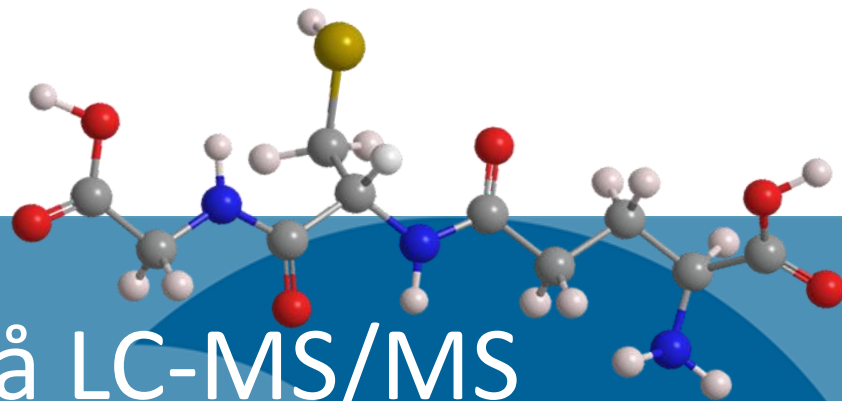
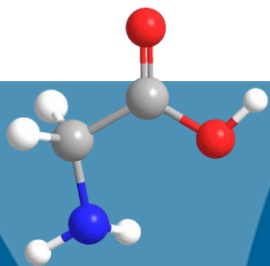


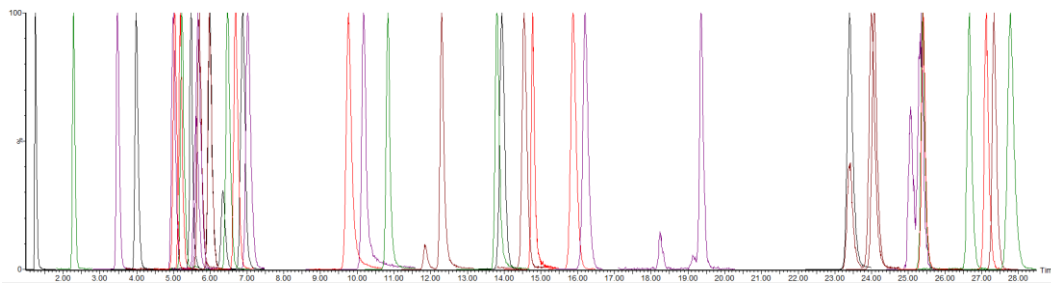


Aminosyror på LC-MS/MS

Karin Leckström

Utbildningsdagarna 2022-08-30

 VÄSTRA
GÖTALANDSREGIONEN
SAHLGRENKA UNIVERSITETSSJUKHUSET



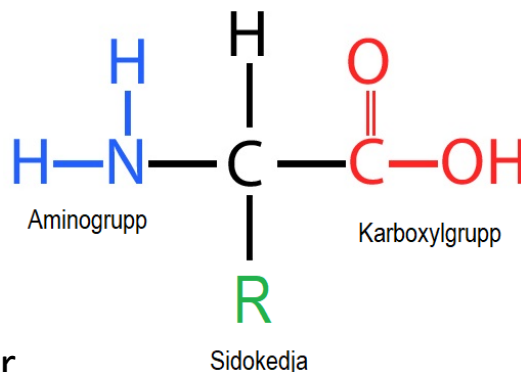
Om aminosyror

Beroende på sidokedjan kan aminosyran t.ex. vara:

- Aromatisk (fenylalanin)
- Sur (asparaginsyra)
- Basisk (arginin)
- Neutral (alanin)

Olika funktioner:

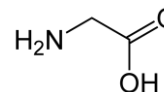
- Energikällor
- Neurotransmittorer
- Byggstenar till protein
- Metabola regulatorer
- Prekursorer i olika metabola vägar



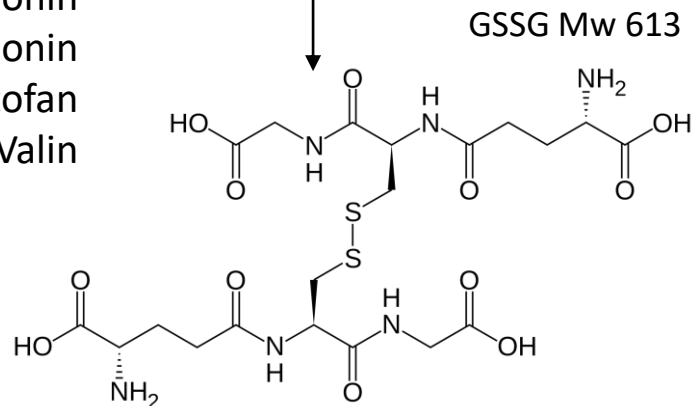
Nio stycken är essentiella

Fenylalanin
Histidin
Isoleucin
Leucin
Lysin
Metionin
Treonin
Tryptofan
Valin

Glycin och oxiderat glutation
minst och störst i metoden



Glycin Mw 75



GSSG Mw 613

Varför analyserar vi aminosyror?

Utredning av medfödda metabola sjukdomar

Rubbning i aminosyraomsättningen

PKU (Fenylketonuri),
MSUD (Maple Syrup Urine Disease)
Homocystinuri
Glutaminbrist
Non-ketotisk hypoglycinemi

Ureacykeldefekter

Citrullinemi
OTC-brist
ASL (Argininosuccinatlyas-brist)
HHH (hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria)

Defekter i transportörer av aminosyror

Cystinuri
Lysinurisk proteinintolerans



Andra patologiska tillstånd

Svältreaktion

Leverpåverkan

Hyperammonemi

Hyperlaktatemi

Nedsatt tarm- eller njurfunktion



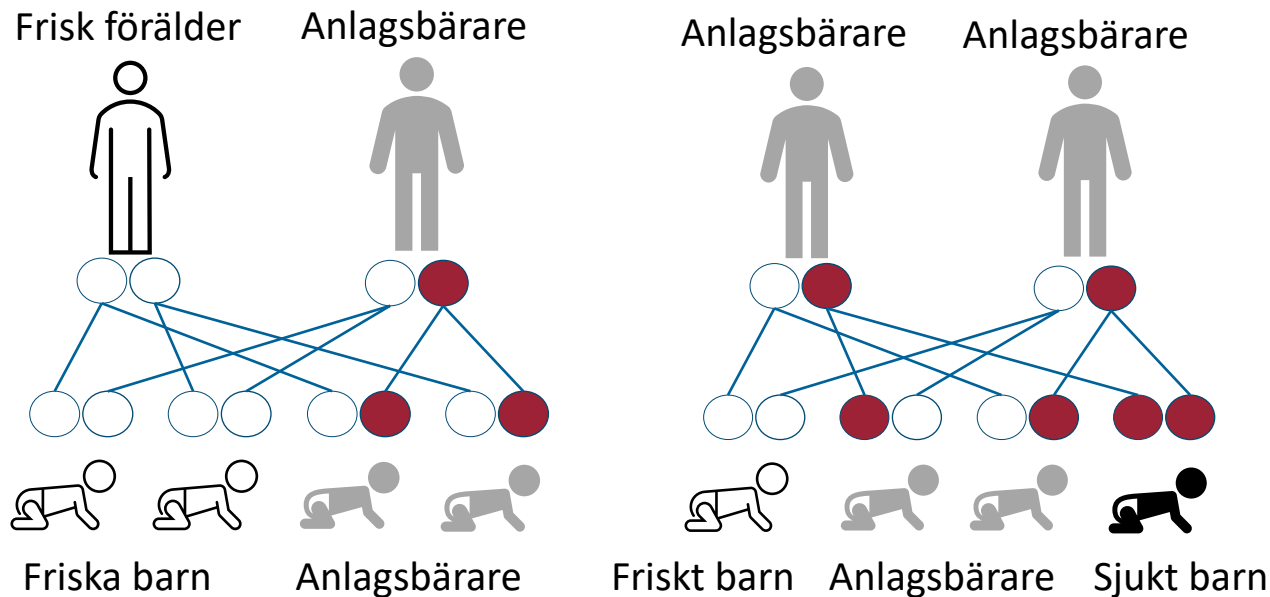
**Verifiering av positiva prover
från nyföddhetsscreening**



**Uppföljning av patienter
under behandling**



Autosomalt recessiv ärftlighet



Exempel på förekomst:

PKU: 5:100 000

MSUD: 1:100 000

Homocystinuri: 1:300 000

Produktionsstatistik

Totalt ca 1900 prover/år

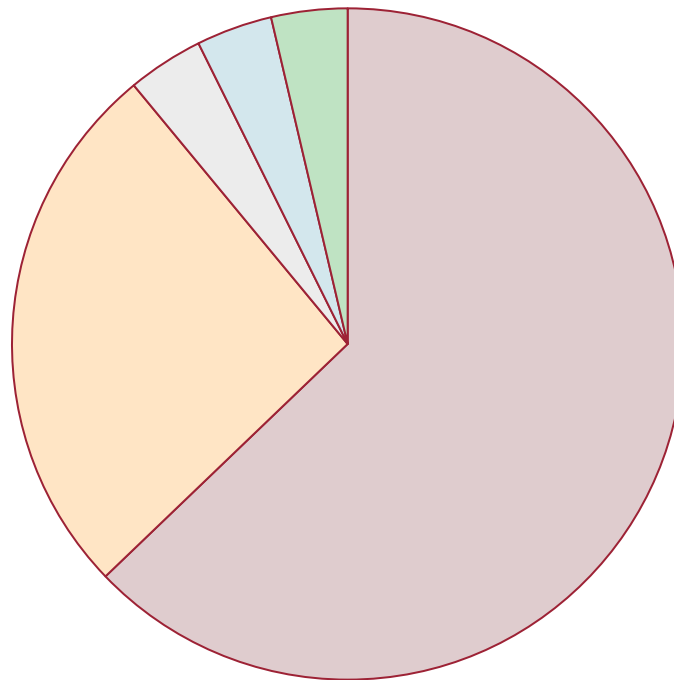
P-aminosyror ca 1200 prover/år

U-Aminosyror ca 500 prover/år

Csv-Aminosyror ca 70 prover/år

Pipekolsyra ca 70 prover/år

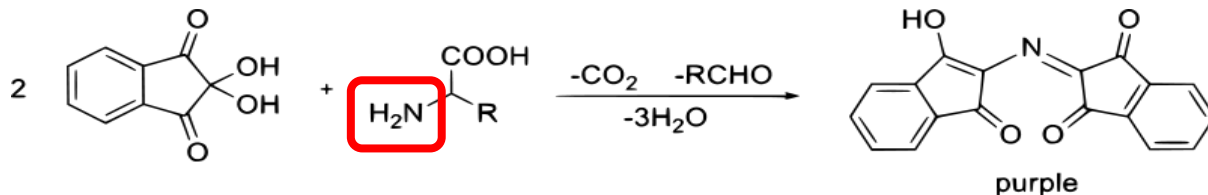
5-ALA ca 70 prover/år



Tidigare metod a.k.a. JEOL

Jonbyteskromatografi med ninhydrin-infärgning.

