### LC/MS基礎講座 〜バイオマーカー定量時の留意点を中心に〜



第14回JBFシンポジウム 2023年3月1日

新井 浩司 (株式会社 L S I メディエンス)

### 本日のテーマー覧



- ◆LC/MSを用いた測定とは
- ◆バイオマーカー定量を開始する前の準備
- ◆メソッド構築時のコツや注意点
- ◆よく起こるトラブル

- ~本内容は以下を想定しています。~
- ・LC/MS測定をこれから実施する方、測定して間もない方を対象
- ・LC/MS/MS(三連四重極タイプ)による測定
- ・留意点は主に低分子のバイオマーカーを対象

### はじめに



バイオアナリシス(Bioanalysis)= 生体試料中の薬物・バイオマーカー分析

#### 生体試料

血液 血漿 血尿 水 下 脳 脊髄 組織 etc. タンパク質や脂質、塩など様々な成分が 入り混じっている複雑なマトリックス

目的とする成分のみを適切な手法を用いて 抽出し、測定しなければならない (LC/MS, LBA, qPCR, etc.)

# 目的成分の測定までの流れ (LC/MS)





・生体試料(血漿/血清/尿)を一定量採取

前処理

- ・生体試料からの目的成分の抽出、クリーンナップ
- ・除タンパク法、液-液抽出法、固相抽出法

LC

- ・分析カラムへの保持力の差で分離
- ・逆相、イオン交換、HILIC、等々

徐々にサンプルを きれいに!

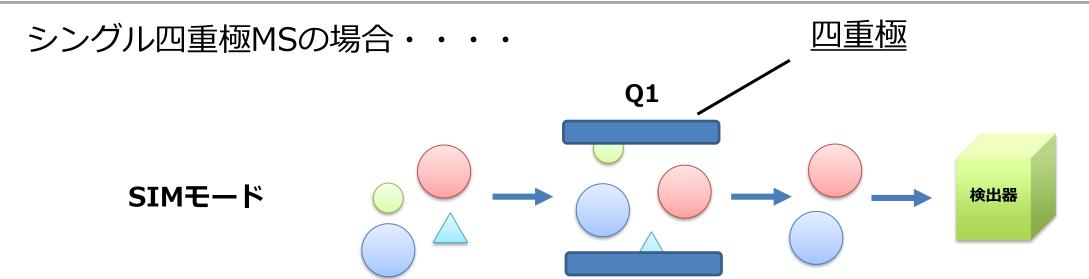
MS

- ・分子量(m/z)の差で分離検出
- · QqQ, TOF, Iontrap

http://bioanalysisforum.jp/

# MSとMS/MS?





SIM: Selected Ion Monitoring

Q1で目的とする化合物のm/zのみを通して測定

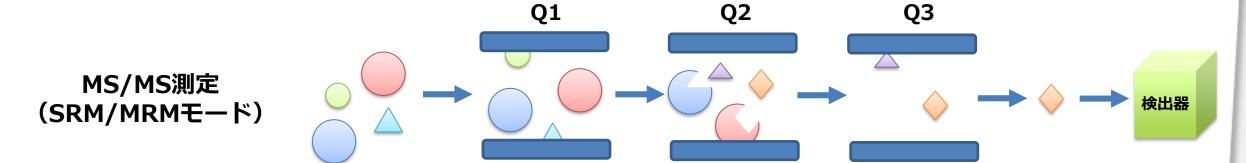
$\Rightarrow$	同じm/zのものは分離できない	1
---------------	-----------------	---

m/z

### MSとMS/MS?

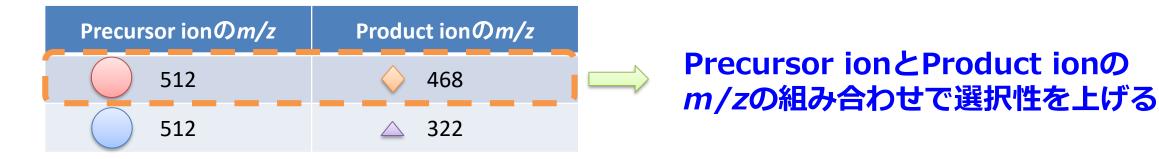


#### 三連四重極の場合・・・



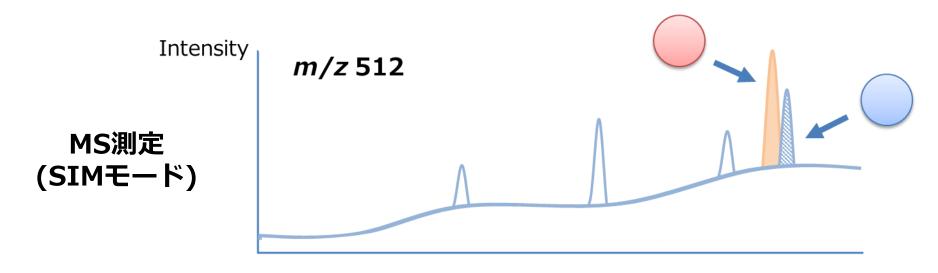
SRM: Selected Reaction Monitoring MRM: Multiple Reaction Monitoring

