

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Využití tandemové hmotnostní spektrometrie a vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie k laboratorní diagnostice poruch metabolismu kreatinu

Diplomová práce

Klinická a toxikologická analýza

Vedoucí diplomové práce: Ing. Evženie Pospíšilová
RNDr. Zuzana Bosáková, CSc

Praha 2006

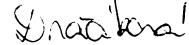
Hana Dvořáková

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Zuzany Bosákové a konsultanta Ing. Evženie Pospíšilové, a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 24. 5. 2006

Hana Dvořáková


Na tomto místě bych chtěla poděkovat Ing. Evženii Pospíšilové a RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. Za odborné vedení, všeestrannou pomoc a cenné rady k mé diplomové práci.

Za odbornou pomoc dále děkuji MUDr. Heleně Jahnové, Ing. Petru Chrastinovi, MUDr. Vladimíru Šuťákovi a všem v laboratoři ÚDMP.

Klíčová slova

Poruchy metabolismu kreatinu

Diagnostika

Deficit guanidinanacetátmethyltransferázy (GAMT)

Deficit arginin-glycintransamidázy (AGAT)

Deficit kreatinového transportéru (CRT)

Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (HPTLC)

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)

Obsah

1. Úvod	5
2. Teoretická část.....	6
2. 1. Dědičné metabolické poruchy	6
2. 2. Metabolismus kreatinu	7
2. 3. Poruchy metabolismu kreatinu.....	10
2. 3. 1. Deficit guanidinacetát methyltransferázy	10
2. 3. 2. Deficit arginin-glycintransamidázy	10
2. 3. 3. Deficit kreatinového transportéru.....	11
2. 3. 4. Klinické příznaky	11
2. 3. 5. Referenční rozmezí.....	13
2. 3. 6. Laboratorní diagnostika a diferenciální diagnostika	13
2. 3. 7. Léčba	14
2. 4. Tenkovrstvá chromatografie.....	15
2. 5. Tandemová hmotnostní spektrometrie	15
2. 5. 1. Iontový zdroj	17
2. 5. 2. Měkké ionizační techniky ve spojení s LC.....	18
3. Experimentální část	19
3. 1. Použité chemikálie.....	19
3. 2. Příprava roztoků	20
3. 3. Přístroje a pomůcky	21
4. Výsledky a diskuze	23
4. 1. Stanovení guanidinacetátu pomocí HPTLC	23
4. 1. 1. Testování nosiče a vyvíjecího zařízení.....	24
4. 1. 2. Stanovení meze detekce.....	25
4. 1. 3. Stanovení guanidinacetátu v moči.....	26
4. 1. 4. Vliv interferencí.....	27
4. 1. 5. Pozitivní vzorek.....	30

4. 2. Stanovení kreatinu, guanidinacetátu a kreatininu tandemovou hmotnostní spektroskopíí	31
4. 2. 2. Kalibrační závislost.....	33
4. 2. 3. Opakovatelnost, reprodukovatelnost	40
4. 2. 4. Referenční rozmezí	43
4. 2. 5. Limit detekce a limit kvantifikace	43
5. Závěr	44
5. 1. Stanovení guanidinacetátu metodou HPTLC	44
5. 2. Stanovení kreatinu, guanidinacetátu a kreatininu metodou MS/MS	44
6. Literatura.....	45

Seznam použitých zkratek a symbolů

?	předpokládaný nález
AGAT	arginin-glycintransamidáza
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
b	krev
c	koncentrace
CK	kreatinkináza
csf	mozkomíšní mok
CRT	kreatinový transportér
CT	kreatin
CTN	kreatinin
dbs	suchá krevní kapka
DMP	dědičné metabolické poruchy
d ₃ -kreatin, kreatinin	deuterované standardy pro kreatin, kreatinin
d ₂ -guanininacetát	deuterovaný standard guanidinacetátu
EEG	elektroencefalografie
ESI	elektrosprej
eV	elektronvolt
f	fibroblasty
FIA	průtoková injekční analýza
GAA	guanidinacetát
GAMT	guanidinacetátmethyltransferáza
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPTLC	vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
l	lymfoblasty
LC	kapalinová chromatografie
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace

<i>m</i>	hmotnost
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
<i>M_r</i>	relativní molekulová hmotnost
MR	magnetická resonance
MRS	magnetická resonanční spektroskopie
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti a náboje
MIM	internetová databáze enzymů
<i>n</i>	počet měření
<i>p</i>	plazma
Q	kvadrupol
R ²	determinační koeficient
<i>R_f</i>	retenční faktor
<i>s</i> ²	směrodatná odchylka
Std	standard
TLC	tenkovrstvá chromatografie
<i>t_R</i>	retenční čas
u	moč
ÚDMP	Ústav dědičných metabolických poruch
<i>v</i>	objem
<i>z</i>	náboj

1. Úvod

Dědičné metabolické poruchy jsou širokou skupinou různých onemocnění, z nichž některé se projevují různým neurologickým postižením a také mentální retardací. Včasné zachycení těchto poruch a následná léčba může příznaky onemocnění zmírnit nebo dokonce i zastavit. Mezi tyto poruchy patří i nedávno zjištěná porucha v metabolismu kreatinu (1994) - deficit guanidinacetátmethyltransferázy. Další poruchy v metabolismu kreatinu jsou deficit arginylglycintransamidázy a deficit kreatinového transportéru. Kvantitativní vyšetření pro diagnostiku těchto poruch prozatím není v České republice dostupné a vzorky od pacientů s podezřením na tyto choroby jsou zasílány k vyšetření do zahraničí. V České republice se provádí pouze kvalitativní stanovení guanidinacetátu v moči ve FN Olomouc.

Cílem této diplomové práce je zavedení vyšetřovacích metod pro komplexní laboratorní diagnostiku poruch metabolismu kreatinu. K plošnému screeningu jedné z těchto poruch (deficit guanidinacetátmetyltransferázy - GAMT) bylo použito stanovení guanidinacetátu v moči tenkovrstvou chromatografií (TLC). Kvantitativní stanovení kreatinu, kreatininu a guanidinacetátu v moči bylo prováděno metodou tandemové hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem a přímým nástřikem vzorku (FIA-ESI-MS/MS). Vypracované metody byly validovány a použity k vyšetření pacientů s klinickými příznaky suspektními pro poruchy metabolismu kreatinu.

2. Teoretická část

2. 1. Dědičné metabolické poruchy

Dědičné metabolické poruchy (DMP) jsou skupinou více než 500 různých onemocnění. Přičinou DMP jsou mutace genů sloužících vesměs jako předloha při proteosyntéze enzymů účastnících se důležitých metabolických procesů. Vzniká abnormální protein s pozměněnou sekvencí aminokyselin. Většinou je aktivita enzymu podstatně snížena nebo je nulová. Někdy může být funkčnost enzymu (nejčastěji katalytická aktivita) z velké části zachována, výjimečně i zcela, pokud se změna sekvence vyskytuje mimo vazebná místa substrátu a koenzymu. Rozsahu aktivit abnormálního enzymu u konkrétního jedince odpovídá široká škála klinických projevů DMP od asymptomatického průběhu (tj. bezpříznakového) až po těžké poškození tkání, orgánů a předčasnou smrt. Přerušení metabolické dráhy na místě odpovídajícímu nefunkčnímu enzymu způsobuje hromadění substrátu a nedostatek produktu enzymové reakce. Nevyužitý substrát může být metabolizován jiným enzymem. Patologicky tak může působit jak hromadění substrátu, tak i přítomnost alternativního produktu (nebo více produktů), stejně jako nedostatek produktu zastavené reakce [1].

Dědičné metabolické poruchy jsou převážně autosomálně recesivní, některé z nich mají dědičnost X-vázanou, mitochondriální nebo autosomálně dominantní. Incidence jednotlivých DMP je relativně nízká (1 : 10 000 až po méně než 1 : 1 000 000), ale celkový výskyt DMP je poměrně vysoký, ve světě je udávána celková incidence 1 : 500, v České republice 1 : 1000 [2]. Klinické projevy DMP jsou rozmanité a celkově zahrnují širokou škálu symptomů v různých kombinacích u jednotlivých onemocnění. Mohou se objevit v kterémkoliv věku, nejčastěji však v novorozeneckém a v dětství, méně časté, nikoliv však výjimečné, jsou první příznaky v adolescenci či dospělosti. Průběh může být chronický, pro některé DMP jsou typické opakované akutní dekompenzace způsobené intoxikací patologickými metabolity. Pro diagnostiku DMP je zásadní cílené vyšetření metabolitů, aktivity enzymu či analýza DNA, event. RNA.

Léčba DMP je většinou symptomatická (léčba symptomů, snížení příjmu substrátů, podávání vitaminových kofaktorů), u některých poruch kauzální (enzymová terapie, transplantace jater, kostní dřeně, genová terapie).

2. 2. Metabolismus kreatinu

Kreatin je látka, která ve formě kreatinfosfátu představuje okamžitou a významnou energetickou rezervu svalu [3]. Navzdory důležitosti kreatinu nejsou jeho metabolismus a distribuce v lidském těle dosud plně vysvětleny [4]. Biosyntéza kreatinu je zobrazena na obrázku 2.1. Kreatin je tvořen hlavně v játrech, pankreatu a ledvinách [5]. Krví se dostává do svalů a mozku, kde je vychytáván do svalových a nervových buněk cestou aktivního Na-dependentního transmembránového transportu [6,7]. Intracelulárně se účinkem kreatinkinázy (CK, EC 2.7.3.2) fosforyluje za vzniku kreatinfosfátu. Kreatinkináza pak v případě potřeby přenáší fosfát na ADP za vzniku ATP a poskytuje tak pohotovou vyrovnávací zásobu energie [8].

Kreatin se po enzymovém i neenzymovém odštěpení vody přemění na kreatinin, který se z organismu vylučuje močí. Denní exkrece kreatinu močí je konstantní a odpovídá svalové hmotě [9, 10]. Denní obrat představuje 1,5 % tělesného kreatinu [11,12].

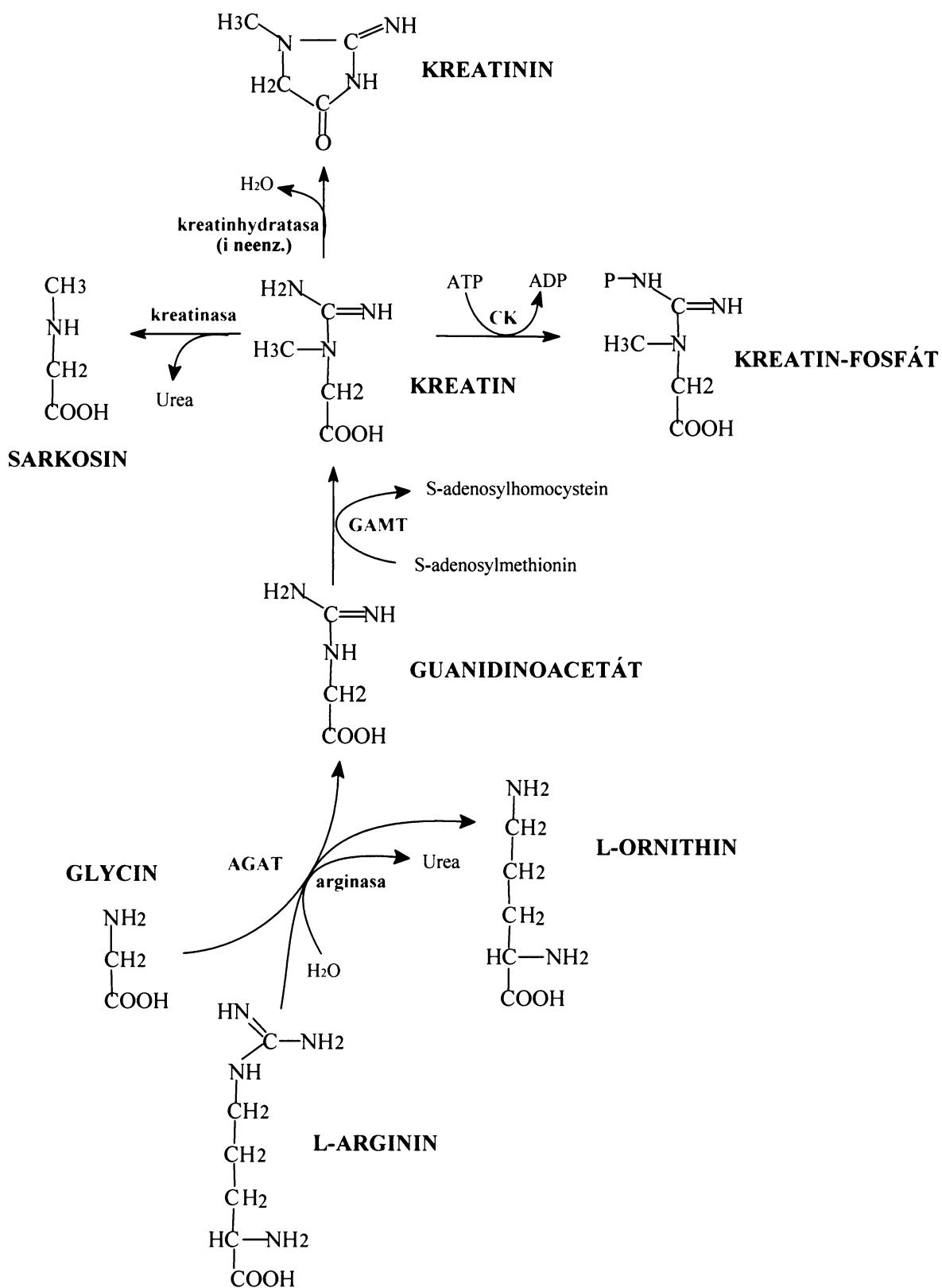
Na biosyntéze kreatinu se podílejí aminokyseliny arginin a glycín. Proces biosyntézy probíhá takto:

1. Arginin-glycintransamidáza (AGAT, EC 2.1.4.1) katalyzuje přenos amidinové skupiny z arginingu na glycín za vzniku ornithinu a guanidinacetátu [13]. Nejvyšší aktivita AGAT je v pankreatu, ledvinách a játrech [14].
2. Působením guanidinacetátmethyltransferázy (GAMT, EC 2.1.1.2) se na guanidinacetát přenáší methylová skupina (donorem je S-adenosylmethionin) za vzniku kreatinu [15].

