

乾燥血斑 (Dried Blood Spot) に含まれる アミノ酸とアシルカルニチンの同時分析

アプリケーションノート

著者

M.P. George
Alere Toxicology Services
Gretna, LA USA

David Presser
Agilent Technologies, Inc
Santa Clara, CA USA

Andre Szczesniewski
Agilent Technologies, Inc
Schaumburg, IL USA

Chunli Yu, Kevin McCain, and Jinglan
Zhang
Mount Sinai School of Medicine
New York, NY USA

概要

Agilent トリプル四重極 LC/MS システムのニュートラルロスキャンモード、プリカーサイオンスキャンモード、マルチプルリアクションモニタリング (MRM) モードを用いて、乾燥血斑に含まれる 37 種類のアシルカルニチンと 12 種類のアミノ酸を同時に検出および定量する高速メソッドを開発しました。このアッセイの分析時間は 1.6 分で、1 日あたり 400~500 のサンプルを分析できます。また、カスタムレポートにより、分析結果の重要な項目を迅速にリストアップするために必要なすべての情報をまとめることができます。



Agilent Technologies

はじめに

乾燥血斑 (DBS) 分析が始まったのは、Robert Guthrie によるフェニルケトン尿症の細菌抑制検査が導入された 1960 年代のことです。それ以降、DBS 分析は広がりを見せ、アミノ酸やアシルカルニチンを分析する細菌抑制検査やその他の技術 (免疫化学的手法や電気泳動法) にまで拡大しています。また、1990 年代には MS/MS 分析も導入されました。MS/MS は複数の分析対象物を同時に測定できる多重分析機能を備えているため、現在では、乾燥血斑分析に好んで用いられる技術となっています。

このアプリケーションノートでは、DBS のアミノ酸およびアシルカルニチンを高速測定するための独自のメソッドを紹介します。Agilent トリプル四重極 LC/MS システムのニュートラルロススキャンモード、プリカーサイオンスキャンモード、マルチプルリアクションモニタリング (MRM) モードを用いるこのメソッドでは、1 日あたり 400~500 のサンプルを分析できます。^{1,2}

このアッセイでは、スキャンデータと MRM データの両方を用いて、すべてのアシルカルニチンとほとんどのアミノ酸 (表 8) を定量することができます。そのため、スキャンデータによる対象化合物の定量結果を MRM による定量結果と比較することが可能です。これにより、化学的干渉に起因するデータの誤読のリスクを避けることができます。

実験手法

試薬と標準物質

血液カード上の参照標準物質を疾病対策予防センター (CDC) から、アミノ酸およびアシルカルニチンの同位体内部標準混合物を Cambridge Isotope Laboratories (カタログナンバーはそれぞれ NSK-A および NSK-B) から入手しました。同位体内部標準の分析用溶液については、メタノール 200 mL でバイアルの内容物を希釈して調製しました。同位体内部標準の分析用溶液の濃度を表 1 に示しています。溶液の保管温度は $\leq 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ です。メタノールとイソプロピルアルコールは Fisher Scientific から、ブタノール-HCl は Regis Chemicals から入手しました。

使用装置

このメソッドは、Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS および Agilent 1200 シリーズ G1367A ウェルプレートオートサンブラと組み合わせた Agilent 1200 シリーズ LC システムで開発しました。機器条件を表 2 にまとめています。

サンプル前処理

適切な同位体内部標準を含むメタノール溶液 100 μL を用いて、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 30 分間にわたって、血斑サンプル (3.2 mm) を抽出しました。抽出した各サンプルを 0.45 μm Low-Binding Hydrophilic PTFE フィルター (Millipore, Cat # MSRLN0410) でろ過し、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ で乾燥させました。その後、ブタノール-HCl (100 μL) を用いて、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 30 分にわたって誘導体化を行い、サンプルを $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 20 分間乾燥させました。その後、各サンプルをメタノール:水 (80:20) 100 μL に再溶解し、注入しました。

内部標準	濃度 (nmol/mL)
グリシン-D3	12.5
アラニン-D4	2.5
バリン-D8	2.5
ロイシン-D3	2.5
メチオニン-D3	2.5
フェニルアラニン-D6	2.5
チロシン-D6	2.5
アスパラギン酸-D3	2.5
グルタミン酸-D3	2.5
オルニチン-D2	2.5
シトルリン-D2	2.5
アルギニン-D5	2.5
C0-カルニチン	0.76
C2-カルニチン	0.19
C3-カルニチン	0.04
C4-カルニチン	0.04
C5-カルニチン	0.04
C8-カルニチン	0.04
C14-カルニチン	0.04
C16-カルニチン	0.08

表 1. 通常分析用内部標準の濃度

LC 分析条件

カラム	なし
注入量	5 μ L
オートサンブラ温度	6 $^{\circ}$ C
ニードル洗浄	洗浄ポート (50:25:25、IPA:MeOH:H ₂ O、5 秒)
移動相	A = H ₂ O + 0.1 % ギ酸 B = メタノール + 0.1 % ギ酸
分析時間	1.8 分
流速	0.5 mL/min
アイソクラティック分析	A = 20 %、B = 80 %

MS 条件 6460

イオンモード	ポジティブ、ESI
乾燥ガス温度	300 $^{\circ}$ C
シースガス温度	300 $^{\circ}$ C
乾燥ガス流量	5 L/min
ネブライザ圧力	60 psi
キャピラリー電圧	4000 V
チャージ電圧	2000 V
MRM 取り込み	Q1 ピークおよび Q2 ピーク幅 = 0.7 m/z
デルタ EMV	200 V

表 2. LC および質量分析計条件

分析パラメータ

質量分析計については、ニュートラルロススキャン、プリカーサイオンスキャン、MRM という 3 つのモードで使用しました。各サンプルを 3 回注入し、3 つの取り込みモードそれぞれに応じて取り込みパラメータを自動的に変更する注入プログラムを用いて、Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS で 3 つのモードを連続して実行しました。図 1 に、同じ DBS サンプルで実施した 3 回の連続スキャンの典型的な再構成トータルイオンクロマトグラム (RTICC) を示しています。

