

# DG2013-02

## 推奨すべき標準溶液の調製法

大住 孝彦<sup>1</sup>, 上野 聡子<sup>2</sup>, 神波 亜矢子<sup>3</sup>, 栗山 早織<sup>4</sup>,  
野田 巧<sup>6</sup>, 山口 建<sup>7</sup>, 山口 高司<sup>8</sup>,  
若松 明<sup>9</sup>, 服部 芳明<sup>10</sup>

大塚製薬株式会社<sup>1</sup>, 味の素製薬株式会社<sup>2</sup>, 田辺三菱製薬株式会社<sup>3</sup>, 日本新薬株式会社<sup>4</sup>, 小野薬品工業株式会社<sup>6</sup>, 株式会社住化分析センター<sup>7</sup>, 日精バイリス株式会社<sup>8</sup>, グラクソ・スミスクライン株式会社<sup>9</sup>, コアメッド株式会社, 元科研製薬株式会社<sup>10</sup>

# マイクロピペットの使用について

プッシュボタン式液体用微量体積計(以下、マイクロピペット)には、**エアードイスプレースメント方式**および**ポジティブディスプレイースメント方式**が存在する。

**ポジティブディスプレイースメント方式**は、ピストンが液体と直接接触するため、揮発性の高い有機溶媒などを使用した際のクロスコンタミネーションを完全に防ぐ。また、キャピラリー内部で完全にピストンを押し下げ、吸引した液体を残すことなく完全に吐き出すため、**エアードイスプレースメント方式**よりも高い精度を有する。

このため、本DG(DG2013-02)に関する項目で**マイクロピペットの記載がある際には、ポジティブディスプレイースメント方式を推奨し、それを意図するものである。**

## メスフラスコとホールピペットの許容差

## メスフラスコ

| 容量     | 10     | 20    | 50    | 100  | 200   | 250   | 500   | 1000 |
|--------|--------|-------|-------|------|-------|-------|-------|------|
| 許容差    | ±0.025 | ±0.04 | ±0.06 | ±0.1 | ±0.15 | ±0.15 | ±0.25 | ±0.4 |
| 精度 (%) | 0.25   | 0.2   | 0.12  | 0.1  | 0.075 | 0.06  | 0.05  | 0.04 |

## ホールピペット

| 容量     | ≦0.5   | ≦2    | ≦5     | ≦10   | ≦20   | ≦25   | ≦50   |
|--------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| 許容差    | ±0.005 | ±0.01 | ±0.015 | ±0.02 | ±0.03 | ±0.03 | ±0.05 |
| 精度 (%) | 1      | 0.5   | 0.3    | 0.2   | 0.15  | 0.12  | 0.1   |

容量, 許容差の単位: mL

上記の体積許容差はクラスAのもの (JIS R3505-1994)

精度: 許容差/容量×100。ホールピペットは容量欄の表示最大容量で計算。

# マイクロピペットの種類と精度の一例

## 容量固定式マイクロピペット

| 容量<br>( $\mu\text{L}$ ) | A社製       |         | B社製       |         |
|-------------------------|-----------|---------|-----------|---------|
|                         | 精度 (%)    | 再現性 (%) | 精度 (%)    | 再現性 (%) |
| 10                      | $\pm 1.2$ | $< 0.6$ | $\pm 1.0$ | $< 0.5$ |
| 100                     | $\pm 0.6$ | $< 0.2$ | $\pm 0.6$ | $< 0.2$ |
| 1000                    | $\pm 0.6$ | $< 0.2$ | $\pm 0.6$ | $< 0.2$ |

## 容量可変式マイクロピペット

| 容量<br>( $\mu\text{L}$ ) | 手動式             |         | 電動式             |         |
|-------------------------|-----------------|---------|-----------------|---------|
|                         | 精度 (%)          | 再現性 (%) | 精度 (%)          | 再現性 (%) |
| 0.5~10                  | $\pm 2.5$ (1)   | $< 1.8$ | $\pm 2.5$ (0.5) | $< 1.8$ |
| 20~200                  | $\pm 2.5$ (20)  | $< 0.7$ | $\pm 1.5$ (10)  | $< 0.7$ |
| 100~1000                | $\pm 3.0$ (100) | $< 0.6$ | $\pm 0.6$ (50)  | $< 0.5$ |

