

# 製剤総則の改正

## Key Points

川西 徹

国立医薬品食品衛生研究所 研究所長

- ① 50年ぶりともいえる製剤総則の全面改正を行った。
- ② 医療現場で汎用される製剤について、①投与経路および適用部位から大分類、②さらに製剤の形状、機能、特性から細分類した。
- ③ 分類された各製剤を定義するとともに、品質保証に必要な試験法、容器・包装、貯法などを示した。
- ④ この改正により医薬品製剤の全体像の把握が可能となるとともに、新規製剤の速やかな局方収載を可能とするフレームワークが完成した。

## はじめに

第十六改正日本薬局方(日局16)では第十五改正と比較して数多くの改正がなされている。そのなかでもっとも大きな改正ポイントの1つは、製剤総則の改正といえる。日本薬局方の製剤総則は医療現場で使用されている有用な製剤を合理的に分類、定義し、品質を保證するのに必要な試験法、容器・包装、貯法などを示すものである。日進月歩の医療技術のなかで製剤技術についても革新が著しいにもかかわらず、日本薬局方は法律に準じる公定規格基準書であり改正の影響が大きいため、製剤総則は個別の追加・訂正以外は本格的な整備をしないままに長時間が経過してきた。そこで7年にわたる検討期間を経て、第十六改正にあわせ全面改正を行った。

本稿では、改正理由、方針、その内容など

について概説する。

## 改正理由

日本薬局方では、製剤関連事項をまとめた独立した製剤総則の形をとったのは日局6に遡ることであるが、さらに日局7(1961年施行)において現在の製剤総則の基本形が完成した。日局7の製剤総則では、主要な製剤がアイウエオ順に分類され、定義、製法および品質管理に必要な試験、貯法などが記され、その後追加や部分的な改正はされたが、日局15の製剤総則に至るまでそのスタイルに大きな変更はなく引き継がれてきた。

このように50年近くにわたって日本薬局方製剤総則について大きな改正がなされなかった理由としては、「『個々の製剤を明瞭に区分できるように分類、定義する』という日局

の不文律があるため、製剤の定義が硬直的であり、新しい製剤の取り込みが困難であったこと、②製剤総則は日本国内を対象としたものであり、改正を行わなくても大きな支障は生じず、むしろ改正した場合に医薬品規制に影響が出ることがあげられる。しかし、近年新しい多種多様な製剤が医療現場で使用されるようになり、これら製剤を分類、定義し、品質管理の現場で参照、使用するには旧来の製剤総則は不十分なものとなっていた。例えば、エアゾール剤は外用、吸入、内服、空間噴霧など、噴出して用いる製剤すべてを含むが、これらの製剤では品質管理に必要とされる試験は、それぞれ異なる。また散剤と顆粒剤は粒子径の違いで分類されてきたが、その合理的理由は見当たらない。

そこで、製剤総則の意義：「医療の場で使用される製剤を合理的かつ適切に分類、定義し、品質を保証するために必要な試験法、貯法等を示す」に立ち返り、全面改正を行うこととした。改正作業は2004年3月に開始し、7年の歳月をかけて改正に至った。その間、医薬品医療機器総合機構（以下、機構）日本薬局方原案審議委員会を通じた関係者への意見聴取、そして機構ホームページを通じて2度の意見公募、厚生労働省ホームページを通じて1度の意見公募を行ってきた。

## 改正の基本方針

このたびの改正にあたっては、日局製剤総則の目的に照らし、以下の基本方針をたてた。

### ①臨床で汎用されている製剤の収載

改正理由に記したように、長年にわたって大きな改正を行わなかったため、臨床現場で汎用されている製剤でも、収載されていない製剤も少なくなかった。例えば口腔内崩壊錠、経口ゼリー剤、舌下錠などがあげられる。

### ②製剤の適切な分類と定義

製剤を適切に分類するとともに適切かつ簡潔に定義する。改正の規制への悪影響を抑えるため、収載製剤の定義は妥当なものについては日局16でも極力日局15を踏襲する。ただし、散剤、顆粒剤、軟膏剤については、合理性や国際的整合性に配慮し定義の変更を行う。

### ③製剤の機能の確保に必要な試験内容の充実

### ④製剤試験（および貯法）記載の整備

各製剤の品質確保に必要な基本的な試験を整理するとともに、製剤試験および貯法について記載整備を行う。

### ⑤国際調和への配慮

現在医薬品製剤の開発、製造、流通の国際化は著しい。国際間で製剤の規制上の取り扱いが異なると、医薬品の品質管理に混乱を招くので、国際的整合性への配慮は必須である。

## 日局16製剤総則における製剤の分類

製剤の分類基準は多種多様である。例えば形状からみると、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、液剤などに分類。製法でみると錠剤は素錠、糖衣錠などに分類できる。製剤機能を取り上げると、放出性から即放錠、腸溶錠、徐放剤などに、崩壊・分散性からは口腔内崩壊、発泡錠、分散錠などに分類できる。また作用からみると全身作用製剤、局所作用製剤に分類できる。このように個々の製剤をとりあげてみると、形状、機能特性の組合せでさまざまな分類が考えられる<sup>1)</sup>。

日局16製剤総則においては、製剤をまず投与経路および適用部位の別で大分類し、さらに製剤の形状、機能、特性から分類する方法を採用した。すなわち、投与経路や適用部位から製剤を分類してみると、品質管理上留意すべき点に共通点が多く、適用部位ごとの剤

形の把握が容易になると考えられた(図1)。この投与経路および適用部位による分類は、現在同様に改正を検討中である米国薬局方の製剤分類の考え方や、現在の欧州薬局方の分類方法とも共通するところである<sup>2, 3)</sup>。

次いで各々の大分類ごとにさらに形状などから主要な剤形を中分類し、規定した。例えば経口投与する製剤については錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤など主要な剤形への分類、あるいは含嗽剤や点鼻剤のような特殊な用途による剤形グループへの分類を行った。

さらに各々の中分類で規定された剤形について、必要に応じて特徴のある剤形を規定して小分類した。例えば錠剤では口腔内崩壊錠、チュアブル錠、発泡錠など特別な機能を有する剤形への分類、経口液剤ではエリキシル錠、懸濁錠、乳剤のように特定の処方・製法による製剤グループへの分類である。

以上の分類によって、日局15製剤総則で収載された剤形数は28であったのに対し、日局16製剤総則では71剤形となった(表1)。なお上記大中小三段の分類とは別に、製造方法や形態をもとにさらに分類されたものもあり、例えば錠剤の場合は素錠、フィルムコーティン

グ錠などへの分類。注射剤では凍結乾燥注射剤、粉末注射剤、充てん済みシリンジ剤、カートリッジ剤などへの分類が行われている。

## 日局16製剤総則の構成

日局15までは、まず「1. 製剤通則」として製剤全般の共通事項が記載され、2. 以下にアイウエオ順に製剤名およびその説明が列記されていた。日局16では日局15同様に〔1〕として「製剤通則」をまとめたが、〔2〕は「製剤各条」とし、大分類、中分類、小分類からなる剤形分類の順番にしたがって剤形およびその説明を列記する構成とした。各剤形の説明は剤形の定義、製法、製剤の特性、試験法、貯法からなるが、日局16収載の剤形の説明は、妥当なものは日局15の説明を極力踏襲することとした。なお、主として生薬を原料とする製剤である生薬関連製剤については、〔3〕生薬関連製剤各条としてまとめて記載することとした。

剤形の記載順序は、汎用性、重要性、性状、用途を基準に優先順位をつけた。すなわち、大分類では 経口投与製剤>注射剤>…>皮膚適用製剤の順、中分類では 固形剤>液剤>半

収載製剤の大分類	品質管理上の留意点
経口投与する製剤	→ 消化管内での溶出性
口腔内に適用する製剤	→ 口腔内での溶出性
注射により投与する製剤	→ 無菌、異物、発熱性物質
透析に用いる製剤	→ 微生物汚染
気管支・肺に適用する製剤	→ 粒子径、微生物汚染
目に投与する製剤	→ 無菌、異物
耳に投与する製剤	→ 微生物汚染
鼻に適用する製剤	→ 噴霧量
直腸に適用する製剤	→ 直腸内での溶融、溶解
経管に適用する製剤	→ 管内での溶融、溶解
皮膚などに適用する製剤	→ 皮膚吸収、刺激性
生薬関連製剤	→ 生薬成分の特殊性

図1 投与経路および適用部位の別により大分類された製剤において、品質管理上留意すべき点

表1 日局16製剤総則において製剤各条にあげた製剤の分類

【2】製剤各条		6. 目に投与する製剤	6-1. 点眼剤	
1. 経口投与する製剤	1-1. 錠剤	6-2. 散粒製剤		
	1-1-1. 口腔内崩壊錠	7. 耳に投与する製剤	7-1. 点耳剤	
	1-1-2. チュアブル錠	8. 鼻に適用する製剤	8-1. 点鼻剤	
	1-1-3. 発泡錠		8-1-1. 点鼻粉末剤	
	1-1-4. 分散錠	8-1-2. 点鼻液剤		
	1-1-5. 崩解錠	9. 歯槽に適用する製剤	9-1. 坐剤	
	1-2. カプセル剤		9-2. 遠隔用半固形剤	
	1-3. 顆粒剤		9-3. 注腸剤	
	1-3-1. 発泡顆粒剤	10. 腔に適用する製剤	10-1. 屋錠	
	1-4. 散剤		10-2. 座用坐剤	
	1-5. 経口液剤	11. 皮膚等に適用する製剤	11-1. 外用固形剤	
	1-5-1. エリキシル剤		11-1-1. 外用散剤	
	1-5-2. 懸濁剤		11-2. 外用液剤	
	1-5-3. 乳剤		11-1-1. リニメント剤	
	1-5-4. リモナーテ剤		11-1-2. ローション剤	
	1-6. シロップ剤		11-3. スプレー剤	
	1-6-1. シロップ用剤		11-3-1. 外用エアゾール剤	
	1-7. 経口ゼリー剤		11-3-2. ホンプスプレー剤	
	2. 口腔内に適用する製剤		2-1. 口腔用錠剤	11-4. 軟膏剤
			2-1-1. トローチ剤	11-5. クリーム剤
2-1-2. 舌下錠			11-6. ゲル剤	
2-1-3. バックル錠		11-7. 貼付剤		
2-1-4. 付着錠		11-7-1. テープ剤		
2-1-5. ガム剤	11-7-2. パップ剤			
2-2. 口腔用スプレー剤	【3】生薬関連製剤各条			
2-3. 口腔用半固形剤	1. エキス剤			
2-4. 含漱剤	2. 丸剤			
3. 注射により投与する製剤	3-1. 注射剤	3. 酒精剤		
	3-1-1. 輸液剤	4. 浸剤・煎剤		
	3-1-2. 埋め込み注射剤	5. 茶剤		
4. 透析に用いる製剤	3-1-3. 持続性注射剤	6. チンキ剤		
	4-1. 透析用剤	7. 芳香水剤		
5. 気管支・鼻に適用する製剤	4-1-1. 腹膜透析用剤	B. 流エキス剤		
	4-1-2. 血液透析用剤	大分類の製剤はゴシック文字、中分類の製剤は斜体ゴシック文字で、小分類の製剤は明朝体文字で記している。また灰色の背景色の製剤は日局16で新規に収載された製剤を表す。		
	5-1. 吸入剤			
	5-1-1. 吸入粉末剤			
5-1-2. 吸入液剤				
5-1-3. 吸入エアゾール剤				

