МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ В БИОАНАЛИТИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ: ПРОБЛЕМЫ, ЗАДАЧИ, МЕТОДЫ

УДК 543.631, 615.099
ВАК 02.00.02

Липеева А.В., к.х.н., ООО "ЛабПро Медиа", mond_05@list.ru
Темердашев А.З., д.х.н., ФГБОУ ВО "Кубанский государственный университет", TemerdashevAZ@gmail.com

Современная биоаналитика охватывает количественное измерение ксенобиотиков (лекарственных средств и их метаболитов, а также биологических молекул в неестественных местах или концентрациях) и биотиков (макромолекул, белков, ДНК, высокомолекулярных лекарственных средств, метаболитов) в биологических системах. Одной из наиболее распространенных задач биоаналитики в клинической и криминалистической практике является анализ хромато-масс-спектрометрическими методами биологических образцов с целью выявления наркотических веществ, стероидов, лекарственных препаратов, маркеров заболеваний и других соединений.

Каждое биоаналитическое исследование можно разделить на четыре этапа – выбор образца и его подготовка, определение методологии исследования, инструментальная база и интерпретация результатов. Несмотря на накопленный практический опыт и высокие аналитические характеристики методов хромато-масс-спектрометрии для указанных выше задач, существует ряд проблем при их применении. На каждом этапе исследования могут возникать специфические ошибки и трудности, которые как в отдельности, так и в совокупности влияют на корректность результатов анализа.

ВЫБОР ОБРАЗЦА

Первым этапом любого анализа является выбор образца (рис.1). В зависимости от цели биоаналитических исследований (допинг-контроль, токсикология, криминалистика и др.) могут использоваться различные типы биологических матриц: кровь, плазма, сыворотка, моча, волосы, грудное молоко, слюна, пот, спинномозговая жидкость и ткани [1]. У каждой матрицы есть свои особенности, которые также могут повлиять на результаты анализа. Например, в плазме содержатся фосфолипиды, в моче – большое количество солей.

Частой проблемой на практике оказывается то, что используется только один тип образцов для анализа. Это связано с тем, что, во-первых, большинство исследовательских групп ограничено доступным материалом, забор и транспортировка которого не требуют специальной подготовки (например, наиболее распространенный – моча), и во-вторых – для таких объектов выработаны надежные методики определения.

Но часто одной матрицы оказывается недостаточно для клинического диагноза: определяемые соединения могут не содержаться в этом типе образца, либо есть другие компоненты, мешающие идентификации. И хотя не существует универсального алгоритма выбора подходящего объекта анализа, даже для решения одной конкретной задачи лучше использовать несколько видов образцов.

В последнее время в качестве неинвазивных биологических образцов стали также использовать волосы, слюну, грудное молоко и фекалии. Волосы представляют собой стабильную и прочную матрицу, с которой легко обращаться и практически невозможно повредить во время сбора и которая имеет высокую степень деградации в посмертных исследованиях [1]. Грудное молоко человека является отличным маркером наркотиков и загрязнителей окружающей среды [2]. Подобно выделению с грудным молоком, некоторые растительные лекарственные средства могут метаболизироваться кишечной микробиотой и выводиться с калом [3].

Проблема следующего этапа исследования – пробоподготовки – состоит в том, что матрицу нельзя напрямую использовать для анализа, и аналиты нужно количественно перевести в форму, пригодную для хроматографического метода: в простых случаях достаточно экстракции летучим органическим растворителем, для труднолетучих соединений требуется дополнительная дериватизация.

ЭКСТРАКЦИЯ

Большинство методов пробоподготовки, используемых сейчас в биоаналитике, можно условно разделить

DOI: 10.32757/2619-0923.2024.1.27.42.54

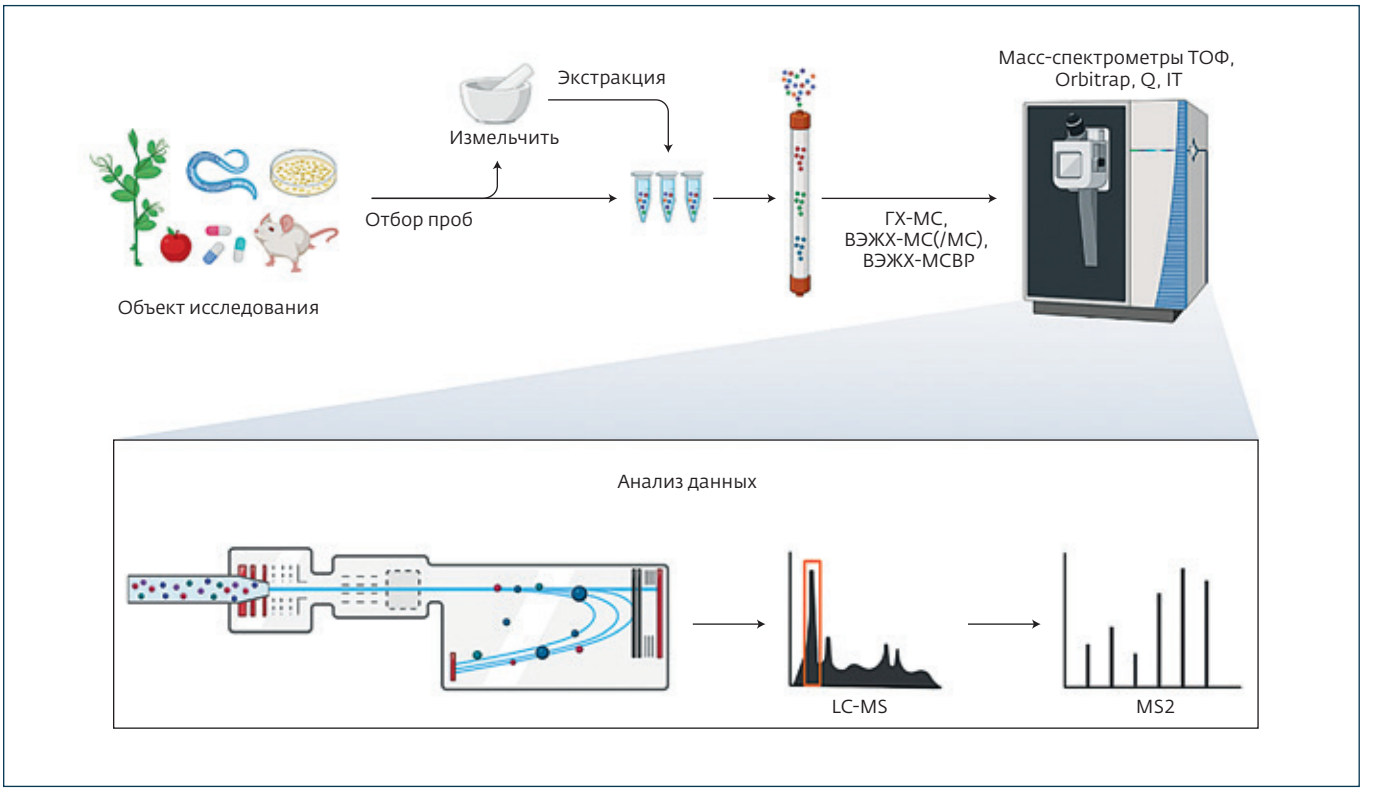


Рис.1. *Общая схема биоаналитического исследования различных образцов*

на несколько групп (рис.2). Самым распространенным методом подготовки проб является экстракция растворителем, включая жидкостно-жидкостную экстракцию, жидкофазную микроэкстракцию и твердожидкостную экстракцию [4].

