

Figures

Figure 1 Typical Chromatograms of P092 and IS in Rat Blood56

Figure 2 Typical Chromatograms of P092 and IS in Monkey Blood57

信頼性保証証明書58

最終ページ : 58

3. 試験実施概要

3.1 表題

Bioanalytical Method Validation for Determination of P092 in Rat and Monkey Blood

3.2 試験番号

B141089

3.3 試験目的

ラット及びサル血液中 P092 濃度を測定するための分析法の妥当性を検証することを目的とした。

3.4 適用ガイドライン

「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」
(薬食審査発 0711 第 1 号, 平成 25 年 7 月 11 日)

3.5 信頼性基準

(申請資料の信頼性の基準)

医薬品, 医療機器等の品質, 有効性及び安全性の確保等に関する法律施行規則 第 43 条

3.6 信頼性保証部門による調査項目

試験計画書, 試験計画書変更書, 試験結果に関する資料, 最終報告書草案及び最終報告書を調査し, 信頼性保証証明書を最終報告書に添付した。

3.7 試験委託者

国立大学法人岐阜大学

〒501-1193 岐阜県岐阜市柳戸 1 番 1

3.7.1 委託責任者

桑田 一夫

国立大学法人岐阜大学

〒501-1193 岐阜県岐阜市柳戸 1 番 1

TEL : 058-230-6143, FAX : 058-230-6144

3.8 試験受託者

株式会社 L S I メディエンス

東京都千代田区内神田一丁目 13 番 4 号 (〒101-8517)

3.9 試験施設

株式会社 L S I メディエンス 鹿島研究所

茨城県神栖市砂山 14 番地 1 (〒314-0255)

3.10 試験責任者

西田 紀子

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 分析代謝研究部 薬物分析グループ

TEL : 0479-46-4024, FAX : 0479-46-3173

E-mail : Nishida.Noriko@mr.medience.co.jp

3.11 試験従事者

鈴木 健吾

3.12 試験日程

試験開始	2015年1月21日
実験開始	2015年1月22日
実験終了	2015年2月24日
試験終了	本報告書への試験責任者の署名日とする。

3.13 保存

次項に示す試験関係資料を試験施設の資料保存室に保存する。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。

3.14 保存する資料

- 1) 試験計画書及び試験計画書変更書
- 2) 測定対象標準物質及び内標準物質に関する資料
- 3) 試験結果に関する資料
- 4) 通信文書等の記録文書
- 5) 最終報告書

4. 試験責任者署名

表 題： Bioanalytical Method Validation for Determination of P092 in Rat and Monkey Blood

試験番号： B141089

試験責任者：

2015年3月19日 西田 紀子
西田 紀子
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
分析代謝研究部 薬物分析グループ

5. 要約

ラット及びサル血液中 P092 濃度を測定するための分析法の妥当性を検証した。

P092 を含むラットもしくはサル血液 20 μL に内標準試料溶液 (IS, Boc-Met-Leu-Phe-OH) 400 μL を添加・攪拌し、除タンパクした。除タンパク後、得られた上清 30 μL に 10 mmol/L ギ酸アンモニウム/メタノール (3:7, v/v) 250 μL を添加し、攪拌後、LC/MS/MS 測定に供した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、カラムとして Inert Sustain C18 (2 μm , 2.1 mm I.D. \times 50 mm, GL Science Inc.) を使用し、10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液とメタノール/28%アンモニア水溶液 (1000:1, v/v) を用いたグラジエント溶離で実施した。溶出液は、質量分析計 API 4000 (AB SCIEX) に導入され、P092 及び IS は、multiple reaction monitoring モードによって検出された。モニターイオン (m/z) は、P092: 252 > 84 (Q1>Q3), IS: 510 > 217 (Q1>Q3) とした。

バリデーション結果を下表に示す。

<ラット>

バリデーション項目	結果
選択性	夾雑ピークは検出されなかった
検量線の直線性 (一次回帰直線, 重み付け: $1/X^2$, X: P092 血液中濃度)	5 to 1000 ng/mL
キャリアオーバー	検出されなかった
定量下限	5 ng/mL
日内再現性 (5, 10, 50 and 800 ng/mL)	Accuracy: 88.3% to 95.9% Precision: 7.1% or below
日間再現性 (5, 10, 50 and 800 ng/mL)	Accuracy: 93.1% to 100.9% Precision: 6.9% or below
回収率及びマトリックス	4.2% at 10 ng/mL (P092) 4.4% at 800 ng/mL (P092) 2.6% at 10 ng/mL (IS) 2.9% at 800 ng/mL (IS)
希釈妥当性	5 and 20 times
測定実測試料の安定性 (4°C) (10 and 800 ng/mL)	48 時間
凍結融解安定性 (-80°C) (10 and 800 ng/mL)	—*
短期安定性 (冷蔵) (10 and 800 ng/mL)	—*
長期安定性 (-80°C) (10 and 800 ng/mL)	—*