Ve svalech člověka je uloženo v průměru kolem 120 g kreatinu v závislosti na typu stravy a množství svalové hmoty. 50 % kreatinu se vytváří endogenně, ostatní kreatin se do těla dostává potravou, zejména z masa a ryb.

Kreatin může také sloužit i jako doplněk sportovní výživy, užívá se 100% kreatin monohydrát. Zvýšená zásoba kreatinu ve svalu znamená, že je k dispozici více energie pro krátké výkony o vysoké intenzitě. Více kreatinu ve svalu může přispívat ke kompenzaci negativních efektů kyseliny mléčné. Vysoká koncentrace kreatinu ve svalu může rovněž urychllovat proces regenerace po výkonu. Významnější efekt užívání kreatinu se projevuje u vegetariánů, kteří mají absenci živočišné stravy a s tím spojený snížený příjem kreatinu. Kreatin není návyková ani toxická látka, při větších dávkách se přebytečný kreatin vylučuje močí v podobě kreatininu [16].

BIOSYNTESA KREATINU



Obr. 2. 1. Biosyntéza kreatinu

2. 3. Poruchy metabolismu kreatinu

Dosud byly popsány tři poruchy metabolismu kreatinu:

1. Deficit guanidinacetátmetyltransferázy (GAMT, S–adenosyl–L–methionin: N–guanidinacetát–methyltransferáza, MIM 601240)
2. Deficit arginin-glycintransamidázy (AGAT, L–arginin:glycin–amidintransferáza, MIM 602360)
3. Deficit kreatinového transportéru (CRT, MIM 300036)

2. 3. 1. Deficit guanidinacetátmetyltransferázy

Jako první dědičná porucha v metabolismu kreatinu byl v roce 1994 popsán deficit guanidinacetátmethyltransferázy [17]. Dosud byly publikovány údaje o přibližně dvaceti pacientech [18]. Gen pro GAMT byl lokalizován na chromozomu 19p13.3 [19]. Dědičnost je autosomálně recesivní. Pacienti s deficitem GAMT mají systémovou depleci kreatinu způsobenou zablokováním biosyntézy kreatinu a následně i deficitem kreatinfosfátu, což bylo prokázáno *in vivo* fosforovou magnetickou resonanční spektroskopíí. *In vivo* protonová magnetická resonanční spektroskopie ukázala, že pacienti s deficitem GAMT mají extrémně nízkou koncentraci kreatinu v mozku, zatímco guanidinacetát - bezprostřední prekursor kreatinu a substrát pro chybějící enzymovou aktivitu - se hromadí v neobvykle vysokých koncentracích. Dalším nálezem je nízká koncentrace kreatininu v séru a moči, stejně jako nízká koncentrace kreatinu v plazmě a mozkomíšním moku. Akumulace guanidinacetátu vede k utváření neobvyklých sloučenin guanidinu, které jsou toxicke pro některé buňky [20].

2. 3. 2. Deficit arginin-glycintransamidázy

Další dědičná porucha v metabolismu kreatinu je deficit arginin-glycintransamidázy. Deficit AGAT byl poprvé popsán v roce 2001 u dvou sourozenců

ženského pohlaví s mentální retardací [4]. Dosud byly publikovány celkem čtyři případy. Na rozdíl od deficitu GAMT zde není syntetizován guanidinacetát, jehož koncentrace v moči a plazmě je nízká a aktivita GAMT je normální. Enzymová aktivita AGAT byla pod úrovní detekce. Dědičnost je autosomálně recessivní. Gen pro AGAT je lokalizován na chromozomu 15q15.3 [21].

2. 3. 3. Deficit kreatinového transportéru

První případ defektu transportu kreatinu byl prezentován v roce 2001 u šestiletého chlapce. Dosud bylo popsáno okolo dvaceti případů tohoto onemocnění [11]. Koncentrace guanidinacetátu v tělních tekutinách tohoto pacienta (plazma, moč) byla ve fyziologickém rozmezí, zatímco koncentrace kreatinu v moči a plazmě byla zvýšena. Koncentrace kreatinu v mozku, která byla zjištěna *in vivo* magnetickou resonanční spektroskopii, byla extrémně nízká. Na rozdíl od deficitu GAMT a AGAT zde nedošlo ke zvýšení koncentrace kreatinu v mozku ani při suplementaci vysokými dávkami.

Biochemickým a molekulárně genetickým vyšetřením bylo zjištěno, že tento pacient a jeho rodina je postižena X-vázaným syndromem poruchy transportu kreatinu, který je důsledkem hemizygotní mutace v genu SLC6A8 [22,23]. Sekvence tohoto genu byla určena a lokalizována na X-chromozomu distálně od genu glukosa-6-fosfátdehydrogenázy na lokusu Xq28 [24]. Další gen pro transportér kreatinu, který je exprimován ve spermiích, byl identifikován na chromozomu 16p11.2 [25].

2. 3. 4. Klinické příznaky

Klinicky se deficity metabolismu kreatinu projevují především postižením centrálního nervového systému. Nejčastějším symptomem je psychomotorická retardace nebo časný vývojový útlum asi od čtvrtého měsíce věku pacienta. Mezi další příznaky patří porucha vývoje řeči, hypotonie, extrapyramidalová symptomatologie. Častá je epilepsie, někdy obtížně kompenzovatelná s malými nebo nespecifickými změnami

v EEG záznamu [26]. Mohou se vyskytnout autistické projevy až sebepoškozování, mentální retardace bez dalších symptomů. Abnormální intenzita signálu v bazálních gangliích na MR mozku může být příčinou extrapyramidové symptomatologie.

Tyto příznaky jsou popisovány u všech typů kreatinového deficitu, objevují se však i u širokého spektra dalších chorob, které je nutné odlišit specializovaným vyšetřením. Klinické příznaky typické pro poruchy metabolismu kreatinu jsou uvedené v tabulce 2. 1.

Tab. 2. 1. Klinické příznaky deficitů kreatinu

Porucha	Klinické příznaky	Biochemické charakteristiky	Diagnostika	Potvrzení diagnózy
GAMT	Mentální retardace	Deficit kreatinu v mozku	MRS mozku	Aktivita GAMT (f,l)
	Opoždění řeči	Akumulace guanidinacetátu	GAA v u, p, csf, dbs	
	Epilepsie	Nízká exkrece kreatinu a kreatininu	Kreatinin v moči/24 hod, kreatin a kreatinin v csf [27,28]	Mutace GAMT (b, f, l, dbs)
	Extrapyramidové příznaky	Vysoký poměr kyselina močová/kreatinin v moči	Kreatin, kreatinin, kyselina močová v moči	
AGAT	Mentální retardace	Deficit kreatinu v mozku, nízká exkrece GAA	MRS mozku, GAA v u, p, csf, dbs	Aktivita AGAT (f,l)
	Opoždění řeči	Nízká exkrece kreatinu ?, nízká exkrece kreatininu ?	Kreatin v moči, kreatinin v moči za 24 hod	Mutace AGAT (b, f, l, dbs)
	Epilepsie			
CRT	Mentální retardace	Deficit mozkového kreatinu	MRS mozku	Aktivita CRT (f,l)
	Opoždění řeči	Nízká exkrece kreatininu	Kreatinin v moči za 24 hod	Mutace CRT (b,f,l)
	Epilepsie	Vysoký poměr kreatin/kreatinin v moči	Kreatin a kreatinin v moči	

2. 3. 5. Referenční rozmezí

V tabulce 2. 2. a 2. 3. jsou uvedena referenční rozmezí guanidinacetátu a kreatinu z různých laboratoří, jejichž hodnoty byly vyhledány v literatuře. Jednotlivé hodnoty se liší, což je způsobeno různými metodami používanými na jednotlivých pracovištích, různou dobou jejich zavedení a také rozdílnou věkovou skupinou zdravých kontrolních jedinců. Hodnoty kreatinu se mohou měnit až desetinásobně v závislosti na svalové hmotě.

Tab. 2. 2. Koncentrace GAA v moči [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]

Zdroj	Fyziologické rozmezí	Deficit GAMT
Stöckler S., Metabolism, 1997 [20]	63 - 429	2224 - 3987
Masaharu Y., Anal Biochem, 1997	109 - 759	—
Mercimek – Mahmutoğlu S., SSIEM 2005 [29]	30 – 640	—

Tab. 2. 3. Koncentrace kreatinu v moči

Zdroj	Fyziologické rozmezí	Deficit GAMT
Stöckler S., Metabolism, 1997	46 - 5250 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	57 – 106 $\mu\text{mol.l}^{-1}$
Besley G. T. N., Journal of Met. Disease, 2004 [30]	42 – 5952 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	—
Valongo C., Clin. Chim. Acta 2004 [31]	40 – 1510 mmol.mol ⁻¹ kreatininu	—
Bizzi A, Annals of Neurol, 2002 [32]	40 – 360 mmol.mol ⁻¹ kreatininu	—

2. 3. 6. Laboratorní diagnostika a diferenciální diagnostika

Laboratorní vyšetření deficitu GAMT, AGAT a CRT je zvažováno u pacientů s mentální retardací, opožděním řeči, epilepsií, extrapyramídovými symptomy,

autistickým chováním, hypotonii. Podnětem k vyšetření metabolismu kreatinu může být opakovaný nález nízké koncentrace kreatininu v běžném biochemickém vyšetření u pacientů s některými z uvedených příznaků.

Pro cílené metabolické vyšetření ve světě je nejčastěji využíváno stanovení kreatininu, kreatinu a guanidinacetátu v plazmě a moči. Nejvhodnější je sběr moči za 24 hodin. Dále se provádí stanovení enzymové aktivity GAMT a AGAT. Dříve začínalo vyšetřovací schéma mozkového kreatinu vyšetřením magnetickou resonanční spektroskopíí, které je však finančně nákladné. Po zavedení nových laboratorních metod se postup změnil - nejprve se stanovuje denní exkrece kreatininu, provádí se vyšetření kreatinu, guanidinacetátu v moči event. v likvidu, případně je vyšetření pacienta doplněno o MRS mozkového kreatinu. V případě pozitivního nálezu se provádí vyšetření enzymové aktivity GAMT nebo AGAT. Pro potvrzení diagnózy se provádí mutační analýza v genech pro GAMT, AGAT a CRT.

Guanidinacetát a kreatin lze stanovit *in vivo* [¹H] magnetickou resonanční spektroskopíí nebo *in vitro*: kolorimetricky, chromatograficky (TLC, HPLC, GC/MS, LC/MS).

2. 3. 7. Léčba

Deficity GAMT a AGAT jsou léčitelná onemocnění. Jejich léčba spočívá v orální suplementaci monohydátem kreatinu (350 mg – 2 g/kg tělesné hmotnosti). Dochází i k odstranění deficitu kreatinu v mozku a v dalších tkáních. Při suplementaci dojde ke zlepšení některých klinických symptomů jako jsou svalová slabost, extrapyramidové příznaky, potíže s polykáním a křeče. Jiné symptomy způsobené pravděpodobně hromaděním guanidinacetátu většinou přetravají. Mezi tyto přetravající symptomy patří opoždění řeči, mentální retardace, autismus. Proto další podpůrnou terapií někdy bývá omezení argininu ve stravě (inhibice syntézy guanidinacetátu) a zároveň substituce ornitinu pro zachování funkčnosti močovinového cyklu. Deficit kreatinového transportéru zatím neumíme léčit [33].

