

シグナル・ノイズ比

検出限界値及び定量限界値はそれぞれ S/N 比 3 以上及び 10 以上に相当する。S/N 比は次式を用いて計算する。

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

H ：規定の標準試料溶液で得られた電気泳動図中の目的成分に相当するピークの高さ、ピークトップから半値幅の 20 倍に相当する範囲から推定できるベースラインまでの距離を測定する。

h ：ブランクの注入後に得られた電気泳動図で、規定の標準試料溶液から得られた泳動図中のピークの半値幅の 20 倍に相当する時間範囲で、かつこのピークが現れる位置の前後の範囲を観察したときの、バックグラウンドの幅。

23. 固体又は粉体の密度

集合体としての固体又は粉体の密度は、粒子間及び粒子内部に存在する微細な空隙部分の体積の評価方法により、異なる定義がなされ、それぞれ異なる数値が与えられ、かつ実用上の意味も異なる。通常、固体又は粉体の密度は 3 つのレベルで定義される。

- (1) 結晶密度：空隙のない均一系とみなされ、真密度とも称される。
- (2) 粒子密度：開口部のない空隙、又は気体により置換されない粒子内細孔も固体又は粉体の体積として評価される。
- (3) かさ密度：粉体層内に形成される空隙部分も固体又は粉体の体積として評価されることから、みかけ密度とも称される。通常、疎充てん時の粉体の密度をかさ密度、タップ充てん時の密度をタップ密度と定義される。

一般に、液体や気体の密度は温度と圧力のみ依存するが、固体又は粉体の密度は分子又は粒子の集合状態に依存する。したがって、固体又は粉体の密度は、当該物質の結晶構造、結晶化度によって変化することはもちろんであるが、試料が非晶質であるか、その一部が非晶質である場合、試料の調製法又は処理法によって変化する。したがって、2 つの固体又は粉体が化学的には同一物質であっても、それらの固体構造が違えば、異なる密度を与える。固体又は粉体粒子の密度は、粉末状医薬品及び医薬品原料の重要な物理的特性であることから、日本薬局方では、粒子密度は「粉体の粒子密度測定法」、かさ密度は「かさ密度及びタップ密度測定法」として、それぞれの密度測定法を規定している。

固体又は粉体の密度は、単位体積当たりの質量 (kg/m^3) であり、通例、 g/cm^3 で表す ($1 \text{ g}/\text{cm}^3 = 1000 \text{ kg}/\text{m}^3$)。

結晶密度 (Crystal Density)

ある物質の結晶密度とは、分子の充てん配列 (molecular packing arrangement) の基本部分 (fundamental part) に属さない、すべての空隙を除いた単位体積当たりの平均質量である。これはその物質の特定の結晶構造に固有な特性であり、測定法に依存しない。結晶密度は、計算又は簡単な測定によって求めることができる。

A. 計算による結晶密度は、以下の方法によって求められる。

1) 例えば、単結晶の X 線回折データ又は粉末 X 線回折データの指標化によって得られる結晶学的データ (体積と単位格子の組成)

2) 当該物質の分子量

B. 測定による結晶密度は、単結晶の質量と体積の測定により、その比 (質量/体積) として与えられる。

粒子密度 (Particle Density)

粒子密度は、結晶密度に加えて粒子内の空隙 (粒子内部の閉じた空隙、及び開孔部はあるが気体が浸入できない空隙) も粒子体積の一部と評価して求められる密度である。すなわち、粒子密度は測定された体積に依存するが、体積の評価は測定法に依存する。粒子密度の測定は、気体置換型ピクノメータ法によるか又は水銀圧入法によるが、日本薬局方では「粉体の粒子密度測定法」として、ピクノメータ法を規定している。

A. ピクノメータ法による密度は、気体置換型ピクノメータを用いて、質量既知の粉体の体積を置換された気体の体積に等しいものと評価することにより求める。ピクノメータ法による密度の測定においては、気体の浸入が可能な開孔部のある空隙は粉体の体積とみなされないが、気体が浸入できない密閉状態にある空隙は粉体の体積の一部とみなされる。ヘリウムは拡散性が高く、開孔部のあるほとんどの空隙に浸入できるため、粒子密度測定用気体として推奨される。したがって、細かく粉碎された粉体のピクノメータ法による粒子密度は、一般には結晶密度とあまり違わない。このため、この方法による粒子密度は、非晶質又は部分的に結晶性である試料の真密度の最良の推定値とみなされ、製造工程中にある医薬品粉末の製造管理に広く役立てることができる。

