

Application News

シングル四重極質量分析計を用いた核酸医薬品の簡易的な不純物分析

服部 考成、加藤 紀子、中園 純菜

ユーザーベネフィット

- ◆ イナートUHPLCシステムNexera™ XS inertとシングル四重極質量分析計LCMS-2050を用いることで、オリゴヌクレオチドおよび関連不純物をLC検出器と同様の感覚で簡便に分析できます。
- ◆ 得られたマススペクトルをデコンボリューションすることで、不純物の分子量を高精度に推定できます。

はじめに

核酸医薬品は疾患特異的な治療薬を創出でき、化学合成によるデザインがしやすいことから新しい創薬モダリティとして近年注目されています。一般的に、十数~数十塩基（修飾塩基も含む）が連結したオリゴヌクレオチドで構成されますが、品質担保のための分析法開発や、その標準化の面では未だ発展途上です。品質管理の段階では、主成分以外に副反応生成物や未反応残渣、分解物などの不純物を分析する必要があります。純度確認には一般にHPLC-UV法が用いられますが、不純物が検出された場合には既知の不純物であるか否かの確認が求められるため、分子量情報が得られる質量分析計は有用な分析ツールです。本アプリケーションニュースでは、イナートUHPLCシステムとシングル四重極質量分析計によるオリゴヌクレオチドと関連不純物の分析をご紹介します。

■ サンプル

合成アンチセンスオリゴヌクレオチドのモデルとして、20 merのオリゴヌクレオチドとその3種類の不純物を合成しました。それぞれのオリゴヌクレオチドの配列を表1に示します。Full length product (FLP) および、関連不純物として3'末端が1塩基欠損したn-1(3') 欠損体、3塩基欠損したn-3(3') 欠損体、5'末端が10塩基欠損したn-10(5') 欠損体の計4種を混合したものを測定用試料としました。

表1 サンプル情報

Name	Sequence (5'→3')	Length
FLP	T*-mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*-mC*	20 mer
n-1 (3')	T*-mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*	19 mer
n-3 (3')	T*-mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*	17 mer
n-10 (5')	dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*-mC*	10 mer

Note : * = 2'-O-methoxyethyl, m = 5-methyl, d = 2'-deoxy

■ 装置、分析条件

LCシステムやカラムへの試料吸着を考慮し、LCはイナートUHPLCシステムであるNexera XS inertを、カラムはイナートカラムであるShim-pack Scepter™ Claris C18-300 を用いました。移動相としてHFIPとトリエチルアミンを含む超純水/メタノールを使用し、高圧グラジエント分析を行いました。MSはシングル四重極質量分析計であるLCMS-2050を用いました。LCMS-2050は、コンパクトでありながら、使いやすさや性能面にも秀でた質量分析計です。ESI法とAPCI法、両方の長を有するイオン化である加熱型DUIS™



図1 Nexera™ XS inert, LCMS™ -2050システム

を標準搭載しています。また、質量範囲はm/z 2-2000まで対応しているため、分子量の大きな核酸医薬品の分析にも有用です。表2に分析条件を示します。

表2 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera XS inert)	
Column	: Shim-pack Scepter Claris C18-300 *1 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm)
Flow rate	: 0.3 mL/min
Mobile phase	: A) 100 mmol/L HFIP, 10 mmol/L TEA in water
Mobile phase	: B) Methanol
Time program	: 10%B (0 min)→35%B (15 min) →40%B (20 min)→90%B (20.1-22 min) →10%B (22.1-26 min)
Column temp.	: 60 °C
UV detection	: 190-400 nm
Injection volume	: 6 μL
[MS conditions] (LCMS-2050)	
Ionization	: ESI/APCI (DUIS), Negative mode
Interface voltage	: -3.0 kV
Mode	: Scan (m/z 550-2000)
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 5.0 L/min
Heating gas flow	: 7.0 L/min
Desolvation temp.	: 450°C
DL temp.	: 200°C

*1: P/N 227-31209-02

■分析結果

モデルオリゴヌクレオチドの測定用試料を分析し得られたUV (260 nm) クロマトグラム、TICクロマトグラムを図2に示します。n-10 (5') 欠損体、n-3 (3') 欠損体、n-1 (3') 欠損体、FLPの順にピークを確認できました。

不純物およびFLP由来ピークのマスペクトルを図3に示します。3~11価の多価イオンが検出されました。それぞれのピークのマスペクトルをデコンボリューションし、分子量を推定しました(図4)。その結果、n-10 (5') 欠損体(理論分子量 3553) 3552、n-3 (3') 欠損体(理論分子量 5987) 5986、n-1 (3') 欠損体(理論分子量 6776) 6776、FLP(理論分子量 7169) 7169と算出され、理論分子量と誤差の小さい結果が得られました。

