

インターゲット分析特集

A COMPENDIUM OF
RELATED RESEARCH
APPLICATIONS



ノンターゲット分析

これまで食品、環境、法医学分野においては、規制された化合物の定量分析が主流でした。

しかし、昨今の食品偽装や食品への異物混入、環境汚染事故、また危険ドラッグによる事件などにより、予期しない化合物に対応可能な分析へのニーズが高まっています。

本資料では、こういった分析に最適なノンターゲット分析(対象を限定しない分析)に焦点を当てた特集を行っています。

Contents

食品・環境分析

Qq-TOF-MSシステムを用いた食品中の混入物質の同定

QTOFを用いた農薬代謝試験

高分解能LC-MS/MSを使った食品サンプルのノンターゲット未知物質スクリーニング

LC-QTOFを用いた米の中の成分についての差異解析

-SWATH®によるペプチド解析の食品分野への応用-

Are Pork Extract Present In My Gummy Bear?

(豚抽出物はグミに含まれているのか? :英語)

法医学分析

新規LC-QTOF-MSを用いた薬物分析の検討

Comparison of HPLC – QTOF MS/MS Analysis to a Routine EMIT, HPLC, GC/NPD and GC/MS Workflow for Forensic Drug Screening LC

(法医学分野での毒物スクリーニングにおけるHPLC-QTOF MS/MSと従来のルーチン分析-EMIT, HPLC, GC/NPD, GC/MS-との比較:英語)

食品・環境分析



Qq-TOF-MSシステムを用いた 食品中の混入物質の同定

○会田 祐司, 建田 潮, 山崎 俊幸, 唐澤 薫 (株式会社 エービー・サイエックス)



【はじめに】

食品の安全性が注目される昨今、製品の安全管理とその保証がより重要になってきており、また、異物混入事件においては、その原因の特定に迅速な対応が求められている。このため、測定方法には簡便な前処理と網羅的な測定・効率的な解析が必要とされる。それに加え、試料の変質や廃棄などによってデータの再取得が難しいことも想定され、過去に測定したデータにおいて混入物の検出・同定が可能であることも求められる。

今回、前処理にQuEChERS法、測定にAB SCIEX TripleTOF® 5600+ System、データ解析にMasterView™ソフトウェアを用いることで食品中の混入物質の同定、及び構造推定を簡便・迅速・網羅的に行うことが出来たので報告する。

【試料と方法】

サンプル: オレンジ、ポテトチップス

前処理(QuEChERS法): 細断したサンプル(オレンジ10 g, ポテトチップス1 g)を50 mL チューブに採取し、ポテトチップスには5 mL ヘキサンを加え、10 mL アセトリル、roQ™ Extraction Kitsを添加後、遠心分離した。分離後、アセトリル層を15 mL チューブに分取しroQ™ dSPE Kitsを添加後、再度遠心分離を行い上清をLC/MS/MS試験溶液とした。



Figure 1. roQ™ QuEChERS Kits

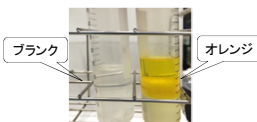


Figure 2. 抽出操作



Figure 3. TripleTOF® 5600+ system

高速液体クロマトグラフ: 島津製作所社製 UFLCxxシステム

カラム: ワイエムシ社製 Triant C18 1.9 µm (2.0 mmφ × 100 mm)

LC 条件: 0.1% 甲酸を含む精製水と0.5 mL 酢酸アンモニウムを含むメタノールを用いたグラジエント分析

質量分析計: AB SCIEX TripleTOF® 5600+ System

イオン化法: ESI法

測定モード: Positive, TOF-MS-IDA-MS/MSを用いたTOF-MSスキャンの情報から、毎秒最大25の化合物に対するTOF-MS/MSスキャンを行い、双方のデータを自動的に取得するInformation Dependent Acquisition (IDA)による測定

解析ソフトウェア及び方法: PeakView® ソフトウェア及びMasterView™ ソフトウェアを用いた同位体比の情報を含めた精密質量から組成演算とフラグメントイオンを用いた構造推定を行った。

AB SCIEX TripleTOF® Systemを用いた混入物探索ワークフロー

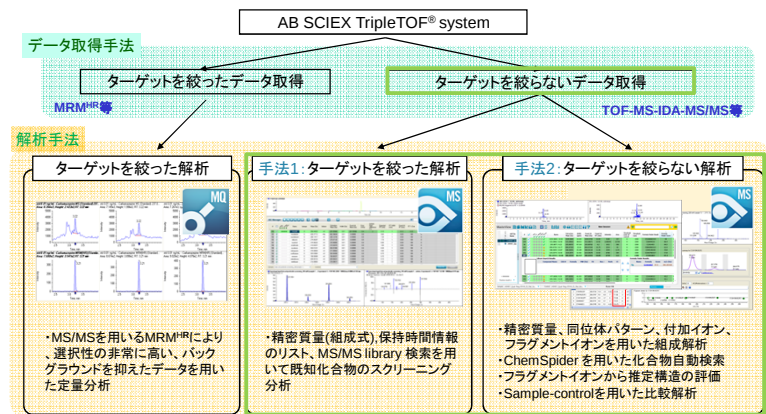


Figure 4. Targeted or Non-targeted workflow (今回は、手法1と手法2を用いた解析を行った)

MasterView™ソフトウェアを用いたターゲット・ノンターゲットスクリーニング解析

未知の混入物質を同定する際には、ターゲットを絞らずにデータを取得する。そのため、何らかの手法を用いて、膨大なデータの中から目的の化合物についてのデータを見つけ出す必要がある。

今回、MasterView™ソフトウェアを用いることで、以下の2種類の手法による解析を行った。

手法1: 化合物リスト(質量精度、保持時間、同位体比、MS/MSスペクトル判定)によるターゲットスクリーニング
手法2: サンプル間の比較などの候補化合物の選定とChemSpiderを用いた組成候補からの構造探索によるノンターゲットスクリーニング

今回の手法と異なる方法として、MarkerView™ ソフトウェアなどの多変量解析ソフトウェアを利用し、主成分分析(PCA: 多変量解析)とPCVPG(Principal Components Variable Grouping: グループ間での多変量解析)を用いて統計学的なデータ解析を行う方法などがある。

【結果】

1. 手法1: ターゲットを絞った解析

今回は一般的に用いられる農薬約150種に対して組成式のリストを作成し、解析した結果、オレンジ中からクロロニコチル系殺虫剤であるイミダクロプリド、殺菌剤・防カビ剤の一種でポストハーベストとして知られているチabendazole (TBZ) が検出・同定された。(Figure 5, 6)

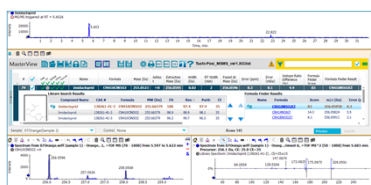


Figure 5. ターゲットスクリーニング結果(イミダクロプリド)
質量誤差: 0.3 ppm, 同位体比誤差: 4.4 %,
ライブラリ判定: 100%, 組成式スコア: .83
上記の値より、Imidaclopridと同定した。



Figure 6. ターゲットスクリーニング結果(チabendazole)
質量誤差: -0.6 ppm, 同位体比誤差: 0.9 %,
ライブラリ判定: 77 %, 組成式スコア: .85
上記の値より、Thiabendazoleと同定した。

【Abbreviation】

IDA: Information Dependent Acquisition

EIC: Extracted Ion Chromatogram

TICC: Total Ion Current Chromatogram

2. 手法2: ターゲットを絞らない解析

QuEChERS法で前処理した操作プランクとポテトチップスサンプルに対して、TOF-MS-IDA-MS/MSメソッドにより測定を行った。取得したデータに対し、MasterView™ソフトウェアを用いて、ピーク抽出と2つのサンプル間の差分解析を行った(Figure 7)。

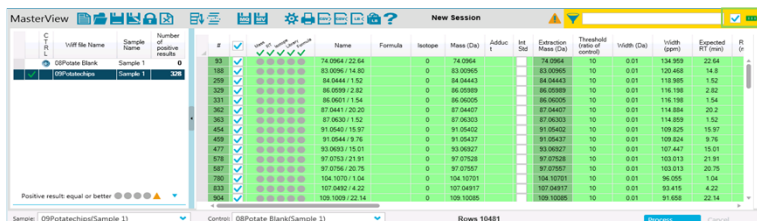


Figure 7. 自動ピーク抽出+2サンプル間比較結果(図内、右が差のあるピークの一覧)
Intensityで10倍以上の差があるピークを抽出

MasterView™ソフトウェアによって得られたピークリストに対して、以下の解析を行った。

・組成解析(精密質量、同位体比) ・ChemSpiderによる候補の探索 ・MS/MSスペクトルライブラリーサーチ(これらはソフトウェア上で、自動で行われる)

結果、ポテトチップスから、発芽防止剤、除草剤であるクロロプロファム、体内で消化・分解されてグリンドールになる可能性が指摘されているグリンドール脂肪酸エステルが検出・同定された(Figure 8, 9, 10, 11)。

