

## ネガティブイオンモードで動作する LC/MS システムでの直線性性能の評価

### Agilent LCMS OQPV ネガティブモード標準キットを用いた評価

#### 著者

Ace G. Galermo, Matt Brittain,  
Cedric Le Doeuff, Shawn Ehlers-  
Cheang, Jesse Stone, and Tom  
Rice  
Agilent Technologies, Inc.

#### 概要

質量分析システムの運転時適格性評価 (OQ) は、定量分析において機器が正確に動作していることを確認するために、通常、ポジティブイオンモードで実施されます。ただし、これはオリゴヌクレオチド分析専用の液体クロマトグラフィー / 質量分析 (LC/MS) 機器を使用するユーザーにとっては課題となります。なぜなら、このシステムは、多くの場合、1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール-トリエチルアミン (HFIP) やトリエチルアミン (TEA) など、ポジティブイオンモード OQ に影響を与える可能性のあるイオンペア試薬で汚染されているためです。この課題に対処するために、アジレントは LCMS OQPV ネガティブモード標準キット (部品番号 5191-4567) を開発しました。これにより、OQ をネガティブイオンモードのみで実施できるようになり、ネガティブイオンモード専用の MS システムから、イオンペア試薬をクリーニングするという煩雑な作業が不要になります。このテクニカルノートでは、Agilent LCMS OQPV ネガティブモード標準キットを用いて、超高性能 LC (UHPLC) システムである、トリプル四重極 MS (TQ MS) を搭載した Agilent 1260 Infinity II LC システム、および Agilent 6470A トリプル四重極 LC/MS の検量線直線性と定量再現性を評価するための 15 分の逆相 C18 ベース LC/MS メソッドの開発について説明します。メソッドおよびキットの適合性は、直線性相関係数 ( $R^2$ ) および相対標準偏差 (RSD) を、ポジティブイオンモードにおけるアジレントの OQ 要件と比較することにより検証しました。検出下限 (LOD) および定量下限 (LOQ) は、それぞれ 0.004  $\mu\text{g/mL}$  と 0.011  $\mu\text{g/mL}$  でした。また、RSD < 2.29% という再現性の高いピーク面積が報告されています。検量線については、平均  $R^2$  が  $0.99899887 \pm 0.00034110$ 、RSD が 0.03% という値が報告されています。示したメソッドは、OQ を実施する際には使用していませんが、結果は、LCMS OQPV ネガティブモード標準キットが、MS システムのネガティブイオンモード OQ に適した標準溶液セットであることを立証しています。

## はじめに

直線性は、定量 LC/MS 分析の重要な性能特性であり、報告される結果の精度と信頼性に直接影響を与えます。LC/MS システムにおいて、直線性は、イオン化効率、サンプルマトリックス、検出器応答、取り込みパラメータ、クロマトグラフィー再現性など、複数の要因により影響を受けます。<sup>1, 2</sup>したがって、MS システムの OQ は、その直線性の検証、メソッド開発、および継続的な性能モニタリングにおいて不可欠な要素です。

近年、オリゴヌクレオチドベースの治療薬、およびその治療薬が生物学的パスウェイに及ぼす影響に関する研究が活発化しています。<sup>3~5</sup>一般的に、LC/MS によるオリゴヌクレオチドの分析は、その構造内のリン酸基のイオン化性のため、ネガティブイオンモードで実施されます。<sup>6</sup>オリゴヌクレオチドのルーチン分析は、多くの場合、TEA と HFIP などのイオンペア試薬を逆相 LC/MS と組み合わせて使用し、ネガティブイオンモードで実施されます。<sup>6~8</sup>従来、直線性の評価はポジティブイオンモードで実施されており、結果に影響を及ぼす可能性のある残留イオンペア試薬を完全に除去するために、システムの十分なクリーニングとフラッシングが必要でした。<sup>5, 9</sup>現在では、ネガティブイオンモードで機器を直接適格性評価およびキャリブレーションすることが要求されていますが、市場ではこの目的に合った適切な標準が不足しています。

本研究では、Agilent 6470A トリプル四重極 LC/MS をモデルとして使用し、ネガティブイオンモードで LC/MS システムの検出器およびシステムの直線性を直接評価するための Agilent LCMS OQPV ネガティブモード標準キット (部品番号 5191-4567) の有用性を実証する LC/MS メソッドを開発しました。このテクニカルノートでは、ポジティブイオンモードで OQ を実施する際に必要な煩雑で時間のかかる機器の準備を不要にする、このキットの利点を明確に示します。

