

Вместе мы сильны



Необходимость идентифицировать и описать неизвестные вещества возникает во многих прикладных областях фармацевтической промышленности, например, при анализе примесей синтезированных соединений, продуктов распада в испытаниях на стабильность, определении метаболита с целью обнаружения ожидаемых и неожиданных продуктов обмена веществ, а также в экспериментах по определению профиля метаболитов для установления различий в профиле масс в более крупных наборах проб и их идентификации. В целом, процесс идентификации имеет большое значение, поскольку все дальнейшие действия основаны на такой идентификации. Возможность дать ответ в разумные сроки или оказать эффективную поддержку процесса принятия решений для последующих этапов описывания свойств определяет потенциал всего решения.

К таким решениям, отличающимся широкими возможностями, относится и хроматомасс-спектрометр LCMS-IT-TOF, представляющий собой комбинацию жидкостного хроматомасс-спектрометра, ионной ловушки и времяпролетного масс-спектрометра, который обладает многочисленными уникальными функциями программного обеспечения.

Сочетание двух разных способов масс-спектрометрии (ионная ловушка и времяпролетный масс-спектрометр в одном приборе) гарантирует возможности, которые не может обеспечить ни одна отдельная технология анализа масс (Рисунок 1). Используя метод масс-спектрометрии с ионной

ловушкой, можно с легкостью выбрать и фрагментировать заданные молекулы (MS^N ; MS/M S, MS/MS/MS, MS/MS/MS/MS...), в то время как времяпролетная масс-спектрометрия обеспечивает высокое разрешение по массам и точное определение масс.

В LCMS-IT-TOF могут быть предусмотрены различные источники ионизации (электрораспыление (ESI), химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI), фотоионизация при атмосферном давлении (APPI), комбинированный источник ESI/APCI, а также источник нанораспыления), которые дополняются методом быстрого хроматографического разделения, что позволяет получить требуемые результаты со временем переключения полярности 100 мс за один заход. В целом, данный метод гарантирует точность определения массы около 3 миллионных долей с внешней калибровкой, независимо от режима MS. В пролетной трубке поддерживается постоянная температура 40°C, обеспечивая стабильность масс даже во время анализа более крупных комплексов проб.

Простота и надежность получения высококачественных данных остается серьезной проблемой при определении неизвестных соединений. При этом, однако, не менее важную роль играют программные средства, используемые для обработки данных.

Наряду с информацией о фрагментах, для описания свойств неизвестного вещества большое значение также имеет химический состав и изотопная модель соединения. В последних публикациях подчеркивается, что, несмотря на всю важность точности масс, данной

информации недостаточно для надежного определения соединения и идентификации неизвестных веществ. Не последнюю роль также играет точный изотопный состав измеряемых ионов. Чтобы построить надежную молекулярную формулу неизвестных веществ относительная погрешность в изотопном составе должна быть менее 5% — такой процент позволяет исключить значительное количество возможных соединений.

Программа «Определитель формулы»

Для того, чтобы установить химический состав неизвестной пробы, программа «Определитель формулы», разработанная компанией «Шимадзу», использует все сгенерированные точные значения масс соединения, включая исходную массу, а также сгенерированные массы фрагментов, полученные в результате экспериментов MS^N для вычисления и валидации общего химического состава

рассматриваемой молекулы, и выдает перечень потенциальных формул. Кроме того, в программе предусмотрено использование информации об изотопном составе для сравнения анализируемой пробы с теоретической потенциальной формулой, что либо повышает вероятность совпадения, либо исключает определенные потенциальные формулы из перечня. Такой подход значительно сокращает число ложноположительных потенциальных составов и существенно упрощает работу оператора. Компания «Шимадзу» владеет патентом на использование информации о фрагментах, полученной в результате экспериментов MS^N с целью прогнозирования химического состава молекулярных ионов.

