

カラム温度:40°C 付近の一定温度

なお、試料溶液の調製については、XYZ の溶解度、溶液中における安定性及びクロマトグラムへの影響を検討した結果から、50% アセトニトリルを抽出溶媒として選択した。時々振り混ぜながら 10 分間超音波を照射して抽出した後、遠心分離することにより、濃度 1 mg/mL の試料溶液を調製することとした。

補足説明

初期スクリーニング検討では、これまでの知見に基づいて、分析条件の大まかな設計を行うことを意図している。分析カラム、移動相の pH、塩濃度、有機溶媒の種類及び比率、グラジエント条件等について、従来のトライ&エラーや経験に基づいた検討に加え、実験計画法によるスクリーニング、市販のクロマトグラフィー分析法開発ソフトウェアを用いた検討も可能である。

初期スクリーニング検討を通じて得られる各要因(パラメータ)に関する知見は、一次リスクアセスメントを行う際に有用となる。本検討過程で、直接的に検討を行った要因の他にも、分析結果に影響を及ぼすその他の要因に関する知見が間接的に得られることがあり、これもリスクアセスメントに活用可能である。また、分析結果への影響のより大きい要因を抽出するためには、実験計画法を利用した分析法パラメータの評価が有用である。

2.2.2 一次リスクアセスメント

HPLC 分析による定量法の分析性能は、その特異性、すなわち分離特性に大きく影響されることが知られている。そこで、分離特性に影響すると考えられる要因を抽出し、リスクアセスメントを行った。リスクアセスメントに際しては、分析法の初期スクリーニングを通じて得られた知見、分析手法に関する一般的な知識及び経験を利用した。リスクアセスメントの結果を特性要因図として図 3 に示す。抽出された要因については、それぞれの特性に基づいた分類を行った。

各要因につき、適切に管理することによって分析結果への影響を抑えることができる要因を要因 C(Controllable)、管理することが難しいものの、分析結果への影響を低減するために対策を施す必要がある要因を要因 N(Noise)、分析結果への影響を検証する必要がある要因を要因 X(experimental)に分類した。要因 N に分類された要因については、欠陥モード影響解析(FMEA)を行うことにより、分析結果への影響を低減するための対策を検討した。また、要因 X に分類された要因については、次の 2.2.3 項において実験的な評価を行うことにより、その影響について検証するとともに至適な領域について確認した。

試料調製方法に由来した分析法の性能への影響についても、別にアセスメントを行った(本報告書は、HPLC 条件の開発について重点を置いているため、試料調製に関して詳細は述べない。試料調製に関するアセスメントは、独立して行うことも HPLC 条件開発の部分と同時にすることもできる)。

補足説明

一次リスクアセスメントでは、初期スクリーニングで分析条件の検討を行う中で得られた知見を利用し、分析結果に影響を及ぼし得る種々の要因を特定し、その影響を低減するための適切な対応ができるよう、その特性に応じた要因の分類を行う。ここで挙げる要因は、初期スクリーニングにおいて直接的に検討したパラメータに限定されるわけではなく、これまでに蓄積されている化合物に関する情報や、選択した分析手法に関する一般的知識や経験からも、分析結果に影響を及ぼし得る要因を抽出することができる。

一次リスクアセスメントでは、多くの要因が特定されるが、要因を CNX に分類することで、その種類に応じた適切な対応が可能となり、実験的な検証の数を減らすことも可能となる。

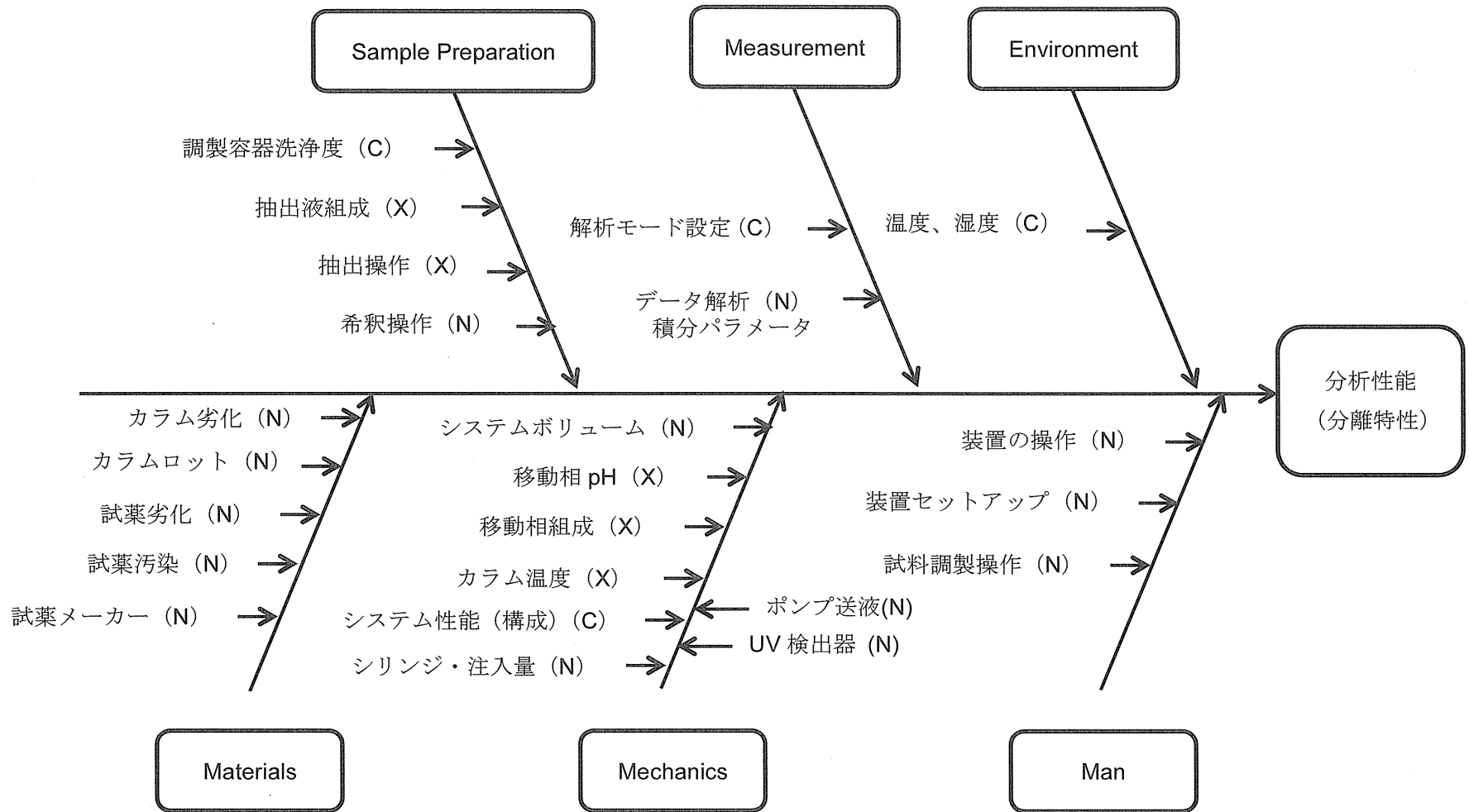


図 3 分析性能(分離特性)を特性とした要因分析(特性要因図)