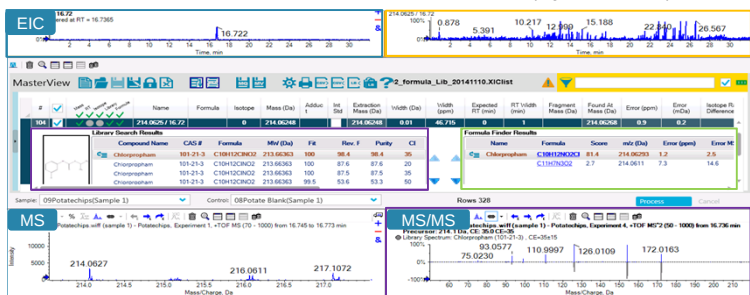


Figure 8. 化合物推定結果(クロロプロファム)
組成解析(図中段)、ライブラリーサーチ(下段右)から、化合物がクロロプロファムであることを推定した。

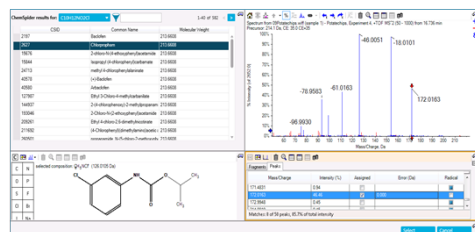


Figure 9. ChemSpiderによる構造確認(クロロプロファム)

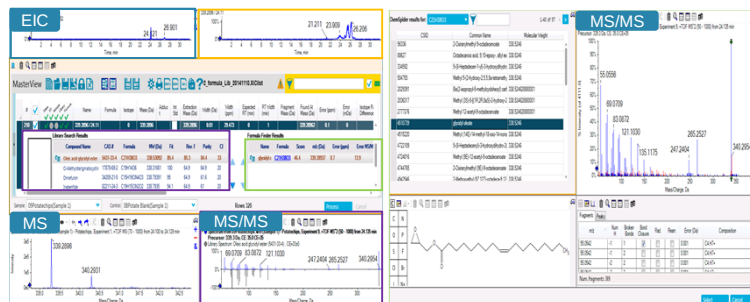


Figure 10. 化合物推定結果(グリンドール脂肪酸エステル)
組成解析(図中段)、ライブラリーサーチ(下段右)から、化合物がグリンドール脂肪酸エステルであることを推定した。

Figure 11. ChemSpiderによる構造確認(グリンドール脂肪酸エステル)

【結論】

手法1: ターゲットを絞った解析

オレンジから、クロロニコチル系殺虫剤であるイミダクロプリド、殺菌剤・防カビ剤の一種でポストハーベストとして知られているチabendazole (TBZ) が検出・同定された。

手法2: ターゲットを絞らない解析

ポテトチップスから、発芽防止剤、除草剤であるクロロプロファム、体内で消化・分解されてグリンドールになる可能性が指摘されているグリンドール脂肪酸エステルが検出・同定された。

【考察】

外因性のものだけでなく、内因性のものも構造推定出来たことから、本報告での方法を用いることで簡便かつ迅速に、網羅的な混入物質の構造推定を行うことが出来ると考えられる。

【参考】

- 1) Katerina Mastovska and Steven J. Lehotay .:J. Agric. Food Chem., 2006, 54 (19), Rapid Sample Preparation Method for LC-MS/MS or GC-MS Analysis of Acrylamide in Various Food Matrices
- 2) 浅倉 こそら.:第107回日本食品衛生学会 学術講演会(2013), 高分解能LC-MS/MSによる簡便且つ信頼性の高い残留農薬定量分析
- 3) André Schre and Yun Yun Zou .: Technical note, 2011, RC-MS/MS Based Strategy for the Non-Targeted Screening of an Unlimited Number of Contaminants in Food Using the AB SCIEX TripleTOF™ 5600 System and Advanced Software Tools

【TRADEMARKS/LICENSING】

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. © 2014 K. K. AB SCIEX.

QTOFを用いた農薬代謝試験



○会田 祐司¹、建田 潮¹、松尾 俊介²、須賀 香屋子¹、鈴木 大悟¹
¹サイエックス、²株式会社アイスティサイエンス

【はじめに】

食の安全確保のため、日々残留農薬分析が行われている。具体的にはサンプリングから始まり、試験溶液調製(抽出・精製)やLC-MS/MSによる測定など様々な工程が正確な結果を得るためには必要になる。LC-MS/MSによる測定はもとより、試験溶液調製も重要な工程である。対象食品によっては、測定対象の農薬が試験溶液調製中に分解等を起こし、正確な結果が得られない場合がある。

今回、タマネギを対象食品とした農薬代謝試験を、前処理法としてSTQ法、測定に1回の測定で必要な情報(精密質量、同位体分布、プロダクトイオンスペクトル)が取得出来るSCIEX X500R QTOF Systemを用いて行ったので、得られたデータを紹介する。

【試料と方法】

サンプル：たまねぎ **対象農薬**：a)チオファネートメチル(TPM)、カルベンダジム(MBC)、b)フェノキサプロップエチル(FPE) **前処理**：対象農薬a)に対しては粉砕後のたまねぎに添加し、室温及び凍結状態でSTQ法(株式会社アイスティサイエンス)による前処理を行った。対象農薬b)に対しては、粉砕後のたまねぎに添加し、一晩37℃で静置し同様にSTQ法による前処理を実施した。



Figure 1. サンプル



Figure 2. SCIEX X500R QTOF System

高速液体クロマトグラフ：島津製作所社製 Nexera X2システム

カラム：GLサイエンス社製 InertSustain 2µm, 2 x 100mm

LC 条件：0.1%酢酸を含む精製水と0.1%酢酸を含むメタノールを用いたグラジエント分析

質量分析計：SCIEX X500R QTOF System

イオン化法：ESI法

測定モード：Positive、TOF MS-IDA-MS/MSを用いたTOF MSの情報から、毎スキャン最大25の化合物に対するTOF-MS/MSスキャンを行い、双方のデータを自動的に取得するInformation Dependent Acquisition (IDA)による測定を実施した。

解析ソフトウェア及び方法：データ取得から定量・構造推定などのデータ解析まで1つのソフトウェアで対応可能なSCIEX OSを用いて、サンプルコントロール間の差分解析を実施した。

SCIEX X500R QTOF Systemを用いたサンプル測定ワークフロー

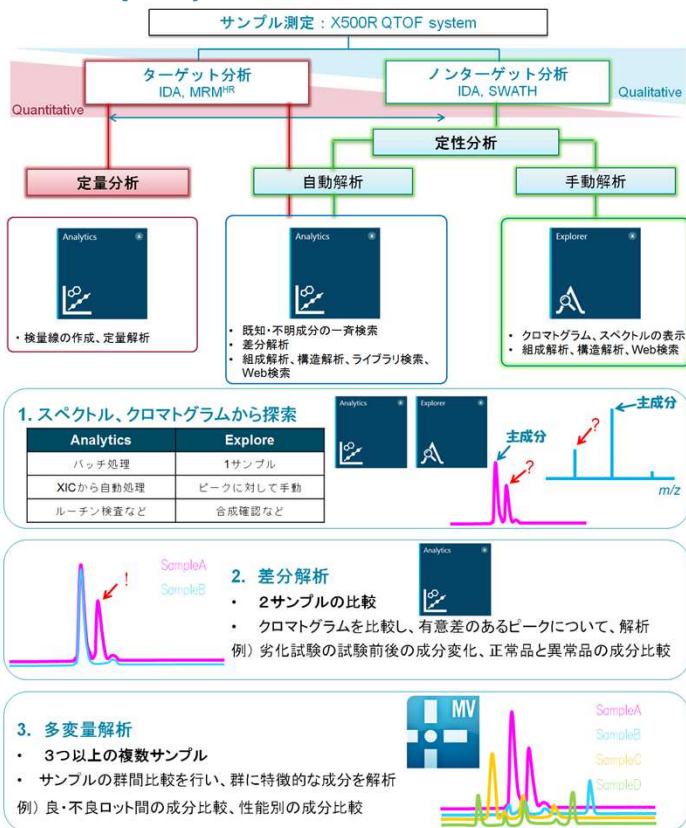


Figure 3. SCIEX X500R QTOF Systemを用いたサンプル測定ワークフロー

【結果】

1. a) サンプルの状態(室温・凍結状態)による、農薬の変化

室温、または凍結状態のタマネギにチオファネートメチルを添加し、STQにより前処理を実施後、SCIEX X500R QTOF Systemで測定し、チオファネートメチルとその分解物であるカルベンダジムのそのエリア値を確認した。

Table.1 保存状態によるエリア値の変化

	未添加	凍結	室温
チオファネートメチル(TPM)	0	2539602	2386014
カルベンダジム(MBC)	0	66448	126039

【Abbreviation】

IDA: Information Dependent Acquisition

EIC: Extracted Ion Chromatogram

TICC: Total Ion Current Chromatogram



Figure 4. TPMのXIC及びエリア値



Figure 5. MBCのXIC及びエリア値

2. b) フェノキサプロップエチルの保存状態による代謝物の確認

未添加サンプルと添加後37℃一晩静置したサンプルを、それぞれSCIEX X500R QTOF Systemで測定し、これらの差分解析により差分ピークを抽出し、構造推定を行った。その結果、(1)エチル基が脱離したと推定されるフェノキサプロップと、(2)メチル基が脱離したと推定されるフェノキサプロップメチルへの変化が観測された。



