

Real-Time Library Searchを利用した代謝物分析について

質量分析フォーラム2024 大阪，東京

2024.7.30 大阪， 2024.8.1 東京



mediford
A Member of PHC Group

メディフォード株式会社
石塚 啓仁

PHC GROUP

2024年3月末
PHCグループ
従業員数
約**9,200**人

2024年3月末
Mediford 従業員数
約**440**人

CRO事業



バイオメディカ事業



病理事業



診断薬事業



LSIM事業
(臨床検査事業)

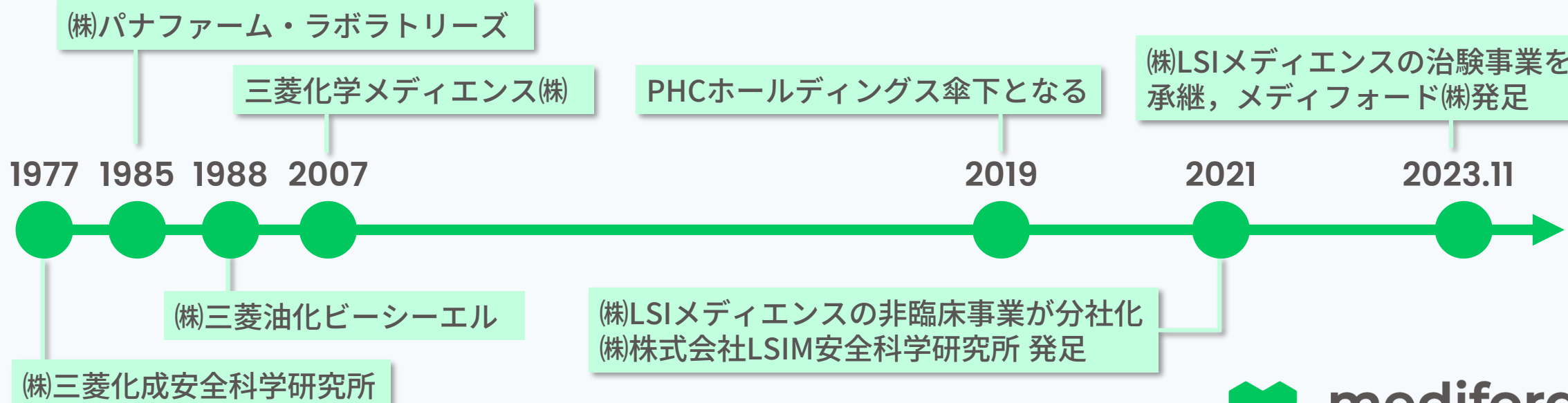


ヘルスケア
ITソリューション事業

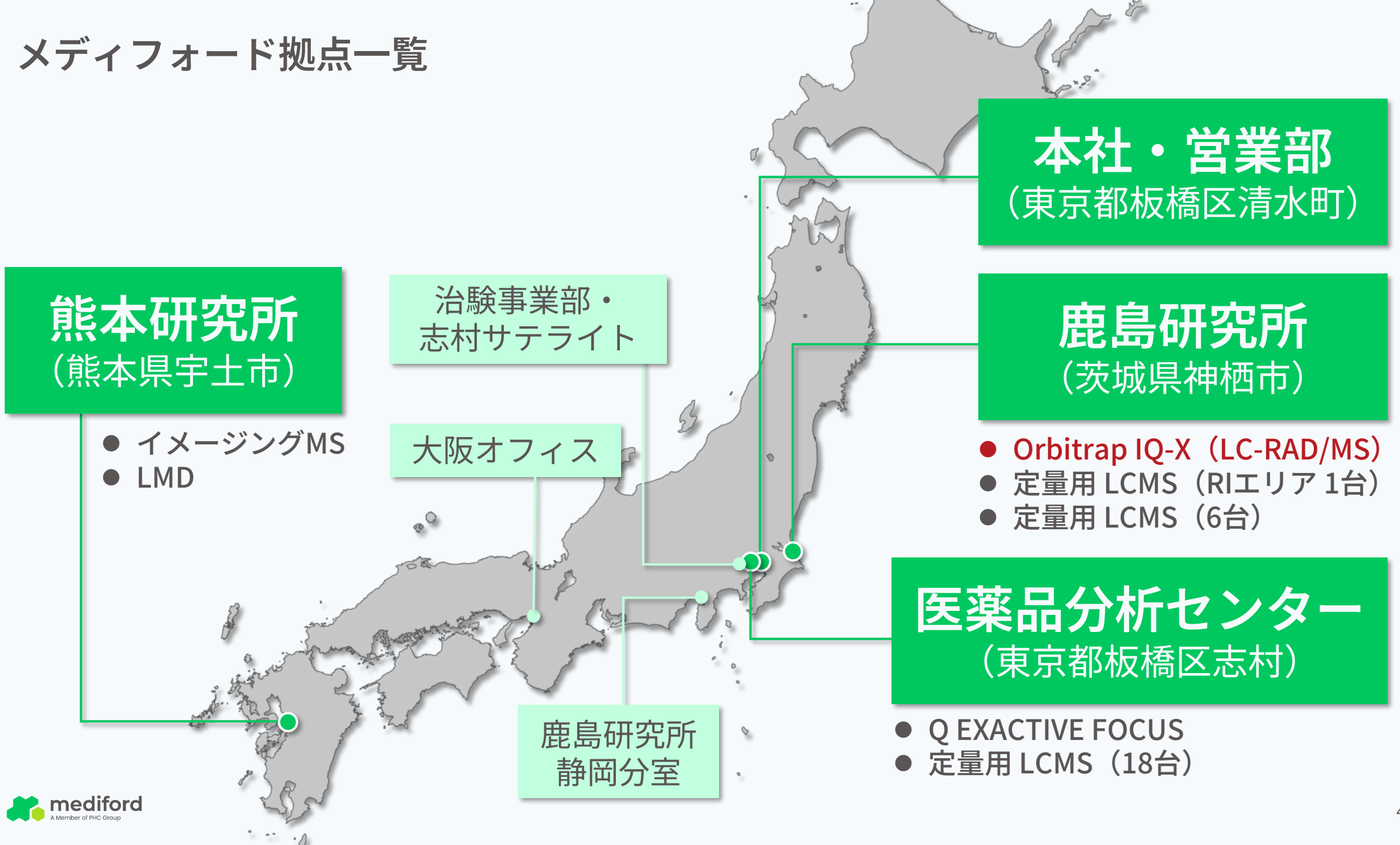


BGM事業
CGM事業
(糖尿病マネジメント)





メディフォード拠点一覧





非臨床受託試験サービス

各種GLP (医薬品、医療機器、再生医療等製品、農薬、化審法等) に適合した施設で、薬事承認申請用の各種安全性試験、薬効薬理試験、薬物動態試験から研究開発初期の探索的検討試験、コンサルティングまで幅広いサービスを展開します。



バイオアナリシスサービス

生体試料中の薬物やその代謝物、バイオマーカー等の各種分析サービスを提供します。分析法開発から分析法バリデーション、実検体の測定までを一貫して実施し、基礎研究/探索段階から検証/臨床開発段階まで、幅広い分析支援が可能です。



セントラルラボサービス

全国の医療機関で実施される臨床研究 (治験・臨床試験) の検体回収から一括検査サービスまで、一連のプロセスをサポートします。海外ラボのネットワークを活かし、医薬品開発のグローバル化にも対応します。

鹿島研究所



〒314-0255
茨城県神栖市砂山14-1

熊本研究所



〒869-0425
熊本県宇土市栗崎町1285

医薬品分析センター



〒174-0056
東京都板橋区志村1-15-10

各施設のGLP適合状況

GLP	鹿島研究所	熊本研究所	医薬品分析センター
医薬品	○	○	○
医療機器	○	○	—
再生医療等製品	○	○	—
化学物質	○	○	—
農薬	○	○	—

薬物動態試験

鹿島研究所はAAALAC認証を取得したGLP適合施設で、
申請資料の信頼性の基準（医薬品医療機器等法）、
農薬GLP、OECD-GLPに対応した薬物動態試験を実施

