

Table 1A Mass Spectrometers and Methods Used

Laboratory Mass spectrometer Operator	Sample Method	Glutathione	Gonadrelin	Human insulin A chain	Human insulin B chain
A1 Qatar Elite (QTOF) Applied Biosystems Operator a1	Calibrator <i>m/z</i> Conc. or amount of sample* Sample introduction <sup>b</sup> (flow rate) Ion spray voltage Others	YOKUDELNA (JEOL) 158.9646, 294.9394, 430.9142, 566.8890, 702.8638, 838.8386, 974.8134, 1110.7882, 1246.7630, 1382.7379, 1518.7127			
		5 $\mu$ M Tip1 1600 V	5 $\mu$ M Tip1 1600 V	20 $\mu$ M Syr1 (0.3 $\mu$ l/min) 2400 V	20 pmol HPLC1 (0.5 $\mu$ l/min) 2400 V
				PE, CAM	CM
				Solid-phase extraction using HLB (Waters)	
A2 LTQ (IT) Thermo Fisher Scientific Operator a2	Calibrator <i>m/z</i> Conc. or amount of sample* Sample introduction <sup>b</sup> (flow rate) Ion spray voltage Others	Caffeine (Sigma-Aldrich), MRFA (Research Plus), Ultramark1621 (Alfa Aesar) 195.0877, 524.2650, 1121.9970, 1221.9906, 1321.9842, 1421.9779, 1521.9715, 1621.9651, 1721.9587			
		5 $\mu$ M Syr1 (3 $\mu$ l/min) 2000 V	5 $\mu$ M Syr1 (3 $\mu$ l/min) 2000 V	10 $\mu$ M Syr2 (3 $\mu$ l/min) 2000 V	10 $\mu$ M Syr2 (3 $\mu$ l/min) 2000 V
				Solid-phase extraction using HLB (Waters)	
A3 LTQ FT (FT-ICR) Thermo Fisher Scientific Operator a2	Calibrator <i>m/z</i> Conc. or amount of sample* Sample introduction <sup>b</sup> (flow rate) Ion spray voltage Others	Caffeine (Sigma-Aldrich), MRFA (Research Plus), Ultramark1621 (Alfa Aesar) 195.0877, 524.2650, 1121.9970, 1221.9906, 1321.9842, 1421.9779, 1521.9715, 1621.9651, 1721.9587			
		5 $\mu$ M Syr1 (3 $\mu$ l/min) 2000 V	5 $\mu$ M Syr1 (3 $\mu$ l/min) 2000 V	10 $\mu$ M Syr2 (3 $\mu$ l/min) 2000 V	10 $\mu$ M Syr2 (3 $\mu$ l/min) 2000 V
				Solid-phase extraction using HLB (Waters)	
B1 Esquire HCT plus (IT) Bruker Daltonics Operator b1	Calibrator <i>m/z</i> Conc. or amount of sample* Sample introduction <sup>b</sup> (flow rate) Ion spray voltage	ES Tuning Mix Pos (Agilent Technologies) 118.09, 322.05, 622.03, 922.01, 1521.97, 2121.93, 2721.89			
		20 $\mu$ g (65 nmol) HPLC3 (0.2 ml/min) 4000 V	20 $\mu$ g (17 nmol) HPLC3 (0.2 ml/min) 4000 V	3.1 nmol HPLC3 (0.2 ml/min) 4000 V	3.1 nmol HPLC3 (0.2 ml/min) 4000 V
B2 LCT (TOF) Waters Operator b1	Calibrator <i>m/z</i> Conc. or amount of sample* Sample introduction <sup>b</sup> (flow rate) Ion spray voltage	NaI 322.7782, 472.6725, 622.5667, 772.4610, 922.3552, 1072.2494, 1222.1437, 1372.0379, 1521.9321, 1671.8264,			
		5 $\mu$ g (16 nmol) HPLC3 (50 $\mu$ l/min) 3000 V	5 $\mu$ g (4.2 nmol) HPLC3 (50 $\mu$ l/min) 3000 V	0.8 nmol HPLC3 (50 $\mu$ l/min) 3000 V	0.8 nmol HPLC3 (50 $\mu$ l/min) 3000 V
B3 LCQ Advantage MAX (IT) Thermo Fisher Scientific Operator b1	Calibrator <i>m/z</i> Conc. or amount of sample* Sample introduction <sup>b</sup> (flow rate) Ion spray voltage	Caffeine (Sigma-Aldrich), MRFA (Research Plus), Ultramark1621 (Alfa Aesar) 195.0877, 524.2650, 1121.9906, 1521.9715, 1821.9530			
		20 $\mu$ g (65 nmol) HPLC3 (0.2 ml/min) 5000 V	20 $\mu$ g (17 nmol) HPLC3 (0.2 ml/min) 5000 V	3.1 nmol HPLC3 (0.2 ml/min) 5000 V	3.1 nmol HPLC3 (0.2 ml/min) 5000 V
C1 LCQ Deca (IT) Thermo Fisher Scientific Operator c1	Calibrator <i>m/z</i> Conc. or amount of sample* Sample introduction <sup>b</sup> (flow rate) Ion spray voltage Others	Caffeine (Sigma-Aldrich), MRFA (Research Plus), Ultramark1621 (Alfa Aesar) 195.0877, 524.2650, 1121.9906, 1521.9715, 1821.9530			
		10 $\mu$ M Syr1 (10 $\mu$ l/min) 5000V	10 $\mu$ M Syr1 (10 $\mu$ l/min) 5000V	4.3 nmol HPLC4 (0.5 mL/min) 5000V	10 $\mu$ M Syr1 (10 $\mu$ l/min) 5000V
				purification by RP-HPLC	
C2 Ultima API (QTOF) Micromass Operator c2	Calibrator <i>m/z</i> Conc. or amount of sample* Sample introduction <sup>b</sup> (flow rate) Ion spray voltage Others	NaI 22.9898, 132.9054, 172.8840, 322.7782, 472.6725, 622.5667, 772.4610, 922.3552, 1072.2494, 1222.1437, 1372.0379,			
		1 $\mu$ M Syr1 (5 $\mu$ l/min) 2500V	10 $\mu$ M Syr1 (5 $\mu$ l/min) 3000V	10 $\mu$ M Syr1 (5 $\mu$ l/min) 3000V	10 $\mu$ M Syr1 (5 $\mu$ l/min) 3000V
				purification by RP-HPLC	
C3 LCT (TOF) Waters Operator c1	Calibrator <i>m/z</i> Conc. or amount of sample* Sample introduction <sup>b</sup> (flow rate) Ion spray voltage Others	NaI 22.9898, 132.9054, 172.8840, 322.7782, 472.6725, 622.5667, 772.4610, 922.3552, 1072.2494, 1222.1437, 1372.0379,			
		1 $\mu$ M Syr1 (5 $\mu$ l/min) 2500V	10 $\mu$ M Syr1 (5 $\mu$ l/min) 3000V	10 $\mu$ M Syr1 (5 $\mu$ l/min) 3000V	10 $\mu$ M Syr1 (5 $\mu$ l/min) 3000V
				purification by RP-HPLC	
D Synapt HDMS (QTOF) Waters Operator d1	Calibrator <i>m/z</i> Conc. or amount of sample* Sample introduction <sup>b</sup> (flow rate) Ion spray voltage	NalCs, Glu-fibrinopeptide 158.9, 228.9, 362.8, 430.8, 498.8, 566.7, 634.7, 702.7, 770.7, 838.7, 906.7, 974.6, 1042.6, 1110.6, 1314.5, 1382.5, 1450.5			
		5 $\mu$ g (16 nmol) HPLC5 (0.25 ml/min) 5000 V	5 $\mu$ g (4.2 nmol) HPLC5 (0.25 ml/min) 5000 V	0.86 nmol HPLC5 (0.25 ml/min) 5000 V	0.86 nmol HPLC5 (0.25 ml/min) 5000 V
F LTQ Orbitrap XL (OT) Thermo Fisher Scientific Operator f1	Calibrator <i>m/z</i> Conc. or amount of sample* Sample introduction <sup>b</sup> (flow rate) Ion spray voltage	Caffeine (Sigma-Aldrich), MRFA (Research Plus), Ultramark1621 (Alfa Aesar) 195.0877, 524.2650, 1121.9970, 1221.9906, 1321.9842, 1421.9779, 1521.9715, 1621.9651, 1721.9587			
		1 $\mu$ M Syr3 (5 $\mu$ l/min) 2000V	1 $\mu$ M Syr3 (5 $\mu$ l/min) 2000V	1 $\mu$ M Syr3 (5 $\mu$ l/min) 2000 V	1 $\mu$ M Syr3 (5 $\mu$ l/min) 2000V

\* Estimated values.

<sup>b</sup> Tip: tip-based infusion, Syr: syringe infusion.

by Individual Laboratories (ESI)

Human insulin	Human growth hormone	Human serum albumin	Sample introduction methods
1654.6875, 1790.6623, 1926.6371, 2062.6119 10 $\mu$ M Tip1 1600 V	10 $\mu$ M Syr1 (0.3 $\mu$ l/min) Gel filtration	10 $\mu$ M Syr1 (0.3 $\mu$ l/min) 2400 V Gel filtration	Tip1 0.1 % AcOH/50 % MeOH Syr1 0.1 % AcOH/50 % MeOH HPLC1 C8 0.1 % formic acid/2 % ACN 0.1 % formic acid/90 % ACN
10 $\mu$ M Syr1 (3 $\mu$ l/min) 2000 V	2 $\mu$ M Syr1 (3 $\mu$ l/min) 2000 V Gel filtration	8 $\mu$ M Syr1 (3 $\mu$ l/min) 2000 V Gel filtration	Syr2 5 mM AcONH <sub>4</sub> (pH 8.5)/50 % MeOH
10 $\mu$ M Syr1 (3 $\mu$ l/min) 2000 V	10 pmol HPLC2 (3 $\mu$ l/min) 2000 V Gel filtration	10 pmol HPLC2 (3 $\mu$ l/min) 2000 V Gel filtration	HPLC2 C18 0.1 % formic acid/2 % ACN 0.1 % formic acid/90 % ACN
20 $\mu$ g (3.4 nmol) HPLC3 (0.2 ml/min) 4000 V	40 $\mu$ g (1.8 nmol) HPLC3 (0.2 ml/min) 4000 V		HPLC3 C8 0.1 % TFA 0.085 % TFA/47 % ACN
1821.7206, 1971.6149 5 $\mu$ g (0.86 nmol) HPLC3 (50 $\mu$ l/min) 3000 V	10 $\mu$ g (0.45 nmol) HPLC3 (50 $\mu$ l/min) 3000 V	10 $\mu$ g (0.15 nmol) HPLC3 (50 $\mu$ l/min) 3000 V	
10 $\mu$ M Syr1 (20 $\mu$ l/min) 4500V	10 $\mu$ M Syr1 (20 $\mu$ l/min) 4500V	10 $\mu$ M Syr1 (20 $\mu$ l/min) 4500V dialysis	HPLC4 C4 0.1 % TFA/2 % ACN 0.1 % TFA/98 % ACN
1521.9321, 1671.8264, 1821.7206, 1971.6149			
Nal 10 $\mu$ M Syr1 (5 $\mu$ l/min) 3000V	10 $\mu$ M Syr1 (5 $\mu$ l/min) 3000V	10 $\mu$ M Syr1 (5 $\mu$ l/min) 3000V dialysis	
785.8 5 $\mu$ g (0.86 nmol) HPLC5 (0.25 ml/min) 5000 V	125 ng (5.6 pmol) HPLC5 (0.25 ml/min) 5000 V	63 ng (0.94 pmol) HPLC5 (0.25 ml/min) 5000 V	HPLC5 C4 0.1 % formic acid 1.0 % formic acid/ACN
1 $\mu$ M Syr3 (5 $\mu$ l/min) 2000V	1 pmol HPLC6 (3 $\mu$ l/min) 2000V	1 pmol HPLC6 (3 $\mu$ l/min) 2000V	Syr3 0.1 % formic acid/50 % AC HPLC6 C18 0.1 % formic acid 0.1 % formic acid/ACN

