

# Application News

## No. C139

LC/MS  
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

### 使用在线固相萃取-液相色谱-串联质谱仪测定干血斑卡中酶活性

Measurement of Enzyme Activities in Dried Blood Spots with Online Solid Phase Extraction-LC/MS/MS System

溶酶体是真核细胞中的一种细胞器，利用各种水解酶分解代谢物。测定该类酶活性的方法有采用人工合成荧光色素的酶活性测定法和串联质谱法。其中串联质谱法的优点是可以一次测定多个酶活性。

本文向您介绍使用 Meyer Children's Hospital, Mass Spectrometry, Clinical Chemistry and Pharmacology Lab. (Florence, Italy) 开发的方法，利用在线固相萃取 (Solid Phase Extraction: SPE) 液相色谱质谱联用仪 (LCMS-8050) 进行干血斑卡 (Dried Blood Spot: DBS) 中酶活性测定的示例。使用该系统中的 SPE 对样品进行净化，可将酶反应后的样品不经预处理即可直接进样，从而进行测定。

#### ■ 样品预处理和分析条件

Sample Preparation and Analytical Conditions

目标酶分别为  $\alpha$ -iduronidase (IDUA)、 $\alpha$ -acid-glucosidase (GAA)、 $\alpha$ -galactosidase A (GLA)。使用干血斑卡 (DBS) 作为样品。将直径为 3.2 mm 的 DBS 穿孔样片放置到 96 孔滴板后，添加含各酶基质和内标物质 (Genzyme) 的反应溶液，在 37 °C 下进行 22 小时反应。图 1 为预处理的流程。

使用在线 SPE-LC 和 LCMS-8050 进行分析。以各酶解生成物为目标化合物，使用内标物质进行 MRM (Multiple Reaction Monitoring) 测定。图 2 为目标酶解生成物和内标物质的结构。表 1 为 MRM 离子对；表 2 为 LC 及 MS 条件。

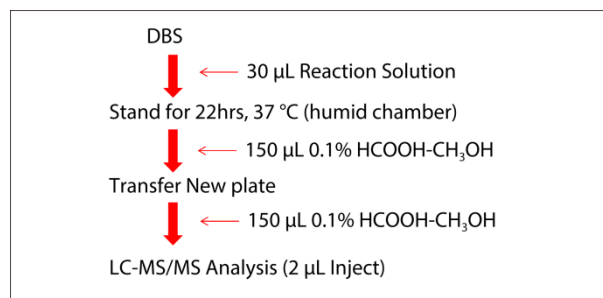


图 1 预处理流程  
Preparation Process Flowchart

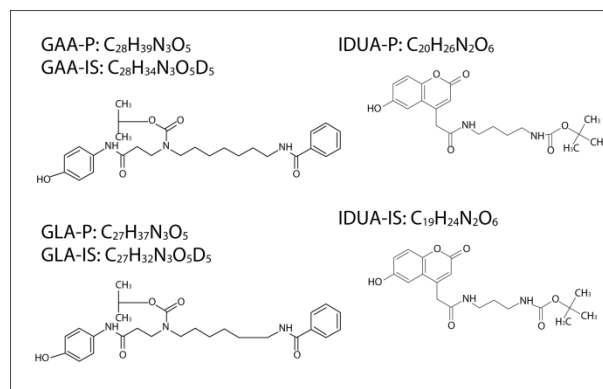


图 2 酶解生成物和内标物质的结构  
Structures of Enzymatic Reaction Products and Internal Standards

表 1 MRM 离子对  
MRM Transitions

Compounds	Polarity	Precursor ion <i>m/z</i>	Product ion <i>m/z</i>
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

表 2 分析条件  
Analytical Conditions

<LC>		<MS>	
色谱柱	: Shim-pack XR-ODS (75 mm L. × 2.0 mm I.D., 2.2 mm)	仪器	: LCMS-8050
捕集柱	: POROS® R1 (30 mm L. × 2.1 mm I.D., 20 mm)	离子化模式	: ESI (+)
流动相 A	: 0.05 % HCOOH-5mM HCOONH <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O	接口温度	: 100 °C
流动相 B	: 0.1 % HCOOH-CH <sub>3</sub> OH	DL 温度	: 100 °C
流动性比例	: 50 %B	加热块温度	: 100 °C
流速	: 0.6 mL/min	雾化气流速	: 3 L/min.
柱温	: 30 °C	加热气流速	: 5 L/min.
进样体积	: 2 μL	干燥气流速	: 15 L/min.
分析时间	: 5.5 min		

## ■ 在线固相萃取-液相色谱-串联质谱仪

Online Solid Phase Extraction-Tandem Mass Spectrometer System

图3为在线 SPE-LC/MS/MS 的仪器构成。由图可知，将酶解生成后的样品直接注入该系统中进行测定，可省略脱盐等精制工序。

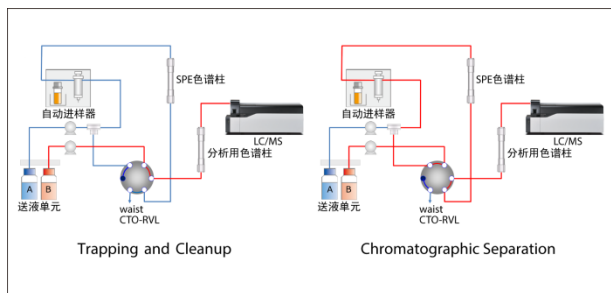


图3 在线固相萃取-LC/MS/MS 系统  
Online SPE-LC/MS/MS System

## ■ 测定结果

Analytical Results

我们对 IDUA、GLA、GAA 的酶活性进行了测定。表3为酶活性测定结果示例；图3为各目标化合物的 MRM 色谱图。空白样品为不含血液的卡纸；样品 A 为含有各种酶活性的样品；样品 B 为不含 IDUA 样品；样品 C 为不含 GLA 样品；样品 D 为不含 GAA 样品。由此可知，样品 A 可以检测到明显的酶解峰，而样品 B~D 的目标峰则有所减少。

