



CHALMERS

Optimering av en gaskromatografisk tandem-masspektrometrisk metabolomikmetod för cerebrospinalvätska

Med tillämpning relaterat till Alzheimers sjukdom

Examensarbete för högskoleingenjörsexamen inom Kemiingenjörsprogrammet

Xuan Vänerlöv

Optimering av en gaskromatografisk tandem-masspektrometrisk metabolomikmetod för cerebrospinalvätska med tillämpning relaterat till Alzheimers sjukdom

XUAN VÄNERLÖV

© XUAN VÄNERLÖV, 2016.

Intuitionen för Biologi och bioteknik

Chalmers Tekniska Högskola

SE-412 96 Göteborg

Sverige

Telefon +46 (0)31-772 1000

Optimization of a gas chromatography tandem mass spectrometric metabolomics method for cerebrospinal fluid with applications related to Alzheimer's disease

Xuan Vänerlöv

Department of Biology and Biological

Chalmers University of Technology

Thesis written in Swedish

Abstract

In this experiment gas chromatography was used to separate analytes in cerebrospinal fluid and mass spectrometry was thereafter applied to detect the analytes. The mass spectrometry included a triple quadrupole and was set into a Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode in parallel with full scanning mode. In order to use MRM mode, MRM parameters had to be optimized from standards which would then be analyzed in the sample. The standards that were optimized were metabolites selected for a method related to diabetes together with the neurotransmitters dopamine, serotonin, epinephrine, gamma-aminobutyric acid (GABA) and acetylcholine. The method that was used was an existing method used for plasma samples which was modified to be suitable for cerebrospinal fluid. The modified method with the added substances was thereafter tested and validated. Dopamine, serotonin, GABA and epinephrine could be optimized for MRM mode, of which dopamine and GABA could be seen in cerebrospinal fluid. In the evaluation of the method, the majority of the metabolites had an acceptable variation to be included in the method. It was concluded that gas chromatography with a mass spectrometer including a triple quadrupole was suitable for the method for cerebrospinal fluid. A future goal is to apply the method in different diseases investigations such as Alzheimer's disease, which therefor is a major chapter in this report.

Keywords: Gas chromatography, tandem mass spectrometry, triple quadrupole, Alzheimer's disease, cerebrospinal fluid, metabolomics, Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Optimering av en gaskromatografisk tandem-masspektrometrisk metabolomikmetod för cerebrospinalvätska med tillämpning relaterat till Alzheimers sjukdom

Xuan Vänerlöv

Intuitionen för Biologi och bioteknik

Chalmers Tekniska Högskola

Sammanfattning

I detta experiment har gaskromatografi använts för att separera analyterna i cerebrospinalvätska och sedan har masspektrometri används innehållande en trippel kvadrupol som körts i MRM-läge parallellt med fullt skanningsläge. För att *Multiple Reaction Monitoring* MRM skulle kunna användas var parametrar tvungna att optimeras från de standarderna som sedan skulle analyseras i provet. Standarderna som optimerades var ett urval metaboliter till en metod relaterat till diabetes samt hjärnans signalsubstanser dopamin, serotonin, epinefrin, *gamma-aminobutyric acid* (GABA) och acetylcholin. Metoden som användes var en befintlig metod utformad för plasmaprover som modifierades för att passa cerebrospinalvätska. Den modifierade metoden med de tillagda substanserna testades och utvärderades sedan. Dopamin, serotonin, GABA och epinefrin kunde optimeras för MRM-läge och dopamin och GABA kunde ses i cerebrospinalvätska. Vid utvärdering av metoden hade majoriteten av metaboliterna tillräckligt hög reproducerbarhet för att inkluderas i metoden. Slutsatsen som drogs var att gaskromatografi med en masspektrometer innehållande en trippel kvadrupol var lämplig till metoden för cerebrospinalvätska. Metoden kan appliceras vid undersökning av olika sjukdomar som till exempel Alzheimers sjukdom och tas därför upp som ett omfattande kapitel i rapporten.

Nyckelord: Gaskromatografi, tandem-masspektrometri, trippel kvadrupol, Alzheimers sjukdom, cerebrospinalvätska, metabolomik, Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Innehållsförteckning

Abstract	i
Sammanfattning	ii
1 Inledning	1
2 Bakgrund	2
2.1 Alzheimers sjukdom	2
2.1.1 Beta-amyloid.....	2
2.1.2 Tau-protein.....	4
2.1.3 Typer av Alzheimers	5
2.2 Metabolomik	5
2.2.1 LC-MS-baserad metabolomik.....	6
2.2.2 GC-MS-baserad metabolomik	7
2.2.3 Masspektrometri	7
2.3 CSV och metabolomik	9
3 Syfte	10
4 Material/ Metod	11
4.1 Material.....	11
4.2 CSV extraktion och optimering av extraktvolym.....	11
4.3 Derivatisering	11
4.4 GC-QQQ analys	11
4.5 MRM-optimering	12
4.6 Kontroll av metod.....	12
5 Resultat och diskussion	13
5.1 MRM-optimering	13
5.2 Kontroll av metod.....	14
6 Slutsats	15
7 Tillkännagivanden	16
8 Referenser	17
Bilaga A	19
Bilaga B	22

1 Inledning

Detektionsmetoden masspektrometri kan användas för att mäta molekyler i en levande organism där ett förhållande mellan massa och laddning mäts hos joner och detta möjliggör identifikation av både kända och okända komponenter. Det finns olika sorters masspektrometriska instrument som kan användas i olika lägen för att erhålla den information som önskas. Några exempel är *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) där ett specifikt jonfragment tillåts att nå detektorn och fullt skanningsläge där alla joner når detektorn som möjliggör identifikation av alla analyter i ett prov. Denna metod är vanlig vid till exempel biologisk forskning där små molekyler, metaboliter, kan mätas för att förstå biologin hos en organism och dess respons på stimulanser eller upptäcka genetiska störningar. Metaboliter återfinns i våra biologiska vätskor såsom blod, urin och cerebrospinalvätska. I cerebrospinalvätska (hjärnryggmärgsvätska) kan fördelningen av de kemiska substanser som finns i hjärnan analyseras och är därför viktig vid undersökning av hjärnsjukdomar, till exempel demenssjukdomar. Den vanligaste demenssjukdomen i världen är Alzheimers sjukdom som troligtvis startar långt innan symptom upptäcks. Det som utmärker sjukdomen och som påträffas vid diagnostiseringen är de så kallade senila plack och neurofibrillära nystan i hjärnan. Beståndsdelarna till dessa och även många andra ämnen i hjärnan kan återspeglas i cerebrospinalvätskan. Cerebrospinalvätskan kan därför användas för att mäta beståndsdelarna i senila plack och neurofibrillära nystan för att diagnostisera Alzheimers sjukdom men skulle också kunna användas för att upptäcka förändringar av olika metaboliter för att hitta samband relaterat till sjukdomen. Några relevanta metaboliter för både Alzheimers sjukdom och övriga hjärnsjukdomar är hjärnans signalsubstanser där hjärnans celler kontaktar varandra med nervpulser som överförs från en cell till en annan med hjälp av kemiska signalsubstanser. För att kartlägga signalsubstansernas vägar från hjärnstammen och ut till resten av hjärnan och ryggmärgen kan dopamin och serotonin användas som signalsubstanser [1]. Dessa signalsubstanser är delaktiga i flera fysiologiska och beteenderelaterade funktioner såsom sömn, vaksamhet, belöningssystemet, motoriska och mentala funktioner. De påverkar också förmågan att reglera matintaget och kroppstemperaturen [2]. I Alzheimers sjukdom har lägre nivåer av dopamin redovisats i bland annat cerebrospinalvätska [1]. Även serotonin har visat sig i lägre koncentrationer i sjukdomen [3]. För att kunna mäta signalsubstanser eller andra ämnen i cerebrospinalvätska behövs en separationsmetod för att kunna urskilja ämnena för senare detektion med hjälp av en detektionsmetod. Vid mätning av metaboliter är masspektrometri en vanlig detektionsmetod och för separationen kan till exempel vätske- eller gaskromatografi användas.

2 Bakgrund

Detta kapitel kommer att behandla Alzheimers sjukdom, metabolomik och dess tillämpning i analytisk kemi.

2.1 Alzheimers sjukdom

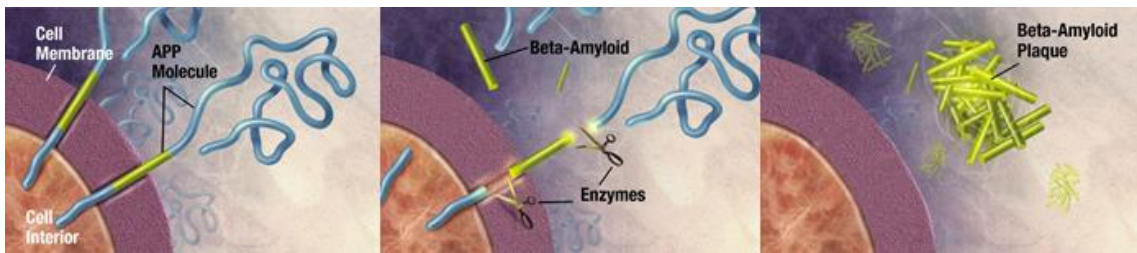
Alzheimers sjukdom (Alzheimer's Disease, AD) är den vanligaste anledningen till demens som över 36 miljoner människor i världen lider av [4]. Allt fler patienter med lättare minnessvårigheter (Mild Cognitive Impairment, MCI) söker sjukvård för att de ofta är rädda för att ha AD [5]. I detta stadium är det mycket svårt att kliniskt avgöra om patienten håller på att utveckla AD eller någon annan typ av demenssjukdom, eller om symptomen orsakats av utbrändhet/depression eller godartad form av MCI som är en del av det normala åldrandet [6]. Av de sökande utvecklar 30-50 procent AD inom 4-6 år [5]. Det är dock sannolikt att sjukdomsprocessen startar redan 20-30 år innan patienten får de första kliniska symptomen [6]. Vid undersökningen används ofta magnetkamera och/eller positronemissionstomografi (Positron Emission Tomography, PET) för att hitta förändringar av biomolekylerna som kodar för AD [6]. De upptäckter som görs hos patienterna med sjukdomen är neurofibrillära nystan (neurofibrillary tangles, NFT) som består av tau-protein (total- och fosfo-tau) och så kallade senila plack som till största del består av Beta-amyloid. Demenssjukdomar är exempel på neurodegenerativa sjukdomar, en kategori av sjukdomar som orsakar ett långsamt sönderfall av nervsystemet. Dessa sjukdomar återspeglas i proteinsammansättningen i cerebrospinalvätska (CSV) där flera biomarkörer finns [6]. Nivåerna av vissa proteiner i CSV analyseras därför hos MCI-patienterna; dessa proteiner är total-tau, fosforylerat tau och beta-amyloid₍₁₋₄₂₎. Proteinerna finns i CSV i ventriklar och subaraknoidalrummet vilka omsluts av hjärnan. Subaraknoidalrummet och hjärnans extracellulärrum åtskiljs endast av ett enkelt lager ependymceller som har hög permeabilitet för de flesta ämnen, inklusive proteiner, vilket innebär att substanserna fritt kan röra sig mellan dessa. Detta utnyttjas vid undersökning av biomarkörernas nivåer för AD i hjärnan.

