

# Application News

## No. C122

LC/MS  
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

### SIL-30AC による共注入法を利用した LC/MS/MS 測定

LC/MS/MS Analysis Using Co-injection Method with SIL-30AC

試料の前処理は作業に時間を要するだけでなく人為的なミスを生じさせる可能性があります。このような前処理が必要な分析においては、そのスループットの向上と再現性を維持するために自動化が有効です。さらに多数の検体をスクリーニングする場合には終夜分析を行うこともあり、自動化は不可欠です。

Nexera システムのオートサンプラー SIL-30AC にはキャリーオーバーを極力減らすための強力なリンス機構の他に、標準で前処理機能を搭載しているため、無人で大量の試料を次々と分析することが可能です。ここでは前処理機能を用いた内部標準法の自動化とその測定結果について、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を例にとってご紹介します。

T. Tanigawa T. Minohata

#### ■ 内部標準法

##### Internal Standard Method

内部標準法は内部標準物質と目的試料の相対比から定量を行う方法であり、注入量の補正、分析環境の変化に対して補正を行うことができます。ただし、あらかじめ目的試料に内部標準溶液を添加しておく必要があるため、スループットや試薬の消費量の増加といった問題があります。このような場合、前処理機能を使うことであらかじめ内部標準溶液を試料に添加することなく、分析の直前に自動で必要量を注入することが可能です。

#### ■ 前処理プログラムと機能

##### Pretreatment Program and Function

SIL-30AC の前処理機能はワークステーションから制御します。前処理機能には予め設定されたテンプレートに準じた動作も可能ですが、ユーザーが任意のコマンドを設定することによってより複雑な動作も可能となります。前処理画面を開くには装置パラメータビューのオートサンプラータブで前処理プログラムをクリックします。今回ご紹介する分析例に即して、Fig. 1 にオートサンプラーの動作、Fig. 2 に LabSolutions の前処理機能設定画面を示しました。表示の設定ではコントロールバイアルラック (ラック番号: 0) の試料ピン番号 1 にセットされたバイアルから 1  $\mu$ L 吸引した後、ラック番号 (rn), 試料ピン番号 (sn) から設定量 (iv)  $\mu$ L 吸引し、装置に注入するようにプログラムされています。

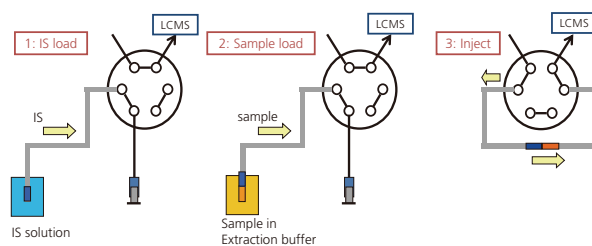


Fig. 1 オートサンプラーの動作 Motion of Autosampler

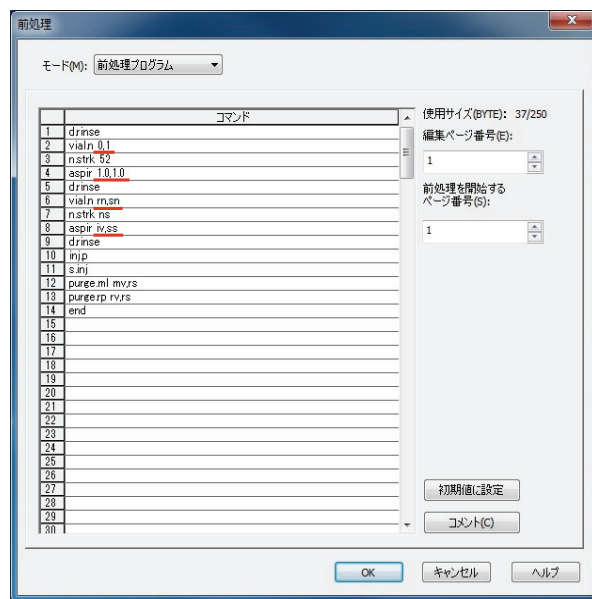


Fig. 2 LabSolutions の前処理機能設定画面 Pretreatment Program Mode Screen in LabSolutions

#### ■ DBS に含まれるアミノ酸・アシルカルニチンの一斉分析 - サンプル抽出と MS 測定

##### Simultaneous Analysis of Amino Acids and Acylcarnitines in DBS (Dried Blood Spot) - Sample Extraction from DBS and MS Analysis

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。このようなスクリーニングでは DBS 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。この時、あらかじめ抽出液に含めておいた内部標準物質とターゲットを比較することで定量を実施します。今回、前処理における抽出液への内部標準溶液の添加を省略し、オートサンプラーから抽出液と内部標準溶液を共注入し、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 で測定を行う方法を検討しました。

実験には ChromSystems 社製のキットを使用しました。抽出液に内部標準溶液を添加しないことを除いて、前処理はキットに添付されているプロトコールに従って実施しました。Fig. 3 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精度管理用ろ紙：QC 用 DBS を使用しました。DBS から 3.0 mm 径のディスクを 96 穴プレートへと切り出した後、プロトコー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。対象化合物に対しては MRM (Multiple Reaction Monitoring) を使用して測定を行いました。各対象化合物の定量は、内部標準物質を使用することで行いました。Table 1 に LC および MS 条件を示しました。

