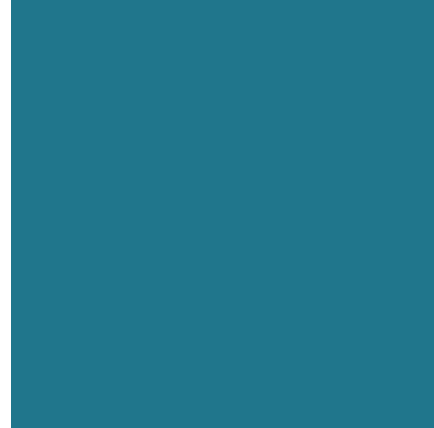




Congreso Nacional del



ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS EN SANGRE POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM ACOPLADA A CROMATOGRFÍA LÍQUIDA

Elena Rodríguez-Portugal Parrilla (1), Cristina Collazo Abal (2), Daisy E. Castiñeiras Ramos (3), María Dolores Bóveda Fontan (3), Jose A. Cocho De Juan (3), Cristobal Colon Mejeras (3)

(1)Complejo Hospitalario Universitario de Ourense, (2)Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, (3)Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela

+ Introducción

■ Aminoácidos (AA):

- Errores Innatos del Metabolismo
- Marcadores del estado nutricional
- Marcadores funcionales de diversos órganos

Alteraciones
fisiopatológicas

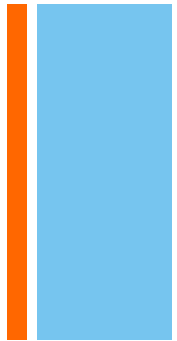
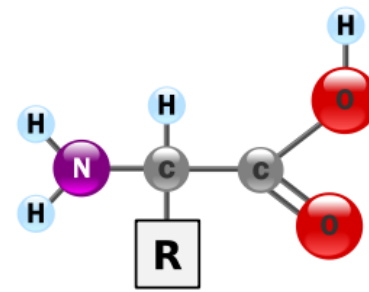
■ Sutiles variaciones en la [AA] → Medir con exactitud → Correcta interpretación de los cambios.

■ Métodos analíticos disponibles: no todos miden selectivamente limitando su uso en diagnóstico y seguimiento.

Nuevos métodos: **LC-MS/MS**
con derivatización precolumna.



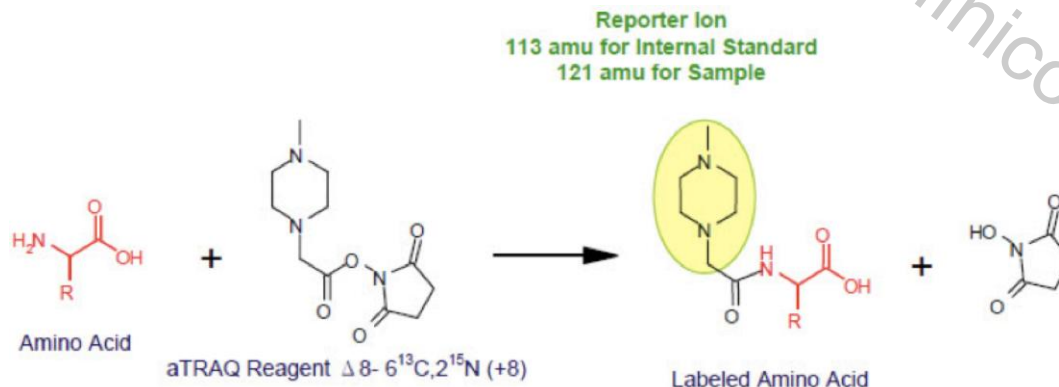
aTRAQ™ (AB Sciex)



+ Objetivo

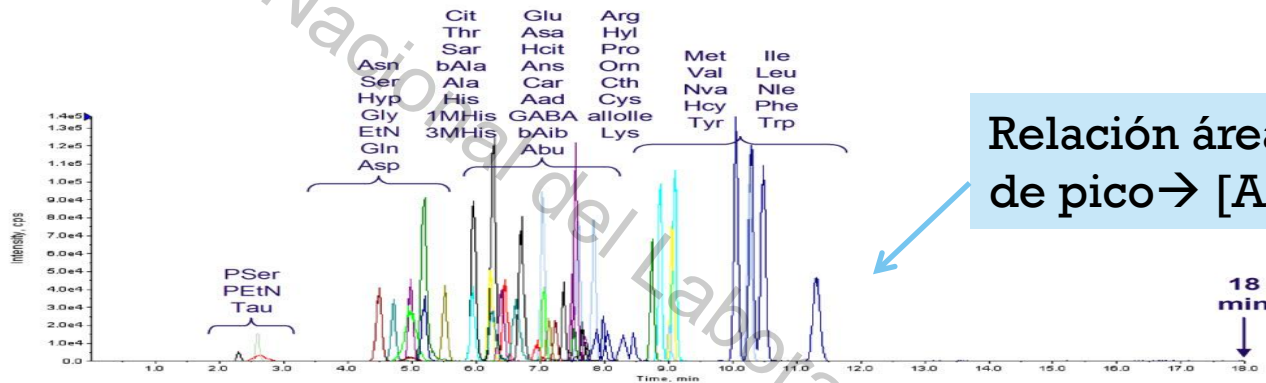
Evaluar el kit de reactivos **aTRAQ™ (AB Sciex)**

