



Palacký University
Olomouc

BIOMEDREG



INSTITUTE OF MOLECULAR AND
TRANSLATIONAL MEDICINE



UNIVERSITY HOSPITAL
OLOMOUC

Metody přímého nástřiku v kombinaci s hmotnostní spektrometrií pro analýzu malých molekul

*D. Friedecký, R. Karlíková, J. Šíroková, L. Najdekr, A. Kalivodová, K. Mičová,
M. Hrdá, J. Jáčová, J. Václavík, I. Vrobel, H. Janečková, K. Hron, T. Adam*

Laboratory of Metabolomics
Institute of Molecular and Translational Medicine
Medical Faculty, Palacký University in Olomouc

Laboratory for Inherited Metabolic Disorders
Department of Clinical Biochemistry
University Hospital Olomouc



Inborn Errors of Metabolism

- purines a pyrimidines (LC/MS Dionex/AB Sciex)
- newborn screening

samples/year

500

30.000

TDM (Dionex Ultimate 3000 RS / AB Sciex API 4000)

- immunosuppressants
- antihypertensives
- tyrosine kinase inhibitors
- methotrexate

4000

500

500

100

Metabolomics

Flow injection analysis / MS

Drug Metabolisation

Aplikace FIA-MS



- 1, Národní program novorozeneckého screeningu DMP

- 2, Monitorování hladin
 - tyrosinkinázové inhibitory u pacientů s CML
 - imunosupresiva u pacientů po transplantaci

- 3, Online SPE/FIA MS – RapidFire

- 4, Turbulent flow chromatography

Sample preparation



- Removal proteins / salts / phospholipids
- ESI => Matrix effects / Ions suppression

- Elimination:
 - Precipitation (MeOH, AcCN, ZnSO₄, TCA...)
 - SPE (C18, modifications, zirconium) - online/offline => price
 - LLE (ether, hexane, ethylacetate)
 - Isotope dilution (deuterated internal standards)

- Long term stability of the methods and instrument
- Analytical parameters of the method

- Time consuming!

Národní program novorozeneckého screeningu DMP

Věstník č. 6, 2009, str. 7-14

*METODICKÝ NÁVOD K ZAJIŠTĚNÍ CELOPLOŠNÉHO NOVOROZENECKÉHO
LABORATORNÍHO SCREENINGU A NÁSLEDNÉ PÉČE*

Endokrinní onemocnění (EO):

- a) kongenitální hypotyreóza (CH)
- b) kongenitální adrenální hyperplázie (CAH)

Dědičné poruchy metabolismu (DMP):

- c) fenylketonurie (PKU) a hyperfenylalaninemie (HPA)
- d) leucinoza (nemoc javorového sirupu, MSUD)
- e) deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (MCAD)
- f) deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem (LCHAD)
- g) deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (VLCAD)
- h) deficit karnitinpalmitoyltransferázy I (CPT I)
- i) deficit karnitinpalmitoyltransferázy II (CPT II)
- j) deficit karnitinacylkarnitintranslokázy (CACT)
- k) glutarová acidurie typ I (GA I)
- l) izovalerová acidurie (IVA)

Jiná onemocnění:

- m) cystická fibroza (CF)

Laboratorní vyšetření NS DMP

Administrativa a logistika příjmu materiálu

- 31 nemocnic s novorozeneckými odděleními
- příjem 100 - 300 vz. denně v pracovní dny (9 h)
- kontrola číselné řady odběrů u každé nemocnice
- vytvoření denní číselné řady a zápis do INS

Příprava vzorku

- terčík (3 mm) z KS => 96ti jamkové pláty
- extrakce organickým rozpouštědlem (IS)
- centrifugace

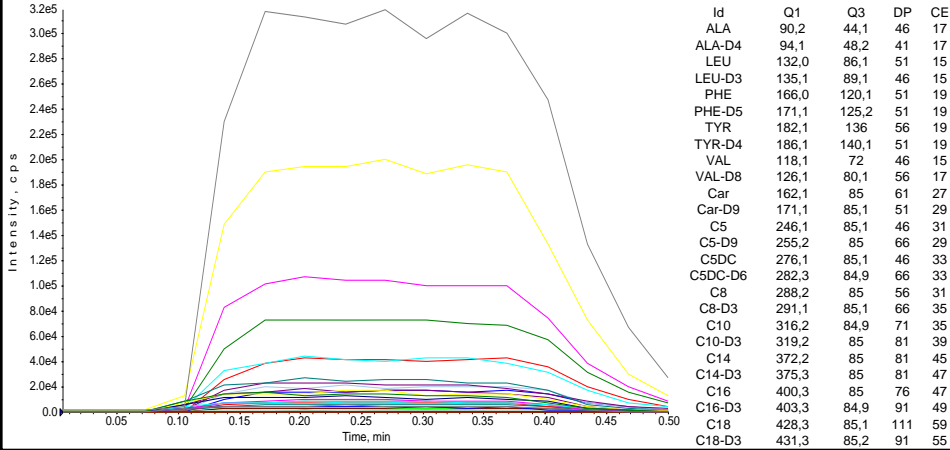
Stanovení AC&AMK (FIA-MS/MS)

(5AMK + 20AC) x 2 (IS)

KS - terčík (3 mm) => 96 well plates , extrakce (MeOH +IS), centrifugace

MF: MeOH + FA, 300/30 µl/min, 80/10 bar; celkový čas analýzy: 43 s

MS: ESI+, 4500 V, 300 °C, 5-100 ms; LOD: AMK 0.9-2.9 µM, AC 0.02-1.07 µM



Laboratorní vyšetření NS DMP

rozhodovací limity - Chemview 2.0 (AB Sciex)

