

生一報**第*****号

2004年9月**日

試 験 報 告 書 (D R A F T)

小児患者における血漿中フェンタニル濃度測定条件の検討 (LC/MS/MS 法)

受 付 番 号 : 16-510003

試験計画書番号 : PKN-0402

株式会社 科学技術研究所 生物第一部

試験名 : 小児患者における血漿中フェンタニル濃度測定条件の検討 (LC/MS/MS 法)

試験委託者 : 国立成育医療センター 治験管理室長 中村秀文
所在地 : 東京都世田谷区大蔵2丁目10番地1号

試験施設 : 株式会社 科学技術研究所
所在地 : 東京都品川区北品川3丁目10番地2号

試験計画書番号 : PKN-0402

試験開始日 : 2004年2月20日

試験終了日 : 2004年9月**日

試験責任者 : 森本 奈々子 (所属) 生物第一部

試験担当者 : 森本 奈々子 (業務) 前処理, 測定, 統計処理

試験責任者署名 :

年 月 日

要 旨

国立成育医療センター 治験管理室の依頼に基づき、小児患者における血漿中フェンタニル濃度測定条件の検討 (LC/MS/MS 法) を実施した。

本測定方法はスピペロンを内標準物質とした LC/MS/MS 法で行った。測定条件の検討において測定範囲の上限は 100ng/mL、測定限界は 0.1ng/mL であり、この範囲内の濃度を正確に測定できる方法であることが確認された。

また、小児患者 6 名より得られた血漿において、クロマトグラム上にフェンタニルの測定に影響を及ぼす妨害ピークは検出されなかった。

1.目的

国立成育医療センター 治験管理室の依頼により、LC/MS/MS を用いた小児患者血漿中フェンタニル濃度測定条件の検討した。また、得られた結果より小児患者血漿と成人血漿の使用の妥当性を確認した。

2.試験材料

2-1 標準物質

クエン酸フェンタニル(Lot 23001, 含量 99.9%, 三共(株)平塚工場より譲渡)

㈱科学技術研究所 麻薬保管庫にて室温で保存した。なお、標準物質の化学構造式を Fig.1 に示した。

フェンタニルは次式により秤量値の補正を行った。

$$\text{フェンタニル (mg)} = \frac{\text{フェンタニルの分子量 (336.46)}}{\text{クエン酸フェンタニルの分子量 (528.59)}} \times \text{秤取量 (mg)}$$

2-2 内標準物質

スピペロン (Lot 033K4085, SIGMA)

室温に保存した。なお、内標準物質の化学構造式を Fig.1 に示した。

秤量値の補正は行わなかった。

2-3 ブランク血漿

ヘパリン処理した小児患者の血漿 (国立成育医療センター)

ブランク血漿は冷凍庫(設定温度-20 °C)に保存した。

冷凍庫は、冷凍庫(2号機)(GS-5203AF3, 日本フリーザー(株), 以下冷凍庫(2))を使用した。

2-4 試薬

水 (精製水, 三共エール薬品(株))

メタノール (高速液体クロマトグラフ用, ナカライテスク(株))

アセトニトリル (高速液体クロマトグラフ用, ナカライテスク(株))

t-ブチルメチルエーテル (高速液体クロマトグラフ用, 和光純薬工業(株))

酢酸アンモニウム (試薬特級, 関東化学(株))

1mol/L-水酸化ナトリウム溶液 (ナカライテスク(株))

3.分析装置及び分析条件

3-1 高速液体クロマトグラフ/質量分析装置 (LC/MS/MS) (3号機)

(1) 分析装置

《質量分析装置 (Applied Biosystems / MDS SCIEX)》

API 3000 LC/MS/MS System

《HPLC装置 (株式会社島津製作所)》

送液ユニット : LC-10AD

オートインジェクタ : SIL-10ADvp

カラムオーブン : CTO-10ACvp

システムコントローラ : SCL-10Avp

サンプルクーラー : 10ADvp

脱気装置 : DGU-12AM

(2) 分析条件

《MS/MS条件》

イオン源 : TurbolonSpray

ターボヒーターガス : Air, 425 °C, 7 L/min

ネブライザーガス : Air, 40 psi, 0.92 L/min

カーテンガス : N₂, 0.95 L/min

オリフィス電圧 : 56 V

イオンスプレー電圧 : 5000 V

コリジョンガス : N₂

コリジョンエネルギー : 31.2 eV

測定モード : positive/MRM

モニターイオン : フェンタニル m/z 337 → 188

スピペロン m/z 396 → 165

《HPLC条件》

カラム : L-column ODS 2.1 mm I.D. × 150 mm

((財)化学物質評価研究機構)

