

タンデムマス・スクリーニングにおける C5アシルカルニチンの識別

服部考成、田中美砂¹、野津吉友²、松井美樹¹、渡辺 淳、小林弘典²
島根大学医学部小児科¹、島根大学医学部附属病院検査部²

ユーザーベネフィット

- ◆ 特別な試薬・装置を用いることなく、通常のタンデムマス・スクリーニングで使うメソッドを少し変更するだけで、C5アシルカルニチン（イソバレリルカルニチン、ピバロイルカルニチン）を識別できます。

■はじめに

新生児マススクリーニングでは、アミノ酸・有機酸・脂肪酸代謝異常症を見つけるために、LC/MS/MSによるフローインジェクション-タンデムマス法でろ紙血中のアミノ酸およびアシルカルニチンを測定します。フローインジェクション法はスルーポットの点から優れた方法ですが、通常はカラムを用いないため異性を識別できません。例えば、C5アシルカルニチンには、イソ吉草酸血症の関連代謝物であるイソバレリルカルニチン（i-C5）以外に、異性体としてピバロイルカルニチン（p-C5）、2-メチルプチリルカルニチン、n-バレリルカルニチンが存在します。p-C5はピボキシル基を含む抗菌薬を投与することにより体内で生成されることが知られていますが、フローインジェクション-タンデムマス法では、i-C5とp-C5を識別できません。そのため、p-C5による偽陽性の報告は特に多く、偽陽性を減らすための測定法が求められています。本アプリケーションニュースでは、確認イオンを用いたi-C5とp-C5を識別するための技術（特許出願中）をご紹介します。

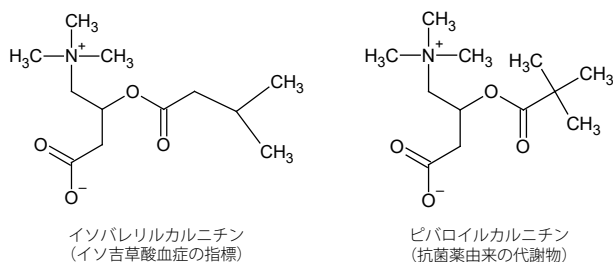


図1 C5アシルカルニチンの異性体

■分析条件

測定機器は、Nexera™ UHPLCシステムとLCMS-8050（図2）を使用しました。LCMS-8050は高感度・高速のトリプル四重極質量分析計で、微量成分の多成分一斉分析が可能です。表1にHPLCおよびMSの分析条件を示します。弊社のタンデムマス・スクリーニングメソッドでは、1 μLのサンプル注入量で、1分で測定可能です。これにより、質量分析計の汚染が軽減されるとともに、ハイスルーポットで多検体を測定できます。

表1 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera X3)	
Mobile phases	: NeoBase Kit
Flow rate	: 0.1 mL/min (0 min)→0.05 mL/min (0.1 min) →0.1 mL/min (0.65 min)→0.5 mL/min (0.66-1 min)
Injection volume	: 1 μL
[MS conditions] (LCMS-8050)	
Ionization	: ESI (Positive mode)
Mode	: MRM (<i>m/z</i> 246.2>85.0, 187.1)
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 10.0 L/min
DL temp.	: 250°C
Block heater temp.	: 400°C

■サンプル

C5アシルカルニチン高値のイソ吉草酸血症患者ろ紙血（検体A）、およびピボキシル基含有抗菌薬によりC5アシルカルニチン高値のろ紙血（検体B）を使用しました。これら検体中のi-C5とp-C5は、カラムを用いたLC/MS/MSでも分析しました。検体Aでは、p-C5は検出されず、i-C5のみが検出されました。検体Bでは、i-C5は検出されず、p-C5のみが検出されました。



図2 LCMS™-8050

■ 前処理

ろ紙血サンプルは、パーキンエルマー社製NeoBaseキットを使用した非誘導体化法の標準プロトコルに従って調製しました。96ウェルプレートの各ウェルに3 mmのろ紙血パンチを1つ入れ、内部標準のアシルカルニチンとアミノ酸を含む100 μLの抽出溶液を添加しました。その後、プレートを700 rpm、45°Cで45分間振とうし、5分間遠心分離した後、上清を測定しました。