B. 水銀圧入法による粒子密度は、顆粒密度とも呼ばれる。この方法を用いて測定される体積も、密閉状態にある空隙は固体又は粉体の体積の一部とみなされるが、ある限界の大きさ以上の開孔部のある空隙は固体又は粉体の体積には含まれない。この限界空隙径 (pore size limit)、すなわち最小浸入径 (minimal access diameter) は、測定中に加えられた水銀の最大浸入圧に依存し、通常は操作圧力下では、水銀はヘリウムならば浸入できる非常に微細な空隙には浸入し得ない。この方法を用いる場合、適用する水銀浸入圧を変えることで、それぞれの浸入圧における限界空隙径に対応した密度が測定できるので、1 つの試料から種々の顆粒密度が得られることになる。

かさ密度及びタップ密度 (Bulk Density and Tapped Density)

粉体のかさ密度は、粒子間の空隙も粉体体積の一部と評価して求められる。したがって、かさ密度は粉体の粒子密度と粉体層中での粒子の空間配列に依存する。また、粉体のかさ密度は粉体層のわずかな揺動によっても、その空間配列が変化するため、再現性よくかさ密度を測定することは極めて難しい。したがって、かさ密度の測定値を示す場合、どのようにして測定したか、その測定条件を明記することが重要である。

日本薬局方では「かさ密度及びタップ密度測定法」を規定している。

A. かさ密度は、ふるいを通してメスシリンダー中へ注入した質量既知の粉体の体積 (かさ体積) を測定することにより求められる (定質量法)。別に日本薬局方では、一定容量 (かさ体積) の粉体の質量を測定することにより、かさ密

度を求める方法（定容量法）も規定している。

- B. タップ密度は、粉体試料を入れた測定用メスシリンダーを機械的にタップすることにより求められる。初期のかさ体積を測定した後、メスシリンダーを一定の測定条件（タップ速度及び落下高さ）の下で機械的にタップし、連続する2つの測定間での体積変化が許容範囲内となるまで測定を繰り返す（定質量法）。別に日本薬局方では、タップ充てんされた一定容量（かさ体積）の粉体の質量を測定することにより、タップ密度を求める方法（定容量法）も規定している。

24. たん白質定量法

以下の方法は薬局方医薬品に含まれるたん白質の定量法の例を示したものである。HPLCなどの他の方法であっても、すべてのたん白質が回収されることを示すことができれば利用して差し支えない。以下に記載したたん白質定量法の多くは市販のキットを用いて測定することが可能である。

注：水を用いる際は精製水を用いること。

方法1（紫外吸収法）

溶液中のたん白質は、芳香族アミノ酸、主としてチロジン及びトリプトファンにより、波長 280 nm の紫外線を吸収する。この性質を利用したのが本法である。波長 280 nm における吸光度を用いたたん白質定量は主にたん白質のチロジンとトリプトファン含量に依存する。たん白質の溶解に用いる緩衝液が水よりも高い吸収を示す場合、緩衝液に妨害物質が存在していることを示している。この妨害は分光光度計で緩衝液の吸光度をゼロに調整することにより補正可能である。妨害物質による吸収が大きく、分光光度計の感度の限界に近づく場合、正確な結果が得られない可能性がある。更に、低濃度ではたん白質はキュベットに吸着し、溶液中のたん白質含量の低下を引き起こす可能性がある。これは高濃度の試料を調製するか、あるいは試料調製に非イオン性界面活性剤を用いることにより防止可能である。

注：試料溶液、標準溶液、緩衝液は試験中、同じ温度に置くこと。

標準溶液 医薬品各条に規定するもののほか、試料たん白質の標準品又は標準物質を、試料溶液と同じ緩衝液に、試料溶液と同じ濃度で溶かした液を調製する。

試料溶液 試料たん白質の適当量を適切な緩衝液に溶かし、1 mL 当たり 0.2 ~ 2 mg のたん白質を含む液を調製する。

操作法 標準溶液及び試料溶液につき、緩衝液を対照とし、紫外可視吸光度測定法により試験を行い、石英製のセルを用いて、波長 280 nm における吸光度を測定する。正確な結果を得るには、試験するたん白質の濃度が直線性の得られる範囲にある必要がある。

光散乱 たん白質の紫外吸収測定の精度は試料による光散乱の影響で低下する可能性がある。溶液中のたん白質が測定光の波長（250 ~ 300 nm）に匹敵するサイズである場合、光散乱により試料の吸光度は明らかな増加を示す。光散乱による波長 280 nm の吸光度を算出するには、試料溶液につき、波長 320 nm、325 nm、330 nm、335 nm、340 nm、345 nm 及び 350 nm における吸光度を測定し、直線回帰法を用いて、測定した

みかけの吸光度の対数を波長の対数に対してプロットし、各点に最も近似した標準曲線を求め、外挿により波長 280 nm における光散乱による吸光度を求める。波長 280 nm における総吸光度から光散乱による吸光度を差し引くことにより溶液中のたん白質の吸光度が得られる。特に溶液が明らかに濁っている場合は、0.2 μm のメンブランフィルターを通すか、あるいは遠心分離することにより、光散乱の影響を減らすことが可能である。

