

DIAGNOSTIKA VYBRANÝCH DĚDIČNÝCH METABOLICKÝCH PORUCH TANDEMOVOU HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ S VYUŽITÍM MODERNÍCH IONIZAČNÍCH TECHNIK

PETR FRYČÁK^{a,*}, KAREL LEMR^a, TOMÁŠ ADAM^{b,*}
a RENATA HUŠKOVÁ^b

^aKatedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, tř. Svobody 8, 771 46 Olomouc,

^bLaboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení konsolidovaných biochemických laboratoří, Fakultní nemocnice Olomouc, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
e-mail: frycak@email.cz, tomasadam@email.cz

Došlo 18.10.01, přepracováno 27.5.02, přijato 3.9.02.

Klíčová slova: diagnostika, metabolické poruchy, hmotnostní spektrometrie

Obsah

1. Úvod
2. Dědičné metabolické poruchy z hlediska biochemie a molekulární biologie
 - 2.1. Poruchy odbourávání mastných kyselin
 - 2.2. Poruchy odbourávání aminokyselin
 - 2.3. Poruchy metabolismu žlučových kyselin
 - 2.4. Poruchy odbourávání purinových a pyrimidinových bází a nukleosidů
3. Přístrojové vybavení a postupy pro hmotnostně spektrometrické sledování metabolitů
 - 3.1. Odběr klinického vzorku
 - 3.2. Příprava vzorku k analýze
 - 3.3. Zavádění vzorku, spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a kapilární elektroforézou
 - 3.4. Iontové zdroje
 - 3.5. Analyzátor iontů, skenovací režimy
 - 3.6. Zpracování a vyhodnocení primárních dat
4. Závěr

1. Úvod

Během posledního desetiletí došlo k rychlému rozvoji a velkému rozšíření iontových zdrojů pracujících za atmosférického tlaku, tj. ionizace elektrospřejem (Electrospray Ionisation – ESI), příp. chemické ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation – APCI). Tyto techniky umožňují kontinuální zavádění kapalných vzorků do iontového zdroje a jsou vhodné pro analýzu látek od středně polárních až po iontové. Takové vlastnosti je (vedle starších technik Fast Atom Bombardment – FAB a Liquid Secondary

Ion Mass Spectrometry – LSIMS) činí mimořádně vhodnými pro analýzu nízkomolekulárních metabolitů. Hmotnostní detektor a případně on-line spojení se separační technikou (vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií nebo kapilární elektroforézou) zajišťují dostatečnou selektivitu stanovení v tak komplexních matricích, jako jsou moč, krev, plazma nebo sérum. Pro řadu skupin především polárních analytů (např. aminokyseliny, acylkarnitiny) je technika ESI/MS/MS, příp. APCI/MS/MS vhodnější než GC/MS, která v takových případech vyžaduje náročnější přípravu vzorků. Moderní ionizační techniky dovolily vyvinout systémy schopné analyzovat několik stovek vzorků za den a automaticky vyhodnotit získaná data¹.

Dědičné metabolické poruchy (DMP) jsou vzácně se vyskytující onemocnění – incidence se pohybuje od cca 1 : 10 000 v případě např. fenylketonurie až k 1 : 500 000 u velmi vzácných poruch; jejich kumulativní incidence je 1 : 500. Klinické příznaky jsou často natolik nespecifické, že včasné stanovení koncentrace příslušných metabolitů v rámci screeningového programu během několika prvních dní po narození může být jedinou cestou, jak určit diagnózu dříve, než nastanou nevratné patologické změny v organismu pacienta. Tato diagnostika vyžaduje stanovení řady analytů ve velkém počtu vzorků (řádově desítky až stovky tisíc ročně). Dostatečné selektivity a prostupu vzorků lze dosáhnout použitím MS (cit.²).

Tento přehledný referát se zaměřuje na DMP, které lze diagnostikovat na základě stanovení aminokyselin, acylkarnitinů, organických kyselin (karboxylové kyseliny C3 až C6 a jejich hydroxy- a ketoderiváty), vyšších mastných kyselin, žlučových kyselin a purinových a pyrimidinových látek. Využití ESI/MS/MS a APCI/MS/MS pro tyto skupiny metabolitů zjednodušilo analýzu oproti tradičním GC/MS nebo jiným metodám, což v některých vyspělých státech umožnilo rozběhnout rozsáhlé screeningové programy.

2. Dědičné metabolické poruchy z hlediska biochemie a molekulární biologie

Příčinou DMP jsou mutace genů sloužících jako předloha při proteosyntéze. Vzniká abnormální protein s pozměněnou sekvencí aminokyselinových zbytků. Jeho funkčnost (nejčastěji katalytická aktivita) může být zcela nebo z velké části zachována, pokud se změna sekvence vyskytuje mimo vazebná místa substrátu a koenzymu. V opačném případě je aktivita enzymu podstatně snížena nebo je nulová. Aktivita abnormálního enzymu u konkrétního jedince odpovídá široké škále klinických projevů DMP od asymptomatického průběhu až po těžké poškození tkání, selhání orgánů a předčasnou smrt.