*: 安定性を評価できなかった。

<サル>

バリデーション項目	結果
選択性	夾雑ピークは検出されなかった
検量線の直線性 (一次回帰直線, 重み付け: $1/X^2$, X: P092 血液中濃度)	5 to 1000 ng/mL
キャリーオーバー	検出されなかった
定量下限	5 ng/mL
日内再現性 (5, 10, 50 and 800 ng/mL)	Accuracy: 92.5% to 96.4% Precision: 4.9% or below
日間再現性 (5, 10, 50 and 800 ng/mL)	Accuracy: 93.8% to 99.7% Precision: 6.5% or below
回収率及びマトリックス	5.0% at 10 ng/mL (P092) 1.9% at 800 ng/mL (P092) 2.2% at 10 ng/mL (IS) 2.1% at 800 ng/mL (IS)
希釈妥当性	5 and 20 times
測定実測試料の安定性 (4°C) (10 and 800 ng/mL)	48 時間
凍結融解安定性 (-80°C) (10 and 800 ng/mL)	—*
短期安定性 (冷蔵) (10 and 800 ng/mL)	—*
長期安定性 (-80°C) (10 and 800 ng/mL)	—*

*:安定性を評価できなかった。

標準試料溶液及び IS 試料溶液の安定性	
室温安定性 : P092 (200 µg/mL and 5 ng/mL) IS (100 µg/mL and 500 ng/mL)	24 hours
冷蔵安定性 : P092 (200 µg/mL and 5 ng/mL) IS (100 µg/mL and 500 ng/mL)	32 days

6. 材料及び方法

6.1 測定対象標準物質

名称：	P092・マレイン酸塩
ロット番号：	KS14001
提供者：	国立大学法人岐阜大学
定量：	99.6%
換算係数：	1.4618 (マレイン酸塩のためフリー体換算する)
保管条件：	冷蔵 (許容範囲：1~10°C, 実測値：3.4~6.5°C), 遮光, 密封 (窒素封入)
保管場所：	被験物質保管場所 (42) (59*) *: 本試験へ移管されるまでの保管場所
安定性の確認：	安定性に関する資料を確認した。
取り扱い上の注意：	保護具 (ゴム手袋, 眼鏡及びマスク) 着用した。
残余測定対象標準物質の 処置：	関連試験にて使用するため, 継続保管する。

6.2 内標準物質 (IS)

名称：	Boc-Met-Leu-Phe-OH
ロット番号：	1052898
製造元：	BACHEM
安定性の確認：	実施しなかった。ISのみを含有する試料 (Zero 試料) の LC/MS/MS 測定において, 以下の点を確認した。 測定対象物質のモニターイオンのイオンクロマトグラムにおいて, 測定対象物質の溶出位置に定量を妨害する夾雑ピークが認められないことを分析日毎に確認した。
取り扱い上の注意：	保護具 (ゴム手袋, 眼鏡及びマスク) 着用した。

6.3 試薬

市販の特級以上の試薬を使用した。水は超純水製造装置 (MILLI-Q Integral5, メルク株式会社) で精製したものをを用いた。

6.4 ブランクマトリックス

動物種：	ラット
系統：	CrI:CD (SD)
投与歴：	なし
抗凝固剤：	ヘパリンナトリウム
保存条件：	約-20°C (許容範囲：-40~-15°C, 実測値：-29.3~-20.5°C)
動物種：	カニクイザル
投与歴：	なし
抗凝固剤：	ヘパリンナトリウム
保存条件：	約-20°C (許容範囲：-40~-15°C, 実測値：-29.3~-20.5°C)

6.5 血液中濃度測定法

6.5.1 標準試料溶液の調製

P092・マレイン酸塩を 14.6 mg (フリー体換算値: 10.0 mg) 正確に量り, メタノールに溶解し, 全量を 50 mL とした (200 µg/mL) (ガラス製メスフラスコを使用した)。溶解の際, 超音波処理を実施した。この溶液を P092 標準試料原液 (SS) とし, 次表に従ってメタノールで順次希釈し, 以下の標準試料溶液を調製した。