Amingruppen reagerar med ninhydrin och det bildade färgkomplexet detekteras.

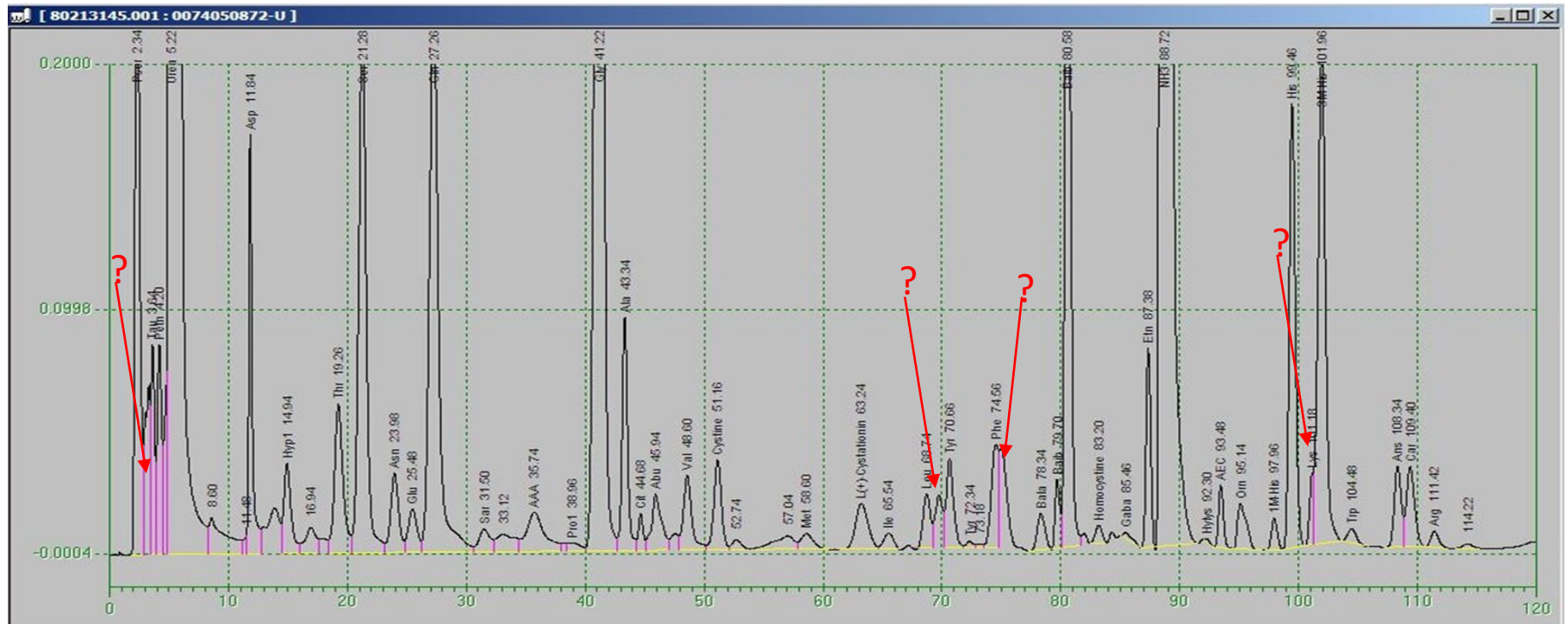


Nackdelar

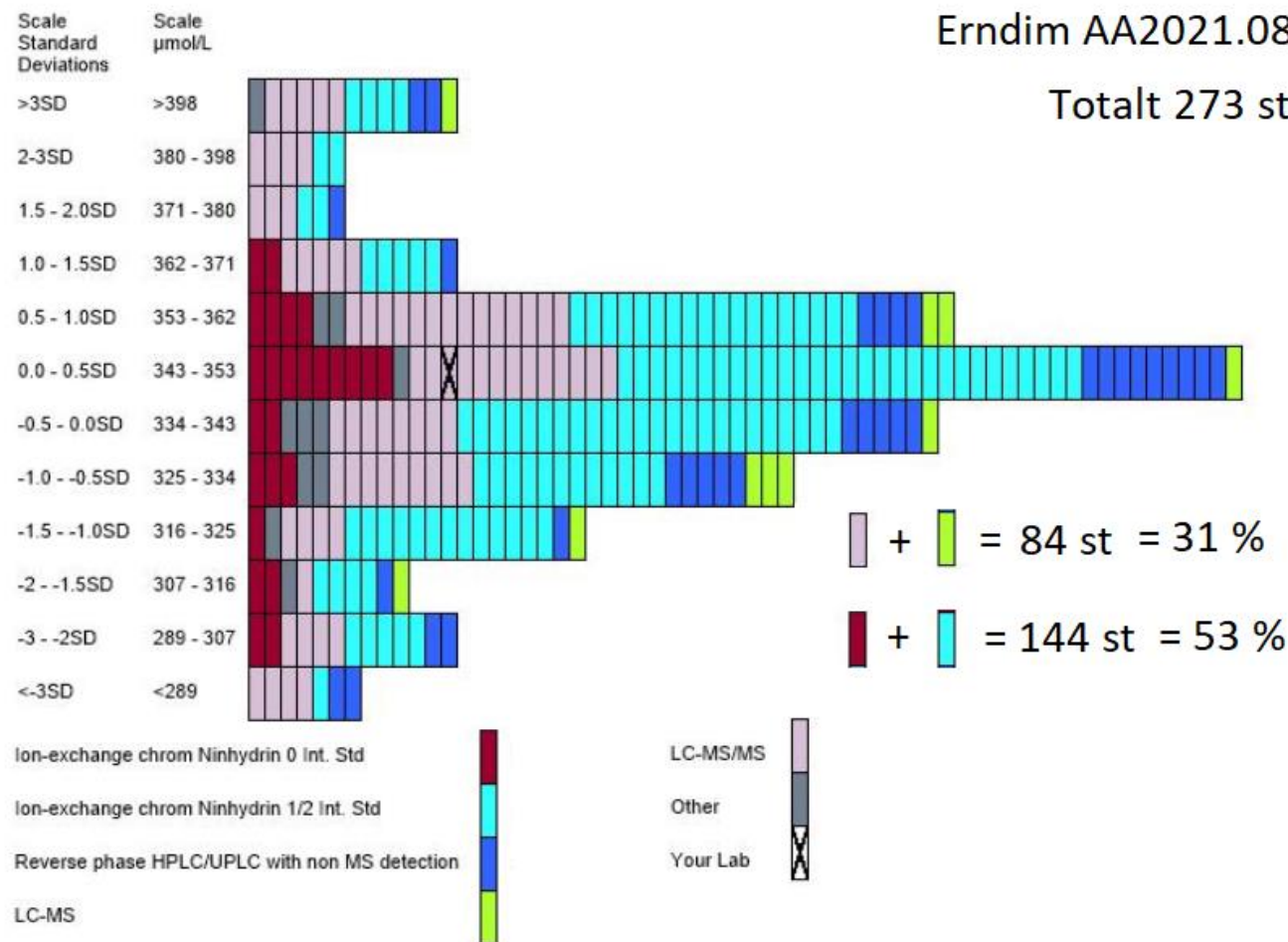
- Analystid på instrument: ca 2,5 h/prov
- Dyr i drift – inköp av buffertar, ninhydrin. Serviceavtal. Ny kolonn efter 1000 injektioner.
- Sårbart – **ett** instrument, svårt att få service. Svårt att köra ikapp avbrott.
- En del aminosyror svåra att skilja ut från andra.
- Svår utvärdering och bedömning av ffa urinprover (störande substanser)



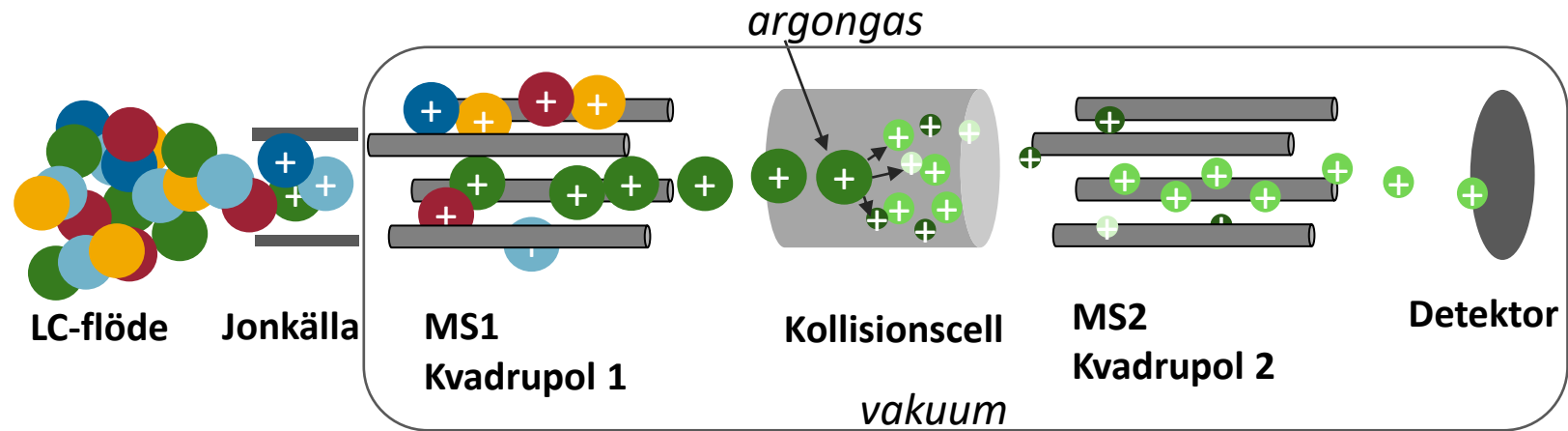
Patientprov i urin – JEOL



Totalt 273 st



Principen för MRM med LC-MS/MS



 Moderjon
Parent ion
Precursor ion

 Dotterjon
Daughter ion
Product ion

Främsta utmaningarna

- Samma massa – isomerer, isobarer, in-source-fragment, naturlig isotopspridning
 - allo-isoleucin, leucin och isoleucin; alanin - sarkosin
 - pipekolsyra och ISF från glutamin och glutamat; asparagin - aspartylglukosamin
 - Asparagin - aspartat, glutamin - glutamat, m.fl.

