

СИСТЕМЫ ГАЗОВОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ С ТЕХНОЛОГИЕЙ ORBITRAP

УДК 543.544.3, 543.51
БАК 02.00.02

Гудилин Д.Ю., к.т.н., ООО "ЛабПро Медиа", dmitrygudilin@yandex.ru
Кудан П.В., ООО "МС-АНАЛИТИКА", pavel.kudan@textronica.com

Газовая хромато-масс-спектрометрия (ГХ/МС) – метод количественного и качественного анализа широкого круга соединений, который заключается в разделении сложных смесей в газовой фазе и идентификации их компонентов средствами масс-спектрометрии. ГХ/МС находит все более широкое применение в токсикологии, криминалистике, медицине, анализе пищевых продуктов и множестве других областей. Наиболее современный на данный момент тип масс-анализатора – Orbitrap (орбитальная ионная ловушка), разработанный под руководством А.А.Макарова группой ученых и инженеров корпорации Thermo Fisher Scientific. Созданные изначально для работы с ВЭЖХ, серийные приборы с Orbitrap обеспечивают разрешение до 1 млн FWHM ($m/z = 200$ а.е.м.) и точность определения масс лучше 1 ppm, что позволяет применять их для решения сложнейших задач в протеомике, метаболомике и других передовых областях научных исследований. Высокий интерес к использованию такой технологии привел к тому, что после достижения необходимой производительности масс-анализаторов корпорацией Thermo Fisher Scientific были предложены решения на базе Orbitrap и для ГХ/МС высокого разрешения.

ПЕРВЫЙ ORBITRAP ДЛЯ ГХ/МС

Работы по созданию системы ГХ/МС на базе нового масс-анализатора Orbitrap (рис.1) начались уже после

презентации первого прибора с орбитальной ионной ловушкой в 2005 году [1]. Одной из ключевых задач на первом этапе было повышение скорости работы ловушки. В результате был создан прототип системы ГХ/МС, далекий от запуска в серию, но вызвавший высокий интерес на рынке.

Предпосылки к разработке реального серийного прибора сложились к 2011 году, когда производительность масс-анализатора была увеличена в четыре раза при одновременном улучшении чувствительности, точности и селективности, что сделало Orbitrap полностью совместимым с газовыми хроматографами по его скоростным возможностям. Важнейшими нововведениями стали применение улучшенных алгоритмов быстрого преобразования Фурье, а также создание ловушки с более высокой напряженностью поля, меньшими размерами и большей рабочей частотой.

В 2015 году был представлен Q Exactive GC Orbitrap – тандемный вариант первого серийного прибора Orbitrap для газовой хроматографии. Годом позднее была выпущена облегченная версия прибора, получившая название Exactive GC Orbitrap. Обе модели показывают уникальное сочетание высокой

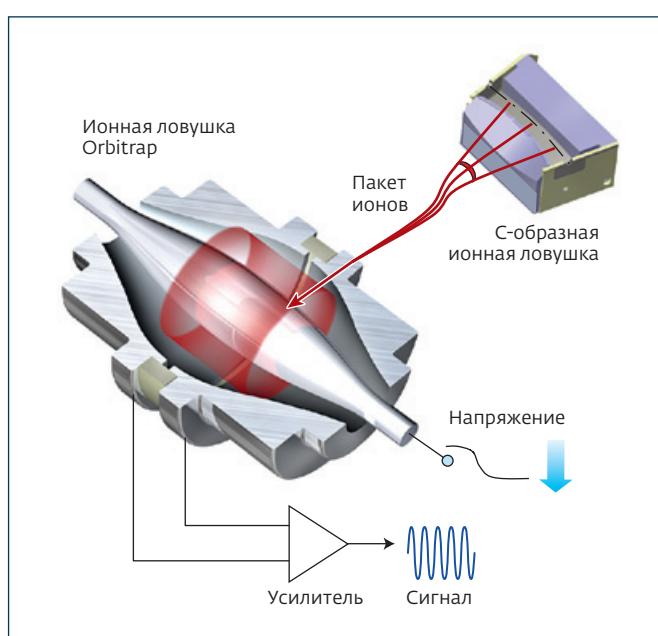


Рис.1. Схема масс-анализатора с орбитальной ионной ловушкой



Рис.2. Система ГХ/МС-МС Q Exactive GC Orbitrap

чувствительности и высокой точности и стабильности определения массы.

