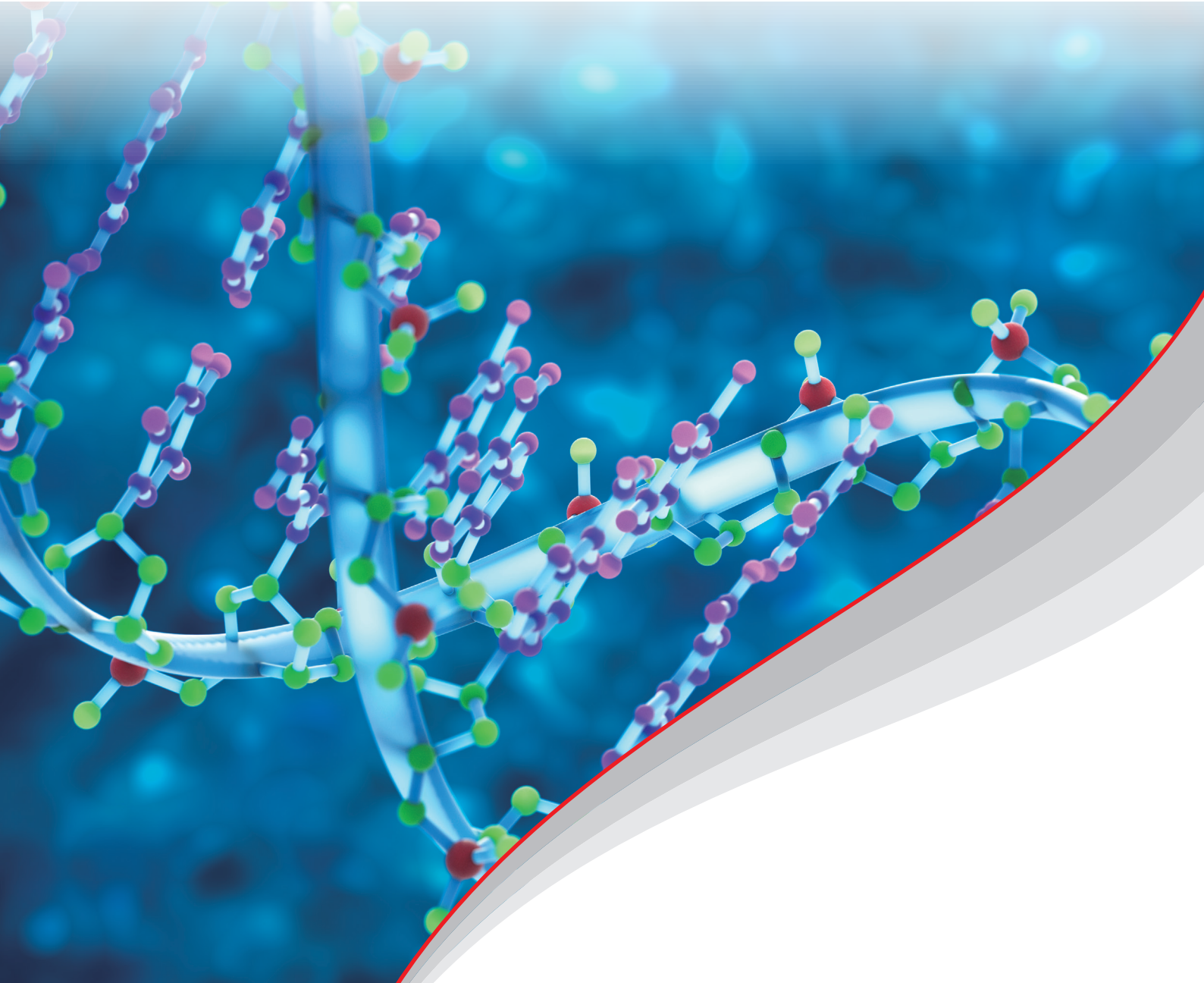
SHIMADZU
Excellence in Science

C10G-0172B

核酸医薬ソリューション



核酸医薬の種類と特徴

核酸医薬品は一般に、十数～数十塩基（修飾塩基も含む）が連結したオリゴ核酸で構成されます。タンパク質に翻訳されることなく直接生体に作用するもので、化学合成により製造されます。
核酸医薬の特徴としては、特定の病気に絞った治療薬を創出することができること、膨大な数の候補化学物質の中から新薬候補を探索して研究するという従来法に比べ手間が省けることなどが挙げられます。核酸医薬はデザインしやすく化学合成できることが利点ですが、血液中、細胞中に豊富に存在する「エキソヌクレアーゼ」、「エンドヌクレアーゼ」により、投与後速やかに分解、排泄されることが実用化の上で大きな課題でした。この問題も、生体内での化学的安定性などの改善を目的に修飾核酸を導入する方法や、病巣部位へのターゲティングを行う DDS 技術（Drug Delivery System）の技術開発により解決されつつあります。

標的タンパク質との結合により機能を阻害する

アプタマー

一本鎖のDNAまたは
RNAが分子内の相補的な配列により
熱力学的に安定な立体構造を
形成している。
標的タンパク質に直接
結合し作用。

デコイ

遺伝子発現を調節する転写因子と
呼ばれるタンパク質と結合することで、
転写因子はゲノムへの結合が
阻害され、免疫応答の
シグナル伝達を阻害。

標的 RNA との結合により遺伝子発現を阻害する

アンチセンス

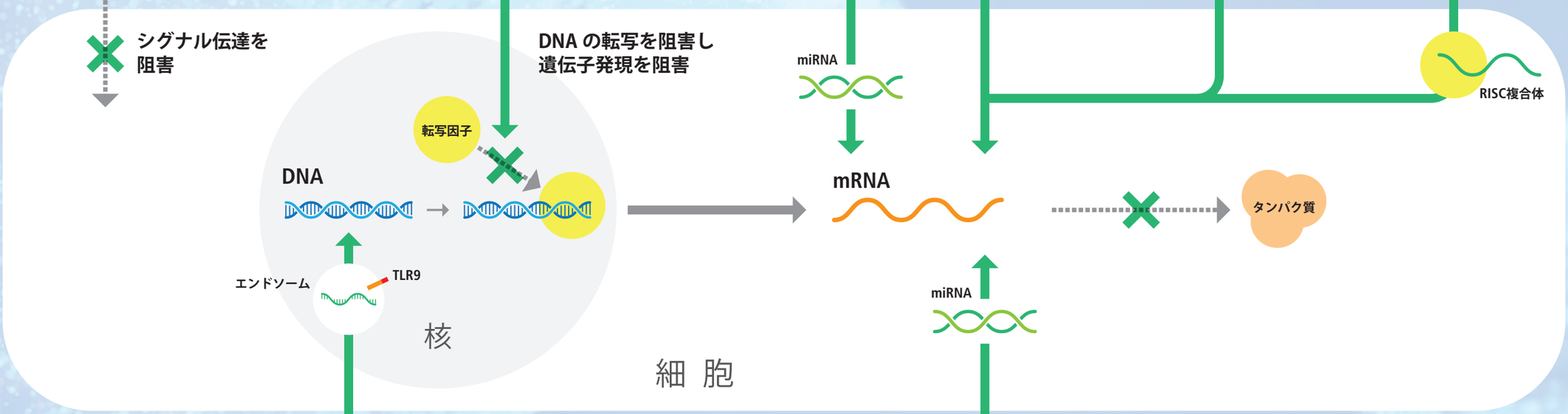
標的タンパク質をコードしたセンス
鎖mRNAに結合することで、
遺伝子発現を阻害あるいは
位置選択的にmRNAを切断。

リボザイム

金属イオンが配位する構造をとり、
酵素活性を有するRNA。
標的mRNAと結合し切断することで
タンパク質発現を阻害。

siRNA

21～25塩基対から成る二本鎖RNA。
RNA干渉経路により標的遺伝子を
切断することでタンパク質発現を
阻害。



CpG オリゴ

一本鎖DNAで、シトシンとグアニンが
ホスホジエステル結合でつながった配列
(CpGモチーフ)を持つ。エンドサイトーシス
で取り込まれ、エンドソーム膜に発現する
Toll様受容体9(TLR9)に作用することで
自然免疫を活性化。

**自然免疫の活性化により
薬効を示す**

miRNA

miRNAはもともと生体内において
複数の遺伝子を標的にその発現
レベルのファインチューニングを
行っている。患部臓器にて
減少しているmiRNAを
補充する。

**miRNA 補充により
標的遺伝子の発現を阻害する**

＊すべての核酸医薬品に該当するわけではありません。

冊子をご覧のお客様へ
各ページで紹介している
アプリケーションや製品紹介ページへは、
カタログ PDF から遷移頂けます。

カタログ PDF ダウンロードはこちら

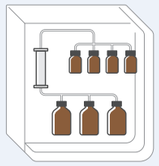
核酸医薬品の合成・精製工程の最適化に活かす分析機器

製造プロセス　分析項目

ラボスケール

オリゴ核酸の合成

核酸合成



粗精製

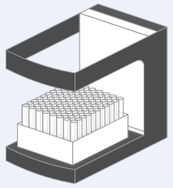
粗精製品の分子量確認

- MALDI-MS
- LC-MS（SQ）

フィードバック　合成条件の最適化

オリゴ核酸の精製

精製



Nexera Prep

回収物中の目的物・不純物の分子量確認

- MALDI-MS
- LC-MS（SQ）

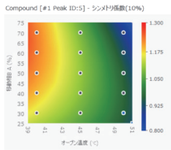
フィードバック　精製条件の最適化

特性解析・分析法開発

目的物および不純物の分離条件最適化

- HPLC・LabSolutions MD
- LC-MS（SQ）

LCMS-2050



LabSolutions MD

目的物および不純物の分子量確認、配列解析

- LC-MS（Q-TOF・SQ）
- MALDI-MS

目的物の融点測定

- Tm解析

Tm解析システム

定量とスペクトル確認

- UV

UV-1900i Plus

新規分析法の開発

従来法では困難な分離分析へのアプローチ

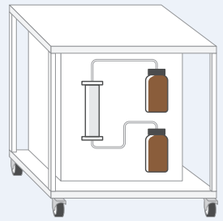
- 超臨界流体クロマトグラフィー SFC

Nexera UC

スケールアップ

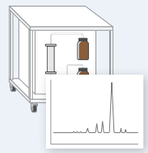
合成・粗精製・精製

核酸合成・精製



スケールアップ前

スケールアップ後



スケールアップ前後での相関性を評価

粗精製品の分子量確認

- MALDI-MS
- LC-MS（SQ）

回収物中の目的物・不純物の分子量確認、配列解析

- LC-MS（Q-TOF・SQ）
- MALDI-MS

品質管理

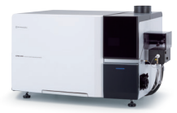
残留溶媒分析

- GC

Brevis GC-2050

元素不純物分析

- ICP-MS



ICPMS-2050

薬物動態

定量および分子量

- LC-MS（TQ）

LCMS-8060RX

LabSolutions MD を用いた最適分離条件探索の効率化

Step1 分析法の初期スクリーニング

■ 検討するパラメーター（例）

分離カラム	水系移動相	有機溶媒
	• アルキルアミン（種類・濃度） • HFIPの濃度	• メタノール／アセトニトリル混合比率

分析スケジュールの自動生成

移動相ブレンディング機能

カラムスイッチング機能

自動分析

取得データの中から最適条件を自動探索
（評価値を用いたクロマトグラムのランキング）

Step2 分析法の最適化

■ 検討するパラメーター（例）

カラムオーブン温度	有機溶媒組成	グラジエント条件

分析スケジュールの自動生成

自動分析

自動ピークトラッキング

グラジエント条件の最適化（AIによる自動探索）

デザインスペースによる最適条件探索

最適条件でのデータ取得

Application

AQbD対応分析法開発支援ソフトウェア

LabSolutions MD

Product

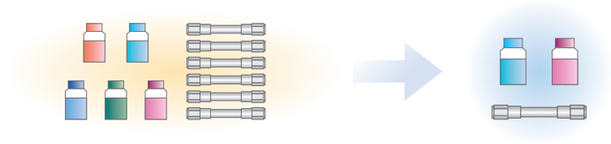
■製品の特長

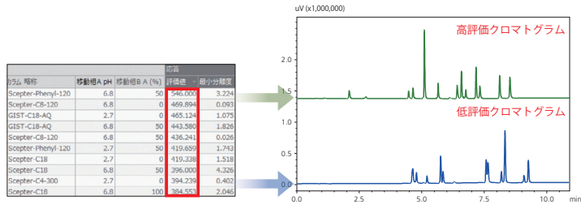
一連の分析法開発ワークフローの効率化を実現

LabSolutions MDは、科学的な根拠とリスクに基づき分析法を開発する"Analytical Quality by Design（AQbD）"アプローチに基づいた、効率的な分析法の開発を実現します。本ソフトウェアは、移動相やカラムといった各種パラメーターの設定を行い、実験計画法を用いた分析スケジュールを自動生成する分析機能、および、得られたデータに対するデザインスペースや予測クロマトグラムの描画を行う解析機能により、効率的に信頼性の高い分析法の開発を実現します。

Step1 分析法の初期スクリーニング

ピーク保持時間および分離に大きく影響を及ぼすパラメーターである、水系移動相のpH、有機系移動相の混合比率およびカラム種類等についてスクリーニングを実施します。膨大な数のデータから迅速に最適な分析条件を探します。

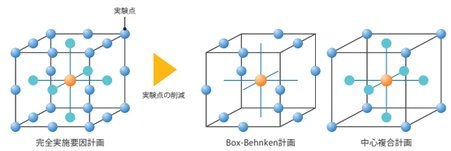




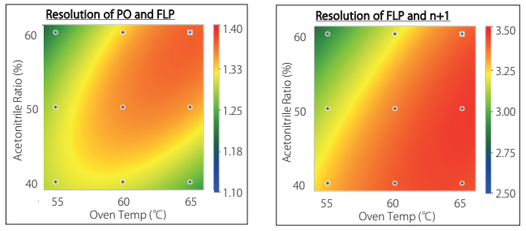
各分析条件および評価値による順位付け　　評価値が高いクロマトグラムと低いクロマトグラムの比較

Step2 分析法の最適化

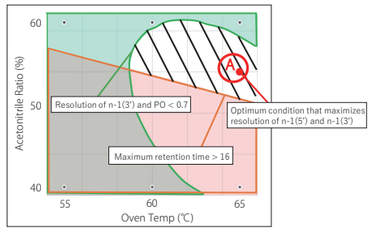
初期スクリーニングの結果により設定された分析条件を起点として、ポンプのグラジエント条件やカラムオーブン温度等の各種パラメーターの最適な水準を検証します。
実験計画を用いた実験点数の削減が可能です。



因子と応答の関係をデザインスペースとして視覚的に描写することが可能です。



FLP及び各不純物の分離度のデザインスペース



デザインスペースの重ね書きによる最適条件探索

Step3 頑健性評値

最適化された分析条件を小さい範囲で変動させた際に、測定値に与える影響が許容範囲内であることを確認します。

オリゴ核酸配列解析ソフトウェア

LabSolutions Insight Biologics

Product

開発から品質管理までの各工程で使用される、多様な質量分析計に対応可能な解析ソフトウェアです。

対応機種

MALDI-MS
MALDI-8030
MALDI-8020
MALDImini-1

LCMS-QTOF
LCMS-9050
LCMS-9030

LCMS-SQ
LCMS-2050
LCMS-2020

核酸合成 粗精製後の確認	✓	✓	✓
核酸合成 精製後の確認	✓	✓	✓
品質管理		✓	✓

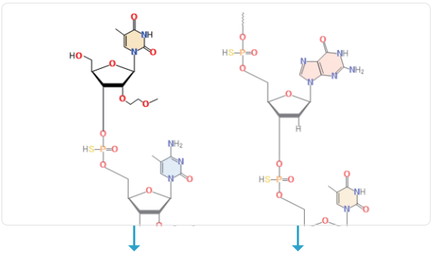
目的物オリゴ核酸の配列情報入力

・配列情報を入力すると構造式が描写されるので確認が容易です。
・作成した目的物の配列情報は解析メソッド中に保存可能です。様々な質量分析計（SQ、Q-TOF、MALDI）を使用する場合にも任意のパラメーターを参照することができます。

