



Применение тандемной масс-спектрометрии в клинической лабораторной диагностике

Мещанкина Т.Е., руководитель направления масс-спектрометрии
«Агентство Химэксперт»

- Характеристика метода ВЭЖХ–МС (иностранная аббревиатура LC-MS): возможности, принцип работы, преимущества
- Примеры внедрения в клиническую лабораторную практику:
 - Лекарственный мониторинг
 - Статус витамина D
 - Скрининг наследственных метаболических нарушений
 - Аналитическая токсикология – обнаружение и подтверждение наркотических веществ

Тандемная масс-спектрометрия – это метод обнаружения, идентификации и количественного определения веществ в биологическом образце, основанный на отношении массы к заряду ионов, которое это вещество может образовывать под влиянием ионизирующих факторов

Аналитические возможности ВЭЖХ/МС/МС

- **Что определяем?** Классы веществ (стероиды, аминокислоты и их производные, лекарственные препараты, наркотические вещества, пептидные маркеры и др.)
- **В чем определяем?** Исследуемые сложные матрицы (кровь, сыворотка, моча, слюна, ликвор, и другие биологические жидкости, сухие пятна)
- Диапазон **чувствительности** (от следовых количеств)
- **Время выполнения** анализа (7 – 10 минут)
- Преимущества: **Мультиплексность** (до 1000 аналитов в одном образце и возможность объединять в одном анализе разные классы веществ) – отсутствие интерференции
- **Идентификация, количественный анализ и подтверждение одновременно**

Эволюция масс-спектрометрии в диагностике

На сегодняшний день

Интегрированное решение

Специализированный клинический анализатор

Включение в линию

Лабораторные тесты



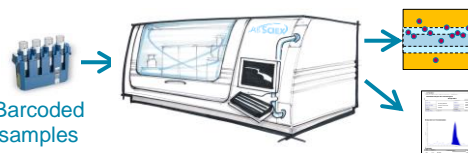
- Маркировка Class I и CE IVD (2a)
- Опытный персонал
- Загрузка партиями
- Меню ПО вызывается вручную

Интегрированные системы, одобренные регулятором



- Class II (Высокая сложность)
- Автоматизированная пробоподготовка
- Наборы реагентов
- Улучшенное ПО
- Меню тестов

Клинический анализатор



Barcoded samples

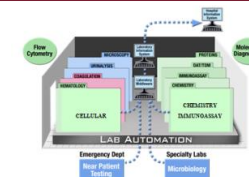
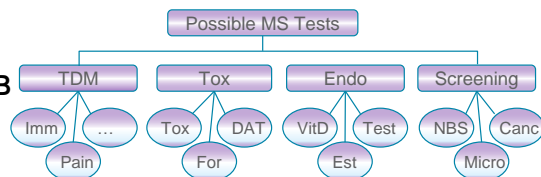
- Средняя сложность, Class II
- Полностью автоматизированные процессы
- Коммуникация через ЛИС
- Обширное меню тестов

Клинический анализатор в линии



- Встраивание в модульный клинический анализатор
- Интеграция в ЛИС
- Средняя сложность Class II
- Полное меню валидированных и утвержденных тестов

- Нет меню тестов



Номенклатурная классификация медицинских изделий по видам

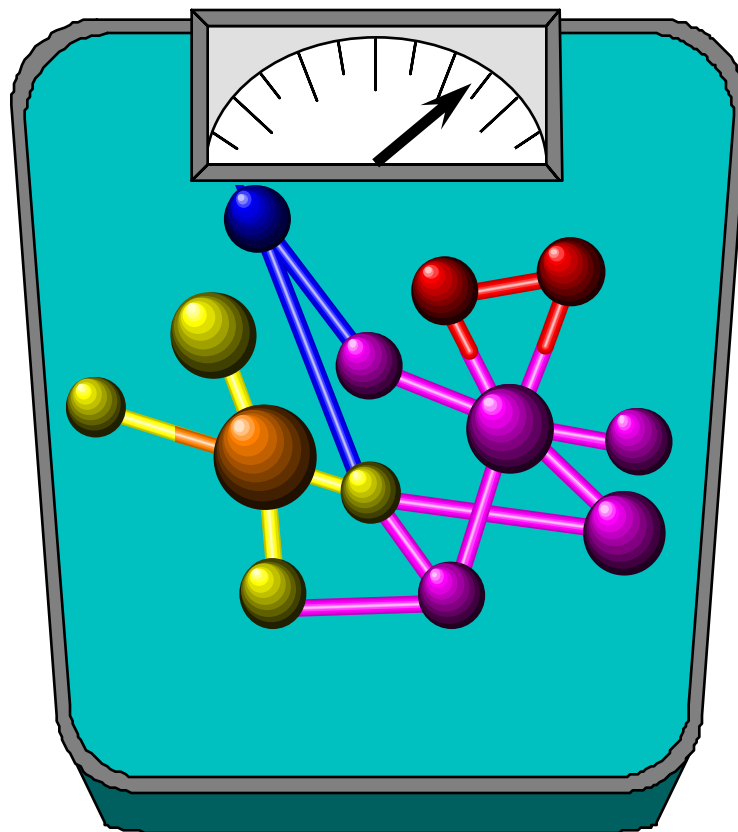
Утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации (Минздрав России) от 25 сентября 2014 г. N 557н

107660	5. Медицинские изделия для in vitro диагностики (ИВД) 5.01. Анализаторы ИВД	Анализатор масс-спектрометрический ИВД, автоматический	Лабораторный аппарат, работающий от сети (на переменном токе), предназначенный для использования при качественном и/или количественном определении химического состава клинического образца с помощью ионизации образца и разделения полученных ионов по массе с помощью электрического и магнитного поля. Устройство работает при минимальном участии техника и полной автоматизации всех процедурных этапов.
--------	--	--	--

107670	5. Медицинские изделия для in vitro диагностики (ИВД) 5.01. Анализаторы ИВД	Анализатор масс-спектрометрический ИВД, полуавтоматический	Лабораторный аппарат, работающий от сети (на переменном токе), предназначенный для использования при качественном и/или количественном определении химического состава клинического образца с помощью ионизации образца и разделения полученных ионов по массе с помощью электрического и магнитного поля. Устройство работает при минимальном участии техника и полной автоматизации всех процедурных этапов. Устройство работает при минимизированном участии техника и частичной, но не полной автоматизации всех процедурных этапов.
--------	--	--	--

