

DG2014-06 分析に活かす「失敗学」

"The Study of Failure" in analytical studies

青山 昭則¹、五十嵐 春江²、齊藤 久美子³、川端 光彦⁴、 匹田 久美子⁵、山田 直人⁶、落合 尚子⁷、細川 裕矢⁸

科研製薬株式会社¹、グラクソ・スミスクライン株式会社²、株式会社住化分析センター³、株式会社新日本科学⁴、田辺三菱製薬株式会社⁵、日本たばこ産業株式会社⁶、大日本住友製薬株式会社⁷、小野薬品工業株式会社⁸

Akinori Aoyama¹, Harue Igarashi², Kumiko Saito³, Mitsuhiko Kawabata⁴, Kumiko Hikida⁵, Naohito Yamada⁶, Shoko Ochiai⁷, Yuya Hosokawa⁸

¹Kaken Pharmaceutical Co., Ltd., ²GlaxoSmithKline K.K., ³Sumika Chemical Analysis Service, Ltd., ⁴Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., ⁵Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, ⁶Japan Tobacco Inc., ⁷Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd., ⁸Ono Pharmaceutical Co.,Ltd.





- DG2014-06の目的 The purpose of this discussion group
 - バイオアナリストの失敗を集約し、「失敗学」の観点から、「失敗しないための知識」をバイオアナリストに提供及び共有する。 To share the examples of failure with bioanalysts and to provide the "Knowledge to prevent failure" in bioanalysis.
 - **Discussionの範囲:低分子のLC/MS分析** Discussion: In the small-molecule LC/MS analysis.
- ・トピック Topics
 - 「失敗事例」の紹介: 1. 試料調製、2. 前処理、3. 分離、4. 検出、5. その他(機器、器具等)
 - 「失敗」の原因と推奨すべき解決策について
 - Classified all of the "Failure": 1. Sample preparation, 2. Sample processing, 3.
 Separation, 4. Detection, 5. Others (analytical equipment, test materials, etc.)
 - Discussion and recommendation of the "Knowledge to prevent failure".



IBF 活動內容 Our Activities

- ンメンバーの募集と決定 Recruitment of members
 - 16 May 2014: 募集開始 from 133 DG supporters , by e-mail
 - 03 Jul 2014: 8名の応募者で確定 8 members
- ➤ Kick off Meeting: 20 Aug 2014 @BMAS2014 (Face to Face)
- ➤ Web Survey: 11-21 Nov 2014 Thanks for over 100 answers! 100件以上のご回答をいただきました。 ご協力ありがとうございました。
- ➤ Discussion: eメール及び毎月2回のWeb会議で議論

By e-mail and Web meeting every 2 weeks

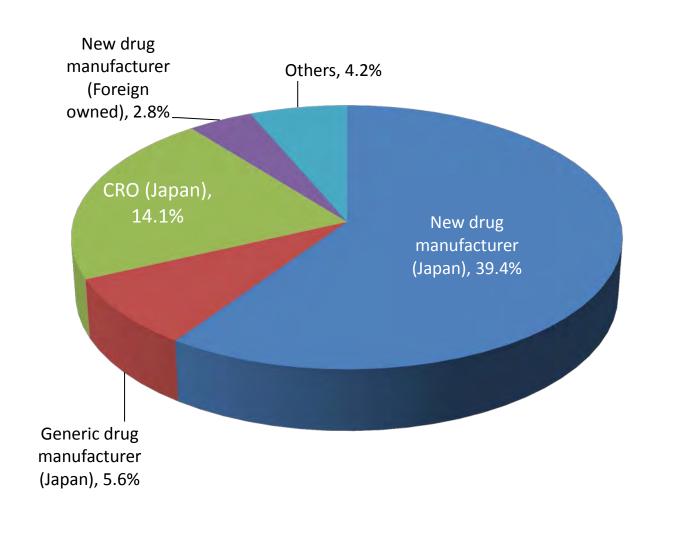


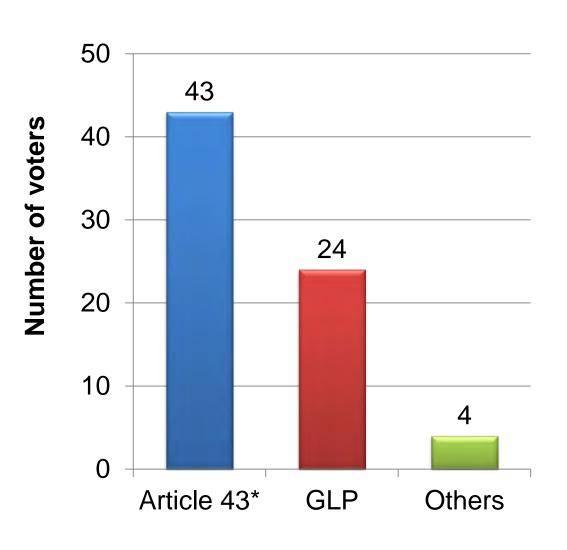


国各者背景 Background of Responders

Q1. あなたの所属についてお聞か せください。

Q2. 基本的に従っている規制要件 は何ですか?(複数回答可)





*The reliability standard for application materials in Japan.

Total number of valid voters: 47



チェックポイント! — 試料調製 Check point – Sample Preparation –

試料調製 前処理 分離 検出



試料調製に使用するピペット



コンタミネーション



標準溶液中安定性

- 保存条件
- ・ 溶媒の影響



調製試料の均一性

• 吸着

·混合不足





試料調製に使用するピペット

Pipette used for the preparation of spiked sample

事例(Case):

・エアディスプレイスメント方式のピペットでメタノール溶液をサンプリングしたところ、値がばらついた。

Great variability was observed in determined concentrations when methanol solution was dispended using an air displacement pipette.

原因 (Cause):

・エアディスプレイスメント方式のピペットで有機溶媒を サンプリングする場合は、ピペットチップ内での溶媒の蒸発等による サンプリング量のばらつき、液だれの可能性がある。

Sampling volume variability might be observed when organic solvent is dispensed by an air displacement pipette due to evaporation of solvent within the pipette tip.

解決策 (Solution):

ポジティブディスプレイスメント方式のピペットの使用
 Use positive displacement pipette



Comment from DG:

- エアディスプレイスメント方式ピペットでは、有機溶媒の蒸発により空気層の圧力が急激に変化し液だれの 原因になります。使用する場合は数回の洗いにより蒸気圧を一定にしてからピペッティングを。
- ・試料調製法、溶液調製法に関する詳細はDG2013-01、 02の発表資料を参考にしてください。 ポジティブディスプレイメント方式のピペットが推奨されています。

Recommend to use positive displacement pipette. Please refer to the presentation slides of DG2013-01 and 02 at 5th JBF symposium.

JBF

コンタミネーション - 1/2

Contamination

事例(Case):

• コンタミネーション!

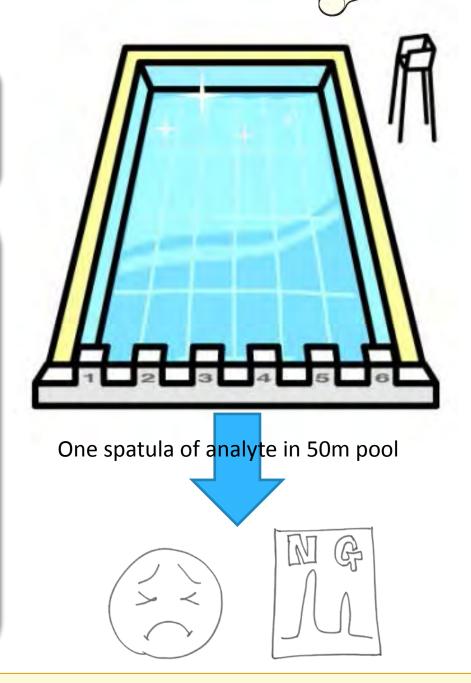
Interfering peaks in blank sample and/or solvent sample!

原因→解決策(Cause → Solution):

様々なステップにおいてコンタミネーションのリスクが

- •標準溶液調製時 (Stock solution preparation)
 - → 標準物質取り扱い場所を限定(部屋を分ける)
 - → 標準物質取り扱いは別行程とする
 - → 標準物質取り扱い後は手袋を交換
 - → 白衣への付着にも注意(白衣を着替える)(ディスポ保護服も有効 from DG)
 - → 標準溶液調製にはディスポ容器を
- 添加サンプル調製時 (Spiked sample preparation)
 - → 使用毎にピペットを拭く(逆にコンタミしないよう注意 from DG)
 - → チップの都度交換を忘れずに

Contamination risks at every steps of bioanalysis



Comment from DG:

- ・被験物質取り扱い時はコンタミネーションのリスクが高い。注意の上に注意を!
- ・標準物質取り扱い(原液調製)の場所と保護具(白衣を含む)は、他の作業と分けることを推奨します。

Be careful to use the reference materials because there is higher risk of a severe contamination.

Place ad clothing for handing standard materials should be fully separated from other process of bioanalysis.



標準溶液の安定性

Stability of the Standard Solutions

事例(Case):

・試料調製において、検討時は問題無かったが、バリデー ション時に安定性の基準を満たさなかった。

Stability of the standard solutions did not meet the criteria in a validation study although there were no problems in the preliminary study

原因 (Cause):

検討時とバリデーション時では室温が異なり、また、希 釈溶媒の変更も行った。

Room temperature was different between the validation study and preliminary study.

解決策 (Solution):

保存温度を変更した。

Storage temperature was changed.



Comment from DG:

・温度、溶媒の種類、pHなどの変化は化合物の溶解度及び安定性に大きく影響するため一定に保つことが大切で ある。

Since the solubility and stability of compounds are affected by changing the temperature, solvent and pH, these conditions should be kept constant.





用時調製する標準溶液の短期安定性

Should we test the bench top stability of standard solution which is prepared just before use?

事例(Case):

・用時調製の標準溶液の短期保存安定性を評価しなかったことを、部内QCで指摘された。

Lack of bench top stability test of standard solution was pointed out at quality control check of a validation study report for the solution which is prepared just before use.

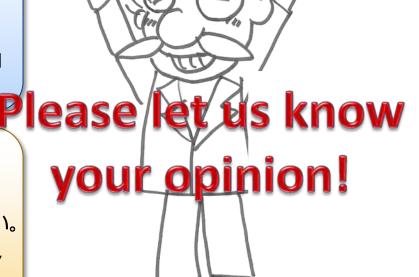


• 用時調製の標準溶液について、短期室温安定性は必要と思いますか? ex. (安定性を確認した)原液からの希釈後、X時間までの使用ならば室温保存安定性は要らない。

Could you let us know your opinion? What situation should we test bench top stability for the standard solution which is prepared just before use?



さまざまなご意見をいただければ幸いです。意見を記入したポストイットを貼ってください。





用時調製する標準溶液の短期安定性

Should we test the bench top stability of standard solution which is prepared just before use?

Question to quests:調製から使用までの放置時間がどの時間を超えると、短期安定性が必要と感じますか? When do you think we should test it? (支持する内容にシール又はコメントを入れたポストイットを貼ってください)

~2 hr or 時間によらず必要 Need even if it's used within 2hr 2 ~4 hr以上で必要 Need if it is stored for >2hr < 4 hr以上で必要 Need if it is stored for >4hr 同一日中に使用するなら 必要ない Unnecessary if used within a day

22ポイント

コメント

Stock solution

2ポイント

26ポイント

22ポイント

コメント

Working solution



事例(Case):

・ラット及びイヌでバリデートされた分析法を、サルに適用したところ、安定性用QC試料の測定値が低下し、ばらつきも大きかった。

Stability of QC samples did not meet the criteria when the validated analytical method under the other animal was adapted to the monkey.

原因 (Cause):

・分析対象化合物の脂溶性が高く,血漿中では主にカイロミクオンに分布しているが,凍結融解によりカイロミクロンが分離・分解して化合物が容器に吸着した。そのため,均一にサンプリングができなかった。また,再現性試験においてはQC試料を用時調製していたため,発見できなかった。

Analyte was mainly distributed in the chylomicron because of lipophilicity. However, since the chylomicron was degraded for the freeze-thaw process, analyte was adsorbed on a container.

解決策 (Solution):

・1測定分ごとに血漿を容器に分注して保存し、保存容器中で前処理を実施することで解決した。

Sample was stored in a container according to each assay and pre-treated in the storage container



Comment from DG:

・特に脂質関連物質は、血漿等では不均一に成りですい。スピンダウン程度の操作でも上層に分離する場合がある。また、試料中の脂質の量は種差や試料採取時の条件(絶食・非絶食)においても変化するため注意が必要である。

Especially a lipid-related substance would become a heterogeneously-distributed state easily in plasma. Moreover, the amount of lipid is changed under the condition of the sampling. (ex. fast / fed)



事例(Case):

• QC サンプル測定値の精度真度の成績が悪い。

Great variability in the determined concentrations of QC samples



原因 (Cause):

調製時の混和をボルテックスのみで行ったため、添加試料の上部・下部で濃度むらが
 Lack of homogeneity because of the insufficient mixing only with a vortex mixer

解決策 (Solution):

• ボルテックスの他に転倒混和を実施

Add inversion

Comment from DG:

- ・均一なQC sampleを調製できる方法かどうか、事前の確認が必要です。
- ・ 測定確立時に調製されたQCサンプルの上部・中部・下部をサンプリングしてそれぞれの濃度を測定し、 均一性を確認することも有意義だと思います。
- ・転倒混和を加えることを推奨します。
- ・試料調製法に関する詳細としてDG2013-01の発表資料も参考にしてください。

It is better to check QC sample preparation procedure in terms of homogeneity at an early stage of method development. It is effective to prepare QC samples with vortex mix and inversion.

Please refer to the presentation slides of DG2013-01 at 5th JBF symposium.