## 方法および材料

### サンプル調製

LCMS OQPV ネガティブモード標準キット (部品番号 5191-4567、個数: 1 個) の標準溶液を用いて、検量線を作成しました。このキットは、次の異なる濃度で調製された標準溶液が含まれる、6 本の茶色ガラスアンプルで構成されています。0.00 (リファレンスブランク)、0.25、0.50、1.00、5.00、および 10.00 µg/mL。UHPLC/TQ MS 分析用として、100 µL の各標準をそれぞれ対応する Agilent オートサンブラバイアル (部品番号 5182-0866、個数: 1 個) に移しました。

### UHPLC/TQ MS 分析

サンプルの分離と分析には、Agilent 1260 Infinity II LC システムと Agilent 6470A トリプル四重極 LC/MS を組み合わせて使用しました。このシステムは、次のモジュールで構成しました。(1) 1260 Infinity II バイナリポンプ (モデル G7112B)、(2) 1260 Infinity II マルチサンブラ (モデル G7167A)、(3) 1260 Infinity II MCT (モデル G7116A)、および (4) 6470A トリプル四重極 LC/MS (モデル G6470A)。

1260 Infinity II LC システムの機器パラメータおよび分離条件を表 1 に示します。

表 1. Agilent 1260 Infinity II LC システムの条件

パラメータ	値
カラム	Agilent ZORBAX RR Eclipse Plus C18 カラム、4.6 × 50 mm、3.5 µm、40 MPa (部品番号 959943-902)
カラム温度	40 °C
注入量	1.0 µL
速度	吸引 100 µL/min、吐出 400 µL/min
オートサンブラ温度	10 °C
ニードル洗浄	33 % メタノール (v:v)、33 % 2-プロパノール (v:v)、および 33 % Milli-Q 水 (v:v) の溶液を用いた、10 秒間のニードル洗浄
移動相	A) 5 mM ギ酸アンモニウム水溶液 B) 75 % メタノール水溶液 (v:v) と 5 mM ギ酸アンモニウム
流量	0.50 mL/min
グラジエントプログラム	時間 (分) %B 0.00 3.00 0.50 3.00 11.20 35.40 11.21 97.00 13.20 97.00 13.21 3.00 15.00 3.00
ストップタイム	15 分
ポストラン	0 分

分離および分析では、1.0  $\mu\text{L}$  の各標準を ZORBAX RR Eclipse Plus C18 カラム (4.6  $\times$  50 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ 、部品番号 959943-902) にサンプルとして注入し、定流量 0.5 mL/min、カラム温度 40  $^{\circ}\text{C}$  において直線グラジエントメソッドを用いて分離しました。オートサンプリング温度は 10  $^{\circ}\text{C}$  に設定しました。移動相およびニードル洗浄溶液は、次の試薬を用いて調製しました。Milli-Q 水、アジレントから入手した LC/MS 用 InfinityLab メタノール (部品番号 5191-5111-001) と 5M ギ酸アンモニウム溶液 (部品番号 G1946-85021)、および 2-プロパノール (Sigma-Aldrich, SKU 1027811000)。オートサンプリングは、33% メタノール (v:v)、33% 2-プロパノール (v:v)、および 33% Milli-Q 水 (v:v) の溶液を用いて、10 秒間のニードル洗浄を実施するように設定しました。次の 15 分の直線グラジエントを使用しました。移動相 A : 5 mM ギ酸アンモニウムの Milli-Q 水溶液 (v:v) (バッファなし)、移動相 B : 75% メタノールの Milli-Q 水溶液 (v:v)、5 mM ギ酸アンモニウム (バッファなし)。次の溶出グラジエントを使用しました。0.00 ~ 0.50 分は 3.00% B、0.51 ~ 11.20 分は 3.00 ~ 35.40% B、11.21 ~ 13.20 分は 97.00% B、13.21 ~ 15.00 分は 3.00% B。

Agilent Dual Jet Stream ESI イオン源のパラメータを表 2 に示します。Dual Jet Stream ESI イオン源はネガティブイオンモードで動作させ、6470A トリプル四重極 LC/MS へのサンプル導入に使用しました。キャピラリ電圧とノズル電圧は、それぞれ -4,000 V と -1,000 V に設定しました。ネブライザ圧力は 17 psi に設定しました。乾燥ガスおよびシースガスの流量は、いずれも 6 L/min に設定しました。窒素乾燥ガスおよびシースガスの温度は、いずれも 200  $^{\circ}\text{C}$  に設定しました。

