

3) 回収率 (%)

標準物質の回収率 (%) =

バリデーション用試料のピーク面積の平均値 / 回収率用試料のピーク面積の平均値 × 100

4) MF (%)

MF (%) = マトリックス効果確認用試料のピーク面積

/ 回収率用試料のピークの面積の平均値 × 100

5) キャリーオーバー

キャリーオーバー (%) = ブランク試料のピーク面積 / S1 試料のピーク面積 × 100

6) 安定性

安定性 (%) = 保存試料の測定値の平均値 / 調製直後試料の測定値の平均値 × 100

7) 標準溶液安定性

安定性 (%) = 保存試料のピーク面積の平均値 / 調製直後試料のピーク面積の平均値 × 100

9.12 数値の取扱い

数値は以下のとおり、四捨五入し、n桁で記載した。

数値	単位	記載方法
測定値及び平均値	μg/mL	有効数字 4 桁
r	-	小数点以下 4 桁
RE, CV, 回収率, 安定性及びキャリーオーバー	%	小数点以下 1 桁
SD	-	平均値の桁数に合わせる
MF 及び平均値	%	小数点以下 1 桁
ピーク面積及び平均値	μV·sec.	整数

10. 統計学的手法

統計学的手法は用いなかった。

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

1) 2013年1月29日に実施した日内再現性の測定において、2013年1月30日に測定途中でピーク形状を確認したところ異常が見られたため、途中で測定を中止した。新品のカラムに変更し再注入を実施し、その結果を採用した。

- 2) 2013年2月1日に実施した日間再現性項目の測定において、V-3及びV-5のサンプルのクロマトグラムに異常が見られた。V-3及びV-5のサンプルを再注入したところクロマトグラムに異常が見られなかった。従ってすべてのサンプルを再注入し、その結果を採用した。
- 3) 2013年2月9日に実施した希釈再現性項目の測定において、理論濃度25 µg/mL (20倍希釈)の判定基準を満たさなかった。理論濃度100 µg/mL (5倍希釈)の結果は判定基準を満たしていたが、不採用とした。あらためて希釈再現性を実施し、その結果を採用した。
- 4) 2013年2月16日に実施した室温保存安定性項目の測定において、検量線試料S2及びS7、バイアル番号13以降のクロマトグラムに異常が見られた。新品のカラムに変更し再注入を実施し、その結果を採用した。
- 5) 2013年2月28日に実施した標準溶液安定性項目の測定において、バイアル番号40のクロマトグラムに異常が見られた。確認のためバイアル番号40及び同濃度の2つのサンプルを再注入した。再注入した結果、全てのクロマトグラムに異常は見られず、問題はなかった。従ってバイアル番号40に関しては、再注入した結果を採用し、同濃度の他2つのサンプルは初回測定値を採用した。

1)～5) 採用した結果は、クロマトグラムに異常は見られず、全て判定基準を満たした。また、オートサンプラー内安定性が確認されている範囲内(48時間)で実施した。よって試験成績への影響は無かったと判断した。

その他、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はなかった。

12. 結果及び考察

12.1 特異性

6個体(男女各3個体)分のヒトブランク血漿を用いて特異性試料及びS1試料を調製し、クロマトグラム上のDF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。その結果、DFの保持時間付近にピークが確認されたが、LLOQの20%以下(12.2%以下)あり、定量には影響しないと判断した(Figure 1-1, 1-2及びTable 1)。

12.2 直線性

検量線の直線性について、結果の要約を以下に示す。検量線範囲10～300 µg/mLにおける1, 1/X及び1/X²の3とおりの重み付けを検討した結果、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(Table 2)。

重み付け	r	CV (%)	RE (%)
1	0.9994~0.9995	0.3~0.9	-4.5~56.0
1/X	0.9986~0.9987	0.3~0.9	-9.3~19.9
1/X ²	0.9960~0.9967	0.3~1.0	-11.2~8.4

12.3 真度及び精度

1) 日内再現性

日内再現性について、結果の要約を以下に示す。CV 及び RE とともに判定基準 (CV は LLOQ で 20%以内, その他の濃度で 15%以内及び RE は LLOQ で±20%以内, その他の濃度で±15%以内) を満たし, 日内再現性が確認された (Table 3)。