2.2.3 実験的評価

一次リスクアセスメントにおいて要因Xに分類された要因につき、分析性能(分離特性)に及ぼす影響を実験的に評価した。

2.2.3.1 HPLC 操作条件

初期スクリーニング及び一次リスクアセスメントの結果より、要因 X に分類された、移動相 pH、カラム温度及び移動相組成(有機溶媒比率)は、XYZ 製剤中の不純物ピークの保持、分離挙動に大きく影響することが明らかとなった。

そこで、移動相の pH、カラム温度及びアセトニトリルの混合比率について、最適な水準を検証するために、Box-Behnken 計画を用いた実験を行った。初期スクリーニングの結果設定された HPLC 操作条件を基点として、実験計画を策定した。実験のデザインと得られた結果を表 3 に、応答曲面の等高線図を図 4 に示した。図 4 の応答局面は、カラム温度 38 ~ 44°C における、移動相 pH 及びアセトニトリルの混合比率の変動に対するピーク数及び最小の分離度の変化を示している。赤色の領域は、ピーク数が 7 未満で目的とする Imp 1 から 6 が互いに、もしくはその他の不純物と分離されていないことを示し、青色の領域は、最小の分離度が 1.5 未満である領域を示している。残る白色の領域では、目的とする Imp 1 から 6 が分離されているとともに、互いの分離度が 1.5 以上である領域を示しており、求める分析性能を満たすパラメータ領域と考えられた。これらの結果より、カラム温度 39 ~ 42°C、移動相の pH 8.5 ~ 10.0、アセトニトリルの混合比率 41 ~ 45% の範囲においては、任意の条件において目的とするピークの分離が得られることが示された。

表 3 最適化実験の条件と結果の一覧

実験 No.	pH	カラム温度	アセトニトリル%	ピーク数	最小の分離度
1	8	35	40	6	3.4
2	8	45	40	7	1.6
3	10	35	40	6	3.4
4	10	45	40	7	1.1
5	9	35	30	6	3.4
6	9	35	50	7	0.7
7	9	45	30	6	3.5
8	9	45	50	7	0.8
9	8	40	30	7	1.4
10	10	40	30	7	1.7
11	8	40	50	7	1.1
12	10	40	50	7	3.0
13	9	40	40	7	2.2
14	9	40	40	7	2.3
15	9	40	40	7	2.3

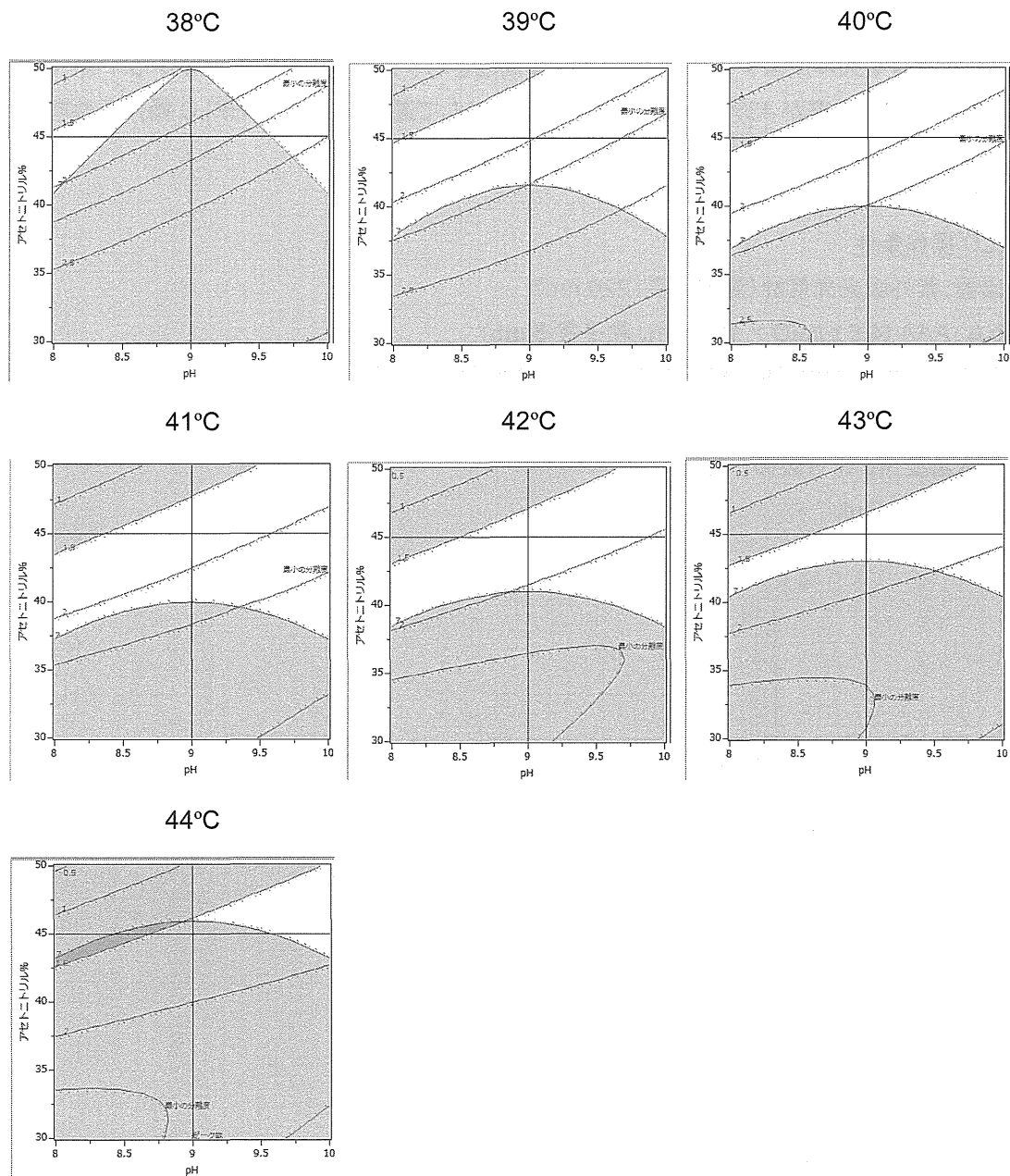


図 4 各カラム温度における移動相の pH とアセトニトリルの混合比率の変動に対するピーク数及び最小の分離度の変化

以上の結果より、良好な分離特性を示した白色の領域が最も大きいカラム温度 40°C の条件の中で、そのほぼ中央に位置する、すなわち高い頑健性を示す条件である、移動相の pH が 9.0 及びアセトニトリル比率が 43%の条件を、最適な条件として選択した。その HPLC 操作条件を以下に示す。、また、その条件で得られたクロマトグラムを図 5 に示す。

