

Application News

No. C94

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

LCMS-8040 を用いた DBS (Dried Blood Spot) に含まれる アミノ酸・アシルカルニチンの一斉分析

Simultaneous Analysis of Amino Acids and Acylcarnitines in DBS (Dried Blood Spot) with LCMS-8040

アミノ酸代謝の指標となるアミノ酸や脂肪酸代謝の指標となるアシルカルニチンは、LC-MS/MSにより短時間で多成分を測定することが可能です。さらにLC-MS/MSは、血液中のアミノ酸およびアシルカルニチンを簡単な前処理で高感度に検出できることから、今後の代謝研究への応用にも期待が高まっています。

LC-MS/MSを用いたスクリーニングではDBS (Dried Blood Spot) からの抽出液を96穴プレートにセットし、オートサンプラーを使用して自動分析を行います。

ここでは、Meyer Children's Hospital, Mass Spectrometry, Clinical Chemistry and Pharmacology Lab. (Florence, Italy) で実際に使用されているプロトコルを使用し、高速液体クロマトグラフ-トリプル四重極型質量分析計LCMS-8040で測定した例をご紹介します。

T. Tanigawa

DBSからのサンプル抽出とMS測定

Sample extraction from DBS and MS Analysis

Fig. 1にサンプルの前処理方法を示しました。サンプルには血液をしみこませたろ紙: DBS (Dried Blood Spot) を使用しました。DBSから3.2 mm径のディスクを96穴プレートへと切り出した後、プロトコルにしたがって前処理を行いました。前処理後のサンプル抽出液を用いて、FIA (Flow Injection Analysis) を実施しました。なお内部標準試料としてカルニチン、アシルカルニチン、アミノ酸の安定同位体 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) にアデノシン、デオキシアデノシン等の安定同位体を混合しStandard extractionとして使用しました。

アミノ酸に対しては46 Daのニュートラルロススキャン、アシルカルニチンに対してはm/z 85のプレカーサーイオンスキャン、そしてアミノ酸の一部とサクシニルアセトン、アデノシン、デオキシアデノシンに対してはMRM (Multiple Reaction Monitoring) を使用して測定を行いました。それらの対象化合物の情報をTable 1に示しました。各対象化合物の定量は、内部標準試料を使用することで行いました。Table 2にLCおよびMS条件を示しました。

