

DG2014-07

分析法の構築

野田 巧¹, 大住 孝彦², 神波 亜矢子³,
副島 呉竹⁴, 戸田 亜希子⁵, 服部 芳明⁶, 牟田口 国則⁷

小野薬品工業株式会社¹, 大塚製薬株式会社², 田辺三菱製薬株式会社³, 富山化学工業株式会社⁴,
株式会社新日本科学⁵, コアメッド株式会社⁶, 株式会社住化分析センター⁷



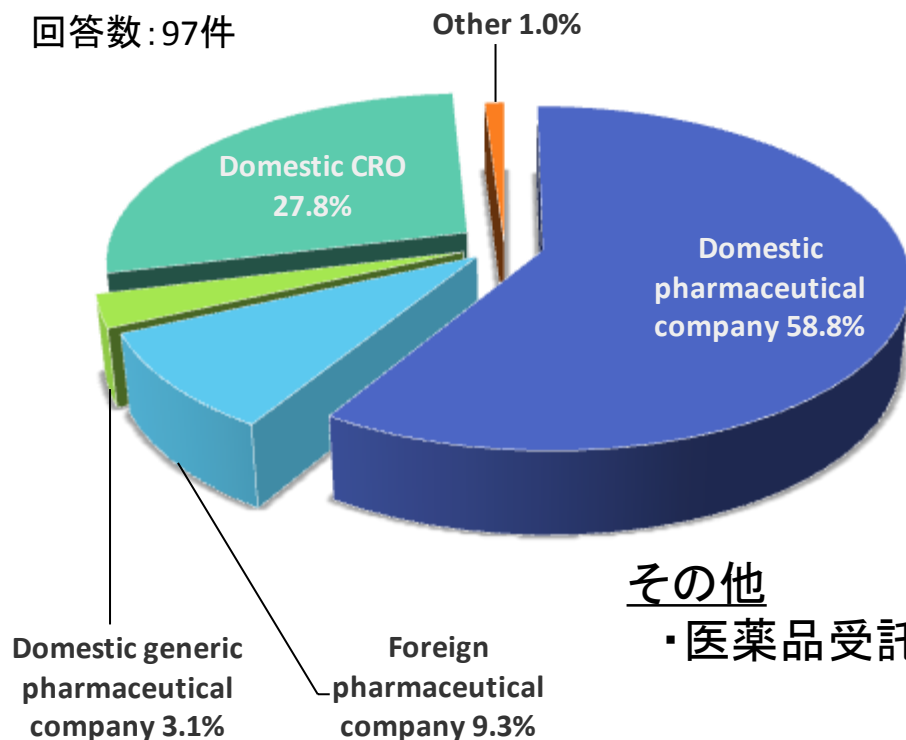
前処理法



背景

Q1. 回答者の所属は？

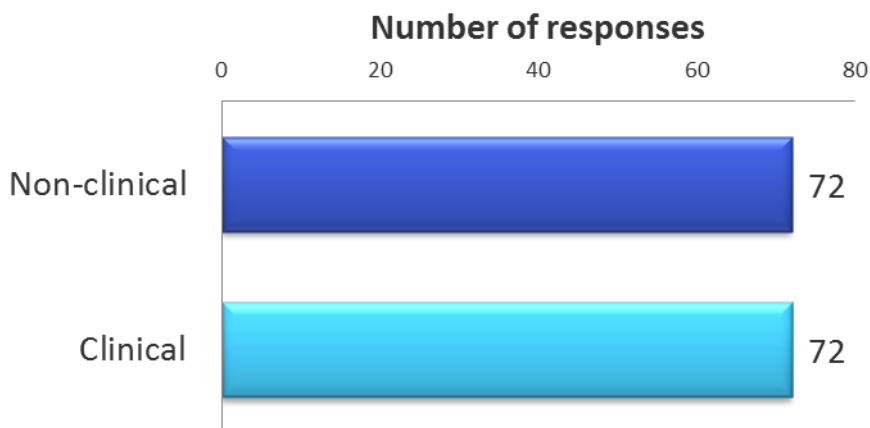
回答数: 97件



その他

・医薬品受託分析機関

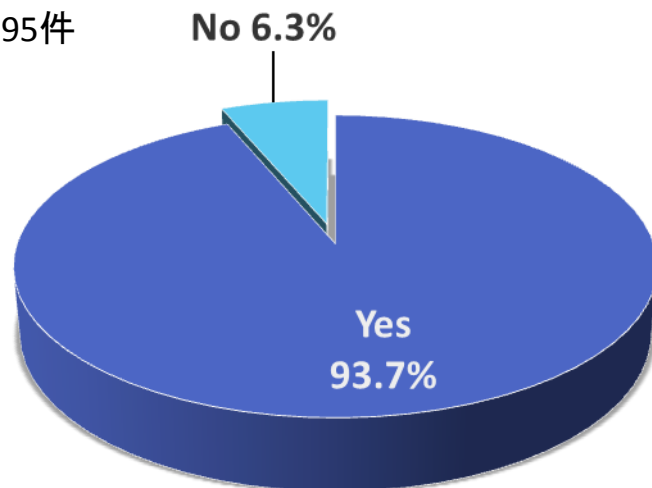
Q2. 担当されているステージはどこですか？



レギュレーション下での生体試料分析経験

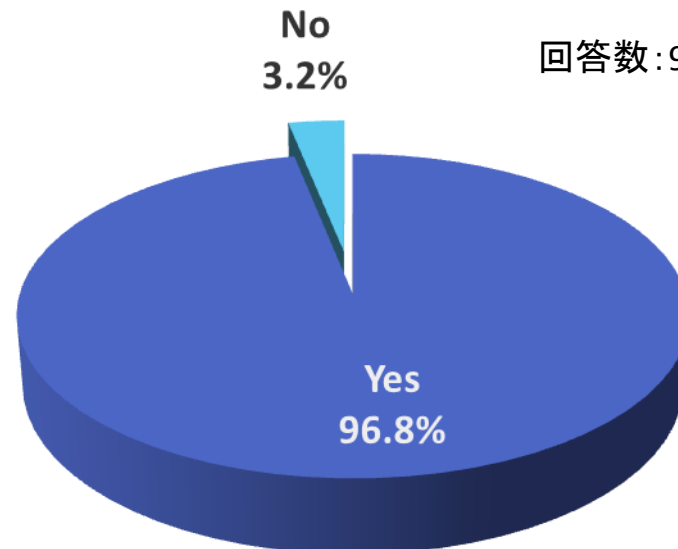
Q3. レギュレーション下（信頼性基準あるいはGLP）での生体試料分析経験はありますか？

回答数：95件



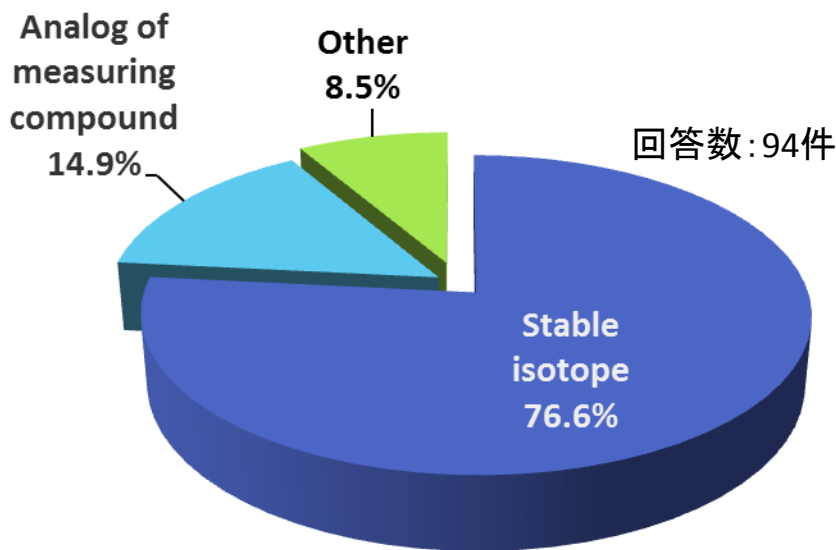
Q4. レギュレーション下での生体試料分析のための分析法構築を行ったことがありますか？

回答数：95件



内標準物質関連

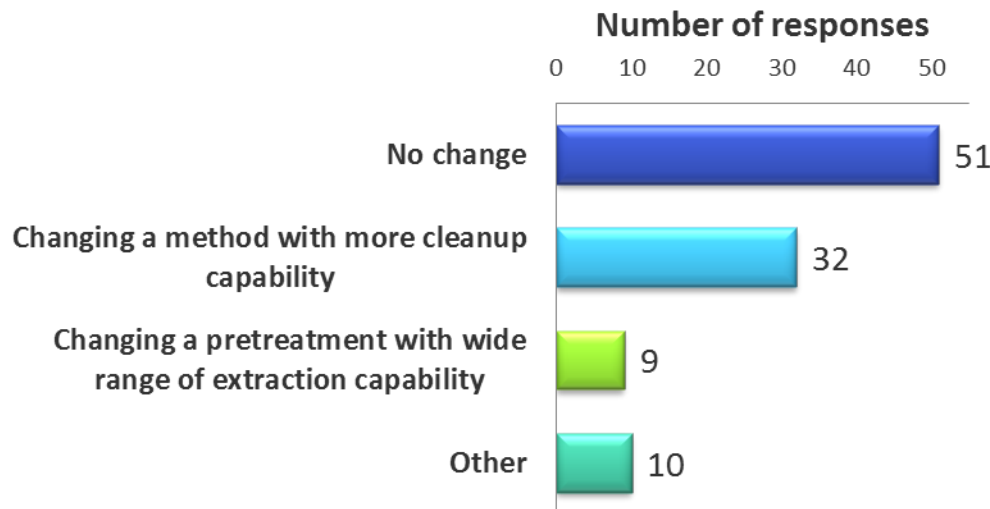
Q5. 内標準物質には何をよく用いますか？



その他

- ・上記いずれも使用する
- ・安定同位体と類縁体が半々
- ・非臨床は類縁体, 臨床は安定同位体 など

Q6. 内標準物質の種類(安定同位体あるいはそれ以外)によって分析法を変更しますか？(複数回答可)

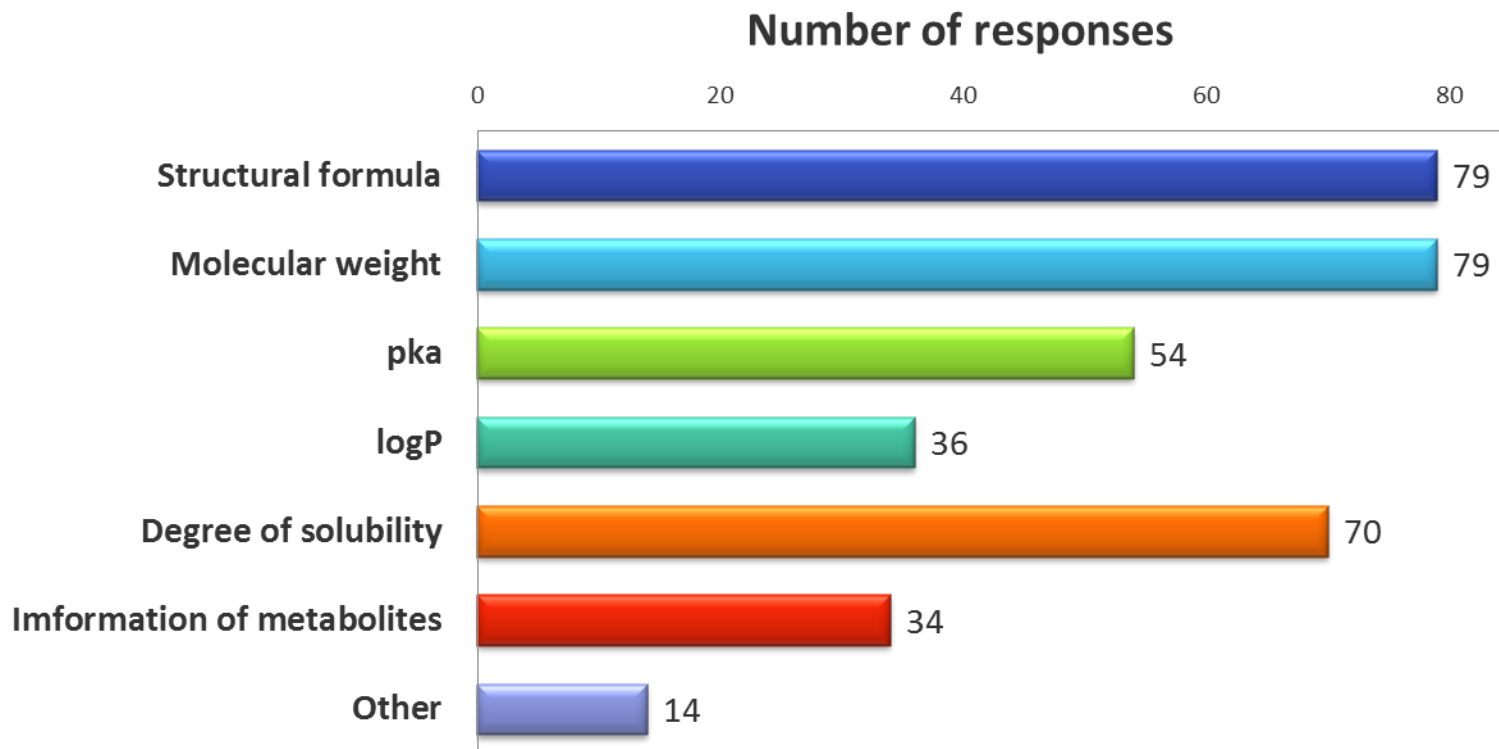


その他

- ・類縁体に変更する場合
回収率, クロマトの保持時間
定量範囲の確認 など

分析法構築前に入手する物性情報

Q7. 分析法構築前にどのような物性情報を入手しますか？



その他

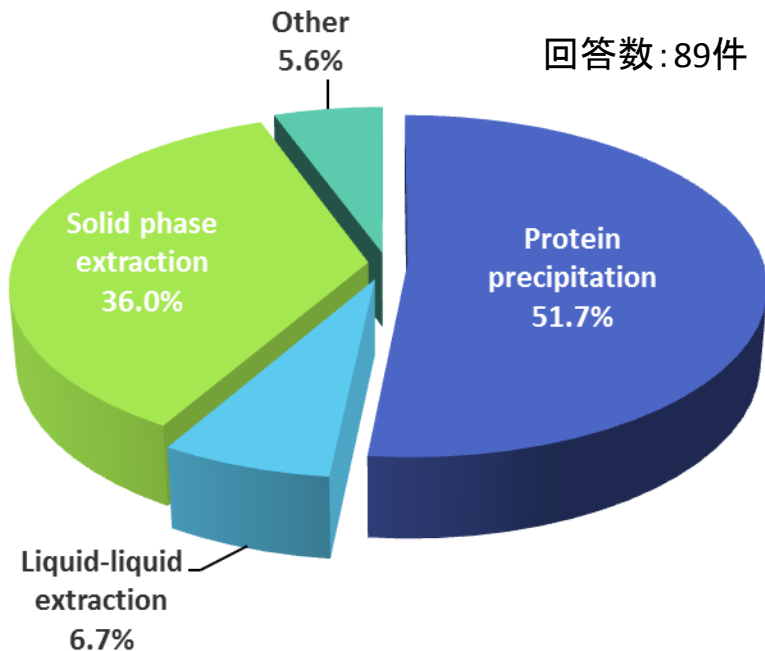
- ・吸着性
- ・吸湿性
- ・logD
- ・保存安定性(光, 熱)
- ・非臨床PKの分析条件
- ・MSの場合, 精密質量と同位体存在比率 など



前処理法の選択

前処理法の選択

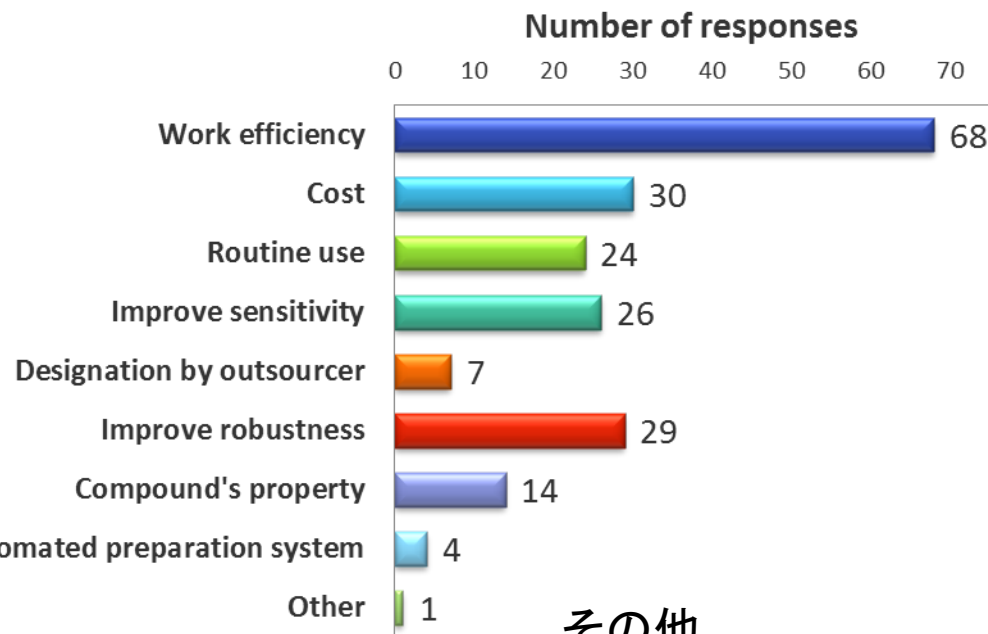
Q8. 最もよく利用する前処理法はどれですか？



その他

- ・創薬ステージによる
- ・2つの方法を組み合わせる
- ・測定感度による など

<Q9. 選択理由>



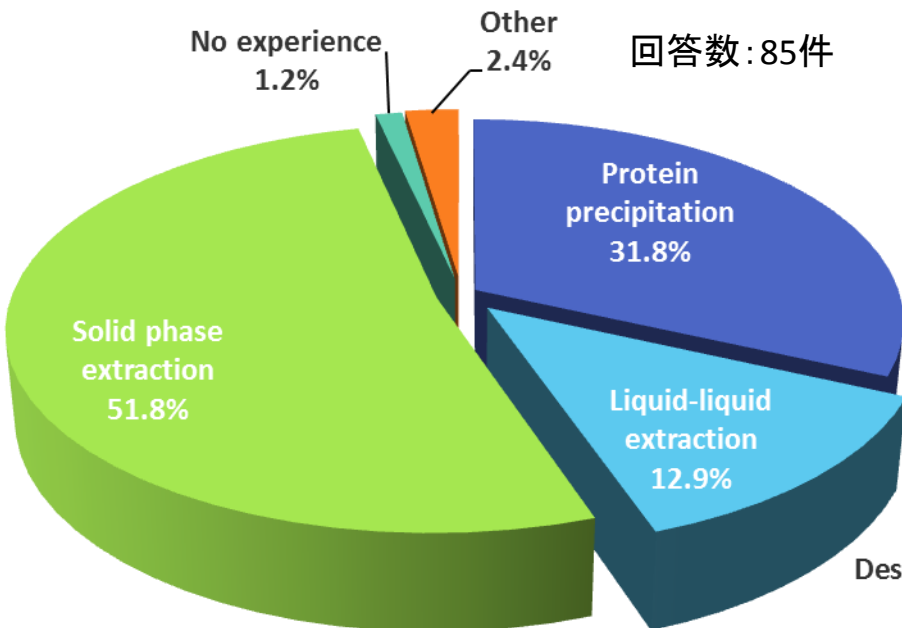
その他

- ・化合物の物理化学的性状に合わせて前処理を設定する

前処理法の選択

Q10. 次に利用する前処理法はどれですか？

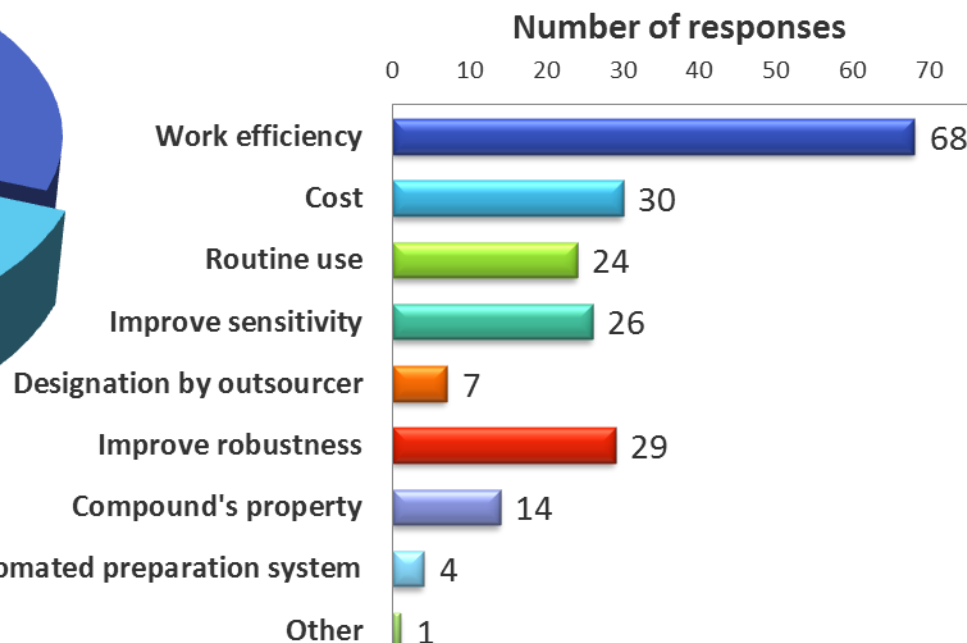
回答数: 85件



その他

- ・創薬ステージによる
- ・基本的に固相以外選択しない

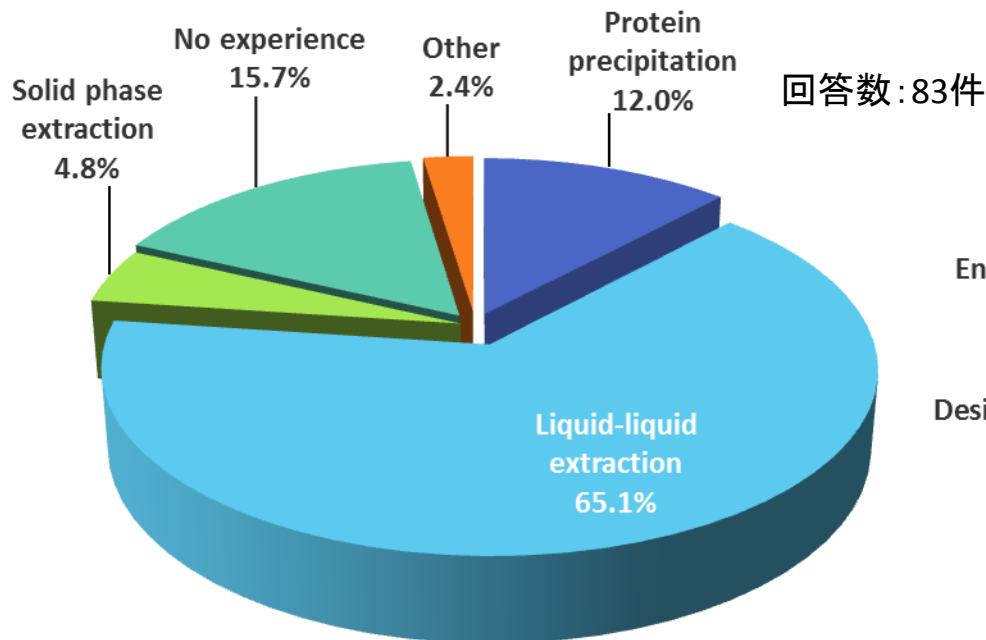
<Q11. 選択理由>



その他

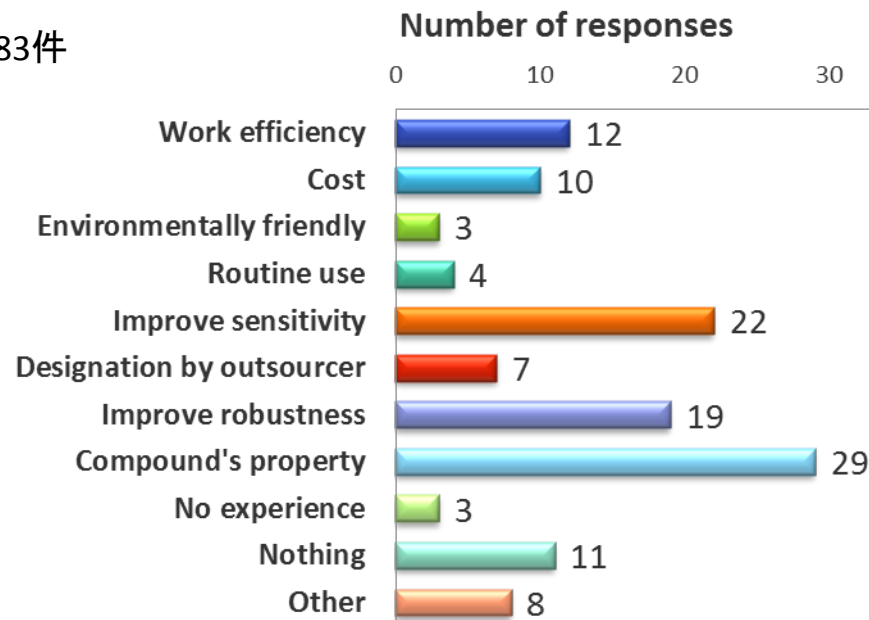
- ・夾雑成分の除去
- ・前処理効率
- ・マトリクス効果の低減 など

Q12. 第3選択の前処理法はどれですか？

その他

- ・珪藻土のカートリッジタイプ
- ・カラムスイッチング
- ・マトリクス効果の低減 など

<Q13. 選択理由>

その他

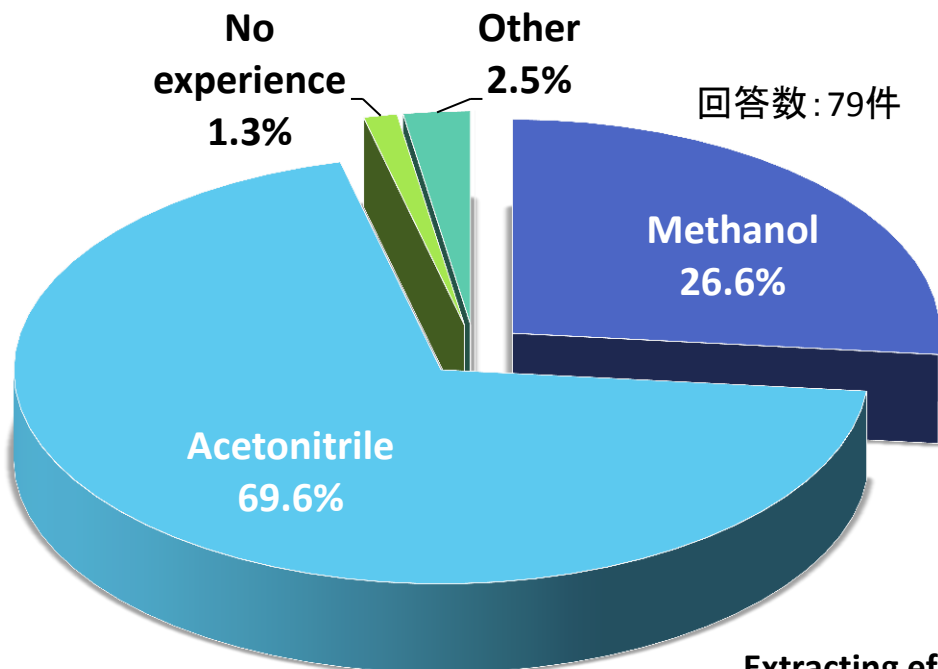
- ・珪藻土を用いた液液抽出は簡便にクリーンアップできる
- ・固相も液液も適さない場合
- ・頑健性 など



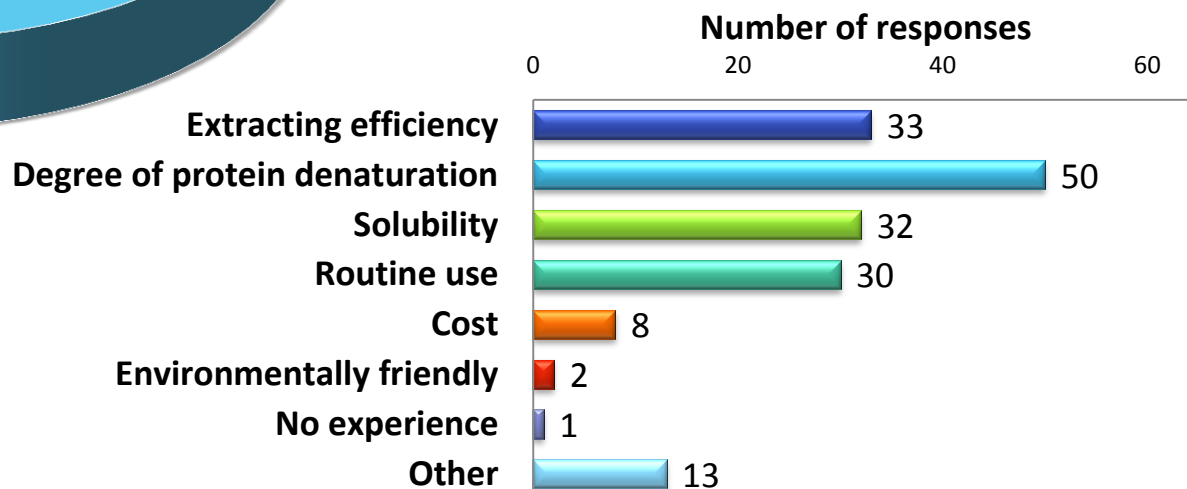
除タンパク法

除タンパク法

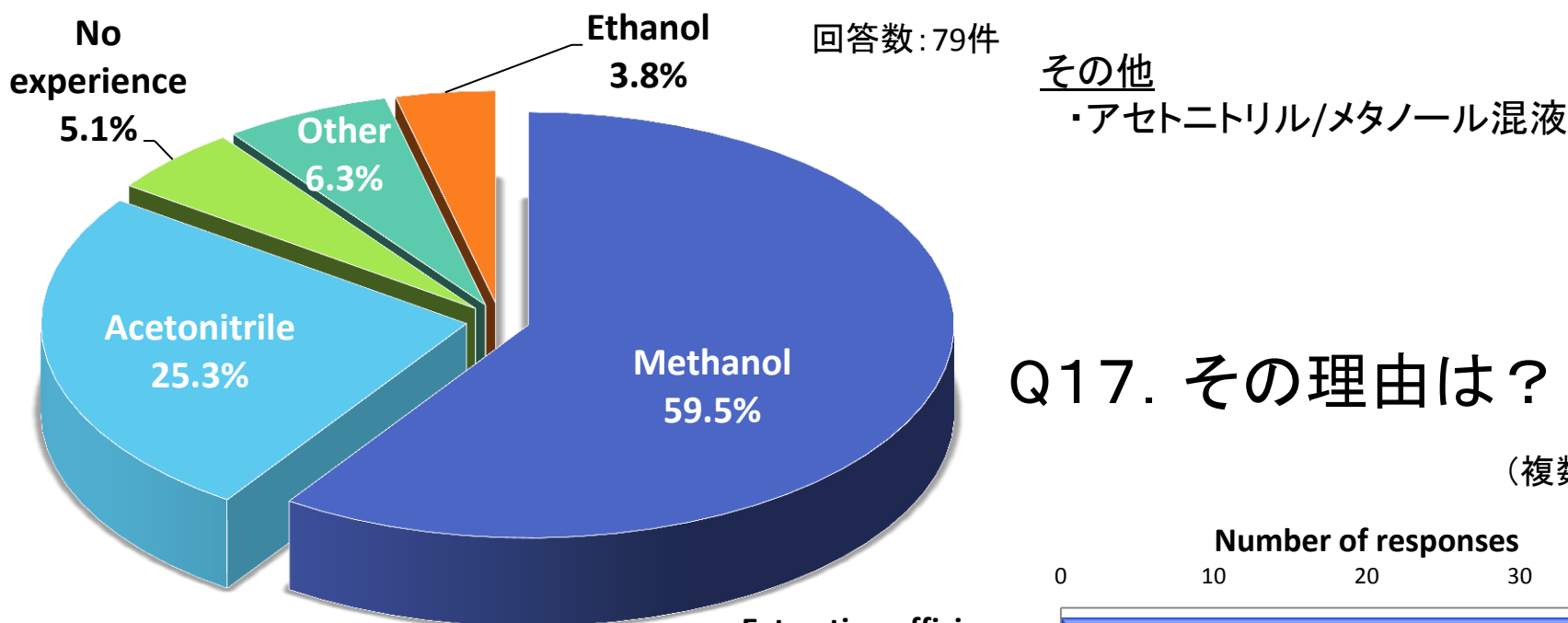
Q14. 抽出溶媒として何を第一選択としますか？



Q15. その理由は？ (複数回答)

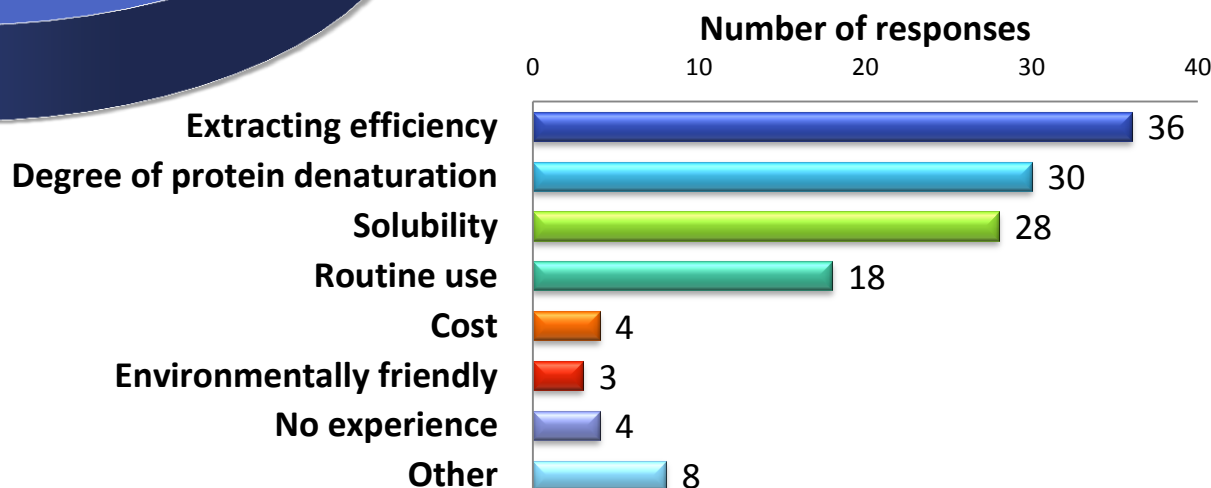


Q16. 次に良く利用する抽出溶媒は何ですか？

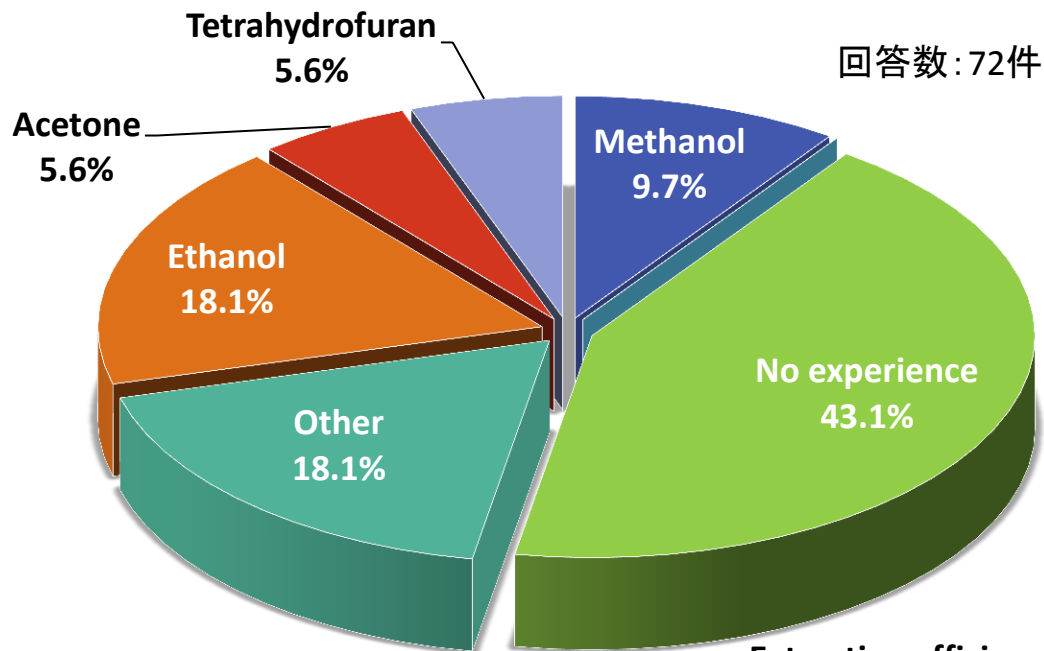


Q17. その理由は？

(複数回答)