計算法 次式により試料溶液中のたん白質濃度 C_U を求める。

$$C_U = C_S \left(\frac{A_U}{A_S} \right)$$

C_S ：標準溶液のたん白質濃度

A_U ：試料溶液の補正した吸光度

A_S ：標準溶液の補正した吸光度

方法2（Lowry法）

本法は一般にローリー（Lowry）法と呼ばれる方法で、Folin-Ciocalteu のフェノール試液（フォリン試液）に含まれるリンモリブデン酸・タングステン酸混合物の発色基がたん白質により還元されて、波長 750 nm に吸収極大が得られることを利用した方法である。フォリン試液は主としてたん白質のチロジン残基と反応するため、たん白質の種類が異なると呈色度に差異を生じる場合がある。本法は妨害物質の影響を受けやすいため、試料からたん白質を沈殿させる操作を入れることもできる。試料中のたん白質から妨害物質を分離する必要がある場合には、試料溶液の調製に先立ち、後述する「妨害物質」の項に示す方法により操作する。妨害物質の影響は、試料たん白質を正確に測定できる濃度範囲内で希釈することにより影響を減らせる可能性がある。公定書⁹¹⁾に記載されているローリー法の変法は以下の方法に替えて用いることができる。

標準溶液 医薬品各条に規定するもののほか、試料たん白質の標準品又は標準物質を、試料溶液の調製に用いた緩衝液に溶解する。この液の一部を同じ緩衝液で希釈して、1 mL 当たり 5 ~ 100 μg のたん白質を含む、標準曲線上等間隔の 5 種類以上の濃度の標準溶液を調製する。

試料溶液 試料たん白質の適当量を適切な緩衝液に溶かし、標準溶液の濃度範囲内の液を調製する。適切な緩衝液は pH 10 ~ 10.5 の範囲である。

対照液 試料溶液及び標準溶液の調製に用いた緩衝液を用いる。**試薬・試液**

硫酸銅試液 硫酸銅（II）五水和物 100 mg 及び酒石酸ナトリウム二水和物 200 mg を水に溶かして 50 mL とし、A 液とする。無水炭酸ナトリウム 10 g を水に溶かして 50 mL とし、B 液とする。B 液をゆっくりと A 液に振り混ぜながら加える。この試液は毎日新たに調製する。

SDS 試液、5 % ドデシル硫酸ナトリウム 5 g を水に溶かして 100 mL とする。

アルカリ性銅試液 5 % SDS 試液、硫酸銅試液、水酸化ナトリウム溶液（4 → 125）の混液（2：1：1）を調製する。室温で 2 週間保存できる。

希フォリン試液 フォリン試液 10 mL に水 50 mL を加える。室温で遮光容器に保存する。

操作法 標準溶液、試料溶液及び対照液、各 1 mL にアルカ

⁹¹⁾ 例：生物学的製剤基準及び薬局方医薬品各条

り性銅試液 1 mL を加えて混和し、室温で 10 分間放置する。各液に希フオリン試液 0.5 mL を加えて直ちに振り混ぜた後、室温で 30 分間放置する。標準溶液及び試料溶液から得た液につき、対照液から得た液を対照とし、紫外可視吸光度測定法により試験を行い、波長 750 nm における吸光度を測定する。

計算法 吸光度とたん白質濃度に直線関係が成立する濃度範囲の標準溶液を用いて、直線回帰法により標準溶液の吸光度をたん白質濃度に対してプロットし、各点に最も近似した標準曲線を求める。得られた標準曲線と試料溶液の吸光度から、試料溶液中のたん白質の濃度を求める。

妨害物質 以下の操作法では、試験に先立ち、デオキシコロール酸・トリクロロ酢酸を試料に加えてたん白質を沈殿させることにより妨害物質を除去する。この方法はたん白質を希釈溶液から濃縮するためにも利用することができる。

デオキシコロール酸ナトリウム試液 デオキシコロール酸ナトリウム 150 mg を水に溶かし、100 mL とする。

トリクロロ酢酸試液 トリクロロ酢酸 72 g を水に溶かし、100 mL とする。

操作法 試料たん白質溶液 1 mL にデオキシコロール酸ナトリウム試液 0.1 mL を加え、攪拌器を用いて混和する。室温で 10 分間放置した後、トリクロロ酢酸試液 0.1 mL を加え、同様に混和する。次に 3000 × g で 30 分間遠心分離し、上澄液を捨て、更に残った水分をピペットで取り除く。たん白質の沈殿をアルカリ性銅試液 1 mL に溶解し、試料溶液の項に準じて操作する。[注：呈色は室温で放置する間、20 ~ 30 分で最高となり、その後徐々に低下する。妨害物質のほとんどは呈色度を低下させるが、界面活性剤の中には呈色をわずかに強めるものがある。塩濃度が高いと沈殿を生じる場合がある。たん白質の種類が異なると呈色強度が変わることもあるので、標準たん白質と試料たん白質は同じでなければならない。]

