

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИММУНОДЕПРЕССАНТОВ В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ МЕТОДОМ ТАНДЕМНОЙ ЖИДКОСТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Д.А.Фармаковский, Shimadzu Europa
smo_df@shimadzu.ru

УДК 543.51; ВАК 02.00.02

Компания Shimadzu предлагает аппаратный комплекс для высокочувствительного количественного определения иммунодепрессантов в цельной крови методом тандемной жидкостной масс-спектрометрии с полностью автоматизированной пробоподготовкой (рис.1) и с использованием высококачественных ¹³C-стандартов. Описаны примеры применения, полученные результаты подтверждают высокую точность, чувствительность и селективность новой методики анализа.

Иммунодепрессанты (рис.2) играют важную роль в трансплантологии, а также используются для лечения расстройств иммунной системы и не аутоиммунных воспалительных реакций. Терапевтический диапазон концентраций этих лекарственных средств, как правило, достаточно узок, поэтому для правильной дозировки необходим тщательный и постоянный контроль их содержания в крови пациента. Традиционное опре-

деление иммунодепрессантов, основанное на иммуноферментном анализе, отличается невысокой специфичностью и чувствительностью, поэтому сегодня все большее значение приобретает жидкостная тандемная масс-спектрометрия как наиболее быстрый, чувствительный и селективный метод. Однако две основные проблемы затрудняют широкое внедрение масс-спектрометрии в практику клинического лабора-



Рис.1. Система пробоподготовки CLAM-2000 и УВЭЖХ-система Nexera X2 с тандемным МС-детектором LCMS-8050

