

# Erfaringer med LC/MS i kliniske studier

Katja B Prestø Elgstøen  
OUS Rikshospitalet

27 mai 2010



1. medfødte stoffskiftesykdommer

1. generelt om metodeutvikling og LCMS

2. eksempler på applikasjoner

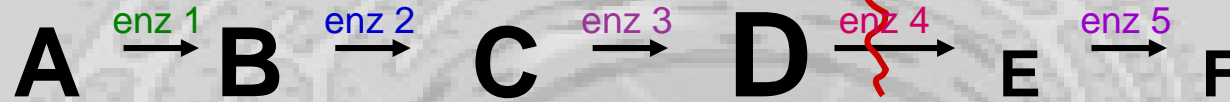
3. sluttbemerkninger

Medfødt stoffskiftesykdom

DNA



RNA



X

Y

patologiske metabolitter

## Laboratoriediagnostikk av medfødte stoffskiftesykdommer (IEM)

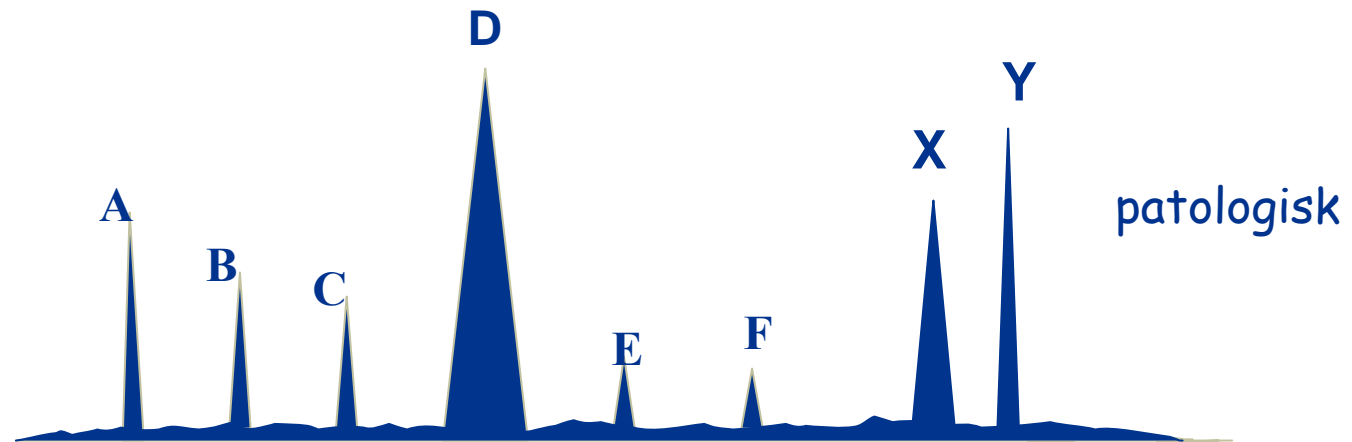
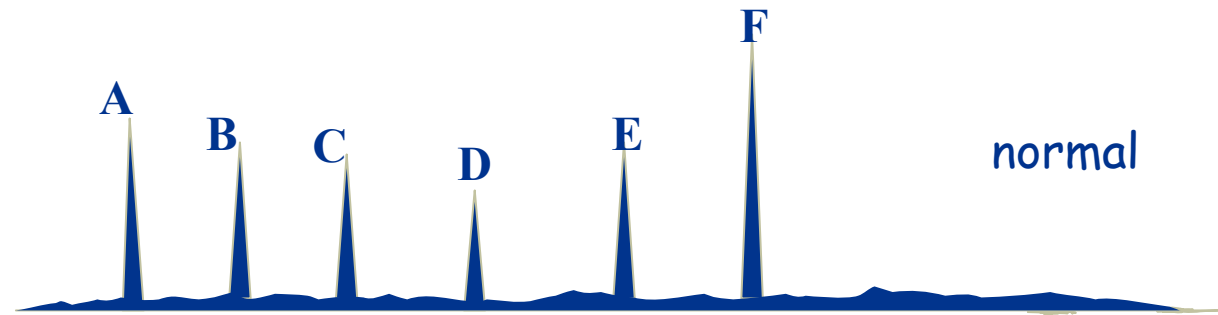
På 3 nivåer:



Seksjon for biokjemisk genetikk (SBG), Avd. for medisinsk biokjemi ved OUS Rikshospitalet har landsfunksjon for laboratorieutredning av IEM. Vi utreder omkring 2000 pasienter årlig og diagnostiserer omkring 200 ulike sykdommer.




## Metabolsk screening - multikomponentanalyse



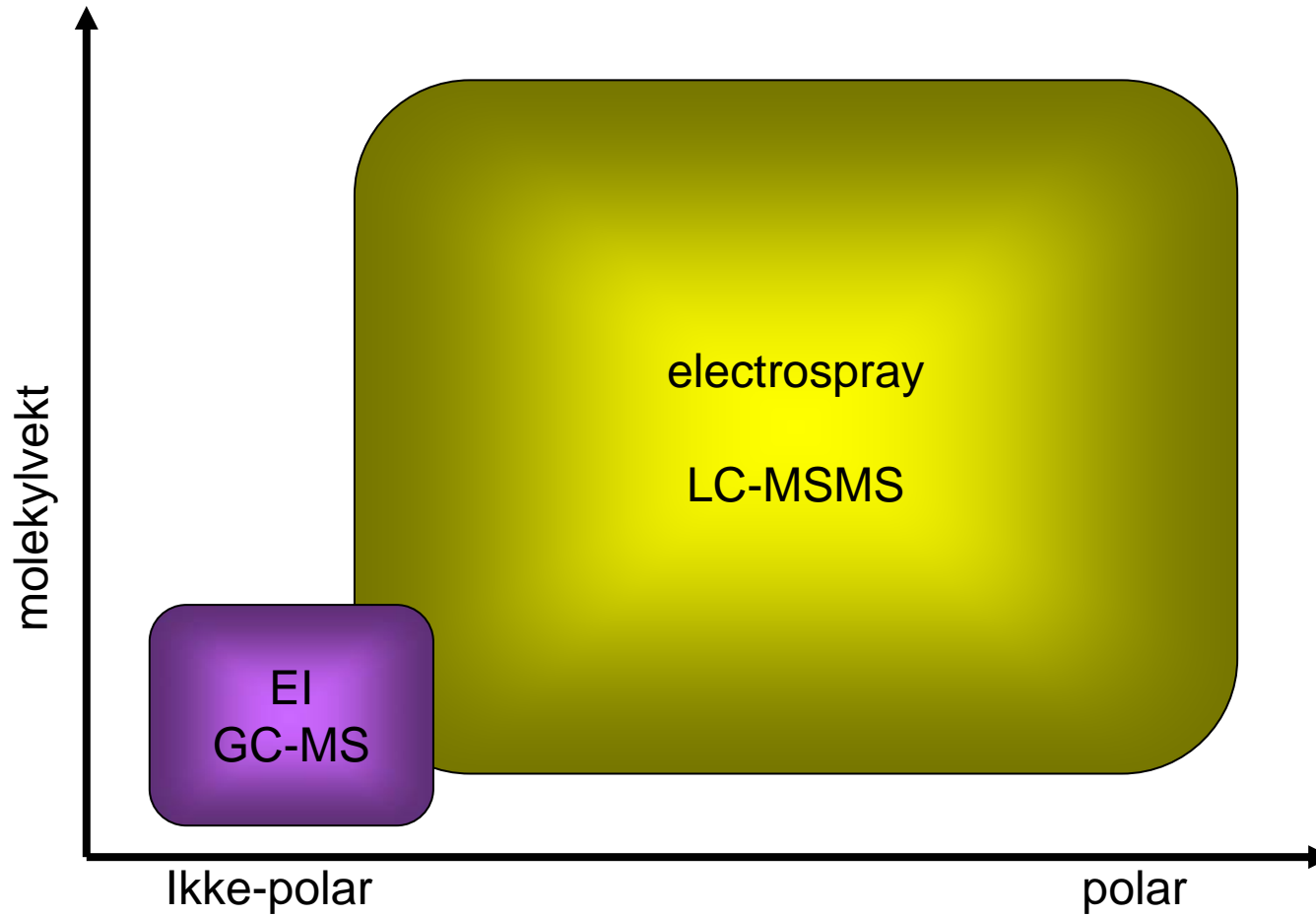
Kan starte behandling basert på laboratoriefunn

## Generelt ved bruk av eller utvikling av LC-MSMS metoder

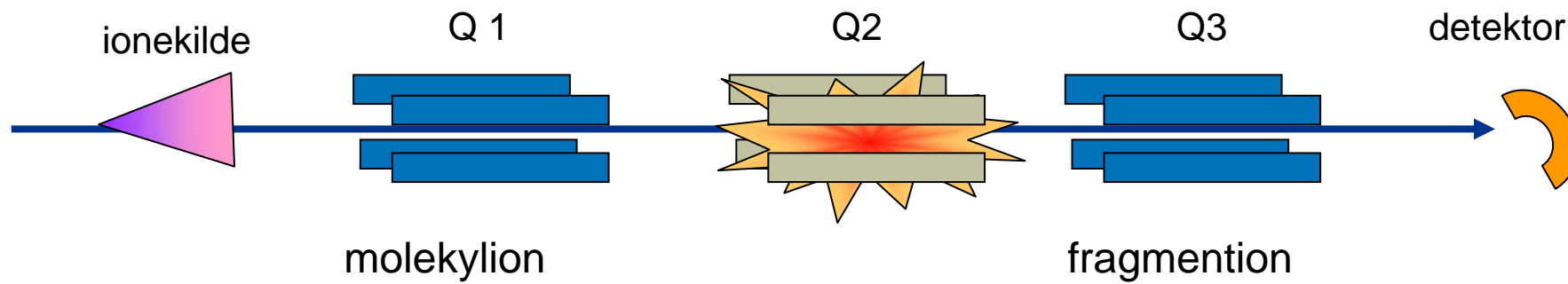
Tenk gjennom :

- hvorfor LC-MS?
- analyttens egenskaper samt konsentrasjon
- prøvematriks egenskaper
- dine egenskaper ! Hva er du god på? 
- "mye" prøveopparbeidelse vs "mye" kromatografi vs "mye" MSMS
- fancy analytisk kjemi ikke alltid like robust.....

