

## 略号及び用語の一覧

CV	Coefficient of variation	(変動係数)
DF	Defibrotide	(デフィブロタイド)
GLP	Good laboratory practice	
HPLC	High performance liquid chromatography	(高速液体クロマトグラフィー)
LLOQ	Lower limit of quantification	(定量下限)
MF	Matrix factor	(マトリックス効果)
PP	Polypropylene	(ポリプロピレン)
QAU	Quality Assurance Unit	(信頼性保証部門)
RE	Relative error	(相対誤差)
SD	Standard deviation	(標準偏差)
ULOQ	Upper limit of quantification	(定量上限)
UV	Ultraviolet	(紫外線)
r	Correlation coefficient	(相関係数)

## 目 次

	ページ
1. 要約.....	5
2. 試験関係者.....	5
3. 記録及び資料の保存.....	5
4. 試験目的.....	6
5. 適用規制.....	6
6. 試験委託者.....	6
7. 試験施設.....	6
8. 日程.....	6
9. 材料及び方法.....	7
9.1 使用機器及び材料.....	7
9.2 標準物質, プランク血漿及び試薬.....	7
9.3 標準溶液の調製.....	8
9.4 試薬溶液の調製.....	11
9.5 試料の調製.....	12
9.6 試料前処理法.....	14
9.7 測定条件.....	14
9.8 システム適合性.....	15
9.9 濃度の算出.....	15
9.10 分析バリデーション法.....	16
9.11 計算式.....	21
9.12 数値の取扱い.....	22
10. 統計学的手法.....	22
11. 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.....	22
12. 結果及び考察.....	23
12.1 特異性.....	23
12.2 直線性.....	23
12.3 真度及び精度.....	24
12.4 定量限界.....	24
12.5 希釈再現性.....	25
12.6 回収率.....	25
12.7 マトリックス効果.....	25
12.8 キャリーオーバー.....	25
12.9 オートサンプラー中での安定性.....	26

12.10	室温保存安定性.....	26
12.11	凍結保存安定性.....	26
12.12	凍結融解安定性.....	26
12.13	標準溶液安定性.....	27

#### Figures

Figure 1-1	Chromatograms of Defibrotide in blank samples prepared using male human plasma and LLOQ sample (10 µg/mL).....	28
Figure 1-2	Chromatograms of Defibrotide in blank samples prepared using female human plasma and LLOQ sample (10 µg/mL).....	29

#### Tables

Table 1	Selectivity of Defibrotide in human plasma.....	30
Table 2	Linearity of calibration curves for determination of Defibrotide in human plasma.....	31
Table 3	Intraday reproducibility for Defibrotide in human plasma.....	32
Table 4	Interday reproducibility for Defibrotide in human plasma.....	33
Table 5	Dilution reproducibility for Defibrotide in human plasma.....	34
Table 6	Recovery of Defibrotide from human plasma.....	35
Table 7	Matrix effect of Defibrotide in human plasma.....	36
Table 8	Carry over test of Defibrotide in the SB sample just after analysis of the ULOQ sample....	37
Table 9	Autosampler stability of Defibrotide in human plasma extract stored at 4°C.....	38
Table 10	Stability of Defibrotide in human plasma stored at room temperature.....	39
Table 11	Stability of Defibrotide in human plasma stored at -20°C.....	40
Table 12	Stability of Defibrotide in human plasma stored at -80°C.....	41
Table 13	Freeze and thaw stability at -80°C.....	42
Table 14	Standard solution stability of Defibrotide at room temperature.....	43
Table 15	Standard solution stability of Defibrotide at -20°C or 4°C.....	44
	信頼性保証陳述書.....	45

## 1. 要約

HPLC 法によるヒト血漿中デフィブロタイド (DF) の濃度測定法の信頼性を保証することを目的とし、濃度測定法のバリデーション試験を実施した。

6 個体 (男女各 3 個体) 分のヒトブランク血漿を用いて、クロマトグラム上の DF の保持時間付近における妨害の有無について検討した結果、DF の保持時間付近にピークが確認されたが定量下限の 20% 以下であり、定量には影響しないと判断した。

