

検量線用試料 (DB) に 30 vol%アセトニトリル溶液 50 μ L を加える。

測定試料*50 μ L に 30 vol%アセトニトリル溶液 50 μ L 及び IS 50 μ L を加える。

*: あらかじめ検量線の範囲を上回ることが予測される試料については、ブランク血漿で希釈してから測定する。

- 2) 1) の試料に超純水 350 μ L を加えて、攪拌する。
- 3) 固相抽出カートリッジにアセトニトリル 1 mL をアプライし通液する。次に 0.1 vol%TFA 溶液 1 mL をアプライし、通液する (平衡化)。
- 4) 平衡化した固相抽出カートリッジに 2) の試料をアプライする。
- 5) 0.1 vol%TFA 溶液 1 mL をアプライし、通液する (洗浄)。
- 6) 超純水 1 mL をアプライし、通液する (洗浄)。
- 7) 洗浄後の固相抽出カートリッジに 90 vol%アセトニトリル溶液 1 mL をアプライし、通液する (通液)。
- 8) 7) の溶出液を窒素気流下で乾固する (40°C 以下)。
- 9) 残渣に 0.2 vol%ぎ酸溶液 0.4 mL を添加し、十分に攪拌する (再溶解)。
- 10) 9) で再溶解後の液を HPLC 用のバイアルに移し、LC/MS/MS 測定用試料とする。なお、LC/MS/MS 測定用試料中 AcPepA のオートサンプラー中 (4°C) での安定性は 82 時間確認されている¹⁾。

10.9 測定条件

10.9.1 HPLC 条件

分析カラム:	Inertsil ODS-3 (2.1 mm I.D. \times 50 mm, 5 μ m, GL Science, Inc.)
移動相 A:	0.2 vol%ぎ酸溶液
移動相 B:	0.2 vol%ぎ酸含有アセトニトリル溶液
洗浄液:	0.1 vol%ぎ酸含有 50 vol%アセトニトリル溶液
流速:	0.2 mL/min
カラム恒温槽設定温度:	40°C
オートサンプラー設定温度:	4°C
注入量:	20 μ L
分析時間:	9 min
グラジエント:	タイムプログラム (以下の容量比で行う)。

時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
Initial	90	10
5.00	90 \rightarrow 10	10 \rightarrow 90
5.00 \rightarrow 6.00	10	90
6.00 \rightarrow 9.00	90	10

10.9.2 MS/MS 条件

使用する機器の状態により最適な条件に設定を変更する。

Ion source : ESI
 Scan type : MRM
 Polarity : Positive
 Source temperature : 400°C
 モニターイオン

化合物	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)
AcPepA	819	655
内標準物質 (Labeled [¹⁵ N ₆]-AcPepA)	822	656

許容範囲 : ±0.5 以内

10.10 システム適合性

(SOP : CALC/102)

各測定バッチの測定前に S1 を測定し、得られたクロマトグラムのベースライン、ピーク形状、保持時間及びピーク面積などを指標に測定系が正常に機能していることを確認する。

測定試料 : S1, n=1
 測定回数 : 1 回

10.11 測定試料実測時の測定系の精度管理

(SOP : CALC/102)

測定試料を測定するときは、QC 試料を測定試料間に配置して測定し、測定法の信頼性を確認する。

QC 試料 : Q1~Q3, 各濃度 n=2
 測定順序 : 上記 QC 試料を測定用試料の間にほぼ均等に配置する。
 判定基準 :

R.E.	6 試料中少なくとも 4 試料が±15.0%以内、かつ同一濃度のうち 1 試料が±15.0%以内
------	--

10.12 濃度の算出

(SOP : CALC/102, CALC/105)

