

内標準物質名： Labeled [<sup>15</sup>N<sub>6</sub>]-AcPepA  
 秤取量： 2 mg  
 調製量： 100 mL  
 調製濃度： 20 µg/mL  
 使用溶媒： 30 vol%アセトニトリル溶液  
 使用器具： PFA 製メスフラスコ  
 保存条件： 冷蔵（許容範囲：1～8°C）  
 保存場所： 冷蔵室

#### 8.4.2 内標準溶液

次表のとおり，内標準原液を希釈し，内標準溶液を調製する．PP 製容器を使用する．

内標準溶液 No.	使用内標準溶液		30 vol%アセトニ トリル溶液量 (mL)	調製濃度 (ng/mL)
	No.	採取量 (mL)		
IS	内標準原液	2	18	2000

保存条件： 冷蔵（許容範囲：1～8°C）  
 保存場所： 冷蔵室  
 使用期限： 本試験内で確認する．

#### 8.5 試薬溶液の調製

試薬溶液は下記の割合で調製する．

##### 8.5.1 0.2 vol%ぎ酸溶液

試薬名： ぎ酸  
 秤取量： 2 mL  
 調製量： 1000 mL  
 使用溶媒： 超純水  
 使用器具： ガラス製メスフラスコ，ガラス製ホールピペット  
 保存条件： 室温  
 使用期限： 2 週間

##### 8.5.2 50 vol%アセトニトリル溶液

超純水及びアセトニトリルを 50：50 の容量比で混合する．

使用器具： ガラス製メスシリンダー  
 保存条件： 室温  
 使用期限： 2 週間

## 8.5.3 0.1 vol%ギ酸含有 50 vol%アセトニトリル溶液

秤取量： 1 mL  
調製量： 1000 mL  
使用溶媒： 50 vol%アセトニトリル溶液  
使用器具： ガラス製メスフラスコ，ガラス製ホールピペット  
保存条件： 室温  
使用期限： 2 週間

## 8.5.4 0.2 vol%ギ酸含有アセトニトリル溶液

試薬名： ギ酸  
秤取量： 2 mL  
調製量： 1000 mL  
使用溶媒： アセトニトリル  
使用器具： ガラス製メスフラスコ，ガラス製ホールピペット  
保存条件： 室温  
使用期限： 2 週間

## 8.5.5 0.1 vol%TFA 溶液

試薬名： TFA  
秤取量： 1 mL  
調製量： 1000 mL  
使用溶媒： 超純水  
使用器具： ガラス製メスフラスコ，ガラス製ホールピペット  
保存条件： 室温  
使用期限： 2 週間

## 8.5.6 90 vol%アセトニトリル溶液

超純水及びアセトニトリルを 10：90 の容量比で混合する。

使用器具： ガラス製メスシリンダー  
保存条件： 室温  
使用期限： 2 週間

## 8.5.7 30 vol%アセトニトリル溶液

超純水及びアセトニトリルを 70：30 の容量比で混合する。

使用器具： ガラス製メスシリンダー  
保存条件： 室温  
使用期限： 2 週間

## 8.6 試料の調製

8.6.1～8.6.7 までの試験操作は氷上で行う。

## 8.6.1 特異性用試料

個別ブランク血漿（雌雄，各 3 匹）50  $\mu$ L をとり，30 vol%アセトニトリル溶液 50  $\mu$ L を加えて特異性用試料とする。

## 8.6.2 検量線用試料

次表のとおり，ブランク血漿をとり，検量線用標準溶液（DB 及び S0 試料は 30 vol%アセトニトリル溶液）を加えて検量線用試料を用時調製する。

検量線用試料 No.	使用標準溶液		ブランク血漿量 ( $\mu$ L)	血漿試料中濃度 (ng/mL)
	No.	採取量 ( $\mu$ L)		
S7	SS7	50	50	5000
S6	SS6	50	50	2000
S5	SS5	50	50	1000
S4	SS4	50	50	500
S3	SS3	50	50	200
S2	SS2	50	50	100
S1	SS1	50	50	50
S0	30 vol%アセトニトリル溶液	50	50	0
DB	30 vol%アセトニトリル溶液	50	50	-

