

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ロン共鳴(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 Kura-kakiuchi, 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 (ウォーターズ(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 (ウォーターズ(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)), TOFTOF 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, P₁R, 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) 混液に加熱し溶かし、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 Mass spectrometer Operator	Sample Method	Glutathione	Gonadrelin	Human insulin A chain	Human insulin B chain	
A1 Qstar Elite (QTOF) Applied Biosystems Operator a1	Calibrator <i>m/z</i> Conc. or amount of sample ^a Sample introduction ^b (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 μ M Tip1 1600 V	5 μ M Tip1 1600 V	20 μ M Syr1 (0.3 μ l/min) 2400 V	20 pmol HPLC1 (0.5 μ l/min) 2400 V	20 μ M Syr1 (0.3 μ 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 ^a Sample introduction ^b (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 μ M Syr1 (3 μ l/min) 2000 V	5 μ M Syr1 (3 μ l/min) 2000 V	10 μ M Syr2 (3 μ l/min) 2000 V	10 μ M Syr2 (3 μ 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 ^a Sample introduction ^b (flow rate) Ion spray voltage Others	Caffeine (Sigma-Aldrich), MRFA (Research Plus), Ultramark1621 (Alfa Aesar) 195.0877, 524.2650, 1221.9906, 1521.9715, 1821.9530 5 μ M Syr1 (3 μ l/min) 2000 V	5 μ M Syr1 (3 μ l/min) 2000 V	10 μ M Syr2 (3 μ l/min) 2000 V	10 μ M Syr2 (3 μ 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 ^a Sample introduction ^b (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 μ g (65 nmol) HPLC3 (0.2 ml/min) 4000 V	20 μ 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 ^a Sample introduction ^b (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 μ g (16 nmol) HPLC3 (50 μ l/min) 3000 V	5 μ g (4.2 nmol) HPLC3 (50 μ l/min) 3000 V	0.8 nmol HPLC3 (50 μ l/min) 3000 V	0.8 nmol HPLC3 (50 μ l/min) 3000 V	
B3 LCQ Advantage MAX (IT) Thermo Fisher Scientific Operator b1	Calibrator <i>m/z</i> Conc. or amount of sample ^a Sample introduction ^b (flow rate) Ion spray voltage	Caffeine (Sigma-Aldrich), MRFA (Research Plus), Ultramark1621 (Alfa Aesar) 195.0877, 524.2650, 1221.9906, 1521.9715, 1821.9530 20 μ g (65 nmol) HPLC3 (0.2 ml/min) 5000 V	20 μ 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 ^a Sample introduction ^b (flow rate) Ion spray voltage Others	Caffeine (Sigma-Aldrich), MRFA (Research Plus), Ultramark1621 (Alfa Aesar) 195.0877, 524.2650, 1221.9906, 1521.9715, 1821.9530 10 μ M Syr1 (10 μ l/min) 5000V	10 μ M Syr1 (10 μ l/min) 5000V	4.3 nmol HPLC4 (0.5 mL/min) 5000V	10 μ M Syr1 (10 μ l/min) 5000V	10 μ M Syr1 (10 μ l/min) 5000V
purification by RP-HPLC						
C2 Ultima API (QTOF) Micromass Operator c2	Calibrator <i>m/z</i> Conc. or amount of sample ^a Sample introduction ^b (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 μ M Syr1 (5 μ l/min) 2500V	10 μ M Syr1 (5 μ l/min) 3000V	10 μ M Syr1 (5 μ l/min) 3000V	10 μ M Syr1 (5 μ l/min) 3000V	
purification by RP-HPLC						
C3 LCT (TOF) Waters Operator c1	Calibrator Conc. or amount of sample ^a Sample introduction ^b (flow rate) Ion spray voltage Others					
D Synapt HDMS (QTOF) Waters Operator d1	Calibrator <i>m/z</i> Conc. or amount of sample ^a Sample introduction ^b (flow rate) Ion spray voltage	NaICs, 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 μ g (16 nmol) HPLC5 (0.25 ml/min) 5000 V	5 μ 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 ^a Sample introduction ^b (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 μ M Syr3 (5 μ l/min) 2000V	1 μ M Syr3 (5 μ l/min) 2000V	1 μ M Syr3 (5 μ l/min) 2000 V	1 μ M Syr3 (5 μ l/min) 2000V	

