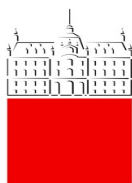


UNIVERZA V LJUBLJANI



FAKULTETA ZA FARMACIJO

Vanja Čuk

**PRIMERJAVA TANDEMSKE MASNE SPEKTROMETRIJE IN IONSKE
IZMENJEVALNE KROMATOGRAFIJE S POST-KOLONSKO
DERIVATIZACIJO ZA DOLOČANJE AMINOKISLIN V PLAZMI**

**COMPARISON OF TWO METHODS FOR DETECTING AMINOACIDS IN
PLASMA: TANDEM MASS SPECTROMETRY AND ION-EXCHANGE
CHROMATOGRAPHY WITH POST COLUMN DERIVATIZATION**

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študij laboratorijska biomedicina

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala v laboratoriju za presnovne motnje, Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko Pediatrične klinike v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm. in somentorice dr. Barbke Repič Lampret, univ.dipl.kem., spec.med.biokem.

ZAHVALE

Hvala somentorici dr. Barbki Repič Lampret, univ. dipl. kem., spec. med. biokem. za strokovno vodenje, vzpodbude in nasvete pri ustvarjanju magistrske naloge.

Hvala mentorju doc. dr. Juriju Trontlju, mag. farm. za pomoč, nasvete in temeljit pregled magistrske naloge.

Hvala vodji laboratorija Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko Mirjani Zupančič mag. med. biokem., da mi je omogočila opravljanje naloge v laboratoriju.

Zahvala tudi vsem zaposlenim v laboratoriju Pediatrične klinike, posebej gre še zahvala zaposlenim v laboratoriju za presnovne motnje.

Hvala tudi Urošu, ki me je skozi študij vzpodbujal, poslušal, bil potrpežljiv in mojima sončkoma Vidu in Izi.

Nazadnje se za vse zahvaljujem tudi mami in sestri.

Izjava: Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Jurija Trontlja.

Vanja Čuk

Komisija za zagovor:

Predsednik: izr. prof. dr. Matjaž Jeras

Mentor: doc. dr. Jurij Trontelj

Somentorica: dr. Barbka Repič Lampret

Član: doc. dr. Bojan Doljak

KAZALO

KAZALO SLIK.....	5
KAZALO PREGLEDNIC.....	6
POVZETEK	7
ABSTRACT	8
SEZNAM OKRAJŠAV.....	9
1. UVOD	10
1.1. AMINOKISLINE	10
1.1.1. OSNOVNA STRUKTURA	10
1.1.2. PRESNOVA AMINOKISLIN	12
1.2. AMINOACIDOPATIJE	12
1.2.1. FENILKETONURIJA.....	13
1.2.2. TIROZINEMIJA	13
1.2.3. BOLEZEN JAVORJEVEGA SIRUPA.....	14
1.2.4. CITRULINEMIJA	14
1.2.5. HOMOCISTINURIJA	14
1.2.6. HIPERORNITINEMIJA	14
1.2.7. NEKETOTIČNA HIPERGLICINEMIJA	15
1.3. METODE DOLOČANJA AMINOKISLIN	15
1.3.1. TANDEMSKA MASNA SPEKTROMETRIJA	15
1.3.2. IONSKO IZMENJEVALNA KROMATOGARFIJA.....	18
1.4. BIOLOŠKI VZORCI.....	20
2. NAMEN DELA.....	22
3. MATERIALI IN METODE	23
3.1. VZORCI.....	23
3.2. TANDEMSKA MASNA SPEKTROMETRIJA	23
3.2.1. PRINCIP METODE.....	23
3.2.2. INŠTRUMENTI IN OPREMA.....	23

3.2.3.	REAGENTI.....	24
3.2.4.	PRIPRAVA VZORCEV	25
3.2.5.	POGOJI HPLC.....	26
3.2.6.	ANALIZA MS/MS	26
3.3.	IONSKO IZMENJEVALNA KROMATOGRAFIJA S POST-KOLONSKO DERIVATIZACIJO.....	27
3.3.1.	PRINCIP METODE.....	27
3.3.2.	INSTRUMENTI IN OPREMA	27
3.3.3.	REAGENTI IN STANDARDI.....	28
3.3.4.	PRIPRAVA POSAMEZNEGA VZORCA	29
3.3.5.	PROGRAM HPLC.....	29
3.3.6.	PROGRAM SPREMINJANJA TEMPERATURE KOLONE.....	30
3.3.7.	REAKTOR ZA POST-KOLONSKO DERIVATIZACIJO	30
3.4.	NOTRANJA KONTROLA	31
3.5.	STATISTIČNA ANALIZA	31
4.	REZULTATI.....	34
4.1.	NATANČNOST	34
4.2.	TOČNOST	36
4.3.	OPISNA STATISTIKA	38
4.4.	KORELACIJA.....	39
4.5.	PRIMERJAVA METOD	42
5.	RAZPRAVA	47
5.1.	PREDNOSTI IN SLABOSTI METOD IEC IN LC-MS/MS	47
5.2.	NATANČNOST	48
5.3.	TOČNOST	49
5.4.	KORELACIJA.....	51
5.5.	PRIMERJAVA METOD LC-MS/MS IN IEC ZA DOLOČANJE AMINOKISLIN V PLAZMI.....	52
6.	SKLEP.....	56

7. LITERATURA.....	57
8. VIRI SLIK.....	60
PRILOGE	61

KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Peptidna vez (1)</i>	10
Slika 2: <i>Prikaz strukturnih formul aminokislin (2)</i>	11
Slika 3: <i>Ionsko stanje aminokislina alanin v odvisnosti od pH okolja (3)</i>	12
Slika 4: <i>Sistem LC-MS/MS (fotografija posneta v presnovnem laboratoriju Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko Pediatrične klinike)</i>	16
Slika 5: <i>Princip ESI (4)</i>	17
Slika 6: <i>Shema delovanja MS/MS, prirejeno po (5)</i>	18
Slika 7: <i>Rakcija ninhidrina v obarvan produkt (6)</i>	20
Slika 8: <i>Deli aparature za post-kolonsko derivatizacijo, sklopljene s tekočinskim kromatografom (7)</i>	20
Slika 9: <i>Primer kromatograma analize aminokislin z uporabljeno metodo LC-MS/MS</i>	27
Slika 10: <i>Primer kromatograma analize aminokislin z metodo IEC</i>	31
Slika 11: <i>Grafični prikazi korelacij med rezultati, izmerjenimi z metodama IEC in LC-MS/MS, za aminokislina alanin, arginin, citrulin in fenilalanin</i>	39
Slika 12: <i>Grafični prikazi korelacij med rezultati, izmerjenimi z metodama IEC in LC-MS/MS, za aminokislina glicin, izolevcin, levcin, lizin, ornitin in serin</i>	40
Slika 13: <i>Grafični prikazi korelacij med rezultati, izmerjenimi z metodama IEC in LC-MS/MS, za aminokislina taurin, tirozin, treonin in valin</i>	41
Slika 14: <i>Bland-Altmanovi diagrami razlik absolutnih vrednosti koncentracij alanina, arginina, citrulina, fenilalanina, glicina in izolevcina, določenih s primerjanima metodama</i>	44
Slika 15: <i>Bland-Altmanovi diagrami razlik absolutnih vrednosti koncentracij levcina, lizina, ornitina, serina, taurina in tirozina, določenih s primerjanima metodama</i>	45

Slika 16: *Bland-Altmanova diagrama razlik absolutnih vrednosti koncentracij treonina in valina, določenih s primerjanima metodama.* 46

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Časovno opredeljen gradientni program za MF 26

Preglednica II: Gradientni program ločbe aminokislin s HPLC..... 30

Preglednica III: Uporabljeni program spreminjanja temperature kolone..... 30

Preglednica IV: Natančnost metode LC-MS/MS. 34

Preglednica V: Natančnost metode IEC. 35

Preglednica VI: Točnost metode LC-MS/MS. 36

Preglednica VII: Točnost metode IEC..... 37

Preglednica VIII: Opisna statistika rezultatov, izmerjenih s primerjanima metodama. Vse vrednosti so v $\mu\text{mol/L}$ 38

Preglednica IX: Povzetek statističnih izračunov za Bland-Altmanov test (diagram) v absolutnih vrednostih..... 42

Preglednica X: Povzetek statističnih izračunov za Bland-Altmanov test (diagram) v odstotkih. 43

POVZETEK

Aminokislinae so pomembni biokemijski kazalci skupine prirojenih presnovnih boleznii, aminoacidopatij. Ionsko izmenjevalna kromatografija (IEC) s post-kolonsko derivatizacijo z ninhidrinom se je dolga leta uporabljala kot zlati standard za analizo aminokislin v fizioloških vzorcih. Zaradi njenih pomanjkljivosti, kot sta: dolg čas analize in velik volumen vzorca, jo v zadnjih letih nadomešča tandemsko masna spektrometrija. Prednost slednje je predvsem krajši čas analize in večja specifičnost. Metodi smo med seboj primerjali, z namenom ugotovitve vpliva izmerjenih rezultatov na klinično odločitev. Aminokislinae smo določili v plazmi 123 otrok. Opredelili smo prednosti in slabosti posamezne metode in statistično ovrednotili natančnost, točnost, pogledali njuno moč linearne povezanosti in ujemanje metod z Bland-Altmanovim diagramom.

Natančnost metod smo preverili z 20 meritvami združenih vzorcev plazme 14 aminokislin. Ugotovili smo boljšo natančnost z metodo IEC (relativna standardna deviacija (RSD) 3 – 13,5%). Pri tekočinski kromatografiji, sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) smo izračunali RSD 4,3 – 14,8%. Točnost metod smo ugotavljali s pomočjo izračuna relativne napake med izmerjeno vrednostjo kontrolnega materiala in vrednostjo proizvajalca. Opravili smo 7 meritev v več zaporednih dneh v različnih serijah. Pri obeh metodah smo dobili primerljive rezultate. Pri vseh aminokislinah, smo za obe metodi in oba parametra, postavili 15% kriterij sprejemljivosti napak, ki ga nismo presegli. Tudi z izračunom korelacijskega koeficienta $> 0,70$ smo za večino aminokislin dobili visoko stopnjo linearne povezanosti med metodama. Ujemanje rezultatov LC-MS/MS in metode IEC smo ocenili s pomočjo Bland-Altmanovega diagrama. Kriterij sprejemljivosti, ki smo si ga postavili in ne vpliva na klinično odločitev, je 15% razlike povprečij. Pri primerjavi metod smo dobili razlike povprečij 11 aminokislin pod 15%, z izjemo citrulina (-31%), serina (19,5%) in tirozina (-19%).

Ocenili smo dobro ujemanje med metodami. Zaključimo lahko da metodo IEC, ki je bila dolga leta zlati standard zamenjamo z metodo LC-MS/MS, saj povprečne razlike metod ne vplivajo na klinično interpretacijo rezultatov.

Ključne besede: aminokislina, plazma, metoda IEC s post-kolonsko derivatizacijo, metoda LC-MS/MS

ABSTRACT

Amino acids represent an important biochemical marker for a group of inborn errors of metabolism called aminoacidopathies. IEC with post-column ninhydrin derivatisation represented a golden standard in quantitation of amino acids in physiological samples. In recent years IEC method is being replaced by tandem mass spectrometry chiefly because of time it takes to analyse one sample and the need of relatively large volume of the sample plasma. The advantages of the later method are mainly shorter time of analysis and greater specificity. The main focus of our study was to assess the influence of measured values on clinical interpretation of the results. We quantified amino acids in blood plasma of 123 children. We identified advantages and disadvantages of both methods and statistically calculated accuracy and precision of methods, power of linear relationship between them and the agreement of the results using Bland-Altman diagram.

Accuracy was tested with 20 measurements of control plasma with known concentrations of 14 amino acids. Accuracy was higher for IEC method (RSD 3 – 13.5%) compared with RSD between 4.3 and 14.8% for the LC-MS/MS method. We tested both methods for precision by calculating the relative error between measured values of control plasma and values stated by the manufacturer. We made 7 measurements of control plasma over several consecutive days in several different batches of samples. The results were similar between methods. We set 15% acceptability of errors for both parameters, which we did not exceed. Correlation coefficient >0.70 showed high degree of linear relationship between the two methods. We assessed agreement of the results of LC-MS/MS and IEC methods using Bland-Altman diagrams. The expected limit of agreement that does not affect the clinical interpretation was set at 15%. Results show that difference of averages for 11 amino acids were below limit that was set 15%, except for citruline (-31%), serine (19,5%) and tyrosine (-19%).

In conclusion we showed a high degree of agreement between methods in question. We can conclude that the IEC method can be replaced with the LC-MS/MS method, as average differences between methods do not influence clinical interpretation of the results.

Key words: amino acid, blood plasma, IEC method with post-column derivatisation, LC-MS/MS method

SEZNAM OKRAJŠAV

BCKAD	razvejano verižni α -ketokislinski dehidrogenazni kompleks (angl. branched chain α -ketoacid dehydrogenase)
CAD	tlak kolizijskega plina (angl. collision gas)
CUR	tlak razprševalnega plina (angl. curtain gas)
ERNDIM	European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism
ESI	elektrozprševalna ionizacija
GC	plinska kromatografija (angl. gas chromatography)
GS	tlak ionskega izvora (angl. ion source gas)
HFBA	heptafluoromaslena kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (angl. high-performance liquid chromatography)
IEC	ionsko izmenjevalna kromatografija (angl. ion exchange chromatography)
IS	interni standard
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija sklopljena z tandemsko masno spektrometrijo (angl. liquid chromatography tandem-mass spectrometry)
m/z	razmerje med maso in nabojem
MeOH	Metanol
MF	mobilna faza
MRM	multirezidualna analiza (angl. multiple reaction monitoring)
MS	masni spektrometer
MS/MS	tandemski masni spektrometer
n	število meritev
PAH	fenilalanin hidroksilaza
RE	relativna napaka
RSD	relativna standardna deviacija
SD	standardni odklon
SF	stacionarna faza
SRM	spremljanje izbrane fragmentacije (angl. selective reaction monitoring)

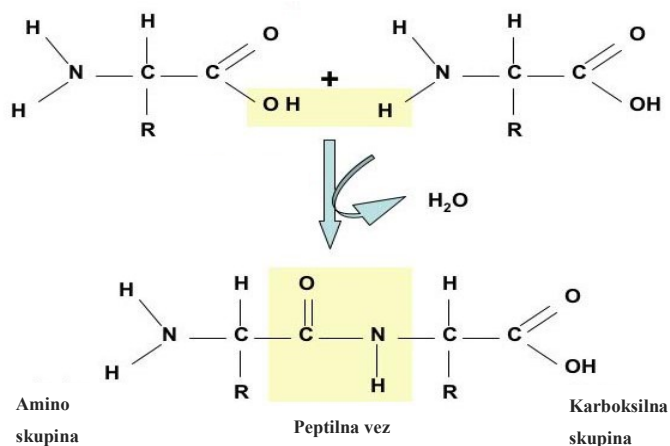
1. UVOD

1.1. AMINOKISLINE

Aminokislina so osnovni gradniki proteinov, zato lahko glede na njihovo kemično lastnost, določimo biološko aktivnost proteinov. Slednji katalizirajo vse reakcije v celicah *in vivo*, ki nadzorujejo celične procese. Lahko so udeležene v sintezi nebeljakovinskih molekul, imajo vlogo nevrottransmiterjev, sodelujejo kot prenašalne molekule v presnovnih poteh. Glede na vse naštetu določanje aminokislin v bioloških vzorcih zagotavlja pomembno informacijo za diagnostiko patoloških stanj in dednih bolezni (1).

1.1.1. OSNOVNA STRUKTURA

Aminokislina imajo značilno zgradbo, v kateri so na centralni ogljikov atom vezani vodikov atom, karboksilna skupina (-COOH), amino skupina (-NH₂) in stranska veriga (-R). Med seboj se razlikujejo po kemijski strukturi skupine R. Aminokislina se med seboj povezujejo s peptidno vezjo, ki nastane med amino skupino ene in karboksilno skupino druge aminokislina, pri čemer se odcepi voda, kar nam prikazuje Slika 1.

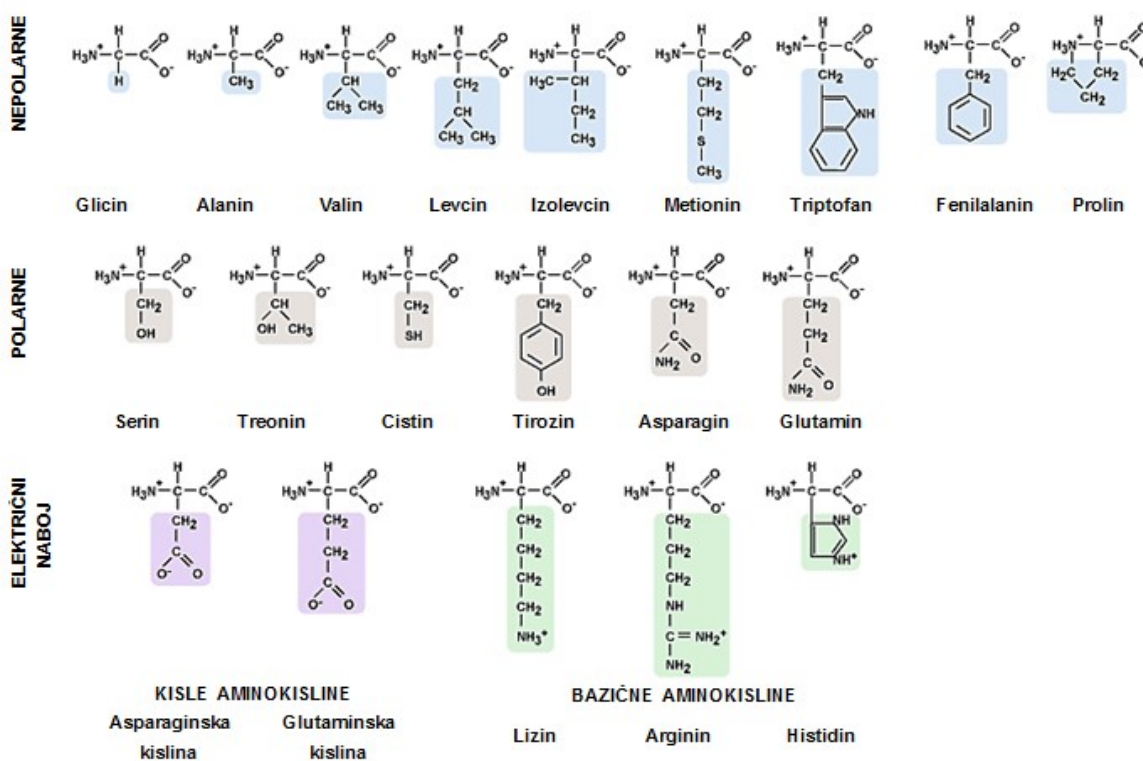


Slika 1: Peptidna vez (1)

Glede na strukturo stranske verige R, delimo aminokislina v 4 skupine (Slika 2):

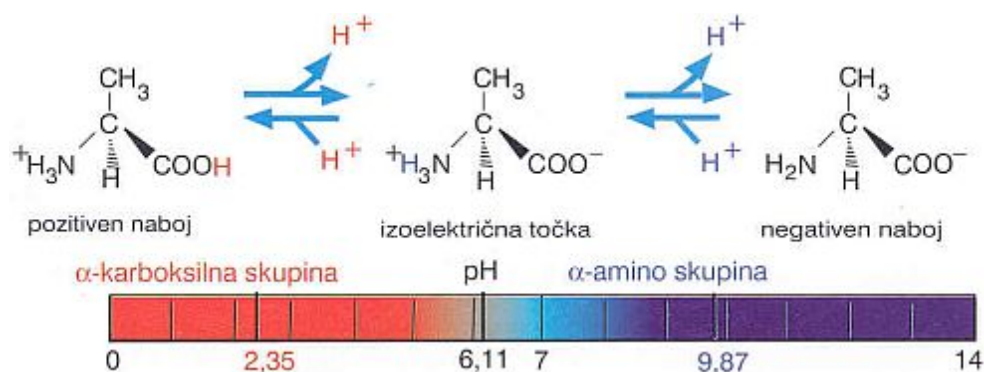
- KISLE aminokislina - stranska veriga nosi dodatno karboksilno skupino (asparaginska, glutaminska kislina)

- BAZIČNE aminokisliline - značilna je dodatna amino skupina (lizin, arginin, histidin)
- POLARNE aminokisliline - so hidrofilne, reagirajo z vodo (serin, treonin, tirozin, cistein, asparagin, glutamin)
- NEPOLARNE aminokisliline - hidrofobne, ne reagirajo z vodo (glicin, alanin, valin, levcin, izolevcin, fenilalanin, triptofan, prolin, metionin) (1).



Slika 2: Prikaz strukturnih formul aminokislin (2)

Za aminokisliline je značilno, da so hkrati kisline in baze, torej so amfoliti. Ionsko stanje skupin in s tem celokupni naboj aminokislin sta odvisna od vrednosti pH topila. V močno kislem je aminska skupina protonirana, zato nastane kationska oblika. V močno bazičnem pa protonirana aminska skupina odda proton in nastane anionska oblika. Pri fiziološkem pH so aminokisliline v dipolarni ionski obliki (Zwitter ioni – kar pomeni, da je aminska skupina protonirana, karboksilna pa deprotonirana, zato je v izoelektrični točki neto naboj enak vrednosti nič) (1). Slika 3 prikazuje spreminjanje naboja alanina v odvisnosti od kislosti oziroma bazičnosti okolja.



Slika 3: Ionsko stanje aminokislina alanin v odvisnosti od pH okolja (3).

1.1.2. PRESNOVA AMINOKISLIN

Poznamo 20 proteinogenih aminokislin, polovico teh jih telo ne more sintetizirati samo, zato jih moramo v telo vnašati s hrano. Esencialne aminokislinae so arginin, histidin, isolevcin, levcin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan in valin. Drugo polovico aminokislin pa lahko telo proizvede samo (neesencialne aminokislinae): alanin, asparagin, asparaginska kislina, cistin, glutaminska kislina, glutamin, prolin, serin in tirozin. Proteini, zaužiti s hrano se začnejo razgrajevati v želodcu (pepsin), njihova razgradnja pa se nadaljuje v tankem črevesu, kjer nanje vplivajo pankreatični encimi, ki jih razgradijo do dipeptidov in prostih aminokislin, ki se absorbirajo v kri. Sinteza in razgradnja proteinov sta cel čas uravnnavani, da se v telesu vzdržuje dušikovo ravnotežje (2).