In vivo 薬物動態試験

- 吸収・分布・排泄試験
- *In vivo, In vitro* 代謝試験

- トキシコキネティクス（TK）試験
- ファーマコキネティクス（PK）試験

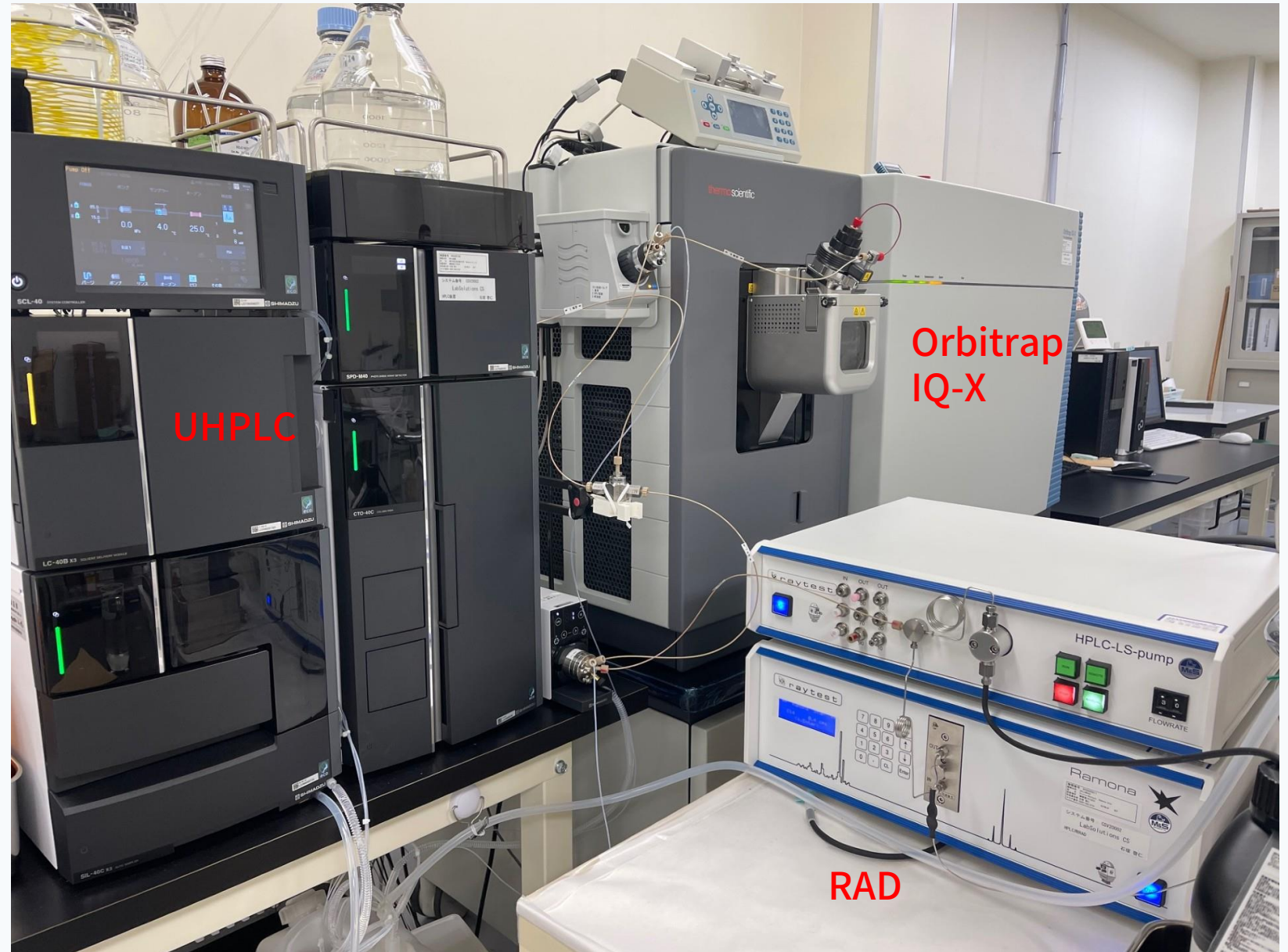
In vitro 薬物動態試験

- *In vivo, In vitro* 血球移行
- *In vivo, In vitro* 蛋白結合
- 薬物代謝酵素阻害試験
- 薬物代謝酵素・分子種同定試験
- *In vitro* ヒト CYP 誘導試験
- *In vitro* 経皮吸収試験

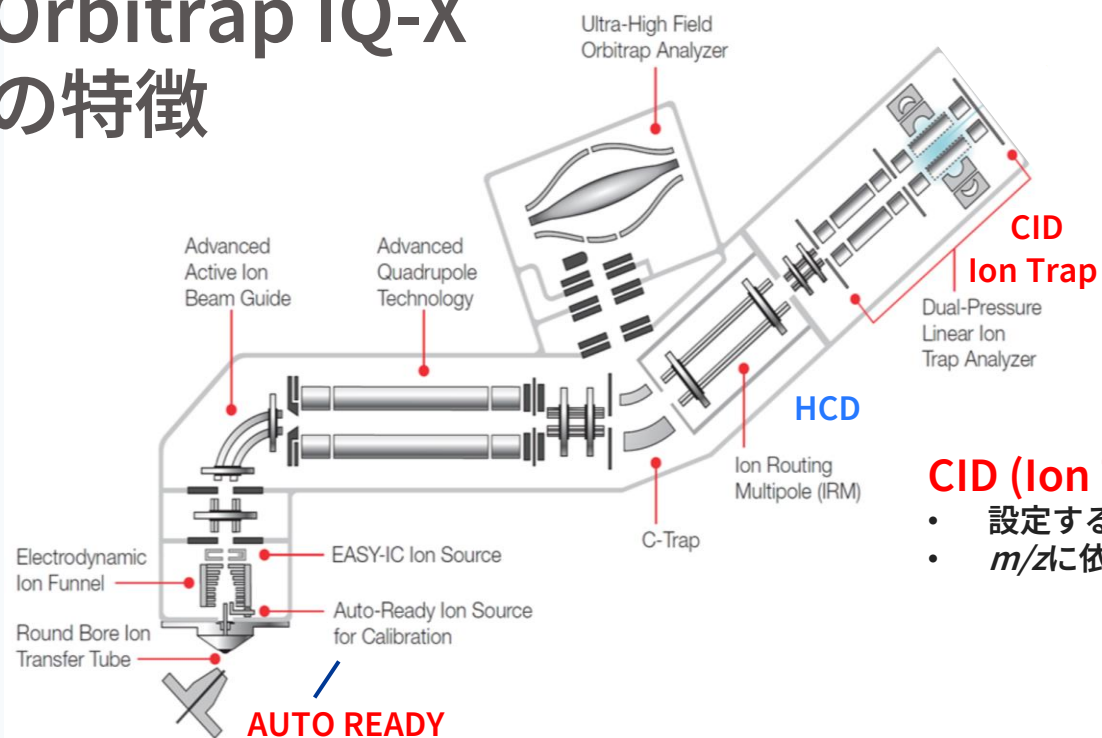
Orbitrap IQ-Xについて

- 運用開始 2024年1月
- 放射線管理区域内に設置
- UHPLCに接続
- RAD(Radioactivity detector)接続
(非標識体分析時は分離可能)

- 電源関係
 - ✓ 鹿島研究所の電源は3系統
 - 東京電力系統
 - 鹿島動力系統
(天候悪化時にガスエンジン発電による同時送電で瞬電防止)
 - メディフォード自家発電系統
(上記2系統遮断時に自動起動。連続運転が可能であり災害級事態への対応に使用)



Orbitrap IQ-X の特徴



Acquisition rate OTMS₂ 40 Hz with 7500 resolution at m/z 200
 Maximum resolution 500K FWHM at m/z 200-500K(50万)
 Mass range Full MS: 50-2000 m/z
 Mass Accuracy 1 ppm int
 Dissociation / Ion Activation CID, HCD
 MS_n Up to MS₁₀ with the ion trap or Orbitrap mass analyzer
 Analyzers OTMS, ITMS
 Detectors Ion Trap, Orbitrap mass analyzer

CID (Ion Trapで実施)

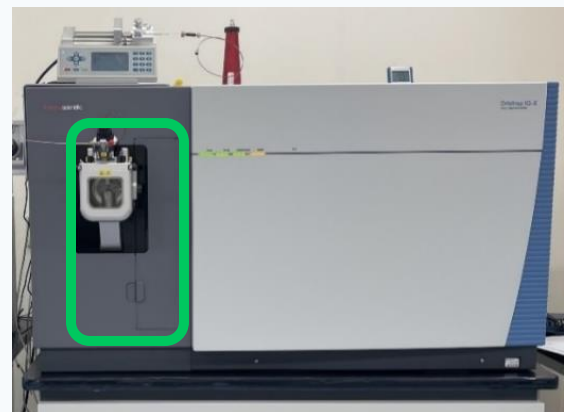
- 設定するエネルギーに依存しないスペクトルパターンが得られる。
- m/zに依存するエネルギーで開裂を起こすためn次開裂しない。

• 分解能@m/z 200 (スキャン速度)

7,500	(40スキャン/秒)
15,000	(22スキャン/秒)
30,000	(12スキャン/秒)
50,000	(10スキャン/秒)
60,000	(7スキャン/秒)
120,000	(3スキャン/秒)
240,000	(1.5スキャン/秒)
500,000	(0.7スキャン/秒)

• 質量精度

3 ppm以内(外部標準法)
 1 ppm以内(内部標準法)
 sub 1ppm以内(EASY-IC)



