



Применение тандемной масс-спектрометрии в клинической лабораторной диагностике

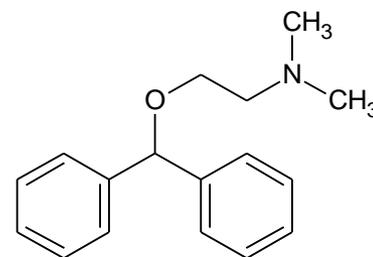
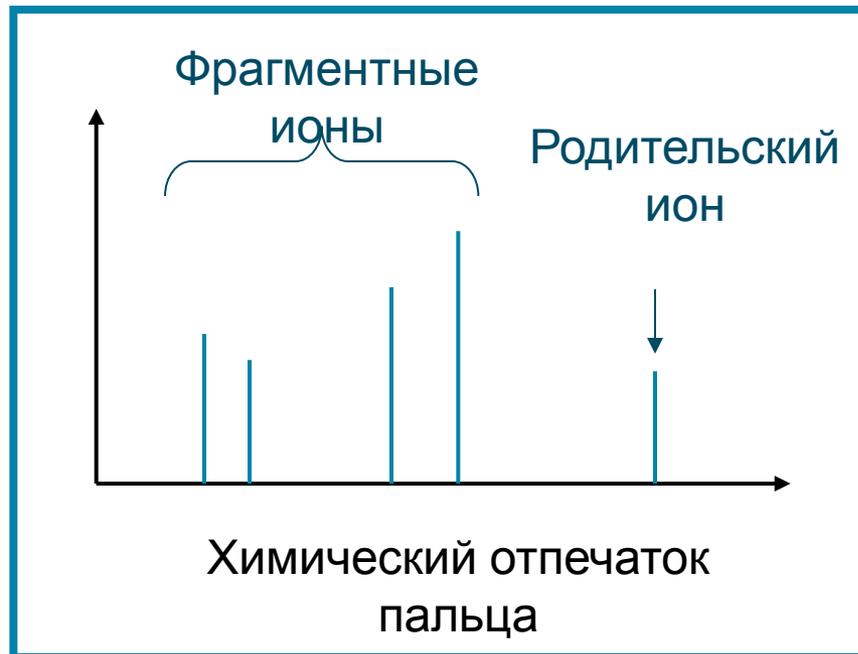
Туаева Н.О., к.б.н., химик-эксперт ЦХТЛ ПМГМУ,
представитель «Агентство Химэксперт»

