

1. 目次

1. 目次	2
2. 試験実施概要	4
2.1 表題	4
2.2 試験番号.....	4
2.3 試験目的.....	4
2.4 適用ガイドライン	4
2.5 適用 GLP	4
2.6 試験委託者	4
2.7 試験受託者.....	4
2.8 試験施設.....	4
2.9 試験責任者.....	4
2.10 試験従事者.....	4
2.11 試験日程.....	5
2.12 保存	5
2.13 保存する資料.....	5
3. 試験責任者署名	6
4. 要約	7
5. 材料及び方法	8
5.1 被験物質.....	8
5.1.1 名称.....	8
5.1.2 ロット番号.....	8
5.1.3 入手量.....	8
5.1.4 供給源.....	8
5.1.5 保管条件.....	8
5.1.6 保管場所.....	8
5.1.7 取扱い上の注意	8
5.1.8 残余被験物質の処理.....	8
5.2 機器	8
5.3 試薬	9
5.4 分析バリデーション.....	9
5.4.1 HPLC 条件.....	9
5.4.2 試料溶解液の調製.....	9
5.4.3 移動相の調製.....	9
5.4.4 被験物質原液の調製.....	10
5.4.5 60%～140%試料溶液の調製	10
5.4.6 特異性.....	10
5.4.7 直線性.....	10

5.4.8	併行精度	10
5.5	計算及び統計学的方法	10
5.5.1	使用した計算ソフト	10
5.6	数値の桁数の取り扱い	11
6.	結果	12
6.1	分析バリデーション	12
6.1.1	特異性	12
6.1.2	直線性	12
6.1.3	併行精度	12
7.	考察	12
8.	特記事項	12
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	12
8.2	試験計画書に従わなかったこと	12
8.2.1	被験物質の保管条件の誤り	12
表 1	直線性の結果	13
表 2	併行精度の結果	14
図 1	特異性 (試料溶解液)	15
図 2	回帰直線 (上) 及び残差プロット (下)	16
図 3	併行精度の代表的なクロマトグラム (併行精度用試料溶液-1)	17

2. 試験実施概要

2.1 表題

P092・マレイン酸塩の分析法バリデーション

2.2 試験番号

P140704

2.3 試験目的

P092・マレイン酸塩の分析法の妥当性を評価することを目的として分析法バリデーションを実施する。

2.4 適用ガイドライン

なし

2.5 適用 GLP

なし

2.6 試験委託者

国立大学法人岐阜大学
岐阜県岐阜市柳戸1番1
委託責任者 桑田 一夫

2.7 試験受託者

株式会社L S I メディエンス
〒101-8517 東京都千代田区内神田一丁目13番4号

2.8 試験施設

株式会社L S I メディエンス 熊本研究所
〒869-0425 熊本県宇土市栗崎町1285番地

2.9 試験責任者

古賀 善幸
株式会社L S I メディエンス
創薬支援事業本部 試験研究センター 安全性研究部
TEL: 0964-23-5111, FAX: 0964-23-5122

2.10 試験従事者

被験物質の管理：小島 徳子，馬場 歩
分析者：馬場 歩

2.11 試験日程

試験開始	2014年12月10日
実験開始	2014年12月11日
実験終了	2014年12月11日
試験終了	本最終報告書への試験責任者署名日とする。

2.12 保存

次項に示す試験関係資料を試験施設の資料保存施設に保存する。保存期間は試験終了後 10 年間とし、以後の保存は試験委託者と協議の上、決定する。

2.13 保存する資料

- (1) 試験計画書及び試験計画書変更書
- (2) 被験物質に関する資料
- (3) 試験結果に関する資料
- (4) 最終報告書
- (5) 通信文書等の記録文書
- (6) その他の試験に関する資料

3. 試験責任者署名

表 題： P092・マレイン酸塩の分析法バリデーション

試験番号： P140704

試験責任者：

2015年 2月 16日

古賀 善幸

古賀 善幸
株式会社LSIメディエンス
創薬支援事業本部 試験研究センター
安全性研究部

4. 要約

P092・マレイン酸塩の特性試験を実施するため、分析法の妥当性を評価することを目的として分析法バリデーションを実施した。その結果、全てのバリデーション項目の判定基準に適合したことから、分析法は妥当であると判断した。

