

Intellistart™ および Radar テクノロジーを用いた高感度バイオアナリシス MRM 分析法の開発およびモニタリング

Robert S. Plumb

Waters Corporation

要約

医薬品の探索および開発のプロセス全体にわたって高感度バイオアナリシス分析法を使用することにより、DMPK、トキシコキネティクス（TK）試験、および無作為化臨床試験をサポートする正確な定量データが得られます。タンデム四重極 LC-MS/MS は、過去 25 年間を経て、定量的バイオアナリシスに最適なテクノロジーになりました。目的に適合した信頼できる分析法を開発するには、LC および MS の取り込みパラメーターを慎重に評価する必要があります。

Waters™ タンデム四重極 MS システムには Intellistart ソフトウェアが搭載されており、これによって、頑健で高感度の MRM 分析法の完全自動開発が容易に行えます。Intellistart は、イオン化の極性、プリカーサーイオン、プロダクトイオン、イオン源電圧、コリジョンエネルギーを最適化して、最適な取り込みパラメーターを特定します。Xevo™ タンデム質量分析計には RADAR テクノロジーも搭載されており、これにより、LC のバックグラウンドシグナルの同時モニタリングが可能になり、分析法開発およびアッセイのモニタリングが簡素化します。

アプリケーションのメリット

- バイオアナリシス試験のための LC-MS/MS 分析法の開発
- Intellistart テクノロジーを使用した MRM 条件の自動最適化
- 専門家以外のユーザーも専門家のユーザーも同様に行える最適な SIR 条件および MRM 条件の迅速で効率的な開発
- RADAR テクノロジーを使用したバックグラウンドシグナルのモニタリングによる LC-MS 分析法開発の簡素化、分

はじめに

液体クロマトグラフィーを組み合わせたマルチプルリアクションモニタリング（MRM）を使用するタンデム四重極質量分析は、その特異性、選択性、感度により、体液中の候補医薬品の高感度定量に最適なテクノロジーになりました¹。一貫して頑健で信頼性があり、迅速で高感度かつ移管可能な定量的バイオアナリシス分析法の開発は、多くの場合困難です。このような分析法には、最適な MS イオン源条件、動作の極性、プリカーサーイオン、プロダクトイオン、コリジョンエネルギーを決定するとともに、迅速で信頼性の高いクロマトグラフィー条件を開発する必要があります。このような LC-MS/MS 分析法の開発には時間がかかることが多く、従来は専門家ユーザーが行っていました。

LC 分離法の最適化には多くの場合、バックグラウンドイオンをモニターして、マトリックス中の分析種に対する干渉を最小限に抑えると同時に、サンプルスループットを最大化する必要があります。医薬品開発試験が無作為化臨床試験に進むと、年齢、ライフスタイル、健康状態、食事、および併用薬の有無におけるばらつきにより、サンプルマトリックスがより複雑になります²。定量的 MRM シグナルを収集すると同時にクロマトグラフィーバックグラウンドシグナルをモニターすることにより、これらの内因性化合物および外因性化合物がアッセイ性能に及ぼす影響をモニターするためのシンプルなアプローチが容易になりました。

今回、高感度で頑健な LC-MS/MS バイオアナリシスアッセイの迅速な開発のための Intellistart ソフトウェアと組み合わせた Xevo タンデム四重極 MS、およびバックグラウンドマトリックスイオンの同時モニタリングのための RADAR テクノロジーの使用について説明します。

実験方法

サンプルの説明

Intellistart ソフトウェアおよび RADAR テクノロジーの適用について実証するために、ラットの血漿中および尿中のメタピリレンの定量用のバイオアナリシス分析法を開発しました。動物試験およびサンプル前処理の完全な詳細は、ウォーターズのアプリケーションノート『DMPK 試験におけるタンデム四重極取り込みモード』（720008016JA）に記載されています³。コントロールのウィスターラットの血漿および尿は、米国ニューヨーク州の BioIVT から入手しました。

血漿サンプルおよび尿サンプルについては、抽出サンプルの 2 μ L アリコート を 2.1 \times 50 mm CORTECS™ C₈ 2.7 μ m

カラムに注入して分析しました。カラムは 40 °C に維持し、0.1% ギ酸水溶液を移動相溶媒 A、0.1% ギ酸含有 95:5 (v/v) アセトニトリル：水を移動相 B として使用して、600 μ L/分で 2.5 分間の逆相リニアグラジエント (表 1) で溶出させました。カラム溶出液は、MRM モードで動作するポジティブイオン ESI 質量分析によってモニターしました。カラム溶出液は、トランジション $m/z=262.2 \rightarrow 119.2$ で、コーン電圧 30 V、コリジョンエネルギー 20 eV を使用し、MRM モードで動作するポジティブイオン ESI 質量分析計によってモニターしました (表 2)。