Vsaka aminokislina se razgrajuje po svoji katabolični poti in sintetizira po svoji anabolični poti. Te reakcije združujejo skupne značilnosti:

- glede na izhodne spojine poznamo 6 biosinteznih poti,
- donor aminoskupine je skoraj vedno glutamat (**transaminacija** in **oksidativna deaminacija**),
- ogljikovo ogrodje izvira iz intermediatov glikolize, citratnega cikla ali fosfoglukonatne poti (3).

1.2. AMINOACIDOPATIJE

Aminokislinae v bioloških vzorcih pediatrične populacije so pomemben biokemijski kazalnik skupine prirojjenih presnovnih motenj, aminoacidopatij. Odkrivanje teh patologij je omejeno na pomanjkanje encima, ki vpliva na prvo ali drugo stopnjo v razgradnji

aminokislin. Prirojene motnje presnove aminokislin se sicer lahko izrazijo kadarkoli, a so najpogostejše v prvem letu otrokovega življenja in predstavljajo nezanemarljiv delež bolezni novorojenčkov in vseh pediatričnih bolezni. Pogosto ostajajo klinično neprepoznane, zato je njihovo odkrivanje izredno pomembno za preprečevanje ireverzibilnih poškodb organizma ali celo smrt bolnika. Vzrok za to težavo je nizka incidenca bolezni in raznolika spremljajoča klinična slika. Presnovne motnje povzroči mutacija gena, ki kodira encim ali beljakovino, potrebno za prenos presnovkov ali sprožitev presnovnih procesov. Posledice so kopičenje nepretvorjenega substrata, njegove stranske presnovne poti in posledično pomanjkanje/odsotnost končnega produkta motene reakcije, kar povzroči klinično sliko (4, 5).

Motnje, ki jih lahko odkrijemo z določanjem aminokislin v bioloških vzorcih, so fenilketonurija (fenilalanin in fenilalanin/tirozin), tirozinemija (tirozin), bolezen javorjevega sirupa (levcin, izolevcin in valin), citrulinemija (citrulin), neketotična hiperglicinemija (glicin), homocistinurija (homocistin, metionin), hiperornitinemija (ornitin) in druge (6).

1.2.1. FENILKETONURIJA

Fenilketonurija je dedna presnovna motnja, ki je posledica mutacije gena za encim fenilalanin hidrosilazo (PAH), ki pretvarja fenilalanin v tirozin. Posledica so povišane koncentracije fenilalanina v krvi, ki moti razvoj možganov in možganskih funkcij v otroštvu. Nekateri bolniki imajo manj hudo obliko bolezni, hiperfenilalaninemijo (če je aktivnost encima samo zmanjšana in je zato kopičenje fenilalanina manjše). V redkih primerih pa povzroči fenilketonurijo okvara gena za molekulo tetrahidrobiopterin, ki je kofaktor, nujen za delovanje encima PAH. Osnovni pristop zdravljenja je vzdrževanje nizkih vrednosti fenilalanina v telesu z dieto (2, 7).

1.2.2. TIROZINEMIJA

Glede na vrsto pomanjkanja encima in posledično različne simptome, delimo tovrstne bolezni v tri skupine. Pri vseh je povišan tirozin. Tirozinemijo **tipa 1** povzroča nizka raven encima fumarilacetoacetatne-hidrosilaze. Klinični znaki so driska, bruhanje, zlatenica, napihnjen trebuh, otekline nog, povečana nagnjenost h krvavitvam. Pri **tipu 2** gre za pomanjkanje encima tirozinske-aminotransferaze. Ti bolniki so lahko duševno manj razviti. Pridruženi klinični znaki so solzenje, občutljivost na svetlobo, bolečine v očeh in

boleče kožne spremembe na dlaneh ter podplatih. Neonatalna tirozinemija (**tip 3**) je motnja zaradi pomanjkanja encima 4-hidroksifenilpiruvatne-dioksidaze. Očitna klinična znaka te redke oblike tirozinemije sta zmanjšana motorična aktivnost in dolgotrajna zlatenica (2).

1.2.3. BOLEZEN JAVORJEVEGA SIRUPA

Neaktivnost encima BCKAD - (angl. branched-chain α -ketoacid dehydrogenase) povzroči povišane koncentracije razvejanih aminokislin (levcin, valin, izolevcin, aloizolevcin). Klinični znaki bolezni so: izguba apetita, značilen vonj urina, vnetje možganske opne, nepravilnosti v dihanju kar lahko vodi v smrt. Bolezen nadzorujemo z omejenim vnosom razvejanih aminokislin (2, 8).

1.2.4. CITRULINEMIJA

Je genetska bolezen z motnjo v ciklusu sečnine. Poznamo dva tipa bolezni. **Tip 1** nastane zaradi pomanjkanja encima arginosukcinatne-sintetaze, ki povzroča kopičenje citrulina in amoniaka v krvi. To povzroči pomanjkanje apetita, bruhanje, letargijo (duševna otopelost), epileptične napade, možganske poškodbe, itd. **Citrulinemija Tipa 2** je posledica mutacije gena, ki zavira sintezo proteina citrina in s tem moti ciklus sečnine ter proizvodnjo proteinov in nukleotidov. V krvi se tako kopičijo citrulin, treonin in metionin, kar se kaže kot hepatomegalija in encefalopatija. Motnja se običajno pojavi v odrasli dobi in večinoma vpliva na centralni živčni sistem (2).

1.2.5. HOMOCISTINURIJA

Je genetska bolezen, pri kateri telo zaradi pomanjkanja encima cistationske- β - sintetaze ne razgradi aminokislina metionin, ki se navadno dalje razgrajuje v homocistein in cistein. Pri homocistinuriji se tako posledično homocistin in metionin kopičita v krvi in urinu. To povzroči šibkost kosti, ektopijo očesne leče in duševno zaostalost (2, 9).

1.2.6. HIPERORNITINEMIJA

Je posledica motnje v metabolizmu ornitina, zaradi pomanjkanja encima ornitin-8-aminotransferaze v matriksu mitohondrija. Klinični znaki so nočna slepota, zmanjšan periferni vid in kasneje izguba vida (10).

1.2.7. NEKETOTIČNA HIPERGLICINEMIJA

Neketotična hiperglicinemija je genetska motnja v presnovi aminokislin, pri kateri se koncentracija glicina v krvi, urinu in likvorju poviša. Značilni klinični znaki v neonatalnem obdobju so letargije, hipotonija, krči, motnje dihanja. Večina bolnikov umre v prvem letu življenja (11).

1.3. METODE DOLOČANJA AMINOKISLIN

Kvantitativna analiza aminokislin v bioloških tekočinah je bistvenega pomena za diagnostiko prirojenih motenj metabolizma ter za spremljanje zdravljenja bolnikov z znano presnovno motnjo. Zato morajo biti uporabljene metode občutljive, specifične in točne. V preteklosti so za laboratorijsko presejanje aminoacidopatij uporabljali papirno, tenkoplastno in dvodimenzionalno kromatografijo. Danes pa za kvantitativno določanje aminokislin v bioloških tekočinah uporabljamo IEC, reverzno fazno tekočinsko kromatografijo visoke zmogljivosti (HPLC), plinsko kromatografijo (GC) in LC-MS/MS (12).

IEC s post-kolonsko ninhidrinsko derivatizacijo je najbolj razširjena metoda v kliničnih laboratorijih in velja za zlati standard analize aminokislin v plazmi, urinu in likvorju. Moore in Stein sta bila prva, ki sta leta 1960 razvila avtomatski aminokislinski analizator na temelju IEC (13). Metoda je zelo ponovljiva, ima širok, dinamičen razpon, odlično območje linearnosti, pa tudi priprava vzorcev je zelo enostavna. Njena slaba stran so dolgi analizni časi, zato se je v zadnjih letih povečala uporaba metode LC-MS/MS, ki je zmogljiva analitsko-raziskovalna metoda za identifikacijo snovi na osnovi molekulskih mas. Tudi ta metoda je zelo občutljiva, hitra in selektivna (12).

1.3.1. TANDEMSKA MASNA SPEKTROMETRIJA

LC-MS/MS je ena izmed najbolj uporabljenih analiznih tehnik za ločevanje, identifikacijo in kvantifikacijo spojin v tekoči fazi (sistem, ki ga uporabljamo v našem laboratoriju je prikazan na Sliki 4).

Inštrument HPLC je sestavljen iz avtomatskega vzorčevalnika, črpalke in kolone s termostatom. Ločitev spojin temelji na njihovem različnem porazdeljevanju med stacionarno fazo (SF), ki se nahaja v kromatografski koloni in mobilno fazo (MF), ki se pomika skozi kolono. Kakovost ločbe je odvisna od izbire SF, sestave MF, dimenzije in temperature kolone (2, 14). Pri višji temperaturi dobimo na koloni boljšo ločbo zaradi

zmanjšane viskoznosti MF in potrebe po nižjem pritisku za črpanje MF (15). Porazdelitvena reverzno-fazna kromatografija je najprimernejša in tudi najbolj uporabna vrsta kromatografije za ločbo aminokislin, proteinov, peptidov. SF so nepolarne molekule (C8 -18 atomov ogljika), vezane na selikagelnih delcih. Za to vrsto kolon uporabljamo polarne MF, kot so: voda, acetonitril in metanol. Sestavo oz. polarnost MF lahko med kromatografsko analizo spreminjamo. Ta način imenujemo gradientno izpiranje, v nasprotju z izokraskim, pri katerem ostane polarnost MF v času kromatografske ločbe nespremenjena. Pri gradientnem izpiranju moramo paziti predvsem na sestavo MF na začetku izpiranja, obliko gradienta, sestavo MF na koncu analize in program pretoka MF. Gradientno izpiranje nam občutno skrajša čas analize in izostri posamezne vrhove (2, 14).



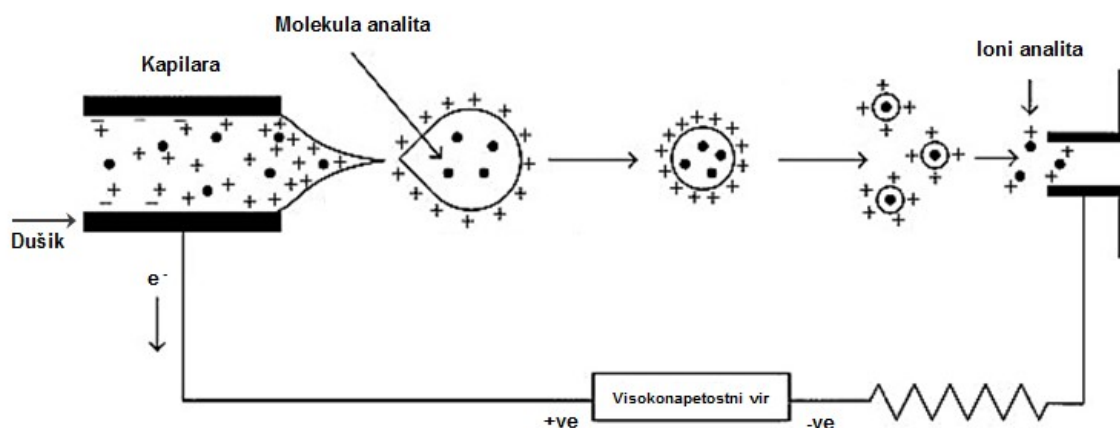
Slika 4: Sistem LC-MS/MS (fotografija posneta v presnovnem laboratoriju Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko Pediatrične klinike)

Masna spektrometrija je danes ena izmed najpomembnejših fizikalnih metod, uporabljenih v analizni kemiji. Je visoko občutljiva ter omogoča identifikacijo in kvantifikacijo analitov (16). Masni spektrometer (MS) je sestavljen iz treh glavnih delov: ionskega izvora, masnega analizatorja in detektorja. Vsi se nahajajo v visokem vakuumu, kar preprečuje trke med posameznimi ioni (2). MS ločuje ione elementov, molekul ali delov molekul (fragmentov), glede na razmerje med njihovimi masami in naboji (m/z), pri čemer izmeri množino posameznih ionov. Rezultat je masni spekter, ki prikazuje absolutne ali relativne intenzitete ionskega toka v odvisnosti od vrednosti razmerij m/z . Ob vstopu

analitov iz kromatografske kolone v MS, se morajo le-ti najprej pretvoriti v plinasto ionizirano stanje, zato je za uspešno masno detekcijo zelo pomembna pravilna izbira ionizacijske tehnike. Ta lahko temelji na elektrorazprševalni ionizaciji (ESI), kemijski ionizaciji pri atmosferskem tlaku ali ionizaciji z ultravijolično svetlobo. Izberemo jo glede na fizikalno-kemijske lastnosti analita (17, 18). Za analizo aminokislin uporabljamo ESI.

Elektrorazprševalna ionizacija se je v kombinaciji s HPLC izkazala kot pomembna tehnika v kliničnih laboratorijih, saj z njo lahko analiziramo tako majhne, kot velike molekule različnih polarnosti, prisotne v kompleksnih bioloških vzorcih. V primeru, da s to metodo ionizacije dobimo anione, govorimo o negativni ESI, kadar pa nastanejo kationi pa o pozitivni ESI. Slednjo uporabljamo, kadar ima analit v svoji strukturi funkcionalno skupino, ki sprejme proton (aminska skupina). ESI je primerna za polarne molekule z visoko molekulsko maso, ki so občutljive na temperaturo (18, 19).

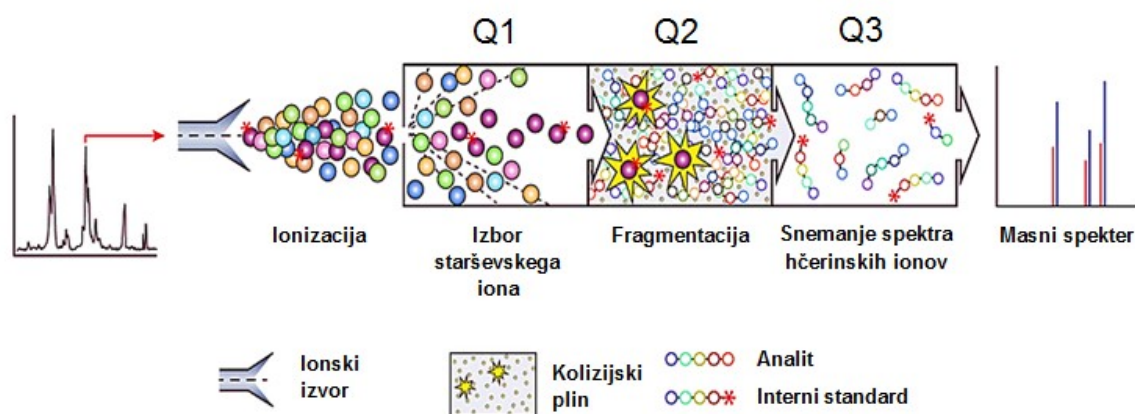
Pri ESI tok raztopine z analiti teče skozi ozko kovinsko kapilaro, ki je pod visoko električno napetostjo (2,5 - 6,0 kV) in atmosferskim tlakom. Pri tem nastanejo majhne nabite kapljice. Ob ogrevani kapilari in pretoku sušilnega plina (dušik), začne MF izhlapevati, kar povzroči manjšanje kapljic in večanje naboja na njihovi površini. Nabite molekule nato potujejo do MS (Slika 5) (16, 19, 20).



Slika 5: Princip ESI (4)

Za selektivno kvantitativno analizo spojin v nizkih koncentracijah uporabljamo tandemski masni spektrometer (MS/MS), pri katerem so med seboj povezani trije kvadrupoli, od katerih ima vsak ločeno funkcijo. V kvadrupolu ioni iz izvora potujejo med štirimi

elektrodami v obliki štirih kovinskih palic, ki so pod električno napetostjo in ustvarjajo elektromagnetno polje. Potencial med elektrodami spreminjamo tako, da detektor dosežejo le določeni ioni, drugi pa se odbijejo. Pri MS/MS (Slika 6) prvi masni filter oz. kvadrupol prepušča samo določene starševske ione, ki se ločijo na podlagi mase in naboja. V drugem kvadrupolu, ki ga imenujemo kolizijska celica in deluje le kot ionsko vodilo, poteče fragmentacija zaradi trkov z inertnim plinom, ki razbije starševske ione na hčerinske. Tretji masni analizator pa prepušča samo eno vrsto hčerinskih ionov v določenem času, čemur sledi detekcija (18).



Slika 6: Shema delovanja MS/MS, prirejeno po (5)

Pri detekciji SRM (ang. Selected reaction monitoring) lahko spremljamo samo izbrani prekursorski in produktni ion, v našem primeru pa iz prekursorskega nastane več produktnih ionov, zato spremljamo več prehodov, kar imenujemo multirezidualna analiza, ali s kratico MRM (ang. Multiple reaction monitoring) (2, 18, 20).

Za kvantifikacijo analitov se uporabljajo stabilni, izotopsko označeni interni standardi (IS), ki imajo podobne fizikalno kemijske lastnosti kot analiti. IS zmanjšajo vpliv napak pri pripravi vzorcev in sprememb v odzivnosti inštrumenta, na končni rezultat (18).

1.3.2. IONSKO IZMENJEVALNA KROMATOGARFIJA

Je separacijska metoda, ki temelji na ionski izmenjavi med MF in ionsko izmenjevalnimi skupinami, ki so vezane na nosilec oziroma SF. IEC uporabljamo za ločevanje anorganskih in organskih kationov in anionov. Molekule ločujemo na osnovi naboja. Pozitivno nabite molekule se vežejo na nasprotno nabito SF in obratno. Kolone so napolnjene s SF, na

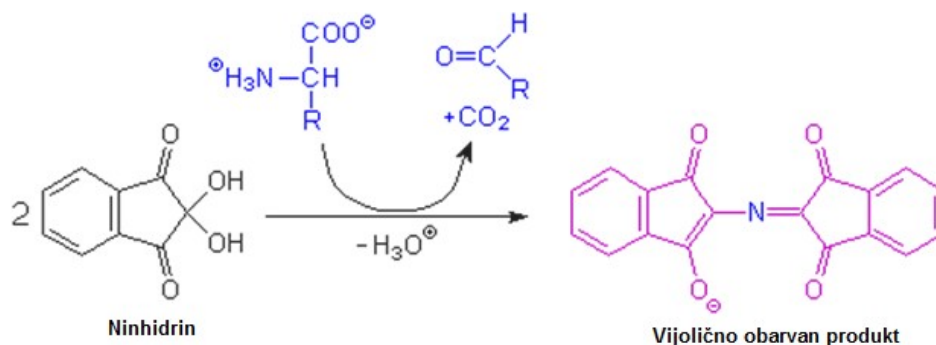
katero so vezane anionske ali kationske izmenjevalne smole iz polistirena, etilvinilbenzena ali metilkrlata. Ločevanje anionov dosežemo s pomočjo kvarternih amonijevih skupin, za ločevanje kationov pa uporabljamo fenilne ali alkilsulfonske skupine. MF mora biti pripravljena v ustreznem območju pH. Prilagoditev vrednosti pH je ključni dejavnik pri IEC, saj določa naboj topil in ionskega izmenjevalca. Pufri, ki pokrivajo široko območje pH in so zato najbolj uporabni, so: fosfatni, citratni ali acetatni, z dodatkom soli ustrezne koncentracije, za boljšo ionsko moč. Ločbo optimiziramo s prilagajanjem ionske moči MF, temperature kolone, hitrosti pretoka, najpomembnejši pa sta vrednost pH MF in njena koncentracija. Ker so aminokislina amfoliti, lahko obstajajo v anionski, kationski in zwitterionski obliki, kar je odvisno od pH, zato je IEC ustrezna izbira za njihovo kvantifikacijo (21, 22, 23).

SESTAVA APARATURE ZA IEC S POST-KOLONSKO DERIVATIZACIJO ZA ANALIZO AMINOKISLIN

Aparatura je sestavljena iz (Slika 8):

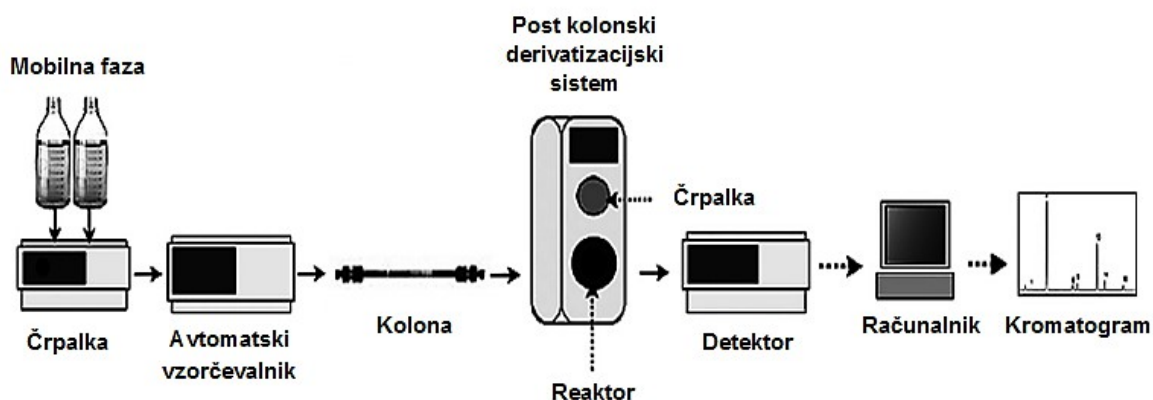
- Rezervoarja za mobilne faze.
- Črpalke, ki zagotavlja enakomeren pretok MF skozi kolono; biti mora vzdržljiva, natančna in točna.
- Avtomatskega vzorčevalnika, ki odmeri natančen volumen vzorca za analizo in omogoča dobro ponovljivost med injiciranjem ter preprečuje navzkrižno kontaminacijo.
- Kromatografske kolone s kolonskim termostatom za uravnavanje temperature in predkolono, ki podaljša življenjsko dobo kolone in jo varuje pred kontaminacijo.
- Derivatizacijskega inštrumenta, sestavljenega iz črpalke za derivatizacijski reagent in ogrevanega reaktorja, v katerem poteče kemična reakcija derivatizacije.