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	Mean ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	RE (%)
10	11.12	1.5	11.2
30	26.42	2.2	-11.9
140	128.0	1.1	-8.6
225	226.9	0.6	0.8
300	306.7	3.1	2.2

2) 日間再現性

日間再現性について、結果の要約を以下に示す。CV 及び RE とともに判定基準 (CV は LLOQ で 20%以内, その他の濃度で 15%以内及び RE は LLOQ で±20%以内, その他の濃度で±15%以内) を満たし, 日間再現性が確認された (Table 4)。

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	Mean ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	RE (%)
10	10.51	6.9	5.1
30	27.75	5.1	-7.5
140	127.7	2.1	-8.8
225	225.0	1.5	0.0
300	313.3	2.6	4.4

12.4 定量限界

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

12.5 希釈再現性

希釈再現性について、結果の要約を以下に示す。CV 及び RE とともに判定基準（CV は 15%以内及び RE は±15%以内）を満たし、5 倍及び 20 倍の希釈再現性が確認された（Table 5）。

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	Mean ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	RE (%)	希釈倍率
500	461.0	2.9	-7.8	20
	450.2	0.9	-10.0	5

12.6 回収率

回収率について、結果の要約を以下に示す。（Table 6）

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	回収率 (%)
30	110.7
140	85.8
225	79.7

12.7 マトリックス効果

男女各 3 個体のブランク血漿を用いたマトリックス効果の検討について、結果の要約を以下に示す。CV が判定基準（CV : 15%以内）を満たした（Table 7）。

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	Mean of MF (%)	CV of MF (%)
30	69.1	9.8
225	76.1	5.3

12.8 キャリーオーバー

キャリーオーバーについて、結果の要約を以下に示す。DF における S1 試料に対する SB 試料のピーク面積の割合は判定基準（20%以下）を満たした（Table 8）。

S1 試料の ピーク面積	SB 試料における ピーク面積	S1 試料に対する SB 試料のピーク 面積の割合 (%)
5724	0	0.0
	0	0.0
	0	0.0

12.9 オートサンプラー中での安定性

オートサンプラー中での安定性について、結果の要約を以下に示す。安定性の判定基準（ $100\pm 15\%$ 以内）を満たしたことから、前処理した測定実測試料中の DF は、 4°C のオートサンプラー中で 48 時間安定であることが確認された（Table 9）。

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	安定性 (%)	
	25 時間	48 時間
30	91.7	95.9
225	105.0	99.8

12.10 室温保存安定性

室温保存安定性について、結果の要約を以下に示す。安定性の判定基準（ $100\pm 15\%$ 以内）を満たしたことから、血漿中の DF は、室温で 24 時間安定であることが確認された（Table 10）。

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	安定性 (%)	
	6 時間	24 時間
30	99.8	85.5
225	98.4	94.9

12.11 凍結保存安定性

凍結保存安定性について、結果の要約を以下に示す。安定性の判定基準（ $100\pm 15\%$ 以内）を満たしたことから、血漿中の DF はともに、冷凍（許容範囲： $-30^{\circ}\text{C}\sim-10^{\circ}\text{C}$ 及び -70°C 以下）で 1 ヶ月間（32 日間）安定であることが確認された（Table 11 及び 12）。

許容範囲： $-30^{\circ}\text{C}\sim-10^{\circ}\text{C}$

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	安定性 (%)	
	2 週間 (15 日間)	1 ヶ月間 (32 日間)
30	101.7	100.6
225	91.9	87.5

許容範囲： -70°C 以下

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	安定性 (%)	
	2 週間 (15 日間)	1 ヶ月間 (32 日間)
30	104.4	95.2
225	92.6	88.8

12.12 凍結融解安定性

凍結融解安定性について、結果の要約を以下に示す。安定性の判定基準（ $100\pm 15\%$ 以内）を満

たしたことから、血漿中の DF は、 -70°C 及び室温での凍結融解操作 3 回まで安定であることが確認された (Table 13)。

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	安定性 (%)
	凍結融解操作 3 回
30	105.2
225	98.1

