

Table 1-7 アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性 【Leu】

濃度 ($\mu\text{mol/mL}$)	0.1	0.25	0.4	0.6	0.8
ピーク面積 ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	76526.4	236904.7	415681.4	640087.8	862022.2
相関係数 (r)	0.999066				
傾き	1135900				
Y切片	-40889				

適合基準

相関係数 (r) : 0.99 以上

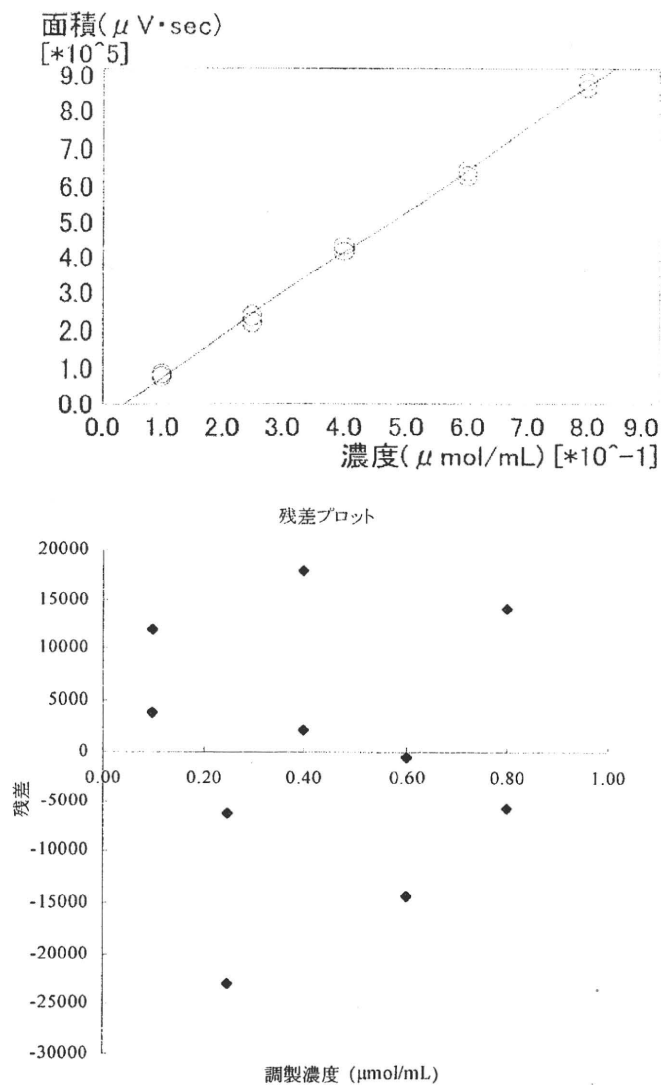


Figure 2-7

アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性 【Leu】

Table 1-8 アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性 【Pro】

濃度 ($\mu\text{mol/mL}$)	0.1	0.25	0.4	0.6	0.8
ピーク面積 ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	92595.1	236920.0	387598.7	578050.5	791810.5
相関係数 (r)	0.999582				
傾き	994740				
Y切片	-10881				

適合基準

相関係数 (r) : 0.99 以上

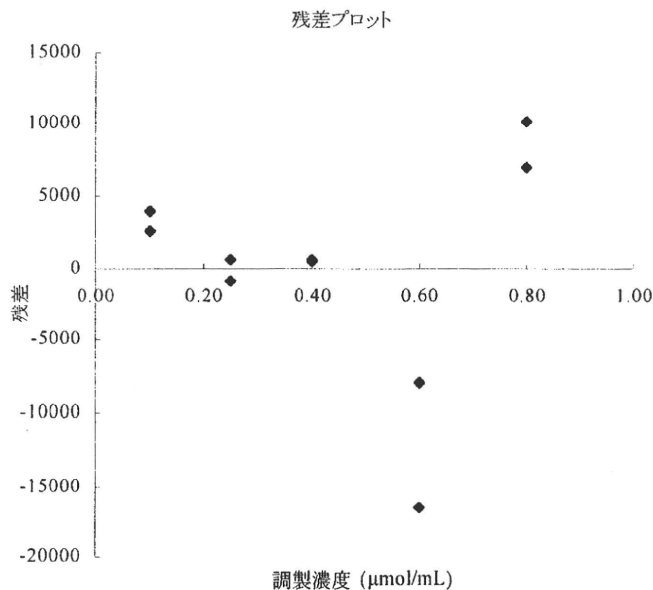
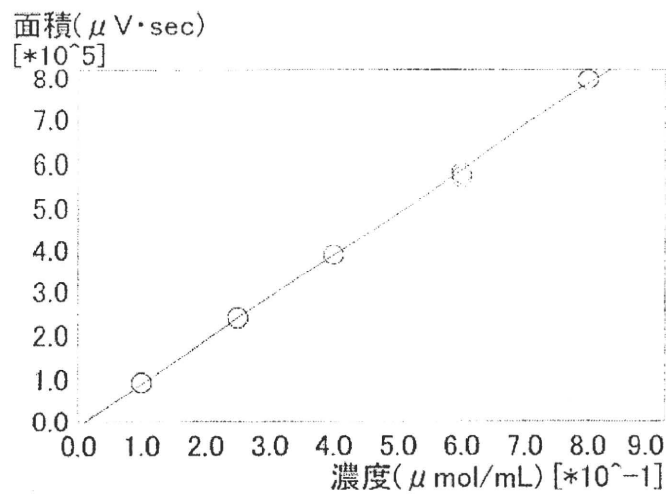


