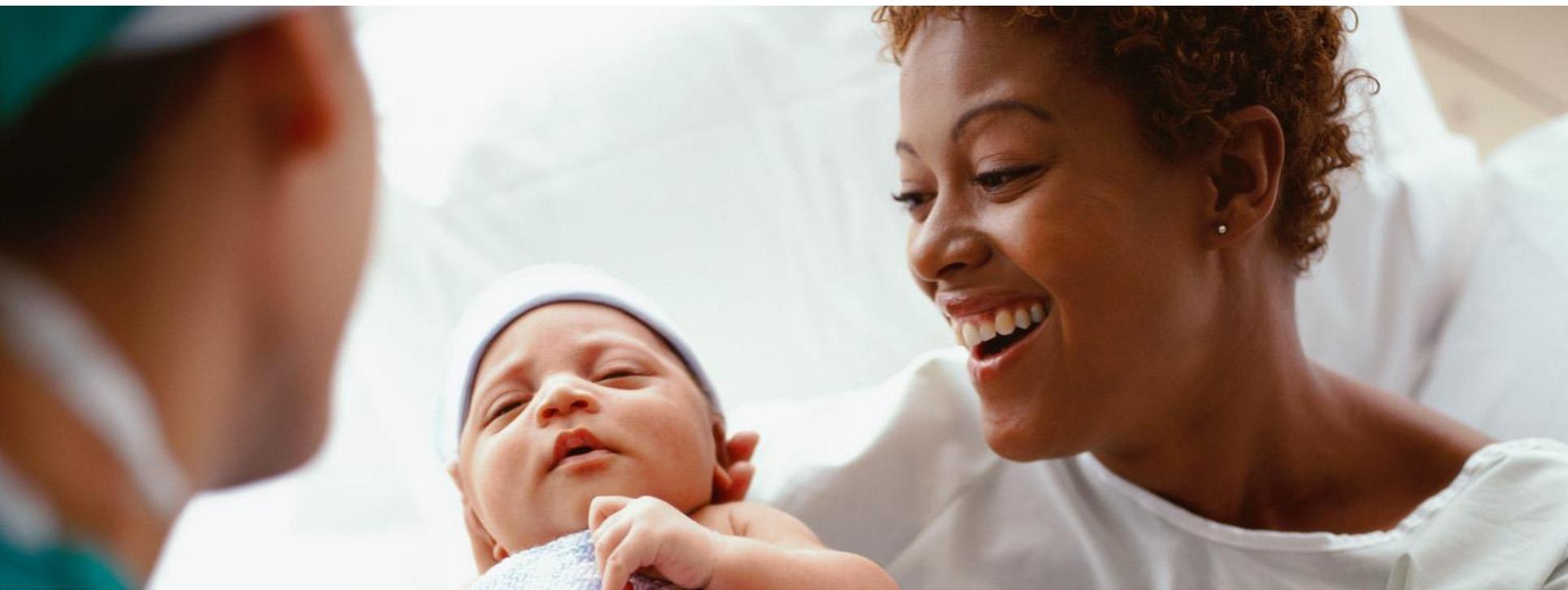




ХИМЭКСПЕРТ



Применение методов масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) в современной клинической лаборатории – обзор приложений, преимущества использования, современные подходы и возможности автоматизации.

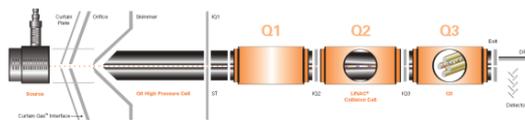
Александр Кирилук PhD

Москва, ул Краснопролетарская, 7. т. 499-973-92-80

IVD-MKT-11-0769-A

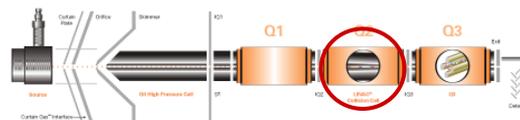


Основные типы тандемных масс-анализаторов



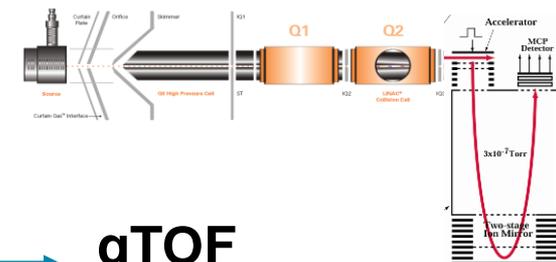
Triple Quad

- Количественный анализ
- ID - MRM



QTRAP®

- Количественный анализ
- ID - MRM
- ID - MS/MS



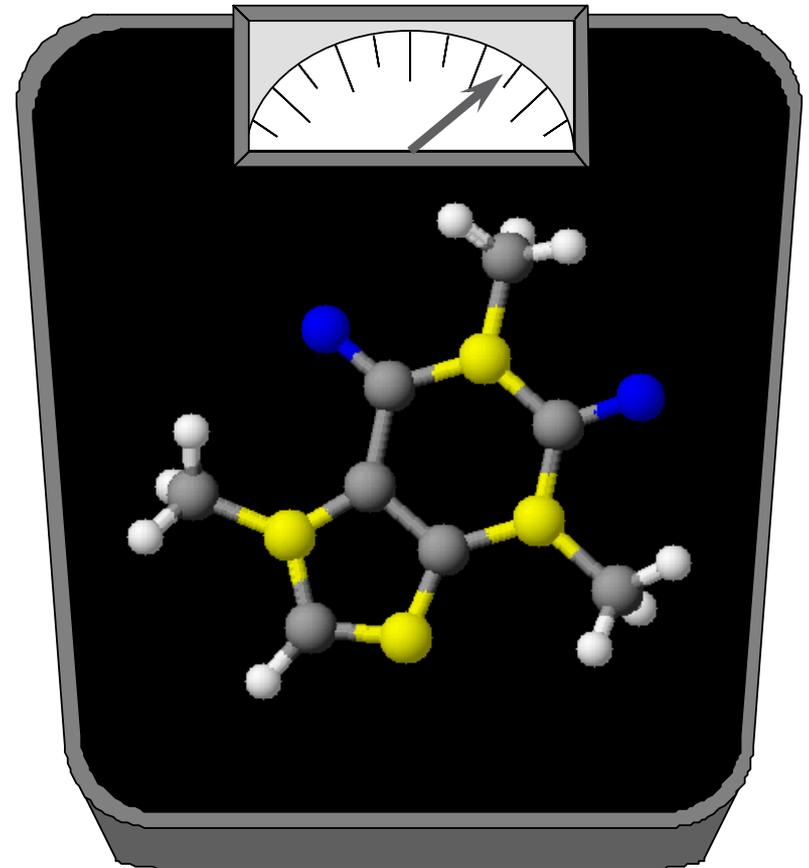
qTOF

- Количественный анализ
- ID – точность определения массы
- ID - MS/MS и библиотечный поиск
- Ретроспективный анализ

**Скорости анализа, селективность и чувствительность
широкий диапазон**

- Источники ионов

- Типы масс-анализаторов



Компактность



Роботизация и автоматизированные системы подготовки образцов

DPX-LC/MS/MS

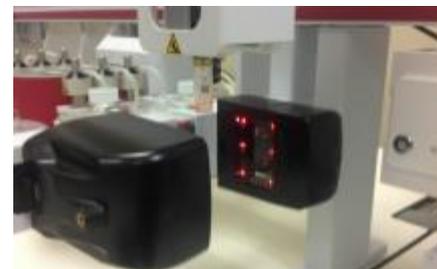


Load



Clean

IVD-MK1-11-0769-A



Analyze



Сравнение ГХ/МС и ВЭЖХ/МС/МС

- *ГХ/МС* часто требует обширной, трудоемкой пробоподготовки в том числе дериватизацию.
- *ГХ/МС* протоколы подготовки проб часто являются специфическими для класса соединений, ограничивая скрининг аналитов по нескольким классам соединений
- У *ГХ/МС* меньшая чувствительность и динамический диапазон
- Трудоемкое обслуживание

Преимущества ВЖХ/МС/МС

- **Точность, специфичность, селективность.** Точный количественный анализ. Преимущество по сравнению с альтернативными технологиями, такими, как ИФА или ГХ/МС (подтверждение)
- **Надежность.** Анализ 1000-х аналитов в сложной матрице
- **Чувствительность.** На уровне нг/мл- пг/мл. Отличная воспроизводимость и динамический диапазон
- **Гибкость и Универсальность.** Позволяет легко добавлять аналиты в анализ. Нет перекрестной реактивности!
- **Стандартная Пробоподготовка.** Та же для разных классов соединений! Не требует сложной дериватизации
- **Возможен Прямой Ввод.**
- **Низкая цена анализа за образец** по сравнению с другими технологиями
- **Скорость (UPLC).** Ответы за минуты! Высокая пропускная способность
- **Простота в использовании.** Автоматизация/отчетность снижает рутинную трудоемкость

Тандемная масс-спектрометрия – замена иммунохимических методов?

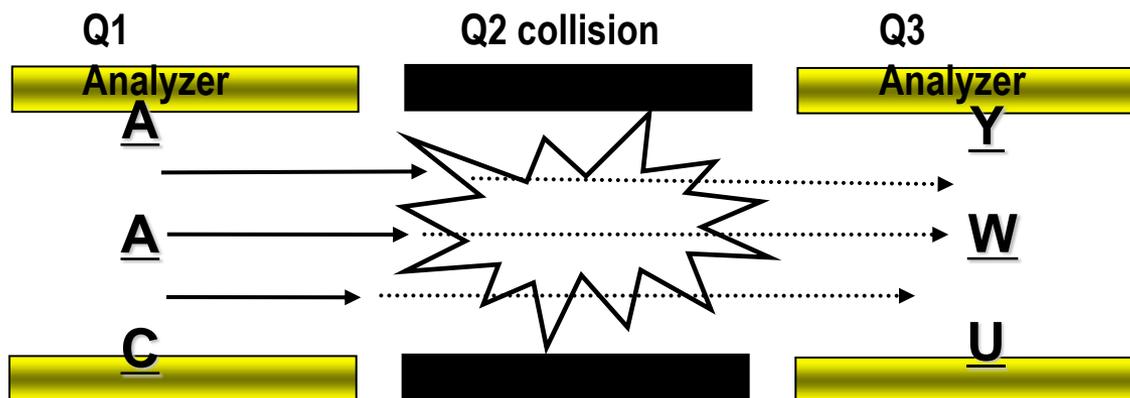
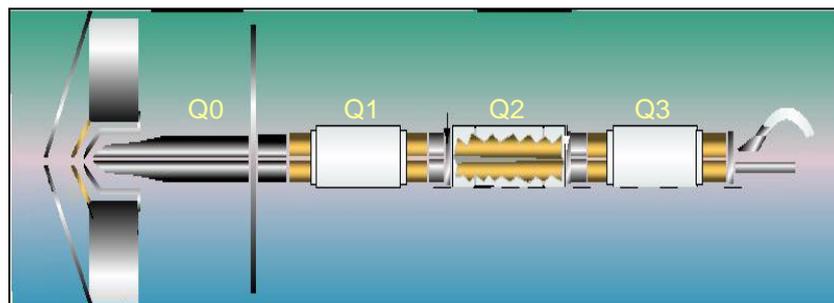
Основные проблемы применения	Применение ИФА	Применение масс-спектрометрии
Проблемы специфичности	Хорошо описанные проблемы кросс-реакций и наложений.	Детекция методом селекции масс позволяет добиться более надежных и достоверных результатов
Низкие пределы количественного анализа	ИФА тесты достигли своих 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

