

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(+)

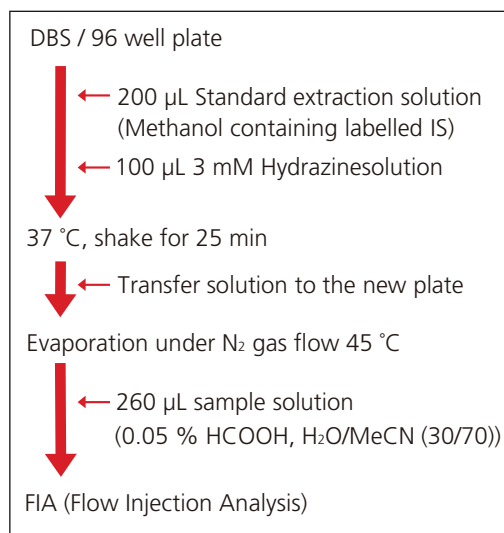


Fig. 1 前処理プロトコル
Preparation Protocol

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。

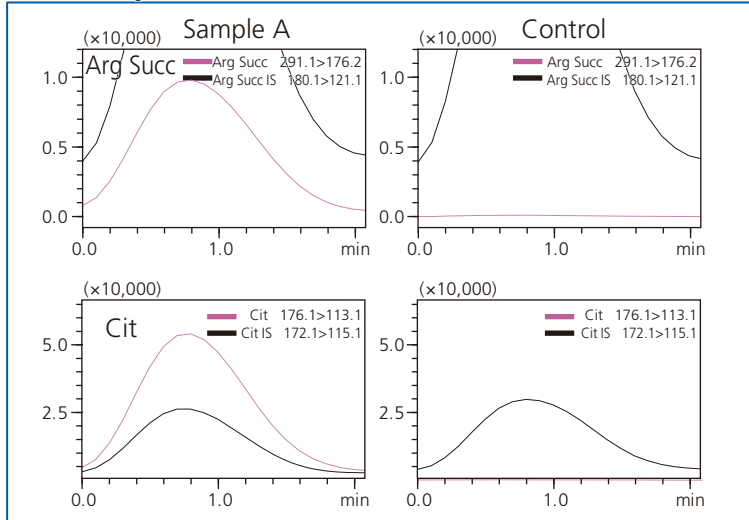
Table 4 7サンプルを使用した測定結果
Analysis Results Using 7 Samples

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

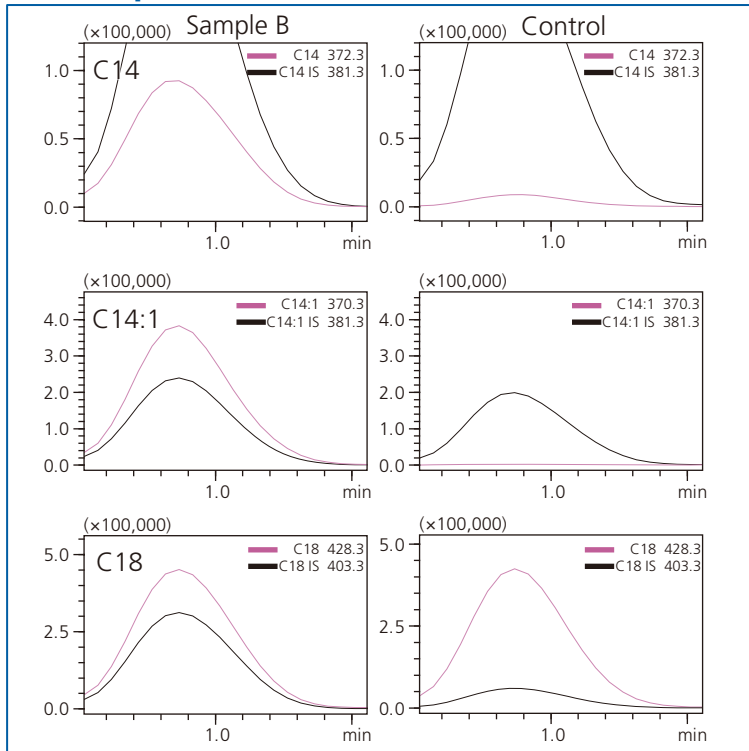
compound	C3	C5DC	C6	C8	C14	C14:1	C18:1	Tyr	Cit	Arg Succ
Criteria Upper Limit (Caution)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Criteria Upper Limit (Notice)	3.30	0.15	0.25	0.40	0.57	0.44	2.43	200.00	30.00	1.00
Criteria Lower Limit (Notice)	0.20	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.39	0.01	3.00	0.01
Criteria Lower Limit (Caution)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
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

