

ИССЛЕДОВАНИЕ МАТРИЧНОГО ЭФФЕКТА ПРИ МЕТАБОЛОМНОМ АНАЛИЗЕ МАРКЕРОВ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК В МОЧЕ МЕТОДОМ ГИДРОФИЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Е.Ю. Данилова^{1,2,*}, Н.Н. Ерощенко², О.Л. Морозова², А.Н. Ставрианиди¹

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
119991, Российская Федерация, Москва, тер. Ленинские Горы, 1, стр. 3

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»
Минздрава России (Сеченовский университет)
119048, Российская Федерация, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Метаболомный анализ биологических образцов является актуальным направлением развития методов диагностики хронической болезни почек (ХБП) у детей. Наиболее часто в метаболомике применяется метод гидрофильной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГИХ-МС/МС), распространенной проблемой при использовании которого является матричный эффект. В рамках исследования была проведена оценка матричного эффекта (МЭ), возникающего при проведении анализа 9 низкомолекулярных полярных маркерных метаболитов ХБП в условиях гидрофильной хроматографии в образцах новой модельной мочи и реального образца. В качестве определяемых 9 биомаркеров были выбраны аминокислоты, их полярные метаболиты, участвующие в патофизиологических процессах развития хронической болезни почек. Оценка матричного эффекта на первом квадруполе проводилась методом расчета отношения параметров коэлюирования низкомолекулярных кластеров, состоящих из формиат-анионов буфера и катионов солей, входящих в состав мочи, и стандарта Л-валина- $^{13}\text{C}_5$. В реальной моче интенсивность сигнала стандарта Л-валина- $^{13}\text{C}_5$ снижалась более чем на 50% относительно метанола при наложении сигнала кластера, тогда как в искусственной моче эффект подавления был сравним с реальным образцом во всех условиях элюирования. Также был применен метод добавок для оценки МЭ не меченных изотопами эндогенных маркеров в реальной и искусственной матрицах. Показано, что предварительная оценка тушения сигнала может быть изучена на модельной моче нового состава. Полученные результаты демонстрируют важность оценки оптимального разрешения сигнала не только маркерных соединений, но и неорганических кластеров, что может существенно снизить погрешности анализа в условиях реальной матрицы. Оценка этого эффекта должна повысить точность анализа полярных метаболитов в реальных образцах в метаболомике ХБП. Примененные образцы искусственной мочи показали сопоставимый МЭ с реальным образцом, что подтверждает ее перспективность для оптимизации условий анализа методом ГИХ-МС/МС.

Ключевые слова: хроническая болезнь почек, метаболомика, матричные эффекты, масс-спектрометрия

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Данилова Е.Ю., Ерощенко Н.Н., Морозова О.Л., Ставрианиди А.Н. Исследование матричного эффекта при метаболомном анализе маркеров хронической болезни почек в моче методом гидрофильной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. *Биомедицина*. 2025;21(4):49–53. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-4-49-53>

Поступила 21.04.2025

Принята после доработки 28.10.2025

Опубликована 10.12.2025

STUDY OF MATRIX EFFECT IN METABOLOMIC ANALYSIS OF URINARY MARKERS OF CHRONIC KIDNEY DISEASE BY HYDROPHILIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY

Elena Yu. Danilova^{1,2,*}, Nikolay N. Eroschenko², Olga L. Morozova²,
Andrey N. Stavrianidi¹

¹ M.V. Lomonosov Moscow State University
119991, Russian Federation, Moscow, Leninskie Gory, 1, Build. 3

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University
of the Ministry of Health Care of Russia (Sechenov University)
119048, Russian Federation, Moscow, Trubetskaya Str., 8, Build. 2

Metabolomic analysis of biological samples is an important direction in the development of diagnostic methods for chronic kidney disease (CKD) in children. Hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry (HILIC–MS/MS) is widely used in metabolomics; however, this method is associated with the problem of matrix effect (ME). In this study, we evaluate the ME arising from the analysis of nine low-molecular weight polar marker metabolites of CKD under HILIC conditions in samples of new model and real urine. Amino acids and their polar metabolites involved in the pathophysiological processes of CKD development were selected as nine biomarkers to be determined. The ME on the first quadrupole was assessed by calculating the ratio of the coelution parameters of low-molecular weight clusters consisting of buffer formate anions and salt cations in urine and L-valine-¹³C₅ standard. In real urine, the signal intensity of the L-valine-¹³C₅ standard was reduced by more than 50% relative to methanol when the cluster signal was superimposed, whereas in artificial urine, the suppression effect was comparable to the real sample under all elution conditions. The addition method was also applied to evaluate the ME of isotope-labeled endogenous markers in real and artificial matrices. It was shown that a preliminary assessment of signal quenching can be studied on model urine of a new composition. The results demonstrate the importance of evaluating the optimal signal resolution of not only marker compounds but also inorganic clusters, which can significantly reduce the analysis errors under real matrix conditions. The evaluation of this effect should improve the accuracy of polar metabolite analysis in real samples in CKD metabolomics. The applied artificial urine samples showed comparable ME to the real sample, which confirms its promising potential for optimizing the HILIC–MS/MS analysis conditions.

