

略称	血漿中濃度 (ng/mL)	P092 標準試料溶液略称
C1 (LLOQ)	5	WS-5
C2	10	WS-10
C3	20	WS-20
C4	50	WS-50
C5	100	WS-100
C6	200	WS-200
C7	500	WS-500
C8 (ULOQ)	1000	WS-1000

LLOQ: lower limit of quantification

ULOQ: upper limit of quantification

6.5.4 バリデーション QC サンプルの調製

PP 製マイクロチューブにブランク血漿 20 μ L を分取後、水/ギ酸 (1000:1, v/v) 400 μ L を添加し、次表に従い P092 標準試料溶液を 20 μ L 添加した。

略称	血漿中濃度 (ng/mL)	P092 標準試料溶液略称
Low QC	10	WS-10
Middle QC	50	WS-50
High QC	800	WS-800

6.5.5 安定性確認用 QC サンプルの調製

PP 製マイクロチューブに次表の条件で P092 標準試料溶液を 20 μ L 分取、窒素乾固後、ブランク血漿を 20 μ L 添加、攪拌し、安定性確認用 QC サンプルを調製した。調製直後に使用しないものについては、分析時まで約 -80°C (実測値: -85.2°C ~ -65.3°C , 許容範囲: -60°C 以下) で保存した。

略称	血漿中濃度 (ng/mL)	P092 標準試料溶液略称
Low stability QC	10	WS-10
High stability QC	800	WS-800

6.5.6 前処理操作方法

- (1) PP 製マイクロチューブに血漿 20 μ L を分取した。
- (2) 水/ギ酸 (1000:1, v/v) 400 μ L を添加した。
- (3) メタノール 20 μ L を添加した
(検量線用標準試料溶液調製時は P092 標準試料溶液)。
- (4) ISWS (ブランク試料調製時はメタノール) 40 μ L を添加した。
- (5) ミキサーを用いて攪拌した。
- (6) 全量を Oasis HLB μ Elution plate (30 μ m, Waters Corporation) にアプライした (プレートは、あらかじめメタノール 200 μ L 及び水/ギ酸 (1000:1, v/v) 200 μ L でコンディ

ショニングしておいた)。

- (7) 水/ギ酸 (1000:1, v/v) 200 μ L で洗浄した。
- (8) メタノール 70 μ L で溶出した。
- (9) 水/ギ酸 (1000:1, v/v) 140 μ L を添加, 攪拌後, 次項に従い測定した。

6.5.7 分析条件

装置

HPLC 装置 : 1100 (Agilent Technologies)
 オートサンプラ : SIL-20AC (Shimadzu Corporation)
 質量分析装置 : API 4000 (AB SCIEX)

HPLC 条件

カラム : XBridge C18, 3.5 μ m, 3.0 mm I.D. \times 50 mm (Waters Corporation)
 カラム温度 : 50°C
 移動相 A : 水/ギ酸 (1000:1, v/v)
 移動相 B : メタノール/ギ酸 (1000:1, v/v)
 移動相 A, B を 4:6 の割合で HPLC で混合する。
 流速 : 0.25 mL/min
 注入量 : 10 μ L
 オートサンプラ設定温度 : 10°C
 ニードル洗浄溶媒 : メタノール

MS/MS 条件

Ionization method : ESI (Electrospray Ionization, Turbo Ion Spray)
 Polarity : Positive
 Scan type : MRM (Multiple reaction monitoring)
 Ion spray voltage (IS) : 5500 V
 Heater gas temperature (TEM) : 500°C
 Nebulizer gas (GS1) : Air, 50 psi
 Heater gas (GS2) : Air, 85 psi
 Curtain gas flow (CUR) : N₂, 18 psi
 Collision gas flow (CAD) : N₂, 4
 Entrance potential (EP) : 10 V
 Monitor ion : P092: *m/z* 252 > 84
 IS: *m/z* 152 > 110

