(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 994 425**

(51) Int. CI.:

G01N 30/06 (2006.01)
G01N 30/86 (2006.01)
G01N 30/04 (2006.01)
H01J 49/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.08.2020 PCT/EP2020/072251**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2021 WO21023865**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2020 E 20756797 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2024 EP 4010692**

(54) Título: **Procedimiento y dispositivo para integración automática de picos cromatográficos**

(30) Prioridad:

08.08.2019 EP 19190813

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2025

(73) Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.00%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(72) Inventor/es:

BABITZKI, GALINA;
LAUBENDER, RUEDIGER;
MICHELY, JULIAN;
REICHERT, ANDREAS y
TARASOV, KIRILL

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y dispositivo para integración automática de picos cromatográficos

Campo de la invención

La invención se refiere a un procedimiento implementado por ordenador para integración automática de picos de al menos un cromatograma de al menos una muestra, una línea de procesamiento implementable por ordenador y un sistema de espectrometría de masas.

Técnica relacionada

La búsqueda y evaluación de picos en cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM) o espectrometría de masas (EM) en general requiere la interacción del usuario o una revisión por un usuario experto, tal como para seleccionar o asignar el pico correcto. Desde hace varios años existe una necesidad de automatizar la búsqueda y evaluación de picos tal como para reducir la interacción del usuario y, por tanto, para potenciar la fiabilidad de la medición.

Los picos en la cromatografía basada en CL-EM o espectrometría de masas experimentan cambios en el tiempo y/o variaciones en la conformación del pico. Dichos cambios y variaciones pueden ser resultado de efectos de matriz y pérdida de rendimiento del sistema, tal como la degradación de las columnas de CL. Los enfoques conocidos para la automatización de la selección de picos usan un objetivo de tiempo de retención fijo y un margen de tiempo de retención fijo para especificar un pico de interés que se debe identificar como una señal. Esta estrategia se implementa, por ejemplo, en el programa informático Multi Quant Sciex, véase https://sciex.com/Documents/Downloads/Literature/verify-update-retention-times.pdf.

Debido a los cambios en el tiempo de retención, dichos enfoques pueden dar lugar a errores, obligando a los usuarios a asignar manualmente los picos correctos.

Se pueden producir problemas similares al ajustar modelos analíticos de conformación de pico para calcular el área de pico.

Los procedimientos conocidos, tales como el programa informático Ascent de Indigo bioautomation, véase https://s3-us-west-2.amazonaws.com/ascent-data/manual/AscentManual.pdf, realizan ajustes de conformación independientes en las señales del analito y del patrón interno. En caso de bajas concentraciones de analito, señal de fondo compleja, alto nivel de ruido o picos de interferencia, esto con frecuencia puede dar lugar a resultados erróneos en el ajuste de conformación de analito. Esta deficiencia imposibilita la automatización completa de la integración de picos y hace necesaria una revisión por un usuario experto y un ajuste manual de resultados para mediciones con características cromatográficas complejas.

El documento EP 3 271 715 A1 criba técnicas para detectar cualitativa y cuantitativamente analitos en muestras biológicas usando una calibración de analito umbral. Específicamente, se describe tener en cuenta el cambio en el tiempo de retención de los patrones internos para la selección de picos en el documento EP 3 271 715 A1. Además, el manual de Waters MassLynx 4.0, http://www.ecs.umass.edu/eve/facilities/equipment/Quattromicro/MassLynx%20Version%204.0%20User's%20Guide.pdf propone tener en cuenta propiedades adicionales del pico de patrón interno, tales como la anchura de pico y la asimetría de pico. Sin embargo, tener en cuenta solo el cambio en el tiempo de retención de los patrones internos como se propone en el documento EP 3 271 715 A1 o incluso la anchura y la asimetría de pico como se propone en el manual Waters MassLynx 4.0 puede no ser suficiente para la búsqueda y evaluación de picos fiables para permitir la automatización sin necesidad de ninguna interacción o revisión del usuario.

El documento WO 2018/229811 A1 divulga añadir a una muestra un material de patrón interno que tenga un tiempo de retención similar al de un analito objetivo y que tenga una proporción de masa con respecto a carga diferente de la del analito objetivo; medir la muestra con un cromatógrafo-espectrómetro de masas y obtener cromatogramas del analito objetivo y del material de patrón interno; detectar un pico del cromatograma del material de patrón interno y obtener un tiempo de comienzo de pico y un tiempo de finalización de pico del pico; y aplicar el tiempo de comienzo de pico y el tiempo de finalización de pico obtenidos a un tiempo de comienzo de pico y un tiempo de finalización de pico del cromatograma del analito objetivo.

Problema que se va a resolver

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar procedimientos y dispositivos para integración automática de picos que eviten las desventajas descritas anteriormente de los procedimientos y dispositivos conocidos. En particular, el procedimiento y el dispositivo deberán permitir una integración de picos fiable y completamente automática, en particular sin necesidad de interacción del usuario.

Sumario de la invención

Este problema se resuelve por un procedimiento implementado por ordenador, una línea de procesamiento implementable por ordenador y un sistema de espectrometría de masas para integración automática de picos de al menos un cromatograma de al menos una muestra, que tienen los rasgos característicos de las reivindicaciones independientes. Los modos de realización preferentes de la invención, que se pueden conseguir de forma aislada o en cualquier combinación arbitraria, se divulgan en las reivindicaciones dependientes.

Como se usa en lo que sigue, los términos "tener", "comprender" o "incluir" o cualquier variación gramatical arbitraria de los mismos se usan de forma no excluyente. Por tanto, estos términos se pueden referir tanto a una situación en la que, además del rasgo característico introducido por estos términos, no están presentes otros rasgos característicos en la entidad descrita en este contexto como a una situación en la que están presentes uno o más de otros rasgos característicos. Como ejemplo, las expresiones "A tiene B", "A comprende B" y "A incluye B" se pueden referir tanto a una situación en la que, además de B, no está presente ningún otro elemento en A (es decir, una situación en la que A consiste única y exclusivamente en B) como a una situación en la que, además de B, uno o más de otros elementos están presentes en la entidad A, tales como un elemento C, elementos C y D o incluso otros elementos.

Además, como se usa en lo que sigue, los términos "preferentemente", "más preferentemente", "en particular", "más en particular", "específicamente", "más específicamente" o términos similares se usan junto con rasgos característicos opcionales, sin restringir posibilidades alternativas. Por tanto, los rasgos característicos introducidos por estos términos son rasgos característicos opcionales y no pretenden restringir el alcance de las reivindicaciones de ninguna forma. La invención, como reconocerá el experto en la técnica, se puede realizar usando rasgos característicos alternativos. De forma similar, los rasgos característicos introducidos por "en un modo de realización de la invención" o expresiones similares están destinados a ser rasgos característicos opcionales, sin ninguna restricción con respecto a modos de realización alternativos de la invención, sin ninguna restricción con respecto al alcance de la invención y sin ninguna restricción con respecto a la posibilidad de combinar los rasgos característicos introducidos de dicha forma con otros rasgos característicos opcionales o no opcionales de la invención.

En un primer aspecto de la presente invención, se divulga un procedimiento implementado por ordenador para integración automática de picos de al menos un cromatograma de al menos una muestra.

El término "procedimiento implementado por ordenador", como se usa en el presente documento, es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a un procedimiento que implica al menos un ordenador y/o al menos una red informática. El ordenador y/o la red informática pueden comprender al menos un procesador que está configurado para realizar al menos una de las etapas de procedimiento del procedimiento de acuerdo con la presente invención. Preferentemente cada una de las etapas de procedimiento se realiza por el ordenador y/o la red informática. El procedimiento se puede realizar de forma completamente automática, específicamente sin interacción del usuario. El término "de forma automática", como se usa en el presente documento, es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a un procedimiento que se realiza completamente por medio de al menos un ordenador y/o red informática y/o máquina, en particular sin acción manual y/o interacción con un usuario.

El término "cromatograma", como se usa en el presente documento, es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir especificamente, sin limitación, a un resultado visual o al resultado de un procedimiento de separación que separa los componentes de la muestra. El cromatograma se puede referir a una distribución de intensidad a lo largo del tiempo generada durante al menos un desarrollo cromatográfico. El cromatograma puede ser o puede comprender un diagrama con el tiempo de retención de los componentes de muestra en el eje x y la intensidad en el eje y. El cromatograma se puede determinar usando al menos un dispositivo de espectrometría de masas, por ejemplo, al menos un dispositivo de espectrometría de masas con cromatografía de líquidos. Como se usa en el presente documento, el término "dispositivo de espectrometría de masas con cromatografía de líquidos" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a una combinación de cromatografía de líquidos con espectrometría de masas. El dispositivo de espectrometría de masas con cromatografía de líquidos puede ser o puede comprender al menos un dispositivo de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) o al menos un dispositivo de microcromatografía de líquidos (μCL). El dispositivo de espectrometría de masas con cromatografía de líquidos puede comprender un dispositivo de cromatografía de líquidos (CL) y un dispositivo de espectrometría de masas (EM), en el que el dispositivo de CL y el de EM están acoplados por medio de al menos una interfaz. Como se usa en el presente documento, el término "dispositivo de cromatografía de líquidos (CL)" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a un módulo analítico

configurado para separar uno o más analitos de interés de una muestra de otros componentes de la muestra para la detección del uno o más analitos con el dispositivo de espectrometría de masas. El dispositivo de CL puede comprender al menos una columna de CL. Por ejemplo, el dispositivo de CL puede ser un dispositivo de CL de única columna o un dispositivo de CL de múltiples columnas que tiene una pluralidad de columnas de CL. La columna de CL puede tener una fase estacionaria a través de la que se bombea una fase móvil para separar y/o eluir y/o transferir los analitos de interés. Como se usa en el presente documento, el término "dispositivo de espectrometría de masas" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a un analizador de masas configurado para detectar al menos un analito en base a la proporción de masa con respecto a carga. El dispositivo de espectrometría de masas puede ser o comprender al menos un dispositivo de espectrometría de masas de cuadrupolo. La interfaz que acopla el dispositivo de CL y el EM puede comprender al menos una fuente de ionización configurada para generar iones moleculares y para transferir los iones moleculares a la fase gaseosa.

El término "pico", como se usa en el presente documento, es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a al menos un máximo local del cromatograma. El término "pico de señal" se puede usar para indicar un pico identificado del analito de interés. El término "integración de picos", como se usa en el presente documento, es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a al menos una operación matemática y/o algoritmo matemático para determinar un área de pico encerrada por un pico del cromatograma. Específicamente, la integración de picos puede comprender la identificación y/o medición de características de curva del cromatograma. La integración de picos puede comprender uno o más de detección de picos, búsqueda de picos, identificación de picos, ajuste de picos, evaluación de picos, determinación del comienzo de pico y/o finalización de pico, determinación del fondo, determinación de la línea base. La integración de picos puede permitir la determinación de uno o más de área de pico, tiempo de retención, altura de pico y anchura de pico. El término "integración automática de picos", como se usa en el presente documento, es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a la integración de picos que se realiza de forma no manual sino por al menos un ordenador y/o red informática y/o máquina. Específicamente, la integración automática de picos se puede realizar sin acción manual ni interacción con un usuario. En particular, la identificación de picos y/o la detección de picos y/o la determinación del área de pico se pueden realizar de forma no manual y sin acción manual o interacción con un usuario.

Como se usa en el presente documento, el término "muestra" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a una muestra arbitraria, tal como una muestra biológica, también llamada muestra de prueba. Por ejemplo, la muestra de prueba se puede seleccionar del grupo que consiste en: un líquido fisiológico, incluyendo sangre, suero, plasma, saliva, líquido del cristalino, líquido cefalorraquídeo, sudor, orina, leche, líquido ascítico, mucosa, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido amniótico, tejido, células o similares. La muestra se puede usar directamente como se obtiene de la fuente respectiva o se puede someter a un flujo de trabajo de pretratamiento y/o preparación de muestra. La muestra comprende al menos un analito y al menos una sustancia química relacionada. Por ejemplo, los analitos de interés pueden ser vitamina D, estupefacientes, fármacos, hormonas y metabolitos en general. Como se usa en el presente documento, el término "sustancia química relacionada" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a una sustancia que tiene una proporción de masa con respecto a carga similar al analito de interés. Por ejemplo, la sustancia química relacionada puede ser al menos un patrón interno y/o al menos una sustancia usada como cuantificador. El procedimiento de acuerdo con la presente invención permite una integración de picos fiable incluso para picos de baja intensidad, altos niveles de ruido o interferencias frecuentes. Específicamente, el procedimiento propone usar para la evaluación del cromatograma del analito de interés valores de entrada o de partida determinados a partir de otro cromatograma de una sustancia química relacionada de la misma medición para el que se pueden garantizar suficientes picos de alta intensidad, bajo nivel de ruido e interferencias de baja frecuencia. Por ejemplo, el procedimiento se puede usar para potenciar la integración de un cromatograma de analito sobre la base de los resultados obtenidos del cromatograma del patrón interno. Por ejemplo, el procedimiento se puede usar para potenciar la integración de un cromatograma calificador sobre la base de los resultados obtenidos del cromatograma cuantificador. Como se usa en el presente documento, el término "patrón interno" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a un analito que está presente con una concentración conocida en la muestra. La muestra de patrón interno puede ser una muestra que comprende al menos una sustancia de patrón interno con una concentración conocida tal como una predeterminada. Los patrones internos pueden ser casi idénticos al analito. La sustancia de patrón interno puede ser similar al analito de interés, tal como moléculas deuteradas o una versión marcada isotópicamente del analito de interés. Para detalles adicionales con respecto a la muestra, se hace referencia, por ejemplo, al documento EP 3 425 369 A1, del que se incluye la divulgación completa adjunta

como referencia. Son posibles otros analitos de interés.

