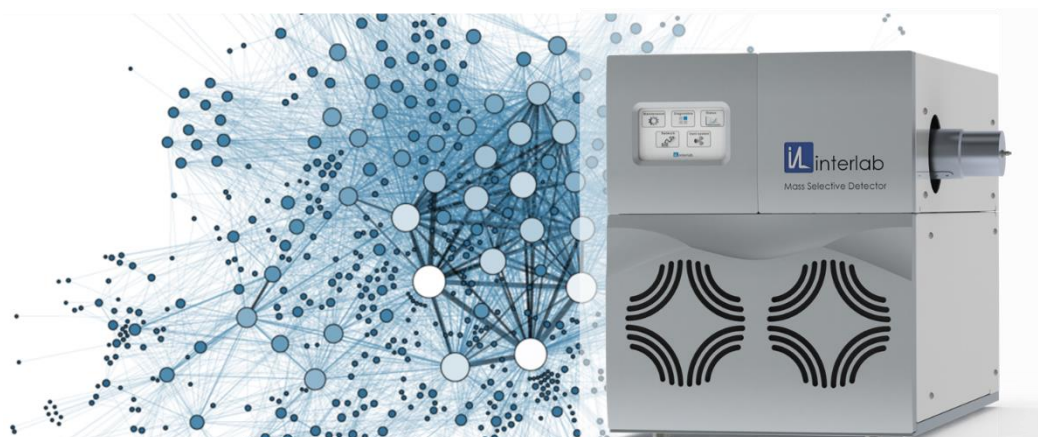




Достижение максимальной чувствительности аналитического метода с помощью алгоритма автоматической настройки iDwell® Time для режима сканирования SIM.

Колунтаев Д. А. к. б. н., научный сотрудник
отдела исследований и разработок,
ООО Интерлаб, Россия, Москва

Ключевые слова

Газовая хромато-масс-спектрометрия, режим сканирования SIM, лекарственные препараты, iDwell® Time

Резюме

Продemonстрирована возможность достижения максимальной чувствительности на хромато-масс-спектрометрической системе Маэстро-αМС за счёт использования инновационного алгоритма настройки сканирования выделенных ионов в режиме SIM на примере детектирования смеси сильнодействующих лекарственных средств.

В настоящее время, газовая хромато-масс-спектрометрия по праву является одним из самых надёжных методов качественного и количественного анализа в аналитической химии. Опираясь с очень сложными смесями соединений, классические и самые простые масс-спектрометрические системы позволяют идентифицировать ионы искоемых компонентов на уровне концентраций пико- и фемтограмм, что зачастую уже соответствует самым высоким требованиям для большинства нормативов контролирующих организаций.

Достижимая высокая специфичность метода, его надёжность и чувствительность обусловлена выбором правильной стратегии получения результатов. В частности, наиболее распространёнными принято считать две основные стратегии использования ГХ-МС систем:

- Scan - режим сканирования в широком диапазоне масс спектра присутствующих ионов в анализируемой смеси;
- SIM (selected ion monitoring) - режим мониторинга выделенных ионов, когда в процессе подготовки к работе, оператор заранее выбирает перечень характерных ионов, соответствующих одному или нескольким искомым соединениям.

Первый режим, в основном используется в задачах нецелевого поиска или скрининга, и не является поистине количественным методом. Подобная стратегия позволяет аналитику только ответить на вопрос о многообразии представленных органических компонентов в пробе, но не позволяет точно установить их количественных значений. При этом надёжно оперируемые уровни концентраций Scan режима в сотни раз выше, по сравнению с режимом сканирования SIM.

Стратегия SIM режима позволяет детектировать вещества на более низких уровнях концентраций, но стоит отметить, что надёжность и эффективность его работы во многом зависит от классификации и уровня подготовки оператора. Зачастую только тонкая и кропотливая работа при подготовке эксперимента позволяет получить желаемый результат.

Система Маэстро-αМС с программным обеспечением «Маэстро-Оператор» позволяет свести к минимуму проблему настройки SIM эксперимента и максимально автоматизировать ряд шагов при разработке стратегии.

Алгоритм автоматической настройки iDwell®Time

Процесс разработки метода SIM подразумевает под собой не только составление перечня индивидуальных и характерных для поиска ионов, но и настройка стратегии их сканирования. Другими словами, это формирование карты временных сегментов сканирования, позволяющих обеспечить систему регистрации детектора достаточной статистической информацией и тем самым получить максимальную информацию о количестве вещества в пробе.

Исходя из литературных данных, запись полного (точного) хроматографического пика требует, не менее 10 точек данных, которые должны быть сохранены на всей ширине детектируемого пика. При этом, частота сбора точек данных (скорость сканирования) должна соответствовать этим требованиям как для узких, так и для широких хроматографических пиков [1 - 3].

