR322 DNA	: MspI
pUC19 DNA	: MspI

- オリゴ核酸、核酸医薬の分析

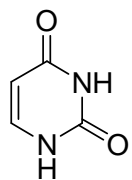
使用カラムの物性

CAPCELL PAK SG300シリーズ及び Proteonaviの物性値

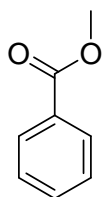
製品名	粒子径 (μm)	細孔径 (nm)	比表面積 (m^2/g)	C%	pH範囲
CAPCELL PAK C₁ SG300	5	30	150	3	2~9
CAPCELL PAK C₈ SG300	5	30	150	6	2~9
CAPCELL PAK C₁₈ SG300	5	30	150	10	2~9
Proteonavi (C₄)	5	30	105	3.3	2~10

標準4種を用いた保持力比較

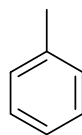
アルキル鎖長に比例した保持力



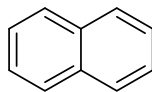
1



2



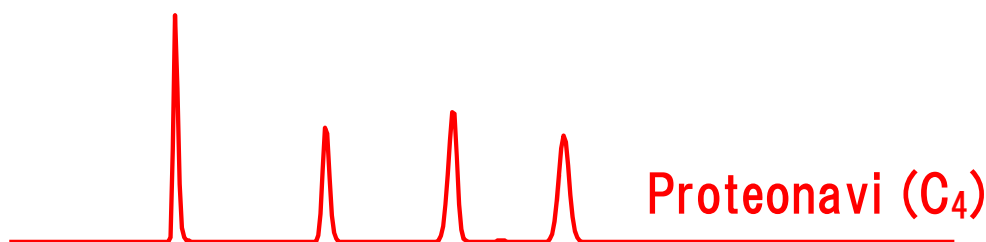
3



4

- | | |
|--------------------|--------------|
| 1. Uracil | (M.W. 112.1) |
| 2. Methyl benzoate | (M.W. 136.2) |
| 3. Toluene | (M.W. 92.1) |
| 4. Naphthalene | (M.W. 128.2) |

CAPCELL PAK C₈ SG300 S5



Proteonavi (C₄)

【HPLC Conditions】

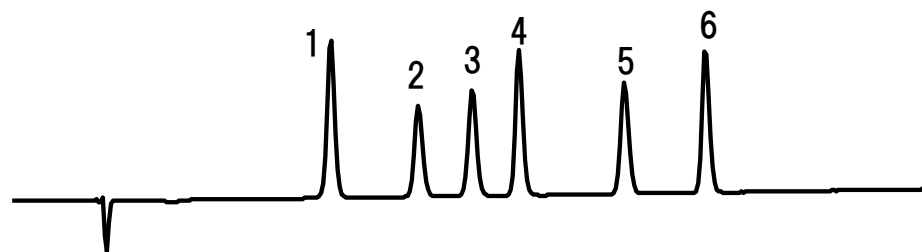
Column size : 2.0 mm i.d. x 150 mm
Mobile phase : H₂O / CH₃CN = 40 / 60
Flow rate : 0.2 mL/min
Temperature : 40 °C
Detection : UV 254 nm

CAPCELL PAK C₁ SG300 S5

0 2 4 6 8 10 [min]

ペプチド6種を用いた保持力比較

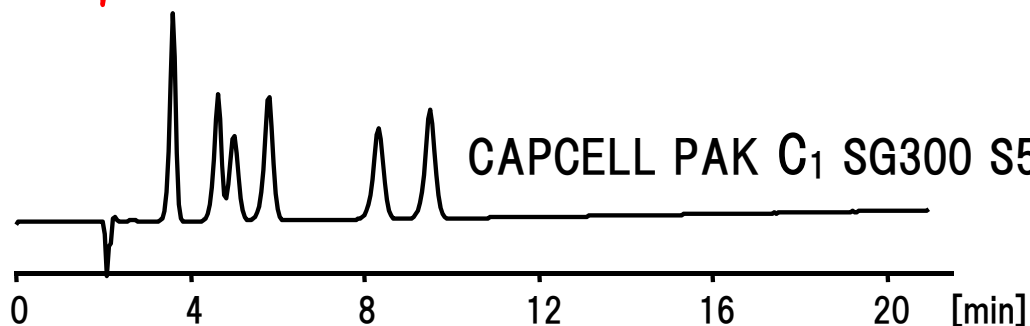
CAPCELL PAK C₈ SG300 S5



Proteonavi (C₄)



CAPCELL PAK C₁ SG300 S5



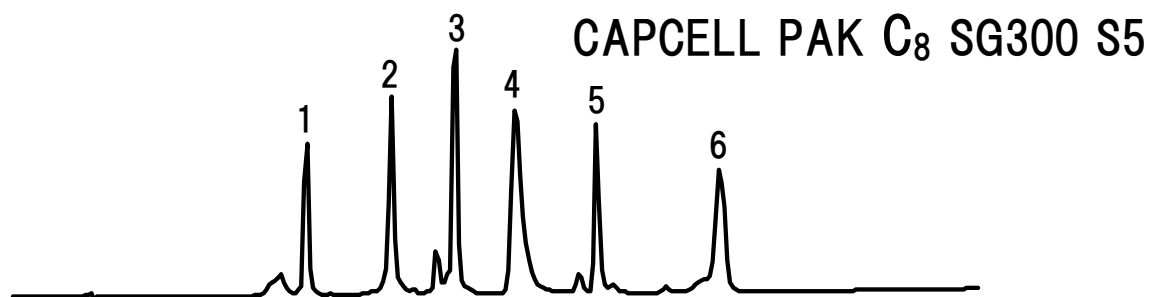
- | | |
|--------------------------|-------------|
| 1. Methionine-Enkephalin | (M.W. 574) |
| 2. Bradykinin | (M.W. 1060) |
| 3. Leucine-Enkephalin | (M.W. 556) |
| 4. Angiotensin II | (M.W. 1046) |
| 5. Neurotensin | (M.W. 1673) |
| 6. Angiotensin I | (M.W. 1296) |