Najpogosteje uporabljen reagent za post-kolonsko detekcijo je ninhidrin. Pri njegovi reakciji z aminokislino nastane temno vijolično obarvan produkt, stranska veriga aminokislina pa se pretvori v ustrezen aldehyd (Slika 7).



Slika 7: *Rakcija ninhidrina v obarvan produkt (6).*

- UV detektorja, katerega delovanje temelji na absorpciji svetlobe v ultravijoličnem in vidnem delu spektra.
- Računalnika za prikaz in zapis signalov (24, 25, 26).



Slika 8: *Deli aparature za post-kolonsko derivatizacijo, sklopljene s tekočinskim kromatografom (7)*

1.4. BIOLOŠKI VZORCI

Proste aminokisliline lahko merimo v različnih fizioloških vzorcih, kot so plazma, urin ali likvor. Motnje v presnovi aminokislin se običajno najprej pokažejo v obliki njihovih povišanih koncentracij v krvi, zato je plazma najpogosteje analiziran vzorec. Pravilni odvzem in shranjevanje vzorcev je eden ključnih dejavnikov za zanesljivo odkrivanje presnovnih motenj. Pomembno je, da vzorec krvi odvezamo v času, ko je presnovno

stanje pri otroku porušeno. Pri nekaterih presnovnih motnjah so namreč biokemijski kazalci prisotni le v akutni fazi bolezni. Na rezultate močno vplivajo prehrana, zdravila, bolezensko stanje in hemoliza. Podatki o tem pa so izjemno pomembni za interpretacijo rezultatov (4).

2. NAMEN DELA

Kvantitativna analiza aminokislin je bistvenega pomena za diagnostiko prirojenih motenj presnove in spremljanje bolnikov z znanimi presnovnimi motnjami. V ta namen lahko uporabimo različne metode in analizatorje. Zaradi natančnega spremljanja bolnikov je pomembno, da različne metode, ki jih pri tem uporabljamo, primerjamo med seboj in ugotovimo ali rezultati, izmerjeni z različnimi analiznimi sistemi, lahko vplivajo na klinične odločitve.

Namen magistrskega dela je primerjava rezultatov analiz plazemskih vzorcev otrok z dvema metodama, ki se najpogosteje uporabljata v kliničnih laboratorijih za analizo aminokislin v fizioloških vzorcih. Aminokislina v plazemskih vzorcih bomo določali z metodo LC-MS/MS in IEC s post-kolonsko derivatizacijo. Opredelili bomo prednosti in slabosti posamezne metode in statistično ovrednotili njuni natančnosti in točnosti, preverili statistično moč njune linearne povezanosti in njuno ujemanje s pomočjo Bland-Altmanovega diagrama.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. VZORCI

Metodi smo primerjali z analizo 123 plazemskih vzorcev otrok, ki smo jih sprejeli v Službo za specialno laboratorijsko diagnostiko, Pediatrične klinike, Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

Vzorci krvi so bili odvzeti v epruvete z Li-heparinom. Med transportom so bili na hladnem. Plazmo smo takoj ločili od celic (najkasneje v 2 urah po odvzemu krvi) ter jo do analize z LC-MS/MS shranili na -20 °C. Za analizo z IEC, smo alikvote vzorcev najprej deproteinizirali, nato pa zamrznili na -20 °C, do uporabe.

3.2. TANDEMSKA MASNA SPEKTROMETRIJA

3.2.1. PRINCIP METODE

Tehnika, ki jo uporabljamo omogoča zaznavo velikega števila molekul, kot tudi določitev njihovih koncentracij. Vzorce plazme tik pred analizo deproteiniziramo s sulfosalicilno kislino in jih nato derivatiziramo z reagenti iz kompleta aTRAQ Kit (Sciex, ZDA). S temi reagenti označimo primarne in sekundarne aminske skupine. IS za vsako aminokislino so označeni z modificiranimi reagenti aTRAQ, ki se razlikujejo za osem masnih enot. Mešanico označenega vzorca in IS ločimo na kromatografski koloni in analite ioniziramo, preden vstopijo do masnega spektrometra. Retencijski časi posamezne aminokisliline in ustreznega IS so enaki, razlikujejo pa se v masnih prehodih.

Izračun koncentracije analitov:

Koncentracija aminokislin v vzorcu = (površina vrha analita / površina vrha (IS)) x koncentracija (IS)

3.2.2. INŠTRUMENTI IN OPREMA

- Tandemski masni spektrometer 3200 Qtrap (AB Sciex, Kanada)
- Dušikov generator (Peak Scientific, Škotska)
- HPLC sistem (Perkin Elmer Series 200, ZDA)
- Kromatografska kolona C18 4,6 x 150 mm (Sciex, ZDA)
- Centrifuga Mini spin (Eppendorf, Nemčija)

- Vibracijski mešalnik Vibromix 10 (Tehtnica, Slovenija)
- Kalibrirane nastavljive pipete z volumni 50 μL , 100 μL in 1000 μL
- Epruvete Eppendorf 1,5 mL
- Viale (2 mL) z zamaški
- Evaporator Speed Vac sistem AES51010 (Savant, ZDA)
- Steklene bučke 250 mL, 500 mL

3.2.3. REAGENTI

- Voda Chromasol V (čistote za kromatografijo), (Honeywell, Nemčija)
- Metanol (MeOH) Chromasol V (čistote za kromatografijo), (Fluka, Nemčija)
- Reagenčni komplet aTRAQ KIT (Sciex, ZDA), ki vsebuje:
 - Reagent aTRAQ $\Delta 8$
 - Sulfosalicilna kislina
 - Reakcijski puffer
 - Hidroksilamin
 - 100% mravljična kislina
 - 100% heptafluoromaslena kislina - HFBA
 - Izopropanol
 - IS aTRAQ $\Delta 0$
 - Raztopina za pripravo IS

Navodila za uporabo reagentov aTRAQ:

- Vse reagente iz kompleta aTRAQ Kit smo pred uporabo termostatirali na sobno temperaturo. Po uporabi pa smo jih takoj zamrznili nazaj na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (znotraj 2h od odtajanja).
- Pred uporabo reakcijskega pufra smo bili pozorni, da na dnu ni nastala oborina. V primeru oborine smo ga segreli (v epruveti) na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ za 5 min, zatem pa dobro premešali.
- Priprava reagenta aTRAQ $\Delta 8$: termostatirano epruveto (na sobno temperaturo) z reagentom aTRAQ smo centrifugirali 1 minuto na 10.000 x g , dodali 70 μL izopropanola, premešali in ponovno kratko centrifugirali zaradi majhnih volumnov. Pripravljeni reagent je bil obstojen 4 tedne.

- Priprava IS aTRAQ $\Delta 0$: epruveto z liofiliziranim IS smo centrifugirali 1 minuto na 10.000 x g in dodali ustrezno količino raztopine za pripravo IS, določeno na certifikatu IS z izmerjenimi koncentracijami, vsebino dobro premešali in zopet centrifugirali 1 minuto na 10.000 x g. Pripravljeni IS smo označili z uporabljenimi serijsko številko.

Priprava mobilnih faz (MF):

MF A: voda + 0,1% mravljična kislina + 0,01% HFBA

Priprava 500 mL MF A: v merilno bučko smo nalili približno 250 mL vode, dodali 500 μ L mravljične kisline in 50 μ L HFBA ter MF dopolnili z vodo do oznake. Obe kislini smo predhodno termostatirali na sobni temperaturi.

MF B: MeOH + 0,1 % mravljična kislina + 0,01 % HFBA

Priprava 250 mL MF B: v merilno bučko smo nalili približno 150 mL MeOH, dodali 250 mL mravljične kisline in 25 μ L HFBA ter MF dopolnili z MeOH do oznake. MF sta bili pri sobni temperaturi stabilni približno 1 mesec.

3.2.4. PRIPRAVA VZORCEV

- V 1,5 mL epruvete smo odpipetirali po 10 μ L sulfosalicilne kisline.
- Dodali smo po 40 μ L vzorca, premešali na vibracijskem mešalniku in 2 minuti centrifugirali na 10.000 x g.
- V nove, čiste 1,5 mL epruvete smo odpipetirali po 40 μ L reakcijskega pufra, dodali po 10 μ L supernatantov vzorcev, premešali na mešalniku in centrifugirali 1 minuto na 10.000 x g.
- V tretji set 1,5 mL epruget smo odpipetirali po 5 μ L razredčenega reagenta aTRAQ $\Delta 8$, dodali po 10 μ L supernatantov iz prejšnjega koraka ter jih premešali in centrifugirali 1 minuto na 10.000 x g .
- Vzorce smo nato inkubirali 30 min pri sobni temperaturi.
- Dodali smo jim po 5 μ L hidroksilamina, premešali in centrifugirali 1 minuto na 10.000 x g .
- Sledila je 20 minutna inkubacija pri sobni temperaturi.
- Nato smo vzorcem dodali po 32 μ L IS, jih premešali in centrifugirali 1 minuto na 10.000 x g .
- Vzorce smo 20 minut sušili v evaporatorju.

- Na koncu smo jim dodali po 20 μL vode, jih premešali, centrifugirali 1 minuto na 10.000 x g in odpipetirali v vialo z vstavki, pri čemer smo pazili, da niso nastali mehurčki.

3.2.5. POGOJI HPLC

Temperatura kolone: 50 °C.

Volumen injiciranega vzorca: 2 μL .

Pretok: 0,8 mL/min.

V Preglednici I so podani parametri gradientnega izpiranja kolone.

Preglednica I: Časovno opredeljen gradientni program za MF.

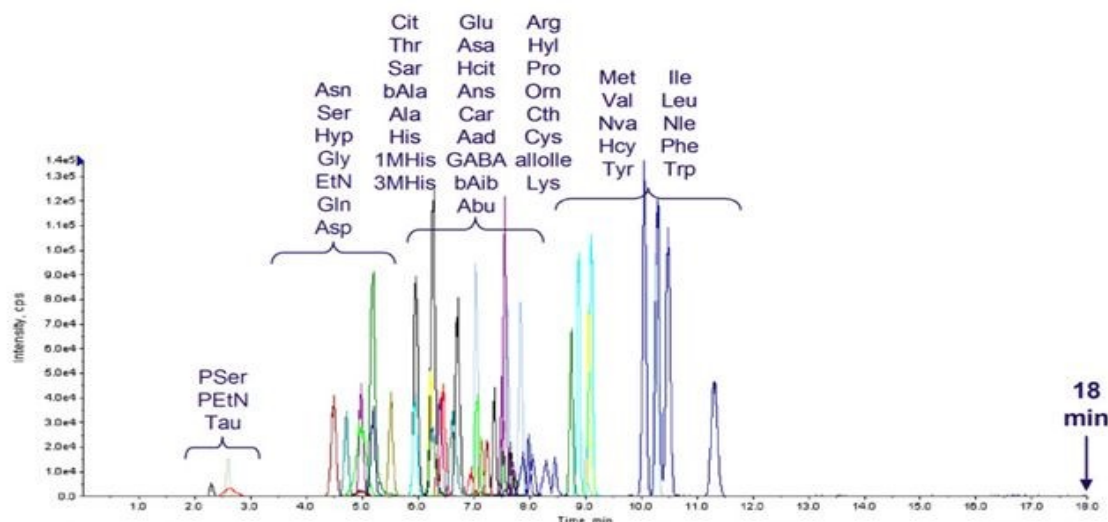
Čas (min)	% MF A	% MF B
0.0	98	2
1.0	98	2
6.0	60	40
10.0	60	40
11.0	10	90
12.0	10	90
13.0	98	2
18.0	98	2
23.0	98	2

3.2.6. ANALIZA MS/MS

Parametri metode:

Ionizacija ESI, prehodi MRM, tlak razprševalnega plina (CUR, angl. curtain gas) - 20 psi (1,4 bar), tlak kolizijskega plina (CAD, angl. Collision gas) - medium, napetost na kapilari ESI (IS, angl. Ion Spray Voltage) - 1250 V, temperatura 600 °C (TEM, angl. temperature), tlak ionskega izvora 1 (GS 1, angl. Ion Source Gas 1) - 60 psi (4,1 bar) in tlak ionskega izvora 2 (GS 2, angl. Ion Source Gas 2) - 60 psi (4,1 bar).

Na Sliki 9 je prikazan primer kromatograma analize aminokislin s sistemom LC-MS/MS.



Slika 9: Primer kromatograma analize aminokislin z uporabljeno metodo LC-MS/MS.

3.3. IONSKO IZMENJEVALNA KROMATOGRAFIJA S POST-KOLONSKO DERIVATIZACIJO

3.3.1. PRINCIP METODE

Aminokislinski analizator omogoča kvantitativno analizo aminokislin. Deluje na principu IEC s post-kolonsko derivatizacijo z ninhidrinom. Aminokisliline zaradi razlik v zgradbi različno inter-reagirajo s SF. Ločevanje posameznih aminokislin dosežemo s spreminjanjem ionske jakosti, vrednosti pH MF in temperature kolone. Post-kolonsko pa nato izvedemo reakcijo z ninhidrinom, ki se, kot smo že omenili, veže na aminske skupine aminokislin. Nastane obarvan kompleks, ki ga detektiramo spektrofotometrično pri valovni dolžini 570 nm za vse aminokisliline, razen za prolin in hidroksiprolin, ki ju na ta način zaznamo pri 440 nm. Intenziteta barvnega kompleksa je sorazmerna koncentraciji aminokislin v vzorcu. Identifikacija in kvantifikacija aminokislin v vzorcu temelji na osnovi primerjave retencijskih časov in signalnih odzivov s tistimi, ki jih izmerimo v standardni raztopini z znanimi koncentracijami aminokislin. Površina pod vrhom posamezne aminokisliline je neposredno sorazmerna njeni koncentraciji v vzorcu.

3.3.2. INSTRUMENTI IN OPREMA

- Aminokislinski analizator Pinnacle PCX (Pickering laboratories, ZDA); njegovi najpomembnejši sestavni deli so: črpalka, reaktor, kationsko izmenjevalna kolona

(4,6 x 75 mm, 5 μ m) s predkolono (2,0 x 20 mm), grelec kolone in detektor UV/VIS (570 nm in 440 nm).

- Aparat HPLC Agilent Technologies 1200 Series (Agilent Technologies, ZDA)
- Centrifuga Eppendorf 5430 (Eppendorf, Nemčija)
- Vibracijski mešalnik Vibromix 10 (Tehtnica, Slovenija)
- Kalibrirane nastavljive pipete z volumni 50 μ L, 100 μ L in 1000 μ L
- Eppendorf epruvete 1,5 mL
- Tehtnica TE124S-0CE (Sartorius, Nemčija)
- Filtri Minisart velikosti por 0,2 μ m (Sartorius, Nemčija)
- Brizge za enkratno uporabo, 3 mL
- Viale (2 mL) z zamaški
- Jeklenka z dušikom

3.3.3. REAGENTI IN STANDARDI

Uporabili smo originalne pufre in reagente proizvajalca Pickering Laboratories (ZDA):

- Litijev pufer pH 2,8 (1.700-1.125%)
- Litijev pufer pH 3,65 (365%)
- Litijev pufer pH 3,75 (375%)
- Litijev pufer za regeneracijo kolone RG003 (0,03%)
- Ninhidrinski reagent (TRIONE Two-Part Ninhydrin Reagent T200). Pred uporabo smo pomešali vsebini dveh stekleničk in tako pripravljeno raztopino ninhidrina prelili v vsebnik za ninhidrin na inštrumentu ter jo prepihali z dušikom. Vsebnik smo pred svetlobo zaščitili z aluminijasto folijo.
- Reagent za obarjanje bioloških vzorcev, Seraprep SP100
- Reagent za pripravo standarda, Lithium Diluent Li220
- Standardne raztopine aminokislin: Amino acid Standard Solution (Sigma, Nemčija); physiological acidics and neutrals (PAN) in Amino acid Standard Solution (Sigma, Nemčija); physiological basics (PB)
- L-glutamin (Fluka-BioChemika, Švica)

Priprava standardne raztopine aminokislin:

Standardna raztopina aminokislin proizvajalca ne vsebuje glutamina, zato ji ga moramo dodati. V 50 mL pufra Lithium Diluent Li220 dodamo 18,3 mg glutamina.

Za pripravo 500 $\mu\text{mol/L}$ standardne raztopine aminokislin med seboj pomešamo: 1 mL standardne raztopine PAN + 1 mL standardne raztopine PB + 1 mL standardne raztopine glutamina + 2 mL pufra Lithium Diluent Li220. Koncentracija posameznih aminokislin v tako pripravljeni standardni raztopini je 500 $\mu\text{mol/L}$, z izjemo cistina (250 $\mu\text{mol/L}$).

3.3.4. PRIPRAVA POSAMEZNEGA VZORCA

- En mL krvi z Li-heparinom smo najprej 5 minut centrifugirali na 1230 g. Nato smo v 1,5 mL epruveto odpipetirali 1 del plazme in dodali enak del reagenta za obarjanje vzorcev.
- Mešanico smo pustili 5 minut na sobni temperaturi in jo centrifugirali (10 min, 10.000 x g).
- Supernatant smo filtrirali skozi filter s porami 0,2 μm .
- Filtrirani vzorece smo odpipetirali v novo vialo.

3.3.5. PROGRAM HPLC

Pretok MF: 0,40 mL/min

Volumen injiciranega vzorca: 100 μL .

V Preglednici II so navedeni podatki o gradientnem izpiranju, v Preglednici III pa program spreminjanja temperature kolone s časom.

Preglednica II: Gradientni program ločbe aminokislin s HPLC.

Čas (min)	1.700-1.125 %	Li365 %	Li375 %	RG003 %
0.00	100	0	0	0
10.00	95	5	0	0
15.00	95	5	0	0
25.00	40	60	0	0
45.00	0	100	0	0
60.00	0	100	0	0
60.10	0	0	100	0
78.00	0	0	100	0
78.10	0	0	70	30
100.00	0	0	70	30
100.10	100	0	0	0
115.00	100	0	0	0

3.3.6. PROGRAM SPREMINJANJA TEMPERATURE KOLONE

Preglednica III: Uporabljeni program spreminjanja temperature kolone.

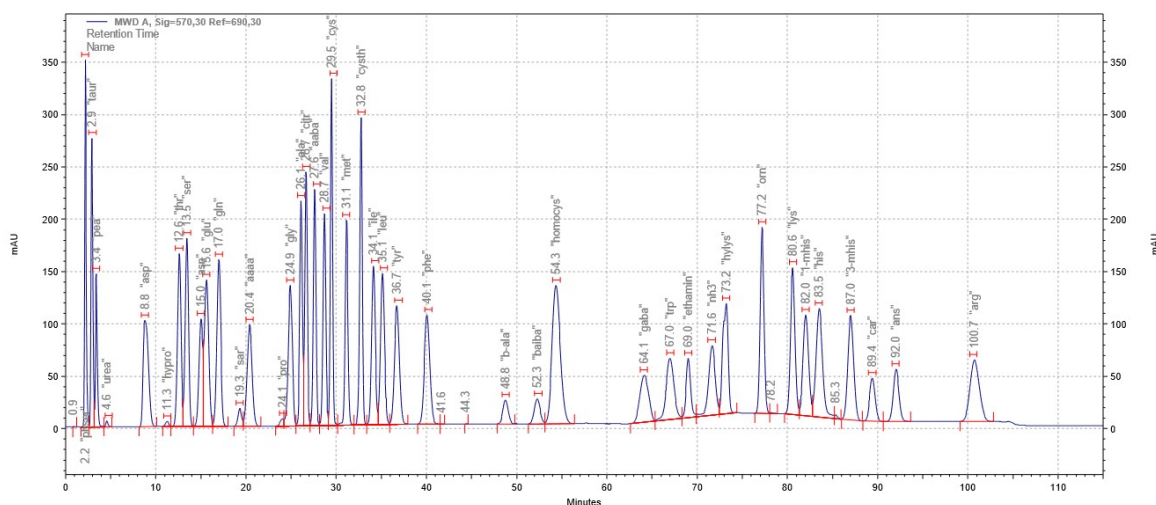
Čas (min)	Temperatura (°C)
0	34
30	34
34	65
67	65
80	70
97	70
98	34

3.3.7. REAKTOR ZA POST-KOLONSKO DERIVATIZACIJO

Pretok ninhidrinskega reagenta: 0,3 mL/min

Temperatura reaktorja: 130 °C

Slika 10 prikazuje primer kromatograma, ki smo ga dobili pri analizi standardne raztopine aminokislin z aminokislinskim analizatorjem.



Slika 10: Primer kromatograma analize aminokislin z metodo IEC.

3.4. NOTRANJA KONTROLA

V vsaki seriji meritev smo z obema metodama izmerili tudi združeno plazmo, ki nam je služila kot notranja kontrola. Pripravili smo jo tako kot vzorce. Združena plazma je zbrana plazma, zmešana, alikvotirana, pripravljena po opisanem postopku in shranjena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize.

Za preverjanje točnosti rezultatov smo uporabili kontrolne raztopine aminokislin z znanimi koncentracijami (Control Amino Acids – MCA Laboratory, Nizozemska).

3.5. STATISTIČNA ANALIZA

Točnost in natančnost metod smo izračunali s programom Microsoft Office Excel 2007. Osnovno oz. opisno statistično analizo podatkov in Bland-Altmanov diagram pa smo naredili s programom GraphPad Prism v. 6.0 (GraphPad Software, ZDA).

Natančnost analize metode je definirana kot ujemanje večkratnih meritev analitov pri ponovljivih pogojih (ista metoda, isti reagent, isti izvajalec analize, isti laboratorij in ista oprema ter kratek čas med meritvami). Podamo jo v obliki standardnega odklona (SD) in RSD (27).

SD izračunamo z enačbo:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

x_i posamezna meritve

\bar{x} povprečna vrednost meritev

n število meritev.

