

Application News

探針エレクトロスプレーイオン化キット DPiMS™ QT
高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS™-9030

DPiMS QTおよびNexera™とLCMS-9030を用いた血中薬物の定性／定量分析

井本 英志、村田 匡

ユーザーベネフィット

- ◆ DPiMS QTによる定性スクリーニングは前処理時間約5分、測定時間約0.5分で実施できます。
- ◆ 簡便に超高速液体クロマトグラフNexeraへの切り替えが可能です。
- ◆ 一度データを取得することで、サンプルを保管することなく、後から対象化合物の拡張が可能です。

はじめに

法医学や科学捜査における薬物、毒物の分析では、検体を採取した後、短時間で成分の同定および定量結果を報告する必要があり、関連成分を漏れなく定性・定量できる簡潔なワークフローの構築が求められています。

本アプリケーションでは、四重極飛行時間型質量分析計 LCMS-9030と探針エレクトロスプレーイオン化キット DPiMS QTとの組み合わせ（図1 左）による定性と超高速液体クロマトグラフNexera X3との組み合わせ（図1 右）による定量フローをご紹介します。一台のLCMS-9030に対して、DPiMS QTとNexeraを併用することで、薬剤の高速定性スクリーニングから定量分析を迅速に実施する事ができます。定量分析を要する検体数を削減することで、測定の効率化と分析に必要な資源の削減が可能です。

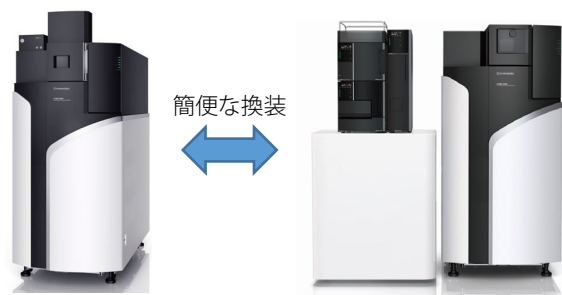


図1 DPiMS™ QTとLCMS™-9030 (左) および Nexera™とLCMS™-9030 (右)

前処理および分析条件

ヒト全血に7成分の薬物を添加し、ヒト全血添加試料を調製しました。表1に7成分の化合物情報を示します。1、5、10、100 ng/mLのヒト全血添加試料を検量点サンプルとし、LC/MSによる定量分析用の検量線を作成しました。また、50 ng/mLのヒト全血添加試料を未知試料としてDPiMS QTによる定性スクリーニングを行った後、LC/MSによる定量分析を行いました。

表1 ヒト全血に添加した薬物7成分

#	Compounds	Formula	MW
1	7-Aminonimetazepam	C16H15N3O	265.1215
2	Aconitine	C34H47NO11	645.3149
3	Brotizolam	C15H10BrCIN4S	391.9498
4	Clotiazepam	C16H15ClN2OS	318.0594
5	Donepezil	C24H29NO3	379.2148
6	Fluvoxamine	C15H21F3N2O2	318.1555
7	Lidocaine	C14H22N2O	234.1732

DPiMS QTによる定性スクリーニング

DPiMS QTによるスクリーニングは血液や尿などの生体試料の場合、約6分で結果を得ることが出来ます。シンプルな前処理操作（図2）の後、DPiMS QTでの測定時間は約0.5分です。DPiMS QTは探針を上下に動作させると共に、探針先端に電圧を印加することで探針表面に付着した試料をイオン化し、質量分析計に直接導入します。分析条件を表2に示します。

① 全血20 μL、水180 μL
エタノール 200 μLを混合

② 攪拌・遠心分離後
上清を試料プレートへ滴下

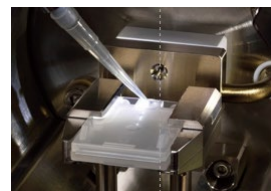


図2 DPiMS™ QTの前処理方法

表2 DPiMS QTとLCMS-9030の分析条件

System	: DPiMS QT+LCMS-9030
Polarity	: Positive
DL temp	: 250 °C
Heat block temp	: 50 °C
Interface Voltage	: 3.5 kV
TOF-MS	: m/z 100-800
Measurement Time	: 0.5 min

