

くお礼申し上げます。また、本研究遂行にご協力いただきました厚生労働省医薬食品局審査管理課鷲田淳専門官、鈴木克之主査、監視指導・麻薬対策課風間秀元 GMP 指導官、独立行政法人医薬品医療機器総合機構品質管理部基準課上野清美課長、森田收氏、仁後知子氏にお礼申し上げます。

本研究の一部は、厚生労働省による支援、並びに平成 20 年度日本公定書協会の「日本薬局方標準品に関する研究（研究者戸井田敏彦）」により実施したものである。

文 献

- 1) <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/default.htm>.
- 2) Guerrini, M., Beccati, D., Shriver, Z., *et al.*: *Nat Biotechnol*, 26(6), 669-675 (2008).
- 3) Kishimoto, T. K., Viswanathan, K., Ganguly, T., *et al.*: *N Engl J Med*, 358(23), 2457-2467 (2008).
- 4) 「日本薬局方」平成 18 年厚生労働省告示第 285 号, 平成 19 年厚生労働省告示第 316 号, 平成 20 年厚生労働省告示第 285 号.
- 5) 「日本薬局方外医薬品規格 2002」平成 14 年医薬発第 0920001 号, 厚生労働省医薬局長通知, 平成 20 年 7 月 31 日薬食発第 0731015 号.
- 6) Maruyama, T., Toida, T., Imanari, T., Yu, G., Linhardt, R. J.: *Carbohydr Res.* 306(1-2), 35-43 (1998).
- 7) Montgomery, R. I., Lidholt, K., Flay, N. W., Liang, J., Vertel, B., Lindahl, U., Esko, J. D.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(23), 11327-11331 (1992).
- 8) Suzuki, A., Toyoda, H., Toida, T., Imanari, T.: *Glycobiology*, 11(1), 57-64 (2001).

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^{*1}, 梶 直孝^{*1}, 木下 充弘^{*1}, 橋井 則貴^{*2}, 川崎 ナナ^{*2},
寺尾 敏光^{*3}, 河合 健蔵^{*4}, 余田 光^{*4}, 山口 照英^{*2}

(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^{*1}, Naotaka KAKOI^{*1}, Mitsuhiro KINOSHITA^{*1}, Noritaka HASHII^{*2},
Nana KAWASAKI^{*2}, Toshimitsu TERAOKA^{*3}, Kenzo KAWAI^{*4},
Hikaru YODEN^{*4} and Teruhide YAMAGUCHI^{*2}

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¹⁾。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²⁾、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

*1 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

*2 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 & Biologics, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

*3 (株)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

*4 扶桑薬品工業(株)研究開発センター 大阪市城東区森之宮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

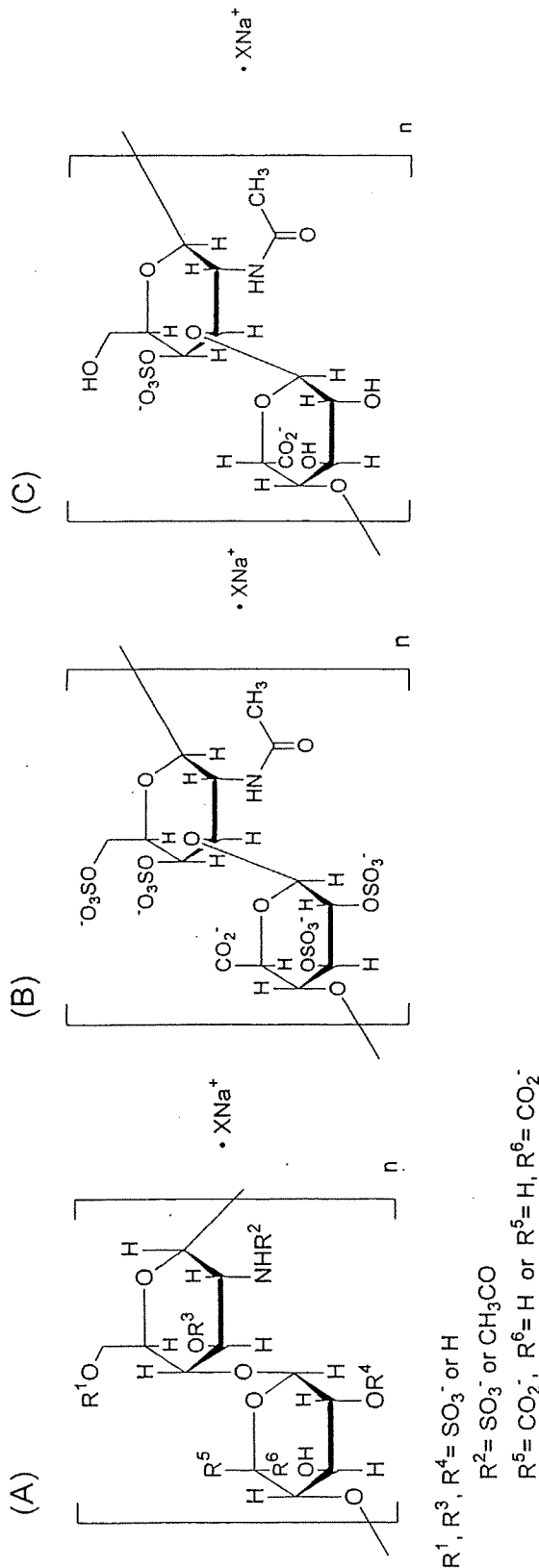


Fig.1 ヘパリンナトリウム (A), OSCS (B) 及び DS (C) の構造

(Fig. 1B)³⁻⁵⁾. 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、デルマタン硫酸 (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¹⁾, ¹H-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²⁾. ¹H-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^{6,7)}.

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⁸⁾. 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 66cm のフェ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 56cm の位置を紫外外部吸収検出窓とした。電気泳動用緩衝液は、リン酸二水素ナトリウム一水和物 1.0g を蒸留水 195mL 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 200mL 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 ± 1 分となるように調整した。分析温度は 25°C とし、検出は 200nm の紫外外部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 $0.010 \sim 0.014 \text{AU}$ 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 0.1M 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 20mg を精製水 1mL に溶解してヘパリンナトリウム溶液 (20mg/mL) とした。この液 0.5mL に OSCS 溶液 (4mg/mL) をそれぞれ 0.0125 , 0.025 , 0.037 , 0.075 , 及び 0.125mL を添加し、次いで精製水 0.487 , 0.475 , 0.462 , 0.425 , 及び 0.375mL 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 $0.5 \sim 5.0\%$ 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 20mg を精製水 1mL に溶解してヘパリンナトリウム溶液 (20mg/mL) とした。この液 0.5mL に DS 溶液 (4mg/mL) をそれぞれ 0.025 , 0.037 , 0.050 , 0.075 , 0.125 , 及び 0.25mL を添加し、次いで精製水 0.475 , 0.462 , 0.450 , 0.425 , 0.375 , 0.25mL 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 $1.0 \sim 10.0\%$ 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

1mg の OSCS を 0.25mL の精製水に溶解し、OSCS 溶液 (4.0mg/mL) を調製した。この液 0 , 0.050 , 0.075 , 及び 0.10mL とヘパリンナトリウ

