



# DG2016-24

## 生体試料中薬物濃度測定における疑問・難問 — 困った時の道しるべ (安定性編) —

### *Questions and Challenges in Bioanalysis*

### *- Find the Loadstar (Stability) -*

細川 裕矢<sup>1</sup>、青山 昭則<sup>2</sup>、五十嵐 春江<sup>3</sup>、川端 光彦<sup>4</sup>、出口 修平<sup>5</sup>、  
橋本 雅世<sup>6</sup>、宮澤 春奈<sup>7</sup>、山田 直人<sup>8</sup>

小野薬品工業株式会社<sup>1</sup>、科研製薬株式会社<sup>2</sup>、グラクソ・スミスクライン株式会社<sup>3</sup>、株式会社新日本科学<sup>4</sup>、  
沢井製薬株式会社<sup>5</sup>、大日本住友製薬株式会社<sup>6</sup>、株式会社住化分析センター<sup>7</sup>、日本たばこ産業株式会社<sup>8</sup>

Yuya Hosokawa<sup>1</sup>, Akinori Aoyama<sup>2</sup>, Harue Igarashi<sup>3</sup>, Mitsuhiko Kawabata<sup>4</sup>,  
Shuhei Deguchi<sup>5</sup>, Masayo Hashimoto<sup>6</sup>, Haruna Miyazawa<sup>7</sup>, Naohito Yamada<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Ono Pharmaceutical Co., Ltd., <sup>2</sup> Kaken Pharmaceutical Co., Ltd., <sup>3</sup> GlaxoSmithKline K.K.,

<sup>4</sup> Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., <sup>5</sup> Sawai Pharmaceutical Co., Ltd.,

<sup>6</sup> Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd., <sup>7</sup> Sumika Chemical Analysis Service, Ltd., <sup>8</sup> Japan Tobacco Inc.



# 概説 Overview

## ◆ Purpose of DG2016-24

- ✓ バイオアナリシスに従事する研究者が抱える「**疑問・難問**」を議論し、**解決策や推奨案を提案及び共有する**。 To provide some solutions and recommendations for questions and challenges in bioanalysis.
- ✓ **第7回JBFシンポジウムでは、DG2015-13より、①検量線、②データの評価及びISR、③その他の疑問 について議論した。**  
At the 7th JBF symposium, DG2015-13 discussed on the questions and challenges related to calibration curve, evaluation of data and ISR, the others.

## ◆ Discussion

- ✓ **安定性に関する疑問・難問** Focused on Stability
- ✓ **低分子化合物** Small-molecule analysis

## ◆ Topics

1. Questions and challenges regarding the Stability
2. Introduce the opinions on Stability recommendation of GBC\*

\*: "Stability: Recommendation for Best Practices and Harmonization from the Global Bioanalysis Consortium Harmonization Team" issued in 2014.

The AAPS Journal, Vol. 16, No. 3, May 2014





## 活動内容 *Activity*

- **2016年6月**
  - ✓ メンバー募集及び決定（8名で活動）
- **2016年7月**
  - ✓ Kick off Meeting
- **2016年8月4日**
  - ✓ Face to Face @LC-MS forum, 東京カンファレンスセンター
- **2016年8月**
  - ✓ アンケート実施
  - ✓ 安定性に関する「疑問・難問」を調査
- **2016年11月**
  - ✓ 再アンケート実施
  - ✓ 安定性に関する調査
- **2016年7月～2017年1月**
  - ✓ Discussion
  - ✓ Web Meeting（1-2回/月）, E-mail

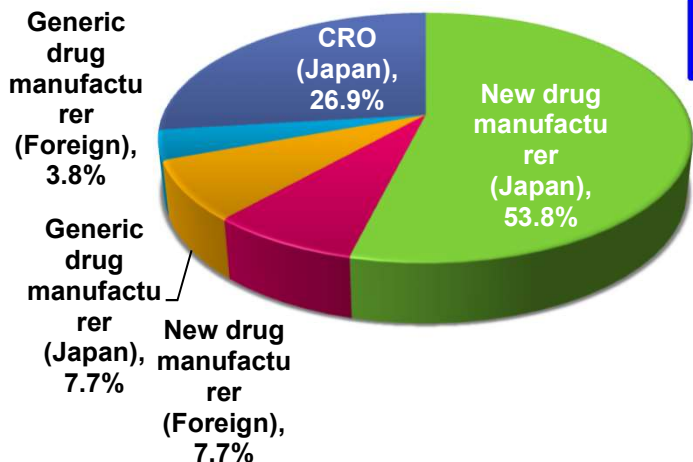




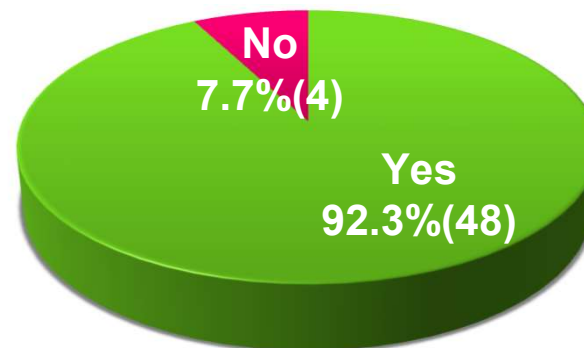
# アンケート回答者の背景

## Background of responders

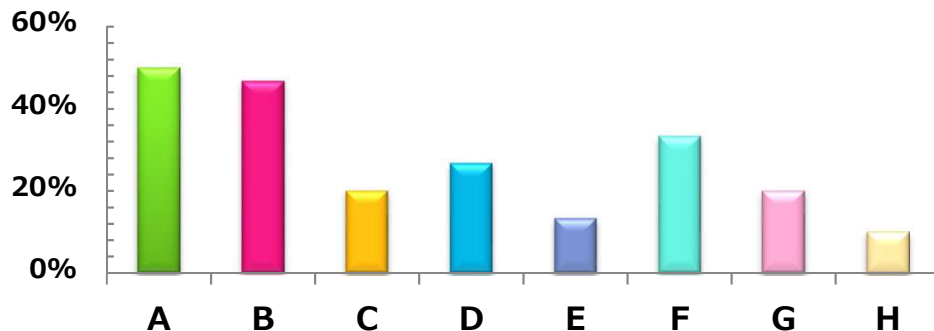
**Q1:** あなたの所属は？



**Q2:** 安定性に関連した「困っていること」、「判断に迷うこと」、「他社ではどうしているのだろう？」などの疑問点がありますか？



**Q3:** 安定性に関して、困ったり、疑問点がある項目を選択してください（複数選択可）。



- A : Matrix (*in vitro*)
- B : Matrix (*in vivo*)
- C : Working solution
- D : Metabolite
- E : Anticoagulant
- F : Blood, Tissue
- G : Container
- H : Others



# 凡例

**黄色枠**は、**DGの知恵袋（ノウハウ集）**です。

例：

不安定性の要因	対策	具体的な対策案
過酸化物などによる酸化・分解	過酸化物の除去、抗酸化剤の添加	グルタチオン、アスコルビン酸等の添加

**赤枠**は、**寄せられた疑問・難問**です。

例：

**疑問3:** 標準溶液の他社における判定基準が知りたい。

**青枠**は、疑問点に対し、実施した**アンケート調査の設問**です。 例：

**Q2:** 配合剤の場合、、、、、で安定性を評価していますか？

**ピンク枠**は、疑問・難問に対する**DG2016-24の意見**です。

例：

**【DGからの意見】**  
±10%以内であるべきであり、、、、使用すべきである。



# 標準溶液の安定性：過去のアンケート結果より

*Stability of Working solution: Results of past questionnaire*

**疑問1:** 内標準物質溶液の安定性を、標準溶液と同様に安定性を評価しているが、他社での評価方法を知りたい。 BMVガイドラインでは詳しく言及されておらず、パブコメ回答でも「分析対象物質の分析に影響を与えないことを確認する」とされている。どの程度の評価が必要最小限なのかも知りたい。

**【DGからの意見】** 他社での実施例として、2012年度に実施したアンケート\*の回答を紹介します。

- 内標準物質原液・溶液の安定性は、標準原液・溶液と同じ方法で評価する。
- バッチ内で測定に問題ない状態か（測定対象を妨害しないか）を確認する。

**疑問2:** ガイドラインに、標準溶液の安定性の評価項目がない。  
(当社では、残存率 $100 \pm 10\%$ 以下かつ精度が $10\%$ 以下と設定している。)

**【DGからの意見】** 他社での実施例として、2012年度に実施したアンケート\*の回答を紹介します。

- 内標準物質とのピーク面積比によって評価し、 $100 \pm 10\%$ を基準とする（内標準によって補正する）。

\*: 第4回JBFシンポジウム、DG-1 標準溶液の調製手法、安定性評価

GBC recommendationポスターの「Stock stability」もご覧ください。



# 標準溶液の安定性：過去のアンケート結果より

*Stability of Working solution: Results of past questionnaire*

**疑問3:** 標準溶液の他社における判定基準が知りたい。

**【DGからの意見】** 他社での実施例として、2012年度に実施したアンケート\*の回答を紹介します。

100±5% (2件 : 6.5%)、100±10% (13件 : 41.9%)、  
100±15% (11件 : 35.5%)、その他 (5件 : 16.1%)

**今回のアンケート結果は、3枚下のポスターをご覧ください。**

**疑問4:** 標準溶液の安定性を評価するとき、どの濃度で検討しているか他社の状況を知りたい。標準溶液を保存して使用する場合、最高濃度と最低濃度の2点のみで検討すればいいと考えている (用時調製の場合は、検討不要)。

**【DGからの意見】** 他社での実施例として、2012年度に実施したアンケート\*の回答を紹介します。

標準原液と標準溶液で異なる溶媒を使用しているか否かによらず、標準溶液については最高濃度及び最低濃度の2濃度を使用して安定性評価を実施する。

\*: 第4回JBFシンポジウム、DG-1 標準溶液の調製手法、安定性評価

GBC recommendationポスターの「Stock stability」もご覧ください。



# 標準原液・溶液の安定性：評価方法

## Stability of Stock and Working solution: Evaluation method

**Q4:** 標準原液及び標準溶液の安定性は、以下のどの方法で評価していますか？  
(複数回答可)

回答	標準原液		標準溶液	
	はい (件)	いいえ (件)	はい (件)	いいえ (件)
調製直後からの <b>変化率</b> で評価する ( <u>検量線を使用しない</u> )	47	8	47	7
調製直後の標準溶液を使用して血漿 など <u>マトリックスの検量線</u> を作成。 真度で評価する	7	37	10	34
調製直後の標準溶液を使用して <u>標準溶液の検量線</u> を作成。 真度で評価する	11	35	10	36





# 標準原液・溶液の安定性：評価方法

## Stability of Stock and Working solution: Evaluation method

- ✓ 標準溶液の安定性を、**血漿などマトリックスの検量線を作成**して評価している方（10名）の所属

国内新薬メーカー	6
国内CRO	1
外資新薬メーカー	2
食品メーカー	1
計	10

- ✓ 標準溶液の安定性を、**標準溶液の検量線を作成**して評価している方（10名）の所属

国内新薬メーカー	6
国内CRO	3
食品メーカー	1
計	10





# 標準原液・溶液の安定性：測定方法

Stability of Stock and Working solution: Analytical method

**Q5:** 標準原液・標準溶液の安定性評価の測定方法について、測定系の安定性も含めて考えた場合、以下のどの方法が適切だと思われますか？

回答	標準原液	標準溶液
	カウント (件)	カウント (件)
LC-MS、GC-MS、LC-UV等、 <u>その試験で用いる同じ測定機器</u> で評価	44	50
その試験の測定機器によらず、 <u>常にLC-UVなどの定量が安定した系</u> で評価	12	8
その他	2	2
有効回答数：	58件	60件

**【その他の意見】**

- LC-MSでも安定同位体の利用により、正確に評価できると考える。
- 内標準物質を使用し、面積比で評価している。

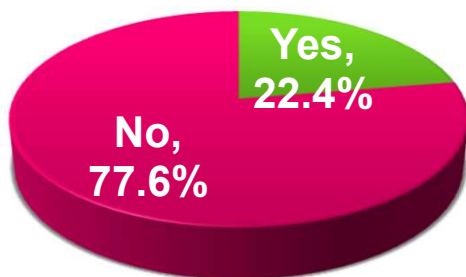


# 標準原液・溶液の安定性：評価基準

## Stability of Stock and Working solution: Evaluation criteria

**Q6:** 2013年のBMVガイドライン発出後に、評価基準を変更しましたか？

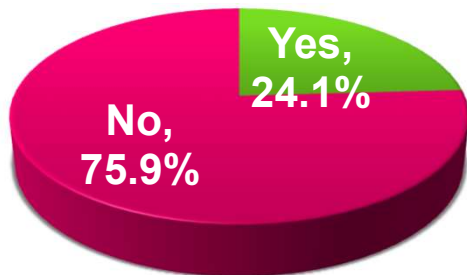
### Stock solution



#### 【その他の意見】

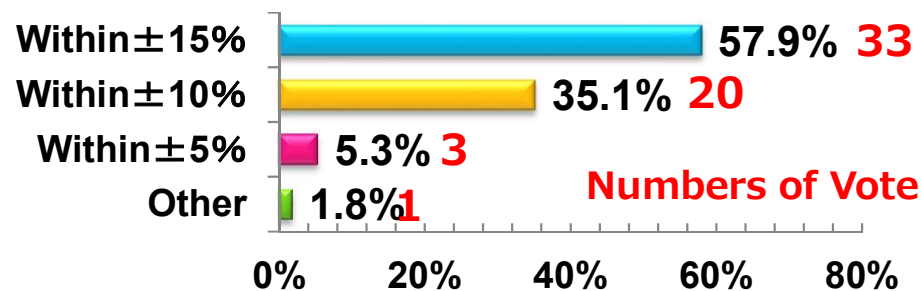
➤ Stock solutionはHPLC-UVで評価するため、評価基準を辛めに設定。

### Working solution

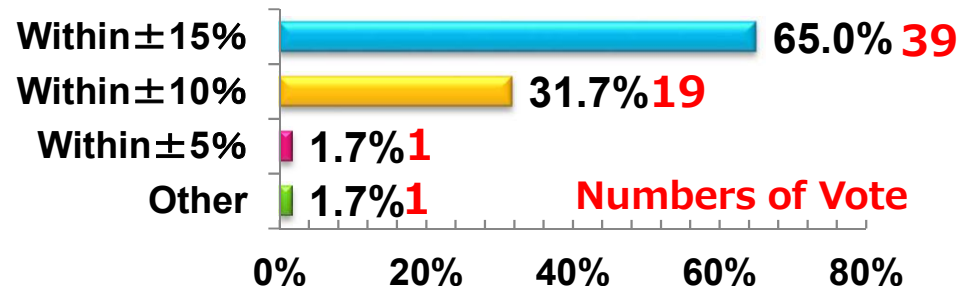


**Q7:** 現在の標準原液・標準溶液の安定性評価の評価基準は？

### Stock solution



### Working solution



#### 【DGからの意見】

少なくとも±10%以内とすべきであり、経時的な変化についても考慮し、試験の目的に合わせて設定すべきである。



# マトリックス中安定性の向上：DGの知恵袋

Know-how for improving stability in matrix

**疑問5:** 安定性が担保できなかったとき、マトリックス中の安定性を向上する手段にはどのようなものがあるか知りたい。

不安定性の要因	対策	具体的な対策案
◆ 過酸化物質などによる酸化・分解	過酸化物質の除去、反応による消費、抗酸化剤の添加	● グルタチオン、 $\alpha$ -トコフェロール、アスコルビン酸等の添加
◆ 酸素による酸化 ◆ 大気中からの混入物との反応	抗酸化剤の使用、混入防止	● $\alpha$ -トコフェロール、アスコルビン酸、EDTA等の添加 ● 窒素、アルゴンガス等の封入 ● 気密容器の使用、閉鎖系での実験
◆ 水分、吸湿による加水分解	乾燥剤の使用、湿度制御	● 窒素、アルゴンガス等の封入 ● 気密容器の使用、シリカゲル、塩化カルシウム、除湿器等の使用
◆ 試薬類・容器成分との反応	除去、不使用、変更	● 試薬、容器の不使用、変更
◆ 試料中成分との反応	反応速度の減少	● 低温保存、保存期間の短縮
◆ 生体反応・酵素反応（酸化、加水分解）	代謝阻害剤の添加、酵素失活処理、低温保存	● 低温保存、保存期間の短縮 ● 有機溶媒、酸、界面活性剤等による酵素タンパク質の変性