P092 標準試料原液及び溶液はポリプロピレン (PP) 製容器にて冷蔵・遮光保存 (許容範囲: 1~10°C, 実測値: 3.9~6.8°C) した。使用期限は, 本試験にて安定性を確認した期間内 (32 日間) で使用した。

標準試料溶液 略称	標準試料溶液濃度 (ng/mL)	使用標準試料溶液 略称	使用量 (µL)*	メタノール 添加量(µL)*
WS-40000	40000	SS	200	800
WS-4000	4000	WS-40000	100	900
WS-1000	1000	WS-4000	250	750
WS-800	800	WS-4000	200	800
WS-500	500	WS-1000	500	500
WS-200	200	WS-1000	200	800
WS-100	100	WS-500	200	800
WS-50	50	WS-500	100	900
WS-20	20	WS-200	100	900
WS-10	10	WS-100	100	900
WS-5	5	WS-50	100	900

*: マイクロピペットを使用した。

6.5.2 IS 試料溶液の調製

IS を 5 mg 正確に量り, メタノールに溶解, 全量を 50 mL として IS 試料原液 (100 µg/mL) を調製した (ガラス製メスフラスコを使用した)。この溶液を IS 試料原液 (ISSS) とし, 次表に従ってメタノールで希釈し IS 試料溶液 (500 ng/mL, ISWS) を調製した。

IS 試料原液及び溶液は褐色ガラス製容器にて冷蔵・遮光保存 (許容範囲: 1~10°C, 実測値: 3.9~6.8°C) した。使用期限は, 本試験にて安定性を確認した期間内 (32 日間) で使用した。

IS 溶液略称	IS 溶液濃度 (ng/mL)	使用 IS 原液 略称	使用量 (mL)* ¹	全量 (mL)* ²
ISWS	500	ISSS	0.5	100

*¹: ガラス製ホールピペットを使用, *²: ガラス製褐色メスフラスコを使用

6.5.3 検量線用標準試料溶液の調製

検量線用標準試料溶液は, PP 製マイクロチューブにブランク血液 20 µL を分取後, 下表の条件で標準試料溶液又はメタノールを添加して用時調製した (各濃度 n=1)。

検量線用 標準試料溶液	添加溶液	添加量 (μL)	血液中濃度 (ng/mL)
Cal-1000 (ULOQ)	WS-1000	20	1000
Cal-500	WS-500	20	500
Cal-200	WS-200	20	200
Cal-100	WS-100	20	100
Cal-50	WS-50	20	50
Cal-20	WS-20	20	20
Cal-10	WS-10	20	10
Cal-5 (LLOQ)	WS-5	20	5
Zero	メタノール	20	0
Blank	メタノール	20	--

LLOQ: lower limit of quantification, ULOQ: upper limit of quantification, --: 該当なし

6.5.4 バリデーション QC サンプルの調製

6.5.4.1 バリデーション QC サンプルの調製

バリデーション QC サンプルは、PP 製マイクロチューブにブランク血液 20 μL を分取後、下表の条件で標準試料溶液を添加して用時調製した。

バリデーション QC サンプル	添加溶液	添加量 (μL)	血液中濃度 (ng/mL)
High QC-1	WS-800	20	800
Middle QC-1	WS-50	20	50
Low QC-1	WS-10	20	10
LLOQ QC-1	WS-5	20	5

6.5.4.2 安定性確認バリデーション QC サンプルの調製

下表の条件でブランク血液と標準試料溶液を混合し、安定性確認バリデーション QC サンプルを調製した。安定性確認バリデーション QC サンプルは適量ずつポリプロピレン (PP) 製マイクロチューブに小分けし、分析時まで約 -80°C (許容範囲： -60°C 以下、実測値： -84.5°C ~ -77.0°C) で保存した。

バリデーション QC サンプル	添加溶液	添加量 (μL)	血液量 (μL)	血液中濃度 (ng/mL)
High QC-2	WS-40000	20	980	800
Low QC-2	WS-1000	10	990	10

6.5.5 血液試料の前処理方法

操作は氷冷下で実施した。

- 1) PP 製マイクロチューブに血液試料 20 μL を分取した。
- 2) ISWS を 400 μL 添加した (Blank には同容量のメタノールを添加した)。
- 3) メタノールを 20 μL 添加した (検量線用標準試料溶液及びバリデーション QC サンプルの調製時は、標準試料溶液を添加した)。
- 4) ミキサーを用いて攪拌した。
- 5) 遠心分離 (20,400 $\times g$, 1 分間, 4°C) に供した。

