



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

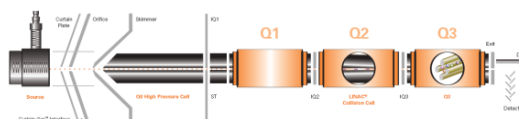
Александр Кирилук PhD

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

IVD-MKT-11-0769-A

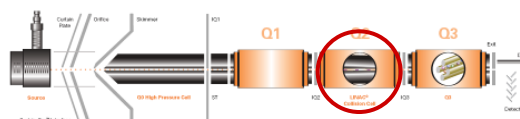
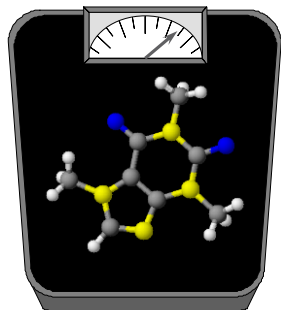
# Основные типы tandemных масс-анализаторов

*Низкое разрешение*



**Triple Quad**

- Количественный анализ
- ID - MRM

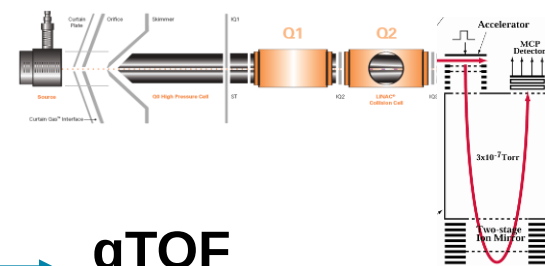


**QTRAP®**

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

**Гибрид Тройного  
квадруполя/Линей  
ной ионной  
ловушки**

*Высокое разрешение*



**qTOF**

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

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

# Компактность и производительность

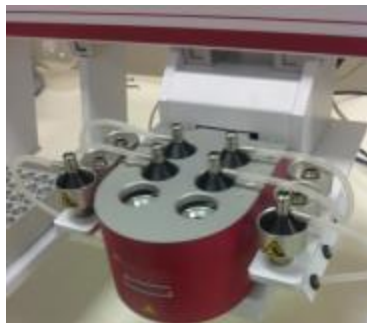


# Роботизация и автоматизированные системы подготовки образцов

## DPX-LC/MS/MS



**Load**



**Clean**



**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

# Тандемная масс-спектрометрия как замена иммунохимических методов?

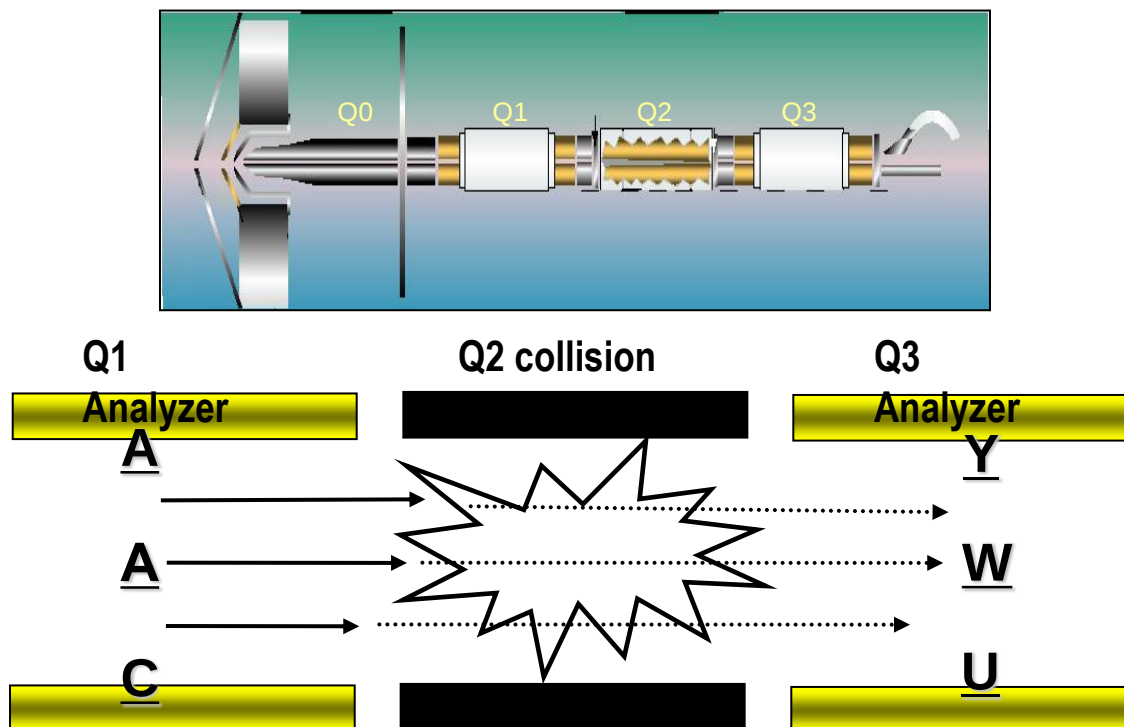
| Основные проблемы применения                                                              | Применение ИФА                                                               | Применение масс-спектрометрии                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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<br>(сложности с созданием новых тест-систем плюс длинный цикл разработки) | Долгое время разработки новых тестов                                         | Не требует антител для разработки новых тестов                                                  |