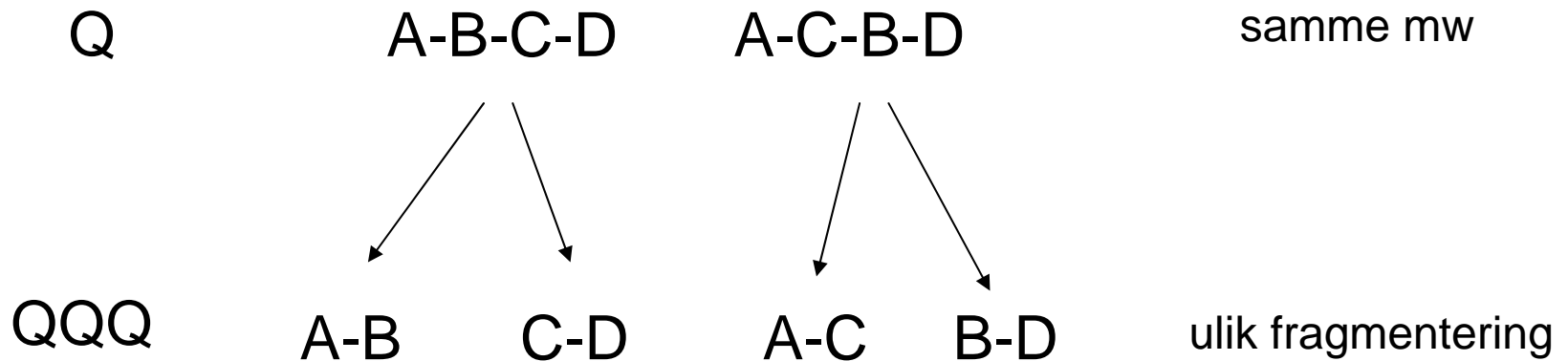
hvorfor LC-MS ?



## hvorfor trippel quadrupol ?



## hvorfor MSMS:



## LC-MS

### molekylion

- positiv ionisering typisk  $MH^+$  ved  $m/z$   $m_w + 1$
- negativ ionisering typisk  $M^-$  at  $m/z$   $m_w - 1$

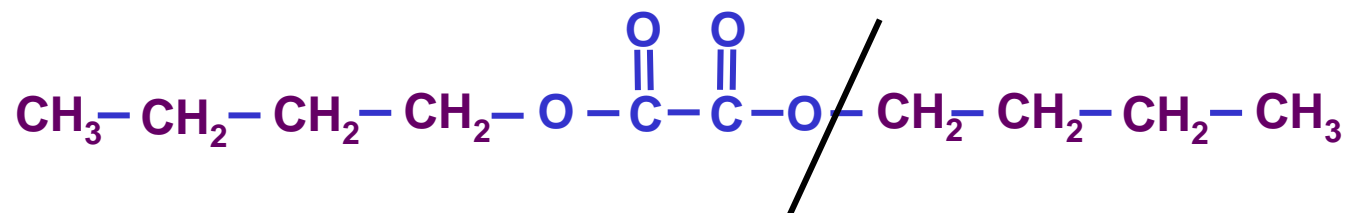
### ADDUKTER

Adduct ion	Kilde	m/z av adduct
$[M + COOH]^-$	format	$M + 45$
$[M + CH_3COO]^-$	eddiksyre	$M + 59$
$[M + Cl]^-$	klorinerte løsemiddel	$M + 35$
$[M + NH_4]^+$	ammonia	$M + 18$
$[M + Na]^+$	Na-salter / glass	$M + 23$
$[M + K]^+$	K – salter	$M + 39$
$[M + CH_3CNH]^+$	acetonitril	$M + 42$
$[M + CH_3OHH]^+$	metanol	$M + 33$

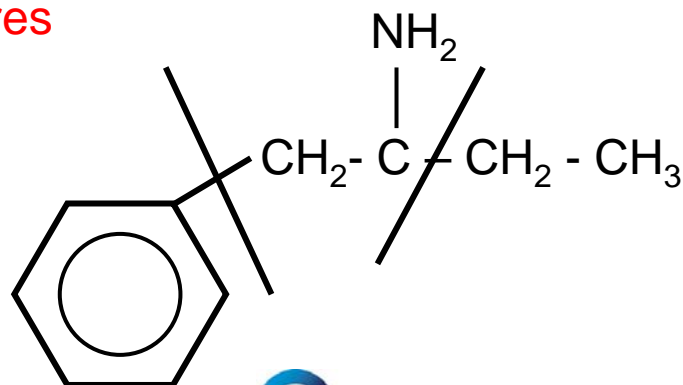


## Fragmentering

- Et molekyls fragmenteringsmønster er dets fingeravtrykk og er uavhengig av prøvematriks.
- Fragmenteringsmønster er vanskelig å prediktere.
- benyttes ofte i kvantitativ analyse, for eksempel MRM, precursor ion scan.

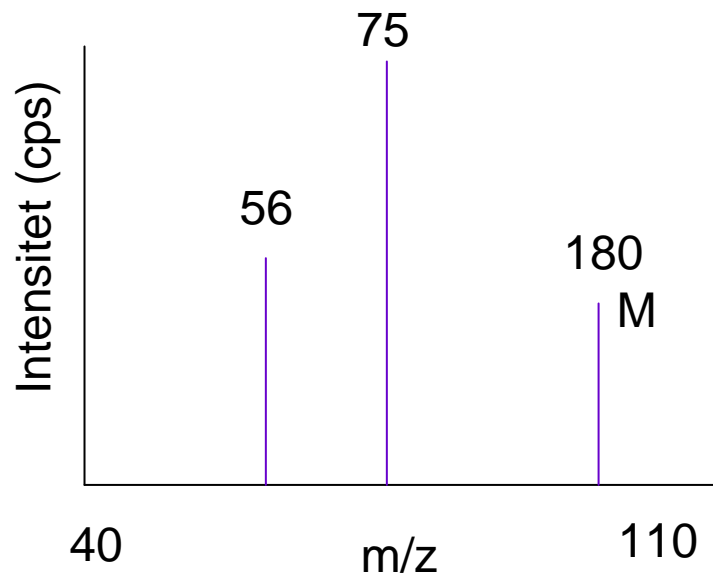
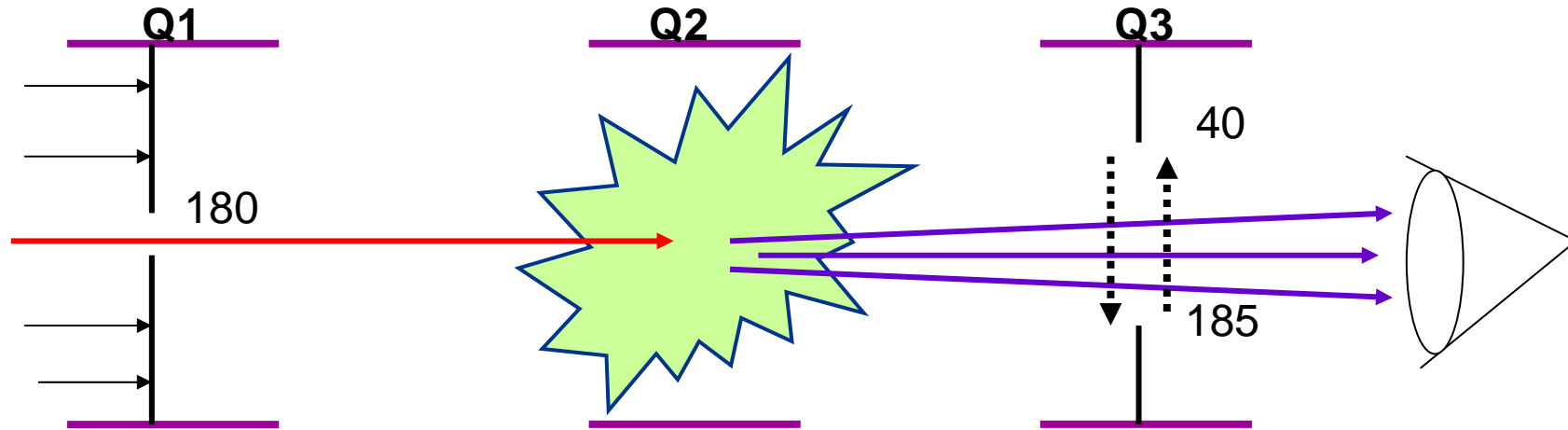


