

Waters™ タンデム四重極質量分析計でサーベ イスキャン MS/MS 機能を用いた、生体液中の 医薬品代謝物の検出および特性解析

Robert S. Plumb

Waters Corporation

要約

生体液サンプルを医薬品代謝物について迅速にスクリーニングする機能は、研究者が代謝のソフトスポットを特定し、潜在的な毒性代謝物を検出し、候補医薬品の薬物動態学的特性を改善するのに役立ちます。この作業は、MS データおよび MS/MS データの取り込みと分析が必要な、複雑で時間のかかるプロセスになる可能性があります。タンデム四重極質量分析計は、MRM モードでの感度が優れているため、医薬品濃度の測定に広く使用されていますが、医薬品代謝物の特性解析試験に適用できるその他の機能も備わっています。ウォーターズのタンデム四重極質量分析計のサーベイスキャン取り込みモードにより、確認フラグメントイオンとコンスタントニュートラルロスを使用して、医薬品の生体内反応を迅速に検出および特性解析することができます。サーベイスキャン LC-MS/MS をメタピリレンの尿中代謝物の分析に適用しました。プリカーサーイオンモニタリング付きサーベイスキャンモードを使用して、投与化合物の複数の共通のフラグメントイオンをモニターすることにより、30 種を超える医薬品関連代謝物が検出されました。これにより、代謝部位の位置特定が容易になりました。

アプリケーションのメリット

- バイアスのないデータ依存取り込み
 - シンプルで使いやすい MS/MS 機能
 - 共通のフラグメントイオンまたはコンスタントニュートラルロスに基づくピーク検出
-

- 単一の分析でプリカーサーイオンとプロダクトイオンの両方を取り込む

はじめに

医薬品代謝物の検出および特性解析は、ADME プロファイリングや in vitro スクリーニングから in vivo トキシコキネティクスのモニタリングに至るまで、創薬と医薬品開発において重要な役割を果たします¹。これらの試験から得られる情報により、in vitro スクリーニングからの代謝ソフトスポットの同定、初期の動物試験における代謝経路と代謝速度の決定、投与群間、性別、種間の代謝プロファイルの比較が可能になり、毒性学的範囲の確立に役立ちます²。

液体クロマトグラフィーと組み合わせた質量分析は、その感度、選択性、迅速な分析法開発、情報が豊富なスペクトルデータ、生体サンプルとの適合性のために、DMPK 試験に最適のプラットフォームとして確立されています。タンデム四重極質量分析計は、医薬品曝露の測定、候補医薬品の薬物動態 (PK) パラメーター決定のための高感度の定量データ取得の目的で、バイオアナリシスラボで広く使用されています³。PK 情報を得るという必要性に加えて、生体液をモニターおよびプロファイリングして医薬品の生体内反応の変化を調べる必要があります。これにより、安全性評価試験から十分な代謝物に対するカバレッジが確保され、生物種間および用量レベル間の代謝物の相対存在量の変化をモニターできて、有毒である可能性のある代謝物が検出されます。タンデム四重極質量分析計の特徴的な設計により、MS モードと MS/MS モードの間の迅速な切り替えが容易に行え、幅の狭い LC ピークの時間枠内において質の高いフラグメントイオンスペクトルを収集することができます。サーベイスキャン取り込みを使用して、共通の確認フラグメントイオン、またはグルクロニドやグルタチオンなどの代謝抱合体のコンスタントニュートラルロスに基づいた、医薬品関連の生体内反応に関連する生体液の高感度プロファイリングを実施できます。

実験方法

サンプルの説明

尿サンプルは、メタピリレン (図 1) を繰り返し経口投与したオスのウィスターラットから採取しました⁴。サンプルは、投与後 2、4、6 日目に 24 時間にわたって採取しました。動物試験およびサンプル前処理の完全な詳細は、ウォーターズアプリケーションノート [720008016JA](#) に記載されています⁵。コントロールのウィスターラットの尿は、米国ニューヨーク州の BioIVT から入手しました。生体液サンプルは、50 µL の尿と 200 µL の氷冷アセトニトリルを混合して調製し、ボルテックス混合してから -20 °C で 1 時間保管しました。次に、得られたサンプルを 9,000 g で 5 分間遠心分離し、上清をトータルリカバリーバイアルに移して LC-MS/MS で分析しました。