プリカーサイオンスキャン、ニュートラルロススキャン、MRM による総合的な DBS 分析

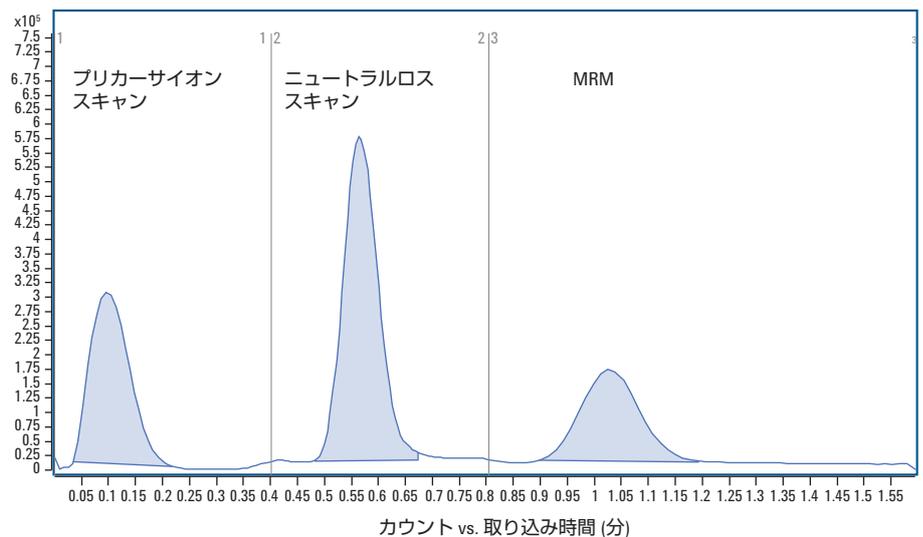


図 1. 同じ乾燥血斑サンプルで連続して実施した 3 回のスキャン分析を示す再構成トータルイオンクロマトグラム (RTICC)

m/z 102 のニュートラルロススキャンによりサンプルを分析し、8 種類のアミノ酸の存在を確認しました (図 2)。最初の四重極では、140~270 の m/z 範囲でスキャンを実行しました。第 3 の四重極 (第 2 の四重極では分子フラグメンテーションを行います) では、最初の四重極との m/z の差が一定 (102) になるように設定し、38~168 の m/z 範囲をスキャンしました。特定のプリカーサイオンの m/z と、プロダクトイオンの m/z における既知のニュートラルロスの組み合わせは、各アミノ酸の特徴を示します。使用した分析パラメータを表 3 に、典型的なスキャン例を図 3 に示しています。

ニュートラルロススキャンモードの概略図

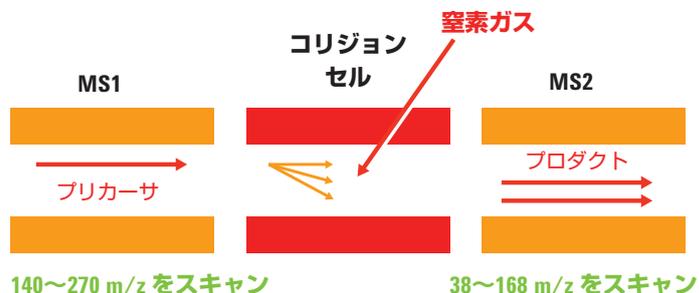


図 2. 最初の四重極質量アナライザ (MS1) および第 3 の四重極 (MS2) を、質量電荷比 (m/z) が一定の差 (102 Da) になるように設定し、各四重極でユーザーの定義した m/z 範囲 (MS1: 140~270、MS2: 38~168) をスキャンします。

ニュートラルロス (m/z)	MS1 起点 (m/z)	MS1 終点 (m/z)	スキャン時間 (ms)	フラグメントモード	フラグメント電圧	衝突エネルギー (eV)
102.1	140	270	300	一定	100	9

表 3. ニュートラルロススキャンの取り込みパラメータ

典型的なアミノ酸のニュートラルロススキャン

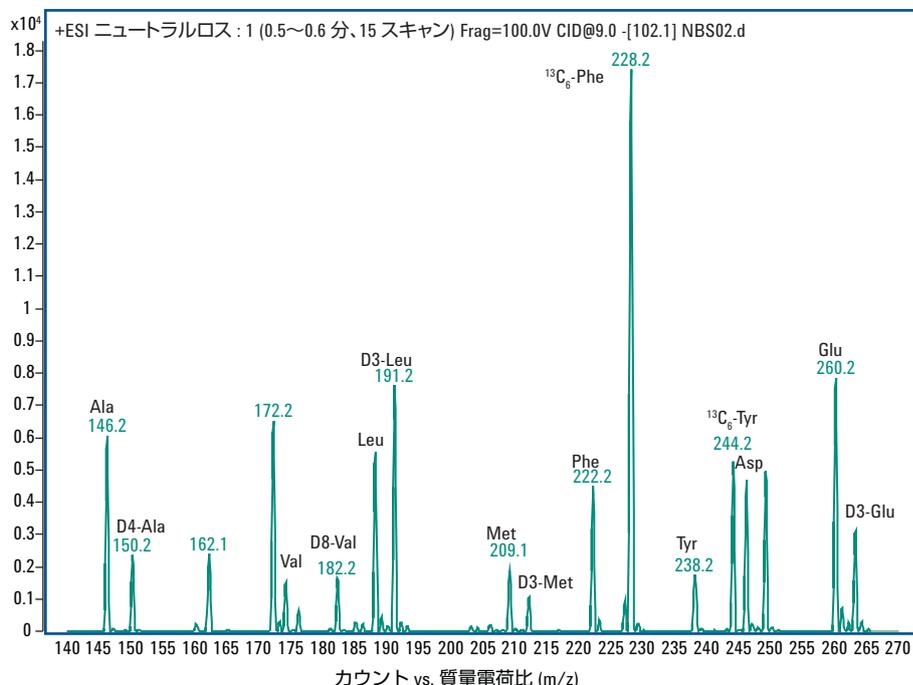


図 3. ニュートラルロス = 102 Da におけるアミノ酸のニュートラルロススキャン

プリカーサイオンスキャンによりサンプルを分析し、37種類のアシルカルニチンの存在を確認しました(図4)。最初の四重極質量アナライザで200~510に定義されたm/z範囲をスキャンし、第3の四重極については、m/z 85のプロダクトイオンのみを検出するように設定しました。固有のプリカーサ m/z と 85 というプロダクトイオン m/z の組み合わせは、各アシルカルニチンの特徴を示します。使用した分析パラメータを表4に、典型的なスキャン例を図5に示しています。