## 8.6.3 バリデーション用試料

次表のとおり，ブランク血漿をとり，バリデーション用標準溶液を加えてバリデーション用試料を用時調製する。

バリデーション用 試料 No.	使用標準溶液		ブランク血漿量 ( $\mu$ L)	血漿試料中濃度 (ng/mL)
	No.	採取量 ( $\mu$ L)		
V5	SV5	50	50	5000
V4	SV4	50	50	4000
V3	SV3	50	50	500
V2	SV2	50	50	100
V1	SV1	50	50	50

## 8.6.4 回収率用試料

8.7 試料前処理法 1)～8)のステップを経た DB にバリデーション用標準溶液, IS 及び 0.2 vol% ぎ酸溶液を加えて回収率用試料を用時調製する.

回収率用試料 No.	使用標準溶液		IS 量 ( $\mu\text{L}$ )	0.2 vol% ぎ酸 溶液量 ( $\mu\text{L}$ )	対照濃度 (ng/mL)
	No.	採取量 ( $\mu\text{L}$ )			
R3	SV4	50	50	300	4000
R2	SV3	50	50	300	500
R1	SV2	50	50	300	100

## 8.6.5 希釈再現性用試料

次表のとおり, ブランク血漿をとり, バリデーション用標準原液を加えて DV を調製する.  
次に, DV をブランク血漿で 100 倍 (10 倍 2 回) 希釈することにより希釈再現性用試料を調製する. 得られた血漿は, それぞれ PP マイクロチューブに 50  $\mu\text{L}$  とり, 30 vol% アセトニトリル溶液を 50  $\mu\text{L}$  添加する.

希釈再現性用試料 No. (希釈倍率)	使用標準溶液		ブランク血漿量 ( $\mu\text{L}$ )	血漿試料中濃度 (ng/mL)
	No.	採取量 ( $\mu\text{L}$ )		
DV	バリデーション用 標準原液	50	950	25000
D1 (10 倍)	DV	20	180	2500
D2 (100 倍)	D1	20	180	250

## 8.6.6 血漿中安定性用試料

次表のとおり, ブランク血漿をとり, バリデーション用標準溶液を加えて安定性用試料を調製する. 得られた血漿は, それぞれ 150  $\mu\text{L}$  ずつ PP マイクロチューブに分注する. 所定時間保存後, PP マイクロチューブに 50  $\mu\text{L}$  とり, 30 vol% アセトニトリル溶液を 50  $\mu\text{L}$  添加する.

安定性用試料 No.	使用標準溶液		ブランク血漿量 ( $\mu\text{L}$ )	血漿試料中濃度 (ng/mL)
	No.	採取量 ( $\mu\text{L}$ )		
PST2	SV6	400	4600	4000
PST1	SV4	150	5850	100

## 8.6.7 血液中安定性用試料

次表のとおり、バリデーション用標準原液及び標準溶液を希釈し、血液中安定性用標準溶液を調製する。PP製容器を使用する。

標準溶液 No.	使用標準溶液		30 vol%アセトニ トリル溶液量 (mL)	調製濃度 (ng/mL)
	No.	採取量 (mL)		
BSTV2	バリデーション用 標準原液	1	1.5	200000
BSTV1	BSTV2	1	9	20000

次表のとおり、ブランク血液をとり、血液中安定性用標準溶液を加えて安定性用試料を調製する。得られた血液は、それぞれ 250  $\mu$ L ずつ PP マイクロチューブに分注する。所定時間保存後、遠心分離 (4°C, 10000 $\times$ g, 5 分間) し、得られた血漿 50  $\mu$ L に 30 vol%アセトニトリル溶液を 50  $\mu$ L 添加する。

安定性用試料 No.	使用標準溶液		ブランク血液量 ( $\mu$ L)	血液試料中濃度 (ng/mL)
	No.	採取量 ( $\mu$ L)		
BST2	BSTV2	50	5000	2000
BST1	BSTV1	25	5000	100