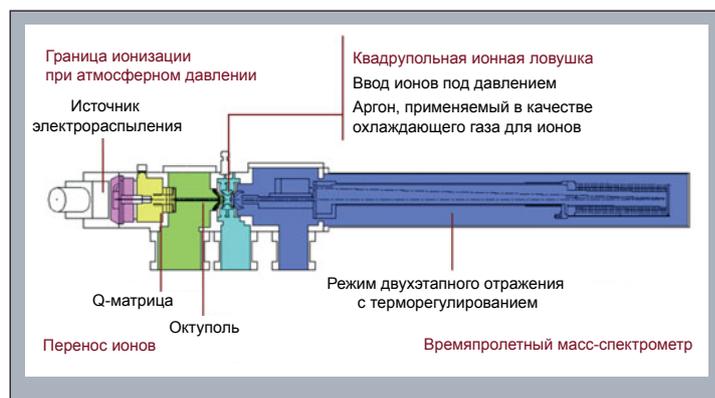


Рисунок 1: Схема спектрометра LCMS-IT-TOF

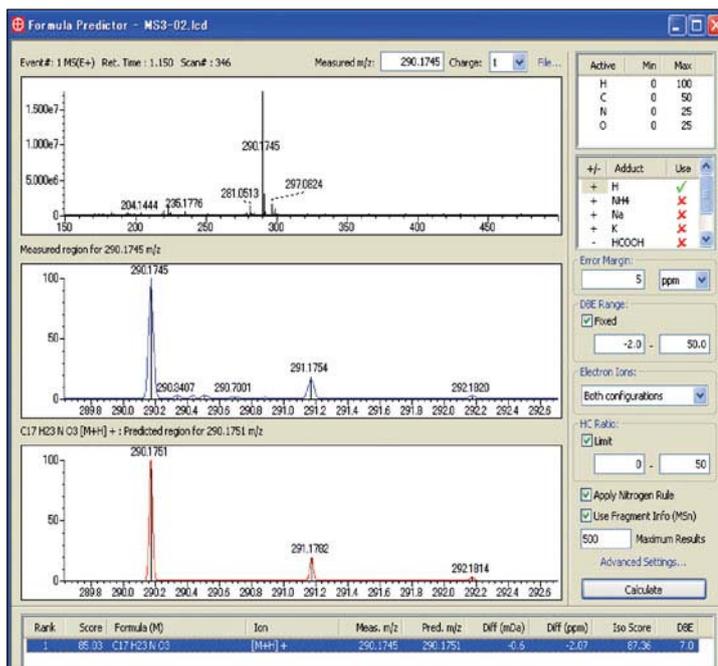


Рисунок 2: Окно программы «Определитель формул», показывающее одну успешную попытку после применения MS3 спектра.

Программа MetID Solution позволяет идентифицировать метаболиты при анализе временных рядов для биологических жидкостей

Программа MetID Solution применяется при оценке токсичности/токсикологии – фармацевтические компании оценивают токсичность потенциальных лекарств; данная программа применяется в области функциональной геномики, когда требуется определить фенотип, полученный при генетической манипуляции, например, при делеции или инсерции генов. Программа MetID Solution сочетает в себе три разных подхода к определению предполагаемых, а также непредполагаемых метаболитов.

Первый этап – стандартный отбор пиков

Один или более файлов с временными рядами данных для анализируемого вещества (т.е., жидкая среда объекта исследования, отбираемая через разные интервалы времени после приема лекарственного препарата) фильтруются в сравнении с контрольным файлом (т.е., жидкая среда, отобранная непосредственно после приема препарата). Исключив общие пики, получают оставшиеся пики, содержащие метаболиты.

Опубликованы данные о вариантах биотрансформации, при которой функциональные группы исходного лекарственного препарата могут метаболизироваться в организме (добавляться или

заменяться). Такие пики известны как предполагаемые трансформации, а их фильтрация осуществляется путем генерирования ХЭИ (хроматограмм экстрагированных ионов), используя метаболизированную формулу.

Оставшиеся пики, которые не могут быть классифицированы ни под одну категорию, называют непредполагаемыми пиками. Их метаболическая вероятность про-веряется вручную. Данный процесс очень трудоемок, но программа «Определитель формул» сокращает затрачиваемые усилия.

Второй этап – маркировка изотопами

Чтобы облегчить подтверждение метаболитов, лаборатории, в которых проводится их поиск, могут маркировать исходный лекарственный препарат редкими изотопами (которые могут быть радиоактивными или нет).

Программа MetID предполагает автоматическое управление процессом маркировки на этапе Отбора пиков, и данная программа также может использовать пики на хроматограммах, получаемых на детекторе радиоактивно маркированных веществ.

Кроме того, программа может генерировать отфильтрованную по изотопу хроматограмму на основании MS хроматограммы для определения таких маркированных метаболитов (данная мера помогает локализовать соединения, содержащие характерное распределение изотопов, таких как галогены; схема показана на рисунке 3).

Третий этап – регрессионный анализ по методу наименьших квадратов (МНК)

При работе на LCMS-IT-TOF постоянная точность определения масс и разрешение данных MSⁿ используются для первичного построения «отпечатка»

исходного соединения или лекарственного препарата (Y) и для последующего получения данных MSn для каждого пика во время анализа, чтобы получить «отпечатки» метаболитов (X).

Результаты регрессионного анализа по методу наименьших квадратов показывают, насколько каждый X похож на Y; поскольку у метаболитов и исходного вещества присутствуют общие функциональные группы, то можно провести быстрое фильтрование многих непредполагаемых пиков на предмет потенциального содержания метаболитов, а также выявить новые биотрансформации.