12.13 標準溶液安定性

標準溶液安定性について、結果の要約を以下に示す。安定性の判定基準 ($100\pm 15\%$ 以内) を満たしたことから、標準原液 (10 mg/mL) は、室温 24 時間及び冷凍で 1 ヶ月 (35 日間) 安定であり、標準溶液 (10 及び $300\text{ }\mu\text{g/mL}$) は、室温 24 時間及び冷蔵で 1 ヶ月 (35 日間) 安定であることが確認された (Table 14 及び 15)。

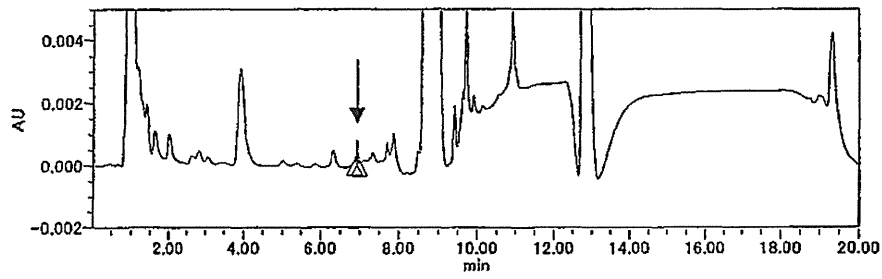
保存条件：室温

濃度	安定性 (%)
	24 時間
$10\text{ }\mu\text{g/mL}$	92.1
$300\text{ }\mu\text{g/mL}$	101.6
10 mg/mL	100.5

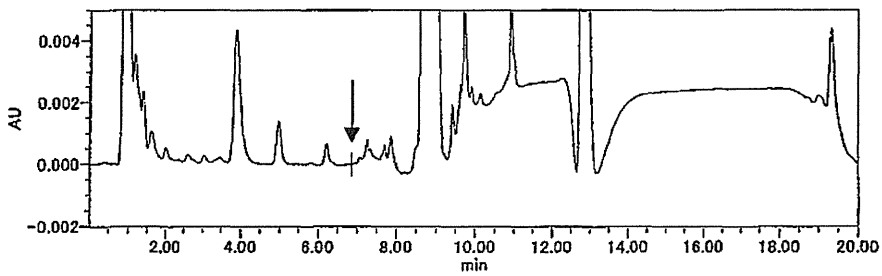
保存条件：10 及び $300\text{ }\mu\text{g/mL}$ は冷蔵， 10 mg/mL は冷凍

濃度	安定性 (%)	
	2 週間 (21 日)	1 ヶ月 (35 日)
$10\text{ }\mu\text{g/mL}$	99.1	95.7
$300\text{ }\mu\text{g/mL}$	99.8	96.1
10 mg/mL	104.7	96.8

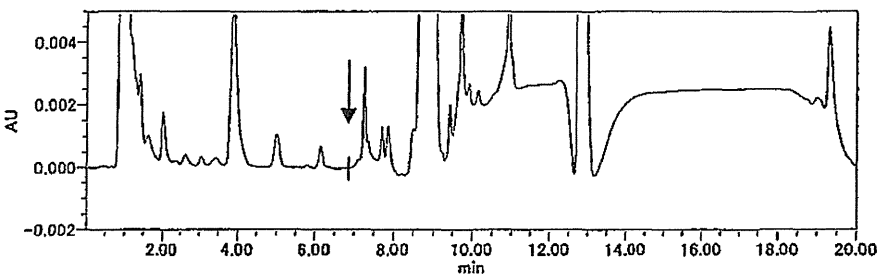
以上の結果から、本分析法はヒト血漿中 DF の濃度測定法に適していると判断する。



SampleName SB_M1

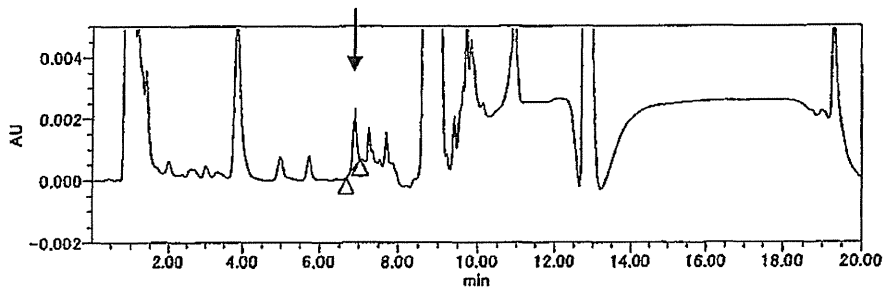


SampleName SB_M2



SampleName SB_M3

Defibrotide



SampleName S1_1

Figure 1-1 Chromatograms of Defibrotide in blank samples prepared using male human plasma and LLOQ sample (10 $\mu\text{g/mL}$)