- kun fragment som bærer ladning detekteres



# Utvikle en kvantitativ LC-MSMS metode

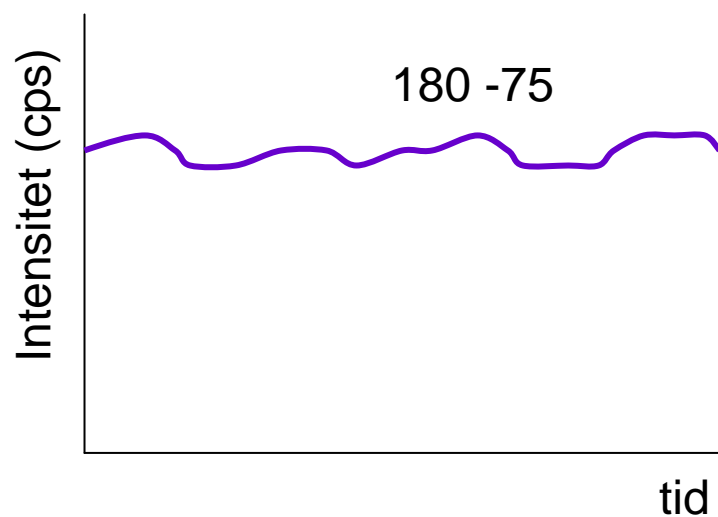
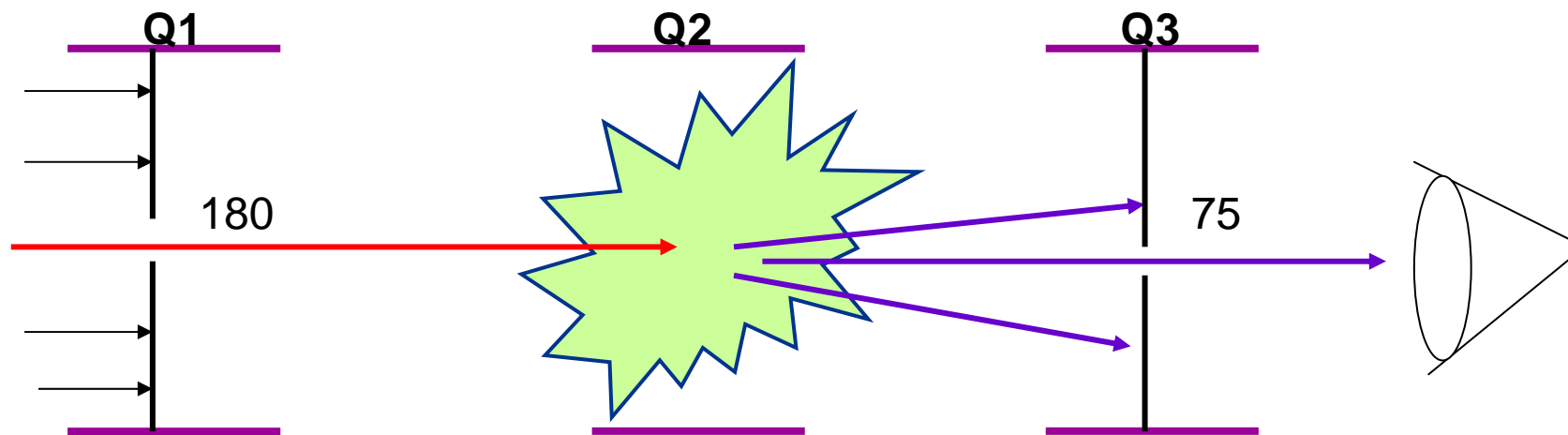
1. Q1 scan , finne molekylion
2. Product Ion Scan av referansestoff



Produktene av 180

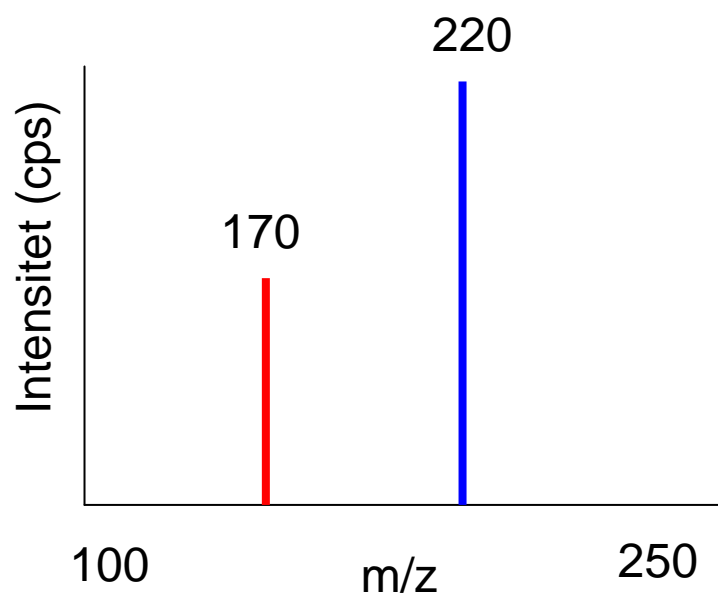
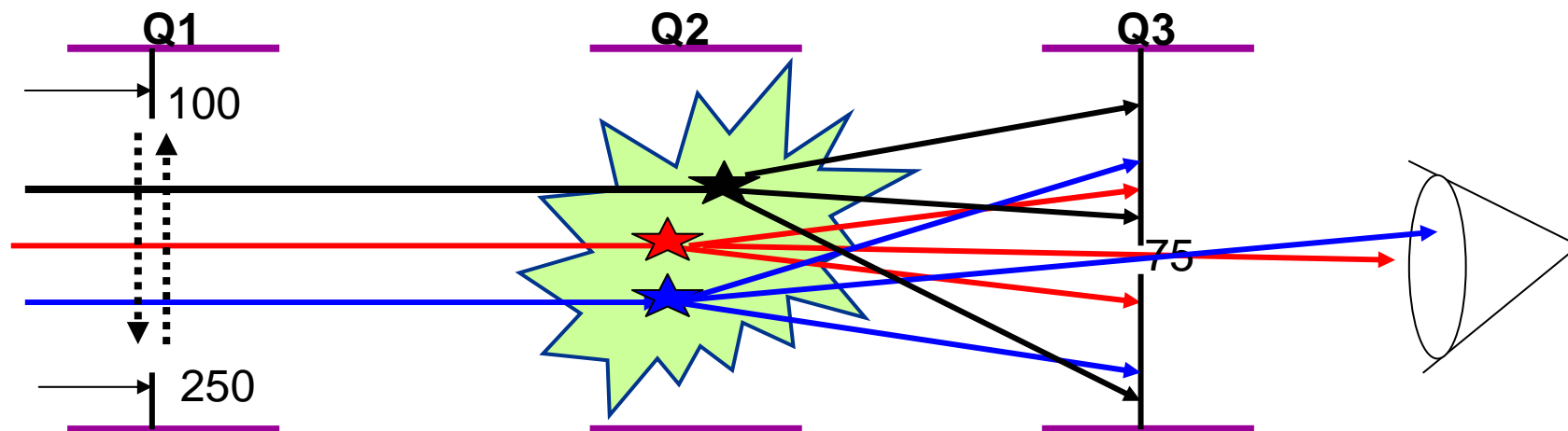
- Finner fragmentene til molekylionet
- Q1 låst på molekylionet (precursor)
- Q2 = kollisjonscelle
- Q3 skanner produktene
- Finner produktionet som gir høyest intensitet

### 3. Multiple Reaction Monitoring MRM



- Q1 låst på molekylionet (precursor)
- Q2 = kollisjonscelle
- Q3 låst på produksjon
- Optimaliserer alle MSMS parametere.

## Precursor Ion Scan



- Finner hvilke molekyllioner som gir ett bestemt fragment.
- Q1 scanner (precursor)
- Q2 = kollisjonscelle
- Q3 låst på ett produkt
- Brukes for klasse spesifikk analyse ( f.eks acylkarnitiner )

## Utvikle eller sette opp en LC-MSMS metode

- MSMS-metoden er nå klar, basert på rent referansestoff.

Metoden skal fungere for reell prøve.

- Behov for prøveopparbeidelse ? Hva vil vi bli kvitt ?
- Behov for kromatografi ?  
Finnes det interferenser som ikke lar seg fjerne med prøveopparbeidelse?  
Hvordan vet vi det ?
- ser ingenting...er det dannet adducter ?

