

LC/TOFMS Application Notes: TOFJ001

LC/TOFMSを用いたIn-Vitro 代謝物の 精密質量測定と定量分析

概要

四重極型LC/MS/MSのMultiple Reaction Monitoring (MRM)は複雑なマトリク ス中の目的化合物を高感度に定量する手法として優れており、広く使用され ています。しかしながらターゲット化合物を分析する手法であるため、未知化 合物の定性情報を得ることはできません。

例えば肝ミクロゾームを用いたADMEスクリーニングでは同一サンプルから、生成代謝物構造情報(定性)と、未変化体のクリアランス情報(定量)とが得られるはずです。しかしながら従来法ではしばしば2回に分けてのインキュベーション、分析が行われています。

ここではモデル化合物をヒト肝ミクロゾームとインキュベーションし、LC-oa-TOFMSを用いて生成代謝物の精密質量と未変化体のクリアランス情報を同時 に得ることを試みました。

LCT Premier LC/oa-TOFMSの特徴

I :Schematic Diagram of LCT Premier™



WとVのフライトパス

図1 にLCT Premier[™]の模式図を示します。

Wモードで分解能10,000FWHM、Vモードで分解能5,000FWHMが得られます。

分析条件

モデル化合物

verapamil, clozapine, glyburide, dextromethorphan, ketoconazole インキュベーション ヒト肝ミクロゾーム S9 37 、振とう高温水槽使用 50-100 mM Tris (pH7.4) 以下を含むNADNPH 2%NaHCO3溶液 0.5 mg/mL b-NADP 2.0 mg/mL Glucose-6-phosphate 1.5 units/mL Glucose-6-phosphate dehydrogenase インキュベーション化合物濃度: 10 mg/mL,等量のMeCNでクエンチ 装置 Waters LCT Premier[™] oa-TOF質量分析計 Waters 2795 セパレーションモジュール HPLC条件 カラム : Waters Symmetry® C18, 2.1 x 100 mm, 3 mm 移動相:A 0.1%ギ酸 B 0.1%ギ酸/MeCN グラジェント: 2%B for 0.5 min, 2 to 80%B in 19.5 min and hold MS条件 イオン化モード: ESI+ データ取り込み:1スペクトル/秒 分解能:5000FWHM 標準物質: Leucine enkephalin (m/z556.2771)







簡便に精密質量測定が可能なLockSpray™ 図 2 に精密質量測定用標準物質を分析 サンプルとは独立して導入することのでき るLockSpray™インターフェイスの模式図を 示します。

分析サンプルのマススペクトルは on-the-fly で質量校正・記録されるため、簡便に精密 質量情報を得ることができます。

2: Schematic of LockSpray



23: Schematic representation of DRE



Z Focus Lens Reduces the Ion Transmission by approx 50 times

24: Performance example of DRE



Mass Accuracy Sulfadimethoxine 0.5 - 10000ng/mL



新技術DREで広いダイナミックレンジ

図 3 にDREの模式図を、図 4 に性能例を 示します。

DREオンのモードでは、フライトチューブ中 イオンプッシャー手前のZフォーカスレンズ でイオン透過率を制御し、高感度モードと その約1/50の低感度モードを高速に切り 替えながら交互に測定を行います。高感度 モードのマススペクトル中、飽和しているイ オンはすべて、低感度モードのイオンの強 度を増幅したもので置き換えられて記録さ れます。そのため図4に示したように、ダイ ナミックレンジが拡大し、高濃度のサンプル でも質量精度のよいマススペクトルを得るこ とが可能です。 図5にVerapamilとその代謝物のマスクロマ トグラムを、図6にそれらの構造を示しま す。9種類の代謝物とそれらの異性体が検 出されました。質量の抽出ウィンドウを 0.1Daにすることでマトリックスの影響を受け ず、S/Nのよいマスクロマトグラムが得らて います。

25a :Extracted mass chromatograms for verapamil metabolites



25b :Extracted mass chromatograms for verapamil metabolites



26 :Proposed structures for detected metabolites of Verapamil



結果



インキュベーション15分に得られた代謝物 m/z 277.1917から元素組成候補を導き出 した結果を示します。Verapamilが分解後 脱メチルした代謝物Cの元素組成がランク 1となっています。

インキュベーション15分、30分、60分に得ら れた代謝物Cのマススペクトルを示します。 MH+の理論値(m/z 277.1916)に対し、0.5 ppm 以内の精度が得られました。

Verapamilを含むモデル化合物5種(未変化 体)の減衰を示します。



本社: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

27 :Elemental compositions for m/z 277.1917 at 30 min



28 :Mass spectra of metabolite C at 15 min, 30 min and 60 min



29 :Clearance of model compounds in vitro



まとめ

精密質量を広いダイナミックレンジで測定できるLC-oa-TOFMSを用いること で、代謝物の構造情報およびそれらの生成量推移、未変化体のクリアランス 情報が同一サンプルから同時に得られる可能性が示唆されました。