Dobljeno vrednost SD uporabimo za izračun RSD, ki nam pove kolikšen je odstotek napake:

$$RSD = 100 \frac{SD}{\bar{x}}$$

Točnost analizne metode označuje odstopanje rezultata posamezne meritve od njegove resnične oz. prave vrednosti. Določimo jo z analizo vzorcev z znanimi koncentracijami analita. V ta namen uporabimo enačbo (27):

$$RE(\%) = 100 \frac{\bar{x}_{izmerjena} - \bar{x}_{ciljna}}{\bar{x}_{cil}}$$

RE relativna napaka

$\bar{x}_{izmerjena}$ povprečne vrednosti, ki smo jih izmerili

\bar{x}_{ciljna} povprečne vrednosti, ki jih je podal proizvajalec

Korelacija ali korelacijski koeficient r , predstavlja moč in smer povezanosti (+ ali -) med dvema primerjanima metodama. Kadar so podatki normalno razporejeni, uporabimo Pearsonov korelacijski koeficient, v primeru njihove nenormalne porazdelitve pa Spearmanov korelacijski koeficient.

Bland-Altmanov diagram je grafični prikaz statistične analize, ki se pogosto uporablja v kliniki za primerjavo nove analizne metode z obstoječo. Na absciso grafa nanese povprečja vseh parov meritev, določenih s primerjanima metodama, na ordinato pa njihove razlike. Izračunamo tudi 95% meji ujemanja, katerih velikost je odvisna od variabilnosti omenjenih razlik in števila analiziranih vzorcev. Primerjani metodi sta primerljivi, če je interval 95% meja ujemanja ozek. Z izračunom povprečnih odklonov meritev pa ugotovimo stopnjo ujemanja ali pomanjkanja ujemanja med metodama, kar nam služi za

oceno sistematične napake. Bland-Altmanov test interpretiramo s kliničnega vidika. Razlike med metodama morajo biti torej dovolj majhne, da ne vplivajo na klinično odločitev. Bland-Altmanov diagram prikazuje točnost ene metode v primerjavi z drugo, in sicer v obliki povprečja razlik, natančnost pa z razpršenostjo razlik (28 , 29, 30, 31).

4. REZULTATI

4.1. NATANČNOST

Natančnost metod smo preverili z 20 meritvami združenih vzorcev plazme, pri čemer smo merili koncentracije 14 aminokislin. Izračunali smo povprečne vrednosti, SD in RSD. Meritve smo izvedli med vsako serijo analiziranih vzorcev, in sicer kot notranjo kontrolo. Rezultati so zbrani v Preglednicah IV in V.

Preglednica IV: Natančnost metode LC-MS/MS.

Aminokislina (N=20)	Povprečje (μmol/L)	SD (μmol/L)	RSD (%)
Alanin	498	34,0	6,8
Arginin	133	10,8	8,1
Citrulin	26,6	1,7	6,5
Fenilalanin	126	5,9	4,6
Glicin	371	29,9	8,1
Izolevcin	87,5	3,8	4,3
Levcin	161	7,5	4,6
Lizin	174	19,2	11,0
Ornitin	87,2	12,9	14,8
Serin	234	17,6	7,5
Taurin	148	10,6	7,1
Tirozin	84,0	3,7	4,4
Treonin	127	8,8	6,9
Valin	262	15,2	5,8

Preglednica V: Natančnost metode IEC.

Aminokislina (N=20)	Povprečje (μmol/L)	SD (μmol/L)	RSD (%)
Alanin	556	19,0	3,4
Arginin	147	6,0	4,1
Citrulin	32,5	4,4	13,5
Fenilalanin	213	8,1	3,8
Glicin	365	10,9	3,0
Izolevcin	77,7	3,4	4,4
Levcin	168	7,1	4,2
Lizin	209	8,9	4,3
Ornitin	95,4	3,1	3,3
Serin	199	6,8	3,4
Taurin	138	17,8	12,9
Tirozin	72,0	3,9	5,4
Treonin	145	5,0	3,4
Valin	258	11,1	4,3

4.2. TOČNOST

Točnost metod za izbranih 14 aminokislin smo določili s pomočjo rezultatov meritev kontrolnega materiala in jo podali v obliki RE. Opravili smo 7 meritev v več zaporednih dneh. Meritve kontrolnega materiala smo primerjali s povprečnimi vrednostmi, ki jih je navedel proizvajalec in so nam predstavljale prave oz. dejanske vrednosti. Rezultate smo zbrali v Preglednicah VI in VII.

Preglednica VI: Točnost metode LC-MS/MS.

Aminokislina (N=7)	Pričakovani interval rezultatov v laboratoriju ($\mu\text{mol/L}$)	Povprečna vrednost proizvajalca ($\mu\text{mol/L}$)	Povprečje ($\mu\text{mol/L}$)	SD ($\mu\text{mol/L}$)	RSD (%)	RE (%)
Alanin	307 - 435	371	416	33,6	8,1	12,2
Arginin	245 - 387	316	306	24,0	7,9	-3,2
Citrulin	95 - 145	120	116	7,4	6,4	-3,5
Fenilalanin	281 - 419	350	333	12,3	3,7	-4,9
Glicin	408 - 614	511	570	50,2	8,8	11,6
Izolevcin	201 - 309	255	245	16,2	6,6	-3,8
Levcin	314 - 478	396	378	16,5	4,4	-4,5
Lizin	145 - 197	171	170	21,6	12,7	-0,8
Ornitin	266 - 388	327	299	26,1	8,7	-8,5
Serin	122 - 178	150	162	16,0	9,8	8,2
Taurin	115 - 165	140	135	6,7	4,9	-3,6
Tirozin	68 - 97	82,6	82,2	6,3	7,7	-0,4
Treonin	138 - 182	160	156	13,3	8,5	-2,3
Valin	332 - 446	389	409	18,3	4,5	5,2

Preglednica VII: Točnost metode IEC.

Aminokislina (N=7)	Pričakovani interval rezultatov v laboratoriju ($\mu\text{mol/L}$)	Povprečna vrednost proizvajalca ($\mu\text{mol/L}$)	Povprečje ($\mu\text{mol/L}$)	SD ($\mu\text{mol/L}$)	RSD (%)	RE (%)
Alanin	538 - 778	658	702	14,9	2,1	6,7
Arginin	215 - 329	272	290	2,2	0,7	6,7
Citrulin	245 - 407	326	339	2,8	0,8	4,0
Fenilalanin	403 - 643	523	547	6,5	1,2	4,7
Glicin	602 - 886	744	798	13,7	1,7	7,3
Izolevcin	136 - 204	170	172	1,8	1,1	1,4
Levcin	334 - 550	442	480	40,3	8,4	8,6
Lizin	284 - 438	361	375	4,2	1,1	3,8
Ornitin	220 - 334	277	283	3,2	1,1	2,2
Serin	122 - 174	148	130	1,8	1,4	-12,0
Taurin	135 - 203	169	183	15,9	8,7	8,3
Tirozin	210 - 328	269	277	3,4	1,2	2,9
Treonin	122 - 172	147	153	6,1	4,0	4,0
Valin	354 - 542	448	469	7,0	1,5	4,8

4.3. OPISNA STATISTIKA

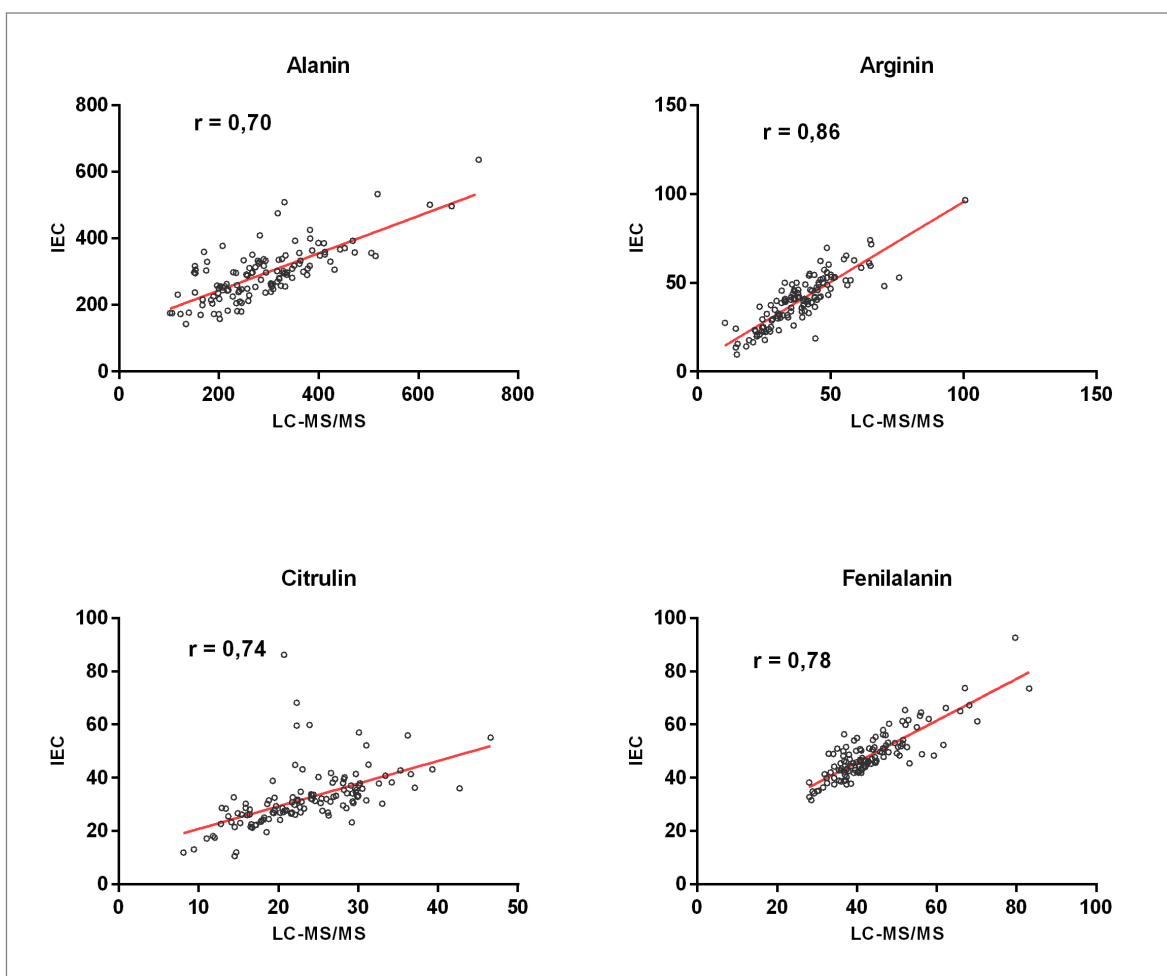
Za vse izbrane aminokisliline smo pri obeh metodah izračunali osnovne statistične parametre: velikost vzorca, najnižja in najvišja vrednost, mediana, povprečna vrednost in SD (Preglednica VIII).

Preglednica VIII: Opisna statistika rezultatov, izmerjenih s primerjanima metodama. Vse vrednosti so v $\mu\text{mol/L}$.

Aminokislina n=123	Metoda	Najnižja vrednost	Mediana	Najvišja vrednost	Povprečje	SD
Alanin	LC-MS/MS	102,2	279,6	720,6	290,2	109,5
	IEC	143,3	295,6	636,2	294,1	81,5
Arginin	LC-MS/MS	10,3	38,2	100,6	38,9	13,7
	IEC	9,5	40,5	96,5	40,5	14,3
Citruilin	LC-MS/MS	8,1	22,7	46,6	23,3	7,0
	IEC	10,6	30,8	86,2	32,2	10,7
Fenilalanin	LC-MS/MS	28,0	41,2	83,2	43,5	9,9
	IEC	31,6	47,0	92,6	48,6	9,1
Glicin	LC-MS/MS	110,7	240,6	485,3	245,5	62,6
	IEC	123,5	221,1	378,5	228,0	54,3
Izolevcin	LC-MS/MS	25,8	55,2	123,4	56,2	15,5
	IEC	24,3	49,4	96,5	51,3	13,7
Levcin	LC-MS/MS	41,1	100,0	248,5	102,6	31,5
	IEC	46,5	97,6	175,8	99,2	24,8
Lizin	LC-MS/MS	65,6	134,5	280,1	138,8	35,9
	IEC	71,5	139,9	249,7	144,5	29,6
Ornitiin	LC-MS/MS	29,1	65,8	140,3	72,1	23,6
	IEC	32,0	71,9	146,5	74,7	21,6
Serin	LC-MS/MS	78,5	132,5	254,4	135,7	32,4
	IEC	68,6	108,2	165,2	110,2	20,1
Taurin	LC-MS/MS	31,2	87,7	176,7	89,9	26,7
	IEC	29,9	83,4	255,4	89,9	33,4
Tirozin	LC-MS/MS	17,0	41,1	95,6	43,1	12,5
	IEC	21,2	50,2	90,5	51,6	11,8
Treonin	LC-MS/MS	43,0	111,3	215,0	113,9	30,7
	IEC	39,9	105,0	185,1	107,3	25,8
Valin	LC-MS/MS	88,1	198,1	382,4	199,1	51,3
	IEC	88,6	186,3	283,5	181,8	41,2

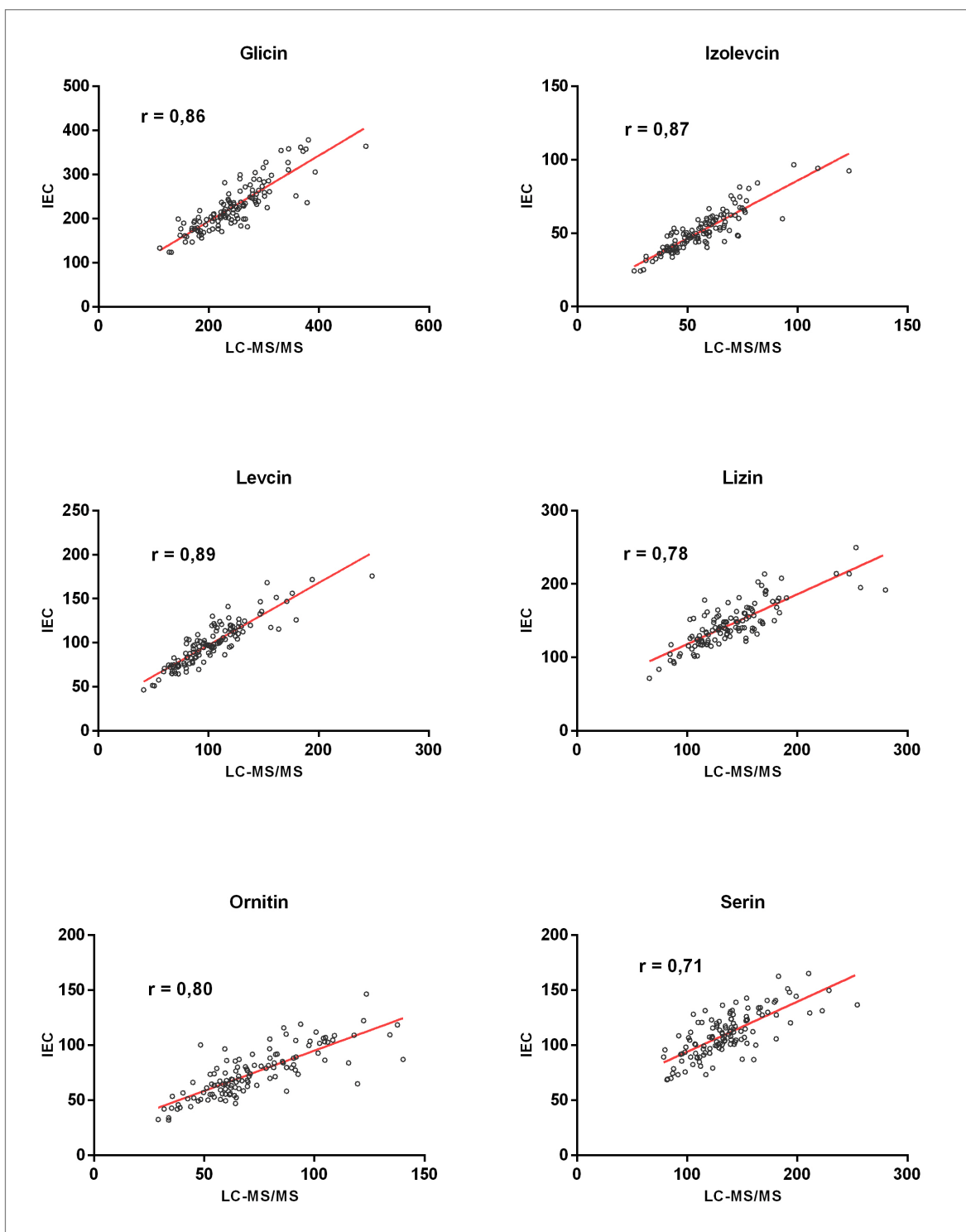
4.4. KORELACIJA

Ker se rezultati meritev niso porazdeljevali normalno, smo izračunali Spearmanov korelacijski koeficient. Grafi 14 določenih aminokislin s pripadajočimi vrednostmi korelacijskih koeficientov r , prikazujejo moč linearne povezanosti med primerjanima metodama (Slike 11, 12, 13).



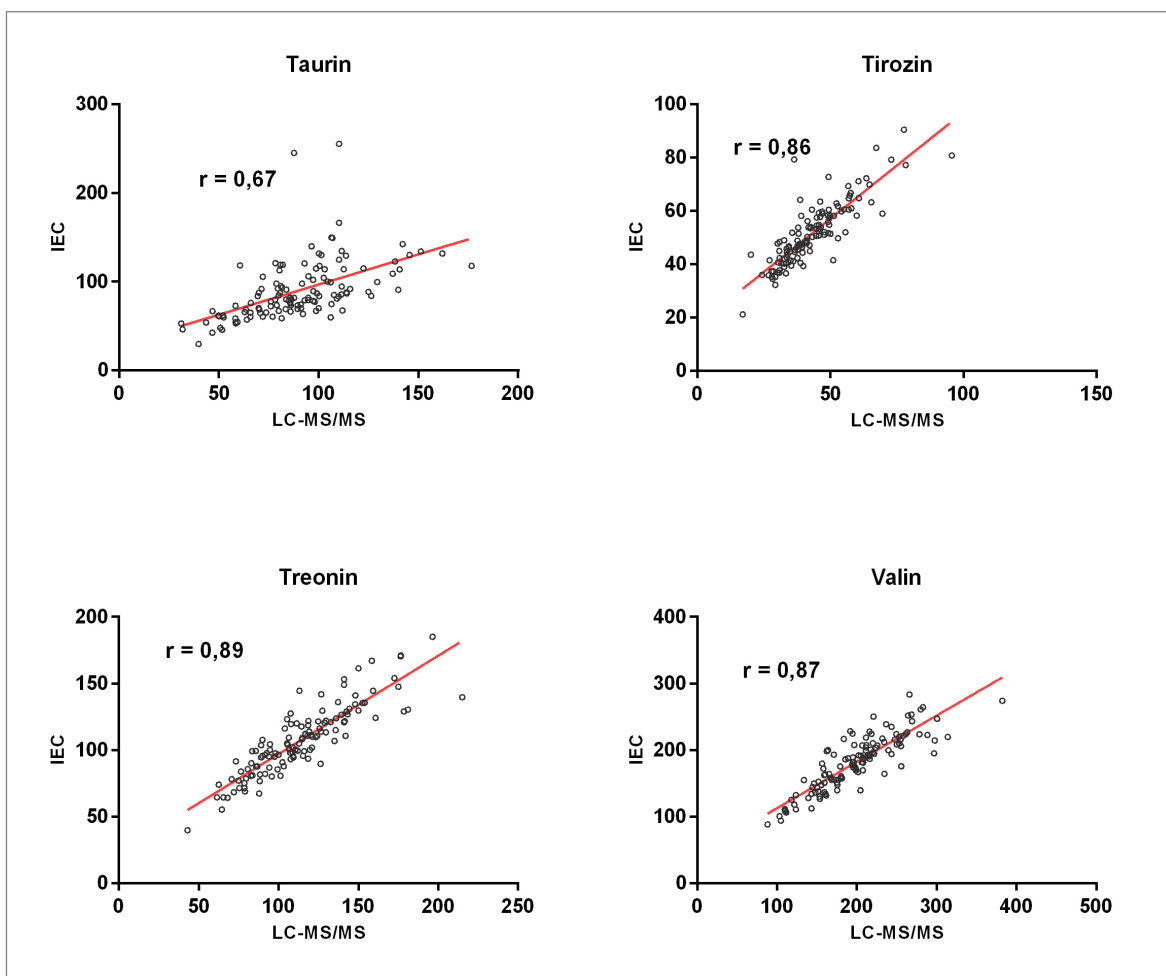
Legenda: r – Spearmanov korelacijski koeficient

Slika 11: Grafični prikazi korelacij med rezultati, izmerjenimi z metodama IEC in LC-MS/MS, za aminokislino alanin, arginin, citrulin in fenilalanin.



Legenda: r – Spearmanov korelacijski koeficient

Slika 12: Grafični prikazi korelacij med rezultati, izmerjenimi z metodama IEC in LC-MS/MS, za aminokisljine glicin, izolevcin, levcin, lizin, ornitin in serin.



Legenda: r – Spearmanov korelacijski koeficient

Slika 13: Grafični prikazi korelacij med rezultati, izmerjenimi z metodama IEC in LC-MS/MS, za aminokisljine taurin, tirozin, treonin in valin.

4.5. PRIMERJAVA METOD

Analizni metodi smo primerjali z Bland-Altmanovim testom in grafičnim prikazom razlik rezultatov, in sicer v obliki absolutnih vrednosti (Slike 14, 15, 16) ter v odstotkih. Statistično smo obdelali koncentracije 14 aminokislin, ki so zbrani v (Preglednici IX in X).

Preglednica IX: Povzetek statističnih izračunov za Bland-Altmanov test (diagram) v absolutnih vrednostih.