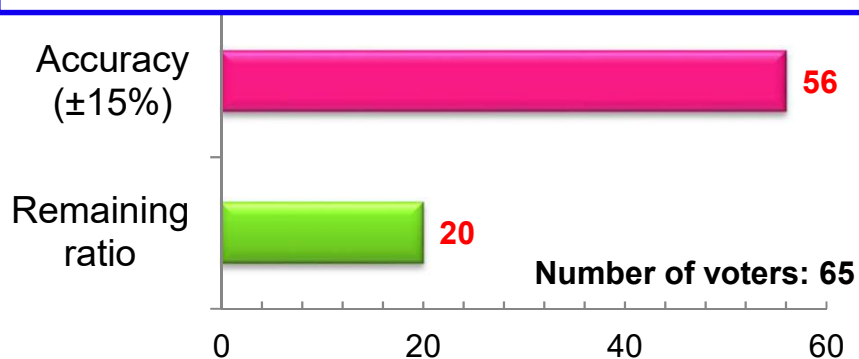
◆ 光化学反応	遮光	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 褐色容器の使用</li> <li>● 暗室、UVカットの蛍光灯等を使用</li> </ul>
◆ 吸着	容器の変更、吸着防止剤の添加	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 容器の材質変更、コーティング</li> <li>● BSA等の吸着防止剤の添加</li> </ul>
◆ 温度、凍結融解	冷却、凍結、液体窒素の使用	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 低温保存</li> <li>● 試料の小分けで凍結融解回数を減らす</li> </ul>
◆ pHの試料間ばらつき (尿など)	pH調整、緩衝液の使用	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 緩衝液等の使用（中性付近）、酸性化、塩基性化</li> </ul>
◆ 微生物の繁殖	防かび剤の添加、低温保存、気密容器の使用	<ul style="list-style-type: none"> <li>● アジ化ナトリウム等の添加</li> <li>● 低温保存</li> </ul>
◆ 試料の不均一性	混合、容器の変更	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 採取前の十分な混合</li> <li>● 容器の大きさの変更</li> </ul>
◆ 前処理操作の問題	前処理方法の変更	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 十分な予備検討</li> </ul>
◆ 検量線の問題	検量線の確認	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 各分析で検量線の傾きや切片が大きく変わらない分析法の開発。</li> </ul>
◆ 抱合代謝物の不安定性 (保存・前処理中の脱抱合)	脱抱合の抑制	<ul style="list-style-type: none"> <li>● (高pH又は低pHにより、脱抱合するため) 保存・前処理時に緩衝液などでpH管理をする。</li> </ul>
◆ マトリックス自体がNG (原因不明)	マトリックスの希釈	<ul style="list-style-type: none"> <li>● (高濃度の場合) 別のマトリックス、緩衝液、有機溶媒等で大希釈</li> </ul>



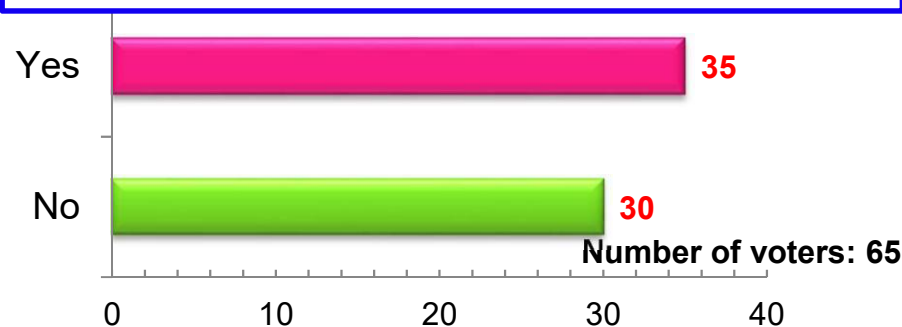
# マトリックス中の安定性:評価方法・対処法

## Stability in Matrix: Evaluation method and Improvement method

**Q8:** マトリックス中安定性の評価方法は？（複数回答可）



**Q9:** マトリックス中で不安定であった場合、原因追究を行いましたか？原因とそのとき講じた対処法は？



### 【回答者コメント】

➤ **安定化剤・阻害剤の添加（17件）**

酸の添加：酢酸、ぎ酸、りん酸、クエン酸、アスコルビン酸

塩基の添加：アンモニア水、重炭酸アンモニウム

その他：抗酸化剤、タンパク質の変性剤

➤ **保存温度や処理温度の変更（6件）**

➤ **容器の材質変更、吸着防止剤添加（4件）**

➤ **保存期間の変更（3件）**

➤ **保存条件の変更（3件）**

遮光、凍結乾燥、保存量

➤ **凝固剤の変更（2件）**

➤ **その他**

酵素により速やかに分解するため対処せず、分解物を測定氷上で試料を扱う際にDMSOを使用し、分注の際に偏りが生じた。



# マトリックス中の安定性:真度と残存率

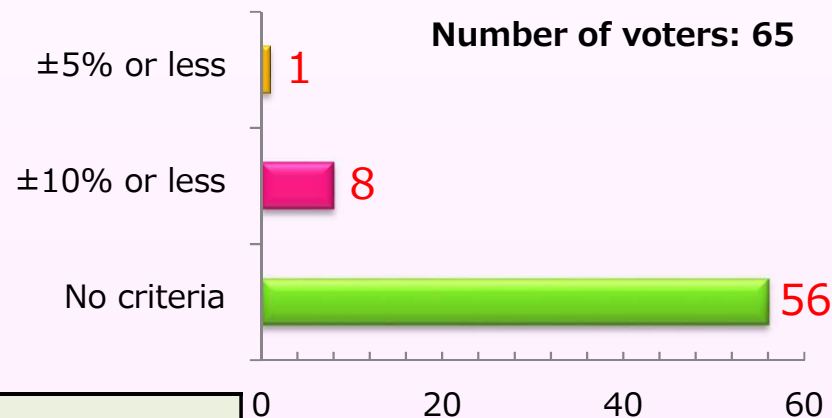
## Stability in Matrix: Accuracy and Residual ratio

**疑問6:** 安定性の評価を真度で実施しているが、初期値が高値で保管後が低値の傾向になった場合、安定と判断できるか悩ましい場合がある。

**Q10:** 調製直後の試料に理論値±15%より厳しい自主基準を設けていますか？

### 【DGからの意見】

- ・ 事前検討で代謝酵素、物性、吸着、**2濃度の統一性**などを考察する。
- ・ 真度だけではなく**残存率で評価**も一案。
- ・ **経時的変化の傾向**も考察する。



### <真度と残存率の関係>

Accuracy	After storage						
	Initial	85	90	95	100	105	110
85	100.0	105.9	111.8	117.6	123.5	129.4	135.3
90	94.4	100.0	105.6	111.1	116.7	122.2	127.8
95	89.5	94.7	100.0	105.3	110.5	115.8	121.1
100	85.0	90.0	95.0	100.0	105.0	110.0	115.0
105	81.0	85.7	90.5	95.2	100.0	104.8	109.5
110	77.3	81.8	86.4	90.9	95.5	100.0	104.5
115	73.9	78.3	82.6	87.0	91.3	95.7	100.0

真度による評価では全て適合範囲である。  
 しかし、初期値の真度によっては残存率が大きく外れている。  
 この様な状況で「安定」と判断すべきではないと考える。

**初期値の真度の目安は、100 ±5~10%を推奨**



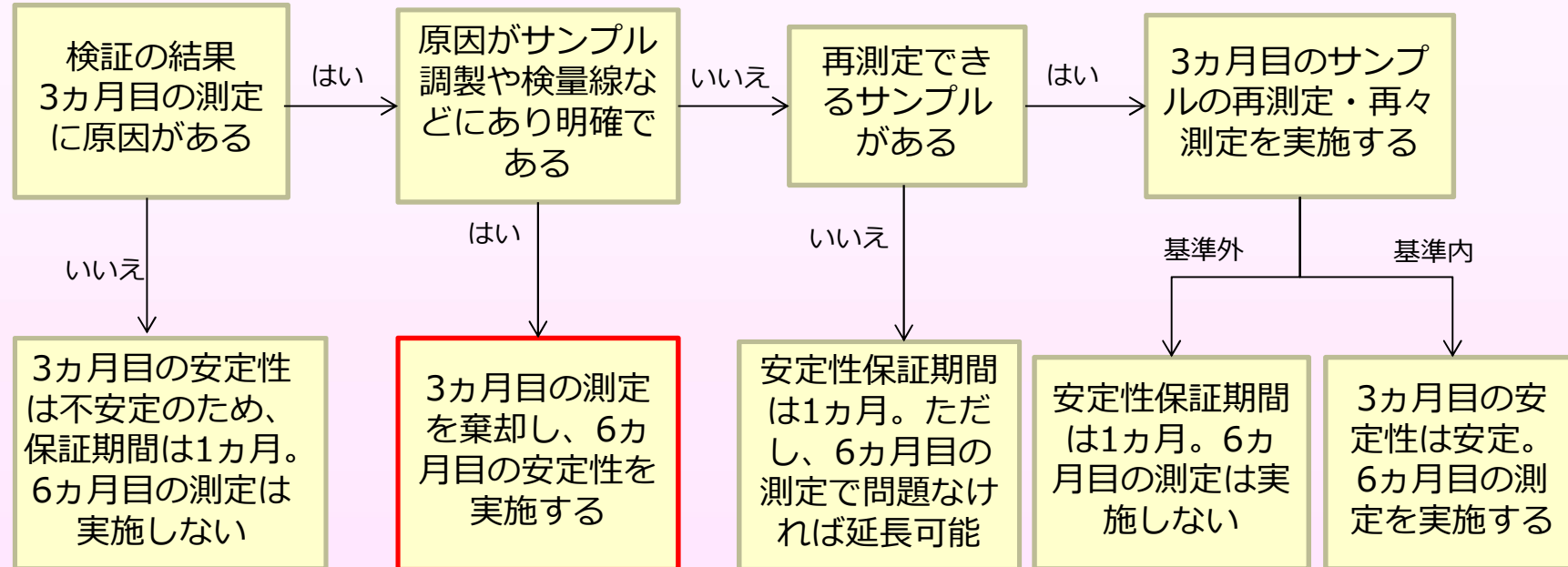
# マトリックス中の安定性:逸脱時の対処

## Stability in Matrix: Treatment of Failing Stability Results

**疑問7:** 1カ月の安定性は評価基準内、3カ月は評価基準外、6カ月は評価基準内の場合、安定性の保証期間は1カ月と6カ月のどちらが良いか？  
 3カ月が判定基準外となった原因が妥当な理由であれば、6カ月として良いのか？それとも、3カ月をやり直すべきか？

### 【DGからの意見】

以下のDecision treeを参照。



GBC recommendationポスターの「Treatment of Failing Stability Results」もご覧ください。





# マトリックス中の安定性:前処理後試料

## Stability in Matrix: Processed sample

**疑問8:** 前処理後試料中の安定性の評価に用いる検量線は、調製直後のものか、それとも新たに調製したものか？

### 【DGからの意見】

どちらの検量線を使用しても問題はないが、条件の設定によっては実測定における保証範囲が変わります。以下の表を参照してください。

検量線	安定性試料	保証範囲
調製直後 (t=0試料の調製時に調製)	同一バイアル	サンプルのみでも再注入可能
	別バイアル	サンプルの再注入は不可
新たに調製 (測定バッチごと調製)	同一バイアル	サンプルの再注入可能 ただし、検量線・QCも同時に測定が必要
	別バイアル	サンプルの再注入は不可

- 同一バイアル：保存後の安定性測定時に初期値を測定したバイアルから再注入して測定する。
  - 別バイアル：初期値及び保存後の安定性の測定時に、全て異なるバイアルから注入して測定する。
- ※ 同一バイアル（再注入）で実施する場合は、再現性（CV）の確認も行うとより良い。



# マトリックス中の安定性: 評価試料の分注方法

*Stability in Matrix: Sample dispensing method*

**疑問9:** BMVガイドラインでは安定性について評価方法は概ね記載があるが、具体的な方法（n数や試料の取り扱い）についての記載に乏しい。安定性評価で用いるn数は、同じチューブから複数回サンプリングするのか、n数分のチューブを調製直後に用意しておくのか、他社状況を知りたい。

## 【DGからの意見】

- ① : 「n数分のチューブを調製直後に用意」
- ② : 「同じチューブからn回サンプリング」

科学的な観点から①と②の評価法のいずれも問題ないと考えています。

なお、JBFシンポジウム2015の会場アンケートでは、① : 8票、② : 8票の同数でした。

本シンポジウムの別発表 : 「P.12 JBF の活動成果 : マトリックス中安定性試験におけるサンプル保存方法に関するアンケート調査結果」のアンケート結果もご覧ください。



# マトリックス中の安定性: 添加溶媒の変更

*Stability in Matrix: Change of spiking solvent*

**疑問10:** 標準溶液 (溶媒A) を添加してマトリックス中の安定性が担保されている。もし、同化合物の標準溶液 (溶媒B) を添加した場合でも、マトリックス中の保存安定性は既に担保されているとして省略可能と考えてよいか？  
また、マトリックスに添加する溶媒の量 (割合) によっても解釈が変わり得るだろうか？

## 【DGからの意見】

溶媒Bでの安定性評価は省略可能と考えるよ。

マトリックス中の化合物の安定性を確認するために、添加溶媒の影響を考える必要性は基本的にはない。理由としては、溶媒の添加量はマトリックスへの影響がない量 (2%程度) で実施するからである。なお、安定性試料を調製する際には、必要な濃度に応じて使用する溶媒や化合物の形態 (溶液→原末) を変化させても良い。ただし、マトリックスへの影響は無いことが前提である。

解釈が変わるような溶媒の添加量 (割合) で、安定性試料を調製すること自体が望ましくない。



# マトリックス中の安定性:残存率による評価

Stability in Matrix: Evaluation by Residual ratio

**疑問11:** GL発効後、血漿中安定性は真度での評価となっているが、残存率での評価を実施したことがあるか? その際には理由を記載する必要があったかと思うがその時の記載内容を知りたい。経験したことがないためわからないが、今後ないとは限らないため、他社の状況を知りたい。

## 【DGからの意見】

原則は真度での評価ですが、科学的に妥当であれば残存率の評価も可能です。なお、原則として真度で評価する理由は、分析方法によるバラツキが保存前試料の定量値に影響を与えることを回避するためです。

従って、**「あえて」残存率で評価する場合、分析法の精度が安定性の評価に影響を及ぼさないことを示す**必要があります (BMV GL Q&A Q3)。

一方、残存率でしか評価できない項目もあります。例えば、「**内因性物質の安定性**」、「**標準原液・溶液の安定性**」、「**全血中の安定性** (を分離した血漿を測定することで評価する場合)」などでは、真度で評価することが不可能です。

これらの場合もGLにあるとおり、**「分析対象物質の特性等を考慮し、他の指標が科学的により適切に評価できる場合」**であることを示すデータが必要なことに注意を払ってください。



# マトリックス中の安定性:残存率の上昇

*Stability in Matrix: Unexpected Rising of Residual ratio*

**疑問12:** マトリックスに添加した安定性サンプルの残存率が上昇する場合、どう解釈して対応を講じたらよいのか？  
なお、添加サンプルなので抱合性代謝物等からアグリコンがはずれて安定性が上昇したわけではない。保存中のマトリックスのpHや組成の変化によるマトリックス効果と考えている。