Table 1 対象化合物
Target Compounds

| Compound | type | m/z | event | Compound | type | m/z | event | Compound | type | m/z | event |
|----------|--------|-------|----------------|-------------|--------|-------|----------------|--------------------|--------|---------------|----------|
| C0 | Target | 162.1 | 2-Precursor(+) | C3DC | Target | 248.1 | 2-Precursor(+) | Ala | Target | 90.3 | 3.NLS(+) |
| C0 IS | ISTD | 171.2 | 2-Precursor(+) | C3DC IS | ISTD | 221.1 | 2-Precursor(+) | Ala IS | ISTD | 94.3 | 3.NLS(+) |
| C5 | Target | 246.2 | 2-Precursor(+) | C4OH | Target | 248.1 | 2-Precursor(+) | Val | Target | 118.1 | 3.NLS(+) |
| C5 IS | ISTD | 255.2 | 2-Precursor(+) | C4OH IS | ISTD | 235.2 | 2-Precursor(+) | Val IS | ISTD | 126.1 | 3.NLS(+) |
| C6 | Target | 260.2 | 2-Precursor(+) | C5I | Target | 244.2 | 2-Precursor(+) | Xleu | Target | 132.1 | 3.NLS(+) |
| C8 | Target | 288.2 | 2-Precursor(+) | C5I IS | ISTD | 255.2 | 2-Precursor(+) | Xleu IS | ISTD | 135.1 | 3.NLS(+) |
| C8 IS | ISTD | 291.2 | 2-Precursor(+) | C5DC | Target | 276.1 | 2-Precursor(+) | Met | Target | 150.1 | 3.NLS(+) |
| C8:1 | Target | 286.2 | 2-Precursor(+) | C5DC IS | ISTD | 291.2 | 2-Precursor(+) | Met IS | ISTD | 153.1 | 3.NLS(+) |
| C8:1 IS | ISTD | 291.2 | 2-Precursor(+) | C5OH | Target | 262.2 | 2-Precursor(+) | Tyr | Target | 182.1 | 3.NLS(+) |
| C6 IS | ISTD | 255.2 | 2-Precursor(+) | C5OH IS | ISTD | 255.5 | 2-Precursor(+) | Tyr IS | ISTD | 188.1 | 3.NLS(+) |
| C2 | Target | 204.1 | 2-Precursor(+) | C12OH | Target | 360.3 | 2-Precursor(+) | Asp | Target | 134.1 | 3.NLS(+) |
| C2 IS | ISTD | 207.1 | 2-Precursor(+) | C12OH IS | ISTD | 381.3 | 2-Precursor(+) | Asp IS | ISTD | 137.1 | 3.NLS(+) |
| C3 | Target | 218.1 | 2-Precursor(+) | C14OH | Target | 386.3 | 2-Precursor(+) | Glu | Target | 146.1 | 3.NLS(+) |
| C3 IS | ISTD | 221.1 | 2-Precursor(+) | C14OH IS | ISTD | 381.3 | 2-Precursor(+) | Glu IS | ISTD | 151.3 | 3.NLS(+) |
| C4 | Target | 232.2 | 2-Precursor(+) | C16OH | Target | 416.3 | 2-Precursor(+) | Phe | Target | 166.1 | 3.NLS(+) |
| C4 IS | ISTD | 235.2 | 2-Precursor(+) | C16OH IS | ISTD | 403.3 | 2-Precursor(+) | Phe IS | ISTD | 172.1 | 3.NLS(+) |
| C10 | Target | 316.1 | 2-Precursor(+) | C18OH | Target | 444.4 | 2-Precursor(+) | Gly | Target | 76.00-30.10 | 1.MRM(+) |
| C10 IS | ISTD | 291.2 | 2-Precursor(+) | C18OH IS | ISTD | 403.3 | 2-Precursor(+) | Gly IS | ISTD | 78.00-32.10 | 1.MRM(+) |
| C10:1 | Target | 314.1 | 2-Precursor(+) | C18:1OH | Target | 442.4 | 2-Precursor(+) | Cit MRM | Target | 176.10-113.10 | 1.MRM(+) |
| C10:1 IS | ISTD | 291.2 | 2-Precursor(+) | C18:1OH IS | ISTD | 403.4 | 2-Precursor(+) | Cit MRM IS | ISTD | 178.10-115.10 | 1.MRM(+) |
| C12 | Target | 344.3 | 2-Precursor(+) | C14:2 | Target | 368.3 | 2-Precursor(+) | Arg MRM | Target | 175.10-116.10 | 1.MRM(+) |
| C12 IS | ISTD | 381.3 | 2-Precursor(+) | C14:2 IS | ISTD | 355.2 | 2-Precursor(+) | Arg MRM IS | ISTD | 180.10-121.10 | 1.MRM(+) |
| C12:1 | Target | 342.3 | 2-Precursor(+) | C16:1OH | Target | 414.3 | 2-Precursor(+) | Arg Succ MRM | Target | 291.10-176.20 | 1.MRM(+) |
| C12:1 IS | ISTD | 381.3 | 2-Precursor(+) | C16:1OH IS | ISTD | 403.3 | 2-Precursor(+) | Arg Succ MRM IS | ISTD | 180.10-121.10 | 1.MRM(+) |
| C14 | Target | 372.3 | 2-Precursor(+) | C10:2 | Target | 312.2 | 2-Precursor(+) | Orn | Target | 133.10-70.10 | 1.MRM(+) |
| C14 IS | ISTD | 381.3 | 2-Precursor(+) | C10:2 IS | ISTD | 291.2 | 2-Precursor(+) | Orn IS | ISTD | 135.10-72.10 | 1.MRM(+) |
| C14:1 | Target | 370.3 | 2-Precursor(+) | C4DC | Target | 262.1 | 2-Precursor(+) | Met MRM | Target | 150.10-104.10 | 1.MRM(+) |
| C14:1 IS | ISTD | 381.3 | 2-Precursor(+) | C4DC IS | ISTD | 235.2 | 2-Precursor(+) | Met MRM IS | ISTD | 153.10-107.10 | 1.MRM(+) |
| C16 | Target | 400.3 | 2-Precursor(+) | C6DC | Target | 290.2 | 2-Precursor(+) | SuAC | Target | 155.00-137.20 | 1.MRM(+) |
| C16 IS | ISTD | 403.3 | 2-Precursor(+) | C6DC IS | ISTD | 255.2 | 2-Precursor(+) | SuAC IS | ISTD | 159.00-141.20 | 1.MRM(+) |
| C16:1 | Target | 398.3 | 2-Precursor(+) | C10 OH | Target | 332.2 | 2-Precursor(+) | ADO | Target | 268.20-136.10 | 1.MRM(+) |
| C16:1 IS | ISTD | 403.3 | 2-Precursor(+) | C10 OH IS | ISTD | 291.2 | 2-Precursor(+) | ADO IS | ISTD | 269.20-136.10 | 1.MRM(+) |
| C18 | Target | 428.4 | 2-Precursor(+) | C8DC | Target | 318.2 | 2-Precursor(+) | Deoxi ADO | Target | 252.20-136.10 | 1.MRM(+) |
| C18 IS | ISTD | 403.3 | 2-Precursor(+) | C8DC IS | ISTD | 381.3 | 2-Precursor(+) | Deoxi ADO IS | ISTD | 257.20-136.10 | 1.MRM(+) |
| C18:1 | Target | 426.4 | 2-Precursor(+) | C18:2 OH | Target | 440.4 | 2-Precursor(+) | Guanosina | Target | 284.10-152.00 | 4.MRM(+) |
| C18:1 IS | ISTD | 403.3 | 2-Precursor(+) | C18:2 OH IS | ISTD | 403.4 | 2-Precursor(+) | Guanosina IS | ISTD | 289.10-156.90 | 4.MRM(+) |
| C18:2 | Target | 424.3 | 2-Precursor(+) | | | | | Deoxy Guanosina | Target | 268.00-152.00 | 4.MRM(+) |
| C18:2 IS | ISTD | 403.3 | 2-Precursor(+) | | | | | Deoxy Guanosina IS | ISTD | 270.10-151.90 | 4.MRM(+) |
| | | | | | | | | Inosina | Target | 269.00-137.10 | 4.MRM(+) |
| | | | | | | | | Inosina IS | ISTD | 273.10-140.90 | 4.MRM(+) |
| | | | | | | | | Deoxy Inosina | Target | 253.10-137.10 | 4.MRM(+) |
| | | | | | | | | Deoxy Inosina IS | ISTD | 273.10-140.90 | 4.MRM(+) |

