

1 **グルカゴン(遺伝子組換え)**2 **Glucagon (Genetical Recombination)**3 **HSQGTFTSDY SKYLDSRRAQ DFLVQWLMNT**4 **C₁₅₃H₂₂₅N₄₃O₄₉S : 3482.75**5 **[16941-32-5]**6 本品は、遺伝子組換えヒトグルカゴンであり、29個のア
7 ミノ酸残基からなるペプチドである。8 本品は定量するとき、換算した脱水物に対し、グルカゴン
9 92.5 ~ 105.0%を含む。10 **製造要件** 本品は、あらかじめ規定された生物活性を有する原
11 薬を製造できることが適切に検証された方法により、製造さ
12 れる。工程内試験として、宿主細胞由来タンパク質残存量を
13 酵素免疫測定法により試験するとき、基準値以下である。ま
14 た、宿主細胞由来DNA残存量が基準値以下となることが検
15 証された方法により精製する。16 **性状** 本品は白色の凍結乾燥した粉末である。

17 本品は水又はエタノール(99.5)にほとんど溶けない。

18 本品は吸湿性がある。

19 **確認試験**20 (1)本品5 mgを0.01 mol/L塩酸試液1 mLに溶かす。この液
21 200 µLをとり、0.1 mol/L炭酸水素アンモニウム試液800 µL
22 及びグルカゴン用酵素試液25 µLを加え、37°Cで2時間反応
23 した後、酢酸(100) 120 µLを加えて反応を停止し、試料溶液
24 とする。別にグルカゴン標準品適量を0.1 mol/L炭酸水素ア
25 ンモニウム試液に溶かし、1 mL中にグルカゴン1 mgを含む
26 ように調製する。この液1000 µLにグルカゴン用酵素試液25
27 µLを加え、37°Cで2時間反応した後、酢酸(100) 120 µLを加
28 えて反応を停止し、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液
29 20 µLにつき、次の条件で液体クロマトグラフィー (2.01) に
30 より試験を行い、両者のクロマトグラムを比較するとき、同
31 一の保持時間のところに同様のピークを認める。32 **試験条件**

33 検出器：紫外吸光度計(測定波長：215 nm)

34 カラム：内径4 mm、長さ50 mmのステンレス管に5
35 µmの液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル
36 化シリカゲルを充填する。

37 カラム温度：22°C付近の一定温度

38 移動相A：トリフルオロ酢酸0.5 mLに水1000 mLを加
39 える。40 移動相B：トリフルオロ酢酸0.5 mLにエタノール(99.5)
41 600 mL及び水400 mLを加える。42 移動相の送液：移動相A及び移動相Bの混合比を次のよ
43 うに変えて濃度勾配制御する。

| 注入後の時間 (分) | 移動相A (vol%) | 移動相B (vol%) |
|---------------|----------------|----------------|
| 0 ~ 35 | 100 → 53 | 0 → 47 |
| 35 ~ 45 | 53 → 0 | 47 → 100 |

44 流量：毎分1.0 mL

45 システム適合性

46 システムの性能：標準溶液20 µLにつき、上記の条件で

47 操作するとき、ピーク1, 2, 3, 4及び5の順に溶出し、
48 ピーク2及び3の分離度は1.5以上である。49 (2)試料溶液及び標準溶液15 µLにつき、定量法の条件で液
50 体クロマトグラフィー (2.01) により試験を行うとき、試料
51 溶液及び標準溶液から得た主ピークの保持時間は等しい。52 **純度試験** 類縁物質及びデスアミド体 本操作は液温2 ~ 8°C
53 で行う。本品50 mgを0.01 mol/L塩酸試液100 mLに溶かし、
54 試料溶液とする。試料溶液15 µLにつき、次の条件で液体ク
55 ロマトグラフィー (2.01) により試験を行う。各々のピーク
56 面積を自動積分法により測定し、面積百分率法によりそれら
57 の量を求めるとき、グルカゴンに対する相対保持時間約1.1
58 のデスアミド体1, 約1.2のデスアミド体2, 約1.3のデスアミ
59 ド体3及び約1.4のデスアミド体4のピークの合計量は0.8%以
60 下である。また、グルカゴン以外のピークの合計量は2.0%
61 以下である。62 **試験条件**63 検出器、カラム、カラム温度、移動相A、移動相B、移
64 動相の送液及び流量は定量法の試験条件を準用する。65 面積測定範囲：溶媒のピークの後から試料溶液注入後
66 37分まで67 **システム適合性**

