

„GCMS-MS w diagnostyce zaburzeń aminokwasów”

Mgr inż. Marta Tomaszewska

Dr n.med. Katarzyna Kuśmierska

Zakład Badań Przesiewowych i Diagnostyki Metabolicznej

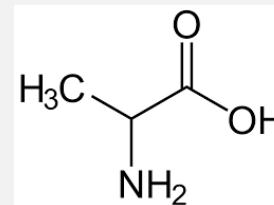
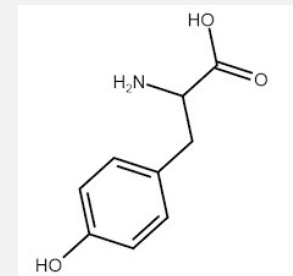
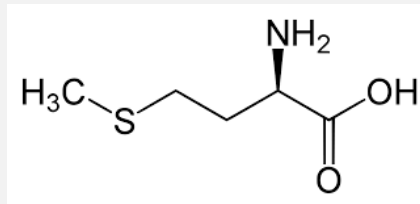
Instytut Matki i Dziecka

SPIS TREŚCI

- Co to jest i do czego służy profil kwasów organicznych w moczu
- Przygotowanie próbek do analizy
- Oznaczenie kwasu metylomalonowego (MMA) i orotowego (ORA) w analizie GCMS-MS
- Omówienie procedur wykorzystywanych do analizy zaburzeń aminokwasów za pomocą GCMS-MS
- Omówienie otrzymanych profilów moczu

DO CZEGO SŁUŻY PROFIL KWASÓW?

- 1) Weryfikuje wstępne rozpoznanie postawione w badaniach przesiewowych noworodków
- 2) Mówi nam o prawidłowym metabolizmie aminokwasów, beta-oksydacji kwasów tłuszczowych
- 3) Pozwala na ocenę stanu klinicznego pacjenta



PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO ANALIZY

Badanie opiera się na obróbce materiału biologicznego -moczu. Pierwszym krokiem w analizie jest przeprowadzenie badania oznaczenia ilości kreatyniny w moczu.



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita
Polska**



**Instytut
Matki i Dziecka**

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



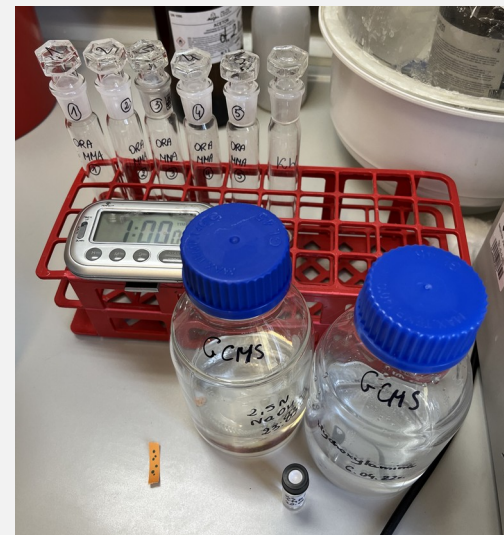
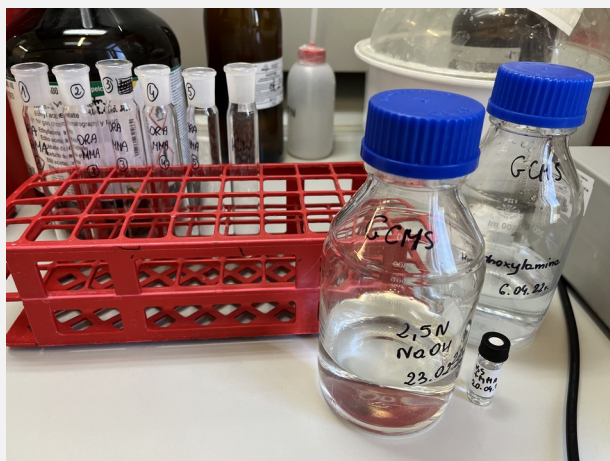
ROZKŁAD MOCNIKA

Kolejnym krokiem jest uzupełnienie zawartości próbki wodą dejonizowaną do 2 ml, po czym dodanie ureazy. Tak przygotowane roztwory po uprzednim wymieszaniu należy ogrzewać w suchej łaźni.



