

Совмещение количественного определения стероидов в сыворотке крови методом ВЭЖХ-МС/МС с полностью автоматизированной пробоподготовкой

MSACL 2016 EU

Stéphane Moreau¹, Daisuke Kawakami², Toshikazu Minohata²,

¹ Shimadzu Europe GmbH, Duisburg, Germany

² Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan,

Введение

В настоящее время стандартная подготовка образцов сыворотки крови для определения в них концентрации стероидов методом жидкостной тандемной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) предусматривает проведение ряда последовательных операций, таких как твердофазная или жидкостная экстракция, высушивание экстракта с последующим его растворением, добавление внутренних стандартов и др.

Эти операции зачастую проводятся вручную и занимают продолжительное время (вплоть до нескольких часов). На каждой стадии

подготовки образца возможны ошибки оператора, что может сказаться на конечном результате.

Нами был разработан метод высокочувствительного количественного определения стероидов в сыворотке крови методом ВЭЖХ-МС/МС, предусматривающий полностью автоматизированную подготовку образцов с помощью станции CLAM-2000 (Clinical Laboratory Automated sample preparation Module). При этом требуется всего лишь одна операция, производимая вручную: нужно загрузить пробирки с образцами в турель CLAM-2000.

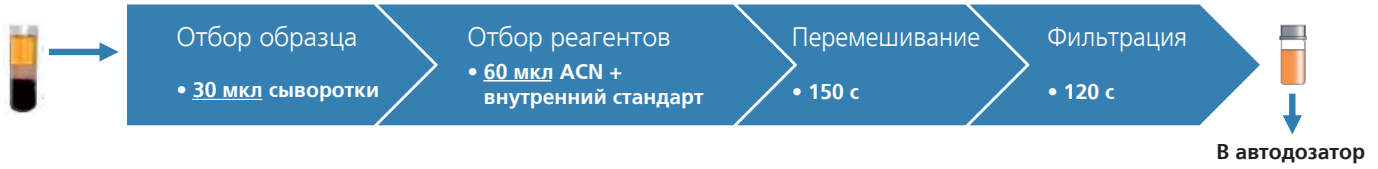
Материалы и методы

Для количественного определения 10 стероидных гормонов (кортизол, альдостерон, 11-деоксикортизол, кортикостерон, 17-гидроксипрогестерон, андростендион, дегидроэпиандростерон, дегидроэпиандростерон-сульфат, прогестерон и тестостерон) в сыворотке использовали коммерческий набор CHS™ MSMS Steroids Kit (PerkinElmer, США). Образцы сыворотки загружали в CLAM-2000 для автоматизированной пробоподготовки, которая предусматривала осаждение белков ацетонитрилом с последующей фильтрацией супернатанта и перенос полученного фильтрата встроенным манипулятором в автодозатор ВЭЖХ-МС/МС системы (рис. 1).



Рисунок 1. CLAM-2000 и ВЭЖХ-МС/МС система NexeraX2 / LCMS-8060

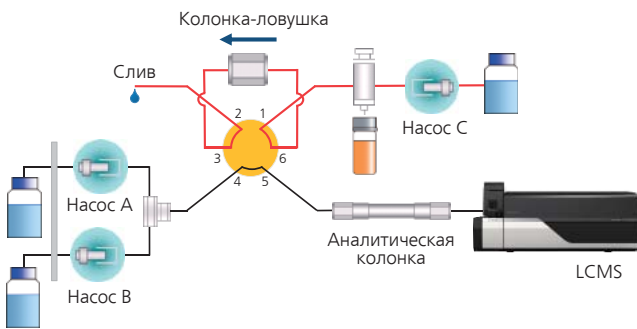
Совмещение количественного определения стероидов в сыворотке крови методом ВЭЖХ-МС/МС с автоматизированной пробоподготовкой



Для хроматографического разделения образцов использовали двумерную схему (рис. 2) с предварительным концентрированием образца

на колонке-ловушке MAYI-ODS и последующим разделением на колонке Kinetex Biphenyl при температуре 40 °С и скорости потока 0,3 мл/мин.