精度：( )内の容量における精度

メトロームジャパン株式会社HPより一部引用

[http://www.metrohm.jp/IC\\_application/column\\_14.html](http://www.metrohm.jp/IC_application/column_14.html)

# DG2013-02

## 1. 標準物質の秤量作業

関連する  
アンケート

Trial DG : DG-1 「標準溶液の調製手法」  
アンケート1 秤量作業

山口 高司  
服部 芳明

日精バイリス株式会社  
元 科研製薬株式会社  
現 コアメッド株式会社

# 1-1 標準物質の秤量

関連する  
アンケート

- 1.4. 秤量に使用する天秤の種類
- 1.5. 使い分けの基準
- 1.10 標準物質の採取について、よく用いられる秤量値と採取容器

Golden  
Standard

- **標準物質の秤量値は4桁以上有することが推奨される。**  
秤量値が10 mg以上の場合  
⇒ **セミマイクロ天秤(最終表示0.01 mgまで)又は  
マイクロ天秤(最終表示0.001 mgまで)を使用する。**

- 秤量値が10 mg未満の場合  
⇒ **原則としてマイクロ天秤を使用する。**

Silver

- **科学的に妥当(例えば、相対誤差:0.1%以下など)であると判断できれば、秤量値は3桁でも構わない。したがって、秤量値が10 mg未満の場合でも、セミマイクロ天秤を使用できる。**

Copper

- **特になし**

# 1-2 秤量操作 (マイクロ天秤使用時)

関連する  
アンケート

1.11. 秤量操作

Golden  
Standard

- **一定量を精密に採取(天秤の精度に合わせて採取)する。**  
例えば、マイクロ天秤で4 mgを秤量する場合、4.000 mg採取する。
- **あるいは、目標秤量値より多く秤量し、その秤量値に対して溶媒を添加する。**  
例えば、秤量値が4.040 mgとなった場合、メスアップ後に追加で1%分の溶媒を添加する。添加には、精度に問題ないことが確認された器具(例:マイクロピペット)を用いる。

Silver

- **一定量を正確に採取(指定した数値に合わせて採取)する。**  
例えば、マイクロ天秤で4 mgを秤量する場合、3.995~4.004 mgの範囲で採取し4.00 mgで取り扱う。

# 1-2 秤量操作（マイクロ天秤使用時）

～続き～

関連する  
アンケート

## 1.11. 秤量操作

Copper

- **採取量に対して所定濃度となるように溶媒を添加する。**  
例えば、調製濃度が1 mg/mLで目標秤量値を2.000 mgとした場合、実際の秤量値は1.910 mgでも2.200 mgでもよく、その秤量値に合わせて1.910 mLや2.200 mLの溶媒を添加する。

精度をより高めるため、溶媒の添加量は10 mL未満かつマイクロピペットの使用が推奨される。

＊代謝物のような量の少ない化合物をマイクロ天秤で秤量する場合は、上記の方法が有用と考えられる。



# 1-3 定量値の有効桁数の設定

関連する  
アンケート

1.12. 定量値の有効桁数の設定

Golden  
Standard

- 秤量値の桁数は、定量値(生体試料中の薬物濃度)の桁数より大きいことが推奨される。  
例えば、定量値を有効数字3桁で求める場合、秤量値は4桁以上であることが推奨される。

Silver

- 秤量値の桁数と定量値の桁数は同じ。

Copper

- 特になし

# DG2013-02

## 2. 標準物質の純度の扱い

関連する  
アンケート

Trial DG : DG-1 「標準溶液調製」  
アンケート2 秤取量補正

山口 建  
上野 聡子

株式会社住化分析センター  
味の素製薬株式会社

## 2-1 秤取量補正

関連する  
アンケート

2.1 秤取量補正の対象及びその測定方法  
2.2-3 秤取量補正の方法及び補正の規定値  
2.4-6 目標秤量値

2.7 内標準物質の補正  
2.8 標準原液の調製方法

Golden  
Standard

- 塩(塩酸塩など)や水和物を除いた遊離体量として量り取る。
- 「純度」補正を行う。
- 補正の際に根拠とする数値は、有効4桁以上の数値を用いることが望ましい。