Однако практически для любых объектов анализа основным в большинстве лабораторий является метод твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ), который включает отбор проб, предварительное концентрирование и экстракцию за один этап [6]. Преимущества этого метода – простота и скорость проведения эксперимента, высокая точность, высокая чистота проб и меньший расход растворителя. ТФМЭ обеспечивает одновременное концентрирование и разделение летучих и нелетучих

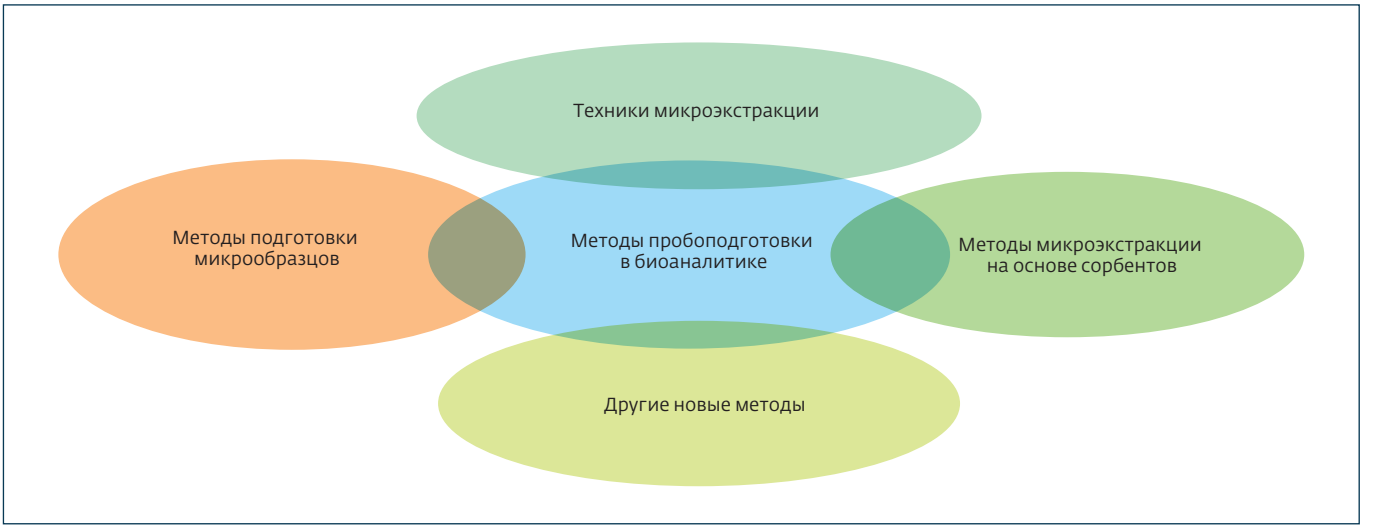


Рис.2. *Основные методы пробоподготовки в биоаналитических исследованиях*

Рис.3. *Выбор растворителя для твердофазной экстракции*

проб [7], прекрасно сочетается с двумерной газовой хроматографией (ГХ), методами комбинационного рассеяния и масс-спектрометрией [8]. Недавно его стали применять для исследования метаболитов и нейротрансмиттеров in vivo [9, 10] и в тканях (например, ногтях и коже) [11]. ТФМЭ применяют для концентрирования генотоксичных примесей (т.е. азиридина, 2-хлорэтиламина и производных метиловых и этиловых эфиров сульфоновых кислот) в некоторых фармацевтических препаратах [12].

Твердофазная экстракция широко используется в различных стероидомных исследованиях, очень актуальных в последнее время не только в допинг-контроле, но и в исследованиях опухолевых заболеваний, называемых онкостероидомика [13].

Несмотря на достоинства этого метода, при его использовании возникают проблемы, связанные с подбором растворителя. Это приводит к неполному извлечению компонентов и частичной потере содержащихся в матрице соединений. Еще более серьезным последствием неправильно подобранных условий экстракции является изменение интенсивности сигнала на хроматограмме, что ведет к неверной интерпретации результатов (рис.3). Часто в лабораториях используют привычные растворители, не учитывая механизмы взаимодействия между сорбентом и аналитом, а также их гидрофобные, полярные и ионогенные свойства. При экстракции из водных растворов стандартными органическими растворителями нередко учитывают только полярность аналита и руководствуются общим правилом, что экстракцию оснований следует проводить при высоком pH водной фазы (обычно на 2 единицы pH выше pKa), а экстракцию кислот – при низком.

В настоящее время существует большое количество работ, посвященных исследованию различных методов экстракции в зависимости от исследуемого объекта и типа определяемых соединений (табл.1).

ДЕРИВАТИЗАЦИЯ

Неотъемлемой частью пробоподготовки является дериватизация образцов. При этом используются различные микрохимические реакции для изменения структуры аналита и облегчения его выделения, разделения или обнаружения. Реакции обычно проводятся либо в автономном режиме и до разделения, либо в режиме онлайн, после разделения и до обнаружения. Существует большое количество хорошо изученных реагентов и условий реакции для улучшения масс-спектрометрического обнаружения, разделения энантиомеров, образования циклических производных и экстракции с дериватизацией. Известны также изотопно меченные реагенты для количественного определения с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения (МСВР). Однако и здесь могут возникнуть трудности, связанные как с подбором метода дериватизации, так и с техническими деталями проведения эксперимента.

