

# 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  $^{13}\text{C}$ -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

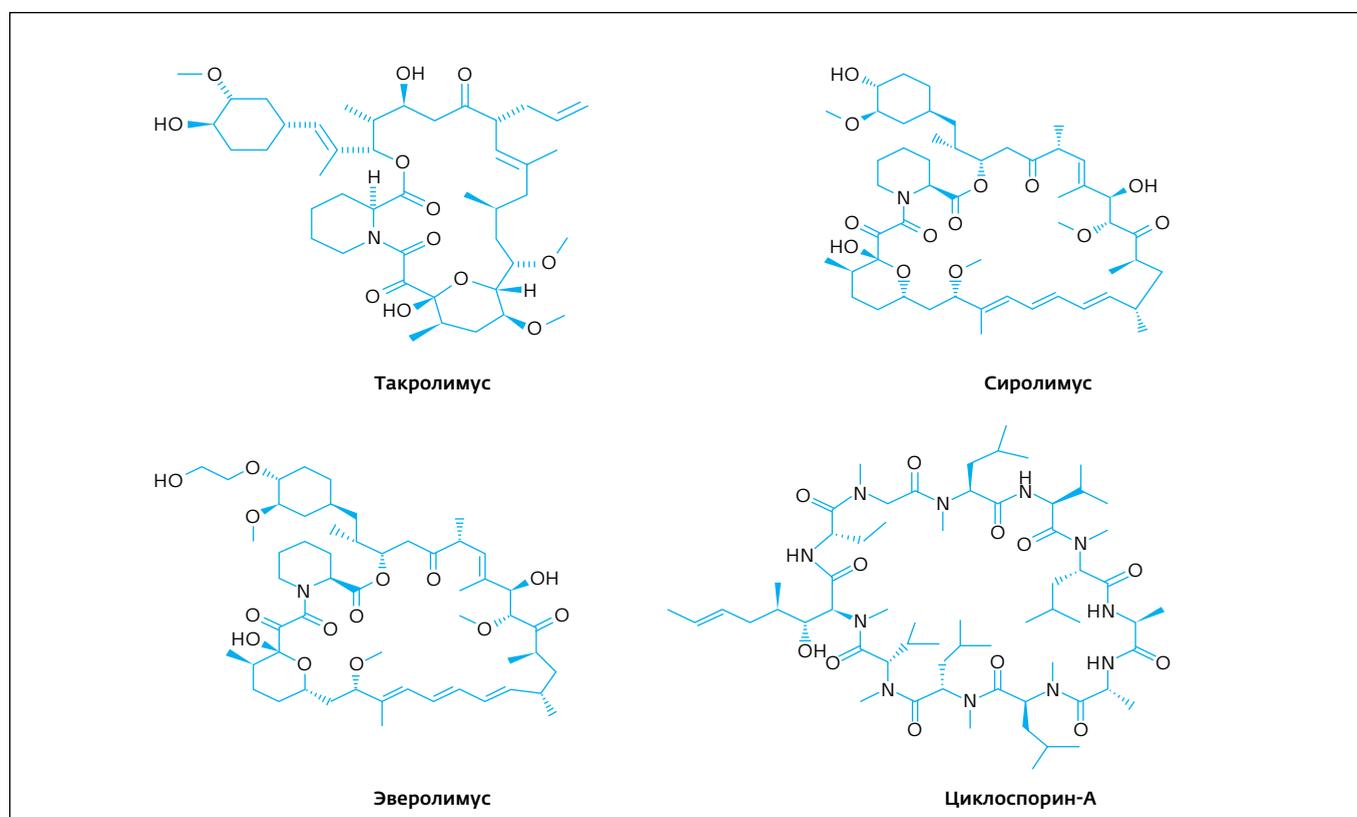


Рис.2. Структурные формулы иммунодепрессантов

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<sup>\*</sup>. 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 (<sup>13</sup>C) внутренние стандарты целевых иммунодепрессантов (далее <sup>13</sup>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