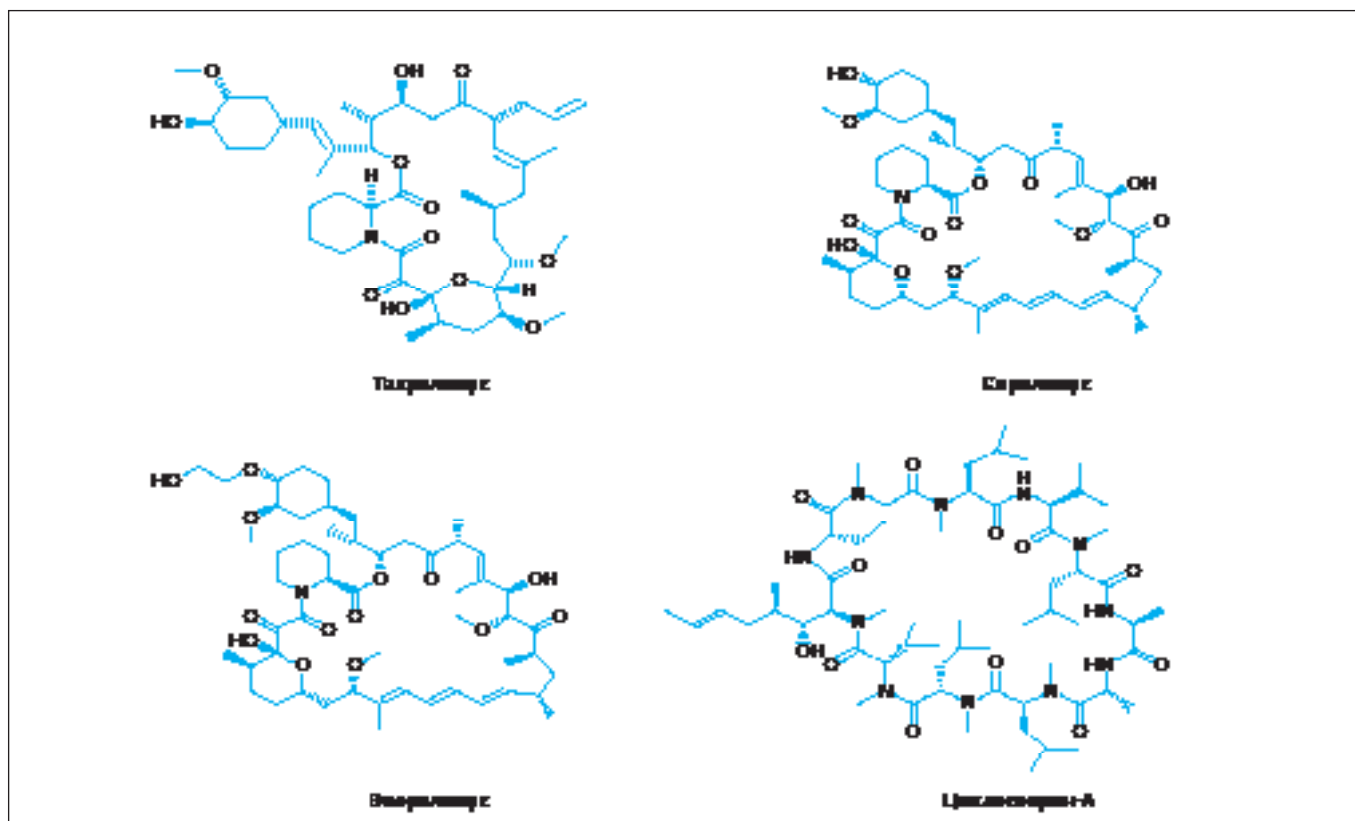


Рис.2. Структурные формулы иммунодепрессантов

торного анализа: длительная и трудоемкая подготовка образцов и достаточно высокие требования к квалификации операторов масс-спектрометрического оборудования. Поэтому масс-спектрометрия пока проигрывает иммунохимии по таким показателям, как производительность, удобство и простота работы.

Использование системы Shimadzu CLAM-2000 для автоматизированной подготовки образцов к последующему масс-спектрометрическому анализу позволяет практически полностью избавиться от проблем с пробоподготовкой и сделать работу на масс-спектрометре такой же простой и производительной, как на традиционных иммунохимических анализаторах. Об этой системе мы рассказывали в предыдущих выпусках журнала*. Приведем пример полностью автоматизированного количественного определения четырех основных иммунодепрессантов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для количественного определения иммунодепрессантов использовали коммерческий набор Dosimmune (Alsachim,

Франция), включающий раствор для экстракции определяемых компонентов из цельной крови и изотопно-меченые (^{13}C) внутренние стандарты целевых иммунодепрессантов (далее ^{13}C -стандарты). Подготовку образцов цельной крови осуществляли в автоматическом режиме при помощи модуля CLAM-2000 (рис.1), а анализ проводили на УВЭЖХ-системе Nexera X2 с tandemным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8050 (все производства Shimadzu, Япония). Список целевых веществ и стандартов представлен в табл.1.

CLAM-2000 осуществляет следующие операции: дозирование образцов, реагентов и внутренних стандартов; перемешивание и/или встряхивание; фильтрацию; инкубирование при заданной температуре; автоматическую загрузку подготовленных к анализу проб в автодозатор ВЭЖХ-МС/МС системы.

Пробирки с образцами цельной крови помещали в соответствующую турель CLAM-2000. Автоматизированная пробоподготовка включала добавление к 5 мкл образца 12,5 мкл раствора внутренних стандартов и 175 мкл раствора для экстракции с последующим 30-секундным перемешиванием и финальной фильтрацией в течение минуты. Полученный фильтрат поступал в автодозатор системы Nexera X2 и далее немедленно начинался анализ.

* Фармаковский Д. Автоматизация пробоподготовки ВЭЖХ-МС/МС для клинических исследований // АНАЛИТИКА. 2017. № 1. С. 72–75

Таблица 1. Формулы, точные массы и регистрируемые MRM-переходы целевых иммунодепрессантов

| Иммунодепрессант | Формула | Точная масса | MRM-переход |
|--------------------------|----------------------------------|--------------|-----------------|
| Эверолимус | $C_{53}H_{83}NO_{14}$ | 957,6 | 975,6 > 908,5 |
| Эверолимус $^{13}C_2d_4$ | $C_{51}^{13}C_2H_{79}D_4NO_{14}$ | 963,6 | 981,5 > 914,5 |
| Сиролимус | $C_{51}H_{79}NO_{13}$ | 913,5 | 931,6 > 864,5 |
| Сиролимус $^{13}Cd_3$ | $C_{50}^{13}CH_{76}D_3NO_{13}$ | 917,5 | 935,4 > 864,5 |
| Такролимус | $C_{44}H_{69}NO_{12}$ | 803,5 | 821,5 > 768,6 |
| Такролимус $^{13}Cd_4$ | $C_{43}^{13}CH_{67}D_4NO_{12}$ | 808,5 | 826,4 > 773,6 |
| Циклоспорин | $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ | 1201,8 | 1219,9 > 1202,8 |
| Циклоспорин d_{12} | $C_{62}H_{99}D_{12}N_{11}O_{12}$ | 1213,8 | 1231,8 > 1214,9 |