標準溶液の安定性

Stability of the Standard Solutions

事例(Case):

• 2施設においてQC試料の凍結保存安定性を確認したところ, 1施設で安定性の基準を満たさず, プラス側に外れた。なお, 検量線を作成する標準溶液は, エステル構造を持つ化合物に対し, アルコール系溶媒で調製していた。

Storage stability of the ester compound in alcohol solution did not meet the criteria in one facility out of two test facilities

原因 (Cause):

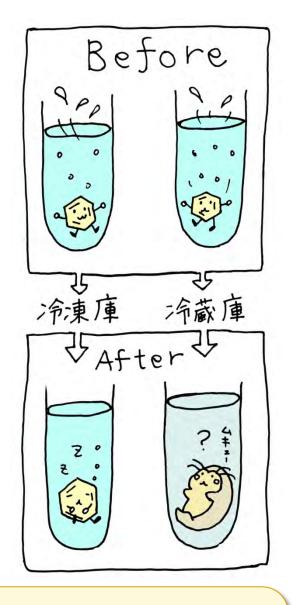
• 施設間で標準溶液の保存条件が異なっていた(冷蔵 vs 冷凍)。そのため、冷蔵保存においては化合物がエステル交換を起こし、検量線の傾きに異常が生じたため、QC試料の正確な値が得られなかった。

Ester exchange reaction occurred by alcohol solution since the storage condition (freezer vs. refrigerator) was different between two test facilities.

解決策 (Solution):

標準溶液の調製溶媒をアセトニトリルに変更し、さらに凍結保存に統一した。

The solvent was changed into acetonitrile. Moreover the standard solutions were stored in a freezer.



Comment from DG:

エステル交換は酸性・塩基性のどちらの条件でも起こりうるため、溶媒の選択には十分注意が必要である。 酸性:カルボニルの求電子性増加、塩基性:アルコールの求核性増加

Ester exchange reaction would occur by alcohol solution under both of acidic and basic conditions. Acidic conditions: increasing electrophilicity of carbonyl Basic conditions: increasing nucleophilicity of alcohol



チェックポイント! — 前処理 Check point – Sample Pretreatment –

試料調製

前処理

分離

検出



測定試料の均一性

• 撹拌不足



前処理中の安定性

- エステル化 ・酸化還元 •人種差
- ・グルクロン酸抱合体 -加水分解
- ・熱による分解



固相抽出

・つまり -素通り ・ ロット間差



除タンパク

・有機溶媒の除タンパク効率



抽出溶媒の添加タイミングと回収率



十分な事前検討

6th JBF Symposium DG2014-06





試料の撹拌不足(複数事例)

Insufficient stirring of the sample (multiple cases)

いい加減な操作はミスのもと!

事例(Case):

- 他の個体とは明らかに異なる時間ー濃度曲線が得られた。
- 有機溶媒添加血漿使用時に再現性が得られない(ISRを失敗)。
- 担当者を変更した際に再現性が得られない。

Reproducibility did not meet the criteria.

原因(Cause):

- 十分な撹拌を行わずに作業を進めてしまった。
- ・凍結時に(水分から先に凍り始めるため)溶液が不均一になり、 それとともに化合物の存在も不均一になっていた。

The sample preparation was performed without enough stirring.

解決策 (Solution):

- 十分な融解、撹拌をした後に前処理を行った。
- 有機溶媒添加血漿は、凍結時に(水分から先に凍り始める)溶液が不均一になるため試料の撹拌を徹底した。

The sample preparation was performed after having enough thaw and stirring.



Comment from DG:

- 撹拌不足による再現性が確認できない事例は多数存在します。そのため、溶媒への溶解性を把握し、十分な融解、撹拌及び転倒混和を心掛けましょう。
- 担当者が変更になる場合、物性及び前処理の注意点を必ず伝えましょう。
- 十分な撹拌操作が必要な際は、試験計画書に記載しましょう。

There are many examples about the insufficient stirring. Please understand solubility, dissolve it enough and stir enough. When the main person changes, let's convey a physical property and analytical procedure



JBT 予期せぬ反応1/2:エステル化

Unexpected reaction (in sample pretreatment): Esterification

事例(Case):

・エステル結合を有する未変化体とエステル結合が加水分解した 代謝物の同時測定法において、前処理中に代謝物が未変化体へ変 換した。

In the simultaneous measurement method of an unchanged drug having ester-bond and its hydrolyzed metabolites, the metabolites changed to unchanged drug during the sample preparation.



・アルコール+ギ酸の混液による抽出後に濃縮乾固 ⇒代謝物のカルボン酸部分とアルコールが反応した。

The samples were evaporated after the extraction with alcohol and formic acid.

⇒Carboxylic acid of metabolite was reacted with alcohol.

解決策 (Solution):

抽出溶媒をアルコールのみとした。

Changed the extractant only to the alcohol.

カルボン酸と アルコールは 酸触媒により エステル化が おきるのか!

Comment from DG:

• 不要な検証及び実験を省くために、使用する溶媒との反応性や酸化還元の影響を受けやすいか等の情報を事前に把握することを推奨します。

We recommend that you should understand property of compound beforehand.





予期せぬ反応2/2:酸化還元

Unexpected reaction : Oxidation and Reduction

事例(Case):

ある日に前処理(遠心濃縮器を使用)したすべての試料で 分析対象物のピークが確認できなかった。

The peaks of the analyte were not detected in all samples.

原因 (Cause):

・ ギ酸や過酸化水素が含まれていた別試験の試料と共に遠心 濃縮器を使用したため、試料が酸化された。

Because of using evaporator with other examination samples that were included formic acid and hydrogen peroxide, all samples were oxidized.

解決策 (Solution):

・特殊な試薬を用いている試料と同時に遠心濃縮機を使用しない。

Avoid using an evaporator at the same time with other samples using the special reagents.

あらゆるところ にコンタミのリ スクが潜んでい るから清潔に!



Comment from DG:

試験管レベルだけでなく、環境によるコンタミのリスクを考慮した上で実験を行いましょう。

We recommend that you should experiment after considering a risk of contamination from environment.





マトリックス中での安定性

Stability in a Matrix

事例(Case):

・海外のCROで測定を実施したところ、プロドラッグが 分析中に活性代謝物に変換した。

Prodrug changed into the active metabolite during the analysis (in the CRO abroad).

原因 (Cause):

・ 人種差による酵素活性の違い。

Racial differences in enzyme activity.

解決策 (Solution):

・酵素活性の違いを検討した。

Racial differences in enzyme activity was confirmed.



Comment from DG:

・プロドラッグは生体内で容易に分解するように、不安定な構造を有して合成されている。酵素活性の違いによる分解に関しては、種差、人種差、系統差、マトリックス間差等を事前に十分検討したうえで分析法を設定する。

We should establish an analytical method considering the species, racial, strain and matrix differences in advance.



事例(Case):

・実測定終了後に,詳細な代謝物検索を実施したところ, 非常に不安定なアシルグルクロナイドが確認され,前処理 により脱抱合している可能性が示唆された。

After the completion of the assays, it was suggested that the carboxylic acid was produced from the acyl-glucuronide during a pretreatment.



原因 (Cause):

・前処理において脱グルクロナイドに対するケアを行っていなかった。また、前処理により生成するアーティファクトと代謝物を見誤った。

Stabilizing the acyl-glucuronide was not done in the pre-treatment method because the existence of the acyl-glucuronide was not taken into account in the preliminary study.

解決策(Solution):

• 前処理法を変更することで解決した。

The pre-treatment method was changed to stabilize the acyl-glucuronide.

Comment from DG:

・カルボン酸化合物はアシルグルクロナイドの生成・分解・転移等がある,という事を前提として考え,早期の 段階で情報収集を行い,対策をした分析法の設定をする。

If the analytes contain carboxylic acid, we should establish an analytical method considering the production, degradation and migration of the acyl-glucuronide in advance.



JBF 不安定な代謝物1/2:未変化体への加水分解

Decomposition of unstable metabolites into unchanged drug

事例(Case):

- ・不安定な代謝物が存在することがバリデーション試験直前に判明した。
- ・血漿中濃度推移がおかしい。
- 再測定値が初回値と大きく異なる。

The results of reanalysis were greatly different from the initial analytical values.

原因 (Cause):

・ 代謝物 (グルクロン酸抱合体等) の分解により、未変化体 の定量値に大きく影響。

The metabolites changed into unchanged drug by the degradation.

解決策(Solution):

• 前処理方法を変更(pH調整)し、不安定な代謝物が安定 化する条件にした。

Unstable metabolite was stabilized by pH adjustment.

Other:-COOH,-NH2,-SH



Influence of High or Low pH

Comment from DG:

- ・高pH又は低pHにより、抱合体が未変化体へ変換したと考えられます。
- ・ 事前に代謝物情報を把握した上で分析法を構築しましょう。
- ・バリデーション試験開始前に実試料を使用した検討を推奨します。

We considered that the conjugation body was degraded to unchanged drug for high pH or low pH. We recommend that you should evaluate an analytical method using the incurred samples before an initiation of validation study.



不安定な代謝物2/2:加熱による分解

Decomposition of unstable metabolites by heating process

事例(Case):

• 血漿中の代謝物を測定したところ、代謝物が前処理中に分解した。

In the analysis of metabolites, the metabolites changed to unchanged drug and underestimated.

原因 (Cause):

• 前処理で用いた窒素気流による有機溶媒留去が予想外にも代謝物に大きな影響(分解)をもたらした。

The metabolites degraded by the evaporation using nitrogen.

解決策 (Solution):

・前処理段階では窒素気流から遠心濃縮システムに変更し、温度を 下げ、かつ外気との接触を断つことにより分解が押さえられること を確認し、これにより分析方法を変更した。

Analytical method was changed from evaporation using nitrogen to centrifugal evaporation system.



Comment from DG:

・窒素気流による溶媒留去は、酸化の原因である酸素との接触を断つことが可能です。よって、この事例に関しては、窒素気流が原因で分解したというより、熱が原因で分解したと推測します。

We do not understand the real intention.

But we guess that the cause of degradation was heat



固相抽出カラムのつまり

Clogging of solid phase extraction cartridge

事例(Case):

血漿サンプルをアプライした際につまりが生じた。

Clogging of solid phase extraction cartridge occurred at the loading of plasma sample

原因 (Cause):

血漿中の固形物 (フィブリン) が原因か?
 Fibrins might be the cause.

解決策 (Solution):

・前処理前に血漿サンプルを遠心分離し沈殿物を除去してから測定

Plasma sample should be centrifuged before pretreatment.



Comment from DG:

- ・血漿サンプルを前処理前に遠心分離する操作は、広く使用されています。
- ・前処理前の遠心分離についてはDG2013-01でも議論されていますので、その発表資料も参考にしてください。
- ただし、被験物質が固形物と一緒に除去されないかは予め確認しておくことが望ましいと思われます。

Sample centrifugation before pretreatment is the popular procedure.

Please refer to the presentation slides of DG2013-01at 5th JBF symposium.

However it is also desirable to confirm if the centrifugation dose not affect to the analyte recovery in advance.





固相抽出法における問題

Failure of solid phase extraction to retain analyte at sample load step

事例(Case):

• メーカー推奨の方法を適用した際に、化合物がロード時に素通りした。 Analyte of interest was not retained to SPE cartridge at sample load step.

原因 (Cause):

• 固相カートリッジに充てんされた官能基より血漿中蛋白との親和性が高い。 Higher affinity to plasma protein than that to the sorbents of SPE cartridge

解決策 (Solution):

・有機溶媒で除タンパクした溶液を固相抽出 (アプライ時の溶媒に適度な有機溶媒を加えることで回避できる可能性も)

Add protein precipitation step before SPE Add some organic solvent to loading sample



Comment from DG:

- 固相抽出の回収率が低く問題がある場合、各stepの溶出液を測定して原因を突き止めることは原因解明and測定法改良に有用です。
- 固相抽出による測定法確立時には、回収率に問題ないことを確認するまでは、全stepの溶出液を廃棄せずに保存しておくことをお勧めします。

It could be good to collect every solution eluted at each step until the analysis method is confirmed to be successful at an early stage of method development. When the recovery of analyte seems very low, we can confirm where it is eluted.



固相抽出カラムのロット間差

Inter-Lot difference of SPE cartridges

事例(Case):

・固相抽出法を用いる測定で、ある日いきなり回収率が著しく低下した。

The extraction recovery suddenly decreased during routine analysis

原因 (Cause):

- 製品ではなく充填剤のロット番号が別のものであった。
 - → メーカーに問い合わせたところ、欠陥ロットであった。
- 酸性化合物に塩基性官能基を持つ化合物

The same Lot No. of products (SPE cartridge), but different Lot No. of cartridge filler → The Lot No. of cartridge filter turned out to be a defective! The analyte having both basic and acidic functional group (Acidic compound)

解決策 (Solution):

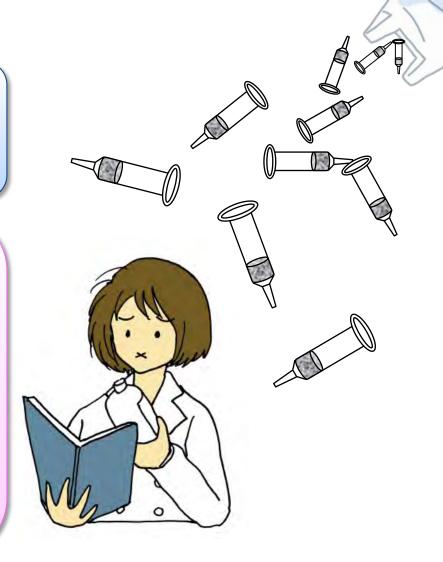
抽出カラムの交換

Change the Extraction column

Comment from DG:

- ・固相カラムのロット番号には様々な識別がある。製品ロット番号が同じでも充填剤のロット番号が違うもの、 あるいは製品ロット番号が違っても充填剤のロット番号は同じものも存在する。
- それまで問題なく測定(回収)できていたものに問題が起こった場合は、カラムのロットを細かく見比べる ことで解決することも?

There are the same Lot No. of products but different Lot No. of cartridge filler. In addition, there actually are the defective Lot. In the sudden problem regarding SPE, you could check not only the Lot No. of extraction cartridge itself but also that of cartridge filler. Moreover, early enquiry to the manufacture could be very efficient.





除タンパク抽出法における問題

Extraction efficiency by protein precipitation method

事例(Case):

・除タンパク後の注入液の濁りを見過ごしてLC-MS/MSに注入していたところ、 カラムがすぐに劣化してしまった。またはカラム圧の上昇がみられた。

The column was rapidly deteriorated and the column pressure increased when cloudy sample solutions were injected.