- 6) 上清 30 μL を分取した。
- 7) 10 mmol/L ギ酸アンモニウム/メタノール (3:7, v/v) 250 μL を添加した。
- 8) 攪拌し、測定実測試料として LC/MS/MS 測定に供した。

6.5.6 LC/MS/MS 測定条件

<装置>

HPLC : ACQUITY Ultra Performance LC (Waters Corporation)
 質量分析装置 : API 4000 (AB SCIEX)

<HPLC 条件>

カラム : InertSustain C18 (2 μm , 2.1 mm I.D.×50 mm, GL Science Inc.)
 カラム温度 : 40°C
 移動相 A : 10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液
 移動相 B : メタノール/28%アンモニア水溶液 (1000:1, v/v)

グラジエント条件 :	Time (min)	移動相 A (%)	移動相 B (%)	流速 (mL/min)
	Initial	30	70	0.7
	0.50	10	90	0.7
	0.51	2	98	0.7
	1.10	2	98	0.7
	1.11	30	70	0.7
	1.20	30	70	0.7

注入量 : 5 μL
 オートサンプラ設定温度 : 4°C
 ニードル洗浄溶媒 : メタノール/28%アンモニア水溶液 (100:1, v/v)

<MS/MS 条件>

Ionization method : ESI (Electrospray Ionization)
 Polarity : Positive
 Scan type : MRM (Multiple reaction monitoring)
 Ion spray voltage (IS) : 5500 V
 Heater gas temperature (TEM) : 400°C
 Nebulizer gas (GS1) : Air, 50 psi
 Heater gas (GS2) : Air, 85 psi
 Curtain gas flow (CUR) : N₂, 35 psi
 Collision gas flow (CAD) : N₂, 4
 Entrance potential (EP) : 10 V
 Monitor ion (m/z , Q1>Q3) : P092: 252 > 84
 IS: 510 > 217

6.6 ラット血液分析法のバリデーション

6.6.1 選択性

雌雄各 3 例の異なる個体から得たブランク血液を用いて、個体毎に n=1 で Blank 及び LLOQ を調製した。それぞれから n=1 で測定実測試料を調製して 1 回測定した。

<許容基準>

測定対象物質及び IS の溶出位置に検出される夾雑ピークの面積が LLOQ における測定対象物質及び IS のピーク面積に対して、それぞれ 20.0 及び 5.0%以下であること。

6.6.2 検量線の直線性

Blank, Zero 及び 8 濃度の検量線用標準試料溶液を n=1 で調製した。それぞれから n=1 で測定実測試料を調製して 1 回測定した。Blank 及び Zero 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（検量線作成には用いなかった）。

測定対象物質の IS に対するピーク面積比を添加濃度に対して一次回帰して得られる直線を検量線とした。検量線には $1/X^2$ の重み付け（X：血液中測定対象物質濃度）を用いた。

各濃度における真度を算出した。

直線性は、バリデーションにて作成される全検量線で評価した。

$$\text{真度 (\%)} = \frac{\text{定量値}}{\text{理論値}} \times 100$$

<許容基準>

- Blank 及び Zero における測定対象物質及び 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定量下限の検量線用標準試料溶液における測定対象物質及び IS のピーク面積に対してそれぞれ 20.0 及び 5.0%以下であること。
- 8 濃度の検量線用標準試料溶液のうち、定量上下限を含む 6 濃度以上において真度が理論値の±15.0%以内（定量下限は±20.0%以内）であるとき、検量線として妥当であると判断する。
- 定量下限及び定量上限以外の濃度について、真度が理論値の±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、定量上下限を含む最低 6 濃度以上の検量線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

LLOQ, ULOQ 及び Blank を調製した。それぞれから n=1 で測定実測試料を調製して、上記順番で LC/MS/MS に注入した。この一連の測定を 3 回実施した。

<許容基準>

Blank 中の測定対象物質及び IS 溶出位置に検出されるキャリーオーバーピークの面積が、3 回の測定全てにおいて、LLOQ における測定対象物質及び IS ピーク面積に対して、それぞれ 20.0 及び 5.0%以下であること。