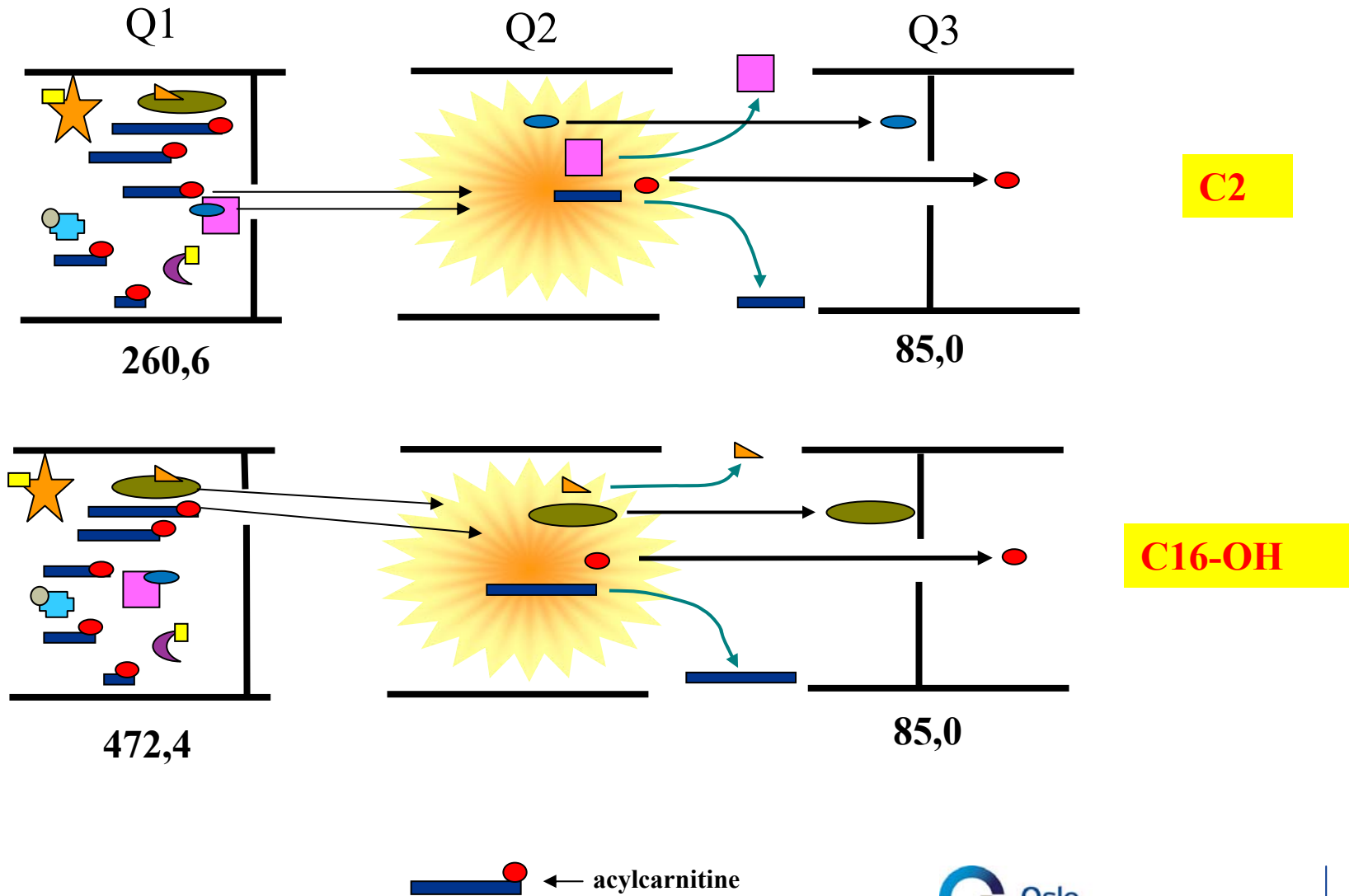
## Eksempel på applikasjon A

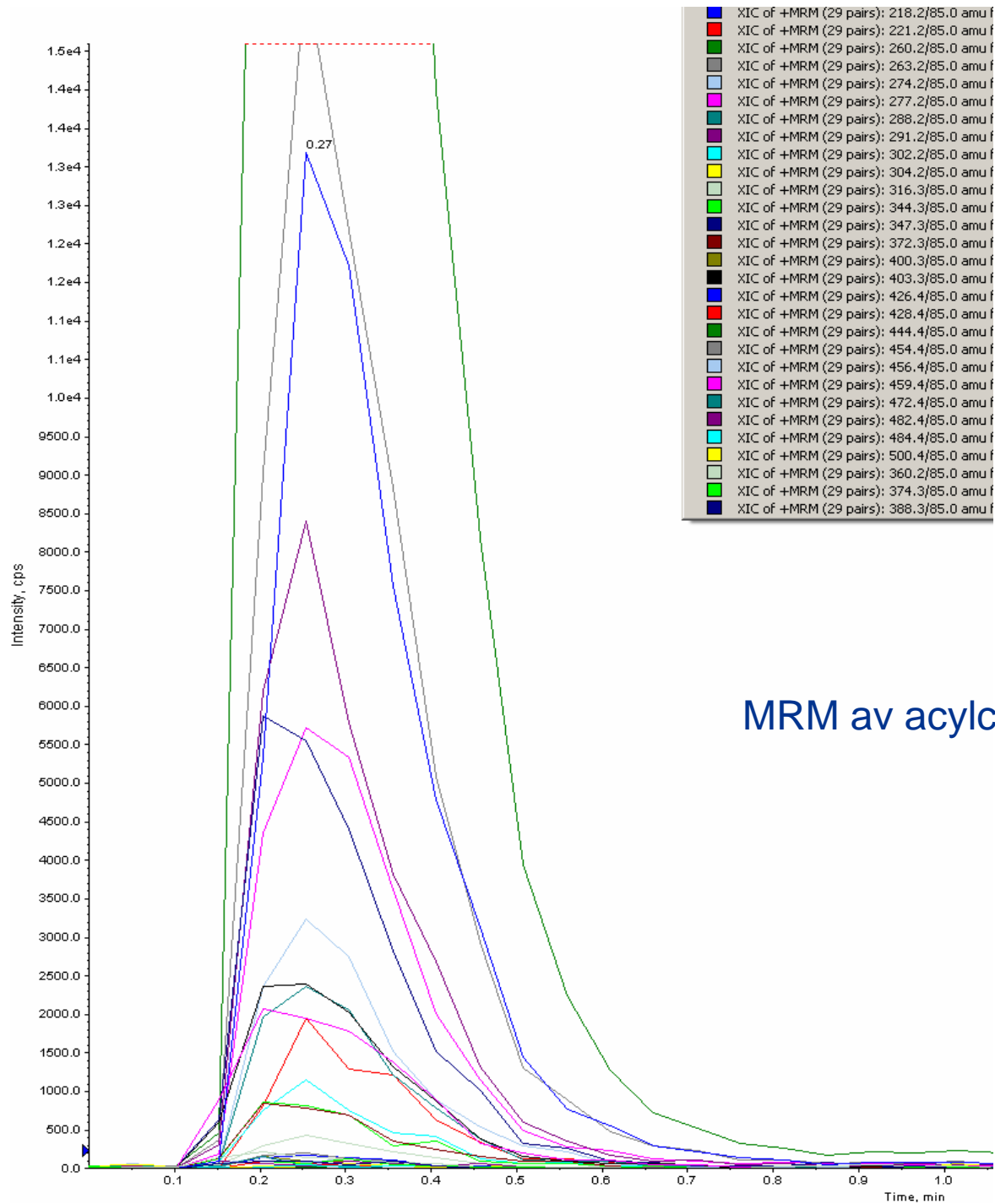
### Kvantitering av acylcarnitiner i plasma :

- plasma + IS + acetonitril for felling av proteiner
- sentrifuger, avpippeter
- dampe inn til tørrhet
- derivatiserer til butylestere
- dampe inn til tørrhet
- ingen kromatografi – direkte MSMS



# Multiple Reaction Monitoring av acylcarnitiner





## MRM av acylcarnitiner

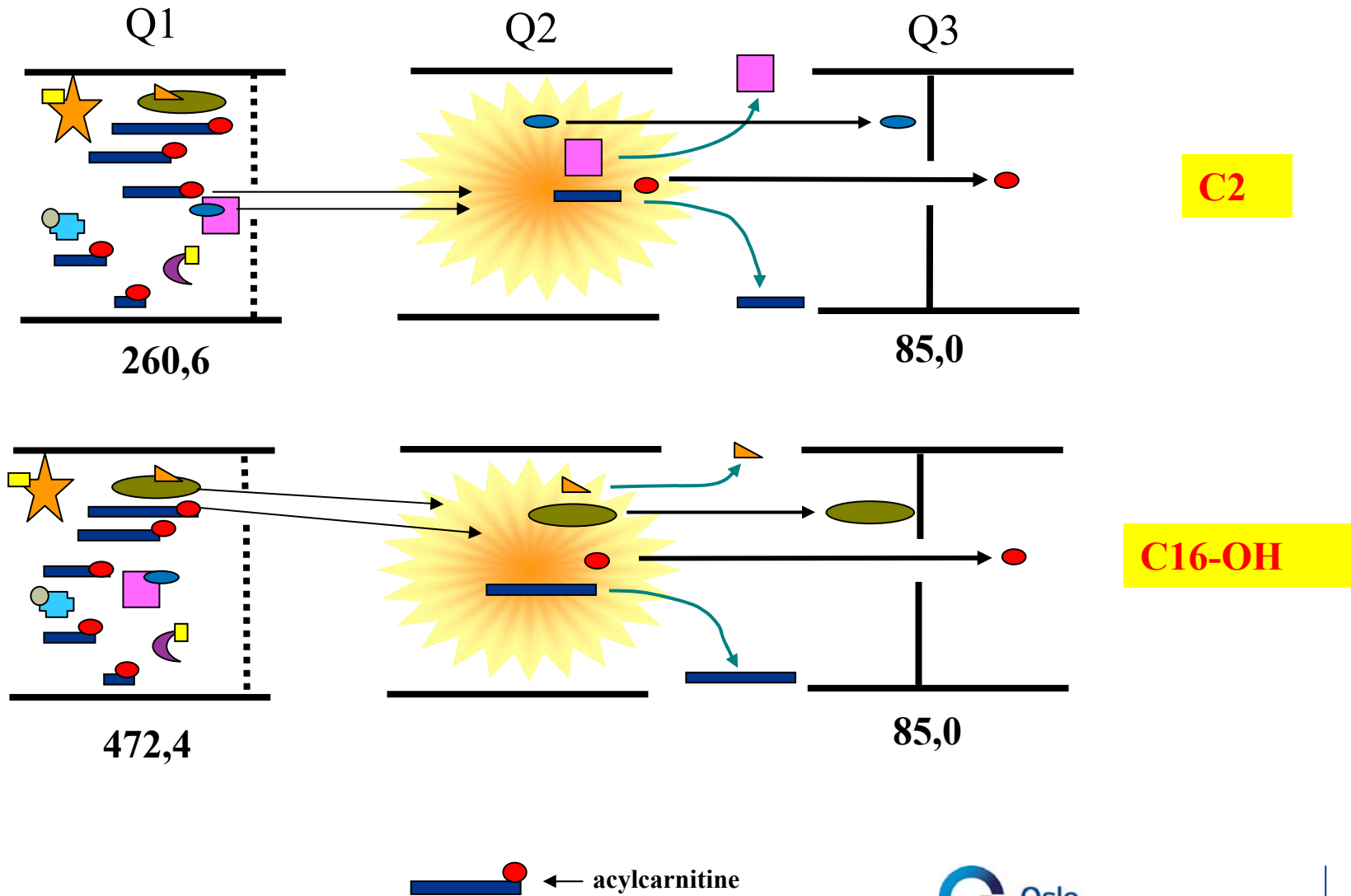
## Hvorfor MRM ?

