

11.2.4 PTC 誘導体化法

- 1) 測定試料溶液 200 μL に 100 mmol/L PITC/アセトニトリル 100 μL 及び 1 mol/L トリエチルアミン/アセトニトリル 100 μL を加える。
- 2) 40°C で 20 分間放置する。
- 3) 1.2 mol/L 塩酸 100 μL を加える (PTC-アミノ酸)。

11.2.5 測定法

11.2.5.1 HPLC 測定条件

HPLC システム： 島津 20A
 検出器： 紫外吸光光度計 (島津 SPD-20A, 測定波長：254 nm, AUX レンジ：2.0 AU/V, レスポンス：0.05 sec, セミマイクロセル)
 カラム： Shim-pack XR-ODS (2.2 μm , 75 \times 3.0 mm i.d.; 株式会社島津製作所)
 カラム温度： 40°C
 試料温度： 5°C
 移動相 A： 10 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH7.0)
 移動相 B： アセトニトリル
 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	95	5
0.3	95	5
3.4	60	40
4	60	40
4.01	95	5
10	95	5

流量： 1.2 mL/min
 注入量： 4 μL
 面積測定範囲： 4 分

11.2.5.2 システムの再現性

測定時に、標準溶液 SA を 6 回測定し、Ser についてピーク面積の相対標準偏差 (RSD) が 5.0% 以下であれば適とする。

11.2.5.3 測定順序

Sys \rightarrow Sys* \rightarrow Sys* \rightarrow AT1 \rightarrow Sys \rightarrow AT2 \rightarrow Sys \rightarrow AT3 \rightarrow Sys

Sys：システムの再現性 (SA を使用)

Sys* : 標準溶液 (SA を使用)

11.2.6 アミノ酸組成比及びペプチド含量の算出

標準溶液 SA と試料溶液 (AT1~AT3) を測定順序 (11.2.5.3 項) に従い測定する。得られた標準溶液の各アミノ酸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、試料溶液中各アミノ酸の濃度を求めて、被験物質中のアミノ酸組成比及びペプチド含量を求める。

アミノ酸組成比 =

$$\text{試料溶液中アミノ酸濃度 } (\mu\text{mol/mL}) / \text{試料溶液中 Ser 濃度平均値 } (\mu\text{mol/mL})$$

ペプチド含量 (%) =

$$\frac{\text{試料溶液中 Ser 濃度 } (\mu\text{mol/mL}) \times (9 \times 10 \times 2.5) \times \text{分子量 } (1635.9)}{\text{被験物質採取量 } (\text{mg}) \times 10^3} \times 100$$

11.2.7 判定基準

アミノ酸組成比 :

Ser を 1.00 としたときの組成比 (平均値)

Gly :	2.55~3.45
Ala :	3.40~4.60
Arg :	0.85~1.15
Met :	0.85~1.15
Phe :	0.85~1.15
Leu :	0.85~1.15
Pro :	4.25~5.75

ペプチド含量 : 設定なし

11.3 純度試験 (HPLC 法)

11.3.1 移動相及び希釈液の調製

(SOP : BIO/250)

以下の割合で調製する。

11.3.1.1 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。

11.3.1.2 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。

11.3.1.3 希釈液の調製

酢酸 10 mL に超純水を加え 1000 mL とする。

11.3.2 試料溶液の調製 (n=3)

被験物質 10 mg を精密に量り、希釈液を加えて溶かし、正確に 20 mL とする。(500 µg/mL)

11.3.3 標準溶液の調製 (n=3)

11.3.2 項で調製した試料溶液を 1 mL 正確に量り、希釈液で正確に 100 mL とする (5 µg/mL)。

11.3.4 測定法

11.3.4.1 HPLC 測定条件

HPLC システム： 島津 10A
 検出器： 紫外吸光光度計 (島津 SPD-10A, 測定波長：215 nm, AUX レンジ：2.0 AU/V)
 カラム： Vydac C18 (5 µm, 250 × 4.6 mm i.d.; Grace Vydac)
 カラム温度 40°C
 試料温度： 5°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	85	15
30	55	45
30.01	85	15
40	85	15