I nuläget finns inget botemedel mot AD, bara behandlingar som lindrar effekterna. Dessa behandlingar kan till exempel göras med läkemedel som hämmar avsättningen av Beta amyloid i senila plack [7]. Dessa ger bäst påverkan om de påbörjas i ett så tidigt stadium som möjligt, det vill säga i MCI-stadiet.

2.1.1 Beta-amyloid

Beta-amyloid ($A\beta$) är huvudkomponenten i senila plack som bildas genom bearbetning, i form av klyvning, av ett större moderprotein; amyloidprecursorprotein (APP), se figur 2.1. Klyvningen av APP kan kategoriseras in i den icke-amyloidogenska och den amyloidogenska reaktionsvägen som illustreras i figur 2.2. I den icke-amyloidogenska reaktionsvägen klyvs APP av α -sekretas 83 aminosyror ifrån karboxiterminalen och bildar sAPP α (Soluble Amyloid Precursor Protein alfa) som sedan utsöndras i det extracellulära rummet. De resterande aminosyrorna behålls i membranet som sedan

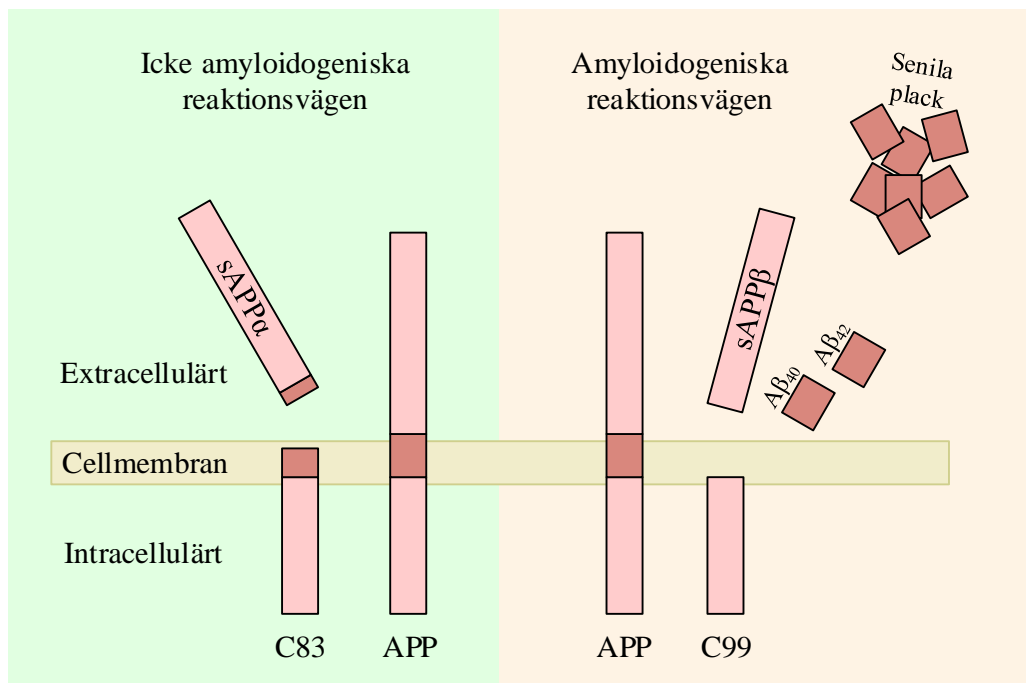
klyvs av ett γ -sekretas som bildar ett kort fragment, p3. Viktigt att poängtera är att klyvning med α -sekretas sker inom A β -regionen som förhindrar bildning av A β [8].



Figur 2.1. Klyvning av APP till A β

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Amyloid-plaque_formation-big.jpg

I den amyloidogeniska reaktionsvägen klyvs istället APP av ett β -sekretas 99 aminosyror ifrån karboxiterminalen och bildar istället sAPP β [8]. Den efterföljande klyvningen av γ -sekretas klyver sedan vid olika fragment av det återstående proteinet, vilket resulterar i olika typer av A β (A $\beta_{(38-43)}$) [8]. A β_{40} med 40 aminosyror är den som det bildas mest av medan den isomeren med två aminosyror längre, A β_{42} är den som hittas i större mängder i senila plack [9]. A β_{40} och A β_{42} avspeglar metabolismen av A β och bildningen av senila plack [7]. Flera studier har visat att den diagnostiska säkerheten för AD är högre om kvoten mellan A β_{42} och A β_{40} mäts än genom att mäta A β_{42} som enskild analys [6]. Vid AD är nivån av A β_{42} i CSV sänkt till cirka 50 % jämfört med nivån hos jämnåriga friska personer [6]. Detta på grund av de stora mängderna av A β i de senila placken i hjärnan.



Figur 2.2 Illustration av icke amyloidogeniska och amyloidogeniska reaktionsvägarna

2.1.2 Tau-protein

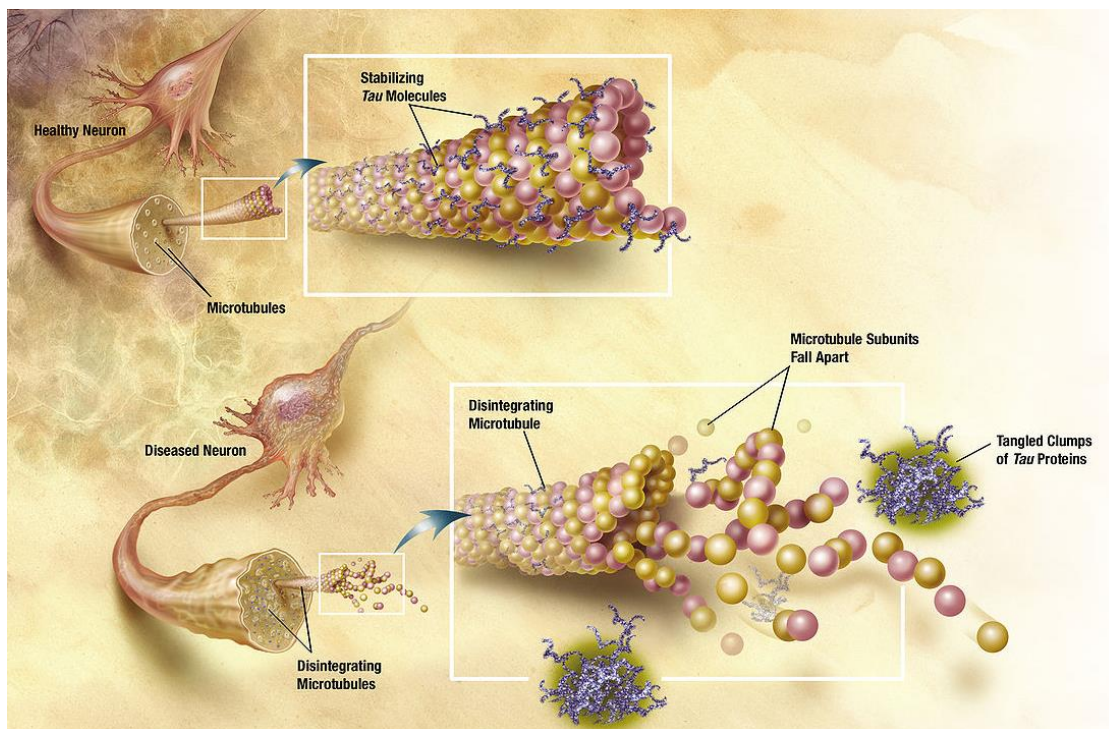
Tau-protein (tau) finns i nervcellernas axoner i hjärnan och har till uppgift att binda och stabilisera till transportsystemet mikrotubuli. En fosfatgrupp kan bindas till ett antal aminosyror i tau, varvid tau kan vara fosforylerat i olika grader.

Vid diagnostik av AD analyseras två olika sorters tau, total-tau (T-tau) som avspeglar axonal nervcells försämring och fosforylerat tau (P-tau) som avspeglar hyperfosforylering av tau och bildning av neurofibriller [6].

Genom en analysmetod som kan mäta alla isoformer av tau kan nivån av T-tau i CSV bestämmas. Ökad nivå av T-tau i CSV speglar graden av neuronal/axonal försämring och skada [6]. Nivån i CSV av T-tau hos patienter med AD har i flera studier visat sig vara måttligt till kraftigt ökad och medelnivån mer än tre gånger högre än hos friska individer [6].

Vid AD kopplas en fosfatgrupp på ett antal aminosyror i tauproteinet. Fosforylerat tau (P-tau) har sämre förmåga att binda till mikrotubuli som finns i axonerna och därmed får axonerna nedsatt stabilitet vilket också påverkat nervcellens funktion. P-tau har också en tendens att klumpa ihop sig till parade helikala filament som i sin tur bildar de stora proteinagregat som bygger upp neurofibrillerna [6]. Nivån av P-tau hos patienter med AD har visats i flera studier vara måttlig till kraftigt ökad i CSV. P-tau i CSV har stor betydelse för att urskilja patienter med AD och patienter med andra former av demens.

En ökning av både T-tau och P-tau talar för AD medan en ökning av T-tau tillsammans med normalt P-tau tyder axonalt sönderfall av annan kategori än AD. Den förändrade kemiska sammansättningen av tau-protein resulterar till att mikrotubuli blir instabil och därmed sönderfaller och bildar neurofibriller som visas i figur 2.3.



Figur 2.3. Bildning av neurofibriller från tau protein
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:TauProtein.gif>

2.1.3 Typer av Alzheimers

AD finns antingen som den familjära AD (fAD) med Mendels smittspridning eller den sporadiska AD (sAD) utan någon genetisk aggregering. Den vanligaste formen är sAD där cirka 95 % av fallen är av denna typ och debutåldern är relativt sen på 65 år eller äldre. Den typiska debutåldern för fAD är ofta före 65 år och kan i vissa fall kan diagnostiseras redan vid 35 års ålder [10].

2.1.3.1 Genetisk

Den genetiska typen av AD är direkt kopplad till mutationer i en av tre specifika gener. Då fAD är ärftlig är sjukdomsförloppet mer förutsägbar än sAD då det är lättare att förutsäga uppkomsten och utvecklingen av sjukdomen. Trots detta är skillnaderna för de två typerna markant små gällande det allmänna minnet och kognitiva förändringar [10]. I båda typerna av AD är nivåerna i CSV av A β lägre och tau förhöjda jämfört med kognitivt normala personer.

