

# ВЭЖХ-МС/МС определение содержания 25-гидроксивитамина Д<sub>2</sub>/Д<sub>3</sub> в сыворотке крови с автоматизированной подготовкой образцов

MSACL 2016 EU

Daisuke Kawakami<sup>1</sup>, Davide Vecchiotti<sup>2</sup>, Maura Brambilla<sup>3</sup>,

<sup>1</sup> Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan,

<sup>2</sup> Shimadzu Italia, Milano, Italy,

<sup>3</sup> Mass spectrometry Toxicology laboratory, Hospital Desio, Italy

## Введение

Определение концентрации 25-гидроксивитамина Д<sub>2</sub>/Д<sub>3</sub> в сыворотке крови необходимо для оценки общего содержания в организме человека витамина Д. Витамин Д выполняет ряд важных функций, например, обеспечивает всасывание в кишечнике фосфора и кальция из продуктов питания. Недостаток витамина Д служит одной из причин таких заболеваний, как рахит у детей, остеопороз, псориаз и др.

Благодаря высокой чувствительности и селективности, оптимальным аналитическим инструментом для количественного анализа 25-гидроксивитамина Д<sub>2</sub>/Д<sub>3</sub> является жидкостная tandemная масс-спектрометрия. Однако до недавнего времени полностью реализовать возможности масс-спектрометрии не позволяла стадия подготовки биологического образца к анализу.

Традиционный метод пробоподготовки предусматривает проведение ряда последовательных операций, которые зачастую проводятся вручную и занимают продолжительное время. На каждой стадии подготовки образца возможны ошибки оператора, которые могут повлиять на конечный результат. Немаловажно и то, что контакт персонала с биологическим материалом несет потенциальный риск как контаминации образцов, так и инфицирования работающих в лаборатории людей.

Для решения перечисленных проблем корпорация Shimadzu разработала первую в мире автоматизированную станцию подготовки биологических



Рисунок 1. CLAM-2000 и ВЭЖХ-МС/МС система NexeraX2 / LCMS-8050

образцов к масс-спектрометрическому анализу CLAM-2000 (Clinical Laboratory Automated sample preparation Module).

CLAM-2000 (рис. 1) осуществляет следующие операции с образцами: дозирование образцов и реагентов, перемешивание/центрифугирование, фильтрацию, инкубирование при заданной температуре, загрузку подготовленных образцов в автодозатор ВЭЖХ-МС/МС системы

В настоящем сообщении приведен пример практического использования CLAM-2000 в связке с tandemным масс-спектрометром LCMS-8050 для количественного определения 25-гидроксивитамина Д<sub>2</sub>/Д<sub>3</sub> в сыворотке крови.

## ВЭЖХ-МС/МС определение содержания 25-гидроксивитамина Д2/Д3 в сыворотке крови с автоматизированной подготовкой образцов

### Материалы и методы

Использовали коммерчески доступный набор для определения 25-гидроксивитамина Д2/Д3 «ClinMass® LC-MS/MS Complete Kit for 25-OH-Vitamin D2/D3, MS7000» (RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, Германия), включающий хроматографическую колонку, подвижную фазу, а также калибровочные и контрольные стандарты. Последние загружали непосредственно в CLAM-2000 для последующего использования при анализе. Пробоподготовка с помощью CLAM-2000 (рис. 2) включала отбор аликвоты образца (30 мкл), добавление к ней 90 мкл преципитирующего раствора с внутренним стандартом, фильтрацию полученной смеси и последующий перенос фильтрата в автодозатор ВЭЖХ-МС/МС системы встроенным манипулятором. При этом полностью были исключены ручные операции с образцами сыворотки. ВЭЖХ-МС/МС система была укомплектована источником химической ионизации при атмосферном давлении (APCI).

<b>ВЭЖХ</b>	Nexera X2
Температура термостата	40°C
Объем пробы	30 мкл
<b>МС/МС</b>	LCMS-8050
Ионизация	Химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)
Режим МС	Регистрация множественных переходов (MRM)
<i>Параметры интерфейса:</i>	
Поток газа-распылителя	1,5 л/мин
Температура интерфейса	375°C
Температура линии десольватации	225°C
Температура нагревательного блока	250°C
Поток газа-осушителя	Выкл.