## 8.6.8 標準溶液安定性用試料

次表のとおり、標準溶液安定性用試料を用時調製する。

標準溶液安定性用 試料 No.	使用標準溶液		使用内標準溶液		0.2 vol% ぎ酸 溶液量 ( $\mu$ L)	溶液中濃度 (ng/mL)
	No.	採取量 ( $\mu$ L)	No.	採取量 ( $\mu$ L)		
SST2	SS5	50	IS	50	300	125
SST1	SS1	50	IS	50	300	6.25

調製直後及び保存後の検量線用標準原液から標準溶液 (SS5) を調製する。

## 8.6.9 内標準溶液安定性用試料

次表のとおり、内標準溶液安定性用試料を用時調製する。

内標準溶液安定性用 試料 No.	使用内標準溶液		使用標準溶液		0.2% ぎ酸溶液量 ( $\mu\text{L}$ )
	No.	採取量 ( $\mu\text{L}$ )	No.	採取量 ( $\mu\text{L}$ )	
IST1	IS	50	SS5	50	300

## 8.7 試料前処理法

- 1) 検量線用試料 (S0~S7) 及びバリデーション用試料に IS 50  $\mu\text{L}$  を加える。  
 検量線用試料 (DB) に 30 vol%アセトニトリル溶液 50  $\mu\text{L}$  を加える。  
 希釈再現性用試料 (D1 及び D2) に IS 50  $\mu\text{L}$  を加える。  
 特異性用試料及び安定性用試料に IS (特異性用試料には 30 vol%アセトニトリル溶液) 50  $\mu\text{L}$  を加える。
  - 2) 1) の試料に超純水 350  $\mu\text{L}$  を加えて、攪拌する。
  - 3) 固相抽出カートリッジにアセトニトリル 1 mL アプライし通液する。次に 0.1 vol%TFA 溶液 1 mL をアプライし、通液する (平衡化)。
  - 4) 平衡化した固相抽出カートリッジに 2) の試料をアプライする。
  - 5) 0.1 vol%TFA 溶液 1 mL をアプライし、通液する (洗浄)。
  - 6) 超純水 1 mL をアプライし、通液する (洗浄)。
  - 7) 洗浄後の固相抽出カートリッジに 90 vol%アセトニトリル溶液 1 mL をアプライし、通液する (通液)。
  - 8) 7) の溶出液を窒素気流下で乾固する (40°C 以下)。
  - 9) 残渣に 0.2 vol%ぎ酸溶液 0.4 mL を添加し、十分に攪拌する (再溶解)。
  - 10) 9) で再溶解後の液を HPLC 用のバイアルに移し、LC/MS/MS 測定用試料とする。
- 試料の前処理操作 1) ~2) は、氷上で行い、試料の前処理操作 3) ~7) は、遠心分離 (50 $\times$ g, 1 分間, 4°C) することにより通液を行う。

## 8.8 測定条件

### 8.8.1 HPLC 条件

分析カラム :	Inertsil ODS-3 (2.1 mm I.D. $\times$ 50 mm, 5 $\mu\text{m}$ , GL Science, Inc.)
移動相 A :	0.2 vol%ぎ酸溶液
移動相 B :	0.2 vol%ぎ酸含有アセトニトリル溶液
洗浄液 :	0.1 vol%ぎ酸含有 50 vol%アセトニトリル溶液
流速 :	0.2 mL/min
カラム恒温槽設定温度 :	40°C
オートサンプラー設定温度 :	4°C
注入量 :	20 $\mu\text{L}$
分析時間 :	9 min

グラジェント：

タイムプログラム（以下の容量比で行う）

時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
Initial	90	10
5.00	90→10	10→90
5.00→6.00	10	90
6.00→9.00	90	10

## 8.8.2 MS/MS 条件

使用する機器の状態により最適な条件に設定を変更する。

Ion source : ESI  
 Scan type : MRM  
 Polarity : Positive  
 Source temperature : 400°C  
 モニターイオン :

化合物	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)
AcPepA	819	655
内標準物質 (Labeled [ <sup>15</sup> N <sub>6</sub> ]-AcPepA)	822	656