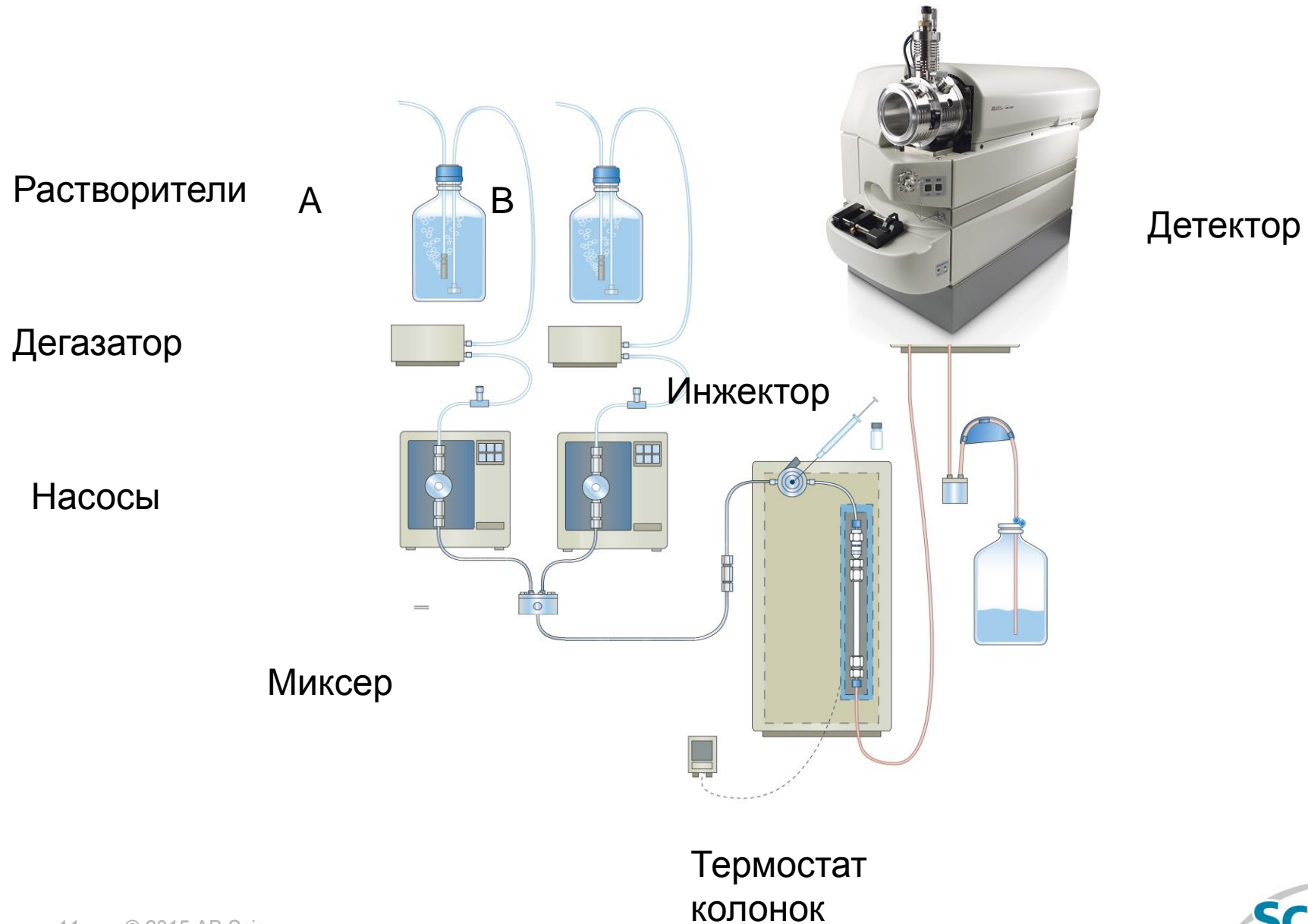
Что такое масс-спектрометр?

Масс-спектрометр измеряет молекулярную массу вещества



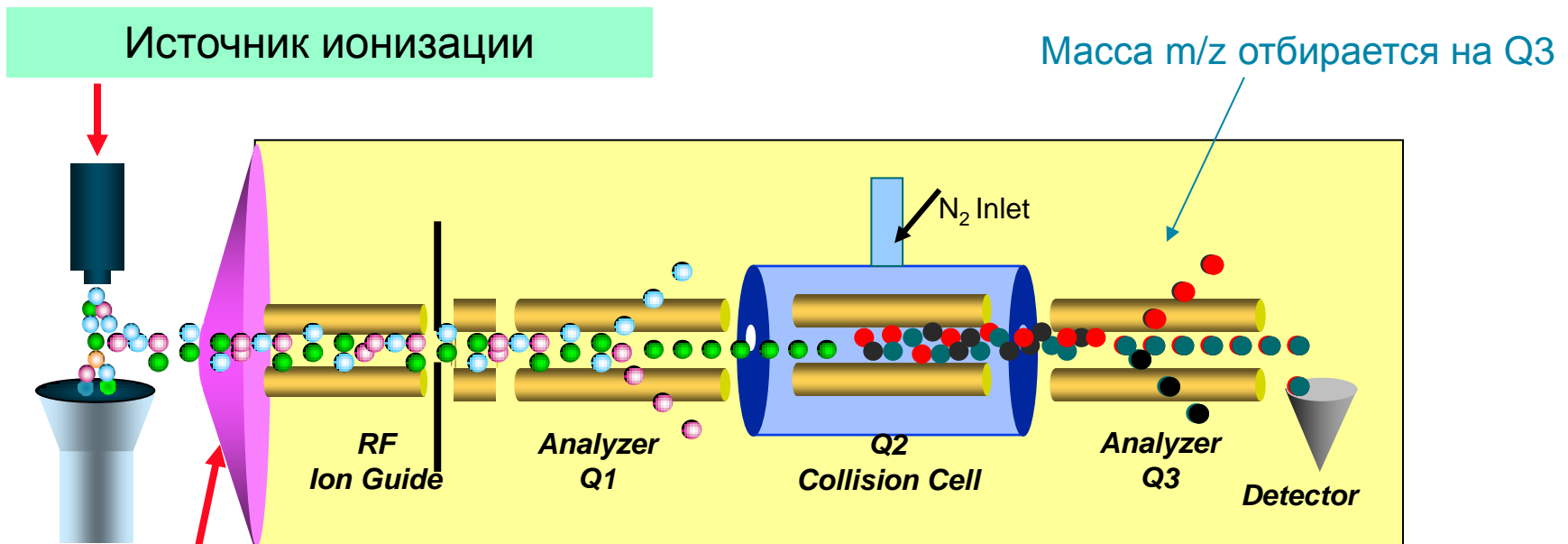
(технически, *отношение* массы к заряду, m/z)

Жидкостной хроматограф

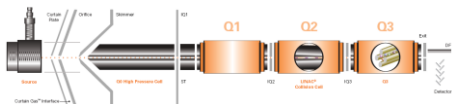


Тандемная масс-спектрометрия

- Ионы массы m/z фильтруются на квадруполе (Q1)
- Фрагментация в ячейке столкновений (Q2)
- Ионы массы m/z фильтруются на втором квадруполе (Q3)