# Основы Метода tandemной 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

# Применение ВЭЖХ/МС/МС в Клинической Лаборатории

## 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

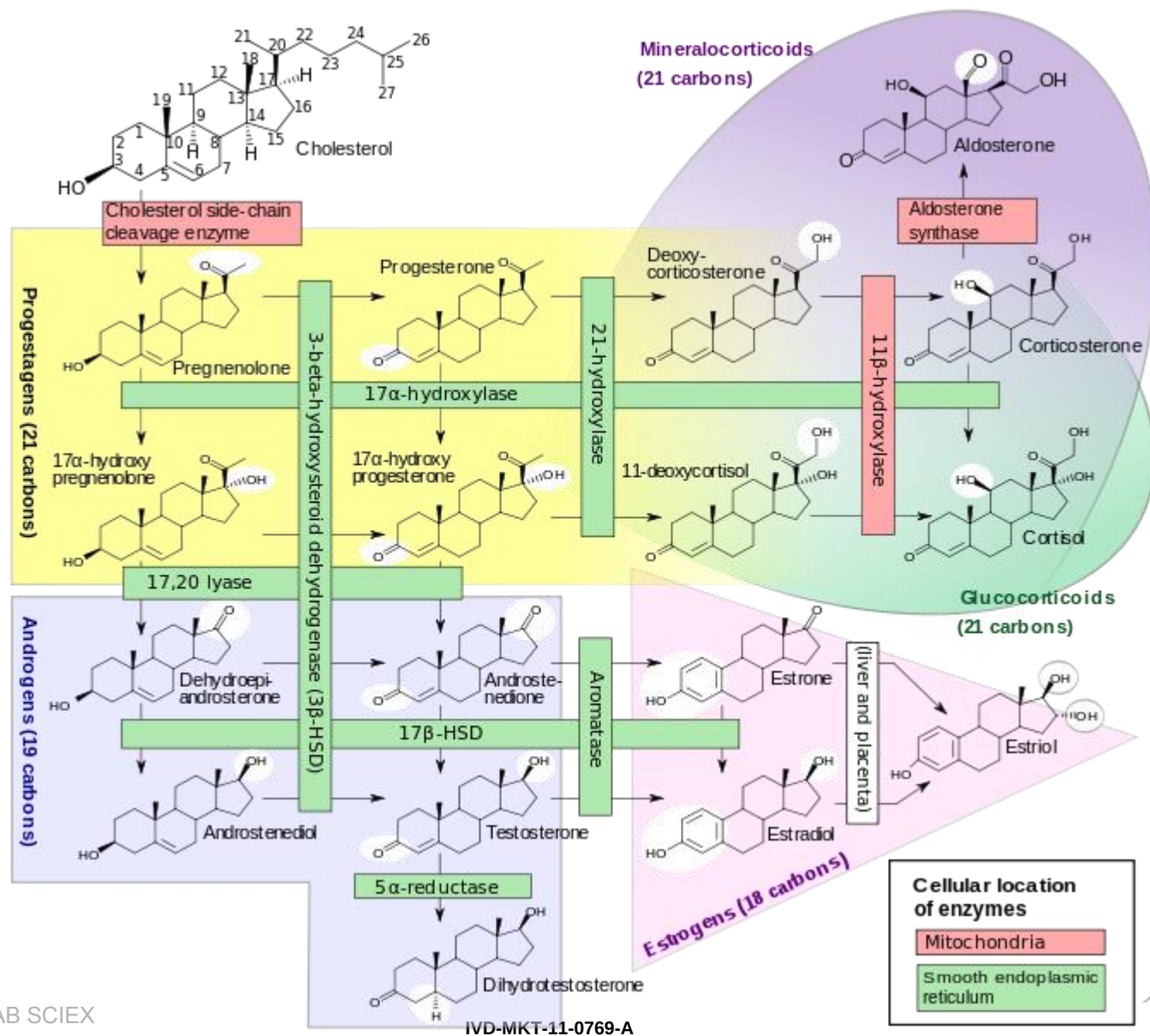
## Биомаркеры

Стероиды  
Витамин D и метаболиты  
Т3/Т4  
Гомоцистеин  
Катехоламины  
Оротовая кислота  
Длинноцепочечные жирные кислоты  
Желчная кислоты  
Раковые маркеры (Пептиды и белки)  
Пурины и пиримидины  
и многие другие

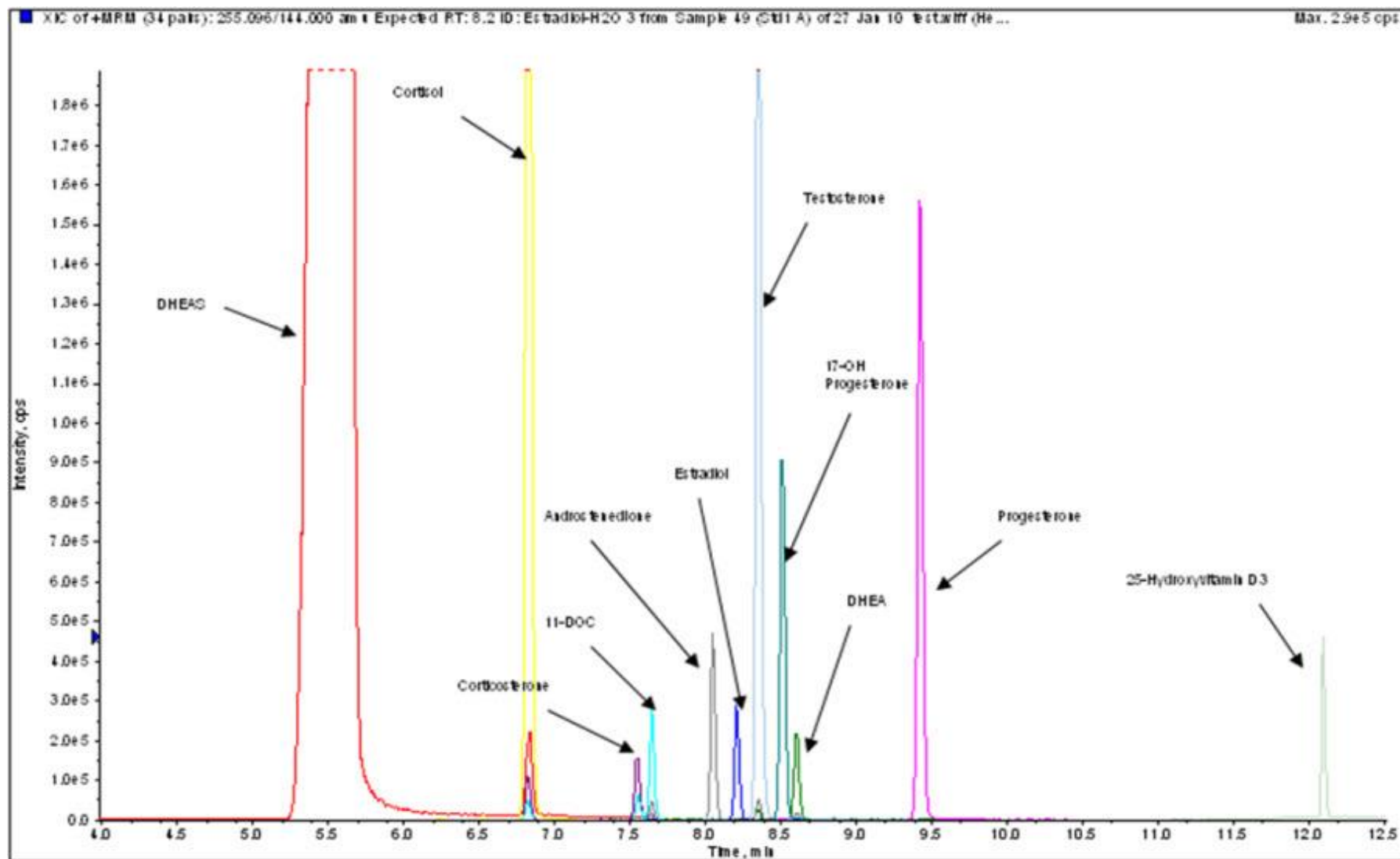
## Токсикологические исследования

Полный скрининг лекарств  
Наркотики  
Каннабиоиды  
Опиаты  
Амфетамины  
Бензодиазепины  
Обезболивающие препараты  
Барбитураты  
и многие другие