血漿中濃度範囲 10~300 µg/mL の、検量線の直線性の検討では、判定基準を満たした上で、より軽い重み付け 1/X を選択した。

再現性の検討で得られた RE 及び CV は、いずれも判定基準 [CV は定量下限 (LLOQ) で 20% 以内、その他で 15% 以内及び RE は LLOQ で ±20% 以内、その他で ±15% 以内] を満たした。

特異性、直線性、日内及び日間再現性の結果から、判定基準を満たした検量線の最低濃度 (10 µg/mL) を LLOQ とし、最高濃度 (300 µg/mL) を ULOQ とした。

希釈再現性用試料 (500 µg/mL) をブランク血漿で 5 及び 20 倍希釈した希釈再現性用試料 (25, 100 µg/mL) の CV 及び RE は、いずれも判定基準 (CV は 15% 以内、RE は ±15% 以内) を満たし、20 倍までの希釈再現性が確認された。

血漿からの DF の回収率の平均値は 30, 140 及び 225 µg/mL においてそれぞれ 110.7, 85.8% 及び 79.7% であった。

キャリーオーバーの評価では、DF は判定基準 (LLOQ 試料のピーク面積の 20% 未満) を満たした。

安定性については、4°C のオートサンプラー内で保存したとき、DF は抽出液中で 48 時間安定であることを確認した。また、血漿中 DF は室温で 24 時間、また、-70°C 以下での凍結融解操作 3 回まで、血漿中冷凍下 (許容範囲: -30°C~-10°C/-70°C 以下) で 1 ヶ月 (32 日間) 安定であることを確認した。

標準原液は、室温 (許容範囲: 1°C~30°C) で 24 時間、冷凍 (許容範囲: -30°C~-10°C) で 1 ヶ月 (35 日) 間安定であることを確認した。

標準溶液は、室温 (許容範囲: 1°C~30°C) で 24 時間、冷蔵 (許容範囲: 1°C~8°C) で 1 ヶ月 (35 日) 間安定であることを確認した。

以上の結果から、ヒト血漿中 DF の濃度測定法の信頼性が確認されたと判断する。

## 2. 試験関係者

試験責任者:

分析担当者:



## 3. 記録及び資料の保存

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。

試験計画書

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

最終報告書

その他、試験に関するすべての資料

保存受託施設：



4. 試験目的

HPLC 法によるヒト血漿中 DF の濃度測定法の信頼性を保証することを目的として実施した。また、ヒト血漿中 DF の安定性を確認した。

5. 適用規制

本試験は、GLP 非適用とするが、以下の基準に従って実施した。また、試験計画書、生データ及び最終報告書間の整合性について、QAU による信頼性調査が行われた。

- ・「申請資料の信頼性の基準」(薬事法施行規則第 43 条：平成 17 年 3 月 23 日厚生労働省令第 37 号)

6. 試験委託者

公立大学法人福島県立医科大学

臨床腫瘍センター 小児腫瘍部門

〒960-1295 福島県福島市光が丘 1 番地

TEL：024-547-1111

FAX：024-547-1089

研究代表者：

菊田 敦

7. 試験施設



8. 日程

試験開始日： 2013 年 1 月 22 日

測定操作開始日： 2013 年 1 月 24 日

測定操作終了日： 2013年3月5日  
 試験終了日（最終報告書作成日）：2013年3月22日

## 9. 材料及び方法

### 9.1 使用機器及び材料

名称	型式	製造者又は販売業者
HPLC システム	Waters 2690	日本ウォーターズ株式会社
UV-検出器	Waters 2487	
データ処理システム	Empower	
超純水製造装置	Milli-Q Gradient-A10	メルク株式会社
冷却遠心機	MX305	株式会社トミー精工
	LX-120	
天秤	AX205	メトラー・トレド株式会社
	AT261	
上皿天秤	PM480	
pH メーター	F-22	株式会社堀場製作所
可変容量型ピペット	Finnpipette	Thermo Fisher Scientific Inc.
可変容量型ディスペンサー	Multipette	Eppendorf AG
冷蔵室	LVL1L	ダイキン工業株式会社
冷凍室	LVF4JB	
超低温フリーザー	MDF-793AT	三洋電機株式会社
デシケーター	TDC-285-SA	トーリ・ハン株式会社
フィルター	セントリカット 超ミニ (0.45 µm)	倉敷紡績株式会社