6.6 分析法バリデーション

6.6.1 特異性

個体別ブランク血漿を雌雄各3個体ずつ用い, 個体ごとにブランク試料及びLLOQ試料をn=1で調製した。それぞれから測定実測試料をn=1で調製, 測定した。

<許容基準>

P092 及び IS の溶出位置に検出されるピークのピーク面積が, LLOQ 試料の P092 及び IS のピーク面積に対してそれぞれ 20.0 及び 5.0%未満であること。

6.6.2 検量線

ブランク試料，ゼロ試料及び 8 濃度の検量線用標準試料溶液を n=1 で調製し，それぞれから測定実測試料を n=1 で調製，測定した。

ブランク試料，ゼロ試料の 2 検体は，LC-MS/MS 測定のバックグラウンド確認のために測定した。

検量線用標準試料溶液につき，P092 の IS に対するピーク面積比を，添加濃度に対し一次回帰して得られる直線を検量線とした。検量線には，1/x の重み付け（x：血漿中 P092 濃度）を用いた。各濃度における真度の指標として相対誤差（relative error：%RE）を算出した。

$$\text{相対誤差 (\%RE)} = \frac{\text{定量値} - \text{理論値}}{\text{理論値}} \times 100$$

<許容基準>

ブランク及びゼロ試料における P092 及び IS の溶出位置に夾雑ピークが検出されていないこと。検出された場合，夾雑ピークのピーク面積が，LLOQ 試料の P092 及び IS のピーク面積に対してそれぞれ 20.0 及び 5.0%未満であること。

検量線用標準試料溶液の 8 濃度中，定量下限及び上限を含む 6 濃度以上において，%RE が ±15.0%（LLOQ では±20.0%）以内であること。

LLOQ 及び ULOQ 以外の濃度について，%RE が ±15.0%を満たさない場合は，当該濃度を除いて再度検量線を作成する。ただし，6 濃度以上の検量線用標準試料溶液が含まれることとする。なお，重み付けを変更してはならない。

6.6.3 キャリーオーバー

ブランク試料，LLOQ 及び ULOQ 試料を n=1 で調製し，それぞれから測定実測試料を n=1 で調製した。LLOQ に続き，ULOQ 試料を測定した後，ブランク試料を測定した。この一連の測定を 3 回繰り返した。

各測定実測試料は，検量線作成用に調製したものを使用した。

<許容基準>

ブランク試料における P092 及び IS の溶出位置に検出されるピークの面積が，LLOQ 試料の P092 及び IS のピーク面積に対してそれぞれ 20.0 及び 5.0%未満であること。

6.6.4 定量下限

特異性の確認において調製された 6 本の LLOQ 試料を用いて評価した。それぞれから n=1 で測定実測試料を調製し，1 回測定した。同時に作成した検量線より得られた定量値の平均値及び標準偏差を用いて，%RE 及び精度の指標として変動係数（Coefficient of variance：%CV）を算出した。

$$\text{変動係数 (\%CV)} = \frac{\text{定量値の標準偏差}}{\text{定量値の平均値}} \times 100$$

<許容基準>

%RE が ±20.0%以内かつ%CV が 20.0%以下であること。

6.6.5 日内再現性

Low QC, Middle QC 及び High QC (各濃度 n=5) より, 測定実測試料を n=1 で調製, 測定した. 同時に作成した検量線から得られた定量値の平均値及び標準偏差を用いて%RE 及び%CV を算出した.

<許容基準>

%RE が±15.0%以内かつ%CV が 15.0%以下であること.

6.6.6 日間再現性

Low QC, Middle QC 及び High QC (各濃度 n=5) より, 測定実測試料を n=1 で 3 日間調製, 測定した. 同時に作成した検量線から得られた定量値 (各濃度 n=15) の平均値及び標準偏差を用いて%RE 及び%CV を算出した.

<許容基準>

%RE が±15.0%以内かつ%CV が 15.0%以下であること.

6.6.7 回収率

回収率用試料

Low QC 及び High QC (各濃度 n=3) より, 測定実測試料を n=1 で調製して, 1 回測定した.

回収率用標準試料

P092 標準試料溶液 (WS-10 又は WS-800, 各濃度 n=1) 20 µL, ISWS 40 µL, メタノール 10 µL 及び水/ギ酸 (1000:1, v/v) 140 µL を分取, 攪拌して調製した. 各溶液を 3 回測定した.