^a. Estimated values.^b. 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 μ M Tip1 1600 V	10 μ M Syr1 (0.3 μ l/min) Gel filtration	10 μ M Syr1 (0.3 μ 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 μ M Syr1 (3 μ l/min) 2000 V	2 μ M Syr1 (3 μ l/min) 2000 V Gel filtration	8 μ M Syr1 (3 μ l/min) 2000 V Gel filtration	Syr2 5 mM AcONH ₄ (pH 8.5)/50 % MeOH		
10 μ M Syr1 (3 μ l/min) 2000 V	10 pmol HPLC2 (3 μ l/min) 2000 V Gel filtration	10 pmol HPLC2 (3 μ l/min) 2000 V Gel filtration	HPLC2 C18 0.1 % formic acid/2 % ACN 0.1 % formic acid/90 % ACN		
20 μ g (3.4 nmol) HPLC3 (0.2 ml/min) 4000 V	40 μ 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 μ g (0.86 nmol) HPLC3 (50 μ l/min) 3000 V	10 μ g (0.45 nmol) HPLC3 (50 μ l/min) 3000 V	10 μ g (0.15 nmol) HPLC3 (50 μ l/min) 3000 V			
10 μ M Syr1 (20 μ l/min) 4500V	10 μ M Syr1 (20 μ l/min) 4500V	10 μ M Syr1 (20 μ l/min) 4500V dialysis	HPLC4 C4 0.1 % TFA/2 % ACN 0.1 % TFA/98 % ACN		
1521.9321, 1671.8264, 1821.7206, 1971.6149					
NaI					
10 μ M Syr1 (5 μ l/min) 3000V	10 μ M Syr1 (5 μ l/min) 3000V	10 μ M Syr1 (5 μ l/min) 3000V dialysis			
785.8					
5 μ 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 μ M Syr3 (5 μ l/min) 2000V	1 pmol HPLC6 (3 μ l/min) 2000V	1 pmol HPLC6 (3 μ l/min) 2000V	Syr3 0.1 % formic acid/50 % AC C18 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	4800 plus (TOF/TOF)	Calibrator ^{a,b}	BK1-7, Angt II, P ₁₄ R, ACTH18-39 (S)				Ins_B, CyC, apoMG, Ald, BS,	
Applied Biosystems	Operator a3	Sample	757.400, 1046.542, 1533.858, 2465.199				5734.51, 12361.96,	
		Conc. ^{c,d}	25 mM	6.3 mM	25 μM (PE), 100 μM (CAM, CM)		83 μM	
		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	Autoflex II (TOF)	Calibrator ^{a,b}	BK1-7, Angt II, SubP (B)	ACTH1-17, ACTH18-39, So28 (B)			Ins, CyC, apoMG (B)	
Brucker Daltonics	Operator b1	Sample	757.40, 1046.54, 1347.74	2093.09, 2465.20, 3147.47			5734.56, 6181.05, 8476.7	
		Conc. ^c	0.5 mg/ml (0.42 mM)		30 μM	40 μM	0.5 mg/ml (86 μM)	
		Solvent	DDW		ACN:DDW:TFA = 700:300:1		DDW	
		Matrix	CHCA2	CHCA2	CHCA2	CHCA2	SA2	
		Deposition method	Spot2	Spot2	Spot2	Spot2	Spot3	
		Mode	reflectron mode	reflectron mode	reflectron mode	reflectron mode	linear mode	
		Others	Recrystallizing sol: EtOH:ACN:0.1%TFA = 6:3:1					
E	Voyager DE RP (TOF)	Calibrator ^{a,b}	GRGDTP (S), Angt I (P), ACTH18-39 (S)					
Applied Biosystems	Operator e1	Sample	601.282, 1295.678, 2464.191					
		Conc. ^{c,d}	1~10 mM	1~10 μM	1~10 μM	1~10 μM	1~10 μM	
		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	Voyager DE-PRO (TOF)	Calibrator ^{a,b}	CHCA, Bom (B)	Angt II, ACTH18-39 (B)	ACTH18-39, So28 (B)	ACTH18-39, Ubl (B)	Ins_B, Ubl (B)	
Applied Biosystems	Operator g1	Sample	190.178(+2), 1619.822	1046.541, 2465.198	2465.198, 3147.471	2465.198, 8565.76	5734.51, 8565.76	
		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)	
		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	AXIMA-TOF ² (TOF/TOF)	Calibrator ^{a,b}	CHCA	CHCA, Angt II, Angt I (S)	CHCA, Angt II, ACTH18-39, ACTH7-38 (S)		Ins_H (S)	
Shimadzu	Operator h1	Sample	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	
		Conc. ^{c,d}	0.5 mg/ml (1.6 mM)	0.5 mg/ml (0.42 mM)	10 μM	10 μM	10 μM	
		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: 32.065⁷⁾ 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 SA2 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-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, 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, ギナドレリン, 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。