HPLC 操作条件

検出器: 紫外吸光光度計 (測定波長: 220 nm)

カラム: AAA (4.6 mmID × 150 mm、粒子径 5 μm)

移動相: pH 9.0 のホウ酸塩緩衝液, pH 9.0 / アセトニトリル混液 (57 : 43)

流速: 1.0 mL/min の一定流量

カラム温度: 40°C 付近の一定温度

試料注入量 5 uL

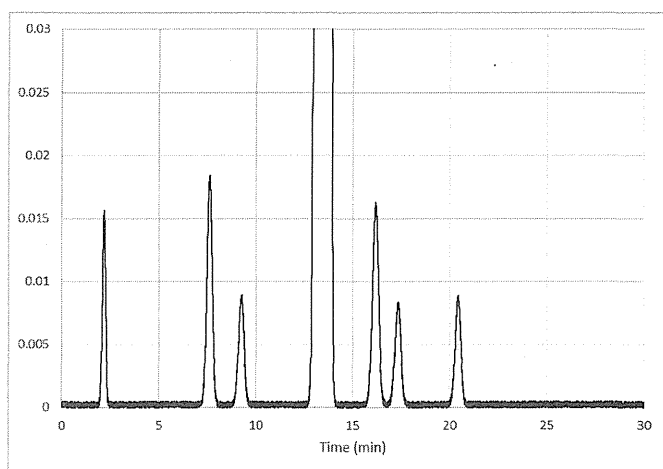


図 5 最適化された条件で得られたクロマトグラム

2.2.3.2 試料調製

一次リスクアセスメントにおいて要因 X に分類された要因のうち、抽出液組成が本分析法の分離特性に影響することが示唆された。そこで、XYZ の溶解度を考慮し、抽出溶媒として 40、50 及び 60% アセトニトリルを選択し、ピークの保持、形状及び分離への影響を確認した。その結果、50% アセトニトリルを選択することで、良好なピーク分離を維持したまま、1 mg/mL 濃度の試料溶液を調製できることが確認された。

補足説明

本報告書においては、試料調製に関わるアセスメント及び実験的な評価に際し、試料抽出溶媒(希釈溶媒)のみを取り上げたが、実際の分析法開発においては他の要因についての考察が必要となる場合もある。

2.2.4 二次リスクアセスメント

一次リスクアセスメントにより Noise(N)に分類された要因について、最適化された分析法を対象に FMEA を行った。Risk Priority Number の定義を表 4 に、FMEA の結果及びリスク優先度のランクが中以上の Noise について、リスクの低減を図った結果を表 5 に示す。試薬、カラム、装置の要因に潜在的なリスクがあることが示唆されたため、それら要因に由来するリスクについては、システム適合性の設定によりリスクの低減を図った。データ解析及び試験者に由来するリスクについては、適切な教育の実施によりリスクの低減を図った。

表 4 Risk Priority Number の定義

Risk Priority Number (RPN) = S × O × D

低 (RPN 1 - 35)	十分に許容可能なリスクレベルであり、通常更なるリスクを低減することは必要されない
中 (RPN 36 - 59)	許容可能なリスクレベルであるが、さらにリスクを低減するための対策が望まれる
高 (RPN 60以上)	許容することが出来ないリスクレベルであり、リスクを低減する対策が必要とされる

表 5 FMEA の結果 (対策前後)

要因	エラーモード	対策前				対策	対策後							
		影響度 故障の影響 スコア	可能性 故障の原因 スコア	検出性 検出方法 スコア	リスク優先度 RPN ランク		影響度 スコア	可能性 スコア	検出度 スコア	リスク優先度 RPN ランク				
Sample Preparation 希釈操作	希釈誤差	ピーク面積	5	器具の精度	2	クロマトグラム	2	20 低	なし	5	2	2	20 低	
Material 試薬	メーカー間差	不純物ピーク	5	純度違い	4	クロマトグラム	2	40 中	メーカー、グレードの指定	5	4	1	20 低	
カラム	汚染	不純物ピーク	5	使用中の汚染	3	クロマトグラム	1	15 低	なし	5	3	1	15 低	
	劣化	不純物ピーク	5	経時的劣化	2	クロマトグラム	1	10 低	なし	5	2	1	10 低	
	充填剤ロット間差	ピーク分離	5	製造ばらつき	3	クロマトグラム	4	60 中	SST 理論段数、分離度)	5	3	1	15 低	
Mechanics HPLC	劣化	ピーク分離	5	経時的劣化	4	クロマトグラム	4	80 中	SST 理論段数、分離度)	5	4	1	20 低	
	送液ポンプ	送液不安定	5	機械的故障	2	クロマトグラム	4	40 中	SST 保持時間の再現性)	5	2	1	10 低	
システムボリューム	ピーク形状悪化	ピーク分離	5	配管の接続	3	クロマトグラム	4	60 中	SST シンメトリー係数、分離度)	5	3	1	15 低	
	シリンジ	注入再現性悪化	ピーク面積	5	機械的故障	2	クロマトグラム	4	40 中	SST 注入再現性)	5	2	1	10 低
UV検出器	応答不安定	ピーク面積	5	機械的故障	2	クロマトグラム	4	40 中	SST 注入再現性)	5	2	1	10 低	
Measurement データ解析	積分パラメータ	不適切な積分	ピーク面積	8	人為的要因	4	クロマトグラム	2	64 高	教育の実施	8	2	2	32 低
Man	試料調製	試料調製ミス	ピーク面積	8	人為的要因	3	生データの記録	2	48 中	教育の実施	8	2	2	32 低
	装置セットアップ	条件設定ミス	全般	8	人為的要因	3	生データの記録	2	48 中	教育の実施	8	2	2	32 低
	装置の操作	操作の間違い	全般	8	人為的要因	3	生データの記録	2	48 中	教育の実施	8	2	2	32 低