- Realiza separación isobárica y cuantifica 42 aminoácidos
- Aplicaciones diagnósticas y de seguimiento en metabolopatías
- Reactivos:
 - Ayudan a la fragmentación MS/MS de AA y estándares internos (IS)
 - Actúan en una zona de peso molecular con pocas interferencias.
- Mejora la precisión y seguridad de la cuantificación mediante:
 - Empleo un estándar interno para cada AA analizado
 - Comparación del tiempo de retención y el peso molecular del estándar y la muestra en cada AA.

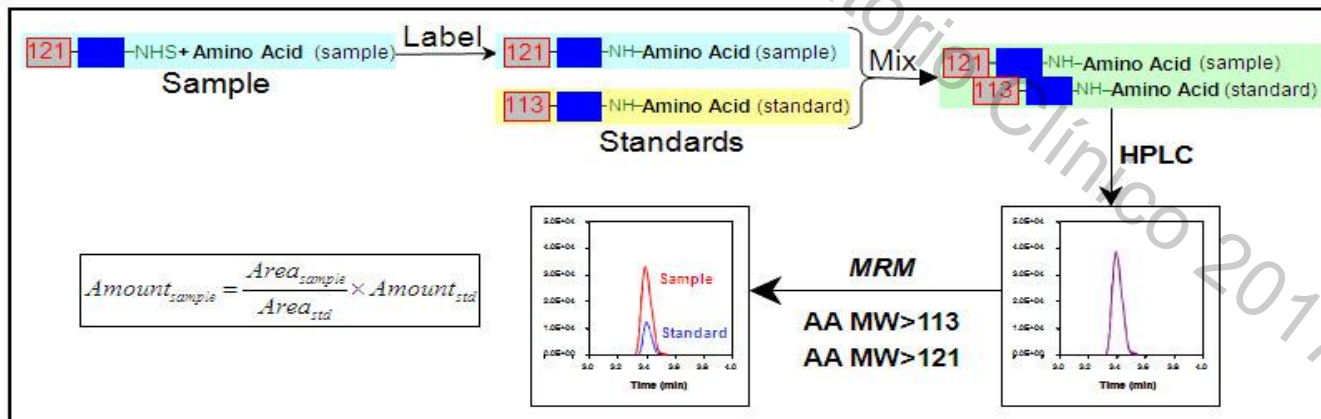


+ Objetivo

- Si tenemos un mismo AA marcado de forma distinta:
 - HPLC: no podemos distinguirlo porque = tiempo de retención
 - MS/MS: tanto la masa del AA como la del isótopo formado fragmentan → permite distinguir el mismo AA de la muestra y del IS.

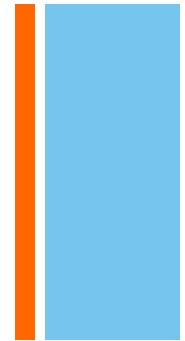


Representative chromatogram showing analysis of 45 amino acids using aTRAQ™ reagents and LC/MS/MS analysis. Total run time is 18 minutes.



General Scheme for LC/MS/MS Based AAA of Samples using New AAA Kit with aTRAQ Reagents.

+ Material y método



■ Equipo LC-MSMS empleado:



Columna C18 de 4.6x150mm



- **Muestras:** sueros QC externo ERNDIM 2015 y 2016
- **Reactivos:** kit aTRAO_{TM} (AB Sciex) con mezcla de 42 patrones internos y reactivos de derivatización
- Comparación de Valores Diana de los 23 AA del programa ERNDIM con los obtenidos.



Preparación muestras (aprox 60 min.)



