

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© УКОЛОВ А.И., 2022

Уколов А.И.

Масс-спектрометрия низкого разрешения в метаболическом профилировании биологических образцов. Совершенствование метода

ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская область, Российская Федерация

Введение. Внедрение метаболомных подходов в практику токсикологических исследований, а также расширение методических возможностей лаборатории по определению низкомолекулярных, метаболических биомаркеров эффекта позволяет более эффективно проводить обнаружение и идентификацию новых биомаркеров. *Цель работы* – разработка методических подходов к метаболическому профилированию биологических образцов методом ГХ-МС низкого разрешения.

Материал и методы. Для метаболического профилирования образцов плазмы крови и мочи использовали газовые хроматомасс-спектрометры Shimadzu QP2010plus или Agilent 5975C. Для обработки результатов применяли оптимизированные базы аналитических характеристик эндогенных соединений и систему AMDIS, для идентификации обнаруженных соединений использовали NIST/EPA/NIH 2020. Статистическую обработку осуществляли с помощью «STATISTICA».

Результаты. Разработана двухстадийная процедура подготовки образцов плазмы крови и мочи для анализа методом ГХ-МС, подобрана смесь внутренних стандартов, определен перечень соединений – эндогенных метаболитов, оценены метрологические характеристики их определения. База данных масс-спектров ионизации электронами и газохроматографических индексов удерживания компонентов метаболического профиля плазмы крови крыс была зарегистрирована (Свидетельство о регистрации базы данных 2021622005 от 23.09.2021).

Ограничения исследования. Перечень аналитов, пригодных для определения методом газовой хроматографии, ограничен летучими и условно летучими соединениями.

Заключение. Использование оптимизированной базы данных метаболитов образца, подготовленного к анализу по стандартизированной процедуре, позволяет отфильтровать аналиты с низкой воспроизводимостью. Небольшие (до 100) базы хроматоспектральных данных позволяют повысить надежность идентификации, исключить влияние дрейфа времен удерживания, и в результате повысить статистическую мощность всего эксперимента, без увеличения количества лабораторных животных.

Ключевые слова: газовая хроматография; масс-спектрометрия; нецелевая метаболомика; токсикометаболомика; кровь; моча

Соблюдение этических стандартов. Заключение ЛЭК №2 от 03.09.2018 г. Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180–230 г (если не указано иное). Условия содержания экспериментальных животных соответствовали «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (GLP)».

Для цитирования: Уколов А.И. Масс-спектрометрия низкого разрешения в метаболическом профилировании биологических образцов. Совершенствование метода *Токсикологический вестник*. 2022; 30(3): 139-148. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2022-30-3-139-148>

Для корреспонденции: Уколов Антон Игоревич, кандидат химических наук, заместитель заведующего отделом токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская область. E-mail: Ukolov.ai@gpRech.ru

Благодарности. Особую благодарность автор выражает профессору СПбГУ Зенкевичу Игорю Георгиевичу за множество ценных замечаний, способствовавших улучшению изложения.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила в редакцию: 12 апреля 2022 / Принята в печать: 25 мая 2022 / Опубликовано: 30 июня 2022

ORIGINAL STUDY

Ukolov A.I.

Low-resolution GC-MS in metabolic profiling of biological samples with the mass spectrometry. Updating of the method

FSUE "Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology", FMBA of Russia, g.p. Kuzmolovskii, 188663, Leningrad region, Russian Federation

Introduction. The introduction of metabolomic approaches into the practice of toxicological studies, as well as the expansion of the methodological capabilities of the laboratory for the determination of low-molecular, metabolic biomarkers of the effect, makes it possible to more effectively detect and identify new biomarkers.

Material and methods. For metabolic profiling of blood plasma and urine samples, Shimadzu QP2010plus or Agilent 5975C gas chromatomass spectrometers were used. The results were processed using optimized databases of analytical characteristics of endogenous compounds and the AMDIS system; NIST/EPA/NIH 2017 was used to identify the detected compounds. Statistical processing was performed using Statistica.

Results. A two-stage procedure for preparing blood plasma and urine samples for analysis by GC-MS was developed, a mixture of internal standards was selected, a list of compounds – endogenous metabolites was determined, and the metrological characteristics of their determination were evaluated.

Limitations. The list of analytes suitable for determination by GC-MS is limited to volatile and conditionally volatile compounds.

Conclusion. Using an optimized database of sample metabolites prepared for analysis according to a standardized procedure allows filtering out analytes with low reproducibility. Small (up to 100) chromatographic databases make it possible to increase the reliability of identification, eliminate the effect of retention time drift, and, as a result, increase the statistical power of the entire experiment without increasing the number of laboratory animals.

Keywords: GC-MS; untargeted metabolomics; toxicometabolomics; blood, urine

Compliance with ethical standards. LEK Conclusion No. 2 dated 03.09.2018. Experiments were carried out on white mongrel male rats weighing 180–230 g (unless otherwise indicated). The conditions of keeping experimental animals corresponded to the "Rules of Laboratory Practice in the Russian Federation (GLP)".