許容範囲：±0.5 以内

## 8.9 システム適合性

(SOP : CALC/101)

各測定バッチの測定前に S1 を測定し、得られたクロマトグラムのベースライン、ピーク形状、保持時間及びピーク面積などを指標に測定系が正常に機能していることを確認する。

測定試料 : S1  
 測定回数 : 1 回

## 8.10 濃度の算出

(SOP : CALC/101)

測定ごとに検量線用試料を分析法により測定する。DB 及び S0 試料により、妨害ピークがないことを確認し、検量線用試料の測定により得られたピーク面積比（標準物質／内標準物質）を用いて、最小二乗法により、検量線（ $Y = aX + b$ ,  $Y =$  ピーク面積比,  $X$  : 濃度）を作成する。DB 及び S0 試料は検量線の回帰分析には用いない。作成した検量線において、手技的エラー等により偏差が異常に大きいポイント（R.E.が±15%以上）が認められたとき、そのポイ

ントが検量線の最低あるいは最高濃度でなく、そのポイントを除いても最低6点の濃度で検量線を構成できる場合、そのポイントを検量線から除外して再計算したものを検量線として採用する。

バリデーション用試料を測定し、それらのピーク面積比を検量線に当てはめて測定値を算出する。

検量線用試料	DB 及び S0～S7, 各濃度 n=1
重み付け	8.11.2 で選択した重み付け
算出値	r, 各試料の逆回帰値及び R.E.
検量線の判定基準	
妨害ピークの ピーク面積	LLOQ 試料の標準物質ピーク面積の 20.0%以下
	LLOQ 試料の内標準物質ピーク面積の 5.00%以下
r	0.9900 以上
R.E.	LLOQ で±20.0%以内, その他の濃度で±15.0%以内

## 8.11 分析バリデーション法

(SOP : CALC/101)

### 8.11.1 特異性

雌雄各3匹のブランク血漿を用いてそれぞれ特異性用試料を調製し、前処理及び測定を行う。クロマトグラム上の標準物質及び内標準物質の保持時間付近における妨害ピークの有無を検討する。

測定試料	特異性用試料 (n=1, 雌雄各3匹) 及び S1 試料
算出値	測定対象物質及び内標準物質のピーク面積
判定基準	
妨害ピークのピーク面積	S1 試料の測定対象物質のピーク面積の 20.0%以下
	S1 試料の内標準物質のピーク面積の 5.00%以下

### 8.11.2 直線性

検量線用試料を分析法により測定し、検量線の直線性を評価する。検量線用試料の測定により得られたピーク面積比(標準物質/内標準物質)を用いて、最小二乗法により、検量線( $Y = aX + b$ , Y: ピーク面積比, X: 濃度)をセットごとに作成する。DB 及び S0 試料は検量線の回帰分析には用いないが、妨害ピークがないことを確認する。重み付けは1,  $1/X$  及び  $1/X^2$  の3とおり検討し、判定基準を満たしたうえで逆回帰値の R.E.が小さい重み付けを総合的に判断して1つ選択する。また、逆回帰値の C.V.を算出し、評価する。



測定試料 (1 セット)	検量線用試料 (DB 及び S0~S7) , 各濃度 n=1
測定回数	3 セット
重み付け	1, 1/X 及び 1/X <sup>2</sup>
算出値	r, 各試料の逆回帰値及び R.E. 各濃度における逆回帰値の Mean, S.D.及び C.V.
判定基準	
r	0.9900 以上
R.E.	LLOQ で±20.0%以内, その他の濃度で±15.0%以内
C.V.	LLOQ で 20.0%以内, その他の濃度で 15.0%以内

### 8.11.3 真度及び精度 (日内及び日間再現性)

バリデーション用試料及び検量線用試料 (DB 及び S0~S7, 各濃度 n=1) を分析法により同一日内で測定する。バリデーション用試料を分析して得られたピーク面積比を検量線に当てはめ測定値を算出し, 日内再現性を評価する。この分析を更に 2 日間行い, 日間再現性を評価する。