下記のとおり、測定バッチごとに検量線用試料を分析法により測定する。なお、DB 及び S0 試料により、妨害ピークがないことを確認する。

QC 試料及び測定試料を測定し、それらのピーク面積比を検量線に当てはめて測定値を算出する。R.E.は 10.16 に記載の計算式から算出する。

検量線用試料： DB 及び S0～S7, 各濃度 n=1
 回帰濃度範囲 50～5000 ng/mL
 検量線算出方法 ピーク面積比（標準物質／内標準物質）を用いた最小二乗法
 検量線の計算式 $Y = aX + b$ （一次回帰直線式），Y：ピーク面積比，X：濃度
 重み付け： $1/X^2$
 検量線ポイントの除外条件： 偏差が異常に大きいポイントがあり，下記の条件をすべて満たす場合，そのポイントを除外して再計算したものを検量線として採用する。
 (1) そのポイントが検量線の最低あるいは最高濃度でない
 (2) そのポイントを除いても当初の濃度水準数の 75%以上かつ最低 6 点の濃度で検量線を構成できる

算出値

検量線用試料： r, 各試料の逆回帰値及び R.E.
 QC 試料： 各試料の測定値及び R.E.
 測定試料： 各試料の測定値，各群雌雄別の各ポイントにおける測定値の Mean 及び S.D.

検量線の判定基準：

妨害ピークのピーク面積	LLOQ 試料の標準物質ピーク面積の 20.0%以下
	LLOQ 試料の内標準物質ピーク面積の 5.00%以下
r	0.9900 以上
R.E.	LLOQ で±20.0%以内，その他の濃度で±15.0%以内

10.13 並行保存用 QC 試料

(SOP : CALC/102)

各測定試料採取日までに，並行保存用 QC 試料を試験場所で調製し [保存する場合は冷凍（許容範囲：-70℃ 以下）で保存する]，ドライアイス存在下で試験施設に送付し，測定試料とともに保存する。

試験場所は，測定試料とともに返送された並行保存用 QC 試料を受領し，測定試料とともに保存する。測定試料保存中の温度の逸脱あるいは輸送中に問題（試験場所で測定試料受領時に凍結状態や試料容器の破損などを確認）が生じた場合，並行保存用 QC 試料（各 n=3）を分析法により測定する（残りの各 n=3 は予備とする）。

なお，判定基準は並行保存用 QC 試料の測定値の Mean に対する R.E.が調製濃度の±15.0%以内とする。

QC 試料： Q1 及び Q3, 各濃度 n=3
 測定順序： 測定試料間にほぼ均等に配置する

判定基準：

R.E.	6 試料中少なくとも 4 試料が $\pm 15.0\%$ 以内、かつ同一濃度のうち 2 試料が $\pm 15.0\%$ 以内
------	--

10.14 薬物動態パラメータ算出法

(SOP : CALC/102, CPUC/014)

下記のとおり、薬物動態パラメータを算出する。N.D.は 0 ng/mL とみなして算出する。なお、対照群についてはパラメータを算出しない。

算出に用いるデータ： 個別別の血漿中 AcPepA 濃度
 算出する薬物動態パラメータ： 下表参照
 解析ソフト： WinNonlin version 5.2.1 (Pharsight Corporation)
 解析モデル： コンパイルドモデル・ライブラリーのノンコンパートメンタル解析 (NCA, NCA setting : Linear Trapezoidal)
 算出する基本統計量： 各群雌雄別の平均値及び S.D. (Microsoft Excel を用いる)

薬物動態パラメータ	WinNonlin での表示
C_{max}	Cmax
T_{max}	Tmax
AUC_{0-4h}	AUC (4 時間点の値を読み取る)

10.15 再測定及びデータの採用基準

再測定は、次の基準に従って行う。

(SOP : CALC/102, DGAC/015)

(測定値が得られない場合)

- 1) 測定操作にミスが生じた場合
- 2) 使用装置にトラブルが生じた場合
- 3) 測定クロマトグラムが標準や他の試料と比較して、明らかに異常と判断された場合
- 4) 同時に測定した検量線又は QC 試料が判定基準を満たさなかった場合
- 5) 算出される測定値が検量線の上限を上回った場合 (この場合は測定試料をブランク血漿で希釈して再測定する)
- 6) 初回測定時に試料を希釈した場合で、測定濃度が検量線の下限を下回った場合 (この場合は測定試料の希釈倍率を変更して測定する)

