



## LC/MS/MSを用いた分析法開発の基礎講座

---

2024年2月5日

積水メディカル株式会社 創薬支援センター 受託試験部

奥菌 剛

# 目次

- 1. 分析法の適用範囲**
- 2. LC/MS/MS条件の最適化**
- 3. 前処理法の最適化**
- 4. 分析法バリデーション**

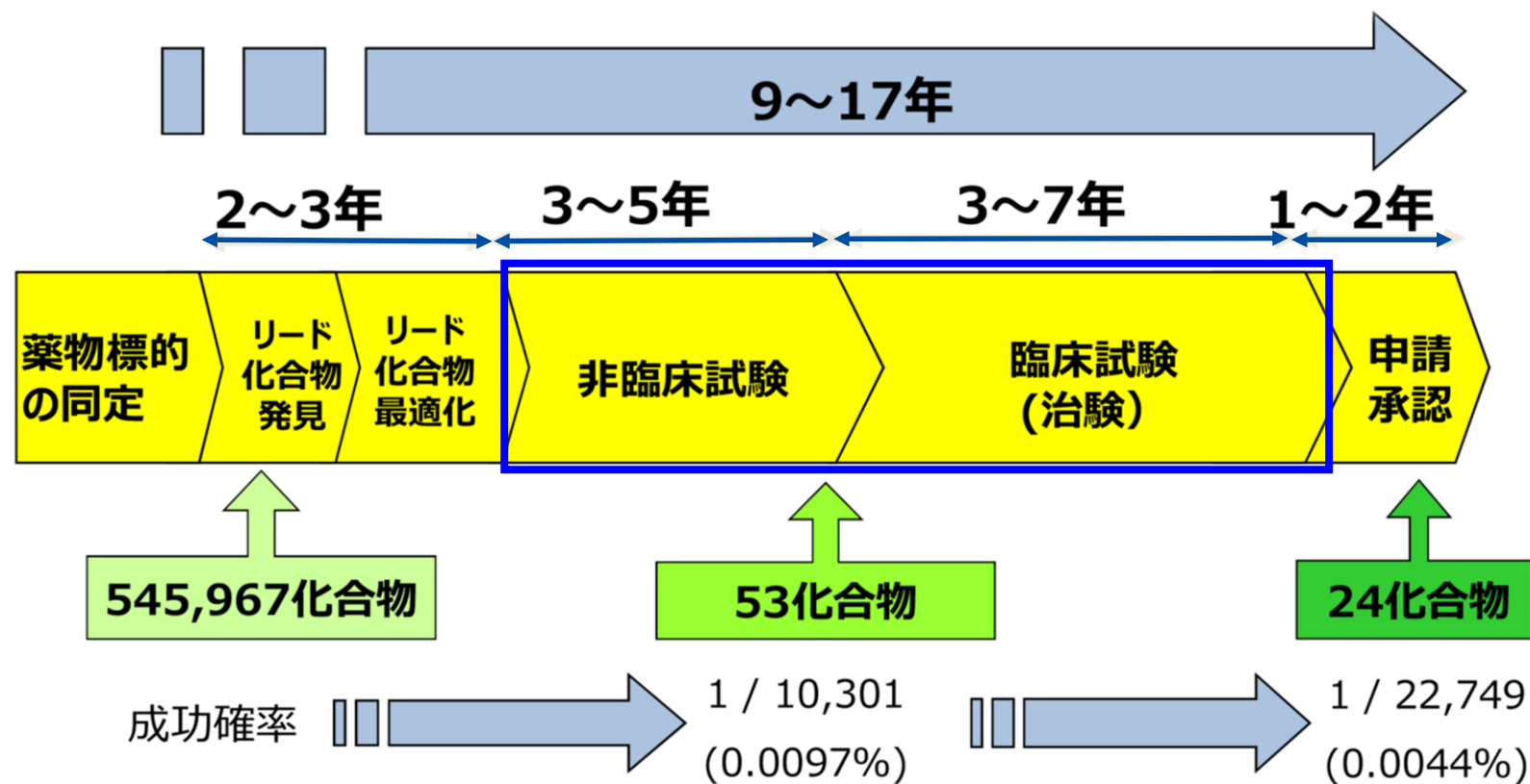
# 1. 分析法の適用範囲（分析法の選択）

モダリティ		分子量 (Da)	分析法	特徴
低分子	低分子医薬品 バイオマーカー	~1000	•HPLC •LC/MS/MS	クロマト法が適
中分子	ペプチド医薬品 核酸医薬品 バイオマーカー	1000~10000	•LC/MS/MS •Hybridization •PCR	