- bedre sensitivitet, bruker ikke tid på å scanne "uinteressante" m/z
- enkelt å tolke, enkelt å behandle data

## Hvorfor ikke MRM ?

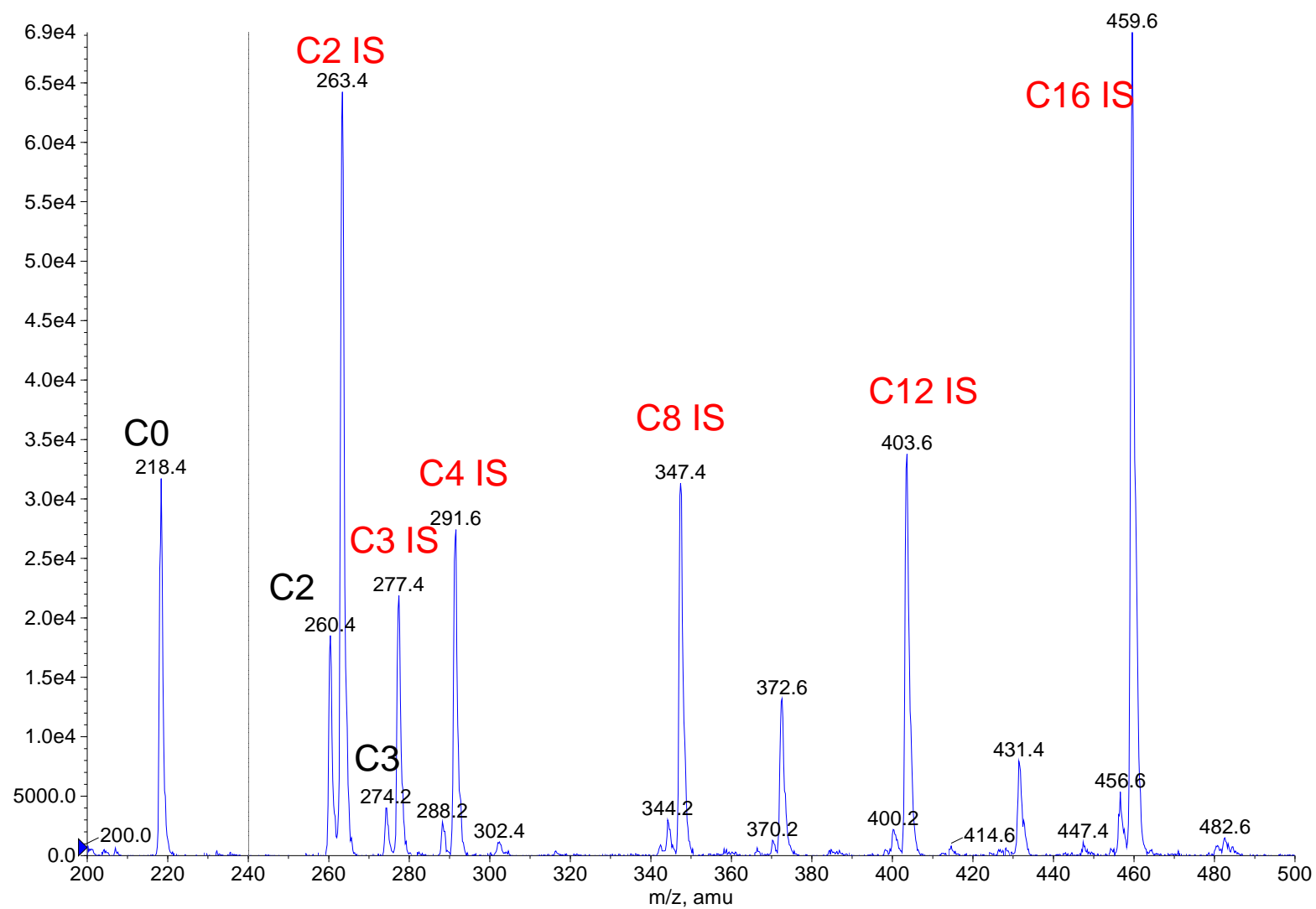
- med MRM ser vi kun det vi har bedt om å få se
- (det man ikke ser kan man få vondt av...!)

## Precursor Ion Scan av acylcarnitiner



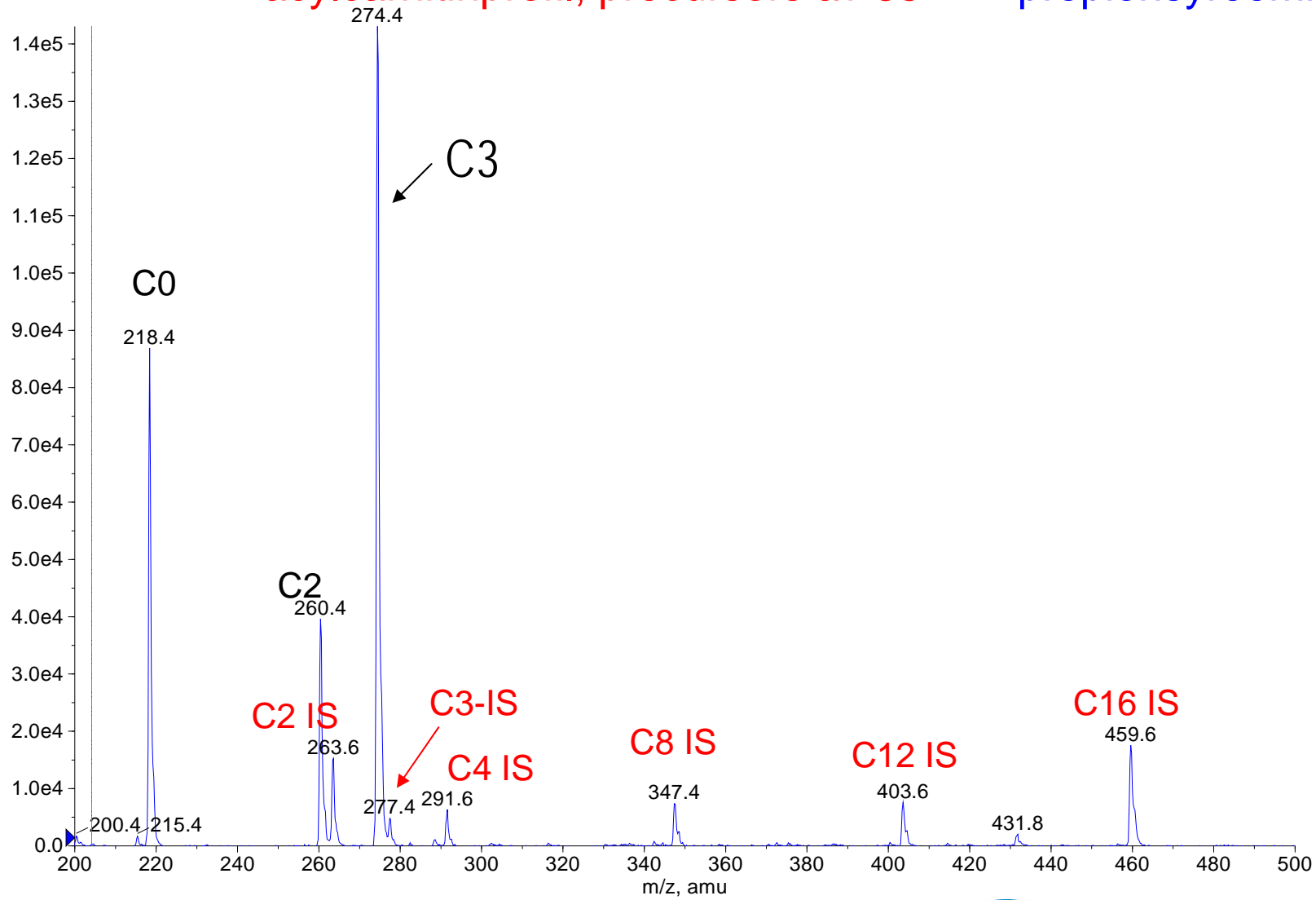
# acylcarnitinprofil, precursors av 85

normal



# acylcarnitinprofil, precursors av 85

# propionsyreemi



## Acylcarnitiner, oppsummert :

Selektiviteten i MSMS-metoden for butylesterne er meget god.