СХОДСТВА И РАЗЛИЧИЯ МОДЕЛЕЙ

Модель Q Exactive GC (рис.2) имеет разрешающую способность до 100 тыс. FWHM (272 а.е.м.) и точность измерения масс 1–3 ppm в диапазоне 30–3000 а.е.м. Динамический диапазон в единичном спектре составляет более 5 тыс. При разрешении 12,5 тыс. FWHM (272 а.е.м.) возможно выполнение до 18 сканирований/с. Благодаря оснащению квадрупольем и столкновительной ячейкой (рис.3) прибор может работать в режиме тандемного анализа ГХ/МС-МС.

Модель Exactive GC отличает отсутствие столкновительной ячейки и меньшая разрешающая способность до 50 тыс. FWHM (272 а.е.м.). Упрощение системы, с одной стороны, не ухудшило ее наиболее важных характеристик, с другой стороны, позволило снизить цену и сделать ГХ/МС высокого разрешения доступной большему числу лабораторий.

Обе модели оснащаются источником ионов ExtractaBrite с регулируемой температурой нагрева. Возможна работа в режимах электронного удара и химической ионизации – позитивной или негативной. Конструкция вакуумного шлюза позволяет извлекать источник для технического обслуживания или перехода на химическую ионизацию без отключения вакуума. В обеих моделях реализована технология управления энергией электронов VeV (Variable



Рис.3. Схема масс-спектрометра Q Exactive GC Orbitrap

electron voltage) в диапазоне 15–150 эВ, которая позволяет смягчать или ужесточать ионизацию электронным ударом. По сравнению с обычными источниками, генерирующими электроны с фиксированным значением энергии около 70 эВ, эта автоматически настраиваемая система повышает точность анализа химических соединений, склонных к интенсивной фрагментации (рис.4).

Обе модели масс-спектрометров комплектуются газовым хроматографом TRACE 1310 с запатентованной системой модульного подключения детекторов и инжекторов для ввода пробы. Доступны три вида быстросменных модулей инжекторов с делением и без деления потока, в том числе инжекторы с программируемой температурой испарения и с функцией экономии гелия. Дополнительно в TRACE 1310 могут устанавливаться пять видов детекторов: пламенно-ионизационный, катарометр, электронно-захватный, азотно-фосфорный и пламенно-фотометрический. В модули инжекторов и детекторов встроены миниатюрные газовые регуляторы системы интегрированного электронного управления IEC (Integrated Electronic Control), обеспечивающие автоматическое поддержание заданного давления.

Масс-спектрометр может комплектоваться роботизированной системой TriPlus RSH, которая автоматизирует ввод проб, в том числе операции разбавления, добавления внутреннего стандарта и дериватизации.

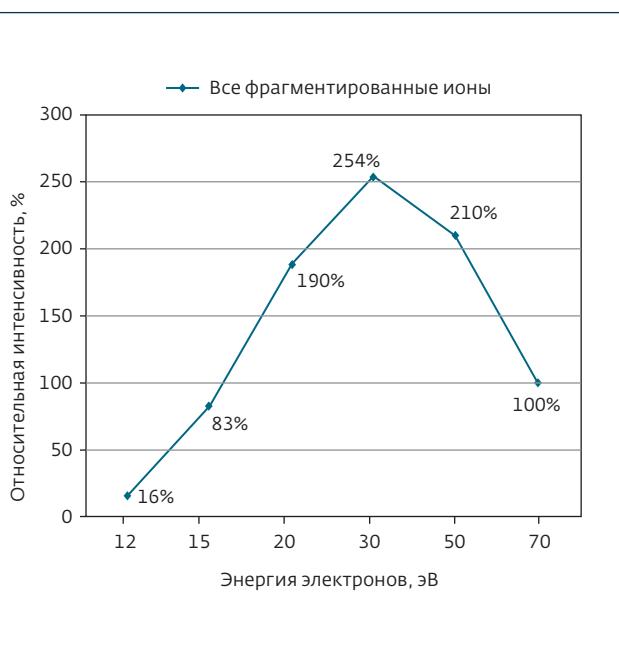


Рис.4. Сравнение чувствительности анализа допинговых веществ в пробе мочи при разных величинах энергии электронов в устройстве ионизации электронным ударом (за 100% принята энергия 70 эВ)

МС ИЛИ МС-МС?

