Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQDシステムを用いた薬毒物スクリーニング

Mark Roberts and Michelle Wood
Waters Corporation, MS Technologies Centre, Manchester, UK

アプリケーションの利点

最新機器 ACQUITY UPLC® I-Class/Xevo® TQD を用いた相補的な 2 種の分析アプローチによる包括的な薬毒物スクリーニング

- 各化合物 2 トランジッションをモニターするターゲット MRM メソッドを用いた検出頻度の高い 178 化合物の高選択 / 高感度分析
- 950 化合物以上の薬毒物関連化合物スペクトルライブラリーを用いた MS フルスキャン分析

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC I-Class System
Xevo TQD タンデム四重極型質量分析計
RADAR ™ Technology
PIC® Scannning
ACQUITY UPLC HSS C_{18} カラム
Waters® トータルリカバリーバイアル

キーワード

薬毒物分析、ターゲット分析、ノンターゲットスクリーニング、薬毒物、UPLC®/MS/MS

はじめに

薬毒物分析は、生前、死後検体など複雑な生体試料中の薬毒物の広範囲なスクリーニングが要求されます。以前報告しましたアプリケーションノートでは ACQUITY UPLC/ACQUITY® TQD システムを用いた 2 種の相補的なスクリーニング分析についてご紹介いたしました。[1-3] このスクリーニング分析ではフルスキャンデータ取り込みと、ターゲット MRM 高感度分析を相補的に用いることで効率的に薬毒物分析を実施することができます。

全世界の 100 以上の研究施設で、この相補的なスクリーニング分析手法を用いた薬毒物分析が行われています。中には LC/MS の分析経験が少ない、もしくは初めての研究施設も含まれています。現在ウォーターズでは、機能、性能共に向上した次世代の LC/MS システムを発売しています。本アプリケーションノートでは、実証済みの 2 種のスクリーニング分析法を最新機種 ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQD を用いて実施、評価いたしましたのでご紹介いたします。

本アプリケーションノートでは、従来の薬毒物スクリーニング分析手法であるフルスキャン及び MRM メソッド[1-3] を最新機種 ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQD に適用し、その有効性について検証しました。

実験

サンプル詳細

標準試料は Sigma-Aldrich® (Poole,Dorset,UK) 及び LGC Standards(Teddington,Surrey,UK) から粉末、もしくは 1 mg/mL 溶液として入手しました。ギ酸アンモニウムとギ酸は Sigma-Aldrich より、アセトニトリルは Greyhound Chromatography(Brikenhead,UK) より購入しました。実サンプルの尿はスクリーニングを実施している共同研究ラボからご提供いただきました。

尿サンプルは液 / 液抽出後、Waters トータルリカバリーバイアルに分注し、最新システム ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQD 及び従来システムである ACQUITY UPLC / TQD を用いて分析しました。

UPLC 条件

システム：	ACQUITY UPLC I-Class
カラム：	ACQUITY UPLC HSS C_{18} カラム 2.1 x 150 mm、1.8 µm 製品番号 186003534
カラム温度：	50℃
サンプル温度：	10℃
注入量：	5 µL（MRM） 10 µL（フルスキャン）
ニードル洗浄溶媒：	5 mM ギ酸アンモニウム 水溶液（pH 3.0）
パージ溶媒：	5 mM ギ酸アンモニウム 水溶液（pH 3.0）
流速：	400 µL/min
移動相 A：	5 mM ギ酸アンモニウム 水溶液（pH 3.0）
移動相 B：	0.1% ギ酸含有アセトニトリル
グラジエント：	移動相 B：13% から 95% の リニアグラジエント （15 分間）を実施

分析条件は前回報告した ACQUITY UPLC 条件[1,2] と同一

MS 条件

質量分析計：	Xevo TQD
イオン化モード：	ESI ポジティブ （ESI ネガティブ（フルスキャン））
キャピラリー電圧：	3.0 kV
コーン電圧：	メソッドで規定
コリジョンエネルギー：	メソッドで規定
脱溶媒温度：	400℃
脱溶媒ガス：	800 L/h
コーンガス：	20 L/h
取り込みモード：	Multiple Reaction Monitoring （MRM）及びフルスキャン
データ管理：	MassLynx® TargetLynx™ アプリケーションマネージャ ChromaLynx™ アプリケーションマネージャ