ム溶液 (20 mg/mL) 0.50 mL を添加し、次いで精製水 0.5, 0.45, 0.425, 及び 0.40 mL を加えて混和し、ヘパリンナトリウム中に OSCS がそれぞれ 0, 2.0, 3.0, 及び 4.0% (w/w) 含む共同検定用試験溶液とした。共同検定用試験溶液はキャピラリー電気泳動装置を用いて測定し、OSCS のピーク面積を求めた。

4.2 DS

4 mg の DS を 1.0 mL の精製水に溶解し、DS 溶液 (4.0 mg/mL) を調製した。この液 0, 0.025, 0.050, 及び 0.10 mL にヘパリンナトリウム溶液 (20 mg/mL) 0.50 mL を添加し、次いで精製水 0.5, 0.475, 0.45, 及び 0.40 mL を加えて混和し、ヘパリンナトリウム中に DS がそれぞれ 0, 1.0, 2.0, 及び 4.0% (w/w) 含む共同検定用試験溶液とした。共同検定用試験溶液はキャピラリー電気泳動装置を用いて測定し、DS のピーク面積を求めた。

結 果

1. OSCS の分析

1.1 特異性

ヘパリンナトリウム 20 mg を 1.0 mL の精製水に溶解し、この液 0.5 mL に精製水 0.5 mL を加え 10 mg/mL の濃度とし、FDA から公開されている分析条件に従って測定した。その結果、ヘパリンナトリウムに由来するピークは 5.8 分をピーク頂点とし、5.0~6.5 分に泳動された (Fig. 2a)。次に、ヘパリンナトリウム溶液 (20 mg/mL) 0.5 mL と OSCS 溶液 (4.0 mg/mL) 0.125 mL と精製水 0.375 mL を添加したものを試験溶液 (5.0% OSCS) として測定した。測定の結果、OSCS に由来するピークは、5.5 分をピーク中心として泳動されたが、ヘパリンナトリウムのピークと完全に分離しなかった (Fig. 2b)。

1.2 検出限界

OSCS を 0.5~5.0% (w/w) になるようにヘパリンナトリウムに添加した溶液を測定し、本分析法の検出限界を確認した。Fig. 3 に示すように、OSCS 含量が 1.5% では OSCS を確認することができたが、OSCS が 1.0% では確認することができず、本試験法の検出限界は 1.5% 程度と判定された。

1.3 直線性、範囲

0.5~10% (w/w) の OSCS を添加したヘパリン

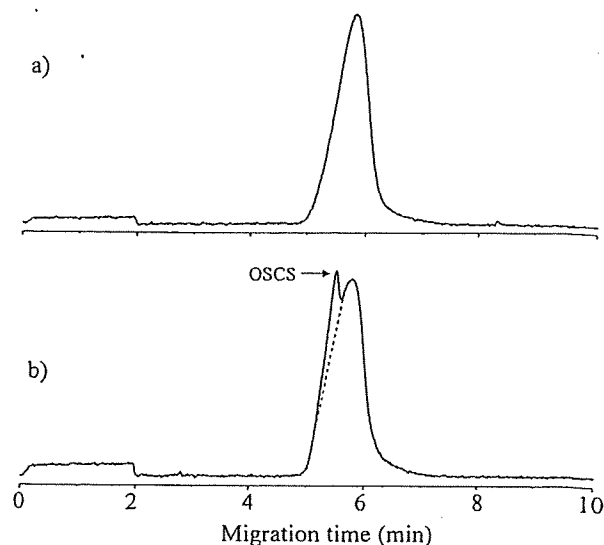


Fig. 2 キャピラリー電気泳動法による OSCS 検出の特異性

a) 10 mg/mL のヘパリンナトリウム溶液, b) 5.0% (w/w) の OSCS を 10 mg/mL のヘパリンナトリウム溶液に添加した溶液。

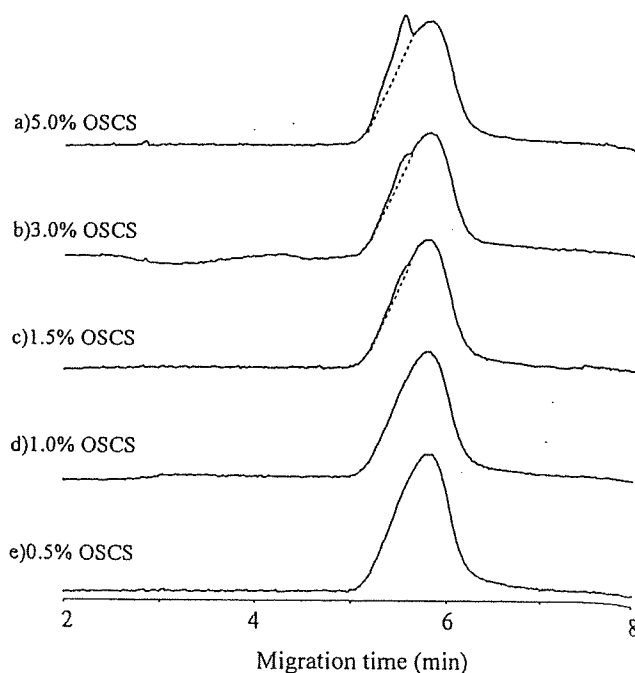


Fig. 3 OSCS を含むヘパリンナトリウムのエレクトロフェログラム

a)~e) : 10 mg/mL のヘパリンナトリウム溶液に 0.5~5.0% (w/w) の OSCS を添加した試験溶液。

ナトリウム溶液を用いて、キャピラリー電気泳動装置により測定した。OSCSのピーク面積は、1.5～10%の範囲で直線性が確認され、その相関係数は0.9758であった。

1.4 真度並びに精度

OSCSを10.0% (w/w) 添加したヘパリンナトリウム溶液を用いて、添加回収率(真度)を求めたところ、添加回収率は41% (RSD=2.18%)であった。また、OSCSを5.0% (w/w) になるように添加したヘパリンナトリウム溶液を用いて、1試験日内に6回測定を行った。1試験日内のOSCSピーク面積の再現性(併行精度, n=6)は、相対標準偏差(RSD)として1.36%であった(Table 1)。一方、異なる6試験日におけるOSCSピーク面積の再現性(室内再現精度)は相対標準偏差(RSD)として2.17%であった(Table 1)。

1.5 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

3機関において、OSCSを2.0, 3.0及び4.0% (w/w) になるようにヘパリンナトリウム溶液に添加し、キャピラリー電気泳動装置を用いて測定した。

Table 1 キャピラリー電気泳動によるOSCS分析の分析能パラメータ

分析能パラメータ	結果
真度 ^a	41 % (RSD= 2.18 %)
併行精度 ^b	1.36 %
室内再現精度 ^b	2.17 %
特異性	Fig.2 参照
検出限界	1.5 % (w/w)
定量限界	1.5 % (w/w)
直線性	$Y = 36663X - 367.1$ ($R^2 = 0.9758$)
範囲	1.5 - 10.0 % (w/w)

^a 10.0% OSCSを用いた(n=6).