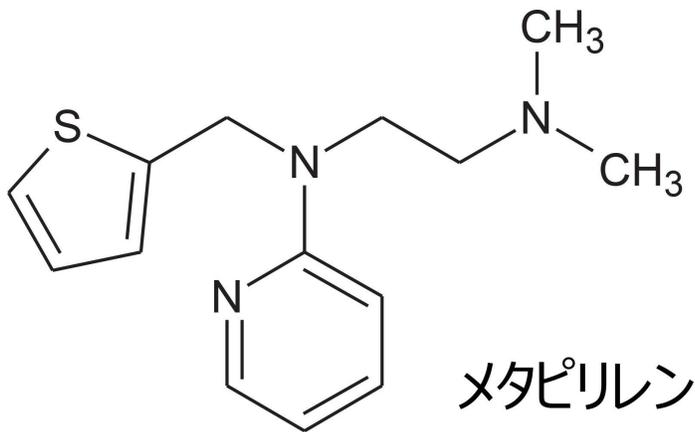


図 1. メタピリレン

分析条件

サンプル抽出後、2 μ L アリコートのサンプルを 2.1 \times 100 mm Cortecs™ C₁₈ 2.7 μ m カラムのクロマトグラフィーカラムにロードしました。カラムは 40 °C に維持し、0.1% ギ酸水溶液を移動相 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 10 分間の逆相リニアグラジエント（表 1）で溶出させました。このカラム溶出液を、サーベイスキャンモードで動作しているポジティブイオン ESI 質量分析により、プリカーサーイオンスキャンまたはコンスタントニュートラルロス取り込みトリガーのいずれかでモニターしました（表 2）。

LC 条件

LC システム:	ACQUITY™ I Class UPLC™
検出:	Xevo™ TQ-XS
バイアル:	Waters 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 μL (尿)
流速:	600 μL/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参照

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	曲線
0	0.6	95	5	初期条件
1	0.6	95	5	6
10	0.6	60	40	6
10.1	0.6	5	5	6
12	0.6	5	5	6
12.1	0.6	95	5	6

表 1. グラジエントテーブル

表 2. 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
取り込み範囲:	ESI

キャピラリー電圧:	2.0 kV
コリジョンエネルギー:	30 eV
コーン電圧:	30 V
データ取り込み:	m/z = 97.1、119.2、133.2 のプリカーサーイオンまたは コンスタントニュートラルロス 80.1 および 176.1 を用いたサーベイスキャン

データ管理

Chromatography software:	MassLynx™ Ver 4.2
MS software:	MassLynx Ver 4.2
Informatics:	MassLynx Ver 4.2

*注 5. 各ソフトウェアのバージョンを指定します。

結果および考察

LC-MS/MS を使用して生体液中の代謝物を同定するには、まず尿や血漿などのマトリックス中の医薬品関連物質を検出し、次に、プリカーサーイオンおよびプロダクトイオンのスペクトルデータを取り込んで分析する必要があります。次に、このデータを、投与した化合物のプリカーサー質量およびフラグメンテーションパターン、検出された代謝物のプリカーサーイオンスペクトルおよびプロダクトイオンスペクトル、および既知の代謝変換（官能基化および抱合）を用いて裏付けます。分析種を医薬品関連代謝物として受け入れるには、分析種が以下の基準を満たす必要があります⁶。

1. 代謝物が妥当な生体内反応によって説明できる
2. 代謝物に、親化合物と共通のフラグメントイオンが少なくとも 1 つある、または親イオンと共通のニュートラルロスが少なくとも 1 つある
3. コントロールサンプルまたは投与前サンプルではその分析種が認められず、その化合物は親化合物と比較して妥当

な保持の範囲内で溶出しなければならない

4. 偽陽性を避けるため、溶出時間が早い成分はすべて排除する

サーベイスキャン取り込みでは、ウォーターズのタンデム四重極 MS イオン光学系の柔軟性を利用して、コンスタントニュートラルロス (CNL) や共通のフラグメントイオンなどのさまざまな MS (MS) 取り込みモードを使用して、医薬品関連分析種をスクリーニングします。(ユーザーが指定した強度のしきい値を超える) このようなピークが検出されると、装置は自動的に検出されたピークのベースピークにターゲット MS/MS データを取得します。このデータ主導型分析モード (DDA) により、高感度で選択的なモードの代謝物スクリーニング、そしてこれに続いてターゲットを絞った MS/MS データ取り込みを容易に行え、これによってバックグラウンドノイズが少ない質の高い MS スペクトルが得られます。

医薬品代謝物のスクリーニングおよび特性解析のためのサーベイスキャン取り込みの応用について説明するため、ラットに抗ヒスタミン・抗コリン作動性医薬品であるメタピリレンを経口投与した後、尿サンプルを分析しました。メタピリレンの化学式は $C_{14}H_{19}N_3S$ で、メタピリレンの真正標準試料 ($m/z = 262.23$) のポジティブイオン MS/MS 分析により、確認フラグメントイオン $m/z = 96.88$ 、 119.17 、 121.17 、 133.07 、 217.09 が得られました。これらのフラグメントイオンは、チオフェン環フラグメント ($m/z = 96.88$)、ピリジン環からのチオフェン環、脂肪族鎖、第 3 級アミン基の喪失 ($m/z = 119.17$)、チオフェン環と脂肪族鎖を喪失して第 3 級アミン基とピリジン基が残った ($m/z = 121.17$)、チオフェン環と第 3 級アミンを喪失してピリジン環と脂肪族鎖が残った ($m/z = 133.07$)、そして最後に第 3 級アミンの喪失 ($m/z = 217.09$) として合理的に説明できます (図 2)。