40 μ L Suero + 10 μ L Acido Sulfosalicilico, precipitado proteínas, "spin"



10 μ L Sobrenadante + 40 μ L Tampón



Reactivo aTRAQ + sobrenadante diluido, 30min a T^a ambiente



Se añade Hidroxilamina



+ 42 Patrones Internos



Evaporado a volumen final deseado

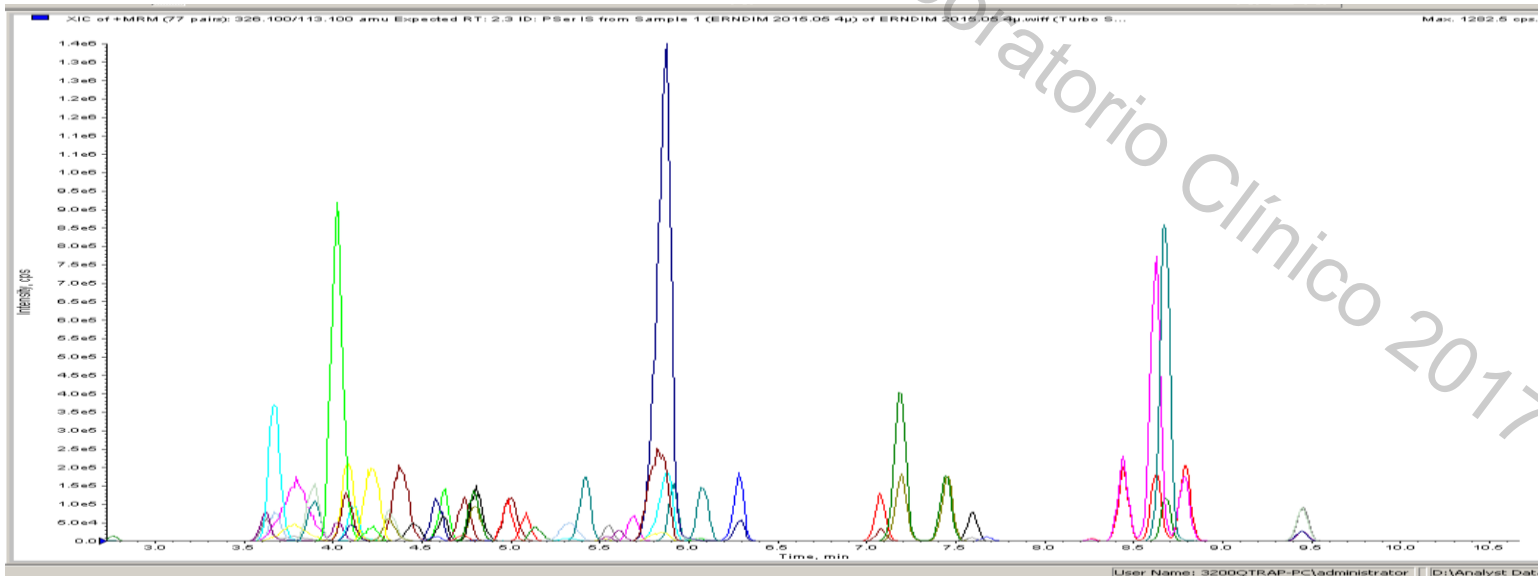


Analisis por LC/MS/MS

Congreso Nacional del Laboratorio Clínico 2017

+ Método MSMS

- 78 MRM, muy rápida adquisición y muy sensible
- Tiempo análisis 10 minutos, 18 incluyendo lavado columna
- Integración en Analyst con posibilidad de automatizarse
- Diferencia de masa (8Da) con IS evita solapamientos
- Tiempos de retención muy estables



+ Resultados

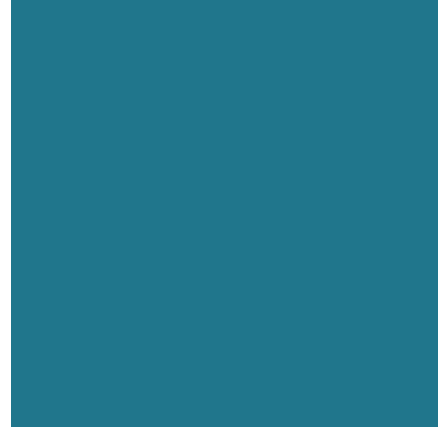
- Elevada calidad analítica, óptima resolución y tiempo de análisis <10'
- Gran **concordancia** con valores diana ERNDIM:
 - 86% Serina – 116% Alanina.
- Puntos a mejorar:
 - Vigilar separación de isómeros: beta-Alanina o Isoleucina → Ajustar el método.
 - Glutamina y Metionina presentaron problemas por su inestabilidad

Conclusión

- Este método permite realizar un perfil de AA completo y de elevada calidad en un tiempo muy reducido respecto a la IEC.
- Obliga a replantear el procesamiento de datos y su interpretación para rentabilizarlo en el trabajo diario.



Congreso Nacional del



Muchas gracias

Congreso Nacional del Laboratorio Clínico 2017