

Validierung der Bestimmung von Orotsäure und S-Sulfocystein im Urin mittels Flüssigchromatographie gekoppelt an ein Massenspektrometer (LC-MS/MS)

Noelle Chatton, BMA 23-26

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Zentrum für Labormedizin - Stoffwechseldiagnostik

1. Zusammenfassung

Die Stoffwechseldiagnostik des ZLM am Inselspital Bern optimiert kontinuierlich ihre Analytik. Mithilfe dieser Diplomarbeit sollte die Bestimmung von Orotsäure und S-Sulfocystein (SSC), die bei Fragestellungen zu Harnstoffzyklusdefekten relevant sind, verbessert werden.

Die bisherigen Methoden mittels HPLC bzw. Aminosäureanalysator waren zeitaufwendig und störungsanfällig. Das Ziel dieser Diplomarbeit war die Integration beider Analyten in ein bestehendes LC-MS/MS In-House Panel. Die neue Methode wurde auf dem Shimadzu LC-40DX3 mit Sciex Triple Quad 6500+ im hochspezifischen MRM-Modus validiert. Als Probenmaterial diente Nativurin aus einem Probenkollektiv von 36 Proben. Dabei wurden diverse analytischen Kriterien geprüft und vollständig erfüllt. Der Methodenvergleich für Orotsäure zeigte eine sehr gute Korrelation mit der bisherigen HPLC-Methode, sodass die neue LC-MS/MS-Methode als präzise und akkurat beurteilt und erfolgreich für die Routineanalytik etabliert werden konnte.

Schlüsselbegriffe: Orotsäure, S-Sulfocystein, LC-MS/MS, Validierung

2. Einleitung

Die beiden Analyten sind vor allem für die Diagnostik seltener angeborener Stoffwechselerkrankungen relevant. Orotsäure dient insbesondere als Marker bei Harnstoffzyklusdefekten, wie bspw. dem Ornithintranscarbamylase-Mangel, während SSC ein wichtiger Biomarker für den Sulfioxidase- und Molybdän-Kofaktor-Mangel ist. [1] Orotsäure wurde bisher mittels HPLC und SSC mit einem Aminosäureanalysator gemessen. Beide Methoden waren wenig spezifisch und die Auswertung war nicht optimal. Ziel der Arbeit war daher, beide Analyten in das bestehende LC-MS/MS-Panel „MMA & Energie Metabolite“ zu integrieren und dadurch Spezifität, Sensitivität und Effizienz zu verbessern.

3. Ziel und Fragestellung

Ziel: Integration und Validierung der beiden Parameter Orotsäure und SSC in das bestehende In-House Panel «MMA & Energie Metabolite» auf dem LC-MS/MS System Shimadzu LC-40DX3 gekoppelt an ein Sciex Triple Quad 6500+ im ZLM am Inselspital.

Fragestellung: Ist die neue LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Orotsäure und SSC präzise und akkurat genug sowie mit bestehenden Methoden vergleichbar, um die analytischen Akzeptanzkriterien zu erfüllen und folglich die Freigabe für Routinemessungen zu ermöglichen?

4. Material, Methodik, Vorgehen

Das LC-MS/MS-Verfahren umfasst chromatografische Trennung, Ionisierung und Massenselektion. Die Analyten werden chromatografisch getrennt, ionisiert und im Triple-Quadrupol anhand ihrer charakteristischen Mutter- und Tochter-Ionen selektiert. Das von den Fragmenten erzeugte Messsignal im Detektor ist proportional zur Analytkonzentration. [2] Die Auswertung erfolgt anhand des resultierenden Chromatogramms.

Die Methode wurde gemäss dem laborinternen Validierungsplan validiert. Der Fokus lag auf der Korrelationsanalyse mittels Passing-Bablok-Regression und Pearson-Korrelation. Die Konfidenzintervalle von Steigung und Achsenabschnitt sollten 1 bzw. 0 umspannen und der Pearson-Korrelationskoeffizient > 0,90 liegen. Untersucht wurden 36 anonymisierte Urinproben sowie 6 Ringversuche von Patient:innen unterschiedlichen Alters und Gesundheitsstatus.

Für Orotsäure und SSC wurden aufgrund ihrer fehlenden Löslichkeit in Perchlorsäure zusätzliche Kalibratoren und interne Standards (Kal B/IS B) hergestellt. Diese wurden erst bei der Probenaufbereitung mit der bestehenden Kal A bzw. dem bestehenden IS A kombiniert.

Es wurden vier Qualitätskontrollen (QC 0–3) eingesetzt. QCs 1–3 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Analyten gespiked. Die QC 0 bestand aus Nativurin mit endogenen Orotsäure- und SSC-Konzentrationen und diente zur Bestimmung der Sollwerte der gespikten QCs 1-3.