移動相 : アセトニトリル:水:1M酢酸アンモニウム (800:200:1)

流速 : 0.3 mL/min

カラム温度 : 40 °C

オートサンプラー温度 : 4 °C

注入量 : 5 μL

4. 試液の調製法

4-1 1M 酢酸アンモニウム水溶液

酢酸アンモニウム 7.7 g を電子上皿天秤 (BX-3200D, 株島津製作所) にて精秤し, 水に溶解し 100 mL とした。

4-2 LC/MS/MS 用移動相

アセトニトリルと水と 1M 酢酸アンモニウム溶液を 800 : 200 : 1 の割合で混和し, 脱気した。

5. 標準液及び試験用検体の調製法

5-1 標準液 (原液)

クエン酸フェンタニル約 15.7 mg (フェンタニルとして約 10 mg: 換算係数=フェンタニルの分子量(336.46)/クエン酸フェンタニルの分子量(528.59)=0.637)を電子天秤(AT-261, 株島津製作所, 以下電子天秤とする)にて精秤し, メタノールに溶解して 100 μ g/mL の溶液とした (Table 1)。本溶液は用時調製とした。

5-2 検量線用標準液

標準液 (原液, 5-1 項) を Table 2 に示した希釈手順に従い, 終濃度 0.1, 0.2, 1, 5, 10, 20, 50, 100 ng/mL の溶液を作製した。本溶液は用時調製とした。

5-3 内標準保存液

スピペロン約 10 mg を電子天秤にて精秤し, メタノールに溶解して 100 μ g/mL の溶液を作製した (Table 3)。

5-4 内標準液

内標準保存液 (5-3 項) を水で希釈し, 10 ng/mL の溶液を作製した (Table 4)。本溶液は用時調製とし, 調製後速やかに使用した。

5-5 精度試験用標準液

標準液 (原液, 5-1 項) を Table 5 に示した希釈手順に従い, 終濃度 0.1, 0.2, 5, 80 ng/mL の溶液とした。

6. 測定方法

6-1 特異性試験

小児患者ブランク血漿 50 μ L に水 100 μ L, 1mol/L-水酸化ナトリウム溶液 25 μ L 及び t-ブチルメチルエーテル 3 mL を加え, レシプロシエーカー (SR-II, タイテック(株)) で

5 分間振盪後、冷却遠心機 (05PR-22, 日立工機株式会社) で 3000 rpm, 5 分間遠心分離し, t-ブチルメチルエーテル層を分取した。t-ブチルメチルエーテル層をチソガス濃縮装置 (TurboVap LV, Zymark Co.,) で窒素ガス気流下において蒸発乾固した。残渣に LC/MS/MS 用移動相 100 μ L を加えて溶解し, LC/MS/MS に注入した。

6-2 検量線の直線性及び精度試験

小児患者ブランク血漿 50 μ L に内標準液 50 μ L, 各濃度に調製した各試験の標準液 50 μ L (ただし, 0 ng/mL は水 50 μ L), 1mol/L-水酸化ナトリウム溶液 25 μ L 及び t-ブチルメチルエーテル 3 mL を加え, レシプロシェーカーで 5 分間振盪後, 冷却遠心機で 3000 rpm, 5 分間遠心分離し, t-ブチルメチルエーテル層を分取した。t-ブチルメチルエーテル層をチソガス濃縮装置で窒素ガス気流下において蒸発乾固した。残渣に LC/MS/MS 用移動相 100 μ L を加えて溶解し, LC/MS/MS に注入した。

7. 実施項目

7-1 特異性試験

小児患者 6 名より得られた血漿につき測定方法に従って測定し, 測定に影響をおよぼす生体由来の妨害ピークがクロマトグラム上に無いことを確認した。

7-2 検量線の直線性

標準物質 0, 0.1, 0.2, 1, 5, 10, 20, 50, 100 ng/mL の検量線を作製し, その直線性を確認した。また, 検量線の濃度範囲および回帰モデル, 重みについても検討した。