分析条件は前回報告した ACQUITY TQD 条件[1,2] と同一

革新的な技術

フロースルーニードル（FTN）[5] 搭載 ACQUITY UPLC I-Class システム（図 1）は、サンプルがニードル部分のみと接触し、UPLC カラムへ直接注入するフローパスデザインを導入しています。サンプルがループに接触しないため、キャリーオーバが最小限に抑えられ、結果の信頼性が向上します。更にシステム容量を 100 µL 以下に抑えることでサンプル拡散が低減され、ピーク形状が改善します。アクティブプレヒーター搭載カラムヒーターはグラジエントディレイとカラムのバンド拡散を最小限に抑えます。

RADAR 及び PIC 機能を搭載した最新の Xevo TQD タンデム四重極型質量分析計[6]（図 1）は、薬毒物分析において効率的なデータ取得を実現します。RADAR 機能を用いることで MRM データ取り込み時にメソッド開発やトラブルシューティングに有効なフルスキャンデータを同時に取得することが可能です。Product Ion Confirmation scanning (PICs) 機能は MRM モードにおいて、ピークが検出された場合に自動でプロダクトイオンスキャンを実行し、分析結果に更なる同定情報を提供します。

図 1　ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQD システム

結果および考察

MRM及びフルスキャンMS技術の概要

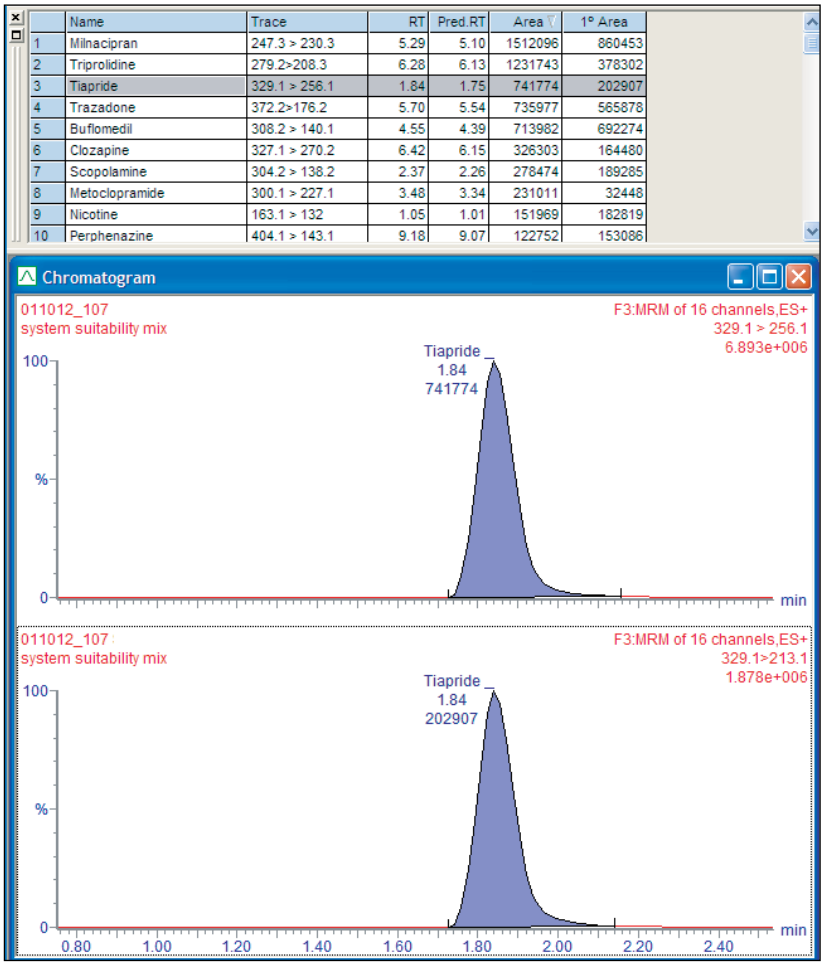
検出頻度の高い 178 化合物を含むオリジナルの MRM メソッドでは、ピークの検出 / 同定に必要な十分なデータポイントを効率的に確保するために、溶出順序に従って 30 のタイムウィンドウを設定しています。各タイムウィンドウの長さは最初の化合物の溶出時間の 0.5 分前及び最後の化合物の溶出時間の 0.5 分後に設定しています。今回は ACQUITY UPLC システムを用いたオリジナルの MRM タイムウィンドウを ACQUITY UPLC I-Class システムで適用できるかを検証しました。

オリジナルのフルスキャンメソッドは異なるコーン電圧（+20 V、+35 V、+50 V、+65 V、+80 V、+95 V、-20 V）を用いてデータを取得し、マススペクトルの網羅的な情報を得ることができます。取得したデータは ChromaLynx アプリケーションマネージャを用いて 950 化合物以上登録されているライブラリーと自動照合を実施します。