Несоответствие подобным правилам, приводит к потере чувствительности метода, искажению профиля пика и соответственно возникновению систематических ошибок в процедуре интегрирования пика, что представлено на рисунке 1. Все эти нарушения прямо влияют на показатели точности количественного анализа и тем самым ограничивают применение масс-спектрометрического метода в ряде приложений.

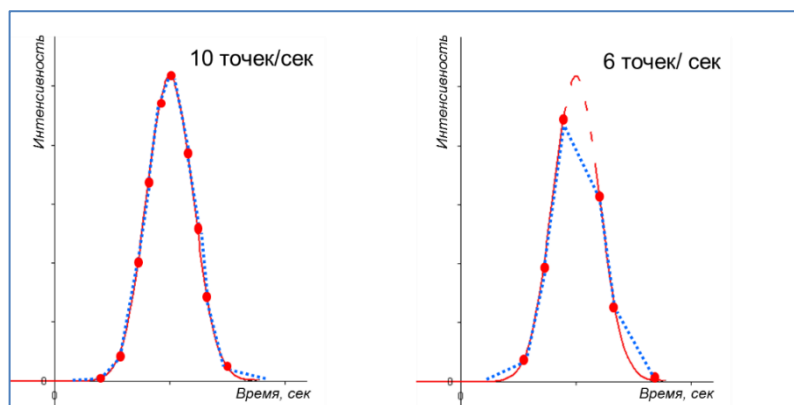


Рис. 1. Искажение профиля пика при недостаточной частоте регистрации сигнала во времени.

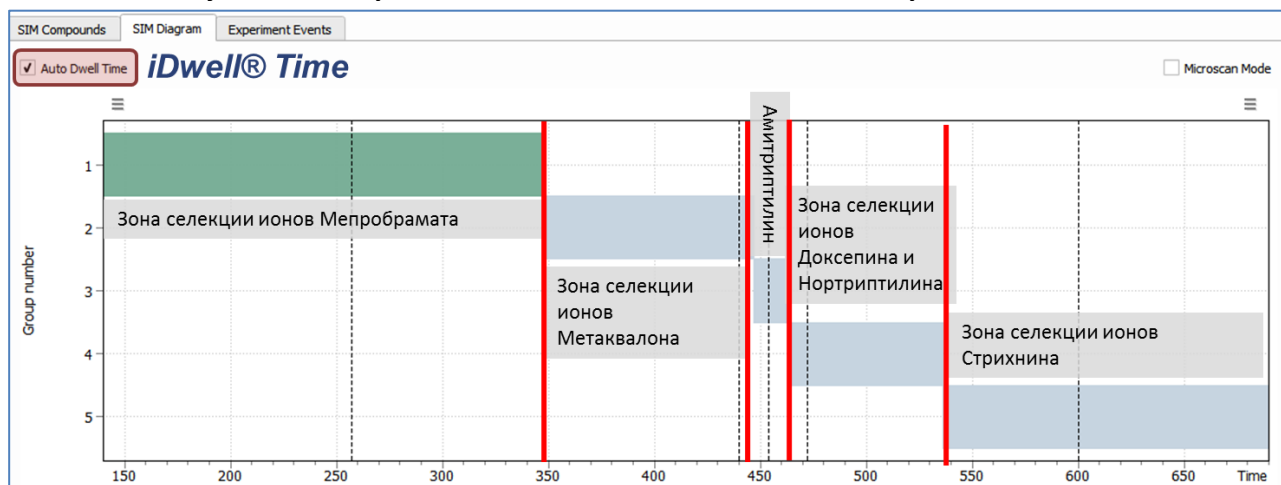
Для решения подобных проблем, оператор обязан вручную формировать таблицы ожидаемых компонентов пробы и вносить их в программное

обеспечение самостоятельно. Работая с комплексными пробами матриц, а также используя мультикомпонентные методы детектирования компонентов существует большая вероятность присутствия в подобных таблицах ожидаемых компонентов с близкими временами элюирования. Подобный факт заставляет оператора при формировании SIM экспериментами объединять такие вещества в единый временной сегмент. Соответственно, не оптимальное разбиение хроматограммы на временные сегменты и является следствием не достаточной частоты регистрации сигнала во времени.

Инновационный алгоритм **iDwell®Time** разработанный компанией **Интерлаб** позволяет автоматически разделять хроматограмму на оптимальные временные сегменты сканирования индивидуальных пиков (рис. 2), с обязательным требованием постоянного наличия не менее 10 точек данных в секунду. Подобное решение позволяет оператору всегда иметь оптимальное количество точек данных для каждой селектируемой массы и тем самым исключить возможные потери ионов в ходе эксперимента для достижения максимальной чувствительности метода, его стабильности, а также корректного алгоритма интегрирования данных. Пример разделения хроматограммы представлен на рисунке 2.