方法 3 (Bradford 法)

本法は一般にブラッドフォード (Bradford) 法とよばれる方法で、クーマシーブリアントブルー G-250 色素の吸収極大波長が、たん白質と結合することにより 470 nm から 595 nm にシフトすることを利用した方法である。クーマシーブリアントブルー G-250 は主にたん白質のアルギニン残基及びリジン残基に結合するため、たん白質の種類が異なると反応性が変わることもある。

標準溶液 医薬品各条に規定するもののほか、試料たん白質の標準品又は標準物質を、試料溶液の調製に用いた緩衝液に溶解する。この液の一部を同じ緩衝液で希釈して、1 mL 当たり 100 μg ~ 1 mg のたん白質を含む、標準曲線上等間隔の 5 種類以上の濃度の標準溶液を調製する。

試料溶液 試料たん白質の適当量を適切な緩衝液に溶かし、標準溶液の濃度範囲内の液を調製する。

対照液 試料溶液及び標準溶液の調製に用いた緩衝液を用いる。

クーマシー試液 クーマシーブリアントブルー G-250²² 100 mg をエタノール (95) 50 mL に溶かす。[注：色素の含有量は製品により異なるため、製品が違えば異なる結果が得られることがある。] この液にリン酸 100 mL を加え、水を加えて 1000 mL とする。この液をろ紙 (ワットマン No.1 又は相当品) を用いてろ過し、室温で遮光容器に保存する。[注：試液の保存中に徐々に沈殿が生じる。用時ろ過する。]

²² 試液の調製において色素の純度が重要である。

操作法 標準溶液、試料溶液及び対照液、各 100 μL にクーマシー試液 5 mL を加え、転倒混和する。再現性に影響を与えるので泡立たせないようにする。標準溶液及び試料溶液から得た液につき、対照液を対照とし、紫外可視吸光度測定法により試験を行い、波長 595 nm における吸光度を測定する。

[注：石英製のセルは色素を吸着するため用いてはならない。たん白質の種類が異なると呈色強度が異なることもあるので、標準たん白質と試料たん白質は同じでなければならない。] 妨害物質は比較的少ないが、界面活性剤やアンフォライト類を試料に共存させることは避けるべきである。塩基性の高い試料は酸性の試液を妨害することがある。

計算法 吸光度とたん白質濃度に直線関係が成立する濃度範囲の標準溶液を用いて、直線回帰法により標準溶液の吸光度をたん白質濃度に対してプロットし、各点に最も近似した標準曲線を求める。得られた標準曲線と試料溶液の吸光度から試料溶液中のたん白質濃度を求める。

方法 4 (ビシンコニン酸法)

本法は一般にビシンコニン酸 (BCA) 法とよばれる方法で、たん白質が銅 II (Cu²⁺) イオンを銅 I (Cu⁺) イオンに還元することを利用した方法である。BCA 試液は銅 I (Cu⁺) イオンの検出に用いられる。本法に対する妨害物質はほとんど存在しない。妨害物質が共存するときは、試料たん白質を正確に測定できる濃度範囲内で希釈することにより影響を減らせる可能性がある。

標準溶液 医薬品各条に規定するもののほか、試料たん白質の標準品又は標準物質を、試料溶液の調製に用いた緩衝液に溶かす。この液の一部を同じ緩衝液で希釈して、1 mL 当たり 10 ~ 1200 μg のたん白質を含む、標準曲線上等間隔の 5 種類以上の濃度の標準溶液を調製する。

試料溶液 試料たん白質の適当量を適切な緩衝液に溶かし、標準溶液の濃度範囲内の液を調製する。

対照液 試料溶液及び標準溶液の調製に用いた緩衝液を用いる。

試薬・試液

BCA 試液 ビシンコニン酸 10 g、炭酸ナトリウム一水和物 20 g、酒石酸ナトリウム二水和物 1.6 g、水酸化ナトリウム 4 g 及び炭酸水素ナトリウム 9.5 g を水に溶かし、必要なら水酸化ナトリウムあるいは炭酸水素ナトリウムを加えて pH 11.25 に調整した後、水を加えて 1000 mL とする。

硫酸銅試液 硫酸銅 (II) 五水和物 2 g を水に溶かし、50 mL とする。

銅・BCA 試液 硫酸銅試液 1 mL と BCA 試液 50 mL を混和する。

操作法 標準溶液、試料溶液及び対照液、各 0.1 mL に銅・BCA 試液 2 mL を加え、混和する。これらの液を 37 °C で 30 分間放置した後、時刻を記録し、室温になるまで放置する。標準溶液及び試料溶液から得た液につき、記録した時刻より 60 分以内に、対照液を対照とし、紫外可視吸光度測定法により試験を行い、石英製のセルを用いて波長 562 nm における吸光度を測定する。これらの液の呈色強度は室温に戻った後も徐々に増加する。試験を妨害する物質が共存するときは、方法 2 の「妨害物質」の項を準用して処理する。たん白質の種類が異なると呈色強度が異なることもあるので、標準たん白質と試料たん白質は同じでなければならない。

