

ACQUITY Premier Oligonucleotide BEH C 18 カラムを用いたオリゴヌクレオチドのクロマト グラフィー分析の改善

Martin Gilar, Zhimin Li, Jason MacLean

Waters Corporation

要約

このアプリケーションノートでは、金属製カラムハードウェア（フリット）への吸着によるオリゴヌクレオチドの損失の原因について説明します。オリゴヌクレオチド分析の改善に使用されるソリューション、カラム、およびベストプラクティスを提供しています。

アプリケーションのメリット

- MaxPeak HPS テクノロジーによりカラムコンディショニングが不要に
 - 金属表面へのサンプル吸着を最小化
 - 分析の再現性が向上
 - 準備不要で、妥協のないカラム性能
-

はじめに

核酸ベースの療法は、新種の治療用化合物です。これには、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）¹、サイレンシング二本鎖 RNA（siRNA）²、マイクロ RNA（miRNA）³、さらにワクチンとして使用できるメッセンジャー

RNA (mRNA) やプラスミドなどの高分子バイオリマーなどが挙げられます⁴。このアプリケーションノートでは、主に治療用オリゴヌクレオチドに焦点を当てています。

治療用オリゴヌクレオチド (一般的に 15 ~ 35 mer) は、化学合成によって調製されます。品質管理および特性評価は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)、キャピラリーゲル電気泳動 (CGE)、または陰イオン交換クロマトグラフィー (AEC) を使用して行います⁵。最近では、イオン対逆相液体クロマトグラフィー (IP RP LC) が、オリゴヌクレオチドの LC および LC-MS 分析における最適な方法となっています^{1,6}。IP RP LC-MS は、ASO 治療用および siRNA 治療用の化合物の高感度分析に適用できます。

オリゴヌクレオチドの IP RP LC 分離は、疎水性アミンと酸で構成されるイオン対移動相を用いて行われます⁷⁻⁹。有用なイオン対移動相の例として、酢酸 (酢酸ヘキシルアンモニウム、HAA) で pH を 7~9 に調整した 25 mM ヘキシルアミンが挙げられます。逆相カラムからのオリゴヌクレオチドの溶出は、アセトニトリルまたはメタノールのグラジエントによって行います。カラム温度は通常 60°C に設定し、オリゴヌクレオチドの二次構造とそれが LC 分離に与える影響を排除します¹⁰。分析に使用されるアルカリ性の pH および高温は、シリカベースのクロマトグラフィーカラムの寿命に悪影響を及ぼします。したがって、オリゴヌクレオチドの IP RP LC 分離には、エチレン架橋型ハイブリッド (BEH) カラムなどの有機/無機ハイブリッド固定相を推奨します¹¹。アルカリ移動相を使用する場合、BEH カラムは、従来のシリカカラムよりもはるかに安定しています¹²。

超高性能の UPLC カラムにより、対象のオリゴヌクレオチドを、短い合成不純物やオリゴヌクレオチド代謝産物から分離することができます。N/N-1 分離を、21/20 mer オリゴヌクレオチドにおいてルーチンで達成しています¹³。核酸が長くなるほど、分離が徐々に困難になります^{14,15}。粒子径 2 μm 以下のカラムでは、浅いグラジエントを使用して最大 60 mer のオリゴヌクレオチドを分離することができます¹⁶。これは、ほとんどの ASO および siRNA に適用するのに十分な分離能です。

AEC および IP RP LC によるオリゴヌクレオチド分析の原理はよく理解されています。ただし、核酸解析分野の専門家は、オリゴヌクレオチドの分析と定量を妨げる非特異的吸着の問題があることを認識しています¹⁷。負電荷を持つ核酸は、ステンレススチールやチタンなどの金属表面、正確には金属表面に存在する酸化膜と相互作用 (キレート化) することが知られています^{18,19}。金属面への吸着は、ピークのテーリング、回収率低下、サンプルキャリーオーバーの原因になる可能性があります²⁰。このような挙動は、それまでオリゴヌクレオチドサンプルに曝露していなかった新しいカラムを使用した場合に最も顕著であり、サンプル注入に数回曝露することで徐々に減少します。

一部のラボでは、上記の効果を緩和するために LC システムおよびカラムをコンディショニングするプロトコルを開発しています。多くの場合、LC システムのコンディショニングは、希釈したリン酸を使用した装置洗浄を用いて行います。通常、クロマトグラフィーカラムのコンディショニングでは、対象のオリゴヌクレオチドを分析する前に、オリゴヌクレオチドサンプルの一部を犠牲にして、繰り返し注入を行っていきます。微量分析においては、pmol レベル以下のサンプルを分析する際に、金属表面への吸着によるサンプル損失の問題が最も顕著になります。