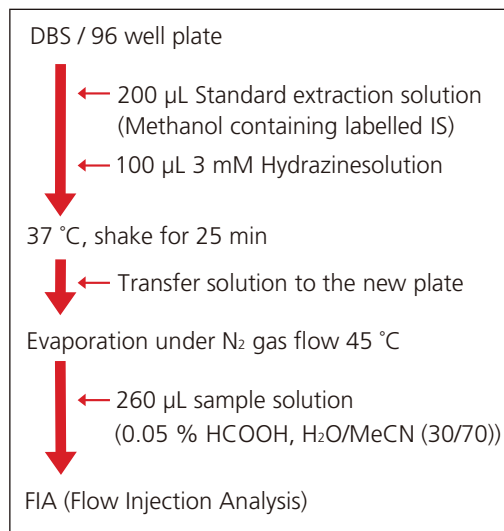


Fig. 1 前処理プロトコル
Preparation Protocol

Table 2 分析条件
Analytical Conditions

| | | | |
|------------------|----------------------------------|--------------------------|--------------|
| Mobile Phase A | : 0.1 % HCOOH-H ₂ O | Ionization Mode | : ESI (+) |
| Mobile Phase B | : 0.1 % HCOOH-CH ₃ CN | Probe Voltage | : +4.5 kV |
| Ratio | : 70 % B | Nebulizing Gas Flow | : 3.0 L/min |
| Flow Rate | : 0.07 mL/min | Drying gas Flow | : 20.0 L/min |
| Injection Volume | : 40 µL | DL Temperature | : 300 °C |
| Analysis Time | : 2.2 min | Block Heater Temperature | : 500 °C |

