

ては Wilcoxon 順位和検定, 尿の色については Fisher 直接確率検定を対照群と被験物質各群との間で実施する. これらの検定及び計算には MUSCOT 統計解析ソフトウェア (ユックムス株式会社) を使用し, 有意水準は Bartlett 法は 5%, その他の検定は両側 5%とする. 一般状態, 一般症状及び神経行動学的機能観察, 眼科的検査, 剖検, 病理組織学的検査, トキシコキネティクス及び休薬期間中のデータについては検定を実施しない.

23. 文献

- 1) 清水茂一: AcPepA のサルを用いた 3 日間反復静脈内投与による用量設定試験. スギ生物科学研究所株式会社, 試験番号: FBM08-6523, 最終報告書, 2009 年

24. 試験成績の報告

本試験の成績について, 最終報告書の草案を試験委託者に 1 部提出する. 最終報告書 (和文) についてはその写し 1 部を試験委託者に提出する.

別添 1	被験物質に関する資料 被験物質の特性 被験物質の安定性 調製液の安定性 調製液の濃度測定
------	--

別添 2	表 1) 一般状態 2) 一般症状及び神経行動学的機能観察 3) 体重 4) 摂餌量 5) 眼科的検査 6) 心電図検査 7) 体温 8) 血圧 9) 呼吸数 10) 尿検査 11) 血液学的検査 12) 血液生化学的検査 13) 骨髄検査 (ミエログラム, 実施した場合) 14) 血液ガス検査 15) 剖検所見 16) 器官重量 (絶対及び相対重量)
------	---

17) 病理組織学的検査所見

別添3 TK 測定報告書

添付資料 試験施設の信頼性保証陳述書

25. 記録, 資料, 試料及び標本の保存

試験施設で発生する記録, 資料, 試料及び標本は, 株式会社新日本科学 安全性研究所 (住所: 〒891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町 2438 番地) の以下の保存場所に最終報告書作成後 10 年間保存する.

株式会社新日本科学 安全性研究所 データ資料室

試験計画書及び試験計画書変更書

試験スケジュール

被験物質及び対照物質に関する記録, 資料

試験系に関する記録, 資料

飼育条件に関する記録, 資料

馴化記録

投与記録

一般状態観察記録

一般症状及び神経行動学的機能観察記録

体重測定記録

摂餌量測定記録

眼科的検査記録

心電図検査記録

体温測定記録

血圧測定記録

呼吸数測定記録

尿検査記録

血液学的検査記録

血液生化学的検査記録

血液ガス検査記録

骨髄検査記録

剖検記録

器官重量測定記録

病理組織学的検査記録

病理標本作製記録

トキシコキネティクスに関する記録, 資料
統計に関する記録
最終報告書草案
最終報告書
その他, 試験に関する資料

株式会社新日本科学 安全性研究所 被験物質保管庫
保存用被験物質

株式会社新日本科学 安全性研究所 器官保管室
血液塗抹標本 (鏡検した場合)
骨髄塗抹標本
ホルマリン固定標本 (真空パック)
パラフィン包埋標本
組織標本

26. 試験計画書の変更

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

27. 試験計画書の作成及び承認

試験計画書の作成

試験責任者 株式会社新日本科学 安全性研究所

楠元 正吾 2011年 3月 7日
楠元 正吾

試験計画書の承認

運営管理者 株式会社新日本科学 安全性研究所

洲加本 孝幸 2011年 3月 7日
洲加本 孝幸

試験計画書の承認

株式会社新日本科学 安全性研究所より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 3月 10日
岡田 秀親

別添 A

調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度測定方法総ページ 3 枚

調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度測定方法
(SOP : BIO/023)

本試験に用いる測定法は株式会社新日本科学 安全性研究所でバリデーションを実施した¹⁾。

1. 標準物質

被験物質を標準物質として使用する。

2. 使用試薬

(SOP : BIO/250)