固形剤>…>用途別の順、小分類では 口腔内崩壊錠>チュアブル錠>発泡錠>分散錠の順に収載した。

各剤形の試験法については、原則として日局一般試験法の記載順序に従った。

## 製剤通則

製剤通則は製剤全般に共通する事項を記載するものであるが、日局15の7項に比して日局16では11項となった。

(2)は剤形の分類法についての説明であるが、追加的に(3)において「製剤各条には一般に使用されている剤形を示したが、それら以外にも適切なものであれば日局の剤形とすることができる」と注釈されている。例えば、投与経路と製剤各条の剤形を組み合わせる新たな剤形とすることができる。なお、各条の剤形名であるが、同じ剤形が複数の投与経路に使用される場合、主たる投与経路の剤形名には投与経路を付していない。例えば、内用カプセル剤、内用散剤についてはいずれもカプセル剤、散剤を剤形名としている。

(4)は製剤各条では、剤形に応じて製剤特性が規定され、この製剤特性については「適切な試験」により確認するべきであることを記したものである。これら試験については本来局方のなかで一般試験法として設定されていることが望ましいが、製品ごとに個別な対応が必要な製剤特性、あるいは一般試験法を設定するには時期尚早な製剤特性もあり、そのような場合は製剤各条では「本剤は、適切な〇〇特性を有する」という表現にとどめている。いずれにせよ、日局一般試験法の設定が可能となった時点で試験法の整備をはかるべきである。

(8)は非無菌製剤であっても、微生物による汚染や増殖を避けて、製剤を製造、保管す

ることの重要性を示し、必要に応じて、微生物限度試験を適用すべきことを示した。微生物限度試験を適用すべきケースについては、製剤が微生物に汚染されるリスク、微生物汚染の人体に与える影響を考慮して判断すべきである。

(9)は製剤均一性試験法のうち含量均一性試験および溶出試験法については、生薬成分は適用除外とすることを記したものである。この規定は従来別途当局からの通知で示されていたが、日局16では製剤通則に書き込まれた。一方、一般用医薬品に関する適用除外については、従来同様に通知で示される。

(10)は容器・包装に関する記述であるが、「製剤の容器・包装は、製剤の品質確保とともに、適正な使用および投与時の安全確保に適したものとす」とされている。日局15までは各剤形の各条に一律の貯法が記されてきた。しかし製剤の安定性は処方や製法が違えば異なるので、一律の規定は合理的ではない。したがって日局16では各条の貯法の記載は「通例、〇〇容器とする」としたうえ、例えば「製品の品質に湿気が影響を与える場合は、防湿性の容器を用いる」のように容器の選択の条件を具体的に示すこととした。

## 製剤各条

### 1 製剤各条一般

製剤各条には、製剤を剤形分類順に記載し、その定義、製法、試験法、容器包装および貯法を示している。ただし、各条に記された試験法および容器・包装に関する記述は基本的な要求事項であり、また、製法は一般的な製法を示したものである。添加剤についての記述は最小限のものである。したがって、個別の製品においてはそれ以外の要求事項もあり得るし、また製法が製剤通則の製法と異なる

ことも十分にあり得ることである。

## 2 製剤の定義の変更

### ㊦ 散剤と顆粒剤

日局15製剤総則までは、散剤、顆粒剤は粒度に基づいて分類されてきた。この分類は日本薬局方独自のものであり、欧米では製剤粒子の結合状態の強弱によって散剤、顆粒剤の分類が行われている。粒度による分類は3つの製剤を明瞭に区別できるという利点を有するものの、造粒された顆粒でも粒径が小さいものは散剤に分類されてきた。経口投与製剤では、吸収速度に直結する溶出性が品質管理上重要であるが、造粒された製剤では崩壊過程が溶出の律速段階となる場合もある。一方、造粒されていない散剤では粒径が溶出性と密接に関係する。このように①粒度は分類には都合がよいが、品質管理上では粒度で分類する合理性はない。②造粒の有無によって製剤の溶出の律速が異なる場合があり、品質管理上では造粒の有無で分類の方が合理的。③欧米との整合性を図ることは重要という理由から、日局16では製造工程における造粒の有無で、散剤と顆粒剤を分類することとした。

また細粒剤は日局15では比較的大きな粒径にそろった散剤という位置づけであり、欧米にはない剤形である。これら細粒剤は造粒工程を経て製造されており、日局16では、日局15細粒に規定されたのと同様の粒度規定を満たす(ただし、日局16細粒剤は日局15細粒に比較して粒度の下限は緩い)顆粒剤として分類することとした。

以上の定義の変更により、粒径が小さいため日局15では散剤に分類された造粒製剤は日局16では「細粒剤」あるいは「顆粒剤」に分類されることになり、販売名の変更が必要となる。しかし名称の変更は長年医療現場へ浸透してきた製品においては、販売面への影響や

安全性などのモニタリングに影響を及ぼすことから、顆粒剤の項(6)に「本剤のうち、微粒状に造粒したものを散剤と称することができる」を追記することとした。ただし、この項の追加は、既存の製品について当面名称変更の措置をとらなくてよいこととすることが意図であり、今後、新たに申請される造粒製剤の場合は、顆粒剤または細粒剤と称すべきと考える。

### ㊧ 軟膏剤とクリーム剤

日局15までは軟膏剤は「通例、適切な稠度の全体を均質な半固形状に製した、皮膚に塗布する外用剤」と定義され、一方クリーム剤は「軟膏剤のうち、通例、乳化した基剤を用いたものをクリームと称することができる」とされ、軟膏剤の一部と定義されてきた。しかし臨床上では軟膏剤とクリーム剤とはしばしば使い分けられており、調剤指針<sup>4)</sup>にも「商品名から基剤を判断すると誤解を生じたり、あるいは基剤を想定できない場合があり注意が必要」とある。また「局所皮膚適用製剤の後発医薬品のための生物学的同等性試験ガイドライン」<sup>5)</sup>などにおいても異なる製剤として扱われ、規制上でも扱いは異なる。そこで日局16では水中油型または油中水型に乳化した半固形状の皮膚に塗布する製剤をクリーム剤とし、軟膏剤とは独立した製剤とした。すなわち、軟膏剤は「皮膚に塗布する、有効成分を基剤に溶解又は分散させた半固形の製剤である」とし、クリーム剤は「皮膚に塗布する、水中油型又は油中水型に乳化した半固形の製剤である」とした。またクリーム剤のなかで水中油型または油中水型クリーム剤は、通常、水性または油性クリーム剤と呼ばれることが多いが、両者を名称で簡単に区別するため、油性クリーム剤にのみ「油性クリーム」を称することができることとした。

日局16における以上の定義の変更により、

従来散剤と称されてきた造粒散剤同様に、一部軟膏剤に名称変更の必要性が生じたこととなった。そこで対策として、販売名については、乳化しているもので「〇〇軟膏」としているものは「〇〇軟膏」と称してよい旨を当局からの通知で示すこととなった。また、局方各条収載のうちで、乳化している軟膏剤である「親水軟膏」は「親水クリーム」、「吸水軟膏」は「吸水クリーム」と名称が変更されたが、「親水軟膏」および「吸水軟膏」の名称も別名として残すこととした。

### 3 その他

#### ㉑ 経口投与製剤と口腔内適用製剤

いずれも口から投与する製剤であるが、経口投与製剤は消化管内で薬物が吸収される製剤であるのに対し、口腔内適用製剤は口腔内で薬物が吸収される製剤である。したがって放出性(溶出性)の条件などに大きな違いがあり、品質管理に用いる試験あるいはその条件は異なる。したがって別製剤として分類することとした。

#### ㉒ 口腔内崩壊錠

口腔内崩壊錠の利点として「水なしでも服用できる」ということがあげられ、その利点を記載すべきという意見も寄せられた。しかし水なしの服用は窒息事故の危険性も伴うため、口腔内崩壊錠であっても水を用いて服用することが望ましい。したがって「水なしでも服用可」とは記載しなかった。

#### ㉓ 経口ゼリー剤とゲル状の経口服液剤

ゼリーは弾性のある一様な分散体で、水分を非常に多く含むものであり、容器から取り出した時にその形が保たれているものである。そこで経口ゼリー剤は「流動性のない成形したゲル状の製剤」と規定した。一方、経口服液剤にも高分子増粘剤が添加されるゲル状の製剤があるが、このような製剤を含むように経

口服液剤は「液状又は流動性のある粘稠なゲル状の製剤である」と規定した。すなわち経口ゼリー剤とゲル状の経口服液剤は流動性の有無で区別した。製剤試験としては、経口ゼリー剤の場合は溶出試験または崩壊試験の適用が求められる。

#### ㉔ 経皮吸収型製剤

経皮吸収型製剤は、日局15で1つの剤形として追加された。しかし、経皮吸収型製剤は、有効成分を全身循環血流に送達することを目的とした皮膚適用製剤の総称であり、1つの剤形として分類することは難しい。そこで日局16では、剤形として独立させず、11.皮膚などに適用する製剤の項の(1)に、その定義を記載するとともに、その放出速度について「経皮吸収型製剤からの有効成分の放出速度は、通例、適切に調節される」と言及した。

#### ㉕ 生薬関連製剤

丸剤、酒精剤、芳香剤は既存製品のほとんどが生薬を有効成分として含有する製剤であるので生薬関連製剤に分類した。また、現在でも使用されているということを利用して茶剤を復活させた。

## 製剤総則改正後の課題

日本薬局方は医療用医薬品、一般用医薬品、生薬含有製剤、薬局製剤、院内製剤すべてを対象としている。したがって、このたびの製剤総則改正はきわめて大きな改訂であり、製薬企業、医療関係者、関連研究機関などへの周知を図ることが重要である。また各条収載製剤についても、総則改正にあわせて、記載の整備を徹底することが必要である。