■測定結果例

Example of Analysis Results

Table 3 にコントロールサンプルの測定結果を示しました。アミノ酸・アシルカルニチン分析支援ソフトウェア Neonatal Solution を使用することにより、対象化合物の濃度 (μM) が自動的に計算され、あらかじめ設定したクライテリアに対して

レンジ内であるかどうかが表示されます。ここでは、あらかじめ設定したクライテリアに対してレンジ内に収まっていることが示されました。

Table 3 コントロールサンプル測定結果
Analysis Results of Control Sample

| Compound | C0 | C2 | C3 | C3DC | C4 | C4OH | C4DC | C5 |
|--------------------------------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|
| Criteria Upper Limit (Caution) | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Criteria Upper Limit (Notice) | 45.00 | 48.00 | 3.30 | 0.70 | 0.92 | 0.50 | 0.54 | 0.56 |
| Criteria Lower Limit (Notice) | 5.50 | 6.30 | 0.20 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.04 | 0.01 |
| Criteria Lower Limit (Caution) | - | - | - | - | - | - | - | - |
| test_001 | 8.32 | 19.84 | 1.47 | 0.20 | 0.14 | 0.18 | 0.19 | 0.07 |
| test_002 | 9.99 | 19.36 | 2.43 | 0.20 | 0.15 | 0.17 | 0.23 | 0.06 |
| test_003 | 7.64 | 21.79 | 1.20 | 0.17 | 0.12 | 0.15 | 0.16 | 0.05 |
| test_004 | 7.16 | 15.14 | 1.48 | 0.18 | 0.27 | 0.17 | 0.27 | 0.09 |
| test_005 | 8.12 | 21.15 | 1.30 | 0.21 | 0.11 | 0.20 | 0.25 | 0.07 |
| test_006 | 11.70 | 24.70 | 1.63 | 0.23 | 0.19 | 0.22 | 0.30 | 0.04 |
| test_007 | 12.31 | 12.52 | 1.66 | 0.10 | 0.14 | 0.09 | 0.24 | 0.04 |
| test_008 | 12.37 | 18.24 | 1.57 | 0.16 | 0.13 | 0.14 | 0.16 | 0.06 |
| test_009 | 12.46 | 16.08 | 1.41 | 0.11 | 0.14 | 0.10 | 0.20 | 0.07 |
| test_010 | 6.93 | 17.85 | 1.23 | 0.25 | 0.15 | 0.21 | 0.21 | 0.06 |
| test_011 | 15.53 | 24.85 | 2.62 | 0.24 | 0.21 | 0.23 | 0.27 | 0.08 |
| test_012 | 8.67 | 10.11 | 0.56 | 0.17 | 0.12 | 0.15 | 0.12 | 0.06 |
| test_013 | 5.83 | 12.29 | 0.99 | 0.15 | 0.17 | 0.14 | 0.26 | 0.06 |
| test_014 | 5.70 | 13.08 | 1.14 | 0.23 | 0.44 | 0.23 | 0.26 | 0.07 |
| test_015 | 7.33 | 14.44 | 1.61 | 0.28 | 0.15 | 0.26 | 0.38 | 0.05 |
| test_016 | 10.18 | 20.75 | 1.08 | 0.33 | 0.17 | 0.29 | 0.13 | 0.05 |
| test_017 | 10.42 | 15.67 | 2.14 | 0.13 | 0.12 | 0.13 | 0.16 | 0.05 |
| test_018 | 11.79 | 21.11 | 1.54 | 0.18 | 0.16 | 0.16 | 0.27 | 0.05 |

■サンプルを使用した測定結果

Analysis Results using Sample

Table 4 に 7 サンプルを使用した測定結果を示しました。サンプル A ~ G について測定を行った結果、設定したクライテリアから外れた対象化合物が検出されました。(Table 4 黄色のセル) さらに、そのプロファイルをコントロールと比較し