5. 材料及び方法

5.1 被験物質

5.1.1 名称

P092・マレイン酸塩

5.1.2 ロット番号

FA5QJ-QG

5.1.3 入手量

0.47992 g

5.1.4 供給源

試験委託者

(株式会社L S I メディエンス 鹿島研究所経由で入手)

5.1.5 保管条件

冷蔵 (1~10°C) , 遮光, 気密*¹, 窒素封入*¹ 8.2.1 項, 被験物質の保管条件の誤り参照

試験施設受領日~最終使用日 (2014 年 11 月 25 日~2014 年 12 月 11 日) までの実測値:

4.0°C ~ 5.6°C

5.1.6 保管場所

被験物質保管室 J009 内の薬用冷蔵庫

5.1.7 取扱い上の注意

特になし.

5.1.8 残余被験物質の処理

被験物質管理責任者に返却した.

5.2 機器

名称	型式	メーカー名
化学天秤	AT250	メトラー・トレド株式会社
高速液体クロマトグラフ	Agilent Technologies Inc.	1100 シリーズ (システム C)
デガッサ		G1322A
クォータナリ・ポンプ		G1311A
オートサンプラ		G1313A
カラム恒温槽		G1316A
UV-Vis 検出器		G1314A
データ処理システム		ChemStation for LC System

5.3 試薬

名称	規格	メーカー名
蒸留水 (水)	高速液体クロマトグラフ用	和光純薬工業株式会社
トリフルオロ酢酸 (TFA)	メーカー特級	純正化学株式会社
アセトニトリル	高速液体クロマトグラフィー用	関東化学株式会社

5.4 分析バリデーション

バリデーション判定基準

- 特異性 : 被験物質の溶出位置に妨害ピークが検出されないこと。
 直線性 : 相関係数は 0.9990 以上であり, 残差プロットは一定の傾向がなく 0 をはさんで適当なばらつきを示すこと. y 切片の 95%信頼区間に 0 を含むこと。
 併行精度 : 繰り返し 6 回の相対標準偏差は 2.5%以下であること。

5.4.1 HPLC 条件

- カラム : Inertsil ODS-2 (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μm, ジーエルサイエンス株式会社)
 カラム温度 : 40°C
 移動相 A : アセトニトリルに 0.2%になるように TFA を添加して調製したもの
 移動相 B : 水 1000 mL に TFA 2 mL を加え振り混ぜて調製したもの
 リニアグラジエント条件 :

Time (min)	Ratio of mobile phases (%)	
	A	B
0	20	80
20	60	40
50	60	40
50.1	20	80
60	20	80

- 流速 : 1.0 mL/min
 検出波長 : UV 254 nm
 注入量 : 5 μL
 洗浄液 : 移動相 A
 データ処理時間 : 溶媒ピークの後ろから 50 分までの範囲

5.4.2 試料溶解液の調製

アセトニトリル 1 容量と移動相 B 1 容量を振り混ぜ, 試料溶解液とした。

5.4.3 移動相の調製

アセトニトリル 1000 mL に TFA 2 mL を加え, 混合・脱気した (移動相 A)。
 水 1000 mL に TFA 2 mL を加え, 混合・脱気した (移動相 B)。

5.4.4 被験物質原液の調製

- (1) 被験物質 約 100 mg を精密に量った。
- (2) 試料溶解液を加え正確に 50 mL とし被験物質原液とした (2000 µg/mL)。

5.4.5 60%～140%試料溶液の調製

下表に従い，被験物質原液を試料溶解液で段階的に希釈し，対試験濃度 60～140%試料溶液とした。

採取溶液の名称	採取量 (mL)	定溶液量 (mL)	P092・マレイン酸塩 (µg/mL)	対試験濃度 (%)	希釈後の 溶液の名称
被験物質原液	3	10	600	60	L-1
被験物質原液	4	10	800	80	L-2
被験物質原液	5	10	1000	100	L-3
被験物質原液	6	10	1200	120	L-4
被験物質原液	7	10	1400	140	L-5

5.4.6 特異性

試料溶解液をブランクとし，ブランクの 5 µL につき 5.4.1 項の試験条件で 1 回分析し，被験物質の溶出位置における妨害ピークの有無を確認した。

5.4.7 直線性

- (1) 60%，80%，100%，120%及び 140%の各試料溶液 5 µL につき，5.4.1 の試験条件でそれぞれ 1 回分析した。
- (2) P092・マレイン酸塩の濃度 (µg/mL) を x 軸，ピーク面積を y 軸として直線性のグラフを作成した。
- (3) 回帰分析により求めた直線の傾き，y 切片，相関係数，残差プロット及び残差平方和を求めた。