Silver

- 標準操作手順書などで定めている基準を満たす場合、純度補正を行わない対応も可能である。
- 量り取り及び有効数字に関しては上記の”Golden Standard”と同様とする。

Copper

- 特になし

例) 1塩酸塩化合物の補正

遊離体分子量 : 500.1

塩酸分子量 : 36.41

純度 : 90.00%

遊離体 10.00mgを溶媒10mLに溶解させる場合  
の秤量値

「塩」補正 → 10.73mg ( $10 \times 536.5 / 500.1$ )

& 「純度」補正 → 11.92mg ( $10 \times 536.5 / 500.1 \times 1 / 0.9000$ )

## 2-2 複数化合物測定時の標準物質\*)

\*) 未変化体/代謝物の同時測定系の測定対象化合物を含有する場合

関連する  
アンケート

2.13 標準物質中に他の測定対象化合物が不純物として含まれる場合

Golden  
Standard

- 未変化体/代謝物の同時測定系を立ち上げる場合、各々の測定対象物質の定量に影響を及ぼさない標準物質を用いる必要がある。
- ある測定対象物質の標準物質中に他の測定対象物質が不純物として含有する場合は、マトリックスへの添加量/濃度などを工夫し、各々の測定対象物質が定量可能な測定系の立ち上げを行う。

Silver

- 特になし

Copper

- 特になし

## 2-3 秤取量補正の根拠数値の更新

関連する  
アンケート

2.14 リテストにてCertificate Of Analysis (COA) が発行された場合の数値の取り扱い

Golden  
Standard

- 最新のリテストの純度を使用する。
- バリデーション試験/TK・PK測定などにおける試験に使用する純度の更新は、リテスト直後の標準原液の調製時からとする。

例えば、新たなCOA発行前に調製された標準原液/標準溶液については、調製時点のCOAの純度を引き続き使用可能であり、更新された純度によるTK/PKサンプル濃度の再計算は必要としない。