Severity

8	High impact	大きな影響がある	結果に重大な影響があり、間違った判断をもたらす
5	Moderate impact	影響がある	結果に相当な影響がある
3	Low impact	軽微な影響がある	結果に軽微な影響があるが、限定的である
1	Very low impact	ほとんど影響がない	結果にほとんど影響しない

Occurrence

4	Frequent	しばしば発生する	定期的に発生することが予想される (10/100)
3	Occasional	ときどき発生する	低い頻度で発生することが予想される (6/100)
2	Rare	まれに発生する	稀に発生すると予想される (1/100)
1	Unlikely	ほとんど発生しない	発生しない、もしくはほとんど発生しないレベル

Detectability

4	Likely not detected	ほとんど検出できない	検出する方法、システムがなく、検知することもできない
2	Regularly detected	通常検出できる	容易に検知することができる
1	Always detected	常に検出できる	検出する方法、システムがある

3. 分析法の性能の検証

ATP に基づき 1.項で設定された性能クライテリアを基準に、ICH Q2 分析法バリデーションガイドラインに従って分析法の性能を検証した。その結果、設定した分析法は全ての基準を満たし、その性能が確認された。

3.1 特異性

XYZ 製剤及び苛酷条件下で強制的に分解させた XYZ 製剤、主薬以外の配合成分及び抽出液のクロマトグラムを図 6 に示した。製剤添加剤成分及び抽出液から目的とする不純物の検出を妨害するピークは認められなかった。また、40°C/75%RH で 6 箇月間保存した XYZ 製剤のクロマトグラムからは、目的とする不純物以外の分解生成物のピークは検出されなかった。本分析法は ATP で規定した性能クライテリアを満足しており、十分な特異性を有することが検証された。

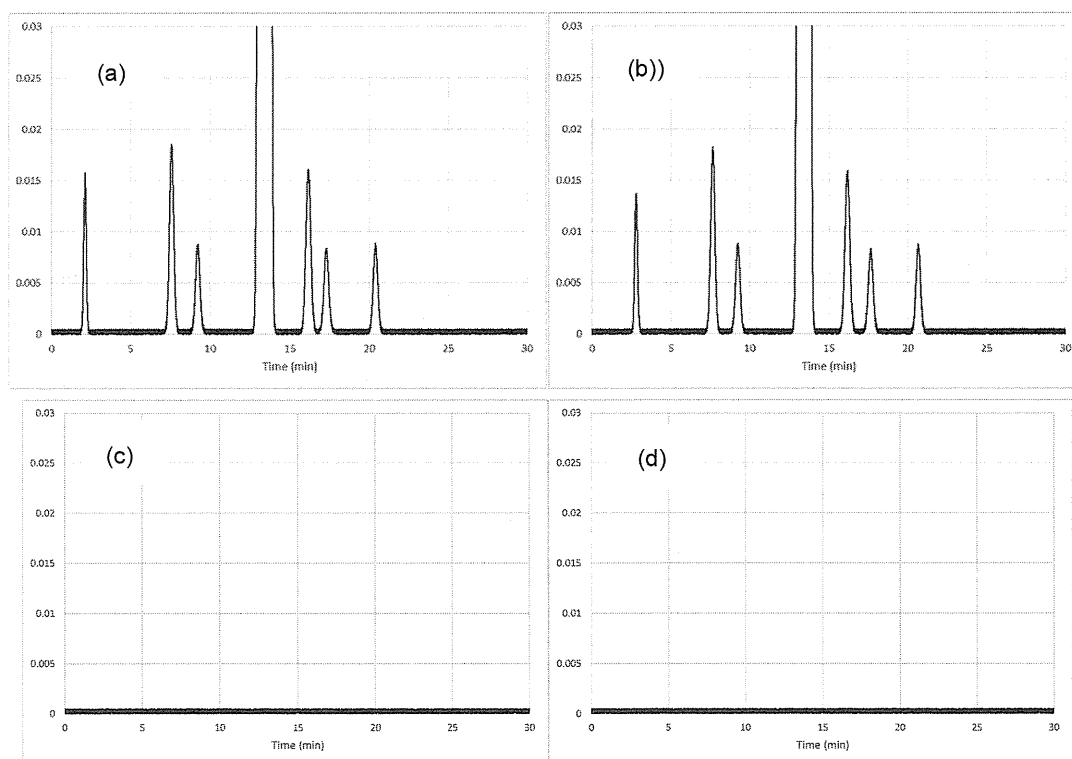


図 6 (a) XYZ 製剤、(b) 苛酷条件下(40°C/75%RH、無包装)、(c) プラセボ、(d) 抽出液

3.2 真度及び精度

二次リスクアセスメントの結果及び本分析法が実際に運用される環境を考慮し、分析法の真度及び精度に影響すると考えられる以下の要因を考慮して、真度及び精度の検証を行った。

- 分析者
- カラム充填剤のロット
- 試薬のメーカー違い
- HPLC 装置
- 分析日
- 不純物量

これら要因をランダムに組み合わせた実験条件を室内再現性に影響する 1 つの因子とし、実験計画法によって真度及び精度(併行精度及び室内再現精度)を求めた。実験のデザイン及び各類縁物質の回収率の結果を表 6 に示す。

表 6 真度及び精度のための実験デザインと添加回収実験の結果

研究班レビュー向けとして、真度及び精度(併行精度、室内再現精度)を、一度に評価する実験計画を用いています。

実験 No.		1	2	3	4	5	6						
実験条件	分析者	A	B	B	B	B	A						
	充填剤ロット	A	A	B	A	A	A						
	試薬のロット	A	B	A	B	B	B						
	HPLC 装置	B	B	B	B	A	A						
	分析日	B	A	B	B	B	B						
添加レベル		0.05%	0.15%	0.25%	0.15%	0.05%	0.25%						
回収率 (%)	XYZ	99.6	100.1	99.6	100.0	99.8	101.0	100.6	99.7	99.4	100.7	99	101.7
	Imp.1	98.1	101.7	99.6	98.4	98.1	101.6	99.3	99.7	100.2	100.2	97.5	99.9
	Imp.2	97.5	101.0	98.9	97.7	97.5	100.9	98.6	99.0	99.6	99.5	96.8	99.2
	Imp.3	97.1	100.6	98.5	97.3	97.0	100.4	98.2	98.6	99.1	99.1	96.4	98.8
	Imp.4	97.2	100.7	98.6	97.4	97.2	100.6	98.3	98.7	99.3	99.2	96.5	98.9
	Imp.5	96.6	100.2	98.0	96.9	96.6	100.0	97.7	98.2	98.7	98.7	95.9	98.4
	Imp.6	98.7	102.3	100.1	98.9	98.6	102.1	99.8	100.2	100.8	100.7	98.0	100.4

