

QTRAP[®] Technology

A COMPENDIUM OF
RELATED RESEARCH
APPLICATIONS



SCIEX QTRAP[®] 6500



Overview

QTRAP®テクノロジー

リニアイオントラップ (LIT) 装備により世界で唯一のトリプル四重極技術となった
QTRAPテクノロジー。

トリプル四重極のMRM感度を併せ持つそのユニークで強力なワークフローにより、
より良いデータ、信頼性、効率性など-究極のパフォーマンスをお約束します。

Contents

QTRAP® Applications & Methods

	Introduction	4-4
	QTRAPテクノロジーとは	5-9
	環境分析	10-15
LC-MS/MSを用いる食品、水、布地中の有機スズ化合物の定量と同定		
	食品分析	16-24
果実および野菜試料中の農薬のスクリーニング・定量時の QTRAP® LC/MS/MSシステムでの同定の信頼性向上		
	法医学分析	25-28
尿中の低濃度合成カンナビノイド及びその主要代謝物の ライブラリを使用した同定 (英語)		
	クリニカルリサーチ	29-33
LC-MS/MS によるヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (NRTI) 抗レトロウイルス薬の分析		
	ライフサイエンス研究	34-40
MRM ³ 分析を用いた全ヒト血清中の前立腺特異抗原 (PSA) の定量化 細胞外マトリックス中の遊離アミノ酸の迅速な LC-MS/MS 分析		
	医薬品・バイオ医薬品	41-45
治療用ペプチドであるエキセナチドのヒト血漿中濃度の定量化		

分析ラボが直面する課題

取得したデータの信頼性について考えたことがありますか？
検出したピークは本当に分析対象化合物なのでしょうか？
MRM、保持時間、およびイオン比以外の確認方法はないのでしょうか？
検出および定量に影響を与えるマトリクス効果を避ける方法はないのでしょうか？

課題への対処

これらの共通の課題へのソリューション：SCIEXQTRAP®テクノロジーは、標準的な定量に確認実験を伴わせることで通常のワークフローをより強化します。QTRAPは、その精度、再現性、頑健性から創薬、食品試験、環境モニタリング、タンパク質定量等の分野で活躍し、世界中の研究室で選択されています。

本資料では、通常のトリプル四重極以上能力を持つQTRAPテクノロジーをご紹介します。



MBLUS-QTRAP 5500 A

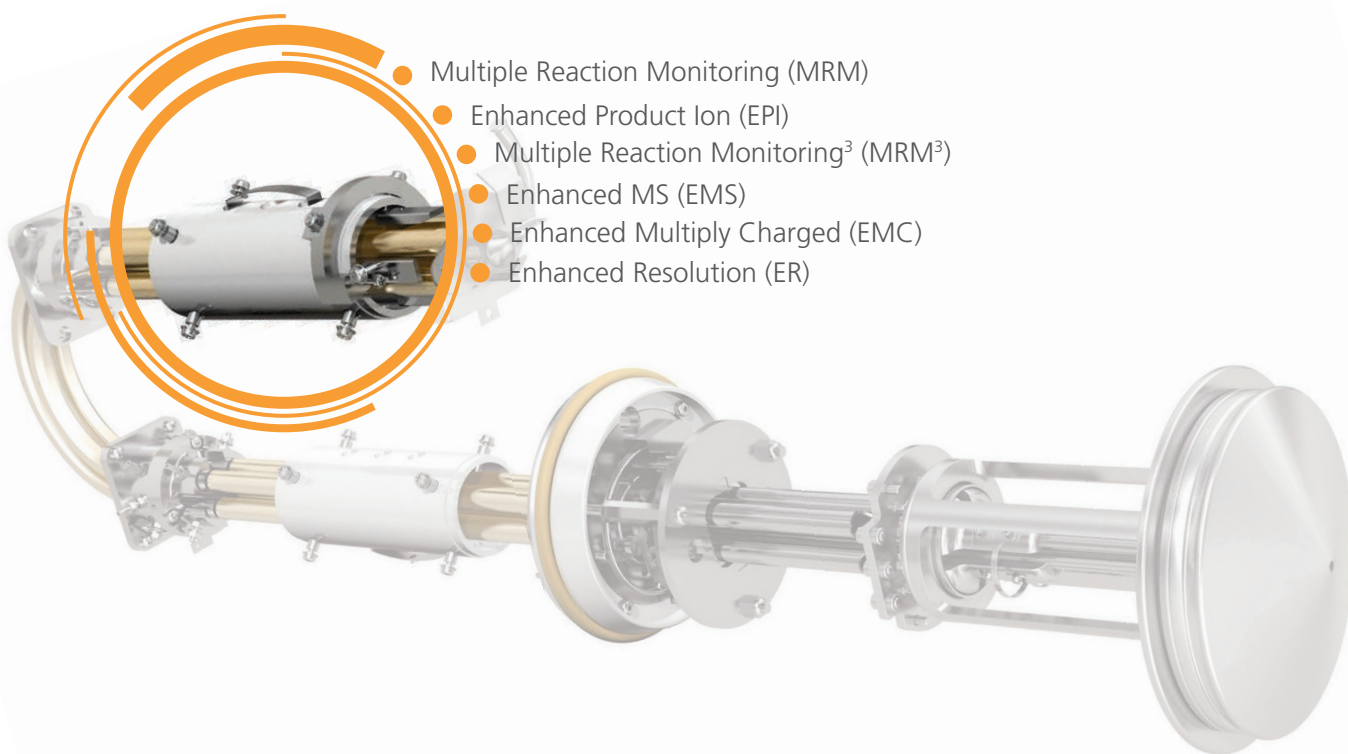
QTRAP® テクノロジーとは

QTRAPシステムの特徴とは何でしょうか？QTRAP 質量分析計シリーズは、標準的なトリプル四重極 LC-MS/MS の機能を持ちながら、特許技術であるリニアイオントラップ (LIT) の能力を併せ持つ、他に類を見ない装置です。

LITは、基本的機能であるMultiple Reaction Monitoring (MRM) の他に様々なワークフローが追加されており、高い特異性と定量能力を発揮します。

QTRAPテクノロジーは標準的なトリプル四重極システム以上の機能を持っています。

Scan Type	Triple Quad	QTRAP
Precursor	•	•
MRM	•	•
Neutral Loss	•	•
Product Ion	•	•
Enhanced MS (EMS)		•
Enhanced Multiply Charged (EMC)		•
Enhanced Resolution		•
Enhanced Product Ion		•
MS ³ (MS/MS/MS) and MRM ³		•

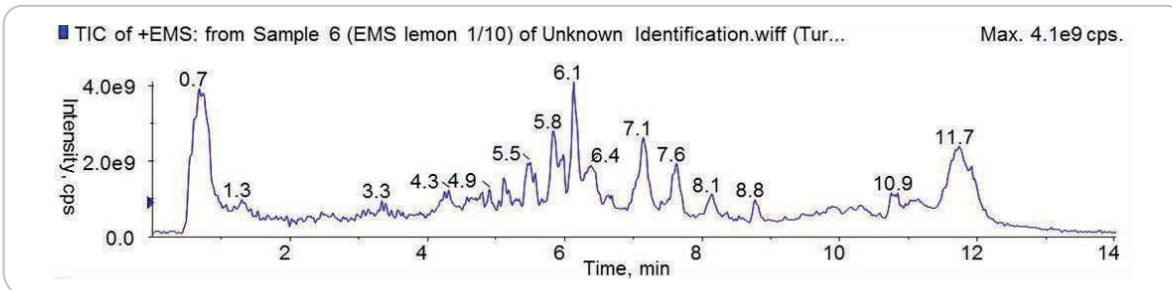
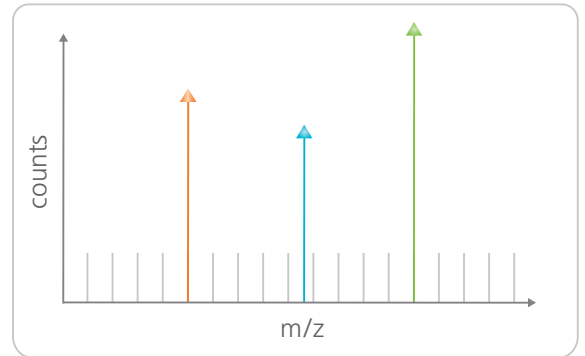
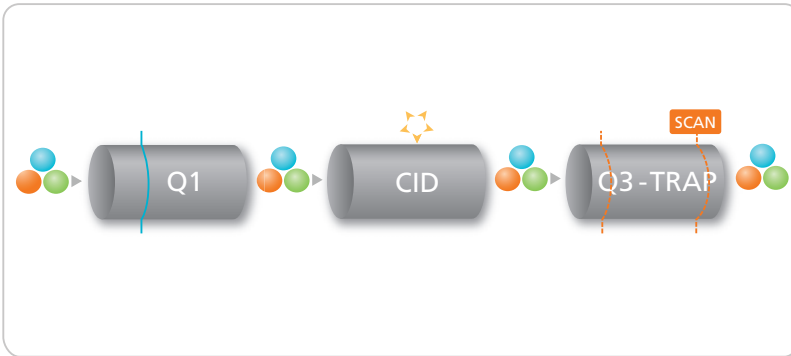


あなたのラボのパフォーマンスを 倍増するユニークなスキャン機能

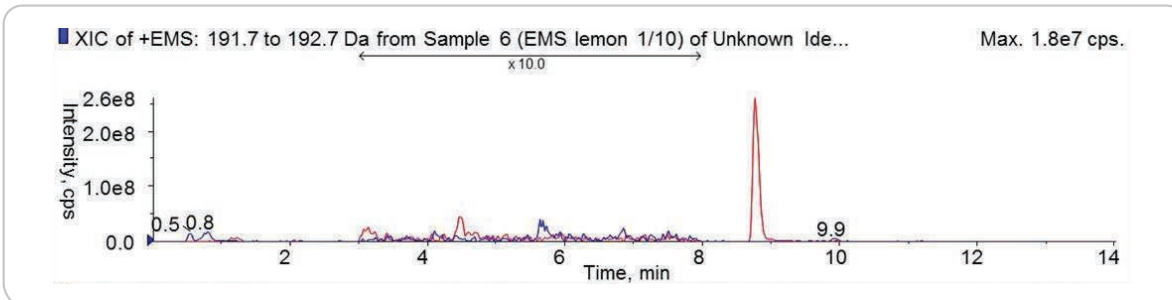
Enhanced MS Scan (EMS)

Enhanced MS Scanは標準的な QTRAP® MS スキャンです。イオンはソース (TurboV® または IonDrive®) からRF モード四重極を経由してイオントラップへ送られます。イオントラップにイオンがトラップされる

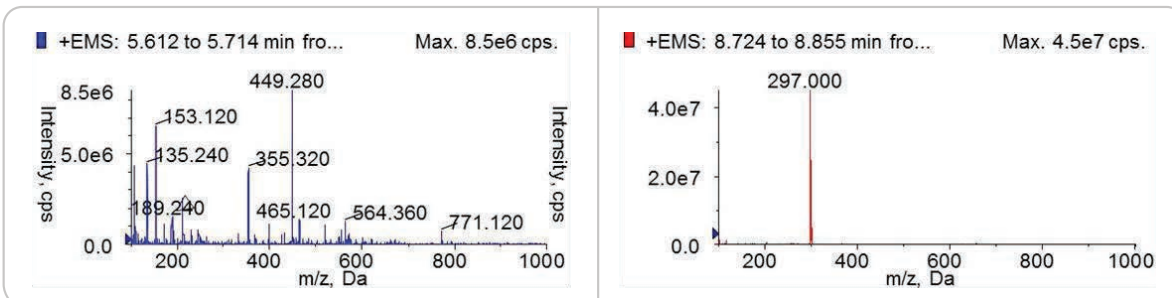
と、イオンがスキャンされ検出器へ向かいます。通常の MS/MS システムでは反応が見にくい場合でも、このタイプのスキャンでは未知の化合物の検出時に非常に高感度のフルスキャンが可能です。



The total ion chromatogram (TIC) for the sample



The extracted ion chromatogram (XIC) from the EMS using a range of 191.7 to 192.7 Da

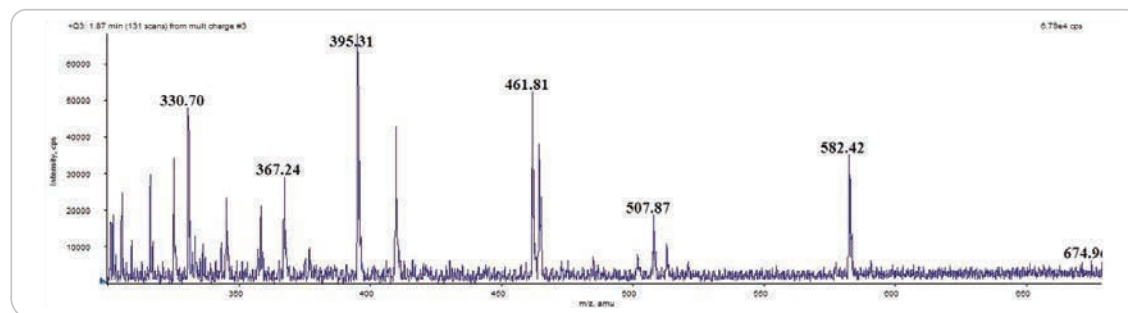
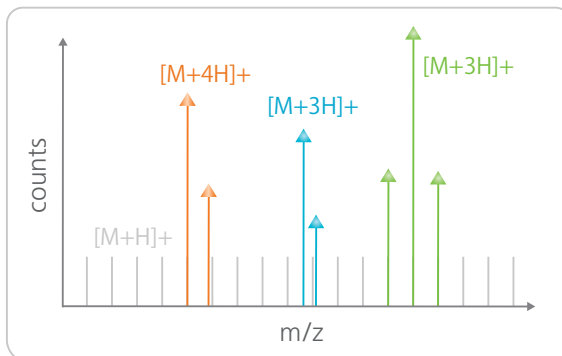
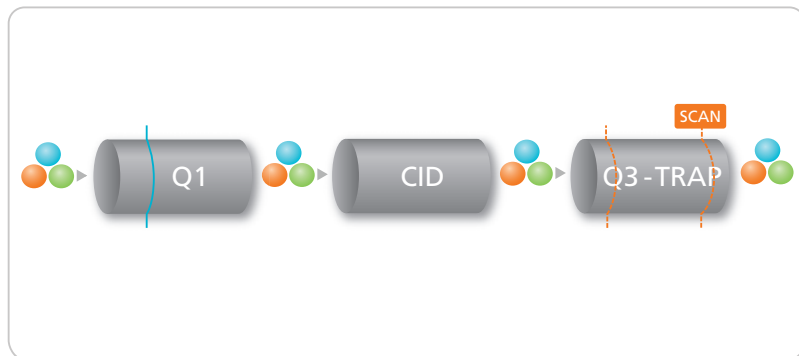


The spectra acquired from the EMS which can be used to understand the potential structure of the detected compound

Enhanced Multiply Charged Scan (EMC)

EMS Scanは QTRAP® の特徴的な機能の一つであり、多電価のイオンの S/N 比を改善することが可能です。EMS では、イオンがソースから LIT に送られ、一旦イオントラップにイオンがトラップされれば、単電荷

のイオンは大部分が取り除かれ、後に多電荷のイオンが残ります。それらのイオンはスキャンされ検出器に向かいます。

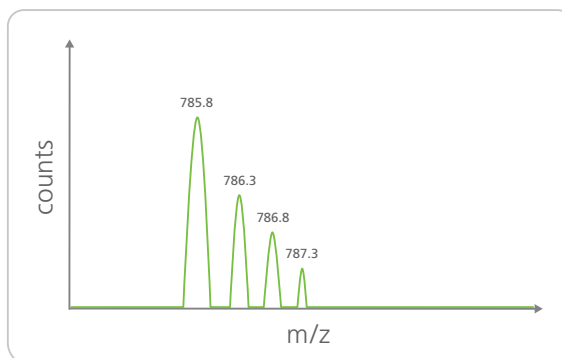
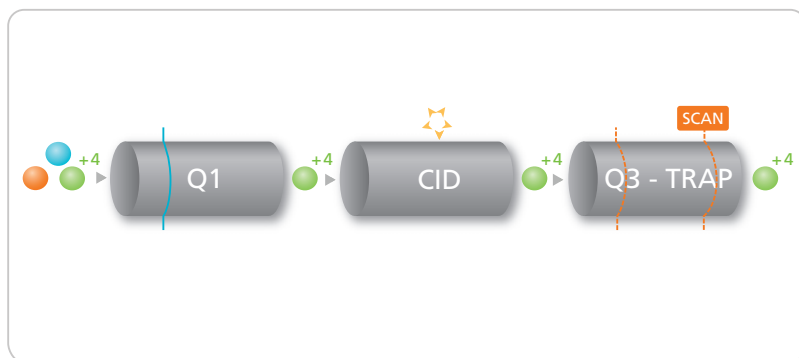


Only see what you need to see, the EMC scan filters out all of the single charged species so only the multiply charged ions remain.

Enhanced Resolution Scan (ER)

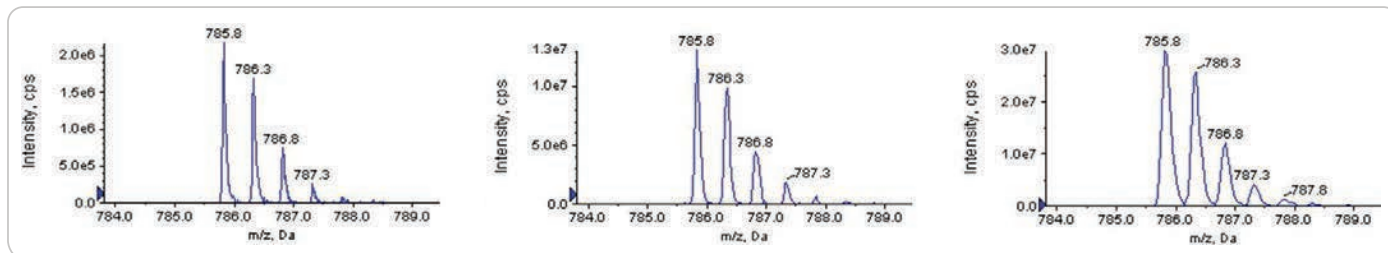
Enhanced Resolution Scanモードを使用すると、高分解能 MS を利用して観察したいイオンを捕捉することができます。このスキャンは、ある分子の分子量を推察する際に重要です。このスキャンモードを使用して電荷状態と質量電荷比 (m/z) の両方を測定します。このスキャンタ

イプは、構造情報を明らかにするとき、データベースサーチを実行するとき、ペプチド配列を判定するときなど、様々な分野の分析において有用です。



Schematic of the path of the ions through the QTRAP

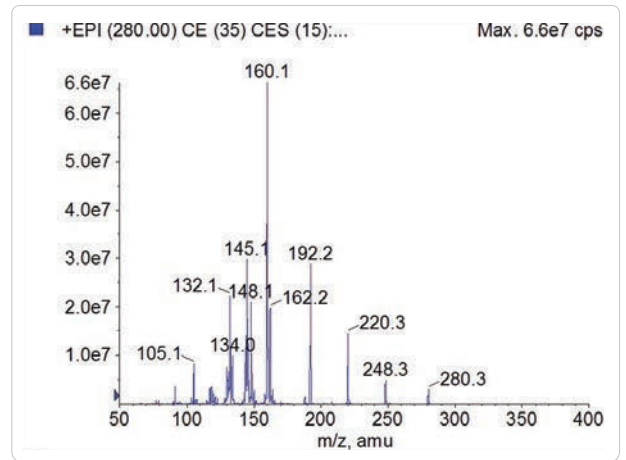
Example of the QTRAP will resolve the analyte



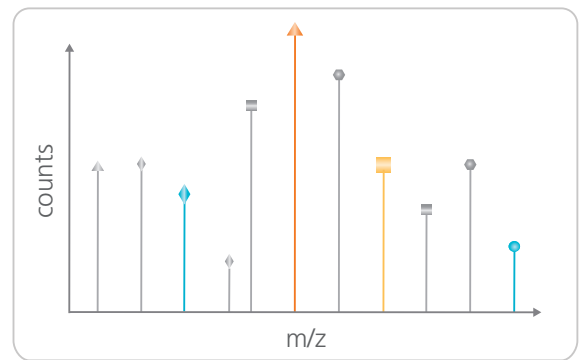
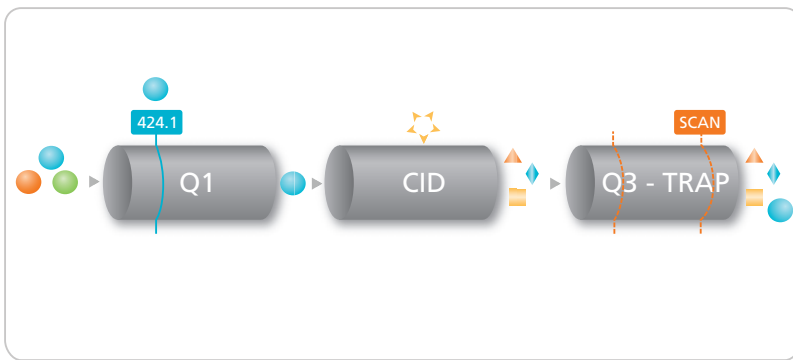
Acquired data using various parameters for an ER scan at 50, 250 and 1000 Da/sec