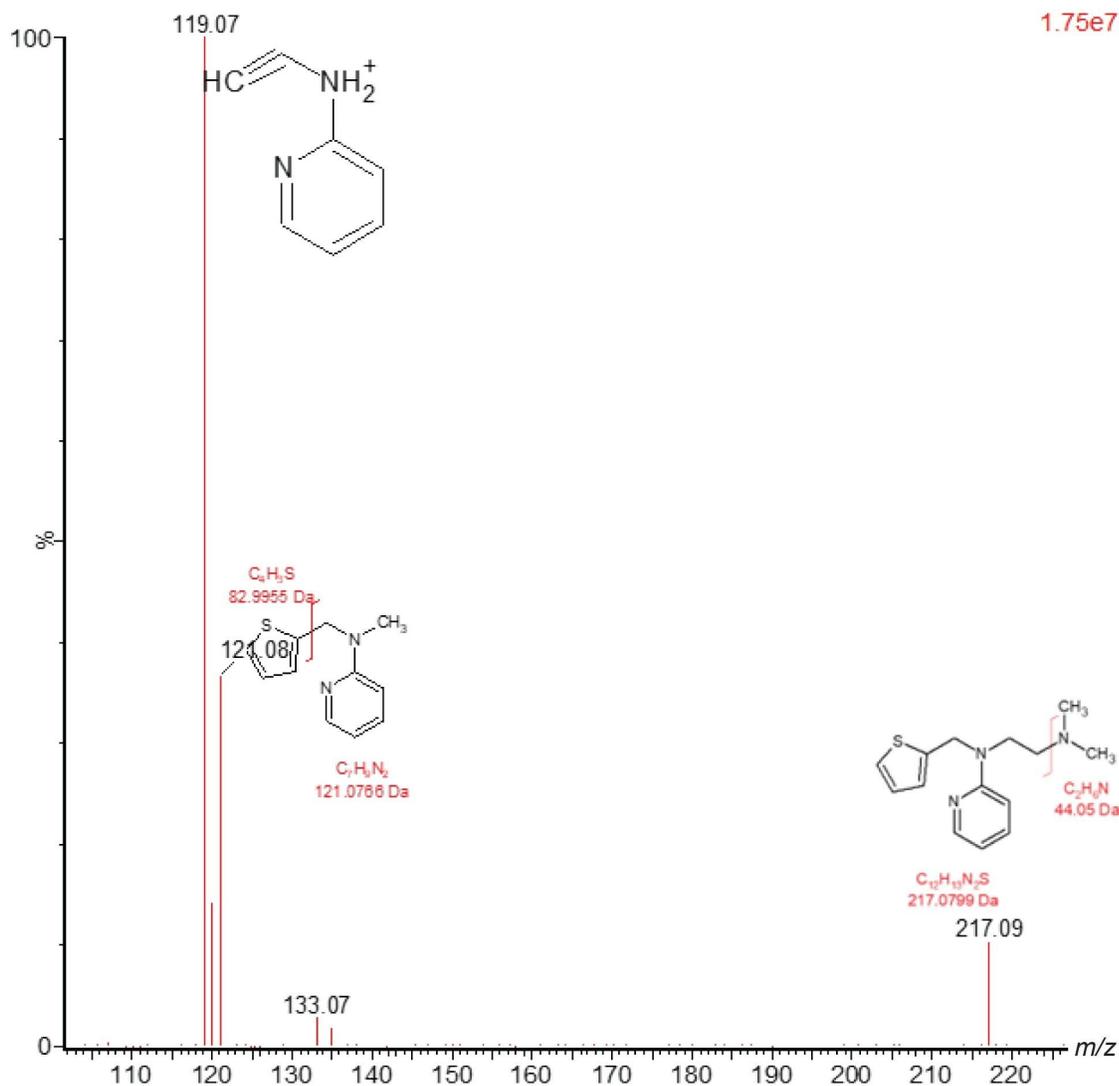


図2. メタピリレン真正標準試料のプロダクトイオンのMS/MS分析 ($m/z = 262.23$)

プリカーサーイオンスキャン取り込み

サーベイスキャンモードで $m/z = 96.88$, 121.17, 137.20 ($m/z = 137.20$ は 121.17 部分の水酸化に対応) のプリカーサーイオンスキャンを使用して尿データを取り込み、質量範囲 $m/z = 50 \sim 600$ にわたってプリカーサーイオンのMS/MSデータを収集しました。セントロイドモードでスキャン時間 0.5 秒、コリジョンエネルギー 30 eV を使用してデータを取り込み、MS/MSモードに切り替え後スキャン時間 0.2 秒でデータを取り込みました。シグナル強度が 1,000 カウントを下回ると、取り込みはプリカーサーイオンスキャンモードに戻りました。 $m/z = 96.88$ のプリカーサーイオ