г. Казань

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

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

Использование МС/МС библиотек

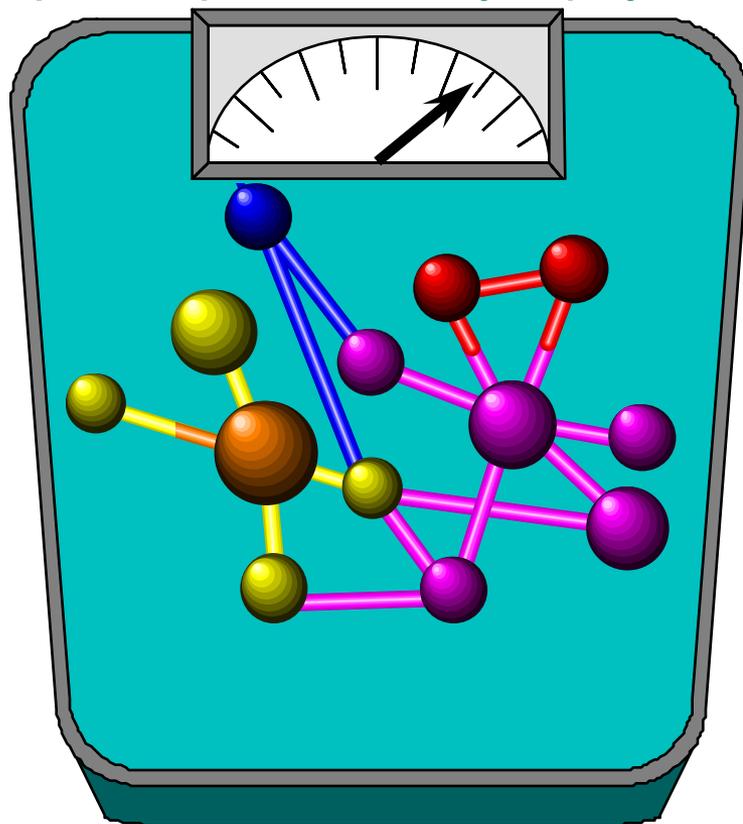


Аналитические возможности ВЭЖХ/МС/МС

- **Что определяем?** Классы веществ (стероиды, аминокислоты и их производные, лекарственные препараты, наркотические вещества)
- **В чем определяем?** В сложных матрицы (кровь, сыворотка, моча, слюна, ликвор, и др. био-жидкости, сухие пятна)
- Диапазон **чувствительности** (от следовых количеств)
- **Время выполнения** анализа (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**

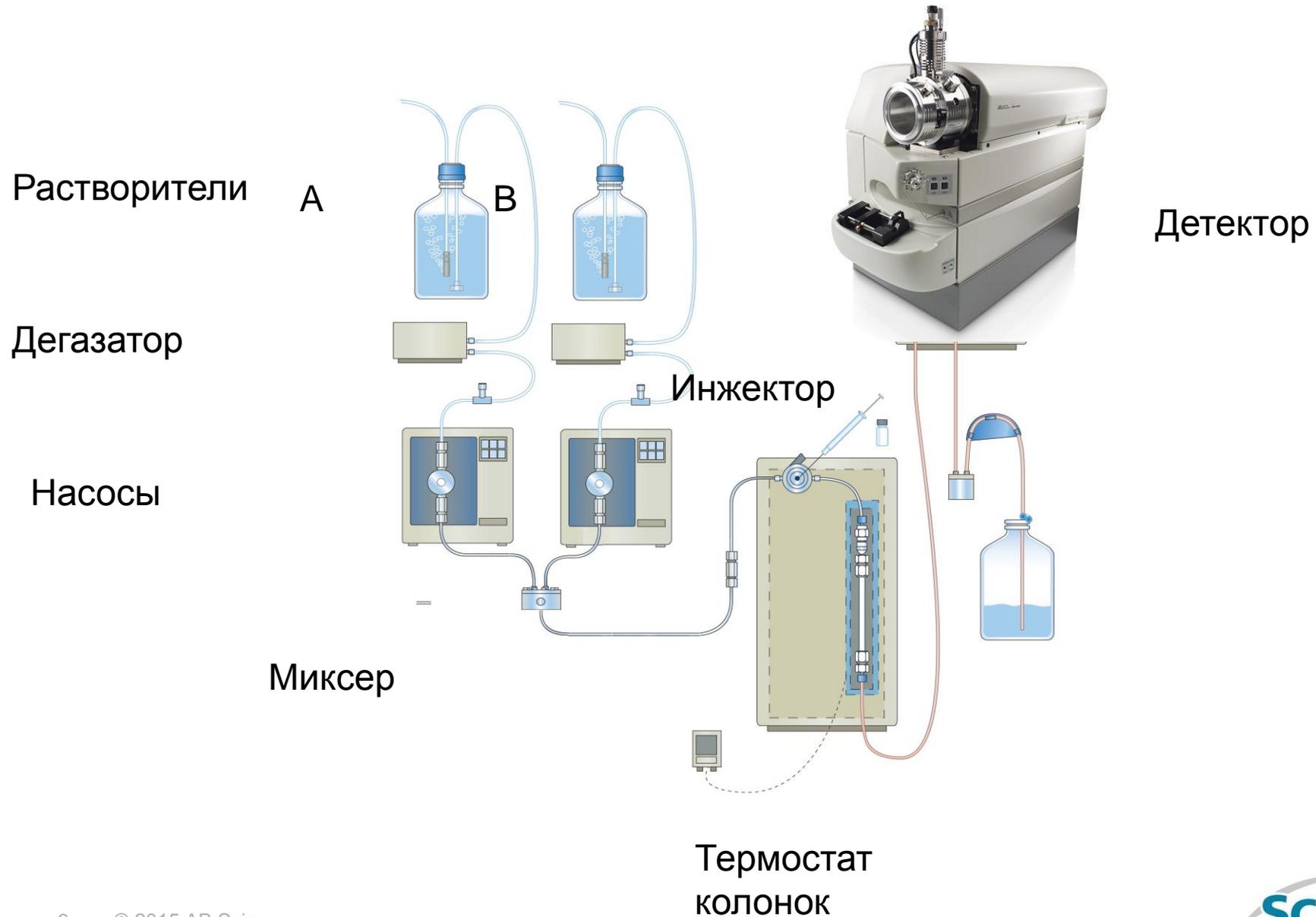
Что такое масс-спектрометр?