7-3 精度試験

標準物質 0.1, 0.2, 5, 80 ng/mL の 4 濃度につき測定例数は 5 で同時再現性試験を実施し, 測定方法の真度と精度を求めた。

真度及び精度は次式より求めた。

$$\text{真度} = (\text{実測値の平均} - \text{理論値}) / \text{理論値} \times 100(\%)$$

$$\text{精度} = \text{S.D.} / \text{実測値の平均} \times 100(\%)$$

7-4 定量計算

定量計算はすべて MacQuan 1.6 (Applied Biosystems / MDS SCIEX) により行った。検量線は測定対象物質と内標準物質のピーク面積比を y, 測定対象物質濃度を x として, 8-2 項で決定した重みづけをし, 直線回帰を行い, 求められた回帰式に被験試料のピーク面積比を代入し, 定量値を得た。得られた定量値は Microsoft® Excel 2000 (Version SR-1) で統計処理し, 報告値とし, 4 桁目を四捨五入して有効数字 3 桁で表した。濃度に関する報告値は表示単位を ng/mL とした。な

お、正確度及び真度は小数点以下2桁目を四捨五入して小数点1桁で表した。

8. 試験結果

8-1 特異性試験

小児患者6名より得られた血漿につき測定方法に従って測定した時、クロマトグラム上にフェンタニルの測定に影響をおよぼすヒト血漿由来の妨害ピークは検出されなかった。比較のため、検量線で得られた0, 100 ng/mLのクロマトグラムの一例をFig.2に、特異性試験のクロマトグラムをFig.3に示した。

8-2 検量線の直線性

検量線は0~100 ng/mLの範囲で、 $1/x$ の重みづけをし、直線回帰を行ったときの相関係数は0.9992であり、直線性の許容基準(相関係数0.995以上)を満たしていた。検量線の一例をFig.4に示した。

8-3 精度試験

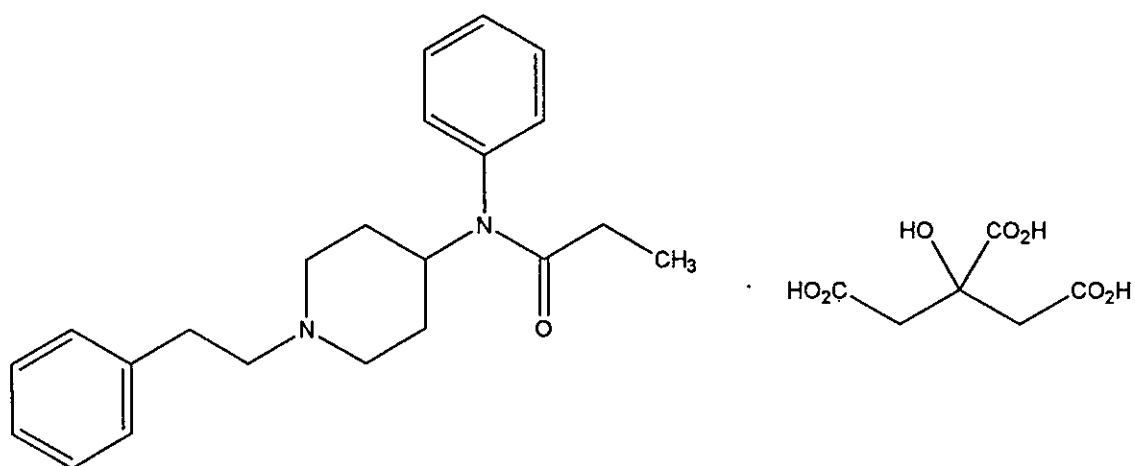
本測定方法におけるフェンタニルの同時再現性試験の結果をTable 6に示した。

同時再現性試験において真度は-6.0~5.0%、精度は3.6~7.4%であった。この結果より、フェンタニルの真度及び精度は全て精度試験の許容基準(0.1 ng/mLでは真度が±20%以内、精度が20%以内、それ以外の濃度では真度が±15%以内、精度が15%以内)を満たしていた。