LC 条件

| | |
|----------|--|
| LC システム: | ACQUITY™ I Class UPLC™ |
| 検出: | Xevo TQ-XS |
| バイアル: | ウォーターズトータルリカバリーバイアル、(製品番号: 186004631) |
| カラム: | CORTECS Premier T3 カラム、2.7 μ m、2.1 \times 100 mm (製品番号: 186010473) |
| カラム温度: | 40 °C |
| サンプル温度: | 8 °C |
| 注入量: | 2 μ L (尿)、1 μ L (血漿) |
| 流速: | 600 μ L/分 |
| 移動相 A: | 0.1% (v/v) ギ酸水溶液 |
| 移動相 B: | 95% アセトニトリル、5% 水、0.1% (v/v) ギ酸 |
| グラジエント: | グラジエントテーブル (表 1) を参照 |

表 1

| 時間 (分) | 流速 (mL/分) | %A | %B | 曲線 |
|-----------|--------------|----|----|------|
| 0 | 0.6 | 95 | 5 | 初期条件 |
| 0.5 | 0.6 | 95 | 5 | 6 |
| 2.5 | 0.6 | 60 | 40 | 6 |
| 2.51 | 0.6 | 5 | 5 | 6 |
| 3.0 | 0.6 | 5 | 5 | 6 |
| 3.1 | 0.6 | 95 | 5 | 6 |
| 4.0 | 0.6 | 95 | 5 | 6 |

MS 条件

| | |
|--------------|------------------------------|
| MS システム: | Xevo TQ-XS |
| イオン化モード: | ポジティブイオン ESI |
| 取り込み範囲: | m/z 100 ~ 800 (RADAR 取り込み) |
| キャピラリー電圧: | 2.0 kV |
| コリジョンエネルギー: | 20 eV |
| コーン電圧: | 30 V |
| MRM トランジション: | m/z : 262.2→119.2 |

データ管理

| | |
|------------------|-----------------------|
| クロマトグラフィーソフトウェア: | MassLynx™ バージョン 4.2 |
| MS ソフトウェア: | MassLynx バージョン 4.2 |
| インフォマティクス: | TargetLynx™ バージョン 4.2 |

結果および考察

マルチプルリアクションモニタリングは、質量分析計を使用する複雑な混合物の微量測定において、最も高感度の分析モードとして受け入れられています。この動作モードでは、最初の分離を行う四重極が、特定のイオン (m/z 値) のみが透過するようにプログラムされています。次に、選択されたイオンがコリジョンセルでフラグメント化され、最終的な分離を行う四重極へと導かれます。この四重極は、選択されたフラグメントイオンのみが通過できるように設定されているため、高度に選択的で特異的な分析法になります。このような特異性および選択性により、バックグラウンド「ノイズ」が大幅に低減され、特に高分離能クロマトグラフィーと組み合わせた場合に、高感度の分析が可能になります。その結果、MRM ベースの LC-MS/MS は、体液中の医薬品およびその代謝物の高感度定量に最適なテクノロジーになりました。

オスのウィスターラットに抗ヒスタミン抗コリン薬であるメタピリレン (図 1) を 150 mg/kg で経口投与した後の血漿サンプル中の医薬品化合物を定量するための MRM 分析の開発および適用を実証するために、逆相 UPLC-MS/MS 分析を行いました⁴。