Přerušení metabolické dráhy na místě odpovídajícím nefunkčnímu enzymu způsobí hromadění substrátu a nedostatek produktu enzymové reakce. Nevyužitý substrát může být me-

* Autor pro korespondenci

Tabulka I
Poruchy odbourávání mastných kyselin

DMP	Diagnosticky významné metabolity ^a	Lit.
<i>Poruchy transportu acyl-CoA do matrix mitochondrií:</i>		
Deficience karnitinpalmitoyltransferasy II nebo karnitinacylkarnitintranslokasy ^{b,c}	acylkarnitiny C14, C16:1, C16, C18:2, C18:1, C18	5–7
<i>Poruchy β-oxidace:</i>		
Deficience dehydrogenasy acyl-CoA s krátkým řetězcem	acylkarnitiny C2, C4, C5	1,7
se středním řetězcem	acylkarnitiny C2, C6, C8, C10:1, C10	1,7–9
s dlouhým řetězcem	acylkarnitiny C14:2, C14:1, C16, C18:1, C18	1,7,10
Deficience peroxisomální dehydrogenasy acyl-CoA s velmi dlouhým řetězcem ^d	mastné kyseliny C20, C22, C24, C26	11
Deficience dehydrogenasy hydroxyacyl-CoA s dlouhým řetězcem	3-hydroxyacylkarnitiny C16, C18:1, C18, acylkarnitiny C14:1, C14	7,12
Porucha více acyl-CoA dehydrogenas (glutarová acidurie II)	acylkarnitiny C2, C3, C4, C5, C6, C8, C10, glutaryl-	1,7

^aUvedeny jsou i metabolity, které jsou použity k vyhodnocení nálezu porovnáním koncentrace akumulovaného a „referenčního“ metabolitu, ^b nelze rozlišit jen na základě stanovení acylkarnitinů¹⁰, ^c existuje i deficience karnitinpalmitoyltransferasy I, je ale mnohem vzácnější, ^d mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (C20 a vyšší) jsou katabolizovány v peroxisomech modifikovanou formou β -oxidace

tabolizován jiným enzymem za vzniku odlišného produktu. Patologicky může působit hromadění substrátu i přítomnost alternativního produktu (nebo více produktů), stejně jako nedostatek produktu zastavené reakce.

2.1. Poruchy odbourávání mastných kyselin^{3,4}

Katabolismus mastných kyselin, známý jako β -oxidace, se odehrává především v mitochondriích, i když podobnou enzymatickou výbavu obsahují i peroxisomy. DMP katabolismu mastných kyselin mohou být důsledkem poruchy transportu mastných kyselin do mitochondriální matrix nebo poruchy vlastní β -oxidace. Pro diagnostiku se využívá stanovení acylkarnitinů v plazmě nebo plné krvi (resp. krevních skvrnách na filtračním papíře, viz dále). V tabulce I jsou uvedeny jednotlivé poruchy a jim odpovídající diagnosticky významné metabolity spolu s citacemi odkazujícími na jejich detekci nebo stanovení hmotnostní spektrometrií.

2.2. Poruchy odbourávání aminokyselin¹³

Katabolismus aminokyselin se skládá z odstranění α -aminoskupiny transaminací a z následného odbourání uhlíkového řetězce na prekuzory nebo meziproducty citrátového cyklu. DMP se mohou týkat jak enzymů katalyzujících odbourání uhlíkového řetězce aminokyselin, tak enzymů močovinového cyklu. Pro diagnostiku se využívá stanovení aminokyselin, acylkarnitinů, acylglycinů (detoxikačních produktů) a organických kyselin v plazmě a moči. Jednotlivé poruchy a odpovídající diagnosticky významné metabolity jsou uvedeny v tabulce II.

2.3. Poruchy metabolismu žlučových kyselin

Žlučové kyseliny jsou biosyntetizovány v peroxisomech z cholesterolu. To mimo jiné zahrnuje zkrácení postranního řetězce tri-, resp. dihydroxycholestanové kyseliny β -oxidací za vzniku cholové, resp. deoxycholové kyseliny. Proto je stanovení různých žlučových kyselin a jejich konjugátů (nejčastěji s glycinem a taurinem) použitelné v diagnostice peroxisomálních poruch.

K diagnosticky významným metabolitům patří glykotrihydroxycholová²⁴, taurocholová²⁵, taurotrihydroxycholová²⁴, taurotetrahydroxycholová²⁴, taurotrihydroxycholestanová^{24,25} a taurotetrahydroxycholestanová kyselina^{24–26} a C29-dikarboxylová žlučová kyselina^{25,26}. Stanovení uvedených metabolitů se provádí v moči^{24,26,27}, plazmě nebo séru^{25,26} a ve žluči²⁶.

2.4. Poruchy odbourávání purinových a pyrimidinových bází a nukleosidů¹³

Lidský organismus katabolizuje hlavní purinové nukleosidy adenosin a guanosin až na kyselinu močovou, která je vylučována v moči. Pyrimidinové nukleosidy uracil, resp. thymin jsou odbourávány na β -alanin, resp. β -aminoisomáselnou kyselinu (další katabolismus vede přes malonaldehyd, resp. methylmalonmonoaldehyd k malonyl-CoA, resp. sukci-nyl-CoA, což jsou metabolity zapojené do biosyntézy mastných kyselin, resp. do citrátového cyklu).

Hmotnostní spektrometrie v diagnostice poruch spojených s touto skupinou metabolitů představuje relativně nejméně propracovanou oblast. Metabolity se stanovují v moči. V tabulce III jsou uvedeny konkrétní poruchy a jim odpovídající metabolity.

Tabulka II
Poruchy odbourávání aminokyselin

DMP	Diagnosticky významné metabolity ^a	Lit.
<i>Poruchy odbourávání uhlíkového řetězce:</i>		
Hyperfenylalaninemie ^b	Phe, Tyr	1,14–16
Deficience systému odbourávajícího glycin (neketotická hyperglycinemie)	Gly	1
Deficience dehydrogenasy 2-ketokyselin s rozvětveným řetězcem (nemoc javorového sirupu)	Leu, Ile, Val, Phe	1,17
Deficience fumarylacetoacetáthydrolasy (tyrosinemie I)	Phe, Tyr	1,16
Deficience jaterní tyrosintransaminasy (tyrosinemie II)	Phe, Tyr	1,16
Deficience isovaleryl-CoA-dehydrogenasy (isovalerová acidurie)	acylkarnitiny C2, C5 v moči: isovalerylglycin, 3-hydroxyisovalerová kyselina	1,6,10 18,19
Deficience 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-lyasy (3-hydroxy-3-methylglutarová acidurie)	hydroxyacylkarnitin C5, methylglutaryl-karnitin v moči: 3-hydroxyisovalerová kyselina, 3-hydroxy-3-methylglutarová kyselina, 3-methylglutakonová kyselina, 3-methylglutarová kyselina	1 18
Deficience glutathionsynthetasy (pyroglutamová acidurie)	pyroglutamová kyselina, Phe v moči: pyroglutamová kyselina	1 20
Deficience histidinamoniaklyasy (histidinemie)	v moči: His	20
Deficience homogentisát oxidasy (alkaptonurie)	v moči: homogentisová kyselina	20
Deficience glutaryl-CoA-dehydrogenasy (glutarová acidurie I)	glutaryl-karnitin ^c	1,6,10
Deficience cystathionin-β-synthasy (homocystinurie)	Met	1
Deficience prolindehydrogenasy/ glutamát-5-semialdehyddehydrogenasy ^d (hyperprolinemie)	Pro, Phe	1
Deficience β-ketothiolasy	acylkarnitiny C5:1, hydroxy-C5	1
Vícenásobná deficience karboxylasy	acylkarnitiny C2, C3, hydroxy-C5	1
Deficience 3-methylkrotonyl-CoA-karboxylasy	hydroxyacylkarnitin C5	6
Deficience propionyl-CoA-karboxylasy (propionová acidemie)	acylkarnitiny C2, C3 v moči: methylcitronová kyselina, tiglylglycin, propionylglycin	1,10,21 18
Methylmalonová acidurie ^e	methylmalonová kyselina, acylkarnitiny C2, C3 v moči: methylmalonová kyselina, methylcitronová kyselina	1,10,21,22 18,22
<i>Poruchy cyklu močovinny:</i>		
Deficience ornithinkarbamoyltransferasy	v moči: orotová kyselina, uracil	23
Deficience argininsukcinátsynthetasy (citrulinemie)	citrulin, Phe, Tyr	1
Deficience argininsukcinátlyasy (argininsukcináturie)	citrulin, Tyr v moči: argininjantarová kyselina	1 18

^a Stanovení v krvi nebo plazmě, pokud není uvedeno jinak; uvedeny jsou i metabolity, které jsou použity k vyhodnocení nálezu porovnáním koncentrace akumulovaného a „referenčního“ metabolitu, ^b existují hyperfenylalaninemie z deficience fenylaninhydroxylasy a deficience enzymů biopterinového metabolismu, ^c ostatní acylkarnitiny mají normální hodnoty – odlišeni od glutarové acidurie II, ^d citovaná publikace nespécifikuje, o který z enzymů jde, ^e existuje několik enzymů jejichž deficience způsobuje methylmalonovou acidurii: methylmalonyl-CoA-mutasa a dále enzymy zodpovědné za tvorbu adenosylkobalaminu, což je koenzym uvedené mutasy

Tabulka III
Poruchy odbourávání purinových a pyrimidinových bází a nukleosidů

DMP	Diagnosticky významné metabolity	Lit.
Deficience adenosindeaminasy	adenosin, deoxyadenosin	23
Deficience purinnukleosidfosforylasy	inosin, deoxyinosin, guanosin, deoxyguanosin	23
Deficience xanthinoxidasy	xanthin, hypoxanthin	23
Deficience molybdenového kofaktoru	xanthin	23
Deficience adeninfosforibosyltransferasy	adenin, dihydroxyadenin	23
Deficience adenylsukcinasy	sukcinyladenosin	23
Deficience dihydroypyrimidindehydrogenasy	uracil, thymín, 5-hydroxymethyluracil	23,28
Deficience orotátfosforibosyltransferasy anebo orotidylátdekarboxylasy	orotová kyselina	23

3. Přístrojové vybavení a postupy pro hmotnostně spektrometrické stanovení metabolitů

3.1. Odběr klinického vzorku

Jak již bylo naznačeno, pro účely diagnostiky DMP se odebírá buď moč nebo krev, která se dále může zpracovat na plazmu nebo sérum. Kromě klasického způsobu odběru „do zkumavky“ se zejména pro screeningové programy uplatňuje odběr moči a plné krve na kartu filtračního papíru. Na kartě je vyznačeno kolečko, do nějž se nechá nasáknout několik kapek moči nebo krve. Další možností je proužek filtračního papíru umístěný do plenek novorozence, případně ponořený do nádobky s odebranou močí. Po nasáknutí vzorkem se karta nebo proužek nechají vysušit. Vzorek na filtračním papíře má řadu výhod: stabilita analytů v pevné fázi, snadná technika odběru, pohodlná manipulace a transport.