Проведенное создателями Orbitrap изучение рынка и практического опыта лабораторий показало, что потребность в анализах с использованием тандемного режима ГХ/МС-МС пока сравнительно мала [2]. Обычным режимом эксплуатации приборов с орбитальной ионной ловушкой пока является ГХ/МС с ионизацией электронным ударом и сканированием полного спектра. Применение все более полных библиотек масс-спектров, фильтрация по массам и сканирование с высоким разрешением в большинстве случаев обеспечивают получение необходимой информации, поэтому тандемный режим применяется обычно для уточнения данных. В частности, МС-МС с химической ионизацией используется для извлечения дополнительной структурной информации об изучаемом соединении.

Хотя полное сканирование кажется более сложным процессом, свойственные приборам с Orbitrap высокие разрешение и точность определения масс на практике упрощают анализ и уменьшают необходимость в трудоемкой разработке специальных методик.

Проведенное компанией Thermo Fisher Scientific сравнение аналитических характеристик Q Exactive GC Orbitrap и Exactive GC Orbitrap [3] при работе с раз-

решением 50 тыс. FWHM ($m/z = 200$ а.е.м.) в режиме с полным сканированием спектра показало одинаковые уровни скорости, чувствительности, точности определения массы, а также близкие значения динамического диапазона и линейности. В частности, было получено одинаковое число точек на пике шириной в три секунды, что свидетельствует об одинаковой скорости сканирования. Значение инструментального предела обнаружения, характеризующего чувствительность, в обоих случаях лежало в диапазоне от 0,04 до 0,17 пг/мкл. Оба масс-спектрометра продемонстрировали очень высокую повторяемость площади пика, а также погрешность определения массы менее 1 ppm независимо от m/z и уровня концентрации, что минимизирует вероятность ложных идентификаций.

ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

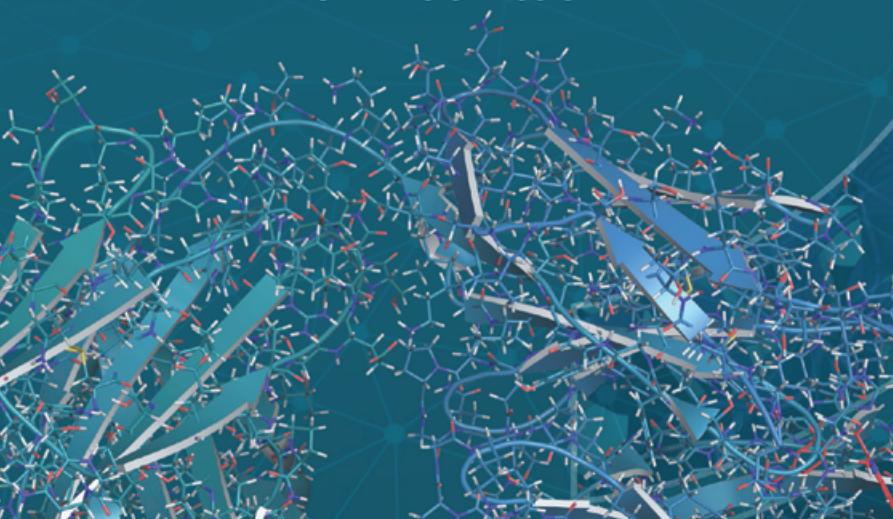
Одни из основных областей применения ГХ/МС – токсикология и криминалистика [4]. Приборы Q Exactive GC Orbitrap и Exactive GC Orbitrap являются мощными, универсальными и высокочувствительными инструментами для качественного и количественного определения наркотических и лекарственных веществ и их метаболитов в различных биологических образцах – крови, плазме, моче, слюне, поте, волосах. В большинстве случаев образцы крови или плазмы анализируются для более точного количественного определения токсиканта, обнаруженного при скрининге мочи.

