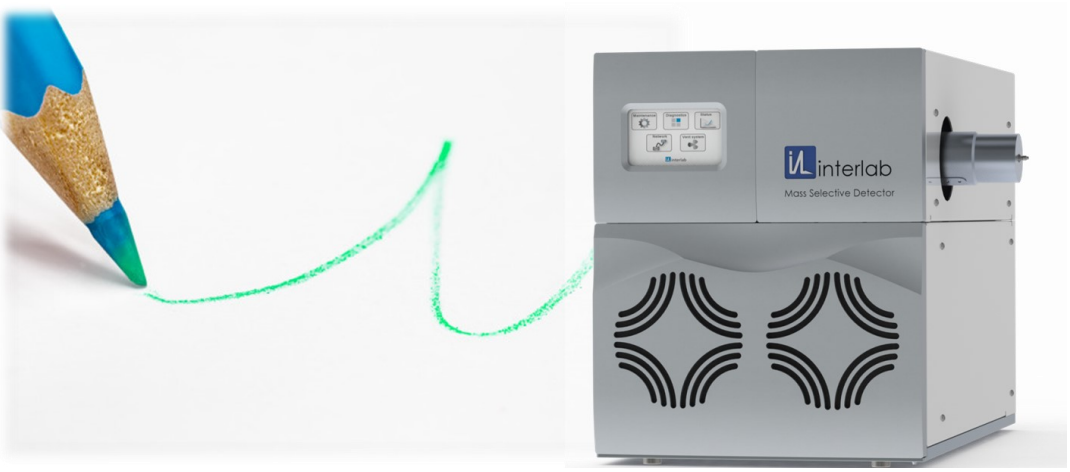
APP NOTE-16/2021GCMS



Новый инструментарий в программном обеспечении Маэстро-αМС - справочника **«Handbook»** для безошибочной работы с хромато-масс-спектрометрическими данными.

Колунтаев Д. А. *к. б. н., научный сотрудник отдела исследований и разработок,* ***ООО Интерлаб****, Россия, Москва*

Ключевые слова

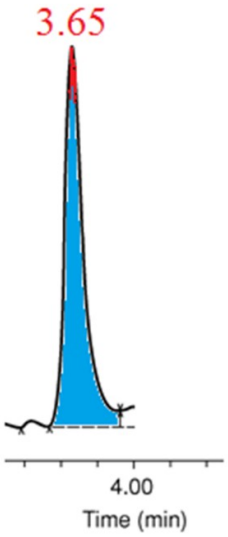
Газовая хромато-масс-спектрометрия, автоматическое и ручное интегрирование пиков, Handbook, справочник.

Резюме

В контексте данной работы представлен новый инструментарий программного обеспечения Маэстро-αМС – справочник «Handbook». Справочник представляет собой файлы, состоящие из страниц с графическими материалами и текстовыми комментариями. Продемонстрирован алгоритм работы справочника и возможные причины необходимости применения данного инструмента.

Введение

Интегрирование хроматографических сигналов является первым и самым главным шагом на этапе пост-экспериментальной обработки данных. Определение интенсивности, площади, а также времени удерживания являются основными их качественными и количественными характеристиками. В частности, площадь детектируемого пика может быть соотнесена с площадью пика аналитического стандарта или же использована для построения калибровочных зависимостей, а время удерживания пиков позволяет строго фиксировать временные рамки появления пика на хроматограмме.



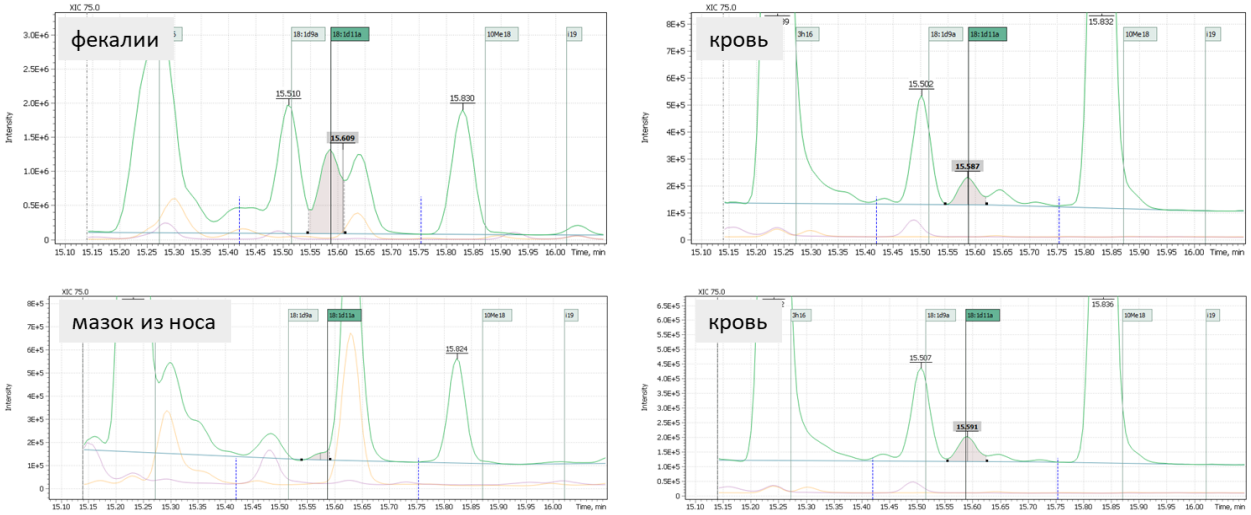
Интегрируют хроматографические сигналы обычно с использованием автоматических методов обнаружения пиков, реализованных в программном обеспечении управления хромато-масс-детектором. При этом в контексте одного исследования строго регламентируется применение единого метода интегрирования, как для всех пиков на хроматограмме одного образца, так и всех анализируемых образцов серии [1-3]. Роль аналитика на стадии обработки данных сводится только к выбору подходящих значений параметров работы интегратора: настройке чувствительности алгоритма к наклону базовой линии, настройке порога базовой линии, ширины возможного пика, пороговой величины площади сигнала и других параметров. Ожидается, что аналитик должен руководствоваться правильными и научно-обоснованными суждениями при выборе параметров интегрирования пиков.