La muestra se puede pretratar añadiendo una sustancia química relacionada, tal como un patrón interno, y/o diluyéndose con otra solución y/o mezclándose con reactivos o similares. El procedimiento puede comprender al menos una etapa de preparación de muestra. En la etapa de preparación de muestra, se puede añadir la al menos una sustancia química relacionada, tal como el patrón interno, a la muestra del analito. La muestra que comprende el analito se puede enriquecer con la sustancia química relacionada. Por ejemplo, se puede añadir a la muestra una sustancia química relacionada con una concentración predefinida. La sustancia química relacionada se puede seleccionar de modo que sea fácilmente identificable en condiciones de funcionamiento normales del dispositivo de espectrometría de masas. La concentración de la sustancia química relacionada, tal como del patrón interno puede estar predeterminada y ser significativamente mayor que la concentración del analito.

El procedimiento comprende las siguientes etapas que, como ejemplo, se pueden realizar en el orden dado. Sin embargo, cabe destacar que también es posible un orden diferente. Además, también es posible realizar una o más de las etapas de procedimiento una vez o repetidamente. Además, es posible realizar dos o más de las etapas de procedimiento simultáneamente o de manera superpuesta en el tiempo. El procedimiento puede comprender otras etapas de procedimiento que no se enumeran.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

a) recuperar al menos un cromatograma de la sustancia química relacionada y al menos un cromatograma del analito;

b) evaluar el cromatograma de la sustancia química relacionada, en el que la evaluación comprende

b1) determinar al menos un valor inicial para el tiempo de retención de analito determinando el tiempo de retención de la sustancia química relacionada y sumando el tiempo de retención de la sustancia química relacionada con un desplazamiento constante predeterminado o predefinido y/o multiplicando el tiempo de retención de la sustancia química relacionada por un factor constante predeterminado o predefinido,

b2) determinar al menos un valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito determinando los parámetros de conformación de pico de al menos un pico del cromatograma de la sustancia química relacionada;

c) evaluar el cromatograma del analito, en el que la evaluación comprende

c1) al menos una etapa de determinación de posición, en la que el tiempo de retención de analito se determina teniendo en cuenta el valor inicial del tiempo de retención de la sustancia química relacionada;

c2) al menos una etapa de integración de picos, en la que el área de pico de analito y la conformación de pico de analito se determinan aplicando al menos un análisis de ajuste al cromatograma del analito teniendo en cuenta el valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito y el tiempo de retención de analito.

Las etapas de procedimiento de a) a c) se pueden realizar de forma totalmente automática. Por ejemplo, las etapas de procedimiento se pueden realizar por al menos una línea de procesamiento implementable por ordenador que se describirá en detalle a continuación.

Un modo de realización adicional del procedimiento incluye la determinación de intervalos de error para el tiempo de retención de pico y los parámetros de conformación de pico. En detalle, el modo de realización adicional comprende las siguientes etapas:

a) Como se describe anteriormente

b) Como se describe anteriormente, donde la determinación del valor inicial para el tiempo de retención de analito incluye la determinación de su intervalo de error.

c) Como se describe anteriormente. Adicionalmente, la etapa de determinación de posición c1) incluye el requisito adicional de que la posición de analito se puede desviar del valor inicial en menos que el intervalo de error de tiempo de retención de analito determinado en la etapa b1). Además, la etapa de integración de picos incluye el requisito adicional de que los parámetros de conformación de pico de analito se pueden desviar del valor inicial en menos que el intervalo de error de parámetro de conformación de pico determinado en la etapa b2).

Como se usa en el presente documento, el término "recuperar al menos un cromatograma" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a uno o más de recibir, descargar, acceder, determinar, detectar y registrar el al menos un cromatograma. Por ejemplo, el cromatograma

se puede recuperar descargando y/o accediendo al cromatograma desde al menos una base de datos, tal como de un detector o de una nube. Por ejemplo, el cromatograma se puede recuperar realizando al menos un desarrollo cromatográfico. El cromatograma de la sustancia química relacionada puede ser un cromatograma que comprende al menos una señal correspondiente a la sustancia química relacionada, tal como del patrón interno. El cromatograma del analito puede ser un cromatograma que comprende al menos una señal correspondiente al analito de interés.

El procedimiento comprende evaluar el cromatograma de la sustancia química relacionada. El procedimiento puede comprender al menos una etapa de preprocesamiento. El preprocesamiento puede comprender uno o más de seleccionar al menos una región de interés en el cromatograma; seleccionar al menos un intervalo de tiempo de retención predefinido; al menos una etapa de suavizado que comprende aplicar uno o más de un filtro de promedio móvil, un filtro gaussiano, una eliminación de ruido de ondícula discreta, un suavizado de Savitzky-Golay, un suavizado de Loess; al menos una etapa de sustracción de fondo que comprende uno o más de un ajuste de mínimos cuadrados ponderado asimétrico con regularización, aplicar un filtro de sombrero de copa morfológico, una determinación de fondo de base de ondícula discreta o continua, determinar valores mínimos de un promedio móvil.

La evaluación comprende determinar al menos un valor inicial para el tiempo de retención de analito determinando el tiempo de retención de la sustancia química relacionada. Para cada muestra se pueden determinar el tiempo de retención de pico y/o parámetros de conformación de pico adicionales de la sustancia química relacionada, tales como la anchura de pico y/o la asimetría de pico. Debido al principio de medición del dispositivo de espectrometría de masas, el tiempo de retención del analito puede ser idéntico a su sustancia química relacionada correspondiente o bien se puede calcular a partir de la sustancia química relacionada, tal como por la suma de una diferencia constante y/o la multiplicación por un factor constante. Por lo tanto, usando el tiempo de retención de la sustancia química relacionada y, si corresponde, algún desplazamiento y/o factor constante puede posibilitar la identificación correcta de los picos de analito incluso si el tiempo de retención está cambiando.

La sustancia química relacionada que se añade a la muestra con una concentración predefinida puede ser fácilmente identificable en condiciones de funcionamiento normales del dispositivo de espectrometría de masas. El procedimiento puede comprender realizar al menos una comprobación de errores, en el que se somete a prueba la señal de la sustancia química relacionada. La comprobación de errores se puede usar para garantizar que se interprete el pico correcto como una señal de la sustancia química relacionada.

Como se usa en el presente documento, el término "valor inicial para el tiempo de retención de analito" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a un valor de partida y/o valor de entrada para la determinación del tiempo de retención de analito a partir del cromatograma del analito.

En un modo de realización adicional del procedimiento, el valor inicial para el tiempo de retención de analito también puede comprender el intervalo de error correspondiente. El término "intervalo de error" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, al intervalo de confianza del resultado de la determinación del tiempo de retención de analito. Para determinar el valor inicial del tiempo de retención de analito, en primer lugar, se puede determinar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada. Esto puede comprender la determinación de al menos un máximo de intensidad local dentro de un intervalo de tiempo de retención predefinido. El intervalo de tiempo de retención predefinido usado para determinar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada puede depender de uno o más del tiempo de retención esperado de la sustancia química relacionada, la anchura del pico cromatográfico de la sustancia química relacionada, un nivel de similitud química de la sustancia química relacionada y el analito de interés, por ejemplo, si se usa una sustancia química relacionada deuterada, marcada con C13 u otra, y un nivel de ruido cromatográfico. El tiempo de retención del máximo de intensidad local determinado se puede determinar a partir del cromatograma y se puede usar, después de la suma de un desplazamiento constante y/o la multiplicación por un factor constante, como valor inicial para el tiempo de retención de analito. La determinación del máximo de intensidad local se puede realizar teniendo en cuenta un intervalo predefinido para una proporción de cuantificador con respecto a calificador en la posición del máximo. Específicamente, los máximos locales que corresponden a picos relacionados con el analito de interés se identifican debido a que tienen una proporción de cuantificador con respecto a calificador cercana al valor que es característico para el analito de interés. Como se usa en el presente documento, el término "proporción de cuantificador con respecto a calificador" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a una proporción de la señal del ion usado para la cuantificación y la señal del ion usado para la confirmación de identidad. Adicionalmente o de forma alternativa, la determinación del tiempo de retención de la sustancia química relacionada puede comprender la determinación de patrones de múltiples máximos locales dentro del intervalo de tiempo de retención predefinido, en el que los patrones tienen una distancia predefinida entre los máximos. Dichos patrones de picos pueden ser característicos para determinados analitos de interés medidos con un protocolo de medición de CL-EM dado y, por lo tanto, se pueden

usar para distinguir picos relacionados con el analito de interés de picos relacionados con otras sustancias. La determinación de los patrones de múltiples máximos locales se puede realizar teniendo en cuenta un intervalo predefinido para una proporción de cuantificador con respecto a calificador en la posición del máximo.

La evaluación comprende sumar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada con un desplazamiento constante predeterminado o predefinido y/o multiplicar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada por un factor constante predeterminado o predefinido. Como se usa en el presente documento, el término "desplazamiento constante" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, al tiempo de retención adicional que se suma al tiempo de retención determinado de la sustancia química relacionada. Por ejemplo, el tiempo de retención de la sustancia química relacionada puede ser t_1, en el que el valor inicial para el tiempo de retención de analito t_{ini} se puede determinar por $t_{ini}=t_1+t_{des}$, en el que t_{des} es el desplazamiento constante. En un modo de realización del procedimiento, el valor inicial para el tiempo de retención de analito t_{ini} se puede determinar por $t_{ini}=t_1+t_{des} \pm \varepsilon$, en el que t_{des} es el desplazamiento constante y ε indica el intervalo de error del tiempo de retención de analito.

El desplazamiento constante se puede predeterminar o predefinir comparando el tiempo de retención determinado de la sustancia química relacionada con al menos un tiempo de retención previsto o esperado de la sustancia química relacionada. El tiempo de retención previsto o esperado de la sustancia química relacionada puede ser un tiempo de retención conocido para la sustancia química relacionada, tal como un tiempo de retención predefinido o predeterminado en determinadas condiciones, en particular condiciones de temperatura. Por ejemplo, la comparación puede comprender restar el tiempo de retención determinado de la sustancia química relacionada del tiempo de retención previsto o esperado. Se puede usar como desplazamiento constante una desviación del tiempo de retención previsto o esperado respecto del tiempo de retención determinado de la sustancia química relacionada. Como se usa en el presente documento, el término "factor constante" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, al tiempo de retención adicional que se aplica al tiempo de retención determinado de la sustancia química relacionada por multiplicación. Por ejemplo, el tiempo de retención de la sustancia química relacionada puede ser t_1, en el que el valor inicial para el tiempo de retención de analito t_{ini} se puede determinar por $t_{ini}=t_1*t_{fac}$, en el que t_{fac} es el factor constante. En un modo de realización del procedimiento, el valor inicial para el tiempo de retención de analito t_{ini} se puede determinar por $t_{ini}=(t_1*t_{fac}) \pm \varepsilon$, en el que t_{fac} es el factor constante y ε indica el intervalo de error del tiempo de retención de analito.

El factor constante se puede predeterminar o predefinir comparando el tiempo de retención determinado de la sustancia química relacionada con al menos un tiempo de retención previsto o esperado de la sustancia química relacionada. El tiempo de retención previsto o esperado de la sustancia química relacionada puede ser un tiempo de retención conocido para la sustancia química relacionada, tal como un tiempo de retención predefinido o predeterminado en determinadas condiciones, en particular condiciones de temperatura. Por ejemplo, la comparación puede comprender generar al menos una proporción del tiempo de retención determinado de la sustancia química relacionada y el tiempo de retención previsto o esperado. La proporción del tiempo de retención previsto o esperado y el tiempo de retención determinado de la sustancia química relacionada se puede usar como factor constante. El uso de un desplazamiento constante puede dar lugar a resultados satisfactorios para pequeños cambios en el tiempo de retención que se producen, por ejemplo, debido a factores externos, tales como la variación de la temperatura del instrumento o la exactitud limitada de los ajustes del gradiente en el procedimiento cromatográfico. Para los efectos que pueden provocar mayores cambios en el tiempo de retención, tales como el envejecimiento de la columna de CL, el uso de un factor constante puede ofrecer un rendimiento superior en comparación con la aplicación de un desplazamiento constante. Como se explica anteriormente, la determinación del valor inicial para el tiempo de retención de analito puede comprender la determinación del al menos un máximo de intensidad local dentro del intervalo de tiempo de retención predefinido. El valor inicial para el tiempo de retención de analito se puede determinar ajustando el intervalo de tiempo de retención predefinido de acuerdo con el máximo local determinado corregido por el desplazamiento constante predeterminado o predefinido y/o el factor constante predeterminado o predefinido.

La evaluación del cromatograma de la sustancia química relacionada comprende determinar al menos un valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito determinando los parámetros de conformación de pico de al menos un pico del cromatograma de la sustancia química relacionada. De forma similar al tiempo de retención de pico, el principio de medición del dispositivo de espectrometría de masas puede dar lugar a que la conformación de pico de analito sea similar a la conformación de pico de la sustancia química relacionada debido a la similitud de ambos compuestos. Como se explica anteriormente, la señal de la sustancia química relacionada está muy bien controlada puesto que este compuesto se añade a la muestra a una concentración predefinida y relativamente alta, de modo que se garantizan resultados de ajuste de conformación de pico fiables. El resultado de la conformación de la sustancia química relacionada se puede usar como entrada para la posterior determinación de conformación para el analito de interés y se pueden establecer restricciones estrictas sobre las desviaciones de esta entrada debido a la similitud conocida de las conformaciones de picos de la sustancia química relacionada y del analito. Como se usa en el presente documento, el término "valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un

experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a valores de partida y/o valores de entrada para la determinación de la conformación de pico de analito a partir del cromatograma del analito.

En un modo de realización adicional del procedimiento, el valor inicial para el valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito también puede comprender el intervalo de error correspondiente. El término "intervalo de error" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, al intervalo de confianza de la determinación del valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito.