6.6.4 定量下限

定量下限における測定対象物質のピーク面積は、Blank の 5 倍以上であった（選択性の結果にて評価した）。

定量下限における真度は理論値の±20.0%以内、精度は 20.0%以下であった（日内再現性の結果にて評価した）。

6.6.5 日内再現性

LLOQ QC-1, Low QC-1, Middle QC-1 及び High QC-1（各濃度 n=5）から、それぞれ n=1 で測定実測試料を調製して 1 回測定した。同時に作成した検量線から得られた定量値（n=5）の平均値を用いて、真度及び精度を算出した。

$$\text{真度 (\%)} = \frac{\text{定量値 (平均値)}}{\text{理論値}} \times 100$$

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

<許容基準>

LLOQ QC：真度が理論値の±20.0%以内かつ精度が 20.0%以下であること。

その他の QC サンプル：真度が理論値の±15.0%以内かつ精度が 15.0%以下であること。

6.6.6 日間再現性

LLOQ QC-1, Low QC-1, Middle QC-1 及び High QC-1 を各濃度 n=5 で 3 日間測定した。すなわち、測定日毎に各バリデーション QC サンプルからそれぞれ n=1 で測定実測試料を調製して 1 回測定した。当該操作を 3 日間繰り返した。同時に作成した検量線から得られた定量値（n=15）の平均値を用いて真度及び精度を算出した。

<許容基準>

LLOQ QC：真度が理論値の±20.0%以内かつ精度が 20.0%以下であること。

その他の QC サンプル：真度が理論値の±15.0%以内かつ精度が 15.0%以下であること。

6.6.7 回収率及びマトリックス効果

血液からの回収率とマトリックス効果を併せた形で Matrix factor を算出し、個体間におけるマトリックス効果のばらつきを確認した。

- マトリックス効果確認試料

雌雄各 3 例から得たブランク血液を用いて、下表の条件に従い、個体毎に n=1 で以下のマトリックス効果確認試料を調製した。それぞれから測定実測試料を n=1 で調製して 1 回測定した。

試料名称	血液中濃度 (ng/mL)	調製方法
Matrix-High	800	Cal-800 と同様の方法で調製した。
Matrix-Low	10	Cal-10 と同様の方法で調製した。

- マトリックス効果基準試料

ブランク血液の代わりに水を用いて、上述のマトリックス効果確認試料と同様の方法で調製した (各濃度につき n=1)。それぞれから n=1 で測定実測試料を調製し、3 回測定した。

- Matrix factor の算出

測定対象物質及び IS について、マトリックス効果基準試料中のピーク面積 (平均値) に対するマトリックス効果確認試料中のピーク面積比を Matrix factor とした。

$$\text{測定対象物質の Matrix factor (\%)} = (M_A / SM_A) \times 100$$

$$\text{IS の Matrix factor (\%)} = (M_{IS} / SM_{IS}) \times 100$$

M_A : マトリックス効果確認試料中の測定対象物質ピーク面積

SM_A : マトリックス効果基準試料中の測定対象物質ピーク面積 (平均値)

M_{IS} : マトリックス効果確認試料中の IS ピーク面積

SM_{IS} : マトリックス効果基準試料中の IS ピーク面積 (平均値)

<許容基準>

精度が 15.0%以下であること。

6.6.8 希釈妥当性

下記 High QC-3 を調製し、ブランク血液を用いて n=5 で 5 倍希釈及び 20 倍希釈した。それぞれから n=1 で測定実測試料を調製して 1 回測定した。

同時に作成した検量線から得られた High QC-3 濃度に希釈倍率を乗じて定量値とした。得られた定量値の平均値を用いて真度及び精度を算出した。

<High QC-3 の調製>

PP 製マイクロチューブに下表の条件で標準試料溶液を分取し、ブランク血液を添加・攪拌し、High QC-3 を用時調製した。

バリデーション QC サンプル	添加溶液	添加量 (μL)	血液量 (μL)	血液中濃度 (ng/mL)
High QC-3	WS-40000	20	980	800

<希釈方法>

20 倍希釈： 5 倍希釈試料 30 μL と 90 μL のブランク血液を混合する。

5 倍希釈： 20 μL の High QC-3 と 80 μL のブランク血液を混合する。

<許容基準>

真度が理論値の $\pm 15.0\%$ 以内かつ精度が 15.0%以下であること。

6.6.9 測定実測試料の安定性

日間再現性（3 日目）に調製された Low QC-1 及び High QC-1 の測定実測試料 1~3 本目を使用した。当該測定実測試料を 4 $^{\circ}\text{C}$ に設定したオートサンプラ内にセットした。各濃度の測定実測試料を調製直後と調製直後の測定実測試料の測定開始から 6, 12, 24 及び 48 時間後に 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。LC/MS/MS は、測定期間中連続運転した。