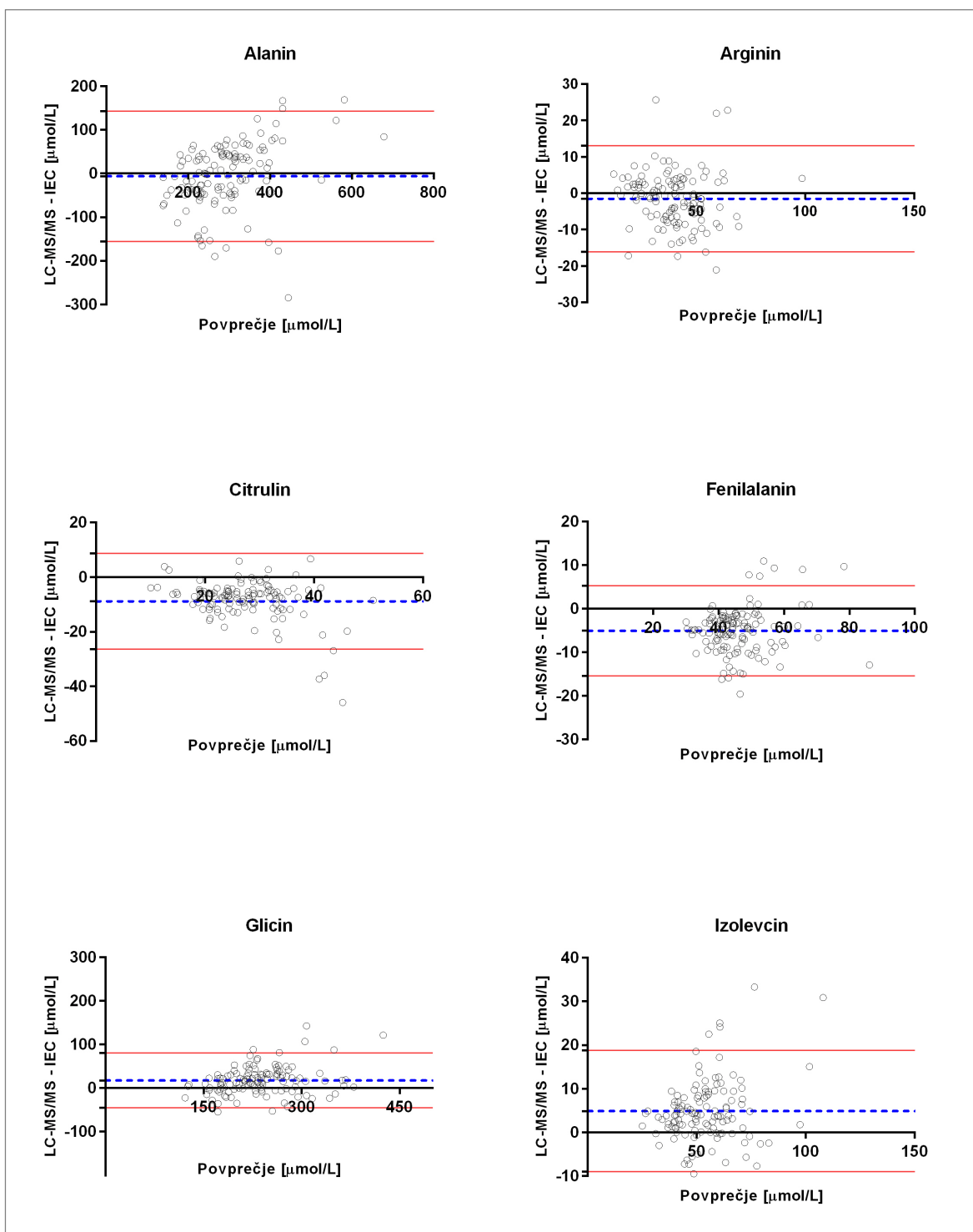
Aminokislina (n=123)	Razlika povprečij obeh metod ($\mu\text{mol/L}$)	SD razlik povprečij obeh metod ($\mu\text{mol/L}$)	95% spodnja meja razlik ($\mu\text{mol/L}$)	95% zgornja meja razlik ($\mu\text{mol/L}$)	Referenčno območje laboratorija ($\mu\text{mol/L}$)
Alanin	-6,2	76,2	-155,4	143,1	152 - 547
Arginin	-1,5	7,4	-16,2	13,1	10 - 140
Citrulin	-8,8	8,9	-26,4	8,7	1 - 46
Fenilalanin	-5,1	5,3	-15,4	5,2	26 - 91
Glicin	17,6	32,0	-45,1	80,2	127 - 341
Izolevcin	4,9	7,1	-9,0	18,8	22 - 107
Levcin	3,4	14,6	-25,1	31,9	49 - 216
Lizin	-5,7	20,6	-45,0	34,7	48 - 284
Ornitin	-2,5	14,4	-30,8	25,7	10 - 163
Serin	25,4	22,3	-18,3	69,1	69 - 187
Taurin	0,1	29,3	-57,5	57,4	10 - 170
Tirozin	-8,4	6,7	-21,5	4,7	24 - 115
Treonin	6,6	14,7	-22,3	35,4	35 - 226
Valin	17,3	25,9	-33,5	68,2	74 - 321

Legenda: n – število parov meritev; SD – standardna deviacija.

Preglednica X: Povzetek statističnih izračunov za Bland-Altmanov test (diagram) v odstotkih.

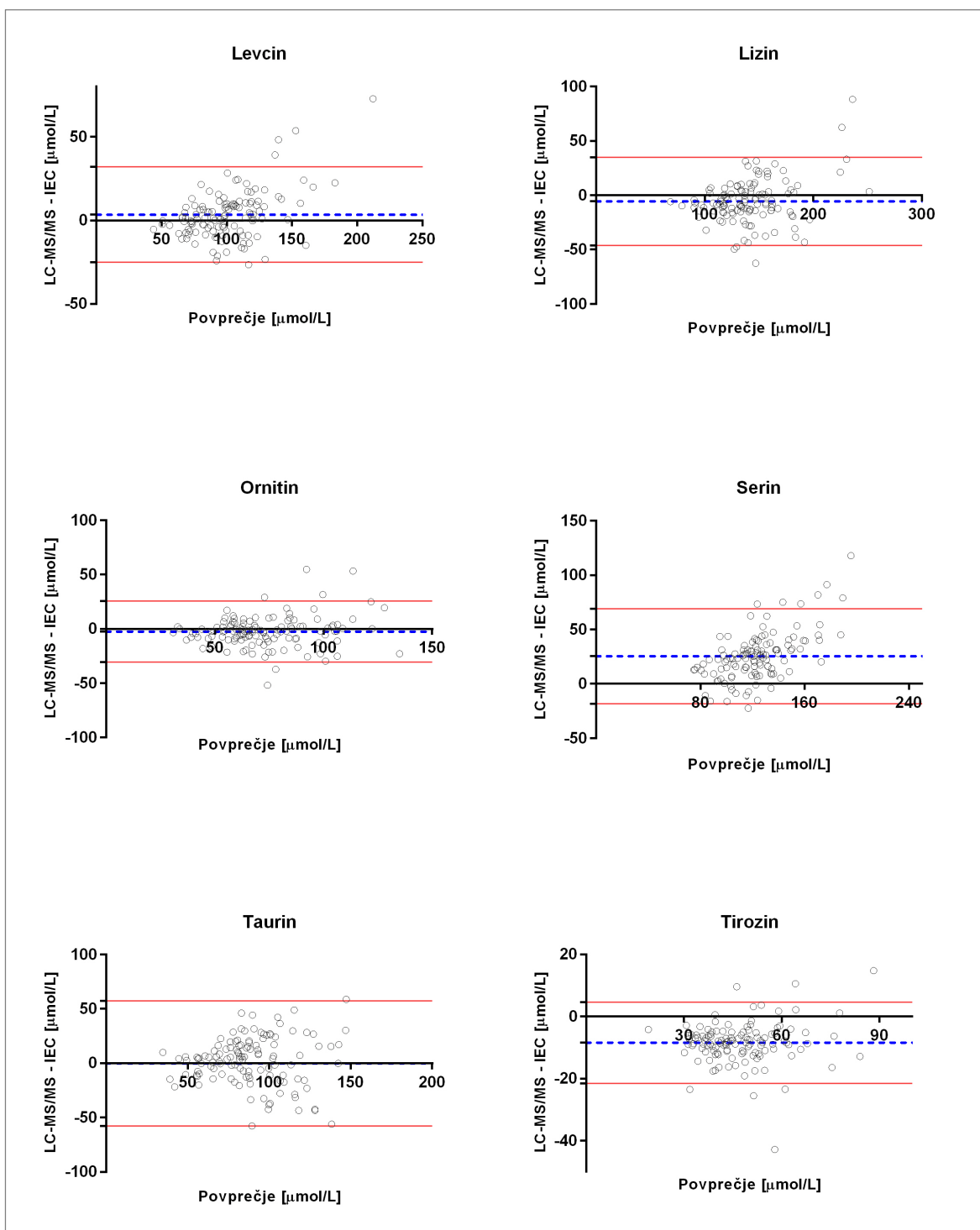
Aminokislina (n=123)	Razlika povprečij obeh metod (%)	SD od razlik povprečij obeh metod (%)	95% spodnja meja razlik (%)	95% zgornja meja razlik (%)	Referenčno območje laboratorija ($\mu\text{mol/L}$)
Alanin	-4,3	26,0	-54,4	45,8	152 - 547
Arginin	-3,1	20,6	-43,5	37,2	10 - 140
Citrulin	-31,0	23,3	-76,7	14,7	1 - 46
Fenilalanin	-11,7	11,1	-33,5	10,1	26 - 91
Glicin	6,9	12,8	-18,2	31,9	127 - 341
Izolevcin	8,9	11,7	-14,0	31,9	22 - 107
Levcin	2,1	12,2	-21,9	26,1	49 - 216
Lizin	-4,9	13,2	-30,8	21,0	48 - 284
Ornitiin	-4,5	18,2	-40,2	31,2	10 - 163
Serin	19,5	15,3	-10,5	49,6	69 - 187
Taurin	1,1	25,7	-49,3	51,5	10 - 170
Tirozin	-19,0	14,0	-46,4	8,4	24 - 115
Treonin	5,3	11,9	-18,1	28,6	35 - 226
Valin	8,4	11,8	-14,8	31,6	74 - 321

Legenda: n – število parov meritev; SD – standardna deviacija.



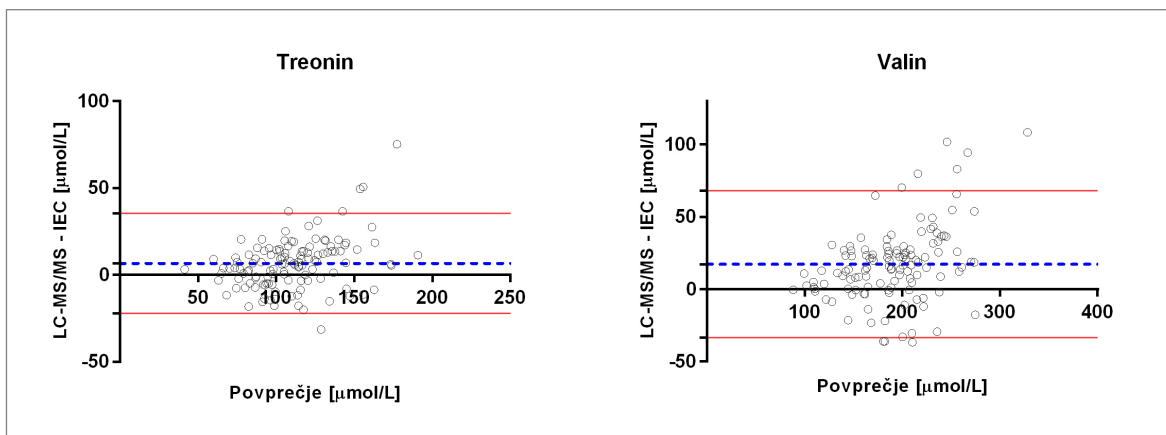
Legenda: modra prekinjena črta – razlika povprečij obeh metod, rdeči polni črti – 95% meji razlik.

Slika 14: Bland-Altmanovi diagrami razlik absolutnih vrednosti koncentracij alanina, arginina, citrulina, fenilalanina, glicina in izolevcina, določenih s primerjanima metodama.



Legenda: modra prekinjena črta – razlika povprečij obeh metod, rdeči polni črti – 95% meji razlik.

Slika 15: Bland-Altmanovi diagrami razlik absolutnih vrednosti koncentracij levcina, lizina, ornitina, serina, taurina in tirozina, določenih s primerjanima metodama.



Legenda: modra prekinjena črta – razlika povprečij obeh metod, rdeči polni črti – 95% meji razlik.

Slika 16: *Bland-Altmanova diagrama razlik absolutnih vrednosti koncentracij treonina in valina, določenih s primerjanima metodama.*

5. RAZPRAVA

Aminokislina so pomembni presnovki v človeškem telesu. Njihovo določanje v bioloških vzorcih pa je pomemben biokemijski kazalnik, uporaben za diagnostiko prirojjenih presnovnih motenj in spremljanje poteka bolezni (znane presnovne motnje) (32). Najbolj razširjena analizna metoda v kliničnih laboratorijih za kvantifikacijo aminokislin je IEC s post-kolonsko ninhidrinsko derivatizacijo, ki se je dolga leta uporabljala kot zlati standard (12). V Službi za specialno laboratorijsko diagnostiko, Pediatrične klinike smo jo želeli nadomestiti z metodo LC-MS/MS. Ključna dejavnika za to odločitev sta njena specifičnost in krajši čas analize, zanemarljiv pa ni niti majhen volumen vzorca, ki ga imamo na razpolago pri pediatričnih pacientih. Primerjavo metod smo izvedli z namenom, da ugotovimo ali dobljeni rezultati vplivajo na klinične odločitve.

Aminokislina lahko z obema primerjanima metodama določamo v plazmi, urinu in likvorju. Ker pa se motnje v presnovi aminokislin običajno najprej pokažejo z zvišanjem njihovih koncentracij v krvi, smo primerjalno analizirali plazemske vzorce 123 otrok.

5.1. PREDNOSTI IN SLABOSTI METOD IEC IN LC-MS/MS

Za pridobitev zanesljivih rezultatov potrebujemo točno in natančno analizno metodo, s širokim linearnim območjem. Pri njenem izboru stremimo k čim krajšem trajanju analize ter uporabi oz. porabi čim manjših količin vzorcev, katerih priprava mora biti nezahtevna, ter tudi reagentov in različnih raztopin.

S primerjavo metod smo ugotovili, da so prednosti IEC dobra ponovljivost, visoka ločljivost ter kratka in nezahtevna priprava vzorcev. Za kvantifikacijo moramo v tem primeru izdelati umeritveno krivuljo, z uporabo standardov aminokislin z znanimi koncentracijami. Visoki stroški vzdrževanja inštrumenta, uporaba dragih pufrov in reagentov (pufri z nizkimi vrednostmi pH, ninhidrin), daljši čas analize (2,5 h) in razmeroma veliki volumni vzorcev, pa predstavljajo njene slabosti. Težava je lahko tudi ko-elucija aminokislin ter interference zaradi morebitne prisotnosti spojin, ki reagirajo z ninhidrinom. Prednost metode pa je po drugi strani v tem, da lahko, v kolikor se v kromatogramu pojavijo, zaznamo dodatne metabolite (33, 34, 35, 36, 37).

Prednosti metode LC-MS/MS, so specifičnost, krajši čas analize (25 minut) in manjše količine analiziranih vzorcev. Poleg tega uporaba označenih IS za vsako posamezno aminokislino pripomore k zanesljivejši kvantifikaciji rezultatov. Slabost metode je, da zahteva priprava vzorca veliko časa, saj vključuje postopek derivatizacije, na koncu pa še obdelavo podatkov (33, 35, 36). Ob tem pa lahko spremljamo samo tiste analite, katerih MRM predhodno definiramo. Nenazadnje so reagenti za LC-MS/MS bistveno cenejši, vzdrževanje aparature pa je primerljivo z vzdrževanjem analizatorja IEC.

Med primerjanjem obstoječe in nove metode smo preverili njuni natančnosti in točnosti. Pri tem smo za vse analizirane aminokislino, postavili kriterij za 15% sprejemljivost napak, kar še vedno ne vpliva na klinično odločitev.

5.2. NATANČNOST

Natančnost je merilo za ponovljivost rezultatov med posameznimi serijami meritev. Kot posledica nenatančnega dela nastanejo slučajne napake, ki jih lahko s prilagoditvijo aparatov do neke mere znižamo, ne moremo jih pa popolnoma odpraviti.

Natančnost obeh metod smo preverili z 20 meritvami 14 združenih plazemskih aminokislin. Izračunali smo povprečne vrednosti, standardne odklone in relativne standardne odklone. Meritve smo izvedli med vsako serijo analiziranih vzorcev, in sicer kot notranje kontrole (Preglednici IV in V).

Z metodo LC-MS/MS smo dobili nekoliko višji vrednosti RSD (slabša natančnost) pri ornitinu (14,8%) in lizinu (11%), ki pa sta bili še vedno sprejemljivi glede na postavljeni kriterij. Pri aminokislinah fenilalaninu (4,6%), izolevcinu (4,3%), levcinu (4,6%) in tirozinu (4,4%) pa so bile vrednosti RSD < 5%, kar kaže na zelo dobro ponovljivost. Ta pa je bistvenega pomena pri interpretaciji rezultatov (fenilketonurija, tirozinemija, prisotnost razvejanih aminokislin pri spremljanju bolnikov z omejitvijo vnosa proteinov).

Večjo natančnost smo določili pri meritvah z metodo IEC. Pri večini izmerjenih aminokislin smo namreč izračunali vrednosti RSD, ki so bile < 5%. Višje vrednosti RSD smo zabeležili pri citrulinu (13,5%) in taurinu (12%), kar pomeni, da je metoda IEC za

njuno določanje najmanj natančna, čeprav še vedno sprejemljiva, glede na naš kriterij. Vzrok za to nižjo natančnost bi lahko bila slabša ločba omenjenih aminokislin ter posledične razlike v njihovih integracijah na kromatogramu. Tako se citrulin eluira tik ob alaninu, ki je prisoten v mnogo višjih koncentracijah, pri taurinu pa prav tako lahko pride do slabše ločbe vrhov.

Naši rezultati glede natančnosti metode LC-MS/MS se razlikujejo od tistih, ki so jih izmerili *Dietzen in sodelavci* na tandemskem masnem spektrometru API 3000 (Applied Biosystems) (34). Izvedli so 90-100 serumskih meritev aminokislin, vendar vzorcev niso pripravili na enak način kot mi. Njihove izračunane vrednosti RSD so bile od 8% (tirozin) – 23% (treonin). Najnižje vrednosti RSD (8-12%) pa so dobili pri aminokislinah, ki zahtevajo strogi dietni režim (fenilalanin, tirozin in razvejane aminokisljine). Te so bile višje od tistih, ki smo jih za iste aminokisljine izračunali mi (< 5%).

Held in sodelavci pa niso določali aminokislin v plazmi, ampak v urinu, in sicer z reagenčnim kompletom aTRAQ KIT (AB Sciex) na tandemskem masnem spektrometru API 4000 (AB Sciex) (33). Natančnost metode so ugotavljali s 5 meritvami kontrol z visokimi in nizkimi koncentracijami aminokislin, in sicer med serijami in znotraj serij meritev. Njihovi rezultati natančnosti meritev med serijami so primerljivi z našimi. Pri tem smo primerjali samo meritve kontrol z nizkimi koncentracijami, ker so bile podobne našim. Vrednosti RSD, ki so jih določili omenjeni avtorji so bile od 2,9% do 14,5%, pri čemer so tako kot mi, zabeležili najvišjo vrednost RSD pri ornitinu, pri lizinu pa je bila ta 2,6%, kar je manj kot v našem primeru (11%).

Tudi *Romain Filee in sodelavci* so testirali reagenčni komplet aTRAQ Kit (AB Sciex) za določanje aminokislin v fizioloških vzorcih, za meritve pa uporabili tandemski masni spektrometer TQ5500 (AB Sciex) (35). Vrednosti RSD za njihove meritve so bile od 9,7% do 18,8%, kar kaže na slabšo natančnost metode, v primerjavi z našimi meritvami.

5.3. TOČNOST

Točnost je merilo za to, kako se izmerjena vrednost ujema z dejansko. Sistematične napake vplivajo na pravilnost analiznega postopka. Lahko jih ugotovimo in skušamo odpraviti.

Med sistematične napake spadajo napake analitika, merilnih inštrumentov in napaka metode, ki je najbolj problematična, saj vpliva na vse rezultate.

Točnost posamezne metode smo izračunali s pomočjo izmerjenih vrednosti kontrolnega materiala 14 aminokislin in jo podali v obliki RE. Opravili smo 7 meritev v več zaporednih dneh in v različnih serijah vzorcev. Primerjali smo povprečne meritve kontrol s povprečnimi vrednostmi, ki jih navaja proizvajalec. Slednje so nam predstavljale prave vrednosti (Preglednici VI in VII).

Povprečja rezultatov meritev z metodo LC-MS/MS so bila pri večini aminokislin za 0,4 – 8,5% (RE) nižja od tistih, ki jih navaja proizvajalec. Izjeme so bile alanin, glicin, serin in valin, za katere smo dobili za 5,2 – 12,2% (RE) višje povprečne rezultate od povprečij proizvajalca.

Povprečja rezultatov meritev z metodo IEC so bila za 1,4 – 8,6% (RE) višja od tistih, ki jih navaja proizvajalec, z izjemo serina, pri katerem je bila ta vrednost za 12% (RE) nižja.

Točnosti meritev, ki smo jih določili za obe metodi torej ne presegajo arbitrarno določene meje 15% (RE).

V kolikor pa kot kriterij še sprejemljive točnosti postavimo pričakovani interval rezultatov v laboratoriju, ki ga podaja proizvajalec kontrolnega materiala, lahko zaključimo, da se povprečja rezultatov naših meritev s primerjanima metodama LC-MS/MS in IEC, nahajajo znotraj le-tega in so zato sprejemljiva.

Ker na točnost rezultatov lahko vplivamo tudi sami analitiki, smo morali biti zelo previdni in natančni pri raztapljanju liofiliziranega kontrolnega materiala, njegovemu shranjevanju, upoštevanju rokov uporabe odprtih in raztopljenih raztopin ter uporabi izključno umerjenih pipet. Na točnost pa je lahko vplivala tudi sama priprava vzorcev, predvsem pri metodi LC-MS/MS, ker je dolgotrajnejša in poteka v več korakih.

5.4. KORELACIJA

Iz izmerjenih podatkov smo izračunali tudi korelacijske koeficiente, ki nam povedo, kakšna sta moč povezave in smer povezanosti med primerjanima metodama. Koeficient ima lahko vrednosti med -1 in 1. Bližje kot je eni od teh skrajnih vrednosti, močnejša je povezanost metod.

