

四重極飛行時間型質量分析計LCMS™-9030を用いた核酸医薬品の分子量確認と定量性の確認

■ 概要

核酸医薬品は、各種疾患の原因となる標的遺伝子、あるいは標的タンパク質に結合することで薬効を発揮する合成オリゴヌクレオチドです。これまで8件の核酸医薬品が承認されており、その多くは20塩基程度の鎖長となります。

ここでは、Q-TOF型質量分析計LCMS-9030を用いた分析例をご紹介します。核酸医薬品としては、20塩基の2'-MOE修飾オリゴヌクレオチドを用いました。精密質量分析では誤差3 mDa (0.05 ppm) で分子量確認ができました。LCMS-9030のMRMモードによる検量線作成では、1~1000 ng/mLの範囲で直線性を確認できました。

N. Kato

■ 核酸医薬品の分析手法

核酸医薬品の構造は、質量分析、NMR、UVスペクトルなどにより確認されていましたが、近年では特異性や汎用性に優れ、かつ未変化体と代謝物の同時評価が可能なLC-MS/MS法が注目されています。

核酸医薬品の分子量は20塩基で6000以上となるため、分子量確認には、四重極飛行時間(Q-TOF)型質量分析計のような高精度質量分析計が用いられます。一方、定量分析には一般的にダイナミックレンジの広いトリプル四重極型質量分析計(TQ-MS)が用いられます。



Q-TOF型質量分析計LCMS™-9030

■ LC-QTOF-MS

LC-QTOF-MSは高速液体クロマトグラフと四重極型質量分析計および飛行時間型質量分析計(TOF)を結合させた高速液体クロマトグラフ質量分析計です。

当社初の四重極飛行時間型質量分析計LCMS-9030はTQ型のLC-MSであるLCMS-8000シリーズで培われた高速性能と高いイオン収束力を継承し、新たに開発したTOFの技術と融合しました。高強度微細格子電極UFgrating™、理想的リフレクトロンiRefTOF™、高精度温度コントロールシステムといった当社独自の技術が搭載されており、常に安定した質量精度を保ちながら、感度と分解能を両立したデータ取得が可能です。

■ サンプル

配列: 5'-mG-mC*-mC*-mU*-mC*-dA-dG-dT-dC*-dT-dG-dC*-dT-dT-dC*-mG-mC*-mA-mC*-mC*-3'

(m) 2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオシド(2-MOE)

(*) CとUの5位のメチル化体

(d) 2'-デオキシヌクレオシド

Monoisotopic mass : 6431.7239

■ 分析条件

HPLCとMSの分析条件を表1に示します。オリゴヌクレオチドの逆相分離では、イオンペア試薬を用いることが一般的で、アミン系試薬としてはTEA*1などがよく使用されます。ここではより高感度に測定ができるHFIP*2とDIPEA*3を用いた移動相を使用しました。

表1 分析条件

| | |
|-----------------------------|--|
| [HPLC conditions] (Nexera™) | |
| Column | : Shim-pack Scepter™ C18 (2.0×75, 1.9 μm) |
| Mobile phases | : A) 50 mmol/L HFIP and 10 mmol/L DIPEA B) Acetonitrile |
| Gradient Program | : B 5% (0-0.5 min) - 15% (0.5-6 min) |
| Flow rate | : 0.2 mL/min |
| Column Temp. | : 50 °C |
| Injection volume | : 5 μL |
| [MS conditions] (LCMS-9030) | |
| Ionization | : ESI (Negative mode) |
| Probe Voltage | : -3 kV |
| Mode | : フルスキャン (m/z 500 - 3000) MRM (803.4626 > 94.9358) |
| Nebulizing gas flow | : 3.0 L/min |
| Drying gas flow | : 10.0 L/min |
| Heating gas flow | : 10.0 L/min |
| DL Temp. | : 250 °C |
| Heat Block Temp. | : 400 °C |
| Interface Temp. | : 350 °C |

*1 Triethylamine

*2 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol

*3 N,N-diisopropylethylamine

■多価イオン解析ソフトウェアによる デコンボリューション

図1にscanモードのデータから抽出したマスペクトルを示します。マスペクトルでは m/z 1071.6、918.4、803.5などの多価イオンが検出されました。これらの多価イオンに対して、LabSolutions Insight Explore™ソフトウェアのオプション"ReSpect"アルゴリズムを用いたデコンボリューションを行いました。