原因 (Cause):

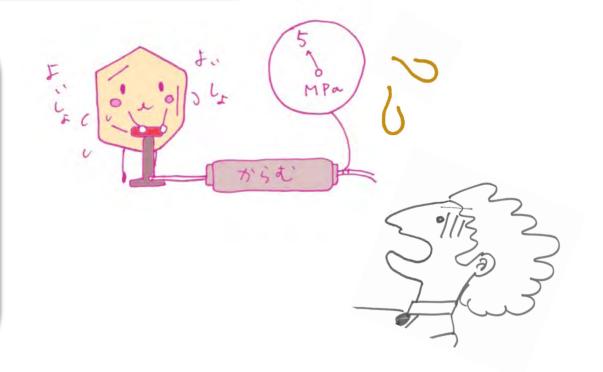
除タンパク効率が低かった。

Low protein precipitation efficiency

解決策 (Solution):

- 除タンパク効率の高い方法を使用 --- 溶媒の選択、温度
- 除タンパク後にフィルター濾過を実施
- プレカラムの利用

Choice of organic solvent, and use of filtration and pre-column to enable higher efficiency of protein precipitation.



Comment from DG:

- よく使用される溶媒の除タンパク効率に注目し、十分な量を添加しましょう → 次頁に文献情報を示します
- ・ 測定する際は、常にカラム圧の変化に注目

Chose organic solvent and its mixing ratio for the protein precipitation with careful consideration of its efficiency. Pay attention to daily column pressure.



除タンパク抽出法における問題 Extraction efficiency by protein precipitation method

Table 3 Comparison of protein precipitation efficiency for various protein precipitants in mouse plasma

Precipitants		% Protein precipitation efficiency ^a Ratio of precipitant to plasma						
		0.5:1	1:1	1.5:1	2:1	2.5:1	3:1	4:1
Acids	TCA	97.2	96.2	96.4	96.4	96.6	96.7	97.3
	%RSD (n=3)	7.91	20.60	3.62	7.53	5.51	6.16	11.33
	m-Phosphoric acid %RSD	Could not be determined due to cloudy supernatant						
Metal ions	Zinc sulphate	20.9	97.8	98.4	97.7	98.4	>99	>99
	%RSD (n=3)	9.22	9.59	20.36	13.50	25.8	_b	_ ^b
Organic	ACN	1.7	92.8	97.2	97.8	98.3	98.4	98.7
	%RSD (n=3)	2.54	2.17	5.01	2.39	4.74	5.19	0.27
	EtOH	31.2	58.0	78.4	92.3	95.4	96.4	97.8
	%RSD(n=3)	2.84	6.80	3.44	3.96	3.70	4.75	4.25
	MeOH	10.1	56.8	82.0	93.5	95.6	96.8	96.3
	%RSD (n=3)	9.55	8.29	5.93	2.68	6.84	4.91	4.32
Salts	Ammonium sulphate	10.8	38.0	77.0	84.7	92.6	97.0	94.7
	%RSD(n=3)	1.257	1.23	1.30	25.07	31.32	2.41	24.98

^a % Protein precipitation efficiency=([total plasma protein-protein remaining in supernatant]/total plasma protein)×100.

C. Polson et al. / J. Chromatogr. B 785 (2003) 263-275



^b Concentration of protein in supernatant below quantification limit.



実サンプル濃度の過小評価 Test sample accuracy affected by spiked sample preparation (the case of LLE)

事例(Case):

ブランクマトリックスに標準溶液と抽出溶媒を同時に添加して検量線サンプルを 調製(標準物質添加と液液抽出を同時に実施)したところ、回収率が実サンプルと 異なり、実サンプルの濃度を過小評価した。

Test sample concentration was underestimated due to the different recovery between standard samples and test samples (the case of LLE)

In this case, standard samples were prepared by adding extraction solvent and standard solution at the same time.

原因 (Cause):

- ・実サンプルと検量線サンプルからの回収率の違い
- 実サンプルからの回収率の低さ
 - Lower recovery of test samples, Higher recovery of standard samples (no extraction but just dilution)

解決策 (Solution):

- ・実サンプルからの回収率も高い溶媒を選択
- ・検量線サンプルは、ごく少量の標準溶液を抽出溶媒とは別に添加して調製
 - Develop extraction method to enable sufficiently-high recovery from test samples
 - Prepare standard samples by spiking standard solution separately to extraction solvent

Comment from DG:

- ・検量線サンプルもQCサンプルと同じように、できる限り実サンプルと同一な前処理(抽出)を施すのが理想的 です。抽出溶媒=標準溶液として、検量線試料調製と抽出を同時に実施する前処理はお勧めしません。
- ・試料調製法に関する詳細は、DG2013-01の発表資料も参考にしてください。

Extraction from standard samples should mimic well the process of test samples. Please refer to the presentation slides of DG2013-01 at this symposium.

Std. in extraction organic solvent





BT 不十分な前処理法検討による分析不成立

Failure of a analytical run due to insufficient investigation of sample clean-up

事例(Case):

• ピーク形状がよくないまま実サンプル分析に突入したところ、検量線、QCのクライテリアから外れやすい。

Unsatisfactory peak shape caused a variability of the determined concentrations and a batch failure.

原因 (Cause):

- 前処理法、カラム分離条件が十分でなくピークエリアにばらつきが出る。
- 内因性の夾雑ピークが存在する。
 Insufficient sample clean-up and column separation

解決策 (Solution):

- よりクリーンな前処理後サンプル調製(除タンパク→液液抽出: Change from PPT to LLE)
- •より分離のよいLC条件

Modify extraction method to get highly clean-upped sample, Better resolution of chromatography



Comment from DG:

実サンプル分析を必要以上に急ぐために失敗をしてしまった例と思います。 急がば回れ。
 More haste, less speed. More haste, more failure



チェックポイント! 一 分離 Check point - Separation-

試料調製 前処理 検出 分離 移動相の混合 分析カラム ・ロット間差 ・新品カラム •平衡化時間 •劣化



移動相条件

・キャリーオーバー ・移動相の保存期間



誘導体化



十分な分離

•代謝物 •異性体 - 類縁体





事例(Case):

・分離条件検討時に水系100%、有機溶媒系100%をHPLC ポンプを用いて2液混合したところ、保持時間が安定しな かった。

Retention time was not stable when 2 liquid mixed 100% of water and 100% of organic solvent using each HPLC pump.

原因 (Cause):

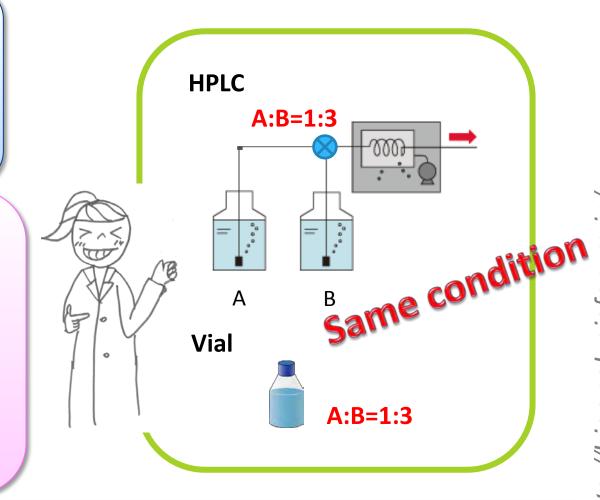
・ミキシングできていなかった。

Could not mix.

解決策(Solution):

• 移動相同士がなじむように、溶媒をお互いに少しずつ混ぜるようにした。また、注入サンプルの溶媒組成比と移動相の溶媒組成比を出来るだけ同じになるようにした。

The mobile phases were adapted. Condition of injection samples and mobile phase were prepared to be similar solvent composition ratio.



Comment from DG:

- ・装置によるのかもしれませんが、水系100%、有機溶媒系100%でも混合できると考えられます。 したがって、以下の2点が原因として考えられます。
 - 1.平衡化の時間が短い 2.注入サンプルの溶媒組成比が初期移動相条件が異なる
- ・不安定な保持時間、ピーク形状不良を招くため、 注入サンプルの溶媒組成比は初期移動相に近い条件に設定しましょう。

We think that HPLC pumps can mix 100% of water and 100% of organic solvent.

1. Time of equilibrating is short 2. Solvent composition ratio of injection samples is different from composition ratio of mobile phase. Prepare the injection samples which is similar with the solvent composition ratio of the initial mobile phase.



移動相の混合不良2/2

Mixed failure of mobile phase 2/2

事例(Case):

・ゴミが混入したらしく、移動相のミキシングカラムに背圧がかかるようになったのでミキシングカラムのみ新品に交換した。その結果、バリデーション時と保持時間が変わってしまった(保持時間3分→3.3分ぐらい)。

Since the back pressure increased on the mixing column of the mobile phase, the mixing column was changed into new one.

(Retention time 3 min - 3.3 min)

原因 (Cause):

解決策(Solution):

その後、変わった保持時間でずっと安定していたため、そのまま 以降の分析を継続して実施した。

おそらく、バリデーション時にはミキシングカラムがつまりかかっ ていたためと推定。

Because it was stable, analysis was continued with changed retention time. A mixing column was assumed to be clogging up at the time of validation study.



Comment from DG:

・(移動相の)ミキシングカラムはグラジエントカーブを支配する重要な要因です。 測定する前に確認しましょう。

The mixing column is an important factor to influence gradient curve. Confirm it before measurement.





JBP 分析カラムのロット間差

Production Lot Differences of an Analytical Column

事例(Case):

ピークの分離が再現できなくなった。

Separation of the peak was not replicated.

原因 (Cause):

・LCカラムのロットを変更した。

A production Lot of the column was changed.

解決策(Solution):

- ①変更後のロットを買い占め、パーシャルバリデーションを実施した。
- ②複数のロットを集め、使用可能なロットを確保した。
- ③カラムメーカーを変更して再バリデーションを実施した。
- 1) Same production Lot of the columns were bought up.
- 2) An suitable production Lots of the column were selected from several production Lots of the column.
- 3) Change the manufacturer



Comment from DG:

•同一ロットを永久的に使用することは不可能なため、この解決法は根本的解決とはならない。消耗品の変更に も耐えられるような、堅牢性の高い分析法を設定することが望ましい。

It is impossible to use the same production Lot of column eternally. We should establish a robust analytical method which endure the change of production Lot.



新品カラム使用時の注意点

Precaution when using a new column

事例(Case):

・実測定を新品カラムで実施したところ保持時間が大きく延長した。

When a new column was used to measure the incurred samples, retention time of the analyte greatly extended.

原因(Cause)

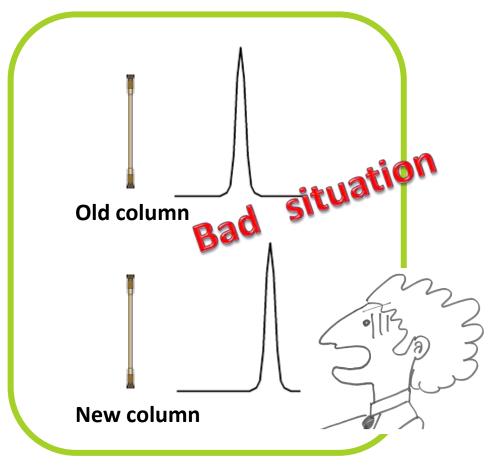
• 保持能力が低下したカラムでバリデートしてしまった。

Analytical method was validated using an old column which has decreased retention ability.

解決策 (Solution):

• ピーク形状(ピーク高さ)も大分違っていたためバリデーションで使用した古いカラムを使って実測定をやり通した。

Incurred samples were measured forcibly using an old column.



Comment from DG:

その後の試験のことを考慮すると、古いカラムに変更して実測定を実施することはおすすめしません。新品カラムによるピーク挙動を確認した上でバリデーション試験を実施しましょう。

We do not recommend that you switch to an old column and measure incurred samples. Let's perform a validation study after confirming the peak behavior by the new column.





HPLCカラムの不十分な平衡化

Insufficient equilibrant of HPLC column

事例(Case):

・分析カラムの検討において、それぞれのカラムの平衡化 時間を十分にとらずに次々とカラムを取り替えてしまい、 結局正しい検討結果が得られず、時間を無駄にした。

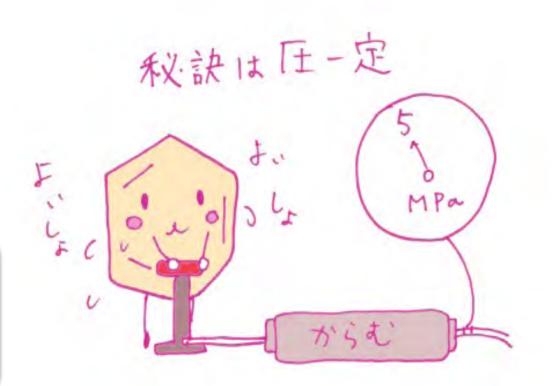
When make a selection of column, columns were exchanged without taking the enough time to equilibrate of each column. A correct examination result was not provided and it was a waste of time after all.



解決策 (Solution):

• 平衡化の時間を十分にとる。

The time of equilibration was taken enough.



Comment from DG:

・カラム、移動相の種類により平衡化の時間は変わってきます。10分程度で平衡化できる条件もあれば、半日かかる条件も存在します。安定した圧力、ベースライン、保持時間の再現性を確認した上でカラムの検討をしましょう。グラジエント分析の場合は、繰り返し分析による平衡化も有効な手段です。

The time of equilibration is different for the kind of mobile phases and columns.

You should evaluate the column after confirming the stable pressure, baseline and retention time reproducibility.





HPLCカラムに起因するピーク形状不良

Deformed peak shapes caused by HPLC column

事例(Case):

通常通り、実試料分析を行っていたところ・・

- ・ 測定対象物質のピークが分析中に徐々に割れ、途中からは完全に二つに分かれてしまった。
- 同じモニタリングイオンだが、カラムによってピークが分かれることがあった。(原因がわからない)

The main peak gradually divided during analysis. And then they completely divided. The main peak was divided for the cause of the different column.