計算法 吸光度とたん白質濃度に直線関係が成立する濃度範囲

の標準溶液を用いて、直線回帰法により標準溶液の吸光度をたん白質濃度に対してプロットし、各点に最も近似した標準曲線を求める。得られた標準曲線と試料溶液の吸光度から試料溶液中のたん白濃度を求める。

方法 5 (Biuret 法)

本法は一般にビウレット (Biuret) 法とよばれる方法で、アルカリ性溶液中でたん白質と銅 II (Cu^{2+}) イオンが反応し、波長 545 nm の吸光度が生じることを利用した方法である。

標準溶液 医薬品各条に規定するもののほか、あらかじめ窒素分析によりたん白質含量を測定したヒトアルブミン (窒素-たん白質換算係数は 6.25 を用いる)、あるいは試料たん白質の標準品又は標準物質を、塩化ナトリウム溶液 (9 → 1000) に溶かす。この液の一部を塩化ナトリウム溶液 (9 → 1000) で希釈し、1 mL 当たり 0.5 ~ 10 mg のたん白質を含む、標準曲線上等間隔の 3 種類以上の濃度の標準溶液を調製する。
[注：試料とヒトアルブミンでプロリン含量が大きく異なるとき、反応性が低い場合がある。その場合は別の標準たん白質を用いること。]

試料溶液 試料たん白質の適当量を塩化ナトリウム溶液 (9 → 1000) に溶かし、標準溶液の濃度範囲内の液を調製する。

対照液 塩化ナトリウム溶液 (9 → 1000) を用いる。

ビウレット試液 硫酸銅 (II) 五水和物 3.46 g を水 10 mL に溶かし、必要ならば温めて溶かした後、放置冷却する (A 液)。クエン酸三ナトリウム二水和物 34.6 g 及び無水炭酸ナトリウム 20.0 g を水 80 mL に溶かし、必要ならば温めて溶かした後、放置冷却する (B 液)。A 液及び B 液を混和し、水を加えて 200 mL とする。ビウレット試液は室温で 6 箇月間安定であるが、濁りや沈殿を生じたものは使用しない。

操作法 標準溶液及び試料溶液の一定量に等量の水酸化ナトリウム溶液 (6 → 100) を加え、混ぜる。直ちに試料溶液の 0.4 容量のビウレット試液を加えて振り混ぜた後、15 ~ 25 °C で 15 分間以上放置する。標準溶液及び試料溶液から得た液につき、ビウレット試液を加えてから 90 分以内に、対照液を対照とし、紫外可視吸光度測定法により試験を行い、波長 545 nm における吸光度を測定する。[注：濁りや沈殿を生じた溶液はたん白質濃度の算出に用いてはならない。]

計算法 最小二乗直線回帰法を用いて、標準溶液のたん白質濃度と吸光度をプロットし、最も近似する標準曲線を求め、この線の相関係数を計算する。[注：標準品の濃度範囲内ではたん白質濃度と吸光度はほぼ直線関係が成立する。] 相関係数が 0.99 以上の直線が得られるのが理想である。標準曲線と試料溶液の吸光度から、必要な補正を行い、試料中のたん白質の濃度を求める。

妨害物質 妨害物質の影響を最小にするため、次のように試料からたん白質を沈殿させることができる。試料の溶液 1 容量に 50 % トリクロロ酢酸 0.1 容量を加え、上清を捨てた後、沈殿物を 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム試液少量に溶かし、これを試料溶液の調製に用いる。

解説 本試験では、等量の IgG とアルブミンでごくわずかな相違が見られる。水酸化ナトリウム溶液とビウレット試液を一緒に加えたり、水酸化ナトリウム溶液を加えた後の混和が不十分であったり、あるいは水酸化ナトリウム溶液を加えてからビウレット試液を加えるまでに時間をあけた場合などでは、アルブミンより IgG の方が大きな値が得られる。妨害物質の影響

を減らすためにトリクロロ酢酸を用いる方法は、試料中のたん白質の濃度が 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の場合にも利用することができる。

方法 6 (蛍光法)

本蛍光法は、たん白質の第一級アミン (例えば N 末端アミノ酸あるいはリジン残基の ϵ -アミノ基など) と反応する *o*-フタルアルデヒド (OPA) によるたん白質の誘導体化を利用した方法である。試験に先立ち、たん白質を加水分解することにより試験感度を増加させることができる。加水分解により、たん白質を構成するアミノ酸の α -アミノ基が OPA 試薬と反応できるようになる。本法は極微量のたん白質でも測定可能である。