Очевидно, что успех подхода масштабного и единообразного интегрирования всех целевых пиков на одной хроматограмме может быть реализован только в случае надёжного хроматографического разделения пиков и не может быть гарантирован при работе с комплексными биологическими матрицами, а также в случае реализации многокомпонентных анализов. Работая с образцами мочи, крови, растительных экстрактов, аналитику зачастую требуется перепроверять принятые ранее режимы автоматического интегрирования и при необходимости вносить корректировки даже в рамках одного эксперимента. При этом высокий диапазон концентраций целевых соединений также не позволяет полагаться на корректность автоматического интегрирования пиков особенно, как уже было ранее замечено, если в методе отслеживаются несколько десятков целевых соединений. Наглядный пример - реализация метода «Оценки микроэкологического статуса человека методом хромато-масс-спектрометрии» (ФС № 2010/038 от 24.02.2010г) [6]. Метод считается универсальным, поскольку применяется для обследования и выявления микроорганизмов в любых органах человека и биологических жидкостях. Такой подход дает возможность быстро получить расширенную информацию о маркерах воспалений и ускоренной диагностике возможных инфекций. Количественные расчёты микробных маркеров зачастую имеют схожие принципы, а следовательно, к результатам интегрирования хромато-масс-спектрометрических данных должны предъявляться строгие правила единообразия. Что при работе с различными матрицами может быть

довольно затруднительно. Примеры интегрирования характеристичного масс-пика 11,12-Октадеценового альдегида представлены на рис 1.

Подобные проблемы также встречаются и при хромато-масс-спектрометрическом мониторинге остаточных количеств действующих веществ пестицидов в различных растительных образцах. Зачастую в рутинных лабораториях контролируют схожий перечень целевых пестицидов, как в образцах овощей, фруктов, так и в зерновых, и масличных культурах. При этом различная природа матриц, их сложность предполагает формирование в профиле масс-хроматограмм множества интерферирующих компонентов, которые могут мешать корректному автоматическому интегрированию пиков в образцах зерновых культур в отличие, например, от овощей или фруктов. Особенно часто такой эффект проявляется на уровне остаточных концентраций пестицидов.

Рис. 1. Различия в окружении и сложности интегрирования 11,12-Октадеценового альдегида в биологических матрицах (кровь, фекалии, мазок из носа).



Сложность современных и широко распространённых многокомпонентных анализов заключается в том, что в рамках одного анализа могут анализироваться сразу несколько соединений, относящихся к различным химическим группам: спирты, кислоты, альдегиды, углеводороды, эфиры. Все эти соединения имеют различные свойства хроматографического разделения, которые зачастую могут выражаться различными полосами удерживания хроматографических пиков. Например, высококипящие соединения будут иметь уширение пиков по основанию в отличие от пиков с ранним временем элюирования (рис. 2a и 2b). Очевидно, что использование автоматического интегрирования в таком случае несёт в себе вероятность потери части интеграла пиков и соответствующей необходимости в дополнительной (точечной) корректировке метода интегрирования.

Не стоит также забывать, что рутинные эксперименты в реальных лабораториях способны нагружать и изнашивать хроматографические элементы системы, тем самым косвенно влияя на сложность хроматографического профиля каждого образца и постепенно ухудшая условия интегрирования пиков.

Рис. 2a. Сигнал рано элюируемого пика метилового эфира миристиновой кислоты (C14:0)