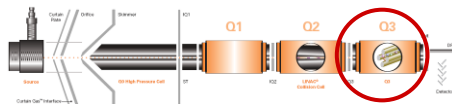


Типы масс-спектрометров



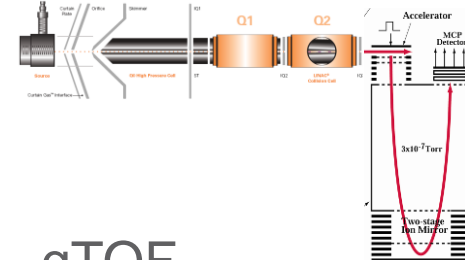
Тандемный масс-спектрометр с тройным квадруполем

- **Количественный анализ**
- Идентификация на основе соотношения MRM



Система Q TRAP®

- Количественный анализ
- Идентификация на основе соотношения MRM
- **Идентификация с помощью MS/MS библиотек**



qTOF

- Количественный анализ
- Идентификация с помощью точных масс
- Идентификация с помощью MS/MS библиотек
- **ID неизвестных**
- **Ретроспективный анализ**

Идентификация неизвестных соединений

Тандемная масс-спектрометрия – замена иммунохимических методов?

Основные проблемы применения	Применение ИХА	Применение масс-спектрометрии
Проблемы специфичности	Хорошо описанные проблемы кросс-реакций и наложений.	Детекция методом селекции масс позволяет добиться более надежных и достоверных результатов
Низкие пределы количественного анализа	ИХА тесты достигли своих пределов количественного определения	Селективность масс-спектрометра позволяет снизить пределы обнаружения и количественного анализа
Высокие издержки	Обычно высокая стоимость, особенно в случае применения индивидуальных тестов	Низкие эксплуатационные расходы и мультиплексный анализ позволяет снизить издержки
Дефицит антител (сложности с созданием новых тест-систем плюс длинный цикл разработки)	Долгое время разработки новых тестов	Не требует антител для разработки новых тестов

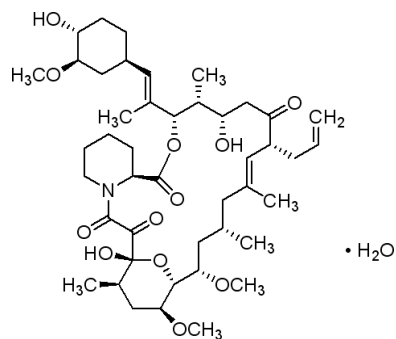


Обзор применений: Лекарственный мониторинг

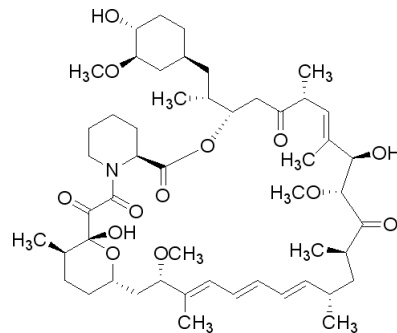
Анализ иммуносупрессоров



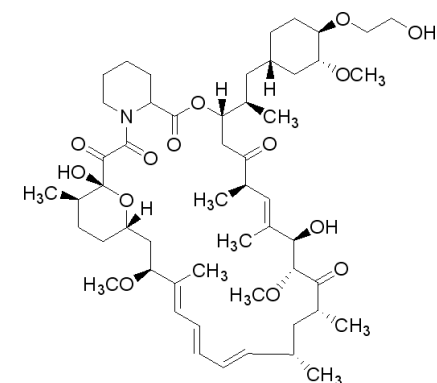
Иммunosuppressоры - структура



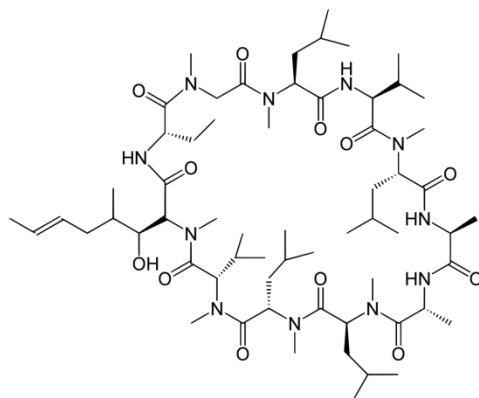
Такролимус
Молекулярный вес
822.0



Сиролимус
(Рапамицин)
Молекулярный вес 914.2



Эверолимус
Молекулярный вес 958.2



Циклоспорин А
Молекулярный вес 1202.6

Преимущества тандемной масс-спектрометрии при анализе иммуносупрессоров

- **Селективность:**
 - Отсутствие кросс-реакций и наложений
- **Чувствительность**
 - Хорошая чувствительность в большом диапазоне концентраций
- **Пробоподготовка**
 - Минимальная пробоподготовка
 - Возможность автоматизации очистки образцов
 - Достаточно небольших количеств образца
- **Точность:**
 - Достоверный и точный количественный анализ с использованием стандартов
- **Гибкость**
 - Одновременное исследование нескольких препаратов
 - Можно объединить с другими панелями исследований

Параметры анализа крови на иммуносупрессоры с использованием тандемного масс-спектрометра

Analyte	S/N	%CV	LLOQ (ng/mL)
<i>Cyclosporin</i>	435	3.9	1.6
<i>Tacrolimus</i>	20	7.2	1.3
<i>Sirolimus</i>	14	8.6	2.3
<i>Everolimus</i>	11	4.3	2.5



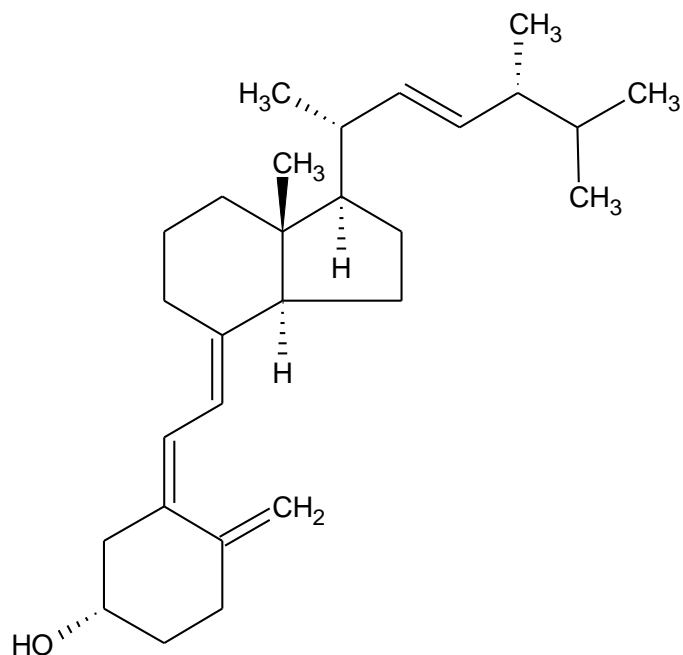
Answers for Science.
Knowledge for Life.™