調製直後及び保存後、それぞれの時点で得られた定量値（平均値）より真度を算出した。

$$\text{真度 (\%)} = \frac{\text{調製直後もしくは保存後の定量値 (平均値)}}{\text{理論値}} \times 100$$

<許容基準>

調製直後及び保存後の真度が共に理論値の $\pm 15.0\%$ 以内であること。

6.6.10 凍結融解安定性

Low QC-2 及び High QC-2（各濃度 $n=3$ ）より、調製直後に $n=1$ 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から調製直後の定量値を得た。

また、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 本を氷冷下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。本操作を繰り返して、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して 1 回測定した。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。

調製直後及び凍結融解 3 回後、それぞれの時点で得られた定量値（平均値）から真度を算出した。

$$\text{真度 (\%)} = \frac{\text{調製直後もしくは凍結融解 3 回後の定量値 (平均値)}}{\text{理論値}} \times 100$$

<許容基準>

調製直後及び凍結融解 3 回後の真度が共に理論値の $\pm 15.0\%$ 以内であること。

6.6.11 短期安定性

凍結保存（約-80°C）された Low QC-2 及び High QC-2（各濃度 n=3）を融解し、完全に融解したことを確認した後、6、24 時間冷蔵（実測値：5.4～5.7°C）で放置した。

放置後、別途各濃度につき 3 本を融解し、全ての試料を検量線用標準試料溶液と共に前処理に供した。それぞれから n=1 で測定実測試料を調製して 1 回測定した。

融解直後、6 及び 24 時間放置後、それぞれの時点で得られた定量値（平均値）から真度を算出した。

$$\text{真度 (\%)} = \frac{\text{融解直後もしくは放置後の定量値 (平均値)}}{\text{理論値}} \times 100$$

<許容基準>

融解直後及び放置後の真度が共に理論値の±15.0%以内であること。

6.6.12 長期安定性

Low QC-2 及び High QC-2（各濃度 n=3）より、調製直後に測定実測試料を n=1 で調製して測定した。同時に作成した検量線から調製直後の定量値を得た。

また、約-80°C（許容範囲：-60°C 以下）において 29 日間凍結保存後、各 QC サンプルにつき 3 本を氷冷下に放置して融解し、n=1 で測定実測試料を調製して測定した。

同時に作成した検量線から凍結保存後の定量値を得た。

調製直後及び凍結保存後、それぞれの時点で、得られた定量値（平均値）から真度を算出した。

$$\text{真度 (\%)} = \frac{\text{調製直後もしくは凍結保存後の定量値 (平均値)}}{\text{理論値}} \times 100$$

<許容基準>

調製直後及び凍結保存後の真度が共に理論値の±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

下記の測定実施試料を調製、測定した。

- 室温における安定性

SS, WS-5, ISSS 及び ISWS を調製し、室温（実測値：18.6～19.1°C）にて 24 時間放置した。

放置後、下記に従い各溶液から n=3 で測定実測試料を調製して 1 回測定した。

同時に用時調製した同濃度の溶液からも n=3 で測定実測試料を調製して 1 回測定した（冷蔵における安定性が確認されたため、その期限内の溶液を使用した）。

- 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 ヶ月 (32 日間) 保存した。保存後、下記に従い各溶液から n=3 で測定実測試料を調製して 1 回測定した。同時に用時調製した同濃度の溶液からも n=3 で測定実測試料を調製して 1 回測定した。

- 測定実測試料の調製

SS :	SS はメタノールを用いて 5 ng/mL まで希釈した。その溶液 (20 μ L) にメタノール 420 μ L を添加後、攪拌した。攪拌後、30 μ L を分取し、10 mmol/L ギ酸アンモニウム/メタノール (3:7, v/v) 250 μ L を添加、攪拌した。
WS-5 :	WS-5 (5 ng/mL : 20 μ L) にメタノール 420 μ L を添加後、攪拌した。攪拌後、30 μ L を分取し、10 mmol/L ギ酸アンモニウム/メタノール (3:7, v/v) 250 μ L を添加、攪拌した。
ISSS :	ISSS はメタノールを用いて 500 ng/mL まで希釈した。その溶液 (400 μ L) にメタノール 40 μ L を添加後、攪拌した。攪拌後、30 μ L を分取し、10 mmol/L ギ酸アンモニウム/メタノール (3:7, v/v) 250 μ L を添加、攪拌した。
ISWS :	ISWS (500 ng/mL : 400 μ L) にメタノール 40 μ L を添加後、攪拌した。攪拌後、30 μ L を分取し、10 mmol/L ギ酸アンモニウム/メタノール (3:7, v/v) 250 μ L 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標準試料溶液中の IS ピーク面積 (平均値)