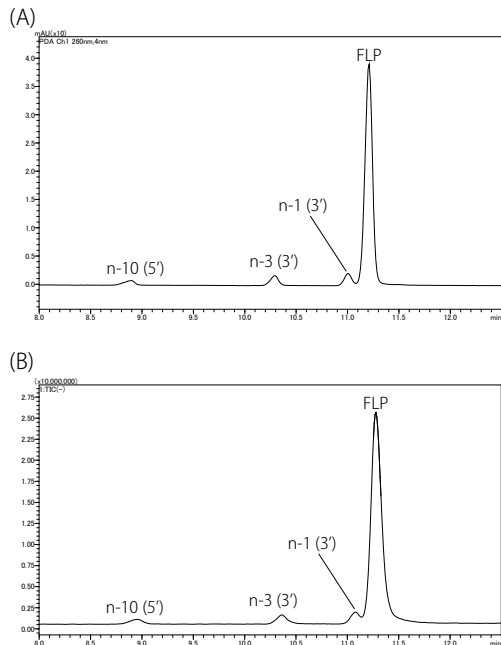


図2 モデルオリゴヌクレオチド分析のクロマトグラム
(A) UVクロマトグラム、(B) TICクロマトグラム

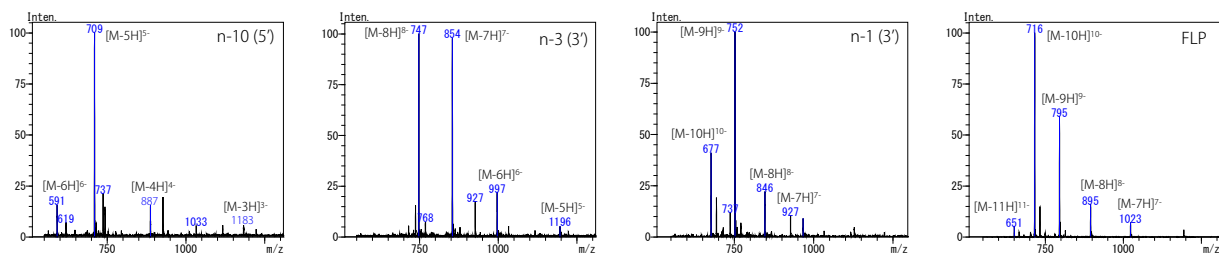


図3 不純物およびFLPのマスペクトル

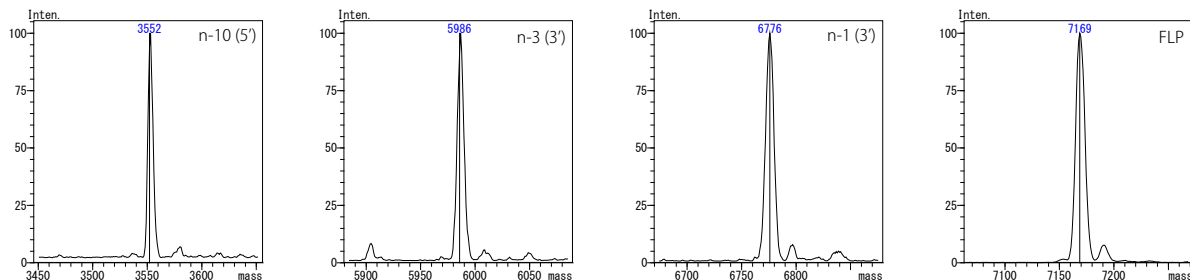


図4 デコンボリューションされたマスペクトル

LCMS、Nexera、Shim-pack ScepterおよびDUISは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

■まとめ

イナートUHPLCシステムであるNexera XS inertとシングル四重極質量分析計であるLCMS-2050を用い、モデルオリゴヌクレオチドの主成分と関連不純物を分析しました。それぞれのピークのマスペクトルをデコンボリューションし分子量推定した結果、理論分子量との誤差は小さく、高精度でオリゴヌクレオチドの不純物分析ができました。LCMS-2050は、LCと同様の簡便な操作感、容易な操作性を可能としながらも、高速、高感度、広質量範囲の分析を実現します。質量分析の経験がない方をはじめ、より多くの方に使っていただきやすい装置であるため、核酸医薬品の品質管理で有用な分析ツールです。オリゴヌクレオチドの網羅的な不純物同定や配列解析には、アプリケーションニュースNo. 01-00595-JPでご紹介した四重極飛行時間(Q-TOF)型LC-MSを用いた分析が有用です。専用の解析ソフトを使うことで、不純物の網羅的な検出や精密質量による高精度な配列解析を簡単に行えますので、合わせてご活用ください。

<関連アプリケーション>

1. オリゴヌクレオチドの逆相イオンペアクロマトグラフィーによる分離条件探索の効率化 [Application News No.01-00558-JP](#)
2. LabSolutions Insight™Biologicsを用いたオリゴヌクレオチド不純物解析ワークフロー [Application News No.01-00595A-JP](#)