For citation: Ukolov A.I. Low-resolution GC-MS in metabolic profiling of biological samples. Updating of the method. *Toksikologicheskii vestnik (Toxicological Review)*. 2022; 30(3): 139-148. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2022-30-3-139-148> (In Russian)

For correspondence: Ukolov Anton Igorevich, PhD, deputy head of toxicological department FSUE "Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology", FMBA of Russia, g.p. Kuzmolovskii, 188663, Leningrad region, Russian Federation. E-mail: Ukolov.ai@gpech.ru

Information about the authors:

Ukolov A.I., <https://orcid.org/0000-0002-2911-1260>

Scopus Author ID: 25321116600; ResearcherID: S-2545-2016

Acknowledgements. The author expresses special gratitude to the Professor of St. Petersburg State University Igor Georgievich Zenkevich for many valuable comments that contributed to the improvement of the presentation.

Conflict of interests. Author declare no conflict of interests.

Funding. The study had no funding.

Received: April 12, 2022 / Accepted: May 25, 2022 / Published: June 30, 2022

Введение

Последние достижения в метаболическом профилировании могут предложить возможность идентификации как специфичных биомаркеров эффекта, так и более сложных паттернов изменений, дающих новые знания о механизмах токсического действия и являющихся так называемыми сигнатурами токсичности. Выбор инструментальных методов довольно широк и включает ЯМР-спектроскопию на различных ядрах (^1H , ^{13}C , ^{31}P и пр.), ВЭЖХ-МС и ГХ-МС (высокого и низкого разрешения) [1]. Выбор метода зависит от целей исследования и имеет ограничения, так ГХ-МС позволяет проводить определение метаболитов с молекулярными массами до 1 кДа, однако относительно низкая цена одноквадрольных масс-селективных детекторов низкого разрешения и их широкое распространение в токсикологических и наркологических лабораториях, в отличие от ЯМР-спектрометров и масс-спектрометров высокого разрешения, определяет актуальность использования такого инструментального обеспечения.

Зачастую, полный набор аналитических стандартов компонентов метаболических профилей обычно недоступен*, поэтому нецелевое метаболическое профилирование происходит в режиме так называемой «безэталонной идентификации», что позволяет унифицировать подходы, применяемые к метаболическому профилированию и к систематическому токсиколого-аналитическому скринингу. При этом, несмотря на большое количество известных баз данных метаболитов (HMDB, KEGG, LipidMaps, ChEBI, MMCD, Metlin, MassBank и пр.), в одном образце зачастую может быть идентифицировано только 10–30% аналитов. Наиболее «проблемным», с точки зрения идентификации, классом соединений в образцах являются углеводы [2]. При использовании метода ГХ-МС многие сахара имеют близкие времена удерживания и масс-спектры без характеристических особенностей, отличающиеся только соотношением интенсивностей, поэтому их надежная безэталонная идентификация возможна только с привлечением газохроматографических индексов удерживания. Например, полиолы (инозитолы или гексагидроксициклогексаны), шестиатомные сахарные спирты имеют девять возможных изомеров, среди которых основной биогенный —

мио-инозитол, а *цилло*-, *эпи*-, *нео*-, *хиро*-, *муко*-инозитол присутствуют в организме человека в малых количествах [3]. Индексами удерживания (ИУ) охарактеризованы только *мио*-инозитол 2122 ± 2 ед.инд., *мезо*-инозитол — 2154, *хиро*-инозитол 2011, 2022, *цилло*-инозитол — 2090. Два изомера охарактеризованы ИУ, но не отнесены к конкретным стереоизомерам — 2000 и 1872 ед. инд. Определение большей части полиолов обычно не проводится, а наиболее изученными являются глицерин, *мио*-инозитол и сорбит, которые играют важную роль в физиологии [4, 5]. Другие полиолы изучены менее полно [6], однако многие из них имеют диагностическую значимость, например соотношение концентраций *мио*- и *хиро*-инозитолов является маркером инсулинорезистентности [7, 8].

В данной работе представлены результаты разработки двухстадийной процедуры подготовки образцов плазмы крови, мочи для анализа методом ГХ-МС, подбора смеси внутренних стандартов, определения и идентификации перечня соединений — эндогенных метаболитов и оценки метрологических характеристик их определения.

В итоговую версию базы данных вошли следующие классы соединений: аминокислоты, карбоновые кислоты (моно-, ди-, три-, гидроксид- и кето-), фосфаты, азотсодержащие соединения, N-производные глицина, азотсодержащие кислоты, дисахариды, стеролы, моносахариды, полиатомные спирты и альдоновые кислоты.

Использование разработанной базы данных позволяет значительно упростить метаболическое профилирование с использованием квадрупольной ГХ-МС, которая, в свою очередь, уменьшает стоимость исследования. Предлагаемый подход позволяет заранее провести идентификацию компонентов, составляющих метаболический профиль и провести отнесение хроматографических пиков.

Материал и методы

Для метаболического профилирования образцов плазмы крови и мочи использовали газовый хромато-масс-спектрометр Shimadzu QP2010plus или Agilent7890 с масс-спектрометром Agilent 5975C и капиллярной колонкой HP-5MS, $60 \text{ м} \times 250 \text{ мкм} \times 0,25 \text{ мкм}$.

В качестве исходной методики подготовки биологических образцов для анализа нами был выбран широко применяющийся метод с двухстадийной дериватизацией метоксиамином и силилирующим агентом [9, 10].