V klinické laboratoři je z karty na příslušném místě speciálním přístrojem vyraženo kolečko přesného průměru a umístěno do vialky nebo jamky mikrotitrační destičky, ve které probíhá další zpracování. Proužky nasáklé vzorkem jsou zpracovávány celé nebo se vezme jejich definovaná část. Objem krve nebo moči připadající na určitou plochu papíru je stanoven předem např. takto²⁹: vytvoří se dvě skvrny vzorku se standardním přídatkem analytu. Druhá skvrna musí obsahovat definovaný objem vzorku (V). Z první skvrny se vyrazí kolečko o přesné ploše (S), druhá se vystříhne celá. Proveďte se stanovení analytu v obou vzorcích. Objem vzorku připadající na jednotkovou plochu filtračního papíru (V_S) je pak definován takto:

$$V_S = (m_1 \cdot V) / (m_2 \cdot S)$$

kde m_1 , resp. m_2 jsou stanovené hmotnosti analytu v části první skvrny o ploše S , resp. v druhé skvrně.

Nutnou podmínkou tedy je, aby k analýze odebraný papír byl kompletně napuštěný vzorkem – tak je možné dosáhnout postačující přesnosti a správnosti stanovení.

3.2. Příprava vzorku k analýze

V případě vzorků na filtračním papíře je nutné analyty nejdříve převést zpět do roztoku extrakcí vodou¹⁴ nebo směsí vody a methanolu²³ za podpory sonikace nebo třepání.

Stanovení koncentrace analytů se provádí metodou přídatku isotopově značených standardů (viz 3.6.). Tyto standardy bývají nejčastěji přidány do rozpouštědla, kterým se extrahuje papír, případně ještě před vlastní extrakcí je definovaný objem roztoku standardů napipetován na proužek papíru napuštěný vzorkem^{23,28}.

Po extrakci je vzorek podroben odstředění, příp. filtraci a supernatant (filtrát) je převeden do čistě vialky nebo jamky mikrotitrační destičky. Takto připravené vzorky se buď přímo analyzují, anebo se provádí derivatizace.

Ke kapalným vzorkům moči nebo plazmy se přidává roztok isotopově značených standardů a po případné deproteinizaci acetonitrilem a centrifugací se zpracovávají podobně jako extrakty z papíru.

Metody stanovení acylkarnitinů a většina metod stanovení aminokyselin využívají derivatizace analytů na butylestery. Esterifikují se karboxyly aminokyselin, karnitinu a acylů s dvěma karboxylovými skupinami. Blokování těchto skupin zabraňuje výskytu analytů ve formě neutrálních amfiontů a (v případě sloučenin se dvěma nebo více karboxylovými skupinami) záporně nabitých iontů již v roztoku. To výrazně zvyšuje podíl kladně ionizovaných molekul analytu v iontovém zdroji. Zvýšení účinnosti ionizace má za následek snížení detekčního limitu metody².

Před derivatizací se extrakt odpaří do sucha v proudu dusíku. K odparku se přidává 3 M-HCl v butan-1-olu příp. směs acetylchloridu a butanolu. Esterifikace probíhá 15 až 30 minut při teplotě 65 °C. Pak se přebytečný butanol a HCl odpaří v proudu dusíku. Nakonec se odparek rozpustí v rozpouštědle vhodném pro další analýzu (viz 3.3.).

Žlučové kyseliny se ze vzorku moči, krve, plazmy nebo i žluči izolují extrakcí pevnou fází na C-18 kolonkách^{24,26,27}. Jiný postup²⁵ je založen na přídatku roztoku isotopově značených standardů a acetonitrilu k plazmě. Po centrifugaci se supernatant odpaří k suchu, odparek se rozpustí a analyzuje.

Purinové a pyrimidinové metabolity se pouze extrahu-

jí z proužků filtračního papíru bez další derivatizace^{23,28}.

Metoda pro stanovení mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem využívá jejich převedení na dimethylaminoethyls-tery¹¹.

3.3. Zavádění vzorku, spojení s vysokoučinnou kapalinovou chromatografií a kapilární elektroforézou

Největší přínos zejména pro screening lze připsat aplikacím, které se obejdou bez předchozí separace vzorku na chromatografické koloně. Do tohoto stadia byly dopracovány některé metody stanovení acylkarnitinů, aminokyselin a mastných kyselin s dlouhým řetězcem. K tomu přispěla zejména skutečnost, že měkké ionizační techniky poskytují jednoduché pseudomolekulární ionty analytů, a ne fragmenty, tak jako elektronová ionizace. Systém pro analýzu bez on-line separace se skládá z HPLC čerpadla, automatického dávkovače a hmotnostního spektrometru, které jsou zapojeny v sérii. Čerpadlo zajišťuje kontinuální průtok v řádu desítek $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Složení „mobilní fáze“ je podobné jako v případě chromatografie na reverzní fázi (viz níže). Automatický dávkovač v pravidelných intervalech dvou až pěti minut nastříkuje vzorky (5 až 20 μl) – jedná se tedy o průtokovou analýzu.