Table 1B Mass Spectrometers and Methods Used

Laboratory	Sample	Glutathione	Gonadrelin	Human insulin A chain	Human insulin B chain	Human insulin
<b>A4</b> 4800 plus (TOF/TOF) Applied Biosystems Operator a3	Calibrator <sup>a,b</sup> <i>m/z</i> Sample Conc. <sup>c,d</sup> Matrix Deposition method Mode	BK1-7, Angt II, P <sub>14</sub> R, ACTH18-39 (S) 757.400, 1046.542, 1533.858, 2465.199 25 mM CHCA1 Spot1 reflectron mode	6.3 mM CHCA1 Spot1 reflectron mode	25 μM (PE), 100 μM (CAM, CM) CHCA1 Spot1 reflectron mode	100 μM (CAM, CM) CHCA1 Spot1 reflectron mode	Ins_B, CyC, apoMG, Ald, BSA 5734.51, 12361.96, 83 μM SA1 Spot1 linear mode
<b>B4</b> Autoflex II (TOF) Bruker Daltonics Operator b1	Calibrator <sup>a,b</sup> <i>m/z</i> Sample Conc. <sup>e</sup> Solvent Matrix Deposition method Mode Others	BK1-7, Angt II, SubP (B) 757.40, 1046.54, 1347.74 0.5 mg/ml (0.42 mM) DDW CHCA2 Spot2 reflectron mode Recrystallizing sol: EtOH:ACN:0.1%TFA = 6:3:1	10 μM (SubP) 2093.09, 2465.20, 3147.47 30 μM ACN:DDW:TFA = 700:300:1 CHCA2 Spot2 reflectron mode	ACTH1-17, ACTH18-39, So28 (B) 2093.09, 2465.20, 3147.47 30 μM ACN:DDW:TFA = 700:300:1 CHCA2 Spot2 reflectron mode	40 μM CHCA1 Spot2 reflectron mode	Ins, CyC, apoMG (B) 5734.56, 6181.65, 8476.77 0.5 mg/ml (86 μM) DDW SA2 Spot3 linear mode
<b>E</b> Voyager DE RP (TOF) Applied Biosystems Operator e1	Calibrator <sup>a,b</sup> <i>m/z</i> Sample Conc. <sup>c,d</sup> Matrix Deposition method Mode	GRGDTF (S), Angt I (F), ACTH18-39 (S) 601.282, 1295.678, 2464.191 1~10 mM CHCA3 (DHB1) Spot4 (Spot5) reflectron mode	1~10 μM CHCA3 (DHB1) Spot4 (Spot5) reflectron mode	1~10 μM CHCA3 (DHB1) Spot4 (Spot5) reflectron mode	1~10 μM CHCA3 (DHB1) Spot4 (Spot5) reflectron mode	1~10 μM CHCA3 (DHB1) Spot4 (Spot5) reflectron mode
<b>G</b> Voyager DE-PRO (TOF) Applied Biosystems Operator g1	Calibrator <sup>a,b</sup> <i>m/z</i> Sample Conc. <sup>c,d</sup> Matrix Deposition method Mode Others	CHCA, Bom (B) 190.178(+2), 1619.822 1.0 mg/ml (3 mM) CHCA4 Spot2 reflectron mode Recrystallizing sol.: ACN:0.1 % TFA = 1:1	Angt II, ACTH18-39 (B) 1046.541, 2465.198 1.0 mg/ml (0.85 mM) CHCA4 Spot2 reflectron mode	ACTH18-39, So28 (B) 2465.198, 3147.471 1.0 mg/ml (0.17 mM) CHCA4 Spot2 reflectron mode	ACTH18-39, Ubl (B) 2465.198, 8565.76 1.0 mg/ml (0.17 mM) CHCA4 Spot2 reflectron mode	Ins_B, Ubl (B) 5734.51, 8565.76 1.0 mg/ml (0.17 mM) CHCA4 Spot2 reflectron mode
<b>H</b> AXIMA-TOF <sup>2</sup> (TOF/TOF) Shimadzu Operator h1	Calibrator <sup>a,b</sup> <i>m/z</i> Sample Conc. <sup>c,d</sup> Matrix Deposition method Mode Others	CHCA 190.050 (+2), 379.093 0.5 mg/ml (1.6 mM) CHCA1 Spot5 reflectron mode	CHCA, Angt II, Angt I (S) 190.050 (+2), 379.093, 1046.542, 1296.685 0.5 mg/ml (0.42 mM) CHCA1 Spot5 reflectron mode	CHCA, Angt II, ACTH18-39, ACTH7-38 (S) 190.050 (+2), 379.093, 1046.542, 2465.20, 10 μM CHCA1 Spot5 reflectron mode	10 μM CHCA1 Spot5 reflectron mode	Ins_H (S) 5803.64 10 μM CHCA1 Spot5 reflectron mode

<sup>a</sup>, Angt I: angiotensin I, Bom: bombesin, BK1-7: bradykinin fragment 1-7, Angt II: angiotensin II, SubP: substance P, So28: somatostatin 28, Ins B: bovine insulin, Ins H: human insulin.

<sup>b</sup>, Manufacturer: S: Sigma-Aldrich; B: Bruker Daltonics; P: Peptide Institute.

<sup>c</sup>, Estimated values.

<sup>d</sup>, Dissolved in 0.1 % TFA/50 % ACN.

溶液を1:1~5の割合で混合し、マイクロピペットを用いてサンプルプレートに滴下し乾固させた。若しくは、サンプルプレート上で試料溶液とマトリックス溶液を混合し乾固させた。その他に、試料溶液とマトリックス溶液をサンプルプレートに乾固した後、再結晶化を行う手法を用いた。サンプルプレートを質量分析計に設置し、N<sub>2</sub>レーザーを照射して試料をイオン化し、ポジティブイオンモードでマススペクトルを測定した。

### 2.5.3 MS/MS

MSと同様に試料をイオン化した後、プロトン化分子を前駆イオンとして選択し、適切なフラグメント化の条件を設定し実行した。

### 2.6 分子質量の計算

観測されたイオンの *m/z* 値と価数から分子質量を計算した。単同位体ピークが確認できた場合は単同位体質量を計算し、確認できなかった場合はピーク頂点より平均質量を計算した。分子量の大きなたん白質のESI-MSにおいて多数の多価イオンとして観測された場合は、デコンボリューション処理によりたん白質分子の質量を求めた。単同位体質量及び平均質量の理論値は、単同位体精密質量 <sup>1</sup>H: 1.007825, <sup>12</sup>C: 12.000000, <sup>14</sup>N: 14.003074, <sup>16</sup>O: 15.994915, <sup>32</sup>S: 31.972072<sup>6)</sup>及び原子量 H: 1.00794, C: 12.0107, N: 14.0067, O: 15.9994, S: 32.065<sup>7)</sup>を用いて計算した。

## by Individual Laboratories (MALDI)

Human growth hormone	Human serum albumin	Sample introduction methods Matrix solutions and deposition methods			
BSA (S) 16952.27, 39212.28, 66430.09 12.5 µM SA1 Spot1 linear mode	Ald, BSA (S) 39212.28, 66430.09 50 µM SA1 Spot1 linear mode	CHCA1 5 mg/ml 0.1 % TFA/50 % ACN	SA1 5 mg/ml 0.1 % TFA/50 % ACN	Spot1 Deposit 1 µl of mixture of 2 µl of sample sol. and 10 µl of matrix sol.	
TN, ProA, BSA (B) 23982, 44613, 66431 1 mg/ml (45 µM) DDW SA2 Spot3 linear mode	1 mg/ml (15 µM) DDW Spot3 linear mode	CHCA2 0.7 mg/ml 2-PrOH:EtOH = 3:1	SA2 Saturated sol. 0.1 % TFA:ACN = 2:1	Spot2 Deposit 1 µl of mixture of 1 µl of sample sol. and 1 µl of matrix sol., then recrystallize	Spot3 Deposit 1 µl of sample sol. and 1 µl of matrix sol.
apoMG, CA (S) 8476.8 (+2), 16952.4, 33904.0 (dimer), 14492.2 (+2), 28983.4 100 µM SA3 Spot5 linear mode	BSA (S) 33216.55 (+2), 66430.09 ~30 µM SA3 Spot5 linear mode	CHCA3 25-30 mg/ml 0.3 % TFA/50 % ACN (10 % EtOH)	DHB1 55-65 mg/ml 0.3 % TFA/50 % ACN (10 % EtOH)	SA3 55-65 mg/ml 0.3 % TFA/50 % ACN (10 % EtOH)	Spot4 Deposit 0.5 µl of matrix sol. and 0.5 µl of sample sol.
Cyc, TN (B) 12360.97, 23982 1.0 mg/ml (45 µM) SA4 Spot2 linear mode	Ald, BSA (B) 39212.28, 66430.09 1.0 mg/ml (15 µM) SA4 Spot2 linear mode	CHCA4 10 mg/ml 0.1 % TFA/50 % ACN	SA4 5 mg/ml 0.1 % TFA/50 % ACN	Spot5 Deposit 0.7 µl of mixture of 1 µl of sample sol. and 1 µl of matrix sol.	
Ald (S) 19607.64 (+2), 39212.28 10 µM SA4 Spot6 linear mode	BSA (S) 33216.55 (+2), 66430.09 10 µM SA4 Spot6 linear mode	SA4 10 mg/ml 0.1 % TFA/50 % ACN	Spot6 Deposit 1 µl of mixture of 1 µl of sample sol. and 4 µl of matrix sol.		