5.4.8 併行精度

- (1) 被験物質約 20 mg を精密に量った。
- (2) 試料溶解液を加え正確に 20 mL とし試料溶液とした (1000 µg/mL)。
- (3) 上記の操作を繰り返し，併行精度用試料溶液を 6 本調製した。
- (4) 各試料溶液 5 µL につき，5.4.1 項の試験条件でそれぞれ 1 回分析した。
- (5) 試料溶液のクロマトグラムをブランク溶液 (試料溶解液，特異性と兼ねた) と比較し，明らかにブランク由来と判断されるピーク及びマレイン酸のピーク (約 3 分付近に溶出) は除いて評価した。
- (6) ピーク面積の総和に対する被験物質のピーク面積百分率を純度 (%) とした。
- (7) 全 6 回の純度 (%) の平均値，標準偏差及び相対標準偏差を求めた。

5.5 計算及び統計学的方法

5.5.1 使用した計算ソフト

計算は，計算処理ソフト Microsoft[®] Office Excel 2010 (Microsoft Corporation) を利用した。

5.6 数値の桁数の取り扱い

数値は、求める桁数+1 桁目を四捨五入して、以下の桁数まで求めた。ただし、秤量値、保持時間、ピーク面積は出力された桁数のまま使用した。

試験項目	求める数値		求める桁数	
			個々の値	平均値
分析バリデーション	直線性	P092・マレイン酸塩 濃度 (µg/mL)	有効数字 4 桁	—
		直線の傾き	有効数字 5 桁	—
		y 切片	有効数字 5 桁	—
		ピーク面積の予測値	整数	—
		残差	整数	—
		相関係数	小数点以下 4 桁	—
		残差平方和	有効数字 5 桁	—
		y 切片の 95%信頼区間	整数	—
	併行精度	純度 (%)	小数点以下 4 桁	小数点以下 4 桁
		標準偏差	小数点以下 1 桁	—
		相対標準偏差	小数点以下 1 桁	—

6. 結果

6.1 分析バリデーション

6.1.1 特異性

クロマトグラムを図1に示す。

試料溶解液において被験物質の溶出位置における妨害ピークは検出されず、判定基準（被験物質の溶出位置に妨害ピークが検出されないこと。）に適合した。

6.1.2 直線性

直線性の結果を表1に、回帰直線及び残差プロットを図2に示す。

被験物質の濃度が600.1~1400 µg/mLの範囲における直線性の相関係数は0.9998で、残差プロットにも一定の傾向が認められなかった。さらに、y切片の95%信頼区間は-440~465で0を含み、判定基準（相関係数は0.9990以上であり、残差プロットは一定の傾向がなく0をはさんで適当なばらつきを示すこと、y切片の95%信頼区間に0を含むこと。）に適合した。

6.1.3 併行精度

併行精度の結果を表2に、代表的なクロマトグラムを図3に示す。

測定を6回繰り返したときの純度の相対標準偏差は0.0%であり、判定基準（繰り返し6回の相対標準偏差は2.5%以下であること。）に適合した。

7. 考察

P092・マレイン酸塩の特性試験を実施するため、分析バリデーションを実施した結果、全てのバリデーション項目の判定基準に適合し、分析法は妥当であると判断した。

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

8.2.1 被験物質の保管条件の誤り

試験計画書、2.1.5 保管条件の項に被験物質を密封保管する旨、規定していたが、実際の保管容器は気密容器であった。保管容器は、試験施設で入手した時点から一貫して、気密容器であったため、当該事態を発見した時点で試験計画書変更書（No.2）を発行した。

密封保管は、試験計画書中に記載した保管条件の誤りであるため、被験物質の安定性に影響しない。従って、試験の信頼性に与える影響は無いと判断した。

表1 直線性の結果

対試験濃度 (%)	P092・マレイン酸塩 の濃度 (μg/mL)	被験物質 のピーク面積	ピーク面積の 予測値	残差
60	600.1	7254.22217	7248	6
80	800.2	9655.51563	9660	-4
100	1000	12002.9	12069	-66
120	1200	14602.1	14480	122
140	1400	16835.0	16891	-56

