

Application News

No. C93

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

LCMS-8040 を用いた DBS (Dried Blood Spot) 中のメチルマロン酸, 3-OH プロピオン酸, コハク酸の測定

Measurement of Methylmalonic Acid, 3-OH Propionic Acid and Succinic Acid in DBS (Dried Blood Spot) with LCMS-8040

アミノ酸やコレステロール, 脂肪酸の代謝においてメチルマロニル-CoA ムターゼやプロピオニル-CoA カルボキシラーゼの酵素活性を測定する場合, メチルマロン酸 (MMA) やプロピオニルカルニチン, 3-OH プロピオン酸 (3-OH PA), コハク酸 (SA) 等が指標となりえます (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 の前処理方法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。メチルマロン酸, 3-OH プロピオン酸, コハク酸を対象化合物とし, 内部標準試料として d3-メチルマロン酸を使用して, MRM (Multiple Reaction Monitoring) 測定を行いました。

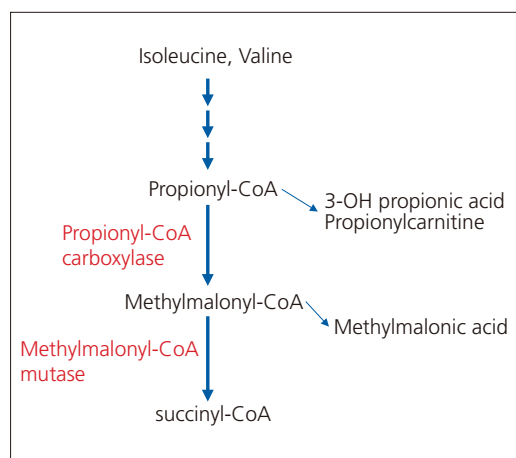


Fig. 1 アミノ酸の代謝経路
Metabolic Pathway of Amino Acid

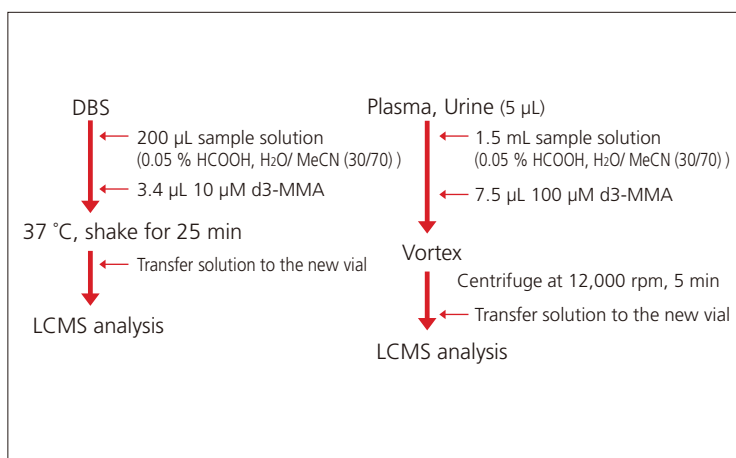


Fig. 2 前処理プロトコル
Preparation Protocol

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Gemini C6-Phenyl (100 mm L. × 2.0 mm I.D., 3 µm)	Probe Voltage	: +4.5 kV
Mobile Phase A	: 0.1 % HCOOH-H ₂ O	Nebulizing Gas Flow	: 2.5 L/min
Mobile Phase B	: 0.1 % HCOOH-CH ₃ CN	Drying Gas Flow	: 15.0 L/min
Ratio	: 60 % B	DL Temperature	: 250 °C
Flow Rate	: 0.2 mL/min	Block Heater Temperature	: 400 °C
Column Temperature	: 30 °C	MRM	: Succinic acid (116.9 > 73.2)
Injection Volume	: 5 µL		: MMA (116.9 > 73.1)
Analysis Time	: 5 min		: d3-MMA (119.9 > 76.1)
Ionization Mode	: ESI (+)		: Lactic acid (89 > 58.9)
			: 3-OH Propionic acid (89 > 58.9)

■測定結果

Analysis Results

Fig.3 に、測定結果を示します。Sample A はメチルマロニル-CoA ムターゼ、Sample B はプロピオニル-CoA カルボキシラーゼの活性を有しないサンプルです。Normal は両方の酵素の活性を有しているサンプルです。結果として、Sample A ではメチルマロン酸、3-OH プロピオン酸、コハク酸が、Sample B では 3-OH プロピオン酸、コハク酸のピーク