REDUKCJA HYDROKSYLOAMINĄ

Po upływie określonego czasu probówki zdjąć z łaźni grzewczej. Następnie dodać NaOH do pH 14 oraz hydroksyloaminę. Reakcja prowadzona jest przez godzinę.



ZATRZYMANIE REAKCJI REDUKCJI

Po upływie godziny reakcję należy zatrzymać poprzez dodanie HCl, doprowadzając do pH około 1. Następnie dodać chlorku sodu.



EKSTRAKCJA OCTANEM ETYLU

Ekstrakcję do fazy organicznej prowadzimy przy użyciu octanu etylu.



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



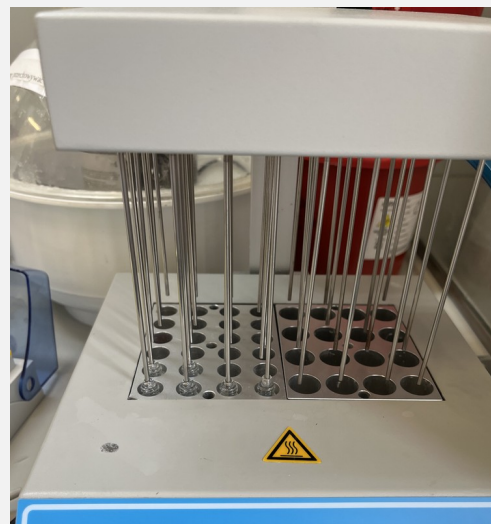
Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



SUSZENIE

Do łaźni grzewczej ustawionej na 60°C należy włożyć próbki i suszyć je w strumieniach azotu do osiągnięcia objętości około 200 μl .



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



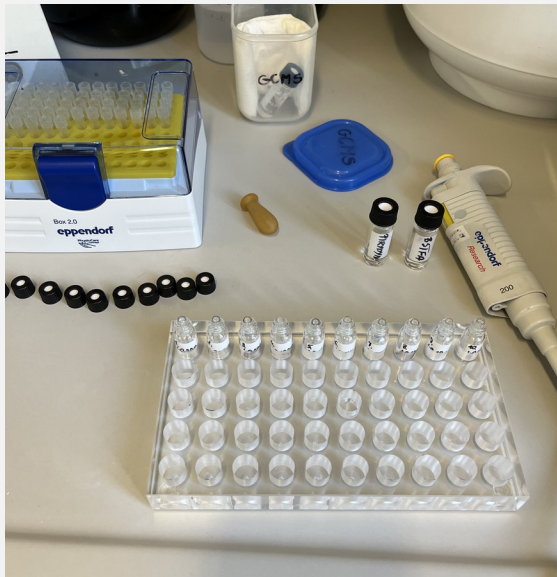
Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



REAKCJA DERYWATYZACJI

Suchą łążnię grzewczą należy nagrzać do 80°C. W tym czasie do osuszonych fiolek dodajemy pirydynę i środek sililujący, po czym wygrzewamy przez pół godziny.