2.1.3.2 Sporadisk

Trots att sAD uppstår sporadiskt, så är det sannolikt att sAD orsakas av en kombination av genetiska och miljömässiga faktorer. I den genetiska typen orsakas AD av mutationer i en av tre specifika gener, men liknande samband har även konstaterats för sAD i genen $\epsilon 4$ som kodar för proteinet Apolipoprotein E (ApoE) [10]. ApoE är en stor kolesterolbärare som transporterar lipider och kolesterol samt reparerar skador i hjärnan [11]. ApoE-genen finns i tre varianter; $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ och $\epsilon 4$ som kodar för motsvarande proteinformerna ApoE2, ApoE3 och ApoE4 och sex genotyper, $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 4/\epsilon 2$, $\epsilon 4/\epsilon 3$ och $\epsilon 4/\epsilon 4$ [10]. Individer som bär på $\epsilon 4$ allelen har ökad risk för att utveckla AD jämfört med de som bär på den vanligaste typen av $\epsilon 3$; $\epsilon 3/\epsilon 3$. Genvarianten $\epsilon 2$ ($\epsilon 2/\epsilon 3$ och $\epsilon 2/\epsilon 2$) har dock visat sig ha skyddande effekt mot AD [11]. Bärare av två $\epsilon 4$ ($\epsilon 4/\epsilon 4$) har störst risk att utveckla AD med 91 % sannolikhet medan de med en $\epsilon 4$ har en sannolikhet på 47 % och de som inte är bärare till $\epsilon 4$ bara har 20 % sannolikhet att utveckla AD [11]. Flera studier tyder på att ApoE4 påverkar nivåerna av A β i CSV, då nivåerna av A β är lägre i CSV hos personer med AD men även hos de individer som är ApoE4-bärare utan någon klinisk AD [12]. Det är därför lämpligt att ta hänsyn till vilken ApoE genotyp individen har när A β analyseras i CSV.

2.2 Metabolomik

Metabolomik är ett framåtväxande område som behandlar systematisk identifiering och kvantifiering av små molekyler (<1500 Dalton), så kallade metaboliter som återfinns i levande organismer, det vill säga metabolom [13]. Metabolomik är den sista kategorin av alla ”omiker” där företrädarna är genomik, transkriptomik och proteomik [14]. Genomiken ger grundläggande information om cellens gener, transkriptomiken ger information om vilka gener som är aktiva och därmed vilka proteiner som kommer bildas och proteomiken ger information om dess proteiner som syftar till att identifiera och lokalisera proteiner och bestämma dess vägar inom en organell, cell eller organism [15]. Metabolomiken ger en mer samlad information om hur cellen beter sig just nu.

Metaboliter tycks agera som talspråk och sänder signaler från den genetiska strukturen och miljön, därför anses metabolomik ge en direkt funktionell avläsning om det fysiologiska tillståndet hos en organism [14]. Med hjälp av NMR (Nuclear Magnetic Resonance, kärnmagnetisk resonans) och MS (Masspektrometri) kan upp till tusentals kemiska beståndsdelar, antingen kända eller okända föreningar, på samma gång jämföras och identifieras [16]. Detta gör att metabolomik kan tillämpas inom många områden, bland annat för att upptäcka kemiska biomarkörer som i sin tur kan användas för att diagnostisera sjukdomar [16], farmaceutisk forskning och utveckling [17] och inom jordbruk och livsmedelssäkerheten [18]. Då metabolomik är en kvalificerad metod för att upptäcka kemiska biomarkörer är detta till stort värde i klinisk medicin då biomarkörer kan användas för att diagnostisera till exempel prediabetes, cancer och kärlsjukdomar [16].

Metabolomikens data kan skapas ur olika källor såsom vätske- och gaskromatografi kopplad till en masspektrometer (LC/MS, GC/MS), kappilärelektrofores (CE) och kärnmagnetisk resonans (NMR). Inom metabolomiken används två olika grupper, målinriktade och icke målinriktade metoder [19]. Den icke målinriktade metabolomiken försöker identifiera och hitta alla små molekyler i ett prov med hjälp av en GC eller LC-separation följt av MS för detektion [19]. Den målinriktade metabolomiken mäter en fördefinierad uppsättning av alla definierade metaboliter i ett prov [15]. Den icke målinriktade metabolomiken har till fördel att det är en omfattande analys som mäter samtliga mätbara analyter i ett prov, inklusive okända [20]. På grund av dess omfattande natur, måste oriktad metabolomik anslutas till avancerade tekniker såsom multivariantanalys för att minska omfattande datamängder som skapas i en mindre uppsättning hanterbara signaler. Dessa signaler måste sedan antecknas genom att antingen använda *in silico*-bibliotek eller experimental undersökning följt av identifiering med analytisk kemi [20]. Metoder för provberedning och den egentliga känsligheten och specificiteten för den analytiska teknik som används är det som begränsar den icke målinriktade analysens teckning av metabolom [20]. Vid riktad metabolomik kan provberedning optimeras vilket minskar dominansen av högförekomstmolekyler. När fördefinierade analyter studeras kan nya associationer mellan metaboliter klarläggas i samband med specifika fysiologiska tillstånd [20].

2.2.1 LC-MS-baserad metabolomik

LC-MS är vätskekromatografi kopplat med masspektrometri och är en populär utgångspunkt vid identifiering och kvantifiering av metaboliter på grund av dess höga genomströmning, mjuka jonisering och goda täckning av metaboliter. Vid LC-MS är elektroprayjonisering (ESI) den jonkälla som är överlägsen vid metabolomikstudier, på grund av dess mjuka jonisering som ger ett stort antal joner genom laddningsutbyte i lösning och ofta bildar intakta molekyllära joner som är till hjälp vid initial identifiering [21]. Innan masspektrometrisk analys separeras ofta analyterna med en högpresterande vätskekromatografi (HPLC) som tillåter separation av föreningar med ett brett spektrum av polaritet av antingen isokratisk eluering eller gradienteluering. Vid isokratisk

eluering används samma sammansättning på mobilfas genom hela analysen och är att föredra vid analys av komponenter med liknande egenskaper. Vid analys av komponenter med olika egenskaper är gradienteluering att föredra då mobilfasens sammansättning ändras under analystiden. Gradienteluering kan användas då föreningar med olika elueringstider ska föras samman till ett kromatogram utan att analystiden blir för lång. Vid LC-MS analyser behöver analyterna inte göras flyktiga innan analys och har ofta kortare körningstid jämfört med GC. En nackdel med LC-MS-baserade metabolomikstudier är identifieringen av okända metaboliter, då massan för en molekylär jon är relativt lätt att mäta men massinformationen oftast inte är tillräcklig för att karakterisera dess struktur och identifiera den som en specifik biokemisk beståndsdel [21]. Här har GC-MS mycket större fördel då EI kan användas som erbjuder reproducerbar fragmentering som kan upprepas över olika GC-MS instrument.

2.2.2 GC-MS-baserad metabolomik

GC-MS är gaskromatografi kopplat till masspektrometri där flyktiga och termiskt stabila föreningar först separeras genom GC och sedan oftast detekteras med en masspektrometer med elektronstötjonisering (EI) [22]. EI och fragmenteringen är generellt reproducerbar mellan instrument och omfattande bibliotek av spektra finns tillgängligt som förbättrar identifieringen av analyter [23]. Den största begränsningen vid användning av GC-MS är begränsningen till flyktiga analyter [23]. De metaboliter med låga molekylvikter och som är flyktiga kan analyseras direkt med GC men de flesta metaboliter kräver derivatisering vid rumstemperatur eller högre temperaturer för att bli tillräckligt flyktiga och termiskt stabila för GC-analys. Eftersom metaboliter har olika kemiska funktionaliteter sker derivatiseringen i två steg för att uppnå detektering av så många metaboliter som möjligt i biologiska prover [23]. Först omvandlas karbonylfunktionella grupper till oximer med O-alkylhydroxyaminlösningar följt av bildandet av trimetylsilyl(TMS)estrar med silylerande reagens, ofta N-metyl-N-(trimetylsilyl)triflouracetamid för att ersätta utbytbara protoner med TMS-grupper. Bildningen av oxim krävs för att eliminera oönskade reaktioner vars produkter är termiskt labila. Vid analys av de derivatiserade proverna är det bara en liten mängd som injiceras och analyseras i GC-MS genom split eller splitless injektion och en kapillärkolonn används för att separera analyter. Användning av kapillärkolonn ger både högre kromatografisk upplösning och högre känslighet [22].

2.2.3 Masspektrometri

Masspektrometri (MS) är en detektionsmetod som används för att upptäcka kända komponenter och identifiera okända komponenter. MS baseras på ett förhållande mellan massa och laddning (m/z) av en analyt som först måste joniseras för att m/z skall kunna mätas. Det är vanligt att m/z -förhållandet är lika med analytens molekylvikt om inte komponenten blir flerladdad efter joniseringen eller som vid EI då molekylerna joniseras genom en hård joniseringsmetod som resulterar till att molekylens vikt fördelas på de fragments som bildas. I ett magnetiskt och/eller elektriskt fält separeras

den laddade molekylen med avseende på dess m/z . Masspektrometri kan också sättas samma i flera steg där prekursorjon-fragmentering sker emellan stegen, detta kallas för tandem-masspektrometri eller MS/MS. MS/MS baseras på att det i första steget väljs en måljon och i det sista steget väljs de fragment av måljonen som önskas detekteras [24]. Det finns olika sorters MS-instrument som till exempel, trippel-kvadrupol-MS, singel kvadrupol-MS, time of flight-MS och kvadrupol-time of flight-MS. De olika instrumenten kan användas i olika lägen för att erhålla den informations som önskas.

2.2.3.1 Olika kontrollägen för Masspektrometri

MS kan användas på ett antal olika sätt för att erhålla kvantitativ information av analyten. De vanligaste lägena som används är skanning, *Selected Ion Monitoring* (SIM) och *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). I skanningsläget är MS inställd så att alla massor inom ett brett intervall mäts (till exempel m/z 50-1050), denna metod används för flera olika syften som till exempel för att identifiera okända analyter i ett prov eller för kvantifiering. Ju bredare massintervall är som skannas desto mindre tid tillägnas insamlingen av joner för varje individuell massa. Med SIM samlar detektorn data från ett fåtal eller enstaka massor, detta leder till att detektorn samlar varje fragmenterad jon under en längre tid vilket ökar känslighet och möjliggör att mindre kvantiteter kan detekteras [25] [26]. Molekyler som genomgått en grundlig karaktärisering i en upptäcktsfas kan detekteras med förbättrad specificitet och känslighet då analysiden i MS fokuseras på de analyter med specifik massa medan de övriga utesluts [27]. Om den valda molekylen fragmenteras och sedan sorteras i ett fåtal fragment med avseende på m/z innan de når detektorn kallas detta MRM. MRM är en kraftfull metod för kvantitativ mätning av metaboliter.

2.2.3.2 Trippel-kvadrupol-masspektrometer QQQ-MS

Ett typiskt exempel på MS/MS är en trippel kvadrupol masspektrometer (QQQ-MS) [28]. En QQQ-MS består av tre kvadrupoler i serie. En metabolit joniseras vid en jonkälla och isoleras sedan i den första kvadrupolen (Q1). Den andra delen (Q2) fungerar som en kollisioncell i en process som kallas för kollisiondissociation (CID) där måljonen fragmenteras. Den sista kvadrupolen (Q3) fungerar som ett massfilter där en massa över laddning väljs (m/z) av ett fragment som slutligen når detektorn [15]. Med en QQQ-MS kan MRM-, SIM-, och skanningsläge användas.

2.2.3.3 Singel kvadrupol- masspektrometri

Metabolomikstudier kan utföras genom singel kvadrupol MS-detektion. Denna detektion kännetecknas av att den är lättanvänd, ökar effektiviteten och låga kostnader [29]. I en singel kvadrupol kan skanning göras i ett valt massområde, och även SIM-metoder kan användas som för det möjligt att kolla på en valt förening med en känt molekylvikt [29].