2. 4. Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie je jedna z nejužívanějších chromatografických screeningových technik. Klasická TLC je jednoduchá, laciná metoda vyžadující minimální instrumentaci a je používaná pro separace jednoduchých směsí a k identifikaci složek. Moderní varianta TLC, vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie využívá účinné stacionární fáze o malé a jednotné velikosti částic a příslušnou instrumentaci pro automatické dávkování, vyvíjení a detekce. U TLC je stacionární pevná fáze nanesená v tenké vrstvě na vhodné desce. Mobilní fáze se skládají většinou ze směsi rozpouštědel, někdy s přídavky kyselin, bází nebo tlumivých roztoků. Vzorek umístěný asi 1 až 1,5 cm od okraje desky se nanese na start ve formě skvrny nebo pásu. Tento okraj desky se ponoří do mobilní fáze, která se nechá vzlínat póry stacionární fáze v TLC. Tenká vrstva je umístěna v komoře sycené parami mobilní fáze. Mobilní fáze unáší analyty, které mohou být rozdílně zadržovány stacionární fází. Dříve než dosáhne čelo mobilní fáze konce desky, ukončí se analýza, deska se vyjmé z komory a vysuší se. K detekci skvrn se použije buď jejich přirozeného zabarvení nebo se skvrny zviditelní reakcí s vhodným činidlem.

Základní veličina charakterizující polohu separovaných zón je retenční faktor R_f definovaný jako poměr vzdáleností, které urazily složka vzorku a čelo mobilní fáze. Hodnota R_f se pohybuje v mezích <0, 1>. Pokud je $R_f = 0$, látka nemigruje, pokud je $R_f = 1$, pak látka není zadržována stacionární fází vůbec a migruje s čelem rozpouštědla. Při identifikaci látek pomocí hodnot R_f se používají příslušné standardy [34].

2. 5. Tandemová hmotnostní spektrometrie

Jednou z metod pro stanovení guanidinacetátu, kreatinu a kreatininu je tandemová hmotnostní spektrometrie. Při MS/MS jsou ionty podrobeny dvěma nebo více hmotnostním analýzám. Nejčastěji jsou pro MS/MS analýzu používány trojitě kvadrupolové analyzátory (viz obr. 2. 2.).

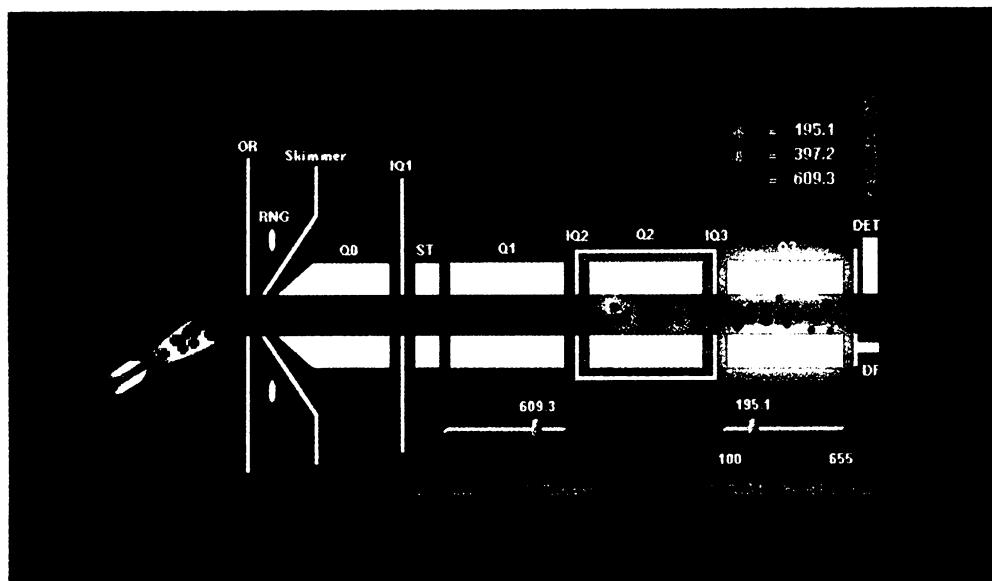
Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a následnému

záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. Látky jsou fragmentovány specificky podle své struktury, což umožňuje jejich následnou identifikaci. Tandemová hmotnostní spektrometrie umožňuje rychlou analýzu bez použití separačních metod (GC, HPLC) i ve složité matrici.

Analýza na trojitém kvadrupólu probíhá ve čtyřech krocích:

1. ionizace molekuly a přechod ionizovaných molekul do plynné fáze
2. separace molekul podle poměru hmotnosti a náboje v prvním hmotnostním spektrometru
3. fragmentace separovaných molekul v kolizní cele
4. separace a detekce jednotlivých fragmentů molekul

Při stanovení skupiny strukturně podobných látek ve složité směsi, např. krvi nebo moči, využíváme toho, že tyto látky odštěpují společný charakteristický fragment. Kvantifikace se provádí pomocí vnitřních standardů stejné struktury jako stanovované látky, které jsou ale označené stabilními izotopy (např. deuteriem ^2H , uhlíkem ^{13}C , dusíkem ^{15}N). Pomocí MS/MS můžeme stanovit i nízké koncentrace látek, a to mnohem rychleji než jinými metodami. Jedna analýza pak bez použití separační techniky s využitím přímého nástřiku vzorku do tandemového hmotnostního spektrometru trvá jen několik minut a během jednoho dne lze vyšetřit několik set vzorků. Vysoká citlivost přístroje umožňuje stanovit množství analytu řádově v pikogramech a tedy i množství biologického materiálu potřebného k vyšetření se pohybuje v několika mikrolitrech krve, moči atd. Omezením využitelnosti této metody je molekulová hmotnost stanovované látky (cca 1000 kilodaltonů) [2].



Obr. 2. 2. Schéma tandemového hmotnostního spektrometru - ionizace elektrosprejem, nabité ionty procházejí trojitym kvadrupolem (Q1 – Q3), Q2 je kolizní cela, ionty dopadají na detektor (DET)

2. 5. 1. Iontový zdroj

Iontový zdroj slouží k převedení analyzované látky do ionizovaného stavu. Veškeré informace poskytované hmotnostním spektrometrem se týkají pouze částic nesoucích náboj, ionizace analyzované látky je nezbytným předpokladem analýzy. Podle množství dodané energie se dělí ionizační techniky na tzv. měkké, při nichž je energetický přebytek dodaný ionizované molekule malý a pravděpodobnost fragmentace nízká, a na tzv. tvrdé, při nichž dodaná energie postačuje k rozsáhlejší fragmentaci primárně vzniklého iontu. V další části jsou uvedeny některé způsoby ionizace ve spojení s kapalinovou chromatografií.

2. 5. 2. Měkké ionizační techniky ve spojení s LC

Ionizace elektrosprejem (ESI) je v současnosti nejčastěji používaným iontovým zdrojem pro kombinaci LC/MS. K rozprášení kapalné fáze přivedené do kovové kapiláry dochází vlivem nehomogenního elektrického pole mezi ústím této kapiláry, na níž je přivedeno vysoké napětí řádu jednotek kilovoltů, a protielektrodou, jež je uzemněna. V procesu elektrosprejování vznikají velmi drobné kapičky kapalné fáze s vysokou hustotou povrchového náboje. Ty jsou protiproudem horkého inertního plynu rychle vysušeny, disociované látky mechanismem iontového vypařování přecházejí přímo do fáze plynné a vzniklé ionty se vedou vstupní štěrbinou přes iontovou optiku do hmotnostního spektrometru. V procesu ionizace mohou vznikat kladně i záporně nabité ionty v závislosti na polaritě napětí vloženého na protielektrodu.

Další ionizační technikou je chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Vstupní kapilára, kterou se přivádí kapalná fáze z chromatografické kolony, ústí do pneumatického rozprašovače, jehož plášt' je vyhříván na teplotu až 700°C. Dochází k efektivnímu rozprášení a odpaření kapalné fáze. V prostoru koronového výboje generovaného na hrotu tzv. koronové jehly, dochází k ionizaci par mobilní fáze nebo molekul zmlžovacího plynu a k tvorbě chemicko-ionizačního plazmatu. Molekuly analyzovaných látek jsou pak následně ionizovány mechanismem chemické ionizace přenosem protonu za vzniku kvazimolekulárních iontů typu $[M+H]^+$ nebo $[M-H]^-$.

3. Experimentální část

3. 1. Použité chemikálie

Aceton (C_3H_6O , p.a., Penta, $M_r = 58,08$)

Acetonitril (C_2H_3N , p.a., Fluka, $M_r = 41,05$)

Brom (Br_2 , RNDr. J. Kulich, Hradec Králové/Říčany, $M_r = 159,8$)

Butan-1-ol ($CH_3(CH_2)_3OH$, p.a., Merck, $M_r = 74,12$)

Demineralizovaná voda (H_2O , $M_r = 18$)

Guanidinacetát ($C_3H_7N_3O_2$, Sigma, $M_r = 117,1$)

Guanidinacetát-2,2-d₂, ($C_3H_9N_3O_2$, 98 %, Isotec, $M_r = 119,1$)

Hydroxid sodný (NaOH, p.a. Penta, $M_r = 40$)

Chlorbutan (C_4H_9Cl , p.a., Merck, $M_r = 92,58$)

8-hydroxychinolin (C_9H_7NO , 99 %, Aldrich, $M_r = 145,16$)

Kreatin ($C_4H_9N_3O_2$, Sigma, $M_r = 131,1$)

Kreatin-d₃ H_2O (methyl-d₃), ($C_5H_{11}N_3O_2$, 98 %, Isotec-Sigma, $M_r = 152,17$)

Kreatinin ($C_4H_7N_3O$, Sigma, $M_r = 113,1$)

Kreatinin-methyl-d₃, ($C_5H_9N_3O$, 98 %, Isotec, $M_r = 116,4$)

Kyselina arginijantarová barnatá sůl ($C_{10}H_{16}N_4O_5$, Serva, $M_r = 409,6$)

Kyselina chlorovodíková (HCl, p.a., Penta, $M_r = 36,5$)

Kyselina mravenčí ($C_2H_2O_2$, p.a., Merk, $M_r = 57,99$)

Kyselina octová ($C_2H_4O_2$, p.a., Penta, $M_r = 60,05$)

L-arginin ($C_6H_{14}N_4O_2$, Lachema, $M_r = 174,6$)

L-arginin hydrochlorid ($C_6H_{15}N_4O_2Cl$, Lachema, $M_r = 220,7$)

L-homoarginin hydrochlorid ($C_7H_{17}N_4O_2Cl$, ICN Biomedicals Inc., $M_r = 224,7$)

Methanol (CH_3OH , p.a., Merck, $M_r = 32,04$)

3. 2. Příprava roztoků

Brom: roztok byl připraven rozpuštěním 0,1 ml Br₂ v 0,5 M NaOH a doplněn na 50 ml.

Derivatizační činidlo: butan-1-ol 100 ml, kyselina chlorovodíková 14,6 ml, chlorbutan 46 ml.

Guanidinacetát: standardní roztok o koncentraci 300 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, byl připraven rozpuštěním $3,51 \cdot 10^{-3}$ g guanidinacetátu v demineralizované vodě a doplněn na 100 ml.

Guanidinacetát-2,2-d₂: zásobní roztok o koncentraci 1,5 mmol.l⁻¹ byl připraven rozpuštěním $1,788 \cdot 10^{-3}$ g v 10 ml acetonitrilu.

Hydroxid sodný: roztok o koncentraci 0,5 mol.l⁻¹, byl připraven rozpuštěním 10 g NaOH a doplněn na 500 ml.

8-hydroxychinolin: roztok o koncentraci 0,1 % byl připraven rozpuštěním 0,025 g 8-hydroxychinolinu v acetonu a doplněn na 25 ml.

Kreatin-d₃ H₂O (methyl-d₃): zásobní roztok o koncentraci 3 mmol.l⁻¹ byl připraven rozpuštěním $4,565 \cdot 10^{-3}$ v 10 ml acetonitrilu.

Kreatinin-methyl-d₃: zásobní roztok o koncentraci 15 mmol.l⁻¹ byl připraven rozpuštěním $1,742 \cdot 10^{-2}$ g ve 10 ml acetonitrilu.

L-arginin hydrochlorid: roztok o koncentraci 1,2 mmol.l⁻¹ byl připraven rozpuštěním 0,00632 g a doplněn na 25 ml demineralizovanou vodou.

L-homoarginin hydrochlorid: roztok o koncentraci 1,2 mmol.l⁻¹ byl připraven rozpuštěním 0,00674 g a doplněn na 25 ml demineralizovanou vodou.