Анализ витамина D

Формы витамина D

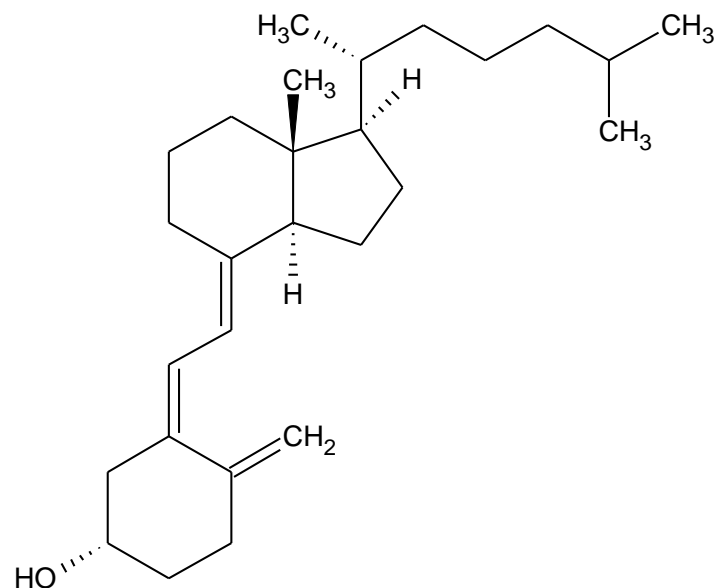
- Две формы витамина D; Витамин D₃ – продукт метаболизма и витамин D₂, поступающий с пищей



Эргокальциферол

Витамин D₂

MW 396.7

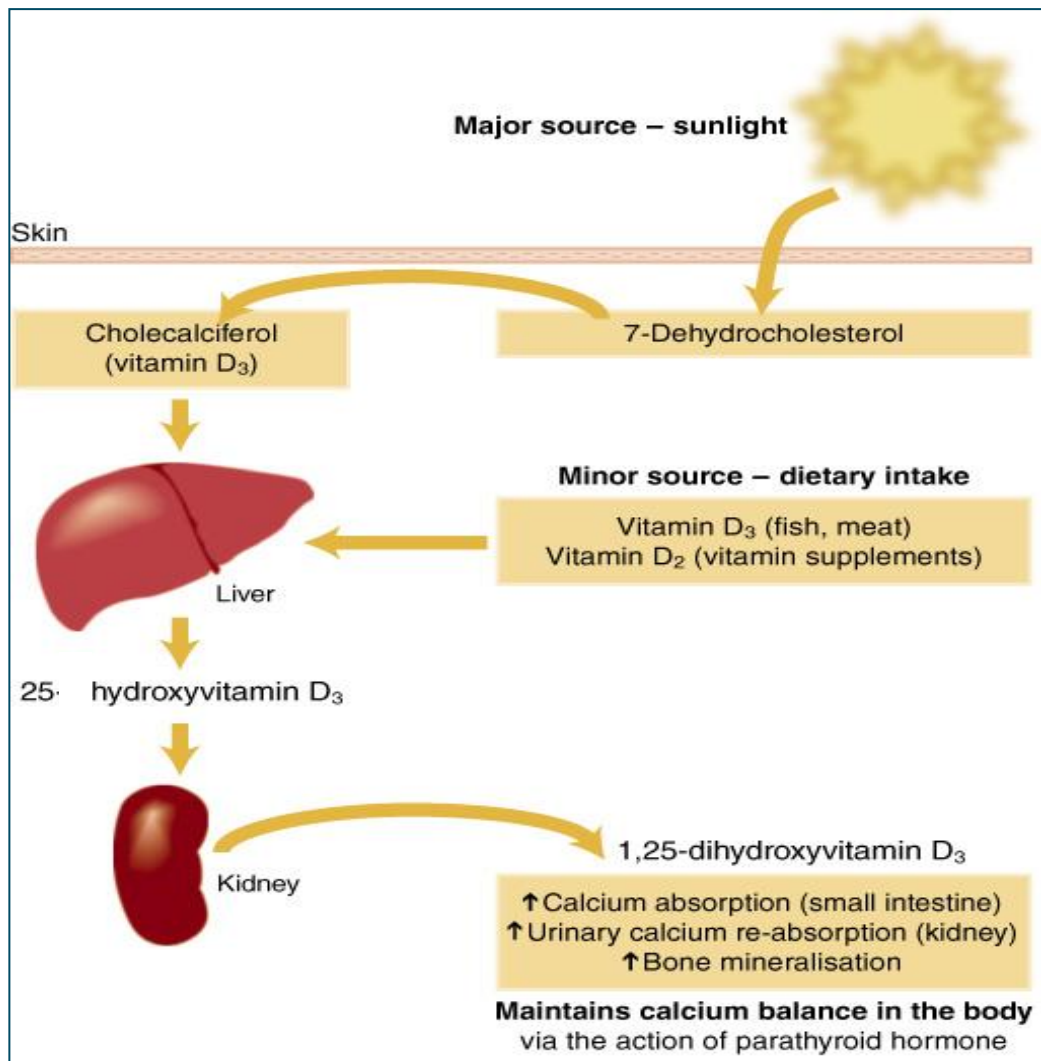


Холекальциферол

Витамин D₃

MW 384.6


Метаболизм витамина D



Зачем измерять 25-гидроксивитамин D?

- Дефицит витамина D связывают с различными заболеваниями такими, как рак, нарушения иммунной системы, болезни сердца, диабет и другими проблемами со здоровьем
- Концентрация 25-гидроксивитамина D отражает общий статус витамина D
- Анализ 25-гидроксивитамина D позволяет сделать выводы о недостатке, дефиците или токсичном уровне витамина D
- Зачем измерять уровень 25-гидроксивитамина D?
 - Стандартная форма препарата для приема
 - Анализ помогает избежать избыточного потребления препаратов, содержащих витамин D

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4539504/>

 US National Library of Medicine
National Institutes of Health

PMC

[Limits](#) [Advanced](#) [Journal list](#)

Journal List > ScientificWorldJournal > v.2015; 2015 > PMC4539504



ScientificWorldJournal. 2015; 2015: 318595.