Таблица 1. Некоторые методы пробоподготовки для различных биологических матриц

Биологическая матрица	Техника подготовки образца	Аналитическая техника	Анализируемые соединения	Литература
Яичники, семенники, печень, сыворотка, моча, плазма	Твердофазная экстракция	УВЭЖХ-ВП МС, ЖХ-МС	Производные кетамина, малеиновая кислота, венлафаксин	[14, 15]
Сыворотка, моча, плазма, слюна, ткани	Жидкостная экстракция	ГХ-МС, ЖХ-МС	Гормоны, напроксен, метоклопрамид, кетамин	[15]
Кровь, плазма	Жидкофазная микроэкстракция полых волокон	ГХ-МС, ЖХ-МС/МС	Производные амфетамина, кветиапин, флуоксетин, венлафаксин	[16]
Моча, выдыхаемый воздух	Капельная микроэкстракция	ГХ-ВП МС	Большинство классов углеводородов, терпеноиды	[17]
Биологические жидкости	Жидкостная микроэкстракция с помощью воздуха	ЖХ-МС/МС	Фторхинолон, пенконазол, варфарин	[18]
Биологические жидкости	Микроэкстракция одной каплей	ЖХ-МС	Анестетики, пиретроидные пестициды, ранитидин, этанол, хром	[19]
Плазма	Тонкопленочная микроэкстракция	УВЭЖХ, ЖХ-МС/МС	Эстрогены, кверцетин	[20]
Плазма, кровь, моча	Электромембранная экстракция	УВЭЖХ, ЖХ-МС/МС	Холин, бетаин, триметиламин-N-оксид, l-карнитин, дезокси-L-карнитин, НПВП, антрациклины, тетрациклины	[21]
Биологические жидкости	Микродиализ	ЖХ-МС/МС	Дофамин, серотонин, производные амфетамина, ванкомицин	[22]
Плазма, сыворотка, молоко, моча	Экстракция точек помутнения	ЖХ-МС/МС	Антазолин, пестициды, витамины	[23]
Кровь	Сухой образец крови	ЖХ-МС, УВЭЖХ, ГХ-МС	Винкристин, актиномицин-D, креатинин, цистатионин, гуанидиноацетат, кокаин, акриламид, допинг-агенты	[24]
Плазма	Сухой образец плазмы	ЖХ-МС, УВЭЖХ, УВЭЖХ-МС/МС	Фосфомицин, ритонавир, триметоприм, сульфаметоксазол, амикацин, литий, абиратерон, D(4)-абиратерон, ламотриген, цефтолозан, фторхинолоны, габапентин, кофеин	[25]
Слюна	Сухой образец слюны	ЖХ-МС, УВЭЖХ, ГХ-МС	Металлопротеиназа-1, DL-молочная кислота, метадон, 5-фторурасил, НПВП, лидокаин,кортизол, кофеин	[26]

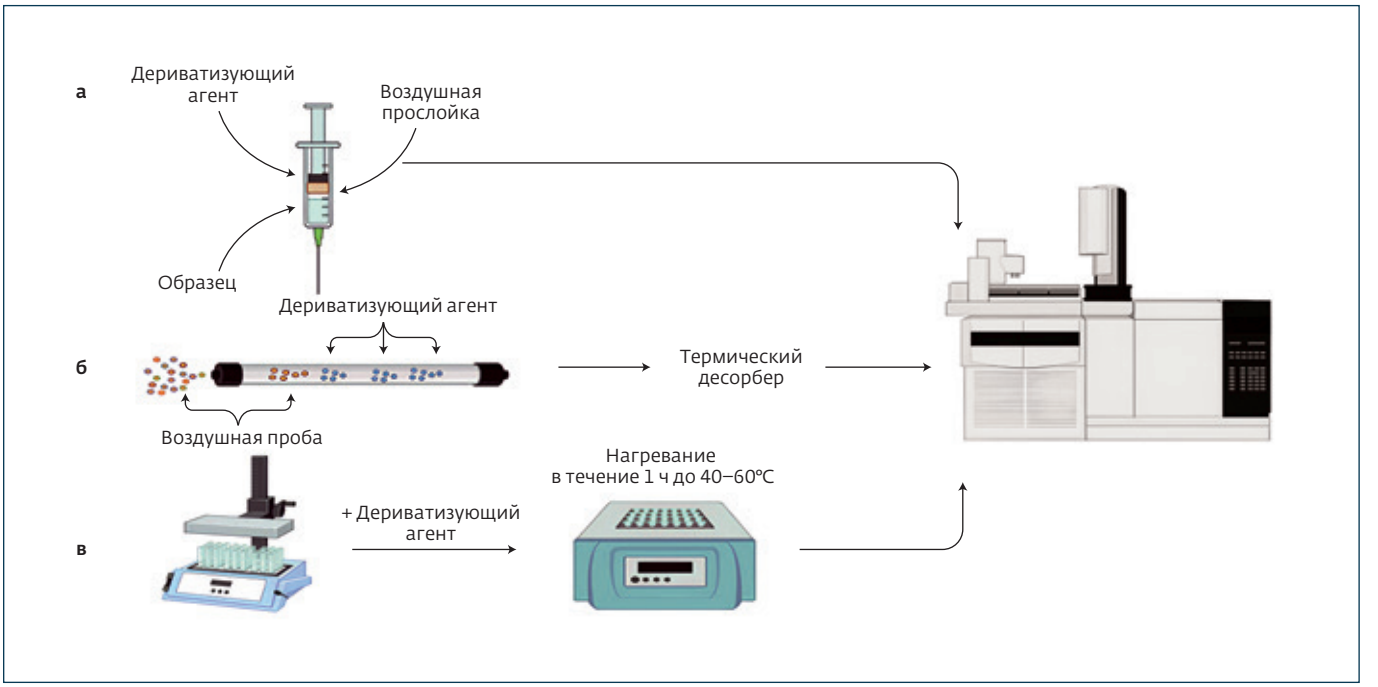


Рис.4. *Дериватизация в инжекторе для количественного анализа (а, б), неавтоматизированная дериватизация (в)*

Предположим, что выбран самый распространенный образец – моча, которую используют для определения большого количества соединений различных классов, в том числе ксенобиотиков, каннабиноидов, гормонов. Первая проблема исследователя – определить круг целевых соединений. Например, если при определении ксенобиотиков не учитывать их метаболизм в организме человека и то, что они часто образуют конъюгаты, при минеральном гидролизе – дешевом и простом методе – произойдет разрушение большого количества органических соединений, среди которых могут оказаться ценные для анализа структуры. Результаты определения при этом будут неполными. Использование мягких ферментативных методов гидролиза позволяет проанализировать большое количество органических соединений различных классов без разрушения, но требует применения достаточно дорогих реагентов, не всегда доступных в клинических лабораториях.

Еще один недостаток гидролитических методов – их низкая воспроизводимость и, следовательно, точность результатов определения искомого компонента. Даже неравномерность нагревания образца при одной и той же температуре может значительно повлиять на результаты анализа.

Метод автоматизированной дериватизации образцов в инжекторе достаточно прост, хорошо изучен и уже успешно применяется для определения профиля жирных кислот, анализа сахара и/или углеводов и фенольных кислот в пищевых продуктах, сырье и биологических материалах. Инжектор оснащен микрошприцем, который предназначен для введения как раствора образца, так и реагента для дериватизации (рис.4). Сначала шприц наполняют реагентом дериватизации, оставляя воздушный зазор для отделения от образца, затем набирают образец. По сравнению с длительной классической дериватизацией, требующей процедуры нагревания до 40–60 °С и последующего охлаждения, подобная операция в инжекторе занимает несколько секунд. Процедура полностью автоматизирована, воспроизводима, однако и здесь возникают две проблемы. Во-первых, такой подход хорошо работает только с LVI- и TV-инжекторами, пригодными для больших объемов. При переходе к обычным SSL-инжекторам, наиболее распространенным в лабораториях, эффективность снижается.