ギナドレリン 1 試験室を除いて、ギナドレリン (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 5,803.59~5,804.87 Da, 平均は 5,803.91 Da, 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 22,093.0~22,127.1 Da, 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

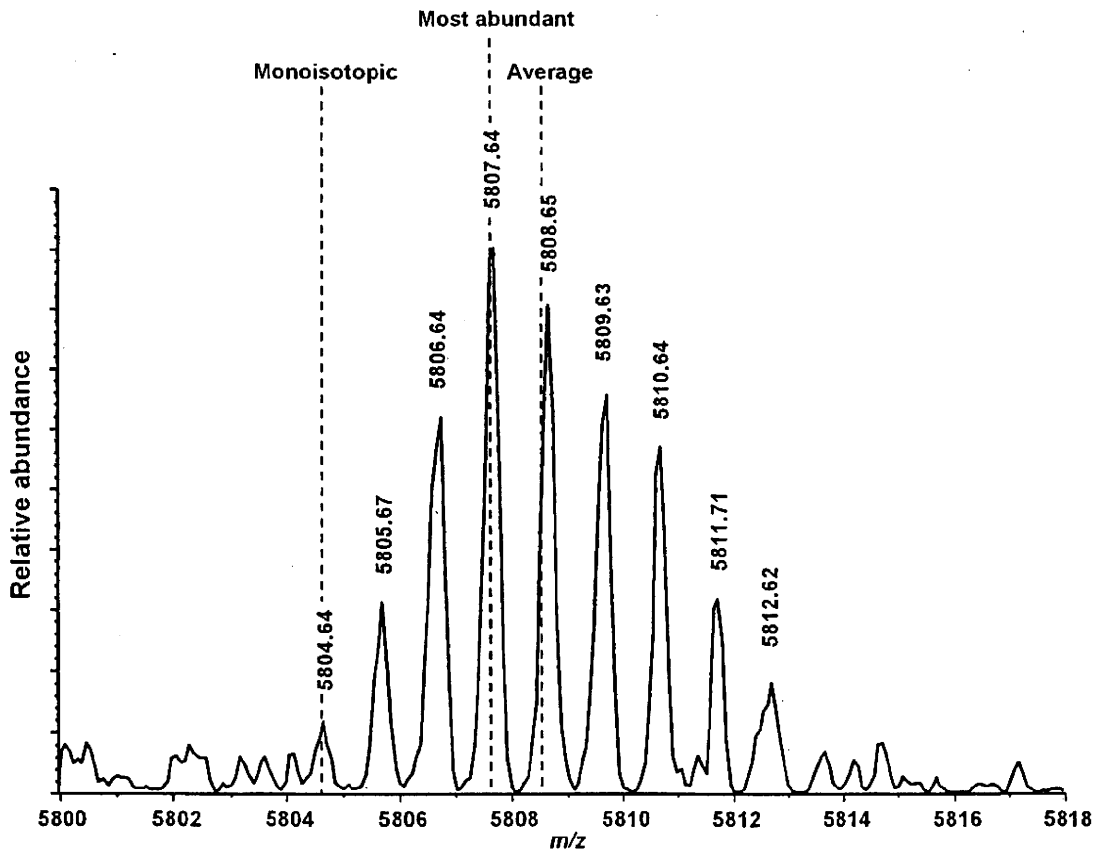


Fig. 1 MALDI-MS Spectrum of Human Insulin
Monoisotopic mass, most abundant mass and average mass were deduced to be 5803.63, 5806.64 and 5807.53, respectively.