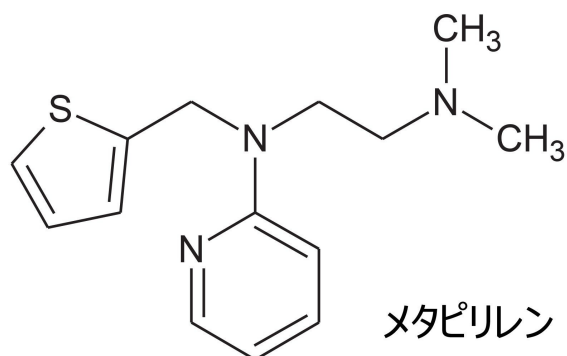
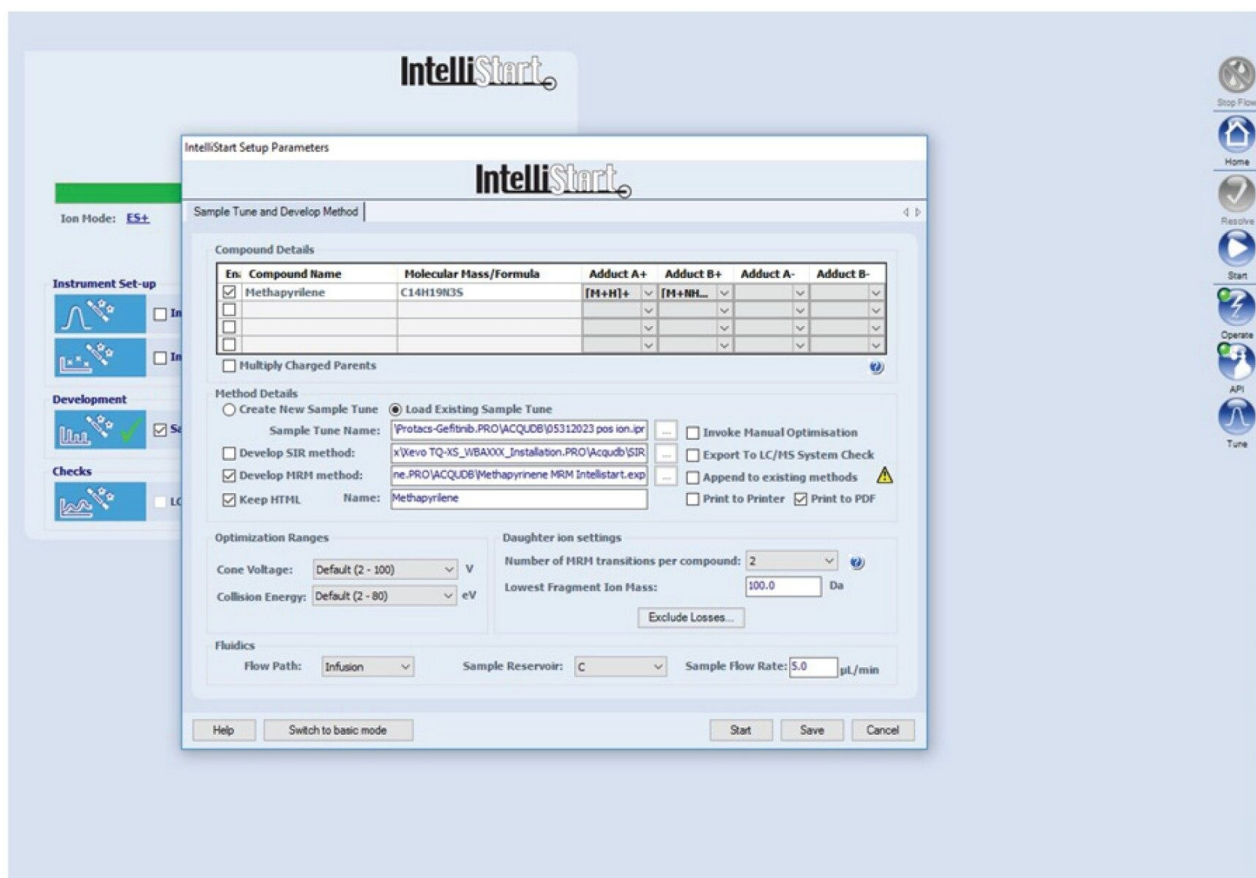


図 1. メタピリレン

100 ng/mL メタピリレン含有 50:50 メタノール:水 (0.1% ギ酸) 溶液を、Xevo TQ-XS 質量分析計に、装置のオンボード流路系を使用して流速 5 μ L/分で注入しました。脱溶媒温度 300 $^{\circ}$ C、脱溶媒ガス (窒素) 流量 500 L/時間を使用しました。Intellistart ソフトウェアに、メタピリレンの元素組成 $C_{14}H_{19}N_3S$ を入力し、コーン電圧の範囲 2 ~ 100 V、コリジョンエネルギーの範囲 2 ~ 80 eV で条件を最適化しました (図 2)。フラグメント質量の下限は $m/z=100$ に設定しました。シグナルレスポンスは、ポジティブイオン化モードとネガティブイオン化モードの両方で評価しました。得られた結果により、最も高感度で特異的なパラメーターは、コリジョンエネルギー 20 eV およびコーン電圧 48 V を使用して、ポジティブイオン化モードでコリジョンエネルギー $m/z=262.2 \rightarrow 119.2$ と特定されました。TQ-XS では通常のことですが、コーン電圧プロファイルは 15 ~ 50 V の間で基本的に平坦であったため、アッセイにはコーン電圧 30 V を使用しました (

図 2)。



Results

IntelliStart generated the following experiments:

MRM Experiment C:\#MassLynx\Methapyrilene.PRO\ACQUDB\Methapyrinene MRM Intellistart.exp

IntelliStart found the following compounds:

| Compound | Formula/Mass | | Parent m/z | Cone Voltage | Daughters | Collision Energy | Ion Mode |
|---------------|--------------|---|------------|--------------|-----------|------------------|----------|
| Methapyrilene | C14H19N3S | 1 | 262.23 | 48 | 119.17 | 20 | ES+ |
| | | 2 | 262.23 | 48 | 118.59 | 28 | ES+ |