トリス緩衝液やアミノ酸緩衝液では、トリスヒドロキシメチルアミノメタンやアミノ酸のような第一級アミンが OPA と反応するため、使用を避けるか除去する必要がある。高濃度のアンモニアも OPA と反応する。アミンが OPA と反応して得られる蛍光は不安定である。標準的な操作を自動化することにより試験の正確さ、精度は改善される。

標準溶液 医薬品各条に規定するもののほか、試料たん白質の標準品又は標準物質を、試料溶液の調製に用いた緩衝液に溶かす。この液の一部を同じ緩衝液で希釈して、1 mL 当たり 10 ~ 200 μg のたん白質を含む、標準曲線上等間隔の 5 種類以上の濃度の標準溶液を調製する。

試料溶液 試料たん白質の適当量を適切な緩衝液に溶かし、標準溶液の濃度範囲内の液を調製する。

対照液 試料溶液及び標準溶液の調製に用いた緩衝液を用いる。
試薬・試液

ホウ酸緩衝液 ホウ酸 61.83 g を水に溶かし、水酸化カリウムを加えて pH 10.4 に調整した後、水を加えて 1000 mL とする。

OPA 試液原液 *o*-フタルアルデヒド 120 mg をメタノール 1.5 mL に溶かし、ホウ酸緩衝液 100 mL を加えて混和する。これにポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテル 0.6 mL を加える。室温で 3 週間安定である。

OPA 試液 OPA 試液原液 5 mL に 2-メルカプトエタノール 15 μL を加える。使用する 30 分以上前に調製しておく。この試液は 1 日は安定である。

操作法 試料溶液及び各標準溶液を pH 8.0 ~ 10.5 に調整する。試料溶液及び各標準溶液 10 μL を OPA 試液 100 μL と混和し、室温で 15 分間放置した後、0.5 mol/L 水酸化ナトリウム試液 3 mL を加えて混和する。これらの液につき、蛍光光度法により試験を行い、励起波長 340 nm、蛍光波長 440 ~ 455 nm における蛍光強度を測定する。[注：励起のための照射は蛍光強度を低下させるため、各測定は一回限りとする。]

計算法 たん白質濃度と蛍光強度は直線関係が成立する。直線回帰法を用いて、標準溶液の蛍光強度をたん白質濃度に対してプロットし、各点に最も近似した標準曲線を求める。得られた標準曲線と試料溶液の蛍光強度から、試料中のたん白質濃度を求める。

方法 7 (窒素測定法)

本法はたん白質量の手段として窒素定量を利用した方法である。試料たん白質に他の窒素含有物質が共存すると本法を妨害することになる。窒素定量を行うと試料は破壊されるが、溶

液中以外たん白質にも適用可能である。

操作法 A 窒素定量法により試験を行い、試料たん白質の窒素含量を測定する。ケルダール法用の市販の装置が利用できる。

操作法 B 窒素分析用の市販の装置が利用できる。窒素分析装置のほとんどは熱分解（例えば 1000 °C 近い温度で酸素中の試料を燃焼する）を利用し、試料たん白質に含まれる窒素から一酸化窒素 (NO) 及び他の窒素酸化物 (NO_x) を発生させる。装置によっては生じた酸化窒素を窒素ガスに変え、熱伝導度検出器で量を測定するものもある。その他、一酸化窒素 (NO) をオゾン (O₃) と混和して二酸化窒素ラジカル (NO₂) とし、それが減衰するときに発する光をケミルミネッセンス検出器で測定する装置もある。装置への注入や熱分解条件を最適化し、分析の恒常性を評価するには、比較的純粋で試料たん白質と同一組成のたん白質標準品又は標準物質を用いる。

計算法 試料の窒素含量をそのたん白質の既知の窒素含量で割ることにより、たん白質の含量を算出する。たん白質の既知の窒素含量はたん白質の化学組成から求めるか、あるいは適切な標準品又は標準物質の窒素含量と比較することにより求めることができる。

25. 等電点電気泳動法

はじめに

等電点電気泳動法はたん白質の等電点の違いを利用して分離する電気泳動法である。分離は両性電解質（アンフォライト）の混合物を含むポリアクリルアミドあるいはカンテン平板ゲルを用いて行う。このようなゲルに電圧をかけることによりアンフォライトがゲル内を移動し、pH 勾配が形成される。ゲルの調製時にゲル自体に弱酸あるいは弱塩基の解離基を導入した固定化 pH 勾配を持ったゲルを用いる場合もある。添加したたん白質がその等電点と同じ pH のゲルの位置にまで泳動されると、たん白質の相対電荷が中和されて移動が止まる。混合するアンフォライトを選択することにより、いろいろな範囲の pH 勾配を作ることが可能である。