L-arginin: roztok o koncentraci 1,2 mmol.l⁻¹ byl připraven rozpuštěním 0,01228 g doplněn na 25 ml demineralizovanou vodou.

Mobilní fáze pro MS/MS: 1000 ml methanol, 1000 ml acetonitril a 0,4 ml kyseliny mravenčí.

Příprava deuterovaných vnitřních standardů: zásobní roztoky d₂-GAA, d₃-CT, d₃-CTN se smíchají v poměru 1 : 1 : 1 a naředí methanolem (1 ml smíchaných deuterovaných vnitřních standardů + 99 ml methanolu), deuterované vnitřní standardy byly připraveny tak, aby jejich koncentrace odpovídala normě pro guanidinacetát 29 – 640 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, kreatin 16 – 5270 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a pro kreatinin

$360 - 12\ 100 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Koncentrace deuterovaných standardů ve vzorku moči byla zvolena pro GAA $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, CT $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$, CTN $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$, tj. na $20 \mu\text{l}$ moči připadá 1 nmol GAA, 2 nmol CT a 10 nmol CTN.

Příprava kalibračních roztoků pro MS/MS: koncentrace zásobních roztoků pro MS/MS byla 40 mmol.l^{-1} , k jednotlivým metabolitům – kreatin, kreatinin a guanidinacetát - byly připraveny i příslušné deuterované standardy s koncentrací 20 mmol.l^{-1} . Pro kalibrační řadu kreatinu bylo naváženo $0,05244 \text{ g}$ std kreatinu o koncentraci 40 mmol.l^{-1} a rozpuštěno v 10 ml demineralizované vody, d_3 -kreatin o koncentraci 20 mmol.l^{-1} byl připraven rozpuštěním $0,01522 \text{ g}$ d_3 -kreatinu v 5 ml demineralizované vody. Roztok guanidinacetátu o koncentraci 40 mmol.l^{-1} byl připraven rozpuštěním $0,02342 \text{ g}$ std guanidinacetátu v 10 ml demineralizované vody, roztok 20 mmol.l^{-1} d_2 -guanidinacetátu byl připraven rozpuštěním $0,01192 \text{ g}$ std d_2 -guanidinacetátu v 5 ml demineralizované vody. Roztok kreatininu o koncentraci 40 mmol.l^{-1} byl připraven rozpuštěním $0,04524 \text{ g}$ std kreatininu v 10 ml demineralizované vody, roztok d_3 -kreatininu o koncentraci 20 mmol.l^{-1} byl připraven rozpuštěním $0,01161 \text{ g}$ std d_3 -kreatininu v 5 ml demineralizované vody. Dále byly standardní roztoky kreatinu, kreatininu a guanidinacetátu o koncentraci 40 mmol.l^{-1} připraveny také v moči. Deuterované standardy použité pro kalibrační přímky v moči byly připraveny v demineralizované vodě. Kreatin, kreatinin a guanidinacetát byl poté naředěn na požadované koncentrace $5, 10, 15$ a 20 mmol.l^{-1} .

3. 3. Přístroje a pomůcky

Automatický spektrofotometrický analyzátor Hitachi 902 (Roche, Švýcarsko)

Derivatizační pec (Binder, USA)

Hliníková destička 25 DC – Alufolien cellulose $20 \times 20 \text{ cm}$ (Merk, Německo)

Horizontální vyvíjecí chromatografická komora (Camag, Švýcarsko)

Chromatografická vana (Camag, Švýcarsko)

Mikrotitrační destička (Chromacol, Velká Británie)

Prohlížeč Camag k prosvícení destiček (Camag, Švýcarsko)

Skleněná HPTLC destička – Kieslegel cellulose 10 x 10 cm (Merk, Německo)

Tandemový hmotnostní spektrometr (API 2000, Sciex, Kanada)

Termoregulační blok (Techne, USA)

4. Výsledky a diskuze

4. 1. Stanovení guanidinacetátu pomocí HPTLC

Pro identifikaci guanidinacetátu v moči byla použita modifikovaná Sakaguchiho reakce [35], která slouží k detekci monosubstituovaných guanidinů. Guanidinové deriváty dávají s α -naftolem a NaClO citlivou barevnou reakci. V reakci místo NaClO byl použit NaBrO [36]. Mezi guanidinové deriváty patří například arginin, kyselina argininjantarová, homoarginin a guanidinacetát. Podstatou metody bylo jednorozměrné rozdělení guanidinacetátu z moči na tenké vrstvě, ponoření do roztoku 8-hydroxychinolinu v acetonu a následná detekce roztokem bromu v NaOH [37].

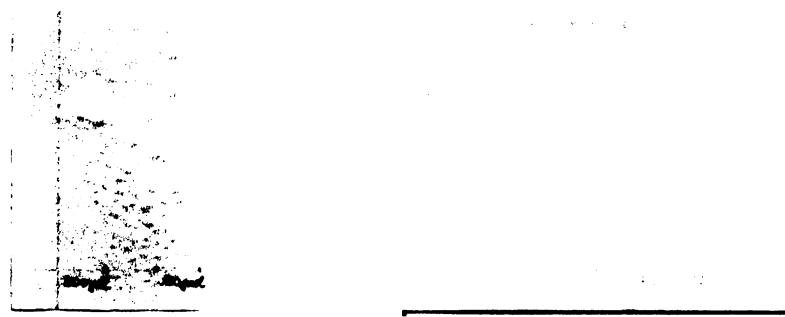
Pro metodu byla použita hliníková destička 25 DC – Alufolien 20 x 20 cm cellulose a skleněná HPTLC destička cellulose 10 x 10 cm. Na skleněné a hliníkové TLC destičky bylo naneseno 10 μ l standardního roztoku guanidinacetátu o koncentraci 300 μ mol.l⁻¹ a 150 μ mol.l⁻¹. Destičky byly vyvinuty ve vyvíjecí směsi ve složení: 35 ml 1-butanolu, 35 ml acetonu, 7 ml kyseliny octové, 23 ml demineralizované vody [38].

Vyvíjení probíhalo v chromatografické vaně dokud čelo nedosáhlo 1 cm pod okraj TLC desky. Pro zvýšení R_f guanidinacetátu byly TLC desky dvakrát vyvíjeny ve stejné směsi. Jedna eluce trvala přibližně hodinu. Mezi jednotlivými cykly byly destičky vysušeny fénem. Vysušené destičky byly po druhém vyvíjení ponořeny do 0,1 % roztoku 8-hydroxychinolinu v acetonu. Po detekci roztokem bromu v NaOH byla hodnocena červeno–oranžová frakce guanidinacetátu.

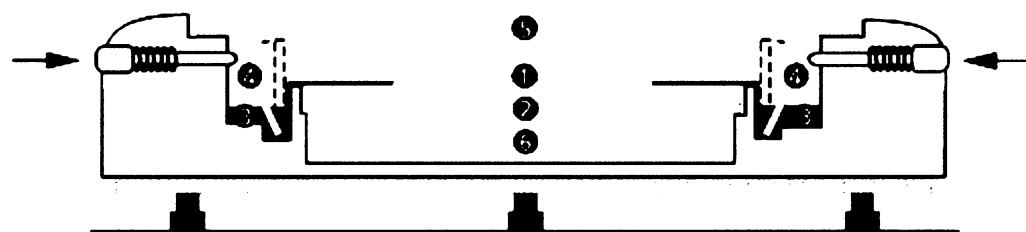
4. 1. 1. Testování nosiče a vyvíjecího zařízení

Pro metodu byla použita hliníková destička 25 DC – Alufolien 20 x 20 cm cellulose a skleněná TLC destička cellulose 10 x 10 cm. Použitá hliníková destička se neosvědčila, po detekci roztokem bromu docházelo k odlupování nosiče od hliníkové TLC desky a detekce guanidinacetátu nebyla možná. Proto byla hliníková TLC deska nahrazena skleněnou HPTLC deskou 10 x 10 cm, která se ukázala být vhodná pro stanovení guanidinacetátu. Nedocházelo k odlupování nosiče od desky a jednotlivé frakce byly dobře oddělené. Skleněnou HPTLC desku bylo možno prosvítit přístrojem Camag, což je výhodné pro vyhodnocování barevné frakce guanidinacetátu. Na obr. 4. 1. je hliníková TLC deska s odlupujícím se nosičem a skleněná TLC deska, která byla dále využívána k identifikaci guanidinacetátu.

Pro stanovení byla použita vertikální chromatografická vana a horizontální vyvíjecí komora Camag, viz obr. 4. 2. Obsah vyvíjecí směsi v horizontální vyvíjecí komoře bylo 7 ml butan-1-olu, 7 ml acetonu, 1,4 ml kyseliny octové a 4,6 ml demineralizované vody. Ve vertikální chromatografické vaně byla celková spotřeba vyvíjecí směsi 100 ml a jedna eluce trvala jednu hodinu. V horizontální vyvíjecí komoře byla celková spotřeba vyvíjecí směsi 20 ml a jedna eluce trvala přibližně 50 minut. Pro další stanovení byla proto použita horizontální chromatografická komora, jejíž výhodou bylo menší množství použitých chemikalií oproti vertikální chromatografické vaně a zkrácení doby eluce celkem asi o 30 minut. Hodnota R_f pro guanidinacetát byla u obou použitých komor 0,57.



Obr. 4. 1. Hliníková TLC deska vlevo a skleněná TLC deska vpravo

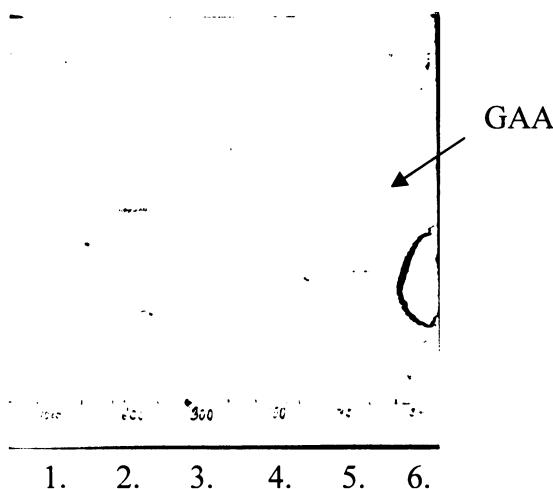


Obr. 4. 2. Horizontální vyvíjecí komora - do prostoru 1 se vkládá TLC deska, do prostoru 3 se vpraví 3 ml vyvíjecí směsi a prostoru 6 se vlévá vyvíjecí směs, horizontální vyvíjecí komora lze použít pro vyvíjení dvěma směry

4. 1. 2. Stanovení meze detekce

V rámci validace metody byla určena mez detekce (viz obr. 4. 3.). K sestrojení kalibrační závislosti byla připravena sestupná koncentrační řada standardů (std) guanidinacetátu. Koncentrace zásobního roztoku std guanidinacetátu byla $1200 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (tj. 0,01404 g ve 100 ml H_2O), který byl postupně ředěn na $600 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $300 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $150 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $75 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $37,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (tj. 10 ml $1200 \mu\text{mol.l}^{-1}$ GAA + 10 ml H_2O na $600 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a dále stejným způsobem). Jednotlivé standardní roztoky GAA byly po $10 \mu\text{l}$ naneseny na skleněnou HPTLC desku. Na jednu destičku $10 \times 10 \text{ cm}$ bylo

naneseno šest vzorků o různé koncentraci. Mez detekce byla vizuálně stanovena na $75 \mu\text{mol.l}^{-1}$ guanidinacetátu.



Obr. 4. 3. Mez detekce: 1) $1200 \mu\text{mol.l}^{-1}$ GAA, 2) $600 \mu\text{mol.l}^{-1}$ GAA, 3) $300 \mu\text{mol.l}^{-1}$ GAA, 4) $150 \mu\text{mol.l}^{-1}$ GAA, 5) $75 \mu\text{mol.l}^{-1}$ GAA, 6) $37,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ GAA

4. 1. 3. Stanovení guanidinacetátu v moči

Jako materiál ke stanovení guanidinacetátu je vhodný sběr moči za 12 nebo 24 hodin. Před odlitím vzorku moči je nutno celý objem moči promíchat. U každého vzorku moči byla stanovena koncentrace kreatininu Jaffého metodou [39] na automatickém spektrofotometrickém analyzátoru Hitachi 902. Po stanovení koncentrace kreatininu v moči byla na skleněnou HPTLC desku nanesena nativní moč (tab. 4. 1) v množství vypočítaném podle vzorce:

$$X = 10/Y$$

kde X je počet nanesených μl moči a Y hodnota kreatininu v moči (mmol.l^{-1}), stanovená Jaffého metodou.