P092 及び IS について, 次式に従って回収率を算出した. さらに, 得られた個々の値を用いて回収率の平均値及び%CV を算出した.

回収率算出式

P092 の回収率(%)=(R_A/SR_A)×100

IS の回収率(%)=(R_{IS}/SR_{IS})×100

R_A : 回収率用試料の P092 ピーク面積

SR_A : 回収率用標準試料の P092 ピーク面積 (平均値)

R_{IS} : 回収率用試料の IS ピーク面積

SR_{IS} : 回収率用標準試料の IS ピーク面積 (平均値)

6.6.8 希釈妥当性

4000 ng/mL の添加血漿 10 µL にブランク血漿 90 µL を添加, 攪拌して 10 倍希釈したもの (n=3) より, 測定実測試料を n=1 で調製し, 測定した.

同時に作成した検量線から得られた濃度に希釈倍率を乗じて定量値を算出した.

4000 ng/mL の添加血漿の調製法 (用時調製) :

PP 製マイクロチューブに P092 標準試料溶液 (WS-4000) を 20 μ L 分取, 窒素乾固後, ブラ
ンク血漿を 20 μ L 添加, 攪拌した.

<許容基準>

定量値の平均値が, 理論値に対して $100.0 \pm 15.0\%$ 以内であること.

6.6.9 測定実測試料の安定性

Low QC 及び High QC (各濃度 $n=3$) より, 測定実測試料を $n=1$ で調製し, 本安定性試験の試
料として使用した.

測定実測試料を 10°C に設定したオートサンプラ内にセットし, 調製直後, 調製直後の測定
実測試料の測定開始から 12, 18, 24, 30 及び 36 時間保存後に各時点で 1 回測定した.

調製直後の測定時に作成した検量線を調製直後及び保存後の測定実測試料の定量に用いた.

<許容基準>

残存率 (オートサンプラ内に保存後の測定実測試料から得られた定量値 (平均値) の, 調製
直後の定量値 (平均値) に対する割合) が, $100.0 \pm 15.0\%$ 以内であること.

6.6.10 凍結融解安定性

Low stability QC 及び High stability QC (各濃度 $n=3$) を調製後, 約 -80°C において 24 時間以
上凍結保存後, 各 QC サンプルにつき 3 本を室温に放置して融解した. 完全に融解したこと
を確認した後, 12 時間以上再凍結した. 本操作を繰り返し, 凍結融解 3 回後に各 QC サンプ
ル (各濃度 $n=3$) より, $n=1$ で測定実測試料を調製, 測定した. 同時に作成した検量線から
凍結融解 3 回後の定量値を得た.

<許容基準>

残存率 (凍結融解 3 回後の QC サンプルの定量値 (平均値) の, 理論値に対する割合) が,
 $100.0 \pm 15.0\%$ 以内であること.

6.6.11 短期室温安定性

Low stability QC 及び High stability QC (各濃度 $n=3$) を調製後, そのまま 4 時間放置した (実
測値: $22.3 \sim 24.1^{\circ}\text{C}$). 4 時間後, 各 QC サンプル (各濃度 $n=3$) より, 測定実測試料を $n=1$
で調製し, 測定した. 同時に作成した検量線から室温放置 4 時間後の定量値を得た.

<許容基準>

残存率 (室温で 4 時間放置後の QC サンプルの定量値 (平均値) の, 理論値に対する割合)
が, $100.0 \pm 15.0\%$ 以内であること.

6.6.12 長期安定性

Low stability QC 及び High stability QC (各濃度 $n=3$) を調製後, 約 -80°C において 2 週間, 1
ヶ月間及び 3 ヶ月間凍結保存後, 各 QC サンプルにつき 3 本を室温に放置して融解し, 測定
実測試料を $n=1$ で調製, 測定した. 同時に作成した検量線から凍結保存 2 週間, 1 ヶ月及び
3 ヶ月後の定量値を得た.

