SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

高速液体クロマトグラフ質量分析計

シングル四重極質量分析計を用いたオリゴヌクレオチド不純物分析

早河 瑞希、丹羽 宏之

ユーザーベネフィット

- ◆ シングル四重極質量分析計 LCMS™-2050とLabSolutions Insight™ Biologicsを用いることで、オリゴヌクレオチドおよび不純物の網羅的特性評価が可能です。
- ◆ UVクロマトグラムと同期したMSスペクトルを使用することで、分離不十分なクロマトグラムにおいても成分の純度計算を行うことが可能です。

■はじめに

近年、核酸医薬品の開発が急速に進み、新たな創薬モダリティとして注目されています。核酸医薬品の合成過程において、目的のオリゴヌクレオチド以外に塩基長の異なる不純物等が生じます。医薬品としての安全性や有効性を担保するため、不純物の網羅的な検出と同定が求められます[1)]。

目的物と不純物を分離する方法として、逆相イオンペアクロマトグラフィーが広く用いられてます。合成の過程で有効成分と類似した構造や性質を持つ不純物が生成されることが多く、全ての不純物を分離する条件を設定することは困難です。このような背景より、液体クロマトグラフ質量分計を用いて不純物の検出と同定を行うことが一般的です。核酸医薬品の解析には、MS/MS解析による配列・構造推定が可能で質量分解能が高い四重極飛行時間型質量分析計が主に用いられます。しかし品質管理において、すでに不純物情報が明らかになっている場合は、質量情報が得られ、かつ取り扱いが簡便なシングル四重極質量分析計の活用が期待されます。

本稿では、高速液体クロマトグラフ質量分析計LCMS-2050とLabSolutions Insight Biologicsを用いて、合成オリゴヌクレオチドの不純物分析例をご紹介します。

■サンプル

ミポメルセンの配列をモデルとしたオリゴヌクレオチド（FLP）と、本分析で不純物として扱う、5′末端から1塩基欠損したn-1(5′)体、3塩基欠損したn-3(5′)体を用いました。表1にFLP、n-1(5′)体、n-3(5′)体の配列を示します。

表 1　各成分の配列情報*

名称	Sequence(5′→3′)
FLP	MG-MC-MC-MU-MC-dA-dG-dT-dC-dT dG-dC-dT-dT-dC-MG-MC-MA-MC-MC
n-1(5′)	MC-MC-MU-MC-dA-dG-dT-dC-dT dG-dC-dT-dT-dC-MG-MC-MA-MC-MC
n-3(5′)	MU-MC-dA-dG-dT-dC-dT dG-dC-dT-dT-dC-MG-MC-MA-MC-MC

* M: 2′-O-(2-methoxyethyl) nucleoside; d: 2′-deoxynucleoside; cytosineとuracilの5位はメチル基で置換されています。全てのヌクレオチド間のホスホジエステル結合は、ホスホロチオエート結合で置換されています。

■分析条件

測定機器はNexera™ XS inertとLCMS-2050を用いました。HPLC条件を表2、MS条件を表3に示します。本稿では不純物分析性能を示すため、n-1(5′)体はFLPと共溶出し、n-3(5′)体は分離される条件（図1）を設定しました。

表 2　HPLC分析条件

System	:	Nexera XS inert
Column	:	Shim-pack Scepter™ Claris C18-120（100 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 µm）*1
Mobile Phase A	:	100 mmol/L HFIP, 10 mmol/L TEA in water
Mobile Phase B	:	100 mmol/L HFIP, 10 mmol/L TEA in methanol
Time Program	:	15% B(0 min)→30% B(6 min)→45% B(6.1-8 min)→15% B(8.1-11 min)
Flow Rate	:	0.4 mL/min
Column Temp.	:	60 ℃
Injection Vol.	:	5 µL
UV Detection	:	190-800 nm (photodiode array detector)

*1 P/N : 227-31210-02

表 3　MS分析条件

Ionization	:	ESI/APCI (DUIS™), Negative mode
Mode	:	Scan (*m/z* 650-2000)
Nebulizing gas flow	:	3.0 L/min
Drying gas flow	:	5.0 L/min
Heating gas flow	:	7.0 L/min
Desolvation temp.	:	500 ℃
DL temp.	:	250 ℃
Interface voltage	:	-3.0 kV