PMCID: PMC4539504

Published online 2015 Jul 29. doi: [10.1155/2015/318595](https://doi.org/10.1155/2015/318595)

Vitamin D, Essential Minerals, and Toxic Elements: Exploring Interactions between Nutrients and Toxicants in Clinical Medicine

[Gerry K. Schwalfenberg](#)^{1, *} and [Stephen J. Genuis](#)²

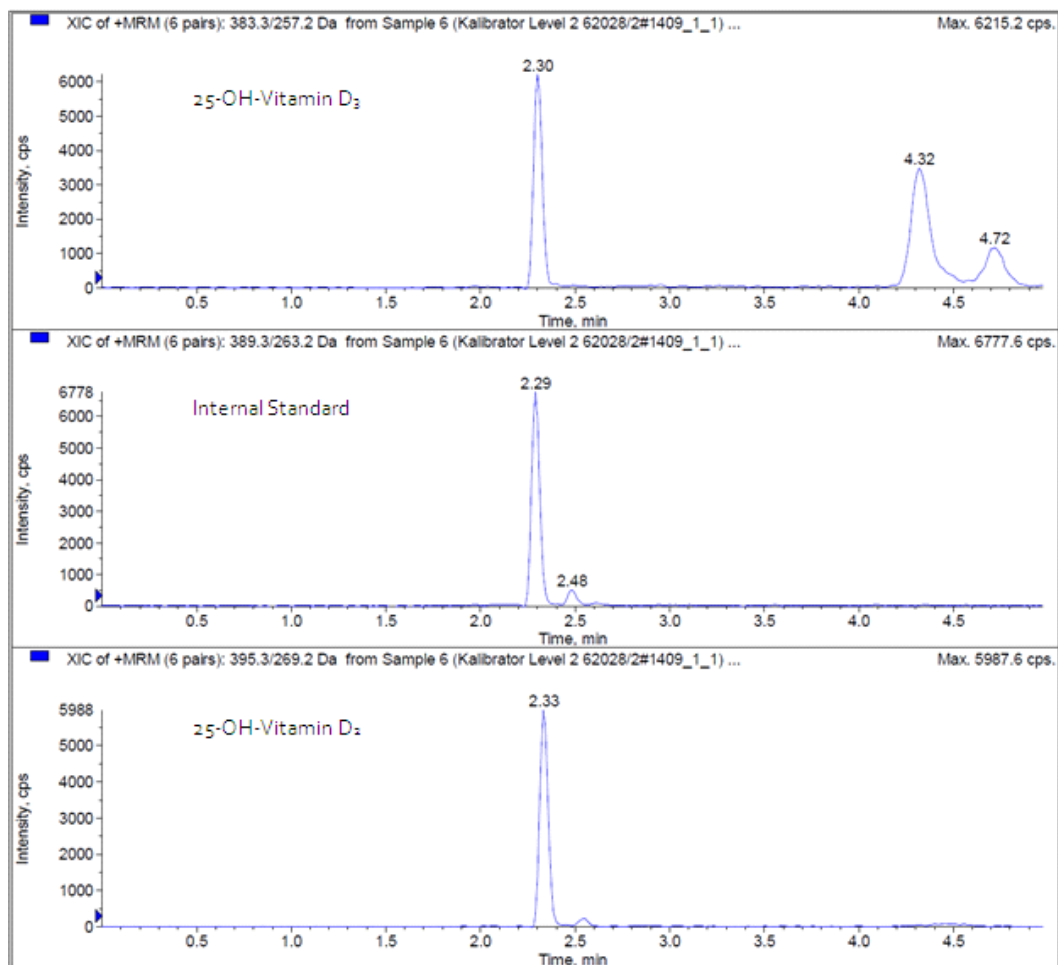
[Author information](#) ▶ [Article notes](#) ▶ [Copyright and License information](#) ▶

Abstract

Go to:

In clinical medicine, increasing attention is being directed towards the important areas of nutritional biochemistry and toxicant bioaccumulation as they relate to human health and chronic disease. Optimal nutritional status, including healthy levels of vitamin D and essential minerals, is requisite for proper physiological function; conversely, accrual of toxic elements has the potential to impair normal physiology. It is evident that vitamin D intake can facilitate the absorption and assimilation of essential inorganic elements (such as calcium, magnesium, copper, zinc, iron, and selenium) but also the uptake of toxic elements (such as lead, arsenic, aluminum, cobalt, and strontium). Furthermore, sufficiency of essential minerals appears to resist the uptake of toxic metals. This paper explores the literature to determine a

Результат анализа



Калибратор SCIEX IVD-MS™ (около 32 мкг/л) – хроматограмма получена с помощью AB SCIEX 3200MD QTRAP® с хроматографом Shimadzu LC

Аналитические характеристики

Аналит	% CV (Low QC)	% CV (High QC)	LLOQ (мкг/л)
25-ОН-Витамин D ³	2.7	4.2	3.0
25-ОН-Витамин D ²	3.9	4.3	2.2



Answers for Science.
Knowledge for Life.™



**Анализ сухих пятен крови на
аминокислоты и ацилкарнитины –
неонатальный скрининг**

Зачем выявлять НБО?

- НБО – обширный класс редких моногенных болезней, суммарная частота которых высока (не менее чем 1:5000 живых новорожденных). Многие из НБО поддаются лечению. Для некоторых возможно полная клиническая коррекция.
- При точно установленном диагнозе возможно проведение дородовой (пренатальной) диагностики в семье.



Известно более 500 форм наследственных нарушений метаболизма. Классификация:

22 подкласса в зависимости от пораженного метаболического пути

Подклассы:	частота
Аминоацидопатии	31%
Органические ацидурии	27%
Дефекты цикла мочевины	21%
Дефекты дыхательной цепи митохондрий	12%
Гликогенозы	8%
Дефекты митохондриального в-окисления	8%
Пероксисомные заболевания	4%