Во-вторых, серьезным недостатком такого подхода является трудность его масштабирования в рутинных анализах для большого количества образцов как из-за увеличения числа используемых шприцев, так и из-за затрат времени оператора. Поэтому автоматическая дериватизация в инжекторе чаще применяется в исследовательских целях для единичных анализов, а не в лабораториях для потоковых анализов.

РВС

ОФИЦИАЛЬНЫЙ ПОСТАВЩИК
современной лабораторной техники

蚂蚁科仪 Ants Scientific Instruments

ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ПРОБ ANTS SCIENTIFIC INSTRUMENTS

Для широкого круга задач в биологии, медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве, экологии, геологии, добыче полезных ископаемых, нефтехимии, производстве конструкционных материалов, электронике и др.

ДРОБЛЕНИЕ И ТОНКОЕ ИЗМЕЛЬЧЕНИЕ

Ультрацентробежная роторная мельница AM 500S

Высокоскоростная мельница для пробоподготовки мягких, среднетвёрдых и волокнистых материалов. Двухступенчатый процесс гарантирует бережное и быстрое измельчение и сохранение аналитических свойств образца.

Настольная щёковая дробилка AM750S

Специально разработана для небольших количеств проб в лаборатории. Пыле- и брызгозащищенная конструкция воронки исключает загрязнение рабочей среды. Широко используется в экологических, университетских, геологических и других подразделениях.

Планетарная шаровая мельница AM 420

Для механохимии, сверхтонкого коллоидного измельчения в нанометровом диапазоне, а также рутинных задач смешивания и гомогенизации мягких, твёрдых, хрупких или волокнистых материалов.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ И РАССЕВ

Смеситель Шатца AF 500

Равномерно перемешивает образцы для точных результатов анализа, идеально подходит для контроля качества и научно-исследовательской деятельности.

Просеивающая машина AF 100S

Для сухого рассева порошков, сыпучих материалов и мокрого рассева суспензий. Диаметр сит 100 мм, 150 мм, 200 мм, 300 мм.

Ротационный прободелитель AF 200S

Разделяет сыпучие твердые частицы размером до 12 мм настолько точно, что характерный состав каждой фракции точно соответствует составу исходного объема пробы.

На правах рекламы. Макет: ООО «ЛабПро Медиа»

rvs-ltd.ru
8 (800) 550 6707
8 (812) 320 6707, 8 (812) 786 9516
post@rvs-ltd.ru
190020, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Бумажная, д. 17

ЦЕЛЕВОЙ ИЛИ НЕЦЕЛЕВОЙ СКРИНИНГ?

Все методы биоаналитических исследований можно разделить на две большие группы – целевой и нецелевой скрининг биологических образцов. Главная проблема выбора – соответствие задачи анализа и оборудования отдельно взятой лаборатории. Зачастую выбор целевой или нецелевой методологии анализа связан именно с приборной базой и наличием либо отсутствием стандартных образцов для сравнения. Однако у каждого подхода есть свои преимущества и недостатки.

Целевой скрининг отличается высокой чувствительностью и возможностью уменьшения времени анализа за счет сравнительно несложной подготовки проб под конкретные классы аналитов. Такой подход применим в тех редких случаях, когда объект исследования точно известен. Однако при целевом скрининге невозможно провести ретроспективный анализ изменения концентрации исследуемого компонента в аналите. Такой анализ хорош как первый шаг биоаналитического исследования, он не дает полного представления о составе образца, однако позволяет выявить критерии валидации методик и перейти к качественному анализу.

Основными недостатками нецелевого скрининга являются его сравнительно низкая чувствительность за счет невозможности "настроиться" на один определенный образец, большое временя анализа и сложноинтерпретируемые результаты. Часто в этом подходе известны классы целевых соединений, примерный состав матрицы и родственные фрагменты, которые могут давать те или иные группы соединений. Анализ масс-спектра высокого разрешения позволяет определить наличие или отсутствие в образце этих структурных фрагментов. Проблема такого подхода заключается в большом количестве вариантов структур и возможных неверных интерпретаций пиков молекулярных ионов. Для установления точных структур данных масс-спектров недостаточно, особенно если речь идет о наличии заместителей в сложных молекулах, образующихся в процессе метаболизма в организме. Необходимо привлекать методы ЯМР-спектроскопии.

Стоит отметить, что в настоящее время нецелевые анализы широко используют жидкостную (ЖХ) или газовую (ГХ) в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения [27, 28], что позволяет обнаружить как известные, так и не охарактеризованные ранее химические вещества разнообразной природы и установить уникальные химические характеристики, которые служат для получения статистических данных об аналите (провести ретроспективный анализ). Эти методы особенно ценны для токсикологии и допинг-контроля для установления новых ядов, наркотических веществ, токсинов и допинг-агентов.

Нецелевой скрининг сегодня – это поиск частично неизвестного в частично известном. Например, токсикологическое определение синтетических каннабиноидов успешно проводится с помощью методов нецелевого скрининга. Все синтетические каннабиноиды в организме полностью метаболизируют, а учитывая их разнообразие, проведение целевого скрининга невыполнимо. Нецелевой скрининг с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения основывается на том, что большинство известных синтетических каннабиноидов в качестве базового фрагмента имеют в структуре индольный или индазольный фрагменты. Исследования методом УВЭЖХ-МС/МС позволяют проводить максимально экспрессное определение аналитов при минимальной пробоподготовке таких образцов, как моча и кровь [30].