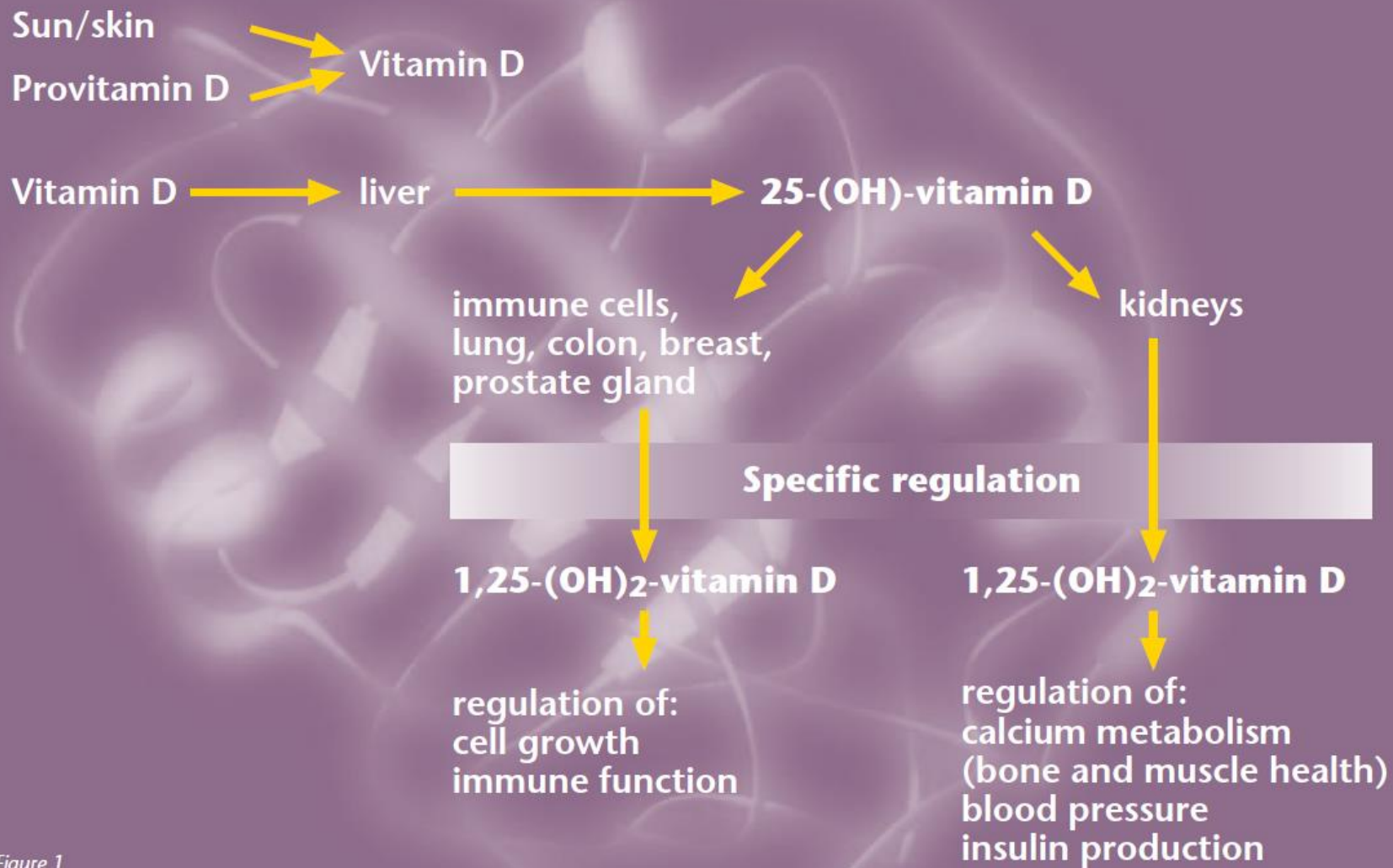
# Стероиды



# Стероидная панель



# Витамины D

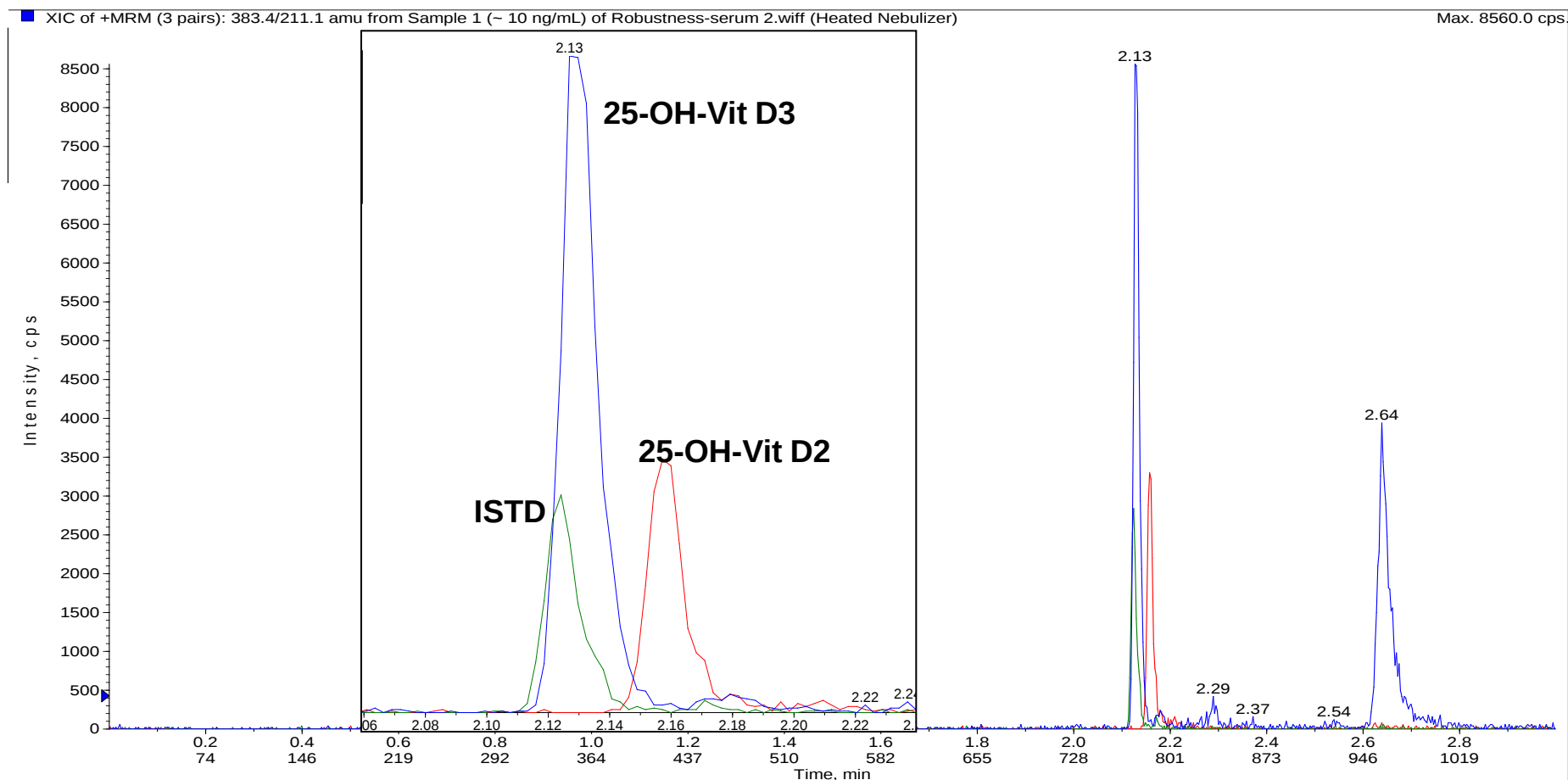


# Анализ витамина D

- 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 количественного анализа витамина D в биологических образцах