オリゴヌクレオチド、リン酸化ペプチド、低分子有機リン酸など、金属表面に強い親和性を示すことが確認されている

分析種との非特異的金属の相互作用を最小限に抑えることを目的として、カラムハードウェア用に Waters MaxPeak High Performance Surfaces (HPS) が開発されました。MaxPeak HPS を使用して構築した MaxPeak Premier カラムハードウェアは、流路の金属表面とサンプルの間にバリアを形成することで、分析種とカラムハードウェアの間の相互作用が最小限に抑えられます。このアプリケーションノートでは、ACQUITY Premier Oligonucleotide BEH C₁₈ カラムを使用して得られるオリゴヌクレオチドの分析の改善点について説明します。LC システムの最適化における注意点については、別のアプリケーションノートで説明します。

実験方法

MISER (1 回の実験での多重注入) 実験の実験条件

サンプル前処理

25 mer のホスホロチオエート (PS) オリゴヌクレオチド CTC TCG CAC CCA TCT CTC TCC TTC T、分子量 7776 Da (GEM 91) を、水性移動相バッファーに 2 pmol/μL の濃度で溶解しました。1 μL (2 pmol) のサンプルを 20 ~ 90 回注入しました。

装置: ACQUITY UPLC H-Class Bio、39 mer オリゴデオキシチミジン 500 pmol でコンディショニング済み

データ管理: Empower 3.0 ソフトウェア、MISER 実験は FTN サンプルマネージャーファームウェア 1.65.356 (MISER_HT_V13) でサポートされます。FTN 装置のメソッドコメント画面で、注入回数、注入頻度、ギャップのタイミングなどの具体的な MISER コマンドを指定しました。

分析条件

カラム: MISER 実験にはカラムを使用して

いません。代わりに、ホルダーに入った 2.1 mm UPLC カラムフリットを、流路のインジェクターの後、検出器の前に配置しました。対照実験では、フリットの入ったホルダーの代わりに PEEK ユニオン（金属を含まない流路）を配置しました。

| | |
|--------------|------------------------------------------|
| 移動相 1: | 10 mM 酢酸ヘキシルアンモニウム (HAA) 水溶液バッファー (pH 7) |
| 移動相 2: | 10 mM 酢酸アンモニウム (AmAc) 水溶液バッファー (pH 4.5) |
| 移動相 3: | 10 mM 酢酸アンモニウム (AmAc) 水溶液バッファー (pH 5) |
| 移動相 4: | 10 mM 酢酸アンモニウム (AmAc) 水溶液バッファー (pH 6) |
| 移動相 5: | 10 mM 酢酸アンモニウム (AmAc) 水溶液バッファー (pH 7) |
| 移動相 6: | 10 mM 酢酸アンモニウム (AmAc) 水溶液バッファー (pH 8) |
| アイソクラティック条件: | 指定した移動相で 0.2 mL/分 |

実験温度： 25 °C

検出 (UV) : 260 nm PDA、5 μL のチタン製検出セル

注入量： 1 μL

イオン対 RP LC の実験条件

サンプル前処理:

MassPREP オリゴヌクレオチド標準試料（製品番号: [186004135](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186004135) <
<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186004135>>）には、15、20、25、30、35 mer のオリゴデオキシチミジン 1 nmol が含まれています。バイアルの内容物を 200 μL の脱イオン水に溶解し、最終濃度を 5 pmol/μL としました。このサンプルの 2 μL (10 pmol) をカラムに注入しました。

装置： ACQUITY UPLC H-Class Bio、39 mer オリゴデオキシチミジン 500 pmol でコンディショニング済み

データ管理： Empower v3.0 ソフトウェア

分析条件

カラム： ACQUITY Premier Oligonucleotide C18、130 Å、1.7 μm、2.1 × 50 mm（製品番号: 186009484）

移動相 A: 25 mM HAA 水溶液（酢酸で pH 6、7、8.5 に調整）

移動相 B: 移動相 A 50%、アセトニトリル 50% (v: v)

カラム温度： 60 °C

検出 (UV) : 260 nm PDA、チタン製 5 μL

注入量： 2 μL

グラジエント

| 時間 | 流速 | %A | %B | 曲線 |
|-------|-----|----|----|----|
| 初期 | 0.4 | 50 | 50 | 初期 |
| 12.00 | 0.4 | 14 | 86 | 6 |
| 12.5 | 0.4 | 50 | 50 | 6 |
| 20 | 0.4 | 50 | 50 | 6 |

データ処理と分析:

MISER 実験における相対回収率は、観察されたオリゴヌクレオチドのピーク面積から推定されました。PEEK ユニオンを使用するか、あるいは余分なオリゴヌクレオチドサンプルで ACQUITY Premier Oligonucleotide BEH C₁₈ カラムをコンディショニングした後に、回収率 100% を表すピーク面積が得られました。