測定試料 (1 セット)	日内再現性: バリデーション用試料 (V1~V5) , 各濃度 n=5
測定回数	1 セット/日, 3 日間 (合計 3 セット)
算出値	
日内再現性	各バリデーション用試料の測定値, 濃度ごとの Mean, S.D., C.V. 及び Mean の R.E. (1 日目の結果から評価する)
日間再現性	各バリデーション用試料の測定値, 濃度ごとの Mean, S.D., C.V. 及び Mean の R.E. (3 日間の結果から評価する)
判定基準	
R.E.	LLOQ で±20.0%以内, その他の濃度で±15.0%以内
C.V.	LLOQ で 20.0%以内, その他の濃度で 15.0%以内

### 8.11.4 定量限界

特異性, 直線性, 日内及び日間再現性の結果から, LLOQ 及び ULOQ を判断する。

### 8.11.5 希釈再現性

希釈再現性用試料及び検量線用試料 (DB 及び S0~S7, 各濃度 n=1) を分析法により測定する。希釈再現性用試料を分析して得られたピーク面積比を検量線に当てはめ, 測定値を算出し, 希釈再現性を評価する。

測定試料 (1セット)	希釈再現性用試料 (D1 及び D2) , 各濃度 n=5
測定回数	1セット
算出値	各希釈再現性用試料の測定値に希釈倍率を乗じた値及び希釈倍率ごとの Mean, S.D., C.V.及び Mean の R.E.
判定基準	
R.E.	±15.0%以内
C.V.	15.0%以内

#### 8.11.6 回収率

回収率用試料及びバリデーション用試料をそれぞれ各濃度 3 試料ずつ調製し、測定を行う。標準物質及び内標準物質のピーク面積を求め、回収率を算出する。

測定試料 (1セット)	回収率用試料 (R1~R3) 及びバリデーション用試料 (V2~V4) , 各濃度 n=3
測定回数	1セット
算出値	各濃度のバリデーション用試料のピーク面積 (標準物質及び内標準物質) , 各濃度の回収率用試料のピーク面積 (標準物質及び内標準物質) 及びピーク面積の Mean, 回収率 (%), 濃度ごとの Mean, S.D.及び C.V.
判定基準	回収率に関しては判定基準を設けない。

#### 8.11.7 キャリーオーバー

検量線用試料 (S7) の測定後に DB を測定する。この測定を合計 3 回実施する。DB の測定で得られたピークレスポンスを算出し、評価する。

測定試料 (1セット)	S7, DB 及び S1 各濃度 n=1
測定回数	3セット
算出値	ピーク面積
判定基準	
ピーク面積	LLOQ の 20.0%以下, IS は 5.00%以下

#### 8.11.8 オートサンプラー中での安定性

検量線用試料 (DB 及び S0~S7, 各濃度 n=1) 及びオートサンプラー中で保存したバリデーション用試料を分析法により測定する。それぞれのバリデーション用試料の測定値を調製直後に測定した検量線を用いて算出し、安定性を評価する。

保存条件	オートサンプラー中 (4°C)
測定試料	バリデーション用試料 (V2 及び V4) , 各濃度 n=3
測定頻度	調製直後, 24 時間及び 72 時間以上保存後
算出値	調製直後の各バリデーション用試料の測定値及び濃度ごとの Mean, 保存後の各バリデーション用試料の測定値, 濃度ごとの Mean, 濃度ごとの残存率 (%)
判定基準	
残存率	100.0±15.0%以内

#### 8.11.9 室温保存安定性

安定性用試料及び検量線用試料 (DB 及び S0~S7, 各濃度 n=1) を分析法により測定する。安定性用試料を分析して得られたピーク面積比を検量線に当てはめ、測定値を算出し、安定性を評価する。

保存条件	室温 (許容範囲 : 1~30°C)
測定試料	安定性用試料 (PST1 及び PST2) , 各濃度 n=3
測定頻度	調製直後, 6 時間及び 24 時間以上保存後
算出値	調製直後の各安定性用試料の測定値及び濃度ごとの Mean, 保存後の各安定性用試料の測定値, 濃度ごとの Mean, 濃度ごとの残存率 (%)
判定基準	
残存率	100.0±15.0%以内