Compound

Methapyrilene

(C14H19N3S)

図 2. Intellistart MS パラメーターの最適化および最適化の結果

最も高感度のプロダクトイオンとして、フラグメントイオン $m/z = 119.17$ が Intellistart によって選択されました。以下の図 3 のデータは、コリジョンエネルギー 30 eV を使用したポジティブイオンにおける、メタピリレン ($m/z = 262.2$) のフラグメンテーションパターンを示しています。

メタピリレン分子のフラグメンテーションにより、3 つの主要なイオン ($m/z = 217.09$ 、 121.08 、 119.07) が生じ、 $m/z = 119.2$ が最も高強度であったことから、Intellistart フラグメントが最適化されていることが確認されました。このイオンは、メタピリレン分子からチオフェン環および脂肪族第 3 級アミン鎖が失われて生じたものと考えられます。

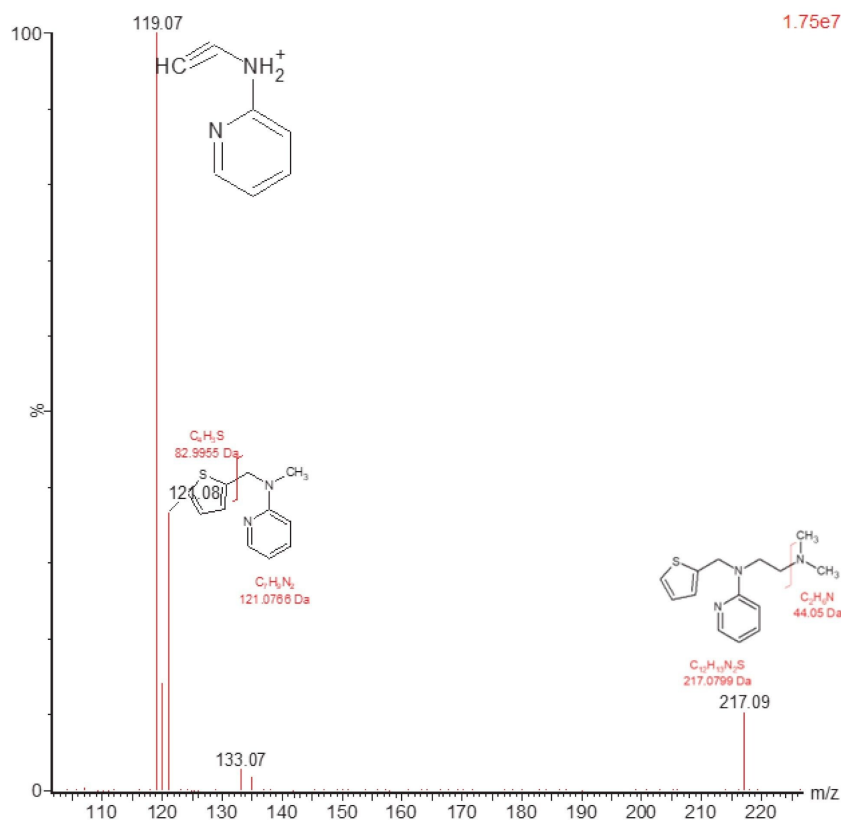


図 3. メタピリレン真正標準試料のプロダクトイオンの MS/MS ($m/z=262.23$)

Intellistart により生成された最適化済みパラメーターにより、最も高感度のトランジション ($262.2 \rightarrow 119.2$) は、コリジョンエネルギー 20 eV で生成されたことがわかりました。コリジョンエネルギーの最適化の結果は、逆相グラジエントクロマトグラフィー分離 (10 分以上の分析) およびコリジョンエネルギー範囲 5 ~ 50 eV を使用して、メタピリレンのピークレスポンスを手動で評価することで確認されました (図 4)。