Ubi: ubiquitin I, Cyc: cytochrome C, apoMG: apomyoglobin, CA: carbonic anhydrase, TN: trypsinogen, ProA: protein A, Ald: aldolase, BSA: bovine serum albumin.

## 2.7 還元アルキル化

## 2.7.1 還元ピリジリエチル (PE) 化

試料約 20 µg を 6 M 塩酸グアニジンを含む 0.25 M トリス緩衝液 100 µL に溶かし、1 M ジチオスレイトール溶液約 3.5 µL (又は 10% 2-メルカプトエタノール溶液約 5 µL) を加えた。この液を窒素あるいはアルゴンの存在下で暗所に室温もしくは 37°C で 1 時間放置した後、反応液に 4-ピニルピリジン約 1 µL を加え、更に 1 時間室温で暗所に放置した。逆相 HPLC、ゲル濾過又は透析等を用いて脱塩した。

2.7.2 還元カルボキシアミドメチル (CAM) 化  
(または還元カルボキシメチル (CM) 化)

試料約 20 µg を 6 M 塩酸グアニジンを含む 0.25

M トリス緩衝液 20 µL に溶かし、20 mM ジチオスレイトール溶液 10 µL を加えた。この液を窒素あるいはアルゴンの存在下で暗所に 37°C で 1 時間 30 分放置した後、7.4 mg/mL のヨードアセタミド溶液 (CM 化の場合はヨード酢酸溶液) 10 µL を加えて更に 45 分間 37°C で暗所に放置した。逆相 HPLC、ゲル濾過又は透析等を用いて脱塩した。

## 2.8 統計処理

各測定は、日を変えて 2 回行った。分子質量の実測値について、分散分析により室内及び室外再現標準偏差を計算した。同一の研究機関及び同一試験者であっても、タイプの異なる装置を用いた場合は、異なる試験室と見なした。

## 2.9 測定機関（試験室数）

国立医薬品食品衛生研究所 (4), キリンファーマ (株) (4), 中外製薬 (株) (3), アステラス製薬 (株) (1), 大日本住友製薬 (株) (1), サーモフィシャーサイエンティフィック (株) (1), 近畿大学 (1) 及び島津製作所 (株) (1)

## 3. 研究結果

### 3.1 MSを用いたペプチド及びたん白質性

#### 医薬品の確認試験法案の作成

標準的試験法として、以下のような測定条件を採用し確認試験法案（別紙1）を作成した。イオン化方法にはESI及びMALDIを使用し、分析計にはQ型、IT型、TOF型又はFT-ICR型等を使用することとした。ESI-MSでは、溶媒として、酢酸、ギ酸又はTFA等を含む水、アセトニトリル及びメタノールの混液等を使用し、試料導入にはインフュージョンやHPLC等を使用することとした。MALDI-MSでは、マトリックスとして、ペプチドにはCHCA又はDHBを、たん白質にはSAを用い、TFAを含む水、アセトニトリル混液に溶解し、試料とマトリックスを混合しサンプルプレート上に乾固し、質量分析に供することとした。質量校正は、装置メーカー推奨のもの、もしくは分子質量が既知の質量分析用標準品、ペプチド及びたん白質を用いるものとした。ジスルフィド結合の還元アルキル化方法には、PE化、CAM化又はCM化を用いることとした。

### 3.2 試験案（MS）の適用可能性の検証

インスリンは各機関で還元アルキル化を行った。確認試験法案に基づいて、グルタチオン、ゴナドレリン、還元アルキル化インスリンA鎖及びB鎖、インスリン、ヒト成長ホルモン及びヒト血清アルブミンの分子質量を日を変えて2回測定した。各機関で使用した装置、質量校正標準品、試料調製法及び試料導入法をTable 1A及び1Bにまとめた。また、Table 2に各機関で得られた分子質量実測値（上段に単同位体質量の実測値、下段に平均質量の実測値）、並びに集計結果を示す。

**グルタチオン** すべての機関において、グルタチオン（分子量：307.3）の単同位体質量を測定した。単同位体質量の実測値は307.00~307.17 Da、平均は307.08 Da、理論値（307.084）からの実測値の

平均の誤差は-0.01 Da、室間再現標準偏差は0.040 Da、相対標準偏差は131 ppmであった。

**ゴナドレリン** 1試験室を除いて、ゴナドレリン（分子量1,182.3）の単同位体質量を測定した。単同位体質量の実測値は1,181.43~1,181.72 Da、平均は1,181.57 Da、理論値（1,181.573）からの実測値の平均の誤差は0.00 Da、室間再現標準偏差は0.058 Da、相対標準偏差は49 ppmであった。

**還元アルキル化ヒトインスリンA鎖** PE化A鎖（分子量：2,804.2）、CAM化A鎖（分子量：2,611.9）及びCM化A鎖（分子量：2,615.8）の測定では、2試験室を除いて単同位体質量を測定した。単同位体質量の実測値は、それぞれ、2,802.04~2,802.61, 2,609.69~2,610.60及び2,614.00~2,614.89、平均は2,802.25, 2,610.09及び2,614.19であり、理論値（2,802.231, 2,610.086及び2,614.022）からの実測値の平均の誤差は0.02, 0.00及び0.17 Da、室間再現標準偏差は0.21, 0.20及び0.28 Da、相対標準偏差は75, 75及び106 ppmであった。PE化インスリンA鎖を測定した5試験室（4機関）は、いずれもプロトン化分子を観測することができた。これに対して、CAM化インスリンA鎖を測定した9試験室（6機関）のうちの1試験室、CM化インスリンA鎖を測定した9試験室（5機関）のうち2試験室で、プロトン化分子を観測できなかった。インスリンA鎖は分子内にシステイン残基を4個含み、還元アルキル化の種類がMSの検出感度に大きく影響することが示された。

**還元アルキル化インスリンB鎖** PE化B鎖（分子量：3,640.2）、CAM化B鎖（分子量：3,544.0）及びCM化B鎖（分子量：3,546.0）の測定では、12試験室が単同位体質量を、3試験室で平均質量を測定した。単同位体質量の実測値は、それぞれ、3,637.74~3,638.41, 3,541.51~3,542.08及び3,543.60~3,544.29、平均は3,638.00, 3,541.75及び3,543.94であり、理論値（3,637.800, 3,541.728及び3,543.696）からの実測値の平均の誤差は0.20, 0.02及び0.25 Da、室間再現標準偏差は0.30, 0.16及び0.23 Da、相対標準偏差は82, 44及び65 ppmであった。

**ヒトインスリン** ヒトインスリン（分子量5,807.6）の測定では、5試験室が単同位体質量を測定し、9試験室が平均質量を測定した。MALDI-

MSで測定したヒトインスリンのマススペクトルの例をFig.1に示す。単同位体質量、最大強度質量及び平均質量に相当する  $m/z$  の位置を図中に示した。各機関の単同位体質量の実測値は5,803.59~5,804.87Da,平均は5,803.91Da,理論値(5,803.638)からの実測値の平均の誤差は0.27 Da, 室間再現標準偏差は0.54 Da, 相対標準偏差は92 ppmであった。また、平均質量の実測値は5,805.1~5,808.2 Da,平均は5,806.5 Da,理論値(5,807.576)からの実測値の平均の誤差は-1.1 Da, 室間再現標準偏差は0.90 Da, 相対標準偏差は155 ppmであった。

**ヒト成長ホルモン** 全機関がヒト成長ホルモン(分子量22,125)の平均質量を測定した。平均質量の実測値は22,093.0~22,127.1Da,平均は22,118.8 Da,理論値(22,124.8)からの実測値の平均の誤差は-6.0 Da, 室間再現標準偏差は10.5 Da, 相対

標準偏差は476 ppmであった。なお、ESI-MSによる測定では、実測値は22,123.0~22,127.1 Da,平均は22,124.5 Da,理論値からの実測値の平均の誤差は-0.2 Da, 室間再現標準偏差は0.92 Da, 相対標準偏差は42 ppmであった。それに対して、MALDI-MSでは、実測値は22,093.0~22,124.8 Da,平均は22,108.4 Da,理論値からの実測値の平均の誤差は-16.3 Da, 室間再現標準偏差は12.2 Da, 相対標準偏差は552 ppmであった。

**ヒト血清アルブミン** 全機関がヒト血清アルブミン(分子量66,437)の平均質量を測定した。平均質量の実測値は66,346~66,500Da,平均は66,418 Da,理論値からの実測値の平均の誤差は-20 Da, 室間再現標準偏差は43 Da, 相対標準偏差は649 ppmであった。ESI-MSによる測定では、実測値は66,436~66,500 Da,平均は66,447 Da,理論値からの実測値の平均の誤差は10 Da, 室間再現標準

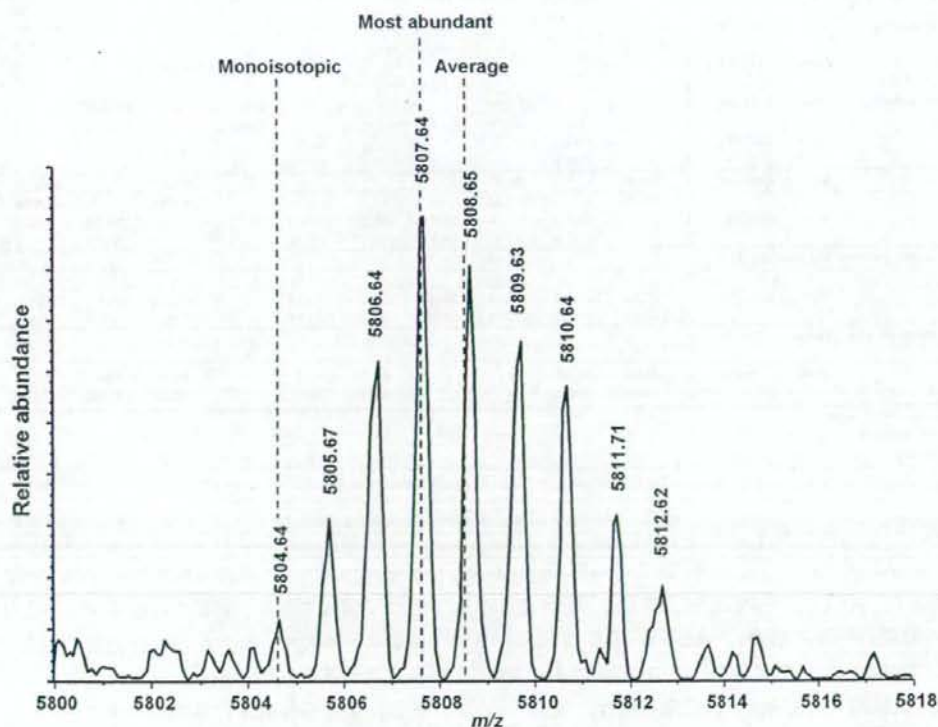


Fig.1 MALDI-MS Spectrum of Human Insulin  
 Monoisotopic mass, most abundant mass and average mass were deduced to be 5803.63, 5806.64 and 5807.53, respectively.