また大きな課題としては、一般試験法に記載のない製剤特性の試験法の設定がある。現在「適切な〇〇性を有する」としてある製剤特性(表2)について、可能なものから一般試験

表2 製剤各条において「本剤は、適切な○○特性を有する」とされた製剤特性のリスト

日局一般試験法に設定されていない試験法
・崩壊性、溶出性：口腔内崩壊錠、口腔用錠剤
・噴霧量の均一性*：口腔用スプレー剤、吸入粉末剤、吸入エアゾール剤、点鼻剤、スプレー剤
・放出性：(1)埋め込み注射剤、持続性注射剤(放出性)；(2)座剤、陰錠、腔用坐剤、貼付剤** (放出特性)；(3)経皮吸収製剤** (放出速度)
・粘性：口腔用半固形剤、軟膏剤、直腸用半固形剤、軟膏剤、クリーム剤、ゲル剤
・粘着性：貼付剤

\* 処方国際調和候補として取り上げられており、比較的早い段階で一般試験法の設定が可能と思われる製剤特性  
 \*\* 欧米の薬局方に収載されている一般試験法の導入が容易と考えられる製剤特性

法の整備が必要である。このなかには国際調和で取り上げられている試験法などがあり、近々に整備が可能と考えられる。

このたびの製剤総則改正の方針の1つは「国際的整合性」にあった。製剤の分類および定義、製剤試験内容については、欧米の動向をみながら改正を行った。しかし一方で欧米の薬局方も改正の議論を行っているところである。したがって、日本薬局方としても改正内容に関する情報発信を積極的に行い、欧米薬局方と齟齬ができないように注意を払う必要がある。

さらに、将来にわたっての課題としては、今後も医療現場において導入され標準的に用いられるようになった新規製剤については、速やかに製剤各条へ収載するよう、フォローアップが重要である。

## おわりに

このたびの製剤総則改正は、半世紀ぶりともいえる大改正であった。

改正製剤総則では、臨床で標準的に使用されている製剤をほぼ網羅するとともに、投与部位および適用部位を大分類し、製剤の形状や特性などによりさらに細分類した。この改正により、医薬品製剤の全体像の把握が可能

になり、医療関係者の医薬品製剤の教育用テキストとして使用することもできよう。そのうえで、各製剤の品質管理に必要な基本的な要件(製剤試験、容器・包装、貯法など)を整備したことにより、医薬品品質管理のテキストとしても使用できると思われる。

大きな改正のため、残された課題も少なくないが、日局16製剤総則の何よりの成果は、今後臨床現場に導入される製剤についても、速やかに収載を可能とする柔軟性のあるフレームワークの完成にあると考えている。

## 謝辞

本稿は日本薬局方原案審議委員会製剤委員会の前座長青柳伸男博士をはじめとした委員の皆様、および事務局の皆様、さらにはコメントを寄せていただきました皆様との長年にわたる討論をもとに書かれたものであり、関係された数多くの皆様へ深く感謝の意を表します。

## 文献

- 1) 青柳伸男：日本薬局方製剤総則：全面改正の考え方。医薬品研究, 39 (11)：741-759, 2008.
- 2) 〈1151〉 Pharmaceutical Dosage Forms, *Pharmaceutical Forum*, 35 (5) 1260-1310, 2009.
- 3) DOSAGE FORMS, *European Pharmacopoeia* 6.0, p. 715-753, 2008.
- 4) 日本薬剤師会：調剤指針, 第12改訂, 薬事日報社, 東京, 2006.
- 5) 平成18年11月24日薬食審発第1124004号

## 製剤試験法

### Key Points

川西 徹

国立医薬品食品衛生研究所 副所長

- ◎ 日局16一般試験法製剤試験では国際調和試験法として日局15に取り込まれた試験法を中心に、部分的な改正が行われた。
- ◎ 多くは、日局15国際調和試験法についてその後の実態に即した修正、国際調和試験法の各局方への取り込みの際に生じた問題の修正である。
- ◎ その他、製剤総則大改正、水各条の改正に伴う記載整備がある。

### はじめに

第十五改正日本薬局方(日局15)では製剤に関する一般試験法のなかで、製剤均一性試験法、注射剤の採取容量試験法、注射剤の不溶性微粒子試験法、崩壊試験法、溶出試験法について、国際調和試験法の取り込みが行われた。日局16では新たな国際調和試験法の取載はなく、また新規試験法の取載もなかった。一方、国際調和案の各局方への取り込みの確認作業のなかで、問題点などが見付き、部分的改正がなされたほか、製剤総則の大改正、および水各条の改正に伴う記載整備のための改正がなされた。以下、試験法別に解説する。

### 眼軟膏剤の金属異物試験法

眼軟膏剤の金属異物試験は製剤総則中の眼軟膏剤の金属性異物を試験する試験法である。日局15においては、判定基準は製剤総則の眼

軟膏剤各条中に記されていた。しかし、日局15第一追補以降、以下の判定基準は一般試験法の眼軟膏剤の金属異物試験法中の「3. 判定」の項に記すこととした。

「本剤10個の50 $\mu$ m以上の金属性異物の合計数は50個以下であり、かつ個々の平底ベトリ皿のうち金属性異物が8個を超えるものが1枚以下のときは適合とする。これに適合しないときは、更に20個について同様に試験し、本剤30個の金属性異物の合計が150個以下であり、かつ個々の平底ベトリ皿のうち金属性異物が8個を超えるものが3枚以下のときは適合とする。」

### 製剤の粒度の試験法

日局15製剤総則では、顆粒剤と散剤は粒子径の違いで分類されていた。しかし日局16製剤総則は大改正され、粒子径による分類ではなく、造粒工程の有無により顆粒剤と散剤と

を分類することとした。ただし、顆粒剤のなかで、細粒および散と称してよい製剤については、粒子径で区別することとした。したがって、この判定に用いる粒度試験を除いて、試験法の記述は削除された。

### 注射剤の不溶性微粒子試験法

注射剤の不溶性微粒子試験は、混入してはならない不溶性微粒子を試験する方法であり、日局15で国際調和試験法に大改正された。その後国際調和試験法の取り込みについての確認作業において、日局15について国際調和試験法を十分反映していないという指摘が欧州薬局方からなされ、以下の2点について、国際調和試験法をより直接的に反映させた記載に改正した。

- (1) 日局15の導入部分は、従来の日局一般試験法の記載にあわせて試験法の目的を述べる一文で始まっている。一方国際調和試験法では、不溶性微粒子の定義に始まっている。そこで、日局16では国際調和を尊重するために、国際調和試験法の記載にしたがって以下の通りの導入文に改正した：「注射剤(輸液剤を含む)の不溶性微粒子とは、これら製剤中に意図することなく混入した、気泡でない容易に動く外来性、不溶性の微粒子である。」
- (2) 国際調和試験法では、微粒子試験用水をフィルター水と表現している。一方日局15では「微粒子試験用水」を試薬で定義し、不溶性微粒子数を規定した精製水としていた。日局16では、国際調和を考慮して、微粒子試験用水を「孔径 $0.45\mu\text{m}$ 以下のメンブランフィルターを通した水で、自動微粒子装置を用いて測定した不溶性微粒子数は、 $10\text{mL}$ 当たり $10\mu\text{m}$ 以上のもの5個以下、 $25\mu\text{m}$ 以上のもの2個以下である」

とした。

以上のほか、第2法顕微鏡粒子計測法の一般注意事項における微粒子試験用精製水の確認の部分が、日局15では編集上のミスで誤記載されていることがわかり、日局16では国際調和試験法に沿った記載に改めた。

### 点眼剤の不溶性微粒子試験法

点眼剤の不溶性微粒子試験は、製剤総則中の点眼剤の不溶性微粒子の大きさおよび数を試験する試験法である。日局15においては、点眼剤の不溶性微粒子試験法の判定基準は製剤総則の点眼剤各条中に記されていた。しかし、日局16局では以下の判定基準は一般試験法の点眼剤の不溶性微粒子試験法中の「3. 判定」の項に記すこととした。

「本剤 $1\text{mL}$ 中の個数に換算するとき、 $300\mu\text{m}$ 以上の不溶性微粒子が1個以下であるときは適合とする。」

### 崩壊試験法

崩壊試験は錠剤、カプセル剤、顆粒剤などにおいて試験液中に定められた条件で規定時間内に崩壊するかどうかを確認する試験である。この試験に用いる試験器の補助板のサイズの記述について、装置の実態にあわせて、「台形の平行線の下端部は長さ $1.6\pm 0.1\text{mm}$ で円周部からの深さ $1.6\pm 0.1\text{mm}$ の位置にあり」を「台形の平行線の下端部は長さ $1.6\pm 0.1\text{mm}$ で円周部からの深さ $1.5\sim 1.8\text{mm}$ の位置にあり」に改正した。この改正にあわせて、崩壊試験装置(図1)も改正した。

### 溶出試験法

溶出試験は経口製剤の吸収速度に密接に関

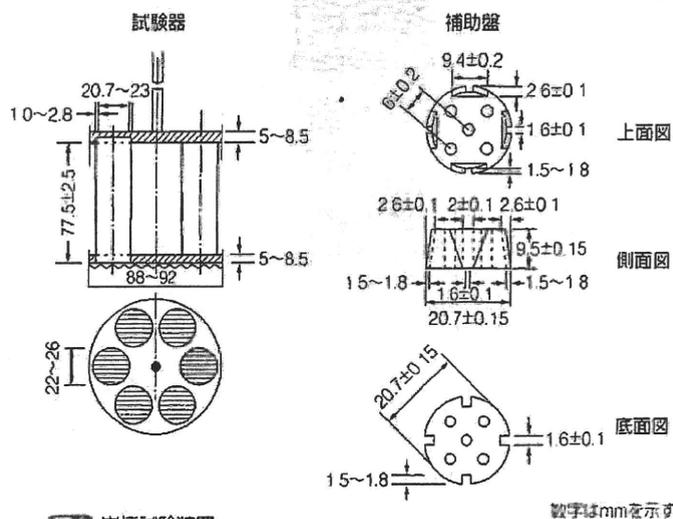


図1 崩壊試験装置

係する品質特性である溶出性を試験し、これら医薬品の製品の一定性確保のために行う試験法であるが、日本薬局方では併せて著しい生物学的非同等性を防ぐことも目的とした試験とされている。溶出試験法は日局15で国際調和され大きく改正されたが、日局16では以下の点について、部分的な改正が行われた。