Najprej smo s Kolmogorov-Smirnovim testom preverjali normalnost porazdelitev vrednosti meritev vseh 14 aminokislin, ki smo jih določili z obema metodama. Ugotovili smo, da so bile vrednosti p v vseh primerih manjše od stopnje sprejetega tveganja ($\alpha = 0,05$), kar pomeni, da se meritve niso porazdeljevale normalno.

Zato smo za izračun korelacije med meritvami, določenimi z metodo LC-MS/MS in tistimi, ki smo jih izmerili z metodo IEC, uporabili Spearmanov koeficient korelacije. Na slikah 11, 12 in 13, so prikazani koeficienti korelacije za 14 aminokislin, ki podajajo moč linearne povezanosti med primerjanima analiznima metodama.

Koeficienti korelacije za večino aminokislin so imeli vrednosti od 0,70 (alanin) do 0,89 (levcin, treonin), kar kaže na visoko stopnjo linearne povezanosti med metodama. Nižji koeficient korelacije smo izračunali pri taurinu (0,67), kar kaže na zmerno linearno povezanost metod.

Tudi *Kaspar in sodelavci* so ugotavljali korelacijo med metodama LC-MS/MS in IEC. Določali so aminokislino v urinskih vzorcih z reagentom iTRAQ, in sicer s tandemskim masnim spektrometrom API 3200 (Applied Biosystem) in z aminokislinskim analizatorjem IEC Biochrom 20 (Biochrom) (38). Izračunali so Pearsonove koeficiente korelacije, ki so primerni za normalno porazdeljene vzorce in dobili vrednosti od 0,80 (izolevcin) do 0,95 (lizin), kar predstavlja visoko povezanost med primerjanima metodama. Šibkejši koeficient korelacije (zmerna linearna povezanost metod) pa so zabeležili v primeru arginina (0,56).

5.5. PRIMERJAVA METOD LC-MS/MS IN IEC ZA DOLOČANJE AMINOKISLIN V PLAZMI

Za testiranje normalnosti porazdelitve razlik meritev med metodama smo uporabili test Kolmogorov-Smirnov in ugotovili, da se niso porazdeljevale normalno, saj so bile vrednosti $p < 0,05$. Z istim testom smo preverili tudi logaritmirane vrednosti razlik, ki pa prav tako niso bile porazdeljene normalno.

Vzrok za to so najverjetneje sistemski dejavniki prisotni pri obeh metodah, ki povzročijo, da porazdelitev razlik med obema skupinama meritev ni normalna, kar bi sicer pričakovali, saj na razlike vplivajo samo slučajni dejavniki.

Ujemanje med rezultati meritev, opravljenih z metodama LC-MS/MS in IEC smo ocenili z Bland-Altmanovim testom in diagramom. Na diagramu prikažemo povprečne vrednosti razlik (povprečnih odstopanj) meritev, izmerjenih z novo metodo LC-MS/MS in obstoječo IEC. Pri tem moramo oceniti, ali so odstopanja klinično pomembna, ali se razlika med metodama večja ali manjša, kakšna je razpršenost okrog povprečnega odklona in kako široke so meje razlik. Meji razlik nam povesta, da se 95% razlik meritev nahaja znotraj tega intervala. Širina intervala pa je odvisna od razpršenosti razlik in števila izmerjenih vzorcev.

Kriterij sprejemljivosti, ki smo ga postavili in ne vpliva na klinično odločitev, je $< 15\%$ razlik povprečnih vrednosti meritev med metodama. Za postavitve tega kriterija smo se morali posvetovati s specialistom in klinikom na tem področju, ki rezultate meritev vrednoti in interpretira. Pri primerjavi metod smo ugotovili, da so bile razlike povprečij meritev 11 aminokislin $< 15\%$, z izjemo citrulina (-31%), serina (19,5%) in tirozina (-19%). Pri citrulinu smo z metodo IEC v absolutnih vrednostih izmerili za 8,8 $\mu\text{mol/L}$ višje rezultate, pri čemer je bil interval 95% meje razlik od -26,4 do +8,7 $\mu\text{mol/L}$. To odstopanje je verjetno posledica že omenjene slabše ločbe citrulina pri uporabi IEC, saj se eluira tik ob alaninu, ki je prisoten v mnogo višjih koncentracijah. Tudi pri alaninu smo z metodo IEC izmerili za 4,3% višje rezultate, v primerjavi z LC-MS/MS. Za absolutne vrednosti alanina je bila tako razlika povprečij 6,2 $\mu\text{mol/L}$, 95% meji razlik pa med -155,4 do +143,1 $\mu\text{mol/L}$. Na diagramu smo opazili porazdelitev točk v obliki troblje, kar pomeni da se povprečna napaka spreminja z velikostjo merjene vrednosti, zato pri višjih koncentracijah

analita dobimo večje razlike. Kljub širokemu intervalu razlik, pa smo bili še vedno znotraj zastavljenega referenčnega območja laboratorija, ki je 152 – 547 $\mu\text{mol/L}$.

Fenilalanin in tirozin sta aminokislini, pomembni za odkrivanje in spremljanje bolnikov z fenilketonurijo. V povprečju smo z metodo IEC pri fenilalaninu izmerili za 11,7%, pri tirozinu pa za 19% višje vrednosti kot z LC-MS/MS. Razlika absolutnih vrednosti za fenilalanin je bila 5,1 $\mu\text{mol/L}$, 95% meja razlik pa od -15,4 do +5,2 $\mu\text{mol/L}$, za tirozin pa 8,4 $\mu\text{mol/L}$ in 95% mejo razlik od -21,5 do +4,7 $\mu\text{mol/L}$. Če 95% meje razlik pri fenilalaninu primerjamo s precej široko postavljenim referenčnim območjem laboratorija, vidimo, da variabilnost rezultatov, izmerjenih s primerjanima metodama ne vpliva na interpretacijo rezultatov oz. na samo diagnostiko. Glede na podatke iz literature, ki kažejo, da se pri višjih koncentracijah lahko vrednosti razlik meritev fenilalanina med primerjanima metodama še povečajo, moramo biti previdni predvsem pri spremljanju bolnikov s fenilketonurijo (39, 40). V obeh citiranih člankih so primerjali rezultate določitev fenilalanina z metodo IEC v plazemskih vzorcih in z metodo LC-MS/MS iz krvnih madežev. Pri določanju tirozina pa so opazili, da so bile razlike povprečij med primerjanima metodama nad 15%, kar bi lahko vplivalo na klinično odločitev glede vodenja diete bolnikov. Zato je zelo priporočljivo, da bolnike vedno kontroliramo z isto analizno metodo.

Klinično pomembne aminokislino za odkrivanje in spremljanje aminoacidopatij so tudi razvejane aminokislino, levcin, valin, izolevcin, poleg teh pa še glicin in treonin. Pri omenjenih aminokislinah smo z metodo LC-MS/MS izmerili od 2,1% (levcin) do 8,9% (izolevcin) višje rezultate v primerjavi z IEC. Najboljše ujemanje med metodama smo opazili pri taurinu, kjer smo izmerili za 1,1% višje rezultate z metodo LC-MS/MS. Slabše ujemanje pa je bilo pri serinu, kjer smo z metodo IEC dobili za 19,5% nižje rezultate. Znižane vrednosti serina so klinično pomembne, saj lahko kažejo na motnje zaradi njegovega pomanjkanja, kar moramo seveda upoštevati pri interpretaciji (4). Vzrok za ugotovljene večje razlike med vrednostmi meritev pri serinu bi lahko bilo prekrivanje oziroma slabša ločba vrhov pri metodi IEC (37).

Ujemanje meritev, določenih z obema metodama smo ocenili tudi pri argininu (-3,1%), lizinu (-4,9%) in ornitinu (-4,5%), in ugotovili, da smo z metodo IEC izmerili za < 5% višje rezultate v primerjavi z LC-MS/MS.

Da se analizni metodi dobro ujemata, so ugotovili tudi v študiji, ki so jo izvedli *Le in sodelavci* (37). Noderivatizirane aminokisliline v plazmi so določali s tandemskim masnim spektrometrom Agilent 6460 (Agilent Technologies) in z aminokislinskim analizatorjem IEC Biochrom 30 (Biochrom). Pri večini aminokislilin, ki smo jih določali tudi mi, so izračunali < 15% razlike povprečij meritev, razen pri glicinu (21%), alaninu (20%) in serinu (18%), kjer so z metodo LC-MS/MS izmerili višje vrednosti. Tako kot mi, pa so pri tirozinu opazili za 19% višje rezultate, določene z metodo IEC.

Do zelo podobnih ugotovitev so prišli tudi *Huub Waterval in sodelavci* (36). Meritve plazemskih vzorcev, opravljene s tandemskim masnim spektrometrom Micromass Quattro Premier XE (Waters) so primerjali s tistimi, ki so jih določili z aminokislinskim analizatorjem IEC Biochrom 20 (Biochrom). Razlike povprečij, ki so bile > 15% so izračunali pri citrulinu (25%) in lizinu (19%), kot vzrok pa navedli njuni slabši ločbi pri uporabi metode IEC.

V omenjenih študijah opozarjajo na veliko prednost uporabe metode LC-MS/MS, in sicer predvsem zaradi njene večje specifičnosti in krajšega časa, ki je potreben za analizo. Zato so se odločili, da metodo, ki je bila dolga leta zlati standard, torej IEC, zamenjajo z LC-MS/MS.

Tudi mi lahko zaključimo, da so ugotovljene razlike povprečij meritev večine aminokislilin v plazemskih vzorcih, določenih s primerjanima metodama, sprejemljive za nadaljnjo interpretacijo. V primeru uporabe metode LC-MS/MS nismo potrebovali ponovne postavitve referenčnih vrednosti za posamezne aminokisliline, z izjemo citrulina. Pomembno je tudi, da rezultate meritev redno preverjamo z uporabo kontrolnega materiala in zunanjih kontrol ter ob ugotovljenih večjih odstopanjih ustrezno ukrepamo. V našem laboratoriju uporabljamo zunanje kontrole vzorcev iz sheme ERNDIM (European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism). Tekom leta moramo oddati meritve 8 prejetih

vzorcev iz sheme (4 pare), do točno določenega termina. Sproti dobimo rezultate posamezne kontrole v primerjavi z vsemi ostalimi laboratoriji, vključenimi v shemo. Na koncu leta pa organizatorji sheme iz vseh dobljenih rezultatov preračunajo in podajo naslednje parametre za posamezne aminokislino: točnost, natančnost, linearnost in odstopanje med laboratoriji.

Ugotovimo lahko, da ima vsaka od primerjanih analiznih metod svoje značilnosti, ki jih moramo upoštevati ob interpretaciji rezultatov, zato je pomembno, da bolnike spremljamo vedno z uporabo iste metode.

6. SKLEP

- Uspešno smo izvedli primerjavo analiznih metod LC-MS/MS in IEC za določanje prostih aminokislin v plazemskih vzorcih in ujemanje med njima ovrednotili z Bland-Altmanovim testom in diagramom. Metodama smo določili tudi natančnost in točnost.
- Z metodo IEC smo za večino analitov dobili bolj natančne rezultate, kar je tudi njena prednost. Izračunane vrednosti RSD pri nobeni od metod niso presegle arbitrarno določenega 15% praga sprejemljivosti.
- Tako z metodo IEC kot z LC-MS/MS smo z analizo kontrolnega materiala dobili rezultate, ki so bili znotraj pričakovanega intervala, ki ga podaja proizvajalec, kar potrjuje točnost obeh.
- Izračunani korelacijski koeficienti so bili za večino aminokislin $> 0,70$, kar pomeni visoko stopnjo linearne povezanosti med primerjanima metodama.
- Ocenili smo dobro ujemanje med metodama, zato lahko LC-MS/MS uspešno nadomesti IEC. Izračunane povprečne razlike meritev, določenih s primerjanima metodama v večini primerov ne vplivajo na klinično interpretacijo rezultatov.
- Za spremljanje bolnikov na terapiji (npr. bolniki s fenilketonurijo) je priporočljivo, da za določanje aminokislin vedno uporabimo isto analizno metodo.

7. LITERATURA

1. C. A. Burtis, E. R. Ashwood, D. E. Burns: Teitz Text book of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Fourth edition, St. Louis, Missouri 2006; 20: 533 – 541.
2. M. L. Bishop, E. P. Fody, L. E. Schoeff: Clinical Chemistry, Sixth edition, Walters Kluwer, Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia, 2010; 10: 223 – 233
3. R. Boyer: Temelji biokemije, Študentska založba, 2005: 19: 524 – 555
4. J. Zschocke, Georg F. Hoffmann: Vademecum Metablicum, Diagnosis and Treatment of Inborn Errors of Metabolism, 3 edition, Milupa metabolics, Germany, 2011; 54 – 79.
5. N. Blau, M. Duran, K. Michael Gibson: Laboratory Guide to the Methods of Biochemical Genetics, Springer, 2008; 53 – 89.
6. J. Fernandes, J. M. Saudubray, G. van den Berghe, J. H. Walter: Inborn Metabolic Diseases Diagnosis and Treatment, Fourth, Revised Edition, Springer, Germany, 2000: 53 – 55
7. G. Schlegel, R. Scholz, K. Ullrich, R. Santer, G. M. Rune: Phenylketonuria: Direct and indirect effects of phenylalanine; Experimental Neurology; 2016, 281, 28–36
8. S. E. Snyderman, P. M. Norton, E. Roitman, L. E. Holt: Maplesyrup urine disease, with particular reference to dietotherapy; Pediatrics 1964, 34, 454-472.
9. N. A. J. Carson, C. E. Dent, C.M. B. Field, G. E. Gaull: Homocystinuria: Clinical and pathological review of ten cases, The Journal of pediatrics; 1965, 66: 3: 565-583.
10. D. Valle, M. Walser, S. W. Brusilow, and M. Kaiser-Kupfer: Gyrate Atrophy: Amino Acids and Correction of Hyperornithinemia, The American Society for Clinical Investigation, 1980, 65: 371-378.
11. D. A. Applegarth, J. R. Toone: Nonketotic Hyperglycinemia (Glycine Encephalopathy): Laboratory Diagnosis Molecular Genetics and Metabolism 74, 2001, 139-146
12. N. Blau, M. Duran, K. Michael Gibson, C. Dionisi-Vici: Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-up of inherited Metabolic diseases, Springer, Germany, 2014; 49:749 – 761.

13. C. Cooper, N. Packer, K. Williams: Amino Acid Analysis Protocols; Methods in Molecular Biology; 159; Humana Press.
14. A. Weston, P. R. Brown: HPLC and CE, Principles and Practise; Saunders Company, 1997; USA, 1,2; 1-133
15. V. R. Meyer: Practical High-Performance Liquid Chromatography, Fifth edition; Wiley, 2010, United Kingdom; 17-55.
16. J. R. Chapman: Methods in Molecular Biology, Vol 61, Protein and Peptide Analysis by Mass Spectrometry; Humana Press, Totowa, NJ 9 – 28.
17. E. de Hoffmann and V. Stroobant: Mass Spectrometry; Principles and Applicatons, Third Edition; Wiley, 2007, England, 1-324
18. C. Dass: Principles and Practice of Biological Mass Spectrometry; John Wiley and Sons, 2001, New York; 36 – 99.
19. C. S. Ho, C. W. K. Lam, M. H. M. Chan, R. C. K. Cheung, L. K. Law, L. C. W. Lit, K. F. Ng, M. W. M. Suenand, H. L. Tai: Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications; ClinBiochem Rev, Vol 24, February 2003.
20. R. Ekman, J. Silberring, A. M. Westman-Brinkmalm, A. Kraj: Mass Spectrometry; John Wiley and Sons, 2009, Canada, 15 -92.
21. J. E. Coligan, B. M. Dunn, D. W. Speicher, P. T. Wingfield (eds.): Current Protocols in Protein Science; John Wiley&Sons, 2003, Chapter 8
22. J. Cazes: Encyclopedia of Chromatography; Marcel Dekker, 2002 New York
23. J. Weiss; Handbook of Ion Chromatography, Third edition, Wiley-VCH, 2004, Weinheim: 13-349.
24. J. S. Fritz and D. T. Gjerde: Ion Chromatography, 4th Ed., WILEY-VCH, Weinheim: 1-204.
25. M. Žorž, HPLC, Ljubljana: samozaložba, 1991
26. Pinnacle Operators Manual; Pickering Laboratories Inc.; USA, Version 6, January 2012
27. J. N. Miller, J. C. Miler: Statistics and Chemometrics for analytical Chemistry, Sixth edition; Pearson, England, 2010, 1, 2: 1 – 35
28. J. Lajovic: Ujemanje metod merjenja-praktični pristop. Revija ISIS, 2010; 1318 – 0193.

29. J. M. Bland, D. G. Altman: Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet*, 1986; 307 – 310.
30. D. Giavarina: Understanding Bland Altman analysis; *Biochemia Medica* 2015; 25(2): 141 - 51.
31. J. M. Bland, D. G. Altman: *Statistical Methods in Medical Research*, Arnold 1999; 8: 135 – 160.
32. H. C. M. T. Prinsen, B. G. M. Schiebergen-Bronkhorst, M. W. Roeleveld, J. J. M. Jans, M. G. M. de Sain.van der Velden, G. Visser, P. M. van Hasselt, N. M. Verhoeven-Duif: Rapid quantification of underivatized amino acids in plasma by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled with tandem mass-spectrometry; April 2016; Springerlink. com.
33. P. K. Held, L. White, M. Pasquali: Quantitative urine amino acid analysis using liquid chromatography tandem mass spectrometry and aTRAQ reagents; *Journal of Chromatography B*, 879 (2011) 2695 – 2703.
34. D. J. Dietzen, A. L. Weindel, M. O. Carayannopoulos, M. Landt, E. T. Normansell, T. E. Reimschisel and C. H. Smith: Rapid comprehensive amino acid analysis by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: Comparison to cation exchange with post-column ninhydrin detection; *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2008; 22: 3481 – 3488.
35. R. Filee, R. Schoos, F. Boemer: *Evaluation of Physiological Amino Acids Profiling by Tandem Mass Spectrometry*; Springer-Verlag Berlin 2013, JIMD Reports.
36. W. A. Huub Waterval, Jean L. J. M. Scheijen, Marjon M. J. C. Ortman-Ploemen, C. D. Habets-van der Poel, J. Bierau: Quantitative UPLC-MS/MS analysis of underivatized amino acids in body fluids is a reliable tool for the diagnosis and follow-up of patients with inborn errors of metabolism; *Clinica Chimica Acta* 407 (2009) 36 – 42.
37. A. Le, A. Ng, T. Kwan, K. Cusmano-Ozog, T. M. Cowan: A rapid, sensitive method for quantitative analysis of underivatized amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); *Journal of Chromatography B*, 944 (2014) 166 – 174.
38. H. Kaspar, K. Dettmer, Q. Chan, S. Daniels, S. Nimkar, M. L. Daviglus, J. Stamler, P. Elliott and P. J. Oefner: *Urinary Amino Acid Analysis: A comparison of*

- iTRAQ-LC-MS/MS, GC-MS, and Amino Acid Analyzer; *J. Chromatogr. B.* 877 (2009), 1838 – 1846.
39. C. O. Gregory, C. Yu, R. H. Singh: Blood phenylalanine monitoring for dietary compliance among patients with phenylketonuria: comparison of methods; *Genet Med* 2007; 9: 761 – 5.
40. U. Grošelj, S. Murko, M. Žerjav Tanšek, J. Kovač, A. Trampuš Bakija, B. Repič Lampret, T. Battelino: Comparison of tandem mass spectrometry and amino acid analyzer for phenylalanine and tyrosine monitoring – implications for clinical management of patients with hyperphenylalaninemia; *Clinical Biochemistry* 2014.

8. VIRI SLIK

1. <http://iweb.langara.bc.ca/biology/mario/Biol2430notes/biol2430chap6.html>.; (dostopano 2. 2. 2017).
2. <https://s-media-cache-ak0.pinimg.com/originals/ed/c0/ca/edc0ca6e8323df7bce06fd72ab5eca80.gif> (dostopano 2. 2. 2017).
3. <https://eucbeniki.sio.si/kemija3/1265/index3.html> (dostopano 2. 2. 2017).
4. <https://www.hindawi.com/journals/ijac/2012/282574/fig6/> (dostopano 2. 2. 2017).
5. <http://www.nature.com/nmeth/journal/v10/n1/abs/nmeth.2309.html> (dostopano 2. 2. 2017).
6. <https://biogenediary.files.wordpress.com/2014/02/ninhydrin.gif> (dostopano 2. 2. 2017).
7. https://www.researchgate.net/figure/230701652_fig1_Fig-4-The-typical-assembly-of-post-column-derivatization-system-with-HPLC-used-for (dostopano 2. 2. 2017).

PRILOGE

Priloga 1: Meritve združenih vzorcev plazme z metodo LC-MS/MS, za izračun natančnosti.