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

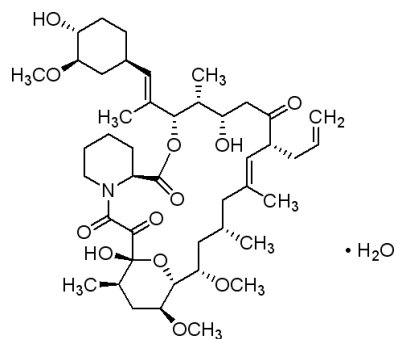


LOQ 25-OH Vit D2, D3, 1-2 ng/ml on API 4000 LC/MS/MS System

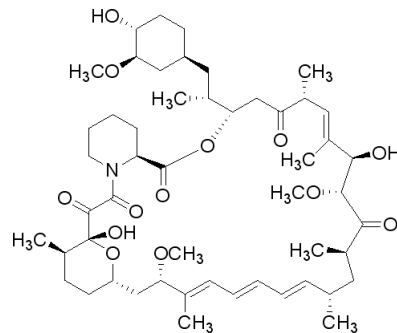


## Мониторинг препаратов с узким терапевтическим диапазоном

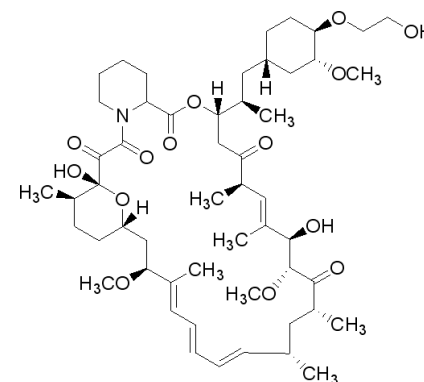
# Иммунодепрессанты



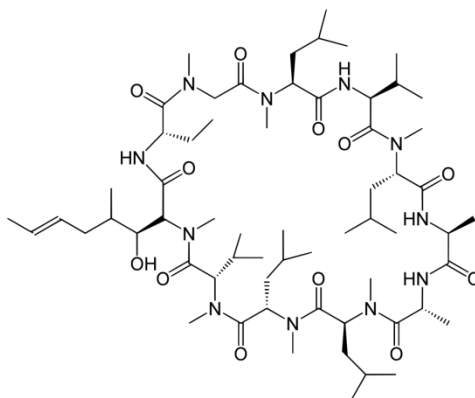
**Tacrolimus**  
(aka FK-506)  
MW 822.0