アルキル鎖長に従わずProteonavi の
保持が特異的に大きい

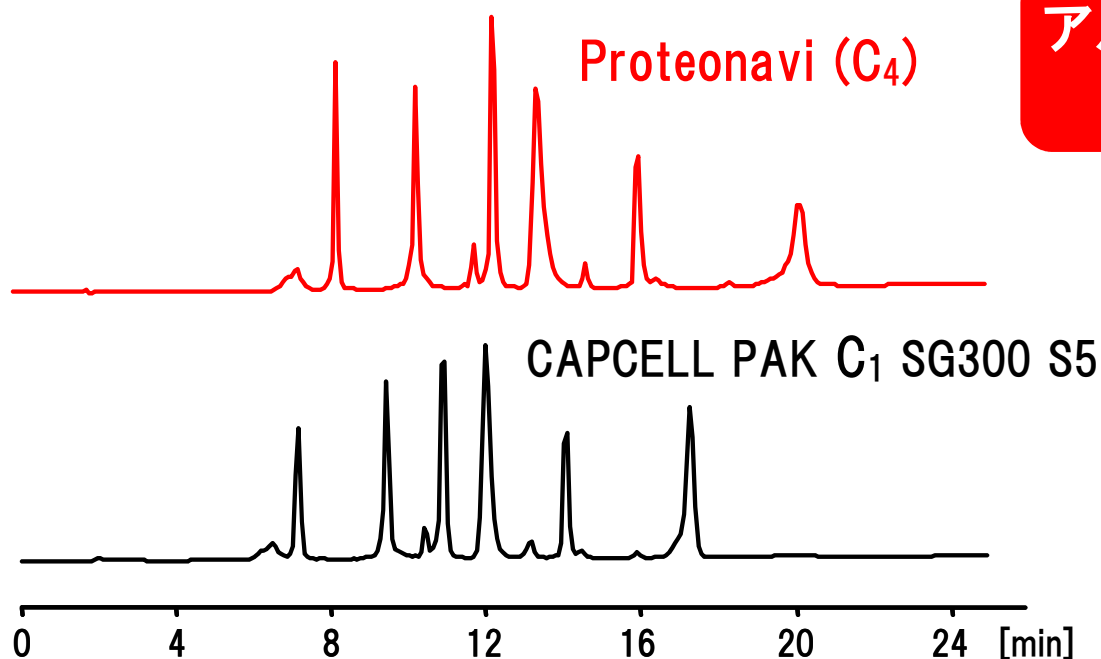
【HPLC Conditions】

- Column size : 2.0 mm i.d. x 150 mm
Mobile phase : A) 0.1 vol% TFA, H₂O
 B) 0.1 vol% TFA, CH₃CN
 B 15 % (0 min) -> 30 % (20 min) Gra.
Flow rate : 0.2 mL/min
Temperature : 40 °C
Detection : UV 220 nm
Inj. vol. : 2 μL

タンパク質6種を用いた保持力比較



- | | |
|-------------------|-----------------|
| 1. Ribonuclease A | (M.W. 13.7 kDa) |
| 2. Cytochrome C | (M.W. 12.4 kDa) |
| 3. Lysozyme | (M.W. 14.3 kDa) |
| 4. B.S. albumin | (M.W. 69.0 kDa) |
| 5. Myoglobin | (M.W. 17.0 kDa) |
| 6. Ovalbumin | (M.W. 45.0 kDa) |