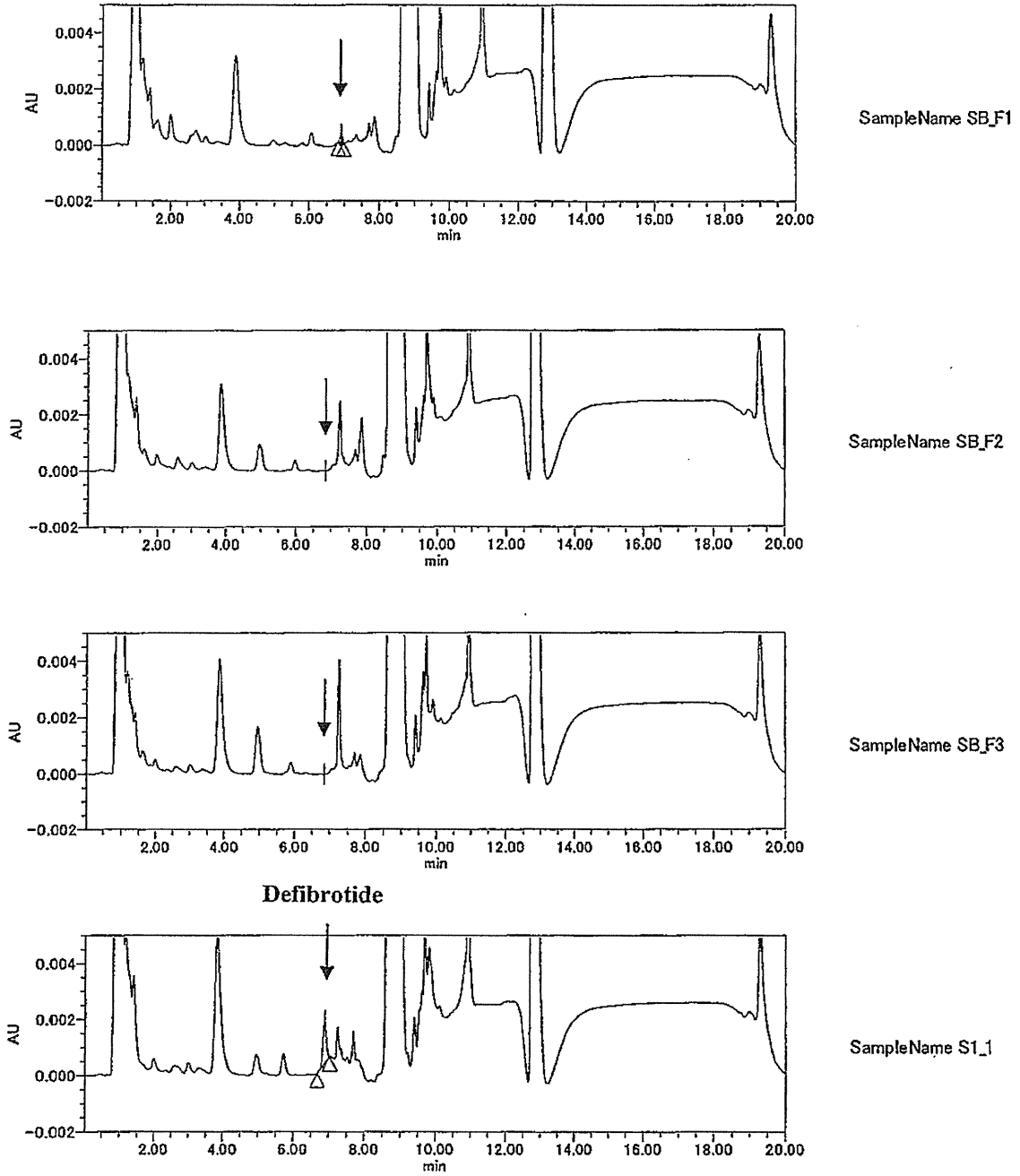


Figure 1-2 Chromatograms of Defibrotide in blank samples prepared using female human plasma and LLOQ sample (10 µg/mL)