2.2.3.4 Time of flight TOF- och Kvadrupol-time of flight Q-TOF spektrometri

Om den sista kvadrupolen i QQQ byts ut mot en time of flight-analysator fås en kvadrupol-time of flight. Där ett statiskt och radiofrekvent fält kan skapas så att bara ett snävt intervall av jonmassor har stabila banor och kan nå detektorn. Denna sorts analys mäter jonens flygtid, *time of flight*. Time of flight (TOF) och kvadrupol-time of flight (Q-TOF) är två masspektrometriska instrument som mäter den experimentella exakta massan hos en analyt. TOF har det bredaste användningsområdet och den högsta analys hastigheten av alla masspektrometrar [30]. Detta instrument kan som QQQ-MS användas i MRM-, SIM-, och skanningsläge.

2.3 CSV och metabolomik

CSV är utsöndringsprodukten av det centra nervsystemet som fyller ventriklarna och subaraknoidalrummet i hjärnan och ryggraden [13]. Den skyddar hjärnan från stötar och cirkulerar näringsämnen och filtrerar kemikalier från blodet [13]. Eftersom produktionen av metaboliter i hjärnan är direkt beroende av sammansättningen i CSV kan denna förväntas återspegla de biologiska processerna i hjärnan [31].

I en tidigare studie undersöktes metaboliter i CSV med hjälp av GC-MS där målet var att etablera en heltäckande databas av detekterbara metaboliter i humant CSV [13]. Enligt en litteraturstudie ska CSV innehålla 308 detekterbara metaboliter varav 41 metaboliter kunde identifieras med hjälp av GC-MS i studien. Då analyter som låg under gränsen 1 μM inte kunde detekteras återstod cirka 75 föreningar. I försöket förväntades fler metaboliter än 41 stycken kunna identifieras, men det konstaterades att en möjlig orsak till att detta inte gjordes kunde vara användningen av ett relativt långsamt instrument som hade långsam skanning i kvadrupolen. I undersökningen testades även NMR och Fouriertransform–Masspektrometri (FTMS) med vätskekromatografi (LC) för att försöka identifiera metaboliter i CSV. Enligt studien verkade GC-MS ge bäst resultat med bäst känslighet tätt efter NMR, men LC-FTMS lämpade sig dåligt för att karakterisera metaboliter i CSV [13].

3 Syfte

I ett tidigare försök till att analysera metaboliter i CSV med hjälp av GC har det framkommit att resultatet förmodligen skulle bli bättre med en snabbare analysmetod, antingen med GC-TOF eller med en snabbare variant av GC-QQQ. I detta experiment testas CSV att analyseras med en snabb skanning GC-QQQ system med en metod som kombinerar både målinriktat och icke målinriktade metabolomikanalyser för en bättre täckning av metabolom i CSV och för att förbättra specificiteten och precisionen av analysen. Första steget är att optimera MRM parametrar från utvalda standarder och föra in dessa till bibliotek samt testa och optimerade parametrarna med CSV-prover. Sedan testa hur pålitlig och reproducerbar metoden är för CSV-analyser och jämföra med plasma. Metoden kan sedan appliceras vid undersökning av sjukdomar, till exempel Alzheimers.

4 Material/ Metod

Metoden är utformad efter tidigare metod som utfärdats av Savolainen et al. [32].

4.1 Material

Alla referensföreningar var från Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). De stabila isotopmärkta interna standarderna (IS) $^{13}\text{C}_5$ -prolin, $^2\text{H}_4$ -bärnstensyra, $^{13}\text{C}_5$, ^{15}N -glutaminsyra, $^2\text{H}_7$ -kolesterol, $^{13}\text{C}_4$ - α -ketoglutarsyra, $^{13}\text{C}_{12}$ -sackaros, $^{13}\text{C}_6$ -glukos and $^2\text{H}_6$ -salicylsyra var från Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA). Vattenfri pyridin, metanol och heptan med LC-MS kvalitet, metylstearat och metoxyaminhydroklorid var från Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). *N*-(trimetylsilyl)trifluoroacetamid (MSTFA) med 1 % Trimetylklorosilan (TMCS) var från Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA) eller från Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Etanol var från Solveco (Rosersberg, Sverige). CSF, dopamin, serotonin, epinefrin och acetylkolin mottogs som gåvor.

4.2 CSV extraktion och optimering av extraktvolym

CSV som användes var frusen och förvarades i -20°C . 50 μl CSV överfördes till 1,5 ml mikrocentrifugtub och därefter tillsattes 450 μl extraktionsmix (MeOH:H₂O 9:1 v/v) innehållande interna standarder. Lösningen skakades (Retsch GmbH, Germany) sedan i 3 minuter i 30 Hz och centrifugerades därefter i 10 minuter i 12000 rpm. Sedan överfördes 200 μl supernatant till en insatsvial som sedan indunstades i 1-2 timmar med vakuumcentrifugering (MiVac Duo concentrator, Genevac Ltd., Ipswich, UK). Resterande supernatant förvarades i -20°C .

Volymen CSV som skulle användas till metoden togs fram genom att 50- 250 μl av extraktet testades att köras i skanningsläge och valde den volym som gav tillräckligt bra intensitet men så att CSV inte slösades, vilket var 200 μl

4.3 Derivatisering

20 μl av 15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ metoxyaminhydroklorid löst i pyridin tillsattes till den indunstade extraktionen som sedan skakades och fick sedan reagera vid 60°C i 60 minuter. Därefter fortsattes reaktionen i rumstemperatur i 2 timmar innan 20 μl *N*-(trimetylsilyl)trifluoroacetamid (MSTFA) med 1 % Trimetylklorosilan (TMCS) tillsattes för derivatisering och skakades därefter. Provet fick reagera i 1 timma innan 20 μl metylstearat löst i heptan (15ng/ μl) tillsattes. Lösningen skakades sedan och analyserades i GC-QQQ.

4.4 GC-QQQ analys

Proverna analyserades med hjälp av gaskromatografi kopplad till en tandem-masspektrometer med hög scanningshastighet (Shimadzu GC-2010 Plus gaskromatograf, Shimadzu TQ-8030 trippel kvadrupol masspektrometer och en Shimadzu AOC-5000 Plus provhanteringssystem från Shimadzu Europa GmbH, Duisberg, Germany). För analys injicerades 1 μl med ett splitförhållande på 1:2 där separationen gjordes i en 15 m x 0,25 mm x 0,25 μm Rxi-5Sil MS-kolonn (Restek

Coporation, Bellefonte, PA) med helium som bärgas och en injektionstemperatur på 270°C. Den initiala ugnstemperaturen var 70°C som hölls i 2 minuter, sedan höjdes temperaturen med 30°C/min till 330°C som hölls i 2 minuter. GC drevs i ett konstant linjärt hastighetsläge på 80 cm/sek. Ingångsflödet var inställt på 3 ml/min. Interface och jonkällans temperatur var 290°C respektive 200°C. I masspektrometern användes elektronstötjonisering (EI) och argon användes som MS/MS-kollisionsgas.

Proverna kördes med hjälp av fullständig genomsökning vid ett massintervall av 50-750 m/z i 75 ms och därefter MRM-övergångar i 45 ms på en total looptid på 120 ms. Retentionsindex beräknades med hjälp av en intern alkanstandard.

4.5 MRM-optimering

Varje standard analyserades i ett fullständigt skanningsläge (50-750 m/z) för att hitta prekursorjoner till MRM-optimeringen. De valda jonerna fragmenterades med en kollisionsenergi mellan 9 och 45 eV med 3 eV intervaller. Produktjonerna valdes av mjukvaran med avseende på högst intensitet.

4.6 Kontroll av metod

Alla tester gjordes genom extraktion och analysering av tio stycken CSV-prover med fem upprepande injektioner från varje vial i tre olika satser på tre olika dagar i följd. En fempunkts kalibreringskurva var etablerad i tredubbla i varje sats innan proverna analyserades. Data från de tre olika satsernas reproducerbarhet för MRM-kanalerna och motsvarande analyter i skanningsläget erhöles. Variationen för precisionen i intra- och intersats uttrycktes i RSD%.

5 Resultat och diskussion

Målet i detta arbete var att optimera MRM parametrar från utvalda standarder, omforma en befintlig metod utformad för plasmaprover till att kunna tillämpas på CSV samt att testa de optimerade MRM parametrarna med metoden för CSV med hjälp av ett GC-QQQ system som kan analysera både målinriktade och icke målinriktade analyter. Metoden testades sedan för att se hur pålitlig den var och dess reproducerbarhet både inom en sats och över tre satser. Koncentrationerna för respektive analyt beräknades i CSV och jämfördes med plasma.

5.1 MRM-optimering

Övergångsjonerna var optimerade från de mest intensiva och åtskiljande övergångsjonerna från varje standard. I de flesta fall kunde intensiva och åtskiljande övergångsjoner hittas och uppehålls- och mättiden för MRM till varje analyt definierades automatiskt av mjukvaran. De valda MRM-jonerna för respektive analyt lades in i metoden och testades sedan med standarderna och eventuella justeringar gjordes. I tabell 6 visas lägena för MRM och retentionsindexen för de metaboliter som analyserades. När MRM parametrarna var optimerade testades metoden med CSV-prover där topparna betraktades. Dopamin kunde identifieras i alla lägena i både standard och CSV varav MRM-läget i CSV var något otydligt. GABA identifierades väl i båda lägena i standarder och i CSV identifierades GABA endast i fullt skanningsläge. I figur 1 och figur 2 ses GABA i fullt skanningsläge både i standard och i CSV. Dopamin och GABA testades även i SIM-läge men MRM-läget gav ett bättre resultat. Serotonin och epinefrin kunde identifieras i standarder men inte i CSV och acetylkolin kunde varken ses i standarder eller CSV, vilket berodde på att acetylkolin inte kunde derivatiseras med hjälp av den använda metoden. Att dopamin, serotonin, GABA, epinefrin och acetylkolin var svåra att se eller inte kunde synas i CSV var inte oväntat då de finns i relativt låga halter i CSV och att den CSV som användes kan ha kommit från patienter med till exempel Alzheimers sjukdom där halterna också förväntas vara ännu lägre än hos friska personer. I tabell 7 visas också de föreningar där MRM parametrarna optimerades men som inte inkluderas i metoden.

Tabell 5.1 - Överblick av metaboliterna i standard och CSV i fullt skanningsläge och MRM-läge. Grön bock symboliserar tydligt resultat, gult snedstreck symboliserar otydligt resultat och rött kryss symboliserar inget resultat.