プリカーサイオンスキャンモードの概略図

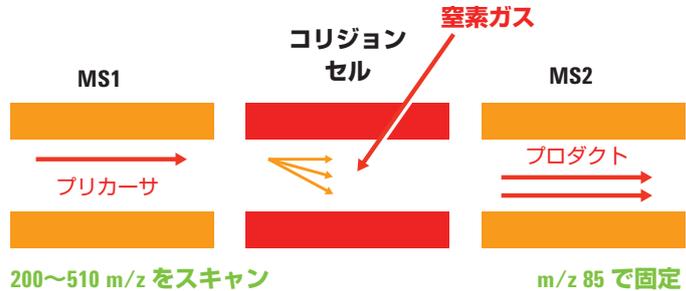


図4. 最初の四重極質量アナライザ (MS1) で 85~200 に定義された m/z 範囲をスキャンし、第2の四重極 (MS2) については、m/z 85 のプロダクトイオンのみを検出するように設定します。固有のプリカーサ m/z と 85 というプロダクトイオン m/z の組み合わせは、各アシルカルニチンの特徴を示します。

プロダクトイオン (m/z)	MS1 起点 (m/z)	MS1 終点 (m/z)	スキャン時間 (ms)	フラグモード	フラグメンター電圧 (eV)	衝突エネルギー (eV)
85	85	200	510	一定	500	25

表4. プリカーサイオンスキャンの取り込みパラメータ

典型的なアシルカルニチンのプリカーサスキャン

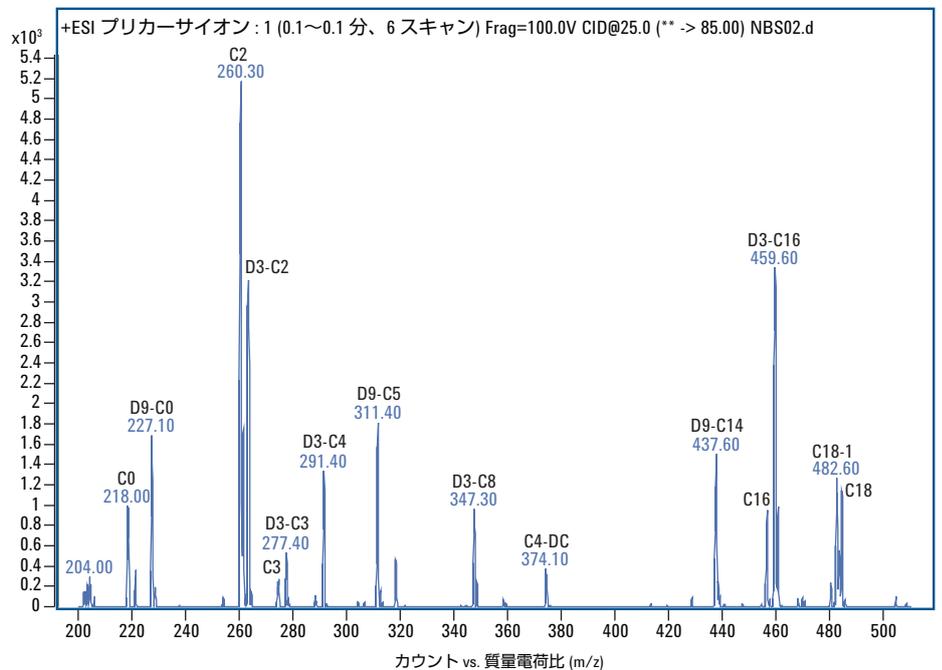


図5. アシルカルニチンのスペクトルプロフィール

マルチプルリアクションモニタリングにより、12種類のアミノ酸と37種類のアシルカルニチンを定量しました(図6)。第1と第2の四重極質量アナライザはそれぞれ、プリカーサイオンの質量電荷比(m/z)ともっとも強度の高いプロダクトイオンのm/zに固定しました。これは、特定のアミノ酸またはアシルカルニチンの特徴を示します。使用した分析パラメータを表5に、ロイシンの典型的なMRM トランジションを図7に示しています。

MassHunter Universal Integrator を用いてデータ解析を実施しました。ピーク高さをを用いて定量を行いました。

MRM モードの概略図

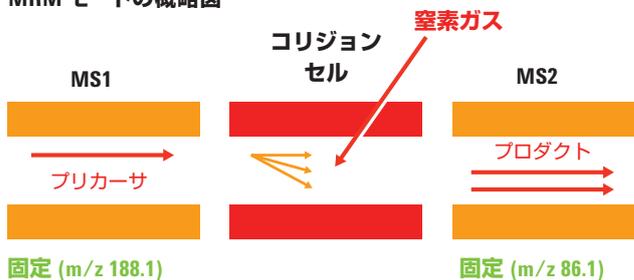


図6. 第1 (MS1) と第3 (MS2) の四重極質量アナライザはそれぞれ、プリカーサイオンの質量電荷比 (m/z) ともっとも強度の高いプロダクトイオンの m/z に固定しました。このケースでは、これが特定のアミノ酸またはアシルカルニチンの特徴を示します。

