

## 11.3.2 試料溶液の調製 (n=3)

被験物質 10 mg を精密に量り、希釈液を加えて溶かし、正確に 20 mL とする。(500 µg/mL)

## 11.3.3 標準溶液の調製 (n=3)

11.3.2 項で調製した試料溶液を 1 mL 正確に量り、希釈液で正確に 100 mL とする (5 µg/mL)。

## 11.3.4 測定法

## 11.3.4.1 HPLC 測定条件

HPLC システム： 島津 10A  
 検出器： 紫外吸光光度計 (島津 SPD-10A, 測定波長：215 nm, AUX レンジ：2.0 AU/V)  
 カラム： Vydac C18 (5 µm, 250 × 4.6 mm i.d. ; Grace Vydac)  
 カラム温度： 40°C  
 試料温度： 5°C  
 移動相 A： 0.1%TFA 水溶液  
 移動相 B： 0.1%TFA アセトニトリル溶液  
 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	85	15
30	55	45
30.01	85	15
40	85	15

流量： 1.0 mL/min  
 注入量： 20 µL  
 面積測定範囲： 30 分  
 定量限界： 0.067%

## 11.3.4.2 システム適合性

測定時に下記項目を確認する。

## 1) システムの性能

システムの再現性の 1 回目で得られた MPS-390 のピークについて、シンメトリー係数が 2.0 以下、理論段数が 2000 段以上であれば適とする。

## 2) システムの再現性

標準溶液を上記の条件で 6 回繰り返して測定し、MPS-390 のピーク面積の RSD が 2.0%以下で

あれば適とする。

#### 11.3.5 純度の算出

希釈液（ブランク）を1回測定後、標準溶液（5 µg/mL）及び試料溶液（500 µg/mL）を1回ずつ交互に測定する（各 n=3）。各々の相対保持時間及びピーク面積を LCsolution を用いて自動積分法により求め、各組み合わせごとに次式により個々の類縁物質量を算出する。なお、該当ブランクピーク及び定量限界以下のピークは計算から除く。

$$\text{被験物質中の個々の類縁物質の量 (\%)} = A_T / A_S$$

$A_T$ ：試料溶液から得られた個々の類縁物質のピーク面積

$A_S$ ：標準溶液から得られた MPS-390 のピーク面積

類縁物質の総量 (%) = 個々の類縁物質の量の合計 (%)

純度 (%) = 100 - 類縁物質の総量の平均値 (%)

#### 11.3.6 判定基準

純度：95.0%以上

### 11.4 酢酸含量（HPLC 法）

#### 11.4.1 移動相の調製

(SOP：BIO/250)

リン酸二水素ナトリウム 2.40 g を超純水約 800 mL に溶解する。この液にリン酸を加えて、pH を 2.8 に調整し、超純水で 1000 mL とする。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。

#### 11.4.2 標準溶液の調製 (n=1)

酢酸を 1.0 g 精密に量り、超純水を加えて正確に 10 mL とする（100 mg/mL）。この液 1 mL を正確に量り、移動相を加えて正確に 100 mL とし、標準原液 R とする（1000 µg/mL）。続いて次表に従い、正確に標準溶液（R-1～R-5）を調製する。標準溶液は、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（初液 0.5 mL は廃棄）する。

標準溶液名	採取液	採取量 (mL)	使用液	調製量 (mL)	調製濃度* ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
R-5	標準原液 R	15	移動相	20	750
R-4	標準原液 R	10	移動相	20	500
R-3	標準原液 R	5	移動相	20	250
R-2	標準原液 R	2.5	移動相	20	125
R-1	標準原液 R	1	移動相	40	25

\* 酢酸濃度として

#### 11.4.3 試料溶液の調製 (n=3)

被験物質を約 10 mg (5~15 mg) に量り取り、移動相を 2 mL 添加し、試料溶液とする。試料溶液は、シリンジフィルター (クロマトディスク 13P, 0.45  $\mu\text{m}$ ; ジーエルサイエンス株式会社) でろ過 (初液 0.5 mL は廃棄) する。