Figure 2-8

アミノ酸含量測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性 【Pro】

Table 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

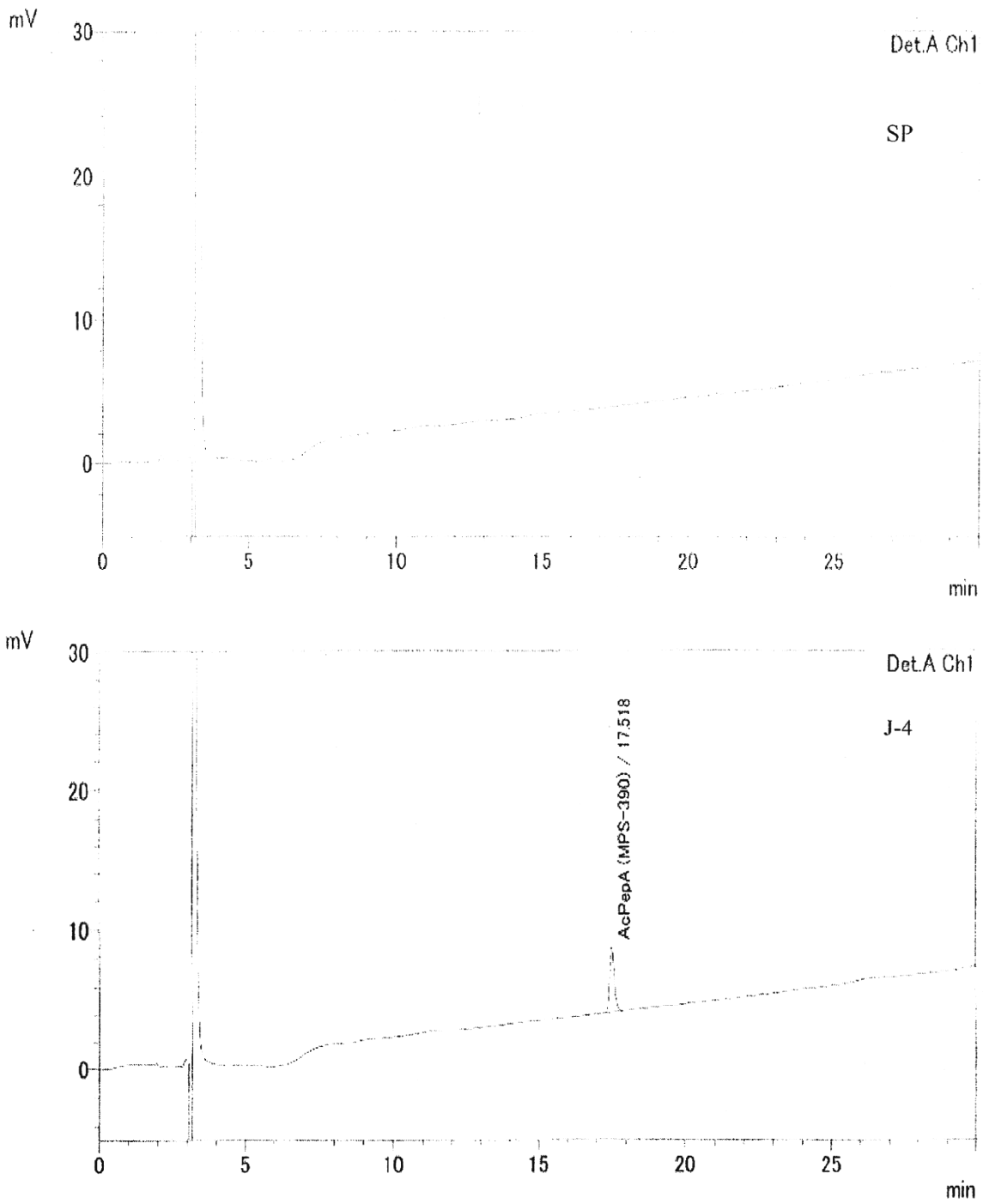
Peak Name	アミノ酸組成比						平均値	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6		
Peak1 [Ser]	1.00	1.01	0.96	1.02	1.03	0.98	1.00	3.0
Peak2 [Gly]	3.41	3.34	3.39	3.39	3.37	3.35	3.38	0.9
Peak3 [Arg]	1.02	1.01	1.03	1.05	1.03	1.01	1.03	1.9
Peak4 [Ala]	3.92	3.95	3.99	4.07	3.96	3.85	3.96	1.8
Peak5 [Pro]	5.54	5.48	5.58	5.44	5.58	5.62	5.54	1.3
Peak6 [Met]	1.03	1.02	0.94	1.02	1.03	0.93	1.00	5.0
Peak7 [Leu]	0.84	0.84	0.86	0.84	0.86	0.84	0.85	1.2
Peak8 [Phe]	0.92	0.91	0.94	0.92	0.95	0.93	0.93	1.1
ペプチド含量 (%)	81.3	81.6	78.0	82.7	83.1	79.2		
平均値 (%)	81.0							
RSD (%)	2.5							