Q18. 第三選択の抽出溶媒は何ですか？

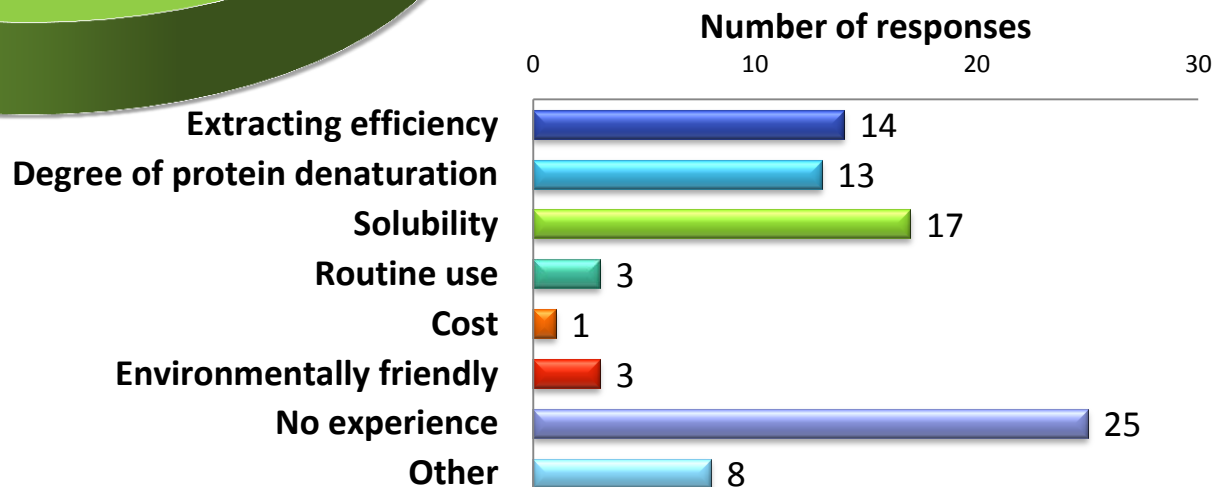


その他

- ・ブチルメチルエーテル
- ・トリクロロ酢酸

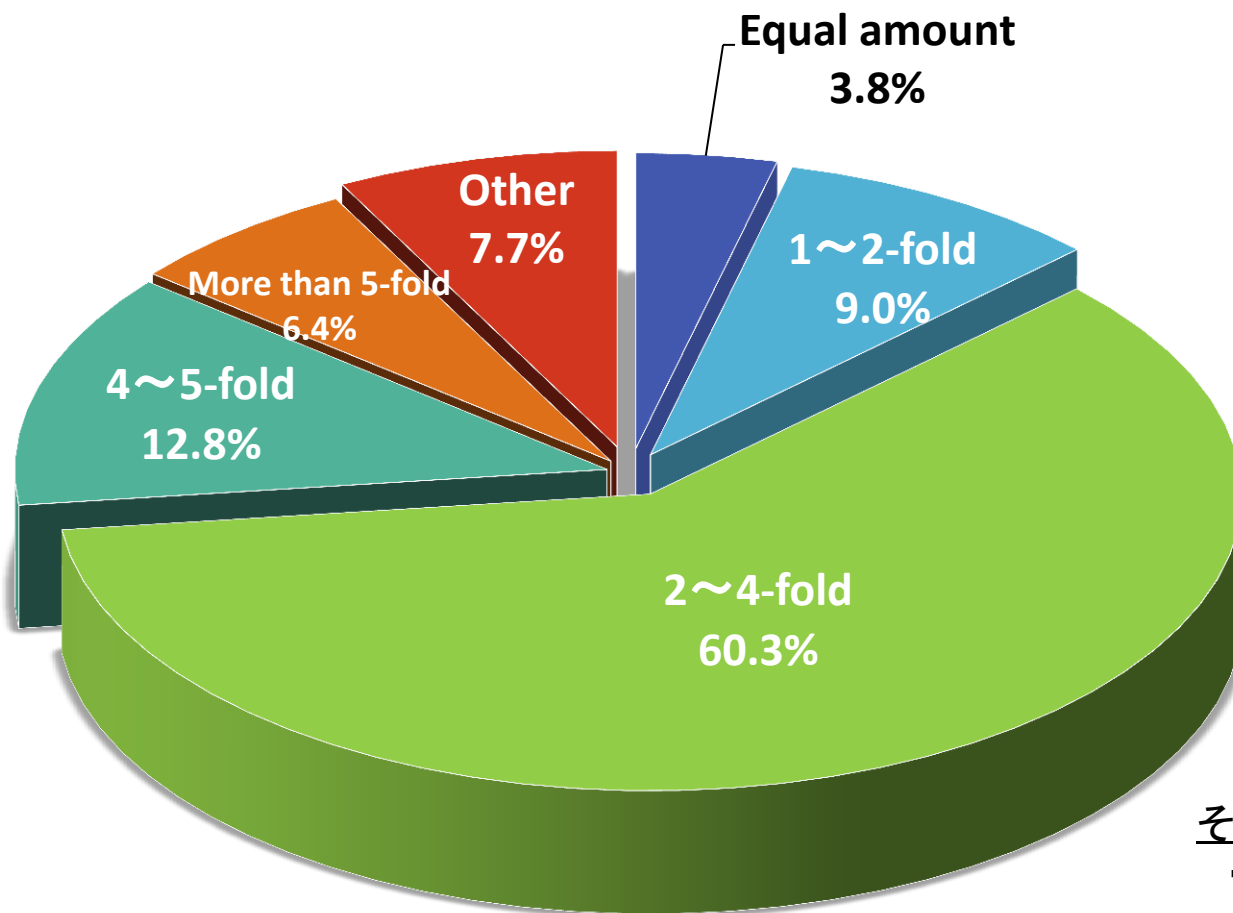
Q19. その理由は？

(複数回答)



Q20. 抽出溶媒は試料の何倍添加しますか？

回答数: 78件

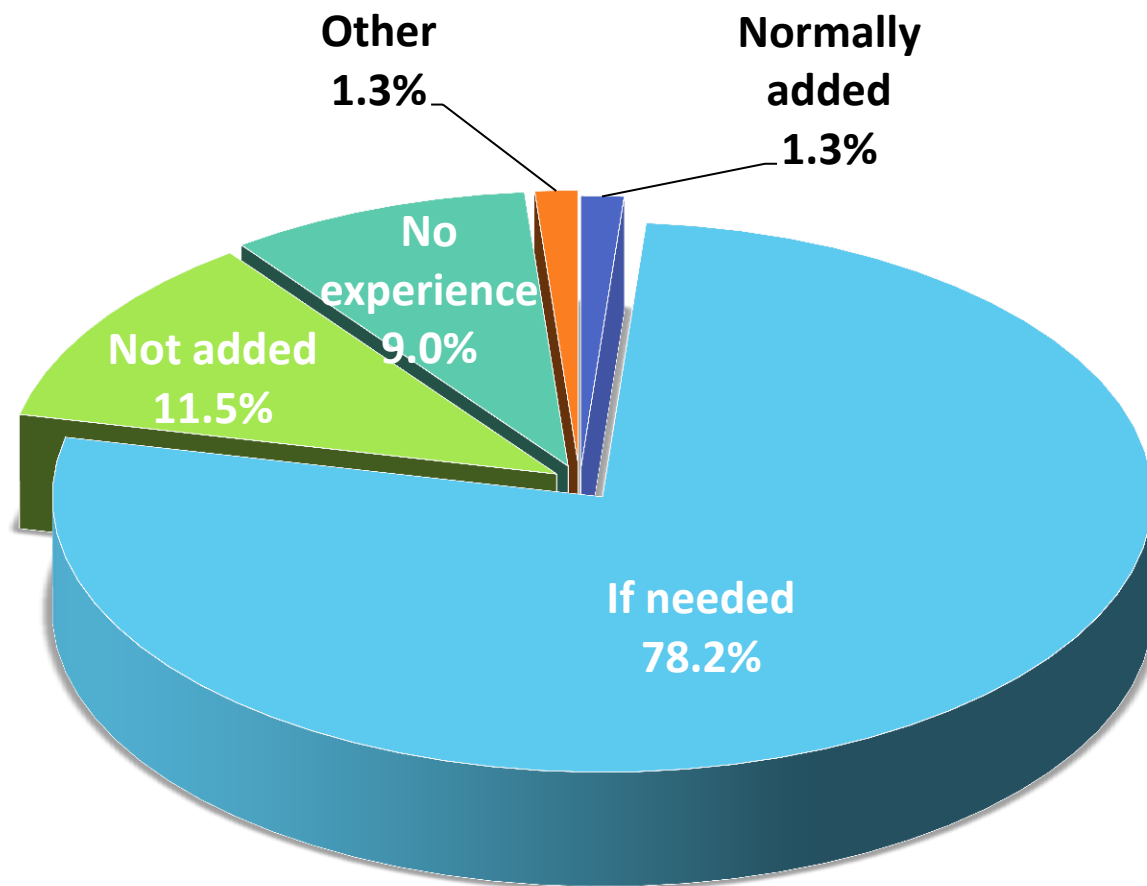


その他

- ・メタノールなら5倍以上、アセトニトリルなら3倍以上
- ・可能な限り倍率を上げる

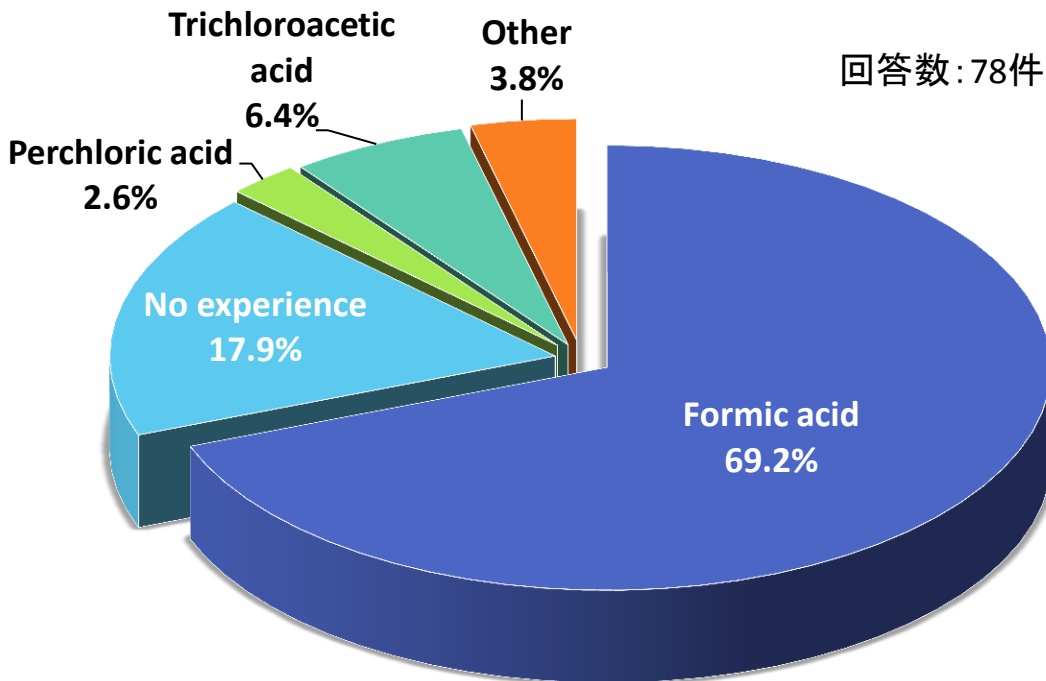
Q21. 酸を添加した抽出溶媒を用いた経験はありますか？

(例: 0.1 vol%ギ酸メタノール) 回答数: 78件



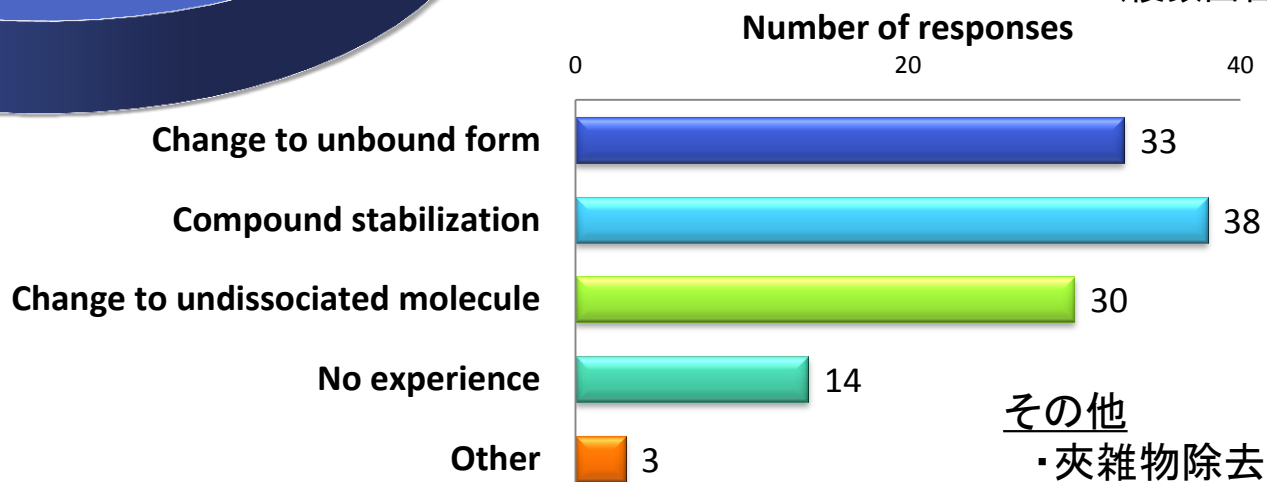
除タンパク法

Q22. 酸を添加する場合、何を第一選択としますか？

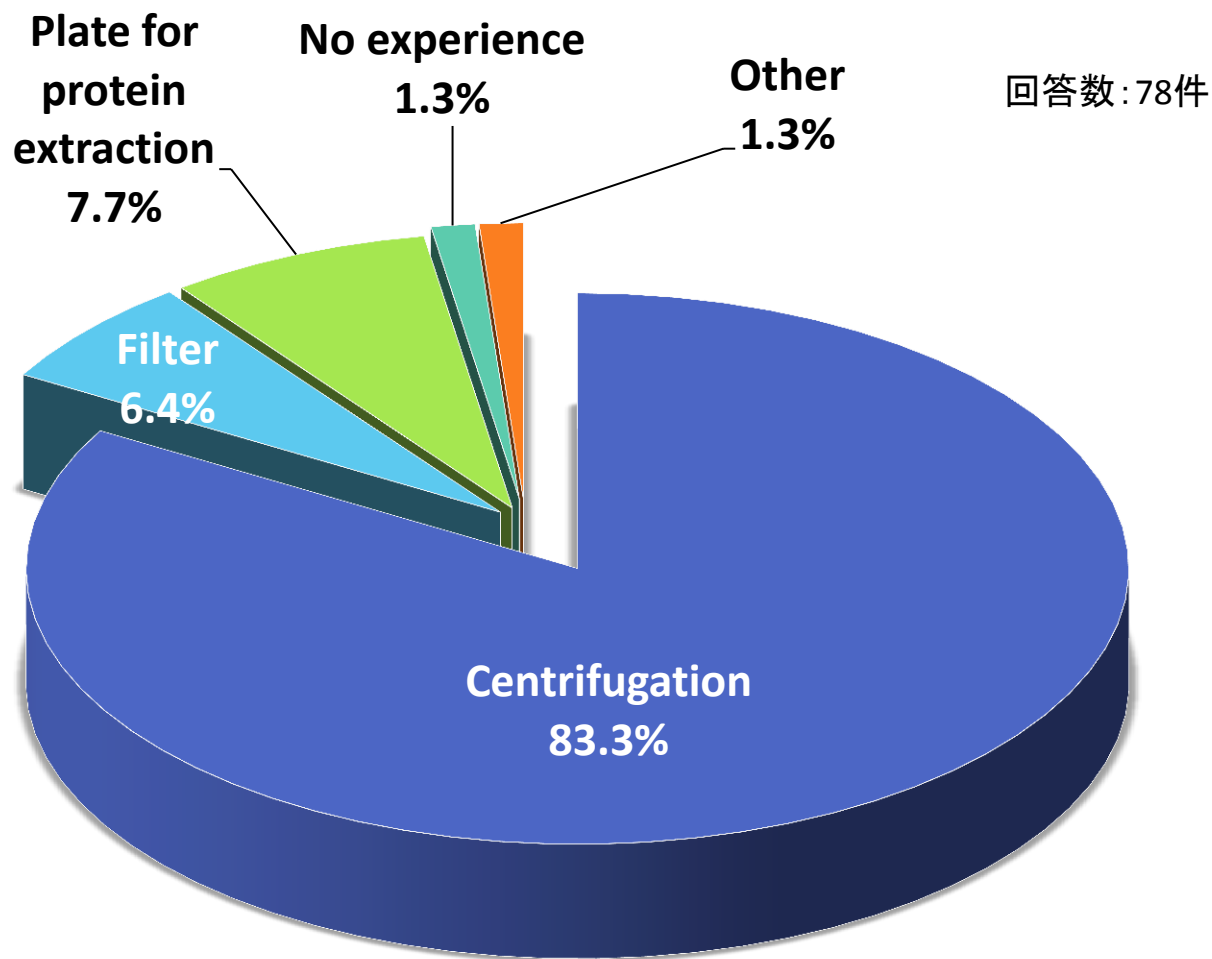


Q23. 酸を添加する理由

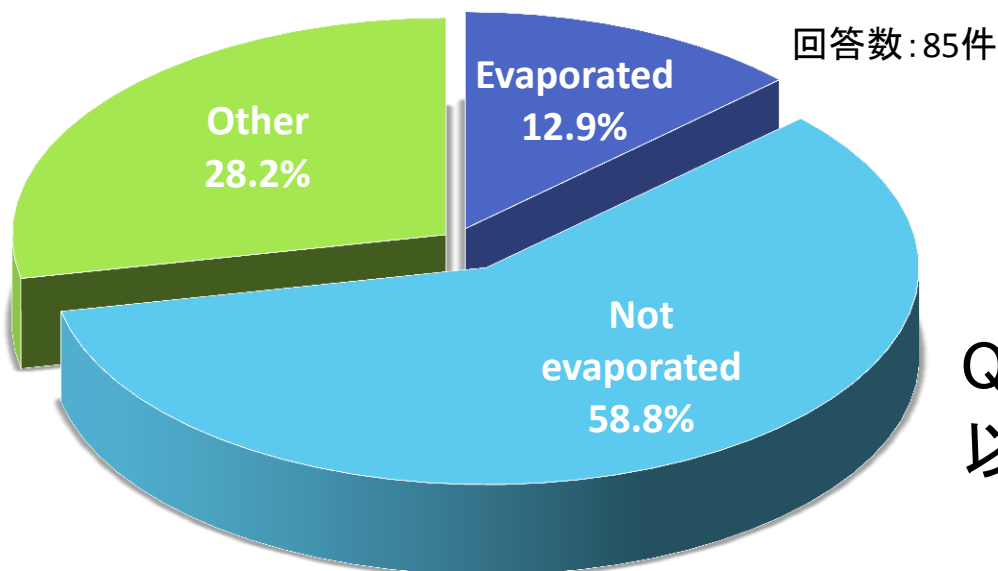
(複数回答)



Q24. 沈渣の除去方法として、何を第一選択としますか？



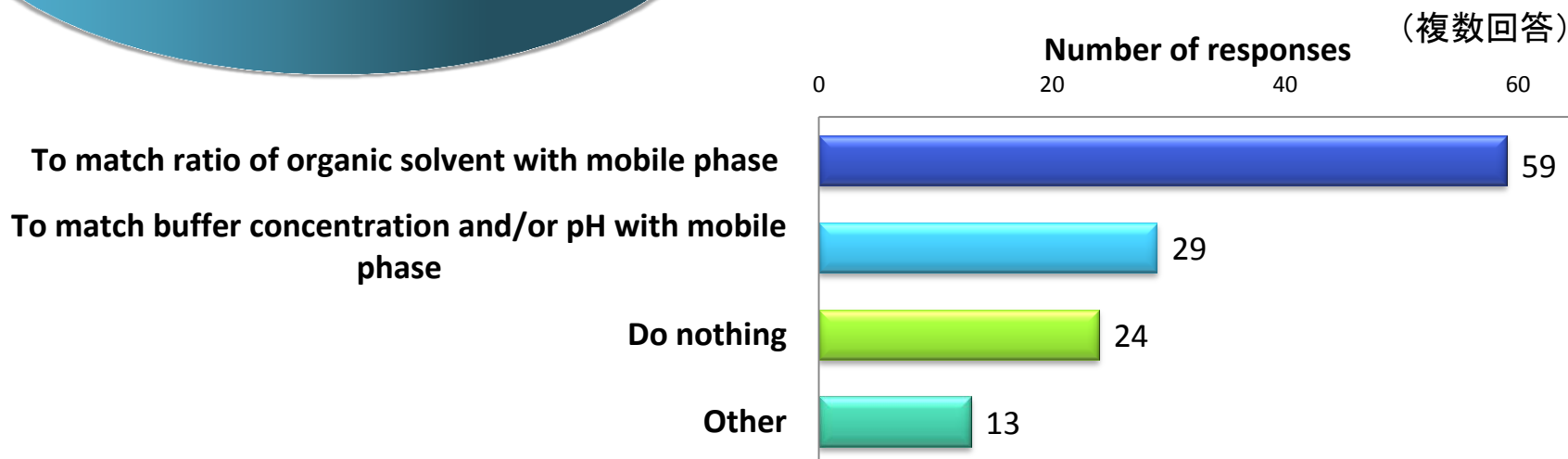
Q25. バイアルに詰める前に乾固操作は行いますか？



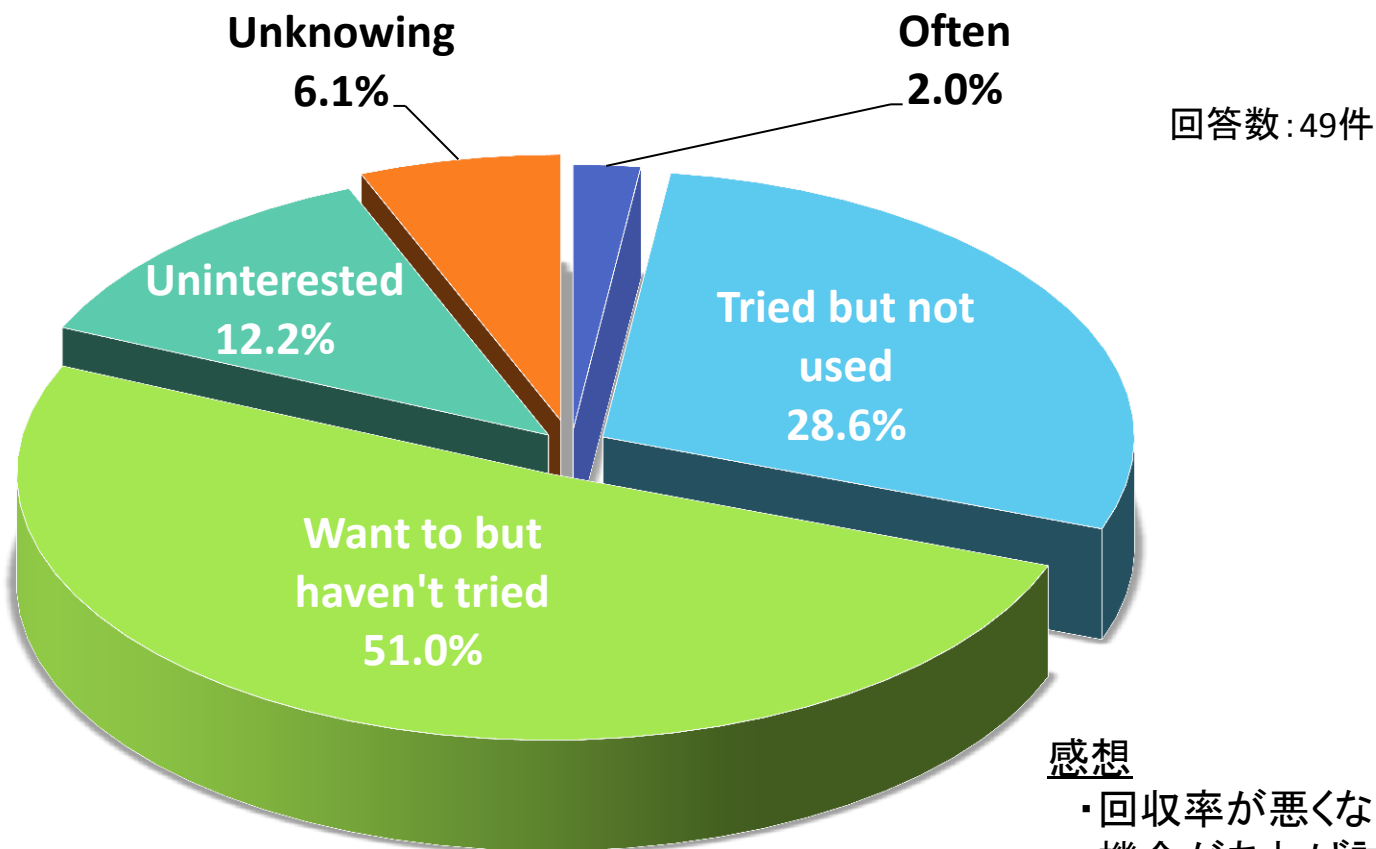
その他

- ・ケースバイケース
- ・基本は乾固したくない
- ・感度や物性(再溶解されるか)によっては乾固することもある

Q26. バイアルに詰める前に以下のような対応をしますか？



Q27. リン脂質除去フィルターを使用したことはありますか？



感想

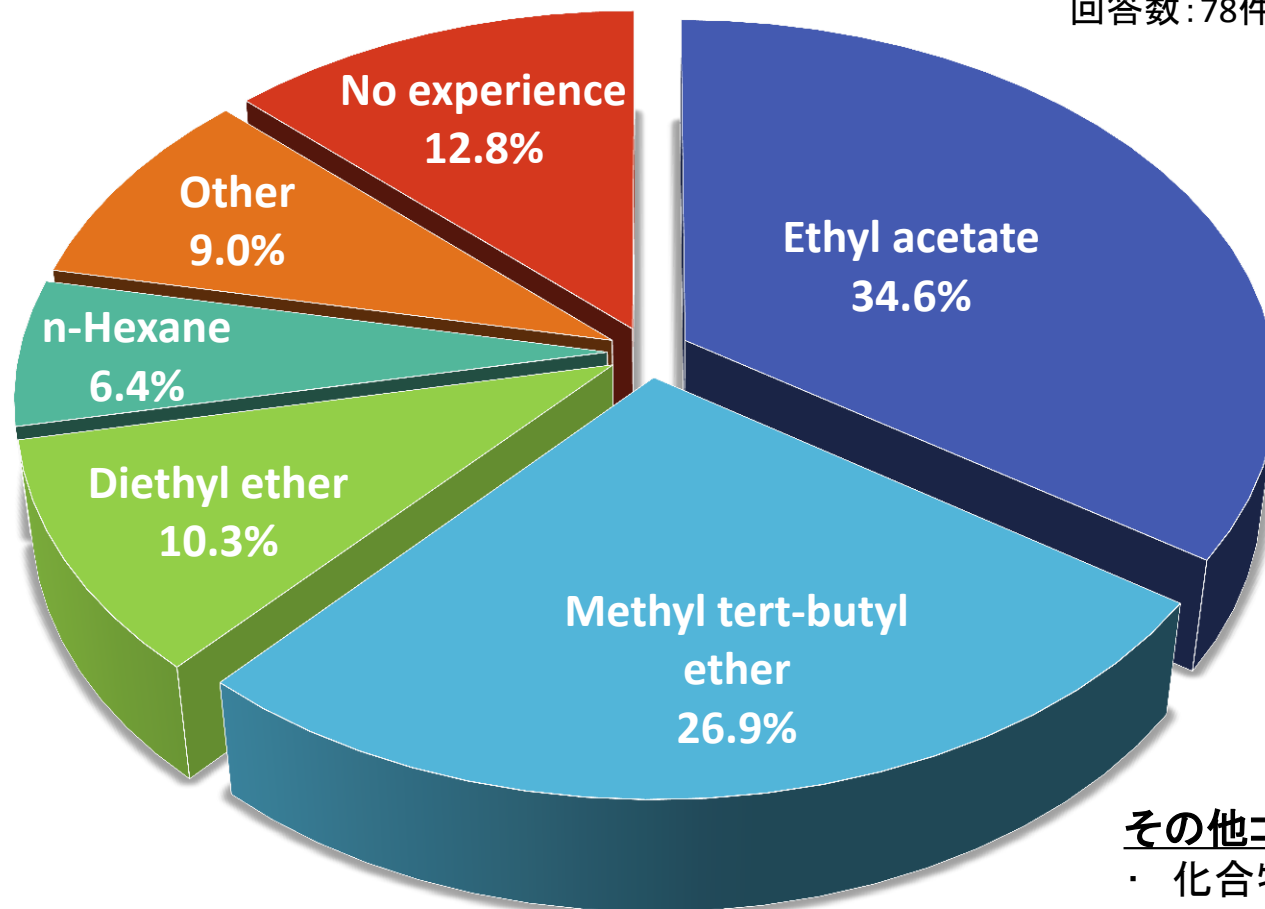
- ・回収率が悪くなり、あまり効果がなかった。
- ・機会があれば試してみたい
- ・フィルターのメーカーや化合物によって回収率が悪いことがあった。



液-液抽出法

Q28. 抽出溶媒として何を第一選択としますか？

回答数: 78件

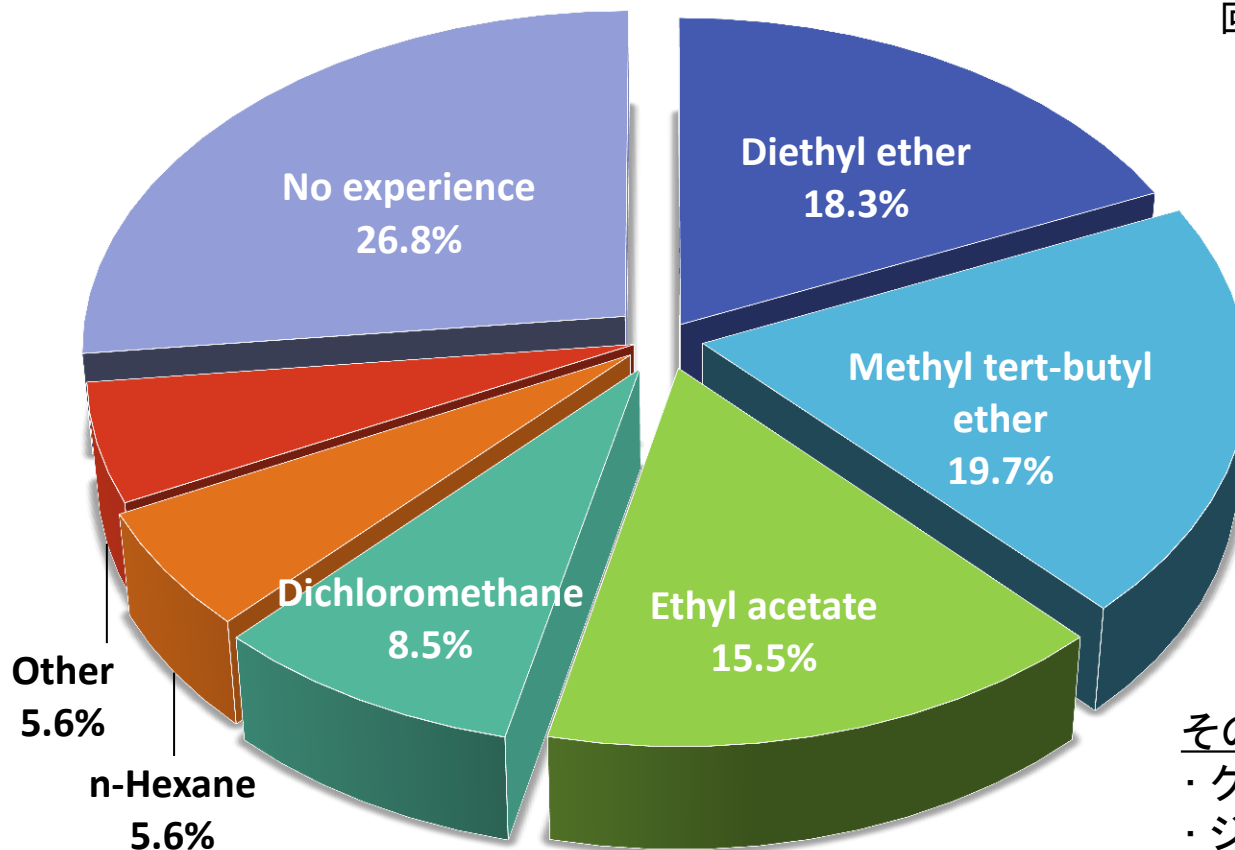


その他コメント

- ・ 化合物の物性に合わせる
- ・ クロロフォルム

Q30. 次に良く利用する抽出溶媒は何ですか？

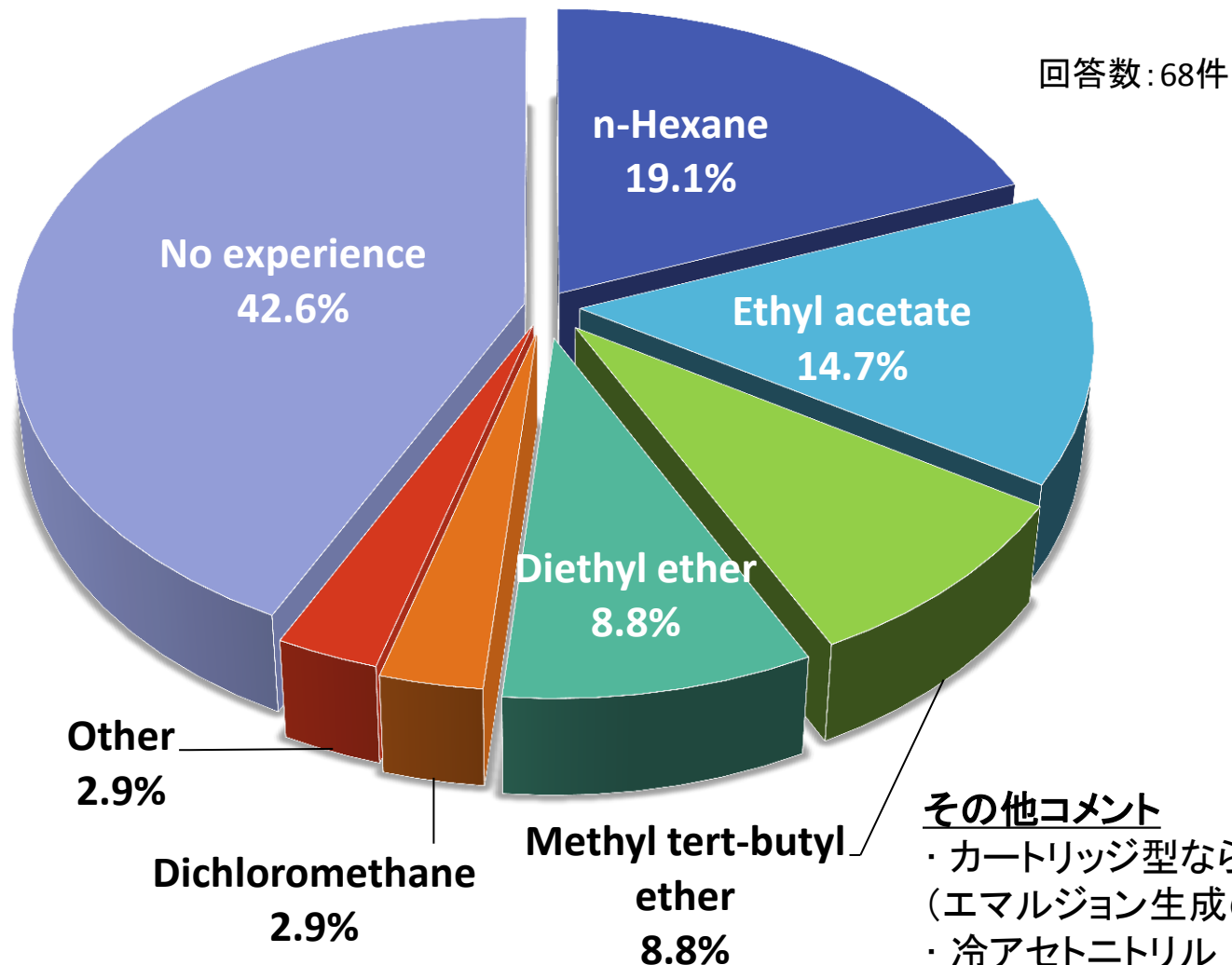
回答数: 71件



その他コメント

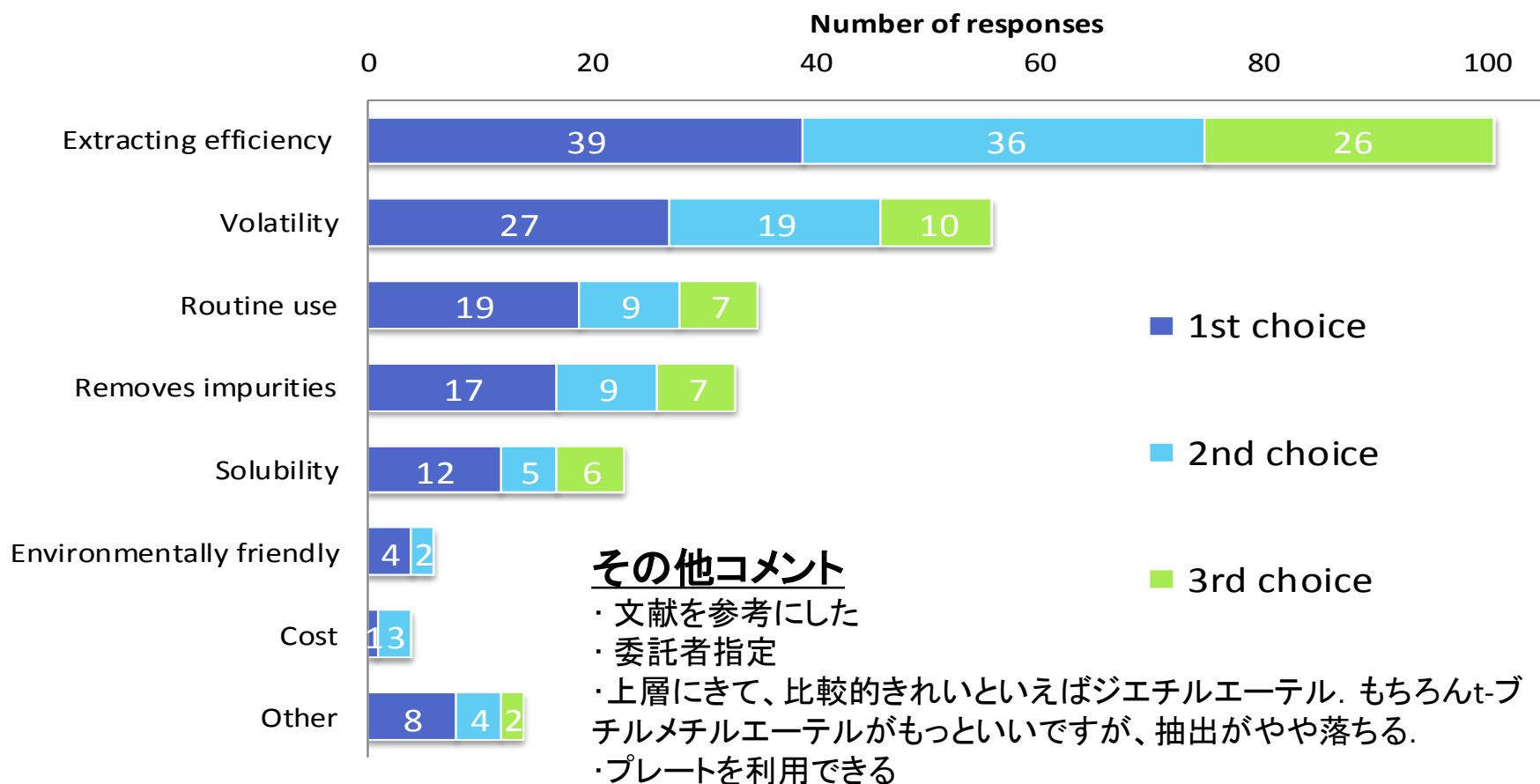
- ・クロロホルム/メタノール(2/1)
- ・ジエチルエーテルと酢エチやイソプロパノールの混液
- ・イソプロパノール