原因 (Cause):

解決策 (Solution):

- ・カラムの劣化に加えて、プレカラムフィルターの劣化(目詰まり?)も原因だった。両方を新しいものにすることで解決した。
- ピークが分かれないカラムを使用した。

Deformed peak shapes caused by deterioration of column and pre-column. It was solved by exchanging new column.



Comment from DG:

- ピーク形状、保持時間、圧力変動の有無を毎日チェックしましょう。
- カラムの交換時期を把握することも推奨します。

About peak shape, retention time, pressure change or not, Let's check every day. We recommend that you understand the time for replacement of the column.



分析カラム内でのキャリーオーバー Carry-Over in an Analytical Column

事例(Case):

LCカラムでキャリーオーバーが発生した。

There was an outbreak of carry-over on the analytical column...

原因· 状況 (Cause / Situation):

- ・複数回サンプルを注入した。
- ・ある日突然。

Multiple injection One day suddenly

解決策 (Solution):

• 分析条件をグラジエントからアイソクラティックに変更 した。

A gradient condition was changed into the isocratic condition.



Comment from DG:

グラジエント分析においては、カラム内で極度に化合物が濃縮され溶出されない可能性がある(カラムからの) 回収率の低下)。

Sometimes, the compounds concentrated in the column may not be recovered from the column under the gradient conditions.



誘導体化で発生した問題点

Problem in derivatization

事例(Case):

・化合物をDiels-Alder反応を用いて誘導体化すると、2本のピークが出現するため、2本のピークをまとめて定量。この2本のピークは常に一定の割合(約1:3)で得られる。しかし、マウス血漿を用いた時に、この割合が変化した。

Analytical compound was derivatized by Diels-Alder reaction and detected as the two separated peaks. The peak intensity ratio of derivatives is always constant (about 1:3). However, this ratio was changed by using mouse plasma.

原因 (Cause):

・生体内の類縁化合物も同様に誘導化された。他の動物種でも様々な生体成分由来のピークが測定対象付近に存在していたが、マウスの血漿では測定対象の一つと偶然重なってしまった。

In mouse plasma, endogenous analog was also derivatized and its peak was overlapped with one of the peaks of interest.

解決策(Solution):

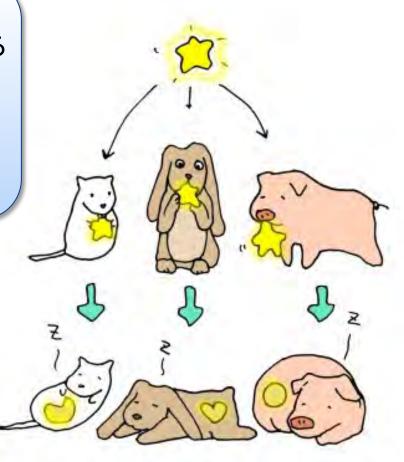
・分析法を変更。誘導化をやめ、LC条件も3倍くらいの時間をかけて類縁物質の分離をした。

Changed the analytical method.

Comment from DG:

・生体内の類縁化合物に関しては、種差や個体差が大きく同一の物質でも量比が大きく異なることがあります。 一種の動物マトリックスを用いて設定した分析法を、異なる種の分析に適用する際は、選択性の確認を十分に行い ましょう。

In endogenous analog, there are specific and individual difference. When one analytical method was used to different kind of matrix analysis, let's conduct selectivity confirmation enough.





• 未変化体と酸化代謝物の同時定量法を確立した際, 実サンプルのみ酸化代謝物のピークが割れる現象が認められた。

A split peak of the oxidative metabolites appeared in chromatogram in incurred sample of one animal species..

原因 (Cause):

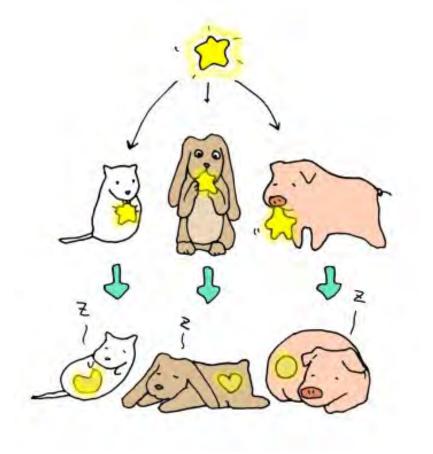
・酸化代謝物のピークの前後に、動物種間で大きさの異なるピークが 認められるが、分析法開発時のラットの試料ではピークが小さく気が 付くことができなかった。

There were isomeric metabolites having similar retention time and their relative abundances were different between the animal species.

解決策(Solution):

• 代謝物の分離のために、グラジエント条件を変更した。

A gradient condition was changed for separation of the metabolites.



Comment from DG:

・酵素活性の種差・人種差・系統差・年齢・性別等により、生成する代謝物や生成量が大きく異なる場合がある。 分析法を設定する際には、十分に選択性を確認するべきであり、さらに、複数の種類の実試料を用いて検証を行 うことはより望ましい。

The kind or amount of metabolites may be significantly different because of the enzyme activity of species differences, racial differences, strain differences, age and sex.



・シス-トランス異性体の同時測定法をバリデーション後に実試料分析を実施。検量線、QCサンプルでは十分にピークが分離したが、実試料では分離できないサンプルがあった。

The incurred samples were measured after validation study using the simultaneous analytical method for cis-trans isomer. However, there were several samples in which these peaks could not separate.

原因 (Cause):

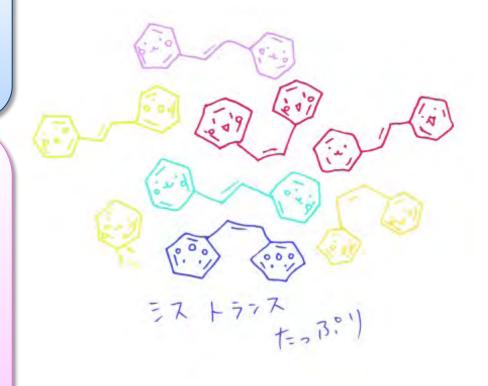
・実試料におけるシス-トランス異性体の存在量の差が大きく、溶出の 速い方の測定対象のテーリングが大きくなり、他方がその上に乗る形の クロマトになった。

A tailing for the peak of the fast elution became higher, and it combined with the peak of the second elution.

解決策 (Solution):

・測定対象の曝露-薬効&安全性考察の重要度から、ばらつきに関する考察を加えることで乗り切った。

Explained that the data did not vary.



Comment from DG:

- ・シス-トランス異性体の同時定量法の際は、高濃度試料により分離度及びテーリングの受け具合を確認し、十分な分離の分析条件を構築する必要があります(分離度1.5以上)。また、事前に存在量を把握し、存在量の低い方を先に溶出する測定法を構築することも有効であると考えます。
- ・異性体に関しては、分離だけでなく相互変換にも注意が必要です。血漿保管中及び前処理中の相互変換の有無も事前に確認することを推奨します。

It is necessary to build the analytical method after confirmation of separation condition enough. About the isomer, it is necessary to evaluate the interconversion.



分離度:クロマトグラム上のピーク相互の保持時間とそれぞれのピーク幅との関係を示すもので、

分離度Rsとして次の式で定義する。

Rs=1.18 \times (t_{R2}-t_{R1}) / (W_{0.5h1}+W_{0.5h2})

 t_{R1} , t_{R2} :分離度測定に用いる二つの物質の保持時間、ただし t_{R1} < t_{R2} $W_{0.5h1}$, $W_{0.5h2}$: それぞれのピーク高さの中点におけるピーク幅

ピークの完全分離:ピークが完全に分離するとは、分離度1.5以上を意味する。

ベースライン分離ともいう。

第十六改正日本薬局方より

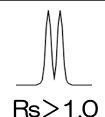


JBF 分離度について

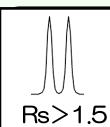
Questions to quests:

①複数化合物同時測定や不純物との分離において、分離の目安はどのように設定していますか?

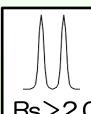
(支持する内容にシール又はコメントを入れたポストイットを貼ってください)



6ポイント



48ポイント



Rs>2.0

4ポイント

その他

3ポイント

②分析法を構築する際、保持時間をどのように設定していますか?

(支持する内容にシール又はコメントを入れたポストイットを貼ってください)

toより保持していたらOK

27ポイント

保持係数 (k=(t_R-t₀)/t₀)が2以上

5ポイント

特に意識していない

10ポイント

その他

6ポイント

試料調製 前処理 分離 検出



光に不安定な化合物



内部標準物質の合成、純度



天然に存在する安定同位体



高感度化によるコンタミネーション



分離条件の失敗

- ・移動相の選択(分離条件と検出条件)
- ・質量分析計のドリフト



マトリックス効果



プログラン 光に不安定な化合物 Unstable compound by light

事例(Case):

LC-MS/MS測定の分析条件を検討時、MSのフロントに PDA (Photodiode Array) を接続して実施. MS, MS/MSいずれでもピークが検出されなかった.

When we established an assay method by connecting PDA in the front of MS, no peaks were observed in MS or MS/MS.

原因 (Cause):

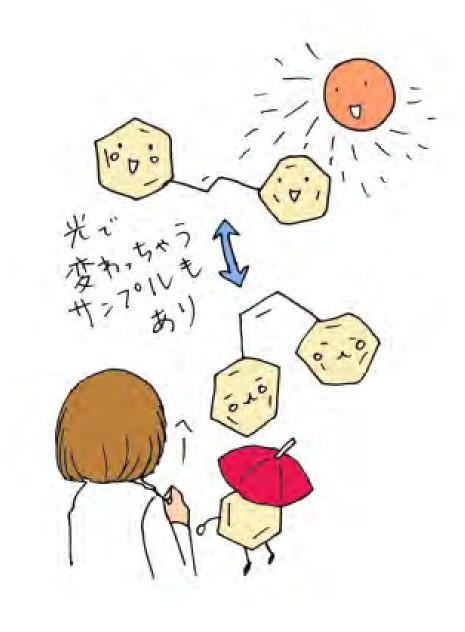
光に不安定な化合物であったことが原因。 事前に室温安定性を確認していたが、曝光が不十分であった.

This compound was unstable in the light. Stability test for light was not enough before study.

解決策 (Solution):

PDAの接続をやめることにより解決。 十分な曝光により、事前に光安定性を評価する。

Stop connecting to the PDA.
Change the method of stability test for light.



Comment from DG:

化合物の測定法を初めて確立する際には、事前に光安定性の情報を取得しましょう。 評価時には、前処理から分析を通して曝される光を考慮しましょう。

Confirm the sample stability for light from pretreatment to measurement when a new assay method is established.



全ての測定対象にISが準備できない Lack of IS for all analytes

事例(Case):

代謝物の定量に際し、全ての測定対象に安定同位体ISが準 備できなかったが、バリデーションは問題なく終了. 実試料測定時にISが準備できなかった測定対象で判定基準 を満たさない現象が時々起りトラブルに!

A stable isotope IS was not always prepared in the measurement of metabolites but a validation study was completed; In sample analysis, some analytes did not meet the acceptance criteria.

原因 (Cause):

測定対象に対応する安定同位体ISが準備できなかったこと が原因。

It was caused by No use of stable isotope labeled IS.

解決策(Solution):

未解決!

だましだまし測定を終了した。

Unsolved!

Sample analysis was carried out in unstable state.



Comment from DG:

新規に測定法を確立する際には、対応する安定同位体ISを準備しましょう。 合成法が難しい, 時間が無い時には, 代用するISが化学構造類似, 物性類似であるかを確認しましょう. 実試料測定やISR (Incurred Sample Reanalysis) 実施時のリスクを考慮しましょう.

Use a stable isotope IS to each analyte when a new assay method is established.

Confirm the chemical structure resemblance and similarity of chemical properties when a substitute IS (instead of a stable isotope IS) is used.

Consider a risk at the sample analysis and the ISR.



ISの純度(測定対象の混入) Contamination of analyte to IS

事例(Case):

ISのロットが更新されたとき、ISのみを測定した時の未変 化体のモニターイオンにピーク出現!

A peak appeared on the chromatogram of analyte monitored ion channel by injection of new lot of IS alone.

原因 (Cause):

IS合成時の精製過程において、未変化体が除去できなかっ たことが原因。

Analyte couldn't be completely removed when IS was synthesized.

解決策 (Solution):

未解決!

その後も純度の高いISが合成・精製されず、継続して同じ ロットのISを使用している.

Unsolved!

Since a high purity IS has not been synthesized and therefore, the same lot of IS is used still now.



Comment from DG:

IS合成の際には、測定法への影響について合成担当者と十分に相談しましょう。 測定対象が混入しない別の合成ルート,精製方法など良いアイデアが浮かぶかもしれません.

Before synthesis of IS, discuss with your chemist the influence to measurement (ex; Lower limit of quantification) and synthesis or purification method to avoid trace amount of analyte.



安定同位体標識内標準物質

Stable isotope-labeled internal standard

事例(Case):

13Cを4つ置換したISを合成した。 未変化体のみを測定した時にISのモニターイオンにピーク 出現!

A peak appeared on the chromatogram of IS (13C₄ labeled compound) monitored ion channel by injection of analyte alone.

原因 (Cause):

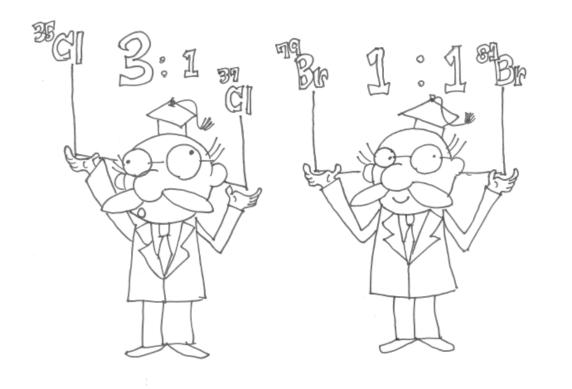
未変化体の化学構造に含まれる原子の天然に存在する安定 同位体が原因

Caused by natural stable isotope in an atom of analyte

解決策 (Solution):

ISは天然に存在する同位体うち大きい方のm/zをモニターすることで解決

Change the monitored ion of IS to a minor stable isotope



Comment from DG:

安定同位体標識の内標準物質を合成する際には未変化体の化学構造をきちんと確認しましょう。 医薬品によく見られるCI, Br, Sは天然に存在する同位体含量が多いので注意が必要です。

Confirm the chemical structure of analyte before synthesis of IS.