感度： PCR> Hybridization> LC/M/MS  選択性、精度： LC/M/MS> Hybridization> PCR
高分子	抗体医薬品 組換え蛋白 バイオマーカー	10000~	•LBA	LBA法が適

LC/MS/MSは、低分子及び中分子を選択的に高精度に測定したい時に用いることが多い。

# 1. 分析法の適用範囲（開発ステージの確認）

医薬品開発に要する期間と成功率



出典：日本製薬工業協会調べ

分析法開発に割ける時間は限られている、分析法が適用される開発ステージを確認。

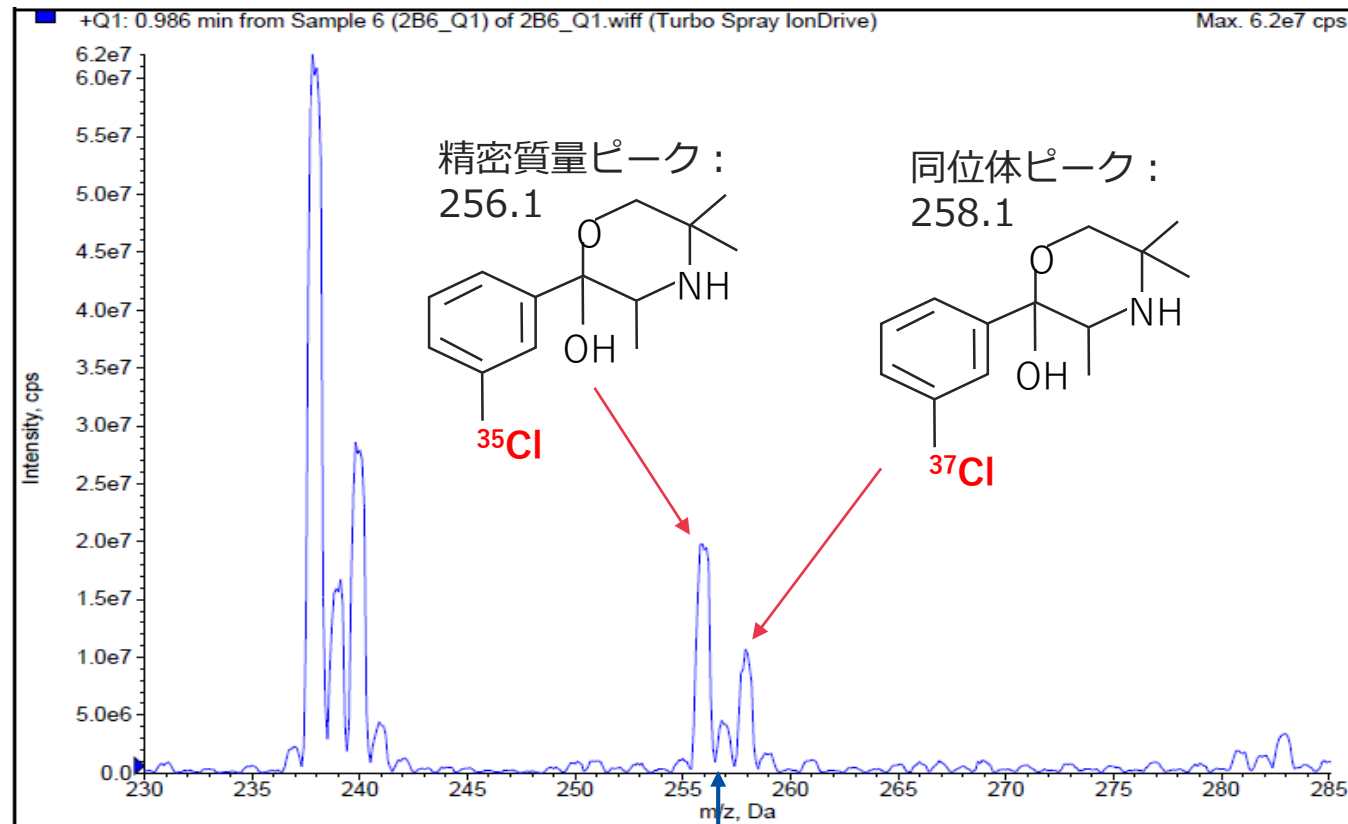
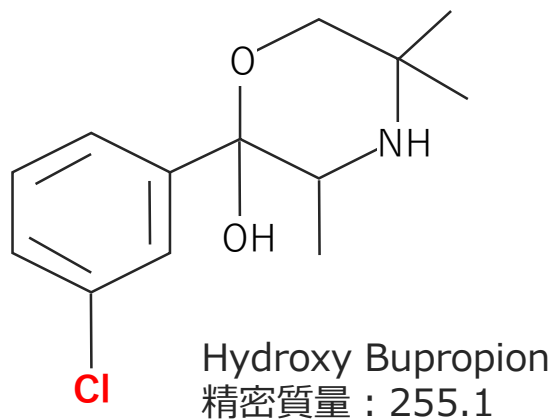
# 1. 分析法の適用範囲（LC/MS/MS測定に必要な情報）