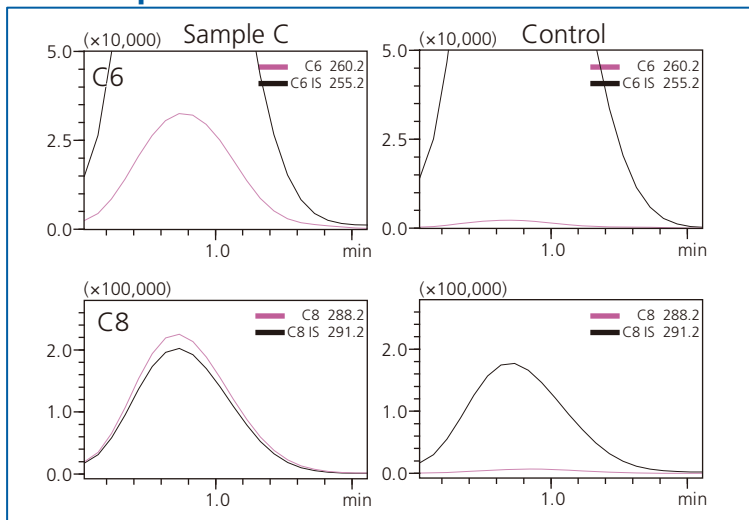
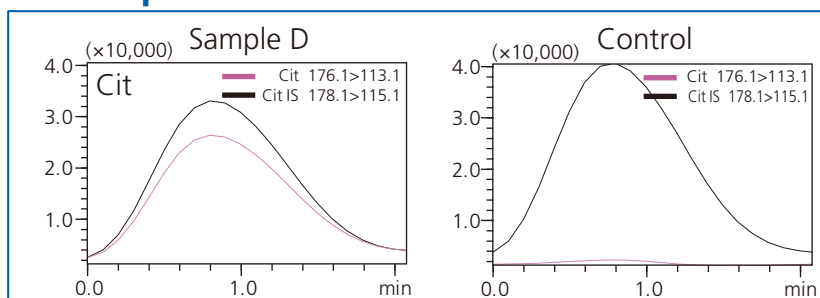
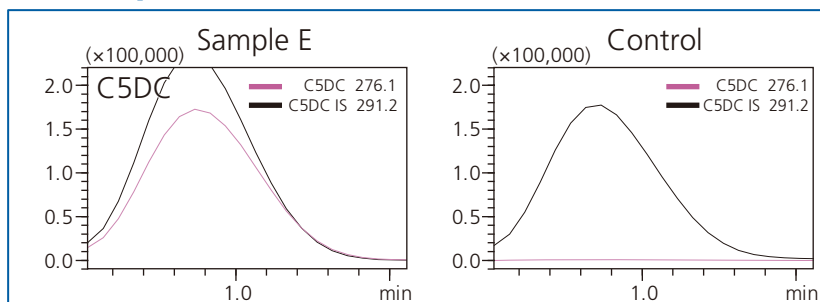


Fig. 2-1 各対象化合物の抽出イオンクロマトグラム
Extract Ion Chromatograms of Each Target Compound

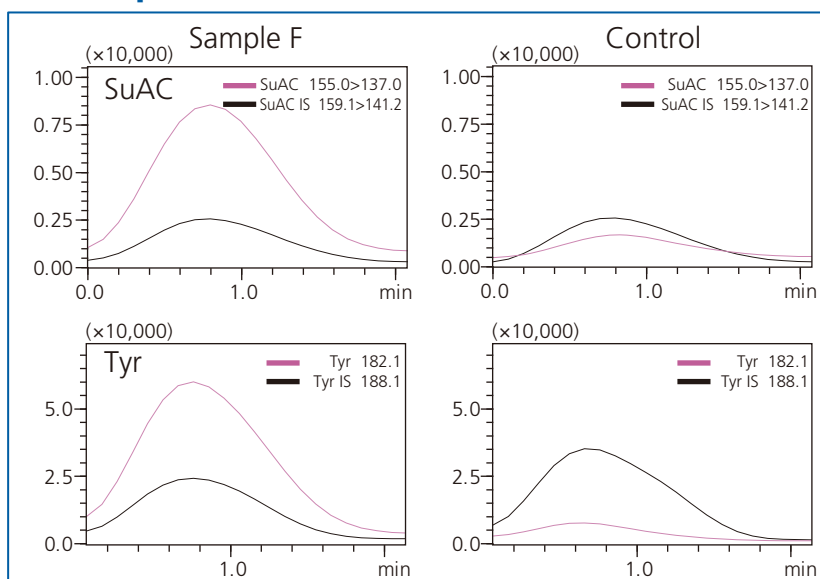
Sample D



Sample E



Sample F



Sample G

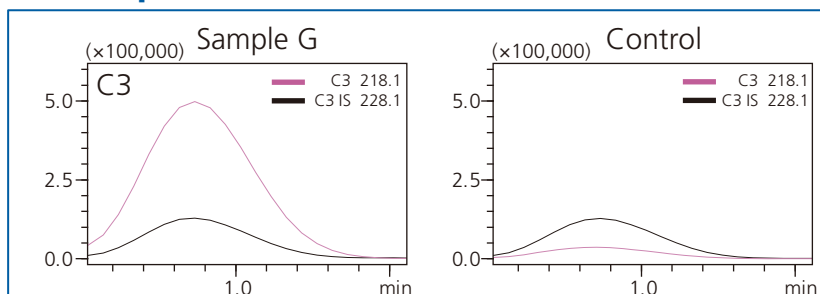


Fig. 2-2 各対象化合物の抽出イオンクロマトグラム
Extract Ion Chromatograms of Each Target Compound

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。