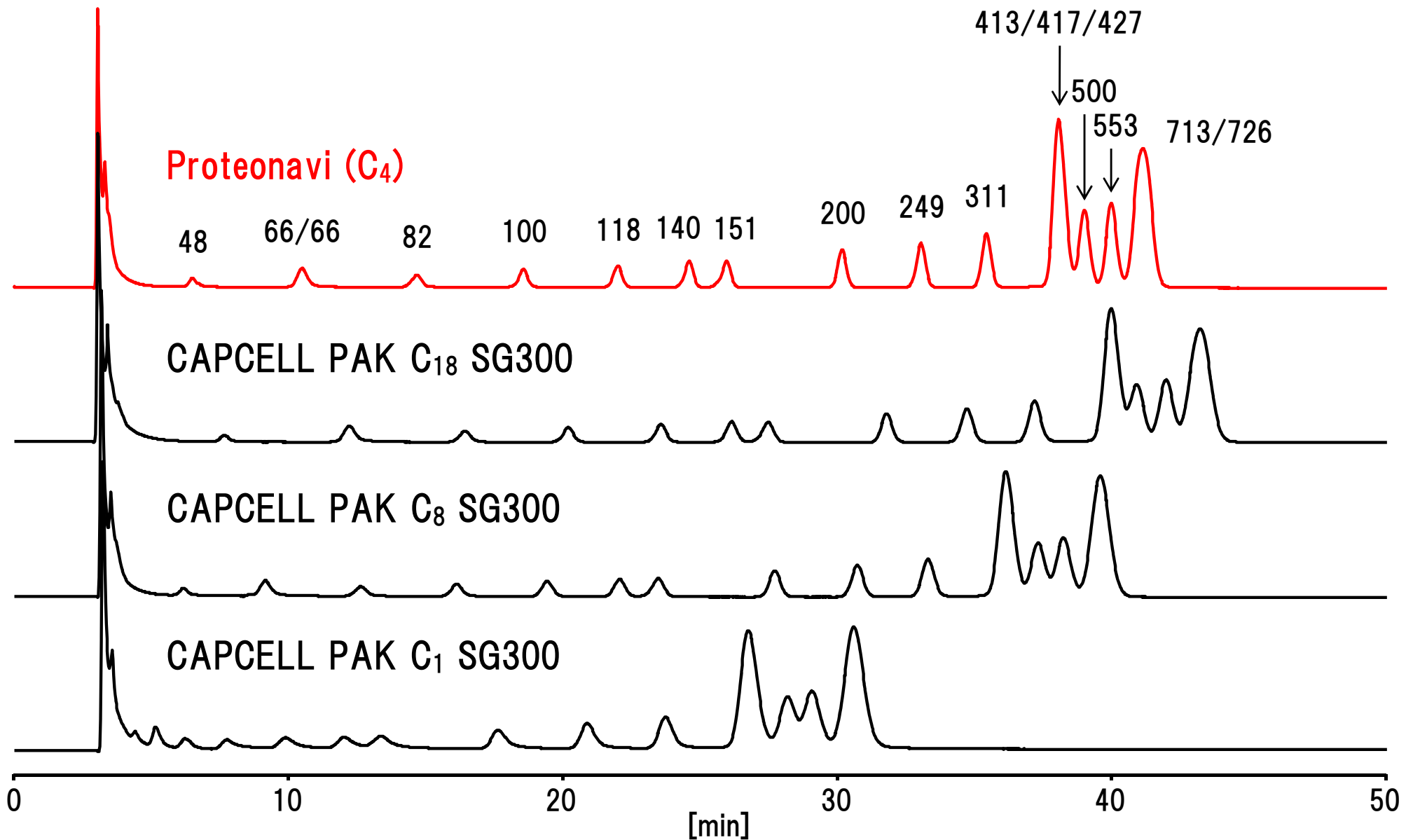


アルキル鎖長に従わずProteonavi の
保持が特異的に大きい

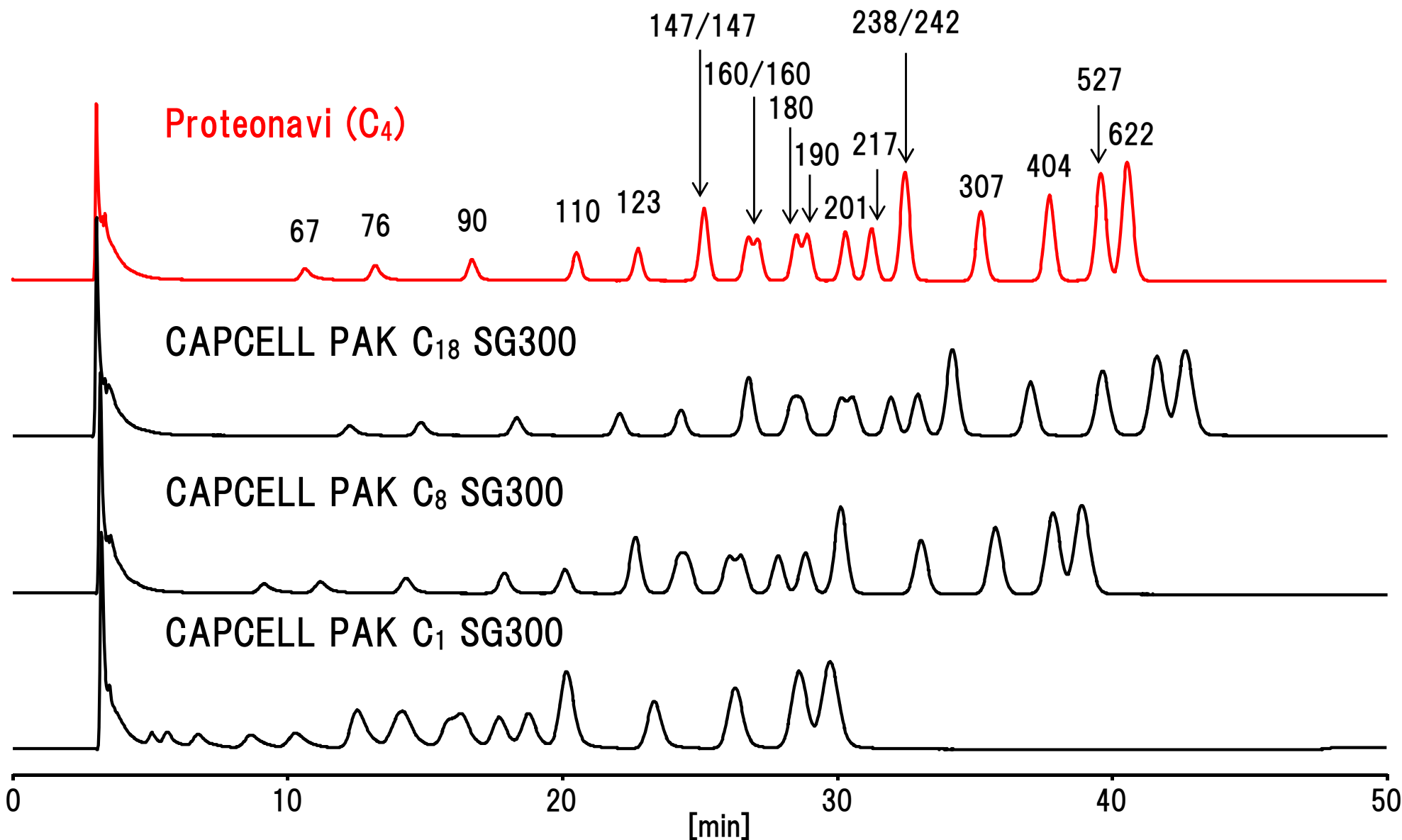
【HPLC Conditions】

- | | |
|--------------|--|
| Column size | : 2.0 mm i.d. x 150 mm |
| Mobile phase | : A) 0.1 vol% TFA, H ₂ O
B) 0.1 vol% TFA, CH ₃ CN
B 20 % (0 min) -> 70 % (20 min) Gra. |
| Flow rate | : 0.2 mL/min |
| Temperature | : 40 °C |
| Detection | : UV 220 nm |
| Inj. vol. | : 2 µL |