Таблица 1. Условия анализа

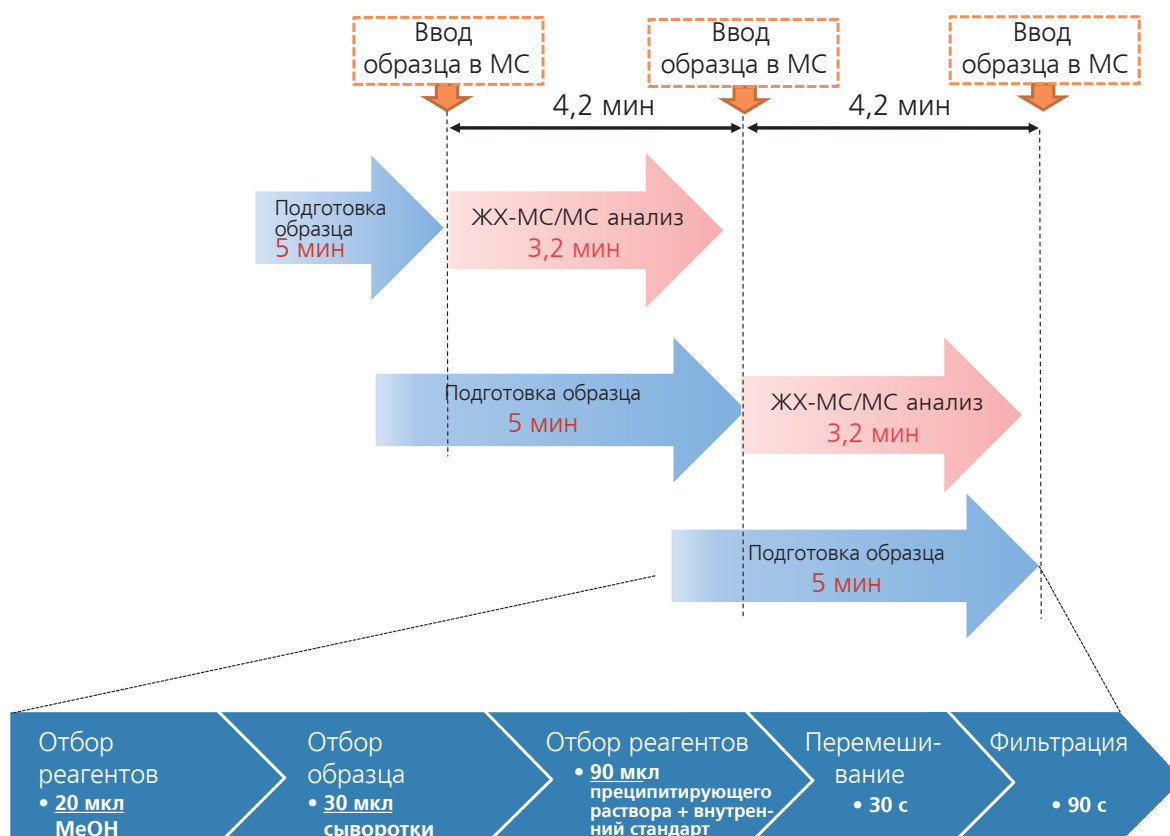


Рисунок 2. Схема анализа при помощи CLAM-2000 и ВЭЖХ-МС/МС

ВЭЖХ-МС/МС определение содержания 25-гидроксивитамина Д2/Д3 в сыворотке крови с автоматизированной подготовкой образцов

## Обсуждение результатов

### Линейность и прецизионность

Полученные калибровочные кривые (рис. 3) демонстрируют хорошую линейность ( $r^2 > 0,999$ ) в клинически значимом диапазоне концентраций 25-гидроксивитамина Д2/Д3 (4,10–68,5 мкг/л). Полученные результаты при определении трех концентраций (включая нижний предел

количественного определения, LLOQ) в семикратной повторности отличаются превосходной воспроизводимостью ( $CV < 6,5\%$ ). Межсуточная прецизионность (3 дня,  $n=7$ ) при определении тех же концентраций также находится на хорошем уровне ( $CV < 7,2\%$ ) (табл. 2).