Q32. 第三選択の抽出溶媒は何ですか？



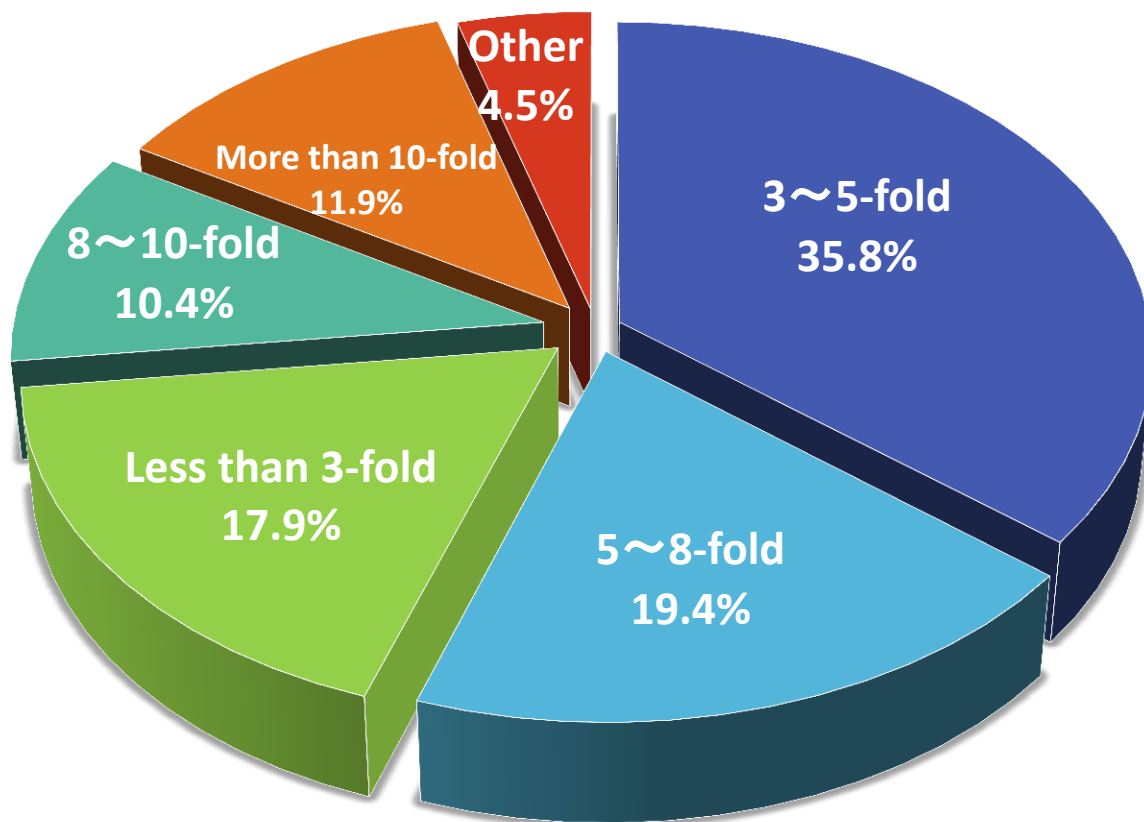
Q29, 31, 33

その抽出溶媒を選択した理由は何ですか？（複数回答可）



Q34. 抽出溶媒は第一選択として試料の何倍添加しますか？

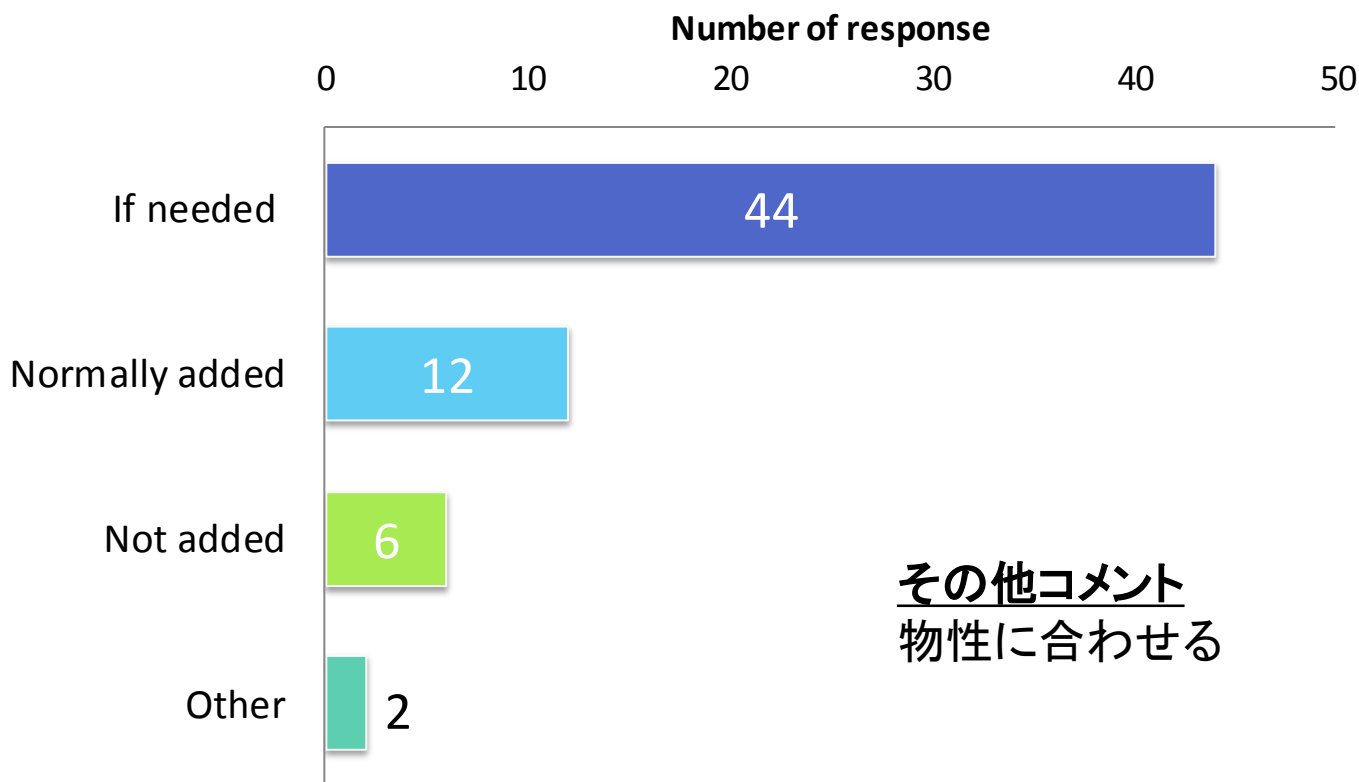
回答数:67件



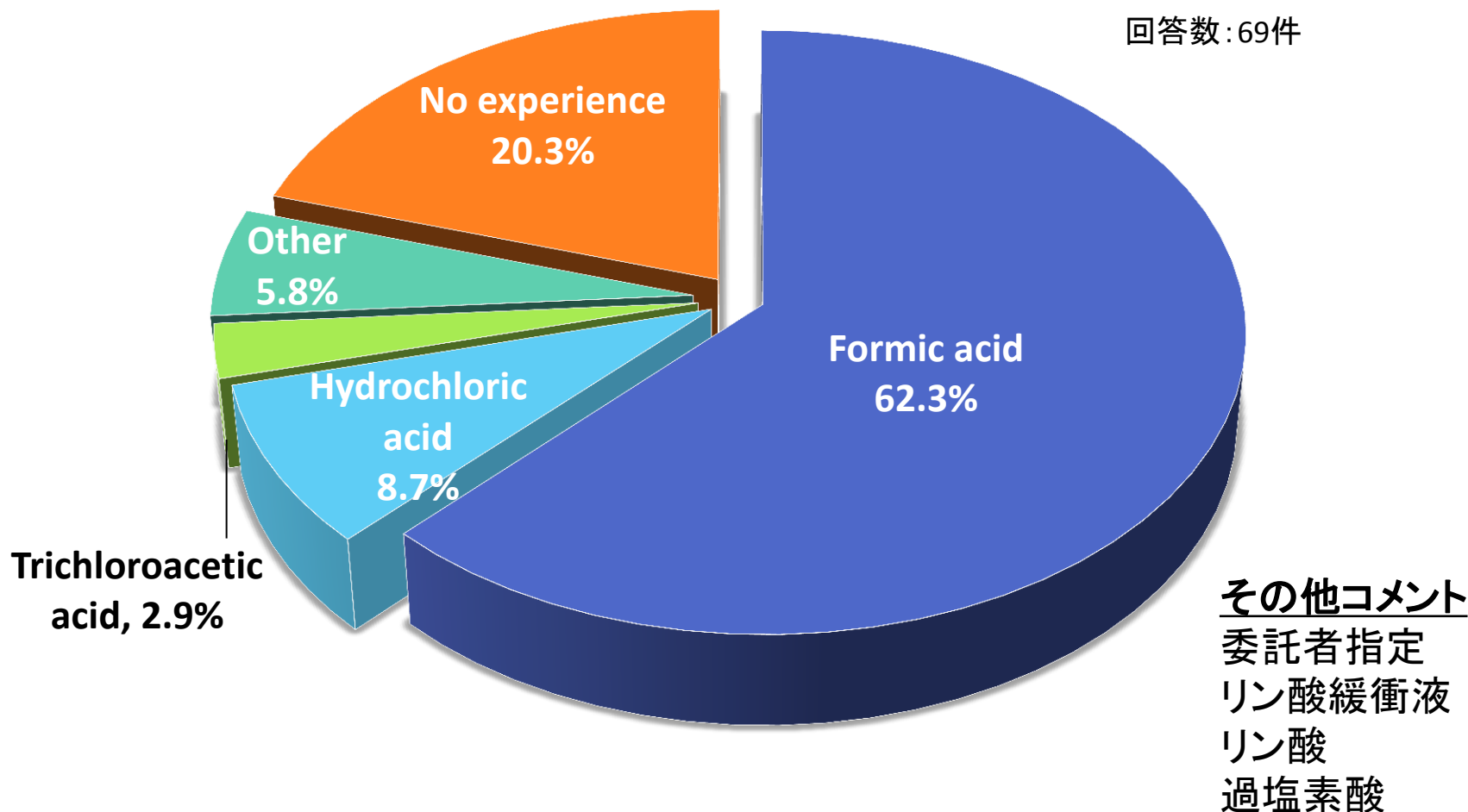
その他コメント

委託者の指定に従う
物性に依存するが5倍以上
ケースバイケース

Q35. 抽出するときに、生体試料に緩衝液等を添加してpHを調整したことはありますか？（複数回答可）

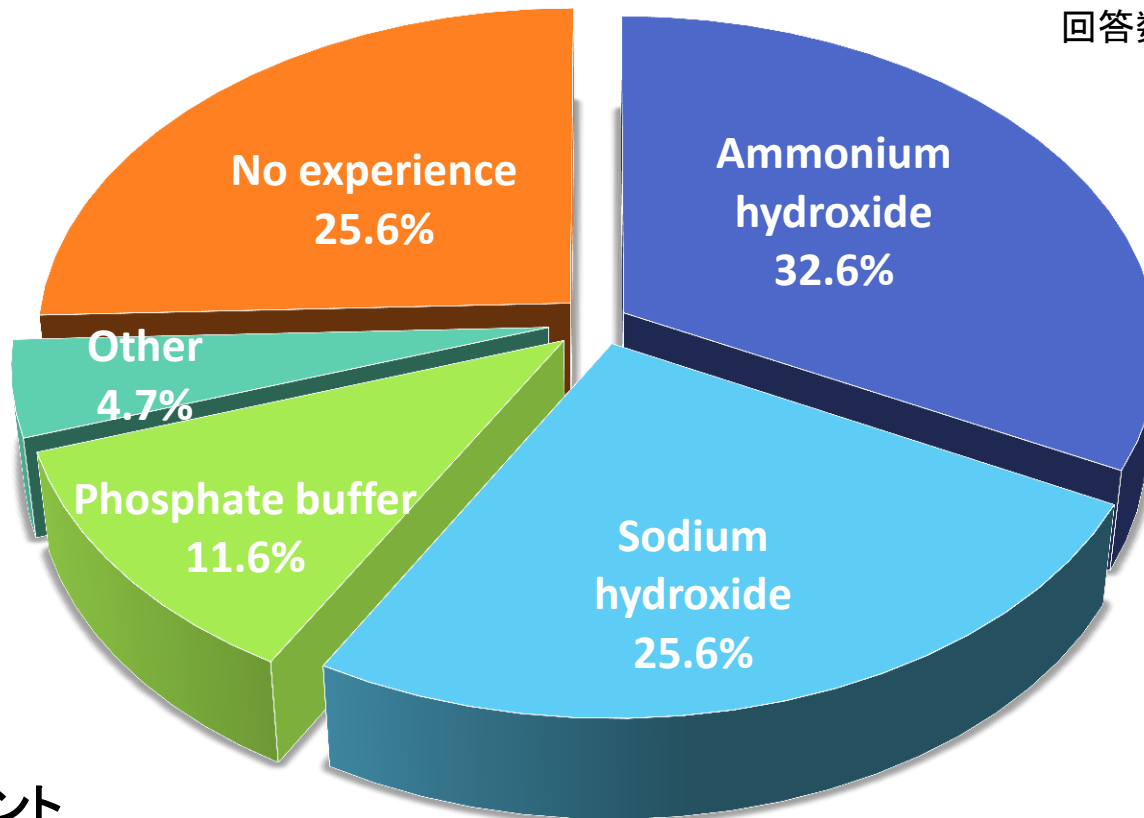


Q36. 酸を添加する場合、何を第一選択としますか？



Q37. 塩基を添加する場合、何を第一選択としますか？

回答数: 41件

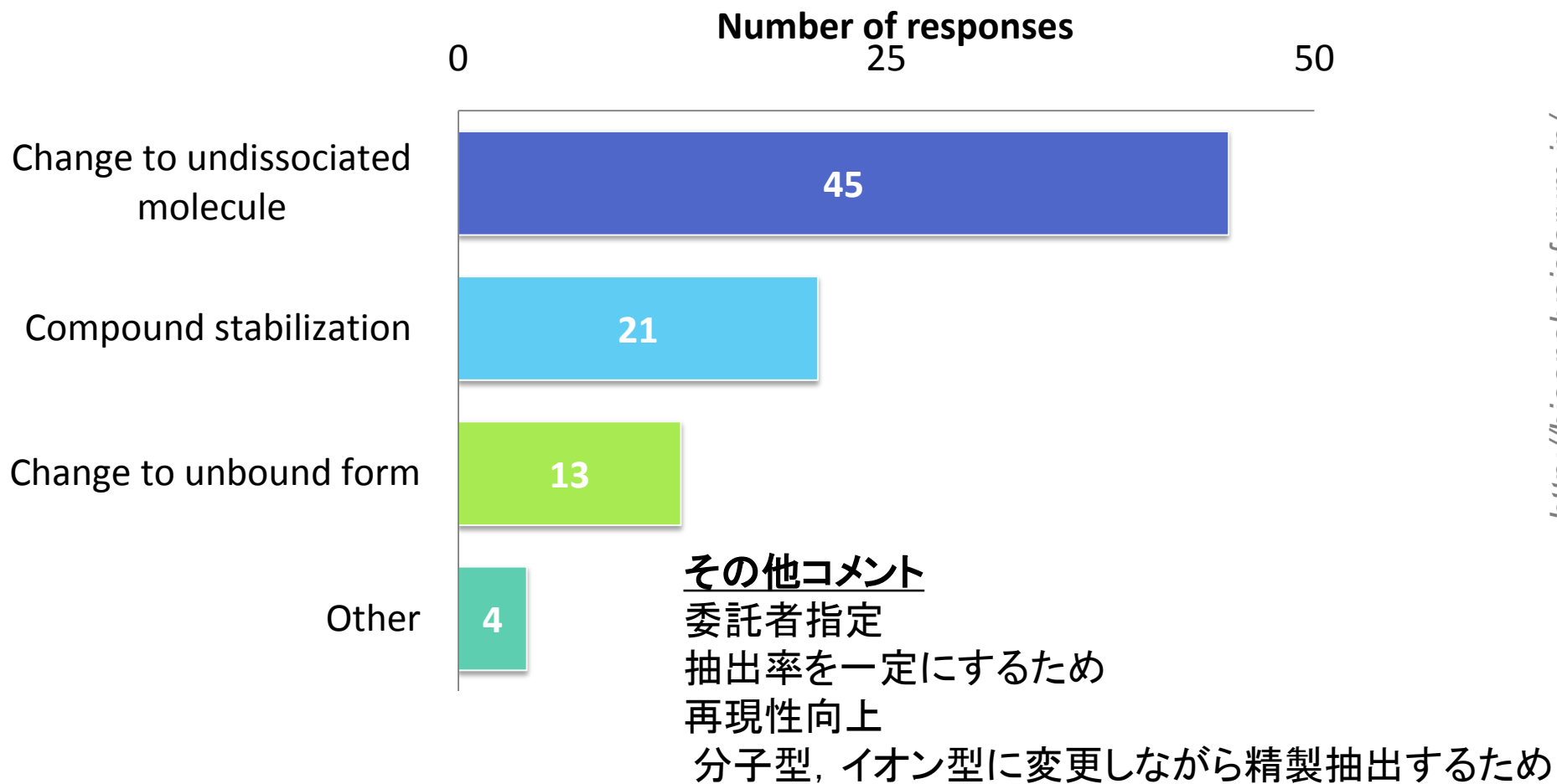


その他コメント

委託者指定

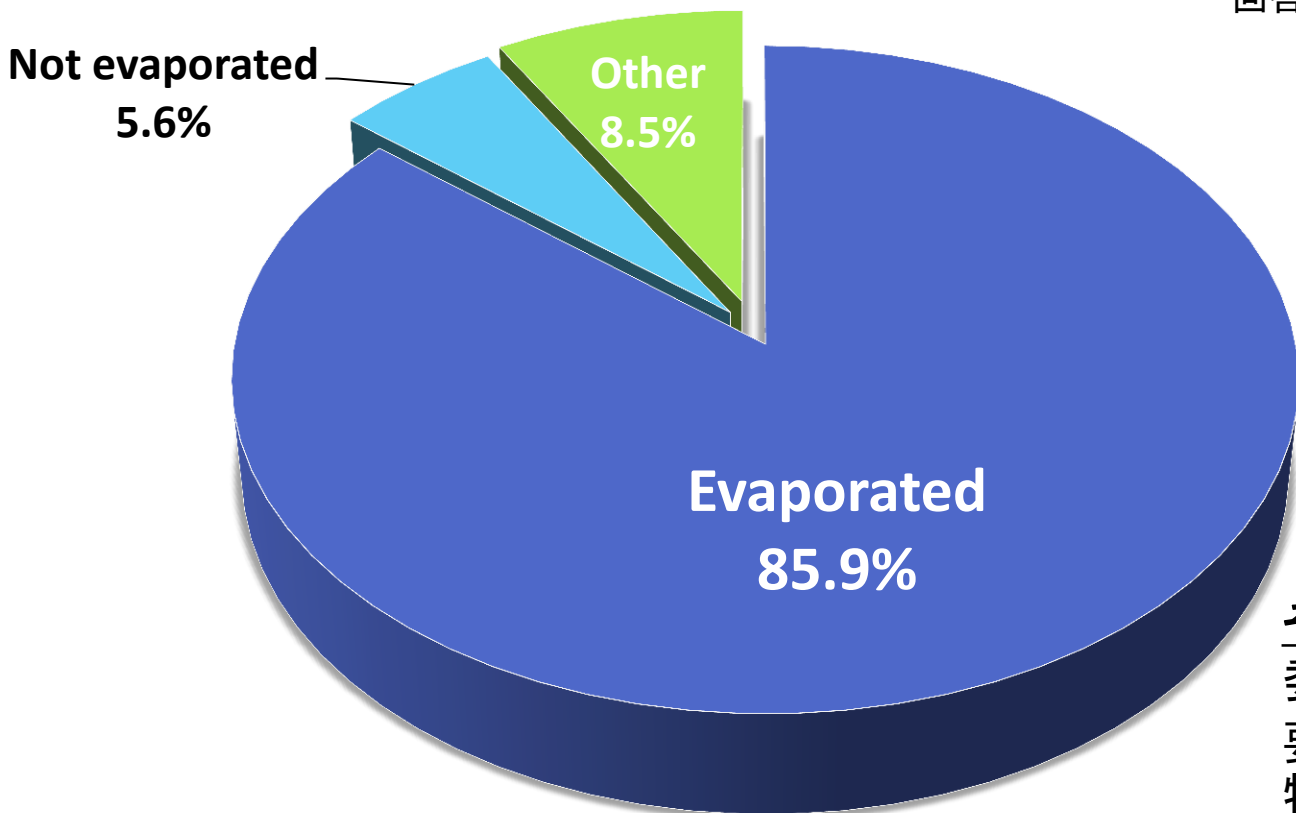
HPLCであればリン酸緩衝液, MSであればアンモニア水又は炭酸水素アンモニウム