<許容基準>

残存率（-80℃における凍結保存 2 週間，1 ヶ月及び 3 ヶ月後の QC サンプルの定量値（平均値）の，理論値に対する割合）が，100.0±15.0%以内であること。

6.6.13 標準試料溶液及び IS 試料溶液の安定性

室温における安定性

SS, WS-5, ISSS, 及び ISWS を調製し，室温にて 24 時間放置した（実測値：23.0～24.7℃）。

放置後，各溶液から n=1 で測定実測試料を調製し，3 回測定した。

同時に用時調製した（冷蔵における安定性を先に確認したため，冷蔵保存されていた溶液を使用）同濃度の溶液からも n=1 で測定実測試料を調製し，3 回測定した。

冷蔵における安定性

SS, WS-5, ISSS, 及び ISWS を調製し，冷蔵にて 1 週間及び 1 ヶ月間及び 3 ヶ月間保存した。

保存後，各溶液から n=1 で測定実測試料を調製し，3 回測定した。

各時点で用時調製した同濃度の溶液からも n=1 で測定実測試料を調製し，3 回測定した。

測定実測試料の調製

SS： SS をメタノールで 20 倍希釈後 20 μL を分取し，メタノール 80 μL 及び水／ギ酸（1000:1, v/v）200 μL を添加，攪拌した。

WS-5： WS-5 20 μL を分取し，メタノール 80 μL 及び水／ギ酸（1000:1, v/v）200 μL を添加，攪拌した。

ISSS： ISSS をメタノールで 50 倍希釈後 20 μL を分取し，メタノール 80 μL 及び水／ギ酸（1000:1, v/v）200 μL を添加，攪拌した。

ISWS： ISWS 20 μL を分取し，メタノール 80 μL 及び水／ギ酸（1000:1, v/v）200 μL を添加，攪拌した。

残存率算出式

測定対象物質の残存率 (%) = $(S_A/NS_A) \times 100$

IS の残存率 (%) = $(S_{IS}/NS_{IS}) \times 100$

S_A ：室温放置又は冷蔵保存後の標準試料溶液中の測定対象物質ピーク面積（平均値）

NS_A ：新たに調製した標準試料溶液中の測定対象物質ピーク面積（平均値）

S_{IS} ：室温放置又は冷蔵保存後の IS 試料溶液中の IS ピーク面積（平均値）

NS_{IS} ：新たに調製した IS 試料溶液中の IS ピーク面積（平均値）

<許容基準>

残存率が 100.0 ± 15.0%以内であること。

6.7 データ解析

6.7.1 検量線の作成及び定量値の算出

LC-MS/MS 装置付属の解析ソフトウェア「Analyst」(Ver. 1.4.2, AB SCIEX)を用いて行った。

6.7.2 定量値

定量単位は“ng/mL”とした。

定量値は有効数字 3 桁で表示した(有効数字 4 桁目を四捨五入)。平均値は有効数字 3 桁(ただし、1000 以上の平均値は整数で表示した)で表示し、標準偏差は平均値と小数点以下同桁数で表示した。平均値及び標準偏差は Microsoft Excel 2003 により算出した。

6.7.3 ピーク面積

「Analyst」で算出される値を使用し、整数で表示した(小数点第 1 位を四捨五入)。

6.7.4 %表記値

Microsoft Excel 2003 で算出し、小数点以下第 1 位まで表示した(小数点以下第 2 位を四捨五入)。算出の際、中間で得られる数値は四捨五入しなかった。

7. 結果及び考察

7.1 分析法バリデーション

7.1.1 特異性

個体別ブランク血漿を雌雄各3個体ずつ用い、個体ごとに調製したブランク試料中には、P092及びISの溶出位置に許容基準を超えて定量に影響を与えるような夾雑ピークは認められず許容基準を満たした (Table 1, Figure 1) .

7.1.2 検量線

全ての検量線の P092 濃度 (5 ~ 1000 ng/mL) における%RE は-13.4% ~ 14.0%であった。また、同時に測定したブランク試料、ゼロ試料においても P092 及び IS の溶出位置に許容基準を超えて定量に影響を与えるような夾雑ピークは認められず、いずれも許容基準を満たした (Table 2) .