	Full skanning standard	MRM i standard	Full skanning CSV	MRM i CSV
<i>Dopamin</i>	✓	✓	✓	/
<i>Serotonin</i>	✓	✓	X	X
<i>GABA</i>	✓	✓	/	X
<i>Epinefrin</i>	✓	✓	X	X
<i>Acetylkolin</i>	X	X	X	X

5.2 Kontroll av metod

Precisionen kontrollerades både i en enskild sats, intrasats, och över alla tre satserna, intersats. Variationen beräknades genom genomsnittskoncentrationerna och standardavvikelseerna för respektive analyt som resulterade i ett uttryck av koefficientvariation, *relative standard deviation* (RSD) som fås genom standardavvikelsen genom genomsnittskoncentrationen. Resultaten för intrasats och intersats för respektive sats, inklusive plasma finns bifogat i tabell 1-4. I metoden var metaboliterna angivna på engelska och motsvarande svenska namn finns i tabell 8. Variationen berättar vilka metaboliter som har tillräckligt hög reproducerbarhet och pålitlighet för att inkluderas i metoden. I de bifogade tabellerna för respektive sats med CSV är de metaboliter som anses vara för opålitliga, i detta fall RSD% över 30, markerat i gult. Variationerna inom en sats var generellt lägre än över alla tre, vilket resulterar till att intersatserna emellanåt hade mycket högre RSD% än i intrasatserna. I tabell 5 är reproducerbarheten och koncentrationerna jämförda mellan varje intrasats inklusive för plasma och reproducerbarheten visar sig vara aningens bättre för plasma men är generellt ganska lika. Plasma och CSV visade också liknande resultat vid användning av fullt skanningsläge vilket visas i figur 3. Vid beräkning av intersats saknades ett antal värden från sats 1 och intersats beräknades då över de två resterande satserna. Att det saknas ett antal toppar och värden vid körning i MRM-läge i sats 1 som förväntades att kunna synas berodde på felprogrammering i metodens parametrar vid körning. Dopamin tros bara visas i sats 1 vilket berodde på fel vid inskrivning av retentionsindex i metoden som resulterade till genomsökning vid fel tidsintervall och redovisas därför inte i resultatet. C17, C19-C26, urea och uridin gav väldigt otydliga/inga toppar och värden vilket var förväntat och redovisas därför heller inte i resultatet. På grund av att programmeringen troligtvis blev fel vid körning av sats 1 skiljer sig generellt RSD%-värdena i denna sats från de övriga två vilket resulterar till ökad RSD% för intersats. Trots detta är det många metaboliter som är godtagbara och kan användas i metoden. I projektet analyserades inte den icke målinriktade metabolomiken på grund av tidsbegränsningen. Då resultatet för CSV och plasma i fullt skanningsläge var relativt lika antas dock antal upptäckta metaboliter i plasma vara jämförbart med vad som kan hittas i CSV.

6 Slutsats

Metoden för CSV anses vara lämplig att köra med GC-QQQ och är pålitlig då reproducerbarheten har testats. Majoriteten av metaboliterna ligger inom en godtagbar gräns vilket i mitt fall var RSD% under 30. Den sporadiska typen av Alzheimer har till en liten del genetiska riskfaktorer i APOE men uppkomsten är till störst del okänd och med denna metod skulle det kunna vara möjligt att hitta samband i metaboliterna för dem som kommer att utveckla Alzheimers. Med fortsatt forskning och utveckling tror jag att metoden kan bli ännu bättre.

7 Tillkännagivanden

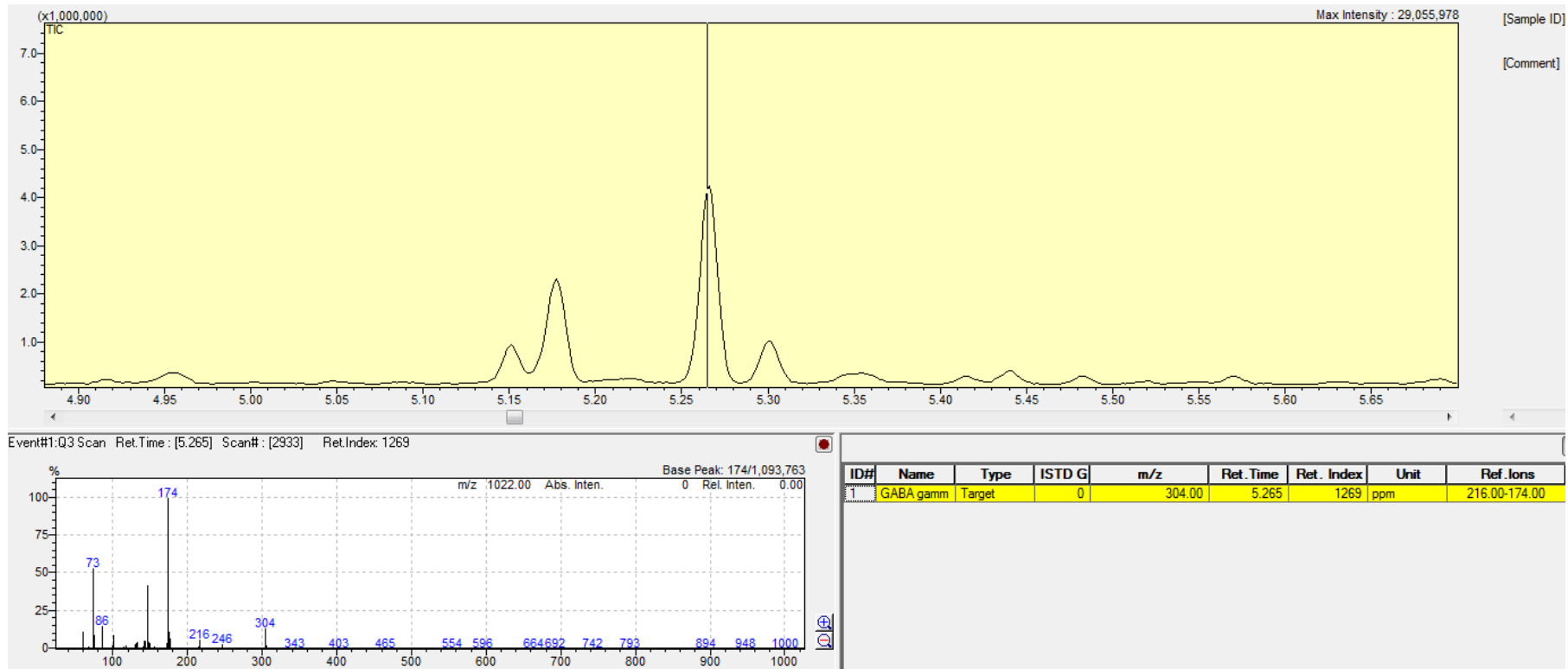
Jag vill tacka min examinator Alastair Ross för möjligheten att utföra detta examensarbete, min enastående handledare Otto Savolainen för allt stöd och tid du tagit dig till att förklara för mig och all handledning jag fått i labbet och rapporten. Mads Lind och Andy Vincent för all rådgivning och support och Jörg Hanrieder för att ha tillhandahållit CSV, dopamin, serotonin, epinefrin och acetylkolin. Jag vill också tacka Jens Medbo för korrekturläsning av rapporten. Till sist vill jag också tacka hela Avdelning 7, Livsmedelsvetenskap för varmt mottagande och för all support.

8 Referenser

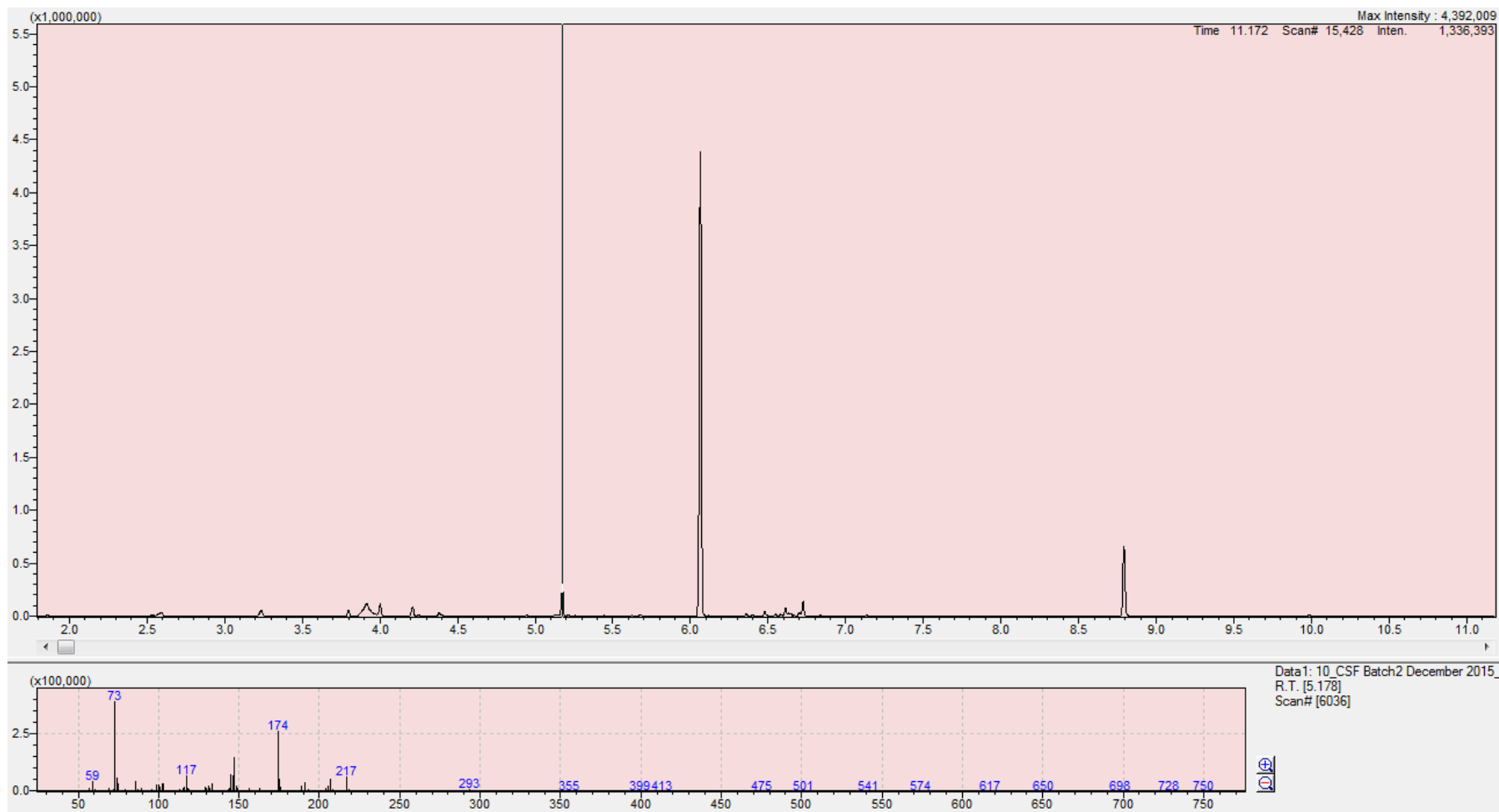
1. Trillo, L., et al., *Ascending monoaminergic systems alterations in Alzheimer's disease. Translating basic science into clinical care.* Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2013. 37(8): p. 1363-1379.
2. Yoshitake, T., et al., *Derivatization chemistries for determination of serotonin, norepinephrine and dopamine in brain microdialysis samples by liquid chromatography with fluorescence detection.* Biomed Chromatogr, 2006. 20(3): p. 267-81.
3. Prokšelj, T., et al., *Decreased platelet serotonin concentration in Alzheimer's disease with involuntary emotional expression disorder.* Neuroscience Letters, 2014. 578: p. 71-74.
4. Anonymous, *Dementia; World Alzheimer's Report 2011: The benefits of early diagnosis and intervention.* Politics & Government Business, 2011: p. 294.
5. *NYA RÖN Patologisk cerebrospinalvätska kan tidigt tyda på alzheimer*, ed. O. Hansson. 2006, [Stockholm] : Läkartidningen Förlag AB. Vol. 103, No. 15-16 (2006), p. 1185.
6. Zetterberg, H., N. Andreasen, and K. Blennow, *[Biomarkers in cerebrospinal fluid and blood in memory complaints].* Lakartidningen, 2009. 106(20): p. 1386-9.
7. Zetterberg, H., L.-O. Wahlund, and K. Blennow, *Cerebrospinal fluid markers for prediction of Alzheimer's disease.* Neuroscience Letters, 2003. 352(1): p. 67-69.
8. LaFerla, F.M., K.N. Green, and S. Oddo, *Intracellular amyloid-[beta] in Alzheimer's disease.* Nat Rev Neurosci, 2007. 8(7): p. 499-509.
9. Hansson, O., et al., *Prediction of Alzheimer's disease using the CSF Aβ₄₂/Aβ₄₀ ratio in patients with mild cognitive impairment.* Dement Geriatr Cogn Disord, 2007. 23(5): p. 316-20.
10. Lista, S., et al., *Biomarkers in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease.* J Alzheimers Dis, 2015. 47(2): p. 291-317.
11. Liu, C.C., et al., *Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy.* Nat Rev Neurol, 2013. 9(2): p. 106-18.
12. Lautner, R., et al., *Apolipoprotein E genotype and the diagnostic accuracy of cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer disease.* JAMA Psychiatry, 2014. 71(10): p. 1183-91.
13. Wishart, D.S., et al., *The human cerebrospinal fluid metabolome.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. 871(2): p. 164-73.
14. Roessner, U. and J. Bowne, *What is metabolomics all about?* Biotechniques, 2009. 46(5): p. 363-5.
15. Roberts, L.D., et al., *Targeted metabolomics.* Curr Protoc Mol Biol, 2012. Chapter 30: p. Unit 30 2 1-24.
16. Idle, J.R. and F.J. Gonzalez, *Metabolomics.* Cell Metabolism, 2007. 6(5): p. 348-351.
17. Puchades-Carrasco, L. and A. Pineda-Lucena, *Metabolomics in pharmaceutical research and development.* Current Opinion in Biotechnology, 2015. 35: p. 73-77.
18. Castro-Puyana, M. and M. Herrero, *Metabolomics approaches based on mass spectrometry for food safety, quality and traceability.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2013. 52: p. 74-87.

