

Application News

No. C139

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

オンライン固相抽出液体クロマトグラフ – タンデムマス型質量分析計を用いた乾燥ろ紙血における酵素活性の測定

Measurement of Enzymatic Activities in Dried Blood Spots with On-Line Solid Phase Extraction-LC/MS/MS System

ライソゾームは細胞内小器官のひとつであり、様々な加水分解酵素により老廃物の分解を行っています。これらの酵素活性を測定する方法として人工蛍光色素を用いた酵素活性測定法やタンデムマス型質量分析法が用いられています。中でもタンデムマス型質量分析法は複数の酵素活性を一度に測定できる利点があります。

ここでは、Meyer Children's Hospital, Mass Spectrometry, Clinical Chemistry and Pharmacology Lab. (Florence, Italy) で開発されたプロトコルを使用し、オンライン固相抽出 (Solid Phase Extraction : SPE) 液体クロマトグラフ – タンデムマス型質量分析装置 (LCMS-8050) を用いて乾燥ろ紙血 (Dried Blood Spot : DBS) における酵素活性の測定を行った例をご紹介します。このシステムを使用することでサンプルは SPE によってクリーンアップされるため、酵素反応後のサンプルについて前処理を行うことなくシステムに直接注入し、測定を行うことが可能です。

T. Tanigawa

■ サンプルの前処理と分析条件

Sample Preparation and Analytical Conditions

対象とする酵素はそれぞれ α -iduronidase (IDUA), α -acid-glucosidase (GAA), α -galactosidase A (GLA) としました。血液をしみこませたろ紙 (DBS) をサンプルとして使用しました。DBS から 3.2 mm 径のディスクを 96 ウエルプレートに切り出した後、それぞれの酵素の基質と内部標準物質 (Genzyme) を含む反応溶液を添加し、37 °C, 22 hrs 反応を行いました。Fig. 1 に前処理フローを示しました。

分析はオンライン SPE-LC と LCMS-8050 を使用して実施しました。それぞれの酵素反応物を対象化合物とし、内部標準物質を使用して、MRM (Multiple Reaction Monitoring) 測定を行いました。Fig. 2 に対象となる酵素生成物と内部標準の構造を示しました。Table 1 に MRM トランジションを、Table 2 に LC および MS 条件を示しました。

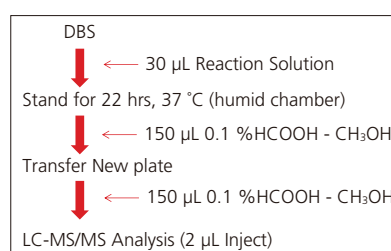


Fig. 1 前処理フロー
Preparation Process Flowchart

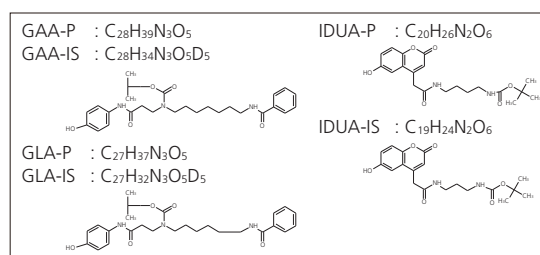


Fig. 2 酵素反応物と内部標準の構造
Structures of Enzymatic Reaction Products and Internal Standards

Table 1 MRM トランジション
MRM Transitions

Compounds	Polarity	Precursor ion m/z	Product ion m/z
IDUA-P	+	391.2	291.2
IDUA-IS	+	377.3	277.2
GAA-P	+	498.4	398.3
GAA-IS	+	503.4	403.3
GLA-P	+	484.3	384.3
GLA-IS	+	489.3	389.3

(注) P : Product, IS : Internal Standard

Table 2 分析条件
Analytical Conditions

<LC>		<MS>	
Analytical Column	: Shim-pack XR-ODS (75 mm L. × 2.0 mm I.D., 2.2 µm)	Instrument	: LCMS-8050
Trapping Column	: POROS® R1 (30 mm L. × 2.1 mm I.D., 20 µm)	Ionization Mode	: ESI (+)
Solvent A	: 0.05 % HCOOH-5 mM HCOONH ₄ -H ₂ O	Interface Temperature	: 100 °C
Solvent B	: 0.1 % HCOOH-CH ₃ OH	DL Temperature	: 100 °C
Ratio	: 50 % B	Heat Block Temperature	: 100 °C
Flow Rate	: 0.6 mL/min	Nebulizing Gas Flow	: 3 L/min.
Oven Temperature	: 30 °C	Heating gas Flow	: 5 L/min.
Injection Volume	: 2 µL	Drying Gas Flow	: 15 L/min.
Analysis Time	: 5.5 min		

■ オンライン固相抽出液体クロマトグラフ – タンデム質量分析計システム

Online Solid Phase Extraction-Tandem Mass Spectrometer System

Fig. 3 にオンライン SPE-LC/MS/MS の装置構成を示しました。酵素反応終了後のサンプルを直接このシステムに注入し、測定を行いました。本システムを使用することにより、脱塩、精製作業が不要となります。