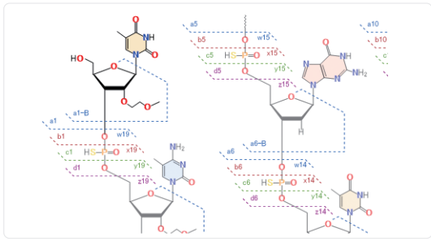
オリゴ核酸配列を入力

#	化合物名	核酸塩基	塩基修飾	バックボーンリンカー	リボース	分子式	モノアイソトピック質量
1	Te	チミン(T)	なし	----	メトキシエトキシ	C13 H18 N2 O5	282.12157
2	smCe	シトシン(C)	メチル	チオリン酸	メトキシエトキシ	C13 H20 N3 O7 P S	393.07596
3	sTe	チミン(T)	なし	チオリン酸	メトキシエトキシ	C13 H19 N2 O8 P S	394.05997
4	sTe	チミン(T)	なし	チオリン酸	メトキシエトキシ	C13 H19 N2 O8 P S	394.05997
5	sGe	グアニン(G)	なし	チオリン酸	メトキシエトキシ	C13 H18 N5 O7 P S	419.06646
6	sGd	グアニン(G)	なし	チオリン酸	デオキシ	C10 H12 N5 O5 P S	345.02968
7	sTd	チミン(T)	なし	チオリン酸	デオキシ	C10 H13 N2 O6 P S	320.02319

配列の構造式をリアルタイムに表示



塩基修飾の追加、編集が可能

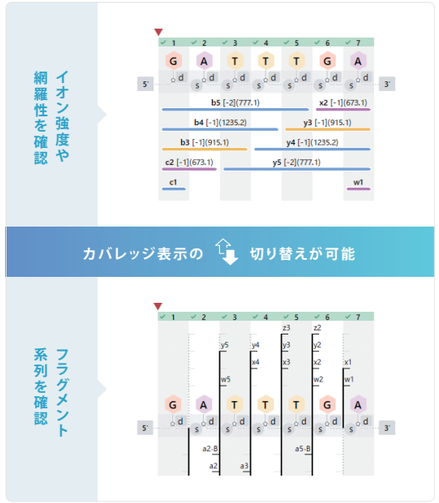


オリゴ核酸配列の設定画面では入力した配列の構造式、質量情報などがリアルタイムに表示され、入力間違いを視覚的に確認できます。また配列に使用する核酸塩基、バックボーンリンカー、リボース、塩基修飾の追加、編集も行えます。

MS分析からのデータ解析（目的物および不純物の簡便な分子量確認）

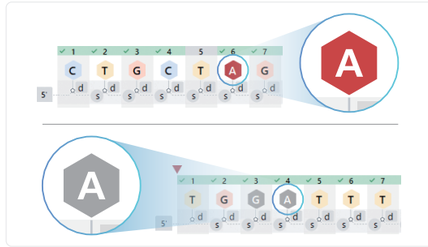
設定した目的物およびその不純物の分子量情報をもとに、解析の結果得られた質量情報に対して自動同定を行います。主成分の同定のみであれば解析時間は 1 秒も要しません。
LCMS では多価イオン解析のためのパラメーター設定は核酸解析用に特化し、必要な 2 項目のみ（価数範囲と装置質量精度のみ）にしています。

MS/MS分析からの配列解析（目的物および不純物の詳細な配列解析）



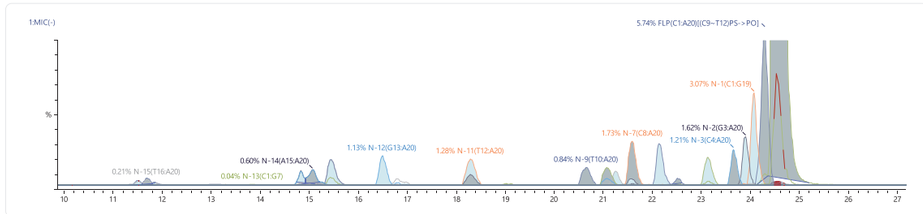
フラグメントスペクトルのアサインを示すカバレッジ表示を搭載しています。確認したい項目に合わせてカバレッジ表示を切り替えることができます。レポート出力も可能です。
配列解析には MS/MS DDA モードという自動的なフラグメント取得分析モードを使用します。
解析の際には同定した成分のプリカーサーイオンを網羅的に自動探索することで高速かつカバレッジの向上が期待できます。この分析設定のために、成分に相当するプリカーサー情報を手入力する必要がありません。

修飾箇所も分かりやすく表示



成分クロマトグラム表示　※MALDIでの取得データには適用できません。

・存在する不純物ピークを分かりやすく表示します。
　測定したマススペクトルをもとに、価数違いや同位体スペクトルをすべて合算したものを描写します。網羅的な表示が可能です。
・UVとMSのクロマトグラムを同時に確認することも可能です。UVの面積値とMSの面積値を組み合わせた成分比率計算が提供できます。



イオン交換クロマトグラフィー（IEX）による オリゴヌクレオチド分析

Application

benefits

- 短鎖オリゴヌクレオチドを塩基単位で再現よく分離できます。
- 目的のオリゴヌクレオチドを、化学合成過程で使用される保護基などの不純物とも分離することができます。
- 高塩濃度や幅広い pHレンジの移動相を用いた分析が可能です。

■ 測定方法と結果

試料	5′-TCTTGGTTACATGAAA-3′ （16 mer） 5′-TCTTGGTTACATGAAAT-3′ （17 mer） 5′-TCTTGGTTACATGAAATC-3′ （18 mer） 5′-TCTTGGTTACATGAAATCC-3′ （19 mer） 5′-TCTTGGTTACATGAAATCCC-3′ （20 mer）
濃度、量	5 μmol/L、4 μL
前処理	上記の濃度に超純水で希釈しました。
測定条件	表 1 の通り
結果	20 mer を目的オリゴヌクレオチドと仮定し、伸長不良の不純物として 16 ～ 19 mer のものを用意しました。いずれも未修飾の一本鎖 DNA であり、化学合成品（HPLC 精製）を使用しました。この 5 配列の混合溶液をイオン交換クロマトグラフィー（IEX）分析した結果、各オリゴヌクレオチドが、塩基単位で鎖長ごとに分離されました（図 1）。 また、6 回繰り返し分析した場合の保持時間と面積の相対標準偏差（%RSD）の結果はいずれも 1 % 以下となり、良好な再現性が得られました（表 2）。 さらに、5 配列のうち 1 配列のみ脱塩精製品、そのほか 4 配列は HPLC 精製品を用いて、不純物を含む試料として混合溶液を作製しました。同様に IEX 分析した結果、目的のオリゴヌクレオチドが分離できていることに加え、遊離の保護基などの不純物や不完全長のオリゴヌクレオチド鎖などの不純物との分離も確認されました（図 2）。

表 1　分析条件

System：	Nexera XS inert
Column：	Shim-pack Bio IEX Q-NP （100 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm）
Mobile phase A：	10 mmol/L NaOH
Mobile phase B：	10 mmol/L NaOH containing 1 mol/L $NaClO_4$
Flow rate：	0.8 mL/min
Time program： （B Conc.）	25-32.5 %（0-15 min）→ 100 %（15-20 min）→ 25 %（20-25 min）
Column temp.：	30 ℃
Injection volume：	4 μL
Detection：	UV 260 nm（SPD-M40）、UHPLC standard cell
Vial：	Shimadzu 1.1 mL sample vial

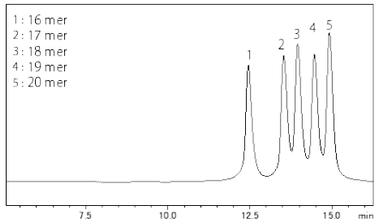


図 1　オリゴヌクレオチド混合試料のクロマトグラム

表 2　6 回繰り返し分析による各成分の相対標準偏差（%RSD）

Length(mer)	保持時間	面積値
16	0.138	0.224
17	0.105	0.335
18	0.098	0.494
19	0.085	0.161
20	0.075	0.307

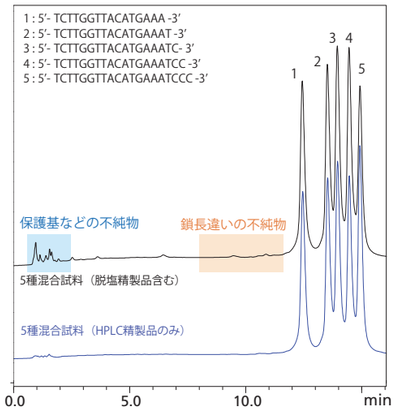


図 2　不純物を含むオリゴヌクレオチド混合試料のクロマトグラム

■ まとめ

Nexera XS inertおよびShim-pack Bio IEX を用いることで、化学合成過程で生じる保護基などの不純物や不完全な合成により生じる鎖長の異なるオリゴヌクレオチドと、目的のオリゴヌクレオチドを再現性良く分離することができます。

超高速液体クロマトグラフ

Nexera XS inert

Product

■製品の特長

タンパク質や糖鎖、核酸などを対象とした研究や、バイオ医薬品や中分子医薬品の多くは金属イオンとの相互作用による吸着が原因で、一般の HPLC システムで信頼性の高いデータ採取が困難となる場合があります。また、高塩濃度や極端な pH の移動相を用いることで、一般の HPLC システムにおいて腐食や耐久性の低下をもたらします。
Nexera XS inert では、独自の技術ですべての移動相 / 試料通過流路の表面における金属イオンの露出を極限まで抑えました。金属イオン由来の吸着現象の抑制と共に、分離改善を目的とした高濃度の酸や塩を含む移動相の使用においても優れた耐久性を発揮し、分析条件を選びません。

システムコントローラー
SCL-40、CBM-40/40lite
直感的な操作を可能にし、装置の起動、分析、シャットダウンなどに要する負担を軽減します。

UV/PDA 検出器
SPD-40/40V/M40
高速分析用の非金属材質セルが、検出器での吸着のリスクを排除します。光路長 5 mm の低拡散仕様セルも選択できます。

送液ユニット
LC-40D XSi
耐腐食性の非ステンレス鋼を採用しています。精密な送液性能とグラジエント性能を持ち、緩衝液の自動調製（オプション）も可能です。

オートサンプラー
SIL-40C XSi
試料通過流路に非金属材質を採用しています。金属配位性分子の吸着を抑制します。

UHPLC 用イナートスイッチングバルブ
FCV-0206H2i/FCV-0607H2i
試料接液部に吸着抑制素材を用いています。流路やカラム切換などに活用できます。

EXPERIENCE
NEWFOUND CLARITY

Unconstrained Recovery and Sensitivity

金属材料への吸着による試料の損失を抑制し、優れた感度を実現します。

Clear Resolution without Restrictions

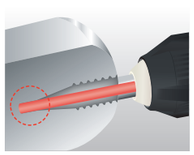
ピーク形状を改善し、優れたクロマトグラフィー分離を実現します。

Assured Reliability and Reproducibility

金属吸着性の化合物に対し、信頼性の高いデータを再現性高く得ることができます。

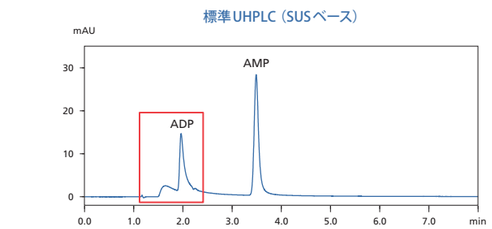
簡便で完璧な接続を可能にするフィンガータイト型フィッティング

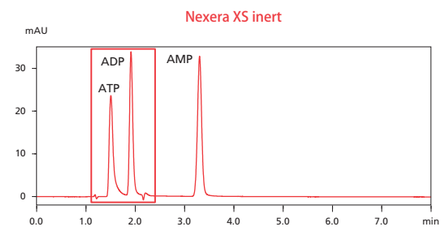
Nexera XS inert は、配管接続に独自のフィンガータイト型フィッティングを採用しています。最大 105 MPa までの圧力に耐える接続が手締めで可能で、また接続部のデッドボリュームも作りません。誰でも簡単に、工具フリーでお使いいただけます。

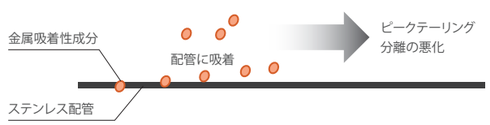


ピーク形状と分離の改善

Nexera XS inert は、独自の技術でシステム内部表面における金属イオンの露出を極限まで低減しています。これにより、試料通過流路でのターゲット分子の吸着を抑え、ピーク形状を良好に保ち、優れた分離を提供します。







シングル四重極質量分析計による 70mer合成DNAの分子量確認

Application

benefits

- 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の分析を LC と同様の感覚で簡便に行うことができます。
- 得られたマススペクトルの多価イオン解析によりオリゴヌクレオチドの分子量推定が可能です。

■ 測定方法と結果

試料	合成一本鎖 DNA GGTGTCAGGCTCACGGACCACTGCACAACAATCCCACGACGT CGCCATTTTCTGCGATCCGGCAAGGCGA
濃度、量	10 pmol
分析	上記のオリゴヌクレオチドを表 1 の分析条件で分析しました。
結果	合成 DNA を分析して得られたトータルイオンクロマトグラムを図 1 に示しました。保持時間 11 分付近にピークが確認されました。保持時間 11 分付近に検出されたピークのマススペクトル（図 2）から、17 ～ 22 価の多価イオンが検出されました。さらに、得られたマススペクトルを多価イオン解析機能を用いて多価イオン解析し分子量を推定したところ、21465.4 と算出され（図 3）、理論分子量（21465.9）と 1 Da 以内の小さい質量誤差で結果が得られました。

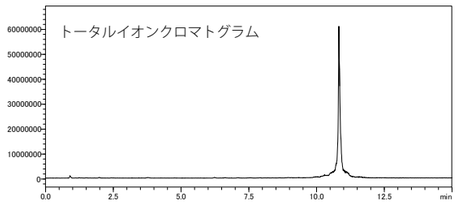


図 1　合成 DNA のトータルイオンクロマトグラム

表 1　分析条件

[HPLC conditions] (Nexera XS inert)	
Column：	Shim-pack Scepter Claris C18-120 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 µm)
Flow rate：	0.3 mL/min
Mobile phase A：	95.4 mM HFIP, 7.1 mM TEA in water
Mobile phase B：	95.4 mM HFIP, 7.1 mM TEA in methanol
Time program：	5 %B (0-2 min) - 35 %B (15 min) - 80 %B (16-17 min) - 5 %B (18-25 min)
Column temp.：	50 ℃
Detection：	PDA 200-400 nm
Injection volume：	2.33 µL (10 pmol)
[MS conditions] (LCMS-2050)	
Ionization：	ESI/APCI (DUIS), Negative mode
Interface voltage：	-2.0 kV
Mode：	Scan (*m/z* 600-2000)
Nebulizing gas flow：	2.0 L/min
Drying gas flow：	5.0 L/min
Heating gas flow：	7.0 L/min
Desolvation temp.：	450 ℃
DL temp.：	200 ℃

