

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  $\mu$ L を分取後、水/ギ酸 (1000:1, v/v) 400  $\mu$ L を添加し、次表に従い P092 標準試料溶液を 20  $\mu$ 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  $\mu$ L 分取、窒素乾固後、ブランク血漿を 20  $\mu$ 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 $-80^{\circ}\text{C}$  (実測値:  $-85.2\sim-65.3^{\circ}\text{C}$ , 許容範囲:  $-60^{\circ}\text{C}$  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  $\mu$ L を分取した。
- (2) 水/ギ酸 (1000:1, v/v) 400  $\mu$ L を添加した。
- (3) メタノール 20  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ Elution plate (30  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu$ L 及び水/ギ酸 (1000:1, v/v) 200  $\mu$ L でコンディ

ショニングした)。

- (7) 水/ギ酸 (1000:1, v/v) 200  $\mu$ L で洗浄した。
- (8) メタノール 70  $\mu$ L で溶出した。
- (9) 水/ギ酸 (1000:1, v/v) 140  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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) : N<sub>2</sub>, 18 psi  
 Collision gas flow (CAD) : N<sub>2</sub>, 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  $\pm 15.0\%$ （LLOQ では  $\pm 20.0\%$ ）以内であること。

LLOQ 及び ULOQ 以外の濃度について，%RE が  $\pm 15.0\%$  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，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  $\pm 20.0\%$  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  $\mu$ L 分取, 窒素乾固後, ブランク血漿を 20  $\mu$ 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  $10^{\circ}\text{C}$  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  $-80^{\circ}\text{C}$  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:  $20.1 \sim 22.3^{\circ}\text{C}$ ). 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  $-80^{\circ}\text{C}$  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、 $100.0 \pm 15.0\%$ 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なかった (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-10.6%~12.2%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、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、7.4%及び6.9%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、-2.1%~9.0%及び3.0%~4.3%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、-3.6%~10.1%及び4.5%~6.2%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76.5%、85.5%及び33.7%、35.7%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3.6%、5.6%及び0.5%、2.2%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93.6%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ル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85.0%及び89.7%、18時間保存後にそれぞれ97.3%及び94.8%、24時間保存後にそれぞれ97.6%及び98.2%、30時間保存後にそれぞれ90.9%及び92.9%、36時間保存後にそれぞれ86.7%及び87.8%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、オートサンプル内で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100.6%及び95.3%となり、いずれも許容基準を満たした(Table 10)。

従って、サル血漿中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107.0%及び91.3%となり、いずれも許容基準を満たした(Table 11)。

従って、サル血漿中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(14日間)保存後にそれぞれ96.7%及び99.6%、1ヶ月間(32日間)保存後にそれぞれ96.5%及び86.5%、3ヶ月間(96日間)保存後にそれぞれ65.3%及び73.1%となり、1ヶ月間(32日間)保存後までは許容基準を満たした(Table 12)。

従って、サル血漿中P092は、約-80°Cにおいて1ヶ月間(32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つ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つたこと  
なし

Table 1 Selectivity

Plasma No.	Sample	P092		IS	
		Peak area	Ratio (%)	Peak area	Ratio (%)
Male No. 1	Blank	0	0.0	0	0.0
	LLOQ	902	--	158259	--
Male No. 2	Blank	0	0.0	0	0.0
	LLOQ	846	--	193952	--
Male No. 3	Blank	0	0.0	2276	1.2
	LLOQ	902	--	194206	--
Female No. 1	Blank	0	0.0	0	0.0
	LLOQ	1016	--	205635	--
Female No. 2	Blank	0	0.0	0	0.0
	LLOQ	968	--	204156	--
Female No. 3	Blank	0	0.0	0	0.0
	LLOQ	1036	--	203719	--

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	2012/8/23	5	5.61	12.2	Blank	0	0
		10	10.4	4.0		( 0.0 )	( 0.0 )
		20	18.4	-8.0			
		50	48.4	-3.2	Zero	0	188871
		100	98.6	-1.4		( 0.0 )	--
		200	191	-4.5			
		500	497	-0.6	LLOQ	843	188421
1000	1020	2.0					
P092	2012/8/24	5	5.48	9.6	Blank	0	0
		10	9.98	-0.2		( 0.0 )	( 0.0 )
		20	19.8	-1.0			
		50	49.5	-1.0	Zero	0	175771
		100	96.2	-3.8		( 0.0 )	--
		200	195	-2.5			
		500	483	-3.4	LLOQ	982	194810
1000	1030	3.0					
P092	2012/8/28	5	5.08	1.6	Blank	0	0
		10	10.4	4.0		( 0.0 )	( 0.0 )
		20	18.1	-9.5			
		50	49.3	-1.4	Zero	0	186891
		100	102	2.0		( 0.0 )	--
		200	198	-1.0			
		500	540	8.0	LLOQ	889	172064
1000	963	-3.7					
P092	2012/9/6	5	5.22	4.4	Blank	0	0
		10	9.81	-1.9		( 0.0 )	( 0.0 )
		20	18.2	-9.0			
		50	53.5	7.0	Zero	0	217109
		100	97.3	-2.7		( 0.0 )	--
		200	202	1.0			
		500	511	2.2	LLOQ	900	218687
1000	988	-1.2					
P092	2012/9/24	5	5.45	9.0	Blank	116	0
		10	11.1	11.0		( 10.5 )	( 0.0 )
		20	20.1	0.5			
		50	44.7	-10.6	Zero	0	207832
		100	92.2	-7.8		( 0.0 )	--
		200	196	-2.0			
		500	479	-4.2	LLOQ	1110	226189
1000	1040	4.0					
P092	2012/11/27	5	4.79	-4.2	Blank	0	0
		10	9.52	-4.8		( 0.0 )	( 0.0 )
		20	21.9	9.5			
		50	51.0	2.0	Zero	450	239930
		100	97.3	-2.7		( 9.9 )	--
		200	196	-2.0			
		500	513	2.6	LLOQ	4556	316887
1000	991	-0.9					