#### 8.11.10 冷蔵保存安定性

安定性用試料及び検量線用試料 (DB 及び S0~S7, 各濃度 n=1) を分析法により測定する。安定性用試料を分析して得られたピーク面積比を検量線に当てはめ、測定値を算出し、安定性を評価する。

保存条件	冷蔵 (許容範囲 : 1~8°C)
測定試料	安定性用試料 (PST1 及び PST2) , 各濃度 n=3
測定頻度	調製直後, 6 時間及び 24 時間以上保存後
算出値	調製直後の各安定性用試料の測定値及び濃度ごとの Mean, 保存後の各安定性用試料の測定値, 濃度ごとの Mean, 濃度ごとの残存率 (%)
判定基準	
残存率	100.0±15.0%以内

## 8.11.11 冷凍保存安定性

安定性用試料及び検量線用試料 (DB 及び S0～S7, 各濃度 n=1) を分析法により測定し, 安定性用試料を分析して得られたピーク面積比を検量線に当てはめ, 測定値を算出し, 安定性を評価する。

保存条件	冷凍 (許容範囲: -30～-10°C)
測定試料	安定性用試料 (PST1 及び PST2), 各濃度 n=3
測定頻度	調製直後, 2 週間, 1 ヶ月及び 3 ヶ月以上保存後
算出値	調製直後の各安定性用試料の測定値及び濃度ごとの Mean, 保存後の各安定性用試料の測定値, 濃度ごとの Mean, 濃度ごとの残存率 (%)
判定基準	
残存率	100.0±15.0%以内

## 8.11.12 凍結融解安定性

安定性用試料及び検量線用試料 (DB 及び S0～S7, 各濃度 n=1) を分析法により測定し, 安定性用試料を分析して得られたピーク面積比を検量線に当てはめ, 測定値を算出し, 安定性を評価する。

凍結融解の操作は, 安定性用試料を冷凍で 24 時間以上経過した時点で取り出し, 流水で一部融解後, 氷上で完全に融解させる (1 回)。その後, 冷凍で 12 時間以上保存, 流水で一部融解, 氷上で完全融解のサイクルを繰り返す (2 及び 3 回目)。

保存条件	冷凍 (許容範囲: -30～-10°C)
融解条件	氷上 (一部の融解は流水で行う)
凍結融解操作	3 回
測定試料	安定性用試料 (PST1 及び PST2), 各濃度 n=3
測定頻度	調製直後, 凍結融解 3 回後
算出値	調製直後の各安定性用試料の測定値及び濃度ごとの Mean, 保存後の各安定性用試料の測定値, 濃度ごとの Mean, 濃度ごとの残存率 (%)
判定基準	
残存率	100.0±15.0%以内

## 8.11.13 血液中保存安定性

血液中安定性用試料及び検量線用試料 (DB 及び S0～S7, 各濃度 n=1) を分析法により測定し, 血液中安定性用試料を分析して得られたピーク面積比を検量線に当てはめ, 測定値を算出し, 安定性を評価する。

保存条件	冷蔵（許容範囲：1～8℃）
測定試料	血液中安定性用試料（BST1 及び BST2），各濃度 n=3
測定頻度	調製直後，2 及び 6 時間以上保存後
算出値	調製直後の各血液中安定性用試料の測定値及び濃度ごとの Mean，保存後の各血液中安定性用試料の測定値，濃度ごとの Mean，濃度ごとの残存率（%）
判定基準	
残存率	100.0±15.0%以内

#### 8.11.14 標準溶液安定性

標準原液及び標準溶液（SS1）を調製し，室温及び冷蔵で保存する．調製直後の検量線用標準溶液（SS1 及び SS5）又は保存後の検量線用標準溶液（SS1），保存後の標準原液から調製した検量線用標準溶液（SS5）及び調製直後の IS を用いて調製した標準溶液安定性用試料を測定する．標準溶液安定性用試料のピーク面積比を算出し，安定性を評価する．