観測数 (N)	5	
相関係数 (r)	0.9998	
回帰直線の傾き (a)	12.056	
回帰直線の y 切片 (b)	12.744	
残差平方和	22428	
y 切片の 95%信頼区間	上限	465
	下限	-440

P092・マレイン酸塩の採取量 (mg) : 100.02

表2 併行精度の結果

	保持時間(分)	試料溶液のピーク面積						
		ブランク	T1	T2	T3	T4	T5	T6
マレイン酸	3.009	-	354.43503	354.78406	354.43558	355.97241	356.45068	355.29138
	3.276 *	9.58891	11.22654	11.26988	11.23974	11.17116	11.29543	11.38408
	6.015	-	1.08365	0.950849	1.11060	1.27020	1.07913	1.21729
	8.711	-	0.782353	0.772429	0.765259	0.743949	0.701443	0.759229
	11.536	-	1.77879	2.00702	2.01728	2.18667	2.25461	2.21687
	12.506	-	11.47774	11.36618	11.40425	11.29598	11.53308	11.41679
	13.141	-	0.749688	0.761892	0.724418	0.736886	0.676351	0.710339
P092	13.643	-	12046.5	12053.4	12053.5	12099.8	12101.6	12058.0
	15.139	-	0.788243	0.735201	0.698783	0.644216	0.753106	0.712277
	15.497	-	1.52576	1.52061	1.56919	1.37976	1.50674	1.50876
	16.928	-	1.82497	1.73787	1.82894	1.84139	1.76110	1.75716
	17.244	-	3.70235	3.59825	3.75322	3.73184	3.58194	3.63357
	18.178	-	8.33977	7.91026	8.08709	7.90117	7.79714	7.79890
	18.791	-	9.65225	9.54255	9.63795	9.68664	9.64804	9.54788
	20.078	-	0.929824	0.923007	0.768243	0.928781	0.881798	0.804220
	21.774	-	6.25418	5.99911	6.16579	6.02685	5.99866	5.80365
	23.693	-	3.30514	3.24027	3.28250	3.28535	3.25677	3.27992
	25.874 **	-	-	-	-	-	3.44333	3.98368
ピーク面積の総和(ブランク由来及びマレイン酸を除く)			12098.694708	12104.465498	12105.313513	12151.459682	12156.473238	12113.150535
被験物質の純度(%)			99.5686	99.5781	99.5720	99.5749	99.5486	99.5447
		平均値	99.5645					
標準偏差			0.0					
相対標準偏差(%)			0.0					

☆ 試料溶液のクロマトグラムをブランク溶液と比較し、明らかにブランク由来と判断されるピーク及びマレイン酸のピーク(約3分付近に溶出)は除いて評価した。

☆ 保持時間は試料溶液T1から引用した。

・「*」はブランク溶液,「**」は併行精度用試料溶液T5から引用した。

☆ ピーク面積の総和に対する被験物質のピーク面積百分率を純度(%)とした。

データファイル C:\HPCHEM\1\DATA\140704\C4121100.D

サンプル名: 特異性

試験番号: P140704
特異性

```

=====
注入日       : 12/11/2014 12:01:37 PM       シーケンライン : 1
サンプル名   : 特異性                       吹-シヨウ     : N イアル 1
オペレータ   : Baba                       注入回数       : 1
                                           注入量         : 5 ul
分析メソッド : C:\HPCHEM\1\METHODS\140704.M
最終変更日時 : 12/10/2014 11:20:19 AM 変更者: Baba
解析メソッド : C:\HPCHEM\1\METHODS\140704.M
最終変更日時 : 12/12/2014 09:10:01 AM 変更者: Baba
    
```