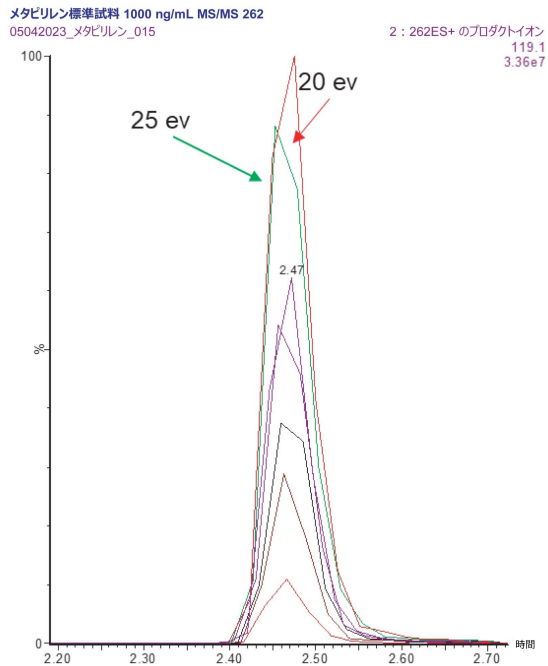


図 4. 5 ～ 50 eV の範囲のコリジョンエネルギーを使用したメタピリレンのピークレスポンスのばらつき

血漿中のメタピリレン定量のための最終 LC-MS/MS では、2.1 × 50 mm CORTECS C₁₈ 2.7 μm カラムに抽出サンプルを 2 μL 注入し、5 ～ 40% ギ酸水溶液 (0.1%)、アセトニトリル (0.1% ギ酸含有) で 2.5 分間で溶出しました。カラム溶出液は、コーン電圧 30 V、コリジョンエネルギー 20 eV でのトランジション 262.2→119.2 を使用し、MRM モードで動作するポジティブイオン ESI によってモニターしました。

バイオアナリシス分析法

分析濃度範囲の選択は、DMPK 試験のニーズに応じて異なります。アッセイは常に目的に適合している必要があり、最高感度のアッセイが常に必要とは限りません。アッセイのダイナミックレンジは、分析法開発プロセスの一部と見なすべきであり、予想されるサンプル濃度範囲と一致している必要があります。吸収がよく、通常のげっ歯類での創薬試験で使用する用量 10 mg/kg の化合物の場合、最大医薬品濃度は 1 ～ 7 μg/mL と予想されます⁵。この試験では、動物に 1 日 50 mg/kg または 150 mg/kg の経口投与 (PO) を行ったため、サンプル中の濃度範囲は 5 ～ 10 μg/mL と予想されました。したがって、非常に高感度のアッセイを開発する必要はなく、十分に装置の定量機能の範囲内であるアッセイ範囲 1 ～ 1000 ng/mL を選択しました。血漿サンプルおよび尿サンプルは、アセトニトリルを使用した単純な除タンパク (2:1 アセトニトリル: サンプル) によって前処理しました。得られた抽出液を、逆相モードで動作する 2.1 × 50

mm CORTECS 2.7 μm カラムで分析し、5～40% ギ酸水溶液 (0.1%) - 95% アセトニトリル：水 (0.1% を含む) の 600 $\mu\text{L}/\text{分}$ で 2.5 分間のリニアグラジエントで溶出しました。メタピリレンは保持時間 $t_R = 1.69$ 分で溶出しました。図 5 に、ラット血漿中のメタピリレンの定量について $1/x$ 重み付けを使用して 1～1000 ng/mL のキャリブレーション範囲にわたる検量線を示します。外部標準試料の分析により、相関係数 0.9986 で切片 8.59 と決定されました。挿入図のクロマトグラム (図 5) に、1 ng/mL およびコントロールのブランクの血漿サンプルのピークレスポンスを示します。これらのサンプルから分かるように、ブランクサンプルと 1 ng/mL サンプルの間に大きな干渉は見られません。

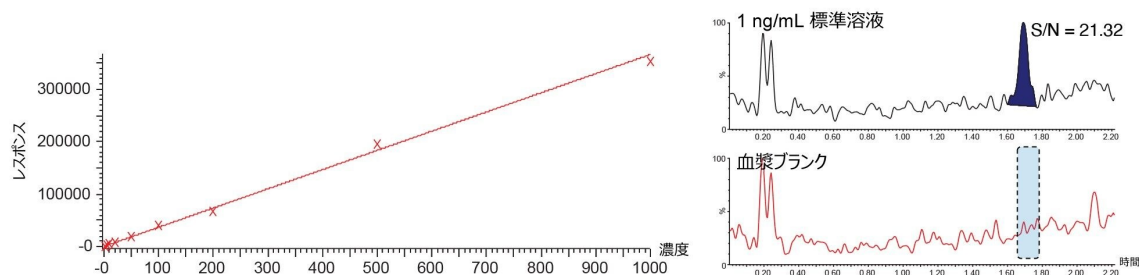


図 5.ラット血漿中の範囲 1～1000 ng/mL にわたるメタピリレンの分析で得られた検量線。挿入図のクロマトグラムには、1 ng/mL の血漿キャリブレーション試薬およびブランクの血漿抽出物を示します。