Enhanced Product Ion(EPI)

Enhanced Product Ion scanは特定のイオンについて高品質なMS/MSスペクトルイオンを得るためのトラップスキャンです。コリジョンセル内でフラグメンテーションを行い、十分な情報を含むMS/MSスペクトルデータを提供します。発生したフラグメントイオンはLITにて取得され、スキャンされます。このユニークなスキャンは同定実験のキーとなり、定量ワークフローを完全に補完可能です。EPIスキャンは通常のプロダクトイオンスキャンと比べて、高感度、高質量精度、高速スキャンを提供します。



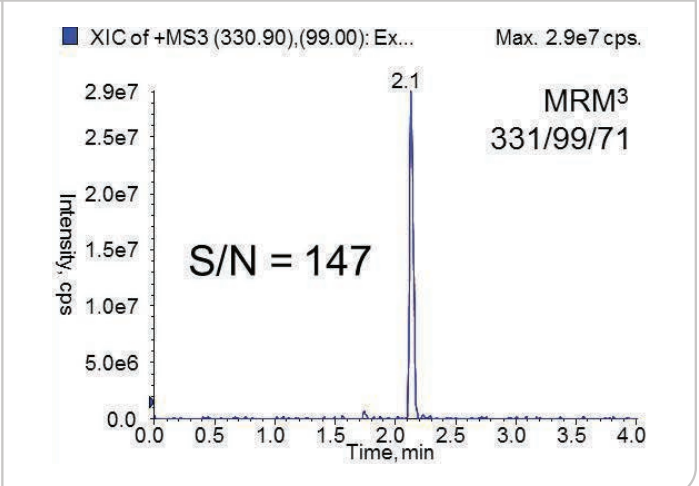
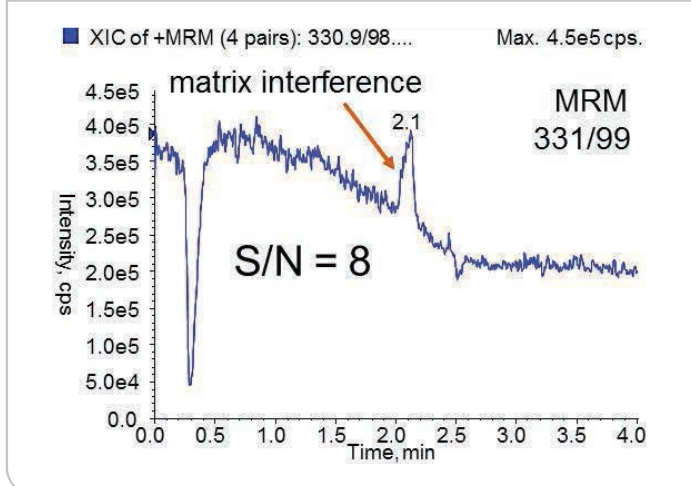
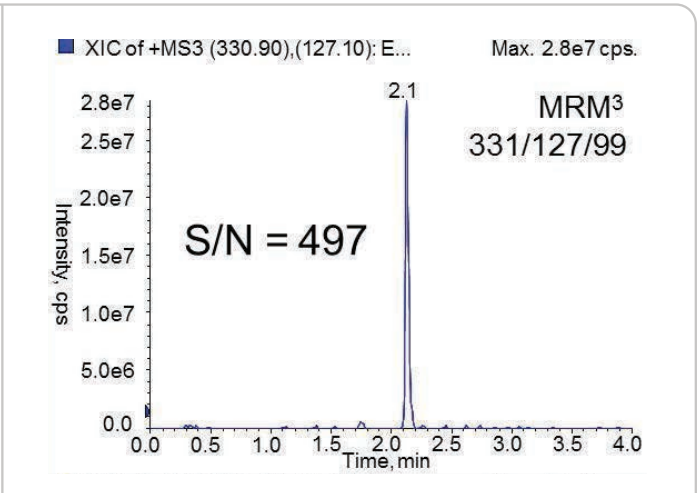
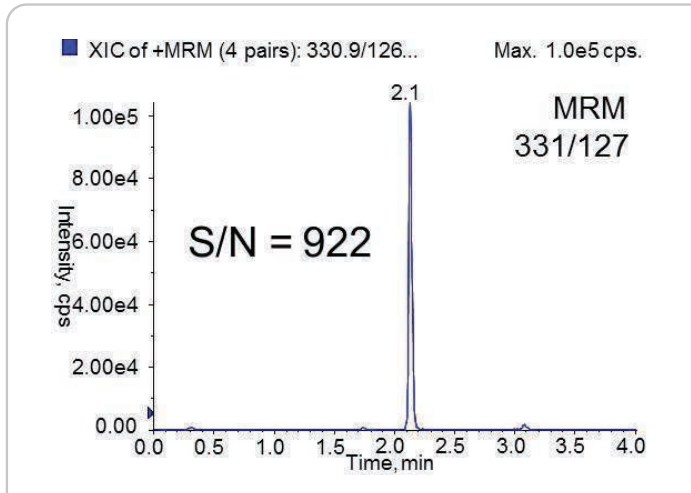
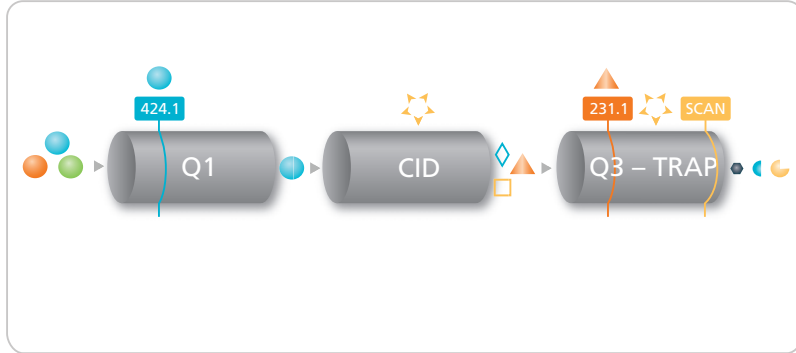
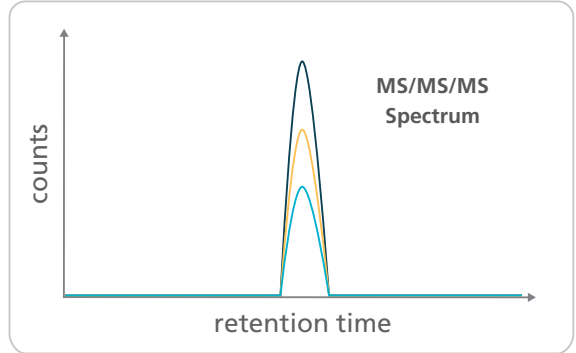
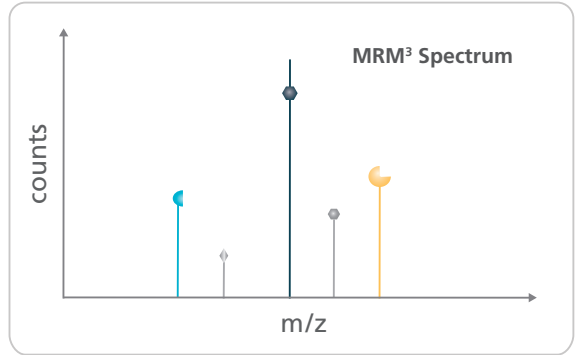
Acquire high quality MS/MS spectra so you have a unique thumbprint of your analyte and build a vast library of compound structural information.



MS³ (MS/MS/MS) and MRM³

MRM³ は、高いバックグラウンドや夾雑成分が多いために、MRM 定量が困難な場合に有効なスキャンソリューションです。MRM³ はこの干渉を完全にに取り除き、特定の化合物を低濃度で検出することができます。

この非常にパワフルなツールを使用すると、サンプルからより多くの構造情報を収集することができます。特にこのスキャンモードは、糖ペプチドなどの修飾ペプチドの特性解析に重要な役割を果たします。



Left panel shows 2 MRM transitions for a compound, where the confirmation MRM transition (bottom panel) shows high background from matrix interferences. By monitoring the 2nd generation MRM, or MRM³, the matrix interferences are virtually eliminated, and the analyte is detected with high S/N for accurate quantitation.

Environmental Testing Using QTRAP Technology





LC-MS/MS を用いる食品、水、布地中の有機スズ化合物の定量と同定

Yun Yun Zou and André Schreiber
AB SCIEX Concord, Ontario (Canada)

概要

有機スズ化合物は、工業原料や多様なバイオサイド・防カビ剤で使用される、炭化水素に結合されたスズで構成される化合物である。この結果、有機スズ化合物は多数の経路から環境に入り、しばしば海水、海産物、果実や野菜、消費財で見つかることがある。これらの化合物は毒性があるため、正確な定量と同定が可能な分析方法が求められている。本報では多様なマトリックス中のトリブチルスズ、フェンチン、シヘキサチン、酸化フェンブタスズの LC-MS/MS 測定法を提示する。トリフェニスホスフェートを内部標準として使用した。

迅速・簡便なアセトニトリル抽出を用いて、添加済みのリンゴ、ジャガイモ、合成海水、布地の試料を調製した。AB SCIEX 4000 QTRAP[®] システムを用いてエレクトロスプレーイオン化 (ESI) と多重反応モニタリング SRM (MRM) によるデータ取得方法で有機スズ化合物を検出した。検出限界は規制レベルより十分に低いことが確認され、試料抽出液をさらに希釈してマトリックス効果の可能性を最低限とすることができた。

緒言

有機スズ化合物は炭化水素置換基をもつスズで構成される化合物であり、プラスチック材料、木材保存料、海洋バイオサイド、農薬中で添加物として広く使用されている。

三置換有機スズ化合物は以前、船の塗料中の防汚剤として広く使用されていたが、こうした塗料は有機スズ化合物を水域環境に放出する可能性があることが明らかとなった。有機スズ化合物はこうした水域環境で堆積物や生物中に蓄積したり、置換基の少ない毒性化合物に分解したりする。微量の有機スズ化合物が水生生物に重大な悪影響を及ぼす可能性が研究で示されている。例えば、海水中に ng/L レベルで存在しているトリブチルスズ (TBT) は、水生生物に対する有害な影響を促進する内分泌攪乱物質として同定されている。このため、防汚塗料中での有機スズ化合物の使用は多くの国で禁止または制限されている¹⁻³。

布地、履き物、壁紙やフローリングなどの消費財での有機スズ化合物の使用がヒトの健康、とくに小児に危険を及ぼすことが明らかにされている。従って、消費財中でのトリブチルスズ (TBT)、トリフェニスズ (TphT)、ジブチルスズ (DBT)、ジオクチルスズ (DOT) などの三置換および二置換有機スズ化合物の使用は制限されている⁴⁻⁵。



最後に、有機スズ化合物は汚染された海産物や農薬としての使用を通じてヒトの食事に入る。多くの食品について Codex 食品規格委員会および EU が国際最大残留基準 (MRL) を確立しており、一部の MRL は 50µg/kg 程度である。

従来、質量分析に接続したガスクロマトグラフィー (GC-MS) が有機スズ化合物の分析に用いられていたが、GC 分析には時間のかかる誘導体化 (化合物の揮発性が低いため) と長いクロマトグラフィー分析時間が必要である。液体クロマトグラフィーとタンデム質量分析 (LC-MS/MS) は、選択性と感度が高いため試料調製の簡略化と分析時間の短縮が可能であり、従って、有機スズ化合物の分析に好ましい技術として進化してきている。

方法の詳細

試料調製

塩化 TBT、フェンチンアセタート、シヘキサチン、酸化フェンブタズを Sigma-Aldrich から購入し、4 種のマトリックス（リンゴ、ジャガイモ、合成海水（35g/L の塩を含む飲用水）、布地素材）に添加した。トリフェニルホスフェート（TPP）を内部標準として使用した。

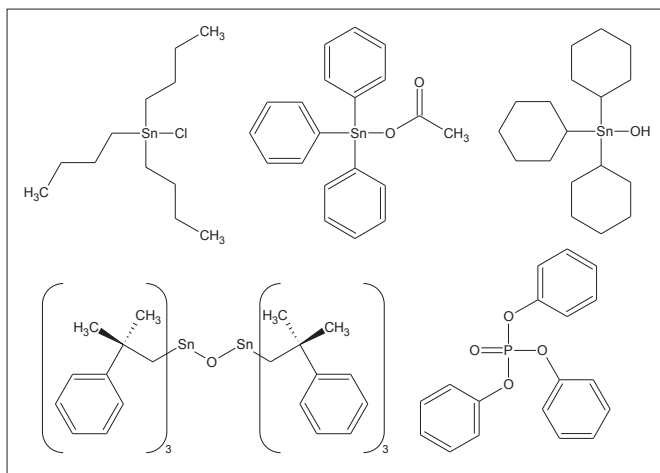


図 1. 目標の有機スズ化合物：塩化 TBT、フェンチンアセタート、シヘキサチン、酸化フェンブタズ、内部標準トリフェニルホスフェート（上左から下右へ）

添加済み試料をアセトニトリルで抽出し、LC 用水で 10 倍希釈してから LC-MS/MS で分析した。添加済み合成海水は有機スズ化合物検出のため直接注入した。マトリックス効果の可能性を低減するため、要求される検出限界によっては追加希釈が可能であることに注意されたい（図 2）。

UHPLC 分離

島津製作所製 UFLC_{XR} システムを Phenomenex Kinetex 2.6u C18 50x3mm カラムと 40°C で使用した。流速 800µL/min で 2% ギ酸 + 5 mM ギ酸アンモニウムを含む水と 2% ギ酸 + 5 mM ギ酸アンモニウムを含むメタノールの勾配により、総分析時間は 12 分となった。

注入量は、リンゴとジャガイモの抽出液について 20µL、布地抽出液と合成海水について 50µL に設定した。

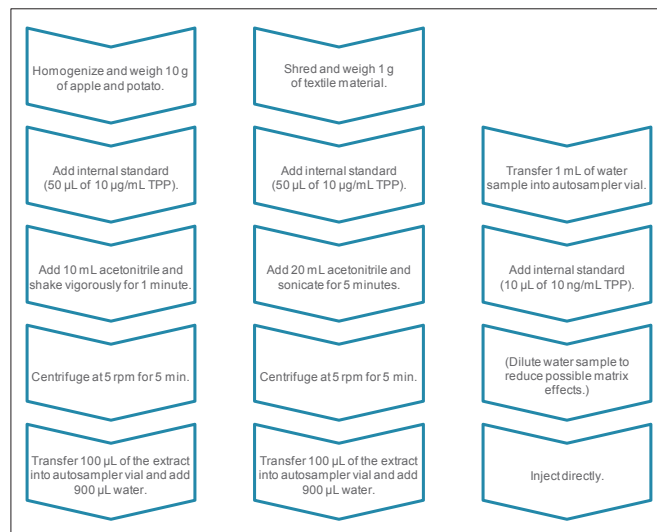


図 2. 果実および野菜、布地、水中の有機スズ化合物分析のための試料調製プロトコル

MS/MS 検出

Turbo V™ イオン源と ESI プローブを伴う AB SCIEX 4000 QTRAP® LC/MS/MS システムを使用した。すべての分析種と内部標準は、選択性と感度を最高にするため MRM を用いて正極性で検出した。化合物ごとに 2 種の MRM トランジションをモニターすることにより、特徴的な MRM 比を用いる定量と同定が可能となった。最高品質のデータを取得するため、Scheduled MRM™ アルゴリズムを有効にした（表 1）。

MultiQuant™ ソフトウェア バージョン 2.1 でデータを処理した。

表 1. 分析種の有機スズ化合物の MRM トランジションと保持時間 (RT)

有機スズ化合物	Q1 (amu)	Q3 (amu)	RT (分)
TBT 1	291.0	123.0	3.8
TBT 2	291.0	235.1	3.8
フェンチン 1	351.0	120.0	3.0
フェンチン 2	351.0	197.0	3.0
シヘキサチン 1	369.0	205.0	5.3
シヘキサチン 2	369.0	287.1	5.3
酸化フェンブタズ 1	519.1	351.0	6.2
酸化フェンブタズ 2	517.1	349.0	6.2
TPP (内部標準)	326.9	152.1	4.4

結果と考察

クロマトグラフィー条件は LC-MS/MS による有機スズ化合物の測定に成功に重要である。有機スズ化合物は逆相物質と強く相互作用してピーク幅が広がることが知られている。この影響を低減しピーク形状を最適化するために強酸性移動相を用いた⁸。

すべてのマトリックス中で、TBT について 2 種のクロマトグラフィー干渉がみとめられたため、安定な保持時間と十分な分離が重要であった。低いカラム圧で作動させつつ UHPLC 性能を向上させるためコアシェルカラム (Phenomenex Kinetex) を用いた (図 3)。

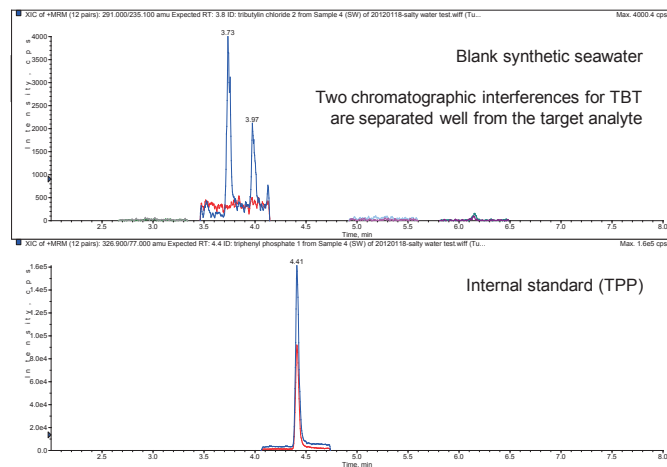


図 3. ブランクの合成海水。TBT の 2 種のクロマトグラフィー干渉が目標とする分析種 (上) および内部標準 (下) からよく分離されている

リンゴ、ジャガイモ、布地、合成海水試料に異なる濃度で添加し、抽出し、迅速 LC-MS/MS 法で分析した。クロマトグラムの例を図 4 と 5 に示す。

得られた S/N 比を表 1 に示す。S/N 値は 2x Gaussian smooth を適用して MultiQuant™ ソフトウェアで評価した。S/N 値を用いて各マトリックス中のすべての分析種について定量限界 (LOQ) を推定した。

表 2. 多様なマトリックス中の S/N 比

有機スズ化合物	リンゴ (2µg/kg)	ジャガイモ (2µg/kg)	布地 (0.1mg/kg)	海水 (50ng/L)
TBT 1	105	71	93	53
フェンチン 1	355	315	209	186
シヘキサチン 1	240	197	51	133
酸化フェンブタス ズ 1	339	377	66	176

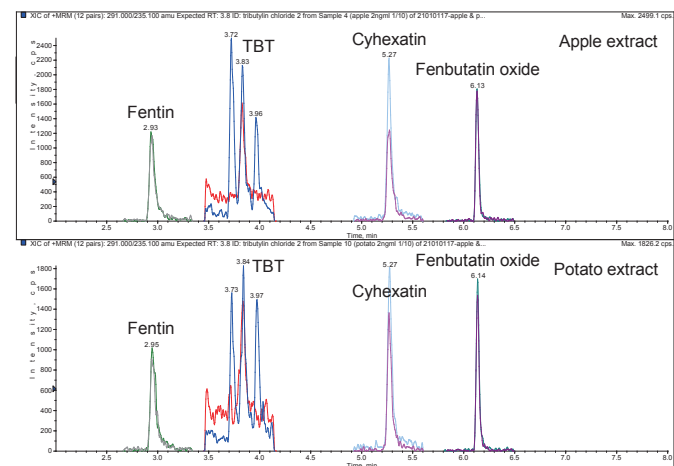


図 4. 2µg/kg を添加し抽出後 10 倍希釈したリンゴ (上) およびパレイシヨ (下) 試料

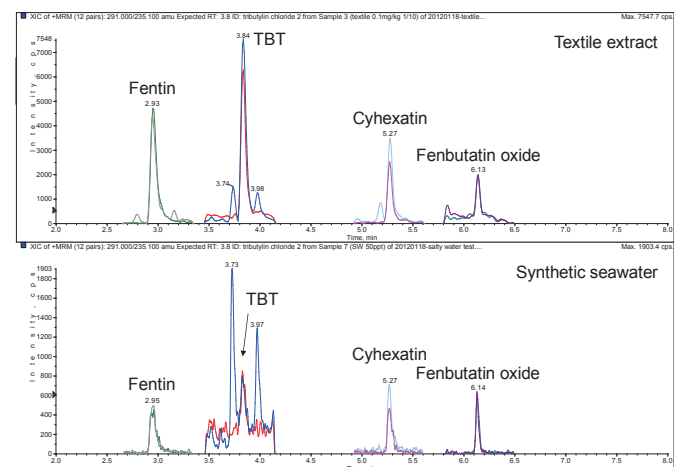


図 5. 0.1mg/kg で添加し抽出後 10 倍希釈した布地素材 (上)、および 50ng/L で添加し直接注入 (50µL) して分析した合成海水

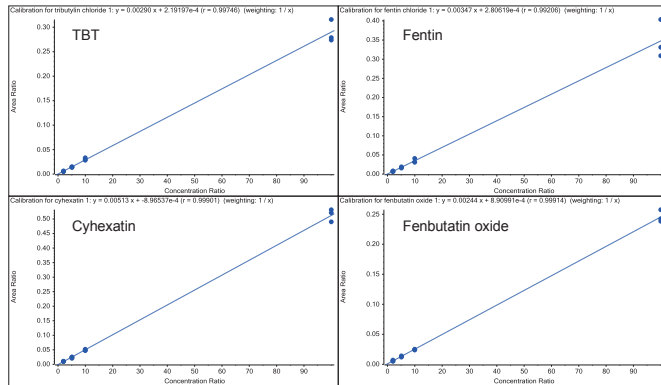


図 6. リンゴマトリックス中の有機スズ化合物の検量線 (2~100 μ g/kg)