D:\Analyst Data\Projects\NBS\Samples\Data\2010-05-03.wiff														
No.	Result	PKU, HPA		MSUD		IVA		GA I						
		Phe	Phe/Tyr	Xle	Xle/Ala	Xle/Phe	Val	C5	C5/C2	C5/C8	C5DC	C5DC/C8	C5DC/C16	
		0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
	Lower Decision Limit	120	1,80	300	1,30	5,50	250	0,60	0,2	11,0	0,35	4,6	0,6	0,40
	Upper Decision Limit	156	0,76	304	0,90	2,10	237	0,79	0,015	1,3	0,21	5	0,06	0,06
Level1		495	1,11	562	0,78	1,14	440	1,76	0,021	1,1	1,20	0,7	0,12	
Level2		149	0,79	294	0,69	2,08	243	0,69	0,017	1,5	0,25	0,5	0,06	
Level2		488	1,08	542	0,76	1,11	437	1,69	0,02	1,0	1,13	0,7	0,12	
3		71	0,61	123	0,57	1,72	117	0,12	0,003	2,0	0,10	1,7	0,03	
4		45	1,16	97	0,50	2,14	79	0,11	0,002	1,1	0,08	0,9	0,02	
5		72	0,89	197	0,84	2,75	158	0,17	0,003	2,0	0,17	1,9	0,04	
6		51	0,53	93	0,57	1,83	82	0,08	0,004	1,7	0,10	2,0	0,04	
7		75	0,95	137	0,67	1,82	125	0,11	0,003	2,9	0,09	2,2	0,02	
8		77	0,92	131	0,57	1,70	111	0,10	0,003	1,2	0,21	2,5	0,06	
9		48	1,17	76	0,37	1,59	63	0,09	0,002	1,7	0,07	1,3	0,02	
10		70	0,83	173	0,66	2,45	162	0,05	0,003	0,7	0,12	1,7	0,06	

MCAD			VLCAD			LCHAD			CPT I, CPT II, CACT				C16/C18	C18/C16	TI			
C6	C8	C8/C2	C8/C10	C10	C10:1	C14	C14:1	C14:1/C16	C16OH	C18OH	C18:1OH	C0				C16	C18	C18:1
0,00	0,00	0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0	0	0	5,0	0,3	0,2	0,2	0	0,00	30000
0,20	0,50	0,05	3,0	0,40	0,20	0,50	0,30	0,15	0,07	0,05	0,05	40,0	8,0	2,0	3,0	25	0,45	
0,51	0,42	0,01	0,8	0,42	0,03	0,38	0,03	0,009	0,007	0,004	0,022	53,7	4,3	2,1	1,2	8	0,14	90413
1,77	1,66	0,019	0,9	1,85	0,03	1,69	0,06	0,006	0,008	0,008	0,018	88,0	9,9	5,9	0,5	6	0,12	113202
0,46	0,46	0,011	1,0	0,45	0,04	0,39	0,05	0,011	0,007	0,008	0,02	56,7	4,5	2,2	1,0	8	0,14	105849
1,77	1,69	0,02	1,0	1,78	0,04	1,61	0,05	0,005	0,012	0,006	0,01	88,8	9,8	6,0	0,5	6	0,12	112076
0,07	0,06	0,001	0,7	0,09	0,03	0,26	0,15	0,038	0,025	0,014	0,019	20,1	3,9	1,0	1,6	4	0,12	100402
0,06	0,09	0,002	0,8	0,12	0,07	0,19	0,07	0,02	0,012	0,01	0,018	24,8	3,6	0,8	1,7	6	0,11	101502
0,05	0,09	0,002	0,7	0,13	0,06	0,30	0,23	0,058	0,019	0,015	0,019	22,2	3,9	0,8	1,7	5	0,11	92471
0,02	0,05	0,002	0,9	0,06	0,04	0,14	0,06	0,027	0,011	0,007	0,007	11,9	2,4	0,6	1,0	4	0,16	100702
0,04	0,04	0,001	0,6	0,06	0,03	0,19	0,12	0,031	0,012	0,019	0,014	12,1	3,8	1,0	1,5	3	0,15	95591
0,07	0,09	0,002	0,7	0,12	0,07	0,23	0,15	0,04	0,021	0,013	0,014	15,8	3,6	0,9	1,3	3	0,14	94144
0,05	0,05	0,001	0,7	0,08	0,06	0,18	0,07	0,023	0,016	0,006	0,016	15,3	3,1	0,6	1,3	4	0,10	96969
0,04	0,07	0,004	0,7	0,10	0,05	0,14	0,11	0,053	0,022	0,009	0,015	6,0	2,1	0,5	0,8	2	0,15	92491

Záchyt dětí s DMP v novorozeneckém screeningu

Onemocnění	Počet zachycených pacientů v roce 2012	Prevalence v roce 2012	FPR (%) 2012	Kumulativní počet zachycených pacientů od r. 2010	Prevalence (kumulativní)
PKU	20	1 : 5338	0,042	77	1 : 5 729
MSUD	0	-	0,004	1	1 : 441 163
MCADD	6	1 : 17 792	0,005	26	1 : 16 968
LCHADD	1	1 : 106 751	0,001	8	1 : 55 145
VLCADD	0	-	0,006	3	1 : 147 054
CPT I	0	-	0	0	-
CPT II / CACT	0	-	0,001	0	-
GA I	0	-	0,003	3	1 : 147 054
IVA	0	-	0,010	2	1 : 220 582
CF	18	1 : 5931	0,045	68	1 : 6 488