ンを使用し、担体のみおよび D6 150 mg/kg サンプルについて、尿分析で得られたデータを図 3 に示します。このデータは、プリカーサーイオン $m/z = 96.88$ のサーベイスキャン取り込みにおいて、担体のみのサンプルには存在しなかった複数のピークが、投与したサンプルに検出されたことを示しています。さらに、重ね描きトレースでは、担体のみのサンプルでは医薬品関連物質の兆候が見られず、取り込みプロセスに選択性があることがわかります。図 4 に示したデータでは、同じ D6 150 mg/kg の尿サンプルの分析で得られた TIC クロマトグラムを、3 種類のプリカーサーイオン $m/z = 96.88$ 、121.17、137.20 をそれぞれ使用して比較しています。このデータからわかるように、一部の分析種は 3 種類のプリカーサー質量すべてで検出されますが（例えば、 $t_R = 1.35$ 分のピークなど）、大部分のピークは、 $m/z = 96.88$ 、121.17 の取り込みのみで検出されます。これは、この取り込みモードの選択性を示しています。非対称的なピーク形状は、DDA 取り込みプロセスによるアーティファクトです。

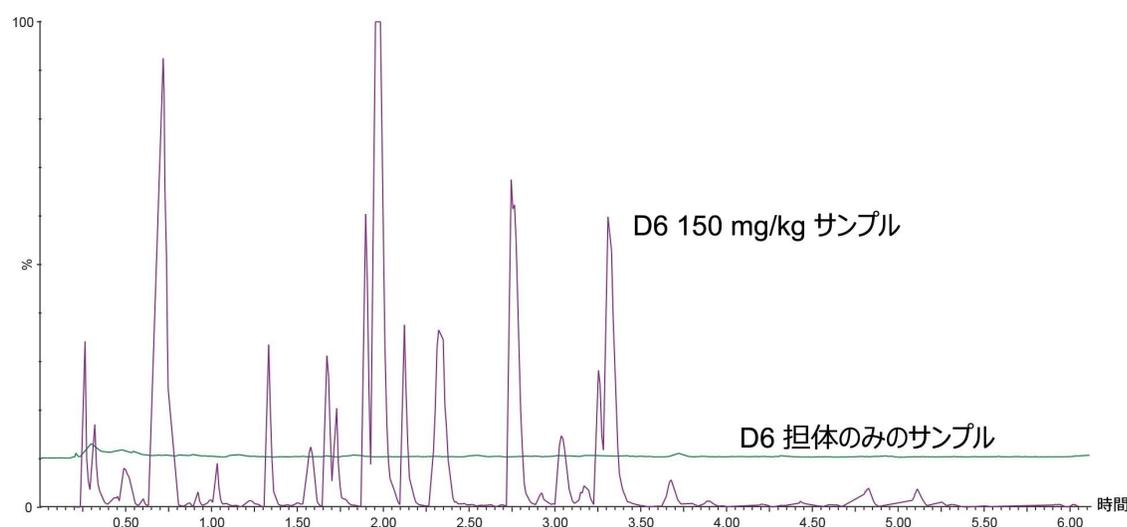


図 3. ポジティブイオン LC-MS/MS サーベイスキャン取り込みプリカーサーイオン $m/z = 96.88$ を使用した D6 担体のみの尿および 150 mg/kg サンプルの分析