* Тем не менее попытки создать большие смеси стандартов предпринимались, см., например, «NIST Standard Reference Material for Human Plasma (SRM 1950)».

Таблица 1 / Table 1

Условия газохроматографического разделения и масс-селективного детектирования при нецелевом метаболическом профилировании
Conditions for Gas Chromatography Separation and Mass Selective Detection in Non-Targeted Metabolic Profiling

Условия анализа	Характеристики
Газ-носитель	Гелий газообразный высокой чистоты марки 6,0, объемная доля гелия не менее 99,9999 % об.
Режим ввода пробы	Объем пробы 1 мкл, без деления потока (1 мин), под давлением 69 кПа
Температурный режим термостата колонки	1 мин при температуре 40°C, затем подъем до 280°C со скоростью 10°C/мин, затем 35 мин при конечной температуре
Температура инжектора	250°C
Объемная скорость газа-носителя через колонку	1 мл/мин
Режим работы масс-спектрометра	Ионизация электронами с энергией 70 эВ. Температура источника ионов: 280°C. Температура интерфейса: 280°C. Масс-селективное детектирование в режиме регистрации полного ионного тока в диапазоне m/z от 40 до 600

В пробах мочи предварительно проводили ферментативный гидролиз избытка мочевины с использованием уреазы. В пробирку для центрифугирования объемом 2 мл вносили 400 мкл плазмы крови (EDTA-K₃), или 0,4 мл мочи, 10 мкл смеси внутренних стандартов (3-фторбензойной, 4-диметиламиномасляной и пальмитиновой-d₃₁ кислот) и 1,2 мл MeOH, затем тщательно встряхивали в течение 5 мин и центрифугировали 15 мин при 14000 об/мин.

Супернатант объемом 1 мл отделяли и переносили в хроматографическую виалу объемом 2 мл, затем упаривали досуха под током азота при комнатной температуре. Затем к сухому остатку прибавляли 50 мкл раствора метоксиамина в пиридине (15 мг/мл) и выдерживали в темноте при комнатной температуре в течение 16 ч. Полученный раствор упаривали досуха и к остатку добавляли 50 мкл БСТФА, затем выдерживали 30 мин при 70 °С. Перед анализом раствор охлаждали до комнатной температуры. Условия газохроматографического разделения и масс-селективного детектирования приведены в табл. 1.

Для обработки результатов, полученных методом ГХ-МС, применяли оптимизированные базы хромато-масс-спектрометрических характеристик эндогенных соединений и систему автоматической идентификации и деконволюции (AMDIS). Дискриминантный анализ полученных данных проводили методом PLS-DA. При идентификации обнаруженных соединений использовали базы данных NIST/EPA/NIH 2014, GOLMMETABOLOMDATABASE, MetLin.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью прикладного пакета программ Statistica (версия 6.0, StatSoft Inc, США, 2001) и Microsoft Excel 2007 с дополнением Multibase 2015. Для выявления взаимосвязей между изучаемыми показателями вычисляли коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для всех видов анализа статистически значимыми по сравнению с контролем считали значения с $p < 0,05$.

Результаты

В табл. 2–4 приведены относительные стандартные отклонения площадей хроматографических пиков в контрольных образцах крови и мочи, а также газохроматографические ИУ, рекомендуемые внутренние стандарты для каждого соединения, оценка статистической мощности при числе животных в каждой группе (6 и 8).

При вычислении справочных значений индексов не были учтены ИУ соединений в базе данных NIST, которые нельзя отнести к конкретному изомеру: *син-* или *анти-*, *альфа-* или *бета-*.

В табл. 3 приведены результаты оценки воспроизводимости определения некоторых отдельных классов соединений, не включённых в табл. 2: моносахариды, альдоновые кислоты и полиатомные спирты. Выделение их в отдельную таблицу связано с затруднениями, возникающими при их отнесении и идентификации.

Таблица 2 / Table 2

Перечень соединений, определяемых в плазме крови при нецелевом метаболическом профилировании методом ГХ-МС**List of compounds determined in blood plasma during non-targeted metabolic profiling by GC-MS**