必要情報	解説
精密質量	精密質量もしくは化合物の組成式（平均分子量ではないことに注意）
溶解性	化合物がどの溶媒に溶けるかわかれば、LC条件や前処理法検討がスムーズに
マトリックス	血漿なのか、尿なのか、組織なのか、マトリックスによって分析法開発のアプローチが変わる
定量範囲	やみくもに高感度な測定法を開発しても時間の無駄 最適な定量範囲（試験の目的）を事前に確認しておく

事前情報は多い方が良いが、少なくとも上記4点があれば、LC/MS/MSの分析法開発は開始できる。

## 2. LC/MS/MS条件の最適化 (精密質量)

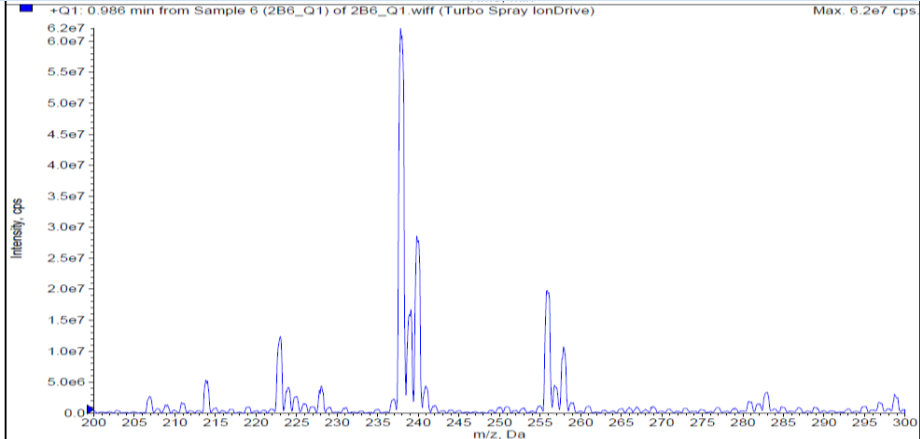
精密質量 = ExactMass = モノアイソトピック質量



ハロゲンを持つ化合物のPositive modeの場合、  
平均分子量255.7を用いて自動でチューニングすると、256.7のスペクトルが検出されてしまう。  
→キャリブレーションするたびに感度が変わるなど、安定した感度が得られない。

