

Использование систем обработки данных ГХ/МС для поиска пиков и идентификации потенциальных токсикантов в систематическом токсикологическом анализе.

А.Б. Мелентьев

Бюро судебно-медицинской экспертизы (нач. Е.Ф. Швед) Челябинской области

Систематический токсикологический анализ (СТА) является одним из наименее разработанных с методической точки зрения подходов в аналитической токсикологии. Его задача поиск неизвестных априори наркотических, психотропных, сильнодействующих лекарственных веществ, пестицидов и других токсикантов. СТА включает в себя логический аналитический поиск возможного присутствия неизвестных вредных веществ в биологических средах организма и их идентификацию. Это очень важная и наиболее трудная часть всех токсикологических исследований, поскольку в ходе этого анализа среди нескольких десятков тысяч веществ, которые могут вызвать интоксикацию или физическую зависимость, необходимо обнаружить одно или несколько, идентифицировать их или их метаболиты для последующего подтверждающего анализа.

За последние 10-15 лет наибольшее количество публикаций посвящено СТА, проводимому методом (ГХ/МС). Подготовка биологических проб проводится методами жидкость-жидкостной экстракции, твердофазной экстракции на полимерных сорбентах или микроэкстракцией на полимерных пленках. Для газохроматографического разделения компонентов, входящих в состав экстрактов биосред обычно используют капиллярные колонки с неполярной или слабополярной неподвижной жидкой фазой - 100% диметилсилоксан, 5% фенил-95% диметилсилоксан и другие им подобные. Большинство предлагаемых методик СТА для идентификации компонентов используют автоматическую идентификацию по полным масс-спектрам с использованием стандартных библиотек масс спектров электронного удара (PMW_TOX, Willey, NIST), индексам Ковача (или аналогам) или относительному времени удерживанию. Только единичные методики предполагают целевой поиск компонентов по характеристическим ионам [3,4,8] или вторичную обработку масс-спектральной информации для очистки полных масс-спектров компонентов от фона и вклада соэлюированных компонентов [5,7].

Систематический токсикологический анализ экстрактов крови и мочи с использованием ГХ/МС проводится судебно-химическом отделении Челябинского областного бюро СМЭ в течение 10 лет и два года в Областном токсикологическом центре. Наш опыт его использования показывает, что применение только стандартных автоматических операций по идентификации хроматографических пиков с использованием

стандартных библиотек масс спектров электронного удара иногда приводит к ложно-отрицательным результатам анализа. Основными причинами ложно-отрицательных результатов являются низкие концентрации анализируемых веществ и высокий фон, создаваемый эндогенными примесями в экстрактах, особенно от гнилостного биологического материала. Одними из путей снижения доли ложно-отрицательных результатов СТА являются вторичная обработка данных ГХ/МС с использованием программ деконволюции и целевой визуальный поиск контролируемых субстанций с помощью ионных хроматограмм по характеристическим ионам. Для того, чтобы использовать эти методы в рутинных анализах необходимо провести определенную методическую подготовку. В настоящей работе приведены данные и подходы, применяемые нами для использования программы AMDIS (Автоматическая система масс-спектральной деконволюции и идентификации) и создании макрокоманд машинной станции для визуального поиска пиков контролируемых соединений с помощью ионных хроматограмм по характеристическим ионам.

Материалы и методы исследования

Для подготовки проб крови и плазмы к СТА методом ГХ/МС нами используется жидкость-жидкостная экстракция в дихлорметан. Подробности методики опубликованы в работе [2]. Подготовка проб мочи к СТА включает стадии кислотного гидролиза, корректировки pH среды, жидкость-жидкостной экстракции в смесь хлороформа с н-бутанолом (9:1) и получение ацелированных производных. Методика опубликована в работе [1]. Газохроматографический анализ образцов проводился нами на хроматографе HP5890 с масс-селективным детектором HP5972A с программным обеспечением MS ChemStation G1034C фирмы Hewlett Packard и хроматографе 6890 с масс-селективным детектором 5975B с программным обеспечением G1701DA версия D.03.00 фирмы Agilent Technologies. Параметры работы хроматографа и масс-селективного детектора приведены в работе [1]. Автоматическая идентификация пиков на хроматограмме с использованием программы ChemStation происходила по библиотекам масс-спектров PMW_TOX2, NIST02, NIST05, WILEY275.

Результаты и их обсуждение

Идентификация соединений при помощи программы AMDIS (National Institute of Standards and Technology USA).

Автоматическая система масс спектральной деконволюции и идентификации (AMDIS) позволяет значительно снизить предел обнаружения за счет преобразования масс спектральной информации. Первоначально программа производит деконволюцию

первичных данных ГХ/МС, чтобы обнаружить все отдельные компоненты. Суть преобразования, которая происходит по параметрам фильтров деконволюции, указанных в меню “Settings-Deconv.” состоит в вычленении из всего набора ионов, составляющего масс-спектр данного хроматографического пика, ионов, имеющих одинаковые ионные профили. В результате конечный масс-спектр очищен от фоновых ионов и ионов соэлюированных соединений, за счет чего улучшается качество идентификации пиков с малой интенсивностью и понижается предел обнаружения (PrO). Преобразованный масс-спектр каждого из обнаруженных компонентов сравнивается с библиотечным, при этом вычисляется фактор соответствия между целевым (библиотечным) и преобразованным спектром их файла данных. Если фактор соответствия выше заданного пользователем, параметры идентификации компонента выводятся, как результат поиска.

Принципиальной новинкой программы AMDIS перед стандартными программами идентификации является возможность одновременного использования нескольких параметров идентификации (масс-спектр и индексы удерживания, масс-спектр и относительное время удерживания). Использование нескольких параметров идентификации основано на принципе штрафных вычетов из основного параметра идентификации (соответствия по масс - спектру) определенной величины, когда другие параметры идентификации (индекс удерживания, относительное время удерживания) не попадают в допустимый интервал. Одновременное использование нескольких параметров значительно улучшает качество идентификации. Однако для использования этих возможностей программы необходимо внести в специализированные библиотеки данные о стандартах (например времена удерживания n-алканов).

Поиск целевых соединений по хроматограммам характеристических ионов с использованием программного обеспечения ChemStation фирмы Agilent Technologies

Автоматический библиотечный поиск на необработанных хроматограммах не всегда обнаруживает анализируемые соединения, так как в экстракте мочи после кислотного гидролиза или гнилостной крови присутствует много эндогенных веществ, которые дают значительный фон на хроматограмме, что затрудняет библиотечный поиск. Для уменьшения предела обнаружения и повышения надежности идентификации анализируемых веществ в сложных биологических матрицах необходим целевой поиск пиков контролируемых веществ на хроматограммах. Нами применялся визуальный поиск по хроматограммам характеристических ионов, построенным в определенном временном интервале. Основная проблема данного подхода - определение времен удерживания

контролируемых соединений, так как не все они имеются в наличии, особенно это касается метаболитов и их производных.

Для расчета времен удерживания контролируемых соединений в конкретных газохроматографических условиях нами использовалась аппроксимация связи между известными индексами удерживания соединений для неподвижной фазы типа HP-1 (100% диметилполисилоксан) [6], и временами удерживания на фазе типа HP-5 (5% фенил-95% диметилсилоксан). Для получения уравнения связи между перечисленными выше параметрами при данных газохроматографических условиях анализировалась смесь из 30 реперных лекарственных веществ. Далее, программа на языке «Visual basic» вычисляла по методу наименьших квадратов коэффициенты полинома n-ной степени (обычно наименьшие ошибки аппроксимации получались при степени полинома равной 4), ошибку аппроксимации (среднеквадратичное отклонение - СКО) и доверительный интервал времени удерживания, внутри которого с вероятностью 95% находится истинное время удерживания. В результате получался полином вида: $\tau = \sum A_i * RI^n$, где τ - время удерживания соединения при данных ГХ условиях, A_i - коэффициенты полинома, а RI – индексы удерживания на фазе типа HP-1 (100% диметилсилоксан) по которому рассчитывались времена удерживания всех интересующих соединений по известному индексу удерживания. Одно из полученных уравнений связи имеет вид:

$$\tau (\text{мин}) = 10,37 - 0,0197 * RI + 1,70 * 10^{-5} * RI^2 - 5,15 * 10^{-9} * RI^3 + 5,94 * 10^{-13} * RI^4$$

с СКО равным 0,126 мин и доверительным интервалом 0,38 мин.

Используя базу данных по индексам удерживания библиотеки PMW_TOX2 вычислялись времена удерживания интересующих нас токсикантов и с помощью программного обеспечения ChemStation составлялись макрокоманды для визуального поиска индивидуальных соединений по их характеристическим ионам с окном поиска по времени удерживанию равным доверительному интервалу, т.е. $\pm 0,4$ мин. Визуальный поиск по характеристическим ионам является самым надежным, хотя и самым трудоемким из предлагаемых методов поиска пиков токсикантов на хроматограммах ГХ/МС.

Описанная выше дублирующая система поиска пиков потенциальных токсикантов, используемая последние несколько лет в Челябинском областном бюро СМЭ и в Челябинском областном токсикологическом центре, хорошо себя зарекомендовала при скрининге биологических жидкостей на наличие наркотических, психотропных и сильнодействующих лекарственных веществ, проводимым методом ГХ/МС.

Литература

1. Мелентьев А.Б., Ким Д.Г. // Изв. Челябинского научного центра УрО РАН – 2003. - №1. - С.1-6.
2. Мелентьев А.Б. Латышева Г.А. Материалы 6-го всероссийского съезда судебных медиков. Москва - Тюмень Издат. Центр "Академия", 2005. С.196-197.
3. Maurer H.H. // Journal of Chromatography B. - 1992. - Vol. 580. - №1. - P. 3-41.
4. Maurer H.H., Tauvel F.X., Kraemer T. // Journal of Analytical Toxicology – 2001. – Vol.25. - № 4. - P. 237-245.
5. Mjos S.A // Analytica Chimica Acta. – 2003. – Vol. 488. - № 2.- P. 231-241.
6. Pflieger K., Maurer H.H., Weber A. / Mass Spectral Library of Drug, Poisons, Pesticides, Pollutants and their Metabolites, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, - 1999.
7. Sachs H., Kintz P. // Journal of Chromatography B. - 1998. - Vol. 713. - №1. - P. 147-161.
8. Solans A., Cornicero M., de la Torre R., Segura J. // Journal of Analytical Toxicology – 1995. – Vol.19. - № 2. - P. 104-114.