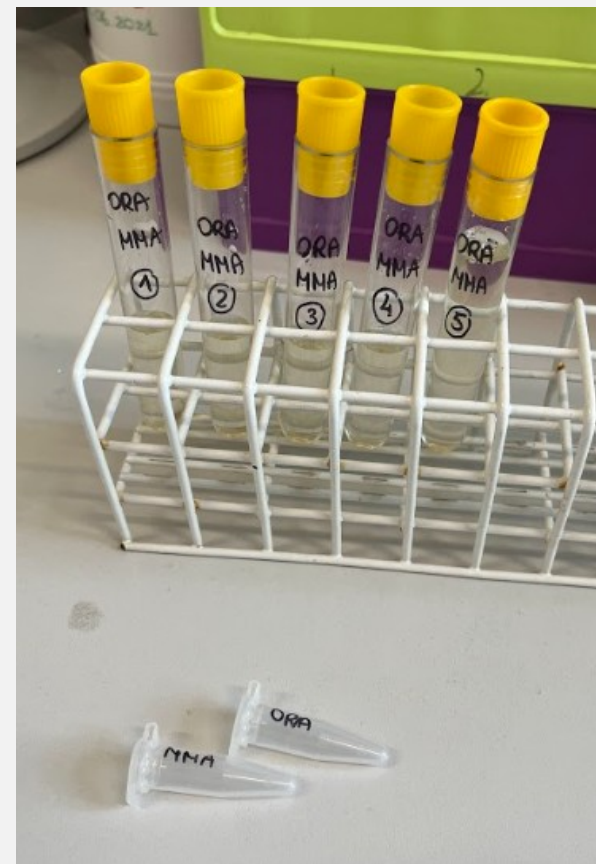
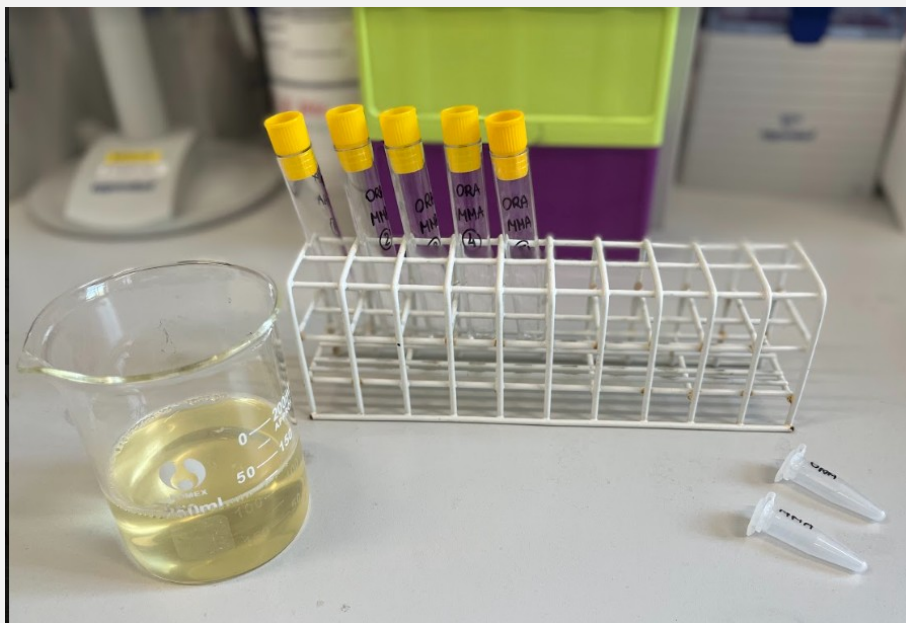


ANALIZA PRZY UŻYCIU GCMS-MS

Próbki po wyciągnięciu z łażni należy zworteksować, po czym umieścić w komorze autosamplera.