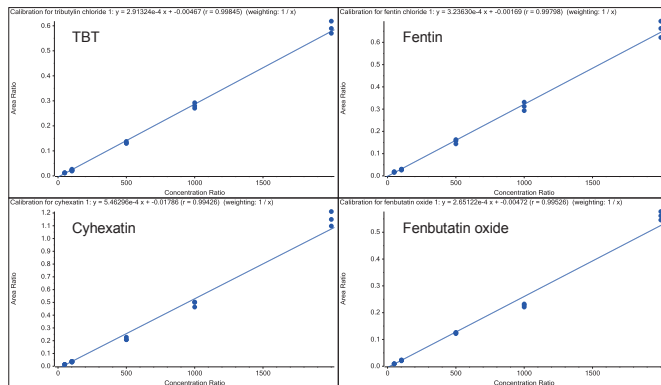


図 7. 合成海水中の有機スズ化合物の検量線 (50~2000ng/L)

表 3. S/N 比 10 に基づく多様なマトリックス中の推定定量限界 (LOQ)

有機スズ化合物	リンゴ μ g/kg	ジャガイモ (μ g/kg)	布地 (μ g/kg)	海水 (ng/L)
TBT	0.2	0.3	10	10
フェンチン	< 0.1	< 0.1	< 10	< 10
シヘキサチン	0.1	0.1	20	< 10
酸化フェンブタズ	< 0.1	< 0.1	15	< 10

リンゴとジャガイモについては 2~100 μ g/kg、布地については 0.1~1mg/kg、海水については 50~2000ng/L で直線ダイナミックレンジを評価した。リンゴと合成海水中の 4 種の有機スズ化合物すべての検量線の例を図 6 と 7 に示す。

すべての化合物についてすべての濃度で再現性は変動係数 (%CV) 15%未満、正確さは 85~115%であることが明らかとなった (表 4)。

表 4. 検量線の最低点での有機スズ化合物の再現性 (%CV) と正確さ

有機スズ化合物	リンゴ (2 μ g/kg)		ジャガイモ (2 μ g/kg)		布地 (0.1mg/kg)		海水 (50ng/L)	
	%CV	正確さ (%)	%CV	正確さ (%)	%CV	正確さ (%)	%CV	正確さ (%)
TBT	10.0	97.0	13.9	86.4	7.3	95.6	6.3	113.1
フェンチン	9.9	101.4	12.4	96.8	4.7	95.8	7.9	112.6
シヘキサチン	5.9	108.5	2.4	88.4	3.6	93.3	4.2	115.0
酸化フェンブタズ	11.4	104.4	11.8	99.5	13.2	97.3	3.6	107.4

化合物の同定は MultiQuant™ ソフトウェアの「多成分」クエリを用いて行った。このクエリは、同定のため MRM 比を自動計算して比較し、ユーザー指定閾値を上回った濃度を強調表示する。クエリファイル実行後の結果テーブルとピークレビューの例を図 8 と 9 に示す。

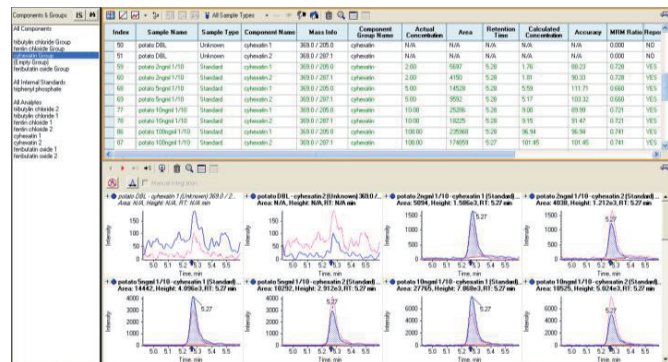


図 8. 「多成分」クエリを用いる自動化合物同定（ジャガイモ中のシヘキサチンの例）

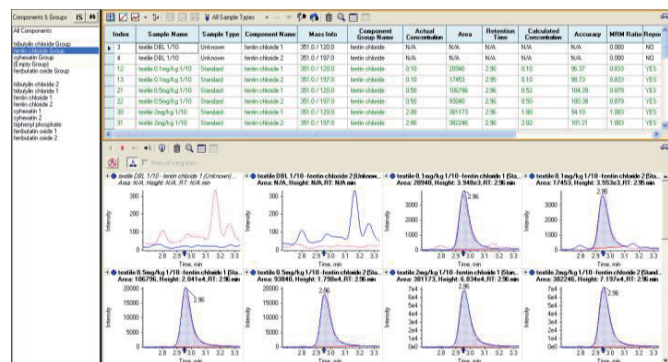


図 9. 「多成分」クエリを用いる自動化合物同定（布地中のフェンチンの例）

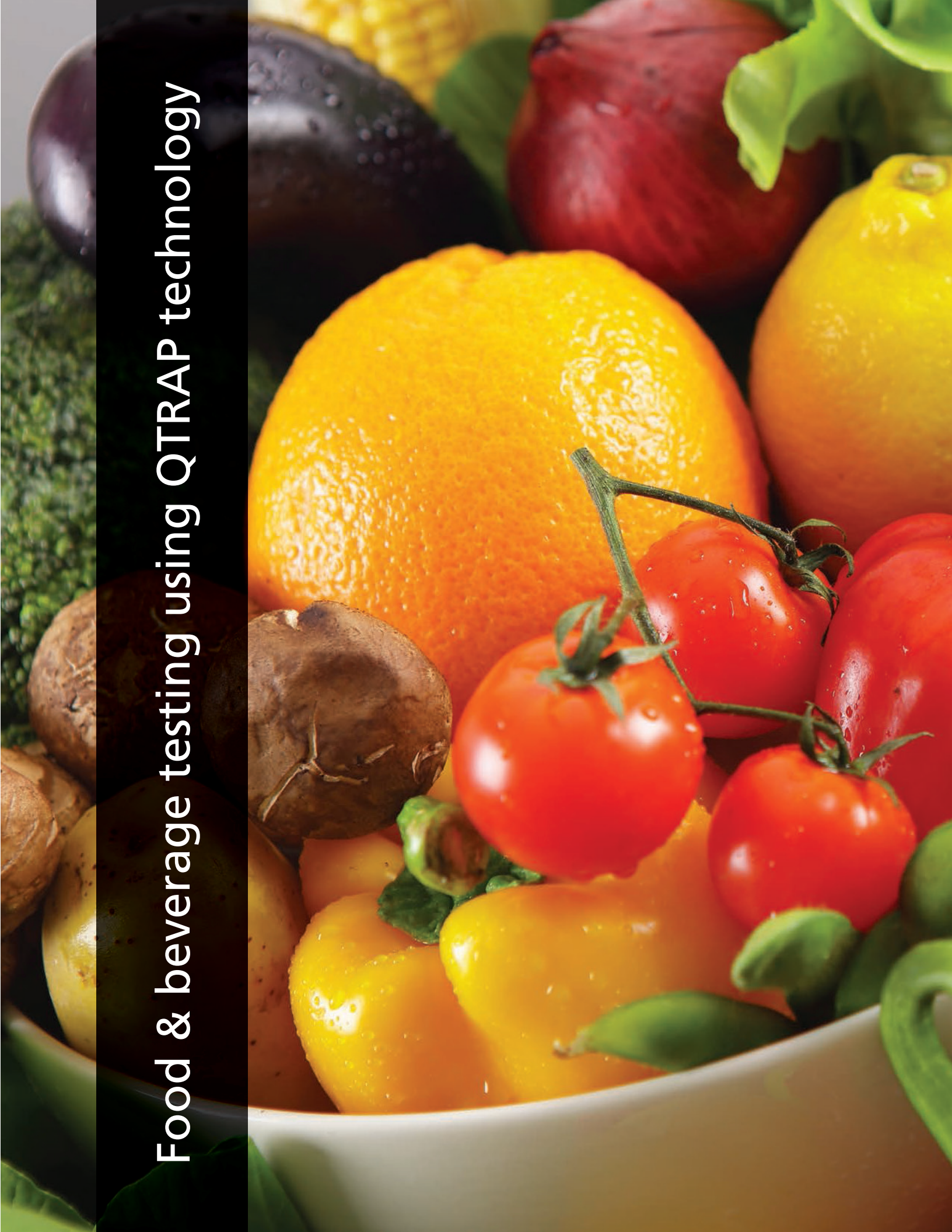
まとめ

食品、海水、布地素材中の多様な有機スズ化合物の測定のための迅速、簡便で堅牢性のある LC-MS/MS 法を開発した。この方法により、MRM モードで作動する AB SCIEX 4000 QTRAP® システムで得られる選択性と感度を利用して正確で再現性のある定量が可能となる。検出限界が規制レベルより十分に低いため、マトリックス効果の可能性を最低限とする試料抽出液の希釈が可能となる。MultiQuant™ ソフトウェアの「多成分」クエリを使用する MRM 比の自動計算により、化合物を確実に同定することができた。

参考文献

- 1 K. Fent: 'Ecotoxicology of organotin compounds' Crit. Rev. Toxicol. 26 (1996) 1-117
- 2 E. Gonzalez-Toledo et al.: 'Detection techniques in speciation analysis of organotin compounds by liquid chromatography' Trends Anal. Chem. 22 (2003) 26-33
- 3 Regulation (EC) 'on the prohibition of organotin compounds on ships' No 782/2003
- 4 Commission Decision 'restrictions on the marketing and use of organostannic compounds' 2009/425/EC
- 5 International Association for Research and Testing in the Field of Textile Ecology: OEKO-TEX Standard 100, Edition 4 (2012)
- 6 <http://www.codexalimentarius.org/standards/pesticide-mls/en/>
- 7 Council Directive 'maximum levels for pesticide residues' 96/32/EC
- 8 EU Reference Laboratory for Single Residue Methods: 'Analysis of Organotin Compounds via QuEChERS and LC-MS/MS – Brief Description' www.crl-pesticides.eu

Food & beverage testing using QTRAP technology





果実および野菜試料中の農薬のスクリーニング・定量時の QTRAP[®] LC/MS/MS システムでの同定の信頼性向上

André Schreiber
AB SCIEX, Concord, Ontario, Canada

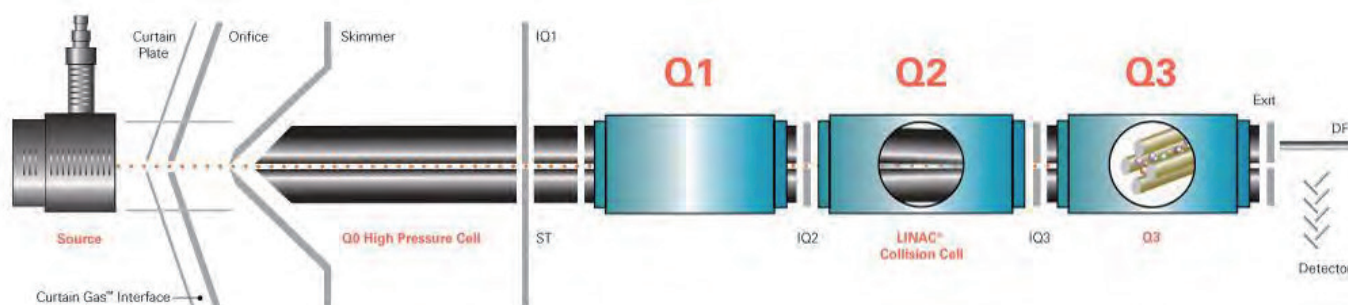


図 1. QTRAP[®] LC/MS/MS システムのイオン経路

QTRAP[®] LC/MS/MS システムでは、トリプル四重極システムと比較して、以下を得ることができる。

- 検出限界が低く再現性と直線範囲に優れた定量のための MRM の選択性と感度
- 定性分析と同定のための迅速・高感度リニアイオントラップ スキャン機能
- LINAC[®] コリジョンセルでのフラグメントイオン生成と CES (Collision Energy Spread) の利用による情報豊富な MS/MS スペクトル
- IDA 実験の遅延時間がなく、1 回の LC 分析の MS/MS スペクトルで定量・同定が可能な、トリプル四重極と QTRAP[®] システムの機能の組み合わせ
- 偽陽性/偽陰性の結果のリスクを最小限にする、質量スペクトルライブラリ検索に基づく確実な同定

概要

本報では、果実および野菜試料中の農薬のスクリーニング・同定のため液体クロマトグラフィーに接続した QTRAP[®] システムの利用について述べる。QTRAP[®] システムと従来のトリプル四重極質量分析計を用いた検出の選択性、感度、正確さを比較する。QTRAP[®] リニアイオントラップ MS/MS スキャンとその後のライブラリ検索でより確実に同定でき、偽陽性/偽陰性の結果の潜在的リスクが最小限となることを示す。

緒言

タンデム質量分析 (MS/MS) に接続した液体クロマトグラフィー (LC) は、微量レベルの農薬、乱用薬物、ステロイド、医薬品、パーソナルケア製品、その他多くの汚染物質などの目標分析種の検出に多くの食品、環境、法医学の検査施設で用いられている、強力な分析ツールである。

エレクトロスプレーイオン化 (ESI)、大気圧化学イオン化 (APCI)、大気圧光イオン化 (APPI) などの多様なイオン源で極性～非極性化合物のイオン化が促進される。生成されたイオンはイオン化後に真空インターフェースを通り質量分析計に到達する。

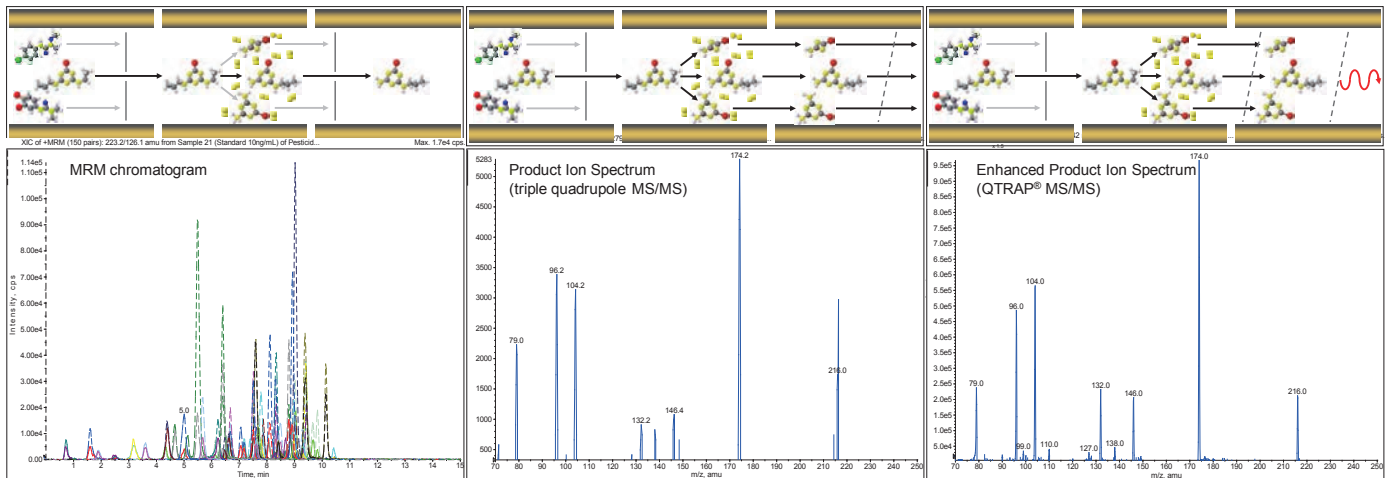


図 2. トリプル四重極および QTRAP[®] LC/MS/MS システムを用いる農薬のスクリーニングと同一。左：農薬のスクリーニングのための 150 種の多重反応モニタリングトランジションの検出。中：トリプル四重極 MS/MS の生成物イオンスペクトル。右：検出された農薬の存在を同定する QTRAP[®] MS/MS の EPI (Enhanced Product Ion) スペクトル。(QTRAP[®] MS/MS スペクトルの感度はトリプル四重極スペクトルの感度の 100 倍超であることに注意。)

多重反応モニタリング SRM (MRM) で作動するトリプル四重極 (QqQ) 質量分析計は主に、目標分析種の定量に用いられる。MRM モードでは、最初の四重極が特定の前駆体イオンを選択通過させ、コリジョンセル (第二の四重極) がフラグメント (生成物イオン) を生成し、これが第三の四重極でさらに選択される (図 2)。

2002 年、AB SCIEX は、新世代の LC/MS/MS システム、軸方向イオン排出を行うハイブリッドトリプル四重極リニアイオントラップ質量分析計 (QTRAP[®] システム) を導入した。EMS (enhanced MS)、EPI (enhanced product ion)、ER (enhanced resolution)、enhanced multiple charge、MS/MS/MS スキャンといった QTRAP[®] システムの高感度イオントラップスキャン機能と MRM、前駆体イオン、ニュートラルロススキャンなどのターゲット四重極実験を組み合わせることで、このテクノロジーのユニークな機能が実現される²⁻⁴。

多様な新しいスキャンタイプがあり、1 回の LC 分析でそれらを組み合わせることができるため、食品、環境、法医学、代謝物同定、プロテオミクスなどの多くのアプリケーションで新しいワークフローが可能となる⁵⁻¹⁵。

QTRAP[®] システムテクノロジー

QTRAP[®] システムの質量分析計部分は、トリプル四重極質量分析計の従来のイオン経路に基づいている。QqQ システムと比較すると、QTRAP[®] システムの第三の四重極 (Q3) は 1 個の四重極またはリニアイオントラップ (LIT) として作動することができる。Q3 のデュアル機能により、選択的に高感度の定量と追加の LIT スキャン機能のための真の多重反応モニタリングなどの QqQ 質量分析計のすべての機能が QTRAP[®] システムに提供され

る。これらの追加 LIT スキャン機能により、スクリーニング、確認、同定への応用の成績が大きく向上する。

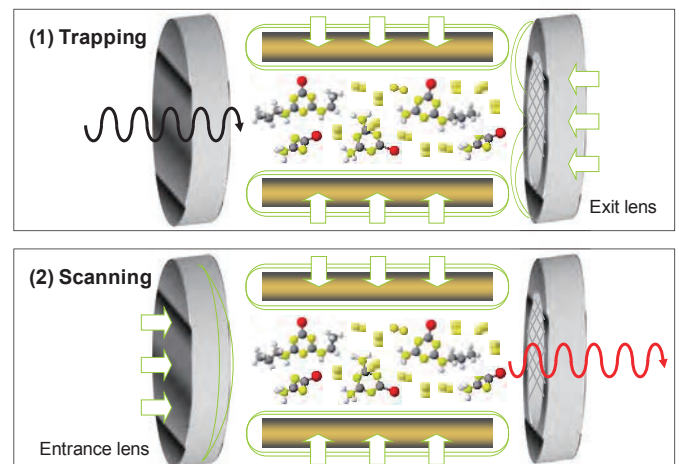


図 3. リニアイオントラップ (LIT) 中のイオンのトラップとスキャン

LIT としての Q3 の作動は、図 3 に示す(1)トラップと(2)スキャンの 2 つの基本段階に分けられる。最初に前駆体イオンまたは生成物イオンあるいはその両方 (スキャンモード選択により異なる) がコリジョンセルを出て、LIT モードで作動する Q3 に進入する。これらのイオンは、半径方向の RF 電圧と Q3 の「出口レンズ」に印加される反発 DC 電圧により Q3 にトラップされる。イオンを蓄積する fill time (通常数ミリ秒) の後に反発性「入口レンズ」を用いて Q3 に進入するイオンを止める。トラップされたイオンは短時間冷却され、その後駆動 RF 電圧と呼応して傾斜されている補助電圧を用いて LIT から軸方向に排出される。