**【DGからの意見】**  
分析バッチの適合性を疑う。

多くの場合、安定性の評価は検量線と安定性試料だけで構成されたバッチで測定を行う。そのため、検量線の真度は基準内であるが、初期値を測定した時の検量線の傾きや切片と異なることに気付かず、安定性の評価をして不適合という結果に陥る場合がある。  
安定性試料は未知試料であるため、実測定と同様、QC試料で測定バッチの適合性を確認しながら評価した方が良い。

その他としては、選択性（マトリックスや内因性物質の安定性）、マトリックス効果（pHの変化やマトリックス組成の変化）、回収率、試料の濃縮（予期しない凍結乾燥）、試料の不均一化などを疑う。



# マトリックス中安定性の向上：DGの知恵袋

Know-how for improving stability in matrix

**疑問13:** マトリックス中の不安定性の原因とその改善方法について、具体的な事例を知りたい。

事例	原因 <small>赤文字：主要因</small>	解決策
検討時は問題無かったが、バリデーション時に安定性の基準を満たさなかった。	検討時とバリデーション時では室温が異なっていた。 →温度	保存温度を変更した。
安定性用QC試料（血漿）の測定値が低下し、ばらつきも大きかった。	Analyte の脂溶性が高く、血漿中では主にカイロミクロンに分布。凍結融解によりカイロミクロンが分離・分解し、化合物が容器に吸着。 →温度（凍結融解） →吸着	前処理1回分の血漿を容器にあらかじめ分注して保存。 保存容器中で前処理を実施。
エステル結合を有する未変化体とエステル結合が加水分解した代謝物の同時測定法において、前処理中に代謝物が未変化体へ変換した。	アルコール+ギ酸の混液による抽出後に濃縮乾固。 代謝物のカルボン酸部分とアルコールが反応した。 →試薬と代謝物の反応（エステル化）	抽出溶媒をアルコールのみとした。

<p>2施設においてQC試料の凍結保存安定性を確認したところ、1施設で安定性の基準を満たさず、プラス側に外れた。 試料の安定性に問題はない。</p>	<p>検量線を作成する標準溶液はエステル構造を持つ化合物に対し、アルコール系溶媒で調製していた。当該施設では、標準溶液を冷蔵保存していたため、化合物がエステル交換を起こし、検量線の傾きに異常が生じた。 →試薬との反応 (エステル交換)</p>	<p>標準溶液の調製溶媒をアセトニトリルに変更。さらに凍結保存に統一した。</p>
<p>測定値の精度・真度の成績が悪い。</p>	<p>調製時の混和をボルテックスのみで行った。添加試料の上部・下部で濃度にムラ。 →試料の不均一性</p>	<p>ボルテックスの他に転倒混和を実施。</p>
<p>有機溶媒を添加した血漿の分析時に（安定性も含めた）再現性が得られない</p>	<p>凍結時に（水分から先に凍り始めるため）溶液が不均一になり、それとともに化合物の存在も不均一になっていた。 →試料の不均一性</p>	<p>十分な融解、撈拌をした後に前処理を行った。</p>
<p>不安定な代謝物が存在することがバリデーション試験直前に判明した。 血漿中濃度推移がおかしい。再測定値が初回値と大きく異なる。</p>	<p>代謝物（グルクロン酸抱合体等）の脱抱合により、未変化体の定量値に大きく影響。 →抱合代謝物の不安定性</p>	<p>前処理方法を変更（pH調整）し、不安定な代謝物が安定化する条件にした。</p>

<p>血漿中の代謝物を測定したところ、代謝物が分解していた。</p>	<p>前処理で用いた窒素気流による有機溶媒留去が予想外にも代謝物に大きな影響（分解）をもたらした。 →酸化・分解 （大気中からの混入）</p>	<p>遠心濃縮システムに変更し、温度を下げ、かつ外気との接触を断つことにより分解を抑えた。</p>
<p>ある日に前処理（遠心濃縮機を使用）したすべての試料で分析対象物のピークが確認できなかった。</p>	<p>ギ酸や過酸化水素が含まれていた別試験の試料と共に遠心濃縮機を使用したため、試料が酸化された。 →酸化・分解 （大気中からの混入） →試薬との反応</p>	<p>特殊な試薬を用いている試料と同時に遠心濃縮機を使用しないことにした。</p>
<p>MSのフロントにPDA（Photodiode Array）を接続して分析。 MS、MS/MSいずれでもピークが検出されなかった。</p>	<p>光に不安定な化合物であった。事前に室温安定性を確認していたが、曝光が不十分であった。 →光化学反応</p>	<p>PDAの接続をやめることにより解決。 十分な曝光により、事前に光安定性を評価する。</p>
<p>注入バイアル中の保存安定性がメーカー、材質により異なる。 前処理に使用するガラス器具の影響。硬質ガラスと軟質ガラスで結果が異なる。</p>	<p>Polypropylene (PP) Polyethylene (PE) ガラス (hard or soft) など様々な材質がある。 各材質への吸着度合いの差、可塑剤 (plasticizer) の影響などは異なる。 また、同じ材質であってもメーカーやロットによって異なる。 →吸着・容器成分との反応</p>	<p>安定性試験前に十分な予備検討を実施。 影響のない材質の器具への変更。</p>





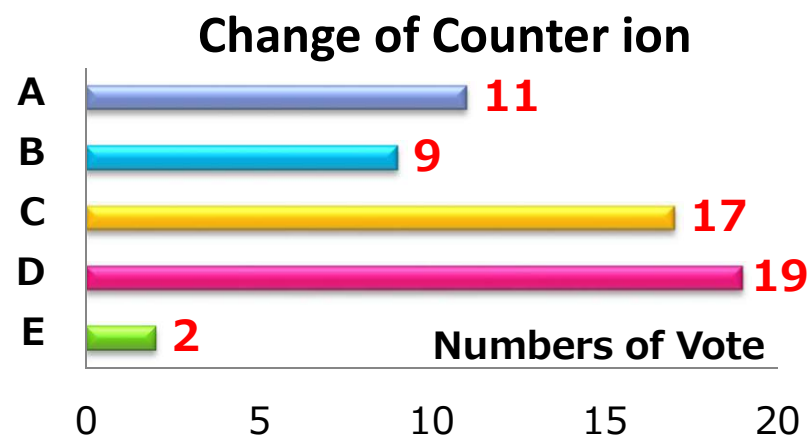
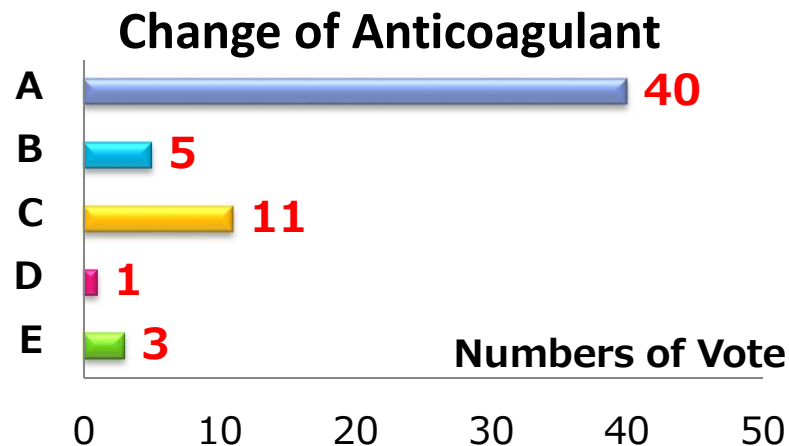
# 抗凝固剤変更時の安定性評価

## Change of Anticoagulant: Stability evaluation

**疑問14:** EDTA2Kで安定性が確認されている場合、EDTA3Kで再試験するか？  
また、この2種の凝固剤で安定性が異なった経験があれば知りたい。

**Q11:** 抗凝固剤の種類の変更  
(例：ヘパリン⇒EDTA) 時に、  
安定性を評価しますか？

**Q12:** 抗凝固剤のカウンターイオンの  
変更 (例：ヘパリンNa⇒ヘパ  
リンLi) では？



- A : Yes, always
- B : When the change of pH or chemical interaction is expected
- C : When there are any concerns in the preliminary study
- D : No, never
- E : Other

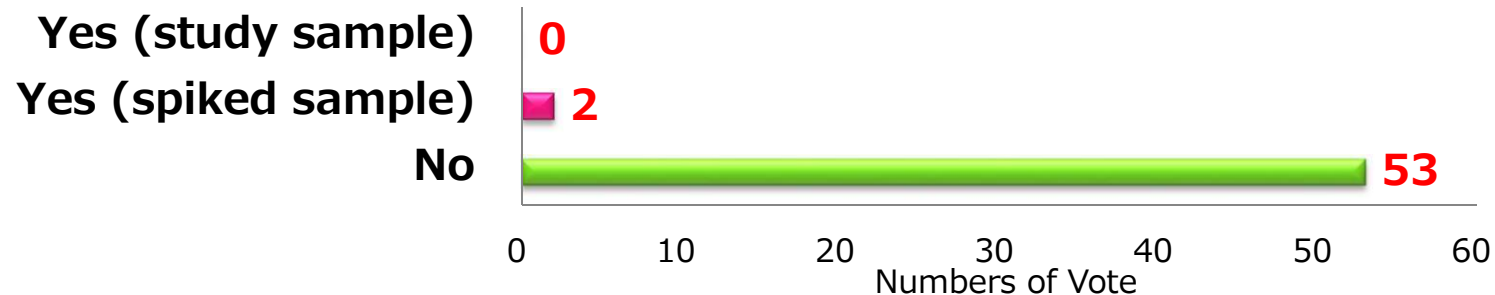


# 抗凝固剤変更時における安定性の変化

Change of Anticoagulant: Results of stability

**Q13:** 抗凝固剤の変更 (カウンターイオンの変更含む) に伴い、安定性の結果が異なったことがありますか? (複数回答可)  
また、安定性の結果が異なった事例と対応例を記載してください。

## Different stability between anticoagulants



### 【回答者コメント】

- EDTAとヘパリンNaで安定性が異なった。より安定であったEDTAで採血を実施。
- より安定なカウンターイオンの抗凝固剤での採取に変更した。不安定な抗凝固剤での測定は安定性が保たれている期間内に測定が終了するようにした。

### 【DGからの意見】

抗凝固剤の種類の変更時には、安定性を評価することを推奨します。  
カウンターイオンの変更については、pH変化により影響が懸念される場合や、事前検討で必要と判断した場合に、安定性評価を実施することを推奨します。



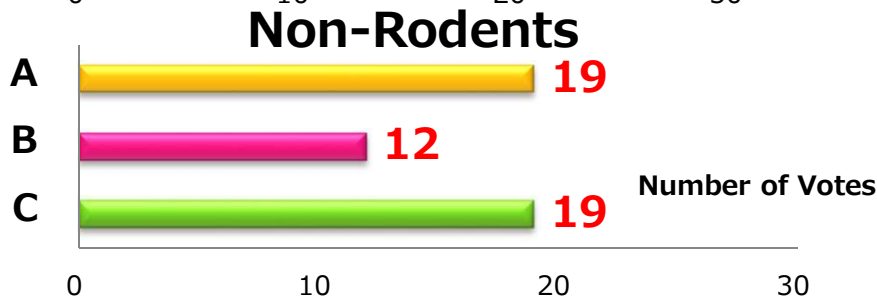
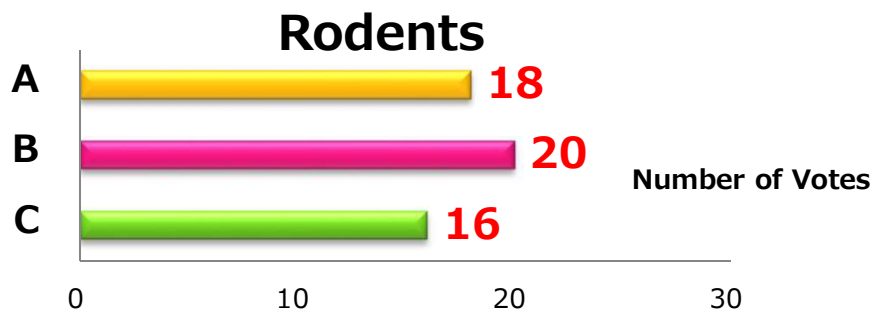
# 動物系統の違いにおける安定性評価

Stability: Differences of animal strains

**疑問15:** マトリックス中の安定性評価で、同動物種で系統が異なる場合、それぞれの系統で安定性を評価しているか他社状況を知りたい。

**Q14:** 同動物種で系統が異なる場合、各系統で安定性を評価しますか？  
(げっ歯類/非げっ歯類別に回答)

**Q15:** 系統間で安定性の結果が異なった経験がありますか？



- A: Yes, Always
- B: When there are any concerns in the preliminary study
- C: No, Never

	Yes	No
Spiked samples	0	49
Study samples	1	46

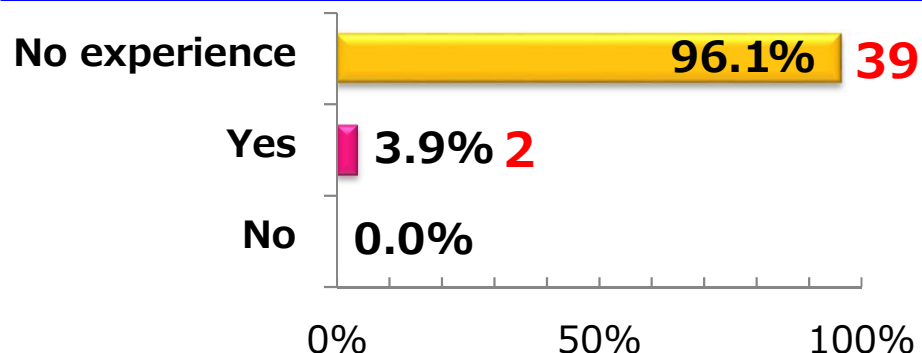
	Yes	No
Spiked samples	0	46
Study samples	0	45



# 抗体薬物複合体（ADC）の安定性

## Stability in Antibody-Drug Conjugate

**Q16:** 抗体薬物複合体（ADC）等において、抗体からの薬剤の放出について、マトリックス中での安定性を評価していますか？  
また、安定性を評価する場合、その項目と方法は？



### 項目と方法（回答者コメント）

- ・初期値との真度の比較により、短期、長期保存及び凍結融解安定性を確認している。

### 【DGからの意見】

**ADCの場合**、抗体などの生体内機能物質と薬物の複合体を投与するため、**複合状態を維持しているかどうか**が重要となる。

実試料におけるフリーの薬物の濃度評価が出来なくなるため、薬剤の放出割合も確認する必要がある。

測定方法（LBA法、クロマトグラフ法）にもよるが、複合体もしくはフリーの薬物濃度を確認する必要があると思われる。

### 『測定の対象』

- ① ADC複合体、
- ② 抗体+複合体（Total mAb）、
- ③ フリーの薬物



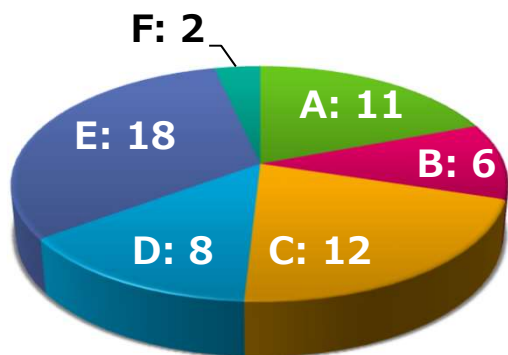
# 併用薬・配合剤の安定性評価

## Stability of Concomitant drug and Combination drug

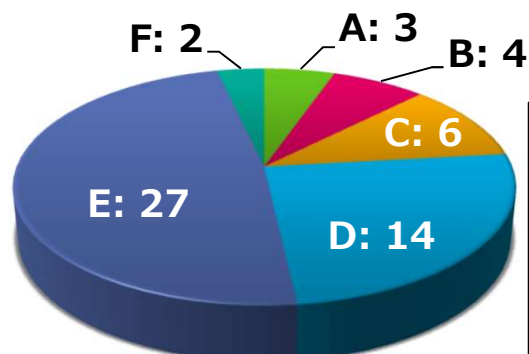
**疑問16:** 併用薬が予定されている場合、共存化のマトリックス中安定性を評価すべきでしょうか？他社状況を知りたい。

