



DG2021-52

**LC-MSによる  
超低分子化合物の定量**

***Quantitative analysis of small molecule  
compounds by LC-MS***



# Members

氏名	所属
小島 恵子 Keiko Kojima	L S I メディエンス
後藤 貴博 Takahiro Goto	田辺三菱製薬
齋藤 昌良 Masayoshi Saito	田辺三菱製薬
中村 早希 Saki Nakamura	科研製薬
文本 英隆 Hidetaka Fumimoto	住化分析センター
横井 宏之 Hiroyuki Yokoi	大塚製薬
新井 浩司 Kouji Arai (アドバイザー)	L S I メディエンス

# 活動の経緯

- ◆ Jun 2021
  - ✓ メンバー募集
  
- ◆ 13 Jul 2021
  - ✓ キックオフ会議
  
- ◆ Jul 2021～Dec 2021
  - ✓ TC と メールを用いた議論
  - ✓ アンケート (Nov 2021)
  
- ◆ Jan 2022～Feb 2022
  - ✓ ポスター準備

# 本DGの目的

分子量が非常に小さい化合物をLC-MSで測定する際、通常の低分子化合物とは異なった、超低分子特有の問題が予測される。



これら問題に対して、文献などを頼りにしながら、測定法開発者が試行錯誤を繰り返している。



DGメンバー内で、問題点の抽出、解決策を議論し、**超低分子化合物測定法開発への一助**としたい。

## 本DGにおける超低分子化合物の定義

**分子量200程度以下の  
生体成分及び医薬品等**

# 超低分子化合物測定時の問題

## メンバー経験談

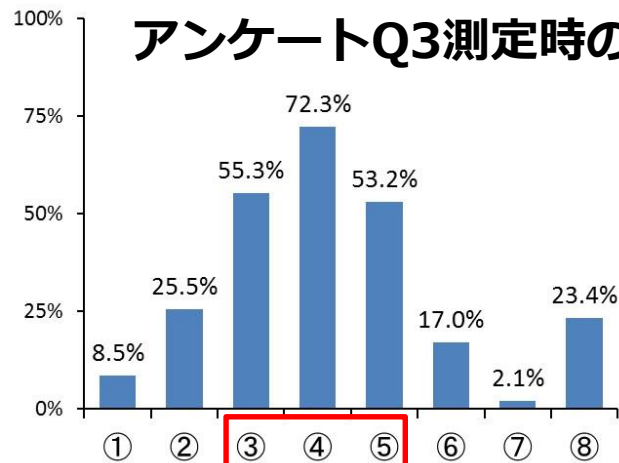
- 汎用のODSカラムに保持しにくい。
- プロダクトイオンの選択肢が少ない，得られない。
- イオン化効率が低い。
- クロマトのバックグラウンドが高く，定量下限が上がる。
- 固相抽出や有機溶媒による除タンパクでは回収率が低い。
- 夾雑成分を除去できず，測定感度を得ることができない。等

選択性が悪い      感度不足

該当しないものは，超低分子化合物でも，通常の低分子化合物と同じアプローチで測定可能。

# 本DGでの議論

アンケートQ3測定時の問題より



①	回収率
②	マトリックス効果
③	感度不足
④	クロマトのバックグラウンド
⑤	選択性
⑥	内標準物質の選定
⑦	苦勞した経験なし
⑧	その他

## 超低分子化合物測定時の問題

### 対策

前処理

測定

誘導体化

メンバーの経験をもとに、3つのポイントから、測定時の問題への対策を議論した。



# 前処理

(Sample preparation)



# 代表的な前処理方法

## 【液-液抽出法】

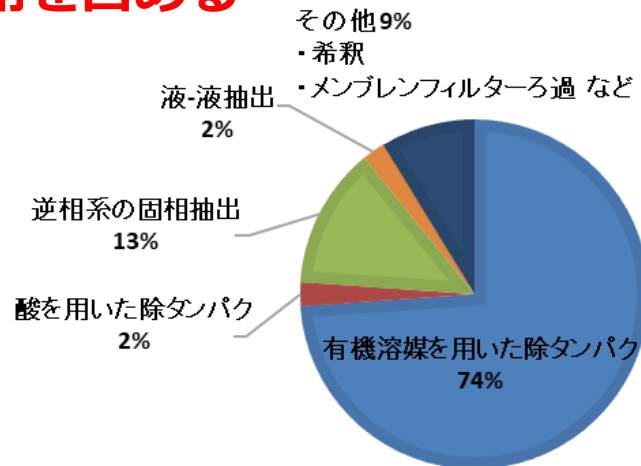
## 【除タンパク法】

- ・ 沈殿法  
有機溶媒もしくは酸添加
- ・ 限外濾過法

## 【固相抽出法】

- ・ 逆相
- ・ 順相
- ・ イオン交換
- ・ ミックスモード

超低分子化合物の前処理方法として  
9割を占める



超低分子化合物の測定時の前処理方法の  
第一選択は何ですか？

DG2021-52 LC-MSを用いた超低分子化合物の定量 Question15

化合物や試料の種類による使い分けが必要だが、  
DGメンバー内議論及びアンケート結果からも

超低分子化合物の前処理方法の1<sup>st</sup> Choice  
有機溶媒による除タンパク

## 1<sup>st</sup> Choice

### 【有機溶媒】

使いやすい汎用性の高い方法

## 2<sup>nd</sup> Choice

### 【酸】

- 中和操作が必要となり、工程が長くなる場合がある
- イオンペア試薬を使用した場合、MS汚染のリスク
- 試薬メーカーによっては妨害ピークが出現することがある
- 回収率が悪く、あまり上手くいかないケースもある

# 除タンパク法(有機溶媒)

## 有機溶媒

- アセトニトリル
- メタノール

### 【試料に対する有機溶媒添加比率】

- アセトニトリル ➡ 等量～4倍
- メタノール ➡ 3倍以上

## 組成

- 単一
- 混液

### 【混液の組成】

- アセトニトリルとメタノール

## 酸添加

- 有り (ギ酸が多い)
- 無し

### 【酸添加理由】

- 回収率の改善
- 代謝物の安定化
- 揮発防止
- 加水分解防止 (pH3付近)

### 【添加濃度】

- 0.1～1% (maxでも10%以下)