Spojení HPLC/MS/MS je nutné využít zejména tehdy, kdy je potřeba rozdělit isomery nerozlišitelné ani tandemovou hmotnostní spektrometrií (což jsou v rámci diagnostiky DMP výjimečné případy), nebo je účinnost ionizace pro dané analyty snižována současnou přítomností složek matrice v iontovém zdroji a signál se ztrácí v šumu^{23,28}. HPLC se pak realizuje na běžných analytických kolonách C-18 délky 100–250 mm, někdy i kratších^{22,25}. Pracuje se isokraticky nebo gradientovou elucí, pH mobilní fáze (směs methanolu nebo acetonitrilu

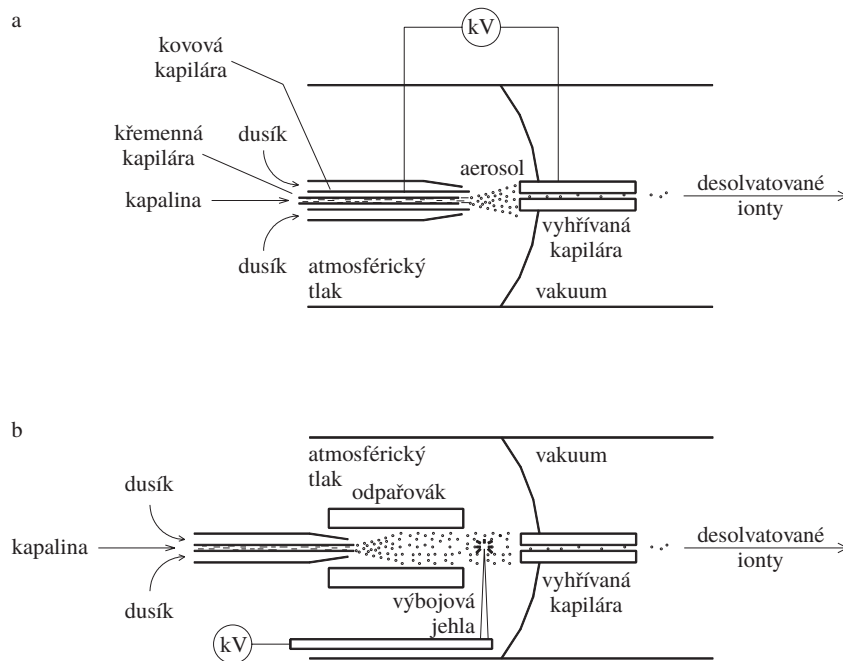
a vody) bývá upraveno přidávkem kyseliny (mravenčí, octová, trifluoroctová) anebo těkavým pufrem (mravenčan, octan amonný).

Pokrok v rozvoji elektroforetických metod a jejich spojení s hmotnostní spektrometrií přes elektrosprejové rozhraní s sebou přináší i diagnostické aplikace techniky CE/ESI/MS/MS (cit.²⁰), kterou je možné považovat za alternativu spojení HPLC/MS/MS. Výhodou CE je práce s malým objemem vzorku, minimální potřeba jeho předúpravy a nízká spotřeba chemikálií. Rutinnímu využití této techniky zatím brání technické obtíže jejího spojení s hmotnostní spektrometrií, nevýhodou je rovněž vysoká koncentrační mez detekce.

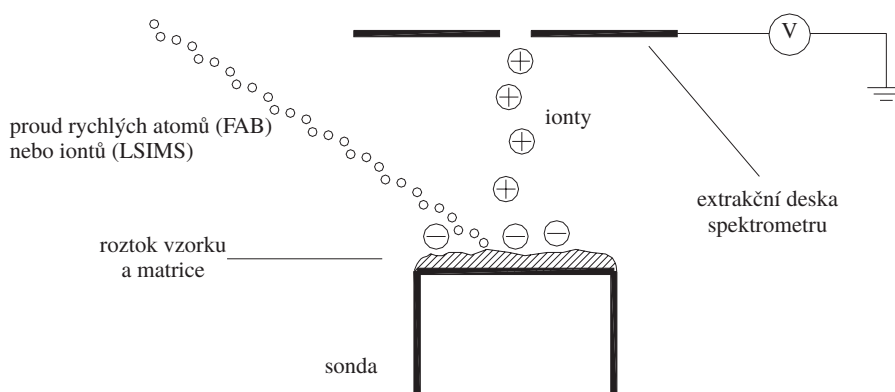
3.4. Iontové zdroje

V současnosti je elektrosprej (obr. 1a) nejpoužívanější iontový zdroj v oblasti hmotnostní spektrometrie nízkomolekulárních metabolitů. Je vhodný pro středně polární až iontové látky. Ionizace nastává odpařováním nabitých kapiček roztoku vzorku rozprašovaného proti vstupní štěrbině spektrometru z tzv. ESI jehly (kovové kapiláry) připojené na vysoký potenciál 3–5 kV. ESI zdroj je vhodný pro průtoky od jednotek do několika málo stovek $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, proto se v případě spojení s HPLC využívá děliče toku, aby bylo dosaženo optimálního průtoku eluátu do iontového zdroje. Při spojení s CE se naopak průtok zvyšuje pomocnou kapalinou (methanol apod.) na několik $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ (při použití nanospreje se pracuje bez této pomocné kapaliny).