**Sirolimus**  
(aka Rapamycin)  
MW 914.2



**Everolimus**  
MW 958.2

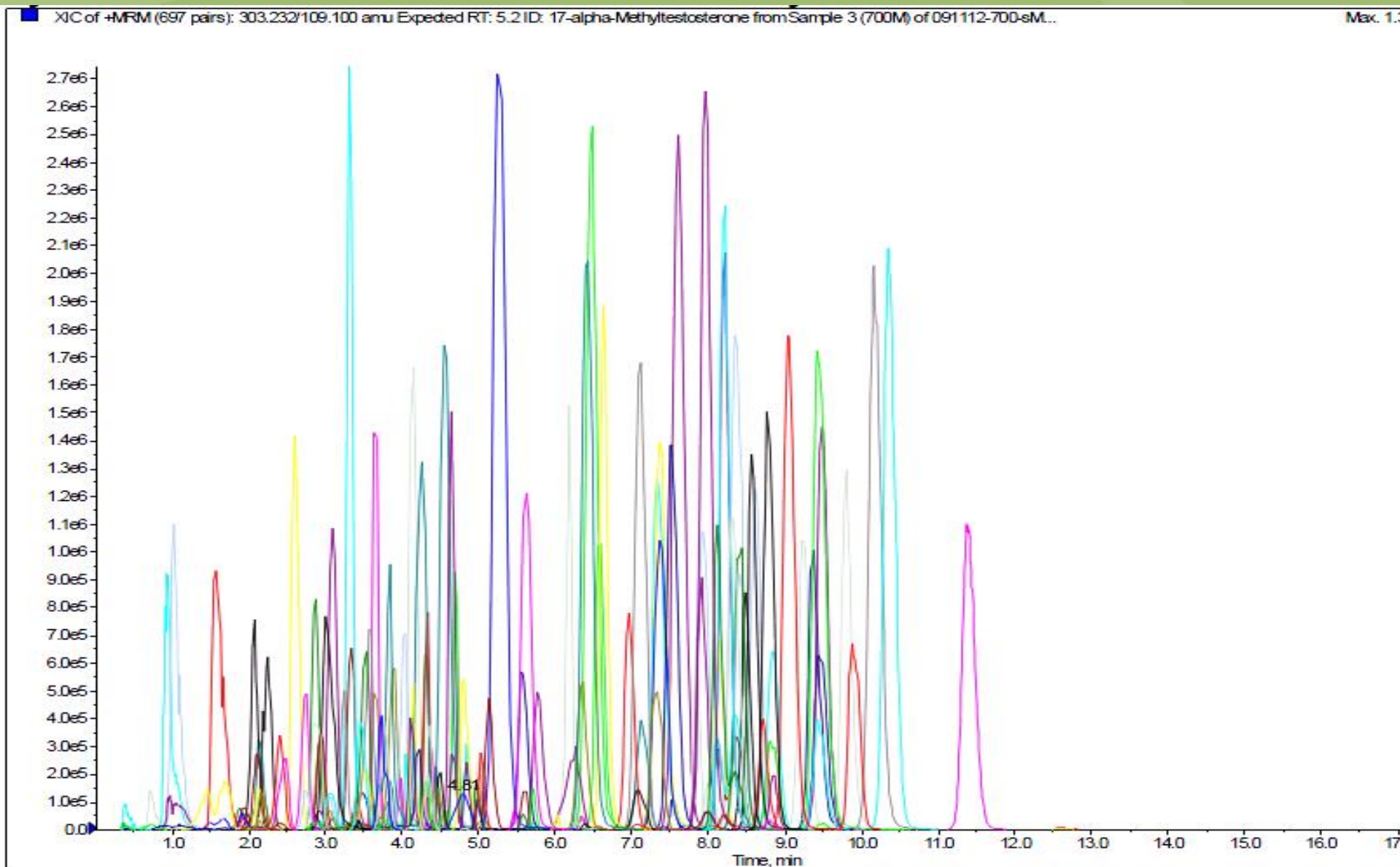


**Cyclosporin A**  
MW 1202.6



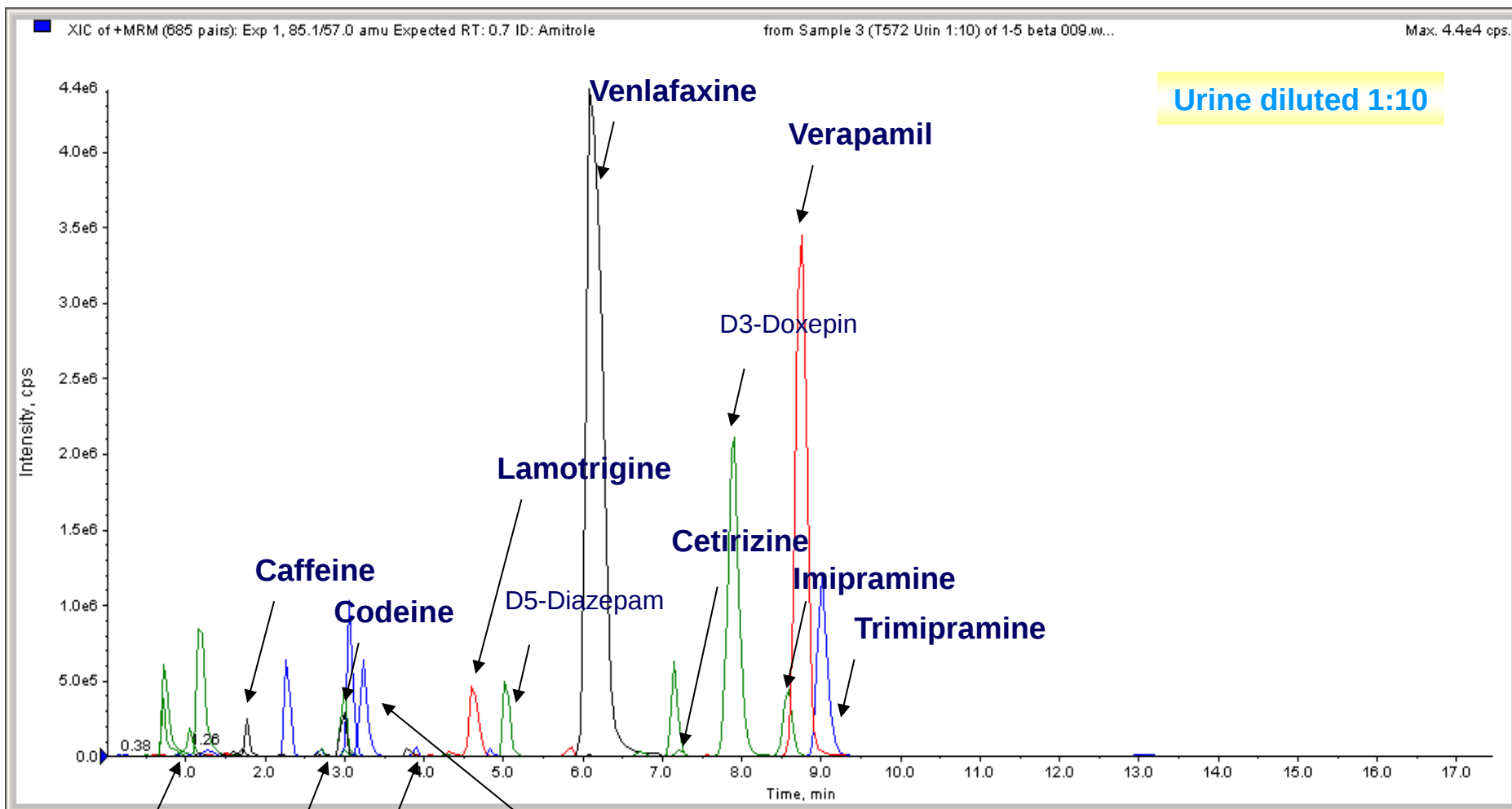
# Скрининг

# Анализ образца мочи на 697 лекарств



# Пациент страдающий от хронической депрессии и эпилепсии.

В анамнезе- множественные попытки самоубийства.

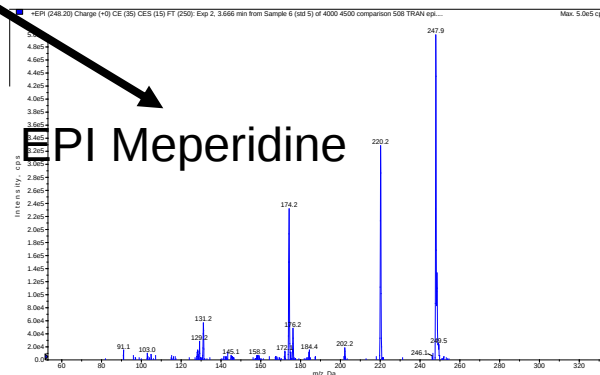
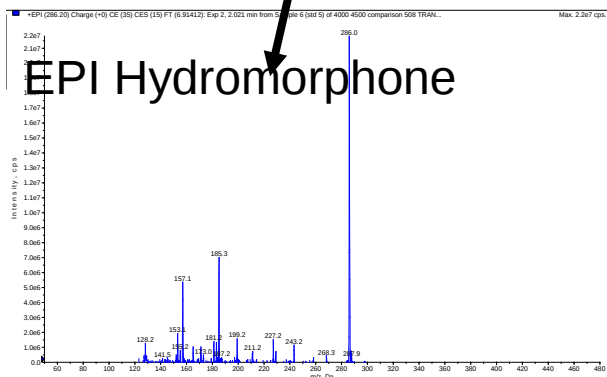
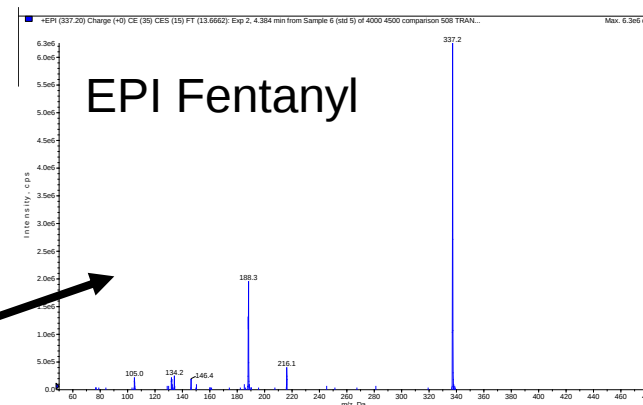
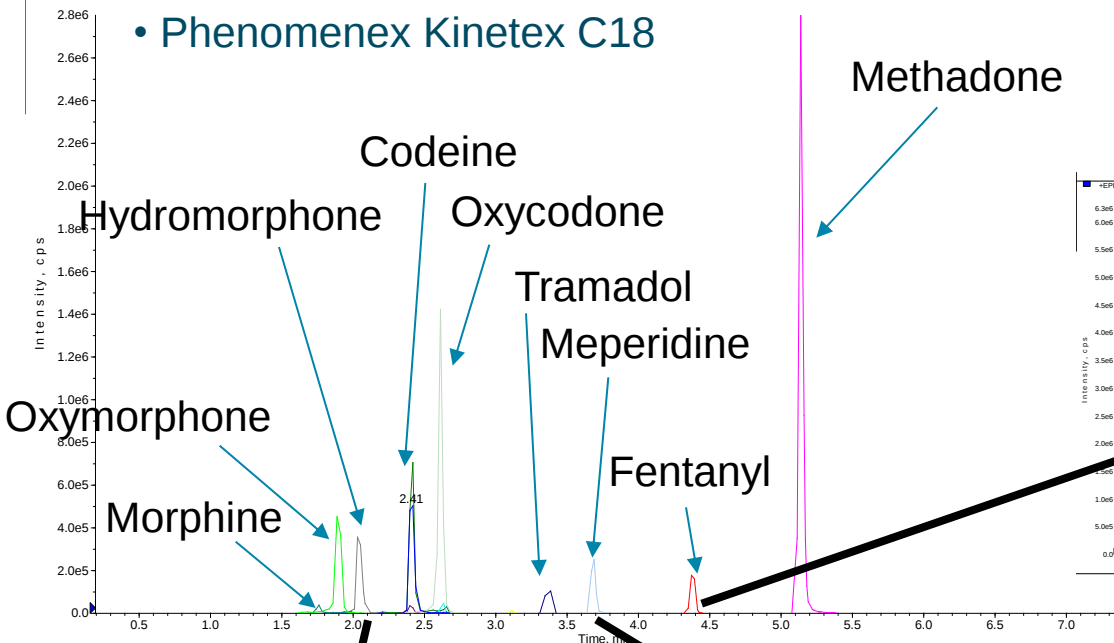


# Спектральное подтверждение на QTRAP® Системе

XIC of +MRM (508 pairs): Exp 1, 300.100/152.100 amu Expected RT: 2.4 ID: Codeine\_1 from Sample 6 (std 5) of 4000 4500 comparison ... Max. 5.0e5 cps.