^b 5.0% OSCSを用いた(n=6).

OSCSに由来するピークは、いずれの機関でも5.4～6.3分に観察された。各機関で得られたOSCSのピーク面積をTable 2に示す。全機関で2.0%以上のOSCSを確認することができたが、ヘパリンナトリウムのピークと分離が十分でないため、2.0%以下のOSCSを検出することは難しく、本分析法の検出限界は2.0%程度と判断された。

2. DSの分析

2.1 特異性

ヘパリンナトリウムに5.0% (w/w) のDSを添加して測定したところ、DSに由来するピークは、6.5分をピーク中心とし6.2～7.0分に観察され、ヘパリンナトリウムのピークとDSのピークを完全に分離することができた(Fig. 4)。

2.2 検出限界

ヘパリンナトリウムに対するDSの濃度が1.0～

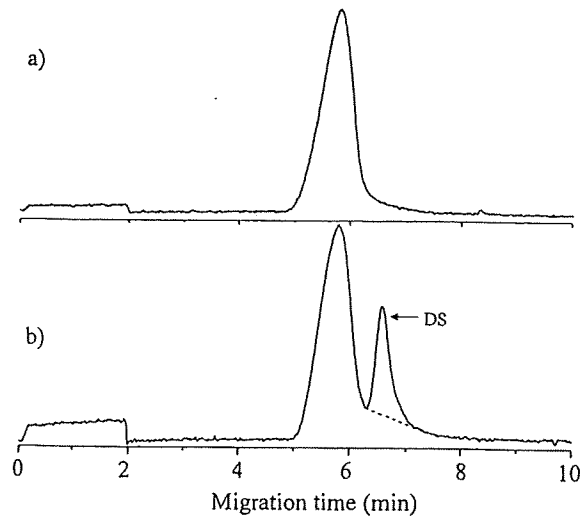


Fig. 4 キャピラリー電気泳動法によるDS検出の特異性

a) 10 mg/mLのヘパリンナトリウム溶液, b) 5.0% (w/w) のDSを10 mg/mLのヘパリンナトリウム溶液に添加した溶液.

Table 2 キャピラリー電気泳動を用いるOSCS限度試験共同検定結果

OSCS % (w/w)	ピーク面積値		
	機関 A	機関 B	機関 C
2.0	6902	36665	7457
3.0	9290	78759	17481
4.0	15336	124710	29949

10.0%になるように試料溶液を調製し、キャピラリー電気泳動装置を用いて測定したとき、1.0%のDSを確認することができた。したがって、検量線のデータ（下記参照）から検出限界は1.0%と判定された（Fig. 5）。

2.3 直線性、範囲

1.0~10% (w/w) のDSを添加したヘパリンナトリウム溶液を用いて、キャピラリー電気泳動装置により測定した。DSのピーク面積は、1.0~10%の範囲で直線性が確認され、その相関係数は0.9991であった（Fig. 6）。

2.4 真度並びに精度

DSを1.0% (w/w) 含むヘパリンナトリウム溶液を用いて、添加回収率（真度）を求めたところ、添加回収率は82%（RSD=1.78%）であった。また、同溶液を用いて、1試験日内に6回測定を行った。1試験日内でのDSピーク面積の再現性（併行精度、n=6）は、相対標準偏差（RSD）として2.15%であった（Table 3）。一方、異なる試験日におけるDSピーク面積の再現性（室内再現精度、n=6）は相対標準偏差（RSD）として2.48%であった（Table 3）。

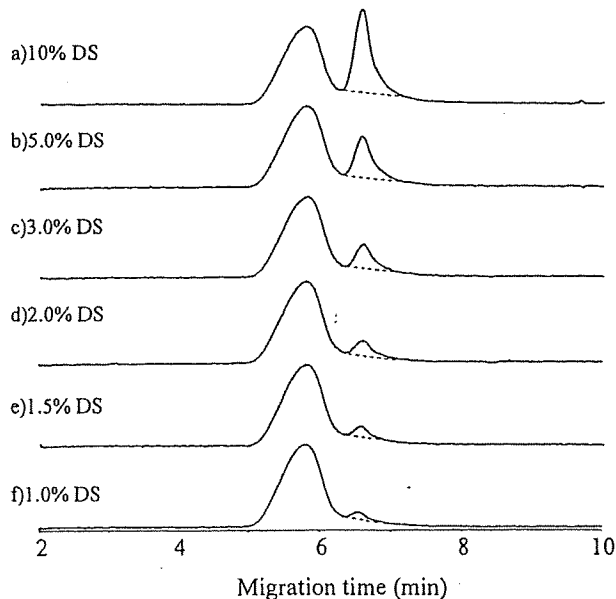


Fig. 5 DSを含むヘパリンナトリウムのエレクトロフェログラム

a)~f) : 10 mg/mL のヘパリンナトリウム溶液に1.0~10.0% (w/w) のDSを添加した試験溶液。

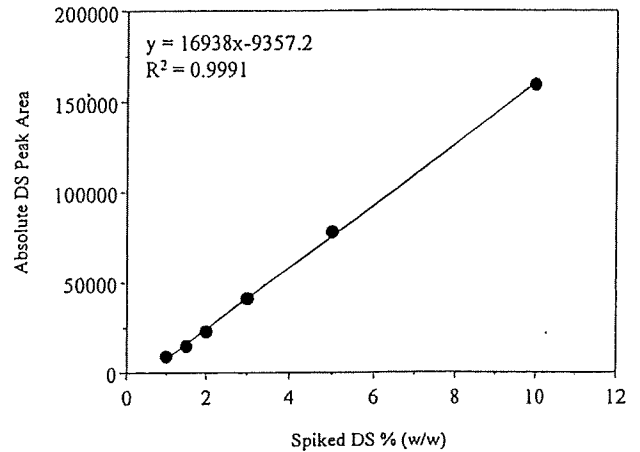


Fig. 6 キャピラリー電気泳動法によるDSの直線性

10 mg/mL のヘパリンナトリウム溶液に1.0~10.0% (w/w) のDSを添加したときのDSピークの絶対面積値をプロットした。

Table 3 キャピラリー電気泳動によるDS分析の分析能パラメータ

分析能パラメータ	結果
真度 ^a	82 % (SD=1.78 %)
併行精度 ^a	2.15 %
室内再現精度 ^a	2.48 %
特異性 ^b	Fig.4 参照
検出限界	1.0 % (w/w)
定量限界	1.0 % (w/w)
直線性	$Y = 16938X - 9357.2$ ($R^2 = 0.9991$) Fig.6 参照
範囲	1.0 · 10.0 % (w/w)

^a 1.0 % DSを用いた(n=6).

^b 5.0% DSを用いた(n=6).