Nexeraによる定量分析

Nexeraによる定量分析では、試料前処理にMicro Volume QuEChERS kit (P/N : S225-37870-91) を用いました。メタノールを用いてDiazepam-d5 (2 μg/mL) 溶液を調製し、ISTDとして用いました。前処理法のフローを図3に示します。Micro Volume QuEChERS kitに水200 μL、アセトニトリル300 μL、生体試料100 μL、ISTD 2 μLを添加し、十分に攪拌した後、遠心分離し得られた上清を分析試料としました。分析条件を表3に示します。

① 水200 μL、アセトニトリル300 μL、全血100 μL、ISTD 2 μLを添加

② 攪拌・遠心分離

③ 上清をLCバイアルに移す

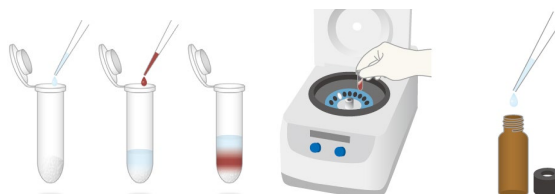


図3 Micro Volume QuEChERS kitを用いた前処理フロー

表3 NexeraおよびLCMS-9030の分析条件

System	: Nexera X3
Column	: Shim-pack Velox™ SP-C18 (100 mm×2.1 mm I.D., 2.7 μm, P/N : 227-32003-03*) *島津GLC 製品番号
Temperature	: 40 °C
Injection volume	: 1 μL
Mobile phases	: 10 mM ammonium formate+ 0.1 % formic acid in Water 10 mM ammonium formate+ 0.1 % formic acid in MeOH
Flow rate	: 0.3 ml/min
Time program (%B)	: 5 % (0 min)→95 % (7.5-10 min)→ 5 % (10.01-15 min)
System	: LCMS-9030 (ESI Positive)
Nebulizing gas	: 3 L/min
Drying gas	: 10 L/min
Heating gas	: 10 L/min
DL temp	: 300 °C
Heat block temp	: 250 °C
Interface temp	: 400 °C
TOF-MS	: m/z 20-800

■ DPiMS QTによる定性スクリーニング

DPiMS QTで取得したヒト全血添加試料 (50 ng/mL) のTICを図4に示します。DPiMS QTでは試料をサンプリングしている時間と探針が導入孔に近づきイオンが導入される時間があるため、間欠的に対象化合物が検出されます。

解析にはLabSolutions™ Insight Exploreを用いました。対象化合物の分子式もしくはm/zによるスクリーニング機能で、各化合物の検出結果を確認することができます。ここでは実測マスペクトルに対して組成推定を行いました。図5にヒト全血添加試料 (50 ng/mL) の実測マスペクトル (上段) および理論マスペクトル (下段) を示します。各薬物の理論m/zと実測m/zから質量誤差 (ppm) を算出しました。質量誤差は-1.0 ppm~1.9 ppmであり、マトリクス中において、安定した質量精度であることが示されました。DPiMS-QTを用いて前処理時間約5分、測定時間0.5分でヒト全血中の薬物を簡単にスクリーニングし、定量分析すべきサンプル・化合物を絞り込みました。その後、Nexeraに切り換えて定量分析を行いました。

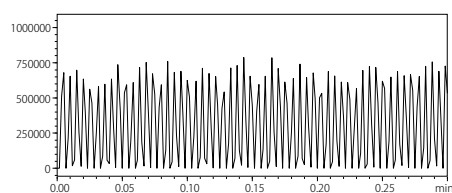
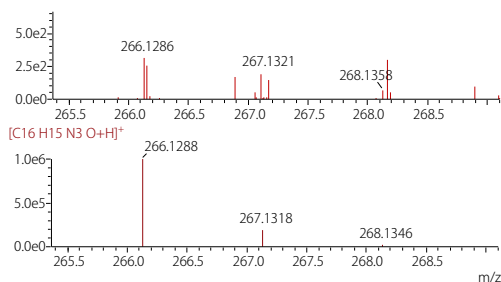
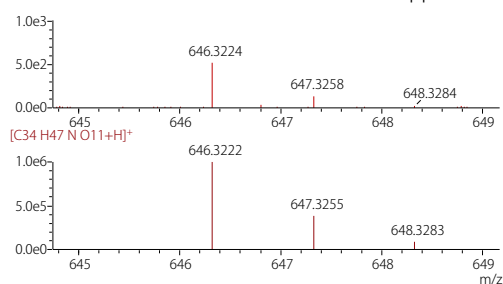