OST MassPREP 標準試料については、39 mer オリゴヌクレオチド 500 nmol を 1 回または複数回注入してカラムをコンディショニングした後に得られたピークシグナルにより、回収率 100% とみなされました。

結果および考察

ステンレススチール製フリットへのオリゴヌクレオチドの吸着

最初の実験では、コンディショニングした ACQUITY UPLC H-Class Bio システムを用いて、25 mer のホスホロチオエート (PS) オリゴヌクレオチドの吸着による損失を評価しました。実験の目標は、UPLC カラムハードウェアで使用しているものと同じ 2.1 mm ステンレススチール製フリットによる分析種の損失を推定することでした。フリットが入っているアウトレットは、内径 75 μ m x 40 cm の PEEK チューブを使用して PDA 検出器のセルに接続されています。この実験にはクロマトグラフィーカラムは使用していません。

1 回の実験での多重注入 (MISER) によるデータ取り込み法²¹を採用しました。1 回の実験で、25 mer のオリゴヌクレオチドを最大 90 回注入しました。注入間隔は 30 秒で、10 回注入するごとに 30 秒のギャップを挿入することで、結果の視覚化が改善されました (図 1)。最初の試験では、10 mM 酢酸ヘキシルアンモニウム (HAA) 水溶液 (pH 7) の移動相を使用しました。図 1A の赤色のクロマトグラムは、PEEK ユニオンでの 20 回のオリゴヌクレオチドサンプル注入を示しています。一貫したピーク高さが観察されました。図 1A のピーク面積は、オリゴヌクレオチド回収率 100% を示しています。次に、PEEK ユニオンを内径 2.1 mm のステンレススチール製フリットが入ったホルダーに交換して、

同じサンプルを 50 回注入しました。図 1B のクロマトグラムは、フリット表面上への吸着によるオリゴヌクレオチドサンプルの損失を示しています。最初はピークが低く、その後の注入では高くなっていきます。これは、金属フリットの有効吸着部位が、余分なサンプルで徐々に飽和するためです。この効果は、LC システム/カラムコンディショニングと呼ばれています。図 1A の実験の平均ピーク面積を使用して、図 1B のステンレススチール製フリットによる分析種の損失を定量しました。50 回目のオリゴヌクレオチド注入の回収率は 71% でした。50 回の注入後にピークシグナルがプラトーに達しました。その後の注入ではピーク面積の改善はわずかでした（データは表示されていません）。

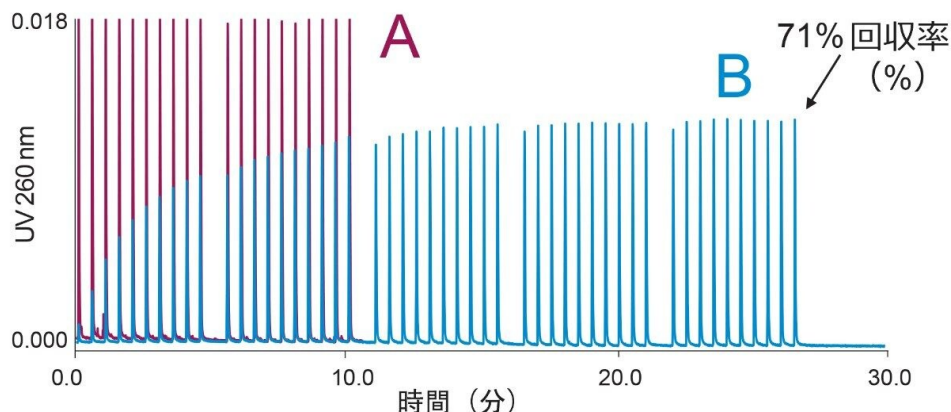


図 1. PEEK ユニオンで 2 pmol の 25 mer PS オリゴヌクレオチドを 20 回連続注入した MISER 実験の結果（赤色のクロマトグラム）。続いて、ユニオンを 2.1 mm ステンレススチール製フリットの入ったホルダーに交換し、同じサンプルの注入を 50 回行いました（青色のクロマトグラム B）。実験条件：10mM HAA (pH 7)（移動相 1）。

移動相の pH が金属表面でのオリゴヌクレオチド吸着に与える影響

2 つ目の試験では、移動相の pH の影響としてのオリゴヌクレオチド吸着を調査しました。移動相には、酢酸または水酸化アンモニウムで異なる pH 値に調整した 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液を使用しました。ここでも、内径 2.1 mm のステンレススチール製フリットで、各 pH 実験ごとに新しいフリットを使用して観察を行いました。図 2 に示す結果は、オリゴヌクレオチドの損失が酸性の pH でより顕著であることを示しています。オリゴヌクレオチドの分離に一般的に使用する pH 7 ~ 8 の条件では、サンプル損失はそれほど顕著ではありませんが、いずれの実験条件においても、最初の 10 ~ 20 回の注入ではこの問題は解消されていません。図 2 で得られたデータを使用して、各 pH 実験の最初の 50 回の注入におけるオリゴヌクレオチドの累積損失を推定しました。損失は、ステンレススチール製フリットでの各注入についてのピーク面積 ($A_{\text{フリット}}$) と、PEEK ユニオンを使用した対照実験で得られた面積 $A_{\text{ピーク}}$ から計算しました。

$$\text{累積損失} = 2 \text{ pmol} \times \sum_i^{50} \frac{A_{\text{frit } i}}{A_{\text{PEEK } i}}$$

式 1.