■ 確認イオンによる識別

MRM測定において、確認イオン比（図3、確認イオンのピーク強度(b)/定量イオンのピーク強度(a)×100）の違いで化合物を識別できることが知られています。そこで、定量イオンを*m/z* 246.2>85.0、確認イオンを*m/z* 246.2>187.1と設定し、i-C5とp-C5の標準溶液を測定しました。図3に示すように、i-C5では定量イオンのピーク強度に対する確認イオンのピーク強度比がp-C5よりも低く、i-C5、p-C5の確認イオン比はそれぞれ20.44%、28.21%でした。i-C5とp-C5を識別する指標として、確認イオン比の類似度（100を完全一致とした0から100のスコア）を以下のように定義しました。

- ・ i-C5スコア = $100 - |R_{DBS} - R_{i-C5}| / R_{i-C5} \times 100$
- ・ p-C5スコア = $100 - |R_{DBS} - R_{p-C5}| / R_{p-C5} \times 100$

これらの式において、 R_{DBS} 、 R_{i-C5} 、 R_{p-C5} はそれぞれ、ろ紙血抽出液、i-C5の標準溶液、p-C5の標準溶液を測定し得られた確認イオン比を表します。

検体A、Bの抽出液を測定したところ、確認イオン比はそれぞれ20.48、28.54となりました。i-C5スコア、p-C5スコアを計算すると、検体Aではi-C5スコアがp-C5スコアよりも高く、検体Bではp-C5スコアがi-C5スコアよりも高くなりました（表2）。以上のことから、検体Aに含まれるC5アシルカルニチンはi-C5であり、検体Bに含まれるC5アシルカルニチンはp-C5であると推定され、カラムを用いたLC/MS/MSによる結果と一致しました。

表2 ろ紙血測定におけるi-C5、p-C5スコア

DBS	C5 Conc. (μmol/L)	i-C5 Score	p-C5 Score
A	5.32	98.0	72.6
B	3.72	58.8	97.7

■ まとめ

カラムを用いないフローインジェクション法によるタンデムマス・スクリーニングにおいても、確認イオンを用いることでi-C5とp-C5を識別できることがわかりました。

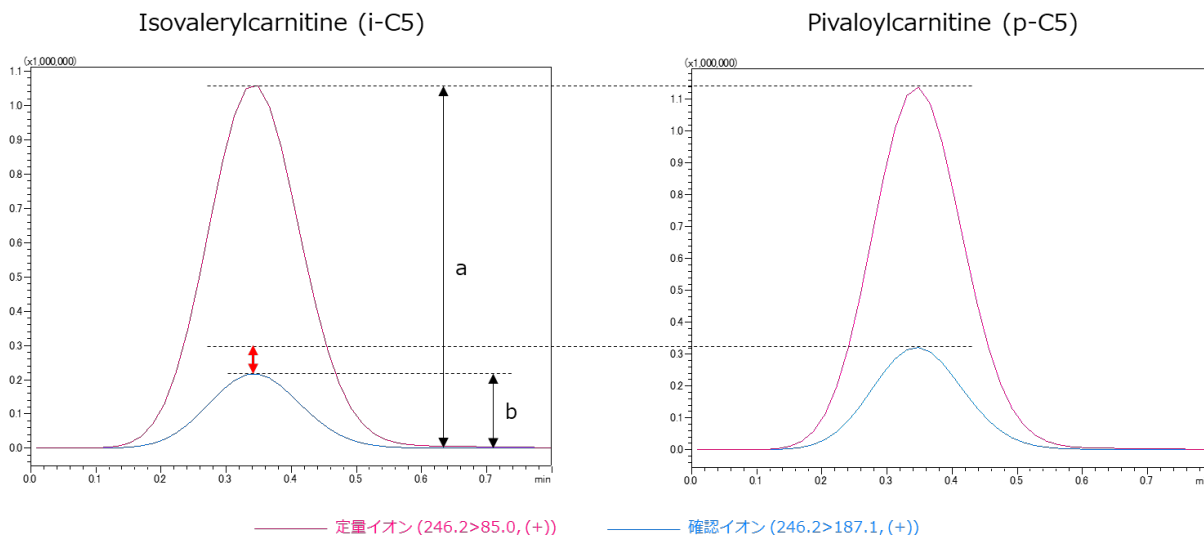


図3 イソバレリルカルニチンとピバロイルカルニチンのMRMクロマトグラム

NexeraおよびLCMSは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

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

01-00228-JP 初版発行：2021年 9月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。本文書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

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。最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただけますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2021