## 【トラブル事例】

- 100%有機溶媒を添加した際に、測定対象が析出してしまった  
→**80%程度の有機溶媒にすることで解決、回収率が向上**
- 試料にアセトニトリル添加 (final 50%) 後に遠心、上清採取時に化合物分布が不均一になった
- 尿をマトリックスに使用したとき、化合物のエリア値がバラついた  
→**希釈することで解決**
- LC-MSでのピーク形状改善のため、最終組成の水系比率を上げる際に、感度が足りなくなることがある (希釈による感度低下)  
→**LLOQを犠牲にする以外に解決策なし**

## 【その他】

- イオンペア含有有機溶媒を使用した除タンパクも選択肢としてある

# 除タンパク法(酸)

## 酸

- TCA
- TFA

### 【酸の種類】

- TCAを用いる場合が多数
- アンケートでは過塩素酸を用いる意見もあり

## 濃度

- 10%以下

### 【試薬の調製方法】

- 酸に水を10%溶液となるように添加し混和する
- 多くの場合で最終酸濃度が4%以下となるように添加

## 操作

- 試料に直接添加

### 【酸添加量】

- 少量添加～等量以上と差がある
- 中和操作を必要とする場合もある

## 1<sup>st</sup> Choice

### 【逆相】（充填剤：C8, C18）

- 除タンパク後の夾雑物除去や脱塩目的でも使用
- 極性の高い化合物が多いため保持力に注意が必要

## 2<sup>nd</sup> Choice

### 【順相】（充填剤：Silica）

- 製品ラインナップが少ないため、選択肢が限られる

### 【イオン交換，ミックスモード】

- 自由度が少なく，メーカー推奨条件での使用が基本

# 固相抽出(逆相)

## 【サンプル調製】

■ そのまま添加

■ 希釈

■ pH調整

### 【希釈溶液】

- ・ 水
- ・ 有機溶媒10～30%の溶液
- ・ pH調整したbuffer

Buffer添加は逆相の場合ほとんどないが、DGメンバー内ではpH5の酢酸緩衝液にて実施経験があった

### 【希釈方法】

- ・ 血漿 ➡ 除タンパク後希釈
- ・ 尿 ➡ そのまま希釈

### 【希釈倍率】 DGメンバー内でも様々だが、分析時のピーク形状を見つつ調整

- ・ 固相カラムの許容ボリューム
- ・ ～10倍程度
- ・ 有機溶媒比率が10%以下となるよう希釈
- ・ 尿は1:1程度

# 固相抽出(逆相)

## 【固相抽出手順】

Conditioning

【コンディショニング液】

- ・有機溶媒→水系が基本
- ・イオンペア試薬水溶液のケースもあり

Sample apply

Wash

【洗浄液】

- ・水
- ・サンプルを希釈した溶媒
- ・バッファー（移動相水系のもの）
- ・水/メタノール（溶媒比率は回収率により決定）

DGメンバー内でも様々だが、  
化合物に合わせた洗浄液・溶出液を選択

Elute

【溶出液】

- ・アセトニトリル, メタノール  
（溶媒比率は選択性, 回収率により決定）
- ・場合によってはギ酸を添加



## 【抽出後サンプルの取扱い】

■そのまま測定

■乾固後，再溶解

基本はそのまま測定だが，ピーク形状や測定感度によっては乾固

### 【乾固方法】

- ・窒素ガス気流下
- ・減圧乾固

40℃で，N<sub>2</sub>ガスを吹き付ける条件での乾固方法が多い

**乾固中の分解・吸着・揮発のリスクがあるため注意が必要**

# Tips\_固相抽出(逆相)

## 【トラブル事例】

- 吸引スピードによって回収率にばらつきが生じることがある

→ 同位体をISとして使用

- ブランクマトリックスでは問題なかったが、実サンプルでカラムが詰まることがある（血漿を水で希釈した際に、固相が詰まる）

→ 自然落下方式から加圧方式に変更

## 【その他\_DGメンバーの経験】

- イオンペア試薬含有の移動相を使用する場合、希釈溶液や再溶解溶液も移動相に揃える
- プロドラッグの修飾部位の測定が必要なケースに、未変化体との分離目的として固相操作実施し、スルー画分を採取した経験有り
- 脱塩目的で固相抽出実施

