



Agilent 6120 シングル四重極型 LC/MS システムを用いた合成核酸の品質管理



<要旨>

合成核酸の品質管理や品質証明には通常、逆相分配 HPLC 分離及び UV 検出が用いられ面積百分率による純度確認試験が行われます。また並行して MALDI-TOF などによる平均分子量の確認を行います。本アプリケーションノートでは LC/MS に直接導入可能な分離方法及びスペクトルデコンボリューションによる平均分子量の算出を行いました。この方法により、一度の分析で UV 検出による純度確認及び平均分子量算出を行うことができ、より迅速なスクリーニングが可能となりました。

Key Words: 合成核酸、品質管理、デコンボリューション

1. はじめに

合成核酸の品質管理や品質証明には逆相分配 HPLC 分離および UV 検出により、面積百分率による純度試験を行います。並行して MALDI-TOF などによる質量分析計により平均分子量の算出を行い、得られた分子量と合成した核酸の理論的な分子量の比較を行います。この方法では一価のマススペクトルを得ることができるという利点がありますが、それぞれ別の実験系での確認試験となります。

本アプリケーションノートでは高 pH 緩衝液への耐性を高め、核酸分離に最適な AdvanaceBio オリゴヌクレオチドカラムによりオリゴ核酸を分離し、UV 検出及びシングル四重極 LC/MS による検出を行いました。ESI ではオリゴ核酸は多価のイオンとして観測され、これらの多価イオンをデコンボリューションすることにより、平均分子量が算出されます。

2. 実験条件

Oligonucleotide Ladder Standard (各 4 nmol/mL) 及び合成核酸 (10 nmol/mL) を試料としました。

検出器にはダイオードアレイ検出器 (G7115A) 及びシングル四重極 LC/MS (G6120B) を用い、直列に接続しました。

表 1. 試料

Oligonucleotide Ladder Standard(PN:5190-9029)	
Length	Molecular Weight(Da)
15 mer	4501
20 mer	6021
25 mer	7543
30 mer	9064
35 mer	10585
40 mer	12108
合成核酸	
22 mer	p_UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA

表 2. LC/MS 分析条件

LC	1260 Infinity II System
カラム	Agilent AdvanceBio Oligonucleotide, 2.1 x 50 mm, 2.7µm (PN:659750-702)
移動相A	10 mM TEA + 200 mM HFIP
移動相B	メタノール
流速	0.4 mL/min
グラジエント	15%B(0 min) -> 25%B(20 min)
カラム温度	40°C
注入量	5 µL
UV検出	260/4 nm, reference 360/20 nm
MS	6120 Single Quad LC/MS
イオン源	ESI
ドライガス	12 L/min
ドライガス温度	350°C
ネブライザ圧力	45 psi
キャピラリ電圧	3500V
極性	Negative
シグナル	Scan, m/z (500-2000)

3. 結果及び考察

図 1 に Oligonucleotide Ladder Standard の UV クロマトグラムを示しました。図 2 に 15 mer 及び 40 mer のマススペクトル及びデコンボリューション結果を示しました。



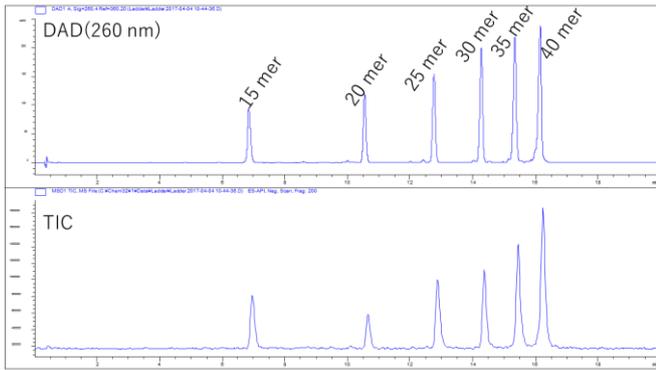


図 1. UV クロマトグラム及び Total Ion Chromatogram (TIC)

