***WADA* tehniskais dokuments – TD2015IDCR**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Dokumenta numurs: | TD2015IDCR | Versijas numurs: | 1.0 |
| Sarakstījusi: | *WADA* Laboratoriju ekspertu grupa | Apstiprinājusi: | *WADA* izpildkomiteja |
| Apstiprināšanas datums: | 2015. gada 12. maijs | Spēkā stāšanās datums: | 2015. gada 1. septembris |

# MINIMĀLIE KRITĒRIJI ANALIZĒJAMO VIELU IDENTITĀTES APSTIPRINĀŠANAI AR HROMATOGRĀFIJAS MASSPEKTOMETRIJU DOPINGA KONTROLES VAJADZĪBĀM

Spēja ar metodi identificēt analizējamo vielu ir visas procedūras funkcija: parauga sagatavošana, hromatogrāfiskā nosķiršana, masas analīze un datu novērtēšana. Jebkurā metodes aprakstā dokumentācijas vajadzībām jāiekļauj visas metodes daļas. Atbilstošos analītiskos raksturlielumus dokumentē attiecībā uz visu identifikācijas metodi, un, izmantojot atbilstīgu metodes validāciju, jābūt pietiekami pierādītam, ka tās ir nolūkam atbilstīgas.

Laboratorijas savos analītiskajos protokolos ievēro identifikācijas kritērijus, kas izklāstīti šajā tehniskajā dokumentā, tostarp diferenciāciju starp vienas un tās pašas vielas izomēriem (ja tas ir nepieciešams, lai nepārprotami identificētu *aizliegto vielu*).

# 1.0. Hromatogrāfiskie kritēriji

* + - Analizējamās vielas hromatogrāfiskās smailes aiztures laiks (*RT*) *paraugā* neatšķiras (*∆RT*) par vairāk nekā vienu (1) procentu (%) vai ± 0,1 minūti (atkarībā no tā, kurš ir lielāks[[1]](#footnote-1), bet nepārsniedz pilna platuma pusintensitātes līmeni (*FWHM*)) no tās pašas analizējamās vielas kontrolparaugā, atsauces kolekcijas paraugā vai atsauces materiālā, kas analizēts tajā pašā analītiskajā partijā.
    - Alternatīvi laboratorija var izvēlēties izmantot relatīvo aiztures laiku (*RRT*) kā apstiprināšanas kritēriju, kur attiecīgās smailes *RT* tiek mērīts attiecībā pret hromatogrāfisko atsauces savienojumu (*CRC*).
      * Ja *CRC* nav stabila ar izotopu iezīmēta analizējamā viela, tad analizējamās vielas *RRT* *paraugā* neatšķiras vairāk kā par ± 1 % no tās pašas analizējamās vielas kontrolparaugā, atsauces kolekcijas paraugā vai atsauces materiālā, kas analizēts tajā pašā analītiskajā partijā.
      * Ja *CRC* ir stabila ar izotopu iezīmēta analizējamā viela, tad analizējamās vielas *RRT* *paraugā* neatšķiras vairāk kā par ± 0,5 % no tās pašas analizējamās vielas kontrolparaugā, atsauces kolekcijas paraugā vai atsauces materiālā, kas analizēts tajā pašā analītiskajā partijā.

# 2.0. Masspektrometriskās identifikācijas kritēriji

Parasti analizējamo vielu identifikācijai izmantotās stratēģijas, izmantojot uz masspektrometriju (MS) balstītus paņēmienus, bieži dēvē par “lejupējām” un “augšupējām” pieejām.

* + - “Augšupējā” pieeja ietver nebojātās analizējamās vielas *MS* analīzi, radot vielai raksturīgos jonus.
    - “Lejupējā” pieeja ietver fermentatīvi vai ķīmiski iegūtu analizējamās vielas fragmentu mērījumus un šādu fragmentu identificēšanu.

Lai gan šie termini ir īpaši izmantoti lielu molekulu (*piemēram*, proteīnu) analīzei, abas pieejas ir derīgas un piemērojamas uz *MS* balstītai jebkuras analizējamās vielas identifikācijai, ja iegūtā informācija atbilst šajā tehniskajā dokumentā noteiktajiem kritērijiem.

Informācijas specifiku, kas iegūta, lai nepārprotami identificētu analizējamo vielu, nosaka kā daļu no metodes validācijas procesa (*piemēram*, izmantojot pamata vietējās sastatāmās meklēšanas rīku (*BLAST*) attiecīgās aminoskābju sekvences analīzei kopā ar piemērotu datu bāzi, piemēram, *UniProtKB*), un tā nav šī dokumenta daļa.