# 固相抽出(イオン交換)

## 【サンプル調製】

■ そのまま添加

■ 希釈

■ pH調整

### 【希釈溶液】

- ・ 洗浄液
- ・ 酢酸アンモニウムやギ酸アンモニウムを用いたバッファー
- ・ pH調整したバッファー

### 【希釈方法】

- ・ 血漿 ➡ 除タンパク後希釈
- ・ 尿 ➡ そのまま希釈

- ・ pH調整バッファーは酸性であればギ酸、塩基性であればアンモニア水を用いて調製
- ・ DGメンバーでpH9.5の塩基性緩衝液の実施経験があった

### 【希釈倍率】 DGメンバー内でも様々だが、分析時のピーク形状を見つつ調整

- ・ 固相カラムの許容ボリューム
- ・ ~10倍程度
- ・ 有機溶媒比率が10%以下となるよう希釈
- ・ 尿は1:1程度

# 固相抽出(イオン交換)

## 【固相抽出手順】

### メーカー推奨プロトコールで実施

ただし、溶出液は酸性または塩基性時に中和させないとピーク形状が崩れる経験あり

## 【抽出後サンプルの取扱い】

■そのまま測定

■乾固後、再溶解

### 【乾固方法】

- ・窒素ガス気流下
- ・減圧乾固

40℃で、N<sub>2</sub>ガスを吹き付ける条件での乾固方法が多い

## 除タンパク同様，汎用性が高い

比率を誤ると分離しない  
最後に乾固が必要となることが多い

### 【有機溶媒の種類】

- ・ 酢酸エチル
- ・ t-ブチルメチルエーテル
- ・ メタノール-クロロホルム
- ・ フェノール-クロロホルム

酢酸エチルにアセトニトリルを加えることで回収率が改善する場合がある

## 【サンプル調製】

## ■そのまま (First) ■バッファー添加 pH調整

- ・希釈は基本しないが，する場合は水を使用する
- ・バッファー添加及びpH調整は測定対象化合物を分子型またはイオン型に偏らせるために添加

## 【pH調整する場合のバッファー】

- ・アンモニア水
- ・酢酸

## 【抽出操作】

## 溶媒又はバッファー添加，攪拌後，溶出液層を回収

DGメンバーでは溶出液層となる溶媒の添加量の一つの目安として溶出液層となる溶媒がもう一方の液の2倍量との意見があった

## 【抽出後サンプルの取扱い】

## 乾固後，再溶解

## 【乾固方法】

- ・ 窒素ガス気流下
- ・ 減圧乾固

40℃で，N<sub>2</sub>ガスを吹き付ける条件での乾固方法が多い

液量が多く化合物の濃度が低くなっているため，基本的に乾固が必要となる

「揮発性化合物」，「熱に不安定な化合物」に不向き

# 前処理方法の選択

## 【選定基準】

- 試料中のタンパク量
- 回収率または，選択性
- 測定対象化合物の感度，物性，マトリックス効果の程度
- 除タンと固相抽出は保持力の強さなどで判断

超低分子化合物の前処理方法1<sup>st</sup> Choice

**有機溶媒もしくは酸による除タンパク**

超低分子化合物の前処理方法2<sup>nd</sup> Choice

**固相抽出や液-液抽出，各手法の組み合わせ**



## 【試料に合わせた前処理】

- タンパク量が多い血漿・組織ホモジネートでは  
除タンパクが1<sup>st</sup> Choice
- タンパク量が少ない尿では除タンパク以外の方法  
(希釈, 固相抽出, 液-液抽出) が1<sup>st</sup> Choice

例)

尿 ➡ 遠心した上清もしくは希釈(移動相初期組成などで  
~100倍希釈)した試料をそのまま測定

# 前処理方法の選択

前処理手法	メリット	考慮すべき点	使用される生体内試料
除タンパク法 (有機溶媒)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 簡便</li> <li>・ 汎用性が高い</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ タンパク量の少ない生体試料には不向き</li> <li>・ 夾雑物の除去能力は低い</li> <li>・ 酸除タンではイオン交換試薬を用いるとMSを汚す恐れがある</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 血漿</li> <li>・ 組織ホモジ</li> <li>・ (尿)</li> </ul>
除タンパク法 (酸)			
固相抽出 (逆相)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 夾雑物の除去や脱塩目的にも使える</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 化合物が保持しない場合がある</li> <li>・ イオン交換では推奨プロトコール以外の微調整は難しい場合がある</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 血漿</li> <li>・ 組織ホモジ</li> <li>(除タンパク後)</li> <li>・ 尿</li> </ul>
固相抽出 (イオン交換)			
液-液抽出	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 汎用性が高い</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 最後に乾固が必要</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 血漿</li> <li>・ 組織ホモジ</li> <li>・ 尿</li> </ul>



# 測定

---



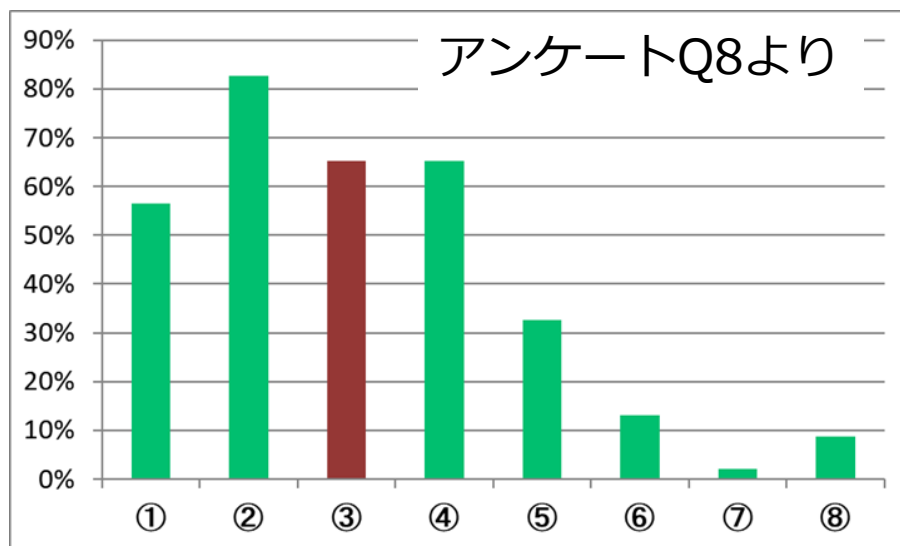
# 移動相

# 「選択性」改善のための打ち手

## □ 改善のために移動相を検討することが多い

- 超低分子化合物の定量で苦労した半数以上が「選択性」で苦労したと回答（アンケートQ3より）

## ◆ 選択性が悪い場合の改善方法としてどの方法を試しますか？ (複数回答可)

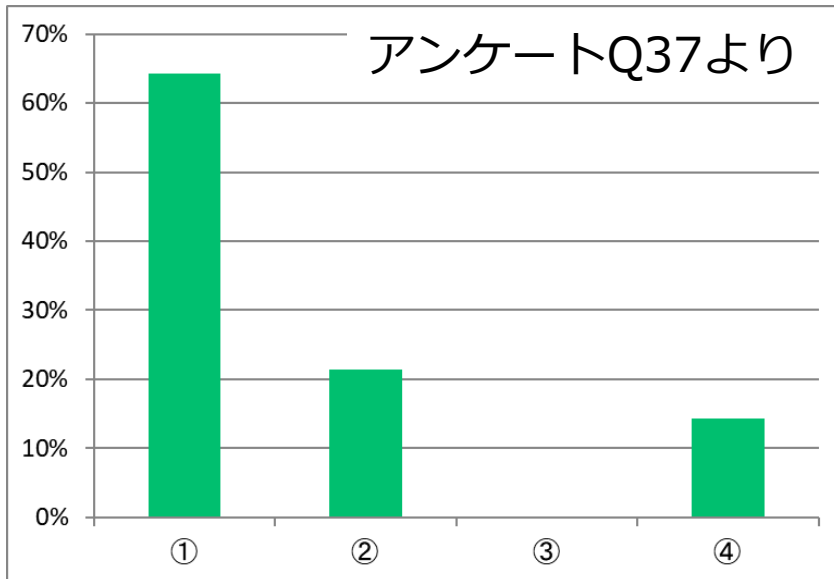


- ① 前処理
- ② カラム
- ③ 移動相
- ④ モニターイオン
- ⑤ 装置パラメータ
- ⑥ 分析装置
- ⑦ 経験なし
- ⑧ その他 (誘導体化, 定量範囲の変更)