累積のオリゴヌクレオチド損失は、pH 5、pH 6、pH 7、pH 8 の各実験でそれぞれ 39.9、24.1、13.8、7.4 pmol でした。この推定値は、LC システム/カラムコンディショニングに関する重要なガイドラインとなります。オリゴヌクレオチド分析の熟練者は、対象サンプルを分析する前に、オリゴヌクレオチドサンプルの一部を犠牲にして、一連の注入を行うことがよくあります。累積回収率の結果から、pH 7～8 の移動相で効率的なコンディショニングを行うには、UPLC システムおよびカラムを、10 pmol を超えるサンプル量（できれば 100 pmol を超えるサンプル量）でコンディショニングすべきであると結論付けることができます。10 mM HAA バッファーまたは 10 mM トリエチルアンモニウム酢酸 (TEAA) バッファーを用いた実験では、オリゴヌクレオチド吸着の程度はほぼ同等でした（データは表示されていません）。

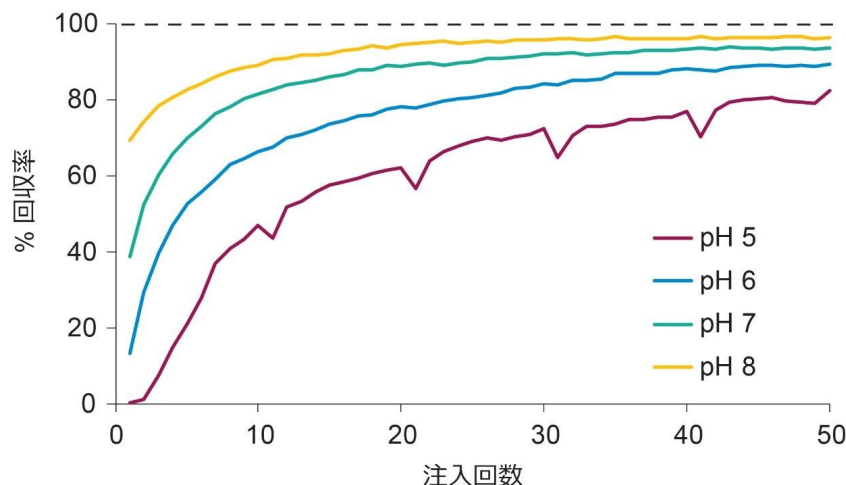


図 2. 2.1 mm のステンレススチール製フリットで 2 pmol の 25 mer オリゴヌクレオチドサンプルを 50 回連続注入した MISER 実験の結果。実験は、pH 5、6、7、8（移動相 2～6）に調整した 10 mM 酢酸アンモニウムバッファーを使用して行いました。

オリゴヌクレオチドサンプルの金属表面における一過性のコンディショニング

グ

図1および図2を詳しく調べることで、LC装置およびカラムのサンプルコンディショニングを行う際に検討すべき重要な情報が明らかになります。まず、繰り返し注入を多数回行っても、分析種のシグナルは完全な100%回収には達しません。次に、pH5での一連の試験(図2)で見られる回収率の「低下」は、コンディショニングの効果が恒久的ではなく、一過性であることを示しています。この低下は、10回の注入の後に挿入した時間のギャップの後に発生しています。延長洗浄中に、フリット表面に吸着した分析種の一部が余分な移動相によって洗い流されます。この「脱コンディショニング」現象は図2のすべての実験で発生していますが、pH5で最も顕著です。この脱コンディショニング現象は、10 mM 酢酸アンモニウム(pH 4.5)の移動相を使用して得られた図3の結果でより詳細に示されています。図3から、洗浄し過ぎるとフリットのさらなる脱コンディショニングにつながる事が明らかになっています。金属フリット表面から分析種が徐々に除去されていることも、ピークのテーリングに表れています。