→ Stort behov av kromatografisk separation
- Endogena substanser
 - Tre olika matriser; plasma, urin, likvor
 - Hur kalibrera på bästa sätt?
- Många analyter
 - Kvantitativa?
 - Kvalitativa?
 - Interna standarder?



Kvantitativa

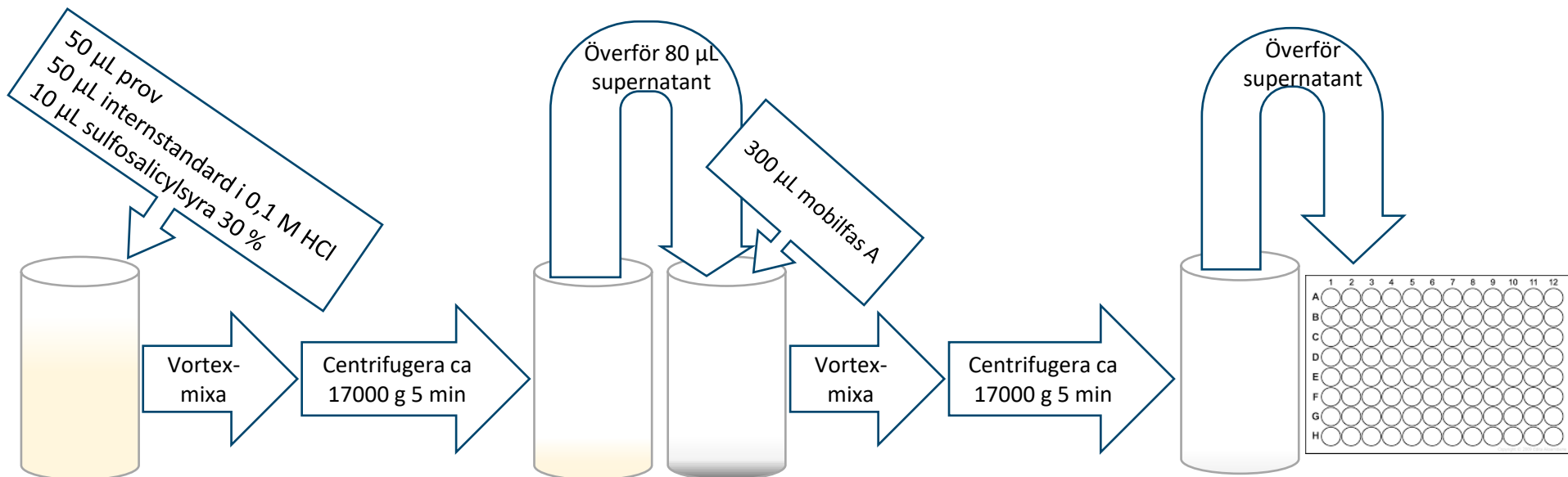
Högsta kalibrer-punkt	System (P, Csv, U)	a.k.a.	Substans	Parent	Daughter
500	P, Csv	Tau	Taurine	126.02	108.02
1000	P, Csv, U	Pro	Proline	117.07	71.07
250	P, Csv, U	Asp	Aspartic acid	134.05	74.05
250	P, Csv	Glu	Glutamic acid	148.06	84.06
250	P, Csv, U	Thr	Threonine	120.07	74.07
100	P	PA	Pipekolsyra	130.09	84.09
1000	P, Csv, U	Phe	Phenylalanine	167.09	121.09
1000	P, Csv, U	Tyr	Tyrosine	183.08	137.08
100	P, Csv, U	Met	Methionine	150.06	104.06
1000	P, Csv	Gln	Glutamine	148.08	85.08
1000	P, Csv, U	Ser	Serine	106.05	60.05
100	Csv	Asn	Asparagine	133.06	74.06
500	P, Csv, U	Val	Valine	119.09	73.09
1000	P, Csv, U	Leu	Leucine	133.11	87.11
250	P, Csv, U	Ile	Isoleucine	132.10	86.10
1000	P, Csv, U	Ala	Alanine	90.06	44.06
1000 (Gly)	P, Csv, U	Gly	Glycine	76.04	30.04
100	P, Csv, U	Cit	Citrulline	176.10	159.10
100	P, Csv	Trp	Tryptophan	205.10	188.10
100	U	(Cys)2	Cystine	241.03	152.03
100	U	Cystationin	Cystathionine	223.08	134.08
100	U	(Hcy)2	Homocystine	269.06	136.06
250	U	5-ALA	Delta-aminolevulinic acid	132.07	114.07
1000	P, Csv, U	His	Histidine	156.08	110.08
500	P, Csv, U	Lys	Lysine	147.11	84.11
500	P, Csv, U	Orn	Ornithine	133.10	70.10
250	P, Csv, U	Arg	Arginine	175.12	70.12

Kvalitativa

Kalibreras ej, intressant att följa.
Kalibreras ej, viktig diagnosmarkör
Kalibreras.

System (P, Csv, U)	a.k.a.	Substans	Parent	Daughter
P, U	S-Cys	Sulfocysteine	201.98	119.98
P, U	Petn	Phosphoethanolamine	142.03	44.03
P, U	Hypro	Hydroxyproline	132.07	86.069
P, U	GSH	Reducerat glutation	308.09	179.09
P, U	Sar	Sarcosine	90.06	44.06
P, U	AAA	Alpha-aminoadipic acid	162.08	98.08
P, U	AGA	Aspartylglucosamine	336.14	126.14
P, U	Allo-Ile	Allo-isoleucine	132.10	86.10
P, U	FIGLU	Formimino-glutamic acid	175.07	84.07
P, U	Hcit	Homocitrulline	190.12	173.12
P, U	GSSG	Oxiderat glutation	613.16	355.16
P, U	Sac	Saccharopine	277.14	84.14
P, U	GlycylPro	Glycylproline	173.09	116.09
P, U	BAIB	Beta-aminoisobutyric acid	104.07	86.07
P, Csv, U	bAla	Beta-alanine	90.062	72.06
P, U	ASA	Argininosuccinic acid	291.13	70.13
P, Csv, U	GABA	Gamma aminobutyric acid	104.071	87.071
P, U	ASA anh x	ASA anhydrid x	273.12	70.12
P, U	ASA anh x	ASA anhydrid y	273.12	70.12
P, U	ASA anh x	ASA anhydrid z	273.12	70.12
U	Nt-M-His (3)	Nt-methyl-histidine	170.091	124.09
U	Np-M-His (1)	Np-methyl-histidine	170.09	96.09
P, U	Hylys	5-hydroxylysine	163.11	128.11
P, U	Ans	Anserine	241.13	109.13
P, U	Car	Carnosine	227.11	110.11
P, Csv, U	HCar	Homocarnosine	241.131	156.13

Upparbetning



Kolonn och instrumentparametrar

LC

Instrument: Waters Acquity

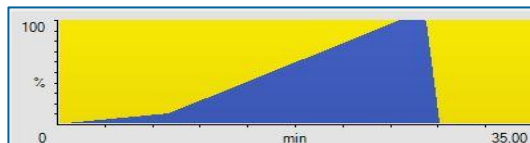
Kolonn: Intrada: 150x3 mm, 0.3 μ m, HILIC + Ion-Exchange mode

Mobilfaser: A: Metanol:65 mM ammoniumformiat:myrsyra 80:20:0,3

B: 100 mM ammoniumformiat:acetonitril 80:20

Gradient:

pH, jonstyrka och andel vattenfas ökar



MS

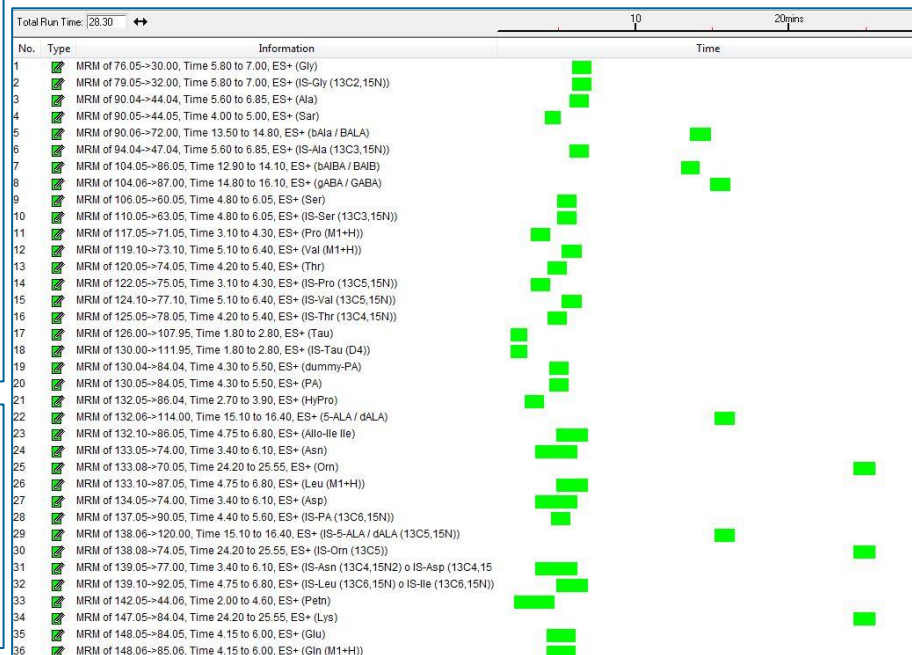
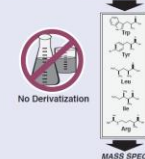
Instrument: Waters Xevo TQD