2.4 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

3機関において、1.0、2.0及び4.0% (w/w) のDSを添加したヘパリンナトリウム試料溶液をキャピラリー電気泳動装置を用いて測定し、DSのピーク面積を求めた。DSに由来するピークは、6.5~7.8分の範囲に観察された。各機関で得られたDSのピーク面積をTable 4に示す。全機関で1.0%以上のDSを確認することができた。

Table 4 キャピラリー電気泳動を用いる DS 限度試験共同検定結果

DS % (w/w)	ピーク面積値		
	機関 A	機関 B	機関 C
1.0	24707	75734	54647
2.0	48633	153927	85043
4.0	78022	425538	142533

考 察

1. OSCS

FDA から公開されているキャピラリー電気泳動を用いる分析法では、ヘパリンナトリウムと OSCS の分離は不完全であった。分析能パラメータの評価により 10% における添加回収率（真度）は 41% (RSD=2.18%) であり、本試験法の OSCS に対する特異性は低かった。また、共同検定で得られた本試験法の検出限界は 1.5% 程度であることから、本試験法は、1.5% 程度の限度試験であり、OSCS の含量が 1.5% 以下であることを保証する試験法であると解釈された。OSCS は、有害事象の原因物質であると考えられていること、また、製造工程由来物質や目的物質関連物質として混入する可能性がないことから、ヘパリンナトリウム中に検出されるべきではない。したがって、本試験法における規格は、「ヘパリンナトリウム中に OSCS に由来するピークが検出されないこと」が適当であると考えられる。OSCS については、厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知薬食審査発第 0701001 号（平成 20 年 7 月 1 日）において、「ヘパリンナトリウムに関する日本薬局方の一部改正に伴う取り扱いについて」として、NMR 法による限度試験（0.5%）が規定された。しかしながら、キャピラリー電気泳動法を用いる試験法は 1.0% 未満の OSCS の混入を検出することができず、OSCS を対象としたヘパリンナトリウムの日本薬局方の純度試験法として、現状では採用できないと判定される。しかし、キャピラリー電気泳動はヘパリンナトリウム中に混入する OSCS を検出できる限られた分析法の一つであり、分析条件の検討によりヘパリンナトリウムと OSCS の分離が達成できれば、OSCS の限度試験として利用することは可能であると考えられる。

2. DS

近畿大学で実施した分析能パラメータ評価では、DS とヘパリンの識別が可能であること、また、1.0~10.0% (w/w) の範囲で直線性があることが確認された。再現性については併行精度が 2.15%、室内再現精度が 2.48% であり、定量性と特異性を有することが明らかにされた。また、共同検定の結果からも、キャピラリー電気泳動法による DS 分析を日本薬局方の試験法として、ヘパリンナトリウム中の DS の混入が 1.0% 以下であることを保障する限度試験として設定することは可能であると判断される。

国内 3 機関による共同検定の結果、キャピラリー電気泳動装置により DS とヘパリンナトリウムのピークを分離できること（同程度の特異性）、1.0% 以上の DS を検出できること（同程度の検出限界）が確認された。今回、共同検定に参加した 3 機関はキャピラリーカラムへの試料導入法としていずれも加圧法を使用した。試料導入法は加圧法の他、吸引法や落差法なども利用でき、他メーカーの装置を用いた場合でも同程度の検出限界を得るためには、分析に使用する試料量を規定することが重要である。例えば、「試料はヘパリンナトリウムのピーク強度がフルスケールの 10% となるように注入する」あるいは「試料はヘパリンナトリウムのピーク最大吸光度が 0.010~0.015 となるように注入する」などとし、今回と同様のバリデーションスタディを実施しなければならない。その結果、同程度の特異性と検出限界が確認できれば、DS を対象とするヘパリン純度試験法として有用である。

なお、DS の規制の必要性については、DS はヘパリンとは異なる物質であるので、純度試験として適切に規制するべきとする意見と、これまでに毒性等の報告がなく、純度試験等により規制する必要はないとする意見があり、国際的にも見解が分かっている。しかし、DS はヘパリンを調製する際の原料

に含まれるため、ヘパリンの精製の指標として有用であると考えられる。今後、国内ヘパリンナトリウム中へのDSの含有量の実態を正確に把握した上で、規制が必要か否か検討していく必要がある。

謝 辞

有益なご助言をいただきました。国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部鹿庭なほ子室長、独立行政法人医薬品医療機器総合機構早川堯夫顧問及び小嶋茂雄顧問、並びにヘパリンナトリウムをご供与いただきました日本バルク薬品㈱に深く御礼申し上げます。本研究の遂行にご協力いただきました厚生労働省医薬食品局審査管理課野田淳専門官、鈴木克之主査、独立行政法人医薬品医療機器総合機構品質管理部基準課上野清美課長、森田收氏、仁後知子氏に感謝いたします。また、有益なご討論をいただいた日本薬局方原案審議委員会生物薬品委員会、FDA、米国薬局方、欧州薬局方、及びヘパリンナトリウム製剤製造会社の関係各位にお礼申し上げます。

本研究の一部は厚生労働省の支援によって行われ

たものである。

文 献

- 1) <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/default.htm>.
- 2) Sugahara, K.: *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **12**, 321-349 (2000).
- 3) Guerrini, M., Beccati, D., Shriver, Z., *et al.*: *Nat Biotechnol*, **26**(6), 669-675 (2008).
- 4) Kishimoto, T. K., Viswanathan, K., Ganguly, T., *et al.*: *N Engl J Med*, **358**(23), 2457-2467 (2008).
- 5) Maruyama, T., Toida, T., Imanari, T., Yu, G., Linhardt, R. J.: *Carbohydr Res*, **306**(1-2), 35-43 (1998).
- 6) <http://www.usp.org/hottopics/heparin.html>.
- 7) http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Heparin_sodium_monograph_Revised.pdf.
- 8) Montgomery, R. I., Lidholt, K., Flay, N. W., Liang, J., Vertel, B., Lindahl, U., Esko, J. D.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(23), 11327-11331 (1992).

質量分析を用いたペプチド及びたん白質性医薬品の確認試験法に関する研究**

原園 景*¹, 川崎 ナナ*¹, 伊藤さつき*¹, 小林 哲*¹, 石川 リカ*²,
高井 俊紀*², 古賀 明子*³, 岡本寿美子*³, 山口 秀人*⁴, 濱詰 康樹*⁵,
佐藤 貴之*⁵, 窪田 雅之*⁶, 掛樋 一晃*⁷, 木下 充弘*⁷, 島 圭介*⁸,
山田 真希*⁸, 山口 照英*¹

(受付：平成 20 年 5 月 22 日, 受理：平成 20 年 9 月 16 日)

Study of Mass Spectrometry as an Identification Test for Peptide/Protein Products

Akira HARAZONO*¹, Nana KAWASAKI*¹, Satsuki ITOH*¹, Tetsu KOBAYASHI*¹,
Rika ISHIKAWA*², Toshiki TAKAI*², Akiko KOGA*³, Sumiko OKAMOTO*³,
Hideto YAMAGUCHI*⁴, Yasuki HAMAZUME*⁵, Takayuki SATOH*⁵,
Masayuki KUBOTA*⁶, Kazuaki KAKEHI*⁷, Mitsuhiro KINOSHITA*⁷,
Keisuke SHIMA*⁸, Masaki YAMADA*⁸ and Teruhide YAMAGUCHI*¹