Однако задачи криминалистики отнюдь не исчерпываются судебной медициной. Например, ряд весьма сложных и интересных проблем связан с установлением подлинности продуктов питания и напитков и выявлением подделок. Традиционно для аутентификации продуктов использовались несколько маркерных веществ при лишь поверхностном изучении состава матрицы. Сканирование всего спектра с высоким разрешением в сочетании с хемометрическими методами открывает новые возможности для получения "отпечатков пальцев" – уникальных идентификаторов продуктов [5]. Это подтвердила, в частности, серия экспериментов, проведенных в пражском Университете химии и технологии (Чехия) с целью анализа химического состава виски – напитка, производство которого в ряде стран является важной отраслью экономики. Определение точного состава виски позволит его производителю не только идентифицировать фальсификаты и принимать меры для защиты своего бренда, но и выйти на новый уровень контроля каче-

ГИБРИДНЫЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТР

Thermo Scientific Q Exactive UHMR

**Новый взгляд
на нативную структуру белка**



Идеальный инструмент для анализа больших белков и белковых комплексов методом top-down. Позволяет по-новому взглянуть на нативную структуру белка и белковые взаимодействия, чтобы более глубоко понять биологические процессы. Незаменим для анализа сложных биотерапевтических препаратов и биофармацевтических исследований.

ПРЕИМУЩЕСТВА

- Широкий диапазон масс – до 80 000 m/z
- Возможность захвата ионов в источнике
- Изоляция ионов-прекурсоров для MS/MS и псевдо-MS3-экспериментов в широком диапазоне – до 25 000 m/z
- Лучшая изоляция ионов-прекурсоров с использованием передовой квадрупольной технологии AQT
- Высокая чувствительность и максимальная устойчивость к загрязнениям за счет продвинутого активного направления ионов AABG
- Ячейка HCD и масс-анализатор высокого разрешения Orbitrap с оптимизированными напряжениями для улучшенного пропускания тяжелых ионов и непревзойденной чувствительности

ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диапазон масс 350 – 80 000 m/z

Разрешение До 200 000 на m/z 400

Частота сканирования До 12 Гц при разрешении 12 500 на 400 m/z

Время переключения полярности <1 сек

Точность определения массы <1 ppm с внутренней калибровкой; <3 ppm с внешней калибровкой

Динамический диапазон >5000 : 1

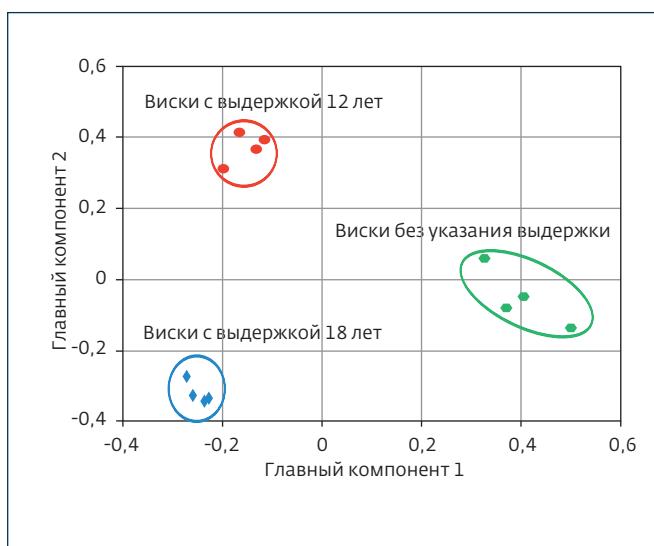


Рис.5. Анализ методом главных компонент в программном обеспечении SIEVE 2.2 подтверждает различия в составе виски разной выдержки, произведенного на одном предприятии