9. 記録の保存

試験計画書、生データ、記録文書及び試験報告書は株式会社 科学技術研究所 資料保存施設に保存する。

Fentanyl Citrate



Sipiperone

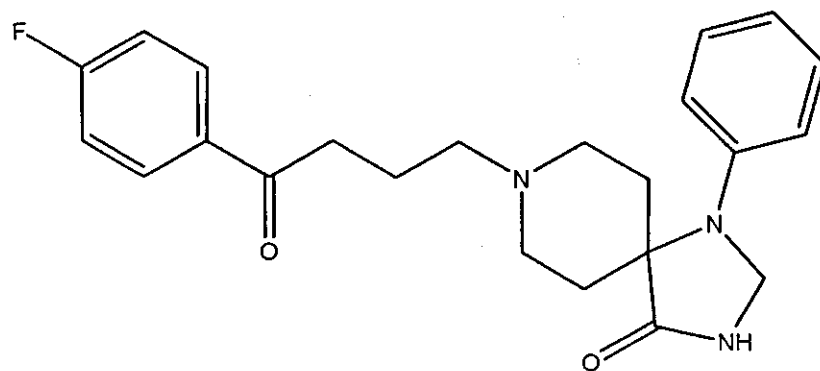


Fig.1 Chemical structures of fentanyl citrate and sipiperone

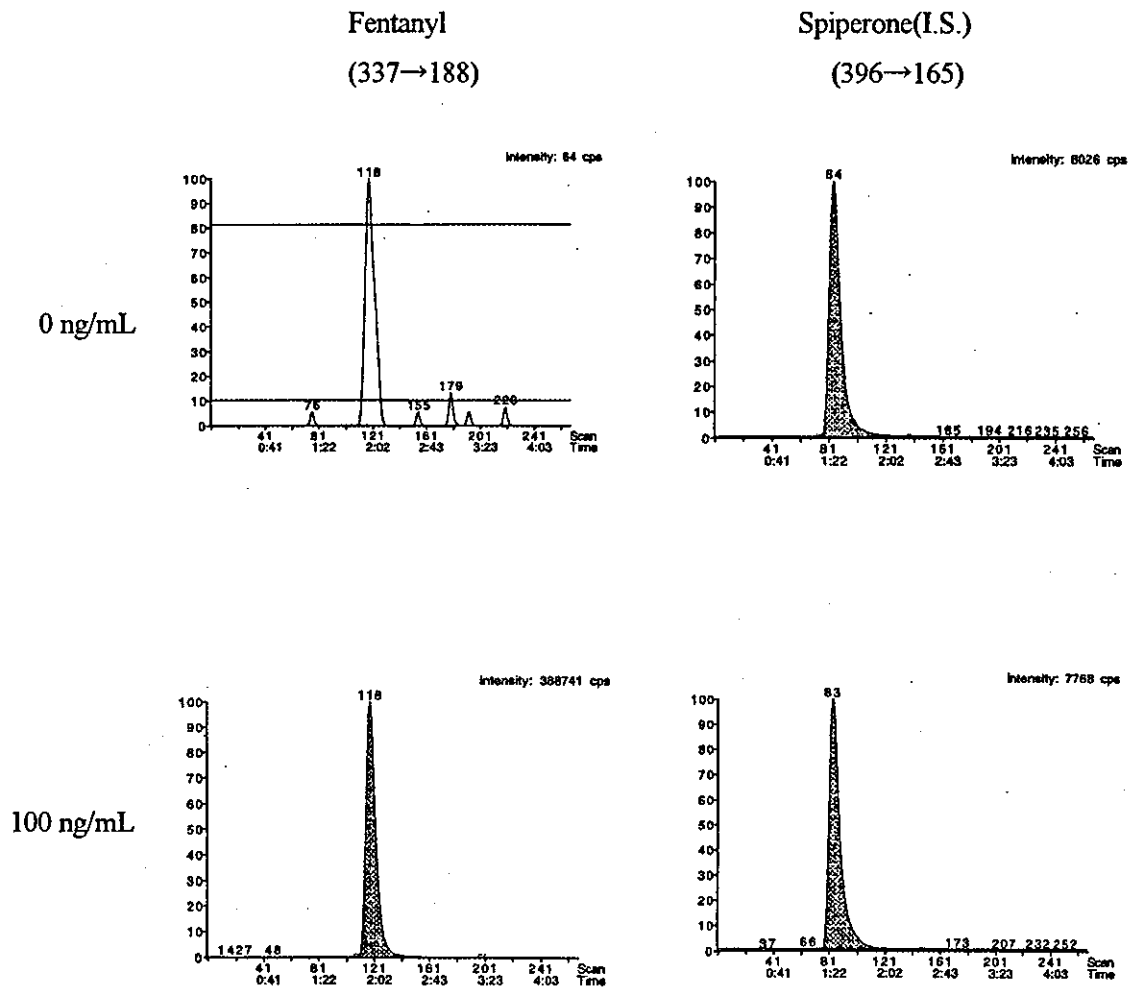


Fig.2 Typical LC/MS/MS chromatograms of the extracts from plasma of Infant patient spiked with fentanyl and spiperone(I.S.)