図4 DPiMS™ QTで取得したヒト全血添加試料 (50 ng/mL) のTIC

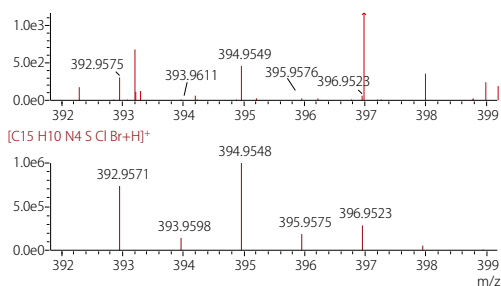
7-Aminonimetazepam Mass error: -0.8 ppm



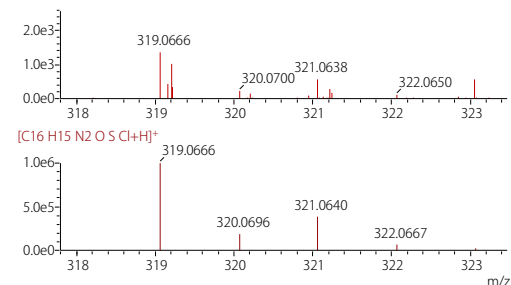
Aconitine Mass error: 0.3 ppm



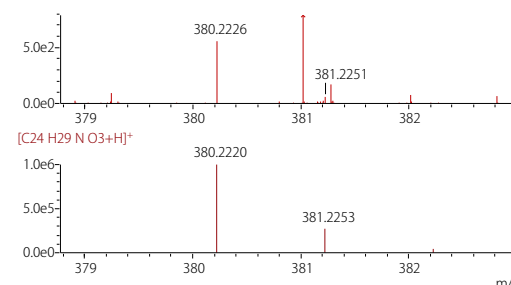
Brotizolam Mass error: 1.0 ppm



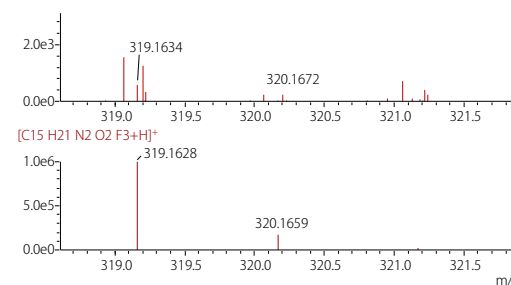
Clotiazepam Mass error: 0.0 ppm



Donepezil Mass error: 1.6 ppm



Fluoxetine Mass error: 1.9 ppm



Lidocaine Mass error: -0.9 ppm

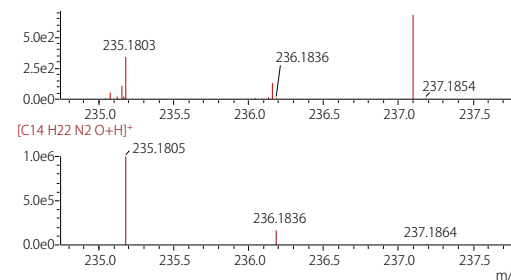


図5 (上段) ヒト全血添加試料 (50 ng/mL) の実測マスペクトルおよび (下段) 各薬物の理論マスペクトル

■ Nexeraによる定量分析

ヒト全血に薬剤7成分を1、5、10、100 ng/mLに添加した試料を検量点サンプルとし、各薬剤の検量線を作成しました。この検量線を用いてヒト全血添加試料（50 ng/mL）の定量分析を実施しました。図6に定量結果、ブランクおよびヒト全血添加試料（50 ng/mL）のマスキロマトグラムを示します。設定した濃度範囲において良好な直線性を得ました。ヒト全血添加試料（50 ng/mL）の定量結果の正確さは、100±15%以内でした。