Table 2 Summary of Measurement of

Laboratory		A1	A2	A3	B1	B2	C1	C2	C3	D	F	A4	B4	
Mass type	Theoretical mass	ESI QTOF	ESI IT	ESI FT-ICR	ESI IT	ESI TOF	ESI IT	ESI QTOF	ESI TOF	ESI QTOF	ESI OT	MALDI TOF/TOF	MALDI TOF	
Sample	(Da)	Observed mass												
Glutathione	Mmono	307.084	1 307.08	307.17	307.08	307.1	307.05	307.0	307.08		307.09	307.08	307.04	
			2 307.08	307.17	307.08	307.1	307.05	307.0	307.08		307.09	307.08	307.03	
	Mave	307.324	1											
			2											
Gonadrelin	Mmono	1181.573	1 1181.58		1181.58	1181.6	1181.43	1181.5	1181.54		1181.58	1181.57	1181.58	1181.5
			2 1181.57		1181.58	1181.6	1181.43	1181.6	1181.54		1181.58	1181.57	1181.57	1181.5
	Mave	1182.290	1	1181.7										
			2	1181.7										
Human insulin A chain Pyridyl ethyl	Mmono	2802.231	1 2802.25							2802.19		2802.18		
			2 2802.25							2802.17		2802.19		
	Mave	2804.249	1											
			2											
Carboxyamidmethyl	Mmono	2610.086	1 2610.11			2610.2	2609.96				2610.08	-	2610.2	
			2 2610.11			2610.6	2609.96				2610.08	-	2610.0	
	Mave	2611.906	1											
			2											
Carboxymethyl	Mmono	2614.022	1 2614.01		2614.11					2614.00		-		
			2 2614.03		2614.11					2614.00		-		
	Mave	2615.845	1	2614.6				2615.0						
			2	2614.6				2614.6						
Human insulin B chain Pyridyl ethyl	Mmono	3637.800	1 3637.82							3637.74		3637.78		
			2 3637.82							3637.74		3637.79		
	Mave	3640.198	1											
			2											
Carboxyamidmethyl	Mmono	3541.728	1 3541.76			3541.8	3541.51				3541.725	3541.73	3541.8	
			2 3541.76			3541.8	3541.51				3541.725	3541.72	3541.8	
	Mave	3544.026	1											
			2											
Carboxymethyl	Mmono	3543.696	1 3543.74		3543.80				3543.90		3543.60		3544.14	
			2 3543.72		3544.29				3543.92		3543.60		3544.20	
	Mave	3545.996	1	3546.6				3545.5						
			2	3546.9				3545.4						
Human insulin	Mmono	5803.638	1 5803.60		5803.82					5804.87		5803.65		
			2 5803.59		5803.82					5804.84		5803.65		
	Mave	5807.576	1	5807.0		5807.2	5806.17	5808.2			5805.6		5805.6	
			2	5807.0		5807.2	5806.17	5807.0			5805.7		5805.8	
Human growth hormone	Mmono	22111.0	1											
			2											
	Mave	22124.8	1	22124.4	22124.3	22125.1	22124	22125	22125.0		22123.0	22124.8	22124.1	22101.4
			2	22124.9	22124.8	22127.1	22124	22125	22124.0		22123.0	22124.8	22124.1	22096.9
Human serum albumin	Mmono	66395	1											
			2											
	Mave	66437	1	66440	66500	-	66439	-		66447	66437	66437	66346	664
			2	66439	66474	-	66440	-		66440	66438	66436	66346	6635

Upper: monoisotopic mass.

Lower: average mass.

-, Not detected.

偏差は 20 Da, 相対標準偏差は 306 ppm であった。一方, MALDI-MS による測定では, 実測値は 66,346~66,440 Da, 平均は 66,382 Da, 理論値からの実測値の平均の誤差は -55 Da, 室間再現標準偏差は 34 Da, 相対標準偏差は 517 ppm であった。

### 3.3 試験案 (MS/MS) の適用可能性の検証

機関 A(4), B(3), C(2), D(1), E(2), F(1) 及び H(1) においてグルタチオン, ゴナドレリン及びインスリン A 鎖及び B 鎖の MS/MS を測定日を変え

て 2 回行い, 検出された b 及び y イオン<sup>8)</sup> と, そのうち, ペプチドの確認試験の際に検出すべきイオンとして設定できると判断されたイオンを集計した。装置の分解能やデータ処理の仕方等によりピークの見え方が異なることから, フラグメントイオンの検出は, 質量分析装置付属のソフトウェアにてピークと認識されたものから目視にて他のイオンと重なっているピークやノイズと疑われるピークを除去することにより判定した。規格として設定できるイオン

Molecular Mass at Each Laboratory

MALDI TOF	E1		E2		G		H		ESI + MALDI				ESI				MALDI			
	MALDI TOF	MALDI TOF	MALDI TOF	MALDI TOF	Average	Bias	Standard deviation SRW	Standard deviation SR (ppm)	Average	Bias	Standard deviation SRW	Standard deviation SR (ppm)	Average	Bias	Standard deviation SRW	Standard deviation SR (ppm)				
307.04 307.04	(307.01)		307.09 307.09		307.08 (n=13)	-0.01	0.0027	0.040 131	307.08 (n=9)	0.00	0.000	0.045 147	307.06 (n=4)	-0.02	0.0049	0.027 88				
1181.64 1181.66	(1181.65)		1181.57 1181.72		1181.57 (n=13)	0.00	0.032	0.058 49	1181.55 (n=8)	-0.02	0.013	0.054 46	1181.60 (n=5)	0.02	0.049	0.060 51				
2802.61 2802.61	(2802.08)		2802.05 2802.04		2802.25 (n=5)	0.02	0.007	0.21 75	2802.21	-0.02			2802.28	0.05						
2609.97 2609.92	(2609.90)		2609.69 2610.28		2610.02 2610.12	0.00	0.185	0.20 75	2610.14	0.05			2610.03	-0.05						
2614.27 2614.20	(2614.03)		2614.89 2614.29		2614.19 (n=5)	0.17	0.191	0.28 106	2614.04	0.02			2614.41	0.39						
3638.28 3638.31			3638.41 3638.29		3638.00 (n=5)	0.20	0.039	0.30 82	3637.78	-0.02			3638.14	0.34						
3541.77 3541.54		3640.2 3639.4	3542.08 3542.01	3541.81 3541.64	3541.75 (n=9)	0.02	0.089	0.16 44	3541.70	-0.03			3541.79	0.07						
3544.10 3544.05		3543.4 3544.0	3544.09 3544.08		3543.94 (n=7)	0.25	0.134	0.23 65	3543.82	0.13			3544.11	0.41						
5807.7 5807.7	(5707.6)		5805.9 5806.0		5803.63 5803.62 5806.5 (n=9)	0.27	0.011	0.54 92 155	5803.98 (n=4)	0.34			5803.63 (n=1)	-0.01						
22118.1 22117.7			22101.9 22112.8	22124.8 22120.6	22118.8 (n=14)	-6.0	2.5	10.5 476	22124.5 (n=9)	-0.2	0.54	0.92 42	22108.4 (n=5)	-16.3	4.2	12.2 552				
66405 66408			66357 66360	66419 66381	66418 (n=11)	-20	20	43 649	66447 (n=6)	10	7.7	20 306	66382 (n=5)	-55	29	34 517				

は、再現良く十分な強度で検出されたものとした。

**グルタチオン** MS/MSにより生じることが予想されるフラグメントイオン  $b_{1-2}$  及び  $y_{1-2}$  のうち、IT型分析計を用いたときにローマスカットオフにより低  $m/z$  のイオン ( $y_1$ ,  $m/z$  76.0) が検出されなかったことを除き、すべての  $b$  及び  $y$  イオンが検出された (データ非表示)。

**ゴナドレリン** ゴナドレリンのMS/MSスペクトルの例を Fig. 2 に示す。ペプチドをMS/MSに

より断片化したとき、主にペプチド結合の位置で開裂が起こる。生じた断片のうち、N末端を含むフラグメントイオンは、 $a$ ,  $b$  及び  $c$  系列、またC末端を含むフラグメントイオンは、 $x$ ,  $y$  及び  $z$  系列と呼ばれる<sup>8)</sup>。低エネルギー衝突誘起解離やポストソース分解では、主に  $b$  及び  $y$  系列のフラグメントイオンが生じる。各  $b$  及び  $y$  イオンが生成する際の切断位置を図中に示した。各機関で測定したゴナドレリンのMS/MSスペクトル上に検出された