Fentanyl
(337→188)

Spiperone
(396→165)

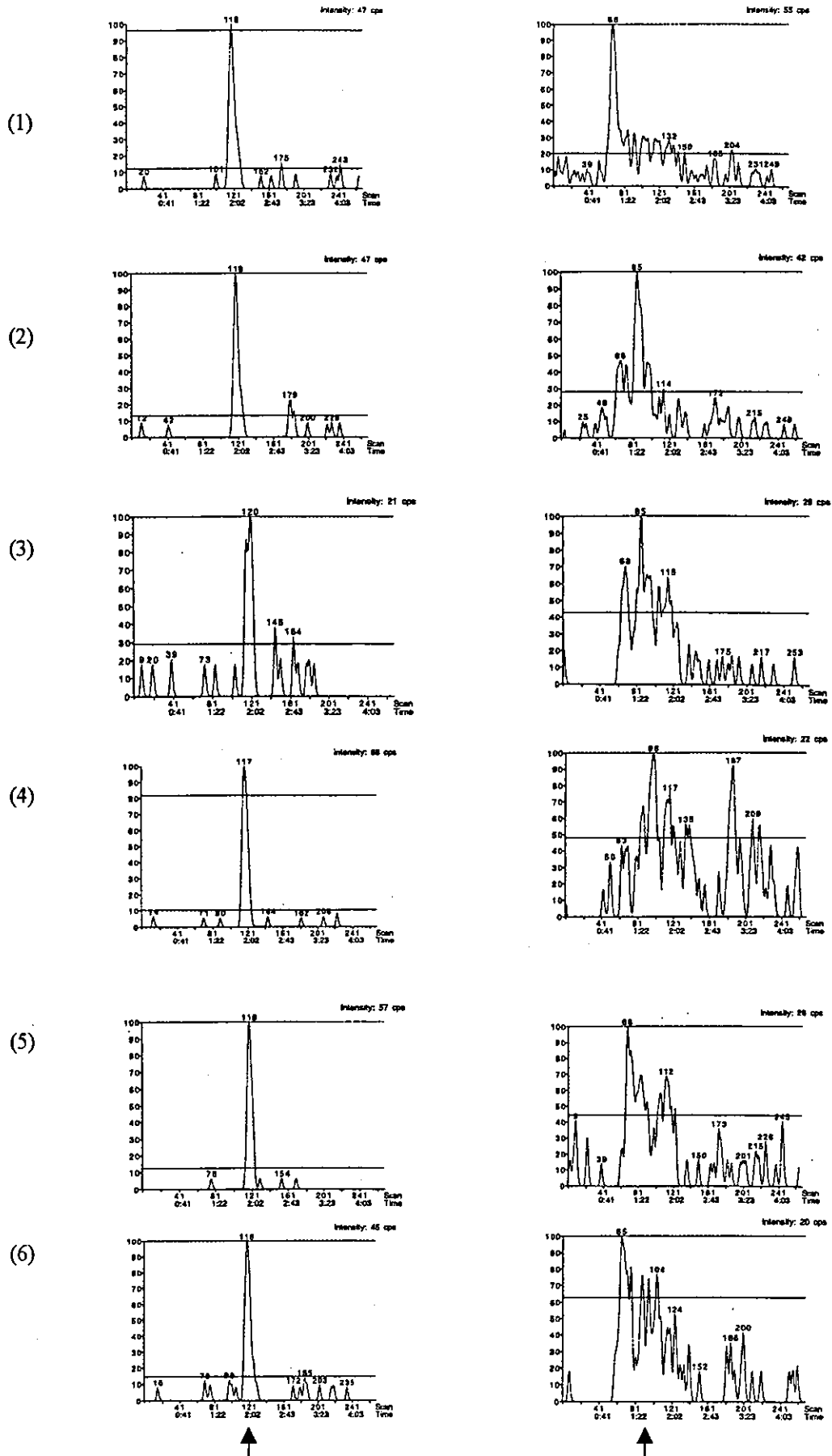


Fig.3 Specificity in fentanyl and spiperone(I.S.) assay of plasma of infant patients by LC/MS/MS