Analýza 87 met+IS pro selektivní screening 50ti DMP

ALA	Car	C4DC, C5OH
ALA-D4	Car-D9	C6DC, C7OH
GLU	C2	C8-1
GLU-D5	C2-D3	C10-1
LEU	C3	C12-1
LEU-D3	C3-D3	C14-2
MET	C4	C14-1
MET-D3	C4-D3	C14OH
PHE	C5	C16-1
PHE-D5	C5-D9	C16-1OH
TYR	C5DC	C16OH
TYR-D4	C5DC-D6	C18-1
VAL	C6	C18-2
VAL-D8	C6-D3	C18-2OH
ARG	C8	C18-1OH
ARG-D7	C8-D3	C18OH
CIT	C10	C10-2
CIT-D2	C10-D3	C4-1
GLY	C12	CIT-NH3
GLY-C2N	C12-D3	CIT-D2-NH3
ORN	C14	PazPC
ORN-D6	C14-D3	lipid PC 01
TRP	C16	PC 16-0-6
THR	C16-D3	PC 16-0-8
ARGSUCC	C18	lipid PC 02
HIS	C18-D3	PAPC
LYS	C3DC, C4OH	PGPC
PRO	C5-1	PoxnoPC
		lipid PC 03
		lipid PC 04
		lipid PC 05

Tyrosinkinasové inhibitory

Léčba chronické myeloidní leukémie

Normal chromosome 9
Normal chromosome 22
Chromosomes break
Changed chromosome 9
Changed chromosome 22 (Philadelphia chromosome)
bcr-abl

=> inaktivní konformace proteinu
=> inhibice fosforylace Tyr
=> blokáce signálních drah
=> inhibice proliferace, apoptóza

A

B

Tyrosinkinasové inhibitory – LC/TMS

Vzorek: plasma + ZnSO₄/MeOH/H₂O => vortex, centrifugace

Interní standard: 50 ng/mL IMA-D8 / DAS-D8 / NIL-D6 / LAP-D4 v MeOH

Kalibrace, IQC: Chromsystems; 3+1 kal / 2 qc

Instrumentace: UHPLC Dionex Ultimate 3000 RS + TMS ABSciex API 4000

Kolona: Acquity BEH C18 (Waters) 1.7 μm, 2.1 x 50 mm + 2.1 x 5.0 mm

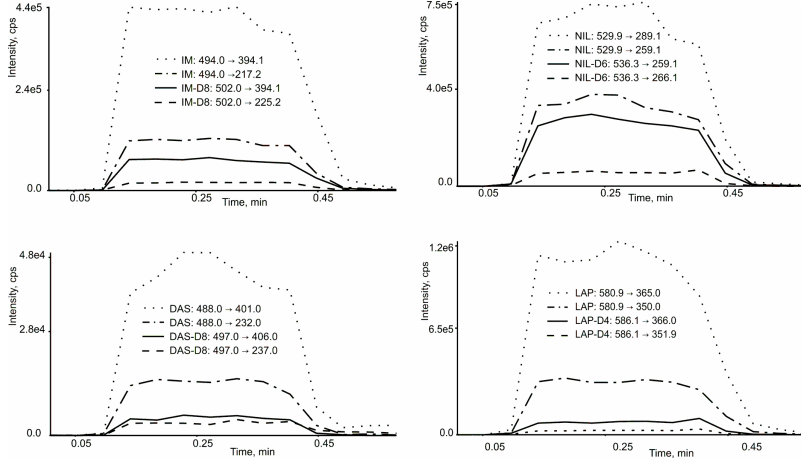
Gadiant: A) 4mM NH₄COOH, pH 3.2 => B) MeOH

Podmínky: 0.5 ml/min (< 450 bar); 40 °C; 2 μL; ESI+, MRM, 50 ms

ID	Q1 Mass	Q3 Mass	CE
IMA	494.4	394.0	40
IMA-d8	502.4	394.0	40
DAS	489.1	402.1	45
DAS-d8	497.2	407.0	40
NIL	531.2	290.0	40
NIL-d6	536.2	295.0	40

Tyrosinkinasové inhibitory – DI-ID/TMS

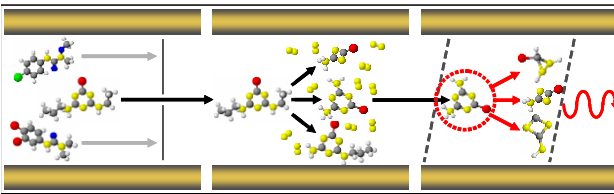
Vzorek: plasma + MeOH => vortex, zmrazení, centrifugace
 Interní standard: IMA-D8 / DAS-D8 / NIL-D6 / LAP-D4
 Instrumentace: UHPLC Dionex Ultimate 3000 RS + TMS AB Sciex 5500 Qtrap
 Podmínky: AcCN+H2O+FA, 300/30 uL/min; 0.5 µL; ESI+, MRM, 50 ms



LOD: 1.3 – 1.6 ng/ml (Das: 45 ng/ml)