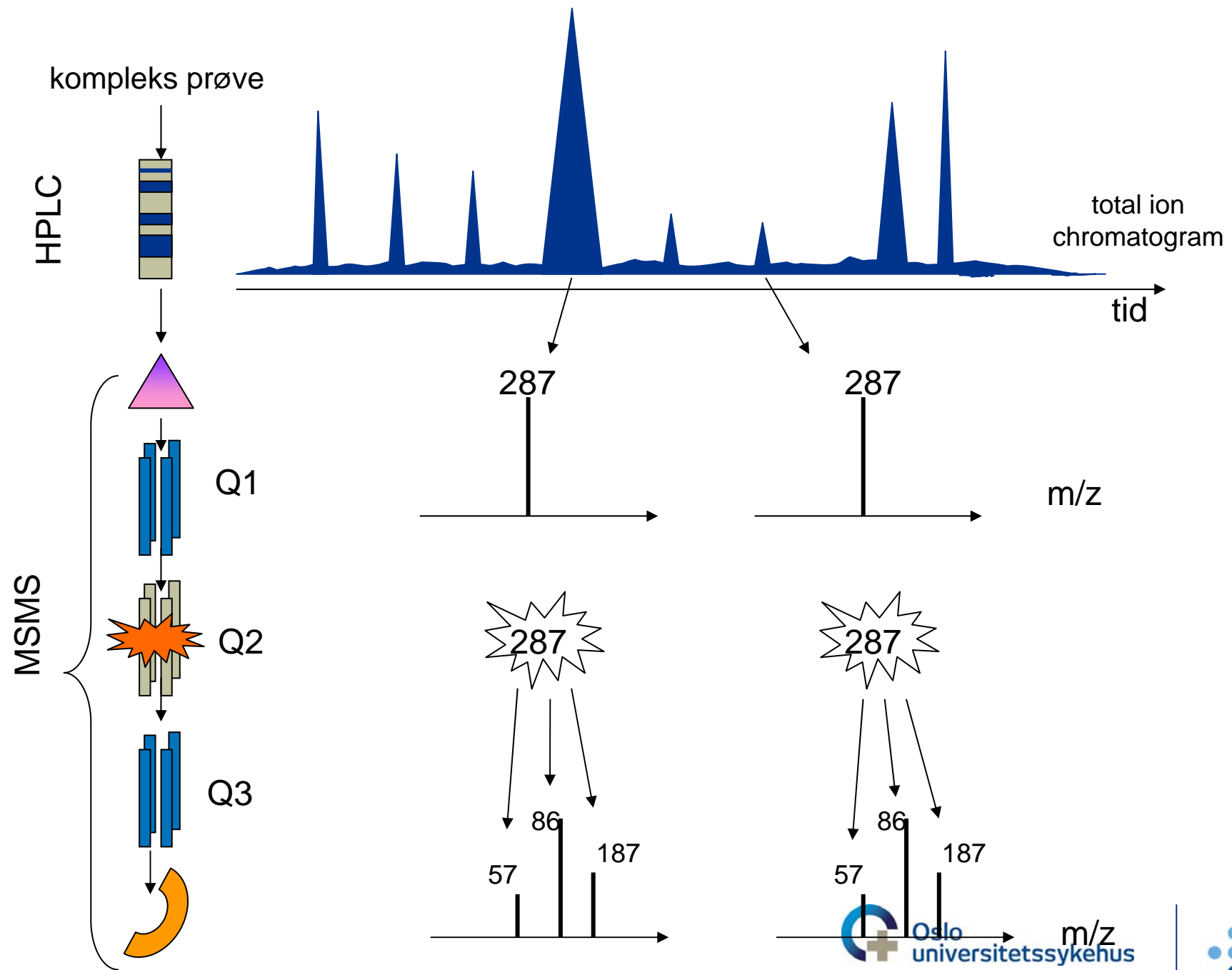
God kjennskap til interferenser.

Kun proteinfelling – derivatisering – direkte MSMS uten kromatografi.

MRM for kvantitering, Precursor Ion Scan for acylcarnitinprofil.

## Hvorfor kromatografi ?

- for å unngå interferenser fra andre stoffer med samme m/z
- for å minske ionesuppresjon og med det øke følsomheten.

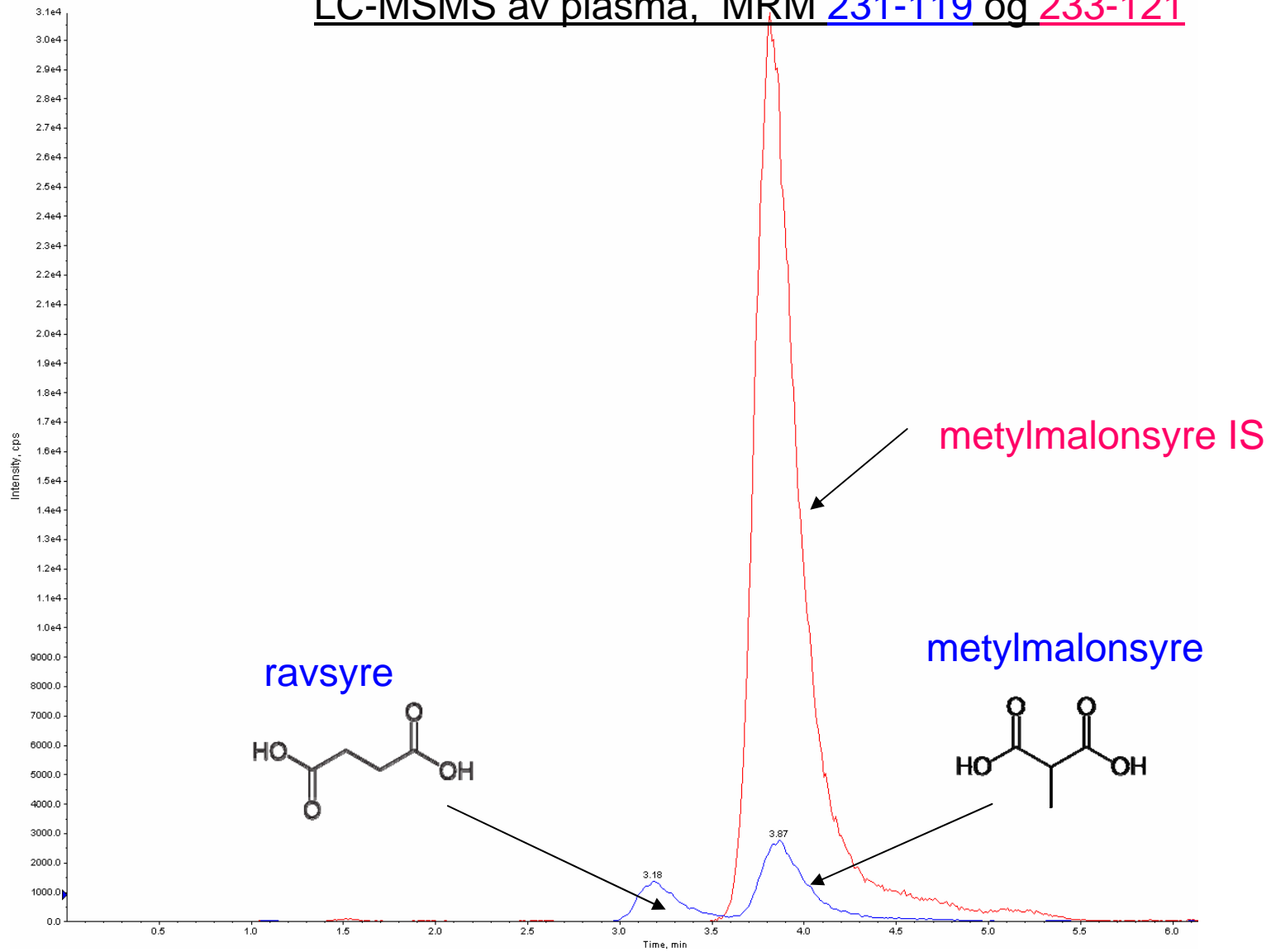


## Eksempel på applikasjon B

### Kvantitering av metylmalonsyre i plasma :

- plasma + IS
- fast fase ekstraksjon, sterk anionbytter
- dampe inn til tørrhet
- derivatiserer til butylestere
- dampe inn til tørrhet – løs i mobilfase
- omvendt fase kromatografi – positiv MSMS med MRM

# LC-MSMS av plasma, MRM 231-119 og 233-121

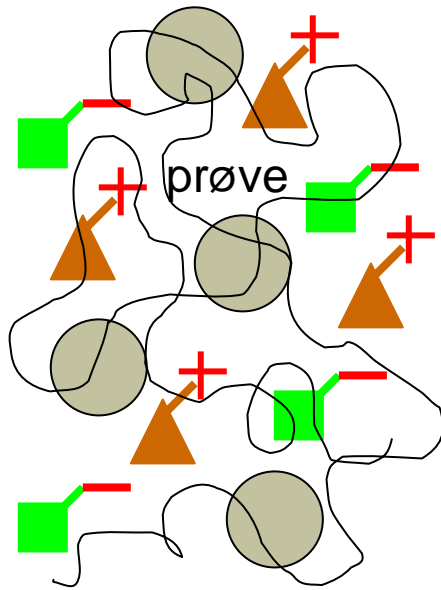


## Hvorfor fast fase ekstraksjon ?

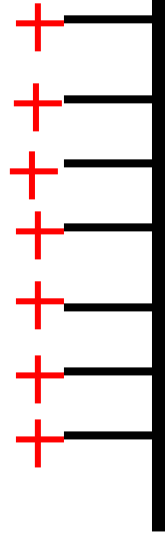
- gir grundigere opprensing av prøve enn proteinfelling og medfører at prøven som injiseres er mindre kompleks.
- bra for kromatografiske kolonner ! økt levetid.