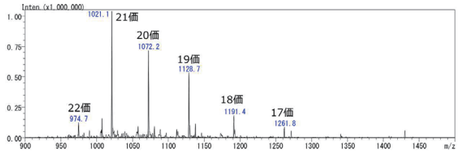


図 2　合成DNAのマススペクトル

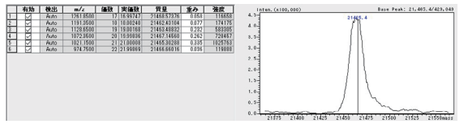


図 3　多価イオン解析結果

■ まとめ

一般的に、多価イオン解析機能を用いて分子量推定を行う場合、より多くの多価イオンが得られる方が分子量推定の信頼性が高まります。今回、検出されたピークのマススペクトルを多価イオン解析した結果、理論分子量に対して 1 Da以内の誤差で核酸医薬品主成分の分子量を推定することが可能でした。LCMS-2050はLCと同様の容易な操作性に加え、高速、高感度、広質量範囲の分析が可能です。本システムは核酸医薬品の品質管理で有用な分析ツールです。

〈謝辞〉
試料は国立研究開発法人医薬基盤研・健康・栄養研究所の笠原勇矢先生にご提供いただきました。ご協力いただいたことに深く敬意を表します。

シングル四重極質量分析計

LCMS-2050

■製品の特長

LCMS-2050は、LC検出器としての使いやすさとMSの優れた能力をかけあわせて「使いやすさ」「基本性能の高さ」「コンパクトさ」の全てを兼ね備えたシングル四重極質量分析計です。
ESI法とAPCI法、両方の特長を有するイオン化である加熱型DUISを標準搭載しています。対象化合物は低分子から高分子、低極性から高極性まで幅広く、LCMS-2050は様々な用途・分野にてお使いいただけます。

Nexera XS inert、LCMS -2050 システム

Product

島津 LC システムとシームレスに接続可能

LCMS-2050をLCシステムの一部として組み入れていただくことができます。Nexera シリーズやi-Seriesといった既存HPLCシステムだけでなく、分取システムNexera Prepにも接続可能です。

簡単なパラメーター設定でLCと変わらない操作性

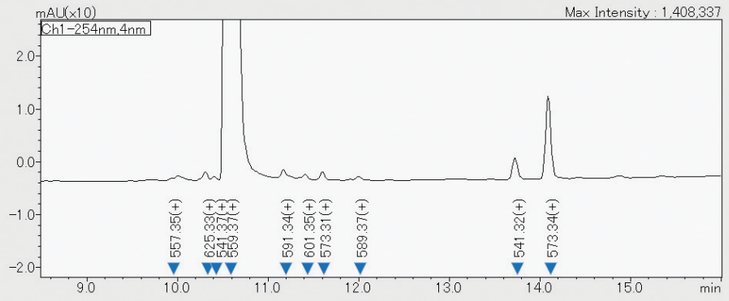
LCMS-2050ではPDA検出器と同じような簡単なパラメーター設定のみで分析可能です。LCを使っているときと変わらない操作感で、MSのデータ採取からデータ解析まで行うことができます。

光学検出器での結果に確度をプラス

LC/MSの特長は高感度・高選択性です。MS検出器は、一般的な光学検出器よりも高感度です。質量情報に基づいて化合物を同定するため、MS検出器は共溶出している成分や紫外可視領域に吸収をもたない成分を検出することができます。また、光学検出器で得られた情報に質量情報を追加することにより、検出されたピーク情報の確度を高めることができます。LCMS-2050はLC検出器として、LCシステムに追加することでデータの質を向上させます。

Mass-it（質量情報オーバーレイ表示機能）

LCの各種検出器とLCMS-2050を組み合わせて分析を実施した場合に、光学検出器で得られたクロマトグラムに質量情報を重ね書きする機能です。特に、成分の分離が困難な共溶出成分や紫外可視領域に吸収をもたない化合物を分析する場合に、質量情報を用いて化合物を分離、同定することができるため、有用な機能です。さらに Mass-it では質量の異なる複数成分が共溶出していることを示唆する機能があります。分離が困難な未知の不純物を見落とすリスクを低減できます。



アトルバスタチンのUVクロマトグラム

原薬・不純物の分子量測定

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

benefits

- イナートLCシステムNexera XS inertとシングル四重極質量分析計LCMS-2050を用いて、オリゴヌクレオチドおよび関連不純物の分子量確認が可能です。
- LCMS-2050はLC検出器と同様の感覚で簡便な分析が可能です。

■ 測定方法と結果

試料	・FLP（20 mer, 理論分子量 7169） T*-mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC- dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*-mC* ・n-1(3′)（19 mer, 理論分子量 6776） T*-mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC- dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC* ・n-3(3′)（17 mer, 理論分子量 5987） T*-mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC- dA-dT-dG-dA-dA-A*-T* ・n-10(5′)（10 mer, 理論分子量 3553） dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*-mC* * = 2′-O-methoxyethyl, m = 5-methyl, d = 2′-deoxy
濃度、量	FLPについて 0.17 pmol/μL, 6 uL（1 pmol 相当）
分析	上記のオリゴヌクレオチド計 4 種を混合（欠損体はFLPに対して5%含有）した試料を表 1 の測定条件で分析しました。
結果	解析には LabSolutions Insight Biologics を使用しました。 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、成分クロマトグラムを図 1 に示します。成分クロマトグラムは MS1 スペクトルを元に、価数違いや同位体スペクトルをすべて合算したクロマトグラムとして表示されます。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。 FLP および n-1(3′) 欠損体由来ピークのマススペクトルを図 2 に示します。3 ～ 10 価の多価イオンが検出されました。各マススペクトルを多価イオン解析し、理論分子量を推定しました（図 3）。その結果、FLP（理論分子量 7169）7168、n-1(3′) 欠損体（理論分子量 6776）6775 と算出され、理論値と 1 Da 以内の質量誤差で同定できました。

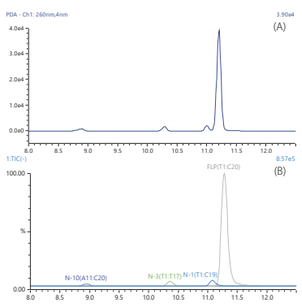


図 1　モデルオリゴヌクレオチド分析のクロマトグラム
(A) UV クロマトグラム、(B) 成分クロマトグラム

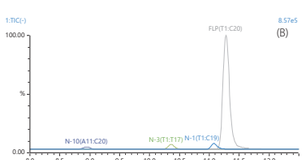


図 2　モデルオリゴヌクレオチド分析の成分クロマトグラム

表 1　測定条件

[HPLC conditions] (Nexera XS inert)	
Column：	Shim-pack Scepter Claris C18-300 (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 ℃
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 ℃
DL temp.：	200 ℃

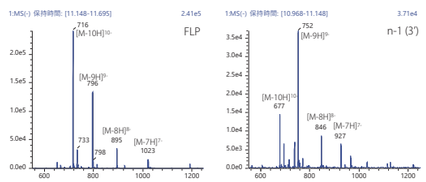


図 3　FLPおよびn-1(3′) のマススペクトル

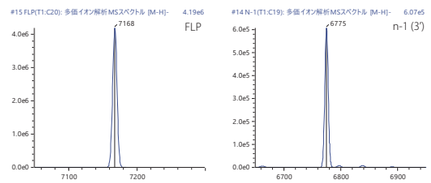


図 4　多価イオン解析されたマススペクトル

■ まとめ

シングル四重極質量分析計LCMS-2050を用いて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。LCMS-2050はLCと同様の簡便な操作感でご使用いただけるため、核酸医薬品の品質管理で有用な分析ツールです。

シングル四重極質量分析計

LCMS-2050

■製品の特長

広いマスレンジ

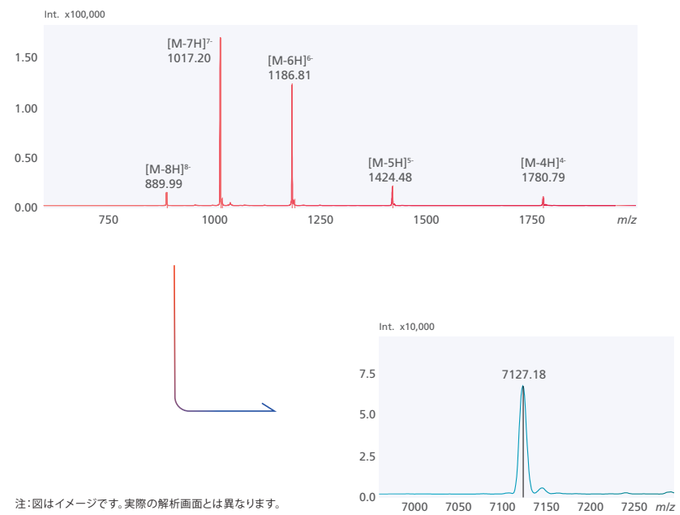
LCMS-2050の質量範囲は*m/z* 2 ～ 2,000までと幅広くカバーしています。また、LabSolutions LCMSの多価イオン解析機能を用いることで、高分子の分子量も推定できます。

ヌシネルセンのマススペクトルと多価イオン解析結果

LCMS-2050でヌシネルセン（理論分子量 :7127.23）を測定すると、4 ～ 8 価のイオンが検出されました。多価イオン解析機能を用いて計算すると、分子量は7127.18と算出され、理論分子量との誤差は0.05 Daと非常に精度よい結果が得られました。一般的に、多価イオン解析機能を用いた分子量推定では、検出される価数イオンが多いほうが、より信頼性の高い分子量を算出することができます。LCMS-2050の広い質量範囲は、核酸だけでなくペプチド、タンパク質、ポリマーなどの高分子の分析にもご活用いただけます。

LCMS-2050

Product



注：図はイメージです。実際の解析画面とは異なります。

核酸解析ソフトウェアLabSolutions Insight Biologicsを用いたデータ解析が可能

LabSolutions Insight Biologicsを用い、核酸塩基やリンカー、リボース、修飾などを選択し配列を作成することで目的物や不純物の同定が容易になります。

逆相イオンペアクロマトグラフィーによるオリゴヌクレオチドの効率的な分離条件の探索と最適化

Application

benefits

- LabSolutions MDを活用することで、移動相スクリーニングや各種パラメーターの検討など、LCメソッド開発にかかる作業を大幅に省力化できます。
- AIアルゴリズムにより、習熟度によらずグラジエント条件の最適化が可能です。
- 鎖長の異なる配列等、不純物を含むオリゴヌクレオチドの最適分離条件検討に役立ちます。

■ 測定方法と結果

試料	チミン塩基が連続した合成オリゴヌクレオチド　鎖長が異なる11 種（HPLC 精製グレード）（dT(x)、x は塩基数）（dT(6)、(10)、(15)、(16)、(17)、(18)、(19)、(20)、(25)、(30) および (40)）
濃度、量	5 µmol/mL
前処理	上記の濃度になるよう水に溶解しました。

Step1 移動相の初期スクリーニング

試料	7 配列（dT(6)、(10)、(15)、(20)、(25)、(30)、(40)）の混合溶液
測定条件	表 1 のとおり。イオンペア試薬にはトリエチルアミン（TEA）、ジブチルアミン（DBA）およびヘキシルアミン（HA）を pH 調整のため酢酸水溶液として使用しました。有機溶媒にはアセトニトリルおよびメタノールを使用しました。 イオンペア試薬とその濃度、有機溶媒の組合せ計 18 通りについて、表 1 の分析条件を用いて検討しました。
結果	イオンペア試薬に TEA を使用した場合、いずれの有機溶媒との組合せにおいても複数のピークが重なりました（図 1）。一方 DBA、HA を使用した場合には分離が改善しました。DBA、HA ともに濃度が高いほど分離が改善する傾向が見られましたが、特に HA は濃度が高くなるほど調製時に溶解しにくい傾向が見られました。

表 1　分析条件

System：	Nexera XS inert
Column：	Shim-pack Scepter Claris C18-120 (100 mm × 2.1 mm I.D., 3 µm) *1
Mobile phase A：	① 20/50/100 mmol/L TEA acetic acid aqueous solution pH6.5 ② 5/20/50 mmol/L DBA acetic acid aqueous solution pH6.5 ③ 20/50/100 mmol/L HA acetic acid aqueous solution pH6.5
Mobile phase B：	Acetonitrile or Methanol
Flow rate：	1.0 mL/min
B Conc.：	① TEA：10-50 %(0-8 min) → 100 %(8.01-11 min) → 10 %(11.01-15 min) ② DBA：20-70 %(0-8 min) → 100 %(8.01-11 min) → 20 %(11.01-15 min) ③ HA：20-80 %(0-8 min) → 100 %(8.01-11 min) → 20 %(11.01-15 min)
Column temp.：	40 ℃
Flow rate：	0.35 mL/min
Injection volume：	5 µL
Detection：	UV 260 nm (SPD-M40, UHPLC inert cell)
Vial：	TORAST-H Glass Vial*2

*1 P/N：227-31210-05, *2 P/N：370-04300-01（島津ジーエルシー）

■ 分離 条件最適化のプロセス

1．スクリーニング	イオンペア試薬の種類および濃度 有機溶剤の種類
2．条件検討	カラムオーブン温度、移動相pHの検討
3．最適化	グラジエント条件

検討したパラメーター

アルキルアミン（種類・濃度）

メタノール／アセトニトリル混合比率

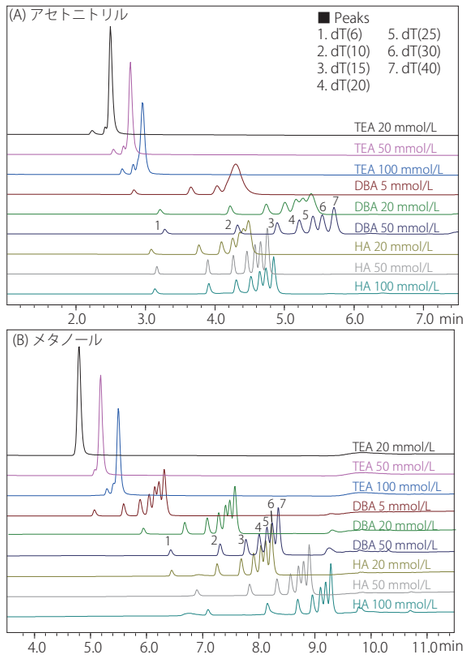


図 1　オリゴヌクレオチド 7 成分混合試料のクロマトグラム
移動相 B：(A) アセトニトリル (B) メタノール

Step2 移動相のpHとオーブン温度の最適化

試料	7 配列（dT(6)、(10)、(15)、(20)、(25)、(30)、(40)）の混合溶液
測定条件	移動相 A に 50 mmol/LDBA と 50 mmol/LHA、有機溶媒にアセトニトリルとメタノールを使用し、さらに条件検討を行いました。グラジエントプログラムは表 1 中②の条件に固定し、カラムオーブン温度を 40、50、60、70、80 ℃、移動相 A の pH を 6.0、6.5、7.0、7.5 と変動させ、各組合せを網羅するように分析バッチを作成し、分析しました。これらパラメーターの変更や有機溶媒の違いにより、各成分の保持時間が大きく変動することから、LabSolutions MD のピークトラッキングを利用し各ピークを同定しました。同定に使用する情報として、UV スペクトルは核酸配列による差異が小さく不向きであることから、溶出順による同定を実施しました。
結果	縦軸を移動相 A の pH、横軸をカラムオーブン温度としたデザインスペースを作成し、最小分離度が 1.5 以上（HA、メタノールの組み合わせのみ 1.2 以上）となる領域を視覚化しました（図 2）。図中の黒点は実測点、赤色領域は分離度が大きい領域、青色領域は分離度が小さい領域をそれぞれ示しています。移動相 pH については、組み合わせる有機溶媒によって至適条件が異なることが示唆されました。またカラムオーブン温度については、イオンペア試薬と有機溶媒の組み合わせに関わらず、温度が高いほど分離度が高くなる傾向が示されました。