**Q17:** 併用薬が予定されている場合、併用薬共存の添加試料による安定性を評価していますか。

- ① : 併用必須薬の場合について
- ② : 併用非必須薬 (風邪薬なども含む) の場合についてお答えください



併用必須薬  
Concomitant Drug,  
essential



併用非必須薬  
Concomitant Drug,  
nonessential

**A:** Yes, always  
**B:** When changes etc. are expected  
**C:** When there are any concerns in the preliminary study  
**D:** Not done, ISR results are considered stability  
**E:** No, never  
**F:** Other

### 【DGからの意見】

併用薬では、選択性等の確認までの場合が多い。

併用必須薬の場合、配合剤と同じく共存させて安定性評価を行うことを推奨。

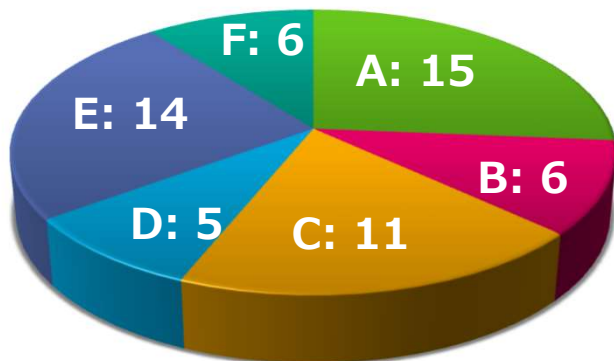


# 併用薬・配合剤の安定性評価

## Stability of Concomitant drug and Combination drug

**疑問17:** 配合剤などの場合、濃度の違いなど考慮に入れ安定性評価を行うのか？

**Q18:** 配合剤の場合、配合薬共存の添加試料で安定性を評価していますか？



- A: Yes, always
- B: When changes etc are expected
- C: When there are any concerns in the preliminary study
- D: Not done, ISR results are considered stability
- E: No, never
- F: Other

### 【DGからの意見】

共存することが確実である「配合剤」については、混合QC試料を調製して安定性を評価するのが良いと考えます（配合薬の検量線の上限濃度を添加）。

**Q19:** 併用薬や配合薬の共存・非共存の違いにより安定性の結果が異なったことがありますか？

Yes (Spiked samples)	1
Yes (Study samples)	0
No	23
No experience	35



# 動物系統差、併用薬、配合薬：DGの知恵袋

Know-how for evaluating animal strains, Concomitant/Combination drugs

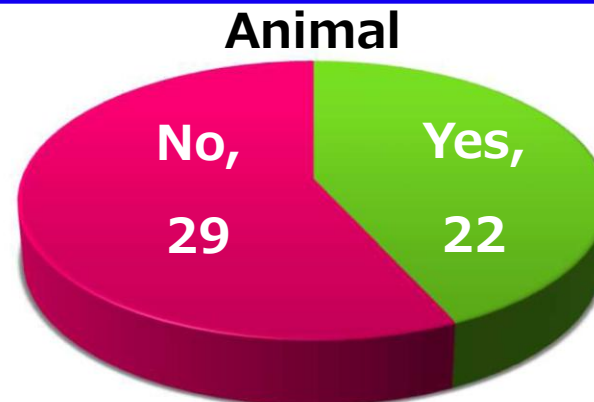
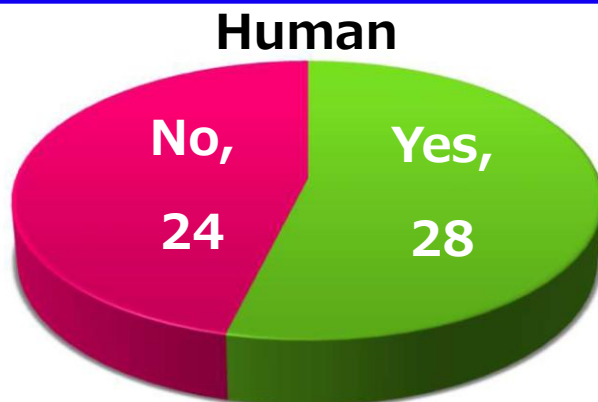
<b>動物の系統差</b>	<p>げっ歯類・非げっ歯類共に60%以上が安定性を「必ず評価する」か「予備検討を実施して懸念があった場合に評価する」であった。系統の違いで<u>安定性の結果が異なった事例はほぼないが、予備検討で確認することを推奨</u>する。</p> <p>DG2013-04の提案で、<u>「系統変更時の安定性についてはISS、並行保存QC試料を用い、実試料測定時に確認が可能」とあるので参照されたい。</u></p>
<b>併用薬①</b> ● 併用必須薬	<p>約半数の方が安定性を「必ず評価する」、「pH変化や化学的相互作用が予想される場合のみ評価する」、「予備検討を実施して懸念があった場合に評価する」のいずれかであった。<u>少なくとも予備検討で確認</u>すること及び<u>ISRの結果から考察</u>する必要があると考える。</p>
<b>併用薬②</b> ■ 併用必須薬	<p>文献等によりpH変化や化学的相互作用を考慮し、<u>化合物の特性から懸念がある場合には予備検討で確認することを推奨</u>する。</p>
<b>配合剤</b>	<p>少なくとも<u>予備検討で確認</u>すること及び<u>ISRの結果から考察</u>する必要があると考える。</p>



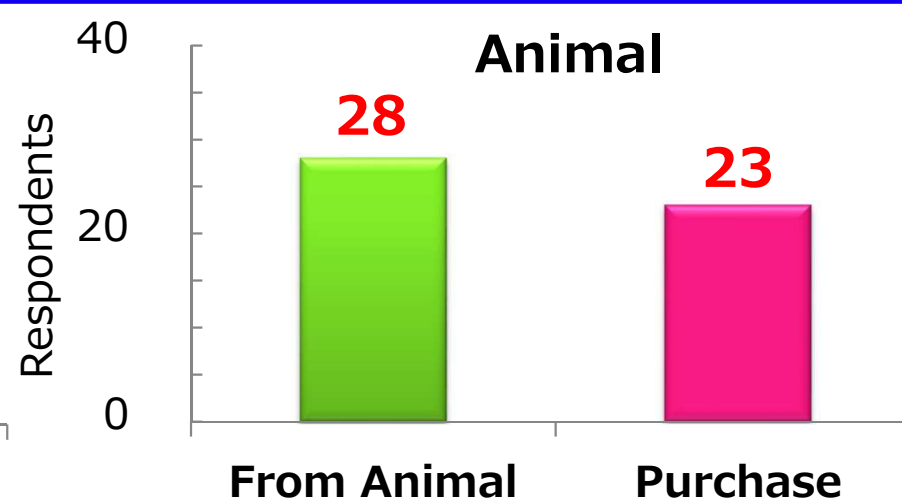
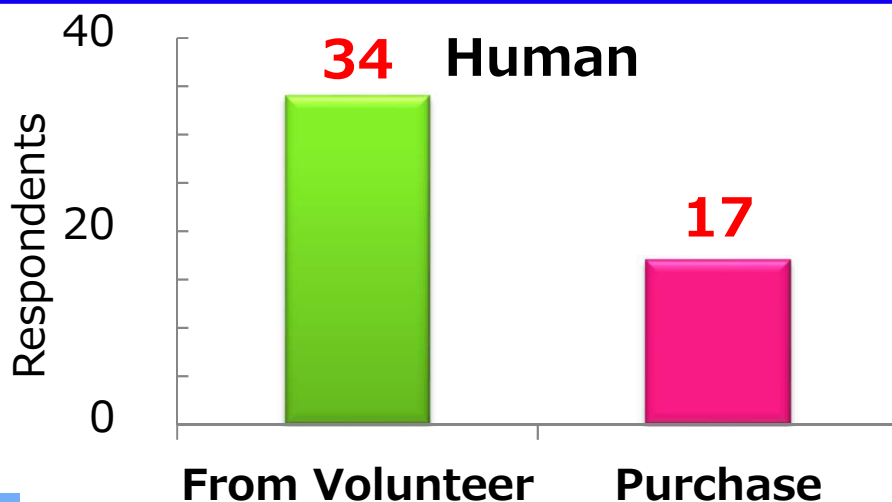
# 全血中の安定性：評価の実施と入手源

Stability in Whole blood: Evaluation and Source of whole blood

**Q20:** ヒト/動物において全血中の安定性評価を実施していますか？



**Q21:** 安定性評価で使用する血液の通常の手入源は？（複数回答可）







# 全血中の安定性：評価の実施と入手源

*Stability in Whole blood: Evaluation and Source of whole blood*

ヒトの全血を購入と回答した方（17名）の所属

国内新薬メーカー	12
国内CRO	3
国内ジェネリックメーカー	1
外資新薬メーカー	1
計	17

国内では売血不可のため、輸入品の購入である。

- ✓ 採血後1～3週間
- ✓ 冷蔵or冷凍輸送



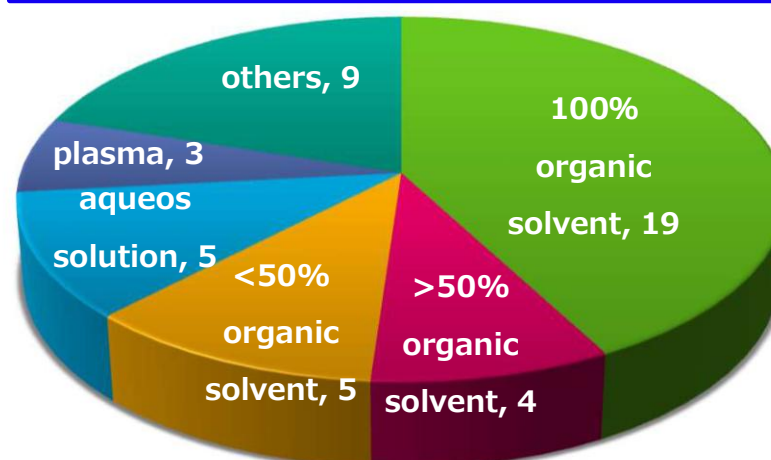
# 全血中の安定性：評価方法

## Stability in Whole blood: Evaluation method

**疑問18:** 全血中安定性の添加サンプルの調製方法を知りたい。

**Q22:** 血液採取から安定性試験実施までの期間で最も近いものは？

**Q23:** 血液に添加する標準溶液の溶媒で最も使用するものは？



**【回答者コメント】**

- ヒトは当日、動物は2日以内
- 2週間以内 (2件)
- 血球が壊れても良い試験であったため凍結して1ヶ月後に使用
- 凍結購入品のため不明

全血中安定性を評価できないのは？ (DG)

**【回答者コメント】**

- Case by case (測定法、標準原液の溶媒、標準溶液の組成に依存) : 4件
- 生理食塩水に溶解 (10%程度の有機溶媒含)
- エタノール、メタノールを利用出来る場合、標準溶液を乾固してから血液を添加



# 全血中の安定性：プレインキュベーション

## Stability in Whole blood: Pre-incubation

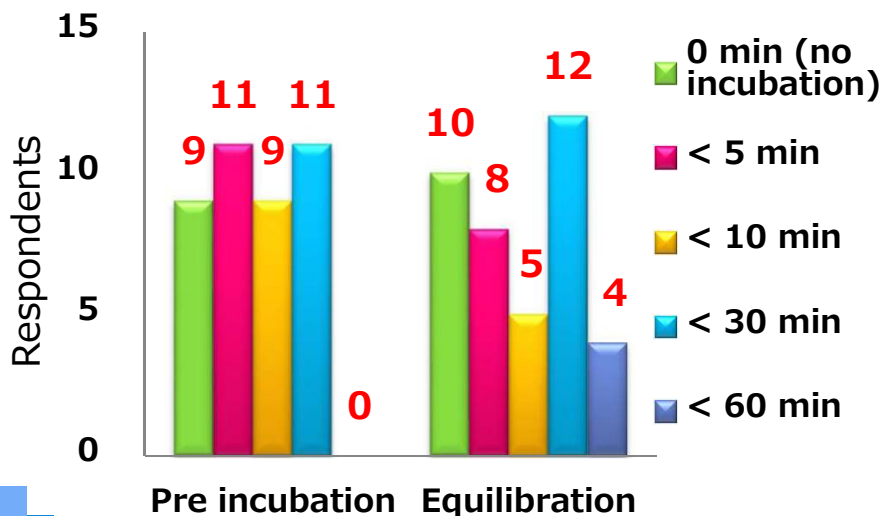
**疑問19:** 全血中安定性を実施する際、血液を37℃でインキュベーション後、標準溶液を添加したものをイニシャルとし、その後37℃で任意の時間インキュベーションしたものを安定性サンプルとしている。この方法が採血後の安定性をどれだけ反映できているのか？問題となった事例があれば知りたい。

**Q24:** プレインキュベーション/平衡化時間\*について事前検討していますか？

	Yes	No
Pre-incubation	20	26
Equilibration	24	22

\*平衡化時間：血液に標準溶液を添加してから安定性試験を開始するまでに、一定時間インキュベーションし、血球などへの移行を平衡状態に保つための時間

**Q25:** プレインキュベーション/平衡化を実施している時間は？（複数選択可）



### 未実施の場合の問題事例、未実施の理由

濃度 Up (2) Down (2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>数時間平衡化しても血漿中濃度が上昇。攪拌不足と考え回転させて平衡化することで改善。</li> <li>初期値から30分後は低くなり、その後安定。</li> </ul>
その他	<ul style="list-style-type: none"> <li>血液を遠心分離中、冷却により移行率が異なった。冷却せずに血漿分離した。</li> <li>血液中では不安定な化合物の場合はプレインキュベーション、平衡化未実施。</li> </ul>



# 全血中の安定性：前処理の方法

## Stability in Whole blood: Pretreatment

**疑問20:** 血漿（または血清）中濃度測定法における「全血」中の安定性の評価法について、他社ではどちらの方法で実施しているか知りたい。

- ① 全血にアナライトを添加し、調製直後、一定期間保管後、**遠心分離した血漿（または血清）を測定**する。血漿（血清）で調製した検量線から濃度として評価する。
- ② 全血にアナライトを添加し、調製直後、一定期間保管後に、**全血のまま前処理して測定**する。アナライトとISの強度比を用い、調製直後からの変化率で評価する。

**Q26:** 全血中の安定性を評価する場合、分析前に遠心分離し、血漿あるいは血清として測定していますか？





# 全血中の安定性：DGからのコメント

Stability in Whole blood: Comments from DG2016-24

## 【DGからの意見】

### ◆ 実施の意義：

- Analyteが**血漿や血清中で不安定な場合**には、**全血中安定性を確認すべき**である。
- 治験の現場などで、**誤って室温に放置された場合**などを想定し、**リスク回避の観点**から実施するという考え方もある。

### ◆ サンプル調製：

- 100%有機溶媒の標準溶液を直接全血に添加するのは、**局所的なタンパク変性や溶血などの影響**があるので避けたほうが良い。一度血漿に添加してから全血に添加する方法もある。
- **プレーンキュベーションの時間**及び標準溶液添加後の**血球移行の平衡化時間**を確保すべきである。

### ◆ 測定方法（前処理）：

- 2つの方法がある。**安定して測定できればどちらの方法でも良い。**
- ① **遠心分離して得た血漿（血清）を前処理して測定する。**血漿（血清）で調製した検量線で定量し、**残存率で評価する。**
- ② **全血のまま前処理し、測定する。**真度による評価またはAnalyteとISの強度比を用い、調製直後からの**残存率で評価する。**