Table 1 Selectivity of Defibrotide in human plasma

Compound	Sample name	Peak area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec.}$)	Ratio for selectivity (%)
Defibrotide	Male 1	1114	10.6
	Male 2	0	0.0
	Male 3	0	0.0
	Female 1	1282	12.2
	Female 2	0	0.0
	Female 3	0	0.0
	S1 (LLOQ)	10533	-

Ratio for selectivity (%) = Peak area of selectivity sample / peak area of calibration sample (S1:LLOQ) \times 100

LLOQ: Lower limit of quantification

-: Not calculated

Table 2 Linearity of calibration curves for determination of Defibrotide in human plasma

Weighting: 1

Calibration curve No.	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)							Correlation coefficient
	10	25	50	100	150	250	300	
1	15.49	26.68	48.18	95.47	145.6	249.2	304.3	0.9994
RE (%)	54.9	6.7	-3.6	-4.5	-2.9	-0.3	1.4	
2	15.60	26.43	48.02	96.41	145.0	248.9	304.6	0.9994
RE (%)	56.0	5.7	-4.0	-3.6	-3.3	-0.4	1.5	
3	15.51	26.21	47.83	95.91	145.9	251.0	302.6	0.9995
RE (%)	55.1	4.8	-4.3	-4.1	-2.7	0.4	0.9	
Mean	15.53	26.44	48.01	95.93	145.5	249.7	303.8	-
SD	0.06	0.24	0.18	0.47	0.5	1.1	1.1	-
CV (%)	0.4	0.9	0.4	0.5	0.3	0.4	0.4	-

Weighting: 1/X

Calibration curve No.	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)							Correlation coefficient
	10	25	50	100	150	250	300	
1	11.85	23.41	45.61	94.46	146.3	253.2	310.2	0.9987
RE (%)	18.5	-6.4	-8.8	-5.5	-2.5	1.3	3.4	
2	11.94	23.13	45.43	95.42	145.6	252.9	310.5	0.9986
RE (%)	19.4	-7.5	-9.1	-4.6	-2.9	1.2	3.5	
3	11.99	23.02	45.33	94.94	146.5	255.0	308.2	0.9987
RE (%)	19.9	-7.9	-9.3	-5.1	-2.3	2.0	2.7	
Mean	11.93	23.19	45.46	94.94	146.1	253.7	309.6	-
SD	0.07	0.20	0.14	0.48	0.5	1.1	1.3	-
CV (%)	0.6	0.9	0.3	0.5	0.3	0.4	0.4	-

Weighting: 1/X²

Calibration curve No.	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)							Correlation coefficient
	10	25	50	100	150	250	300	
1	10.50	22.66	46.00	97.36	151.8	264.3	324.1	0.9967
RE (%)	5.0	-9.4	-8.0	-2.6	1.2	5.7	8.0	
2	10.55	22.34	45.83	98.48	151.3	264.4	325.1	0.9962
RE (%)	5.5	-10.6	-8.3	-1.5	0.9	5.8	8.4	
3	10.57	22.21	45.73	98.03	152.4	266.8	322.9	0.9960
RE (%)	5.7	-11.2	-8.5	-2.0	1.6	6.7	7.6	
Mean	10.54	22.40	45.85	97.96	151.8	265.2	324.0	-
SD	0.04	0.23	0.14	0.56	0.6	1.4	1.1	-
CV (%)	0.4	1.0	0.3	0.6	0.4	0.5	0.3	-

Table 3 Intraday reproducibility for Defibrotide in human plasma

No.	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)				
	10	30	140	225	300
1	11.28	26.59	126.5	224.7	289.8
2	11.28	26.80	127.2	227.6	311.5
3	11.12	26.17	127.6	227.2	311.9
4	10.87	26.99	128.6	227.9	309.4
5	11.05	25.54	130.1	227.2	311.0
Mean	11.12	26.42	128.0	226.9	306.7
SD	0.17	0.58	1.4	1.3	9.5
CV (%)	1.5	2.2	1.1	0.6	3.1
RE (%)	11.2	-11.9	-8.6	0.8	2.2