Weighted (1/x)

Intercept = -0.0003691

Slope = 0.4244

Correlation Coeff. = 0.9992

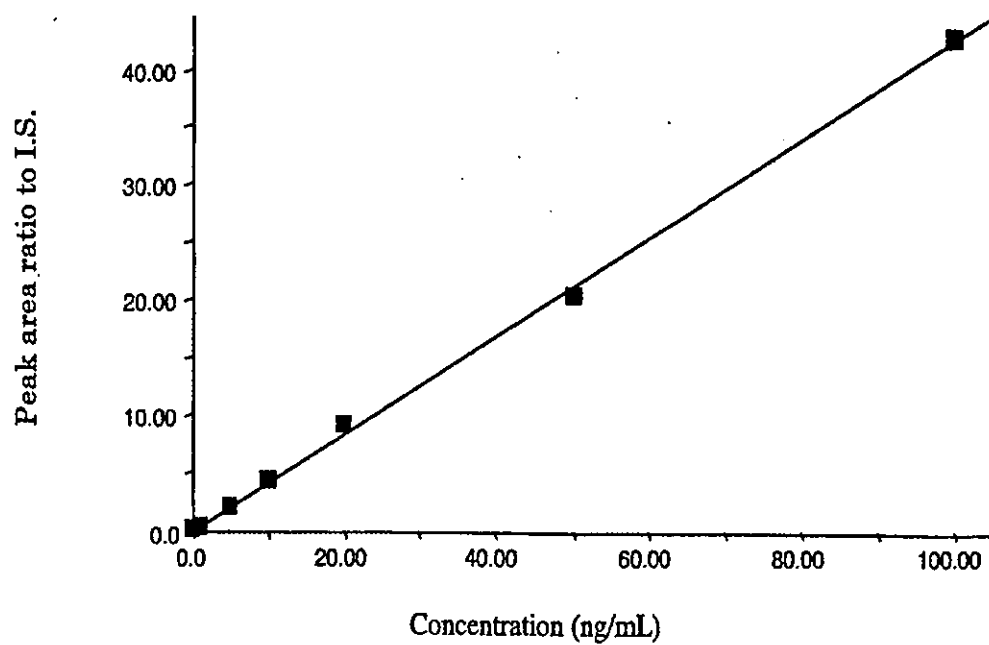


Fig.4 Typical standard curve for determination of fentanyl in plasma of infant patients

Table 1 Preparation of the standard concentrated solution

Solution No.	Target Conc. (ng/mL)	Sampling			Dilution			Instrument	Total Volume
		Compound	Instrument	Weight (mg)	Dilution Solvent	Instrument	Volume (mL)		
1	100,000	Fentanyl citrate	balance	15.7*	methanol	-	-	volumetric flask	up to 100 mL

$$* \text{ actual weight (mg)} = \frac{336.46 \text{ (mass of fentanyl)}}{528.59 \text{ (mass of fentanyl citrate)}} \times \text{weight (mg)}$$

Table 2 Preparation of the standard solutions

Solution No.	Target Conc. (ng/mL)	Sampling			Dilution			Instrument	Total Volume
		Solution No.	Instrument	Volume (mL)	Dilution Solvent	Instrument	Volume (mL)		
1	100,000 (concentrated solutions of fentanyl (Table 1))								
2	5,000	1	glass pipette	1.0	water	-	-	volumetric flask	up to 20 mL
3	100	2	glass pipette	1.0	water	-	-	volumetric flask	up to 50 mL
4	50	3	glass pipette	2.0	water	glass pipette	2.0	glass tube	-
5	20	4	glass pipette	2.0	water	glass pipette	3.0	glass tube	-
6	10	5	glass pipette	2.0	water	glass pipette	2.0	glass tube	-
7	5	6	glass pipette	2.0	water	glass pipette	2.0	glass tube	-
8	1	7	glass pipette	1.0	water	glass pipette	4.0	glass tube	-
9	0.2	8	glass pipette	1.0	water	glass pipette	4.0	glass tube	-
10	0.1	9	glass pipette	2.0	water	glass pipette	2.0	glass tube	-

Table 3 Preparation of the internal standard concentrated solution

Solution No.	Target Conc. (ng/mL)	Sampling			Dilution			Instrument	Total Volume
		Compound	Instrument	Weight (mg)	Dilution Solvent	Instrument	Volume (mL)		
11	100,000	spiperone	balance	10	methanol	-	-	volumetric flask	up to 100 mL