Keywords: chronic kidney disease, metabolomics, matrix effects, mass spectrometry

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Danilova E.Yu., Eroschenko N.N., Morozova O.L., Stavrianidi A.N. Study of Matrix Effect in Metabolomic Analysis of Urinary Markers of Chronic Kidney Disease Hydrophilic Interaction Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal Biomed.* 2025;21(4):49–53. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-4-49-53>

Submitted 11.04.2025

Revised 01.10.2025

Published 10.12.2025

Введение

Хроническая болезнь почек (ХБП) является полиэтиологическим заболеванием. Однако патогенез ХБП остается неизменным вне зависимости от первичного

фактора [2]. Одной из основных проблем в эффективной и своевременной терапии пациентов с ХБП является отсутствие надежных методов раннего выявления поражения почек [7, 8]. Метаболомный анализ

был предложен в качестве подхода, который может улучшить оценку и стратификацию риска ХБП [5].

Метаболиты ХБП могут быть проанализированы в различных биологических жидкостях [3]. Анализ мочи имеет ряд преимуществ с точки зрения диагностики благодаря низкой стоимости и простоте сбора образца. Кроме того, как биологическая жидкость моча скапливается вблизи места воспаления тканей при ХБП, что также может способствовать более раннему выявлению развития заболевания [6]. Для метаболомного анализа биообразцов используются различные аналитические методы, но наиболее популярными остаются методы, основанные на масс-спектрометрии [1, 4, 9]. Гидрофильная ионная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ГИХ-МС/МС) в метаболомных исследованиях широко используется для определения полярных соединений. Однако при разделении анализируемых соединений необходимо также учитывать влияние биологической матрицы образца. Сложность этого вопроса, особенно в контексте метаболомики мочи, содержащей высокие концентрации различных полярных соединений, подчеркивает необходимость исследований для оценки возможности применения ГИХ-МС/МС в метаболомном анализе.

В данном исследовании было проведено сравнение уровня матричного эффекта для меченого Л-валина $^{13}\text{C}_5$ и перспективных маркеров ХБП, включающих Л-изолейцин, Л-фенилаланин, цитруллин, гипоксантин, инозин, Л-триптофан, Л-валин, Л-треонин, Л-метионин, Л-лейцин, в искусственной моче нового состава и реальном образце мочи с помощью двух сорбентов методом ГИХ-МС/МС.

Цель работы — оценить возможность воспроизведения матричного эффекта, наблюдаемого в реальных биопробах, с помо-

щью искусственной мочи нового состава, для более корректного определения низкомолекулярных маркеров при разработке метаболомных методов диагностики.

Результаты и их обсуждение

В метаноле все исследуемые соединения, включая внутренний стандарт Л-валин- $^{13}\text{C}_5$, демонстрировали высокую стабильность сигнала и воспроизводимость при использовании как изократического, так и градиентного режима элюирования с формиат-аммонийным буфером ($\text{CV} < 10\%$). Однако в реальной моче наблюдалось значительное снижение интенсивности сигнала, что свидетельствует о выраженном матричном эффекте, характерном для этой биологической жидкости. Подавление сигнала Л-валина- $^{13}\text{C}_5$ в реальной моче превышало 61% по сравнению с метанольными растворами в градиентном режиме элюирования. При использовании искусственной мочи нового состава наблюдался схожий эффект подавления сигнала, сопоставимый с уровнем в реальных образцах при всех протестированных режимах элюирования (подавление сигнала — более 54% в градиентном режиме элюирования).

Важно отметить, что степень матричного подавления была чувствительна к условиям хроматографического разделения. Особенно сильное подавление сигнала Л-валин- $^{13}\text{C}_5$ происходило при наложении сигнала кластеров формиат-анионов и неорганических катионов, входящих в состав мочи. Наиболее выраженный эффект наблюдался при изократическом элюировании с содержанием 70% органической фазы. Было показано, что данный эффект возникает при более раннем выходе удерживаемых полярных кластеров в ионизационный источник, что приводит к более сильному угнетению сигнала.