### 9.2 標準物質、ブランク血漿及び試薬

#### 9.2.1 標準物質

名称： Defibrotide CRM (デフィブロタイド, DF)  
 提供者： Gentium SpA  
 受領日： 2012年10月31日  
 ロット番号： CRM346/00/12  
 受領量： 500 mg × 2本  
 分子量： 15.6 KDa (±2 KDa)  
 使用期限： 2013年5月  
 保存条件： 室温, 防湿  
 保存場所： 被験物質保管室1 デシケーター6(室温, 許容範囲:1°C~30°C)

保存期間及び実測保存温度：

受領日	最終使用日	保存温度 (実測値)
2012年10月31日	2013年3月1日	19.7°C~22.8°C

取扱い： 手袋, キャップ, 保護メガネ及びマスクを着用した。

### 9.2.2 ブランク血漿

種： ヒト (男女)  
 抗凝固剤： クエン酸ナトリウム  
 供給元： SNBL PBC  
 保存条件： 冷凍-20°C (許容範囲： -30°C~-10°C)

### 9.2.3 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
メタノール		
28%アンモニア水	試薬特級	
ギ酸 (98.0%)		
酢酸アンモニウム		
超純水	蒸留水を超純水製造装置で精製した。	

## 9.3 標準溶液の調製

検量線用標準原液 (A-1 及び A-2) 及び標準溶液とバリデーション用標準原液 (B-1 及び B-2) 及び標準溶液はそれぞれ別途に調製した。

### 9.3.1 標準原液

下記のとおり, 標準物質を溶媒に溶かして標準原液 (A-1, A-2, B-1 及び B-2) を調製した。

標準物質名： DF  
 秤取量： 50 mg  
 調製量： 5 mL  
 調製濃度： 10 mg/mL (A-1 及び B-1)  
 使用溶媒： 超純水  
 使用器具： ガラス製メスフラスコ  
 保存条件： 遮光, 冷凍 (許容範囲： -30°C~-10°C)  
 保存場所： 冷凍室 4 (標準溶液安定性用以外の A-1 は用時調製した)

保存期間及び実測保存温度 (B-1) :

調製日	最終使用日	保存温度 (実測値)
2013年2月7日	2013年2月15日	-22.4°C~-14.2°C

標準原液 No.	使用標準原液 No.	標準原液量 (mL)	調製量 (mL)	調製濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
A-2	A-1	1	10	1000

使用溶媒： 超純水  
 使用器具： ガラス製メスフラスコ及びホールピペット  
 保存条件： 遮光, 冷凍 (許容範囲: -30°C~-10°C)  
 保存場所： 冷凍室4 (A-2 は使用時に調製した)

標準原液 No.	使用標準原液 No.	標準原液量 (mL)	調製量 (mL)	調製濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
B-2	B-1	1	10	1000

使用溶媒： 超純水  
 使用器具： ガラス製メスフラスコ及びホールピペット  
 保存条件： 遮光, 冷凍 (許容範囲: -30°C~-10°C)  
 保存場所： 冷凍室4

保存期間及び実測保存温度 (B-2) :

調製日	最終使用日	保存温度 (実測値)
2013年2月7日	2013年2月12日	-22.4°C~-14.7°C

## 9.3.2 標準溶液

次表のとおり, 標準原液を希釈し, 検量線用, バリデーション用及び安定性用標準溶液を調製した.

## 検量線用標準溶液

検量線用標準溶液 No.	使用標準原液 No.	標準原液量 ( $\mu\text{L}$ )	溶媒添加量 ( $\mu\text{L}$ )	調製濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
SS-7	A-2	300	700	300
SS-6	A-2	250	750	250
SS-5	A-2	150	850	150
SS-4	A-2	100	900	100
SS-3	A-2	50	950	50
SS-2	A-2	25	975	25
SS-1	A-2	10	990	10



使用溶媒： 50 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 9.0)  
 使用器具： 可変容量型ピペット, 可変容量型ディスペンサー及び PP 製チューブ  
 保存条件： 遮光, 冷蔵 (許容範囲: 1°C~8°C)  
 保存場所： 冷蔵室 3  
 保存期間及び実測保存温度：