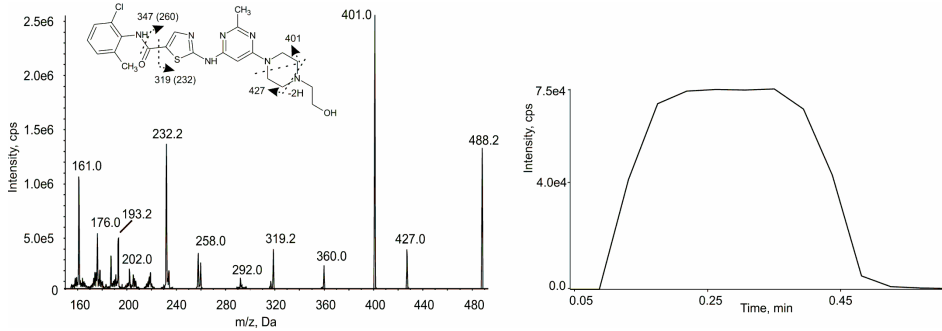
Dasatinib – MRM3

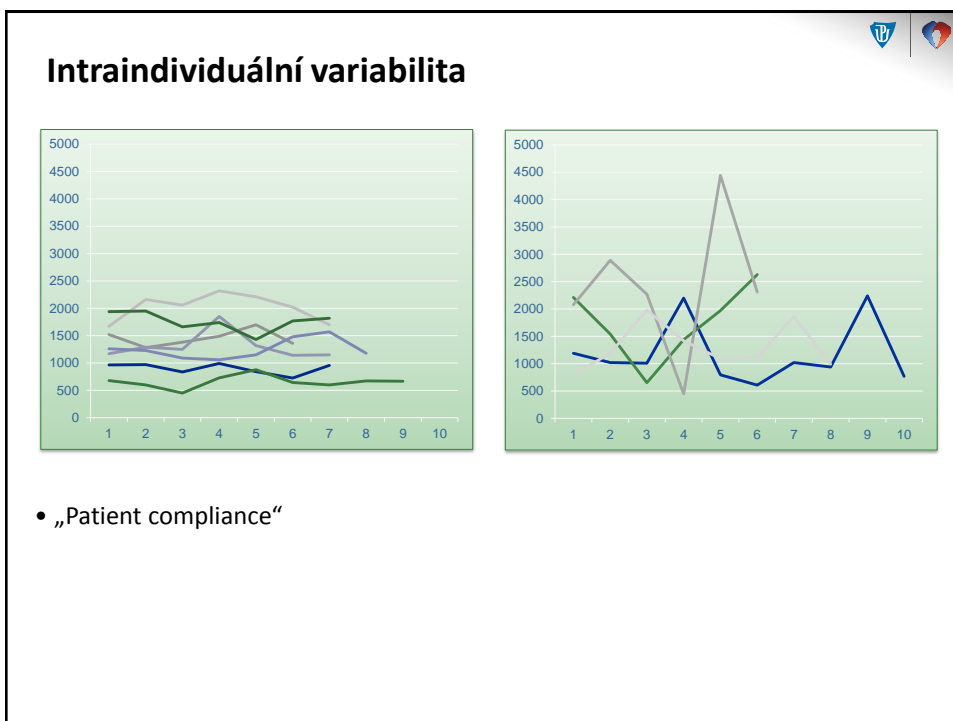
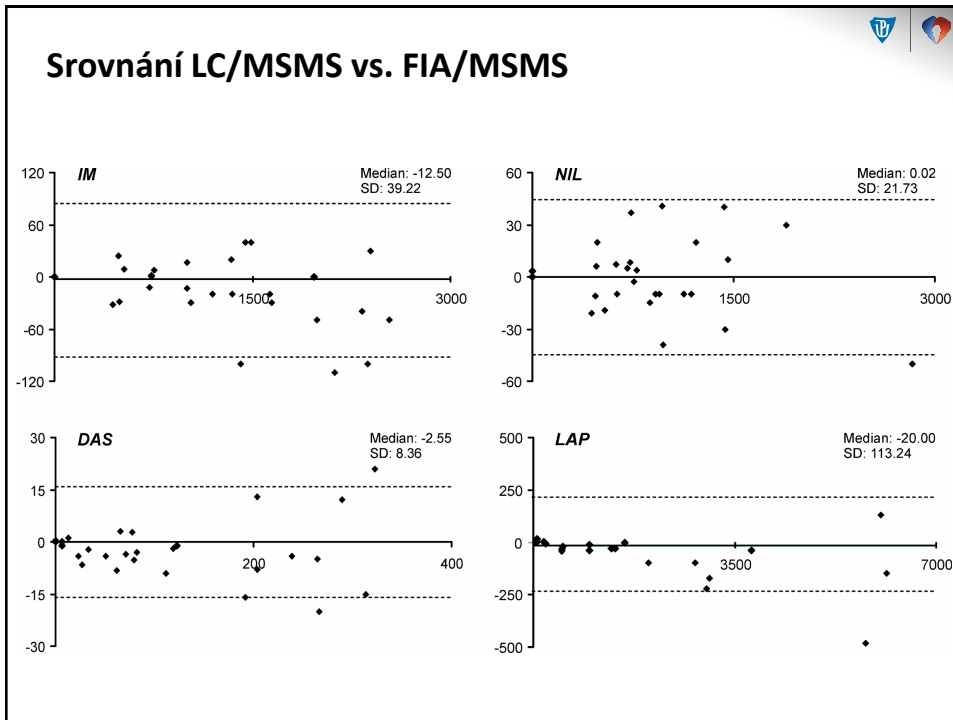
c = 315/100 ng/ml; LOD: 0.29 / 45 ng/ml