表 2. Agilent Dual Jet Stream ESI イオン源のパラメータ

パラメータ	値
イオンモード	ネガティブ
乾燥ガス温度	200 $^{\circ}\text{C}$
乾燥ガス流量	6 L/min
シースガス温度	200 $^{\circ}\text{C}$
シースガス流量	6 L/min
ネブライザ圧力	17 psi
キャピラリ電圧	-4,000 V
ノズル電圧	-1,000 V

6470A トリプル四重極 LC/MS のスキャンおよび時間パラメータを、それぞれ表 3 および表 4 に示します。質量分析計は、選択イオンモニタリング (SIM) モードおよびネガティブ極性で動作させました。LCMS OQPV ネガティブモード標準キットのサンプルは、質量を m/z 545.1、ドウェルタイムを 470 ms、MS2 分解能を [Unit (最小単位)] に設定してモニタリングしました。フラグメンタ電圧とセル加速電圧は、それぞれ 140 V と 5 V に設定しました。エレクトロンマルチプライア電圧 (EMV) は、手動調整モードで 1,435 V に調整しました。UHPLC/TQ MS データは、Agilent MassHunter Workstation ソフトウェア (バージョン 10.1、ビルド 10.1.67) を使用して取り込み、Agilent MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェア (バージョン 10.2、ビルド 10.2.733.8) で解析しました。

表 3. Agilent 6470A トリプル四重極 LC/MS のスキャンセグメントおよび手動モードのパラメータ

パラメータ	値
化合物グループ	「なし」
化合物名	LCMS OQPV ネガティブモード標準
ISTD	「チェックなし」
質量	m/z 545.1
MS2 分解能	最小単位
ドウェル	470 ms
フラグメンタ電圧	140 V
セル加速電圧	5 V
極性	ネガティブ
手動調整モードでのエレクトロンマルチプライア電圧	1,425 V

表 4. Agilent 6470A トリプル四重極 LC/MS の時間セグメントのパラメータ

パラメータ	値
数	1
開始	0
スキャンタイプ	MS2 SIM
Div バルブ	MS へ
デルタ EMV (+)	0
デルタ EMV (-)	0
保存	「チェックあり」

## 結果と考察

LCMS OQPV ネガティブモード標準キットを用いて、イオンペア試薬や追加の添加剤を必要としない、ネガティブイオンモードで動作する LC/MS システムに基づいた、検出器およびシステムの直線性を評価するための定量メソッドを開発し、その有用性を実証しました。メソッドは、LC/MS による 6 種類の標準溶液の分離および分析と、その後の検量線直線性および定量再現性の評価で構成されています。

最初に、リテンションタイムとピーク面積で標準を正確かつ高い再現性で定量するために、逆相 C18 クロマトグラフィーに基づいた 15 分の直線グラジエント、および Dual Jet Stream ESI イオン源と EMV のパラメータを最適化して適用しました。LCMS OQPV ネガティブモード標準キットは、リファレンスブランクと、0.25 ~ 10.00 µg/mL の範囲の 5 つの異なる濃度の標準溶液で構成されています。標準の中性モノアイソトピック質量は 546.1363 Da であり、それに対応する脱プロトン化された質量  $[M-H]^- = m/z$  545.1 は、SIM モードおよびネガティブ極性で動作する 6470A トリプル四重極 LC/MS を使用してモニタリングしました。他の機器においてもメソッドを正規化するために、EMV (検出器ゲインなど) を最適化して、最高濃度である 10.00 µg/mL の標準に対する機器の最大応答が約  $1.5 \times 10^6$  になるように設定しました。本研究で使用した 6470A トリプル四重極 LC/MS については、EMV を手動調整モードで 1435 V に調整しました。ただし、EMV や検出器ゲインの設定は、検出器の経年劣化によって異なる場合があり、機器ごとに変動する可能性があります。