La determinación del al menos un valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito puede comprender ajustar al menos un pico del cromatograma de la sustancia química relacionada. El ajuste puede comprender usar al menos una técnica de ajuste de curva, tal como una o más de interpolación polinómica, algoritmo de Gauss-Newton, transformada de Fourier y similares.

Por ejemplo, el cromatograma de la sustancia química relacionada se puede ajustar usando al menos una función gaussiana modificada exponencialmente. Por ejemplo, el ajuste puede comprender usar al menos una función de ajuste como se describe en "Mathematical functions for the representation of chromatographic peaks", Valerio B. Di Marco, G. Giorgio Bombi, Journal of Chromatography A, 931 (2001) 1–30. Usando una o más de estas técnicas de ajuste de curva, se ajusta un pico para el cromatograma de la sustancia química relacionada. A partir de las técnicas de ajuste de curva, se pueden determinar los parámetros de pico del pico de la sustancia química relacionada. Los parámetros de pico pueden comprender uno o más de la anchura de pico, asimetría de pico, posición de pico, línea base y similares. Los parámetros de pico determinados a partir del cromatograma de la sustancia química relacionada se pueden usar para estimar los parámetros de pico del pico de analito expandiéndolos a un intervalo con los denominados intervalos de tolerancia.

El procedimiento puede comprender determinar al menos un intervalo de tolerancia del parámetro de pico respectivo. El intervalo de tolerancia $p \pm \varepsilon$ se puede dar por el respectivo valor inicial determinado p para los parámetros de conformación de pico de analito y un intervalo de error ε. El intervalo de error puede depender de la resolución del detector, el error de ajuste y el nivel de similitud química de la sustancia química relacionada y el analito de interés, por ejemplo, si se usa una sustancia química relacionada deuterada, marcada con C13 u otra. El intervalo de tolerancia puede ser diferente para los diferentes parámetros de conformación de pico.

En un modo de realización del procedimiento, el intervalo de error ε de los parámetros de conformación de pico de analito se puede establecer en el intervalo de error de los parámetros de conformación de pico de la sustancia química relacionada.

El procedimiento comprende evaluar el cromatograma del analito. La evaluación del cromatograma del analito puede comprender al menos una etapa de preprocesamiento. El preprocesamiento puede comprender uno o más de seleccionar al menos una región de interés en el cromatograma; seleccionar al menos un intervalo de tiempo de retención predefinido; al menos una etapa de suavizado que comprende aplicar uno o más de un filtro de promedio móvil, un filtro gaussiano, una eliminación de ruido de ondícula discreta, un suavizado de Savitzky-Golay, un suavizado de Loess; al menos una etapa de sustracción de fondo que comprende uno o más de un ajuste de mínimos cuadrados ponderado asimétrico con regularización, aplicar un filtro de sombrero de copa morfológico, una determinación de fondo de base de ondícula discreta o continua, determinar valores mínimos de un promedio móvil. El preprocesamiento puede ser idéntico o diferente al preprocesamiento aplicado al cromatograma de la sustancia química relacionada.

La evaluación comprende al menos una etapa de determinación de posición, en la que el tiempo de retención de analito se determina teniendo en cuenta el valor inicial del tiempo de retención de la sustancia química relacionada. El tiempo de retención de analito se puede determinar usando al menos una técnica de ajuste de curva. El valor inicial para el tiempo de retención de analito se puede usar como valor de partida para el ajuste de curva. Dado el valor inicial del tiempo de retención de analito determinado a partir del cromatograma de la sustancia química relacionada, el tiempo de retención de analito se puede determinar, por ejemplo, usando al menos una técnica de ajuste de curva. El ajuste puede comprender usar al menos una técnica de ajuste de curva, tal como una o más de interpolación polinómica, algoritmo de Gauss-Newton, transformada de Fourier y similares. Por ejemplo, el ajuste puede comprender usar al menos una función de ajuste como se describe en "Mathematical functions for the representation of chromatographic peaks", Valerio B. Di Marco, G. Giorgio Bombi, Journal of Chromatography A, 931 (2001) 1–30. El tiempo de retención de analito se puede determinar usando un intervalo de tolerancia estrecho alrededor del valor inicial del tiempo de retención. Por ejemplo, el intervalo de tolerancia $t \pm \varepsilon_t$ viene dado por el respectivo valor inicial determinado t para el tiempo de retención de pico de analito y un intervalo de error $\pm \varepsilon_t$.

En un modo de realización del procedimiento, el intervalo de error ε_t del tiempo de retención de analito se puede establecer en el intervalo de error del tiempo de retención de la sustancia química relacionada. El intervalo de error

puede depender de la resolución del detector, la anchura del pico cromatográfico del analito de interés y la sustancia química relacionada, el nivel de similitud química de la sustancia química relacionada y el analito de interés, por ejemplo, si se usa una sustancia química relacionada deuterada, marcada con C13 u otra, y el nivel de ruido cromatográfico. La anchura del intervalo de tolerancia $t \pm \varepsilon_t$ puede ser en general más pequeña que la anchura del pico cromatográfico del analito de interés.

La evaluación comprende además al menos una etapa de integración de picos, en la que el área de pico de analito y la conformación de pico de analito se determinan aplicando al menos un análisis de ajuste al cromatograma del analito teniendo en cuenta el valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito y el tiempo de retención de analito. Usando el tiempo de retención de analito determinado y el valor inicial de los parámetros de conformación de pico de analito, se puede ajustar una curva al cromatograma del analito para determinar el área de pico y la conformación de pico de analito. En la etapa de integración de picos, el cromatograma de analito se puede ajustar usando al menos una función gaussiana modificada exponencialmente. Por ejemplo, el ajuste puede comprender usar al menos una función de ajuste como se describe en "Mathematical functions for the representation of chromatographic peaks", Valerio B. Di Marco, G. Giorgio Bombi, Journal of Chromatography A, 931 (2001) 1–30. El área de pico de analito y la conformación de pico de analito se pueden determinar usando el intervalo de tolerancia $p \pm \varepsilon$ alrededor del valor inicial del respectivo parámetro de conformación de pico de analito, como se describe anteriormente.

El uso del tiempo de retención y los parámetros de conformación de pico de la sustancia química relacionada para evaluar el cromatograma de analito puede dar lugar a una determinación de área de pico de analito más exacta, especialmente en caso de baja concentración de analito, fondo complejo, alto nivel de ruido y picos de interferencia. Por tanto, el procedimiento de acuerdo con la presente invención posibilita una automatización fiable de la integración de picos sin necesidad de revisión por un usuario experto ni de ajuste manual.

Adicionalmente al uso de un cromatograma de patrón interno, se pueden usar parámetros de otros fragmentos, tales como cuantificadores del analito y/o del patrón interno para la cuantificación y/o la comprobación de errores.

En otro aspecto, se divulga un programa informático que incluye instrucciones ejecutables por ordenador para realizar el procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización como se describe en el presente documento, específicamente las etapas de procedimiento de a) a c), cuando el programa se ejecuta en un ordenador o red informática, específicamente en un procesador.

Por tanto, en general, en el presente documento se divulga y propone un programa informático que incluye instrucciones ejecutables por ordenador para realizar el procedimiento de acuerdo con la presente invención en uno o más de los modos de realización incluidos en el presente documento cuando el programa se ejecuta en un ordenador o red informática. Específicamente, el programa informático se puede almacenar en una unidad de almacenamiento de datos legible por ordenador. Por tanto, específicamente, una, más de una o incluso todas las etapas de procedimiento como se indica anteriormente se pueden realizar usando un ordenador o una red informática, preferentemente usando un programa informático. El ordenador puede estar específicamente total o parcialmente integrado en el dispositivo de espectrometría de masas, y los programas informáticos se pueden incorporar específicamente como un programa informático. De forma alternativa, sin embargo, al menos parte del ordenador también se puede localizar fuera del dispositivo de espectrometría de masas.

En el presente documento se divulga y propone además un producto de programa informático que tiene medios de código de programa, para realizar el procedimiento de acuerdo con la presente invención en uno o más de los modos de realización incluidos en el presente documento cuando el programa se ejecuta en un ordenador o red informática, por ejemplo, una o más de las etapas de procedimiento mencionadas anteriormente. Específicamente, los medios de código de programa se pueden almacenar en una unidad de almacenamiento de datos legible por ordenador.

En el presente documento se divulga y propone además una unidad de almacenamiento de datos que tiene una estructura de datos almacenada en la misma, que, después de cargarla en un ordenador o red informática, tal como en una memoria de trabajo o memoria principal del ordenador o red informática, puede ejecutar el procedimiento de acuerdo con uno o más de los modos de realización divulgados en el presente documento, específicamente una o más de las etapas de procedimiento mencionadas anteriormente.

En el presente documento se divulga y propone además un producto de programa informático con medios de código de programa almacenados en una unidad de almacenamiento legible por máquina, para realizar el procedimiento de acuerdo con uno o más de los modos de realización divulgados en el presente documento, cuando el programa se ejecuta en un ordenador o red informática, específicamente una o más de las etapas de procedimiento mencionadas anteriormente. Como se usa en el presente documento, un producto de programa informático se refiere al programa como un producto comercializable. El producto puede existir en general en un formato arbitrario, tal como en un formato impreso, o en una unidad de almacenamiento de datos legible por ordenador. Específicamente, el producto de programa informático se puede distribuir sobre una red de datos.

Finalmente, en el presente documento se divulga y propone una señal de datos modulada que contiene instrucciones legibles por un sistema informático o red informática, para realizar el procedimiento de acuerdo con uno o más de los modos de realización divulgados en el presente documento, específicamente una o más de las etapas de procedimiento mencionadas anteriormente.

Específicamente, en el presente documento se divulga además:

- un ordenador o red informática que comprende al menos un procesador, en el que el procesador se adapta para realizar el procedimiento de acuerdo con uno de los modos de realización descritos en esta descripción,

- una estructura de datos cargable en ordenador que se adapta para realizar el procedimiento de acuerdo con uno de los modos de realización descritos en esta descripción mientras se ejecuta la estructura de datos en un ordenador,

- un programa informático, en el que el programa informático se adapta para realizar el procedimiento de acuerdo con uno de los modos de realización descritos en esta descripción mientras se ejecuta el programa en un ordenador,

- un programa informático que comprende medios de programa para realizar el procedimiento de acuerdo con uno de los modos de realización descritos en esta descripción mientras se ejecuta el programa informático en un ordenador o en una red informática,

- un programa informático que comprende medios de programa de acuerdo con el modo de realización precedente, en el que los medios de programa se almacenan en un medio de almacenamiento legible para un ordenador,

- un medio de almacenamiento, en el que una estructura de datos se almacena en el medio de almacenamiento y en el que la estructura de datos se adapta para realizar el procedimiento de acuerdo con uno de los modos de realización descritos en esta descripción después de haberse cargado en un almacenamiento principal y/o de trabajo de un ordenador o de una red informática, y

- un producto de programa informático que tiene medios de código de programa, en el que los medios de código de programa se pueden almacenar o se almacenan en un medio de almacenamiento, para realizar el procedimiento de acuerdo con uno de los modos de realización descritos en esta descripción, si los medios de código de programa se ejecutan en un ordenador o en una red informática.

En otro aspecto de la presente invención, se divulga una línea de procesamiento implementable por ordenador para la integración automática de picos de al menos un cromatograma de al menos una muestra. La muestra comprende al menos un analito y al menos una sustancia química relacionada. La línea de procesamiento comprende

- al menos un recopilador de datos configurado para recuperar al menos un cromatograma de la sustancia química relacionada y al menos un cromatograma del analito;

- al menos un dispositivo de evaluación configurado para evaluar el cromatograma de la sustancia química relacionada y el cromatograma del analito,

en la que el dispositivo de evaluación comprende al menos un procesador de tiempo de retención configurado para determinar al menos un valor inicial para el tiempo de retención de analito determinando el tiempo de retención de la sustancia química relacionada,

en la que el dispositivo de evaluación comprende al menos un sumador configurado para sumar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada con un desplazamiento constante predeterminado o predefinido y/o al menos un multiplicador configurado para multiplicar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada por un factor constante predeterminado o predefinido,

en la que el dispositivo de evaluación comprende al menos un dispositivo de determinación de posición configurado para determinar el tiempo de retención de analito teniendo en cuenta el valor inicial del tiempo de retención de la sustancia química relacionada,

en la que el dispositivo de evaluación comprende además al menos un procesador de picos configurado para determinar al menos un valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito determinando los parámetros de conformación de pico de al menos un pico del cromatograma de la sustancia química relacionada,

en la que el dispositivo de evaluación comprende al menos un dispositivo de ajuste configurado para determinar el área de pico de analito y la conformación de pico de analito aplicando al menos un análisis de ajuste al

cromatograma del analito teniendo en cuenta el valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito y el tiempo de retención de analito.

La línea de procesamiento se puede configurar para realizar el procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de los modos de realización precedentes. Para los modos de realización, los términos usados en el presente documento y las posibles definiciones, se puede hacer referencia a la descripción del procedimiento anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término "línea de procesamiento implementable por ordenador" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a un conjunto de operaciones secuenciales y/o dispositivos tales como dispositivos informáticos, procesadores y similares para realizar una integración automática de picos. La línea de procesamiento se puede configurar para realizar el procedimiento de acuerdo con la presente invención. La línea de procesamiento se puede configurar para realizar las etapas de procedimiento de a) a c) de forma totalmente automática.

Como se usa en el presente documento, el término "recopilador de datos" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a al menos una base de datos configurada para recibir y/o almacenar el al menos un cromatograma de la sustancia química relacionada y el al menos un cromatograma del analito. La recepción y/o almacenamiento de los cromatogramas de la sustancia química relacionada y del analito se puede realizar simultánea o posteriormente.