#### 11.4.4 測定法

##### 11.4.4.1 HPLC 測定条件

HPLC システム: 島津 10A  
 検出器: 紫外吸光光度計 (島津 SPD-10A, 測定波長: 220 nm, AUX レンジ: 2.0 AU/V)  
 カラム: YMC-Pack ODS-AQ (5  $\mu\text{m}$ , 150  $\times$  4.6 mm i.d.: 株式会社ワイエムシイ)  
 カラム温度: 30°C  
 試料温度: 20°C  
 移動相: 20 mmol/L  $\text{H}_3\text{PO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  (pH2.8)  
 流量: 0.7 mL/min  
 注入量: 50  $\mu\text{L}$   
 測定時間: 10 分

##### 11.4.4.2 システムの再現性

測定時に確認する。標準溶液 R-3 (調製濃度: 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を上記の条件で 6 回繰り返して測定し、酢酸のピーク面積の RSD が 2.0%以下であれば適とする。

##### 11.4.5 酢酸含量の算出

標準溶液 (R-1~R-5) を 2 回ずつ測定後、試料溶液 (n=3) を 1 回ずつ測定する。LCsolution を用いて自動積分法により解析し、標準溶液のピーク面積 (Y) と酢酸の調製濃度 (X) より、回帰直線 (最小二乗法による一次回帰直線式) を作成する。傾き及び Y 切片から、次式により酢酸含量 (% Acetate) を算出する。

$$\mu\text{g Acetate} = (\text{試料溶液の酢酸ピーク面積} - Y \text{切片}) / \text{傾き} \times 2$$

$$\text{酢酸含量 (\% Acetate)} = \mu\text{g Acetate} / \text{被験物質秤量値 (\mu\text{g})} \times 100$$

得られた3回の酢酸含量 (% Acetate) の平均値 (Mean) を求める。

#### 11.4.6 判定基準

設定なし

### 11.5 水分 (電量滴定法)

#### 11.5.1 試験方法

- 1) ハイドラナール・水-標準品 (力価1) 約 1 g を用い、水分含量を3回測定し、回収率 (平均値) が  $100.0 \pm 5.0\%$  以内であることを確認する。
- 2) 水分測定装置のフラスコの栓を一定時間 (約 30 秒間) 開け、空の水分測定用秤量瓶をフラスコに投入し、START キーを押す。スターラーで陽極液を 180 秒間かき混ぜた後、自動滴定する。この操作を3回繰り返し、平均値をブランク値とする。
- 3) 空の水分測定用秤量瓶の質量を精密に量る。
- 4) 被験物質を約 0.01 g 量り、3) で質量を量った水分測定用秤量瓶に移す。
- 5) 被験物質の入った水分測定用秤量瓶の質量を精密に量る (グロス重量)。
- 6) 水分測定用秤量瓶をすばやく水分測定装置のフラスコに投入し、START キーを押す。この際、フラスコの栓を開放している時間が、ブランク測定の場合と同じ一定時間 (約 30 秒間) となるように留意する。
- 7) 陽極液を 180 秒間かき混ぜながら被験物質を溶かした後自動滴定して、被験物質の水分量を求める。
- 8) グロス重量及び空の水分測定用秤量瓶の質量をデータ処理装置 (KF-Win/ER) に入力し、投入された被験物質の質量 (g) を求める。
- 9) 3) ~8) の操作を3回繰り返す。

#### 11.5.2 水分の算出

投入された被験物質の質量と水分量から、データ処理装置 (KF-Win/ER) より水分含量 (%) を求め、 $n=3$  の平均値を算出する。

#### 11.5.3 判定基準

設定なし

### 12. 特性及び安定性の評価

特性では、性状、アミノ酸含量 (アミノ酸組成比及びペプチド含量)、純度試験で得られた結果が判定基準を満たしているとき、初期の品質が適合基準内であると判断する。判定基準のな

い項目については、参考値として分析結果を報告する。また、安定性では、性状、アミノ酸含量（アミノ酸組成比及びペプチド含量）、純度試験で得られた結果が判定基準を満たしているとき、被験物質が安定であると判断する。判定基準のない項目については、参考値として分析結果を報告する。