(測定値が得られる場合)

- 7) 測定値が異常に高値又は低値を示した場合又は濃度推移に異常がみられた場合
 - 8) 試験責任者又は試験主任者が再測定の必要があると判断した場合
- 7) 及び 8) の理由で再測定を実施する場合は、以下の基準を (1) ~ (5) の順に適用してデ

ータを採用する。

- (1) 再測定値が初回測定値の±20%以内である場合は、初回測定値を採用する。
- (2) 再測定値が初回測定値の±20%を超える場合は、再々測定を実施する。
- (3) 再々測定値が初回測定値の±20%以内である場合は、初回測定値を採用する。
- (4) 再々測定値が再測定値の±20%以内である場合は、再測定値を採用する。
- (5) 初回測定値、再測定値及び再々測定値ともに互いに±20%を超える場合は、試験主任者がどの値を採用するかを判断する。

10.16 計算式

次の計算式から算出する。

1) R.E.

$$\text{R.E. (\%)} = (\text{測定値} - \text{理論値}) / \text{理論値} \times 100$$

10.17 数値の取扱い

数値は以下のとおり、n+1桁目を四捨五入し、n桁で記載する。また LLOQ (50 ng/mL) 未満は N.D.と表記し、0 ng/mL として扱う。

数値	単位	桁数
測定値及び Mean	ng/mL	有効数字 3 桁
r	-	小数点以下 4 桁
R.E.	%	小数点以下 1 桁
S.D.	-	Mean の桁数に合わせる
C _{max} 及び Mean	ng/mL	有効数字 3 桁
T _{max} 及び Mean	h	有効数字 3 桁
AUC 及び Mean	ng·h/mL	有効数字 3 桁

10.18 統計学的手法

有意差検定は実施しない。

11. 成績の報告

本測定の結果について、以下の図及び表を含む TK 測定報告書草案 (英文) を試験責任者に提出する。TK 測定報告書 (英文) は写しを 1 部提出する。TK 測定報告書は要約、目的、材料及び方法、結果及び考察で構成する。

図	血漿中 AcPepA 濃度推移
表	血漿中 AcPepA 濃度及び薬物動態パラメータ 検量線の測定結果 QC 試料の測定結果

信頼性保証陳述書

12. 記録及び資料の保存

以下の記録及び資料を、TK 測定報告書作成後 3 ヶ月を経過するまでは SNBL PBC 資料保存施設に保存し、その後は下記の施設に保存委託し、計 10 年間保存する。それ以降の保存については、試験番号：SBL861-006 の保存期間に準ずる。

試験計画書（写し）

標準物質及び内標準物質に関する資料

測定に関するチャート及び記録

TK 測定報告書草案

TK 測定報告書

試験責任者との協議及び交信記録

その他、試験に関するすべての資料

保存受託施設：

SNBL DSR データ資料室

〒891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町 2438 番地

13. 測定計画書の変更

測定計画内容に変更が生じた場合は、試験主任者は変更箇所及びその理由を明確にし、試験責任者に連絡する。また、その内容を反映した試験計画書変更書の写しを入手する。

14. 文献

- 1) 林 善治：LC/MS/MS によるサル血漿中 AcPepA 中濃度測定法バリデーション，SNBL PBC，試験番号 PBC861-001，測定成績書，2011 年

試験計画書変更書 (No. 2)

表 題： AcPepA (MPS-390) のカニクイザルにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

試験番号： SBL861-006

【変更日】 2011 年 3 月 23 日

【変更内容】

I. 別添 B TK 測定計画書 3 ページ 8. 日程

下線部を追加する.