流量： 1.0 mL/min
 注入量： 20 µL
 面積測定範囲： 30 分
 定量限界： 0.067%

11.3.4.2 システム適合性

測定時に下記項目を確認する。

1) システムの性能

システムの再現性の 1 回目で得られた MPS-390 のピークについて、シンメトリー係数が 2.0 以下、理論段数が 2000 段以上であれば適とする。

2) システムの再現性

標準溶液を上記の条件で 6 回繰り返して測定し、MPS-390 のピーク面積の RSD が 2.0%以下で

あれば適とする。

11.3.5 純度の算出

希釈液（ブランク）を1回測定後、標準溶液（5 µg/mL）及び試料溶液（500 µg/mL）を1回ずつ交互に測定する（各 n=3）。各々の相対保持時間及びピーク面積を LCsolution を用いて自動積分法により求め、各組み合わせごとに次式により個々の類縁物質量を算出する。なお、該当ブランクピーク及び定量限界以下のピークは計算から除く。

$$\text{被験物質中の個々の類縁物質の量 (\%)} = A_T / A_S$$

A_T ：試料溶液から得られた個々の類縁物質のピーク面積

A_S ：標準溶液から得られた MPS-390 のピーク面積

類縁物質の総量 (%) = 個々の類縁物質の量の合計 (%)

純度 (%) = 100 - 類縁物質の総量の平均値 (%)

11.3.6 判定基準

純度：95.0%以上

11.4 酢酸含量（HPLC 法）

11.4.1 移動相の調製

(SOP : BIO/250)

リン酸二水素ナトリウム 2.40 g を超純水約 800 mL に溶解する。この液にリン酸を加えて、pH を 2.8 に調整し、超純水で 1000 mL とする。この液をメンブランフィルター（OMNIPORE, 0.45 µm ; 日本ミリポア株式会社）で減圧ろ過し、超音波減圧処理により脱気する。

11.4.2 標準溶液の調製 (n=1)

酢酸を 1.0 g 精密に量り、超純水を加えて正確に 10 mL とする (100 mg/mL)。この液 1 mL を正確に量り、移動相を加えて正確に 100 mL とし、標準原液 R とする (1000 µg/mL)。続いて次表に従い、正確に標準溶液 (R-1~R-5) を調製する。標準溶液は、シリンジフィルター（クロマトディスク 13P, 0.45 µm ; ジーエルサイエンス株式会社）でろ過（初液 0.5 mL は廃棄）する。

標準溶液名	採取液	採取量 (mL)	使用液	調製量 (mL)	調製濃度* ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
R-5	標準原液 R	15	移動相	20	750
R-4	標準原液 R	10	移動相	20	500
R-3	標準原液 R	5	移動相	20	250
R-2	標準原液 R	2.5	移動相	20	125
R-1	標準原液 R	1	移動相	40	25

* 酢酸濃度として

11.4.3 試料溶液の調製 (n=3)

被験物質を約 10 mg (5~15 mg) に量り取り, 移動相を 2 mL 添加し, 試料溶液とする. 試料溶液は, シリンジフィルター (クロマトディスク 13P, 0.45 μm ; ジーエルサイエンス株式会社) でろ過 (初液 0.5 mL は廃棄) する.

11.4.4 測定法

11.4.4.1 HPLC 測定条件

HPLC システム: 島津 10A

検出器: 紫外吸光光度計 (島津 SPD-10A, 測定波長: 220 nm, AUX レンジ: 2.0 AU/V)

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

カラム温度: 30°C

試料温度: 20°C

移動相: 20 mmol/L H_3PO_4 - NaH_2PO_4 (pH2.8)

流量: 0.7 mL/min

注入量: 50 μL

測定時間: 10 分

11.4.4.2 システムの再現性

測定時に確認する. 標準溶液 R-3 (調製濃度: 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を上記の条件で 6 回繰り返して測定し, 酢酸のピーク面積の RSD が 2.0%以下であれば適とする.