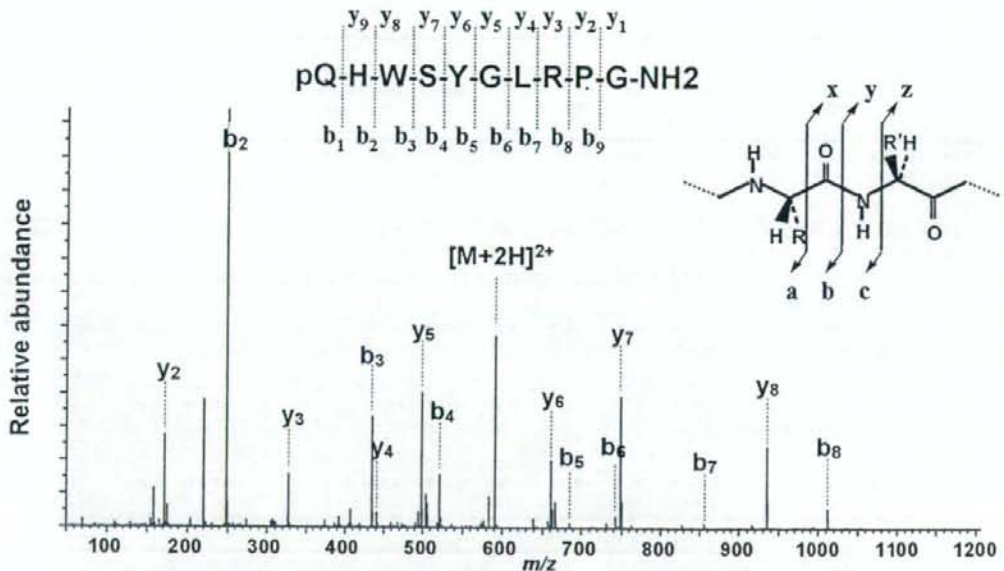


Fig. 2 MS/MS Spectrum of  $m/z$  591.8 (+2) of Gonadorelin

b及びyイオンの集計結果をTable 3に示す。検出されたフラグメントイオンは、装置、測定条件により違いがあったが、生じることが予想されるフラグメントイオン $b_{1-9}$ 及び $y_{1-9}$ のうち、 $b_2$ ,  $b_3$ ,  $b_4$ ,  $b_6$ ,  $b_8$ ,  $y_2$ ,  $y_3$ ,  $y_5$ ,  $y_6$ ,  $y_7$ 及び $y_8$ が検出されやすい傾向があった。2回の測定とも検出できたイオンの数は、平均13.1個(7~16個)であった。また、各機関において規格として設定可能と判断されたイオンは、平均10.3個(5~16個)であった。各試験室で観測したフラグメントイオンの $m/z$ 値の実測値の理論値からの誤差は、一試験室(E1及びE2)を除くと-0.45~0.22であり、各測定での誤差の平均は-0.21~0.11、また標準偏差は0.001~0.15であった(Table 3)。機関Eにおいて実測値と理論値との差が大きくなった原因として、装置の分解能が低いこと、及びピークがノイズや他のフラグメントイオンと重なった場合にピークがブロードになったことが考えられた。機関Eを除く各試験室(機関Hでは2種類の条件で測定が行われているので、フラグメントイオンが多く観測されたH1の測定値を採用した。)で観測した $b_{2-8}$ 及び $y_{2-8}$ の各フラグメントイオンの $m/z$ 値の室内再現標準偏差及び室間再現標準偏差を求めたところ、それぞれ0.01~0.11及び0.05~0.14であった(データ非

表示)。

還元アルキル化インスリンA鎖 インスリンA鎖のMS/MSによって検出されたb及びyイオンの数をTable 4に示す。CAM化インスリンA鎖を測定した試験室A4及びE1、及びCM化インスリンA鎖を測定した試験室A4, C1, C2及びE1では、前駆イオンのシグナル強度が低く、フラグメントイオンを検出できなかった。MS/MSスペクトルを測定できた試験室においては、13~35個のフラグメントイオンを検出することができた。また、6~26個のフラグメントイオンを規格として設定可能であると判断した。

還元アルキル化インスリンB鎖 いずれの還元アルキル化方法でも、5個以上のフラグメントイオンを検出することができた(Table 4)。また、4~35個のフラグメントイオンを規格として設定可能であると判断した。

#### 4. 考 察

本研究では、ペプチド及びたん白質性医薬品の確認試験法として適していると思われるイオン化方法、分析計及び測定方法を設定し、MSを用いた標準的確認試験法を作成した。更に、8機関共同で試験法の適用可能性を検証した。

はじめに、分子質量測定によるペプチド及びたん白質性医薬品の確認試験の適用可能性を評価した。分子量約300–6,000の共通試料を測定したところ、分子量4,000以下のペプチドの場合、多くの試験室で単同位体質量を測定することができた。分子量が約6,000のペプチドの場合は、多くの機関で平均質量を測定したが、分解能の高いリフレクトロン型のTOF、OT及びFT-ICR型分析計を使用した機関では、単同位体質量を測定することができた。分子量5,807.6のインスリンにおいて、同位体存在比から推定した単同位体分子の存在量は、天然存在比が最大の同位体分子の約14%しかないことから、より分子量の大きなペプチドでは単同位体ピークの検出は難しいと考えられ、単同位体質量が測定可能なペプチドは分子量が6,000程度のもまでと考えられた。

分子量1,000以下のペプチドの単同位体質量測定を測定した場合、実測値の許容範囲はグルタチオン及びゴナドレリンにおける空間再現標準偏差から $2.8 \times$ 空間再現標準偏差<sup>9)</sup>により計算したところ、それぞれ $\pm 0.11$ 、 $\pm 0.16$ であり、 $\pm 0.3$  Da以内の誤差で分子質量を測定することが可能であり、アミノ酸組成の違いによって生じる1 Daの質量差を識別できることが示唆された。

分子量1,000–6,000のペプチドでは、観測された単同位体質量値の空間再現標準偏差は概ね100 ppm以内であり、 $\pm 300$  ppmがペプチドの単同位体質量の実測値の許容範囲と考えられた。この場合、質量差1 Daのペプチドを識別できない場合があり、1 Da差が問題になる場合は、MS/MSやHPLC等による確認を併用することが望ましいと思われる。

分子量6,000までのペプチドの平均質量を測定した場合、インスリンにおける空間再現標準偏差155 ppmから、 $\pm 500$  ppm以内の質量誤差で分子質量が得られることが示唆された。なお、得られた実測値の平均値5,806.5 Daは、分子量(5,807.6)よりむしろ最大強度質量の理論値(5,806.6)に近く、単同位体質量を設定しない場合、規格設定において分子量と最大強度質量のいずれと比較するのかが明確にしておく必要がある。

ESI-MSを用いて分子量22,125の成長ホルモンの平均質量を測定した場合、空間再現標準偏差は42 ppmであり分子量約6,000のインスリンと同程

度であった。したがって、分子量6,000–22,000の範囲において、質量誤差 $\pm 500$  ppm(約11 Da)以内で測定できることが確認された。一方、MALDI-MSを用いた場合は、空間再現標準偏差は552 ppmであり、質量誤差 $\pm 1,600$  ppm(約35 Da)以内で測定できることが確認された。ESI-MSで測定した場合のばらつきが小さかった理由として、分子量の大きなたん白質でも多価イオンとして観測されるため、測定範囲をカバーした質量校正標準品を用いた質量校正が行えたことや、観測された複数の多価イオンを用いてデコンボリューション処理をすることによって、個々のピークのずれが補正されたことが考えられた。これに対して、MALDI-MSを用いた場合、分子量の大きな試料の測定に適した質量校正標準品がなかったことや、リフレクトロンモードではなくリニアモードでの測定になったことが、試験空間の実測値の差につながったものと考えられた。

ESI-MSを用いてヒト血清アルブミン(分子量：約66,400)を測定した場合、空間再現標準偏差は306 ppmであり、ヒト成長ホルモンを分析した場合に比べて、実測値のばらつきが大きかった。しかし、IT型分析計を用いた試験室を除く5試験室(TOF型若しくはOT型分析計を使用)が得た実測値の平均の理論値からの誤差は、2.0 Daであり、空間再現標準偏差は3.0 Da、相対標準偏差は46 ppmであった(データ非表示)。この結果は、十分な分解能を有する装置を用いた場合は、分子量6,000–66,400の範囲で、質量誤差 $\pm 500$  ppmで測定できることを示唆している<sup>10,11)</sup>。

ヒト血清アルブミンをMALDI-MSで測定した場合、空間再現標準偏差は517 ppmであり、質量誤差 $\pm 1,600$  ppm(約105 Da)で測定できることが示唆された。しかし、実測値の平均値が理論値と大きく異なっていることから(-55 Da)、質量校正が正確でなかった可能性がある。MALDI-MSでは、分子量の大きいたん白質を測定する場合、質量校正標準品としてBSAを用いることが多いが、BSAは翻訳後修飾等により分子量が不均一であることが知られており<sup>12,13)</sup>、各試験室で質量校正に用いたBSAの違いが、MALDI-MSによる実測値の偏り、ばらつきにつながった可能性が推察される。MALDI-MSによりたん白質医薬品の質量測定を行う場合は、質量校正標準品の設定が重要であると思

Table 3 Summary of Detected Fragment Ions in MS/MS

Laboratory	A1	A2	A3	B1	B3	C1	C2	D
Mass type	ESI QTOF CID	ESI IT CID	ESI FT CID	ESI IT CID	ESI IT CID	ESI IT CID	ESI QTOF CID	ESI QTOF CID
Precursor ion Energy	591.8 (+2) 30 eV	591.8 (+2) 35%	591.8 (+2) 35%	592.1 (+2) 30-200%	591.8 (+2) 35%	591.8 (+2) 25%	1182.6 (+1) 30 eV	591.8 (+2) 15-45 eV
Fragment ions								
b-ions								
<i>m/z</i>								
1 112.04	-	-	-	-	-	-	-	○
2 249.10	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	-	-	⊙
3 435.18	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	-	⊙	○
4 522.21	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	-	⊙	○
5 685.27	○	⊙	⊙	○	○	-	⊙	○
6 742.29	○	⊙	⊙	⊙	⊙	○	⊙	-
7 855.38	○	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	-
8 1011.48	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	○	○
9 1108.53	-	-	-	-	-	-	-	-
y-ions								
<i>m/z</i>								
9 1071.55	-	-	-	-	-	-	-	-
8 934.49	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	○	⊙
7 748.41	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	○	⊙
6 661.38	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	○	○	⊙
5 498.31	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	-	○	⊙
4 441.29	○	⊙	⊙	⊙	⊙	-	○	-
3 328.21	○	⊙	⊙	⊙	⊙	-	○	○
2 172.11	⊙	⊙	⊙	○	○	-	○	○
1 75.06	-	-	-	-	-	-	-	-
Mass error ( <i>m/z</i> )								
Spectrum 1 Average	-0.014	-0.01	0.001	0.01	-0.07	-0.10	0.030	0.000
SD	0.006	0.04	0.001	0.01	0.09	0.15	0.013	0.009
Max	-0.007	0.09	0.004	0.03	0.02	0.22	0.049	0.017
Min	-0.027	-0.08	0.000	-0.02	-0.28	-0.28	0.010	-0.021
Spectrum 2 Average	-0.007	0.02	0.001	0.01	-0.08	-0.09	0.029	0.004
SD	0.002	0.06	0.001	0.01	0.10	0.13	0.012	0.007
Max	-0.004	0.11	0.004	0.03	0.09	0.10	0.049	0.014
Min	-0.012	-0.08	0.000	-0.02	-0.28	-0.23	0.010	-0.010
Number of fragment ions detected in both of two independent MS/MS spectra								
b-ions	7	7	7	7	7	4	7	6
y-ions	7	7	7	7	7	3	7	6
Total	14	14	14	14	14	7	14	12
Number of fragment ions which individual laboratories considered as possible acceptance criterion for identification test								
b-ions	4	7	7	6	6	3	5	1
y-ions	5	7	7	5	5	2	0	4
Total	9	14	14	11	11	5	5	5

○, Ions which were detected in both of two independent MS/MS spectra.

⊙, Ions which individual laboratories considered as possible acceptance criterion for identification test.

\*, A collision energy ramp was used.

b, W-ion was detected.