スクリーニング、確認、同定の応用に最も重要な LIT スキャンモードは EMS (Enhanced MS)、ER (Enhanced Resolution)、EPI (Enhanced Product Ion) スキャンである。

EMS では、未知化合物同定のため、イオン源で生成された分子イオンでイオントラップが満たされる。ER スキャンはターゲットイオンの質量を正確に測定し、また、電荷状態や同位体パターンの確認に用いることができる。最後に、EPI モードを用いて、検出された分析種の存在をフラグメントイオンの解釈や質量スペクトルライブラリ検索により同定することができる。

QTRAP[®] システムの EPI (Enhanced Product Ion) スキャンには、QqQ 質量分析計の生成物イオンスキャンを上回るいくつかの利点がある。例えば、

- 図 2 に示す LIT でのイオン蓄積のため、EPI スペクトルの感度ははるかに高い
- CES (Collision Energy Spread) により、1 個の MS/MS スペクトルの生成物イオンの情報が多い
- リニアイオントラップスキャンが迅速なためサイクル時間が短い

QTRAP[®] システムの EPI スキャンには従来のイオントラップ質量分析計の生成物イオンスキャンを上回るいくつかの利点もある。例えば、

- CID (Collision Induced Dissociation) に特徴的である、フラグメントが (共鳴励起スペクトルに比べ) 多い MS/MS スペクトル
- イオントラップではなくコリジョンセル中でフラグメントが生成されるため固有の低質量カットオフがない
- QTRAP[®] システムが満たされる際に前駆体イオンの選択とフラグメンテーションが同時に起こるため、従来のイオントラップよりサイクル時間が短い
- 質量シフトやスペクトル中の不正確な同位体パターンを生じさせる空間電荷効果に対し、LIT は影響を受けにくい。²⁻³

実験

Turbo V[™] イオン源と ESI プローブを伴う 3200 QTRAP[®] LC/MS/MS システムをトリプル四重極モードと QTRAP[®] モードで使用して、農薬のスクリーニング・同定へのこれら 2 種の質量分析計の使用を検討した。

試料

果実および野菜試料 (リンゴ、アンズ、バナナ、キュウリ、ブドウ、グレープフルーツ、キウイ、レモン、オレンジ、西洋ナシ、コショウ、レーズン、イチゴ、紅茶、トマト) を QuEChERS (迅速 (Quick)、簡便 (Easy)、安価 (Cheap)、有効 (Effective)、厳格 (Rugged)、安全 (Safe)) 手順の変法を用いて抽出した¹⁶。

HPLC

システムコントローラ CBM-20A、LC-20AD ポンプ 2 台、脱気装置 DGU-20A3、オートサンプラー SIL-AC、カラムオープン CTO-20AC で構成される島津製作所製 Prominence LC システムを用いた。溶出液 A (5mM ギ酸アンモニウムを含む水) と溶出液 B (5mM ギ酸アンモニウムを含むメタノール) の 8 分間で 80/20 から 10/90 (A/B) までの勾配を Phenomenex Synergi 4u Fusion-RP 80A 50×2mm カラムで用いた。カラム温度は 25°C に設定した。試料量 20μL を注入した。

MS/MS 検出

QqQ モードで分析種につき 2 種の MRM トランジションを用い、正極性で 75 種の農薬を検出した。

検出された定量イオンおよび定性イオンの MRM をそれぞれの MRM とともに表 1 のリストに示す。化合物に依存するすべてのパラメータを最高感度での各農薬の検出につき完全に最適化した。すべての MRM トランジションに 5ms のデータ収集時間を用いた。

この一般的なトリプル四重極実験をユニークな QTRAP[®] IDA (Information Dependent Acquisition) と比較した。IDA では、化合物につきデータ収集時間 10ms で 1 個の MRM トランジションのみモニターした。この MRM サーベイでは、MRM シグナルが 500cps の閾値より上になると EPI (Enhanced Product Ion) スキャンが自動的に開始された。スキャン速度 4000amu/s、CES (Collision Energy Spread) 15V、衝突エネルギー (CE) 35V を用い、50~550amu で EPI スペクトルを取得した。また、同時溶出する化合物を見逃すリスクを最小限にするため、dynamic exclusion も起動した。

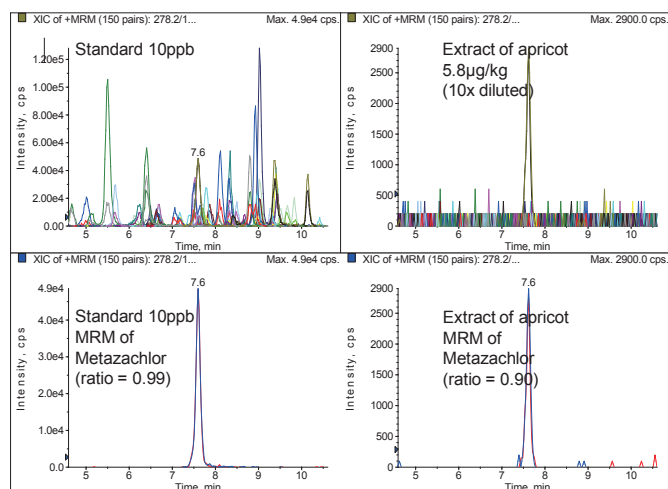


図 4. アンズ抽出液中の 5.8μg/kg のメタザクロルの定量と MRM 比同定 (278/134、278/210)

表 1. 検討した 75 種の農薬の MRM トランジション、MRM 比、検出限界 (S/N=6)、10ng/mL での変動係数 (n=3)

農薬	MRM 1	MRM 2	比	LOD (ng/mL)	%CV (n=3)	農薬	MRM 1	MRM 2	比	LOD (ng/mL)	%CV (n=3)
アセタミプリド	223/126	223/99	0.20	0.2	4.7	イルガロール	254/198	254/83	0.14	0.05	2.20
アルジカルブ	208/89	208/116	0.60	1.0	8.5	イソプロチュロン	207/72	207/46	0.25	0.20	3.90
アトラジン	216/174	216/104	0.51	0.1	5.5	レナシル	235/153	235/136	0.24	0.20	5.00
アゾキシストロビン	404/372	404/344	0.45	0.1	1.5	リニューロン	249/160	249/182	0.98	1.00	8.50
ベナラキシル	326/148	326/91	0.97	0.1	3.3	ルフェヌロン	511/141	511/158	0.50	5.00	11.90
ベンジオカルブ	224/109	224/167	0.95	0.5	7.9	マラチオン	331/127	331/99	0.42	0.20	2.70
ブロムコナゾール	378/159	378/161	0.77	0.5	4.5	メベンダゾール	296/164	296/105	0.26	0.20	1.10
ブプロフェジン	306/201	306/116	0.71	0.2	4.9	メトラキシル	280/220	280/192	0.79	0.50	4.90
カルバリル	202/145	202/127	0.40	0.2	5.4	メタミトロン	203/175	203/104	0.72	0.20	4.30
カルベンダジム	192/160	192/132	0.17	0.1	3.1	メタザクロル	278/134	278/210	0.98	0.10	2.40
カルボフラン	222/165	222/123	0.44	0.2	3.3	メタバズチアズロン	222/165	222/150	0.35	0.10	3.50
クロルフェンピホス	359/99	359/155	0.90	0.5	5.5	メチダチオン	303/145	303/85	0.93	0.50	4.70
クロトルロン	213/72	213/46	0.21	0.2	3.2	メチオカルブ	226/169	226/121	0.96	0.50	3.30
クロルピリホスメチル	322/125	324/125	0.71	1.0	8.4	メトミル	163/88	163/106	0.77	1.00	7.00
シアナジン	241/214	241/104	0.24	0.5	6.9	メトラクロル	284/252	284/176	0.29	0.10	2.20
シプロコナゾール	292/125	292/70	0.95	0.5	7.2	メトルカルブ	166/109	166/94	0.30	0.50	3.80
シロマジン	167/85	167/68	0.45	0.5	4.2	メトリブジン	215/187	215/84	0.70	1.00	8.20
デスエチルアトラジン	188/146	188/104	0.40	0.5	7.7	モリネート	188/126	188/55	0.52	2.00	7.90
デスイソプロピルアトラジン	174/104	174/96	0.77	1.0	6.7	モノリニューロン	215/126	215/99	0.68	0.50	6.00
ジアジノン	305/169	305/97	0.94	0.1	3.1	モヌロン	199/72	199/126	0.16	0.10	1.60
ジクロルボス	221/109	223/109	0.55	1.0	4.6	ニテンピラム	271/126	271/237	0.78	0.50	4.10
ジフェノコナゾール	406/251	408/253	0.56	0.2	2.8	オキサジキシル	279/219	279/132	0.51	0.50	0.70
ジフェノクスロン	287/72	287/123	0.65	0.5	2.0	ペンディメタリン	282/212	282/194	0.18	1.00	8.70
ジフルベンズロン	311/141	311/158	0.70	1.0	6.6	プロクロラズ	376/308	376/70	0.26	0.20	2.80
ジメテンアミド	276/244	276/168	0.24	0.1	3.2	プロフェンホス	375/305	373/303	0.87	1.00	1.90
ジメトエート	230/125	230/199	0.76	0.2	2.8	プロメカルブ	208/109	208/151	0.94	1.00	6.40
ジメトモルフ	388/301	388/165	0.52	0.5	4.3	プロメトン	226/142	226/86	0.29	0.10	3.20
ジウロン	233/72	235/72	0.70	0.5	5.1	プロメトリン	242/158	242/200	0.43	0.20	0.20
エチオフェンカルブ	226/107	226/77	0.62	0.5	6.7	プロバクロル	212/170	212/94	0.72	0.20	3.70
フェナミホス	304/217	304/202	0.59	0.1	2.6	プロパニル	218/127	218/162	0.96	1.00	3.60
フルフェナセット	364/194	364/152	0.71	0.2	3.4	プロピコナゾール	342/159	342/69	0.25	0.50	1.00
フルフェノクスロン	489/141	489/158	0.51	1.0	7.6	プロスルホカルブ	252/91	252/128	0.21	0.20	7.30
フルロキシビル	255/209	255/181	0.74	5.0	10.4	シマジン	202/132	202/124	0.90	0.50	3.10
ヘキサフルムロン	461/158	461/141	0.59	5.0	9.0	スピロキサミン	298/144	298/100	0.66	0.20	3.40
イマザリル	297/159	299/161	0.37	0.5	8.5	テルブトリン	242/186	242/68	0.18	0.02	2.00

表 1. (続き)

農薬	MRM 1	MRM 2	比	LOD (ng/mL)	%CV (n=3)	農薬	MRM 1	MRM 2	比	LOD (ng/mL)	%CV (n=3)
イマザピル	262/217	262/149	0.54	0.2	3.0	シアベンダゾール	202/175	202/131	0.62	0.10	1.60
イマザキン	312/199	312/267	0.99	0.5	4.5	シアクロプリド	253/126	253/99	0.32	0.20	6.70
イミダクロプリド	256/175	256/209	0.73	1.0	4.6						

結果

MRM の選択性

QTRAP[®]システムとトリプル四重極システムを用いる多重反応モニタリング (MRM) での検出では、この質量分析計の二重質量フィルタリングにより優れた選択性が得られる。この選択性は、果実や野菜の抽出液など複雑な試料中の未知および目標とする分析種をスクリーニングする上で大きな力になる。図 4 にアズン抽出液中の 5.8 μ g/kg のメタザクロルの MRM 検出の例を示す。MRM 検出の選択性が高いため、マトリックスシグナルは同定される汚染物質の定量を妨害しない。

MRM の感度

MRM で作動する QTRAP[®]システムとトリプル四重極システムで優れた感度での微量レベルの定量が可能である。75 種の農薬の検出限界 (LOD) を表 1 に要約した。図 5 に、10ng/mL 濃度のトマト抽出液に添加した一部農薬のクロマトグラムの例を示す。ここに提示したスクリーニング法でのすべての MRM トランジションは 5ms という短いデータ収集時間を用いて検出された。リニア加速器 (LINAC[®]) コリジョンセルにより、感度を低下させずにこうした短いデータ収集時間を用いることが可能となる。

MRM 比を用いる同定

MRM 検出の選択性は高いが、マトリックスシグナルの妨害により偽陽性/偽陰性の結果のリスクが常にあるため、スクリーニング結果の確認が必要である。通常、分析種ごとに第二の MRM をモニターし、定量イオン/定性イオンのトランジションの比を未知試料ごとに計算して、標準の MRM 比と比較する。欧州委員会決定 2002/657/EC のような多様なガイドラインで同定のための MRM 比の許容範囲が定義されている (表 2)¹⁷。図 4 はアズン抽出液中の 5.8 μ g/kg のメタザクロルの MRM 比に基づく陽性の同定の例を示す。

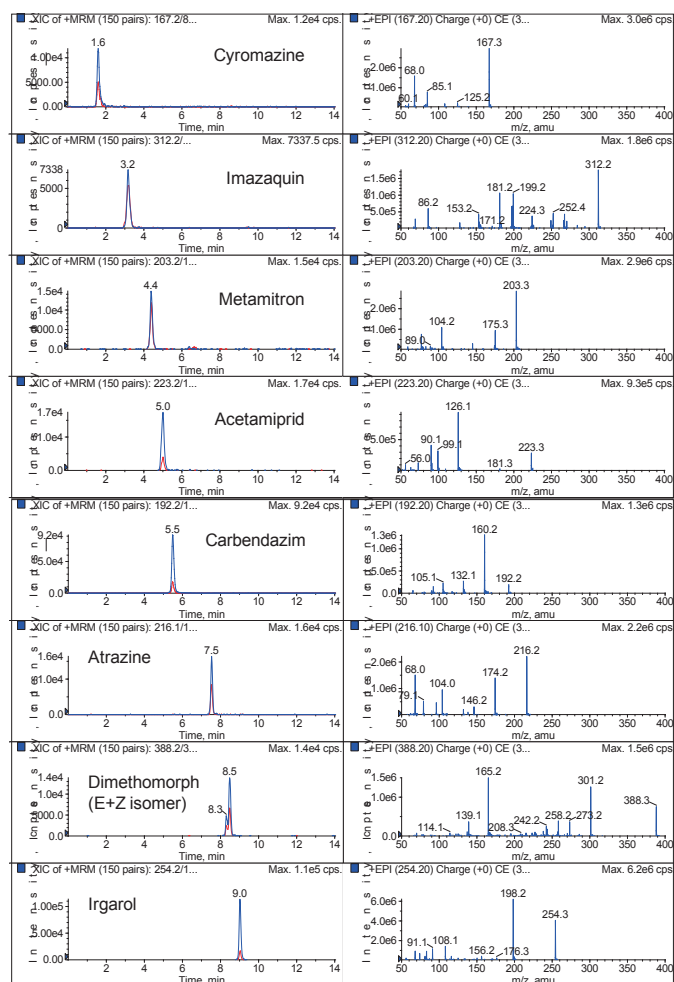


図 5. 10ng/mL でトマト抽出液に添加した農薬のクロマトグラムの例 (左) と、同じ濃度の対応する EPI スペクトル (右)

QTRAP[®] MS/MS スペクトルとライブラリ検索を用いる同定

代替策として、フルスキャン MS/MS 実験、および未知物質のスペクトルを標準と比較するライブラリ検索を用いて同定を行うことができる。図 2 に示すように、QTRAP[®] システムを用いた MS/MS スペクトルに基づく同定は、QqQ と比較して高感度で迅速なスキャンのため効率がよい。さらに、QTRAP[®] システム

により、従来のイオントラップより特徴的な MS/MS スペクトルが得られ、サイクル時間も短縮できる。

図 5 はトマト抽出液に 10ng/mL 濃度で添加した一部農薬の EPI (Enhanced Product Ion) スペクトルを示す。これらのスペクトルは、75 種の MRM トランジションを含むサーベイスキャンで IDA を用いて自動取得した。ここに示したスペクトルは、EPI スペクトルの選択性が高く、同定に必要な分析種の完全な分子フィンガープリントである。また、EPI スペクトルは高感度であり、既存の質量スペクトルライブラリで検索可能である。

表 2. 2002/657/EC による MRM 比の許容範囲¹⁷

相対 MRM 強度	最大許容範囲
> 0.5	± 20%
0.2 – 0.5	± 25%
0.1 – 0.2	± 30%
< 0.1	± 50%

この高度の同定を用いて、MRM 比の計算に基づく偽陽性/偽陰性の検出の潜在的リスクを最低限とすることができる。一例を図 6 に示す。バナナ抽出液中の農薬チアベンダゾールとイマザリルが MRL より上で同定・定量されたが、チアベンダゾールしか MRM 比で同定されなかった。イマザリルは MRM 比 0.50、MRM 比許容範囲 0.28~0.46 では同定できなかった。対照的に、フラグメントイオンが豊富な EPI スペクトルをライブラリ検索すれば、バナナ試料中の汚染物質の存在が両方とも明確に同定でき、イマザリルの検出偽陰性が回避された。

図 7 は、同定のための MS/MS ライブラリ検索の利点を実証した別の例を示す。MRM 比でイチゴ抽出液中のメタラキシルの存在が明確に同定される。しかし対応する EPI スペクトルとライブラリ検索の結果から偽陽性の結果が明確に同定される。メタラキシルはこのイチゴ試料中には存在しなかった。

定量・同定の再現性

自動開始される EPI スキャンを MRM 比計算の代わりに用いる同定分析を行うことで、モニター対象の MRM トランジションの数を減らすことができる。75 種の農薬の同定・検出に QTRAP[®] スクリーニング法を用いれば、150 種ではなくわずか 75 種の MRM トランジションをモニターすればよい。MRM トランジションが減ったことで MRM 実験のサイクル時間が短縮できた (QTRAP[®]: 1.1s、QqQ: 1.5s) 反面、トランジションあたりのデータ収集時間は延長された。LC ピーク全体で取得されるデータ点が増えたため、このサイクル時間短縮で再現性が向上した。

農薬の混合物をトマト抽出液に添加し、今回開発した QqQ + QTRAP[®] 法を用いて 10 回分析した。表 3 に提示したデータと図 8 のスペクトルの例に、EPI スペクトルの質量スペクトルライブラリ検索に基づく同定の再現性が MRM 比計算より大きいことが明確に示されている。

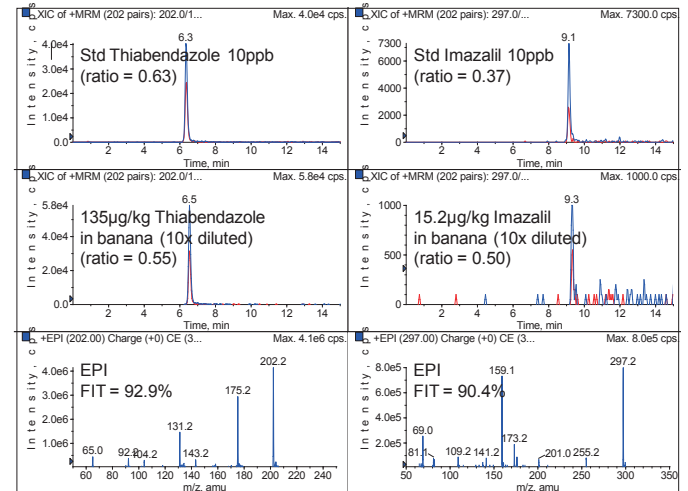


図 6. バナナ抽出液中の 135µg/kg のチアベンダゾールと 15.2µg/kg のイマザリルの定量。チアベンダゾールは陽性 (0.55、許容範囲 0.50~0.76)、イマザリルは陰性 (0.50、許容範囲 0.28~0.46) と同定された。この偽陰性は EPI (Enhanced Product Ion) スキャンとライブラリ検索に基づく同定で回避できる