AUTO READY
 キャリブレーション液が内蔵
 週末に自動制御で
 キャリブレーションを実施

Orbitrap IQ-X選択理由

LTQ Orbitrap XL



更新前機器：LTQ Orbitrap XL（2008年導入）

特徴

- 精密質量，Ion Trapでの多段階MSnを利用した構造解析が可能

LTQ Orbitrap XLの利点

- MS3により得られたフラグメントイオンより代謝部位の更なる絞り込みが可能であった（代謝物分析を当社で受託している化合物の2-3割程度）。
- 当社顧客においてもサーモフィッシャーサイエンティフィック社の精密質量MSは，ユーザー数が多く，顧客の測定・解析条件に合わせることが可能．また測定データも顧客の環境下での確認が可能．

LTQ Orbitrap XLの課題

- MS2の取得速度が遅くCompound Discoverer™の様なMS2情報を利用する解析ソフトの性能を活かしきれない
- 代謝物において選択的なMS3を取得する設定が難しい（選択的にMS3測定が可能であれば，代謝部位を絞り込めることが増える）

LTQ Orbitrap XLでの課題を解決できる機種としてIQ-Xを選択．IQ-Xは多段階MSn機能，選択的にMS3測定が可能なReal-Time Library Search，有用なMS2取得ができるAcquireXを搭載しており当社のニーズを満たしていた．

Real-Time Library Search (RTLS)

RTLSの概要説明

代謝物の構造推定時に有益なMS3スペクトルとは？

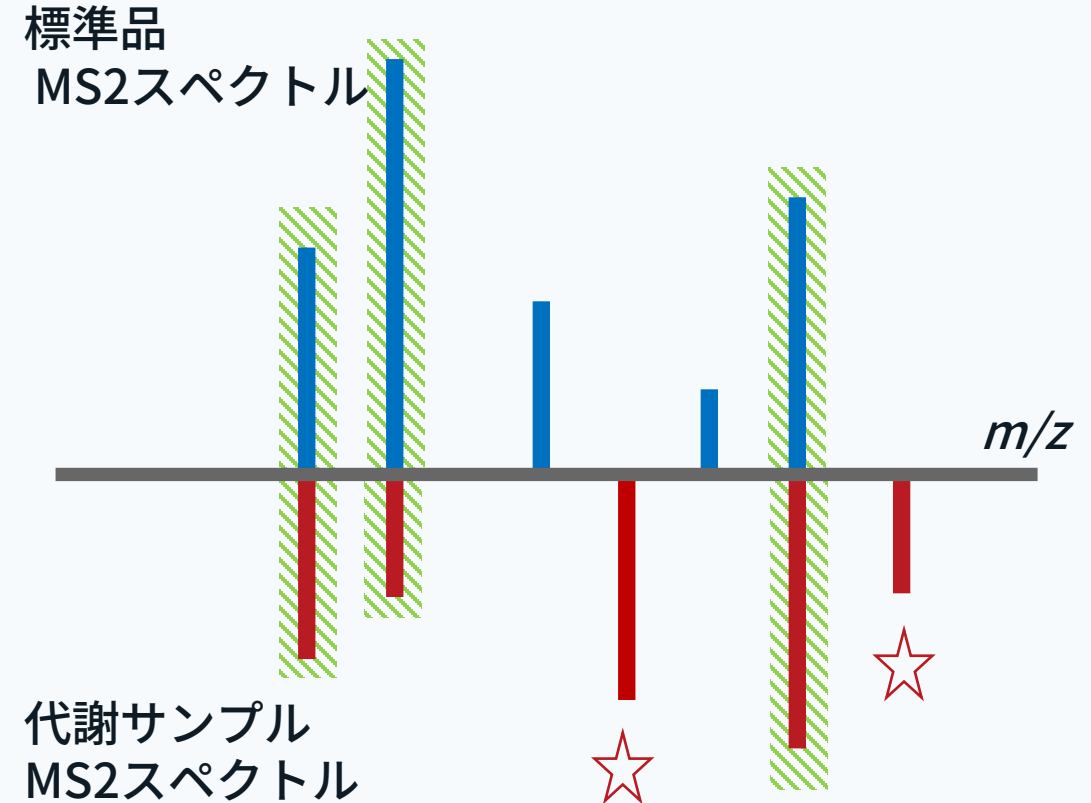
- 未変化体，標準物質と一部異なるMS2スペクトルに対してMS3を取得したデータ
- 同時に検出されているスペクトルが，未変化体と類似している

RTLSは

- 未変化体又は標準物質と類似したMS2スペクトルが「**観測された場合のみ**」，MS3の取得を実施する．
- 取得するMS3は予め登録している未変化体等のフラグメントライブラリーを参照して，「**観測されていないMS2スペクトル**」からMS3を取得

➡ 「自動的」かつ「効率的」に「代謝物特異的なMS3を取得」を取得することが可能

RTLSは，上記以外にも多数の機能を搭載



☆ 未変化体，標準物質で観測されていないMS2スペクトル ¹¹

▨ 未変化体又は標準物質と代謝サンプルのMS2が一致したスペクトル

メディフォードでのRTLSを使用した分析方法

No.	内容
1	イオン化条件，コリジョンエネルギーを決める．
2	ライブラリー作成のため，1.で設定した条件で未変化体，代謝物標品などを分析． 標識化合物（ ^{14}C 等）の場合は，代謝物の質量が異なるためサンプルを分析．
3	mzVaultを用いて，分析したデータからRTLSに用いるライブラリーを作成 （1ライブラリーに複数化合物を登録可能）．
4	メソッドにRTLS用のライブラリーを反映する．
5	サンプル測定することでRTLSが適用される．