### 1 バドル法で用いるシンカー

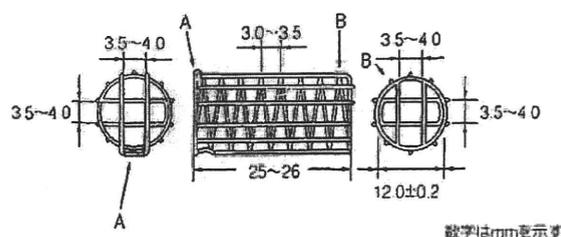
バドル法はわが国では溶出試験で標準的に使用されている方法であり、ベッセル中の溶出試験液に攪拌翼と回転軸からなるバドルを入れ、回転翼を回転し攪拌、試料から溶出試験液に溶出してくる有効成分を測定する方法である。その際、錠剤などの試料が浮く場合は、らせん状に数回巻いた針金のような科学的に不活性な材質でできた小型の締め付けないシンカーを試料に取り付けることができる。日局15ではわが国で使用されてきたシンカーのみでなく種々のシンカーが使用可能となった。しかし溶出試験結果はシンカーの形状により影響を受けるので、日局16では従来のシ

ンカーと異なるものを用いる場合は、その形状などを記載することとして、「また、それら以外のバリデートされたシンカーを用いることもできる。シンカーを使用することが規定されている場合、シンカーは別に規定する」という一文を挿入する改正を行った。ただしこの改正部分は日局16独自の記載であり不調和部分である。

なお日局15のシンカーの仕様例の図(図2)は、らせん状の針金は5巻きでありピッチが3.0~3.5mmであるにもかかわらず、全長が25~26mmとされ、製造が不可能な例であったため、日局16では7巻半の例に図が改められた。

### 2 フロースローセル法の脈流

フロースローセル法は、送液用ポンプで試験液をフロースローセルに送液し、セル中の試料から溶出する有効成分を測定する方法である。用いるポンプについては、日局15では「定流量(表示流量の±5%)で送液でき、脈流の波形は $120 \pm 10$ パルスの正弦型でなけ



A: 耐酸時計金の留め金  
B: 耐酸時計金の支柱

図2 シンカーの仕様例

ればならない。ただし、脈流が生じない送液用ポンプを用いてもよい」とのみ説明されていたが、日局16では、試験条件の一定性確保を明確にするため、さらに「フロールーセル法による溶出試験では、送液速度と、脈流の有無が規定されなければならない」と追加した。

### 3 試験液の計量

「操作 回転バスケット法及びパドル法 即放性製剤」の試験液について、「規定された容量は、20~25℃での計量値に相当する」を追加した。この追加部分は、国際調和試験法にはもともとあった記述であるが、試験液はしばしば加熱脱気され、試験液の体積を20℃で計量することは困難であり、多くの場合は、加熱した試験液をメスシリンダーで計量している状況に混乱を起こす可能性があったので、日局15取り込み時に削除した。しかし、その後ICH Q4Bで規制当局による受入の検討の過程で、追加することとした。ただし、この追加部分は、20~25℃で試験液の体積を測定することを意図しているのではなく、例えば、従来通りメスシリンダーで計量し温度換算などの換算を行うような操作でもよい。

### 点眼剤の不溶性異物検査法

日局15においては、点眼剤の不溶性異物検査法の判定基準は製剤総則の点眼剤各条中に記されていた。しかし、日局16局では以下の判定基準は一般試験法の点眼剤の不溶性異物検査法中の「3. 判定」の項に記すこととした。

「澄明で、たやすく検出される不溶性異物を認めない。」

### おわりに

既存の製剤試験法については、主立った試験については米国薬局方と欧州薬局方との国際調和はなされたが、各局とも長い歴史をもった試験法であるため、いまだ非調和部分を含むものも少なくない。したがって今後も部分的な改正がなされ、その改正を日局に取り込む改正が続くことが予想される。また、製剤吸入試験関係の新たな試験法の調和が続いており、近々にこれら調和試験法が記載されるものと思われる。さらに、日局16製剤総則には、一般試験法にはまだない、「適切な〇〇性」と表現された確認すべき製剤特性があげられている。これらの試験については、今後試験法の設定が望まれるところである。

# Hyphenated Technique for Releasing and MALDI MS Analysis of O-Glycans in Mucin-Type Glycoprotein Samples

Keita Yamada,<sup>†</sup> Satomi Hyodo,<sup>†</sup> Mitsuhiro Kinoshita,<sup>†</sup> Takao Hayakawa,<sup>‡</sup> and Kazuaki Kakehi<sup>\*†</sup>

School of Pharmacy and Pharmaceutical Research and Technology, Kinki University

We developed an automatic apparatus for the release of O-glycans from mucin-type glycoproteins and proteoglycans (Matsuno, Y.-k.; Yamada, K.; Tanabe, A.; Kinoshita, M.; Maruyama, S.-z.; Osaka, Y.-s.; Masuko, T.; Kakehi, K. *Anal. Biochem.* 2007, 363, 245–257. Yamada, K.; Hyodo, S.; Matsuno, Y. K.; Kinoshita, M.; Maruyama, S. Z.; Osaka, Y. S.; Casal, E.; Lee, Y. C.; Kakehi, K. *Anal. Biochem.* 2007, 371, 52–61). The method allows rapid release of O-glycans as the reducing form within 10 min. In the present study, we connected the device to a MALDI-TOF MS spotter and achieved routine analysis of O-glycans in biological samples for clinical use after *in situ* derivatization of the released O-glycans with phenylhydrazine. We applied the method to the analysis of O-glycans expressed on MKN45 cells derived from human stomach cancer cells and found that MKN45 cells expressed characteristic trisialo-poly-lactosamine-type glycans as reported previously (Yamada, K.; Kinoshita, M.; Hayakawa, T.; Nakaya, S.; Kakehi, K. *J. Proteome Res.* 2009, 8, 521–537). We also applied the method to the analysis of O-glycans in serum samples. The present technique is the first attempt to use MS measurement for routine clinical diagnostic works.

The O-linked glycans (O-glycans) in glycoproteins are covalently linked to Ser/Thr residues of the core protein through *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) at their reducing ends. These glycans are often called as mucin-type glycans due to their predominant presence in tracheas and mucin secretory glands such as salivary glands. Currently, there are eight known core structures for O-glycans,<sup>1</sup> and a number of research works reported the aberrant glycan patterns in relation to the development and metastasis of malignancy.<sup>2–4</sup> Recently, Lebrilla and co-workers studied O-glycosylations in epithelial ovarian cancer cells

and serum samples of breast cancer patients and proposed the use of O-glycans as clinical markers.<sup>5,6</sup>

Because various types of O-glycans are linked to the repeating Ser/Thr residues of Ser/Thr/Pro rich tandem repeating units of the core protein, direct analysis of the glycopeptides is difficult even if using the most newly developed analytical techniques such as mass spectrometry. Therefore, we have to release carbohydrate chains from the core proteins prior to the analysis. Various approaches to release glycans from the polypeptide backbone through the enzymatic or chemical procedures have been developed but have been a big challenge in the case of the analysis of O-glycans using a minute amount of glycoproteins.<sup>1</sup>

*N*-Glycanases (*N*-glycoamidases), the enzymes providing facile cleavage of asparagine-linked glycans (*N*-glycans), are revolutionary in the analysis of *N*-glycans.<sup>7</sup> In contrast, there is no enzyme which is capable of releasing a wide range of O-glycans from the core protein.<sup>8</sup> Therefore, we usually release O-glycans from the core proteins by chemical methods, typically by  $\beta$ -elimination with alkali in the presence of sodium borohydride or mild hydrazinolysis.<sup>9,10</sup>

*N*-Acetylgalactosamine (GalNAc) residues at the reducing end of mucin-type O-glycans are attached to Ser/Thr residues of mucin-type glycoproteins. To release the O-glycans, we usually use the alkali solution under mild conditions. However, if the GalNAc residues at the reducing end of the released glycans are substituted at the C-3 position, further degradation (i.e., peeling) tends to proceed. This is the most critical problem in the analysis of mucin-type O-glycans. Alkali-catalyzed  $\beta$ -elimination in the presence of sodium borohydride under mild conditions to prevent the “peeling” reaction is still the most common method for routine analysis of O-glycans,<sup>11–13</sup> and the method affords O-glycans as the reduced form (i.e., alditols). Consequently, the hemiacetal group at the reducing terminal is no longer available for chemical modification with fluorescent or UV-absorbing tags for their sensitive and high-resolution analysis. Royle and co-workers

\* To whom correspondence should be addressed. Kowakae 3-4-1, Higashi-Osaka, 577-8502 Japan. Phone: +80-6-6721-2332. Fax: +80-6-6721-2353. E-mail: k\_kakehi@phar.kindai.ac.jp.

<sup>†</sup> School of Pharmacy.

<sup>‡</sup> Pharmaceutical Research and Technology.

(1) Mechref, Y.; Novotny, M. V. *Chem. Rev.* 2002, 102, 321–369.

(2) Fuster, M. M.; Esko, J. D. *Nat. Rev. Cancer* 2005, 5, 526–542.

(3) Jensen, P. H.; Kolarich, D.; Packer, N. H. *FEBS J.* 2010, 277, 81–94.

(4) An, H. J.; Kronewitter, S. R.; De Leo, M. L.; Lebrilla, C. B. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2009, 13, 601–607.

(5) Leiserowitz, G. S.; Lebrilla, C.; Miyamoto, S.; An, H. J.; Duong, H.; Kirmiz, C.; Li, B.; Liu, H.; Lam, K. S. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2007.

(6) Kirmiz, C.; Li, B.; An, H. J.; Clowers, B. H.; Chew, H. K.; Lam, K. S.; Ferrige, A.; Alecio, R.; Borowsky, A. D.; Sulaimon, S.; Lebrilla, C. B.; Miyamoto, S. *Mol. Cell. Proteomics* 2007, 6, 43–55.

(7) Takahashi, N. In *Handbook of Endoglycosidases and Glycoamidases*; Takahashi, N., Muramatsu, T., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1992; p 183.

(8) Umemoto, J.; Bhavanandan, V. P.; Davidson, E. A. *J. Biol. Chem.* 1977, 252, 8609–8614.

(9) Merry, A. H.; Neville, D. C.; Royle, L.; Matthews, B.; Harvey, D. J.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M. *Anal. Biochem.* 2002, 304, 91–99.