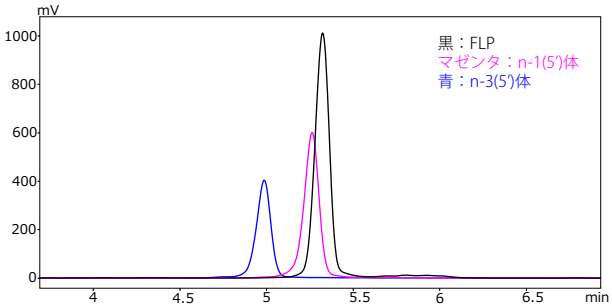

図 1　FLP、n-1(5′)体、n-3(5′)体のクロマトグラ(PDA検出器　260 nm)

■解析パラメーター設定

LabSolutions Insight Biologicsはオリゴヌクレオチドおよびその不純物の解析ソフトウェアです。図2の設定画面で核酸塩基やリンカー、リボース、修飾等を選択し、FLPの配列を作成します。これらの核酸塩基、リンカー、リボースや塩基修飾は自由に追加、編集ができます。配列を入力すると左下に分子式や質量情報、右側には構造式が表示されます。

LC-MSでは単一の成分であっても、価数違いや同位体の違いにより、異なる*m/z*で検出されます。Insight Biologicsでは価数違いや同位体由来のピークを1つの成分クロマトグラムとしてまとめて表示可能です。本稿では、各成分のピーク面積値を以下の式から算出するように設定しました。

成分面積値=(UVクロマトグラムのピーク面積値)
×(当該ピーク中に含まれる対象成分の「成分クロマトグラム」MS値 / 当該ピーク中に含まれる全成分の「成分クロマトグラム」合計 MS値)

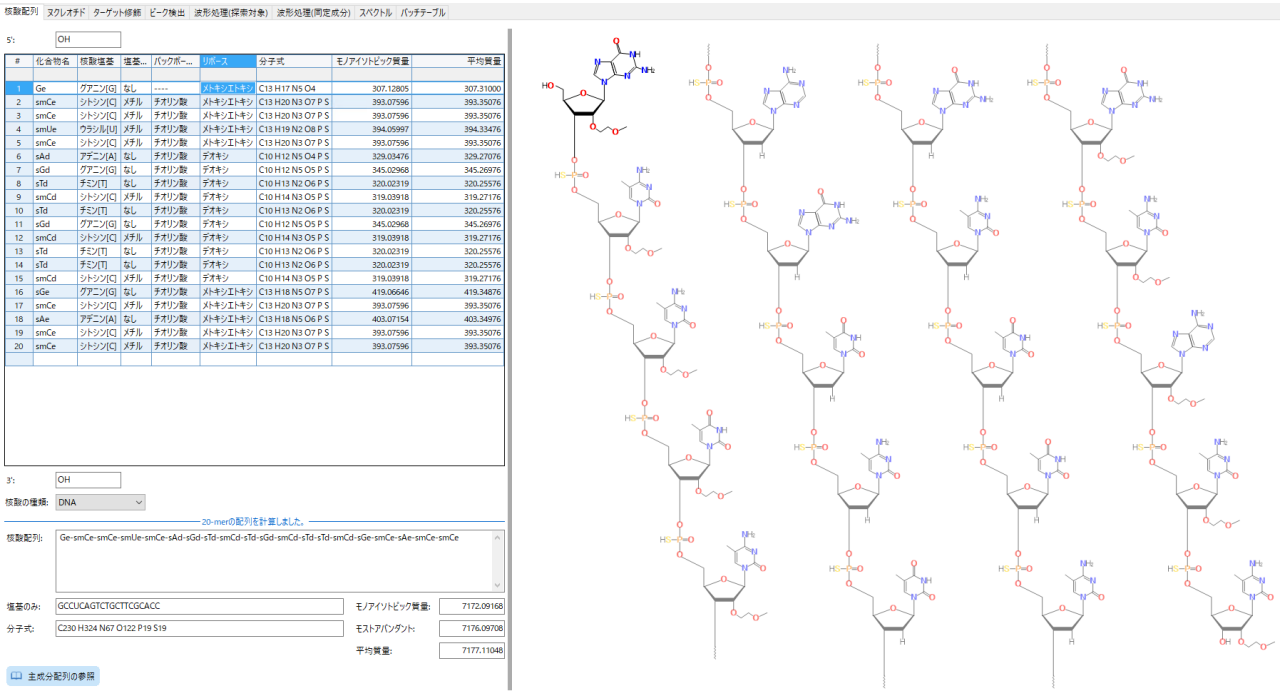

図 2 LabSolutions Insight Biologics 設定画面（核酸配列）

■FLP中の不純物の定量

LabSolutions Insight Biologicsにおいて、FLPの成分面積値と濃度の直線性の確認を行いました。結果、1、5、10、25、50 µmol/Lの範囲で寄与率0.999以上を示しました。