Дополнительно была оценена воспроизводимость времён удерживания исследуемых метаболитов и внутреннего стандарта в разных матрицах. В метаноле времена

удерживания были стабильными. В реальной моче наблюдалась вариабельность времен удерживания на 0,2–0,5 мин, связанная с взаимодействием компонентов биообразца и вследствие измененных условий удерживания. В искусственной моче нового типа эта вариабельность повторялась с аналогичной тенденцией, что указывает на адекватность модели с точки зрения сорбционно-хроматографического поведения.

Для количественной оценки матричного эффекта эндогенных метаболитов (Л-изолейцин, Л-фенилаланин, цитруллин, гипоксантин, инозин, Л-триптофан, Л-валин, Л-треонин, Л-метионин, Л-лейцин) применялся метод добавок: калибровочные кривые строились в метаноле, искусственной и реальной моче. Вычисление угловых коэффициентов позволило оценить снижение отклика, связанное с матрицей. Расчётный матричный эффект для искусственной мочи оказался близок к значениям,

полученным в реальной, что подтверждает её применимость для валидации аналитических условий и предварительного подбора параметров метода.

Закключение

Таким образом, проведённое исследование продемонстрировало, что искусственная моча нового состава может служить надёжной моделью реальной биологической жидкости при оценке и компенсации матричного эффекта в условиях ГИХ-МС/МС. Это позволяет использовать её на этапе оптимизации и валидации аналитических методов в метаболомике мочи, снижая зависимость от труднодоступных и переменных по составу реальных образцов. Применение такой модели повышает воспроизводимость и точность перспективного метаболомного анализа в контексте ранней диагностики хронической болезни почек и других областей диагностики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Amoresano A., Pucci P. Mass Spectrometry in Metabolomics. 1st ed. *Elsevier*. 2022.
2. Danilova E.Y., Maslova A.O., Stavrianidi A.N., et al. CKD urine metabolomics: modern concepts and approaches. *Pathophysiology*. 2023;30. DOI: 10.3390/pathophysiology30040033.
3. Giskeødegård G.F., Andreassen T., Bertilsson H., et al. The effect of sampling procedures and day-to-day variations in metabolomics studies of biofluids. *Anal. Chim. Acta*. 2019;1081:93–102. DOI: 10.1016/j.aca.2019.07.026.
4. Glavan M.R., Socaciu C., Socaciu A.I., et al. Untargeted metabolomics by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization-quadrupole-time of flight-mass spectrometry analysis identifies a specific metabolomic profile in patients with early chronic kidney disease. *Biomedicines*. 2023;11(4):1057. DOI: 10.3390/biomedicines11041057.
5. Hocher B., Adamski J. Metabolomics for clinical use and research in chronic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 2017;13:269–284. DOI: 10.1038/nrneph.2017.30.
6. Khamis M.M., Adamko D.J., El-Aneed A. Mass spectrometric based approaches in urine metabolomics and biomarker discovery. *Mass Spectrom. Rev.* 2017;36:115–134. DOI: 10.1002/mas.21455.
7. Rysz J., Gluba-Brzózka A., Franczyk B., et al. Novel biomarkers in the diagnosis of chronic kidney disease and the prediction of its outcome. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18:1702. DOI: 10.3390/ijms18081702.
8. Sanchez-Niño M.D., Sanz A.B., Ramos A.M., et al. Clinical proteomics in kidney disease as an exponential technology: heading towards the disruptive phase. *Clin. Kidney J.* 2017;10:188–191. DOI: 10.1093/ckj/sfx023.
9. Sarigul N., Korkmaz F., Kurultak İ. A new artificial urine protocol to better imitate human urine. *Sci. Rep.* 2019;9:1–11. DOI: 10.1038/s41598-019-56693-4.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Данилова Елена Юрьевна*, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: phenolyat@gmail.com

Elena Yu. Danilova*, M.V. Lomonosov Moscow State University, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia (Sechenov University);
e-mail: phenolyat@gmail.com

Ерощенко Николай Николаевич, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: nikolay.eroshchenko@yandex.ru

Nikolay N. Eroshchenko, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia (Sechenov University);
e-mail: nikolay.eroshchenko@yandex.ru

Морозова Ольга Леонидовна, д.м.н., проф., ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: morozova_o_l@staff.sechenov.ru

Olga L. Morozova, Dr. Sci. (Med.), Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia (Sechenov University);
e-mail: morozova_o_l@staff.sechenov.ru

Ставрианиди Андрей Николаевич, д.х.н., проф., ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»;
e-mail: stavrianidi.andrey@gmail.com

Andrey N. Stavrianidi, Dr. Sci. (Chem.), Prof., M.V. Lomonosov Moscow State University;
e-mail: stavrianidi.andrey@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author