典型的なアミノ酸の MRM 分析

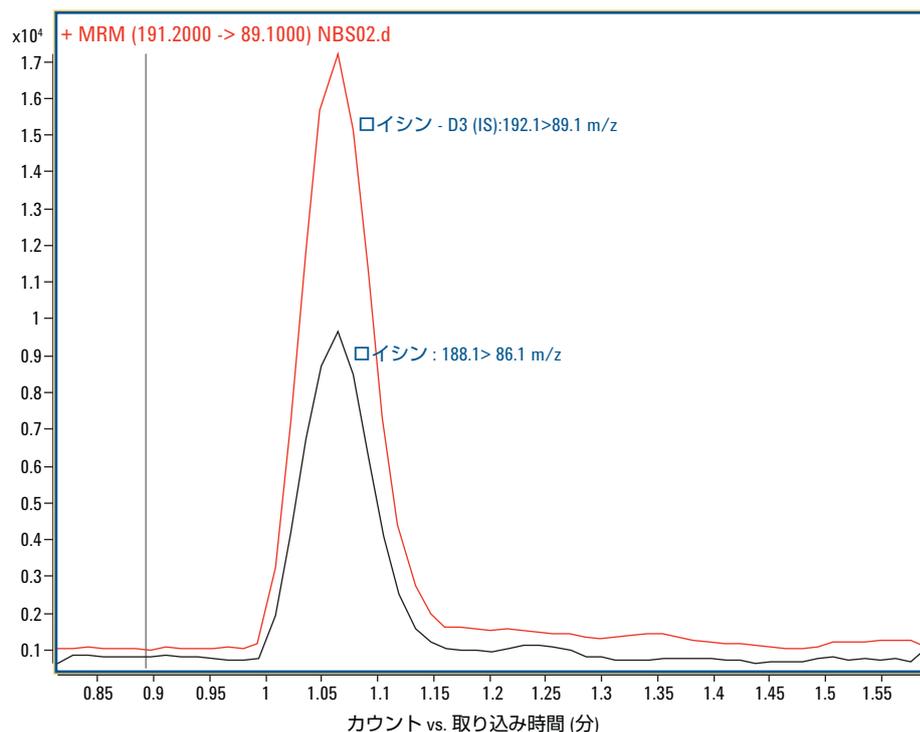


図7. ロイシンおよびロイシン-d3 内部標準 (IS) の MRM 分析クロマトグラム

表 5. MRM 取り込み
パラメータ

化合物	セグメント	プリカーサイオン	MS/MS	IS	IS 濃度 (nmol/mL)	衝突エネルギー (EV)
アラニン	3	146.1 -> 44.0	MRM	アラニン-D4	2.5	9
アラニン-D4	3	150.1 -> 48.0	MRM	<なし>	2.5	9
アルギニン	3	231.2 -> 70.1	MRM	アルギニン-D4-5C13	2.5	9
アルギニン-D4-5C-13	3	236.2 -> 75.1	MRM	<なし>	2.5	9
アスパラギン酸	3	246.2 -> 144.1	MRM	アスパラギン酸-D3	2.5	9
アスパラギン酸-D3	3	249.2 -> 147.1	MRM	<なし>	2.5	9
C0	3	218.2 -> 103.0	MRM	C0-D9	0.76	16
C0-D9	3	227.2 -> 103.0	MRM	<なし>	0.76	25
C10:1	3	370.3 -> 85.0	MRM	C8-D3	0.04	25
C10:2	3	368.3 -> 85.0	MRM	C8-D3	0.04	25
C10	3	372.3 -> 85.0	MRM	C8-D3	0.04	25
C12:1	3	398.3 -> 85.0	MRM	C14-D9	0.04	25
C12:1-OH	3	414.5 -> 85.0	MRM	C14-D9	0.04	25
C12	3	400.3 -> 85.0	MRM	C14-D9	0.04	25
C12-OH	3	416.5 -> 85.0	MRM	C14-D9	0.04	25
C14:1	3	426.4 -> 85.0	MRM	C14-D9	0.04	25
C14:1-OH	3	442.5 -> 85.0	MRM	C14-D9	0.04	25
C14:2	3	424.3 -> 85.0	MRM	C14-D9	0.04	25
C14	3	428.4 -> 85.0	MRM	C14-D9	0.04	25
C14-D9	3	437.4 -> 85.0	MRM	<なし>	0.04	25
C14-OH	3	444.4 -> 85.0	MRM	C14-D9	0.04	25
C16:1	3	454.4 -> 85.0	MRM	C16-D3	0.08	25
C16:1-OH	3	470.4 -> 85.0	MRM	C16-D3	0.08	25
C16	3	456.4 -> 85.0	MRM	C16-D3	0.08	25
C16-D3	3	459.4 -> 85.0	MRM	<なし>	0.08	25
C16-OH	3	472.4 -> 85.0	MRM	C16-D3	0.08	25
C18:1	3	482.4 -> 85.0	MRM	C16-D3	0.08	25
C18:1-OH	3	498.4 -> 85.0	MRM	C16-D3	0.08	25
C18:2	3	480.4 -> 85.0	MRM	C16-D3	0.08	25
C18:2-OH	3	496.4 -> 85.0	MRM	C16-D3	0.08	25
C18	3	484.4 -> 85.0	MRM	C16-D3	0.08	25
C18-OH	3	500.4 -> 85.0	MRM	C16-D3	0.08	25
C2	3	260.2 -> 85.0	MRM	C2-D3	0.19	25
C2-D3	3	263.2 -> 85.0	MRM	<なし>	0.19	25
C3	3	274.2 -> 85.0	MRM	C3-D3	0.04	25
C3-D3	3	277.2 -> 85.0	MRM	<なし>	0.04	25
C3-DC	3	360.4 -> 85.0	MRM	C3-D3	0.04	25
C4	3	288.2 -> 85.0	MRM	C4-D3	0.04	25
C4-D3	3	291.2 -> 85.0	MRM	<なし>	0.04	25
C4-DC	3	374.3 -> 85.0	MRM	C8-D3	0.04	25
C4-OH	3	304.4 -> 85.0	MRM	C4-D3	0.04	25
C5:1	3	300.3 -> 85.0	MRM	C5-D9	0.04	25
C5	3	302.2 -> 85.0	MRM	C5-D9	0.04	25
C5-D9	3	311.3 -> 85.0	MRM	<なし>	0.04	25
C5-DC	3	388.3 -> 85.0	MRM	C8-D3	0.04	25
C5-OH	3	318.4 -> 85.0	MRM	C5-D9	0.04	25
C6	3	316.3 -> 85.0	MRM	C8-D3	0.04	25
C6-DC	3	402.3 -> 85.0	MRM	C14-D9	0.04	25
C8:1	3	342.3 -> 85.0	MRM	C8-D3	0.04	25
C8	3	344.3 -> 85.0	MRM	C8-D3	0.04	25
C8-D3	3	347.3 -> 85.0	MRM	<なし>	0.19	25
シトルリン	3	232.2 -> 113.1	MRM	シトルリン-D2	2.5	9
シトルリン-D2	3	234.2 -> 115.1	MRM	<なし>	2.5	9
グルタミン酸	3	260.2 -> 158.1	MRM	グルタミン酸-D3	2.5	9
グルタミン酸-D3	3	263.2 -> 161.2	MRM	<なし>	2.5	9
グリシン	3	132.1 -> 76.1	MRM	グリシン-N15-2C13	12.5	4
グリシン-N-15-2C-13	3	134.1 -> 78.1	MRM	<なし>	12.5	4
ロイシン	3	188.1 -> 86.0	MRM	ロイシン-D3	2.5	9
ロイシン-D3	3	191.2 -> 89.1	MRM	<なし>	2.5	9
メチオニン	3	206.2 -> 104.1	MRM	メチオニン-D3	2.5	9
メチオニン-D3	3	209.2 -> 107.1	MRM	<なし>	2.5	9
オルニチン	3	189.2 -> 70.1	MRM	オルニチン-D2	2.5	14
オルニチン-D2	3	191.2 -> 72.1	MRM	<なし>	2.5	14
フェニルアラニン	3	222.2 -> 120.1	MRM	フェニルアラニン-6C13	2.5	9
フェニルアラニン-6C-13	3	228.2 -> 126.1	MRM	<なし>	2.5	9
チロシン	3	238.2 -> 136.1	MRM	チロシン-6C13	2.5	9
チロシン-6C-13	3	244.2 -> 142.1	MRM	<なし>	2.5	9
バリン	3	174.2 -> 72.1	MRM	バリン-D8	2.5	9
バリン-D8	3	182.2 -> 80.1	MRM	<なし>	2.5	9