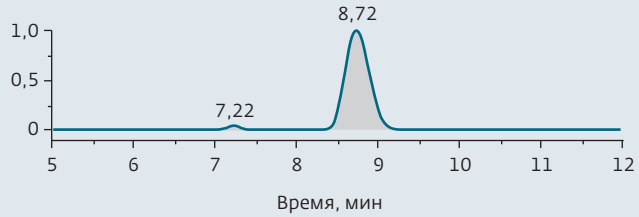
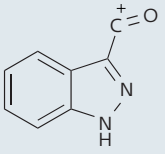
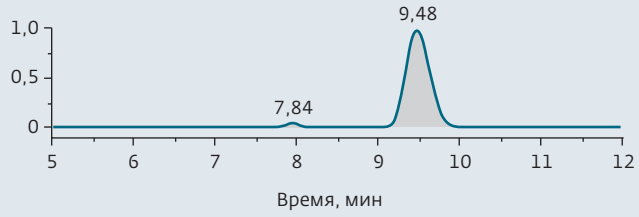
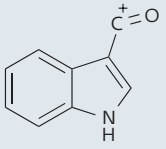
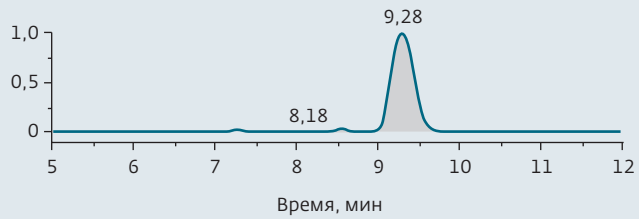
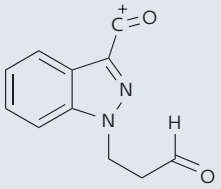
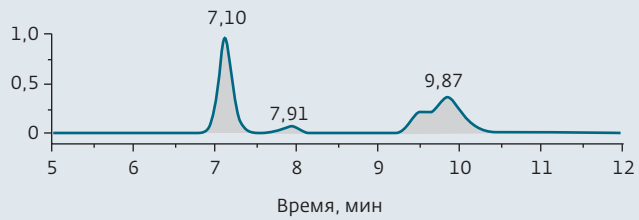
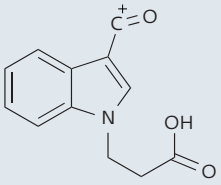
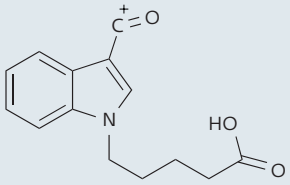
Известно [31, 32], что основным путем выведения каннабиметиков из организма является их окисление, которое может выражаться в образовании метаболитов 1-й и 2-й фазы. В ходе протекания 1-й фазы метаболизма может происходить как упрощение исходной структуры (например, деалкилирование, гидролиз), так и ее усложнение (моно- или поли-гидроксилирование, карбокилирование, карбонилирование). В результате этих процессов, как правило, образуются более полярные соединения, которые могут выводиться из организма с мочой. В ходе протекания 2-й фазы метаболизма происходит образование конъюгатов исходных соединений или метаболитов 1-й фазы с мочевыми кислотами (например, глюкуроновой и сульфоновой), связывание с пептидами и аминокислотами, что также приводит к существенному увеличению гидрофильности данных продуктов и ускорению выведения из организма [33].

Зная структуры конкретных каннабиноидов и основные пути метаболизма, можно предположить набор молекулярных и псевдомолекулярных ионов метаболитов, а исходя из базовой структуры аналита – некоторые общие продуктионы и рассчитать их точную массу (табл.2).

Основным преимуществом такого подхода является возможность проведения ретроспективного анализа по выбранным ионам, что особенно важно в случаях работы с малыми количествами испытуемого образца [30].

Схожая картина наблюдается и при изучении метаболитов разнообразных ксенобиотиков. Почти всегда при анализе литературных данных можно использовать предикторный механизм и составить примерный список метаболитов. Главная проблема в данном случае – правильность интерпретации полученных масс-спектров, чтобы отсеять заведомо ложные результаты от потенциально положительных. Примером такого подхода является исследование метаболизма ноотропного препарата нового поколения Унифирам (DM232), который проходит клинические испытания в качестве средства

Табл.2. *Масс-спектры, массы некоторых фрагментов и их структурные формулы, соответствующие ряду наиболее распространенных синтетических каннабиметиков*

Вид масс-спектра	Точная масса фрагмента (а.е.м)	Структурная формула фрагмента
	145,0396	
	144,0443	
	217,0608	
	216,0655	
	244,0968	

для улучшения памяти, предотвращения болезни Альцгеймера, синдрома дефицита внимания и различных форм деменции (рис.5) [34]. DM232 предположительно обладает существенно большей активностью по сравнению с пирацетамом.

Нецелевой скрининг с применением УВЭЖХ–МСВР и предикторного механизма с привлечением библиотек, содержащих спектры ряда ксенобиотиков и их метаболитов и пестицидов для минимизации возникновения ложноположительных результатов, позволил установить два основных метаболита препарата. В качестве матрицы использовали мочу до и после применения унифирама и несколько режимов сканирования: автоматическую двумерную МС, полное сканирование и сканирование в режиме фрагментации с широкополосной диссоциацией, вызванной столкновением (bbCID). Подготовку проб к анализу проводили

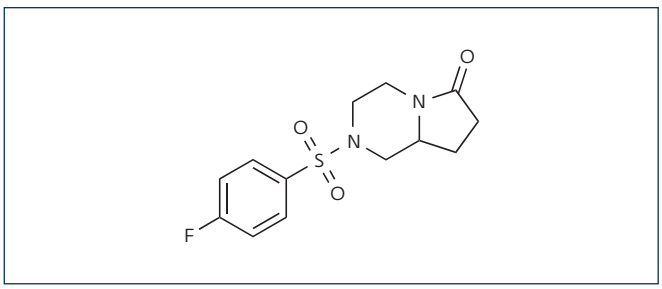


Рис.5. *Структура препарата Унифирам (DM232)*

путем простого разбавления проб, а также ферментативного и минерального гидролиза, используя ферменты E. coli и H.pomatia [35].

В результате проведенных экспериментов в специально подобранных условиях были установлены структуры двух предполагаемых основных метаболитов унифирама (рис.6).