Масс-спектрометр измеряет молекулярную массу вещества



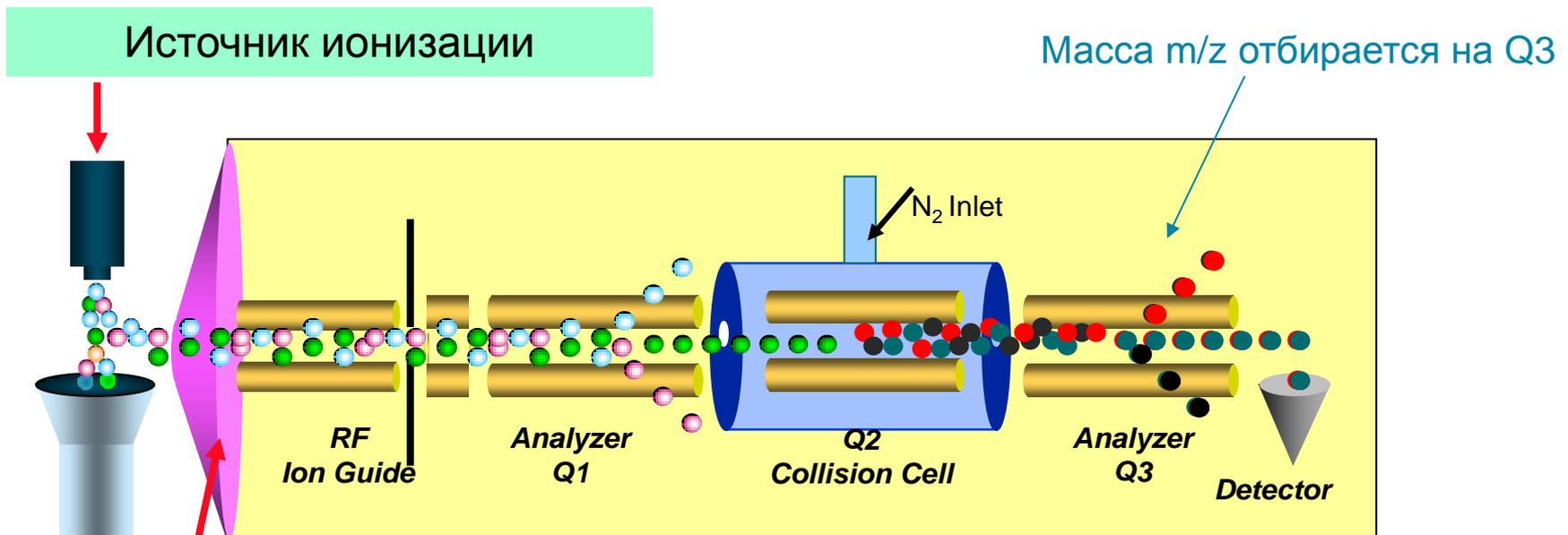
(технически, *отношение* массы к заряду, m/z)

Жидкостной хроматограф

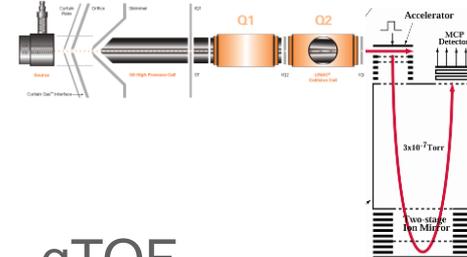
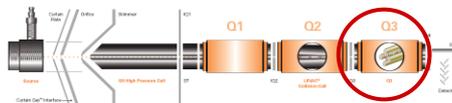
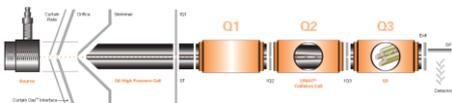