Tab. 4. 1. Objem nanášeného vzorku moči na TLC desce v μ l

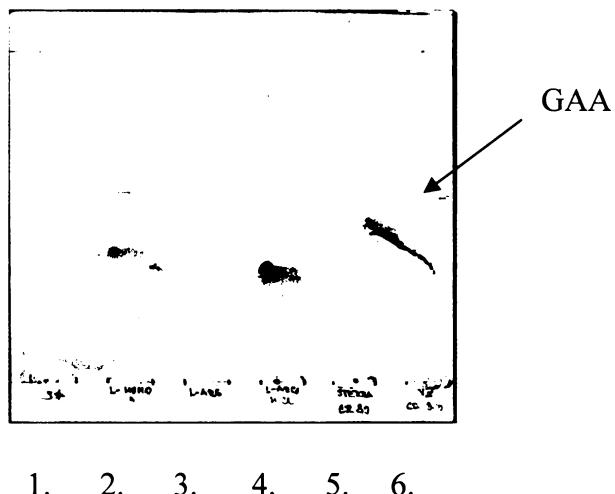
vzorek	Kreatinin (mmol.l^{-1})	Množství moče (μl)
3525	4,1	3
3555	0,9	11
3523	2,4	5
3531	6,2	2
3545	5,7	2
300 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GAA	–	10

Při hodnotách kreatininu v moči vyšších než 1 mmol.l^{-1} byl objem nanášené moči příliš nízký. Proto byla v dalším stanovení koncentrovaná moč ředěna tak, aby hodnota kreatininu byla 1 mmol.l^{-1} a nanáška na destičku tak činila minimálně 10 μl . Maximální možná nanáška na TLC desku je 30 μl moči, to znamená, že vyšetření lze provést u moči s minimální koncentrací kreatininu 0,4 mmol.l^{-1} . U nanášky vyšší než 30 μl by docházelo k rozlití skvrny a následná detekce guanidinacetátu by byla ztížená. Na destičku bylo nanášeno zároveň se vzorky moče i 10 μl standardního roztoku guanidinacetátu o koncentraci 300 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Pozice frakcí byla porovnána se standardem guanidinacetátu naneseným na téže desce.

4. 1. 4. Vliv interferencí

Kvůli možným interferencím bylo na destičku naneseno 10 μl dalších standardních roztoků guanidinových derivátů: L-homoarginin hydrochlorid (1,2 mmol.l^{-1}), argininojantarová kyselina (1,2 mmol.l^{-1}), L-arginin hydrochlorid (1,2 mmol.l^{-1}), naředěná moč (0,1 ml moče + 0,8 ml demineralizované vody) od pacienta s argininojantarovou acidurií a roztok standardu guanidinacetátu (300 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). Na destičce se ukázala červeno – oranžová frakce u standardů homoargininu, argininu a v moči pacienta s argininojantarovou acidurií. Tyto frakce však eluují v jiném místě než

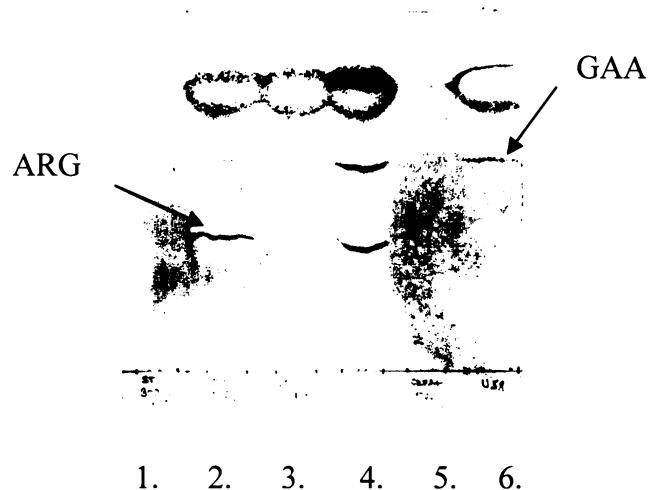
standardní roztok guanidinacetátu. U standardního roztoku homoargininu byl $R_f = 0,38$, kyselina argininjatarová se Sakaguchiho čnidlem nereaguje, u standardního roztoku argininu byl $R_f = 0,33$ a v moči od pacienta s argininjantarovou acidurií byl $jR_f = 0,25$, (viz obr. 4. 4.).



1. 2. 3. 4. 5. 6.

Obr. 4. 4. Interference: 1) std roztok guanidinacetát $300 \mu\text{mol.l}^{-1}$, 2) std homoarginin $1,2 \text{ mmol.l}^{-1}$, 3) std kys. arginijantarová $1,2 \text{ mmol.l}^{-1}$, 4) std arginin $1,2 \text{ mmol.l}^{-1}$, 5) moč od pacienta s argininjantarovou acidurií, 6) kontrolní moč

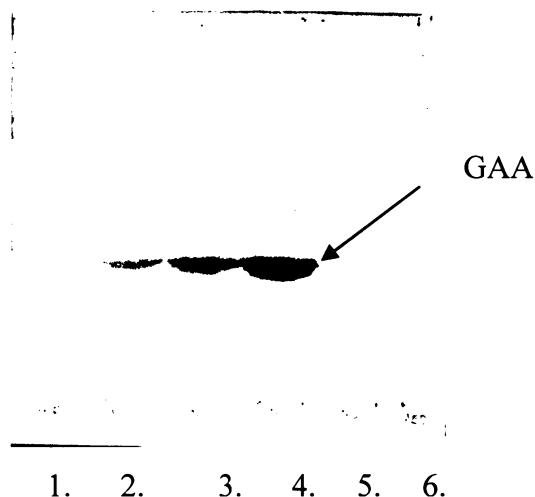
Na další TLC desku bylo naneseno 10 μ l std GAA ($300 \text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$), několik vzorků močí od pacientů s cystinurii, kteří mívají ve své moči výrazně zvýšenou koncentraci argininu a std roztok kreatininu ($1,2 \text{ mmol.l}^{-1}$). Potvrdilo se, že frakce argininu má odlišnou hodnotu $R_f = 0,38$ a neinterferuje s guanidinacetátem. U frakce kreatininu se nevytvořila žádná barevná reakce, kreatinin se Sakaguchiho činidlem nereaguje (viz obr. 4.5.).



Obr. 4. 5. Interference: 1) std GAA $300 \text{ }\mu\text{mol/l}$, 2) moč cystinurie 1, 3) moč cystinurie 2, 4) moč cystinurie 3, 5) std kreatinin $1,2 \text{ mmol/l}$, 6) kontrolní moč

4. 1. 5. Pozitivní vzorek

Dále byla testována „pozitivní“ moč, která byla připravena z fyziologické moči s normálním obsahem guanidinacetátu přidáním standardu GAA v množství 1000, 2000 a $4000 \mu\text{mol.l}^{-1}$, což jsou koncentrace očekávané u pacientů s deficitom GAMT. Na obr. 4. 6. je červeno – oranžová frakce velmi zřetelná u „pozitivních“ močí“ oproti $300 \mu\text{mol.l}^{-1}$ roztoku standardu guanidinacetátu.



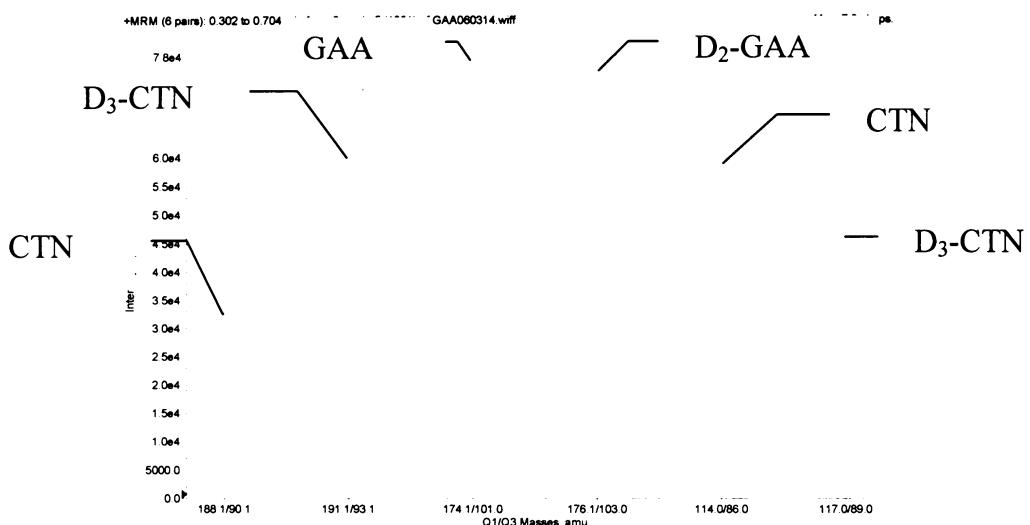
Obr. 4. 6 „Pozitivní moč“: 1) std roztok GAA $300 \mu\text{mol}^{-1}$, 2) moč se přídavkem GAA $1000 \mu\text{mol}^{-1}$, 3) moč se std přídavkem GAA $2000 \mu\text{mol}^{-1}$, 4) moč se std přídavkem GAA $4000 \mu\text{mol}^{-1}$ 5) normální moč, 6) std roztok GAA $150 \mu\text{mol}^{-1}$

4. 2. Stanovení kreatinu, guanidinacetátu a kreatininu tandemovou hmotnostní spektroskopíí

Ke kvantitativnímu vyšetření guanidinacetátu, kreatinu a kreatininu bylo použito tandemové hmotnostní spektrometrie. K měření byl použit tandemový hmotnostní spektrometr API 2000 s ionizací elektrosprejem a přímým nástříkem vzorku (FIA-ESI-MS/MS).

Vzorky byly připraveny na mikrotitrační destičce s 96 jamkami, do jamek byly pipetovány vzorky nativní moči spolu s 200 μl deuterovaných vnitřních standardů v methanolu. Koncentrace vnitřních standardů byla připravena tak, aby jejich koncentrace v metanolu byla u guanidinacetátu 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, kreatinu 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, kreatininu 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a jejich množství odpovídalo fyziologickému rozmezí [40]. Poté následovalo odpaření na termoregulačním bloku při teplotě 40 °C pod cirkulujícím vzduchem. Po odpaření vzorku a vnitřních standardů bylo do jamek napipetováno 100 μl derivatizačního činidla. Poté byla mikrotitrační destička přikryta plastovým uzávěrem a 40 minut inkubována v derivatizační peci při 60 °C. Po inkubaci následovalo opět odpaření na termoregulačním bloku při 40 °C pod cirkulujícím vzduchem. Takto připravené vzorky byly rozpuštěny ve 200 μl mobilní fáze obsahující methanol, acetonitril a kyselinu mravenčí v poměru 1000 : 1000 : 0,4 ($v/v/v$).

Injektovný objem byl 20 μl vzorku při konstantním průtoku mobilní fáze 50 $\mu\text{l/min}$. Napětí na kapiláře bylo +5,5 kV a teplota sušícího plynu byla 100 °C. Analýza jednoho vzorku trvala 3 minuty. V hmotnostním spektrometru byly sledovány produkty rozpadu iontů, přičemž byly monitorovány následující přechody: m/z 174 > 101 pro GAA, m/z 176 > 103 pro d₂-GAA, m/z 188 > 90 pro kreatin, m/z 191 > 93 pro d₃-kreatin, m/z 114 > 86 pro kreatinin, m/z 117 > 89 pro d₃-kreatinin. Doba skenu jednoho přechodu byla jedna sekunda. Intenzity signálů kreatinu, kreatininu, guanidinacetátu a jejich deuterovaných standardů je ukázán na obr. 4. 7. Poměry ploch píků mezi analytem a vnitřním standardem byly použity ke kvantifikaci.