11.4.5 酢酸含量の算出

標準溶液 (R-1~R-5) を 2 回ずつ測定後, 試料溶液 (n=3) を 1 回ずつ測定する. LCsolution を用いて自動積分法により解析し, 標準溶液のピーク面積 (Y) と酢酸の調製濃度 (X) より, 回帰直線 (最小二乗法による一次回帰直線式) を作成する. 傾き及び Y 切片から, 次式により酢酸含量 (% Acetate) を算出する.

$$\mu\text{g Acetate} = (\text{試料溶液の酢酸ピーク面積} - Y \text{ 切片}) / \text{傾き} \times 2$$

$$\text{酢酸含量 (\% Acetate)} = \mu\text{g Acetate} / \text{被験物質秤量値 (\mu\text{g})} \times 100$$

得られた3回の酢酸含量 (% Acetate) の平均値 (Mean) を求める。

11.4.6 判定基準

設定なし

11.5 水分 (電量滴定法)

11.5.1 試験方法

- 1) ハイドラナール・水-標準品 (力価 1) 約 1 g を用い、水分含量を 3 回測定し、回収率 (平均値) が $100.0 \pm 5.0\%$ 以内であることを確認する。
- 2) 水分測定装置のフラスコの栓を一定時間 (約 30 秒間) 開け、空の水分測定用秤量瓶をフラスコに投入し、START キーを押す。スターラーで陽極液を 180 秒間かき混ぜた後、自動滴定する。この操作を 3 回繰り返し、平均値をブランク値とする。
- 3) 空の水分測定用秤量瓶の質量を精密に量る。
- 4) 被験物質を約 0.01 g 量り、3) で質量を量った水分測定用秤量瓶に移す。
- 5) 被験物質の入った水分測定用秤量瓶の質量を精密に量る (グロス重量)。
- 6) 水分測定用秤量瓶をすばやく水分測定装置のフラスコに投入し、START キーを押す。この際、フラスコの栓を開放している時間が、ブランク測定の場合と同じ一定時間 (約 30 秒間) となるように留意する。
- 7) 陽極液を 180 秒間かき混ぜながら被験物質を溶かした後自動滴定して、被験物質の水分量を求める。
- 8) グロス重量及び空の水分測定用秤量瓶の質量をデータ処理装置 (KF-Win/ER) に入力し、投入された被験物質の質量 (g) を求める。
- 9) 3) ~8) の操作を 3 回繰り返す。

11.5.2 水分の算出

投入された被験物質の質量と水分量から、データ処理装置 (KF-Win/ER) より水分含量 (%) を求め、 $n=3$ の平均値を算出する。

11.5.3 判定基準

設定なし

12. 特性及び安定性の評価

特性では、性状、アミノ酸含量 (アミノ酸組成比及びペプチド含量)、純度試験で得られた結果が判定基準を満たしているとき、初期の品質が適合基準内であると判断する。判定基準のな

い項目については、参考値として分析結果を報告する。また、安定性では、性状、アミノ酸含量（アミノ酸組成比及びペプチド含量）、純度試験で得られた結果が判定基準を満たしているとき、被験物質が安定であると判断する。判定基準のない項目については、参考値として分析結果を報告する。

13. 測定結果の取扱い

水分含量はデータ処理装置（KF-Win/ER）から出力された値を用いる。ピーク面積、シンメトリー係数、理論段数、相対保持時間及びシステムの再現性はデータ処理装置（LCsolution）から出力された値を用いる。その他の計算には、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 桁小さい値で四捨五入する。

ピーク面積：	小数点以下 1 桁
アミノ酸組成比：	小数点以下 2 桁
ペプチド含量：	小数点以下 1 桁
シンメトリー係数：	小数点以下 1 桁
理論段数：	整数
相対保持時間：	小数点以下 3 桁
平均値：	計算に用いる数値と同桁
RSD：	小数点以下 1 桁
個々の類縁物質の量：	小数点以下 3 桁
類縁物質の総量：	小数点以下 2 桁
純度：	小数点以下 1 桁
酢酸含量：	小数点以下 1 桁
水分含量：	小数点以下 2 桁