Основы Метода тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС-МС), с квадрупольным масс-спектрометром

Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Лучшая селективность – низкий предел обнаружения и количественного анализа

Одновременный Количественный анализ множества аналитов



A-Y : Количественный анализ

A-W : Подтверждение

C-U : Внутренний стандарт

Клинические исследования с применением ВЭЖХ/МС/МС

Терапевтический мониторинг лекарств

Иммунодепрессанты

Обезболивающие препараты

Антиретровирусные препараты

Противосудорожные препараты

Нейролептики

Антираковые агенты
и многие другие

Исследования врожденных пороков метаболизма

Более 40 заболеваний

Обмен Жирных кислот

Оксидативные нарушения

Аминокислоты

Ацилкарнитины

Формы гемоглобинов
и многие другие

Биомаркеры

Стероиды

Витамин D и метаболиты

T3/T4

Гомоцистеин

Катехоламины

Оротовая кислота

Длинноцепочечные жирные кислоты

Желчная кислоты

Раковые маркеры (Пептиды и белки)

Токсикологические исследования

Полный скрининг лекарств

Наркотики

Каннабиоиды

Опиаты

Амфетамины

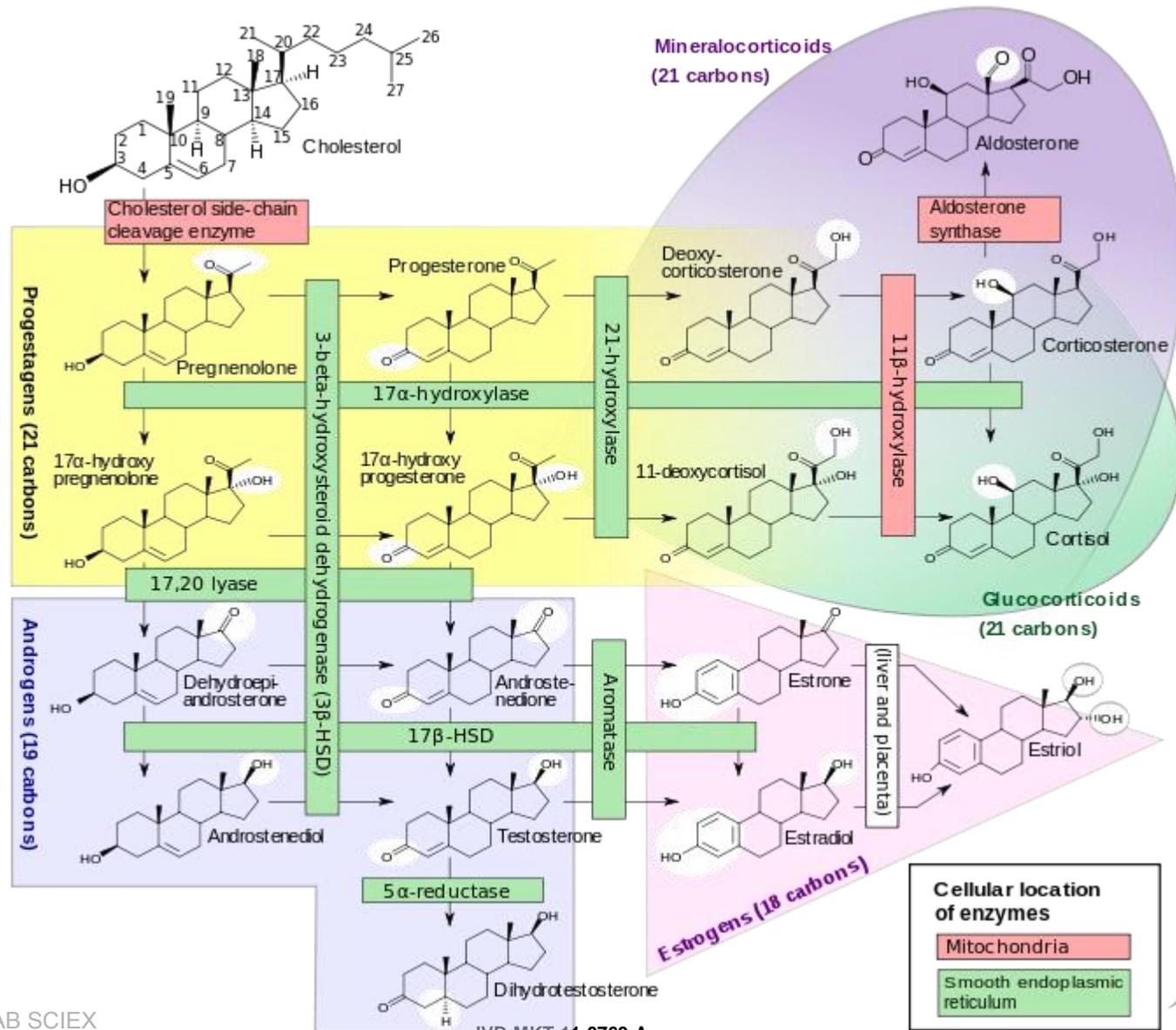
Бензодиазепины

Обезболивающие препараты

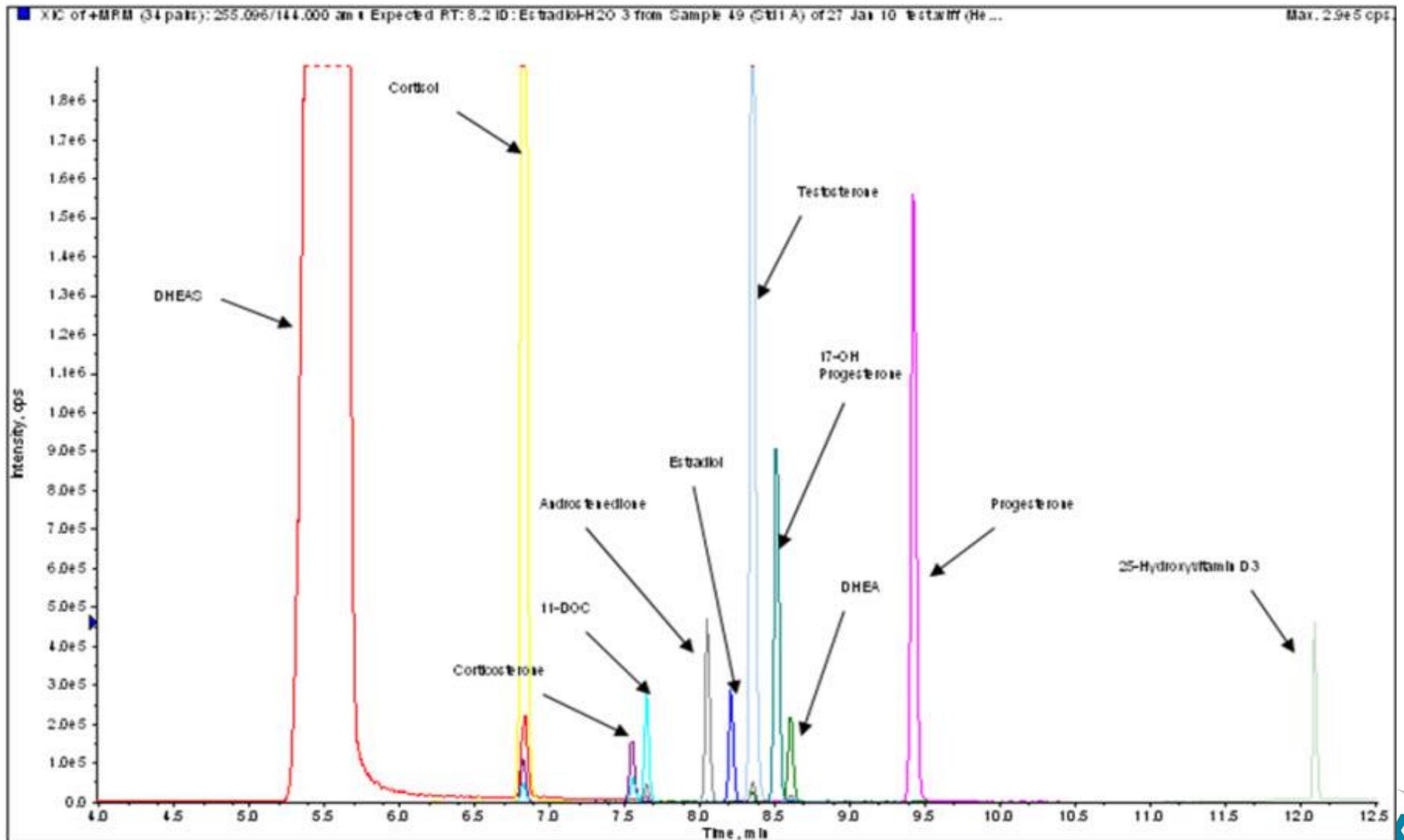
Барбитураты

и многие другие

Стероиды



Стероидная панель



Витамины D

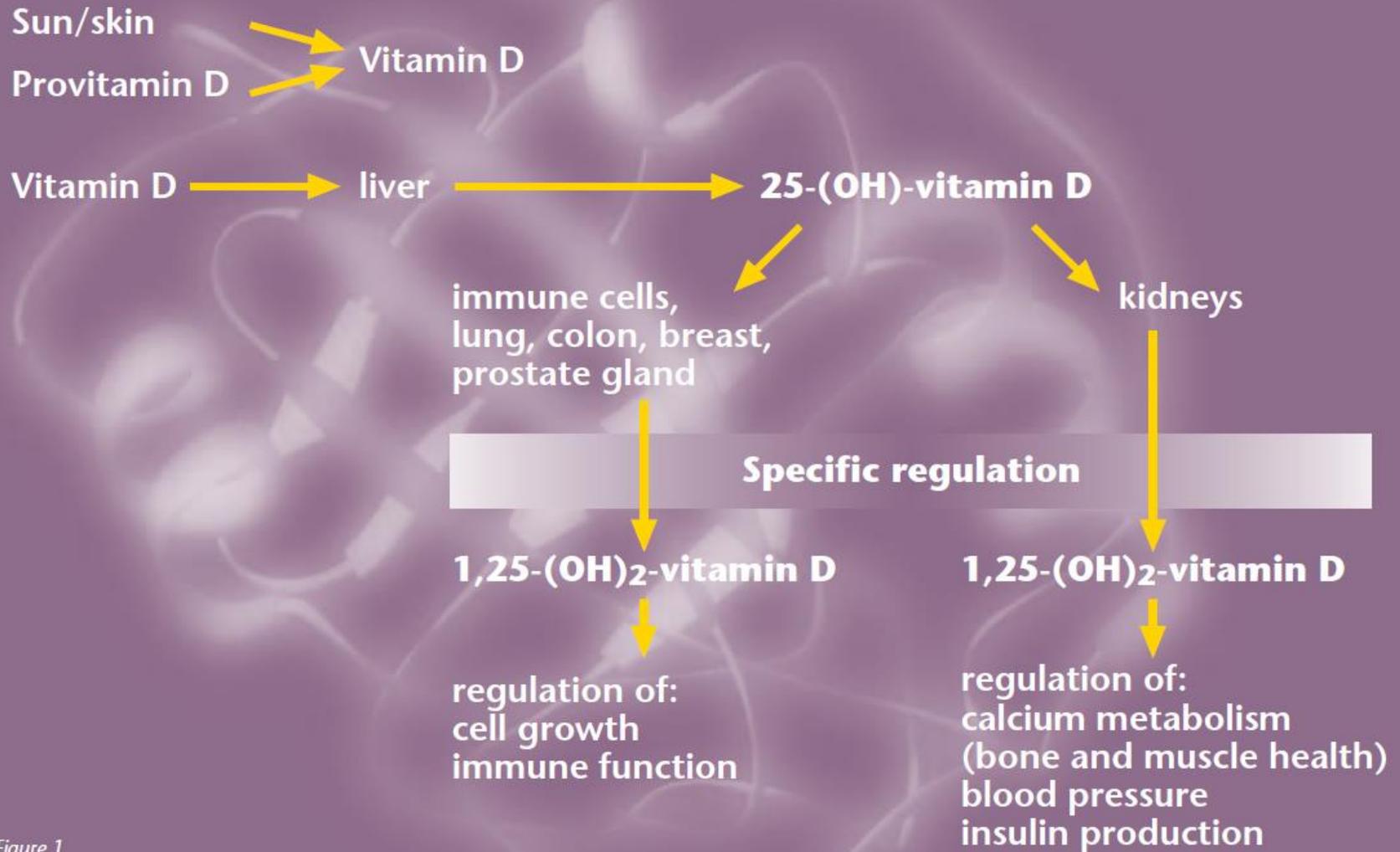


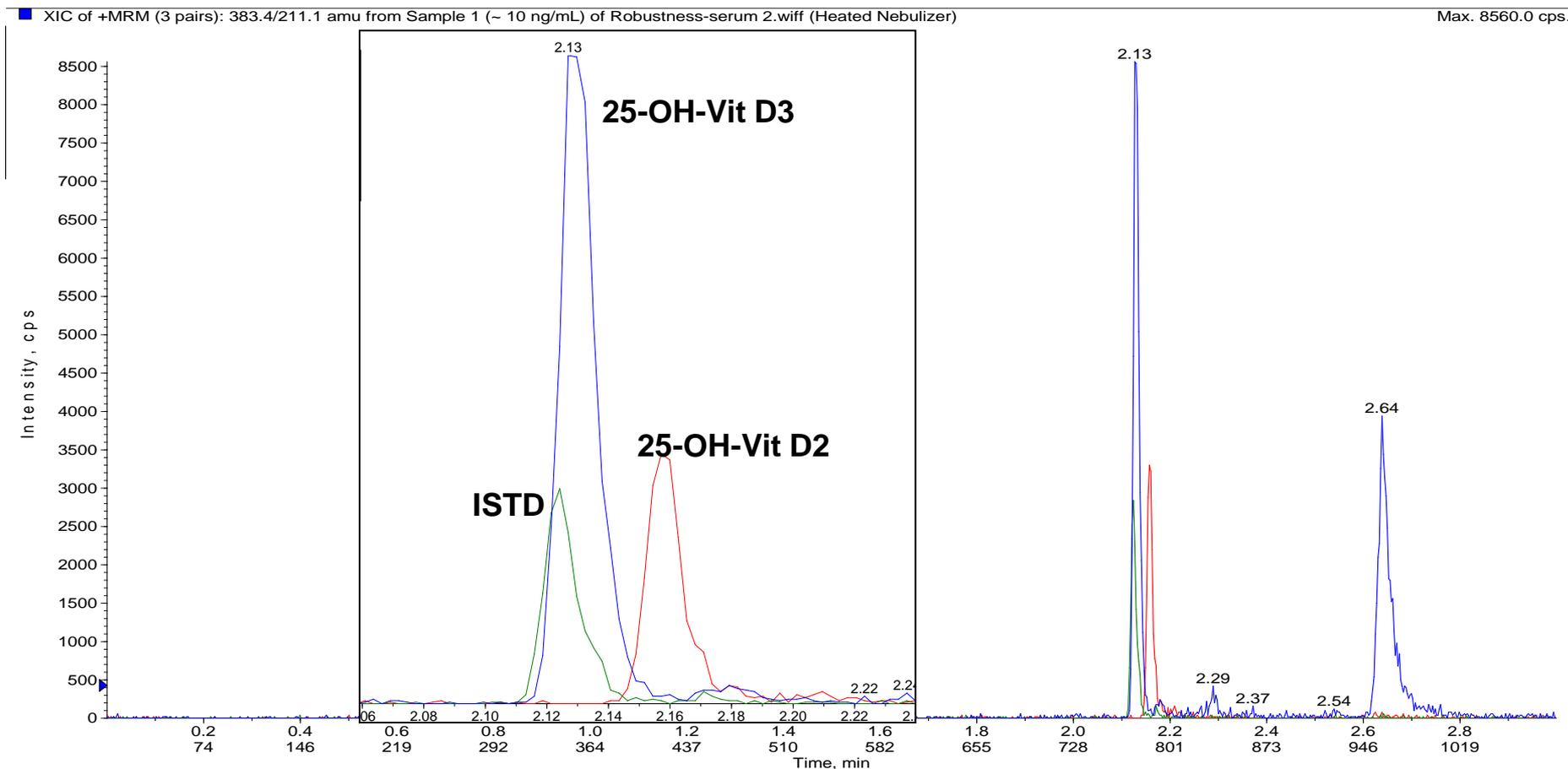
Figure 1

Анализ витамина D

- Дефицит витамина D связывают с различными заболеваниями такими, как рак, нарушения иммунной системы, болезни сердца, диабет и другими проблемами со здоровьем. За последние пару лет это привело к значительному росту количества исследований связанных с изучением витамина D.
- ВЭЖХ/МС/МС спектрометрия быстро приобрела статус референтного метода детектирования и количественного анализа витамина D в биологических образцах



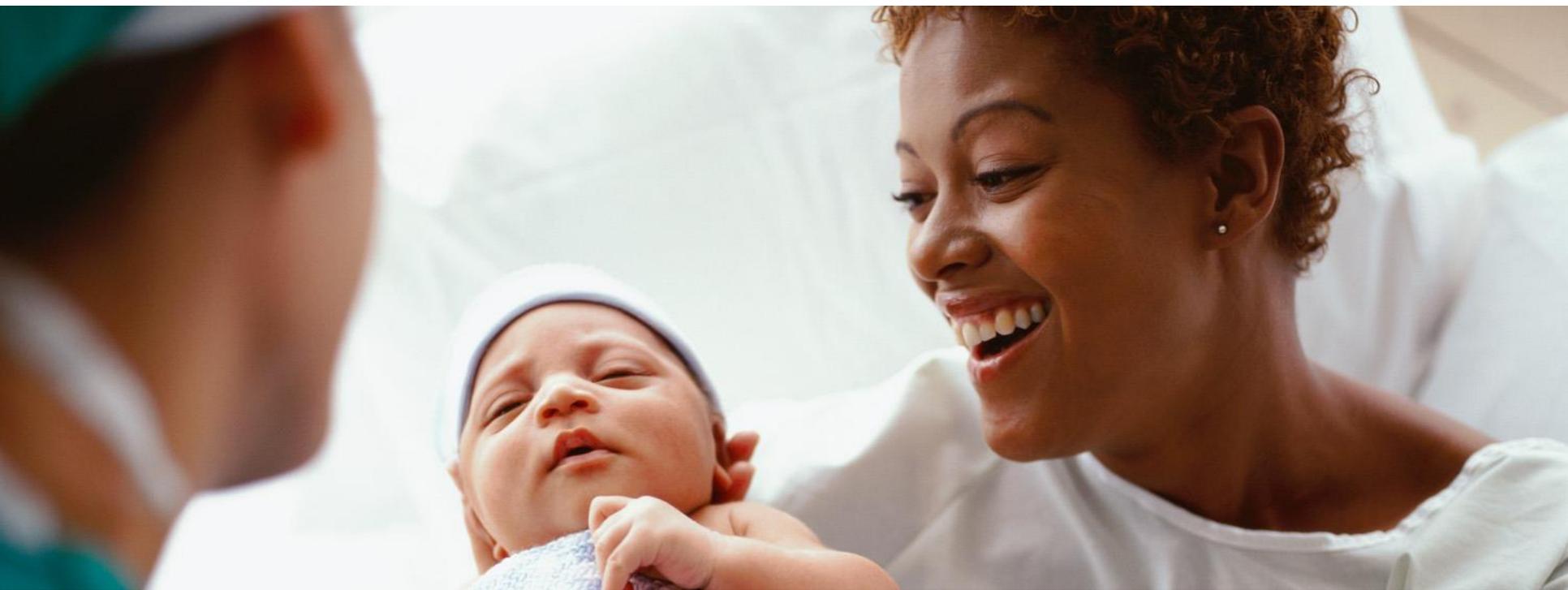
Пример хроматограммы образца ОН-витамина-D3 и ОН-витамина-D2 выполненных на системе 4000 QTRAP