Химический класс	Название	ИУ, ед. инд	ISTD	s _r , %	1-β, %	
					n = 8	n = 6
Аминокислоты	Аланин	1141	ДМАБ	60	34	26
	Лейцин	1183	ДМАБ	77	20	16
	2-Аминомасляная кислота	1176	ДМАБ	14	99	99
	Валин	1222	ДМАБ	6	99	99
	Норлейцин	1279	ДМАБ	5	99	99
	Изолейцин	1303	ДМАБ	36	69	55
	Пролин	1311	ДМАБ	16	99	99
	Глицин	1320	ДМАБ	22	98	92
	Серин	1367	ДМАБ	24	96	89
	Треонин	1394	ДМАБ	8	99	99
	Пироглутаминовая кислота	1510	ДМАБ	34	75	61
	Аспарагиновая кислота	1527	ДМАБ	24	68	57
	Метионин	1531	ДМАБ	63	31	23
	Аспарагин	1606	ДМАБ	17	99	99
	Глутаминовая кислота	1626	ДМАБ	39	63	49
	Тирозин	1909	ДМАБ	54	40	30
	Триптофан	2238	ДМАБ	27	94	77
Фенилаланин	1646	ДМАБ	42	57	44	
Гидроксикарбоновые кислоты	Молочная кислота	1061	ФБ	18	99	99
	2-Гидроксимасляная кислота	1130	ФБ	13	99	99
	3-Гидроксимасляная кислота	1162	ФБ	9	99	99
	2-Гидроксиизовалериановая кислота	1169	ФБ	14	99	99
	3-Гидроксиизовалеривановая кислота	1213	ФБ	16	99	99
Кетокислоты	2-Кетоизокапроновая кислота	1217	ФБ	13	99	99
	Ацетоуксусная кислота	1300	ФБ	11	99	99
	Пировиноградная кислота	1048	ФБ	37	68	54
Дикарбоновые кислоты	Метилантарная кислота	1330	ФБ	89	14	12
	Щавелевая кислота	1105	ФБ	24	84	61
	Малоновая кислота	1206	ФБ	8	99	99
	Янтарная кислота	1317	ФБ	21	99	97
	Адипиновая кислота	1506	ФБ	24	61	48
	Глутаровая кислота	1404	ФБ	74	22	18
	Фумаровая кислота	1346	ФБ	26	93	83
Яблочная кислота	1493	ФБ	24	96	87	
Трикарбоновые кислоты	Лимонная кислота	1836	ФБ	20	98	96
Монокарбоновые кислоты	Изовалериановая кислота	924	ПК	65	29	22
	Гексановая кислота	1071	ПК	38	65	52
	Стеариновая кислота	2234	ПК	23	98	89
	Арахидоновая кислота	2383	ПК	53	41	31
	Гептадекановая кислота	2138	ПК	45	52	40
Монокарбоновые кислоты	Додекановая кислота	1653	ПК	15	99	99
	Пальмитолеиновая кислота	2029	ПК	12	99	99
	Тетрадекановая кислота	1850	ПК	26	98	81
	Z,Z-Октадека-9,12-диеновая кислота	2210	ПК	6	99	99
	цис-Октадец-9-еновая кислота	2213	ПК	9	99	99
	транс-Октадец-9-еновая кислота	2219	ПК	12	99	99
	Пальмитиновая кислота	2045	ПК	16	99	99
Фосфаты	Фосфорная кислота	1286	ПК	25	99	99
	Пирофосфорная кислота	1632	ПК	24	99	89
	Глицерол-3-фосфат	1776	ПК	18	99	99
Азотсодержащие соединения	Мочевина	1246	ДМАБ	25	95	85
	Креатинин	1577	ДМАБ	33	78	63
N-производные глицина	N-ацетилглицин	1290	ФБ	46	52	40
	N-формилглицин	1383	ФБ	47	49	38
Азотсодержащие кислоты	Никотиновая кислота	1335	ДМАБ	71	24	19
	Пипеколиновая кислота	1343	ДМАБ	117	3	10
	Индолпропионовая кислота	2110	ДМАБ	96	10	8
	Индолмолочная кислота	2205	ДМАБ	19	99	98
Дисахариды	Сукроза	2726	ФБ	55	39	29
Стероиды	Холестерол	3335	ПК	10	99	99

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4: ISTD – внутренние стандарты: ДМАБ – 4-диметиламинобензойная кислота; ФБ – 3-фторбензойная кислота; ПК – пальмитиновая кислота d31. 1-β – см. комментарии в тексте.

Таблица 3 / Table 3

Дополнительный перечень соединений, определяемых в плазме крови при нецелевом метаболическом профилировании методом ГХ-МС
Additional list of compounds determined in blood plasma during non-targeted metabolic profiling by GC-MS

Химический класс	Соединение, форма (изомер)	ИУ, ед. инд.	Справочные* ИУ, ед. инд.	ISTD	s _{rr} , %	1-β, %	
						n = 8	n = 6
Моносахариды:							
Рибоза	Рибоза (син+анти)	1679	1680±11	ПК	31	82	67
	α-Рибофураноза	1653	1677 ^{ЕА}	ПК	32	79	64
Галактоза	Галактоза (анти)	1909	1892±6	ПК	16	84	71
	Галактоза (син)	1932	1892±23	ПК	–	–	–
	α-Галактопираноза	1915	1877±26	ПК	–	–	–
Глюкоза	Глюкоза (анти)	1924	1901±32	ПК	180	8	7
	Глюкоза (син)	1947	1894±11	ПК	118	11	9
	α-Глюкопираноза	1953	1902±31	ПК	19	99	99
	β-Глюкопираноза	1995	1944±23	ПК	64	30	23
Фруктоза	Фруктоза (анти)	1845	1875	ПК	–	–	–
Полиатомные спирты	2,3-бутандиол	1026	1040±12	ПК	–	–	–
	Глицерин	1279	1292±7	ПК	–	–	–
	Треитол (эритритол)	1516	1507±20	ПК	20	98	97
	Арабитол	1739	1740±27 ^С	ПК	31	82	67
	Неидентиф 3-дезоксипентитол	1828	К	ПК	–	–	–
	1,5-Ангидроглюцитол	1876	1881	ПК	16	99	99
	Галактитол	1966	1956±34 ^С	ПК	37	69	55
	Маннитол	1974	1969±23 ^С	ПК	58	35	27
	Хиро-инозитол	2001	2017±8	ПК	–	–	–
	Сцилло-инозитол	2087	2090	ПК	–	–	–
	Мио-инозитол	2125	2136±12 ^С	ПК	38	65	52
Альдоновые кислоты	Глицериновая кислота	1337	1342±5	ФБ	17	99	99
	Гликолевая кислота	1075	1076±4	ФБ	16	99	99
	4-Дезоксиэритроновая кислота	1363	1362±3	ФБ	16	99	99
	3-Дезокситетроновая кислота	1416	1429±3	ФБ	40	61	48
	2-Дезокситетроновая кислота	1435	1448±6	ФБ	27	95	78
	Треоновая кислота	1535	1523	ФБ	17	99	99
	Эритроновая кислота	1570	1571±7	ФБ	24	99	89
	2-Дезоксирибоновая кислота	1666	1682	ФБ	27	95	79
	Рибоновая кислота	1803	1799	ФБ	50	46	35
Глюконовая кислота	2040	2026±25	ФБ	21	99	96	
Неидентифицированные	m/z 361	1980	–	–	–	–	–
	m/z 361	1997	–	–	–	–	–
	m/z 205	1894	–	–	–	–	–
	m/z 205	1904	–	–	–	–	–