Загрузка образца



Анализ

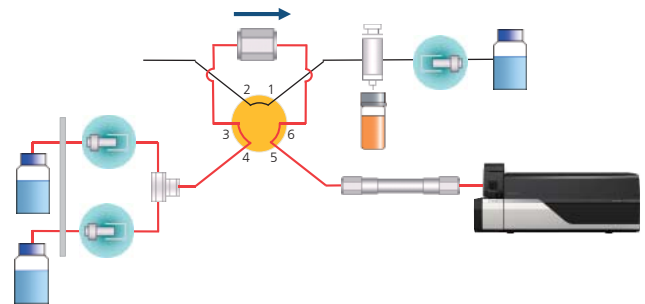
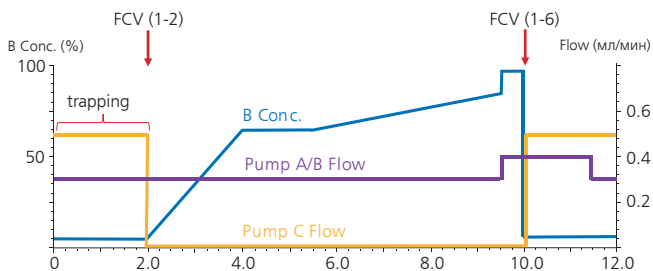


Рисунок 2. Схема анализа с использованием колонки-ловушки

ВЭЖХ	Nexera X2
Подвижная фаза А	1 мМ раствор флюорида аммония в воде
Подвижная фаза В	Метанол
Подвижная фаза С	10 мМ раствор формиата аммония в воде
Температура термостата	40 °С
Хроматографическая колонка	Kinetex Biphenyl (100 мм x 2 мм; 2,6 мкм)
Колонка-ловушка	MAYI-ODS (5 мм x 2 мм)
Объем пробы	30 мкл
Градиент:	

МС/МС	LCMS-8060
Ионизация	Электроспрей с горячим газом
Поток газа-распылителя	3 л/мин
Поток газа-осушителя	7 л/мин
Поток горячего газа	13 л/мин
Температура линии десольватации	120 °С
Температура нагревателя	450 °С
Температура интерфейса	370 °С
Условия регистрации MRM-переходов:	



MRM 1	+	DHEAS	271.20>213.20, 271.20>197.10	
MRM 2	+	DHEAS	IS 277.10>213.20, 277.10>208.10	
MRM 3	+	Cortisol	363.40>121.10, 363.40>97.00	
MRM 4	+	Cortisol	IS 366.10>121.10, 366.10>97.10	
MRM 5	+	Aldosterone	361.20>343.00, 361.20>315.20	
MRM 6	+	Aldosterone	IS 367.20>343.25, 367.20>331.10	
MRM 7	+	11-Deoxycortisol	347.20>109.10, 347.20>97.05	
MRM 8	+	11-Deoxycortisol	IS 352.20>100.15, 352.20>113.05	
MRM 9	+	Coricosterone	347.20>121.15, 347.20>97.15	
MRM 10	+	Coricosterone	IS 355.20>125.05, 355.20>97.00	
MRM 11	+	DHEA	271.20>253.15, 271.20>213.20	
MRM 12	+	17-OHP	331.10>97.00, 331.10>109.00	
MRM 13	+	17-OHP	IS 339.10>100.05, 339.10>113.10	
MRM 14	+	Testosterone	289.10>97.15, 289.10>109.05	
MRM 15	+	Testosterone	IS 294.10>100.00, 294.10>113.05	
MRM 16	+	Androstenedione	287.10>97.10, 287.10>109.15	
MRM 17	+	Androstenedione	IS 292.10>100.10, 292.10>113.05	
MRM 18	+	Progesterone	315.20>97.05, 315.20>109.10	
MRM 19	+	Progesterone	IS 324.10>100.00, 324.10>113.00	
MRM 20	-	DHEAS	neg 367.10>97.10	
MRM 21	-	DHEAS	neg IS 373.10>98.00	
MRM 22	-	Aldosterone	neg 359.20>189.25, 359.20>331.35	
MRM 23	-	Aldosterone	neg IS 365.20>194.20, 365.20>337.20	

Таблица 1. Условия анализа

Совмещение количественного определения стероидов в сыворотке крови методом ВЭЖХ-МС/МС с автоматизированной пробоподготовкой

Обсуждение результатов

Пригодность системы для стероидного профилирования оценивали по результатам анализа образцов сывороток крови с добавленными стероидными гормонами, а также стандартных и контрольных образцов из набора. Диапазон определяемых концентраций составлял (нг/мл):

1,51–320 для кортизола; 0,03–1,14 для альдостерона; 0,08–18 для 11-деоксикортизола; 0,29–62 для кортикостерона; 0,12–26 для 17-гидроксипрогестерона; 0,08–18 для андростендиона; 0,31–65 для дегидроэпиандростерона; 12,9–2750 для дегидроэпиандро-

стерон-сульфата; 0,12–26,5 для прогестерона и 0,03–7,2 для тестостерона.

Как видно из рис. 3, полученные калибровочные кривые характеризуются превосходной линейностью в исследуемом диапазоне концентраций: $r^2 > 0,997$. Анализ отличается также хорошей воспроизводимостью получаемых результатов: величина коэффициента вариации составила менее 10% ($n=3$).