(変更前)

並行保存用 QC 試料送付予定日： 2011 年 3 月 24 日

(変更後)

並行保存用 QC 試料送付予定日： 2011 年 3 月 24 日, 2011 年 4 月 20 日

II. 別添 B TK 測定計画書 4 ページ 10. 材料及び方法 10.1 試験系及び測定試料に関する情報 10.1.3 試験系に関する情報

下線部を変更する.

(変更前)

投与経路： 経口

(変更後)

投与経路： 静脈内

III. 別添 B TK 測定計画書 11 ページ 10. 材料及び方法 10.7 試料の調製

下線部を変更あるいは追加する.

(変更前)

10.7.1 及び 10.7.2 の試験操作は氷上で行う.

(変更後)

10.7.1, 10.7.2 及び 10.7.3 の試験操作は氷上で行う.

IV. 別添 B TK 測定計画書 11 ページ 10. 材料及び方法 10.7 試料の調製
 「10.7.2 QC 試料」の後に「10.7.3 並行保存用 QC 試料」として以下を追加する。
 (変更後)

10.7.3 並行保存用 QC 試料

次表のとおり、ブランク血漿をとり、QC 用標準溶液を加えて並行保存用 QC 試料を調製する。

並行保存用 QC 試料

並行保存用 QC 試料 No.	使用標準溶液		ブランク血漿量 (μ L)	血漿試料中濃度 (ng/mL)
	No.	採取量 (μ L)		
PQ2	SQ4	120	1380	4000
PQ1	SQ3	35	1365	100

得られた血漿は、それぞれ 200 μ L ずつ PP マイクロチューブに分注する。

V. 別添 B TK 測定計画書 14 ページ 10. 材料及び方法 10.13 並行保存用 QC 試料
 下線部を追加する。

(変更前)

QC 試料： Q1 及び Q3, 各濃度 n=3

(変更後)

並行保存用 QC 試料： PQ1 及び PQ2, 各濃度 n=3

【変更理由】

- I. 記載漏れのため.
- II. 記載誤りのため.
- III.~V. 並行保存用 QC 試料調製法の記載漏れのため.

試験計画書変更書の作成

試験責任者 株式会社新日本科学 安全性研究所

楠元 正吾 印 2011年 3月 23日

楠元 正吾

試験計画書変更書 (No. 2)

表 題： AcPepA (MPS-390) のカニクイザルにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

試験番号： SBL861-006

【変更日】 2011 年 3 月 23 日

【変更内容】

I. 別添 B TK 測定計画書 3 ページ 8. 日程

下線部を追加する.

(変更前)

並行保存用 QC 試料送付予定日： 2011 年 3 月 24 日

(変更後)

並行保存用 QC 試料送付予定日： 2011 年 3 月 24 日, 2011 年 4 月 20 日

II. 別添 B TK 測定計画書 4 ページ 10. 材料及び方法 10.1 試験系及び測定試料に関する情報 10.1.3 試験系に関する情報

下線部を変更する.

(変更前)

投与経路： 経口

(変更後)

投与経路： 静脈内

III. 別添 B TK 測定計画書 11 ページ 10. 材料及び方法 10.7 試料の調製

下線部を変更あるいは追加する.

(変更前)

10.7.1 及び 10.7.2 の試験操作は氷上で行う.

(変更後)

10.7.1, 10.7.2 及び 10.7.3 の試験操作は氷上で行う.

IV. 別添 B TK 測定計画書 11 ページ 10. 材料及び方法 10.7 試料の調製
 「10.7.2 QC 試料」の後に「10.7.3 並行保存用 QC 試料」として以下を追加する。
 (変更後)

10.7.3 並行保存用 QC 試料

次表のとおり、ブランク血漿をとり、QC 用標準溶液を加えて並行保存用 QC 試料を調製する。

並行保存用 QC 試料

並行保存用 QC 試料 No.	使用標準溶液		ブランク血漿量 (μ L)	血漿試料中濃度 (ng/mL)
	No.	採取量 (μ L)		
PQ2	SQ4	120	1380	4000
PQ1	SQ3	35	1365	100