Como se usa además en el presente documento, el término "dispositivo de evaluación" se refiere en general a un dispositivo arbitrario adaptado para realizar las etapas de procedimiento como se describe anteriormente, preferentemente usando al menos un dispositivo de procesamiento de datos y, más preferentemente, usando al menos un procesador y/o al menos un circuito integrado específico de la aplicación. Por tanto, como ejemplo, el al menos un dispositivo de evaluación puede comprender al menos un dispositivo de procesamiento de datos que tiene almacenado en el mismo un código de programa informático que comprende una serie de instrucciones de ordenador. El dispositivo de evaluación puede proporcionar uno o más elementos de equipo físico para realizar una o más de las operaciones nombradas y/o puede proporcionar uno o más procesadores con programa informático ejecutándose en los mismos para realizar una o más de las etapas de procedimiento.

Como se explica anteriormente, el dispositivo de evaluación comprende el procesador de tiempo de retención. Como se usa en el presente documento, el término "procesador de tiempo de retención" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a un procesador configurado para realizar la determinación del tiempo de retención de la sustancia química relacionada, en particular la determinación de máximos locales dentro del cromatograma de la sustancia química relacionada. El procesador de tiempo de retención se puede configurar para determinar al menos un máximo de intensidad local dentro de un intervalo de tiempo de retención predefinido para determinar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada. Por ejemplo, el procesador de tiempo de retención se puede configurar para determinar el máximo de intensidad local teniendo en cuenta un intervalo predefinido para una proporción de cuantificador con respecto a calificador en la posición del máximo. Adicionalmente o de forma alternativa, el procesador de tiempo de retención se puede configurar para determinar patrones de múltiples máximos locales dentro del intervalo de tiempo de retención predefinido para determinar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada, en el que los patrones tienen una distancia predefinida entre los máximos. El procesador de tiempo de retención se puede configurar para la determinación de los patrones de múltiples máximos locales teniendo en cuenta un intervalo predefinido para una proporción de cuantificador con respecto a calificador en la posición del máximo, como se explica en detalle anteriormente con respecto al procedimiento.

Como se explica además anteriormente, el dispositivo de evaluación comprende el al menos un sumador configurado para sumar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada con un desplazamiento constante predeterminado o predefinido y/o al menos un multiplicador configurado para multiplicar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada por un factor constante predeterminado o predefinido. El sumador y/o el multiplicador se pueden configurar como circuitos digitales o se pueden implementar como programa informático.

El dispositivo de evaluación comprende el dispositivo de determinación de posición configurado para determinar el tiempo de retención de analito teniendo en cuenta el valor inicial del tiempo de retención de la sustancia química relacionada. Como se usa en el presente documento, el término "dispositivo de determinación de posición" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a un dispositivo tal como un procesador configurado para determinar el tiempo de retención de analito a partir del cromatograma del analito. El dispositivo de determinación de posición se puede disponer posterior al procesador de tiempo de retención y al sumador y/o multiplicador. Adicionalmente o de forma alternativa, el dispositivo de determinación de posición se puede diseñar integrado con el procesador de tiempo de retención y/o el dispositivo

de evaluación puede comprender al menos un procesador configurado para realizar ambas acciones, la determinación del valor inicial para el tiempo de retención de analito y el tiempo de retención de analito. El dispositivo de determinación de posición se puede configurar para determinar el tiempo de retención de analito usando al menos una técnica de ajuste de curva, en el que el valor inicial para el tiempo de retención de analito se usa como valor de partida para el ajuste de curva. La técnica de ajuste de curva puede comprender usar al menos un ajuste seleccionado del grupo que consiste en interpolación polinómica, algoritmo de Gauss-Newton, transformada de Fourier y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "procesador de picos" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a un procesador configurado para determinar parámetros de conformación de pico de al menos un pico. El procesador de picos se puede configurar para realizar al menos un procedimiento de ajuste. El procesador de picos se puede configurar para ajustar al menos un pico del cromatograma de la sustancia química relacionada. El ajuste puede comprender usar al menos una técnica de ajuste de curva, tal como una o más de interpolación polinómica, algoritmo de Gauss-Newton, transformada de Fourier y similares. El procesador de picos se puede configurar para determinar al menos un intervalo de tolerancia. El intervalo de tolerancia $p \pm \varepsilon$ se puede dar por el respectivo valor inicial determinado p para los parámetros de conformación de pico de analito y un intervalo de error $\pm \varepsilon$.

El procesador de picos se puede disponer posterior al procesador de tiempo de retención, al sumador y/o multiplicador y al dispositivo de determinación de posición. Adicionalmente o de forma alternativa, el procesador de picos se puede diseñar integrado con el procesador de tiempo de retención y/o el dispositivo de determinación de posición y/o el dispositivo de evaluación puede comprender al menos un procesador configurado para realizar las siguientes acciones, la determinación del valor inicial para el tiempo de retención de analito y el tiempo de retención de analito, determinando los parámetros de conformación de pico.

Como se usa en el presente documento, el término "dispositivo de ajuste" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a al menos un procesador configurado para determinar el área de pico de analito y la conformación de pico de analito aplicando al menos un análisis de ajuste al cromatograma del analito teniendo en cuenta el valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito y el tiempo de retención de analito. Por ejemplo, el dispositivo de ajuste se puede configurar para ajustar el cromatograma de analito usando al menos una función gaussiana modificada exponencialmente. Por ejemplo, el ajuste puede comprender usar al menos una función de ajuste como se describe en "Mathematical functions for the representation of chromatographic peaks", Valerio B. Di Marco, G. Giorgio Bombi, Journal of Chromatography A, 931 (2001) 1–30.

El dispositivo de evaluación puede comprender además al menos un preprocesador. El preprocesador se puede configurar para preprocesar el cromatograma de la sustancia química relacionada y/o del cromatograma del analito por uno o más de seleccionar al menos una región de interés en el cromatograma; seleccionar al menos un intervalo de tiempo de retención predefinido; al menos una etapa de suavizado que comprende aplicar uno o más de un filtro de promedio móvil, un filtro gaussiano, una eliminación de ruido de ondícula discreta, un suavizado de Savitzky-Golay, un suavizado de Loess; al menos una etapa de sustracción de fondo que comprende uno o más de un ajuste de mínimos cuadrados ponderado asimétrico con regularización, aplicar un filtro de sombrero de copa morfológico, una determinación de fondo de base de ondícula discreta o continua, determinar valores mínimos de un promedio móvil.

En otro aspecto de la presente invención, se divulga un sistema de espectrometría de masas. Como se usa en el presente documento, el término "sistema" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a un dispositivo que comprende al menos dos elementos. Los elementos pueden interactuar funcionalmente tal como para realizar el procedimiento de acuerdo con la presente invención.

El sistema de espectrometría de masas comprende

- al menos un dispositivo de espectrometría de masas que comprende al menos un filtro de masas y al menos un detector;

- al menos una línea de procesamiento implementable por ordenador de acuerdo con la presente invención.

Para los modos de realización, los términos usados en el presente documento y las posibles definiciones, se puede hacer referencia a la descripción del procedimiento y la línea de procesamiento implementable por ordenador anteriormente.

El dispositivo de espectrometría de masas puede ser o comprender al menos un dispositivo espectrómetro de masas con cromatografía de líquidos. El dispositivo de espectrometría de masas puede comprender al menos un

cromatógrafo. Como se usa en el presente documento, el término "filtro de masas" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a al menos un dispositivo configurado para separar componentes de una muestra con respecto a sus masas. Como se usa en el presente documento, el término "detector" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a al menos un dispositivo configurado para detectar partículas entrantes y para determinar el al menos un cromatograma.

El sistema de espectrometría de masas puede comprender además al menos un dispositivo de preparación de muestra. Como se usa en el presente documento, el término "dispositivo de preparación de muestra" es un término amplio y se le ha de dar su significado común y habitual para un experto en la técnica y no se ha de limitar a un significado especial o personalizado. El término se puede referir específicamente, sin limitación, a un dispositivo configurado para preparar la muestra para su análisis posterior. El dispositivo de preparación de muestra se puede configurar para añadir al menos una sustancia química relacionada a la muestra del analito.

El procedimiento y dispositivos de acuerdo con la presente invención pueden proporcionar un gran número de ventajas con respecto a los procedimientos y dispositivos conocidos para la integración de picos. En particular, el procedimiento y los dispositivos permiten una integración automática fiable de picos sin necesidad de revisión por un usuario experto ni de ajuste manual.

Breve descripción de las figuras

Otros rasgos característicos y modos de realización opcionales se divulgarán con más detalle en la posterior descripción de los modos de realización, preferentemente junto con las reivindicaciones dependientes. En las mismas, los rasgos característicos opcionales respectivos se pueden conseguir de manera aislada, así como en cualquier combinación factible arbitraria, como se dará cuenta el experto en la técnica. El alcance de la invención no está restringido por los modos de realización preferentes. Los modos de realización se representan esquemáticamente en las figuras. En las mismas, los números de referencia idénticos en estas figuras se refieren a elementos idénticos o funcionalmente comparables.

En las figuras:

la figura 1	muestra una comparación de un procedimiento para la integración automatizada de picos como es conocido en la técnica y una integración con revisión manual;
las figuras 2A a 2C	muestran la integración de picos del cromatograma de analito sin y con ajuste del tiempo de retención (figuras 2A y B) y el cromatograma de la sustancia química relacionada (figura 2C);
la figura 3	muestra un diagrama de flujo de un procedimiento implementado por ordenador de acuerdo con la presente invención;
las figuras 4A a 4C	muestran el uso de las características de picos de la sustancia química relacionada para la cuantificación de analito;
las figuras 5A y 5B	muestran el cromatograma de la sustancia química relacionada con la conformación de pico ajustada (fig. 5A) y el ajuste de pico resultante del cromatograma de analito (fig. 5B); y
la figura 6	muestra un modo de realización de un sistema de espectrometría de masas de acuerdo con la presente invención.

Modos de realización ejemplares

La figura 1 muestra una comparación de un procedimiento para la integración automatizada de picos como es conocido en la técnica usando un margen de tiempo de retención fijo (cuadrados) con la integración de picos reales usando revisión manual. Para menores concentraciones de analito, el procedimiento automatizado con margen de tiempo de retención fijo da lugar a una cuantificación incorrecta. Los resultados erróneos son resultado de la integración de un pico incorrecto debido a un cambio en el tiempo de retención específico de muestra. Además, la figura 1 muestra una comparación de un procedimiento para la integración automatizada de picos de acuerdo con la presente invención con la integración de picos reales usando revisión manual (círculos). Usando el procedimiento de acuerdo con la presente invención se garantiza la selección de la señal adecuada y la cuantificación de la proporción de área correcta.

Las figuras 2A a 2C muestran un ejemplo del efecto del ajuste del tiempo de retención (TR) en base al TR del

patrón interno (PI). Las figuras 2A y 2B muestran la integración de picos de un cromatograma de analito ejemplar, en el que en el eje x se representa el tiempo de retención TR y en el eje y la intensidad I. Las líneas 112 designan los cromatogramas preprocesados del analito en las figuras 2A y 2B y el PI en la figura 2C. Las líneas 110 designan el área integrada. La línea discontinua vertical 113 designa la localización correcta del pico de analito. Si bien una integración sin ajuste de tiempo de retención no logra capturar el pico correcto como es evidente en la figura 2A, usando el tiempo de retención del patrón interno como entrada para ajustar el tiempo de retención de analito da lugar a una integración correcta del pico de analito, véase la figura 2B.

La figura 3 muestra un diagrama de flujo de un modo de realización ejemplar de un procedimiento implementado por ordenador para la integración automática de picos de al menos un cromatograma de al menos una muestra de acuerdo con la presente invención. El procedimiento se puede realizar de forma completamente automática, específicamente sin interacción del usuario. El procedimiento comprende las siguientes etapas que, como ejemplo, se pueden realizar en el orden dado. Sin embargo, cabe destacar que también es posible un orden diferente. Además, también es posible realizar una o más de las etapas de procedimiento una vez o repetidamente. Además, es posible realizar dos o más de las etapas de procedimiento simultáneamente o de manera superpuesta en el tiempo. El procedimiento puede comprender otras etapas de procedimiento que no se enumeran.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

a) recuperar al menos un cromatograma de la sustancia química relacionada (indicado con el número de referencia 114) y al menos un cromatograma del analito (indicado con el número de referencia 116);

b) evaluar el cromatograma de la sustancia química relacionada, en el que la evaluación comprende

b1) determinar al menos un valor inicial para el tiempo de retención de analito (indicado con el número de referencia 117) determinando el tiempo de retención de la sustancia química relacionada (indicado con el número de referencia 118) y sumar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada con un desplazamiento constante predeterminado o predefinido y/o multiplicar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada por un factor constante predeterminado o predefinido (indicado con el número de referencia 120),

b2) determinar al menos un valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito (indicado con el número de referencia 122) determinando los parámetros de conformación de pico de al menos un pico del cromatograma de la sustancia química relacionada (indicado con el número de referencia 121);

c) evaluar el cromatograma del analito, en el que la evaluación comprende

c1) al menos una etapa de determinación de posición (indicada con el número de referencia 124), en la que el tiempo de retención de analito se determina teniendo en cuenta el valor inicial del tiempo de retención de la sustancia química relacionada;

c2) al menos una etapa de integración de picos (indicada con el número de referencia 126), en la que el área de pico de analito y la conformación de pico de analito se determinan aplicando al menos un análisis de ajuste al cromatograma del analito teniendo en cuenta el valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito y el tiempo de retención de analito.