Примечание. * — значения справочных ИУ приведены в виде среднее ± СКО; ^{ЕА} — единственное значение; ^С — подтверждено стандартом; К — идентифицирован с точностью до класса.

Таблица 4 / Table 4

Перечень соединений, определяемых в моче при нецелевом метаболическом профилировании методом ГХ-МС**List of compounds determined in urine by non-targeted metabolic profiling by GC-MS**

Химический класс	Название	ИУ, ед. инд	ISTD	s _r , %	1-β, %*	
					n = 8	n = 6
Аминокислоты	Аланин	1141	ДМАБ	70	25	20
	Валин	1222	ДМАБ	18	99	99
	Норлейцин	1279	ДМАБ	20	99	96
	Изолейцин	1303	ДМАБ	42	58	45
	Пролин	1311	ДМАБ	12	99	99
	Глицин	1320	ДМАБ	29	89	73
	Серин	1367	ДМАБ	30	86	70
	Треонин	1394	ДМАБ	13	99	99
	Аспарагиновая кислота	1527	ДМАБ	28	92	76
	Метионин	1531	ДМАБ	91	13	12
	Глутаминовая кислота	1626	ДМАБ	41	60	47
	Тирозин	1909	ДМАБ	78	20	16
	Триптофан	2238	ДМАБ	35	72	58
	Фенилаланин	1646	ДМАБ	53	41	32
	3-Аминоизомасляная кислота	1231	ДМАБ	40	61	48
N,N-диметилглицин	981	ДМАБ	28	92	76	
Гидроксикарбоновые кислоты	Молочная кислота	1061	ФБ	28	92	76
	2-Гидроксимасляная кислота	1130	ФБ	15	99	99
	3-Гидроксимасляная кислота	1162	ФБ	9	99	99
	2-Гидроксиизовалериановая кислота	1169	ФБ	16	99	99
	3-Гидроксиизовалеривановая кислота	1213	ФБ	23	98	91
	2-Метил-3-гидроксимасляная кислота	1288	ФБ	27	95	79
	5-Гидроксигексановая кислота	1356	ФБ	14	99	99
	Гомованилиновая кислота	1769	ФБ	25	95	85
	4-Гидроксиминдальная кислота	1783	ФБ	14	99	99
	Аскорбиновая кислота	1902	ФБ	25	95	85
	Кофейная кислота	2159	ФБ	32	80	65
Кетокислоты	2-Кетоизокапроновая кислота	1217	ФБ	17	99	99
	Ацетоуксусная кислота	1300	ФБ	16	99	99
	Пировиноградная кислота	1048	ФБ	51	44	34
	3-Метил-2-кетовалериановая кислота	1258	ФБ	23	97	91
	2-Кетоглутаровая кислота	1572	ФБ	27	95	79
Дикарбоновые кислоты	Метилантарная кислота	1330	ФБ	130	4	2
	Щавелевая кислота	1105	ФБ	36	70	56
	Малоновая кислота	1206	ФБ	12	99	99
	Янтарная кислота	1317	ФБ	22	98	92
	Адипиновая кислота	1506	ФБ	25	95	85
	Глутаровая кислота	1404	ФБ	100	9	9
	Фумаровая кислота	1346	ФБ	39	63	50
	3-Метилглутаконовая кислота	1436	ФБ	45	53	41
	Субериновая кислота	1579	ФБ	51	44	34
Яблочная кислота	1493	ФБ	30	86	70	

Продолжение таблицы 4 на стр. 146.

Продолжение таблицы 4. Начало на стр. 145.