### 13. 測定結果の取扱い

水分含量はデータ処理装置（KF-Win/ER）から出力された値を用いる。ピーク面積、シンメトリー係数、理論段数、相対保持時間及びシステムの再現性はデータ処理装置（LCsolution）から出力された値を用いる。その他の計算には、表計算ソフト Excel を用いる。算出される数値の表示桁数は以下のとおりとする。

ピーク面積：	小数点以下 1 桁
アミノ酸組成比：	小数点以下 2 桁
ペプチド含量：	小数点以下 1 桁
シンメトリー係数：	小数点以下 1 桁
理論段数：	整数
相対保持時間：	小数点以下 3 桁
平均値：	計算に用いる数値と同桁
RSD：	小数点以下 1 桁
個々の類縁物質の量：	小数点以下 3 桁
類縁物質の総量：	小数点以下 2 桁
純度：	小数点以下 1 桁
酢酸含量：	小数点以下 1 桁
水分含量：	小数点以下 2 桁

### 14. 統計学的手法

統計学的検定は実施しない。

### 15. 参考資料

- 1) 山田聡美：AcPepA（MPS-390）の特性確認のためのバリデーション。株式会社新日本科学 安全性研究所，試験番号：SBL861-002，最終報告書，2011 年

### 16. 試験成績の報告

#### 16.1 分析証明書

信頼性保証部門の確認を受け、その写し 1 部を試験委託者に提出する。

## 16.2 最終報告書

本試験の成績について、最終報告書の草案（和文）を試験委託者に1部提出する。最終報告書（和文）についてはその写し1部を試験委託者に提出する。

別添1

表

- (1) 性状（外観）
- (2) アミノ酸含量（アミノ酸組成比及びペプチド含量）
- (3) 純度試験（HPLC法）
- (4) 酢酸含量（HPLC法）
- (5) 水分（電量滴定法）

添付資料 信頼性保証陳述書

## 17. 記録及び資料の保存

記録及び資料は、以下の保存場所に最終報告書作成後10年間保存する。

株式会社新日本科学 安全性研究所 データ資料室

試験計画書及び試験計画書変更書

試験スケジュール

被験物質に関する記録、資料

測定に関するチャート及び記録

分析証明書

最終報告書草案

最終報告書

その他、試験に関する資料

## 18. 試験計画書の変更

試験計画内容に変更が生じた場合は、試験計画書変更書を作成し、変更箇所及びその理由を明確にする。

19. 試験計画書の作成及び承認

試験計画書の作成

試験責任者 株式会社新日本科学 安全性研究所

山田 聡美 印  
山田 聡美

2011年 3月 15日

試験計画書の承認

運営管理者 株式会社新日本科学 安全性研究所

洲加本 孝幸 印  
洲加本 孝幸

2011年 3月 15日

試験計画書の承認

株式会社新日本科学 安全性研究所より提示された試験計画書を承認致します。

医療法人さわらび会福祉村病院長寿医学研究所

岡田 秀親 印  
岡田 秀親

2011年 4月 12日

試験計画書変更書 (No. 1)

表 題 : AcPepA (MPS-390) のラットを用いる小核試験

試験番号 : SBL861-008

【変更日】 2011年4月11日

【変更内容】

I. 6 ページ 10. 投与液の調製, 10.1 被験物質調製液  
下線部を変更する.

(変更前)

安定性 : 0.5 及び 4 mg/mL 調製液について, 別途実施される GLP 試験 (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, SBL861-006) において冷蔵, 遮光, 気密条件下で 2 日間+室温, 遮光条件下で 24 時間安定であることが確認されている. (CERTIFICATE OF ANALYSIS, Certificate No.: 861006-1)

(変更後)

安定性 : 0.5 及び 4 mg/mL 調製液について, 別途実施される GLP 試験 (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, SBL861-006) において冷蔵, 遮光, 密封条件下で 2 日間+室温, 遮光条件下で 24 時間安定であることが確認されている. (CERTIFICATE OF ANALYSIS, Certificate No.: 861006-1)

【変更理由】

I. 調製液保存条件の記載誤り.

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

鳥越 直彦



2011年4月11日

鳥越 直彦



試験計画書変更書 (No. 1)