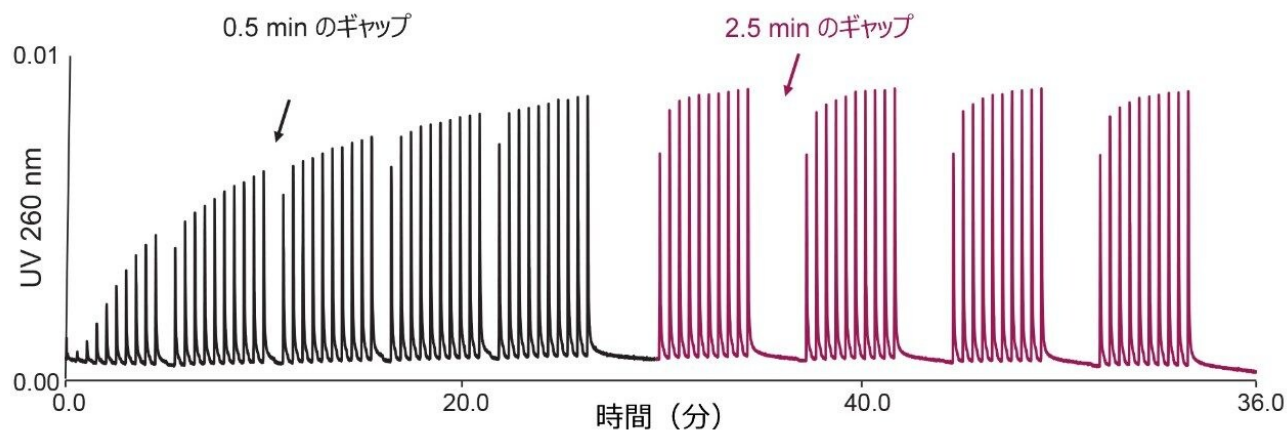


図3. 2.1 mm のステンレススチール製フリット(黒線)上で25 mer のオリゴヌクレオチド 2 pmol を50回注入した後、時間のギャップを延長して(10回の注入ごとに0.5分のギャップではなく2.5分のギャップを挿入)、同じサンプルを40回注入したMISER実験の結果。移動相は10 mM 酢酸アンモニウム(pH 4.5)(移動相2)でした。

ステンレススチール製ハードウェアを完全にコンディショニングし、サンプル注入を50回行った後でも100%回収を達成することが困難な理由は、金属表面からの分析種の流出にあります(図1Bを参照)。フリットに吸着された分析種は、実験中に継続的に洗い流されます。サンプルの流出は、オリゴヌクレオチド分析における予期せぬ高レベルのサンプルキャリーオーバーの原因になる可能性があります。新しいカラムを取り付けた後、またはLCシステムを完全に洗浄した後に、サンプルシグナルが突然減少する理由が、カラムのコンディショニングによって説明できます。このような事象が発生した場合は、コンディショニングのプロトコルを繰り返して、以前に確立した検量線と一致する結果を得ることを推奨します。

図 1～3 に示されたデータは、金属製の LC の部品に対する非特異的なサンプル吸着により、オリゴヌクレオチドの LC 分析が複雑になる可能性があることを示しています。この現象は、特に高感度 LC-MS 分析における定量分析に影響を及ぼします。非特異的吸着はステンレススチール表面に限られず、チタンや非鉄金属合金でさまざまなレベルのサンプル損失が観察されました（データは表示されていません）。これらのサンプル損失に対処するために、ウォーターズでは、MaxPeak High Performance Surfaces を開発しました（MaxPeak Premier カラムで採用）。このテクノロジーは、金属表面に共有結合で固定化したハイブリッドシリカの、高度に架橋した組成物からなるバリア層を有するハードウェアを利用しています。[Lauber *et al.*、ウォーターズホワイトペーパー、720006930EN <<https://www.waters.com/waters/library.htm?lid=135074404>>、2020 年] HPS テクノロジーを使用して、フリットを含むカラムハードウェアを恒久的に不活性化しています。MaxPeak Premier カラムは、多くのラボで使用されている一過性のカラムコンディショニングプロトコルのための優れたソリューションを提供します。

オリゴヌクレオチドの分析への MaxPeak Premier カラムテクノロジーの応用

高分離能オリゴヌクレオチド分析用に、ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C₁₈ カラムを選択しました。このカラムには、中性から弱塩基性の pH および高温での分離に適した 1.7 μm のハイブリッドシリカ粒子が充填されています。ACQUITY Oligonucleotide BEH C₁₈ カラムはステンレススチール製のハードウェアを使用するため、金属表面への吸着によりサンプル損失が発生する可能性があります。一方、ACQUITY Premier Oligonucleotide BEH C₁₈ カラムは、同じ粒子が充填されているうえ、MaxPeak HPS カラムハードウェアを採用しています。これら 2 種類のカラムを、以下の研究で比較しています。

図 4 は、従来の ACQUITY UPLC ステンレススチールと MaxPeak Premier ハードウェアカラムの性能の比較を示しています（どちらも同じクロマトグラフィー粒子を充填しています）。予想通り、ステンレススチール製カラムでは一過性のコンディショニングを行うまで、最初の数回の注入においてサンプルの若干の損失が観察されました。MaxPeak Premier カラムでは顕著なサンプル損失は観察されませんでした。最初のサンプル注入からほぼ完全なオリゴヌクレオチド回収が認められました。