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	1081	--	196727	--
ULOQ-1	238833	--	194101	--
Blank-1	0	0.0	0	0.0
LLOQ-2	1035	--	197492	--
ULOQ-2	232491	--	193731	--
Blank-2	0	0.0	0	0.0
LLOQ-3	910	--	201367	--
ULOQ-3	237558	--	193000	--
Blank-3	0	0.0	0	0.0

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	6.01	5.37	0.37	7.4	6.9
		4.93				
		5.15				
		5.39				
		5.23				
		5.51				

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	11.2	10.9	0.5	9.0	4.3
		10.7				
		11.0				
		11.4				
		10.2				
	50	47.4	48.9	1.5	-2.1	3.1
		50.2				
		48.9				
		50.7				
		47.5				
	800	771	790	24	-1.2	3.0
		767				
		794				
		794				
		826				

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			
P092	10	1	11.2	11.0	0.7	10.1	6.2
			10.7				
			11.0				
		11.4					
		10.2					
		11.1					
	2	2	11.5	11.0	0.7	10.1	6.2
			11.8				
			10.6				
		11.0					
		10.7					
		9.88					
	3	3	11.9	11.0	0.7	10.1	6.2
			9.99				
			12.2				
		47.4					
		50.2					
		48.9					
50	2	50.7	48.2	2.3	-3.6	4.8	
		47.5					
		45.0					
	47.4						
	46.5						
	50.6						
3	3	46.3	48.2	2.3	-3.6	4.8	
		51.9					
		49.0					
	51.1						
	45.9						
	44.8						
800	1	771	824	37	3.0	4.5	
		767					
		794					
	794						
	826						
	882						
2	2	817	824	37	3.0	4.5	
		856					
		832					
	867						
	805						
	785						
3	3	843	824	37	3.0	4.5	
		864					
		856					

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	2094	73.9	76.5	2.8	3.6
			2160	76.2			
			2250	79.4			
		Standard sample	2892				
			2921	--	--	--	--
			2693				
	Mean	2835	--	--	--	--	
	800	Recovery sample	196353	90.7	85.5	4.8	5.6
			175985	81.3			
			182647	84.4			
Standard sample		221955					
		211474	--	--	--	--	
		215987					
Mean	216472	--	--	--	--		
IS (400 ng/mL)	10	Recovery sample	174385	33.8	33.7	0.2	0.5
			173119	33.6			
			174863	33.9			
		Standard sample	516544				
			516003	--	--	--	--
			515457				
	Mean	516001	--	--	--	--	
	800	Recovery sample	180194	36.6	35.7	0.8	2.2
			174390	35.4			
			172662	35.1			
Standard sample		498410					
		495834	--	--	--	--	
		483270					
Mean	492505	--	--	--	--		

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	3970	3743	93.6
			3640		
			3620		

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)	11.2 10.7 11.0	11.0	--
		12 h	9.53 9.27 9.18	9.33	85.0
		18 h	10.4 11.1 10.5	10.7	97.3
		24 h	11.1 10.3 10.7	10.7	97.6
		30 h	10.3 9.50 10.1	9.97	90.9
		36 h	9.77 9.19 9.57	9.51	86.7
		Just after preparation (Initial)	771 767 794	777	--
		12 h	701 667 724	697	89.7
		18 h	731 716 764	737	94.8
		24 h	747 755 788	763	98.2
		30 h	716 708 743	722	92.9
		36 h	679 666 703	683	87.8

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	10.4	10.1	100.6
			10.5		
	800	3 cycles	9.29	762	95.3
			748		
		773			
		765			

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	10.6	10.7	107.0
			11.0		
	800	4 h	10.5	731	91.3
			738		
		733			
		721			