検討したパラメーター

移動相のpH

カラムオーブン温度

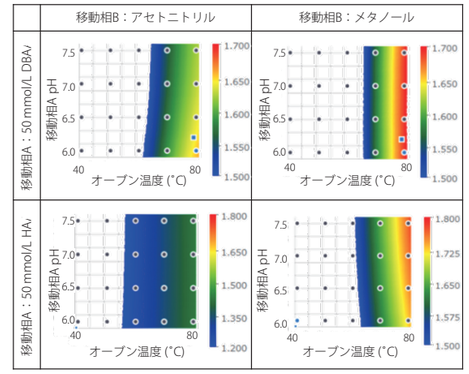


図 2　オリゴヌクレオチド 7 成分混合試料の
最小分離度のデザインスペース

Step3 グラジエント条件の自動最適化

試料	鎖長の異なるオリゴヌクレオチド 11 配列（dT(6)、(10)、(15)ー(20)、(25)、(30)、(40)）の混合試料
測定条件	上記の混合試料に対し、最小分離度を 1.5 として、最適なグラジエント条件を自動で探索しました。有機溶媒はメタノール、カラムオーブン温度は 80 ℃に固定しました。 移動相 A を 2 条件（50 mmol/LDBApH7.5、50 mmol/LHApH7.5）として AI アルゴリズムによる補正分析を繰り返し、最終的に各移動相条件にて最小分離度 1.5 を満たすグラジエント条件が自動探索されました。最適化後の条件でのクロマトグラムを図 4 に示します。
結果	最終的に各移動相条件にて最小分離度 1.5 を満たすグラジエント条件が自動探索されました。最適化後の条件でのクロマトグラムを図 4 に示します。

AI によるグラジエント条件の自動最適化機能

図3　LabSolutions MDのグラジエント条件自動最適化のワークフロー

LabSolutions MDのグラジエント条件の自動最適化ワークフローを図 3 に示します。LabSolutions MDは、独自のAIアルゴリズムを搭載しており、「AI によるグラジエント条件の改良（条件探索）」および「改良された条件での分析（補正分析）」を繰り返すことで分離に関する要求を満たす条件を自動で探索します。

検討したパラメーター

グラジエント条件

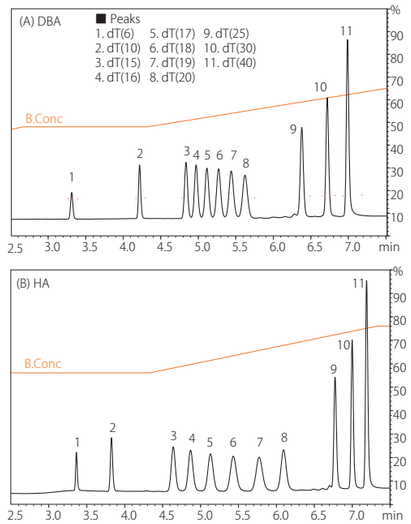


図 4　自動探索された条件での
オリゴヌクレオチド 11 成分混合試料のクロマトグラム
移動相 A：(A) 50 mmol/L DBA pH 7.5
(B) 50 mmol/L HA pH 7.5

■ まとめ

鎖長の異なる 11 配列の混合標準試料をモデルサンプルとし、逆相イオンペアクロマトグラフィーでの分離条件検討を行いました。Labsolutions MDの活用により、イオンペア試薬、移動相 pH、およびカラムオーブン温度の各項目を網羅的に検討し、また結果を視覚化することで、効率良くこれらの最適条件を探索することができました。さらにLabSolutions MDのグラジエント条件の自動最適化を実施し、数時間で最小分離度 1.5 を満たすグラジエント条件が自動で探索され、作業の大幅な省力化が可能となりました。

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最適分離条件探索の効率化

Application

benefits

- オリゴヌクレオチドおよび関連不純物の最適分離条件探索の一連のワークフローを LabSolutions MDにより効率化できます。
- オリゴヌクレオチドおよび関連不純物ピークをシングル四重極質量分析計LCMS-2050により正確にトラッキング可能です。
- イナートUHPLCシステムNexera XS inert、イナートカラム Shim-pack Scepter Claris により、オリゴヌクレオチドの金属配位性吸着を抑制し良好なピーク形状を得られます。

Step1 分析法の初期スクリーニング

表 1　分析対象試料

名称	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-1(5′)	mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*-mC*	19 mer
n-3	T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*-mC*	17 mer
n+1	T*-T*-mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dC-dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*-mC*	21 mer
PO	FLP 5′ 末端の PS → PO 変化体	20 mer

* = 2′-O-methoxyethyl　m = 5-methyl　d = 2′-deoxy, PS(full)

検討したパラメーター

- アルキルアミンの濃度
- HFIPの濃度
- メタノール／アセトニトリル混合比率

表 2　初期スクリーニング条件

System：	Nexera XS inert (Method Scouting System)
Column：	Shim-pack Scepter Claris (100 mm × 2.1 mm I.D., 3 µm) *1
Temperature：	60 ℃
Injection volume：	2 µL
Mobile phases Pump A – Line A：	100 mmol/L HFIP*2 and 20 mmol/L TEA*3 in water
– Line B：	100 mmol/L HFIP in water
– Line C：	200 mmol/L HFIP and 20 mmol/L TEA in water
– Line D：	200 mmol/L HFIP in water
Pump B – Line A：	Acetonitrile
– Line B：	Methanol
Flow rate：	0.4 mL/min
Time program (%B)：	6 % (0 min) → 24 % (36 min) → 50 % (36-37 min) → 6 % (37-46 min)
Detection：	260 nm (SPD-M40, UHPLC inert cell)
System：	LCMS-2050
Ionization：	ESI/APCI (DUIS), negative mode
Mode：	SCAN (*m/z* 500-2000)
Nebulizing gas：	2.0 L/min (N_2)
Drying gas：	5.0 L/min (N_2)
Heating gas：	7.0 L/min (N_2)
DL temp.：	200 ℃
Desolvation temp.：	450 ℃
Interface Voltage：	-2.0 kV

*1 P/N：227-31210-05（島津ジーエルシー）
*2 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
*3 Triethylamine

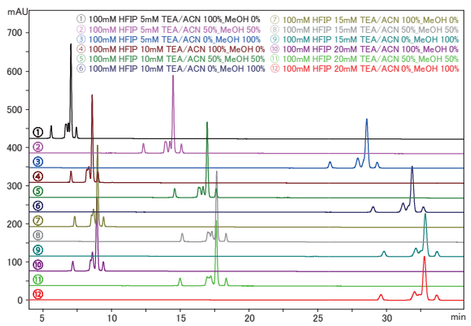


図 1　移動相の初期スクリーニングで得られたクロマトグラム
HFIPの添加濃度 100 mmol/L（上）、200 mmol/L（下）

Step2 分析法の最適化

検討したパラメーター

- グラジエント初期濃度
- 有機系移動相中のアセトニトリル濃度
- カラムオーブン温度

不純物ピークのMSトラッキング

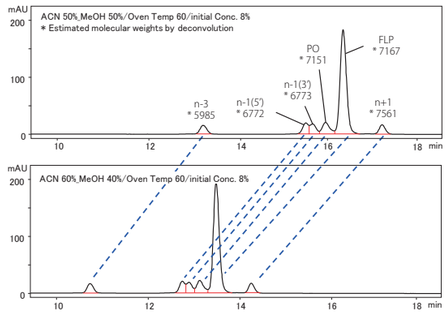


図 2　カラムオーブン温度 60 ℃、初期濃度 8 %、アセトニトリル、比率 50 %（上）および 60 %（下）の LC クロマトグラム
（点線は分子量による不純物のトラッキングを示す）

デザインスペースによる最適分析条件探索

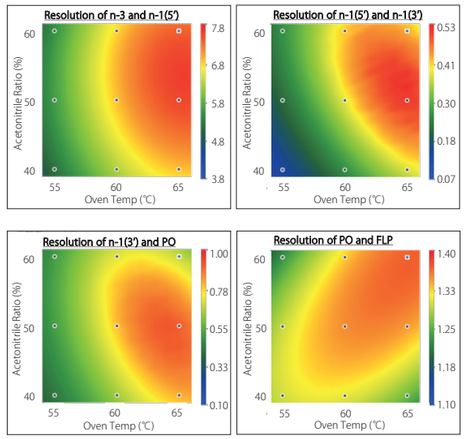


図 3　11FLPおよび各不純物の分離度のデザインスペース
（グラジエント初期濃度：8 %）

最適分離条件でのクロマトグラム

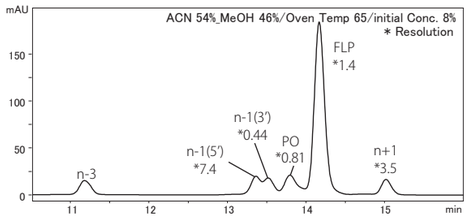


図 4　最適化条件でのクロマトグラム
（HFIPの添加濃度 100 mmol/L、TEA の添加濃度 10 mmol/L）

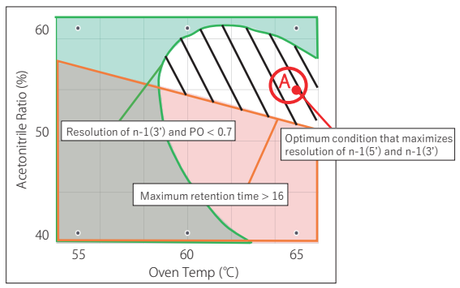


図 5　デザインスペースの重ね書きによる最適条件探索

■ まとめ

オリゴヌクレオチドの分析においては、移動相に添加するHFIPおよびイオンペア試薬の濃度や有機溶媒組成、さらにはカラムオーブン温度やグラジエントプログラム等の各種LCパラメーターの変動により分離パターンが変化します。また、変化の挙動はオリゴヌクレオチドの鎖長や塩基構成、修飾結合の有無等によっても異なるため、対象配列ごとに分離を最適化することが求められます。一方で、対象配列ごとに網羅的な分析を実施することや、得られた膨大なデータを解析し、最適条件を探索することは非常に手間がかかります。LabSolutions MDを用いることで、分析スケジュール作成や移動相調製を自動化でき、また、解析面ではピークトラッキングの自動化やデザインスペースによる効率的な最適条件の探索が可能です。本稿でご紹介したように、LabSolutions MDに加えて、イナートUHPLCシステムNexera XS inert、イナートカラム Shim-pack Scepter Claris、シングル四重極質量分析計LCMS-2050を組み合わせることで、オリゴヌクレオチドの分析法開発の一連のワークフローの効率化を実現可能です。

原薬・不純物の配列決定

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

benefits

- LCMS-9050と解析ソフトウェア LabSolutions Insight Biologicsを用いてオリゴヌクレオチドおよび不純物の配列解析が可能です。
- オリゴヌクレオチドのユーザーが任意に設定した修飾も含めて網羅的な不純物同定を行うことが可能です。
- LabSolutions Insight Biologicsではフラグメントカバレッジ画面で欠損箇所や修飾箇所を分かりやすく確認できます。

■ 測定方法と結果

試料	ホスホロチオアート修飾された 20-mer オリゴヌクレオチドの粗体 配列：CTG CTA GCC TCT GGA TTT GA モノアイソトピック質量：6399.5998
分析	表 1 の分析条件で分析しました。
解析ソフトウェア	LabSolutions Insight Biologics
結果	得られた MS1 データから網羅的な不純物同定を行った結果、鎖長違い、塩基欠損体、イオン付加体など 30 以上の不純物が確認されました（図 1）。PS20mer のピークについて多価イオン解析結果を図 2 に示します。不純物のスペクトルも同様に多価イオン解析され、不純物の検索に用いられます。 主成分および 5′ 末端から 14 ヌクレオチドが欠損した不純物（主成分に対して 0.5 % で存在する）について、MS2 データのフラグメントスペクトルから配列カバレッジを確認した結果、高いカバー率が確認できました（図 3）。

表 1　分析条件

[HPLC conditions] (Nexera XS inert)	
Column：	Shim-pack Scepter Claris C18-120, 100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 µm
Mobile phase A：	100 mM HFIP/10 mM TEA 含有水溶液
Mobile phase B：	50 mM HFIP/5 mM TEA 含有 50% メタノール
Gradient Program：	5 %B (0-1 min) → 40 %B (26 min) → 90 %B (26.1-30 min) → 5 %B (30.1-34 min)
Column Temp.：	60 ℃
Injection volume：	2 µL
[MS conditions] (LCMS-9050)	
Ionization：	ESI (Negative mode)
Mode：	MS scan (*m/z* 550~2500), DDA
Interface Voltage：	-3.0 kV
Nebulizing Gas Flow：	3.0 L/min
Drying Gas Flow：	10.0 L/min
Heating Gas Flow：	10.0 L/min
DL Temp.：	250 ℃
Block Heater Temp.：	400 ℃
Interface Temp.：	350 ℃

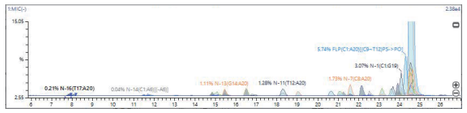


図 1　成分クロマトグラム

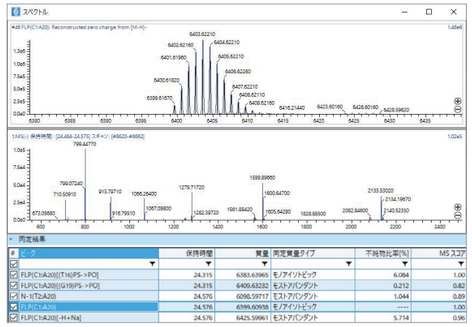


図 2　多価イオン解析結果
上段：多価イオン解析スペクトル、中段：マススペクトル、
下段：同定結果

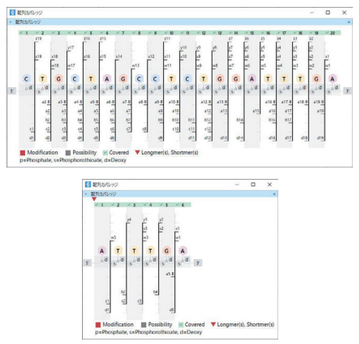


図 3　配列カバレッジ
上：主成分、
下：5′ 末端から 14 ヌクレオチドが欠損した不純物

■ まとめ

LabSolutions Insight Biologicsを用いてオリゴヌクレオチドの不純物の網羅的な同定、配列の確認が可能です。
完全な配列カバレッジは主成分だけでなく、0.5 %の存在比である不純物に対しても、高い配列カバー率が得られました。

四重極飛行時間型質量分析計

LCMS-9050

Product

■製品の特長

LCMS-9050は、当社のLCMSシリーズで培われた技術を継承し最高クラスの質量精度安定性を実現した四重極飛行時間（Q-TOF）型質量分析計です。

安定した質量精度

島津独自の高精度温度コントロールシステムが外的要因による精密質量変化を抑制するため、質量較正を意識することなく精密質量を測定できます。

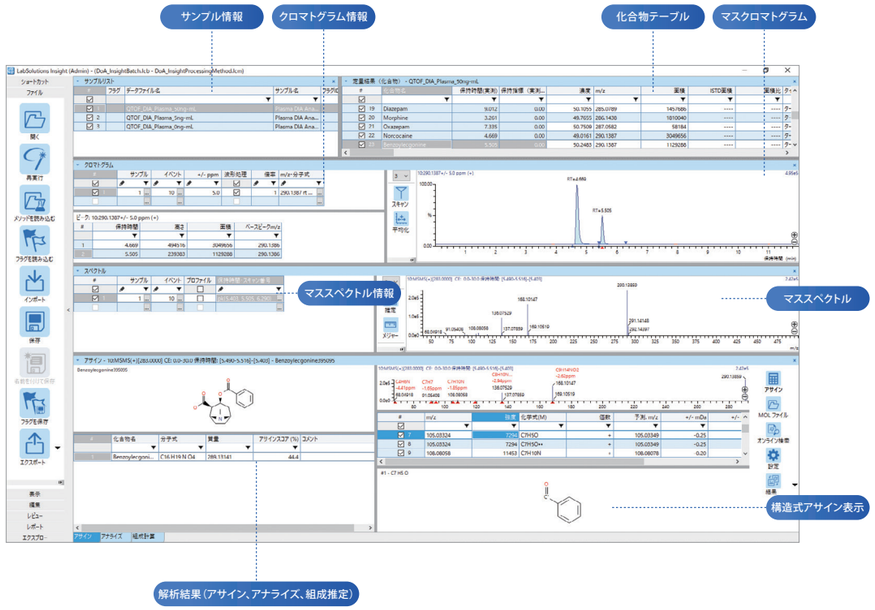
新しいアプリケーションの可能性を開く正負極性切替

安定した正負高速極性切替技術は正イオン / 負イオンを同時に分析することを可能にし、新たなアプリケーションの開発や分析の効率化に貢献します。

LabSolutions Insight Explore

定性解析から定量解析までをサポートするソフトウェア

LabSolutions Insight Exploreでは、多検体の定量解析処理に加えて高分解能・高質量精度質量分析計データを用いた精度の高いライブラリ検索、構造解析、組成推定、多価イオン解析が可能です。