Q38. 緩衝液を添加する理由は何ですか？（複数回答可）



Q39.バイアルに詰める前に乾固操作は行いますか？

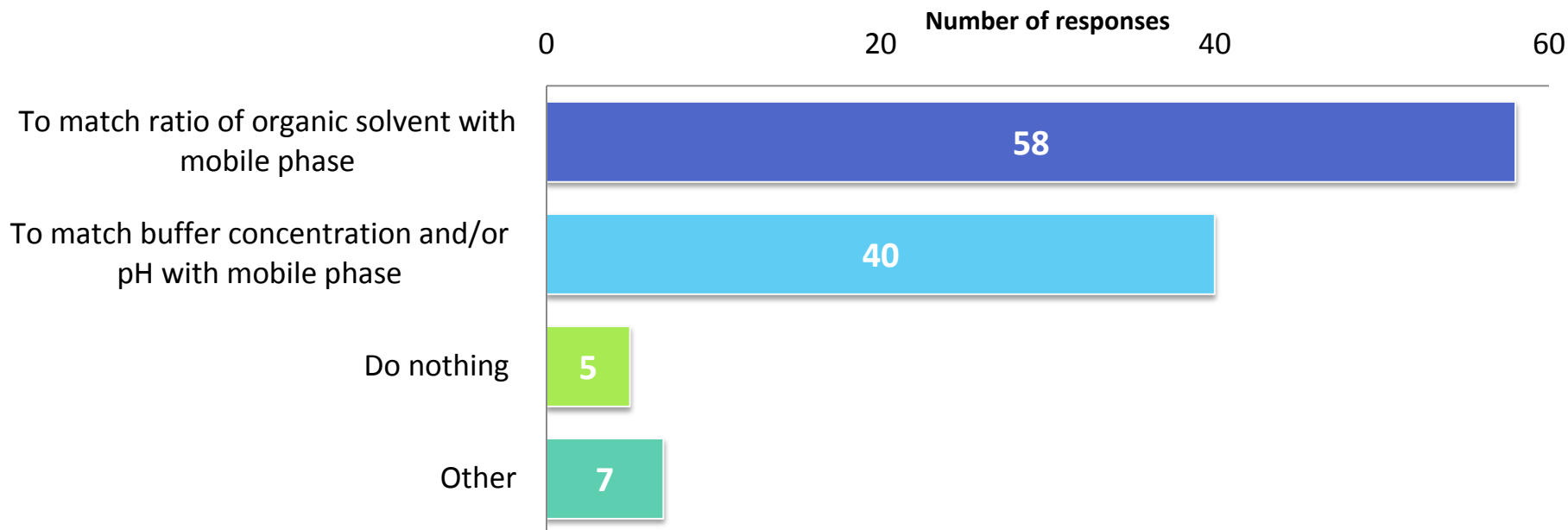
回答数:71件



その他コメント

委託者指定
要求される感度と化合物の
物性による
可能であれば乾固しない
HPLCに影響があるため

Q40. 最後に実試料をバイアルに詰める前に、以下のような対応をしますか？（複数回答可）



その他コメント

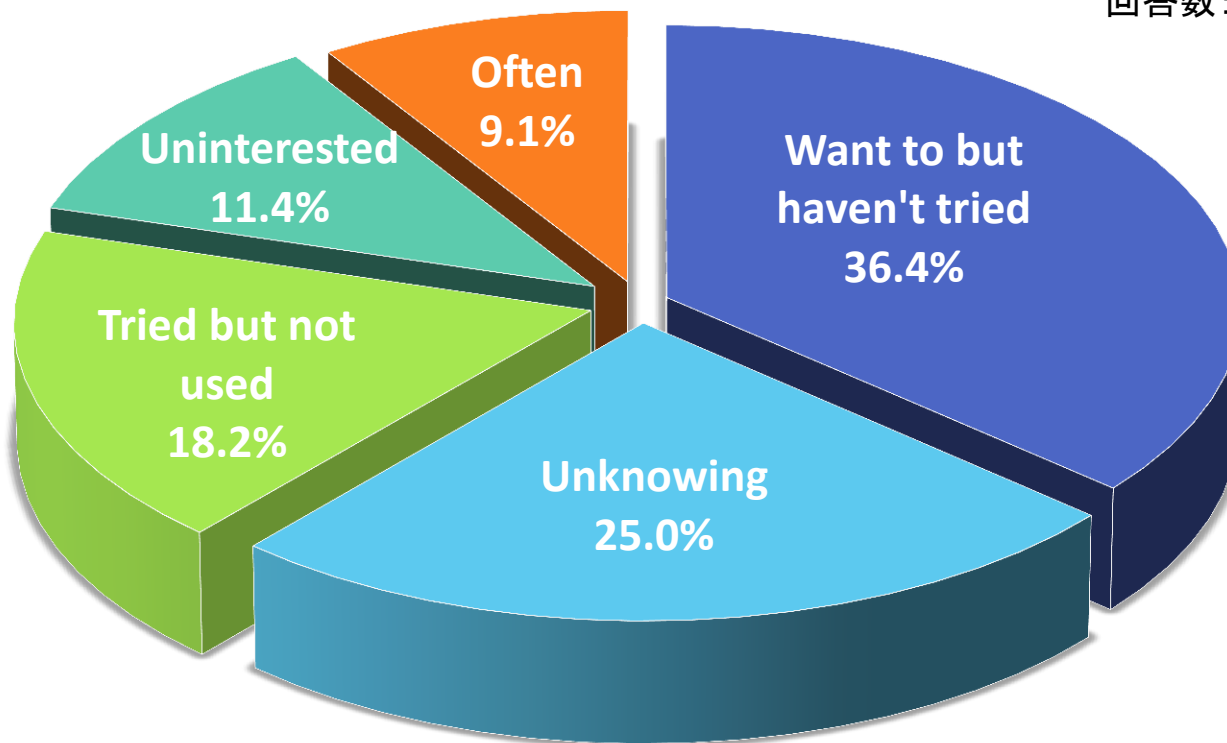
移動相で再溶解する

分離に影響がなければ、移動相の組成と合わせないこともある
可能であれば、移動相より有機溶媒比率を下げる

移動相で溶解するフィルターを通す

Q41. 珪藻土を用いた液液抽出カラムを使用したことはありますか？

回答数: 44件



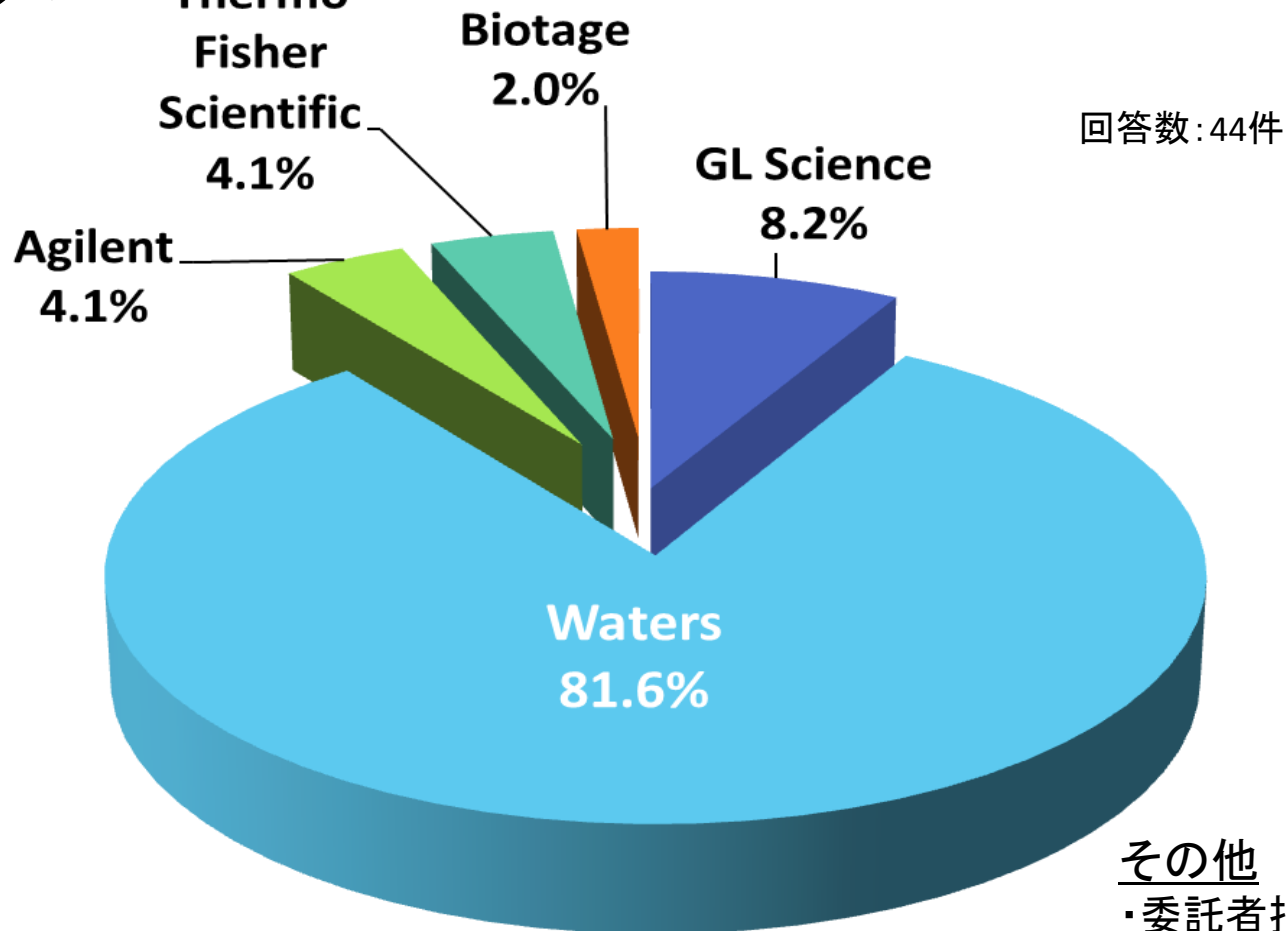
その他コメント

ロット差が見られたことがあった



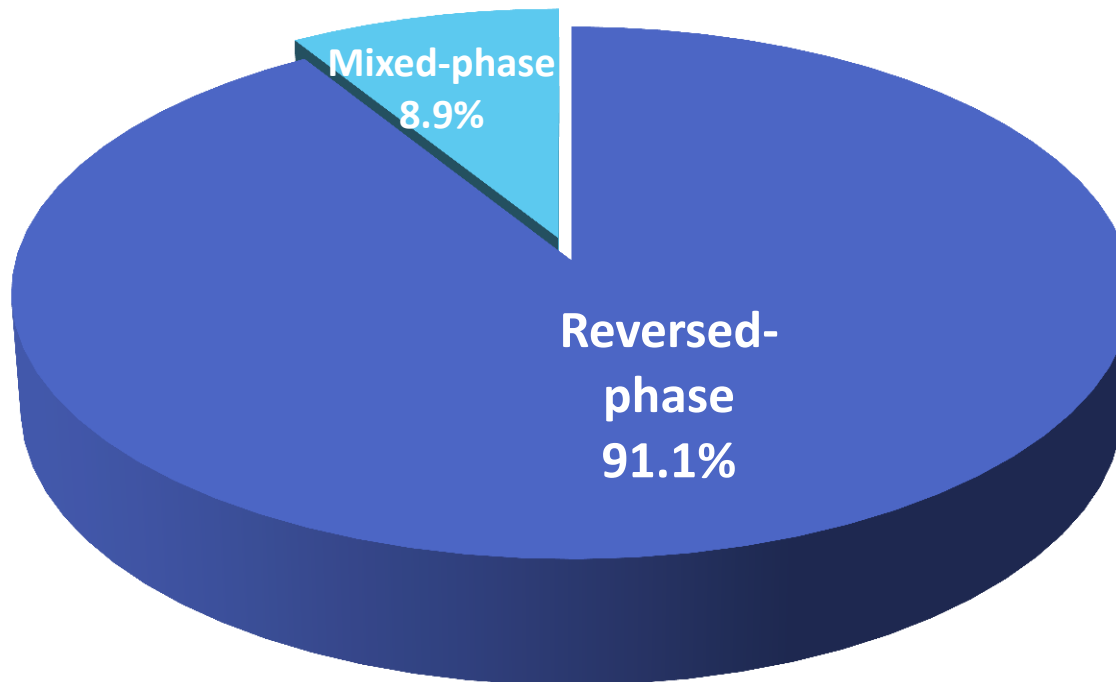
固相抽出法

Q42. 第一選択として用いる固相カラムのメーカーはどこですか？



Q43. ケミストリは何を第一選択としますか？

回答数: 45件

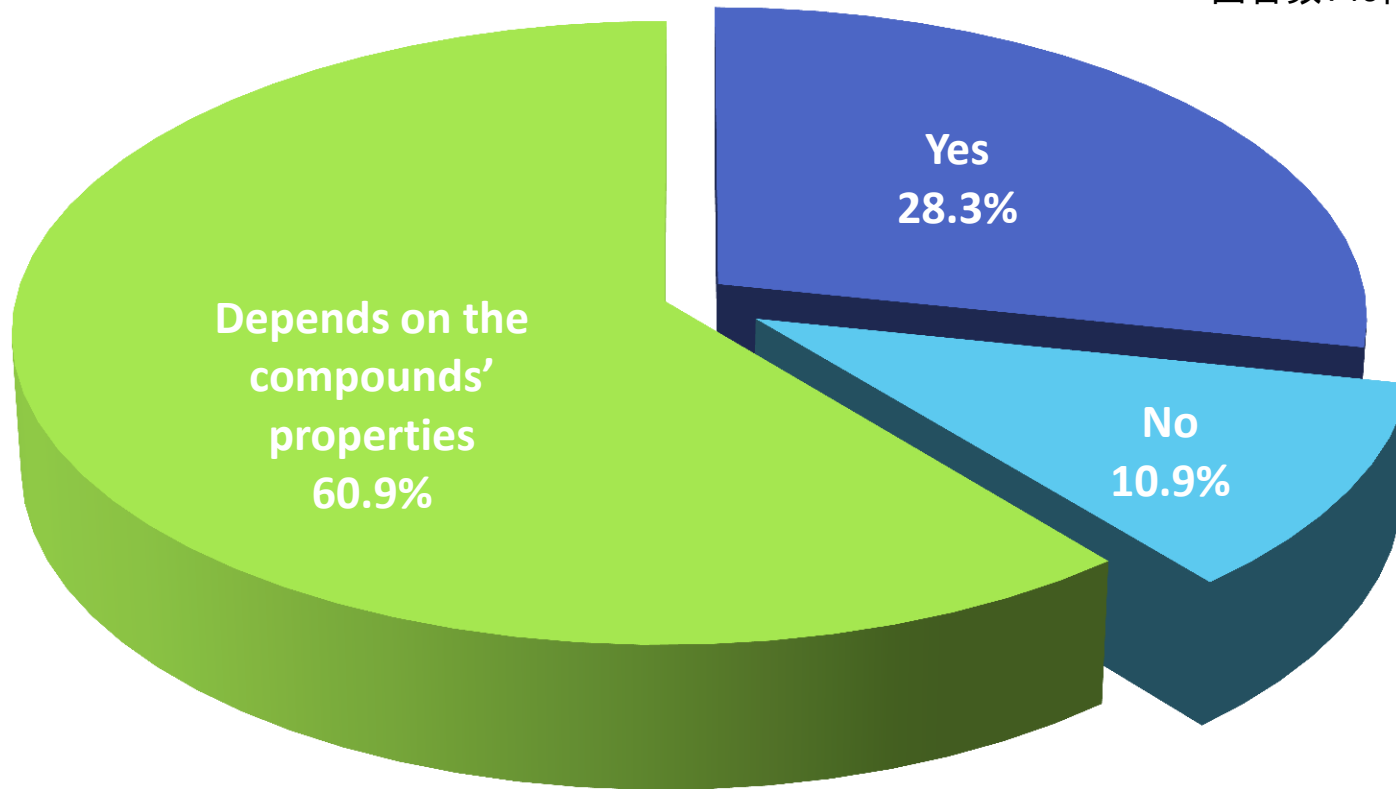


その他

・委託者指定による

Q44. 第一選択として固相に添加する前に試料のpHを調整しますか？

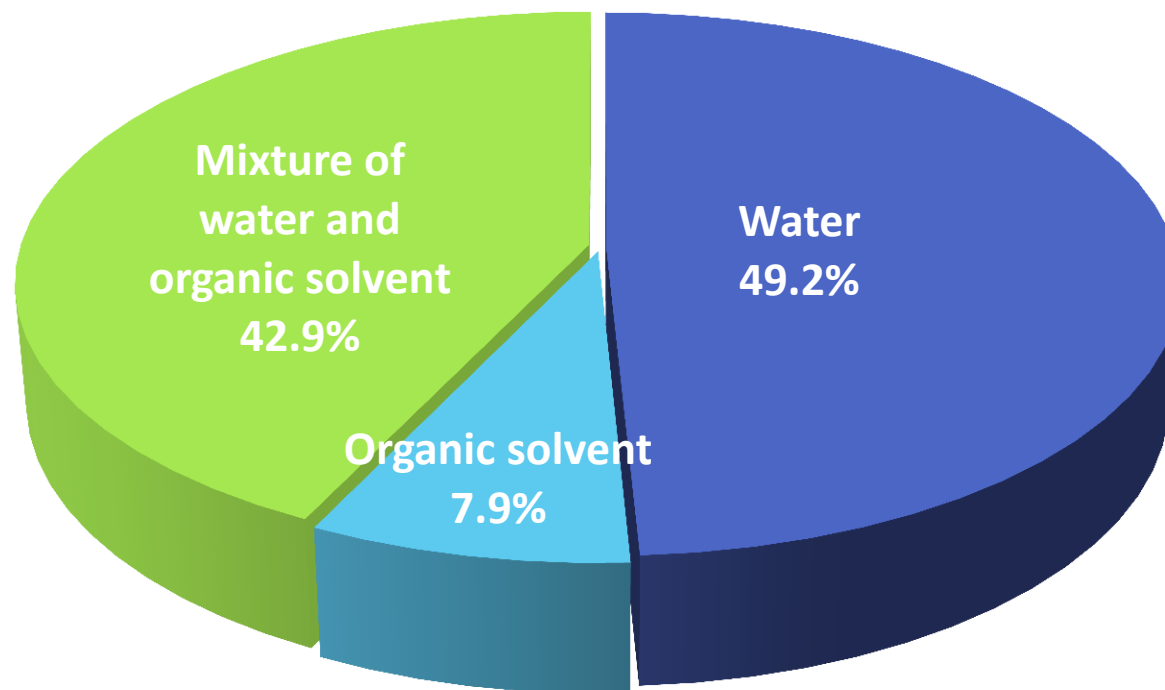
回答数: 46件



その他
・委託者指定による

Q45. 第一選択としてどのように洗浄しますか？（複数回答可）

回答数: 46件



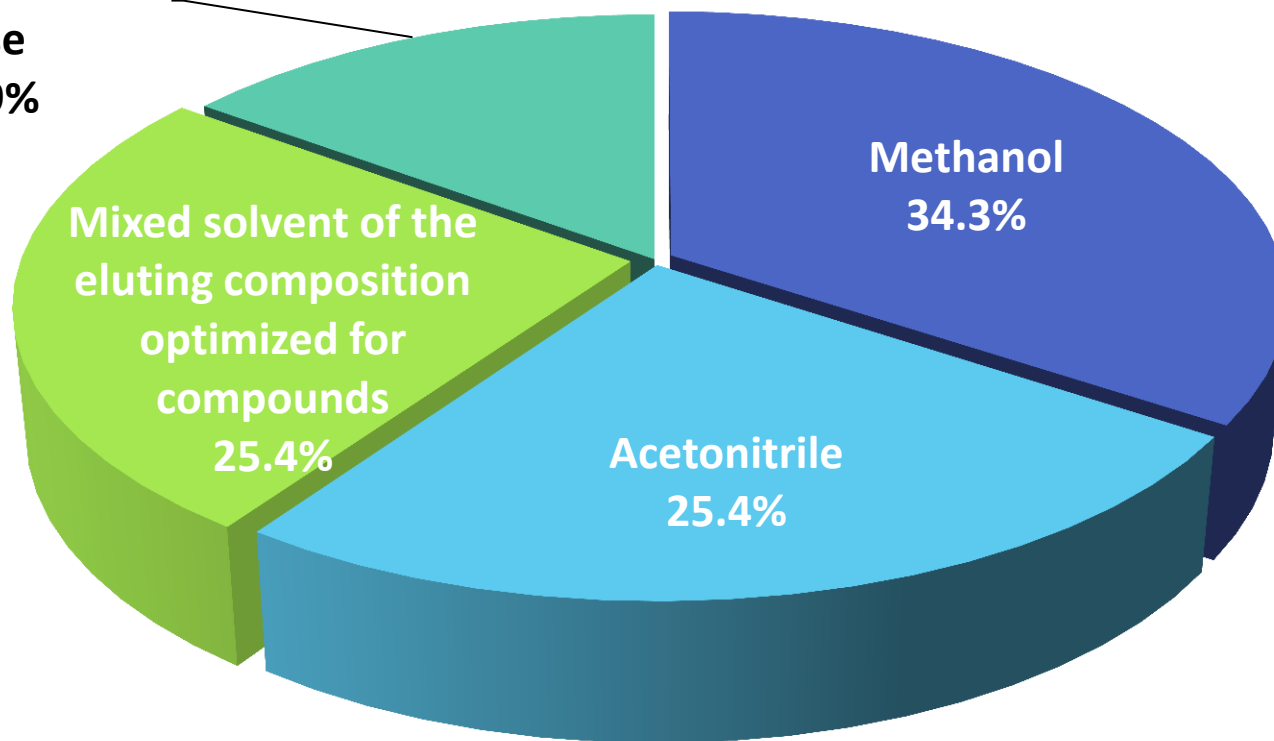
その他

- ・委託者指定による
- ・有機溶媒で溶出が認められない場合に限り、有機溶媒を使用する
- ・ステップワイズに溶出力を上げる

Q46. 第一選択としてどの有機溶媒で溶出しますか？（複数回答可）

Organic solvent
added with acid or
base
14.9%

回答数:46件

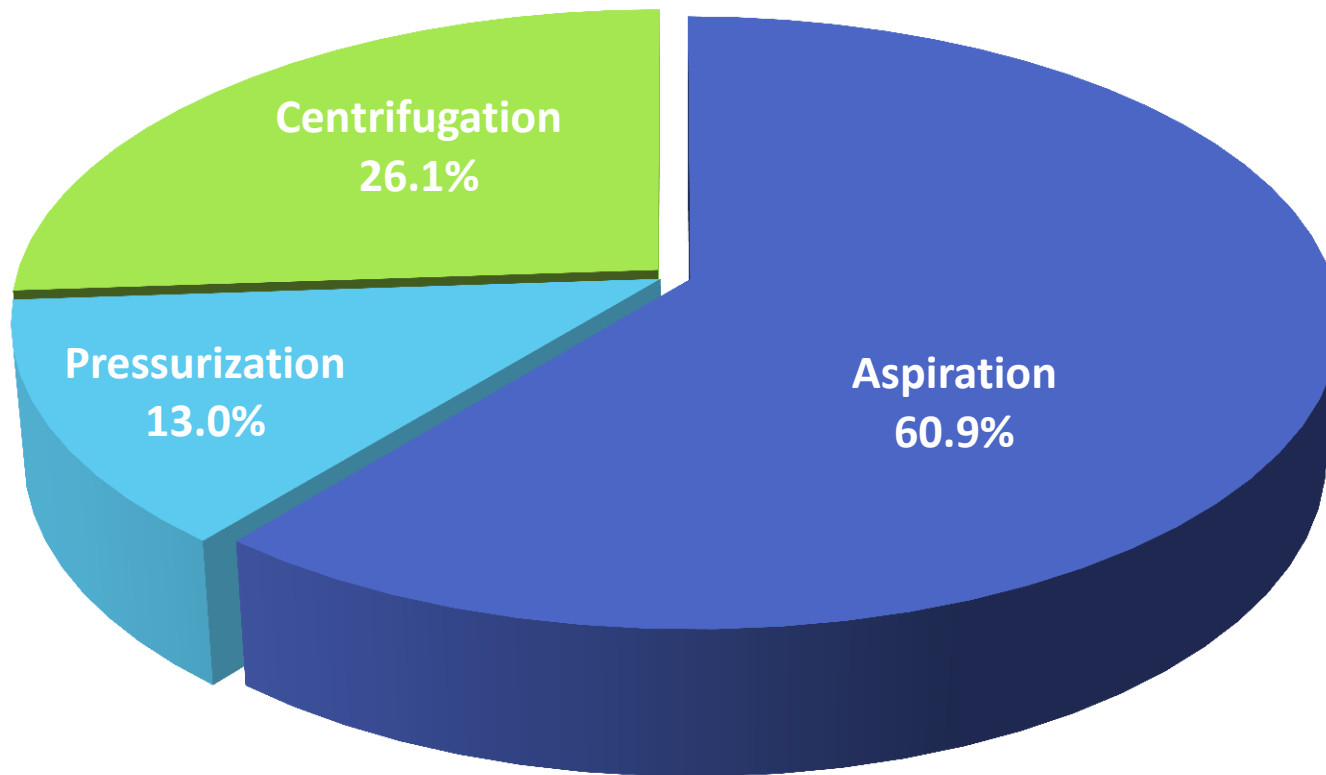


その他

- ・ 委託者指定による

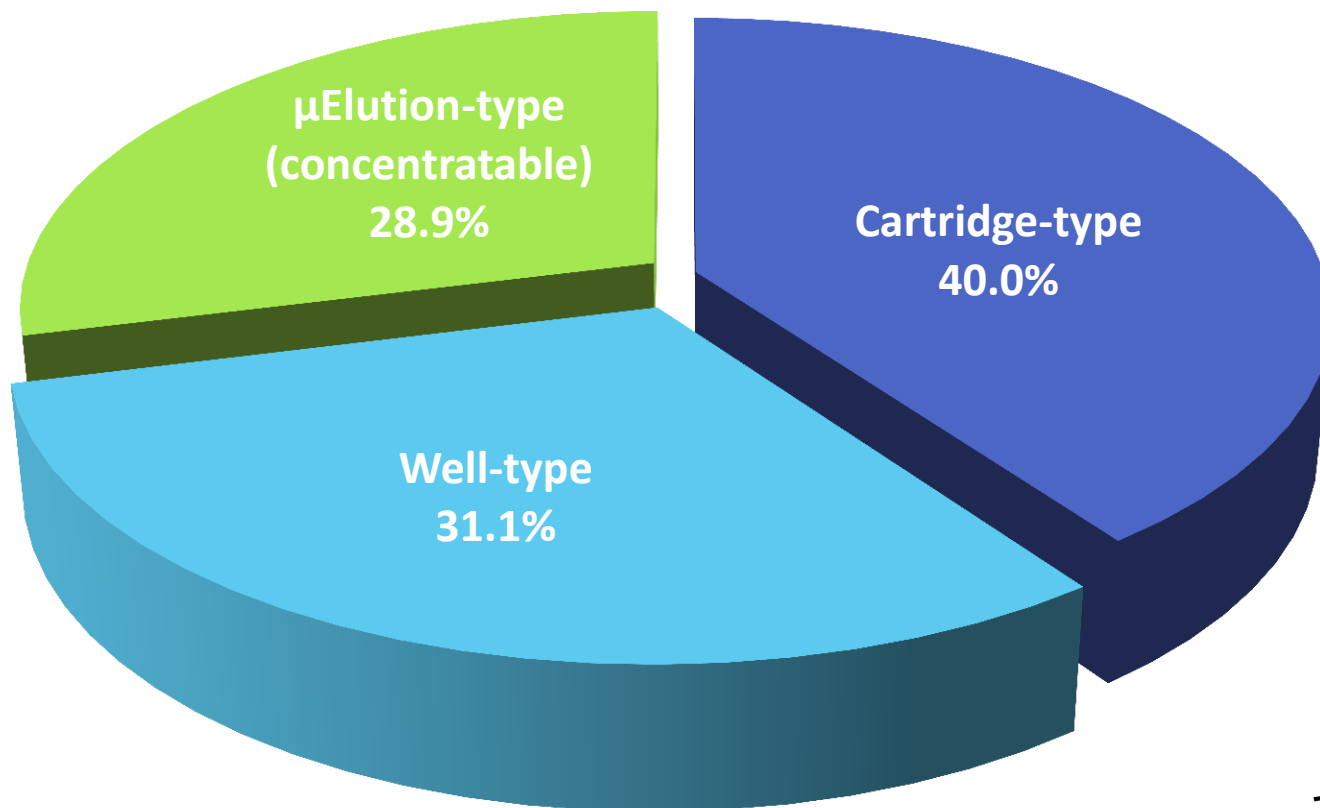
Q47. 第一選択としてどのように通液しますか？

回答数: 46件



Q48. 第一選択としてどのタイプを用いますか？

回答数: 45件

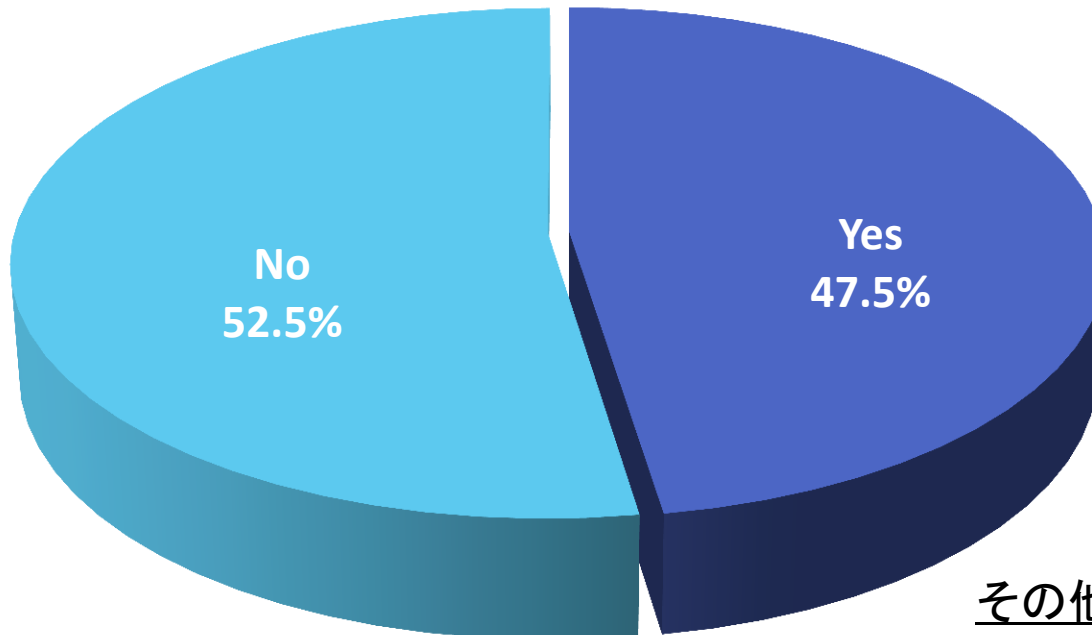


その他

- ・委託者指定による
- ・手元にあるものを使う

Q49. バイアルに詰める前に乾固操作は行いますか？

回答数:40件

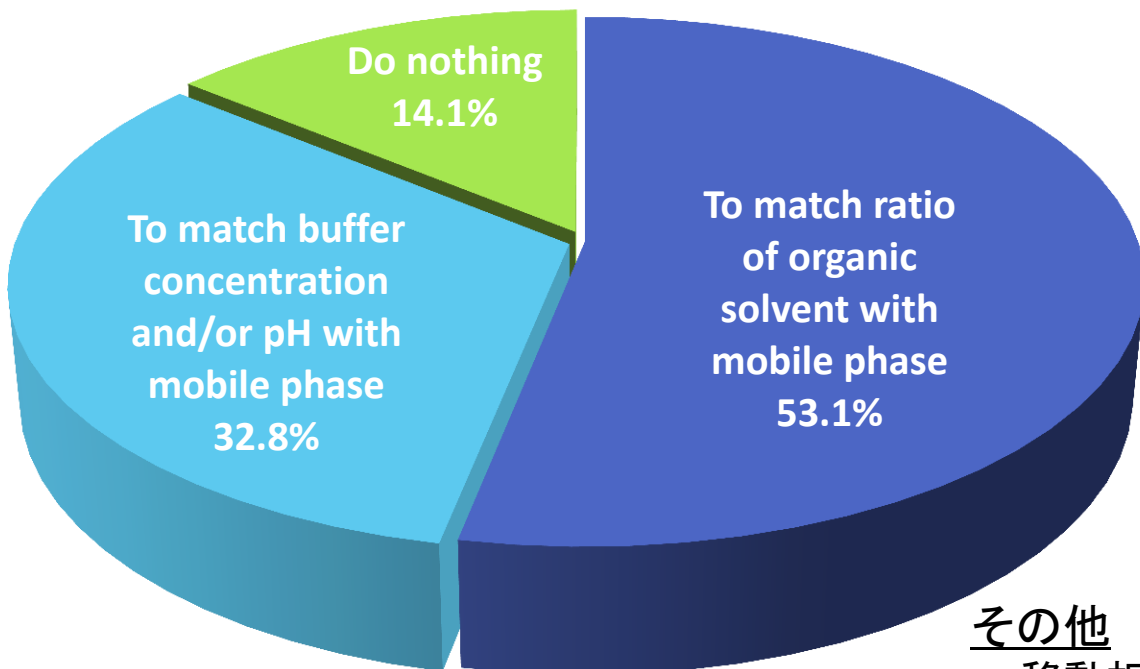


その他

- ・ ケースバイケース (×3)
- ・ 検出感度による
- ・ 要求感度によって決める
- ・ 要求される感度と化合物の物性による
- ・ 可能な限り乾固させないように

Q50. 最後に実試料をバイアルに詰める前に、以下のような対応をしますか？（複数回答可）

回答数:44件



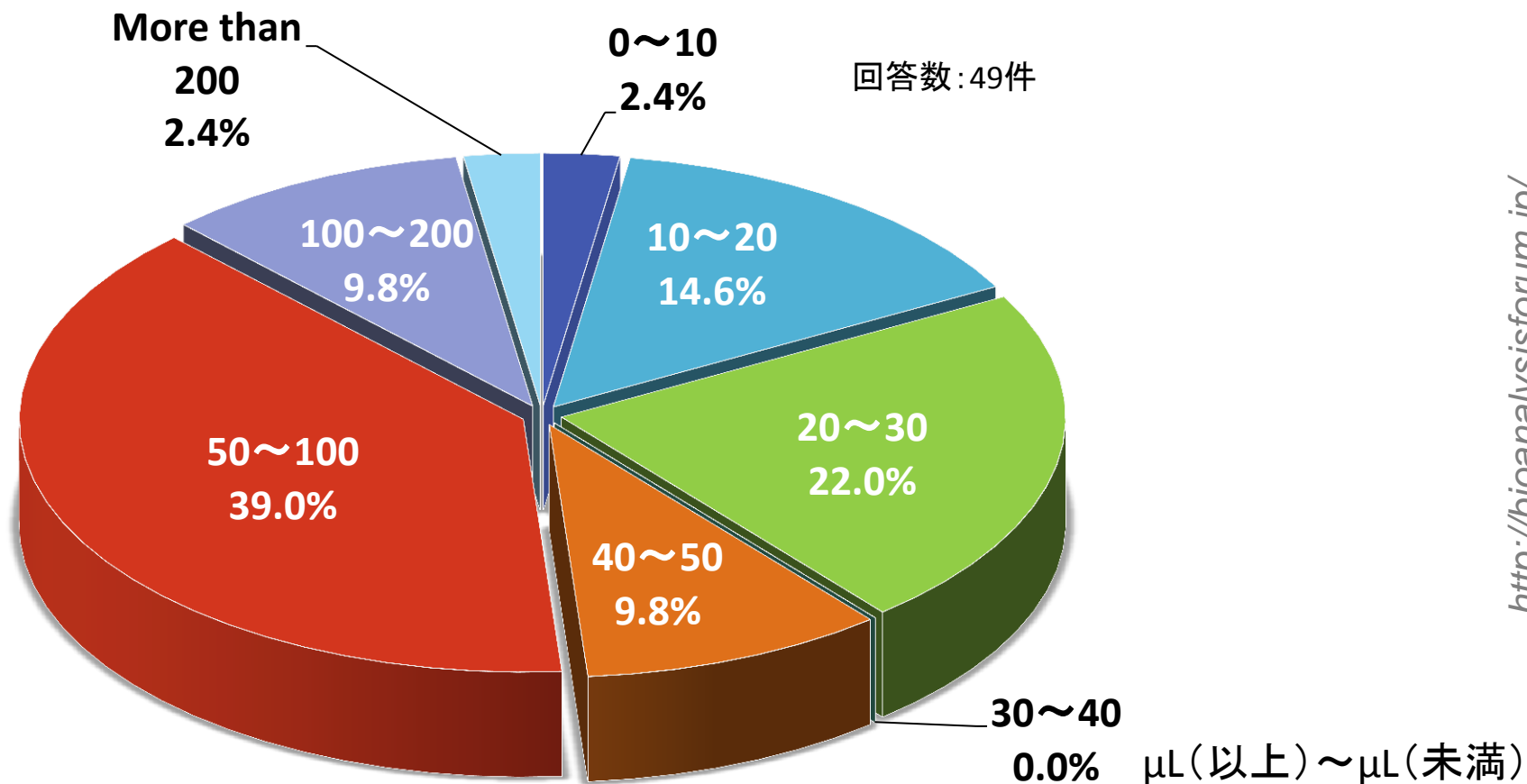
その他

- ・ 移動相で溶解する(×2)
- ・ 分離に影響がなければ、有機溶媒比率を上げる
- ・ 可能であれば、移動相よりも有機溶媒比率を下げる
- ・ 移動相より溶出力の弱い溶媒に溶解する
- ・ pH, 塩濃度は必要であれば合わせている

前処理法（その他）

前処理法（その他）

Q51. 1回の前処理で使用する血漿量(μL)は？



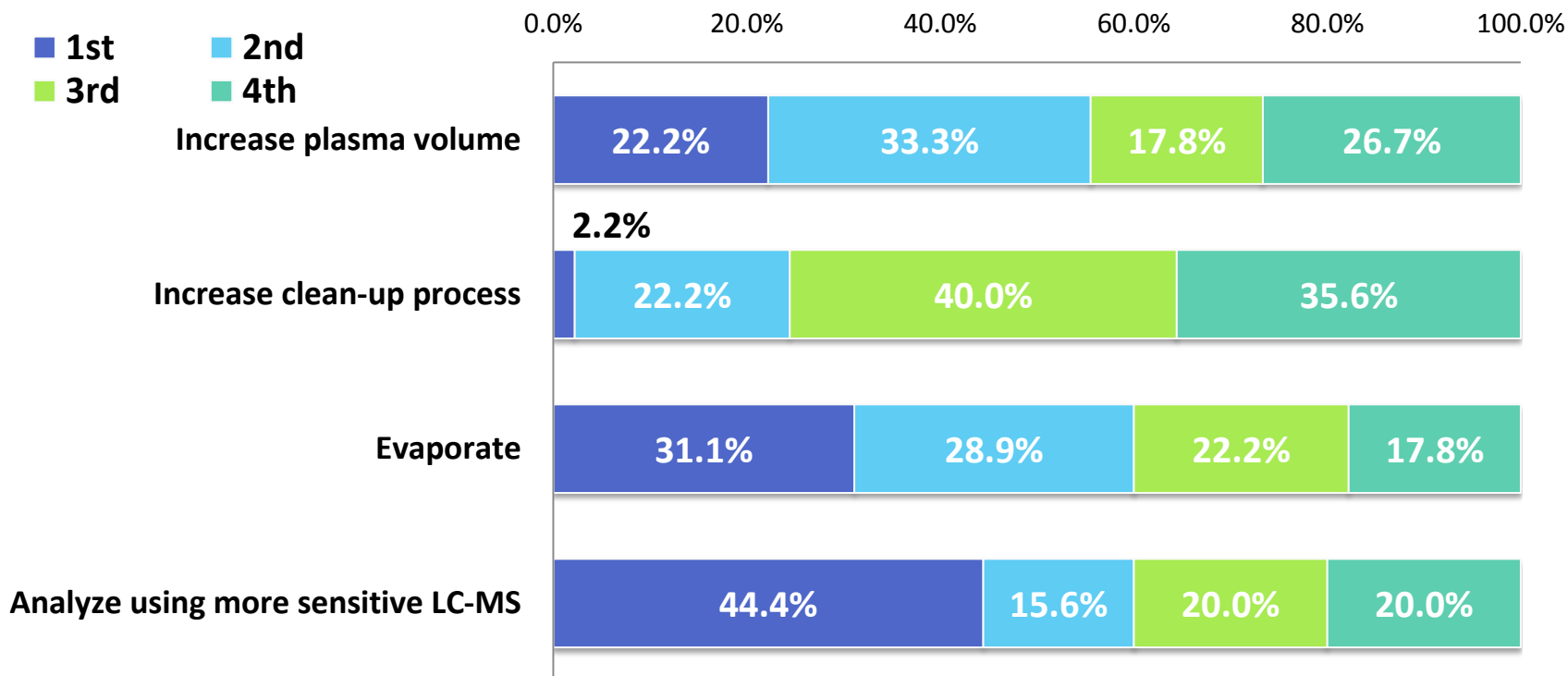
意見

- ・げっ歯類(特にマウス)は極力少ない量で実施。大動物はケースバイケース。
- ・100~1000 μLでなるべく少ない量

前処理法（その他）

Q52. 前処理で高感度化を検討するとき、
以下の選択肢のどれから順に実施しますか？

回答数: 45件



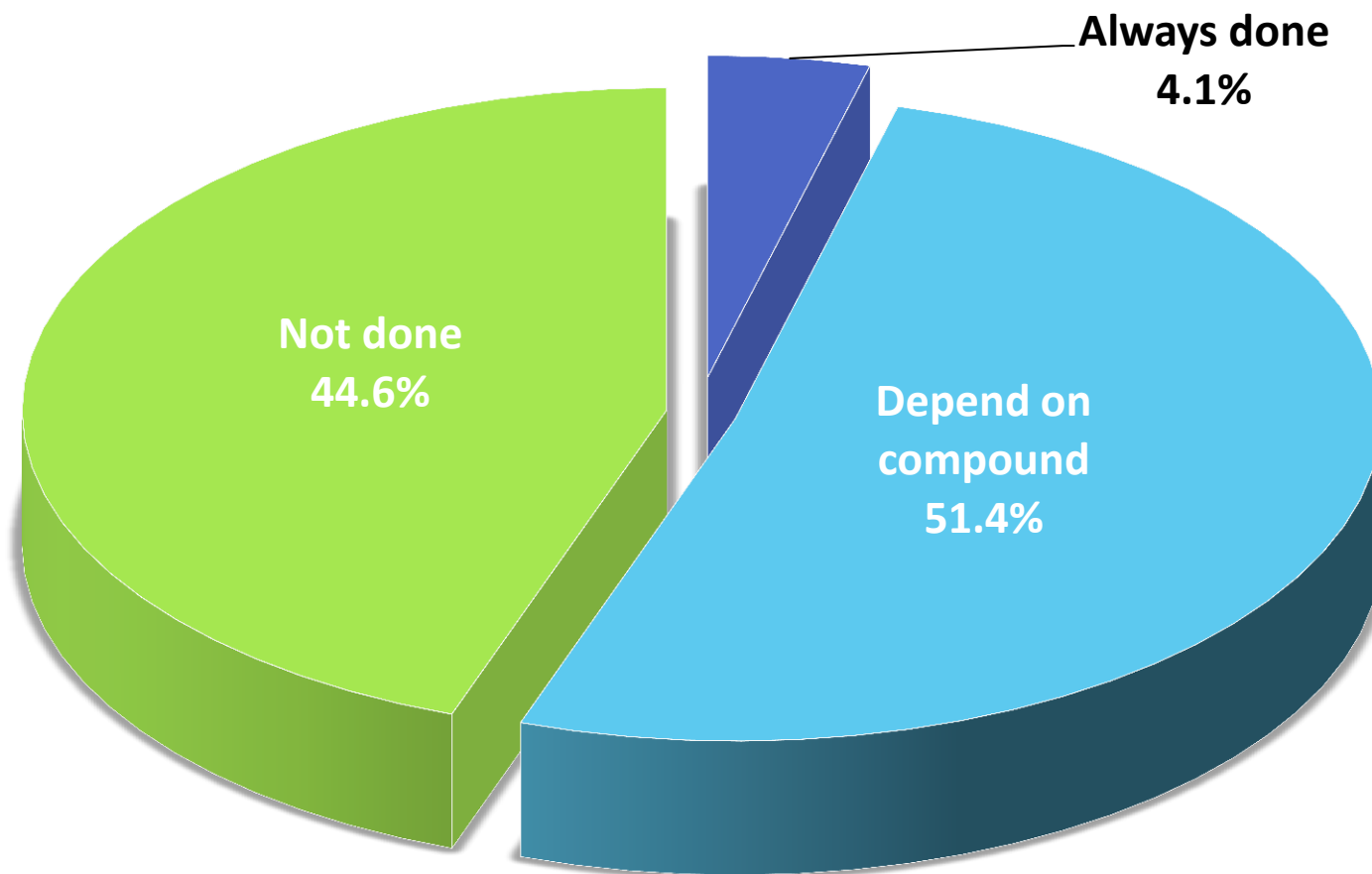
<トータルスコアによる対処順位>

①高感度のLC-MSで対応する⇒②濃縮乾固を行う⇒③血漿使用量を増やす
⇒④クリーンアップ過程を追加する

前処理法（その他）

Q53. 安定性を考慮して、抽出溶媒など前処理に用いる
試薬・試液を冷却していますか？

回答数: 74件



Q54. 複数化合物（例えば、未変化体及び代謝物）を前処理する場合、1化合物を前処理する場合と違って何か注意している点は？

回答数：49件

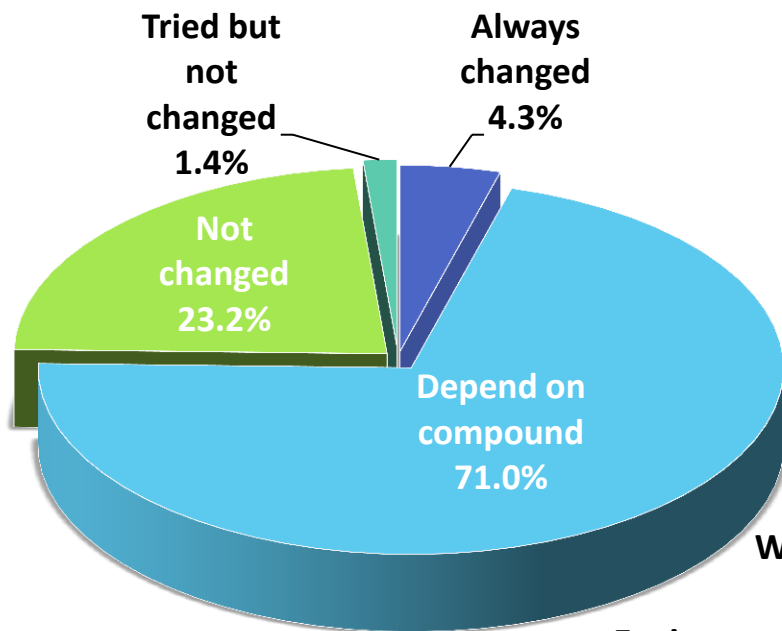
意見

- ・前処理中に他の化合物に変換しないように注意する（例：代謝物→未変化体）
- ・抱合体を含む場合は加水分解されないように注意する
- ・物性が大きく異なる場合、いずれの化合物も高い回収率を得られるよう注意する
- ・内標準物質は、可能な限り未変化体の安定同位体を用いる
- ・特になし