Attention! There are natural stable isotope of Cl, Br, and S at high existence ratios. (cf. Isotopic Compositions of the Elements Table).



代謝物の天然に存在する同位体による妨害

Interference of metabolite stable isotope

事例(Case):

CIを有する化合物の迅速測定(3分間). バリデーションはうまくいったが、実試料測定時に投与初期は リーディング、時間経過と共にテーリングがみられた。 未変化体の濃度推移に異常がみられた。

During the high throughput measurement of Cl compound, peak leading and tailing were observed on the analyte chromatogram.

原因 (Cause):

酸化代謝物[M+16]の脱水体[M+16-18]が生成[M-2]。 フラグメントイオンが未変化体と酸化代謝物で同じであったため、 代謝物[M-2]の天然に存在する同位体37CI体が未変化体に重 なったことが原因

The molecular weight of the natural stable isotope of metabolite is the same as the molecular weight of analyte.

解決策 (Solution):

LCでピーク分離することにより解決

Peak separation by changing the LC condition.



Comment from DG:

天然に存在する安定同位体を化学構造に有する化合物の測定法を確立する際には、生成が予想される代謝物のフラグメントイオンが同一でないことをきちんと確認しましょう。

同一の場合はLCでの分離を検討しましょう。

Confirm the fragment ion of the expected metabolites when an assay method is established for a compound having natural stable isotopes in the chemical structure.

Try to separate by LC when analytes have same fragment ions!



RI標識体投与サンプルのMS定量

Measurement of samples administered radio isotope-labeled compound

事例(Case):

 14 Cが2つ標識されたRI(14 C。標識体)を用いて実施したラットADME試験において,Dが5つ標識されたIS(D_5 -IS)を用いて定量を行ったところ測定値が低く見積もられた.

During the measurement of the double ¹⁴C labeled compound using LC-MS/MS, the sample concentrations were underestimated.

原因 (Cause):

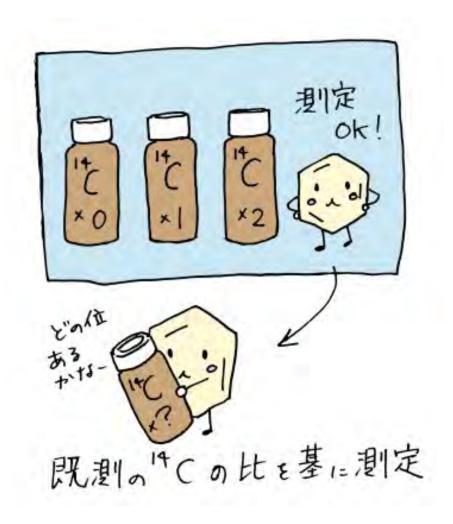
単純に 14 C/ 12 C置換率から濃度算出 14 C $_2$ 標識体の天然に存在する同位体が D_5 -ISと同じ分子量であり、ISのエリアに上乗せされたことが原因。

It was caused by the calculation using only $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio. The molecular weight of analyte natural stable isotope was the same as IS.

解決策 (Solution):

投与に用いた標識体の14C置換率(O個, 1個, 2個)を 実測して換算に用い, ISへの影響についても補正した.

Use the replacement ratio of ^{14}C ($^{14}\text{C}_0/^{14}\text{C}_1/^{14}\text{C}_2$) and correct the influence to IS for calculation the sample concentration.



Comment from DG:

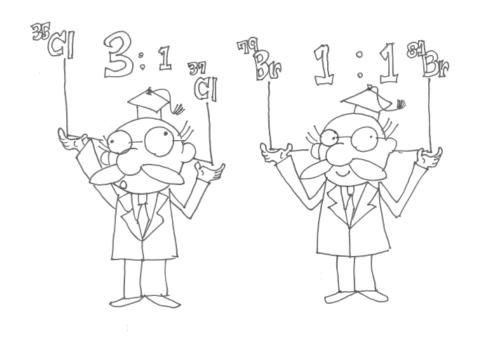
14C標識体を用いた試料をMSで定量する際には、14C置換率だけで無く、約1%の割合で天然に存在する同位体にも注意しましょう。

Confirm not only the replacement ratio of ¹⁴C but also natural isotope ratio.



元素の同位体組成表(2014)_抜粋 Isotopic Compositions of the Elements

元素記号	質量数	同位体存在度 [原子百分率]
Н	1 2	99.9885 0.0115
С	12 13	98.93 1.07
N	14 15	99.636 0.364
0	16 17 18	99.757 0.038 0.205
F	19	100
S	32 33 34 36	94.99 0.75 4.25 0.01
Cl	35 37	75.76 24.24
Br	79 81	50.69 49.31



©2014 日本化学会 原子量専門委員会 元素の同位体組成表(2014)より抜粋



15. 0

JBF コンタミネーション Contamination

事例(Case):

・測定感度をより高くするため、高感度な装置を新規導入し、定量下限を20分の1とする分析法を開発した。検量線で定量下限付近のピークが希釈倍率から計算される値よりも高いピークとなった。

An analytical method was developed using high-sensitive analytical machine introduced to improve the sensitivity of analysis and get the LLOQ to one-twentieths. A peak response around the LLOQ was higher than expected one.

原因(Cause):

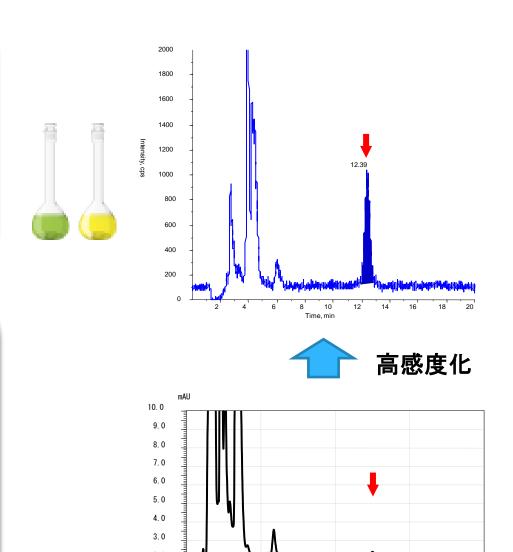
・標準溶液の希釈溶媒を入れるガラス容器由来のコンタミと判明。今まで使用していた装置の定量範囲では影響がなかったが、高感度装置を用いて定量下限を20分の1にしたところ影響が発覚した。

The contamination was caused by a glass container for the diluent of working solutions. No contaminations were noted when a quantified range of conventional machine used, but when one-twentieth of the LLOQ was set, the results were affected by contamination.

解決策 (Solution):

・希釈溶媒の容器をディスポーザブル容器に変更すること で解決した。

Disposable container was used for diluent.



0.0

Comment from DG:

• 分析感度に応じた確認が必要。また、材料からの影響も感度に応じて変化することにも注意が必要。

Consider the analytical sensitivity and then prepare an appropriate analytical method. Also focus on effects from materials. That changes according to analytical sensitivity.



分離条件の失敗 1/2 Carelessness at analytical conditions

事例(Case):

LC-UV (210nm) 測定において、移動相に酢酸を選 択したところベースが高くなった。 LC/MS(ネガティブ)測定において、保持を期待して 酸添加を増やしたところピークが小さくなった。

In the LC-UV, 210nm analysis acetic acid was selected as mobile phase and a very high baseline was confirmed. LC/MS was used in the analysis and a small peak appeared because strong acid for a negative ion analysis was used to get a longer retention time.

原因 (Cause):

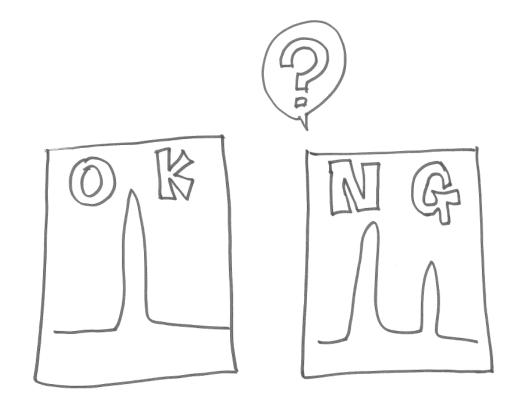
移動相の選択の間違い。

A mobile phase selected was wrong.

解決策 (Solution):

• 検出器に適した移動相を選択する必要があるが、分離に 最適な移動相の選択は、必ずしも検出に最適とはならな いジレンマがある。

We have to select a mobile phase being appropriate to each detector. However, there is a dilemma: The best mobile phase for separation is not always suitable for detection.



Comment from DG:

経験が、先見の明を生む。分離に適した移動相条件と検出に適した移動相条件は重ならない。どこでバランス を取るかが重要。

Learn from experience. The best mobile phase for separation is not the one that is the best for detection. Consider the best solution between two conditions.



分離条件の失敗 2/2 Carelessness at maintenance

事例(Case):

・LC/MSにおいて、絶対感度のドリフトがかなりあった。 内標準物質に重水素標識体を用いても、感度ドリフト につれて定量値がずれた。

Drift in absolute sensitivity using LC/MS was significantly noted. A deuterium-labeled compound was used as internal standard substance but quantified values were affected by the drift of absolute sensitivity.

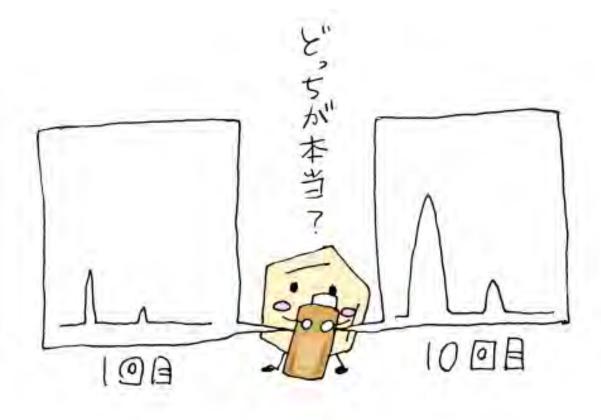
原因 (Cause):

質量分析計ではしばしば感度のドリフトが見られる。 Sensitivity sometimes drifts in mass spectrometer analysis.

解決策 (Solution):

•LC/MSシステムの平衡化手順を明確にした。感度ドリ フトの許容範囲をデータ採用基準として設けた.

Procedures for equilibration in LC/MS system are specified. An acceptance criterion for sensitivity drift was set as one of data adoption criteria.



Comment from DG:

・状況に適した安定化条件の設定が必要。

Select optimal stabilization conditions according to analytical conditions.





マトリックス効果 1/2

Matrix effect

事例(Case):

マトリックス効果の影響により、バリデーションできなかった。

Matrix effects disturbed the validation test.

 前処理法を当時最新の固相抽出Mixモードに変更したら、 クライテリアを満たさなかった。
 When samples were extracted using a current solid phase

When samples were extracted using a current solid phase extraction mix mode, the results did not meet the acceptance criteria.

原因(Cause):

• 前処理法に関わらず、化合物に適したクリーンナップが出来ていない。

Samples were not completely cleaned up in every extraction method

解決策(Solution):

・前処理法を変更(液・液抽出→除タンパク法)して、再度バリデーション試験を実施した。

Samples were extracted using deproteination method instead of using a liquid-liquid extraction method and then a second validation test was performed.

・前処理法を液・液抽出にもどした。

A liquid-liquid extraction method was used in the next test.



Comment from DG:

・前処理法の種類に関係なく前処理によるクリーンナップ効果とマトリックス効果の関係を良く確認して、前処理法を検討することが重要(液・液抽出→除タンパク法の例もある)

Confirm relationship of clean-up effects by extraction and matrix effects and then an optimal extraction method should be determined (sometimes a deproteination method is better than liquid-liquid extraction)



JBF

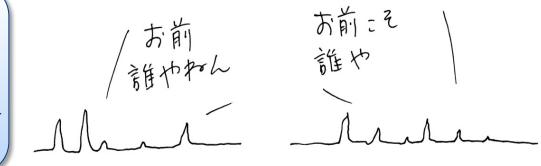
マトリックス効果 2/2

Matrix effect

事例(Case):

・スクリーニング段階の化合物(=D体が無い化合物)について、PK試験時、血漿試料を測定したところ、(安定同位体ISが無い)一部の試料の濃度推移に異常が見られた。A screening compound (Its d-compound has not been developed.) in plasma

A screening compound (Its d-compound has not been developed.) in plasma samples was analyzed in a PK study and some unexpected concentrations were found.



原因(Cause):

• MS/MSの前に接続のPDAクロマトを見たところ、測定対象の保持時間に血漿由来の夾雑物が濃度が低い試料で多く存在しており、イオン化を抑制していることがわかった。構造類似化合物をISとして入れていたものの、保持時間が離れていたためISとして機能していなかった。

として機能していなかった。 Chromatograms from PDA connecting to MS/MS were checked and at the retention time of unchanged compound plasma-related foreign substances existed in a sample at unexpectedly low concentration and the amount was more than that in other samples. The foreign compounds were found to inhibit the ionization of unchanged compound. A compound of similar structure to analyte was used as internal standard substance but did not work well because its retention time is far from that of analyte.

解決策 (Solution):

• 移動相を変更して、測定対象と夾雑物を分離し、イオン化抑制 を低減した分析条件で再測定を実施した。 Reanalysis was performed using another condition: another mobile phase

Reanalysis was performed using another condition: another mobile phase was used and analyte was isolated from the matrix of plasma to prevent from inhibiting ionization.



Comment from DG:

• 安定標識体のISが無い分析系では、マトリックス効果の影響に特に注意すること。 Consider matrix effects in a test system not using a stable isotope labeled IS.

