

トリガー MRM : アジレントトリプル四重極 LC/MS システムを使用した同時定量/定性

技術概要

トリガー MRM (tMRM) 法を用いた取り込みは、全てのアジレントのトリプル四重極 LC/MS システムで使用可能な分析メソッドです。tMRM 法は、MRM とプロダクトイオンスペクトルを組み合わせたもので、ライブラリによる同定や確認に最適です。tMRM 分析によって分析時間が短縮され、スループットが向上し、迅速で感度の高い定量および定性分析を 1 台の機器で 1 回の分析で実行できるようになります。

tMRM 法を用いた取り込み動作について

tMRM 分析では、最大で 10 個の MRM トランジション (1 次および 2 次) がメソッド内の各対象化合物について定義されます。1 次トランジションはすべての対象化合物について取り込まれますが、1 つの 1 次トランジションの信号がユーザー定義のしきい値を超えると、2 次トランジションがトリガーされ、指定された数のスキャンが作動しデータが取り込まれます (図 1)。

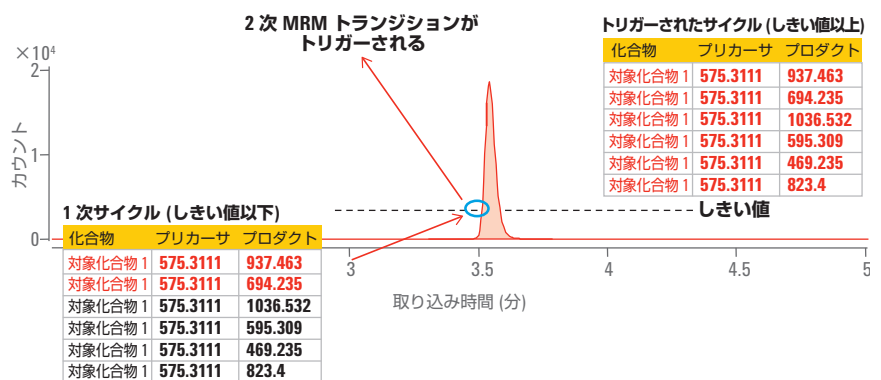


図 1. 対象化合物ごとに 2 つの 1 次トランジションを使用した tMRM 法による分析。1 次 MRM 信号がユーザー定義のしきい値を超えると、2 次 MRM トランジションがトリガーされます。



tMRM ライブラリ検索

tMRM を使用すると、tMRM 分析で取り込まれた 2 次 MRM スペクトルが 1 次 MRM トランジションスペクトルと結合し、プロダクトイオンスペクトルが生成されます。図 2 に、1 つの tMRM プロダクトイオンスペクトルを生成する 9 個の MRM トランジション (2 つの 1 次トランジションと 7 つの 2 次トランジション) を示します。このプロダクトイオンスペ

クトルは、ライブラリ検索と対象化合物の同定に使用されます。

各対象化合物の tMRM プロダクトイオンスペクトルを使用すると、ライブラリ検索を使用し対象化合物を高い信頼性にて確認することができます。従来のプロダクトイオンスキャン技術ではなく、tMRM を使用してこのようなプロダクトイオンスペクトルを生成する最大の利点は、測定時間の短縮です。イオントラッ

プまたはトリプル四重極機器を使用した一般的なプロダクトイオンスキャンでは約 200 ms の時間がかかるのに対し、10 個のすべての MRM トランジションを取り込む所要時間が 50 ms 未満になります。この高速のサイクルタイムにより、各ピークで取り込まれるデータポイントの数が増え、取り込まれる定量データの感度、堅牢性、精度が改善します。