75 stycken MRM-övergångar samlas i tidsoptimerade fönster

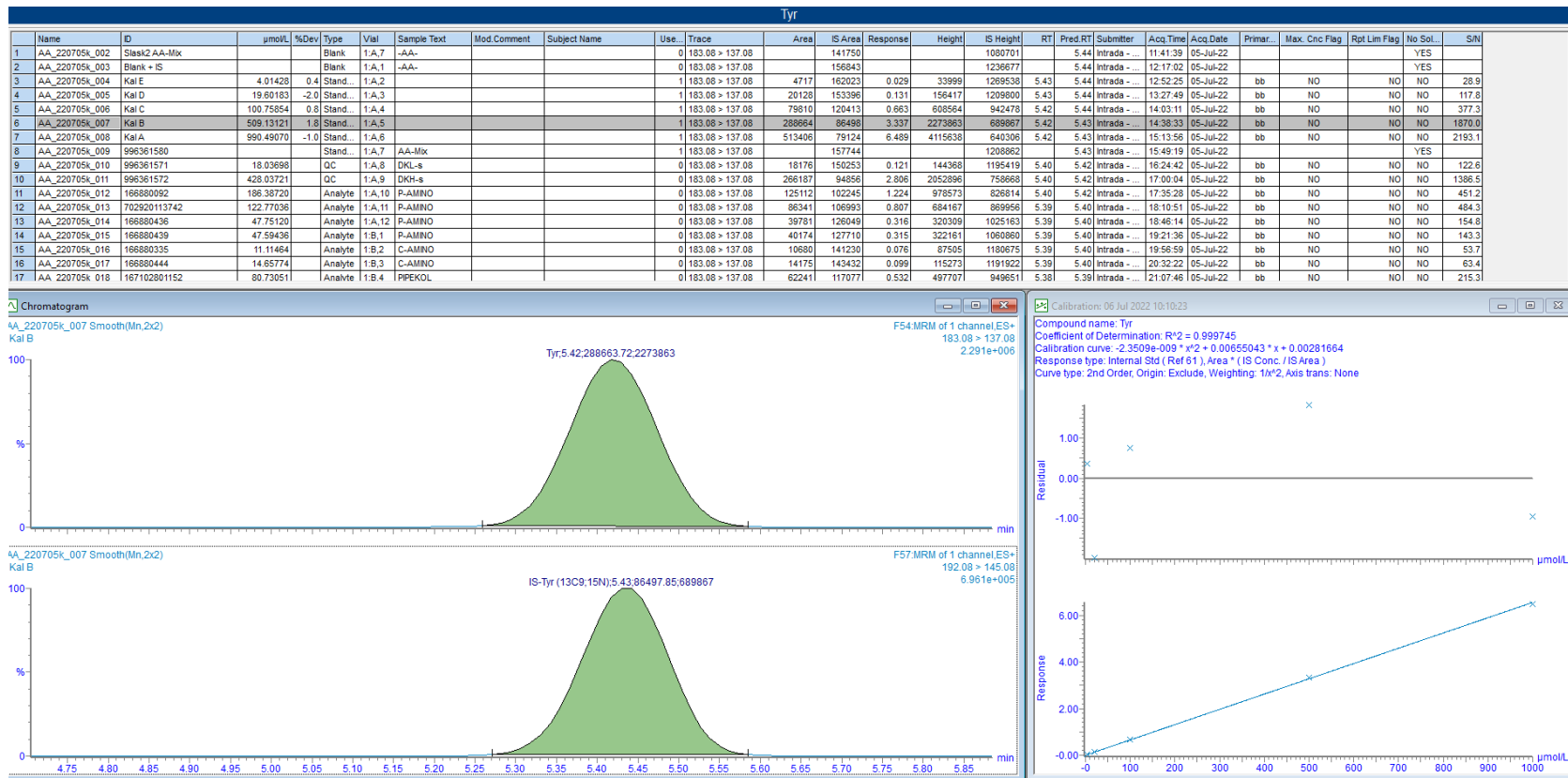
80 stycken analyter (inkl 27 IS) i utvärdering

The world's first specialty column for intact amino acid analysis via LC-MS

- LC-MS analysis of amino acids
- Amino Acid Analysis - No derivatization required
- Ability to separate isobaric amino acids such as Leu and Ile
- High-throughput (< 1 minute) analysis for selected amino acids
- 5-10 minutes for protein amino acids analysis
- Pure spherical silica / 3 μ m particles / unique stationary phase designed for amino acid



Utvärdering



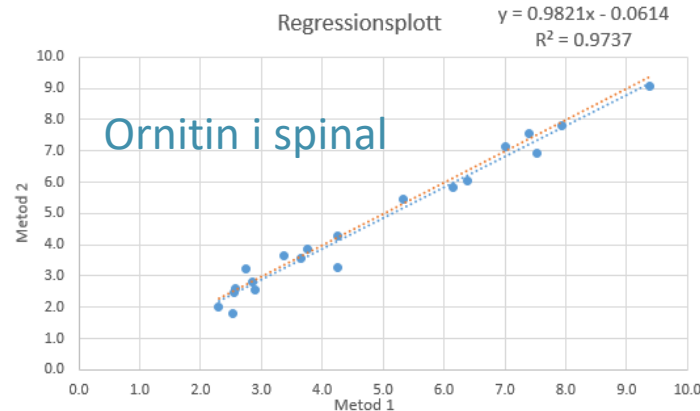
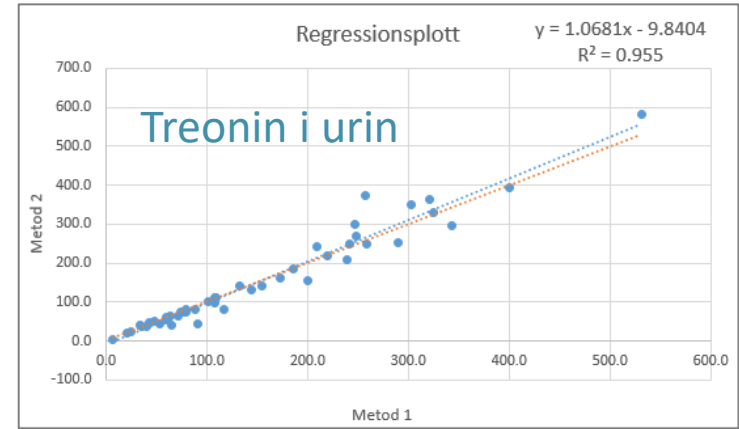
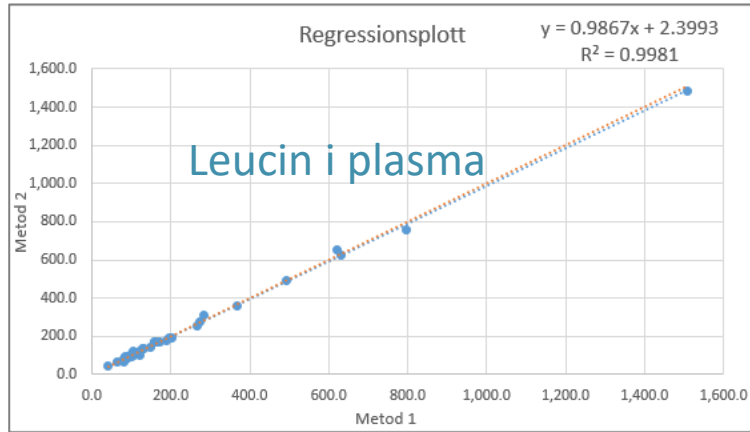
CV % driftkontroller i QM 210101-211231					
Analyt (Rt-ordning)	PLASMA			URIN	
	LDK	HDK		LDK	HDK
Tau	3.2	2.5		na	na
Pro	3.2	3.9		2.2	3.9
Asp	3.7	3.5		3.7	4.7
Glu	3.0	2.5		na	na
Thr	4.4	4.4		3.3	4.1
Pipekolsyra	4.8	3.2		na	na
Phe	4.2	3.7		3.6	4.7
Tyr	4.3	2.7		3.4	3.4
Met	4.1	3.5		5.8	5.1
Gln	3.6	2.9		na	na
Ser	6.3	5.6		5.1	4.8
Asn	5.4	5.3		na	na
Val	3.5	2.4		3.5	2.9
Leu	3.6	2.4		3.5	3.3
Ile	3.4	2.6		2.5	3.3
Ala	3.3	2.6		2.3	3.2
Gly	3.9	3.1		2.7	3.8
Cit	3.5	2.4		2.0	3.4
Trp	3.1	3.0		na	na
(Cys)2	na	na		2.0	3.2
Cystationin	na	na		1.9	3.6
(Hcy)2	na	na		3.2	4.0
5-ALA	na	na		1.7	3.0
His	4.1	2.9		2.0	3.3
Lys	3.4	2.3		2.2	3.1
Orn	3.6	2.7		3.0	3.4
Arg	3.4	2.8		2.1	3.2