チェックポイント! — その他 Check point – Others –







チェックポイント! — その他 Check point – Others –





事例(Case):メタノール/ぎ酸溶液

・ミックスモードの固相抽出において、メタノールにぎ酸を入れた溶出液を設定していたが、調製後2日目では、溶出できなかった

On the mixed-mode SPE the methanol/formic acid was used as eluate, the analyte was not eluted using the eluate prepared one day before the extraction.

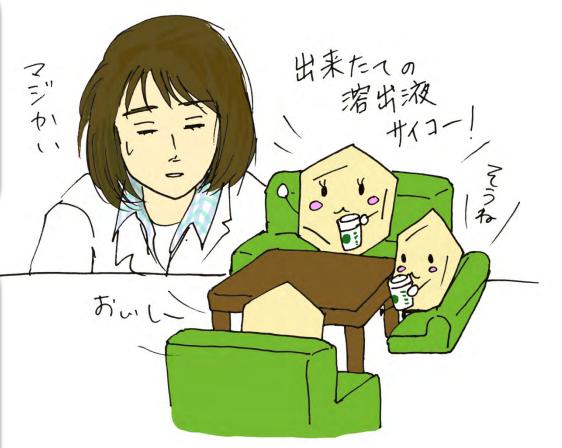
原因 (Cause):

• アルコールと酸の反応により、pHが変化してしまった The pH of eluate was altered by the reaction between an alcohol and an acid.

解決策 (Solution):

• 用時調製または冷蔵による保存

Prepare eluate on the day of use. Store at a refrigerator.



Comment from DG:

固相抽出の溶出液だけでなく、移動相に使用する場合も要注意。移動相は室温保存になるため、調整日から日数が経過すると、溶出時間が変化してしまう場合があります。酸は水系の移動相ラインに添加するなど工夫が必要です。

Caution!! When methanol/formic acid is used as mobile phase, the retention time vary in few days after the preparation, because the storage condition of mobile phase is room temperature. We recommend that acid should be added to aqueous solution.



事例(Case): Mobil phase

・LC/MS/MS測定において、バックグラウンドが高い

The background of LC/MS/MS is high.

原因 (Cause):

• 移動相調製に使用していた超純水由来の成分の影響

The effect of impurities in ultrapure water using on the preparation for mobile phase.

解決策 (Solution):

• 移動相調製に使用していた超純水を市販の超純水に変更

Change to the commercially available ultrapure water.



Comment from DG:

- ・試薬メーカーからLC/MS用超純水が発売されています。
- Ultra-pure water for LC/MS has been provided from some manufacturers.
- ・超純粋製造装置の使用時点検のチェック項目(抵抗値の確認、初流を廃棄など)、定期的なメンテナンス (フィルター、UVランプ交換など)状況のチェックも重要です。

Check on the maintenance condition of the water purification system.

JBF

ブランクマトリックス 1/5

Blank matrix

事例(Case):ブランク試料からピーク検出

- ・GE医薬品の測定。輸入プラズマを使用したところ、ブランク試料から測定対象物質のピークが検出された。
- ・社内ボランティアからのブランク血漿でも同様のトラブル報告あり。

The analyte was detected in the blank matrix (commercial plasma, plasma from in-house volunteer).

原因 (Cause):

・血液提供者がこの医薬品を服用していた

The volunteer of the blood has taken the drug.

解決策 (Solution):

- 輸入プラズマのロットを変える
- ・服用していないボランティアから採血する

Using the plasma that was collected from the volunteer who does not take the drug.



Comment from DG:

珍しくないトラブルです。広く出回っているGE医薬品、OTC医薬品成分の測定では要注意。このような成分の測定の際は、事前にブランク試料からピークが検出されないことを確認しておくことをお勧めします。

We recommend to check the blank samples before the analysis of GE or OTC drug. Because the analyte might be detected in the blank samples.

ブランクマトリックス 2/5

Blank matrix

事例(Case):ヒト血漿 Human plasma

・米国臨床試験の実検体測定においてカラムの詰まりやマトリックス エフェクトが発現。

The clogging of the HPLC column and matrix effect are appeared on the analysis of the test samples that was collected from the clinical study in U.S.

• 連続注入したところ、ピーク強度が徐々に低下

The peak intensity decreases gradually.

原因 (Cause):

- ・ 食生活の違いによる脂質量の差?
- 内因性物質の影響?

The amount of the lipid in the blood may differ by diet. The effect of the endogenous materials.

解決策 (Solution):

・より精製度の高い前処理方法に変更

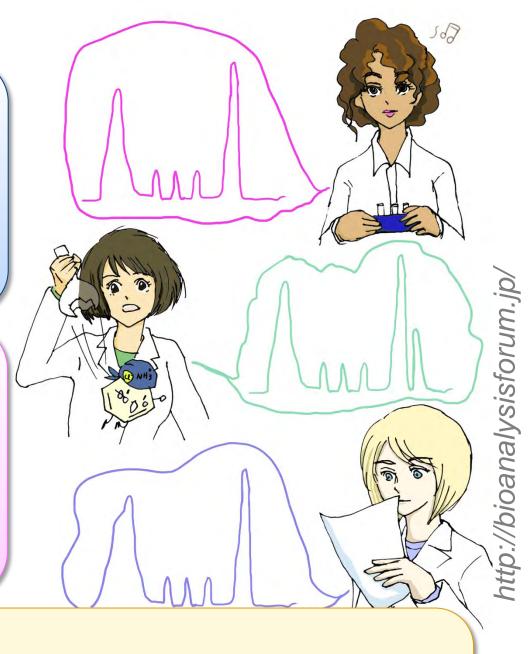
The changing to more purified pretreatment method.

Comment from DG:

ヒトは動物よりも個人差が大きいため、よりクリーンにする前処理が必要になることがあります。バッチ耐久性 も事前に確認しておくことをお勧めします。高脂血症の血漿も市販されています。

The more purified pretreatment may be effective on the human sample analysis because human sample vary among different individuals. Test the durability of analytical method before the sample analysis.

The hyperlipidemic plasma are commercially available.





ブランクマトリックス 3/5

Blank matrix

事例(Case):抗凝固剤 Anti coagulant

・LC/MS/MS測定において、使用したブランク血漿の抗 凝固剤がヘパリンの場合は妨害成分が検出され、EDTAだ と問題が無かった

The interfering peak was detected in heparinized plasma, but not detected in EDTA plasma.

原因 (Cause):

• 抗凝固剤由来の妨害成分?

The interfering substance from anticoagulant.

解決策 (Solution):

• 抗凝固剤を変更できない場合は、前処理法や測定条件の変更により妨害成分の影響を除去。

Change to another method (pretreatment and analysis) that is not affected by interfering substances.



Comment from DG:

抗凝固剤の違いは測定結果に影響を及ぼす場合もあるため、抗凝固剤が変更になる場合はフルバリデーションが必要です。(DG2013-04)

Full validation is needed for changing the anticoagulant.



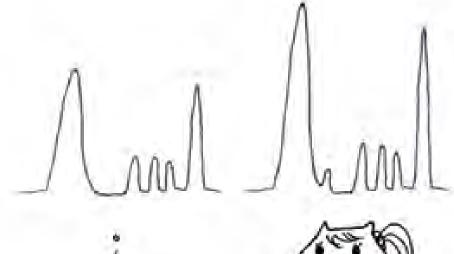
ブランクマトリックス 4/5

Blank matrix

事例(Case):月齢の差

・幼若動物の血清では問題なく測定できたが、成獣では妨害物質が多すぎて分析できなかった

The interfering peaks were observed in matured animal more than juvenile.



原因 (Cause):

• 成獣のみに存在する夾雑成分の影響

The effect of the interfering substance from adult animals.

解決策 (Solution):

・成獣より得たブランクマトリックスを使用して分析法を再作成

The analytical method was re-established to suitable for matured animals.



Comment from DG:

できるだけ実検体に近い月齢のブランクマトリックスを使用してバリデートする必要があります。絶食、非絶食の差が見られる場合もありますので、条件を要確認。

The analytical method should be validated with blank matrix as nearly as test samples. Fasted or non fasted?



ブランクマトリックス 5/5

Blank matrix

事例(Case):サル血漿

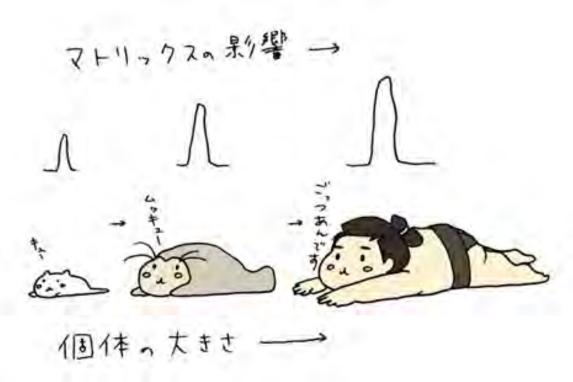
・バリデーションの選択性などは問題なしだったにもかかわらず、LLOQ未満ではあったが対照群の検体から妨害ピークが検出された。その検体は薄緑色をしていた。

Interfering peak was detected in the control group, despite of the method was validated.

事例(Case):その他

・LC-MSなのに血清試料をアフィニティー精製をしても 妨害物質がのぞけなかった

The interfering substances were not removed, despite of the affinity separation was done.



Comment from DG:

小動物→大動物→ヒトになるにつれ、マトリックスの影響が大きくなることがあります。

Matrix Effect: Human > Monkey, Dog > Rat, Mouse



器具の材質による影響 Interference from material of apparatus

事例(Case):

・注入バイアル中の保存安定性がメーカー、材質により異なる

The injection sample stability is affected by the manufacturer of the vial and materials.

- ・前処理に使用するガラス器具の影響。硬質ガラスと軟質ガラスで結果が異なる The effect of the glass apparatus on the pretreatment. Hard glass or Soft glass??
- •LC/MS/MS測定において夾雑ピークが出現

The interfering peak appear on the LC/MS/MS chromatogram.



- Polypropylene (PP)、Polyethylene (PE)、ガラス (hard or soft)
- • 各材質への吸着度合いの差、可塑剤 (plasticizer)の影響など。

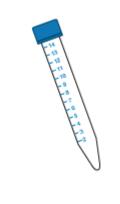
解決策 (Solution):

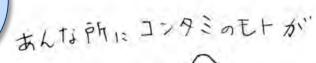
影響のない材質の器具への変更

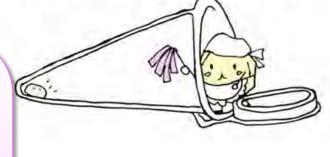
Change to the apparatus made by different material.

・夾雑ピークの影響を受けない前処理条件、分析条件への変更

Change to the pretreatment process and analytical conditions which are avoidable the interfering peaks











• 検量線の直線性不良(低濃度側のレスポンス低)

The calibration curve is not linear. The response of lower concentration range was below the expected one.

チューニング時にイオン化しない

Analyte was not ionized at the optimization step.

原因 (Cause):

ガラスチューブ、ガラスシリンジへの吸着

Adsorption of glass apparatus

解決策 (Solution):

・影響のない材質の器具への変更

Change to another kind of apparatus.



Comment from DG:

検量線の低濃度側のレスポンスが低くなるのは吸着の特徴です。

使用器具の材質の見直しを行いましょう。

検討初期に吸着の検討をすることをお勧めします。

The low response of the low concentration range is the characteristic of the adsorption. Check the apparatus.

We recommend to test if the analyte adsorbed to the apparatus at the early phase of the method investigation.



Comment from DG: Check point!

いつもと異なる結果が得られた場合や、提示法が再現できない場合
→操作ミス? The operation error?

→容器、器具の違い?・・・容器、器具は型番までチェック Check the model number of the apparatus.

夾雑ピークの出現

→コンタミ?・・・目的成分で得られる複数のSRMでピークが得られるかを検証。

Test the multiple SRM that obtained from the analyte.

→容器、器具由来?

What is source of the interfering peak? Tubes or other apparatus?





ピークがテーリングする。

Peak tailing was observed.

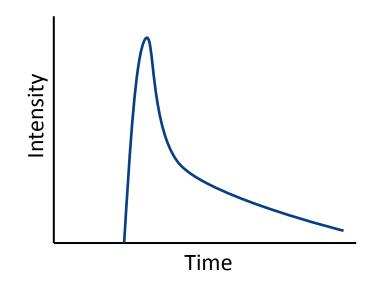
原因 (Cause):

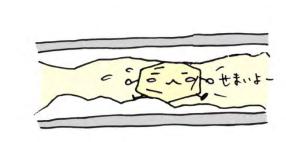
- ニードルとの相互作用 Interaction between the needle and analyte
- 同一機種で別の装置に変更した。
 .Change another instrument in the model.

解決策 (Solution):

- 二ードル種類の変更。 Change the type of needle.
- MS条件の最適化、LCのメンテナンスや条件の再検討。

Re-optimize the analytical conditions and do maintenance HPLC.







Comment from DG:

エードルのみでなく、分析対象物質が接触する配管の材質や形状により吸着などが生じることがあります。また、装置の使用状況により配管内部の汚れなど異なるので、測定法開発時に配管との相互作用の有無を確認しましょう。

Interaction between HPLC lines and analyte is altered by materials, shapes and surface conditions of lines which directly contact to analyte



イオンペア試薬の析出

Ion-pair reagent

事例(Case):

・揮発性イオンペア試薬を用いた分析で、100%有機溶媒(イオンペア含む)で移動相を長時間流すと、ラインの接続部(フェラル)の隙間から液漏れし、白く粉が吹いていた。

White powder was observed at the LC connecting part (ferrule) when HPLC eluent containing ion-pair reagent was prepared by 100% organic solvent and used for a long time.

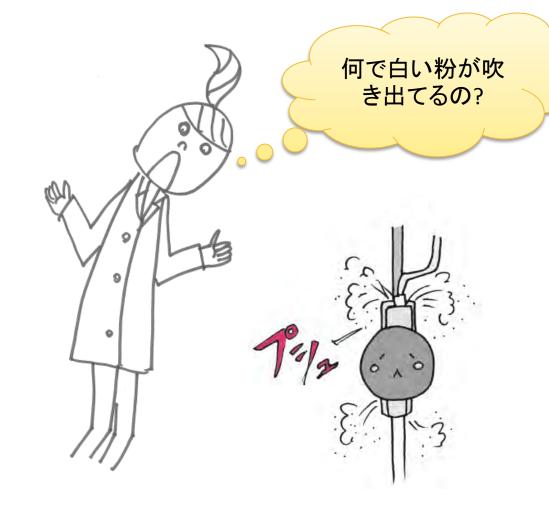
原因 (Cause):

イオンペア試薬が100%有機溶媒に溶けにくい→析出?Precipitation?