mzVaultでのライブラリー作成

1.登録したいMS2を
フィルターで選択

FTMS + c ESI d Full ms2 346.1219@hcd35.00

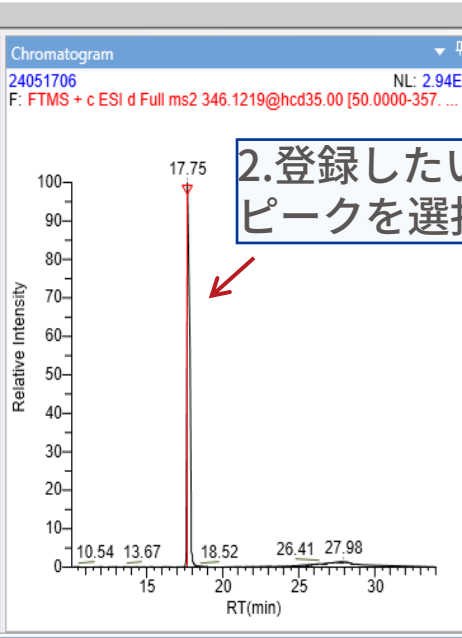
0.02 to 43.00

TIC

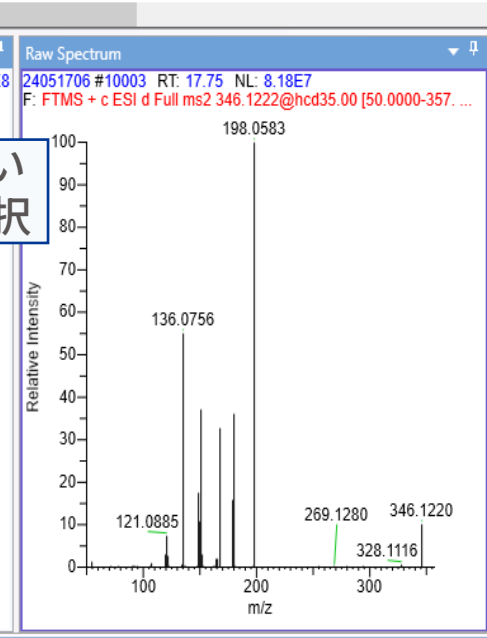
0.0000 +/- 5.00 ppm

Average On

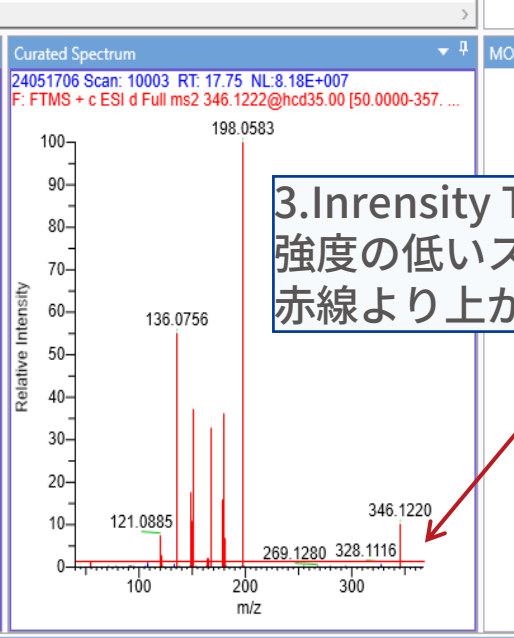
Time range 0.00 - 0.00



2.登録したい
ピークを選択



3.Inensity Threshold (Auto, Manual)で
強度の低いスペクトルを除去。
赤線より上がライブラリーに登録される。



Compound tab and other functions apply to Omeprazole

POS12_4STD

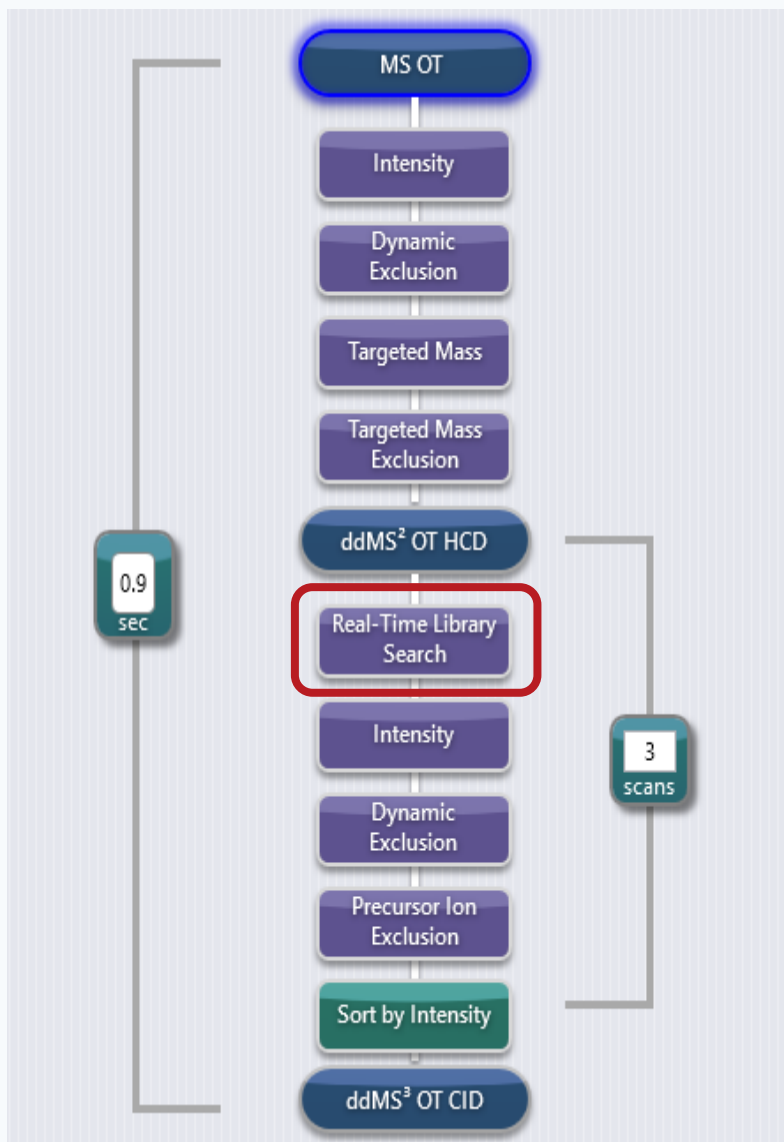
Library Spectrum	Entry No	Compound	Synonyms	Formula	CAS ID	InChi Key	Compound Class	ChemSpider ID	HMDB ID	KEGG
<input type="checkbox"/>	1	Caffeine								
<input type="checkbox"/>	2	Omeprazole								
<input checked="" type="checkbox"/>	6	2 FTMS + c ESI d Full ms2 346.1222@hcd35.00 [50.0000-357.0000]								
<input type="checkbox"/>	3	Midazolam								
<input type="checkbox"/>	4	Rosuvastatin								

Spectrum ID	Compound ID	Scan Filter	Retention Time	Scan Number	Precursor m/z	Neutral Mass	Collision Energy	Polarity	Fragmentation Mode
6	2	FTMS + c ESI d Full ms2 346.1222@hcd35.00 [50.0000-357.0000]	17.752	10003	346.1222	0.0000	10.0,35.0,50.0	+	HCD

4.ライブラリーに登録される。複数の化合物を1つの
ライブラリーに登録可能（未変化体，代謝物標品等）



当社の使用しているMS3メソッド



RTLSノード設定

Real-Time Library Search Properties

LIBRARY SEARCH SETTINGS

Spectral Library: POSI2_4STD.db
 [Browse] [Clear]

Collision Energy Tolerance: 15

Similarity Search:

Precursor Search Tolerance (ppm): 50000000

Use Adducts for Offset Query Searches:

Adduct Masses

	Adduct Molecular Species	Charge
1	M+H	1

Maximum Search Time (ms): 150

Use Retention Time Filter:

Reverse Library Search:

Use Multiple Precursors in Search:

PEAK SELECTION AND THRESHOLD SETTINGS

Use as a Trigger Only:

Consider Unmatched Peaks Only:

Add Adducts to Dynamic Exclusion:

Add Matched Fragments to Dynamic Exclusion:

Scoring Threshold

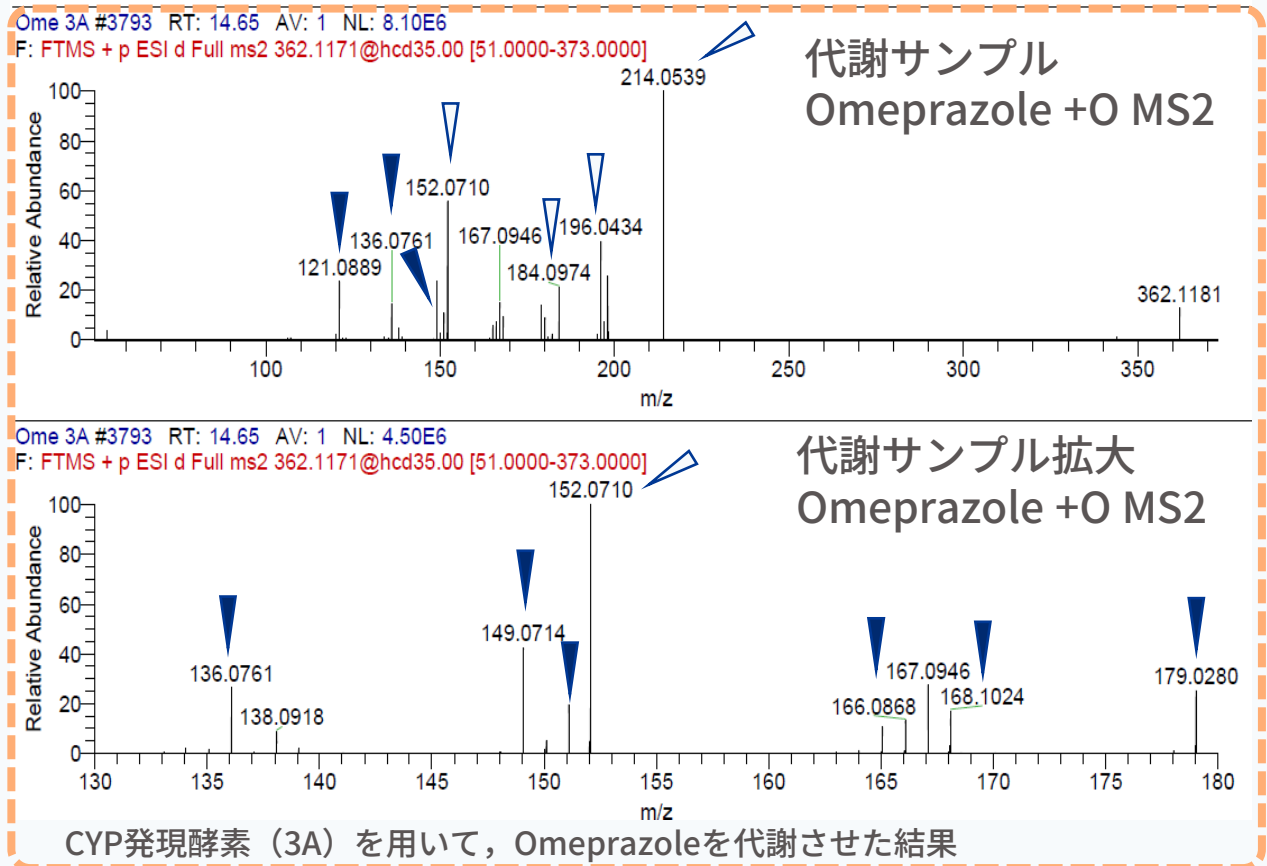
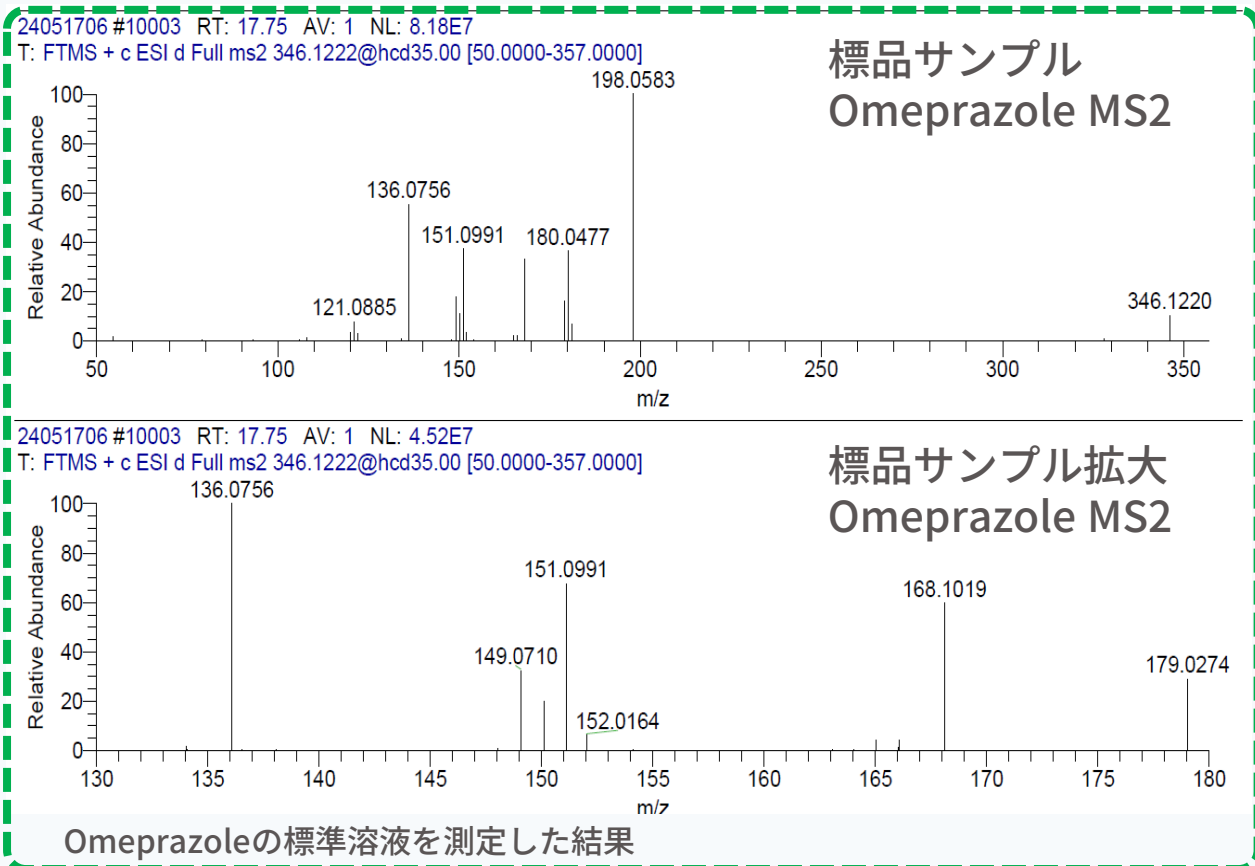
	Score Type	Filter By	Score
1	Cosine Score	At least	10