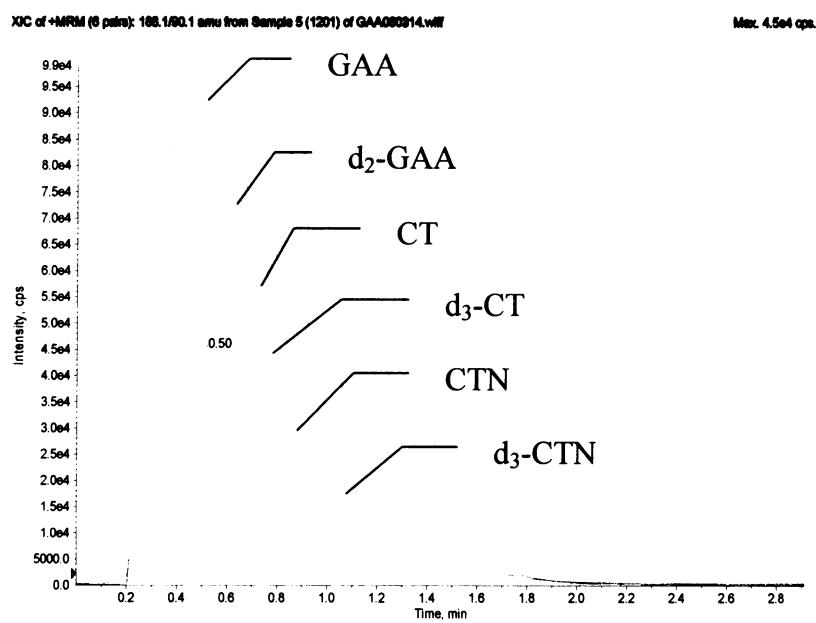


Obr. 4. 7. Intenzity signálů CT, CTN, GAA, d₃-CT, d₃-CTN a d₂-GAA

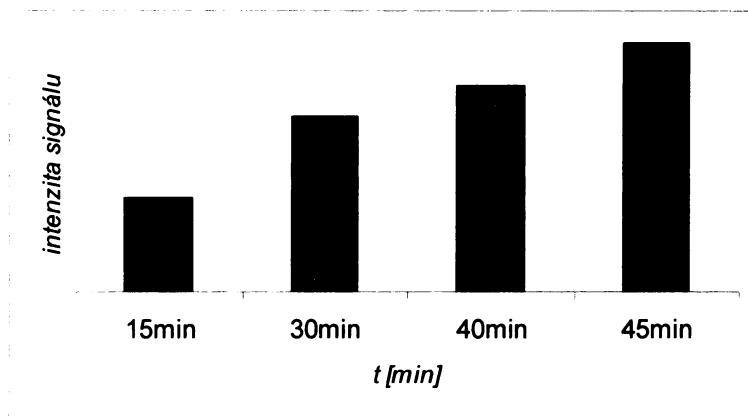
4. 2. 1. Určení množství vzorku moči a doby inkubace

Nejdříve bylo do jamek v mikrotitrační destičce pipetováno automatickou pipetou 20 µl nativní moči a vzorky byly připraveny spolu s deuterovanými vnitřními standardy pro analýzu. Při vyhodnocení hmotnostního spektra byla nalezena velmi nízká intenzita signálu, protože nativní moč obsahuje mnoho dalších látek, které snižují jeho intenzitu. Proto bylo v dalším měření pipetováno pouze 5 µl moči, což se ukázalo jako vyhovující. Záznam analýzy vzorku moče je na obr. 4. 8.

Dále byla testována doba inkubace (15, 30, 40 a 45 minut). Patnáctiminutová doba inkubace vykazovala na hmotnostním spektru nízkou intenzitu signálu. Optimální dobu inkubace pro intenzitu signálu vykazovala destička derivatizovaná 40 minut (viz obr. 4. 9.). Při inkubaci, která by byla delší než 45 minut, by mohlo docházet k rozpadu metabolitů. Další připravované vzorky byly inkubovány po dobu 40 minut.



Obr. 4. 8. Záznam analýzy vzorku moči

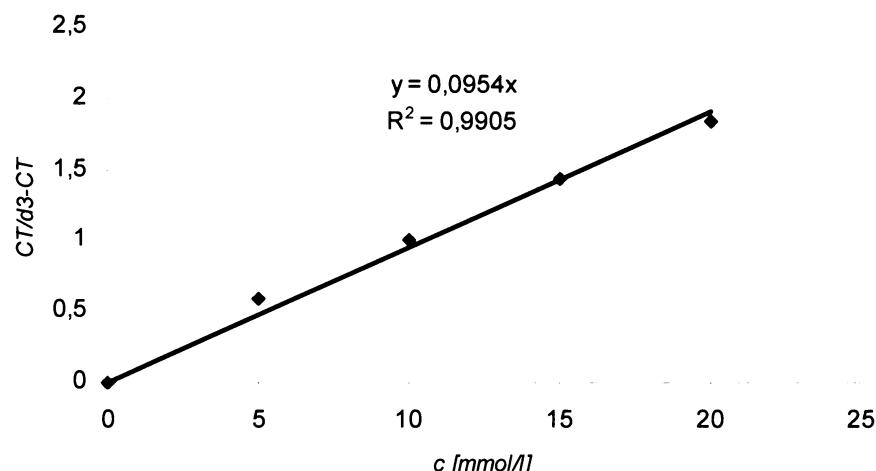


Obr. 4. 9. Závislost intenzity signálu na době derivativace

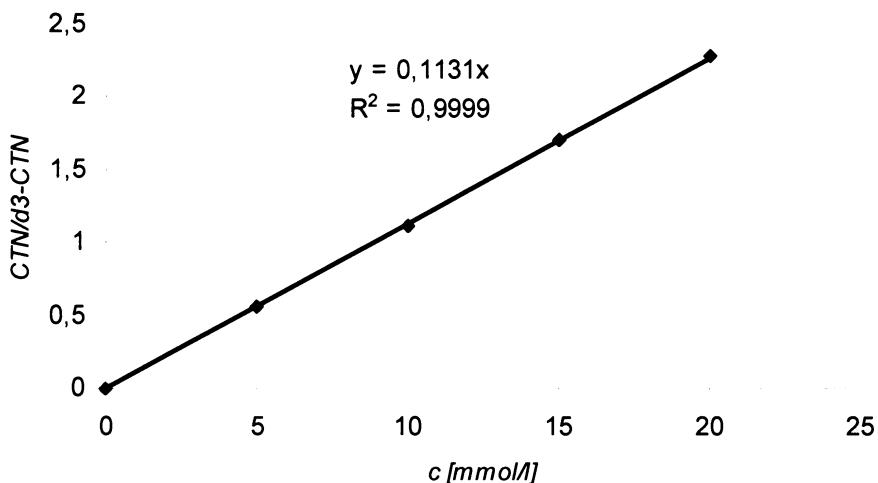
4. 2. 2. Kalibrační závislost

K sestrojení kalibrační závislosti byla připravena sestupná koncentrační řada standardů o koncentraci 20, 15, 10 a 5 mmol.l⁻¹ v demineralizované vodě a v moči pro

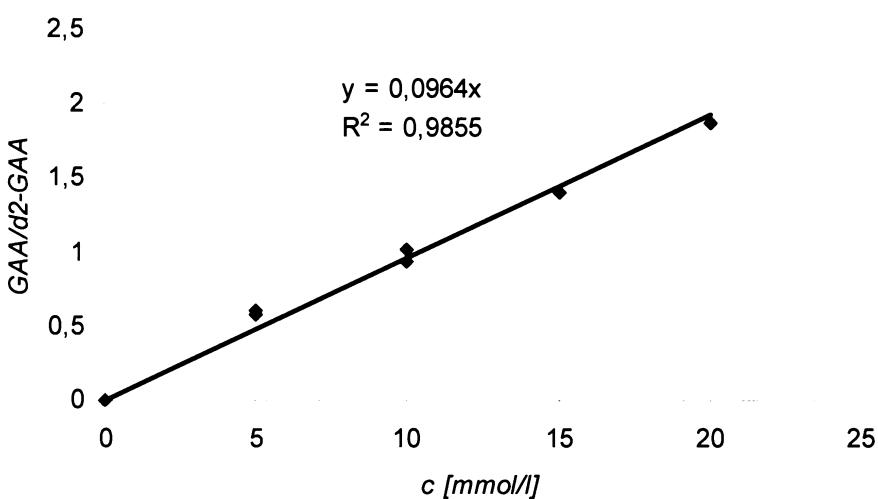
kreatin, kreatinin a guanidinacetát. Dále byl také analyzován vzorek demineralizoavné vody, který nevykazoval žádnou intenzitu signálu a vzorek nativní moči který dával nízkou intenzitu signálu, ve fyziologické moči jsou přítomny všechny analyzované metabolity. Koncentrace zásobních roztoků byla 40 mmol.l^{-1} . K jednotlivým metabolitům byly připraveny i příslušné deuterované standardy o koncentraci 20 mmol.l^{-1} . Do mikrotitračních jamek bylo pipetováno $10 \mu\text{l}$ příslušného standardu (CT, CTN, GAA) a $10 \mu\text{l}$ příslušného deuterovaného vnitřního standardu (d_3 -CT, d_3 -CTN, d_2 -GAA) v koncentraci $5, 10, 15$ a 20 mmol.l^{-1} . Kalibrace byla prováděna jak z plochy píku, tak z výšky píku. V grafech je uvedena závislost poměru metabolitů a deuterovaných standardů na koncentraci jednotlivý metabolit v mmol.l^{-1} , viz obr. 4. 10. - 4. 13. V každém grafu je uvedena i příslušná rovnice regresní analýzy spolu s determinačním koeficientem.



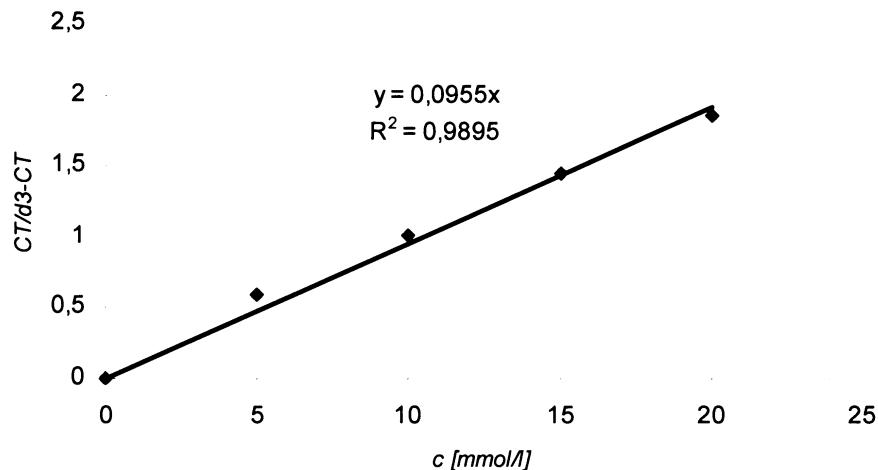
Obr. 4. 10. Kalibrační přímka v demineralizované vodě: v grafu je znázorněna závislost poměru plochy píku kreatin/ d_3 -kreatin na koncentraci kreatinu v mmol.l^{-1} ; koncentrační rozmezí $0-20 \text{ mmol.l}^{-1}$.



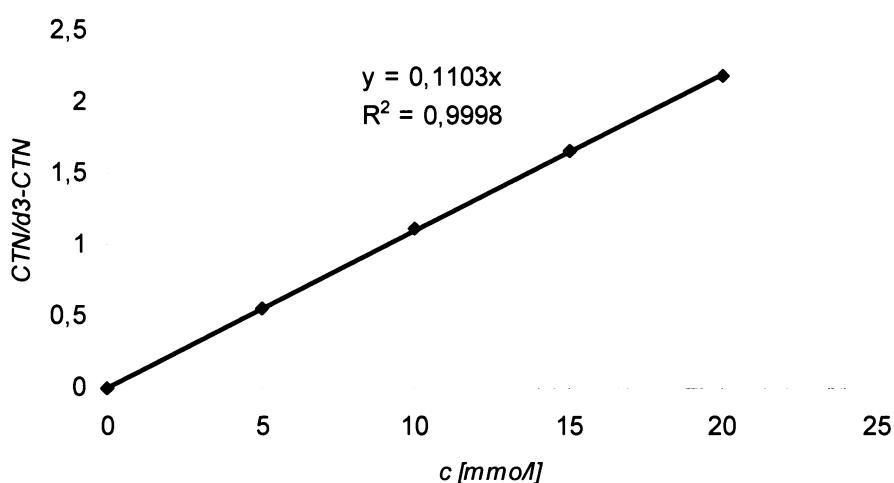
Obr. 4. 11. Kalibrační přímka v demineralizované vodě: v grafu je znázorněna závislost poměru plochy píku kreatinin/ d_3 -kreatinin na koncentraci kreatininu v mmol.l^{-1} ; koncentrační rozmezí 0-20 mmol.l^{-1} .



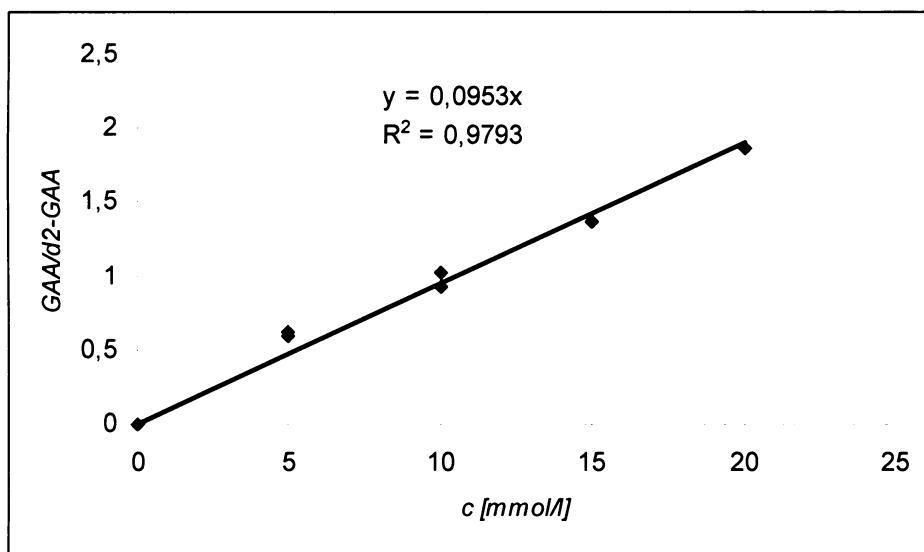
Obr. 4. 12. Kalibrační přímka v demineralizované vodě: v grafu je znázorněna závislost poměru plochy píku poměru guanidinacetát/ d_2 -guanidinacetát na koncentraci guanidinacetátu v mmol.l^{-1} ; koncentrační rozmezí 0-20 mmol.l^{-1} .