## □ まずはギ酸や酢酸を添加した移動相を試す

- 添加濃度は0.1~1%程度
- 始めに塩基性条件から実施する方は居なかった

## ◆ 最初に試す水系の移動相は何ですか？



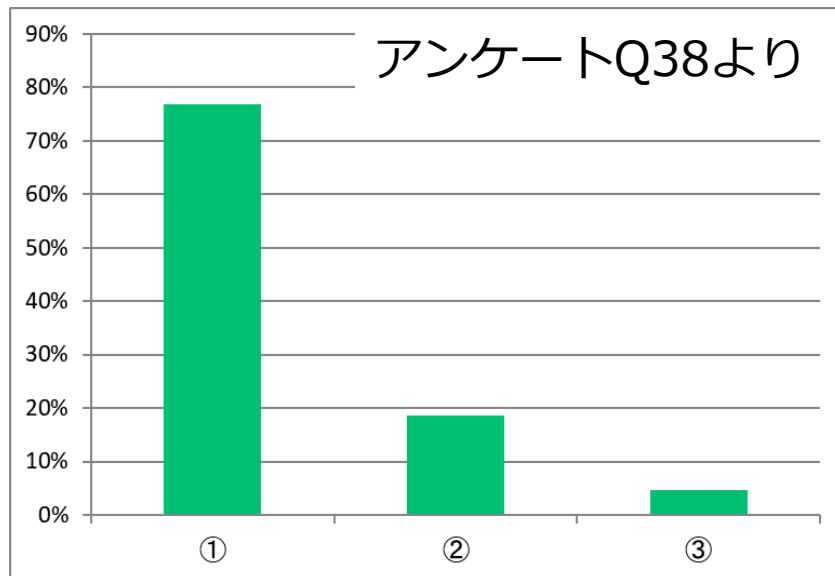
- ① ギ酸や酢酸添加 (酸性)
- ② ギ酸アンモや酢酸アンモ添加 (中性付近)
- ③ アンモニアやトリエチルアミン添加 (塩基性)
- ④ その他 (化合物の特性に応じて)

# 有機溶媒系の移動相

## □ まずはアセトニトリルを試す

- ギ酸または酢酸を0.1~1%程度添加

## ◆ 最初に試す有機溶媒系の移動相は何ですか？



- ① アセトニトリル
- ② メタノール
- ③ その他（化合物の特性に応じて）

# 移動相の選択

添加する酸は0.1~1%程度が一般的

揮発性の塩は10 mM程度で使用する

高濃度の塩を使用してグラジエント分析を行うと、有機溶媒の濃度によっては析出する可能性もあるため注意が必要

メタノールを用いることも有用

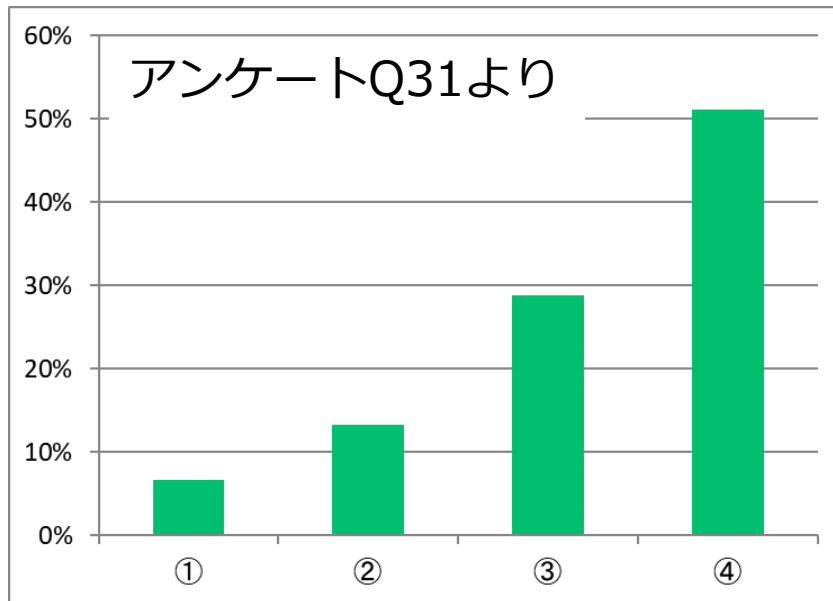
メタノールはアセトニトリルより溶出力が弱いため、分離や保持を調整しやすい



# イオンペア試薬の使用

□ 使用経験者の半数以上がイオンペア試薬を使用しない

◆ 超低分子化合物の測定時にイオンペアを使用した移動相を使用しますか？



- ① よく使用する
- ② たまに使用する
- ③ 使用しない
- ④ 経験なし

# イオンペア試薬を使用しない理由

## □ イオンペア試薬による装置の汚染が大きな理由

- LCの汚染により保持時間が安定しない  
MSの汚染により感度が低下する（BGが上昇する）
- イオンペア試薬使用後の装置のメンテナンスが大変
- 他の測定に影響を与える
- イオンペア試薬よりも様々なカラムを試す  
（カラムの種類が豊富）

# 装置汚染の対処およびケア方法

## □ 50%程度の有機溶媒で洗浄

- アセトニトリルやメタノールなどの有機溶媒を用いる
- 洗浄液に0.1~1%程度の酸を添加することが有効な場合もある
- 分析に使用しないカラムや抵抗管を接続して、背圧が掛かる状態で一晩通液させる（1~2 mL/min程度を目安）