名称	等級	製造者
アセトニトリル	HPLC 用	和光純薬工業株式会社
トリフルオロ酢酸 (TFA)	HPLC 用	和光純薬工業株式会社
超純水	Milli-Q システムにて精製した水。	

3. 測定機器

名称	型式	製造者	SOP
HPLC システム	島津 10A	株式会社島津製作所	BIO/273
検出器	島津 SPD-10A	株式会社島津製作所	BIO/273
データ処理装置	LCsolution	株式会社島津製作所	BIO/273

4. 移動相の調製

(SOP : BIO/250)

以下の割合で調製する。

4.1 移動相 A の調製

超純水 1000 mL と TFA 1 mL を混合し、超音波減圧処理により脱気する。

4.2 移動相 B の調製

アセトニトリル 1000 mL と TFA 1 mL を混合し、超音波減圧処理により脱気する。

5. 標準溶液の調製 (n = 1)

次表に従い、正確に標準溶液を調製する。

標準溶液名	採取物	採取量	使用液	調製量 (mL)	調製濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
S	被験物質	10 mg	超純水	40	250
STD	S	2 mL	超純水	50	10

6. 試料溶液の調製 (n=2)

調製液をよく転倒混和した後、次表に従い正確に採取し、超純水を用いて正確に試料溶液を調製する。

試料溶液	採取液 (生理食塩液調製液)	採取量 (mL)	使用液	調製量 (mL)	調製濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
T1	0.5 mg/mL 調製液	1	超純水	50	10
T2	1.5 mg/mL 調製液	1	超純水	15	100 [t2]
	t2	1	超純水	10	10
T3	4 mg/mL 調製液	1	超純水	40	100 [t3]
	t3	1	超純水	10	10

[] 内は、調製途中の溶液名。

7. 測定法

7.1 HPLC 測定条件

検出器： 紫外吸光光度計 (測定波長：215 nm, AUX レンジ：2.0 AU/V)

カラム： YMC-Pack Pro C18 RS (5 μm , 150 \times 4.6 mm i.d.; 株式会社ワイエムシィ)

カラム温度： 40 $^{\circ}\text{C}$

試料温度： 5 $^{\circ}\text{C}$

移動相 A： 0.1%TFA 水溶液

移動相 B： 0.1%TFA アセトニトリル溶液

移動相の送液： 移動相 A 及び移動相 B の混合比を以下のように直線的に変えて濃度勾配制御する。

注入後からの時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0 \rightarrow 5	70 \rightarrow 50	30 \rightarrow 50
5.01 \rightarrow 10	20	80
10 \rightarrow 20	70	30

流量： 1.0 mL/min

注入量： 20 μL

面積測定範囲： 5分

7.2 システムの再現性

測定の開始時に、標準溶液 STD (調製濃度：10 $\mu\text{g/mL}$) を 6 回繰り返して測定し、AcPepA (MPS-390) のピーク面積の相対標準偏差 (RSD) が 2.0%以下であれば適とする。

8. 調製液濃度の算出

標準溶液 STD を 2 回測定後、試料溶液 T1~T3 を 1 回ずつ測定する。得られた標準溶液のピーク面積と調製濃度から LCsolution により検量線（一点検量線法）を作成し、試料溶液中の AcPepA（MPS-390）濃度を求め、次式により調製液中の AcPepA（MPS-390）濃度、含有率及び安定性を算出する。

調製液中の AcPepA（MPS-390）濃度（mg/mL）

$$= \text{試料溶液中の AcPepA（MPS-390）濃度（}\mu\text{g/mL）} \times \text{希釈倍率} \times 10^{-3}$$

含有率（%） = 調製液中の AcPepA（MPS-390）濃度（mg/mL） / 目標濃度（mg/mL） × 100

安定性（%） = 保存期間後の調製液中の AcPepA（MPS-390）濃度平均値（mg/mL） /
調製直後の調製液中の AcPepA（MPS-390）濃度平均値（mg/mL） × 100