理論

たん白質は電場がかけられたゲル内の等電点の位置では実効電荷が 0 となり移動度がゼロとなるが、拡散作用による移動は認められる。たん白質は通電により形成された pH 勾配の各々の等電点位置で移動が停止し、そこに濃縮される。この濃縮効果を“フォーカシング (focusing)”と呼ぶ。電圧をかけることにより発生する熱を放散させなければならないため、かけられる電圧には制限があるが、試料量を少なくして高電圧で分析することにより、たん白質の分離度を向上できる。薄いゲルや自動温度調節循環装置を利用した冷却板を用いることによりゲルの発熱を防ぎ、切れのよいフォーカシングが可能となる。分離度 R は隣り合う二つのバンドを分離するのに必要な最小 pI 差 (ΔpI) を測定することで算出される。

$$R = \Delta pI = 3 \sqrt{\frac{D \left(\frac{dpH}{dx} \right)}{E \left(-\frac{d\mu}{dpH} \right)}}$$

式中、 D はたん白質固有の拡散係数、 dpH/dx は pH 勾配、 E は電界強度 (V/cm)、 $-d\mu/dpH$ はたん白質の pH 移動度

曲線上における pI に等しい pH での傾きである。 D 及び $-d\mu/dpH$ はたん白質固有の値であり変えることはできないが、 R はより狭い pH 範囲を用い、電界強度を大きくすることにより分離をよくすることができる。アンフォライト担体を用いて作製された等電点ゲルによるたん白質の分離は非常に良好な結果が得られる。ゲル自体にアンフォライト担体と同様の解離基を導入した固定化 pH 勾配を用いることにより分離度を更に向上させることができる。アンフォライト担体を用いて作製した等電点ゲルでは、0.02 pH 単位以上異なる等電点を持つたん白質を分離できるが、固定化 pH 勾配を用いたゲルでは、約 0.001 pH 単位以上異なる等電点を持つたん白質を分離できる。

操作

試料の特性並びにその調製には、特に注意を払う必要がある。必要に応じて透析あるいはゲルろ過法により、試料を脱イオン水ないしは 2% アンフォライトを含む溶液に調製することが最も望ましい。

ポリアクリルアミド平板ゲルでフォーカシングが完了するのに要する時間は色素たん白質（例えばヘモグロビン）をゲル表面の別々の位置に添加し、電圧をかけることによって確認できる。すなわち、異なる位置に添加した色素たん白質のバンド位置が同一になった時点でフォーカシングが完了したことが確認できる。プロトコールによってはフォーカシングの完了を泳動開始後の経過時間で定めることができる。

適切に調製された標準品あるいは、IEF 用マーカーたん白質と泳動パターンを比較することにより、等電点電気泳動を目的たん白質の確認試験に用いることができる。また、標準品の泳動バンドとの濃淡を比較することにより、限度試験として等電点電気泳動を用いることもできる。更には、デンシトメーターを用いてバンドの濃淡を測定することにより定量法として用いることも可能であり、あるいは同様の操作により目的たん白質のバンドに含まれるたん白質の相対量を測定することも可能である。

装置

装置の構成は以下の通りである：

定電圧定電流定電力電源装置。2500 V の電圧を供給できるものが汎用されているが、このような電源装置が操作上、最適と考えられる。また 30 W 以上の出力を持つ装置が望ましい。

適当な材質でできたゲル支持用冷却板を含むプラスチック性等電点電気泳動装置。

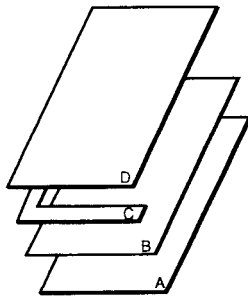
白金電極が付いたプラスチック製カバー。各電極はそれぞれ陽極液及び陰極液で浸された適当な幅、長さ及び厚さの紙芯でゲルと接続される。

ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法：操作の詳細

以下はポリアクリルアミド平板ゲルを用いる等電点電気泳動操作法の詳細であり、医薬品各条に特に規定がない限り本法を用いる。

平板ゲルの調製法

型枠 型枠 (図参照) はガラス板 (A)、ゲルの取り扱いを容易にするためのポリエステルフィルム (B)、1 つ以上のスペーサー (C)、ガラス板 (D) 及びこれらを固定するためのクランプから成っている。



7.5 % ポリアクリルアミドゲル アクリルアミド 29.1 g 及び N,N' -メチレンビスアクリルアミド 0.9 g を水 100 mL に溶かす。この液 2.5 容に医薬品各条に規定されたアンフォライト混液を加え、水で 10 容とする。この液を注意深く混和した後、脱気する。

型枠の組み立て 一番下のガラス板にポリエステルフィルムをのせ、スパーサーを置き、2 枚目のガラス板をその上に置き、それらをクランプで固定する。上記で用時調製した 7.5 % ポリアクリルアミドゲルをマグネチックスターラーで攪拌しながら、10 % ペルオキシ二硫酸アンモニウム溶液 0.25 容及び N,N,N',N' -テトラメチルエチレンジアミン 0.25 容を加え、この液を直ちに型枠のガラス板間の隙間に流し込む。