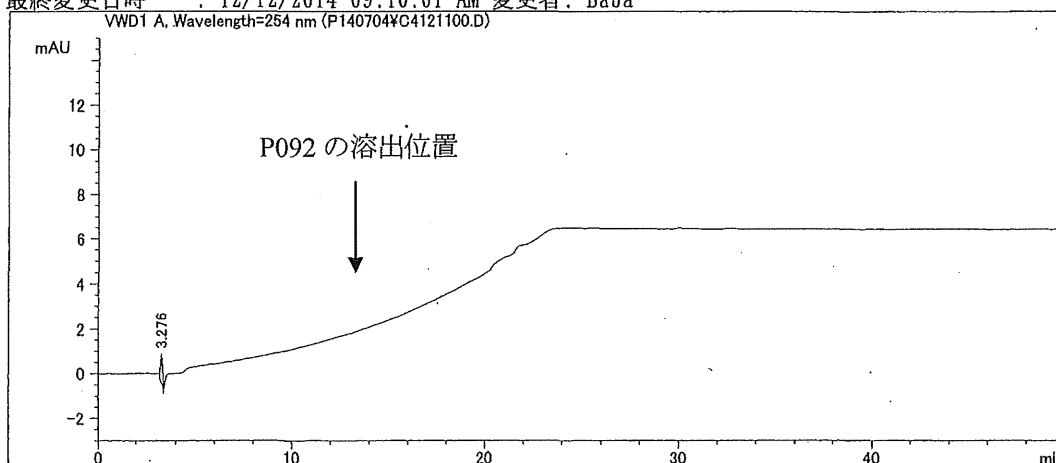


図 1 特異性 (試料溶解液)

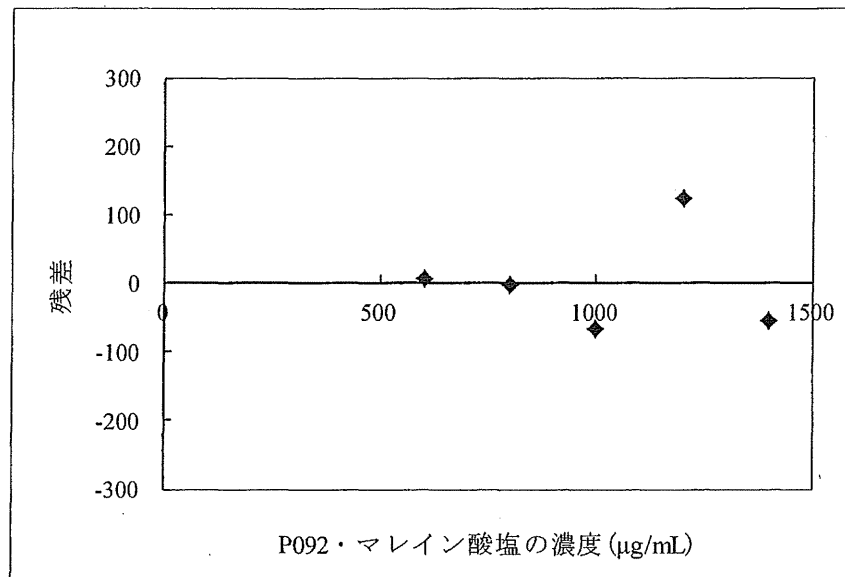
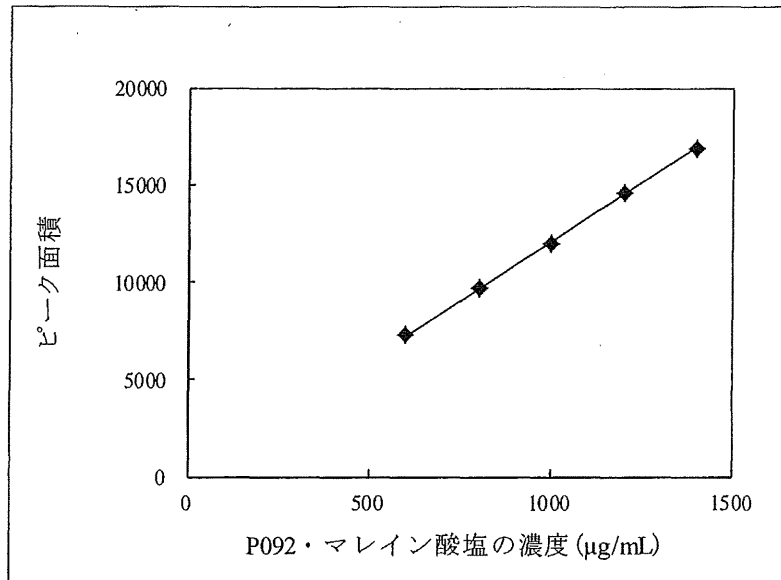