7.1.3 キャリーオーバー

LLOQ, ULOQ 試料に続けて測定したブランク試料中の P092 及び IS の溶出位置には、許容基準を超えて定量に影響を与えるような夾雑ピークは認められず許容基準を満たした (Table 3) .

7.1.4 定量下限

特異性確認時に測定した6個体別 LLOQ 試料から得られた P092 の定量値を用いて算出した%RE 及び%CV は、1.2%及び8.0%となり、いずれも許容基準を満たした (Table 4) .

7.1.5 日内再現性

QC サンプル (P092 濃度 : 10, 50 及び 800 ng/mL, 各濃度 n=5) から得られた P092 の定量値を用いて算出した%RE 及び%CV は、-5.0% ~ -2.3%及び3.3% ~ 9.6%となり、いずれも許容基準を満たした (Table 5) .

7.1.6 日間再現性

QC サンプル (P092 濃度 : 10, 50 及び 800 ng/mL, 各濃度 n=15) から得られた P092 の定量値を用いて算出した%RE 及び%CV は、-2.2% ~ 2.0%及び4.7% ~ 7.1%となり、いずれも許容基準を満たした (Table 6) .

7.1.7 回収率

P092 及び IS について、回収率 (回収率用標準試料溶液中のピーク面積 (平均値) に対する回収率用試料中のピーク面積) の平均値は、P092 濃度が 10 及び 800 ng/mL, 及び IS 濃度が 400 ng/mL (P092 濃度が 10 及び 800 ng/mL の場合それぞれで算出) についてそれぞれ 83.0%, 87.6%及び35.2%, 34.6%であった。また、回収率の個々の値を用いて算出した P092 及び IS の回収率の%CV は、それぞれ 5.6%, 5.4%及び5.4%, 5.3%であった (Table 7) .

7.1.8 希釈妥当性

10倍希釈した4000 ng/mLの添加血漿中P092の測定値に希釈倍率を乗じて得られた定量値(平均値)は、理論値に対して92.1%となり、許容基準を満たした(Table 8)。

従って、10倍の希釈操作は妥当であることが確認された。

7.1.9 測定実測試料の安定性

10°Cに設定したオートサンプラ内の測定実測試料を測定して求めたLow QC及びHigh QC中P092の定量値(平均値)は、調製直後の定量値(平均値)に対して12時間保存後にそれぞれ89.3%及び92.9%、18時間保存後にそれぞれ85.6%及び91.3%、24時間保存後にそれぞれ89.3%及び93.0%、30時間保存後にそれぞれ91.4%及び93.8%、36時間保存後にそれぞれ86.1%及び90.0%となり、いずれも許容基準を満たした(Table 9)。

従って、測定実測試料中P092は、オートサンプラ内で36時間保存後も安定であることが確認された。

7.1.10 凍結融解安定性

約-80°C及び室温で3回凍結融解後のLow stability QC及びHigh stability QC中P092の定量値(平均値)は、理論値に対してそれぞれ96.5%及び92.8%となり、いずれも許容基準を満たした(Table 10)。

従って、ラット血漿中P092は、3回凍結融解後も安定であることが確認された。

7.1.11 短期室温安定性

室温で4時間放置後のLow stability QC及びHigh stability QC中P092の定量値(平均値)は、理論値に対してそれぞれ93.3%及び90.7%となり、いずれも許容基準を満たした(Table 11)。

従って、ラット血漿中P092は、室温で4時間放置後も安定であることが確認された。

7.1.12 長期安定性

約-80°Cにて凍結保存後のLow stability QC及びHigh stability QC中P092の定量値(平均値)は、理論値に対して2週間(15日間)保存後にそれぞれ101.1%及び86.2%、1ヶ月間(33日間)保存後にそれぞれ90.9%及び88.1%、3ヶ月間(97日間)保存後にそれぞれ68.6%及び78.3%となり、1ヶ月間(33日間)保存後までは許容基準を満たした(Table 12)。