キャリーオーバーの評価

正確で信頼性の高いサンプル定量を行うには、分析バッチの前のサンプルからの交叉汚染や分析種のキャリーオーバーがないことを確認することが重要です。このことについて評価するため、1000 ng/mL のキャリブレーションスタンダードの注入分析の直後に、血漿ブランクサンプルを分析しました。1000 ng/mL の標準試料の後のブランク血漿から得られたピーク面積を図 6 に示します。データによると、 $t_R = 1.69$ にピークを生じた 1 ng/mL の標準試料のシグナル対ノイズ比 (S/N) の値は 21.3 ですが、ブランク血漿サンプルではピークの S/N 比の値は 3.51 になりました (図 5)。このことから、このアッセイでは、メタピリレンに顕著なキャリーオーバーはなかったことが確認されました。

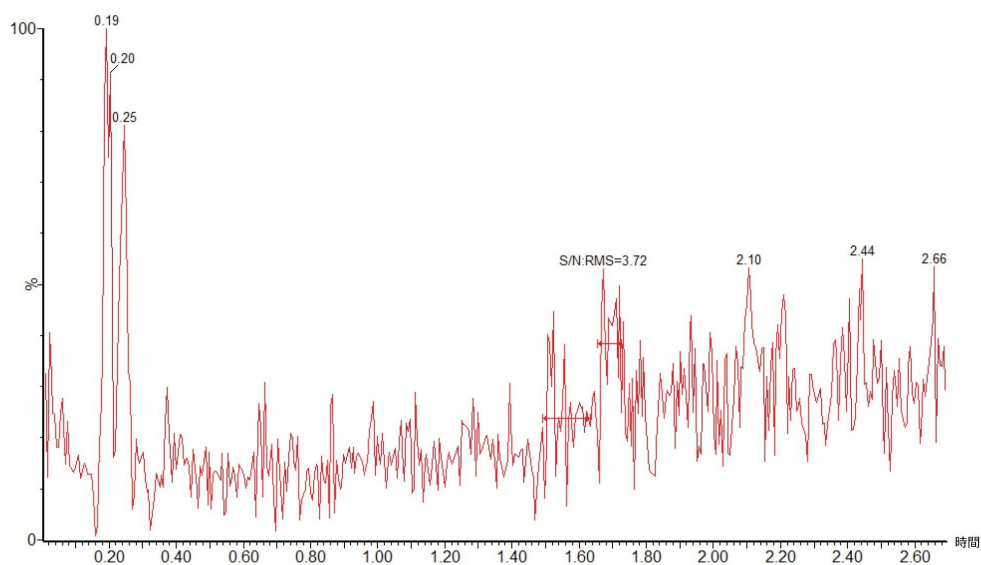


図 6.1000 ng/mL 標準試料の直後に注入したブランク血漿の分析におけるメタピリレン ($t_R = 1.69$ 分) のピークレスポンスと 1 ng/mL の標準試料のピークレスポンスの比較。

アッセイのバリデーション

メタピリレンラット血漿アッセイの検出限界、精度、正確性、安定性、および再現性について判定するために、2018 年 FDA バイオアナリシス分析法バリデーションガイダンスの記載に従って、3 日間のバリデーション試験を実施しました⁶。各分析バッチは、検量線、6 回繰り返しの QC、およびこれに次ぐ 2 番目の検量線（別々に抽出）によって構成されます。最終的な検量線を作成する前に、QC サンプルの間に等間隔でブランク血漿抽出物を分析したため、バッチサイズが 96 サンプルに増えました。日間精度については、変動係数が 3.8 ~ 13.3% の範囲（それぞれ 1000 ng/mL および 1 ng/mL の標準試料）、QC 精度が 7.2 ~ 10.8% の範囲でした（表 3）。ラット尿を用いた分析のバリデーションでも、同様の結果が得られました。すべてのデータがバイオアナリシス分析法のバリデーションの FDA 合否基準を満たしている

| サンプル | 平均 (ng/mL) | 標準偏差 | %CV |
|------------|---------------|------|------|
| 血漿ブランク | 0 | 0 | |
| 1 ng/mL | 1.0 | 0.1 | 13.3 |
| 2 ng/mL | 2.0 | 0.2 | 8.3 |
| 5 ng/mL | 5.0 | 0.4 | 8.2 |
| 10 ng/mL | 10.7 | 1.1 | 10.5 |
| 20 ng/mL | 17.9 | 0.9 | 4.8 |
| 50 ng/mL | 51.0 | 3.2 | 6.3 |
| 100 ng/mL | 108.3 | 10.9 | 10.1 |
| 200 ng/mL | 199.3 | 11.9 | 6.0 |
| 500 ng/mL | 520.0 | 49.6 | 9.5 |
| 1000 ng/mL | 972.9 | 37.0 | 3.8 |
| 3 QC | 2.9 | 0.2 | 7.2 |
| 30 QC | 30.0 | 2.3 | 7.7 |
| 300 QC | 302.5 | 32.6 | 10.8 |