Compound Class 1

	Keyword	Promote/Reject
--	---------	----------------

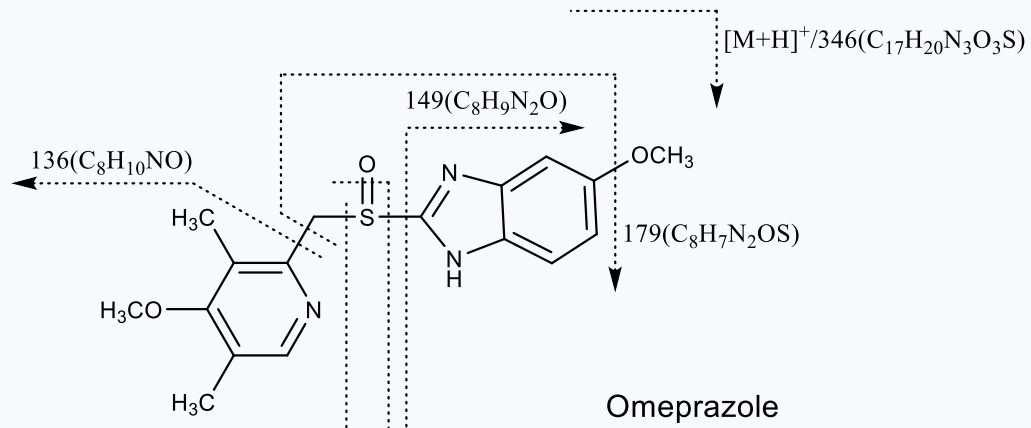
RTLSの実測データ

▼ Omeprazole のライブラリーと一致したMS2スペクトル ▽ MS3が取得できたスペクトル

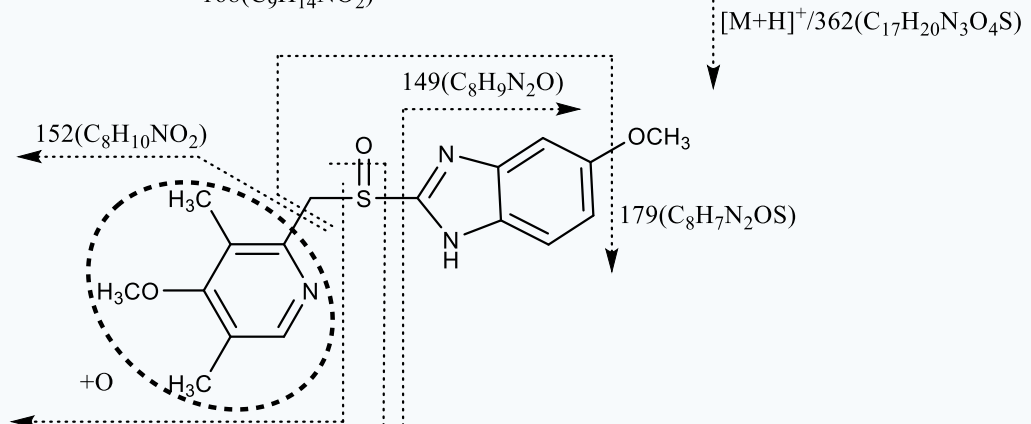
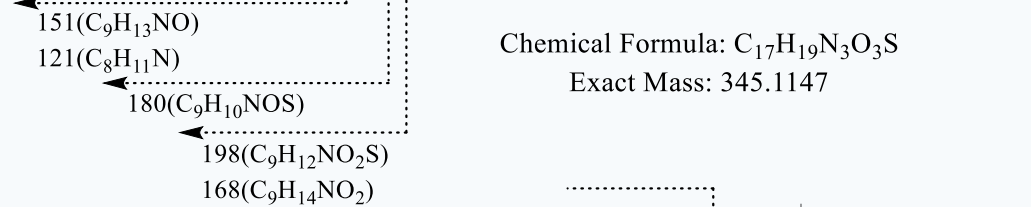


RTLSを用いて未変化体で観測されない m/z 152, 184, 196, 214 のMS2スペクトルに対応するMS3スペクトルを取得した。

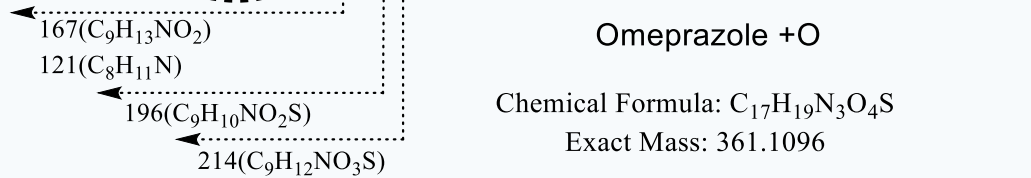
MS2で得られたフラグメントイオンに対してRTLSを用いることで有用なMS3を自動的に取得した。



