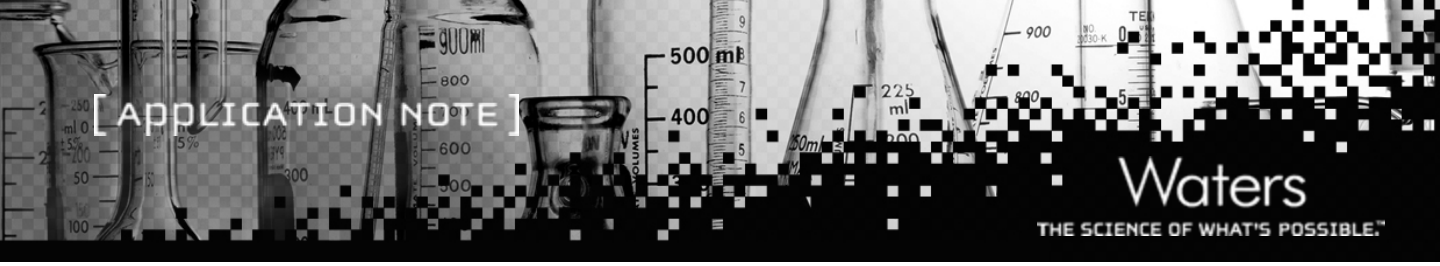

No. 720001168J

ACQUITY UPLC®/MS/MSを利用した迅速生体試料分析

概要

タンデム四重極型MSを装備したACQUITY UPLC®は、生体試料の分析に最適です。UPLC®は、HPLCで確立された理論を基礎とし、スピード、感度、分離に対して革新的な一歩を踏み出しました。ACQUITY UPLC®は、粒子径2μm以下というカラム充填剤のアドバンテージを最大限に利用するため、システムボリュームを可能な限り低く抑え、システム全体が再設計されております。

UPLC®で得られる非常にシャープなピークに対して信頼性のあるデータを得るためには、十分なデータポイントを確保することが重要です。その観点から、タンデム四重極型MS/MS検出器Quattro Premier™は、ハイスピードMRM分析を達成すべく設計されております[1]。UPLC®とQuattro Premier™の組み合わせによって、感度及び精度を妥協することなく迅速な定量分析を達成することが可能です。

本アプリケーションでは、4種類の化合物を用いて、UPLC®とQuattro Premier™によって得られるスピード及び感度についてその一例をご紹介いたします。

LC条件

Instrument:	ACQUITY UPLC System		
Column:	ACQUITY UPLC BEH C_{18} Column, 2.1 x 50 mm, 1.7 µm		
Flow Rate:	0.6 mL/min.		
Mobile Phase:	10 mM NH_4OAc at pH 5.0 A: 10% ACN B: 80/20 ACN/MeOH		
Inj. Volume:	5 µL		
Gradient:	Time (min.)	%A	Curve
	0.0	95	–
	0.8	5	6
	1.0	5	6
	3.0	95	1

MS条件

Instrument:	Quattro Premier Mass Spectrometer
Capillary Voltage:	0.5 kV
Source Temp:	130 °C
Desolvation Temp:	400 °C
Desolvation Gas:	800 L/Hr
Cone Gas:	50 L/Hr
Data Collection:	ESI+ MRM
Dwell Time:	10 ms
Inter-channel Delay:	10 ms

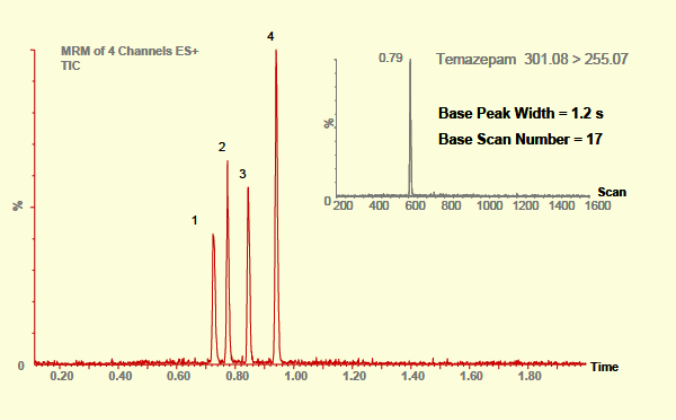

図1 試料溶液のTIC
(four channels per collection cycle)
1. Alprazolam (309.0>281.0)
2. Temazepam (301.0>255.0)
3. Diazepam (285.0>193.0)
4. Prazepam (325.1>271.1)

結果及び考察

図1には4種類の成分がベースライン分離されたTIC (Total Ion Chromatogram)を、図2には各化合物に対する個々のMRMクロマトグラムをお示し致します。Temazepamについては(LCピーク幅1.2秒間)17データポイントを得ることができました。1ピークあたりのデータポイントを15以上にしないと、ピーク形状が崩れたり、特にピークトップをはずしてしまう可能性が高くなるため、高速MRMは有効です。今回の分析例では、4つの化合物を同時測定してもトータルで70msと非常に短時間で、1ピークあたり十分なデータポイントを得ることができました。

5回の繰り返し注入により得られた各化合物の直線性の範囲は、0.02～1000 ng/mL (Alprazolam)、0.05～1000 ng/mL (Diazepam、Prazepam及びTemazepam)(図3)、また、定量分析結果については表1にお示し致します。