次に、直線性範囲内のFLP 20 µmol/Lに対して各ヌクレオチド欠損体を添加した試料を調製し、分析しました。n-1(5')体とn-3(5')体のいずれにおいても、FLPに対して0.25%（添加濃度 では0.05 µmol/L）以上添加した場合、両ヌクレオチド欠損体を検出および同定できました。FLPに対してn-1(5')体 0.25%添加した際のUVクロマトグラムと成分クロマトグラムを図3、多価イオン解析結果を図4、5に示します。

また n-3(5')体 0.25%添加した際のUVクロマトグラムと成分クロマトグラムを図6、多価イオン解析結果を図7、8に示します。

FLP中に含まれる各ヌクレオチド欠損体の添加濃度、および得られた成分面積値は上記の添加濃度範囲（0.25、0.5、1、2、5%）において、図9に示すように寄与率0.999以上の良好な直線性を示しました。

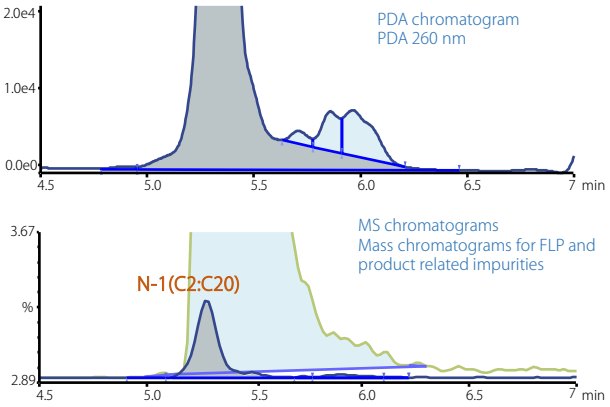

図 3 FLPに対してn-1(5')体 0.25%添加した際のクロマトグラム
上：UVクロマトグラム　下：成分クロマトグラム

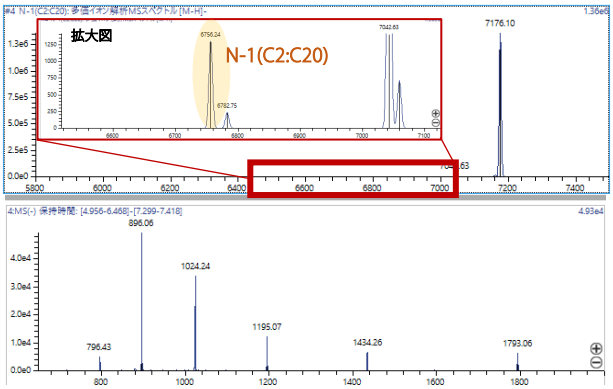

図 4 FLPに対してn-1(5')体 0.25%添加した際の多価イオン解析結果
（図3に示すn-1(5')体）
上：多価イオン解析マススペクトル　下：マススペクトル

#	ピーク	保持時...	面積	質量	質量誤差 (ppm)	質量誤差 (mDa)	多価イオン m/z
2	N-1(G1:C19)	4.888	65	6782.43	-87.599	-594.19	846.96,967.75,1129.42
3	FLP(G1:C20)	4.888	2228	7177.42	43.592	312.86	1195.58,1434.56,1792.79
4	N-1(C2:C20)	5.338	16782	6756.24	-117.384	-793.17	749.80,843.57,964.16,1125.16,1349.81
5	N-1(G1:C19)	5.338	31402	6782.75	-40.233	-272.90	752.88,846.92,967.95,1129.40,1355.60,1694.59