本アプリケーションノートでは ACQUITY TQD で取得したオリジナルのスペクトルライブラリーと Xevo TQD で得られるスペクトルとの互換性を検証しました。

MRM及びフルスキャン取り込みモードを用いたシステム適合性確認用スタンダードの分析

実サンプルデータ取得前に分析システムの性能を検証することは、システムの管理を行う上で重要です。今回は幅広い極性範囲を持つ化合物を混合したシステム適合性確認用スタンダード（SSM）を分析することで、システム性能を確認しました。



	Name	Trace	RT	Pred.RT	Area	1° Area
1	Milnacipran	247.3 > 230.3	5.29	5.10	1512096	860453
2	Triprolidine	279.2>208.3	6.28	6.13	1231743	378302
3	Tiapride	329.1 > 256.1	1.84	1.75	741774	202907
4	Trazadone	372.2>176.2	5.70	5.54	735977	565878
5	Buflomedil	308.2 > 140.1	4.55	4.39	713982	692274
6	Clozapine	327.1 > 270.2	6.42	6.15	326303	164480
7	Scopolamine	304.2 > 138.2	2.37	2.26	278474	189285
8	Metoclopramide	300.1 > 227.1	3.48	3.34	231011	32448
9	Nicotine	163.1 > 132	1.05	1.01	151969	182819
10	Perphenazine	404.1 > 143.1	9.18	9.07	122752	153086

図 2 ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQD システムを用いた一般的な SSM 分析結果（TargetLynx ブラウザー画面）。SSM に含まれる 10 成分全てがオリジナル MRM メソッドの予測保持時間 ±0.3 分で溶出。オリジナルのクロマトグラフィーメソッドを ACQUITY UPLC I-Class システムに適用可能であることが実証されました。

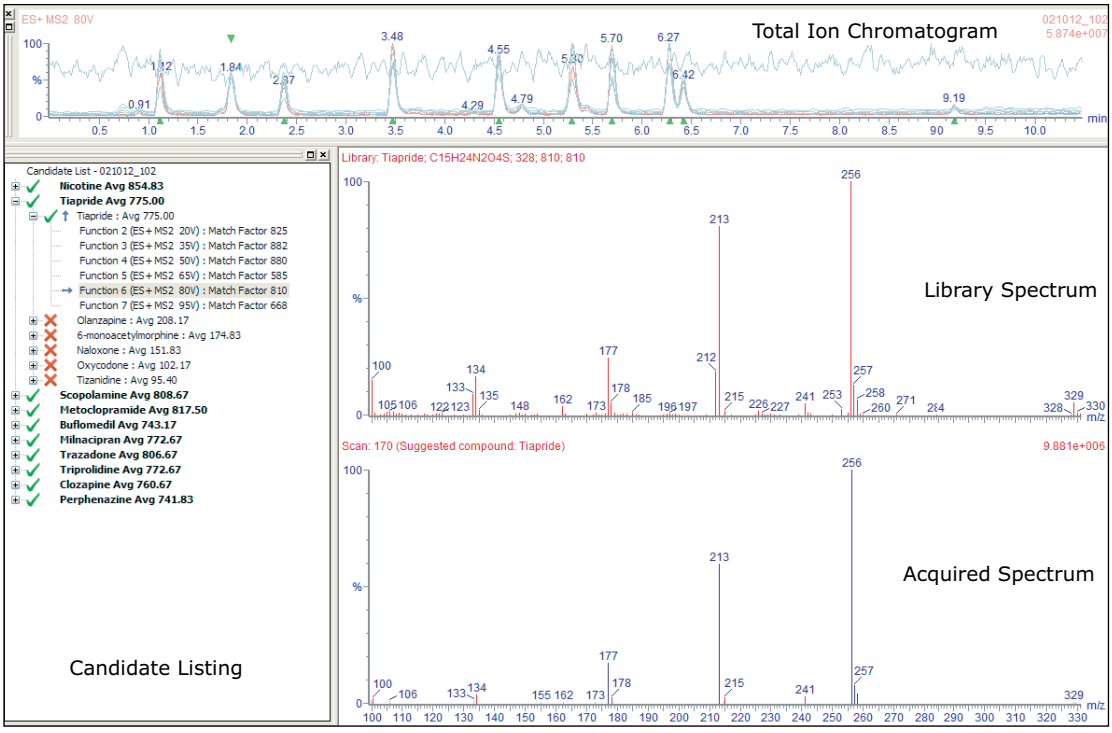


図 3　SSM のフルスキャンスクリーニング分析結果（ChromaLynx ブラウザー画面）。全 10 成分がオリジナルのスペクトルライブラリーを用いた検索において、高いマッチ率で検出されました。