## □ 窒素発生装置のラインにトラップカラムを設ける

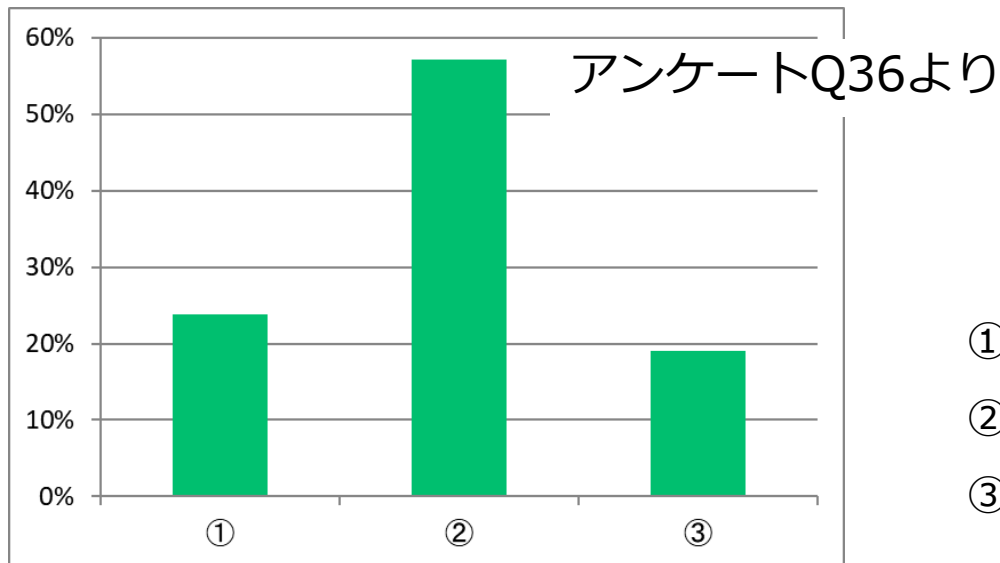
- トラップカラムとしてヒドロカーボンカラムを接続する
- 揮発したイオンペア試薬が窒素発生装置内に入り込み、窒素と共にMS装置内に供給され続ける

# イオンペア試薬による効果

## □ 効果が認められないケースも多々ある

➤ 期待する効果: **保持・分離の改善** (アンケートQ35より)

## ◆ イオンペア試薬を使用することで改善したケースはありますか？



- ① ほとんどのケースで改善した
- ② たまに改善した
- ③ 改善したことがない

# 代表的なイオンペア試薬

- 酸性化合物に用いる代表的なイオンペア試薬  
トリエチルアミン (TEA)  
テトラブチルアンモニウム (TBA)

塩基性化合物に用いる代表的なイオンペア試薬  
トリフルオロ酢酸 (TFA)  
ヘキサフルオロ酪酸 (HFBA)  
ウンデカフルオロヘキサン酸 (UFHA)



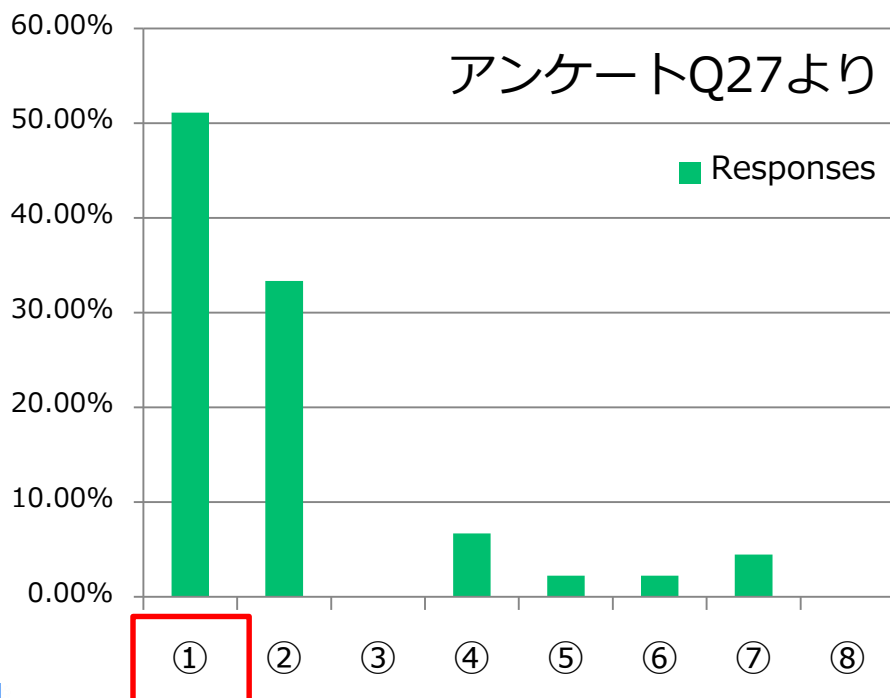
# カラム

# 分析カラムの第一選択

## □ まずは汎用ODSを試す

使用実績が豊富，耐久性が高め。

### ◆ 超低分子化合物の測定時の分析カラムの第一選択は何ですか？



## 汎用ODSが主流

- ① ODSカラム (汎用カラム)
- ② 水100%で使用可能なODSカラム
- ③ Phenylカラム
- ④ HILIC系のカラム
- ⑤ イオン交換カラム
- ⑥ ODS-イオン交換のmixモードのカラム
- ⑦ その他の特殊カラム (アミノ酸専用等)
- ⑧ その他 (具体的に)

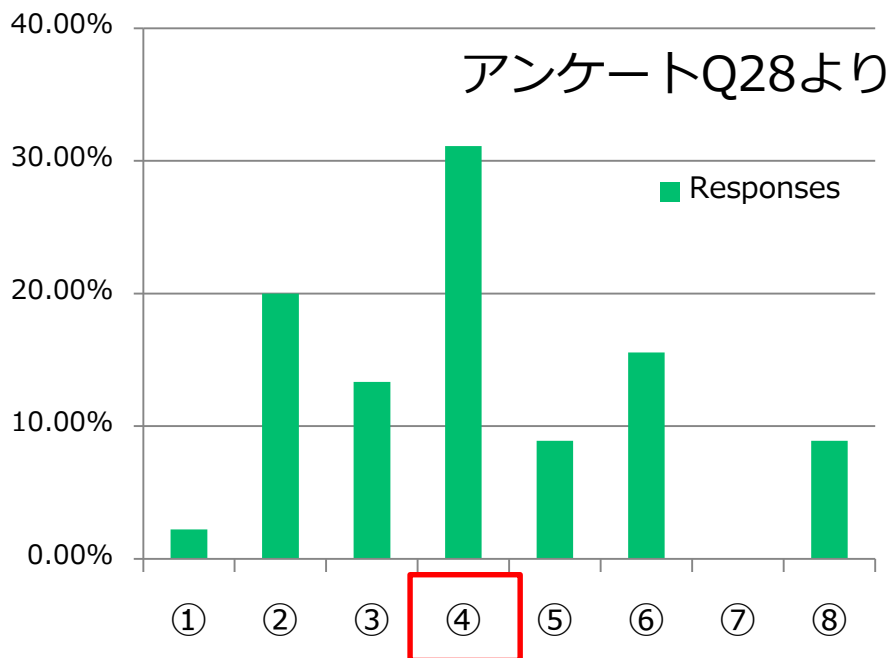
# 分析カラムの第二選択

## □ 次にHILIC or ODS-イオン交換のmixモードのカラムを試す

HILIC：親水性相互作用による，極性化合物の保持を期待できる。

ODS-イオン交換のmixモード：2種類の充填剤の利点を活用できる。

### ◆ 超低分子化合物の測定時の分析カラムの第二選択は何ですか？



## 第二選択としては HILICが主流

- ① ODSカラム (汎用カラム)
- ② 水100%で使用可能なODSカラム
- ③ Phenylカラム
- ④ **HILIC系のカラム**
- ⑤ イオン交換カラム
- ⑥ ODS-イオン交換のmixモードのカラム
- ⑦ その他の特殊カラム (アミノ酸専用等)
- ⑧ その他 (具体的に) ...PFPやADME