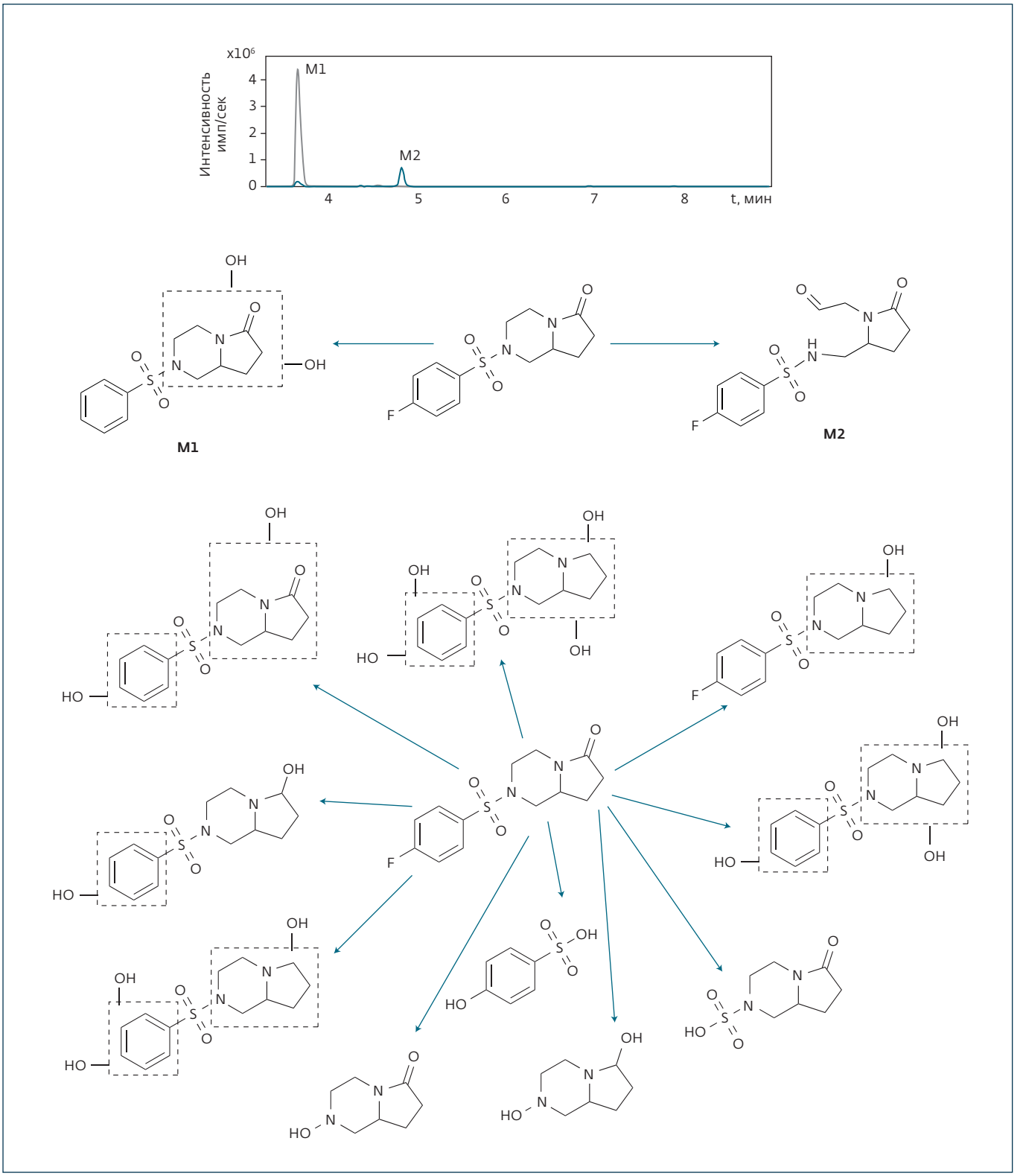


Рис.6. *Предполагаемые метаболиты унифирама*

www.has.ru

ХРОМОС
инжиниринг

ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ «ХРОМОС ЖХ–301»

Жидкостный хроматограф «Хромос ЖХ-301» – современный, надёжный, высокоэффективный прибор для качественного и количественного определения состава многокомпонентных растворов.

Предназначен для решения различных аналитических задач в экологии, санитарно-гигиенических и ветеринарных исследованиях, при контроле качества и сертификации пищевой и сельскохозяйственной продукции, в медицине, фармацевтике, нефтехимии, криминалистике и пр.

Включен в государственные реестры СИ РФ, Республики Казахстан и Республики Беларусь, имеет Регистрационное удостоверение Росздравнадзора РФ.

ПРЕИМУЩЕСТВА

Высокое качество и надежность
Широкие функциональные возможности
Оптимальная конфигурация под ваши задачи
Высокая чувствительность и точность детектирования
Малые габариты, вес и энергопотребление
Удобство в обслуживании и ремонте

ДЕТЕКТОРЫ

Кондуктометрический
Электрохимический
Спектрофотометрический
Флюориметрический
Рефрактометрический
Низкотемпературный испарительный по светорассеянию
С диодной матрицей

КВАРЦЕВЫЕ КАПИЛЛЯРНЫЕ КОЛОНКИ

Кварцевые капиллярные колонки совместного производства ГК «ХРОМОС Инжиниринг» и ЦКХ «ХромоСиб»

Тип неподвижной фазы	Длина, м / диаметр, мм / толщина пленки, мкм	Аналоги
Метилполисилоксан (ПМС) – 100%/ 5% – фенил/15% – фенил	25÷60/0,25; 0,32; 0,53/0,2÷1,5	BP1/5; ZB-1/5/35; HP1/5/35; Rtx-1/5/20
Полиэтиленгликоль (Карбовакс)	25÷60/0,25; 0,32/0,2÷1,5	BP-20, ZB-WAX, DBWAX, RtxWAX, SUPELCOWAX
Мезофазный мезопористый SiO_2	25÷30/0,32	HP-GasPro, SilicaPLOT
Пористые сополимеры дивинилбензола	25÷30/0,32	CP-PoraPLOT, Rt-PLOT/Q, Supel-Q-PLOT
Пористый поли(1-триметилсилил-1-пропин)	30/0,32; 0,53	Нет. Для определения серосодержащих соединений в углеводородной матрице

Разработанная методология такого нецелевого поиска метаболитов была основана на постепенном увеличении элюирующей силы подвижной фазы при использовании хроматографического разделения с быстрой регистрацией спектра ионов-прекурсоров и ионов-продуктов. Для сокращения времени анализа, а также уменьшения ширины хроматографических пиков в таком подходе возможно помимо градиента по составу подвижной фазы также изменение скорости ее подачи. Подобная плавная развертка градиента позволяет уменьшить количество коэлюирующихся соединений и обеспечить лучшую работу масс-спектрометра при нецелевом поиске соединений. Использование предложенных условий хроматографирования и масс-спектрометрического детектирования позволяет обнаружить метаболиты унифирама в течение шести дней после однократного употребления 10 мг вещества [35].

ПРОБЛЕМЫ ИНСТРУМЕНТАЛЬНОЙ БАЗЫ

Для подавляющего большинства токсикологических и криминалистических лабораторий приборы класса hi-end недоступны. Наиболее актуальными системами остаются классические моноквадрупольные системы ГХ-МС с источниками электронной ионизации, а идентификация соединений проводится с помощью стандартных библиотек, для которых удовлетворительным значением фактора подобия спектра считают значение более 80%. Зачастую лаборатории вынуждены выбирать методологию анализа, исходя из того, какое оборудование имеется.

Другой проблемой является воспроизводимость методик биоаналитических измерений, они должны быть валидированными, доступными и воспроизводимыми, особенно при переносе с одной экспериментальной базы на другую. Если разработанные условия эксперимента переносятся на другой прибор без валидации параметров, то часто получаются невоспроизводимые данные. Поэтому при смене приборной базы необходима обязательная валидация методик, учитывающая рабочие диапазоны приборов, особенно для сложных матриц, содержащих биомаркеры в концентрациях от пикограммовых до миллиграммовых. Это касается в том числе стероидомных исследований [13]. Стероидные гормоны могут присутствовать в организме человека в очень широком диапазоне концентраций, а интенсивность сигналов будет сказываться на конечном результате анализа. При одновременном определении и недостаточном рабочем диапазоне прибора получить достоверные результаты вряд ли удастся.