Plasma
n=195

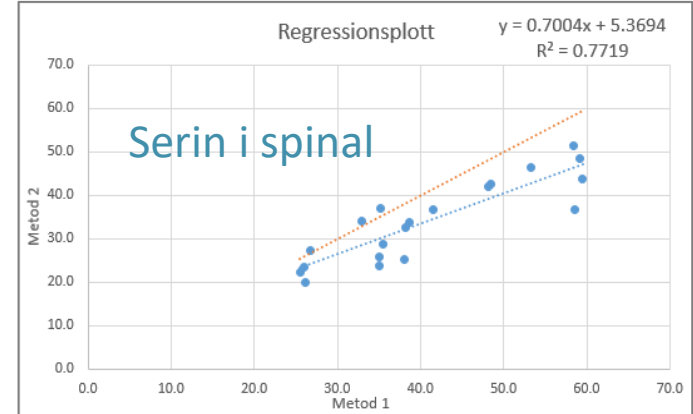
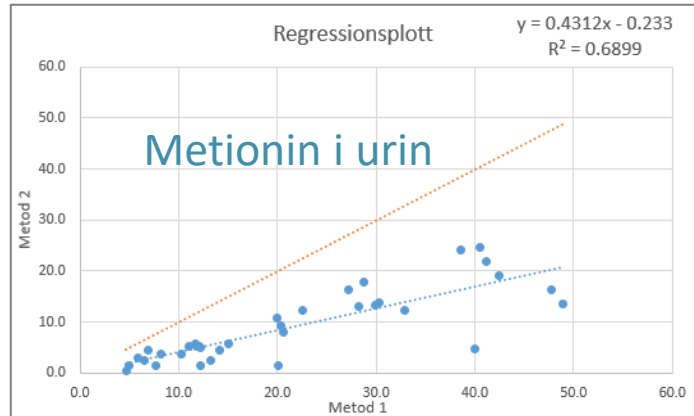
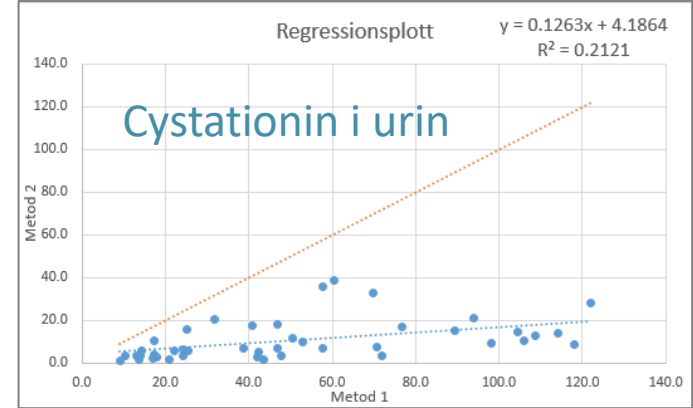
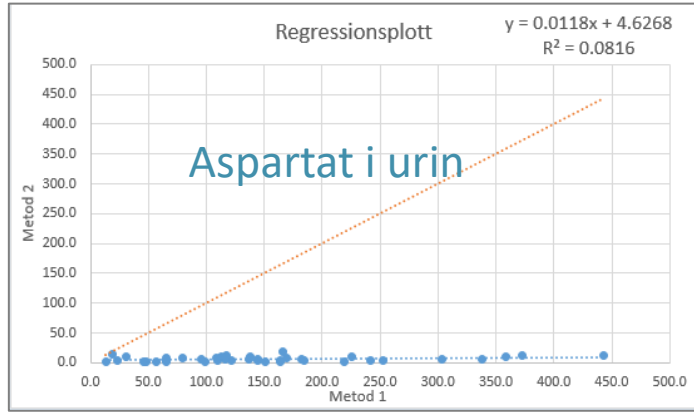
Urin
n=112