14. 統計学的手法

統計学的検定は実施しない。

15. 参考資料

- 1) 山田聡美：AcPepA（MPS-390）の特性確認のためのバリデーション。株式会社新日本科学 安全性研究所，試験番号：SBL861-002，最終報告書，2011 年

16. 試験成績の報告

16.1 分析証明書

信頼性保証部門の確認を受け、その写し 1 部を試験委託者に提出する。

16.2 最終報告書

本試験の成績について、最終報告書の草案（和文）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

表

- (1) 性状（外観）
- (2) アミノ酸含量（アミノ酸組成比及びペプチド含量）
- (3) 純度試験（HPLC法）
- (4) 酢酸含量（HPLC法）
- (5) 水分（電量滴定法）

添付資料 信頼性保証陳述書

17. 記録及び資料の保存

記録及び資料は、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

被験物質に関する記録、資料

測定に関するチャート及び記録

分析証明書

最終報告書草案

最終報告書

その他、試験に関する資料

18. 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。

19. 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

山田 聡美 印 2011年 2月 4日
山田 聡美

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 印 2011年 2月 4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。

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 印 2011年 8月 12日
岡田 秀親

最終報告書

表 題： 調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度測定法バリデーション試験

試験番号： SBL861-005

試験責任者： 山田聡美

署名 山田 聡美 印 2011 年 01 月 01 日

株式会社新日本科学 安全性研究所

本報告書は表紙を含む 17 頁

目 次

要 約	4
1. 試験目的	5
2. 適用規則	5
3. 試験委託者	5
4. 試験施設	5
5. 試験日程	5
6. 材料及び方法	6
6.1 被験物質	6
6.2 試薬	6
6.3 測定機器	6
6.4 調製液の調製	6
6.5 移動相の調製	7
6.5.1 移動相 A の調製	7
6.5.2 移動相 B の調製	7
6.6 標準溶液の調製	7
6.7 試料溶液の調製	7
6.8 測定法	7
6.8.1 HPLC 測定条件	7
6.8.2 システムの再現性	8
6.9 分析法バリデーション	8
6.9.1 特異性	8
6.9.2 検量線の直線性	8
6.9.3 オートサンプラー内の安定性	8
6.9.4 真度及び併行精度	9
7. 測定結果の取扱い	9
8. 統計学的手法	10
9. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び 試験計画書に従わなかったこと	10
10. 結果及び考察	11
11. 試験責任者, その他の試験に従事した研究者全員の氏名及び業務分担	12
12. 記録及び資料の保存	12
別添 1	13
Figures	
1 調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度測定法における特異性	14
2 調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度測定法における検量線の直線性	15

Tables

1	調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度測定法における検量線の直線性	15
2	調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度測定法におけるオートサンプラー内の 安定性	16
3	調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度測定法における真度及び併行精度	17

要 約

生理食塩液を媒体とした調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度測定を実施するために、紫外部検出による HPLC 測定法のバリデーションを実施した。

- 1) 特異性では、生理食塩液について、得られたクロマトグラム上の MPS-390 の保持時間付近に妨害ピークがないことを確認した。
- 2) 検量線の直線性では、5~20 µg/mL の濃度範囲で検量線が原点を通る直線であると判定した。
- 3) オートサンプラー内の安定性では、測定試料がオートサンプラー（設定温度；5°C）内で 24 時間安定であることを確認した。
- 4) 真度及び併行精度では、生理食塩液を媒体とした 0.5, 1 及び 4 mg/mL 調製液を測定して得られた回収率について、平均値及び相対標準偏差を算出したところ、いずれも適合基準内であった。

以上の結果より、生理食塩液を媒体とした調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度測定に関して、本測定法の妥当性が確認された。

1. 試験目的

本試験の目的は、生理食塩液を媒体とした調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度測定を実施するために、紫外部検出による HPLC 測定法の妥当性を確認することである。

2. 適用規則

本試験は、適用規則なしとした。

3. 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

〒441-8124 愛知県豊橋市野依町字山中 19-14

TEL : 0532-46-7511

FAX : 0532-46-8940

委託試験責任者 :

