

Analýza biologického materiálu dvojrozměrnou plynovou chromatografií

Wojtowicz P., Dostálová E., Adam T.

Laboratoř dědičných metabolických poruch, Univerzita Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc.

SOUHRN

Cíl studie: Plynová chromatografie se v diagnostice užívá pro speciální stanovení, například profilu organických kyselin v moči nebo séru. Tato metoda ovšem umožňuje, zejména pak ve svém dvojdimenzionálním uspořádání (GC×GC), mnohem ucelenější pohled na vybraný biologický materiál. Cílem práce bylo vyvinout postup pro komplexní analýzu biologického materiálu.

Typ studie: Vývoj analytické metody

Název a sídlo pracoviště: Laboratoř dědičných metabolických poruch, Fakultní nemocnice, Olomouc

Materiál a metody: Analýzy byly provedeny na GC×GC (Agilent 7890) spojeném s průletovým hmotnostním analyzátozem (TOF MS) (LECO Pegasus 4D). Automatické zpracování dat bylo provedeno programem ChromaTOF (LECO) za použití „reference.“

Výsledky: V této studii byla vytvořena tzv. reference metabolitů, obsahující zejména organické kyseliny, aminokyseliny a látky podobné povahy, které byly derivatizovány dvěma postupy – silylací nebo alkylací methylchloroformiátem. Aplikací referenční na naměřené vzorky bylo možno identifikovat (shoda 733–999) více než 100 analytů v každém vzorku.

Závěry: GC×GC-TOF je vhodná metoda pro metabolickou analýzu mnoha biologických maticí a může být také uplatněna v diagnostice metabolických onemocnění. Zpracování dat lze plně automatizovat.

Klíčová slova: dvojrozměrná plynová chromatografie, metabolomika, diagnostika, metabolické poruchy

SUMMARY

Wojtowicz P., Dostálová E., Adam T.: Analysis of biological material by two-dimensional gas chromatography

Objective: Gas chromatography is used in diagnostics mostly for special analyses e.g. organic acids profiling in urine or serum. But this method enables, especially in two-dimensional version (GC×GC), more comprehensive view on selected biological material. The aim of this work was to develop a method for complex analysis of biological material.

Design: Analytical method development

Settings: Laboratory for Inherited Metabolic Disorders, Palacky University and University Hospital, Olomouc

Material and methods: Analyses were performed on GC×GC (Agilent 7890) coupled with time-of-flight mass analyzer (TOF MS) (LECO Pegasus 4D). An automated data processing was performed by the ChromaTOF software (LECO) using “reference” tool.

Results: In this study, the list of metabolites was created. It covers predominantly organic acids, amino acids, sugars, and similar – silylated or alkylated via methylchloroformiate. After applying the reference we were able to identify (spectral matches of 733–999) more than 100 analytes in each sample.

Conclusion: GC×GC-TOF is a valuable tool in metabolomic analysis of many biological matrices and enables also diagnosing metabolic disorders. Data processing can be fully automated.

Keywords: two-dimensional gas chromatography, metabolomics, diagnosing, metabolic disorders

Úvod

Plynová chromatografie–hmotnostní spektrometrie (GC/MS) je metoda často používaná k metabolickým studiím pro analýzu celé řady látek (organické kyseliny, aminokyseliny, cukry, ...). Klasické techniky ve spojení s kvadrupólovým analyzátozem však mohou mít problémy z hlediska komplexnosti analyzované matrice – ve vzorku je přítomno velké množství analytů, jejichž koncentrace se pohybují v rozmezí několika řádů, a proto dochází k častým koelucím. Minoritní, avšak diagnosticky velmi důležité, analyty tak mohou být snadno přehlédnuty. Řešením může být použití dvojrozměrné plynové chromatografie ve spojení s průletovým analyzátozem (GC×GC-TOF). Užitím této techniky se kombinuje zvýšená separační kapacita GC×GC

s identifikačními možnostmi poskytnutými plnými spektry průletového analyzátozu a pokročilými nástroji pro vyhodnocování dat. Při studiu lidského metabolomu se využívá celá řada materiálů: plazma, moč, kultivované buňky, ale i sliny, mozkomíšní mok, nebo např. výpotky kolenního kloubu. Každá tato matrice může hrát důležitou roli v diagnostickém procesu mnoha onemocnění. Téměř nezbytnou součástí GC analýz je derivatizace polárních látek pro zvýšení jejich těkavosti. Jednou z nejpoužívanějších derivatizačních metod je silylace, ta však přináší řadu problémů, např. tvorbu více derivátů z jednoho analytu, jejichž poměr se v čase mění, či citlivost derivátů i ke stopám vlhkosti. Dalšími možnostmi derivatizace jsou např. nepřímá alkylace pomocí chloroformiátů nebo acylace. Cílem práce bylo vyvinout postup pro komplexní analýzu biologických materiálů.