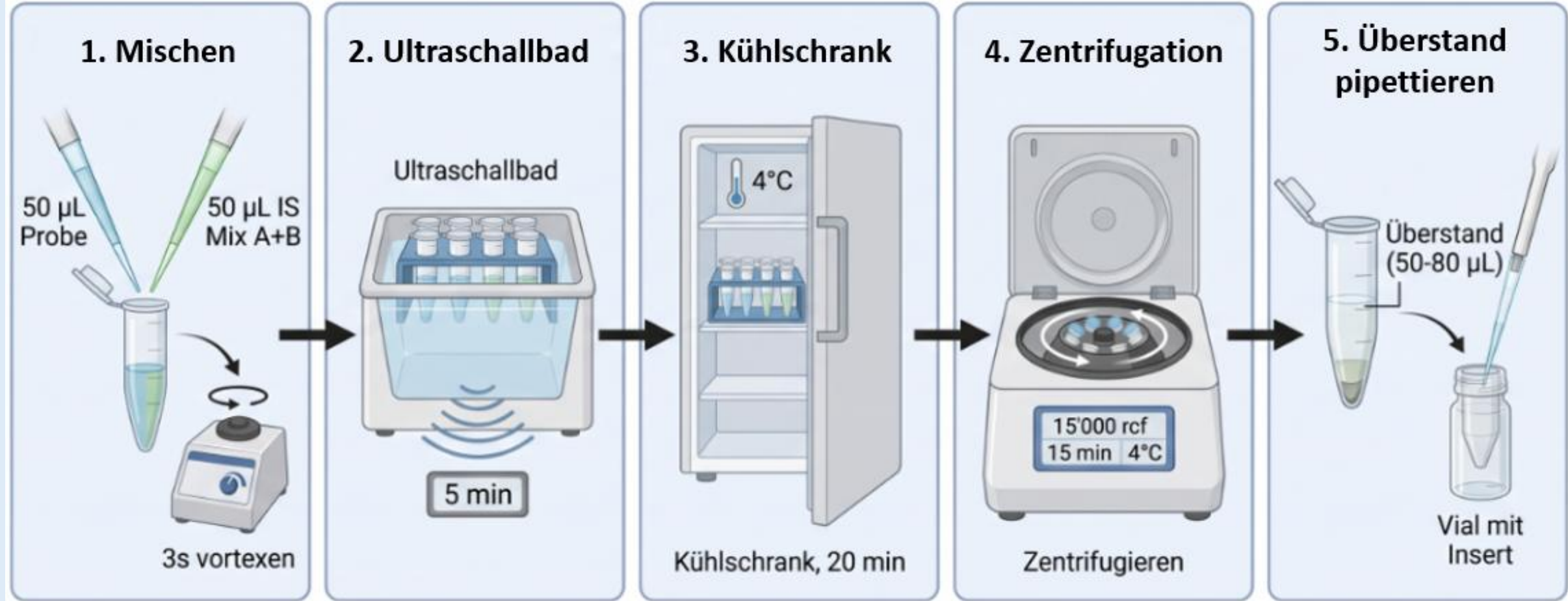


Abb. 1: Ablauf Probenaufbereitung (Chatton, 2026)

5. Ergebnisse / Resultate

Insgesamt wurden alle Kriterien des Validierungsplans erfüllt.

Im Methodenvergleich zwischen der etablierten HPLC- und der neuen LC-MS/MS-Methode ergab sich eine Regressionsgleichung mit einer Steigung von 0,9944 (95%-KI: 0,8857–1,0264) und einem Achsenabschnitt von –0,1185 (95%-KI: –0,2837–0,07757). Der Pearson-Korrelationskoeffizient betrug $r = 1,0$. Zusätzlich wurde die Korrelation unter Ausschluss der zwei Extremwerte berechnet und betrug $r = 0,9166$. Der Bland-Altman-Plot ergab eine mittlere Differenz von –8,2 % mit Übereinstimmungsgrenzen von –57,4 % bis +40,9 %.