68 システムの性能は定量法のシステム適合性を準用する。

69 検出の確認：定量法の標準溶液15 µLにつき、上記の条
70 件で操作するとき、デスアミド体2に相当するピーク
71 を検出する。72 **水分 (2.48)** 10%以下(50 mg, 電量滴定法)。73 **定量法** 本操作は液温2 ~ 8°Cで行う。本品約50 mgを精密に
74 量り、0.01 mol/L塩酸試液100 mLに溶かし、試料溶液とす
75 る。別にグルカゴン標準品を0.01 mol/L塩酸試液に溶かし、
76 1 mL中にグルカゴン0.5 mgを含むように調製し、標準溶液
77 とする。試料溶液及び標準溶液15 µLずつを正確にとり、次
78 の条件で液体クロマトグラフィー (2.01) により試験を行い、
79 それぞれの液のグルカゴンのピーク面積 A_T 及び A_S を測定す
80 る。

81
$$\text{グルカゴンの量(\%)} = A_T / A_S \times C_S / C_T \times 100$$

82 C_S ：標準溶液の濃度(mg/mL)83 C_T ：試料溶液の濃度(mg/mL)84 算出したグルカゴンの量(%)を水分量で補正し、脱水物に
85 換算したグルカゴン量(%)を得る。86 **試験条件**

87 検出器：紫外吸光度計(測定波長：214 nm)

88 カラム：内径3 mm、長さ150 mmのステンレス管に3
89 µmの液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル
90 化シリカゲルを充填する。

91 カラム温度：45°C付近の一定温度

92 移動相A：リン酸二水素カリウム16.3 gを水750 mLに溶
93 かし、リン酸を加えてpH 2.7に調整した後、水を加
94 えて800 mLとし、液体クロマトグラフィー用アセト
95 ニトリル200 mLを加える。

96 移動相B：水/アセトニトリル混液(3 : 2)

97 移動相の送液：移動相A及び移動相Bの混合比を次のよ
98 うに変えて濃度勾配制御する。

| 注入後の時間 (分) | 移動相A (vol%) | 移動相B (vol%) |
|---------------|----------------|----------------|
| 0～25* | 61 | 39 |
| 25～29 | 61→12 | 39→88 |
| 29～30 | 12 | 88 |
| 30～31 | 12→61 | 88→39 |
| 31～37 | 61 | 39 |

- 99 * デスアミド体4が溶出された後にグラジエントが
100 開始されるようにアイソクラティックの時間を調
101 整する。
102 流量：毎分0.5 mL
103 システム適合性
104 システムの性能：グルカゴン標準品を0.01 mol/L塩酸試
105 液に溶かし、1 mL中にグルカゴン0.5 mgを含む液と
106 なるように調製する。50℃で48時間加熱し、システ
107 ム適合性試験用溶液とする。この液15 μLにつき、上
108 記の条件で操作するとき、主ピークより後ろに溶出す
109 るデスアミド体1～4に相当する4本のピークは明確に
110 検出され、その合計量が7%以上であり、グルカゴン
111 とデスアミド体1のピークの分離度は1.5以上である。
112 また、標準溶液15 μLにつき、上記の条件で操作する
113 とき、主ピークのシンメトリー係数は1.8以下である。
114 システムの再現性：標準溶液につき、上記の条件で試験
115 を5回繰り返すとき、グルカゴンのピーク面積の相対
116 標準偏差は2.0%以下である。
117 貯法
118 保存条件 遮光して-15℃以下で保存する。
119 容器 気密容器。
120 -----

121 **9.01 標準品(1)の項に次を追加する。**

122 グルカゴン標準品

123 **9.41 試薬・試液の項に次を追加する。**

- 124 炭酸水素アンモニウム試液, 0.1 mol/L 炭酸水素アンモニウ
125 ム7.9 gを水500 mLに溶かす。5 mol/L水酸化ナトリウム試
126 液を加えてpH 10.3に調整し、水を加えて1000 mLとする。
127 酵素試液, グルカゴン用 α-キモトリプシン2 mgを0.1
128 mol/L炭酸水素アンモニウム試液1 mLに溶かす。
129 α-キモトリプシン わずかに帯黄白色の凍結乾燥品。1 mg
130 当たり350 U以上のα-キモトリプシンを含む。
131
132