適合基準

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

RSD : 10.0%以下



SP : 希釈液 (1%酢酸水溶液)

J-4 : 直線性確認用試料溶液 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

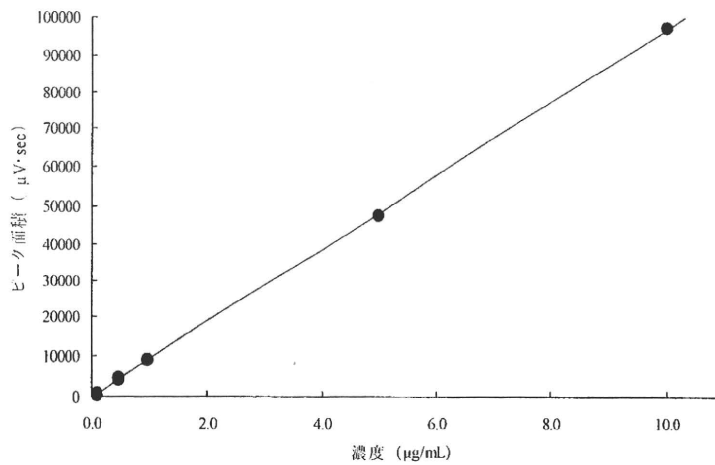
Figure 3 純度測定法における AcPepA (MPS-390) の特異性

Table 3-1 純度測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性 【J-1～J-5】

濃度 (μg/mL)	0.1	0.5	1	5	10
ピーク面積 (μV・sec)	539.1	4336.0	9165.9	47463.8	97117.0
相関係数 (r)	0.999965				
傾き	9741.6				
Y切片	-597.1				

適合基準

相関係数 (r) : 0.99 以上



残差プロット

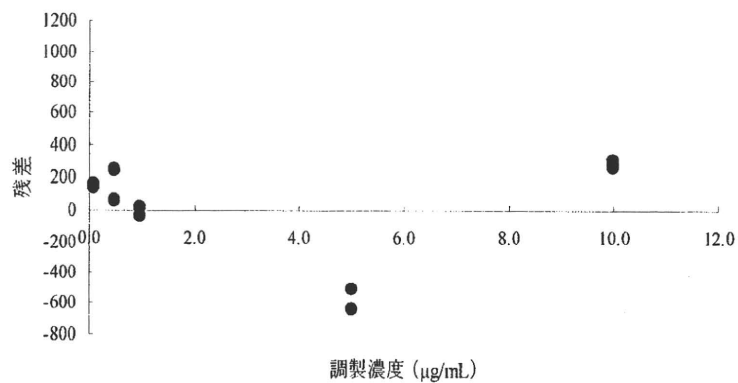


Figure 4-1 純度測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性 【J-1～J-5】

Table 3-2 純度測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性 【J-6～J-10】

濃度 (μg/mL)	25	50	100	250	500
ピーク面積	253401.2	506473.2	1009064.4	2468577.2	4796831.6
(μV・sec)	252873.9	501010.0	1007272.0	2468156.2	4795908.7
相関係数 (r)	0.999893				
傾き	9560.5				
Y切片	37262				
傾きの比	1.0				