Figure 6. 2サンプル間の差分解析後の差分ピーク(推定:フェノキサプロップ)の、XIC、MSスペクトル、及びMS/MSスペクトル

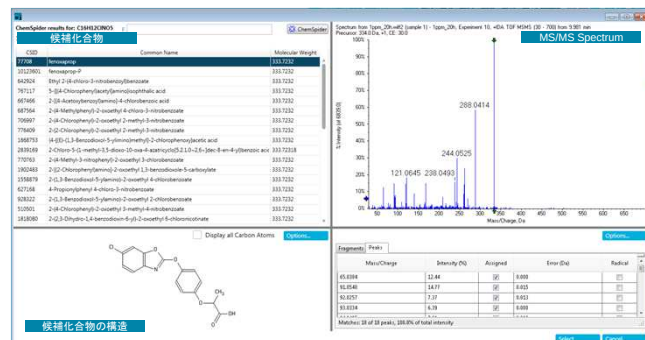


Figure 7. 取得したMS/MSスペクトルとChempSpiderを用いた自動Fragment matching



Figure 7. 差分ピーク(推定:フェノキサプロップメチル)のライブラリーサーチ結果

【結論】

a) サンプルの状態(室温・凍結状態)による、農薬の変化

チオファネートメチルを含むサンプルを室温で操作した場合、レスポンス比として約10%がカルベンダジムに変化していた。

b) フェノキサプロップエチルの保存状態による代謝物の確認

(1)エチル基が脱離したと推定されるフェノキサプロップと、(2)メチル基が脱離したと推定されるフェノキサプロップメチルへの変化が観測された。

【考察】

一度の測定で化合物推定に必要な情報(精密質量、同位体分布、プロダクトイオンスペクトル)を一度の測定で取得できるSCIEX X500R QTOF Systemは再測定の手間がなく効率的な解析が行えた。さらに、1つのソフトウェアで差分解析や構造推定など多彩な解析が可能なSCIEX OSであれば、代謝試験だけでなく、食品中の混入成分の検出などにも有効だと考えられる。今後は、このような事例にも活用し、様々なデータ知見を得ていく予定である。また、時間経過による分解については、あらかじめ段階的な検証が必要と考える。

【参考】

1) 千葉ら、宮城県保健環境センター年報、第33号、2015、STQ法による残留農薬分析のための試料前処理法の検討

2) 会田ら、食品衛生学会2014、QqTOFMSシステムを用いた食品中の混入物質の同定

【TRADEMARKS/LICENSING】

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. © 2016 K. K. AB SCIEX. AS 10-479 A

高分解能LC-MS/MSを使った食品サンプルのノンターゲット未知物質スクリーニング



André Schreiber¹, Jianru Stahl-Zeng², Jeffery Rivera¹ and Vanaja Raguvaran^{1 1}
SCIEX, Concord, ON (Canada); ² SCIEX, Darmstadt (Germany);

概要

食品中の残留物質や汚染物質といった予期せぬ物質の構造を推定するための新しい未知物質スクリーニングアプローチを使って得られた結果を報告します。果実と野菜サンプルをQuEChERS法により抽出し、コアシェルカラムを用いた逆相クロマトグラフィーで分析を行いました。SCIEX X500R QTOFシステムのInformation Dependent Acquisition (IDA) 測定モードを用いた1回の測定で、高分解能の精密質量MSおよびMS/MSデータを取得しました。コントロールとサンプルの比較や、組成解析、ライブラリサーチ、およびChemSpiderによる化合物検索を自動で行うことのできる、新しいSCIEX OSソフトウェアを使ってデータ解析を実施しました。

はじめに

エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を使用したLC-MS/MSは、広範な分子量和極性をもつ化合物をカバーし、半揮発性化合物や熱不安定性化合物を分析できる強力な分析ツールです。特に三連四重極質量分析計は、Multiple Reaction Monitoring (MRM) モードで操作したときの優れた選択性と感度により、1回の分析で何百もの食品汚染物質のターゲット定量を可能にすることから、一般的に使用されています。トリプル四重極-リニアイオントラップ (QTRAP®) や四重極飛行時間型 (QTOF) のようなハイブリッドシステムを含むLC-MS/MS技術の進歩により、今ではターゲットおよびノンターゲットスクリーニングをルーチン試験で実施することが可能になっています。しかし、フルスキャンクロマトグラムは非常に情報に富み、サンプルだけでなくサンプルマトリクスそのものに存在する化合物からのイオンも含まれるため、そのイオン数はすぐに数千にも上ります。そのため、生成された高分解能の精密質量データを探索するための強力なソフトウェアが必要になります。

今回は、一般的な抽出操作とLC分離に高分解能・精密質量MS/MS検出を組み合わせた新しい未知物質スクリーニングアプローチを使って得られたスクリーニング結果を報告します。TOF-MSおよびMS/MSデータはSCIEX X500R QTOFシステムを使って取得しました。

TOF-MSおよびMS/MSの情報をもとに、食品中の残留物質や汚染物質といった予期せぬ化学物質のスクリーニングを行いました。マトリクス (コントロールサンプル) と汚染物質を含むマトリクス (サンプル) を比較することで、ターゲットとなる汚染物質特有のシグナルを抽出します。抽出したイオンは、ライブラリを使って自動検索を行うとともに、得られた候補組成を用いて ChemSpider 上で候補化合物を検索し、構造解析を行います。新しいSCIEX OSソフトウェアは、食品中の予期しない化学物質の構造を推定するための、使いやすい直感的なワークフローを提供します。

実験

- 地元のスーパーマーケットで入手した果実と野菜のサンプル
- EURLによって提供された標準物質を使った定量
- 欧州公定法 15662に従った、Phenomenex roQ QuEChERSキット緩衝塩ミックスおよびdSPEキットを使ったQuEChERS法
- マトリクス効果を最小にするため10~20倍に希釈したサンプル抽出物
- SCIEX ExionLC™ ACシステムとPhenomenex Kinetex Biphenylカラム (50 x 2.1 mm, 2.6 µm) を使ったUHPLC
- 5 mMのギ酸アンモニウムを含有する水とメタノールのグラジエント
- 0.5 mL/分の流速
- 5 µLの注入量



- エレクトロスプレーイオン化 (ESI) を用いたTurboV™ イオンソース搭載 SCIEX X500R 500 QTOFシステムによる検出
- Twin Spray設定を使った Calibrant Delivery System (CDS) によるサンプル分析間に行う継続的なキャリブレーション
- Information Dependent Acquisition (IDA) :
 - 100~1000 DaのTOF-MSサーベースキャン (100 ms)
 - Collision Energy (CE) 35 V, Collision Energy Spread (CES) ±15 Vを使った50~1000 DaのDependent TOF-MS/MSスキャン (50 ms) 10回
- 最良のIDAカバレッジが得られるようにDynamic background subtraction (DBS) を有効化し、inclusion listは使用せずに、未知化合物のMS/MSを取得しました。過去のデータを使用して再解析を行うこともできます。
- SCIEX OSソフトウェアを使ったノンターゲットデータ解析

結果

SCIEX X500R QTOFシステムの性能特性 2万超の分解能 (半値幅) と5 ppm未満の質量精度があれば、多くの場合、干渉マトリクスから分析対象を十分に分離することができることから、これらの数値は各種ガイドラインで化合物同定の要件とされています。4mm径のTOF管前オリフィスとN字型光学系を採用したX500R QTOFシステムは、低分子量化合物で25000から35000の分解能と2 ppm未満の質量精度を提供します。X500R QTOFの感度とリニアダイナミックレンジはQTRAP® 5500システムのMRMモードと同等であるため、イオン化抑制を最小に抑えることのできる前処理抽出物の希釈を可能にし、10 µg/kgレベルでの検出を簡単にこなします (図1および2)。

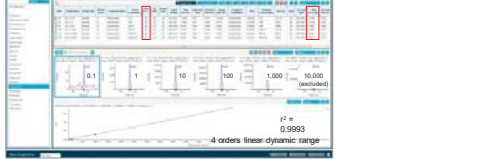
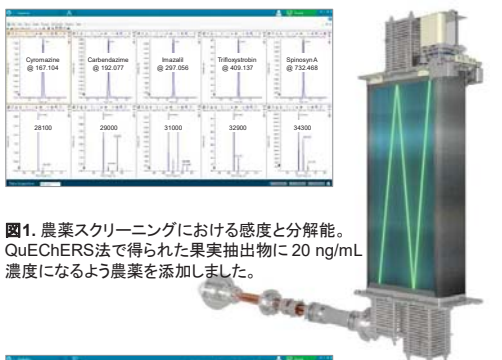


図1. 農薬スクリーニングにおける感度と分解能。QuEChERS法で得られた果実抽出物に 20 ng/mL 濃度になるよう農薬を添加しました。

ノンターゲットデータ分析のワークフロー

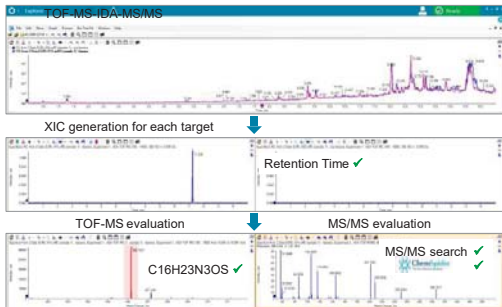


図3. ノンターゲットピークファインディングアルゴリズムを使ってXICを抽出し、コントロールとサンプルのXICを比較することで、マトリクスのシグナルと汚染物質に関連するシグナルを識別します。MSおよびMS/MSの情報から得られた候補組成をもとに、MS/MSを用いたライブラリサーチ、ChemSpiderサーチを自動的に実施します。ChemSpiderが導き出した構造とHR-MS/MSスペクトルが自動的に比較され、汚染物質の構造を推定します。