Программа Profiling Solution

Сравнение массива данных и выявление различий – это преимущество программы пакета Profiling Solution. Отличаясь быстротой и надежностью, данный пакет основан на применении сгенерированных хроматографических данных и данных масс-спектрометра, полученных в результате многократного измерения проб, для выявления различий (Рисунок 5).

В рамках данной программы предусматриваются следующие этапы:

- Основываясь на запатентованном методе, программа сопоставляет комплекты многокомпонентных данных, используя уникальную технологию спектральной сортировки, и генерирует массив сопоставленных данных на основании данных о спектрах (независимо от разрешения по массам) и хроматографических данных с целью образования потоков многокомпонентных данных (поддерживает переключение полярности в пределах одного цикла).
- Встроенные фильтры для совокупного анализа контроля качества (отфильтровывание специфического поведения ионов, времени удерживания)
- Встроенные статистические средства.

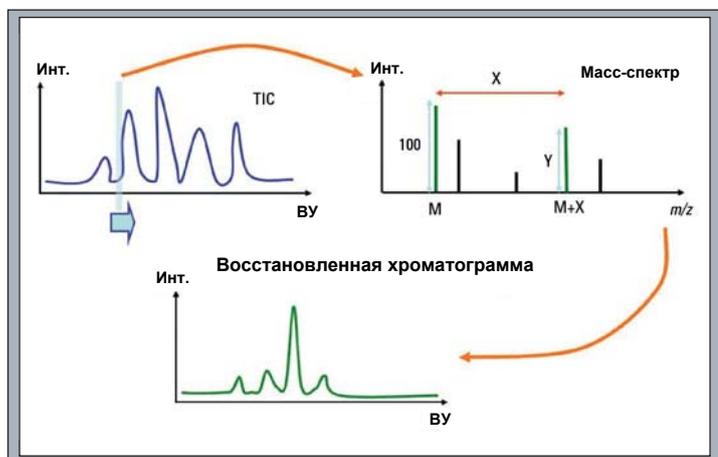


Рисунок 3: Схематическое изображение порядка получения отфильтрованной по изотопу хроматограммы.

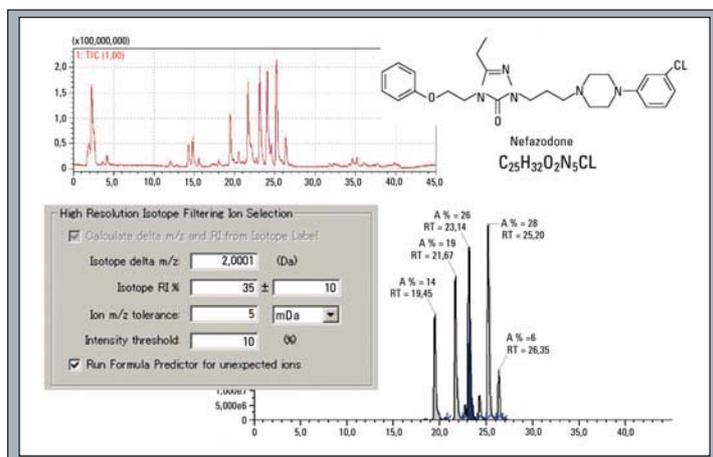


Рисунок 4: Реальный пример хроматограммы Нефазодона, отфильтрованной по экстрагируемым изотопам, основанной на изотопном распределении хлора.

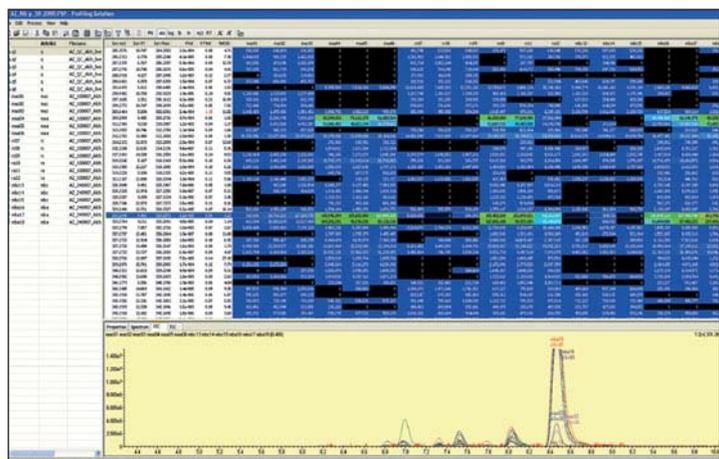


Рисунок 5: Массив разных проб, где выделен значимый разброс

(р-значение, нормировка, удаление изотопов)
 ● Экспорт в статистические пакеты (SIMCA-P, MatLab в виде текстового файла)
 ● Оперативные связи со средствами поиска данных в Интернете (LipidMaps, KEGG, Metlin, ChemSpider).