尿サンプルを用いたターゲットMRMスクリーニング分析

実サンプルとして尿を用いた、薬毒物スクリーニング分析結果を表 1 に示しました。検出された全ての薬毒物の保持時間は予測保持時間に対して ±0.19 分以内であり、オリジナルのクロマトグラフィーメソッドが ACQUITY UPLC I-Class システムを用いた実サンプル分析に対しても適用可能であることが実証されました。

生体サンプル中の薬物の代謝成分同定は、検出成分の拡張、薬物同定の付加情報、データ解釈の補足の点において非常に有用です。今回のサンプルでは、両システムにおいて methadone とその代謝物の EDDP、cocaine とその代謝物の benzoylecgonine が検出されました。図 4 に ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQD システムを用いた MRM 分析結果の TargetLynx ブラウザーを表示しました。最新のシステムを用いることで感度が向上し、従来システムでは検出が難しかった成分が検出されています。また、ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQD システムでは ACQUITY UPLC I-Class のピーク拡散を最小限に抑えたシステム設計によりピーク感度が向上したため、全化合物において従来システムと比較して高い面積値が得られました。

		ACQUITY UPLC/TQD (original configuration)		ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQD (new configuration)	
化合物名	**予測 RT**	**検出 RT**	**面積値**	**検出 RT**	**面積値**
Methadone	8.61	8.77	434734	8.80	463948
EDDP	7.46	7.67	145310	7.65	149118
Paracetamol	1.50	1.58	5703	1.55	55966
Cocaine	4.61	4.80	11644	4.75	11702
Benzoylecgonine	2.97	3.13	10500	3.09	11261
Nicotine	1.01	1.02	3284	1.05	6143
Caffeine	2.10	2.19	1499	2.16	3866
Temazepam	9.34	–	–	9.46	3683
Oxazepam	8.07	8.17	1853	8.18	2528
Theophylline	1.46	–	–	1.45	2255
Nordiazepam	9.14	–	–	9.31	1297