図 5 FLPに対してn-1(5')体 0.25%添加した際の多価イオン解析結果　同定結果

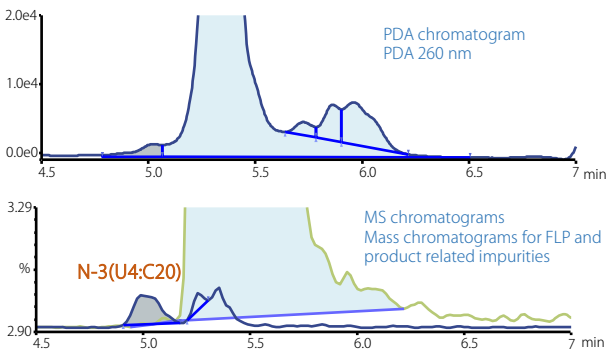

図 6 FLPに対してn-3(5′)体 0.25%添加した際のクロマトグラム
上：UVクロマトグラム　下：成分クロマトグラム

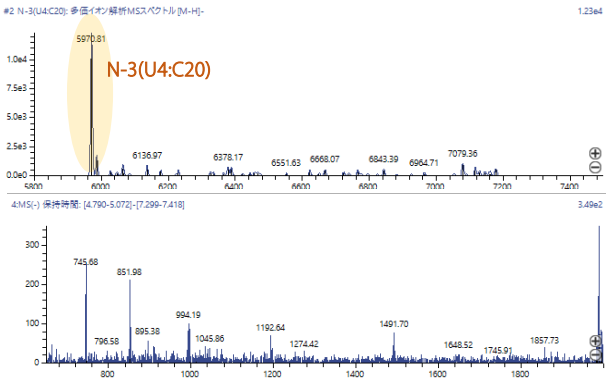

図 7 FLPに対してn-3(5′)体 0.25%添加した際の多価イオン解析結果
（図6に示すn-3(5′)体）
上：多価イオン解析マススペクトル　下：マススペクトル

#	ピーク	保持時...	面積	質量	質量誤差 (ppm)	質量誤差 (mDa)	多価イオン m/z
1	N-3(G1:C17)	4.688	----	5985.24	-106.294	-636.26	746.76,854.23,996.65
2	N-3(U4:C20)	5.022	13506	5970.81	-42.054	-251.11	662.48,745.45,851.77,993.97,1193.28,1491.76
3	N-3(G1:C17)	5.022	107	5986.08	35.234	210.90	854.13,996.51,1196.62,1495.24
4	N-2(C3:C20)	5.022	99	6365.06	102.450	652.03	1059.94,1271.58,1590.41

図 8 FLPに対してn-3(5′)体 0.25%添加した際の多価イオン解析結果　同定結果

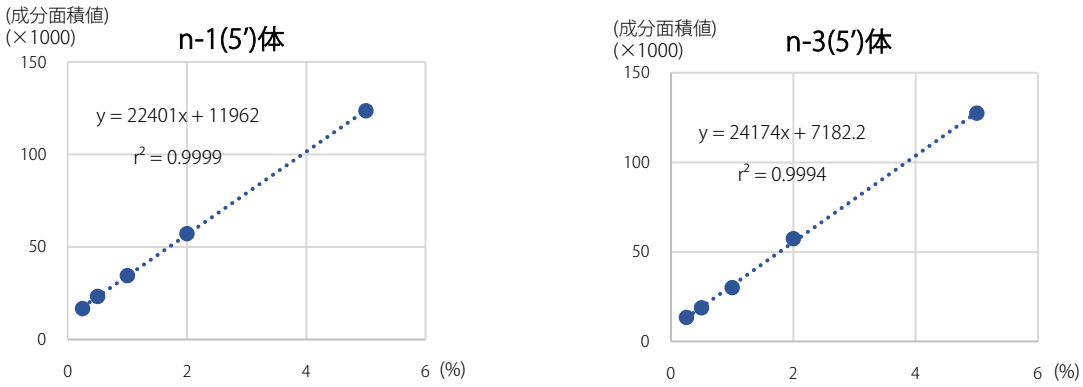

図 9 添加濃度に対する直線性評価

■まとめ

高速液体クロマトグラフ質量分析計LCMS-2050とLabSolutions Insight Biologicsソフトウェアを用いてFLPにそれぞれn-1(5′)体、n-3(5′)体を添加した試料を解析しました。FLPと分離しているn-3(5′) 体のみならず、共溶出するn-1(5′)体においても、低濃度域での検出、同定および含有量測定を行うことができました。分離条件の確立が困難な場合において本装置とソフトウェアを用いることで、核酸医薬品の品質確認を効率的に行うことが可能です。

<謝辞>
本アプリケーションニュースはAMED 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業「核酸医薬品の製造・精製・分析基盤技術の開発」プロジェクト（代表：小比賀聡）による支援の成果です。

<参考文献>
1) 髙嶺竜太朗. 山口卓男. 核酸医薬の不純物分析における課題について. J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. 2023, vol.71, No.2, P51-54

<関連アプリケーション>
1. 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
2. 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　Application News No.01-00656-JP

LCMS、LabSolutions Insight、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。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
https://www.an.shimadzu.co.jp/
01-00974-JP　初版発行：2025年 8月

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。
本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

© Shimadzu Corporation, 2025

アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。

LCMS-2050
シングル四重極質量分析計

Nexera XS inert
超高速液体クロマトグラフ

LabSolutions Insight Biologics
オリゴ核酸向け配列同定ソフトウェア

関連分野

医薬・バイオ医薬品

核酸・mRNA医薬品

価格お問い合わせ

製品お問い合わせ

技術お問い合わせ

その他お問い合わせ