LOQ 25-OH Vit D2, D3, 1-2 ng/ml on API 4000 LC/MS/MS System



Мониторинг препаратов с узким терапевтическим диапазоном



Скрининг

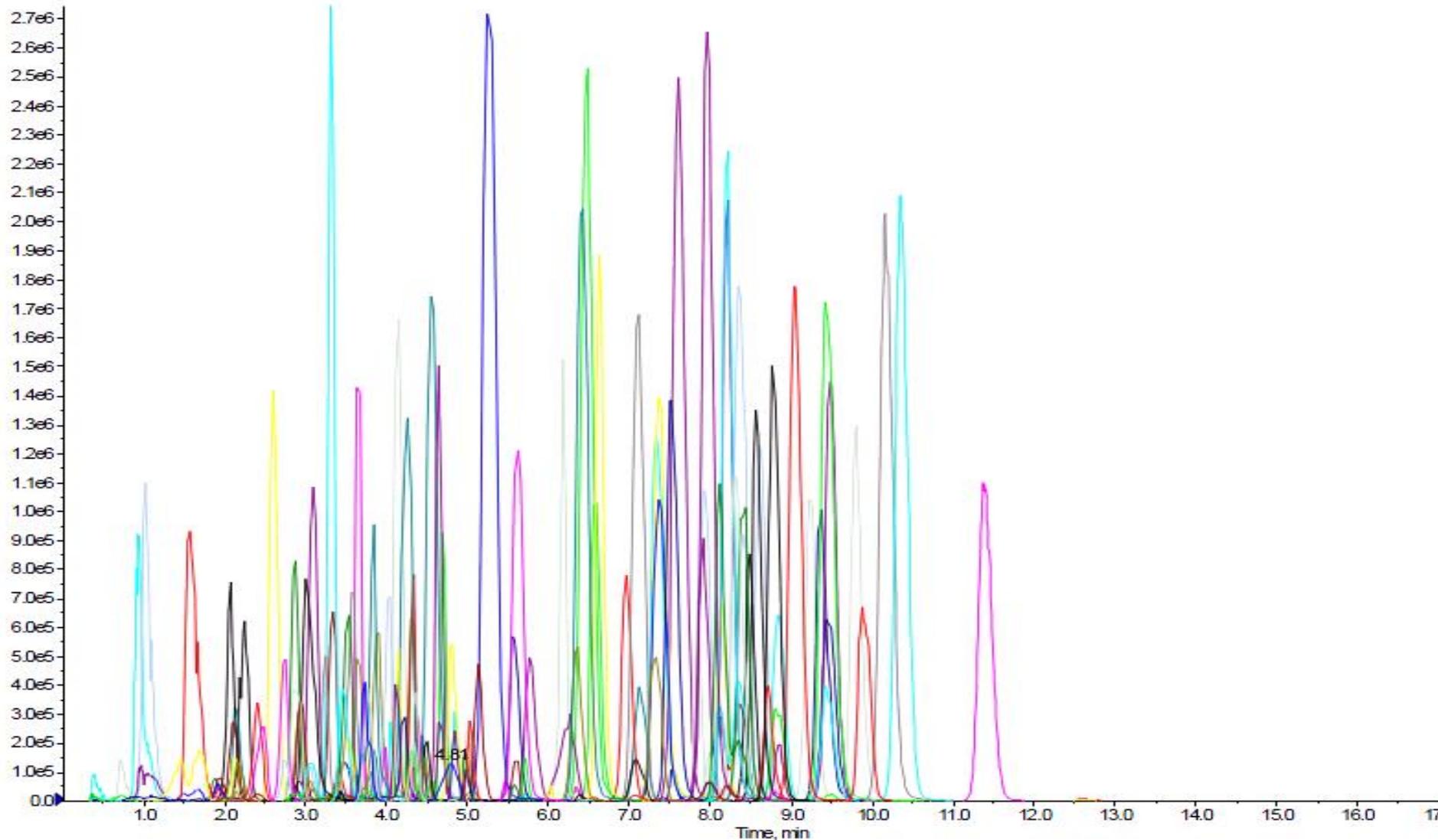
IVD-MKT-11-0769-A



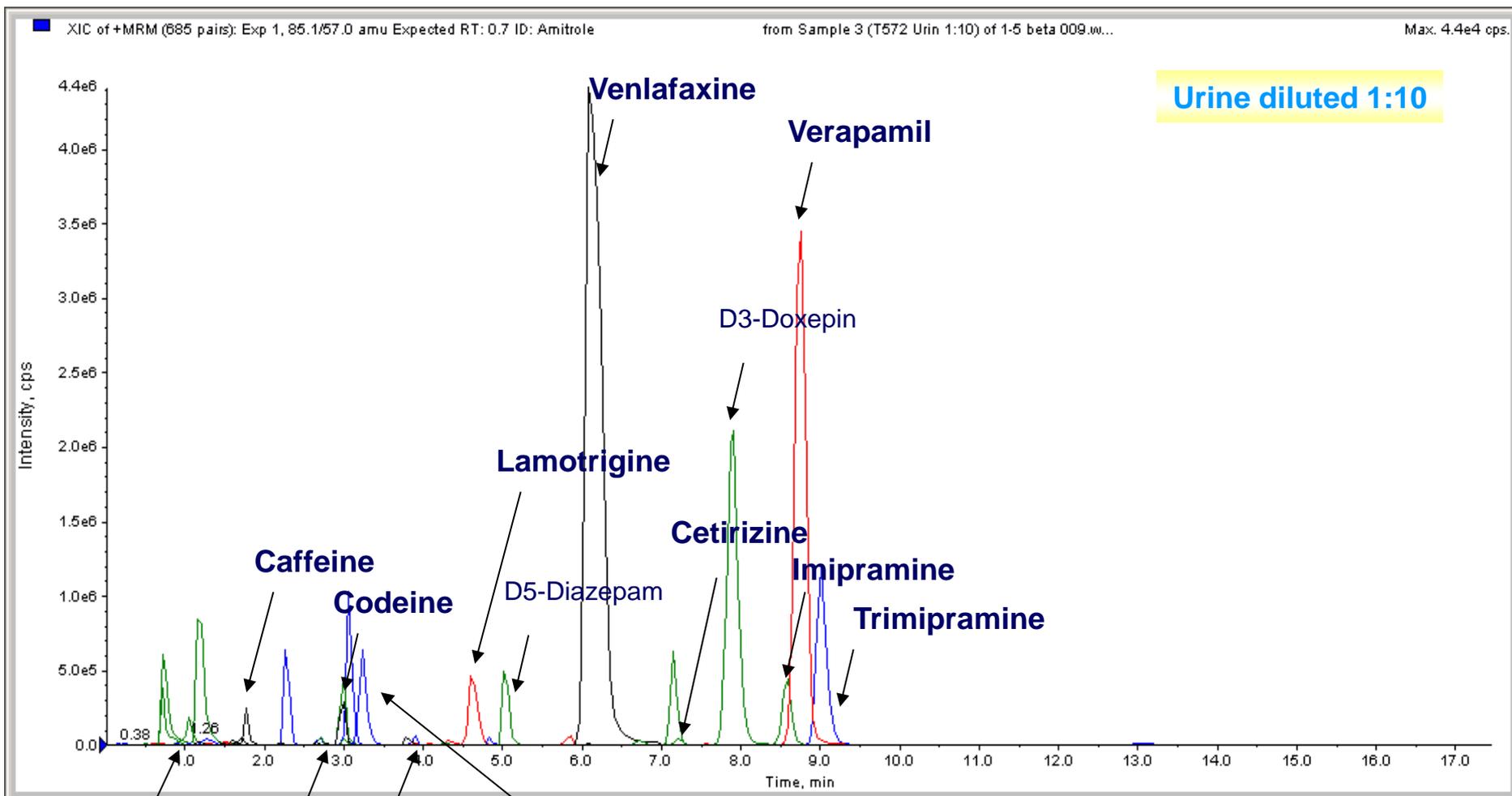
Анализ образца мочи на 697 лекарств

XIC of +MRM (697 pairs): 303.232/109.100 amu Expeded RT: 5.2 ID: 17-alpha-Methyltestosterone from Sample 3 (700M) of 091112-700-sM...

Max. 1.3



Пациент страдающий от хронической депрессии и эпилепсии. В анамнезе- множественные попытки самоубийства.



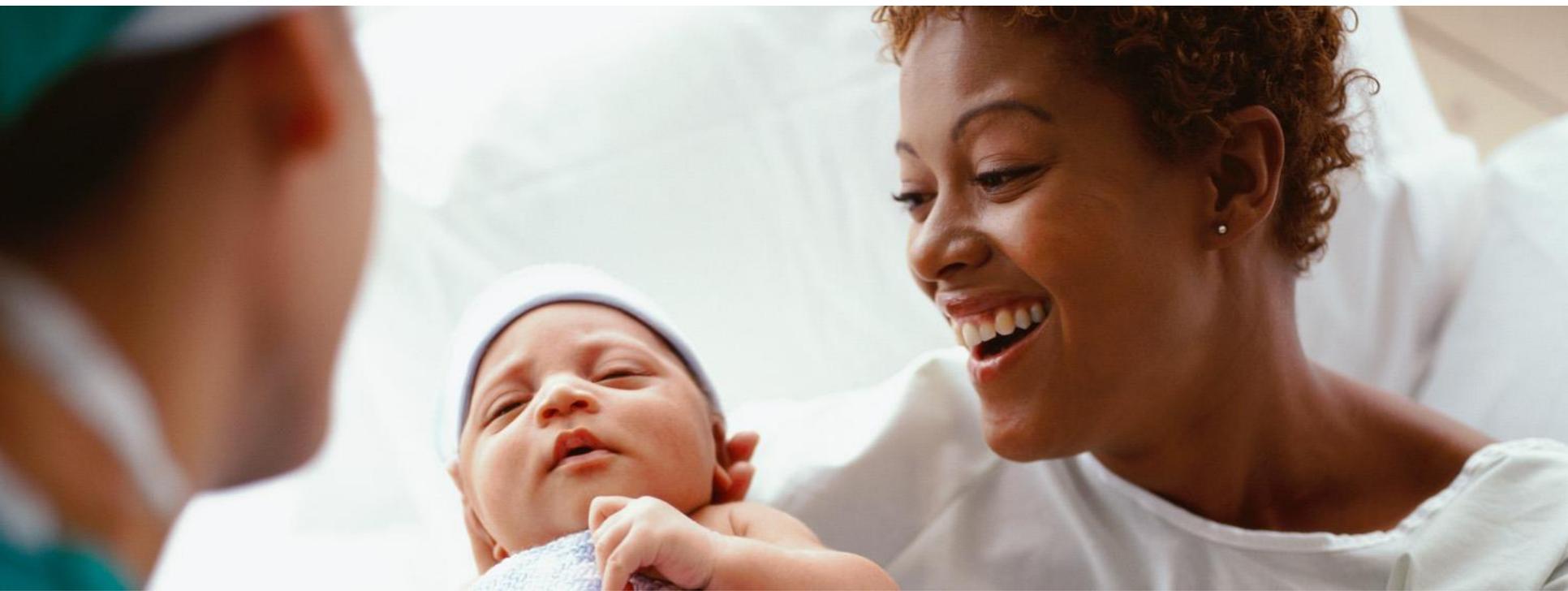
Paracetamol

Oxazepam

Lisinopril

Sulpiride

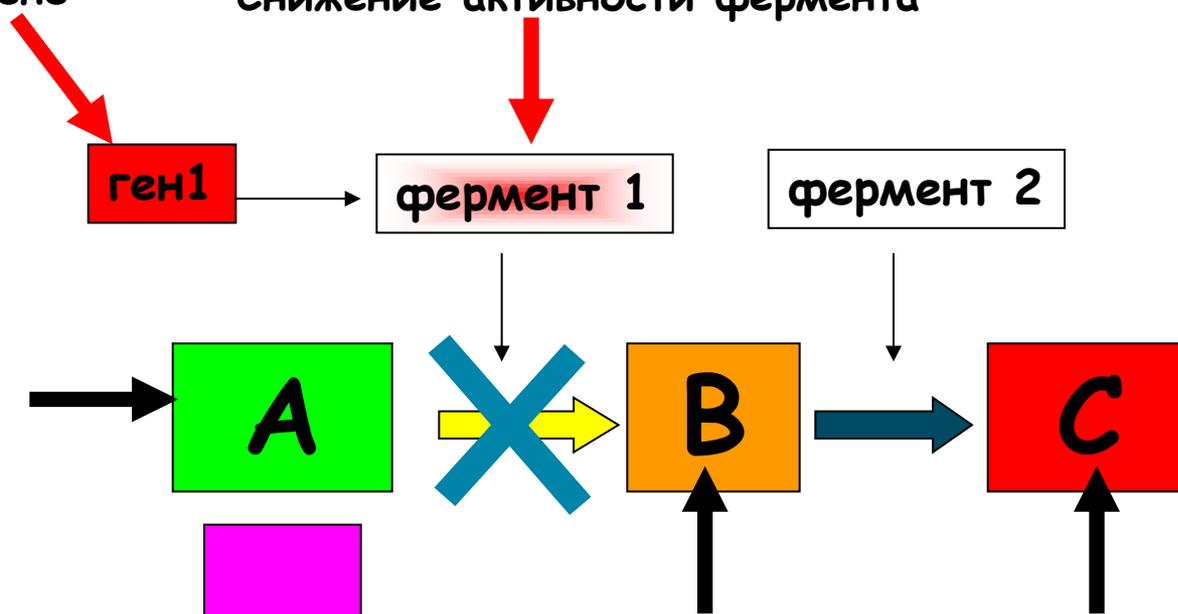
IVD-MKT-11-0769-A



Наследственные болезни обмена веществ

Мутации в гене

Снижение активности фермента



Увеличение количества субстрата

Снижение количества продуктов реакции

A1, A2

Увеличение содержания производных субстрата в биологических жидкостях или тканях

Наследственные нарушения метаболизма – редкие заболевания.