保存条件	室温及び冷蔵（許容範囲：1～8℃）
測定試料	標準溶液安定性用試料（SST1 及び SST2），各濃度 n=3
測定数	1 セット（各試料 n=3）／時点，合計 3 セット
測定頻度	室温：調製直後，6 及び 24 時間以上保存後 冷蔵：調製直後，2 及び 4 週間以上保存後
算出値	各標準溶液安定性用試料のピーク面積比，Mean 及び残存率（%）
判定基準	
残存率	100.0±15.0%以内

#### 8.11.15 内標準溶液安定性

内標準原液及び IS を調製し，室温及び冷蔵で保存する．調製直後及び保存後の IS 並びに調製直後の標準溶液（SS5）を用いて調製した内標準溶液安定性用試料を測定する．内標準溶液安定性用試料のピーク面積比を算出し，安定性を評価する．

保存条件	室温及び冷蔵（許容範囲：1～8℃）
測定試料	内標準溶液安定性用試料（IST1）， n=3
測定数	1セット（各試料 n=3）／時点， 合計 3 セット
測定頻度	室温：調製直後， 6 及び 24 時間以上保存後 冷蔵：調製直後， 2 及び 4 週間以上保存後
算出値	各内標準溶液安定性用試料のピーク面積比， Mean 及び残存率（%）
判定基準	
残存率	100.0±15.0%以内

### 8.12 計算式

次の計算式から算出する。

#### 1) 真度（相対誤差：R.E.）

$$\text{R.E. (\%)} = (\text{測定値} - \text{理論値}) / \text{理論値} \times 100$$

#### 2) 精度（変動係数：C.V.）

$$\text{C.V. (\%)} = \text{S.D.} / \text{Mean} \times 100$$

#### 3) 回収率

$$\text{回収率 (\%)} = (\text{バリデーション用試料のピーク面積}) / (\text{回収率用試料のピーク面積の Mean}) \times 100$$

#### 4) 安定性

$$\text{残存率 (\%)} = \text{保存後試料の測定値の Mean} / \text{調製直後試料の測定値の Mean} \times 100$$

#### 5) 標準溶液及び内標準溶液安定性

$$\text{残存率 (\%)} = \text{保存後試料のピーク面積比*の Mean} / \text{調製直後試料のピーク面積比*の Mean} \times 100$$

\*：標準溶液安定性算出時ピーク面積比= 標準物質のピーク面積／内標準物質のピーク面積，  
内標準溶液安定性算出時ピーク面積比= 内標準物質のピーク面積／標準物質のピーク面積

### 8.13 数値の取扱い

数値は以下のとおり， n+1 桁目を四捨五入し， n 桁で記載する。

数値	単位	記載方法
測定値及び Mean	ng/mL	有効数字 3 桁
r	-	小数点以下 4 桁
R.E., C.V., 回収率, 残存率	%	小数点以下 1 桁
S.D.	-	Mean の桁数に合わせる
ピーク面積	-	整数
ピーク面積比	-	有効数字 3 桁

#### 8.14 統計学的手法

有意差検定は実施しない。

#### 9 試験成績の報告

すべてのバリデーションの結果について、試験委託者に下記の図及び表を含む最終報告書草案を提出する。最終報告書（写し）1部及び電子ファイル（PDF）を提出する。

図の種類	特異性
表の種類	直線性
	日内及び日間再現性
	希釈再現性
	回収率
	キャリーオーバー
	オートサンプラー中での安定性
	室温保存安定性
	冷蔵保存安定性
	冷凍保存安定性
	凍結融解安定性
	血液中保存安定性
	標準溶液安定性
	内標準溶液安定性

#### 信頼性保証陳述書

#### 10 記録及び資料の保存

(SOP : CPUC/100)