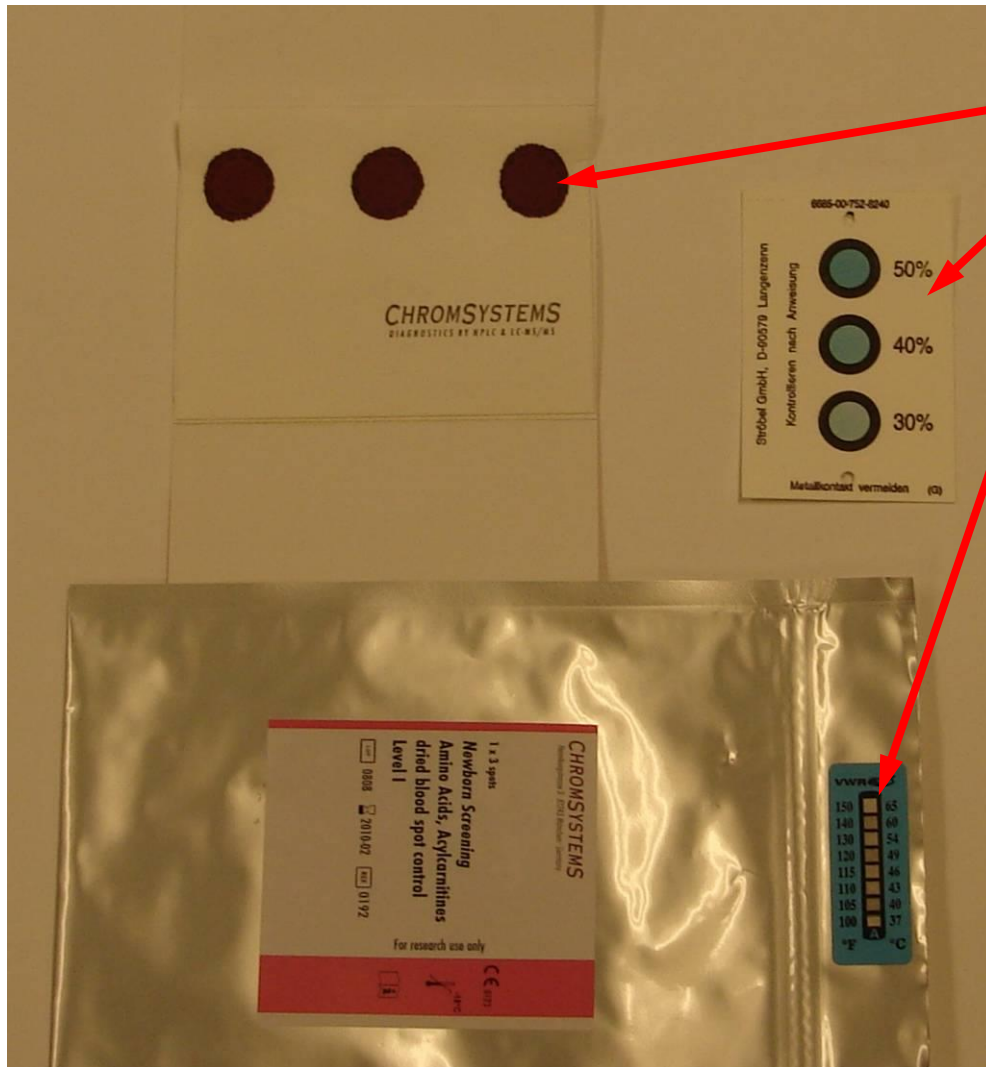
Как проявляются наследственные нарушения метаболизма. Диагностика

- В большинстве случаев заболевания сопровождаются поражением многих систем органов
- Могут проявляться в любом возрасте от младенческого до взрослого, в зависимости от метаболического дефекта
- Клинические симптомы, как правило, неспецифичны
- Многие заболевания чрезвычайно сходны по клиническим проявлениям
- Точная диагностика возможна только с помощью лабораторных методов

Тандемная масс спектрометрия- современная технология диагностики НБО

- Позволяет анализировать большое число метаболитов, а значит выявлять большое число наследственных нарушений обмена веществ
- Время анализа одного образца- несколько минут
- Требуется небольшое количество биологического материала
- В мировой практике здравоохранения этот метод используют для проведения массового скрининга новорожденных на наследственные болезни обмена веществ (НБО). В пятне высушенной крови возможно определение аминокислот (в том числе и фенилаланина) и ацилкарнитинов. Количественное определение этих веществ позволяет исключать несколько десятков наследственных заболеваний, относящихся к различным классам НБО (нарушения метаболизма аминокислот, органических кислот и дефектов митохондриального β -окисления жирных кислот).

Отбор и транспортировка проб



- Пятна крови (3 на карту)
- Индикатор влажности
- Индикатор температуры

Анализ сухих пятен крови на аминокислоты и ацилкарнитины

Рутинное количественное определение аминокислот и ацилкарнитинов с помощью тандемной масс-спектрометрии - ВЭЖХ/МС/МС (система [AB SCIEX 3200MD Series](#))

- наборы реагентов
- Данные для диагностики около 40 заболеваний, связанных с наследственными нарушениями обмена веществ полученные в результате анализа сухого пятна крови
- Простая конфигурация оборудования – не требуется хроматографическое разделение

Пример отчета о выполнении теста на аминокислоты и ацилкарнитины (с маркировкой отклонений)



Created with [ClearCore™ MD 1.0](#) – Quantitation Reporter
Printed: 12/06/2014 2:41:14 PM

Per Sample Report

Sample: High control

Sample			
Data File		Date	
Sample Number	1	Vial	85
Sample Type		Plate	1
Processing Method			

Test Name	Result	Units	Qualifier	LCL	UCL
Alanine	564.121	µM	PASSED	301	1073
Aspartic acid	219.214	µM	PASSED	199	402
Arginine	116.687	µM	PASSED	88	255
Citrulline	217.906	µM	PASSED	200	343
Glutamic acid	520.168	µM	PASSED	476	908
Glycine	378.808	µM	FAILED_TOO_LOW	641	1184
Leucine	411.888	µM	PASSED	355	712
Methionine	178.572	µM	PASSED	92	368
Ornithine	426.593	µM	PASSED	316	693
Phenylalanine	377.894	µM	PASSED	325	730
Tyrosine	422.728	µM	PASSED	353	679
Valine	276.157	µM	PASSED	275	564
C2-Carnitine	59.929	µM	PASSED	41.8	93.2
C3-Carnitine	12.188	µM	PASSED	9.49	19.8
C4-Carnitine	4.116	µM	PASSED	2.49	6.05
C5-Carnitine	1.902	µM	PASSED	1.36	3.46
C5-DC-Carnitine	3.569	µM	PASSED	1.07	3.58
C6-Carnitine	1.867	µM	PASSED	1.39	2.98
C8-Carnitine	2.037	µM	PASSED	1.47	3.33
C10-Carnitine	1.889	µM	PASSED	1.33	3.51
C12-Carnitine	1.849	µM	PASSED	1.48	3.04
C14-Carnitine	1.812	µM	PASSED	1.32	3.12
C16-Carnitine	11.866	µM	PASSED	8.03	18.2
C18-Carnitine	7.406	µM	PASSED	4.79	12.9
alanine/arginine ratio	4.834		PASSED	0	∞



Answers for Science.
Knowledge for Life.™



Аналитическая токсикология

Методические рекомендации



Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы
"ФЕДЕРАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ"

127083, Россия, г. Москва, ул. 8 Марта, д.1, стр.12, этаж 3; info@fedlab.ru, www.fedlab.ru

3.2. Медицинские организации (лаборатории), выполняющие предварительные и подтверждающие химико-токсикологические исследования