Частота встречаемости

Заболевания

Частота

Аутосомно-рецессивный тип наследования

Фенилкетонурия	1:8 000
Болезнь Тея-Сакса (среди евреев-ашкенази)	1:120 000
Болезнь Гоше	1:3 000
Болезнь Краббе	1:40 000
	1:100 000

X-сцепленный рецессивный тип наследования

X-сцепленная адренолейкодистрофия	1:40 000
Мукополисахаридоз тип II	1:70 000

Как проявляются наследственные нарушения метаболизма. Диагностика

- В большинстве случаев заболевания сопровождаются поражением многих 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

■ 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.



IVD-MKT-11-0769-A

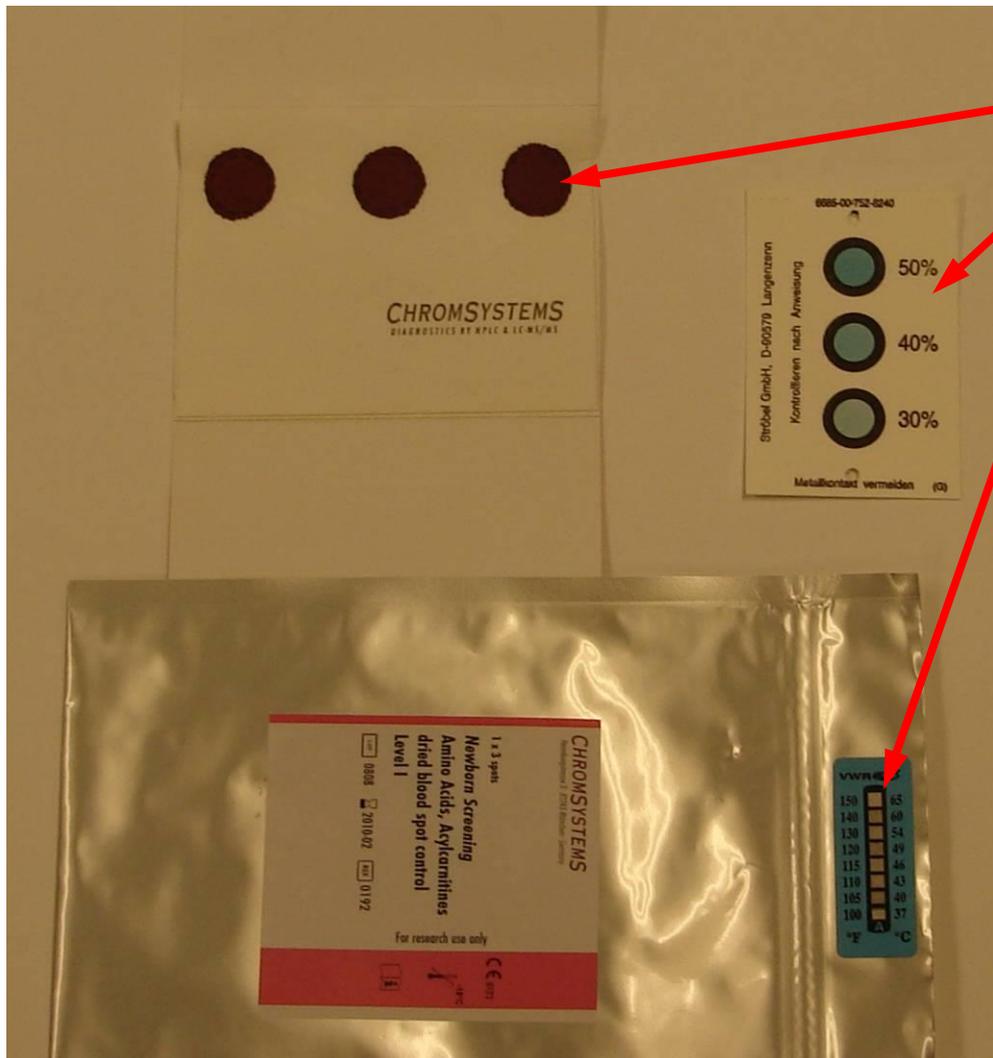
Массовый скрининг новорожденных

- Во всех странах проводится массовое обследование новорожденных на некоторые из НБО (фенилкетонурия)
- Современные технологии позволяют проводить скрининг на многие из НБО. Для их диагностики необходимо уникальные и дорогостоящие биохимические тесты, а частота их в популяции не велика, что не позволяет включать их в программу массового скрининга на НБО.

Тандемная масс спектрометрия- современная технология диагностики НБО

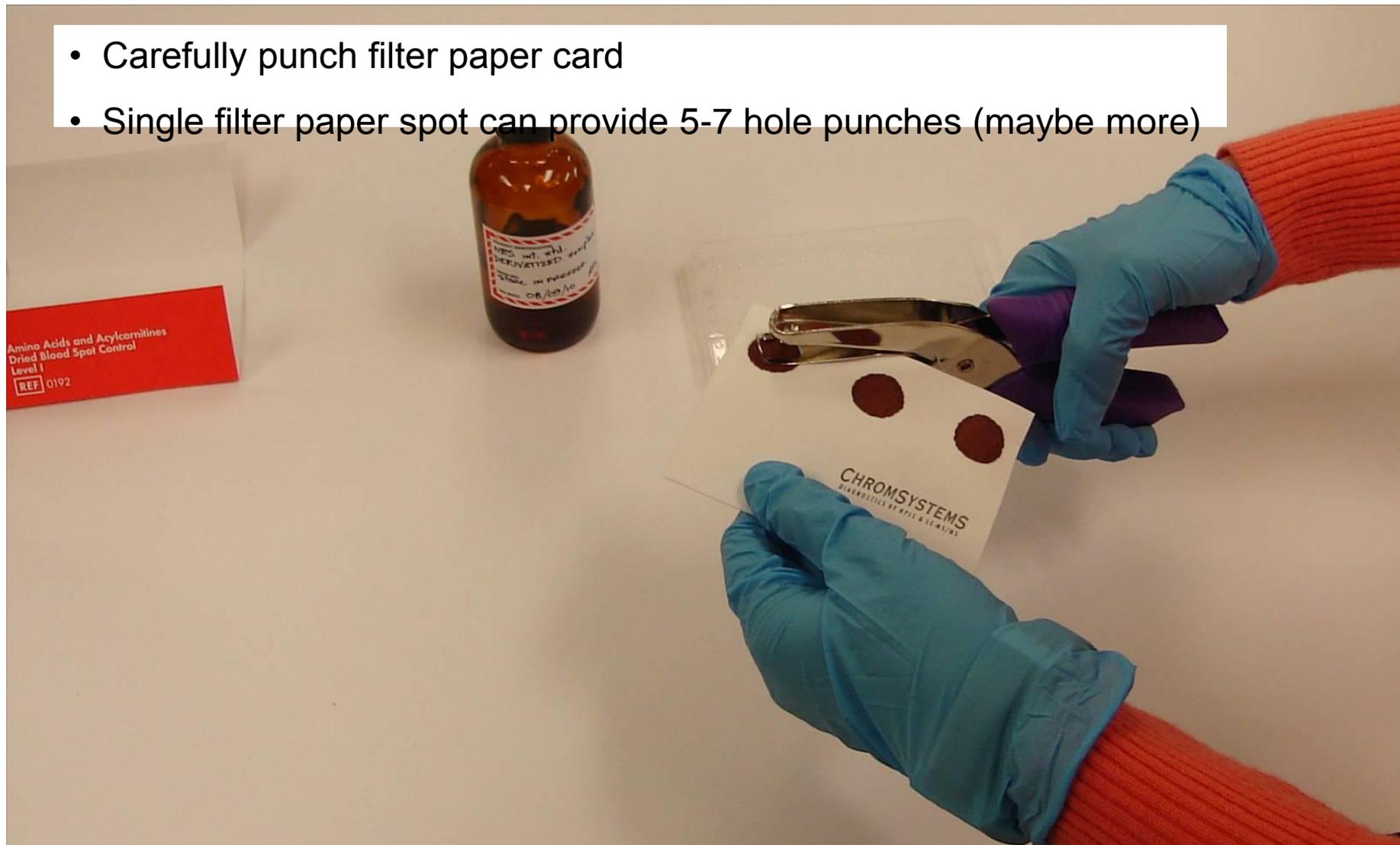
- В некоторых странах скрининг включает 30-40 форм НБО
- Позволяет анализировать большое число метаболитов, а значит выявлять большое число наследственных нарушений обмена веществ
- Время анализа одного образца- несколько минут
- Требуется небольшое количество биологического материала
- В мировой практике 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).