Materiál a metody

V této studii byly zkoumány tři biologické materiály – moč, kultivované lidské fibroblasty a krevní plazma, derivatizované dvěma technikami – silylací N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamidem nebo alkylací methylchloroformiátem (MCF).

Pro analýzy byl použit systém Pegasus 4D sestávající se z plynového chromatografu Agilent 7890 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA), MPS2/CIS4/ALEX systému (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Německo) a Pegasus HT hmotnostního spektrometru (LECO Co., St. Joseph, USA). Instrumentální podmínky byly shodné s předchozí publikací [1].

Statistické vyhodnocení naměřených dat bylo provedeno pomocí programu Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., www.statsoft.com).

Výsledky a diskuse

Cílem práce bylo vyvinout postup pro komplexní analýzu biologických vzorků plynovou chromatografií. Jako derivatizační metoda byla (kromě široce používané silylace) zvolena též alkylace MCF. Při tomto postupu se vzorek nachází v zásaditém vodném prostředí, přidá se alkohol pro vytvoření esterů a pyridin sloužící jako katalyzátor. Samotná reakce je provedena během několika vteřin přidáním MCF a není nutné žádné zahřívání. Deriváty jsou poté extrahovány do nemísitelného rozpouštědla (chloroform, izooktan), které může být ihned injektováno do GC [2].

Součástí práce bylo vytvoření databáze metabolitů (tzv. reference) obsahující retenční charakteristiky a hmotnostní spektra zkoumaných látek. Aplikace této reference na analyzovaný vzorek automaticky vyhodnotí

Table 1. Illustration of the results (silylated fibroblasts extract) with using the reference.

Name	RT 1;2 (s)	Type	UM	Reverse	Quant	S/N	Area	Area%
*2-Ketoglutaric eo-TMS	1418 ; 2.424	Tolerance	198	966	DTIC	330.6	792680	0.0162
*2-OHglutaric 3TMS	1385 ; 2.256	Match	129	960	DTIC	309.94	435379	0.0089
*3-OHisobutyric 2TMS	1004 ; 2.264	Match	147	964	DTIC	507.3	1357977	0.0278
*4-Aminobutyric 3TMS	1352 ; 2.248	Match	174	768	DTIC	491.1	118338	0.0024
*4-OHproline 3TMS	1352 ; 2.216	Match	230	993	DTIC	1933.7	2042566	0.0419
*5-Oxoproline 2TMS	1355 ; 2.560	Match	156	993	DTIC	113642	113120730	2.3215
*Acetic 2TMS	908 ; 2.304	Match	147	841	DTIC	859.31	1302690	0.0267
*Adipic 2TMS	1331 ; 2.368	Match	111	887	DTIC	201.98	205582	0.0042
*Aminomalonic 3TMS	1310 ; 2.296	Match	218	967	DTIC	1047.2	3228860	0.0662
*Azelaic 2TMS	1535 ; 2.392	NF	75	969	DTIC	160	567662	0.0110
*Benzoic TMS	1112 ; 2.664	Match	77	733	DTIC	18.102	23115	0.0004
*beta-Alanine 3TMS	1271 ; 2.224	Match	248	987	DTIC	896.39	2439244	0.0500
*Citric 4TMS	1556 ; 2.240	Match	273	994	DTIC	8824	12447721	0.2550
*Cystathionine 4TMS	1739 ; 2.256	Toleranace	128	980	DTIC	1019.4	655061	0.0134
*Fumaric 2TMS	1193 ; 2.312	Match	245	973	DTIC	943.43	1453249	0.0298
*Glucose 5TMS	1601 ; 2.088	Match	103	847	DTIC	20.409	86871	0.0017

RT – retention time; UM – Unique mass; S/N – signal to noise ratio; DTIC – deconvoluted total ion chromatogram; NF – not found