前処理法（その他）

Q55. 非臨床と臨床で前処理法は変えていますか？

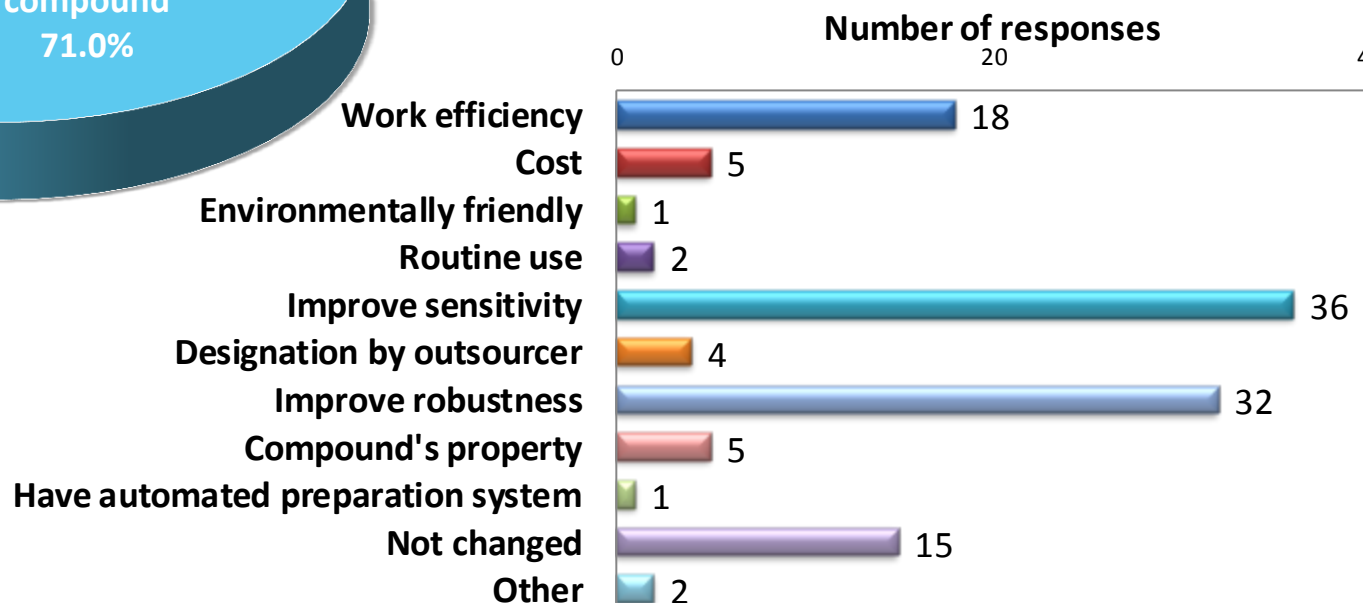
回答数：69件



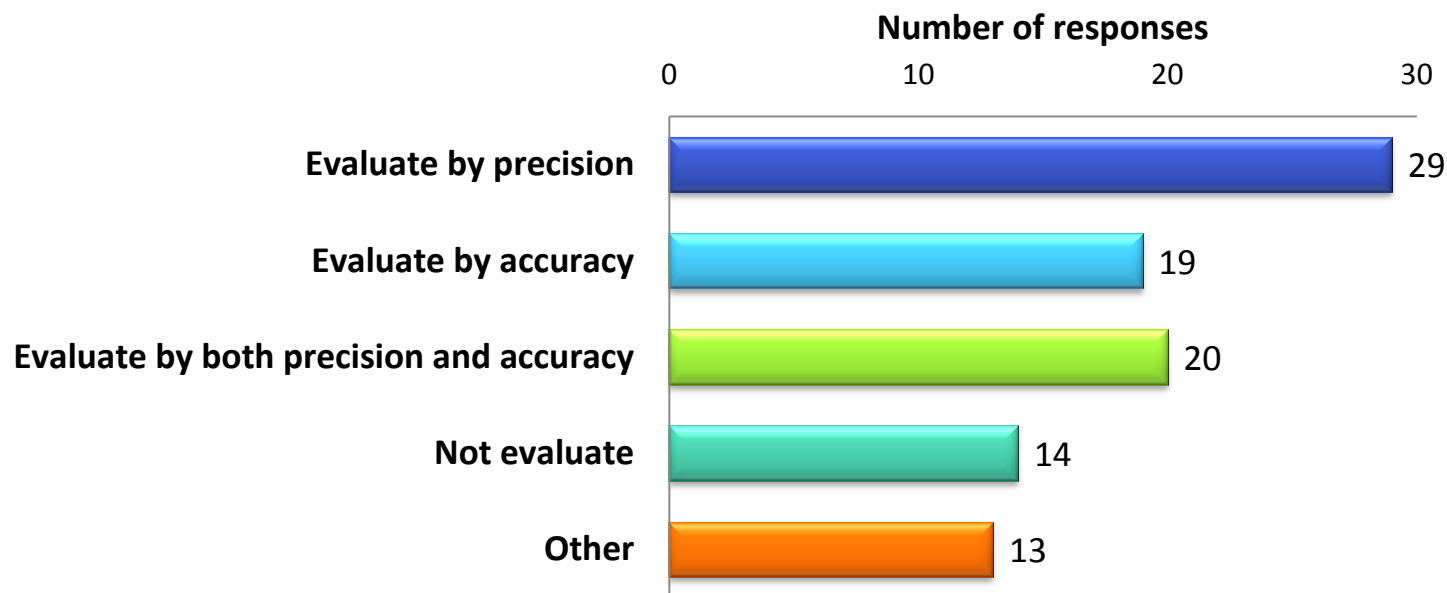
意見

・動物は大きくなるほど夾雑物質が汚くなるから

Q56. 変えている場合、その理由は？



Q57. 回収率は評価しますか？



意見

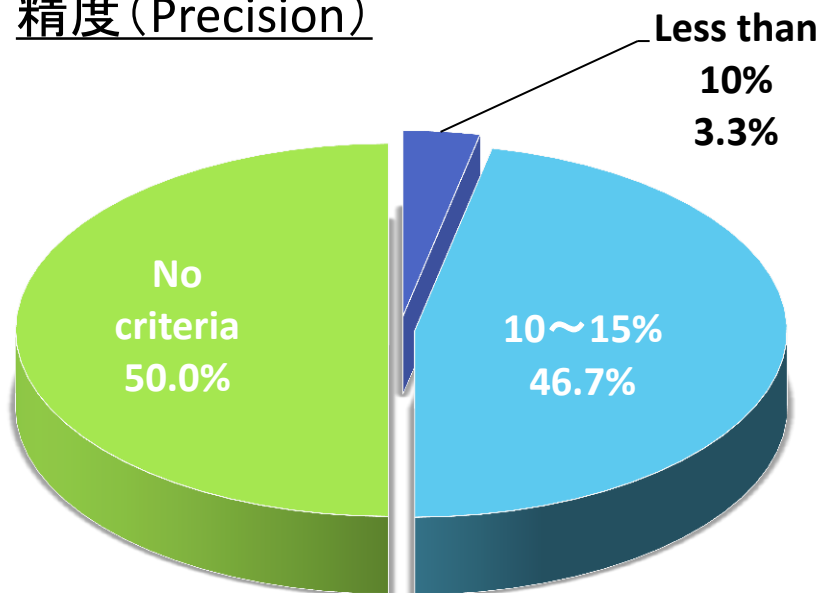
- ・回収率は算出するが、判断基準は設けない。
- ・精度で評価し、真度の基準は設けないが80%程度を目標とする。
- ・確認する程度。バリデーションでは基本評価しない。
- ・基準値は、開発ステージによって変更する。
- ・基準値は設けないが、真度より精度の値を重要視する。

前処理法（その他）

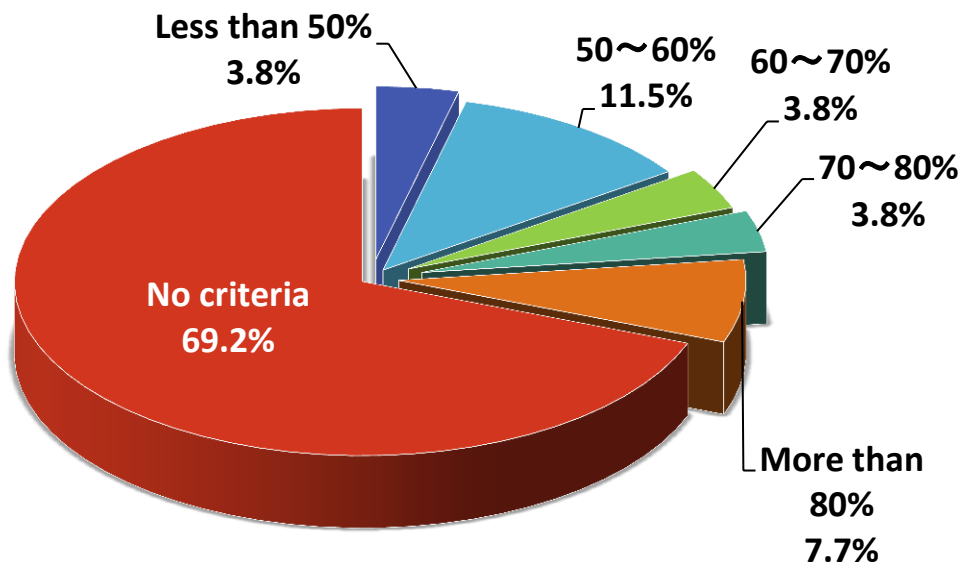
Q58. 回収率を評価する場合、具体的にどのような基準を設けていますか？

回答数：69件

精度 (Precision)



真度 (Accuracy)

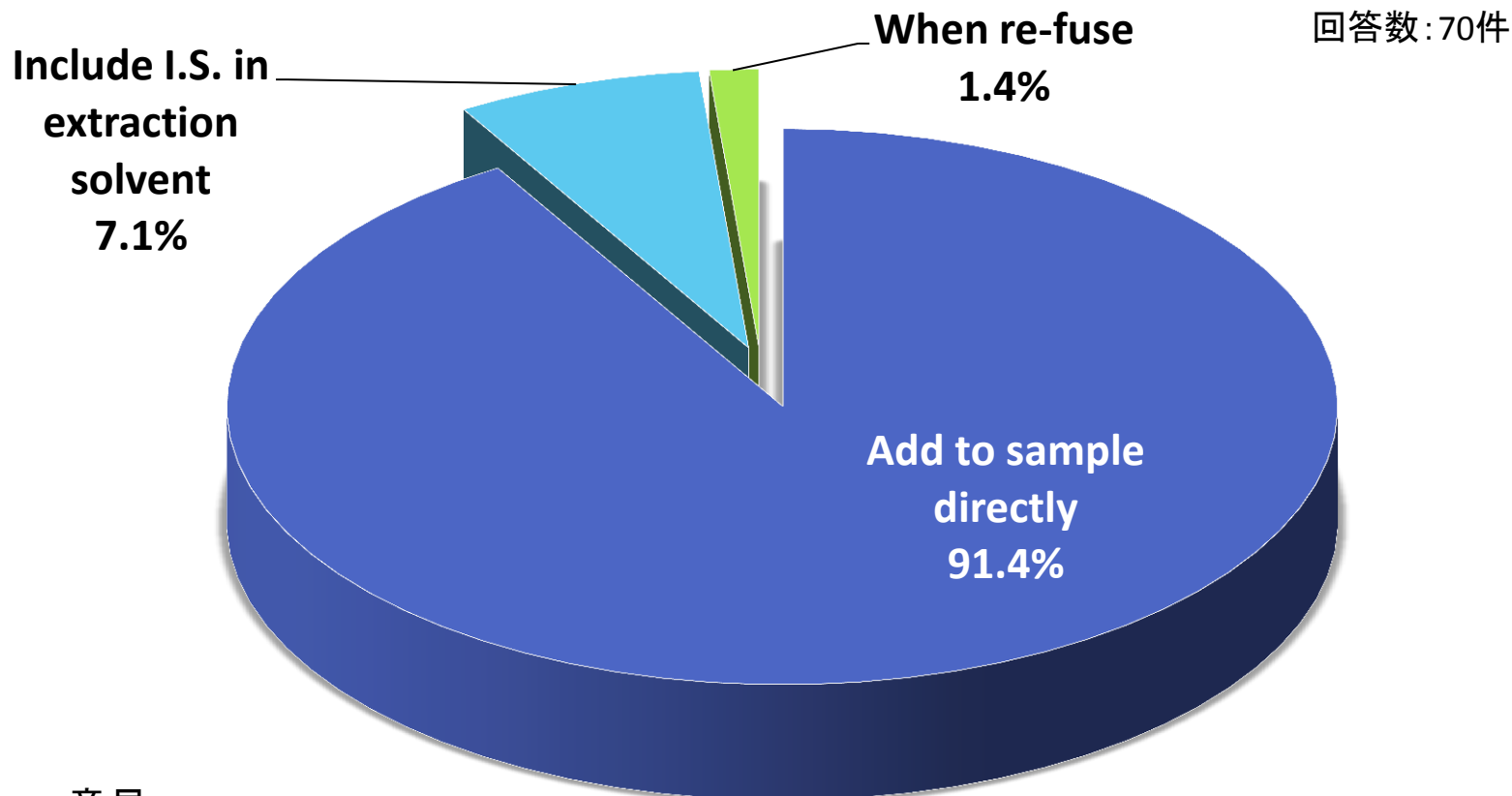


意見

- ・安定した測定を実現するために回収率80%以上は欲しいと感じる。
- ・最低でも精度20%以内。ステージが上がれば、ガイドライン等の値に準じる。
- ・低、中、高濃度試料の回収率が同程度の値を示していれば良い。

前処理法（その他）

Q59. 前処理のどの時点で内標準物質を添加しますか？



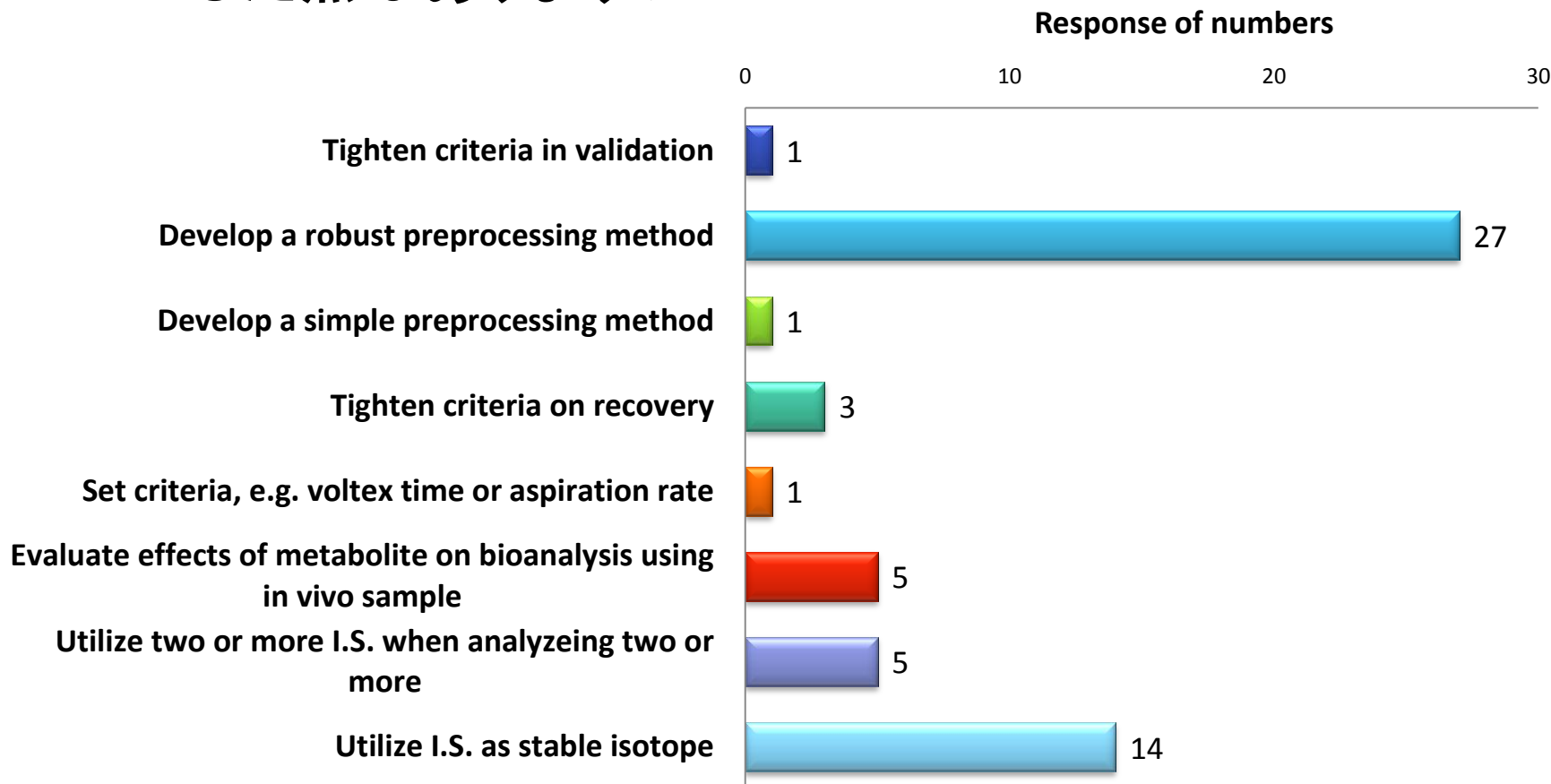
<http://bioanalysisforum.jp/>

意見

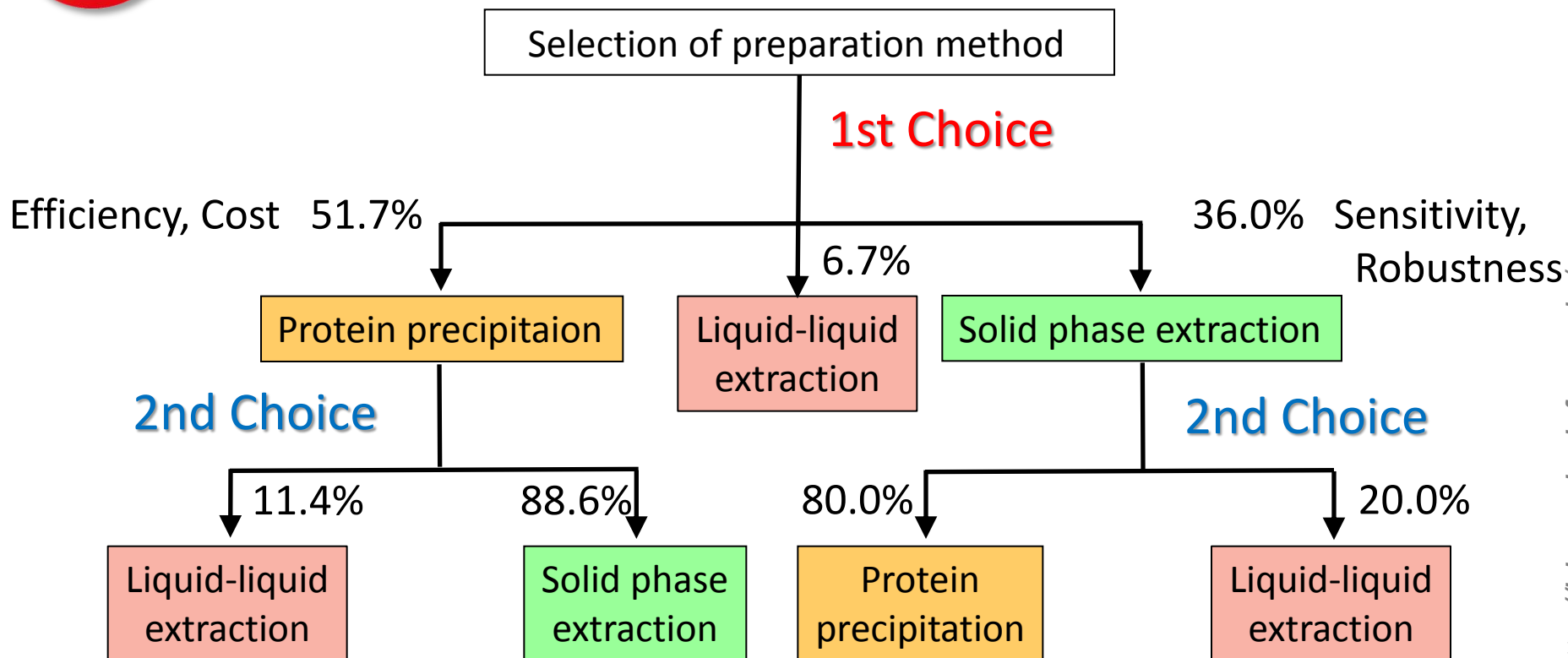
- ・前処理の全過程のばらつきを補正するため
- ・内標準物質が安定同位体でない場合、試料に直接添加すると誤差が大きくなるので、再溶解時に添加する
- ・ケースバイケース

前処理法（その他）

Q60. ISRが導入されて、前処理に関して以前から変更した点がありますか？

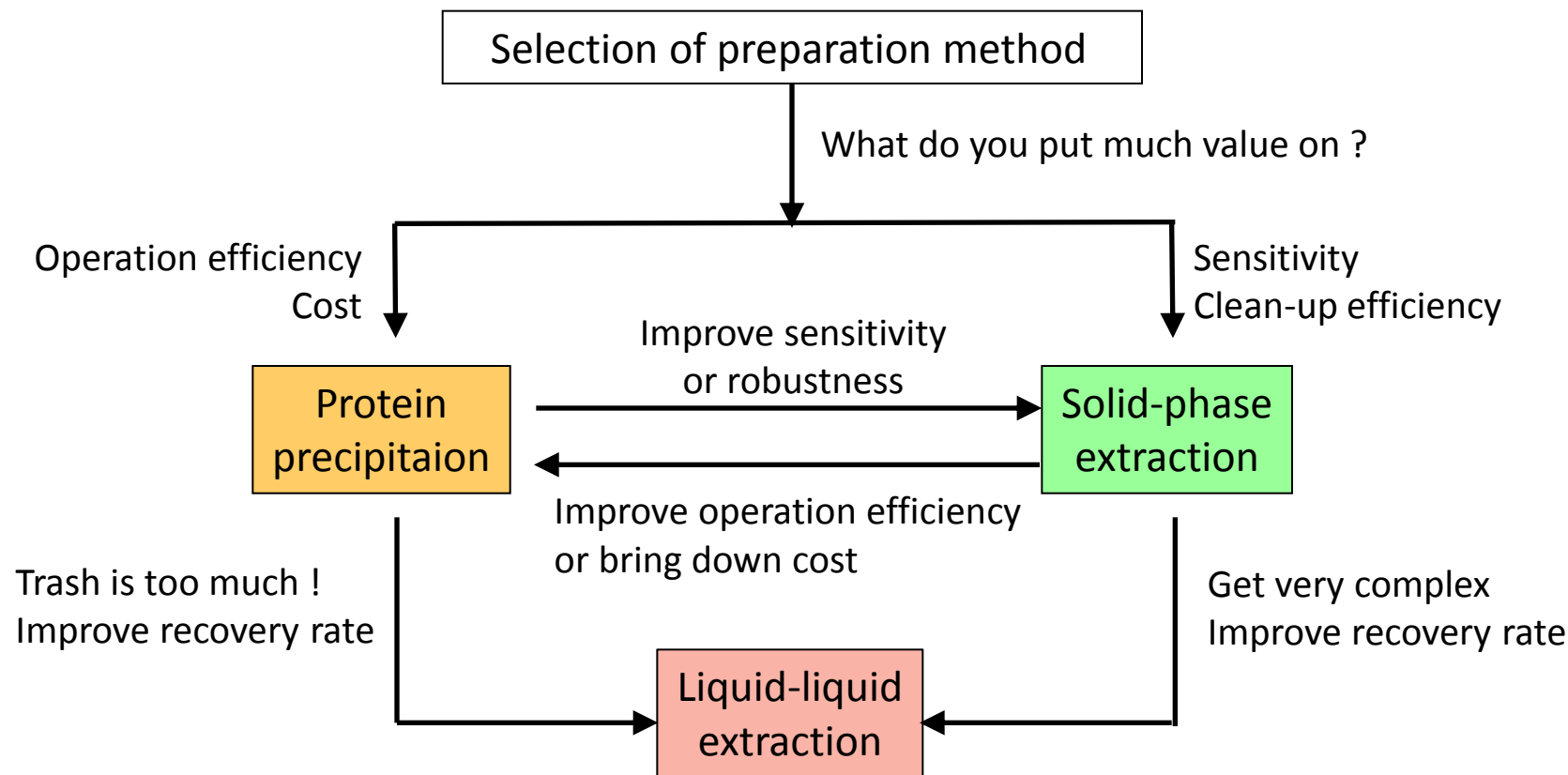


アンケートまとめ（前処理法の選択）



- ✓ 作業効率・コストを理由に除タンパク法を選択する
- ✓ 感度・頑健性を理由に固相抽出法を選択する
- ✓ 液液抽出法は、第一選択としてほとんど用いられていない

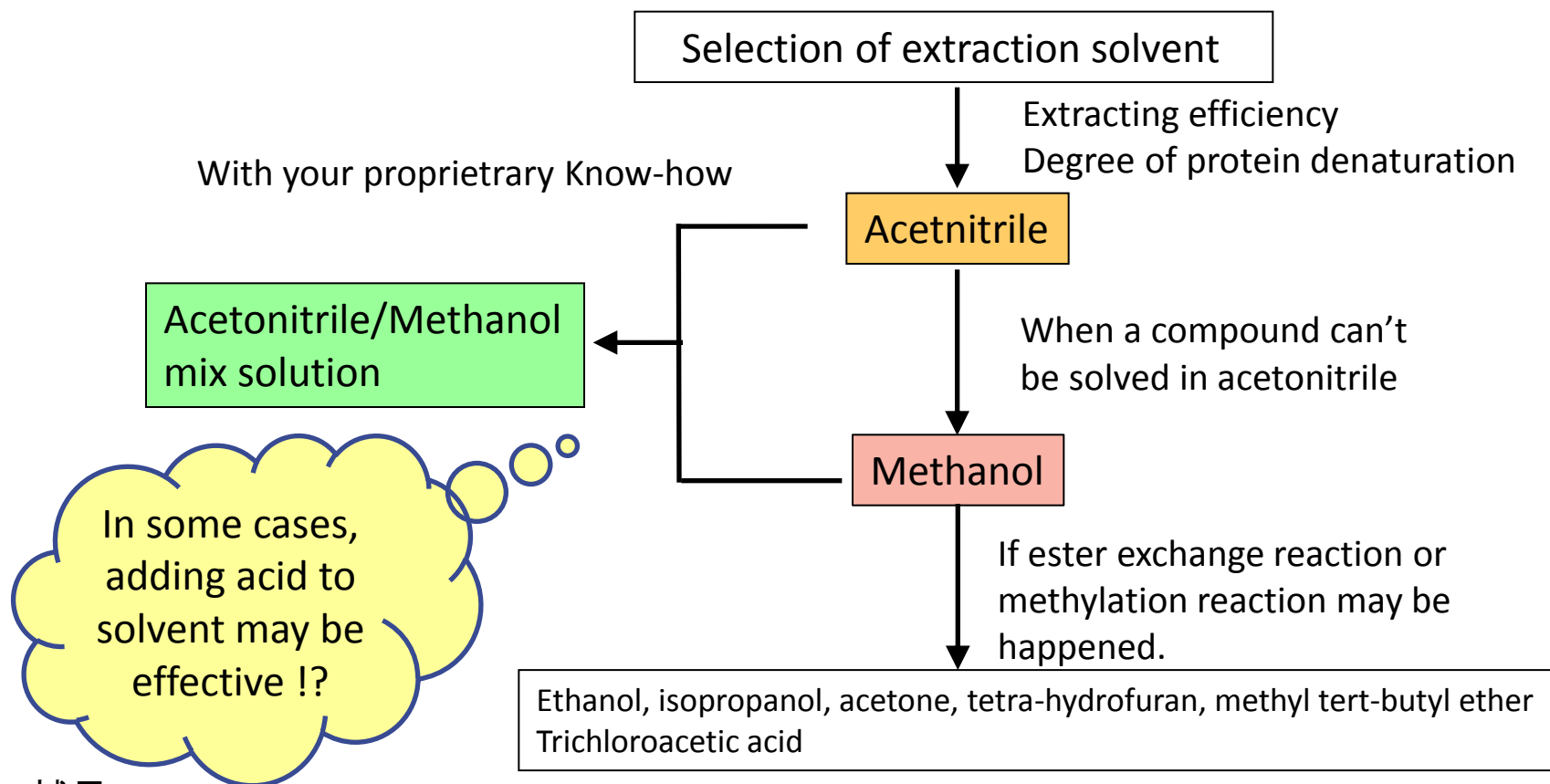
前処理法の選択のDecision Tree



その他の注意点

- ・固相抽出のイオン交換モードやMIXモードは特にクリーンアップ効率が高い。
一方、逆相モードのHLBでは脂溶性の高い化合物の選択性や回収率が低い場合がある。
- ・液液抽出は単純な極性分配のため物性の異なるものを同時に抽出することは難しい

除タンパク法の抽出溶媒選択のDecision Tree



補足

- ・アセトニトリルは沈査が固化しているので、デカントしやすい。
- ・アルコール系は固化がマイルドなので、フィルターで沈査除去が可能。
- ・抽出力を考慮すると、溶媒の添加量の目安は、アセトニトリルで試料の3倍、メタノールで試料の5倍程度が望ましい。

抽出溶媒に酸を添加するときの注意点

抽出溶媒に酸を添加するケース

- ・前処理中の化合物が不安定な場合
- ・化合物がタンパクと結合して回収率が低い場合

補足

- ・一般的にギ酸が汎用されており、トリクロロ酢酸も用いられている。

注意点

- ・ギ酸メタノールは長期保存するとエステル化が進行し、変性効率の低下が懸念される。したがって、用時調製を推奨する。
- ・不安定さは血漿中安定性に起因する場合もあるので注意が必要。

固相抽出で回収率が悪い場合の対処法

(逆相系で保持が予想される場合の対処法)

逆相モード

アプライ時にトラップされない

問題解決:

- ✓ 希釈溶媒に若干の有機溶媒
Ex. 10~20%エタノール
- ✓ 除タンパク後, 水で希釈
Ex. デカント試料に水を添加
- ✓ 酸または塩基を添加
Ex. 数%のギ酸, アンモニアなど

固相からの溶出が不十分

問題解決:

- ✓ 溶出溶媒を変更
Ex. メタノール⇔アセトニトリル
- ✓ 溶出量・回数を増やす
Ex. 2~3回に分けて溶出
Ex. 2~3倍量添加
- ✓ ゆっくりと通液
Ex. 吸引スピード, 遠心速度

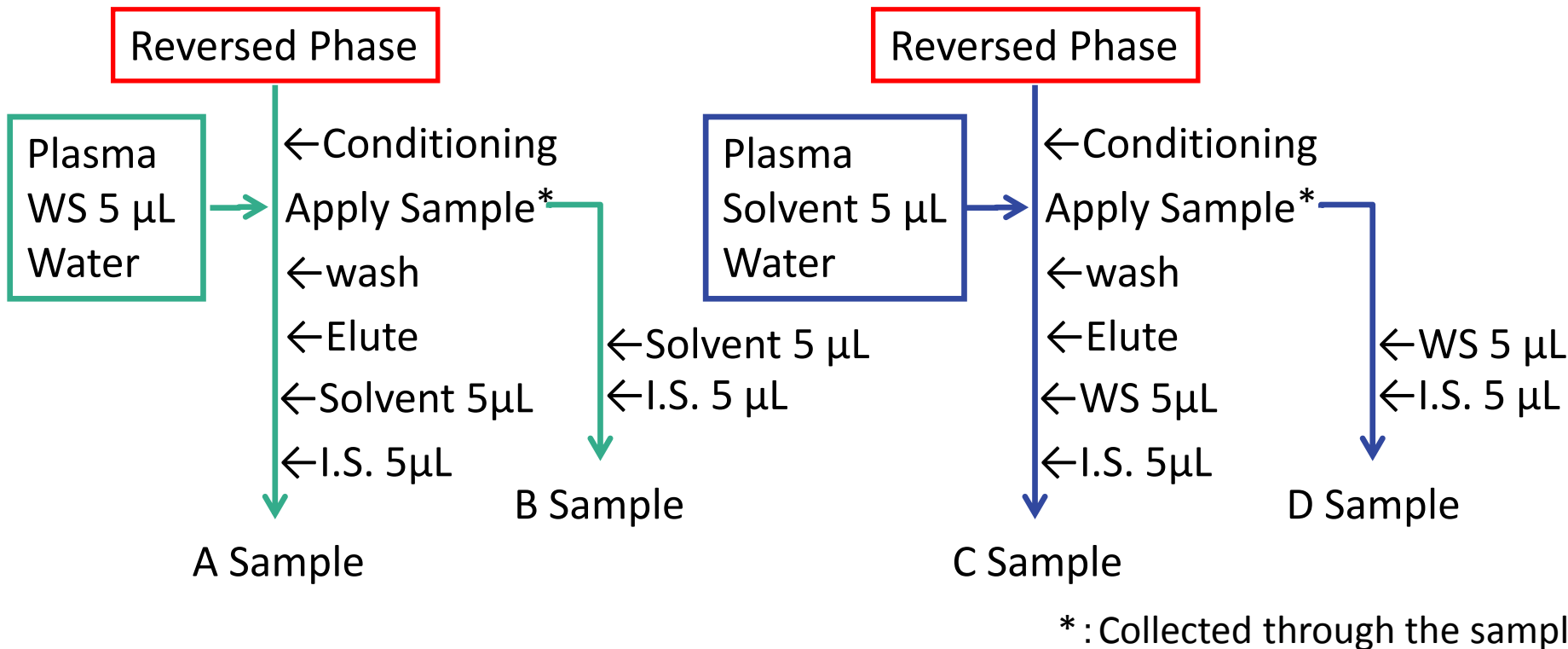
回収率が悪い場合の原因究明にはマスバランス試験の実施も効果的

マスバランス試験実施例

(前処理過程のどこで化合物をロスしているかを確認)

WS: Working Solution

Solvent : Diluent solvent of WS



Area ratio of A Sample/Area ratio of C Sample \times 100=Recovery Rate (1)

Area ratio of B Sample/Area ratio of D Sample \times 100=Rate of Filtrate (2)

100 - (1) - (2) = Rate of remained at solid phase

固相デバイスの一般的な違い

Cartridge type



Well type

 μ Elution type

	Cartridge type	Well type	μ Elution type
Sorbent mass	Large	Medium	Small
Sample volume	Large	Medium	Small
Elution volume	Large	Medium	small
Evapolated	necessary	Case by case	Case by case
Throughput	slow	middle	fast

測定法（分析条件）



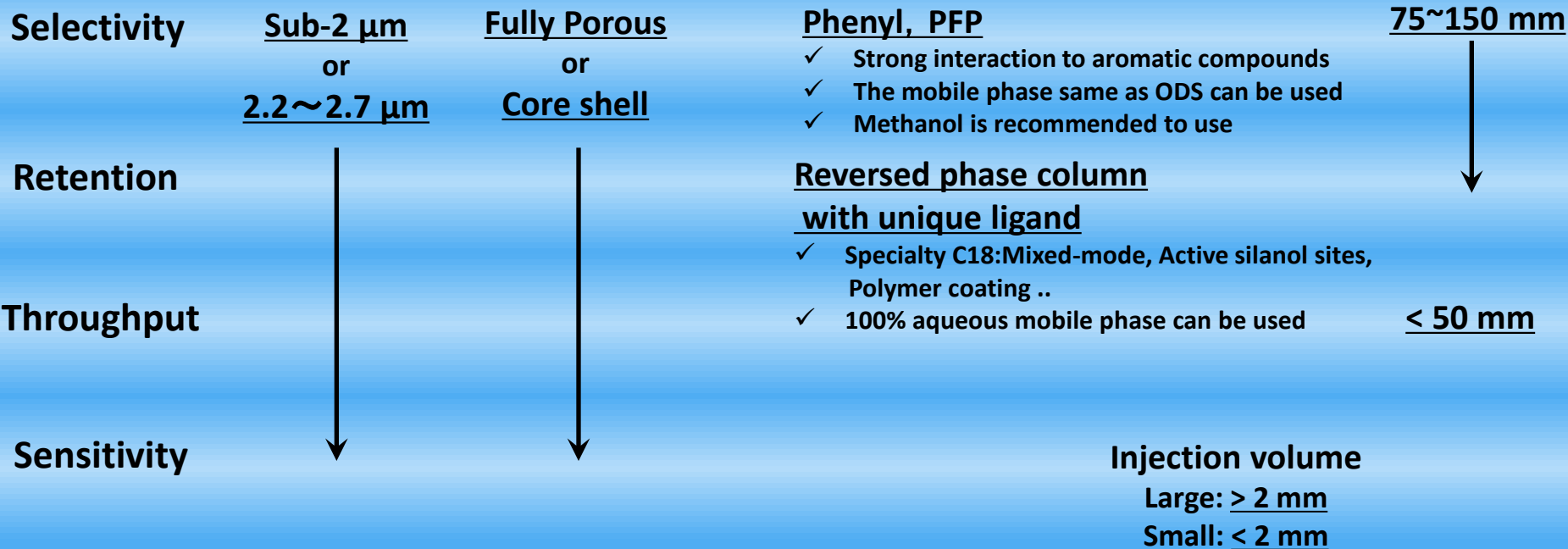
カラムの選択

推奨法：カラムの選択

Particle Size	Particle Technology	Chemistry	ID	Length
---------------	---------------------	-----------	----	--------

First choice	<u>3 μm</u>	<u>Fully Porous</u>	<u>C18</u>	<u>2 mm</u>	<u>50 mm</u>
--------------	-----------------------------------	---------------------	------------	-------------	--------------

Choice for the requirement



推奨法：カラムの選択①

第一選択

➤ 全多孔性C18カラム

- カラムサイズ:

- カラム長さ: 50mm

- » カラム容積が小さく移動相の置換, 追い出し時間の短縮化に有利

- カラム内径: 2mm

- » カラム断面積に応じた最適流速領域がMSのイオン化に最適

- » 試料の負荷量が多い時は, 移動相より極性の高い溶媒にする, 又はグラジエント条件を用いる事で良好なピーク形状が得られる

- 粒子径: 3 μ m

- » 5 μ mより高い分離度を有し最適流量範囲が広い

- » 高分離分析・分析時間短縮のためにセミマイクロLCで最も汎用的である

- 化合物の溶出挙動(時間, ピーク形状)を目安にして移動相やカラム条件の最適化を行う.