*MS* kritēriji identificēšanai, izmantojot skenēšanas (piemēram, pilnas skenēšanas, produkta jonu skenēšanas) vai neskenēšanas (piemēram, izvēlētu jonu kontroles, izvēlētas reakcijas kontroles) metodes, ir balstīti uz tādu jonu klātbūtni un relatīvo izplatību, kurus laboratorija ir noteikusi kā diagnostiskus attiecībā uz analizējamo vielu. Jebkādu datu apstrādi (*piemēram*, integrēšanu, atņemšanu, vidējo rādītāju aprēķināšanu utt.) konsekventi veic visā analītiskajā partijā.

*Aizliegtās vielas* vai tās *metabolīta* vai *marķiera* koncentrācija, iespējams, ir jāsalīdzina (*t. i.*, analizējamās vielas signāls vienas pakāpes robežās) *paraugā* un kontroles urīnā, atsauces kolekcijas paraugā vai atsauces materiālā, lai nodrošinātu mērķa analizējamās vielas identificēšanu.

Piemēro turpmāk norādītos identifikācijas kritērijus.

* Katrs identificēšanai izmantotais masas mērījums ir ± 0,5 Da robežās no tā paša jona attiecīgās masas, kas iegūta no kontrolparauga, atsauces kolekcijas parauga vai atsauces materiāla, kas analizēts tajā pašā analītiskajā partijā.
* Izmantojot vienpakāpes *MS*, iegūst vismaz trīs (3) diagnostikas jonus.
* Izmantojot daudzpakāpju *MS* (*piemēram*, *MS/MS*), uzrauga vismaz divas (2) prekursora produkta jonu pārejas (*t. i.*, divas *SRM* pārejas). Prekursora jonu izolācijas platums nepārsniedz 1,3 *m*/*z*, ja vien to nepieprasa tā molekulārā masa un uzlādes stāvoklis.
* Diagnostikas jonu izplatību nosaka no integrēto izvēlēto jonu hromatogrammu smailes laukuma vai augstuma. Tas ir piemērojams arī tad, ja identificēšanai tiek izmantots tikai skenēšanas režīms.
* Visu diagnostikas jonu signāla/trokšņa (*S/T*) attiecība ir lielāka nekā trīs pret viens (3:1).
* Relatīvo izplatību aprēķina, dalot katra diagnostikas jona jonu trasējuma laukumu vai augstumu ar laukumu vai augstumu, kas iegūts no jonu trasējuma, par galveno smaili ņemot visizplatītāko diagnostikas jonu.[[2]](#footnote-2)
* Neviena diagnostikas jona relatīvā intensitāte neatšķiras vairāk kā par 1. tabulā norādīto daudzumu no to pašu jonu attiecīgās relatīvās izplatības, kas iegūti no pozitīva kontroles urīna, atsauces kolekcijas parauga vai atsauces materiāla.
* Ja nav pieejami trīs (3) diagnostikas joni vai divas (2) pārejas, sagatavo otru atvasinājumu vai izmanto otru jonizācijas vai disociācijas metodi.[[3]](#footnote-3) Otrās jonizācijas metodes pamatā ir atšķirīgs fizikālais princips, *t. i.*, ķīmiskā jonizācija pret elektronu jonizāciju, un tai atkal jānodrošina dažādi diagnostikas joni. Nav pieļaujams izmantot metodi, kas maina tikai to pašu jonu relatīvo izplatību.
* Bez derīga paskaidrojuma[[4]](#footnote-4) nav atļauts savākt vairāk nekā minimālo nepieciešamo jonu vai pāreju skaitu *SRM* vai *SIM* un atlasīt tos, kuru relatīvā izplatība ietilpst pielaides logu diapazonā, vienlaikus ignorējot citus jonus vai pārejas, kas neatbilst identifikācijas kritērijiem.

**1. tabula.** Maksimālās pielaides logi relatīvajai izplatībai, lai nodrošinātu attiecīgu ticamību identifikācijai

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Relatīvā izplatība atsauces paraugā**5  (% no galvenās smailes) | **Maksimālās pielaides logi relatīvajai izplatībai *paraugā*** | **Piemēri** | |
| **Relatīvā izplatība**  (% no galvenās smailes) | **Pielaides logs**  (% no galvenās smailes) |
| 50–100 | ± 10 (absolūts) | 60  95 | 50–70  85–105 |
| 25–50 | ± 20 % (relatīvs) | 40 | 32–48 |
| 1–25 | ± 5 (absolūts)6 | 10  3 | 5–15  > 06–8 |