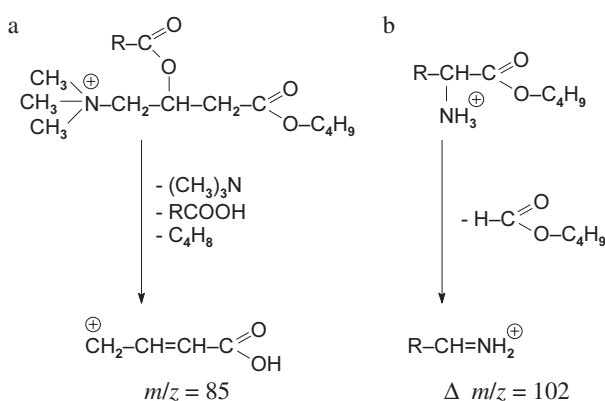
Rozhraní pro chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (obr. 1b) je alternativou elektrosprejové ionizace. Komerční přístroje bývají obvykle vybaveny oběma typy ionizace, jejichž záměna je snadná a netrvá více než několik minut. Obecně je APCI vhodná pro méně polární látky než ESI, i když oblasti vhodné polarity analytů se u obou technik do značné



Obr. 1. Zjednodušená schémata ESI (a) a APCI (b), uspořádání s vyhřívanou kapilárou



Obr. 2. Zjednodušené schéma FAB a LSIMS

Obr. 3. Kolizí indukovaná disociace butylesterů acylkarnitinů^{8,21} (a) a aminokyselin^{16,17} (b)

míry překrývají. V rozhraní APCI se roztok vzorku zmlžuje do vyhřívaného prostoru cylindrického odpařovačku. Směs horkých par a plynů pak proudí oblastí koronového výboje u špičky jehly, kterou prochází proud o velikosti několik μA . Výboj ionizuje molekuly rozpouštědla a zmlžujícího plynu (dusíku), a tyto ionty předávají náboj molekulám analytů. APCI je v diagnostice DMP používána daleko méně než ESI. Důvodem je např. vyšší spotřeba rozpouštědel a vzorku: dolní hranice optimálního průtoku pro běžná rozhraní APCI je asi $200 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$.

Vývojově starší měkké ionizační techniky FAB a LSIMS (obr. 2) jsou založené na aplikaci roztoku vzorku na sondu vkládanou do iontového zdroje. Na sondu je zaměřen paprsek rychlých atomů Xe (FAB) nebo iontů Cs⁺ (LSIMS). Dopad rychlých částic způsobí ionizaci molekul vzorku a jejich převedení z kapalně do plynné fáze. Rozpouštědlo musí obsahovat glycerol, zajišťující obnovu kapalného filmu na sondě, aby měl signál dostatečnou dobu trvání. Existují průtočné modifikace těchto technik (*continuous flow*) určené pro spojení s HPLC; i v tomto případě je nutný přídavek glycerolu do mobilní fáze.

Všechny výše uvedené měkké ionizační techniky poskytují nejčastěji pseudomolekulární ionty [M+H]⁺ a [M-H]⁻. Někdy dochází i k tvorbě aduktů s jinými kationty, jako jsou

např. [M+Na]⁺, [M+NH₄]⁺, [M-2H+Na]⁻ a klastrových iontů, např. [M+M+H]⁺, [M+M+Na]⁺, [M+M-H]⁻.

3.5. Analyzátor iontů, skenovací režimy

V diagnostice DMP se téměř výhradně používá trojitý kvadrupól (uspořádání QQQ). První a třetí kvadrupól (Q₁ a Q₃) slouží jako analyzátor iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z), druhý kvadrupól (Q₂) plní funkci kolizní cely. V prostoru Q₂ podléhají pseudomolekulární ionty kolizí indukované disociaci (CID). Kolizním plynem bývá inertní plyn (Ar, Xe, He, N₂) pod tlakem desetin Pa a kolizní energie se pohybuje v řádu desítek eV.

Různými kombinacemi funkcí Q₁ a Q₃ se nastavují následující režimy skenování:

Sledování vybraného dceřiného iontu (Selected reaction monitoring, SRM)

Q₁ i Q₃ jsou nastaveny na ionty se specifickým m/z , tzn. ze všech iontů vzniklých ve zdroji se vybere jeden (Q₁) a po fragmentaci v Q₂ se pomocí Q₃ vybere jeden jeho fragment (většinou ten s největším zastoupením), který prochází až do detektoru. Takto se postupuje u všech analytů obsažených ve vzorku. SRM se mj. používá v případech stanovení více analytů, z nichž každý fragmentuje jiným mechanismem. V rámci diagnostiky DMP to jsou purinové a pyrimidinové látky a mastné kyseliny s dlouhým řetězcem.

Sledování dceřiných iontů (Product (daughter) ion scan)

Q₁ je nastaven na ion se specifickým m/z , Q₃ skenuje určitý interval m/z , tzn. ze všech iontů vzniklých ve zdroji se vybere jeden (Q₁) a po fragmentaci v Q₂ se pomocí Q₃ sledují všechny jeho fragmenty. Tento režim se používá zejména při vývoji metody, protože poskytuje nejvíce informací o struktuře látky a o průběhu její fragmentace.

