

LCMS™-8060 を用いた核酸医薬品の 定量性の検証と分子量確認

■ 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。

ここでは、トリプル重極型質量分析計 LCMS-8060 を用いた 20 塩基の 2'-MOE 修飾オリゴヌクレオチドの分析例をご紹介します。MRM モードによる検量線作成では、1~300 ng/mL の範囲で直線性が得られ、スキャンモードで得られた多価イオン質量スペクトルからデコンボリューションにより分子量を確認しました。

N. Kato

■ 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	: C18 ODS Column (50 mm×2.1 mm I.D., 2.5 μm)
Mobile phases	: A) 50 mmol/L HFIP and 10 mmol/L DIPEA B) Acetonitrile
Gradient Program	: B 5 % (0-0.5 min) - 15 % (0.5-3 min)
Flow rate	: 0.2 mL/min
Column Temp.	: 60 °C
Injection volume	: 2 μL
[MS conditions] (LCMS-8060)	
Ionization	: ESI (Negative mode)
Probe Voltage	: -4 kV
Mode	: フルスキャン (m/z 500 - 2000) MRM (m/z 803.5 > 95.0)
CID gas	: 330 kPa
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 8.0 L/min
Heating gas flow	: 12.0 L/min
DL Temp.	: 300 °C
Heat Block Temp.	: 450 °C
Interface Temp.	: 250 °C

*1 Triethylamine

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

*3 N,N-diisopropylethylamine



LCMS™-8060

■ 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

Average mass : 6436.39

■ 検量線

図 1 に MRM モードでの代表的なクロマトグラム、図 2 に検量線を示しました。1~300 ng/mL の範囲で検量線を作成しました。寄与率 (R^2) は 0.998 でした。

Q 803.50>95.00 (-)

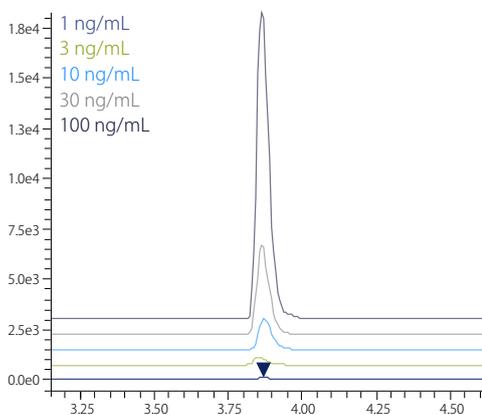


図 1 核酸医薬品の MRM クロマトグラム

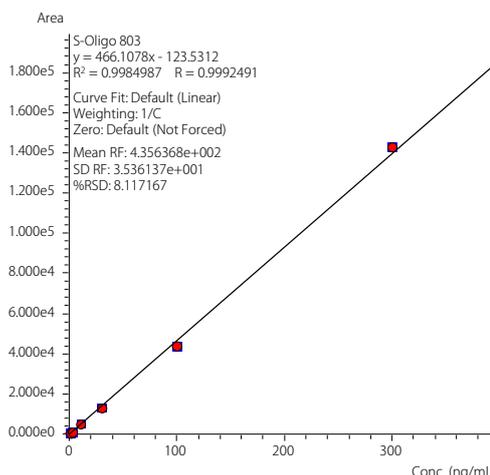


図 2 検量線

■ スキャンモードのクロマトグラムとマススペクトル

図3にスキャンモードで測定したマスクロマトグラムを示しました。マスクロマトグラムは6価、7価、8価のイオンを選択しました。

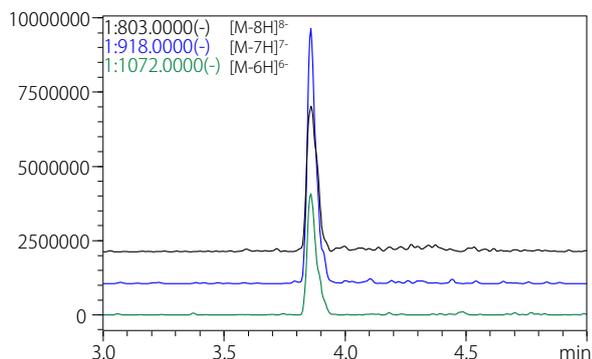


図3 核酸医薬品のマスクロマトグラム

図4にマススペクトルを示しました。5~8 価のイオンが検出されました。

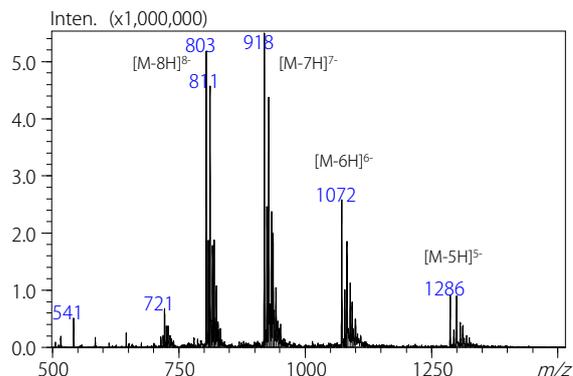


図4 核酸医薬品のマススペクトル

■ 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

LabSolutions™ LCMS ソフトウェアのデコンボリューション機能を用い分子量計算を行った結果を図5に示しました。目的のマススペクトルを LabSolutions LCMS 上で表示し、デコンボリューションメニューを選択するだけで多価イオン解析を行うことができます。

デコンボリューション結果に示されるように、推定分子量は6436.37であることが確認されました。(理論値: 6436.39) このようにほぼ誤差なく分子量を確認することができました。

Compound	Adduct Ion
1	Auto 6436.3733
2	Auto 6499.4658
3	Auto 6536.6113
4	Auto 6474.2746
5	Auto 6561.5447

Detect	Name	Mass	Type	Mass	Charge	# of Peak	SD	Report	Intensity
1	Auto	6436.3733	-(H+)	-1.00728	-1	4	0.245	<input checked="" type="checkbox"/>	14305156
2	Auto	6499.4658	-(H+)	-1.00728	-1	6	4.500	<input type="checkbox"/>	13277484
3	Auto	6536.6113	-(H+)	-1.00728	-1	5		<input type="checkbox"/>	6324122
4	Auto	6474.2746	-(H+)	-1.00728	-1	4		<input type="checkbox"/>	5811554
5	Auto	6561.5447	-(H+)	-1.00728	-1	5	1.276	<input type="checkbox"/>	5709776

Enable	Detect	m/z	Charge	Actual	Mass	Weight
<input checked="" type="checkbox"/>	Auto	1286.3200	5	4.99980	6436.63640	0.385
<input checked="" type="checkbox"/>	Auto	1071.7200	6	6.00001	6436.36368	0.268
<input checked="" type="checkbox"/>	Auto	918.4200	7	7.00042	6435.99096	0.197
<input checked="" type="checkbox"/>	Auto	803.5200	8	8.00019	6436.21824	0.151

図5 多価イオン解析結果

■ まとめ

LCMS-8060を用いた2'-MOE修飾オリゴヌクレオチドの分析例をご紹介しました。1~300 ng/mLの範囲で検量線が取得でき、スキャンデータからデコンボリューション機能により小さい誤差範囲で分子量を確認することができました。

LCMS、Nexera、および LabSolutions は、株式会社 島津製作所の日本およ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9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。