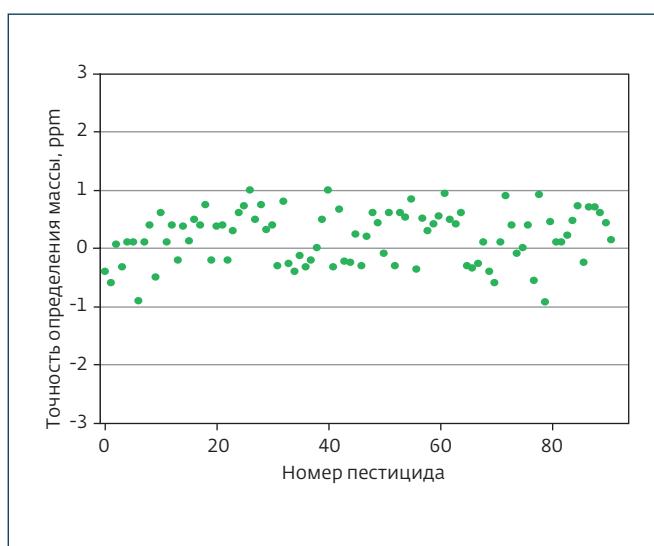


Рис.6. Погрешность определения массы всех обнаруженных пестицидов в пшенице не превысила 1 ppm, что значительно ниже нормы, установленной стандартами

ства, сравнивая разные партии продукции и выявляя изменения в производственном процессе и их влияние на состав. Тогда можно будет гарантировать, что данный сорт виски содержит особые фирменные ароматы, ожидаемые потребителем.

В проведенном исследовании [6] для профилирования девяти сортов виски различного происхождения, возраста и типа использовалась ГХ/МС-МС-система Q Exactive GC Orbitrap. Для каждого образца было выполнено по четыре измерения полного масс-спектра с обработкой полученных данных с помощью программного обеспечения TraceFinder и SIEVE. В ходе исследования прибор Q Exactive GC при разрешении 60 тыс. FWHM обеспечил точность определения массы менее 1 ppm для всех компонентов в образце. При этом широкий динамический диапазон способствовал устранению изобарических помех. Программное обеспечение SIEVE 2.2 и TraceFinder позволило с высокой скоростью получить профили образцов виски, надежно выделяя и идентифицируя компоненты (рис.5). Соединения, для которых отсутствовали данные в библиотеках, были с высокой достоверностью определены по значениям их масс.

Еще одна обширная область для применения систем ГХ/МС с Orbitrap – контроль безопасности сельскохозяйственной продукции. Возможности прибора Exactive GC Orbitrap были проверены в лаборатории Европейского Союза по контролю содержания пестицидов в зерновых и кормах, распо-

ложенной в Дании [7]. Исследовались образцы пяти злаков: пшеницы, ячменя, овса, ржи и риса. Согласно законодательству ЕС, содержание пестицидов в зерне не должно превышать 10 мкг/кг, если иное не оговорено в специальных нормативных документах. Исследование проводилось при разрешении 60 тыс. FWHM ($m/z = 200$ а.е.м.). Использовался масс-спектрометр Exactive GC Orbitrap с автосемплером TriPlus RSH, хроматографом TRACE 1310 GC и капиллярными колонками TraceGOLD TG-5SiLMS. Образцы семян были предварительно обработаны 105 видами пестицидов, что сформировало 525 комбинаций пестицид–матрица. Результаты показали, что Exactive GC обеспечивает надежную идентификацию пестицидов в зерновых в соответствии с требованиями европейских стандартов. В ходе сканирования были выявлены все 105 пестицидов и 96% комбинаций пестицид–матрица. Погрешность определения масс составила менее 1 ppm (рис.6). Прибор продемонстрировал хорошую линейность и стабильность характеристик в ходе повторных опытов, что является важным требованием для лабораторий, специализирующихся на рутинных задачах. Таким образом, была подтверждена способность масс-спектрометра с ловушкой Orbitrap идентифицировать в режиме полного сканирования одновременно неограниченное число пестицидов, в противоположность трехквадрупольным приборам, применяющимся в настоящее время для проверки содержания в зерне отдельных элементов.