適合基準

相関係数 (r) : 0.99 以上

傾きの比 : 0.8～1.2 の範囲

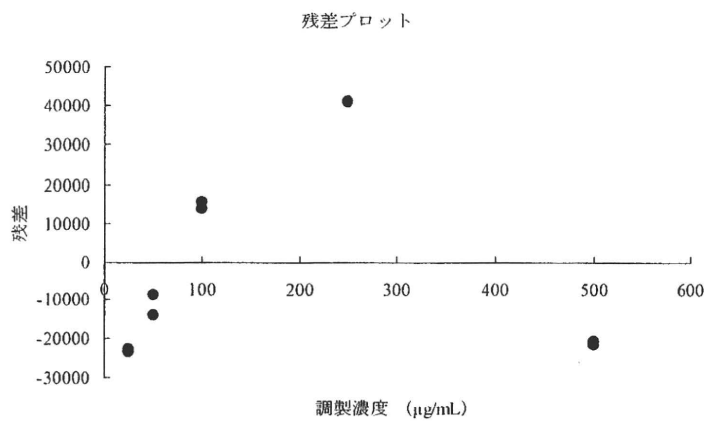
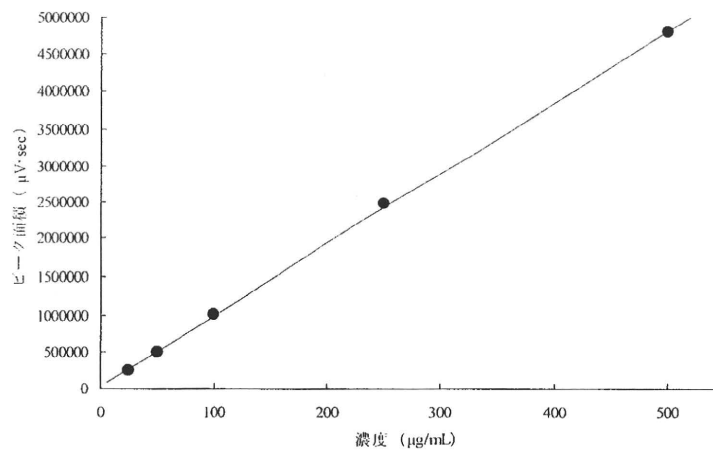


Figure 4-2

純度測定法における AcPepA (MPS-390) の直線性 【J-6～J-10】

Table 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

直線性確認用試料溶液 J-5 (10 µg/mL, 設定温度 ; 5°C)

測定時点	ピーク面積 (µV·sec)	平均値 (µV·sec)	安定性 (%)
分析開始時	96506.3	96594.7	(100.0)
	96683.1		
24時間後	95747.2	96126.9	99.5
	96506.6		

併行精度用試料溶液 (500 µg/mL, 設定温度 ; 5°C)

測定時点	ピーク面積 (µV·sec)	平均値 (µV·sec)	安定性 (%)
分析開始時	4739996.3	4741358.0	(100.0)
	4742719.8		
24時間後	4740023.0	4738952.7	99.9
	4737882.3		

適合基準

安定性 : 100.0±10.0%以内

Table 5 純度測定法における AcPepA (MPS-390) の定量限界及び検出限界

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	ピーク面積 ($\mu\text{V} \cdot \text{sec}$)	予測値	残差
0.1	539.1	377.0910763	162.0089237
	517.0	377.0910763	139.9089237
0.5	4336.0	4273.725725	62.27427475
	4519.6	4273.725725	245.8742748
1	9165.9	9144.519036	21.38096363
	9109.5	9144.519036	-35.01903637
5	47463.8	48110.86553	-647.0655254
	47599.2	48110.86553	-511.6655254
10	97117.0	96818.79864	298.2013634
	97082.9	96818.79864	264.1013634
残差の標準偏差		325.065	
回帰直線の傾き		9741.586622	
定量限界 ($\mu\text{g/mL}$)		0.334	
検出限界 ($\mu\text{g/mL}$)		0.110	