19. Dehaven, C.D., et al., *Organization of GC/MS and LC/MS metabolomics data into chemical libraries*. J Cheminform, 2010. 2(1): p. 9.
20. Roberts, L.D., et al., *Targeted Metabolomics*. Current Protocols in Molecular Biology, 2012. CHAPTER: p. Unit30.2-Unit30.2.
21. Zhou, B., et al., *LC-MS-based metabolomics*. Molecular BioSystems, 2012. 8(2): p. 470-481.
22. Dunn, W.B. and D.I. Ellis, *Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2005. 24(4): p. 285-294.
23. Villas-Bôas, S.G., et al., *Alkylation or Silylation for Analysis of Amino and Non-Amino Organic Acids by GC-MS? Metabolites*, 2011. 1(1): p. 3-20.
24. Lavagnini, I., *Quantitative applications of mass spectrometry*. 2006, Chichester: Wiley.
25. *The Facts on File dictionary of forensic science*. Reference and Research Book News, 2004. 19(3).
26. Zhang, L., et al., *Untargeted fatty acid profiles based on the selected ion monitoring mode*. Analytica Chimica Acta, 2014. 839: p. 44-50.
27. Kitteringham, N.R., et al., *Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomics and metabolomics*. Journal of Chromatography B, 2009. 877(13): p. 1229-1239.
28. Shimomura, M., *Triple quadrupole mass spectrometer*. 2014, Google Patents.
29. Veryser, L., et al., *Implementation of a single quad MS detector in high-throughput transdermal research of plant extracts*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015. 115: p. 594-602.
30. Damoth, D.C., *INTRODUCTION: THE MA-1 AND OTHER TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETERS*, in *Time-of-Flight Mass Spectrometry*, D.P.E. Williams, Editor. 1969, Pergamon. p. 1-19.
31. O'Sullivan, A., et al., *Metabolomics of cerebrospinal fluid from humans treated for rabies*. J Proteome Res, 2013. 12(1): p. 481-90.
32. Savolainen, O.I., A.-S. Sandberg, and A.B. Ross, *A Simultaneous Metabolic Profiling and Quantitative Multimetabolite Metabolomic Method for Human Plasma Using Gas-Chromatography Tandem Mass Spectrometry*. Journal of Proteome Research, 2015.

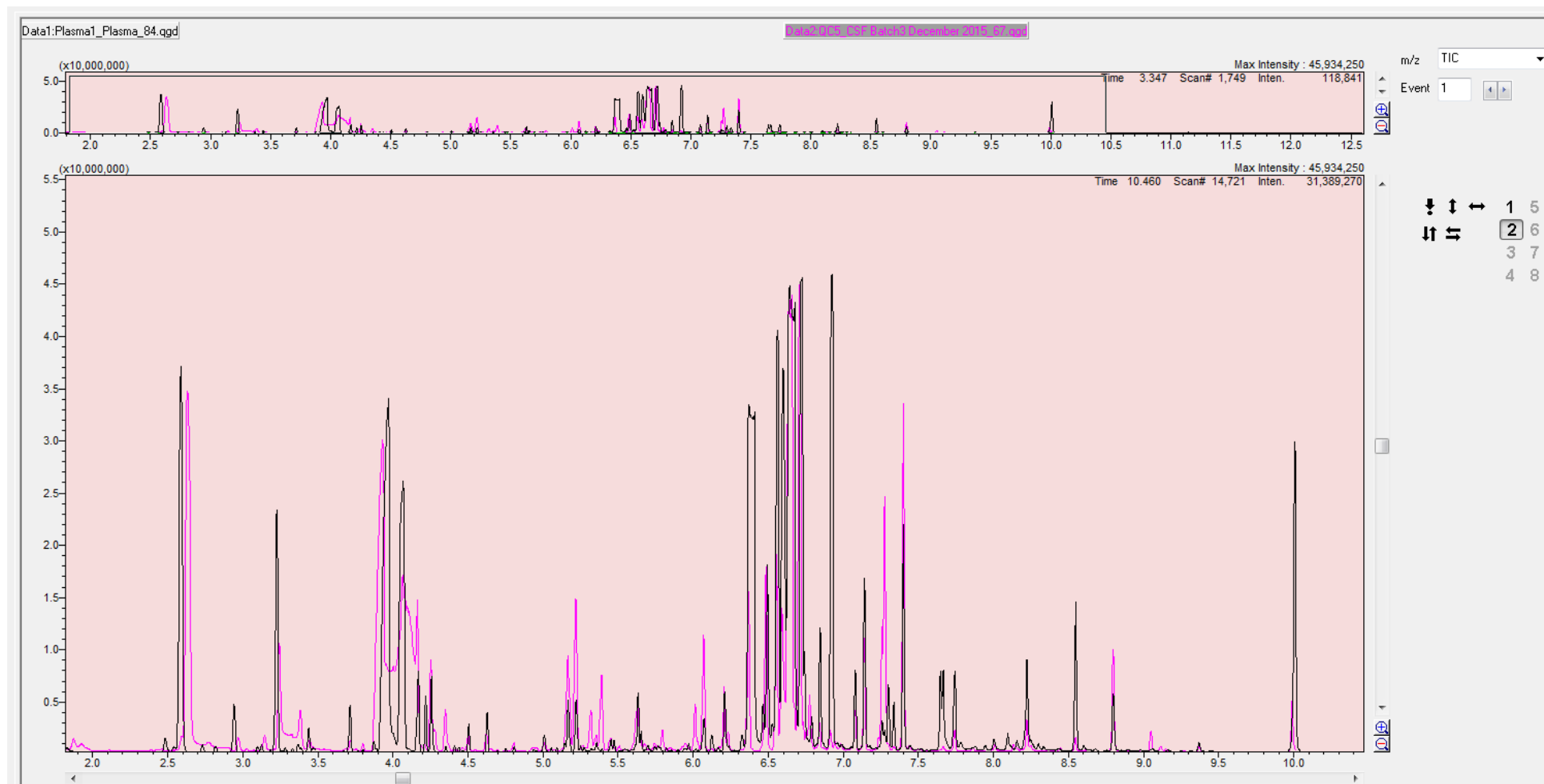
Bilaga A



Figur 1 GABA i standard kört i fullt skanningsläge.



Figur 2 GABA i CSV kört i fullt skanningsläge.



Figur 3 Jämförande mellan CSV och plasma

Bilaga B

Tabell 1. Reproducerbarhet för metaboliterna i batch 1 som mättes i CSV i MRM-läge samt koncentrationerna för respektive metabolit.

Batch 1						
Förening	RSD% för MRMs		Intersats på 2 satser	Molvikt (g/mol)	Konc. ng/μl	Konc. μmol/l
	Intrasats	Intersats				
N- Acetylglycine	19,98	22,30		117,10	1,45	37,03
cis- Aconitic acid	2,15	94,40		174,11	5,86	100,94
Alanine	31,94	17,96		89,09	20,64	694,86
β- Alanine	0,90	14,75		89,09	0,05	1,66
DL- Asparagine	8,20	36,22		132,12	0,76	17,36
Cholesterol	27,84	27,47		386,65	1,97	15,25
Citric acid	x	x	13,87	192,12	x	x
CMPF	x	x	7,81	240,25	x	x
Dimethylarginine	27,42	42,07		202,25	0,33	4,95
Fumaric acid	41,50	37,10		116,07	0,01	0,18
L(+)- Glutamic acid	7,80	12,57		147,13	0,67	13,75
L(+)- Glutamine	29,11	45,30		146,14	142,37	2922,62
Glutamine TMS	x	x	4,36	146,14	x	x
Glycine	8,87	24,63		75,07	0,87	34,95
DL- Histidine	0,52	25,66		155,15	1,84	35,53
2- Hydroxybutyric acid	x	x	1,53	104,10	x	x
3- Hydroxybutyric acid	10,98	13,75		104,10	2,90	83,64
Inosine	x	x	74,58	268,23	x	x
myo- Inositol	x	x	14,06	180,16	x	x
L- Isoleucine	10,64	24,36		131,17	0,62	14,21
Itaconic acid	23,35	7,81		130,10	0,06	1,34
α- Ketoglutaric acid	5,95	13,03		146,10	0,11	2,19
Ketoleucine	3,52	6,01		130,14	0,29	6,69
Lactate	21,49	17,35		90,08	8,77	291,93
DL- Leucine	9,42	12,02		131,17	1,69	38,72
DL- Lysine	4,17	4,85		146,19	2,25	46,24
DL- Methionine	13,72	12,65		149,21	0,33	6,69
3- Methyl-2-oxopentanoic acid	4,56	21,92		130,14	0,19	4,33
Ornithine	x	x	8,92	132,16	x	x
DL- Phenylalanine	12,42	7,42		165,19	1,09	19,81
L(-)- Proline	2,19	27,33		115,13	0,98	25,52
trans-4-hydroxy-L-Proline	82,00	8,76		131,13	0,36	8,17
DL- Serine	11,57	20,74		105,09	1,02	29,06
Succinic acid	4,86	22,19		118,09	0,07	1,86
L- Threonine	19,02	10,95		119,12	1,62	40,70
α- Tocopherol	0,08	13,45		430,71	1,51	10,51
γ- Tocopherol	0,36	5,05		416,68	0,41	2,94
Tryptophan TMS	37,63	78,65		204,23	0,14	2,04
DL- Valine	x	20,94		117,15	1,75	44,70

Gulmarkerat - RSD% över 30

x - topp/värde saknas

Tabell 2. Reproducerbarhet för metaboliterna i batch 2 som mättes i CSV i MRM-läge samt koncentrationerna för respektive metabolit.