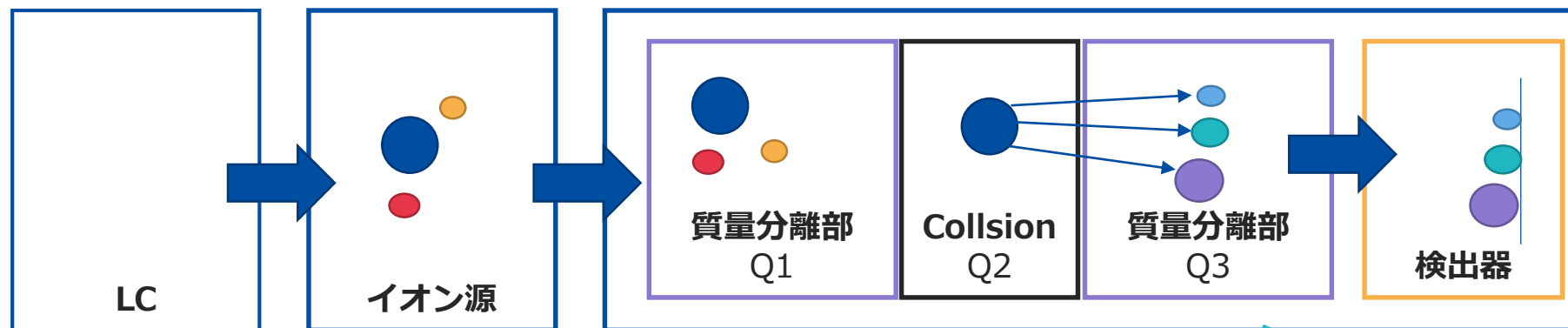
精密質量 + 1 (posi) もしくは - 1 (nega) の m/z を検索。

## 2. LC/MS/MS条件の最適化（キャリブレーション）

量り（天秤や体重計）	質量分析計
天秤のゼロ点調整	基準のマスペクトルを設定し、校正すること
天秤の外部分銅	キャリブレーション用の物質 PPG：ポリプロピレングリコール等
重さの表示	マスペクトル → 
重さの計測 体重を知りたい人の計測	未知化合物の分析
ゼロ点調整されていない体重計で実際より軽く体重が表示されたら、気持ちは嬉しいが、実は痩せていない。	キャリブレーションできていないMSを使用して測定法を確立すると、間違ったm/zを選択し、MSをメンテナンスしたときになぜか感度が落ちるなんてこともある・・・。

マスペクトル確認時に精密質量 +1(posi)もしくは-1(nega)のm/zが得られない場合は、キャリブレーションを行う

## 2. LC/MS/MS条件の最適化（MS条件）



イオン源のパラメーター  
→移動相の影響を受ける  
→LC条件決定後、再度最適化  
→感度向上

各種電圧やガス流量  
を最適化

堅牢な分析法を確立するコツ：

- ・ヒーター温度やキャピラリー電圧は最大値にはせず、一つ低めに設定し、消耗品を長持ちさせる。
- ・質量分離部を汚れにくくするために、カーテンガス流量を少し多めに設定。



## 2. LC/MS/MS条件の最適化 (LC条件)

カラム	官能基	移動相	特徴
逆相	C18、C8	保持：緩衝液(ギ酸アンモニウム等)、 酸性水溶液(0.1%ギ酸等) 溶出：有機溶媒(アセトニトリルやメタノール等)	第一選択のカラム 最もよく利用されるカラム
順相	シリカ	保持：ヘキサン 溶出：酢酸エチル、エタノール	疎水性の移動相はプロトン移動が起こりにくいので、 LC/MSに不向き
HILIC	シルカ アミド ジオール	使用する移動相は逆相と同様、 保持と溶出が逆相と逆	Hydrophilic Interaction Chromatography 親水性相互作用クロマトグラフィー 高極性化合物を分離
イオン交換	スルホン酸 カルボン酸 第4級アンモニウム 第3級アミン	逆相と同様	pHの変化と有機溶媒の比率で分離