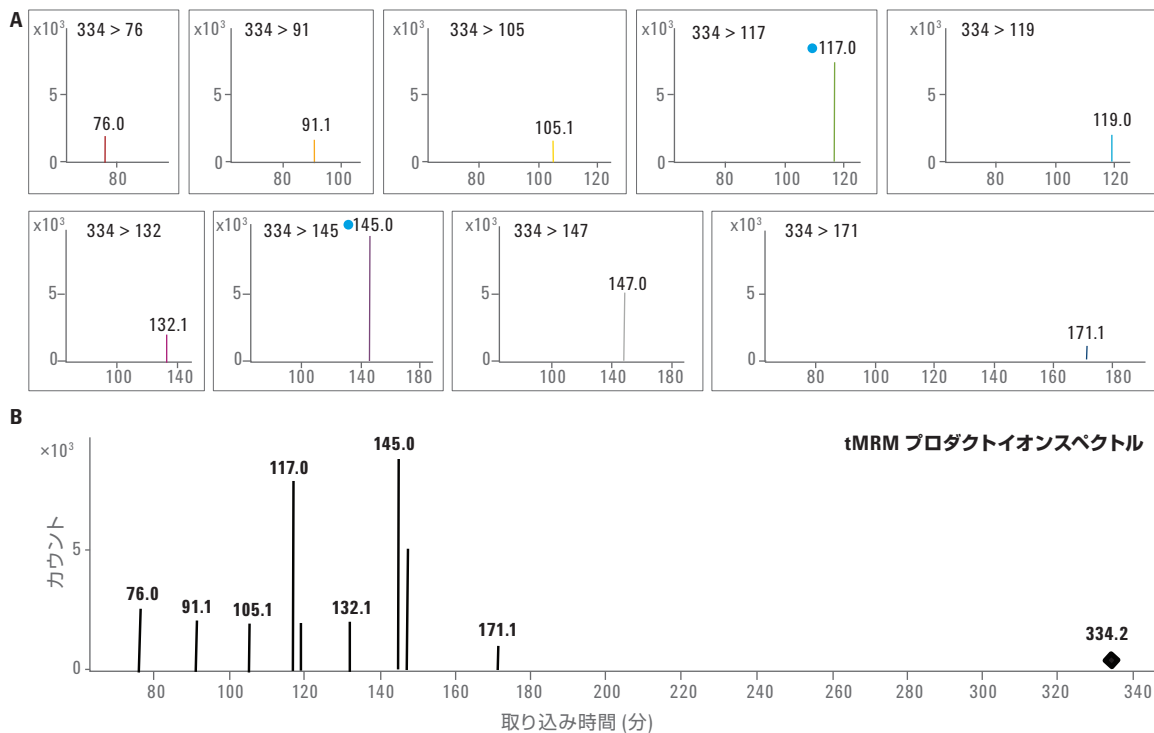


図 2. tMRM プロダクトイオンスペクトルは、対象化合物 A の 1 次 (●) および 2 次 MRM スペクトルを組み合わせることで生成されます。プロダクトイオンスペクトル B は、ライブラリ検索と対象化合物の確認に使用できます。

新たに拡張された トリガー機能

Agilent 6400 シリーズトリプル四重極 LC/MS システム用の Agilent Mass Hunter B.06 Acquisition ソフトによって、tMRM データの品質を向上する次のトリガー機能が追加されます。

・ エントランス遅延

指定した 1 次 MRM トランジションの信号がトリガーしきい値を超えると、エントランス遅延によってユーザー定義のサイクル数だけトリガーが延期され、2 次 MRM トランジションの取り込みがピークの頂点に近付きます。

・ トリガー遅延

トリガーしきい値に達すると、トリガー間でスキップするサイクル数がトリガー遅延によって定義され、2 次 MRM トランジションの取り込みがピーク全体に広がります。トリガー遅延はエントランス遅延機能と組み合わせて使用することができます。

・ トリガーウィンドウ

トリガーウィンドウは、特定のピークで予測されるリテンションタイムについてすべてのトリガー機能のアクティブ化をユーザー定義ウィンドウ内に設定します。この機能により、標的化合物と特定の tMRM メソッドの既知のリテンションタイムに基づくトリガーの特異性が向上します。

図 3 に、エントランス遅延トリガー機能を使用して取り込んだデータを示します。パネル A は 0 回のスキャンサイクルのエントランス遅延を、パネル B は 3 回のスキャンサイクルのエントランス遅延を示します。この例では、エントランス遅延により 2 次スペクトルの取り込みがピークの頂点に近付いています。