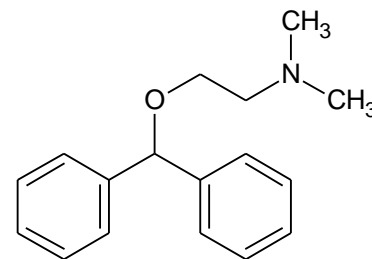
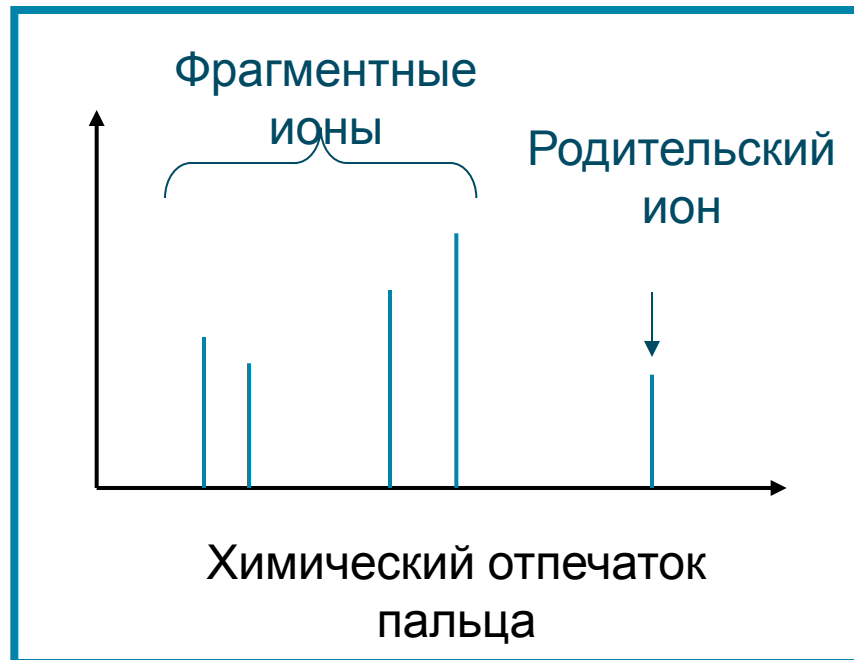
МЕТОДИЧЕСКИЕ

Правила проведения исследований на преобучающихся в общеобразовательных профессиональных образовательных организациях в целях реализации потребностей в образовании в сфере потребления наркотических веществ наркотических и токсических веществ

Методические

№ п/п	Наименование оборудования	Количество единиц
Аналитическое оборудование		
1	Оборудование для анализа проб методом ВЭЖХ/МС/МС, включая: тандемный квадрупольный масс-спектрометр; управляющий компьютер; программное обеспечение для управления масс-спектрометром и жидкостным хроматографом; программное обеспечение для обработки и хранения результатов анализа; библиотеки масс-спектров; принтер для распечатки результатов анализа; высокоэффективный жидкостной хроматограф с системой автоматического ввода образцов (автосамплер), двумя насосами, дегазатором, UV-детектором, термостатом; газогенераторную станцию для газоснабжения масс-спектрометра с компрессором (компрессорами).	Не менее 1

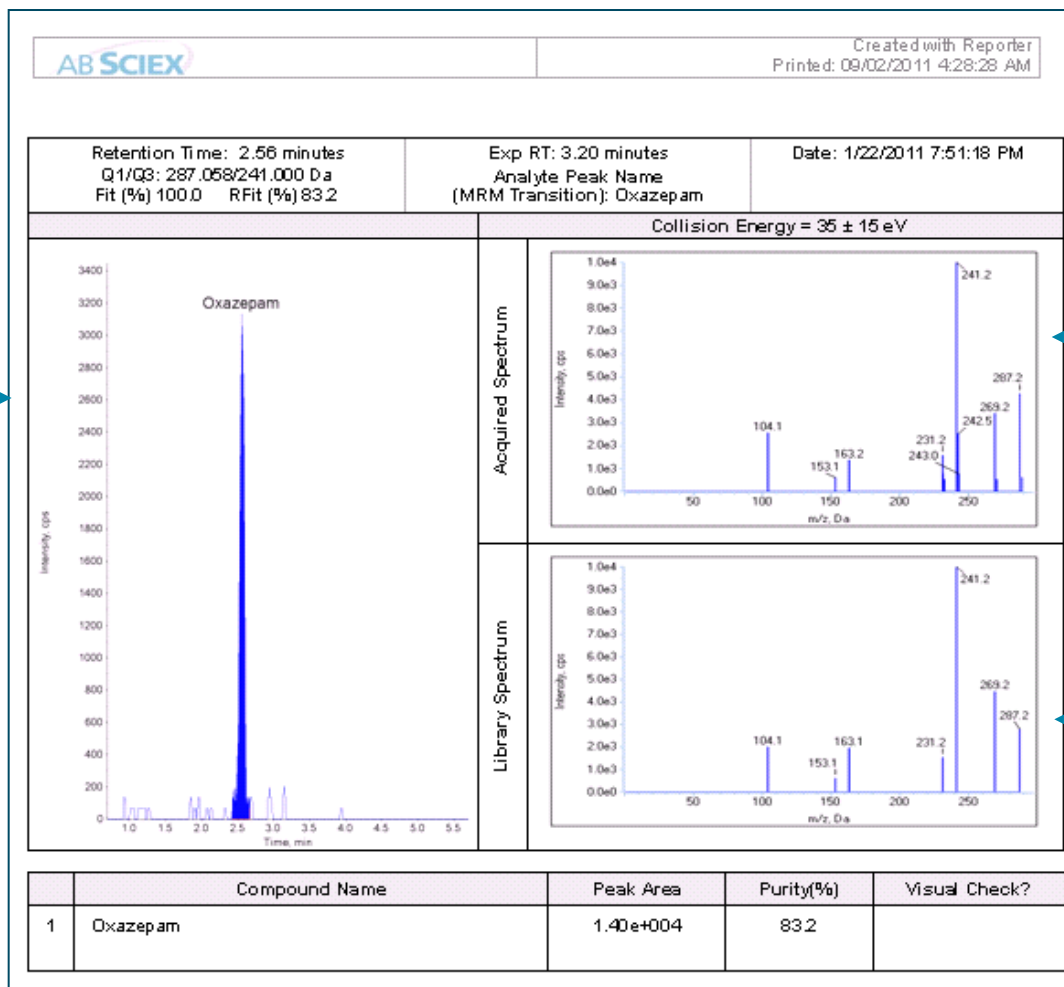
Использование МС/МС библиотек



Многоцелевой скрининговый подход с MRM детектированием на системах Q TRAP®

Обзорный скан: MRM
Зависимый скан: EPI

MRM для
Оксазепама
287.1/241.0
↑
(Детекция)



Полученный спектр
↑
(Подтверждение)
↓
Библиотечный спектр
Оксазепама

Подтверждающий анализ на наркотики

Основные характеристики:

>300 соединений в рутинном

скрининговом методе

8-12 минут – время анализа

Подтверждение с помощью

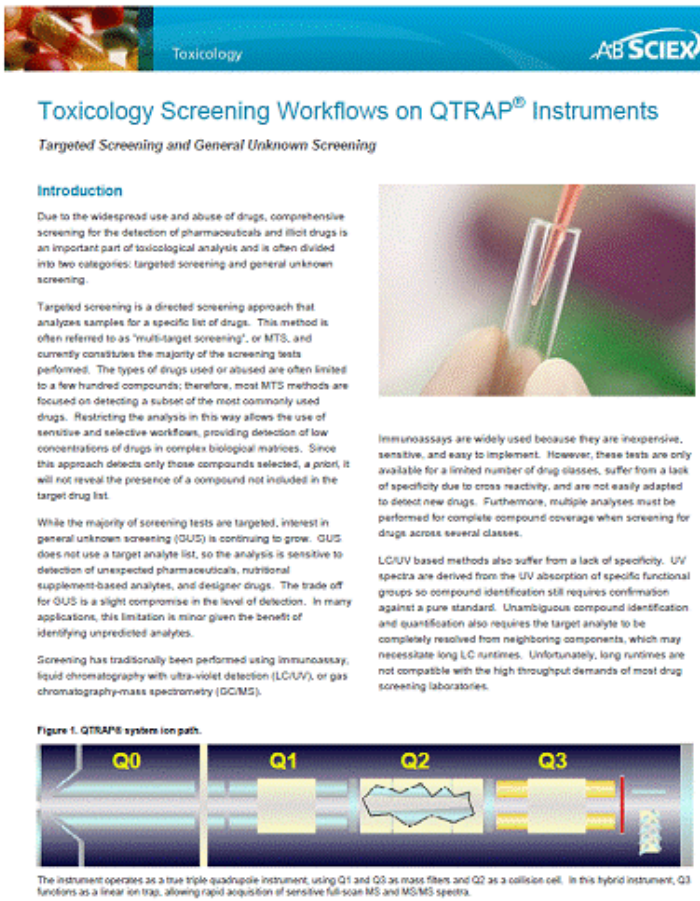
спектральных библиотек

>1400 веществ в библиотеке

Возможность работы с любыми

матрицами

Готовая методика анализа



Toxicology **AB SCIEX**

Toxicology Screening Workflows on QTRAP® Instruments

Targeted Screening and General Unknown Screening

Introduction

Due to the widespread use and abuse of drugs, comprehensive screening for the detection of pharmaceuticals and illicit drugs is an important part of toxicological analysis and is often divided into two categories: targeted screening and general unknown screening.

Targeted screening is a directed screening approach that analyzes samples for a specific list of drugs. This method is often referred to as "multi-target screening", or MTS, and currently constitutes the majority of the screening tests performed. The types of drugs used or abused are often limited to a few hundred compounds; therefore, most MTS methods are focused on detecting a subset of the most commonly used drugs. Restricting the analysis in this way allows the use of sensitive and selective workflows, providing detection of low concentrations of drugs in complex biological matrices. Since this approach detects only those compounds selected, a priori it will not reveal the presence of a compound not included in the target drug list.

While the majority of screening tests are targeted, interest in general unknown screening (GUS) is continuing to grow. GUS does not use a target analyte list, so the analysis is sensitive to detection of unexpected pharmaceuticals, nutritional supplement-based analytes, and designer drugs. The trade off for GUS is a slight compromise in the level of detection. In many applications, this limitation is minor given the benefit of identifying unpredicted analytes.

Screening has traditionally been performed using immunoassays, liquid chromatography with ultra-violet detection (LC/UV), or gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS).

Immunoassays are widely used because they are inexpensive, sensitive, and easy to implement. However, these tests are only available for a limited number of drug classes, suffer from a lack of specificity due to cross reactivity, and are not easily adapted to detect new drugs. Furthermore, multiple analyses must be performed for complete compound coverage when screening for drugs across several classes.

LC/UV based methods also suffer from a lack of specificity. UV spectra are derived from the UV absorption of specific functional groups so compound identification still requires confirmation against a pure standard. Unambiguous compound identification and quantification also requires the target analyte to be completely resolved from neighboring components, which may necessitate long LC runtimes. Unfortunately, long runtimes are not compatible with the high throughput demands of most drug screening laboratories.

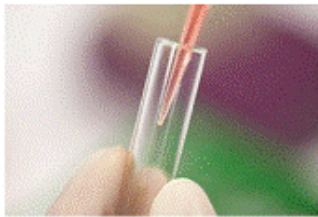
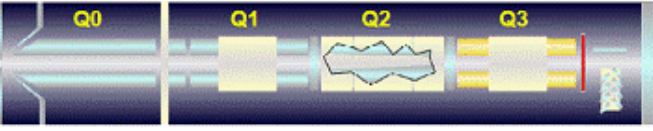


Figure 1. QTRAP® system ion path.



The instrument operates as a true triple quadrupole instrument, using Q1 and Q3 as mass filters and Q2 as a collision cell. In this hybrid instrument, Q3 functions as a linear ion trap, allowing rapid acquisition of sensitive full-scan MS and MS/MS spectra.

- Анализ стероидов
 - Панель стероидов
 - Тестостерон
 - Низкие концентрации тестостерона
 - Эстроген/Эстрадиол
- Биомаркеры
 - Гомоцистеины
 - Гомованилиновая кислота
 - Метанефрины
 - Т3/Т4/FT3/FT4
 - Этилсульфаты и этилглюкорониды
 - Метаболиты никотина
 - Гемоглобинопатии

Для лабораторий, нуждающихся в новых технологиях для повышения скорости анализа, селективности и чувствительности - результаты, которым можно доверять



**AB SCIEX
API 3200MD™
QTRAP® 3200MD**

Источник Turbo V™

с зондами
TurboIonSpray® или
APCI



Analyst® MD SW



Cliquant® MD SW

Серия **AB SCIEX 3200MD** устанавливает новый стандарт **надежного рутинного количественного анализа множественных аналитов** в клинической лабораторной диагностике.

Также доступна с **уникальной функцией QTRAP®**, позволяющей **проводить одновременный количественный и качественный анализ** повышая таким образом **уровень достоверности**.

Понятный оператору интерфейс – **ПО Cliquant® с поддержкой русского языка**, а также специализированная **методическая и сервисная поддержка**, позволяет серии **3200MD** стать **идеальной стартовой системой** для КДЛ

Выводы

- Тандемная масс-спектрометрия – универсальная технология с большим потенциалом применения в клинических лабораториях
- Масс-спектрометрия является альтернативой иммунохимическим методам и позволяет повысить достоверность, снизить издержки, снизить количество выполняемых анализов
- Технология AB SCIEX разработана с учетом обширного опыта в области клинических исследований, что дает уверенность в успешном внедрении в клиническую лабораторную диагностику масс-спектрометров API 3200MD™ & 3200MD QTRAP®



Answers for Science.
Knowledge for Life.™