解決策 (Solution):

100%有機溶媒を95%有機溶媒/5%水(イオンペア含む)にすると全くこの現象は無くなった。

The phenomenon was disappeared after adding 5% water to the HPLC eluent.



Comment from DG:

• イオンペア試薬が有機溶媒に溶けにくかったために析出したのでは?

Precipitation might occur due to a low solubility of the ion pair reagent in organic solvent.

JBF オートサンプラーの注入エラ

Injection error of Auto sampler

事例(Case):

- ① 終夜運転の翌朝、バイアルが床に山となって散乱して いた。測定データは全てベースラインのみ
- ②ピークが検出されない。ピークが予想より小さい。

No peaks detected! Peak response was lower than expected one.

原因 (Cause):

サンプルが吸引されていない

- ①アーム駆動域に飛び出していたバイアルにアームが衝突 し、掴んでいたバイアルが落下。
- ②注入量設定ミス、ニードルの高さ設定ミス

Inappropriate vial position.

Inappropriate injection volume or needle height.

解決策(Solution):

- ①測定開始前にバイアルが適切に配置されているか確認す る。
- ②注入量、吸引時のニードルの高さを適切に設定する。
- 1) Check if vials are correctly set just before the start of analysis.
- 2 Correct injection volume or the height of needle.

Intensity Time

http://bioanalysis.vi

Comment from DG:

機械は正直です。分析開始前に自分の意図していることが設定されているか必ず確認しましょう(バイアルの 配置、注入順序、注入量、ニードル高さなど)。また、使用している機器の特徴をきちんと把握することは実験 者の基本です。

Check the instrument settings just before the start of analysis if your intention is revealed or not.

JBP オートサンプラーの注入エラー

Injection error of auto sampler

事例(Case):

ニードルがガラスインサートに入ったまま注入動作とな り、インサートを割ってエラーで停止。ランダムに発生。 最終的にオートサンプラーは故障。

HPLC vials were crashed randomly in the injection process.



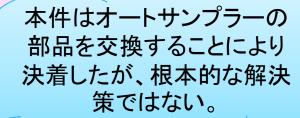
・インサートの微妙な大きさの違いにより、この現象がラ ンダムで発生した。

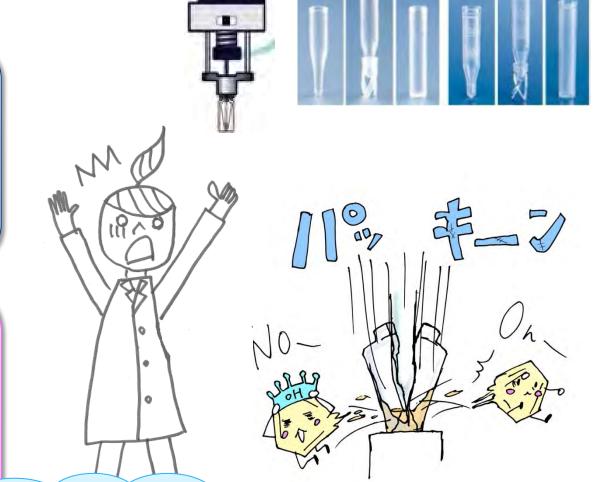
Inappropriate inserts of HPLC vial were used.

解決策 (Solution):

• 未解決 (オートサンプラーの部品交換)

Replace the parts of the auto sampler





Comment from DG:

使用する装置にどのバイアルが利用できるかを予め機器メーカーに確認しましょう。

Check the usable HPLC vial s for your equipment in advance.



JBI 前処理操作時の不注意

Carelessness at analytical procedure

事例(Case):

• ある化合物を液一液抽出後、遠心分離機で遠心したとこ ろ、全ての試験管の頭が吹っ飛んだ。

All the caps of sample tubes were exploded during centrifugation in a liquid-liquid sample extraction study.

・検量線の高濃度試料が頭打ちとなり、検量線を引くこと ができなかった。

High concentration calibration standards could not be properly analyzed and therefore a calibration curve could not be constructed.

原因 (Cause):

• ローター半径に対して、試験管高さが長かったことが原 因でした。

The test tubes were longer than the rotor radius.

・いくつもメソッドを作り測定をしていたため、HPLCで インジェクション量のミスが起きた。

Due to performing analyses using multiple methods HPLC failed to inject a certain volume.

解決策(Solution):

- ・事前に機器の状況を確認する。
- 操作を明確にするようにした。

Check the setting of HPLC beforehand.

Use an appropriate apparatus

〈アングルロータ〉 〈スイングロータ〉 〈バッチロータ〉 (コレクタ式) Rmin Rmin, Rav Rmax Rmax

Comment from DG:

・油断大敵。確認不足によるミス

Always be alert and careful. Check more details.



• N₂発生装置を2台のMSで共用していて時々分析がおかしくなる(1つのRunの中でランダムに)おかしいものが全くないRunもある。

In analysis using an N_2 generator that is connected to two MSs an MS sometimes can not properly work.

原因 (Cause):

• 別のMSの設定ミスで、チャージアップ防止のためのポジネガ反転時に大量の N_2 ガスを使用していた。このため自分のMSの N_2 ガスが低下し、大量使用時間は数秒だが、数秒が「たまたま」ピークに重なるとおかしくなっていた。

One of the two MSs was set in unintended conditions and the MS used a huge volume of N2 gas in reverse mode for preventing a charging up. Therefore N_2 gas for the MS temporally became insufficient. When a peak was detected in such an insufficient gas period, an unforeseen shape of peak was noted.

解決策 (Solution):

• N_2 ガス発生装置は1MSに1台。他人は疑ってかかりましょう。

Each N_2 gas generator for each MS Keep an watchful eye on others.



Comment from DG:

常に使用しているシステムだからといって、慣れだけで信じてはいけません。

Check the analytical system conditions just before the analysis even though you are familiar to the analytical system.





• 1台の N_2 発生装置で2台のMSを運用(MSは購入したばかり)。 N_2 は共用しているので切らないように口頭で伝達。新MSを試験運転中に共用の N_2 ガス発生装置をoffにされ、新品のMSが水浸しになり、電気系の結構なところまで交換するハメに。

An N_2 generator was connected to two current MSs. N_2 was shared with two MSs and therefore personnel related were verbally indicated not to switch off. However, the N_2 gas generator was inadvertently turned off during the installation of new MS. The new MS was submerged and almost broken.

原因 (Cause):

• 口頭伝達では注意事項が伝わらなかった。

Verbal indication was not enough for calling for attention.

解決策(Solution):

・見てすぐ分かるように赤白の(運転中!)マグネット札を作りました。今のソフトはN2ガス圧低いと分析が止まりますが、昔はそうではなかったのです。

A magnet sign was prepared to let everyone know the situation. The latest software can classify a low level of N_2 gas and stop the equipment but old one could not.



Comment from DG:

注意事項や伝達事項は見てすぐにわかるようにしておく。口頭伝達では伝わらない。

Prepare clear signs for caution and indications. Do not trust verbal indications.





・Wash液をポンプより低い位置に置いていた(瓶が大きいので置き場所がなく架台に直置き)「サイホンの原理」が働かず、ASAMPのポンプのパワーではWash液を汲み上げられず、分析に支障が出た。

Wash solution was put on a place lower than pump and on the same rack as the HPLC. The pump of ASAMP could not siphon the wash solution.

原因 (Cause):

- 不慣れな社員がMSを使用。
 An apprentice performed an analysis using MS.
- HPLCのWash液をガロン瓶にしたかった(交換面倒)。 He wanted to use a big bottle as a reservoir of wash solution for HPLC (to avoid replacing bottles multiple times).

解決策 (Solution):

• 移動相の容器は、ポンプより上に置く

A container for mobile phase has to be put on upper place than pump.



Comment from DG:

・基本は、操作の意味を知って、使用すること。 (新人には、新人専用のマニュアルが必要?)

Learn how to use MS before activation. (Directions specific to apprentice should be prepared?)





JBF メンテナンス時の不注意 Carelessness at maintenance

事例(Case):

・メンテナンス後、HPLCの電気配線がすべて外されてい たままになっていた

All the electrical wiring of HPLC was left disconnected after maintenance.

原因 (Cause):

• 不慣れな社員が対応したこと。クレーム入れて、後日配 線してもらったが間違って再配線、MSに過電流が流れ、 MSの基盤が全部死亡。

An inexperienced person accompanied the subcontractor. The subcontractor came and connected the wiring after received a claim but they connected wrong wires. The infrastructure of MS was totally broken by overcurrent.)

解決策(Solution):

・必ずメンテ後は、業者がいる内に「試し打ち」をするこ

Perform a test injection in front of the subcontractor after maintenance.



Comment from DG:

・システム確認の「試し打ち」で、機器のコンディションを確認するまでがメンテナンスです.

Once conditions of equipment are checked by test injection, maintenance can be finished.





• API5000でQOを洗浄するため、IPAやアセトニトリルに浸した(その後液体をしっかり絞った)スワブ(メーカー推奨品)を四重極に差し込み、引き抜こうとしたところ先端のスポンジが軸から外れた。

The pad was peeled off from the bar of the swab which dipped into IPA and acetonitrile to clean the QO of API5000.

原因 (Cause):

・スワブの先端のスポンジと軸の部分は熱により溶接されていたが、溶媒に よりその結合が弱まったと考えられた。

The bind between a pad and a bar of swab was possibly broken by dipping into the solvents.

解決策 (Solution):

接合部を極力溶媒中に浸さないようにすること、あまり念入りにはIPAやアセトニトリルに浸したスワブで洗浄しないことにした。(50%メタノールによる洗浄を念入りにする。)

Not dip a binding part of swab. Change the dipping solvent to 50% methanol.



スワブが軸か

Comment from DG:

・溶媒はスワブのスポンジ表面が湿る程度に軽くつけましょう。50%メタノールでは洗浄効果が弱い場合もありますのでIPAの利用は有効だと考えます。

A swab should be used to be moisturized lightly the surface of pad.





- LLOQの定量が出来なかった。
- MSの点検後に感度が低下した。
- ・ネガティブモードからポジティブに切り替えたらピークが検出されなかった。

Could not determine at LLOQ, Became lower sensitivity after a maintenance. No peak was detected after changing an ionization mode.

原因 (Cause):

- MSの状態変化 Decrease the sensitivity, Change the optimal parameter, Charge-up
 - ・感度低下 Charg・最適パラメーターの変化
 - チャージアップ

解決策 (Solution):

• MSの洗浄、パラメータの再設定など

Clean a mass spectrometer.

Re-optimize the analytical parameters of a mass spectrometer.

定期的な おそうじ、 まだまだ。 またいまた。

Comment from DG:

• MSは生き物です。Calibrationは次第にずれてきます。各部位に残った汚れ(イオン化出来なかったものや、 透過できなかったものなど)により最適な電圧値も影響を受けます。MS条件は絶対的なものではないというこ とを認識し、ある一定の範囲内で装置の状態を保てるように日常及び定期的なメンテナンスを推奨します。

MS is alive. Calibration and optimal parameters are altered with time and are affected by dirt remained at each part. Daily and periodically maintenance are recommended to keep the performance of mass spectrometer.



 Analyst (AB Sciex社製)で解析メソッド作成時に Sum Multiple lonsのチェックボックスにチェックを 誤っていれてしまって解析し、ISの面積値を2倍として 算出していた。

In preparing an analytical method using Analyst (AB Sciex) a box of Sum Multiple lons was inadvertently checked and therefore twice the IS area was calculated.

原因 (Cause):

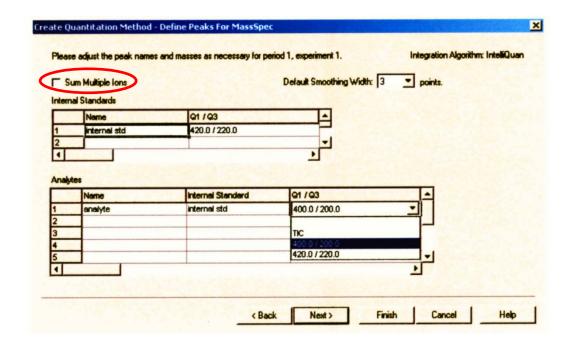
・移動Barのせいで表示が見えず(ISで2列、Analytesで3列しか表示されない)、ISの項目を2列入力していることに気付かずに解析していた。

A mobile bar hided information (Only the software can display is two columns for IS and three columns for analytes.) and an analyst did not find it during data analysis.

解決策 (Solution):

・使用しない部分でもソフトの機能を良く知っておくこと。

Analysts have to have a detailed knowledge of functions on software.



Comment from DG:

普段使用しないソフトの機能も周知することが必要(チェックボックスなど、安易に触ってしまいやすい箇所は特に注意)。

Learn unfamiliar functions on software (Especially, tools such as checkbox that we can easily touch).)



技術移管での不注。 Carelessness at maintenance

事例(Case):

• 高度なカラムスイッチングの技術を海外CROに移管し たら、ケミストが技術を持って転職してしまい、技術 を再現できなくなった。

A high technique of column switching was transferred to overseas CRO. However, an analyst moved to another company and therefore the technique can not be reproduced any more.