結果と考察

定量と定性確認

このメソッドでは、2 分の分析時間で、定量データと定性データを得ることができました。既知の同位体内部標準の濃度と図 8 に示す計算式を用いて、各化合物の濃度を MRM データから求めました。定量の精度を確認するために、MRM を用いて 6 種類のアミノ酸および 11 種類のアシルカルニチンに関する CDC 参照標準物質を定量し、標準物質の実際の濃度に対して測定濃度をプロットしました。表 6 と 7、および図 9 からは、これらのプロットの R² 値と傾きが 1 にきわめて近いことがわかります。このことは、MRM 定量メソッドの精度がきわめて高いことを示しています。

対象化合物の定量

C_{analyte}	$= \frac{I_{\text{analyte}} \times V_{\text{ex}} \times C_{\text{IS}}}{V_{\text{BS}} \times I_{\text{IS}} \times \text{RRF}}$
記号の説明:	
C_{analyte}	= 分析対象化合物の濃度 (mM)
I_{analyte}	= 分析対象化合物の強度 (1 秒あたりのカウント数)
V_{ex}	= サンプル抽出量 (mL)
C_{IS}	= 内部標準の濃度 (mM)
V_{BS}	= 1 つのパンチに含まれる血液量 (ヘマトクリット 50 % の 3.2 mm のパンチで 3.1 μL)
I_{IS}	= 内部標準の強度 (1 秒あたりのカウント数)
RRF	= 抽出効率

図 8. 分析対象化合物の濃度の計算式

アシルカルニチン	Y 切片 (nmol/mL)	傾き	R ²
C0-カルニチン	2.9040	0.848	0.976
C2-カルニチン	0.7100	1.090	0.981
C3-カルニチン	0.2200	0.910	0.994
C4-カルニチン	-0.0099	0.903	0.998
C5-カルニチン	0.0032	1.053	0.988
C6-カルニチン	0.0019	0.997	0.988
C8-カルニチン	0.0406	0.919	0.978
C10-カルニチン	0.0352	0.970	0.977
C14-カルニチン	0.0517	0.813	0.990
C16-カルニチン	0.0254	0.941	0.986
C18-カルニチン	0.0598	0.812	0.995

表 6. アシルカルニチンの実際濃度と算出濃度の統計プロットから得られたデータ

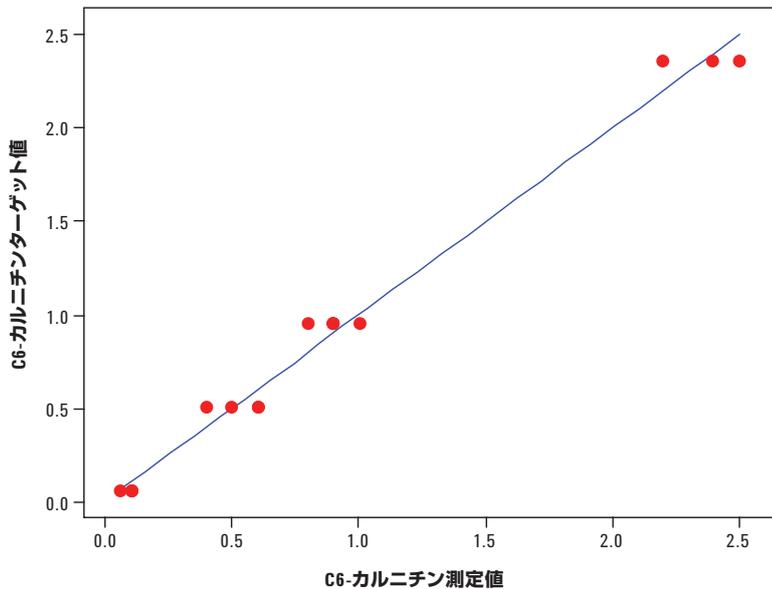
アミノ酸	Y 切片 (nmol/mL)	傾き	R ²
フェニルアラニン	13.44	0.9917	0.987
チロシン	25.99	0.9266	0.992
ロイシン	23.74	0.8950	0.989
メチオニン	5.80	0.9770	0.990
バリン	15.90	0.8550	0.970
シトルリン	4.30	0.9700	0.992