得られた血漿は、それぞれ 200 μ L ずつ PP マイクロチューブに分注する。

V. 別添 B TK 測定計画書 14 ページ 10. 材料及び方法 10.13 並行保存用 QC 試料
 下線部を追加する。

(変更前)

QC 試料： Q1 及び Q3, 各濃度 n=3

(変更後)

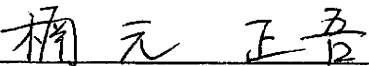

並行保存用 QC 試料： PQ1 及び PQ2, 各濃度 n=3

【変更理由】

- I. 記載漏れのため。
- II. 記載誤りのため。
- III.~V. 並行保存用 QC 試料調製法の記載漏れのため。

試験計画書変更書の作成

試験責任者 株式会社新日本科学 安全性研究所



 2011年 3月 23日
 楠元 正吾

試験計画書変更書 (No. 4)

表 題 : AcPepA (MPS-390) のカニクイザルにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

試験番号 : SBL861-006

【変更日】 2011 年 4 月 1 日

【変更内容】

I. 4 ページ 6. 試験施設

下線部を追加する.

(変更前)

運営管理者 : 洲加本 孝幸

e-mail : sukamoto-takayuki@snbl.co.jp

(変更後)

運営管理者 : 洲加本 孝幸 (2011 年 3 月 31 日まで)

e-mail : sukamoto-takayuki@snbl.co.jp

大島 洋次郎 (2011 年 4 月 1 日から)

e-mail : ooshima-yojiro@snbl.co.jp

【変更理由】

I. 2011 年 4 月 1 日付で運営管理者が交替するため.

試験計画書変更書の作成

試験責任者 株式会社新日本科学 安全性研究所

楠元正吾



2011 年 4 月 / 日

楠元 正吾

試験計画書

表題： AcPepA (MPS-390) (Lot No. 2K08045) の特性及び安定性試験

試験番号： SBL861-007

試験責任者： 山田聡美

株式会社新日本科学 安全性研究所

目 次

1. 表題.....	4
2. 試験目的.....	4
3. 適用規則.....	4
4. 試験委託者.....	4
5. 試験施設.....	4
6. 試験関係者.....	4
7. 試験日程.....	4
8. 被験物質.....	5
9. 試薬.....	5
10. 測定機器.....	6
11. 品質確認.....	6
11.1 性状（外観）.....	6
11.1.1 方法.....	6
11.1.2 判定基準.....	6
11.2 アミノ酸含量測定（アミノ酸組成比及びペプチド含量）.....	6
11.2.1 試液及び移動相の調製.....	6
11.2.2 標準溶液の調製.....	7
11.2.3 試料溶液の調製.....	7
11.2.4 PTC 誘導体化法.....	8
11.2.5 測定法.....	8
11.2.6 アミノ酸組成比及びペプチド含量の算出.....	9
11.2.7 判定基準.....	9
11.3 純度試験（HPLC 法）.....	9
11.3.1 移動相及び希釈液の調製.....	9
11.3.2 試料溶液の調製.....	10
11.3.3 標準溶液の調製.....	10
11.3.4 測定法.....	10
11.3.5 純度の算出.....	11
11.3.6 判定基準.....	11
11.4 酢酸含量（HPLC 法）.....	11
11.4.1 移動相の調製.....	11
11.4.2 標準溶液の調製.....	11
11.4.3 試料溶液の調製.....	12
11.4.4 測定法.....	12
11.4.5 酢酸含量の算出.....	12

11.4.6	判定基準.....	13
11.5	水分（電量滴定法）.....	13
11.5.1	試験方法.....	13
11.5.2	水分の算出.....	13
11.5.3	判定基準.....	13
12.	特性及び安定性の評価.....	13
13.	測定結果の取扱い.....	14
14.	統計学的手法.....	14
15.	参考資料.....	14
16.	試験成績の報告.....	14
16.1	分析証明書.....	14
16.2	最終報告書.....	15
17.	記録及び資料の保存.....	15
18.	試験計画書の変更.....	15
19.	試験計画書の作成及び承認.....	16