た結果を Fig. 2 に示しました。クライテリアから外れた対象化合物について、コントロールと異なるプロファイルが観察されました。

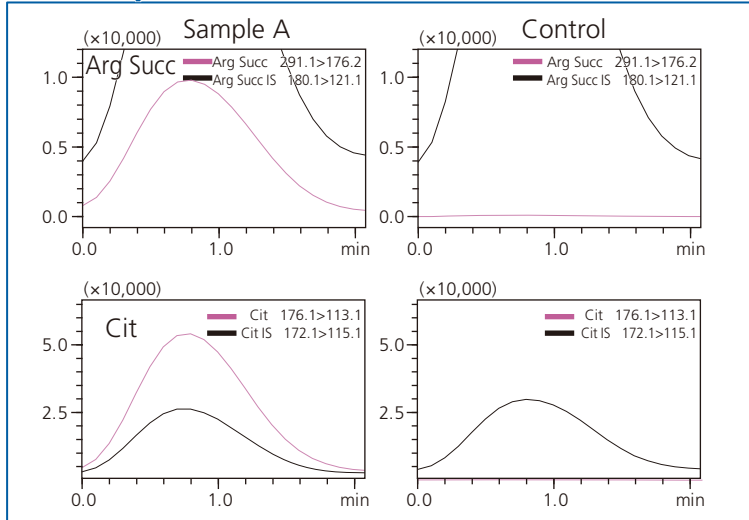
Table 4 7サンプルを使用した測定結果
Analysis Results Using 7 Samples

Sample A : ArgSuc, Sample B : VLCAD, Sample C : MCAD, Sample D : Cit I, Sample E : GAL I, Sample F : Tyr I, Sample G : PA

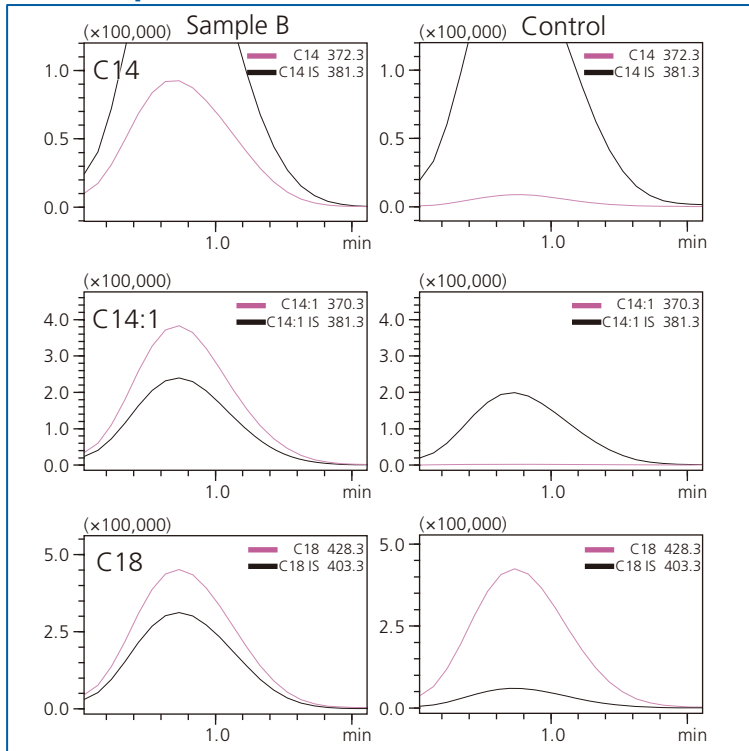
| compound | C3 | C5DC | C6 | C8 | C14 | C14:1 | C18:1 | Tyr | Cit | Arg Succ |
|--------------------------------|------|------|------|------|------|-------|-------|--------|--------|----------|
| Criteria Upper Limit (Caution) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Criteria Upper Limit (Notice) | 3.30 | 0.15 | 0.25 | 0.40 | 0.57 | 0.44 | 2.43 | 200.00 | 30.00 | 1.00 |
| Criteria Lower Limit (Notice) | 0.20 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.39 | 0.01 | 3.00 | 0.01 |
| Criteria Lower Limit (Caution) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sample A_ArgSuc | 0.33 | 0.01 | 0.02 | 0.09 | 0.11 | 0.03 | 0.37 | 50.93 | 71.01 | 57.85 |
| Sample B_VLCAD | 0.59 | 0.02 | 0.04 | 0.04 | 0.91 | 3.54 | 3.16 | 68.26 | 38.28 | 0.78 |
| Sample C_MCAD | 0.32 | 0.01 | 0.44 | 2.49 | 0.10 | 0.02 | 0.63 | 57.79 | 5.57 | 0.04 |
| Sample D_Cit I | 0.91 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.06 | 0.02 | 0.32 | 57.02 | 116.82 | 0.44 |
| Sample E_GAL I | 0.28 | 1.66 | 0.01 | 0.01 | 0.08 | 0.03 | 0.68 | 87.22 | 7.86 | 0.67 |
| Sample F_Tyr I | 0.23 | 0.00 | 0.01 | 0.05 | 0.06 | 0.08 | 1.09 | 344.21 | 31.90 | 0.74 |
| Sample G_PA | 8.58 | 0.00 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.54 | 23.28 | 13.74 | 0.29 |