Batch 2						
Förening	RSD% för MRMs		Intersats på 2 satser	Molvikt (g/mol)	Konc. ng/ul	Konc. µmol/l
	Intrasats	Intersats				
N- Acetylglycine	0,42	22,30		117,10	1,29	33,14
cis- Aconitic acid	1,81	94,40		174,11	1,36	23,42
Alanine	18,93	17,96		89,09	28,39	956,10
β- Alanine	0,50	14,75		89,09	0,07	2,22
DL- Asparagine	10,92	36,22		132,12	0,70	15,96
Cholesterol	27,66	27,47		386,65	1,32	10,28
Citric acid	36,90	x	13,87	192,12	15,11	235,97
CMPF	0,73	x	7,81	240,25	2,12	26,53
Dimethylarginine	49,38	42,07		202,25	0,50	7,40
Fumaric acid	15,43	37,10		116,07	0,01	0,27
L(+)- Glutamic acid	10,16	12,57		147,13	0,75	15,33
L(+)- Glutamine	45,69	45,30		146,14	281,24	5773,27
Glutamine TMS	16,64	x	4,36	146,14	29,77	611,02
Glycine	7,57	24,63		75,07	0,99	39,52
DL- Histidine	2,00	25,66		155,15	1,78	34,45
2- Hydroxybutyric acid	19,81	x	1,53	104,10	1,44	41,57
3- Hydroxybutyric acid	10,05	13,75		104,10	2,20	63,54
Inosine	27,59	x	74,58	268,23	0,02	0,22
myo- Inositol	19,68	x	14,06	180,16	8,01	133,41
L- Isoleucine	20,25	24,36		131,17	0,51	11,56
Itaconic acid	24,91	7,81		130,10	0,06	1,27
α- Ketoglutaric acid	7,20	13,03		146,10	0,13	2,57
Ketoleucine	4,50	6,01		130,14	0,29	6,80
Lactate	17,85	17,35		90,08	8,73	290,90
DL- Leucine	14,94	12,02		131,17	1,35	30,84
DL- Lysine	3,87	4,85		146,19	2,45	50,26
DL- Methionine	14,34	12,65		149,21	0,39	7,81
3- Methyl-2-oxopentanoic acid	5,10	21,92		130,14	0,14	3,26
Ornithine	5,31	x	8,92	132,16	1,32	30,05
DL- Phenylalanine	11,31	7,42		165,19	1,18	21,52
L(-)- Proline	2,83	27,33		115,13	0,77	20,10
trans-4-hydroxy-L-Proline	61,22	8,76		131,13	0,35	8,07
DL- Serine	6,93	20,74		105,09	1,49	42,45
Succinic acid	4,44	22,19		118,09	0,10	2,48
L- Threonine	17,82	10,95		119,12	1,79	45,09
α- Tocopherol	0,03	13,45		430,71	1,96	13,65
γ- Tocopherol	0,27	5,05		416,68	0,45	3,23
Tryptophan TMS	6,70	78,65		204,23	0,75	11,06
DL- Valine	27,45	20,94		117,15	1,29	33,16

Gulmarkerat - RSD% över 30

x - topp/värde saknas

Tabell 3. Reproducerbarhet för metaboliterna i batch 3 som mättes i CSV i MRM-läge samt koncentrationerna för respektive metabolit.

Batch 3						
Förening	RSD% för MRMs		Intersats på 2 satser	Molvikt (g/mol)	Konc. ng/ul	Konc. µmol/l
	Intrasats	Intersats				
N- Acetylglycine	1,19	22,30		117,10	0,92	23,51
cis- Aconitic acid	3,05	94,40		174,11	1,19	20,57
Alanine	19,51	17,96		89,09	21,60	727,31
β- Alanine	0,60	14,75		89,09	0,06	2,12
DL- Asparagine	35,62	36,22		132,12	0,36	8,09
Cholesterol	40,46	27,47		386,65	1,20	9,30
Citric acid	22,23	x	13,87	192,12	18,40	287,27
CMPF	1,46	x	7,81	240,25	2,37	29,63
Dimethylarginine	26,92	42,07		202,25	0,21	3,08
Fumaric acid	7,57	37,10		116,07	0,01	0,38
L(+)- Glutamic acid	5,95	12,57		147,13	0,87	17,65
L(+)- Glutamine	30,29	45,30		146,14	386,09	7925,53
Glutamine TMS	21,08	x	4,36	146,14	27,98	574,44
Glycine	5,41	24,63		75,07	1,38	55,25
DL- Histidine	16,95	25,66		155,15	1,11	21,47
2- Hydroxybutyric acid	16,25	x	1,53	104,10	1,41	40,68
3- Hydroxybutyric acid	7,46	13,75		104,10	2,52	72,55
Inosine	28,29	x	74,58	268,23	0,06	0,71
myo- Inositol	14,61	x	14,06	180,16	6,56	109,29
L- Isoleucine	8,07	24,36		131,17	0,82	18,71
Itaconic acid	37,67	7,81		130,10	0,05	1,15
α- Ketoglutaric acid	3,43	13,03		146,10	0,14	2,84
Ketoleucine	2,74	6,01		130,14	0,32	7,46
Lactate	9,51	17,35		90,08	11,67	388,74
DL- Leucine	8,38	12,02		131,17	1,65	37,78
DL- Lysine	4,51	4,85		146,19	2,25	46,28
DL- Methionine	10,60	12,65		149,21	0,43	8,64
3- Methyl-2-oxopentanoic acid	3,43	21,92		130,14	0,22	5,11
Ornithine	3,14	x	8,92	132,16	1,17	26,49
DL- Phenylalanine	9,55	7,42		165,19	1,27	22,99
L(-)- Proline	1,56	27,33		115,13	1,33	34,56
trans-4-hydroxy-L-Proline	2,78	8,76		131,13	0,30	6,95
DL- Serine	2,97	20,74		105,09	1,51	43,10
Succinic acid	3,80	22,19		118,09	0,12	2,93
L- Threonine	11,85	10,95		119,12	2,01	50,64
α- Tocopherol	0,06	13,45		430,71	1,66	11,56
γ- Tocopherol	0,58	5,05		416,68	0,41	2,97
Tryptophan TMS	31,77	78,65		204,23	0,31	4,62
DL- Valine	8,81	20,94		117,15	1,99	50,85

Gulmarkerat - RSD% över 30

x - topp/värde saknas

Tabell 4. Reproducerbarhet för metaboliterna som mättes i plasma i MRM-läge samt koncentrationerna för respektive metabolit.

Plasma				
Förening	RSD%	Molvikt (g/mol)	Konc. ng/µl	Konc. µmol/l
	Intrasats			
N- Acetylglycine	0,76	117,10	0,94	24,08
Cis- Aconitic acid	5,95	174,11	6,61	113,89
Alanine	4,27	89,09	54,92	1849,27
β- Alanine	3,02	89,09	0,11	3,60
DL- Asparagine	9,97	132,12	3,33	75,70
Cholesterol	4,94	386,65	259,50	2013,41
Citric acid	29,41	192,12	526,43	8220,17
CMPF	1,82	240,25	2,77	34,60
Dimethylarginine	4,88	202,25	0,53	7,87
Fumaric acid	29,91	116,07	0,04	1,07
L(+)- Glutamic acid	0,40	147,13	3,79	77,27
L(+)- Glutamine	12,20	146,14	1107,49	22734,19
L(+)- Glutamine TMS	11,45	146,14	116,84	2398,52
Glycine	1,65	75,07	4,26	170,05
DL- Histidine	16,92	155,15	73,80	1426,91
2- Hydroxybutyric acid	2,68	104,10	1,45	41,80
3- Hydroxybutyric acid	1,08	104,10	2,90	83,63
Inosine	25,84	268,23	0,23	2,55
myo- Inositol	2,64	180,16	1,32	22,02
L- Isoleucine	1,42	131,17	4,61	105,54
Itaconic acid	33,58	130,10	0,87	20,18
α- ketoglutaric acid	0,65	146,10	1,35	27,82
Ketoleucine	6,08	130,14	2,95	68,04
Lactate	3,60	90,08	52,21	1738,77
DL- Leucine	1,77	131,17	8,61	196,81
DL- Lysine	2,19	146,19	5,98	122,77
DL- Methionine	1,29	149,21	1,22	24,53
3- Methyl-2-oxopentanoic acid	6,80	130,14	1,57	36,15
L- Ornithine	5,12	132,16	3,72	84,55
DL- Phenylalanine	1,64	165,19	3,23	58,72
L(-)- Proline	0,31	115,13	15,59	406,36
trans-4-hydroxy-L-Proline	0,60	131,13	0,78	17,83
DL- Serine	4,29	105,09	3,01	85,86
Succinic acid	1,74	118,09	0,38	9,73
L- Threonine	3,45	119,12	6,84	172,22
α Tocopherol	3,65	430,71	2,95	20,51
γ- Tocopherol	0,76	416,68	0,44	3,16
L(-)- Tryptophan TMS	6,68	204,23	69,78	1025,00
DL- Valine	3,34	117,15	12,37	316,79

Tabell 5. Jämförelse för intra-sats samt koncentration mellan de tre satserna samt plasma.