Sledování mateřských iontů (Precursor (parent) ion scan)

Q₁ skenuje určitý interval m/z , Q₃ je nastaven na ion se specifickým m/z , tzn. že Q₁ postupně vybírá ionty z daného intervalu m/z a Q₃ sleduje, zda a v jaké míře z nich vzniká fragment s nastavenou hodnotou m/z . Sken se využívá při

sledování skupiny strukturně příbuzných analytů s podobnou fragmentací, v případě diagnostiky DMP jsou to acylkarnitiny poskytující fragment $m/z = 85$ (obr. 3a).

Sledování neutrální ztráty (Neutral loss scan)

Q_1 skenuje interval m/z . Q_3 zároveň skenuje interval s m/z nižší o určitou konstantní hodnotu, tzn. Q_1 postupně vybírá ionty z daného intervalu m/z a Q_3 sleduje, zda a v jaké míře při fragmentaci ztrácejí ze své struktury neutrální část dané hmotnosti. Stejně jako „precursor ion scan“ se „neutral loss scan“ používá pro strukturně příbuzné analyty; pro diagnostické účely jsou to především aminokyseliny, které odštěpují butylestero-ovou skupinu a vodík jako butyl-formiát ($\Delta m/z = 102$, obr. 3b).

3.6. Zpracování a vyhodnocení primárních dat

Diagnostické metody směřují ke stanovení koncentrací metabolitů. Pro hmotnostní spektrometrii neplatí žádný jednoduchý vztah mezi absolutním signálem detektoru a koncentrací analytu, koncentrace analytů se proto stanovuje na základě kalibrace signálu analytu vůči signálu vnitřního standardu. Jako vnitřní standardy se v hmotnostní spektrometrii s výhodou užívají isotopově značené molekuly samotných analytů. Značení se provádí stabilními isotopy ^2H , ^{13}C nebo ^{15}N . Standardy obsahují alespoň tři atomy těchto nuklidů, aby jejich signál nebyl zvyšován příspěvkem píků majících původ v přirozeném výskytu těžších isotopů H, C, N, O a S v molekulách analytu.

Signálem daného iontu se rozumí výška, případně plocha píku u příslušné hodnoty m/z integrovaná přes všechny skeny věnované sledování tohoto iontu. Koncentrace analytu je pak zjištěna z kalibrační závislosti poměru signálu analytu a signálu vnitřního standardu na koncentraci analytu při konstantní koncentraci vnitřního standardu. Sestrojit kalibrační závislost je nutné zejména v případech, kdy pro některé analyty nejsou isotopově značené standardy dostupné, a stanovení se pak provádí pomocí standardu podobné struktury.

Kromě koncentrace jednotlivých metabolitů jsou často užitečné i další ukazatele, jako jsou poměry koncentrací nebo i jen prosté poměry signálů dvou metabolitů. Rozhodnutí o diagnóze se učiní jejich porovnáním s referenčními hodnotami stanovenými jako určitý kvantil souboru hodnot charakterizujících zdravou populaci.

Významným aspektem především screeningových metod je využití výpočetní techniky pro automatické vyhodnocení naměřených dat. Systémy analyzující až několik stovek vzorků za den shromažďují tak obrovské množství dat, že jejich „manuální“ posuzování je v podstatě nemožné. Řešením je počítačové vyhodnocování – na základě přednastavených referenčních hodnot se vzorky rozdělí na klinicky vyhovující a na vzorky, které mohou vypovídat o metabolické poruše a je potřeba se jimi dále zabývat. Takový algoritmus detailně popisuje např. Rashed a spol.¹

4. Závěr

V uplynulých deseti letech došlo k významnému posunu v diagnostice DMP. Přejít od spojení GC/MS s klasickou

ionizací elektronem k moderním ionizačním technikám umožnil vyvinout metody s velmi vysokou dostupností vzorků. Ionizace za atmosférického tlaku (ESI, APCI) v oblasti diagnostiky DMP nahrazuje i starší měkké ionizační techniky FAB a LSIMS.

Přednost moderních metod je nutno vidět zejména v možnosti prvotního záchytu jedinců s DMP, i když definitivní diagnóza je v každém konkrétním případě ověřována a potvrzována nezávislými metodami (stanovení aktivity enzymu spojeného s danou poruchou, analýza příslušného genu aj.). Plošný screening je v současnosti prováděn jen v některých vyspělých státech (např. USA, Nizozemsko, SRN); v budoucnosti však lze očekávat významné rozšíření screeningu DMP tandemovou hmotnostní spektrometrií i do dalších států.

Seznam použitých zkratk

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
CE	kapilární elektroforéza
CID	kolizí indukovaná disociace
CoA	koenzym A
DMP	dědičné metabolické poruchy
ESI	ionizace elektrosprejem
FAB	ionizace nárazem rychlých atomů
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LSIMS	hmotnostní spektrometrie s ionizací z kapalně matrice nárazem rychlých iontů
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie

Práce vznikla za podpory MŠMT ČR (grant MSM 153100013).