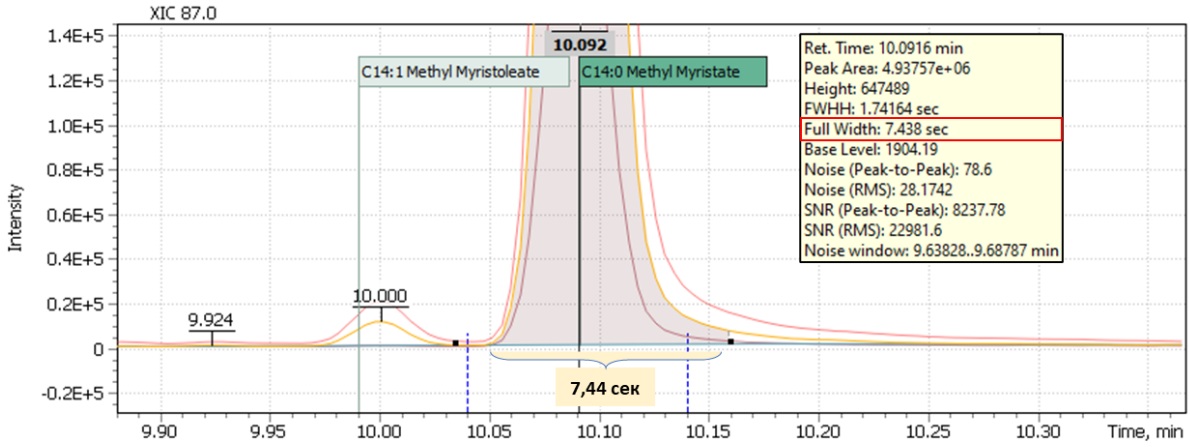
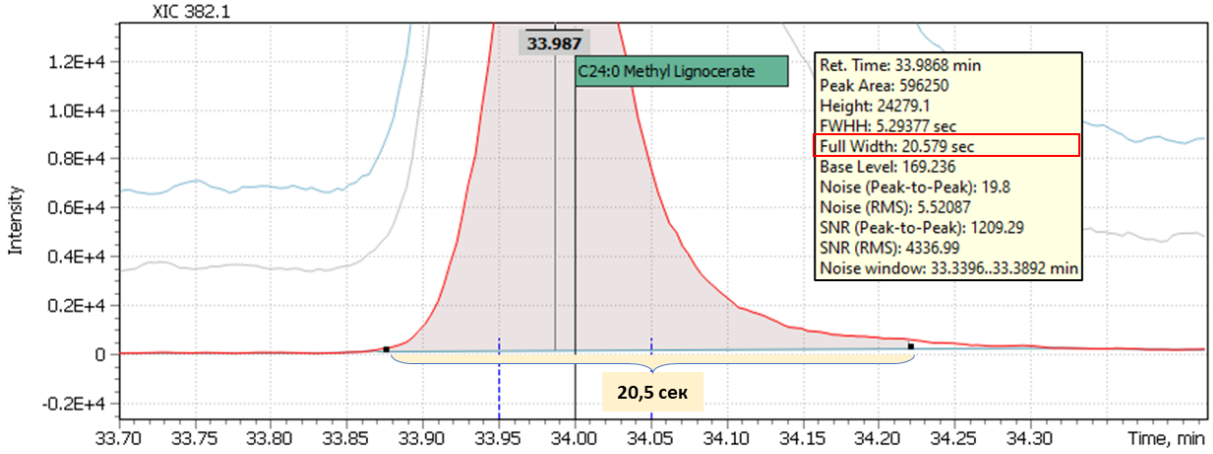


Рис. 2b. Сигнал поздно элюируемого пика метилового эфира лигноцериновой кислоты (C24:0)



В завершение стоит отметить, что многокомпонентные анализы подразумевают под собой также возможность детектирования аналитической системой, как сигналов на уровне предела количественного обнаружения инструментального метода, так и на уровне высокоинтенсивных мажорных пиков. Автоматическим алгоритмам интегрирования пиков, безусловно, проще работать с высокоинтенсивными сигналами, где момент начала пика (подъём) может быть надёжно определён алгоритмами математической обработки данных. Сигналы на уровне следовых количеств также должны быть надёжно интегрированы даже несмотря на возможные колебания базовой линии.

Всё это делает необходимым наличие постоянного контроля за корректностью интегрирования целевых пиков, единообразием при интегрировании пиков, принятых в процессе работы с калибровочными сигналами, идентичностью параметров интегрирования, использованных в ходе сбора статистических характеристик. Такие требования часто могут служить основанием к ручным правкам автоматического интегрирования пиков. Несмотря на то, что, согласно литературным данным и рекомендательным письмам надзорных органов, *нет чётких и строго регламентированных процедур, описывающих, как правильно выполнять подобное ручное интегрирование пиков [4],* предполагается, что лаборатория сама должна иметь чёткую политику в отношении того, как пики должны быть проинтегрированы в рамках

любого эксперимента особенно, если речь идёт о рутинных анализах. В противном случае возникает вероятность искажения хроматографических данных [4].

Существуют две основные причины искажения данных:

- За счёт «среза» полезной площади пика (*в зарубежной литературе - «Peak Shaving»*). Процесс ручной разметки базовой линии сигнала с целью уменьшения площади пика. Если подобное воздействие совершается на сигналах аналитических стандартов, которые в последствии используются для построения калибровочной зависимости, то последующий корректно обсчитываемый образец будет характеризоваться заведомо ложным увеличением его концентрации. В случае же корректировки разметки базовой линии пика испытуемого образца результату исследования будет соответствовать пониженная концентрация аналита. Наглядно процесс «среза» полезной площади пика представлен на рисунке 3 (линия 2).
- За счёт «наращивания» площади пика (*в зарубежной литературе - «Peak Enhancing»*). Подобный процесс выражается неправильной разметкой базовой линии для интегрирования целевого пика. В результате целевой компонент характеризуется увеличенной площадью и, как следствие, увеличением его количества. На рисунке 3, линия 3 соответствует процессу «наращивания» площади пика на хроматограмме.