目的のm/z 化合物の結合を 目的のm/z のみを通す 開裂させる のみを通す (precursor ion) (fragmentation) (product ion)

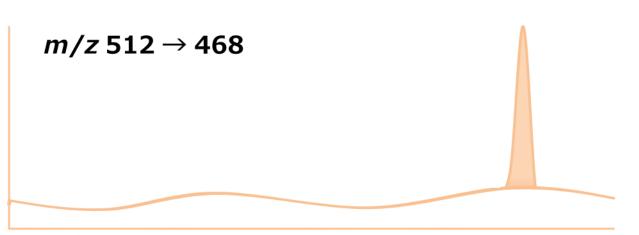


# MS測定とMS/MS測定のイメージ

**JBF** 



MS/MS測定 (SRMモード)



より選択性が高い

Time (min)

http://bioanalysisforum.jp/



# LC/MS測定までの流れ ~バイオマーカー定量を中心に~

# LC/MS(/MS)によるバイオマーカー定量



薬物濃度測定 の考え方



バイオマーカー
測定の考え方

### 測定前の準備~標準物質~



#### ◆標準物質の入手

低分子のバイオマーカーであれば概ね購入可能。

・購入時の注意点 似たような名前や構造の化合物が多い 通称があったり、特定の表記方法で表示されている場合もある

#### 例:

- N-methylnicotinamide, 1-methylnicotinamide (N1-methylnicotinamide)
- Lignoceric acid, Tetracosanoic acid, Tetracosanoate, C24:0
- →IUPAC名やCAS番号などを確認し、 いくつかの試薬メーカーのサイトで正しい化合物かを確認

### 測定前の準備~内標準物質~



#### ◆ 内標準物質の入手

SIL-IS: 安定同位体標識された内標準物質

できるだけSIL-ISの使用を推奨

可能であれば、重水素体でなく13Cや15Nが理想。

市販品がない場合や高額で購入できない場合は類縁体を使用。 類縁体は極力化合物の性質が近くLCの保持時間が変わらないものを選択

#### ● SIL-ISを推奨する理由

- ・クロマトグラム上で目的化合物の同定が容易になる (LC保持時間等、実マトリックスで直接確認が可能)
- ・検量線にサロゲートマトリックスを用いる場合、 類縁体のIS使用は結構リスクが高い (特にマトリックス効果の大きい高感度測定)

### 測定前の準備~内標準物質~



- <SIL-ISを使用する際の注意点>
- 化合物純度よりも同位体純度に注意(未標識体d0の混在)
- →化合物純度が悪くても同位体純度が高ければ測定に大きな影響はない
- →同位体純度が悪くてもd0体以外の重水素体の存在は大きな影響はない

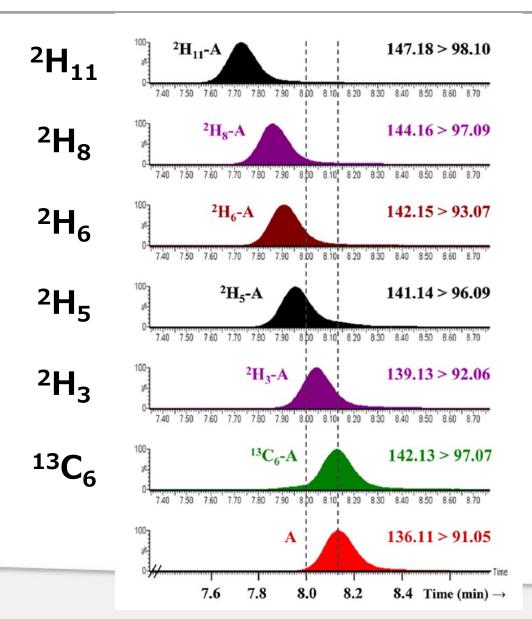
例:d5体を使用する場合、d1~d4体は混在していてもISとしては使用可能

未標識体(d0体)の混在は、測定に影響があるので注意が必要 入手したら、まず未標識体の影響を確認

- 重水素体よりも13Cや15Nを推奨
- →13Cや15Nの方がISとしての補正能力が高い (重水素体は意外と挙動が異なることがある)

### 測定前の準備~内標準物質~





重水素は数が多いと挙動が異なるためd3~d5体程度が 経験的には望ましい

(置換されている位置や化合物の大きさ等にもよる)

→そのため、可能なら13Cや15N推奨。 ただし、市販されていない場合や重水素体よりも高価 な場合が多いのが悩みどころ。

Journal of Chromatography A, 1344 (2014) 83–90 Fig.2の一部抜粋

### 測定前の準備~定量下限の設定~



#### ◆目標定量下限、検量線範囲の設定

#### 内因性濃度の事前確認内容

- ・対象マトリックス(血清/血漿、血漿なら抗凝固剤)
- ・試料採取後の安定性情報 (ex vivoでの生成にも注意)
- ・他に性差や年齢、食事の影響、濃度の日内変動も場合により考慮