Химический класс	Название	ИУ, ед. инд	ISTD	s _{rr} %	1-β, %*	
					n = 8	n = 6
Трикарбоновые кислоты	Лимонная кислота	1836	ФБ	24	96	88
	Метиляблочная кислота	1478	ФБ	21	98	96
	Аконитовая кислота	1748	ФБ	20	99	98
Монокарбоновые кислоты	Изовалериановая кислота	924	ПК	65	29	22
	Гексановая кислота	1071	ПК	38	66	52
	Стеариновая кислота	2234	ПК	23	97	91
	Арахидоновая кислота	2383	ПК	53	41	32
	Гептадекановая кислота	2138	ПК	45	53	41
	Додекановая кислота	1653	ПК	15	99	84
	Пальмитолеиновая кислота	2029	ПК	12	99	99
	Тетрадекановая кислота	1850	ПК	26	98	82
	Z,Z-октадека-9,12-диеновая кислота	2210	ПК	10	99	99
	Цис-октадец-9-еновая кислота	2213	ПК	12	99	99
	Транс-октадец-9-еновая кислота	2219	ПК	12	99	99
	Пальмитиновая кислота	2045	ПК	16	99	99
	Фосфаты	Фосфорная кислота	1286	ПК	25	99
Пирофосфорная кислота		1632	ПК	24	96	88
Глицерол-3-фосфат		1776	ПК	18	99	99
Азотсодержащие соединения	Мочевина	1246	ДМАБ	25	99	85
	Креатинин	1577	ДМАБ	33	77	62
	Урацил	1346	ДМАБ	34	75	60
	Тимин	1403	ДМАБ	27	95	79
	Дигидротимин	1493	ДМАБ	31	83	67
	Цитозин	1534	ДМАБ	19	99	97
	5-Гидроксииндол	1709	ДМАБ	29	89	73
N-производные глицина	N-ацетилглицин	1290	ФБ	63	31	24
	N-формилглицин	1383	ФБ	56	38	29
	N-изовалерионилглицин	1491	ФБ	66	28	22
	Гиппуровая кислота	1845	ФБ	93	12	11
	4-Гидроксигиппуровая кислота	2246	ФБ	0	-	-
Азотсодержащие кислоты	Никотиновая кислота	1335	ДМАБ	38	66	52
	Пипеколиновая кислота	1343	ДМАБ	177	8	7
	Индолпропионовая кислота	2110	ДМАБ	82	17	15
	Индолмолочная кислота	2205	ДМАБ	25	99	85
	3-Уреидопропионовая кислота	1663	ДМАБ	92	12	11
	Мочевая кислота	2146	ДМАБ	96	11	10
Моносахариды	Рибоза (2 изомера)	1679	ПК	25	99	85
	Галактоза (анти)	1909	ПК	18	99	98
Альдоновые кислоты	Глюконовая кислота	2040	ФБ	19	99	97
	Галактаровая кислота	1870	ФБ	35	72	58
	Эритроновая кислота	1570	ФБ	41	60	47
	2-Дезокситетроновая кислота	1435	ФБ	28	92	76
	4-Дезоксиэритроновая кислота	1363	ФБ	22	99	94
	Глицериновая кислота	1337	ФБ	25	99	85
Полиатомные спирты	Мио-инозитол	2125	ПК	59	35	27
	Галактитол	1966	ПК	55	39	30
	Маннитол	1974	ПК	71	24	19
	Арабитол	1739	ПК	52	43	33
	1,5-Ангидроглюцитол	1876	ПК	20	99	98

Из табл. 4, помимо неидентифицированных, в заключительную версию оптимизированной базы данных, не вошли: фруктоза, галактоза (*син-*) и α -галактопираноза. Глюкоза, основной моносахарид крови, требует специальной подготовки крови, включающей ингибирование ферментов эритроцитов. Кроме того, перегруженный пик цепной формы глюкозы имеет крайне низкую воспроизводимость. Благодаря стадии метоксимирования можно пренебречь циклическими формами моносахаридов и не учитывать их при дальнейшей обработке данных.

Обсуждение

Работа по оптимизации методики нецелевого метаболического профилирования была выполнена в 4 этапа:

- Создание оптимизированных баз данных.
- Идентификация и отнесение пиков.
- Подбор внутренних стандартов для количественного анализа.
- Вычисление статистической мощности эксперимента.

Рассмотрим подробнее методику создания и оптимизации соответствующих баз данных. Для создания перечня метаболитов в плазме крови крыс, включенных в базу данных (БД), была проведена предварительная фильтрация и оптимизация. Оптимизация включала в себя следующие стадии:

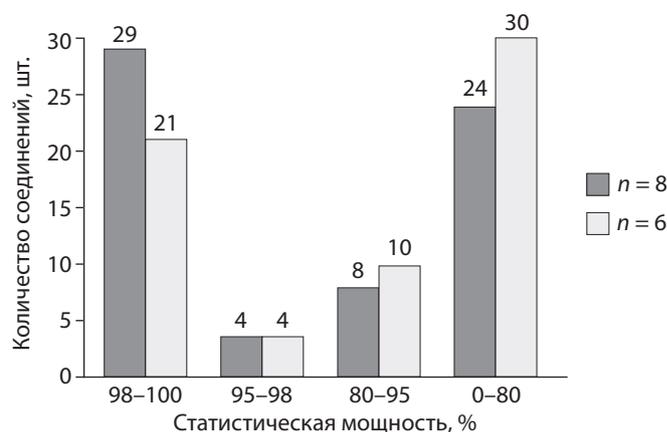
Предварительную деконволюцию масс-хроматограмм и «разметку» хроматографических пиков.

Первый этап оптимизации: исключение пиков по отношению сигнал/шум, площади и пр.