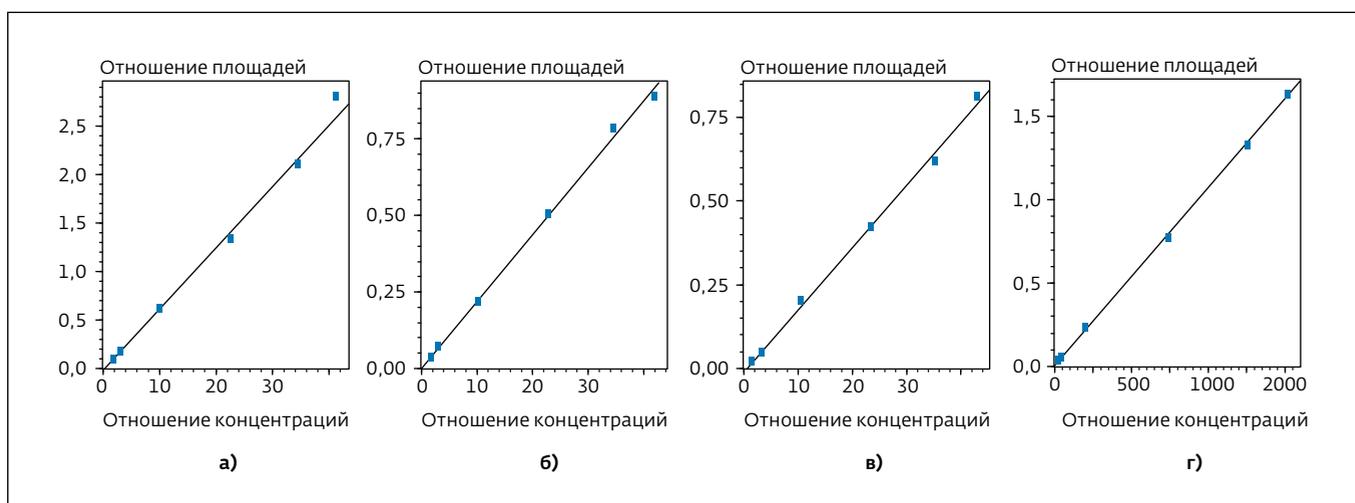


Рис.3. Калибровочные графики определения в цельной крови: а – такролимуса, б – сиролимуса, в – эверолимуса, г – циклоспорина-А

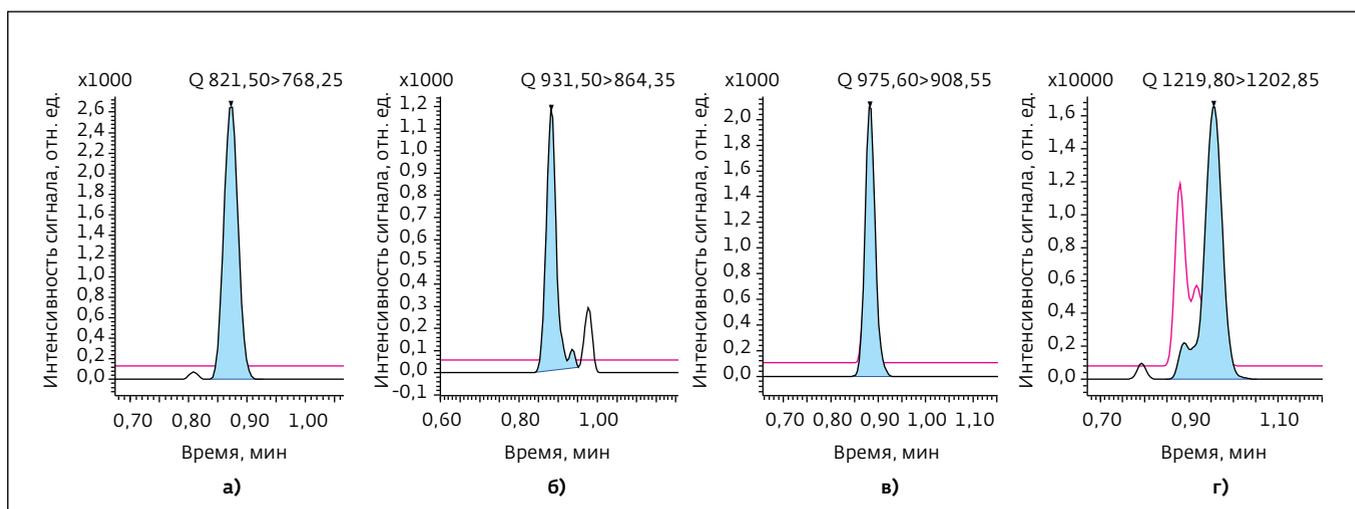


Рис.4. MRM-хроматограммы, полученные при определении в цельной крови: а – такролимуса 0,5 нг/мл, б – сиролимуса 0,5 нг/мл, в – эверолимуса 0,5 нг/мл, г – циклоспорина-А 5 нг/мл

использовали  $^{13}\text{C}$ -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, сиролимуса 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, сиролимуса 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 tandemной жидкостной масс-спектрометрии с полностью автоматизированной пробоподготовкой и с использованием высококачественных  $^{13}\text{C}$ -стандартов обеспечивает более высокое качество получаемых результатов по сравнению с традиционными способами анализа.