Программа Open Solution ComponentID

Во многих лабораториях, занимающихся синтезом, химикам предоставляется доступ к системе с одним квадруполом, используя программу «Open Access» (открытый доступ). Однако для точного измерения массы целевого соединения в масс-спектрометрическом отделе, как правило, проводится анализ данной пробы. Результатом могут стать большие накладные расходы в отделах, занимающихся масс-спектрометрией. Open Solution ComponentID представляет собой программное средство для автоматизации процесса прогнозирования формул (Рисунок 6а). Объединив данное средство с надежностью LCMS-IT-TOF, получаем эффективный метод подтверждения молекулярных масс и составления профиля примесей.

ComponentID отличается простым и понятным пользователю интерфейсом для регистрации проб (и проведения анализа) и распечатки отчетов с результатами, используя LCMS-IT-TOF (Рисунок 6б). Таким образом, процесс анализа собственных проб значительно упрощается для ученых, проводящих синтез, и других пользователей в лаборатории. Для данных заказчиков программа является эффективным средством, которое в своем использовании напоминает применение прибора в формате «открытым доступом».

- Заказчики, которые намерены предоставить одну систему LCMS-IT-TOF в совместное пользование группе ученых, чтобы каждый мог подтверждать молекулярную массу синтезируемых соединений или подтверждать уровень их чистоты или примеси
- Пользователи, желающие использовать программу для прогнозирования формул для подтверждения синтеза и повышения точности такого определения.
- Пользователи, рабочее место которых расположено вдали от приборов, в результате чего возникает необходимость в совершении затратных по времени перемещений. прежде чем они смогут увидеть результаты.

ComponentID предлагает следующие функции, предназначенные для удовлетворения описанных выше потребностей заказчика.

1. После входа в программу требуется лишь пять шагов, чтобы начать анализ: ввести количество проб, выбрать метод, ввести целевой химический состав, поместить пробы в автоматический пробоотборник и нажать кнопку [Start] (Старт). Отчет с результатами может быть получен по электронной почте. Следовательно, обычным пользователям обучение не требуется. Администрирование системы ЖХ/МС и разработка методов является ответственностью системного администратора. Функция регистрации проб аналогична используемой в широко известной программе Open Solution и в PsiPort для систем серии LCMS-2020/LCMS-2010.
2. Результаты точного измерения масс в процессе MSⁿ, полученные в системе LCMS-IT-TOF,

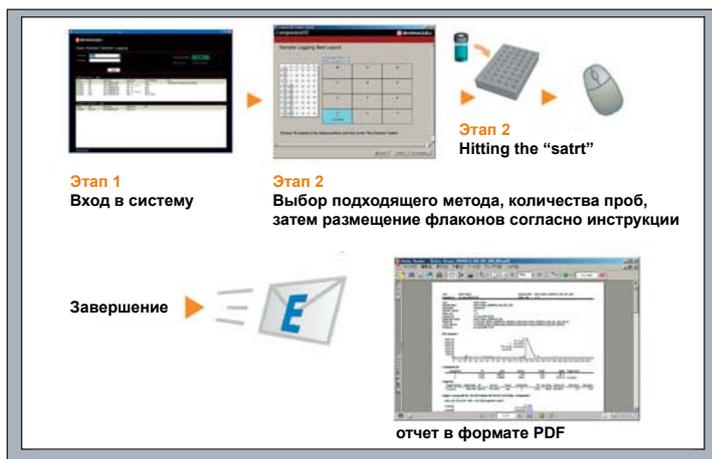


Рисунок 6а: Этап генерирования данных о точных массах в среде открытого доступа



Рисунок 6б: Окно запуска программы ComponentID solution

применяются для точного прогнозирования состава синтезируемых веществ и примесей. Затем полученные результаты автоматически включаются в отчет.
 3. ComponentID поддерживает высокопроизводительный ЖХ/МС анализ с применением системы Prominence, а также проточно-инжекционный анализ, при котором колонка не используется. Применение проточно-инжекционного анализа обеспечивает возможность обработки большого количества проб за короткое время.
 4. Время ввода данных может быть сокращено путем импортирования данных о пробах, например состав синтезируемых соединений, из таблиц в формате Excel, или путем прямого копирования и вставки из Excel файла. Данная функция также удобна для синтетических веществ в форме пластинок.

5. После завершения анализа полученные результаты переводятся в файл в формате PDF, присоединяются к электронному письму и отправляются на заранее указанный адрес электронной почты. Вывод полученных результатов может быть изменен системным администратором таким образом, чтобы PDF файл включал не только результаты из программы определителя формул, но также МС хроматограммы, спектры, ЖХ хроматограммы или другую информацию по желанию пользователя.
 6. Кроме того, в ComponentID представлено множество иных функций, разработанных на основании реальной эксплуатации систем Open Solution и PsiPort, среди прочих – функция блокировки «рабочего стола», анализ в ночное время и установка приоритетов.