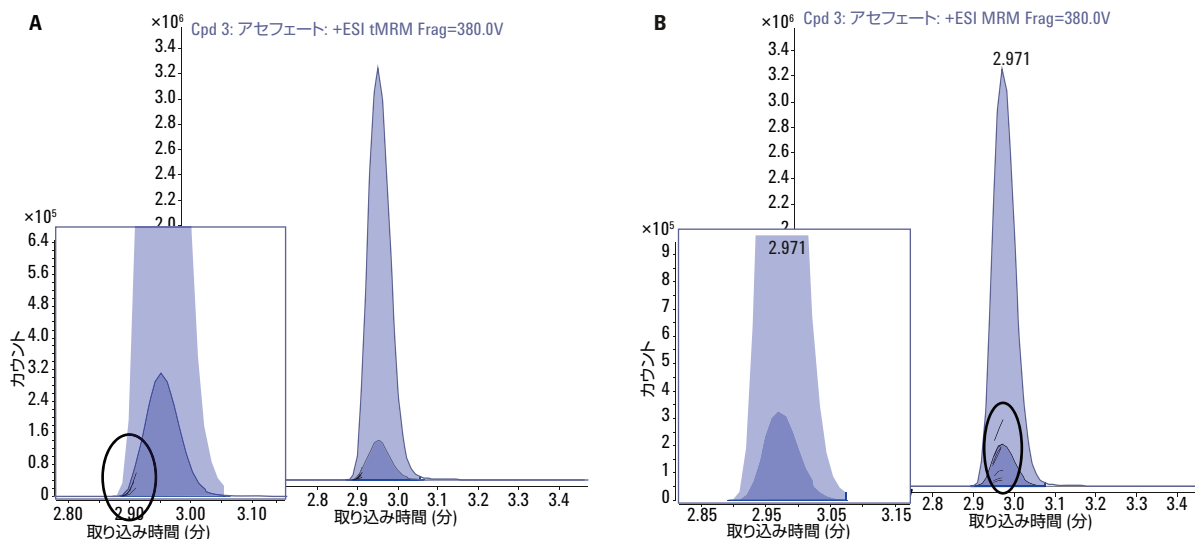


図 3. エントランス遅延トリガー機能を使用してアセフェートについて取り込んだデータ。

tMRM 法による偽陽性の回避例

テブフェンピラドは、ショウガに含まれる可能性が指摘されている、毒性殺虫剤です。検出についての大きな問題は、ショウガには、テブフェンピラドと共溶出し、クオリファイアイオン比が類似した2つの同じ1次MRM トランジションを共有する内因性化合物が含まれることです。tMRM 分析を使用しない一般的なトリプル四重極分析では、ショウガ抽出物はテブフェンピラドについて偽陽性の結果が出やすくなります。しかし、tMRM 分析によって生成されるプロダクトイオンスペクトルを使用すると、ショウガの内因性化合物とテブフェンピラド汚染物質を区別することが可能です。tMRM を用いずに同じ定量および定性データを取り込むためには、最初に、トリプル四重極にて高速スキャンを実施して抽出物を分析し、次にイオントラップまたは Time-of-Flight (TOF) 機器を定性分析に使用し再分析する必要があります。

図4に、テブフェンピラドのtMRM ライブラリスペクトルと、ショウガ抽出物で検出された内因性化合物のスペクトルの比較を示します。テブフェンピラドのスペクトルの丸で囲んだピークは、ショウガの内因性化合物のピークとは大きく異なります。または内因性化合物では見られません。この場合は、tMRM 法を用いた取り込みで生成される定性データにより偽陽性の結果が回避されました。

tMRM 法による取り込みを使用した高速定量分析

テブフェンピラドのtMRM プロダクトイオンスペクトルは定量と同時に生成されたものですが、いずれの結果もスペクトルの質が低下することはありません。1次MRMのしきい値を使用してさらにMRM トランジションをトリガーすると、そのtMRMのサイクルタイムは必ず可能な限り短くなり、各ピークで取り込まれるデータポイントの数は最大になり

ます。分析ピークで取り込まれるデータポイントの数が最大になると、定量分析の感度と精度が最適化されます。tMRMを使用した定量は、ダイナミックMRM¹ (Stone, 2009)にも利用できます。これは、残留農薬のスクリーニングなどで検出される数多くの対象化合物の確認と同定に理想的です。さらに、tMRM メソッドでは、各MRMを最適なコリジョンエネルギーで取り込むことができるため、感度が最大になります。