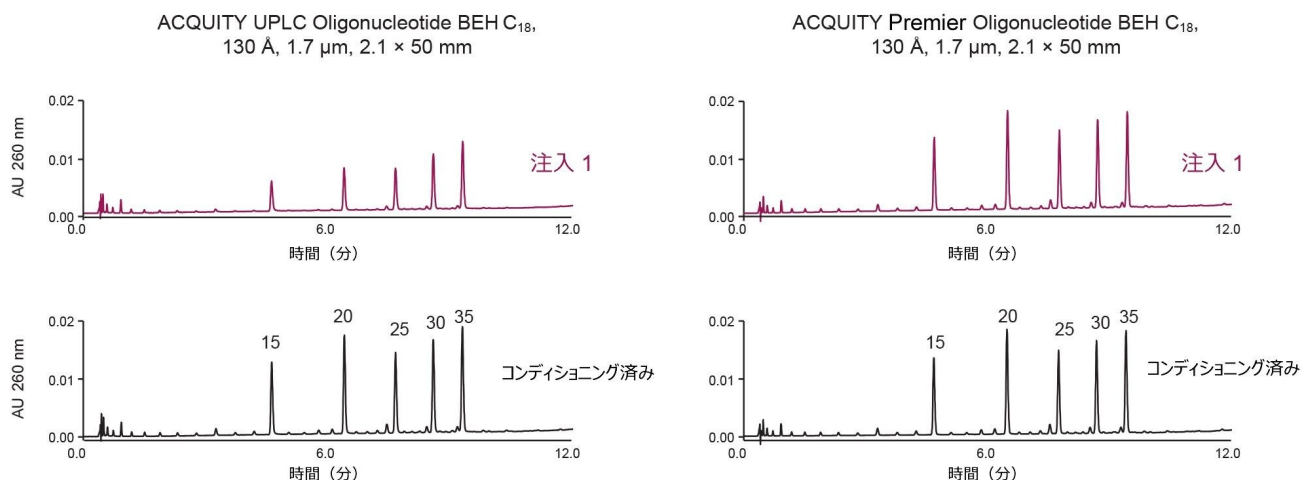


図 4. 従来のカラムハードウェアと ACQUITY Premier カラムハードウェアでのオリゴヌクレオチド分析の比較。15、20、25、30、35 mer オリゴヌクレオチド (OST MassPREP サンプル) 10 pmol を新しいカラムに注入しました (注入 #1)。ステンレススチール製カラムではオリゴヌクレオチド回収が不完全ですが、ACQUITY Premier カラムではほぼ完全な回収が得られます。続いて、39 mer オリゴヌクレオチドサンプルを 1 nmol 注入してカラムをコンディショニングし、分析を繰り返しました (クロマトグラムにはコンディショニング済みと表示)。これらの実験には、25 mM HAA (pH 7) イオン対移動相を使用しました。

前述のように、pH の選択は実験上の重要な考慮事項です。高 pH では、従来のカラムハードウェアでもオリゴヌクレオチドの回収率が向上します。ただし、pH の選択は以下の 2 つの要因によって制限されます。まず、塩基性 pH ではカラムの安定性が低下し、高 pH ではカラム寿命が短くなることが予測されます。次に、イオン対保持メカニズムが、移動相添加剤であるアミンのプロトン化による効果的なイオン対形成に依存しています。逆相カラムでの保持には、オリゴヌクレオチドとプロトン化アミンのイオン対形成が必要になります。イオン対試薬に適するアミンのほとんどは pK_a 値が約 10.5 であるため、pH 値が 9.5 を超える移動相では電荷が徐々に減少し、オリゴヌクレオチドの保持と分離が低下します。pH 値が 8.5 を超える移動相を使用するオリゴヌクレオチドのイオン対逆相分離は推奨しません。

未使用のカラム 6 本について、3 つの異なる pH 値で 30 mer のオリゴデオキシチミジンの回収率測定を行いました。pH 6、7、8.5 に調整した 25 mM HAA バッファーシステムを使用して、従来のステンレススチール製カラムと ACQUITY Premier カラムを比較しました。LC システムも、ハードウェアの部品に対する非特異的吸着により、分析種損失の原因となり得ることを考慮することが重要です。図 5 に示す実験は、コンディショニングされた LC システムで実施して、これらの交絡効果を最小限に抑えました。この実験で観測された回収率を図 5 に示します。予測どおり、pH を高くすることで、分析種の損失を軽減できます。ただし、ステンレススチール製カラムの場合、pH 8.5 でも回収は不完全なままです。これに対し、MaxPeak Premier カラムでは、pH 6 ~ 8.5 の範囲でほぼ完全な回収率が実現されます。MaxPeak Premier カラムを使用した場合に認められる微量の分析種損失は、LC システムハードウェアの不完全