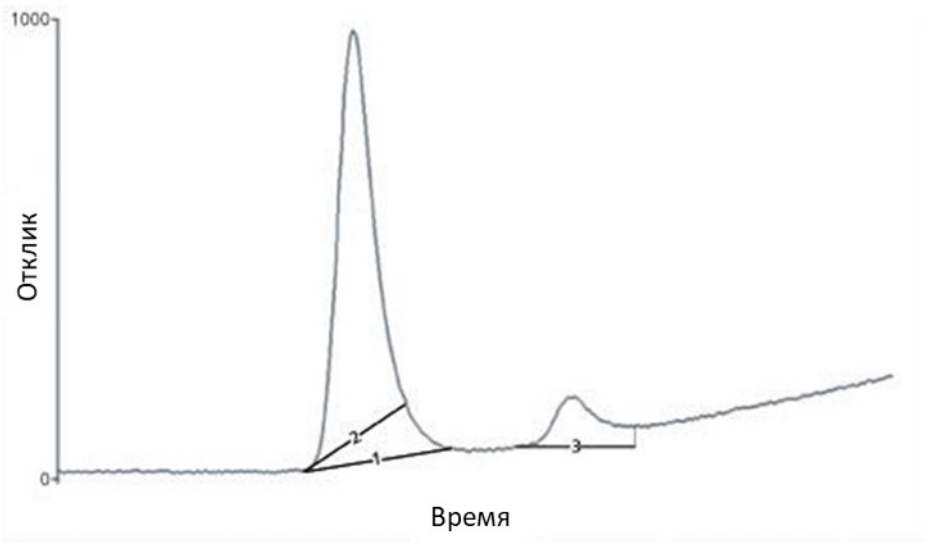


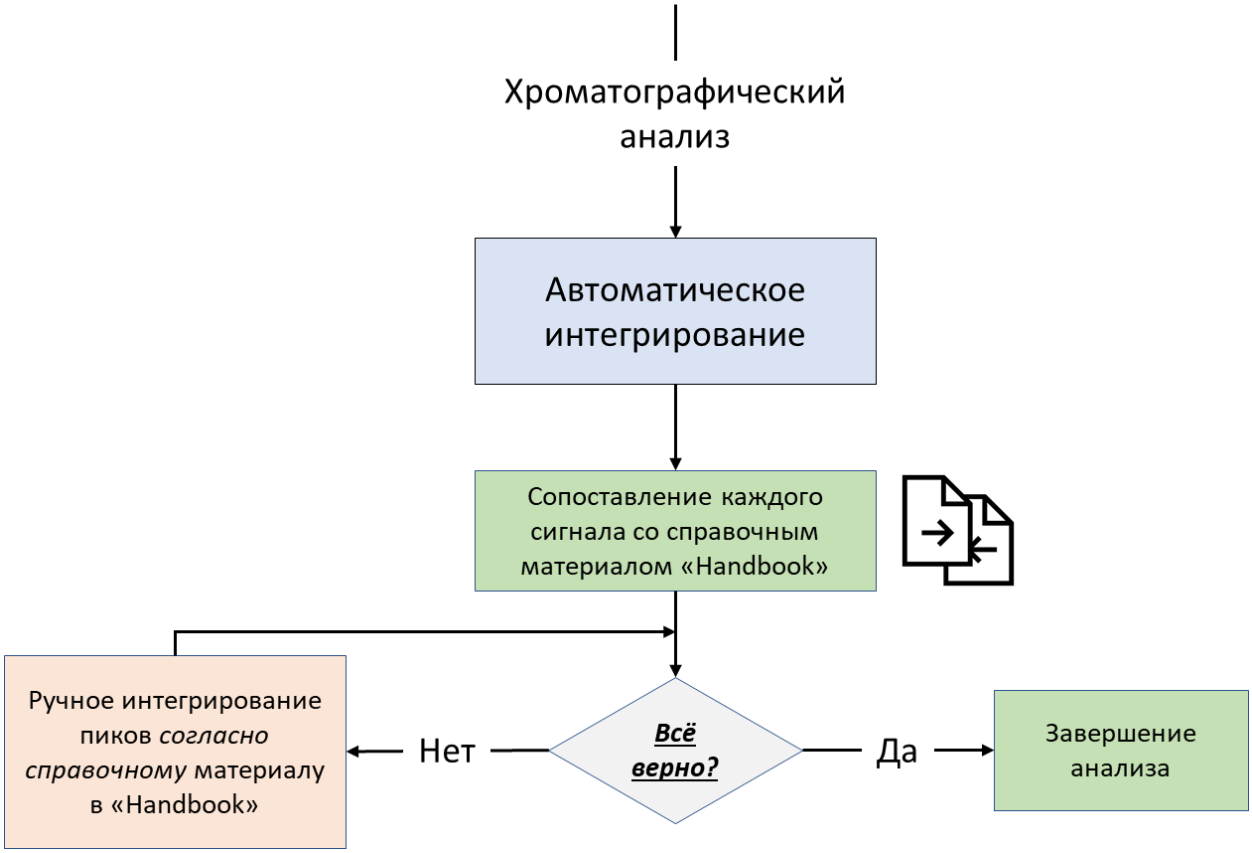
Рис. 3: Примеры «среза» полезной площади пика (2) и «наращивания» площади пика (3). [4]

Для исключения возможных способов искажения данных за счёт неправильного интегрирования, как автоматического, так и ручного, в программном обеспечении «Маэстро-αМС» *(Маэстро-Аналитик)* реализован инструментарий, позволяющий контролировать корректность интегрирования пиков – справочник «Handbook». Подобный справочник представляет собой файл, состоящий из страниц с графическими материалами и текстовыми комментариями. Страницы создаются пользователем в привязке к искомым веществам и в процессе работы с таблицей искомых веществ выводятся в специальном окне в качестве визуальных примеров обработки пиков каждого искомого вещества.

Функция «Handbook» в программном обеспечении Маэстро-αMC

Визуальный контроль корректности интегрирования пиков может быть легко реализован с помощью новой функции «Handbook» в программном обеспечении «Маэстро-αMC». Данная функция позволяет быстро загружать и наглядно отображать примеры обработки пиков целевых соединений в виде графических материалов с возможностью дополнения тестовыми комментариями. Принцип работы алгоритма подразумевает синхронизацию отображения содержимого материала справочника в зависимости от названия анализируемого соединения. Предполагаемая блок-схема для визуального контроля корректности интегрирования представлена на рисунке 4.