推奨法：カラムの選択②

第二選択

選択性を変えたい場合

➤ フェニル基を有するカラム

- ODSで分離が不十分なときや保持が弱い場合に有用
- 芳香族化合物に対して特に強い相互作用を発揮し、ODSと同じ移動相を用いる事ができるため汎用且つ効率的に検討を行える

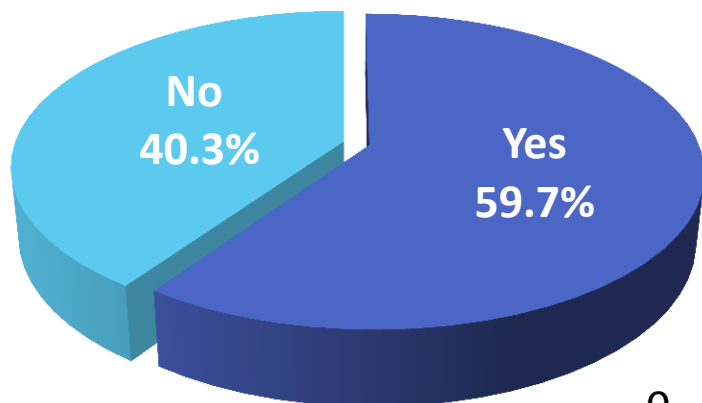
ODSで保持が弱い場合

➤ ユニークな官能基を有した逆相系カラム

- 逆相モードにおける移動相，注入溶媒の種類を変える事なくカラムの評価が可能である。
- 最大100%の水系移動相を用いることができるカラム。
- 極性基を有したものや二次相互作用の強いカラムを用いる。

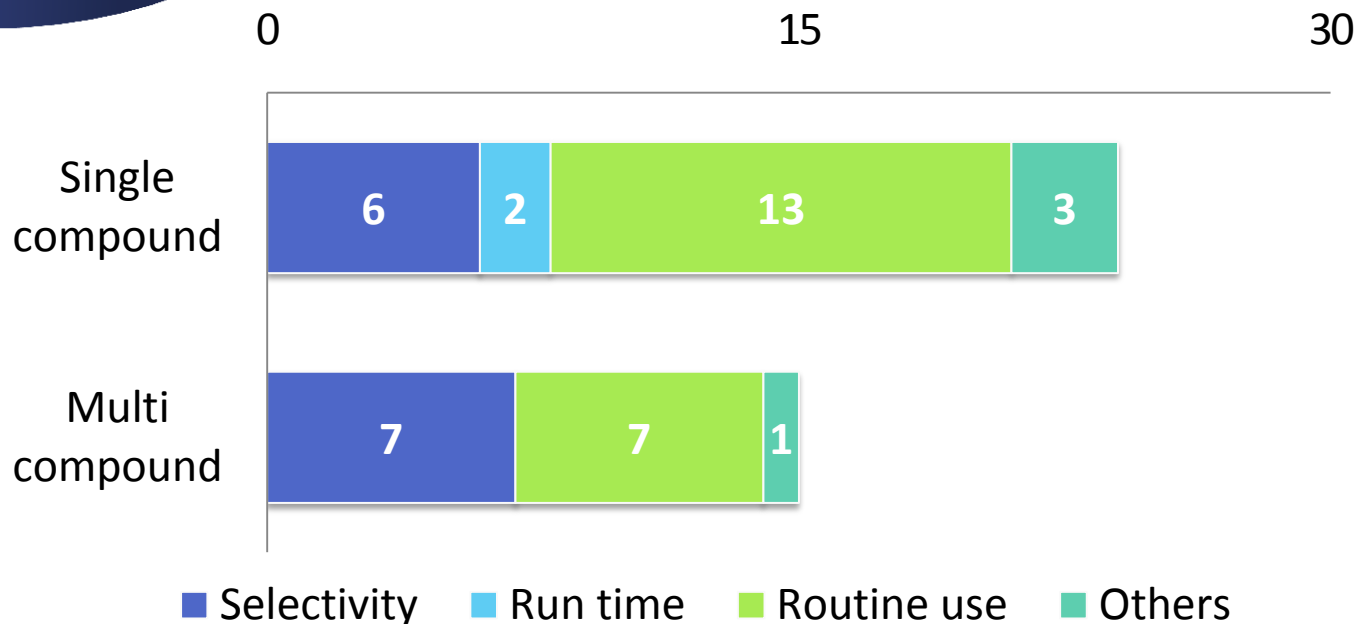
Q62. 第一選択のカラムはありますか？

回答数: 72件



選択理由

number of responses

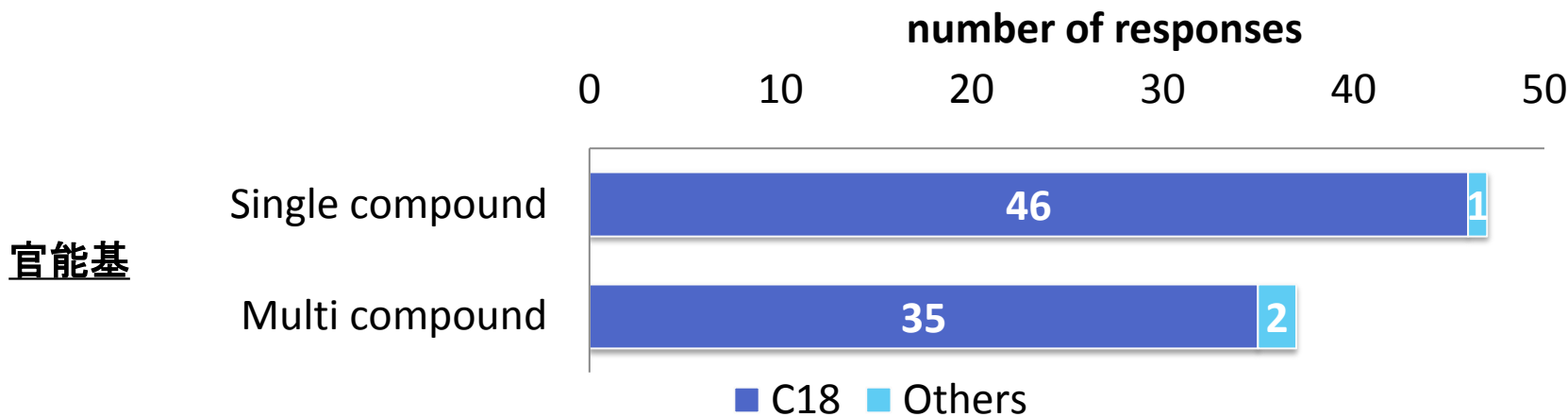
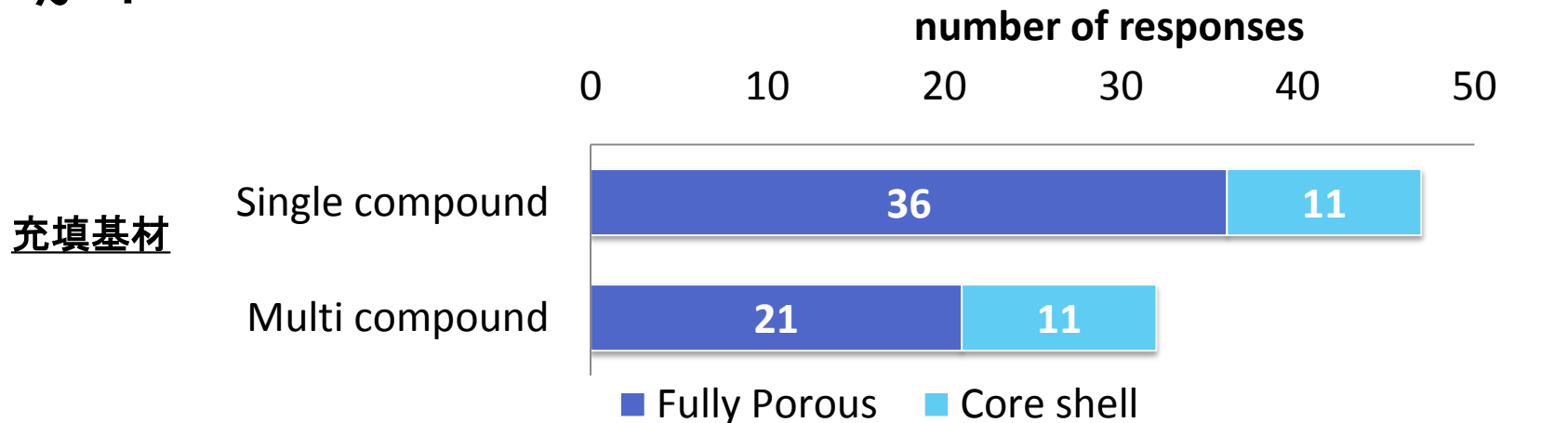


■ Selectivity ■ Run time ■ Routine use ■ Others

6th JBF Symposium, DG2014-07

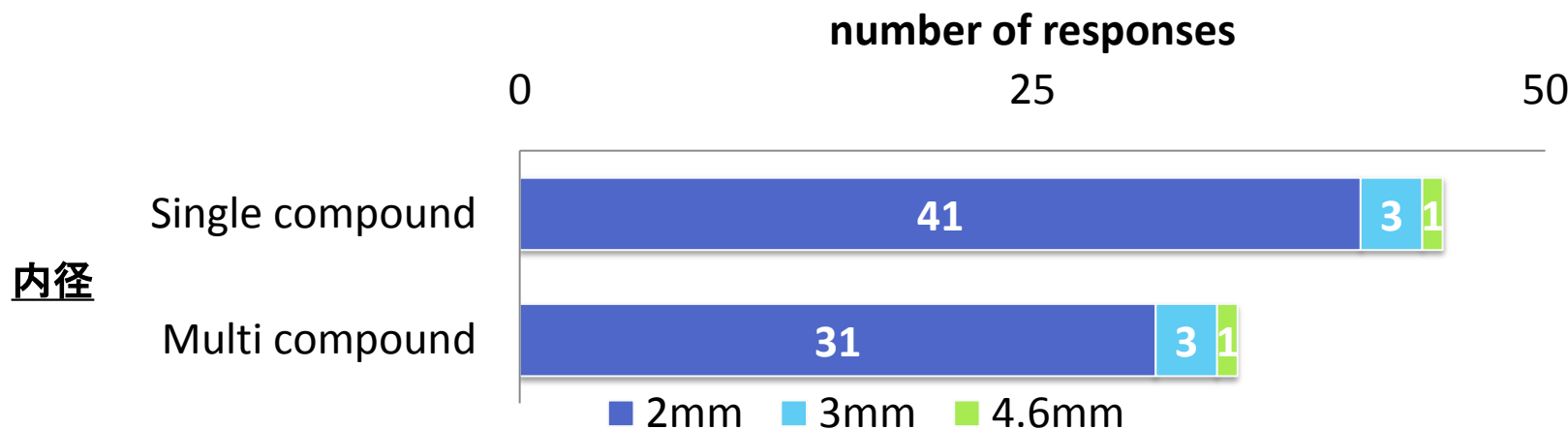
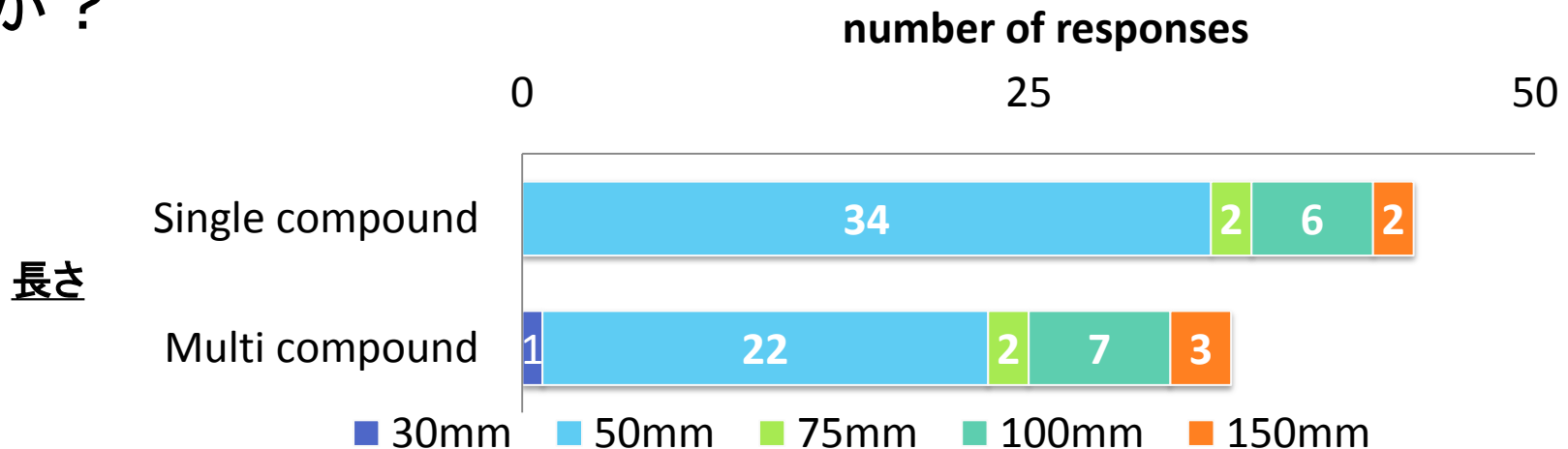
カラムの選択

Q63.どのような種類のカラムを第一選択として利用しますか？

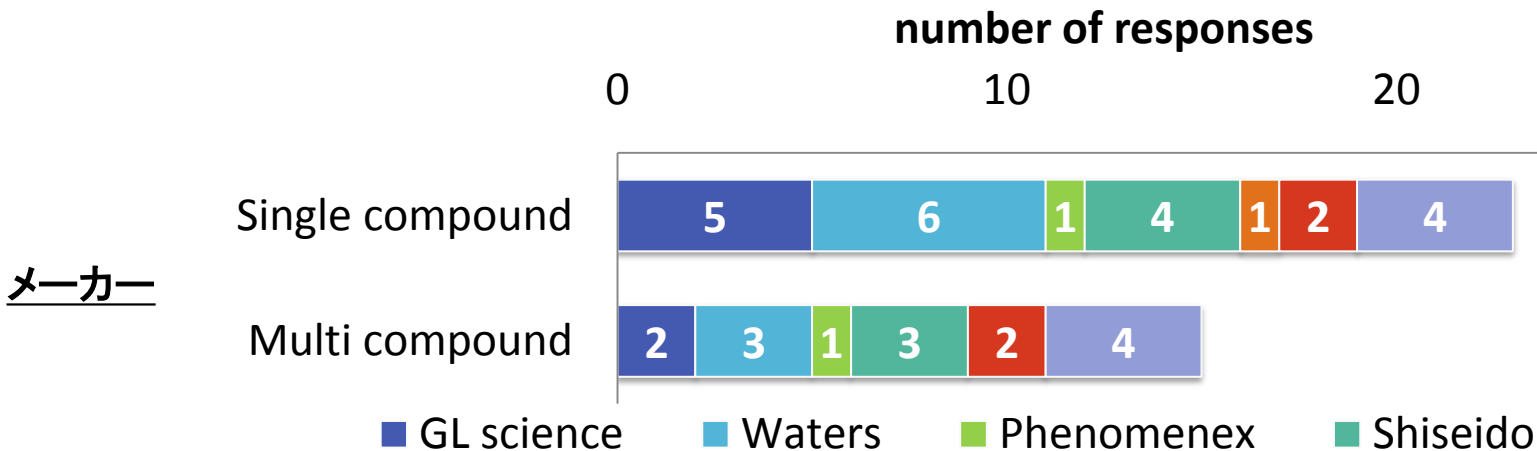
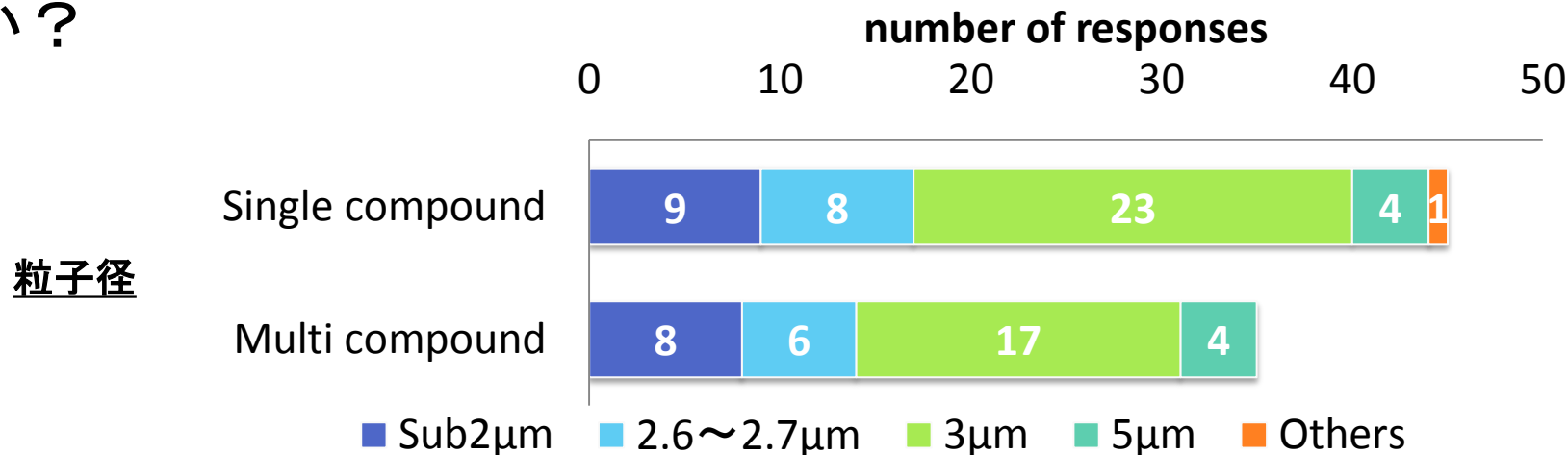


カラムの選択

Q63.どのような種類のカラムを第一選択として利用しますか？

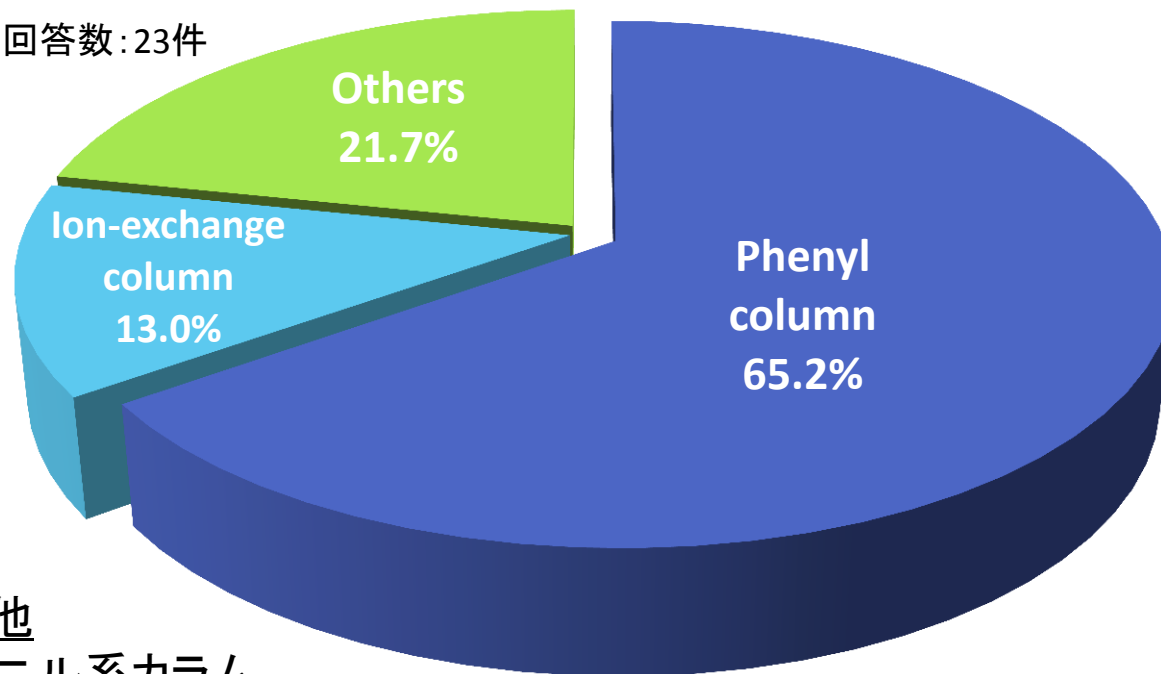


Q63.どのような種類のカラムを第一選択として利用しますか？



Q64. 選択性を変えたい場合の2ndチョイスカラムがあれば教えてください

回答数: 23件

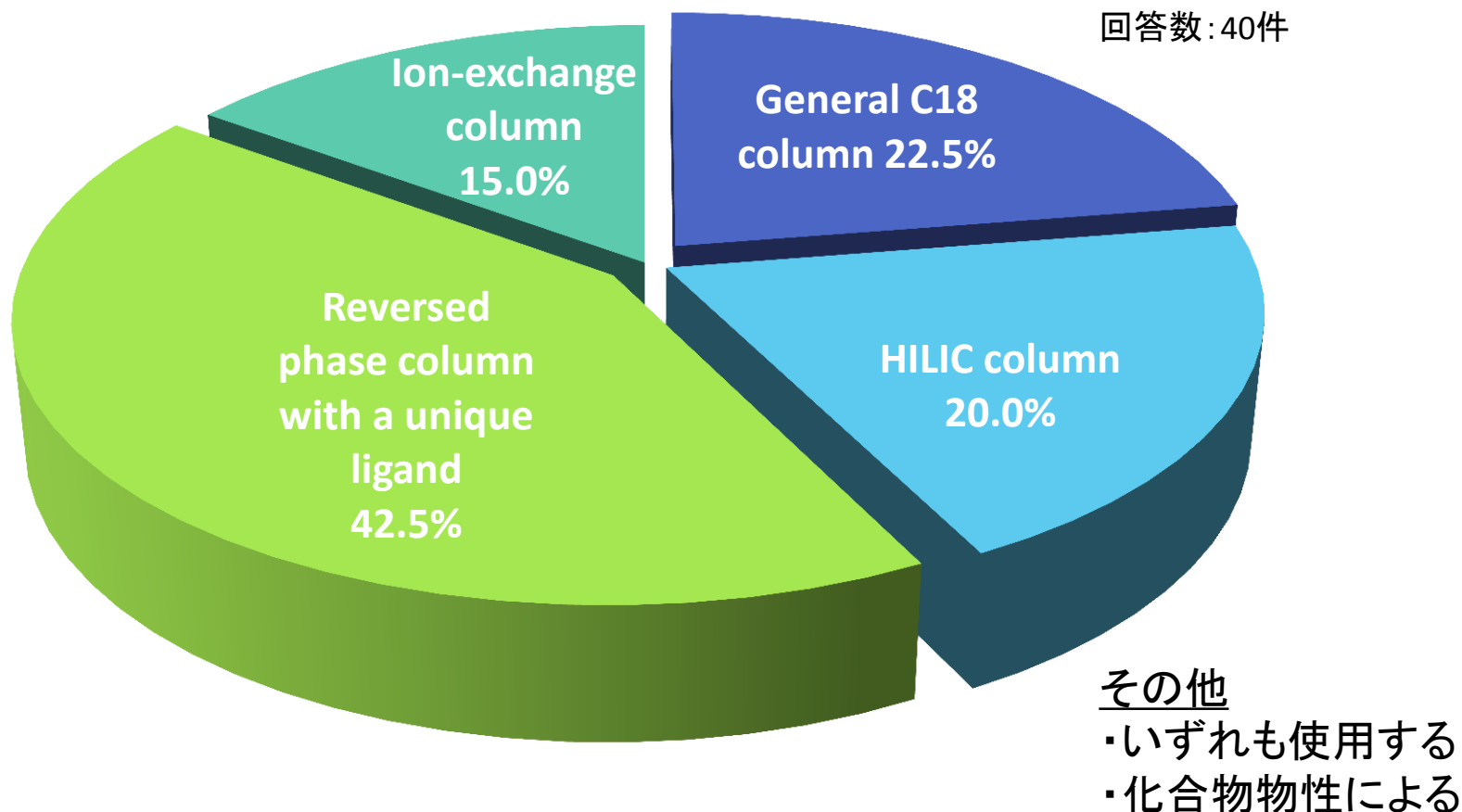


その他

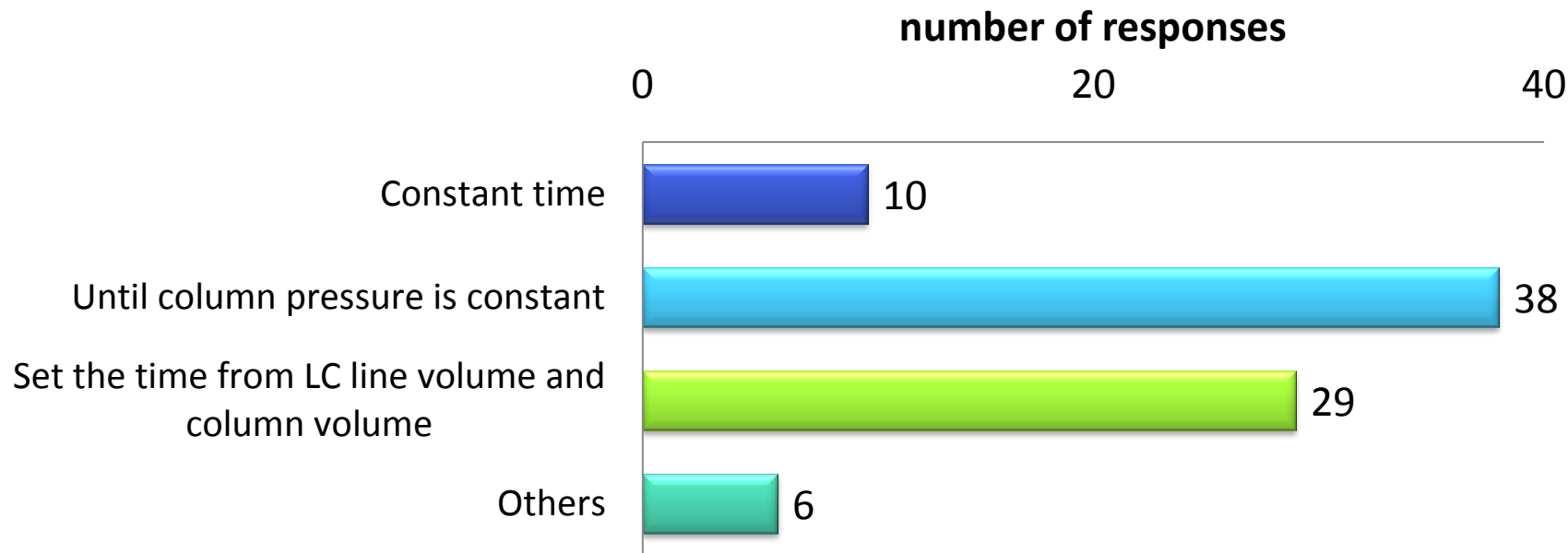
- ・フェニル系カラム
C18と選択性が変わるので比較的骨格別に分析できるので
- ・イオン交換系カラム
保持力及び夾雑物との分離性を考慮すると、HILICより使いやすい

カラムの選択

Q65. 通常のODSで保持が弱い化合物を測定する際のカラム選択は？



Q66.安定化にかける時間の設定方法は？（複数回答可）



その他

- ・移動相に用いる溶媒の種類と混合比率によって大まかに分けている.
- ・化合物物性による.
- ・フルスキャンのスペクトルが安定するまで

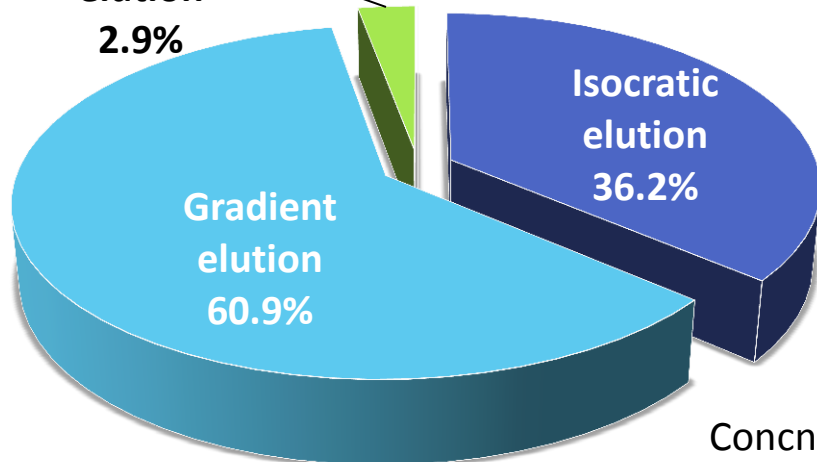


溶出法, 移動相

Q67. どのタイプの溶出法を第一選択としますか？

Stepwise elution
2.9%

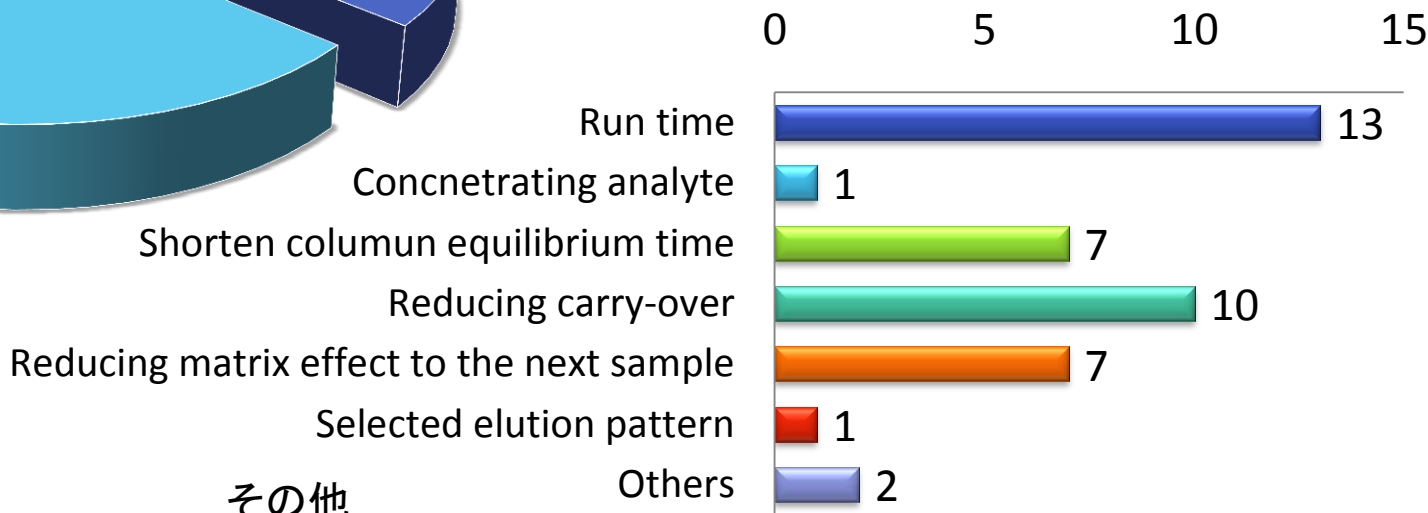
回答数: 69件



<選択理由>

回答数: 41件

number of responses



その他

- ・委託者の指定による
- ・押し出しを目的としたグラジエントであり、分離時はイソクラティック
- ・カラムトップでの濃縮とピークをシャープにする事で感度を稼ぐ

Q68. 第一選択の溶出方法の有機溶媒比率を教えてください(記述回答)

➤ アイソクラティック

- 50%(2件), 60%(3件), 70%(1件), 80%(2件)

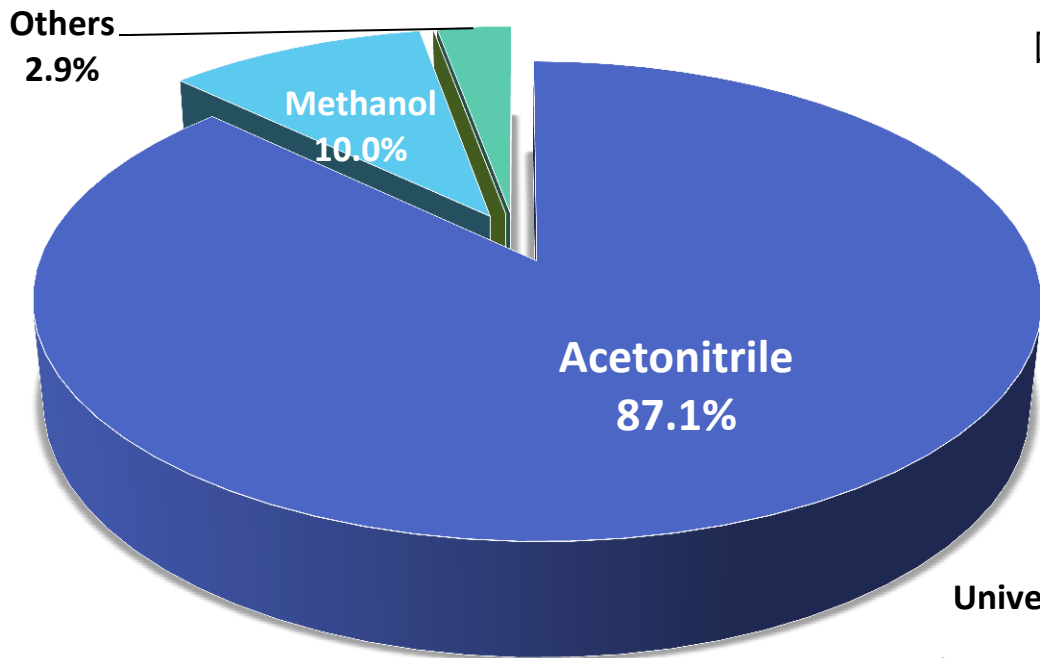
➤ グラジエント

Start ratio	Gradient method ratio
5%	5→80%(1→6 min), 5→90%(5 min),
	5→5→95→95→5% (0→2→5→5.1→9 min)
10%	10→90%(2件), 10→90%(0→3 min)
	10→10→90→90%(0→0.5→2.0→2.5 min)
	10→70%(0→5 min)
20%	20→95%, 20→95%(1→3min)

➤ 決まっていない

- グラジエント条件は10%刻みで条件変更しながら決定

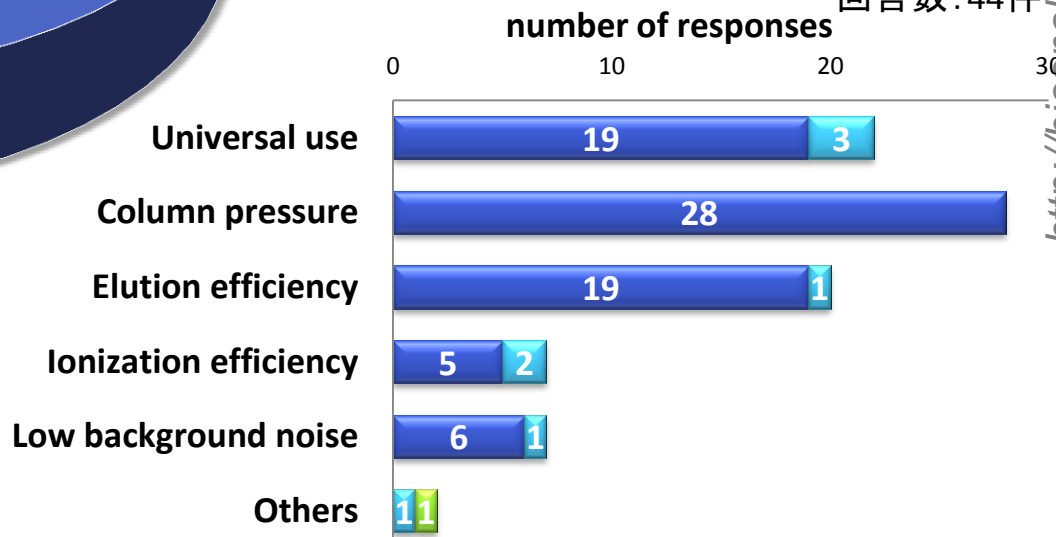
Q69. 第一選択の有機溶媒についてお聞かせ下さい



回答数: 70件

Q70. Q69の選択理由を教えてください (複数回答可)