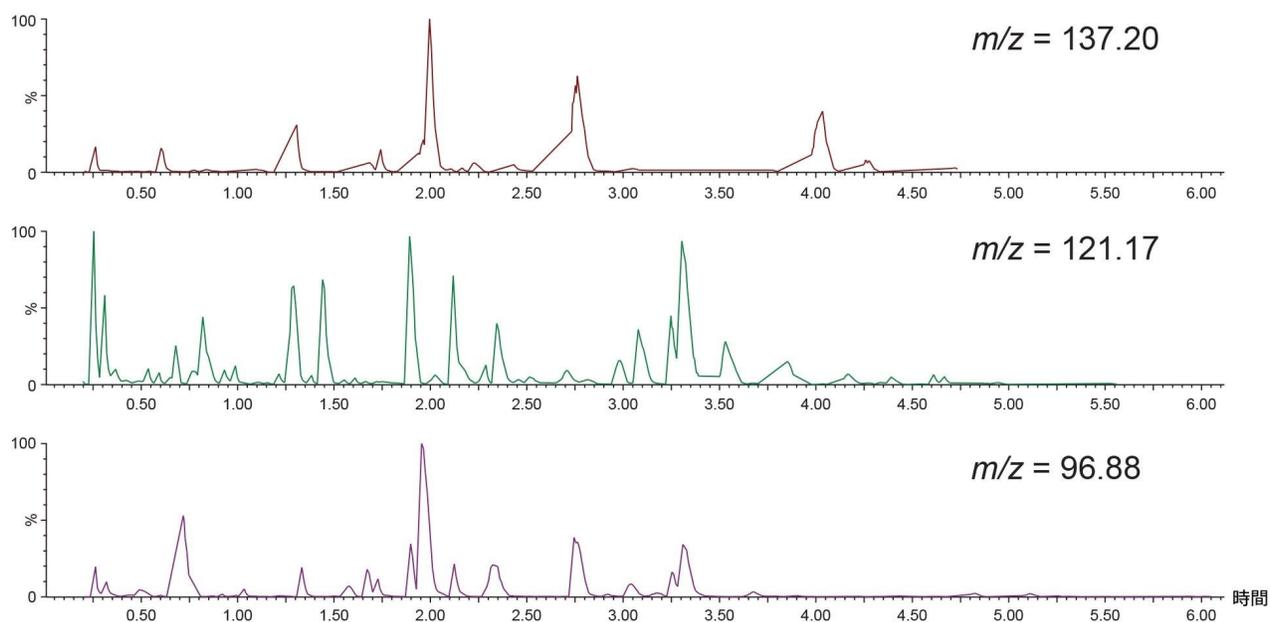


図 4. ポジティブイオン LC-MS/MS サーベイスキャン取り込みプリカーサーイオン $m/z = 96.88$ 、 121.17 、 137.20 を使用した 150 mg/kg サンプルの分析

サーベイスキャンは DDA 取り込みモードであり、スキャン取り込み（この場合はプリカーサーイオン）を利用して、MS スペクトルデータと MS/MS スペクトルデータの両方を単一の分析で収集します。これらの MS スペクトルと MS/MS スペクトルを、代謝物の分類と特性解析に使用しました。この分析モードを使用して、計 34 種の医薬品類縁代謝物が検出されました。 $m/z = 96.88$ のプリカーサーイオンから取得した MS スペクトルと MS/MS スペクトルの例を図 5 に示します。窒素酸化物 ($t_R = 3.3$ 分)、水酸化 ($t_R = 3.0$ 分)、ジヒドロキシル化 ($t_R = 2.7$ 分)、メタピリレンの代謝物について取得された MS スペクトルと MS/MS スペクトルのデータを示しています。DDA 取り込みの特異性により、生成された MS/MS スペクトルには無関係のノイズがなく、したがって解釈がより簡単であることが特記されます。

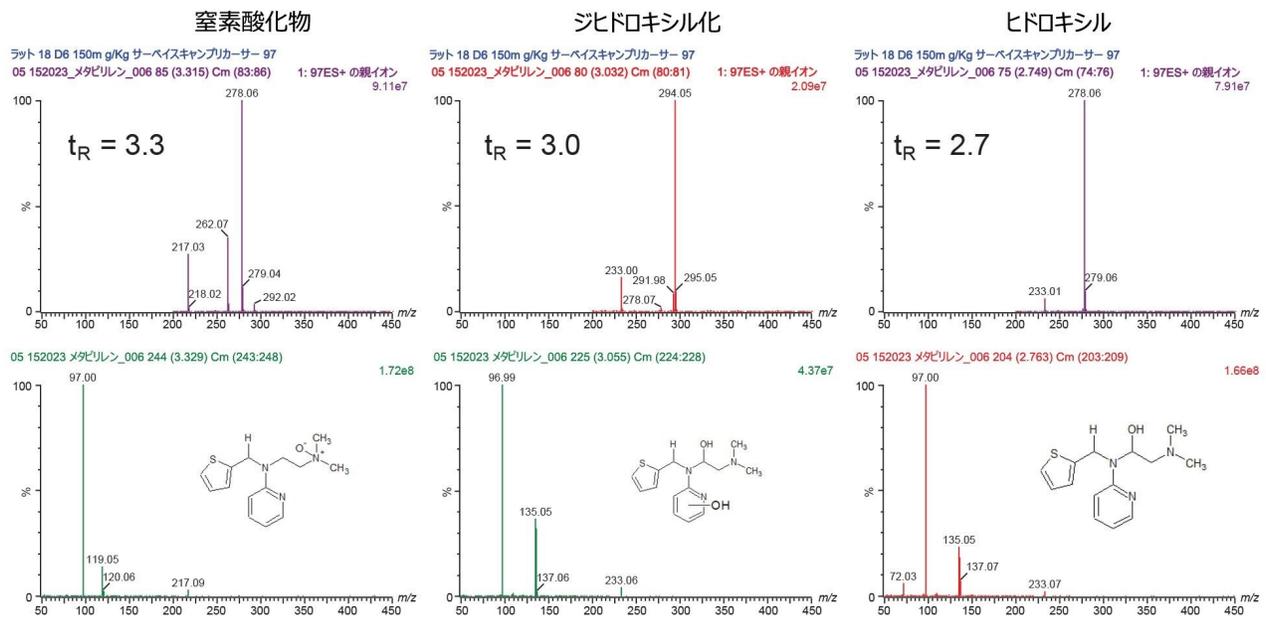
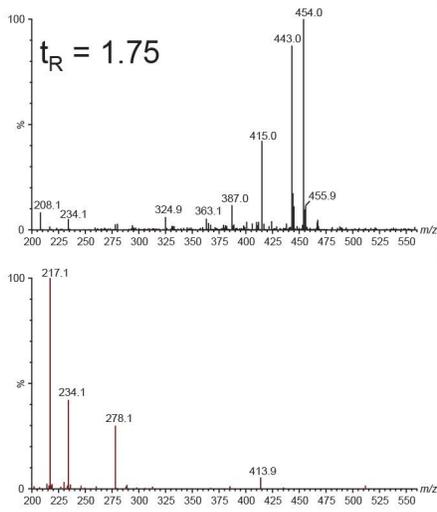