El cromatograma se puede determinar usando al menos un dispositivo de espectrometría de masas 128, por ejemplo, al menos un dispositivo de espectrometría de masas con cromatografía de líquidos. El dispositivo de espectrometría de masas con cromatografía de líquidos puede ser o puede comprender al menos un dispositivo de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) o al menos un dispositivo de microcromatografía de líquidos (µCL). El dispositivo de espectrometría de masas con cromatografía de líquidos puede comprender un dispositivo de cromatografía de líquidos (CL) y un dispositivo de espectrometría de masas (EM), en el que el dispositivo de CL y el de EM están acoplados por medio de al menos una interfaz. El dispositivo de cromatografía de líquidos (CL) se puede configurar para separar uno o más analitos de interés de una muestra de otros componentes de la muestra para la detección del uno o más analitos con el dispositivo de espectrometría de masas 128. El dispositivo de CL puede comprender al menos una columna de CL. El dispositivo de espectrometría de masas 128 se puede configurar para detectar al menos un analito en base a la proporción de masa con respecto a carga. El dispositivo de espectrometría de masas 128 puede ser o puede comprender al menos un dispositivo de espectrometría de masas de cuadrupolo. La interfaz que acopla el dispositivo de CL y el EM puede comprender al menos una fuente de ionización configurada para generar iones moleculares y para transferir los iones moleculares a la fase gaseosa.

La integración del pico puede comprender la identificación y/o la medición de las características de curva del cromatograma. La integración de picos puede comprender uno o más de detección de picos, búsqueda de picos, identificación de picos, ajuste de picos, evaluación de picos, determinación del comienzo de pico y/o finalización de pico, determinación del fondo, determinación de la línea base. La integración de picos puede permitir la determinación de uno o más de área de pico, tiempo de retención, altura de pico y anchura de pico. La integración

de picos se puede realizar de forma no manual sino por al menos un ordenador y/o red informática y/o máquina. Específicamente, la integración automática de picos se puede realizar sin acción manual ni interacción con un usuario. En particular, la identificación de picos y/o la detección de picos y/o la determinación del área de pico se pueden realizar de forma no manual y sin acción manual o interacción con un usuario.

La muestra se puede seleccionar del grupo que consiste en: un líquido fisiológico, incluyendo sangre, suero, plasma, saliva, líquido del cristalino ocular, líquido cefalorraquídeo, sudor, orina, leche, líquido ascítico, mucosa, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido amniótico, tejido, células o similares. La muestra se puede usar directamente como se obtiene de la fuente respectiva o se puede someter a un flujo de trabajo de pretratamiento y/o preparación de muestra. La muestra comprende al menos un analito y al menos una sustancia química relacionada. Por ejemplo, los analitos de interés pueden ser vitamina D, estupefacientes, fármacos, hormonas y metabolitos en general. La sustancia química relacionada puede ser una sustancia que tiene una proporción de masa con respecto a carga similar al analito de interés. Por ejemplo, la sustancia química relacionada puede ser al menos un patrón interno y/o al menos una sustancia usada como cuantificador. El procedimiento de acuerdo con la presente invención permite una integración de picos fiable incluso para picos de baja intensidad, altos niveles de ruido o interferencias frecuentes. Específicamente, el procedimiento propone usar para la evaluación del cromatograma del analito de interés valores de entrada o de partida determinados a partir de otro cromatograma de una sustancia química relacionada de la misma medición para el que se pueden garantizar suficientes picos de alta intensidad, bajo nivel de ruido e interferencias de baja frecuencia. Por ejemplo, el procedimiento se puede usar para potenciar la integración de un cromatograma de analito sobre la base de los resultados obtenidos del cromatograma del patrón interno. Por ejemplo, el procedimiento se puede usar para potenciar la integración de un cromatograma calificador sobre la base de los resultados obtenidos del cromatograma cuantificador. La muestra de patrón interno puede ser una muestra que comprende al menos una sustancia de patrón interno con una concentración conocida tal como una predeterminada. Los patrones internos pueden ser casi idénticos al analito. La sustancia de patrón interno puede ser similar al analito de interés, tal como moléculas deuteradas o una versión marcada isotópicamente del analito de interés. Para detalles adicionales con respecto a la muestra, se hace referencia, por ejemplo, al documento EP 3 425 369 A1, del que se incluye la divulgación completa adjunta como referencia. Son posibles otros analitos de interés.

La muestra se puede pretratar añadiendo una sustancia química relacionada y/o diluyéndose con otra solución y/o habiéndose mezclado con reactivos o similares. El procedimiento puede comprender al menos una etapa de preparación de muestra. En la etapa de preparación de muestra, se puede añadir la al menos una sustancia química relacionada a la muestra del analito. La muestra que comprende el analito se puede enriquecer con la sustancia química relacionada. Se pueden añadir sustancias químicas relacionadas a la muestra con una concentración predefinida. La sustancia química relacionada se puede seleccionar de modo que sea fácilmente identificable en condiciones de funcionamiento normales del dispositivo de espectrometría de masas. La concentración de la sustancia química relacionada se puede predeterminar y ser significativamente mayor que la concentración del analito.

La recuperación de al menos un cromatograma 114 y 116 puede comprender uno o más de recibir, descargar, acceder, determinar, detectar y registrar el al menos un cromatograma. Por ejemplo, el cromatograma se puede recuperar descargando y/o accediendo al cromatograma desde al menos una base de datos, tal como de un detector o de una nube. Por ejemplo, el cromatograma se puede recuperar realizando al menos un desarrollo cromatográfico. El cromatograma de la sustancia química relacionada puede ser un cromatograma que comprende al menos una señal correspondiente a la sustancia química relacionada. El cromatograma del analito puede ser un cromatograma que comprende al menos una señal correspondiente al analito de interés.

El procedimiento puede comprender al menos una etapa de preprocesamiento 130, por ejemplo, para preprocesar uno o ambos del cromatograma de la sustancia química relacionada o el cromatograma del analito. El preprocesamiento 130 puede comprender uno o más de: seleccionar al menos una región de interés en el cromatograma; seleccionar al menos un intervalo de tiempo de retención predefinido; al menos una etapa de suavizado que comprende aplicar uno o más de un filtro de promedio móvil, un filtro gaussiano, una eliminación de ruido de ondícula discreta, un suavizado de Savitzky-Golay, un suavizado de Loess; al menos una etapa de sustracción de fondo que comprende uno o más de un ajuste de mínimos cuadrados ponderado asimétrico con regularización, aplicar un filtro de sombrero de copa morfológico, una determinación de fondo de base de ondícula discreta o continua, determinar valores mínimos de un promedio móvil.

En la etapa b) la evaluación comprende determinar al menos un valor inicial para el tiempo de retención de analito 117 determinando el tiempo de retención de la sustancia química relacionada 118. Para cada muestra se pueden determinar el tiempo de retención de pico y/o parámetros de conformación de pico adicionales de la sustancia química relacionada, tales como la anchura de pico y/o la asimetría de pico. Debido al principio de medición del dispositivo de espectrometría de masas, el tiempo de retención del analito puede ser idéntico a su sustancia química relacionada correspondiente o bien se puede calcular a partir de la sustancia química relacionada, tal como por la suma de una diferencia constante y/o la multiplicación por un factor constante. Por lo tanto, usando el tiempo de retención de la sustancia química relacionada y, si corresponde, algún desplazamiento y/o factor constante puede posibilitar la identificación correcta de los picos de analito incluso si el tiempo de retención está

cambiando.

La sustancia química relacionada que se añade a la muestra con una concentración predefinida puede ser fácilmente identificable en condiciones normales de funcionamiento del dispositivo de espectrometría de masas 128. El procedimiento puede comprender realizar al menos una comprobación de errores, en el que se somete a prueba la señal de la sustancia química relacionada. La comprobación de errores se puede usar para garantizar que se interprete el pico correcto como una señal de la sustancia química relacionada.

El valor inicial para el tiempo de retención de analito puede ser un valor de partida y/o valor de entrada para la determinación del tiempo de retención de analito 124 a partir del cromatograma del analito. Para determinar el valor inicial del tiempo de retención de analito 117, en primer lugar, se puede determinar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada 118. Esto puede comprender la determinación de al menos un máximo de intensidad local dentro de un intervalo de tiempo de retención predefinido. El intervalo de tiempo de retención predefinido usado para determinar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada 118 puede depender de uno o más del tiempo de retención esperado de la sustancia química relacionada, la resolución del detector y el intervalo de cambios en el tiempo de retención que se esperan debido al envejecimiento de la columna cromatográfica usada en la medición y otras influencias que pueden afectar la solidez de la medición cromatográfica. El tiempo de retención del máximo de intensidad local determinado se puede determinar a partir del cromatograma y se puede usar, después de la suma de un desplazamiento constante y/o la multiplicación por un factor constante 120, como valor inicial para el tiempo de retención de analito. La determinación del máximo de intensidad local se puede realizar teniendo en cuenta un intervalo predefinido para una proporción de cuantificador con respecto a calificador en la posición del máximo. La restricción a un intervalo predefinido de este tipo puede garantizar que los máximos locales seleccionados correspondan a picos relacionados con el analito de interés debido a que tienen una proporción de cuantificador con respecto a calificador cercana al valor que es característico para el analito de interés. Adicionalmente o de forma alternativa, la determinación del tiempo de retención de la sustancia química relacionada 118 puede comprender la determinación de patrones de múltiples máximos locales dentro del intervalo de tiempo de retención predefinido, en el que los patrones tienen una distancia predefinida entre los máximos. Dichos patrones de picos pueden ser característicos para determinados analitos de interés medidos con un protocolo de medición de CL-EM dado y, por lo tanto, se pueden usar para distinguir picos relacionados con el analito de interés de picos relacionados con otras sustancias. La determinación de los patrones de múltiples máximos locales se puede realizar teniendo en cuenta un intervalo predefinido para una proporción de cuantificador con respecto a calificador en la posición del máximo.

La evaluación comprende sumar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada con un desplazamiento constante predeterminado o predefinido y/o multiplicar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada por un factor constante predeterminado o predefinido 120. Por ejemplo, el tiempo de retención de la sustancia química relacionada puede ser t_1, en el que el valor inicial para el tiempo de retención de analito t_{ini} se puede determinar por $t_{ini}=t_1+t_{des}$, en el que t_{des} es el desplazamiento constante. El desplazamiento constante se puede predeterminar o predefinir comparando el tiempo de retención determinado de la sustancia química relacionada con al menos un tiempo de retención previsto o esperado de la sustancia química relacionada. El tiempo de retención previsto o esperado de la sustancia química relacionada puede ser un tiempo de retención conocido para la sustancia química relacionada, tal como un tiempo de retención predefinido o predeterminado en determinadas condiciones, en particular condiciones de temperatura. Por ejemplo, la comparación puede comprender restar el tiempo de retención determinado de la sustancia química relacionada del tiempo de retención previsto o esperado. Se puede usar como desplazamiento constante una desviación del tiempo de retención previsto o esperado respecto del tiempo de retención determinado de la sustancia química relacionada. Por ejemplo, el tiempo de retención de la sustancia química relacionada puede ser t_1, en el que el valor inicial para el tiempo de retención de analito t_{ini} se puede determinar por $t_{ini}=t_1*t_{fac}$, en el que t_{fac} es el factor constante. El factor constante se puede predeterminar o predefinir comparando el tiempo de retención determinado de la sustancia química relacionada con al menos un tiempo de retención previsto o esperado de la sustancia química relacionada. El tiempo de retención previsto o esperado de la sustancia química relacionada puede ser un tiempo de retención conocido para la sustancia química relacionada, tal como un tiempo de retención predefinido o predeterminado en determinadas condiciones, en particular condiciones de temperatura. Por ejemplo, la comparación puede comprender generar al menos una proporción del tiempo de retención determinado de la sustancia química relacionada y el tiempo de retención previsto o esperado. La proporción del tiempo de retención previsto o esperado y el tiempo de retención determinado de la sustancia química relacionada se puede usar como factor constante. El uso de un desplazamiento constante puede dar lugar a resultados satisfactorios para pequeños cambios en el tiempo de retención que se producen, por ejemplo, debido a factores externos, tales como la variación de la temperatura del instrumento o la exactitud limitada de los ajustes del gradiente en el procedimiento cromatográfico. Para los efectos que pueden provocar mayores cambios en el tiempo de retención, tales como el envejecimiento de la columna de CL, el uso de un factor constante puede ofrecer un rendimiento superior en comparación con la aplicación de un desplazamiento constante. Como se explica anteriormente, la determinación del valor inicial para el tiempo de retención de analito puede comprender la determinación del al menos un máximo de intensidad local dentro del intervalo de tiempo de retención predefinido. El valor inicial para el tiempo de retención de analito se puede determinar ajustando el intervalo de tiempo de retención predefinido de acuerdo con el máximo local determinado corregido por el desplazamiento constante predeterminado o predefinido y/o el factor constante predeterminado o

predefinido.

La evaluación del cromatograma de la sustancia química relacionada comprende determinar al menos un valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito 122 determinando los parámetros de conformación de pico de al menos un pico del cromatograma de la sustancia química relacionada 121. De forma similar al tiempo de retención de pico, el principio de medición del dispositivo de espectrometría de masas 128 puede dar lugar a que la conformación de pico de analito sea similar a la conformación de pico de la sustancia química relacionada debido a la similitud de ambos compuestos. Como se explica anteriormente, la señal de la sustancia química relacionada está muy bien controlada puesto que este compuesto se añade a la muestra a una concentración predefinida y relativamente alta, de modo que se garantizan resultados de ajuste de conformación de pico fiables. El resultado de la conformación de la sustancia química relacionada se puede usar como entrada para la posterior determinación de conformación para el analito de interés y se pueden establecer restricciones estrictas sobre las desviaciones de esta entrada debido a la similitud conocida de las conformaciones de picos de la sustancia química relacionada y del analito. El valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito pueden ser valores de partida y/o valores de entrada para la determinación de la conformación de pico de analito a partir del cromatograma del analito. La determinación del al menos un valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito puede comprender ajustar al menos un pico del cromatograma de la sustancia química relacionada. El ajuste puede comprender usar al menos una técnica de ajuste de curva, tal como una o más de interpolación polinómica, algoritmo de Gauss-Newton, transformada de Fourier y similares. Por ejemplo, el cromatograma de la sustancia química relacionada se puede ajustar usando al menos una función gaussiana modificada exponencialmente. Por ejemplo, el ajuste puede comprender usar al menos una función de ajuste como se describe en "Mathematical functions for the representation of chromatographic peaks", Valerio B. Di Marco, G. Giorgio Bombi, Journal of Chromatography A, 931 (2001) 1–30. Usando una o más de estas técnicas de ajuste de curva, se ajusta un pico para el cromatograma de la sustancia química relacionada. A partir de las técnicas de ajuste de curva, se pueden determinar los parámetros de pico del pico de la sustancia química relacionada. Los parámetros de pico pueden comprender uno o más de la anchura de pico, asimetría de pico, posición de pico, línea base y similares. Los parámetros de pico determinados a partir del cromatograma de la sustancia química relacionada se pueden usar para estimar los parámetros de pico del pico de analito expandiéndolos a un intervalo con los denominados intervalos de tolerancia.

