

ADRA キット

<分析条件・データ解析方法>

反応完了後はこちらの条件を参考に分析、データ解析を実施して下さい。

1. HPLC 分析

HPLC にカラムを装着し、移動相 A と移動相 B でカラム温度を 40°C にして平衡化します。分析は、0.3 mL/min. の流速で NAC および NAL で異なるグラジエント条件で行って下さい。グラジエント条件については以下の「HPLC 条件」を参考にして下さい。

※6.5 分間の再平衡化時間は、島津 promin.ence を使って決定しています。別の装置では、装置の混合容積によって再平衡化時間が変わることがあります。ピークの溶出時間が安定すれば、より短い平衡化時間で問題ありません。

1-1. HPLC 条件

カラム	富士フイルム和光純薬(株) Wakopak® Core C18 ADRA φ3.0×150 mm (製品コード: 233-63991)		
移動相	A: 0.1 v/v% TFA 水溶液 B: 0.1 v/v% TFA アセトニトリル溶液		
カラム温度	40°C		
サンプル温度	25°C サンプル冷却機能のあるオートサンプラーがある場合、4°C にすることでサンプルを測定時までより安定な状態で保存できます。		
検出器	フォトダイオードアレイ検出器または吸光度検出器 (281 nm)		
注入量	10~20 μL (HPLC 装置によって変わります。ピークがブロードならば、注入量を減らして下さい。)		
溶出条件	NAC 溶出条件		
	時間	流速	%A %B
	0 分	0.3 mL/min.	70 30
	9.5 分	0.3 mL/min.	45 55
	10 分	0.3 mL/min.	0 100
	13 分	0.3 mL/min.	0 100
	13.5 分	0.3 mL/min.	70 30
	20 分	終了	
	NAL 溶出条件		
	時間	流速	%A %B
	0 分	0.3 mL/min.	75 25
	9.5 分	0.3 mL/min.	55 45
	10 分	0.3 mL/min.	0 100
	13 分	0.3 mL/min.	0 100
	13.5 分	0.3 mL/min.	75 25
	20 分	終了	

- 各標準液、サンプルおよびコントロールとも等量を注入してください。注入量は、10-20 μL の範囲で変えても構いません (10 μL 未満ではピークが小さく、定量性に欠けるため推奨しません。また、装置によっては 20 μL を注入するとピークがブロードになる可能性があります。
- 吸光度は 281 nm でモニターして下さい。フォトダイオードアレイ検出器を使用する場合または 2 波長検出できる場合は、291 nm の吸光度も検出して、NAC および NAL のピーク純度を確認して下さい。
- グラジエント後は他の物質を除くために、移動相 B (アセトニトリル) を 100% まで増やします。少なくとも 6.5 分間、カラムをグラジエント前の移動相の組成で再度平衡化します。
- 使用する装置によって再平衡化時間は変わります。再平衡化時間はピークの溶出時間が安定すれば短い時間に変更することが可能です。
- カラムから検出器までの配管の内径や長さによりピークがブロードになる場合があります。配管の内径を 0.18 mm 以下、カラムから検出器までの距離を 50 cm 以下にして下さい。

1-2. HPLC サンプル分析シーケンス

HPLC 分析における各サンプルの分析は以下の条件を満たす順番となるよう設定して下さい。

具体的な順番については下記の「分析シーケンスの例」または最終ページの「参考:HPLC 分析例」を参考にして下さい。

•分析の順番

- ① 検量線用標準液と参照コントロール A から測定 (n=3) します。
- ② 共溶出コントロールは標準液と参照コントロール A の測定後であれば、どの順番で測定しても構いません。
- ③ 参照コントロール B は、参照コントロール C、陽性対照物質および被験物質と反応させたサンプルの測定の前後に n=3 ずつ、計 n=6 測定します。
- ④ 参照コントロール C、陽性対照物質および被験物質と反応させたサンプルは、n=1 ずつセットにして測定します。(各サンプルの n=1 をすべて測定してから n=2 の測定を行います。)

分析シーケンスの例

Std 7 (希釈用緩衝液) [†] Std 6 Std 5 Std 4 Std 3 Std 2 Std 1 (検量線用標準液)	3-1 ① 参照
参照コントロール A, n=1 参照コントロール A, n=2 参照コントロール A, n=3	3-1. ① 参照
共溶出コントロール 1 共溶出コントロール 2 共溶出コントロール 3 ... 共溶出コントロール n	3-4. 参照
参照コントロール B, n=1 参照コントロール B, n=2 参照コントロール B, n=3	3-2. 参照
参照コントロール C, n=1 [§] Phenylacetaldehyde/ Squaric Acid Diethyl Ester (陽性対照), n=1 サンプル 1, n=1	繰り返し測定の 1 回目 3-1. ②, 3-1. ③, 3-2. 参照