Silver

- 標準操作手順書などで定めている基準を満たす場合、試験実施中は初期値を使用する。

Copper

- 特になし



# DG2013-02

## 3. 標準溶液調製

関連する  
アンケート

**Trial DG : DG-1 「標準溶液調製」  
アンケート3 標準溶液調製**

野田 巧  
栗山 早織

小野薬品工業株式会社  
日本新薬株式会社

## 3-1 標準原液を調製するときの容器

関連する  
アンケート

3.1 標準原液を調製するときの容器の規定は？

Golden  
Standard

安定性、使用溶媒、吸着性などを考慮して使用する容器を選択し、SOPあるいは試験計画書で規定する。

Silver

SOP及び試験計画書で使用する容器を規定しなかった場合、使用した容器を生データに記録する。

Copper

特になし



## 3-2 標準原液の調製方法

関連する  
アンケート

3.2 標準原液を調製するときの容器は？  
3.4 どの器具をガラス製以外で使用？

3.3 ガラスへの吸着のある化合物の取扱いは？  
3.4 標準原液を調製するときの添加器具は？

**原則メスフラスコを用い、10 mL以上を調製する。目標値より多く精密に秤量した場合、マイクロピペットを用いて必要な溶媒を添加する。吸着が懸念される場合、吸着しない容器あるいはコーティング(シリル化など)した容器を用いる。**

**精密に採取した採取量に応じた溶媒をマイクロピペットを用いて添加する。**

**特になし**

Golden  
Standard

Silver

Copper



## 3-3 超音波装置の使用

関連する  
アンケート

3.5 難溶解性物質の溶解方法について、超音波装置を用いる場合の取り決めは？  
3.6 どこで取り決めていますか？

Golden  
Standard

**使用する超音波装置を  
SOPあるいは試験計画書に記載する。**

Silver

**SOP及び試験計画書で  
使用する超音波装置を規定しなかった場合、  
使用した超音波装置を生データに記録する。**

Copper

**特になし**

## 3-4 標準溶液の希釈

関連する  
アンケート

3.8 標準溶液の希釈についての取り決めは？  
3.10 最大希釈倍率は？

Golden  
Standard

希釈回数は3回を上限とし、  
希釈倍率については上限を定めない。

Silver

3回を上回る希釈の妥当性が確認できる場合、  
希釈回数 of 制限を設けない。

Copper

特になし

## 3-5 標準溶液の希釈に使用する器具

関連する  
アンケート

3.9 標準溶液の希釈に用いる器具は？

Golden  
Standard

希釈に用いる器具を  
原則メスフラスコおよびホールピペットとする。

Silver

メスフラスコおよびマイクロピペットを用いて調製する。

Copper

マイクロピペットを用いて調製する。その場合、  
溶解溶液と希釈溶液が同一でなければならない。  
(異なる場合、混合によって容積変化が生じるため)

## 3-6 標準溶液調製に使用する溶媒

関連する  
アンケート

- 3.11 希釈を行う際、原液を調製する溶媒と同じ溶媒を使用？
- 3.12 「Yes」の方、取り決めは？
- 3.13 「No」の方、何で希釈？

Golden  
Standard

溶解度などに問題がない限り、  
標準原液と標準溶液の溶媒は同じであることが望ましい。

Silver

化合物の溶解度、標準溶液の扱いやすさなどから、  
標準原液と標準溶液について異なる溶媒を選択する場合、  
使用する溶媒についてはあらかじめ規定しておく。  
また、混合によって容積変化が生じるため、  
メスアップを必須とする。