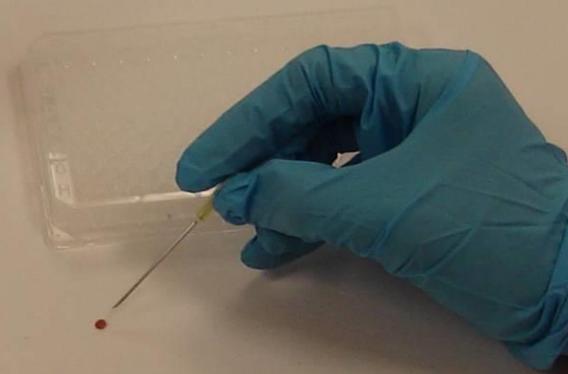


- 3 пятна
- Индикатор влажности
- Индикатор температуры

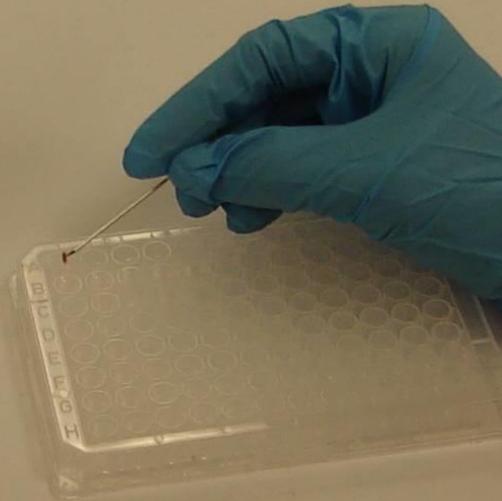
- Carefully punch filter paper card
- Single filter paper spot can provide 5-7 hole punches (maybe more)



- Carefully collect filter paper spot



- Place filter paper spots into well plates



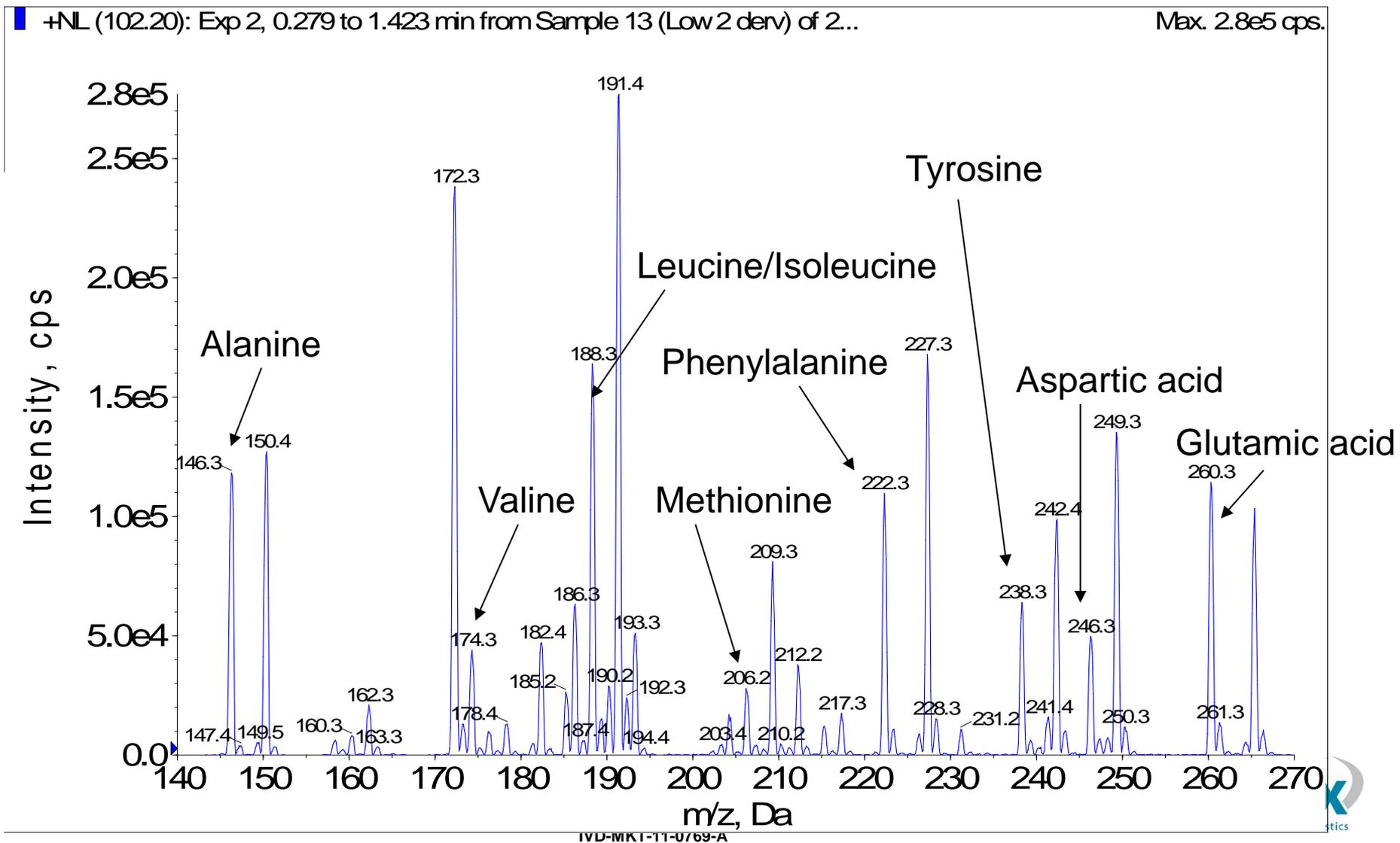
- Add 200 μ L of extraction solution to each well