われる。

次に、MS/MSによって得られたペプチドフラグメントイオンを、アミノ酸配列の確認に利用できるかどうか、及びどのような基準で試験を行うのが適当かを、分子量約300から4,000のペプチドを用いて検証した。グルタチオン(3アミノ酸残基)では、IT型分析計を使用した場合を除いて、すべてのb及びyイオンを検出することができた。ゴナドレリン(アミノ酸10残基)のMS/MSでは、ほとん

どの機関で、予想されるb及びyイオンのうち10個のフラグメントイオンを確認することができた。より分子量の大きいインスリンA鎖(21アミノ酸残基)及びインスリンB鎖(30アミノ酸残基)においても、ほとんどの機関で10個以上のフラグメントイオンを確認し、5個以上のフラグメントイオンを規格に設定できると判断した。したがって、ペプチドの確認試験において、確認すべきフラグメントイオンとして、分子量1,000から4,000のペプチ

Spectra of Gonadorelin at Each Laboratory

F	A4	B4	E1	E2	H1	H2	
ESI OT CID	MALDI TOFTOF CID	MALDI TOF PSD	CHCA MALDI TOF PSD	DHB MALDI TOF PSD	MALDI TOFTOF PSD	MALDI TOFTOF CID	
591.8 (+2) 35%	1182.6 (+1) 1 keV	1182.6 (+1)	1182.6 (+1)	1182.6 (+1)	1182.6 (+1)	1182.6 (+1)	20 keV
○	⊙	⊙	○	○	⊙	⊙	
⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	
⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	
⊙	⊙	⊙	○	○	⊙	⊙	
⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	
⊙	⊙	⊙	-	-	⊙	⊙	
⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	
-	⊙	-	-	-	-	-	
-	-	○	-	-	-	-	
⊙	⊙	⊙	-	-	⊙	⊙	
⊙	⊙	⊙	-	-	⊙	⊙	
⊙	⊙	⊙	○	○	⊙	⊙	
⊙	⊙	⊙	○	○	⊙	⊙	
⊙	⊙	⊙	-	-	⊙	⊙	
⊙	⊙	⊙	○	○	⊙	⊙	
⊙	⊙	⊙	○	○	⊙	⊙	
-	-	-	-	-	-	-	
-0.001	-0.03	0.11	0.58	0.73	-0.21	-0.16	
0.001	0.04	0.01	0.65	0.87	0.11	0.11	
0.000	0.01	0.13	1.63	2.43	-0.07	-0.05	
-0.003	-0.12	0.09	-0.18	-0.21	-0.41	-0.45	
-0.002	-0.04	0.09	0.53	0.97	-0.17	-0.09	
0.001	0.04	0.03	0.57	0.75	0.12	0.10	
0.000	0.01	0.13	1.43	2.23	0.03	0.03	
-0.003	-0.13	0.02	-0.21	0.02	-0.41	-0.30	
6	9	8	7	7	8	7	average
7	7	8	4	4	7	6	
13	16	16	11	11	15	13	13.1
5	9	8	5	5	8	6	
7	7	7	0	0	7	5	
12	16	15	5	5	15	11	10.3

ドでは5~10程度のイオンを設定することが可能と思われた。しかしながら、装置間で検出されたフラグメントイオンは異なっていたことから、装置に依存しない規格を設定するためには、今後、断片化条件の最適化及び標準化の検討が必要である。

MS/MSにおいてフラグメントイオンのm/z値の理論値からの誤差の程度は、質量校正の正確さ、分析計の分解能、ソフトウェアの違い、プリカーサーイオンの分子量及びフラグメントイオンの分子量、

ピーク強度等によって変動することが推測される。ゴナドレリンのMS/MSスペクトルで観測された各フラグメントイオンのm/z値の室間再現標準偏差は、最大で0.14であったことから、分子量1,000程度のペプチドのMS/MSでは、フラグメントイオンの同位体ピークを±0.4程度のm/zの誤差で検出することが可能と推定された。より大きなペプチドのMS/MSについては、本研究では例数が少なく、また、装置ごとの差が大きかったことから、

Table 4 Number of Detected Fragment Ions in MS/MS Spectra of Insulin

Laboratory		A1	A2	A3	B1	B3	C1	C2	D
Mass type		ESI	ESI	ESI	ESI	ESI	ESI	ESI	ESI
		QTOF	IT	FT	IT	IT	IT	QTOF	QTOF
Sample		CID	CID	CID	CID	CID	CID	CID	CID
Human insulin A chain									
Pyridylethyl	Precursor ion	1402 (+2)							702 (+4)
	Energy	66 eV							25 eV
	b-ions	9							9
	y-ions	4							7
	Total	13							16
	b-ions	4							3
	y-ions	6							5
Total	10							8	
Carboxyamidemethyl	Precursor ion	1306 (+2)			1307 (+2)	871 (+3)			
	Energy	40 eV			30-200%	35%			
	b-ions	11			14	21			
	y-ions	8			14	14			
	Total	19			28	35			
	b-ions	5			8	4			
	y-ions	9			9	2			
Total	14			17	6				
Carboxymethyl	Precursor ion	1308 (+2)	1308 (+2)	1308 (+2)					872 (+3)
	Energy	40 eV	35%	35%					25 eV
	b-ions	10	14	12					14
	y-ions	8	13	10					8
	Total	18	27	22					22
	b-ions	8	13	9					5
	y-ions	8	13	8					7
Total	16	26	17					12	
Human insulin B chain									
Pyridylethyl	Precursor ion	910 (+4)							729 (+5)
	Energy	43 eV							25 eV
	b-ions	11							10
	y-ions	8							8
	Total	19							18
	b-ions	9							3
	y-ions	6							1
Total	15							4	
Carboxyamidemethyl	Precursor ion	1182 (+3)			1773 (+2)	887 (+4)			
	Energy	60 eV			30-200%	35%			
	b-ions	18			19	24			
	y-ions	11			17	17			
	Total	29			36	41			
	b-ions	12			8	9			
	y-ions	6			7	5			
Total	18			15	14				
Carboxymethyl	Precursor ion	1182 (+3)	1182 (+3)	1182 (+3)			1182 (+3)	887 (+4)	887 (+4)
	Energy	60 eV	35%	35%			35%	30 eV	25 eV
	b-ions	12	18	19			11	23	19
	y-ions	6	18	17			11	25	19
	Total	18	36	36			22	48	38
	b-ions	6	17	15			1	10	7
	y-ions	3	18	17			4	9	3
Total	9	35	32			5	19	10	

Upper: Number of the b- and y-ions detected both in two independent MS/MS spectra.

Lower (Bold): Number of the b- and y-ions which individual laboratory considered as possible acceptable criterion for identification test.

今後の検討が必要であると思われる。

分子量 4,000 を超えるペプチドやたん白質については、生じるフラグメントイオンが限られるので、MS/MS を確認試験に用いることは難しいと思われる。しかし、たん白質分解酵素などでペプチド断片

とすることによって MS/MS を応用できる可能性があることから<sup>14)</sup>、今後、酵素処理と MS/MS による確認試験の検討を行っていきたい。

A Chain and Insulin B Chain at Each Laboratory

F	A4	B4	E1	E2	H	Average
ESI	MALDI	MALDI	CHCA	DHB		
OT	TOFTOF	TOF	MALDI	MALDI	MALDI	
CID	TOFTOF	PSD	TOF	TOF	TOFTOF	
	CID	PSD	PSD	PSD	PSD	
	2803 (+1)		2803 (+1)	2803 (+1)		
	1 keV		-	-		
	10		17	19		
	3		5	10		
	13		22	29		18.6
	10		9	8		
	3		0	0		
	13		9	8		9.6
1306.5 (+2)	-	2611 (+2)	-	2611 (+1)	2611 (+1)	
35%		-		-	-	
17		17		15	15	
17		17		10	13	
34		34		25	28	29.0
7		12		7	13	
7		4		3	9	
14		16		10	22	14.1
				2615 (+1)		
				-		
				19		
				10		
				29		23.6
				7		
				2		
				9		16.0
	3639 (+1)		3639 (+1)	3639 (+1)		
	1 keV		-	-		
	1		11	16		
	4		5	17		
	5		16	33		18.2
	1		4	4		
	4		1	2		
	5		5	6		7.0
1182 (+3)	3543 (+1)	3543 (+1)	3543 (+1)	3543 (+1)	3543 (+1)	
35%	1 keV		-	-	-	
25	19	18	12	18	20	
25	15	24	7	19	21	
50	34	42	19	37	41	36.6
12	19	5	4	4	15	
8	15	12	1	2	15	
20	34	17	5	6	30	17.7
	3545 (+1)		3545 (+1)	3545 (+1)		
	1 keV		-	-		
	2		14	20		
	8		8	19		
	10		22	39		29.9
	2		6	4		
	8		1	3		
	10		7	7		14.9

5. 結論

ペプチド及びたん白質性医薬品の確認試験として質量分析を用いる場合の標準的試験法(別紙1)を作成した。多機関共同研究の結果、MSにより分子の質量の確認を行ったとき、分子量1,000以下のペ

プチドでは±0.3Da(単同位体質量)、分子量1,000~6,000のペプチドの場合、±300ppm(単同位体質量)もしくは±500ppm(平均質量)、分子量6,000~22,000までのペプチド及びたん白質の場合、ESIでは±500ppm(平均質量)、また、MALDI

では±1,600 ppm (平均質量) 以内の誤差で分子の質量を測定可能であることが確認された。MS/MSにおいては、分子量1,000~4,000のペプチドでは、5~10のフラグメントイオンをペプチドの確認に利用可能であると考えられたが、装置間で検出されたフラグメントイオンは異なっていたことから、装置に依存しない規格を設定するためには、測定条件の検討が必要である。

### 謝 辞

本研究を行うに当たり、ゴナドレリン酢酸塩標準品を供与して頂いた財団法人日本公定書協会に厚く御礼申し上げます。

有益なご助言を賜りました国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部鹿庭なほ子先生に感謝いたします。

本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金政策創薬総合研究事業の支援を受けて行ったものである。

### 文 献

- 1) Hirayama, K., S. Akashi, S., Furuya, M., Fukuhara, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 639-646 (1990).
- 2) Arnott, D., Shabanowitz, J., Hunt, D. F.: *Clin. Chem.*, **39**, 2005-2010 (1993).
- 3) McLafferty, F. W., Fridriksson, E. K., Horn, D. M., Lewis, M. A., Zubarev, R. A.: *Science*, **284**, 1289-1290 (1999).
- 4) Medzihradszky, K. F.: *Methods in Enzymology*, **402**, 209-244 (2005).
- 5) Strupat, K.: *Methods in Enzymology*, **405**, 1-36 (2005).
- 6) Audi, G., Wapstra, A. H.: *Nuclear Physics A*, **595**, 409-480 (1995).
- 7) 厚生労働省：第十五改正日本薬局方、付録 原子量表 (2004) について、2006, p. 1667-1670.
- 8) Roepstorff, P., Fohlman, J.: *Biomed. Mass. Spectrom.*, **11**, 601 (1984).
- 9) JIS z 8402-1991「分析・試験の許容差通則」、日本規格協会発行。
- 10) Tarelli, E., Mire-Sluis, A., Tivnann, H. A., Bolgiano, B., Crane, D. T., Gee, C., Lemerminier, X., Athayde, M. L., Sutcliffe, N., Corran, P. H., Rafferty, B.: *Biologicals*, **26**, 331-346 (1998).
- 11) Girard M., Bietlot H. P., Cyr T. D.: *J. Chromatogr. A*, **772**, 235-242 (1997).