Copper

特になし

## 3-7 標準原液調製の妥当性評価

関連する  
アンケート

3.14 標準原液調製の妥当性評価を実施しますか？  
3.16 どのように実施？

3.15. どこで規定？  
3.17. 何で確認？

Golden  
Standard

**標準原液調製の妥当性評価のため、  
同時に2系列の標準原液を調製し、  
試験に用いる機器で確認する。**

Silver

**必ずしも2系列の標準原液を同時に調製する必要はないが、  
標準原液の妥当性評価を実施する。  
例えば、同じ試験ならびに別の試験で異なる時期  
(安定性が確認されている期間内)に調製した標準原液を  
比較して確認する。**

Copper

**特になし**

## 3-8 標準原液調製の妥当性評価における基準

関連する  
アンケート

3.18 標準原液調製の妥当性評価の基準は？

Golden  
Standard

同時に調製した2系列の標準原液を比較し、  
±5%以内であれば適合とする。

Silver

同時に調製した2系列の標準原液または  
異なる時期に調製した標準原液を比較し、  
SOPや試験計画書で定めた基準以内であれば  
適合とする。

Copper

前処理した検量線およびQC試料を測定し、  
±15%以内であれば適合とする。



## 3-9 標準溶液 (WS) の調製容量

関連する  
アンケート

3.19 標準溶液の調製容量は？

Golden  
Standard

WSを保存して使用する場合、  
調製容量は10 mL以上であることが望ましい。

Silver

保存安定性の問題、マトリックスで希釈するなど、  
WSを用時調製する場合、1 mL以下であっても、  
マイクロピペットを用いて調製できる。

Copper

特になし



# DG2013-02

## 4. 標準溶液の安定性評価

関連する  
アンケート

Trial DG : DG-1 「標準溶液調製」  
アンケート4 安定性評価

若松 明                    グラクソ・スミスクライン株式会社  
神波 亜矢子              田辺三菱製薬株式会社



## 4-0 標準原液の有効期限

関連する  
アンケート

1.9. 標準物質の有効期限の取り扱い

Golden  
Standard

- 標準原液は、有効期限内の標準物質を用いて調製する。  
標準原液の有効期限は、  
**標準原液**の安定性が保証された期間で規定する。

\* ただし、FDAが発出したBMVのドラフトガイダンスでは、  
**標準物質**の有効期限内に標準原液を使用する  
ことが推奨されている。

Silver

- 特になし

Copper

- 特になし

## 4-1 標準原液の保管（小分け，容器の材質）

関連する  
アンケート

- 4.1. 標準原液(Stock solution)保管時の小分け
- 4.2. 標準原液(Stock solution)の保存容器の材質は

Golden  
Standard

- 化合物および溶媒の特性（安定性、吸着性、揮発など）や コンタミンの懸念に応じて、小分けを考慮する
- 標準原液(Stock)の保存容器はガラスを基本とし、化合物の特性に応じて選択する。ガラス以外の容器を使用する場合、保存容器からの溶出物が分析に影響を及ぼさないことを確認する

Silver

- 特になし

Copper

- 特になし

## 4-2 冷蔵・遮光保存 標準原液, 標準溶液の使用時の取扱い

関連する  
アンケート

- 4.3. 標準原液(Stock solution)が冷蔵、遮光保存の場合、使用時も同条件で使用するか？  
4.7. 標準溶液(Working solution)が冷蔵、遮光保存の場合、使用時も同条件で使用するか？

Golden  
Standard

- **冷蔵保管の場合**  
⇒ **室温に戻して使用する**
- **遮光保存の化合物**  
⇒ **光に弱い化合物を取り扱う際には、暗室やUVカットランプの使用、電灯を消すなどの対応をする**  
なお、物性・安定性データにより光に弱いと特定されない化合物については、上記対応を必須としない

Silver

- 特になし

Copper

- 特になし

## 4-3 一定期間保管した標準原液 (Stock) を用いて調製した標準溶液 (Working) の使用期限は？

関連する  
アンケート

4.8. 標準原液を調製して2週間後に調製した標準溶液の使用期限は？  
(標準原液 (Stock)、標準溶液 (Working) の安定性はともに1カ月)

Golden  
Standard

- **標準原液の安定性の期間内に標準溶液を使用する**  
(たとえば、標準原液 (Stock)、標準溶液 (Working) の安定性はともに30日間で、14日間保管した標準原液から調製した標準溶液は、16日以内(原液調製後30日以内)に使用する)

Silver

- **標準溶液の安定性に不安定な傾向が認められない場合に限り、原液の安定性保証期間に依存することなく、標準溶液調製時からの安定性の保証期間使用可とする**  
(たとえば、標準原液 (Stock)、標準溶液 (Working) の安定性はともに30日間で、14日間保管した標準原液から調製した標準溶液は、標準溶液調製時から30日間使用可とする)

Copper

- 特になし

# 4-4 標準原液・標準溶液の安定性確認方法

## ～その1～

関連する  
アンケート

4.11. 標準原液(Stock)の安定性の確認方法は？ 4.13. 標準原液(Stock)の安定性評価の測定方法  
4.14. 標準溶液(Working)の安定性確認方法は？ 4.16. 標準溶液(Working)の安定性評価の測定方法

Golden  
Standard

### ➤ 分析試料

**標準原液、標準溶液とも、LC移動相(GCの場合注入溶媒)で機器のダイナミックレンジ内になるよう適宜希釈したものを分析試料とする。**

### ➤ 対照

**新たに標準物質から調製した標準原液、標準溶液を対照とする。標準溶液の対照については、安定性の保証期間内である標準原液を用いて調製してもよい。**

### ➤ 機器

**原則として試験に用いる機器で評価する。目的に応じて使用する機器を変更しても良い(標準原液の評価にはLC/UVが有用の場合がある)。**

## 4-4 標準原液・標準溶液の安定性確認方法

## ～その2～

関連する  
アンケート4.11. 標準原液(Stock)の安定性の確認方法は？ 4.13. 標準原液(Stock)の安定性評価の測定方法  
4.14. 標準溶液(Working)の安定性確認方法は？ 4.16. 標準溶液(Working)の安定性評価の測定方法Golden  
Standard

## ➤ 評価法

LC/MS, GC/MSで評価する場合は、標準物質と内標準物質のピーク強度比で評価する。LC/UV, LC/FLなどで評価する場合は、標準物質のピーク強度で評価してもよい