調製日	最終使用日	保存温度 (実測値)
2013年1月24日	2013年2月4日	1.7°C~5.9°C
2013年2月7日	2013年2月16日	1.8°C~5.4°C
2013年3月1日	2013年3月4日	1.9°C~5.1°C

## バリデーション用標準溶液

バリデーション用標準溶液 No.	使用標準原液 No.	標準原液量 (μL)	溶媒添加量 (μL)	調製濃度 (μg/mL)
VS-5	B-2	300	700	300
VS-4	B-2	225	775	225
VS-3	B-2	140	860	140
VS-2	B-2	30	970	30
VS-1	B-2	10	990	10

使用溶媒： 50 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 9.0)  
 使用器具： 可変容量型ピペット, 可変容量型ディスペンサー及び PP 製チューブ  
 保存条件： 遮光, 冷蔵 (許容範囲: 1°C~8°C)  
 保存場所： 冷蔵室 3  
 保存期間及び実測保存温度：

調製日	最終使用日	保存温度 (実測値)
2013年1月24日	2013年2月4日	1.7°C~5.9°C
2013年2月7日	2013年2月12日	1.8°C~5.0°C

## 安定性用標準溶液

安定性用標準溶液 No.	使用標準原液 No.	標準原液量 (μL)	溶媒添加量 (μL)	調製濃度 (μg/mL)
STS-2	B-1	450	550	4500
STS-1	B-1	60	940	600

使用溶媒： 50 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 9.0)

使用器具： 可変容量型ピペット，可変容量型ディスペンサー及び PP 製チューブ

保存条件： 遮光，冷蔵（許容範囲：1°C～8°C）

保存場所： 冷蔵室 3

保存期間及び実測保存温度：

調製日	最終使用日	保存温度（実測値）
2013年1月24日	2013年1月31日	1.7°C～5.0°C
2013年2月7日	2013年2月16日	1.8°C～5.4°C

#### 9.4 試薬溶液の調製

試薬溶液は下記の割合で調製した。使用期限は調製後，室温で2週間とし，期限内に使用した。

##### 9.4.1 25 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

酢酸アンモニウム（分子量 77.08）1.93 g を超純水に溶かし，全量を 1000 mL とした。

##### 9.4.2 50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

酢酸アンモニウム（分子量 77.08）3.85 g を超純水に溶かし，全量を 1000 mL とした。

##### 9.4.3 50 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液（pH 9.0）

50 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液に 28%アンモニア水を加えて pH 9.0 に調整した。

##### 9.4.4 0.1%ギ酸含有アセトニトリル

アセトニトリルにギ酸（98.0%）1 mL を加えて全量を 1000 mL とした。

##### 9.4.5 移動相 A：25 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液（pH 9.0）

25 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液に 28%アンモニア水を加えて pH 9.0 に調整した。

##### 9.4.6 移動相 B：50 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液（pH 9.0）／アセトニトリル／メタノール（50/45/5，v/v/v）

50 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液（pH 9.0）500 mL，アセトニトリル 450 mL 及びメタノール 50 mL を混合した。

##### 9.4.7 移動相 C：1%アンモニア水

超純水に 28%アンモニア水 35.7 mL を加えて全量を 1000 mL とした。

##### 9.4.8 移動相 D：0.1%ギ酸含有アセトニトリル／超純水（9/1，v/v）

0.1%ギ酸含有アセトニトリル 900 mL 及び超純水 100 mL を混合した。

## 9.5 試料の調製

## 9.5.1 検量線用試料

次表のとおり、PP製チューブにブランク血漿をとり、検量線用標準溶液「ブランク試料 (SB) は 50 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 9.0)」を加えて十分に攪拌して検量線用試料を即時調製した。

検量線用試料 No.	使用標準溶液 No.	標準溶液量 ( $\mu\text{L}$ )	ブランク血漿量 ( $\mu\text{L}$ )	血漿中濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
S7	SS-7	50	50	300
S6	SS-6	50	50	250
S5	SS-5	50	50	150
S4	SS-4	50	50	100
S3	SS-3	50	50	50
S2	SS-2	50	50	25
S1	SS-1	50	50	10
ブランク試料 (SB)	*	50	50	-

