

# アミノ酸組成分析の分析法バリデーション

○武田希美, 澤里理美, 廣瀬知弘, 佐々木裕佳子, 岡 征子  
北海道大学 創成研究機構 グローバルファシリティセンター 機器分析受託部門

## 概要

当部門で行っているアミノ酸組成分析の分析精度の確認と、その分析精度を保ちながら継続的に分析を行うために、管理項目とその基準を明確に設定することを目的として、分析法バリデーションの実施と評価を行ったのでその結果と、実施にあたって一部方法検討も行ったので合わせて報告する。

## 1. アミノ酸組成分析とは

当部門で行っているアミノ酸組成分析は主に2種有り、タンパク質やペプチドを対象としたアミノ酸組成調査やそのアミノ酸量を定量する分析と、溶液中に遊離で存在しているアミノ酸について、前述と同様にアミノ酸組成調査やそのアミノ酸量を定量する分析に大別される。測定はどちらも、アミノ酸がニンヒドリンと定量的に反応する性質を利用したアミノ酸自動分析計で行っており、溶液中の遊離アミノ酸分析では、アミノ酸単位になっているため、特に処理を必要としないが、タンパク質やペプチドは、アミノ酸単位に分解しなければならず、塩酸加水分解等の前処理を行う必要がある。加水分解の方法は数種あり、目的に応じて使い分けられているが、本報告では、塩酸で加水分解する分析方法の場合の報告をする。この前処理は、下記フローに沿って行い、分析計で測定できるまで約2日間を要する。その長い工程を経る分析方法の精度や誤差幅を知るため、分析法バリデーションを行った。



図-1 アミノ酸自動分析計

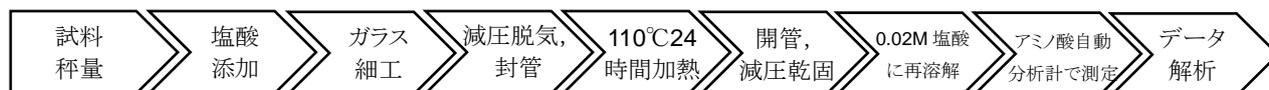


図-2 アミノ酸組成分析フロー(塩酸加水分解前処理有)

## 2. 分析法バリデーション

分析法バリデーションは、「意図される目的への適合性」や「適した性能を有していることの証明」を目的としており、期待される結果をクリアするか検証、確認し、その結果評価を行うものである。当部門のアミノ酸組成分析の内、塩酸加水分解方法は、書籍<sup>[1], [2]</sup>に記載されている方法を元にしており、日本薬局方の「2.04 たん白質のアミノ酸分析法」も同様の分析方法である。先の書籍によると、この方法の分析精度は、アミノ酸回収率で  $100 \pm 3\%$ と述べられている。これより、当部門における分析精度を確認するため、また、分析方法検証のため、分析法バリデーションを行うこととした。

## 《検証内容》

「厚生労働省, 厚生省医薬安全局審査管理課長医薬審, 第 338 号, 平成 9 年 10 月 28 日. 分析法バリデーションに関するテキスト(実施方法)について」<sup>[3]</sup>や, 「日本ダイオネクス(株) 大河原正光:標準化教育プログラム [ 個別技術分野編ー化学分野 ] 第 5 章 分析バリデーション」<sup>[4]</sup>等を参考に, 右記項目について評価した。

- |                             |
|-----------------------------|
| 1 真度 (Accuracy/Trueness)    |
| 2 精度 (Precision)            |
| 3 特異性 (Specificity)         |
| 4 検出限界 (Detection limit)    |
| 5 定量限界 (Quantitation limit) |
| 6 直線性 (Linearity)           |
| 7 範囲 (Range)                |
| 8 頑健性 (Robustness)          |

表-1 分析法バリデーション項目

### 3. 分析法バリデーション実施方法と結果

分析法バリデーションの各項目について, 期待している結果から方法を決めて実施した。しかし, 表-1中の「2 精度」を実施にあたり, 組成既知で入手と取り扱いがし易いタンパク質として, ウシ血清アルブミン(BSA)を用いた。評価において, 組成既知物質として選択した BSA のアミノ酸組成は重要であるが, 文献により小さいながら差異があり, 評価結果にも差異が生じる。また, 用いた BSA は試薬レベルのものしか入手できなく, 精確な純度が不明で, さらに結果評価が難しくなった。この二つの理由により, 当部門にある分析機器, LC/MS とプロテインシーケンサーでアミノ酸組成を, CHN コーダーで純度を求めることができないかを検討した。また, 測定を進めている過程で, 純度及び組成既知のタンパク質として, ヒト血清アルブミン(HSA)が産業技術総合研究所から入手可能であることが分かり, これについても評価した。

分析法バリデーションの結果は, 期待していた結果が得られたのと共に, 継続的に分析精度を維持するための管理項目と基準設定ができた。詳細については, ポスター内で報告する。

### 4. まとめ

本分析では, タンパク質やペプチドの塩酸加水分解方法のバリデーションを実施したが, 今後は他の加水分解方法や遊離アミノ酸分析方法についても, バリデーションを実施していく必要があると考えている。

### 5. 参考文献

- [1] 日本生化学会編: "生化学実験講座 1 タンパク質の化学Ⅱ一次構造決定法", 東京化学同人
- [2] 安藤鋭郎, 伊勢村寿三, 成田耕造, 渡辺格: "タンパク質化学 2 基礎", 共立出版.
- [3] 厚生労働省, 厚生省医薬安全局審査管理課長医薬審, 第 338 号, 平成 9 年 10 月 28 日. 分析法バリデーションに関するテキスト(実施方法)について
- [4] 日本ダイオネクス(株) 大河原正光:標準化教育プログラム [ 個別技術分野編ー化学分野 ] 第 5 章 分析バリデーション