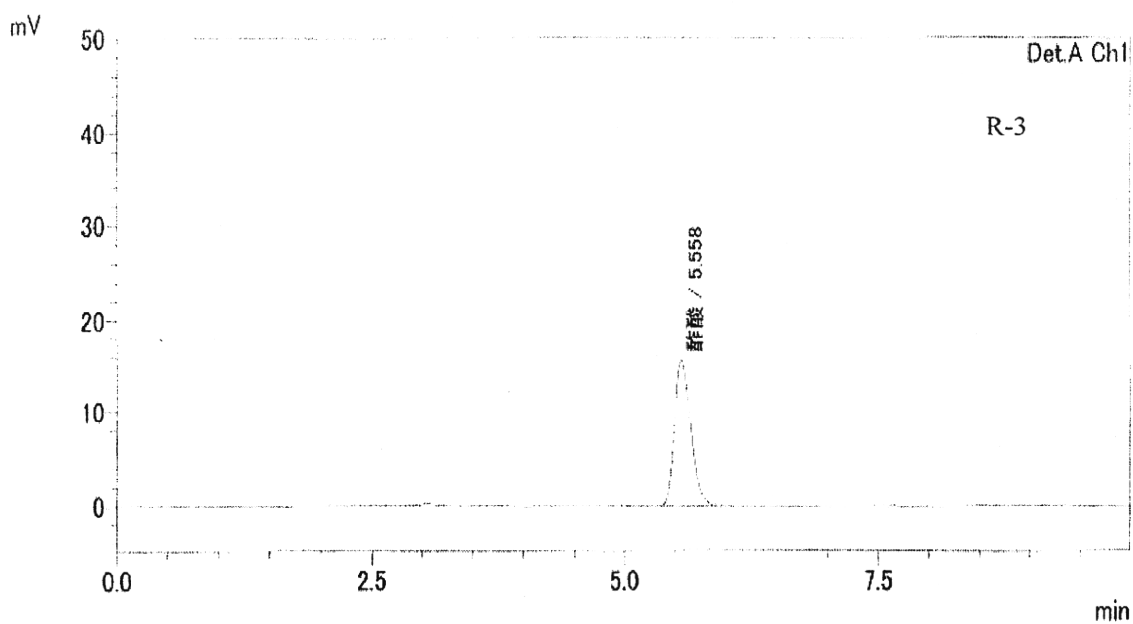
Table 6 純度測定法における AcPepA (MPS-390) の併行精度

Peak No.	RRT (分)	個々の類縁物質の量 (%)					
		1	2	3	4	5	6
Peak 1	0.11	-	-	0.142	-	-	-
Peak 2	0.43	0.974	0.950	0.994	0.988	0.946	0.927
Peak 3	0.81	0.147	0.139	0.140	0.142	0.146	0.137
Peak 4	0.95	0.342	0.353	0.362	0.363	0.342	0.347
Peak 5	0.98	0.390	0.398	0.397	0.414	0.375	0.393
Peak 6 (MPS-390)	1.00	-	-	-	-	-	-
Peak 7	1.03	1.234	1.143	1.191	1.064	1.162	1.040
類縁物質の総量 (%)		3.09	2.98	3.23	2.97	2.97	2.84
純度 (%)		96.9	97.0	96.8	97.0	97.0	97.2
純度 (Mean, %)		97.0					
RSD (%)		0.1					

RRT : 相対保持時間

適合基準

RSD : 10.0%以下



SP : 移動相 (20 mmol/L H₃PO₄-NaH₂PO₄ (pH2.8))

R-3 : 標準溶液 (調製濃度 : 250 μg/mL)

Figure 5 酢酸含量測定法における酢酸の特異性

Table 7 酢酸含量測定法における酢酸の直線性

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	25	125	250	500	750
ピーク面積 ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	17321.9	86874.8	172732.4	343935.6	517393.9
相関係数 (r)					0.999997
傾き					688.73
Y切片					325.03