従って、ラット血漿中P092は、約-80°Cにおいて1ヶ月間(33日間)保存後も安定であることが確認された。

7.1.13 標準試料溶液及びIS試料溶液の安定性

室温における安定性

室温で24時間放置後のSS, WS-5, ISSS及びISWS中P092及びISのピーク面積(平均値)は、冷蔵保存されていた(冷蔵における安定性を先に確認した)同濃度のSS, WS-5, ISSS及びISWS中P092及びISのピーク面積(平均値)に対してそれぞれ106.7%, 89.0%, 103.9%及び97.9%となり、いずれも許容基準を満たした(Table 13)。

従って、SS、WS-5、ISSS 及び ISWS 中 P092 及び IS は、室温で 24 時間放置後も安定であることが確認された。

冷蔵における安定性

冷蔵（許容範囲：1～10℃）で 1 週間、1 ヶ月間及び 3 ヶ月間保存後の SS、WS-5、ISSS 及び ISWS 中 P092 及び IS のピーク面積（平均値）は、用時調製した SS、WS-5、ISSS 及び ISWS 中 P092 及び IS のピーク面積（平均値）に対して 1 週間（7 日間）保存後にそれぞれ 101.6%、93.3%、97.7%及び 95.2%、1 ヶ月間（34 日間）保存後にそれぞれ 100.7%、113.4%、101.2% 及び 100.2%、3 ヶ月間（97 日間）保存後にそれぞれ 100.0%、101.2%、98.8%及び 103.9%となり、いずれも許容基準を満たした（Table 14）。

従って、SS、WS-5、ISSS 及び ISWS 中 P092 及び IS は、冷蔵で 3 ヶ月間（97 日間）保存後も安定であることが確認された。

8. 特記事項

8.1 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
なし

8.2 試験計画書に従わなかったこと
なし

Table 1 Selectivity

Plasma No.	Sample	P092		IS	
		Peak area	Ratio (%)	Peak area	Ratio (%)
Male No. 1	Blank	0	0.0	3537	1.7
	LLOQ	921	--	204044	--
Male No. 2	Blank	0	0.0	2385	1.2
	LLOQ	953	--	200709	--
Male No. 3	Blank	0	0.0	2250	1.1
	LLOQ	1073	--	209982	--
Female No. 1	Blank	0	0.0	3891	1.8
	LLOQ	1218	--	210607	--
Female No. 2	Blank	0	0.0	3685	1.8
	LLOQ	1126	--	208714	--
Female No. 3	Blank	0	0.0	2662	1.3
	LLOQ	973	--	210701	--

LLOQ: lower limit of quantification

Ratio (%) = (peak area in Blank/peak area in LLOQ) × 100

--: not applicable

Table 2 Calibration curve

Analyte	Date	Calibration curve			Back ground (% of LLOQ)		
		Concentration (ng/mL)		%RE	Sample	Peak area	
		Nominal	Measured			P092	IS
P092	2012/8/21	5	5.05	1.0	Blank	0	2158
		10	11.4	14.0		(0.0)	(1.1)
		20	20.0	0.0			
		50	43.3	-13.4	Zero	0	189717
		100	98.9	-1.1		(0.0)	--
		200	193	-3.5			
		500	519	3.8	LLOQ	953	190198
		1000	995	-0.5			
P092	2012/8/22	5	5.53	10.6	Blank	0	1879
		10	9.51	-4.9		(0.0)	(1.0)
		20	19.7	-1.5			
		50	45.7	-8.6	Zero	0	182756
		100	102	2.0		(0.0)	--
		200	202	1.0			
		500	514	2.8	LLOQ	996	188365
		1000	987	-1.3			
P092	2012/8/28	5	5.21	4.2	Blank	0	1321
		10	10.4	4.0		(0.0)	(0.8)
		20	19.0	-5.0			
		50	50.0	0.0	Zero	0	167033
		100	94.8	-5.2		(0.0)	--
		200	200	0.0			
		500	516	3.2	LLOQ	766	166682
		1000	990	-1.0			
P092	2012/9/6	5	5.42	8.4	Blank	0	2554
		10	9.48	-5.2		(0.0)	(1.3)
		20	18.9	-5.5			
		50	51.4	2.8	Zero	0	186236
		100	95.4	-4.6		(0.0)	--
		200	203	1.5			
		500	527	5.4	LLOQ	1161	196597
		1000	975	-2.5			
P092	2012/9/24	5	4.93	-1.4	Blank	0	1348
		10	10.7	7.0		(0.0)	(0.8)
		20	20.3	1.5			
		50	46.3	-7.4	Zero	0	207930
		100	98.4	-1.6		(0.0)	--
		200	203	1.5			
		500	509	1.8	LLOQ	1047	173404
		1000	993	-0.7			
P092	2012/11/27	5	5.37	7.4	Blank	0	0
		10	9.82	-1.8		(0.0)	(0.0)
		20	18.8	-6.0			
		50	50.9	1.8	Zero	0	258389
		100	101	1.0		(0.0)	--
		200	198	-1.0			
		500	484	-3.2	LLOQ	4475	257958
		1000	1020	2.0			