Рис. 4. Блок-схема для визуального контроля корректности интегрирования.

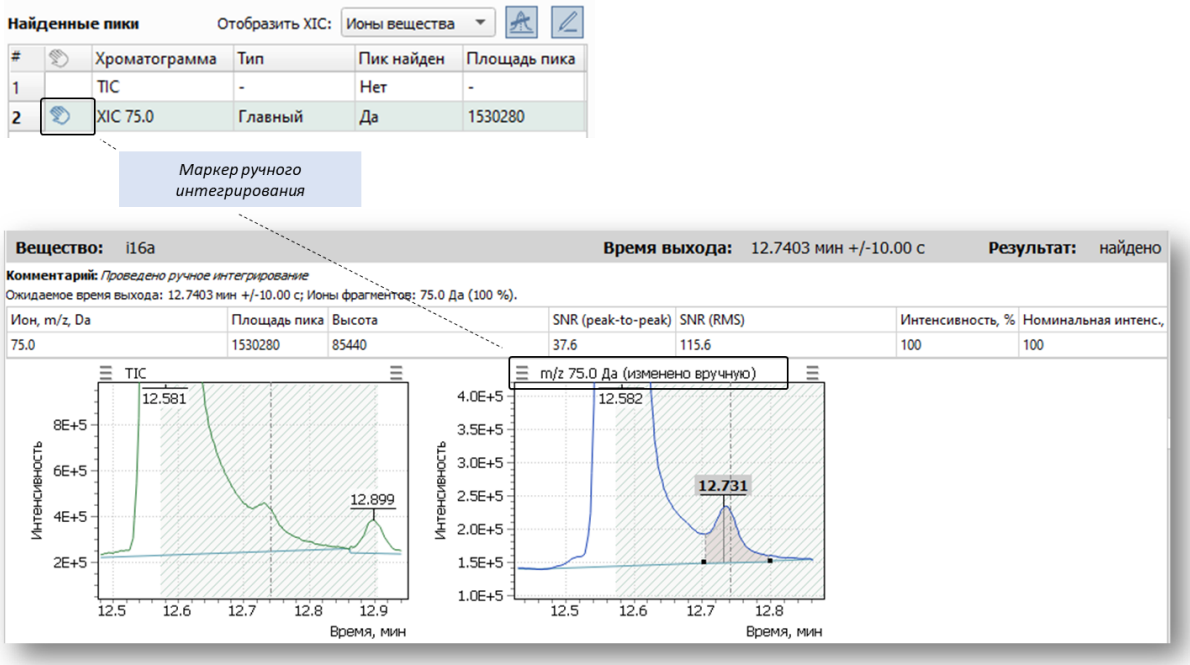


Подготовка справочного материала должна выполняться исключительно *экспертами с правами администратора или руководителями исследования*, которые обучены всем тонкостям инструментального метода, а также имеют значительный опыт работы в области постановки хроматографических методов. При этом все предложенные варианты интегрирования пиков должны соответствовать научно-обоснованным подходам и по возможности соответствовать следующим принципам стандартной операционной процедуры [5].

Наличие подготовленного справочного материала позволяет лаборанту или оператору, даже с небольшим опытом работы в хроматографии, всегда иметь перед собой примеры правильного интегрирования и обработки пиков, что предостерегает от возможных случаев непреднамеренного искажения данных. При этом, согласно всем нормам, правилам и указаниям, направленным на обеспечение согласованности и достоверности результатов лабораторных исследований (GLP, GMP), в программном

обеспечении «Маэстро-αMC» любые ручные правки строго отслеживаются и выделяются специальными маркерами, что представлено на рисунке 5. Как можно заметить, маркеры ручных правок сопровождают интегрированные сигналы от момента их внесения и до вывода отчётной документации.

Рис. 5. Маркировка применения ручного интегрирования при обработке данных и в отчётных документах.



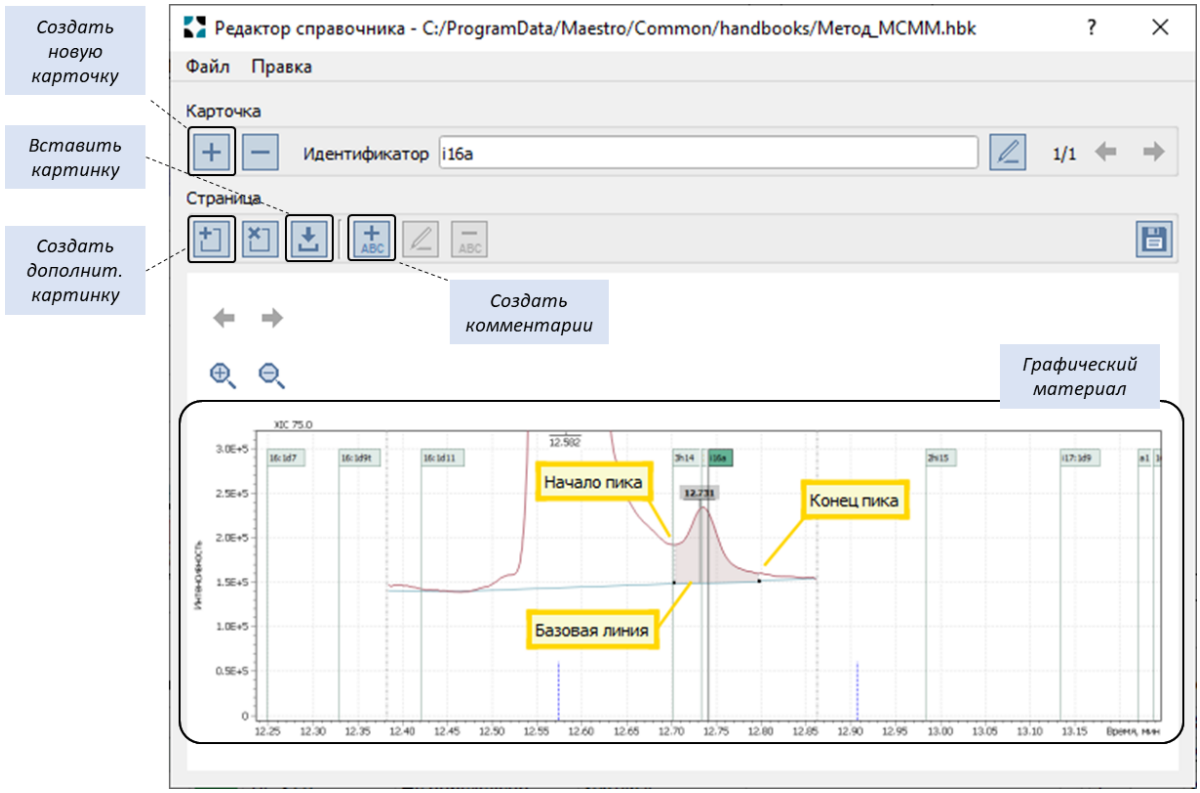
Настройка справочного материала функции «Handbook»