Chemical Formula: $C_{17}H_{19}N_3O_3S$
 Exact Mass: 345.1147



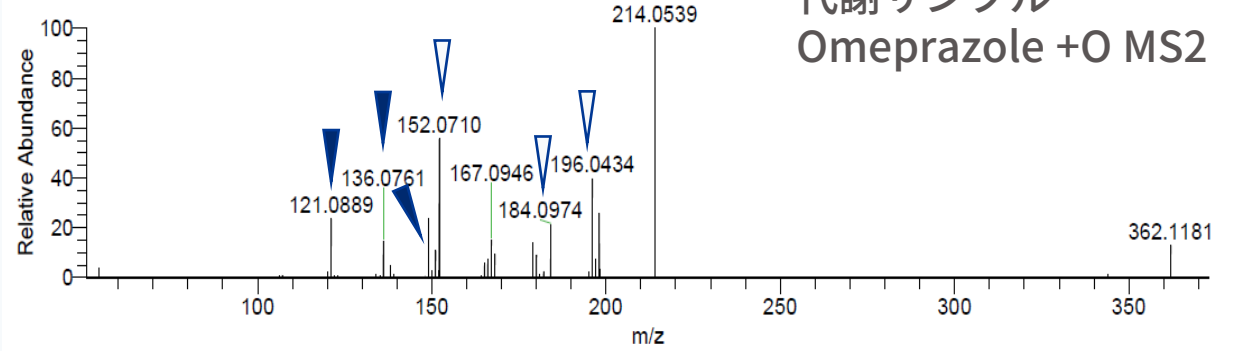
Chemical Formula: $C_{17}H_{19}N_3O_4S$
 Exact Mass: 361.1096



Ome 3A #3793 RT: 14.65 AV: 1 NL: 8.10E6

F: FTMS + p ESI d Full ms2 362.1171@hcd35.00 [51.0000-373.0000]

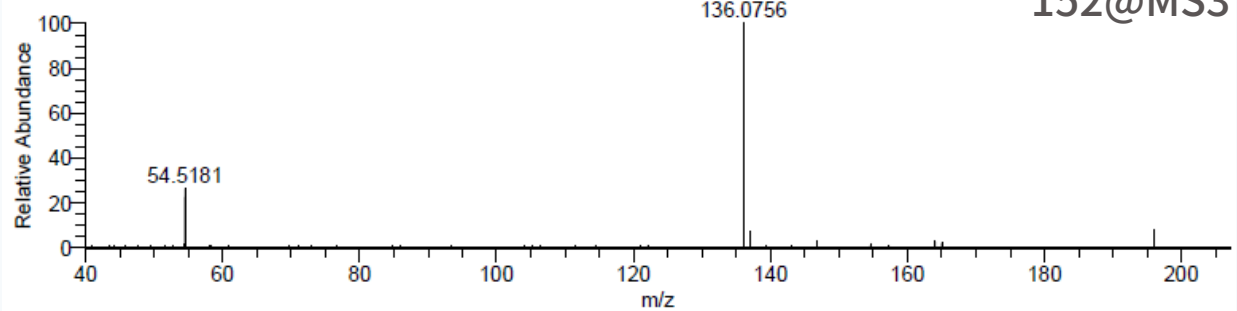
代謝サンプル
 Omeprazole +O MS2



Ome 3A #3805 RT: 14.68 AV: 1 NL: 1.11E6

F: FTMS + p ESI d Full ms3 362.1171@hcd35.00 152.0710@cid35.00 [40.0000-207.0777]

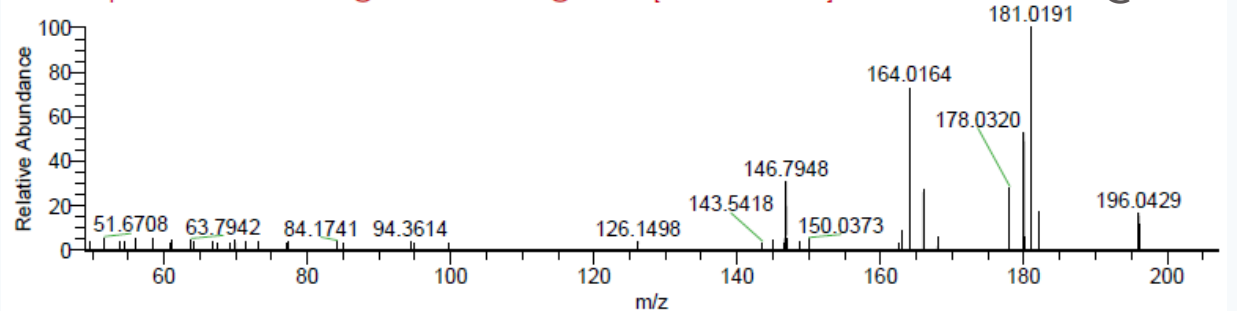
152@MS3



Ome 3A #3797 RT: 14.66 AV: 1 NL: 3.32E5

F: FTMS + p ESI d Full ms3 362.1169@hcd35.00 196.0434@cid35.00 [49.0000-207.0777]

196@MS3



181.0191 : $C_8H_7NO_2S$

164.0164 : C_8H_6NOS

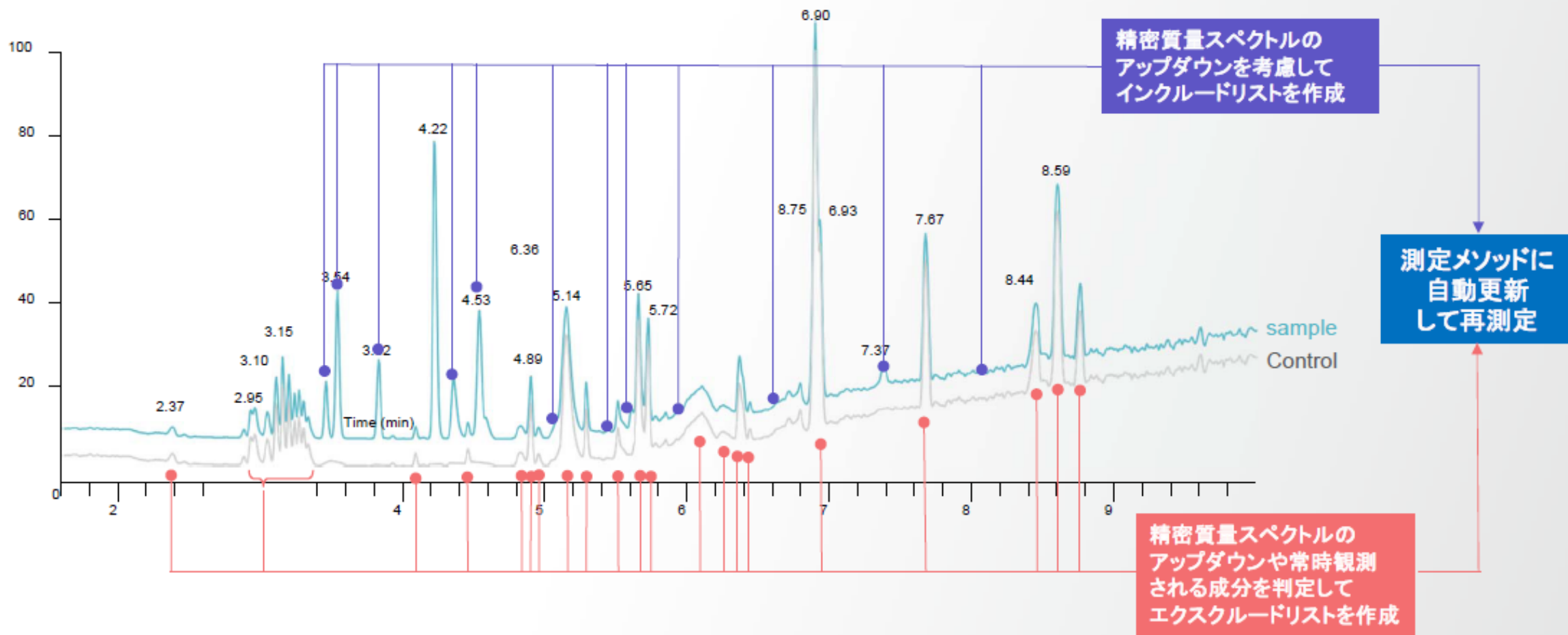
AcquireX



取得したデータから自動で

- MSn 除外対象とする成分 (バックグラウンドイオンやシステム、マトリクス由来の成分などサンプルユニークではない成分) の特定
 - サンプルユニークな成分の特定
- を行い、作成したエクスクルーションリスト及びインクルージョンを測定メソッドに自動更新、再測定することにより、対象化合物の MSn 測定のカバレッジと質を向上させる。

精密質量から判定するので TIC で判別できないピークも検出する。



AcquireX BACKGROUND & COMPONENT INCLUSION

空白
試料

Full Scanのみ：Exclusion listを作成
精密質量のスペクトルのアップダウンや常時観測される成分を判定

Wash
試料

Full Scanのみ：Wash分析中にExclusion listを作成しMSn測定メソッドに反映 (10-15分)