1. 表題

AcPepA (MPS-390) (Lot No. 2K08045) の特性及び安定性試験

2. 試験目的

AcPepA (MPS-390) (Lot No. 2K08045) の品質 [性状 (外観), アミノ酸含量 (アミノ酸組成比及びペプチド含量), 純度試験 (HPLC 法), 酢酸含量 (HPLC 法) 及び水分 (電量滴定法)] を分析し, 特性及び安定性を確認する.

3. 適用規則

本試験は, 以下の GLP を遵守して実施する.

厚生省令第 21 号「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」(平成 9 年 3 月 26 日, 一部改正 厚生労働省令第 114 号 平成 20 年 6 月 13 日)

4. 試験委託者

医療法人さわらび会福祉村病院長寿医学研究所

〒441-8124 愛知県豊橋市野依町字山中 19-14

TEL : 0532-46-7511 FAX : 0532-46-8940

委託試験責任者 : 岡田秀親

5. 試験施設

株式会社新日本科学 安全性研究所

〒891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町 2438 番地

TEL : 099-294-2600 FAX : 099-294-3619

6. 試験関係者

試験責任者 : 山田聡美

被験物質取扱い責任者 : 真鍋ひろ子

7. 試験日程

試験開始日 : 2011 年 3 月 15 日

分析実施日程

特性 : 2011 年 3 月 22 日～2011 年 3 月 25 日

安定性 : 2011 年 5 月 16 日～2011 年 5 月 20 日

最終報告書草案作成日 : 2011 年 6 月 10 日

最終報告書作成日 / 試験終了日 : 2011 年 6 月 24 日

8. 被験物質

(SOP : TSB/002)

名称 : AcPepA (MPS-390)
 提供者 : 医療法人さわらび会福祉村病院長寿医学研究所
 ロット番号 : 2K08045
 分子量 : 1635.9
 受領日 : 2011年3月1日
 入手日 : 2011年3月22日
 入手量 : 3g
 保存条件 : 冷凍, 遮光
 保存場所 : 被験物質保管所内冷凍室 (許容範囲 : -30~-10°C)
 取扱い : マスク, キャップ, 手袋及び保護眼鏡を着用する。
 残余被験物質 : すべて被験物質管理責任者に移管する。

9. 試薬

(SOP : BIO/250)

名称	等級	製造者
アセトニトリル	HPLC 用	和光純薬工業株式会社
リン酸二水素カリウム	試薬特級	和光純薬工業株式会社
リン酸水素二カリウム	試薬特級	和光純薬工業株式会社
イソチオシアン酸フェニル (PITC)	アミノ酸配列分析用	和光純薬工業株式会社
トリエチルアミン	試薬特級	和光純薬工業株式会社
塩酸	試薬特級	和光純薬工業株式会社
アミノ酸混合標準液, H 型	アミノ酸自動分析用	和光純薬工業株式会社
トリフルオロ酢酸 (TFA)	HPLC 用	和光純薬工業株式会社
リン酸二水素ナトリウム	試薬特級	和光純薬工業株式会社
リン酸	試薬特級	和光純薬工業株式会社
酢酸	試薬特級	和光純薬工業株式会社
ハイドラナール・水-標準品 (力価 1)	—	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH.
ハイドラナール・クーロマット AG (陽極液)	—	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH.
ハイドラナール・クーロマット CG (陰極液)	—	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH.
超純水	Milli-Q システムにて精製した水.	