\* : 50 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 9.0)

## 9.5.2 バリデーション用試料

次表のとおり、PP製チューブに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十分に攪拌してバリデーション用試料を調製した。

バリデーション用 試料 No.	使用標準溶液 No.	標準溶液量 ( $\mu\text{L}$ )	ブランク血漿量 ( $\mu\text{L}$ )	血漿中濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
V5	VS-5	50	50	300
V4	VS-4	50	50	225
V3	VS-3	50	50	140
V2	VS-2	50	50	30
V1	VS-1	50	50	10

## 9.5.3 希釈再現性用試料

次表のとおり、PP製チューブに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十分に攪拌して希釈再現性用試料 (DS, n=1) を調製した。

希釈再現性用試料 No.	使用標準原液 No.	標準原液量 ( $\mu\text{L}$ )	ブランク血漿量 ( $\mu\text{L}$ )	血漿中濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
DS	B-1	50	950	500

希釈再現性用試料 (DS) を次表のとおり PP 製チューブにブランク血漿で希釈する操作を 5 回繰り返し、希釈再現性用試料 (DV1 及び DV2, 各濃度  $n=5$ ) を調製した。

希釈再現性用 試料 No.	使用試料 No.	試料採取量 ( $\mu\text{L}$ )	ブランク 血漿量 ( $\mu\text{L}$ )	希釈倍率	血漿試料中濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
DV2	DS	20	80	5	100
DV1	DV2	25	75	20	25

#### 9.5.4 回収率用試料

VS-2~VS-4 (各濃度  $n=3$ )  $50 \mu\text{L}$  に、 $50 \text{ mmol/L}$  酢酸アンモニウム緩衝液 ( $\text{pH } 9.0$ )  $450 \mu\text{L}$  を加えて十分に攪拌して回収率用試料 (R1~R3) とした。

#### 9.5.5 安定性用試料

次表のとおり、PP 製チューブにブランク血漿をとり、安定性用標準溶液を加えて十分に攪拌して安定性用試料を調製した。安定性試料は、必要に応じて調製濃度を変更せずに調製量を変更した。安定性用試料は、 $200 \mu\text{L}$  ずつ PP 製チューブに分取し保存した。

安定性用試料 No.	使用標準溶液 No.	標準溶液量 ( $\mu\text{L}$ )	ブランク血漿量 ( $\mu\text{L}$ )	血漿中濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
ST2	STS-2	50	950	225
ST1	STS-1	50	950	30

#### 9.5.6 マトリックス効果確認用試料

次表のとおり、男女各 3 個体のブランク血漿 ( $50 \mu\text{L}$ ) について、PP 製チューブを用い、標準溶液及び  $50 \text{ mmol/L}$  酢酸アンモニウム緩衝液 ( $\text{pH } 9.0$ ) を加え、遠心ろ過「セントリカット超ミニ ( $0.45 \mu\text{m}$ ) ,  $5000\times$ ,  $4^\circ\text{C}$ ,  $5 \text{ min}$ ] し、マトリックス効果確認用試料とした。

マトリックス効果 確認用試料 No.	使用標準 溶液 No.	標準溶液量 ( $\mu\text{L}$ )	ブランク 血漿量 ( $\mu\text{L}$ )	50 mmol/L 酢酸アンモニウム 緩衝液 (pH 9.0) 量 ( $\mu\text{L}$ )	血漿中濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
ME2	VS-4	50	50	400	225
ME1	VS-2	50	50	400	30

### 9.5.7 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調製した。調製にはPP製チューブを使用した。

標準溶液安定性用 試料 No.	使用標準 溶液 No.	標準溶液量 ( $\mu\text{L}$ )	50 mmol/L 酢酸アンモニウム 緩衝液 (pH 9.0) 量 ( $\mu\text{L}$ )	試料中濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
SST3	SS-7*	50	450	300
SST2	SS-7	50	450	300
SST1	SS-1	50	450	10