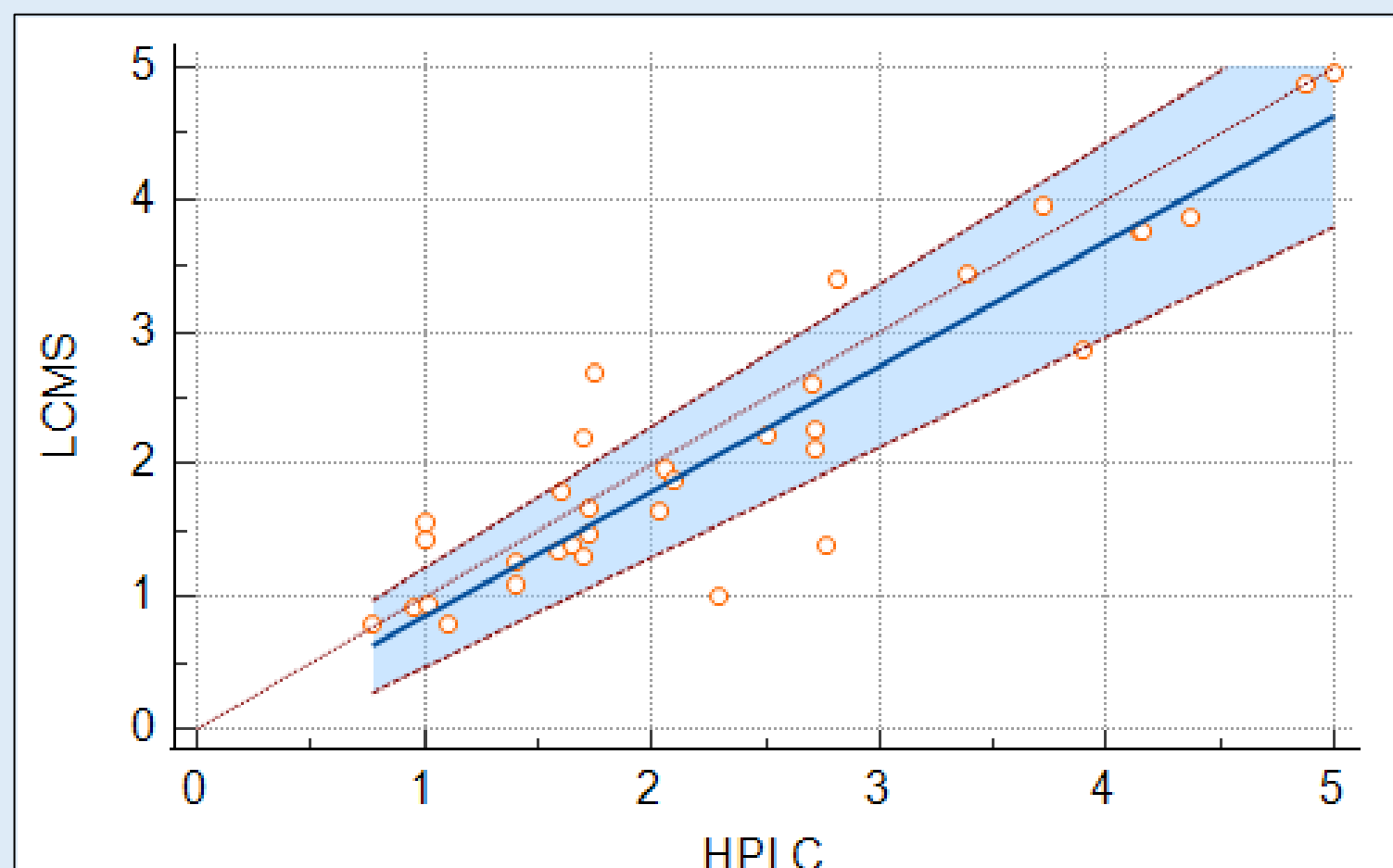


Abb. 2: Passing-Bablok Regression exklusive zwei hohe Werte (Chatton, 2026)