# fast fase ekstraksjon

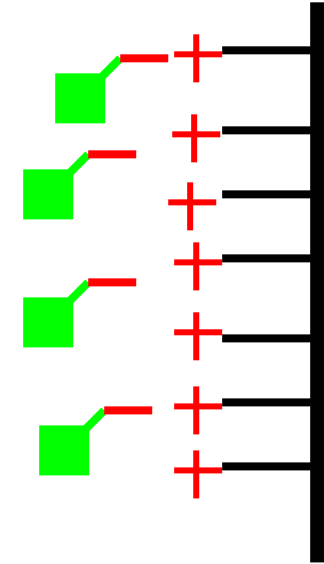
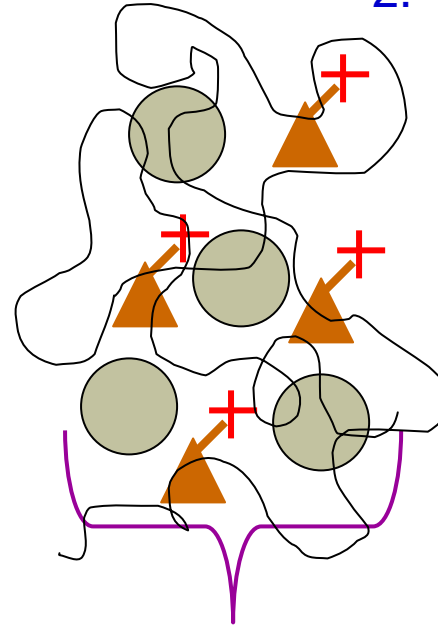
1. load



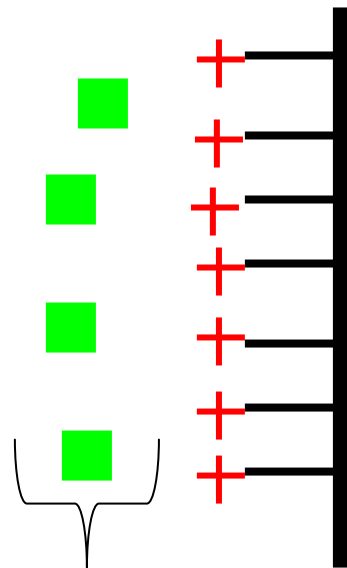
SAX



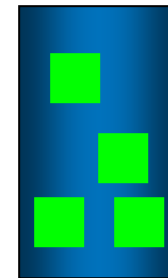
2. vask



3. eluer



4. opprenset prøve



## Metylmalonsyre, oppsummert :

Derivatisering gir god følsomhet, fast fase ekstraksjon gir meget robust analyse.

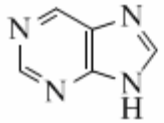
Ravsyre har samme mw som metylmalonsyre og gir samme fragmentering (samme MRM). Må ha kromatografi.

Fast fase ekstraksjon – derivatisering – omvendt fase kromatografi,  
positiv MRM for kvantitering.

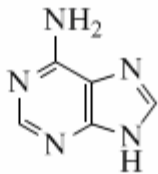
## Eksempel på applikasjon C

LC-MSMS av puriner og pyrimidiner i urin

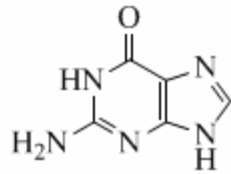
### puriner



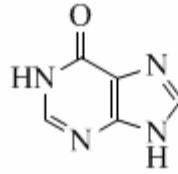
purine



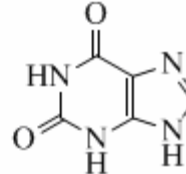
adenine



guanine

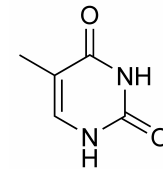


hypoxanthine

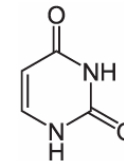


xanthine

### pyrimidiner



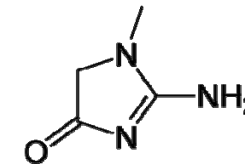
thymine



uracil

## Kvantitering av puriner og pyrimidiner i urin :

- mål kreatinin med standard klinisk kjemi (nedbrytningsprodukt av kreatinfosfat i muskel)
- fortyynn til kreatinin på 1 mmol/L og tilsett IS
- omvendt fase kromatografi (lang kolonne) gradient – **negativ** MSMS med MRM



Mobilfase A: 50mM eddisyre pH4,0

Mobilfase B: 50mM ammonium format pH5,0/MeOH/AcN (2:1:1)

**pyrimidiner :**

Metabolitt	MW	Produkt/Fragment-ion	RT minutter	Anvendt internstandard
<b>uracil</b>	112,1	111/42	3,2	uracil IS
<b>uracil int.std.</b>	114,1	113/43	3,2	
<b>thymin</b>	126,1	125/42	4,4	thymin IS
<b>thymin int. std.</b>	130,1	129/42	4,4	
<b>adenin</b>	135,1	134/107	6,4	adenin IS
<b>adenin int.std. * Q1</b>	136,1	135/108	6,4	
<b>hypoxantin * Q1</b>	136,1	135/92	3,7	hypoxantin IS
<b>hypoxantin int.std. * Q1</b>	138,1	137/93	3,7	
<b>xantin</b>	152,1	151/108	3,8	xantin IS
<b>xantin int.std.</b>	154,1	153/109	3,8	
<b>orotsyre</b>	156,1	155/111	2,5	uracil IS
<b>N-carbamyl-β-alanin</b>	132,1	131/88	2,6	N-carb.-β-alanin IS
<b>N-carb.-β-alanin int.std * Q1</b>	138,1	137/89	2,6	