10. 測定機器

名称	型式	製造者	SOP
HPLC システム	島津 10A	株式会社島津製作所	BIO/273
	島津 20A	株式会社島津製作所	BIO/273
検出器	島津 SPD-10A	株式会社島津製作所	BIO/273
	島津 SPD-20A	株式会社島津製作所	BIO/273
データ処理装置	LCsolution	株式会社島津製作所	BIO/273
電量滴定方式カールフィッシャー水分計	MKC-510N	京都電子工業株式会社	BIO/233
データ処理装置	KF-Win/ER	京都電子工業株式会社	BIO/233

11. 品質確認

(SOP : BIO/231)

11.1 性状 (外観)

(SOP : BIO/210)

11.1.1 方法

被験物質約 1 g を白紙上にとり、色及び形状を観察する。

11.1.2 判定基準

白色または淡い白色の粉末

11.2 アミノ酸含量測定 (アミノ酸組成比及びペプチド含量)

11.2.1 試液及び移動相の調製

(SOP : BIO/250)

以下の割合で調製する。

11.2.1.1 100 mmol/L PITC / アセトニトリルの調製

PITC 24 μ L にアセトニトリル 2000 μ L を加える。

11.2.1.2 1 mol/L トリエチルアミン / アセトニトリルの調製

トリエチルアミン 277 μ L にアセトニトリル 1723 μ L を加える。

11.2.1.3 6 mol/L 塩酸の調製

塩酸 5 mL に超純水を加えて 10 mL とする。

11.2.1.4 1.2 mol/L 塩酸の調製

6 mol/L 塩酸 1 mL に超純水を加えて 5 mL とする。

11.2.1.5 0.02 mol/L 塩酸の調製

1.2 mol/L 塩酸 1 mL に超純水を加えて 60 mL とする。

11.2.1.6 移動相 A の調製

リン酸二水素カリウム約 1.36 g を秤量し、超純水で 1000 mL とする (1 液)。リン酸水素二カリウム約 1.74 g を秤量し、超純水で 1000 mL とする (2 液)。1 液に 2 液を加えて pH7.0 に調製する。この液をメンブランフィルター (OMNIPORE, 0.45 μm ; 日本ミリポア株式会社) で減圧ろ過し、超音波減圧処理により脱気する。

11.2.1.7 移動相 B の調製

アセトニトリルを分取し、超音波減圧処理により脱気する。

11.2.2 標準溶液の調製

アミノ酸混合標準液 SA (各アミノ酸濃度: 2.50 $\mu\text{mol/mL}$, 混合液 H) [#] を次表に従い、正確に希釈する。11.2.4 項の方法でこれらの液を PTC 誘導体化する。なお、標準溶液は用時調製とする。

標準溶液	採取液	採取量 (mL)	使用液	添加量 (mL)	調製濃度 ($\mu\text{mol/mL}$)	測定濃度* ($\mu\text{mol/mL}$)
SA	混合液 H	0.2	0.02 mol/L 塩酸	0.3	1	0.4

*各 PTC-アミノ酸の濃度

アミノ酸混合標準液組成 (各アミノ酸濃度: 2.50 $\mu\text{mol/mL}$)

L-Aspartic Acid (Asp)	L-Threonine (Thr)	L-Serine (Ser)
L-Glutamic Acid (Glu)	L-Proline (Pro)	Glycine (Gly)
L-Alanine (Ala)	L-Cystine (Cys)	L-Valine (Val)
L-Methionine (Met)	L-Isoleucine (Ile)	L-Leucine (Leu)
L-Tyrosine (Tyr)	L-Phenylalanine (Phe)	L-Lysine (Lys)
L-Histidine (His)	L-Arginine (Arg)	

11.2.3 試料溶液の調製 (n=3)

被験物質を約 50 mg を精密に量り、6 mol/L 塩酸 5 mL を加えて溶かし正確に 5 mL とする。この液 0.5 mL をバキュームチューブに移し、減圧下 110°C で 20 時間加熱する。放冷後、反応液を減圧留去する。残留物に 0.02 mol/L 塩酸 9 mL を正確に加える。この液をシリンジフィルター (クロマトディスク 13P, 0.45 μm ; ジーエルサイエンス株式会社) でろ過した液 (初液 1 mL は廃棄) を 11.2.4 項の方法で PTC 誘導体化し、試料溶液 (AT1~AT3) とする。