El procedimiento puede comprender determinar al menos un intervalo de tolerancia del parámetro de pico respectivo. El intervalo de tolerancia $p \pm \varepsilon$ se puede dar por el respectivo valor inicial determinado p para los parámetros de conformación de pico de analito y un intervalo de error ε. El intervalo de error puede depender de la resolución del detector, el error de ajuste y el nivel de similitud química de la sustancia química relacionada y el analito de interés, por ejemplo, si se usa una sustancia química relacionada deuterada, marcada con C13 u otra. Por ejemplo, el uso de una sustancia química relacionada deuterada puede requerir establecer un intervalo de error más amplio en comparación con una sustancia química relacionada marcada con C13.

El procedimiento comprende evaluar el cromatograma del analito. La evaluación del cromatograma del analito puede comprender la al menos una etapa de preprocesamiento 130. El preprocesamiento puede comprender uno o más de seleccionar al menos una región de interés en el cromatograma; seleccionar al menos un intervalo de tiempo de retención predefinido; al menos una etapa de suavizado que comprende aplicar uno o más de un filtro de promedio móvil, un filtro gaussiano, una eliminación de ruido de ondícula discreta, un suavizado de Savitzky-Golay, un suavizado de Loess; al menos una etapa de sustracción de fondo que comprende uno o más de un ajuste de mínimos cuadrados ponderado asimétrico con regularización, aplicar un filtro de sombrero de copa morfológico, una determinación de fondo de base de ondícula discreta o continua, determinar valores mínimos de un promedio móvil. El preprocesamiento puede ser idéntico o diferente al preprocesamiento aplicado al cromatograma de la sustancia química relacionada.

La evaluación comprende la etapa de determinación de posición 124, en la que el tiempo de retención de analito se determina teniendo en cuenta el valor inicial del tiempo de retención de la sustancia química relacionada. El tiempo de retención de analito se puede determinar usando al menos una técnica de ajuste de curva. El valor inicial para el tiempo de retención de analito se puede usar como valor de partida para el ajuste de curva. Dado el valor inicial del tiempo de retención de analito determinado a partir del cromatograma de la sustancia química relacionada, el tiempo de retención de analito se puede determinar, por ejemplo, usando al menos una técnica de ajuste de curva. El ajuste puede comprender usar al menos una técnica de ajuste de curva, tal como una o más de interpolación polinómica, algoritmo de Gauss-Newton, transformada de Fourier y similares. Por ejemplo, el ajuste puede comprender usar al menos una función de ajuste como se describe en "Mathematical functions for the representation of chromatographic peaks", Valerio B. Di Marco, G. Giorgio Bombi, Journal of Chromatography A, 931 (2001) 1–30. El tiempo de retención de analito se puede determinar usando un intervalo de tolerancia estrecho alrededor del valor inicial del tiempo de retención. Por ejemplo, el intervalo de tolerancia $t \pm \varepsilon_t$ viene dado por el respectivo valor inicial determinado t para el tiempo de retención de pico de analito y un intervalo de error $\pm \varepsilon_t$. El intervalo de error puede depender de la resolución del detector, la anchura del pico cromatográfico del analito de interés y la sustancia química relacionada, el nivel de similitud química de la sustancia química relacionada y el analito de interés, por ejemplo, si se usa una sustancia química relacionada deuterada, marcada con C13 u otra, y el nivel de ruido cromatográfico. Los cromatogramas con alto nivel de ruido pueden requerir, por ejemplo, un

intervalo de error más amplio.

La evaluación comprende además la etapa de integración de picos 126, en la que el área de pico de analito y la conformación de pico de analito se determinan aplicando al menos un análisis de ajuste al cromatograma del analito teniendo en cuenta el valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito y el tiempo de retención de analito. Usando el tiempo de retención de analito determinado y el valor inicial de los parámetros de conformación de pico de analito, se puede ajustar una curva al cromatograma del analito para determinar el área de pico y la conformación de pico de analito. En la etapa de integración de picos, el cromatograma de analito se puede ajustar usando al menos una función gaussiana modificada exponencialmente. Por ejemplo, el ajuste puede comprender usar al menos una función de ajuste como se describe en "Mathematical functions for the representation of chromatographic peaks", Valerio B. Di Marco, G. Giorgio Bombi, Journal of Chromatography A, 931 (2001) 1–30. El área de pico de analito y la conformación de pico de analito se pueden determinar usando el intervalo de tolerancia p ± ε alrededor del valor inicial del respectivo parámetro de conformación de pico de analito, como se describe anteriormente.

El uso del tiempo de retención y los parámetros de conformación de pico de la sustancia química relacionada para evaluar el cromatograma de analito puede dar lugar a una determinación de área de pico de analito más exacta, especialmente en caso de baja concentración de analito, fondo complejo, alto nivel de ruido y picos de interferencia. Por tanto, el procedimiento de acuerdo con la presente invención posibilita una automatización fiable de la integración de picos sin necesidad de revisión por un usuario experto ni de ajuste manual.

Las figuras 4A a 4C muestran el uso de las características de picos de la sustancia química relacionada para la cuantificación de analito. La figura 4A muestra el cromatograma de la sustancia química relacionada, en este caso el cromatograma del patrón interno, usado para determinar los parámetros de conformación de pico y tiempo de retención. La figura 4B muestra un procedimiento para la integración de picos con un margen de tiempo de retención fijo y que no tiene en cuenta la conformación de pico ni el tiempo de retención determinados del cromatograma de la sustancia química relacionada. La presencia de un pico de interferencia junto al pico de analito, línea discontinua, da lugar a un resultado incorrecto de la conformación de pico de analito 132. La figura 4C muestra que el uso de los parámetros de conformación de la sustancia química relacionada posibilita la cuantificación correcta del pico de analito 132 incluso en presencia de un pico de interferencia.

La figura 5A muestra otro cromatograma de la sustancia química relacionada ejemplar, en este caso el cromatograma del patrón interno, con el resultado de ajuste. En este modo de realización, el resultado de ajuste puede ser una anchura de pico de 2950 y una asimetría de pico de 0,1. Estos parámetros de conformación de pico se pueden usar para estimar los parámetros de pico del analito expandiéndolos en el denominado intervalo de tolerancia, por ejemplo, anchura de pico = 2950 ± 20 % y asimetría de pico = 0,1 ± 50 %. El tiempo de retención derivado de este cromatograma del patrón interno puede ser 4700. El tiempo de retención de analito se puede determinar a partir del cromatograma mostrado en la figura 5B usando un intervalo de tolerancia estrecho alrededor del valor inicial del tiempo de retención. Por ejemplo, el intervalo de tolerancia $t \pm \varepsilon_t$ viene dado por el respectivo valor inicial determinado t para el tiempo de retención de pico de analito y un intervalo de error $\pm \varepsilon_t$. Por ejemplo, en el ejemplo mostrado en las figuras 5A y B el intervalo de tolerancia puede ser ± 0,1 %. La figura 5B muestra además el ajuste de pico resultante del cromatograma de analito usando el procedimiento de acuerdo con la presente invención. Los resultados de ajuste de analito pueden ser una anchura de pico de 2890, una asimetría de pico de 0,12 y un tiempo de retención de pico de 47100.

La figura 6 muestra un modo de realización de un sistema de espectrometría de masas 134 de acuerdo con la presente invención de una manera altamente esquemática. El sistema de espectrometría de masas 134 comprende al menos un dispositivo de espectrometría de masas 128 que comprende al menos un filtro de masas 136 y al menos un detector 138. El dispositivo de espectrometría de masas puede ser o comprender al menos un dispositivo espectrómetro de masas con cromatografía de líquidos. El dispositivo de espectrometría de masas 128 puede comprender al menos un cromatógrafo. El filtro de masas 136 se puede configurar para separar los componentes de una muestra con respecto a sus masas. El detector 138 se puede configurar para detectar partículas entrantes y para determinar el al menos un cromatograma. El sistema de espectrometría de masas 134 comprende además al menos una línea de procesamiento implementable por ordenador 140 para la integración automática de picos de al menos un cromatograma de al menos una muestra de acuerdo con la presente invención.

La línea de procesamiento 140 comprende

- al menos un recopilador de datos 142 configurado para recuperar al menos un cromatograma de la sustancia química relacionada y al menos un cromatograma del analito;

- al menos un dispositivo de evaluación 144 configurado para evaluar el cromatograma de la sustancia química relacionada y el cromatograma del analito,

en la que el dispositivo de evaluación 144 comprende al menos un procesador de tiempo de retención 146 configurado para determinar al menos un valor inicial para el tiempo de retención de analito determinando el tiempo

de retención de la sustancia química relacionada,

en la que el dispositivo de evaluación 144 comprende al menos un sumador 148 configurado para sumar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada con un desplazamiento constante predeterminado o predefinido y/o al menos un multiplicador 150 configurado para multiplicar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada por un factor constante predeterminado o predefinido,

en la que el dispositivo de evaluación 144 comprende al menos un dispositivo de determinación de posición 152 configurado para determinar el tiempo de retención de analito teniendo en cuenta el valor inicial del tiempo de retención de la sustancia química relacionada,

en la que el dispositivo de evaluación 144 comprende además al menos un procesador de picos 154 configurado para determinar al menos un valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito determinando los parámetros de conformación de pico de al menos un pico del cromatograma de la sustancia química relacionada,

en la que el dispositivo de evaluación 144 comprende al menos un dispositivo de ajuste 156 configurado para determinar el área de pico de analito y la conformación de pico de analito aplicando al menos un análisis de ajuste al cromatograma del analito teniendo en cuenta el valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito y el tiempo de retención de analito.

El recopilador de datos 142 puede ser o puede comprender al menos una base de datos configurada para recibir y/o almacenar el al menos un cromatograma de la sustancia química relacionada y el al menos un cromatograma del analito. La recepción y/o almacenamiento de los cromatogramas de la sustancia química relacionada y del analito se puede realizar simultánea o posteriormente.

El dispositivo de evaluación 144 puede comprender al menos un dispositivo de procesamiento de datos que tiene un código de programa informático almacenado en el mismo que comprende una serie de instrucciones de ordenador. El dispositivo de evaluación 144 puede proporcionar uno o más elementos de equipo físico para realizar una o más de las operaciones nombradas y/o puede proporcionar uno o más procesadores con programa informático ejecutándose en los mismos para realizar una o más de las etapas de procedimiento.

El procesador de tiempo de retención 146 puede ser un procesador configurado para realizar la determinación del tiempo de retención de la sustancia química relacionada, en particular la determinación de máximos locales dentro del cromatograma de la sustancia química relacionada. El procesador de tiempo de retención 146 se puede configurar para determinar al menos un máximo de intensidad local dentro de un intervalo de tiempo de retención predefinido para determinar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada. Por ejemplo, el procesador de tiempo de retención 146 se puede configurar para determinar el máximo de intensidad local teniendo en cuenta un intervalo predefinido para una proporción de cuantificador con respecto a calificador en la posición del máximo. Adicionalmente o de forma alternativa, el procesador de tiempo de retención 146 se puede configurar para determinar patrones de múltiples máximos locales dentro del intervalo de tiempo de retención predefinido para determinar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada, en el que los patrones tienen una distancia predefinida entre los máximos. El procesador de tiempo de retención 146 se puede configurar para determinar los patrones de múltiples máximos locales teniendo en cuenta un intervalo predefinido para una proporción de cuantificador con respecto a calificador en la posición del máximo, como se explica en detalle anteriormente con respecto al procedimiento.

El sumador 148 y/o el multiplicador 150 se pueden configurar como circuitos digitales o se pueden implementar como programa informático.

El dispositivo de determinación de posición 152 se puede configurar para determinar el tiempo de retención de analito a partir del cromatograma del analito. El dispositivo de determinación de posición 152 se puede disponer posterior al procesador de tiempo de retención 146 y al sumador 148 y/o multiplicador 150. Adicionalmente o de forma alternativa, el dispositivo de determinación de posición 152 se puede diseñar integrado con el procesador de tiempo de retención 146 y/o el dispositivo de evaluación 144 puede comprender al menos un procesador configurado para realizar ambas acciones, la determinación del valor inicial para el tiempo de retención de analito y el tiempo de retención de analito. El dispositivo de determinación de posición 152 se puede configurar para determinar el tiempo de retención de analito usando al menos una técnica de ajuste de curva, en el que el valor inicial para el tiempo de retención de analito se usa como valor de partida para el ajuste de curva. La técnica de ajuste de curva puede comprender usar al menos un ajuste seleccionado del grupo que consiste en interpolación polinómica, algoritmo de Gauss-Newton, transformada de Fourier y similares.

El procesador de picos 154 se puede configurar para realizar al menos un procedimiento de ajuste. El procesador de picos 154 se puede configurar para ajustar al menos un pico del cromatograma de la sustancia química relacionada. El ajuste puede comprender usar al menos una técnica de ajuste de curva, tal como una o más de interpolación polinómica, algoritmo de Gauss-Newton, transformada de Fourier y similares. El procesador de picos 154 se puede configurar para determinar el intervalo de tolerancia. El intervalo de tolerancia $p \pm \varepsilon$ se puede dar por

el respectivo valor inicial determinado p para los parámetros de conformación de pico de analito y un intervalo de error ± ε.