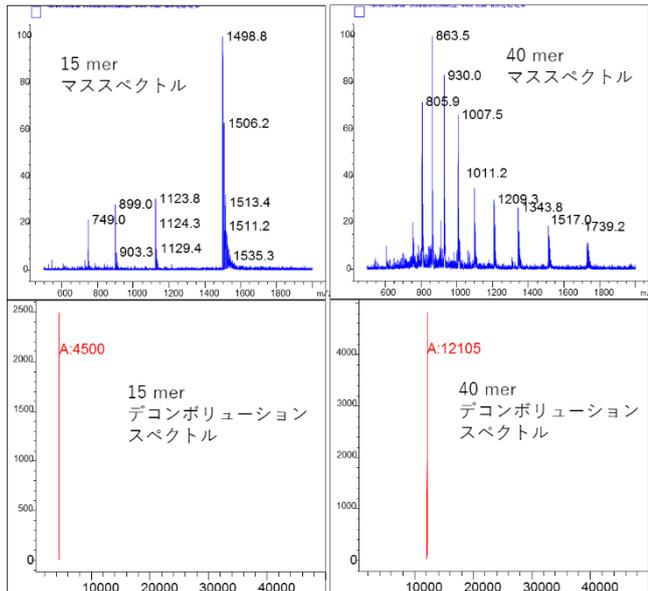


図 2. 15 mer 及び 40 mer のマススペクトルと

デコンボリューションスペクトル

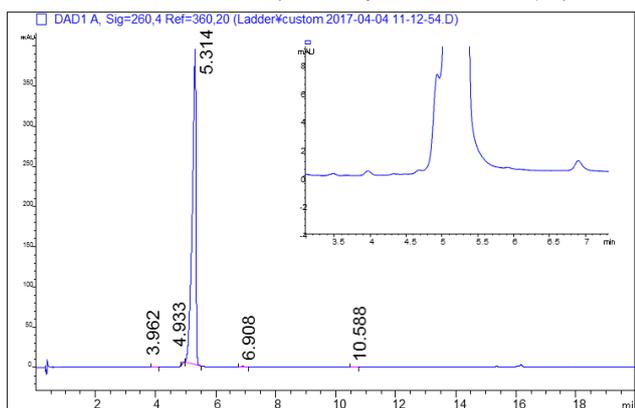


図 3. 合成核酸の UV クロマトグラム (全体図と拡大図)

40 mer のピークにおいてもイオン化が確認でき、得られた分子量と理論値との差異は 0.025 % でした。同様の分析条件で測定した合成核酸の UV クロマトグラムを示しました (図 3 参照)。メインピークの近傍に不純物ピークが観測されました。図 4 にメインピークのマススペクトル及びデコンボリューションスペクトルを示しました。

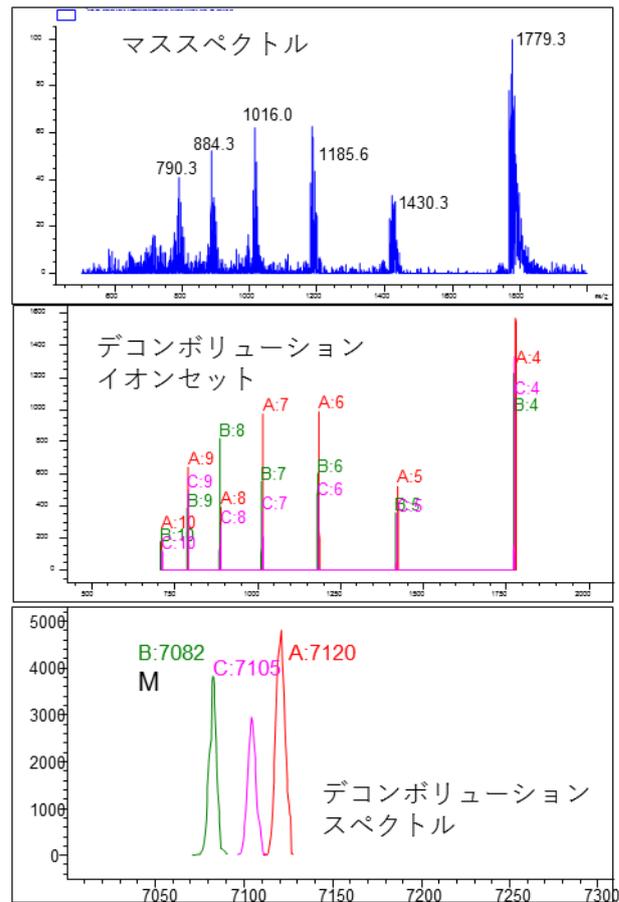


図 4. 合成核酸のデコンボリューション結果

メインピークの理論分子量が 7084 に対し、デコンボリューション結果との誤差は 0.028 % でした。この結果では、ナトリウム付加体とカリウム付加体が観測されました。

4. まとめ

Oligonucleotide Ladder Standard 及び合成核酸を 6120 Single Quad LC/MS システムで分析し、良好なイオン化を確認しました。いずれの試料においても UV クロマトグラムと同時に平均分子量を確認できることが確認されました。

【LC-MS-201704HK-001】

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる障害について一切免責とさせていただきます。また、本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

www.agilent.com/chem/jp



Agilent Technologies