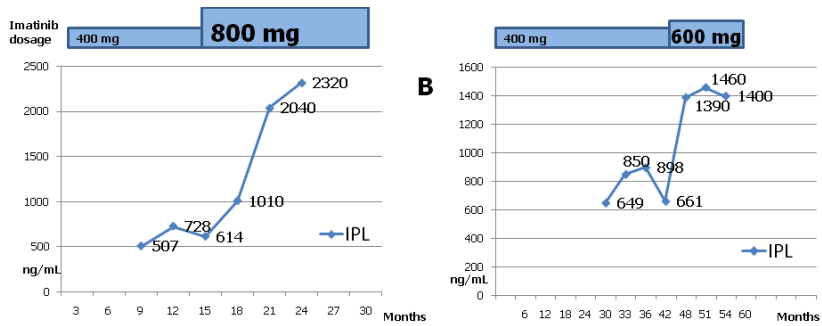
DP = 50 V
 CE = 41 V

LIT:
 fill time = dynamic, <250 ms
 excitation = 25 ms, 0.13 V
 mass window = 0.5 Da





Změna terapie

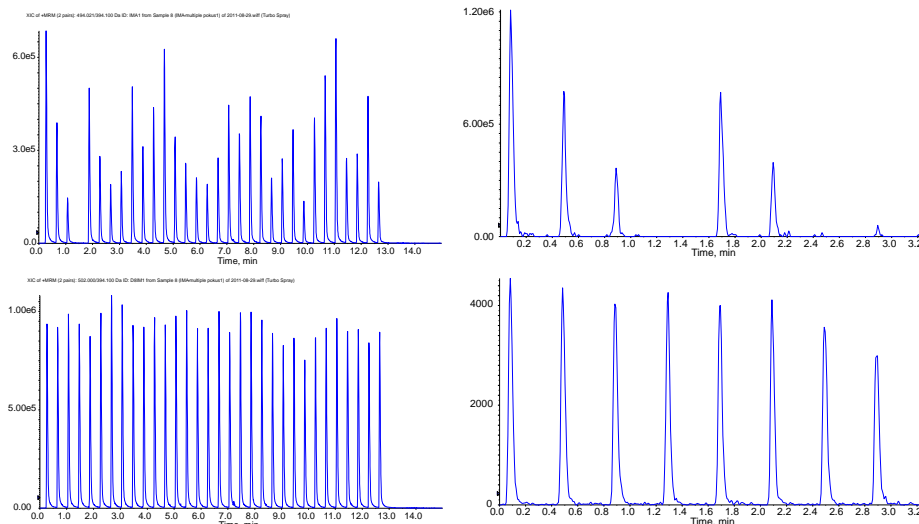


- Management terapie

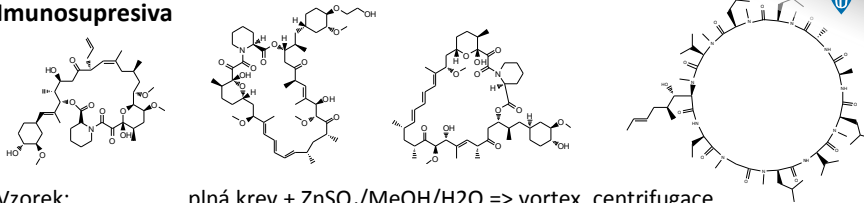
špatná CR/MR & nízká hladina IM & dobrá snášenlivost léčby

dobrá CR/MR & vysoká hladina IM & adverzní reakce

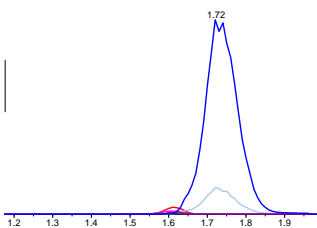
Multiple FIA



Imunosupresiva



Vzorek: plná krev + ZnSO₄/MeOH/H₂O => vortex, centrifugace
 Interní standard: 10/100 ng/mL CYA-d4, TAC-d2, SIR-d3, EVE-d4 v MeOH
 Kalibrace, IQC: Chromsystems; 6+1 kal / 3 qc
 Instrumentace: UHPLC Dionex Ultimate 3000 RS + TMS ABSciex API 4000
 Kolona: Acquity BEH C18 (Waters) 1.7 μm, 2.1 x 50 mm + 2.1 x 5.0 mm
 Gadiant: A) 25mM NH₄COOH, pH 3.0 => B) MeOH
 Podmínky: 0.4 ml/min (< 350 bar); 50 °C; 5 μL; ESI+, MRM, 50ms



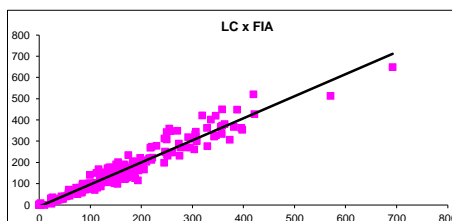
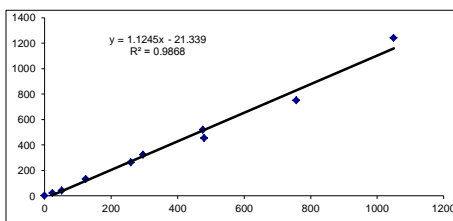
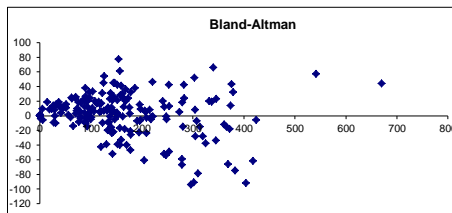
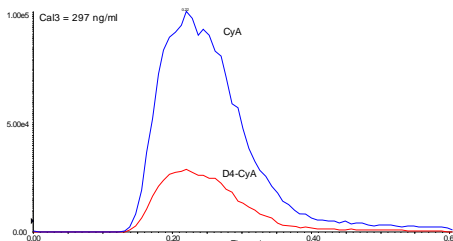
ID	Q1 Mass	Q3 Mass	CE
CYA-NH3	1219.8	1202.7	23
CYA-NH3-d4	1223.8	1206.7	23
TAC-NH3	821.4	768.5	29
TAC-NH3-d2	824.4	771.5	29
SIR-NH3	931.5	864.4	23
SIR-NH3-d3	934.5	864.4	23
EVE-NH3	975.5	908.4	25
EVE-NH3-d4	979.5	912.4	25