表 6 の結果につき、XYZ 及び類縁物質の回収率ごとに 1 元配置分散分析を行った結果を表 7 に示す。分散分析の結果、いずれの類縁物質についても p 値は 0.9 を超えていたことから、回収率が室内再現性条件に影響されることはなく、類縁物質ごとに回収率の全データ(n = 12)の平均値を計算して真度の不偏推定値及び $\sqrt{0.95} \times 100\%$ 信頼区間を求めることができると判断した

(有意水準 5%)。

また、分散分析から室内再現精度の不偏推定値及び $\sqrt{0.95} \times 100\%$ 信頼区間を測定値の標準偏差として求めた結果についても表 7 に示した。得られた真度及び室内再現精度の $\sqrt{0.95} \times 100\%$ 信頼区間はいずれも事前に設定した性能クライテリアを満足しており、本分析法の真度及び精度は、ATP から規定される性能クライテリアを満たすことが確認された。

表 7 類縁物質ごとの分散分析の結果

	p 値	真度		精度(測定値%の標準偏差)	
		回収率	偏り(測定値%) 不偏推定値 [P%信頼区間]	室内再現精度 不偏推定値 [P%信頼区間]	併行精度 不偏推定値 [P%信頼区間]
XYZ	0.98	100.1			
Imp.1	0.93	99.5%	-0.0005 [-0.0017, 0.0006]	0.0013 [0.0008, 0.0028]	0.0016 [0.0010022, 0.0041343]
Imp.2	0.91	98.9%	-0.0023 [-0.0047, -0.0002]	0.0026 [0.0017, 0.0055]	0.0032239 [0.0020, 0.0081]
Imp.3	0.92	98.4%	-0.0016 [-0.0028, -0.0006]	0.0013 [0.0008, 0.0027]	0.0016 [0.0010, 0.0040]
Imp.4	0.91	98.6%	-0.0029 [-0.0053, -0.0008]	0.0026 [0.0017, 0.0055]	0.0032 [0.0020, 0.0081]
Imp.5	0.92	98.0%	-0.0020 [-0.0033, -0.0010]	0.0013 [0.0008, 0.0028]	0.0016 [0.0010, 0.0041]
Imp.6	0.92	100.1%	0.00005 [-0.0012, 0.0011]	0.0013 [0.0008, 0.0028]	0.0016 [0.0010, 0.0041]

$$P = \sqrt{0.95} \times 100$$

3.3 直線性

報告の必要な閾値である 0.1%から規格値 0.2%を含むよう、原薬 XYZ に対して 0.05 ~ 2.0%に相当する XYZ 溶液 (0.5 ~ 20 ug/mL) を分析し、本分析法の直線性を確認した。図 7 に回帰直線をプロットした結果を示す。直線回帰分析の結果は、回帰直線の相関係数は 1.00、回帰直線の濃度 0 におけるレスポンスの 95%信頼区間は原点を含んでいた。以上の結果より、本分析法は報告の必要な閾値から規格値を含む範囲で直線性を示すことが確認され、一点検量線法による不純物の定量が妥当であると考えられた。

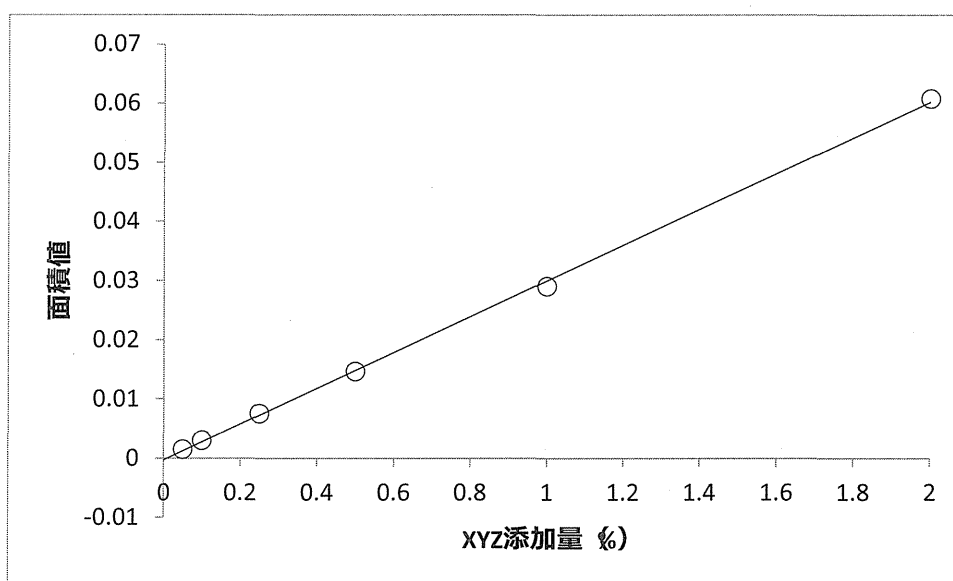


図7 直線性

3.4 感度

本分析法の定量限界を検証するため、0.05%の量に相当する原薬 XYZ の 0.5 ug/mL 溶液を調製し、得られるクロマトグラムの signal to noise (S/N) 比を求めた。得られた結果は、S/N 比が 15.3 であり、ATP で規定された性能クライテリアを満たすことが検証された。

3.5 範囲

真度、精度及び直線性の結果より、本分析法は 0.05 ~ 0.25%の範囲において、測定値は 80% の確率で真値の $\pm 0.02\%$ となることが明らかとなったことから、ATP で規定された要件を満たすことが検証された。

3.6 頑健性

本分析法の分離特性については、2.2.3 項で示した通り、目的とする各不純物が分離される領域が明らかとなっている。下記に示す範囲においては、任意のパラメータの組み合わせにおいても、目的とする各不純物が分離されることが示されており、パラメータの変更が測定値に影響を与えない頑健な領域であることが検証されている。

	標準操作値	下限値	上限値
移動相の pH	9.0	8.5	10.0
カラム温度(°C)	40	39	42
移動相中のアセトニトリル割合(%)	43	41	45

また、真度及び精度の結果から、本分析法の測定値のばらつきは、許容できるレベルまで低減

されていることが検証されている。

3.7 溶液安定性

試料溶液及び標準溶液の安定性について検証するため、25°C で試料溶液及び標準溶液を保存し、保存開始から6時間毎に分析を行った。いずれの溶液も24時間後までに顕著な変化を認めなかったことから、試料溶液及び標準溶液は調製後24時間まで分析に用いることができることが明らかとなった。