(10) Cancilla, M. T.; Penn, S. G.; Lebrilla, C. B. *Anal. Chem.* 1998, 70, 663–672.

employed mild hydrazinolysis to afford O-glycans from microgram quantities of glycoproteins, although a relatively lengthy time (~6 h) and the need for reacylation of de-N-acetylated groups make it unsuitable for rapid analysis of multiple samples.<sup>9</sup> Karlsson and Packer reported an in-line flow releasing system employing alkaline  $\beta$ -elimination to release the reducing O-glycans from the core protein immobilized on the column, but this method also requires a long reaction time (16 h).<sup>14</sup> Huang et al. developed a method for releasing O-glycans in the presence of ammonia and successfully analyzed O-glycans from fetuin.<sup>15</sup> The method allowed simultaneous determination of both N- and O-glycans.

Recently, we developed an automatic O-glycan releasing apparatus for the release of O-glycans from mucin-type glycoproteins and proteoglycans and named the system "AutoGlycoCutter" (AGC).<sup>16–19</sup> Alkali-induced degradation of oligosaccharides (i.e., peeling reaction) has been a big problem during the alkali-catalyzed release of mucin-type glycans from the core peptides.<sup>20</sup> Use of the automatic device and optimization of experimental parameters dramatically improved the efficiency in the release of O-glycans in mucin-type glycoproteins. We successfully applied the device to the analysis of O-glycans from some leukemia and epithelial cancer cells and achieved identification of more than 80 O-glycans. Also, we found that poly-lactosamine-type O-glycans having larger molecular size than 6000 were present in a stomach cancer cell line (MKN 45 cells).<sup>18</sup> We suggested that these poly-lactosamine-type O-glycans might be a marker molecule of a stomach tumor.

However, to realize the O-glycan analysis in diagnostic works for the clinical purpose, we have to develop a full automatic machine from the releasing of O-glycans in biological samples to the analysis of glycan profiles. In the present study, we attempted hyphenation of the autoglycan releasing system with a sample spotter machine for the MALDI MS apparatus.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Materials and Equipment.** Bovine submaxillary mucin (BSM) was obtained from Sigma-Aldrich Japan (Shinagawa-ku, Tokyo, Japan). Phenylhydrazine and 2-aminobenzoic acid (2AA) for labeling of glycans were obtained from Tokyo Kasei Kogyo (Chuo-ku, Tokyo, Japan). 2,5-Dihydroxy benzoic acid (DHB) as the matrix material for MALDI MS measurement and Triton-X100 were also from Sigma-Aldrich Japan. Pronase (*Streptomyces griseus*) was obtained from Calbiochem (San Diego, CA). The protein inhibitor cocktail for animal cells was obtained from Nacalai

Tesque (Nakagyo-ku, Kyoto, Japan). Ultrapure water by a Milli-Q water system (Millipore, Bedford, MA) was used. Other reagents and solvents were of the highest grade commercially available or HPLC grade.

MALDI-TOF MS spectra of O-glycans were acquired on a MALDI-QIT TOF mass spectrometer (AXIMA-QIT, Shimadzu, Kyoto, Japan). The instrument was operated in the positive-ion mode throughout the work, and acquisition and data processing were controlled by Launchpad software (Kratos Analytical, Manchester, U.K.). For collision-induced dissociation, argon gas was used as the collision gas.

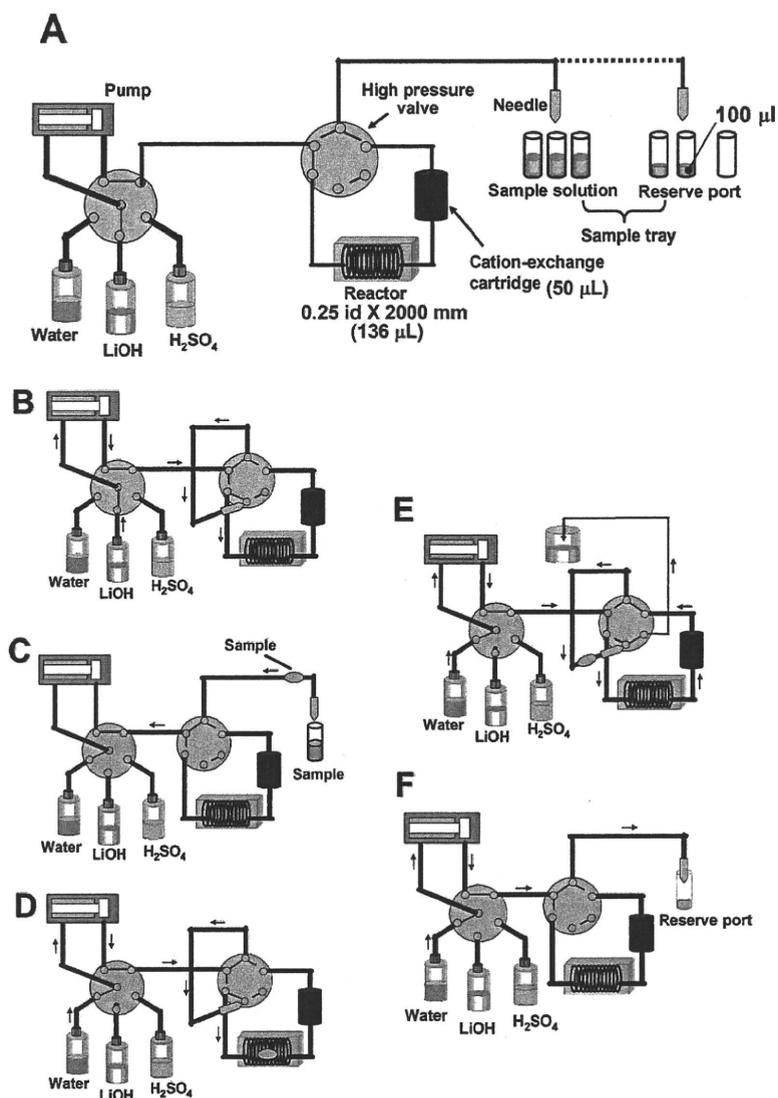
**Cell Culture.** In the present study, we used MKN45 cells (human gastric adenocarcinoma cell line). The cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum and 1% (v/v) penicillin–streptomycin mixed solution (10 000 u penicillin and 10 mg of streptomycin/mL, Nacalai Tesque). Fetal calf serum was previously kept at 56 °C for 30 min. The cells were cultured at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and harvested at 80% confluent state. Collected cells ( $1 \times 10^7$  cells) were washed with phosphate buffered saline (PBS) and collected by centrifugation at 800g for 20 min.

**Glycopeptide Pool from the Whole Cells.** Cancer cells ( $2.0 \times 10^7$  cells) were suspended in 5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0, 500  $\mu$ L) and mixed with an equal volume of 2% Triton X100 in the same buffer in an ice-bath. After homogenization of the cells for 7 min with a glass homogenizer, the mixture was centrifuged at 8000g for 30 min. The supernatant layer was collected and boiled for 7 min at 100 °C followed by evaporation to dryness by a centrifugal evaporator (SpeedVac, Savant, Sunnydale, CA). The lyophilized material was suspended in water (200  $\mu$ L), and ethanol (800  $\mu$ L) was added to the mixture to 80% concentration. The precipitate was collected by centrifugation and washed with ethanol (1 mL  $\times$  3) and then with acetone (1 mL  $\times$  2). The residue was dried in vacuo, and Pronase (50  $\mu$ g) in 5 mM Tris-HCl (pH 8.0, 200  $\mu$ L) was added, and the mixture was kept at 37 °C for 24 h. After the reaction mixture was boiled for 10 min, the supernatant was collected by centrifugation. Because cancer cells often contain a relatively large amount of free glycans in cytosols,<sup>21</sup> contaminated free glycans were previously reduced to the alditol form with sodium borohydride as follows: an aqueous solution of 2 M NaBH<sub>4</sub> (500  $\mu$ L) was added to the supernatant and kept at room temperature for 30 min. Glacial acetic acid was carefully added to the mixture to decompose excess NaBH<sub>4</sub>, and the mixture was passed through a centrifugal filter device (5 kDa cutoff). The solution was concentrated to 30  $\mu$ L after washing with the water (400  $\mu$ L  $\times$  3). A half of the solution (15  $\mu$ L) was injected to the AGC-MS system.

**Glycoprotein Pool from Serum Samples.** A 50  $\mu$ L portion of a human pooled serum sample (Wako Pure Chemicals) was diluted with water (200  $\mu$ L), and the mixture was passed through a centrifugal filter device (10 kDa cutoff) to remove salts and low-molecular weight materials. The solution was concentrated to 30  $\mu$ L after washing with water (250  $\mu$ L  $\times$  3). Half of the solution (15  $\mu$ L) was injected to the AGC-MS system.

- (11) Kakehi, K.; Susami, A.; Taga, A.; Suzuki, S.; Honda, S. *J. Chromatogr., A* **1994**, *680*, 209–215.
- (12) Schulz, B. L.; Packer, N. H.; Karlsson, N. G. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 6088–6097.
- (13) Backstrom, M.; Thomsson, K. A.; Karlsson, H.; Hansson, G. C. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 538–545.
- (14) Karlsson, N. G.; Packer, N. H. *Anal. Biochem.* **2002**, *305*, 173–185.
- (15) Huang, Y.; Mechref, Y.; Novotny, M. V. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 6063–6069.
- (16) Matsuno, Y.-k.; Yamada, K.; Tanabe, A.; Kinoshita, M.; Maruyama, S.-z.; Osaka, Y.-s.; Masuko, T.; Kakehi, K. *Anal. Biochem.* **2007**, *362*, 245–257.
- (17) Yamada, K.; Hyodo, S.; Matsuno, Y. K.; Kinoshita, M.; Maruyama, S. Z.; Osaka, Y. S.; Casal, E.; Lee, Y. C.; Kakehi, K. *Anal. Biochem.* **2007**, *371*, 52–61.
- (18) Yamada, K.; Kinoshita, M.; Hayakawa, T.; Nakaya, S.; Kakehi, K. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 521–537.
- (19) Yamada, K.; Watanabe, S.; Kita, S.; Kinoshita, M.; Hayakawa, T.; Kakehi, K. *Anal. Biochem.* **2010**, *396*, 161–163.
- (20) Lloyd, K. O.; Kabat, E. A.; Licerio, E. *Biochemistry* **1968**, *7*, 2976–2990.

- (21) Ishiduka, A.; Hashimoto, Y.; Naka, R.; Kinoshita, M.; Kakehi, K.; Seino, J.; Funakoshi, Y.; Suzuki, T.; Kameyama, A.; Narimatsu, H. *Biochem. J.* **2008**.