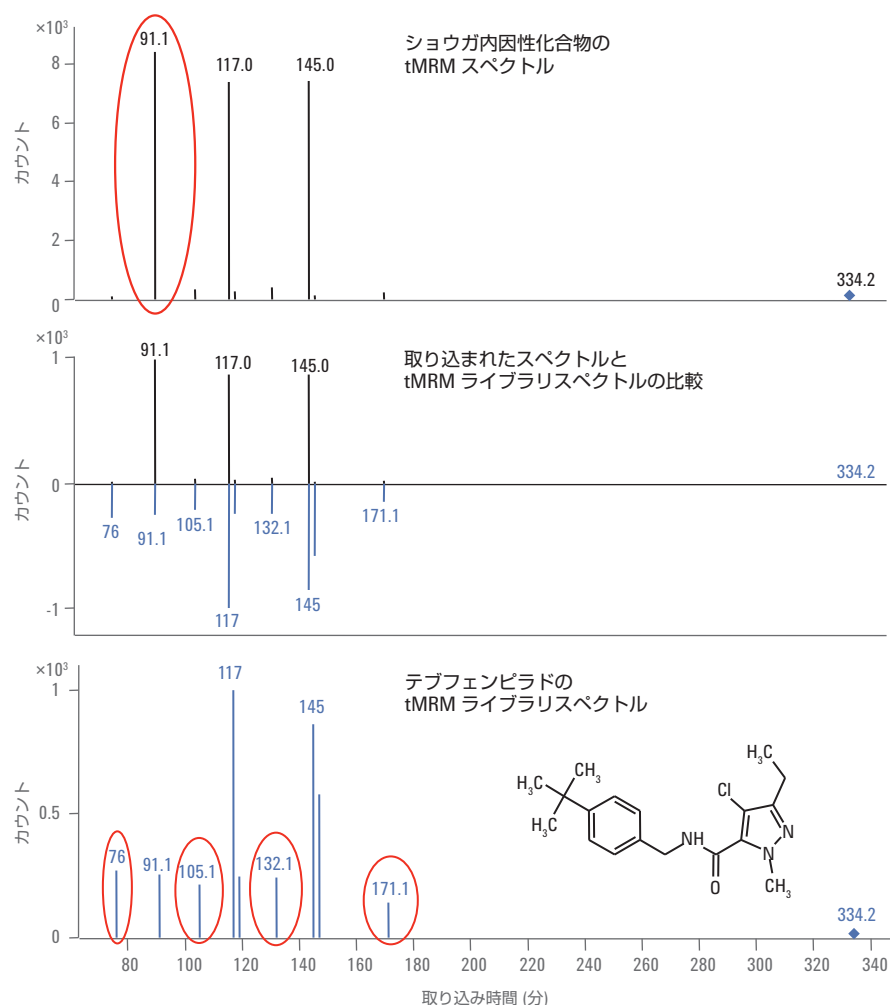


図4. ショウガの内因性化合物について得られたtMRMスペクトルと、テブフェンピラドの真のライブラリtMRMスペクトルとの比較。

結論

tMRM はデータに依存するスキャン機能であり、スループットを向上し、定量と定性の両方の情報を提供し、分析コストを削減します。標準のプロダクトイオンスキャン技術では、トランジションあたり約 200 ms の時間がかかります。これは tMRM サイクルの 4 倍以上の時間です。一般的なプロダクトイオンスキャンのサイクルタイムは長いため、対象化合物の個々のピークで取り込まれるデータポイントの数が減少し、定性および定量の結果における感度と堅牢性が低下します。さらに、プロダクトイオンスキャンのサイクルタイムが長い機器の LC メソッドは、対象化合物の共溶出を最小限に抑えるために所要時間が延びることが頻繁にあります。tMRM を使用すると、ピーク幅が狭い高スループットの LC メソッドをトリプル四重極 LC/MS 機器で容易に採用できるため、定量分析と定性による確認を 1 台の機器を使用して 1 回の注入で実行できます。



参考文献

1. New Dynamic MRM Mode Improves Data Quality and Triple Quad Quantification in Complex Analyses. Agilent publication 5990-3595EN.

www.agilent.com/chem/jp

研究目的にのみ使用できます。診断手順には使用しないでください。本資料記載の情報は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2013
Published in Japan., January 18, 2013
5990-8461JAJP



Agilent Technologies