回答数: 44件



Q69, Q70のその他
・委託者の指定による

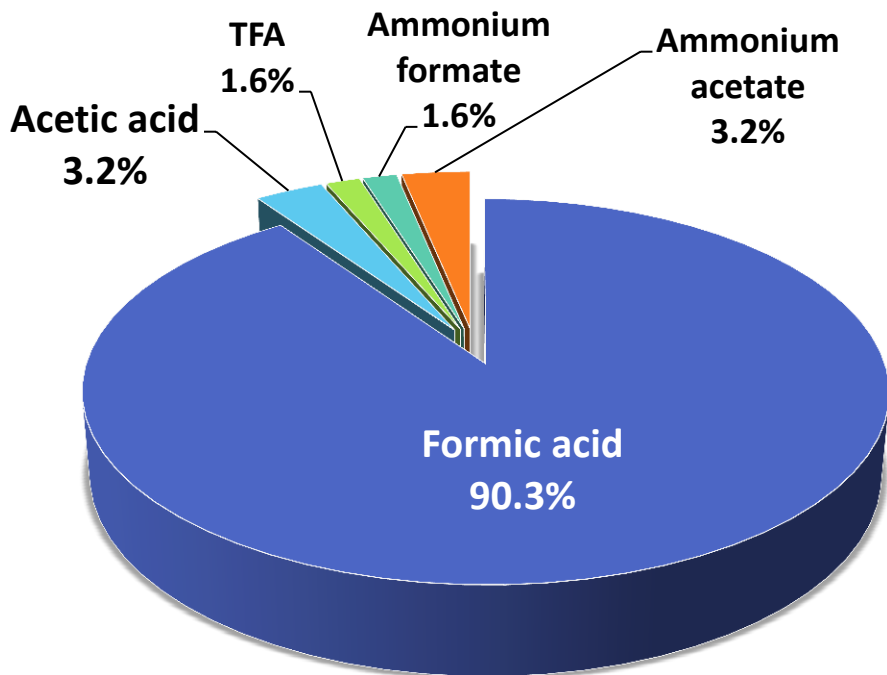
Q71. 第一選択の添加剤とその濃度について教えてください

<濃度>

回答数:62件

<添加剤>

回答数:62件



Added reagents	concentration	Counts
Formic acid	0.05%	1
	0.1%	39
	5mM	1
	10mM	1
	Others	14*
TFA	0.1%	1
Ammonium formate	10mM	1
Acetic acid	0.1%	1
	Others	1
Ammonium acetate	10mM	1
	Others	1

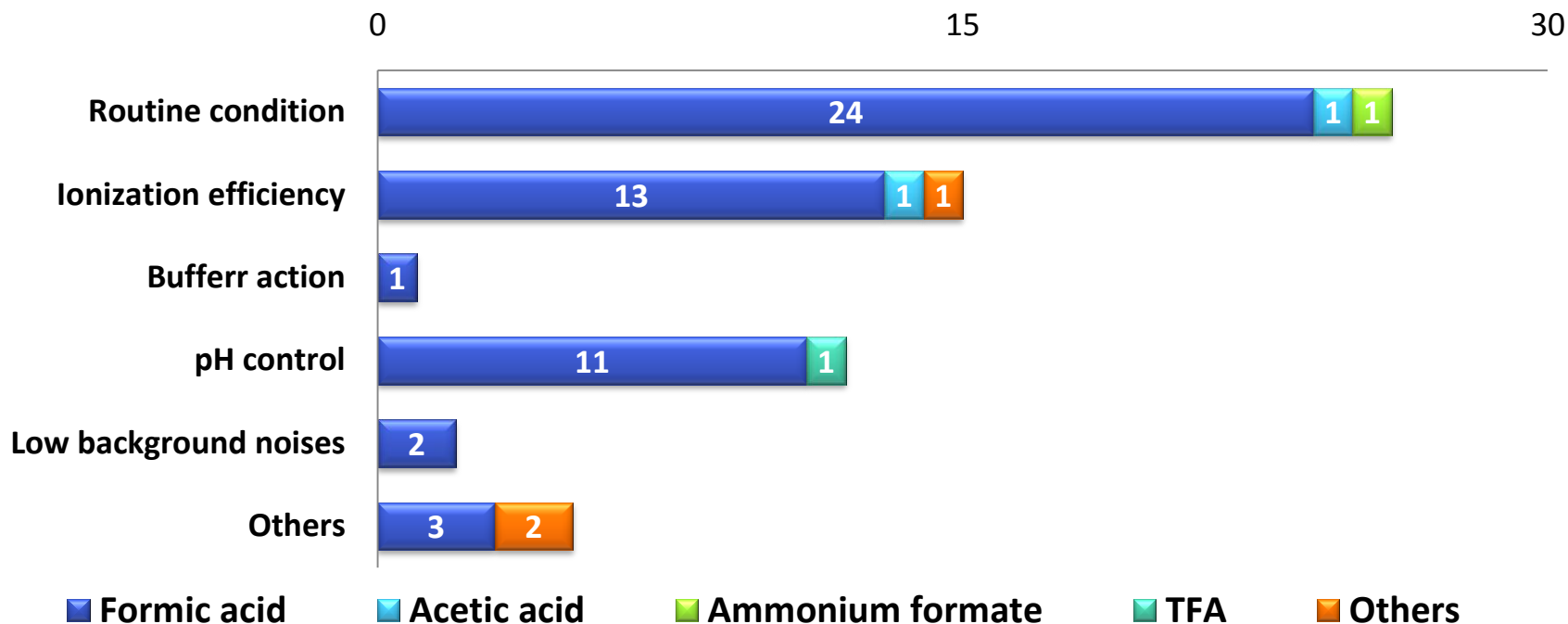
*1回目アンケートは濃度選択肢がなかったため多数となった

<http://bioanalysisforum.jp/>

Q72. 第一選択の添加剤の理由を教えてください(複数回答可)

number of responses

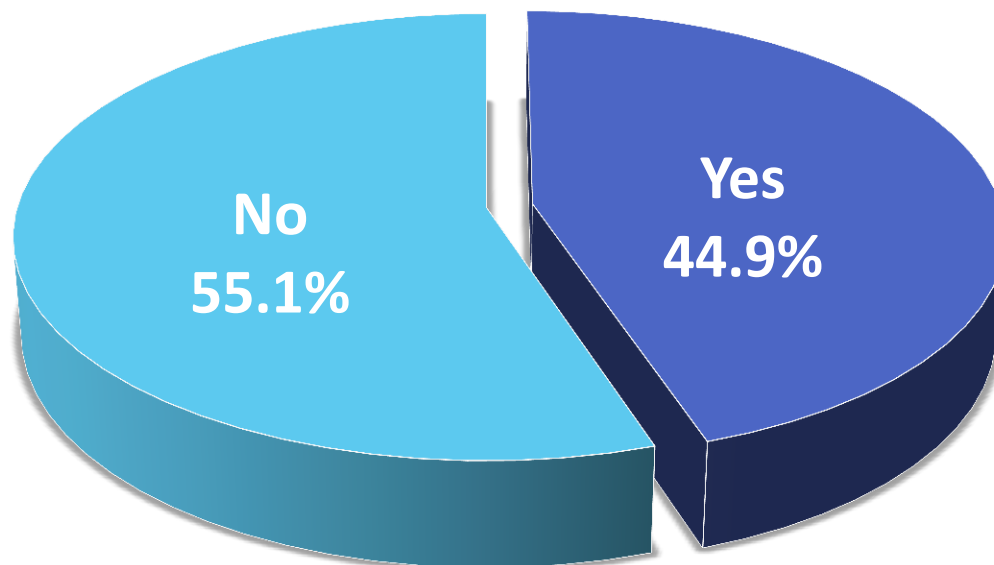
回答数:51件


<http://bioanalysisforum.jp/>

その他

- ・委託者の指定による
- ・調製が簡便、汎用性:5件
- ・化合物の物性や文献情報による:3件
- ・シンプルな方から開始

Q73. (LC-MSにおける)イオンペア試薬の使用の経験は？



使用理由

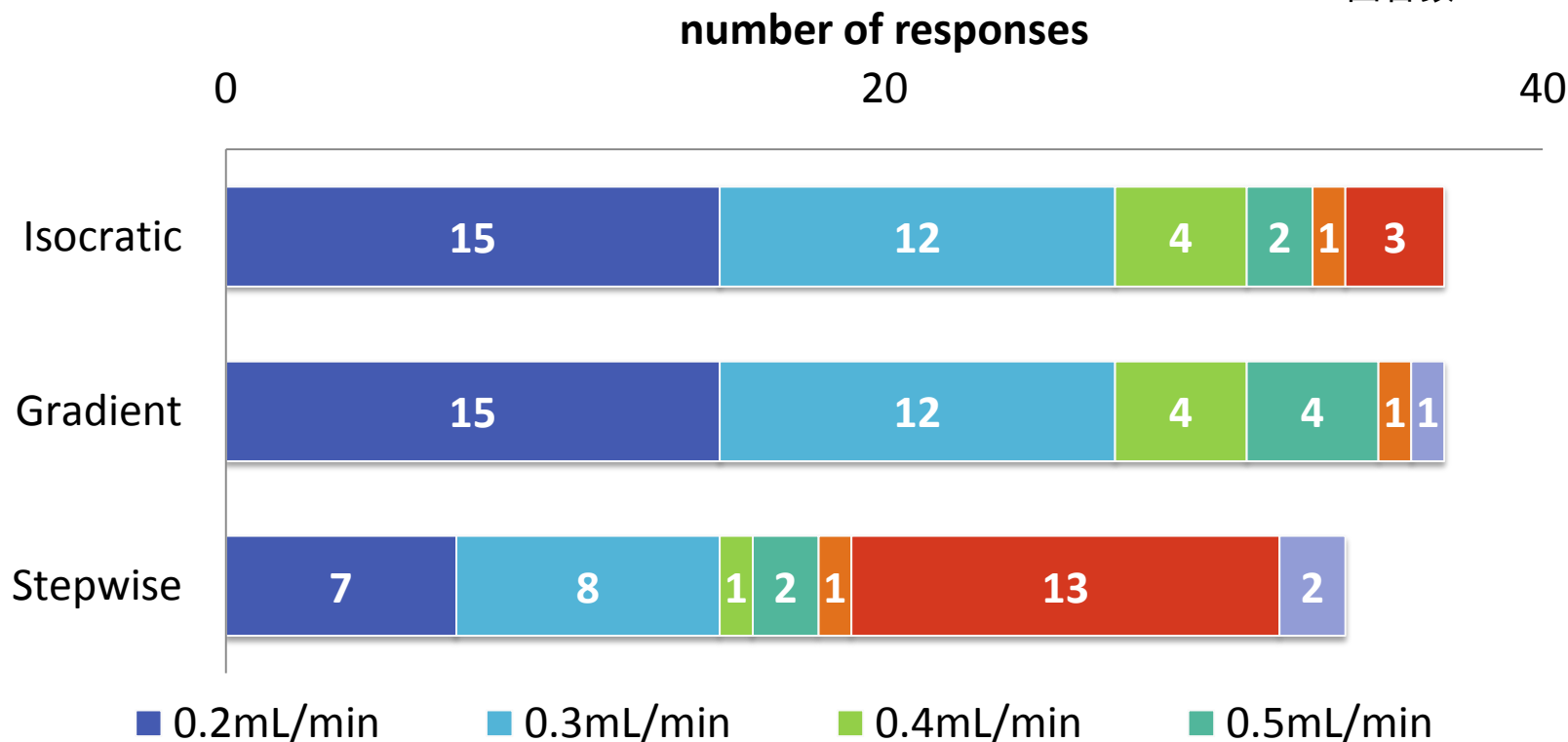
- ・保持向上: 9件
- ・ピーク形状、分離改善: 4件
- ・委託者の指定

その他

- ・イオンペア的にTFA等の使用はあるが、界面活性剂的なものはMSだとない
- ・あまり良い思い出がない
- ・現状、ルーチンでは使っていない

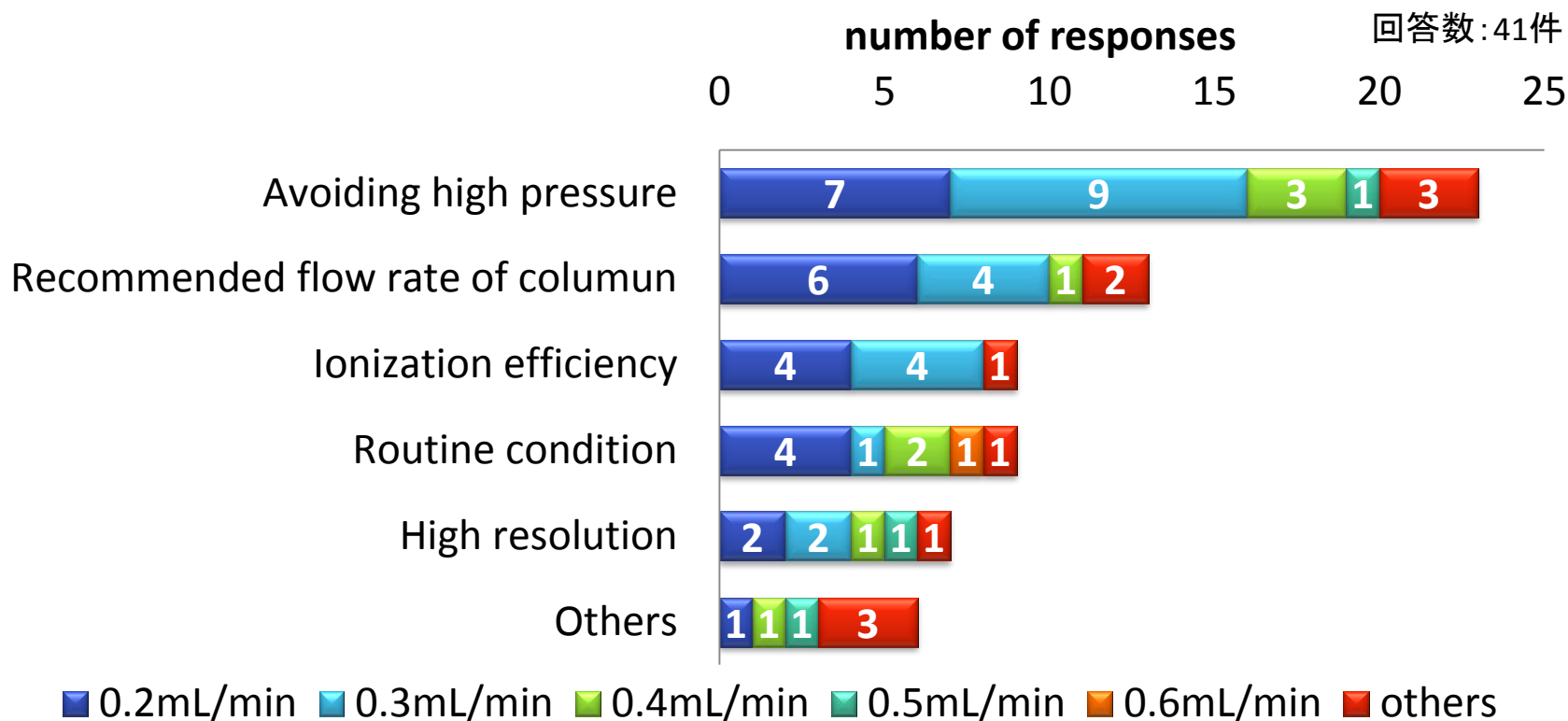
Q74. 第一選択の流速は？

回答数: 34~37件

その他

- ・委託者の指定による
- ・使用カラムによる
- ・ステップワイズの時は流速もステップワイズ選択するカラムに依存
- ・0.2~0.4 mLで適切なカラム圧や目的に合っている条件を選択

Q75. 第一選択の流速の理由を教えてください（複数回答可）



*LC溶出法により流速が違う場合の回答は、Othersに含みました

その他

- ・委託者の指定による
- ・作業効率を上げるため
- ・カラムの耐圧と分析時間の高速化
- ・ミキシングデッドボリュームを考慮
- ・自分の中で基本の条件なので、その後でモディファイしやすい



キャリアオーバー



Carryover原因追究フロー

※ To confirm how many injections are necessary in order to eliminate Carry Over

Multiple Injection of a Blank Sample

No Change

Decrease

Increase the injection volume of the above blank sample

Investigate by changing to ...

- Run gradient without injection (Disconnect AS or Optional inj. mode) or
- Multiple gradient cycles per 1 run

Enhancement of the intensity

No Change

Peak not detected

Peak detected

Needle (outside)

Injector (Needle(inside), Valve, Loop, Joints, ...)

Column (Frit, Guard, Material...)

<http://bioanalysisforum.jp/>

推奨法：キャリーオーバー対策

Needle

洗浄条件の最適化

- ・ 洗浄液量, 回数を増やす。
- ・ 洗浄液検討(化合物の溶解性を考慮する)

脂溶性が高いもの

水/メタノール/アセトニトリル/2-プロパノールをベースとし、
2-propanolの比率, アセトニトリルの比率を上げていく。
必要があれば酸を加える。

水溶性が高いもの

pHの検討を行う。

保持のためにpHを調整している場合, 塩抜きも効果がある。

- ・ 内部洗浄の使用

これだけで解決することは稀だが, 効果がある場合もある。

推奨法：キャリーオーバー対策

Column (Frit, Guard, Material…)

グラジエント変更

- ・ 初期溶媒比率を上げる。
- ・ 洗浄用グラジエントを測定用グラジエントの後に追加する。

カラムの交換・変更

- ・ 担体への吸着が疑われる際は、カラムケミストリの変更，新品への交換の他，ある程度使用済みのカラムへの交換が有効な場合もある。

移動相の変更

- ・ 化合物の溶解度を考慮して変更する。

推奨法：キャリーオーバー対策

Injector (Valve, Needle, Loop, Joints…)

各パーツの洗浄・交換

- ・洗浄又は交換後，挙動を確認する。
新品への交換の他，ある程度使用済みのパーツへの交換が有効な場合もある。
測定ごとに交換することを意図するものではない。
- ・コーティングや材質の異なるパーツが入手できる場合は検討してみる。

移動相の変更

- ・化合物の溶解度を考慮して変更する。

Q76. 経験はありますか？

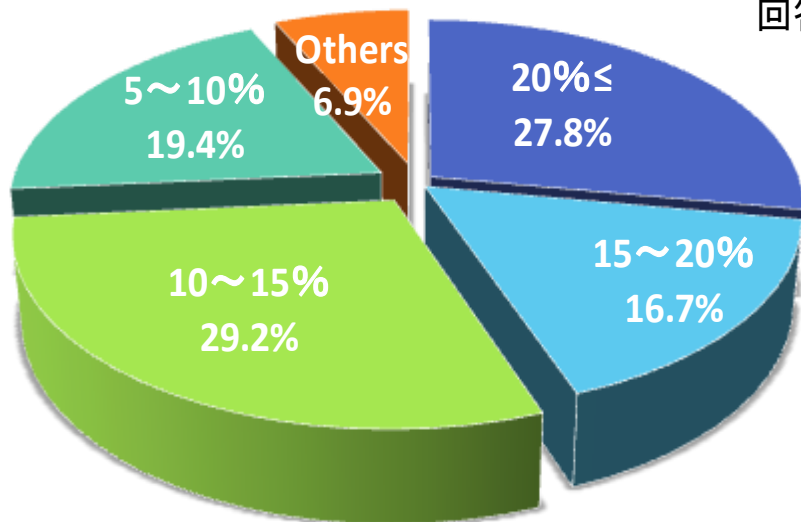
Answer	Counts
Yes	71
No	1

<引き起こさない理由>

- ・オートサンプラーのWashパラメータ設定で
(ほぼすべて)解決可能
- ・十分な洗浄で回避可能

Q77. LLOQの何%から対応しますか？

回答数: 72件



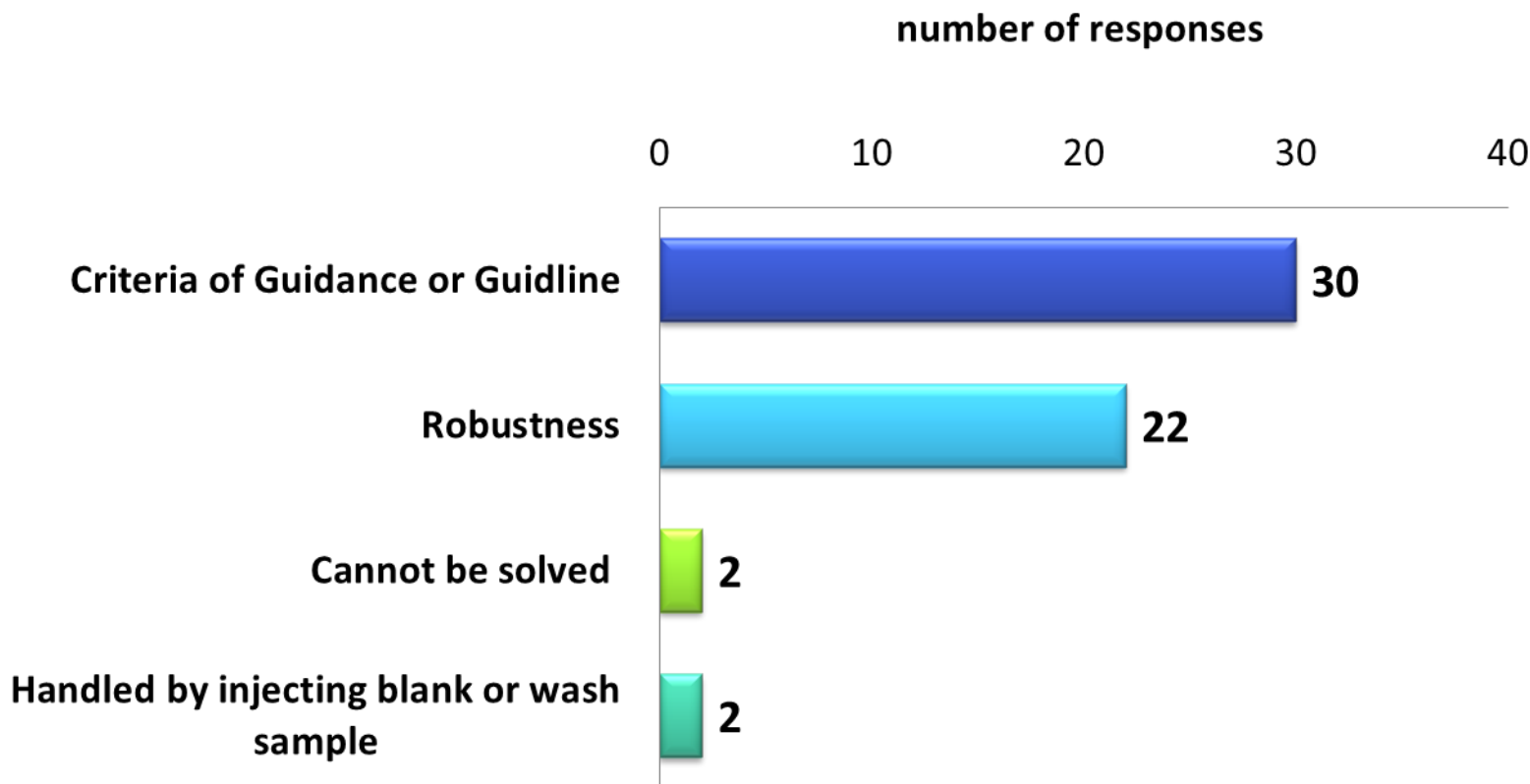
<その他コメント>

- ・実試料を多数分析する際、
増加する可能性も考慮し5%未満でも対応
- ・検量線の基準値から頻繁に逸脱した場合

Q78. キャリーオーバーに対応する基準値の理由は？

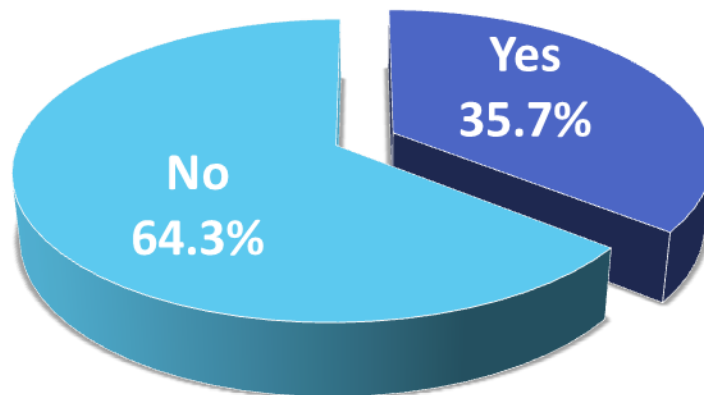
(複数回答可)

回答数:43件



Q79. 原因の追究の手順をお持ちでしょうか？

回答数: 70件



手順をお持ちな場合, 可能な範囲で教えてください

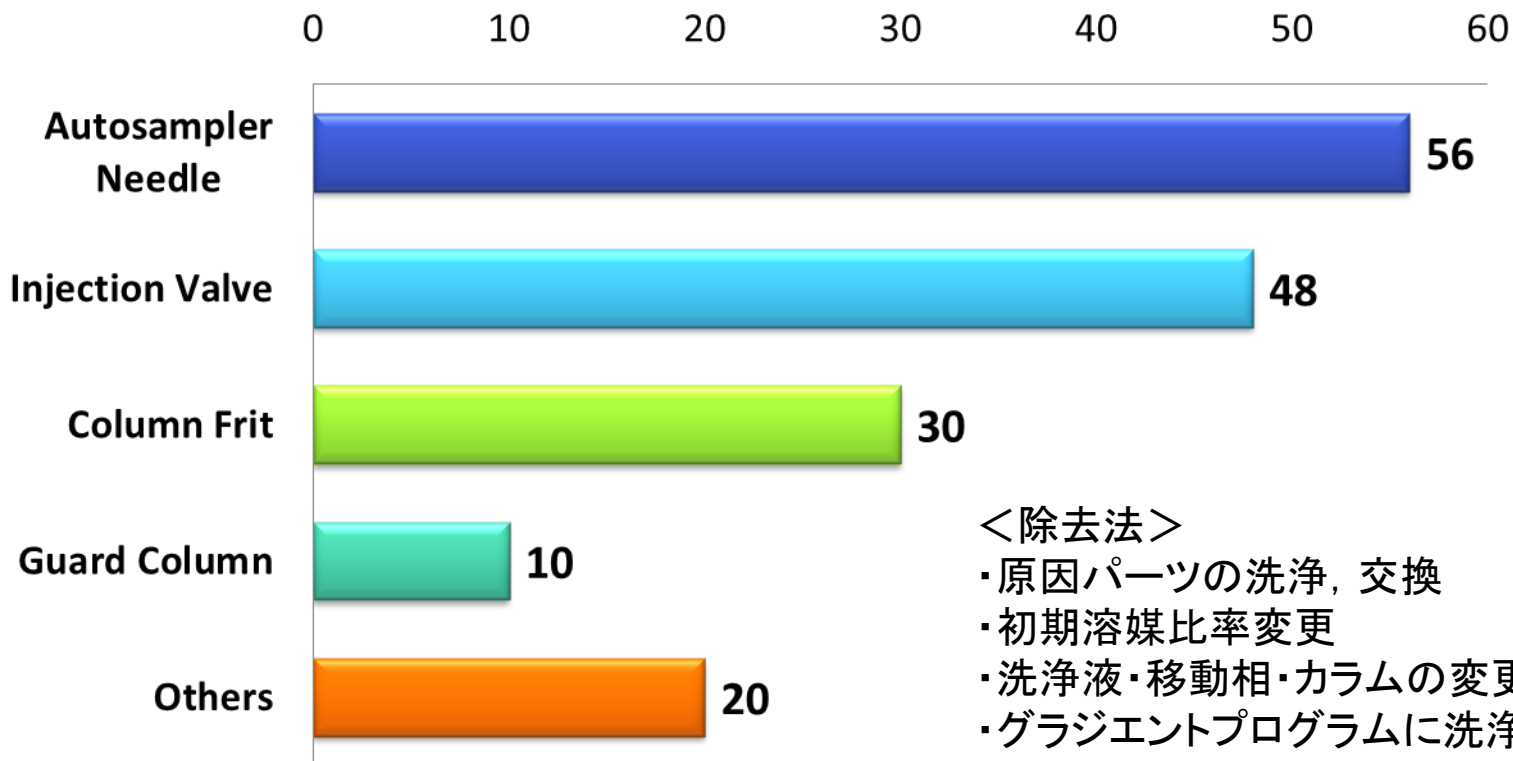
No.	Comment
1	空打ち (Injバルブのみ作動) → ブランク注入 → ブランク注入 (複数回)
2	流路、カラム、インジェクター、測定機器
3	どこに吸着するかを特定してパーツを変えるか、溶解成分を移動相に添加する
4	洗浄液の検討、グラジエントをアイソクラティックへ変更、カウンターイオンを検討
5	注入部、カラム、配管などを順に検討
6	手あたり次第に試行錯誤する。

Q80. 原因箇所はどこが多いとお考えですか？

また、除去法は？（複数回答可）

回答数：88件

number of responses



<除去法>

- ・原因パーツの洗浄，交換
- ・初期溶媒比率変更
- ・洗浄液・移動相・カラムの変更
- ・グラジエントプログラムに洗浄工程を組み込む

Q81. オートサンプラーニードルの第一選択の洗浄液があれば教えてください(自由コメント)

より溶解度の強い有機溶媒, +酸or塩基

50%メタノール水溶液

メタノール+酸

メタノール, アセトニトリルに酸(ギ酸, TFA, 酢酸)の添加

IPA

アセトニトリル, 2-プロパノール, 水, ギ酸の混液

2-プロパノール/アセトニトリル/水混液(5:1:1)

有機溶媒の混液(アセトニトリル/メタノール)組成は、化合物によって調整

2-プロパノール、pHを調整する。

アセトニトリル/メタノール/2-プロパノール/0.1%ギ酸水溶液の等量混合液を使用。

メタノール/イソプロパノール

酸添加溶液と50%イソプロパノール

移動相の塩抜き

サンプル溶解液から、酸あるいは塩基除いた組成

水/MeOH/iPrOH/MeCN 1/1/1/1

水/アセトニトリル/イソプロパノール混液

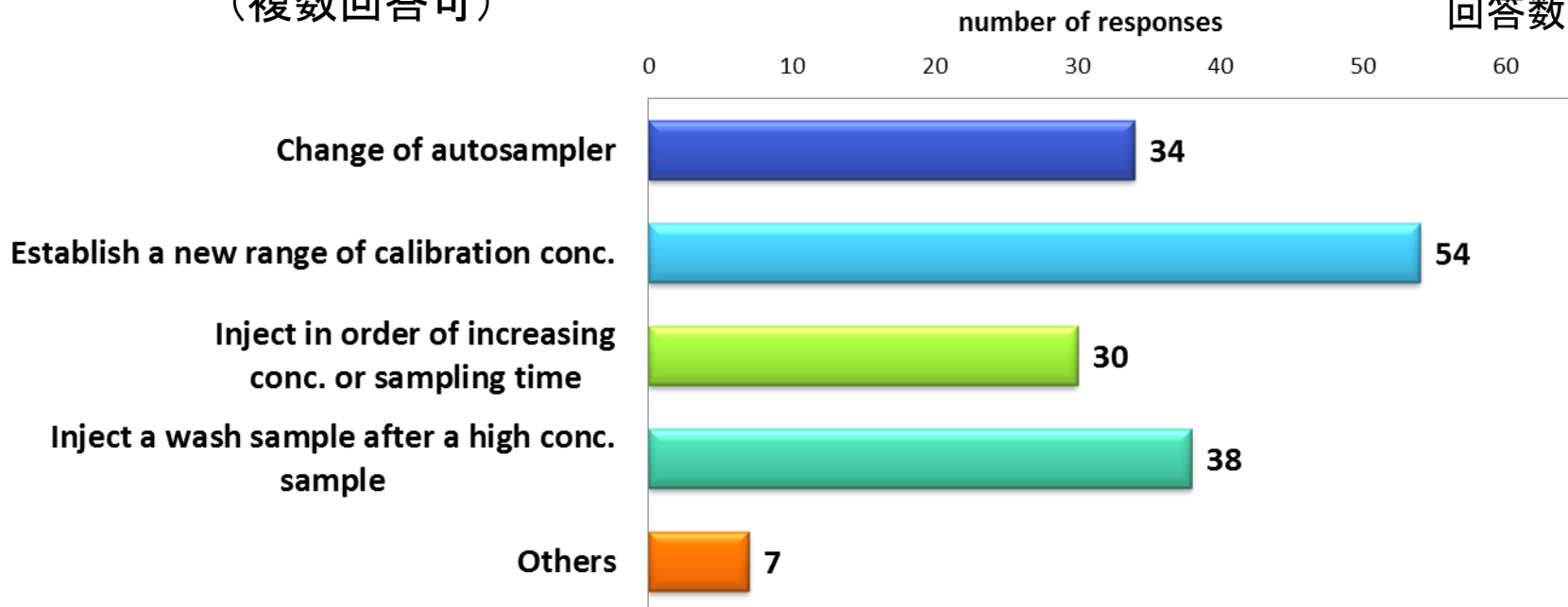
70%アセトニトリル

アセトニトリル

Q82. 除去できなかった場合の対処方法について

(複数回答可)

回答数: 78件



<その他コメント>

- ・カラムスイッチ
- ・ブランク試料の注入
- ・Wash溶液として溶媒のみでなく、
ブランク試料の除タン上清もおくと影響を小さくできる事が多い
- ・検体の間に溶媒バイアルをセットし毎回検体をサンドイッチして注入
- ・移動相条件とカラムの変更(物性に合わせて移動相の初期条件を変更)
- ・一定エリアのピークが消えない際、サンプル濃縮で対応(スプリッター使用で頭打ちを防ぐ)

Q82. 除去できなかった場合の対処方法について <その他コメント>

- ・ 事前に測定値に基準を設け再測定を行う

例) 検量線範囲1~1000 ng/mLの分析法において

1000 ng/mL注入後, 0.25 ng/mL相当のキャリーオーバーが起こる場合

Validation報告書にLLOQの25%のキャリーオーバーが起こることを記載し,

実測定の計画書またはSOPに,

分析法としてキャリーオーバーの懸念があること,

X番目のピークエリアからX+1番目のピークエリアへの影響を評価し,

影響がある場合は当該サンプルを再測定することを記載しておく。

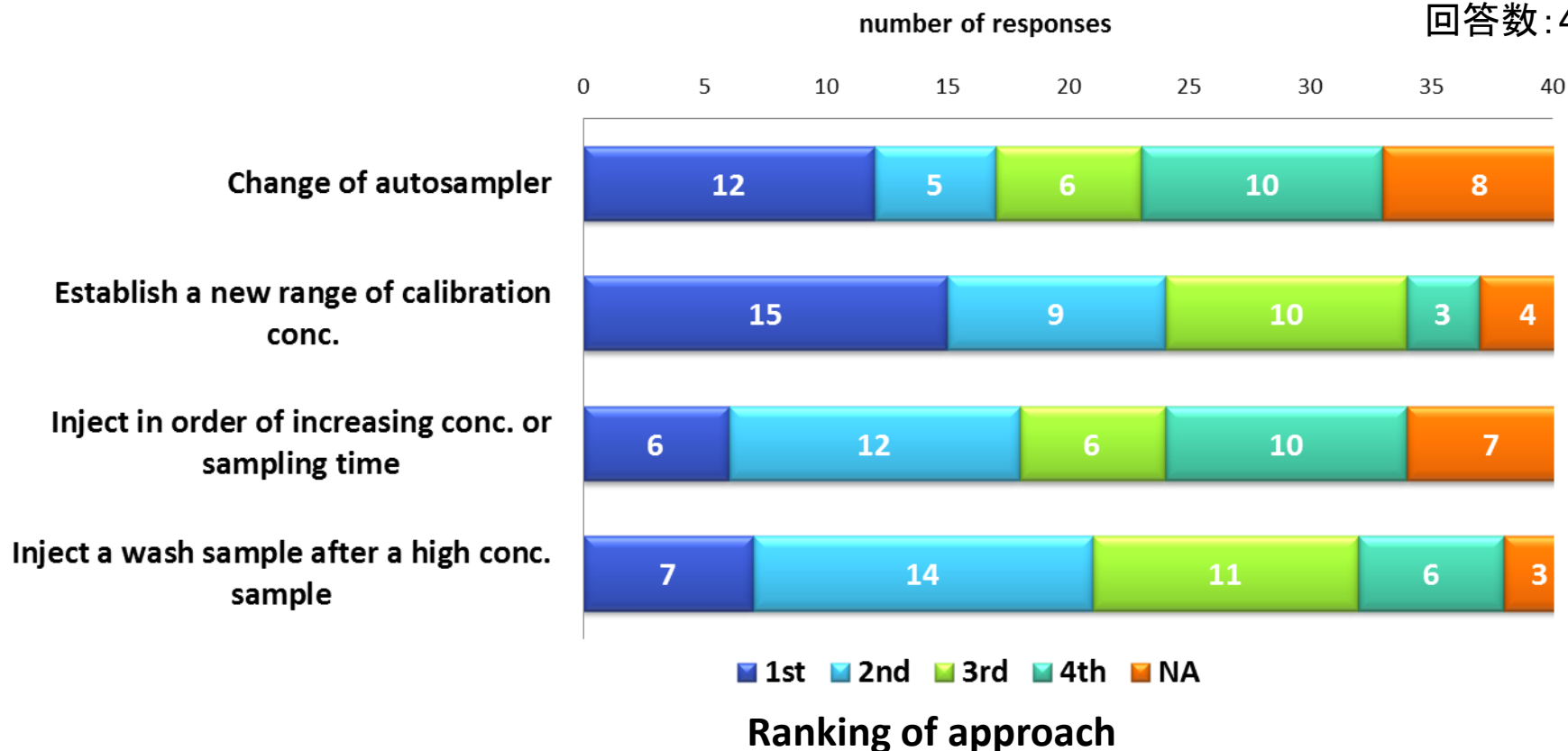
なお, Validation時にキャリーオーバーが無い場合においても,

計画書またはSOPに同様の記載をしておくことで

万が一の事態にも対処可能

Q83. 対処法の順番を教えてください。

回答数: 41件



<トータルスコアによる対処順位>

- ①定量範囲変更⇒②オートサンプラー変更, 高濃度試料注入後Wash溶液注入
⇒④影響の出ない注入順へ変更

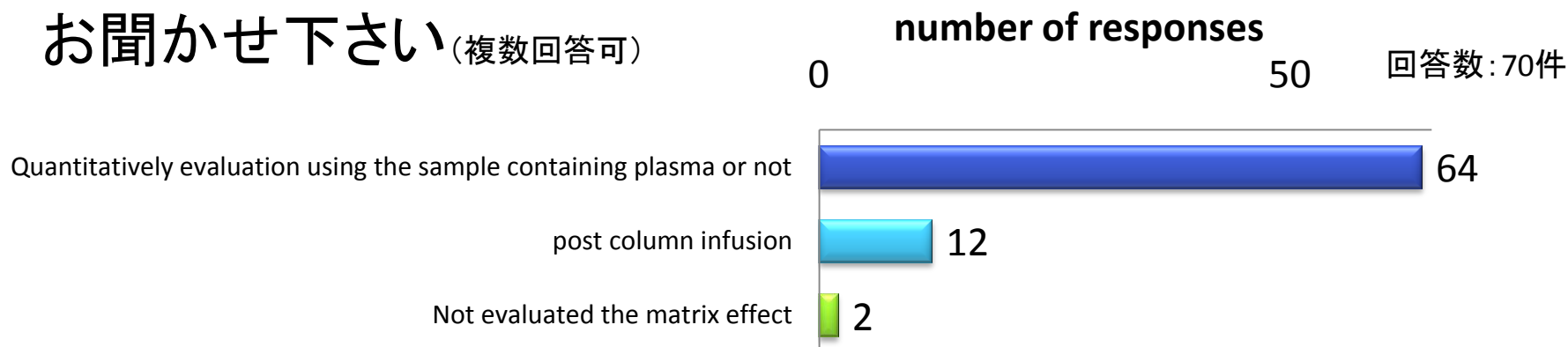
Q84. キャリーオーバー対策に有効なオートサンプラー
がありましたらお聞かせください

メーカー, 機種名	理由
HTC-PAL, Agilent	洗浄方法, 吸着しにくい材質のパーツに変更することが可能.
島津SIL-10A	シンプルで一番よかった
Nexera	3液洗浄
資生堂、Nanospace SI2	超音波洗浄機能があり、一定の効果が認められた。
おそらくWaters製品	

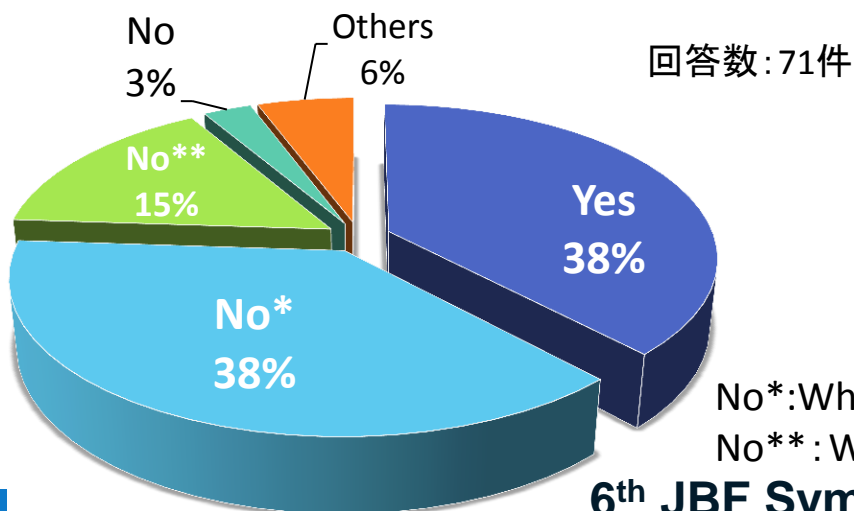


測定法（その他）

Q85. 検討段階におけるマトリクス効果の評価法についてお聞かせ下さい (複数回答可)



Q86. マトリクスの影響がある場合 (マトリクスファクターが1にならなかった場合), 除去は試みますか?