多価イオン解析機能（デコンボリューション）

LabSolutions Insight Explore CSD（オプション）には、Positive Probability Limited の多価イオン解析アルゴリズム *"ReSpect"* が搭載されています。核酸医薬や抗体医薬のような分子量が大きいオリゴヌクレオチド、タンパク質の多価イオン解析による分子量推定に有用です。

卓上型MALDI-TOF MS "MALDI-8030"を用いたアンチセンス核酸の配列確認

Application

benefits

- シンプルかつ安価な装置で核酸医薬品の合成確認が行えます。
- MALDI-ISDによりシンプルかつ明確にオリゴ核酸配列を読むことができます。
- 複雑なMS/MSスペクトルを解析する必要がないため、省力化を実現できます。

■ 測定方法と結果

試料	アンチセンス核酸医薬品 3 種（mipomersen,nusinersen および inotersen）をそれぞれモデル配列としたオリゴ核酸合成品（表 1 ）
濃度、量	各試料を 0.1 mg/mL（約 13~14 pmol/μL）になるように水に溶解しました。
質量分析	0.5 μL のサンプル溶液を MALDI ターゲットプレートに搭載し、そこに 0.5 μL のマトリックス溶液を重層し風乾させた後、MALDI-8030（図 1）で測定を行いました。 マトリックス溶液としては、50 % アセトニトリルに 40 mg/mL で溶解させた THAP（2',4',6'-trihydroxyacetophenone monohydrate）または HPA（2-hydroxypicolinic acid）を用い、どちらも添加剤として 40 mM のクエン酸アンモニウムを用いました。
結果	分子量測定 マトリックスとして HPA や THAP がよく用いられます。今回のモデル核酸医薬品にもこれらを検討したところ、負イオンモードにおいて脱プロトン化体 $[M-H]^-$ としてイオン化できました。クエン酸アンモニウムを添加することで、不要なカチオン付加を抑制することが可能でした（図 1）。 配列確認 オリゴ核酸の MALDI-ISD では、ホスホジエステル結合の一か所で切断されたイオンの 5' 側である a-series と 3' 側である w-series が特異的に観測されます（図 2 ）。 マトリックスとして HPA を用い、ホスホロチオエート修飾をはじめ、様々な修飾が施された核酸医薬品であっても、連続的な ISD ピークを生じることが分かりました（図 3）。この一価イオンからなるマススペクトルはシンプルなためマニュアル解析も可能ですが LabSolutions Insight Biologics を用い自動で解析する事も可能です。

■ 分子量確認

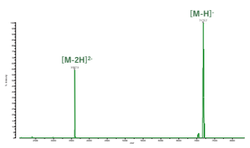


図 1　THAPマトリックスを用いて取得したmipomersenの負イオンMALDIマススペクトル

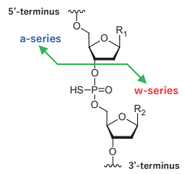


図 2　MALDI-ISDで観測されるオリゴ核酸フラグメントイオンの命名法

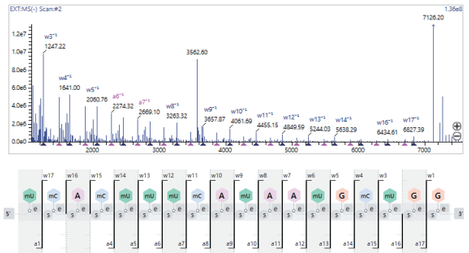


図 3　LabSolutions Insight Biologics によるモデル核酸医薬品の解析例

表 1 3 種のモデル化合物

Name	Chemical formula	Mw	Note
Mipomersen	C230H324N67O122P19S19	7177.2	ASO, PS (full), 2'-MOE, 20 mer
5'-G*-mC*-mC*-mU*-mC*-dA-dG-dT-dmC-dT-dG-dmC-dT-dT-dmC-G*-mC*-A*-mC*-mC*-3'			
Nusinersen	C234H340N61O128P17S17	7127.2	ASO, PS (full), 2'-MOE, 18 mer
5'-T*-mC*-A*-mC*-T*-T*-T*-mC*-A*-T*-A*-A*-T*-G*-mC*-T*-G*-G*-3'			
Inotersen	C230H318N69O121P19S19	7183.1	ASO, PS (full), 2'-MOE, 20 mer
5'-T*-mC*-T*-T*-G*-dG-dT-dT-dA-dmC-dA-dT-dG-dA-dA-A*-T*-mC*-mC*-mC*-3'			

* = 2'-O-(2-methoxyethyl)　m = 5-methyl　d = 2'-deoxy

■ まとめ

MALDIは一価のイオンを優先的に生じることから、複雑なマススペクトルを解釈することなく、合成アンチセンス核酸の質量確認が容易に行えます。また、MALDI-ISD測定は MS/MS 能力のないリニア型TOF MSでも実施可能なので、卓上型のようなシンプルな構造のMALDI-TOF MSでも活用できます。化学修飾を多く含む核酸医薬品の場合においても、通常のオリゴ核酸同様、MALDI-ISDにおいて単純開裂に基づくシンプルな一連のフラグメントイオンが生じるので、内部配列の解析に有効でした。

〈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）による支援の成果によるものです。

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計

MALDI-8030/MALDI-8030 Easycare

Product

■装置の特長

MALDI-8030 はコンパクトな設置面積のリニアモードMALDI-TOF質量分析計です。オリゴ核酸、ペプチド、タンパク質、ポリマーなどの品質管理やプロファイリングの用途で用いられます。装置性能を長時間保つために、卓上型でも大口径のイオン光学系を使用し、イオン減汚染リスクを低減しています。また、真空を落とすことなくイオン引出電極のクリーニングが行える、UV レーザーによる迅速な自動イオン源クリーニング機能（TrueClean）を搭載しています。

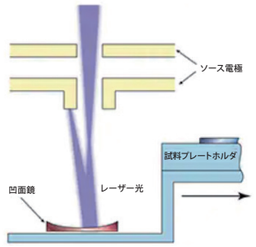
- デュアル極性リニアモード（正負イオン）MALDI-TOF
- 200 Hz 固体レーザー、355 nm
- 迅速なサンプル導入のためのロードロックチャンバー
- UV レーザーによるイオン源クリーニング機能
- コンパクトな設置面積の卓上型
- 静かな運転音（< 55 dB）

用途に応じて選択可能な試料プレート

スライドガラス型試料プレート FlexiMass シリーズは、ユーザーの実験フローに応じて異なるタイプのプレートを選択することが可能です。
ディスポーザブル型の FlexiMass-DS は、そのままの状態ですぐに使え、プレート洗浄の手間やキャリーオーバーのリスクがありません。ルーチン業務において簡便にお使いいただけます。再利用可能なステンレス製の FlexiMass-SR は、試料調製において消耗品の費用や、より長期間の使用を想定した場合に最適です。

自動イオン源クリーニング機能 TrueClean

大口径のイオン光学系は、長期間にわたりイオン源汚染のリスクを低減します。
装置性能を長期間維持することにより、堅牢性の高いプラットフォームを提供します。
また、稼働時間をさらに長くするために、装置の真空を落とすことなくイオン引出電極のクリーニングを行えるようＵＶレーザーによる迅速な（<10 min）自動イオン源クリーニング機能 TrueClean を搭載しました。



高品質・低ランニングコスト

性能強化と長寿命化につながる部品の選択と構成部品数のスリム化を通じて、コンパクトな設置面積と優れたパフォーマンスの両立を可能とした信頼性と堅牢性の高いプラットフォームを作り上げました。また、シンプルな装置デザインは、保守部品の交換および日々のメンテナンスにかかるコストを低減し、長期にわたる分析の品質維持に貢献します。

データベースによる管理

MALDI-8030 は MALDI Solutions によって制御され、測定データに含まれるパラメーターや試料リストからなるすべての情報は、一元管理された堅牢な Microsoft SQL データベースに保存されます。このシステムは、装置管理者によりユーザーごとに異なる役割を与えることが可能で、データベースへのアクセスや装置の操作などの権限を管理できます。

小型MALDIデジタルイオントラップ型質量分析計 MALDImini-1を用いたオリゴ核酸分析

Application

benefits

- MALDImini-1とLabSolutions Insight Biologicsを組み合わせると、測定から解析まで10分程で、分子量分析および配列解析が可能です。
- 小型で場所を取らないMALDImini-1は、限られたファシリティ内での省スペースな運用を可能にします。

■ 測定方法と結果

試料	アンチセンス核酸医薬品（nusinersen）をモデル配列としたオリゴ核酸合成品 （配列は P22 MALDI-8030 参照）
濃度、量	試料溶液として、20 pmol/μL の水溶液を作製しました。
分析	試料溶液とマトリックス溶液を 1:1（v/v）で混合後、1 μL、サンプルプレート上に滴下し、乾燥後、測定を行いました。マトリックス溶液として、3-hydroxypicolinic acid (3-HPA) と 2,4-dihydroxyacetophenone (2,4-DHAP) を、それぞれ 70 mM クエン酸水素二アンモニウムを含むアセトニトリル / 水 (50/50,v/v) に溶解し、40 mg/mL の各溶液を作製しました。これらの 3-HPA 溶液と 2,4-DHAP 溶液を 1:1(v/v) で混合した混合マトリックス 3-HPA/2,4-DHAP 溶液を作製しました。 測定は MALDImini-1 でラスター走査を行いました。分子量分析および配列解析用、それぞれ別の設定条件を用いました。
結果	・分子量分析として、$[M+H]^+$ を検出しました。 ・配列解析として、特定の結合の開裂に基づく一連のフラグメントイオン種に限定された多くのフラグメントイオンを、主に一価で、検出しました。 ・MALDImini-1 の分子量分析および配列解析で取得したデータを出力し、LabSolutions Insight Biologics で解析すると、速やかに同定結果を示しました。MALDImini-1 のフラグメントの特徴から、表示される推定配列はシンプルです。

■ 分子量分析の結果

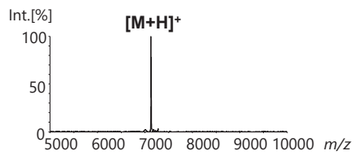


図 1　MALDImini-1 によるマススペクトル

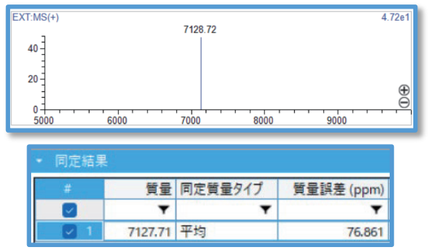


図 2　LabSolutions Insight Biologics による MALDImini-1 データの解析結果の一部

■ 配列解析の結果

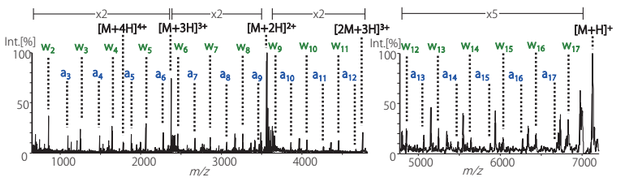
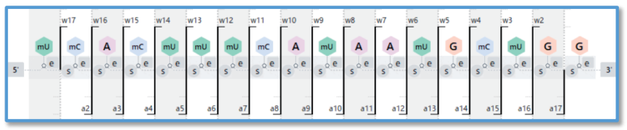


図 3　MALDImini-1 によるフラグメントスペクトル



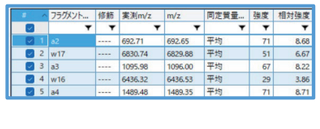


図 4　LabSolutions Insight Biologics による MALDImini-1 のデータ解析結果の一部
配列カバレッジ（左）と同定結果のウィンドウ表示例　s = チオリン酸、e = メトキシエトキシ、m = メチル

■ まとめ

小型質量分析計 MALDImini-1とオリゴ核酸配列解析用ソフトウェアLabSolutions Insight Biologicsの組み合わせは一価の限定されたイオン種に基づく、信頼性の高い配列解析が可能です。場所を取らない小型分析システムによる、迅速で容易な配列解析を提案します。

デジタルイオントラップ型質量分析計

MALDImini-1

Product

■製品の特長

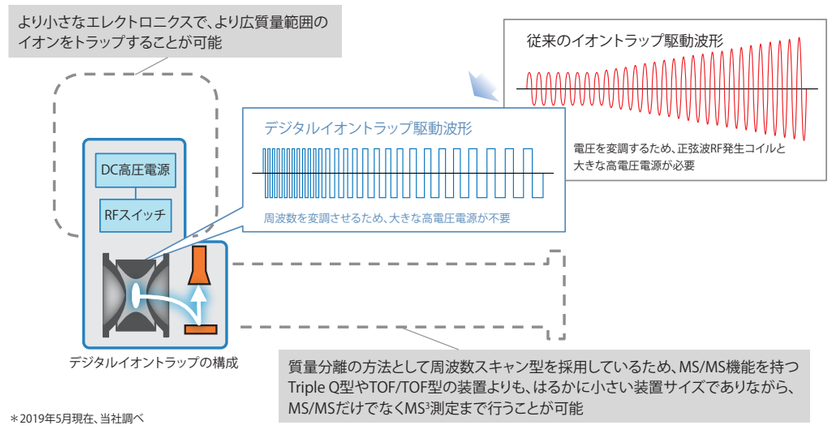
MALDImini-1 は、小型・軽量な装置サイズながら、高感度なMS^n測定が可能。さまざまなアプリケーションへのニーズに応えます。

どこにでも置けるMALDI-MS

従来のMS^n質量分析計は、設置に大きなスペースと周辺設備を必要としましたが、MALDImini-1 は、A3 サイズを下回る省スペースなフットプリントです。真空ポンプも内蔵しており、AC 100 V 電源さえあれば設置することができます。
化学実験台に設置して、サンプル調製をしたその場で質量分析の結果を確認。そんな使い方も可能です。

小型化と高感度・広質量範囲を両立させるデジタルイオントラップ（DIT）技術

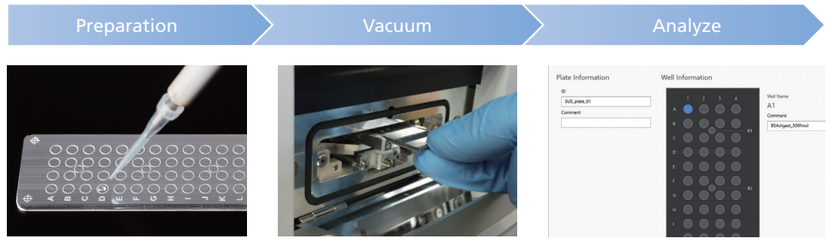
イオンをトラップするために従来の正弦波RFではなく、矩形波 RF を用いる島津製作所独自の技術「デジタルイオントラップ」を世界で初めて＊搭載しました。