SCIEX OSソフトウェアでのデータ分析ワークフロー

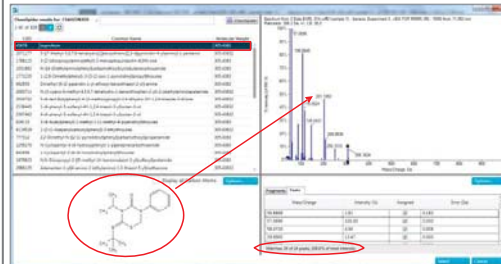
- 1) ノンターゲットピークファインディングと解析パラメータの設定



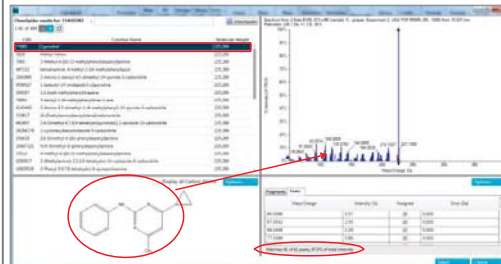
2) 2サンプル (コントロールとサンプル) 間の自動比較とスペクトル解析



3) ChemSpiderサーチと構造解析



有機栽培バナナ抽出物のコントロールサンプルとの比較で見つかった、バナナに含まれるプロフェジンの構造解析



有機栽培ブドウ抽出物のコントロールサンプルとの比較で見つかった、ブドウに含まれるシプロジニルの構造解析

まとめ

食品サンプル中の予期しない未知化学物質の構造を推定するための新しいノンターゲットスクリーニングアプローチを開発し、食品サンプルへの適用に成功しました。果実と野菜のサンプルはQuEChERS法により抽出し、コアシェルカラムを用いた逆相クロマトグラフィーで分析を行いました。SCIEX X500R QTOFシステムのInformation Dependent Acquisition (IDA) 測定モードを用いた1回の測定で、精密質量のMSおよびMS/MSデータを取得し、新しいSCIEX OSソフトウェアを使ってデータ解析を実施しています。

SCIEX OSソフトウェアは、コントロールサンプルとサンプルを比較し、サンプルに含まれる特有の汚染物質とマトリクスを識別しました。ターゲットとなるイオンはスペクトルライブラリを使って自動検索を行うとともに、候補組成を見つけChemSpiderサーチにより候補化合物を検索しました。ChemSpiderが導き出した構造とHR-MS/MSスペクトルは自動的に比較され、構造解析までを自動的に行いました。このように、新しいSCIEX OSソフトウェアは、食品中の予期しない化学物質の構造を推定するための使いやすい直感的なワークフローを提供します。

参考文献

- 1 EU Commission Decision 'concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results' #2002/657/EC
- 2 SANCO Document: 'Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed' #SANCO/12495/2011

TRADEMARKS/LICENSING

研究用にもみ使用できません。診断目的には使用できません。The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. © 2015 AB Sciex. MKT 10- 360 A.

LC-QTOFを用いた米の中の成分についての差異解析

-SWATH®によるペプチド解析の食品分野への応用-

○建田 潮, 横山 亮, 会田 祐司(株式会社 エービー・サイエックス)



【はじめに】

食品の安全に関わる分析において、液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析装置(LC/MS/MS)は、残留成分(農薬等)の分析などに多く用いられている。その中でも精密質量を測定できる液体クロマトグラフィー・四重極/飛行時間型タンデム質量分析装置(LC-QTOF)は、その対応できるワークフローの多彩さから使用実績が増えてきている。

また近年、食品の正当性(品種や産地)について多くの議論がなされるようになってきている。しかしながら、これらに対するLC/MS/MSを用いた分析事例は多く見受けられることはできない。そこで、今回品種の違いを解析するためのワークフローについて、LC-QTOFを用いたコメ中のペプチドの分析によって報告する。測定は、定量的再現性を保ったまま網羅的に測定することが可能なSWATH®を用いて行った。

【方法】

サンプル: コメ、(計10種)

A: 無洗米、B-F: 日本産白米、G: もち米、H: 古代米、I: タイ産古代米、J: タイ産白米

前処理: 酸性の水溶液でコメ中から水溶性成分を抽出し、その後タンパク質を沈殿により除去、濃縮した。

コメをミキサーにより1mm末程度に破碎し、10mLの0.5mM酢酸を加え、1時間超音波(45℃)抽出した。これを3000gにて15分間遠心分離し、上清を3mL採取した。この上清に対して18mLのアセトンを加え、終夜-20℃にて静置し、タンパク質を沈殿させた。これを15000gにて30分間遠心分離し、上清を17mL採取し、フィルタリング後300uLまで濃縮し、測定サンプルとした。

高速液体クロマトグラフ: 島津製作所社製 UFLCXRシステム

カラム: GLサイエンス製 InertsustainC18 1.9μm (2.0 mmφ × 100 mm),

LC 条件: 0.1%酢酸を含む精製水とアセトリトリルを用いたグラジエント分析

質量分析計: AB SCIEX TripleTOF® 5600+ System, イオン化法: ESI法 (Positive)

ソフトウェア: AnalystTF®1.7, Peakview®2.1 with SWATH® Acquisition MicroApp, ProteinPilot® Markerview®2.2

測定モード: 差異解析用: SWATH®, イオンライブラリ作成用: TOF-MS・IDA・TOF-MS/MS (IDA),

SWATH (Sequential Window Acquisition of all Theoretical fragment-ion spectra)

SWATHは、LC-QTOFにおけるデータ取得方法の一つで、取りこぼし無く再現性のよいデータを取得する際に使用する。Q1を25Da(可変)の幅に設定してMS/MSを取得する。これを繰り返し、サンプル中に含まれる全てのイオンについてのMS/MSスペクトル情報を得ることができる(図1)。IDA (Information Dependent Acquisition)でのMS/MSスペクトル取得よりも高い再現性で、MRMよりも高い網羅性を持って、定性、定量両面で使用可能なデータを取得できる(図2、3)。すべてのイオンに対してのフラグメントイオンのデータが内包されるため、後から様々な解析をすることが可能となる。

TOF-MS・IDA・TOF-MS/MS (IDA)

TOF-MSで一定基準を満たして検出されたイオンを選択し、TOF-MS/MSにてスペクトルを取得する。イオンライブラリの作成に使用した。

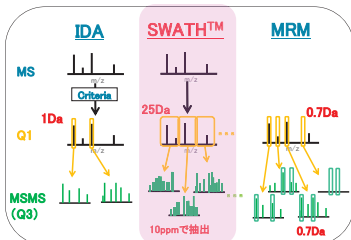


図1 SWATHと他のスキャンの比較

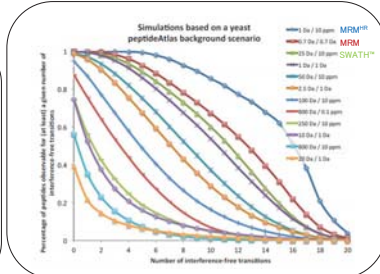


図3 SWATHの定性性*1

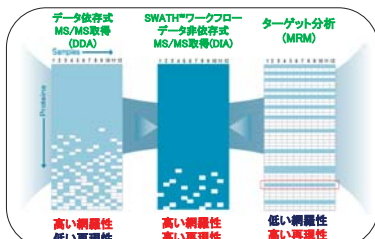


図2 SWATHの特徴(他のスキャンとの比較)

測定からデータ解析

まず、SWATHでデータを取得した。その後、あらかじめIDAで測定しておいたデータから作成したイオンライブラリにてピークの抽出を行った。最後に抽出したピークをMarkerView®ソフトウェアにてサンプル間の多変量解析を行った(図4)。多変量解析とは、多くの変数要素を持ったデータを解析する手法である。その中でも、主成分分析(principal component analysis : PCA)は群間の違いをプロットし、その違いを作り出す主成分を分析することによく使用される。

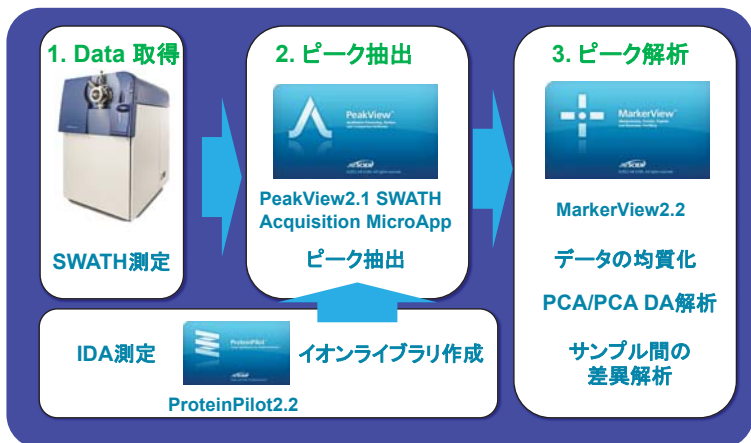


図4 測定から解析のフローチャート

【結果】

1. イオンライブラリの作成

まず、サンプルB(日本産白米)についてIDA測定でイオンライブラリ作成用のデータを取得した。それらデータをProteinPilotを用いてペプチド同定を行った(図5)。その結果、95%以上のConfidenceを持っているペプチドが167個同定された(表1)。そこで、この同定データをイオンライブラリとして使用することとした。