- Phenomenex Kinetex C18

Simple “dilute and shoot” sample preparation



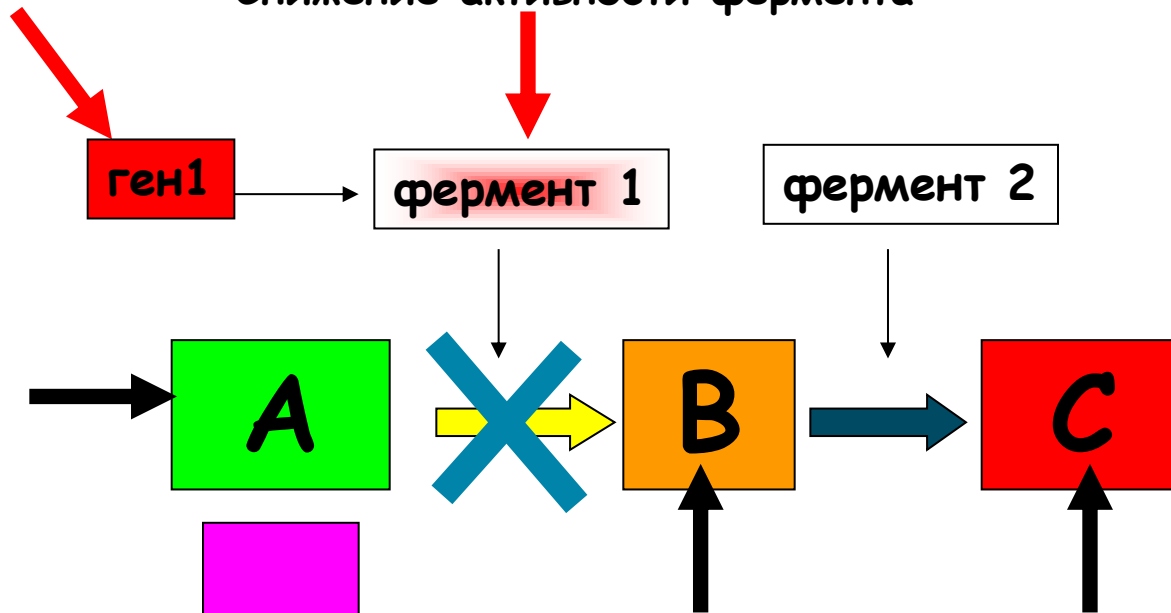
- 508 transitions monitored
- 2 transitions per compound
- sMRM-IDA-EPI
- 10  $\mu$ L injection



# Наследственные болезни обмена веществ

Мутации в гене

Снижение активности фермента



Снижение количества продуктов реакции

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       | 1:120 000 |
| (среди евреев-ашкенази) | 1:3 000   |
| Болезнь Гоше            | 1:40 000  |
| Болезнь Краббе          | 1:100 000 |

### Х-сцепленный рецессивный тип наследования

|                                   |          |
|-----------------------------------|----------|
| Х-сцепленная адренолейкодистрофия | 1:40 000 |
| Мукополисахаридоз тип II          | 1:70 000 |

- НБО – обширный класс редких моногенных болезней, но суммарная частота встречаемости их достаточно высока (около 1:5000 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. Но 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  $\beta$ -окисления жирных кислот).

# Анализ аминокислот и ацилкарнитинов в сухих пятнах крови

- Реагенты и стандарты
- 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





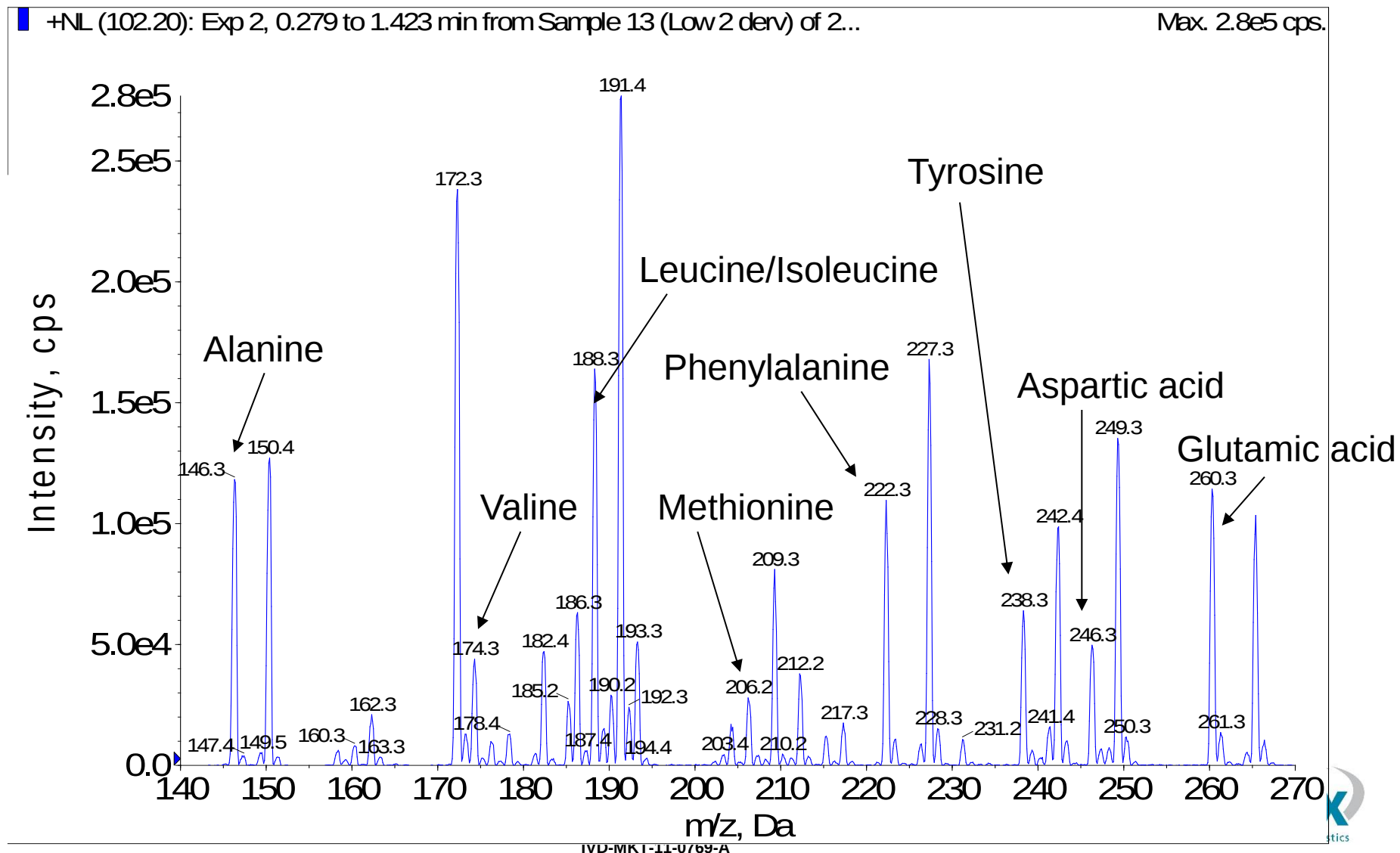
- 3 пятна
- Индикатор влажности
- Индикатор температуры