# 組織中安定性の向上：DGの知恵袋

Know-how for improving stability in tissue

**疑問21:** 組織中における不安定性の原因とその改善方法について、具体的な事例を知りたい。

不安定性の要因	対策	具体的な対策案
◆ 組織保存中の分解	酵素的分解の抑制	<ul style="list-style-type: none"><li>● 組織に局在する代謝酵素の把握</li><li>● 代謝酵素阻害剤の添加</li><li>● 低温保存</li><li>● 保存期間の短縮</li></ul>
◆ ホモジネート調製時の分解	酵素的分解の抑制 ホモジネート調製方法の最適化	<ul style="list-style-type: none"><li>● 組織に局在する代謝酵素の把握</li><li>● ホモジネート調製の溶媒の最適化（種類・量など）<ul style="list-style-type: none"><li>✓ 有機溶媒や酸の使用により、ホモジネート調製と抽出を兼ねる方法もある</li></ul></li><li>● 代謝酵素阻害剤の添加</li><li>● 組織の凍結粉碎後にホモジネートを調製</li><li>● 氷冷下でホモジネートを調製</li></ul>
◆ 前処理中の分解	酵素的分解の抑制	<ul style="list-style-type: none"><li>● 代謝酵素阻害剤の添加</li><li>● 前処理は氷冷下で行う</li><li>● 作業時間の短縮（効率化）</li></ul>

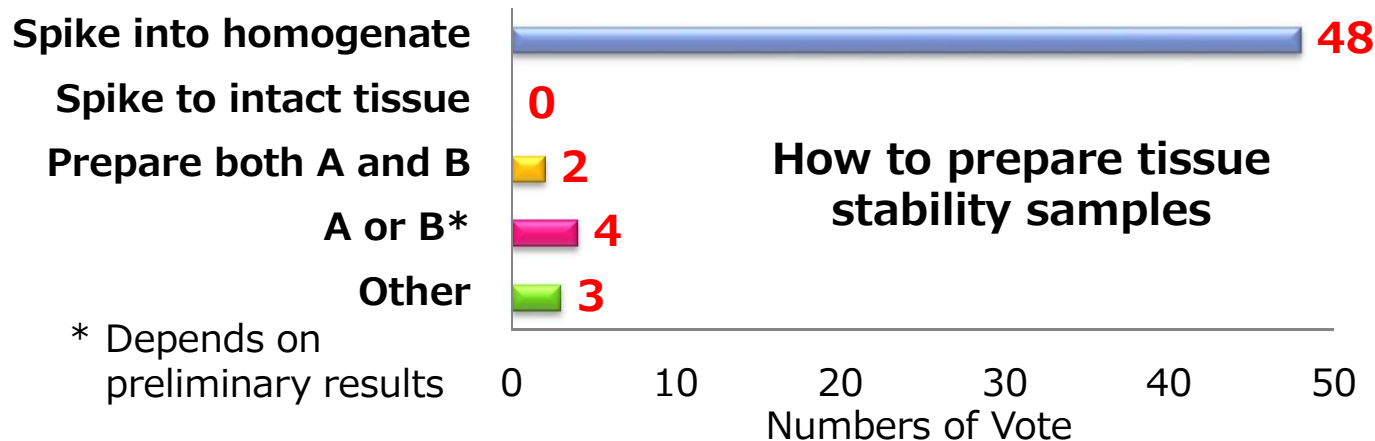


# 組織中安定性：評価方法

## Stability in tissue: Evaluation method

**疑問22:** 実試料を考えると、ホモジネート前の組織を保存することが望ましいと考えている。組織のままで添加試料を調製することがあるのか？他社の状況を知りたい。

**Q27:** 組織中安定性評価において、どのように添加試料を調製しますか。



### 【DGからの意見】

固体の組織に標準溶液を添加する手法では、均一な添加試料の調製が困難である。添加試料は、組織ホモジネートに標準溶液を添加する方法でよいと考える。この場合、固体の状態での安定性は評価できないことから、実試料測定でも組織採取後、なるべく速やかにホモジネートを調製し、固体状態の保存期間を最小限にすることが望ましい。



# 組織中安定性：マトリックスによる差

*Stability in tissue: Difference of stability between Matrices*

**疑問23:** 血漿中では凍結保存で安定性であったが、組織中では不安定であった。組織によって異なるのか分からず、どのように対応したら良いのか困った。

**Q28:** 血漿あるいは血清等と組織の両方で安定性を評価し、結果が大きく異なった事例及び結果に対する対応について教えてください。

事例	結果に対する対応
◆ 肝臓組織ホモジネートで安定性が低い	● データの扱いのグレードを下げた
◆ 血漿（血清）と組織で安定性が異なる	● 組織をホモジナイズする溶液を変更
◆ 血漿と皮膚で安定性が異なる	● 代謝酵素の違いによるものであったので、血漿に酵素阻害剤を適用

### 【回答者コメント】

- 血漿と小腸組織、血漿と腫瘍組織で安定性が異なった経験あり
- 探索段階の分析では、試料前処理を氷冷で行う。また、室温で数時間の安定性を評価する
- 室温を氷冷にすることにより安定化するかどうか検討する
- 血漿で不安定な場合は組織のホモジネート溶媒を予め工夫する

### 【DGからの意見】

マトリックスによっては、代謝酵素、ホモジネート調製溶媒、前処理時の温度やハンドリング等の影響を大きく受けることがあるので注意が必要。探索段階など、安定性の情報が乏しい段階では、氷冷下での操作が望ましい。



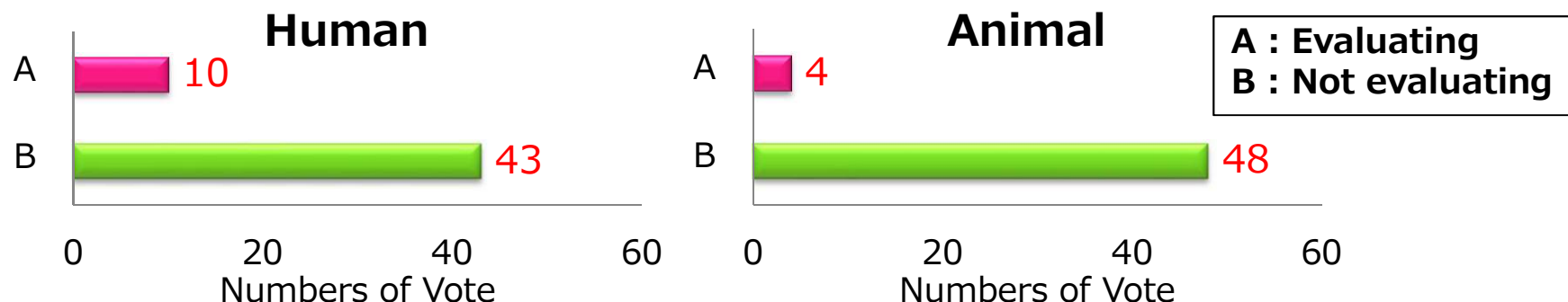


# 溶血した血漿（血清）中の安定性

Stability in Hemolyzed plasma (serum)

**疑問24:** 溶血血漿中での安定性評価について、具体的な方法、条件を知りたい。

**Q29:** ヒト/動物において溶血血漿（血清）で安定性を評価していますか？  
評価する場合、溶血血漿をどのように調製していますか？  
(自由記載。例：血漿に溶血血液を2%の割合で混合など)



## 調製方法

- 溶血血液を2%添加した血漿で実施（4件）
- 溶血させた血液を2%以上添加（溶血血液は血液を凍結融解5回以上して調製）
- 溶血血液混合。1、2、5%
- 血漿に溶血血液を5%の割合で混合
- 5%
- スポンサーと協議

## 【DGからの意見】

溶血血漿（血清）については、マトリックス効果は確認したほうがよい。

一方、安定性は必ずしも必要ではないと考える。

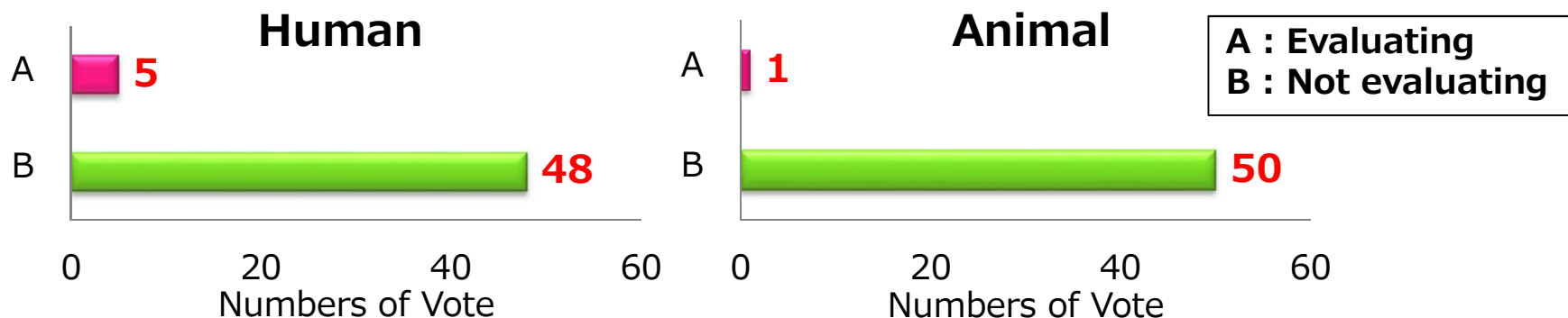


# 高脂肪血漿（血清）中の安定性

Stability in Hyperlipidemic plasma (serum)

**疑問25:** 高脂肪血漿中での安定性評価について、具体的な方法、条件を知りたい。

**Q30:** ヒト/動物において高脂肪血漿（血清）で安定性を評価していますか？  
評価する場合、高脂肪血漿をどのように定義し、試料調製していますか？  
(自由記載。例：300mg/dLトリグリセリド含有など)



## 定義と調製方法

- 300mg/dL トリグリセリド含有血漿を購入
- スポンサーと協議
- 特に設定していないが、300mg/dLとしたこともある。また、高脂血漿の安定性を必須とはしていない。
- 300mg/dL以上のTG含有血漿

## 【DGからの意見】

高脂肪血漿（血清）については、マトリックス効果は確認したほうがよい。

一方、安定性は必ずしも必要ではないと考える。



# 未変化体⇔代謝物の変換抑制：DGの知恵袋

Know-how for Suppressing "Parent" ⇔ "Metabolite" conversion

**疑問26:** 未変化体⇔代謝物の変換を防ぐための具体的な方法を知りたい。

変換の要因	対策	具体的な対策案
◆ 全般	反応速度の低下	● 氷上操作、低温室実験
◆ 血漿中酵素による代謝 (加水分解等)	酵素阻害剤の添加 除タンパク質	● 血漿または全血に酵素阻害剤 (Esterase 阻害剤、Cytidine deaminase阻害剤等) を添加する ● サンプル採取後、ただちに有機溶媒で除タンパクする
◆ エステルの非酵素的分解	pHの調整	● 弱酸性にする
◆ エステル化	アルコールの除去	● エステル系化合物の代謝物を前処理する際、アルコールを使用しない。 例：カルボン酸の前処理でメタノールを使うと、カルボン酸のメチルエステルが合成されることがある。
◆ アシルグルクロナイドの脱抱合	pHの調整	● 弱酸性にする (アシルグルクロナイドは弱酸性で安定、塩基性で不安定)
◆ N-グルクロナイドの脱抱合	pHの調整	● 塩基性にする (N-グルクロナイドは酸性で不安定、塩基性で安定)



# 代謝物の安定性: 疑問点

## Stability of Metabolites: Questions

**疑問27:** 未変化体および代謝物の標準品をブランクマトリクスに添加して実施した安定性試験では基準に適合していた。  
しかし、実試料測定時に代謝物がISRの判定基準をクリアできなかった。  
オリジナル分析時の代謝物濃度が低いため、ISRのための再分析時に生成した代謝物がオリジナル値へ与える影響が大きいと推察し、独自の判定基準を設けることで対応としている。  
他社の状況を知りたい。

**疑問28:** 代謝物の安定性を確認する場合、常に未変化体が存在することもないので、現在は代謝物のみブランクマトリクスに添加していますが、正しいのでしょうか？不明です。

**疑問29:** 各項目の安定性について、各社どこまでケアしているか知りたい（代謝物のケアは？）。

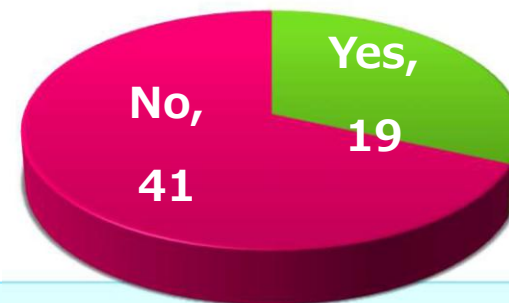




# 代謝物の安定性:未変化体の変換による影響

*Stability of Metabolites: Impact of the conversion of unchanged drug*

**Q31:** 代謝物の安定性評価又は代謝物の定量分析において、未変化体からの変換が代謝物濃度に影響を与えたことがありますか。  
(ある場合、事例と対応を具体的に記載)



## 【回答者コメント】

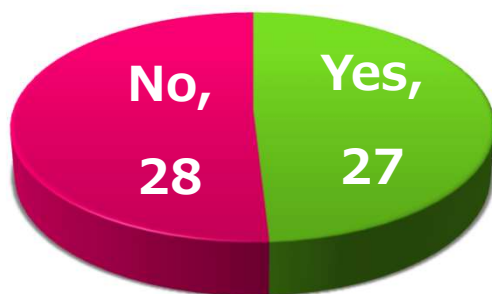
事例	対応
➤ 血漿中の酵素による代謝	● 酵素阻害剤を添加した。採取後直ちに有機溶媒で除タンパクした。
➤ 分解 (加水分解、エステル化合物、アシルグルクロナイド)	● 酸性条件にした。
➤ 分解 (N脱メチル、エステル切断)	● 前処理法を変更した。
➤ 分解が非常に早い。	● 代謝物濃度として測定した。
➤ プロドラッグから活性体への変換	● 条件検討を実施し、試料中及び前処理中を酸性条件にした。
➤ 実検体で未変化体濃度が代謝物に比べて高く、15%以内の分解であっても分解産物の代謝物の定量値に影響を及ぼしてしまった。バリデーションでは等量添加しているので問題を把握できていなかった。	● 記載なし。
➤ 記載なし。	● 前処理法を変更した。氷上調製とした。



# 代謝物の安定性: 評価方法

## Stability of Metabolites: Evaluation method

**Q32:** 代謝物の安定性試験において、安定性試験料に未変化体を添加していますか。



Yes: Spike Unchanged Drug  
No : Metabolite Only

**Q33:** 代謝物安定性評価試料（低濃度：QC-L、高濃度：QC-H）にそれぞれ添加する未変化体の濃度は以下のどれですか？

	Metabolite QC-L	Metabolite QC-H	Number of voters
Concentration of Unchanged Drug to add	Low-Level	High-Level	16
	High-Level		3
	Expected C <sub>max</sub>		3
	Others		4

### 【Othersの方の意見】

- 基本はQC-Lに低濃度を添加するが、平衡関係などの情報がある場合は別途やり方を変える
- Case by case
- 実施しない（予備検討で未変化体⇔代謝物の影響のない方法で実施する）
- 予想される比率で未変化体を添加



# 代謝物の安定性：DGからのコメント

Stability of Metabolites: Comments from DG2016-24

## 【DGからの意見】

- 代謝物の安定性評価において、**未変化体を添加**するかどうかは、**添加派と非添加派がほぼ半々**の結果であった。
- 未変化体の**添加濃度は、下表の(A)、(B)、(C)のいずれも問題ない**と考える（回答者の実施例は(A)が最も多く、約62%）。
- **未変化体濃度が代謝物に比べて著しく高い**場合、保存中や前処理中に**未変化体から代謝物へ変換**することにより、代謝物の定量値に影響を与えるリスクもある。また、**ISRが外れる要因**にも繋がる。
- 上記が懸念される場合は、**未変化体のみを添加した安定性試料における代謝物濃度をモニター**する、または、**最高血漿中濃度の未変化体を添加**する等により、事前に評価しておくことを推奨する。