Тандемная масс-спектрометрия

- 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 квадруполом



Система Q TRAP®



— **Количественный анализ**

— Идентификация на основе соотношения MRM

— 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

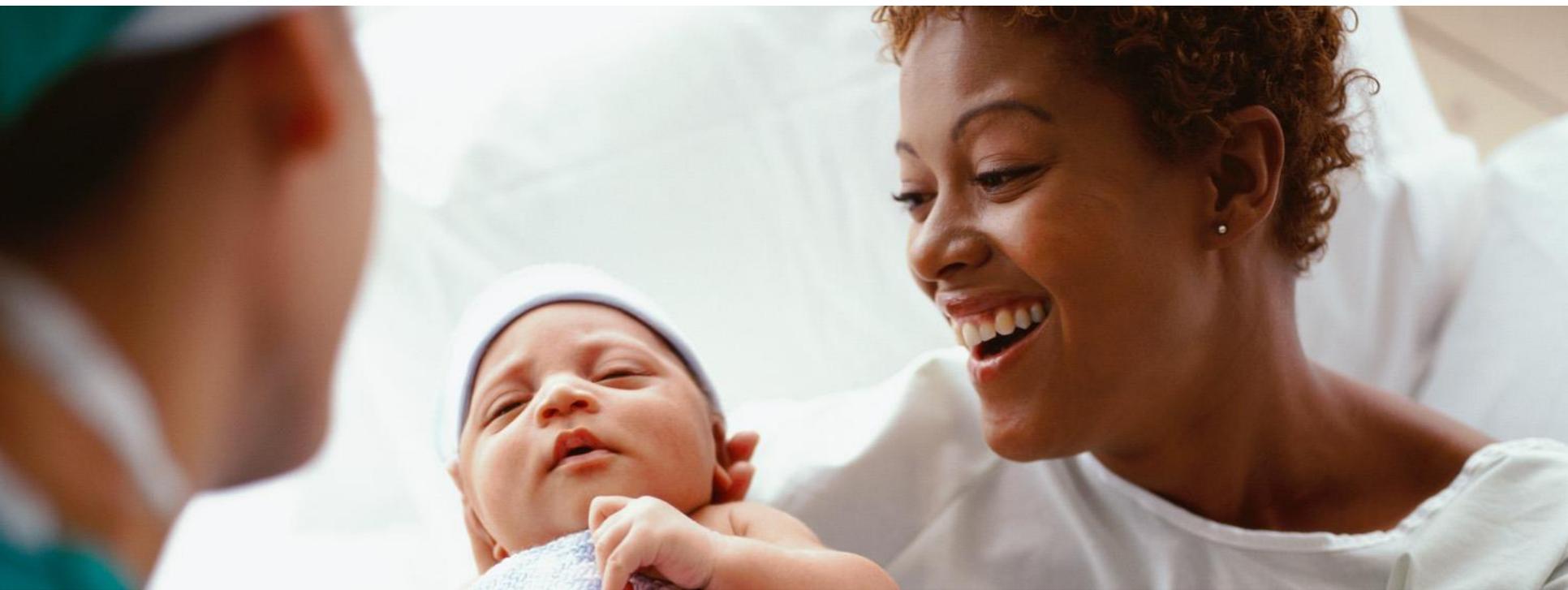
— **ID неизвестных**

— **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
Высокая стоимость исследований	Обычно высокая стоимость, особенно в случае применения индивидуальных тестов	Низкие эксплуатационные расходы и мультиплексный анализ позволяет снизить издержки
Трудоемкость разработки аналитических наборов	Наработка, очистка и иммобилизация моноклональных АТ, подбор условий взаимодействий АГ-АТ	Не требует антител для разработки новых тестов