RE: relative error, LLOQ: lower limit of quantification

%RE = (measured value - nominal value)/nominal value × 100

The value in parenthesis denotes peak area ratio (%) of back ground peak area to that in LLOQ.

--: not applicable

Table 3 Carryover

Sample	P092		IS	
	Peak area	Ratio (%)	Peak area	Ratio (%)
LLOQ-1	859	--	177639	--
ULOQ-1	217120	--	167010	--
Blank-1	0	0.0	2110	1.2
LLOQ-2	828	--	178108	--
ULOQ-2	218233	--	169908	--
Blank-2	0	0.0	2379	1.3
LLOQ-3	878	--	180504	--
ULOQ-3	225051	--	168369	--
Blank-3	0	0.0	1924	1.1

LLOQ: lower limit of quantification, ULOQ: upper limit of quantification

Ratio (%) = (peak area in Blank/peak area in LLOQ) × 100

--: not applicable

Table 4 Lower limit of quantification

Analyte	Concentration (ng/mL)				%RE	%CV
	Nominal	Measured	Mean	SD		
P092	5	4.64	5.06	0.40	1.2	8.0
		4.83				
		5.13				
		5.68				
		5.36				
		4.73				

SD: standard deviation, RE: relative error, CV: coefficient of variance

%RE = (mean value - nominal value)/nominal value × 100

%CV = (standard deviation/mean value) × 100

Table 5 Within-run accuracy and precision

Analyte	Concentration (ng/mL)				%RE	%CV
	Nominal	Measured	Mean	SD		
P092	10	10.3	9.50	0.83	-5.0	8.8
		10.2				
		8.63				
		9.76				
		8.59				
	50	48.0	47.9	1.6	-4.1	3.3
		48.8				
		50.1				
		46.3				
		46.5				
	800	771	782	75	-2.3	9.6
		741				
		906				
		782				
		710				

SD: standard deviation, RE: relative error, CV: coefficient of variance

%RE = (mean value - nominal value)/nominal value × 100

%CV = (standard deviation/mean value) × 100

Table 6 Between-run accuracy and precision

Analyte	Concentration (ng/mL)					%RE	%CV
	Nominal	Run	Measured	Mean	SD		
P092	10	1	10.3	10.1	0.7	1.1	7.1
			10.2				
			8.63				
		9.76					
		8.59					
		10.0					
	2	10.0					
		10.7					
		10.4					
	3	3	10.3				
			9.75				
			10.6				
		10.8					
		11.2					
		10.4					
P092	50	1	48.0	48.9	2.3	-2.2	4.7
			48.8				
			50.1				
		46.3					
		46.5					
		49.2					
	2	51.0					
		49.2					
		48.5					
	3	3	50.6				
			52.3				
			51.1				
		51.7					
		44.9					
		45.5					
P092	800	1	771	816	52	2.0	6.4
			741				
			906				
		782					
		710					
		863					
	2	823					
		833					
		867					
	3	3	838				
			796				
			803				
		809					
		820					
		873					