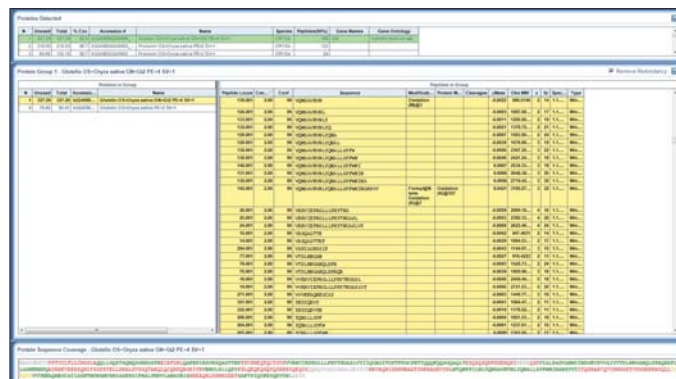


図5 ペプチド同定データの例

Unused (Conf) Cutoff	Proteins Detected	Proteins Before Grouping	Distinct Peptides	Spectra Identified	% Total Spectra
>2.0 (99)	69	102	2443	2660	88.2
>1.3 (95)	97	167	2553	2774	92.0
>0.47 (66)	173	439	2622	2845	94.4
Cutoff Applied: >0.05 (10%)	412	1813	2661	2884	95.7

表1 ペプチド同定数

2. SWATHデータからのピーク抽出

各サンプルにつき3試行づつSWATH測定を行い、差異解析用のデータを取得した。取得したデータに対し、Peakview2.1 with SWATH Acquisition MicroAppを用いてピークの抽出を行った(図6)。

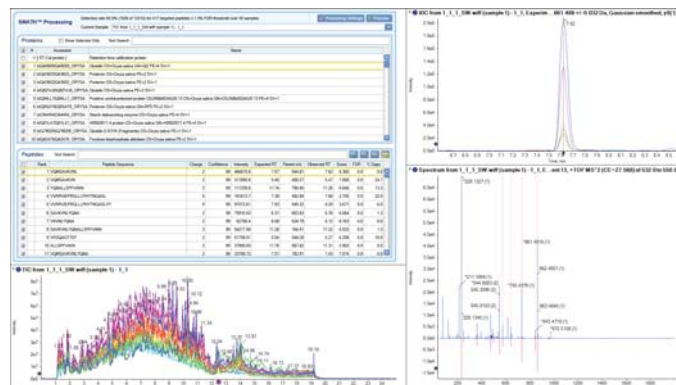


図6 SWATHデータ解析例

3. 抽出データに対するMarkerViewでのサンプル間の差異解析

抽出データをMarkerView2.2ソフトウェアで多変量解析した。その結果、タイ産白米は大きく日本産のものとの差異があることが分かった。さらに、日本産、タイ産の色味は非常に似たプロットを示すことが分かった(図7)。どのような成分がこのプロットの違いに影響しているのかを見たところ、配列ESSRGPFNLLのペプチドは日本産赤米に多く、タイ産黒米でも見られた。配列FFAPGGRNPEのペプチドはタイ産黒米に多く、日本産赤米でも見られた。配列VQMSAVKVNLLのペプチドは多くのサンプルに含まれるが、タイ産白米に特に多く含まれていた(図8)。

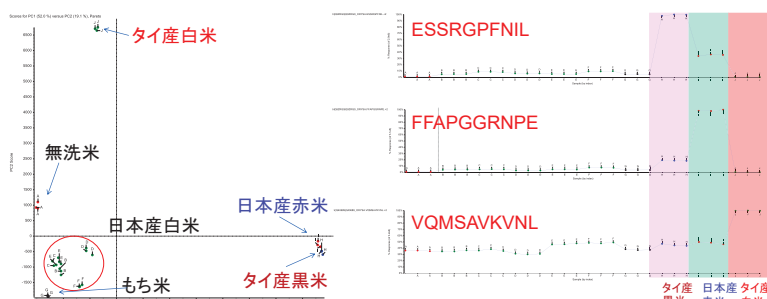


図7

【結論】

SWATH測定により網羅的で再現性のあるデータ取得を核としたワークフローにより、タイ産や色米等、品種の違いによる差異を見出すことができた。しかしながら、保存条件等をそろえることが困難であったことから、日本産白米の中での差異解析は行わなかった。今後は各条件をそろえた分析を行うことにより、またペプチド以外のイオンライブラリを使用することにより、より良い結果を導き出せる。

【参考】

- Gillet, Arbersold Institute of Molecular Systems Biology, ETH Zurich, Switzerland
- André Schre and Yun Yun Zou : Technical note, 2011, RC-MS/MS Based Strategy for the Non-Targeted Screening of an Unlimited Number of Contaminants in Food Using the AB SCIEX TripleTOF™ 5600 System and Advanced Software Tools

【TRADEMARKS/LICENSING】

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. The trademarks mentioned herein are the property of Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. © 2015 SCIEX.

【Abbreviation】

IDA: Information Dependent Acquisition
EIC: Extracted Ion Chromatogram
TICC: Total Ion Current Chromatogram

Are Pork Extracts Present in My Gummy Bears?

Gelatin Speciation by LC-MS/MS



Chor Teck Tan¹, André Schreiber², and Jens Dahlmann³
¹ SCIEX Singapore, ² SCIEX Concord, Ontario (Canada), ³ SCIEX Darmstadt (Germany)

OVERVIEW

The accidental or fraudulent blending of meat and animal products from different species is highly relevant for consumers with ethical concerns against eating species such as horse or pork in particular the Jewish and Muslim communities. In this work, we present the results from the initial development of an LC-MS/MS method utilizing SCIEX TripleTOF® 5600 and 4000 QTRAP® LC/MS/MS systems for the determination of the origin of gelatin used in food products (candies and gummy bears) and also pharmaceutical capsules.



INTRODUCTION

Following the Food Standards Agency (FSA)’s announcement in January that horse and pig DNA had been identified in beef products sold by several supermarket chains, further testing across Europe and beyond has revealed widespread incidences of such food contamination. This intended adulteration for financial gain or careless false declaration of meat products is a severe problem for consumers who have ethical or religious concerns about the consumption of pork or horse, more specifically the Muslim or Jewish communities who represent about 23 % of the worldwide population. As the tolerance level for porcine and equine content in foods is 0 %, for religious reasons, the limit of detection (LOD) needs to be as low as possible and so the continued development of more sensitive methods is necessary.¹

However, pork based products are not only used as the meat but can also be found in gelling agents in food (for example in candy, ice cream, and marshmallows) as well as in the cosmetic and pharmaceutical industry in the form of gelatin. Gelatin is made from collagen, a protein, which has been extracted from the skin, bones, and connective tissues of animals such as cows, chicken, pigs, and fish. After extraction the collagen is partially hydrolyzed to form the gelatin which is a mixture of peptides and proteins and is used in the form of sheets, granules or powder.

In the production of gelatin the protein hydrolysis normally occurs with hot water or under acidic conditions. The gelatin so produced is purified and used in food manufacturing and this process again may involve elevated temperatures. Under these conditions species-specific DNA present from the original animal is often denatured or removed making the use of the polymerase chain reaction (PCR), often used in species identification, difficult²⁻⁴ or impossible.⁵

An alternative protein-based method, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), has also been used for speciation⁶ but this approach has limitations, including that it detects only one part of the protein and not multiple protein markers and so can pose a risk of producing false negatives and positives.

So an LC-MS/MS approach, detecting multiple tryptic peptides as markers for confirmation offers a more accurate and reliable approach to gelatin speciation than PCR or ELISA-based techniques. Initial identification of markers was by a shotgun proteomics approach using the high-resolution and accurate mass SCIEX TripleTOF® 5600 system.⁶ The method developed in this work uses the SCIEX 4000 QTRAP® system where multiple reaction monitoring (MRM) was used to detect markers which then automatically trigger the acquisition of enhanced product ion (EPI) scan to provide additional sequence information to further identify the peptides and proteins and therefore the gelatin species.

EXPERIMENTAL

Sample Preparation

Each sample (5mg) was dissolved in 600 µL of 50 mM ammonium bicarbonate buffer (37 °C for 10-15 minutes). This extract was digested using trypsin (50 mM in ammonium bicarbonate buffer) in a trypsin to sample ratio of 1:100. Digestion took place either overnight at 37 °C (10-15 hours) or using a microwave burst technique where the samples are placed in ice and subject to 5 x 30 sec of microwave digestion, between each microwave burst the sample was shaken. Once digested the samples were spun (12,000 rpm for 5 minutes). The top supernatant layer (500 µL) was removed carefully, not to disturb the bottom sediment, and centrifuged again (12,000 rpm for 5 minutes). The top portion of the supernatant (200 µL) was used for analysis.