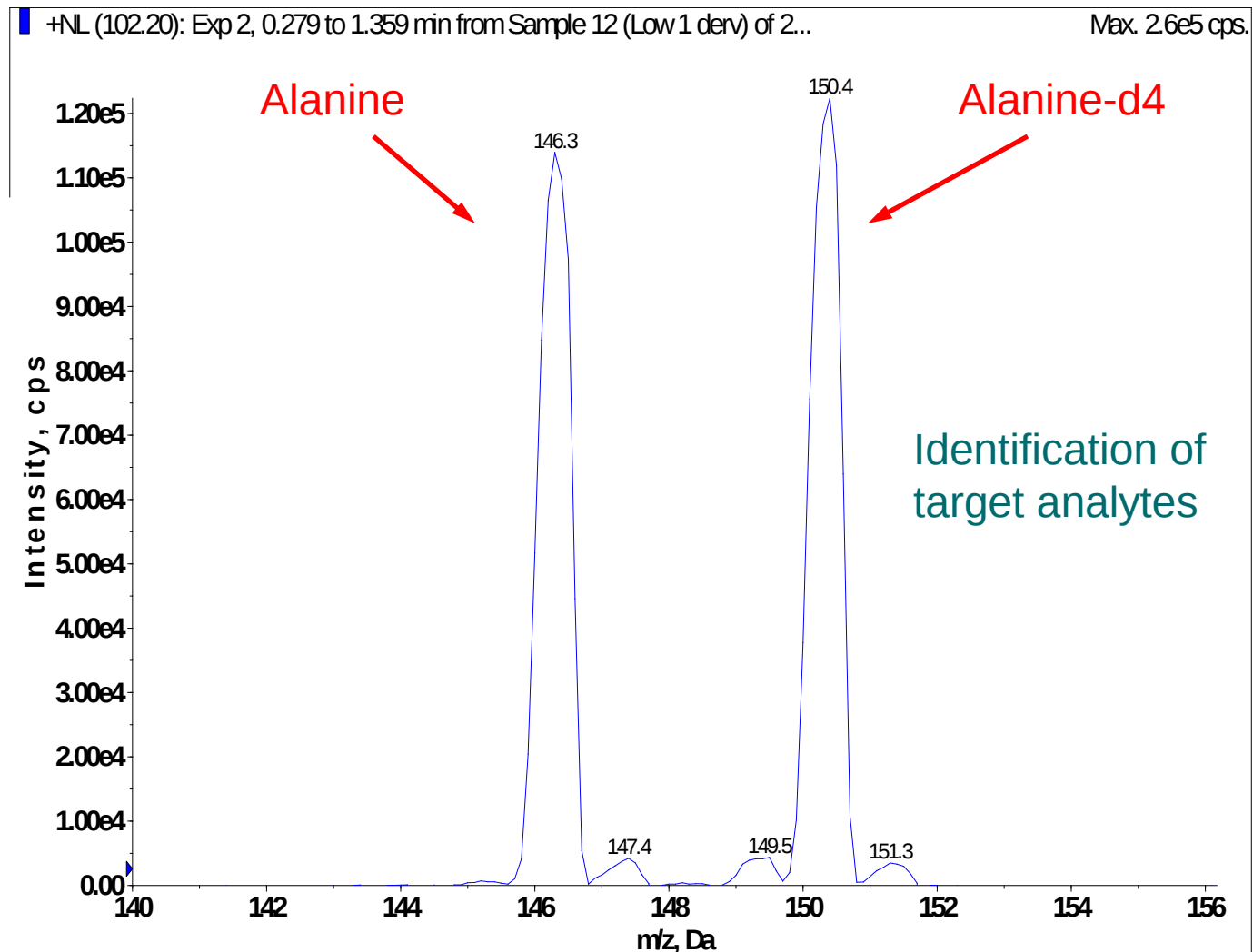
# Альтернативные Системы Автоматической Экстракции



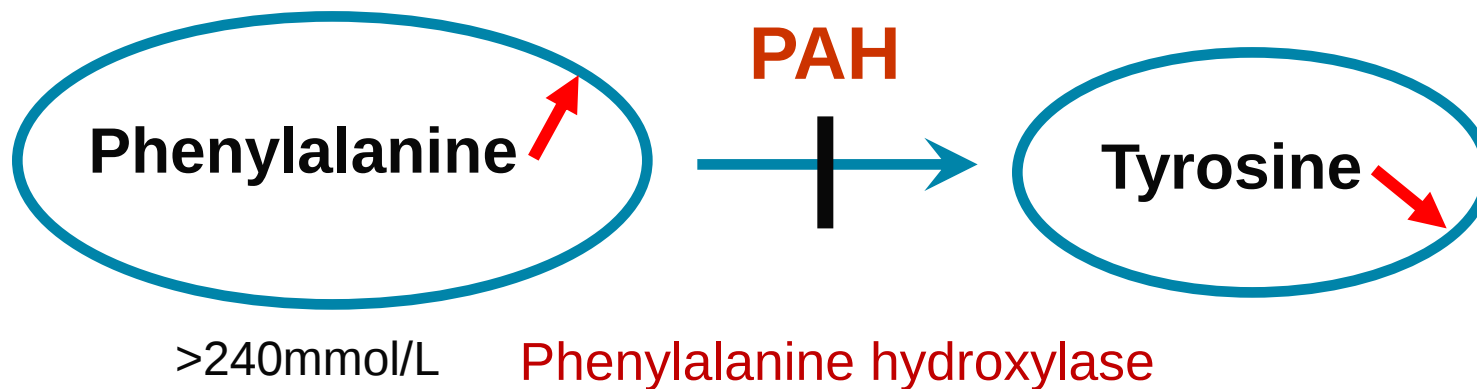
# Анализ Аминокислот



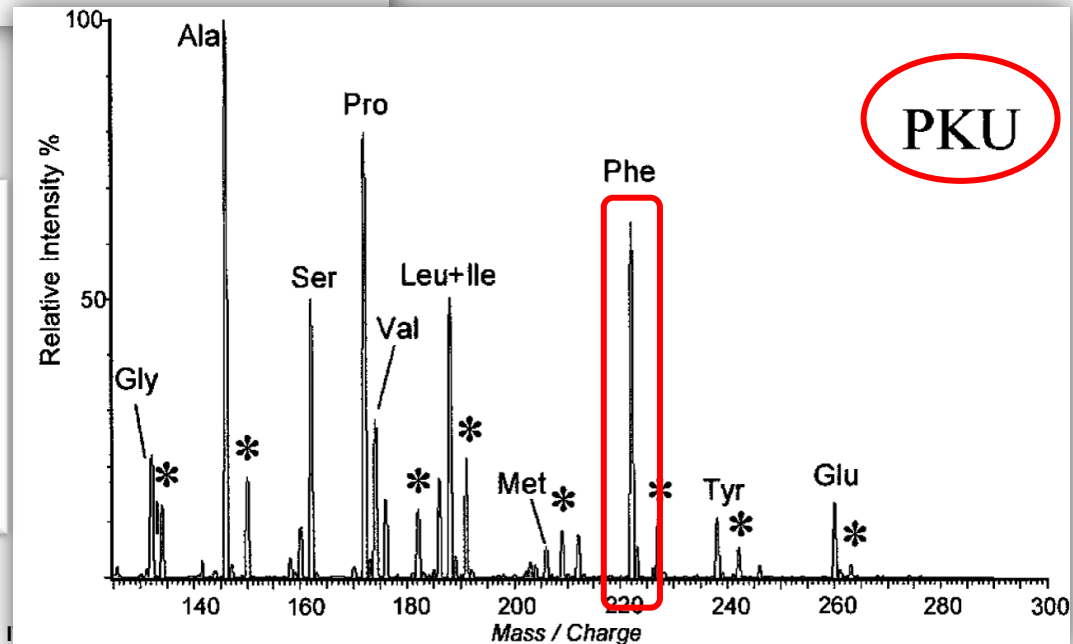
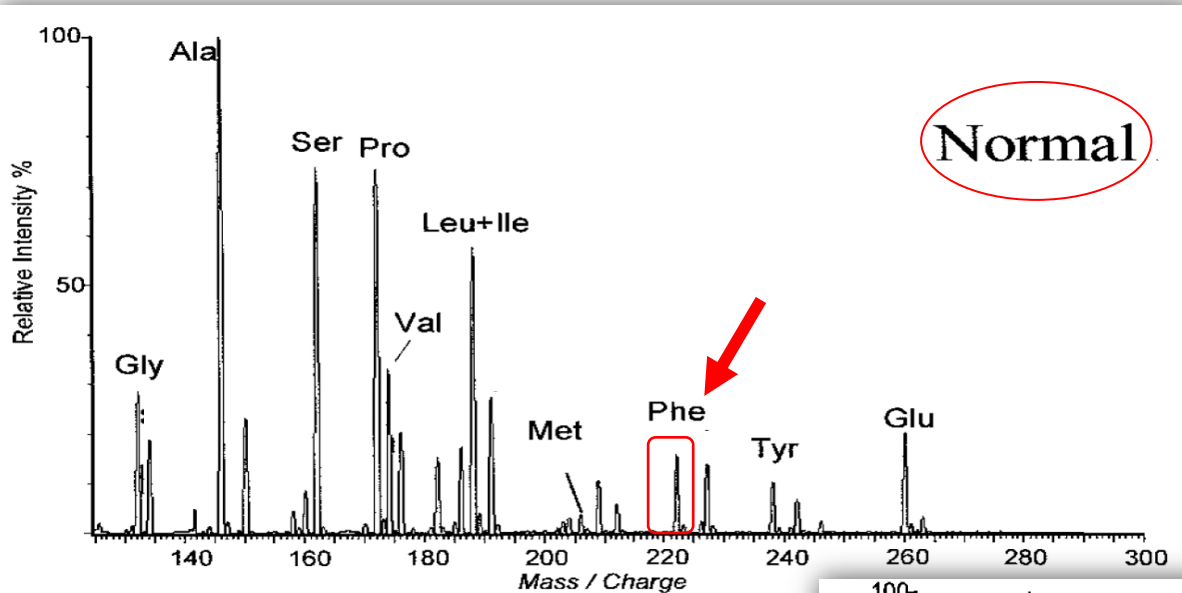
# Пример данных для аланина



