

1 レノグラスチム(遺伝子組換え)

2 確認試験(3)の項を単糖プロファイルとする。

3 単糖プロファイル 本品2 mLを正確に量り、前処理カラム(前
4 処理用オクタデシルシリル化シリカゲル0.36 gを用いて調製
5 したもの)に添加し、水/アセトニトリル/トリフルオロ酢
6 酸混液(600:400:1) 5 mLで洗浄後、アセトニトリル/水
7 /トリフルオロ酢酸混液(800:200:1)で溶出し、初めの溶
8 出液5 mLを正確に分取する。この液1.5 mLを試験管に正確
9 に量り、内標準溶液20 μ Lを正確に加えた後、凍結乾燥する。
10 凍結乾燥物をメタノール/塩化アセチル混液(9:1) 250 μ L
11 に溶かし、封管後、90 $^{\circ}$ Cで2時間加熱する。冷後、開封して
12 内容物を減圧乾固する。残留物にメタノール200 μ Lを加え、
13 減圧乾固する。残留物をピリジンのメタノール溶液(1 \rightarrow 10)
14 200 μ L及び無水酢酸50 μ Lに溶かし、密栓し10分間放置す
15 る。この液を約50 $^{\circ}$ Cで減圧乾固し、残留物にメタノール
16 200 μ Lを加え、約50 $^{\circ}$ Cで減圧乾固する。残留物にピリジン
17 /1,1,1,3,3,3-ヘキサメチルジシラザン/クロロトリメチル
18 シラン混液(10:2:1) 50 μ Lを加え、密栓し30秒間激しく振
19 り混ぜ、50 $^{\circ}$ Cで10分間加熱する。冷後、ペンタン300 μ Lを
20 加えて穏やかに振り混ぜた後、更に水300 μ Lを加えて穏や
21 かに振り混ぜる。上層をとり、窒素気流中で約10 μ Lに濃縮
22 し、試料溶液とする。別にD-ガラクトース約54 mg及びN-
23 アセチルガラクトサミン約33 mgを精密に量り、水に溶か
24 してそれぞれ正確に20 mLとし、D-ガラクトース溶液及び
25 N-アセチルガラクトサミン溶液とする。次にN-アセチル
26 ノイラミン酸約9.3 mgを精密に量り、D-ガラクトース溶液
27 1 mL及びN-アセチルガラクトサミン溶液2 mLを正確に加
28 えて溶かし、更に水を加えて正確に20 mLとする。この液1
29 mLを正確に量り、内標準溶液1 mLを正確に加える。この液
30 40 μ Lをとり、凍結乾燥する。凍結乾燥物をメタノール/塩
31 化アセチル混液(9:1) 250 μ Lに溶かし、以下試料溶液と同
32 様に操作し、単糖標準溶液とする。試料溶液及び単糖標準溶
33 液2 μ Lにつき、次の条件でガスクロマトグラフィー(2.02)
34 により試験を行い、内標準物質のピーク面積に対するD-ガ
35 ラクトース、N-アセチルガラクトサミン及びN-アセチル
36 ノイラミン酸のそれぞれのピーク面積の比 Q_T 及び Q_S を求め、
37 次式により、各単糖の量(mol/molレノグラスチム)を求める
38 とき、D-ガラクトースは0.7~1.2、N-アセチルガラクト
39 サミンは0.7~1.2及びN-アセチルノイラミン酸は1.0~2.0
40 である。

41 各単糖の含量(mol/molレノグラスチム)

$$42 = M / (M_m \times D_s) \times Q_T / Q_S \times 18667 / C \times 5 / 3$$

43 M : 各単糖の秤取量(mg)

44 M_m : 各単糖の分子量

45 D-ガラクトース: 180.16

46 N-アセチルガラクトサミン: 221.21

47 N-アセチルノイラミン酸: 309.27

48 D_s : 各単糖の希釈倍率

49 D-ガラクトース: 20000

50 N-アセチルガラクトサミン: 10000

51 N-アセチルノイラミン酸: 1000

52 C : 本品のタンパク質濃度(mg/mL)

53 18667: レノグラスチムのタンパク質部分の分子量

54 内標準溶液 ミオイノシトール48 mgを水に溶かし、50
55 mLとする。この液1 mLをとり、水を加えて20 mLとす
56 る。

57 試験条件

58 検出器: 水素炎イオン化検出器

59 カラム: 内径0.25 mm、長さ30 mのフューズドシリカ
60 管の内面にガスクロマトグラフィー用7%シアノプロ
61 ピル-7%フェニルーメチルシリコーンポリマーを厚
62 さ0.25 μ mで被覆する。

63 カラム温度: 110 $^{\circ}$ Cから毎分10 $^{\circ}$ Cで185 $^{\circ}$ Cまで昇温し、
64 次いで毎分2 $^{\circ}$ Cで210 $^{\circ}$ Cまで昇温する。さらに毎分
65 8 $^{\circ}$ Cで260 $^{\circ}$ Cまで昇温し、260 $^{\circ}$ Cを15分間保持する。

66 キャリヤーガス: ヘリウム

67 流量: 内標準物質の保持時間が約24分となるように調
68 整する。

69 システム適合性

70 システムの性能: 単糖標準溶液2 μ Lにつき、上記の条
71 件で操作するとき、D-ガラクトース、内標準物質、
72 N-アセチルガラクトサミン及びN-アセチルノイラ
73 ミン酸の順に流出し、内標準物質とN-アセチルガラ
74 クトサミンの分離度は10以上である。
75