# HILICカラムを用いた分析法の基本条件

## □ 移動相の溶出力：水系 > 有機溶媒系

疎水性相互作用による保持が認められるODSとは逆の溶出パターンを示す。  
グラジエント分析時は高有機溶媒→低有機溶媒で。

## □ 移動相の水系割合は50%以下を目安に

水系50%以下でも十分な溶出力が得られる。平衡化時間の短縮。

## □ グラジエント分析による保持時間の調整は可能

ただし、ピーク形状が悪くなることもあるため注意。

## □ 平衡化時間を長めに設定する

充填剤の粒子表面に形成される水層を安定化させる = 保持の再現性。  
保持の再現性が得られるよう、分析間の適切な平衡化時間を検討する。

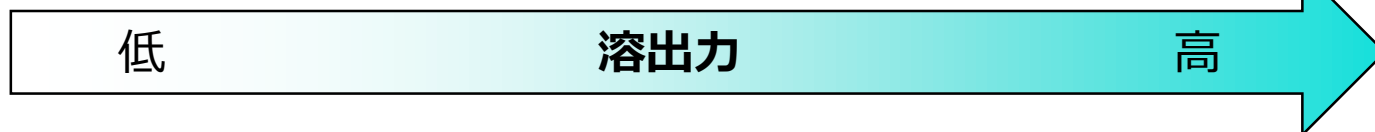
# HILICカラムでフルバリデーションは可能か？

## □ 可能であるが、ロット間差・耐久性・ カラムの平衡化時間の設定に注意

フルバリデーションを想定するのであれば、同一ロットのカラムを複数本入手しておくのが望ましい。  
保持の再現性を得るために、一般的に汎用ODSと比較して長めの平衡化時間が必要なケースが多い。

# ODS-イオン交換のmixモードカラムを用いた 分析法の基本条件

## □ 移動相



ODS基に対して

- ・水系

イオン交換基に対して

- ・低い塩濃度
- ・分析対象物質がイオン型になりやすいpH

ODS基に対して

- ・有機系

イオン交換基に対して

- ・高い塩濃度（～200 mM）
- ・分析対象物質が分子型になりやすいpH

## □ 使用する移動相によっては、平衡化時間を長めに設定

塩濃度やpHでグラジエント分析を行う場合は、カラム平衡化に時間を要する。

## □ 塩の析出に注意

高濃度の塩による分析にて機器を使用した後は、水での洗浄を必ず行う。

## ODS-イオン交換のmixモードカラムでフルバリデーションは可能か？

### □ 可能であるが、予備カラムを多めに用意すること

カラムの劣化が早い。高濃度の塩を含む移動相を流す場合はさらに早い。同一ロット間でも耐久性に差があるケースも見受けられる。分離の状況がすぐに変わりやすいため、ピーク形状をこまめに確認し、変化が認められた場合はカラムを交換することが望ましい。