- 12) Peters T.: *In All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications*. Academic Press, Properties of Thiol Group, 1996, p. 51-54.
- 13) Wada, Y.: *J. Mass Spectrom.*, **31**, 263-266 (1996).
- 14) 川崎ナナ, 原園 景, 川西 徹: 医薬品研究, **37**(7), 438-447 (2006).
- 15) 厚生労働省：第十五改正日本薬局方, 2006, p. 1652-1655.

### 別紙

#### ペプチド及びたん白質の質量分析

質量分析 (以下「MS」という) は、適当な手法によりイオン化した分子を質量電荷比 ( $m/z$ ) に応じて分離し、検出する方法である。得られたデータは、イオンの  $m/z$  を x 軸に、それに対するイオンの相対強度を y 軸に示したマススペクトルとして示される。電荷数 ( $z$ ) と  $m/z$  より、分子の質量を求めることができる。タンデム質量分析 (以下「MS/MS」という) は、一つの前駆イオンから分解して生じるプロダクトイオンを  $m/z$  に応じて検出する方法であり、観測されたプロダクトイオンの  $m/z$  により、構造の確認や推定が可能である。MS 及び MS/MS は、ペプチド及びたん白質性医薬品の確認試験などに用いられる。

質量分析は、イオンの分離を行う原理に、真空中の電界及び磁界を運動する荷電粒子の受ける力  $F$  は、

$$F = q(E + v \times B) = ma$$

$F$ : 力

$q$ : 電荷

$E$ : 電場

$v$ : イオンの運動ベクトル

$B$ : 磁束密度

$\times$ : ベクトルの外積

$m$ : 質量

$a$ : 加速度

であることを利用している。

#### 装置

質量分析計は、イオン源、分析部、検出部及びデータ処理部からなる (図1)。導入された試料は、イオン源においてイオン化される。ペプチド及びたん

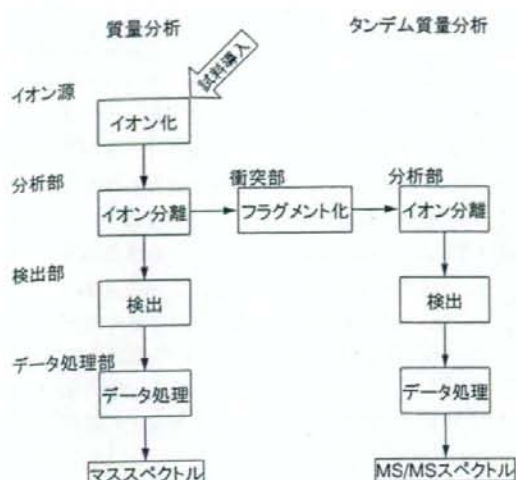


図1 質量分析計

たん白質のイオン化には、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI: Matrix-assisted laser desorption ionization) 又はエレクトロスプレーイオン化法 (ESI: Electrospray ionization) などが用いられる。分析部は、生成されたイオンを  $m/z$  に応じて分離する部位で、四重極型、飛行時間型 (TOF: Time-of-flight) 又はイオントラップ型分析計などが用いられる。MS/MS では、通例、複数の分析部を組み合わせた装置が用いられる。第1分析部で分離されたイオンは、衝突部でフラグメント化され、生じたイオンは次の分析部で  $m/z$  に応じて分離される。イオントラップ型の分析計は単独で MS/MS を行うことができる。通例、フラグメント化には、衝突誘起解離 (CID: Collision-induced dissociation) などが利用される。MALDI TOF MS においては、ポストソース分解 (PSD: Post source decay) を利用することもできる。検出部は、分離されたイオンを信号として検出する部位であり、検出された信号は、データ処理部で処理され、マススペクトル又は MS/MS スペクトルとして出力される。

## 操作法及び調整法

### 1. MS

あらかじめ適切な試料を用いて質量測定を行い、感度及び分解能を確認する。必要であれば、イオン源、分析部又は検出部の電圧などを調整する。適切

な質量校正標準物質を用いて質量校正を行う。医薬品各条で規定した物質を用いて質量測定を行い、理論質量と測定質量の差などが医薬品各条に定める基準値に適合していることを確認する。医薬品各条に規定した方法で試料を調製し、質量測定を行う。通例、イオン化方法に応じて以下の方法で操作する。

#### (1) MALDI MS

脱塩した試料ペプチド/たん白質を適切な溶媒に溶解して試料溶液とする。通例、溶媒にはトリフルオロ酢酸水溶液などを用いる。別に、試料ペプチド/たん白質の構造特性に応じて適切なマトリックスを選び、トリフルオロ酢酸水溶液とアセトニトリルなどの混合液に溶かしてマトリックス溶液とする。通例、ペプチド/たん白質の測定には、 $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸 (CHCA)、2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) 又は、シナピン酸 (SA) などを用いる。試料溶液とマトリックス溶液を通例 1:1~5 の割合で混合し、サンプルプレートに滴下し乾燥させる。サンプルプレートをイオン源に設置し、適切な強度のレーザーを照射して試料をイオン化させる。イオンを分析部/検出部に導入し、マススペクトルを測定する。

#### (2) ESI MS

脱塩した試料ペプチド/たん白質を適切な溶媒に溶解して試料溶液とする。通例、溶媒には 0.1~1.0% 酢酸などを含む水/メタノール又はアセトニトリル混合液を用いる。試料溶液は、シリンジインフュージョン又は HPLC 法などにより ESI チップに導入する。ESI チップに電圧をかけて試料をイオン化し、マススペクトルを測定する。

## 2. MS/MS

必要に応じて、適切な試料を用いて MS/MS の質量校正を行う。あらかじめ医薬品各条で規定した物質を用いて MS/MS 測定を行い、感度及びフラグメント化が医薬品各条に定める基準値に適合していることを確認する。MS と同様に試料ペプチドを導入してイオン化する。前駆イオンを選択し、適切な MS/MS の条件を設定し、MS/MS スペクトルを測定する。

### 確認試験

#### (1) 分子質量の確認

MS により分子質量を確認する。単同位体ピークが確認できる場合には、単同位体質量を用いる。単



同位体ピークが確認できない場合は、ピークの頂点より分子質量を求める。試料たん白質が多数の多価イオンとして観測されている場合には、デコンボリューション処理により分子質量を求める。測定値が規格内であることを確認する。

#### (2) アミノ酸配列などの確認

試料ペプチドの分子質量を確認した後、MS/MSスペクトルを測定する。医薬品各条で規定したフラグメントイオンの有無を確認することにより、アミノ酸配列などを確認する。分子内にジスルフィド結合を含むペプチドを測定する場合は、通例、試料を還元アルキル化した後、MS/MSを行う。還元試薬として通例、ジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール及びトリス(2-カルボキシエチル)フォスフィンなどが用いられる。また、アルキル化試薬と

して通例、ヨード酢酸、ヨードアセトアミド、4-ピニルピリジンなどがよく用いられる。還元アルキル化の効率、たん白質ごとに異なり、アルキル化の種類は、ペプチドのイオン化に影響を与える。

#### (3) 分子量の大きなペプチド及びたん白質の確認

分子量が大きく、MS/MSにより有用なフラグメントイオンが観測できない場合、還元アルキル化及び酵素消化などにより断片化し、医薬品各条で規定したペプチド断片を確認することにより、ペプチド/たん白質の確認を行う。また、断片化ペプチドのMS/MSによりアミノ酸配列の確認ができることがある。ペプチド/たん白質の断片化方法は、ペプチドマップ法におけるペプチド結合の選択的切断を参照すること<sup>15)</sup>。



## ヘパリン純度試験に関する研究 (第3報)

## キャピラリー電気泳動法によるヘパリンナトリウム不純物の分析

掛樋 一晃<sup>\*1</sup>, 梶 直孝<sup>\*1</sup>, 木下 充弘<sup>\*1</sup>, 橋井 則貴<sup>\*2</sup>, 川崎 ナナ<sup>\*2</sup>,  
 寺尾 敏光<sup>\*3</sup>, 河合 健蔵<sup>\*4</sup>, 余田 光<sup>\*4</sup>, 山口 照英<sup>\*2</sup>

(受付:平成20年9月8日, 受理:平成20年10月24日)

## Studies on the Heparin Purity Test (Part 3)

## Analysis of Contaminants in Heparin Sodium by Capillary Electrophoresis

Kazuaki KAKEHI<sup>\*1</sup>, Naotaka KAKOI<sup>\*1</sup>, Mitsuhiro KINOSHITA<sup>\*1</sup>, Noritaka HASHII<sup>\*2</sup>,  
 Nana KAWASAKI<sup>\*2</sup>, Toshimitsu TERAOKA<sup>\*3</sup>, Kenzo KAWAI<sup>\*4</sup>,  
 Hikaru YODEN<sup>\*4</sup> and Teruhide YAMAGUCHI<sup>\*2</sup>

## 緒 言

ヘパリンナトリウムは、ウロン酸 (L-イズロン酸又はD-グルクロン酸) とグルコサミン (GlcN) の2糖を構成単位とする硫酸化グリコサミノグリカンのナトリウム塩で、構成2糖単位に2~3個硫酸基を持つ構造からなる (Fig. 1A)。ヘパリンナトリウムは、血液透析その他の体外循環装置使用時の血液凝固の防止剤として世界中で汎用されており、日本薬局方にも収載されている。また、様々な低分子量ヘパリン製剤の原料としても使用されている。

2007年12月以降米国において、特定のヘパリンナトリウム製剤 (以下「ヘパリン製剤」という) 投

与後に低血圧や急性過敏症反応などの重篤な副作用症例の発生の増加が認められたことから、2008年1月以降、当該ヘパリン製剤が自主回収された。米国食品医薬品庁 (FDA) は2008年3月に急性炎症反応の原因物質として、ヘパリン製剤原料のヘパリンナトリウムに混入していた過硫酸化コンドロイチン硫酸 (over-sulfated chondroitin sulfate; OSCS) を特定した<sup>1)</sup>。天然に存在するコンドロイチン硫酸は、グルクロン酸とN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) の2糖単位に硫酸基が1~3個結合したグリコサミノグリカンであるが<sup>2)</sup>、ヘパリン製剤に混入していたOSCSは、2糖単位中のすべての水酸基が硫酸化されたコンドロイチン硫酸であった