LC-MS/MS

Initial identification of species specific peptides, from tryptic digests of porcine and bovine gelatin, was done by a shotgun proteomics approach using the high resolution and accurate mass SCIEX TripleTOF® 5600 system coupled to an Eksigent ekspert™ ultraLC 100-XL system. In these survey experiments a Phenomenex Aeris wide pore column was used for separation of the peptides using a 45 minutes gradient at a flow rate of 250 µL/min. An information dependent acquisition (IDA) method was used to automatically trigger 30 TOF-MS/MS spectra from the information in the TOF-MS survey scan.

Principle components analysis within the software was then used to identify species specific markers (Figures 1 and 2).

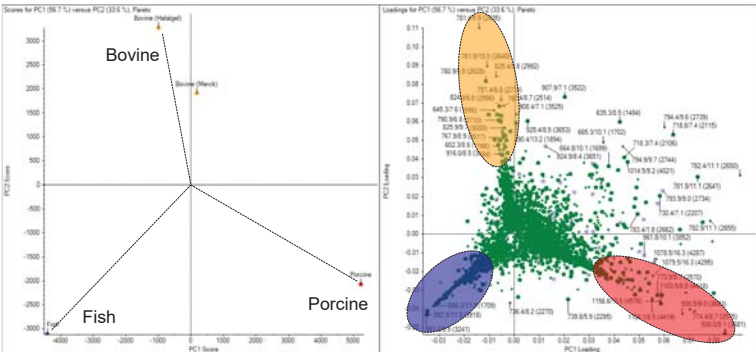


Figure 1. MarkerView™ software was used to identify characteristic markers for gelatin speciation, PCA Scores plot for bovine, porcine and fish (left) and PCA Loadings showing characteristic markers (right)

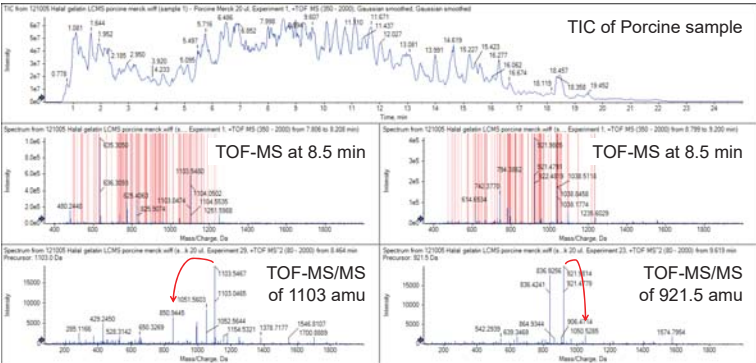


Figure 2. TOF-MS and TOF-MS/MS data of two selected marker compounds for porcine, TripleTOF® data was used to develop the MRM method

From this information seven markers were identified and the method was transferred to an SCIEX 4000 QTRAP® system where MRM transitions for each marker were optimized. In this final screening method samples were separated on a C18 column using the gradient shown in Table 1 where eluent A was water and eluent B was acetonitrile with both mobile phases containing 0.1% formic acid. The flow rate was set to 250 µL/min, column oven temperature to 40°C, and 20 µL of the sample volume was injected.

Are Pork Extracts Present in My Gummy Bears?

Gelatin Speciation by LC-MS/MS



MRM conditions for the most intense marker transitions are given in Table 2. In addition 3 qualifier transitions were monitored for each peptide marker. MRM transitions were acquired at a dwell time of 20 msec and were used as IDA triggers to automatically acquire full scan EPI spectra for identification of the gelatin marker.

Table 1. LC gradient conditions used for separation at a flow rate of 250 µL/min

Step	Time	A (%)	B (%)
0	0.0	95.0	5.0
1	2.0	95.0	5.0
2	12.0	60.0	40.0
3	12.5	10.0	90.0
4	13.0	95.0	5.0

Table 2. MRM transitions for the marker peptides of bovine and porcine gelatin, DP was set to 100 V for all transitions

Marker	Q1	Q3	CE (V)
Pork 1	1103.0	850.9	57.5
Pork 2	486.2	786.4	26.4
Pork 3	921.5	1050.6	49.4
Pork 4	620.8	618.3	28.3
Beef 1	659.3	766.5	34
Beef 2	781.4	991.6	42.3
Beef 3	644.8	971.5	37.3

RESULTS

When burst microwave digestion was compared to the traditional overnight trypsin digestion results were identical, as this method was quicker this approach was used for this study. Alkylation and reduction of the proteins was also not necessary as the disulfide bridges and the secondary structure of the collagen had already been broken during extraction and purification of the gelatin.

Trypsin extracts produced from beef and pork samples using this method were compared (Figure 3) and marker peptides which have different sequences and generated different MRM and fragmentation patterns could be produced.

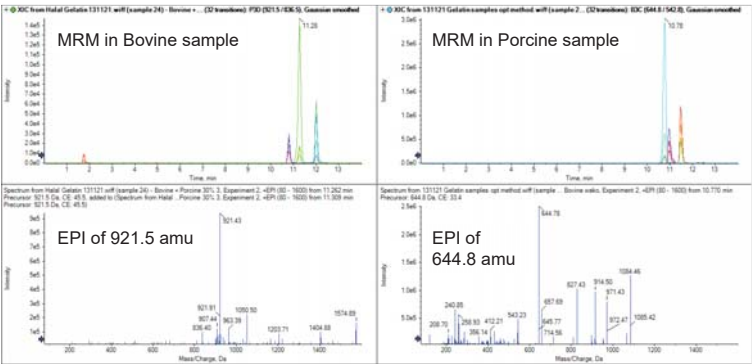


Figure 3. Comparison of a tryptic digest of a porcine gelatin (left) and a bovine (right) gelatin, MRM transitions were used to automatically acquire full scan EPI spectra for identification of the gelatin marker

Beef gelatin was then spiked with pork gelatin so that levels of contamination of beef with pork gelatin could be determined and a 1% contamination of bovine gelatin with porcine gelatin could be easily identified (Figure 4).

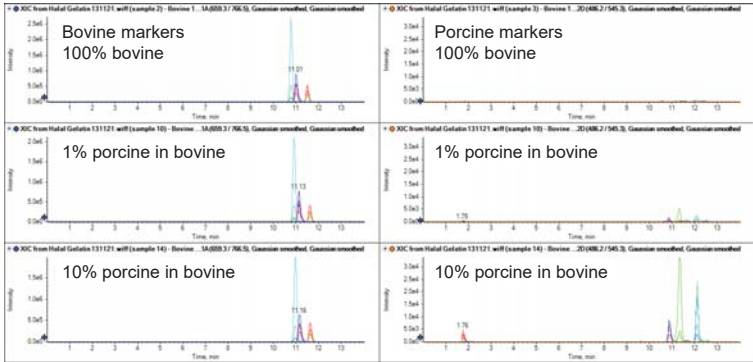


Figure 4. Results of spiking pork gelatin into beef gelatin, porcine markers were easily detected at 1% contamination

The method was then tested on extracts of gummy bears, fruit and chocolate candies as well as pharmaceutical capsules used for drug delivery and examples are shown in Figure 5. Here pork gelatin was detected but with no trace of bovine gelatin seen in the sweets and in the capsules only bovine gelatin was detected.

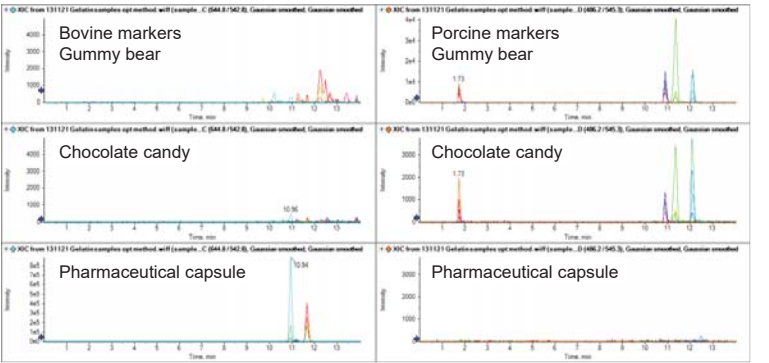


Figure 5. Results from the analysis of gummy bears, candy and pharmaceutical capsule for the presence of bovine (left) and porcine (right) markers. These examples show the presence of pork gelatin in gummy bear and chocolate candy. In the pharmaceutical capsule only bovine gelatin was detected.

SUMMARY

In this study, we have identified 7 markers which are either specific for pork or beef gelatin and highlight the use of LC-MS/MS for gelatin speciation. These first results have shown that the gelatin ingredient can be extracted and analyzed in less than 1 hour and a 1% impurity of pork in beef gelatin can be detected. Further to this, this method can be used to detect the presence of pork gelatin in processed food such as sweets and also the animal source gelatin used in pharmaceutical capsules and offers multiple points of identification previously not available by ELISA analysis.

In the future lower detection limits will be possible with the use of microLC⁶ and more sensitive LC-MS/MS systems which mean that gelatin speciation at even lower levels is possible. This will help alleviate ethical concerns of the source of gelatin used in food manufacturing and pharmaceutical capsules used to deliver drugs.