4. 管理戦略

本試験法は、HPLC の操作条件に関し、2.2.3 項で示した最適化による結果から、目的とする分離特性が検証された領域においては、そのパラメータの変動は分離性能に影響を与えないことが実験的に明らかとなっている。本試験法は試験法設定の段階で要因 X に起因する内在的リスクを低減済みであり、3.6 項に示した範囲は、分析結果に影響を与えない頑健な領域 Method Operable Design Region (MODR: 試験方法操作許容領域)であることが示されている。

さらに、設定された試験法に対するリスクアセスメントの結果、2.2.4 項に示すとおり、試薬、カラム、装置に潜在的なリスクが確認された。これらの要因のリスクを低減するために、システム適合性として、ピーク分離度、理論段数、シンメトリー係数、繰り返し再現性の確認を組み込み、管理することとした。これにより、日常の試験時に、本分析法が期待される性能を維持していることを確認することが可能である。

システム適合性

・システムの性能（特異性）:

Imp 1 と Imp 4 を含むシステム適合性溶液 10 µL について分析するとき、Imp 1 と Imp 4 の分離度は 1.5 以上である。また、Imp 1 の理論段数は 15000 以上であり、そのシンメトリー係数は 1.2 以内である。

・システムの再現性（精度）:

Imp 1 と Imp 4 を含むシステム適合性溶液 10 µL について分析を 6 回繰り返すとき、Imp 1 と Imp 4 のピーク面積の相対標準偏差は 10%以下である。

・検出の確認（直線性、定量限界）

1.0%の XYZ 溶液から得られる XYZ のピーク面積に対する 0.05%の XYZ 溶液から得られる XYZ のピーク面積の比は 3 ~ 7%の範囲に含まれる。

システム適合性溶液は、Imp 1 と Imp 4 を含む試料から調製された溶液である。

補足説明

蓄積されるシステム適合性のデータ(分離度や繰り返し再現性等)を定期的にレビューすることにより、運用時における分析法の性能を検証することができる。また、システム適合性の一部として、管理の対象となる不純物を含む基準となる試料の測定を組み込むことも、分析法が意図された性能を保持していることを確認することに有用である。

定期的にレビューした結果や OOS や OOT の情報を利用し、適切にシステム適合性の要件を見直すことは、ATP で規定した分析法の性能を保つことに繋がる。また、必要に応じ、分析法の変更を行うための根拠となる。

補足説明

実験計画法等を用いて要因の影響を検証することにより、MODR:試験方法操作許容領域を設定することが可能であり、ATP のコンセプトを適用することにより、承認後の分析条件の変更に関して、規制上の柔軟性が付与されることが期待される。

5 結論

XYZ 製剤の類縁物質試験法として HPLC-UV 法による分析法を開発した。開発した分析法につき、特異性、真度及び精度、感度及び範囲について評価したところ、ATP から規定される性能クライテリアを満たしていることが検証された。さらには、分析法の直線性について評価した結果、直線回帰式は原点を通る直線であることが明らかとなった。以上の結果から、本分析法は ATP に規定された性能を有していることが検証された。また、開発を通じて得られた知見を基に、運用時においても意図した分析法の性能を保証することができる管理戦略についても設定を行った。

解説 1: 確率を基にする真度精度の ATP の設定について

1 はじめに

Analytical Quality by Design (AQbD)では、分析法の開発を始めるにあたり、分析法が備えるべき性能である Analytical Target Profile (ATP) を設定している。報告書では、例として純度試験 類縁物質に対して以下のような ATP を適用した。

本分析法は、XYZ 製剤中の類縁物質を、ICH Q3B の報告の必要な閾値から規格値の 120% の範囲で主薬(XYZ)に対する割合として定量することを目標に開発した。本分析法は、0.05% から 0.20%の類縁物質につき、95%の信頼性をもって、報告値が 80%の確率で真値の $\pm 0.02\%$ に含まれる性能を有していなければならない。

上記の ATP には「報告値が、80%の確率で真値の $\pm 0.02\%$ に含まれ」や「報告値が、95%の確率で真値の $\pm 0.10\%$ に含まれ」といった表現が含まれている。これらは、従来の分析法バリデーションにおける真度及び精度に相当する記述である。

2 統計モデルと分析法の性能の表現

分析結果 x と真値 x^* との関係を、次式のモデルで仮定する。

$$\text{式 1 } x = x^* + \delta + \varepsilon, \varepsilon \sim N(0, \sigma^2)$$

ここで、 δ は分析法に固有の偏りを表し、分析法の真度にあたる。また、 ε は誤差である。ここでいう誤差は、単に併行精度(偶然誤差)だけを意味するのではなく、分析法が、そのライフサイクルを通じておかれる環境に応じて室間再現性や室内再現性と解釈される。ここでは、 ε は平均値 0、標準偏差 σ の正規分布に従う確率変数であると仮定している。また、式 1 から、分析結果 x は平均値 $x^* + \delta$ 、標準偏差 σ の正規分布に従う確率変数といえる。

$$\text{式 2 } x \sim N(x^* + \delta, \sigma^2)$$

例として、図 1 に含量の真値 $x^* = 100\%$ の試料を、 $\delta = 0\%$ 、 $\sigma = 3\%$ の定量法で分析したときの分析結果の分布を示した。図 1 より、分析結果がどのように分布するかがわかる。また、図 1 からは、長い目で見たときに、分析結果がどの程度の範囲に、どの程度の割合(確率)で含まれるかも読み取ることができる。