表 1　両システムを用いた尿サンプルの MRM ターゲットスクリーニング分析結果

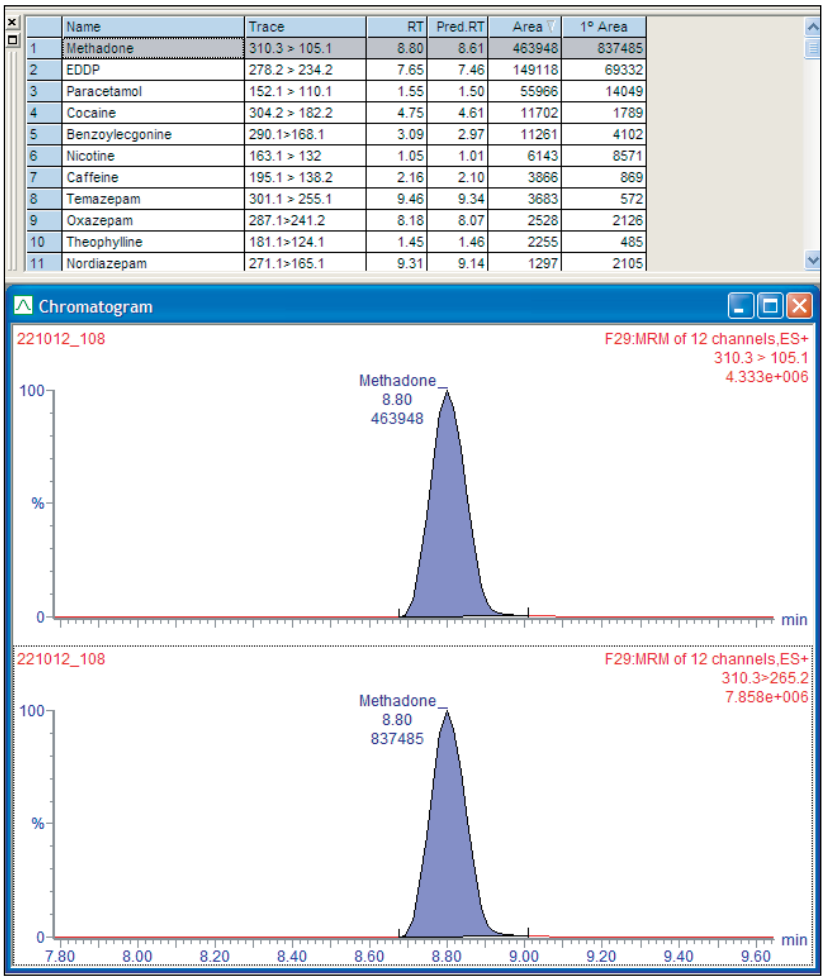


図 4　尿サンプル中 methadone の TargetLynx ブラウザーによる分析結果画面

尿サンプルを用いた薬毒物フルスキャン分析

薬毒物分析において、フルスキャン分析を行う最大の利点は非常に多くの成分を同時にスクリーニング可能な点です（スクリーニング成分数はスペクトルライブラリー数にのみ依存）。フルスキャン分析は検出頻度の高い化合物に限定したターゲット MRM 分析と相補的に実施します。現在ウォーターズでは 950 以上の化合物のスペクトルライブラリーを提供しております。また専用解析ソフトウェア ChromaLynx アプリケーションマネージャでは簡便にライブラリーの追加や新規作成が可能であり、また複数のライブラリーを用いた検索も実行できます。フルスキャン分析のもうひとつの利点として、ターゲットを絞った取り込み手法ではないため、新たな成分に対して過去のデータを遡って再解析できる点があげられます。

図 5 に ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQD システムを用いた尿サンプルのフルスキャン分析結果を表示しました。サンプル中に mirtazapine とその代謝物の mirtazapine N-desmethyl が検出されています。ChromaLynx ブラウザー上で新規システムを用いた尿サンプル中の mirtazapine N-desmethyl スペクトルがオリジナルの ACQUITY TQD スペクトルライブラリーと非常に高いマッチ率を示していることがわかります。今回の評価で、ACQUITY TQD スペクトルライブラリーを Xevo TQD システムで適用可能なことが分かりました。

今回のフルスキャン分析では xylometazoline も検出されました。この鼻粘膜充血除去薬は検出頻度の観点からターゲット MRM 分析メソッドには含まれていない化合物です。