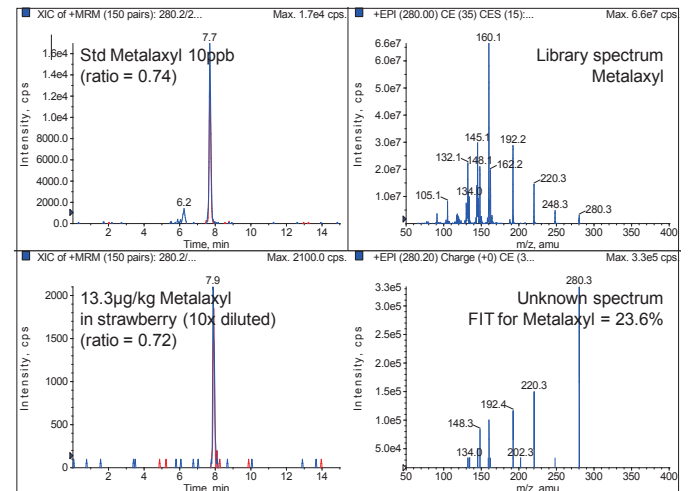
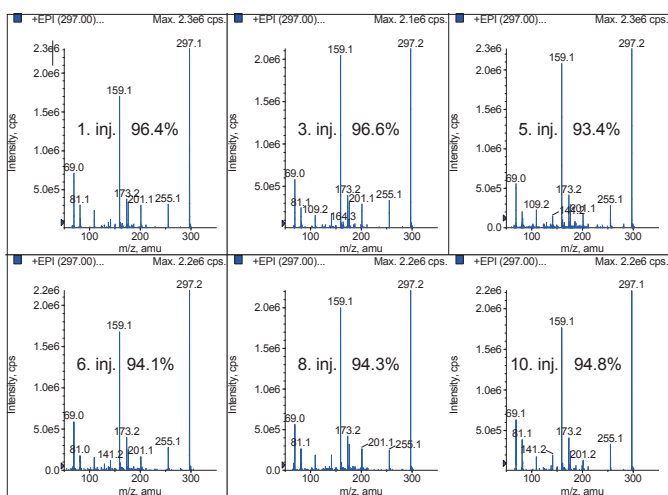


図 7. イチゴ抽出液中の 13.3µg/kg のメタラキシルの定量。この結果は MRM 比計算 (0.72、許容範囲 0.59~0.89) で同定されたが、ライブラリ検索で偽陽性であることが明確に示される

表 3. トマト抽出液に添加した農薬の反復注入に基づく MRM 比計算と質量スペクトルライブラリ検索に基づく同定の再現性 (n=10)

農薬	MRM 比	%CV	ライブラリフィット	%CV
アズキシストロビン	0.22	8.9	88.8	1.8
ジメトモルフ	0.76	8.8	95.7	0.5
フルフェナセツト	0.90	11.8	91.2	1.3
イマザリル	0.52	13.6	94.7	1.3
イミダクロプリド	0.39	25.3	78.1	5.5
メタベンズチアズロン	0.47	11.7	95.9	1.0
チアベンダゾール	0.66	4.9	91.2	2.4


図 8. 15.2µg/kg のイマザリルが検出されたバナナ抽出液の反復分析。EPI (Enhanced Product Ion) スペクトルのライブラリ検索フィット値から、QTRAP® LC/MS/MS システムを用いた MS/MS 同定の高い再現性が示される

まとめ

トリプル四重極システムと QTRAP® LC/MS/MS システムを用いる多重反応モニタリング (MRM) は、他に類を見ない選択性と感度のため、目標とする分析種のスクリーニングと定量に広く用いられている。この質量分析計の二重質量フィルタリングにより、優れた再現性と直線範囲をもち、S/N 比が最良、従って定量限界 (LOD) が最小となる。食品、環境、法医学など多くの応用で、検出される分析種の同定のガイドラインは質量スペクトルの追加情報を要求している。こうした同定は通常、化合物につき 2 種の MRM トランジション検出と MRM 比の計算によって行われる。

しかし、多様な試料中で検査が求められる汚染物質の数が増えるにつれ、必要な MRM トランジションの数は、特許取得したリニア加速器 (LINAC®) コリジョンセルを用いる AB SCIEX

システムのような最新技術のトリプル四重極質量分析計の能力でさえも超えている。このため、1 回の注入でスクリーニング可能な化合物の数に制限が生じたり、LC ピーク全体のデータ点の数が不十分のため再現性や正確さが低下したりしている。

今回、ハイブリッドトリプル四重極リニアイオントラップ (QTRAP®) システムにより、Q3 をリニアイオントラップとして用いる高感度 MS/MS スキャンと選択的 MRM 検出を組み合わせることで、目標とする多数の分析種のスクリーニング・同定のワークフローが一新される。IDA (Information Dependent Acquisition) 実験で、指定した閾値を超える MRM シグナルが検出されると EPI (Enhanced Product Ion) スキャンが自動的に開始される。こうした EPI スペクトルは、Q1 での前駆体イオン選択、コリジョンセルでの生成物イオン生成、LIT でのイオン蓄積により、MRM シグナルと同程度の感度と選択性をもち、完全な分子フィンガープリントを含んでいる。豊富な生成物イオンスペクトルはコリジョンセル中のフラグメントイオンの生成の結果である。これらのスペクトルは既存の質量スペクトルライブラリで検索可能である。

フルスキャン MS/MS スペクトルに保存されている情報により、確実性の高い同定が可能で、潜在的な偽陽性/偽陰性のリスクは最少となる。さらに、確認のためのすべての MRM トランジションのサイクル時間が短縮された点を利用し、S/N 比向上のため他の MRM トランジションのデータ収集時間を延長することができるので、結果として再現性と正確さが向上する。これらに加えて、MRM サーベイスキャンでスクリーニングする化合物を追加することも可能である。

参考文献

- 1 A. Schreiber 'Advantages of Using Triple Quadrupole over Single Quadrupole Mass Spectrometry to Quantify and Confirm the Presence of Pesticides in Water and Soil Samples' Application Note AB SCIEX (2006)
- 2 J. W. Hager: Rapid Commun. Mass Spectrom. 16 (2002) 512-526
- 3 J. W. Hager and J. C. Y. Le Blanc: Rapid Commun. Mass Spectrom. 17 (2003) 1056-1064
- 4 B. A. Collings et al.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 14 (2003) 622-634
- 5 P. Marquet et al.: J. Chromatogr. B 789 (2003) 9-18
- 6 C. A. Mueller et al.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 19 (2005) 1332-1338
- 7 S.M.R Stanley et al.: J. Chromatogr. B 836 (2006) 1-14
- 8 H. D. Hernando et al.: Anal. Bioanal. Chem. 389/6 (2007) 1815-1831
- 9 M. J. M. Bueno et al.: Anal. Chem. 79/24 (2007) 9372-9384
- 10 M. Gros et al.: J. Chromatogr. A 1189 (2008) 374-384
- 11 Hongying Gao et al.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 21 (2007) 3683-3693
- 12 R. D. Unwin et al.: Molecular and Cellular Proteomics 4/18 (2005) 1134-1144
- 13 E. Ciccimaro et al.: Rapid Comm. Mass Spectrom. 20 (2006) 3681-3692
- 14 L. Anderson et al.: Molecular and Cellular Proteomics 5/4 (2006) 573-588
- 15 J. R. Whiteaker et al.: J. Proteome Research 6/10 (2007) 3962-3975
- 16 M. Anastassiades et al.: J. AOAC Int. 86 (2003) 412-431
- 17 European Commission Decision 2002/657/EC



株式会社 エービー・サイエックス

本社: 〒140-0001 東京都品川区北品川4-7-35 御殿山トラストタワー21F
TEL: 0120 (318) 551 FAX: 0120 (318) 040
大阪: 〒531-0072 大阪府大阪市北区豊崎3-19-3 ピアスタワー
<http://www.sciex.jp> Email: jp_sales@sciex.com

Forensics testing using QTRAP technology

CR
SCENE DO NOT ENTER

SCENE DO NOT ENTER



For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.

Forensic

SCIEX

Detecting a New Wave of K2/Spice in Human Urine

An Analytical Method for the Identification of JWH-018, JWH-073, JWH-081 and JWH-250 using the QTRAP® LC-MS/MS System

Alexandre Wang, Brent Dawson, Hua-Fen Liu
SCIEX, Redwood City, CA

Purpose

This application note describes an updated version of the screening method for the active ingredients in K2/Spice blends. Previously we have developed a method focused on the detection of JWH-018 and JWH-073 in human urine. This has now been expanded to include JWH-081 and JWH-250, as well as their metabolites. This screening method takes advantage of the QTRAP® system to perform an information dependent acquisition (IDA) using multiple reaction monitoring (MRM) as a survey scan, and automatically triggering an enhanced product ion (EPI) scan. EPI spectra are searched against an MS/MS spectral library for confirmation.

Introduction

In 2010, the Drug Enforcement Administration announced that they would be temporarily controlling five synthetic cannabinoids: JWH-018, JWH-073, JWH-200, CP-47 and CP47-C8 homologue. Meanwhile, other as-yet unregulated chemicals emerged to replace the controlled substances, including JWH-081 and JWH-250. Similar to JWH-018 and JWH-073, these new chemicals also act as cannabinoid agonists at both the CB1 and CB2 receptors in the brain, causing feelings of euphoria and



Figure 2. QTRAP® system technology enables identification, characterization, confirmation and quantitation of low abundance analytes.

clarity. With the emergence and widespread abuse of these new chemicals, it became necessary to expand our original screening method in order to detect all four active ingredients, as well as their metabolites. The major challenge was that little or no parent compounds were observed in human urine after a few hours of dose, making it essential to include metabolites of every active ingredient in the screening method.

Key Features of Hybrid Linear Ion Trap Technology

- Exceptional triple quadrupole and ion trap sensitivity allows identification, characterization, confirmation, and quantitation of low abundance analytes with a high degree of confidence.
- Powerful workflows enable fast, efficient identification, characterization, confirmation, and quantitation—all in a single experiment.
- LINAC® collision cell permits greatly reduced dwell times without a loss in sensitivity allowing multi-target analyses.
- Broad linear dynamic range provides true triple quadrupole quantitation performance and enhances identification of ions in complex matrices.
- Powerful advanced scan modes, including neutral loss and precursor ion scans, can be used in flexible combinations to achieve unprecedented selectivity.

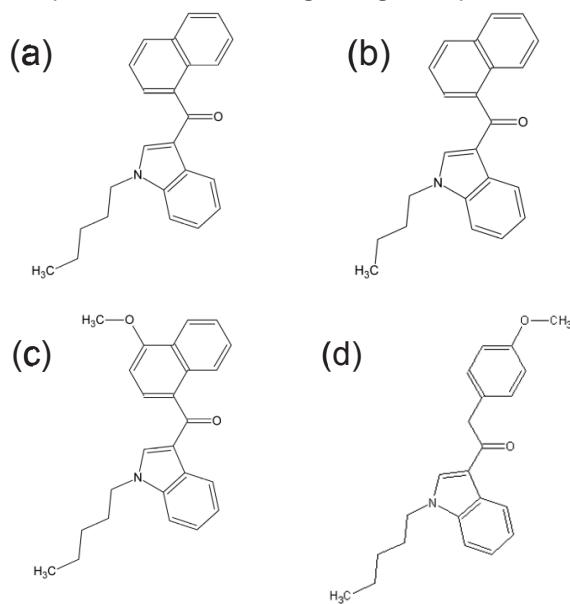


Figure 1. Chemical structures of (a) JWH-018, (b) JWH-073, (c) JWH-081, and (d), JWH-250.

Experimental Conditions

The identification of metabolites of the active ingredients JWH-081 and JWH-250 was accomplished using the enhanced sensitivity and resolution provided by the QTRAP® 5500 system and the TripleTOF® 5600 system, however the final screening method was developed for the 4000 QTRAP® system. JWH-081 and JWH-250 were incubated in human liver microsomes and hepatocytes to produce the phase 1 and phase 2 metabolites. These samples were then analyzed using a predictive MRM list of probable metabolite transitions as the survey scan. MRM transitions producing a signal above a pre-determined threshold triggered an enhanced product ion (EPI) scan taking advantage of the linear ion trap. The MS/MS spectrum for each identified metabolite was also added to a searchable library.

Based on the results, the major metabolites for JWH-081 and JWH-250 were added to the existing 4000 QTRAP® method containing metabolites for JWH-018 and JWH-073. Chromatographic separation was achieved on a Restek Ultra Biphenyl column, 5µ 50mm x 2.1mm, with a linear gradient and a flow rate of 0.5mL/min. Mobile phase A consisted of water, 0.1% formic acid and mobile phase B consisted of acetonitrile, 0.1% formic acid.

Table 1. HPLC Gradient for K2 Screening Method

Time	%A	%B
0	90	10
0.5	90	10
6	10	90
7.5	10	90
7.6	90	10
9	90	10

Results and Discussion

Identification and screening of K2 metabolites were challenging for many reasons including the presence of multiple active ingredients, short half-life for the parent compound, lack of standards as well as lack of control samples for the positive urine specimens. To resolve these challenges, JWH-081 and JWH-250 were incubated in human liver microsomes and hepatocytes and the *in vitro* metabolite pathway was identified for each individual compound.

Table 2. List of Major Metabolites for JWH-081 Included in the Screening Method.

Peak ID	Biotransformation	Mass Shift	Expected m/z
M1	Demethylation	-14	358.2
M2	Oxidation + Demethylation	2	374.2
M3	Oxidation 1	16	388.2
M4	Oxidation 2	16	388.2
M5	Oxidation + Hydrogenation	18	390.2
M6	Carboxylation 1	30	402.2
M7	Carboxylation 2	30	402.2
M8	Di-oxidation 1	32	404.2
M9	Di-oxidation 2	32	404.2
M10	Demethylation + Glucuronidation	162	534.2
M11	Oxidation + Demethylation + Glucuronidation	178	550.2
M12	Oxidation + Glucuronidation	194	564.2
M13	Carboxylation + Glucuronidation	206	578.2
M14	Di-oxidation + Glucuronidation	208	580.2
	JWH-081	0	372.2

Table 3. List of Major Metabolites for JWH-250 Included in the Screening Method.

Peak ID	Biotransformation	Mass Shift	Expected m/z
M1	Demethylation	-14	322.2
M2	Oxidation + Demethylation	2	338.2
M3	Oxidation 1	16	352.2
M4	Oxidation 2	16	352.2
M5	Carboxylation	30	366.2
M6	Di-oxidation	32	368.2
M7	Sulfonation + Oxidation	96	432.2
M8	Demethylation + Glucuronidation	162	498.2
M9	Oxidation + Glucuronidation	194	528.2
M10	Carboxylation + Glucuronidation	206	542.2
M11	Di-oxidation + Glucuronidation	208	544.2
	JWH-250	0	336.2

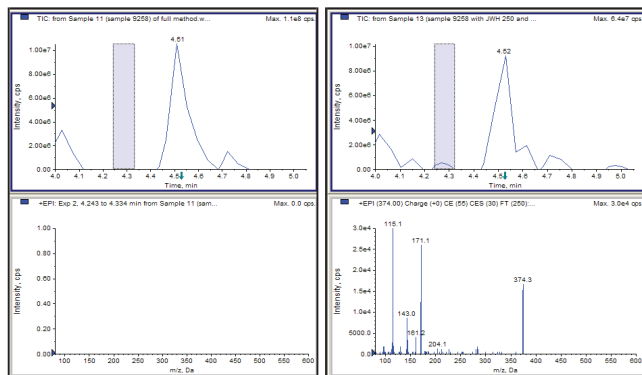


Figure 3. Chromatograms (top) and extracted EPI spectra (bottom) for a blank urine sample (left) and a urine sample spiked with the microsomal incubation of JWH-081 (right). The chromatogram and spectrum on the right show the presence of the demethylation+oxidation metabolite of JWH-081.

The *in vitro* incubation samples were analyzed by using a targeted MRM-IDA-EPI approach where LightSight® software was used to generate a list of possible metabolites for each synthetic cannabinoid. Both JWH-081 and JWH-250 were found to be extensively metabolized by demethylation, mono-, di-hydroxylation, carboxylation, reduced di-hydroxylation and corresponding glucuronide conjugation.

Based on the consolidated list of major metabolites for each active ingredient, the original spice/K2 method (JWH-018 and JWH-073) was updated to include the new parent compounds (JWH-081 and JWH-250) as well as the corresponding major metabolites. Screening confirmation was carried out through IDA triggering of EPI scans where the acquired MS2 spectrum was matched against a library developed from *in vitro* experiments.

The screening method was evaluated with human urine samples spiked with the microsomal incubations as well as positive urine samples diluted with mobile phase and injected directly into the 4000 QTRAP® system. Both sets of samples yielded good signal for various MRM transitions as well as positive matches for the triggered EPI spectra.

Conclusions

The updated IDA method is capable of screening for the synthetic cannabinoids JWH-018, JWH-073, JWH-081, JWH-250 and their major metabolites in a single injection using MRM transitions as survey scan, and triggering enhanced product ion scans which are automatically searched against the MS/MS library for positive confirmation. The method takes full advantage of the sensitivity of the 4000 QTRAP® system to find low level metabolites as well as the trap features of the hybrid system to generate full product ion spectra for library confirmation.

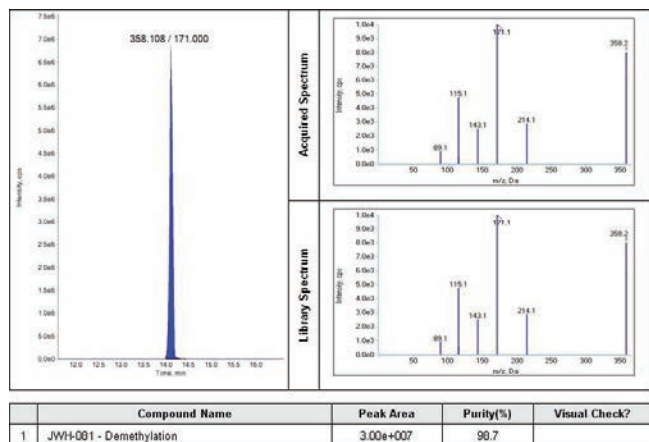
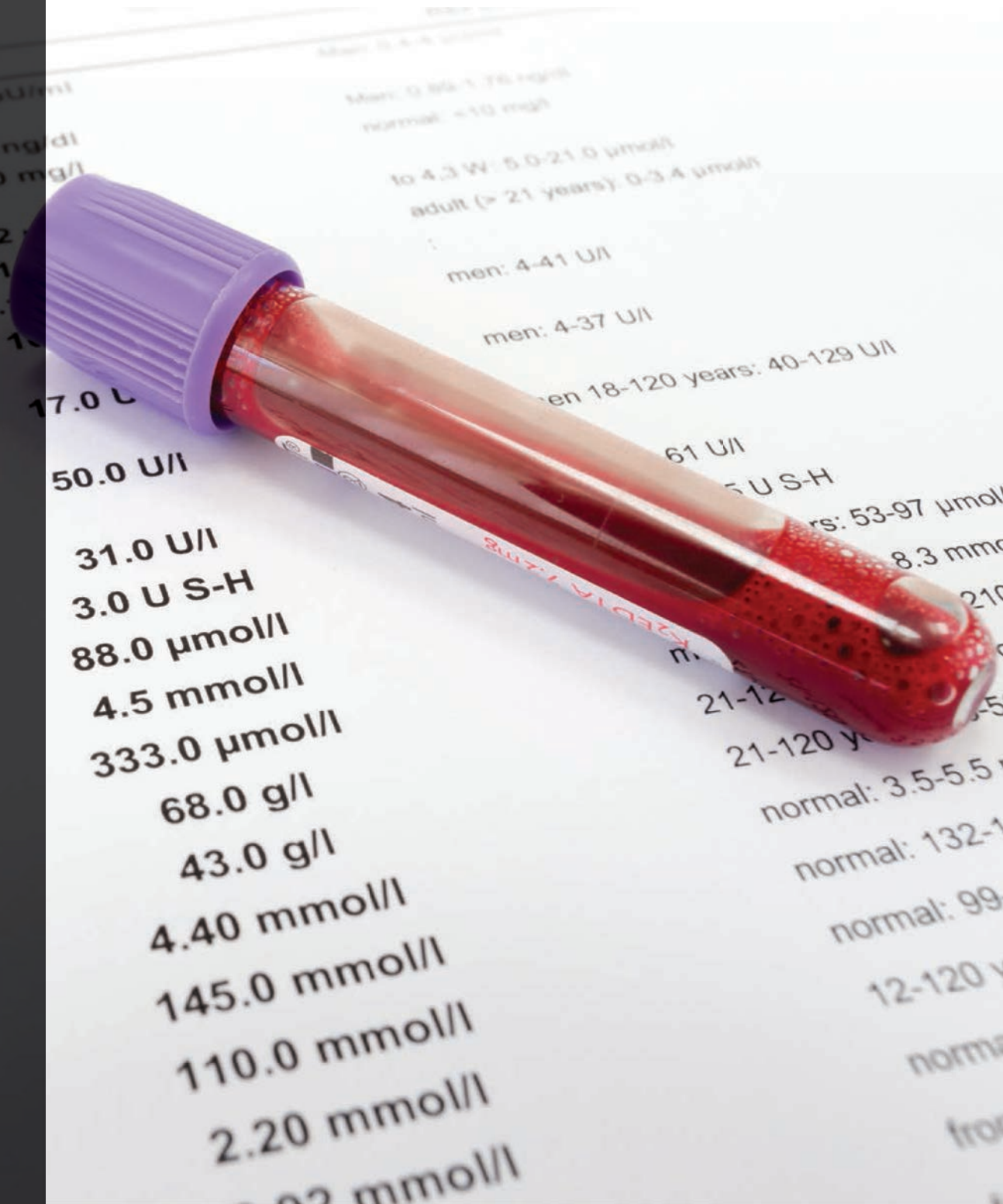


Figure 4. MS2 library search result with a positive match for a metabolite of JWH-081.

