

Application News

No. C91

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

LCMS-8040 を用いた DBS (Dried Blood Spot) に含まれる フマリルアセト酢酸加水分解酵素の活性測定

Measurement of Fumarylacetoacetate Activity in DBS (Dried Blood Spot) with LCMS-8040

アミノ酸の代謝において、フマリルアセト酢酸加水分解酵素の活性を測定する場合、中間代謝産物であるフマリルアセト酢酸やサクシニルアセトン (SuAC) が指標となります (Fig. 1)。

ここでは、Meyer Children's Hospital, Mass Spectrometry, Clinical Chemistry and Pharmacology Lab. (Florence, Italy) で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 でサクシニルアセトンの測定を行っ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

血液をしみこませたろ紙：DBS (Dried Blood Spot) をサンプルとして使用しました。DBS から 3.2 mm 径のディスクを切り出した後、Fig. 2 に記載したプロトコルにしたがってサンプル抽出を行いました。血漿や尿サンプルからも抽出することが可能であり、参考までにその前処理方法についても示しました。

Table 1 に LC および MS 条件を示しました。サクシニルアセトンを対象化合物とし、内部標準試料として $^{13}\text{C}_4$ -サクシニルアセトンを使用して、MRM (Multiple Reaction Monitoring) 測定を行いました。

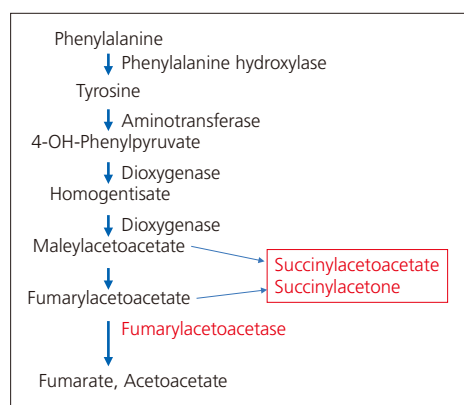


Fig. 1 代謝経路
Metabolic Pathway

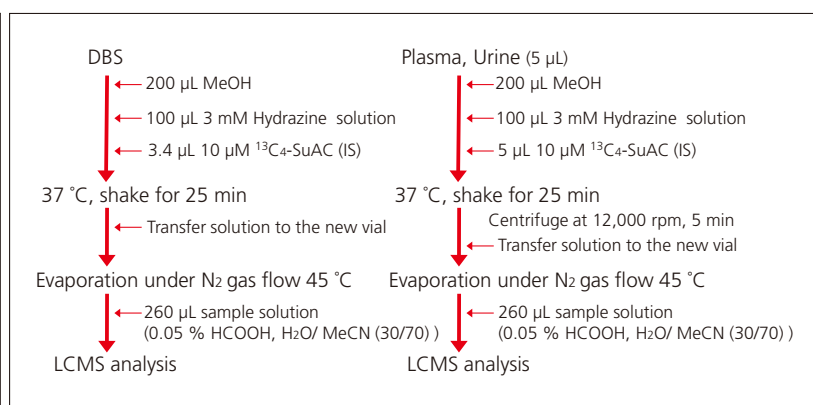


Fig. 2 前処理プロトコル
Preparation Protocol

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Synergi POLAR-RP (150 mm L. x 2.0 mm I.D., 4 µm)	Ionization Mode	: ESI (+)
Mobile Phase A	: 0.1 % HCOOH-H ₂ O	Probe Voltage	: +4.5 kV
Mobile Phase B	: CH ₃ OH	Nebulizing Gas Flow	: 2.5 L/min
Ratio	: 80 % B	Drying Gas Flow	: 15.0 L/min
Flow Rate	: 0.2 mL/min	DL Temperature	: 250 °C
Column Temperature	: 30 °C	Block Heater Temperature	: 400 °C
Injection Volume	: 5 µL	MRM	: Succinylacetone (154.8 > 136.9) $^{13}\text{C}_4$ -Succinylacetone (158.9 > 141)
Analysis Time	: 4 min		

■測定結果

Analysis Results

Fig. 3 に測定結果を示しました。Sample はフマリリアセト酢酸加水分解酵素活性を有しないサンプル、Control はその酵素活性を有するサンプルです。Positive Control はあらかじめサクシニルアセトンを添加した血液をスポットした