SD: standard deviation, RE: relative error, CV: coefficient of variance

%RE = (mean value - nominal value)/nominal value × 100

%CV = (standard deviation/mean value) × 100

Table 7 Recovery

Analyte	P092 conc. (ng/mL)	Sample	Peak area	Recovery (%)			%CV
				Individual	Mean	SD	
P092	10	Recovery sample	2021	85.8	83.0	4.6	5.6
			2015	85.5			
			1830	77.7			
		Standard sample	2491	--	--	--	--
			2288	--	--	--	--
			2288	--	--	--	--
	Mean	2356	--	--	--	--	
	800	Recovery sample	163215	86.4	87.6	4.8	5.4
			157964	83.6			
			175526	92.9			
		Standard sample	198680	--	--	--	--
			183273	--	--	--	--
184763			--	--	--	--	
Mean	188905	--	--	--	--		
IS (400 ng/mL)	10	Recovery sample	176390	33.9	35.2	1.9	5.4
			178402	34.3			
			194455	37.3			
		Standard sample	523609	--	--	--	--
			516337	--	--	--	--
			521943	--	--	--	--
	Mean	520630	--	--	--	--	
	800	Recovery sample	172730	35.5	34.6	1.8	5.3
			174048	35.8			
			158090	32.5			
		Standard sample	491908	--	--	--	--
			488750	--	--	--	--
479108			--	--	--	--	
Mean	486589	--	--	--	--		

SD: standard deviation, CV: coefficient of variance

Recovery (%) = (peak area of recovery sample/mean peak area of standard sample) × 100

%CV = (standard deviation/mean value) × 100

--: not applicable

Table 8 Dilution suitability

Analyte	Dilution	Concentration (ng/mL)			Dilution suitability (%)
		Nominal	Measured	Mean	
P092	10	4000	3880	3683	92.1
			3610		
			3560		

Dilution suitability (%) = (mean value/nominal value) × 100

Table 9 Post-preparative stability

Analyte	Concentration (ng/mL)			Residual rate (%)	
	Nominal	Storage period	Measured		
P092	10	Just after preparation (Initial)	10.3 10.2 8.63	9.71	--
		12 h	8.99 8.49 8.52	8.67	89.3
		18 h	8.77 7.97 8.19	8.31	85.6
		24 h	8.59 8.98 8.44	8.67	89.3
		30 h	9.04 9.37 8.22	8.88	91.4
		36 h	7.91 9.02 8.15	8.36	86.1
		Just after preparation (Initial)	771 741 906	806	--
		12 h	757 734 755	749	92.9
		18 h	733 699 775	736	91.3
		24 h	741 724 784	750	93.0
		30 h	748 722 799	756	93.8
		36 h	753 685 737	725	90.0

Residual rate (%) = mean value after storage/mean initial value × 100

--: not applicable

Table 10 Freeze and thaw stability

Analyte	Concentration (ng/mL)			Residual rate (%)	
	Nominal	Cycle	Measured		
P092	10	3 cycles	10.2	9.65	96.5
			9.44		
			9.32		
	800	3 cycles	712	742	92.8
			777		
			737		

Residual rate (%) = mean value after freeze and thaw cycles/nominal value × 100

Table 11 Short-term stability at room temperature

Analyte	Concentration (ng/mL)			Residual rate (%)	
	Nominal	Storage period	Measured		
P092	10	4 h	9.02	9.33	93.3
			9.35		
			9.63		
	800	4 h	698	725	90.7
			742		
			736		

Residual rate (%) = mean value after storage/nominal value × 100

Table 12 Long-term stability

Analyte	Concentration (ng/mL)			Residual rate (%)	
	Nominal	Storage period	Measured		
P092	10	15 days	9.64	10.1	101.1
			10.5		
			10.2		
		33 days	7.58	9.09	90.9
			9.29		
			10.4		
	97 days	6.44	6.86	68.6	
		7.16			
		6.99			
	800	15 days	718	689	86.2
			668		
			682		
33 days		715	705	88.1	
		716			
		684			
97 days	632	627	78.3		
	623				
	625				

Residual rate (%) = mean value after storage/nominal value × 100