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

<許容基準>

残存率が 100.0 \pm 15.0% 以内であること。

6.7 サル血液分析法のバリデーション

6.7.1 選択性

雌雄各 3 例の異なる個体から得たブランク血液を用いて、個体毎に n=1 で Blank 及び LLOQ を調製した。それぞれから n=1 で測定実測試料を調製して 1 回測定した。

<許容基準>

測定対象物質及び IS の溶出位置に検出される夾雑ピークの面積が LLOQ における測定対象物質及び IS のピーク面積に対して、それぞれ 20.0 及び 5.0%以下であること。

6.7.2 検量線の直線性

Blank, Zero 及び 8 濃度の検量線用標準試料溶液を n=1 で調製した。それぞれから n=1 で測定実測試料を調製して 1 回測定した。Blank 及び Zero 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（検量線作成には用いなかった）。

測定対象物質の IS に対するピーク面積比を添加濃度に対して一次回帰して得られる直線を検量線とした。検量線には $1/X^2$ の重み付け（X：血液中測定対象物質濃度）を用いた。

各濃度における真度を算出した。

直線性は、バリデーションにて作成される全検量線で評価した。

<許容基準>

- Blank 及び Zero における測定対象物質及び 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定量下限の検量線用標準試料溶液における測定対象物質及び IS のピーク面積に対してそれぞれ 20.0 及び 5.0%以下であること。
- 8 濃度の検量線用標準試料溶液のうち、定量上下限を含む 6 濃度以上において真度が理論値の $\pm 15.0\%$ 以内（定量下限は $\pm 20.0\%$ 以内）であるとき、検量線として妥当であると判断する。
- 定量下限及び定量上限以外の濃度について、真度が理論値の $\pm 15.0\%$ 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、定量上下限を含む最低 6 濃度以上の検量線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。

6.7.3 キャリーオーバー

LLOQ, ULOQ 及び Blank を調製した。それぞれから n=1 で測定実測試料を調製して、上記順番で LC/MS/MS に注入した。この一連の測定を 3 回実施した。

<許容基準>

Blank 中の測定対象物質及び IS 溶出位置に検出されるキャリーオーバーピークの面積が、3 回の測定全てにおいて、LLOQ における測定対象物質及び IS ピーク面積に対して、それぞれ 20.0 及び 5.0%以下であること。

6.7.4 定量下限

定量下限における測定対象物質のピーク面積は、Blank の 5 倍以上であった（選択性の結果にて評価した）。

定量下限における真度は理論値の $\pm 20.0\%$ 以内、精度は 20.0% 以下であった（日内再現性の結果にて評価した）。

6.7.5 日内再現性

LLOQ QC-1, Low QC-1, Middle QC-1 及び High QC-1（各濃度 $n=5$ ）から、それぞれ $n=1$ で測定実測試料を調製して 1 回測定した。同時に作成した検量線から得られた定量値 ($n=5$) の平均値を用いて、真度及び精度を算出した。

<許容基準>

LLOQ QC：真度が理論値の $\pm 20.0\%$ 以内かつ精度が 20.0% 以下であること。

その他の QC サンプル：真度が理論値の $\pm 15.0\%$ 以内かつ精度が 15.0% 以下であること。

6.7.6 日間再現性

LLOQ QC-1, Low QC-1, Middle QC-1 及び High QC-1 を各濃度 $n=5$ で 3 日間測定した。すなわち、測定日毎に各バリデーション QC サンプルからそれぞれ $n=1$ で測定実測試料を調製して 1 回測定した。当該操作を 3 日間繰り返した。同時に作成した検量線から得られた定量値 ($n=15$) の平均値を用いて真度及び精度を算出した。

<許容基準>

LLOQ QC：真度が理論値の $\pm 20.0\%$ 以内かつ精度が 20.0% 以下であること。

その他の QC サンプル：真度が理論値の $\pm 15.0\%$ 以内かつ精度が 15.0% 以下であること。

6.7.7 回収率及びマトリックス効果

血液からの回収率とマトリックス効果を併せた形で Matrix factor を算出し、個体間におけるマトリックス効果のばらつきを確認した。

- マトリックス効果確認試料

雌雄各 3 例から得たブランク血液を用いて、下表の条件に従い、個体毎に $n=1$ で以下のマトリックス効果確認試料を調製した。それぞれから測定実測試料を $n=1$ で調製して 1 回測定した。