9. 測定結果の取扱い

ピーク面積、試料溶液濃度及びシステムの再現性は、データ処理装置から出力された値を用いる。その後の計算には、表計算ソフト Excel を用いる。算出される数値の表示桁数は以下のとおりとし、数値の丸め方は必要桁の 1 桁小さい桁で四捨五入する。

ピーク面積：	小数点以下 1 桁
濃度値：	有効数字 5 桁
Mean：	計算前の数値と同じ桁数
百分率表示値：	小数点以下 1 桁

10. 参考文献

- 1) 山田聡美：調製液中の AcPepA（MPS-390）濃度測定法バリデーション試験，株式会社新日本科学 安全性研究所，試験番号 SBL861-005，最終報告書，2011 年

別添 B

TK 測定計画書.....総ページ 17 枚

略号及び用語の一覧

略号／用語	定義
AUC _{0-4h}	Area under the plasma concentration-time curve up to 4 h (投与後 4 時間までの血漿中濃度時間曲線下面積)
C _{max}	Maximum plasma concentration (最高血漿中濃度)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	Electro spray ionization
GLP	Good Laboratory Practice
HPLC	High performance liquid chromatography
LC-MS/MS	Liquid chromatography / tandem mass spectrometry
LIMS	Laboratory Information Management System (データ管理システム)
LLOQ	Lower limit of quantification (定量下限)
MRM	Multiple reaction monitoring
MS/MS	Tandem mass spectrometry
N.D.	Not detected (定量限界未満)
PFA	<i>p</i> -Fluorophenylalanine
PP	Polypropylene
QAU	Quality Assurance Unit (信頼性保証部門)
QC	Quality control (精度管理)
r	Correlation coefficient (相関係数)
R.E.	Relative error (相対誤差, 真度)
S.D.	Standard deviation (標準偏差)
SNBL DSR	Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., Drug Safety Research Laboratories (株式会社新日本科学 安全性研究所)
SNBL PBC	Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., Pharmacokinetics and Bioanalysis Center (株式会社新日本科学 薬物代謝分析センター)
SOP	Standard Operation Procedure (標準操作手順書)
TFA	Trifluoroacetic acid (トリフルオロ酢酸)
TK	Toxicokinetic(s) (トキシコキネティクス)
T _{max}	Time to reach the maximum plasma concentration (最高血漿中濃度到達時間)
ULOQ	Upper limit of quantification (定量上限)

1. 表題

「AcPepA (MPS-390) のカニクイザルにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 (試験番号 : SBL861-006) 」における血漿中薬物濃度測定試験

2. 実験番号

PBC861-006-01

3. 目的

SNBL DSR で実施される「AcPepA (MPS-390) のカニクイザルにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 (試験番号 : SBL861-006) 」での AcPepA の血漿中濃度を LC-MS/MS¹⁾により測定し、全身的暴露を評価する。

4. 適用規制

本測定は、以下の GLP を遵守し、ガイドラインに準拠して実施する。

- ・ 「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」 (平成 9 年 3 月 26 日厚生省令第 21 号、一部改正 厚生労働省令第 114 号 平成 20 年 6 月 13 日)
- ・ 「トキシコキネティクス (毒性試験における全身的暴露の評価) に関するガイダンスについて」 (平成 8 年 7 月 2 日薬審第 443 号厚生省薬務局審査課長通知)

5. 試験施設

SNBL DSR

〒891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町 2438 番地

TEL : 099-294-2600

FAX : 099-294-3619

6. 試験場所

SNBL PBC

〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 16 番地 1

TEL : 073-483-8881

FAX : 073-483-7377

試験場所管理責任者 :

鶴藤 雅裕

e-mail : uto-masahiro@snbl.co.jp

7. 測定関係者

試験主任者 :

林 善治

e-mail : hayashi-yoshiharu@snbl.co.jp

分析担当者 :

阿部 直樹

試験場所被験物質管理責任者 :