＊2019年5月現在、当社調べ

速やかに測定開始

測りたいサンプルをマトリックスと混ぜ、プレートに塗布するだけでサンプル調製は完了します。さらに、サンプルプレートを装置に挿入し、測定可能となるまでの真空引き時間はわずか 5 分。
待機時間を最小化することで、難易度の高い分析でも短時間で何度も実施することができます。



プレートにサンプルを滴下
（FlexiMass-SR、FlexiMass-DSが使用可能）

装置へ挿入し、待機（真空引き）

分析開始

微量サンプルであっても広質量範囲でのMS^n分析が可能

MALDIイオン源とDIT技術の組み合わせにより、微量なサンプルであっても広い質量範囲で高感度なMS、MS^n測定が可能です。さまざまな分子の質量確認だけでなく、タンパク質同定や糖鎖・糖ペプチドの構造解析など、多岐にわたる分析を行うことができます。

新しいTm解析システムを用いた核酸医薬品の熱安定性解析

Application

benefits

- 二本鎖核酸の 50 % が一本鎖に解離する温度（Tm 値）を簡便に求めることができます。
- アニーリング（前処理）から Tm 値の解析（中線法、微分法）まで全て自動で行うことができます。
- LabSolutions DB/CS システムと連携させることで、業界最高水準のデータインテグリティをサポートします。

■ 測定方法と結果

試料 Forward Reverse	M13 primer 5′-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGGA-3′ 5′-TCCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG-3′
濃度	12 μM 10 mM リン酸バッファ （17 mM NaCl を含む）
分析条件	表 1 のとおり
結果	中線法と微分法の 2 種類の計算方法で算出した結果を表 2 に示しました。 中線法では前遷移領域、後遷移領域で選択された区間ごとにそれぞれ接線を引き、2 本の接線の中線と吸光度曲線との交点を Tm 値（融解温度）として計算されます。図 1 のように前遷移領域と後遷移領域を任意に設定し、Tm 値を求めました。 微分法では設定された区画内で設定されたポイント数毎に 1 次微分演算を行い、その最大値を示す位置が Tm 値（融解温度）と計算されます。図 2 のように判定領域を任意に設定し、Tm 値を求めました。

表 1　分析条件

分光光度計：	UV-2600i、TMSPC-8
測定波長：	260 nm
校正用測定波長：	320 nm
スリット幅：	2.0 nm
温度範囲：	15 ～ 90 ℃
温度間隔：	1 ℃
昇温速度：	1 ℃ / min
セル：	8 連マイクロセル　光路長 1 mm

表 2　試料の測定結果

解析方法	Tm 値（℃）
中線法	65.47
微分法	65.98

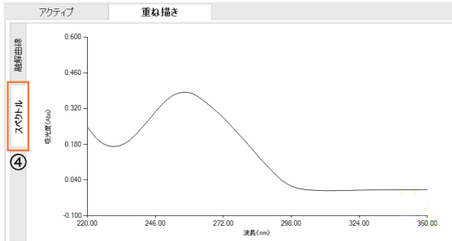


図 1　試料の吸収スペクトル

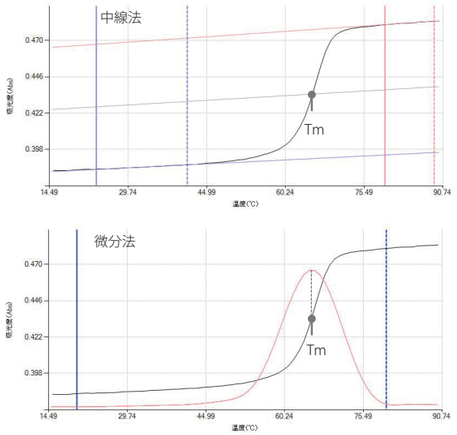


図 2　試料の吸収スペクトル　（上：中線法、下：微分法）

■ まとめ

Tm解析ソフトウェアは、品質評価や安定性評価で実施される二本鎖DNAやRNAのTm値の算出にご利用いただけます。また、この様々な濃度（C）において算出したTm値を利用することで、より詳細なハイブリダイゼーション解析が可能となります。

紫外可視分光光度計

Tm解析システム

Product

■製品の特長

Tm解析システムは、TMSPC-8iを分光光度計と接続し、昇温・冷却により核酸のTm値を測定する装置です。昇降温速度は± 0.1、0.2、0.5、1、2、5 ℃の 12 段階から選択できます。8 連マイクロセルは光路長 10 mm（最小試料量 100 μL）と 1 mm（最小試料量 10 μL）の 2 種類あり、8 種類の試料をパラレルに同時測定可能です。

信頼性のあるデータインテグリティ

業界最高水準のデータインテグリティをTm解析で実現します。測定パラメーターや監査証跡、分析および解析結果は、ユーザー権限やセキュリティポリシーによって保護されたデータベースで管理されるため、オペレーターによる誤操作や改ざんなどを防止できます。

多様なニーズをサポートする機能

Tm解析で求められる微量測定や高感度測定に対応するだけでなく、Excel自動転送機能による熱力学パラメーター解析まで、多様化するニーズにお応えします。

自動化された効率的なワークフロー

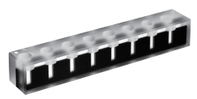
従来のTm解析では、『UV-Visスペクトル確認→アニーリング→融解曲線測定→解析作業』といった複数の手順が必要となり、記録やデータも離散していました。本Tm解析システムでは、時間を要していたアニーリングや各種補正（バックグランド波長、温度ブランク補正）、Tm値算出（中線法、微分法）を自動化し、シームレスなワークフローと効率的なTm解析が可能です。

8 連マイクロマルチセル

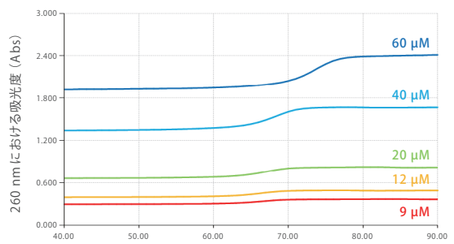
8 つのサンプルを、一度に同一条件で測定することが可能なマイクロマルチセルです。
高感度に測定したいニーズに対応した従来の光路長 10 mm（最小サンプル量 100 μL）マイクロマルチセルにくわえて、高額サンプルを微量測定したいニーズに対応した光路長 1 mm（最小サンプル量 10 μL）のセルを新たにラインアップ。特に光路長 1 mm のセルでは温度によるサンプル蒸発が問題となりますが、セル上面を封止することで試料の蒸発を抑制するシール方式※により、融解温度の高いサンプルでも安定した測定が可能になりました。

※シール方式は甲南大学フロンティアサイエンス学部生命化学科 川上純司教授より支援を頂きました。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。

光路長 1 mm
マイクロマルチセル



光路長 10 mm
マイクロマルチセル



核酸（M13プライマー）の融解曲線
（光路長1 mmマイクロマルチセル使用）

コンパクトモデルBrevis GC-2050を用いた医薬品残留溶媒分析の効率化　ー JP18、USP467水溶性試料 ー

Application

※掲載データの分析対象は核酸医薬品ではありません

benefits

- スリムでコンパクトなBrevis GC-2050 は、ラボでの稼働台数を増やすことでハイスループットに分析できます。
- Brevis GC-2050 はコンパクトでありながら、複数キャリアガスを用いて分析をすることができます。
- ICHQ3C(R8) で新たにクラス 2 溶媒へ追加されたtert-Butyl alcoholおよび Cyclopentylmethyl etherも分析可能です。

■ 測定方法と結果

試料	クラス 1 およびクラス 2 標準溶液（水溶性試料）
分析条件	表 1 の通り
結果	図 1 に操作法 A によるクラス 1 標準溶液（水溶性試料）、図 2 にクラス 2 標準溶液（水溶性試料）の分析結果を示しました。（クラス 2A：黒、クラス 2B：ピンク、TBA、CPME、MiBK：青） クラス 1 の残留溶媒に対し、感度確認が必要な四塩化炭素の分析では、良好な S/N が得られました。クラス 2 の残留溶媒に対し、操作法 A では「アセトニトリルとジクロロメタンのピークの分離度は 1.0 以上」、操作法 B では「アセトニトリルと cis-1,2- ジクロロエテンのピークの分離度は 1.0 以上」がシステム適合性で規定されており、共に良好な結果が得られました。

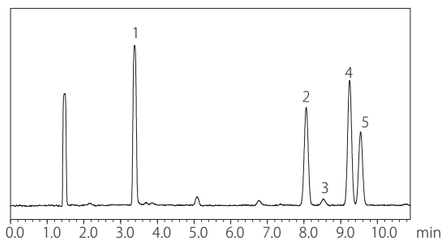


図 1　操作法 A によるクラス 1 標準溶液クロマトグラム（水溶性試料）
1. 1,1-Dichloroethane、2. 1,1,1-Trichloroethane、
3.Carbon tetrachloride、4.Benzene、5.1,2-Dichloroethane

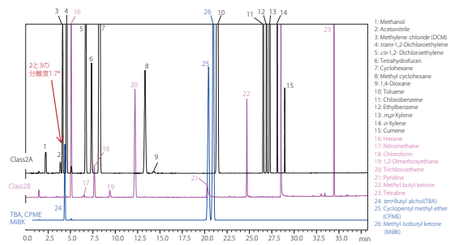


図 2　操作法 A によるクラス 2 標準溶液クロマトグラム（水溶性試料）
＊図中に示している分離度の値は参考値であり、保証値ではありません。

表 1　測定条件

GC 分析条件（操作法 A・操作法 B）	
Model：	Brevis GC-2050
Detector：	水素炎イオン化検出器 FID
Column：	A) SH-I-624Sil MS (0.32 mm I.D. × 30 m, d.f.= 1.8 µm) B) SH-PolarWax (0.32 mm I.D. × 30 m, d.f.= 0.25 µm)
Column temperature：	A) 40 ℃ (20 min) –10 ℃ /min –240 ℃ (20 min) Total 60 min B) 50 ℃ (20 min) –6 ℃ /min –165 ℃ (20 min) Total 59.17 min
Injection Mode：	A) Split 1:5 B) Split 1:10
Carrier Gas Controller：	線速度 (He, N_2, H_2)
Linear Velocity：	35 cm/sec
Detector Temperature：	250 ℃
FID H_2Flow Rate：	32 mL/min
FID Make up Flow Rate：	24 mL/min (N_2)
FID Air Flow Rate：	200 mL/min
Injection Volume：	1 mL
HS-20NX 分析条件（操作法 A・操作法 B 共通）	
Model：	HS-20 NXUSTL (Ultra Short Transfer Line)
Oven Temperature：	80 ℃
Sample Line Temperature：	110 ℃
Transfer Line Temperature：	120 ℃
Vial Shaking Level：	Off
Vial Volume：	20 mL
Vial Equilibrating Time：	60 min
Vial Pressurizing Time：	1 min
Vial Pressure：	75 kPa
Loading Time：	0.5 min
Load Equilib. time：	0 min
Needle Flush Time：	5 min

■ まとめ

Brevis GC-2050はコンパクトな製品でありながら、第十八改正日本薬局方（JP18）およびUSP General Chapter<467> Residual Solventsに準拠した医薬品残留溶媒分析が可能です。また、ハイエンドモデルと比較して実験室に設置可能な台数を増やすことができるため、医薬品の残留溶媒分析を効率的に行うことができます。

ガスクロマトグラフ

Brevis GC-2050

Product

■製品の特長

省スペースながら妥協のない分析性能を実現したBrevis GC-2050は「より小さく、よりシンプルで使いやすく、しかし分析性能は落とすことなくラボ分析が確実こなすことができる」ニーズに応えた製品です。

Brevis GC-2050、HS-20 NX USTL(Ultra Short Transfer Line)

Compact without Compromises　妥協のないコンパクト設計

あらゆる分析ニーズをカバーする拡張性を備えつつ、横幅 350 mmのコンパクトサイズを実現しており、限られたスペースで装置の稼働数を上げることができます。省スペースデザインでありながら一般的に使用されるキャピラリカラム 2 本を収納することができ、水素を始めとしたヘリウム代替キャリアガスによる運用もサポートしています。

Built-in Analytical Intelligence　最新のユーザー支援技術

Remote Display、LabSolutions Directを活用し、スマートデバイスを用いてどこにいてもGC システムにアクセスすることが可能です（自動リモートオペレーション）。またClean Pilot機能を使うことで、短時間で効率的にカラムの自動コンディショニングを行い、ラボワークの負荷を軽減しながら、より安定した分析結果を提供します。

Best-in-Class Performance　クラス最高レベルの性能

最上位機種の基本性能を継承しており、非常に高い面積再現性、保持時間再現性を達成しています。

ヘッドスペースサンプラー

HS-20 NX

Product

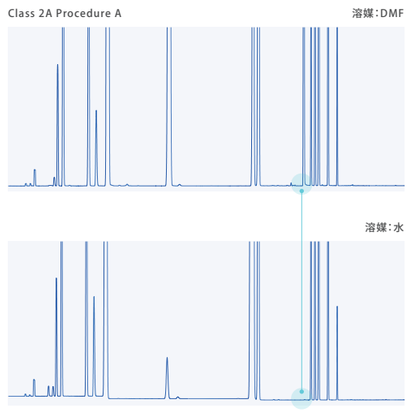
■製品の特長

高い基本性能とユーザーフレンドリーなデザインは、揮発性成分分析への最適なソリューションとして研究部門から品質管理まであらゆる分析を強力にバックアップします。

低キャリーオーバー

アイソレーションガスフローを採用したHS-20 NX シリーズは、キャリーオーバーを従来比 1/10 に低減しました。高沸点化合物や高極性化合物など幅広い化学種の分析に対応し、確かな分析結果が得られます。

医薬品残留溶媒分析ではDMF溶媒での分析後に水溶媒での分析を行うことがありますが、HS-20 NXではDMFのキャリーオーバーに悩まされることはありません。異なる溶媒種、濃度差の大きい試料の分析時には、低キャリーオーバーを実現するHS-20 NXが有効です。



DMFのキャリーオーバーがない

ICP-MSを用いた経口製剤中の元素不純物分析
ー第十八改正日本薬局方 ー

Application

※掲載データの分析対象は核酸医薬品ではありません

benefits

- PDE値の濃度換算方法にオプション 1 を用いた場合の管理閾値でも、十分な感度で定量することができます。
- 元素不純物試験法の定量試験における真度・精度の適合基準を、容易に満たして分析できます。
- プリセットメソッドを用いることで条件設定の手間を省略でき、簡単に分析を開始できます。

■ 測定方法と結果

試料	経口製剤（胃腸薬 OD 錠）（核酸医薬品ではありません）
濃度、量	目標濃度：PDE 値からオプション 1（製剤の 1 日投与量：10 g）を用い限度濃度を換算しました。この限度濃度を試料の希釈倍率（250 倍希釈：［前処理］参照）で除し、目標濃度 J 値を算出しました。
前処理（図 1）	被験試料約 0.2 g に純水 4 mL、硝酸 4 mL、塩酸 0.5 mL を添加し、マイクロ波分解装置で分解（200 ℃、約 60 min）しました（塩酸は Hg など一部の元素の溶液中安定性向上のために添加）。室温まで分解容器を冷却し、50 mL に定容しました（250 倍希釈）。 分解処理時の各元素の汚染量の確認のために、処理ブランク液も用意しました。
分析条件	高周波出力： 1.20 kW プラズマガス流量： 9.0 L/min 補助ガス流量： 1.10 L/min キャリアガス流量： 0.85 L/min セルガス： He 標準物質： 多元素混合標準液 ICHQ3D 経口剤用（Cd,Pb,As,Co,V,Ni）、水銀標準液 ICHQ3D 用単元素標準液（内標準用）Sc,Ga,In,Bi
結果	被験試料の固体中換算濃度：試料溶液濃度から処理ブランク濃度を差し引き、希釈倍率を乗じて換算しました。試料溶液中濃度は、全元素で J 値以下でした。 局方の定量試験における適合基準は、真度：添加回収率が 70 ～ 150 %、精度：RSD が 20 % 以下、定量限界：0.5 J 以下の濃度で真度の適合基準を満たすこととされています。今回の分析結果は、添加回収率は 94 % ～ 104 %、RSD は 3 % 以下と、適合基準を十分な余裕をもって満たしました。また、10 σ は 0.5 J のさらに 1/10 以下と十分に低い値であることが確かめられました。（表 2）