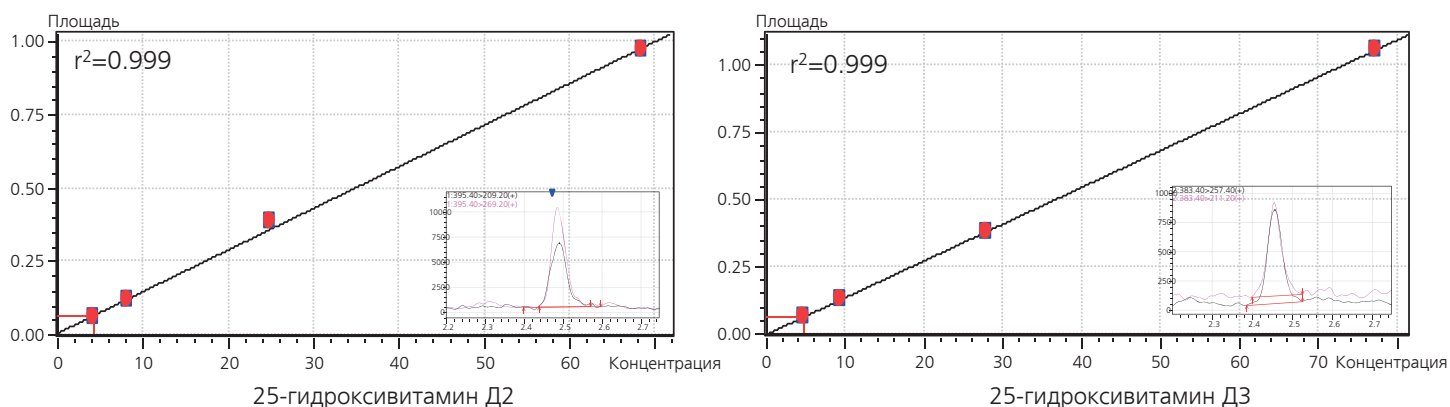


Рисунок 3. Калибровочные кривые и МС-хроматограммы

#### 25-гидроксивитамин Д2

CV%	Низкая концентрация (5,7 мкг/л)	Средняя концентрация (17,1 мкг/л)	Высокая концентрация (40,0 мкг/л)
Прецизионность в пределах суток (n=7)	4,4 %	2,3 %	1,1 %
Межсуточная прецизионность (3 дня)	5,2 %	4,7 %	3,7 %

#### 25-гидроксивитамин Д3

CV%	Низкая концентрация (6,3 мкг/л)	Средняя концентрация (18,9 мкг/л)	Высокая концентрация (43,0 мкг/л)
Прецизионность в пределах суток (n=7)	2,9 %	5,1 %	2,4 %
Межсуточная прецизионность (3 дня)	5,1 %	5,3 %	5,2 %

Таблица 2. Прецизионность в пределах суток и межсуточная прецизионность

## ВЭЖХ-МС/МС определение содержания 25-гидроксивитамина Д2/Д3 в сыворотке крови с автоматизированной подготовкой образцов

### Сравнение с традиционной пробоподготовкой

Результаты, полученные с помощью CLAM-2000, сравнивались с результатами, полученными при использовании традиционной пробоподготовки в соответствии с рекомендациями RECIPE для используемого набора.

Для сравнения использовали регрессионный анализ по Баблоку/Пассингу (рис. 4). Как видно из рисунка, наблюдается превосходная корреляция результатов, полученных при автоматизированной и традиционной подготовках образцов к анализу.

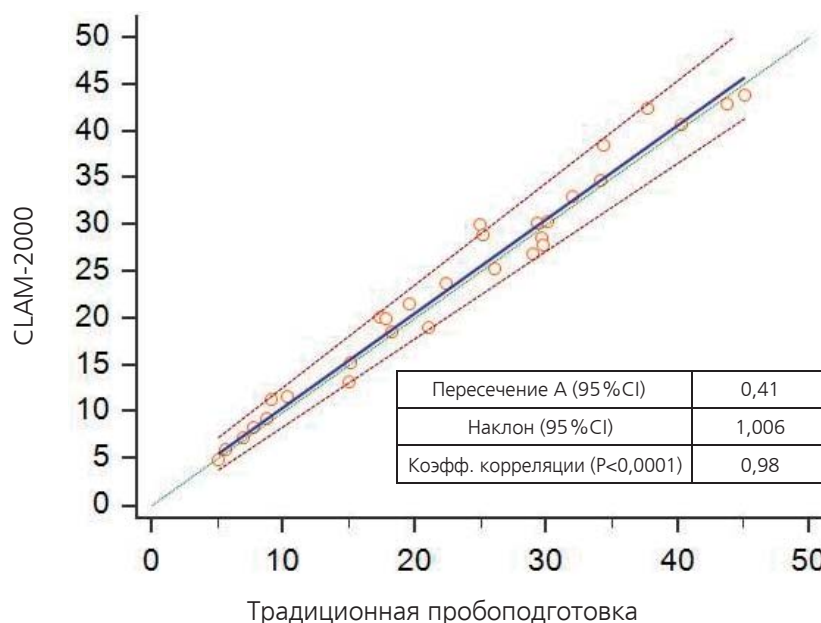


Рисунок 4. Корреляция между результатами, полученными с помощью CLAM-2000 и при использовании традиционной пробоподготовки

## Заключение

Показано, что автоматизированная подготовка образцов сыворотки крови к анализу методом тандемной масс-спектрометрии может быть успешно использована для определения концентрации 25-гидроксивитамина Д2/Д3 в сыворотке крови.

CLAM-2000 обеспечивает превосходное качество получаемых результатов при одновременном сокращении времени анализа и уменьшении количества используемых реагентов. Также полностью исключается риск ошибок оператора и инфицирования персонала лаборатории.

Первое издание: Октябрь, 2016