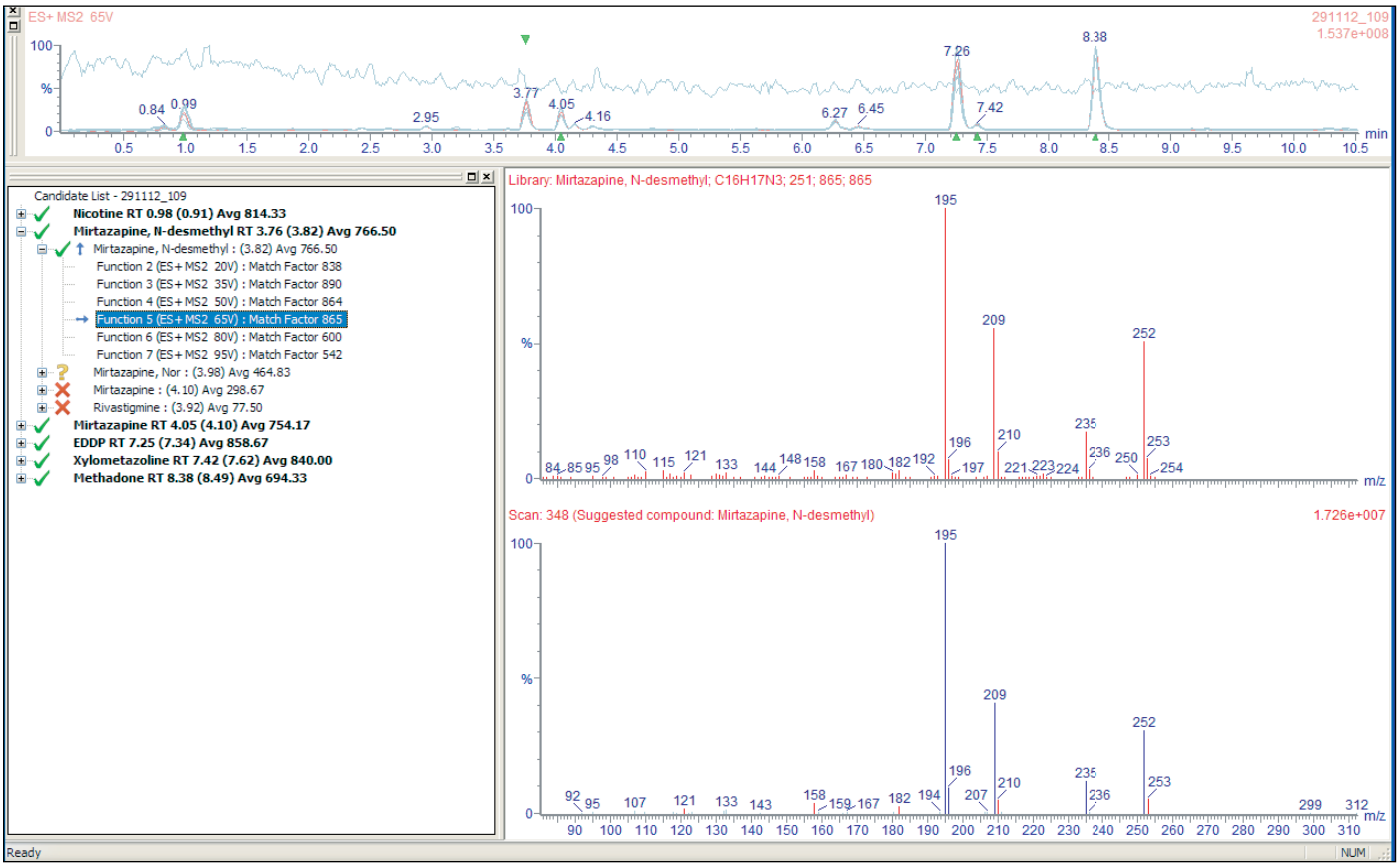


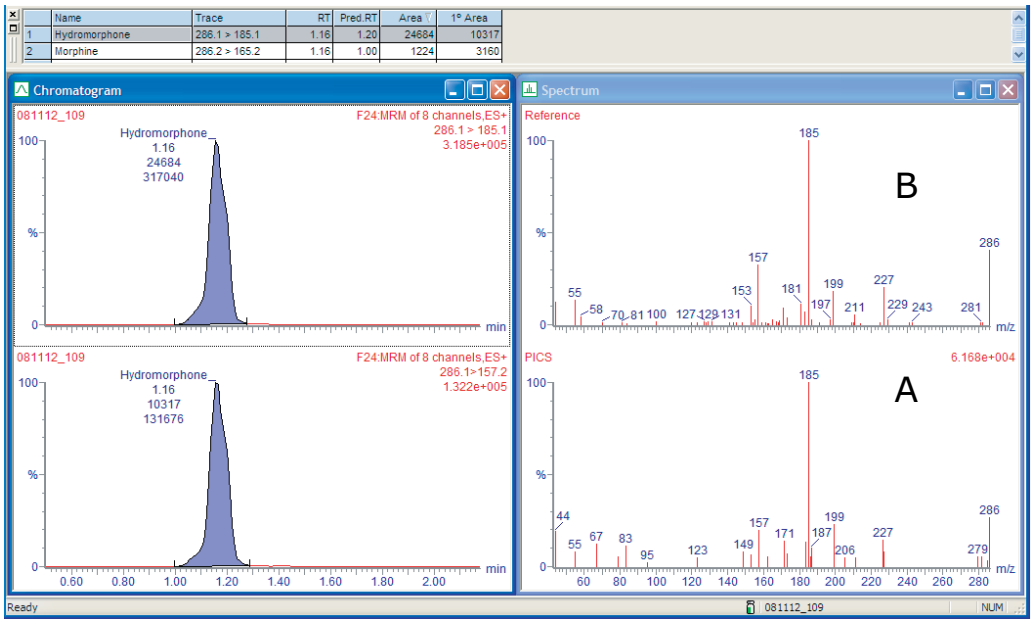
図 5　尿サンプル中の mirtazapine の代謝物である mirtazapine N-desmethyl 検出結果（ChromaLyn ブラウザー画面）

PICsによるhydromorphoneとmorphineの識別

Xevo TQD の新機能である MRM 分析時のトリガーを用いた Product Ion Confirmation scanning(PICs) 取り込みは、プロダクトイオンのフラグメントパターンを用いた類似化合物の識別に非常に有効です。

図 6 に MRM スクリーニングメソッドを用いた hydromorphone の分析例を表示しました。hydromorphone は hydromorphone だけでなく morphine の MRM トランジッションにおいても検出されます。Hydromorphone と morphine は異性体であり、いくつか共通した MRM トランジッションを持ち、本アプリケーションノートの分析法では保持時間が 0.2 分の差で溶出されます。このような類似した化合物の場合、PIC スキャン機能を用いてデータ取得を行うことで、類似化合物の識別のための追加情報を得ることができます。

今回の例では、PICs で得られたスペクトルデータが、morphine より hydromorphone のスペクトルデータにより一致していることが分かります。TargetLynx ブラウザー上では、実測データを hydromorphone や morphine のリファレンスデータと視覚的に比較することができます。