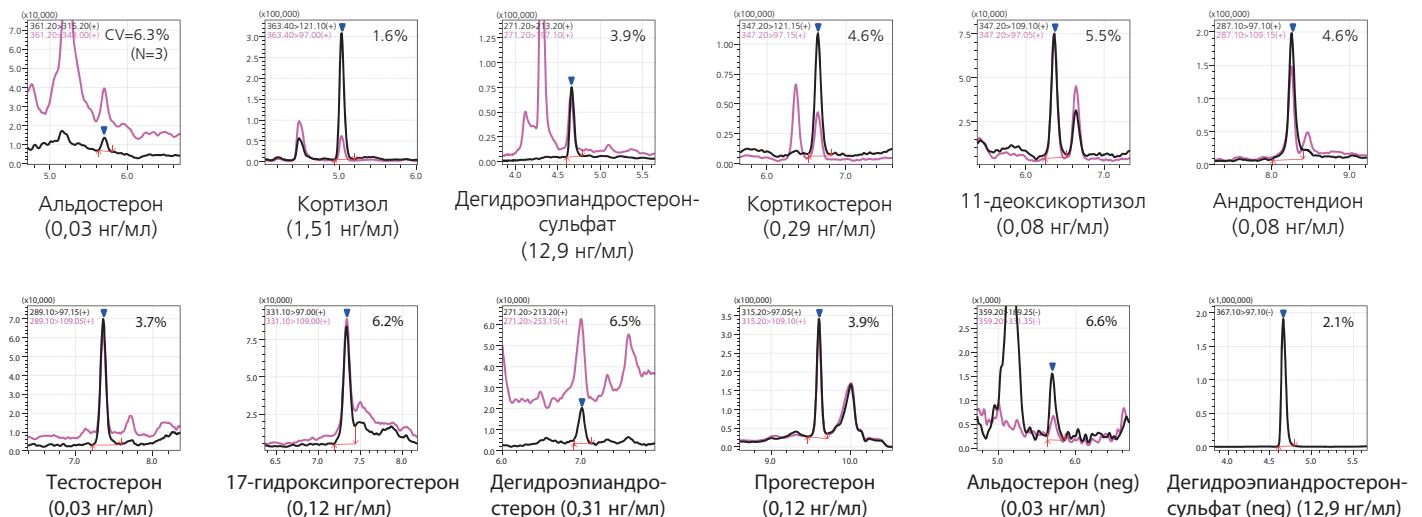
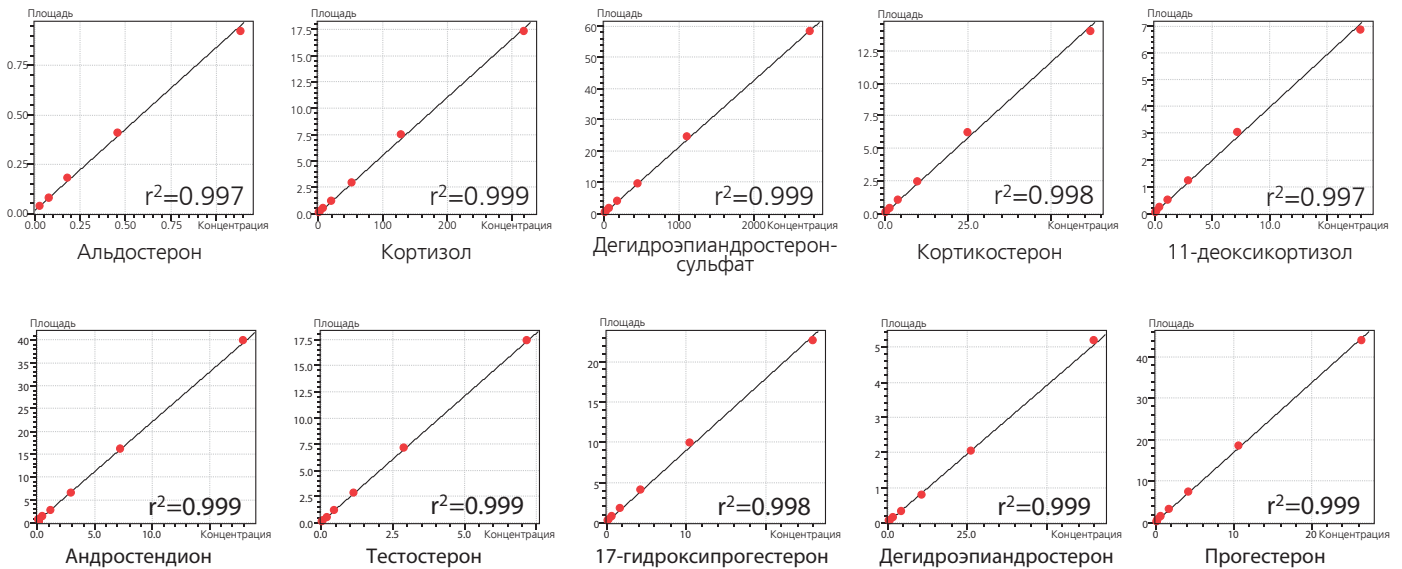