\* : SS-7 は調製直後または保存後の A-1 から希釈した。

### 9.6 試料前処理法

- 1) 検量線用試料 (SB 及び S1~S7) 及びバリデーション用試料 (V1~V5) 100  $\mu\text{L}$  に 50 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 9.0) 400  $\mu\text{L}$  を加えて十分に攪拌した。  
安定性用試料及び希釈再現性用試料 (50  $\mu\text{L}$ ) に 50 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 9.0) 450  $\mu\text{L}$  を加えて十分に攪拌した。
- 2) 遠心ろ過「セントリカット超ミニ (0.45  $\mu\text{m}$ ) , 5000 $\times$ g, 4 $^{\circ}\text{C}$ , 5 min」し、そのろ液を HPLC 測定用試料とした。

### 9.7 測定条件

#### 9.7.1 HPLC 条件

分析カラム :	Waters X Bridge C8 (3.5 $\mu\text{m}$ , 2.1 mm I.D. $\times$ 100 mm, Waters 株式会社)
ガードカラム :	Waters X Bridge C8 (3.5 $\mu\text{m}$ , 2.1 mm I.D. $\times$ 10 mm, Waters 株式会社)
移動相 A :	25 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 9.0)
移動相 B :	50 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 9.0) / アセトニトリル / メタノール (50/45/5, v/v/v)
移動相 C :	1%アンモニア水

移動相 D : 0.1% ぎ酸含有アセトニトリル / 超純水 (9/1, v/v)  
 ニードル洗浄液 : 移動相 C  
 測定波長 : 260 nm  
 タイムプログラム : グラジエント (以下の容量比で行った)

時間 (min)	流速 (mL/min)	移動相 A (%)	移動相 B (%)	移動相 C (%)	移動相 D (%)
0.00	0.4	100	0	0	0
4.00	0.4	95	5	0	0
4.50	0.4	40	60	0	0
6.00	0.5	30	70	0	0
7.00	0.5	0	0	0	100
10.00	0.5	0	0	0	100
10.50	0.5	0	0	100	0
16.00	0.5	0	0	100	0
16.80	0.5	0	100	0	0
17.00	0.5	0	100	0	0
17.10	0.5	100	0	0	0
20.00	0.4	100	0	0	0

カラム恒温槽設定温度 : 50°C  
 オートサンプラー設定温度 : 4°C  
 注入量 : 20 µL  
 測定時間 : 20 分  
 測定間隔 : 5 分

#### 9.8 システム適合性

各測定日の測定前に下記の試料を測定し、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した。

測定試料 : 検量線用試料 (S1) 又は標準溶液安定性用試料 (SST1) , n=1  
 測定回数 : 1 回

#### 9.9 濃度の算出

測定ごとに検量線用試料を分析法により測定した。ブランク試料により、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を用いて、最小二乗法による一次回帰直線式から検量線 ( $Y = aX + b$ ,  $Y =$  ピーク面積,  $X =$  濃度) を作成した。ブランク試料は検量線の回帰分析には用いなかった。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当初の濃度水準数の 75%以上かつ最低 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した。バリデーション用試料、希釈再現性用試料及び安定性用試料を測定し、それらのピーク面積を検量線に当てはめて測定値を算出した。

検量線用試料	ブランク試料及び S1～S7, 各濃度 n=1
重み付け	1/X
算出値	r, 各試料の逆回帰値及び RE
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%以下
r	0.99 以上
RE	LLOQ で±20%以内, その他の濃度で±15%以内

## 9.10 分析バリデーション法

### 9.10.1 特異性

男女各 3 個体のブランク血漿を用い、クロマトグラム上の標準物質の保持時間付近における妨害ピークの有無について検討した。特異性対照試料として定量下限試料 (S1 試料) を測定した。

測定試料	ブランク試料 (各個体 n=1, 男女各 3 個体) 及び S1 試料
算出値	測定対象物質のピーク面積
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%以下

### 9.10.2 検量線

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した。検量線用試料の測定により得られたピーク面積を用いて、最小二乗法による一次回帰直線式から検量線 ( $Y = aX + b$ , Y: ピーク面積, X: 濃度) をセットごとに作成した。ブランク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した。重み付けは 1, 1/X, 1/X<sup>2</sup> について検討し、判定基準を満たした上で、より軽い重み付け 1/X を採用した。また、逆回帰値の CV を算出し、評価した。