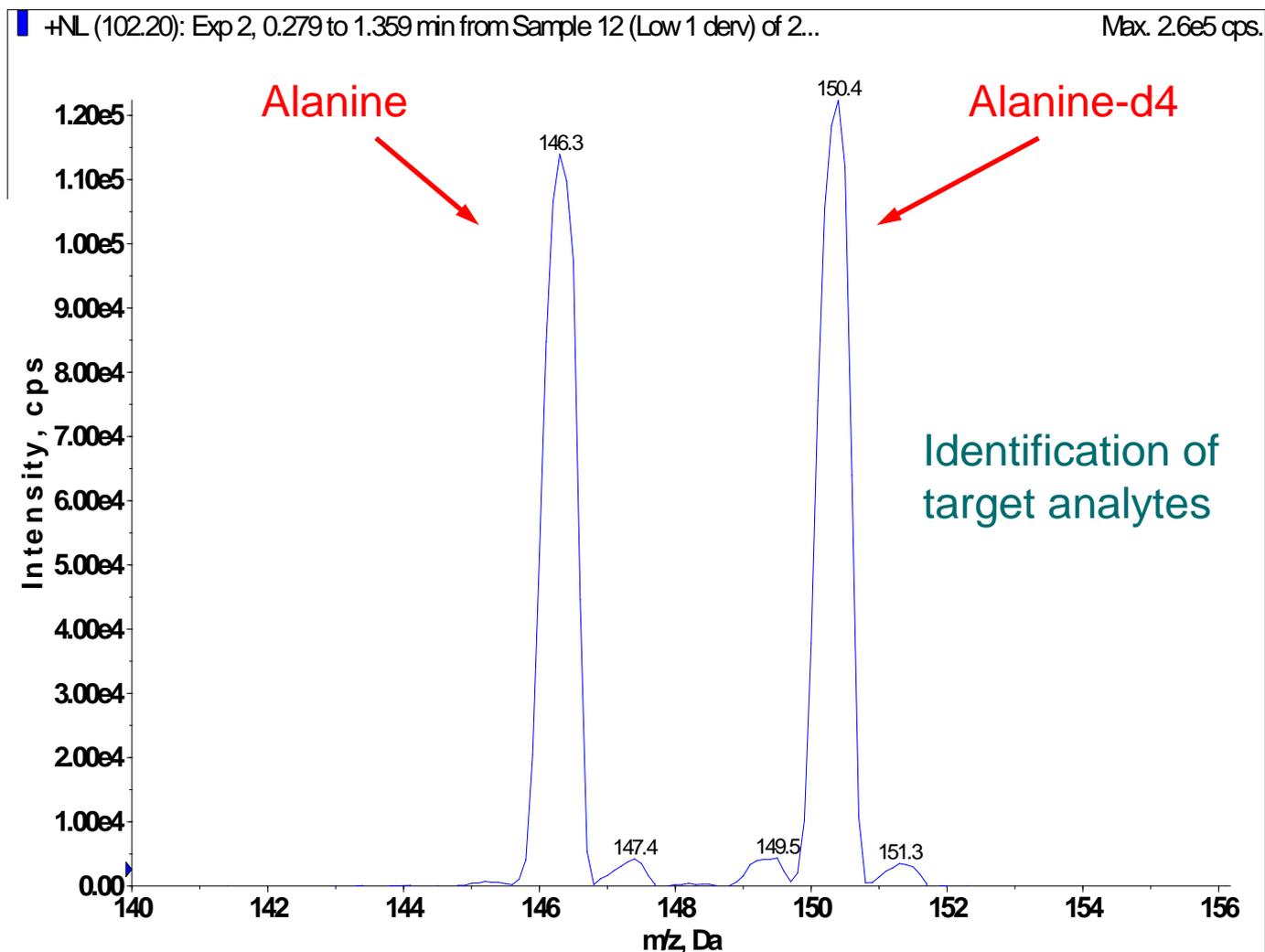
Системы автоматической экстракции



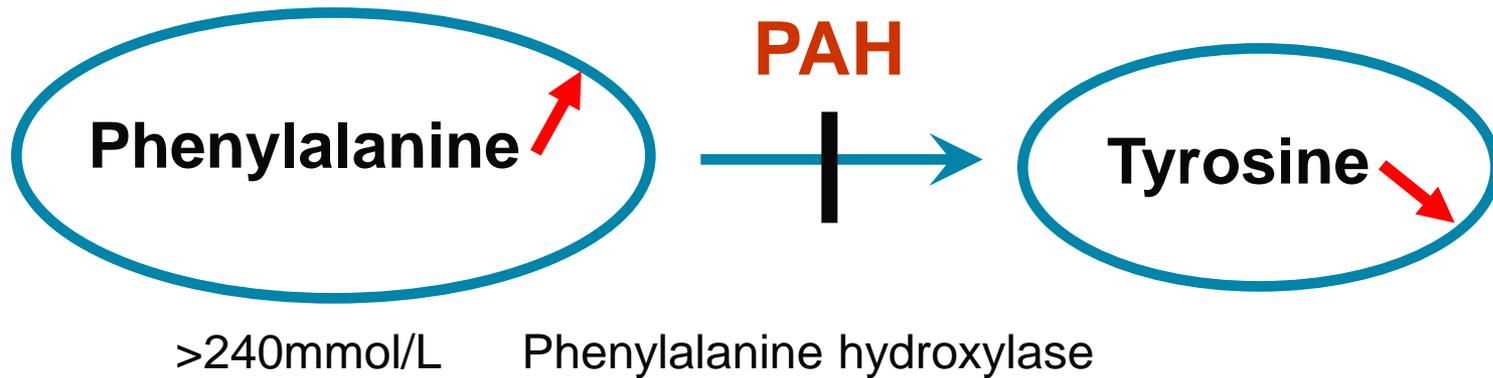
Анализ Аминокислот



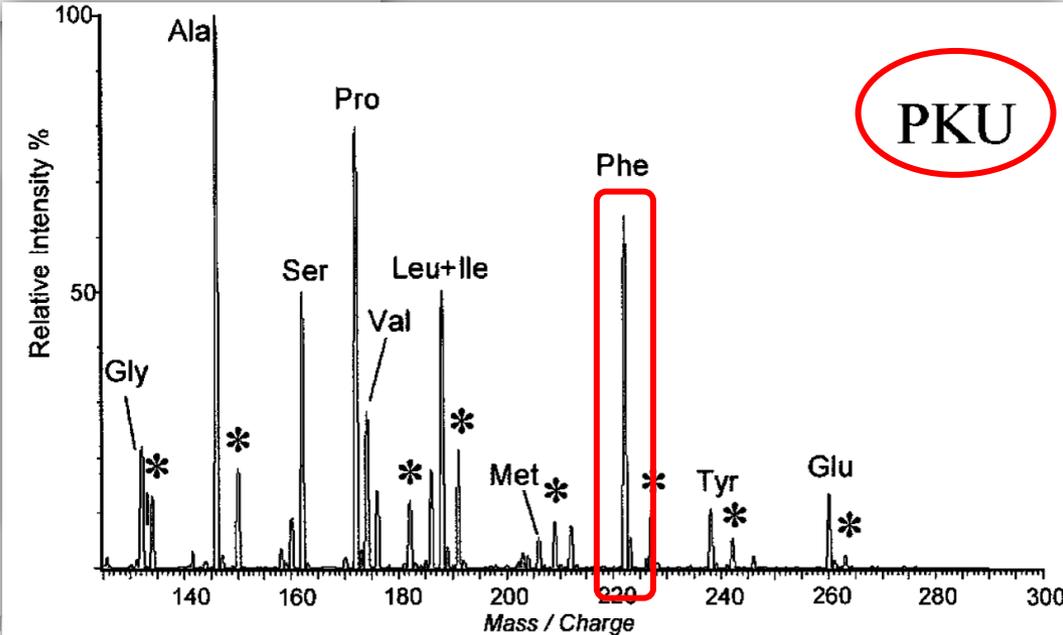
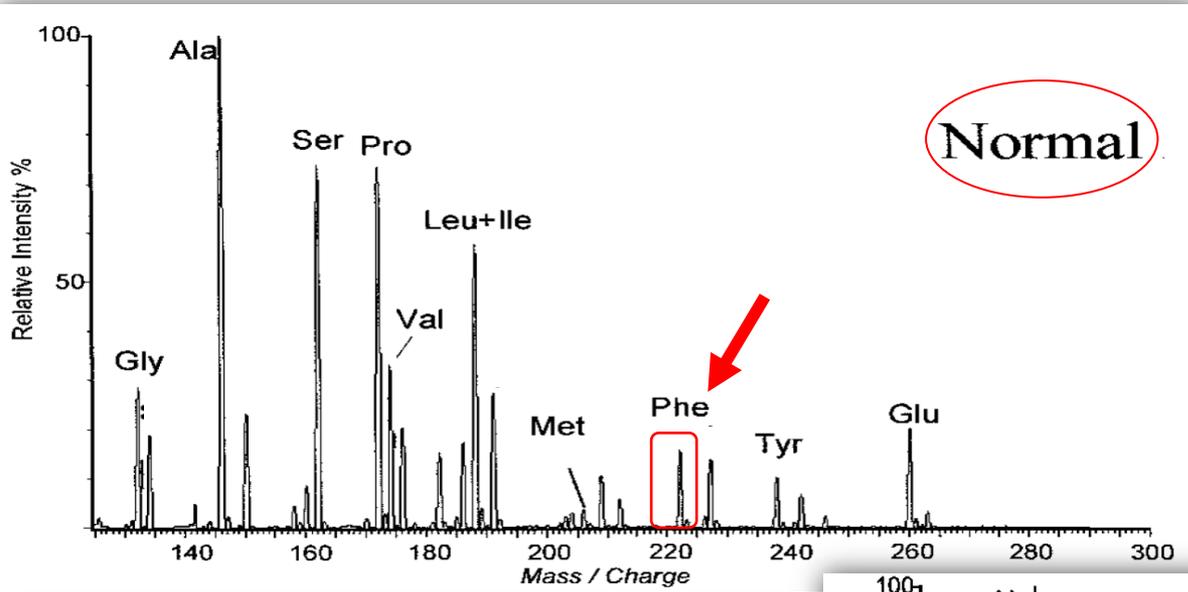
MS/MS данные для аланина

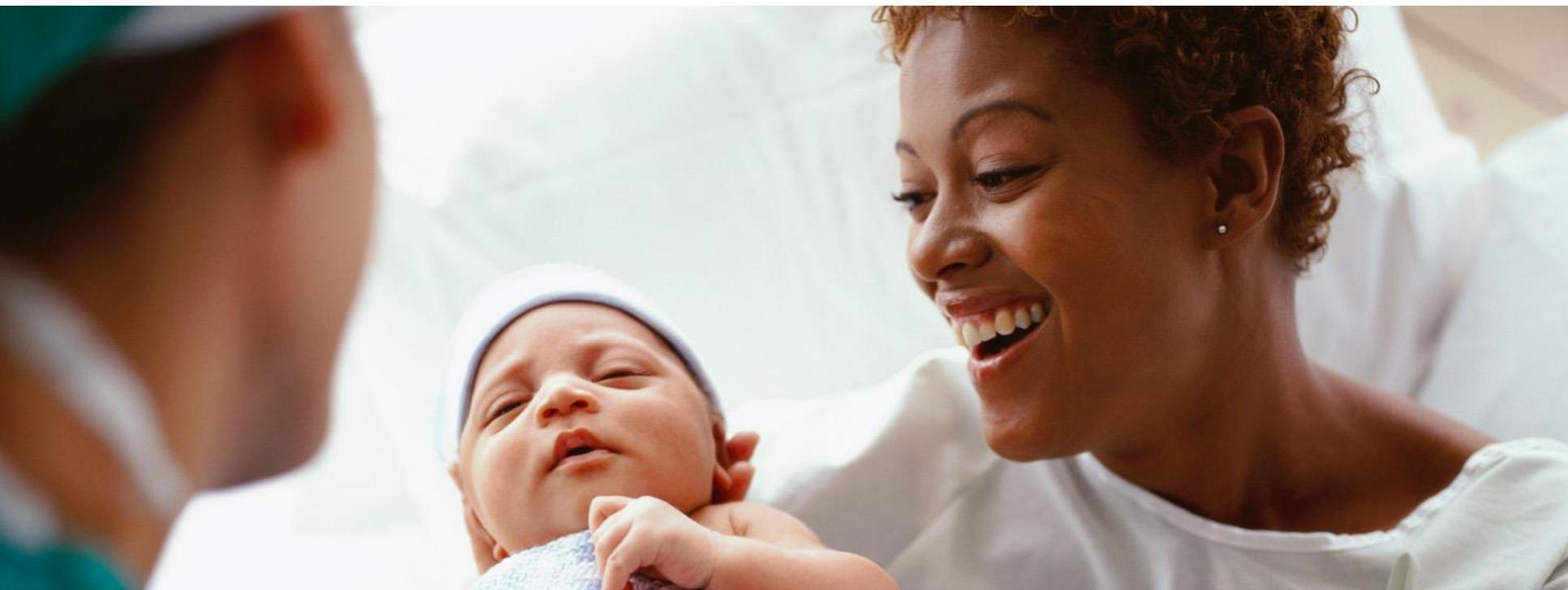


Phenylketonuria (PKU): (1 на 10000)



LCMSMS_Phenylketonuria (PKU)