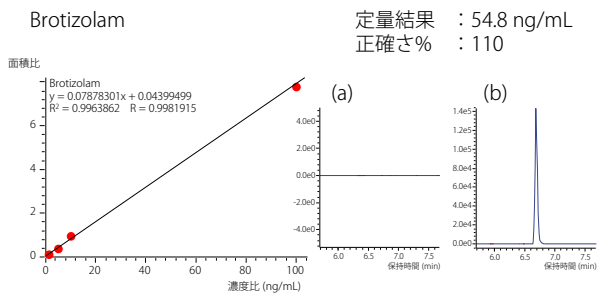
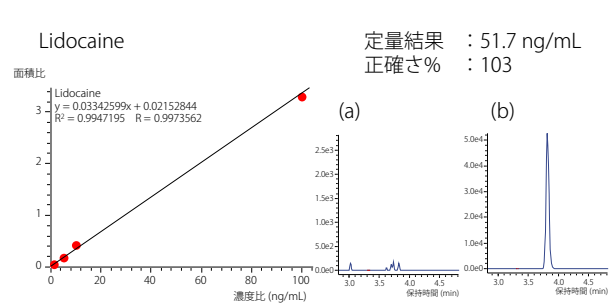
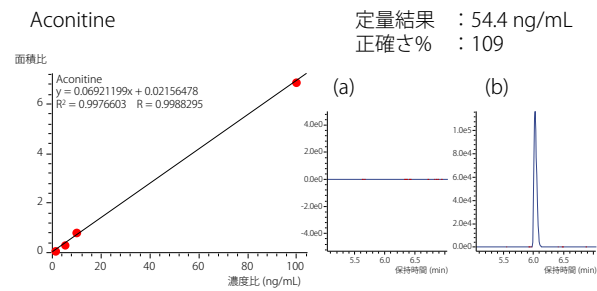
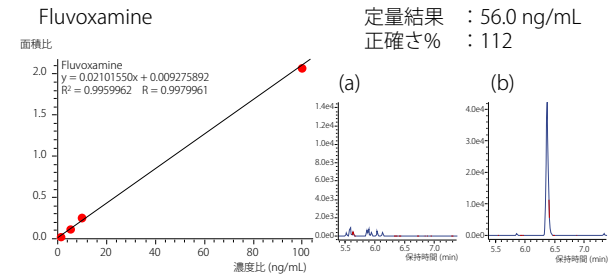
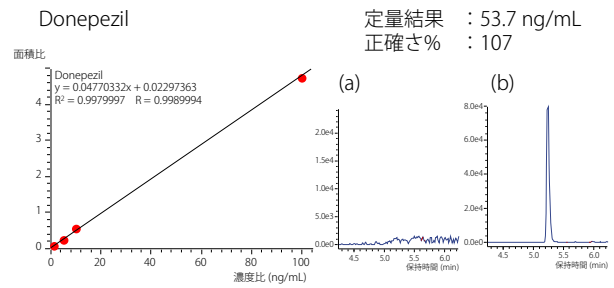
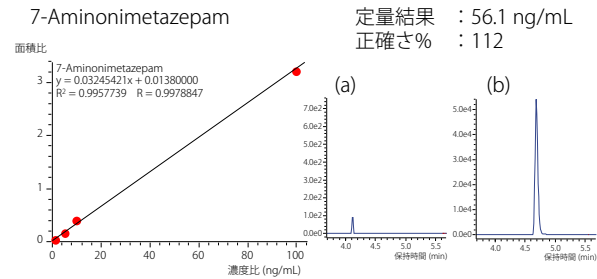
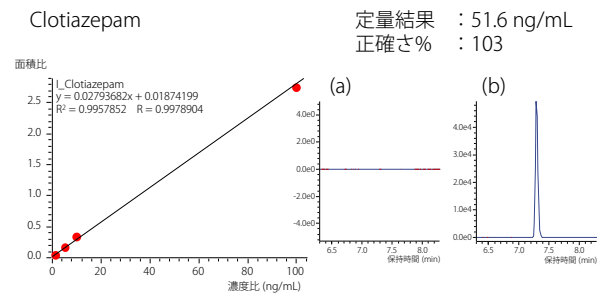


図6 ヒト全血添加試料（1-100 ng/mL）を用いた各薬物の検量線、定量結果および(a)ブランク、(b)ヒト全血添加試料（50 ng/mL）のマスキロマトグラム



■ まとめ

ヒト全血に添加した7成分の薬物を対象に、LCMS-9030とDPiMS QTによる高速定性スクリーニングおよびNexeraへの切り換えによる定量分析を行いました。DPiMS QTによる測定では前処理時間約5分、測定時間0.5分で各薬剤を検出しました。Nexeraによる定量分析では、全ての成分において1-100 ng/mLの範囲で直線性が得られ、全血添加試料（50 ng/mL）の定量結果の正確さは100±15%以内と良好な結果が得られました。DPiMS QTによる高速定性スクリーニングから定量が必要な化合物を絞り込むことが可能であり、簡便な換装により定量分析に移行することができます。

LCMS、Nexera、LabSolutions、DPiMS、およびShim-pack Veloxは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00167-JP 初版発行：2021年9月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。本文中に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していません。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。
<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Clubにご登録いただきますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2021