サンプル 2, n=1 サンプル 3, n=1 ... サンプル n, n=1	
参照コントロール C, n=2 [§] Phenylacetaldehyde/Squaric Acid Diethyl Ester (陽性対照), n=2 サンプル 1, n=2 サンプル 2, n=2 サンプル 3, n=2 ... サンプル n, n=2	繰返し測定 of 2 回目 3-1 ②, 3-1 ③, 3-2. 参照
参照コントロール C, n=3 [§] Phenylacetaldehyde/Squaric Acid Diethyl Ester (陽性対照), n=3 サンプル 1, n=3 サンプル 2, n=3 サンプル 3, n=3 ... サンプル n, n=3	繰返し測定 of 3 回目 3-1. ②, 3-1. ③, 3-2. 参照
参照コントロール B, n=4 参照コントロール B, n=5 参照コントロール B, n=6	4-2. 参照

† 反応停止液の添加、および標準液希釈系列の調製後、すみやかに検量線用標準液から分析を始める。

§ 3回繰り返す参照コントロールCは、サンプルと一緒に測定して下さい。これらは各々のサンプルにおけるNACおよびNALの減少率を計算するのに使用します。

2. データ解析と計算

NAC および NAL の濃度は、標準液 (Std 1 から Std 7 まで) の検量線に基づいて、各々のサンプルの 281 nm の吸光度のピーク面積から算出します。また、NAC および NAL の減少率は、各サンプルのピーク面積を参照コントロールのピーク面積で割った値から求めます。

2-1. 標準液、サンプルおよびコントロールにおける NAC および NAL のピーク面積を求めます。

2-2. NAC および NAL の濃度の算出

2-2-1. 標準液の濃度とピーク面積とで検量線を作成します。この検量線は、 $r^2 > 0.990$ を満たす必要があります。

2-2-2. 参照コントロールにおける NAC および NAL の濃度の平均値、SD (標準偏差) および CV (変動係数) を計算します。各濃度の平均は、3.2~4.4 μM でなければなりません。

2-2-3. 使用した各溶媒での参照コントロール C (n=3) における NAC および NAL の濃度の平均値、SD および CV を計算します。各濃度の平均値は、3.2~4.4 μM でなければなりません。ただし、溶媒が 5%DMSO/アセトニトリルの場合は、DMSO による SH 基の酸化により、NAC の濃度が減少することが知られているので、NAC の濃度の平均値は、2.8~4.0 μM とします。

2-3. NAC および NAL のピーク面積

2-3-1. 参照コントロール B (n=6) とアセトニトリルで調製した参照コントロール C (n=3) を合わせた 9 回について、NAC および NAL の平均ピーク面積、SD および CV を計算する。上記の CV は、10%未満でなければなりません。

2-3-2. 参照コントロール C (n=3) について、NAC および NAL のピーク面積の平均値を計算します。

2-4. 減少率の算出

2-4-1. 陽性対照と各被験物質に関して、測定ごとの NAC および NAL のピーク面積、および各溶媒の参照コントロール C における NAC および NAL のピーク面積の平均値から、次式に従って NAC および NAL の減少率を計算する。

$$\text{NAC (\% depletion)} = [1 - (\text{NAC のピーク面積} / \text{参照コントロール C の NAC ピーク面積の平均値})] \times 100$$

$$\text{NAL (\% depletion)} = [1 - (\text{NAL のピーク面積} / \text{参照コントロール C の NAL ピーク面積の平均値})] \times 100$$

2-4-2. NAC 減少率と NAL 減少率の平均値 (平均スコア: Average Score) を計算する。値は、小数第 2 位を四捨五入する。

3. 判定基準

3-1. 試験成立の判定基準

全測定に関して、以下のすべての基準を満足する必要があります。

以下の基準を満足しない場合は、すべての被験物質に対して再試験を実施して下さい。

① 装置の適合性:

検量線の直線性 $r^2 > 0.990$

参照コントロール A における NAC および NAL の濃度の平均値 = 3.2~4.4 μM

② 陽性対照:

Phenylacetaldehyde または Squaric Acid Diethyl Ester における NAC および NAL の減少率は、次表に記載した範囲内に入らなければなりません。

	NAC 減少率 (%)		NAL 減少率 (%)	
	下限値	上限値	下限値	上限値
Phenylacetaldehyde または Squaric Acid Diethyl Ester	30	80	70	100

陽性対照における標準偏差:

NAC および NAL の n=3 における減少率の SD は、10%未満でなければなりません。

③ 分析時間中における参照コントロールの安定性:

参照コントロール C における NAC および NAL の濃度の平均値=3.2~4.4 μM

ただし、溶媒が 5%DMSO/アセトニトリルの場合は、DMSO による SH 基の酸化により、NAC の濃度が減少することが知られているので、NAC の濃度の平均値は、2.8~4.0 μM とします。

3-2. 被験物質の測定結果の成立の判定基準

被験物質に関して、以下のすべての基準を満足する必要があります。

以下における①の基準を満足しない場合は基準を満たさなかったサンプルにおいて、②の基準を満足しない場合はすべての被験物質に対して、③の基準を満足しない場合は基準を満たさなかった参照コントロール C と同じ溶媒を使用したサンプルにおいて再試験を実施して下さい。

① サンプルの繰返しの最大標準偏差

NAC および NAL の n=3 における減少率の SD は、10%未満でなければなりません。

② 分析シーケンス内での参照コントロール B およびアセトニトリルの参照コントロール C

参照コントロール B (n=6) とアセトニトリルの参照コントロール C (n=3) の合計 9 回における NAC および NAL のピーク面積の CV は、10%未満でなければなりません。

③ 分析シーケンス内での参照コントロール C

各溶媒における参照コントロール C (n=3) における NAC および NAL のピーク面積の CV は、10%未満でなければなりません。

3-3. 試験データの判定基準

NAC および NAL の減少率から平均スコアを算出し、下表に従い「感作性物質」、「非感作性物質」を判定します。

平均スコア (NAC と NAL の減少率の平均)	判定
< 4.9%	非感作性物質
4.9% ≤	感作性物質

平均スコアまたは NAC の減少率が以下の範囲に入った場合には、判定結果が正しくないことがあるため、確認試験を実施して判定結果の正否を確認します。1 回目と 2 回目の判定結果が異なった場合は、さらに確認試験を実施し、3 回の判定結果の多数決により判定します。

NAC/NAL 予測モデル: 3.0% ≤ 平均スコア ≤ 10.0%

NAC 単独予測モデル: 4.0% ≤ NAC の減少率 ≤ 11.0%

3-4. 共溶出の取扱い

3-4-1. 共溶出 妨害 (interference)

- (1) 被験物質によっては、NAC および NAL と共溶出する場合があります。被験物質と NAC または NAL が共溶出する可能性があるかを確認するため、共溶出コントロールを分析し、このクロマトと参照コントロール C のクロマトを比較します。
- (2) 共溶出コントロールにおいて被験物質が 281 nm に吸収があり、かつ NAC または NAL と溶出時間が近い場合には、サンプルのクロマトから、被験物質と NAC または NAL のピークが実際に分離されているか否かを確認します。被験物質のピークが NAC または NAL のピークに完全に重なっている場合や、2 つのピークの境 (ピークとピークの谷間) がベースラインより高い位置になっている場合は共溶出とします。さらに、共溶出している被験物質のピーク面積が参照コントロール C の NAC および NAL のピーク面積の 10% 以上である場合、共溶出による“妨害 (interference)”とします。共溶出が生じて、NAC および NAL の減少率が算出できない場合も、共溶出による“妨害 (interference)”とします。なお、共溶出しない場合でも、参照コントロール C の濃度が低いケースでは、見掛け上 NAC および NAL の減少率が-10%未満となることがあります。また、試験操作が適切でなかったため、異常値として-10%未満となることもあります。これらの場合には、必要に応じて再試験するなどの対応をとって下さい。

3-4-2. ピーク純度指標: 281 nm/ 291 nm 面積比

フォトダイオードアレイ検出器を使用すると、被験物質と NAC または NAL との共溶出は 281 nm/291 nm の面積比率を計算することで調べられる場合があります。この面積比率は、共溶出がない場合すべてのサンプルおよび標準液の NAC および NAL のピークで同じとなるので、ピークの純度測定に利用できます。各サンプルに関して、比率が次の範囲に入れば、共溶出が生じている可能性は低いと考えられます。しかし、特に被験物質が NAC および NAL と高い反応性を示す場合には、ピークが非常に小さくなるため、被験物質のピーク純度 (281 nm/ 291 nm の面積比) の計算が正しいとは限りません。