El procesador de picos 154 se puede disponer posterior al procesador de tiempo de retención 146, al sumador 148 y/o multiplicador 150 y al dispositivo de determinación de posición 152. Adicionalmente o de forma alternativa, el procesador de picos 154 se puede diseñar integrado con el procesador de tiempo de retención 146 y/o dispositivo de determinación de posición 152 y/o el dispositivo de evaluación 144 puede comprender al menos un procesador configurado para realizar las siguientes acciones, la determinación del valor inicial para el tiempo de retención de analito y el tiempo de retención de analito, determinando los parámetros de conformación de pico.

El dispositivo de ajuste 156 se puede configurar para ajustar el cromatograma de analito usando al menos una función gaussiana modificada exponencialmente. Por ejemplo, el ajuste puede comprender usar al menos una función de ajuste como se describe en "Mathematical functions for the representation of chromatographic peaks", Valerio B. Di Marco, G. Giorgio Bombi, Journal of Chromatography A, 931 (2001) 1–30.

El dispositivo de evaluación 144 puede comprender además al menos un preprocesador. El preprocesador se puede configurar para preprocesar el cromatograma de la sustancia química relacionada y/o del cromatograma del analito por uno o más de seleccionar al menos una región de interés en el cromatograma; seleccionar al menos un intervalo de tiempo de retención predefinido; al menos una etapa de suavizado que comprende aplicar uno o más de un filtro de promedio móvil, un filtro gaussiano, una eliminación de ruido de ondícula discreta, un suavizado de Savitzky-Golay, un suavizado de Loess; al menos una etapa de sustracción de fondo que comprende uno o más de un ajuste de mínimos cuadrados ponderado asimétrico con regularización, aplicar un filtro de sombrero de copa morfológico, una determinación de fondo de base de ondícula discreta o continua, determinar valores mínimos de un promedio móvil.

Lista de números de referencia

110	curva
112	curva
113	línea
114	recuperar el cromatograma de la sustancia química relacionada
116	recuperar el cromatograma del analito
117	determinar el valor inicial para el tiempo de retención de analito
118	determinar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada
120	sumar y/o multiplicar
121	determinar los parámetros de conformación de pico de la sustancia química relacionada
122	determinar el valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito
124	etapa de determinación de posición
126	etapa de integración de picos
128	dispositivo de espectrometría de masas
130	etapa de preprocesamiento
132	conformación de pico de analito
134	sistema de espectrometría de masas
136	filtro de masas
138	detector
140	línea de procesamiento implementable por ordenador
142	recopilador de datos
144	dispositivo de evaluación
146	procesador de tiempo de retención
148	sumador
150	multiplicador
152	dispositivo de determinación de posición
154	procesador de pico
156	dispositivo de ajuste

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento implementado por ordenador para la integración automática de picos de al menos un cromatograma de al menos una muestra, en el que la muestra comprende al menos un analito y al menos una sustancia química relacionada, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

a) recuperar al menos un cromatograma de la sustancia química relacionada y al menos un cromatograma del analito; (114, 116)

b) evaluar el cromatograma de la sustancia química relacionada, en el que la evaluación comprende

b1) determinar al menos un valor inicial para el tiempo de retención de analito (117) determinando el tiempo de retención de la sustancia química relacionada (118) y sumando el tiempo de retención de la sustancia química relacionada con un desplazamiento constante predeterminado o predefinido y/o multiplicando el tiempo de retención de la sustancia química relacionada por un factor constante predeterminado o predefinido (120),

b2) determinar al menos un valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito (122) determinando los parámetros de conformación de pico de al menos un pico del cromatograma de la sustancia química relacionada (121);

c) evaluar el cromatograma del analito, en el que la evaluación comprende

c1) al menos una etapa de determinación de posición (124), en la que el tiempo de retención de analito se determina teniendo en cuenta el valor inicial del tiempo de retención de la sustancia química relacionada;

c2) al menos una etapa de integración de picos (126), en la que el área de pico de analito y la conformación de pico de analito se determinan aplicando al menos un análisis de ajuste al cromatograma del analito teniendo en cuenta el valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito y el tiempo de retención de analito.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación precedente, en el que las etapas de procedimiento de a) a c) se realizan de forma totalmente automática.

3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la determinación del tiempo de retención de la sustancia química relacionada (118) comprende determinar al menos un máximo de intensidad local dentro de un intervalo de tiempo de retención predefinido.

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación precedente, en el que la determinación del máximo de intensidad local se realiza teniendo en cuenta un intervalo predefinido para una proporción de cuantificador con respecto a calificador en la posición del máximo.

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la determinación del tiempo de retención de la sustancia química relacionada (118) comprende determinar patrones de múltiples máximos locales dentro del intervalo de tiempo de retención predefinido, en el que los patrones tienen una distancia predefinida entre los máximos.

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación precedente, en el que la determinación de los patrones de múltiples máximos locales se realiza teniendo en cuenta un intervalo predefinido para una proporción de cuantificador con respecto a calificador en la posición del máximo.

7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el valor inicial para el tiempo de retención de analito se determina ajustando el intervalo de tiempo de retención predefinido de acuerdo con el máximo local determinado corregido por el desplazamiento constante predeterminado o predefinido y/o el factor constante predeterminado o predefinido.

8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tiempo de retención de analito t se determina usando un intervalo de tolerancia determinado a partir del cromatograma de la sustancia química relacionada como dominio, en el que el intervalo de tolerancia $t \pm \varepsilon$ para el tiempo de retención de pico de analito t comprende un intervalo de error del tiempo de retención de pico de analito ε, que se establece en el intervalo de error respectivo del tiempo de retención de pico de la sustancia química relacionada.

9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la determinación del al menos un valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito (122) comprende ajustar al menos un pico del cromatograma de la sustancia química relacionada, en el que el ajuste comprende usar al menos una técnica de ajuste de curva, tal como una o más de interpolación polinómica, algoritmo de Gauss-Newton, transformada de Fourier y similares.

10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tiempo de retención de analito se determina usando al menos una técnica de ajuste de curva, en el que el valor inicial para el tiempo de retención de analito se usa como valor de partida para el ajuste de curva.

11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación precedente, en el que la técnica de ajuste de curva comprende usar al menos un ajuste seleccionado del grupo que consiste en interpolación polinómica, algoritmo de Gauss-Newton, transformada de Fourier y similares.

12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento comprende determinar al menos un intervalo de tolerancia, en el que el intervalo de tolerancia $p \pm \varepsilon$ viene dado por el respectivo valor inicial determinado p para los parámetros de conformación de pico de analito y un intervalo de error $\pm \varepsilon$.

13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación precedente, en el que el intervalo de error de los parámetros de conformación de pico de analito $\pm \varepsilon$ se establece en el intervalo de error de los parámetros de conformación de pico de la sustancia química relacionada.

14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que en la etapa de integración de picos (126) el cromatograma de analito se ajusta usando al menos una función gaussiana modificada exponencialmente.

15. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la evaluación del cromatograma de la sustancia química relacionada y/o del cromatograma del analito comprende al menos una etapa de preprocesamiento (130), en el que el preprocesamiento (130) comprende uno o más de: seleccionar al menos una región de interés en el cromatograma; seleccionar al menos un intervalo de tiempo de retención predefinido; al menos una etapa de suavizado que comprende aplicar uno o más de un filtro de promedio móvil, un filtro gaussiano, una eliminación de ruido de ondícula discreta, un suavizado de Savitzky-Golay, un suavizado de Loess; al menos una etapa de sustracción de fondo que comprende uno o más de un ajuste de mínimos cuadrados ponderado asimétrico con regularización, aplicar un filtro de sombrero de copa morfológico, una determinación de fondo de base de ondícula discreta o continua, determinar valores mínimos de un promedio móvil.

16. Una línea de procesamiento implementable por ordenador (140) para la integración automática de picos de al menos un cromatograma de al menos una muestra, en la que la muestra comprende al menos un analito y al menos una sustancia química relacionada, en la que la línea de procesamiento (140) comprende

- al menos un recopilador de datos (142) configurado para recuperar al menos un cromatograma de la sustancia química relacionada y al menos un cromatograma del analito;

- al menos un dispositivo de evaluación (144) configurado para evaluar el cromatograma de la sustancia química relacionada y el cromatograma del analito,

en la que el dispositivo de evaluación (144) comprende al menos un procesador de tiempo de retención (146) configurado para determinar al menos un valor inicial para el tiempo de retención de analito determinando el tiempo de retención de la sustancia química relacionada, en la que el dispositivo de evaluación (144) comprende al menos un sumador (148) configurado para sumar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada con un desplazamiento constante predeterminado o predefinido y/o al menos un multiplicador (150) configurado para multiplicar el tiempo de retención de la sustancia química relacionada por un factor constante predeterminado o predefinido,

en la que el dispositivo de evaluación (144) comprende al menos un dispositivo de determinación de posición (152) configurado para determinar el tiempo de retención de analito teniendo en cuenta el valor inicial del tiempo de retención de la sustancia química relacionada,

en la que el dispositivo de evaluación (144) comprende además al menos un procesador de picos (154) configurado para determinar al menos un valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito determinando los parámetros de conformación de pico de al menos un pico del cromatograma de la sustancia química relacionada,

en la que el dispositivo de evaluación (144) comprende al menos un dispositivo de ajuste (156) configurado para determinar el área de pico de analito y la conformación de pico de analito aplicando al menos un análisis de ajuste al cromatograma del analito teniendo en cuenta el valor inicial para los parámetros de conformación de pico de analito y el tiempo de retención de analito.

17. La línea de procesamiento (140) de acuerdo con la reivindicación 16, en la que la línea de procesamiento (140) se configura para realizar el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-15.

18. Un sistema de espectrometría de masas (134) que comprende

- al menos un dispositivo de espectrometría de masas (128) que comprende al menos un filtro de masas (136) y al menos un detector (138);

- al menos una línea de procesamiento implementable por ordenador (140) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17.