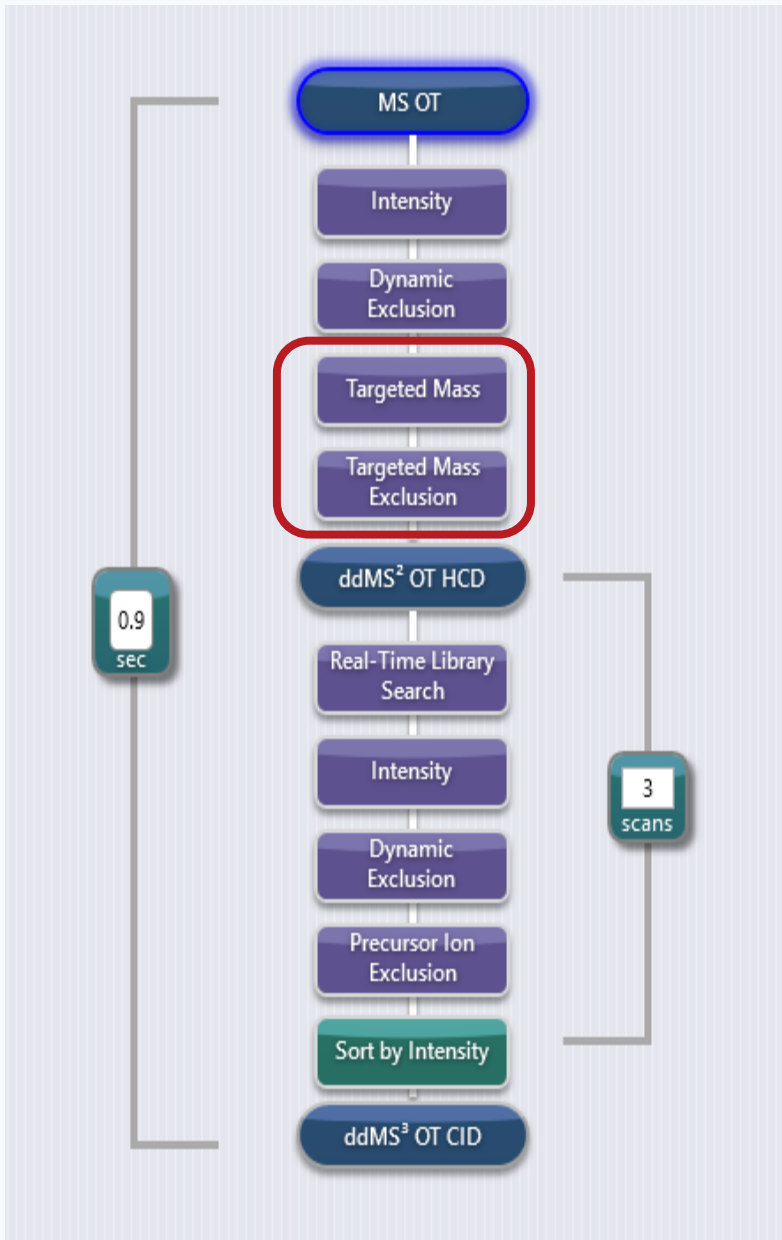
サンプル

Full Scanのみ：Inclusion listを作成
精密質量のスペクトルのアップダウンを考慮して成分を判定

分析前にInclusion listをMSn測定メソッドに反映 (10-15分)

サンプル

MSn測定：Exclusion list, Inclusion listが反映されたメソッドで測定
このデータを構造推定に用いる



Target Massノード設定

Targeted Mass Properties

MASS LIST

Mass List Type: m/z

Time Mode: Start/End Time

Include Intensity Threshold:

Add Mass List Targets Determined by Xcalibur AcquireX:

Compound	m/z	t start (min)	t stop (min)	Inten
Listは入力しない				

Target Mass Exclusionノード設定

Targeted Mass Exclusion Properties

MASS LIST

Mass List Type: m/z

Time Mode: Start/End Time

Include Intensity Threshold:

Add Mass List Targets Determined by Xcalibur AcquireX:

Compound	m/z	t start (min)	t stop (min)	Inten
Listは入力しない				

Acquire X のシーケンス画面

MS OT
Targeted Mass
Targeted Mass Exclusion
ddMS² OT HCD

BACKGROUND EXCLUSION & COMPONENT INCLUSION

Experiment Details

Experiment Folder
D:\Data\T202402M\24053001 Browse

Experiment Name
24053001

Instrument Methods

Full Scan Method
D:\Data\T202402M\T202402M_AQX_Fullscan... Browse New

MSn Template Method
D:\Data\T202402M\T202402M_AQX_MS3_ver... Browse New

Experiment Parameters

Exclusion Override Factor (default = 3)
3

Exclusion List Peak Window Extension (s) (default = 0 s)
3

Inclusion List Peak Window Extension (s) (default = 0 s)
3

Inclusion List Peak Fragmentation Threshold (%) (default = 50%)
50

Preferred Ions

Sequence Design

AcquireX Template Injections # Header Blanks 3 #ID Blocks 2

#	Name	Exclusion Ref	Instrument Method	Vial	Inj Vol (μl)
1	Water	<input type="checkbox"/>	T202402M_AQX_Fullscan_ver1	1	0.00 μl
2	StdMix	<input type="checkbox"/>	T202402M_AQX_Fullscan_ver1	1	0.00 μl
3	BlankMatrix vivo	<input checked="" type="checkbox"/>	T202402M_AQX_Fullscan_ver1	1	0.00 μl
4	Wash_01		T202402M_AQX_Fullscan_ver1	1	0.00 μl
5	Omeprazole IR 02104 025h		T202402M_AQX_Fullscan_ver1	1	0.00 μl
6	Omeprazole 02104 025h		T202402M_AQX_MS3_ver2	1	0.00 μl
7	Wash_02		T202402M_AQX_Fullscan_ver1	1	0.00 μl
8	Midazolam IR 03107 025h		T202402M_AQX_Fullscan_ver1	1	0.00 μl
9	Midazolam 03107 025h		T202402M_AQX_MS3_ver2	1	0.00 μl

Experiment Parameters

Exclusion Override Factor (default = 3)

3

Vial Inj Vol (μl)
1 0.00 μl

Back Cancel Save Save As Submit

Blankサンプルで検出されたバックグラウンドイオン強度に対して指定倍数以上のイオン強度をもつイオンをMSnのプリカーサーイオンとする指定が可能

Acquire X 測定後のMSnメソッド

Target Massノード設定

Targeted Mass Properties

MASS LIST

Mass List Type: m/z

Time Mode: Start/End Time

Include Intensity Threshold:

Add Mass List Targets Determined by Xcalibur AcquireX:

	Compound	m/z	t start (min)	t stop (min)
1909		441.2093	30.32	30.5
1910		195.0995	19.3	19.49
1911		367.3219	30.85	31.02
1912		198.1853	15.94	16.25
1913		283.1904	31.89	32.05
1914		445.2329	33.22	33.53
1915		476.3467	30.65	30.8
1916		408.2927	29.88	30.27
1917		332.2065	17.08	17.24

1917個の
Inclusion List

Target Mass Exclusionノード設定

Targeted Mass Exclusion Properties

MASS LIST

Mass List Type: m/z

Time Mode: Start/End Time

Include Intensity Threshold:

Add Mass List Targets Determined by Xcalibur AcquireX:

	Compound	m/z	t start (min)	t stop (min)
15332		622.9263	27.1	27.12
15333		798.9457	28.17	28.21
15334		437.189	29.14	29.18
15335		495.3896	28.75	28.92
15336		475.2966	28.87	28.9
15337		415.1747	24.82	25.13
15338		578.285	30.59	30.63
15339		315.0745	28.07	28.19
15340		697.5464	30.16	30.19

15340個の
Exclusion List

Acquire XとRTLSを併用した代謝物の探索

確認方法

ラットにOmeprazole, Midazolamを経口投与し，血漿中代謝物をAcquire XとRTLSで分析．
ブランク試料は，代謝物と同様の前処理を実施したラット血漿を使用．文献で報告されている代謝物が，MSn取得（Inclusion list 登録）されているかの確認を実施．

結果

化合物/代謝物	+O	+O ₂	+(O ₃ S)	-(CH ₂ O)	-(CH ₂)+(O)	-O	-(CH ₂)	-H ₂ +O	-H ₂ +O ₂	Glucuronide
Omeprazole	MS3	MS3	MS3	MS3	MS3	MS3	MS3	MS3	MS3	MS3