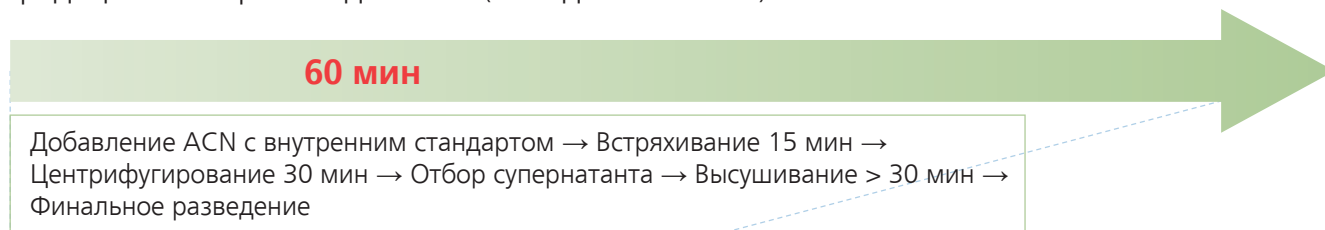
Рисунок 3. Калибровочные кривые (7 концентраций) и MRM-хроматограммы (1 концентрация) для 10 стероидов

Совмещение количественного определения стероидов в сыворотке крови методом ВЭЖХ-МС/МС с автоматизированной пробоподготовкой

Использование CLAM-2000 позволило сократить время подготовки одного образца в 10 раз (с 1 часа до 6 минут) при практически полном отсутствии ручных манипуляций с образцом.

Для еще большего увеличения производительности была реализована перекрестная пробоподготовка: подготовка очередного образца начинается еще до завершения анализа предыдущего (рис. 5).

- Традиционная пробоподготовка (осаждение белков)



- Автоматизированная подготовка с помощью CLAM-2000

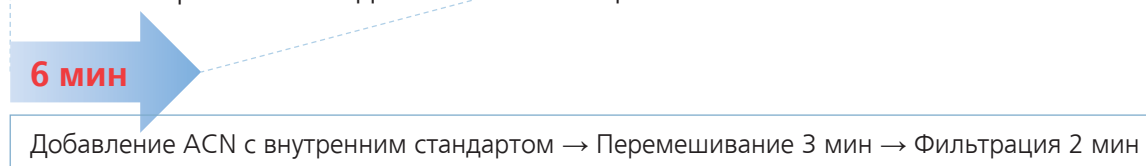


Рисунок 4. Время подготовки образца к анализу вручную и в автоматизированном режиме

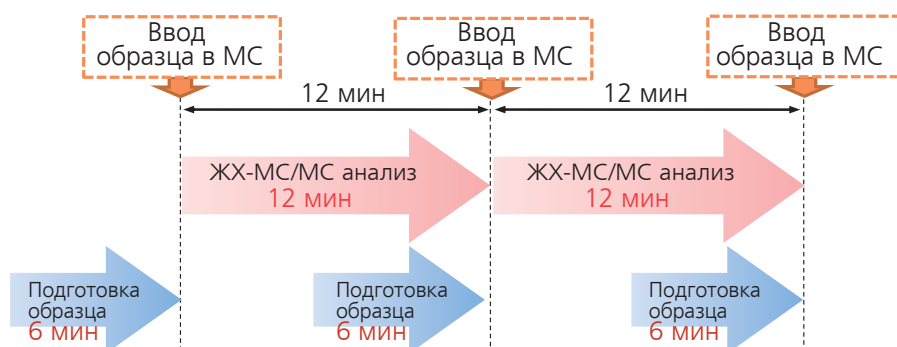


Рисунок 5. Анализ с перекрестной схемой подготовки образцов

Заключение

Была разработана методика количественного определения стероидных гормонов в сыворотке крови и представлена система для автоматизированного анализа образцов методом ВЭЖХ-МС/МС. Полученные результаты показывают, что система

обладает высокой чувствительностью и производительностью, а отсутствие ручных операций при подготовке образцов существенно повышает точность количественного анализа.

Первое издание: Октябрь, 2016