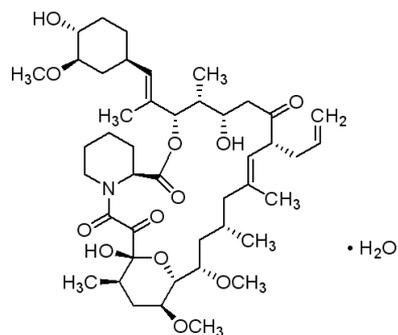


Обзор применений: Лекарственный мониторинг

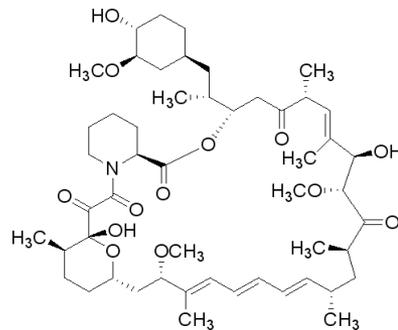
Анализ иммуносупрессоров



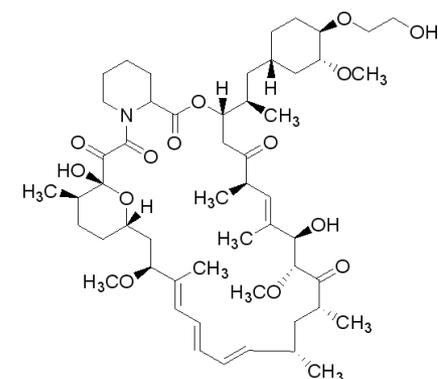
Иммunosuppressory - структура



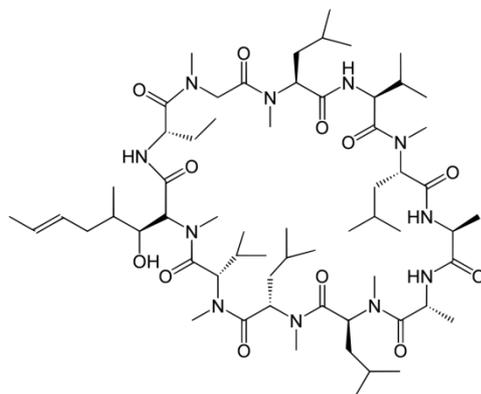
Такролимус
Молекулярный вес
822.0



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 иммуносупрессоров с использованием tandemного 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

Анализ гомоцистеина методом ВЭЖХ/МС/МС

- Время анализа – 2 минуты
- Предел количественного анализа с использованием масс-спектрометра 3200MD – 6 нг/мл
- Отношение сигнал/шум, измеренное для концентрации 1.36 мкг/мл – 2300:1



Answers for Science.
Knowledge for Life.™



Неонатальный скрининг на аминокислоты и ацилкарнитины – анализ сухих пятен крови

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%
Перокисомные заболевания	4%

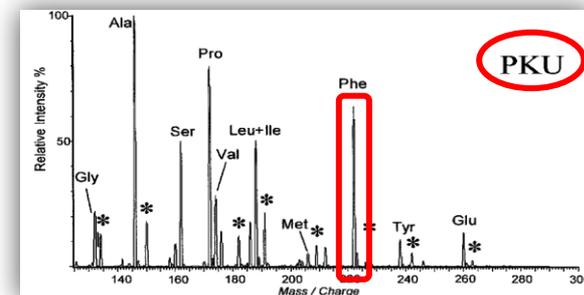
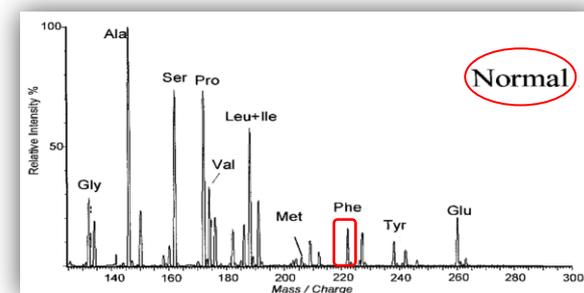
Как проявляются наследственные нарушения метаболизма. Диагностика

- В большинстве случаев заболевания сопровождаются поражением многих систем органов
- Могут сопровождать человека от младенческого до взрослого возраста, 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

Анализ сухих пятен крови на аминокислоты и ацилкарнитины

Рутинный метод, благодаря тандемной масс-спектрометрии - ВЭЖХ/МС/МС (система [AB SCIEX 3200MD Series](#)):

- наборы реагентов
- Минимальная пробоподготовка: сухое пятно крови позволяет получать данные для диагностики около 40 заболеваний, связанных с наследственными нарушениями обмена веществ
- 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	∞