表 3. ラット血漿中のメタピリレン測定に関する日間バリデーションの結果

マトリックスバックグラウンドのモニタリング

動物試験では、マトリックスバックグラウンドシグナルは、生物種、性別、系統、食餌、および月齢によって大きく異なる可能性があり、投与媒体の変更にも影響されることがあります。無作為化ヒト臨床試験（第 I～III 相）では、マトリックスバックグラウンドシグナルは、年齢（小児、高齢）、性別、健康状態、併用薬、並びに食事や人種の影響を受ける可能性があります。マトリックスバックグラウンドシグナルのばらつきが LC-MS/MS 分析法の頑健性、信頼性、正確性にどのように影響するかを理解することは、より広い分析法の展開に不可欠です。Waters Xevo タンデム質量分析計には、RADAR テクノロジーが備わっています。このテクノロジーでは、革新的な T-Wave™ コリジョンセル設計を利用して、MRM (MS/MS) モードと MS フルスキャン取り込みの間で迅速な切り替えを行います。これにより、クロマトグラフィーピーク全体のポイント数に悪影響を与えることなく、またアッセイの感度を維持したまま、MRM データとフルスキャンデータを同時に取り込むことができます（図 7）。D2 および D6 の尿サンプルの分析から得られたポジティブイオンフルスキャン LC-MS RADAR データを以下の図 8 に示します。このデータから、D6 のサンプルには $t_R = 1.3$ 分に（赤色のボックスで強調表示した）追加のピークがありますが、D2 のサンプルにはこのピークがないことが分かります。この特性の RADAR による MS スペクトルには、 $m/z=454.2$ にベースピークが見られ、 $m/z=235.2$ により小さいおそらくフラグメントのピークが見られます。このことは、メタピリレンの O-グルクロニド代謝物から得られるスペクトルと一致しています。この保持時間はメタピリレンの保持時間と大きく異なるため、この新しいピークは尿中のメタピリレンの分析で得られる結果の正確性には影響しないと考えられました。この場合、経口投与において in vivo で生じる可能性のある主要な代謝物について何らかの暫定的な指標が得られますが、RADAR アプローチを使用しても、分析法開発時のバックグラウンドシグナルをモニターすることや、ルーチンのバッチ分析時にサンプルをモニタ

一することができます。

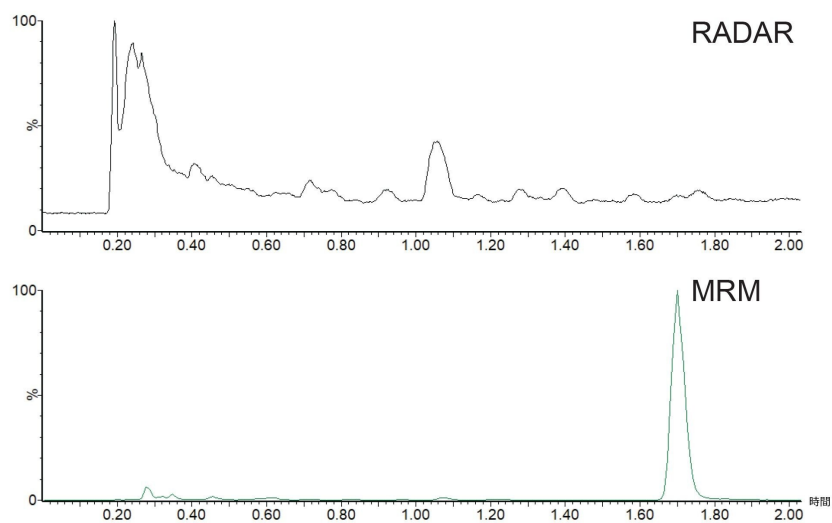


図7. メタピリレンを 150 mg/kg で経口投与した後の D6 におけるラット尿サンプルでの RADAR および MRM 取り込み。ポジティブイオン ESI モードでのメタピリレンの MRM トランジション 262.2→119.2 からの $t_R=1.7$ 分に見られるピーク。