На стадии подготовки справочного материала эксперт с правами администратора подбирает подходящие примеры данных, которые несут в себе максимально информативное отображение корректного интегрирования пиков, а также возможные примеры интерференций мешающих пиков. Выбранные хроматограммы целевых сигналов загружаются в буфер обмена операционной системы компьютера и далее помещаются в соответствующую карточку справочника «Handbook».

Синхронизация отображения справочного материала в процессе работы с таблицей искомых веществ будет реализована только в случае совпадения имени искомого вещества и имени идентификатора в карточке (рис. 6). При этом для одного соединения может быть подготовлено несколько вариантов карточек справочного материала. Такой подход позволяет избежать возможного отличия в интегрировании пиков, например, в случае работы с разными типами матриц (рис. 1).

Среди вспомогательных инструментов создания карточек следует отметить и возможность внесения вспомогательных сообщений с текстовыми комментариями, которые позволяют корректно интерпретировать детали справочного материала (рис. 6 *«создать комментарии»*).

Рис. 6. Пример создания и разметки карточки образца «i16a» для справочника «Метод_МСММ».



Подготовленный материал справочника сохраняется в память программного обеспечения «Маэстро-Аналитик» под любым предложенным именем и в последствии может быть использован в работе с помощью настройки параметров качественного и количественного анализа *(страница «Анализ»)* в меню «Справочник».

Рис. 7. Окно редактора аналитического метода, страница «Анализ»