Clinical research using QTRAP technology





For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.

Clinical Research



LC-MS/MS によるヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (NRTI) 抗レトロウイルス薬の分析

QTRAP® 4500 LC/MS/MS システムを用いた定量と確認のワークフロー
YunYun Zou, Michael Jarvis SCIEX, Concord, Canada

はじめに

ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (NRTI) は、天然に発生するデオキシヌクレオチドのアナログである抗レトロウイルス薬の重要な一種です。この阻害薬は、基質結合に対してデオキシヌクレオチドと競合し、ウイルスの DNA 鎖の成長を、鎖の終結を引き起こすことで阻害します。このような抗レトロウイルス薬は、しばしば、薬物のカクテル投与の一部として投与されています。この投与は、高活性抗レトロウイルス療法 (Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART) として知られており、ウイルスのライフサイクルの複数の段階を標的としています。このような薬物のヒト血漿中の精密な定量に望ましいのは、単一の分析方法です。

ここで説明した研究において、NRTI 抗レトロウイルス薬である、Abacavir (ABC)、Didanosine (ddl)、Emtricitabine、(FTC)、Lamivudine (3TC)、Stavudine (d4T)、Zidovudine (AZT) のLC-MS/MSによる定量法を開発しました。これには、QTRAP 4500 ハイブリッドトリプル四重極/リニアイオントラップ質量分析計を用いました。



この分析法は、Scheduled MRM™ アルゴリズムを用いた多重反応モニタリング (MRM) スキャンモードで定量を行います。この分析法では血漿中の定量限界が、種々のターゲットについて、0.1 から 1.0 ng/mL の範囲にあります。

図1. ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (NRTI) 抗レトロウイルス薬の構造。

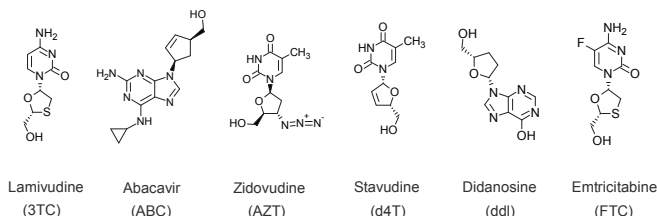
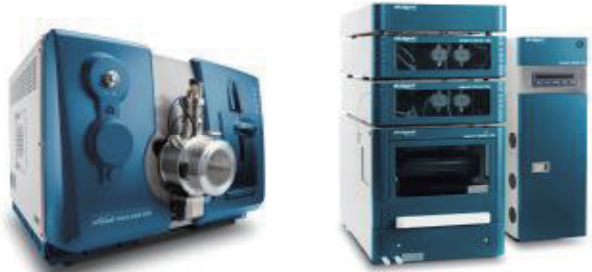


図2. NRTI 抗レトロウイルス薬の LC-MS/MS 分析を、SCIEX QTRAP 4500 LC/MS/MS システム (左) および UltraLC 100 システム (右) を用いて実行しました。



QTRAP 4500 のリニアイオントラップを利用し、MS/MS スペクトルを含むリファレンスライブラリーを、6 つの NRTI 抗レトロウイルス薬について生成しました。2 つめに開発した分析法は、これら化合物の定量と確認を同時に実行するために、QTRAP リニアイオントラップのスピードと感度を利用しています。

この方法は情報依存的アクイジション (IDA) モードでリニアイオントラップを使用し、検出された NRTI 抗レトロウイルス薬全てに対してリニアイオントラップを用いて、MS/MS スペクトルを自動的に取得しました。さらにこれを MS/MS ライブラリーに照合して、検出した化合物を確認しました。この方法により、定量する化合物の情報について信頼性を向上させることができます。

実験

サンプル調製

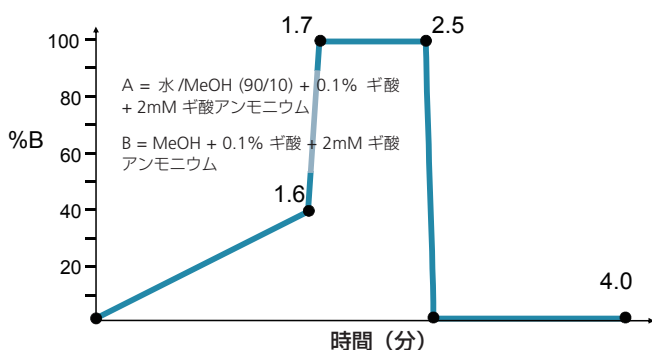
150 μL の血漿を、1.5 mL のポリプロピレン製エッペンドルフ遠心チューブに量り取りました。6 μL の内部標準液を各チューブに添加し、これをさらに vortex で十分混和しました。内部標準液は、それぞれ 10g/mL の、Didanosine- $^{13}\text{C}_2$ (ddl- $^{13}\text{C}_2$)、Emtricitabine- $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}_2$ (FTC- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$)、Lamivudine- $^{15}\text{N}_2, ^{13}\text{C}$, (3TC- $^{15}\text{N}_2, ^{13}\text{C}$)、Stavudine- d_3 (d4T- d_3)、および Zidovudine- d_3 (AZT- d_3)です。次に、400 μL のメタノールを各サンプルに添加しタンパク質を析出させ、3 分間、vortex で混和した後、14,000 rpm で 5 分間、遠心分離しました。上清を新しい1.5 mL マイクロ遠心チューブに移し取り、40°C で窒素ガスで乾固しました。乾燥したサンプルは、300 μL の 10:90 v/v メタノール: 水を用いて再溶解し、vortex で混和し、10,000 rpm で 5 分間、遠心分離し、不溶性の物質を除去しました。再溶解液を LC-MS/MS システムに直接注入しました。

HPLC 条件

オートサンプラ、バイナリポンプ、脱気装置、カラムオープンで構成される SCIEX の UltraLC 100 システムを用いました。クロマト分離は、SecurityGuard C18 カートリッジ (4x3 mm) と、Phenomenex Kinetex C18 カラム (50x3 mm, 2.6mm) を用いました。カラムオープンは 40°C に設定しました。

HPLC 分析法は、合計流速が 700 $\mu\text{L}/\text{分}$ となる、4 分間の2液グラジエントを用いました。移動相 A は、水/メタノール (90/10) + 0.1% ギ酸 + 2mM ギ酸アンモニウムとしました。移動相 B は、メタノール + 0.1% ギ酸 + 2mM ギ酸アンモニウムとしました。インジェクションボリュームは 20 μL としました。

図3. HPLC フローグラジエント

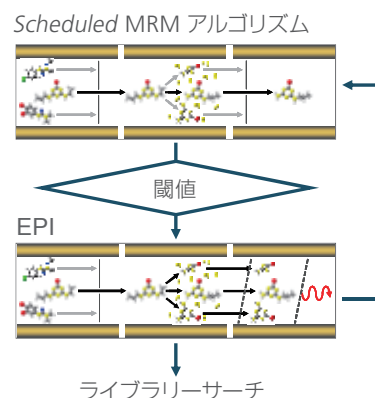


MS/MS 条件

Turbo V™ イオンソース付きの SCIEX QTRAP® 4500 LC-MS/MS システムを、ポジティブエレクトロスプレーイオン化 (ESI) モードで使用しました。6 種類の抗レトロウイルス薬を、化合物毎に 2 つの MRM を利用して検出しました。Abacavir 以外は、同重体で標識した標的化合物のアナログを、各ターゲットの内部標準として使用しました。MRM トランジションを表 1 に要約します。2 つの LC-MS/MS 分析法を開発して試験しました：

- 6 つの抗レトロウイルス薬定量のための LC-MS/MS 分析法
 - 化合物毎に 2 MRM トランジションをモニターし、内部標準についてはそれぞれ 1 MRM トランジション
 - Scheduled MRM™ (sMRM) アルゴリズムを用います
- MS/MS ライブラリーサーチを用い、6 つの抗レトロウイルス薬の定量と確認同時分析のための LC-MS/MS 分析法
 - 化合物毎に 2 MRM トランジションをモニターし、内部標準についてはそれぞれ 1 MRM トランジション
 - Scheduled MRM アルゴリズムを用います
 - QTRAP リニアイオントラップを用いた、検出全化合物に対する情報依存的アクイジション (IDA) による高感度、高品質の MS/MS スペクトル取得
 - MS/MS スペクトルは、リファレンスライブラリーと照合して検出全化合物の情報を確認します

図4. ターゲットの同時定量と確認のための MRM-IDA-EPI 分析ワークフロー



MRM-IDA-EPI 分析ワークフローでは、多重反応モニタリング (MRM) をサーベイスキャンとして使用してターゲットの存在を検出します。情報依存的アクイジションモード (IDA) のクライテリアは事前に設定し、化合物を検出してシグナル強度が特定の閾値を超えた場合は、エンハンスドプロダクトイオン (EPI) MS/MS スペクトルを自動的に取得します。MS/MS スペクトルは、リファレンスライブラリーと照合して検出全化合物の情報を確認します。

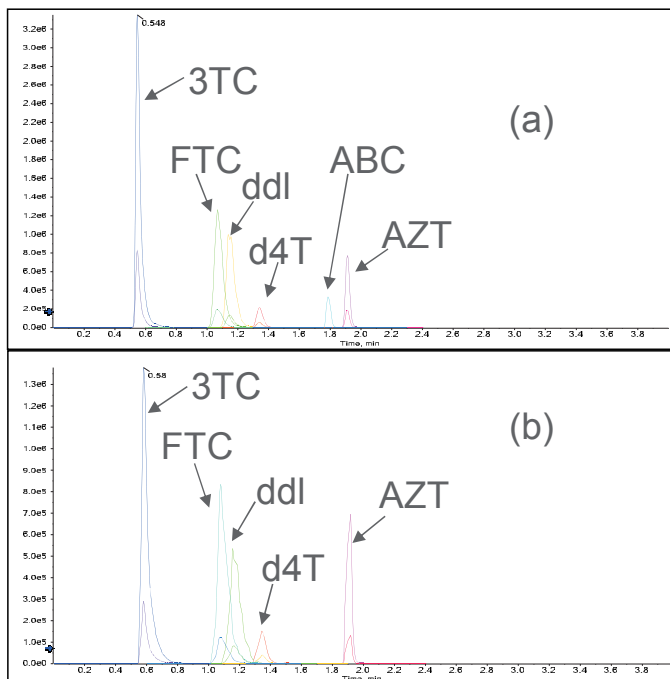
表1. 標的化合物に対する MRM トランジション

ターゲット	Q1	Q3	ターゲット	Q1	Q3
d4T (定量)	225.1	127.0	FTC (定量)	248.0	130.0
d4T (確認)	225.1	110.1	FTC (確認)	248.0	113.0
d4T-d3	228.1	130.0	FTC-13C,15N2	251.0	133.0
3TC (定量)	230.0	112.0	AZT (定量)	268.1	127.2
3TC (確認)	230.0	95.1	AZT (確認)	268.1	110.1
3TC-15N2,13C	233.0	115.0	AZT-d3	271.0	130.0
ddl (定量)	237.1	137.0	ABC (定量)	287.2	191.2
ddl (確認)	237.1	110.0	ABC (確認)	287.2	150.2
dl-13C2,15N	240.0	140.0			

結果

Abacavir (ABC), Didanosine (ddl), Emtricitabine, (FTC), Lamivudine (3TC), Stavudine (d4T), Zidovudine (AZT) の定量法として、迅速な、4 分間の LC-MS/MS 法を開発しました。これには、SCIEX QTRAP® 4500 LC/MS/MS システムを用いました。

図5. 5 ng/mL の各ターゲットをスパイクしたヒト血漿サンプルのクロマトグラム例。(a) QTRAP® 4500 システム (上)、(b) 4000 QTRAP® システム (下) を使用。



この分析法を評価するために、ヒト血漿サンプルのセットに、一連の既知濃度の標的化合物をスパイクし、これを用いて、化合物毎のキャリブレーションカーブを作成しました。血漿サンプルに、1 ng/mL から 5000 ng/mL の濃度範囲でスパイクしました。Abacavir (ABC) のみ、0.1 ng/mL から 500 ng/mL の範囲でスパイクしました。これは他のターゲットと比べて反応が顕著に強いことによるものです。

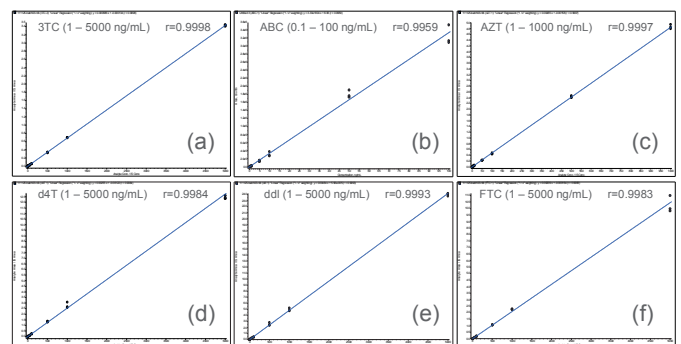
QTRAP® 4500 システムで分析した 5 ng/mL の濃度でスパイクさせた血漿サンプルのクロマトグラム例を図5a に示します。同一の分析を 4000 QTRAP システムで実行し、5ng/mL サンプルのクロマトグラムを図5b に示します。見て分かるように、QTRAP 4500 システムによる分析では、ターゲットによって、ファクターが 1.1 倍 (AZT) から 2.4 倍 (3TC) まで感度が上がり、平均してシグナルは 1.6 倍になっていました。4000 QTRAP® システムを用いた Abacavir に関する比較データは得られていません。ターゲット毎のキャリブレーションカーブを図5 に示します。

表2. 抗レトロウイルス薬の分析を対象とした、MRM モードの QTRAP 4500 システムのシグナルの増強。4000 QTRAP システムとの比較

	3TC	AZT	d4T	ddl	FTC	Average
シグナル強度比	2.4x	1.1x	1.4x	1.9x	1.5x	1.66x

本分析法でカバーされる濃度レンジ全体で、全ターゲットの真度は 88% から 118% の範囲であり、CV は 10% 未満でした (LLOQ については <12%)。同じサンプルセットを最初に分析した後、4° C で保管し、4 日後に再分析しました。同様の結果が得られ、真度と CV は同じ範囲内であり、ここで紹介した分析法が頑健であることが示されています。

図6. キャリブレーションカーブ。(a) Lamivudine (3TC)、(b) Abacavir (ABC)、(c) Zidovudine (AZT)、(d) Stavudine (d4T)、(e) Didanosine (ddl)、(f) Emtricitabine。



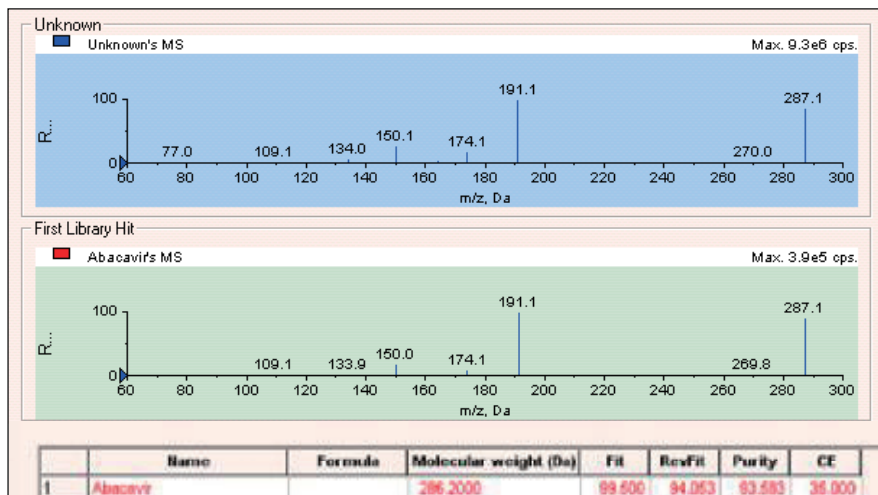
先に述べたように、2 つめの分析方法を開発し、これは、LC-MS/MS の稼働中に情報依存的アキュイジション (IDA) モードで、リニアイオントラップを用いたエンハンスドプロダクトイオン (EPI) MS/MS スペクトルの取得を自動的に開始するものです。この分析法を用い、MRM モードで標的の化合物を定量しながら、常々実施し続けました。さらに、検出した各ターゲットの情報は、取得した MS/MS スペクトルを、リファレンスライブラリーと比較することで確認可能であり、その結果偽陽性が生じる可能性を低減しました。

MS/MS スペクトルライブラリーは、可能性が考えられる干渉を低減するために適切な標準液を用いて各化合物について個別に注入し、作成しました。EPI スペクトルをスパイクしたヒト血漿サンプルから取得し、スペクトルライブラリーと比較した場合、計算した純度スコアは、全サンプルについて70-95%の範囲内でした。図7には、ヒト血漿サンプルにスパイクした Abacavir について、代表的ライブラリー検索の確認結果を示しています。

結論

ヒト血漿中の、6 種類のヌクレオシド系逆転写酵素阻害 抗レトロウイルス薬の検出および定量について、迅速かつ頑健な分析法を開発しました。簡単なタンパク質沈殿操作後に、再溶解する方法を、血漿マトリックスを洗浄するために用いています。SCIEX QTRAP® 4500 LC-MS/MS システムと UltraLC 100 UHPLC システムを用い、高速クロマトグラフィーを高感度検出法と併用しました。

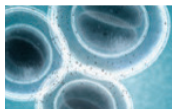
図7. MS/MS ライブラリー検索結果、ヒト血漿にスパイクした Abacavir の分析 (上)。



Scheduled MRM™ アルゴリズムを用いて、dwell time とサイクルタイムを自動的に最適化し、最高の感度と再現性が得られました。QTRAP リニアイオントラップを情報依存的アキュイジション (IDA) モードで用い、エンハンスドプロダクトイオン (MS/MS) スペクトルを取得しています。このスペクトルを用いて、偽陽性の可能性を最小化するために追加の確認作業を行いました。QTRAP 4500 LC-MS/MS システムのスピードと感度により、データ品質を妥協せずに、1 回の分析で定量および確認用の情報を同時に取得することが可能となります。

Biomarkers and omics using QTRAP technology





MRM³ 分析を用いた全ヒト血清中の前立腺特異抗原 (PSA) の定量化

SCIEX QTRAP[®] 5500 システムを用いたハイスループット分析

Fortin T¹, Salvador A², Charrier JP¹, Lenz C³, Bettsworth F¹, Lacoux X¹, Choquet-Kastylevsky G¹, Lemoine J².