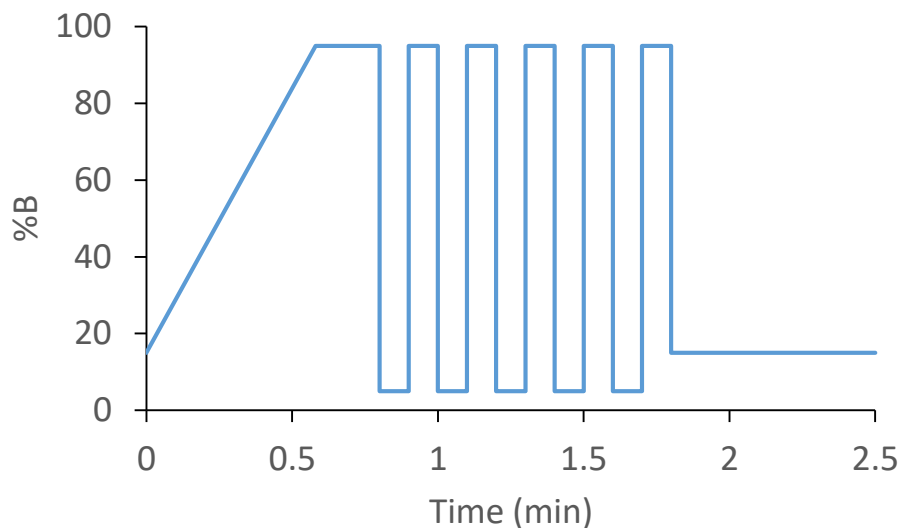
化合物の特性を見極め、カラムと移動相を選択。

## 2. LC/MS/MS条件の最適化 (LC条件)

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	曲線
0.00	0.75	85	15	-
0.58	0.75	5	95	6
0.80	0.75	5	95	6
0.90	0.75	95	5	1
1.00	0.75	5	95	1
1.10	0.75	95	5	1
1.20	0.75	5	95	1
1.30	0.75	95	5	1
1.40	0.75	5	95	1
1.50	0.75	95	5	1
1.60	0.75	5	95	1
1.70	0.75	95	5	1
1.80	0.75	5	95	1
2.50	0.75	85	15	1