| compound | SuAC | C14:1/C4 | C3/C0 | C3/C4 | C3/C16 | C5DC/C4 | C5DC/C8 | C5DC/C12 | C8/C10 |
|--------------------------------|-------|----------|-------|--------|--------|---------|---------|----------|--------|
| Criteria Upper Limit (Caution) | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Criteria Upper Limit (Notice) | 2.00 | 2.14 | 0.30 | 25.80 | 1.60 | 0.56 | 0.75 | 1.07 | 2.42 |
| Criteria Lower Limit (Notice) | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| Criteria Lower Limit (Caution) | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sample A_ArgSuc | 1.71 | 0.21 | 0.01 | 2.56 | 0.31 | 0.10 | 0.15 | 0.32 | 1.01 |
| Sample B_VLCAD | 1.23 | 23.85 | 0.05 | 3.94 | 0.22 | 0.12 | 0.43 | 0.13 | 0.32 |
| Sample C_MCAD | 1.12 | 0.21 | 0.03 | 2.72 | 0.28 | 0.12 | 0.01 | 0.33 | 12.17 |
| Sample D_Cit I | 1.07 | 0.25 | 0.04 | 13.05 | 0.65 | 0.13 | 0.67 | 0.75 | 1.36 |
| Sample E_GAL I | 0.97 | 0.40 | 0.03 | 3.95 | 0.25 | 23.60 | 223.72 | 59.59 | 0.16 |
| Sample F_Tyr I | 10.43 | 1.19 | 0.01 | 3.44 | 0.28 | 0.04 | 0.05 | 0.05 | 0.67 |
| Sample G_PA | 0.96 | 0.57 | 0.33 | 154.82 | 12.51 | 0.07 | 0.21 | 0.30 | 0.73 |

Sample A



Sample B



Sample C

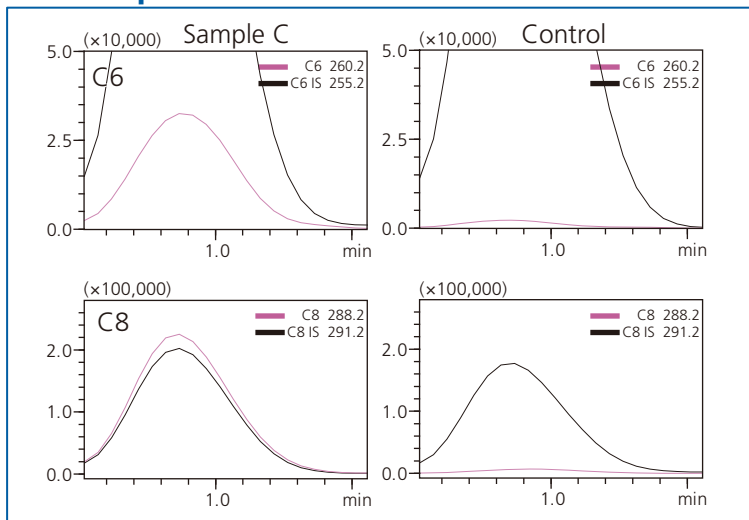
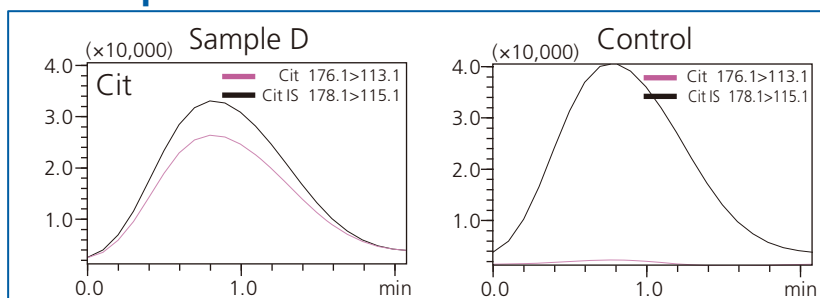
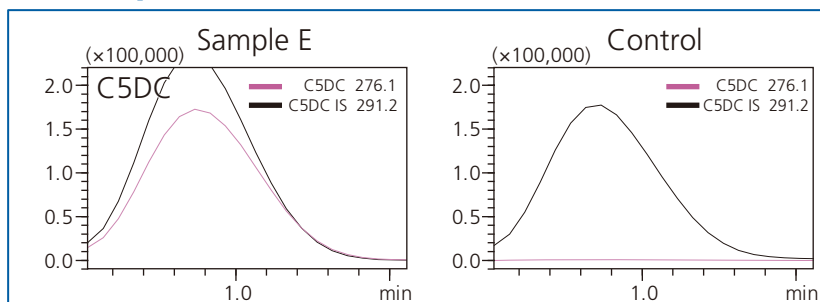