測定試料 (1 セット)	検量線用試料 (SB 及び S1~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 RE 各濃度における逆回帰値の平均値, SD 及び CV
判定基準	
r	0.99 以上
RE	LLOQ で±20%以内, その他の濃度で±15%以内
CV	LLOQ で 20%以内, その他の濃度で 15%以内

#### 9.10.3 真度及び精度 (日内及び日間再現性)

検量線用試料及びバリデーション用試料を分析法により同一日内で測定した。バリデーション用試料を分析して得られたピーク面積を検量線に当てはめ測定値を算出し、日内再現性を評価した。この分析を更に2日間行い、日間再現性を評価した。

測定試料 (1 セット)	検量線用試料 (SB 及び S1~S7, 各濃度 n=1) 及び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, 濃度ごとの測定値の平均値, SD, CV 及び平均値の RE (1 日目の結果から評価した)
日間再現性	各バリデーション用試料の測定値, 濃度ごとの測定値の平均値, SD, CV 及び平均値の RE (3 日間の結果から評価した)
判定基準	
RE	LLOQ で±20%以内, その他の濃度で±15%以内
CV	LLOQ で 20%以内, その他の濃度で 15%以内

#### 9.10.4 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 を判断した。

#### 9.10.5 希釈再現性

検量線用試料及び希釈再現性用試料を分析法により測定した。希釈再現性用試料を分析して得られたピーク面積を検量線に当てはめ, 測定値を算出し, 希釈再現性を評価した。



測定試料	検量線用試料 (SB 及び S1~S7, 各濃度 n=1) 及び希釈再現性用試料 (DV1 及び DV2), 各濃度 n=5
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平均値, SD, CV 及び平均値の RE
判定基準	
RE	±15%以内
CV	15%以内

#### 9.10.6 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 n=3 ずつ調製し, 測定を行った. 標準物質のピーク面積を求め, 回収率を評価した.

測定試料	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
算出値	各濃度の回収率用試料のピーク面積の平均値, 各濃度のバリデーション用試料のピーク面積の平均値, 各濃度の回収率 (%)
判定基準	判定基準を設けなかった.

#### 9.10.7 マトリックス効果

マトリックス効果確認用試料及び回収率用試料を HPLC に注入した. 各試料の測定から得られたピーク面積から MF を算出し, マトリックス効果を評価した.

測定試料	マトリックス効果確認用試料 (ME1 及び ME2, 各濃度男女各 3 個体ずつ) 回収率用試料 (R1 及び R3, 各濃度 n=3)
算出値	各マトリックス効果確認用試料のピーク面積 各回収率用試料のピーク面積, その平均値, MF 及び MF の CV
判定基準	
CV	15%以内

#### 9.10.8 キャリーオーバー

検量線用試料及び ULOQ 試料, SB 試料を前処理し, 下表の順で注入した.

S7 試料測定直後のブランク試料の測定で得られたピーク面積と S1 試料の測定で得られたピーク面積を比較してキャリーオーバーを評価した.

測定試料	検量線用試料 (SB 及び S1~S7, 各濃度 n=1) 及び ULOQ 試料 (n=3), SB 試料 (n=3)
注入順序	SB 試料→S1~S7 試料→S7 試料→SB 試料→S7 試料→SB 試料→S7 試料→SB 試料
算出値	S7 測定後の SB 及び S1 試料のピーク面積
判定基準	
キャリーオーバー	標準物質: 20%以下

#### 9.10.9 オートサンプラー中での安定性

検量線用試料及びバリデーション用試料を分析法により測定した。その後、バリデーション試料をオートサンプラー中で保存して測定した。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、安定性を評価した。

保存条件	オートサンプラー中 (4°C)
測定試料	検量線用試料 (SB 及び S1~S7, 各濃度 n=1) 及び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 48 時間以上保存後
算出値	各バリデーション用試料の測定値, 調製直後試料については濃度ごとの平均値, 保存試料については濃度ごとの平均値及び安定性 (%)
判定基準	
安定性	100±15%以内