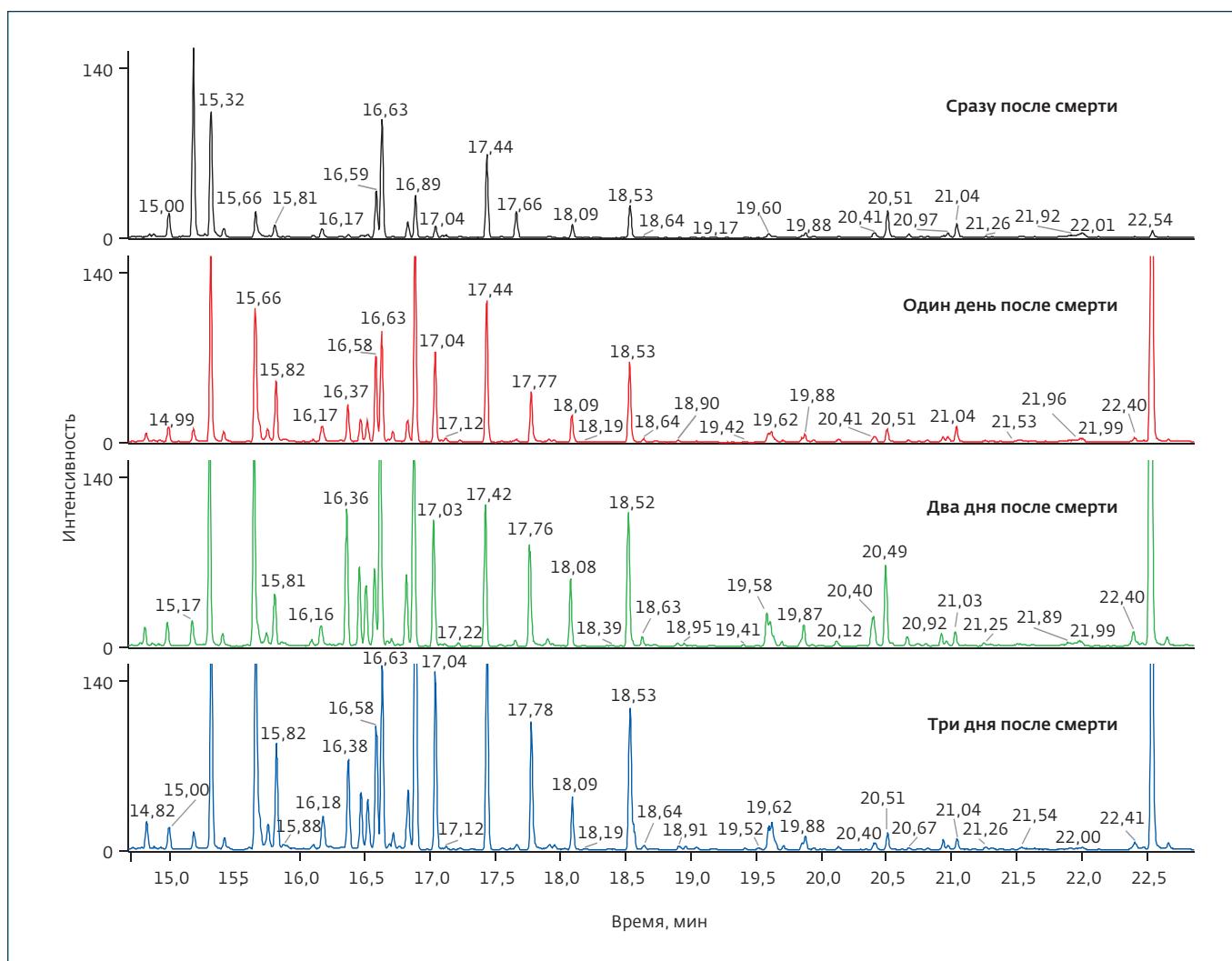


Рис.7. Хроматограммы, полученные для четырех образцов с разной продолжительностью разложения тканей

Помимо рутинных анализов, масс-спектрометры с ловушкой Orbitrap востребованы и при решении серьезных исследовательских задач. Так, ГХ/МС представляет интерес для обнаружения биомаркеров в метаболомике – науке, изучающей низкомолекулярные профили процессов, протекающих в живых клетках. Причем, если возможности газовой хроматографии – разрешение, воспроизводимость, удобство библиотек – уже давно соответствуют решаемым задачам, то квадрупольные масс-анализаторы не обеспечивали необходимые для анализа сложных образцов динамический диапазон, точность определения массы и скорость сканирования. С появлением систем ГХ/МС с ионной ловушкой это несоответствие можно считать преодоленным, что подтвердили исследования по обнаружению биомаркеров наступления смерти, проведенные в Университете

Глазго (Великобритания) [8]. Оценка посмертного интервала – одна из сложнейших задач судебной медицинской экспертизы, особенно после того, как температура трупа и окружающей среды уравновесились. Поэтому выявление биомаркера смерти важно не только для науки, но и для криминалистической практики.