Summary

Since mass spectrometry (MS) and tandem mass spectrometry (MS/MS) make it possible to measure accurately the mass of peptides and proteins and provide structural information, they have been used for not only analysis of primary structure and post-translational modification but also identification tests of peptide and protein products. However, assay methods for identification tests have not been fully standardized due to the availability of different ionization methods, many types of analyzers and various analytical conditions. In this paper, mass spectrometry for identification tests of peptide and protein products has been standardized and validated in a collaborative study using several types of mass spectrometers equipped with ESI or MALDI sources. Based on the results of molecular mass measurement from the collaborative study, we propose the following acceptance criteria: i) 0.3 Da (monoisotopic mass) for peptides with masses of <1,000 Da, ii) 300 ppm (monoisotopic mass) and 500 ppm (average mass) for peptides with masses of 1,000~6,000 by ESI-MS and MALDI-MS, and iii) 500 ppm and 1,600 ppm (average mass) for proteins with masses of 6,000~22,000 Da by ESI-MS and MALDI-MS, respectively. Although peptides with masses of 1,000~4,000 Da yielded 5~10 b- and y- series fragments by CID-MS/MS and PSD, the detected ions were not identical among laboratories. Further study is necessary for optimization and standardization of MS/MS conditions.

Key words

Mass spectrometry, Tandem mass spectrometry, Peptide, Protein, Biologicals, Identification test

1. 緒言

質量分析(MS)及びタンデム質量分析(MS/MS)は、それぞれ、ペプチドや分子量十萬程度までのたん白質の質量を測定できること及びアミノ酸配列に関する情報を得られることから¹⁻⁵⁾、近年、ペプチド及びたん白質性医薬品の特性・構造解析に汎用され、更に確認試験として取り入れられるようになってきた。しかし、ペプチドやたん白質の質量分析において、イオン化法として主にエレクトロスプレーイオン化法(ESI)及びマトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)の2種類が用いられていること、分析計として四重極(Q)型、イオントラップ(IT)型、飛行時間(TOF)型、フーリエ変換イオンサイクロトン共鳴(FT-ICR)型など複数の装置が用いられていること、装置メーカーごとに推奨している質量校正用標準品が異なっていること、試験者によって分析条件が大きく異なることから、試験結果の許容範囲や試験法としての応用可能性が明確にされていない。そのため、MSやMS/MSを確認試験として広く適用していくには、条件設定

をしていく必要があり、装置に依存しないMSを用いた確認試験法の整備と、適用可能性の範囲を明らかにすることが望まれている。そこで、本研究では、国立医薬品食品衛生研究所、バイオ医薬品開発メーカー、大学、MS装置開発メーカーによって、MSを用いたペプチド及びたん白質性医薬品の標準的な確認試験法を作成し、そのバイオ医薬品への適用について検討した。

2. 研究方法

2.1 試料

グルタチオン(C₁₀H₁₇N₃O₆S₁:単同位体質量307.084, 平均質量307.3), ゴナドレリン(C₅₅H₇₅N₁₇O₁₃:単同位体質量1,181.573, 平均質量1,182.3), 遺伝子組換えヒトインスリン(C₂₅₇H₃₈₃N₆₅O₇₇S₆:単同位体質量5,803.638, 平均質量5,807.6), 遺伝子組換えヒト成長ホルモン(C₉₉₀H_{1,528}N₂₆₂O₃₀₀S₇:単同位体質量22,111, 平均質量22,125), 及び遺伝子組換えヒト血清アルブミン(C_{2,936}H_{4,590}N₇₈₆O₈₈₉S₄₁:単同位体質量66,395, 平均質量

- *1 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 of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences. 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
- *2 キリンファーマ(株)製造本部 群馬県高崎市萩原町100-1(〒370-0013)
Production Division, Kirin Pharma Co., Ltd. 100-1, Hagiwara-machi, Takasaki City, Gunma 370-0013, Japan
- *3 中外製薬(株)分析技術研究部 東京都北区浮間5-5-1(〒115-8543)
Analytical Technology Research Department, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd. 5-5-1 Ukima, Kita-ku, Tokyo 115-8543, Japan
- *4 アステラス製薬(株)製剤研究所 静岡県焼津市大住180(〒435-0072)
Pharmaceutical Analysis, Pharmaceutical Research & Technology Laboratories., Astellas Pharma Inc. 180, Ozumi, Yaizu-shi, Shizuoka 425-0072, Japan
- *5 大日本住友製薬(株)技術研究センター分析研究部 大阪府茨木市蔵垣内1-3-45(〒567-0878)
Technology Research and Development Center, Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd. 1-3-45 Kurakakiuchi, Ibaraki City, Osaka 567-0878
- *6 サーモフィッシャーサイエンティフィック(株) 神奈川県横浜市神奈川区守屋町3-9 C-2F(〒221-0022)
Chromatography & MS Sales Department, Product marketing Group, Thermo Fisher Scientific K.K. TBAJ. 3-9 C-2F, Moriya-cho, Yokohama City, Kanagawa 221-0022, Japan
- *7 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, Kowakae 3-4-1, Higashi-osaka 577-8502, Japan
- *8 島津製作所(株)分析計測事業部応用技術部京都アプリケーション開発センター 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1(〒604-8511)
Applications Development Center, Analytical Applications Department, Analytical & Measuring Instruments Division, Shimadzu Co. 1 Nishinokyo-Kuwabaracho, Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511, Japan
- Corresponding author: Nana Kawasaki, Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences. 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
E-mail: nana@nihs.go.jp

66,437) を用いた。試料はすべて機関 A が入手し、機関 B, C, D, E, F, G 及び H に配付した。グルタチオンはペプチド研究所より購入し、秤量後配付した。ゴナドレリン (ゴナドレリン酢酸塩標準品) は財団法人日本公定書協会より供与され、秤量後配付した。ヒトインスリン (ヒューマリン R 注) は日本イーライリリー(株)より購入し、分注後配付した。ヒト成長ホルモン (グロウジェクト BC) は大日本住友製薬(株)製を購入し、ゲルろ過により脱塩後分注し、凍結乾燥後配付した。ヒト血清アルブミンはバイオチェーン(株)より購入し、蒸留水に溶解後分注し、凍結乾燥後配付した。

2.2 装置

ESI-MS 装置として、TOF 型：LCT (ウォータース(株))、Q-TOF 型：Qstar Elite (アプライドバイオシステムズ(株))、Ultima API 及び Synapt HD-MS (ウォータース(株))、IT 型：LCQ Deca, LCQ Advantage MAX 及び LTQ (サーモフィッシャーサイエンティフィック(株))、Esquire HCT plus (ブルカー・ダルトニクス(株))、オービトラップ (OT) 型：LTQ-Orbitrap XL (サーモフィッシャーサイエンティフィック(株))、FT-ICR 型：LTQ-FT (サーモフィッシャーサイエンティフィック(株))を使用した。MALDI-MS 装置として、TOF 型：Voyager DE RP 及び Voyager DE-PRO (アプライドバイオシステムズ(株))、Autoflex II (ブルカー・ダルトニクス(株))、TOF/TOF 型：4800 plus (アプライドバイオシステムズ(株))、AXIMA-TOF² (島津製作所(株))を使用した。