岡田秀親

4. 試験施設

株式会社新日本科学 安全性研究所

〒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

5. 試験日程

試験開始日 : 2011 年 1 月 26 日

バリデーション実施日程 : 2011 年 1 月 27 日～2011 年 1 月 31 日

試験終了日 : 2011 年 3 月 3 日

6. 材料及び方法

6.1 被験物質

名称： AcPepA (MPS-390)
 提供者： 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
 分子量： 1635.9
 受領日： 2010年12月9日
 入手日： 2011年1月26日
 入手量： 1g
 保存条件： 冷凍，遮光
 保存場所： 被験物質保管所内冷凍室
 [受領日～移管日；2010年12月9日～2011年2月18日；
 -32.8～-26.3°C，許容範囲：-30～-10°C]
 取扱い： マスク，キャップ，手袋及び保護眼鏡を着用した。
 残余被験物質： すべて被験物質管理責任者に移管した。

6.2 試薬

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
生理食塩液	日本薬局方	株式会社大塚製薬工場
超純水	Milli-Q システムにて精製した水。	

6.3 測定機器

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

6.4 調製液の調製

調製濃度： 0.5, 1 及び 4 mg/mL
 換算係数： なし
 調製方法： 生理食塩液に必要量の被験物質を少量ずつ加えてスターラー攪拌して溶解させ，0.5, 1 及び 4 mg/mL 調製液を調製した。調製後，シリンジフィルター (MILLEX GV 0.22 µm, 日本ミリポア株式会社) でろ過した。なお，調製液は用時調製とした。

6.5 移動相の調製

以下の割合で調製した。

6.5.1 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した。

6.5.2 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した。

6.6 標準溶液の調製 (n=1)

AcPepA (MPS-390) 10 mg を精密に量り、超純水を加えて正確に 40 mL とした (標準原液 S : 250 µg/mL)。続いて次表に従い、正確に標準溶液 (S-1~S-5) を調製した。調製は用時調製とした。

標準溶液名	採取液	使用液	採取量 (mL)	調製量 (mL)	調製濃度 (µg/mL)
S-5	標準原液 S	超純水	4	50	20
S-4	標準原液 S	超純水	3	50	15
S-3	標準原液 S	超純水	2	50	10
S-2	標準原液 S	超純水	1.5	50	7.5
S-1	標準原液 S	超純水	1	50	5

6.7 試料溶液の調製 (n=3)

調製液をよく転倒混和した後、次表に従い、生理食塩液調製液を正確に採取し、超純水を用いて正確に試料溶液 T1~T3 を調製した。調製は用時調製した。

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 (µg/mL)
T1	0.5 mg/mL 調製液	1	超純水	50	10
T2	1 mg/mL 調製液	1	超純水	100	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。

6.8 測定法

6.8.1 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 × 4.6 mm i.d.; 株式会社ワイエムシイ)

カラム温度： 40°C
 試料温度： 5°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した。

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

流量： 1.0 mL/min
 注入量： 20 μL
 面積測定範囲： 5 分

6.8.2 システムの再現性

測定を開始時に、標準溶液 S-3（調製濃度：10 μg/mL）を 6 回繰り返して測定し、MPS-390 のピーク面積の相対標準偏差（RSD）が 2.0%以下であり適とした（実測値：0.1%）。

6.9 分析法バリデーション

6.9.1 特異性

生理食塩液を HPLC に 20 μL 注入した。得られたクロマトグラム上の MPS-390 の保持時間付近に妨害ピークがないことを確認した。

6.9.2 検量線の直線性

標準溶液（S-1～S-5）を 2 回ずつ測定後、LCsolution を用いて自動積分法により解析し、ピーク面積（Y）と MPS-390 の調製濃度（X）より、検量線（最小二乗法による一次回帰直線式）を作成した。相関係数（r）、傾き、Y 切片及び各濃度における回帰式からの相対偏差を求め、得られた検量線の r が 0.99 以上であり、各濃度における相対偏差が ±5.0%以内であるとき、その濃度範囲において直線性が適合基準内であると判定した。また、Y 切片は最低濃度の平均ピーク面積を 100.0%としたとき、原点（0）±10.0%以内であれば、検量線が原点を通る直線であると判定した。

$$\text{相対偏差 (\%)} = [(\text{ピーク面積} - Y \text{ 切片}) / \text{傾き} - \text{調製濃度}] / \text{調製濃度} \times 100$$