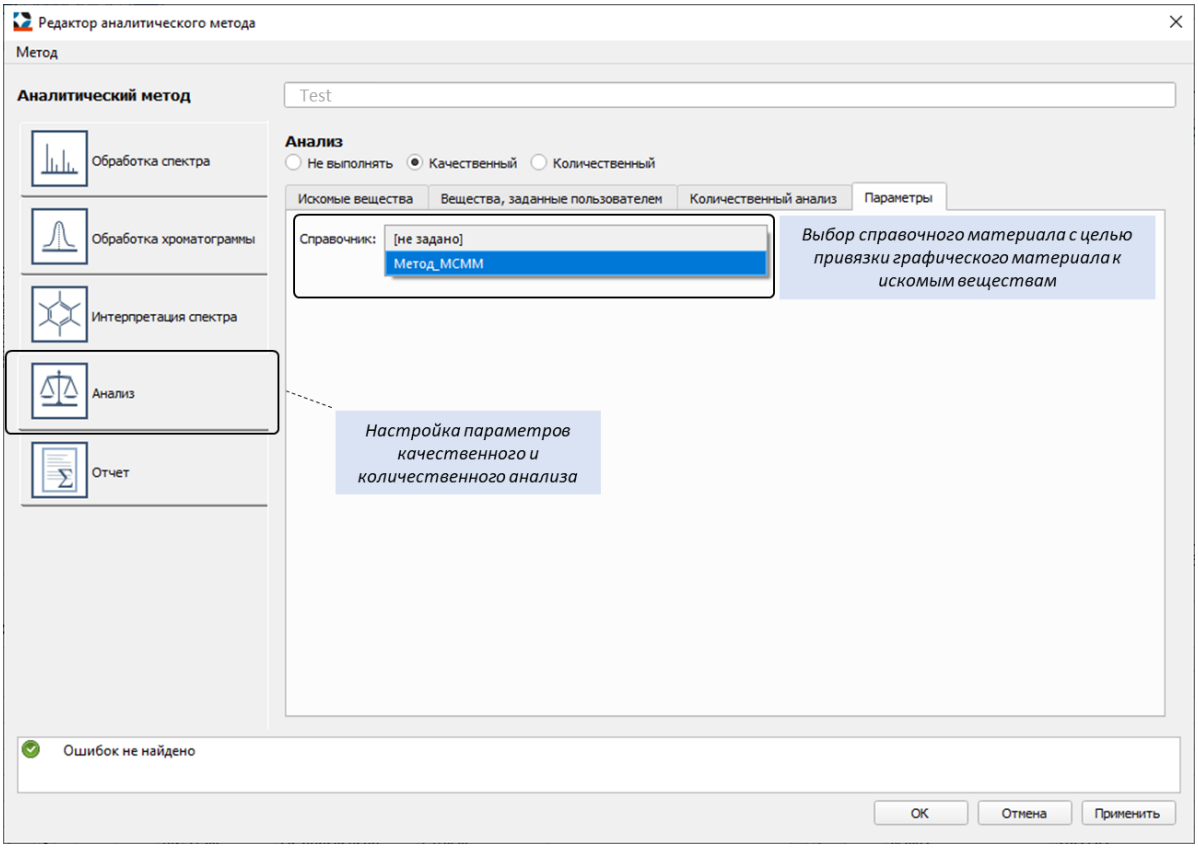


Рис. 8. Пример интегрирования пика изогексадеканового альдегида (i16a) в образце крови с одновременным визуальным контролем корректности детектирования пиков.

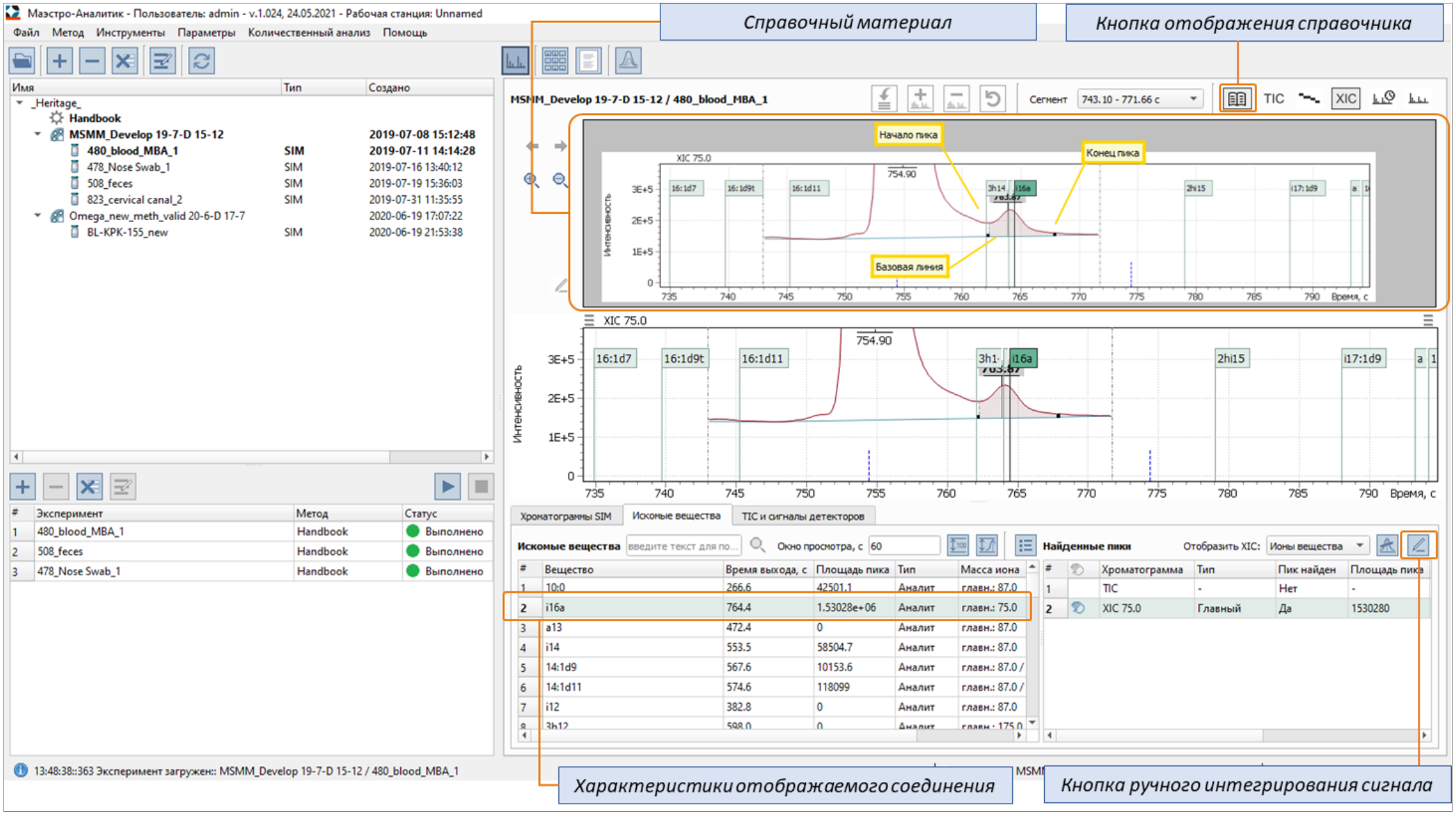
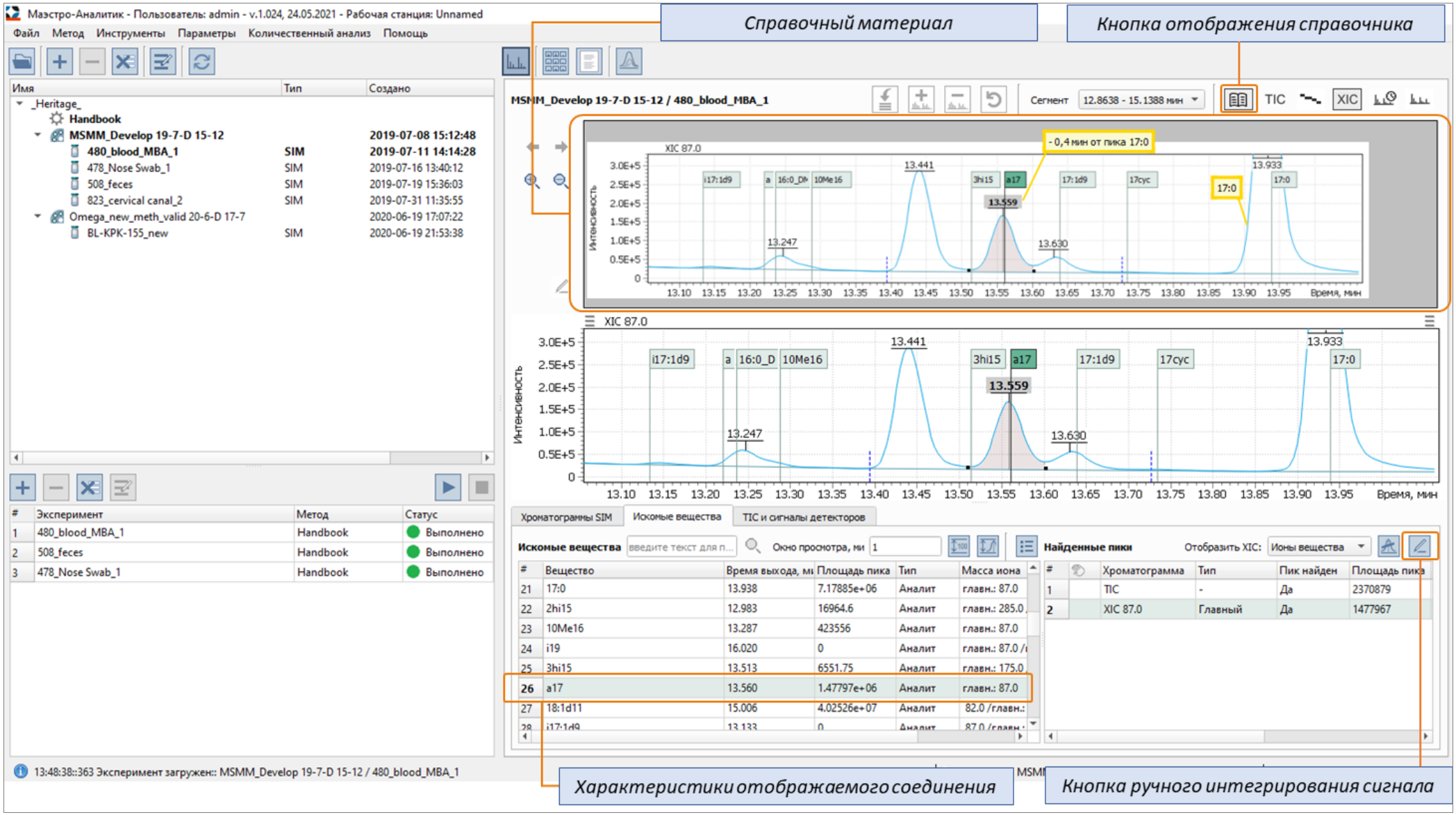