Förening	RSD%				Konc. µmol/l			
	Sats 1	Sats 2	Sats 3	Plasma	Sats 1	Sats 2	Sats 3	Plasma
	Intrasats	Intrasats	Intrasats					
N- Acetylglycine	19,98	0,42	1,19	0,76	37,03	33,14	23,51	24,08
cis- Aconitic acid	2,15	1,81	3,05	5,95	100,94	23,42	20,57	113,89
Alanine	31,94	18,93	19,51	4,27	694,86	956,10	727,31	1849,27
β- Alanine	0,90	0,50	0,60	3,02	1,66	2,22	2,12	3,60
DL- Asparagine	8,20	10,92	35,62	9,97	17,36	15,96	8,09	75,70
Cholesterol	27,84	27,66	40,46	4,94	15,25	10,28	9,30	2013,41
Citric acid	x	36,90	22,23	29,41	x	235,97	287,27	8220,17
CMPF	x	0,73	1,46	1,82	x	26,53	29,63	34,60
Dimethylarginine	27,42	49,38	26,92	4,88	4,95	7,40	3,08	7,87
Fumaric acid	41,50	15,43	7,57	29,91	0,18	0,27	0,38	1,07
L(+)- Glutamic acid	7,80	10,16	5,95	0,40	13,75	15,33	17,65	77,27
L(+)- Glutamine	29,11	45,69	30,29	x	2922,62	5773,27	7925,53	x
Glutamine TMS	x	16,64	21,08	11,45	x	611,02	574,44	2398,52
Glycine	8,87	7,57	5,41	1,65	34,95	39,52	55,25	170,05
DL- Histidine	0,52	2,00	16,95	16,92	35,53	34,45	21,47	1426,91
2- Hydroxybutyric acid	x	19,81	16,25	2,68	x	41,57	40,68	41,80
3- Hydroxybutyric acid	10,98	10,05	7,46	1,08	83,64	63,54	72,55	83,63
Inosine	x	27,59	28,29	25,84	x	0,22	0,71	2,55
myo- Inositol	x	19,68	14,61	2,64	x	133,41	109,29	22,02
L- Isoleucine	10,64	20,25	8,07	1,42	14,21	11,56	18,71	105,54
Itaconic acid	23,35	24,91	37,67	33,58	1,34	1,27	1,15	20,18
α- Ketoglutaric acid	5,95	7,20	3,43	0,65	2,19	2,57	2,84	27,82
Ketoleucine	3,52	4,50	2,74	6,08	6,69	6,80	7,46	68,04
Lactate	21,49	17,85	9,51	3,60	291,93	290,90	388,74	1738,77
DL- Leucine	9,42	14,94	8,38	1,77	38,72	30,84	37,78	196,81
DL- Lysine	4,17	3,87	4,51	2,19	46,24	50,26	46,28	122,77
DL- Methionine	13,72	14,34	10,60	1,29	6,69	7,81	8,64	24,53
3-Methyl-2-oxopentanoic acid	4,56	5,10	3,43	6,80	4,33	3,26	5,11	36,15
Ornithine	x	5,31	3,14	5,12	x	30,05	26,49	84,55
DL- Phenylalanine	12,42	11,31	9,55	1,64	19,81	21,52	22,99	58,72
L(-)- Proline	2,19	2,83	1,56	0,31	25,52	20,10	34,56	406,36
trans-4-hydroxy-L-Proline	82,00	61,22	2,78	0,60	8,17	8,07	6,95	17,83
DL- Serine	11,57	6,93	2,97	4,29	29,06	42,45	43,10	85,86
Succinic acid	4,86	4,44	3,80	1,74	1,86	2,48	2,93	9,73
L- Threonine	19,02	17,82	11,85	3,45	40,70	45,09	50,64	172,22
α- Tocopherol	0,08	0,03	0,06	3,65	10,51	13,65	11,56	20,51
γ- Tocopherol	0,36	0,27	0,58	0,76	2,94	3,23	2,97	3,16
Tryptophan TMS	37,63	6,70	31,77	6,68	2,04	11,06	4,62	1025,00
DL- Valine	x	27,45	8,81	3,34	44,70	33,16	50,85	316,79

x - topp/värde saknas

Tabell 6. Lägen för MRM och retentionsindex för metaboliter analyserade i MRM- och fullskanningsläge.

Förening	IS	Kvantifierare		Referens		Retentions-index
		Övergång	CE	Övergång	CE	
N- Acetylglycine	2	218,00>130,10	9	218,00>73,10	18	1286
cis- Aconitic acid	3	229,00>147,10	12	375,00>147,10	18	1745
Alanine	1	116,00>73,10	12	147,00>73,10	18	1101
β- Alanine	2	174,00>73,00	18	248,00>147,00	18	1423
DL- Asparagine	1	231,00>73,10	15	188,00>73,10	9	1665
Cholesterol	10	329,00>95,00	9	129,00>73,00	30	3149
Citric acid	6	273,00>73,10	24	273,00>183,20	12	1809
CMPF	8	327,00>147,20	18	266,00>147,10	24	1968
Dimethylarginine	6	256,00>157,20	9	256,00>75,10	24	1828
Fumaric acid	3	245,00>73,10	24	143,00>75,10	12	1351
L(+)- Glutamic acid	5	246,00>73,00	27	128,00>73,00	12	1617
L(+)- Glutamine	5	203,00>147,10	15	227,00>73,00	6	1727
Glutamine TMS	5	203,00>156,10	9	203,00>73,10	21	1769
Glycine	5	174,00>73,10	15	248,00>147,10	15	1302
DL- Histidine	6	154,00>73,10	18	254,00>73,10	24	1912
2- Hydroxybutyric acid	2	131,00>73,10	12	205,00>147,10	12	1131
3- Hydroxybutyric acid	2	191,00>147,10	12	233,00>147,20	12	1163
Inosine	6	230,00>73,10	21	259,00>73,10	24	2565
myo- Inositol	8	217,00>73,10	18	305,00>73,10	27	2081
L- Isoleucine	1	158,00>73,00	18	218,00>73,00	18	1291
Itaconic acid	2	215,00<147,20	9	259,00>147,20	9	1343
α- Ketoglutaric acid	4	198,00>73,10	12	288,00>73,10	24	1574
Ketoleucine	2	200,00>82,1	15	216,99>89,1	12	1215
Lactate	1	191,00>73,10	9	191,00>147,10	9	1130
DL- Leucine	1	158,00>73,00	15	102,00>73,00	9	1271
DL- Lysine	5	156,00>73,00	18	174,00>73,00	18	1917
DL- Methionine	5	176,00>128,00	9	128,00>73,00	9	1515
3- Methyl-2-oxopentanoic acid	3	189,00>79,1	15	189,00>99,1	9	1195
Ornithine	6	142,00>73,00	15	174,00>73,00	15	1813
DL- Phenylalanine	5	218,00>73,00	15	192,00>73,00	15	1622
L(-)- Proline	1	142,00>73,00	18	216,00>147,00	15	1292
trans-4-hydroxy-L-Proline	5	230,00>73,00	27	230,00>140,00	9	1521
DL- Serine	2	204,00>73,00	15	218,00>73,00	15	1359
Succinic acid	2	247,00>147,20	9	247,00>73,10	27	1328
L- Threonine	1	218,00>73,00	18	291,00>101,00	12	1384
α- Tocopherol	10	237,00>73,00	15	502,00>73,00	36	3133
γ- Tocopherol	10	233,00>73,00	36	488,00>73,00	12	2989
Tryptophan TMS	3	202,00>73,00	18	291,00>101,00	18	2207
Urea	2	189,00>174,20	12	189,00>73,10	24	1249
Uridine	6	245,00>73,10	24	259,00>157,20	24	2440
DL- Valine	1	144,00>73,10	15	218,00>73,10	21	1214
Dopamine	1	175,00>73,10	18	268,00>73,10	24	2093
Dopamine	1	175,00>73,00	24	102,00>73,10	14,19	1822
Epinephrine	1	355,00>281,20	7,79	174,00>73,10	15	1961
Epinephrine	1	175,00>86,10	9	355,00>281,20	18	1844
GABA	1	304,00>174,10	18	174,00>100,10	9	1535
Serotonin	1	290,00>174,10	52,48	290,00>73,10	18	2460
Serotonin	1	218,00>174,10	9	218,00>73,10	18	2481

Interna standarder						
² H ₇ -cholesterol	10	336,00>121,20	18	129,00>73,1	9	3118
¹³ C ₆ -glucose	7	323,00>73,10	30	147,00>73,10	18	1899
¹³ C ₅ , ¹⁵ N- glutamic acid	5	251,00>73,10	30	251,00>132,10	15	1624
¹³ C ₄ -α-ketoglutarate	4	201,00>73,10	18	147,00>73,10	30	1580
Methyl stearate	8	143,00>55,10	18	298,00>101,10	18	2124
¹³ C ₅ -prolin	1	146,00>73,10	15	220,00>147,10	15	1394
Putrescine-D ₄	6	174,00>73,10	18	174,00>86,10	12	1728
² H ₆ -salicylic	3	271,00>73,10	30	149,00>133,10	9	1501
² H ₄ -succinic acid	2	147,00>73,10	18	309,00>293,80	18	1317
¹³ C ₁₂ -sucrose	9	367,00>73,10	30	367,00>174,10	9	2641

Tabell 7. Metaboliter som MRM-optimerades men ej inkluderas i metoden.

Förening
Aminoadipic acid
5- aminolevulinic acid hydrochloride
Benzoic acid
Chenodeoxycholic acid
Cholic acid
L- citrulline
Deoxycholic acid
D- Gluconic acid sodium salt
D- glucuronic acid
Glycochenodeoxycholic acid
Glycocholic acid
Glycodeoxycholic acid
Hyochoolic acid
Hyodeoxycholic acid
Lithocholic acid
Oxalacetic acid
Quinic acid
Taurochenodeoxycholic acid
Taurocholic acid
Taurodeoxycholic acid
Taurolithocholic acid
Uric acid
Ursodeoxycholic acid

Tabell 8. Översättningslista för metaboliter.

Engelsk benämning	Svensk benämning
N- Acetylglycine	N- Acetylglycin
cis- Aconitic acid	cis- Akonitsyra
Alanine	Alanin
β- Alanine	β- Alanin
DL- Asparagine	DL- Asparagin
Cholesterol	Kolesterol
Citric acid	Citronsyra
CMPF	CMPF
Dimethylarginine	Dimetylarginin
Fumaric acid	Fumarsyra
L(+)- Glutamic acid	L(+)- Glutaminsyra
L(+)- Glutamine	L(+)- Glutamin
Glutamine TMS	Glutamin TMS
Glycine	Glycin
DL- Histidine	DL- Histidin
2- Hydroxybutyric acid	2- Hydroxismörsyra
3- Hydroxybutyric acid	3- Hydroxismörsyra
Inosine	Inosin
myo- Inositol	myo- Inositol
L- Isoleucine	L- Isoleucin
Itaconic acid	Itakonsyra
α- Ketoglutaric acid	α- Ketoglutarsyra
Ketoleucine	Ketoleucine
Lactate	Laktat
DL- Leucine	DL- Leucin
DL- Lysine	DL- Lysin
DL- Methionine	DL- Metionin
3- Methyl-2-oxopentanoic acid	3- Metyl-2-oxopentansyra
Ornithine	Ornitin
DL- Phenylalanine	DL- Fenyylalanin
L(-)- Proline	L(-)- Prolin
trans-4-hydroxy-L-Proline	trans-4-hydroxy-L-Prolin
DL- Serine	DL- Serin
Succinic acid	Bärnstenssyra
L- Threonine	L- Treonin
α- Tocopherol	α- Tokoferol
γ- Tocopherol	γ- Tokoferol
Tryptophan TMS	Tryptofan TMS
Urea	Urea
Uridine	Uridin
DL- Valine	DL- Valin
Dopamine	Dopamin
Epinephrine	Epinefrin
GABA	GABA
Serotonin	Serotonin

Interna standarder	
² H ₇ -cholesterol	² H ₇ -kolesterol
¹³ C ₆ -glucose	¹³ C ₆ -glukos
¹³ C ₅ , ¹⁵ N - glutamic acid	¹³ C ₅ , ¹⁵ N - glutaminsyra
¹³ C ₄ -α-ketoglutarate	¹³ C ₄ -α-ketoglutarsyra
Methyl stearate	Metylstearat
¹³ C ₅ -proline	¹³ C ₅ -prolin
Putrescine-D ₄	Putrescin-D ₄
² H ₆ -salicylic	² H ₆ -salicylsyra
² H ₄ -succinic acid	² H ₄ -bärnstenssyra
¹³ C ₁₂ -sucrose	¹³ C ₁₂ -sackaros