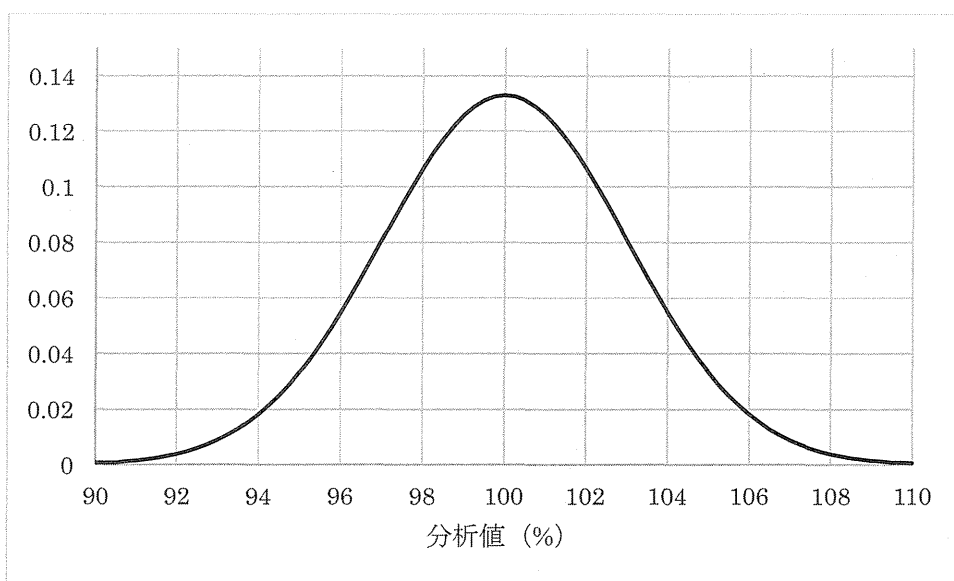


図 1 $x^* = 100\%$ の試料を、 $\delta = 0\%$ 、 $\sigma = 3\%$ の定量法で分析したときの分析結果の分布

式 1 または式 2 のような性能を備えた分析法の分析結果 x が、任意の下限 LL 及び上限 UL から構成される区間に含まれる確率 P は、次式のように与えられる。

$$\text{式 3 } P = \int_{LL}^{UL} N(x^* + \delta, \sigma^2) dx$$

式 3 を利用すれば、任意の δ 、 σ の組み合わせに対応する性能の分析法の分析結果が、任意の区間に含まれる確率を求められる。例えば、ある定量法について、その性能が $\delta = 0\%$ 、 $\sigma = 3\%$ で表されるとき、その分析結果が真値 $\pm 5\%$ の区間に含まれる確率は約 90.4% であることを計算できる。同様に、分析法の性能が、 $\delta = 2\%$ 、 $\sigma = 3\%$ または、 $\delta = 0\%$ 、 $\sigma = 5\%$ であるとき、その分析結果が真値 $\pm 5\%$ の区間に含まれる確率は、それぞれ約 83.2% または約 68.3% となる。図 2 には、真値 $x^* = 100\%$ の試料を分析したときの分析結果の分布、真値 $\pm 5\%$ の区間とその区間に含まれる確率の関係を示した。x 軸、分析値の分布を表す実線の曲線及び 2 本の点線で囲まれた領域の面積が求めたい確率に等しい。

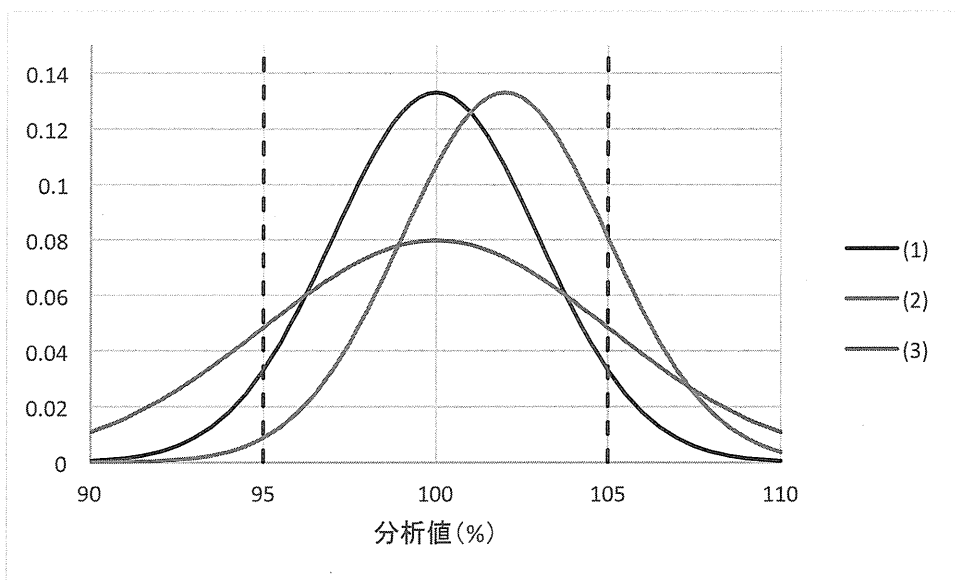


図 2 (1) $\delta = 0\%$ 、 $\sigma = 3\%$ 、(2) $\delta = 2\%$ 、 $\sigma = 3\%$ または、(3) $\delta = 0\%$ 、 $\sigma = 5\%$ をもつ分析値の分布、区間と確率の関係

同様にして、様々な δ 、 σ の組み合わせに対して、分析結果が真値 $\pm 5\%$ の区間に含まれる確率を評価し、その結果を等高線プロットすると図 3 が得られる。図 3 を利用すれば、分析法の性能を視覚的に表現することができる。たとえば、ある分析法の真の性能が、 $\delta = 2\%$ 、 $\sigma = 4\%$ である場合、この分析法の性能は、図 3 の赤いシンボルのようにプロットされ、「分析結果が真値 $\pm 5\%$ の区間に含まれる確率は 70 ~ 75%である」ということがわかる。