Table 4 Preparation of the internal standard solutions

Solution No.	Target Conc. (ng/mL)	Sampling			Dilution			Instrument	Total Volume
		Solution No.	Instrument	Volume (mL)	Dilution Solvent	Instrument	Volume (mL)		
11	100,000 (concentrated solutions of spiperone (Table 3))								
12	1,000	11	glass pipette	1.0	water	-	-	volumetric flask	up to 100 mL
13	10	12	glass pipette	1.0	water	-	-	volumetric flask	up to 100 mL

Table 5 Preparation of the working solutions for the precision test

Solution No.	Target Conc. (ng/mL)	Sampling			Dilution			Instrument	Total Volume
		Solution No.	Instrument	Volume (mL)	Dilution Solvent	Instrument	Volume (mL)		
1	100,000 (concentrated solutions of fentanyl (Table 1))								
14	4,000	1	glass pipette	1.0	water	-	-	volumetric flask	up to 25 mL
15	80	14	glass pipette	1.0	water	-	-	volumetric flask	up to 50 mL
16	5	15	glass pipette	2.5	water	-	-	volumetric flask	up to 40 mL
17	0.2	16	glass pipette	2.0	water	-	-	volumetric flask	up to 50 mL
18	0.1	17	glass pipette	2.0	water	glass pipette	2.0	glass tube	-

Table 6 Repeatability of LC/MS/MS analysis for fentanyl in plasma of infant patients

	Unit ; ng/mL			
	0.1 ng/mL	0.2 ng/mL	5 ng/mL	80 ng/mL
	0.109	0.205	4.58	79.1
	0.106	0.225	4.96	72.2
	0.108	0.197	4.65	76.4
	0.0930	0.191	5.32	75.0
	0.111	0.188	4.88	73.2
Mean	0.105	0.201	4.88	75.2
S.D.	0.00716	0.0148	0.293	2.72
Accuracy (Rel.error%)	5.0	0.5	-2.4	-6.0
Precision (CV%)	6.8	7.4	6.0	3.6

試験計画書(DRAFT)

小児患者における血漿中フェンタニル濃度測定 (LC/MS/MS 法)

試験計画書番号 : PKG-0504

株式会社 科学技術研究所

1. 表題

小児患者における血漿中フェンタニル濃度測定 (LC/MS/MS 法)

2. 目的

国立成育医療センターの依頼により、国立成育医療センター他、5つの治験施設において実施される「新生児及び小児(6歳以下)におけるクエン酸フェンタニルの投与量、有効性の確認とその安全性の評価—非対照、非盲検試験—」(治験実施計画書番号 IISPedAne001)における、小児患者の血漿中フェンタニル濃度測定を実施する。

3. 試験委託者

名称：国立成育医療センター 治験管理室長 中村 秀文
所在地：東京都世田谷区大蔵2丁目10番1号

4. 試験施設

名称：株式会社 科学技術研究所
所在地：東京都品川区北品川3丁目10番2号

5. 試験責任者

氏名：沢幡 美枝子
所属：株式会社 科学技術研究所 生物第一部

6. 治験実施施設

- 1) 大阪府立母子保健総合医療センター (大阪府和泉市室堂町 840)
- 2) 北里大学病院 (神奈川県相模原市北里 1-15-1)
- 3) 神戸大学医学部附属病院 (兵庫県神戸市中央区楠町 7-5-2)
- 4) 国立成育医療センター (東京都世田谷区大蔵 2-10-1)
- 5) 東京大学医学部附属病院 (東京都文京区本郷 7-3-1)
- 6) 独立行政法人国立病院機構 岡山医療センター (岡山県岡山市田益 1711-1)

7. 試験計画

7-1 概要

治験実施施設より送付されるヒト血漿中のフェンタニル濃度測定を「LC-MS/MS によるヒト血漿中フェンタニル濃度測定法バリデーション」(最終報告書 PKGR-0305, 2004年3月29日付), 「小児患者における血漿中フェンタニル濃度測定条件の検討 (LC/MS/MS 法)」(試験報告書 生一報 16 第 512018 号, 2004年10月20日付) 及び GLP 遵守の生体試料中薬物濃度測定 (SOP/KXE) に従って実施する。

なお、本試験は「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」(厚生省令第