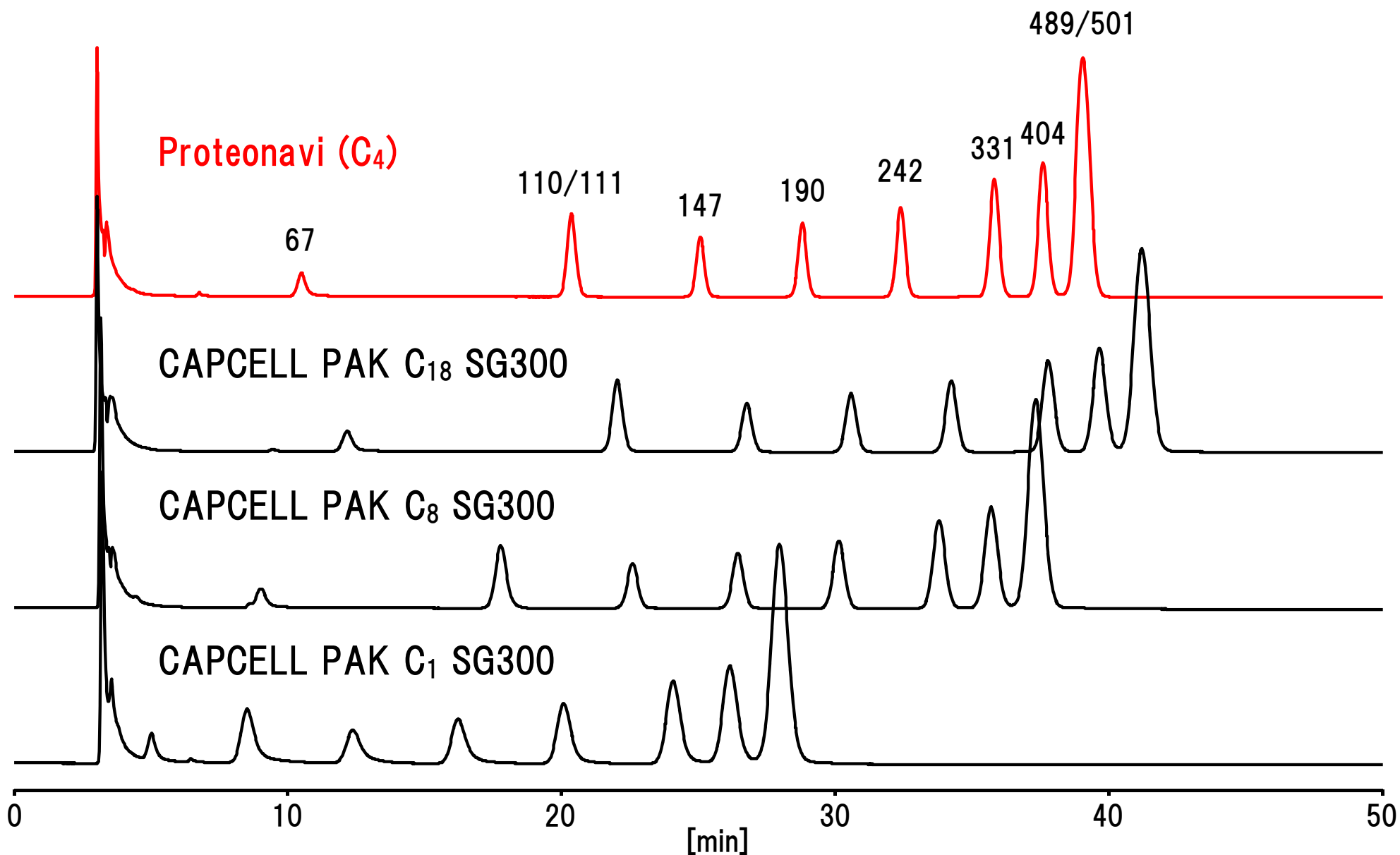
DNA断片の分析 ~φX174 DNA : 制限酵素 HinfI~



DNA断片の分析 ~pBR322 DNA : 制限酵素 MspI~



DNA断片の分析 ~pUC19 DNA : 制限酵素 MspI~



保持時間と塩基対(bp)の関係 ～Proteonavi～

DNA消化断片を逆相で分離した結果



保持時間と塩基対には強い
相関があり、保持時間から塩
基対を予想することが可能

【HPLC Conditions】

Column : Proteonavi ; 2.0 mm i.d. x 250 mm

Mobile phase : A) 100 mmol/L TEAA

B) 100 mmol/L TEAA, 20 vol% CH₃CN

B 60 % (0 min) -> 95 % (50 min) -> 60 % (50.1 min) Gradient

Flow rate : 200 μL/min

Temperature : 50 °C

Detection : UV 260 nm

Inj. vol. : 4 μL

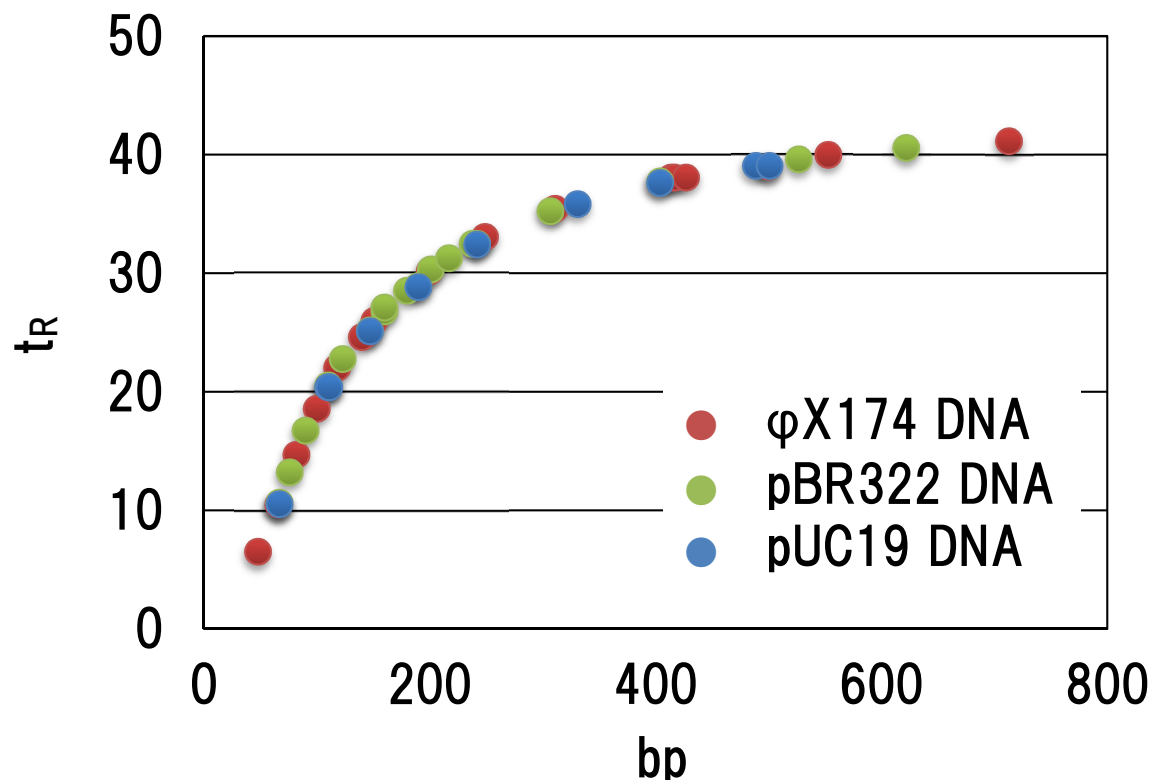


図1. DNA断片の塩基対と保持時間の関係

| 本日の内容

- 核酸塩基の分析
- ヌクレオシドの分析
- ヌクレオチドの分析
- DNA断片の分析



オリゴ核酸、核酸医薬の分析



RNAオリゴ核酸
官能基とグラジエント勾配

核酸医薬の溶出挙動

オリゴ核酸の分析 ～RNA-oligonucleotide～

塩基長	塩基配列
14 mer	rCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU
17 mer	rUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU
20 mer	rUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU
21 mer	rGrUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU

【HPLC Conditions】

Column : CAPCELL PAK C₁₈ MGII S3 ; 2.0 mm i.d. x 150 mm
CAPCELL PAK C₈ DD S3 ; 2.0 mm i.d. x 150 mm
CAPCELL PAK Ph UG120 S5 ; 2.0 mm i.d. x 150 mm
CAPCELL PAK ADME-HR S3 ; 2.1 mm i.d. x 150 mm