ILOŚCIOWE OZNACZENIE ORA I MMA



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita
Polska**



**Instytut
Matki i Dziecka**

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



PRZYGOTOWANIE KRZYWEJ KALIBRACYJNEJ ORA I MMA

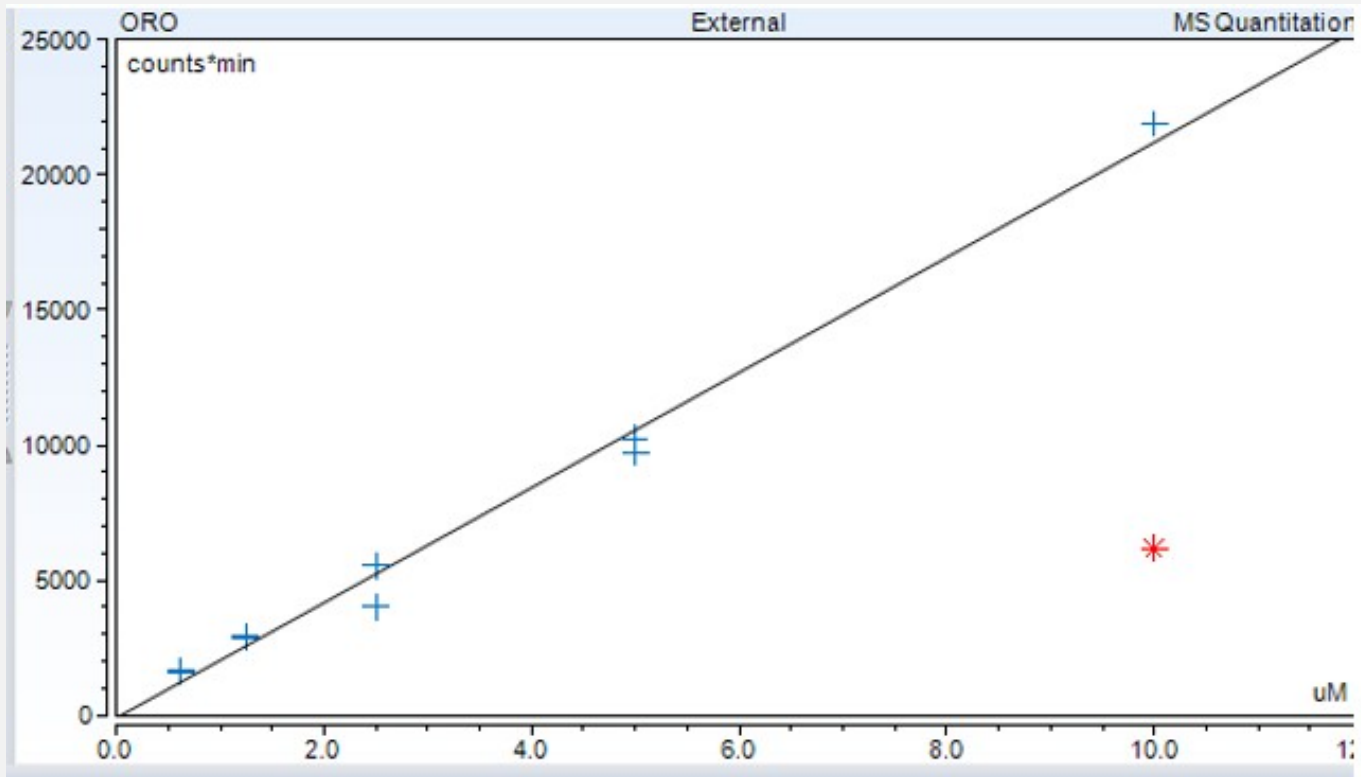
- Przygotowanie roztworów wzorcowych kwasu orotowego i metylomalonowego
- Przygotowanie moczu zlewkowego
- Rozcieńczenie moczu zlewkowego do kreatyniny równej 1
- Przygotowanie roztworów kalibracyjnych przez serię rozcieńczeń roztworów wzorcowych kwasów metylomalonowego i orotowego
- Przelanie 2 ml każdego z roztworów do probówek ekstrakcyjnych
- Przygotowanie analogiczne do standardowego przygotowania moczu metodą GCMS-MS

