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，分子をイオン化させ，質量（*m*）を電荷数（*z*）で割った *m/z* に応じてイオンを分離し，検出する方法である．測定結果は，イオンの *m/z* を x 軸に，それに対する信号の相対強度を y 軸に示したマススペクトルとして示される．イオンの *m/z* と *z* より，分子の質量を求めることができる．MS/MS は，一段階目の分析部で選択した前駆イオンを解離させ，生じたプロダクトイオンを二段階目の分析部で分離し，検出する手法である．観測したプロダクトイオンの *m/z* により，構造の確認や推定を行うことができる．質量分析で得られる情報は定性的であるが，定量にも利用される．MS 並びに MS/MS は，ペプチド及びたん白質分子の質量の測定並びにアミノ酸配列の確認及び翻訳後修飾の確認などに利用できることから，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．

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）．イオン源は，導入された試料をイオン化する部位であり，ペプチド及びたん白質のイオン化には主に，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）及びエレクトロスプレーイオン化法（ESI: Electrospray ionization）が用いられる．分析部は，生成したイオンを *m/z* に応じて分離する部位であり，主に四重極型，飛行時間型，イオントラップ型及びフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型などが用いられる．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，マススペクトルとして出力される．MS/MS 又は多段階 MS は，複数の分析部を連結した分析計並びにイオントラップ型及びフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型の分析計を用いて行われる．イオンの解離には，通例，衝突誘起解離（CID: Collision-induced dissociation），ポストソース分解（PSD: Post-source decay）及び電子捕獲解離（ECD: Electron capture dissociation）などが利用される．

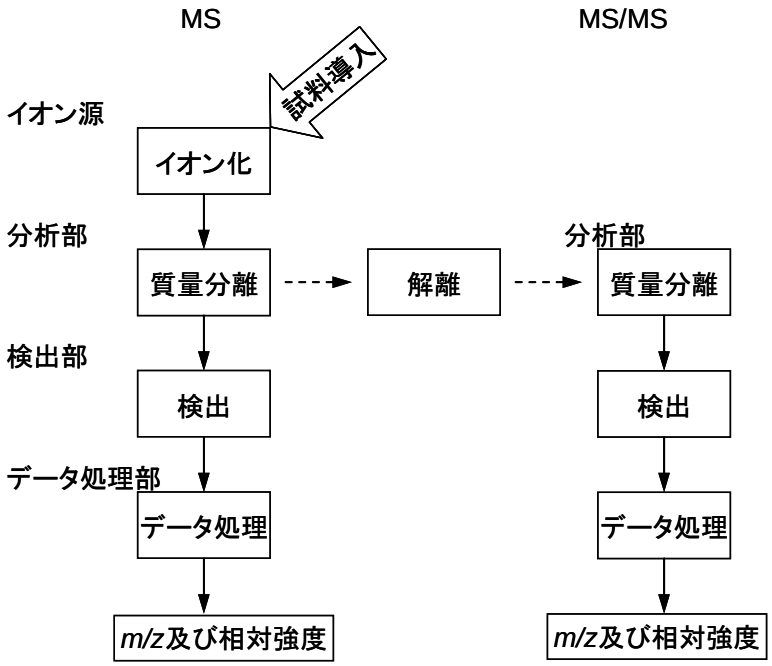

図１　MS 及び MS/MS の概念図

各種測定様式

１．MS

MS の測定法には次の方法がある．

（１）　フルスキャンモード

選択した *m/z* 範囲のイオンを検出する方法であり，試料の質量及び同位体に関する情報を得ることができる．

（２）　選択イオンモニタリング（SIM）

特定の *m/z* のイオンのみを検出する方法であり，試料の高感度な検出に利用される．

2. MS/MS

MS/MS の測定法には次の方法がある．

（1）　プロダクトイオンスキャンモード

選択した *m/z* の前駆イオンより生じたプロダクトイオンを検出する方法であり，試料や不純物の定性的な情報を得ることができる．

（2）　前駆イオンスキャンモード

解離により特定の *m/z* のプロダクトイオンを生ずる前駆イオンを走査する測定法であり，特定の部分構造を持つ試料の特異的検出に利用される．

（3）　コンスタントニュートラルロススキャンモード

解離により特定の質量の減少（中性分子の脱離）が起こる前駆イオンを走査する測定法であり，特定の部分構造を持つ試料の特異的検出に利用される．

（4）　選択反応モニタリング(SRM)

特定の *m/z* の前駆イオンを解離させて生じる特定の *m/z* のプロダクトイオンを検出する方法であり，複雑なマトリックス中の低レベルの試料の定量的検出に利用される．

操作法

1. MS

あらかじめ医薬品各条のシステム適合性で規定した試験溶液を用いて質量測定を行い，検出感度及び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．基準値を満たしていない場合は，イオン源，分析部又は検出部の電圧などの調整や，適切な質量校正標準物質を用いた質量校正を行う．基準値を満たしていることを確認した後，医薬品各条に規定した方法で試料を調製し，試験条件に従い質量測定を行う．通例，イオン化法に応じて以下の方法で操作する．

（**1**）マトリックス支援レーザー脱離イオン化法（MALDI）

脱塩した試料ペプチド及び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を含む水溶液などを用いる．別に試料ペプチド及び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，トリフルオロ酢酸を含む水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，ペプチド及びたん白質の測定には，α-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸，2,5-ジヒドロキシ安息香酸又はシナピン酸などを用いる．試料溶液とマトリックス溶液を混合し，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し，マススペクトルを得る．

（**2**）エレクトロスプレーイオン化法（ESI）

脱塩した試料ペプチド及びたん白質を適切な溶媒に溶解して試料溶液とする．通例，溶媒には酢酸などを含む水及びメタノール又はアセトニトリルの混合液を用いる．試料溶液は，シリンジ又は液体クロマトグラフイーなどにより 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，マススペクトルを得る．

2. MS/MS

あらかじめ医薬品各条のシステム適合性で規定した試験溶液を用いて MS/MS を行い，規定されたプロダクトイオンが検出されることを確認する．MS と同様に試料ペプチドを適切な溶媒に溶解して試料溶液とし，イオン源に導入してイオン化する．医薬品各条で規定された前駆イオンを選択し，試験条件に従い適切な解離条件を設定して解離させ，プロダクトイオンスペクトルを得る．分子内にジスルフィド結合を含むペプチドの MS/MS を行う場合は，通例，試料を還元アルキル化する．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及び 4-ビニルピリジンなどが用いられる．

確認試験への応用例

1. 分子の質量の確認

MS により試料ペプチド及びたん白質分子の質量を測定する．モノアイソトピックピークが確認できる場合には，モノアイソトピックピークより質量を求める．モノアイソトピックピークが確認できない場合は，ピークの頂点より質量を求める．試料たん白質が多数の多価イオンとして観測される場合には，デコンボリューション処理により質量を求める．測定値が医薬品各条で規定した値の範囲内であることを確認する．

2. アミノ酸配列などの確認

試料ペプチド分子の質量を確認した後，MS/MS により医薬品各条で規定した前駆イオンを選択して解離させ，医薬品各条で規定したプロダクトイオンが検出されることを確認する．分子量が大きく有用なプロダクトイオンが観測できない場合，試料ペプチド及びたん白質を酵素などにより断片化し，生じたペプチド断片の MS/MS によりアミノ酸配列などを確認できることがある．ペプチド及び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．

用語解説

イオントラップ型（IT: Ion trap）　狭義には四重極イオントラップを指し，四重極型と同様の原理を利用して，高周波電圧によりイオンを閉じこめ，イオンを *m/z* 別にセルから追い出すことによりイオンを分離する方法．特定の *m/z* のイオンをトラップし，解離及びイオン放出を繰り返すことにより，多段階 MS（MS^n）を行うことが出来る．

エレクトロスプレーイオン化法（ESI: Electrospray ionization）　大気圧下，試料溶液を ESI チップより高電圧をかけ噴霧し，帯電液滴を形成させ，試料イオンを生成する方法．ペプチド及びたん白質などの高分子化合物では多価イオンが生成する．液体クロマトグラフィーやキャピラリー電気泳動と接続して用いることができる．

四重極型（Q: Quadrupole）　直流と高周波を重ね合わせた電圧を，双曲線又はそれに相当する断面をもつ平行な 4 本の電極柱に印加し，電圧を変化させることによって通過できるイオンの *m/z* を変化させて，イオンを分離する方法．

衝突誘起解離（CID: Collision-induced dissociation）　中性の衝突ガス（He，Ar，N_2 など）との衝突によって衝突エネルギーの一部がイオンの内部エネルギーに変換され，イオンが励起し，解離すること．衝突ガスと衝突させる際のイオンの加速電圧により低エネルギーCID（約 1000 V 以下の電圧で加速されたイオンの衝突）と高エネルギーCID（1000 V 以上の電圧で加速されたイオンの衝突）に分けられる．

電子捕獲解離（ECD: Electron capture dissociation）　多価のプロトン付加分子が，低エネルギーの電子と反応し，ラジカルイオンとなった後，解離すること．フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計でイオンの解離に利用される．

飛行時間型（TOF: Time-of-flight）　イオン化した試料を高電圧で加速した後，一定距離を飛行するのに要した時間の違いによりイオンを分離する方法．イオン源から検出器までイオンを直線的に飛行させるリニア型と，静電界ミラー（リフレクトロン）を用いて反転させるリフレクトロン型がある．リフレクトロンを利用した場合，イオンの初期運動エネルギーのばらつきを補正することにより分解能が向上する．

フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型（FT-ICR: Fourier transform ion cyclotron resonance）　一様な磁場中で，磁場に垂直な平面内で回転運動（サイクロトロン運動）するイオンの周期が *m/z* に反比例することを利用して，*m/z* 値の異なるイオンを検出する方法．高周波電圧を印加してイオンを共鳴励起させたのち，検出電極で検出した誘導電流信号をフーリエ変換により解析し，マススペクトルを得る．

ポストソース分解（PSD: Post-source decay）　MALDI において，イオン源で生じたイオンが加速場領域を出てから検出器に到達するまでに，イオン自身の過剰内部エネルギーまたは残留ガスとの衝突によって解離すること．リフレクトロン飛行時間型質量分析計を用いた MS/MS に利用される．

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）　試料とマトリックスを混合し，ナノ秒オーダーの短時間のレーザー光を照射することにより試料イオンを生成する方法．たん白質や糖質，オリゴヌクレオチド，脂質などの生体高分子をほとんど分解せずにイオン化することができる．主に一価イオンが生成する．