Условия УВЭЖХ-анализа: Nexera X2 и набор Dosimmune

Колонка-ловушка: Ascentis C8 4,6 × 30 мм, 5 мкм.
 Аналитическая колонка: Ascentis C18 2,1 × 50 мм, 5 мкм.
 Объем пробы: 20 мкл.
 Подвижная фаза А: 90% 3 мМ раствора формиата аммония (рН=3,6) + 10% метанола.
 Подвижная фаза В: 10% 3 мМ раствора формиата аммония (рН=3,6) + 90% метанола.
 Поток подвижной фазы А: 2 мл/мин (колонка-ловушка).
 Поток подвижной фазы В: 0,8 мл/мин (аналитическая колонка).
 Температура термостата колонок: 65°C.

Условия МС/МС: LCMS-8050

Поток газа-распылителя: 3 л/мин (азот).
 Поток горячего газа: 10 л/мин (воздух).

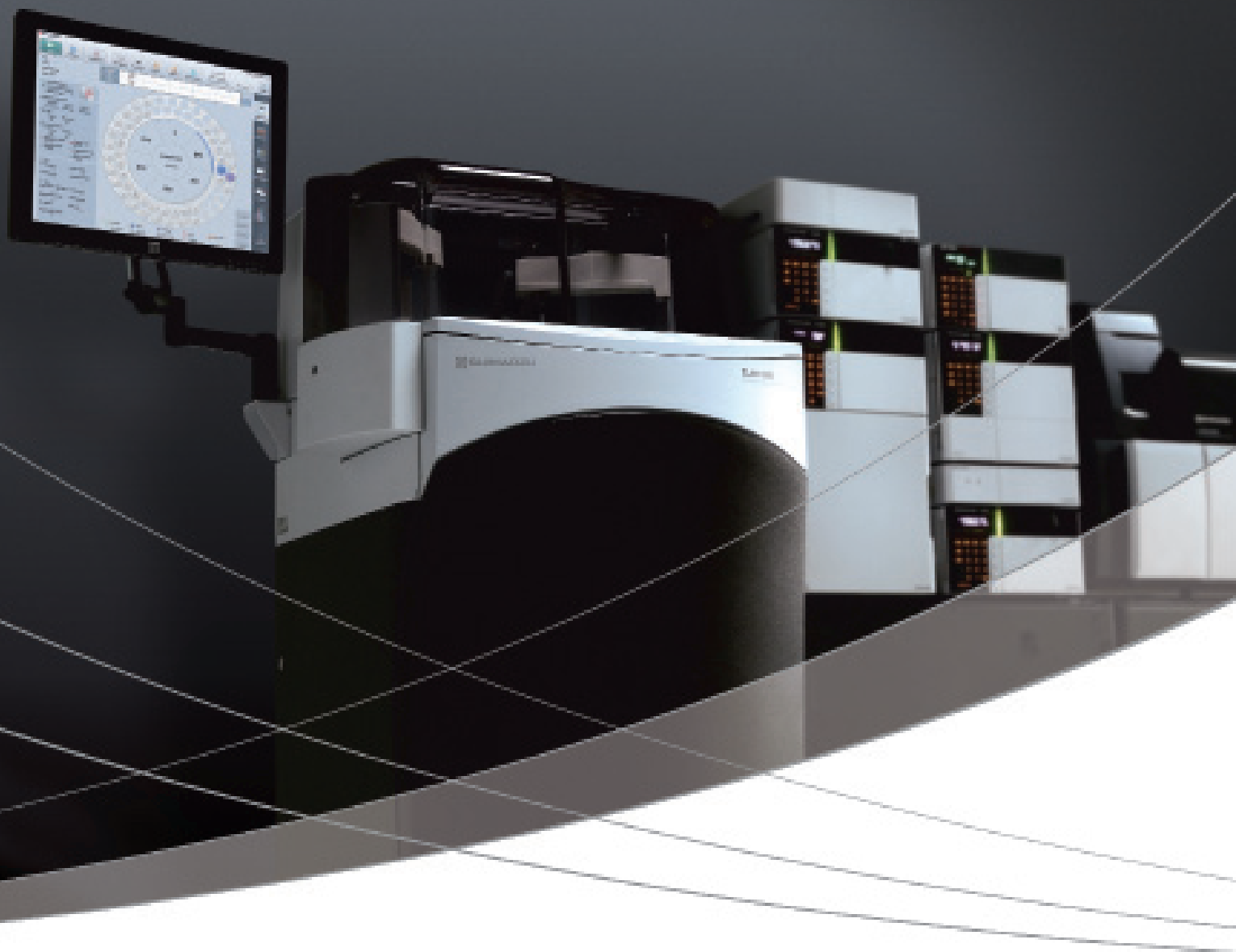
Поток газа-осушителя: 10 л/мин (азот).
 Температура интерфейса: 200°C.
 Температура линии десольватации: 250°C.
 Температура нагревательного блока: 200°C.
 Пауза между регистрациями сигнала: 1 мс.
 Время переключения полярности ионизации: 5 мс.
 Количество точек данных на пик: >30.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как правило, в количественном масс-спектрометрическом анализе используют дейтерированные внутренние стандарты. Однако они отличаются сравнительно невысоким уровнем изотопного обогащения, что зачастую приводит к некорректным количественным результатам (завышение концентрации нативных соединений). В настоящей работе