近藤 貴雄

8. 日程

並行保存用 QC 試料送付予定日： 2011年3月24日
 測定試料受領予定日： 2011年4月5日, 2011年5月2日
 測定操作終了予定日： 2011年5月31日
 TK 測定報告書草案提出日： 2011年7月14日
 試験終了日 (TK 測定報告書作成日) :
 2011年9月1日

9. 測定法に関する情報

測定法は SNBL PBC で実施した「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)」¹⁾ で下記のとおり信頼性が確認された方法を用いる。

動物種 (系統)	カニクイザル
マトリクス	血漿
抗凝固剤	EDTA・2K
検量線範囲	50~5000 ng/mL
LLOQ :	50 ng/mL
ULOQ :	5000 ng/mL
希釈再現性	ブランク血漿で 100 倍希釈まで可能

マトリクス中における測定対象物質の安定性は下表のとおり。

冷蔵保存安定性 :	1~8°C で 6 時間まで安定
凍結融解安定性 :	凍結融解操作 3 回まで安定 (保存/融解条件: -70°C 以下/氷上)
冷凍保存安定性 :	-70°C 以下で 15 日間安定

10. 材料及び方法

10.1 試験系及び測定試料に関する情報

(SOP : CALC/003)

10.1.1 測定試料採取施設

SNBL DSR

〒891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町 2438 番地

TEL : 099-294-2600

FAX : 099-294-3619

10.1.2 測定試料採取試験

表題 : AcPepA (MPS-390) のカニクイザルにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

試験番号 : SBL861-006

試験責任者： 楠元 正吾

10.1.3 試験系に関する情報

種： カニクイザル

被験物質： AcPepA (ロット番号：2K09030)

投与経路： 経口

投与回数及び投与期間： 1日1回，週7日，4週間投与（計28回投与，急速投与と持続投与をあわせて1回投与とする）

試験群構成： 対照群1群，被験物質群3群

群	被験物質 及び 対照物質	投与量 (mg/kg/日)		投与容量 (mL/kg/日)		投与液 濃度 (mg/mL)	剖検 時期	動物数 (動物番号)	
		急速	持続	急速	持続			雄	雌
1	生理食塩液	-		10		-	ERC	2 (1, 2)	2 (6, 7)
		-	-	2.5	7.5			EDA 3 (3~5)	3 (8~10)
2	AcPepA	5		10		0.5	EDA	3 (11~13)	3 (14~16)
		1.25	3.75	2.5	7.5				
3	AcPepA	15		10		1.5	EDA	3 (17~19)	3 (20~22)
		3.75	11.25	2.5	7.5				
4	AcPepA	40		10		4	ERC	2 (23, 24)	2 (28, 29)
		10	30	2.5	7.5			EDA 3 (25~27)	3 (30~32)

EDA：投与期間終了時

ERC：休薬期間終了時

10.1.4 測定試料に関する情報

例数： 全例（対照群全例についても測定を実施する）

採血ポイント

投与開始日： 急速投与終了直後，持続投与開始後約1時間，持続投与終了直前，終了後約1，2及び4時間（6ポイント）

投与終了日： 急速投与開始前，急速投与終了直後，持続投与開始後約1時間，持続投与終了直前，終了後約1，2及び4時間（7ポイント）

抗凝固剤： EDTA・2K

輸送及び受領方法： 血漿中濃度測定用試料は，試験施設で調製され，凍結保存後（許容範囲：-70℃以下），ドライアイスによる凍結下で試験場所に輸送される。試験場所では，受領時にドライアイス残量，測定試料の凍結状態，試料容器に破損がないことを確認する。