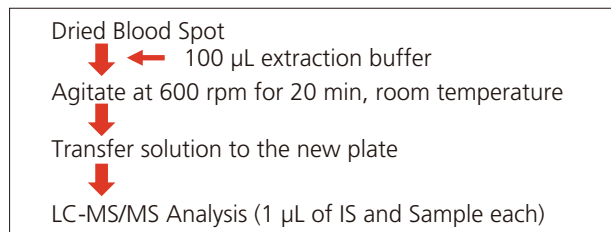


Fig. 3 前処理プロトコール  
Preparation Protocol

Table 1 分析条件  
Analytical Conditions

Mobile Phase	: 0.1 % HCOOH - H <sub>2</sub> O / CH <sub>3</sub> CN (2 / 8)
Time Program	: 0.1 mL/min (0 min) → 0.075 mL/min (0.1 min) → 0.5 mL/min (0.66-1 min)
Injection Volume	: 1 µL
Analysis Time	: 1 min
Ionization Mode	: ESI(+)
Probe Voltage	: +4.5 kV
Nebulizing Gas Flow	: 3.0 L/min
Drying Gas Flow	: 12.0 L/min
DL Temperature	: 250 °C
Block Heater Temperature	: 400 °C

## 測定結果例

### Example of Analysis Results

Table 2 に共注入法および従来法 (キットに添付されたプロトコールに従って前処理を実施。) によって得られた試料の測定結果を示しました。濃度の異なる精度管理用ろ紙血 (Level-I, Level-II) からそれぞれ 3 スポットを切り出して処理を行い、それぞれ n = 10 で測定を実施しました。3 日間同様の測定を行い、その平均値とデータシートに記載されているターゲット値との比率を計算しました。なお、弊社のアミノ酸・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、対象化合物の濃度を自動的に計算することができます。

得られた結果はデータシートに記載されているレンジ内におさまっているだけでなく (データ未添付)、Table 2 における共注入法の結果が示すようにターゲット値に近い値が得られていることが確認されました。さらに、従来法と比較して遜色ない結果が得られました。

共注入法では内部標準溶液は従来法の 5 倍の濃度に調製しましたが、1 分析の使用量が 1/100 に抑えられるため (共注入法で使用する量が 1 µL に対し、従来法では 100 µL を使用します。)、実質的に 1/20 の消費量となります。このように、SIL-30AC の前処理機能を利用した共注入法を用いることで、前処理作業の簡略化だけでなく、試薬の消費を抑えた分析が可能となります。

Table 2 測定結果  
Results of Analysis

Level-I						Level-II					
Component	average (µmol/L)		target (µmol/L)	ratio (average/target)		Component	average (µmol/L)		target (µmol/L)	ratio (average/target)	
	共注入法	従来法*		共注入法	従来法*		共注入法	従来法*		共注入法	従来法*
Ala	423.99	420.76	411.00	1.03	1.02	Ala	672.15	722.38	714.00	0.94	1.01
Arg	67.05	66.80	70.00	0.96	0.95	Arg	138.89	146.69	141.00	0.99	1.04
Asp	198.19	185.51	201.00	0.99	0.92	Asp	446.06	490.05	446.00	1.00	1.10
Cit	68.67	68.83	69.00	1.00	1.00	Cit	250.10	274.29	270.00	0.93	1.02
Glu	404.47	395.23	418.00	0.97	0.95	Glu	689.73	808.85	742.00	0.93	1.09
Gly	407.26	391.81	394.00	1.03	0.99	Gly	939.76	977.15	1006.00	0.93	0.97
Leu	374.94	368.78	372.00	1.01	0.99	Leu	616.42	652.52	644.00	0.96	1.01
Met	70.59	69.09	71.00	0.99	0.97	Met	254.81	269.46	257.00	0.99	1.05
Orn	211.86	202.91	208.00	1.02	0.98	Orn	493.23	548.32	555.00	0.89	0.99
Phe	152.56	158.20	167.00	0.91	0.95	Phe	547.77	602.35	564.00	0.97	1.07
Pro	320.11	325.46	360.00	0.89	0.90	Pro	732.41	772.55	701.00	1.04	1.10
Tyr	198.58	199.28	202.00	0.98	0.99	Tyr	525.85	595.79	580.00	0.91	1.03
Val	262.67	258.42	262.00	1.00	0.99	Val	463.26	499.90	482.00	0.96	1.04
C0	50.33	50.16	49.40	1.02	1.02	C0	99.33	110.00	107.00	0.93	1.03
C2	28.30	28.11	28.10	1.01	1.00	C2	67.13	70.10	69.70	0.96	1.01
C3	6.35	5.89	6.02	1.06	0.98	C3	14.83	14.96	15.40	0.96	0.97
C4	1.13	1.03	1.08	1.04	0.96	C4	4.53	4.56	4.69	0.97	0.97
C5	0.61	0.65	0.64	0.96	1.02	C5	2.37	2.71	2.71	0.87	1.00
C6	0.51	0.49	0.51	1.01	0.97	C6	2.40	2.56	2.48	0.97	1.03
C8	0.56	0.55	0.54	1.04	1.01	C8	2.40	2.39	2.50	0.96	0.96
C10	0.53	0.51	0.51	1.03	1.00	C10	2.18	2.36	2.27	0.96	1.04
C12	0.47	0.48	0.47	0.99	1.02	C12	2.11	2.26	2.20	0.96	1.03
C14	0.52	0.50	0.51	1.01	0.98	C14	2.16	2.20	2.23	0.97	0.99
C16	4.94	4.86	5.00	0.99	0.97	C16	12.60	13.08	13.30	0.95	0.98
C18	2.61	2.61	2.56	1.02	1.02	C18	8.22	8.77	8.49	0.97	1.03

\*従来法：キットのプロトコールに従って前処理し、SIL-30AC の前処理プログラムを使用せずに測定を実施。

\*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。