Таблица 2. Точность определения концентрации

| Такролимус | | Сиролимус | |
|---------------------|-------------|---------------------|-------------|
| Концентрация, нг/мл | Точность, % | Концентрация, нг/мл | Точность, % |
| 2,9 | 114 | 3,2 | 115 |
| 5,4 | 108 | 5,7 | 105 |
| 13,3 | 87 | 13,3 | 93 |
| 40,5 | 95 | 40,6 | 103 |
| Эверолимус | | Циклоспорин-А | |
| Концентрация, нг/мл | Точность, % | Концентрация, нг/мл | Точность, % |
| 3,2 | 114 | 36,1 | 98 |
| 5,8 | 92 | 223,4 | 106 |
| 13,4 | 85 | 454,6 | 85 |
| 42,1 | 94 | 1693,0 | 95 |



Универсальное решение для лабораторной медицины

CLAM-2000 — первая в мире система для автоматизированной подготовки биологических образцов к анализу методом тандемной жидкостной масс-спектрометрии

- CLAM-2000 совместим со всем модельным рядом жидкостных хроматографов и масс-спектрометров Shimadzu
- Автоматизированная пробоподготовка значительно увеличивает производительность работы лаборатории и исключает ошибки оператора, тем самым повышая точность и воспроизводимость результатов количественного анализа
- Интуитивно понятный графический интерфейс делает загрузку, обработку и последующий анализ образцов предельно простыми
- Отсутствует риск контаминации образцов и инфицирования персонала
- В отличие от традиционных анализаторов CLAM-2000 легко адаптировать для проведения самых разнообразных анализов, включая разработанные самими пользователями

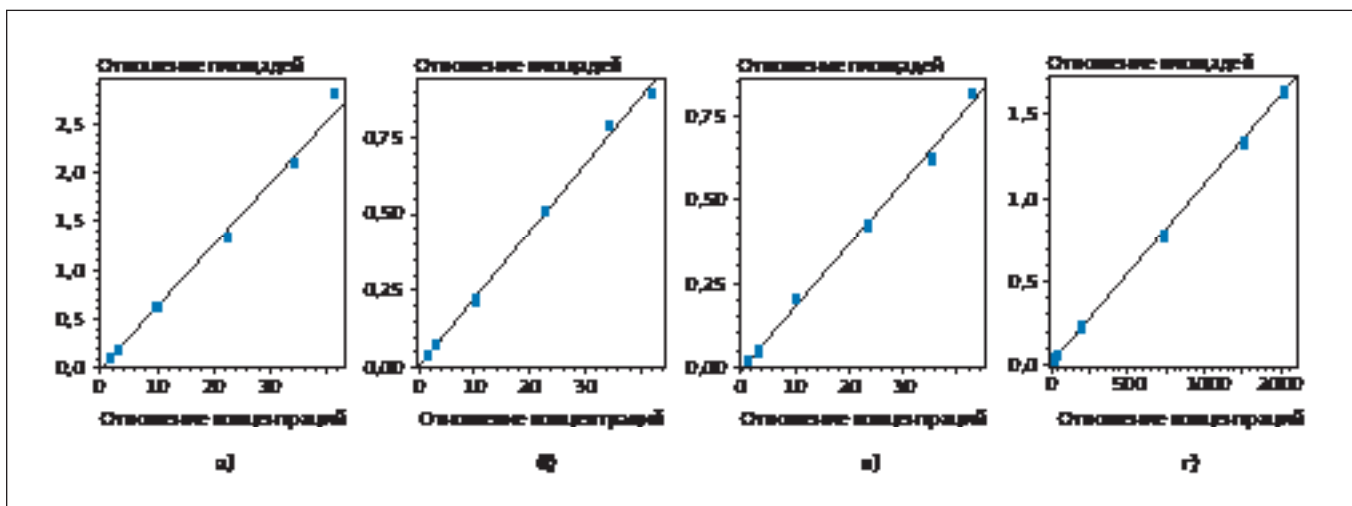


Рис.3. Калибровочные графики определения в цельной крови: а – такролимуса, б – сиrolимуса, в – эверолимуса, г – циклоспорина-А