試料の識別方法： 試料容器に貼付したラベル情報（試験番号，動物番号及び採血

ポイント)により識別する。

受領予定試料数： 血漿 416 検体
 測定予定試料数： 血漿 416 検体
 測定対象物質： AcPepA

10.1.5 測定試料の保存

保存条件： 冷凍
 保存場所： 超低温フリーザー（許容範囲：-70°以下）
 測定の実施： 確認された安定性期間内¹⁾で測定を終了する。

10.1.6 測定後の試料の処理

測定後の残余試料は、TK 測定報告書作成までに試験場所にて廃棄する。

10.2 使用機器及び材料

以下の装置、機器又はその同等品を使用する。

装置又は機器	型式	製造者又は販売業者	SOP
HPLC システム	島津 10A システム	株式会社島津製作所	CALC/232
	島津 20A システム		
MS/MS システム	API 3000	AB SCIEX	CALC/202
データ処理ソフト	Analyst		
LIMS ソフト	Watson	Thermo Fisher Scientific Inc.	CALC/105
天秤	AT261	メトラー・トレド株式会社	CALC/302
	AX205		
	AE240		
	CP225D	ザルトリウス・メカトロニクス・ジャパン株式会社	
冷却遠心機	LX-120	株式会社トミー精工	CALC/308
	MX-301		
超純水製造装置	Milli-Q SP	日本ミリポア株式会社	CALC/314
	Milli-Q Gradient-A10		
窒素乾固装置	Turbo Vap LV Evaporator	Caliper Life Sciences, Inc.	CALC/322
可変容量型ディスプレイ ペンサー	Eppendorf	Eppendorf AG	CALC/324
	Finnpipette	Thermo Fisher Scientific K.K.	RILC/345
	Finnpipette P.C.R. (PDP)		
	Microman pipette	Gilson, Inc.	RILC/369
冷凍室	LVF4JA	ダイキン工業株式会社	CALC/006

装置又は機器	型式	製造者又は販売業者	SOP
冷蔵室	LVL1X5KA	ダイキン工業株式会社	CALC/006
超低温フリーザー	ULT2090-3J-D30	サーモフィッシャーサイエ ンティフィック株式会社	CALC/312
冷凍冷蔵庫	MPR-414FRS	三洋電機株式会社	TSBC/004
冷凍庫	MDF-436	三洋電機株式会社	TSBC/007
固相抽出カートリ ッジ	Oasis HLB (1 mL, 30 mg)	Waters	-

10.3 標準物質, 内標準物質, ブランク血漿及び試薬

(SOP : TSBC/001, TSBC/004, TSBC/007)

標準物質及び内標準物質は試験場所被験物質管理責任者が受領・保管する。試験に必要な量を秤取りし, 本試験内で用いる。秤取しなかった分は引き続き試験場所被験物質管理責任者が保管する。

10.3.1 標準物質

名称 : MPS-390 (AcPepA)
 送付元 : 医療法人さわらび会福祉村病院 長寿医学研究所
 ロット番号 : 2K09030
 受領日 : 2010年11月17日
 受領量 : 200 mg
 含量 : 97.7%
 安定性 : 委託者より安定性に関する情報を入手する
 保存条件 : 冷凍, 遮光, 気密
 保存場所 : 被験物質保管室2 冷凍庫 (冷凍, 許容範囲: -30~-10°C)
 取扱い : 手袋, キャップ, 保護メガネ及びマスクを着用する。

10.3.2 内標準物質

名称 : Labeled [¹⁵N₆]-AcPepA
 送付元 : オペロン バイオテクノロジー株式会社
 ロット番号 : 1011089M (ID)
 受領日 : 2011年1月17日
 受領量 : 50 mg (10 mg×5本)
 純度 : 97.63%
 安定性 : 2012年1月
 保存条件 : 冷凍, 遮光, 気密
 保存場所 : 被験物質保管室2 冷凍冷蔵庫 (冷凍, 許容範囲: -40~-20°C)
 取扱い : 手袋, キャップ, 保護メガネ及びマスクを着用する。

10.3.3 ブランク血漿

(SOP : RILC/108)

動物種 : カニクイザル
 抗凝固剤 : EDTA・2K
 供給元 : SNBL DSR
 SNBL PBC
 保存条件 : 冷凍 (許容範囲 : -30~-10°C)