Исследование проводилось на 16 срезах мышечной ткани с бедер восьми мертвых крыс. Аналитический комплекс включал масс-спектрометр Q Exactive GC Orbitrap с автосемплером TriPlus RSH и хроматограф TRACE 1310 GC. Полученные данные (рис.7) были обработаны с применением статистического анализа, после чего идентифицировались изменения в составе образцов. Проект показал, что система Q Exactive GC является эффективным инструментом для высокоселективного анализа метаболитов, при-

существующих в сложной матрице разлагающихся биологических тканей.

Развитие масс-спектрометров с технологией Orbitrap идет по пути, с одной стороны, роста возможностей приборов, с другой стороны, – их удешевления. Последнее обусловлено сравнительно простой конструкцией орбитальной ионной ловушки. Конструкция приборов в целом также имеет тенденцию к упрощению и удешевлению. Например, если в первой

модели LTQ Orbitrap применялось пять турбомолекулярных насосов, то в Q Exactive их число уменьшено до двух. Таким образом, масс-спектрометры с технологией Orbitrap привлекательны не только по техническим возможностям, но и по уровню требуемых инвестиций по сравнению с топовыми версиями приборов с квадрупольными и времязадерживающими масс-анализаторами. Можно прогнозировать, что указанные тенденции приведут к постепенному росту доли приборов с Orbitrap, в том числе систем ГХ/МС, на рынке хромато-масс-спектрометрического оборудования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Eliuk S., Makarov A. Evolution of Orbitrap mass spectrometry instrumentation // Annual Rev. Anal. Chem. 2015. No. 8. P. 61–80.
2. Makarov A. Orbitrap: ten years young // The Analytical Scientist. 2015. P. 4–6.
3. Cojocariu C., Roberts D., Silcock P. Full-scan analytical performance. Thermo Scientific Exactive GC and the Thermo Scientific Q Exactive GC mass spectrometers. Technical note 10511. Thermo Fisher Scientific, 2016. 4 p.
4. Гладилович В.Д., Подольская Е.П. Возможности применения метода ГХ-МС (обзор) // Научное приборостроение. 2010. Т. 20. № 4. С. 36–49.
5. Hajšlová J. Attaining accurate authentication // The Analytical Scientist. 2015. P. 22–24.
6. Roberts D., Hajšlova J., Pulkrabova J., Silcock P. Chemical profiling and differential analysis of whiskies using Orbitrap GC-MS. Application Note 10492. Thermo Fisher Scientific, 2016. 9 p.
7. Roberts D., Poulsen M. E., Silcock P. Multi-residue pesticide screening in cereals using GC-Orbitrap mass spectrometry. Application note 10541. Thermo Fisher Scientific, 2017. 9 p.
8. Weidt S., Pesko B., Cojocariu C., et al. Untargeted metabolomics using Orbitrap-based GC-MS. Application Note 10457. Thermo Fisher Scientific, 2016. 6 p.

РЕКЛАМА



IX СЪЕЗД ВМСО

VIII ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ
«МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ И ЕЕ ПРИКЛАДНЫЕ ПРОБЛЕМЫ»

С 14 по 18 октября 2019 года, Москва

НАУЧНЫЕ СЕКЦИИ

- Приборостроение
- Изотопная масс-спектрометрия
- Органическая масс-спектрометрия
- Масс-спектрометрия в химическом анализе (экология, допинг-контроль, контроль продукции и процессов и т.д.)
- Неорганическая и элементная масс-спектрометрия
- Масс-спектрометрия в медицине и биологии

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ

Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН и Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН.

Для иногородних участников конференции предусмотрено размещение в гостинице с организованным подъездом к месту проведения заседаний.

ЯЗЫК КОНФЕРЕНЦИИ

Русский, английский.

vmso.ru



pharmtech
& ingredients

Международная выставка
оборудования, сырья и технологий
для фармацевтического производства

19–22.11.2019

Россия, Москва
МВЦ «Крокус Экспо»

**Получите
билет по
промокоду**

pha19V

pharmtech-expo.ru



Организатор
+7 (499) 750-08-28
pharmtech@ite-expo.ru

При поддержке