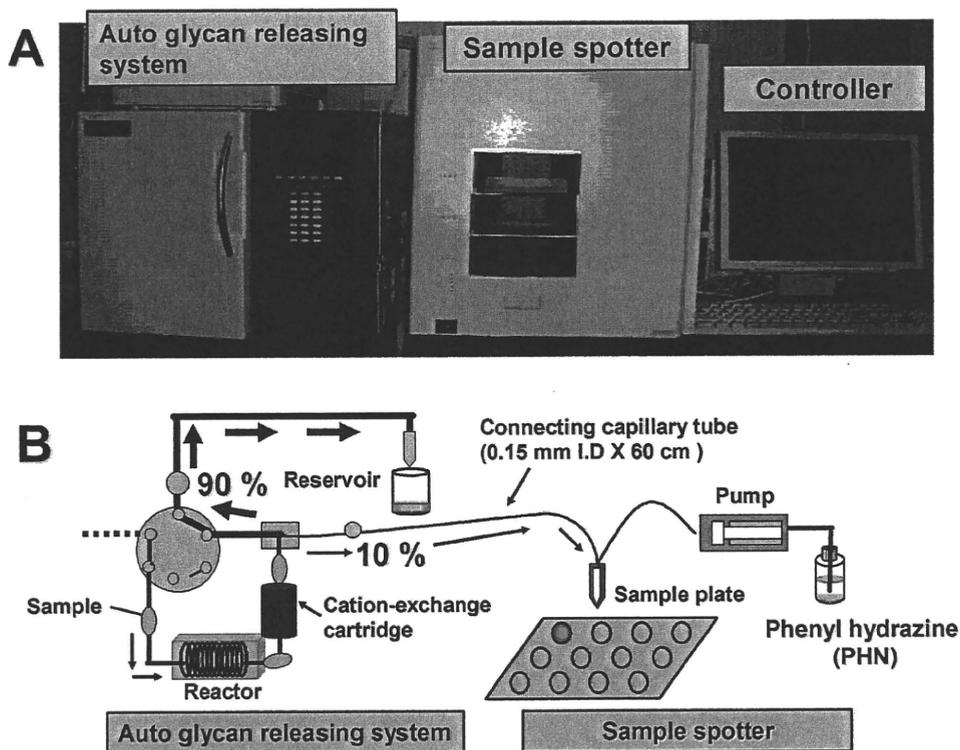
**Figure 1.** Flow diagram of the autoglycan releasing system.

**Releasing Reaction of O-Glycans Using an AutoGlycoCutter System (AGC).** The AGC system has been improved from the original version in order to be able to analyze microscale samples (Figure 1).<sup>16</sup> To release the O-glycans from glycoprotein samples, an aqueous solution (15  $\mu\text{L}$ ) of a glycoprotein sample was injected into the AGC. The AGC is composed of a pump, a reactor, a cartridge packed with cation exchange resin, a sample tray, and a switching valve (Figure 1A).

The glycan releasing reaction was performed as shown from parts B to F of Figure 1. When the program starts, the tubing of the reactor is filled with the alkali solution (0.5 M LiOH for glycan releasing) (Figure 1B). The introduced sample solution is mixed with the alkali solution and moved to the reactor at 120  $\mu\text{L}/\text{min}$  (Figure 1C,D). When the mixed solution is introduced to the reactor, the flow is stopped and the solution is kept at the elevated temperature (45  $^{\circ}\text{C}$ ) for a specified period (3.0 min). After the releasing reaction in the reactor, the mixture is pushed out from the reactor and passed through a small cartridge packed with cation-exchange resin (Figure 1E). The effluent from the cartridge is collected to the fraction collector (Figure 1F). In the present study, the effluent was divided and a portion (one tenth of the

total volume) was introduced to the MALDI spotter (see below). The whole procedure was performed according to the automatic valve changing program and was completed within 4 min. After the run, the cation-exchange cartridge is regenerated with 0.25 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . The collected solution ( $\sim 100 \mu\text{L}$ ) containing the released O-glycans were employed for the analysis by high-performance liquid chromatography and/or capillary electrophoresis after derivatization with a fluorescent labeling reagent such as 2-aminobenzoic acid (also see below).

**Hyphenation of the AGC Apparatus to an Automatic Spotter Machine (AccuSpot) for MALDI MS Measurement: "AGC-MS System".** A 10% portion of the reaction mixture was introduced to the MALDI plate as shown in Figure 2. An aqueous solution of 1.25% phenylhydrazine was mixed with the 10% flow of the eluate using a sheath flow device installed in the spotter machine at the rate of 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ . And the mixture was spotted onto the MALDI plate, on which a solution (1  $\mu\text{L}$ ) of 2,5-dihydroxybenzoic acid (10 mg/mL in 30% ethanol) had been previously spotted and air-dried at room temperature. The sampling rate was set at 20 s intervals. The solution on the MALDI plate is kept at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 1 h, and MALDI MS spectra of O-glycans



**Figure 2.** Auto glycan releasing system-MS system: (A) auto glycan releasing system-MS system. (B) Scheme for collection of the effluent from the Auto glycan releasing system. A 10% portion of the effluent is introduced to the spotter machine by adjusting the capillary size. In this case, we used a fused silica capillary (0.15 mm i.d., 60 cm). At the spotter port, an aqueous solution of 1.25% phenylhydrazine is mixed at the rate of 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

were acquired. The 90% portions of the eluate were recovered to the fraction collector and evaporated to dryness for further structural studies as well as quantitative analysis.

**Fluorescent Labeling of the Released O-Glycans with 2-AA.** The mixture of the released O-glycans in the 90% portions of the eluate was dissolved in 2-AA solution (100  $\mu\text{L}$ ) freshly prepared by dissolution of 2-AA (30 mg) and sodium cyanoborohydride (30 mg) in methanol (1 mL) containing 4% sodium acetate and 2% boric acid. The mixture was kept at 80  $^{\circ}\text{C}$  for 1 h. Water (100  $\mu\text{L}$ ) was added after cooling, and the mixture was applied to a column of Sephadex LH-20 (1.0 cm i.d., 30 cm length) previously equilibrated with 50% aqueous methanol. The earlier eluted fluorescent fractions were pooled and evaporated to dryness under reduced pressure and used for the analysis by HPLC and CE.

**CE Analysis of 2-AA Labeled O-Glycans.** 2-AA-Labeled oligosaccharides were analyzed with a P/ACE MDQ glycoprotein system (Beckman Coulter, Fullerton, CA) equipped with a helium-cadmium laser-induced fluorescence detector (Ex 325 nm, Em 405 nm). Electrophoresis was performed using a DB-1 capillary (100  $\mu\text{m}$  i.d., 30 cm length) in 100 mM Tris-borate buffer (pH 8.3) containing 5% polyethylene glycol (PEG70000) as the running buffer. Sample solutions were introduced into the capillary by pressure injection at 1 psi for 10 s. Separation was performed by applying the potential of 25 kV at 25  $^{\circ}\text{C}$ .

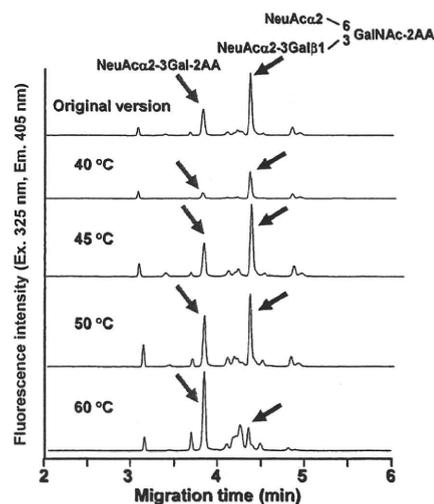
**HPLC Analysis of 2-AA Labeled O-Glycans.** The HPLC system was composed from a SCL-10A system controller (Shimadzu, Nakagyo-ku, Kyoto, Japan), two LC-10AD pumps (Shimadzu), a 655A-52 column oven (Hitachi, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan), and an FP-920 fluorescence detector (JASCO, Hachi-oji,

Tokyo, Japan) connected with a data processor (SmartChrom, KYA Technologies, Hachi-oji, Tokyo, Japan). Separation was done with a polymer-based Asahi Shodex NH2P-50 4E column (Showa Denko, Hachi-oji, Tokyo, Japan; 4.6 mm i.d., 250 mm length) using a linear gradient formed by 2% acetic acid in acetonitrile (solvent A) and 5% acetic acid in water containing 3% triethylamine (solvent B). The column was initially equilibrated and eluted with 70% solvent A for 2 min, then solvent B was increased to 95% over 80 min and kept at this composition for further 100 min. The flow rate was maintained at 1.0 mL/min through the analysis. Detection was performed by fluorometry at 350 nm for excitation and 425 nm for emission, respectively.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Auto Glycan Releasing System (AutoGlycoCutter:AGC) for Online Analysis of O-Glycans in Mucin-Type Glycoproteins.** Releasing of O-glycans attached to Ser/Thr residues of mucin-type glycoproteins has been a big problem in their analysis.<sup>22</sup> Recently, we developed an apparatus for the automatic release of O-glycans using an in-line flow system (AutoGlycoCutter-1, AGC-1).<sup>16</sup> The original version of the apparatus was designed for relatively large scale samples ( $\sim 100 \mu\text{g}$ –1 mg), and a cartridge packed with cation exchange resin (1 mL) and a reactor of 700  $\mu\text{L}$  volume were installed. To apply the method to the analysis of the smaller amount of samples with higher sensitivity, we miniaturized the system by using a cartridge of 50  $\mu\text{L}$  volume packed with cation

(22) An, H. J.; Kronewitter, S. R.; de Leoz, M. L.; Lebrilla, C. B. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2009, 13, 601–607.



**Figure 3.** Optimization for oligosaccharide releasing reaction. O-Glycans released from the model glycopeptide by the automatic glycan-releasing system were analyzed by CE after labeling with 2-AA. The most upper panel shows the results on the analysis of O-glycans in the model glycopeptide using the original version of the auto glycan releasing system. The similar results were observed at 45 °C. Analytical conditions for CE: capillary, DB-1 capillary (100 m i.d., 30 cm); running buffer, 100 mM Tris-borate buffer (pH 8.3) containing 5% PEG70000; applied voltage, 25 kV; injection, pressure method (1 psi for 5 s); temperature, 25 °C; detection, helium-cadmium laser-induced fluorescence (excitation 325 nm, emission 405 nm).