Table 2 Summary of Measurement of

Laboratory		A1	A2	A3	B1	B2	C1	C2	C3	D	F	A4	I
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 TOFTOF	MA T
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
	Mave	307.324	1 307.08	307.17	307.08	307.1	307.05	307.0	307.08		307.09	307.08	307.03
Gonadrelin	Mmono	1181.573	1 1181.58		1181.58	1181.6	1181.43	1181.5	1181.54		1181.58	1181.57	1181.58
	Mave	1182.290	1 1181.57		1181.58	1181.6	1181.43	1181.6	1181.54		1181.58	1181.57	1181.57
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
Carboxyamidomethyl	Mmono	2610.086	1 2610.11			2610.2	2609.96				2610.08	-	261
	Mave	2611.906	1 2610.11			2610.6	2609.96				2610.08	-	261
Carboxymethyl	Mmono	2614.022	1 2614.01		2614.11						2614.00		-
	Mave	2615.845	1 2614.03		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
Carboxyamidomethyl	Mmono	3541.728	1 3541.76			3541.8	3541.51				3541.725	3541.73	354
	Mave	3544.026	1 3541.76			3541.8	3541.51				3541.725	3541.72	354
Carboxymethyl	Mmono	3543.696	1 3543.74		3543.80			3543.90		3543.60			3544.14
	Mave	3545.996	1 3543.72		3544.29			3543.92		3543.60			3544.20
Human insulin	Mmono	5803.638	1 5803.60		5803.82					5804.87		5803.65	
	Mave	5807.576	1 5803.59		5803.82					5804.84		5803.65	
Human growth hormone	Mmono	22111.0	1 5807.0			5807.2	5806.17	5808.2		5805.6		5805.6	580
	Mave	22124.8	1 5807.0			5807.2	5806.17	5807.0		5805.7		5805.8	580
Human serum albumin	Mmono	66395	1 22124.4	22124.3	22125.1	22124	22125	22125.0		22123.0	22124.8	22124.1	22101.4
	Mave	66437	1 22124.9	22124.8	22127.1	22124	22125	22124.0		22123.0	22124.8	22124.1	22096.9
Human serum albumin	Mmono	66395	1 66440	66500	-	66439	-		66447	66437	66437	66346	66
	Mave	66437	1 66439	66474	-	66440	-		66440	66438	66436	66346	66

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

E1 MALDI TOF	E2 DHB MALDI TOF	G MALDI TOF	H MALDI TOFTOF	ESI + MALDI			ESI			MALDI					
				Average	Bias	Standard deviation SRW	Average	Bias	Standard deviation SRW	Average	Bias	Standard deviation SRW	SR (ppm)	SR (ppm)	SR (ppm)
307.04 307.04	(307.01) (307.01)	307.09 307.09	307.08 307.09	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) (1181.69)	1181.57 1181.72	1181.57 1181.57	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
				1181.7 (n = 1)	-0.6										
2802.61 2802.61	(2802.08) (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) (2609.78)	2609.69 2610.28	2610.02 2610.12	2610.09 (n = 8)	0.00	0.185	0.20 75	2610.14	0.05			2610.03	-0.05		
2614.27 2614.20	(2614.03) (2614.04)	2614.89 2614.29		2614.19 (n = 5)	0.17	0.191	0.28 106	2614.04	0.02			2614.41	0.39		
				2614.7 (n = 2)	-1.1										
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		
	3640.2 3639.4			3639.8	-0.4										
3541.77 3541.54		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		
	3543.4 3544.0			3543.7	-0.3										
3544.10 3544.05		3544.09 3544.08		3543.94 (n = 7)	0.25	0.134	0.23 65	3543.82	0.13			3544.11	0.41		
	3545.4 3545.4			3545.8 (n = 3)	-0.15										
			5803.63 5803.62	5803.91 (n = 5)	0.27	0.011	0.54 92	5803.98 (n = 4)	0.34			5803.63 (n = 1)	-0.01		
5807.7 5807.7	(5707.6) (5807.6)	5805.9 5806.0		5806.5 (n = 9)	-1.1	0.43	0.90 155	5806.7 (n = 5)	-0.9			5806.3 (n = 4)	-1.3		
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