LITERATURA

1. Rashed M. S., Bucknall M. P., Little D., Awad A., Jacob M., Alamoudi M., Alwattar M., Ozand P. T.: Clin. Chem. 43, 1129 (1997).
2. Chace D. H.: Chem. Rev. 101, 445 (2001).
3. Bauer M. F., Gempel K., Hofmann S., Jaksch M., Philbrook C., Gerbitz K.: Clin. Chem. Lab. Med. 37, 855 (1999).
4. Wanders R. J. A., Vreken P., den Boer M. E. J., Wijburg F. A., van Gennip A. H., Ijlst L.: J. Inherited Metab. Dis. 22, 442 (1999).
5. Albers S., Marsden D., Quackenbush E., Stark A. R., Levy H. L., Irons M.: Pediatrics 107, e103 (2001) (URL: <http://www.pediatrics.org>).
6. Vianey-Saban C., Guffon N., Delolne F., Guibaud P., Mathieu M., Divry P.: J. Inherited Metab. Dis. 20, 411 (1997).
7. Vreken P., van Lint A. E. M., Bootsma A. H., Overmars H., Wanders R. J. A., van Gennip A. H.: J. Inherited Metab. Dis. 22, 302 (1999).
8. Chace D. H., Hillman S. L., Van Hove J. L. K., Naylor E. W.: Clin. Chem. 43, 2106 (1997).
9. Clayton P. T., Doig M., Ghafari S., Meaney C., Taylor C., Leonard J. V., Morris M., Johnson A. W.: Arch. Dis. Child. 79, 109 (1998).
10. Chace D. H., DiPerna J. C., Mitchell B. L., Sgroi B., Hofman L. F., Naylor E. W.: Clin. Chem. 47, 1166 (2001).

11. Johnson D. W.: *J. Inherited Metab. Dis.* 23, 475 (2000).
12. Van Hove J. L. K., Kahler S. G., Feezor M. D., Ramakrishna J. P., Hart P., Treem W. R., Shen J.-J., Matern D., Millington D. S.: *J. Inherited Metab. Dis.* 23, 571 (2000).
13. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.: *Harperova biochemie*. H&H, Jinočany 1998.
14. Tuchman M., McCann M. T.: *Clin. Chem.* 45, 571 (1999).
15. Chace D. H., Sherwin J. E., Hillman S. L., Lorey F., Cunningham G. C.: *Clin. Chem.* 44, 2405 (1998).
16. Chace D. H., Millington D. S., Terada N., Kahler S. G., Roe C. R., Hofman L. F.: *Clin. Chem.* 39, 66 (1993).
17. Chace D. H., Hillman S. L., Millington D. S., Kahler S. G., Roe C. R., Naylor E. W.: *Clin. Chem.* 41, 62 (1995).
18. Buchanan D. N., Muenzer J., Thoene J. G.: *J. Chromatogr.* 534, 1 (1990).
19. Ito T., Kidouchi K., Sugiyama N., Kajita M., Chiba T., Niwa T., Wada Y.: *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.* 670, 317 (1995).
20. He T., Quinn D., Fu E., Wang Y. K.: *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.* 727, 43 (1999).
21. Rashed M. S., Ozand P. T., Harrison M. E., Watkins P. J. F., Evans S.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 8, 129 (1994).
22. Magera M. J., Helgeson J. K., Matern D., Rinaldo P.: *Clin. Chem.* 46, 1804 (2000).
23. Ito T., van Kuilenburg A. B. P., Bootsma A. H., Haasnoot A. J., van Cruchten A., Wada Y., van Gennip A. H.: *Clin. Chem.* 46, 445 (2000).
24. Evans J. E., Ghosh A., Evans B. A., Natowicz M. R.: *Biol. Mass Spectrom.* 22, 331 (1993).
25. Bootsma A. H., Overmars H., van Rooij A., van Lint A. E. M., Wanders R. J. A., van Gennip A. H., Vreken P.: *J. Inherited Metab. Dis.* 22, 307 (1999).
26. Libert R., Hermans D., Draye J.-P., van Hoof F., Sokal E., de Hoffmann E.: *Clin. Chem.* 37, 2102 (1991).
27. Lemonde H. A., Johnson A. W., Clayton P. T.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13, 1159 (1999).
28. van Lenthe H., van Kuilenburg A. B. P., Ito T., Bootsma A. H., van Cruchten A., Wada Y., van Gennip A. H.: *Clin. Chem.* 46, 1916 (2000).
29. Hill J. B., Palmer P.: *Clin. Chem.* 15, 381 (1969).

P. Fryčák^a, K. Lemr^a, T. Adam^b, and R. Hušková^b
 (^a*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc*, ^b*Laboratory of Inherited Metabolic Disorders, Department of Clinical Chemistry, Medical Hospital, Olomouc*): **Diagnostics of Some Inherited Metabolic Disorders by Mass Spectrometry Using Modern Ionisation Techniques**

The review deals with the progress in the diagnostics of inherited metabolic disorders by mass spectrometry in the last decade. It is focused on the atmospheric pressure ionisation techniques, i.e. electrospray ionisation and atmospheric pressure chemical ionisation. The first part of the article describes very briefly the molecular causes of inherited metabolic disorders, such as disorders of metabolisms of fatty acids, amino acids, bile acids, purine and pyrimidine and related metabolites. The other part describes the procedures from sampling over the analysis itself to the raw data evaluation.