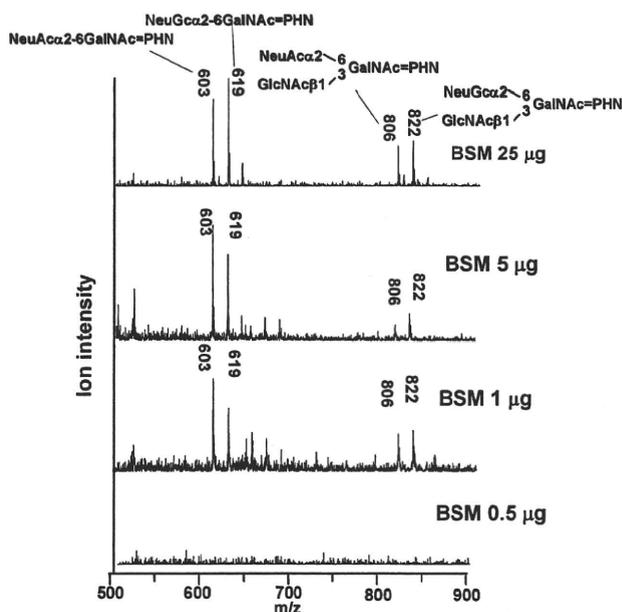
exchange resin and a reactor having 136  $\mu\text{L}$  volume. In addition, the dead volume was minimized by removing the detector. The volume (15  $\mu\text{L}$ ) of the sample solution was also fixed. In this device (Figure 1), the sample solution is brought to the reactor, then the flow is stopped for a specified time, and the releasing reaction occurs in the reactor. Then, the flow brings the sample zone to the cartridge (50  $\mu\text{L}$  volume). It should be noted that these modifications minimize diffusion of the sample zone, and the reaction mixture was recovered with the minimal dilution.

We optimized the conditions for glycan releasing reaction using a model glycopeptide derived from caseinoglycomacropeptide (cow milk) having the sequence **GEPTSTPT**.<sup>17</sup> Disialyl-T antigen, (NeuAca2-3Gal $\beta$ 1-3(NeuAca2-6)GalNAc, attaches to the fourth Thr residue (shown in bold face with underline) from the N-terminal. NeuAca2-3Gal $\beta$ 1-3-residue of the disialyl T antigen is labile under alkaline conditions and forms degradation product (NeuAca2-3Gal) by  $\beta$ -elimination (i.e., peeling reaction).<sup>17,18</sup> After the releasing reaction, the mixture of the released oligosaccharides was labeled with 2AA and analyzed by CE (Figure 3).

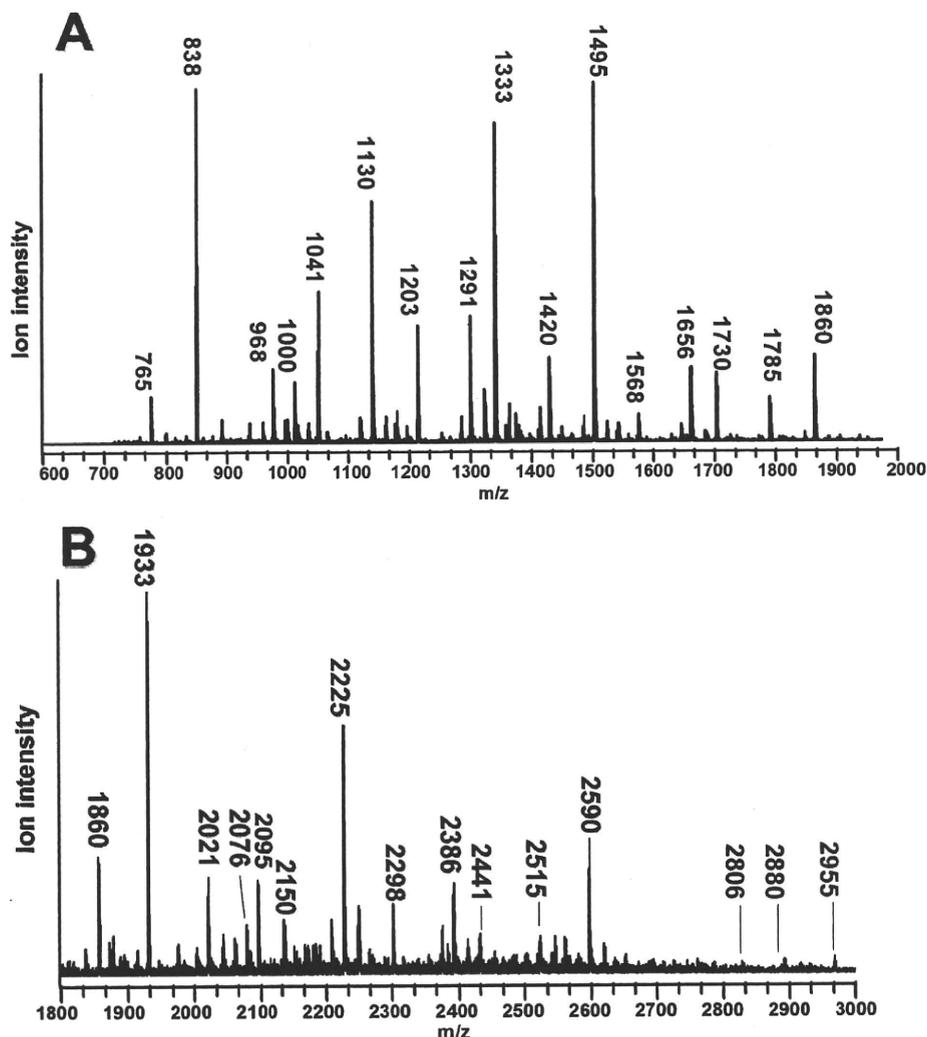
The disialyl-T and the degradation product (NeuAca2-3Gal-2AA) were observed at 4.4 and 3.8 min, respectively. The best yield of disialyl-T was observed at 45 °C. At 40 °C, the yield of disialyl-T was lower than that at 45 °C. At the higher temperatures than 50 °C, the abundance of the peeling product (i.e., NeuAca2-3Gal $\beta$ 1-3) became higher. The yield of the disialyl T from the model peptide obtained under the optimized conditions (reaction solution, 0.5 M LiOH; reaction time, 3 min; reaction temperature, 45 °C) was  $58.8 \pm 3\%$  ( $n = 5$ ) when determined by CE. The ratio of the degradation product was  $24.4 \pm 1\%$ . It should be noted that the present method showed excellent repeatability, although partial degradation was observed.

**Hyphenation of AGC with a Spotter Machine for MALDI MS Measurement.** We directly connected the auto glycan releasing system to the spotter machine for MALDI MS measurement (Figure 2). The effluent from the cartridge was divided by a splitter, and a 10% portion of the effluent was introduced to the MALDI spotter. By adjusting the length and the internal diameter of tubing (0.15 mm i.d., 60 cm length), we could introduce one tenth of the sample solution to the MALDI plate and the effluent was automatically mixed with an aqueous solution of the matrix (DHB). However, we could not detect the molecular ions due to free O-glycans released from the core peptides with high sensitivity (data not shown). This is probably due to the presence of contaminated peptide fragments and other materials during the releasing reaction.

To improve the sensitivity in detection of the glycans, on-plate derivatization of O-glycans in the effluent collected on the MALDI plate was examined. Lattova et al. reported that phenylhydrazine was a useful derivatization reagent for highly sensitive detection of glycans in clinical samples. The method is based on on-plate derivatization of glycans with phenylhydrazine to form phenylhydrazone. The phenylhydrazone thus formed on the plate was detected by a MALDI-MS apparatus.<sup>23,24</sup> In the present study, we introduced a 1.25% aqueous solution of phenylhydrazine to be mixed with the effluent from AGC, and the mixture was spotted onto the plate, on which DHB solution had been previously spotted and dried. The mixture on the target was kept at 37 °C for 1 h to complete the derivatization reaction according to the method reported by Lattova et al.<sup>23,24</sup> We can use a diluted phenylhydrazine solution due to its high reaction efficiency in hydrazone formation. In addition, because the effluent was passed through a cartridge packed with cation exchange resin, it showed acidic property which is preferable for hydrazone formation. It should be noticed that phenylhydrazone derivatives of reducing carbohydrates are easily crystallizable and may be a strong point for MALDI MS measurement. In addition, it was not necessary to



**Figure 4.** Detection limit of the autoglycan releasing system-MS system as examined using bovine submaxillary mucin as a model sample.



**Figure 5.** Analysis of O-glycans from MKN45 cells. The results for the low- and high-mass ranges are shown in parts A and B, respectively.

remove the excess phenylhydrazine by washing. Thus, the whole procedure from the releasing of O-glycans to MS measurement was completed within 1.5 h.

On the basis of the studies described above, we applied the present technique to the analysis of O-glycans from bovine submaxillary mucin (BSM). The results are shown in Figure 4.

When using 25  $\mu\text{g}$  of BSM (2.5  $\mu\text{g}$  as the injected amount), we could easily observe the major molecular ions due to O-glycans. Two molecular ions observed at  $m/z$  603 and  $m/z$  619 are due to NeuAc $\alpha$ 2-6GalNAc=PHN and NeuGc $\alpha$ 2-6GalNAc=PHN, respectively. Two molecular ions observed at  $m/z$  806 and 822 are confirmed as sialyl-core 3 structures, GlcNAc $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc=PHN and GlcNAc $\beta$ 1-3(NeuGc $\alpha$ 2-6)GalNAc=PHN, respectively. Sialic acids of O-glycans in BSM have two forms of *N*-acetyl neuraminic acid and *N*-glycolyl neuraminic acid. Therefore, we could observe two sets of the molecular ions of O-glycans.<sup>11</sup> Even at the 1  $\mu\text{g}$ -level of the sample (0.1  $\mu\text{g}$  as the amount injected to the MALDI plate), we clearly observed the molecular ions of these glycans.

**Application to the Analysis of O-Glycans Derived from Cancer Cells.** We applied the present method to the analysis of O-glycans expressed on MKN45 cells (a human stomach cancer cell line). O-glycans of glycopeptide fractions obtained from the whole cells after digestion with Pronase were analyzed by the present method. The results observed for low- and high-molecular ranges are shown in parts A and B of Figure 5, respectively, and the list of the proposed structures based on our previously reported data is summarized in Table 1.<sup>18</sup>

Two molecular ion peaks observed at  $m/z$  838 and  $m/z$  1041 are due to asialo core 2 type structures, Gal $\beta$ 1-3(Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc=PHN and Gal $\beta$  1-3(GlcNAc $\beta$ - Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc=PHN, respectively. Four molecular ion peaks at  $m/z$  1203, 1568, 1933, and 2298 are confirmed as asialo polyactosamine-type O-glycans, Gal $\beta$ 1-3((Gal $\beta$ -GlcNAc $\beta$ ) $_n$ -Gal $\beta$ 1-4-GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc=PHN ( $n = 1-4$ ). The molecular ion peak observed at  $m/z$  765 corresponds to sialyl-T, NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc=PHN. Three molecular ion peaks observed at  $m/z$  968, 1130, and 1333 are assigned as monosialo core 2 type glycans, Gal $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc=PHN + NeuAc $_1$ , Gal $\beta$ 1-3(Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc=PHN + NeuAc $_1$ , and Gal $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ -Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc=PHN + NeuAc $_1$ , re-

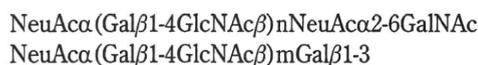
(23) Lattova, E.; Chen, V. C.; Varma, S.; Bezabeh, T.; Perreault, H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1644-1650.