Mobile phase : A) 100 mmol/L TEAA
B) 100 mmol/L TEAA, CH₃CN

Flow rate : 300 μL/min

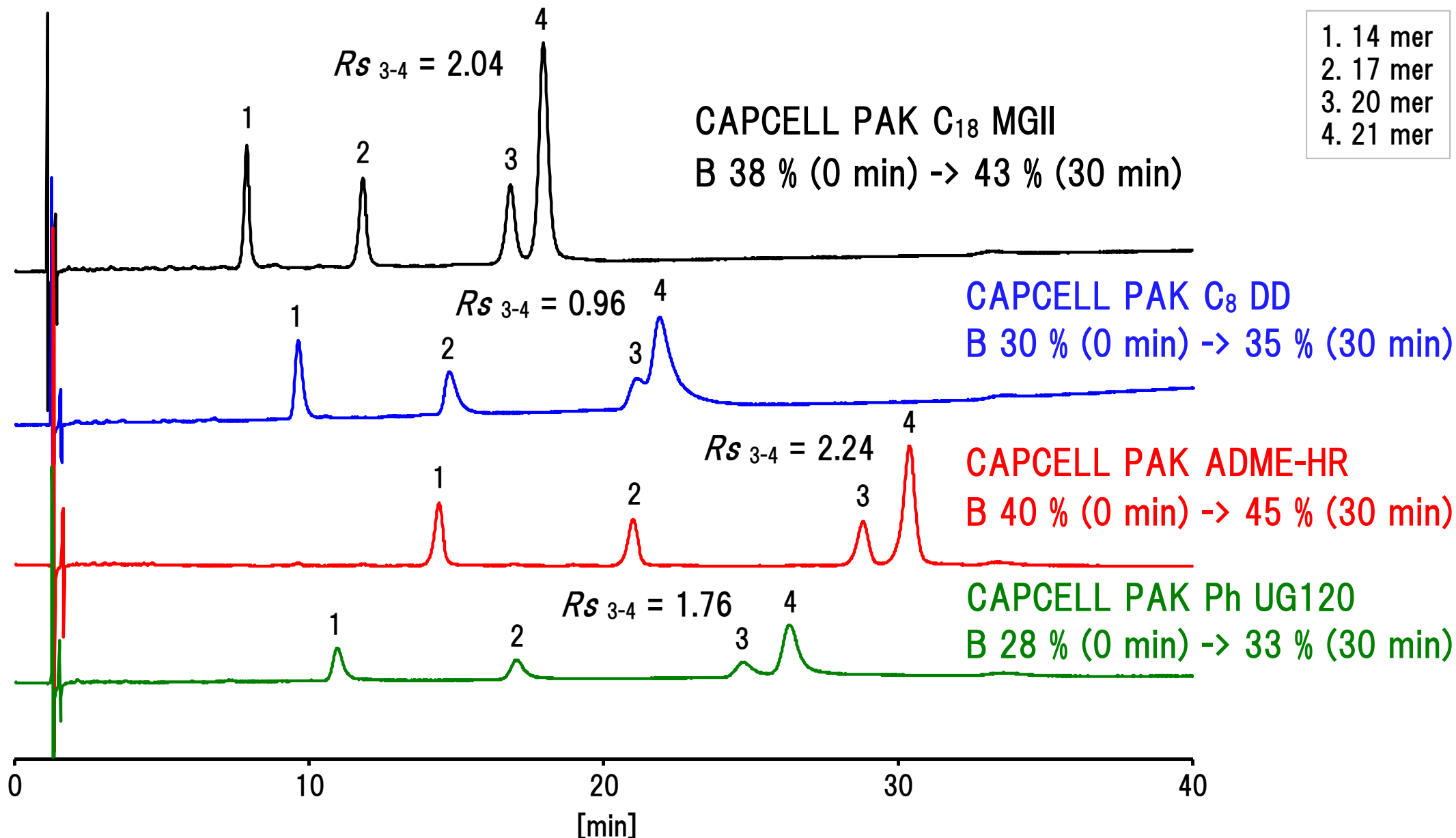
Temperature : 50 °C

Detection : UV 260 nm

Inj. vol. : 2 μL

Sample : 1. 14 mer 2. 17 mer 3. 20 mer 4. 21 mer (RNA oligonucleotide)

オリゴ核酸の分析 ～官能基とグラジエント勾配～



核酸医薬の溶出挙動

化合物名	ターゲット	タイプ	化学修飾
Inotersen	トランスサイレチン(TTR) : mRNA		
Nusinersen	SMN2 : pre-mRNA	アンチセンス	S1化 2'-MOE
Volanesorsen	アポリポタンパク質C-III(ApoC-III) : mRNA		

【HPLC Conditions】

Column : CAPCELL PAK **C₁₈** MGII S2 ; 2.0 mm i.d. x 50 mm