5 Kontrolparaugs, atsauces kolekcijas paraugs vai atsauces materiāls, kas analizēts tajā pašā analītiskajā partijā.

6 Diagnostikas joni vienmēr ir jānosaka *paraugā* (*S/T* > 3:1).

**3.0. Definīcijas**

**Diagnostikas jons(-i)** – molekulārie joni vai fragmentjoni, kuru klātbūtne un izplatība ir raksturīga analizējamai vielai, un tādējādi var palīdzēt to identificēt. Otru jonu, kas pieder tai pašai izotopu kopai, arī var izmantot kā diagnostikas jonu tikai tad, ja to pamato fragmenta atomu sastāva īpatnība (*piemēram*, Cl, Br vai citu elementu klātbūtne ar lielu izotopu jonu saturu).

**Relatīvā izplatība** – konkrēta jona izplatība attiecībā pret visvairāk uzraudzītā jona izplatību.

**Relatīvās izplatības maksimālās pielaides logs** – maksimālā pieļaujamā starpība starp konkrēta jona, kas iegūts no *parauga*, un tāda jona, kas iegūts no atsauces parauga, relatīvo izplatību. To var izteikt kā ABSOLŪTU vai RELATĪVU.

**Absolūts** – nosaka, pieskaitot norādīto pielaides vērtību pie relatīvās izplatības, kas noteikta attiecībā uz uzraudzīto jonu atsauces paraugā, vai atņemot norādīto pielaides vērtību no tās.

**Relatīvs** – nosaka, aprēķinot norādīto pielaides procentu līmeni relatīvajai izplatībai, kas noteikta attiecībā uz uzraudzīto jonu atsauces paraugā, un pēc tam šo vērtību pieskaitot pie relatīvās izplatības vai atņemot no tās.

**Skenēšana** –nepārtraukta *m*/*z* vērtību diapazona jonu iegūšana.

**Izvēlētu jonu kontrole (*SIM*)** – viena vai vairāku iepriekš noteiktu diskrētu *m*/*z* vērtību jonu iegūšana noteiktiem aiztures laikiem.

**Izvēlētās reakcijas kontrole (*SRM*)** – dati, kas iegūti no konkrētiem produkta joniem, kuri atbilst *m*/*z* atlasītajiem prekursora joniem, kas reģistrēti divos vai vairākos masspektrometrijas posmos. *SRM* var veikt kā tandēma masspektrometriju laikā vai tandēma masspektrometriju telpā.

**Signāla/trokšņa (*S/T*) attiecība** – instrumentu atbildes lielums uz analizējamo vielu (signāls) attiecībā pret fona lielumu (troksnis).

**Pateicības**

*WADA* laboratorijas ekspertu grupa vēlas pateikties *WADA IDCR* darba grupas ekspertiem par viņu ieguldījumu šī tehniskā dokumenta izstrādē: Dr. Hosē A. Paskvālam [*José A. Pascual*], Prof. Mario Tēvisam [*Mario Thevis*], Prof. Pēteram van Ēno [*Peter van Eenoo]* un Dr. Terensam Vanam [*Terence Wan*].

1. Kritērijs “atkarībā no tā, kurš ir lielāks” var radīt *RT* starpību (*ΔRT*), kas ir nereāli liela šaurām hromatogrāfiskām smailēm (piemēram, *UHPLC* ar *FWHM*, kas vienāds ar 1 s). Tā kā jebkurš *ΔRT*, kas lielāks par *FWHM*, parasti netiek uzskatīts par atbilstošu *RT*, tad maksimālo *ΔRT* nosaka atsauces smailes *FWHM* kontrolparaugā, atsauces kolekcijas paraugā vai atsauces materiālā. [↑](#footnote-ref-1)
2. Galvenās smailes jons ir visizplatītākais diagnostikas jons, kas iegūts no pozitīva kontroles urīna, atsauces kolekcijas parauga vai atsauces materiāla. Šo atsauces galvenās smailes jonu piemēro arī, lai aprēķinātu relatīvo izplatību, izmantojot *parauga* hromatogrammu, pat ja tas neveido galvenās smailes jonu *paraugā*. [↑](#footnote-ref-2)
3. Cita disociācijas metode var būt, piemēram, MS3 izmantošana MS2 vietā vai elektronu satveres disociācijas (*ECD*) vai elektronu pārneses disociācijas (*ETD*) izmantošana sadursmes ierosinātas disociācijas (*CID*) vietā. [↑](#footnote-ref-3)
4. Derīgs paskaidrojums varētu būt, piemēram, skaidrs pierādījums, ka vienu no primāri konstatētajiem joniem ietekmē daļēji līdzskalota viela. [↑](#footnote-ref-4)