Imunosupresiva FIA-MS/MS

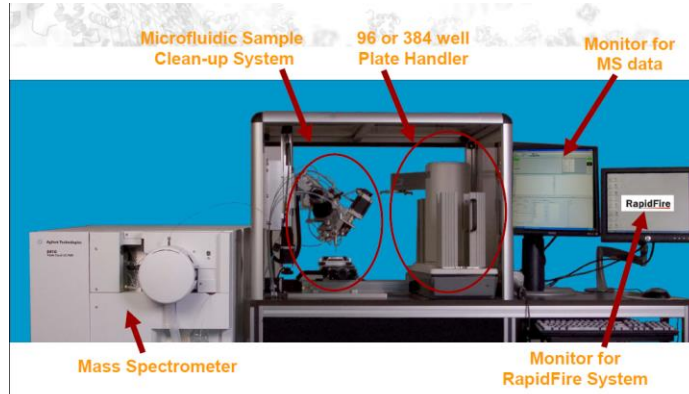
Plná krev - deproteinace (MeOH+IS+NH₄FA), vortex, zamražení, centrifugace

MF: MeOH + FA, 200 μl/min, 30 bar; celkový čas analýzy: 50 s

MS: ESI+, 4500 V, 300 °C, 200 ms; LOD: 1.6 ng/ml



Online SPE/FIA MS



RapidFire

RapidFire Mass Spectrometry

Ultra-fast autosampler & online SPE system



- Replaces LC in LC/MS
- Reusable SPE cartridge
- Integrates with standard ESI MS instruments

- **Cycle time = 7-13 s/sample**

Compatible with biological matrices

- Serum
- Plasma
- Whole blood
- Urine



RapidFire Features

Ultra-fast Autoinjector



- Standard 96 or 384-well plates
- 10- μ L injection loop



Online SPE

- SPE purification of protein precipitated samples
- Fast & efficient cycling
- Cartridge changer (6 slots)
 - Cartridge packing material
 - C4, C8, C18, Phenyl, Cyano
 - HILIC
 - Custom
 - Automatic or programmed switch
 - 24-hour unattended runs

Extraction Method

- 50 μ L serum
- Crash with 200 μ L acetonitrile containing deuterium labeled IS
- Vortex/Centrifuge
- Remove 30 μ L of supernatant and dilute with 600 μ L of mobile phase A.
- Done on a Hamilton Starlet – 96 well plate format

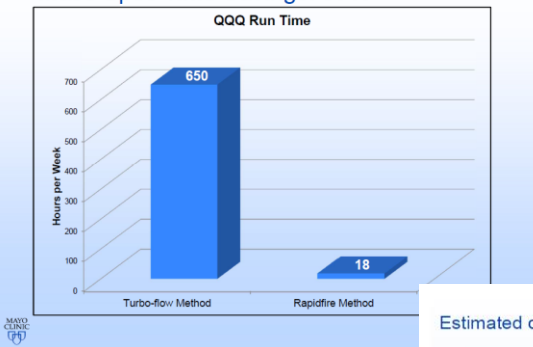
Vlastnosti

- Matrix effects: 0,33 (Cocaine metabolite in urine, same for IS – compensation)
- Linear range: 25-5000 ng/ml (amphetamines in urine)
 - 1-100 ng/ml (antiepileptics in serum)
- Carry over: not significant (or inject blank after high-conc. Sample)
- Accuracies: <10%
- Stability for >2000 injections (cartridges, precision <3%)