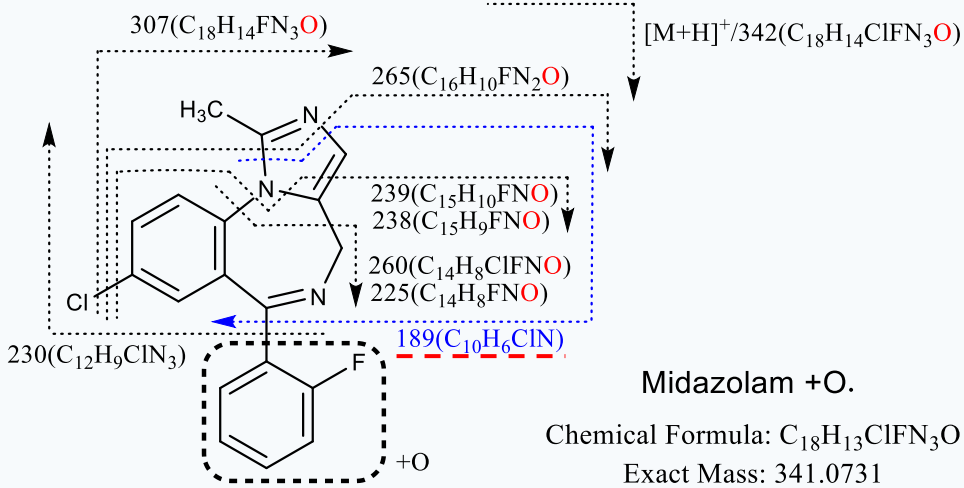
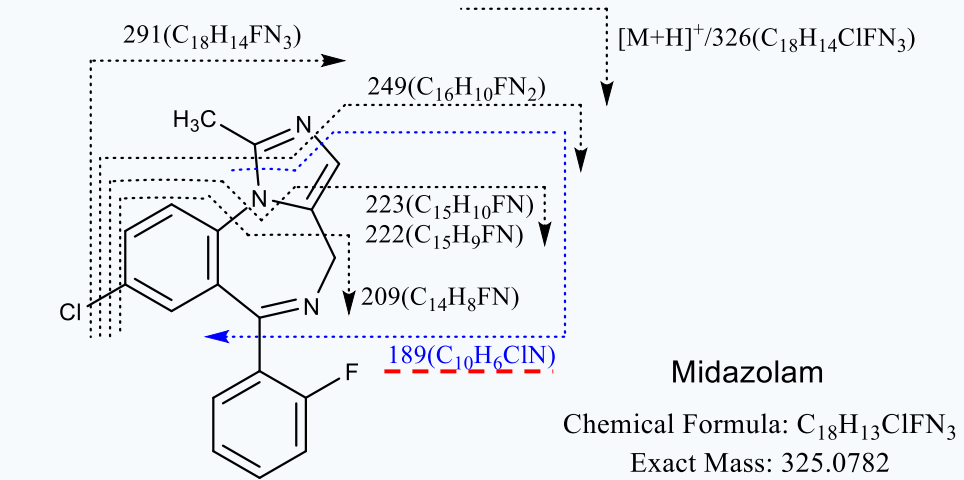
ExpectedCompounds MS3 : 72/1444

化合物/代謝物	+O	+O ₂	-(CH ₂)	+O Glucuronide	+2O Glucuronide
Midazolam	MS3	MS3	MS3	MS2	MS2

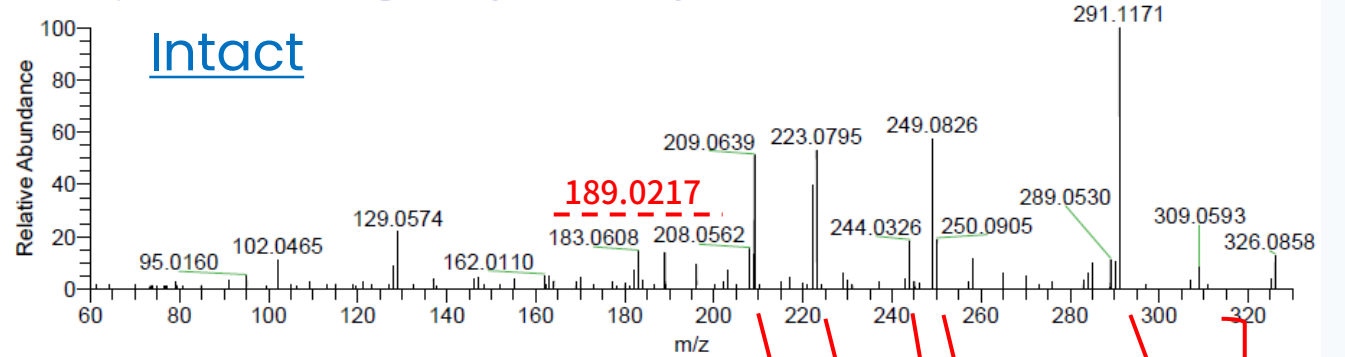
その他のMS3:文献で確認できなかった代謝物候補2種 +(H₂O₂), +O₃が取得されていた．
ExpectedCompounds MS3 : 23/2684

考察

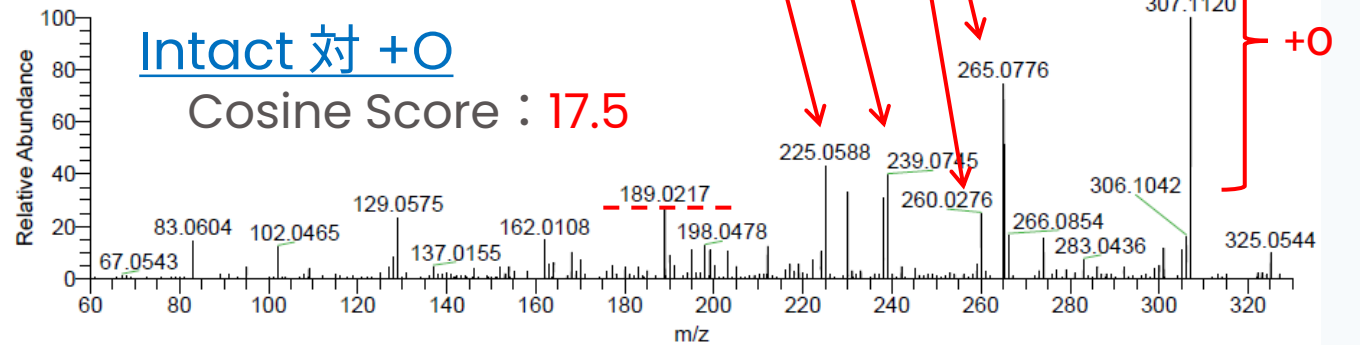
2つの異なる化合物においても，AcquireXにより複数化合物の代謝物がInclusion listに登録され，MSnが取得が確認された．また多くの代謝物でMS3の取得が確認された．



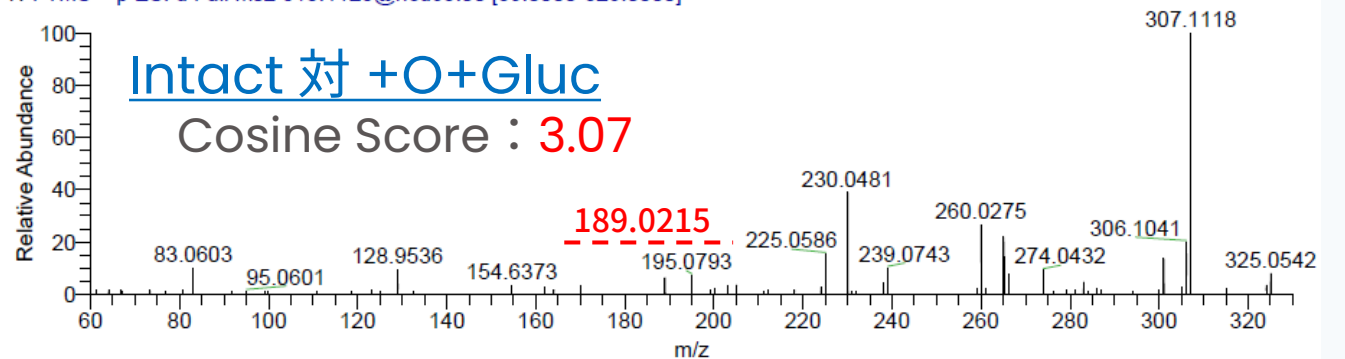
Midazolam 03107 025h #5681 RT: 21.13 AV: 1 NL: 2.01E5
 T: FTMS + p ESI d Full ms2 326.0857@hcd65.00 [49.0000-337.0000]



Midazolam 03107 025h #5240 RT: 19.77 AV: 1 NL: 6.90E5
 T: FTMS + p ESI d Full ms2 342.0805@hcd65.00 [50.0000-353.0000]



Midazolam 03107 025h #3123 RT: 14.02 AV: 1 NL: 2.49E5
 T: FTMS + p ESI d Full ms2 518.1125@hcd65.00 [59.0000-529.0000]



まとめ

サンプルの初回分析において

- Real-Time Library Searchにより 特異的なMS3データ取得が可能になった。
(ライブラリー作成・検索含め当社内で完結)。
- AcquireXにより機器とソフトウェアが自動制御されることで不要なMS2データを減らし、
目的化合物の網羅的なMS2の取得を実施できる。



これらを組み合わせて迅速かつ解析に有用であるデータ収集が可能

Mission

「生きていく」を明るく、前向きにする。

Vision

心身の健康や充実を叶える方法を、
人々が主体的に選べる世界にする。



mediford

A Member of PHC Group