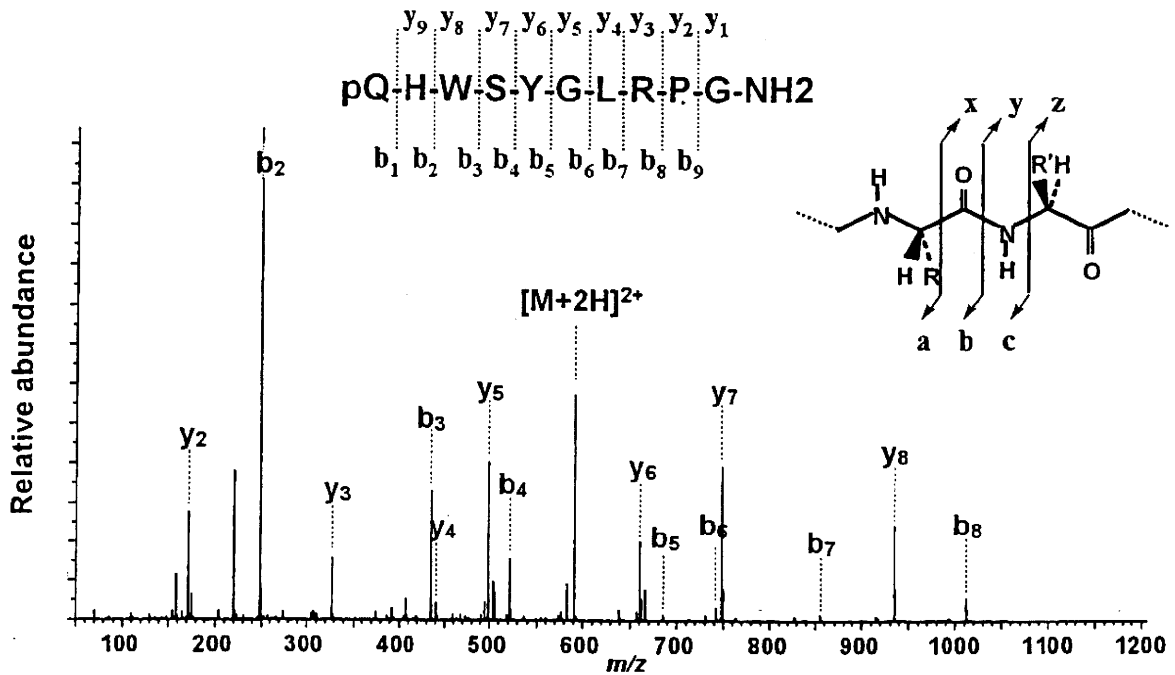


Fig. 2 MS/MS Spectrum of m/z 591.8 (+2) of Gonadorelin

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 $-0.45\sim-0.22$ であり、各測定での誤差の平均は $-0.21\sim-0.11$ 、また標準偏差は $0.001\sim 0.15$ 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 $0.01\sim 0.11$ 及び $0.05\sim 0.14$ 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 程度のものまでと考えられた。

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室間再現標準偏差から $2.8 \times$ 室間再現標準偏差⁹⁾ により計算したところ、それぞれ ± 0.11 , ± 0.16 であり、 ± 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室間再現標準偏差は概ね 100 ppm 以内であり、 ± 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室間再現標準偏差 155 ppm から、 ± 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を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、室間再現標準偏差は 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 ± 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、室間再現標準偏差は 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、試験室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、室間再現標準偏差は 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、室間再現標準偏差は 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 ± 500 ppm で測定できることを示唆している^{10,11)}。