適合基準

相関係数 (r) : 0.99 以上

傾きの比 : 0.8~1.2 の範囲

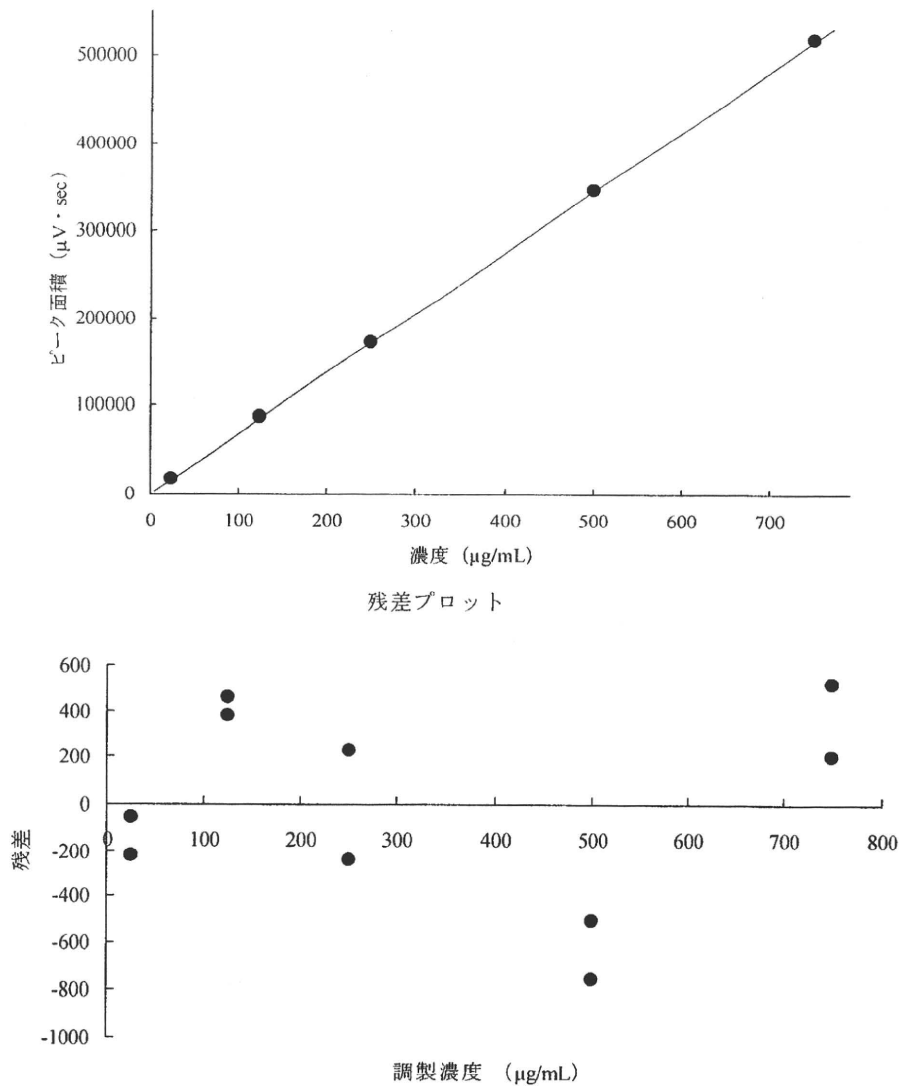


Figure 6 酢酸含量測定法における酢酸の直線性

Table 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

標準溶液 R-3 (調製濃度 : 250 µg/mL, 設定温度 ; 20°C)

測定時点	ピーク面積 (µV·sec)	平均値 (µV·sec)	安定性 (%)
分析開始時 (システムの再現性)	172694.1	172464.8	(100.0)
	172775.6		
	172236.7		
	172647.3		
	173905.0		
	170530.3		
24時間後	171084.2	171002.1	99.2
	170919.9		

試料溶液 (設定温度 ; 20°C)

測定時点	ピーク面積 (µV·sec)	平均値 (µV·sec)	安定性 (%)
分析開始時	310961.0	311060.5	(100.0)
	311159.9		
24時間後	307763.9	307445.6	98.8
	307127.3		

適合基準

安定性 : 100.0±10.0%以内

Table 9 酢酸含量測定法における酢酸の併行精度

	μg Acetate	% Acetate	Mean % Acetate	RSD(%)
1	891.52	0.1		
2	877.65	0.1		
3	891.11	0.1		
4	902.98	0.1	0.1	0.0
5	886.09	0.1		
6	885.25	0.1		

適合基準

RSD : 10.0%以下

試験計画書

表題： AcPepA (MPS-390) の特性及び安定性試験

試験番号： SBL861-003

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) の特性及び安定性試験

2. 試験目的

AcPepA (MPS-390) (Lot No. 2K09030) 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 2 月 4 日

分析実施日程

特性 : 2011 年 2 月 4 日～2011 年 2 月 10 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 : 2K09030
 分子量 : 1635.9
 入手日 : 2011年2月4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 1g 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 11.5 項の方法で PTC 誘導体化し、試料溶液 (AT1~AT3) とする。