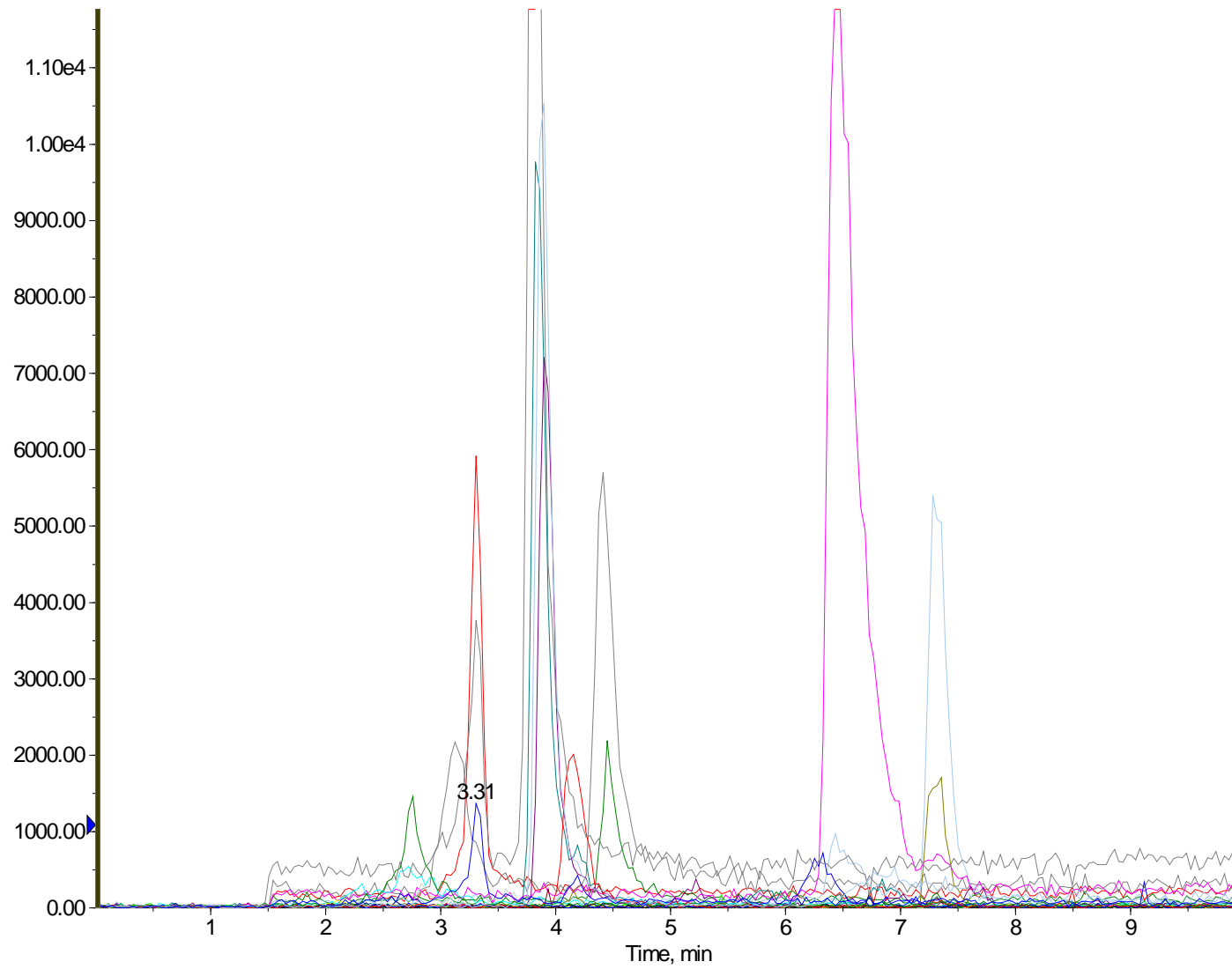


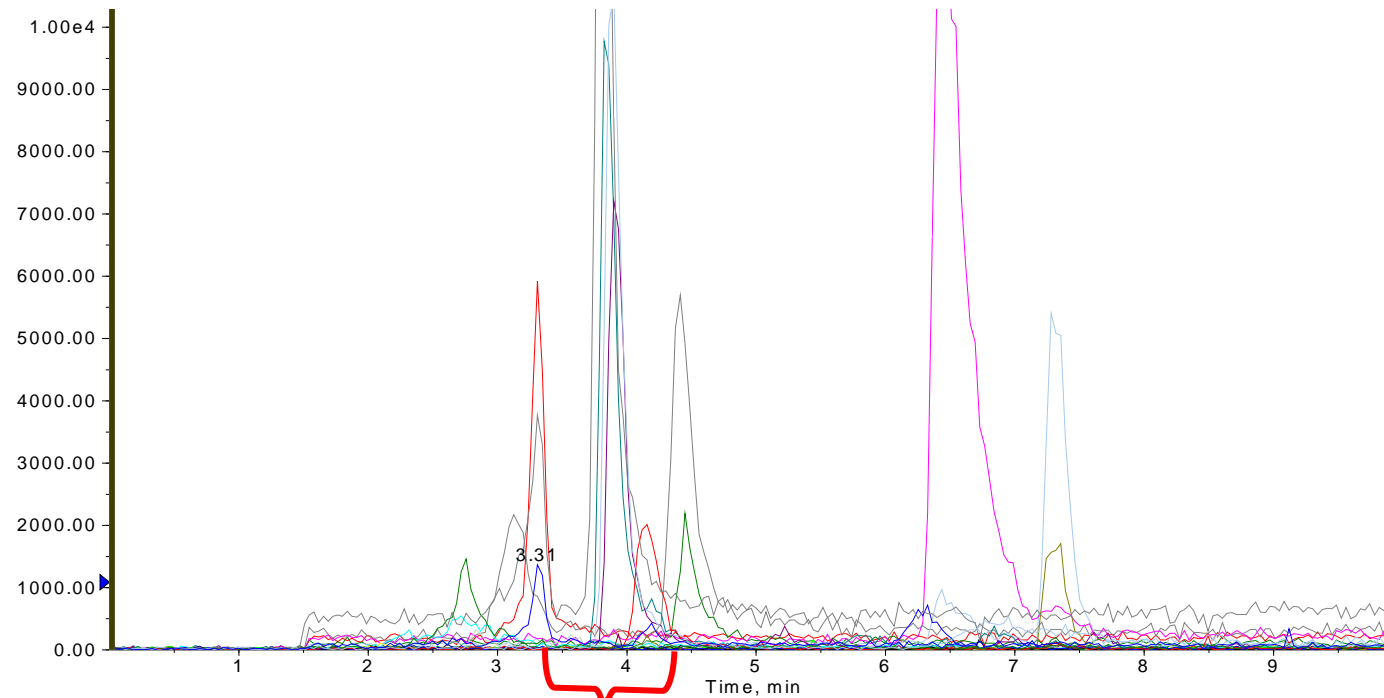
<b>puriner :</b>				
<b>Metabolitt</b> *mw og MRM	<b>MW</b>	<b>Produkt/Fragment-ion</b>	<b>RT minutter</b>	<b>Anvendt internstandard</b>
<b>thymidin</b>	242,2	287/241	5,9	thymidin IS
<b>pseudouridin</b> * MRM	244,1	289/243	2,7	uracil IS
<b>uridin</b> * MRM	244,2	289/243	3,3	uracil IS
<b>deoxyadenosin</b>	251,2	296/45	8,6	adenosin IS
<b>deoxyinosin</b>	252,2	297/251	4,9	adenin IS
<b>deoxyguanosin</b> * MRM	267,2	312/266	5,5	adenin IS
<b>adenosin</b> * MRM	267,2	312/266	7,5	adenosin IS
<b>adenosin int.std.</b>	268,2	313/267	7,5	
<b>inosin</b>	268,2	267/135	4,1	adenin IS
<b>guanosin</b>	283,2	328/282	4,4	adenosin IS



# Puriner og pyrimidiner i urin

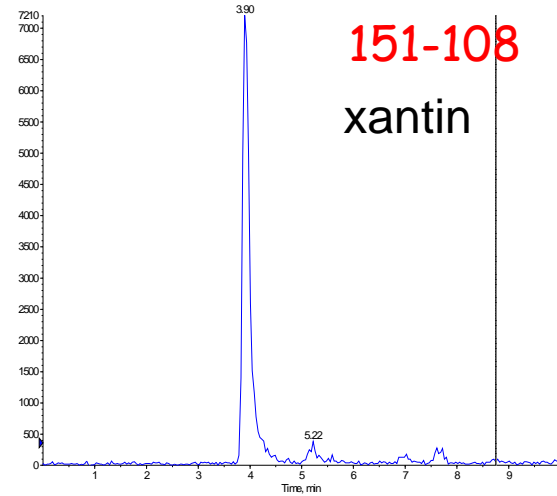
# LC-MSMS negativ ionisering





ekstrahert

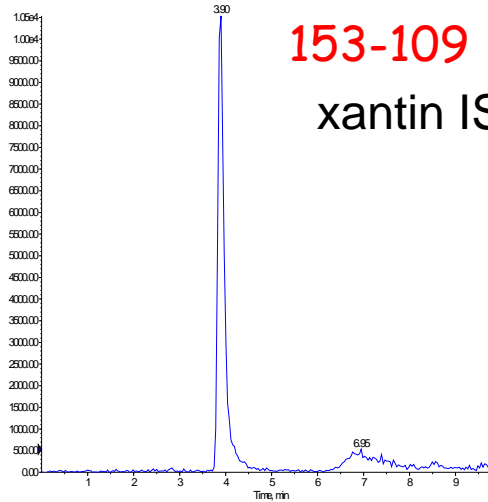
XIC of -MRM(21 pairs): 151.0/108.0 amu from Sample 17 (20051939 P8) of 061205.wiff



**151-108**  
xantin

Max: 7210 cps

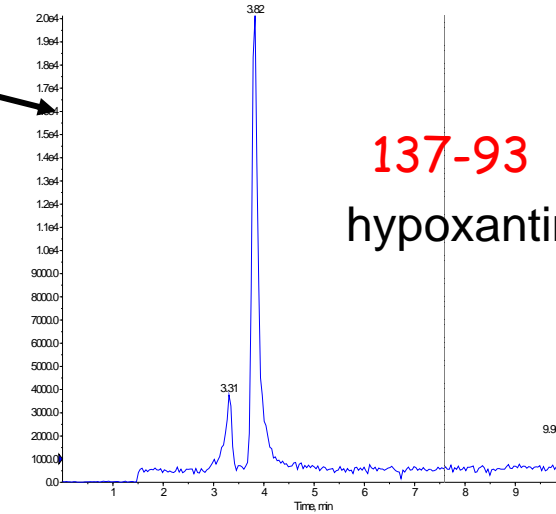
XIC of -MRM(21 pairs): 153.0/109.0 amu from Sample 17 (20051939 P8) of 061205.wiff



**153-109**  
xantin IS

XIC of -MRM(21 pairs): 137.0/93.0 amu from Sample 17 (20051939 P8) of 061205.wiff

Max: 20e4 cps



**137-93**  
hypoxantin IS



## Puriner og pyrimidiner i urin , oppsummert :

Urin langt enklere prøvematriks enn plasma – kun fortynning nødvendig.  
Negativ ionisering gir god nok følsomhet i urin.

Kromatografi nødvendig da flere stoffer har samme MRM

Måler overgang fra format-adduct til molekylion for purinene.

Mål kreatinin – fortynn i hht kreatininverdi – omvendt fase kromatografi med format i mobilfase - negativ MRM for kvantitering.

## Sluttbemerkninger LC-MS

### generelt om prøvematriks :

- blod/plasma/serum : mye proteiner som må fjernes.  
Lav konsentrasjon av analytt.
- urin : høy ionestyrke som må reduseres.  
Høy konsentrasjon av analytt – og interferenser.

### generelt om tubinger/kolonner osv:

- ha egne overganger/tubinger/kolonner for hver applikasjon hvis mulig.
- lag gode loggsystemer, spesielt hvis flere brukere.
- vurder helheten ved oppgradering/ending av metoder.

## Sluttbemerkninger LC-MS

- om du setter opp en publisert metode :  
forstå din analysemetode, hva skjer ved hvert trinn og hvorfor.
- om du utvikler metoden selv :  
heller for omfattende enn for lettvint til du har grundig kunnskap og oversikt over interferenser.
- sjekk robusthet av metoden
- bruk eksterne kvalitetskontroller i tillegg til egne.
- en metode er aldri ferdig validert.....