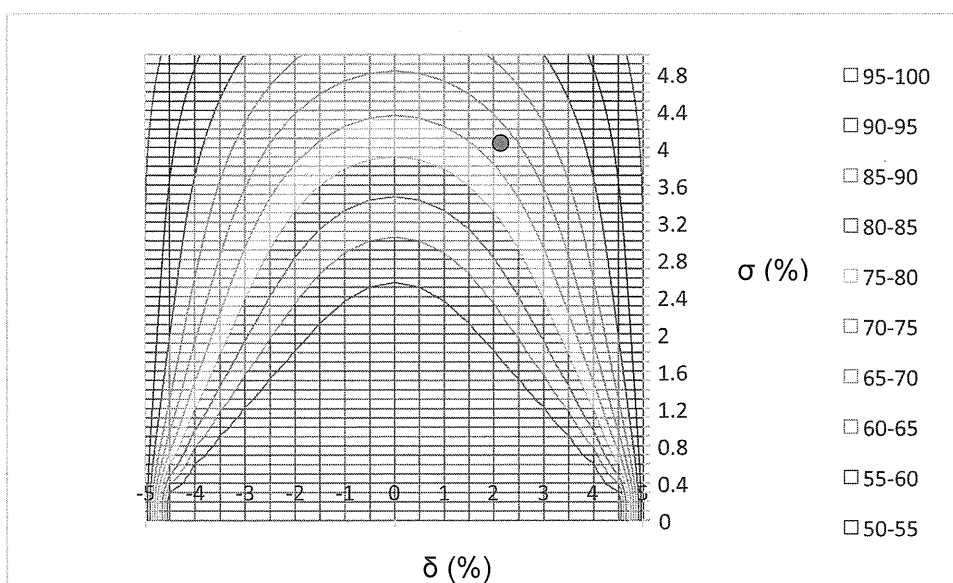


図 3 定量法の真度、精度と分析法の性能の関係

3 従来の分析法バリデーションの判定基準との比較

従来の分析法バリデーションの判定基準は、真度と精度を別個に規定している。例えば、判定基準として「真度として真値 $\pm 3.0\%$ 以内かつ精度として 3.0% 以下の標準偏差」を設定する。この判定基準を図 3 に重ね書きすると、図 4 の赤い実線で囲まれた領域になる。この領域内の真度及び精度の組み合わせをもつ分析法はすべて分析法バリデーションの判定基準に適合すると判定されるが、分析値が $95 \sim 105\%$ の区間に含まれる確率は、 $75 \sim 100\%$ と非常に広い範囲で変化することがわかる。また、図 4 の青いシンボルは、いずれもその分析値が $95 \sim 105\%$ に含まれる確率が 95% である分析法に対応しているが、従来の分析法バリデーション基準に基づけば、一方は適合、他方は不適合と判定される。

以上のように、報告書に記載された統計モデルに基づく ATP の設定は、従来よりも合理的に分析法の性能を規定できるものと考えられる。

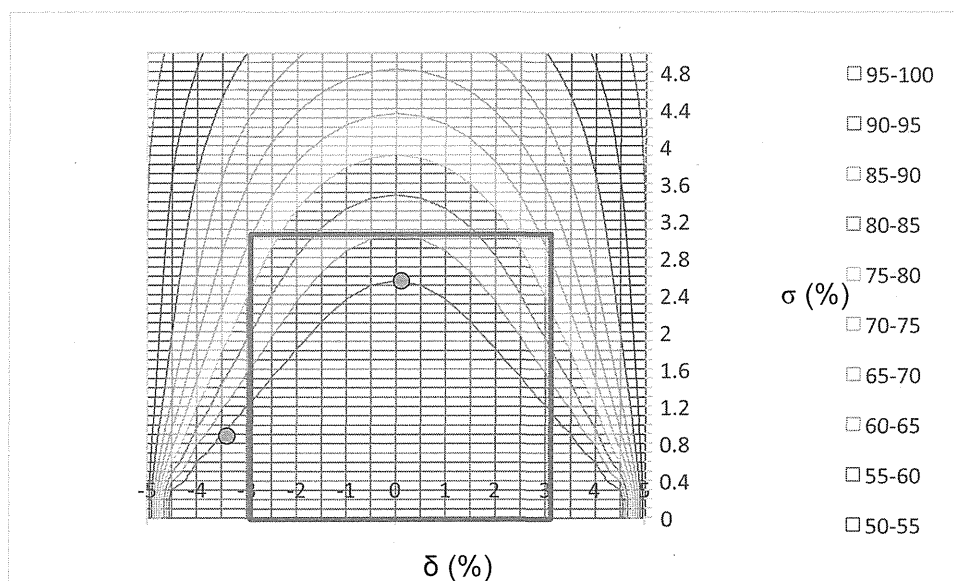


図 4 従来の分析法バリデーション基準との比較

4 真度及び精度の区間推定と ATP

これまでの議論において、分析法の本当の真度及び精度が既知であるとして考察を進めてきた。しかしながら、通常は分析法の真の性能は不明であり、分析法バリデーションなど限られた実験から得られる推定値をもとにして分析法の性能を評価している。

具体的に、小標本から分析法の真度及び精度を推定する場合について解説する。添加回収実験などにより分析法の真度を評価し、 x_1, x_2, \dots, x_n なるデータが得られたとする。分析法の真の真度はこれら x_1, x_2, \dots, x_n なるデータを生み出す母集団の平均値、すなわち母平均 μ であるが、有限回の実験から μ を知ることはできない。従って、有限回の実験の結果より構成される標本から μ を推定しなければいけない。

データ x_1, x_2, \dots, x_n の平均(標本平均)は以下の式で与えられる。

$$\text{式 4 } \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

\bar{x} は母平均 μ の不偏推定量であり、真度を評価する指標となるが、ある実験により得られた値の一つにすぎない。ある実験においてATPに適う \bar{x} が得られても、別の実験では異なる \bar{x} が得られる。つまり、単に不偏推定値に基づいて分析法の性能を評価した場合には、実験の不確かさが考慮されていないことになる。

そこで、区間推定によって \bar{x} の信頼区間を考慮して評価する必要がある。

信頼区間とは、着目するパラメータの値を、実験データに基づいて区間の形式で推定したものであり、信頼区間がパラメータの真値を含む確率を信頼水準または信頼度という。たとえば、ある分析法の真度を実験的に評価し、信頼水準95%の信頼区間(95%信頼区間)を求めた場合には推定される区間の95%には、分析法の真の真度(真度の真値)を含んでいることを表している。

平均値の推定のための自由度が n のとき、標準偏差未知の母平均 μ の $P\%$ 信頼区間は以下の式より求められる。

$$\text{式 5 } \bar{x} - t\left(n-1, \frac{100-P}{100}\right) \frac{s}{\sqrt{n}} \leq \mu \leq \bar{x} + t\left(n-1, \frac{100-P}{100}\right) \frac{s}{\sqrt{n}}$$

ここで、 $t\left(n-1, \frac{100-P}{100}\right)$ は自由度 $n-1$ の t 分布の両側 $100-P\%$ 分位点のうちの上の値を表す。標本標準偏差 s は標準偏差の不偏推定量であり、次式で与えられる。

$$\text{式 6 } s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\mu - x_i)^2}{n-1}}$$

真度と同様の理由で、精度の信頼区間を評価する必要がある。標本標準偏差 s の推定のための自由度が $n-1$ のとき、母標準偏差 σ の $P\%$ 信頼区間は、

$$\text{式 7 } \sqrt{(n-1) \frac{s^2}{\chi^2(n-1, (100-P)/200)}} \leq \sigma \leq \sqrt{(n-1) \frac{s^2}{\chi^2(n-1, 1-(100-P)/200)}}$$

ここで、 $\chi^2(n-1, (100-P)/200)$ は自由度 $n-1$ の χ^2 分布の $(100-P)/200\%$ 分位点を、 $\chi^2(n-1, 1-(100-P)/200)$ は自由度 $n-1$ の χ^2 分布の $1-(100-P)/200\%$ 分位点をそれぞれ表す。