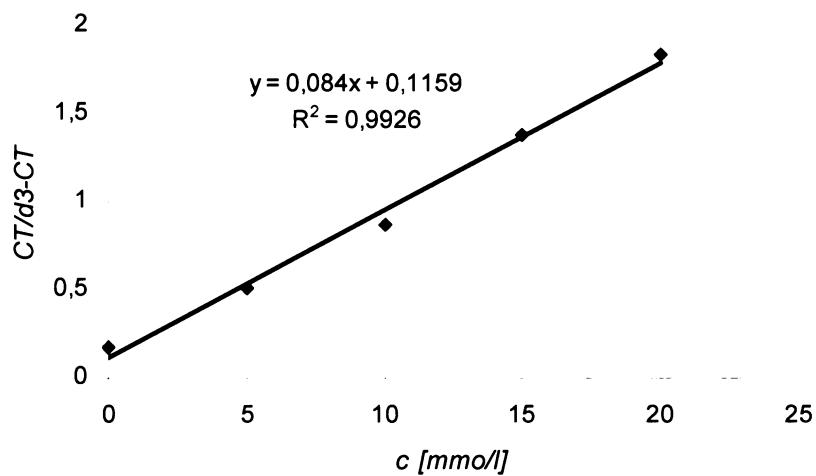
Obr. 4. 13. Kalibrační přímka v demineralizované vodě: v grafu je znázorněna závislost poměru výšky píku kreatin/d₃-kreatin na koncentraci kreatinu v mmol.l⁻¹; koncentrační rozmezí 0-20 mmol.l⁻¹.



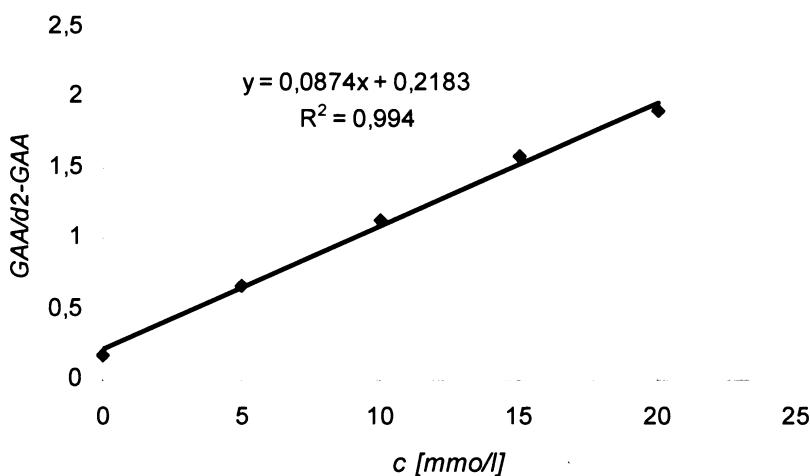
Obr. 4. 14. Kalibrační přímka v demineralizované vodě: v grafu je znázorněna závislost poměru výšky píku kreatinin/d₃-kreatinin na koncentraci kreatininu v mmol.l⁻¹; koncentrační rozmezí 0-20 mmol.l⁻¹.



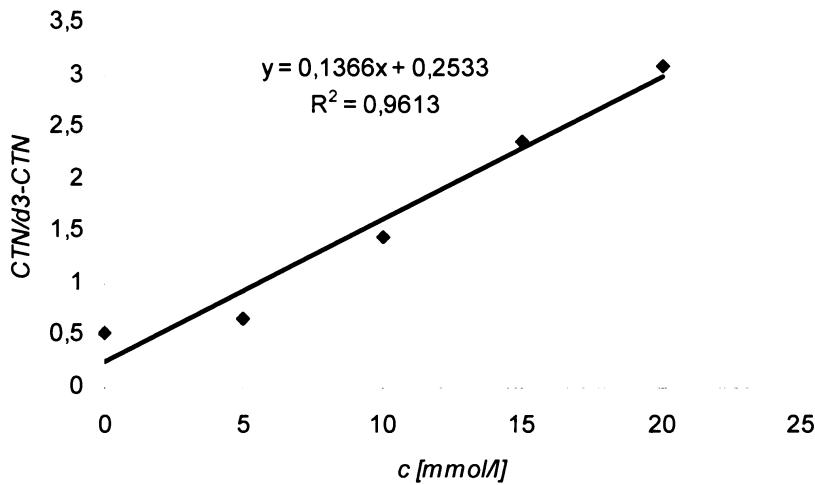
Obr. 4. 15. Kalibrační přímka v demineralizované vodě: v grafu je znázorněna závislost výšky píku poměru guanidinacetát/d₂-guanidinacetát na koncentraci guanidinacetátu v mmol.l⁻¹; koncentrační rozmezí 0-20 mmol.l⁻¹.



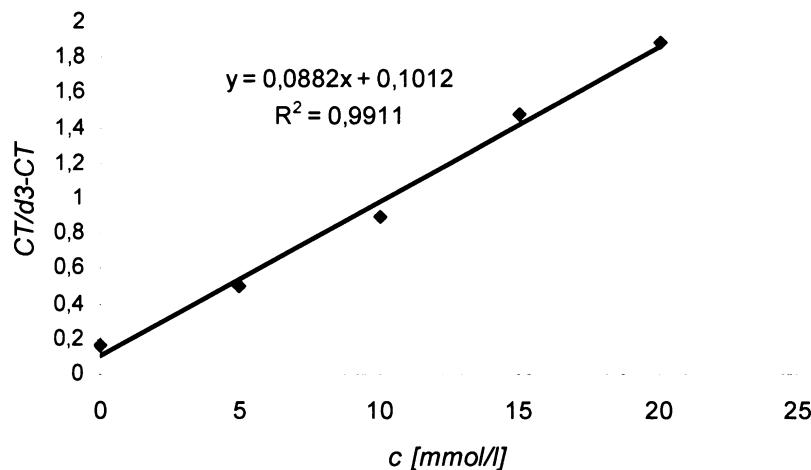
Obr. 4. 16. Kalibrační přímka v moči: v grafu je znázorněna závislost plochy píku poměru kreatin/d₃-kreatin na koncentraci kreatinu v mmol.l⁻¹; koncentrační rozmezí 0-20 mmol.l⁻¹.



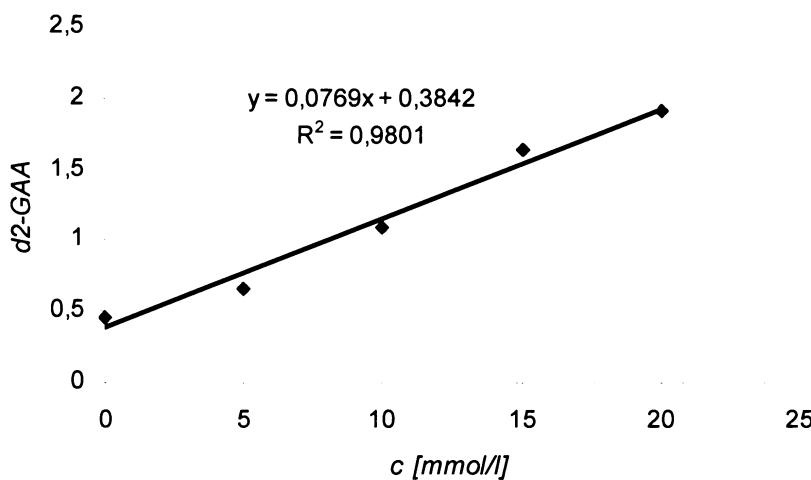
Obr. 4. 17. Kalibrační přímka v moči: v grafu je znázorněna závislost plochy píku poměru guanidinacetát/d₂-guanidinacetát na koncentraci v mmol.l⁻¹; koncentrační rozmezí 0-20 mmol.l⁻¹.



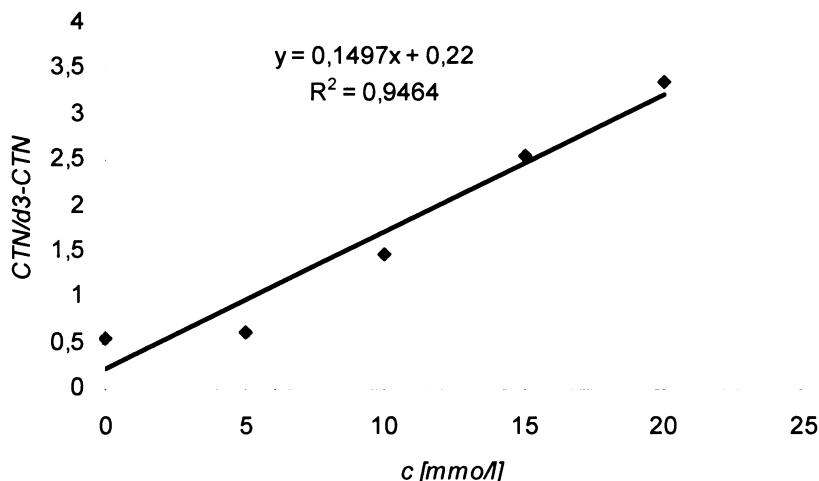
Obr. 4. 18. Kalibrační přímka v moči: v grafu je znázorněna závislost plochy píku poměru kreatinin/d₃-kreatinin na koncentraci kreatininu v mmol.l⁻¹; koncentrační rozmezí 0-20 mmol.l⁻¹.



Obr. 4. 19. Kalibrační přímka v moči: v grafu je znázorněna závislost výšky píku poměru kreatin/d₃-kreatin na koncentraci kreatinu v mmol.l⁻¹; koncentrační rozmezí 0-20 mmol.l⁻¹.



Obr. 4. 20. Kalibrační přímka v moči: v grafu je znázorněna závislost výšky píku poměru guanidnacetát/d₂-guanidinacetát na koncentraci v mmol.l⁻¹; koncentrační rozmezí 0-20 mmol.l⁻¹.



Obr. 4. 21. Kalibrační přímka v moči: v grafu je znázorněna závislost výšky píku poměru kreatinin/ d_3 -kreatinin na koncentraci v mmol.l^{-1} ; koncentrační rozmezí 0-20 mmol.l^{-1} .

4. 2. 3. Opakovatelnost, reprodukovatelnost

Opakovatelnost byla určena opakovaným nástříkem vzorku moče, který byl připraven postupem viz. kapitola 4. 2. Celkem bylo provedeno dvacet měření. Průměr, směrodatná odchylka a procento chyby měření z plochy i výšky píku u jednotlivých metabolitů a jejich poměrů s deuterovanými standardy jsou uvedeny v tabulce 4. 2. Chyba opakovatelnosti stanovení se pohybovala kolem pěti procent.

Reprodukčnost stanovení byla určena opakovanou analýzou vzorku nativní moči a rovněž i moči obohacené přídavkem 2 mmol.l^{-1} guanidinacetátu. Koncentrace přidaného guanidinacetátu v takto připravené moči odpovídá koncentracím typickým pro deficit GAMT. Celkem bylo provedeno 10 měření v průběhu 10 dní. Reprodukovatelnost se pohybovala s chybou kolem pěti procent viz tabulka 4. 3. a 4. 4., Hodnoty průměru, směrodatné odchylky, procenta chyby měření a koncentrace jednotlivých metabolitů vypočítané pomocí příslušných kalibračních křivek byly stanoveny z výšky i plochy píku.