REFERENCES

1. P. J. O'Mahony: 'Finding horse meat in beef products - a global problem' QJM 106 (2013) 595-597
2. S. Ghovvati, M. R. Nassiri, S. Z. Mirhoseini, A. H. Moussavi, A. Javadmanesh: 'Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay' Food Control 20 (2009) 696-699
3. S. Soares, J. S. Amaral, M. B. Oliveira, I. Mafrá: 'A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products' Meat Science 94 (2013) 115-120
4. S. R. Murray, R. C. Butler, A. K. Hardcare, G. M. Timmerman-Vaughan: 'Use of quantitative real-time PCR to estimate maize endogenous DNA degradation after cooking and extrusion or in food products' J Agric Food Chem 55 (2007) 2231-2239
5. F.-C. Chen, Y. H. P. Hsieh: 'Detection of pork in heat-processed meat products by monoclonal antibody-based ELISA' Journal of AOAC International 83 (2000) 79-85
6. Stephen Lock: 'Can LC-MS/MS Be Used in Horse Meat Detection?' Application Note SCIEX (2013) # 7580213-01

TRADEMARKS/LICENSING

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB Sciex™ is being used under license.

法医学分析



〇須賀 香屋子¹, 安部 寛子², 岩瀬 博太郎^{2,3} (¹株式会社エービー・サイエックス, ²千葉大・法医, ³東大・法医)

ABSTRACT

薬物分析は法医学分野の薬物関連死や法科学分野の薬物関連の事件解明に必須な分析であり、迅速かつ網羅的な分析法が望まれる。

本研究では、生体試料・法医学試料における迅速な薬物分析の確立を目的とし、スクリーニングおよび定量的包括的分析を簡単かつ効率良く実施できるよう開発されたSCIEX X500R QTOF Systemによる薬物分析の評価を行ったので報告する。

INTRODUCTION

IDA (Information Dependent Acquisition)測定法はMSとMS/MSを同時に取得する高速、高分解能、高質量精度な分析法であり、1度の測定でサンプル中に含まれる化合物の質量情報を大量に得ることができる効率良い測定法である。得られたデータは、定量だけでなく既知の化合物リストを用いたターゲットスクリーニングや未知成分を検出するノンターゲットスクリーニングに対応しており、その解析を効率良く行うソフトウェアの機能性も重要である。

本研究では、定性、定量性能を兼ね備えたSCIEX X500R QTOF Systemを用いてIDAを行った。解析はこの装置と共に開発されたSCIEX OS Softwareを用い、既知の化合物リストによるクロマトグラム抽出とそのピークのモノアイソトピック質量の精度と同位体比、保持時間、ライブラリ(MS/MS)の一致度を自動判定するターゲット解析と同時に定量を行った。さらに、未知成分の混入を想定したノンターゲットスクリーニングでは、独自のアルゴリズムを使ってクロマトグラム抽出とそのピークのMSおよびMS/MSの組成解析とChemSpiderサーチの自動検索を行い、ChemSpiderが示した構造とMS/MSとの比較により最終的にその構造を推定した。

MATERIALS, METHODS AND CONDITIONS

Samples Preparation:

ブラインドテスト試料

実際の症例を参考に、ブランク血液・尿に薬物を添加・前処理した

血液および尿 (2症例分の血液・尿;計4試料)

前処理

試料血液・尿ともに0.5mLを用い、アセトリル除タンパク後にQuEChERS

抽出キットを使用し、薬物成分を抽出した。

マトリックス検量線の調製

ブラインドテストで検出された薬物の混合標準溶液を系列希釈し、血液および尿に添加して調製した(検量線濃度: 1.5, 10, 50, 100, 500 ng/mL)。

LC

System: Nexera2 System (Shimadzu)

Column: L-column ODS 5um, 1.5*150mm

Mobile Phase:

A: 95% 10mM ammonium formate, 5% MeOH

B: 5% 10mM ammonium formate, 95% MeOH

Flow Rate: 0.1mL/min,

Column Oven: 40°C

Injection Volume: 10uL

Software

SCIEX OS Software (SCIEX)

Information Dependent Acquisition method (IDA)

Survey ScanのTOF-MSを取得しながら、TOF-MSで一定以上の感度があるもののMS/MSを取得。

DBS機能の併用により、TOFMS後、不要なバックグラウンドノイズや同じピークを重複してMS/MSせず、強度の強いピークのLC上のピークトップでMS/MSを測定することが可能。

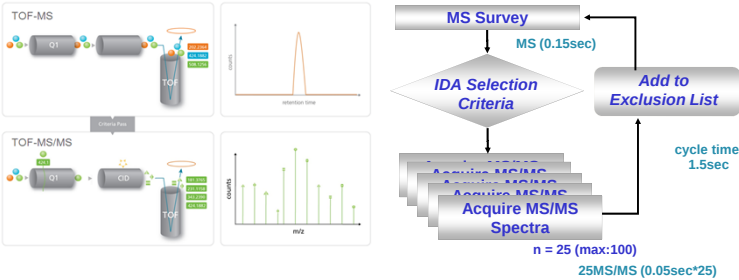


Figure2 IDA workflow

RESULT-1 Target and Non-target Screening

Target Screening

ブラインドテストとして約3000薬物のターゲットリストおよびライブラリ(MS/MS)を用い、検出された成分についてモノアイソトピック質量の精度と同位体比、保持時間、ライブラリ(MS/MS)の4項目で一致度を判定した。

[Blood]

Table1 血液中の症例1(4薬物)および症例2(7薬物)中の同定結果

	Component Name	Formula	Found At Mass	Mass Error (ppm)	Retention Time	Area	Height	RT Confidence	Mass Error Confidence	Isotope Confidence	Library Confidence	Library Hit
症例1	Alprazolam	C17H13ClN4	309.089	0.872	14.27	1.584e5	1.784e5	✓	✓	✓	✓	Alprazolam
	Paroxetine	C19H18FNO3	330.150	0.838	13.32	1.633e7	6.791e5	✓	✓	✓	✓	Paroxetine
	Amodiaquine	C17H18ClN3O	314.104	-0.150	14.08	2.203e6	1.174e7	✓	✓	✓	✓	Amodiaquine
	Lidocaine	C14H17ClN2O	235.100	-0.938	13.79	5.870e7	1.704e5	✓	✓	✓	✓	Lidocaine
症例2	Olanzapine	C17H18N4S	312.140	-0.959	13.27	1.332e8	6.401e7	✓	✓	✓	✓	Olanzapine
	Trazodone	C18H17ClN2SO	372.155	-2.765	15.81	1.065e8	1.041e7	✓	✓	✓	✓	Trazodone
	Flunitrazepam	C16H12F2N2O3	314.084	0.884	13.77	1.389e6	1.440e5	✓	✓	✓	✓	Flunitrazepam
	Etizolam	C13H15ClN4S	341.077	-1.548	14.41	3.893e7	4.440e5	✓	✓	✓	✓	Etizolam
	Diphenhydramine	C17H19N	256.169	-1.813	12.75	2.214e8	1.174e7	✓	✓	✓	✓	Diphenhydramine
	7-Aminoflunitrazepam	C16H14FN3O	284.113	-0.389	10.93	3.393e7	2.840e5	✓	✓	✓	✓	7-Aminoflunitrazepam
	Lamotrigine	C8H7ClN3S	256.015	-1.624	11.06	4.042e8	1.326e7	✓	✓	✓	✓	Lamotrigine

ABBREVIATION: CE: Collision Energy, CES: Collision Energy Spread, DBS: Dynamic Background Subtraction,

TRADEMARKS/LICENSES: For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. AB Sciex is doing business as SCIEX. © 2010-2016 AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of the AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

[Urine]

Table2 尿中の症例1(4薬物)および症例2(7薬物)中の同定結果

	Component Name	Formula	Found At Mass	Mass Error (ppm)	Retention Time	Area	Height	RT Confidence	Mass Error Confidence	Isotope Confidence	Library Confidence	Library Hit
症例1	Alprazolam	C17H13ClN4	309.089	1.751	14.35	1.233e5	3.229e4	✓	✓	✓	✓	Alprazolam
	Paroxetine	C19H18FNO3	330.150	-0.718	13.33	2.105e7	1.710e6	✓	✓	✓	✓	Paroxetine
	Amodiaquine	C17H18ClN3O	314.105	-1.884	14.10	1.268e8	9.857e6	✓	✓	✓	✓	Amodiaquine
	Lidocaine	C14H17ClN2O	235.100	-0.830	13.45	1.780e7	6.942e5	✓	✓	✓	✓	Lidocaine
症例2	Olanzapine	C17H18N4S	312.140	-1.993	13.33	3.313e8	1.119e7	✓	✓	✓	✓	Olanzapine
	Trazodone	C18H17ClN2SO	372.155	-0.959	15.74	2.352e8	1.160e7	✓	✓	✓	✓	Trazodone
	Flunitrazepam	C16H12F2N2O3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	✓	✓	✓	✓	Flunitrazepam
	Etizolam	C13H15ClN4S	341.078	-0.669	14.44	1.932e7	1.370e6	✓	✓	✓	✓	Etizolam
	Diphenhydramine	C17H19N	256.169	-0.588	12.61	6.858e8	1.587e7	✓	✓	✓	✓	Diphenhydramine
	7-Aminoflunitrazepam	C16H14FN3O	284.115	-1.890	10.95	6.256e7	4.787e6	✓	✓	✓	✓	7-Aminoflunitrazepam
	Lamotrigine	C8H7ClN3S	256.015	-0.828	11.08	4.702e8	1.244e7	✓	✓	✓	✓	Lamotrigine