2.3 質量校正

各試験室において Table 1A 及び 1B に示す質量校正標準品を用いて質量校正を行った。ESI-MS 装置を使用した場合は、YOKUDELNA, Caffeine + MRFA + Ultramark 1621, ヨウ化ナトリウム, ヨウ化ナトリウム・セシウム又は ES tuning Mix Pos + Glu-fibrinopeptide を使用した。MALDI-MS 装置を使用した場合は、 α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸 (CHCA), GRGDTP, angiotensin I, ACTH 18-39, bombesin, bradykinin fragment 1-7, angiotensin II, substance P, P₁₄R, ACTH 1-17, somatostatin 28, bovine insulin, human insulin, ubiquitin I, cytochrome C, apomyoglobin, carbonic anhydrase, trypsinogen, protein A, aldolase

及び bovine serum albumin (BSA) を試料に応じて使用した。質量校正標準品は各機関にて用意した。

2.4 システム適合性

システム適合性は、MS においては、「angiotensin I を測定したとき、そのモノアイソトピック質量が 1,295.5~1,295.9 である」等により判定した。MS/MS においては、「angiotensin I につき、上記の条件で操作するとき、 b_2^{1+} , b_4^{1+} , b_6^{1+} , y_2^{1+} 及び y_4^{1+} のプロダクトイオンが検出される」や「angiotensin I の $m/z=1,296.7$ を前駆イオンとして PSD による測定を行ったとき、 m/z 255.1, 269.2, 354.2, 506.3, 513.3, 517.2, 534.3, 619.4, 756.4 及び 1,183.6 のうち少なくとも 5 個のフラグメントイオンが観測される」等により判定した。

2.5 測定方法

2.5.1 ESI-MS

各機関で用いた ESI-MS の測定方法を Table 1A に示した。脱塩した試料を、0.1% 酢酸を含むメタノール/水 (1:1) 混液、5 mM 酢酸アンモニウム (pH 8.5) を含むアセトニトリル/水 (1:1) 混液又は 0.1% ギ酸を含むアセトニトリル/水 (1:1) 混液に溶かし、1~20 $\mu\text{mol/L}$ の溶液を作成した。試料溶液を ESI チップに導入し、電圧をかけてイオン化した後、ポジティブイオンモードでマススペクトルを測定した。もしくは、0.1~1% のギ酸又は 0.085~0.1% のトリフルオロ酢酸 (TFA) を含む水/アセトニトリル混液を溶離液に用いた HPLC により試料を分離し、溶出液を直接 ESI チップに導入して質量を測定した。

2.5.2 MALDI-MS

各機関で用いた MALDI-MS の測定方法を Table 1B に示した。試料を水、0.1% TFA 又は 0.1% TFA を含むアセトニトリル/水 (7:3) 混液に溶かし、1 $\mu\text{mol/L}$ から 25 mmol/L の溶液を作成した。マトリックスには、ペプチド試料では CHCA 又は 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) を、たん白質試料ではシナピン酸 (SA) を使用した。マトリックスは、0.1% TFA を含むアセトニトリル/水 (1:1) 混液に溶かし、5~10 mg/mL の溶液もしくは飽和溶液とした。又は 0.3% TFA を含むアセトニトリル/水 (1:1) 混液に加温し溶かし、過飽和溶液 (CHCA 25~30 mg/mL, DHB 及び SA 55~60 mg/mL) とした。試料溶液とマトリックス

Table 1A Mass Spectrometers and Methods Used

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

^a, Estimated values.^b, Tip: tip-based infusion, Syr: syringe infusion.

by Individual Laboratories (ESI)

B chain	Human insulin	Human growth hormone	Human serum albumin	Sample introduction methods		
1654.6875, 1790.6623, 1926.6371, 2062.6119	10 μM Tip1 1600 V	10 μM Syr1 (0.3 μl/min) Gel filtration	10 μM Syr1 (0.3 μl/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
4 μl/min	10 μM Syr1 (3 μl/min) 2000 V	2 μM Syr1 (3 μl/min) 2000 V Gel filtration	8 μM Syr1 (3 μl/min) 2000 V Gel filtration	Syr2 5 mM AcONH ₄ (pH 8.5)/50 % MeOH		
4 μl/min	10 μM Syr1 (3 μl/min) 2000 V	10 pmol HPLC2 (3 μl/min) 2000 V Gel filtration	10 pmol HPLC2 (3 μl/min) 2000 V Gel filtration	HPLC2 C18 0.1 % formic acid/2 % ACN 0.1 % formic acid/90 % ACN		
10 μl/min	20 μg (3.4 nmol) HPLC3 (0.2 ml/min) 4000 V	40 μg (1.8 nmol) HPLC3 (0.2 ml/min) 4000 V		HPLC3 C8 0.1 % TFA 0.085 % TFA/47 % ACN		
10 μl/min	1821.7206, 1971.6149 5 μg (0.86 nmol) HPLC3 (50 μl/min) 3000 V	10 μg (0.45 nmol) HPLC3 (50 μl/min) 3000 V	10 μg (0.15 nmol) HPLC3 (50 μl/min) 3000 V			
10 μl/min						
M μl/min	10 μM Syr1 (20 μl/min) 4500V	10 μM Syr1 (20 μl/min) 4500V	10 μM Syr1 (20 μl/min) 4500V dialysis	HPLC4 C4 0.1 % TFA/2 % ACN 0.1 % TFA/98 % ACN		
1521.9321, 1671.8264, 1821.7206, 1971.6149						
10 μl/min	10 μM Syr1 (5 μl/min) 3000V	10 μM Syr1 (5 μl/min) 3000V	10 μM Syr1 (5 μl/min) 3000V dialysis			
1450.5 μmol/min	785.8 5 μg (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		
M μl/min	1 μM Syr3 (5 μl/min) 2000V	1 pmol HPLC6 (3 μl/min) 2000V	1 pmol HPLC6 (3 μl/min) 2000V	Syr3 0.1 % formic acid/50 % AC HPLC6 0.1 % formic acid 0.1 % formic acid/ACN		