CAPCELL PAK **ADME-HR** S2 ; 2.1 mm i.d. x 50 mm
CAPCELL PAK **INERT ADME-HR** S3 ; 2.0 mm i.d. x 50 mm
Proteonavi (**C₄**) ; 2.1 mm i.d. x 50 mm

Mobile phase : A) H₂O / CH₃OH / HFIP / TEA = 450 / 50 / 15 / 1
B) H₂O / CH₃OH / HFIP / TEA = 50 / 450 / 15 / 1
B 0 % (0 min) -> 90 % (10 min) -> 90 % (15 min) -> 0 % (15.1 min) Gradient

Flow rate : 300 μL/min
Temperature : 60 °C
Detection : UV 260 nm
Inj. vol. : 5 μL

核酸医薬の溶出挙動 ～官能基～

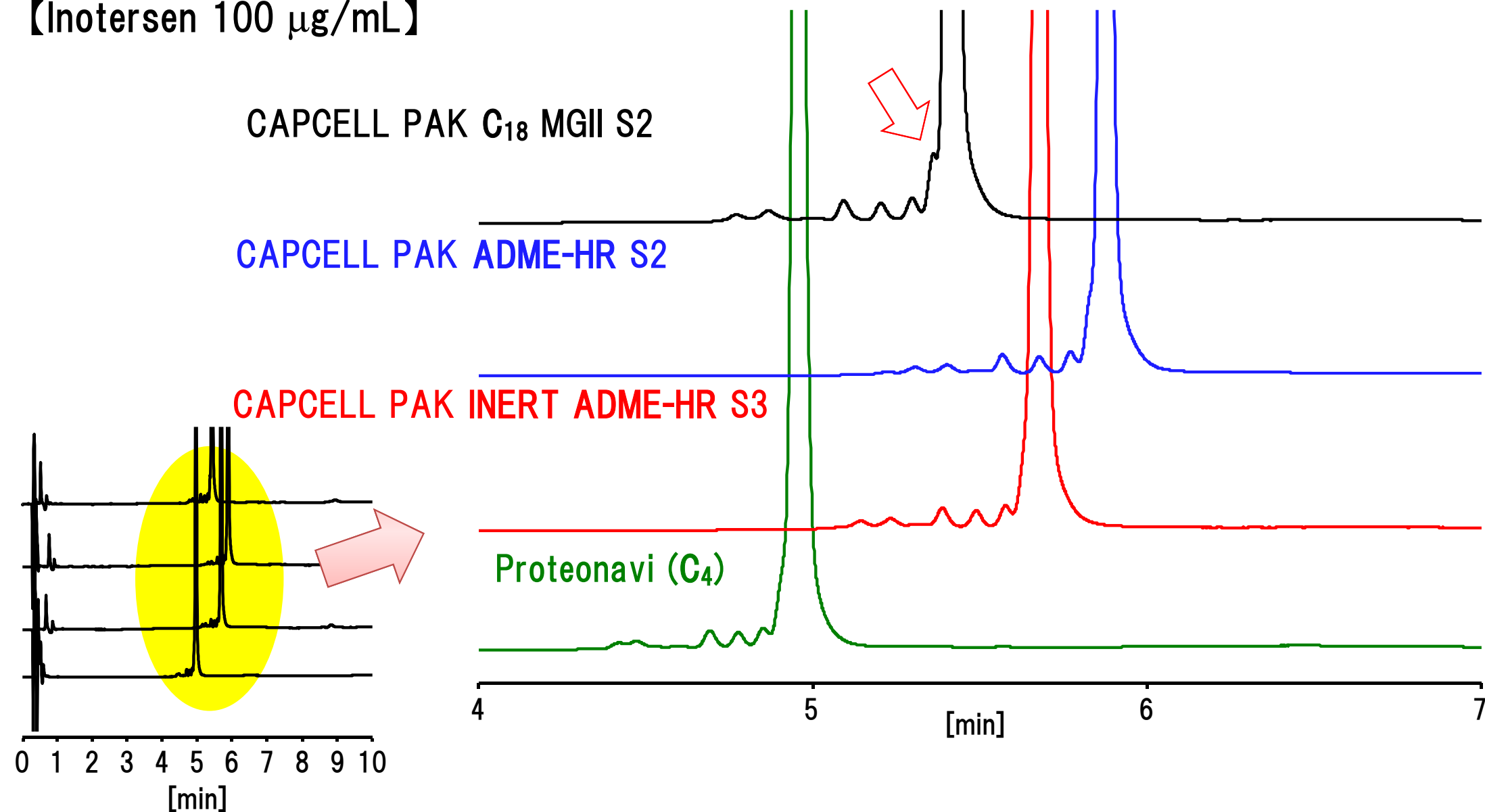
【Inotersen 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 】