なコンディショニングが原因である可能性があります。

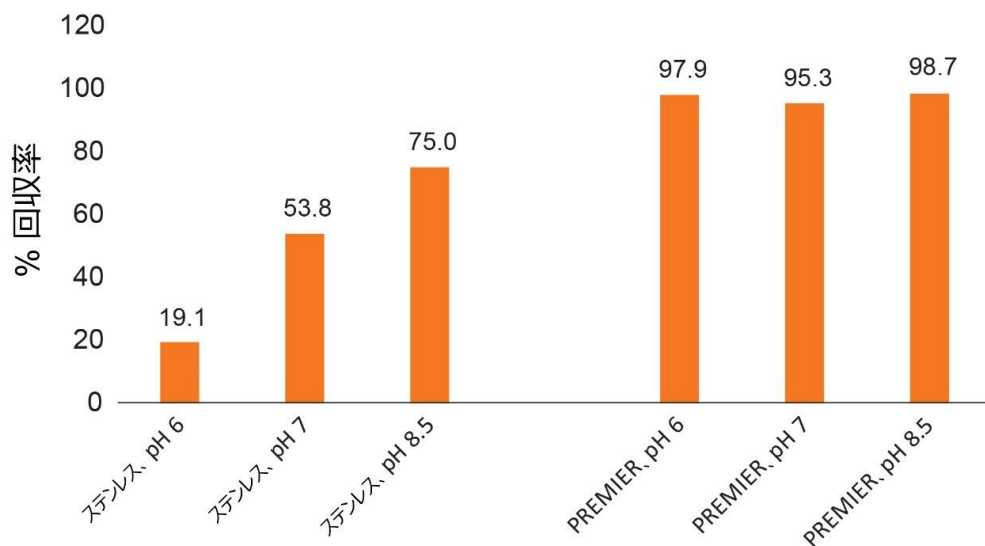


図 5. 30 mer オリゴデオキシチミジンの新しいカラムへの初回注入時の回収率。pH 6.0 ~ 8.5 での従来のステンレススチール製カラムでは、回収が不完全であることが分かりました。MaxPeak HPS カラムハードウェアを採用した MaxPeak Premier カラムを使用することで、高い回収率が得られました。

結論

このアプリケーションノートでは、高感度オリゴヌクレオチド分析を実現するためのベストプラクティスを提案しています。ステンレススチール製のカラムハードウェアが、オリゴヌクレオチドの非特異的吸着の大きな原因となっていることが実証されました。サンプル注入を繰り返すと、カラムおよび LC 装置の金属表面が徐々にコンディショニングされます。しかし、このコンディショニングは一過性のものであることが認められました。サンプルは LC システム（およびカラム）の金属表面から徐々に脱吸着され、移動相の洗浄によってハードウェアが部分的に脱コンディショニングされていました。

移動相の pH は重要な実験上のパラメーターです。高 pH によりオリゴヌクレオチドサンプルの回収率が改善しますが、この解決法はそれほど効果的ではありません。

最近導入された MaxPeak HPS テクノロジーは、金属表面とオリゴヌクレオチドの間の望ましくない相互作用を最小限

に抑える有望なアプローチです。この新しいテクノロジーを取り入れた ACQUITY Premier カラムが、オリゴヌクレオチド分析の改善のために利用できるようになりました。この新しいテクノロジーを採用することで、従来の LC-UV アプリケーション、特に高感度 LC-MS 分析において、オリゴヌクレオチド分析の品質と再現性を改善させることができます。

参考文献

1. Gilar, M.; Fountain, K. J.; Budman, Y.; Holyoke, J. L.; Davoudi, H.; Gebler, J. C. Characterization of Therapeutic Oligonucleotides Using Liquid Chromatography with On-line Mass Spectrometry Detection. *Oligonucleotides* 2003, 13(4), 229–243.
2. McCarthy, S. M.; Gilar, M.; Gebler, J. Reversed-Phase Ion-pair Liquid Chromatography Analysis and Purification of Small Interfering RNA. *Anal.Biochem.* 2009, 390(2), 181–188.
3. Basiri, B.; Sutton, J. M.; Hooshfar, S.; Byrnes, C. C.; Murphy, M. M.; Bartlett, M. G. Direct Identification of Microribonucleic Acid miR-451 from Plasma Using Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *J. Chromatogr.A* 2019, 1584, 97–105.
4. Pardi, N.; Hogan, M. J.; Porter, F. W.; Weissman, D. mRNA Vaccines - A New Era in Vaccinology. *Nat.Rev. Drug Discov.* 2018, 17(4), 261–279.
5. Gilar, M.; Bouvier, E.S.P. Purification of Crude DNA Oligonucleotides by Solid-Phase Extraction and Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.A* 2000, 890(1), 167–177.
6. Gilar, M. Analysis and Purification of Synthetic Oligonucleotides by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array and Mass Spectrometry Detection. *Anal.Biochem.* 2001, 298(2), 196–206.
7. Gilar, M.; Fountain, K. J.; Budman, Y.; Neue, U. D.; Yardley, K. R.; Rainville, P. D.; Russell II, R. J.; Gebler, J. C. Ion-pair Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Oligonucleotides: Retention Prediction. *J. Chromatogr.A* 2002, 958(1-2), 167–182.
8. Li, N.; El Zahar, N. M.; Saad, J. G.; van der Hage, E. R. E.; Bartlett, M.G. Alkylamine Ion-Pairing Reagents and The Chromatographic Separation of Oligonucleotides. *J. Chromatogr.A* 2018, 1580, 110–119.
9. Gong, L.; McCullagh, J. S. Comparing Ion-Pairing Reagents and Sample Dissolution Solvents for Ion-Pairing Reversed-Phase Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis of