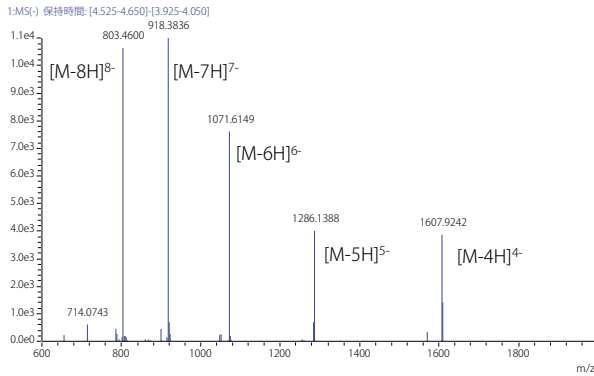


図1 核酸医薬品のマスペクトル

図2に分子量計算を行った結果を示します。デコンボリューションスペクトルに示されるように、monoisotopic massは6431.72であることが確認されました。その質量誤差は3 mDa (0.05 ppm) でした。

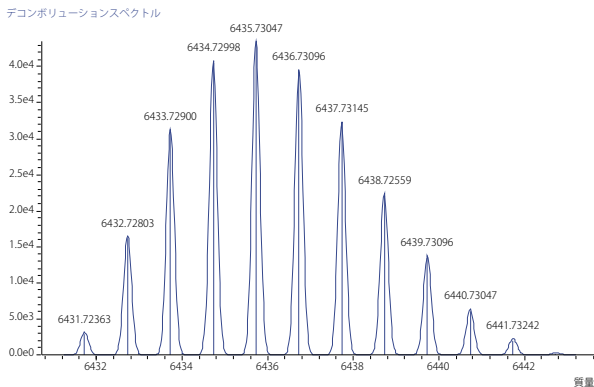


図2 デコンボリューションスペクトル

■標準品の分析

LCMS-9030ではトリプル四重極型装置と同様に、MRMモードを使用することでより高感度に定量を行うことができます。プリカーサイオンは8価の m/z 803.4626、プロダクトイオンは m/z 94.9358 (PSO₂⁻) をモニターイオンとして使用しました。図3にMRMモードでの代表的なクロマトグラムを示します。

Q 803.4626>94.9358 (-)

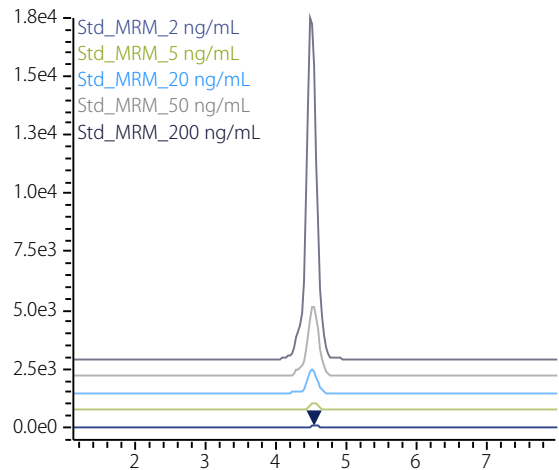


図3 核酸医薬品のMRMクロマトグラム

■検量線

図4に検量線を示します。1~1000 ng/mLの範囲で検量線を作成しました。寄与率 (R²) は0.996でした。

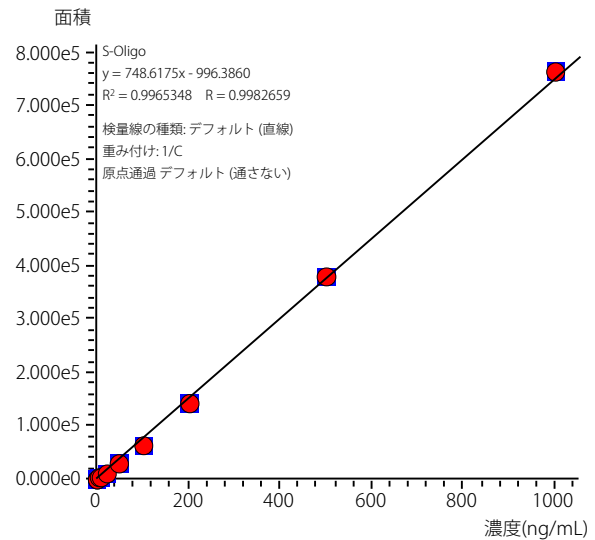


図4 検量線

■まとめ

Q-TOF型質量分析計LCMS-9030を用い、精密質量分析では誤差0.05 ppmで分子量確認ができました。また1~1000 ng/mLの範囲で直線性を確認できました。

LCMS、UFgrating、iReFTOF、Nexera、Shim-pack Scepter、およびLabSolutions Insight Exploreは、株式会社島津製作所の日本及びその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2020年6月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。