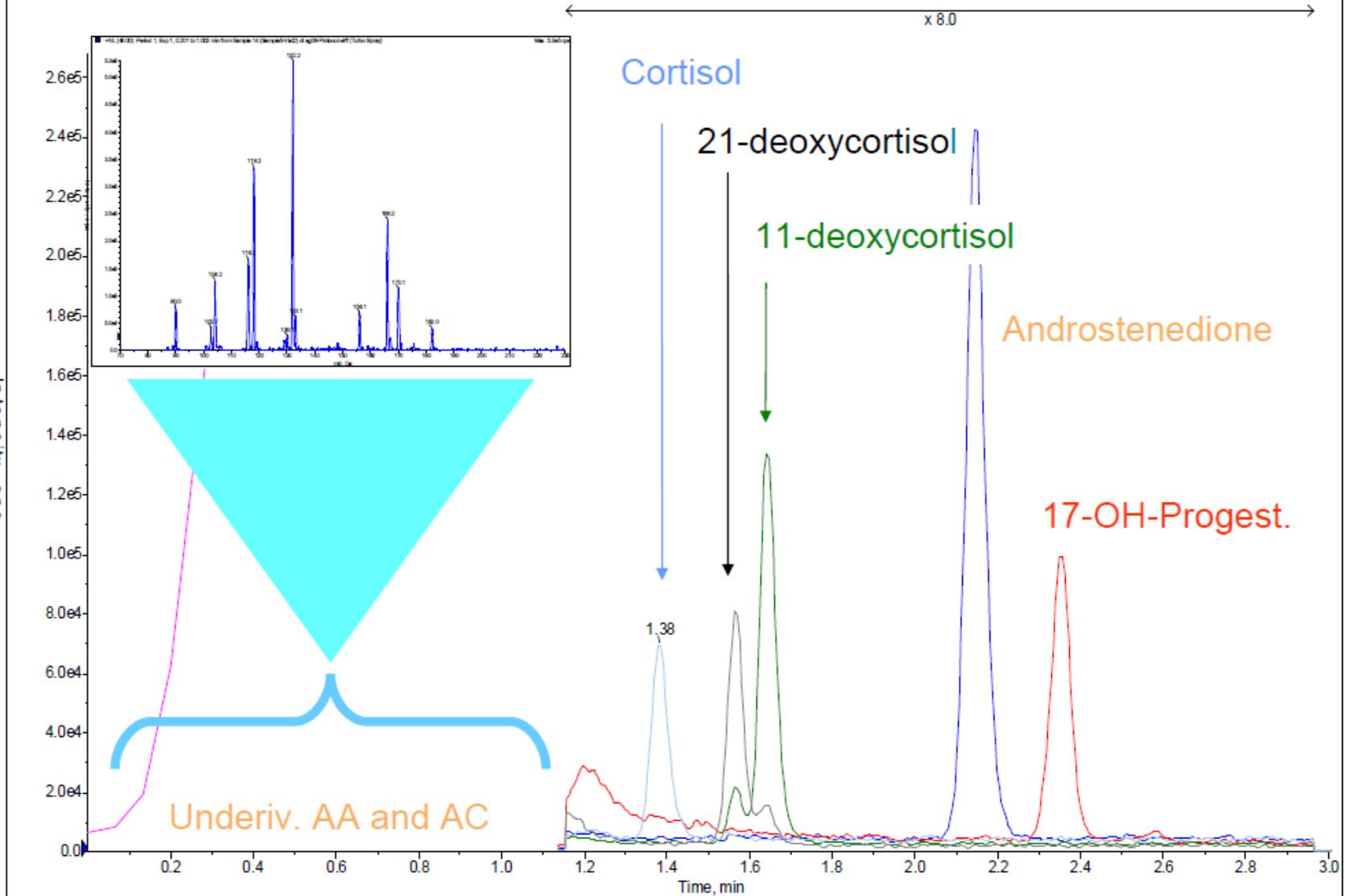


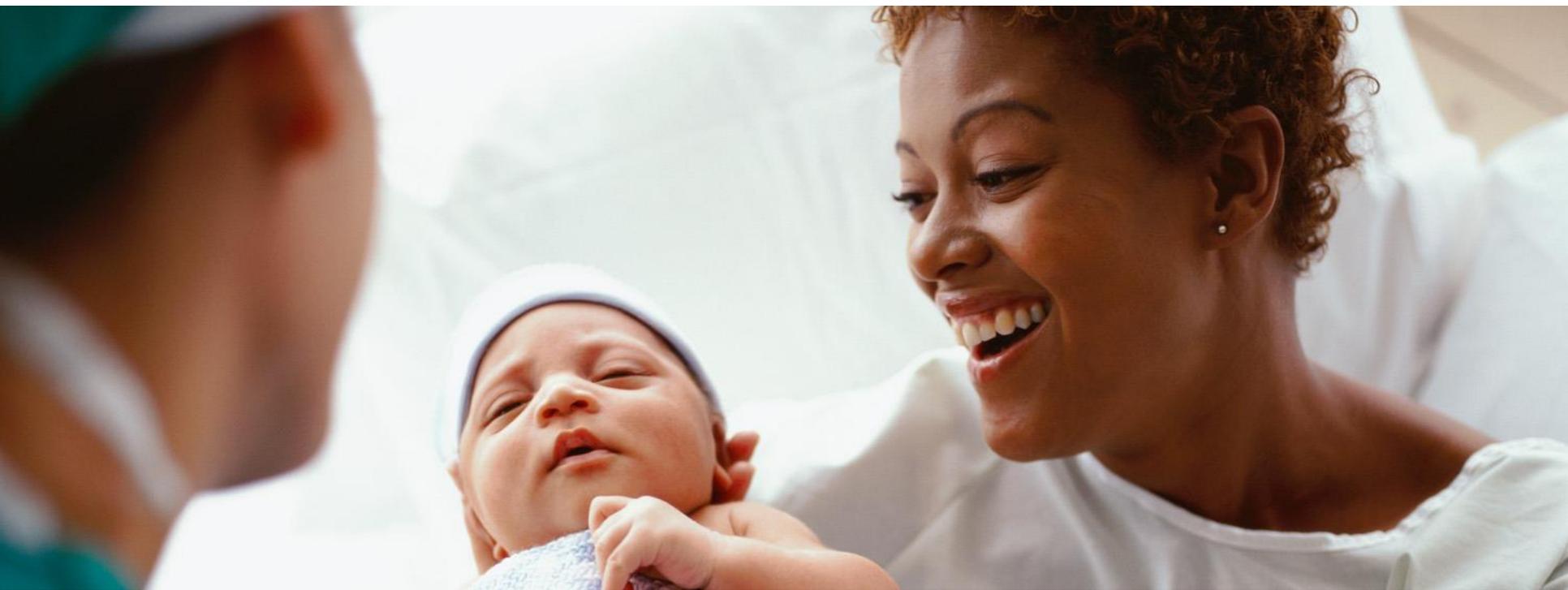


Врожденная Гиперплазия Коры Надпочечников (ВГКН)

Стремление к дальнейшему расширению протокола скрининга НБО

- Включение измерения определенных стероидов связанных с ВГКН, используя упрощенную подготовку образцов в сочетании с полностью автоматизированным рабочим процессом.





Количественный анализ высокомолекулярных соединений



Трипторелин

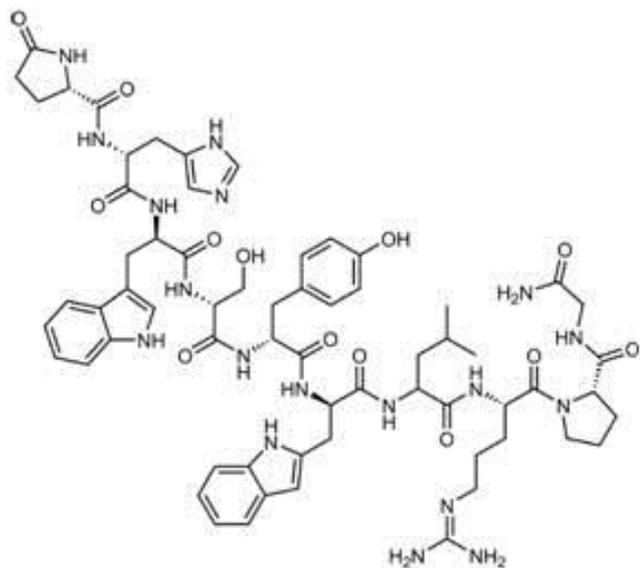
Противоопухолевый препарат, синтетический аналог гонадотропин-рилизинг гормона (входит в список Жизненно Необходимых и Важнейших Лекарственных Препаратов)

Подавляет секрецию ЛГ, ФСГ и соответственно функцию яичек и яичников. Вследствие этого происходит ингибирование секреции эстрогенов яичниками до состояния менопаузы, а также снижение секреции тестостерона.

Применение: Эндометриоз, миома матки, программа ЭКО, раннее половое созревание, гипогонадотропная амеорея. Симптоматическое лечение прогрессирующего гормонозависимого рака предстательной железы (альтернатива хирургической кастрации).

Количественный анализ высоко-молекулярных соединений

- Трипторелин это декапептид. GnRH агонист
- Подобно другим GnRH агонистам, Трипторелин может использоваться во вспомогательной репродукции и при лечении гормонально зависимых раков



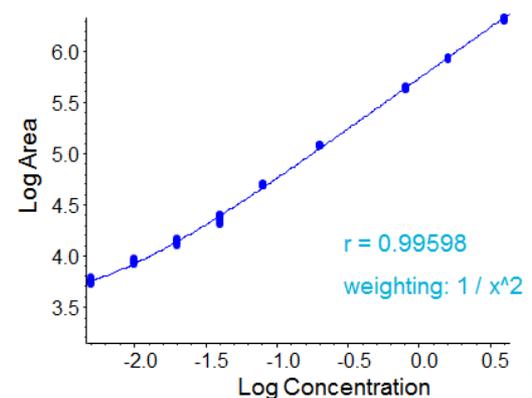
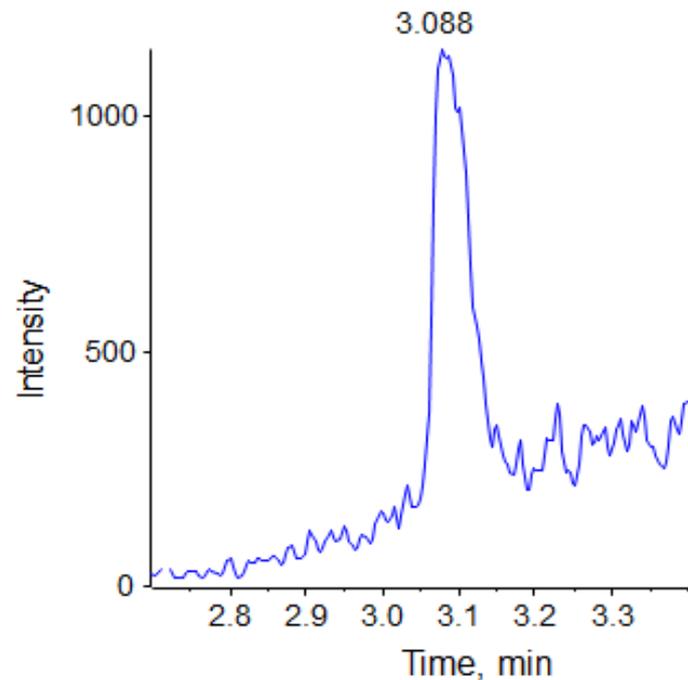
Molecular Mass: 1311.5 g/mol

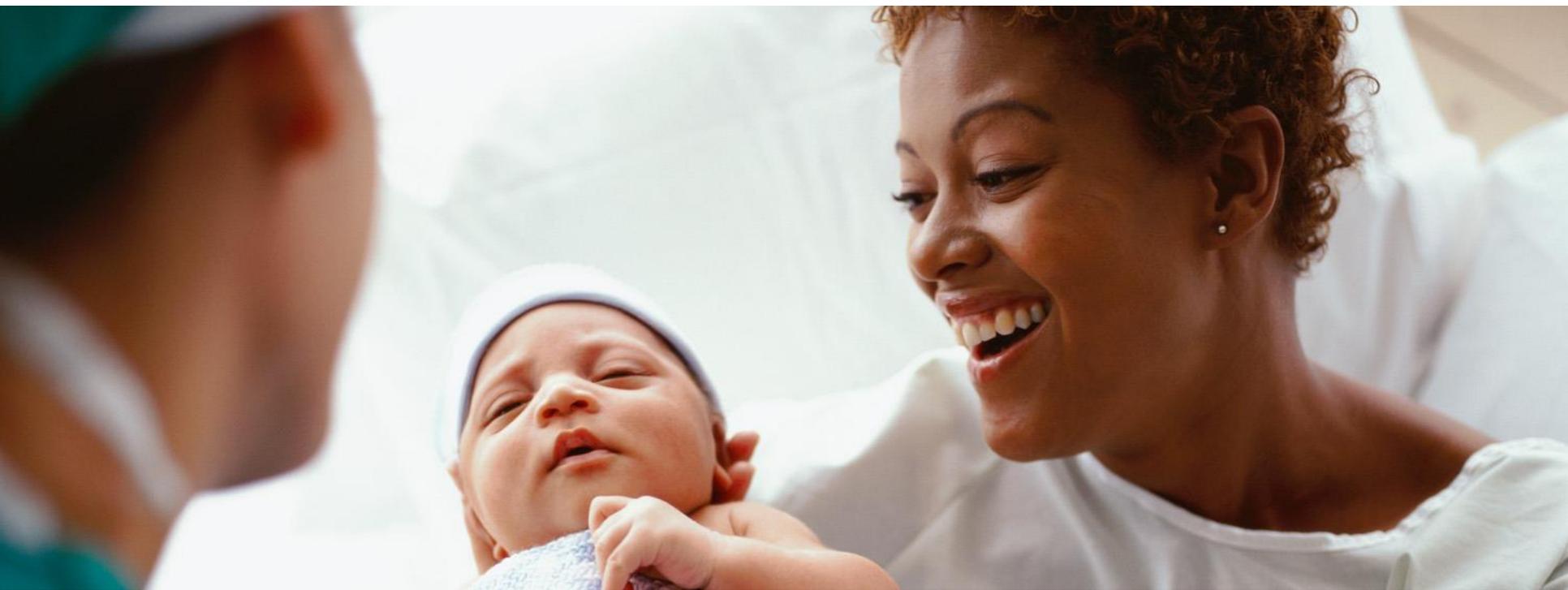
Вызов → Требуется очень низкий предел обнаружения

Signal at LLOQ – Matrix Curve

QTRAP® 5500 System

- QTRAP 5500 system signal at LLOQ (40 pg/mL)
 - 6 replicates were performed
 - 305 amol on column:
 - Area %CV- 9.7
 - Accuracy – 102.8 %





Спасибо

akirilyuk@khimexpert.ru

IVD-MKT-11-0769-A