	Metabolite QC-L	Metabolite QC-H	
Concentration of Unchanged Drug to add	Low-Level	High-Level	(A)
	High-Level		(B)
	Expected C <sub>max</sub>		(C)



# 吸着防止のポイント：DGの知恵袋

Know-how for preventing adsorption

**疑問30:** 吸着による問題を未然に防ぐための留意点を知りたい。

ポイント	一般的な留意点と対応
◆ 事前検討の重要性	<ul style="list-style-type: none"><li>● 吸着現象は複雑な問題であり、バリデーション前の検討が重要。</li></ul>
◆ 化合物の溶解性 ◆ 試料の組成	<ul style="list-style-type: none"><li>● 吸着現象は化合物の溶解性が引き金となる。</li><li>● タンパク質を含むマトリックス中より緩衝液や尿など、タンパク成分が無いマトリックス中に起こりやすい。</li></ul>
◆ 化合物と資材との相互作用	<ul style="list-style-type: none"><li>● 化合物と資材表面の相互作用の状態を変更する。</li><li>● 材料の変更、コーティング、溶媒の添加による溶解性の改善、添加剤による相互作用のブロックなどが主な対策となる。</li></ul>
◆ 容器の材質	<ul style="list-style-type: none"><li>● ガラス：表面は、親水性の高いシラノール基と疎水性のシロキサン。イオンの吸着と疎水的吸着が同時に起こる。</li><li>● ポリプロピレンなどのプラスチック容器：疎水的吸着のみが生じる。</li></ul>
◆ 資材のコーティング	<ul style="list-style-type: none"><li>● シリコナイズ：材質表面の疎水性（はっ水性）を上げて、化学結合や相互作用を回避するタイプ。</li><li>● 親水基導入：イオン性の親水性基や非イオン性の超親水性基を化学結合させることで、素材表面の親水性を上げ、疎水性吸着あるいはイオンの吸着を抑制するタイプ。</li></ul>





# 吸着した場合の対処方法：DGの知恵袋

Know-how of countermeasure strategy in case of adsorption

**疑問31:** 容器やチップ等への吸着が疑われた場合の具体的な対処法を知りたい。

**Q34:** 容器やチップ等への吸着が酷い化合物はどのような対応をしていますか？

## Q34の回答：まとめ

吸着の事例	対策	具体的な解決策
◆ 褐色ガラスで標準溶液を保存した際に著しく吸着した (キレート生成か?)	容器の材質変更	● ガラス容器からポリプロピレン容器へ変更した
◆ 溶解度が低い化合物の尿中安定性が取れない	有機溶媒の添加	● 有機溶媒を等量程度添加してから保存した (溶解性の改善)
◆ どうしても吸着現象が回避できない	有機溶媒の添加	● 分析に使用する量を小分けして保存し、使用時には保存容器に有機溶媒等 (エタノール等) を添加した (溶媒による容器からの回収)

<p>◆ 吸着現象が回避できない</p>	<p>コーティング製品への変更 添加剤の使用</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● シリコナイズ製品への切り替えを行った。</li> <li>● シリコナイズ製品が市販されていない特殊な容器の場合、シグマコート™（シリコナイズ）などのコーティング剤を用い、自前でコーティングした。</li> <li>● 緩衝液中安定性の場合、適当なタンパク質（BSAなど）の添加で吸着を回避した。</li> <li>● 市販の吸着防止剤（ブロックエースなど）を使用した。</li> </ul>
<p>◆ 標準溶液の安定性でガラス製容器で調製したところ、吸着が見られた</p>	<p>事前に用意していた対応策を順に適用</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 以下の対応で吸着回避できる場合が多い。</li> <li>① 標準溶液の調製容器をガラス→ポリプロピレン製に変更</li> <li>② 標準溶液調製時の溶媒の有機溶媒濃度を上げる</li> <li>③ 標準溶液の溶媒を有機溶媒ではなく、血漿に変更</li> </ul>

## Q34 : カテゴリー別、回答者コメント全文

<p><b>■ <u>材質変更・コーティング</u></b> <b>(18コメント)</b></p>	<p>褐色ガラスで標準溶液を保存した際に著しく吸着した（キレート生成か？）ポリプロピレン製容器に変更して対応した。</p>
	<p>低吸着チップやポリマー、シリコンなどの表面加工をした容器を使用、ガラス容器を使用、酸性又は塩基性にふる、などの対応で吸着を防止している。ペプチドの分析で、ポリプロピレンからガラスに変更した際に、容器吸着がおこり、MSのレスポンスが低下した。</p>
	<p>シリコナイズド製品への切り替えが1stチョイス。in vitro試験の緩衝液中安定性の場合、適当なタンパク質（BSAなど）で吸着を回避できる場合がある。特殊な容器の場合はシグマコート™（シリコナイズ）などのコーティング剤を用いる場合もある。吸着が回避できたかどうかを確認するのは意外と手間です（マスバランスが取れないので）。これらをふまえ、自社完結の場合、吸着の検討はHotで行うことが多いです。申請に用いる信頼性基準/GLP基準データを取得するような開発の後期では、必ず<sup>3</sup>Hや<sup>14</sup>Cラベル体があるので、Hot試験では回収率がキモになる場合が多いのでHot試験での吸着はしっかり検討します。</p>
<p><b>■ <u>溶媒の添加・溶解性の改善</u></b> <b>(5コメント)</b></p>	<p>分析に使用する量を小分けして保存し、使用時には保存容器に有機溶媒等（エタノール等）を添加する。容器変更により安定性が変化した事例はない</p>
	<p>溶解度が低い化合物の尿中安定性が取れない場合に、有機溶媒を等量程度添加してから保存した経験があります。</p>
<p><b>■ <u>事例が無い</u></b> <b>(5コメント)</b></p>	<p>血液や血漿など、蛋白を含む試料では吸着が問題になったことはない。</p>
	<p>血液などの試料であればポリプロピレン容器での吸着経験はまだありません。標準溶液であれば、溶媒を変更します。</p>

<p>■ <b>事前検討で回避</b> (3コメント)</p>	<p>吸着が酷い化合物の経験はないが、バリデーション試験前に事前に吸着は検討している。</p>
<p>■ <b>その他</b> (3コメント)</p>	<p>標準溶液をガラス製試験管で調製していて吸着がみられたとき          ①標準溶液の調製容器をガラス→ポリプロピレン製に変更した。          ②標準溶液調製時の溶媒の有機溶媒濃度を上げた。          ③上記対応でも改善されない場合には、標準溶液を有機溶媒ではなく、血漿に変更した。</p> <p>吸着防止剤の添加</p> <p>PP・PEへの吸着が酷い化合物は試料自体に試薬を添加して吸着を抑える試料形態をとってから保存することを前提とする。</p>

**疑問32:** 実試料分析において、バリデーション時と異なる材質で検体が保存されていたとき、その試料の測定値は採用するか否か。  
 採用しない場合、容器の違いの影響を検討した追加バリデーションを行って、採用できるように対応するかどうか。

**【DGからの意見】**

検討する時間があれば、**追加バリデーションの実施**を検討する。  
 もしなければ、測定報告書に保存容器が異なっていた旨を記録して、対応を考察する。



# Stability: Recommendation for Best Practices and Harmonization from the Global Bioanalysis Consortium Harmonization Team

8<sup>th</sup> JBF Symposium DG2016-24

Received 19 August 2013; accepted 17 January  
2014; published online 19 February 2014



# Summary of the recommendations for stability from GBC

## Topics and GBC recommendation

### ◆ General

- Stability assessment should cover all relevant conditions encountered in practice  
実際に遭遇する条件を満たすよう安定性を評価すべきである。
- Storage duration should be at least equal to the maximum storage period for any individual study sample  
少なくとも各試験サンプルの最大保管期間と等しい期間で評価すべきである。
- Deviation of the result for a stored sample from the reference value should not exceed 15% (chromatography) or 20% (binding assays)  
真度15%(クロマトグラフィー法)、20%(リガンド結合法)を満たすべきである。
- Two concentration levels (low and high) suffice for stability assessment; stability at an over-curve level is not necessary unless scientifically called for  
安定性は低濃度、高濃度の2濃度で評価すべきである。検量線外の濃度については科学的懸念がない限り不要である。
- A single time point suffices for each stability assessment with an appropriate number of replicates  
タイムポイント毎に適切な数 (n=3以上) で評価すること。
- Stability results should generally not be extrapolated to other storage conditions  
安定性の結果を異なる保存条件に外挿してはならない。



# Summary of the recommendations for stability from GBC

## Topics and GBC recommendation

### ◆ Reference values

- Results for stored samples can be compared to nominal or t=0 values  
**保存試料の値は、理論値もしくはt=0（初期）値と比較する。**
- Fresh calibrators are essential for long-term stability assessment, but calibrators stored frozen suffice for other stability determinations as long as stability under frozen conditions is confirmed  
**新たに調製した検量線用試料が長期安定性評価には必須であるが、凍結保存条件下での安定性が確認されている期間内であれば、凍結保存された検量線用試料を安定性評価に使用できる。**

### ◆ Transferability

- Stability results obtained in other laboratories can be used if storage conditions are similar and if the assessment has been performed in an acceptable way  
**安定性の結果は、保存条件が同等であり、安定性の評価が適切な方法で行われているのであれば、他施設で得られた結果を利用することができる。**





# Summary of the recommendations for stability from GBC

## Topics and GBC recommendation

### ◆ Failing results

- Stability results should be rejected in the case of an analytical error or failing calibration or QC results and be accepted otherwise  
**安定性の結果は、分析のエラー、検量線・QCが外れた場合は棄却しなければならない。それ以外の場合は受け入れなければならない。**
- Stability results not meeting the criteria indicate that investigated storage conditions are unsuitable  
**安定性の結果がクライテリアを満たさないことは、保存条件が不適切であることを示している。**
- Possible analytical outliers can be investigated by re-analysis in duplicate  
**分析の外れ値の可能性は、n=2で再分析を行うことで評価できる。**

### ◆ Bench-Top, Freeze/Thaw and Long-Term Frozen Stability in Biological Matrix

- Storage and analysis conditions should mimic the situation for study samples  
**実試料測定に即した条件で安定性を評価すべきである。**
  - Frozen stability at a lower temperature is not needed if already demonstrated at a higher temperature, unless scientifically required (S)  
**科学的懸念がない限り、既に高温条件で安定性が評価されているのであれば、低温条件での安定性評価は不要である。**
- S : Small molecules**





# Summary of the recommendations for stability from GBC

## Topics and GBC recommendation

### ◆ Stock Stability

- Stability assessment is needed for lowest and highest concentrations which will be stored in practice  
**安定性は、実際に保存する最低及び最高濃度において評価が必要である。**
- Stability assessment is needed for the conditions used for long-term storage and for bench-top use  
**安定性は、長期保存及び実験で用いられる条件において評価が必要である。**
- Deviation of the result for a stored sample from the reference value should not exceed 10% (S)  
**保存後の値は、リファレンス値から10%を超えて乖離すべきではない。**
- Stability assessment for internal standards is only required when scientifically called for (S)  
**内標準物質の安定性は、科学的に必要な場合にのみ評価が必要である。**

**S : Small molecules**





# Summary of the recommendations for stability from GBC

## Topics and GBC recommendation

### ◆ Extract Stability

- Assessment of relative stability (against stored extracts of calibrators) suffices as long as extracts of calibrators and QCs will be stored together with study samples (S)

検量線試料とQC試料が試験サンプルと共に保存される場合、相対的な安定性(一緒に保存した検量線に対する安定性)の評価で十分である。

S : Small molecules

### ◆ Whole Blood Stability

- Stability assessment is generally not necessary if stability in plasma/serum has been demonstrated under the same conditions, unless the analyte is known to behave differently in the presence of blood cells  
一般に、血漿/血清中安定性が担保されているときには同条件での全血中安定性評価は不要(例外: 血球存在下で挙動が異なる薬物)。
- Stability assessment can be performed by direct analysis of whole blood or by harvesting and subsequent analysis of plasma/serum  
全血中安定性評価には、血液を直接分析する方法と、血漿/血清の状態にしてから分析する方法がある。



# Summary of the recommendations for stability from GBC

## Topics and GBC recommendation

### ◆ Tissue Stability

- Stability cannot be demonstrated for intact tissue, but only for tissue homogenate  
固体の組織の状態では評価が難しいので、ホモジネートを用いて評価する。
- Storage of study samples in the form of homogenate is recommended  
実試料はホモジネートの状態で保存することが望ましい。

### ◆ Endogenous Analytes

- Stability assessment should be similar to that for xenobiotics, whenever possible  
内因性化合物の安定性評価は可能な限り内因性以外の化合物の評価と同様にすべきである。
- Stability should be assessed using the authentic matrix and the authentic analyte  
内因性化合物の安定性は、本物のマトリックスと本物の化合物で評価すべきである。





# Summary of the recommendations for stability from GBC

## Topics and GBC recommendation

### ◆ Deviating matrix types

- Additional stability assessment should be considered if the biological matrix in a particular study deviates considerably from a normal control matrix and if this deviation in composition is likely to impact analyte stability

特定試験の生体試料が従来の生体試料と大きく異なる場合、またその生体試料の組成に起因する差が測定対象物質の安定性に影響を与える可能性があるなら、追加の安定性評価を考慮すべきである。

### ◆ Incurred sample stability

- Stability in incurred samples should be considered in case of possible differences in stability in spiked and incurred samples (S)

インカードサンプル安定性は、スパイク試料と実試料とで安定性に差異が生じる可能性がある場合に考慮すべきである。

S : Small molecules





## Reference Values

- Analyte stability results are typically obtained by comparing the concentration after storage to a reference value, which can be either the **theoretical concentration** or the concentration experimentally determined in an aliquot of the sample which **has not been subjected to storage (t = 0 value)**.

**DG : ○ 同意。安定性は真度もしくは残存率 (t=0値との比較) で評価が可能。**

- Comparison to the t = 0 value **rules out any bias introduced by the spiking process** and, therefore, gives a direct estimate of the effect of storage (although a bias may be introduced by the experimental determination of the t = 0 value).
- Expressing stability by comparison to the corresponding t = 0 value **can be regarded as equally acceptable**.
- Also in this case, it is **advisable to check the t = 0 concentrations and to consider preparation of a new set of stability samples** if their concentrations deviate relatively much from the corresponding nominal values, to avoid that concentrations after storage are outside the normal acceptance criteria.