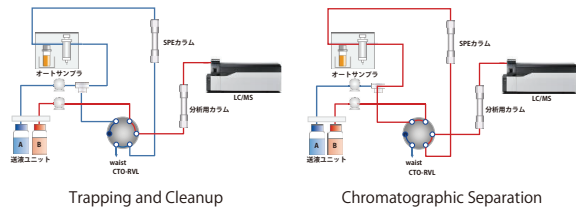


Fig. 3 オンライン固相抽出 – LC/MS/MS システム
MRM Chromatograms of Each Target Compound

■ 測定結果

Measurement Results

DUA, GLA, GAA の酵素活性について測定を行いました。Table 3 に酵素活性測定結果の例を、Fig. 4 に各対象化合物の MRM クロマトグラムを示しました。ブランクは血液を含まない紙を使用しました。サンプル A はそれぞれの活性を有する酵素を含むサンプル、サンプル B は IDUA 欠損サンプル、サンプル C は GLA 欠損サンプル、サンプル D は GAA 欠損サンプルです。サンプル A では酵素分解物のピークが明確に検出されているのに対し、サンプル B ~ D では対象となるピークが減少していました。

Table 3 酵素活性測定結果例
Example of Enzymatic Activity Measurement Results

	IDUA ($\mu\text{mol/h/L}$)	GLA ($\mu\text{mol/h/L}$)	GAA ($\mu\text{mol/h/L}$)
Blank	0.3	0.1	0.1
Control	15.2	10.1	6.0
Sample A	13.2	6.6	7.3
Sample B	1.8	6.9	5.8
Sample C	17.6	0.5	9.8
Sample D	8.4	2.0	0.8

活性 ($\mu\text{mol/h/L}$) = $[(P/IS) \times [IS] \times 30/3.4] / 22$
 ・ (P/IS) : プロダクト (P) と内部標準 (IS) の面積比
 ・ [IS] : 内部標準 (IS) の濃度 ($\mu\text{mol/L}$) ・ 30 : 添加溶液量 (μL)
 ・ 3.4 : DBS 中の血液量 (μL) ・ 22 : 反応時間 (hr)

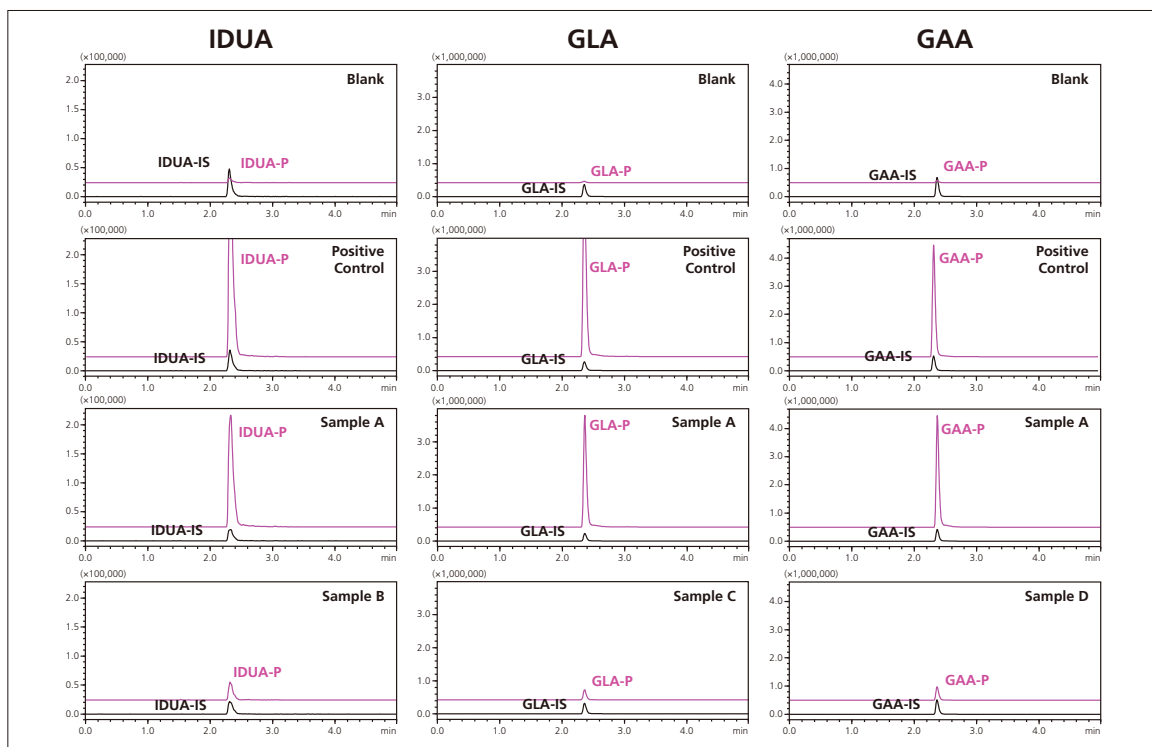


Fig. 4 各対象化合物の MRM クロマトグラム
Blank : 血液を含まない紙血サンプル, Sample A : 各活性を有する酵素を含むサンプル,
Sample B : IDUA 欠損サンプル, Sample C : GLA 欠損サンプル, Sample D : GAA 欠損サンプル
MRM Chromatograms of Each Target Compound

[参考文献]
la Marca G et al., *Anal. Chem.* 81 (2009) 6113-6121
Ombrore D. et al., *Eur. J. Mass Spectrom.* 19, 497-503 (2013)

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

[謝辞]
本アプリケーションニュースは、Dr. G. la Marca (Meyer Children's Hospital, Mass Spectrometry, Clinical Chemistry and Pharmacology Lab., Florence, Italy) のご指導と試料提供のもと作成いたしました。深く感謝申し上げます。

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

初版発行 : 2016年11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。