Table 4 Interday reproducibility for Defibrotide in human plasma

Day	No.	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)				
		10	30	140	225	300
1	1	11.28	26.59	126.5	224.7	289.8
	2	11.28	26.80	127.2	227.6	311.5
	3	11.12	26.17	127.6	227.2	311.9
	4	10.87	26.99	128.6	227.9	309.4
	5	11.05	25.54	130.1	227.2	311.0
	Mean	11.12	26.42	128.0	226.9	306.7
	SD	0.17	0.58	1.4	1.3	9.5
	CV (%)	1.5	2.2	1.1	0.6	3.1
2	RE (%)	11.2	-11.9	-8.6	0.8	2.2
	1	11.21	28.36	133.1	227.6	317.7
	2	10.69	29.84	126.3	226.2	315.4
	3	11.08	29.70	126.9	227.4	328.9
	4	10.47	30.17	131.8	225.2	307.1
	5	10.65	27.90	128.8	221.0	315.6
	Mean	10.82	29.19	129.4	225.5	316.9
	SD	0.31	1.00	3.0	2.7	7.8
3	CV (%)	2.9	3.4	2.3	1.2	2.5
	RE (%)	8.2	-2.7	-7.6	0.2	5.6
	1	10.13	29.22	122.6	217.4	315.7
	2	9.468	27.44	123.7	219.1	314.7
	3	9.553	27.55	125.9	223.0	317.2
	4	9.495	27.19	128.2	224.9	318.9
	5	9.371	26.82	128.2	228.5	314.2
	Mean	9.603	27.64	125.7	222.6	316.1
SD	0.302	0.92	2.6	4.5	1.9	
Total	CV (%)	3.1	3.3	2.1	2.0	0.6
	RE (%)	-4.0	-7.9	-10.2	-1.1	5.4
	Total Mean (n=15)	10.51	27.75	127.7	225.0	313.3
	SD (n=15)	0.72	1.42	2.7	3.4	8.2
	CV (%)	6.9	5.1	2.1	1.5	2.6
RE (%)	5.1	-7.5	-8.8	0.0	4.4	

Table 5 Dilution reproducibility for Defibrotide in human plasma

No.	Concentration (500 µg/mL)	
	5-fold dilution	20-fold dilution
1	447.8	482.4
2	451.5	463.4
3	457.0	449.3
4	448.1	450.4
5	446.7	459.7
Mean	450.2	461.0
SD	4.2	13.4
CV (%)	0.9	2.9
RE (%)	-10.0	-7.8

Table 6 Recovery of Defibrotide from human plasma

No.	Peak area of Defibrotide								
	30 µg/mL			140 µg/mL			225 µg/mL		
	A	R	Recovery (%)	A	R	Recovery (%)	A	R	Recovery (%)
1	96806	85014	-	438633	500370	-	687789	852106	-
2	98696	87505	-	424738	498085	-	700302	889314	-
3	95258	90231	-	435268	515852	-	693325	871713	-
Mean	96920	87583	110.7	432880	504769	85.8	693805	871044	79.7

A: Peak area of Defibrotide in validation sample

R: Peak area of Defibrotide in recovery sample

- : Not calculated

Recovery (%) = (mean peak area of validation samples / mean peak are of recovery samples) × 100

Table 7 Matrix effect of Defibrotide in human plasma

Compound	30 µg/mL				225 µg/mL			
	Peak area (µV·sec.)		Matrix factor (%)	Peak area (µV·sec.)		Matrix factor (%)		
	R1	ME1		R3	ME2			
Defibrotide	85014	M1	69864	79.8	852106	M1	611482	70.2
		M2	62998	71.9		M2	680477	78.1
	87505	M3	58284	66.5	889314	M3	641718	73.7
		F1	61190	69.9		F1	713801	81.9
	90231	F2	59316	67.7	871713	F2	662790	76.1
		F3	51684	59.0		F3	664668	76.3
Mean	87583	-	-	69.1	871044	-	-	76.1
SD	-	-	-	6.8	-	-	-	4.0
CV (%)	-	-	-	9.8	-	-	-	5.3