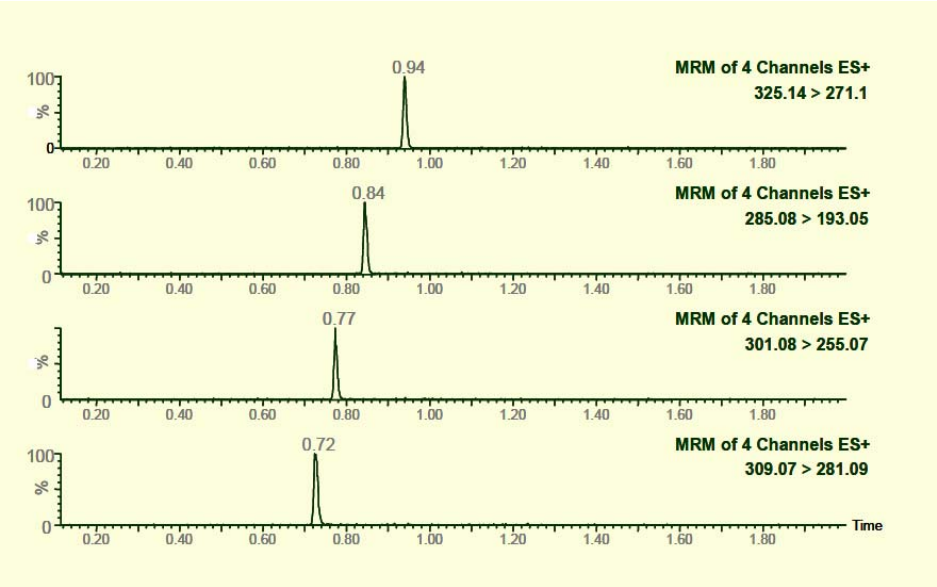

図2　各試料のMRMクロマトグラム

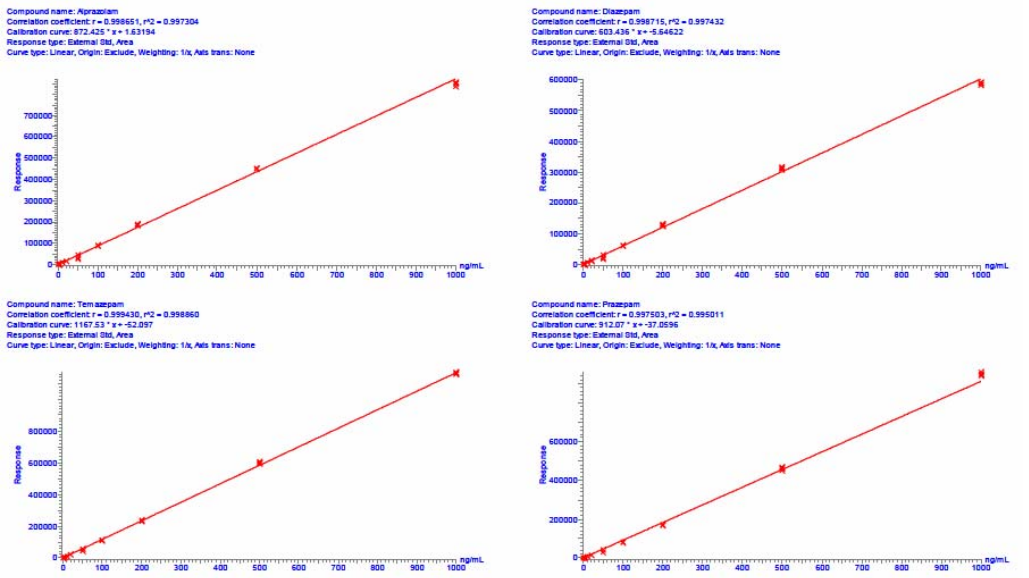

図3　各試料の直線性

表1　定量分析概要

Compound Name	MRM Transition	Cone Voltage (V)	Collision Energy (V)	Linear Range (ng/mL)	* R^2
Alprazolam	309.0 > 281.0	43	27	0.02 - 1000	0.997
Diazepam	285.1 > 193.0	36	32	0.05 - 1000	0.997
Prazepam	325.1 > 271.1	36	24	0.05 - 1000	0.995
Temazepam	301.1 > 255.0	26	20	0.05 - 1000	0.999

* *R^2 was determined based on 15 point calibration for Alprazolam and 14 points calibration for Diazepam, Prazepam and Temazepam. Five replicates were made for each concentration point.*

まとめ

UPLC®とQuattro Premier™を用いた4種類の化合物の混合試料についてのMRM分析例をお示しいたしました。UPLC®によって1.2秒という非常にシャープなピークを得ることができますが、Quattro Premier™の高速MRMにより、それぞれのピークに対して約17データポイントを得ることができ、正確なピーク同定を行うことができました。従って、本システムは複雑なマトリックスの試料分析に最適です[2]。
また、今回分析を行った4種類の化合物については、0.02～1000 ng/mL (Alprazolam)、0.05～1000 ng/mL (Diazepam、Prazepam及びTemazepam)の範囲で直線性を示しました。
UPLC®/MS/MSによって、ハイスループットで高感度な分析を行うことができました。

参考文献

1. N. Kirchner “Ion Processing: Control and Analysis”, US Patent No. 5,206,506, April 27th, 1993
2. K. Yu, et al. “HT Quantification Analysis for a 5 Drug Mixture in Rat Plasma – A Comparison of HPLC/MS/MS and UPLC/MS/MS”, Presented at the 52nd ASMS Conference, Nashville, TN, June 2004.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™
日本ウォーターズ株式会社　www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第５小池ビル　TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 カトキチ新大阪ビル11F　TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム　東京　大阪
テクニカルセンター　東京　大阪　名古屋　福岡　静岡