原因 (Cause):

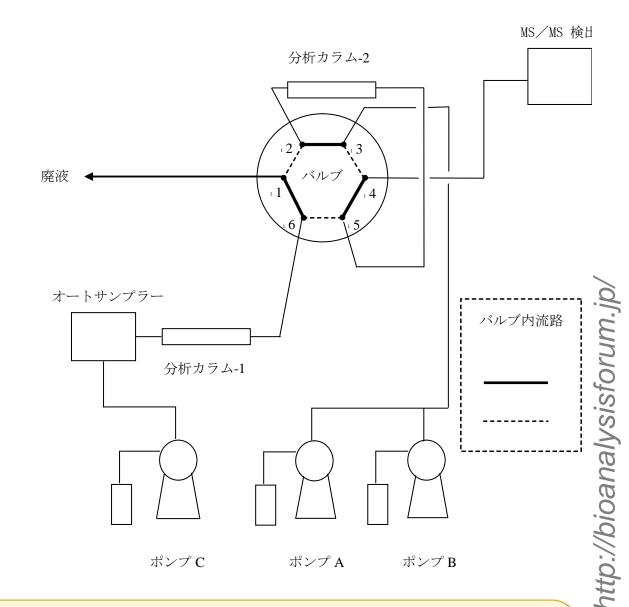
ケミストが交代したが、後任が能力がなくて、技術を再 現できなかった。

A successor was not capable of reproducing the technique.

解決策 (Solution):

技術移管で、それなりの技術を移管する場合、誰にでも わかるような表記をしておくこと。

An analytical method should be written clearly in detail to get enough understanding of anybody.



Comment from DG:

• 測定法の詳細は誰にでもわかるように明確に記載しましょう

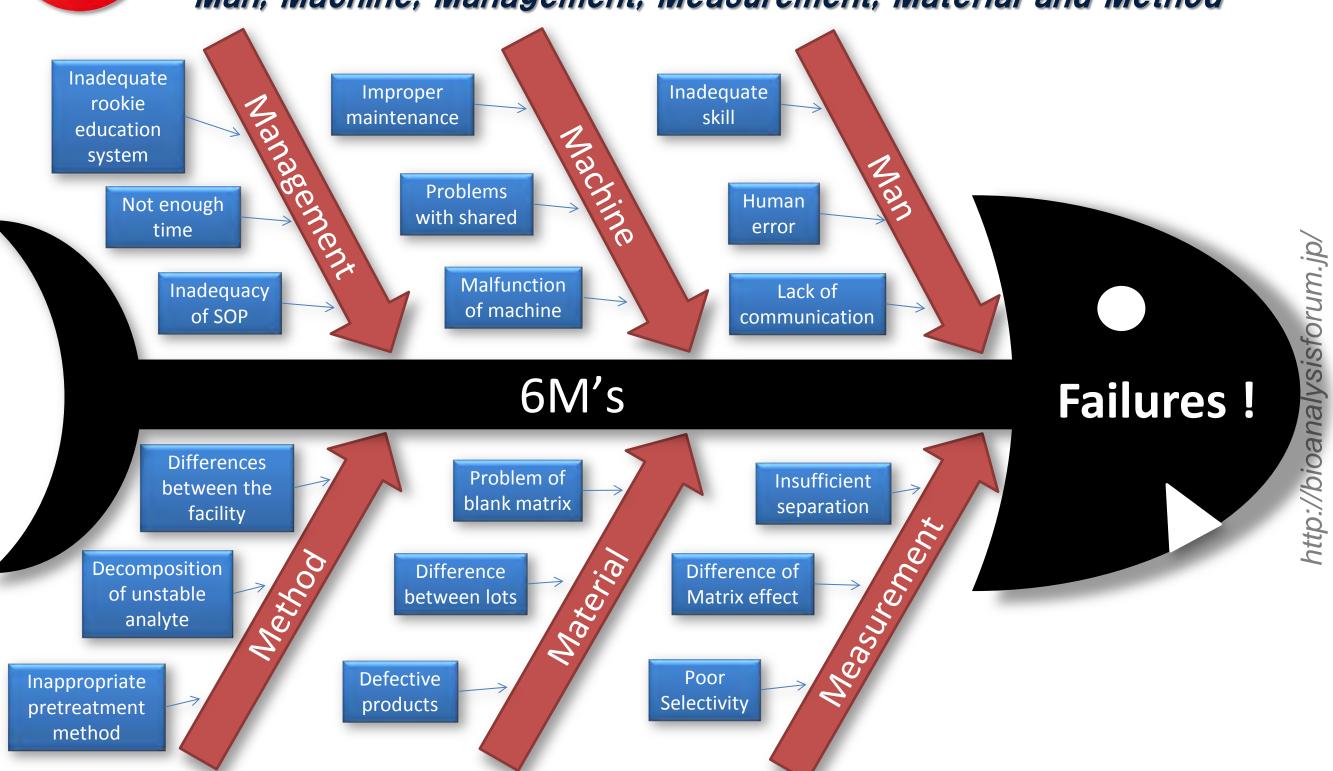
Convey the exact information containing the analytical techniques and tips.





Br Cause-and-Effect for 6Ms in bioanalysis

- Man, Machine, Management, Measurement, Material and Method -





JBF まとめ Summary

- ▶ 1. 試料調製、2. 前処理、3. 分離、4. 検出、5. その他(機器、器具等)の各過程でさまざまな「失敗」を抽出した。We classified the various "Failure" in the each step of bioanalysis ("Sample preparation", "Sample processing", "LC separation", "MS detection" and "Others (analytical equipment, test materials, etc.)").
- ▶「失敗事例」を、原因別(コンタミネーション、安定性、 試験材料のロット差など)に精査し、その真因と推奨すべき解決策についてまとめた。We were summarized the detail of the cause (contamination, stability, lot difference of the test materials, etc.) of these failure.
- →本DGの事例を「失敗しないための知識」として活用いただければ幸いです。We would be appreciated to leverage the examples of failure as "Knowledge to prevent failure" in bioanalysis.



こんにちは、今回イラストを 担当した デザイン四つ葉 の リバモリウム です。

ベンゼンちゃんはTwitterで有機ゆるきゃらがほしいよね、って話から描いてみて ↓

webで漫画を公開→電子書籍になった(今は整備中で読めないかも)

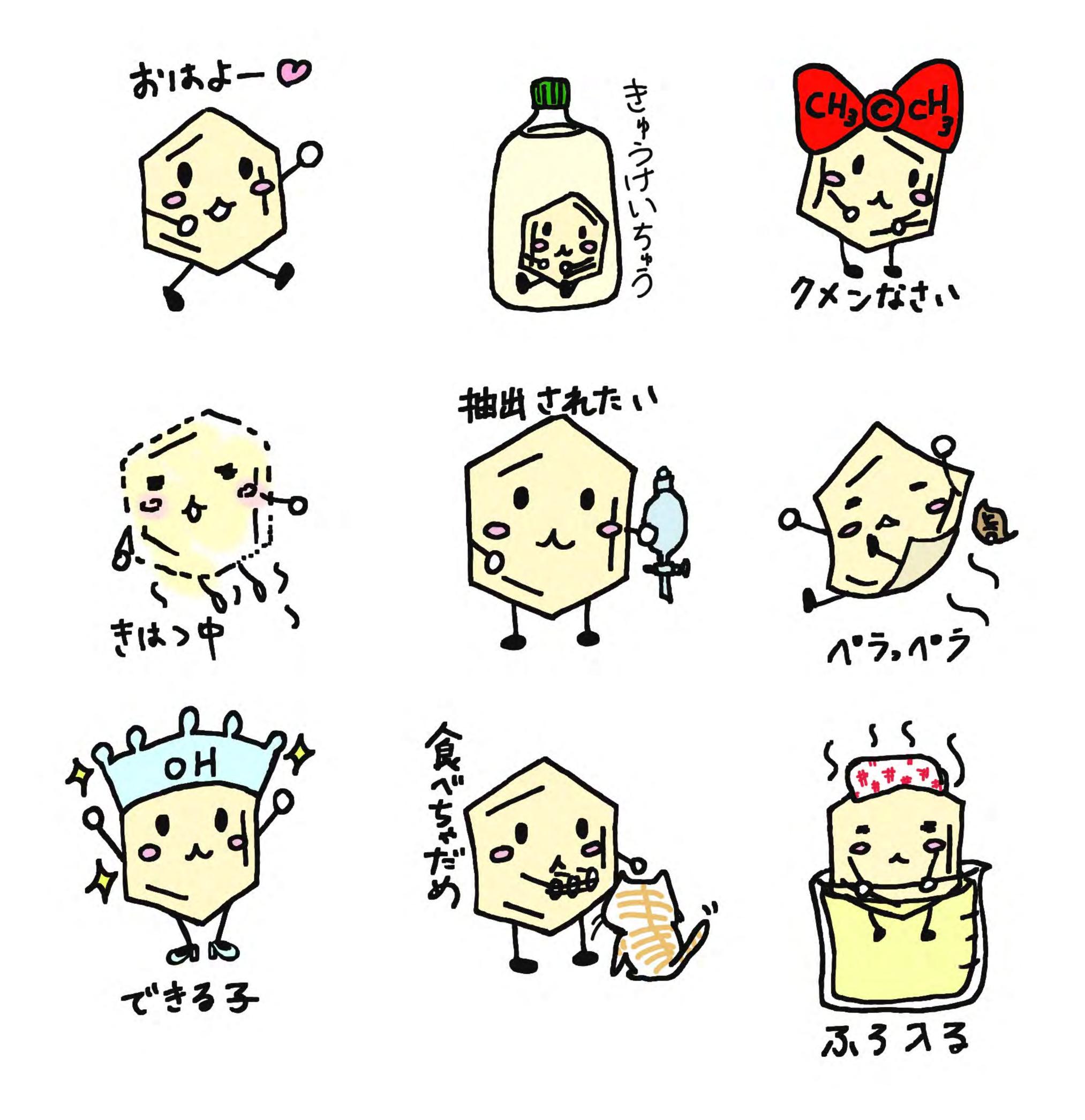
化学カードゲームを作った("いえらぼ☆ベンゼン編"対象は大学生くらい向け)

1

LINEスタンプを作った(ベンゼンちゃんで検索すると出てきます)

今回の発表者さんたちに見つけてもらってイラストを依頼して頂いた

というこんな流れでこの世のどこかでなんとなくいろんなことをしています。







皆様のご厚意により奇跡的に生息している

デザイン四つ葉さんは

工学部卒の修士で

自分のできる範囲で

実験・研究・イラストの

お仕事ができたらしたいです。

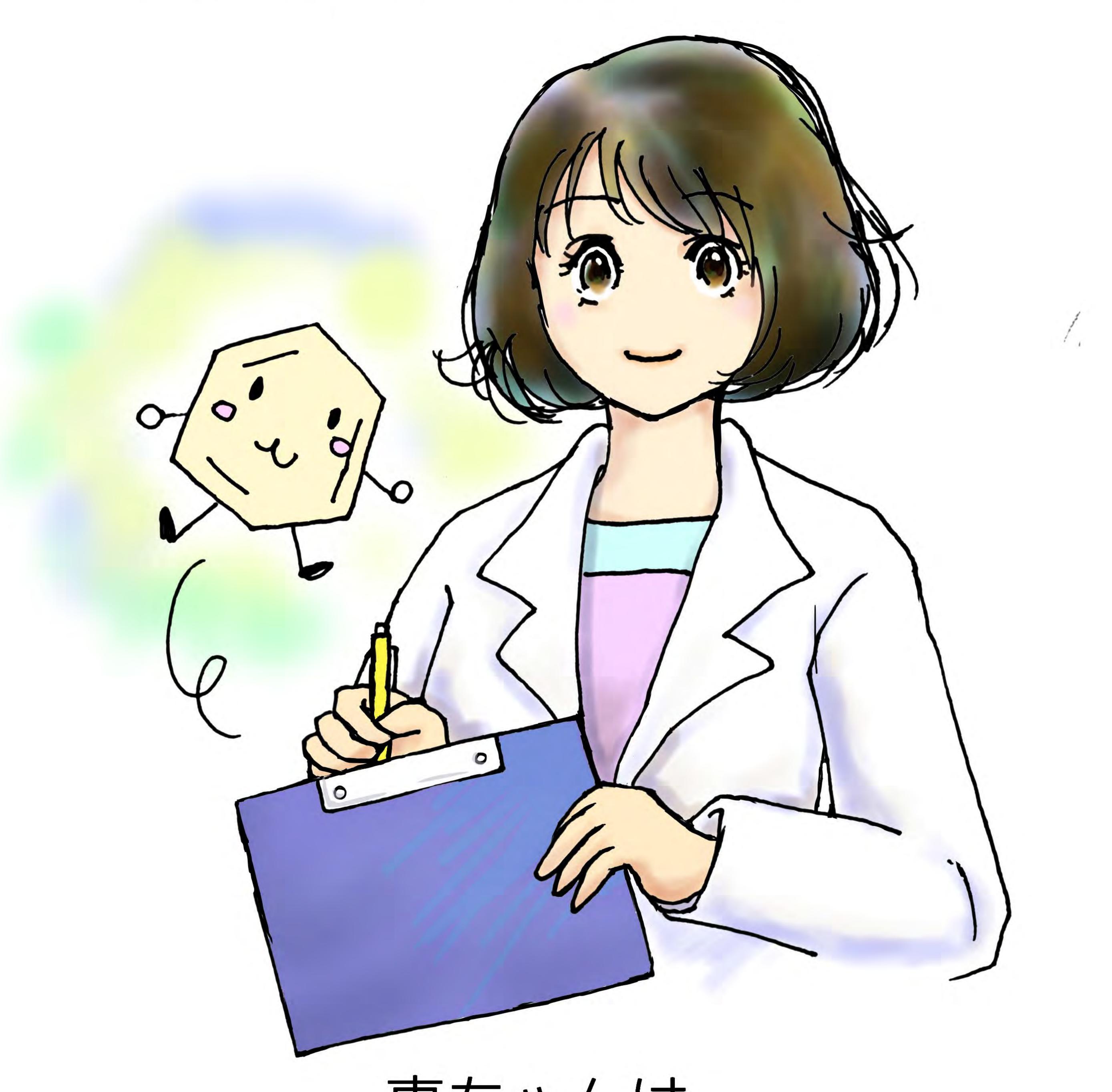
今年の10月から暇になります。

興味があったら

名刺を持ってゆかれてください。

今回イラストに呼んでくださった Mr.BLUE MOUNTAIN を はじめとするグループの皆様 ありがとうございました。

ベンゼンの妖精 ベンゼンちゃんこと めぐみちゃん と 工学部の4年生 恵ちゃん



恵ちゃんは 失敗ばかりじゃないんだぞ… ちゃんとまなんでるんだもんねー