90% < 参照コントロールの面積比率 < 110%

3-4-3. 共溶出 減少率< -10%

- (1) NACまたはNALの減少率が-10%未満の場合には、共溶出しているか、反応混合液中へNACまたはNALを正確に添加しなかったか、またはベースラインの「ノイズ」の影響を受けたか、等の原因が考えられます。この場合でも、NAC および NAL のピークが適切な溶出時間に現れて、適切なピーク形状を示す場合、ピークを積分して構いません。この原因として、NAC/NAL のピークを大きくするベースラインのノイズ、または NAC および NAL と被験物質の共溶出が考えられます。
- (2) 求めた減少率は、「推定 (estimate)」として報告します。
共溶出が NAL だけである場合、「NAC 単独モデル」を使用して下さい。
共溶出が、NAC または NAC と NAL の両方である場合、データは「不確定 (inconclusive)」と記録します。
- (3) 被験物質が NAC と共溶出し、ピークが積分できない場合には、感作性を NAL 単独の減少率からは予測できないので、このデータは「不確定 (inconclusive)」と記録して下さい。

3-4-4. 共溶出におけるピーク面積の算出

- (1) NAC および NAL のピークと被験物質のピークが一部で重なっている場合、ピークの境からベースラインの高さまで垂直に切り出します。
- (2) ピークに完全に重なっている場合は、不確定 (inconclusive)とし、ピーク面積の算出は行いません。

3-4-5. 推定減少率

被験物質は NAC および NAL と反応するが、共溶出している場合も考えられます。この場合、NAC および NAL のピーク面積は本来の面積よりも大きくなるため、反応率が「過小評価」されます。被験物質と NAC および NAL の溶出時間が完全に一致しない場合、減少率は「共溶出-推定減少率」と付記して算出しても構いません。平均スコアが基準値未満の場合、結果は「不確定」と報告します。しかし、NAC が共溶出しない場合には、NAC 単独予測モデルを使用して下さい。

平均スコア	共溶出なし	NAC または NAC と NAL で共溶出	NAL のみで共溶出
< 4.9%	非感作性物質	不確定	NAC 単独予測 モデルを使用
4.9% ≤	感作性物質	感作性物質	NAC 単独予測 モデルを使用

NAC 単独予測モデル

NAC 減少率	判定
< 5.6%	非感作性物質
5.6% ≤	感作性物質

参考:HPLC 分析例

5 種類の被験物質があり、被験物質 1, 2, 3 はアセトニトリルに、被験物質 4, 5 は水に溶解する場合。

Std 7(希釈用緩衝液)

Std 6

Std 5

Std 4

Std 3

Std 2

Std 1

参照コントロール A, 1 回目 (アセトニトリルで調製)
参照コントロール A, 2 回目 (アセトニトリルで調製)
参照コントロール A, 3 回目 (アセトニトリルで調製)

被験物質 1 用共溶出コントロール
被験物質 2 用共溶出コントロール
被験物質 3 用共溶出コントロール
被験物質 4 用共溶出コントロール
被験物質 5 用共溶出コントロール

参照コントロール B, 1 回目 (アセトニトリルで調製)
参照コントロール B, 2 回目 (アセトニトリルで調製)
参照コントロール B, 3 回目 (アセトニトリルで調製)

参照コントロール C, 1 回目 (アセトニトリルで調製)
参照コントロール C, 1 回目 (蒸留水調製)
Phenylacetaldehyde/Squaric Acid Diethyl Ester, 1 回目
サンプル 1, 1 回目
サンプル 2, 1 回目
サンプル 3, 1 回目
サンプル 4, 1 回目
サンプル 5, 1 回目

参照コントロール C, 2 回目 (アセトニトリルで調製)
参照コントロール C, 2 回目 (蒸留水で調製)
Phenylacetaldehyde/Squaric Acid Diethyl Ester, 2 回目
サンプル 1, 2 回目
サンプル 2, 2 回目
サンプル 3, 2 回目
サンプル 4, 2 回目
サンプル 5, 2 回目

参照コントロール C, 3 回目 (アセトニトリルで調製)
参照コントロール C, 3 回目 (蒸留水で調製)
Phenylacetaldehyde/Squaric Acid Diethyl Ester, 3 回目
サンプル 1, 3 回目
サンプル 2, 3 回目
サンプル 3, 3 回目
サンプル 4, 3 回目
サンプル 5, 3 回目

参照コントロール B, 4 回目 (アセトニトリルで調製)
参照コントロール B, 5 回目 (アセトニトリルで調製)
参照コントロール B, 6 回目 (アセトニトリルで調製)

被験物質 1, 2 および 3 の減少率は、アセトニトリルで調製した参照コントロールにおける NAC および NAL のピーク面積の平均値に基づいて計算して下さい。

被験物質 4 および 5 の減少率は、純水で調製した参照コントロール C における NAC および NAL のピーク面積の平均値に基づいて計算して下さい。