Metodjämförelse: LC-MS/MS vs Jeol

Plasma generellt ok överensstämmelse



Metodjämförelse: LC-MS/MS vs Jeol



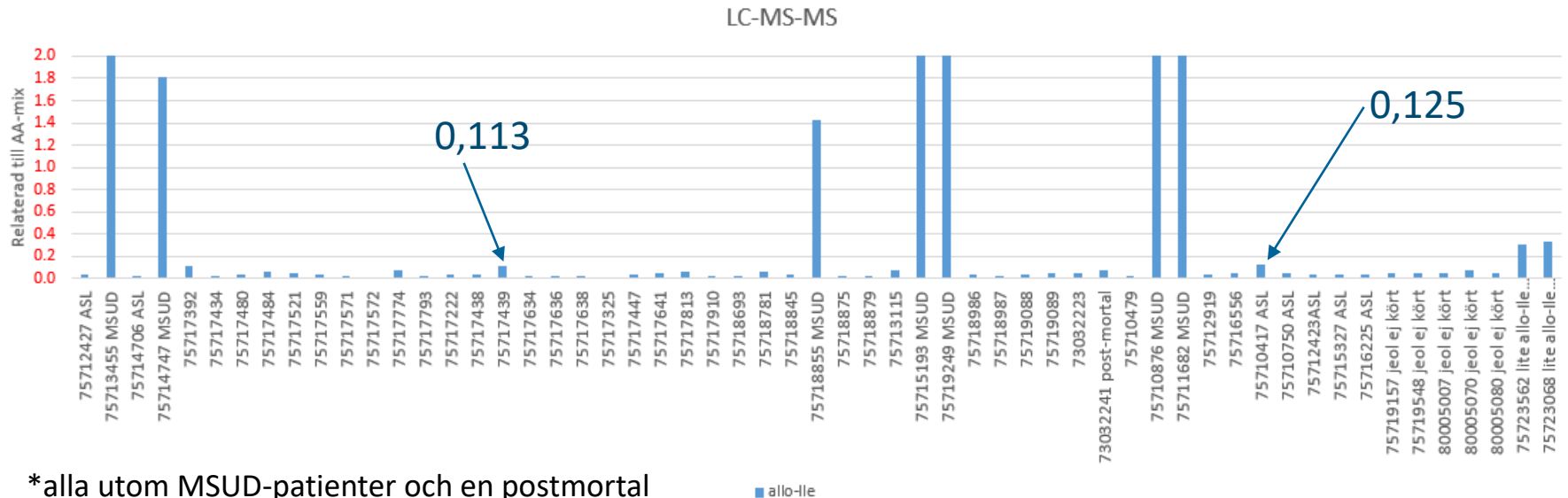
Riktighet för kvalitativa

Allo-Ile i plasma

mv*: 0,037 arbiträr enhet

SD*: 0,025 arb enh

mv+3SD: 0,12 arb enh

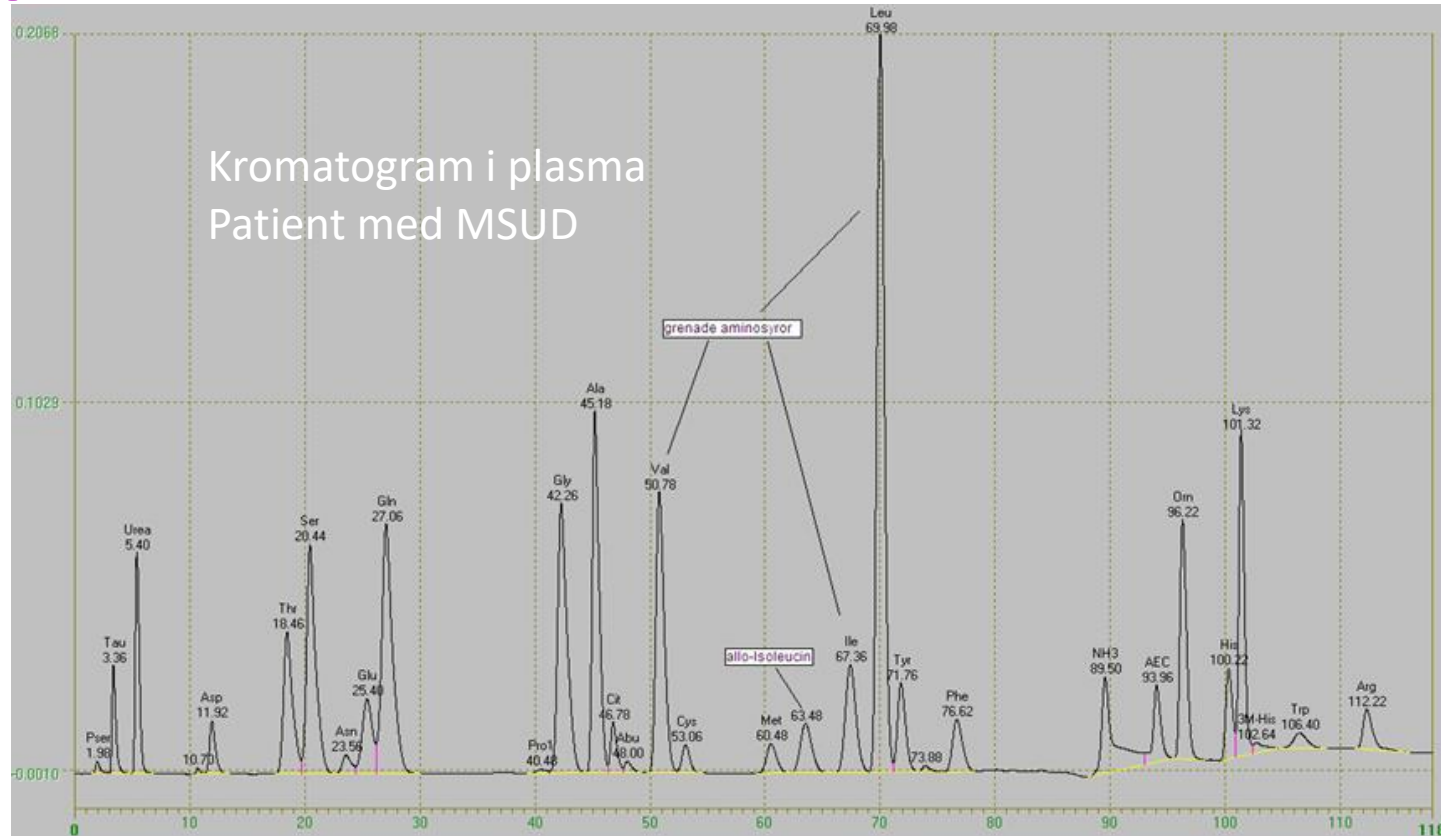


*alla utom MSUD-patienter och en postmortal

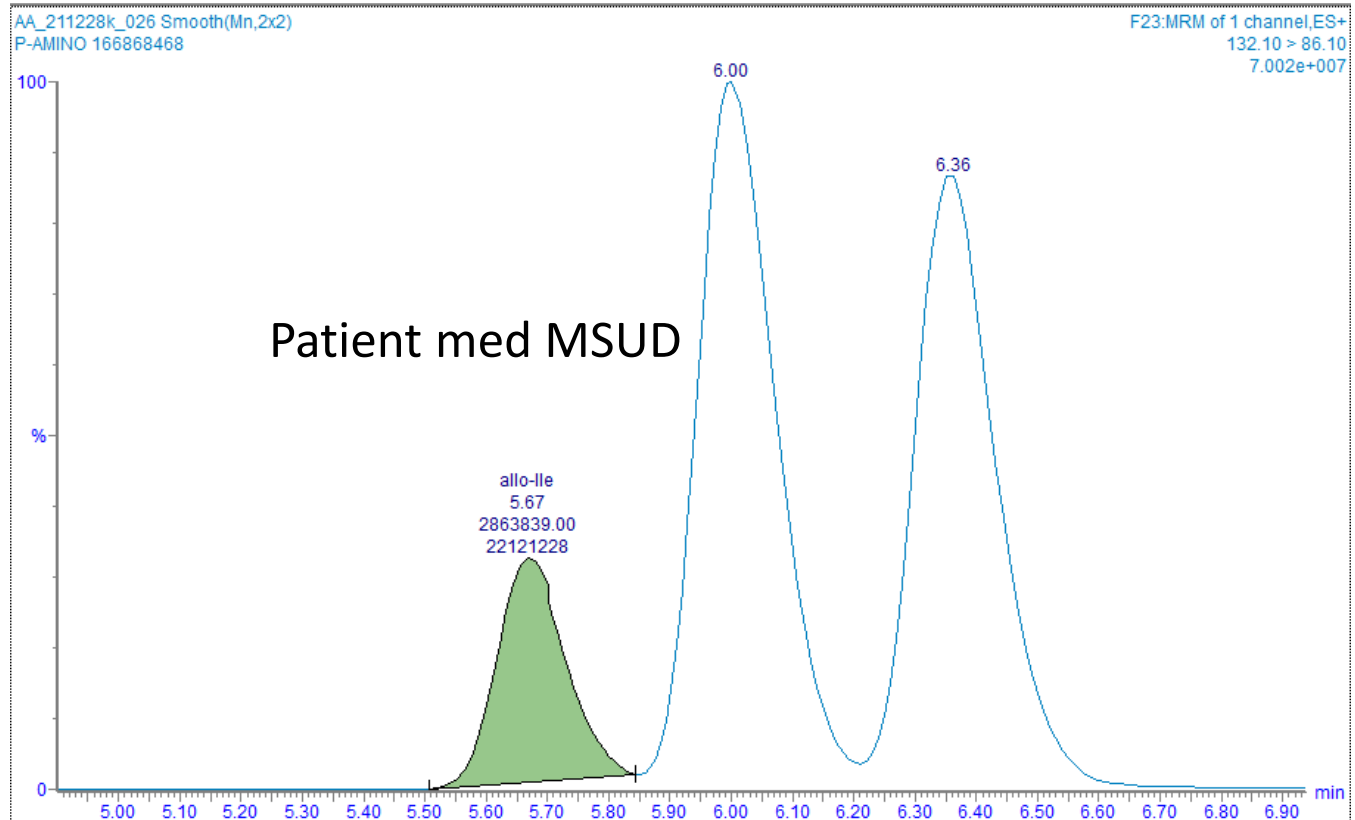
MSUD på JEOL

Maple Syrup Urine Disease

Kromatogram i plasma
Patient med MSUD



MSUD på LC-MS/MS

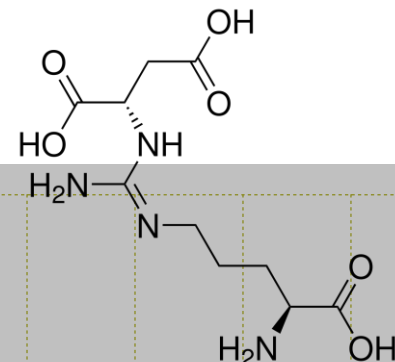
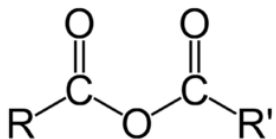