**DG : ○ 同意。t = 0値との比較は、試料調製時の添加操作における影響が排除されるので、純粹に分析対象の安定性評価が可能である。しかし、容器等への吸着により評価不能なケースもあるので、t=0の真度も重要である。真度の大きな逸脱は測定に影響を及ぼす可能性がある (LLOQやULOQを超えるなど)。安定性試料の調製時に一定の濃度範囲を逸脱した場合、新たな試料調製を推奨する。**



## Reference Values

- Comparison to the theoretical value, which is recommended by current regulatory guidelines, essentially is **a combination of the bias caused by storage and pre-analytical bias** because of the spiking process.
- Both approaches are scientifically correct, but for the latter approach, due attention has to be paid to **the effect that the bias originating from the spiking process** may have on the final result.
- Therefore, it is recommended that the concentrations of the stability samples **be measured prior to the stability experiment to allow evaluation of the accuracy of spiking.**
- In order to avoid incorrect conclusions about stability, it is advisable **to consider preparation of a new set of stability samples if the bias found for the spiked samples exceeds a specific value.**

**DG : ○ 同意。** 真度での評価は、純粹に分析対象物質の安定性を評価していない。すなわち、保存による影響と試料調製時の添加操作による影響の組み合わせである点に注意が必要。安定性試料の調製時に一定の濃度範囲を逸脱した場合、新たな試料調製を推奨する。

### 【DG Comment】

添加ミス等で、安定性の評価期間に相当する時間を無駄にする事は、莫大な損失に繋がります。



# Reference Values

➤ The magnitude of this value will depend on the risk one accepts, but **needs to be more stringent than the usual 15% or 20% acceptable bias.**

**DG : ○ 同意。一定の濃度範囲を設定する事は難しいが、通常の許容範囲（15% または20%）よりも厳しくする必要がある。**

## 【DG Comment】

以下の表を参考に、許容範囲を設定することを提案する。

＜真度と残存率の関係＞

Accuracy	After storage									
	Initial	80	85	90	95	100	105	110	115	120
80	100.0	106.3	112.5	118.8	125.0	131.3	137.5	143.8	150.0	
85	94.1	100.0	105.9	111.8	117.6	123.5	129.4	135.3	141.2	
90	88.9	94.4	100.0	105.6	111.1	116.7	122.2	127.8	133.3	
95	84.2	89.5	94.7	100.0	105.3	110.5	115.8	121.1	126.3	
100	80.0	85.0	90.0	95.0	100.0	105.0	110.0	115.0	120.0	
105	76.2	81.0	85.7	90.5	95.2	100.0	104.8	109.5	114.3	
110	72.7	77.3	81.8	86.4	90.9	95.5	100.0	104.5	109.1	
115	69.6	73.9	78.3	82.6	87.0	91.3	95.7	100.0	104.3	
120	66.7	70.8	75.0	79.2	83.3	87.5	91.7	95.8	100.0	

真度による評価では全て許容範囲であるが、初期値の真度によっては残存率が大きく逸脱する。真度と残存率のバランスを考えて、安定性試料調製時の許容範囲を設定することを推奨する。初期値の真度の目安は100±5~10%を推奨。



## Reference Values

- In some situations, comparison to the theoretical value is impossible because the results cannot be directly derived from a calibration curve.
- Examples include the assessment of the **stability of stock and working standard solutions, the stability in whole blood** (if performed by preparation and subsequent analysis of plasma), and **the stability of endogenous analytes**.
- In these cases, comparison to the corresponding  $t = 0$  value is the only option.

**DG : ○ 同意。真度での評価か残存率での評価かは、ケースバイケースである。  
(例：標準原液・溶液の安定性、分離した血漿で測定を行う全血中の安定性、  
内因性物質の安定性などは残存率でしか評価できない)**







## Reference Values

- **The use of freshly prepared calibrators for stability assessment**, as specified by regulatory guidelines, is especially important for the determination of (long-term) frozen stability, since the use of calibrators that are stored frozen prior to analysis can lead to a similar analyte instability profile in the stability samples and the calibrators, with **the risk that instability passes unnoticed**.
- In this context, a workable definition of “fresh” could be: prepared on the day of the stability assessment, unfrozen, and stored using any necessary stabilizing precautions (such as protected from light or on ice).
- For other stability assessments, **the use of calibrators that are not freshly prepared** but stored frozen until their use can be regarded as scientifically appropriate **if the stability of the calibrators over the period of frozen storage is ensured**.

**DG : ○ 同意。**凍結保存された検量線用試料の使用は、不安定性を見逃すリスクを伴っている。このため安定性評価には、新たに調製した検量線用試料の使用が重要である。なお、凍結保存条件下での安定性が確認されている期間内であれば、凍結保存された検量線用試料を安定性評価に使用する事は科学的に適切である。

### 【DG Comment】

検量線用試料は分析の「物差し」であるため、この基準が不確実であれば全ての結果が正しくないものになります。検量線用試料が、安定性の保証されている期間内で真度が許容範囲内であったとしても、検量線（傾き，切片等）が妥当であることを考慮する。



# Transferability of Stability Results

- As analyte (in) stability is determined by physicochemical parameters (**temperature, time, matrix composition, exposure to light**), stability results can be considered universally valid. Therefore, it is scientifically justifiable to refer to stability results obtained elsewhere, if critical storage conditions are similar and the stability assessment has been performed in a scientifically sound and traceable way.
- Any acceptably validated method may be considered to yield reliable results and thus, the acceptability of **transfer of stability results** does not need identical analytical methods **at the different sites**.

**DG : ○同意。安定性は温度、時間、マトリックス、光等の物理化学的要因で決まるため、原則として、施設間で安定性試験を繰り返す必要はない。**

- For analytes with a clear stability profile, slight variations in storage conditions (e.g., because of **seasonal fluctuations in temperature, humidity, and lighting conditions**) will be **an acceptable risk**, both within a single laboratory and between different laboratories and do not warrant additional stability investigations.

**DG : ○同意。施設間、施設内における軽微な保存条件の差異（温度、湿度、光などの季節変動）は許容でき、追加の安定性評価を要さない。**



# Transferability of Stability Results

- In the case of **larger variations in storage conditions** between analytical sites or between the analytical site and the sample collection site, it is recommended to either **repeat the stability test** in each new lab or to **cover all different storage conditions** in the original stability assessment.
- Whether or not a stability experiment will need to be repeated should be considered **case-by-case** and will also depend on the effort it will take to cover the necessary storage conditions during the original validation, compared to simply repeating the experiment.

**DG : ○同意。保存条件が施設間で大きく異なる場合、①（新しい施設で）再試験を実施、②（元の施設で）全ての保存条件をカバーする追加検討の実施を推奨。**

**①と②の選択は労力を勘案しながらケース・バイ・ケースで判断。**

- An **exception** is transferring stability results between methods that use protein-protein interactions (such as **ligand-binding assays** and **immunoprecipitation extractions**) and that employ **different reagents** and/or **incubation times**, since **binding surfaces and kinetics may impact** the ability to measure the analyte across methods during stability assessments.

**DG : ○同意。LBAなどのタンパク質-タンパク質相互作用による分析で、試薬やインキュベーション時間が異なる場合、安定性の結果を流用できない。結合部位や結合速度が影響を受け、安定性の評価時と異なってしまう（ことにより別の結合部位や別の結合速度を測定してしまう）可能性があるためである。**



# Treatment of Failing Stability Results

- In the same way as study samples, stability samples are analyzed in an **analytical run containing calibrators and QC samples**. If the **calibration curve and/or QCs fail** the acceptance criteria or if there is a documented **error in preparation**, then the stability results are invalid and the assessment **should be performed again**, regardless of whether the stability assessments would have passed.

**DG : ○同意。安定性の評価試料は検量線・QCとともに測定しなくてはならない。検量線・QCが基準を満たさない場合や、実験手技にミスがあった場合、たとえ安定性の評価が基準を満たしていてもその結果を不採用とし、再実施しなくてはならない。**

- If the run is valid, but the **stability results do not meet** the pre-defined acceptance criteria, the investigated storage conditions should be considered unsuitable. Where needed, **shorter storage periods, lower storage temperatures**, and/or **the addition of stabilizing agents** can be investigated and additional stability testing for the adapted storage conditions performed.

**DG : ○同意。安定性が許容基準を逸脱した場合、必要に応じてより短時間、より低温、安定化剤の添加などの条件で追加の安定性評価を実施する。**



# Treatment of Failing Stability Results

- If a failed assessment is suggestive of an **analytical outlier**, the recommended approach is to investigate this by **repeating the experiment in duplicate**. Reporting all data and making a **scientific judgment of the total data set**, based on pre-defined criteria, is appropriate.

**DG : ○同意。** 安定性の逸脱原因が、分析における異常値 (外れ値) にあることが疑われた場合、再分析をn=2で実施することを推奨する。  
あらかじめ設定した評価基準に従い、全データセットを科学的に評価することは適切である。

## 【DG Comment】

分析結果が外れ値である可能性を評価するため、再分析データを取得するとき、以下の①、②のいずれも可である (合計n=3のデータを得る)。

- ① 初回 + 再分析(n=2)
- ② 初回 + 再分析(n=1) + 再々分析(n=1)

n=3のデータから外れ値を除外し、残りのn=2のデータをもとに安定性を評価するのは、適切な手法です。

このような外れ値、採用データの取り扱いは、あらかじめ試験計画書で規定しておくことをお勧めします。



# Treatment of Failing Stability Results

- In some cases, repeating the experiment may be unnecessary for the final decision. **One example is a time course** where the early and late time points pass the criteria while the middle time point fails. It may be scientifically justifiable to accept the longer time without a repeated assessment depending on the magnitude of the discrepancy and overall data trend.

**DG : ○同意。例えば、保存期間の「時点a:○」、「時点b:x」となった場合、更に長期の「時点c」を評価する。  
「時点b」の逸脱の程度と経時的な変化に基づき、「時点c:○」を採用することが科学的に妥当な場合には、「時点c」までの安定性が担保されたとして良い。**





# Bench-Top, Freeze/Thaw and Long-Term Frozen

- it is essential to assess stability **at the conditions** that are **used for study samples**. For example, if samples are intended to be thawed at 37°C or in the refrigerator rather than at ambient temperature or if thawed samples will be stored on melting ice rather than at the bench-top, these conditions should also be used for stability assessment.

**DG : ○ 同意。** 実試料測定に即した条件で安定性を評価することが重要である。実試料を37°C若しくは冷蔵庫で融解することになるのであれば、その条件で安定性を評価すべきである。

- Molecules will be chemically **more stable** at a **lower storage temperature**, based on **Arrhenius' law of reaction kinetics**, but **proteins** may undergo (increased) **denaturation** and **partial loss** of their **three-dimensional structure** during **freezing at lower**. Assessment of stability at a lower storage temperature will, therefore, typically not be necessary, except when scientifically called for.

**DG : ○ 同意。** アレニウスの法則より、化学的には分子はより低温で安定である。低分子化合物については、高温 (-20°C) の安定性を評価していれば、より低温 (-80°C) の安定性評価は不要である。一方、抗体医薬品等のタンパク質については、より低温で変性や高次構造の一部が分解される懸念があるため、高分子定量には注意が必要である。事前に評価することを推奨する。



# Bench-Top, Freeze/Thaw and Long-Term Frozen

- The possible **denaturation of large molecules** could influence their recognition by ligand-binding assays. This denaturation is most likely to take place during the actual **freezing and thawing processes** rather than during **frozen storage at a constant** .

**DG : ○ 同意。タンパク質の変性は、定温保管よりも、凍結融解の繰り返しの方がよく起こり得る。**

## 【DG Comment】

低分子 :	より低温度で安定 -20℃で安定な場合、-80℃による評価は不要
高分子 :	より低温度で、変性又は高次構造の分解懸念 更に、定温保管より凍結融解繰り返しの方が起こり得る -20℃で安定な場合でも-80℃の評価が必要







## Stock Stability

- To justify the use of a stock or diluted solution after storage, analyte stability in these solutions should be demonstrated for the **appropriate period** and at the **actual storage conditions**, not only because of **potential analyte degradation** but also because **repeated, long-term use** of a solution may lead to **concentration changes** due to solvent evaporation.

**DG : ○ 同意。** 分解のみでなく、繰り返しや長期間使用により溶媒が蒸発するなど濃度変化の可能性も考慮して、適切な期間及び実際の保存条件で評価すべきである。

- If solutions at different analyte concentrations are stored, it is recommended to perform stability assessments at the **lowest** and **highest concentrations** encountered **in practice**, as **adsorption effects** may be **concentration dependent**.

**DG : ○ 同意。** 異なる濃度の溶液を保存する場合は、（吸着が濃度依存的であるため）実際に保存する最低及び最高濃度での評価を推奨する。

- In order to cover the different storage conditions to which stock and derived solutions are subjected, it is necessary to investigate stability at the conditions both for **long-term storage** (typically refrigerated or frozen) and for **daily use at the laboratory bench** (typically at ambient conditions).

**DG : ○ 同意。** 長期及び日々の実験で使用する条件の両方で評価することが必要。



# Stock Stability

- In contrast to the stability in a spiked biological matrix, stock stability for small molecules is not assessed by reference to a calibration curve but by **comparing the analytical response** of a **stored** solution to that of a **freshly prepared** reference solution. The use of an existing stock solution as the reference, even when within its proven stability period, increases the risk of misinterpreting the stability of a stored stock solution and should be avoided.

**DG : ○ 同意。** 標準溶液の安定性は、新たに調製した標準溶液とのレスポンスを比較することで評価する。安定性保証期間内の保存溶液であっても、安定性を誤解するリスクが高くなるため、リファレンス（安定性評価の対照溶液）に使用することは避けるべきである。

- To limit error propagation in the preparation process of calibrators and QCs, it is recommended that the **acceptable difference** between the responses of fresh and stored solutions should be tighter than for spiked biological samples and **not exceed  $\pm 10\%$** , as was recently described.
- In order to be able to reliably demonstrate such a small difference between fresh and stored solutions, the **coefficient of variation** for each set of replicates should be limited and preferably **no more than 10%**.

**DG : △ 一部同意。** FreshとStoredの差は $\pm 10\%$ を超えるべきではない。繰り返しの精度は10%以下であるべき。

## 【DG Comment】

標準溶液については、真に安定な範囲で使用すべきである。安定性評価のある時点において分析誤差のために生じる10%の差については許容可能であるが、経時的な変化（増加・減少）が認められた場合には、10%の差を許容すべきではない。



# Stock Stability

- With regard to internal standards, which are often applied in chromatographic methods, very frequently, a stable-isotope labeled form of the analyte or a close chemical analogue is used and the stability properties of these molecules typically are very similar to those of the analyte, when stored at identical conditions.
- In addition, internal standards are used for response normalization in a single run only and the suitability of the internal standard solution is thus evaluated daily by reviewing the results of the bioanalytical runs.
- Therefore, the continued long-term storage stability of internal standard solutions is much less critical than for standards solutions of the analytes.
- Often, it may **not be necessary to separately assess the stability of internal standard solutions, if analyte stability has been demonstrated** and, for **stable-isotope labeled forms, if no isotope exchange occurs** during storage.
- Internal standard stability assessment may be required in individual cases, when scientifically called for, such as in the case of molecules, solvents and/or storage conditions that are very different from those of the analyte.
- In such a case, **wider acceptance criteria** than for analyte stock stability are fully acceptable.

**DG : ○ 同意。**内標準物質は、単一の分析単位での標準化に用いられ、その妥当性が日々評価される。内標準物質が安定同位体であり、保存中の同位体交換がない場合において、分析対象物質の安定性が示されていれば別途安定性を評価する必要はない。科学的に必要と考えられる場合（分析対象物質と分子構造、溶媒、保存条件などが大きく異なる場合）には評価した方がよい。許容基準は分析対象物質よりも広くてよい。



# Stock Stability

- For **reference material received as a solution**, the **stability information provided by the manufacturer is acceptable** for use and does not need to be regenerated at the analytical lab, provided that the manufacturer's storage conditions are followed.
- When possible, **dilutions** should be prepared in the **same solvent or buffer as the provided stock solution** to build on the manufacturer's stability documentation.
- If the manufacturer's stability information covers a range of concentrations and temperatures that include the diluted stock concentration and storage, stability assessment does not need to be repeated.

**DG : ○ 同意。** 標準物質が溶液の場合、測定施設で新たにその溶液中の安定性を評価する必要はない（保存条件が製造者の条件と同じであればその安定性情報を利用可）。希釈する際は、添付文書で安定性が確認されているStock solutionと同じ溶媒あるいは緩衝液を使用すべきである。希釈後の溶液濃度、保存条件が添付文書の情報でカバーされる場合には新たな安定性評価は不要。



# Extract Stability

- For methods using some form of sample extraction during analysis, such as most chromatographic assays, the assessment of **analyte stability in the extracts** is needed to ensure **complete coverage of the relevant storage conditions**.