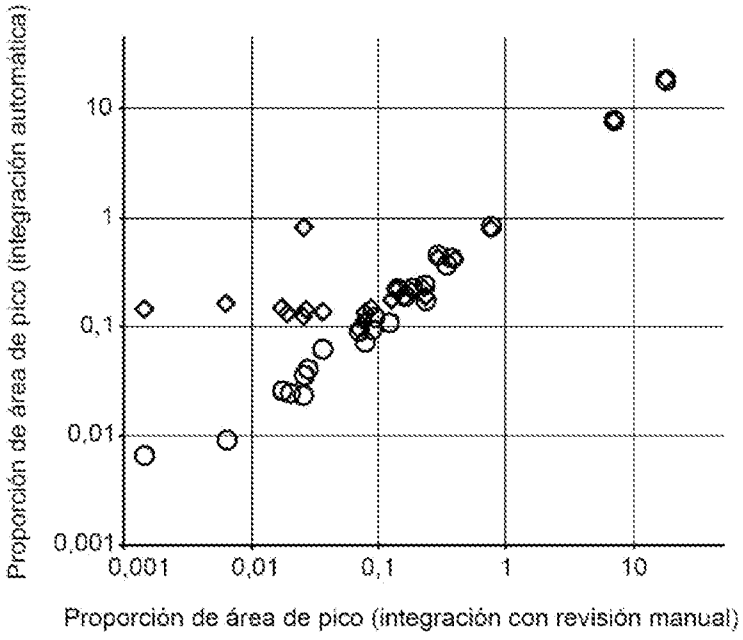


Fig. 1

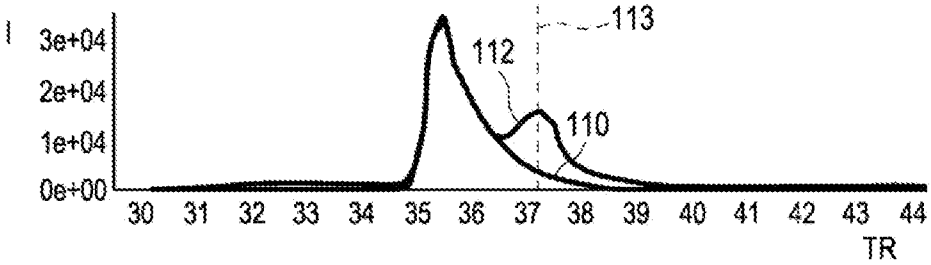


Fig. 2 A

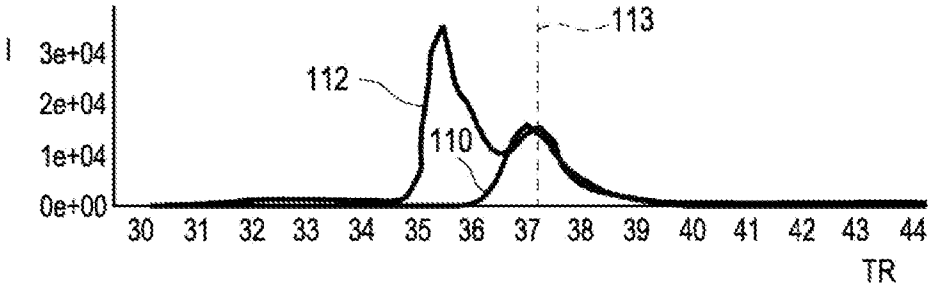


Fig. 2 B

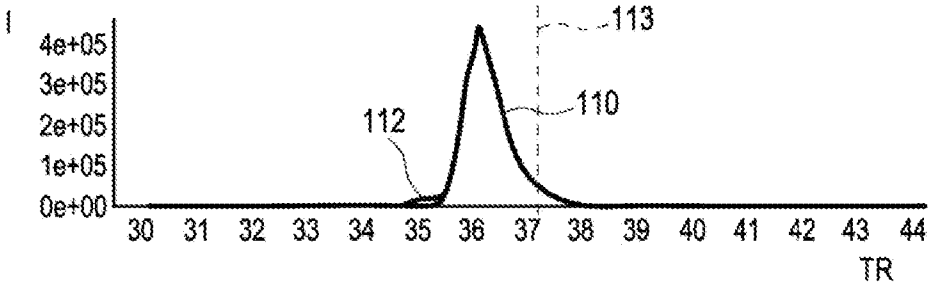


Fig. 2 C

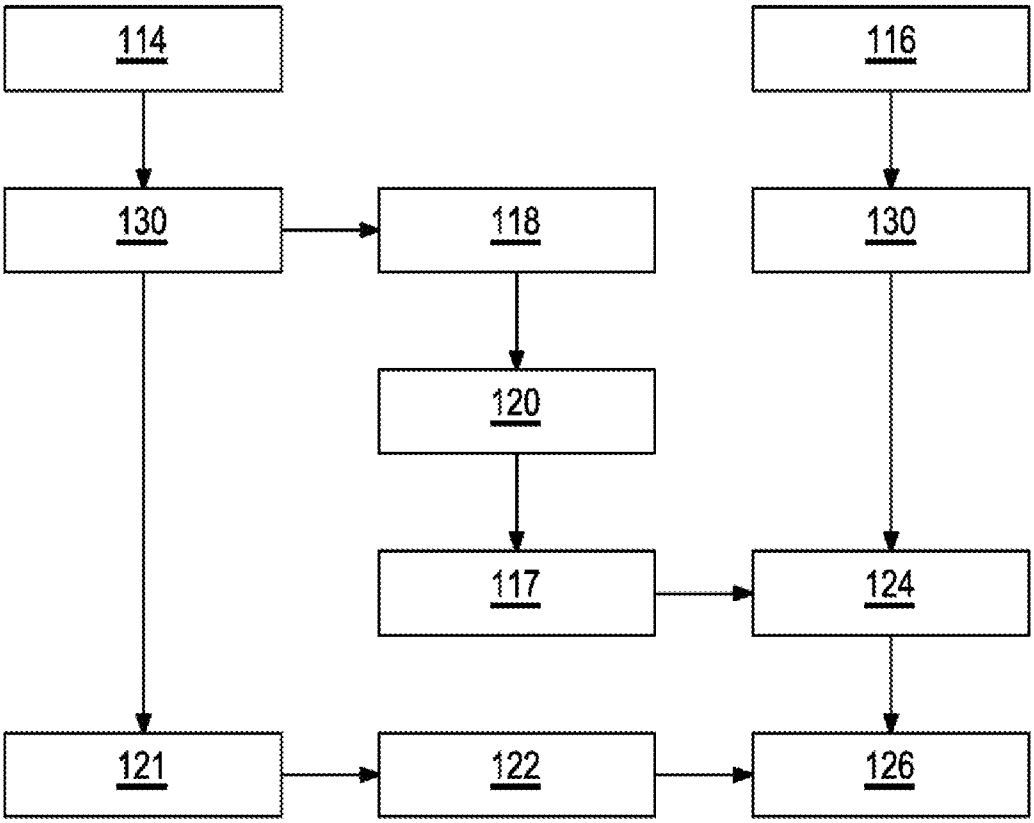


Fig. 3

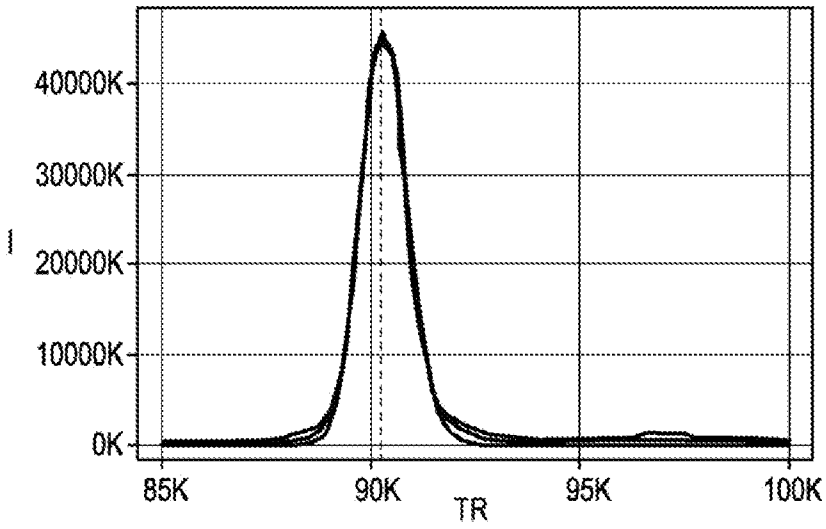


Fig. 4 A

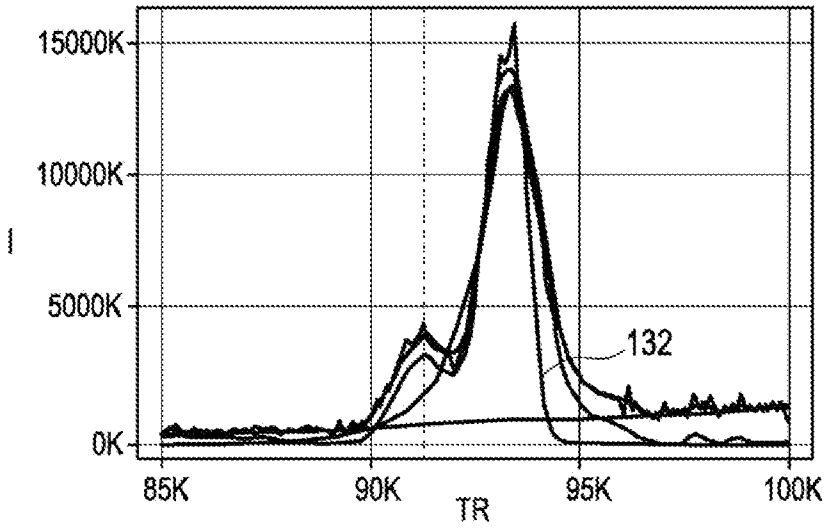


Fig. 4 B

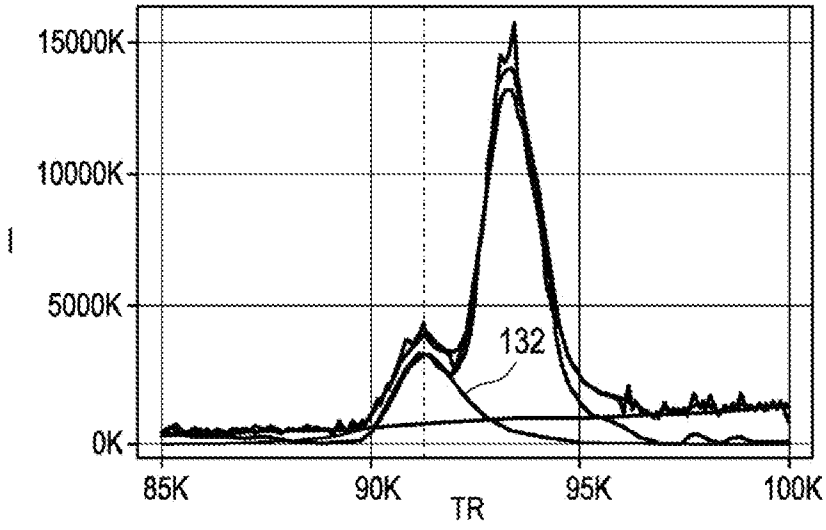


Fig. 4 C

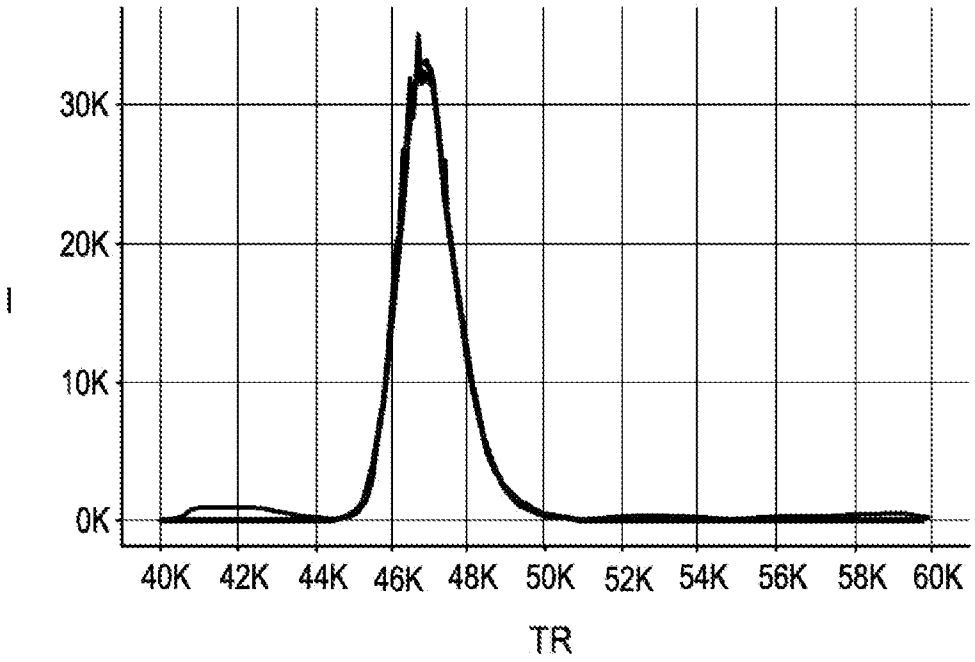

30K
20K
I
10K
0K
40K 42K 44K 46K 48K 50K 52K 54K 56K 58K 60K
TR

Fig. 5 A

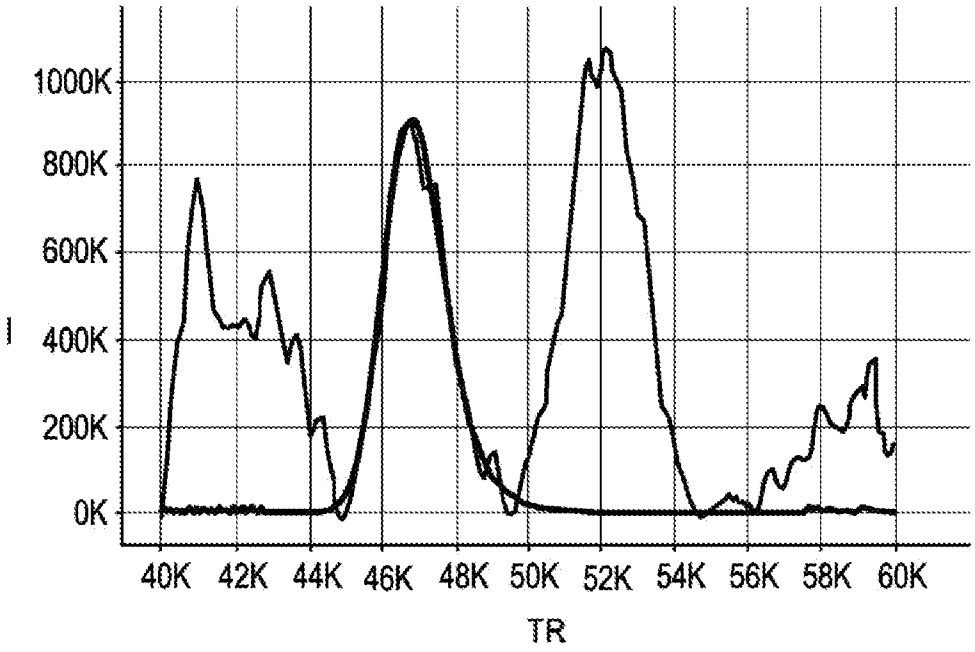

1000K
800K
600K
I
400K
200K
0K
40K 42K 44K 46K 48K 50K 52K 54K 56K 58K 60K
TR

Fig. 5 B

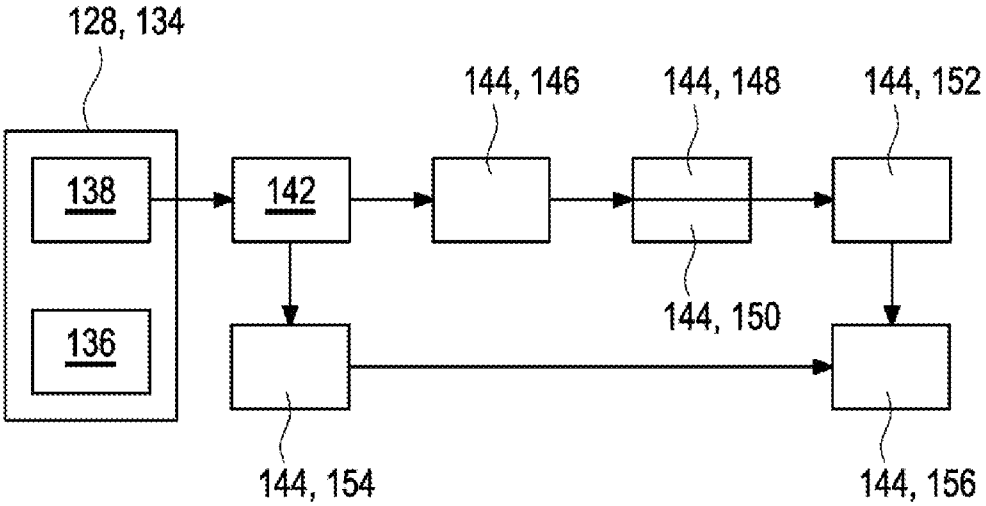

128, 134
138
136
142
144, 146
144, 148
144, 150
144, 152
144, 154
144, 156

Fig. 6