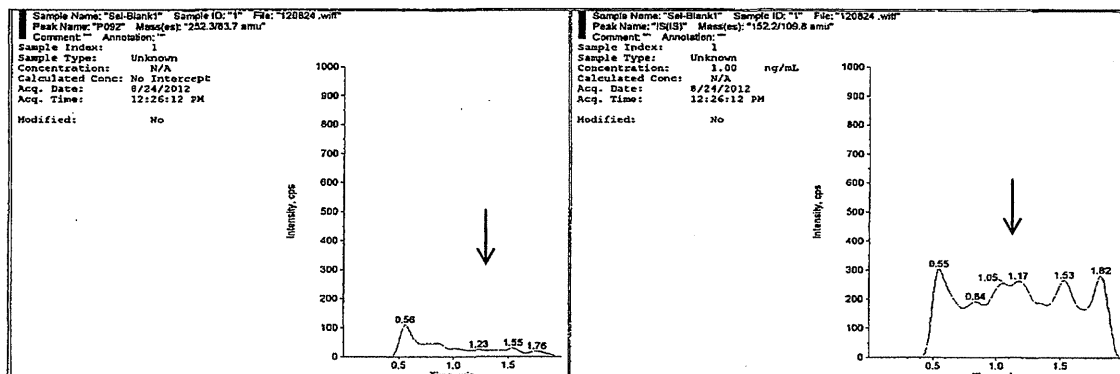
Residual rate (%) = mean value after storage/nominal value × 100

Table 12 Long-term stability

Analyte	Concentration (ng/mL)			Residual rate (%)	
	Nominal	Storage period	Measured		
P092	10	14 days	10.4	9.67	96.7
			9.62		
			8.99		
		32 days	8.55	9.65	
			9.49		
			10.9		
	96 days	7.73	6.53		
		6.77			
		5.10			
	800	14 days	897	797	99.6
			754		
			739		
32 days		688	692		
		694			
		695			
96 days	452	585			
	654				
	649				

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

(1) Blank sample



(3) LLOQ sample (5 ng/mL)

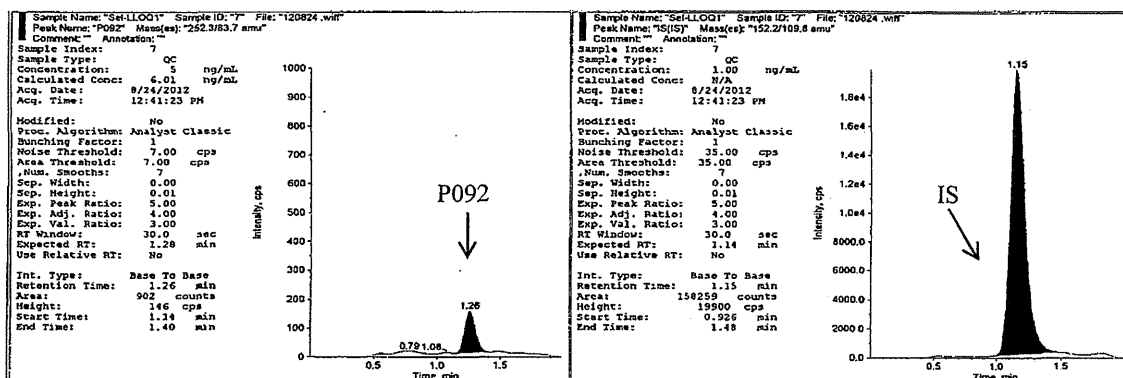


Figure 1 Typical chromatograms of selectivity

## 信 頼 性 保 証 証 明 書

試験委託者：岐阜大学

表 題：サル血漿中P092濃度測定法バリデーション

試験番号：B120712


本試験は下記の基準に従って実施され、本最終報告書は、試験の方法、結果が正確に記載されていることを保証する。調査の内容、調査日および報告日を以下に示す。

「申請資料の信頼性の基準」

(薬事法施行規則第43条, 平成16年7月9日)

調 査 内 容	調 査 日	報 告 日	
		試験責任者	運営管理者
試験計画書			
試験計画書	2012年08月13日	2012年08月13日	2012年08月13日
(再調査)	2012年08月14日	2012年08月14日	2012年08月14日
試験計画書変更書 (1)	2012年08月14日	2012年08月14日	2012年08月14日
試験計画書変更書 (2)	2012年08月21日	2012年08月21日	2012年08月21日
(再調査)	2012年08月21日	2012年08月21日	2012年08月21日
試験資料・最終報告書			
試験資料・最終報告書草案	2013年01月07日 ～2013年01月10日	2013年01月10日	2013年01月10日
(再調査)	2013年01月16日	2013年01月16日	2013年01月16日
試験資料・最終報告書	2013年01月29日	2013年01月29日	2013年01月29日

2013年1月29日  
信頼性保証部門責任者

東川国男 

東川 国男  
三菱化学メディエンス株式会社  
鹿島研究所