6.9.3 オートサンプラー内の安定性

標準溶液 S-3（調製濃度：10 μg/mL）をオートサンプラー（設定温度；5°C）内に保存し、シ

システムの再現性の測定の開始から約 24 時間 (24~26 時間) 後に 2 回測定した。システムの再現性 (測定開始時) で測定されたピーク面積の平均値を 100.0% とし、約 24 時間後の平均値が 100.0±5.0% 以内であるとき、標準溶液がオートサンプラー内で 24 時間安定であると判定した。また、試料溶液 T1 (調製濃度: 10 µg/mL) をオートサンプラー (設定温度; 5°C) 内に保存し、システムの再現性測定後及び約 24 時間 (24~26 時間) 後に 2 回ずつ測定した。システムの再現性測定後に測定されたピーク面積の平均値を 100.0% とし、約 24 時間後の平均値が 100.0±5.0% 以内であるとき、試料溶液がオートサンプラー内で 24 時間安定であると判定した。

6.9.4 真度及び併行精度

標準溶液 S-3 (調製濃度: 10 µg/mL) を 2 回測定後、試料溶液 T1~T3 (n=3) を 1 回ずつ測定した。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 MPS-390 濃度を求め、次式により調製液中の MPS-390 濃度を算出した。

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

調製液 3 回分の測定値から回収率 (%) をそれぞれ求め、平均値 (Mean) 及び RSD を算出した。回収率の平均値が 100.0±5.0% 以内であるとき、真度が適合基準内であると判定した。また、RSD が 5.0% 以下であるとき、併行精度が適合基準内であると判定した。

$$\text{回収率 (\%)} = \text{調製液中の MPS-390 濃度平均値 (mg/mL)} / \text{調製濃度 (mg/mL)} \times 100$$

$$\text{RSD (\%)} = \text{標準偏差 (SD)} / \text{Mean} \times 100$$

7. 測定結果の取扱い

検量線情報 (検量線の傾き、切片及び相関係数等)、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た。その後の計算には、表計算ソフト Excel を用いた。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した。

ピーク面積:	小数点以下 1 桁
濃度:	有効数値 5 桁
相対偏差:	小数点以下 1 桁
相関係数:	小数点以下 6 桁
回収率:	小数点以 1 桁
Mean:	計算前の数値と同じ桁数
RSD:	小数点以下 1 桁

8. 統計学的手法

統計学的検定は実施しなかった。

9. 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたこと

本試験では、予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかつたことはなかつた。

10. 結果及び考察

項目	算出する数値等	適合基準	結果	判定
特異性 (Figure 1)	生理食塩液の クロマトグラム	クロマトグラム上の MPS-390 の保持時間 付近に妨害ピークが ない.	クロマトグラム上の MPS-390 の保持時間付 近に妨害ピークがな かった.	適
検量線の 直線性 (Table 1, Figure 2)	相関係数 (r)	0.99 以上	0.999884	適
	相対偏差	±5.0%以内	-0.8%~2.1%	
	傾き	—	9477.86	
	Y 切片	—	-2600.42	
	Y 切片/最低濃 度平均ピーク面 積	原点 (0) ±10.0%以内	-5.7%	
オートサン プラー内の 安定性 (Table 2)	安定性 (初期値に対す る割合)	標準溶液 S-3 100.0±5.0%以内	97.4%	適
		試料溶液 T1 100.0±5.0%以内	98.8%	
真度及び 併行精度 (Table 3)	回収率の平均値 (真度)	100.0±5.0%以内	0.5 mg/mL : 103.5% 1 mg/mL : 103.8% 4 mg/mL : 103.9%	適
	回収率の RSD (併行精度)	5.0%以下	0.5 mg/mL : 0.9% 1 mg/mL : 1.1% 4 mg/mL : 0.3%	

以上の結果より, 生理食塩液を媒体とした調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度測定に関して, 本測定法の妥当性が確認された.