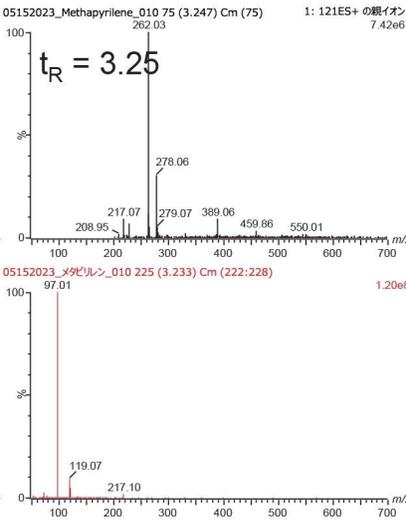
図 5. $m/z = 96.88$ のプリカーサーイオンのサーベイスキャン取り込みを使用した、ラット尿 $D6 150 \text{ mg/kg}$ のポジティブイオン $ESI \text{ LC-MS/MS}$ 分析で得られた MS スペクトルと MS/MS スペクトル

$m/z = 121.17$ のプリカーサーイオンを使用したサーベイスキャン取り込みで取得した MS および MS/MS のデータを図 6 に示します。このデータの例では、メタピリレン（投与化合物）、窒素酸化物 ($t_R = 3.3$ 分)、 N - O -グルクロニド ($t_R = 1.8$ 分) および代謝物について取得されたスペクトルを示しています。図 5 に示すデータと同様に、得られた MS/MS スペクトルは非常に明瞭であり、バックグラウンドノイズがないため、構造解析のプロセスが簡素化します。ウォーターズのタンデム四重極質量分析計の高速取り込み機能により、1 回の分析実行で複数のプリカーサーイオンをスキャンできました。これにより、迅速で包括的な代謝物の検出と代謝部位の特定が可能になりました。

N-O-グルクロニド



メタピリレン



窒素酸化物

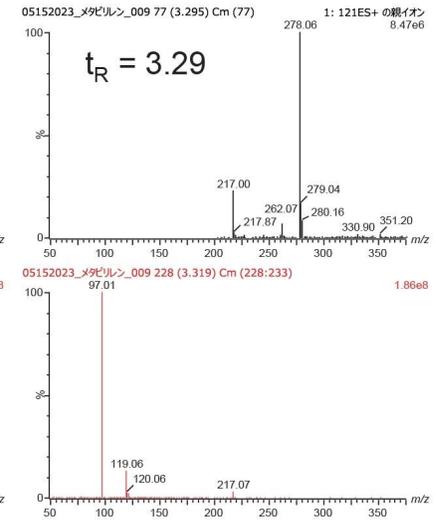


図 6. $m/z = 121.17$ のプリカーサーイオンのサーベイスキャン取り込みを使用した、ラット尿 D6 150 mg/kg のポジティブイオン ESI LC-MS/MS 分析で得られた MS スペクトルと MS/MS スペクトル

コンスタントニュートラルロス (CNL) は MS/MS データ取り込みモードの 1 つであり、ニュートラルフラグメントの喪失に基づいて化合物が検出されます。この取り込みモードは一般的に、硫酸塩、グルクロン酸、グルタチオンなどの極性部分との抱合によって生じる医薬品代謝物のスクリーニングに使用されます。この取り込みモードを説明するため、メタピリレンの尿サンプルを、176.12 Da のニュートラルロスを使用してポジティブイオン ESI サーベイスキャンモードで分析し、グルクロニド代謝物をモニターしました (取り込みパラメーターはプリカーサーイオンスキャンモードと同様でした)。D6 担体のみおよび D6 150 mg/kg サンプルについて取得したデータを図 7 に示します。このデータからわかるように、担体みのサンプルでいくつかのピークが検出され、グルクロニド抱合体 (176.12 Da) の喪失のシグナルが見られました。これらは内因性化合物 (食品や環境など) の抱合体である可能性が最も高いと考えられます。D6 150 mg/kg サンプルの分析では、担体みのサンプルと比較して顕著に多くのグルクロニド抱合体が見られました。