# カラムへ保持していなくても分析は可能？

- 妨害ピークが認められず、かつISとして安定同位体を使用するのであれば、カラムへ保持していなくても分析可能

選択性に影響を及ぼすような妨害ピークがないことを確認する。  
マトリックス効果を受けやすいため、ISとして安定同位体を使用する。

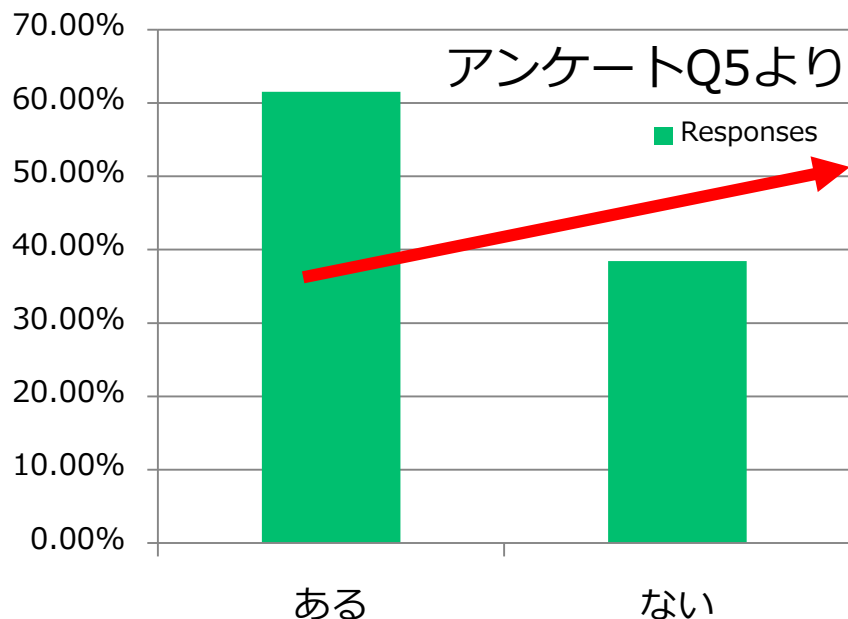


# 内標準物質 (IS)

## □ 安定同位体が望ましい

超低分子化合物のカラムへの保持が試料中夾雑成分と重なることが多く、マトリックス効果による分析の不安定化や定量下限の上昇が起きやすい。

- ◆ 超低分子化合物の分析時に、一般的な化合物と比較して苦労した経験はありますか？



## 「ある」と回答した人の19%がISのトラブルを経験

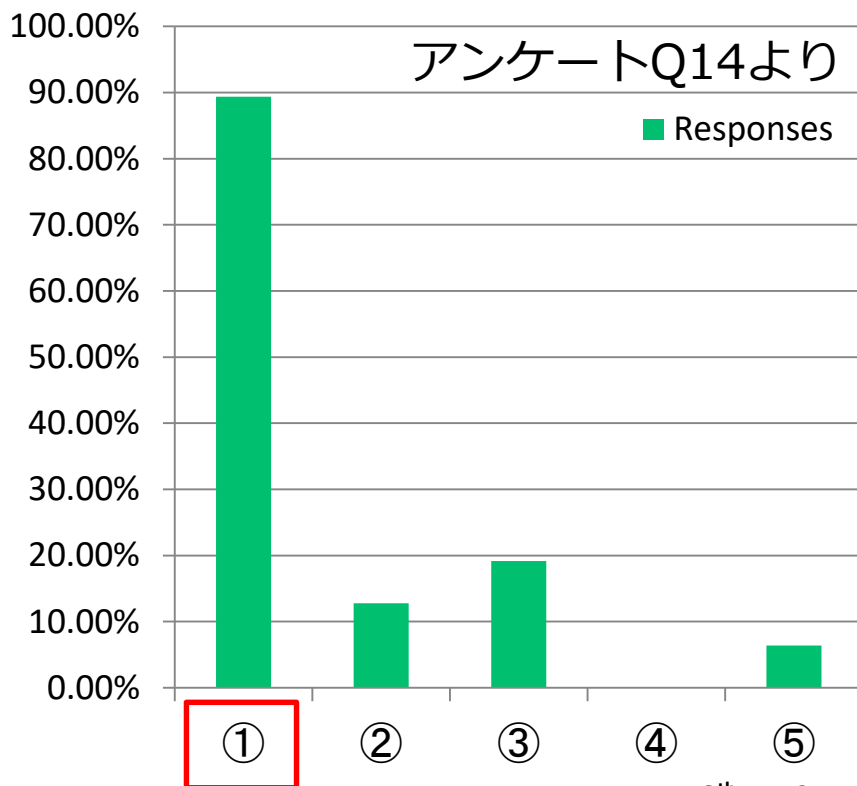
- ISが安定同位体ではなかったためマトリックス効果の影響を受けないよう前処理を工夫した
- ISとして安定同位体を使用しないとratioが安定しなかった

# 安定同位体を手に入れない場合のIS

## □ Analyteの類縁体を試す

Analyteに似た物性である場合，回収率やカラム保持の類似性を期待できる。

### ◆ 安定同位体を手に入れない場合どのように対応しますか？（複数回答可）



## 類縁体が主流

- ① 類縁体を用いる
- ② 合成担当者に合成してもらう等，入手できるまで待つ
- ③ ISを使用しないで対応する
- ④ LC-MSでの測定を諦める
- ⑤ その他（具体的に）…類縁体以外の低分子化合物や一般試薬から選択





# 誘導体化

# 誘導体化法について

誘導体（ゆうどうたい、英: derivative）とは？  
→有機化学の用語のひとつで、ある有機化合物を母体として考えたとき、官能基の導入、酸化、還元、原子の置き換えなど、母体の構造や性質を大幅に変えない程度の改変がなされた化合物のこと（出典：Wikipedia）

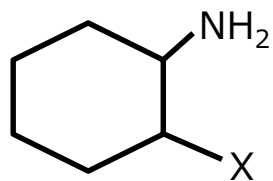
## LC-MS/MS分析

対象となる化合物を誘導体へと変化させることで、感度不足や選択性等、超低分子化合物を測定する時の問題を改善することを目的とする。

## 誘導体化法の例

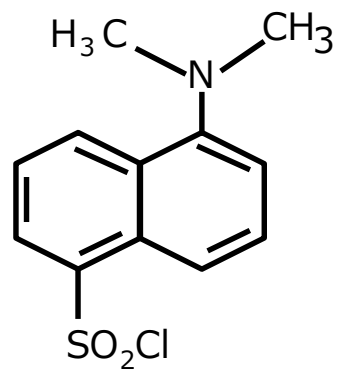
## ダンシル化 (Dansyl Chloride)

Compound X

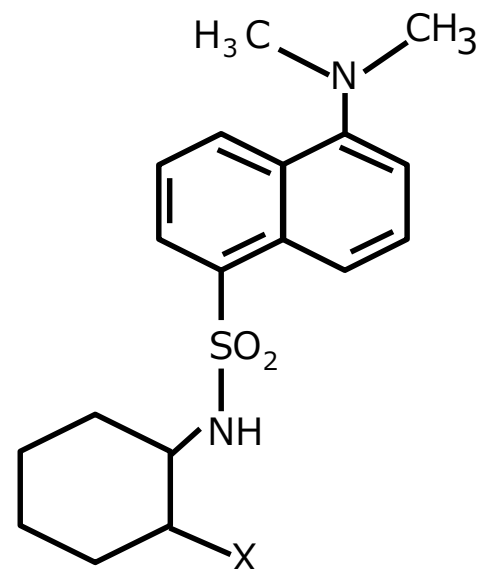


+

Dansyl Chloride

→  
-HCl

Dansylated Compound X



# 誘導体化法の例

- フェノール基, アミノ基 : ダンシル化**  
Dansyl Chloride溶液を添加し, 塩基性下, 加温で反応
- アルデヒド基 : ヒドラゾン化**  
ヒドラジン溶液を添加し, 酸性下, 加温(または室温)で反応
- カルボキシル基 : メチル化**  
Trimethylsilyldiazomethane溶液を添加し,  
メタノール存在下, 室温で反応

# 誘導体化によって得られること

## □ 保持時間の改善

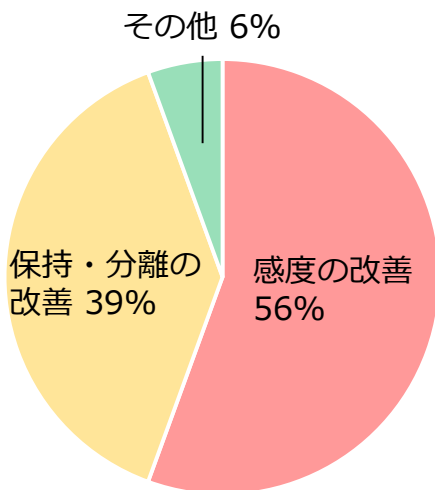
誘導体化されることによって、ODS系の分析カラムへの保持が強くなり、分析カラムや移動相、グラジエント条件の選択肢が広がる。これによって、選択性や夾雑物との分離の改善が期待される。