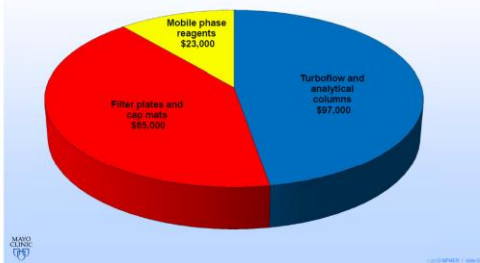
Projects done

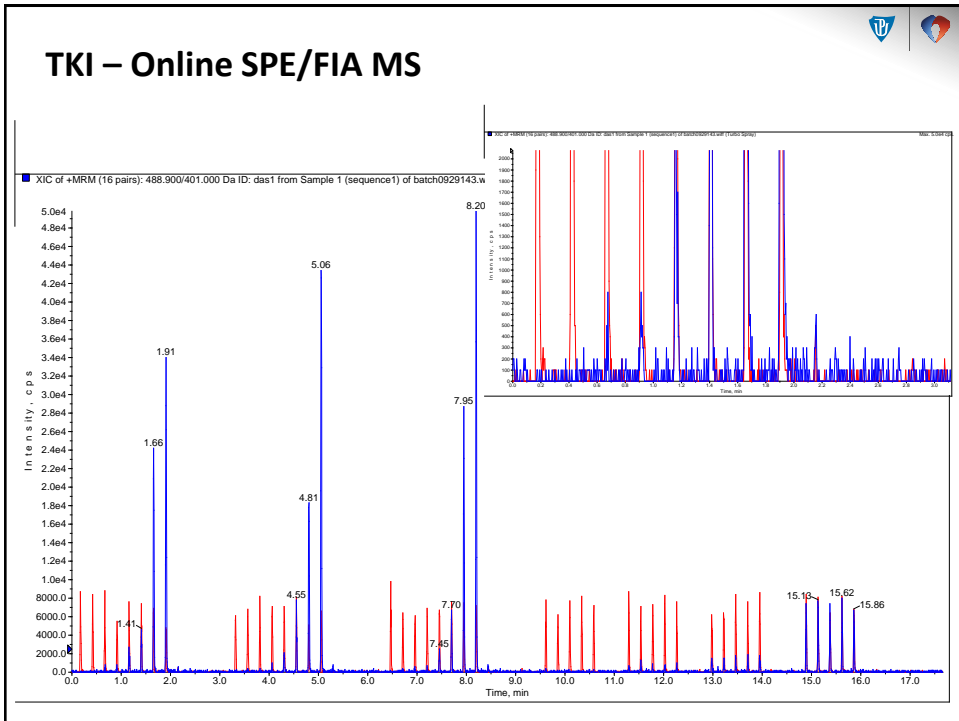
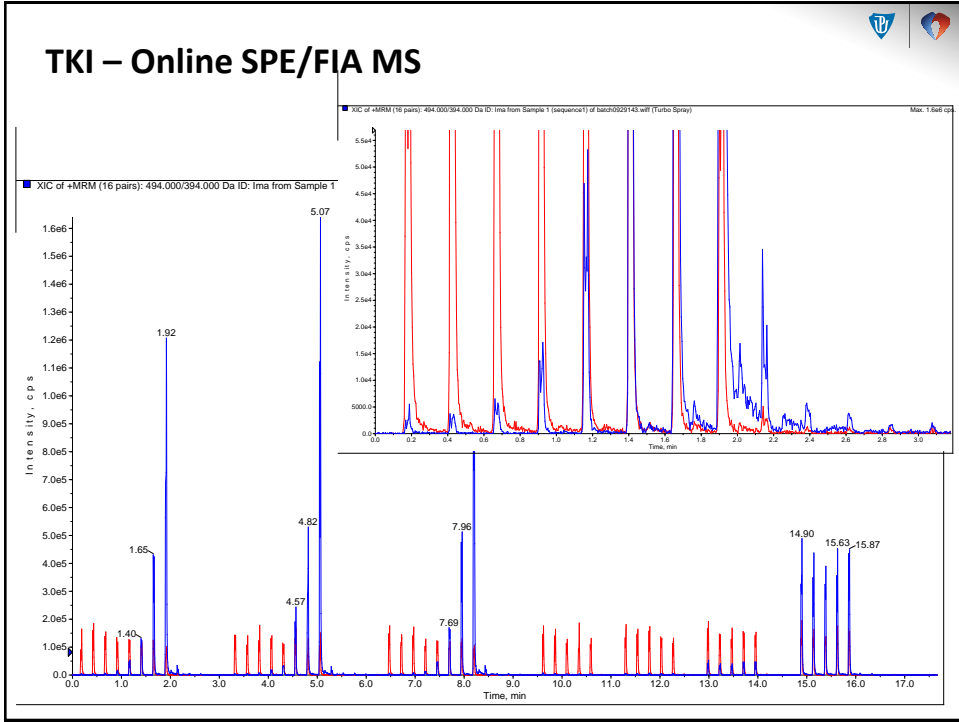
- Benzodiazepines in urine (app. note)
- Antiepileptics in serum (app. note)
- Amphetamines in urine (app. note)
- Tricyclic antidepressants in serum (app. note)
- Voriconazol (antimycotic) in serum
- Metabolites of cocaine and midazolam in urine (app. note)
- Tacrolimus in whole blood