CAPCELL PAK C₁₈ MGII S2

CAPCELL PAK ADME-HR S2

CAPCELL PAK INERT ADME-HR S3

Protonavi (C₄)



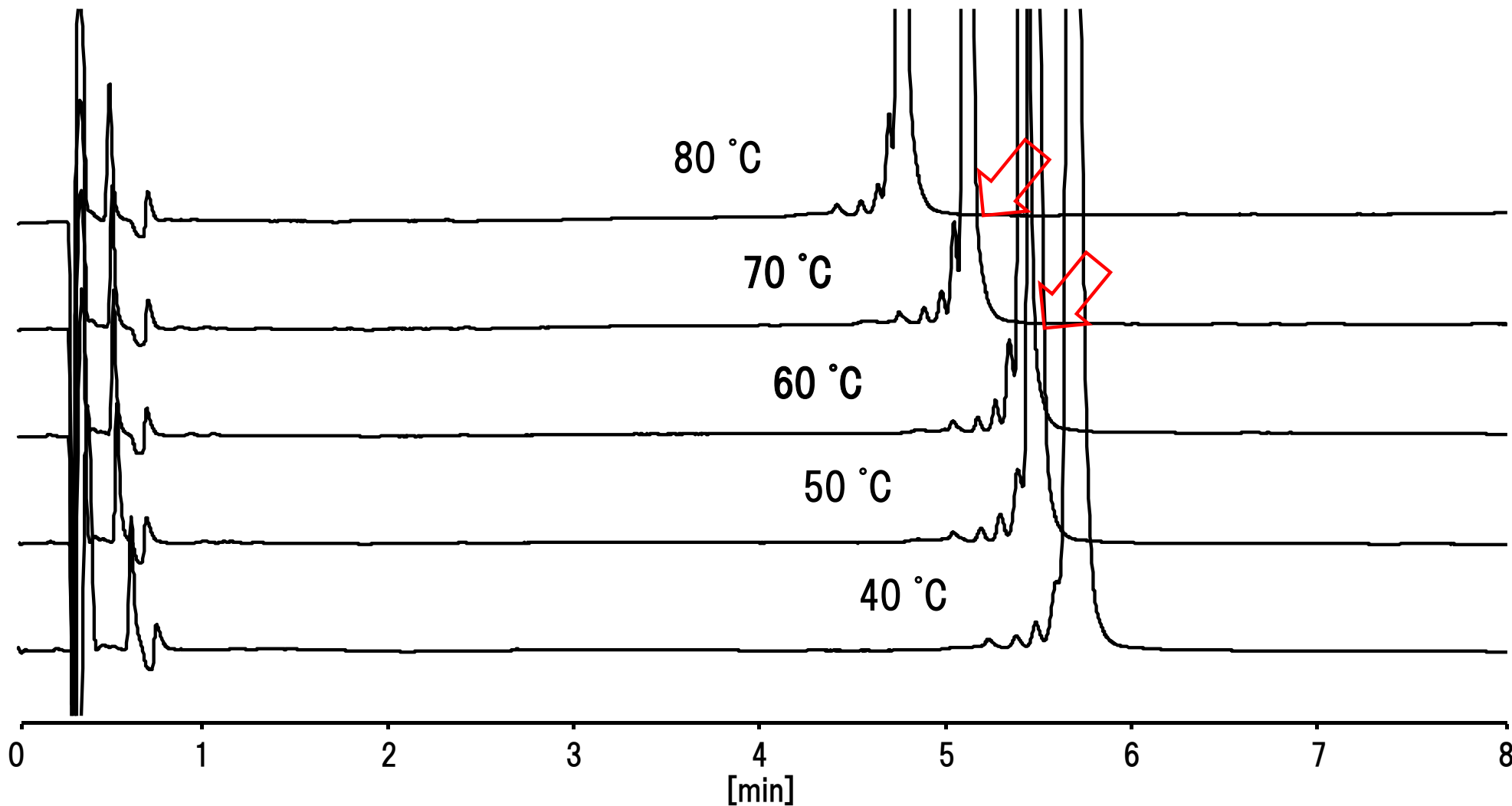
核酸医薬の溶出挙動 ～温度～

【Nusinersen 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 】

【HPLC Conditions】

Column : CAPCELL PAK C_{18} MGII S2 ; 2.0 mm i.d. x 50 mm

Temperature : XX $^{\circ}\text{C}$



核酸医薬の溶出挙動 ～グラジエント勾配～

【Volanesorsen 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 】

【HPLC Conditions】