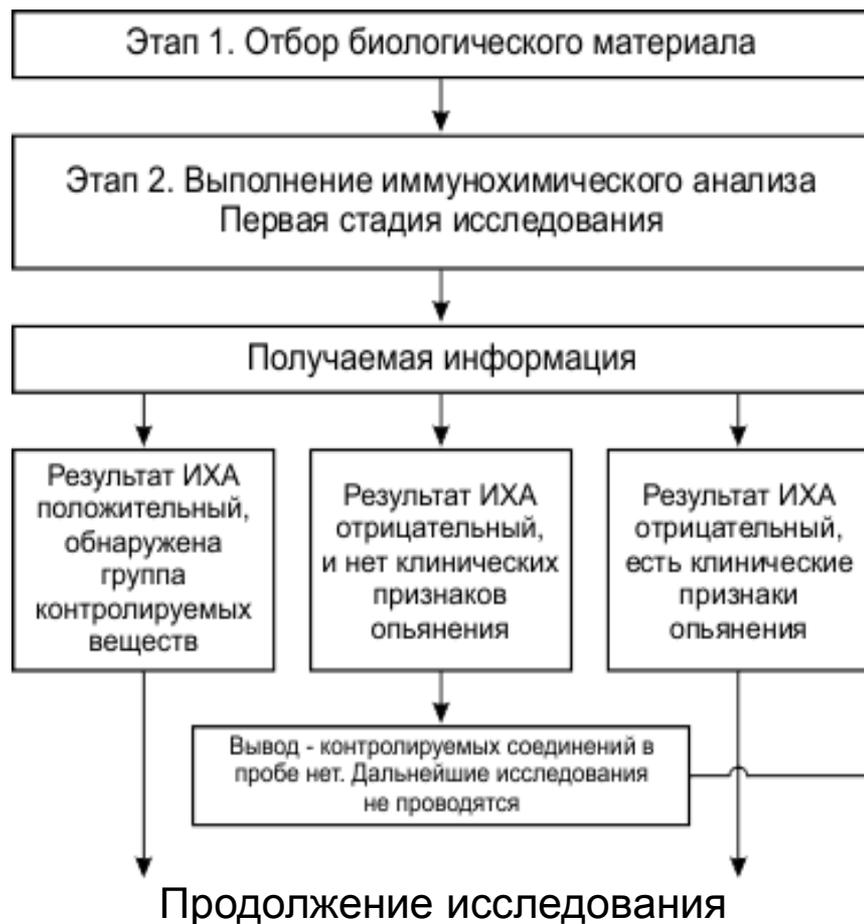


Answers for Science.
Knowledge for Life.™



Аналитическая токсикология

Общая схема исследования (Первая стадия - ИХА)



Диагностическое исследование выполняется за шесть этапов по отработанной и научно обоснованной схеме, широко применяемой в мировой практике. Схема предусматривает выполнение анализа токсикантов и их метаболитов в две стадии: **первая стадия - ИХА; вторая стадия – ВЭЖХ-МС/МС.**

Этап 1. Отбор биологического материала.
Этап 2. Выполнение количественного анализа методом ИХА. Определение группы наркотических средств, психотропных веществ, включая новые синтетические психоактивные соединения, обнаружение этилглюкуронида и котинина.

Выполнение **этапа 6**
- оформление
справки (заключения)



Общая схема исследования (Вторая стадия – ВЭЖХ-МС/МС)



Этап 3. Приготовление проб для подтверждающего анализа методом ВЭЖХ-МС/МС. Разбавление мочи в два раза (упрощенный метод пробоподготовки).

Этап 4. Проведение подтверждающего исследования методом ВЭЖХ-МС/МС.

Этап 5. Обработка результатов.

Этап 6. Оформление справки (заключения).