Трудности с воспроизводимостью также могут возникнуть при слишком запутанных и многоступенчатых протоколах пробоподготовки и проведения анализа. Протоколы для биоаналитики должны быть быстрыми, понятными и с возможностью реализовать их в условиях рутинных анализов. Слишком сложные и длительные процедуры анализа приемлемы разве что для исследовательских лабораторий.

Еще одна проблема связана с выбором разрешения прибора. Например, при нецелевом анализе объектов, содержащих соединения противоположных полярностей (различные соединения могут ионизироваться с образованием как положительных, так и отрицательных ионов), необходим МСВР, однако надо учитывать, что он не способен к быстрому переключению режимов. Переключение полярностей на ВП МС и последующая стабилизация шкалы прибора обычно занимает длительное время, в условиях большого количества образцом это серьезная проблема. Приборы низкого разрешения способны переключаться между режимами за несколько миллисекунд, это большое преимущество перед МСВР, если речь идет о рутинных анализах.

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

После грамотного выбора и подготовки образца, определения методологии исследования соответственно задачам и возможностям прибора и получения набора масс-спектров перед исследователем встает необходимость правильной обработки полученных данных. Серьезной проблемой биоаналитики сегодня является недостаточная статистическая мощность исследования и привлечение избыточного математического аппарата. Оценка размера выборки, необходимой для получения достоверных результатов, должна производиться уже на этапе планирования эксперимента, чем часто пренебрегают в целях экономии времени.

В соответствии с действующими методическими рекомендациями Минздрава России мощность статистических тестов должна поддерживаться на уровне не меньше 80%. В последнее время отмечается тенденция проводить исследования на минимальном числе добровольцев с целью сокращения финансовых затрат. Занижение размера выборки приводит к негативным последствиям: если статистическая мощность исследования недостаточна, то ряд результатов и гипотез может быть ошибочно отвергнут. Однако и неоправданное расширение выборки приводит к получению огромного набора данных, что для некоторых задач является избыточным. Помимо этого, из ана-

лиза огромного количества данных часть результатов может не учитываться по причине их несоответствия ожидаемому распределению. С этим связано большое число ошибочных выводов исследования и даже ошибки в постановке возможного диагноза.

Последняя, но не по значимости, проблема – пренебрежение антропогенными факторами, упущение которых также часто приводит к ложным выводам об "уникальности" биомаркера. Особенно ярко это проявляется при анализе выдыхаемого воздуха. Не проанализировав окружающую пациентов обстановку, исследователи ошибочно делают выводы, что тот или иной компонент является уникальным показателем заболевания. Например, если больные находятся в условиях стационара, в окружающем их воздухе часто присутствуют компоненты дезинфицирующих средств, которые впоследствии выявляются в результатах анализа. Однако эти компоненты никак не связаны с истинным заболеванием. Другим классическим примером является анализ выдыхаемого воздуха человеком, находящимся длительное время около оживленных транспортных магистралей. В процессе сгорания топлива и работы двигателей автотранспортных средств, а также в результате износа дорожного полотна и автомобильных шин образуется большое число мелкодисперсных частиц, постоянно происходит выброс оксида углерода, тяжелых металлов. Анализ такого воздуха не даст никакой информации о настоящем биомаркере того или иного заболевания. В целом результаты биоаналитических исследований часто обладают широкими доверительными интервалами и не могут быть основанием для постановки диагноза, они являются вспомогательными и не исключают таких методов диагностики, как МРТ, КТ и биопсия.

* * * *

Возможности применения современной биоаналитической хромато-масс-спектрометрии настолько обширны, что сложно назвать области биологии и медицины, где она не нашла бы применения. В то же время, если мы говорим об анализе медико-биологических объектов, невозможно определение всех аналитов привести к какому-то одному стандартизированному решению. Более того, какой бы метод мы ни выбрали, любой из них будет и правильным, и неправильным, будет иметь свои фундаментальные и инструментальные ограничения. Осознанный выбор методологии, тщательная подготовка проб, подбор оптимального размера выборки, технических характеристик приборной базы, валидация методик определения и учет антропогенных факторов позволят избежать проблем и получить качественные результаты исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Kohler I.**, **Guillarme D.** Multi-target screening of biological samples using LC-MS/MS: Focus on chromatographic innovations // Bioanalysis. 2014. N. 6. P. 1255–1273.
2. **Lopes B.R.**, **Barreiro J.C.**, **Cass Q.B.** Bioanalytical challenge: A review of environmental and pharmaceuticals contaminants in human milk // J. Pharm. Biomed. Anal. 2016. Vol. 130. P. 318–325.
3. **Deda O.**, **Gika H.G.**, **Wilson I.D.** et al. An overview of fecal sample preparation for global metabolic profiling // J. Pharm. Biomed. Anal. 2015. Vol. 113. P. 137–150.
4. **Buszewski B.**, **Szultka M.** Past, present, and future of solid phase extraction: A review // Crit. Rev. Anal. Chem. 2012. Vol. 42. P. 198–213.
5. **Alexovic M.**, **Dotsikas Y.**, **Bober P.** et al. Achievements in robotic automation of solvent extraction and related approaches for bioanalysis of pharmaceuticals // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2018. Vol. 1092. P. 402–421.
6. **Boyaci E.**, **Rodríguez-Lafuente A.**, **Gorynski K.** et al. Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases // Anal. Chim. Acta. 2015. Vol. 873. P. 14–30.
7. **Vas G.**, **Vekey K.** Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis // J. Mass Spectrom. 2004. Vol. 39. P. 233–254.
8. **de Oliveira F.M.**, **Scheel G.L.**, **Augusti R.** et al. Supramolecular microextraction combined with paper spray ionization mass spectrometry for sensitive determination of tricyclic antidepressants in urine // Anal. Chim. Acta. 2020. Vol. 1106. P. 52–60.
9. **Jalili V.**, **Barkhordari A.**, **Ghiasvand A.** A comprehensive look, at solid-phase microextraction technique: a review of reviews // Microchem. J. 2020. Vol. 152. P. 104319.
10. **Matys J.**, **Gieroba B.**, **Jozwiak K.** Recent developments of bioanalytical methods in determination of neurotransmitters in vivo // J. Pharm. Biomed. Anal. 2020. Vol. 180. P. 113079.
11. **Burlikowska K.**, **Stryjak I.**, **Bogusiewicz J.** et al. Comparison of metabolomic profiles of organs in mice of different strains based on SPME-LC-HRMS // Metabolites. 2020. Vol. 10. P. 255.
12. **March J.G.**, **Genestar C.**, **Simonet B.M.** Determination of 2-ethylhexyl 4- (dimethylamino) benzoate using membrane-assisted liquid-liquid extraction and gas chroma-