-: Not calculated

Matrix factor (%) = peak area of matrix effect sample (ME)/ mean peak area of recovery sample (R) × 100

Table 8 Carry over test of Defibrotide in the SB sample just after analysis of the ULOQ sample

No.	Peak area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec.}$)		Carry over (%)
	S1	SB	
1		0	0.0
2	5724	0	0.0
3		0	0.0

Carry over (%) = Peak area of SB sample / Peak area of S1 sample \times 100

Table 9 Autosampler stability of Defibrotide in human plasma extract stored at 4°C

Storage period	No.	30 µg/mL		225 µg/mL	
		Concentration	Stability (%)	Concentration	Stability (%)
Shortly after preparation	1	29.08	-	216.8	-
	2	29.62	-	225.7	-
	3	29.90	-	219.3	-
	Mean	29.53	100.0	220.6	100.0
After 24 hours (Actual: 25 hours)	1	26.92	-	227.2	-
	2	27.04	-	234.2	-
	3	27.31	-	233.5	-
	Mean	27.09	91.7	231.6	105.0
After 48 hours (Actual: 48 hours)	1	28.09	-	223.8	-
	2	28.35	-	209.7	-
	3	28.51	-	227.2	-
	Mean	28.32	95.9	220.2	99.8

- : Not calculated

Stability (%) = (Mean measured concentration of storage samples / mean measured concentration of samples shortly after preparation)

Table 10 Stability of Defibrotide in human plasma stored at room temperature

Storage period	No.	30 µg/mL		225 µg/mL	
		Concentration	Stability (%)	Concentration	Stability (%)
Shortly after preparation	1	29.21	-	214.1	-
	2	28.26	-	220.5	-
	3	27.06	-	219.5	-
	Mean	28.18	100.0	218.0	100.0
After 6 hours (Actual: 6 hours)	1	28.60	-	212.9	-
	2	27.97	-	214.7	-
	3	27.76	-	216.2	-
	Mean	28.11	99.8	214.6	98.4
After 24 hours (Actual: 24 hours)	1	24.52	-	198.1	-
	2	23.50	-	210.7	-
	3	24.23	-	211.5	-
	Mean	24.08	85.5	206.8	94.9

- : Not calculated

Stability (%) = (Mean measured concentration of storage samples / mean measured concentration of samples shortly after preparation) × 100

Table 11 Stability of Defibrotide in human plasma stored at -20°C

Storage period	No.	30 µg/mL		225 µg/mL	
		Concentration	Stability (%)	Concentration	Stability (%)
Shortly after preparation	1	26.62	-	234.3	-
	2	25.77	-	247.0	-
	3	25.15	-	238.8	-
	Mean	25.85	100.0	240.0	100.0
After 2 weeks (Actual: 15 days)	1	26.46	-	216.2	-
	2	26.47	-	223.0	-
	3	25.98	-	222.7	-
	Mean	26.30	101.7	220.6	91.9
After 1 month (Actual: 32 days)	1	26.98	-	205.9	-
	2	25.81	-	211.7	-
	3	25.24	-	212.5	-
	Mean	26.01	100.6	210.0	87.5

- : Not calculated

$$\text{Stability (\%)} = (\text{Mean measured concentration of storage samples} / \text{mean measured concentration of samples shortly after preparation}) \times 100$$

Table 12 Stability of Defibrotide in human plasma stored at -80°C

Storage period	No.	30 µg/mL		225 µg/mL	
		Concentration	Stability (%)	Concentration	Stability (%)
Shortly after preparation	1	26.62	-	234.3	-
	2	25.77	-	247.0	-
	3	25.15	-	238.8	-
	Mean	25.85	100.0	240.0	100.0
After 2 weeks (Actual: 15 days)	1	26.88	-	220.9	-
	2	27.01	-	219.3	-
	3	27.09	-	226.6	-
	Mean	26.99	104.4	222.3	92.6
After 1 month (Actual: 32 days)	1	25.25	-	214.1	-
	2	24.93	-	212.0	-
	3	23.68	-	212.9	-
	Mean	24.62	95.2	213.0	88.8

- : Not calculated

Stability (%) = (Mean measured concentration of storage samples / mean measured concentration of samples shortly after preparation) × 100