表 題： 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

試験番号： PBC861-001

【変更日】 2011年2月25日

【変更内容】

I. 8. 材料及び方法, 8.11 分析バリデーション法, 8.11.11 冷凍保存安定性  
下線部を追加する.

(変更後)

保存条件	冷凍（許容範囲：-30~-10°C）及び冷凍（許容範囲：-70°C以下）
測定試料	安定性用試料（PST1及びPST2），各濃度 n=3
測定頻度	調製直後，2週間，1ヵ月及び3ヵ月以上保存後
算出値	調製直後の各安定性用試料の測定値及び濃度ごとの Mean，保存後の各安定性用試料の測定値，濃度ごとの Mean，濃度ごとの残存率（%）
判定基準	
残存率	100.0±15.0%以内

II. 8. 材料及び方法, 8.11 分析バリデーション法, 8.11.12 凍結融解安定性  
下線部を追加する.

(変更後)


保存条件	冷凍（許容範囲：-30~-10°C）及び冷凍（許容範囲：-70°C以下）
融解条件	氷上（一部の融解は流水で行う）
凍結融解操作	3回
測定試料	安定性用試料（PST1及びPST2），各濃度 n=3
測定頻度	調製直後，凍結融解3回後
算出値	調製直後の各安定性用試料の測定値及び濃度ごとの Mean，保存後の各安定性用試料の測定値，濃度ごとの Mean，濃度ごとの残存率（%）
判定基準	
残存率	100.0±15.0%以内

【変更理由】

I.及びII. 保存条件を追加したため.

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 薬物代謝分析センター

林 善治  2011年 2月 25日

---

林 善治

最終報告書

表題： AcPepA (MPS-390) の特性確認のためのバリデーション

試験番号： SBL861-002

試験責任者： 山田聡美

署名 山田 聡美 印 2011 年 1 月 13 日

株式会社新日本科学 安全性研究所

本報告書は表紙を含む 43 頁

## 目 次

要 約	5
1. 試験目的	6
2. 適用規則	6
3. 試験委託者	6
4. 試験施設	6
5. 試験日程	6
6. 材料及び方法	7
6.1 被験物質	7
6.2 試薬	7
6.3 測定機器	8
6.4 アミノ酸含量測定法のバリデーション	8
6.4.1 試液及び移動相の調製	8
6.4.2 標準溶液の調製	8
6.4.3 特異性用試料溶液の調製	9
6.4.4 試料溶液の調製	9
6.4.5 PTC 誘導体化法	9
6.4.6 測定法	10
6.4.7 分析法バリデーション	11
6.5 純度測定法のバリデーション	12
6.5.1 移動相の調製	12
6.5.2 試料溶液の調製	12
6.5.3 測定法	13
6.5.4 分析法バリデーション	14
6.6 酢酸含量測定法のバリデーション	15
6.6.1 移動相の調製	15
6.6.2 標準溶液の調製	15
6.6.3 試料溶液の調製	15
6.6.4 測定法	16
6.6.5 分析法バリデーション	16
7. 測定結果の取扱い	17
8. 統計学的手法	17
9. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び 試験計画書に従わなかったこと	18
10. 結果及び考察	19
10.1 アミノ酸含量測定法のバリデーション	19

10.1.1	アミノ酸組成比.....	19
10.1.2	ペプチド含量.....	19
10.2	純度測定法のバリデーション.....	20
10.3	酢酸含量測定法のバリデーション.....	21
11.	試験責任者, その他の試験に従事した研究者全員の氏名及び業務分担.....	22
12.	記録及び資料の保存場所.....	22
別添 1	.....	23

#### Figures

1	アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の特異性.....	24
2-1	アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性【Ser】.....	25
2-2	アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性【Gly】.....	26
2-3	アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性【Ala】.....	27
2-4	アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性【Arg】.....	28
2-5	アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性【Met】.....	29
2-6	アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性【Phe】.....	30
2-7	アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性【Leu】.....	31
2-8	アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性【Pro】.....	32
3	純度測定法における AcPepA (MPS-390) の特異性.....	34
4-1	純度測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性【J-1~J-5】.....	35
4-2	純度測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性【J-6~J-10】.....	36
5	酢酸含量測定法における酢酸の特異性.....	40
6	酢酸含量測定法における酢酸の直線性.....	41