LC/MS の直線性と再現性は、6 つのキャリブレーションレベルのうちの 5 つにおいて、3 回注入分析により評価しました。検量線の作成に使用した 5 つのキャリブレーションレベルは、0.25 ~ 10.00 µg/mL の濃度範囲の標準溶液で構成しました。リファレンスブランクには測定可能な標準が含まれていないため、キャリブレーションレベルとして含めておらず、直線性の評価にも使用しませんでした。6 種類の標準溶液の代表的なトータルイオンクロマトグラムを図 1 に示します。標準溶液は、約 10.1 分のリテンションタイムで溶出することが観察されました。約 12.5 ~ 15.0 分のリテンションタイムウィンドウ範囲にあるシグナルは、LC 分離の「洗浄」セグメントに対応するため、メソッドの評価には含めませんでした。リテンションタイムに一貫性があり、ピーク形状が対称的であることが観察されており、分析シーケンス全体を通してクロマトグラフィー性能が安定していることが示されました。MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアを用いて、各標準溶液の積分されたトータルイオンクロマトグラムのピーク面積と公称濃度の関係を示すプロットを作成しました。次に、ソフトウェアにより線形回帰モデルを適用し、検量線用の 3 回の繰り返し分析それぞれに対する、検量線の直線性を評価しました (図 2)。結果として得られた 5 レベルの平均検量線は、評価した濃度範囲全体にわたり強い直線関係を示しており、平均  $R^2$  は  $0.99899887 \pm 0.00034110$ 、RSD は 0.03 % でした。これらの結果は、アジレントが規定するポジティブイオンモードの運転時適格性要件である  $R^2 > 0.98000$  および RSD < 10.00 % という許容基準に適合しており、それを上回っています。<sup>10</sup>

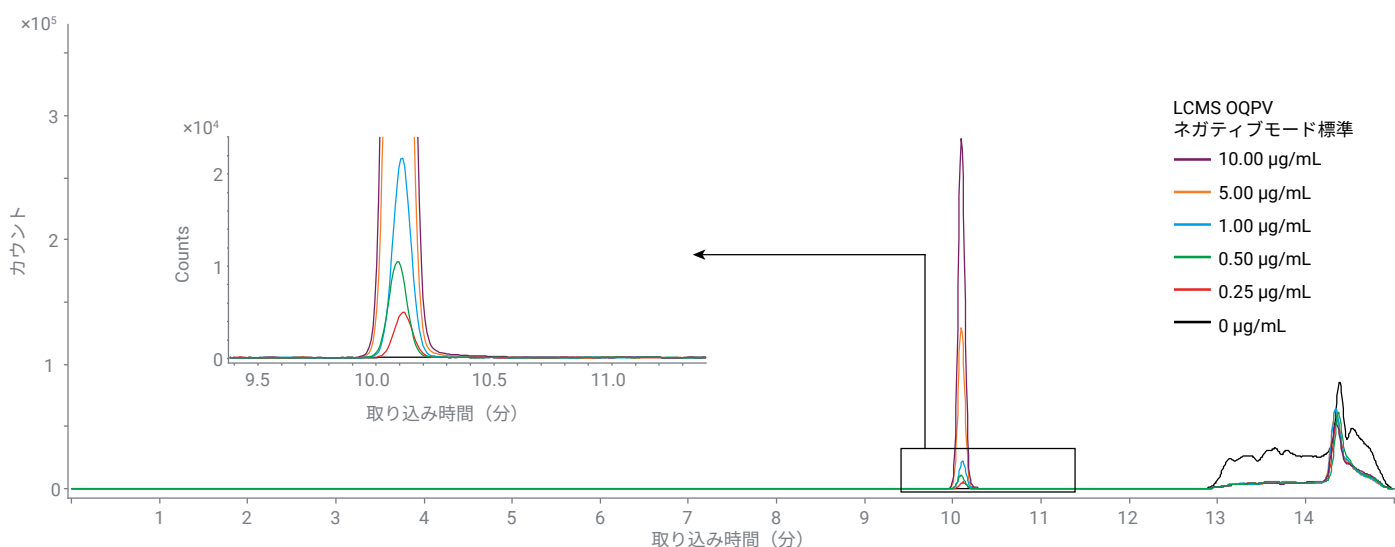


図 1. Agilent LCMS OQPV ネガティブモード標準キット (部品番号 5191-4567) に含まれる 6 種類すべての標準溶液の SIM  $[M-H]^- = m/z$  545.1 の代表的なトータルイオンクロマトグラム ( $n = 1 \times 1.0 \mu\text{L}$  注入)。分離および分析は、Agilent ZORBAX RR Eclipse Plus C18 カラム、 $4.6 \times 50 \text{ mm}$ 、 $3.5 \mu\text{m}$ 、40 MPa (部品番号 959943-902) で実施しました。