その結果、血液、尿ともに、添加した既知の薬物成分すべてが検出され同定できた (Table 1, 2)。

※ 検出濃度はTable3参照

Data

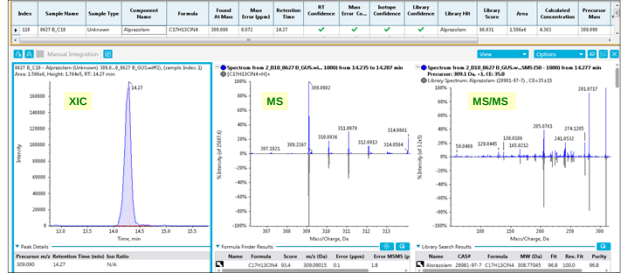


Figure3 症例1(血液)中のAlprazolamのマスキングクロマトグラム、MSおよびMS/MS (青:実測値、グレー:MS:理論パターン、MS/MS:ライブラリ)

成分ごとの4項目 (精度、同位体比、保持時間、ライブラリ) の判定結果および実データ(クロマトグラムおよびMSとMS/MS)とその理論パターンやライブラリとの比較が表示可能

Non-target Screening

症例2のサンプルにおいて、添加された薬物でライブラリに該当しない2ピークのMSおよびMS/MSの組成解析とChemSpider検索、ChemSpiderでヒットした構造式によるMS/MSのフラグメント解析を行った。

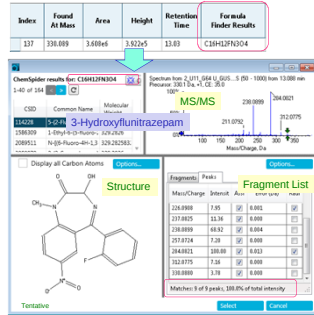


Figure4 症例2(尿)中の未知成分の構造解析 (m/z 330.09, 13.0min)

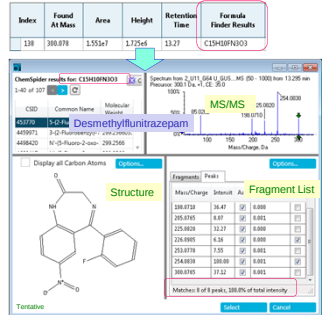


Figure5 症例2(尿)中の未知成分の構造解析 (m/z 300.08, 13.3min)

その結果、3-HydroxyflunitrazepamおよびDesmethyflunitrazepamと推定された。

RESULT-2 Quantitation

添加した11薬物について、MS定量による検量線の濃度範囲と直線性、検量線の相関係数(r)を求めた。



Figure6 症例2(尿)中のTrazodoneの定量解析(1-500ng/mL)

質量精度はすべての濃度で 1 ppm 未満、MS/MSは定量下限値である1ng/mLから取得できライブラリーサーチによる同定も可能であった。ターゲットリストによる4項目 (精度、同位体比、保持時間、ライブラリ) の判定はすべての濃度で合格を示した。

Table3 定量結果 (TOF-MS)

	添加成分	検量線範囲 (ng/mL)		血液 (μg/mL)		尿 (μg/mL)	
		血液	尿	添加量	分析結果	添加量	分析結果
症例1	Alprazolam	1-250	1-500	0.005	0.004	0.005	0.002
	Amoxapine	1-500	1-500	12	3.7	10	1.0
	Lidocaine	1-500	1-500	0.22	0.18	0.13	0.086
	Paroxetine	1-250	1-500	0.25	0.088	3.0	0.81
症例2	Diphenhydramine	1-500	1-500	1.1	0.79	7.3	4.6
	Etizolam	1-250	1-500	0.11	0.12	0.045	0.072
	Flunitrazepam	1-250	1-500	0.004	0.005	N.D.	N.D.
	Lamotrigine	1-250	5-500	3.9	1.9	7.4	6.6
	Olanzapine	1-500	1-500	0.36	0.43	1.5	1.6
	Trazodone	1-250	1-500	0.39	0.32	1.2	1.2
	7-aminoflunitrazepam	1-250	1-500	0.090	0.077	0.30	0.37
	3-Hydroxyflunitrazepam	1-500	1-500	0.050	0.063	0.20	0.36
	Desmethyflunitrazepam	1-250	1-500	0.010	0.0093	0.30	0.34

相関係数 (r) は > 0.99. 各濃度ポイントでの真度は80~120%と良好な直線性が得られた (Table 3)。

定量下限値は、血液ではすべての薬物が1ng/mL、尿ではLamotrigineを除く薬物が1ng/mLであった。

CONCLUSIONS

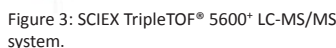
ターゲット・ノンターゲットスクリーニングの結果、添加したすべての薬物成分が検出可能であった。また定量結果もおおそその成分において実際の添加量と同程度を示した。膨大な情報が得られるIDA測定と解析を組み合わせることで、効率的な薬物分析が可能であることが示された。

Curtis Hedman¹, Xiang He², Daniel McManaway¹, Ryan Pieters¹, Amy Miles¹, Josh Plath² and
Adrian Taylor²

²SCIEEX, 1201 Radio Road, Redwood City, CA 94065

Figure 1: Proposed HPLC QTOF sample workflow.

1. Transfer to microcentrifuge tubes.
2. Centrifuge at 16,000 x g for 5 minutes.
3. Dilute 20 μ L clear solution with 180 μ L 20% MeOH in water in autosampler vial.
4. Cap and vortex vials.



- **MS Detection**
 - DuoSpray™ ion source
- **Source/gas parameters**
 - ISVF: 2500 V (-2500 V for negative mode)
 - Cur: 35 psi
 - TEM: 600°C (500°C for negative mode)
 - GS1: 60
 - GS2: 60
- **TOF-MS**
 - 100 to 1000 m/z; 100 ms scan time; CE: 10; DP: 90
- **IDA-MS/MS**
 - 40 TO 1000 m/z; DP: 90
 - IDA: 12 candidate ions scan, each at 30 ms using CE spread (20 to 50 V)
 - Dynamic Backeround Subtraction™ algorithm

Figure 4: SCIEX TripleTOF® 5600+ LC-MS/MS system parameters.



The results of the targeted screening by HPLC-QTOF MS/MS versus the EMIT, HPLC and GC workflow is summarized in Figure 6. There were 112 compounds detected using both methods. Seven compounds reported by the EMIT, HPLC, GC/NPD and GC/MS workflow were not reported in the blinded HPLC-QTOF MS/MS analysis. This is likely due to the difference in sample preparation procedures used. The WSLH method extraction procedure uses a double solvent extraction/cleanup and the samples for the HPLC-QTOF MS/MS analysis were prepared by a simple protein precipitation procedure and were further diluted 1:10 prior to analysis. Moreover, the HPLC-QTOF MS/MS analysis also detected five compounds in higher confidence with MS/MS matching that were not detected in the original WSLH screening analysis methods.

Figure 6: Results of the targeted screening by HPLC-QTOF MS/MS versus the EMIT, GC/NPD, HPLC and GC/MS workflows.

Figure 7 shows an example of how MS/MS^{ALL} with SWATH® acquisition compared to targeted screening by HPLC-QTOF MS/MS acquisition for compound detection in one of the submitted blinded samples. Both TOF-IDA-MS/MS and TOF-MS/MS^{ALL} with SWATH® data acquisition will provide MS/MS information for unknown targets. While IDA-MS/MS offers more selective precursor isolation for MS/MS data acquisition, the SWATH® acquisition approach makes sure the MS/MS information will be recorded for everything all the time. This is of key importance for surveillance of novel psychoactive substances, such as synthetic cannabinoids, as new variations of these compounds are being introduced frequently.



CONCLUSION

In summary, the use of HPLC-QTOF MS/MS shows great promise for streamlining routine forensic drug screening workflows, and has the added benefit of being able to also detect and identify true unknowns making this a very powerful analysis technique for a forensic toxicology laboratory.

TRADEMARKS/LICENSING

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.
The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte.
Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under
license. AB Sciex is operating as SCIEX
© 2015 AB SCIEX. RUO-MKT-10-2546-A

Figure 2: Sample preparation method used for HPLC-QTOF MS/MS samples.

お客様の成功は私たちの成功です。 お客様の成功を心からサポートいたします。

お客様は、SCIEXの顧客として、世界トップクラスのサポートをご利用いただけます。私たちは、お客様がどこにいても、信頼されるパートナーとして、質問に答え、ソリューションを提供し、ラボの生産性を最大限に高めます。

当社のカスタマーサポートは、お客様が常に最新の状態を保てるように最新の製品情報、ソフトウェア更新、修理の方法や手順へのアクセスを有しています。

お客様のご質問にお答えします。

詳しくは、http://sciex.jp/about-us/contact_us をご参照ください。

Answers for Science. Knowledge for Life.™

本製品は研究用에만使用できます。
診断目的及びその手続き上での使用はできません。

AB Sciex is doing business as SCIEX.

© 2017 AB Sciex. For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

MKT20-532 A

本社：〒140-0001 東京都品川区北品川4-7-35 御殿山トラストタワー21F
TEL : 0120-318-551 FAX : 0120-318-040

大阪：〒531-0075 大阪府大阪市北区豊崎3-19-3 ビアスタワー

URL : <http://www.sciex.jp> Email : jp_sales@sciex.com



株式会社エービー・サイエックス