その他

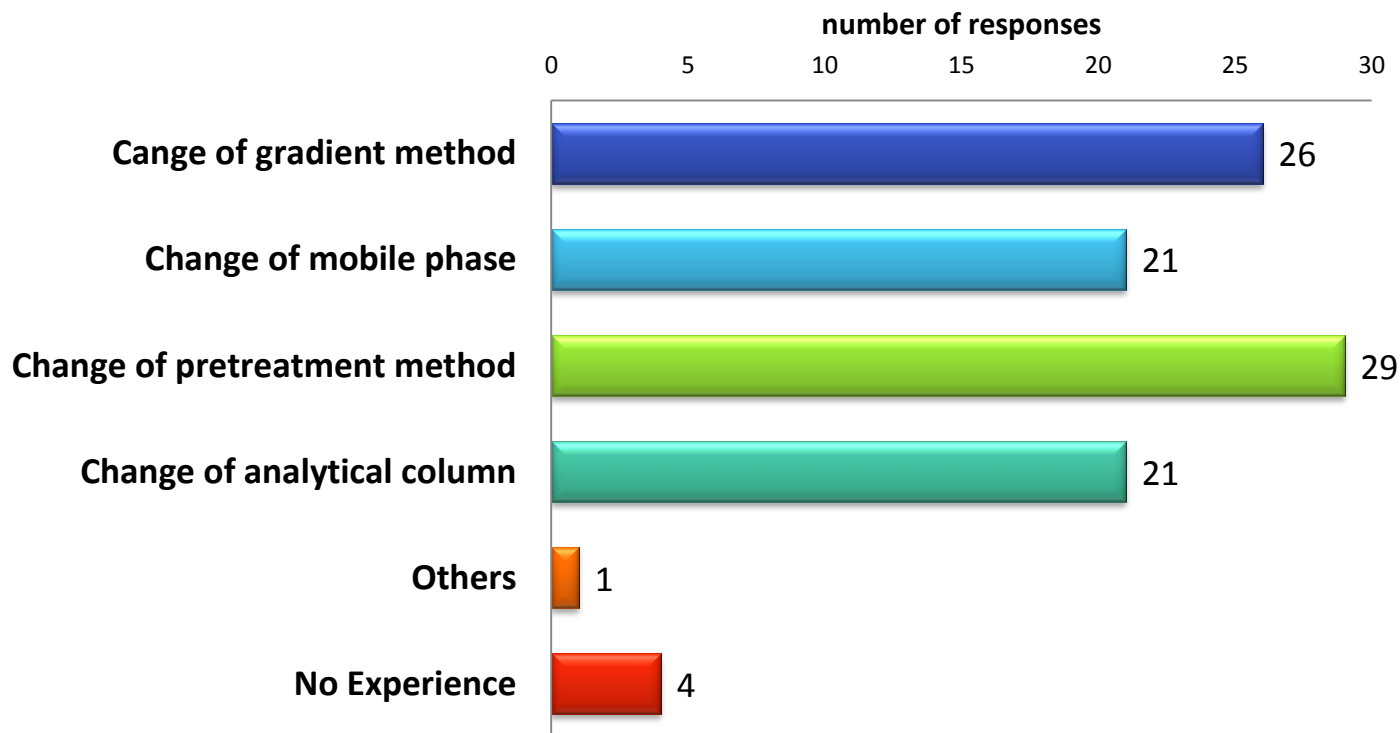
- ・大量かつ連続測定では, 検討では読めない変化がある可能性が高いため, エフェクトが無い条件を一度は詰めて見る
- ・ケースバイケース; 2件

No*: When it have no influence on determined value

No**: When it is normalized by internal standard

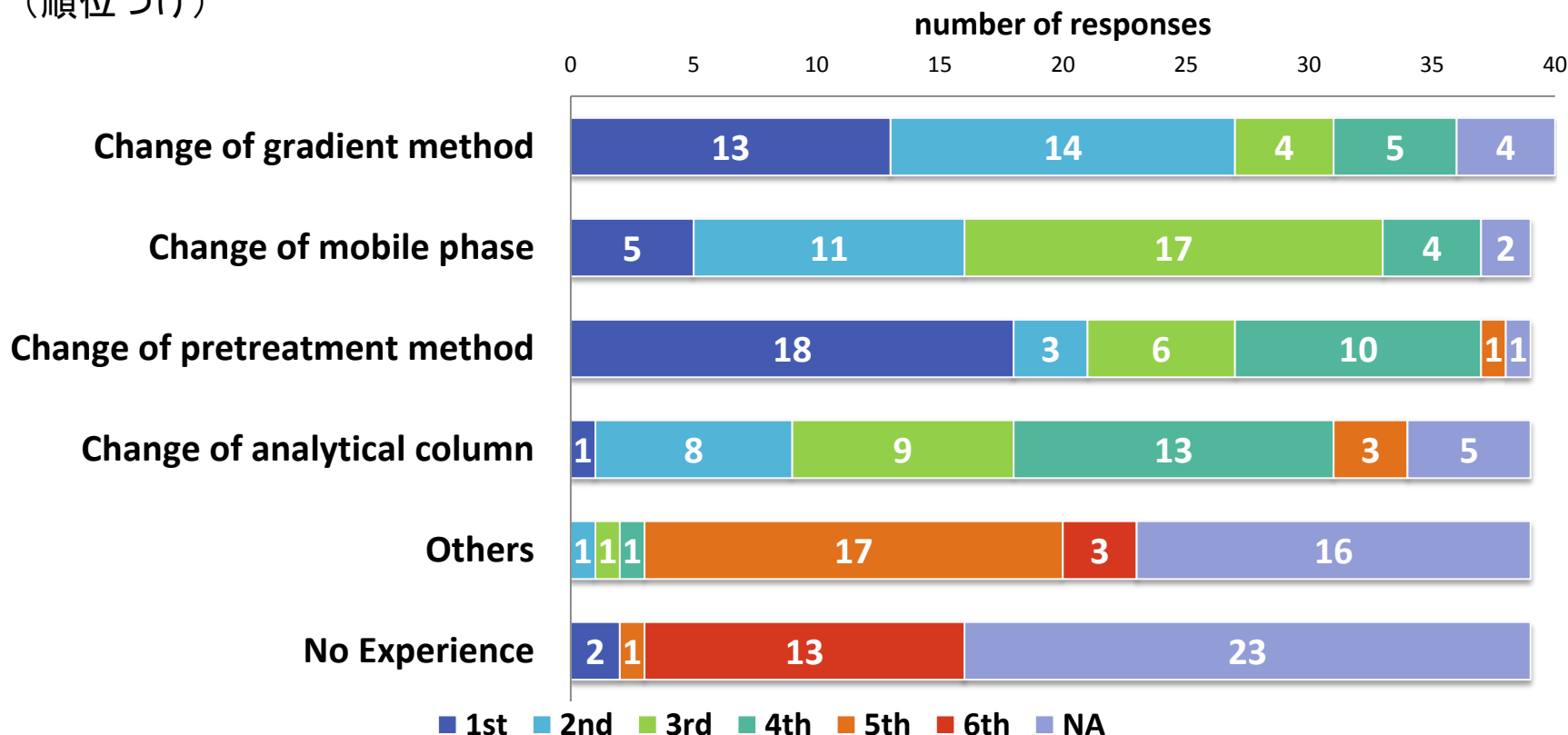
マトリックスの影響

Q87. マトリックスの影響がある場合, その除去方法についてお聞かせ下さい (複数回答可)



回答数: 40件

Q88. マトリックス効果に対する対処順番を教えてください
(順位づけ)

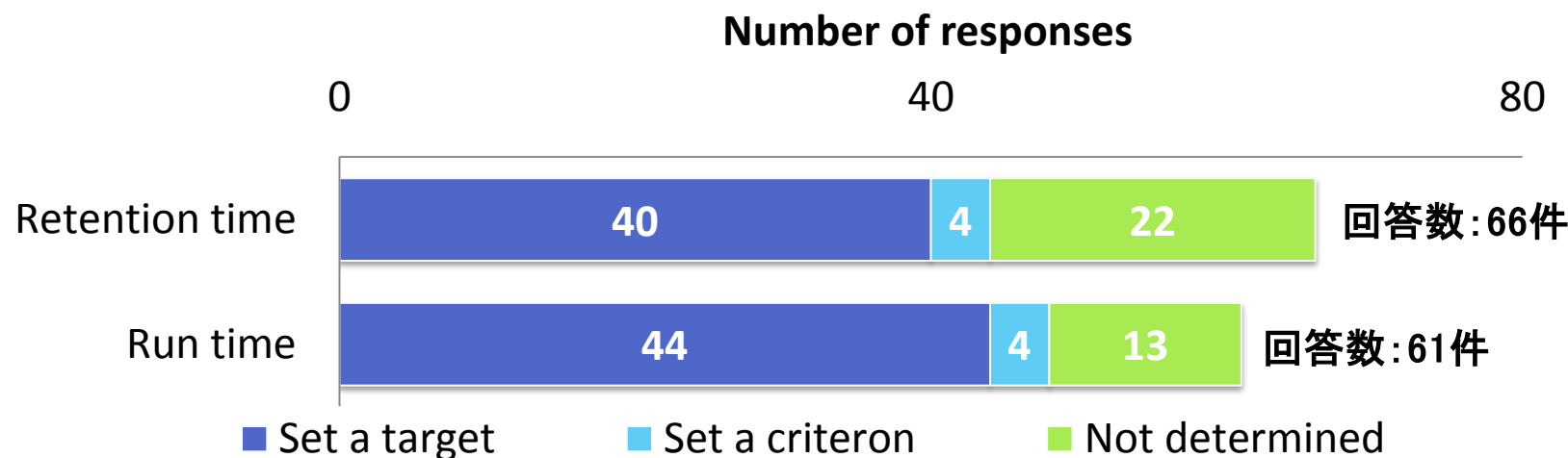


回答数: 39~40件

<トータルスコアによる対処順位>

①グラジエント変更⇒②前処理変更⇒③移動相変更⇒④分析カラム変更

Q89. 保持時間, 測定時間 (run time) の目安はありますか？



<コメントより>

保持時間

- ・ $k = 2, 3-4$, または5と各社まちまち。(k; capacity factor)
- ・ kを使わない場合, 測定時間の半分を目安とされているようであった。

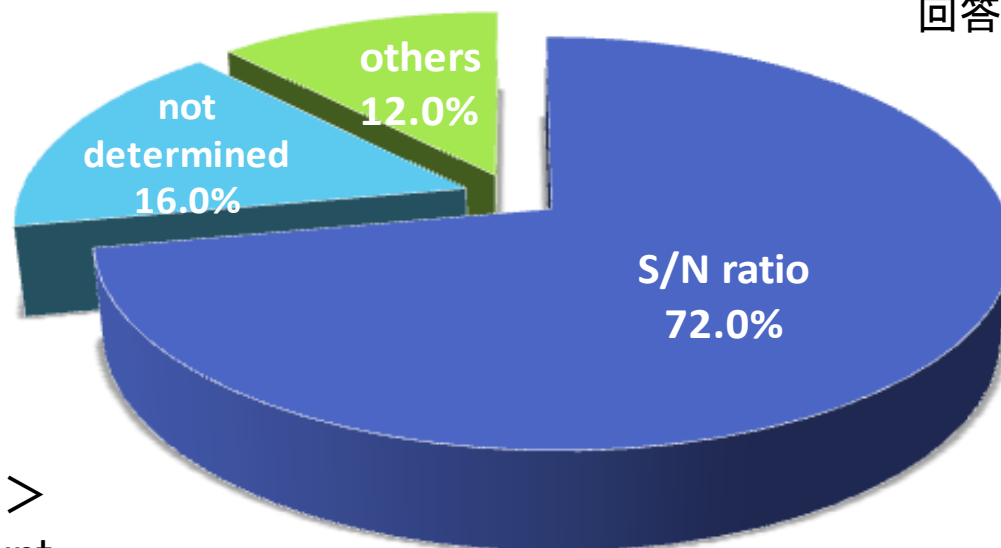
測定時間

- ・ 5分以内または10分以内を目安にというのが主であった。
- ・ 複数成分分析時は15分との意見もあった。

測定法（その他）

Q90. LLOQピークの高さの目安はありますか？

回答数: 75件



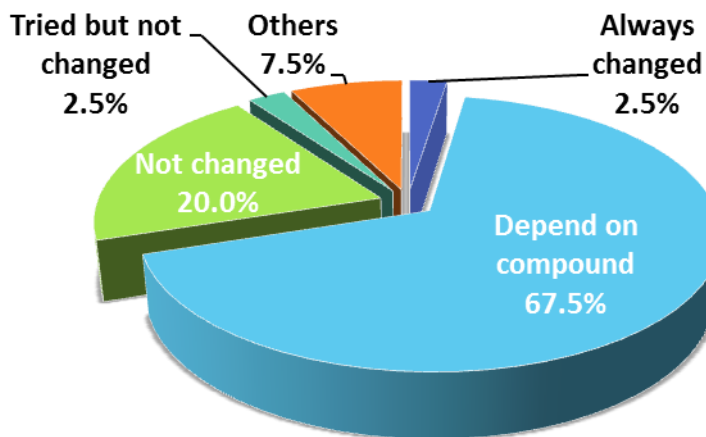
<その他コメント>

- Area 3000 count
- SNより、ISからのコンタミ等その他の要因で決まることも多い
- intensity 300以上
- 見た目とLLOQのQC試料の定量性で判断しています。
- 結果的にだいたいS/N=50位で感度を留めることが多い
- S/N比5以上だと安心できるが、こだわりません
- バックグラウンドとの比較で判断
- API5000(AB SCIEX)であれば高さとして1000程度

測定法（その他）

Q91. 非臨床（動物）と臨床（ヒト）で測定法（分析条件）は変更していますか？

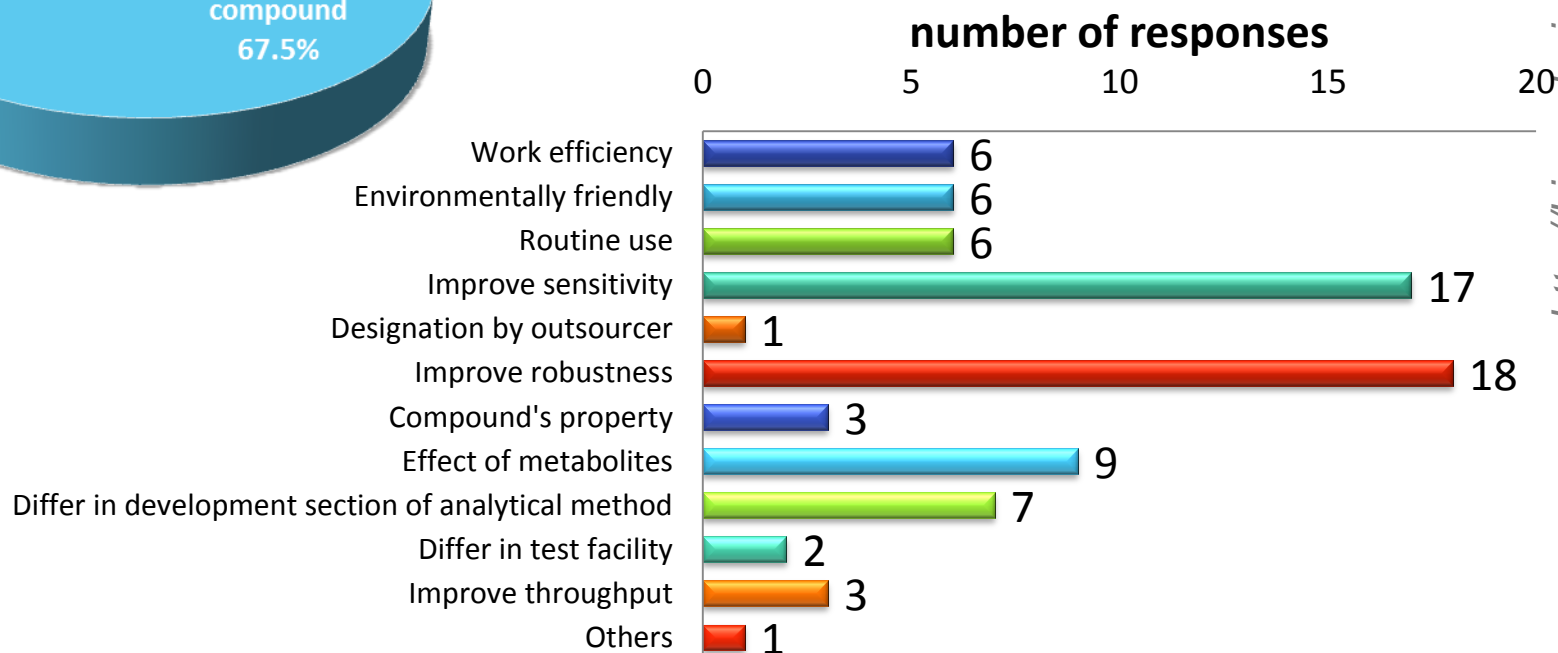
回答数：40件



<その他コメント>

- ・委託者の指定による
- ・マトリックス中の夾雑物質の違い
- ・定量濃度範囲を変更することがある
- ・臨床では非臨床より高感度で測定する場合がある
- ・ヒトサンプルの測定経験なし

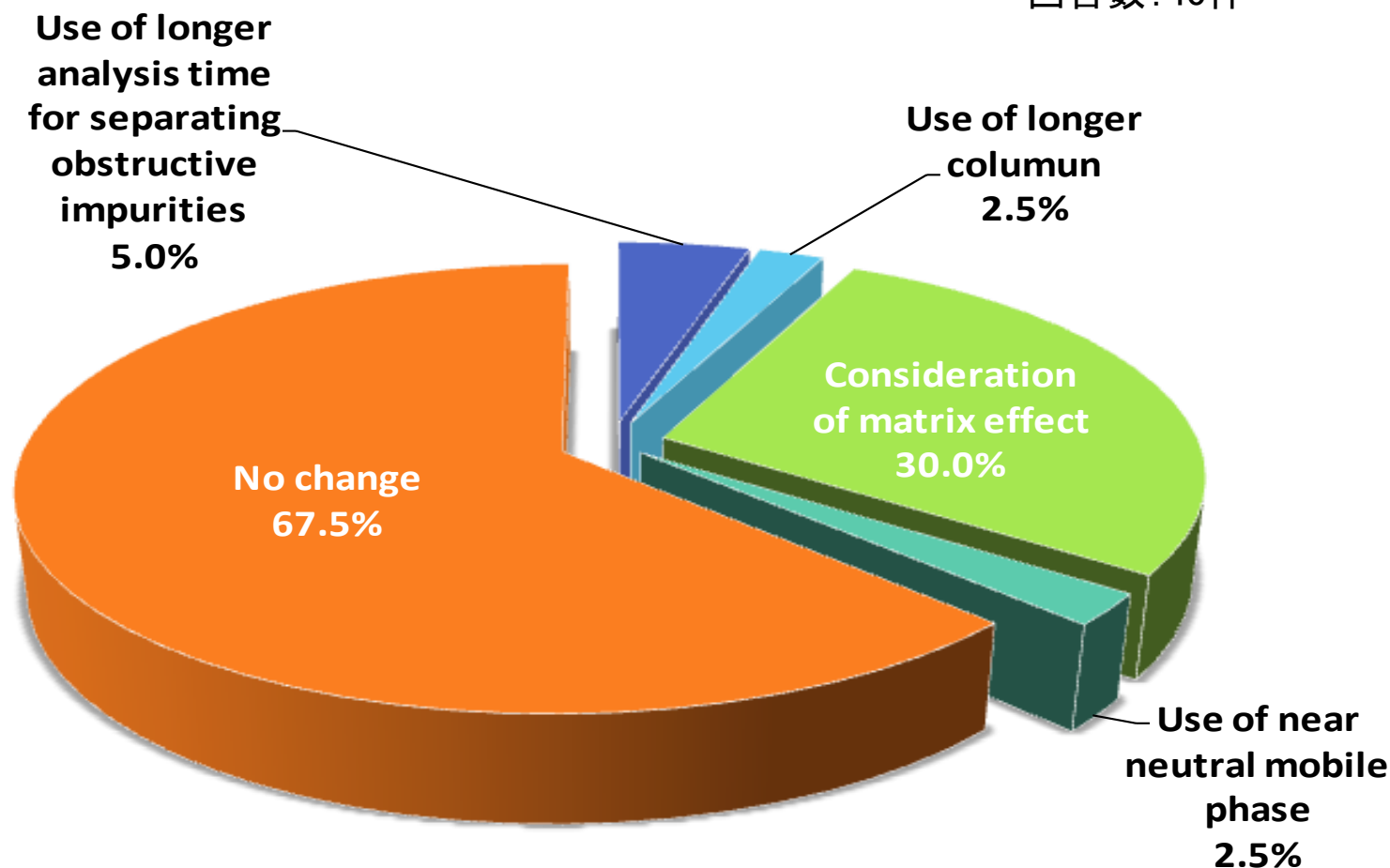
Q92. 変更している場合、その理由は？



測定法（その他）

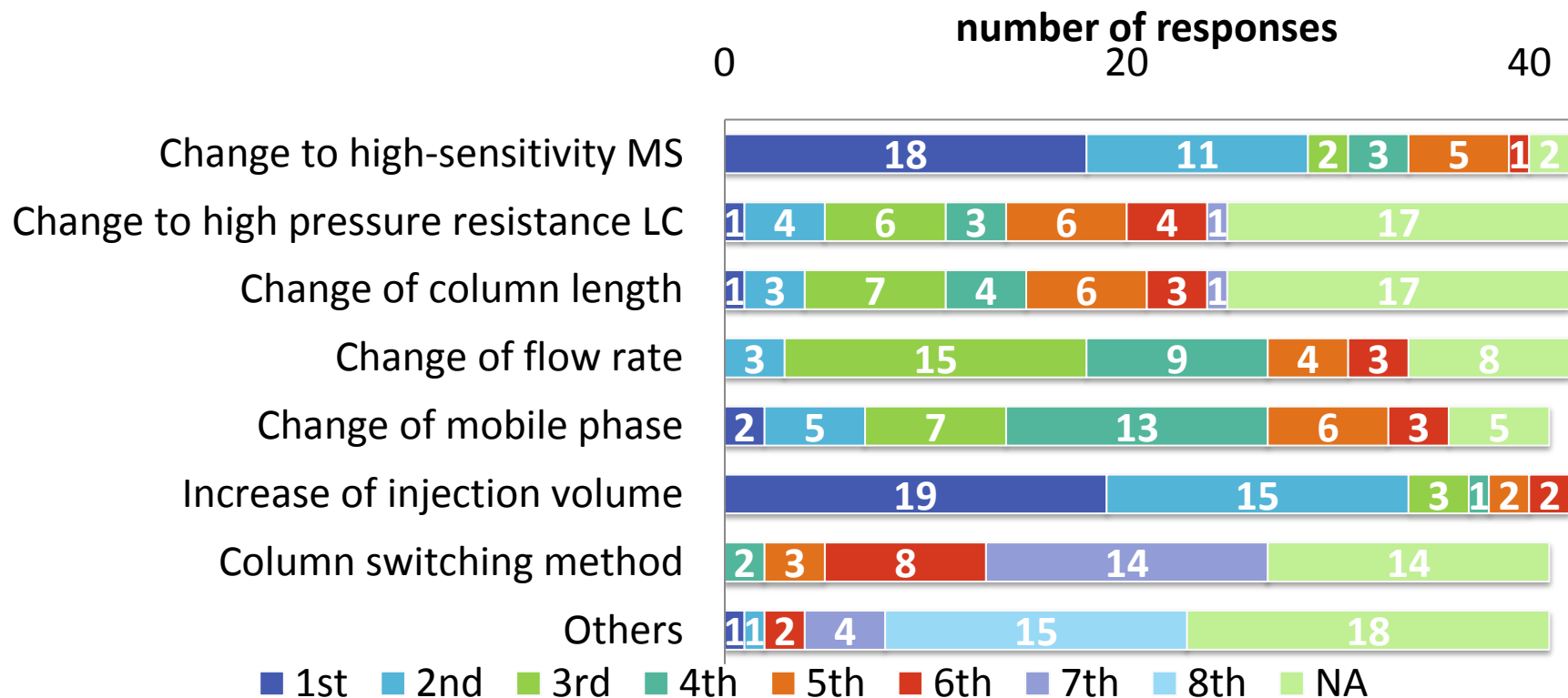
Q93. ISRが導入されて、測定法（分析条件）に関して以前と変更したことはありますか？

回答数：40件



測定法（その他）

Q94. 測定法（分析条件）における高感度化の検討を行う際の第一選択を教えてください（順位づけ） 回答数：41～42件



<トータルスコアによる対処順位>

①注入量変更⇒②高感度機へ変更⇒③流速変更⇒④移動相変更⇒⑤カラム長変更
⇒⑥高圧LCへ変更⇒⑦カラムスイッチング

Q95. 測定法の構築に関する疑問・悩みがありましたら教えてください(1)

- ✓ N-oxideやacyl glucuronideは不安定であり、溶出位置がaglyconeに近く、妨害になりやすい。標品や投与試料がない場合にどうしようもないが、もし分離しやすい条件が経験的に知られているなら採用したい。
- ✓ 前処理の労力が大きいメソッドが多く、1日当たりの処理検体数が向上しないことが、1つの悩みです。
- ✓ 少しくらい悩むのが楽しい。
- ✓ 複数の物質を同時測定するときに、イオン化効率に差異があって定量範囲が合わないこと
- ✓ 検量線が頭打ちになった際の対処手順・核酸、ペプチド等の構築手順
- ✓ 物性の異なるものの同時測定、ペプチドの分析、高極性化合物(HILICが使えなかった場合の測定法構築)
- ✓ 最近新しいカラムがどんどん出ているので、試すだけでも大変。実は、測定に関しては、前処理ほどセオリーが通用しないような気がする

Q95. 測定法の構築に関する疑問・悩みがありましたら教えてください(2)

- ✓ LC-MSの場合、前処理・移動相条件はイオン化との兼ね合いだと思いますが、今回のアンケートではイオン化に関する条件設定がありませんでした。
- ✓ 現在、ガイドラインでは要求されない、いわば「nice to do」のバリデーション項目が提案されては、結局「測定法開発段階で確認しましょう」という落としどころで結論されています。実際にこれらは対応されているのかどうか知りたいです。
- ✓ P-IIにおけるヒト血漿中薬物濃度の定量において代謝物による定量妨害や、back conversionの影響を事前に予測したり(in vitro試験をどれだけ信頼するか、代謝予測ソフトを使うか、動物in vivo試料を使うか)、サンプル入手後に検討したりしたい(ほとんど可能性のないようなキラル変換も確認するか、HPLC保持時間をゆっくりとって妨害の有無を検討するか、など)と思うのですが、他社の様子を知りたいです。
- ✓ 複数化合物同時分析において、(通常は等量を混ぜて評価)、濃度差が大きい倍に生じる現象(相互変換やキャリーオーバー、分離)をどう評価するかがいつも悩みます



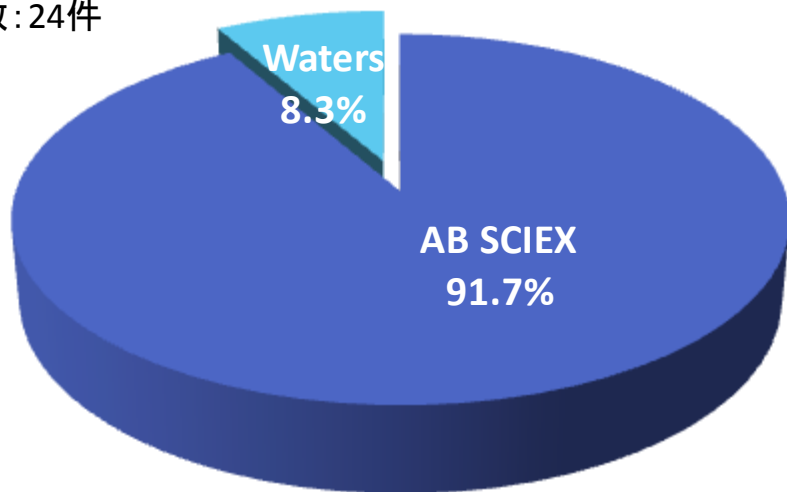
MSの選択

JBF MSの選択

Q96. 第一選択のMSはありますか？

メーカー

回答数: 24件

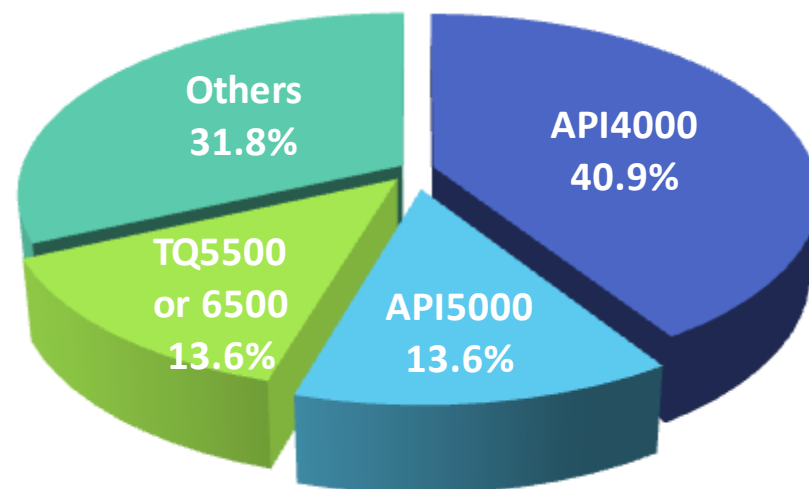


その他

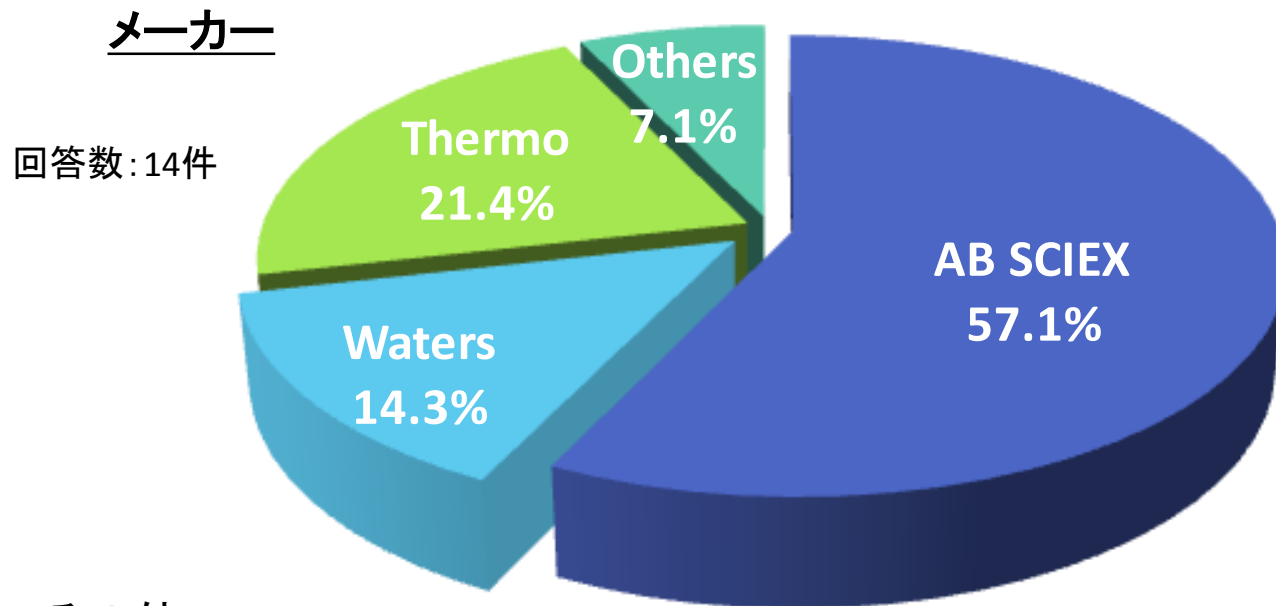
- ・再現性が高い
- ・高感度であるため
- ・頑健性が高く、信頼しているから。
- ・世界中メソッドの移管が楽だから(同型機をみつけやすい)

AB SCIEX機種

回答数: 22件



Q97. 第二選択のMSはありますか？

その他

▪ Thermo

分解能を細かく設定できるので、妨害ピークを回避できることがある
API5000と比べて頭打ちしづらく高濃度領域が取りやすい

▪ Waters

UPLC接続のため分析時間が短い

Q98. 定量に高分解能MS (HRMS)を用いたことはありますか？

- ✓ OrbiTrap velos→代謝物構造推定のため.
- ✓ 代謝物の構造決定に高分解能MSを用いていた. 代謝物量を見積もるためにピーク面積を算出したことはあったが, きちっとした定量に定性用MSを用いたことはない.

Q99. 定量にイオンモビリティまたはイオントラップ機能を用いたことはありますか？

- ✓ MSは目的に応じて使い分けるべき.
- ✓ 医薬品の申請には使わないが、結構高感度で簡単に測定できた.
- ✓ バックグラウンド低減のために使用し, 十分な効果が得られた.
- ✓ MRM3の定量性について他社から情報を得たい.