DBS を使用しました。Sample においてサクシニルアセトンのピークが特異的に検出されました。この分析系により酵素活性の確認を行う事が可能となります。

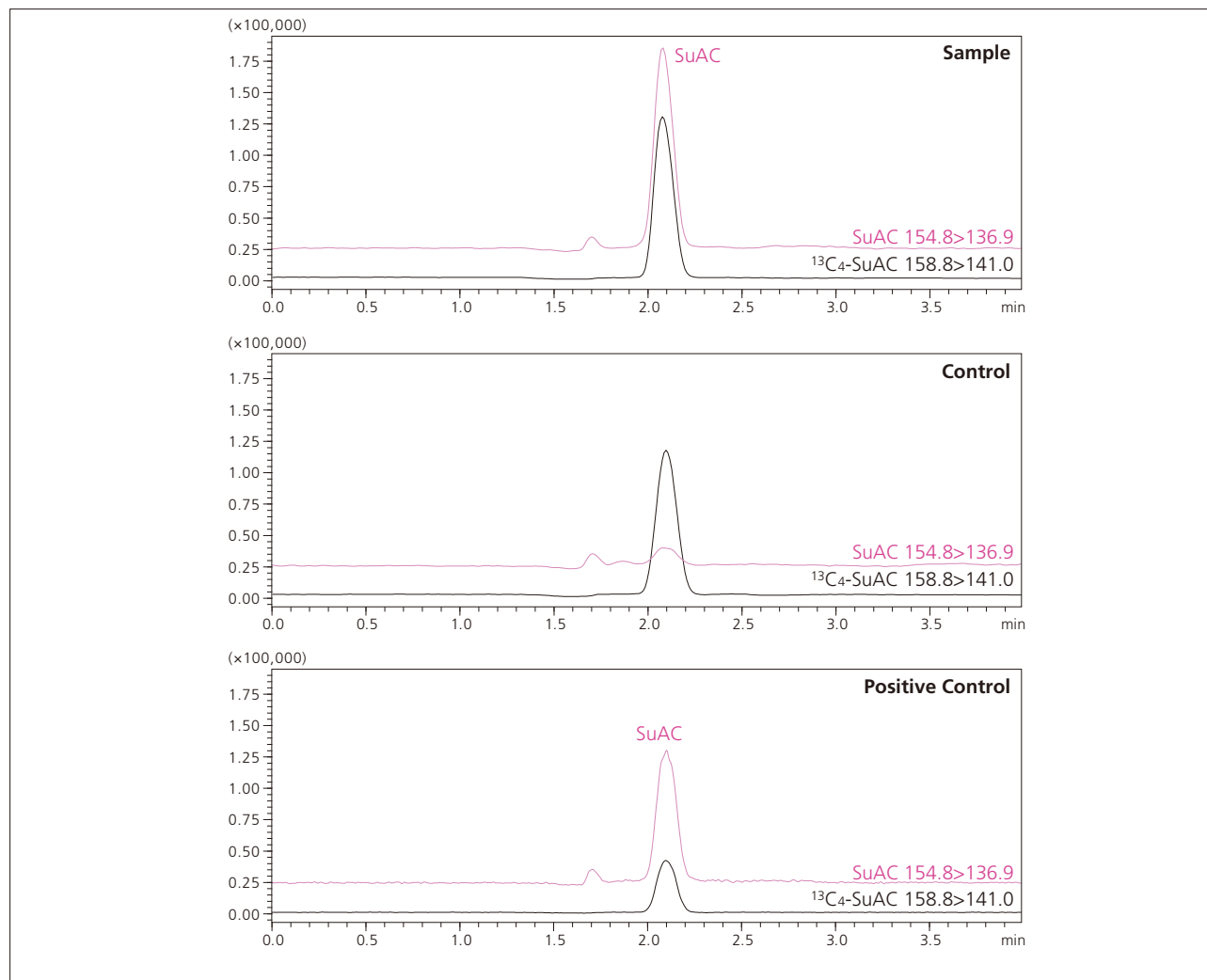


Fig. 3 各対象化合物の抽出イオンクロマトグラム
Extract Ion Chromatograms of Each Target Compounds

[参考文献]

la Marca G, et al. Progress in expanded newborn screening for metabolic conditions by LC-MS/MS in Tuscany: Update on methods to reduce false positive. JIMD Short report #127 (2008)
la Marca G, et al. The inclusion of succinylacetone as marker for tyrosinemia type I in expanded newborn screening programs Rapid Commun. Mass Spectrom. 22 (2008) 812-818
la Marca G, et al. The successful of succinylacetone as a marker of tyrosinaemia type I in Tuscany newborn screening program.. Rapid Commun. Mass Spectrom. 23 (2009) 3891-3893

[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。

注：本システムの使用は研究用途に限りです。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。

3100-03401-525-IK
2014.3