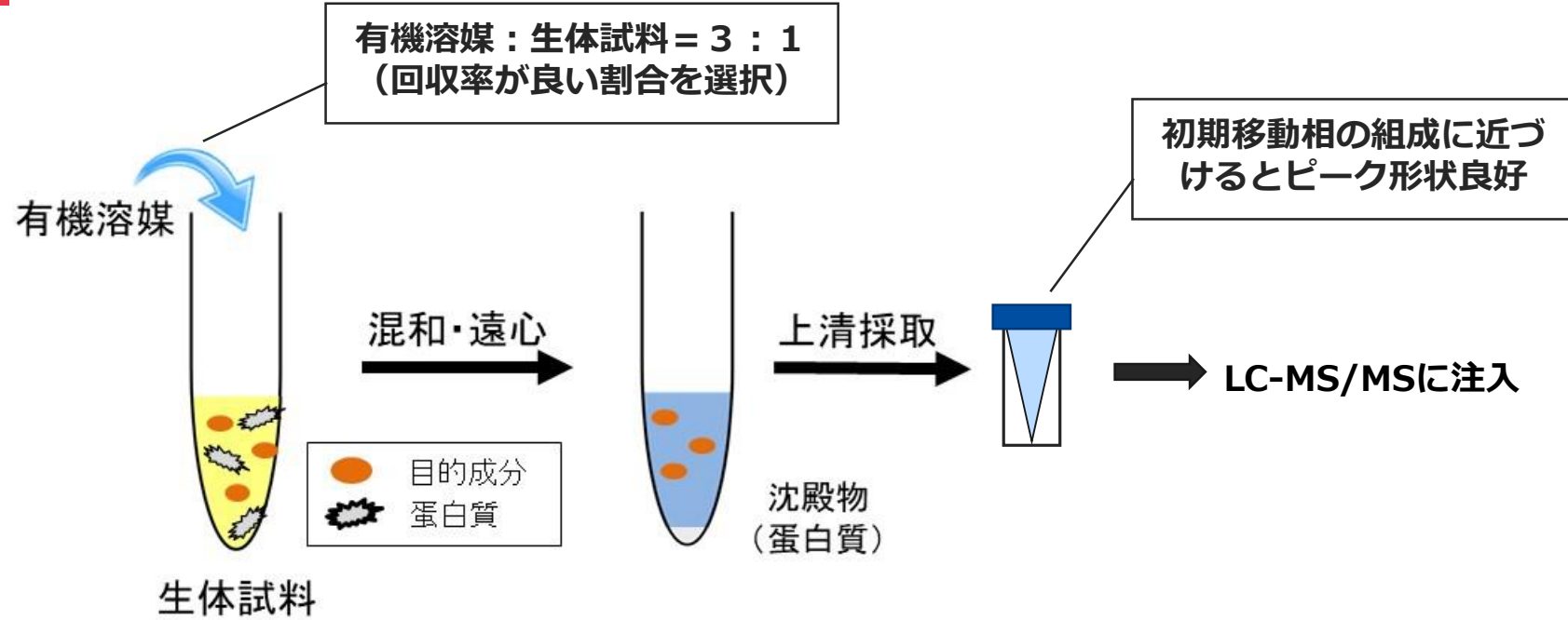
キャリーオーバーの原因箇所と対策：

- ① シリンジ→洗浄溶媒、洗浄方法の変更
- ② スイッチングバルブ→バルブの切り替え、洗浄液を測定
- ③ カラム→カラム洗浄の時間を延ばす (有機溶媒リッチ)



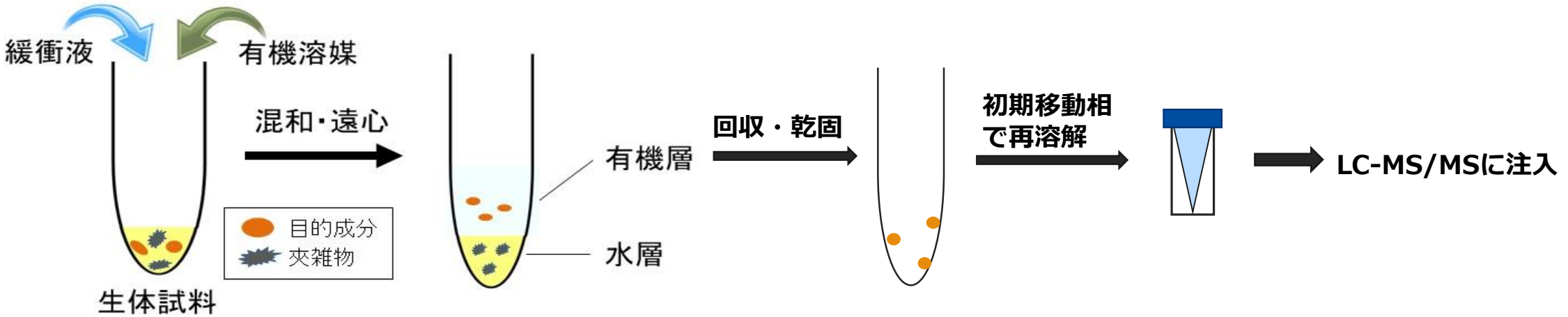
カラムに吸着するキャリーオーバーは上記のようなグラジエントにするとキャリーオーバーが解消する場合がある。

### 3. 前処理法の最適化（除蛋白法）



もっとも簡便な前処理法で、結果も考察しやすいデータが得られるケースがほとんど  
→一般的にファーストチョイスの前処理法

### 3. 前処理法の最適化（液-液抽出法）



分配係数は、化学物質の疎水性の指標。  
化合物の分配係数が高いほど、疎水性で有機層に移動。  
 $\text{Log Kow} = n - \frac{\text{オクタノール濃度}}{\text{水濃度}}$