# Фенилкетонурия: (1 на 10000)



# Пример выявления фенилкетонурии (PKU)

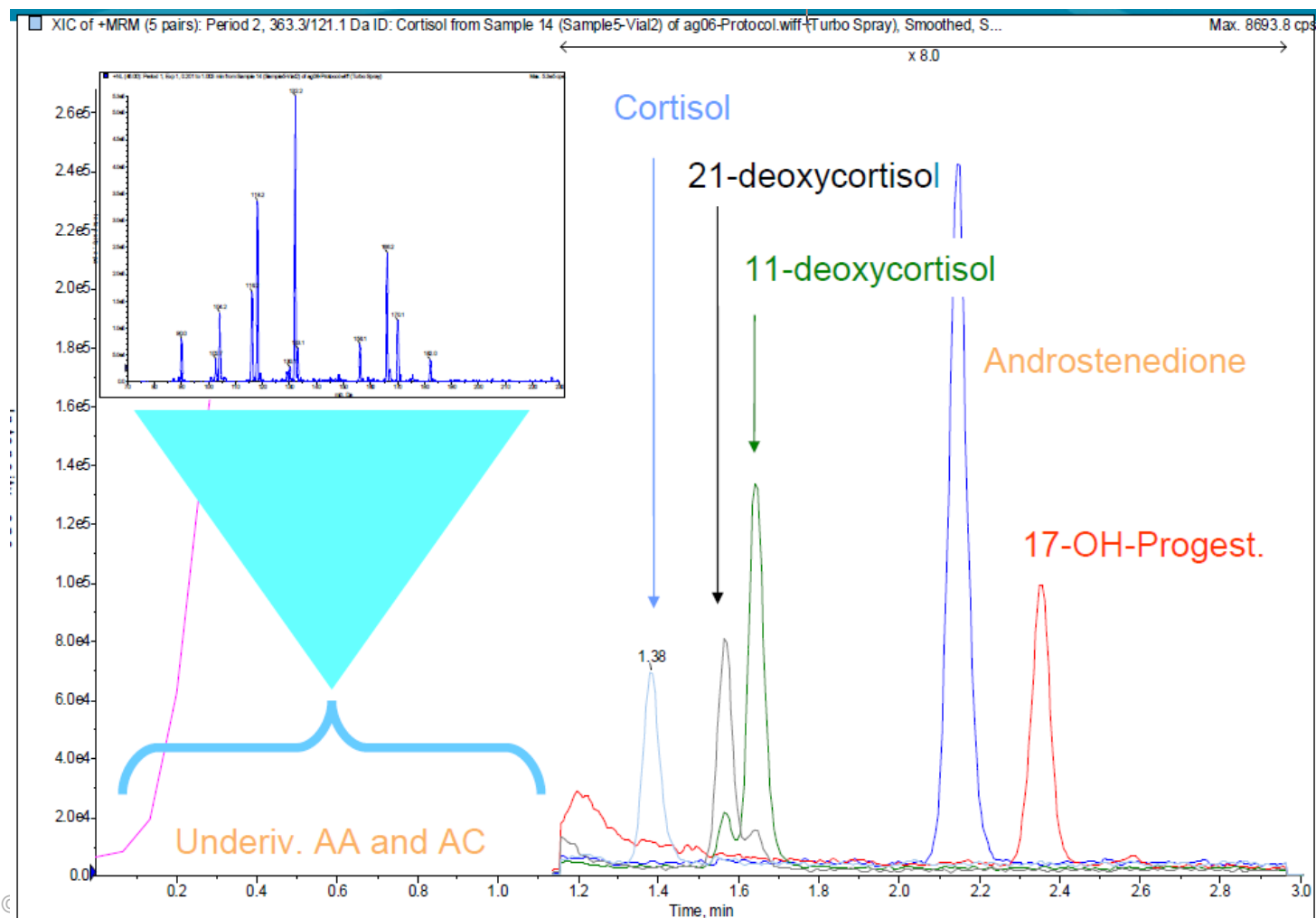




## Врожденная Гиперплазия Коры Надпочечников (ВГКН)

# Расширение протокола скрининга НБО

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





# Спасибо

[akirilyuk@khimexpert.ru](mailto:akirilyuk@khimexpert.ru)



## **Количественный анализ высоко- молекулярных соединений**

# Трипторелин

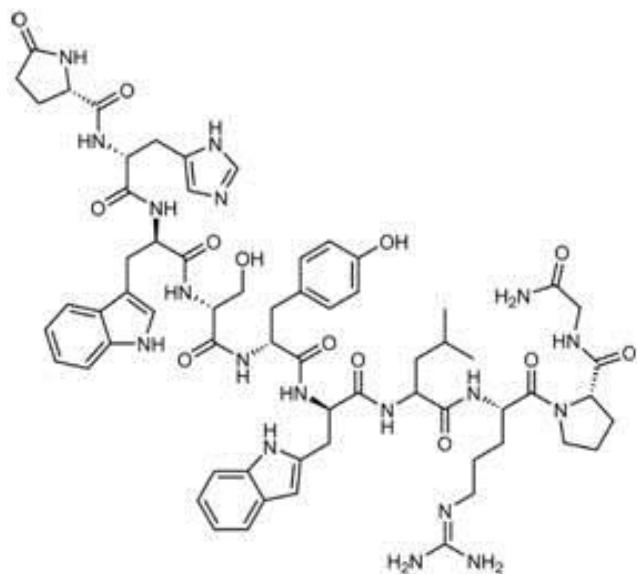
Противоопухолевый препарат, синтетический аналог гонадотропин-рилизинг гормона (входит в список Жизненно Необходимых и Важнейших Лекарственных Препаратов)

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



$C_{64}H_{82}N_{18}O_{13}$

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 %