Column : CAPCELL PAK C_{18} MGII S2 ; 2.0 mm i.d. x 50 mm

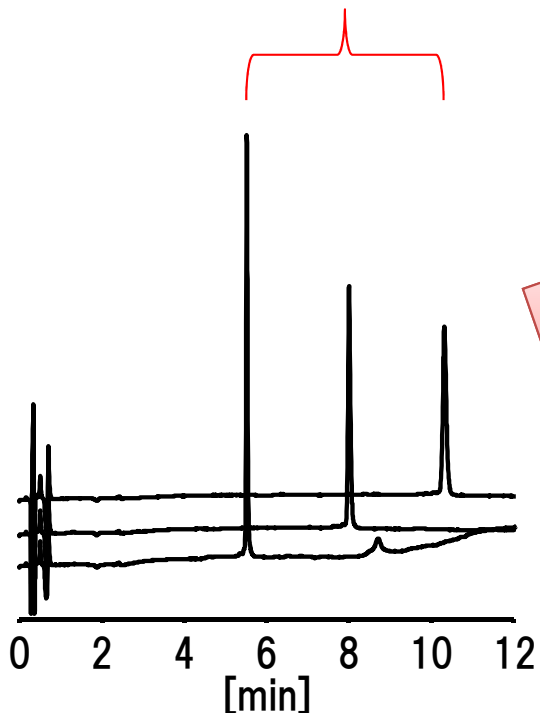
Mobile phase : A) H_2O / CH_3OH / HFIP / TEA = 450 / 50 / 15 / 1

B) H_2O / CH_3OH / HFIP / TEA = 50 / 450 / 15 / 1

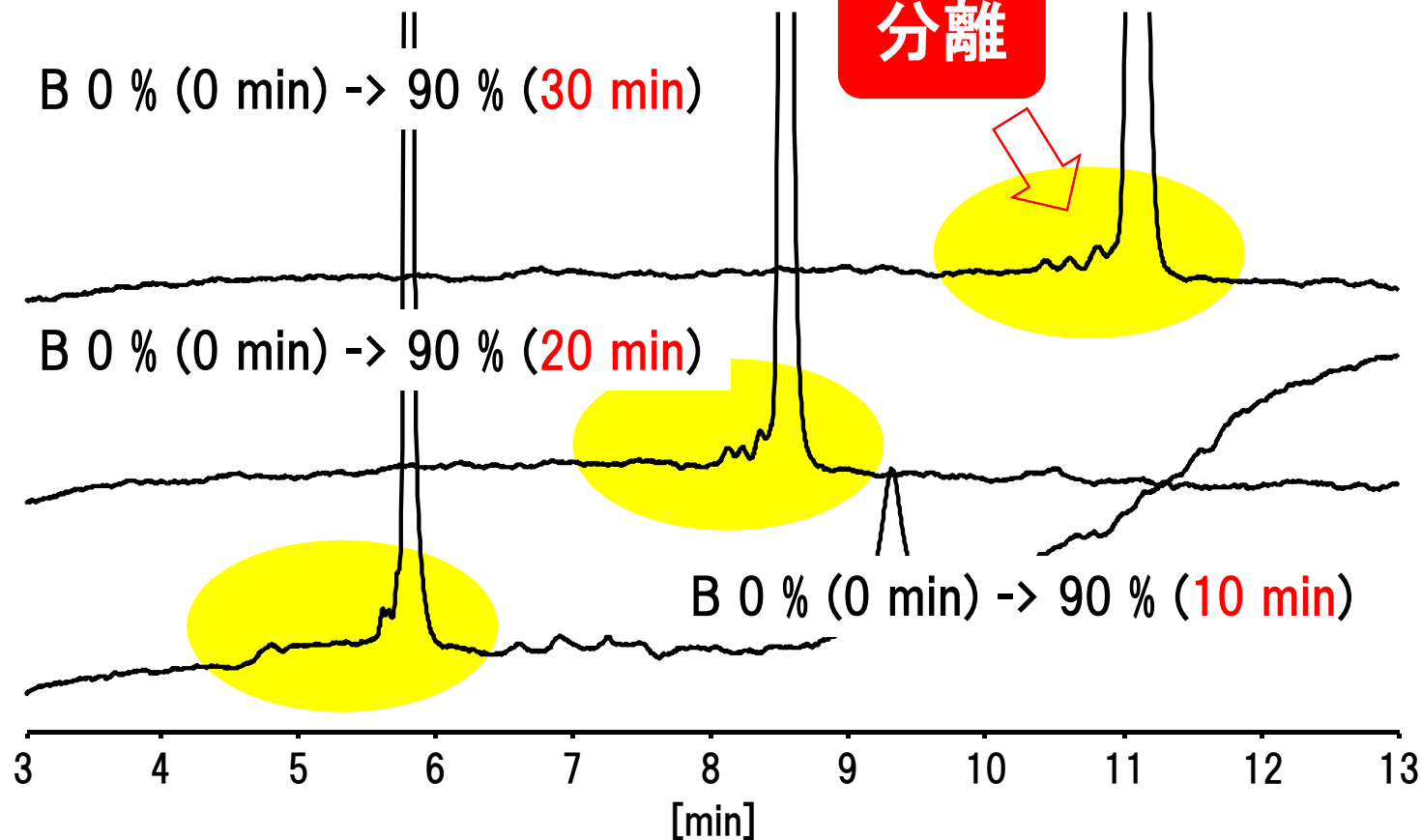
B 0 % (0 min) \rightarrow 90 % (10, 20 and 30 min) Gradient

Temperature : 60 $^\circ\text{C}$

感度



分離





お問合せ先 株式会社 大阪ソーダ
ヘルスケア事業部営業部
TEL : 06-6110-1598
e-mail : silica@osaka-soda.co.jp