## □ 感度の向上

誘導体化されることによって、測定時に効率的にフラグメント化され、誘導体化前の状態よりも感度が高いプロダクトイオンが生成されることが期待される。

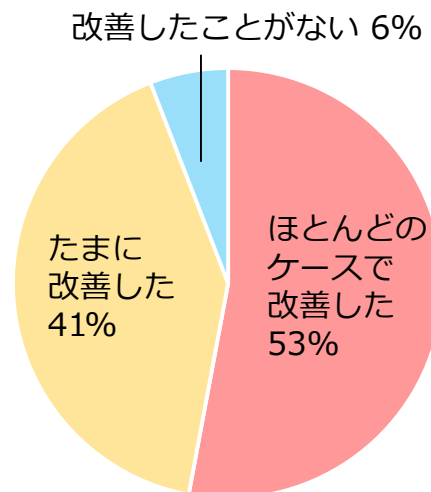
# 誘導体化法に期待すること

Q41 誘導体化を検討する一番の理由は何ですか？



その他：揮発性のものを不揮発性に变化させる

Q42 誘導体化法により改善したケースはありますか？

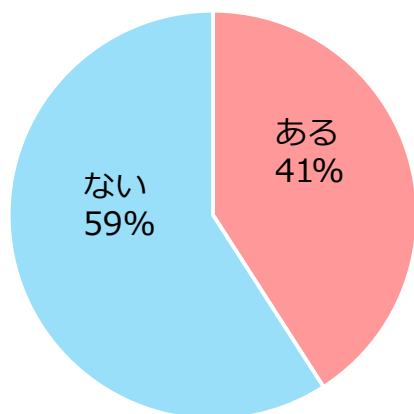


- ✓ 誘導体化を検討する理由は【感度の改善】 【保持・分離の改善】が多くを占めた.
- ✓ 90%以上の方が【ほとんどのケースで改善した】 【たまに改善した】を選択した.

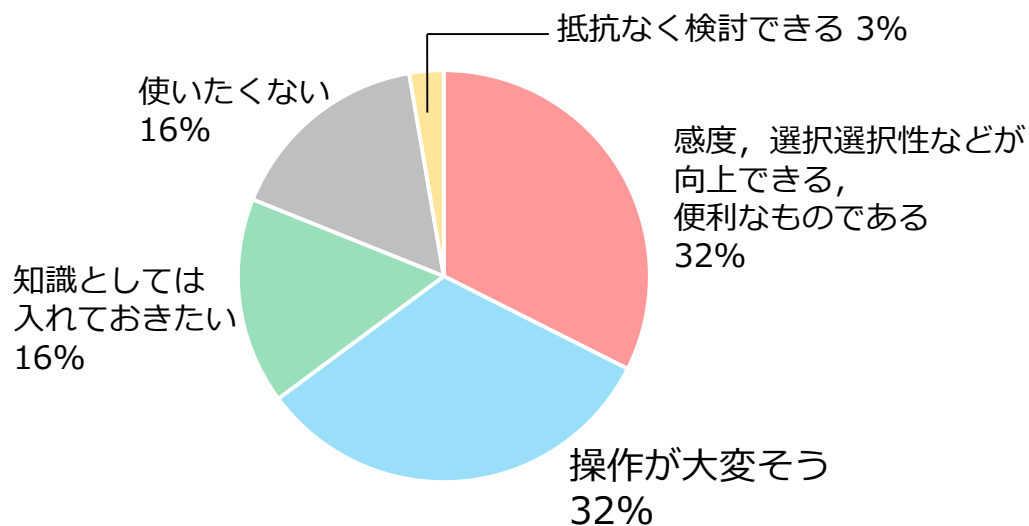
# 誘導体化法の経験や印象

問題が改善されるという大きなメリットがある一方・・・

Q40 超低分子測定時に、  
測定対象の誘導体化を  
行った経験はありますか？



Q43 誘導体化への一番の印象を  
教えてください。



✓経験がない方が60%近くいた。

✓ネガティブ（操作が大変そう、使いたくない）な印象を持っている方も50%近くいた。

# 誘導体化法の検討

- 必要な反応試薬や反応条件の設定はどうするか？
- 誘導体化効率にバラつきはないか？
- バラつきを補正するための安定同位体は入手可能か？
- 安定性（反応前および反応後）に問題はないか？
- 過剰試薬（反応試薬）反応残留をどのように取り除くか？
- 意図しない物質の誘導体化（夾雑物の増加）が存在するか？
- 誘導体化法と非誘導体化法で測定値は同等であるか？



検討項目が多くなる



# 誘導体化法の検討

## □ 試薬

- ・ 誘導体化試薬を必要に応じて購入する必要がある
- ・ 反応試薬によっては、取り扱いに注意が必要なものも含まれる

## □ 操作

- ・ 反応試薬が用時調製の場合、手間が増える
- ・ 反応試薬の添加や反応時間が必要になり操作が煩雑になる



検討項目の多さと併せて負担が増えることがデメリット

# 誘導体化法の検討時の注意点

- **誘導体化反応は禁水であるか？**

極性が高い化合物の場合、溶媒に水を使用することがあるが、誘導体化反応が禁水であると反応が進まなくなる

- **誘導体化反応におけるpHは問題ないか？**

標準原液や標準溶液に酸性もしくは塩基性溶媒を使用している場合、誘導体化反応の条件によっては反応が進まなくなる

- **対象化合物に誘導体化のターゲットとなる官能基がいくつ付いているか？**

複数の官能基が全て置換される場合もあれば、ひとつしか置換されないケースもあるため、MSの最適化を行う際は全てのパターンについて確認する必要がある

# 誘導体化法のメリット・デメリット

## メリット

- ・ 感度の向上が期待できる
- ・ 選択性や分離が向上することが望まれる

## デメリット

- ・ 誘導体化率のバラつき等、検討項目が多くなる
- ・ 反応試薬の取り扱いに注意するケースもある
- ・ 操作が煩雑になる

**閲覧いただきありがとうございました。**

**ご意見，ご質問がある方は，以下のメールでも受け付けております。**

**DG2021-52**

**横井 宏之(大塚製薬(株))**

**yokoi.hiroyuki@otsuka.jp**

**頂いたご質問については，メンバーで議論し，回答させていただきます。**