Tab. 4. 2. Opakovatelnost nástřiku z plochy a výšky píku u vzorku moče (n=20)

Plocha píku	CT / d ₃ -CT	GAA / d ₂ -GAA	CTN / d ₃ -CTN
průměr	4,5	1,5	3,6
s ²	0,02	0,1	0,2
%	0,4	4,4	4,5
c [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	47,2	15,6	31,8
Výška píku	CT / d ₃ -CT	GAA / d ₂ -GAA	CTN / d ₃ -CTN
průměr	4,5	1,5	3,6
s ²	0,02	0,03	0,1
%	0,4	2,3	1,9
c [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	47,1	15,7	32,6

Tab. 4. 3. Reprodukovatelnost nástřiku z plochy a výšky píku u fyziologického vzorku moči (n =10)

Plocha píku	CT / d ₃ -CT	GAA / d ₂ -GAA	CTN / d ₃ -CTN
průměr	0,6	1,1	1,2
s ²	0,0	0,1	0,1
%	5,6	4,9	5,0
c [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	6,3	11,4	10,6
Výška píku	CT / d ₃ -CT	GAA / d ₂ -GAA	CTN / d ₃ -CTN
Průměr	1,0	0,6	2,2
s ²	0,6	0,0	0,1
%	3,9	4,6	4,3
c [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	9,1	6,3	19,9

Tab. 4. 4. Reprodukovatelnost nástríku z plochy a výšky páku u vzorku moči s přídavkem 2 mmol.l⁻¹ guanidinacetátu (n=10)

Plocha páku	CT / d ₃ -CT	GAA / d ₂ -GAA	CTN / d ₃ -CTN
průměr	1,1	10,5	2,3
s ²	5,0.10 ²	5,5.10 ⁴	0,1
%	4,7	3,8	4,8
c [μmol.l ⁻¹]	11,5	108,9	20,3
Výška páku	CT / d ₃ -CT	GAA / d ₂ -GAA	CTN / d ₃ -CTN
průměr	1,1	10,8	2,6
s ²	6,3.10 ²	6,1.10 ¹	0,1
%	5,6	5,7	4,7
c [μmol.l ⁻¹]	11,5	113,3	23,6

4. 2. 4. Referenční rozmezí

Referenční rozmezí bylo určeno ze souboru 96 vzorků moči. Referenční rozmezí bylo pro guanindinacetát $16 - 588 \mu\text{mol.l}^{-1}$, kreatin $26 - 1135 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a pro kreatinin $303 - 4575 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

Tab. 4. 5. Referenční rozmezí pro CT, CTN a GAA pro metodu MS/MS

	c CT [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	c CTN [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	c GAA [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]
průměr	464,0	1802,4	230,7
medián	416,6	1611,9	232,0
n	62	46	84
min	25,55	302,19	15,53
max	1133,4	4571,2	586,8
rozmezí:	26 - 1135	303 - 4575	16 - 588
min - max			

4. 2. 5. Limit detekce a limit kvantifikace

Z hodnot šumu byl určen limit detekce a limit kvantifikace, viz. tab. 4. 6. Signály analytů ležely vysoko nad těmito hodnotami. Limit detekce byl určen jako trojnásobek signálu šumu a limit kvantifikace jako desetinásobek signálu šumu.

Tab. 4. 6. Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) pro CT, CTN a GAA

	LOD [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	LOQ [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]
CT	0.60	1.90
GAA	0.22	0.72
CTN	3.60	11.99

5. Závěr

5. 1. Stanovení guanidinacetátu metodou HPTLC

Byla testována a zavedena jednoduchá a levná metoda pro subjektivní stanovení guanidinacetátu v moči tenkovrstevnou chromatografií, určená pro selektivní screening kreatinového deficitu z poruchy GAMT. Tato metoda byla modifikována. Doba stanovení je přibližně 3 hodiny. Metoda není specifická, ale známé interference nevadí. Stanovení guanidinacetátu je indikováno u pacientů s neurologickými příznaky. Tato metoda neumožňuje záchyt jiných kreatinových deficitů (deficit AGAT a CRT).

5. 2. Stanovení kreatinu, guanidinacetátu a kreatininu metodou MS/MS

V Ústavu dědičných metabolických poruch je zaváděna nová kvantitativní screeningová metoda, která bude sloužit ke stanovení všech tří známých poruch metabolismu kreatinu – deficitu GAMT, AGAT a CRT. Metoda je jednoduchá, rychlá s dobou přípravy vzorku přibližně tři hodiny. Doba analýzy jednoho vzorku na tandemovém hmotnostním spektrometru je 3 minuty. Použitá metoda umožňuje automatizaci stanovení velkých sérií vzorků. Metoda je specifická pro dané metabolity. Po zavedení této metody předpokládáme zlepšení záchytu a diferenciální diagnostiky pacientů s poruchami metabolismu kreatinu, což v některých případech umožní cílenou léčbu.

6. Literatura

1. Fryčák P., Lemr K., Adam T., Hušková R.: Diagnostika vybraných dědičných metabolických poruch tandemovou hmotnostní spektrometrií s využitím moderních ionizačních technik., *Chem. Listy* **97**: 93 – 100 (2003)
2. Chrastina P., Šťastná S., Myšková H., Zeman J.: Tandemová hmotnostní spektrometrie – budoucnost novorozeneckého screeningu dědičných metabolických poruch. *Čech. – Slov. Pediatr.*, **58**, , No. 7, p. 464 - 467 (2003)
3. Murray R. K, Granner D. K., Mayes P. A., Rodvell V. W.: Harperova biochemie, Jinočany, 2. vydání, 351 – 352 (2002)
4. Bianchi M. C., Tosseti M., Fornai F.: Reversible brain creatine deficiency in two sisters with normal blood creatine level. *Ann. Neurol.*, **47**: 511 – 3 (2000)
5. Walker J.B.: Creatine: Biosynthesis, regulation and function. *Adv. Enzymol* **50**: 177 (1979)
6. Möller A., Hamprecht B.: Creatine uptake in cultured cells of rat and mouse brain. *J. Neurochem.*, **52**: 544 – 550 (1989)
7. Guimbal C., Kilimann M. W. A.: Na^+ - dependent creatine transporter in rabbit brain, muscle, heart and kidney. *J. Biol. Chem.*, **268**: 8418 – 8421 (1993)
8. Wallimann T., Wyss M., Brdiczka D., Nicollay K., Eppenberger H.M.: Significance of intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes for cellular energy homeostasis: „The Phospho – Creatine Circuit“. *Biochem. J.*, **281**: 21 – 24 (1992)
9. Němečková A., Musil J. a kolektiv: Lékařská chemie a biochemie, Avicenum, 1. vydání, 283 (1991)
10. Racek J. et al.: Klinická biochemie, Galén, 2. vydání, 71 (2004)
11. Sykut-Cegielska J., Gradowska W., Mercimek-Mahmutoglu S., Stöckler-Ipsiroglu S.: Biochemical and clinical characteristics of creatine deficiency syndromes, Vol. **51** No 4 (2004)
12. Borsook H., Dubnoff J.W.: The hydrolysis of phosphocreatine and the origin of urinary creatine. *J. Biol. Chem.*, **168**: 493 – 510 (1947)

13. Carducci C., Santagata S., Leuzzi V., Carducci C., Artikly C., Giovanniello T., Bartoni R., Antonozzi I.: Quantitative determination of guanidinoacetate and kreatine in dried blood spot by flow analysis – electrospray tandem mass spektrometry. *Cl. Chim. Acta* **48**: 1772 – 8 (2005)
14. Humm A., Fritzsche E., Mann K., Gohl M., Huber R.: Recombinant expression and isolation of human L-arginine: glycine amidinotransferase and identification of its aktive – site cysteine residue. *Biochem. J.* **322**: 771 – 776 (1997)
15. Isbrand D., Figura K.: Cloning and sequence analysis of human guanidinoacetate N-methyltransferase cDNA. *Biochim. Biophys. Acta* **1264**: 265 – 267 (1995)
16. www.biocen.cz, FAQ – Creatine monohydrate (Kreatin)
17. Stöckler-Ipsiroglu S., Holzbach U., Hanefeld F. Marquardt I., Helms G., Reguard M., Hänicke W., Frahm J.: Creatine deficiency in the brain: A new treatable inborn error of metabolism. *Pediatr. Res.*, **36**: 409 – 413 (1994)
18. Figura K., Hanefeld F., Isbrand D., Stöckler – Ipsiroglu S.: Guanidinoacetate methytransferase deficiency. In: The metabolic and molecular basis of inherited disease (eds Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D) McGraw – Hill, New York, 1897 – 1908 (2000)
19. Chae Y. J., Chung C. E., Kim B. J., Lee M. H., Lee H.: The gene encoding guanidin-acetatemethyltransferase (GAMT) maps to human chromosome 19 at band p13.3 and to mouse chromosome 10. *Genomics* **49**: 162-164 (1998)
20. Stockler-Ipsiroglu S., Stromberger C., Item Ch. B., Mühl A.: Disorders of Creatine Metabolism, kap. **24**: 468 – 480, (1997)
21. Item C. B., Stockler-Ipsiroglu S., Stromberger C., Muhl A., Alessandri M. G., Bianchi M. C., Tosetti M., Fornai F., Cioni G.: Arginine:glycine amidinotransferase deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in humans. *Am. J. Hum. Genet.* **69**: 1127-1133 (2001)
22. Salomons G. S., Van Dooren S. J. M., Bunea D. Verhoeven N. M., Degrauw T. J. Jakobs C.: Creatine transporter deficiency: development of a new functional test for creatine uptake in cultured cells. *J. Inher. Metab. Dis.* : **24** (Supl. 1): 119 (2001a)

23. Salamons G. S. Dooren S. J., Verhoeven N. M.: X – linked creatine – transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine – deficiency syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*: **68**: 1497 – 1500, et al. (2001b)
24. Gregor P., Nash S. R., Caron M. G., Seldin M. F., Warren S. T.: Assignment of the creatine transporter gene (SLC6A8) to human chromosome Xq28 telomeric to G6PD. *Genomics* **25**: 332-333 (1995)
25. Iyer G. S., Krahe R., Goodwin L. A., Doggett N. A., Siciliano M. J., Funanage V. L., Proujansky R.: Identification of a testi - expressed creatine transporter gene at 16p11.2 and confirmation of the X-linked locus to Xq28. *Genomics* **34**: 143-146 (1996)
26. Item C.B., Mercimek–Mahmotoglu S., Battini R.: Characterisation of seven novel mutations in seven patients with GAMT deficiency. *Hum. Mutat.*: **23**: 254, et al. (2004)
27. Stöckler-Ipsiroglu S. Marescau B., De Deyn P.P., Trijbels J.M.F., Henefeld F.: Guanidino compounds in guanidinoacetate methyltransferase deficiency, a new inborn error of creatine synthesis. *Metabolism.*, **46**: 1189 – 93 (1997)
28. Schulze A., Hess T., Wevers R., Echhardt S., Surtees R. A. H.: Creatine deficiency syndrome caused by guanidinoacetate methyltransferase deficiency: diagnostic tools of a new inborn error of metabolism. *J. Pediatr.*, **131**: 626 - 31 (1997)
29. Mercimek–Mahmotoglu S., Muhl A., Waldhor T., Moslinger D., Stöckler-Ipsiroglu S.: Measurement of guanidinoacetate, creatine and creatinine in urine by tandem mass spectrometry: a rapid screening metod for creatine deficienty syndromes. *J. Inherit. Metab. Dis.* **28** (2005)
30. Besley G. T. N., Pollitt R. J., Brown G. K., Hoffmann G. F., Gibson K. M.: *J. Inherit. Metab. Dis.*, **27**: 211 (2004)
31. Valongo C., Cardoso M., Domingues P., Almeida L., Verhoeven N., Salomons G., Jakobs C., Vilarinho L.: Age related reference values for urine creatine and guanidinoacetic acid concentration in children and adolescents by gas chromatography – mass spetrometry. *Cl. Chim. Acta*, **348**: 155 – 161 (2004)
32. Buzzi A., Bugiani M., Salomons G., Hunneman D., Moroni I., Estienne M., Danesi U., Jakobs C., Uziel G.: X – linked creatine deficiency syndrome:

A novel mutation in creatine transporter gene SLC6A8. *Annals of Neurology*, **52**: 227 - 231

33. Stöckler-Ipsiroglu S., Hanefeld F., Frahm J.: Creatine replacement therapy in guanidinoacetate methyltransferase deficiency, a novel inborn error of metabolism. *Lancet*, **348**: 789 – 790 (1996)
34. Štulík K. a kolektiv: Analytické separační metody. UK v Praze, 1. vydání (2004)
35. Sakaguchi S., *J. Biochem.*, Japan, **5**: 25 (1925)
36. Weber CJ: A modification of Sakaguchi's reaction for the quantitative determination of arginine. (1929)
37. Schulze A, Mayetepek E, Rating D, Bremer H. K: Sakaguchi reaction: a useful method for screening guanidinoacetate methyltransferase deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.* **19** (5): 706. (1996)
38. Osobní sdělení, pí. Hladíková, FN Olomouc
39. Jaffé M., and Hoppe–Seilers Z., *Physiol. Chem.* **10**: 391- 400 (1886)
40. Gan–Schreier H., Langhans C., Kohlmueller D., Komlósi K., Anninos A., Hoffmann G., Okun J., Schulze A.: Fast quantitative analysis guanidinoacetate, creatine and creatinine in urine by electrospray ionisation tandem mass spectrometry, 25th Annual meeting SSIEM, Paříž (2005)