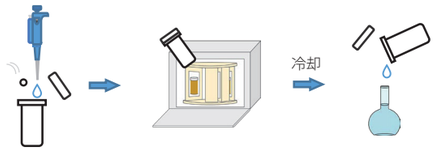


図 1　前処理手順

表 1 装置条件

装置：	ICPMS-2050
ネブライザー：	ネブライザー DC04
チャンバー：	サイクロンチャンバー
トーチ：	ミニトーチ
スキマーコーン：	ニッケル製
オートサンプラ：	AS-20
内標準元素添加方法：	内標準自動添加キット （試料 : 内標準溶液 = 約 9 : 1）

表 2 定量結果

クラス	元素	10σ [μg/L]	処理ブランク液濃度 [μg/L]	試料溶液濃度 [μg/L]	固体中濃度 [μg/g]	0.5 J添加		1.0 J添加			1.5 J添加	
						添加濃度 [μg/L]	回収率 [%]	添加濃度 [μg/L]	回収率 [%]	RSD [%]	添加濃度 [μg/L]	回収率 [%]
1	^{111}Cd	0.02	<	<	<	0.3	94	0.6	97	2.2	0.9	96
	^{208}Pb	0.004	0.005	0.029	0.006	0.3	102	0.6	103	0.95	0.9	103
	^{75}As	0.04	<	<	<	0.9	103	1.8	100	0.74	2.7	99
	^{202}Hg	0.01	<	<	<	1.8	96	3.6	96	0.94	5.4	97
2A	^{59}Co	0.01	<	<	<	3	100	6	100	0.73	9	100
	^{51}V	0.05	<	<	<	6	103	12	104	0.93	18	104
	^{60}Ni	0.4	<	<	<	12	104	24	104	0.60	36	104

10σ =ブランク溶液を繰り返し測定した際に得られた標準偏差 × 10 × 検量線の傾き<：10σ未満

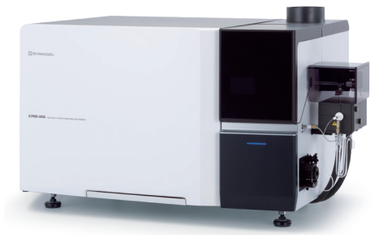
■ まとめ

局方の適合基準と比較し、真度、精度、定量限界を、余裕をもって満たす性能があることが確かめられました。また、測定質量や分析条件の検討には手間や時間がかかりますが、LabSolutions ICPMSのプリセットメソッドを用いて省略することが出来ました。以上より、経口製剤中の元素不純物分析にICPMS-2050が有効であることを確認できました。

ICP 質量分析計
ICPMS-2040/2050

■製品の特長

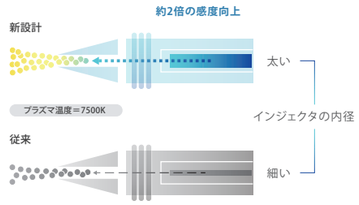
ICPMS-2040/2050 は、進化した独自のミニトーチシステムにより環境性能と分析性能を高次元で両立させ、特別なオプション無し で測定時間を短縮できます。また、オペレーターの操作を最小限 に抑える各種機能やメンテナンスサポート機能を備えたソフトウ ェアは、働き方に変革をもたらします。



Product

Eco Friendly yet Competent ーエコと高性能の両立ー

アルゴンガス消費量を通常の約 2/3 に低減し、かつ低純度（99.95 %）のガスを使用できるという島津独自のミニトーチシステムの特長はそのままに、トーチの形状を最適化することによりプラズマへの試料導入流速を下げ、試料のイオン化効率を向上させることで、従来機と比べ約 2 倍の感度向上を実現しました。



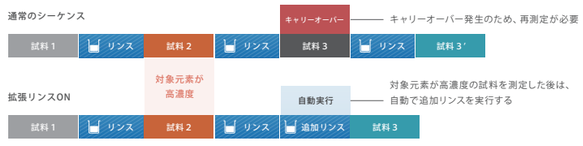
Fast at No Additional Cost ー「速い」をもっと身近にー

新設計ガスコントローラによる高速セルガス置換と、標準搭載の先行リンス機能により、測定時間を大幅に短縮できます。

Minimal Operation Required ー働き方に変革をもたらす操作性ー

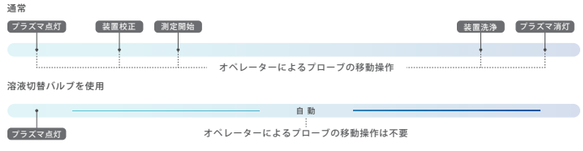
拡張リンス ー導入系洗浄の自動最適化ー

対象元素の定量値が予め設定した上限を超えた場合に、追加リンスを自動実行することでキャリーオーバーの発生を防止する拡張リンス機能を標準搭載しました。追加リンスでは異なる組成のリンス液を指定することもできるため、より確実な洗浄を行うことができます。



溶液切替バルブ ープラズマ点灯以降の無人操作を実現ー

溶液切替バルブは、オンラインで内標準自動添加を行う際に、それぞれのプローブの移動（溶液の切り替え）を自動化するオプションです。これにより、オペレータは試料セットおよびプラズマ点灯を行った後は装置を操作する必要がなく、装置校正から測定、装置洗浄、プラズマ消灯までを装置が自動で行います。



二本鎖DNAの定量測定
～TrayCellやNano Stickを用いた微量測定～

Application

benefits

- 最速 29,000 nm/min の超高速スキャンでスペクトル取得が可能です。
- TrayCell（Hellma Analytics 社製）や Nano Stick（SINCO 社製）を利用することで試料容量最小 3 µL から測定可能です。
- バイオメソッド内の核酸定量機能を用いることで、核酸濃度の定量値が表示されます。

■ 測定方法と結果

試料	二本鎖 DNA
濃度、量	1 ～ 300 ng/mL、2 µL
前処理	上記の濃度に超純水で希釈しました。
測定条件	表 1 の通り
TrayCell を用いた二本鎖 DNA の測定方法	二本鎖 DNA を調製し 27.5、55、110、220、440 ng/µL の標準試料を用意しました（希釈溶液には超純水を用いました）。また未知濃度試料は、同じ DNA をエタノール沈殿にて調製しました。TrayCell は 2 種類の蓋を使い分けることで 1.0 mm と 0.2 mm の光路長に変更することができます。今回は光路長 1.0 mm の蓋を使用し、4 µL 滴下して表 1 の条件で測定しました（図 1）。
Nano Stick を用いた二本鎖 DNA の測定方法	二本鎖 DNA の標準試料および未知試料は上記 TrayCell と同様に調製し、測定条件も上述同様に表 1 の通り行いました。Nano Stick の光路長は 0.5 mm で、試料容量は 3 µL で測定しました（図 2）。
結果	TrayCell および Nano Stick を使用し測定したときの検量線と UV スペクトルの結果を図 3 および図 4 に示します。どちらの結果も高い直線性のある検量線が得られ、440 ng/µL の試料を 10 回繰り返し測定を行い相関関数や CV 値を算出した結果精度よく測定できていることを確認しました。

表 1　測定条件

波長（検量線）：	260 nm、320 nm
波長範囲：	220 nm ～ 330 nm
スキャンスピード：	低速
サンプリングピッチ：	1.0 nm

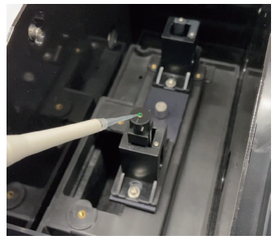


図 1　TrayCell の外観

図 2　Nano Stick の外観と使用手順

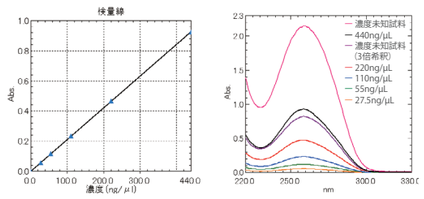


図 3　TrayCell での測定結果

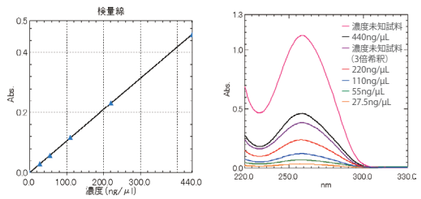


図 4　Nano Stick での測定結果

■ まとめ

紫外可視分光光度計と TrayCell および Nano Stick を用いることで数 µL オーダーの微量試料でも精度よく簡単に測定できることを確認しました。

紫外可視分光光度計
UV-1900i Plus

Product

■製品の特長

紫外可視分光光度計UV-1900i Plusは、省スペース設計かつ人間工学に基づいたハードデザインを採用しています。カラータッチパネルを搭載し、「一目で状態・使い方が分かる」を実現したユーザーインターフェース（UI）を採用しています。また、バイオメソッド内に 1. 核酸定量、2. Lowry 法、3. BCA 法、4. CBB（Bradford 法）、5. Biuret 法、6. UV 吸収法の 6 種類の測定条件が内蔵されており、目的に応じて簡単に測定ができます。操作パネルのスクリーンショット機能も備えており、パソコンに接続しなくても測定結果を簡便に抽出することができます。10 mm 角形セルは約 4 mL の試料容量が必要ですが、TrayCell や Nano Stick を使用することで 2 µL ～ 4 µL 程度の微量測定が可能です。

様々なニーズを満たす高い性能

高速スキャン	最速 29,000 nm/min でスペクトル取得が可能です。短時間の化学反応追跡などに効果を発揮します。UV-1900i Plus では特定波長における吸光度変化に加えて、短時間でのスペクトル取得が可能となったため、より詳細な挙動を調べることが可能です。
低い迷光	0.5 % 以下（198 nm）の低迷光により、紫外域でも 1 Abs 以上で正確な測定が可能となり、高い濃度の試料でも正確に定量できるようになりました。
高い再現性 繰り返し精度	0.0002 Abs 以下の高い測光繰り返し精度によって、測定結果のばらつきが抑えられるため、より正確な定量分析やより低濃度の試料の検出が可能です。
多彩な測定モード	フォトメトリック、スペクトル、定量、カイネティクス、タイムコース、バイオメソッドの 6 種類の測定モードが搭載されています。

薬局方、GLP/GMP、FDA 21 CFR Part 11 などの規制に完全対応

JP、USP、EP に準拠した装置バリデーション機能	JIS の 9 項目だけでなく、日本薬局方（JP）、米国薬局方（USP）、欧州薬局方（EP）で規定されている検査が可能です。当然のことながら、各薬局方が求める仕様にハードウェアとしても準拠しています。また、検査条件の保存が可能なため、一度条件を保存してしまえば都度それを呼び出すだけで簡単に検査を行うことができます。 検査結果も保存可能なので、管理性に優れています。
クラス最高レベルの分解 1 nm	クラス最高レベルの分解 1 nm を達成するとともに、ツェルニー・ターナーマウントの分光器の採用によりコンパクトで明るい光学系を実現しています。 USP/EP で求められている波長分解性能を余裕をもってクリアできます。
セキュリティ機能 UP	外部制御に関するセキュリティ機能が追加され、規制対応がより強化されました。 「Administrator」、「Developer」、「Operator」の 3 段階の権限レベルを、使用ユーザに設定することができます。
規制・ガイドラインに対応	FDA 21 CFR Part 11、PIC/S GMP ガイドラインなどの ER/ES 規制対応に必要なユーザー管理、権限管理、データのオーディットトレイルなどデータの完全性の確保（データベース管理）に対応可能です。また、データベースによるデータ管理、ユーザー管理を行い厚労省 ER/ES 指針などの規制に対応します。1 台の PC でデータを安全に管理し、ER/ES 対応を行いたいお客様に最適な構成です。 * 取得データは LC/GC 等のデータとともにサーバ上で一元管理することも可能です。

siRNA 型オリゴヌクレオチドのトリプル四重極質量分析計による定量と分子量確認

Application

benefits

- 1 台で高感度定量と分子量確認が可能です。
- メンテナンスが簡単なため、分析のダウンタイムを最小限にとどめることが可能です。

■ 測定方法と結果

試料	5′-pU CGAAGUAUUCCGCGUACG dTdT-3′ 平均分子量 : 6646.0 5′-pC GUACGCGGAAUACUUCGA dTdT-3′ 平均分子量 : 6669.0
濃度、量	1 ～ 10000 fmol/L、10 µL
前処理	上記の濃度に超純水で希釈しました。
測定条件	表 1 の通り
結果	AS-Oligo と SS-Oligo における検量線は、1 fmol ～ 10000 fmol の範囲で良好な直線性を示し（図 1）、寄与率（R^2）は AS-Oligo が 0.997、SS-Oligo が 0.995 でした。 検出限界は 1 fmol、定量下限は 5 fmol でした。MRM（Multiplereaction monitoring）による分析では、SIM を上回る感度が得られませんでした。 SS-Oligo と AS-Oligo 各 100 fmol の混合溶液の SIM クロマトグラムを図 2 に示しました。イオンペアクロマトグラフィーにより、それぞれ 6.88 分と 6.94 分に溶出し、分離度 R は 0.3 でした。 質量スペクトル（図 3、4）からは、両試料ともに、4 価～ 9 価のイオンが検出されました。 ソフトウェア LabSolutions の多価イオン解析機能により分子量計算を行った結果、AS-Oligo と SS-Oligo の推定分子量は 6645.0 と 6667.2 であり、平均分子量との誤差は 1.0 Da と 1.8 Da でした。

表 1　測定条件

［HPLC conditions］(Nexera)	
Column:	市販の C18colmn(100 mm × 2.1 mml.D., 1.7 µm)
Mobile phases:	A)200 mM HFIP*1 and 7.5 mM TEA*2/water B)Methanol
Grandient Program:	B conc. 4 %(0 min) － 20 %(8.0 min)
Flow rate:	0.2 mL/min
Column Temp.:	75 ℃
Injection volume:	10 µL
［MS conditions］(LCMS-8060)	
Ionization:	ESI(Negative mode)
Probe Voltage:	-3 kV
Mode:	Q3scan(*m/z*500-1800) SIM *m/z* 1666.0(SS), *m/z*1659.9(AS)
Nebulizing gas flow:	3.0 L/min
Drying gas flow:	5.0 L/min
Heating gas fow:	15.0 L/min
DL Temp.:	250 ℃
Heat Block Temp.:	500 ℃
Interface Temp.:	350 ℃

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

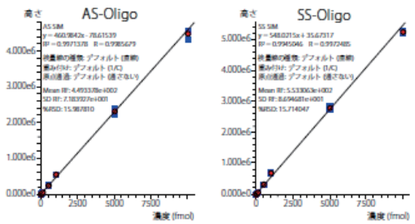


図 1　SIM クロマトグラムから得られた検量線

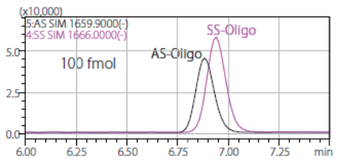


図 2　SIM クロマトグラム

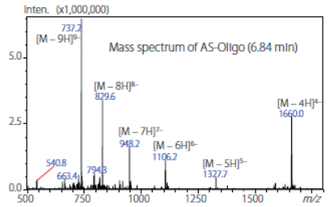


図 3　AS-Oligo のマススペクトル

図 4　AS-Oligo の多価イオン解析スペクトル

■ まとめ

トリプル四重極質量分析計 LCMS-8060 を用い siRNA 型オリゴヌクレオチドの SIM による定量分析を行った結果、得られる質量スペクトルは低分解能であるものの、多価イオン解析機能により数 Da の誤差範囲内で分子量が確認できました。