STĘŻENIA WYKORZYSTYWANE DO KRZYWEJ

	ORA [μM]	MMA [μM]
1	10	100
2	5	50
3	2,5	25
4	1,25	12,5
5	0,625	6,25



KRZYWA ORA



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita
Polska**

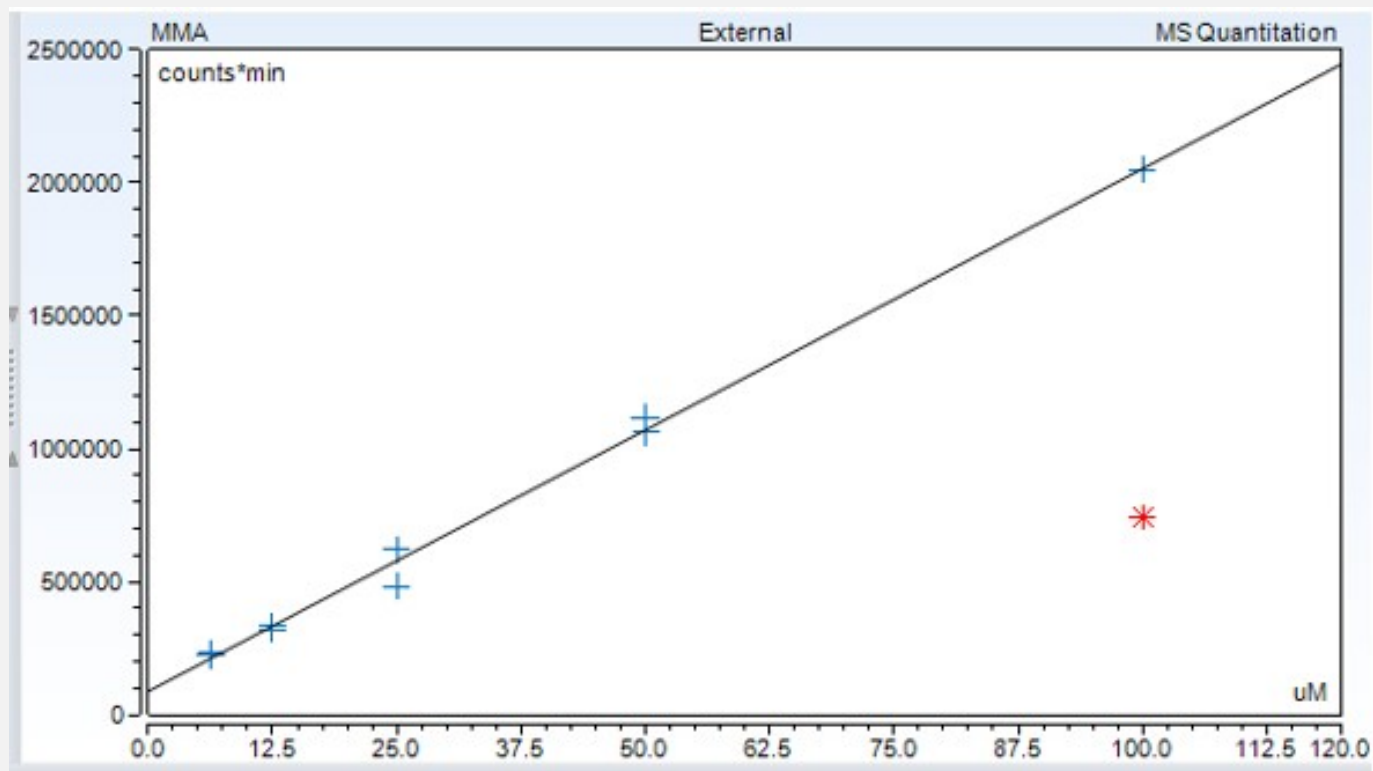


**Instytut
Matki i Dziecka**

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



KRZYWA MMA



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita
Polska**



**Instytut
Matki i Dziecka**

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



PROCEDURY WYKORZYSTYWANE DO ANALIZY ZA POMOCĄ GCMS-MS

Analiza za pomocą aparatów GCMS-MS odbywa się na dwóch urządzeniach, firmy Shimadzu oraz Thermo Scientific.

Aparat Shimadzu: pozwala na analizę profilu moczu pacjenta oraz umożliwia postawienie diagnozy i weryfikację już zdiagnozowanej choroby metabolicznej.

Aparat Thermo Scientific: pozwala na ilościowe określenie stężenia kwasów orotowego i metylomalonowego oraz dokładniejszą analizę profilu moczu z możliwością wykrycia większej liczby metabolitów.



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



PROFIL UZYSKANY ZA POMOCĄ GCMS-MS

Profil uzyskany za pomocą GCMS-MS opisuje zależność m/z do czasu. Przy wykorzystaniu jonów referencyjnych, pomocniczych oraz tła referencyjnego możliwe jest zidentyfikowanie poszczególnych związków. Wydłużenie czasu analizy pozwala na wyodrębnienie większej ilości analitów.



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Dziękuję za uwagę 😊



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita
Polska**



**Instytut
Matki i Dziecka**

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny