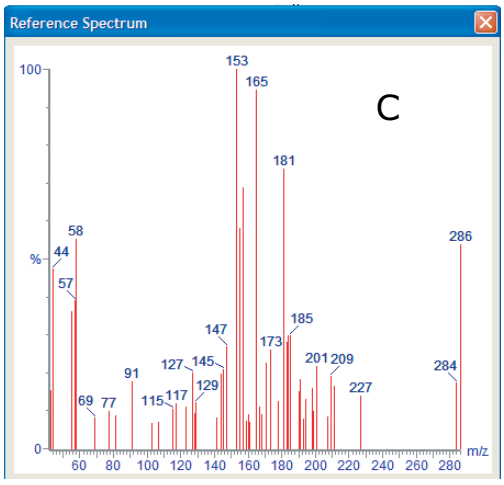


図 6　TargetLynx ブラウザー上で、測定サンプルの hydromorphone スペクトル (A) と 200 ng/mL の hydromorphone のリファレンスプロダクトイオンスペクトル (B)、morphine のプロダクトイオンスペクトル (C) と比較が可能です。

RADAR機能を用いた追加情報の有用性

フルスキャン分析を行った尿サンプルについてRADAR機能を用いたMRMターゲットスクリーニングメソッドで分析しました。MRMターゲットスクリーニングメソッドにRADAR機能を追加することで、MRM分析時にフルスキャンデータを取り込み、MRMメソッドに登録されていない化合物を検出することが可能です。今回のRADARによるフルスキャン分析では、MRMメソッドには登録されていないため検出することのできない、mirtazapine N-desmethyl、desmethyl citalopram、xylometazolineが3.79、6.47、7.42分に検出されました。図8に代謝物である2成分のコーン電圧30 Vのスペクトル結果を表示しました。RADAR機能によって得られるこの付加情報は、特に複雑な生体サンプル中において、一般的なターゲットスクリーニング分析では検出することのできない未知化合物の存在を確認することができるだけでなく、メソッド開発及びバリデーション時においては、共溶出化合物の同定や問題の検証のためのトラブルシューティングにも活用することができるため非常に有効であると言えます。

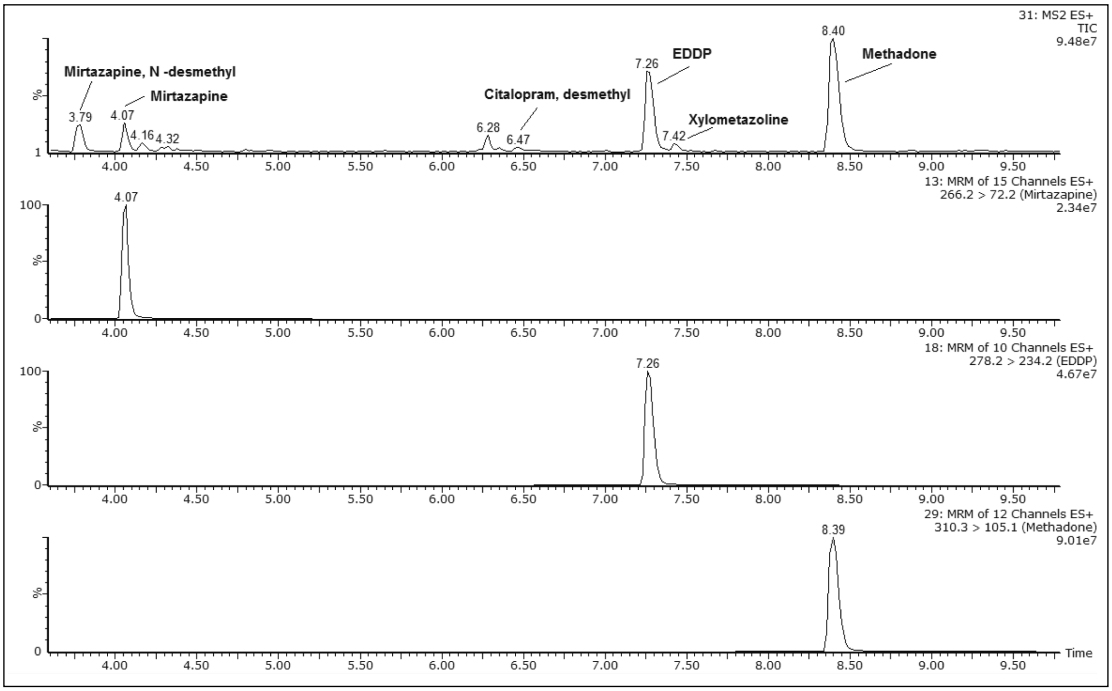


図7　RADAR機能を用いてMRMデータと同時に取得した加水分解尿サンプルのフルスキャンデータ（上図）。MRMメソッドには登録されていないmirtazapine N-desmethyl（3.79分）、desmethyl citalopram（6.47分）、xylometazoline（7.42分）が検出されました。

