

■バイオ医薬品分析への応用（ペプチド製剤オキシトシンのアミノ酸組成分析）

AS/AAA-005

オキシトシンは9個のアミノ酸で構成された分子量1007のペプチドです。このようなペプチド製剤の品質評価のひとつとして、アミノ酸組成の確認がおこなわれています。

今回は、L-8900形 日立高速アミノ酸分析計の高分離カラムを用い、日本薬局方に準拠した分析法でオキシトシンのアミノ酸組成を求めました。なおここでは医薬品のモデルサンプルとして、一般試薬のオキシトシン酢酸塩を使用しました。

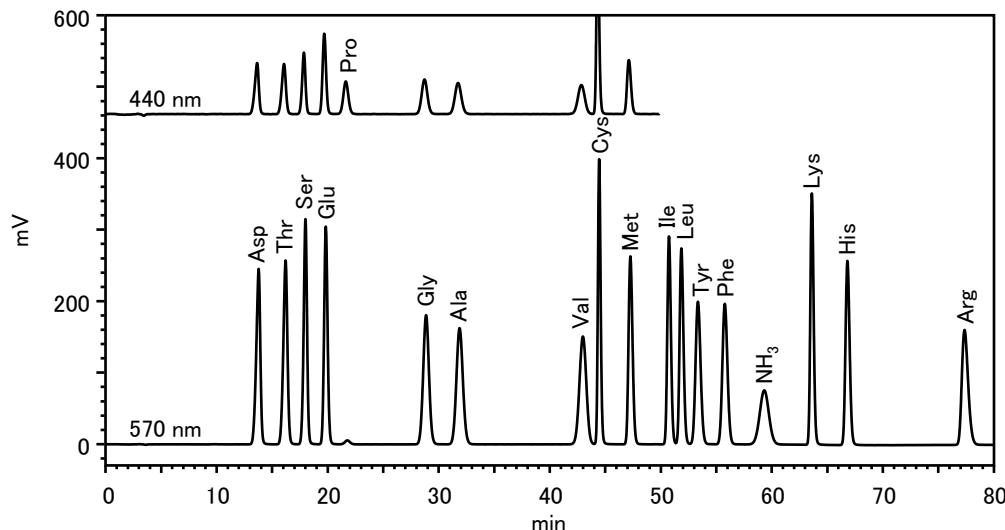
Cys—Tyr—Ile—Gln—Asn—Cys—Pro—Leu—Gly—NH₂
Oxytocin C₄₃H₆₆N₁₂O₁₂S₂ = 1007.19

【オキシトシン構造式】



【L-8900形 日立高速アミノ酸分析計】

■標準試料測定例(システム適合性の確認)



【アミノ酸標準溶液測定例(各 10 nmol/20 μL)】

(クロマトグラムに記載のCysは、シスチン(システインの2量体)を表します。)

<標準分析法測定条件>

カラム : #2622 4.6 mm I.D. × 80 mm
アンモニアフィルタカラム : #2650L 4.6 mm I.D. × 60 mm
溶離液 : MCI緩衝液L-8500 PH-Kit(*)
流量 : 0.26 mL/min
カラム温度 : 57 °C

反応液 : 日立用ニンヒドリン発色溶液キット(*)

反応液流量 : 0.3 mL/min
反応温度 : 130 °C
検出波長 : VIS 440nm, 570 nm
注入量 : 20 μL

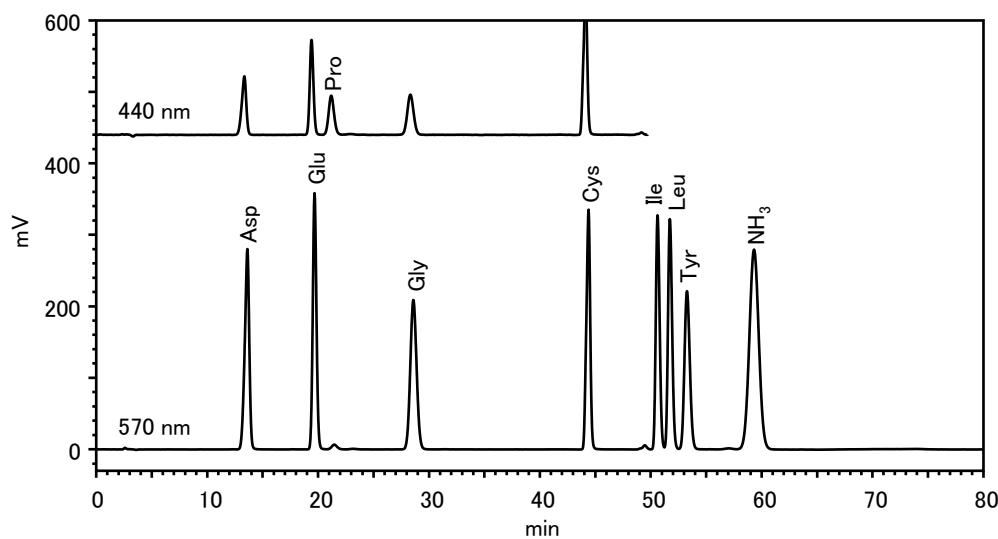
(*)販売元 : 和光純薬工業株式会社

(注)溶離液は薬局方に従って一部調整しました。

システム適合性項目	規定値	測定結果	
システムの性能	アミノ酸溶出順	アスパラギン酸、トレオニン、セリン、グルタミン酸、プロリン、グリシン、アラニン、バリン、シスチン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、チロジン、フェニルアラニン、リジン、ヒスチジン、アルギニンの順	左記のとおり
	分離度(トレオニン-セリン)	1.5 以上	2.93
	分離度(グリシン-アラニン)	1.4 以上	2.93
	分離度(イソロイシン-ロイシン)	1.2 以上	1.79
システムの再現性	アスパラギン酸、プロリン、バリン、アルギニンの各ピーク面積の相対標準偏差(n = 3)	それぞれ 2.0 % 以下	0.07 %, 0.41 % 0.37 %, 0.09 %

【システム適合性】溶出順、分離度、面積値の相対標準偏差とも規定値に対し、十分に満足する結果が得られました。

■オキシトシン測定例(構成アミノ酸の確認)



【オキシトシンの測定例】

(クロマトグラムに記載のCysは、シスチン(システインの2量体)を表します。)

<構成アミノ酸の確認>

成分名	規定値 (Leuに対するモル比)	測定結果
アスパラギン酸(Asp)	0.95 ~ 1.05	0.997
グルタミン酸(Glu)	0.95 ~ 1.05	0.995
グリシン(Gly)	0.95 ~ 1.05	1.000
シスチン(Cys)	0.80 ~ 1.05	0.935
イソロイシン(Ile)	0.80 ~ 1.10	0.963
ロイシン(Leu)	1とする	1とする
チロジン(Tyr)	0.80 ~ 1.05	0.934
プロリン(Pro)	0.95 ~ 1.05	1.007

<試料の前処理法(加水分解)>

```

試料 1mg
| ← 6 mol/L 塩酸 1mL
脱気
|
加熱 115 °C, 16 hr
|
減圧乾固
|
0.02 mol/L 塩酸 で 2 mL に溶解
|
ろ過 Pore Size 0.2 μm
|
アミノ酸分析試料(20 μL)

```

ロイシン(Leu)に対する他のアミノ酸のモル比は、理論値1に対し 0.93 ~ 1.01 となり、良好な結果が得られました。

装置構成 : L-8900形 日立高速アミノ酸分析計

注意: 本資料に掲載のデータは測定例を示すもので、性能を保証するものではありません。