ASL-brist på JEOL

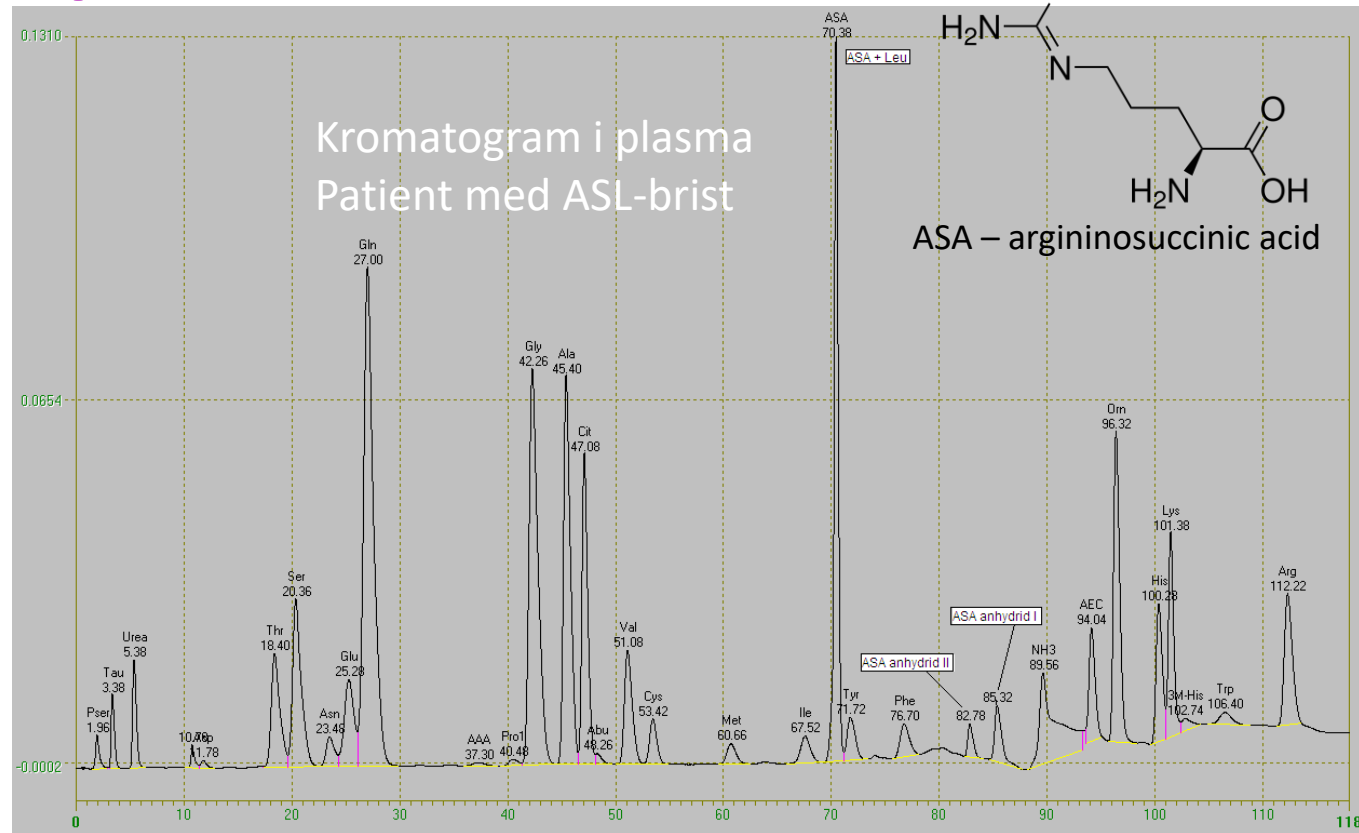
Argininosuccinatlyas-brist

Karboxylsyra+karboxylsyra

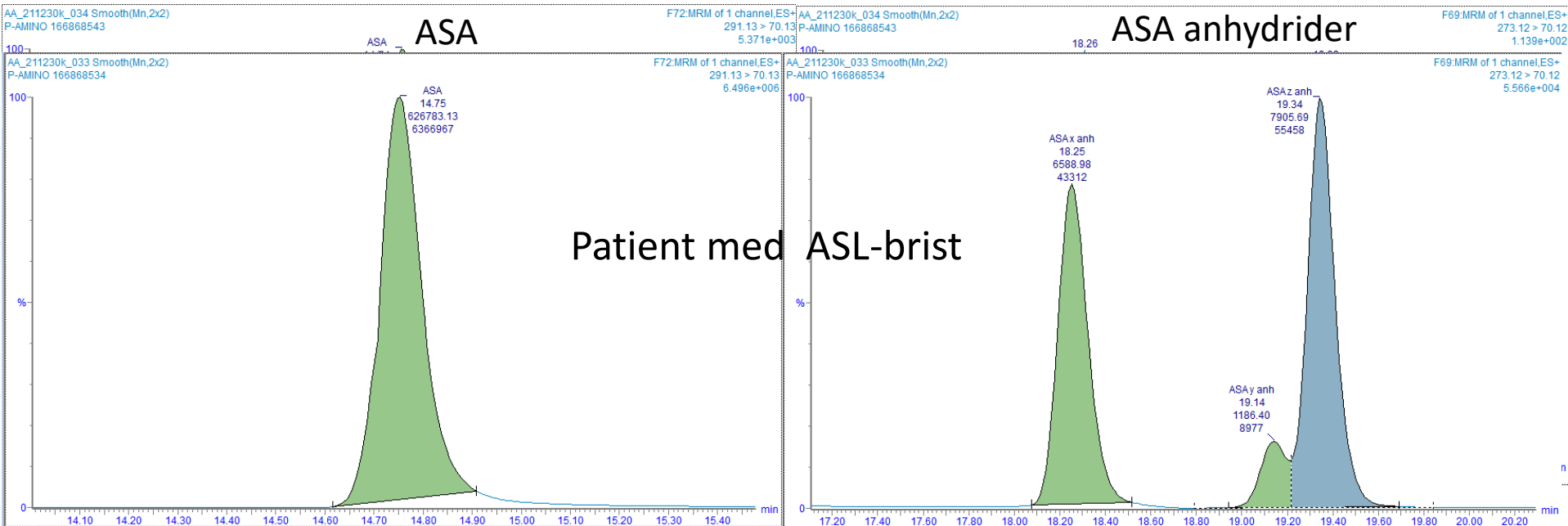
→anhydrid



ASA – argininosuccinic acid

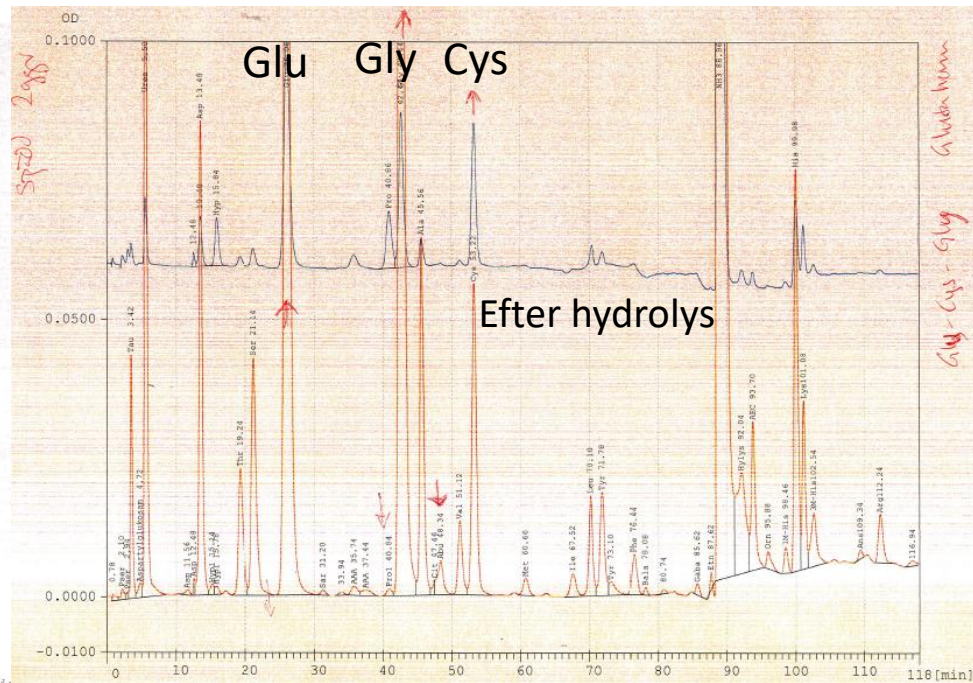
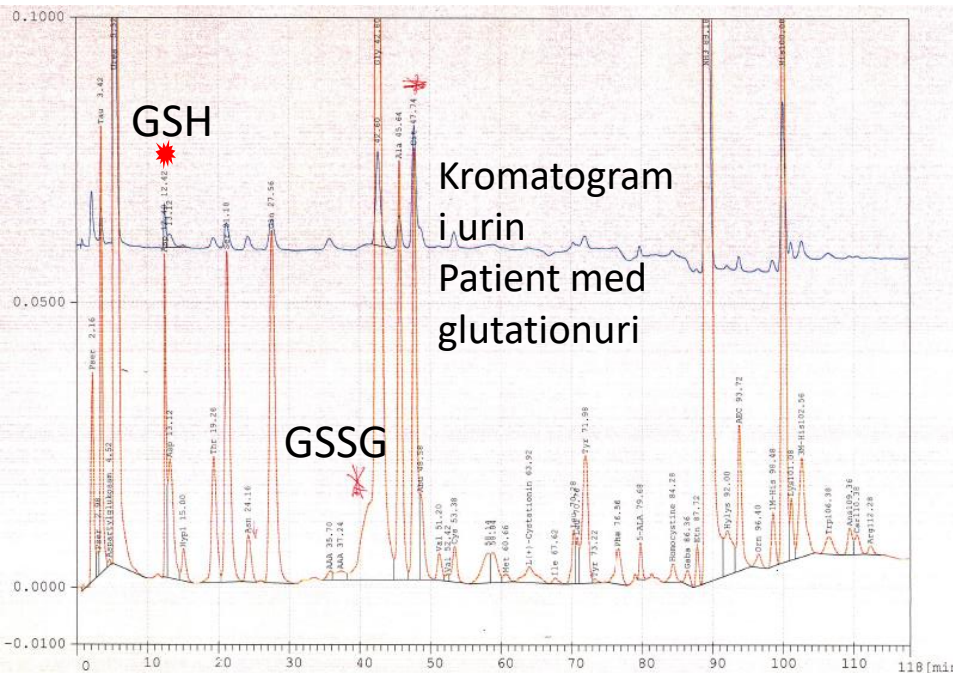
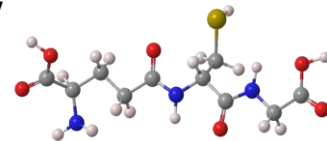


ASA och anhydrider på LC-MS/MS



Glutationuri på Jeol

Tripeptid
Glu-Cys-Gly



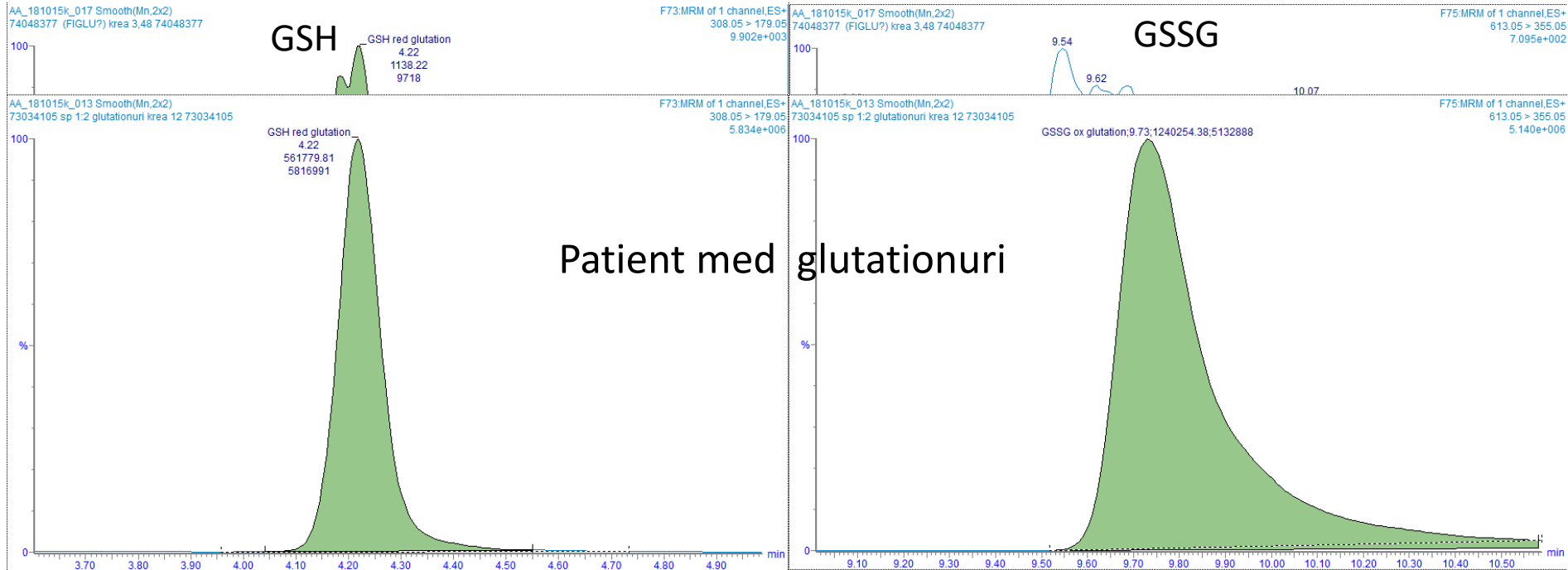
γ -glutamyl transpeptidase deficiency caused by a large homozygous intragenic deletion in GGT1
[Eur. J. Hum. Genet.](#) 26 (6) 808-817, 2018 J Asin-Cayuela et al.

Karin Leckström, Diagnostisk Masspektrometri och Kromatografi

GSH – reducerat glutation
GSSG – oxiderat glutation

Sahlgrenska Universitetssjukhuset

GSH och GSSG på LC-MS/MS



Patient med MSUD

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	
1	SU / Sahlgrenska						P-Aminosyror		Projekt: AA_191230k		20191222-75739089AP														P-Aminosyror	
2	Laboratoriet för Klinisk Kemi						2019-12-30		LiDnr: 75739089		http://clab02/secure/20191222-75739089AP.pdf														7.6E+07	
3	413 25 GÖTEBORG								Signatur: zelha		Års mapp															
4	Ackrediterat enligt ISO/IEC 15189										2016															
5																										
6																										
7	Namn: [REDACTED]								Personnummer: [REDACTED]																	
8	Avdelning: Ö 330 bkontv Barn								Provtagningsdatum: 2019-12-22 11:38																	
9									< 18 år																	
10																										
11																										
12	Aminosyra						µmol/L																			
13	Taurin						34																			
14	Aspartat						3.8																			
15	Treonin						63																			
16	Serin						96																			
17	Glutamat						80																			
18	Glutamin						420																			
19	Prolin						81																			
20	Glycin						170																			
21	Alanin						87																			
22	Citrullin						13																			
23	Valin						460																			
24	Metionin						9.6																			
25	Isoleucin						190																			
26	Leucin						650																			
27	Tyrosin						42																			
28	Fenylalanin						54																			
29	Ornitin						21																			
30	Histidin						63																			
31	Lysin						56																			
32	Tryptofan						23																			
33	Arginin						38																			
34																										
35																										
36																										
37																										
38																										
39																										
40	Kommentar:																									
41	MSUD. Kontroll.																									
42	Koncentrationen av allo-isoleucin är signifikant ökad. Kvantifieras ej med den nya metoden.																									
43																										
44																										

SVEDEAC
 KEMIDETERING
 1240
 ISO 15189

20191222-75739089AP
 75739089
 zelha

IMPORTERA RESULTAT
 Måste användas innan rapportfilen
 konverterats för att skickas till TEX.