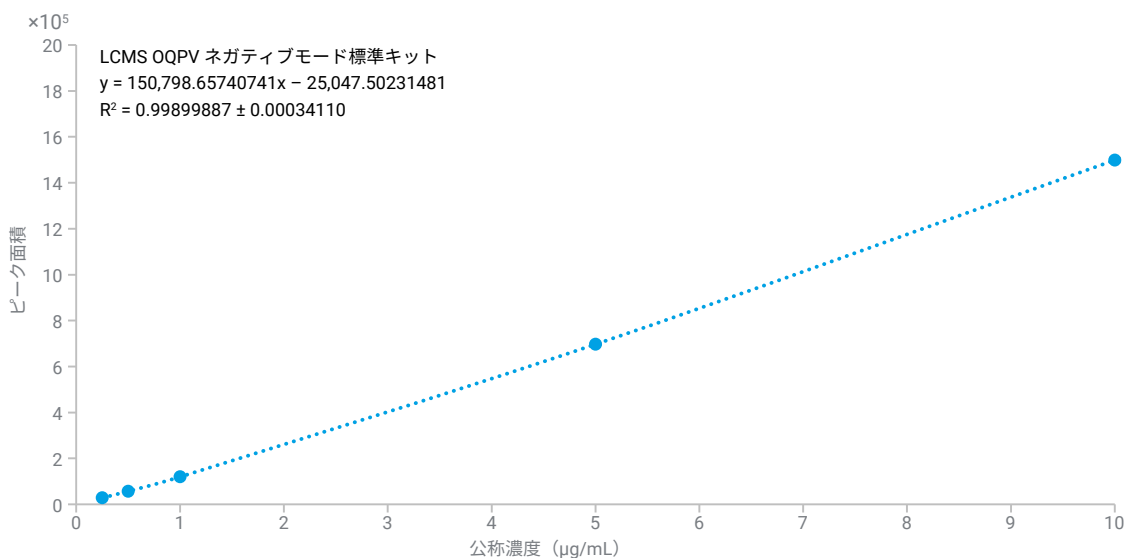


図 2. Agilent LCMS OQPV ネガティブモード標準キット (部品番号 5191-4567) の平均検量線 (n = 3 × 1.0 µL 注入の繰り返し分析)

また、LC/MS メソッドの LOD、LOQ、および定量再現性も、キットに含まれる 6 種類の標準すべてを用いて決定および評価しました。LOD は、次の式 1 を用いて計算しました。

式 1.

$$LOD = 3.3 \frac{\sigma}{S}$$

ここで、σ はブランクの標準偏差、S は検量線の傾きです。

次に、式 2 を用いて LOQ を計算しました。

式 2.

$$LOQ = 10 \frac{\sigma}{S}$$

LOD および LOQ は、それぞれ 0.004 µg/mL と 0.011 µg/mL と計算されました。ピーク面積、標準偏差、RSD、および R<sup>2</sup> 値を表 5 に示します。標準のピーク面積に対して RSD < 2.29 % が得られており、アジレントが規定するポジティブイオンモードの運転時適格性要件で要求される RSD < 10.00 % と比較して、最適化された LC/MS メソッドが卓越した定量再現性を示していることが実証されました。<sup>10</sup>

表 5. Agilent LCMS OQPV ネガティブモード標準キット (部品番号 5191-4567) のピーク面積、標準偏差、RSD、および R<sup>2</sup> 値 (n = 3 × 1.0 µL 注入の繰り返し分析)

公称濃度 (µg/mL)	注入 1 ピーク面積	注入 2 ピーク面積	注入 3 ピーク面積	平均ピーク面積	標準偏差	%RSD
0.00 (リファレンスブランク)	428	687	728	614	163	26.48
0.25	27528	28675	28626	28276	649	2.29
0.50	56469	56792	57525	56929	541	0.95
1.00	119956	118212	120786	119651	1314	1.10
5.00	701995	694611	694281	696962	4362	0.63
10.00	1488795	1501505	1506164	1498821	8990	0.60
直線性相関係数 (R <sup>2</sup> )	0.99936599	0.99883072	0.99873206	0.99897626	0.00034110	0.03