トリプル四重極質量分析計

LCMS-8060RX

Product

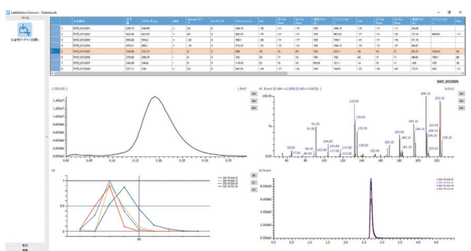
■製品の特長

LCMS-8060RX は、高速・高感度を兼ね備えたトリプル四重極型の質量分析計です。
質量範囲は *m/z* 2 ～ 2000 で、LabSolutions LCMS ソフトウェアの多価イオン解析機能を用いることで核酸医薬品の分子量推定を行うことが可能です。原薬の分子量確認には MALDI-TOF 型や Q-TOF 型の LC-MS などの精密質量分析計が用いられます。
一方、薬物の血中動態解析などの定量分析では、高感度でダイナミックレンジの広いトリプル四重極質量分析計が汎用されています。

分析とデータ解析を効率化するソフトウェア
LabSolutions Connect MRM / LabSolutions Insight

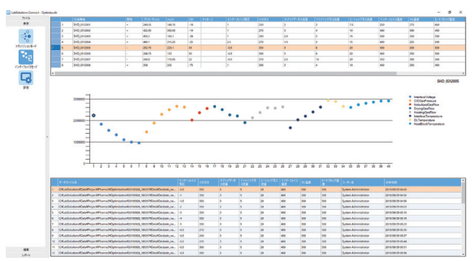
全自動最適化で MS 条件の最適化にかかる手間を削減

MRM パラメーター（プリカーサイオン *m/z*、プロダクトイオン *m/z*、各種電圧など）とインターフェイスパラメーター（ガス流量、温度条件）を自動で最適化できます。極性、アダクトイオン、価数も考慮して網羅的に探索することで、測定したい成分が最も高感度で測定できる MS 条件を 1 回の最適化で得ることができます。
また、上記の最適化結果は、データブラウザ機能でグラフィカルに確認することができます。MRM パラメーターの最適化結果画面では、クロマトグラム、スペクトル、各種電圧を同時に確認できます。インターフェイスの最適化結果画面では、各パラメーター変更時における、シグナル強度の変化を確認することができます。



MRM 最適化

プリカーサイオン、プロダクトイオン、各電圧の最適化結果をグラフィカルに確認できます。



インターフェイス最適化

各インターフェイスパラメーターを変更することで感度がどれくらい変化したかをグラフィカルに確認できます。

短鎖オリゴ核酸分析に対する超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）の応用

Application

benefits

- ホスホロチオアート修飾短鎖オリゴ核酸の不純物を分離することができました。
- SFCを用いることでLCと異なる選択性が得られることがあります。
- 分取にSFCを用いると溶媒の１つである二酸化炭素が気化するため、後処理が簡便になります。

■ 測定方法と結果

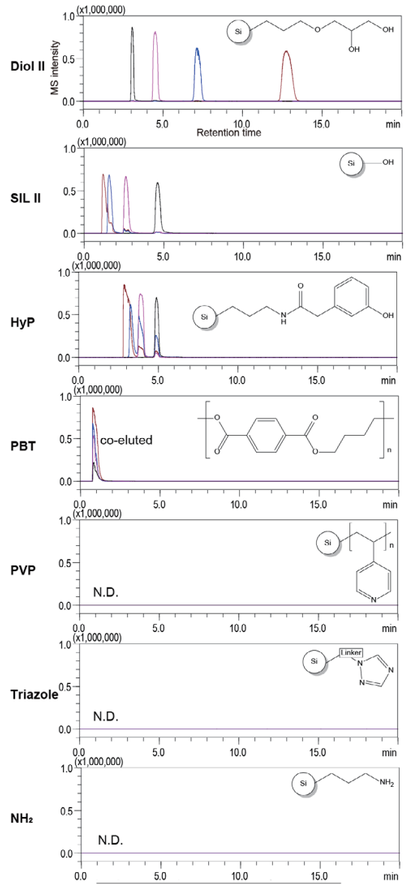
試料	5′-ToToToT-3′ 5′-TsToToT-3′ 5′-TsToTsT-3′ 5′-TsTsTsT-3′ T: チミジン、o: ホスホジエステル結合、 s: ホスホロチオアート結合
濃度、量	100 nmol/mL、5 µL
分析	水 5 % を含むメタノールに溶解した試料を表 1 の測定条件で分析し、カラムごとの保持特性を比較しました。
結果	Diol II カラムを用いて PS 含有量の異なるオリゴ核酸を分離できました。SIL II、HyP カラムによって分離、又は部分的に分離しました。PBT カラムはオリゴ核酸を保持せず、PVP、Triazole、NH_2 カラムは全ての配列が一定時間内に溶出しませんでした。 カラムによって保持特性が変わることがわかりました。

表 1　図 1 の分析条件

System：	Nexera UC
Column：	Shim-pack UC-Diol II, SIL II, HyP, Triazole and NH_2 (150 mm × 2.1 mm I.D., 3 µm) Shim-pack UC-PBT and PVP(150 mm × 3.0 mm I.D., 3 µm)
Temperature：	35 ℃
Injection volume：	5 µL
Mobile phases：	A) CO_2、B)50 mmol/L ammonium formate in methanol and water (95:5, v/v) A/B=50:50
Flow rate：	1.0 ml/min
Detection：	260 nm (PDA coupled to a high-pressure cell)

表 2　MS分析条件

System：	LCMS-9030
Polarity：	Negative
Interface temp：	350 ℃
Nebulizer gas：	3.0 L/min
Heating gas：	10.0 L/min
Drying gas：	10.0 L/min
DL temp：	250 ℃
Heat block temp：	400 ℃
Interface Voltage：	-3.5 kV
TOF-MS：	*m/z* 150-2000



Name	Sequence (5′-3′)	*m/z*, $[M-H]^-$
■ T4	$T_oT_oT_oT$	1153.22
■ T4+1PS	$T_sT_oT_oT$	1169.20
■ T4+2PS	$T_sT_oT_sT$	1185.18
■ T4+3PS	$T_sT_sT_sT$	1201.15

Thymidine (T), PO linkage ($_o$), PS linkage ($_s$), hold-up time (▲)

図 1　PS 含有量の異なる T4 混合液の分析（EIC 重ね書き）

■ まとめ

カラム等分析条件を最適化することで SFC を用いて短鎖オリゴ核酸が分析可能であることを示しました。

超臨界流体抽出／超臨界流体クロマトグラフシステム

Nexera UC

Product

■製品の特長

オリゴ核酸の分析には逆相イオンペアクロマトグラフィーがよく用いられますが、目的物に構造が類似した一部不純物については、目的物との分離は困難です。そのため既存法と異なる選択性を持つ分離法の開発が期待されています。
超臨界クロマトグラフィー（SFC）は温度、圧力共に臨界点以上の二酸化炭素を移動相に用いる分析法です。液体と比べ、二酸化炭素は低粘性かつ 高拡散性を示すため、高分離能、特殊な選択性を持つこと が報告されています。一方で二酸化炭素を含む移動相は低極性のため高極性化合物の分析には不適合とされていました。しかし、近年二酸化炭素と混合するモディファイアの組成や固定相の選択により、ペプチドやヌクレオチドを例とした高極性化合物が分析可能になっています。

Nexera UC は目的成分の抽出から分析・分取までを完全自動化 超臨界流体 CO_2 で固体試料から成分を自動抽出し、そのまま分析・分取までを オンラインでシームレスに行うことができます。
高回収率の分取精製と優れた操作性を両立 独自の気液分離技術を採用し、CO_2 気化時の溶出液飛散による回収率低下を抑制 して、揮発性成分でも高い回収率を実現します。

Nexera UC/s UHPLC/SFC 切換システム

SFC システムに 1 台の UHPLC 用ポンプを追加するだけで、1 つの試料に対して、SFC 分析と UHPLC 分析を自動的に切り換えて、それぞれの分離モードで測定できるシステムです。本システムを用いることで、従来の UHPLC としての分析も通常通り行うことが可能であると共に、UHPLC では分離が困難なサンプルも、UHPLC と異なる分離モードを持つ SFC にて条件を検討することが可能となり、利便性や作業性が大幅にアップします。既存の UHPLC システムから UHPLC/SFC 切換システムにアップグレードするためのキットもご用意しています。

イナートカラム

Shim-pack Scepter Claris

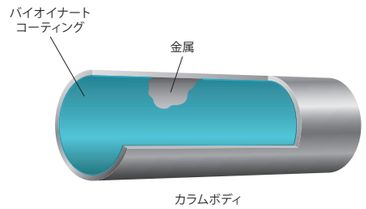
Product

benefits

- バイオイナートコーティングによる吸着抑制
- 有機シリカハイブリッドによる高 pH 移動相に対する高い耐久性
- 中分子、高分子に適したワイドポア型の充填剤など種類豊富な固定相ラインアップ

■製品の特長

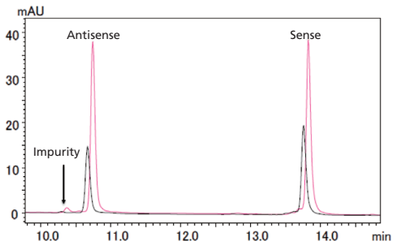
バイオイナートコーティングによる優れた低吸着性



Shim-pack Scepter Claris はバイオイナートコーティングを施したカラムボディにScepter充填剤をパッキングしたカラムです。
金属吸着しやすい化合物、特に核酸において優れた低吸着性能を発揮するカラムです。

siRNAの分析事例

合成したsiRNAの分析について、Shim-pack Scepter（ステンレスボディ）とShim-pack Scepter Claris（イナートコーティングボディ）を比較しました。Antisense鎖、Sense鎖共に倍以上感度が異なることがわかります。また、低濃度の不純物ピークについては、Clarisでは確認できますが、ステンレスボディでは確認することができませんでした。

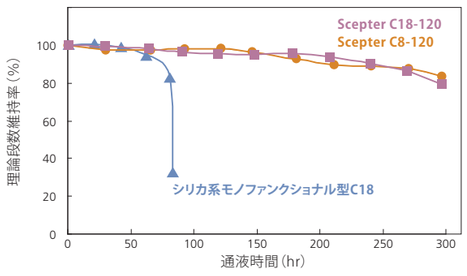


種類豊富な固定相により幅広い分析選択性を実現

Shim-pack Scepter シリーズは直鎖アルキル鎖系の C4、C8、C18 の他、Phenyl、PFPP、Diolと、分離性能の異なる豊富な固定相ラインアップを有します。また、C4、C18 には中分子、高分子向けに最適化したワイドポア型の充填剤があり、核酸やタンパク質などの分析において優れたクロマトパフォーマンスを発揮します。

高pH移動相における耐久性

核酸分析で用いるよりも高い pH(pH11.5) の移動相を一定時間通液してカラム性能が落ちるか評価しました。通常のシリカ系 C18 カラムでは塩基性移動相によりカラム性能が急激に低下しましたが、有機シリカハイブリッド基材を用いているShim-pack Scepter シリーズは塩基性移動相に対し、高い耐久性を示します。



Mobile phase : 50 mmol/L triethylamine (pH 11.5)/methanol = 90/10 (v/v)
Flow Rate : 1.0 mL/min
Column Temp. : 40 °C
Sample : Benzyl alcohol

LC、LC/MS 用高品質ガラスバイアル

Shim-vial H glass

Product

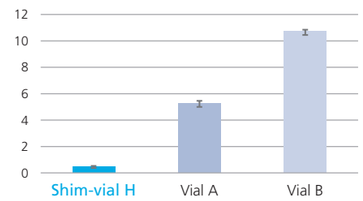
benefits

- 全数検査による徹底した品質管理
- 独自の処理により塩基性化合物の吸着を極限まで抑制（Shim-vial H glass）
- Na溶出の抑制によりpH変化に弱いサンプルも安定

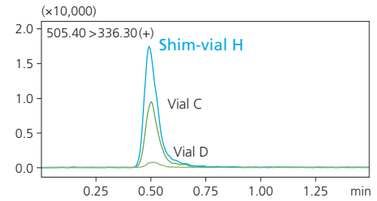
■製品の特長

金属イオンの排除により塩基性化合物の吸着を抑制

ガラス中に含まれる金属イオン（Na）は塩基性化合物の吸着に影響すると考えられます。Shim-vial Hは成形時の特殊な処理によってNaを徹底排除することにより、卓越した低吸着性を実現しました。一部の処理工程を簡略化した Shim-vial Sでも優れた低吸着性を示します。



Na溶出量（μg/mL）



クロルヘキシジン（100 μg/L、1 μL）

高精度な加工技術で実現した究極の小容量化

ユニークな形状をした小容量バイアルは、1.5 mLバイアルと同じ材料、洗浄処理を施し、容器とサンプルの接触面積を抑えることで他の小容量インサートよりも吸着を抑制します。また、熱伝導性を上げるためにバイアル底面は空洞化しています。

最小残存量：約 10 μL

ニードルストロークを 1.5 mL バイアルよりも 15 mm 以上高く設定してご使用ください。
例：Shimadzu SIL-40 シリーズ　32mm 以下

用途に応じたバイアルセレクション

高度な低吸着処理により、ガラスに吸着しやすい塩基性化合物の微量分析を実現するShim-vial Hと、コストパフォーマンスに優れたShim-vial Sをラインアップしています。

高感度分析 Shim-vial H

- pptオーダーの高感度分析（LC-MS）
- 吸着しやすい化合物の分析（LC-MS、LC）
- 再現性を重視する分析（QA/QC）
- 低バックグラウンドを求める分析

日常分析 Shim-vial S

- 一般的な化合物の分析（LC-MS、LC）
- ppb～ppmオーダーの高感度分析
- 再現性を重視する分析（QA/QC）
- 低バックグラウンドを求める分析

本文書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。
なお、本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。
本製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認・認証等を受けておりません。
治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。
トラブル解消のため補修用部品・消耗品は純正部品をご採用ください。
外観および仕様は、改良のため予告なく変更することがありますのでご了承ください。

製品情報　価格お問合せ

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1

東京支社（官公庁担当）(03) 3219-5631
（大学担当）(03) 3219-5616
（会社担当）(03) 3219-5622
関西支社 (06) 4797-7230
札幌支店 (011) 700-6605
東北支店 (022) 221-6231
郡山営業所 (024) 939-3790
つくば支店（官公庁・大学担当）(029) 851-8511
（会社担当）(029) 851-8515
北関東支店（官公庁・大学担当）(048) 646-0095
（会社担当）(048) 646-0081
横浜支店（官公庁・大学担当）(045) 311-4106
（会社担当）(045) 311-4615
静岡支店 (054) 285-0124
名古屋支店（官公庁・大学担当）(052) 565-7521
（会社担当）(052) 565-7531
京都支店（官公庁・大学担当）(075) 823-1604
（会社担当）(075) 823-1603
神戸支店 (078) 331-9665
岡山営業所 (086) 221-2511
四国支店 (087) 823-6623
広島支店 (082) 236-9652
九州支店（官公庁・大学担当）(092) 283-3332
（会社担当）(092) 283-3334

島津コールセンター 0120-131691
（操作・分析に関する相談窓口） IP電話等：(075) 813-1691

初版発行：2022年3月　3656-02503-ODPIT