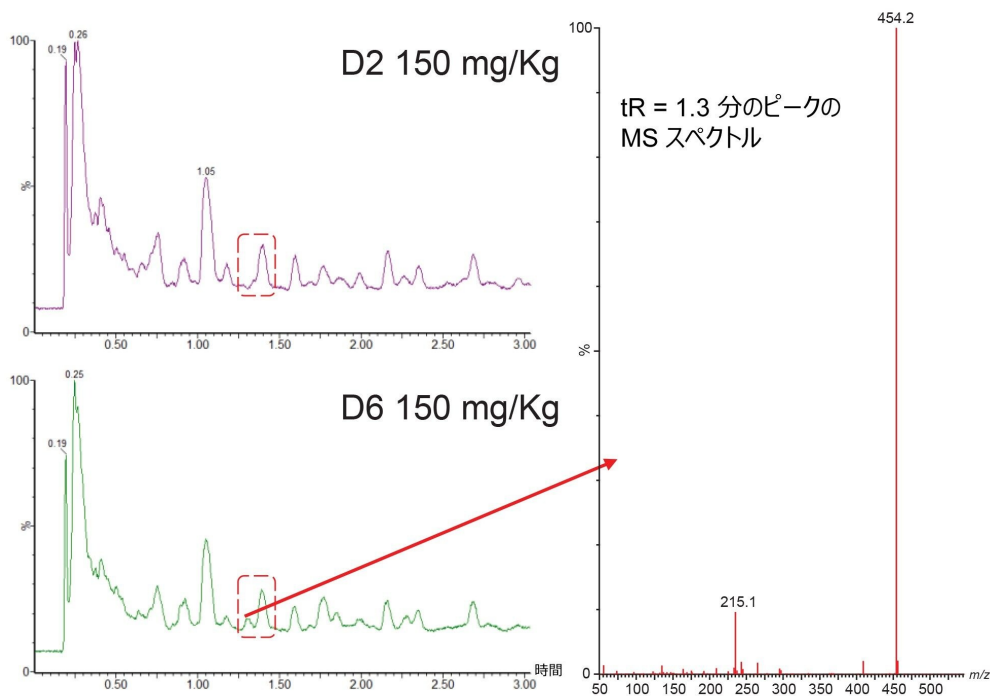


図 8. メタピリレンを 150 mg/kg で経口投与した後の D2 および D6 におけるラット尿サンプルでの RADAR 取り込み。 $t_R=1.3$ 分のピークの挿入図のスペクトルは、メタピリレンの O-グルクロニド代謝物のスペクトルと一致しています。

結論

LC-MS/MS は、体液中の医薬品およびその代謝物の定量用の高感度な分析法になります。ラットの血漿および尿中のメタピリレン定量用のシンプルで頑健な MRM アッセイが開発され、バリデーションされました。Intellistart ソフトウェアを使用して、げっ歯類の血漿および尿中のメタピリレンの分析用に、プリカーサーイオン、プロダクトイオン、コーン電圧、コリジョンエネルギーを迅速に最適化することができました。このアッセイを、3 日間プロトコルを使用し、1 ~ 1000 ng/mL のキャリブレーション範囲にわたって、血漿中および尿中でバリデーションしました。この分析法は、許容可能な精度および再現性を示しました。

RADAR により、フルスキャンデータと MRM データを同時に取り込んでバックグラウンドシグナルをモニターし、定量的 MRM データの質を損なうことなく、効率的な分析法開発、トラブルシューティング、臨床試験サンプルの分析を行うことができます。また、RADAR テクノロジーにより、将来の前臨床試験や臨床試験に役立つ可能性のある主要代謝

物などのその他の成分の検出も容易に行えるようになります。

参考文献

1. Thakur A, Tan Z, Kameyama T, El-Khateeb E, Nagpal S, Malone S, Jamwal R, Nwabufo CK. Bioanalytical Strategies in Drug Discovery and Development. *Drug Metab Rev.* 2021;53(3):434–458. doi: 10.1080/03602532.2021.1959606 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34310243/>> .Epub 2021 Aug 23. PMID: 34310243.
2. Duggan JX. Quantification Below the LLOQ in Regulated LC-MS/MS Assays: A Review of Bioanalytical Considerations and Cautions. *Bioanalysis.* 2019 Apr;11(8):797-814. doi: 10.4155/bio-2018-0261 <<https://www.future-science.com/doi/10.4155/bio-2018-0261>> .
3. Robert S. Plumb. Tandem Quadrupole Acquisition Modes in DMPK Studies, Waters application note. 720008016, September 2023.
4. Graichen ME, Neptun DA, Dent JG, Popp JA, and Leonard TB (1985) Effects of Methapyrilene on Rat Hepatic Xenobiotic Metabolizing Enzymes and Liver Morphology. *Fundam Appl Toxicol* 5:165–174.
5. Molloy B, Mullin L, King A, Gethings LA, Plumb RS, Wilson ID. The Pharmacometabodynamics of Gefitinib after Intravenous Administration to Mice: A Preliminary UPLC-IM-MS Study. *Metabolites.* 2021 11;11(6):379. doi: 10.3390/metabo11060379. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34208076/>>
6. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, 2018. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry> <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>> .

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-XS タンデム四重極質量分析計 <<https://www.waters.com/134889751>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720008082JA、2023 年 11 月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)