10.3.4 試薬

(SOP : CALC/005)

以下の試薬又はその同等品を使用する。

試薬	等級	製造者
アセトニトリル	HPLC 用	和光純薬工業株式会社
ぎ酸	試薬特級	和光純薬工業株式会社
TFA	試薬特級	和光純薬工業株式会社
超純水	蒸留水を超純水製造装置で精製する。	

10.4 標準原液及び標準溶液の調製

検量線用標準原液及び標準溶液と QC 用標準原液及び標準溶液はそれぞれ別途に調製する。

10.4.1 標準原液

下記のとおり標準物質を 30 vol%アセトニトリル溶液に溶かして検量線用標準原液及び QC 用標準原液を調製する。

標準物質名 : AcPepA
 秤取量 : 12.5 mg
 調製量 : 25 mL
 調製濃度 : 500 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
 使用期限 : 29 日間¹⁾

10.4.2 標準溶液

次表のとおり、検量線用標準原液及び QC 用標準原液より順次希釈し、検量線用及び QC 用標準溶液を調製する。PP 製容器を使用する。

検量線用標準溶液

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)		
SS8	検量線用標準原液	1	9	50000
SS7	SS8	1	9	5000
SS6	SS7	4	6	2000
SS5	SS7	2	8	1000
SS4	SS6	2	6	500
SS3	SS5	2	8	200
SS2	SS4	2	8	100
SS1	SS3	2	6	50

使用溶媒： 30 vol%アセトニトリル溶液
 保存条件： 冷蔵（許容範囲：1～8°C）
 保存場所： 冷蔵室
 使用期限： 29日間¹⁾

QC用標準溶液

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)		
SQ4	QC用標準原液	1	9	50000
SQ3	SQ4	1	11.5	4000
SQ2	SQ3	1	7	500
SQ1	SQ2	2	8	100

使用溶媒： 30 vol%アセトニトリル溶液
 保存条件： 冷蔵（許容範囲：1～8°C）
 保存場所： 冷蔵室
 使用期限： 29日間¹⁾

10.5 内標準原液及び内標準溶液の調製

10.5.1 内標準原液

下記のとおり内標準物質を30 vol%アセトニトリル溶液に溶かして内標準原液を調製する。

内標準物質名： Labeled [¹⁵N₆]-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

10.5.2 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

使用溶媒： 30 vol%アセトニトリル溶液
 保存条件： 冷蔵（許容範囲：1～8°C）
 保存場所： 冷蔵室
 使用期限： 29 日間¹⁾

10.6 試薬溶液の調製

試薬溶液は下記の割合で調製する。

10.6.1 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

10.6.2 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

10.6.3 0.1 vol%ぎ酸含有 50 vol%アセトニトリル溶液

試薬名： ぎ酸

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

10.6.4 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

10.6.5 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

10.6.6 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

10.6.7 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

10.7 試料の調製

10.7.1 及び 10.7.2 の試験操作は氷上で行う。

10.7.1 検量線試料

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。

検量線試料

検量線用試料 No.	使用標準溶液		ブランク血漿量 (μ L)	血漿試料中濃度 (ng/mL)
	No.	採取量 (μ 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	-

10.7.2 QC 試料

次表のとおり、ブランク血漿をとり、QC 用標準溶液を加えて QC 用試料を用時調製する。

QC 試料

QC 試料 No.	使用標準溶液		ブランク血漿量 (μ L)	血漿試料中濃度 (ng/mL)
	No.	採取量 (μ L)		
Q3	SQ3	50	50	4000
Q2	SQ2	50	50	500
Q1	SQ1	50	50	100

10.8 試料前処理法

下記の試料の前処理操作 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 $^{\circ}$ C) することにより通液を行う。

1) 検量線用試料 (S0~S7) 及び QC (Q1~Q3) 試料に IS 50 μ L を加える。