Table 1B Mass Spectrometers and Methods Used

Laboratory	Mass spectrometer	Sample	Glutathione	Gonadrelin	Human insulin A chain	Human insulin B chain	Human insulin	
A4	Calibrator ^{a, b}		BK1-7, Angt II, P ₁₄ R, ACTH18-39 (S)				Ins_B, CyC, apoMG, Ald, BSA	
4800 plus (TOFTOF)	<i>m/z</i>		757.400, 1046.542, 1533.858, 2465.199				5734.51, 12361.96,	
Applied Biosystems	Sample	Conc. ^{c, d}	25 mM	6.3 mM	25 μM (PE), 100 μM (CAM, CM)		83 μM	
Operator a3	Matrix		CHCA1	CHCA1	CHCA1	CHCA1	SA1	
	Deposition method		Spot1	Spot1	Spot1	Spot1	Spot1	
	Mode		reflectron mode	reflectron mode	reflectron mode	reflectron mode	linear mode	
B4	Calibrator ^{a, b}			BK1-7, Angt II, SubP (B)	ACTH1-17, ACTH18-39, So28 (B)		Ins, CyC, apoMG (B)	
Autoflex II (TOF)	<i>m/z</i>			757.40, 1046.54, 1347.74	2093.09, 2465.20, 3147.47		5734.56, 6181.05, 8476.77	
Brucker Daltonics	Sample	Conc. ^c Solvent		0.5 mg/ml (0.42 mM)	30 μM	40 μM	0.5 mg/ml (86 μM)	
Operator b1	Matrix			DDW	ACN:DDW:TFA = 700:300:1		DDW	
	Deposition method			CHCA2	CHCA2	CHCA2	SA2	
	Mode			Spot2	Spot2	Spot2	Spot3	
	Others			reflectron mode	reflectron mode	reflectron mode	linear mode	
				Recrystallizing sol.: EtOH:ACN:0.1%TFA = 6:3:1				
E	Calibrator ^{a, b}		GRGDTP (S), Angt I (P), ACTH18-39 (S)					
Voyager DE RP (TOF)	<i>m/z</i>		601.282, 1295.678, 2464.191					
Applied Biosystems	Sample	Conc. ^{c, d}	1~10 mM	1~10 μM	1~10 μM	1~10 μM	1~10 μM	
Operator e1	Matrix		CHCA3 (DHB1)	CHCA3 (DHB1)	CHCA3 (DHB1)	CHCA3 (DHB1)	CHCA3 (DHB1)	
	Deposition method		Spot4 (Spot5)	Spot4 (Spot5)	Spot4 (Spot5)	Spot4 (Spot5)	Spot4 (Spot5)	
	Mode		reflectron mode	reflectron mode	reflectron mode	reflectron mode	reflectron mode	
G	Calibrator ^{a, b}		CHCA, Bom (B)	Angt II, ACTH18-39 (B)	ACTH18-39, So28 (B)	ACTH18-39, Ubl (B)	Ins_B, Ubl (B)	
Voyager DE-PRO (TOF)	<i>m/z</i>		190.178(+2), 1619.822	1046.541, 2465.198	2465.198, 3147.471	2465.198, 8565.76	5734.51, 8565.76	
Applied Biosystems	Sample	Conc. ^{c, d}	1.0 mg/ml (3 mM)	1.0 mg/ml (0.85 mM)	1.0 mg/ml (0.17 mM)	1.0 mg/ml (0.17 mM)	1.0 mg/ml (0.17 mM)	
Operator g1	Matrix		CHCA4	CHCA4	CHCA4	CHCA4	CHCA4	
	Deposition method		Spot2	Spot2	Spot2	Spot2	Spot2	
	Mode		reflectron mode	reflectron mode	reflectron mode	reflectron mode	reflectron mode	
	Others		Recrystallizing sol.: ACN:0.1 % TFA = 1:1					
H	Calibrator ^{a, b}		CHCA	CHCA, Angt II, Angt I (S)	CHCA, Angt II, ACTH18-39, ACTH7-38 (S)		Ins_H (S)	
AXIMA-TOF ² (TOFTOF)	<i>m/z</i>		190.050 (+2), 379.093	190.050 (+2), 379.093, 1046.542, 1296.685	190.050 (+2), 379.093, 1046.542, 2465.20,		5803.64	
Shimadzu	Sample	Conc. ^{c, d}	0.5 mg/ml (1.6 mM)	0.5 mg/ml (0.42 mM)	10 μM	10 μM	10 μM	
Operator h1	Matrix		CHCA1	CHCA1	CHCA1	CHCA1	CHCA1	
	Deposition method		Spot5	Spot5	Spot5	Spot5	Spot5	
	Mode		reflectron mode	reflectron mode	reflectron mode	reflectron mode	reflectron mode	
	Others		Zip TipC18					

^a, 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.

^b, Manufacturer, S: Sigma-Aldrich; B: Brucker Daltonics; P: Peptide Institute.

^c, Estimated values.

^d, 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、N₂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 ¹H: 1.007825, ¹²C: 12.000000, ¹⁴N: 14.003074, ¹⁶O: 15.994915, ³²S: 31.972072⁶⁾及び原子量 H: 1.00794, C: 12.0107, N: 14.0067, O: 15.9994, S: 32.0657⁷⁾を用いて計算した。

by Individual Laboratories (MALDI)

lin	Human growth hormone	Human serum albumin	Sample introduction methods Matrix solutions and deposition methods		
ld, BSA	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.
8476.77 μM)	TN, ProA, BSA (B) 23982, 44613, 66431 1 mg/ml (45 μM) DDW SA2 Spot3 linear mode	1 mg/ml (15 μM) DDW SA2 Spot3 linear mode	CHCA2 0.7 mg/ml 2-PrOH:EtOH = 3:1	SA2 Saturated sol. 0.1 % TFA:ACN = 2:1	Spot2 Spot3 Deposit 1 μl of mixture of 1 μl of sample sol. and 1 μl of matrix sol., then recrystallize Deposit 1 μl of sample sol. and 1 μl of matrix sol.
l B1) 5) ode	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.
'mM) ode	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.
ode	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-ビニルピリジン約 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、ダ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 の位置を图中に示した。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 66,346~66,500 Da, 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