Применение созданной БД к 10 масс-хроматограммам, полученным при анализе одной той же аликвоты образца (погрешность ГХ-МС-анализа).

Применение созданной БД к 10 масс-хроматограммам, полученным при анализе различных аликвот одного образца (погрешность подготовки проб). Результаты идентификации инозитолов приведены в табл. 2 в объединенном виде с другими полиатомными спиртами: 2,3-бутандиолом, глицерином и пр. Среди изомеров инозитола обнаружены хиро-, сцилло- и мио-инозитол. Согласно литературным данным, эти изомеры присутствуют в крови в следующих концентрациях: *мио*-инозитол $23,0 \pm 8,0$ мкМ, *сцилло*-инозитол $0,026$ ($0,0026$ – $0,321$) мкМ, а для *хиро*-инозитола не удалось обнаружить справочных данных по его содержанию в крови.

Важный аспект дизайна токсикологического исследования — определение количества животных (или добровольцев) в группах [11]. Размер



Результаты оценки статистической мощности при нецелевом метаболическом профилировании образцов плазмы крови методом ГХ-МС.

Statistical power estimation results for non-targeted metabolic profiling of blood plasma samples by GC-MS.

группы или выборки тесно связан с понятием статистической мощности и, соответственно, с вероятностью ошибок II рода [12]. Размер выборки зависит от различных факторов, таких как: минимальный ожидаемый эффект, вариация измерений, желаемая статистическая мощность, уровень значимости и тип статистического теста [13, 14]. Недостаточный размер выборки может привести к высокой вероятности ложноотрицательных результатов, в противоположность этому, излишний размер выборки может привести к нерациональному использованию экспериментальных животных.

В ходе выполнения настоящего исследования нами была оценена статистическая мощность нецелевого метаболического профилирования различных видов биологических образцов. Мощность эксперимента вычислена с помощью ПО G POWER v. 3.1 для двух групп животных (контрольной и экспериментальной) по 6 и 8 особей. За ожидаемые изменения концентрации биомаркеров принимали изменения в 1,5 раза, минимальное значение p принимали = 0,05 для критерия Манна–Уитни для двухстороннего распределения. Количество животных в группах определено с учетом реально достижимого размера экспериментальных групп лабораторных животных. Минимальной достаточной мощностью для исключения ошибок II рода считали 80%, которая позволяет судить об отсутствии влияния химического фактора на метаболические профили. На рисунке приведены результаты оценки статистической мощности при нецелевом метаболическом профилировании образцов плазмы крови методом ГХ-МС.

Показаны количества соединений, для которых возможна ошибка II рода при обнаружении статистически значимых изменений концентраций потенциальных биомаркеров эффекта. Обоснование размера выборки для нецелевого метаболического профилирования с позиций статистической мощности выполнено впервые.

Заключение

1. Для эффективного использования результатов, полученных с использованием газовых хромато-масс-спектрометров с одним квадрупольным масс-анализатором предложен новый подход, заключающийся в создании оптимизированных баз хромато-масс-спектрометрических характеристик эндогенных соединений. В результате проведенной оптимизации нами были подготовлены две базы данных для открытого ПО AMDIS 2,66, характеризующих метаболические профили плазмы крови и мочи крыс. База данных масс-спектров ионизации электронами и газохроматографических индексов удерживания компонентов метаболического профиля плазмы

крови крыс была зарегистрирована (Свидетельство о регистрации базы данных 2021622005 от 23.09.2021).

2. Выделение в отдельные базы данных масс-спектров ионизации электронами и газохроматографических индексов удерживания аналитов, составляющих метаболические профили, повышает эффективность применения газовой хроматографии с масс-селективным детектированием низкого разрешения для метаболического профилирования плазмы крови, мочи, органов и тканей [16, 17]. Для минимизации ошибок II рода при количественном определении потенциальных биомаркеров проведено обоснование необходимого размера экспериментальной выборки биологических образцов при определении различных биомаркеров.

3. Внедрение разработанной методики в практику экспериментальной токсикологии позволило получить новые знания о механизмах действия алифатических углеводородов [18], чрезвычайно опасных веществ, на примере RVX, хладона RL316 [19] и гидроксилamina [20].

ЛИТЕРАТУРА

(п. п. 2–15 см. References)

1. Гончаров Н.В., Уколов А.И., Орлова Т.И., Мигаловская Е.Д., Войтенко Н.Г. Метабомика: на пути интеграции биохимии, аналитической химии, информатики. *Успехи соврем. биол.* 2015; 135(1): 3–17.
16. Зенкевич И.Г., Уколов А.И., Кушакова А.С., Густылева Л.К. Возможности идентификации изомерных алкиларенов с использованием аддитивных схем оценки газохроматографических индексов удерживания. *Журнал аналитической химии.* 2011; 66(12): 1282–9.
17. Зенкевич И.Г., Уколов А.И. Кодирование особенностей структуры органических соединений для оценки хроматографических индексов удерживания с использованием аддитивных схем. *Журнал структурной химии.* 2010; 51(4): 671–81.
18. Уколов А.И., Кессених Е.Д., Радилов А.С., Гончаров Н.В. Токсикометабомика: поиск маркеров хронического воздействия низких концентраций алифатических углеводородов. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии.* 2017; 53(1): 24–32.
19. Уколов А.И., Шачнева М.Д., Радилов А.С. Идентификация биомаркеров экспозиции и эффекта 1,4-дихлоргексафторбутена-2. *Токсикологический вестник.* 2019; 4(157): 23–31.
20. Уколов А.И., Радилов А.С. Методология определения биомаркеров органических соединений с использованием хроматомасс-спектрометрии. *Медицина экстремальных ситуаций.* 2018; 20(3): 439–50.