ヒト血清アルブミンを MALDI-MS で測定した場合、室間再現標準偏差は 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^{12,13)}、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	591.8 (+2)	591.8 (+2)	591.8 (+2)	592.1 (+2)	591.8 (+2)	591.8 (+2)	1182.6 (+1)	591.8 (+2)	
Energy	30 eV	35%	35%	30-200%	35%	25%	30 eV	15-45 eV ^a	
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, 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	MALDI	MALDI	CHCA MALDI	DHB MALDI	MALDI	MALDI	
OT	TOFTOF	TOF	TOF	TOF	TOFTOF	TOFTOF	
CID	CID	PSD	PSD	PSD	PSD	CID	
591.8 (+2)	1182.6 (+1)	1182.6 (+1)	1182.6 (+1)	1182.6 (+1)	1182.6 (+1)	1182.6 (+1)	
35%	1 keV	-	-	-	-	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 QTOF	ESI IT	ESI FT	ESI IT	ESI IT	ESI IT	ESI QTOF	ESI 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に限られるので、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¹⁴⁾、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	MALDI	
OT	TOFTOF	TOF	MALDI	MALDI	TOFTOF	
CID	CID	PSD	TOF	TOF	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、±300 ppm(単同位体質量)もしくは±500 ppm(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±500 ppm(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

- Hirayama, K., S. Akashi, S., Furuya, M., Fukuhara, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 639-646 (1990).
- Arnott, D., Shabanowitz, J., Hunt, D. F.: *Clin. Chem.*, **39**, 2005-2010 (1993).
- McLafferty, F. W., Fridriksson, E. K., Horn, D. M., Lewis, M. A., Zubarev, R. A.: *Science*, **284**, 1289-1290 (1999).
- Medzihradzky, K. F.: *Methods in Enzymology*, **402**, 209-244 (2005).
- Strupat, K.: *Methods in Enzymology*, **405**, 1-36 (2005).
- Audi, G., Wapstra, A. H.: *Nuclear Physics A*, **595**, 409-480 (1995).
- 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.
- Roepstorff, P., Fohlman, J.: *Biomed. Mass. Spectrom.*, **11**, 601 (1984).
- JIS z 8402-1991「分析・試験の許容差通則」、日本規格協会発行。
- Tarelli, E., Mire-Sluis, A., Tivmann, 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).
- Girard M., Bietlot H. P., Cyr T. D.: *J. Chromatogr. A*, **772**, 235-242 (1997).
- Peters T.: In All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications. Academic Press, Properties of Thiol Group, 1996, p. 51-54.
- Wada, Y.: *J. Mass Spectrom.*, **31**, 263-266 (1996).
- 川崎ナナ, 原園 景, 川西 徹: 医薬品研究, **37**(7), 438-447 (2006).
- 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

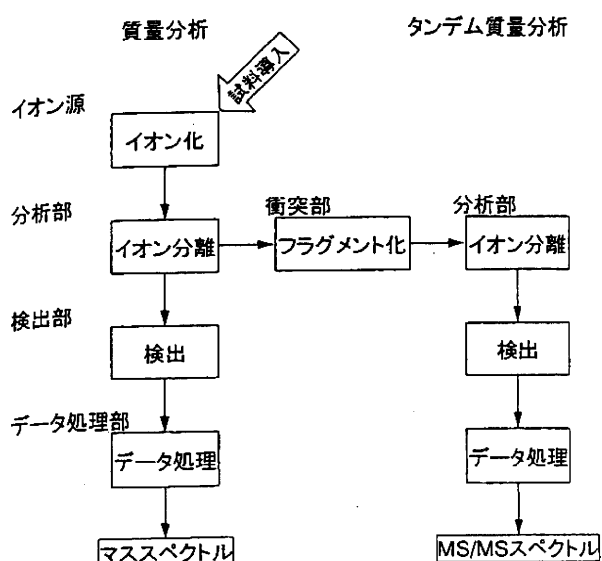


図1 質量分析計

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、 α -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-ビ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¹⁵⁾。