	Aminosyra	µmol/L
2	Tau	33.6711
1	Asp	3.8414
1	Thr	62.792
4	Ser	95.8668
1	Glu	80.2381
4	Gln	418.248
4	Pro	80.6127
4	Gly	167.761
4	Ala	86.4692
0.4	Cit	12.5888
2	Val	464.432
0.4	Met	9.64463
1	Ile	189.974
4	Leu	646.2
4	Tyr	41.5014
4	Phe	54.0677
2	Orn	20.6003
4	His	62.9911
2	Lys	55.493
0.4	Trp	22.5952
1	Arg	38.1172

Aminosyra	Relativ AA-mix (ae)
S-Cys	0.001753
Petrn	0.075093
Hypro	0.671534
GSH	0.001504
Sar	0.058653
AAA	0.065364
AGA	0.007533
Allo-Ile	2.529223
FIGLU	0.009035
Hcit	0.024035
GSSG	0.001926
Sac	0.005247
GlycylPro	0
BAIB	0.119708
bAla	0.183381
ASA	0.007733
GABA	0.031335
ASA x anH	0
ASA y anH	0
ASA z anH	0
NH-M-His (3)	0.179076
Np-M-His 11	0.022899
Hyllys	0.04808
Ans	0
Car	0
HCar	0.007539

mv + 3 SD (av ≤ ca 55 prover)	
Ref (ae)	0.227
	0.448
	2.910
	0.021
	0.717
	0.354
	0.023
	0.119
	0.137
	0.323
	0.014
	0.019
	0.030
	0.512
	0.611
	0.057
	0.064
	0.267
	0.781
	0.107
	0.153
	0.067
	0.961
	0.025

Patient med ASL-brist

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V
1	SU / Sahlgrenska		 U-Aminosyror 2019-10-14		Projekt: AA_191011k																	
2	Laboratoriet för Klinisk Ken				LiDnr: 74056466																	
3	413 25 GÖTEBORG				Signatur: karan39																	
4	Ackrediterat enligt ISO/IEC 15 189																					
5																						
6																						
7	Namn: [REDACTED]				Personnummer: [REDACTED]																	
8	Avdelning: 471040 Klinkem Lab Jönköping Sj				Provtagningsdatum: 2019-10-07																	
9																						
10	Uppsamlingsstid (timmar):				Kreatinin mmol/L: 1.6																	
11	Diures (ml):																					
12																						
13																						
14	Aminosyra		µmol/L		mmol/mol kreatinin		Ref. intervall övre gräns mmol/mol Kreatinin		Ålder:		> 2 år											
15	Aspartat		5.6		4		5															
16	Treonin		37		23		80															
17	Serin		72		45		120															
18	Prolin		8.5		5		10															
19	Glycin		290		180		600															
20	Alanin		64		40		200															
21	Citrullin		1.1		<1		6															
22	Valin		11		7		20															
23	Cystin		9.0		6		20															
24	Metionin		2.9		2		7															
25	Cystationin		1.3		<1		3															
26	Isoleucin		4.1		3		20															
27	Leucin		9.8		6		20															
28	Tyrosin		35		21		33															
29	Fenylalanin		17		11		23															
30	Homocystin		<0.4		Ej beräknat																	
31	Ornitin		3.9		2		12															
32	Histidin		140		88		400															
33	Lysin		17		11		50															
34	Arginin		5.1		3		20															
35																						
36																						
37																						
38																						
39																						
40	Kommentar:																					
41	Argininosuccinatyas-brist. Kontroll.																					
42																						
43	Koncentrationer av argininosuccinat (ASA) och ASA-anhydrid är signifikant ökade. Kvantifieras ej med den nya metoden.																					
44																						
45																						

IMPORTERA RESULTAT
 Måste användas i/n rapportförel
 konverterats för att skickas till TEK.

kreatinin		
LLOQ	Aminosyra	µmol/L
1	Asp	5.5591
1	Thr	36.577
4	Ser	71.6892
4	Pro	8.49273
4	Gly	292.604
4	Ala	64.2125
0.4	Cit	1.13692
2	Val	11.433
0.4	(Cys)2	9.01008
0.4	Met	2.86476
0.4	Cystationin	1.25958
1	Ile	4.07743
4	Leu	9.80066
4	Tyr	34.5363
4	Phe	17.3405
0.4	(Hcy)2	0.02664
2	Orn	3.86139
4	His	142.29
2	Lys	17.4057
1	Arg	5.08464

Aminosyra	Relativ AA-mix	per kreatinin
S-Cys	0.058133	0.04
Petn	0.834093	0.52
Hypro	0.393244	0.24
GSH	0.002477	0.00
Sar	0.009437	0.01
AAA	0.41837	0.26
AGA	0.416219	0.26
Allo-Ile	0.006671	0.00
FIGLU	0.1811	0.11
Hcit	0.417431	0.26
GSSG	0	0.00
Sac	0.07802	0.05
GlycylPro	0.959353	0.60
BAIB	1.286796	0.80
bAla	0.07309	0.05
ASA	483.650568	300.40
GABA	0.040751	0.03
ASA x anh	245.545986	152.51
ASA y anh	246.860251	153.33
ASA z anh	21.714923	13.49
Nt-M-His (3)	3.191846	1.98
Np-M-His (1)	0.452621	0.28
Hylys	0.155285	0.10
Ans	0.114033	0.07
Car	7.435009	4.62
HCar	0.463301	0.29

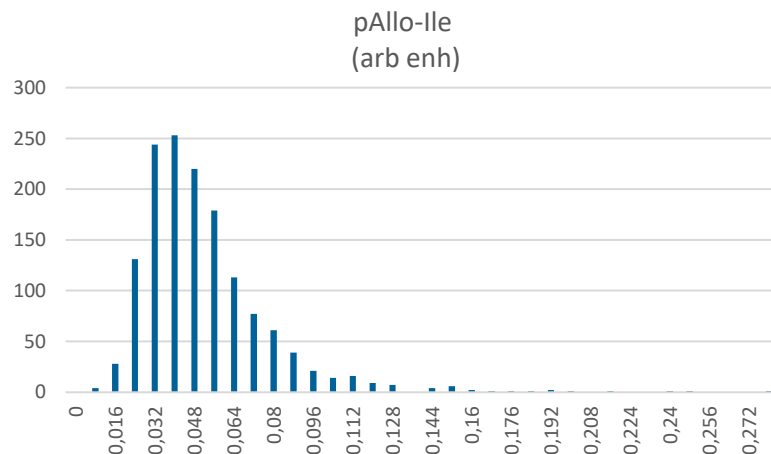
Ref per kreatinin
0.15
1.63
2.35
0.01
0.84
1.90
0.66
0.03
1.00
1.05
0.002
0.37
3.63
5.35
1.29
5.61
0.09
4.15
13.0
0.78
7.45
27.3
1.70
21.7
32.0
0.58

På gång... nya referensgränser för kvalitativa AA

Allo-Ile i plasma

mv+3 SD = 0,128 arb enh (idag 0,119)

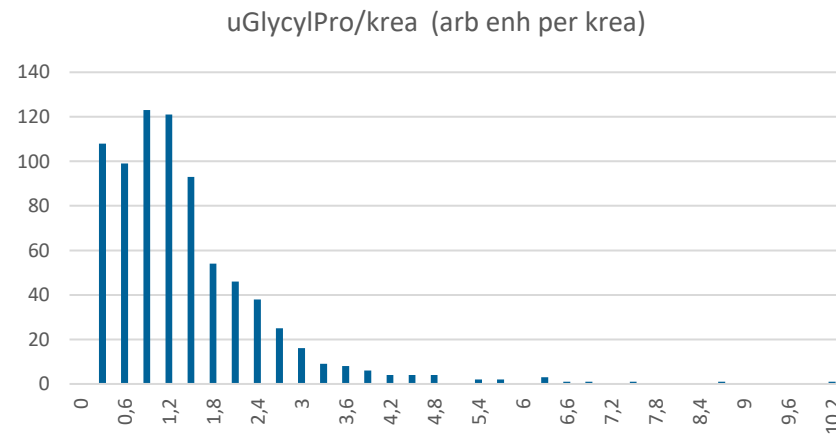
	mv+3 SD				
	alla	<1mån	<18år	Man	Kvinna
Arb enh	0.128	0.097	0.129	0.156	0.121
antal	1438	136	1157	57	59



GlycylPro i urin

mv+3 SD = 4,66 arb enh (idag 3,63)

	mv+3 SD			
	alla	<6 mån	<2 år	>2 år
arb enh	4.66	7.35	3.80	2.64
antal	770	159	152	447



Jeol	LC-MS/MS
En kalibreringspunkt i veckan	Kaliberingskurva varje batch
En DK per dag (endast normalserum)	DK Hög och DK Låg i två matriser → 4-8 DK per batch
Ca 10 prover per dag	20-33 prover/batch
Varje dag – tidskrävande men lättillgängligt för akuta	Tisdag och fredag
2,5 h/injektion	35 min/injektion men fler injektioner
"Ser allt" som färgas in med ninhydrin. Mycket stör.	Valt ut 27 + 26 (kvantifieras + semikvantitativt/kvalitativt)
Ett instrument med svårtillgänglig service	Back-up-instrument + tillgänglig service
Dyra reagens och kolonn. Dyrt serviceavtal.	Billigare mobilfaser och kolonn. Befintligt serviceavtal.
Tre analysmetoder: aminosyror, 5-ALA, pipekolsyra	En analysmetod
Endast svarsprotokoll i LIS	Allt in i LIS → enklare att få ut statistik.



Citrullus lanatus
Citrullin isolerades
från vattenmelon 1914

Tack för uppmärksamheten!



VÄSTRA
GÖTALANDSREGIONEN
SAHLGRENSKA UNIVERSITETSSJUKHUSET

Tack!

Jordi Asin Cayuela

Ulla Rüetschi

Yan Shen

Anders Olsson

Marta Komorowska

Zeina Hachem

Renata Sollerman

Henrik Ryberg

Katarina Zohrevand

Joachim Greter

Itaru Yazawa