以下の記録及び資料を、最終報告書作成後 3 ヶ月を経過するまでは SNBL PBC 資料保存施設

に保存し、その後は下記の施設に保存委託し、計 10 年間保存する。それ以降の保存については、試験委託者と SNBL PBC の間で協議するものとする。

#### 試験計画書

標準物質及び内標準物質に関する資料

測定に関するチャート及び記録

最終報告書草案（英文）

最終報告書（英文）

その他、試験に関するすべての資料

保存施設： SNBL DSR データ資料室  
〒891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町 2438 番地


#### 11 試験計画書の変更

試験計画内容に変更が生じた場合は、変更箇所及びその理由を明確にし、試験計画書変更書を作成する。



12 試験計画書の作成及び承認

試験責任者 株式会社新日本科学 薬物代謝分析センター

林 善治  2011年 1月 20日  
林 善治

試験計画書の承認


運営管理者 株式会社新日本科学 薬物代謝分析センター

鶴藤 雅裕  2011年 1月 24日  
鶴藤 雅裕

試験計画書の承認

株式会社新日本科学 薬物代謝分析センターから提示された試験計画書を承認致します。

試験委託者 医療法人さわらび会福祉村病院 長寿医学研究所

岡田 秀親  2011年 1月 25日  
岡田 秀親

試験計画書変更書 (No. 2)

表 題： LC/MS/MS によるサル血漿中 AcPepA 中濃度測定法バリデーション

試験番号： PBC861-001

【変更日】 2011年3月18日

【変更内容】

I. 8. 材料及び方法, 8.11 分析バリデーション法, 8.11.14 標準溶液安定性  
下線部を変更する.

(変更前)

保存条件	室温及び冷蔵 (許容範囲: 1~8°C)
測定試料	標準溶液安定性用試料 (SST1 及び SST2), 各濃度 n=3
測定数	1セット (各試料 n=3) / 時点, 合計3セット
測定頻度	室温: 調製直後, 6 及び 24 時間以上保存後 冷蔵: 調製直後, 2 及び 4 週間以上保存後
算出値	各標準溶液安定性用試料のピーク面積比, Mean 及び残存率 (%)
判定基準	
残存率	100.0±15.0%以内

(変更後)

保存条件	室温及び冷蔵 (許容範囲: 1~8°C)
測定試料	標準溶液安定性用試料 (SST1 及び SST2), 各濃度 n=3
測定数	1セット (各試料 n=3) / 時点, 合計3セット
測定頻度	室温: 調製直後, 6 及び 24 時間以上保存後 冷蔵: 調製直後, 2, 4 週間及び 2 ヶ月以上保存後
算出値	各標準溶液安定性用試料のピーク面積比, Mean 及び残存率 (%)
判定基準	
残存率	100.0±15.0%以内

II. 8. 材料及び方法, 8.11 分析バリデーション法, 8.11.15 内標準溶液安定性  
下線部を変更する.

(変更前)

保存条件	室温及び冷蔵（許容範囲：1～8℃）
測定試料	内標準溶液安定性用試料（IST1）， n=3
測定数	1セット（各試料 n=3）／時点，合計3セット
測定頻度	室温：調製直後，6及び24時間以上保存後 冷蔵：調製直後，2及び4週間以上保存後
算出値	各内標準溶液安定性用試料のピーク面積比，Mean及び残存率（%）
判定基準	
残存率	100.0±15.0%以内

(変更後)



保存条件	室温及び冷蔵（許容範囲：1～8℃）
測定試料	内標準溶液安定性用試料（IST1）， n=3
測定数	1セット（各試料 n=3）／時点，合計3セット
測定頻度	室温：調製直後，6及び24時間以上保存後 冷蔵：調製直後，2，4週間及び2ヵ月以上保存後
算出値	各内標準溶液安定性用試料のピーク面積比，Mean及び残存率（%）
判定基準	
残存率	100.0±15.0%以内

## 【変更理由】

I.及びII. より長期の安定性を確認するため.

試験計画書変更書の作成

試験責任者 株式会社新日本科学 薬物代謝分析センター



 2011年3月18日

林 善治

試験計画書

表題： AcPepA (MPS-390) の特性確認のためのバリデーション

試験番号： SBL861-002

試験責任者： 山田聡美

株式会社新日本科学 安全性研究所