図2 回帰直線（上）及び残差プロット（下）

4. P092 マレイン酸塩の特性試験 及び保存安定性試験

データファイル C:\¥HPCHEM¥1¥DATA¥P140704¥C4121106.D

サンプル名: T1

試験番号: P140704
 併行精度用試料溶液-1

```

=====
注入日       : 12/11/2014 06:09:27 PM      シーケンスライン : 7
サンプル名   : T1                          インジェクション : バイアル 7
オペレータ   : Baba                        注入回数         : 1
                                                注入量           : 5 ul
分析メソッド : C:\¥HPCHEM¥1¥METHODS¥P140704.M
最終変更日時 : 12/10/2014 11:20:19 AM 変更者: Baba
解析メソッド : C:\¥HPCHEM¥1¥METHODS¥P140704.M
最終変更日時 : 12/12/2014 09:10:01 AM 変更者: Baba
    
```

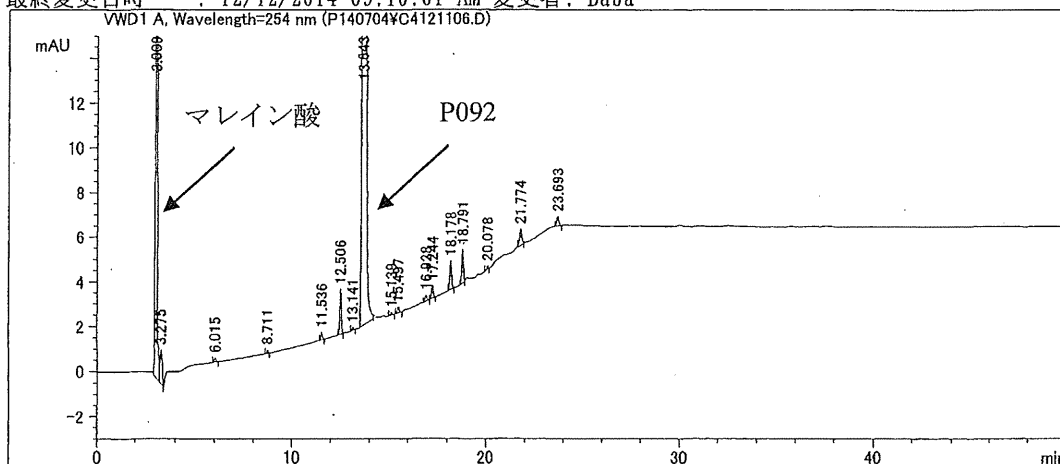


図3 併行精度の代表的なクロマトグラム (併行精度用試料溶液-1)

最終報告書

P092・マレイン酸塩の特性試験及び保存安定性試験

(試験番号：P140711)

本写しは原本と相違ありません
株式会社 LSIメディエンス 熊本研究所
2015年3月16日
試験責任者 古賀善幸

株式会社 L S I メディエンス

1. 陳述書

表 題：P092・マレイン酸塩の特性試験及び保存安定性試験

試験番号：P140711

本試験は下記の基準に従って実施したものである。

厚生省令第21号「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，一部改正 厚生労働省令第114号，平成20年6月13日)

試験責任者：

2015年3月16日

古賀 善幸

古賀 善幸
株式会社LSIメディエンス
創薬支援事業本部 試験研究センター
安全性研究部

2. 目次	
1. 陳述書.....	2
2. 目次.....	3
3. 試験実施概要.....	5
3.1 表題.....	5
3.2 試験番号.....	5
3.3 試験目的.....	5
3.4 適用ガイドライン.....	5
3.5 適用 GLP	5
3.6 試験委託者.....	5
3.7 試験受託者.....	5
3.8 試験施設.....	5
3.9 試験責任者.....	5
3.10 試験従事者.....	6
3.11 試験日程.....	6
3.12 保存.....	6
3.13 保存する資料.....	6
4. 試験責任者署名.....	7
5. 要約.....	8
6. 材料及び方法.....	9
6.1 被験物質.....	9
6.1.1 名称.....	9
6.1.2 ロット番号.....	9
6.1.3 入手量.....	9
6.1.4 供給源.....	9
6.1.5 保管条件.....	9
6.1.6 保管場所.....	9
6.1.7 取扱い上の注意.....	9
6.1.8 残余の被験物質の処理.....	9
6.2 機器.....	10
6.3 試薬.....	10
6.4 特性試験の概要.....	10
6.4.1 共通事項.....	10
6.4.2 性状.....	10
6.4.3 確認試験 (IR)	10
6.4.4 純度試験.....	11
6.5 計算及び統計学的方法.....	12
6.5.1 使用した計算ソフト.....	12
6.6 数値の桁数の取り扱い.....	12