REFERENCES

1. Goncharov N.V., Ukolov A.I., Orlova T.I., Migalovskaya E.D., Voitenko N.G. Metabolomics: On the Way to an In-tegration of Biochemistry, Analytical Chemistry, and Informatics. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 2015; 5(4): 296–307. (in Russian)
2. Kusmierz J., DeGeorge J.D., Sweeney D., May C., Rapoport S.I. Quantitative analysis of polyols in human plasma and cerebrospinal fluid. *J. Chromatogr.* 1989; 497: 39–48.
3. Michell R.H. Inositol and its derivatives: their evolution and functions. *Adv. Enzyme Regul.* 2011; 51(1): 84–90.
4. Garcia-Bunuel L., Garcia-Bunuel V.M. Cerebrospinal fluid levels of free myo-inositol in some neurological disorders. *Neurology.* 1965 Apr; 15: 348–50. <https://doi.org/10.1212/wnl.15.4.348>
5. Clement R. *Diabetes Mellitus and Obesity.* In B. Brodoff, S. Bleicher (Editors). Baltimore: Williams and Wilkins. 1982; 117.
6. Smith S.L., Novotny M., Karmen A. Elevation of certain polyols in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J. Chromatogr.* 1984; 336: 351–5.
7. Heimark D., McAllister J., Larner J. Decreased myo-inositol to chiro-inositol (M/C) ratios and increased M/C epimerase activity in PCOS theca cells demonstrate increased insulin sensitivity compared to controls. *Endocr. J.* 2014; 61(2): 111–7.
8. Jung T.S., Hahn J.R., Kim J.J., Jung J.H., Kang M.Y., Moon S.W. et al. Determination of Urinary Myo-/Chiro-Inositol Ratios from Korean Diabetes Patients. *Yonsei Med. J.* 2005; 46(4): 532–8.
9. Halket J.M., Waterman D., Przyborowska A.M., Patel R.K.P., Fraser P.D., Bramley P.M. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *J. Exp. Bot.* 2005; 56: 219–43.
10. A J., Trygg J., Gullberg J., Johansson A.I., Jonsson P., Antti H. et al. Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome. *Anal. Chem.* 2005; 77: 8086–94.
11. Blaise B.J. Data-Driven Sample Size Determination for Metabolic Phenotyping Studies. *Anal. Chem.* 2013; 85: 8943–50.
12. Eng J. Sample size estimation: how many individuals should be studied? *Radiology.* 2003; 227(2): 309–13.
13. Dell R.B., Holleran S., Ramakrishnan R. Sample Size Determination. *Inst. Lab. Anim. Res. J.* 2002; 43: 207–13.
14. Vinaixa M., Samino S., Saez I., Duran J., Guinovart J.J., Yanes O. A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS–Based Untargeted Metabolomics–Derived Data. *Metabolites.* 2012; 2: 775–95.
15. Hendriks M.M.W.B., Eeuwijk F.A. van, Jellema R.H., Westerhuis J.A., Reijmers T.H., Hoefsloot H.C.J. et al. *Data-processing strategies for metabolomics studies.* Trends Anal. Chem. 2011; 30: 1685–98.
16. Zенкевич И.Г., Уколов А.И., Кушакова А.С., Густылева Л.К. Идентификация изомерных алкиларенов с использованием аддитивных схем для оценки газ-хроматографических индексов удерживания. *Журнал Аналитической Химии.* 2011; 66(12): 1165–72. (in Russian)
17. Zенкевич И.Г., Уколов А.И. Кодирование структурных особенностей органических соединений для оценки хроматографических индексов удерживания с использованием аддитивных схем. *Журнал Структурной Химии.* 2010; 51(4): 642–51. (in Russian)
18. Ukolov A.I., Kessenikh E.D., Radilov A.S., Goncharov N.V. Toxicometabolomics: Identification of markers of chronic exposure to low doses of aliphatic hydrocarbons. *Zhurnal e'volucionnoy bioximii i fiziologii.* 2017; 53(1): 25–36.
19. Ukolov A.I., Shachneva M.D., Radilov A.S. Identification of biomarkers of exposure and effect of 1,4-dichlorohexafluorobutene-2. *Toksikologicheskii vestnik.* 2019; 4(157): 23–31. (in Russian)
20. Ukolov A.I., Radilov A.S. Metodologiya opredeleniya biomarkorov organicheskikh soedineniy s ispol'zovaniem hromatomass-spektrometrii. *Medicina ekstremalnykh situatsii.* 2018; 20(3): 439–50. (in Russian)

ОБ АВТОРЕ:

Уколов Антон Игоревич (Anton Igorevich Ukolov) – кандидат хим. наук, заместитель заведующего отделом токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, 188663, г.п. Кузьмоловский, Ленинградская область, Российская Федерация. E-mail: AntonUkolov@gmail.com