Выполнение **этапа 6** при отсутствии контролируемых соединений в пробе



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

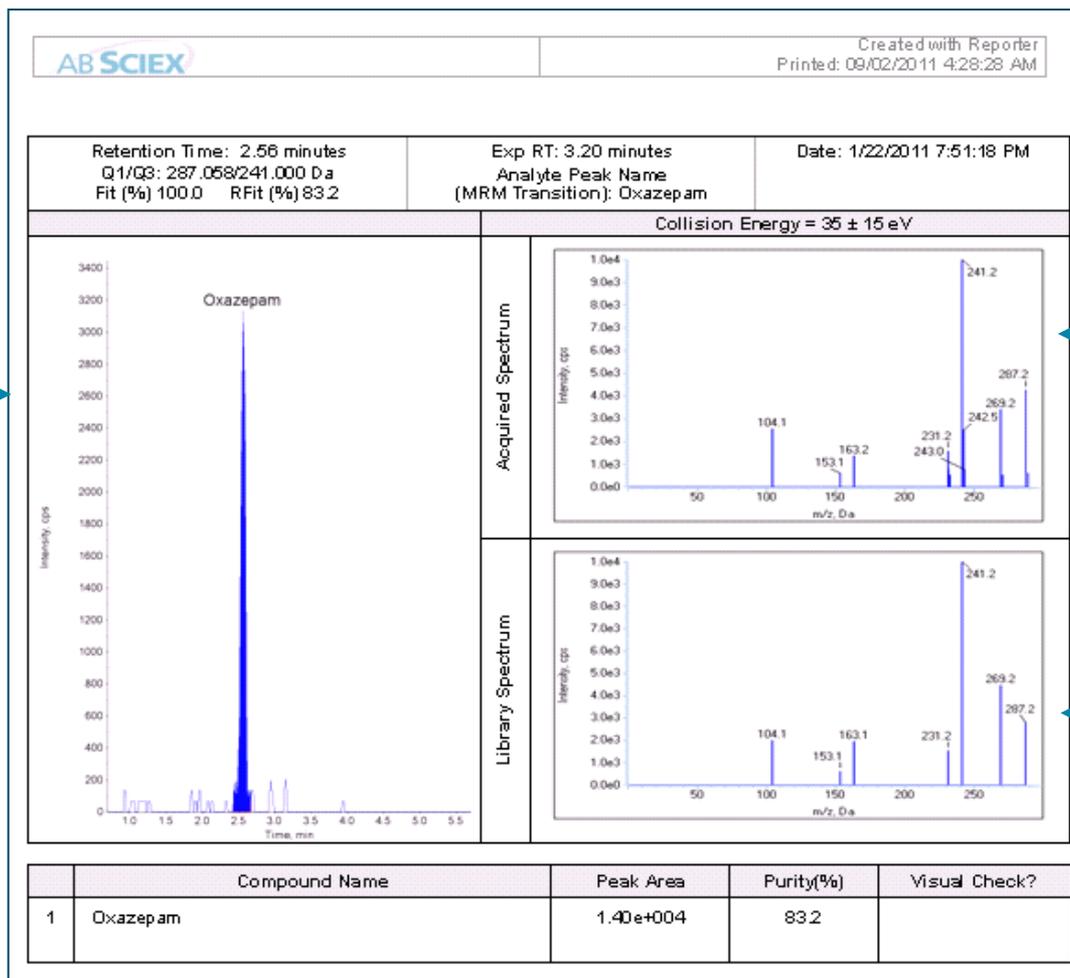
Методические

№ 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

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:

>600 соединений в рутинном

скрининговом методе

8-12 минут – время анализа

Подтверждение с помощью

спектральных библиотек

>4300 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

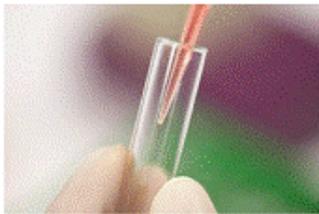
Introduction

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.

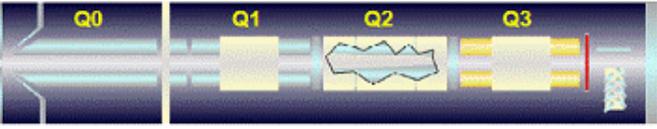
Screening has traditionally been performed using immunoassays, liquid chromatography with ultra-violet detection (LC/UV), or gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS).



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
 - Гомованилиновая кислота
 - Т3/Т4/FT3/FT4
 - Этилсульфаты и этилглюкорониды
 - Метаболиты никотина
 - Гемоглобинопатии
 - Статус витамина D

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®



БЛАГОДАРИМ ЗА ВНИМАНИЕ

Answers for Science.
Knowledge for Life.™