#### バイオマーカーで何を確認したいか

・疾患や薬物投与による濃度上昇 or 減少

#### 検量線範囲

・バイオマーカーの変動範囲にもよるが、

TK/PK測定ほど検量線範囲を広くする必要はない場合も多い。

http://bioanalysisforum.jp/

### 測定前の準備~データベース活用~

#### ◆その他の情報

文献やデータベースに情報がある場合も多いので調べておく

Adult (>18 years old)



The Human Metabolome Database https://hmdb.ca/

Biospecimen Status

Detected and Quantified

Detected and

Detected and

Detected and

Quantified

Quantified

Quantified

Blood

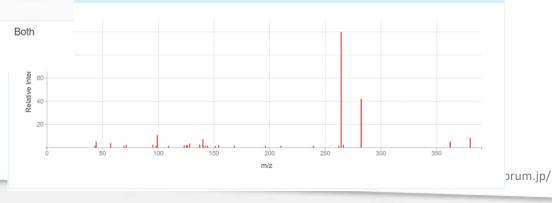
Blood

Blood

Blood

Value

0.044 +/- 0.001 uM



### 測定メソッド構築~感度確認~



#### ◆まずはマトリックスフリーの状態で確認

ピーク形状や保持時間

LC条件は文献情報等あればそれを参考に。

特に情報がなければ、以下の様な条件でとりあえず測定してみる

分析カラム: C18, 2.0 mm I.D. x 50~100 mm, 3~5 um

移動相:0.1%ギ酸-アセトニトリル系

この意識は大事

#### ◆ 検量線と実サンプルを測定

前処理もLCも粗い条件で良いので、まずは検量線と実マトリックスを測定。

マトリックスフリーの状態で測定条件を詰めても、 夾雑ピークやマトリックス効果の影響で、結局条件を変える可能性あり。

http://bioanalysisforum.jp/

# 測定メソッド構築~サロゲートマトリックス~



#### ◆サロゲートマトリックスの選択

まずはシンプルなもので試す(水やPBS)

ISがSIL-ISで、高感度を求めない測定であれば シンプルなサロゲートマトリックスで十分な場合が多い。

#### <u>以下の場合は、他のサロゲートも検討するとよい。</u>

- ・前処理中の吸着の影響がある
- ・実マトリックスとのマトリックス効果の差が大きい

マトリックス効果の影響が大きすぎると、SIL-ISでも補正しきれない場合がある

### 測定メソッド構築~サロゲートマトリックス~



#### ◆ サロゲートマトリックスの例

- ·水やPBS
- ・水やPBS+BSA
- ・血清/血漿を水やPBSで希釈したもの
- ・血清/血漿を活性炭カラムでろ過したもの
- ・異なる動物種のもの(主にタンパク質/ペプチド測定の場合)

PBS+BSAは性質としては血漿に近くなるが、 BSAの種類(グレートや脂質フリー等)や濃度を検討する必要がある。

BSAや血清/血漿を基にしたマトリックスは使用期限どうすべきか悩ましい

# ~バイオマーカー測定でよく起こるトラブル~



#### 直線性が得られない(低濃度ほど面積値が低くなるなど)

主な原因:容器やLC配管への吸着

対策: ・低吸着チューブやシリコナイズチューブへの変更

・サロゲートマトリックスをBSA入りのものにするなど

#### ● 真度の基準を満たさない

主な原因: サロゲートと実マトリックスのマトリックス効果の差

対策: ・実マトリックスに近いサロゲートに変更

・前処理方法やISの変更を検討

・代替標準物質法を用いる(DG2016-25参照)

Accuracy (%) = (Determined conc. - Endogenous conc.)

Spiked conc. http://bioanalysisforum.jp/

## ~バイオマーカー測定でよく起こるトラブル~



#### ■ コンタミネーション

原因:環境由来(器具、試薬、実験者)

対策:・実験器具やチューブの事前洗浄

・実験者からのコンタミもあることを考慮する

→前処理中以外にも、試薬の原末にコンタミしている可能性もある (共通で使用している試薬の場合、他の実験者からのコンタミもあり)

コンタミネーションは1つ1つ可能性を探り、原因を特定することがとても重要 (やみくもにやって、とりあえずコンタミがなくなっただけでは危険)

### まとめ



- ➤ 選択性が高い、ISに安定同位体を使用可能など LC-MS/MSはバイオマーカー定量において有用な方法である
- ▶ バイオマーカー測定は薬物濃度測定とは異なる注意点がある
  - ・ブランクマトリックスに実マトリックスが使えない(場合が多い)
  - ・検出しているピークが目的としているものであるかの判断が必要
  - ・安定性確認中に値が上昇することもある

・・・などなど

薬物濃度測定のメソッド開発よりも確認する内容も多く、 難しいところもありますが、本内容が少しでも皆様のバイオマーカー測定の お役に立てれば幸いです。

ご清聴ありがとうございました。