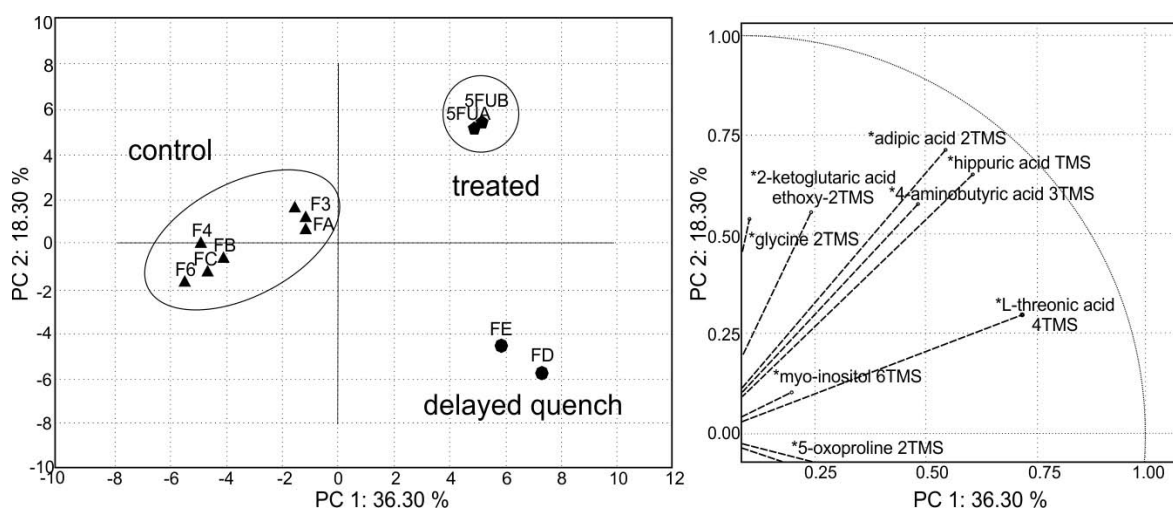


Fig. 1. PCA (Principal Component Analysis) of silylated cultured human skin fibroblasts with the relation of 5-fluorouracil treatment. The data were log-transformed, median centred, and normalized. The projection of the cases and enlarged part of loadings on the component plane 1x2 is shown.

možnou přítomnost jejich jednotlivých zástupců, a pokud dojde ke shodě, také analyty kvantifikuje. Použití reference ilustruje Tabulka 1. Databáze v současnosti obsahuje 286 silylderivátů a 185 MCF-derivátů a je dále rozšiřována. Dosud byla použita například pro diagnostiku poruch v metabolismu aminokyselin (plazma), diagnostiku organických acidurií (moč), či definování metabolomu fibroblastů. Obrázek 1 zobrazuje statistické vyhodnocení (analýza hlavních komponent) fibroblastů s přidavkem 5-fluorouracilu do kultivačního média.

Závěr

V prezentované práci bylo dokázáno, že užitím dvojrozměrné plynové chromatografie je možno stanovit násobně více analytů v porovnání s klasickými technikami. Tato skutečnost je dokumentována na vzorcích močí, plazem a kultivovaných fibroblastů. Možnost automatizace zpracování dat snižuje chyby stanovení a také značně zkracuje dobu potřebnou pro vyhodnocení.

Literatura

1. **Wojtowicz, P., Zrostlíková, J., Kovalczuk, T., Schůrek, J., Adam, T.** Evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for the diagnosis of inherited metabolic disorders using an automated data processing strategy. *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, p. 8054–8061.
2. **Husek, P., Matucha, P., Vránová, A., Simek, P.** Simple plasma work-up for a fast chromatographic analysis of homocysteine, cysteine, methionine and aromatic amino acids. *J. Chromatogr. B*, 2003, 789, p. 311–322.

Tato práce byla podpořena granty CZ.1.05/2.1.00/01.0030, A/CZ0046/2/0011, a MSM6198959205.

Toto krátké sdělení vzniklo na základě abstraktu posteru prezentovaného na konferenci „1st Joint Congress Symposium,“ 1.–5. 5. 2011, San Diego, USA. Podpořeno cestovním grantem výboru ČSKB.

Do redakce došlo 24. 4. 2011

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Petr Wojtowicz

Laboratoř dědičných metabolických poruch, UP a FN

Olomouc

I. P. Pavlova 6,

775 20 Olomouc

e-mail: petr.wojtowicz@gmail.com