表 7. アミノ酸の実際濃度と算出濃度の統計プロットから得られたデータ

アシルカルニチンおよびアミノ酸の実際濃度と MRM 測定濃度の良好な相関性

適合線プロット (濃度 nmol/mL)

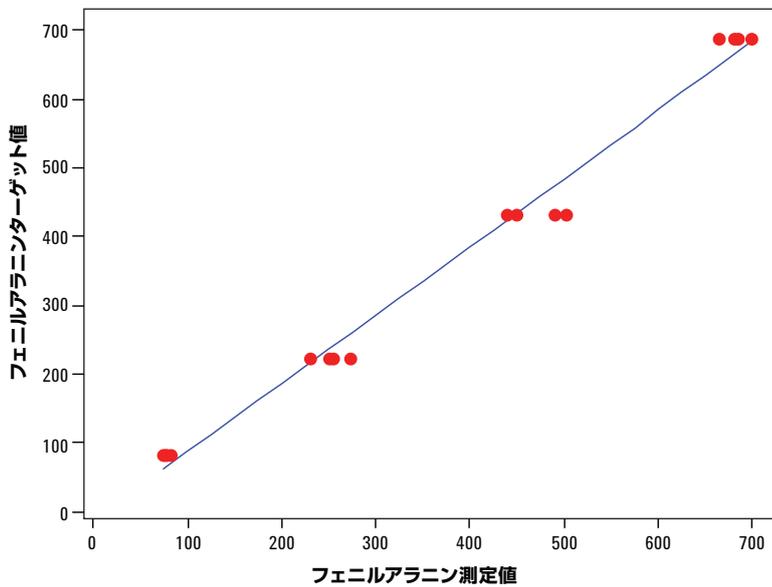
C6-カルニチンターゲット値 = 0.00186 + 0.9965 C6-カルニチン測定値



S	0.0904959
R-Sq	98.8%
R-Sq(adj)	98.7%

適合線プロット (濃度 nmol/mL)

フェニルアラニンターゲット値 = -13.44 + 0.9917 フェニルアラニン測定値



S	27.3402
R-Sq	98.7%
R-Sq(adj)	98.7%

図 9. C6-カルニチンのアッセイ性能 (上図) およびフェニルアラニンのアッセイ性能 (下図) の統計プロット

定量データに加えて、アミノ酸およびアシルカルニチンの相対濃度に関するデータを得る必要が生じることもあります。図 3 および 5 に示すように、こうしたデータは、プリカーサイオンおよびニュートラルロスのスキャンにより得ることができます。スキャンモードでは、すべてのアシルカルニチンおよび 8 種類のアミノ酸のデータが得られます。ルーチン手順としては、採取した MRM データを用いて定量とカスタムレポート作成を実施しますが、プリカーサイオンスキャンとニュートラルロススキャンのデータを用いて、アシルカルニチンとアミノ酸を定量することも可能です。この選択肢を用いれば、化学的干渉に起因するデータの誤読のリスクを排除することができます (表 8)。

化合物	セグメント	トランジション	スキャン	化合物	プリカーサ	プロダクト
アラニン	2	146.1-[102.1]->44.0	ニュートラルロス	ターゲット	146.1	44
アラニン-D4	2	150.1-[102.1]->48.0	ニュートラルロス	ISTD	150.1	48
バリン (nl)	2	174.1-[102.1]->72.0	ニュートラルロス	ターゲット	174.1	72
バリン-D8 (nl)	2	182.1-[102.1]->80.0	ニュートラルロス	ISTD	182.1	80
ロイシン (nl)	2	188.1-[102.1]->86.0	ニュートラルロス	ターゲット	188.1	86
ロイシン-D3 (nl)	2	191.1-[102.1]->89.0	ニュートラルロス	ISTD	191.1	89
メチオニン (nl)	2	206.2-[102.1]->104.1	ニュートラルロス	ターゲット	206.2	104.1
メチオニン-D3 (nl)	2	209.2-[102.1]->107.1	ニュートラルロス	ISTD	209.2	107.1
フェニルアラニン (nl)	2	222.2-[102.1]->120.1	ニュートラルロス	ターゲット	222.2	120.1
フェニルアラニン-6C-13 (nl)	2	228.2-[102.1]->126.1	ニュートラルロス	ISTD	228.2	126.1
グリシン (nl)	2	132.1-[56.0]->76.1	ニュートラルロス	ターゲット	132.1	76.1
チロシン (nl)	2	238.2-[102.1]->136.1	ニュートラルロス	ターゲット	238.2	136.1
チロシン-6C-13 (nl)	2	244.2-[102.1]->142.1	ニュートラルロス	ISTD	244.2	142.1
アスパラギン酸 (nl)	2	246.2-[102.1]->144.1	ニュートラルロス	ターゲット	246.2	144.1
アスパラギン酸-D3 (nl)	2	249.2-[102.1]->147.1	ニュートラルロス	ISTD	249.2	147.1
グルタミン酸 (nl)	2	260.2-[102.1]->158.1	ニュートラルロス	ターゲット	260.2	158.1
グルタミン酸-D3 (nl)	2	263.2-[102.0]->161.2	ニュートラルロス	ISTD	263.2	161.2
フェニルアラニン/チロシン (nl)	2	222.2-[102.1]->120.1	ニュートラルロス	ターゲット	222.2	120.1
メチオニン/フェニルアラニン (nl)	2	206.2-[102.1]->104.1	ニュートラルロス	ターゲット	206.2	104.1
グリシン-N-15-2C-13 (nl)	2	134.1-[56.0]->78.1	ニュートラルロス	ISTD	134.1	78.1
ロイシン/フェニルアラニン (nl)	2	188.1-[102.1]->86.0	ニュートラルロス	ターゲット	188.1	86
シトルリン (nl)	2	232.2-[119.1]->113.1	ニュートラルロス	ターゲット	232.2	113.1
アスパラギン酸/アルギニン (nl)	2	246.2-[102.1]->144.1	ニュートラルロス	ターゲット	246.2	144.1
シトルリン-ISTD (nl)	2	234.2-[119.1]->115.1	ニュートラルロス	ISTD	234.2	115.1
オルニチン (nl)	2	189.2-[119.1]->70.1	ニュートラルロス	ターゲット	189.2	70.1
オルニチン-ISTD (nl)	2	191.2-[119.1]->72.1	ニュートラルロス	ISTD	191.2	72.1
アルギニン (nl)	2	231.2-[161.1]->70.1	ニュートラルロス	ターゲット	231.2	70.1
アルギニン-ISTD (nl)	2	236.2-[161.1]->75.1	ニュートラルロス	ISTD	236.2	75.1
C0 (prec)	1	218.3->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	218.3	85
C2 (prec)	1	260.3->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	260.3	85
C3 (prec)	1	274.3->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	274.3	85
C4 (prec)	1	288.3->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	288.3	85
C5:1 (prec)	1	300.3->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	300.3	85
C5 (prec)	1	302.3->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	302.3	85
C4-OH (prec)	1	304.4->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	304.4	85
C6 (prec)	1	316.4->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	316.4	85
C5-OH (prec)	1	318.4->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	318.4	85
C8:1 (prec)	1	342.4->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	342.4	85
C8 (prec)	1	344.4->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	344.4	85
C3-DC (prec)	1	360.4->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	360.4	85
C10:2 (prec)	1	368.4->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	368.4	85
C10:1 (prec)	1	370.4->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	370.4	85
C10 (prec)	1	372.4->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	372.4	85
C4-DC (prec)	1	374.4->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	374.4	85
C5-DC (prec)	1	388.5->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	388.5	85
C12:1 (prec)	1	398.5->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	398.5	85
C12 (prec)	1	400.5->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	400.5	85
C6-DC (prec)	1	402.5->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	402.5	85
C12:1-OH (prec)	1	414.5->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	414.5	85
C12-OH (prec)	1	416.5->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	416.5	85
C14:2 (prec)	1	424.5->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	424.5	85
C14:1 (prec)	1	426.5->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	426.5	85
C14 (prec)	1	428.4->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	428.4	85
C14:1-OH (prec)	1	442.5->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	442.5	85
C14-OH (prec)	1	444.5->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	444.5	85
C16:1 (prec)	1	454.6->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	454.6	85
C16 (prec)	1	456.6->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	456.6	85
C16:1-OH (prec)	1	470.6->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	470.6	85
C16-OH (prec)	1	472.6->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	472.6	85
C18:2 (prec)	1	480.6->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	480.6	85
C18:1 (prec)	1	482.6->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	482.6	85
C18 (prec)	1	484.6->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	484.6	85
C18:2-OH (prec)	1	496.6->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	496.6	85
C18:1-OH (prec)	1	498.6->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	498.6	85
C18-OH (prec)	1	502.6->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	502.6	85
C0-D9 (prec)	1	227.3->85.0	プリカーサイオン	ISTD	227.3	85
C2-D3 (prec)	1	263.2->85.0	プリカーサイオン	ISTD	263.2	85
C3-D3 (prec)	1	277.3->85.0	プリカーサイオン	ISTD	277.3	85
C4-D3 (prec)	1	291.3->85.0	プリカーサイオン	ISTD	291.3	85
C5-D9 (prec)	1	311.3->85.0	プリカーサイオン	ISTD	311.3	85
C8-D3 (prec)	1	347.3->85.0	プリカーサイオン	ISTD	347.3	85
C14-D9 (prec)	1	437.4->85.0	プリカーサイオン	ISTD	437.4	85
C16-D3 (prec)	1	459.6->85.0	プリカーサイオン	ISTD	459.6	85
C14:1/C12:1 (prec)	1	426.5->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	426.5	85
C14:1/C16 (prec)	1	426.5->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	426.5	85
C14:1/C2 (prec)	1	426.5->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	426.5	85
C16/C2 (prec)	1	456.6->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	456.6	85
C3/C0 (prec)	1	274.3->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	274.3	85
C3/C2 (prec)	1	274.3->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	274.3	85
C3-DC/C10 (prec)	1	360.4->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	360.4	85
C4/C2 (prec)	1	288.3->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	288.3	85
C4/C3 (prec)	1	288.3->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	288.3	85
C5/C3 (prec)	1	302.3->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	302.3	85
C5-DC/C8 (prec)	1	388.5->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	388.5	85
C5-OH/C8 (prec)	1	318.4->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	318.4	85
C8/C10 (prec)	1	344.4->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	344.4	85
C8/C2 (prec)	1	344.4->85.0	プリカーサイオン	ターゲット	344.4	85
オルニチン-ISTD (nl)	2	191.2-[119.1]->72.1	ニュートラルロス	ISTD	191.2	72.1
アルギニン (nl)	2	231.2-[161.1]->70.1	ニュートラルロス	ターゲット	231.2	70.1

表 8. ニュートラルロススキャンおよびプリカーサイオンスキャンの取り込みパラメータ

分析結果のカスタムレポート作成

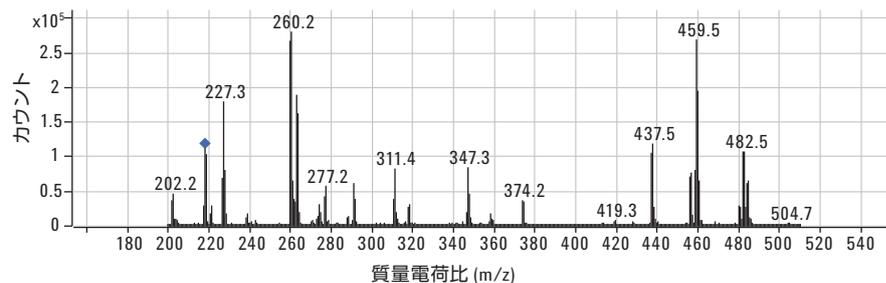
Agilent MassHunter ソフトウェアをカスタマイズすれば、DBS サンプル中のアミノ酸およびアシルカルニチンの濃度とスキャンスペクトルを表示するレポートを作成し、代謝の先天性異常を判断するのに必要な情報を得ることができます (図 10)。スキャンスペクトルでは、アミノ酸およびアシルカルニチンに特徴的なパターンが得られ、各化合物の干渉や異常な相対量を視覚的に確認することができます。また、カスタムレポートでは、異常な化合物量のフラグを表示したり、必要な化合物の濃度比を計算したりすることもできます。

図 10. DBS アシルカルニチン (上図) およびアミノ酸 (下図) のカスタムレポート。これらのレポートでは、12 種類のアミノ酸および 37 種類のアシルカルニチンのスペクトルプロフィールと定量結果が表示されています。分析者は通常範囲を定義し、MassHunter Quantification Method に通常値を入力します。その後、カスタムレポートが各分析結果について、通常値として表示するか、低または高のフラグをつけて表示します。各ピークの定量番号がスペクトルプロフィール上に表示されます。

定量および定性確認データを表示するカスタムレポート

機器	機器 1	サンプル名	NBS-1-96-AC
操作者		データファイル	NBS-1-961-AC.d
注入量		取り込みメソッド	100119-NBS-SCN-MRM-ALL-CB2.m
ポジション	P1-A1	取り込み時間	1/20/2010 16:08
希釈	1		

+ プリカーサイオン (0.045~0.414 分、44 スキャン) (** -> 85.0) NBS-1-961-AC.d



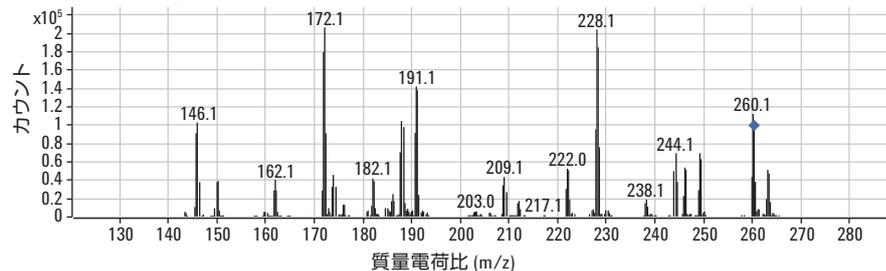
化合物	結果	通常範囲	フラグ	レスポンス	ISTD	ISTD レスポンス
C3	0.0 nmol/mL	0-0.98	低	277341	C3-D3	387052
C4	0.0 nmol/mL	0-0.16	低	119872	C4-D3	635182
C5:1	0.0 nmol/mL	0-1.3	低	2810	C5-D9	868554
C4-OH	0.0 nmol/mL	0.0-1.0	低	23665	C4-D3	635182
C6	1.0 nmol/mL	0-0.08	高	50651	C8-D3	990593
C5-OH	0.0 nmol/mL	0-0.7	低	285403	C5-D9	868554

バッチデータベース

C:\MassHunter\data\QQQ\Mt Sinai\100120\QuantResults\NBS003 One Sample.batch.bin

機器	機器 1	サンプル名	NBS-1-96-AC
操作者		データファイル	NBS-1-961-AC.d
注入量		取り込みメソッド	100119-NBS-SCN-MRM-ALL-CB2.m
ポジション	P1-A1	取り込み時間	1/20/2010 16:08
希釈	1		

+ ニュートラルロス (0.547~0.826 分、33 スキャン) NL NBS-1-961-AC.d



化合物	結果	通常範囲	フラグ	レスポンス	ISTD	ISTD レスポンス
メチオニン	0.3 nmol/mL	0.3-15.0	低	135296	メチオニン-D3	1218973
アルギニン	18.0 nmol/mL	0.3-15.0	高	50716	アルギニン-D4-5C13	1752101
ロイシン/ フェニルアラニン	2.4	0.3-1.5	高			
シトルリン/ アルギニン	4.7	0.3-1.5	高			

まとめ

乾燥血斑に含まれるアミノ酸とアシルカルニチンを正確に検出および定量できるメソッドを紹介しました。このアッセイの分析時間は 1.6 分で、1 日あたり 400~500 サンプルを分析できます。カスタムレポートでは、必要なすべての情報をまとめ、すべての関連データを迅速かつ簡単に表示することが可能です。このアッセイでは、MRM により測定された全アシルカルニチンと 12 種類のうち 8 種類のアミノ酸 (102 m/z のニューラルロスを示す 8 種類のみ) のスキャンデータを用いて、任意のサンプルの MRM 定量を確認することもできます。MassHunter ソフトウェアの Universal Integrator では、任意のアミノ酸およびアシルカルニチンの濃度を検出し、偽陰性データをレポートすることができます。ただし、このメソッドを用いた DBS サンプル分析では、1000 回を超える分析でも偽陰性データは観察されませんでした。

参考文献

1. P. A. Wayne, Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry; Proposed Guideline, I/LA32-P, Clinical and Laboratory Standards Institute, Standards@clsi.org.
2. D. H. Chase, J. C. DiPerna, B. L. Michell, B. Sgroi, L. F. Hoffman, E. W. Naylor, "Electrospray Tandem Mass Spectrometry for Analysis of Acylcarnitines in Unexplained Cause of Death," *Clin. Chem.* 47:1166-1182, **2001**.

www.agilent.com/chem/jp

本アプリケーションノートは、研究以外の目的には使用できません。診断目的では使用できません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2010
Published in Japan. July 20, 2010
5990-6036JAJP



Agilent Technologies