が検出されました。乳酸 (LA) と 3-OH プロピオン酸は分子量が同じであり、その MRM トランジションも同じです。しかし、それぞれを分離することにより 3-OH プロピオン酸のピークを特異的に検出することができました。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。

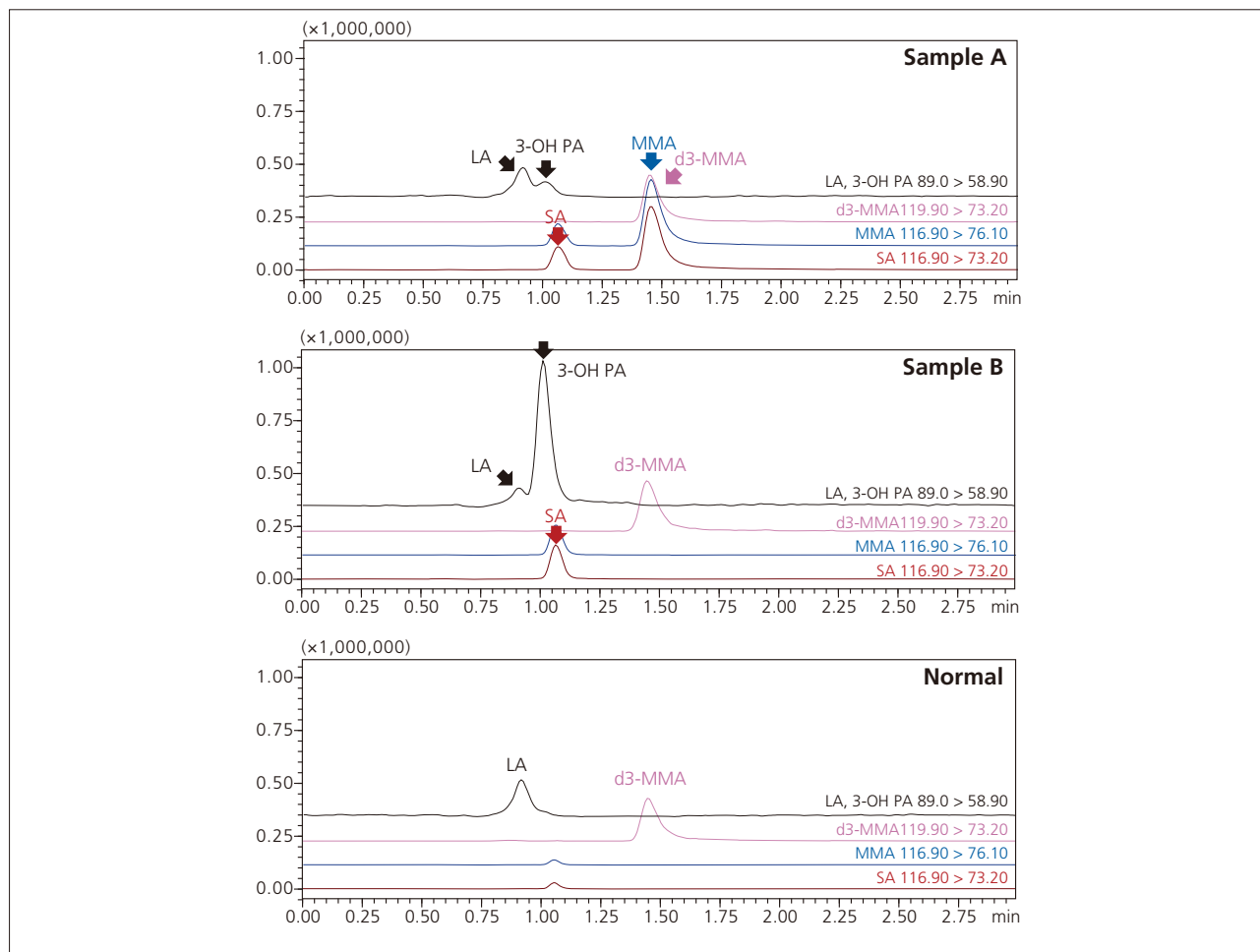


Fig.3 各対象化合物の抽出イオンクロマトグラム
Extract Ion Chromatograms of Each Target Compounds

[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. Rapid 2nd-Tier Test for Measurement of 3-OH-Propionic and Methylmalonic Acids on Dried Blood Spots: Reducing the False-Positive Rate for Propionylcarnitine during Expanded Newborn Screening by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Clinical Chemistry 53:1364-1369 (2007)

[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。