**DG : ○同意。抽出試料中の分析対象物の安定性評価は、該当する保存条件を完全に担保するべきである**

- **Absolute** (post-preparative or on-instrument) **stability** is defined as the absolute constancy of a concentration over time, **as measured against a freshly extracted calibration curve**, while **relative** (post-preparative or on-instrument) **stability** is defined as the constancy of a concentration over time relative to **a calibration curve that is extracted and stored together with the sample extracts**.

**DG : ○同意。絶対的安定性は、一定期間オートサンプラーに保存した抽出試料を新たに抽出した検量線で評価することであり、相対的安定性は、抽出試料と共に保存した検量線で評価することである。**

- Post-preparative stability needs to be determined for **all conditions** to which extracts will be subjected.
- The stability of extracts during storage prior to placement in the autosampler, such as **a few hours at room temperature**, **does not need to be assessed** as a standard.

**DG : ○同意。前処理後試料安定性は、抽出試料が曝されるすべての条件で評価する必要があるが、オートサンプラーに設置する前の室温で置かれる2、3時間の抽出試料の安定性を“標準で”評価する必要は無い。**



## Extract Stability

- As long as extracted study samples are always stored together with and **under identical conditions** as the extracted calibration and quality control samples, **it is not necessary to establish the absolute post-preparative or on-instrument stability**, because any degradation over time will occur to the same extent for study samples, calibrators, and QCs. In such a case, it will suffice to assess **relative post-preparative or on-instrument stability**, as long as sufficient sensitivity is maintained for quantification.

**DG : △一部同意。抽出した試験試料が常に検量線およびQC試料と同一条件下で一緒に保存されている場合に限り、試験試料、検量線、QC試料について同程度に経時劣化は起こるので、絶対的な安定性を確立する必要はない。十分な感度を維持していれば、相対的な安定性を評価していれば十分である。**

### 【DG Comment】

絶対的な安定性を確認しておくことを推奨する。

ただし、絶対的な安定性が確認できない時、相対的な安定性が確認できれば測定は可能と考える。

また検量線に代替マトリックスを使用している場合には、検量線の変化が実試料の変化と同等でない可能性があるため、絶対的な安定性を確認しておくことを推奨する。



## Extract Stability

- **Re-injection reproducibility** refers to the possibility to **re-inject a complete or partial batch** of samples into the analytical instrument. This is typically done by analyzing a set of samples, re-injecting them together with the calibrators, and calculating the result against the re-injected calibration curve and/or against a freshly extracted curve. It should be noted that this is, in fact, a reproducibility assessment rather than a stability assessment..

**DG : ○同意。再注入の再現性は、一分析単位全て、または一部の試料を再注入する可能性を調査することである。典型的には、一緒に保存した検量線、または新たに抽出した検量線で評価を実施する。安定性評価よりもむしろ再現性評価である点に留意する。**

### 【DG Comment】

実測定の時、再注入する可能性があるならば再注入再現性を確認しておく必要がある。

この場合、精度・平均真度で評価することを推奨する。





## Whole blood stability

- There is accumulating evidence that there is little difference between stability in plasma/serum and stability in whole blood except for some well-defined classes of (small) molecules such as N-oxides and hydroxamic acids. **Whole blood stability testing** may therefore **not be strictly necessary in all situations** as long as plasma/serum stability under the same storage conditions has been demonstrated.

**DG : ○ 同意。血漿（血清）中安定性が高いことが判明しており、同一条件下で保存している場合は必ずしも全血で評価する必要はない。**

- It is recommended that **stability in whole blood should be assessed** at least for compounds belonging to **these classes (N-oxides and hydroxamic acids)** and for **compounds with borderline stability in plasma/serum.**

**DG : ○ 同意。血漿（血清）と全血中で安定性が異なることが構造的に予想される場合（N-オキシドやヒドロキサム酸の構造を含む）や、血漿（血清）中安定性が良好ではない場合には全血での評価を実施すべき。**

### 【DG Comment】

臨床現場での予測できない事態（臨床試験の施設で全血の状態に放置される、採血～遠心分離までの時間がかかるなど）を想定し、ヒトのみで全血中安定性を評価しておくこともよい。





# Whole blood stability

- Two approaches for whole blood stability testing exist as follows: **(1) the analysis of plasma/serum after removal of cellular material** and **(2) the analysis of whole blood itself**. ...both approaches can be combined to obtain more detailed information.

**DG : ○ 同意。全血中安定性評価法としては、(1) 血漿/血清を測定、(2) 全血を測定の2パターンある。両者を合わせれば、より詳細な知見を得ることができる。**

評価方法	pros	cons
血漿・血清を測定 (残存率で評価)	実際のサンプリング手順に近い。ex vivoの分布(血漿⇄血球)の情報も得られる。	分配が平衡に達していることを確認する必要がある。
全血を測定 (真度で評価)	血球移行を考慮しなくてよい。	全血の分析法を構築する必要がある。

- Whichever approach is followed, care should always be taken to prevent **hemolysis** during spiking and incubation. Therefore, the volumes of organic solvents for spiking the whole blood samples should be kept to a minimum. In addition, in order to properly mimic the situation during sampling, it is recommended that spiked **whole blood** should be **warmed to 37°C prior to stability testing**.

**DG : ○ 同意。全血に標準溶液を添加する際は、溶血に注意。また、採血の状況を再現するため、評価前の全血は37°Cで保温するべきである。**

## 【DG Comment】

有機溶媒100%の溶液の場合は、添加量を全血の1%程度までに抑える。溶液の有機溶媒の含有率を減らす、溶液を血漿で希釈する方法も有効。



# Tissue stability

- As intact tissues cannot be homogeneously spiked, **stability assessment has to be performed by preparing blank tissue homogenate**, spiking it with the analyte and subsequently subjecting it to the relevant stability experiments.

**DG : ○ 同意。組織中安定性評価用の試料は、ホモジネートに被験物質を添加して調製すべきである。固体の組織には被験物質を均一に添加できないため。**

- The composition and volume of the **homogenization solvent** can influence the resulting analyte stability profile and will **need to be optimized** in the stage of method development.

**DG : ○ 同意。ホモジネート調製溶媒は安定性に影響する可能性があるので、溶媒の組成と量は最適化すべきである。**

- Since it may vary from tissue to tissue and from species to species, **stability needs to be established for each individual new matrix.**

**DG : ○ 同意。異なる種や組織ではそれぞれについて安定性の評価が必要。**

## 【DG Comment】

ホモジネート調製溶媒の種類や量は、化合物の特性（溶解度、容器への吸着性）や組織の粘性も考慮すべきである。また、肝臓など代謝酵素が豊富に存在する組織などではサンプルの凍結融解や取扱い時の温度などにも注意が必要である。



## Tissue stability

- Because of the inherent absence of stability data in the intact tissue, it is advisable to **homogenize** tissues from dosed animals **as soon as possible after collection** and **store the samples as homogenate**, in order to cover as much of the storage period as possible by actual stability results. There might be logistical limitations that complicate the homogenization of tissue samples immediately after collection. If this is the case, then it is advised to **store the intact tissues at  $< -70^{\circ}\text{C}$  rather than at  $-20^{\circ}\text{C}$  until homogenization** and to still try to restrict the storage period from sampling until homogenization to a minimum.

**DG : ○ 同意。固体の組織中安定性は評価が難しいので、組織採取後直ちにホモジネートにすることが望ましい。すぐにホモジネートにできない場合は、 $-20^{\circ}\text{C}$ より $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存し、かつ固体での保存は短期間にすべきである。**

### 【DG Comment】

組織中安定性評価は固体の組織とホモジネートの両方で評価すればより詳細な知見を得ることができる。比較的均一性の高い組織については、固体での組織中安定性をISSで評価できると考えられる（例：投与個体のサンプルを一部取り分けて初期値を測定し、残りを固体のまま一定期間保存後にホモジネート調製・測定し、残存率を算出する）。不均一性の高い組織については、ミンスしたサンプルを多めにプールする方法で解決できる可能性がある\*。

\*Xue, Gao, Ji et al. Bioanalysis (2012) 4(21), 2637–2653



# Urine Stability

- Since the **native pH of urine** can **vary between approximately 4 and 8.5**, it is important that stability assessments take this into account. It is **recommended** that **stability of the analyte in urine be assessed at three pH values, e.g., pH 4, 6.5, and 8.5**, to properly evaluate the stability profile under actual physiological conditions.

**DG : △ 一部同意。一般的に尿のpHは約4~8.5で変動するため、3つのpHで安定性を評価することを推奨する。**

## 【DG Comment】

尿はpHの変動が大きいいため、化合物の析出等も考えられる。  
pHの変動を考慮して、予備検討でpHを変えて検討することが望ましい。

### <pH調整に用いる試薬の例>

酸性：クエン酸

アルカリ性：アンモニア

予め安定なpHがわかっている場合は、そのpHで検討すればよい。



# Urine Stability

- Since **adsorption** problems in urine are likely to be more pronounced than in more protein-rich matrices, it is especially important that the **same container material and additives**, if any, **be used for the stability assessments and the actual urine sampling**. The **experiments can be conducted in smaller containers** (e.g., 30 mL or even less) **while sampling is done in larger containers** (often 1 or 2 L), **as long as the container material and the typical urine volume to container surface area ratio are similar**. Since a small urine aliquot is usually transferred to a secondary container which is subsequently sent to the bioanalytical lab, stability should also be tested in the secondary container, if this is made of a different material.

**DG : ○ 同意。**尿は吸着の問題が生じやすいため、安定性評価と実際の尿採取とで同一の容器材質や添加剤を使用することを推奨する。  
容器の材質及び容器表面積に対する尿量が同等であれば、実験と実際の尿採取では異なる容器を用いても良い。

## 【DG Comment】

実際の現場やハプニングを想定してより過剰な条件で検討することが望ましい。  
(移し替えによる検討、容器表面積に対する尿量を変えて検討等)



## Urine Stability

- While urine is typically clear and homogeneous at the moment of voiding, **considerable amounts of sediment may be formed upon storage**, depending on the composition of the urine and the storage temperature. This phenomenon essentially makes urine a **non-homogeneous matrix** and can have a **pronounced effect on the concentrations** after storage, particularly when an analyte binds to the sediment and a non-representative sub-sample is taken for analysis. Proper attention should therefore be paid to the **optimization of the procedure for urine collection** and the **taking of representative sub-samples**, to ensure that the reported analyte concentration in urine does not deviate from the concentration directly after sampling.

**DG : ○ 同意。尿は保存すると沈殿物が生じて不均一になり、定量値に影響することがある。尿の採取と分注に注意が必要である。**

### 【DG Comment】

尿は組成（病態の場合における炎症、尿中の細胞や糖の量が多い等の影響）及び保存温度（室温：微生物の繁殖、低温：塩（シュウ酸、リン酸塩）の結晶化）により沈殿物を生じる。

尿の採取時には、採取量（1つの容器への分注量）や小分け、保存容器等の手順に注意する。小分けする際は、よく攪拌した後に小分けする必要がある。なお、予め小分けすることで分析時の室温放置時間を少なくできる。

保存後の採取時には、化合物の特性にもよるが、沈殿物に測定対象物質が吸着することも懸念されるため、血漿の前処理のように沈殿物の除去はすべきではない。よく攪拌した後、採取することを推奨する。なお、ローテーター等を用いた回転による攪拌は効果的である。



# Urine Stability

- Another bioanalytical aspect in which urine may be different from other matrices, at least for small organic molecules, is the possible **presence of higher amounts of phase-2 metabolites that can convert back to the analyte during storage** and thus give rise to overestimation of analyte concentrations. To address this, **additional stability experiments using samples spiked with relevant concentrations of these metabolites or using incurred samples should be considered**, where it should be taken into account that **stability of phase-2 metabolites can be pH-dependent**.

**DG : ○ 同意。**尿中には、保存中に未変化体に変換しうる第2相代謝物（抱合体等）が高濃度で存在する可能性がある。これに対処するため、これらの代謝物を添加した試料あるいは実試料を用いて追加の安定性を評価することを考慮すべきである。その場合、第2相代謝物の安定性がpH依存的に変化することを考慮すべきである。

## 【DG Comment】

物性データや動物データから、尿中に第2相代謝物が存在することが予測される場合は、予め安定性を確認し、場合によっては安定化剤の添加等を考慮することが望ましい。

できるだけ早い段階にISR等で安定性を確認することを推奨する。



# Stability of Endogenous Analytes

- A typical approach would be to screen a number of authentic matrix lots for low analyte levels and select a sample to be used as the low concentration for stability assessment. The low-concentration stability sample could then be spiked to prepare the high-concentration stability sample or, alternatively, an incurred sample with a suitable high concentration could be selected after screening a number of lots of the matrix.

**DG : ○ 同意。** 内因性物質の安定性評価には、分析対象物質を含まないマトリックスが通常存在しないため、 $t = 0$ からの残存率評価など、いくつかの特徴があるが、可能な限りは一般的なアプローチに従うべきである。分析対象の内因性物質の濃度の低いものを本物のマトリックスのロットからスクリーニングし、安定性評価用低濃度試料として選択する。高濃度安定性評価用試料は、低濃度試料へ添加して調製するか、高濃度安定性評価用試料に適した（濃度の）マトリックスを複数のロットからスクリーニングすることで選択する。





# Stability of Endogenous Analytes

- It is essential that **the samples used for stability determination should be the authentic biological matrix containing the authentic analyte**, although it is recognized that calibration samples generally are in a different form (surrogate matrix or surrogate analyte), because of the usual presence of analyte in the authentic matrix.

**DG : ○ 同意。** 検量線は、代替マトリックスの使用が許容されるが、評価検体の安定性評価は、代替マトリックスではなく、測定対象物質を含む本物のマトリックスを使用する。

- If it is the intention not to prepare fresh calibration standards in each run for bioanalysis but to use stored calibrators, **stability should also be assessed in the calibration matrix, if this is different from the matrix of the study samples.**

**DG : ○ 同意。** 評価バッチごとに検量線試料を調製せず、保存した検量線試料で測定する場合で、安定性評価試料のマトリックスと検量線のマトリックスが異なる場合（すなわち検量線は代替マトリックスを用いる場合）は、検量線試料のマトリックスでも安定性を確認すべきである。



# Stability in Deviating Matrix Types

## 【Recommendation from GBC】

Deviating matrix (通常のコントロールマトリックスの組成とは異なる組成のマトリックス) における安定性評価は、実施する科学的根拠があれば実施すべきである。以下に例を記載する。

Deviating matrix typeの例	安定性評価のトリガーとなる状況
溶血血漿	溶血により溶出した血球細胞のヘモグロビンまたは他の成分との接触による不安定性
患者のマトリックス	健常人のマトリックスと患者のマトリックスの間の酵素活性の著しい差
併用薬または製剤由来の添加剤を含むマトリックス	併用薬または添加剤によるサンプル特性への著しいインパクト 例：pHの変化、酵素活性の変化

## 【DG Comment】

血球中に多く存在する酵素 (例：炭酸脱水酵素) が関与する化合物は溶血血漿による安定性の評価をするほうがよい、という情報もある。



# Stability in Incurred Samples

- **Incurred sample stability (ISS) should not be considered as a goal in itself.** The main stability dataset will be stability assessments done using spiked samples but **ISS could serve to bridge a possible gap between spiked and incurred samples, when deemed necessary based on the physicochemical and/or metabolic properties of the analyte.** As the metabolite profile can be different for different species, it is recommended that the experiments should be conducted in all relevant species, whenever feasible.

**DG : ○ 同意。** インカードサンプルの安定性 (ISS) は、それ自体が目標と考えるべきではない。添加試料と実試料で安定性に差が生じる可能性があり、分析対象化合物の物理化学的 (および/または) 代謝特性に基づいて必要と認めた場合は、ISSを実施する。

- Alternatively, assessment of stability in incurred samples represents a way to evaluate the impact where it should be noted that for methods in plasma or serum, **stability in incurred whole blood samples might be relevant as well.**

**DG : ○ 同意。** ISSを実施する場合、様々な制約のもとで実施するため血漿及び血清で評価したISSの結果は、全血の安定性も同様の結果であると考えべき。