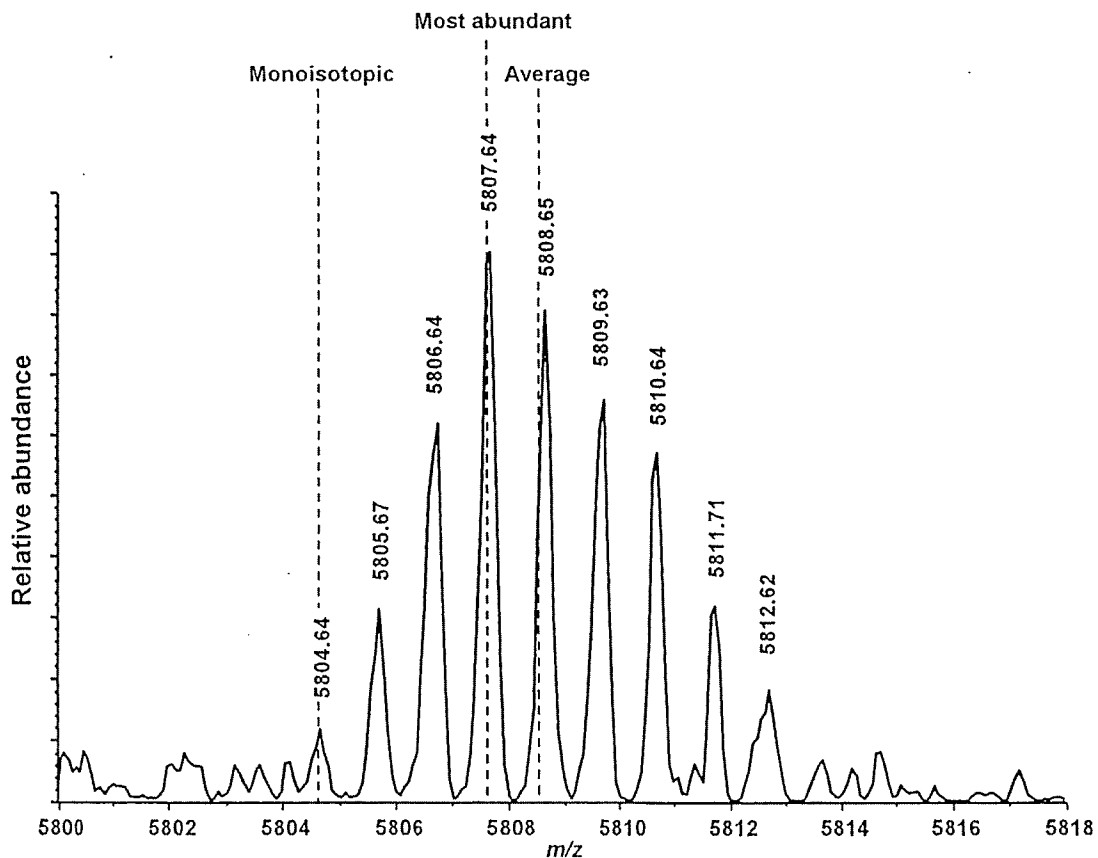


Fig.1 MALDI-MS Spectrum of Human Insulin
 Monoisotopic mass, most abundant mass and average mass were deduced to be 5803.63, 5806.64 and 5807.53, respectively.

Table 2 Summary of Measurement of

Laboratory			A1	A2	A3	B1	B2	C1	C2	C3	D	F	A4	B4	
Mass type			ESI	ESI	ESI	ESI	ESI	ESI	ESI	ESI	ESI	ESI	MALDI	MALDI	
Sample	Theoretical mass (Da)	Observed mass	QTOF	IT	FT-ICR	IT	TOF	IT	QTOF	TOF	QTOF	OT	TOFTOF	TOF	
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		
	Mave	307.324	1 307.08	307.17	307.08	307.1	307.05	307.0	307.08		307.09	307.08	307.03		
Gonadorelin	Mmono	1181.573	1 1181.58		1181.58	1181.6	1181.43	1181.5	1181.54		1181.58	1181.57	1181.58	1181.5	
	Mave	1182.290	1 1181.57		1181.58	1181.6	1181.43	1181.6	1181.54		1181.58	1181.57	1181.57	1181.5	
Human insulin A chain	Pyridyl ethyl	Mmono	2802.231	1 2802.25							2802.19		2802.18		
		Mave	2804.249	1 2802.25							2802.17		2802.19		
Carboxyamidmethyl	Mmono	2610.086	1 2610.11			2610.2	2609.96					2610.08	-	2610.2	
	Mave	2611.906	1 2610.11			2610.6	2609.96					2610.08	-	2610.0	
Carboxymethyl	Mmono	2614.022	1 2614.01		2614.11						2614.00		-		
	Mave	2615.845	1 2614.03	2614.6	2614.11						2614.00		-		
Human insulin B chain	Pyridyl ethyl	Mmono	3637.800	1 3637.82							3637.74		3637.78		
		Mave	3640.198	1 3637.82							3637.74		3637.79		
Carboxyamidmethyl	Mmono	3541.728	1 3541.76			3541.8	3541.51					3541.725	3541.73	3541.8	
	Mave	3544.026	1 3541.76			3541.8	3541.51					3541.725	3541.72	3541.8	
Carboxymethyl	Mmono	3543.696	1 3543.74		3543.80				3543.90		3543.60		3544.14		
	Mave	3545.996	1 3543.72	3546.6	3544.29				3543.92		3543.60		3544.20		
Human insulin	Mmono	5803.638	1 5803.60		5803.82						5804.87		5803.65		
		5807.576	1 5803.59		5803.82						5804.84		5803.65		
Human growth hormone	Mmono	22111.0	1 22124.4	22124.3	22125.1	22124	22125	22125.0			22123.0	22124.8	22124.1	22101.4	22097
		22124.8	1 22124.9	22124.8	22127.1	22124	22125	22124.0			22123.0	22124.8	22124.1	22096.9	22093
Human serum albumin	Mmono	66395	1 66440	66500							66447	66437	66437	66346	664
		66437	1 66439	66474							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⁸⁾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)				
B4	307.04	(307.01)	307.09	307.08	307.08	-0.01	0.0027	0.040	307.08	0.00	0.000	0.045	307.06	-0.02	0.0049	0.027				
	307.04	(307.01)	307.09	307.09	(n = 13)			131	(n = 9)		147	(n = 4)				88				
1181.5	1181.64	(1181.65)	1181.57	1181.57	1181.57	0.00	0.032	0.058	1181.55	-0.02	0.013	0.054	1181.60	0.02	0.049	0.060				
1181.5	1181.66	(1181.69)	1181.72	1181.57	(n = 13)			49	(n = 8)		46	(n = 5)				51				
				1181.7	(n = 1)															
	2802.61	(2802.08)	2802.05		2802.25	0.02	0.007	0.21	2802.21	-0.02			2802.28	0.05						
	2802.61	(2802.08)	2802.04		(n = 5)			75												
2610.2	2609.97	(2609.90)	2609.69	2610.02	2610.09	0.00	0.185	0.20	2610.14	0.05			2610.03	-0.05						
2610.0	2609.92	(2609.78)	2610.28	2610.12	(n = 8)			75												
	2614.27	(2614.03)	2614.89		2614.19	0.17	0.191	0.28	2614.04	0.02			2614.41	0.39						
	2614.20	(2614.04)	2614.29		(n = 5)			106												
					2614.7	-1.1														
					(n = 2)															
	3638.28		3638.41		3638.00	0.20	0.039	0.30	3637.78	-0.02			3638.14	0.34						
	3638.31		3638.29		(n = 5)			82												
		3640.2			3639.8	-0.4														
		3639.4																		
3541.9	3541.77		3542.08	3541.81	3541.75	0.02	0.089	0.16	3541.70	-0.03			3541.79	0.07						
3541.0	3541.54		3542.01	3541.64	(n = 9)			44												
		3543.4			3543.7	-0.3														
		3544.0																		
	3544.10		3544.09		3543.94	0.25	0.134	0.23	3543.82	0.13			3544.11	0.41						
	3544.05		3544.08		(n = 7)			65												
		3545.4			3545.8	-0.15														
		3545.4			(n = 3)															
				5803.63	5803.91	0.27	0.011	0.54	5803.98	0.34			5803.63	-0.01						
				5803.62	(n = 5)			92	(n = 4)				(n = 1)							
5806.0	5807.7	(5707.6)	5805.9		5806.5	-1.1	0.43	0.90	5806.7	-0.9			5806.3	-1.3						
5805.0	5807.7	(5807.6)	5806.0		(n = 9)			155	(n = 5)				(n = 4)							
22097.0	22118.1		22101.9	22124.8	22118.8	-6.0	2.5	10.5	22124.5	-0.2	0.54	0.92	22108.4	-16.3	4.2	12.2				
22093.0	22117.7		22112.8	22120.6	(n = 14)			476	(n = 9)			42	(n = 5)			552				
6644.0	66405		66357	66419	66418	-20	20	43	66447	10	7.7	20	66382	-55	29	34				
6635.0	66408		66360	66381	(n = 11)			649	(n = 6)			306	(n = 5)			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⁸⁾。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