Рис. 9. Пример интегрирования пика антеизогептадекановой кислоты (a17) в образце крови с одновременным визуальным контролем корректности детектирования пиков.



Примеры использования справочного материала

На рисунках 8 и 9 представлены примеры отображения окна программного обеспечения «Маэстро-Аналитик», где одновременно с пост-обработкой и валидацией данных метода масс-спектрометрии микробных маркеров выполняется также и визуальный контроль корректности автоматического интегрирования данных с помощью функции справочного материала «Handbook». Детектирование пиков представлено в образце крови человека. Очевидна простота и удобство использования функции справочника в контексте одного окна программного обеспечения, что исключает необходимость в дополнительных справочных материалах на рабочем столе аналитика.

Выводы

Инструментарий справочника «Handbook» позволяет реализовать ручной контроль за корректностью интегрирования целевых пиков, с возможностью синхронизации отображения справочной информации с исследуемыми соединениями, что в свою очередь позволяет сохранять системность в выборе подходов к автоматическому и ручному интегрированию пиков.

Используя подобный инструмент, появляется возможность снижения возможных системных ошибок в интегрировании сигналов, что особенно важно для сотрудников с небольшим опытом работы в хроматографии или же студентам и аспирантам высших учебных заведений, не имевших до этого опыта работы в хроматографических лабораториях.

Возможность внесения текстовых сообщений поверх справочной информации, позволяет обращать внимание работников на детали при детектировании пиков, а также рельефа хроматографического профиля. Инструментарий доступен в программном обеспечении Маэстро-αMC начиная с версии 1.024.

Литература

1. World Health Organization (WHO), Technical Report Series No.996 Annex 5 Guidance on Good Data and Records Management Practices (WHO, Geneva, Switzerland, 2016).
2. EU GMP Chapter 6 on Quality Control (2014)
3. FDA Current Good Manufacturing Practice for Finished Pharmaceutical Products, 21 CFR 211 (2009).
4. *R.D. McDowall,* Questions of Quality: Where Can I Draw The Line? LCGC Europe-06-01-2015, Volume 28, Issue 6, Pages: 336–342
5. Standard operating procedures. Chromatographic peak integration procedures, SOP 1001, p. 1-33, 01/10/2000, rev. 0.0
6. G.A. Osipov and N. V. Verkhovtseva. Study of human microecology by mass spectrometry of microbial markers. Beneficial Microbes, March 2011; 2(1): 63-78