<sup>\*1</sup> 近畿大学薬学部 大阪府東大阪市小若江3-4-1 (〒577-8502)

School of Pharmacy, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan

<sup>\*2</sup> 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀1-18-1 (〒158-8501)

Division on Biological Chemistry & Biochemicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>\*3</sup> 株式会社大塚製薬工場 徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原115 (〒772-8601)

Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., 115 Kuguhara, Tateiwa, Muya-cho, Naruto, Tokushima 772-8601, Japan

<sup>\*4</sup> 扶桑薬品工業(株)研究開発センター 大阪府東区森之宮2-3-30 (〒536-8523)

Research and Development Center, Fuso Pharmaceutical Industries, 2-3-30 Morinomiya, Joto-ku, Osaka 536-8523, Japan

Corresponding author: Kazuaki Kakehi, School of Pharmacy, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan

E-mail: k\_kakehi@phar.kindai.ac.jp

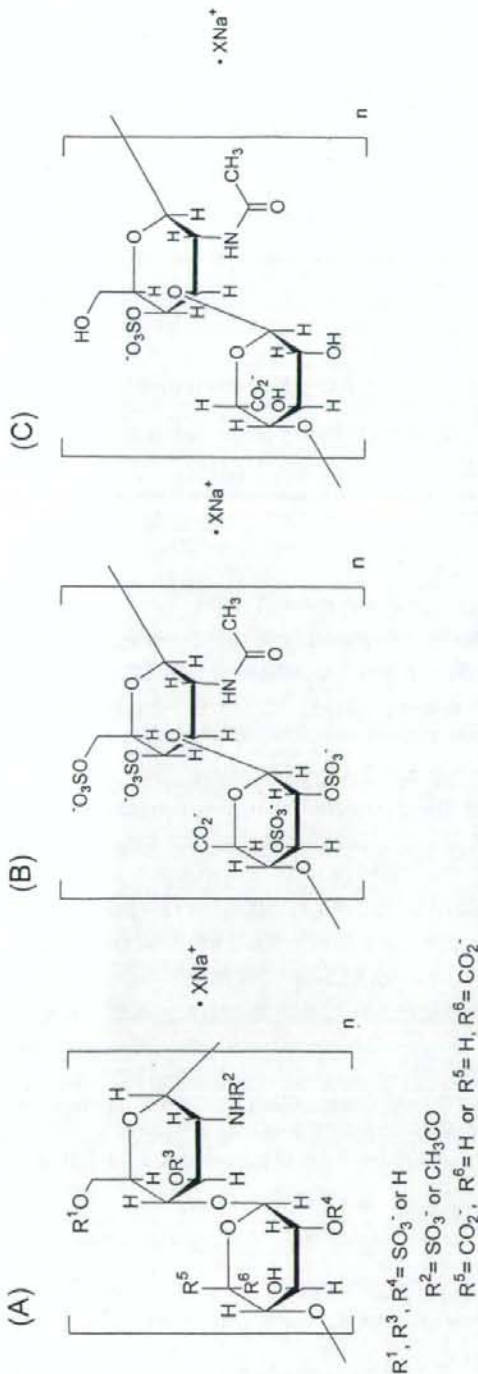


Fig. 1 ヘパリンナトリウム (A), OSCS (B) 及び DS (C) の構造

(Fig. 1B)<sup>6-8)</sup>. その後、有害事象を引き起こしたヘパリンナトリウム中に、OSCSに加えて、デルマトン硫酸 (DS: 別名: コンドロイチン硫酸 B) (Fig. 1C) が多く含まれていることが明かにされた。

FDA は急性炎症反応の原因物質として OSCS を特定したことを公表するとほぼ同時に<sup>1)</sup>, <sup>1</sup>H-核磁気共鳴スペクトル測定法 (NMR) とキャピラリー電気泳動法を用いた OSCS 検出法をインターネット上に公開した<sup>1)</sup>. <sup>1</sup>H-NMR は、ヘパリンの GlcNAc の *N*-アセチル基と OSCS の GalNAc の *N*-アセチル基の化学シフトの違いを利用する方法であり、キャピラリー電気泳動法は、ヘパリンと OSCS が分子量及び硫酸基数の違いで分離できることを利用する方法である。各国は、FDA が公開した分析法を用いてヘパリンナトリウムの分析を行うとともに、OSCS の存在が確認されたヘパリンナトリウムの回収を行う等の対応をとった。一方で、世界的にヘパリン関連医薬品の供給不足への懸念が広がり、ヘパリンナトリウム製剤の安定供給のために、ヘパリンナトリウム原料中の OSCS 及び DS の分析法の整備が緊急課題となっている。我が国でも、この事態に迅速に対応するために、日本薬局方ヘパリンナトリウム各条に OSCS 及び DS 試験の追加を検討するに至った<sup>6,7)</sup>.

本研究では、我が国におけるヘパリンナトリウムの品質・安全性確保を目的として、FDA の方法を参考に、キャピラリー電気泳動による OSCS 及び DS 分析法を確立するとともに、日本薬局方各条ヘパリンナトリウム純度試験としての適用可能性を検証した。

## 実験方法

### 1. 試料

ヘパリンナトリウムは日本薬局方ヘパリンナトリウム標準品を使用した。共同検定に参加した製薬企業 2 社は、各社のヘパリンナトリウムを使用した。OSCS は日本バルク薬品㈱から供与された OSCS を含むヘパリンナトリウムから、弱塩基性陰イオン交換 HPLC により精製して用いた<sup>8)</sup>. DS (ブタ皮膚由来) は生化学工業㈱から購入した。その他の試薬は特級あるいは HPLC グレードを使用した。

## 2. 分析条件

ヘパリンナトリウム、OSCS及びDSは精製水に溶解し、ポアサイズ0.45  $\mu\text{m}$ の酢酸セルロース製メンブランフィルターでろ過し試料溶液とした。この液についてFDAのWebサイトにて公開されている分析条件に従い分析を行った。キャピラリーカラムは内径50  $\mu\text{m}$ 、全長66 cmのフューズドシリカキャピラリーを使用し、試料導入末端側から56 cmの位置を紫外吸収検出窓とした。電気泳動用緩衝液は、リン酸二水素ナトリウム水和物1.0 gを蒸留水195 mLに溶解し、リン酸でpHを3.5に調整した後、蒸留水を加えて200 mLとし、ポアサイズ0.45  $\mu\text{m}$ の酢酸セルロース製メンブランフィルターでろ過して用いた。印加電圧の極性は、試料導入側を陰極、廃液側を陽極とし、ヘパリンの泳動時間が $6 \pm 1$ 分となるように調整した。分析温度は25°Cとし、検出は200 nmの紫外吸収検出により行った。また、試料注入はヘパリンナトリウムの最大ピーク強度が0.010~0.014 AUとなるように加圧法により注入した。キャピラリーカラムは0.1 M水酸化ナトリウムで10分間、続いて蒸留水により10分間洗浄し、3回の空試験を行った後に使用した。キャピラリーは分析ごとに、蒸留水で4分間、泳動用緩衝液で4分間洗浄後、試験に使用した。

## 3. 分析能パラメータの評価

近畿大学薬学部において、キャピラリー電気泳動装置としてBeckman P/ACE MDQ Glycoprotein Systemを用いて実施した。ピーク面積値は、Beckman 32 Karat Gold Softwareを用いて算出した。

### 3.1 OSCS

ヘパリンナトリウム20 mgを精製水1 mLに溶解してヘパリンナトリウム溶液(20 mg/mL)とした。この液0.5 mLにOSCS溶液(4 mg/mL)をそれぞれ0.0125, 0.025, 0.037, 0.075, 及び0.125 mLを添加し、次いで精製水0.487, 0.475, 0.462, 0.425, 及び0.375 mLを加えて混和し、ヘパリンナトリウムに対してOSCSをそれぞれ0.5, 1.0, 1.5, 3.0, 及び5.0% (w/w)含む溶液とした。これらの溶液を分析能パラメータ評価用試験溶液とし、キャピラリー電気泳動装置を用いて測定した。OSCSのピーク面積は最小ピーク幅設定値を2秒とし、OSCSのピーク開始点とピーク終了点を結ぶ傾斜線をベース

ラインとして検出されるピークの積算値から求めた。真度は10% OSCSを含むヘパリンナトリウム溶液、併行精度並びに室内再現精度は5.0% OSCSを含むヘパリンナトリウム溶液を試験溶液として6回分析を行いOSCSのピーク面積値より算出した。また、検出限界についてはOSCSを0.5~5.0%含むヘパリンナトリウム試験溶液をそれぞれ6回分析し算出した。

### 3.2 DS

ヘパリンナトリウム20 mgを精製水1 mLに溶解してヘパリンナトリウム溶液(20 mg/mL)とした。この液0.5 mLにDS溶液(4 mg/mL)をそれぞれ0.025, 0.037, 0.050, 0.075, 0.125, 及び0.25 mLを添加し、次いで精製水0.475, 0.462, 0.450, 0.425, 0.375, 0.25 mLを加えて混和し、DSをそれぞれ1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 5.0, 及び10.0% (w/w)含む溶液とした。これらの溶液を分析能パラメータ評価用試験溶液とし、キャピラリー電気泳動装置を用いて測定した。DSのピーク面積は最小ピーク幅設定値を2秒とし、DSのピーク開始点とピーク終了点を結ぶ傾斜線をベースラインとして検出されるピークの積算値から求めた。真度、併行精度並びに室内再現精度は1.0% DSを含むヘパリンナトリウム溶液を試験溶液として6回分析を行いDSのピーク面積値より算出した。また、検出限界についてはDSを1.0~10.0%含むヘパリンナトリウム試験溶液をそれぞれ6回分析し算出した。

## 4. キャピラリー電気泳動法における特異性及び検出限界に関する共同検定

近畿大学薬学部、(株)大塚製薬工場、及び扶桑薬品工業(株)が参加した。ここでは便宜上試験室A~Cと記す(順不同)。キャピラリー電気泳動装置として、機関AはBeckman P/ACE MDQ Glycoprotein System及びBeckman 32 Karat Gold software、機関BはBeckman P/ACE 5510及びWaters Empower、機関CはBeckman P/ACE MDQ Molecular Characterization System及びP/ACEシステムMDQワークステーションVer 2.2を使用した。

### 4.1 OSCS

1 mgのOSCSを0.25 mLの精製水に溶解し、OSCS溶液(4.0 mg/mL)を調製した。この液0.050, 0.075, 及び0.10 mLとヘパリンナトリウ