AK (n=20)	Ala	Arg	Cit	Phe	Gly	Ile	Leu	Lys	Orn	Ser	Tau	Tyr	Thr	Val
1	534,5	148,0	26,3	129,5	360,3	92,6	159,5	179,4	83,8	255,8	160,1	84,9	139,6	264,9
2	461,3	118,3	28,7	127,3	390,3	90,5	154,8	172,3	101,4	254,8	153,2	83,7	132,6	268,6
3	501,7	140,3	30,1	134,5	434,3	86,1	172,1	223,4	101,7	253,0	157,3	90,9	134,8	289,0
4	514,6	127,7	29,3	130,0	382,8	90,8	169,1	187,3	97,7	237,4	153,8	88,7	133,9	263,7
5	503,5	139,7	24,5	125,4	379,6	91,1	145,6	154,0	88,0	256,6	140,4	78,3	137,8	270,3
6	522,4	130,6	27,0	135,1	404,9	89,1	160,9	183,9	99,2	249,9	157,2	85,6	133,8	284,4
7	442,0	127,7	28,3	135,0	361,7	91,6	166,1	180,1	88,8	239,2	159,7	88,3	119,9	260,4
8	492,7	122,8	24,9	117,4	361,1	83,0	161,0	186,3	70,8	218,8	132,3	82,4	120,3	231,5
9	481,5	128,5	23,9	121,2	326,2	86,1	166,9	164,8	77,4	216,4	139,1	83,1	116,5	234,2
10	482,3	130,5	24,5	121,6	363,3	89,9	154,2	189,6	68,1	232,9	140,6	76,4	115,0	247,4
11	485,8	129,0	25,7	115,8	330,1	87,9	160,8	158,8	81,6	221,0	138,7	78,1	116,8	252,0
12	506,1	140,5	25,7	127,5	358,1	90,2	163,6	153,0	82,3	244,7	164,4	86,8	114,8	262,7
13	495,7	144,6	28,3	129,8	367,4	89,1	176,0	195,3	115,7	244,0	140,2	84,7	130,1	255,1
14	556,7	137,1	25,2	115,3	368,4	83,1	165,0	146,7	95,7	219,6	140,3	84,9	133,9	260,7
15	452,1	120,1	26,7	127,9	346,5	81,5	165,0	181,6	73,3	218,3	144,0	84,6	123,6	269,5
16	451,1	130,2	25,3	121,0	345,2	90,8	150,0	163,7	78,9	211,7	146,9	83,7	137,0	265,8
17	534,1	120,1	25,4	125,1	355,4	84,7	153,3	155,8	76,7	229,7	136,0	87,8	129,4	277,2
18	471,6	114,9	27,0	127,5	346,1	79,3	157,9	144,7	70,6	195,4	131,3	80,7	113,9	243,0
19	567,0	146,8	27,2	125,4	425,5	84,7	160,1	177,3	95,7	255,1	160,5	84,1	133,0	274,6
20	500,0	153,1	27,2	127,4	414,9	88,4	167,6	185,8	96,5	234,6	157,6	82,4	122,1	273,9
Povprečje ($\mu\text{mol/L}$)	497,8	132,5	26,6	126,0	371,1	87,5	161,5	174,2	87,2	234,4	147,7	84,0	126,9	262,4
SD ($\mu\text{mol/L}$)	34,0	10,8	1,7	5,9	29,9	3,8	7,5	19,2	12,9	17,6	10,6	3,7	8,8	15,2
RSD (%)	6,8	8,1	6,5	4,6	8,1	4,3	4,6	11,0	14,8	7,5	7,1	4,4	6,9	5,8

Priloga 2: Meritve združenih vzorcev plazme z metodo IEC, za izračun natančnosti.

AK (n=20)	Ala	Arg	Cit	Phe	Gly	Ile	Leu	Lys	Orn	Ser	Tau	Tyr	Thr	Val
1	553,9	146,4	32,42	212,5	364,2	76,1	166,4	201,3	94,9	194,3	131	70,2	140,9	252,2
2	557,4	146,5	34,2	213,2	365,8	76,1	165,4	201	94	193,8	131,4	69,3	141,9	254,6
3	560,8	148,1	38,4	214,1	374,4	78,1	168,3	211,2	96,3	201,6	135,2	69,9	147,4	261,2
4	558,8	147	33,4	214,5	367,7	78,1	171,5	205,1	96,7	204,3	175,8	75,3	149,2	262,3
5	563,2	148,8	36,6	216,6	369,3	78,4	170,9	211,7	97,4	202,9	134,6	75,5	148,3	258,8
6	506,4	134,2	33,3	195,3	334,6	70,6	154,2	191,5	88,1	182,4	123,8	67,8	134,1	235,1
7	545,5	143,5	36,1	209	358,6	75	165,3	203,4	94,2	194,3	126,9	71,7	142,8	250,8
8	562,9	147	36,8	213,9	370,6	77,9	168,8	209,5	96,1	201,8	183,9	70	146	261,2
9	512,8	135,2	34,5	196,7	338,8	71,1	152,7	194,5	88,4	185,8	124,6	63,8	136,3	238,8
10	547,1	142,6	35,3	209,6	361,8	76,3	164,6	202,6	93,4	196,9	173	68,9	143,2	251,7
11	554,7	147,7	36	214	365,6	77,6	167,7	208,6	96	197,9	134,1	70	144,8	257
12	561,6	147,4	35,2	213,2	370,1	78	169,3	209,6	96,6	202,5	141,7	74,4	146,1	256
13	562,4	147,2	36,9	214,3	371	77,7	167,7	209,7	96,3	202,9	138,3	70,1	148,8	256,5
14	568,5	147,5	26,3	215,7	369,7	81,3	173,9	215,5	97,5	205,8	130,9	75	148,7	264,9
15	557,7	144,7	25,4	212,3	363,2	78,2	169,7	217,3	96,2	194,9	128,8	72,5	146,1	258,9
16	571	147	25,1	215,1	367,2	80,7	172,7	222,1	96	202,7	141	74,7	146,2	263,2
17	561	153,4	27,2	212,8	363,6	77,4	169,2	211,9	94,2	200	125,2	72,8	146,6	260
18	590,5	164,2	28,9	236,7	378,9	87,2	188,1	230,6	103,1	212	131	82,4	156,9	282,7
19	578,8	148,8	32,1	218,9	378,3	79,3	173,5	212,7	96,8	202,5	129	74,9	150,8	281,7
20	554,1	145,5	26	216	364,2	78	170	209,9	94,8	199,8	124,6	71,1	143,9	261,5
Povprečje ($\mu\text{mol/L}$)	556,5	146,6	32,5	213,2	364,9	77,7	168,5	209,0	95,4	199,0	138,2	72,0	145,5	258,5
SD ($\mu\text{mol/L}$)	19,0	6,0	4,4	8,1	10,9	3,4	7,1	8,9	3,1	6,8	17,8	3,9	5,0	11,1
RSD (%)	3,4	4,1	13,5	3,8	3,0	4,4	4,2	4,3	3,3	3,4	12,9	5,4	3,4	4,3

Priloga 3: Meritve kontrolnega materiala aminokislin z metodo LC-MS/MS, za izračun točnosti.

.AK (n=7)	Pričakovan interval rezultatov v laboratoriju ($\mu\text{mol/L}$)	Povprečna vrednost proizvajalca ($\mu\text{mol/L}$)	1	2	3	4	5	6	7	Povprečje ($\mu\text{mol/L}$)	SD ($\mu\text{mol/L}$)	RSD (%)	RE (%)
Ala	307 - 435	371	403	410	411	379	394	436	481	416	33,6	8,1	12,2
Arg	245 - 387	316	315	314	290	293	267	338	325	306	24,0	7,9	-3,2
Cit	95 - 145	120	117	113	110	117	106	118	129	116	7,4	6,4	-3,5
Phe	281 - 419	350	319	342	326	327	321	349	345	333	12,3	3,7	-4,9
Gly	408 - 614	511	556	590	519	536	521	635	635	570	50,2	8,8	11,6
Ile	201 - 309	255	239	251	241	228	227	258	272	245	16,2	6,6	-3,8
Leu	314 - 478	396	369	390	382	374	348	394	391	378	16,5	4,4	-4,5
Lys	145 - 197	171	163	175	160	156	143	180	210	170	21,6	12,7	-0,8
Orn	266 - 388	327	296	275	275	297	292	308	352	299	26,1	8,7	-8,5
Ser	122 - 178	150	149	162	155	148	155	177	191	162	16,0	9,8	8,2
Tau	115 - 165	140	127	137	139	128	130	144	140	135	6,7	4,9	-3,6
Tyr	68 - 97	82,6	81,3	81,1	81,8	77,8	73,1	88,6	92,0	82,2	6,3	7,7	-0,4
Thr	138 - 182	160	155	152	149	143	148	181	168	156	13,3	8,5	-2,3
Val	332 - 446	389	403	413	406	391	388	440	424	409	18,3	4,5	5,2

Priloga 4: Meritve kontrolnega materiala aminokislin z metodo IEC, za izračun točnosti.

AK (n=7)	Pričakovan interval rezultatov v laboratoriju ($\mu\text{mol/L}$)	Povprečna vrednost proizvajalca ($\mu\text{mol/L}$)	1	2	3	4	5	6	7	Povprečje ($\mu\text{mol/L}$)	SD ($\mu\text{mol/L}$)	RSD (%)	RE (%)
Ala	538 - 778	658	690	684	694	707	712	728	699	702	14,9	2,1	6,7
Arg	215 - 329	272	293	289	291	291	290	291	287	290	2,2	0,7	6,7
Cit	245 - 407	326	337	338	341	336	339	344	337	339	2,8	0,8	4,0
Phe	403 - 643	523	544	541	547	542	551	560	547	547	6,5	1,2	4,7
Gly	602 - 886	744	804	771	798	800	811	811	792	798	13,7	1,7	7,3
Ile	136 - 204	170	171	172	171	171	173	176	173	172	1,8	1,1	1,4
Leu	334 - 550	442	454	450	461	538	539	466	452	480	40,3	8,4	8,6
Lys	284 - 438	361	375	369	373	374	371	379	381	375	4,2	1,1	3,8
Orn	220 - 334	277	282	281	280	282	281	288	288	283	3,2	1,1	2,2
Ser	122 - 174	148	127	130	131	132	133	131	129	130	1,8	1,4	-12,0
Tau	135 - 203	169	170	181	180	158	205	195	192	183	15,9	8,7	8,3
Tyr	210 - 328	269	274	275	277	271	280	279	280	277	3,4	1,2	2,9
Thr	122 - 172	147	144	147	149	155	160	157	158	153	6,1	4,0	4,0
Val	354 - 542	448	462	465	471	467	471	484	467	469	7,0	1,5	4,8

Priloga 5: Rezultati meritev 14 aminokislin v 124 plazemskih vzorcih z metodo LC-MS/MS.

AK (n=123)	Ala	Arg	Cit	Phe	Gly	Ile	Leu	Lys	Orn	Ser	Tau	Tyr	Thr	Val
1	187,0	35,2	16,4	35,1	181,3	73,7	117,7	115,7	59,4	97,9	110,3	30,9	83,6	183,8
2	304,0	24,2	36,2	50,7	290,3	58,0	119,1	133,4	91,5	154,3	96,5	52,9	142,0	234,6
3	468,2	39,2	22,1	65,9	252,6	75,8	171,0	235,4	65,9	139,3	106,9	60,7	135,0	288,6
4	399,2	32,9	17,2	48,1	226,7	77,9	147,0	102,4	54,5	134,6	110,3	46,9	94,6	243,6
5	256,5	24,9	29,8	37,4	184,8	44,7	88,7	110,1	68,7	105,0	113,7	31,5	75,5	174,9
6	361,0	27,9	20,2	46,6	238,2	63,2	119,8	164,3	87,2	134,9	80,8	46,4	129,7	232,2
7	505,5	56,3	33,0	83,2	258,3	123,4	248,5	247,1	101,7	123,0	94,9	65,4	118,6	382,4
8	199,9	23,3	17,1	35,5	128,0	67,9	132,8	84,6	35,2	85,2	80,4	29,3	68,1	282,9
9	245,1	42,4	30,2	46,6	147,7	48,2	107,8	118,0	60,1	122,2	82,1	46,1	89,9	218,5
10	431,8	41,8	29,2	61,7	270,1	73,1	156,5	183,7	89,6	149,9	142,2	95,6	181,1	314,1
11	279,6	35,5	16,4	32,9	149,3	42,4	82,3	144,7	52,7	102,2	60,6	39,0	105,4	194,6
12	242,0	44,9	25,5	36,8	250,5	53,7	101,4	138,7	59,6	144,2	92,9	50,0	160,8	243,6
13	383,1	21,5	9,4	35,9	298,8	31,2	59,9	85,2	35,5	94,9	31,2	24,3	62,5	110,0
14	273,3	23,3	15,2	36,6	174,1	43,9	89,9	105,7	57,1	132,1	102,6	30,1	89,9	158,1
15	514,2	39,4	39,3	70,2	358,3	66,8	179,6	257,4	134,3	193,8	126,4	59,9	178,5	297,5
16	217,6	14,4	12,9	51,4	186,4	30,0	72,5	65,6	53,4	98,0	162,0	36,0	72,0	123,8
17	234,9	24,8	22,3	34,3	217,0	34,1	66,6	88,1	57,4	111,0	86,3	47,7	78,7	159,6
18	316,8	44,8	29,7	40,8	220,6	51,0	98,4	108,7	59,5	129,7	91,3	49,6	116,9	216,1
19	273,1	35,1	22,0	41,8	227,3	50,1	108,2	145,8	72,8	139,4	72,0	49,0	120,5	209,1
20	333,7	55,9	18,1	39,8	344,8	61,8	86,2	167,5	59,6	153,9	59,3	33,6	127,4	160,3
21	321,0	57,5	24,6	37,4	190,4	43,1	70,0	101,1	70,4	168,1	98,0	56,9	99,4	161,5
22	386,9	40,9	30,1	46,9	245,0	71,6	127,6	118,9	65,1	139,4	106,5	46,1	159,2	263,2
23	350,9	30,3	21,7	50,0	186,7	109,2	194,2	147,0	45,3	148,8	80,6	37,6	154,0	300,8
24	328,9	42,1	21,8	42,2	366,8	40,8	77,7	127,1	64,1	182,9	46,8	49,1	143,2	155,8
25	227,8	24,3	12,0	28,1	131,8	38,0	49,3	113,5	31,8	82,3	31,8	17,0	92,6	103,3
26	218,9	27,5	28,1	40,8	236,1	54,8	104,9	115,5	79,8	138,8	106,5	32,7	111,3	211,6
27	412,2	39,1	29,1	46,5	258,0	46,3	99,3	136,0	79,1	114,9	100,5	60,5	128,8	195,1
28	245,5	45,1	26,9	46,3	180,9	61,4	122,9	156,1	64,4	133,8	97,3	41,0	94,2	258,3
29	260,5	47,2	33,4	39,5	250,0	58,4	111,5	122,9	75,9	154,5	69,5	36,7	112,9	225,6
30	258,8	44,0	34,2	41,1	277,7	44,9	95,5	106,9	79,9	153,4	110,3	47,7	103,2	175,4
31	452,0	30,8	20,8	47,8	290,6	57,4	113,2	171,5	71,9	191,3	111,6	38,9	176,6	234,2
32	332,7	35,2	24,4	51,6	286,0	73,8	148,2	183,3	97,5	153,9	81,1	45,6	142,6	253,3
33	720,6	45,7	22,4	36,0	313,8	35,6	69,1	144,6	82,4	172,6	101,4	44,8	139,4	160,9
34	402,3	64,9	30,5	44,4	221,1	50,9	103,8	160,4	62,8	132,5	66,0	63,5	114,8	214,4
35	363,3	34,0	31,3	58,0	263,4	76,8	161,5	152,5	100,8	152,5	140,6	57,6	136,1	269,3
36	336,1	30,0	22,9	41,3	296,8	51,7	109,4	181,9	79,7	141,8	97,3	42,1	125,6	181,6
37	244,8	32,8	25,3	38,5	223,6	44,6	79,8	106,5	87,4	116,9	87,7	42,3	88,4	153,7
38	318,0	39,7	18,8	55,8	208,9	74,8	127,5	154,0	104,7	120,5	79,1	52,8	126,7	202,0
39	293,6	75,8	42,7	59,3	378,6	93,1	163,8	280,1	115,5	222,6	111,9	51,0	215,0	296,8
40	331,4	64,5	16,7	67,1	371,0	98,3	176,1	253,2	123,6	210,2	145,6	56,7	141,0	223,9
41	216,7	36,1	29,4	56,3	263,3	72,7	114,7	153,2	140,3	180,8	139,9	55,6	126,3	255,7
42	228,7	25,3	25,4	44,7	241,2	55,1	104,5	151,7	102,4	139,7	129,4	45,8	109,1	201,6
43	234,1	39,8	28,6	44,5	301,1	54,2	105,1	181,3	118,0	179,0	111,4	49,1	172,5	216,2
44	123,0	22,3	26,5	35,5	222,0	38,8	91,0	113,4	69,7	134,2	83,7	28,0	76,5	165,5
45	307,5	41,5	17,8	42,9	240,5	66,4	124,6	168,0	58,2	192,9	176,7	36,6	106,4	189,0

46	336,6	51,6	31,0	37,6	239,8	49,3	90,3	134,1	62,4	103,0	151,3	32,5	98,0	168,6
47	410,3	61,5	32,6	79,7	221,9	70,8	146,8	158,2	86,1	131,9	109,2	77,6	158,4	268,6
48	412,1	19,4	26,2	50,3	244,2	48,7	103,4	177,6	108,4	128,7	114,0	57,2	108,5	196,6
49	236,8	20,9	29,3	40,4	200,8	58,7	109,8	104,2	81,5	131,4	94,7	35,3	95,8	255,4
50	361,3	27,6	14,5	47,3	182,4	51,0	119,5	161,3	58,5	137,8	111,6	40,4	107,5	217,6
51	320,5	50,3	36,6	43,9	274,9	65,3	124,4	132,9	78,1	125,5	85,8	49,4	148,1	247,5
52	382,0	26,9	17,9	55,0	263,0	76,2	138,0	127,9	105,0	164,7	125,0	54,1	119,6	253,1
53	189,9	32,2	11,0	28,6	235,1	44,2	67,1	144,3	51,1	140,1	39,8	32,6	83,7	111,5
54	347,1	48,7	28,1	44,1	235,6	66,5	129,8	154,2	67,1	126,5	58,4	52,3	148,0	249,7
55	329,1	40,3	23,2	39,1	179,2	43,1	83,9	125,1	56,0	109,1	89,5	41,3	107,3	159,7
56	201,7	41,5	16,5	42,0	216,8	69,6	127,3	128,3	59,7	160,4	80,1	38,8	64,5	206,4
57	265,7	32,6	19,5	39,3	183,6	45,0	90,3	170,3	93,8	127,1	76,1	35,6	94,7	171,3
58	316,9	100,6	26,8	44,6	266,0	49,7	87,8	153,6	91,4	165,1	122,5	72,9	152,5	153,6
59	326,5	37,9	19,7	33,4	284,3	44,4	66,2	108,8	48,4	107,6	46,7	38,0	118,7	123,8
60	442,8	14,8	28,2	36,9	344,6	58,5	91,4	159,1	122,4	142,0	138,3	39,5	110,6	180,4
61	332,7	65,0	22,7	52,6	306,3	58,9	120,7	166,4	119,6	254,4	137,2	78,3	141,1	207,5
62	377,8	25,5	18,5	37,2	266,5	45,4	67,0	153,3	67,8	162,2	93,1	33,3	115,4	143,2
63	472,0	44,0	29,6	49,5	285,1	66,5	111,4	168,5	104,1	159,6	99,2	49,9	123,2	198,1
64	368,9	47,2	35,3	45,8	284,9	67,1	119,7	128,8	69,3	166,4	78,3	45,6	121,2	221,7
65	324,0	49,1	29,7	41,7	216,9	59,8	100,0	146,2	62,0	180,9	100,0	49,5	109,4	214,3
66	376,8	33,7	26,0	44,5	283,8	66,7	104,7	159,3	104,8	151,9	98,7	45,6	120,9	239,5
67	347,0	50,0	20,6	40,1	252,9	57,4	85,5	128,9	59,6	138,8	85,8	30,8	126,6	179,7
68	306,0	18,3	16,6	29,3	240,6	31,1	50,8	74,2	61,9	91,5	100,3	30,9	43,0	104,9
69	293,0	55,7	19,4	40,5	247,2	41,2	79,8	118,2	64,5	198,9	110,1	44,6	196,5	148,3
70	622,7	48,6	21,7	41,2	308,5	52,1	102,4	144,1	54,5	143,5	107,7	51,3	124,8	208,4
71	304,0	27,3	31,0	44,9	230,5	64,7	110,8	109,6	90,5	112,1	115,8	45,7	82,7	254,9
72	666,3	58,9	28,5	62,3	279,5	73,3	115,3	190,0	82,2	142,5	89,5	44,9	150,0	198,8
73	308,7	46,3	29,9	47,9	206,9	69,0	131,3	155,7	92,6	149,1	81,5	57,9	101,2	261,3
74	423,3	30,5	37,1	51,0	243,7	64,8	127,1	151,8	137,7	143,4	113,9	64,7	135,8	250,2
75	152,9	10,3	20,2	43,1	291,7	58,7	103,1	128,6	85,5	140,0	70,3	42,5	116,7	206,7
76	106,2	40,0	22,8	43,5	310,1	47,8	78,2	109,1	62,4	126,9	91,0	29,3	87,8	175,6
77	254,8	49,3	24,2	36,8	266,0	37,9	86,2	110,8	64,5	129,0	85,1	38,2	107,8	121,8
78	174,4	46,2	18,2	46,7	300,9	55,2	104,1	129,7	69,9	153,8	94,8	38,5	116,0	195,7
79	518,0	50,1	46,6	52,9	380,9	71,6	120,5	159,2	109,1	155,0	97,4	34,8	176,5	280,0
80	284,0	65,3	30,0	40,8	343,7	40,8	80,4	130,1	49,7	131,8	83,5	34,3	105,7	204,8
81	102,2	40,2	29,3	43,8	169,8	60,5	122,0	92,7	37,8	108,9	76,9	39,5	79,0	264,4
82	176,0	30,1	24,2	56,1	235,7	61,4	91,6	117,4	70,8	141,9	70,7	67,2	114,8	195,0
83	207,3	51,3	28,2	52,2	227,6	73,8	115,0	125,4	65,6	180,2	85,9	44,9	124,3	212,1
84	167,0	70,2	14,7	53,2	485,3	58,9	91,1	163,4	64,2	211,2	106,1	69,5	175,1	204,6
85	151,6	45,5	22,4	32,5	227,5	40,8	65,0	111,0	38,2	122,8	58,5	34,4	91,6	146,6
86	169,9	43,9	21,0	52,1	300,0	81,8	153,2	185,6	60,9	126,8	73,7	49,3	144,4	265,9
87	150,4	48,6	22,1	51,4	278,9	69,8	118,4	171,0	81,8	173,0	97,8	46,9	129,6	211,8
88	249,6	44,1	14,5	68,2	393,3	62,9	126,2	160,8	33,9	228,8	92,2	39,8	141,5	278,6
89	151,8	55,0	26,3	30,1	275,3	60,8	67,8	118,7	29,1	114,6	51,6	37,7	83,0	139,2
90	117,5	36,3	21,7	40,7	254,9	54,7	98,7	135,6	65,8	116,2	86,2	37,5	102,4	207,9
91	202,4	48,6	26,6	36,8	236,3	49,6	95,6	84,4	39,0	139,8	63,6	33,5	105,3	177,2
92	152,7	43,0	21,6	41,2	286,8	48,1	82,7	121,6	51,7	120,4	65,8	43,1	88,3	160,7
93	304,3	32,9	14,4	40,5	279,3	60,0	100,4	149,9	69,5	141,7	83,8	35,0	118,1	199,1
94	282,0	44,3	15,9	44,7	206,5	56,3	111,9	179,0	48,4	103,0	91,7	36,4	112,0	221,0
95	196,4	29,7	13,7	34,1	144,6	40,8	80,1	137,1	42,5	79,8	71,4	27,1	89,1	162,4
96	239,4	36,8	11,8	42,6	376,4	43,4	72,2	113,4	33,9	120,2	64,1	33,3	99,9	194,3