Oligonucleotides. *Rapid Commun.Mass Spectrom.* 2014, 28(4), 339–350.

10. Sturm, M.; Quinten, S.; Huber, C. G.; Kohlbacher, O. A Statistical Learning Approach to the Modeling of Chromatographic Retention of Oligonucleotides Incorporating Sequence and Secondary Structure Data. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35(12), 4195–4202.
11. Gilar, M.; Yang, H.; Bouvier, E. S.; Warren, B. HPLC and UPLC Columns for the Analysis of Oligonucleotides. Waters Application Note, 720002376EN <
<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=1521847>> , 2007.
12. Wyndham, K. D.; O'Gara, J. E.; Walter, T. H.; Glose, K. H.; Lawrence, N. L.; Alden, B. A.; Izzo, G. S.; Hudalla, C. J.; Iraneta, P. C. Characterization and Evaluation of C18 HPLC Stationary Phases based on Ethyl-Bridged Hybrid Organic/Inorganic Particles. *Anal.Chem.* 2003, 75(24), 6781–6788.
13. Ivleva, V. B., UPLC-MS Analysis of Interfering RNA Oligonucleotides. Waters Application Note, 720002412EN <
<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=10014836>> , 2008.
14. Huber, C. G.; Oefner, P. J.; Bonn, G. K. High-Resolution Liquid Chromatography of Oligonucleotides on Nonporous Alkylated Styrene-Divinylbenzene Copolymers. *Anal.Biochem.* 1993, 212(2), 351–358.
15. Huber, C. G.; Oefner, P. J.; Preuss, E.; Bonn, G. K. High-Resolution Liquid Chromatography of DNA Fragments on Non-Porous Poly(Styrene-Divinylbenzene) Particles. *Nucleic Acids Res.* 1993, 21(5), 1061–1066.
16. McCarthy, S. M.; Gilar, M. Hexylammonium Acetate as an Ion-Pairing Agent for IP-RP LC Analysis of Oligonucleotides. Waters Application Note, 720003361EN <
<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=10152270>> , 2010.
17. Shlyankevich, A. Validation of Analytical Methods for Oligonucleotides: Unique Challenges and Solutions. *TIDES* 2010.
18. Tuytten, R.; Lemiere, F.; Witters, E.; Van Dongen, W.; Slegers, H.; Newton, R. P.; Van Onckelen, H.; Esmans, E. L. Stainless-Steel Electrospray Probe: A Dead End for Phosphorylated Organic Compounds? *J. Chromatogr.A* 2006, 1104(1-2), 209–221.
19. Walter, T. H.; Alden, B. A.; Blaze, M.; Boissel, C.; DeLano, M.; Field, J.; Lawrence, N.; Osterman, D.; Patel, A. Characterization of New MS-Compatible Mixed-Mode Reversed-Phase/Anion-Exchange HPLC columns. *J. Chromatogr A* 2020, Submitted for publication.
20. Chen, S.; Zhang, J.; Liao, D.; Qian, M. G. A Novel Dynamic Flush Method to Reduce Column-Related Carryover. *J. Chromatogr.Sci.* 2014, 52(8), 950–953.

21. Welch, C. J.; Gong, X.; Schafer, W.; Pratt, E. C.; Brkovic, T.; Pirzada, Z.; Cuff, J. F.; Kosjek, B. MISER Chromatography (Multiple Injections in A Single Experimental Run): The Chromatogram is the Graph. *Tetrahedron: Asymmetry* 2010, 21(13-14), 1674–1681.

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio システム <<https://www.waters.com/10166246>>

ACQUITY UPLC PDA 検出器 <<https://www.waters.com/514225>>

Empower 3 クロマトグラフィーデータソフトウェア <<https://www.waters.com/10190669>>

720007012JA、2020年9月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [サイトマップ](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)