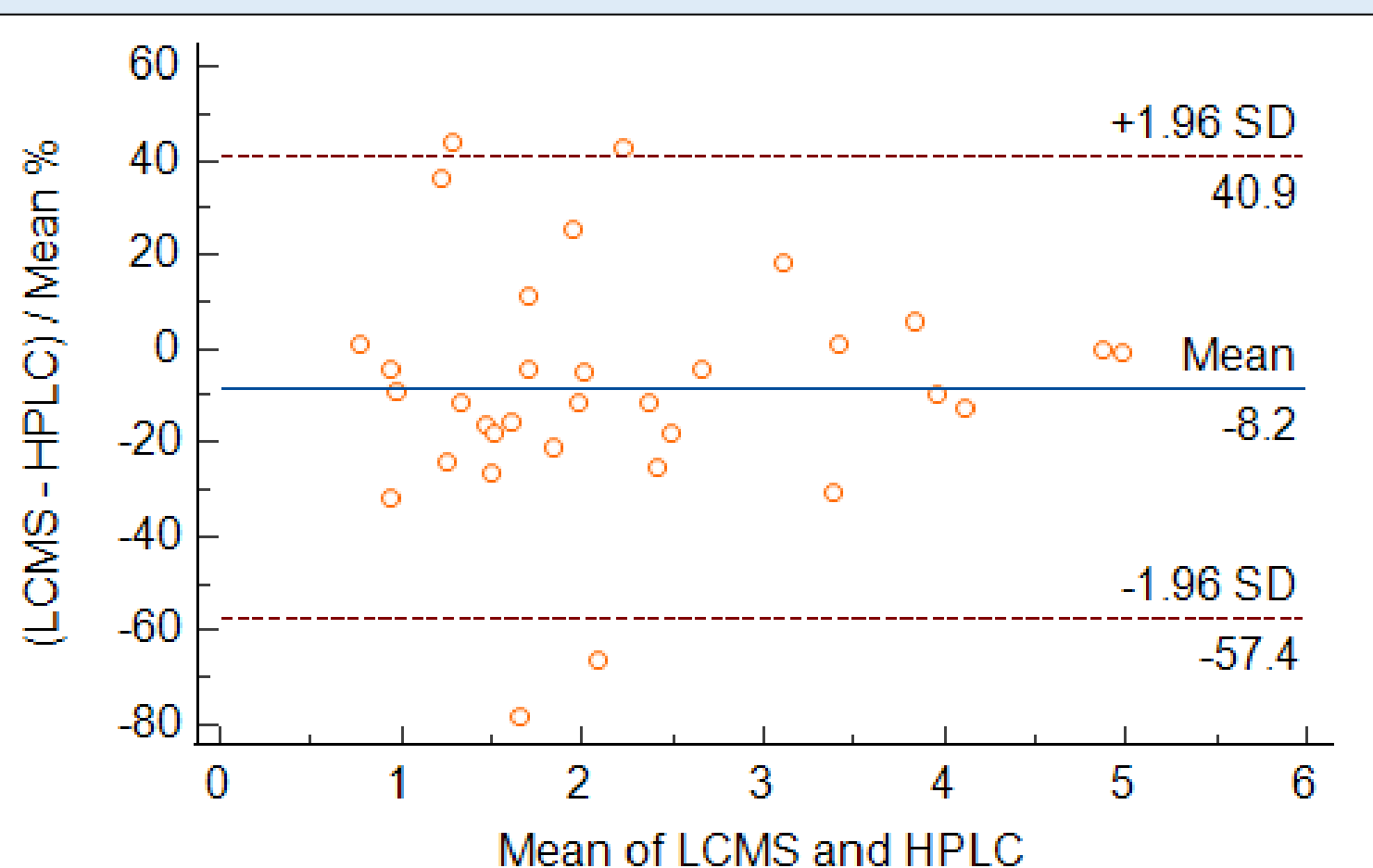


Abb. 3: Bland-Altman-Plot exklusive zwei hohe Werte (Chatton, 2026)

6. Diskussion

Zwischen HPLC und LC-MS/MS zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung. Die Konfidenzintervalle der Passing-Bablok-Regression umfassten die Idealwerte 1 (Steigung) und 0 (Achsenabschnitt). Die Pearson-Korrelation betrug $r = 1,0$ und blieb auch ohne die beiden Extremwerte mit $r = 0,9166$ stark. Extremwerte können statistische Kennwerte und insbesondere die Korrelation aufgrund ihrer grossen Abweichung vom Mittelwert deutlich beeinflussen. Der mittlere Bias von –8,2 % zeigt, dass LC-MS/MS im Mittel etwas niedrigere Orotsäurewerte als HPLC liefert, was auf die höhere Spezifität von LC-MS/MS zurückzuführen ist. Aufgrund der kleinen Stichprobe ($n = 36$) sind Aussagekraft und Übertragbarkeit eingeschränkt. Für SSC war wegen der geringen Anzahl positiver Patientenproben kein direkter Methodenvergleich möglich, die Leistungsfähigkeit wurde jedoch anhand von Ringversuchen bestätigt. Insgesamt wurden die Akzeptanzkriterien erfüllt und beide Parameter für die Routine in das LC-MS/MS-Panel aufgenommen.

Referenzen

- [1] Mönch, E. (2011). Defekte des Harnstoffzyklus – Klinische Bedeutung und Therapie (2. Auflage). UNIMED.
- [2] Medcover Diagnostics. (2024). Methoden und Technologien. Medcover Diagnostics. <https://www.medcover-diagnostics.de/unternehmen/methoden-technologien/massenspektrometrie-lc-ms-ms>

Abbildungen

- Abb. 1: eigene Abbildung – mit BioRender kreiert (Chatton, 2026)
 Abb. 2: Chatton, N., (2026). *Passing-Bablok Regression exklusive zwei hohe Werte*. medi.
 Abb. 3: Chatton, N., (2026). *Bland-Altman-Plot exklusive zwei hohe Werte*. Medi

Künstliche Intelligenz

ChatGPT: Zusammenfassen von Texten