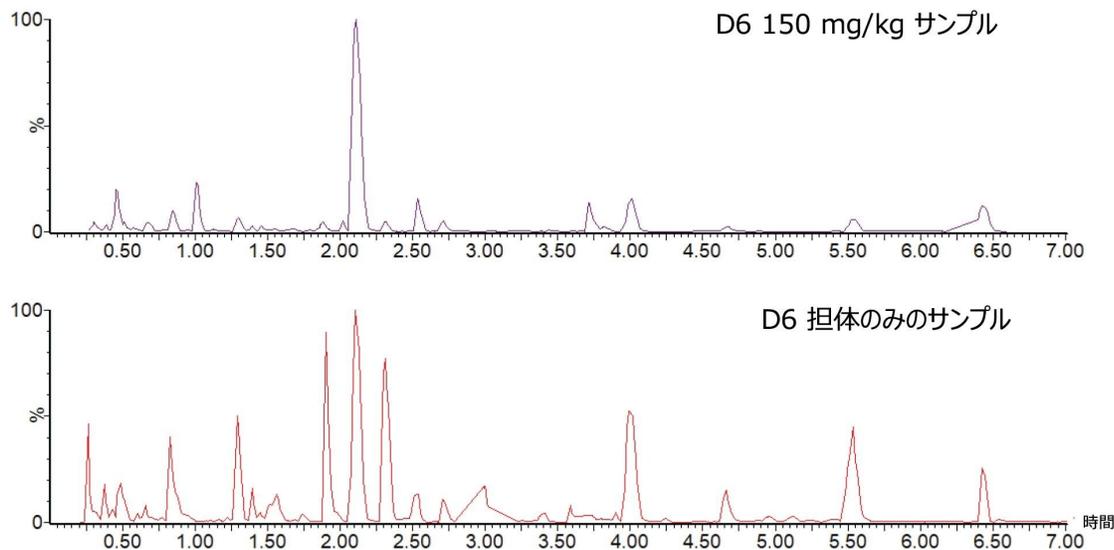


図 7. ポジティブイオン LC-MS/MS サーベイスキャン取り込みのコンスタントニュートラルロス 176.12 Da を使用した D6 担体のみの尿および 150 mg/kg サンプルの分析

メタピリレンを投与した動物の尿の CNL グルクロニド (-176 DA) 分析により、医薬品関連のグルクロニド代謝物の存在についてさらに分析しました。これにより、O-グルクロニド、N-O-グルクロニド、脱メチル O-グルクロニド、ジヒドロキシルグルクロニドなど、メタピリレンの複数官能基化によるグルクロニド抱合体と類縁のいくつかの医薬品が明らかになりました。図 8 に、メタピリレンの O-グルクロニド代謝物 ($m/z = 454.1$) の抽出イオンクロマトグラム (A) のデータを示します。このデータにより、4 種類の O-グルクロニド代謝物が存在することがわかりました。 $t_R = 1.94$ と 1.54 分の 2 本のピークに由来する MS スペクトルと MS-MS スペクトルを図 8 B、C に示します。 $t_R = 1.94$ 分のピークの MS スペクトル (図 8B) では、 $m/z = 454.1$ のベース MS ピークおよび MS/MS フラグメントイオン $m/z = 233.1$ 、 137.08 、 96.88 が見られ、この代謝物はピリジン環の水酸化により生じた代謝物のグルクロニド抱合体であることが裏付けられます。対照的に、 $t_R = 1.54$ のピークに由来する MS/MS フラグメントイオン (図 8C) により、親化合物であるメタピリレン ($m/z = 217.10$ 、 121.08 、 96.99) に一致するフラグメントイオンが得られ、窒素酸化代謝物のグルクロニド抱合体であることが示唆されました。