#### Tables

1-1	アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性【Ser】.....	25
1-2	アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性【Gly】.....	26
1-3	アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性【Ala】.....	27
1-4	アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性【Arg】.....	28
1-5	アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性【Met】.....	29
1-6	アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性【Phe】.....	30
1-7	アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性【Leu】.....	31
1-8	アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性【Pro】.....	32
2	アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の真度及び併行精度.....	33
3-1	純度測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性【J-1~J-5】.....	35
3-2	純度測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性【J-6~J-10】.....	36
4	純度測定法における AcPepA (MPS-390) のオートサンプラー内の安定性.....	37
5	純度測定法における AcPepA (MPS-390) の定量限界及び検出限界.....	38
6	純度測定法における AcPepA (MPS-390) の併行精度.....	39

7	酢酸含量測定法における酢酸の直線性 .....	41
8	酢酸含量測定法における酢酸のオートサンプラー内の安定性 .....	42
9	酢酸含量測定法における酢酸の併行精度 .....	43

## 要 約

AcPepA (MPS-390) の特性確認を実施するために、アミノ酸含量 (アミノ酸組成比及びペプチド含量)、純度試験及び酢酸含量の測定法のバリデーションを実施した。

## 1) アミノ酸含量 (アミノ酸組成比及びペプチド含量)

Ser, Gly, Ala, Arg, Met, Phe, Leu 及び Pro の測定について、特異性、直線性ならびに真度及び併行精度はすべて適合基準を満たしていた。また、ペプチド含量測定について、併行精度が適合基準を満たしていた。

## 2) 純度測定法

特異性、直線性、オートサンプラー内の安定性及び併行精度について、すべて適合基準を満たしていた。また、定量限界は 0.334 µg/mL であり、検出限界は 0.110 µg/mL であった。

## 3) 酢酸含量

特異性、直線性、オートサンプラー内の安定性及び併行精度について、すべて適合基準を満たしていた。

以上の結果より、AcPepA (MPS-390) のアミノ酸含量 (アミノ酸組成比及びペプチド含量)、純度試験及び酢酸含量の測定に関して、本測定法の妥当性が確認された。

1. 試験目的

本試験の目的は、AcPepA (MPS-390) の特性確認を実施するために、アミノ酸含量 (アミノ酸組成比及びペプチド含量)、純度試験及び酢酸含量の測定法の妥当性を確認することである。

2. 適用規則

本試験は、適用規則なしとした。

3. 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

4. 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

5. 試験日程

試験開始日 : 2010年12月16日  
バリデーション実施日程 : 2010年12月16日～2010年12月24日  
試験終了日 : 2011年1月13日



## 6. 材料及び方法

## 6.1 被験物質

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： 2K09030  
 分子量： 1635.9  
 受領日： 2010年12月9日  
 入手日： 2010年12月17日  
 入手量： 2g  
 保存条件： 冷凍，遮光  
 保存場所： 被験物質保管所内冷凍室  
 [受領日～移管日；2010年12月9日～2011年1月12日：  
 -26.6～-18.4°C，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した。  
 残余被験物質： すべて被験物質管理責任者に移管した。

## 6.2 試薬

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
超純水	Milli-Q システムにて精製した水。	

## 6.3 測定機器

名称	型式	製造者
HPLC システム	島津 10A	株式会社島津製作所
	島津 20A	株式会社島津製作所
検出器	島津 SPD-10A	株式会社島津製作所
	島津 SPD-20A	株式会社島津製作所
データ処理装置	LCsolution	株式会社島津製作所

## 6.4 アミノ酸含量測定法のバリデーション

## 6.4.1 試液及び移動相の調製

以下の割合で調製した。

## 6.4.1.1 100 mmol/L PITC/アセトニトリルの調製

PITC 24  $\mu$ L にアセトニトリル 2000  $\mu$ L を加えた。

## 6.4.1.2 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  $\mu$ L にアセトニトリル 1723  $\mu$ L を加えた。

## 6.4.1.3 6 mol/L 塩酸の調製

塩酸 5 mL に超純水を加えて 10 mL とした。

## 6.4.1.4 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 とした。

## 6.4.1.5 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 とした。

## 6.4.1.6 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 とした (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 とした (2 液)。1 液に 2 液を加えて pH7.0 に調整した。この液をメンブランフィルター (OMNIPORE, 0.45  $\mu$ m ; 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した。