11.2.4 PTC 誘導体化法

- 1) 測定試料溶液 200 μL に 100 mmol/L PITC/アセトニトリル 100 μL 及び 1 mol/L トリエチルアミン/アセトニトリル 100 μL を加える。
- 2) 40°C で 20 分間放置する。
- 3) 1.2 mol/L 塩酸 100 μL を加える (PTC-アミノ酸)。

11.2.5 測定法

11.2.5.1 HPLC 測定条件

HPLC システム： 島津 20A
 検出器： 紫外吸光光度計 (島津 SPD-20A, 測定波長：254 nm, AUX レンジ：2.0 AU/V, レスポンス：0.05 sec, セミマイクロセル)
 カラム： Shim-pack XR-ODS (2.2 μm , 75 \times 3.0 mm i.d.; 株式会社島津製作所)
 カラム温度： 40°C
 試料温度： 5°C
 移動相 A： 10 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH7.0)
 移動相 B： アセトニトリル
 移動相の送液： 移動相 A 及び移動相 B の混合比を以下のように直線的に変えて濃度勾配制御する。

注入後からの 時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	95	5
0.3	95	5
3.4	60	40
4	60	40
4.01	95	5
10	95	5

流量： 1.2 mL/min
 注入量： 4 μL
 面積測定範囲： 4 分

11.2.5.2 システムの再現性

測定時に、標準溶液 SA を 6 回測定し、Ser についてピーク面積の相対標準偏差 (RSD) が 5.0% 以下であれば適とする。

11.2.5.3 測定順序

Sys \rightarrow Sys* \rightarrow Sys* \rightarrow AT1 \rightarrow Sys \rightarrow AT2 \rightarrow Sys \rightarrow AT3 \rightarrow Sys

Sys：システムの再現性 (SA を使用)

Sys* : 標準溶液 (SA を使用)

11.2.6 アミノ酸組成比及びペプチド含量の算出

標準溶液 SA と試料溶液 (AT1~AT3) を測定順序 (11.2.5.3 項) に従い測定する。得られた標準溶液の各アミノ酸のピーク面積と調製濃度から LCsolution により検量線 (一点検量線法) を作成し、試料溶液中各アミノ酸の濃度を求めて、被験物質中のアミノ酸組成比及びペプチド含量を求める。

アミノ酸組成比 =

$$\text{試料溶液中アミノ酸濃度 } (\mu\text{mol/mL}) \text{ } / \text{ 試料溶液中 Ser 濃度平均値 } (\mu\text{mol/mL})$$

ペプチド含量 (%) =

$$\frac{\text{試料溶液中 Ser 濃度 } (\mu\text{mol/mL}) \times (9 \times 10 \times 2.5) \times \text{分子量 } (1635.9)}{\text{被験物質採取量 } (\text{mg}) \times 10^3} \times 100$$

11.2.7 判定基準

アミノ酸組成比 :

Ser を 1.00 としたときの組成比 (平均値)

Gly : 2.55~3.45

Ala : 3.40~4.60

Arg : 0.85~1.15

Met : 0.85~1.15

Phe : 0.85~1.15

Leu : 0.85~1.15

Pro : 4.25~5.75

ペプチド含量 : 設定なし

11.3 純度試験 (HPLC 法)

11.3.1 移動相及び希釈液の調製

(SOP : BIO/250)

以下の割合で調製する。

11.3.1.1 移動相 A の調製

超純水 1000 mL と TFA 1 mL を混合し、超音波減圧処理により脱気する。

11.3.1.2 移動相 B の調製

アセトニトリル 1000 mL と TFA 1 mL を混合し、超音波減圧処理により脱気する。

11.3.1.3 希釈液の調製

酢酸 10 mL に超純水を加え 1000 mL とする。