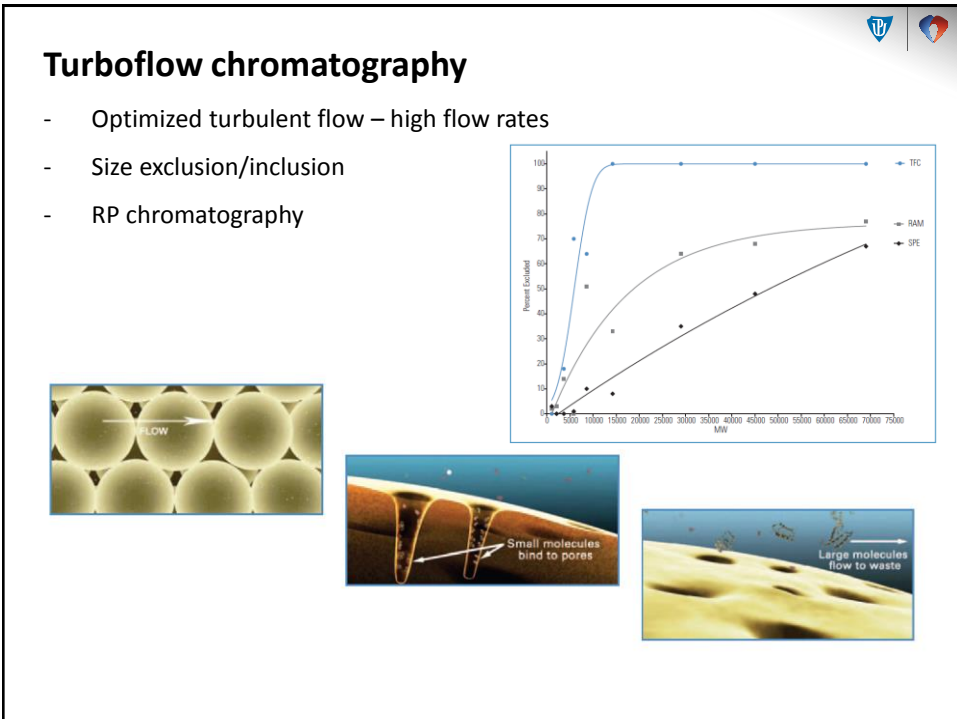
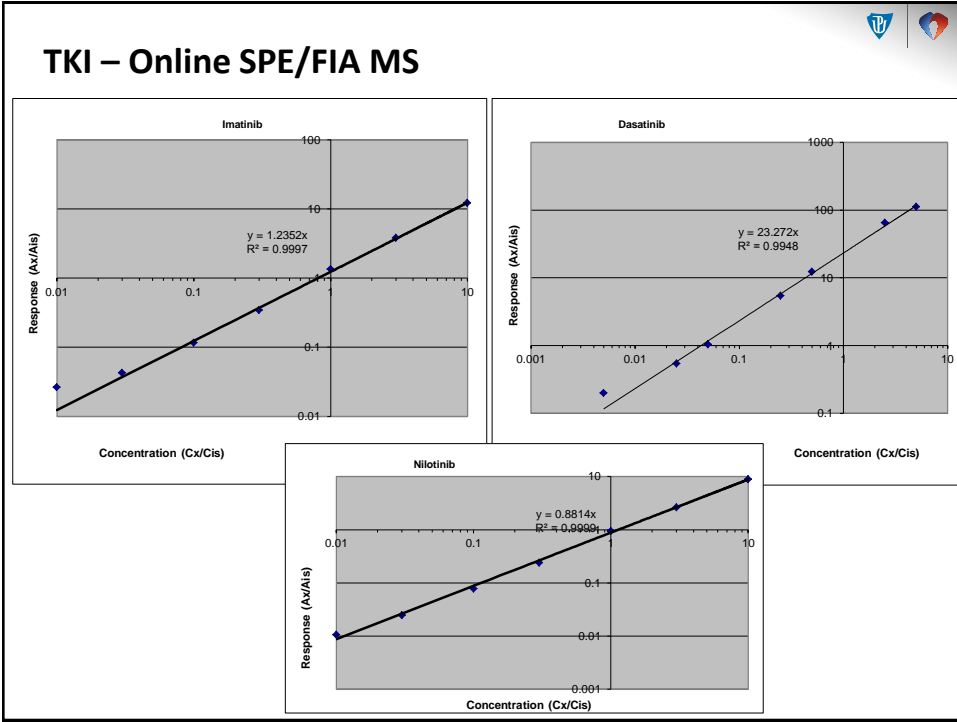
Mass Spec Time Savings: 97%



Estimated consumables annual cost savings: \$205,000







Turboflow chromatography

Liquid-Liquid Extraction (LLE)

1. Aliquot of sample
2. Spike with IS
3. Add buffer
4. Add MTBE
5. Shake 10 min
6. Centrifuge
7. Remove organic
8. Evaporate to dryness
9. Reconstitute
10. Transfer to plate
11. Inject onto column

Solid Phase Extraction (SPE)

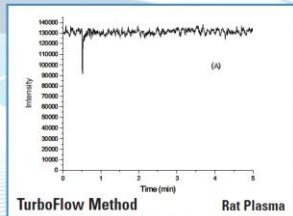
1. Aliquot of sample
2. Spike with IS
3. Add 0.1N HCL
4. Condition sorbent
5. Add sample to sorbent
6. Wash
7. Evaporate
8. Reconstitute
9. Transfer
10. Inject onto column

Protein Precipitation (PPT)

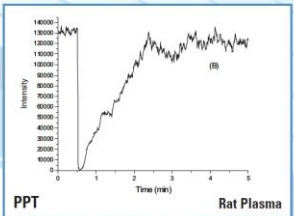
1. Aliquot of sample
2. Spike with IS
3. Add acetonitrile
4. Centrifuge
5. Remove supernatant
6. Reconstitute
7. Transfer to plate
8. Inject onto column

TurboFlow Method

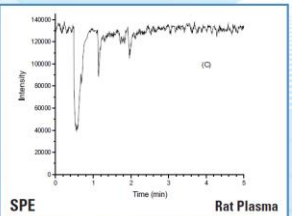
1. Aliquot of sample
2. Spike with IS
3. Centrifuge
4. Inject onto column



TurboFlow Method
Rat Plasma



PPT
Rat Plasma



SPE
Rat Plasma

TEAM

T. Adam (Head of the group)

K. Hron (statistics)

PhD: J. Jáčová, A. Kalivodová, R. Karlíková, K. Mičová, L. Najdekr, J. Václavík, I. Vrobel

Students: H. Rezková, M. Machálková, M. Galoczková, M. Ludvová, S. Pavlíková

Staff: V. Bekárek, E. Hlídková, H. Janečková

Lab staff: J. Ševčíková, L. Kittlová, V. Růžicková, M. Kapustová, T. Semeniuk, A. Záborská

D. Friedecký (MET, TDM, NBS, IEM)

J. Šíroková (postdoc)



Infrastructural part of this project (Institute of Molecular and Translational Medicine) was supported from the Operational programme Research and Development for Innovations (project CZ.1.05/2.1.00/01.0030).