¹BioMerieux, France, ²University of Lyon, France, ³SCIEX, Germany

ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (NRTI) は、天然に発生するデオキシヌクレオチドのアナログである抗レトロウイルス薬の重要な一種です。この過去 10 年にわたり、質量分析法によるプロテオミクスは、疾患タンパク質バイオマーカー候補を比較的少数のサンプルから発見するために使用されてきました。しかし、このようなバイオマーカー候補の検証/妥当性確認はほとんど行われておらず、臨床用アッセイに使用の際にこのようなタンパク質をどのように解釈できるかはほとんど分かっていません。従来、免疫反応を用いたアッセイが、臨床研究におけるタンパク質の検出と定量化に用いられてきました。しかしこのような試験法を開発するには長期間を要します。研究者らがタンパク質アッセイを迅速に開発し、高い特異性と感度を有する検査法を生み出すことができる分析手法が必要です。このことから、LC-MS に基づくタンパク質定量化法に関心が高まりつつあります。

この数年、タンパク質の定量化に安定同位体標識蛋白/ペプチドと組み合わせたMRMアッセイを採用することが活発に検討されてきており、臨床研究向けに有望視されています。臨床研究のためのタンパク質アッセイに関する重要な必要項目は、高特異性、高頑健性、非常に高いスループット、例えばヒト血清中の ng/mL から pg/mL という濃度レンジで低い存在量のタンパク質を定量する能力です。また、サンプル調製は簡単で頑健である必要があります。



バイオマーカーの検証に MRM が広く使用されることを阻害するもう一つの制約は、ナノフロークロマトグラフィーの使用が広がっていることです。ナノフロークロマトグラフィー技術によって、LC-MS/MS 法の全体的感度が大きく向上しており、サンプルの必要量は著しく減少している一方で、この技術では、現在のところサンプルのスループット、再現性、頑健性については、臨床研究に適応できるレベルには達していません。

ここでは、顕著にサンプルの複雑性を軽減させられるMRM³と呼ばれる新規の、非常に高い選択性を持つ質量分析法に、セミマイクロのクロマトグラフィーを組み合わせた新規のアプローチについて説明します。このアプローチによって、ng/ml レベルまでの低濃度でヒト血清からタンパク質バイオマーカーを頑健に検出することが可能となります。

MRM³を用いたタンパク質バイオマーカー定量の重要な特徴

- QTRAP[®] 5500 システムにおけるテクノロジーの進歩によって、MRM³はより高速で、高感度になっています。
- MRM³ 分析によってペプチド検出の特異性はより高くなり、それによって、非常に複雑なサンプルからのペプチドの定量化が向上しています。
- より高い特異性によって、低濃度の検出に必要な分画化も軽減し、サンプルのスループットも改善します。

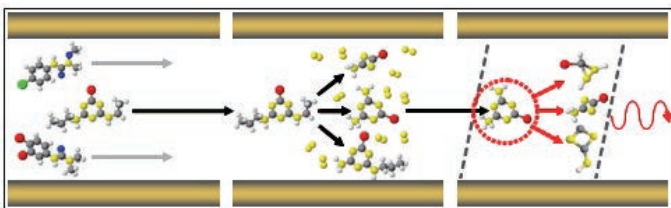


図1. LC-MS による定量分析のための MRM³。ターゲットプリカーサーイオンは、Q1 四重極で選択後、Q2 コリジョンセルでフラグメント化され、リニアイオントラップ (LIT) でプロダクトイオンが収集されます。適切なフラグメントイオンが選択され、共鳴励起を用いる第 2 ステップでフラグメント化します。2 次プロダクトイオンが収集され、リニアイオントラップを出て検出器に向けてスキャンされます。

方法

サンプル調製: ヒト血清サンプルは、6 M の尿素で変性させ、30 mM のジチオスレイトールで還元し、50 mM のヨードアセトアミドでアルキル化します。タンパク質は一晚にわたり37 °Cで保温してトリプシンで消化しました(酵素と基質の比率は 1:30 w/w)。サンプルは、逆相カートリッジ (Oasis HLB 3 cm³, Waters) を用いて脱塩し、MCX カートリッジ (Waters) を用いてメタノール/酢酸緩衝液の pH 5.5 の混液で溶出させて分画化しました。²

液体クロマトグラフィー: LC-MS/MS 分析は、2.1 x 100 mm Symmetry C18 逆相カラム (3.5 μm, Waters) を用いて実施しました。30 分の線形グラジエント (0.1% 酢酸中、アセトニトリルの割合が 5-40%。300 μL/min) を用いて、ペプチドを MS システムに溶出しました。トータルインジェクションサイクルは 45 分としました。²

質量分析法: MRM および MRM³ の両モードのデータ取得で、Turbo V™ ソース付きQTRAP® 5500を使用して溶出物を分析しました。Q1 と Q3 の 2 つの四重極の分解能はUnitを用いて MRM を実施しました。MRM³分析は、MS/MS/MS スキャン機能を用いて実施しました。プリカーサーイオンは、Unit分解能の Q1 で分離し、1 次プロダクトイオンは、最適化されたコリジョンエネルギーを用いた Q2 コリジョンセル中で生成し、Q3 のリニアイオントラップ内で 200 ms トラップしました。適切な 1 次プロダクトイオンが選択され、2 次フラグメントを生成するため、共鳴励起によって25 msさらに励起されました。これらは最後に、イオントラップから 10 000 Da/sec でスキャンされ、その結果、ペプチド毎に350 msのトータルサイクルタイムとなった。² Q0 トラッピングを用いて感度をさらに向上させました。

データ処理: MultiQuant™ ソフトウェアを用いてデータを処理しました。MRM のピークエリアは、ピーク毎、または複数を積算して積分しました。MRM のピークエリアは、最大 4 つの二次プロダクトイオンの積分値を合算して決めました。

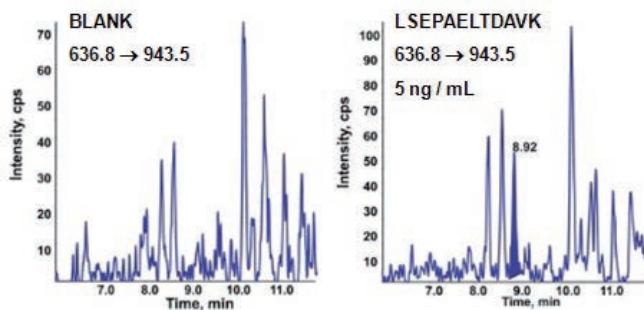


図3. ヒト血清中 PSA (5ng/mL) の MRM による定量化。除去、消化、一部分画化と組み合わせることで、高速 HPLC と MRM 分析を使用して PSA を検出可能です¹。

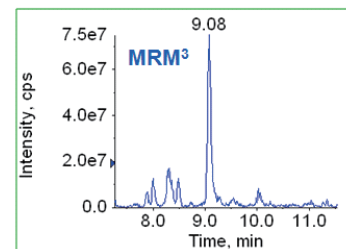
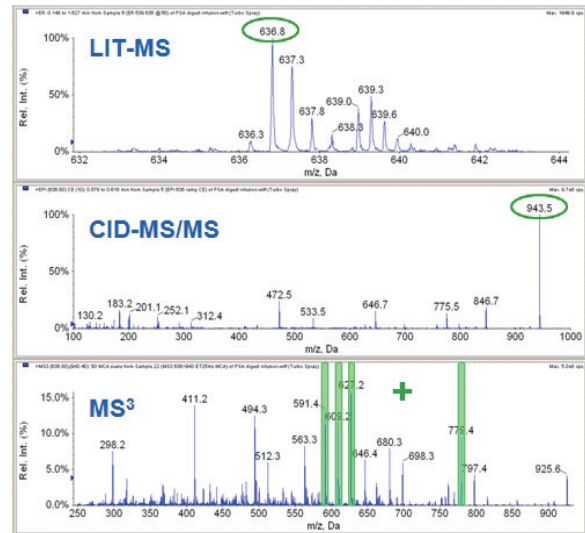


図2. MRM³ アッセイのデザイン。EMS スキャン (上段) を用いて主要なプリカーサーイオンを選択し、EPI モード (中段) を用いて最も強度の高いフラグメントイオンを同定しました。また、MS³ フラグメンテーションを用いて抽出に最良の二次プロダクトイオンを選択しました。複数の二次プロダクトイオンを用いて、MRM³ XIC を生成することが可能でした。

これまでの研究から PSA が低濃度で検出できることが示されている

最近では、高速クロマトグラフィーを用いた 4000 QTRAP システム上の LC-MRM 分析を用いて、ヒト血清中の PSA を検出できることが示されています。この分析法は、HSA 除去と、さらに混合カチオン交換分画化、さらに HPLC 分離を行い、低濃度の検出が可能となっています (図3)。存在量の多いタンパク質の除去は自動化が最も困難なステップであることから、このステップをなくすためにさらに方法を探索したことが、重要なワークフロー改善につながりました。ここで、MRM³ 分析 3 (図2) の使用を、ヒト血清中で PSA や他の低存在量のタンパク質の検出のために探索しました。

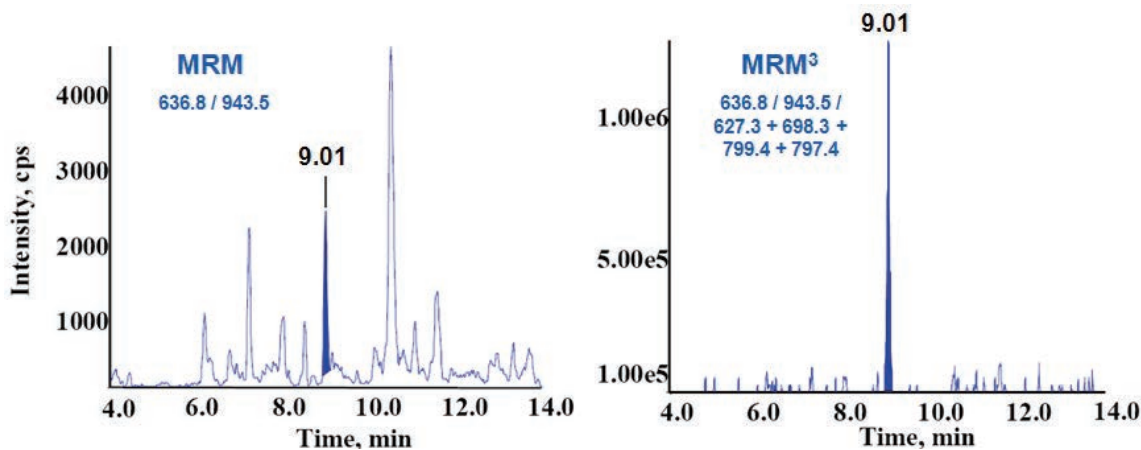


図4. MRM³ 分析を用いたバックグラウンド妨害物の低減。PSA は女性のヒト血清に 50 ng/ml の濃度で添加し、バックグラウンドの顕著な低減が観察されました。

PSA 定量化のための MRM³

最初に通常の MRM モードと比較した、MRM³ モードの検出特異性向上を評価するために、トリプシン消化したヒト女性の血清に、トリプシンで加水分解された細菌性タンパク質モデル TP171、TP574、TP435、コア NS4、ヒト前立腺特異抗原 (PSA) を、30 点以上の濃度で、0 から 1000 ng/mL の濃度でスパイクしました。

平均では、MRM から MRM³ に移行した結果、5 つのモデル タンパク質については、検出限界と定量化が 3 ~ 5 倍改善しました²。PSA のバックグラウンドの干渉/ノイズの除去を図4 に示します。CoreNS4 タンパク質由来の検量線のデータから、典型的な改善が示されています (図5)。MRM および MRM³ データの LC クロマトグラム上のバックグラウンドの低減に関するデータは図中、上段に示します (図5)。中段には、データ取得モードそれぞれについて検量線を示します。下段の表には、それぞれの検量線について、精度と真度を示します。標準的 MRM より選択性の高い MRM³ を用いた実験によって定量下限が改善することを強調しています。

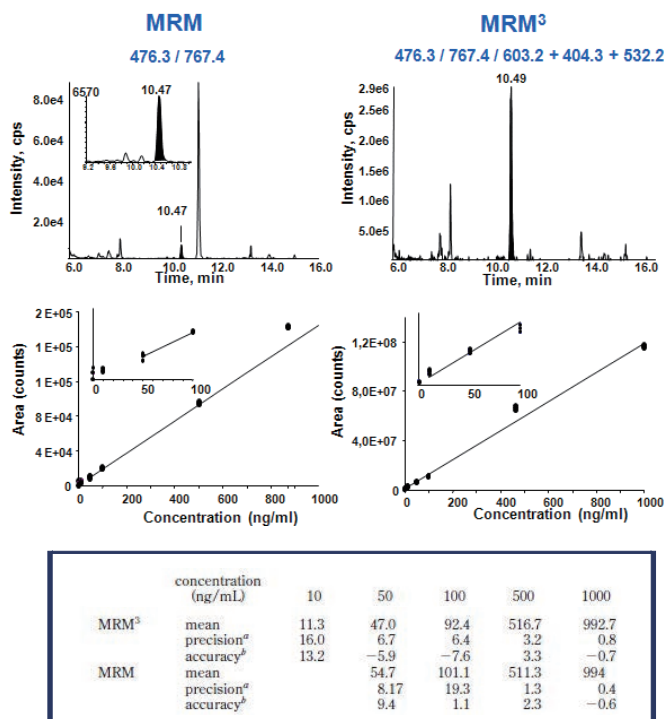


図5. ヒト血漿中 CoreNS4 由来 ALEFWAK ペプチドの検出下限の改善。MRM 分析の定量下限 (LLOQ) は 50 ng/mL であり、MRM³ では LLOQ は 10 ng/mLでした。

必要な定量限界である 4 ng/mL に達するために、未処理の血清をトリプシン加水分解のみ実施した後、カートリッジフォーマットの、混合カチオン交換固相抽出法に基づく、以前最適化したタンパク質特異的ペプチド濃縮法を使用しました²。この抽出ステップは、追加のクロマトグラフィーモジュールを用いてオンラインで容易に稼働できます。MRM³ 分析と組み合わせたこの抽出ステップにより、サンプル調製法から免疫法を用いた除去ステップを省くことが可能となりました。

ELISA アッセイと良好な相関

MRM³ 定量アッセイは、女性のブランク血清および前立腺癌とわかっている男性の 3 つのサンプル上で実施しました。得られた PSA の測定値は、確立した ELISA アッセイから得られた値と良好な相関を示しました (図6)²。これは、生体液中の低濃度タンパク質バイオマーカーの検出と精密な定量化のための MRM³ 法の可能性を明確に示しています。

結論

- ng/mL レベルの低濃度におけるヒト血清中タンパク質の定量化について、高速クロマトグラフィーと LC-MRM³ 分析法を用いて示しました。
- 全身を循環している 4-10 ng/mL の PSA という限界レベルの検出は、LC-MRM³ 分析を組み合わせた、頑健な 2 ステップのサンプル調製法を用いて、ヒト血清中で精密に分析できました。
- QTRAP[®] 5500 システムと比べて、スピードおよび感度が改善していることから、MRM³ 分析法は、バックグラウンドや妨害物質が非常に大きい場合に、複雑なマトリックス中のペプチドを対象とした頑健な定量法であることがわかります。

参考文献

1. Fortin T et al. (2009) Clinical quantitation of prostate-specific antigen biomarker in the low nanogram/milliliter range by conventional bore liquid chromatography-tandem mass spectrometry (multiple reaction monitoring) coupling and correlation with ELISA tests. *Mol. Cell. Prot.* **8**, 1006.
2. Fortin T et al. (2009) Multiple reaction monitoring cubed for protein quantitation at the low nanogram/milliliter level in nondepleted human serum. *Anal. Chem.* **15**, 9343.
3. MRM³ Quantitation for Highest Specificity in Complex Matrices. AB SCIEX Technical Note, Publication 0920210-01.

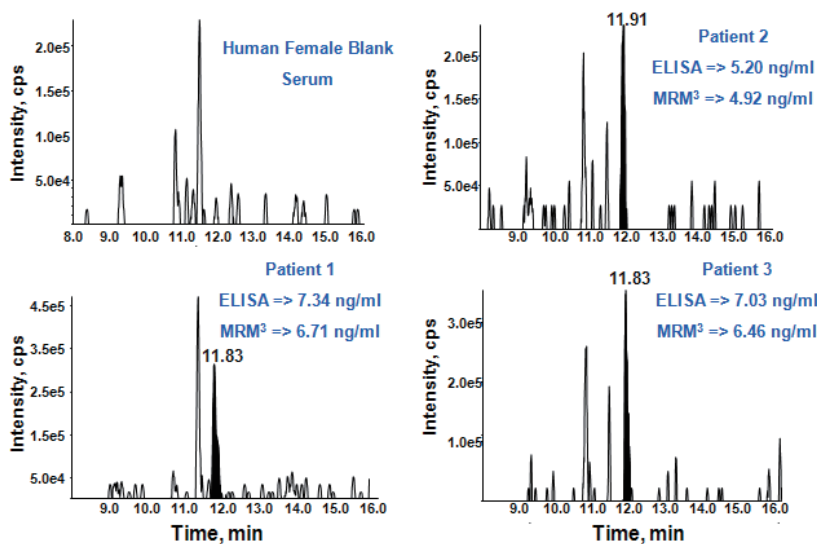
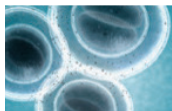


図6. LC-MS と ELISA 法の相関。女性血清および前立腺癌の 3 名の男性患者の血清中 PSA 濃度を LC-MRM³ および臨床的に受け入れられている ELISA アッセイで分析しました。いずれの方法も全身循環系の PSA 濃度について非常に近い測定値を示しました。



細胞外マトリックス中の遊離アミノ酸の迅速な LC-MS/MS 分析

QTRAP® 6500+ システムによる、遊離アミノ酸の定量的、高速、高感度、高頑健性分析

Catherine S. Lane
SCIEX, Warrington, UK

はじめに

誘導体化を行わないアミノ酸 17 種の定量について、迅速で、頑健性の高い、シンプルな分析法を説明します。この方法を、精製した末梢血中単核細胞 (PBMC) 由来の細胞上清の分析に使用しました。QTRAP MIDAS™ の機能を用いることで、同体重種を含むターゲットの比類ない同定が可能でした。

実験

サンプル: アミノ酸標準液 (AAS18, Sigma)。2.5 µmol/ml の L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン・HCl、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、および L-バリンと、1.25 µmol/ml の L-システインが含まれます。サンプルは、0.1% ギ酸水で分析のために希釈しました。精製した PBMC (10,000,000 細胞) 由来の細胞上清を、メタノールで沈殿させ、上清を除去しました。サンプルは分析のために、0.1% のギ酸水で 50 倍希釈しました。

クロマトグラフィー: 0.5 x 150 mm の ACE 3 AQ カラム (HiChrom) を取り付けられた MicroLC 200 システム (Eksigent) で、流速 20µl/min としました。移動相: 0.1% ギ酸水 (A)、0.1% ギ酸アセトニトリル (B)。グラジエント5分間は、B が 2 から 20% で、合計分析時間は 10 分間です。インジェクションボリュームは 2 µL としました。

質量分析法: Eksigent の 内径 50 µm のエレクトロードを取り付けた、IonDrive™ Turbo V イオンソースを付けた QTRAP 6500+ LC-MS/MS システム (SCIEX)。MRM (表1) または MIDAS モードでデータを取得しました。ピーク積分には MultiQuant™ ソフトウェア v3.0.2. を用いました。

表1. 17 種のアミノ酸に最適化した MRM トランジション。

Amino Acid	Parent ion m/z	Fragment ion m/z	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Glycine	76.1	30	6	7.6	19	14
L-Alanine	90.1	44	6	4.5	17	6
L-Serine	106.1	60	6	10.5	15.5	7
L-Proline	116.1	70	20	13.5	21	10
L-Valine	118.1	55	11	13.5	27	8
L-Threonine	120.1	103.2	105	14.5	25	7
L-Leucine/soleucine	132.1	86	8	14.5	13	10
Isoleucine 2	132.1	69	8	14.5	23	8
L-Aspartic Acid	134.1	74	7	14.5	19	10
L-Lysine	147.1	84	16	13.5	23	10
L-Glutamic Acid	148.1	84	21	14.5	21	10
L-Methionine	150.2	104	6	12	15	12
L-Histidine	156.1	110	16	13	19	12
L-Phenylalanine	166.1	103	11	14	37	12
L-Arginine	175.2	70	40	11	27	8
L-Tyrosine	182.2	165.2	20	11	13	8
L-Cystine	241.2	152.1	25	14	19	10

結果

17 種のアミノ酸の MRM 抽出イオンクロマトグラム例を図1に示します。この方法を、PBMC の細胞上清の分析に使用しました (図2)。MIDAS ワークフローを用い、フルスキャンリニアイオントラップ MS/MS データを使用して、ターゲットの情報を確認可能でした。例えば、同体重のアミノ酸、L-ロイシンおよび L-イソロイシン (図2) です。

検出下限値 (LOD) 付近の4つのアミノ酸の MRM 抽出イオンクロマトグラムと、対応する検量線を図3と4に示します。17 種のアミノ酸について LOD を算出し、それぞれの濃度は、希釈した PBMC 細胞上清中で測定しました (表 2)。

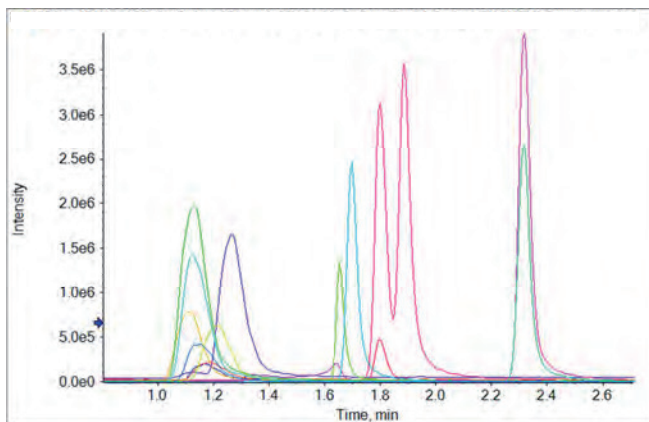


図1. 17 種のアミノ酸の、オンカラムで 0.5 pmol における MRM 抽出イオンクロマトグラム例 (システインのみ、オンカラムで 0.25 pmol)。