Fig. 2-1 各対象化合物の抽出イオンクロマトグラム
Extract Ion Chromatograms of Each Target Compound

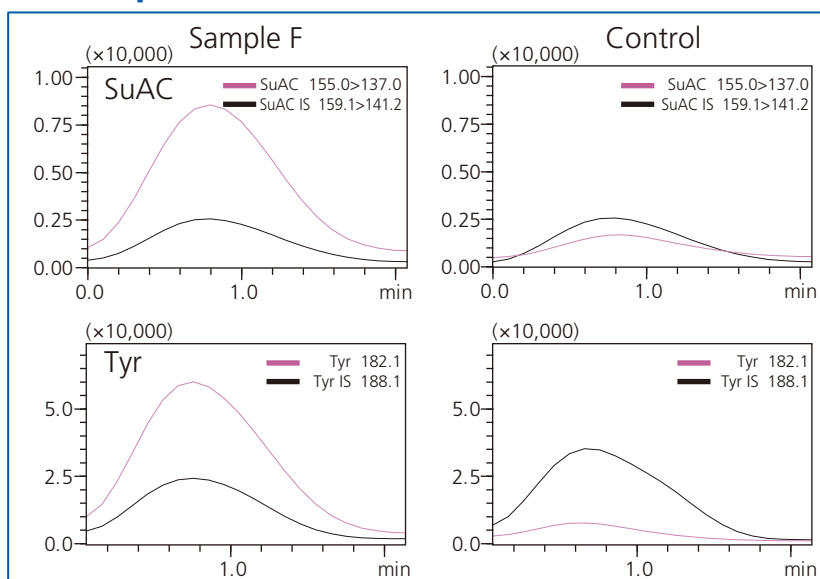
Sample D



Sample E



Sample F



Sample G

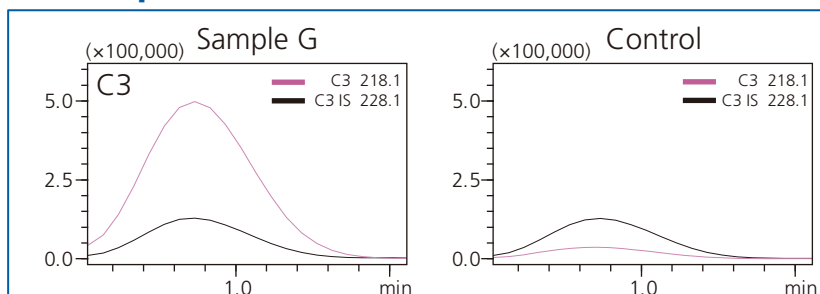


Fig. 2-2 各対象化合物の抽出イオンクロマトグラム
Extract Ion Chromatograms of Each Target Compound

注：本システムの使用は研究用途に限ります。臨床診断目的での使用はできません。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2014年3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075)813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。

3100-03401-525-IK
2014.3