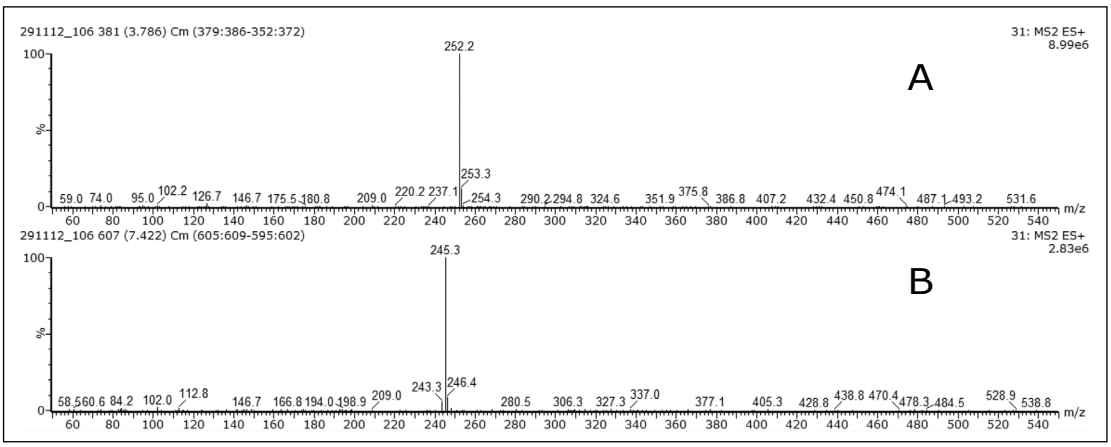


図8　RADAR機能を用いて取得したmirtazapine N-desmethyl（3.79分）（A）とxylometazoline（7.42分）（B）のフルスキャンマススペクトル（コーン電圧30 V）。

まとめ

薬毒物スクリーニングメソッドを最新の UPLC/MS システムに問題なく移管することができ、最新の機能を薬毒物分析に適用することが可能となりました。ピーク拡散とシステム容量を最小限に抑えた ACQUITY UPLC I-Class システムは MS を検出器に用いた分析において感度が向上します。新機能である RADAR と PICs を有した Xevo TQD 質量分析計は分析結果に更に多くの情報を提供することが可能です。

薬毒物スクリーニング分析専用プロジェクトには分析と解析に必要な全てのメソッドが含まれています。このプロジェクトには多くの薬毒物の分析メソッドが準備されており、最小限のトレーニングで薬毒物分析を行っていただけます。

またこのメソッドは薬毒物分析専用に分析者の方々の要求を元に開発したしました。データベースは化合物を簡便に追加登録することができ、分析メソッドを広範囲の化合物に適応していただくことができます。

参考文献

1. Roberts M, Lee R, Wood M. Targeted MRM Screening for Toxicants in Biological Samples by UPLC/MS/MS. Waters Application Note 720002749EN.
2. Lee R, Roberts M, Paccou A, Wood M..Development of a New UPLC/MS Method for Systematic Toxicological Analysis. Waters Application Note 72002905EN.
3. Humbert L, Grisel F, Richeval C, Lhermitte M. Screening of Xenobiotics by Ultra-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Using In-Source Fragmentation at Increasing Cone Voltages: Library Constitution and an Evaluation of Spectral Stability. *Journal of Analytical Toxicology*. 2010; Vol. 34.
4. Rosano TG, Wood M, Swift TA. Postmortem Drug Screening by Non-Targeted and Targeted UltraPerformance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technology. *Journal of Analytical Toxicology*. 2011; Vol. 35.
5. ACQUITY UPLC I-Class System Brochure. Waters Brochure 720003290EN.
6. Xevo TQD Brochure. Waters Brochure 720003953EN.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

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サムティ新大阪フロントビル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 札幌

Waters、ACQUITY UPLC、ACQUITY、UPLC、PIC、Xevo および MassLynx は Waters Corporation の登録商標です。
RADAR、TargetLynx、ChromaLynx および The Science of What's Possible は Waters Corporation の商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2013 Waters Corporation. Printed in Japan.

2013年6月 720004602JA PDF