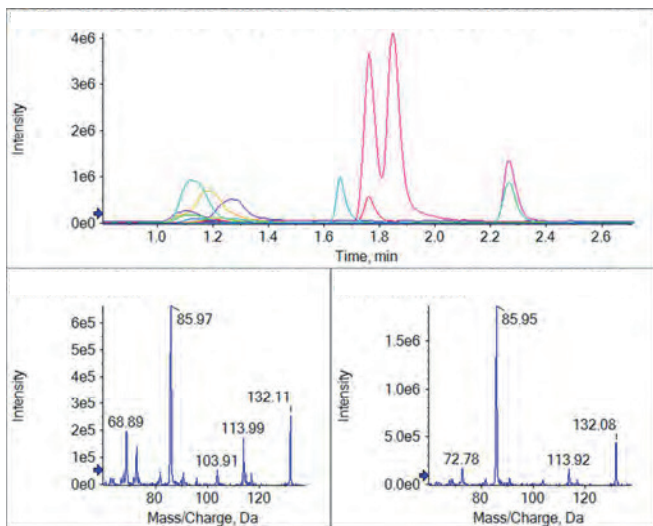


図2. MIDAS ワークフロー。 MIDAS ワークフローを使用し、サーベイスキャンとしてMRM トランジションを用い、高感度のリニアイオントラップ MS/MS データのデータ取得モードを動作させました。このようなデータから、同重体構造を含むターゲットの最終的な同定が可能でした。上段は、PBMC 細胞上清中の 17 種のアミノ酸の MRM 抽出イオンクロマトグラム (50 倍希釈) です。下段は、左から右に、1.75 分と 1.88 分に精製したフルスキャンリニアイオントラップ MS/MS データです。それぞれ同重体アミノ酸の L-イソロイシンと L-ロイシンに対応しています。m/z 69 の L-イソロイシンの特徴的フラグメントイオンが、左側の MS/MS スペクトル中に観察できます。

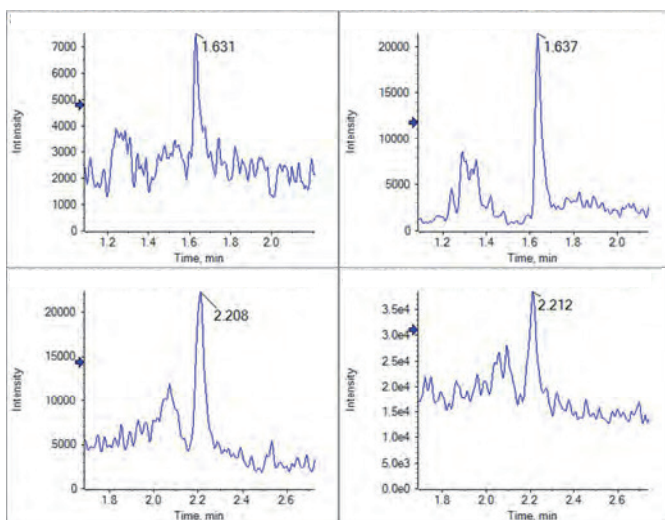


図3. 上左から時計回りに：オンカラムで 1 fmol の、L-メチオニン、L-チロシン、L-スレオニン、L-フェニルアラニン。

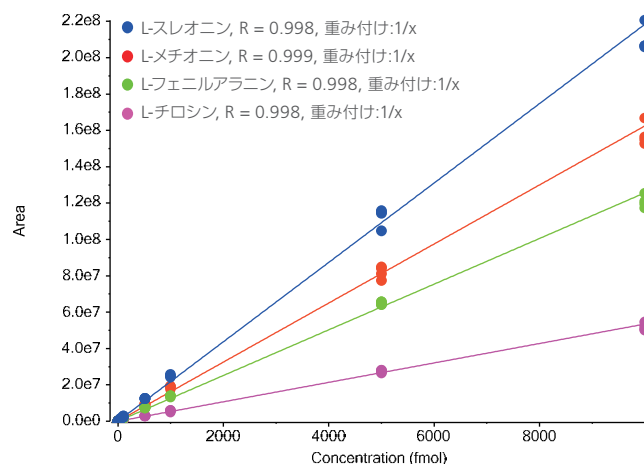


図4. リニアダイナミックレンジが 4 桁を越える、L-スレオニン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-チロシンの検量線 (オンカラムで 1 fmol からオンカラムで 10 pmol)。

表2. 17 種のアミノ酸について検出限界を算出し、それぞれの濃度は、希釈した PBMC 細胞上清中で測定しました (50 倍希釈)。

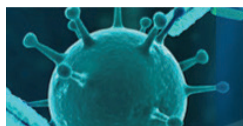
Amino Acid	LOD (fmol)	Mean conc. (n=3) in diluted PBMC cell supernatant (fmol/μl)	Peak Area %CV	Calculated conc. in undiluted PBMC cell supernatant (pmol/μl)
Glycine	<1000	<LOD	-	-
L-Alanine	<1000	<LOD	-	-
L-Serine	50	21	7.7	1.0
L-Proline	2.5	96	4.7	4.8
L-Valine	25	105	6.1	5.2
L-Threonine	1	97	7.3	4.9
L-Leucine	2.5	338	3.2	17
Isoleucine	2.5	329	1.5	16
L-Aspartic Acid	10	26	4.9	1.3
L-Lysine	5	305	2.2	15
L-Glutamic Acid	5	55	4.8	2.8
L-Methionine	1	3	6.2	0.17
L-Histidine	5	23	4.0	1.1
L-Phenylalanine	1	100	5.1	5.0
L-Arginine	2.5	220	5.4	11
L-Tyrosine	1	97	1.4	4.8
L-Cystine	1.25	36	6.8	1.8

結論

ここで説明した分析法により、17 種のアミノ酸の迅速で、頑健性の高い、高感度の定量が誘導体化無しに実施可能です。QTRAP® システム独自の MIDAS の機能を用いて、ターゲットの明瞭な同定が可能です。このメソッドを PBMC 細胞上清サンプル中のアミノ酸の定量に使用し、良好な結果が得られました。

Drug discovery using QTRAP technology





For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.

Drug Discovery and Development



治療用ペプチドであるエキセナチドのヒト血漿中濃度の定量化

複雑な混合物中で最高の選択性を得るための、SCIEX QTRAP® 5500 システムにおける、MRM³ 定量法

Yan Xu, John Paul Gutierrez, Tian-Sheng Lu, Haiqing Ding, Katie Piening, Erin Goodin, Xiuying Chen, Kristin Miller, Yong-Xi Li

Medpace Bioanalytical Laboratories, Cincinnati, OH

生物製剤が注目を集めるなか、新薬研究におけるタンパク質とペプチドの定量分析に LC-MS を使用することに大きな関心が寄せられています。エキセナチドは、1 型および 2 型糖尿病の治療用として承認された高分子のペプチド製剤です。このペプチドは、膵 β 細胞によるグルコース依存的なインスリン分泌を促進し、グルコース代謝とインスリン分泌の調整器として作用します。

近年、エキセナチドの血漿中濃度は、薬物動態研究に用いられる免疫酵素的アッセイ等のリガンド結合アッセイを利用して測定されていました。しかし、ある種の化合物は類似した生理化学的特徴を持つことがあるため、このようなタイプの分析法では特異性と選択性に問題があります。このため、血漿中のペプチド検出においてより高い選択性を確保できる MRM³ LCMS 法¹ を、SCIEX QTRAP 5500 システムを使用して評価しました。

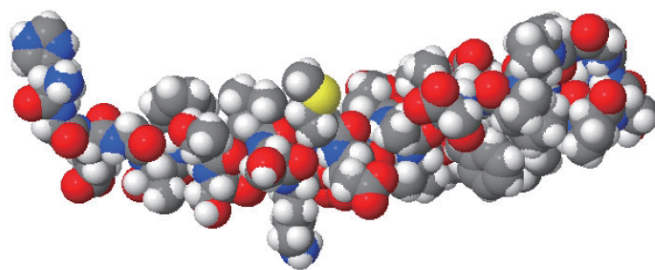


図1. エキセナチドの構造。エキセナチドは 39 個のアミノ酸からなる巨大なペプチド (分子量 4186.6 Da) であり、グルコース代謝とインスリン分泌の調整器として作用しています。

MRM³を用いた巨大なペプチド医薬品の定量の重要な特徴

- MRM³において複数のフラグメンテーション ステップによって、より高い選択性が達成されます。
- 改良された QTRAP 5500 システムは、より高速で、より感度の高い MRM³ 分析が可能です。
- 非常に複雑なマトリックスにおける検出限界は、MRM³ 分析を用いて、濃度曲線の下限で干渉を除去することによって、改善することができます。

- 従来のイオントラップ上の MS³ とは異なり、独自のハイブリッド式トリプル四重極-リニアイオントラップデザインを採用しているため、Q1 をプリカーサーイオンの選択 (ユニット分離) に、Q2 をトランスミッションモードにおける 1 次フラグメンテーション ステップに利用することができます。これにより、1 次プロダクトイオンの選択について高速化、選択性の向上、柔軟性の向上が可能です。これは、Q2 の 1 次フラグメンテーションと関連する低質量のカットオフがなく、より高い衝突エネルギーを使用可能なためです。

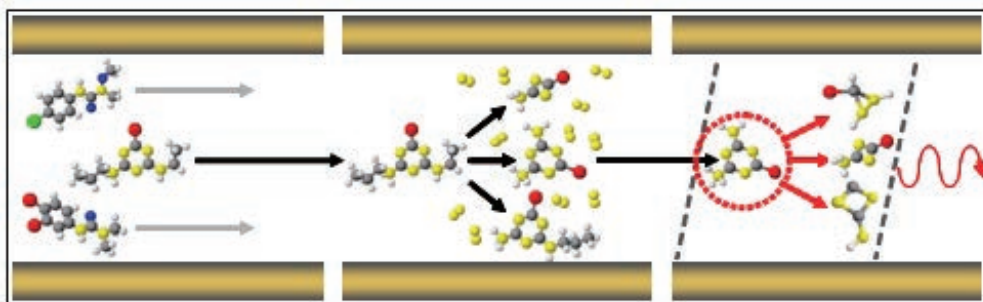


図2. LC-MS による定量分析のための MRM³。プリカーサーイオンは最初に Q1 四重極で選択され、次に Q2 コリジョンセル中でフラグメント化されます。プロダクトイオンはトラップされ、リニアイオントラップで単離され、その後、励起を受け、2 次フラグメンテーション ステップが実行されます。2 次プロダクトイオンがスキャンされ、検出器に向けて排出されます。

方法

サンプル調製: エキセナチドはヒト血漿から抽出し、窒素吹付濃縮装置の TurboVap で乾燥させ、再調製しました。全ステップで、pH と有機相を慎重に制御しました。

液体クロマトグラフィー:

- Shimadzu UFLC LC-20ACXR
- 逆相 C-18 2.0 x 30 mm, 5 μm
- 流速: 0.6 mL / min.
- 注入量 5 μL
- 移動相 A
 - 0.1% のギ酸を含む水
- 移動相 B
 - 0.1% のギ酸を含むメタノール
- Gradient 2 – 5 分間で 95% の移動相 B を送液

質量分析法: SCIEX QTRAP® 5500 システムで MRM³ アクイジション法を用い、LC-MS 分析を実行しました。Dynamic Fill Time (DFT) を用いた MS³ スキャンタイプで、トラップを充填し、10,000 Da/秒でスキャンしました。トラップ励起時間は 25 ms で、全サイクルタイムは 0.17 秒でした。MRM³ 分析に用いたトランジションイオンは、838 → 396 → 202 でした。

アッセイ開発の結果

エンハンスド MS (EMS) モードでは、m/z 838.3 における複数電荷のプリカーサーイオン $[M+5H]^{5+}$ が、1 次プリカーサーとして選択されました (図2, 上段)。この電荷状態がフラグメント化された場合、主要なプロダクトイオン m/z 396.4 が 2 次プリカーサーとして選択されました (エンハンスドプロダクトイオン (EPI) スキャン, 図3, 中段)。m/z 396.4 はリニアイオントラップ中でフラグメント化され、MS³ スペクトルが生じました (図3, 下段)。主要なフラグメントイオン m/z 202.2 が、MS³ 定量化のための、2 次プロダクトイオンとして選択されました。QTRAP 5500 システム上で実行される MRM³ 分析の原理は図1 に示しています。

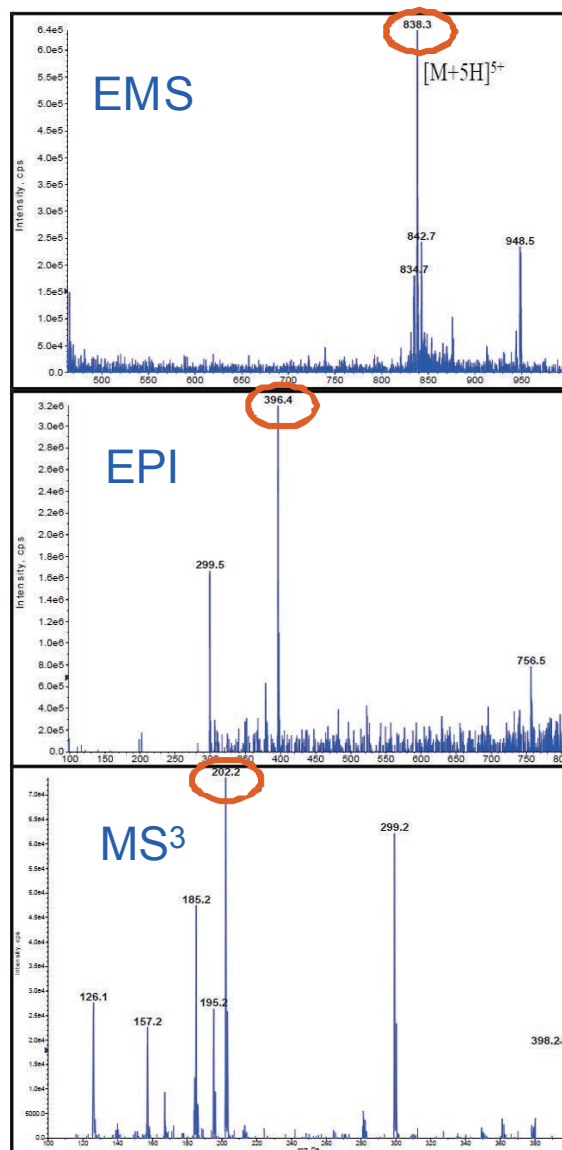


図3. MRM³アッセイのデザイン。 EMS スキャン (上段) を用いて主要なプリカーサーイオンを選択しました。EPI モード (中段) を用いて最も強度の高いフラグメントイオンを同定しました。MS³ フラグメンテーションを用いて抽出する最良の 2 次フラグメントを選択しました。

エキセナチドに関するアッセイ性能

MRM³ 分析を用いた結果、ヒト血漿抽出物におけるエキセナチド検出の選択性は顕著に改善しました。図4 は、MRM³ vs. 従来型 MRM 定量の比較を示しています。ベースラインは低下し、血漿マトリックス由来のクロマトグラフ上の干渉は、MRM³では完全に消失していました。QTRAP® 5500 システムの高速スキャンスピード (10 000 Da/秒) により、ターゲットのクロマトグラフ上のピークを通して十分なデータ数が得られ、定量の再現性は良好でした。

検出能力が改善した結果、表1 に示すような定量下限および 4 種の QC レベルにおける優れたアッセイ性能を得ることができました。6 回繰り返し時の真度と %CV から、MRM³ 法は、申請用に利用可能なバイオアナリシス アッセイに適した測定性能を提供できることを示しています。

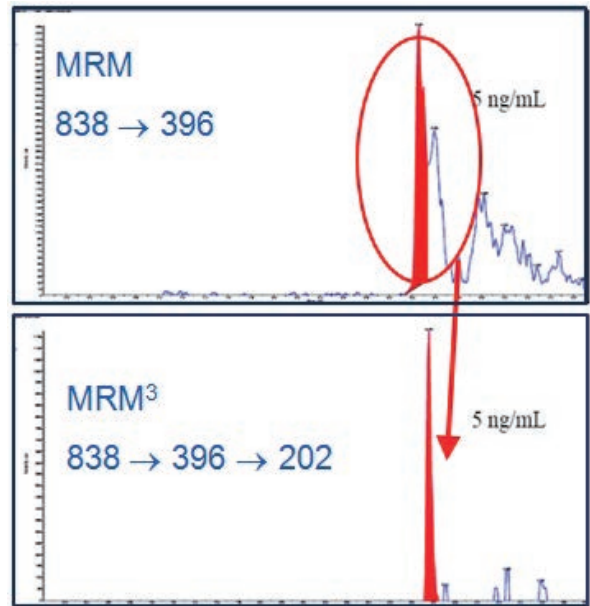


図4. MRM³ は、血漿中の検出感度を顕著に改善しました。クロマトグラフの干渉およびバックグラウンドノイズが消失することにより、血漿中のエキセナチドの定量限界を改善しています。

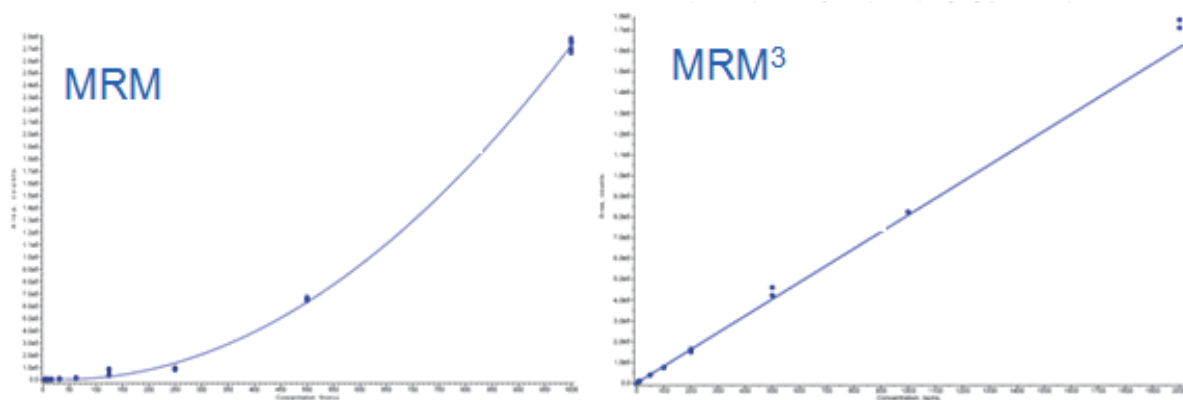


図5. MRM および MRM³ 分析を用いたヒト血漿中エキセナチドのキャリブレーション曲線。(左) 250-1000 ng/mL の MRM、(右) 5 - 1000 ng/mL の MRM³ は、顕著に良好な線形性を示しています ($R^2 = 0.996$)。

結論

- MRM³ 分析を用いることで、ヒト血漿中のエキセナチドのバイオアナリシスアッセイ法の開発に成功しました。
- MRM³ の選択性が向上したことで、ベースラインノイズとクロマトグラフ上の干渉が取り除かれ、その結果、従来の MRM と比べて優れた分析性能が得られました。
- MRM³ は、このターゲットで従来の MRM ではキャリブレーション範囲が 250-1000 ng/mL 未満であったのと比べ、5-2000 ng/mL の範囲であり、優れた線形性を持つ可能性を示しました。
- MRM³ アッセイの真度と再現性は、開発段階のバイオアナリシスアッセイの要件と同等でした。

参考文献

- MRM³ Quantitation for Highest Selectivity in Complex Matrices. AB SCIEX Technical Note, Publication 0920210-01.

表1. MRM³ アッセイの真度と再現性。品質管理サンプルで達した再現性から、MRM³ 分析が、妥当性が確認されたバイオアナリシスに適合することが示されています。

	LLOQ	LQC	MQC	MHQC	HQC
Conc (ng/mL)	5.00	15.0	50.0	800	1800
	5.14	15.9	46.4	779	1650
	4.32	16.9	47.2	767	1549
	5.65	12.0	41.7	821	1521
	4.54	13.5	43.7	729	1641
	3.69	17.1	50.0	658	1745
	4.22	17.4	45.3	751	1672
Mean	4.59	15.5	45.7	751	1630
SD	0.701	2.22	2.85	54.8	82.4
CV	15.3%	14.3%	6.2%	7.3%	5.1%
RE	-8.2%	3.2%	-8.6%	-6.1%	-9.5%

お客様の成功は私たちの成功です。 お客様の成功を心からサポートいたします。

お客様は、SCIEXの顧客として、世界トップクラスのサポートをご利用いただけます。
私たちは、お客様がどこにいても、信頼されるパートナーとして、質問に答え、
ソリューションを提供し、ラボの生産性を最大限に高めます。

当社のカスタマーサポートは、お客様が常に最新の状態を保てるように最新の製品情報、
ソフトウェア更新、修理の方法や手順へのアクセスを有しています。

お客様のご質問にお答えします。

詳しくは、sciex.com/biologicsをご覧くださいか、
www.sciex.com/contactusにてお近くの顧問担当者をお探してください。

Answers for Science. Knowledge for Life.™

**本製品は研究用에만使用できます。
診断目的及びその手続き上での使用はできません。**

AB Sciex is doing business as SCIEX.

© 2017 AB Sciex. For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-3320-A MKT 20- 512 A



株式会社エービー・サイエックス

本社：〒140-0001 東京都品川区北品川4-7-35
御殿山トラストタワー21F
TEL: 0120-318-551 FAX: 0120-318-040

大阪：〒531-0075 大阪府大阪市北区豊崎3-19-3
ピアスタワー

URL : <http://www.sciex.jp> Email : jp_sales@sciex.com