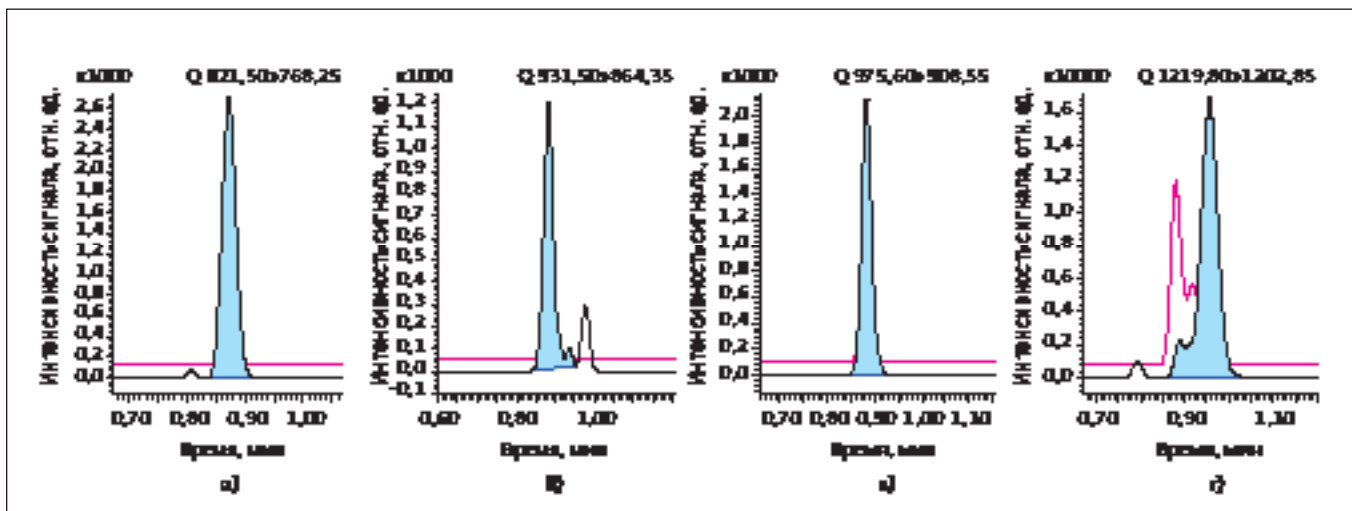


Рис.4. MRM-хроматограммы, полученные при определении в цельной крови: а – такролимуса 0,5 нг/мл, б – сиrolимуса 0,5 нг/мл, в – эверолимуса 0,5 нг/мл, г – циклоспорина-А 5 нг/мл

использовали ^{13}C -стандарты для трех иммунодепрессантов, что обеспечило более высокую точность результатов вкпе с существенным снижением матричного эффекта. Разработанная методика анализа обеспечивала линейный отклик в терапевтическом диапазоне концентраций 0,5–40,0 нг/мл (для такролимуса, сиrolимуса и эверолимуса) и 5–1500 нг/мл для циклоспорина-А (рис.3). Для всех целевых соединений линейность (R^2) была выше 0,99, а отношение сигнал/шум при определении концентраций на уровне LLOQ (нижний предел количественного обнаружения) превышало 25:1 (рис.4). Предел количественного обнаружения составил 0,5 нг/мл (для такролимуса, сиrolимуса и эверолимуса) и 5 нг/мл для циклоспорина-А. Анализ образцов цельной крови с известной концентрацией

иммунодепрессантов показал, что точность (сходимость) результатов во всем диапазоне находится на очень хорошем уровне и составляет 85–115% (табл.2).

Приведенные примеры подтверждают высокие точность, чувствительность и селективность предложенной методики анализа. Таким образом, количественное определение важнейших иммунодепрессантов в цельной крови методом тандемной жидкостной масс-спектрометрии с полностью автоматизированной пробоподготовкой и с использованием высококачественных ^{13}C -стандартов обеспечивает более высокое качество получаемых результатов по сравнению с традиционными способами анализа.