## ➤ 条件

**化合物の特性, 使用予定期間, 使用時の保管条件に応じて設定する**

標準原液(Stock), 標準溶液(Working)を室温以外で保管する場合は、使用時に室温に戻す必要があるため、室温における安定性(24時間など)も確認する

Silver

➤ 特になし

Copper

➤ 特になし



## 4-5 標準原液・標準溶液の安定性の評価基準は？

関連する  
アンケート

4.12. 標準原液(Stock)の安定性評価の判定基準は？

4.15. 標準溶液(Working)の安定性評価の判定基準は？

Golden  
Standard

- 新たに調製した溶液と保管溶液について、その差が標準溶液では5%以内、標準溶液では10%以内とする
- 不安定さが懸念される化合物、ばらつきの多い化合物ではn=5以上での実施を検討する

Silver

- 新たに調製した溶液と保管溶液について、妥当な比較法及び基準をSOPや試験計画書で定める

Copper

- 特になし

# 4-6 IS原液 (IS Stock) IS溶液 (IS Working) の安定性評価

関連する  
アンケート

4.17. IS原液(IS Stock)、IS溶液(IS Working)の安定性評価の対応は？

Golden  
Standard

- IS原液・IS溶液の安定性を確認する場合、**標準原液・標準溶液と同様の方法で確認する**

Silver

- **測定バッチ内で測定に問題ないことを確認する**  
(たとえば、1ラン(1分析単位)中のISピーク強度のばらつきが、あらかじめ規定した範囲内であることを確認するなど)

Copper

- 特になし



# 4-7 標準溶液 (Working) の安定性評価の濃度 (原液と溶液で溶媒同じ・異なる)

関連する  
アンケート

4.18. 標準溶液(Working)の安定性評価の濃度は？  
(標準原液Stockと標準溶液Workingで溶媒が同じ場合)  
(標準原液Stockと標準溶液Workingで溶媒が異なる場合)

Golden  
Standard

➤ 標準溶液(Working Solution)のうち**最高と最低濃度で検討する**。ただし、標準原液と標準溶液の溶媒が同じ場合は**最高濃度評価に標準原液の評価結果(\*)を当てることができる**

(\*) 4-4項. 標準原液・標準溶液の安定性確認方法参照

Silver

➤ 特になし

Copper

➤ 特になし

# 4-8 複数化合物の標準溶液(Working)の 安定性評価の方法は？

関連する  
アンケート

4.20. 複数化合物の標準溶液(Working)の安定性評価の方法は？

Golden  
Standard

➤ **混液で評価する**

**単液で保管する場合は、単液で評価する**

Silver

➤ 特になし

Copper

➤ 特になし

## 4-9 バリテーションにおいて混液で安定性を評価し、 本測定において評価対象の化合物数を減らした場合の対応

関連する  
アンケート

4.21. 本測定で化合物数が減った場合、バリテーションと同じ化合物数の溶液？  
(バリテーションで複数化合物の標準溶液(Working)安定性を確認した場合)

Golden  
Standard

▶ **標準溶液の化合物数は減らさない  
バリテーションと同条件で標準溶液(Working)を調製する**

Silver

▶ 「化合物を減らすことによる化合物間の相互の影響、測定への影響、安定性への影響、がないことを確認」したうえで、化合物数を減らした標準溶液を調製する  
(例えば、混液と単液として調製した標準溶液の各分析対象物のピーク強度を比較して確認するなど)

Copper

▶ 特になし

# 4-10 凍結する溶媒（水やDMSO）使用時 小分けする？その安定性は？

関連する  
アンケート

4.23. 凍結する溶媒(水やDMSO)を使用した場合、小分けする？

4.24. 小分けしない場合の安定性評価方法

Golden  
Standard

- 凍結する条件で保存する場合は、1回の凍結融解の安定性を確保したうえで小分けする。  
または、小分けせず凍結融解の安定性(回数は使用する頻度による)を評価する

Silver

- 特になし

Copper

- 特になし