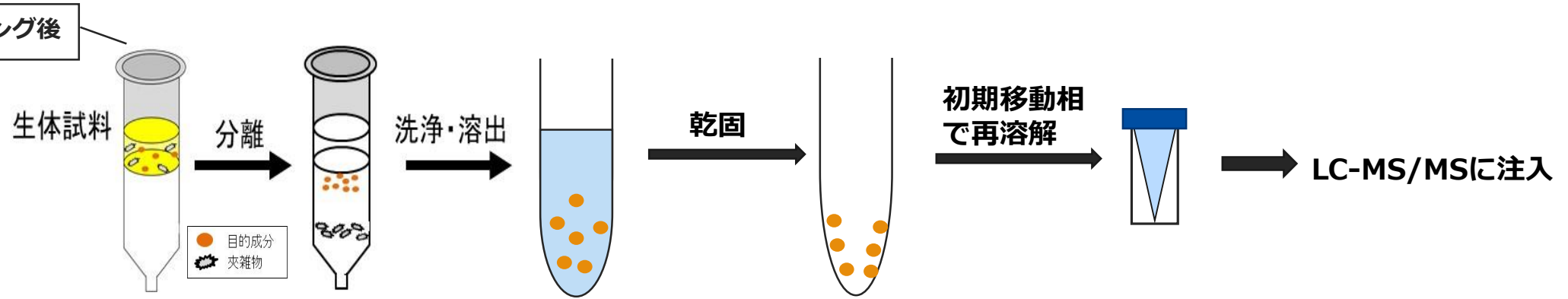
極性 ↑

- ・ 酢酸エチル(分配係数0.73)
- ・ tert-ブチルメチルエーテル(分配係数0.94)
- ・ クロロホルム(分配係数1.97)
- ・ ヘキサン(分配係数3.9)

疎水性 ↓

除蛋白法より精製したいし、感度をあげるために濃縮したい場合に液液抽出を用いる。  
有機溶媒を大量に使用するため、環境と安全面は良くない。

### 3. 前処理法の最適化（固相抽出法）



固相種類	充填剤	洗浄液	溶出液
疎水性相互作用 (逆相)	C18、C8、ベンゼン環	水	アセトニトリル メタノール
極性相互作用 (順相)	未修飾シリカゲル、 アミノプロピル	ヘキサン	イソプロパノール 酢酸エチル
イオン交換	スルホン酸（強カチオン）、 4級アミン（アニオン）	水、イオン交換の結合を妨げない有機溶媒	2%ギ酸メタノール、 1%アンモニアメタノール

選択性の高い（夾雑物と分離できる）抽出法、濃縮もできる。  
固相カラムのコストがかかる。  
ステップが多いので、経験値の浅い実験者だと抽出ミスするリスクがある。

## 4. 分析法バリデーション（予備検討で最低限確認すべき項目）

検討項目	試料	判定基準	検討項目以外で予測できること
検量線	6濃度 各濃度n=1	真度が±15%以内 相関係数が0.99以上	前処理後試料と 初期移動相で標準溶液を希釈した試料 のイオン強度を比較することでマトリックス効果や回収率を簡易的に確認可。
日内再現性	3濃度 各濃度n=3	真度が±15%以内 精度が15%以内	生体試料に対する標準溶液（有機溶媒）の割合を5%以下になるように日内再現性試料を調製することで、実試料に近い試料を調製できる。 Analyteが容器に吸着するか否かや、希釈再現性が実施できるかを予測可。
キャリーオーバー	LLOQ→ULOQ →ブランク試料 各n=1	ブランク試料／LLOQ試料 Analyte：20%以下 I.S.：5%以下	検量線範囲を狭くするなどの対応が可。
安定性	2濃度 各濃度n=2	室温でover night 真度が±15%以内	室温で安定ならほとんどのケースで安定。

急がば回れなので、事前にバリデーション項目を満たすかを確認しておきましょう。

## 4. 分析法バリデーション（ガイドライン）

発行元	発行年	発行ガイドライン
FDA	2001	Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine
厚生労働省	2013	医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン
ICH 医薬品規制調和国際会議	2022	BIOANALYTICAL METHOD VALIDATION AND STUDY SAMPLE ANALYSIS M10

- ・ 出版時期は未定だが、JBFでICH M10ガイドラインの解説書を出版予定。
- ・ JBFシンポジウムにはバイオアナリシスの専門家が多数参加しており、ガイドラインを学ぶのに良い機会。
- ・ 2023年10月2・3日で行われたICH M10 WSの纏めがポスター会場に掲載。

ご清聴ありがとうございました

# Confidence Inspired by Quality

---

確かな品質を通じて信頼を構築する