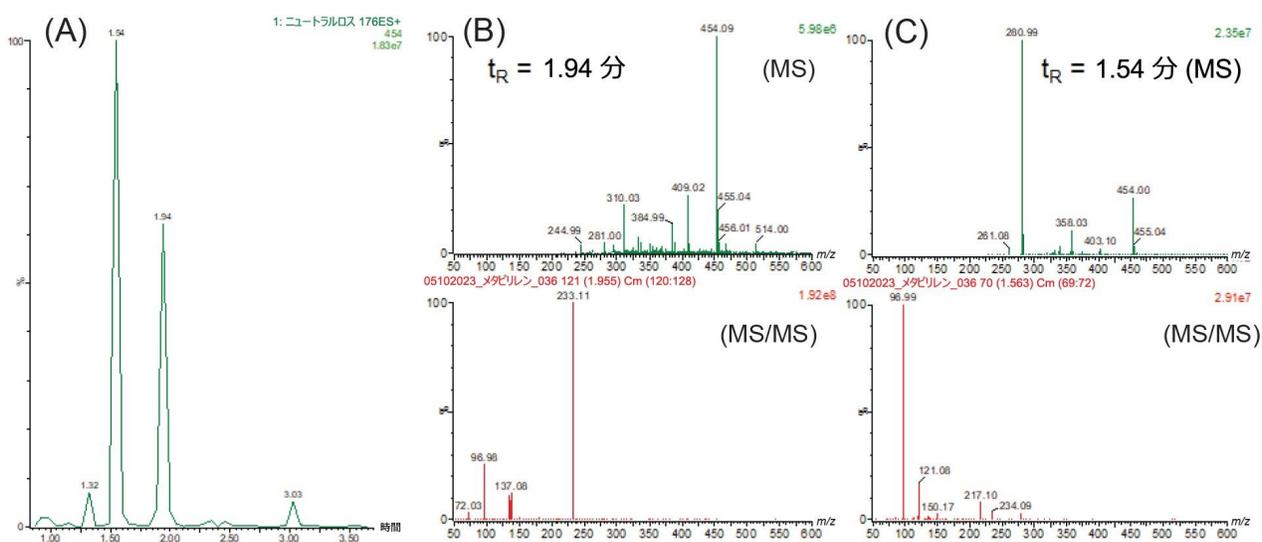


図 8. D6 150 mg/kg 尿サンプルのコンスタントニュートラルロス $m/z=176$ の取り込みから得られた、プリカーサー代謝物 $m/z=454$ の抽出イオンクロマトグラム (A)。 $t_R=1.94$ 分で溶出するピークの MS および MS/MS スペクトル (B)、および $t_R=1.54$ で溶出するピークの MS および MS/MS スペクトル。

結論

医薬品代謝物の検出および特性解析は、創薬および医薬品開発のプロセスで重要な役割を果たします。ウォーターズのタンデム四重極質量分析計は、新規のコリジョンセル設計を備えており、異なる取り込みモード間の迅速な切り替えが可能になっています。サーベイスキャンでは、この機能を利用して、共通のフラグメントイオンまたはコンスタントニュートラルロスによって、医薬品関連物質を選択的にスクリーニングします。この取り込みモードを使用して、ラットへのメタピリレン経口投与後の尿中の医薬品代謝物を調査しました。サーベイスキャン取り込みモードは、迅速で高感度かつ特異的なデータ分析モードであり、きれいな MS/MS スペクトルが得られて、構造の解釈が簡素化しました。このアプローチを使用して得られたターゲット MS/MS スペクトルにより、医薬品代謝物の迅速でシンプルな特性解析が可能になりました。このアプローチを使用して、30 種を超える尿中の医薬品関連代謝物が検出および特性解析されました。この取り込みモードを使用したことで、これまでに報告されていなかった N-O-グルクロニドなどのメタピリレンの代謝物が検出されました。

参考文献

1. Molloy BJ, King A, Mullin LG, Gethings LA, Riley R, Plumb RS, Wilson ID. Rapid Determination of the Pharmacokinetics and Metabolic Fate of Gefitinib in the Mouse Using a Combination of UPLC/MS/MS, UPLC/QToF/MS, and Ion Mobility (IM)-Enabled UPLC/QToF/MS. *Xenobiotica*. 2021 Apr;51(4):434–446. doi: 10.1080/00498254.2020.1859643.
2. Lanz J, Williams G, Dayer J, Délémonté T, Gertsch W, Ramstein P, Aichholz R, Trunzer M, Pearson D. Evaluation of Relative MS Response Factors of Drug Metabolites for Semi-Quantitative Assessment of Chemical Liabilities in Drug Discovery. *J Mass Spectrom*. 2017 Apr;52(4):210–217. doi: 10.1002/jms.3918. PMID: 28152561.
3. Ackermann BL, Berna MJ, Murphy AT. Recent Advances in Use of LC/MS/MS for Quantitative High-Throughput Bioanalytical Support of Drug Discovery. *Curr Top Med Chem*. 2002 Jan;2(1):53–66. doi: 10.2174/1568026023394605.
4. Geenen S, Guallar-Hoyas C, Michopoulos F, Kenna JG, Kolaja KL, Westerhoff HV, Thomas P, Wilson ID. HPLC-MS/MS Methods for the Quantitative Analysis of 5-Oxoproline (Pyroglutamate) in Rat Plasma and Hepatic Cell Line Culture Medium. *J Pharm Biomed Anal*. 2011 Nov 1;56(3):655–63. doi: 10.1016/j.jpba.2011.06.001.
5. "Tandem Quadrupole Acquisition Modes in DMPK Studies", Waters Application Note [720008016](#).
6. Molloy BJ, King A, Gethings LA, Plumb RS, Mortishire-Smith RJ, Wilson ID. Investigation of the Pharmacokinetics and Metabolic Fate of Fasiglifam (Tak-875) in Male and Female Rats Following Oral and Intravenous Administration. *Xenobiotica*. 2023 Feb;53(2):93–105. doi: 10.1080/00498254.2023.2179952.

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>>

720008228JA、2024 年 1 月



© 2025 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシーポリシー](#) [商標](#) [キャリア](#) [法的通知およびプライバシー通知](#) [Cookies](#)
[Cookie 環境設定](#)