(24) Lattova, E.; Kapkova, P.; Krokhn, O.; Perreault, H. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2977-2984.

**Table 1. O-Glycans Observed in MKN45 Cells**

proposed structures	observed molecular mass ( <i>m/z</i> )
Asialo Glycans	
Galβ1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	838
Galβ1-3(GlcNAc-Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	1041
Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	1203
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) <sub>2</sub> -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	1568
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) <sub>3</sub> -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	1933
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) <sub>4</sub> -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	2298
Monosialo Glycans	
NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAc=PHN	765
Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN + NeuAc <sub>1</sub>	968
Galβ1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN + NeuAc <sub>1</sub>	1130
Galβ1-3(GlcNAc-Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN + NeuAc <sub>1</sub>	1333
Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN + NeuAc <sub>1</sub>	1495
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) <sub>2</sub> -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN + NeuAc <sub>1</sub>	1860
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) <sub>3</sub> -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN + NeuAc	2225
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) <sub>4</sub> -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN + NeuAc	2590
Galβ1-3((Gal-GlcNAc) <sub>5</sub> -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN + NeuAc	2955
Disialo Glycans	
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	1420
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc-Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	1785
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>2</sub> -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	2150
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>3</sub> -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	2515
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>4</sub> -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN	2880
Trisialo Glycans	
NeuAc-Gal-GlcNAc-(NeuAc-Gal-GlcNAc)Galβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAc=PHN	2076
NeuAc-Gal-GlcNAc-(NeuAc-Gal-GlcNAc)Galβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAc=PHN + Gal-GlcNAc	2441
NeuAc-Gal-GlcNAc-(NeuAc-Gal-GlcNAc)Galβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAc=PHN + (Gal-GlcNAc) <sub>2</sub>	2806
Degradation Product	
(Gal-GlcNAc) <sub>2</sub> -Gal=PHN	1000
NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>2</sub> -Gal=PHN	1291
NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>3</sub> -Gal=PHN	1656
(Gal-GlcNAc) <sub>4</sub> -Gal=PHN	1730
NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>4</sub> -Gal=PHN	2021
(Gal-GlcNAc) <sub>5</sub> -Gal=PHN	2095
NeuAc-(Gal-GlcNAc) <sub>5</sub> -Gal=PHN	2386

spectively. Five molecular ion peaks at *m/z* 1495, 1860, 2225, 2590, and 2955 are due to monosialo polyactosamine-type O-glycans, Galβ1-3((Galβ-GlcNAcβ)<sub>*n*</sub>-Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc=PHN + NeuAc<sub>1</sub> (*n* = 1–5). Disialo polyactosamine-type O-glycans were also observed in MKN45 cells. Four molecular ion peaks at *m/z* 1785, 2150, 2515, and 2880 are confirmed as disialo core 2 type glycans modified with 1–7 units of lactosamine residues. Three molecular ion peaks containing three sialic acid residues were observed at *m/z* 2076, 2441, and 2806 are due to NeuAc<sub>3</sub>Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>3</sub>=PNH, NeuAc<sub>3</sub>Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>4</sub>=PNH, and NeuAc<sub>3</sub>Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>5</sub>=PNH, respectively. As reported previously, these trisialo glycans are core 1 type glycans having the structures as indicated below.<sup>18</sup>



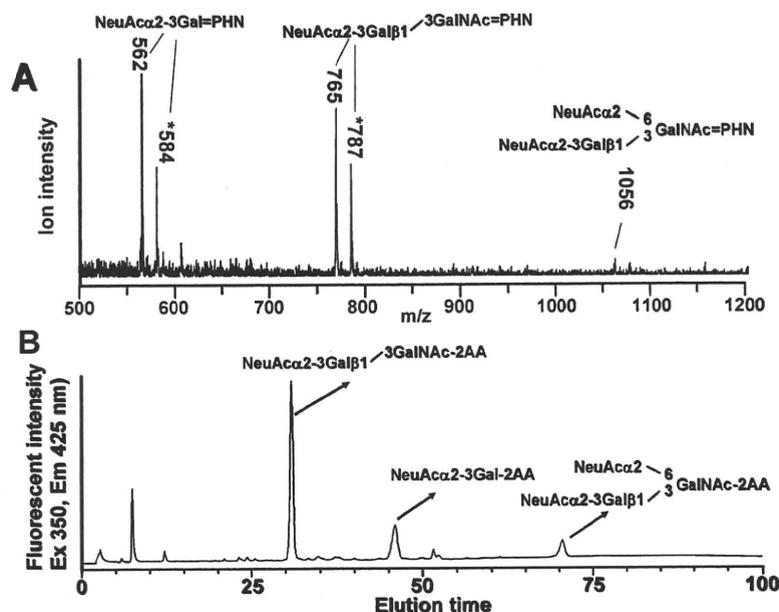
These structures were observed exclusively in MKN45 cells according to our recent research results, and we suggested that these O-glycans might be a specific marker of gastric adenocarcinoma.<sup>18</sup> Seven molecular ion peaks observed at *m/z* 1000, 1291, 1656, 1730, 2021, 2095, and 2386 are due to the degradation products from these trisialo core 1 type polyactosamine glycans, NeuAc-(Galβ-GlcNAcβ)<sub>*n*</sub>-Gal=PHN (*n* = 1–5), and the presence of these products means that these glycans occupy the 1-3 linked arm of the glycans because of easy

degradation (i.e., peeling). Therefore, these glycans are important keys for structural confirmation of the parent glycans.<sup>18</sup>

**Analysis of O-Glycans Derived from Serum Glycoproteins Using AGC-MS System.** Another application to the analysis of O-glycans in a serum sample is shown in Figure 6. After brief deionization of the diluted solution using an ultramembrane filter, the solution was easily analyzed by the present system. As indicated in Figure 6A, several molecular ions were observed. The molecular ion peaks observed at *m/z* 765 with sodium adduct ion (*m/z* 787) are confirmed as sialyl-T.

The molecular ion peak observed at *m/z* 1056 corresponds to disialyl-T. The molecular ion peaks observed at *m/z* 562 with sodium adduct ion *m/z* 584 are due to a peeling product (NeuAc α2-3Gal=PNH). After the releasing reaction is performed in the flow of an aqueous LiOH solution, the reaction mixture is passed through a cartridge packed with cation exchange resin. Therefore, the effluent from the device does not contain cation(s) as examined by the absence of Li adduct ion in the MS spectra. Then, the effluent from the device is mixed with diluted phenylhydrazine solution and spotted onto the MALDI plate. Accordingly, the phenylhydrazone on the MALDI plate theoretically only shows protonated ions. In this case, however, diluted phenylhydrazine solution probably contains a trace amount of sodium ion, and the MS gives sodium adduct ions as well as protonated ions.

To confirm these peaks, we also analyzed the O-glycans obtained from the split effluent (collected by the fraction collector)



**Figure 6.** Analysis of O-glycans in a pooled serum sample. (A) MS analysis of the O-glycans by the present method. (B) Analysis of the O-glycans in a pooled serum sample by HPLC. The nine tenth portions of the O-glycans released by the autoglycan releasing system-MS system were labeled with 2-AA and analyzed by HPLC. Analytical conditions for HPLC: column, Asahi Shodex NH2P-50 4E (4.6 mm  $\times$  250 mm); eluent, solvent A, 2%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  in acetonitrile; solvent B, 5%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ /3% triethylamine in water, gradient condition, linear gradient (30–95% solvent B) from 2 to 82 min, maintained for 20 min.

as 2-AA derivatives using HPLC (Figure 6B). Each of the peaks was collected and compared with the standard samples by MALDI-TOF MS as reported previously.<sup>18</sup> The most abundant peak observed at 31 min is due to sialyl-T which shows the molecular ion at  $m/z$  765. The peak observed at 71 min is derived from disialyl-T which shows the molecular ion at  $m/z$  1085. We also observed the peak due to the peeling product (NeuAc $\alpha$ 2-3Gal-2AA) at 45 min. These results were in good agreement with the direct MS analysis as shown in Figure 6A, although the relative abundances of these glycans are different between HPLC and MS methods. The HPLC/CE-fluorescent detection method affords accurate amounts of the glycans based on the fluorescent intensity of the 2-aminobenzoic acid residue at the reducing terminal. A combination of both methods will be a powerful tool for accurate diagnosis of the disease or disease states.

## CONCLUSIONS

We have been developing an automatic device for releasing O-glycans from the mucin-type glycoproteins.<sup>17–19</sup> In the present paper, we connected the device to a spotter machine for MALDI MS measurement and attempted direct measurement of O-glycans. Because we could not observe the molecular ions of free glycans by direct measurement due to their low sensitivity and the presence of contaminated materials during releasing reactions, we labeled the released O-glycans with phenylhydrazine by *in situ* derivatization to achieve highly sensitive detection of O-glycans by MS measurement. The derivatization reaction proceeded under mild conditions even in the presence of 2,5-dihydroxybenzoic acid

(matrix material). Accordingly, we performed the analysis from the glycan releasing reaction to MS measurement within 1.5 h.

The system allows MS analysis of O-glycans of bovine submaxillary mucin even when using 1  $\mu\text{g}$  of the protein sample (actual sample amount 100 ng). We applied the present technique to the analysis of the O-glycans expressed on MKN45 cells derived from human stomach adenocarcinoma and found that trisialo-O-glycans were present abundantly as reported previously.<sup>18</sup> In addition, O-glycans in a pooled serum sample were also successfully analyzed. It is well-known that quantitative analysis is often difficult in MS measurement. Fluorescence detection by HPLC/CE gives robust and reproducible results in quantitative analysis. The data in Figure 6 indicate that the proposed method using the hyphenated glycan-releasing and MS analysis shows similar glycan profiles with those obtained by HPLC, but the relative abundances of the glycans are somewhat different from those observed by HPLC/CE analysis. However, extremely high-throughput characteristics of the present method will be quite important in routine analysis of glycans for clinical use. We believe that the present technique is the primary attempt to use MS measurement for routine clinical diagnostic works.

Received for review June 15, 2010. Accepted July 20, 2010.

AC101581N