表3 酶活性测定结果示例

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
SampleA	13.2	6.6	7.3
SampleB	1.8	6.9	5.8
SampleC	17.6	0.5	9.8
SampleD	8.4	2.0	0.8

活性 ( $\mu\text{mol/h/L}$ ) =  $[(P/IS) \times [IS] \times 30 / 3.4] / 22$

- (P/IS): 产物 (P) 和内标 (IS) 的面积比
- [IS]: 内标 (IS) 的浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) · 30: 添加溶液量 ( $\mu\text{L}$ )
- 3.4: DBS 中的血液量 ( $\mu\text{L}$ ) · 22: 反应时间 (hr)

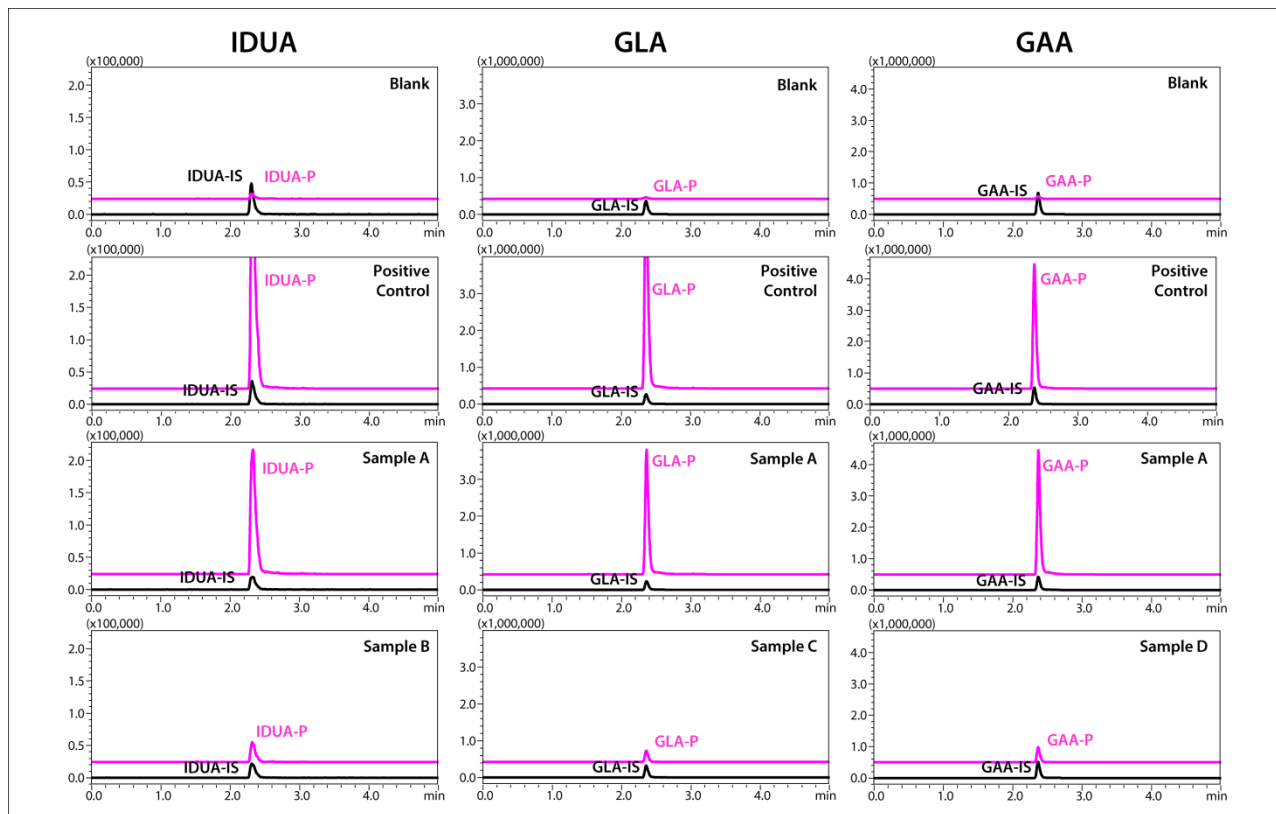


图3 各目标化合物的 MRM 色谱图

Blank: 不含血液的卡纸样品、Sample A: 含有各种酶活性的样品、Sample B: 不含 IDUA 样品、Sample C: 不含 GLA 样品、Sample D: 不含 GAA 样品  
MRM Chromatograms of Each Target Compound

Blank: Sample filter paper containing no blood; Sample A: Sample containing enzymes with all activities; Sample B: Sample missing IDUA;  
Sample C: Sample missing GLA; and Sample D: Sample missing GAA

### [参考文献]

La Marca G *et al.*, *Anal. Chem.* 81 (2009) 6113-6121  
D.Ombrone *et al.*, *Eur.J.Mass Spectrom.* 19, 497-503 (2013)

### [鸣谢]

在本应用报告的编写过程中，我们得到了 Dr. G. la Marca (Meyer Children's Hospital, Mass Spectrometry, Clinical Chemistry and Pharmacology Lab., Florence, Italy) 的大力协助，并为我们提供了样品，在此深表感谢。

注：· 本应用报告中记载的产品并非为经国内相关法律批准和认证的医疗器械。  
· 请勿将本应用报告中记载的分析方法用于诊断目的。



岛津企业管理(中国)有限公司  
岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439  
400-650-0439

### 免责声明:

· 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;  
· 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。  
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2016年12月