tography-mass spectrometric detection // Anal. Bioanal. Chem. 2009. Vol. 394. P. 883–891.
13. **Темердашев А.З.** Хромато-масс-спектрометрические методы анализа в аналитической токсикологии и допинг-контроле // Лаборатория и производство. 2021. № 1. С. 62–71.
14. **Clark K.D.**, **Zhang C.**, **Anderson J.L.** Sample preparation for bioanalytical and pharmaceutical analysis // Anal. Chem. 2016. Vol. 88. P. 11262–11270.
15. **Niu Z.**, **Zhang W.**, **Yu C.** et al. Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques // Trends Anal. Chem. 2018. Vol. 102. P. 123–146.
16. **Tahmasebi E.**, **Yamini Y.**, **Saleh A.** Extraction of trace amounts of pioglitazone as an anti-diabetic drug with hollow fiber liquid phase microextraction and determination by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection in biological fluids // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2009. Vol. 877. P. 1923–1929.
17. **Jeannot M.A.**, **Cantwell F.F.** Solvent microextraction into a single drop // Anal. Chem. 1996. Vol. 68. P. 2236–2240.
18. **Wang L.**, **Huang T.**, **Cao H.X.** et al. Application of air-assisted liquid-liquid microextraction for determination of some fluoroquinolones in milk powder and egg samples: Comparison with conventional dispersive liquid-liquid microextraction // Food Anal. Methods. 2016. Vol. 9. P. 2223–2230.
19. **Pano-Farias N.S.**, **Ceballos-Magana S.G.**, **Muniz-Valencia R.** et al. Direct im- ~ mersion single drop microextraction method for multi-class pesticides analysis in mango using GC-MS // Food Chem. 2017. Vol. 237. P. 30–38.
20. **Jafari Z.**, **Hadjmohammadi M.R.** In situ growth of zeolitic imidazolate framework-8 on woven cotton yarn for the thin film microextraction of quercetin in human plasma and food samples // Anal. Chim. Acta. 2020. Vol. 1131. P. 45–55.
21. **Drouin N.**, **Rudaz S.**, **Schappler J.** Sample preparation for polar metabolites in bioanalysis // Analyst. 2017. Vol. 143. P. 16–20.
22. **El-Sherbeni A.A.**, **Stocco M.R.**, **Wadji F.B.** et al. Addressing the instability issue of dopamine during microdialysis: The determination of dopamine, serotonin, methamphetamine and its metabolites in rat brain // J. Chromarogr. A. 2020. Vol. 1627. P. 461403.
23. **Namera A.**, **Saito T.** Recent advances in unique sample preparation techniques for bioanalysis // Bioanalysis. 2013. Vol. 5. P. 915–932.
24. **Damen C.W.N.**, **Rosing H.**, **Schellens J.H.M.** et al. Application of dried blood spots combined with high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionisation tandem mass spectrometry for simultaneous quantification of vincristine and actinomycin-D // Anal. Bioanal. Chem. 2009. Vol. 394. P. 1171–1182.
25. **Parker S.L.**, **Lipman J.**, **Dimopoulos G.** et al. A validated method for the quantification of fosfomycin on dried plasma spots by HPLC-MS/MS: Application to a pilot pharmacokinetic study in humans // J. Pharm. Biomed. Anal. 2015. Vol. 115. P. 509–514.
26. **Hsiao Y.C.**, **Lin S.Y.**, **Chien K.**, et al. An immuno-MALDI mass spectrometry assay for the oral cancer biomarker, matrix metalloproteinase-1, in dried saliva spot samples // Anal. Chim. Acta. 2020. Vol. 1100. P. 118–130.
27. **Hollender J.**, **Schymanski E.L.**, **Singer H.P.**, **Ferguson P.L.**Nontarget screening with high resolution mass spectrometry in the environment: Ready to go? // Environ. Sci. Technol. 2017. Vol. 51. P. 11505–11512.
28. **Farré M.J.**, **Jaén-Gil A.**, **Hawkes J.** et al. Orbitrap molecular fingerprint of dissolved organic matter in natural waters and its relationship with NDMA formation potential // Sci. Total Environ. 2019. Vol. 670. P. 1019–1027.
29. **Du B.**, **Tian Z.**, **Peter T.K.** et al. Developing Unique Nontarget High-Resolution Mass Spectrometry Signatures to Track Contaminant Sources in Urban Waters // Environ. Sci. Technol. Lett. doi.org/10.1021/acs.estlett.0c 00749.
30. **Лабутин А.В.**, **Темердашев А.З.** Нецелевой скрининг маркеров синтетических каннабиноидов в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием // Масс-спектрометрия. 2015. Т. 12. № 1. С. 30.
31. **Sobolevsky T.**, **Prasolov I.**, **Rodchenkov G.** Detection of urinary metabolites of AM-2201 and UR-144, two novel synthetic cannabinoids // Drug Test. Anal. 2012. Vol. 4. N. 10. P. 745–753.
32. **Peters F.T.**, **Meyer M.R.** In vitro approaches to studying themetabolism of new psychoactive compounds // Drug Test Anal. 2011. Vol. 3. N. 7–8. P. 483–496.
33. **Temerdashev A.Z.**, **Grigor'ev A.M.**, **Rybal'chenko I.V.** Evolution of New Narcotic Substances and Methods of Their Determination // J. Anal. Chem. 2014. Vol. 69. N. 9. P. 899–926.
34. **Martino M.V.**, **Guandalini L.**, **Di Cesare Mannelli L.** et al. Piperazines as nootropic agents: new derivatives of the potent cognition-enhancer DM235 carrying hydrophilic substituents // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2017. Vol. 25. N. 6. P. 1795.
35. **Темердашев А.З.**, **Зорина М.О.**, **Дмитриева Е.**В, **Азарян А.А.** Изучение метаболизма нового ноотропного препарата унифирама методом ультра высокоэффективной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии высокого разрешения // Журнал аналитической химии. 2021. Т. 76. № 2. С. 1–8.

XI РОССИЙСКИЙ ФОРУМ БИОТЕХНОЛОГИЙ

24 - 27 СЕНТЯБРЯ 2024, наукоград КОЛЬЦОВО

БИЗНЕС-ФОРУМ

ДЛЯ БИЗНЕСА, НАУКИ, ВЛАСТИ И ИНФРАСТРУКТУРЫ

НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

ВИРУСОЛОГИЯ, МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, ФУНДУМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА, БИОТЕХНОЛОГИЯ, БИОФИЗИКА, БИОИНФОРМАТИКА

ОТРАСЛЕВАЯ ВЫСТАВКА

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ КОМПАНИЙ

OPENBIO.RU