#### 9.10.10 室温保存安定性

検量線用試料及び安定性用試料を分析法により測定した。安定性用試料を分析して得られたピーク面積を検量線に当てはめ、測定値を算出し、安定性を評価した。

保存条件	室温 (許容範囲: 1°C~30°C) 保存場所: 臨床試料前処理室 1 保存期間 2013 年 2 月 15 日~2013 年 2 月 16 日, 実測温度: 17.7°C~21.3°C
測定試料	検量線用試料 (SB 及び S1~S7, 各濃度 n=1) 及び安定性用試料 (ST1 及び ST2), 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	各安定性用試料の測定値, 調製直後試料については濃度ごとの平均値, 保存試料については濃度ごとの平均値及び安定性 (%)
判定基準	
安定性	100±15%以内

## 9.10.11 凍結保存安定性

検量線用試料及び安定性用試料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を検量線に当てはめ、測定値を算出し、安定性を評価した。

保存条件	冷凍-20°C (許容範囲: -30°C~-10°C) 及び冷凍-80°C (許容範囲: -70°C以下) 保存場所: 冷凍室 4 保存期間 2013年1月31日~2013年3月4日, 実測温度: -22.8°C~-14.2°C 保存場所: 超低温フリーザー5 保存期間 2013年1月31日~2013年3月4日, 実測温度: -91.5°C~-74.7°C
測定試料	検量線用試料 (SB 及び S1~S7, 各濃度 n=1) 及び安定性用試料 (ST1 及び ST2), 各濃度 n=3
測定頻度	調製直後, 2週間, 1ヵ月以上保存後
算出値	各安定性用試料の測定値, 調製直後試料については濃度ごとの平均値, 保存試料については濃度ごとの平均値及び安定性 (%)
判定基準	
安定性	100±15%以内

## 9.10.12 凍結融解安定性

検量線用試料及び安定性用試料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を検量線に当てはめ、測定値を算出し、安定性を評価した。

保存条件	冷凍-80°C (許容範囲: -70°C以下) 保存場所: 超低温フリーザー5 保存期間 2013年1月31日~2013年2月13日, 実測温度: -91.2°C~-80.7°C
融解条件	室温 (許容範囲: 1°C~30°C)
凍結融解操作	3回 (1回目は24時間以上, 2回目以降は12時間以上凍結保存した)
測定試料	検量線用試料 (SB 及び S1~S7, 各濃度 n=1) 及び安定性用試料 (ST1 及び ST2), 各濃度 n=3
測定頻度	調製直後, 凍結融解3回後
算出値	各安定性用試料の測定値, 調製直後試料については濃度ごとの平均値, 保存試料については濃度ごとの平均値及び安定性 (%)
判定基準	
安定性	100±15%以内

## 9.10.13 標準溶液安定性

標準原液 A-1 及び標準溶液 (SS-1 及び SS-7) を調製し、保存した。調製直後及び保存後の標準溶液 (SS-1 及び SS-7) 及び A-1 から希釈した SS-7 を用いて調製した標準溶液安定性用試料を測定した。標準溶液安定性用試料のピーク面積を算出し、安定性を評価した。

保存条件	室温（許容範囲：1°C～30°C）及び冷蔵 4°C（許容範囲：1°C～8°C）又は冷凍-20°C（許容範囲：-30°C～-10°C） 標準原液（A-1） 保存場所：試料前処理室 3 保存期間 2013 年 2 月 28 日～2013 年 3 月 1 日， 実測温度：20.3°C～22.7°C 保存場所：冷凍室 4 保存期間 2013 年 1 月 24 日～2013 年 2 月 28 日， 実測温度：-22.8°C～-14.2°C  標準溶液（SS-1～SS-7） 保存場所：試料前処理室 3 保存期間 2013 年 2 月 28 日～2013 年 3 月 1 日， 実測温度：20.3°C～22.7°C 保存場所：冷蔵室 3 保存期間 2013 年 1 月 24 日～2013 年 2 月 28 日， 実測温度：1.7°C～5.9°C
測定試料	標準溶液安定性用試料（SST1～SST3），各濃度 n=3
測定頻度	調製直後，室温 24 時間及び冷蔵又は冷凍 2 週間及び 1 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，平均値及び安定性（%）
判定基準	
安定性	100±15%以内

## 9.11 計算式

次の計算式から算出した。

## 1) 真度（相対誤差：RE）

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

## 2) 精度（変動係数：CV）

$$CV (\%) = SD / \text{平均値} \times 100$$