方法

型枠をはずし、冷却した支持板を適当な液体 2 ~ 3 mL で濡らし、その上に気泡が生じないように注意しながらポリエステルフィルム上に重合させたゲルを移す。医薬品各条に規定されたように試料溶液及び標準溶液を調製する。約 10 mm × 5 mm の試料添付用の紙片（複数）をゲル板上に置き、各紙片に試験する試料の規定量を浸み込ませる。また、等電点既知のたん白質溶液の規定量を pH マーカーとしてゲルに載せる。プロトコールによっては紙片の代わりに試料液を添付する溝を持ったゲル板を使用する。ゲルの幅に届く長さに切った 2 枚のろ紙をそれぞれの電極液（陽極液は酸性、陰極液はアルカリ性）に浸す。陽極液及び陰極液のそれぞれの組成は医薬品各条に規定される。これらの紙芯をゲルの両端に端から数ミリメートル重なるように置く。両電極が各紙芯に接触するようにカバーをかける。医薬品各条に規定された電気泳動条件に従って泳動を開始する。標準たん白質混合物の泳動が終了した時点で電流を止め、ピンセットで試料添加用紙片と両電極紙芯を取り除き、ゲル平板を「ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動用固定液」に浸す。室温で 30 分間穏やかに攪拌した後、固定液を除き、「脱色液」200 mL を加えて 1 時間、攪拌する。脱色液を捨て、「クーマシー染色液」を加えて 30 分間放置する。次に「脱色液」に浸して透明な背景にバンドが見えるようになるまでゲルを脱色する。医薬品各条に記載されている染色パターンのバンドの位置及び濃度を調べる。

本試験法の細部の変更（検証の必要な項目）

本法を準用して、試験法あるいは操作法の変更を行う場合には適切な検証が必要である。変更には次のようなケースが含まれる。

- (1) 市販平板ゲル、染色及び脱色液のキットの使用
- (2) 固定 pH 勾配ゲルの使用
- (3) ディスクゲルの使用
- (4) 種々のサイズの超薄層 (0.2 mm) 平板ゲルカセットの使用

使用

- (5) 異なるサンプル量あるいは紙以外のサンプル添加手段を含むサンプル添加操作法の変更
- (6) ゲルの寸法や装置に依存する電流、電圧等の変更やバンドの移動度から判断するのではなく定められた泳動時間の分離等、種々の泳動条件の利用
- (7) プレフォーカシング段階の組み入れ
- (8) 自動装置の使用
- (9) カンテンゲルの使用

等電点電気泳動操作法の検証

本法と異なる方法を採用する場合にはその検証を行う必要がある。次の判断基準により分離能を評価することができる。

- (1) 例えば等電点既知の着色 pH マーカーを用いる場合は目的とする安定な pH 勾配が形成されているかどうかの評価
- (2) 被験物質の標準物質の泳動パターンと被験物質の電気泳動パターンとの比較
- (3) 医薬品各条に記述された以外の評価基準

本法の規定の変更

特定の物質の分析に必要な本法の変更は各医薬品各条に詳細に規定することができる。これらには次のものが含まれる。

- (1) 泳動ゲル中への尿素の添加 (3 mol/L の濃度がたん白質を可溶化しておくのに必要な量としてしばしば用いられるが、8 mol/L まで用いることもできる)：等電点において沈殿を生じるたん白質がある場合には、沈殿を起こさせないようにゲルの組成に尿素を加える。尿素を使う必要がある場合には、たん白質のカルバミル化を防ぐために用時調製した溶液を用いるべきである。
- (2) 他の染色法の利用
- (3) たん白質の凝集や沈殿を防ぐために非イオン性の界面活性剤（例えばオクテチルグルコシド）や両親媒性の界面活性剤（例えば 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) や 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate (CHAPSO)) を添加したゲルの使用や試料へのアンフォライトの添加

注意

試料はゲルのどの場所にもでも添加できるが、極端な pH 環境に試料をさらすことのないように電極付近に試料を添加することは避けるべきである。試験法を開発する場合に、被験試料をゲルの 3 つのポイント（中心と両端）とに添加することができるが、両端に添加したたん白質の泳動パターンは同一にはならないことも起こりうる。

フォーカシングを長時間行くと pH 勾配が崩れて「pH ドリフト（陰極流）」と呼ばれる現象が起こる可能性がある。その機構は完全に解明されているわけではないが、電気的浸透圧と二酸化炭素の吸収が陰極流を引き起こす要因であると考えられている。pH ドリフトはゲルの陰極側からフォーカスしたたん白質が外へ泳動されてしまう現象である。固定化 pH 勾配を用いることによりこの問題を解決することができる。

泳動中はゲルを支えるゲル支持板をじゅうぶんに冷却（おおよそ 4°C）することが重要である。電気泳動中に高い電場をかけると発熱することがあり、ゲルのフォーカシングにも影響する。