## 結論

本研究では、Agilent LCMS OQPV ネガティブモード標準キット（部品番号 5191-4567）を、ネガティブイオンモードでの質量分析機器の運転時適格性評価に使用する、適切な標準溶液セットとして評価するための LC/MS メソッドを開発しました。このメソッドの特長は、逆相 C18 クロマトグラフィーに基づいて最適化された 15 分の直線グラジエントに加え、Agilent 1260 Infinity II LC システムと Agilent 6470A トリプル四重極 LC/MS を組み合わせたシステムで実証済みの最適化された Agilent Dual Jet Stream ESI イオン源と EMV のパラメータです。メソッドとキットの適合性は、決定された直線性相関係数および相対標準偏差を、アジレントがポジティブイオンモードの運転時適格性評価要件として規定した許容基準と比較することにより検証しました。開発したメソッドは、OQ を実施する際には使用していませんが、結果は、Agilent LCMS OQPV ネガティブモード標準キットが、質量分析計の OQ をネガティブイオンモードのみで実施できる、適切な標準溶液セットであることを立証しています。このキットは、オリゴヌクレオチド分析のために、通常はネガティブイオンモードで動作する専用機器を使用しているユーザーにとっての課題である、ポジティブイオンモードでの運転時適格性評価に備えて、MS システムからイオンペア試薬をクリーニングするという煩雑な作業を不要にしたユーザーに対して、大きな利点を提供します。

## 参考文献

1. Cheng, W. L.; Markus, C.; Lim, C. Y.; Tan, R. Z.; Sethi, S. K.; Loh, T. P. Calibration Practices in Clinical Mass Spectrometry: Review and Recommendations. *Ann. Lab. Med.* **2023**, 43(1), 5–18. DOI: 10.3343/alm.2023.43.1.5
2. Cortese, M.; Gigliobianco, M. R.; Magnoni, F.; Censi, R.; Di Martino, P. Compensate for or Minimize Matrix Effects? Strategies for Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Technique: A Tutorial Review. *Molecules* **2020**, 25, 3047. DOI: 10.3390/molecules25133047
3. Thakur, S.; Sinhari, A.; Jain, P.; Jadhav, H. R. A Perspective on Oligonucleotide Therapy: Approaches to Patient Customization. *Front.Pharmacol.* **2022**, 13, 1006304. DOI: 10.3389/fphar.2022.1006304
4. Takakusa, H.; Iwazaki, N.; Nishikawa, M.; Yoshida, T.; Obika, S.; Inoue, T. Drug Metabolism and Pharmacokinetics of Antisense Oligonucleotide Therapeutics: Typical Profiles, Evaluation Approaches, and Points to Consider Compared with Small Molecule Drugs. *Nucleic Acid Ther.* **2023**, 33(2), 83–94. DOI: 10.1089/nat.2022.0054
5. Liu, A.; Cheng, M.; Zhou, Y.; Deng, P. Bioanalysis of Oligonucleotide by LC–MS: Effects of Ion-Pairing Reagents and Recent Advances in Ion-Pairing-Free Analytical Strategies. *Int. J. Mol.Sci.* **2022**, 23, 15474. DOI: 10.3390/ijms232415474
6. Guzmán-Lorite, M.; Marina, M. L.; García, M. C.; Gabelica, V. miRNA and DNA Analysis by Negative Ion Electron Transfer Dissociation and Infrared Multiple-Photon Dissociation Mass Spectrometry. *Anal.Chim.Acta* **2024**, 1299, 342431. DOI: 10.1016/j.aca.2024.342431
7. Apffel, A.; Chakel, J. A.; Fischer, S.; Lichtenwalter, K.; Hancock, W. S. Analysis of Oligonucleotides by HPLC–Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal.Chem.* **1997**, 69, 1320–1325. DOI: 10.1021/ac960916h
8. Sutton, J.; Guimaraes, G. J.; Annavarapu, V.; Dongen, W. D.; Bartlett, M. G. Current State of Oligonucleotide Characterization Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry: Insight into Critical Issues. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2020**, 31, 1775–1782. DOI: 10.1021/jasms.0c00179
9. Gong, L. Comparing Ion-Pairing Reagents and Counter Anions for Ion-Pair Reversed-Phase Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis of Synthetic Oligonucleotides. *Rapid Commun.Mass Spectrom.* **2015**, 29(24), 2402–2410. DOI: 10.1002/rcm.7409
10. Analytical Scale Agilent LCMS Systems Operational Qualification. Agilent Technologies, December 2018. Available at: [https://www.agilent.com/Library/service/Public/LCMS%20Hardware\\_Operational%20Qual-LC\\_col7.pdf](https://www.agilent.com/Library/service/Public/LCMS%20Hardware_Operational%20Qual-LC_col7.pdf)

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE-014468

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2025  
Printed in Japan, May 1, 2026  
5994-9136JAJP