97	256,9	36,2	8,1	31,9	169,1	43,1	81,0	133,3	69,6	139,1	65,8	33,9	141,1	185,6
98	382,3	40,5	19,3	38,2	256,5	48,7	92,2	170,9	106,0	116,3	81,7	43,0	150,1	185,4
99	289,6	35,9	25,0	41,1	173,3	66,1	110,3	134,7	60,7	101,3	79,6	41,4	114,4	236,8
100	267,4	36,5	15,4	34,3	223,2	59,8	63,8	119,0	85,9	123,1	52,4	27,9	80,8	110,3
101	167,5	31,6	15,9	34,3	228,7	39,3	68,6	113,8	64,9	105,6	52,1	32,6	113,1	133,8
102	134,2	24,4	14,9	30,4	156,5	53,9	79,3	87,5	47,3	94,0	103,1	26,8	61,5	152,0
103	294,3	48,6	24,1	37,4	281,7	42,7	72,5	134,9	79,9	126,6	58,4	30,9	108,7	167,4
104	319,7	33,0	20,5	32,4	204,1	40,5	68,4	135,8	87,4	95,2	70,1	39,4	106,7	144,6
105	352,6	47,6	23,9	31,5	303,9	28,6	54,7	112,6	57,4	144,2	78,4	37,6	91,5	109,9
106	215,3	41,9	23,0	40,0	154,6	42,8	87,3	139,6	60,2	92,3	72,0	38,6	85,7	164,1
107	241,1	31,1	22,8	39,2	245,0	58,6	95,4	150,3	65,6	131,6	78,8	20,1	132,5	196,2
108	199,9	29,0	14,1	37,3	169,6	52,0	86,1	117,4	54,5	122,1	100,2	33,6	89,1	196,9
109	139,6	31,5	13,4	37,3	110,7	59,8	103,5	104,2	40,4	78,5	49,7	30,8	73,3	191,9
110	266,8	46,2	18,8	36,6	183,6	47,9	79,9	128,4	44,9	113,2	43,6	37,9	103,9	156,5
111	211,7	28,2	18,6	44,0	174,1	58,8	105,8	124,2	91,7	107,5	85,6	34,3	94,1	211,5
112	207,5	37,8	16,1	47,2	159,8	55,9	96,3	147,1	43,9	129,5	112,6	28,5	137,3	179,4
113	281,2	38,2	18,1	38,0	209,1	58,1	107,1	127,7	53,6	86,8	58,3	45,6	86,0	215,9
114	261,2	35,1	24,1	46,6	195,7	59,6	95,0	124,0	61,5	87,6	50,7	42,4	119,3	220,1
115	184,0	37,7	27,1	36,0	208,1	45,2	72,6	111,9	55,7	106,9	104,5	56,9	79,6	150,4
116	207,6	37,2	19,5	28,0	256,7	37,3	59,3	102,5	70,9	109,9	50,0	30,4	70,6	118,2
117	189,1	14,4	20,7	28,9	256,9	25,8	41,1	93,5	83,1	98,7	98,7	41,1	107,5	88,1
118	236,4	15,0	22,3	37,0	239,3	42,4	71,8	117,3	98,0	140,9	79,9	30,0	118,6	151,8
119	163,5	26,0	30,1	42,7	194,3	54,9	97,2	136,7	64,0	115,1	87,7	35,3	78,6	220,7
120	278,0	45,5	28,3	39,9	331,0	66,3	83,3	154,1	52,7	81,5	62,9	28,3	65,5	159,2
121	289,8	22,4	12,8	36,2	229,9	41,8	73,0	139,3	90,6	133,5	106,0	37,8	86,7	143,6
122	198,3	21,8	19,3	38,6	179,1	62,7	120,0	105,8	63,7	111,4	76,0	41,8	74,9	211,6
123	200,5	42,9	27,2	37,9	157,4	43,4	85,2	134,5	73,9	128,1	69,9	55,1	97,5	171,0

Priloga 5: Rezultati meritev 14 aminokislin v 124 plazemskih vzorcih z metodo IEC.

AK (n=123)	Ala	Arg	Cit	Phe	Gly	Ile	Leu	Lys	Orn	Ser	Tau	Tyr	Thr	Val
1	204,5	41,9	26,3	51,0	202,8	81,4	141,1	178,2	96,6	93,5	255,4	48,3	99,2	216,8
2	239,9	22,7	56,0	48,4	238,9	44,3	95,0	139,8	104,3	101,8	139,9	49,7	110,8	164,4
3	393,3	33,8	26,1	65,0	200,2	65,7	146,9	214,1	87,1	100,9	149,4	64,8	106,9	222,9
4	386,6	39,2	22,3	60,3	232,3	80,5	146,6	152,0	74,1	117,4	166,4	59,0	100,2	234,9
5	249,3	22,6	35,4	40,2	172,4	40,4	83,9	118,4	80,5	82,5	129,4	40,4	71,5	151,4
6	356,1	28,9	26,9	56,2	237,2	60,8	120,1	202,8	110,1	115,7	119,1	53,9	122,1	217,4
7	356,6	48,7	30,3	73,5	183,4	92,5	175,8	214,0	92,7	79,3	106,2	63,2	93,6	274,1
8	172,2	20,8	22,2	38,9	123,8	64,8	124,7	95,8	43,0	69,9	112,9	35,2	64,2	264,5
9	246,9	46,1	37,9	57,9	162,2	49,3	116,9	161,8	67,9	106,8	119,2	63,4	95,8	224,6
10	306,0	32,9	23,3	52,4	181,6	48,1	117,4	161,0	79,5	87,2	142,5	80,8	130,5	219,7
11	324,7	49,0	28,2	49,1	176,9	48,7	103,5	162,7	73,6	104,5	118,4	58,1	123,3	225,0
12	210,0	40,5	27,7	38,9	206,8	44,0	85,9	128,5	65,0	104,6	120,6	51,4	124,2	194,0
13	399,4	23,4	13,2	45,4	315,7	34,2	71,0	117,3	53,6	85,6	52,9	36,0	74,2	108,6
14	313,4	36,5	23,0	48,3	194,6	53,4	102,4	153,2	67,4	136,2	104,3	47,7	107,7	172,0
15	347,2	30,6	43,2	61,2	251,6	44,3	126,0	195,0	109,4	120,3	84,1	58,2	129,1	214,6
16	183,0	13,5	28,7	52,9	163,7	25,1	64,8	71,5	64,7	75,7	131,8	41,0	68,3	111,0
17	205,8	24,9	68,2	37,5	183,7	30,6	65,2	92,3	50,8	84,8	80,3	52,1	71,4	136,8
18	301,4	47,4	34,6	46,8	204,7	48,0	97,4	124,4	74,7	101,8	70,2	57,4	111,9	190,9
19	254,2	33,9	29,8	46,6	213,2	45,7	99,3	148,1	81,8	112,4	60,7	58,3	111,6	192,6
20	349,0	65,3	24,3	50,1	358,0	58,1	89,2	198,2	60,2	142,7	54,7	42,5	129,7	163,5
21	278,4	51,5	31,3	37,5	168,7	33,7	65,4	115,6	71,9	127,5	77,3	64,7	85,5	131,8
22	363,7	39,3	37,3	51,0	236,0	62,2	122,2	123,0	80,0	108,1	74,9	57,7	144,7	226,9
23	318,1	32,6	30,8	49,2	156,2	94,1	171,7	136,2	52,1	112,6	87,6	42,3	135,5	247,1
24	301,9	55,1	32,7	46,5	361,7	39,7	77,0	155,2	85,5	162,6	66,9	55,9	127,0	147,8
25	225,5	24,8	17,5	32,8	123,5	36,1	51,7	120,9	42,1	69,3	46,5	21,2	97,7	100,9
26	245,3	37,4	38,0	50,8	256,2	59,2	121,9	157,0	105,5	129,0	149,9	42,0	120,0	204,2
27	351,5	35,8	37,1	51,1	237,4	40,2	96,8	132,5	81,6	91,1	117,9	71,1	120,5	181,4
28	206,6	46,0	32,9	49,5	171,3	57,5	112,8	167,3	76,6	103,5	102,1	47,9	86,9	221,8
29	228,8	52,5	40,8	42,9	226,5	56,0	102,9	136,7	80,9	123,3	84,0	45,3	105,0	207,1
30	212,6	41,5	38,3	41,9	247,0	38,0	78,1	115,4	88,3	122,2	124,9	51,0	87,9	139,8
31	371,2	32,1	27,7	53,2	263,8	51,5	105,7	191,1	91,7	151,2	134,7	47,2	171,1	212,1
32	295,5	35,9	33,6	54,2	255,6	67,4	135,5	180,5	99,8	122,6	95,0	50,7	129,0	220,3
33	636,2	41,8	31,3	38,6	298,2	32,6	67,8	148,6	91,6	140,5	130,1	53,2	126,5	134,3
34	348,4	74,0	35,9	51,4	200,9	48,5	95,9	157,2	68,7	106,1	76,1	72,2	109,1	193,3
35	332,9	30,5	44,9	62,2	228,5	72,0	151,4	159,6	111,9	114,7	113,8	66,7	123,9	243,5
36	291,0	31,3	31,0	47,4	273,1	47,1	101,1	176,8	96,7	114,8	78,3	47,1	116,3	157,8
37	180,3	50,1	30,6	37,8	170,4	38,9	66,8	101,6	58,3	73,3	245,0	44,9	81,7	126,8
38	475,7	37,3	24,5	63,3	199,9	67,2	126,7	168,1	103,0	96,9	73,5	61,8	141,8	192,2
39	333,1	53,0	36,0	48,3	236,1	59,8	115,6	191,9	83,9	131,3	67,7	41,4	139,8	195,0
40	508,8	61,0	21,3	73,7	352,7	96,5	156,2	249,7	146,5	165,1	130,2	69,3	153,2	203,8
41	243,3	25,9	30,5	48,8	199,0	48,5	86,4	122,0	87,0	105,8	91,0	51,9	89,7	175,9
42	298,5	17,8	32,2	45,7	197,2	44,2	90,9	140,4	101,7	105,1	99,7	53,2	95,5	167,2
43	296,4	39,9	34,2	47,7	251,1	46,4	95,1	168,0	109,2	139,1	85,7	51,7	154,1	186,7
44	172,7	19,8	31,0	42,9	214,9	40,3	90,9	116,9	76,8	104,4	80,2	35,2	83,9	164,0
45	262,4	39,9	23,6	46,2	189,8	60,5	107,3	148,1	55,8	148,1	118,0	44,5	109,4	187,9
46	298,0	53,2	31,5	43,6	233,3	48,9	89,1	125,9	69,1	89,2	134,2	40,2	97,6	155,6

47	386,0	58,5	37,9	92,6	205,5	73,1	132,6	166,4	115,8	110,3	81,0	90,5	167,0	253,4
48	358,8	17,7	26,9	51,6	220,3	43,0	93,9	176,2	104,6	97,6	87,0	65,7	98,8	176,8
49	181,8	16,5	31,1	42,0	172,8	49,4	99,9	111,4	79,7	96,2	79,4	39,4	80,2	206,1
50	323,9	25,2	21,6	52,2	160,9	46,7	115,0	173,5	64,6	110,0	94,5	48,3	93,2	200,9
51	280,8	53,4	41,4	50,7	248,4	62,5	113,3	145,0	79,1	99,6	76,7	60,4	141,1	215,8
52	317,4	23,9	24,0	59,1	231,4	64,2	119,8	137,2	107,1	133,9	88,6	59,8	100,3	210,1
53	172,7	31,7	17,2	31,6	243,5	42,5	65,0	152,6	61,2	116,2	29,9	38,9	81,1	106,5
54	308,8	48,9	29,7	50,5	213,4	62,7	118,5	168,2	67,7	103,0	54,3	62,8	134,4	224,2
55	295,6	34,1	28,5	45,4	173,6	41,2	82,5	123,8	63,9	89,0	73,5	50,2	98,1	151,1
56	158,6	37,9	21,6	44,1	177,0	62,3	118,3	137,1	49,6	86,9	67,1	40,5	55,5	181,6
57	296,0	40,0	27,9	54,0	192,6	50,6	109,3	213,6	119,0	118,3	72,4	51,8	104,4	193,3
58	270,7	96,5	38,2	46,1	234,3	44,5	82,8	152,5	77,4	129,5	115,2	79,2	135,4	130,3
59	338,5	46,1	29,4	42,0	304,3	44,9	74,7	124,1	50,8	92,6	42,6	51,5	122,0	132,4
60	366,8	9,5	39,6	42,3	310,8	50,2	86,2	136,0	122,3	112,0	122,8	47,5	100,4	160,8
61	256,0	59,5	28,9	51,6	224,9	48,9	96,4	149,3	64,9	136,5	109,0	77,2	120,9	169,9
62	309,8	22,3	19,6	39,1	198,9	36,9	67,6	126,2	58,7	100,0	79,2	36,5	95,7	112,6
63	357,7	42,1	36,2	53,1	237,2	53,8	102,9	146,2	106,3	112,3	86,9	58,3	109,8	173,9
64	299,7	50,1	42,8	49,8	246,4	57,6	109,2	118,3	78,4	134,1	79,8	52,4	110,1	194,4
65	257,9	43,2	41,5	44,4	194,6	48,0	88,5	139,6	61,1	127,4	70,2	54,8	94,5	190,8
66	290,2	31,8	32,0	45,7	241,4	55,4	98,2	139,9	86,5	107,0	67,1	50,5	101,8	199,8
67	281,6	46,7	27,1	42,1	221,2	49,5	77,3	139,5	55,6	113,0	75,7	36,8	113,9	158,2
68	256,1	14,2	22,5	34,2	226,6	31,4	51,1	83,9	56,1	73,2	83,8	37,7	39,9	94,1
69	237,0	51,3	26,8	42,6	192,6	38,8	71,0	117,7	52,4	144,4	83,4	50,6	185,1	136,0
70	500,8	49,5	27,0	43,6	285,7	48,2	94,9	140,8	63,5	117,0	85,1	58,2	121,7	186,0
71	261,2	22,5	52,2	46,5	202,8	53,6	101,3	125,4	88,3	80,9	91,8	54,7	80,7	215,8
72	497,1	62,7	28,6	66,2	255,8	60,1	103,9	181,0	71,5	101,0	69,5	57,5	129,8	172,3
73	247,8	42,3	32,9	49,6	176,4	51,8	112,4	155,3	73,6	105,2	59,0	60,9	80,8	224,3
74	330,5	23,3	36,3	51,9	212,8	52,2	110,2	160,4	118,4	103,0	87,9	69,9	115,0	208,4
75	306,4	27,5	24,2	51,1	288,4	60,0	119,5	156,9	85,2	123,7	68,9	54,0	112,3	207,3
76	175,6	37,8	27,1	45,3	260,9	43,0	74,7	102,2	63,2	99,7	74,3	32,2	67,4	148,3
77	291,9	60,3	31,9	46,3	272,0	34,1	92,7	121,7	66,5	121,6	78,9	47,1	119,7	118,1
78	303,9	51,8	25,2	47,9	259,0	53,2	107,4	141,6	66,7	125,9	81,9	47,6	99,3	173,8
79	532,8	54,5	55,1	61,7	378,4	70,6	119,8	163,9	108,7	133,8	89,4	44,7	170,4	261,0
80	275,9	71,7	33,3	46,3	327,4	40,7	82,9	132,8	57,1	100,6	69,2	40,6	104,1	191,1
81	175,4	40,9	34,1	47,2	146,9	60,8	118,4	101,6	41,9	88,5	60,6	44,3	69,1	252,2
82	329,4	29,9	33,4	64,6	201,5	61,6	95,6	117,6	74,1	119,7	64,8	83,6	108,2	189,3
83	377,9	52,8	35,5	59,9	206,4	74,7	113,7	140,6	72,0	140,6	66,3	54,6	110,8	207,6
84	199,5	48,2	12,0	45,4	363,8	40,3	69,6	131,8	47,0	129,2	60,0	58,9	147,6	140,0
85	316,8	50,2	31,8	38,0	216,9	39,9	72,3	129,6	46,0	107,7	53,0	46,7	82,3	150,3
86	359,9	54,4	27,8	65,5	283,2	84,2	168,2	207,9	65,2	116,6	65,3	72,7	131,0	283,5
87	297,5	69,7	44,9	61,3	246,0	75,5	128,3	186,2	83,9	129,9	88,9	59,7	113,4	189,7
88	334,0	36,4	10,6	67,3	305,5	53,4	104,2	138,7	32,0	149,7	63,6	39,3	121,8	223,9
89	237,9	63,4	25,8	35,0	276,5	55,9	73,3	120,3	32,6	96,6	45,8	45,4	90,2	128,1
90	230,8	45,8	26,9	44,5	224,5	47,8	97,6	148,4	60,5	93,1	73,7	46,7	91,0	181,1
91	256,5	52,8	41,8	56,4	240,5	50,3	99,9	104,4	43,4	123,8	68,5	45,8	105,1	156,0
92	295,6	45,6	26,6	42,9	232,2	40,2	76,4	115,3	50,3	92,8	60,4	50,2	76,7	133,7
93	264,9	40,9	32,7	44,2	264,2	50,7	97,3	140,3	68,1	127,9	91,2	41,4	110,7	169,7
94	409,0	18,6	30,3	55,4	194,1	56,3	120,9	150,0	100,3	111,7	98,0	79,3	99,5	250,4
95	258,0	39,8	25,5	48,9	198,8	48,0	104,3	174,7	51,5	95,7	91,9	41,5	103,7	198,5
96	238,8	40,9	18,1	45,2	357,6	36,4	72,6	122,8	34,0	107,4	57,4	40,2	96,6	178,6
97	288,2	40,9	12,0	41,4	173,6	40,2	83,7	148,3	62,6	130,3	65,2	43,5	149,1	186,3

98	425,4	49,1	38,9	47,0	290,3	46,8	101,6	189,4	102,7	131,5	93,3	60,5	161,4	187,8
99	337,4	43,9	40,3	50,3	191,3	66,4	124,0	148,4	65,8	106,8	92,3	56,1	117,8	238,9
100	297,7	45,2	26,2	39,9	236,9	56,2	74,8	130,8	84,1	115,5	59,9	37,3	85,7	110,2
101	216,5	45,6	28,7	44,2	281,4	37,9	82,8	137,9	66,1	128,0	62,1	49,0	144,5	155,2
102	143,3	29,4	26,7	35,2	160,9	49,8	88,0	94,4	49,4	91,7	114,1	35,8	64,6	152,6
103	297,8	56,0	32,2	43,1	289,3	36,5	74,6	139,2	69,9	119,8	72,8	42,3	102,2	158,5
104	335,9	39,3	28,6	39,9	204,1	38,2	75,0	131,0	79,8	92,2	87,5	46,4	100,6	144,5
105	393,0	57,2	59,9	36,3	327,8	24,3	57,8	122,1	59,3	138,9	120,8	48,8	96,4	111,5
106	263,1	54,0	43,2	55,0	189,7	50,1	97,5	153,7	86,1	108,6	105,5	64,1	99,4	200,0
107	242,1	30,3	34,8	41,9	232,6	43,3	94,7	150,0	68,9	111,4	97,9	43,6	121,0	182,3
108	250,6	34,9	23,4	45,9	178,1	51,9	96,3	133,1	52,9	123,0	131,8	44,6	94,6	207,8
109	177,0	38,7	28,5	51,6	133,1	66,7	130,1	128,7	56,8	89,2	62,0	44,9	91,5	228,6
110	351,2	62,4	31,5	50,0	218,2	52,8	99,1	138,6	66,3	120,5	54,1	53,7	116,2	179,7
111	256,2	29,6	30,2	54,2	176,8	58,9	119,7	151,1	89,3	100,6	82,2	46,2	95,2	218,7
112	244,0	44,2	26,1	56,0	159,0	54,2	102,4	181,4	44,2	113,5	114,1	37,3	136,1	175,4
113	329,9	42,1	24,3	48,7	210,5	57,2	113,5	164,5	55,4	74,4	58,6	59,2	87,8	227,8
114	310,9	40,4	33,8	51,0	197,9	50,9	98,6	147,6	55,0	78,5	48,2	53,4	113,9	210,4
115	214,8	42,0	39,5	42,9	209,0	39,9	79,7	117,5	78,8	101,2	100,1	60,5	78,7	143,7
116	253,0	50,1	32,5	38,3	299,4	36,2	67,2	126,2	73,9	120,6	61,0	40,7	78,3	125,4
117	225,5	24,2	86,2	34,9	262,1	24,3	46,5	104,8	91,9	98,3	114,9	48,7	127,6	88,6
118	259,6	15,6	59,6	41,1	225,7	38,4	73,5	134,5	103,6	131,6	84,7	36,9	118,7	138,2
119	170,3	32,4	57,0	45,9	185,9	46,5	97,7	136,9	61,8	99,2	81,9	41,0	75,2	197,1
120	333,0	49,0	40,2	45,9	354,2	60,7	87,9	168,2	55,2	68,6	65,8	34,4	64,7	162,4
121	317,4	20,8	22,7	43,5	221,1	37,9	73,9	136,0	82,3	108,2	99,3	48,7	87,7	134,3
122	235,9	22,9	27,1	44,4	178,9	59,0	116,4	103,8	54,2	89,2	78,0	53,8	77,1	199,2
123	218,1	38,9	33,3	42,5	147,1	38,5	78,8	125,7	63,5	100,9	70,3	60,6	95,1	156,3