試料名称	血液中濃度 (ng/mL)	調製方法
Matrix-High	800	Cal-800 と同様の方法で調製した。
Matrix-Low	10	Cal-10 と同様の方法で調製した。

- マトリックス効果基準試料

ブランク血液の代わりに水を用いて、上述のマトリックス効果確認試料と同様の方法で調製した（各濃度につき n=1）。それぞれから n=1 で測定実測試料を調製し、3 回測定した。

- Matrix factor の算出

測定対象物質及び IS について、マトリックス効果基準試料中のピーク面積（平均値）に対するマトリックス効果確認試料中のピーク面積比を Matrix factor とした。

<許容基準>

精度が 15.0%以下であること。

6.7.8 希釈妥当性

下記 High QC-3 を調製し、ブランク血液を用いて n=5 で 5 倍希釈及び 20 倍希釈した。それぞれから n=1 で測定実測試料を調製して 1 回測定した。

同時に作成した検量線から得られた High QC-3 濃度に希釈倍率を乗じて定量値とした。得られた定量値の平均値を用いて真度及び精度を算出した。

<High QC-3 の調製>

PP製マイクロチューブに下表の条件で標準試料溶液を分取し、ブランク血液を添加・攪拌し、High QC-3 を用時調製した。

バリデーション QC サンプル	添加溶液	添加量 (μL)	血液量 (μL)	血液中濃度 (ng/mL)
High QC-3	WS-40000	20	980	800

<希釈方法>

20 倍希釈： 5 倍希釈試料 30 μL と 90 μL のブランク血液を混合する。

5 倍希釈： 20 μL の High QC-3 と 80 μL のブランク血液を混合する。

<許容基準>

真度が理論値の±15.0%以内かつ精度が 15.0%以下であること。

6.7.9 測定実測試料の安定性

日間再現性（3 日目）に調製された Low QC-1 及び High QC-1 の測定実測試料 1～3 本目を使用した。当該測定実測試料を 4℃ に設定したオートサンプラ内にセットした。各濃度の測定実測試料を調製直後と調製直後の測定実測試料の測定開始から 6, 12, 24 及び 48 時間後に 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。LC/MS/MS は、測定期間中連続運転した。

調製直後及び保存後、それぞれの時点で得られた定量値（平均値）より真度を算出した。

<許容基準>

調製直後及び保存後の真度が共に理論値の $\pm 15.0\%$ 以内であること。

6.7.10 凍結融解安定性

Low QC-2 及び High QC-2 (各濃度 $n=3$) より, 調製直後に $n=1$ 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から調製直後の定量値を得た。

また, 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 本を氷冷下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して 1 回測定した。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。

調製直後及び凍結融解 3 回後, それぞれの時点で得られた定量値 (平均値) から真度を算出した。

<許容基準>

調製直後及び凍結融解 3 回後の真度が共に理論値の $\pm 15.0\%$ 以内であること。

6.7.11 短期安定性

凍結保存 (約 -80°C) された Low QC-2 及び High QC-2 (各濃度 $n=3$) を融解し, 完全に融解したことを確認した後, 6, 24 時間冷蔵 (実測値: $5.4\sim 5.7^{\circ}\text{C}$) で放置した。

放置後, 別途各濃度につき 3 本を融解し, 全ての試料を検量線用標準試料溶液と共に前処理に供した。それぞれから $n=1$ で測定実測試料を調製して 1 回測定した。

融解直後, 6 及び 24 時間放置後, それぞれの時点で得られた定量値 (平均値) から真度を算出した。

<許容基準>

融解直後及び放置後の真度が共に理論値の $\pm 15.0\%$ 以内であること。

6.7.12 長期安定性

Low QC-2 及び High QC-2 (各濃度 $n=3$) より, 調製直後に測定実測試料を $n=1$ で調製して測定した。同時に作成した検量線から調製直後の定量値を得た。

また, 約 -80°C (許容範囲: -60°C 以下) において 29 日間凍結保存後, 各 QC サンプルにつき 3 本を氷冷下に放置して融解し, $n=1$ で測定実測試料を調製して測定した。

同時に作成した検量線から凍結保存後の定量値を得た。

調製直後及び凍結保存後, それぞれの時点で, 得られた定量値 (平均値) から真度を算出した。

<許容基準>

調製直後及び凍結保存後の真度が共に理論値の $\pm 15.0\%$ 以内であること。