## 6.4.1.7 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した。

## 6.4.2 標準溶液の調製

アミノ酸混合標準液 (各アミノ酸濃度 : 2.50  $\mu$ mol/mL, 混合液 H) # を次表に従い、正確に希

積した。6.4.5 項の方法でこれらの液を PTC 誘導体化した。なお、標準溶液は用時調製とした。

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* ( $\mu\text{mol/mL}$ )
A-5	混合液 H	0.4	0.02 mol/L 塩酸	0.1	2	0.8
A-4	混合液 H	0.3	0.02 mol/L 塩酸	0.2	1.5	0.6
A-3	混合液 H	0.2	0.02 mol/L 塩酸	0.3	1	0.4
A-2	混合液 H	0.125	0.02 mol/L 塩酸	0.375	0.625	0.25
A-1	混合液 H	0.05	0.02 mol/L 塩酸	0.45	0.25	0.1

\*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)	

#### 6.4.3 特異性用試料溶液の調製 (AP, n=1)

6 mol/L 塩酸 0.5 mL をバキュームチューブに正確にとり、減圧下 110°C で 20 時間加熱した。放冷後、反応液を減圧留去した。残留物に 0.02 mol/L 塩酸 9 mL を正確に加えた。この液をシリンジフィルター (クロマトディスク 13P, 0.45  $\mu\text{m}$ ; 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 6.4.5 項の方法で PTC 誘導体化し、特異性用試料溶液とした。

#### 6.4.4 試料溶液の調製 (n=6)

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 とした。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 時間加熱した。放冷後、反応液を減圧留去した。残留物に 0.02 mol/L 塩酸 9 mL を正確に加えた。この液をシリンジフィルター (クロマトディスク 13P, 0.45  $\mu\text{m}$ ; 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 6.4.5 項の方法で PTC 誘導体化し、試料溶液とした。

#### 6.4.5 PTC 誘導体化法

- 1) 測定試料溶液 200  $\mu\text{L}$  に 100 mmol/L PITC / アセトニトリル 100  $\mu\text{L}$  及び 1 mol/L トリエチルアミン / アセトニトリル 100  $\mu\text{L}$  を加えた。
- 2) 40°C で 20 分間放置した。
- 3) 1.2 mol/L 塩酸 100  $\mu\text{L}$  を加えた (PTC-アミノ酸)。

## 6.4.6 測定法

## 6.4.6.1 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  $\mu$ m，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した。

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  $\mu$ L  
 面積測定範囲： 4 分

## 6.4.6.2 システムの再現性

測定の開始時に、標準溶液 A-3 を 6 回測定したところ、Ser についてピーク面積の相対標準偏差（RSD）が 5.0%以下であり適とした（実測値：0.6%，0.5%）。

## 6.4.6.3 測定順序

## 1) 直線性の確認

Sys  $\rightarrow$  A-1  $\rightarrow$  Sys  $\rightarrow$  A-2  $\rightarrow$  Sys (A-3)  $\rightarrow$  A-4  $\rightarrow$  Sys  $\rightarrow$  A-5  $\rightarrow$  Sys  $\rightarrow$  Sys

Sys：システムの再現性（A-3 を使用）

A-1～A-5 は 2 回ずつ注入した。

## 2) 特異性、真度及び併行精度の確認

Sys  $\rightarrow$  AP  $\rightarrow$  Sys\*  $\rightarrow$  Sys\*  $\rightarrow$  T1  $\rightarrow$  T2  $\rightarrow$  Sys  $\rightarrow$  T3  $\rightarrow$  T4  $\rightarrow$  Sys  $\rightarrow$  T5  $\rightarrow$  T6  $\rightarrow$  Sys

Sys：システムの再現性（A-3 を使用）

Sys\*：標準溶液（A-3 を使用）