Применение алгоритма iDwell®Time зачастую требует от оператора лишь визуального контроля, автоматически сформированного SIM эксперимента.

Рис. 2. Автоматическое сегментирование SIM эксперимента анализа смеси пяти сильнодействующих лекарственных веществ с помощью алгоритма iDwell®Time.



Экспериментальная часть

Для представления возможностей алгоритма iDwell®Time, было выполнено сравнение двух стратегий SIM эксперимента, а именно стратегия с использованием алгоритма автоматической сегментации хроматограммы и подбором корректного времени сканирования ионов, и стратегия сбора данных без сегментирования хроматограммы, когда все ожидаемые ионы помещаются в один временной сегмент, а времена сканирования указываются оператором вручную.

Табл. 1. Схема эксперимента

№	Концентрация	Схема 1	Схема 2
1	1 ppm Toxi-Discs A-4	iDwell®Time	DwellTime = 20 msec (4 spec/sec)
2	0.1 ppm Toxi-Discs A-4	iDwell®Time	DwellTime = 20 msec (4 spec/sec)
3	0.01 ppm Toxi-Discs A-4	iDwell®Time	DwellTime = 20 msec (4 spec/sec)

В качестве экспериментальной смеси использовали коммерческий стандарт (Toxi-Discs A-4, Varian), что представляет собой смесь сильнодействующих лекарственных средств, нанесённых на специализированный диск с сорбирующей поверхностью. Диск растворяли в 1 мл этанола (полученная концентрация 10 ppm для каждого соединения), после чего готовили 3 стандартных раствора смеси с концентрациями 1,0ppm – 0,1ppm – 0,01ppm соответственно. Смеси анализировали с помощью хромато-масс-спектрометрического метода, представленного в таблице 2.

Табл. 2. Параметры инструментального метода.

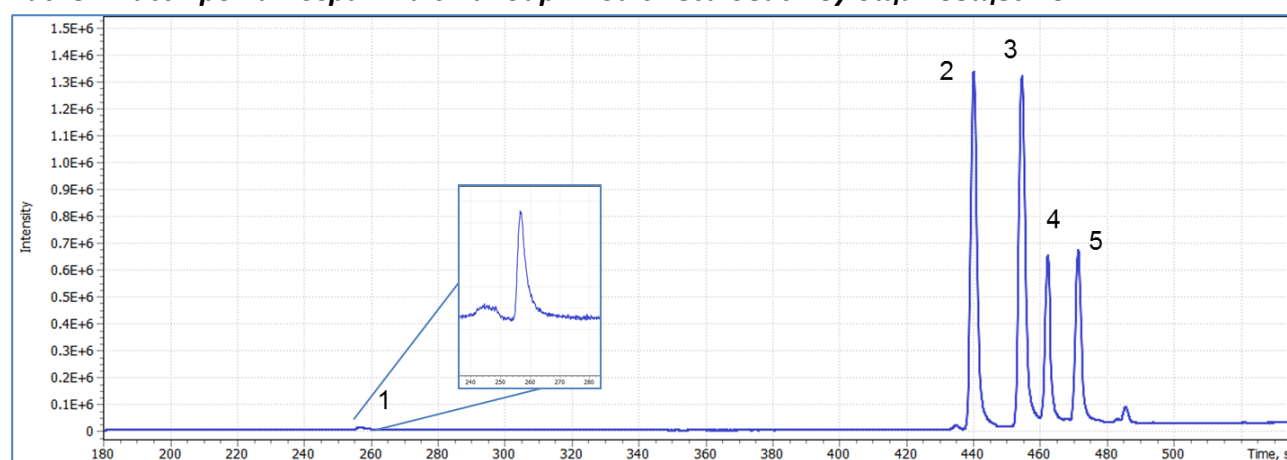
Инструментарий	
ГХ-МС система	Maestro-αMS
Испаритель	Split/Splitless (liner: Restek 4 mm x 6.3 x 78.5)
Хроматографическая колонка	Rtx-5MS (30m x 0.25mm; 250um)
Экспериментальные настройки	
Объём пробы	1 мкл
Соотношение деления пробы	Split 10:1
t° испарителя	270°C
Режим тока газ-носителя	Режим Constant flow
Градиент t° печи	180°C в течение 0,5 мин; 10.0°C/мин до 280°C, удержание 1,0 мин;
Тип и скорость газа-носителя	(He) 1,0 мл/мин
t° интерфейса МС	270°C
Условия детектирования	
Источник ионизации	ЭИ (EI)
t° источника	230°C
Задержка растворителя	140 сек
Режимы сканирования	SIM (см. табл. 3)
Dwell Time	Выбор оптимального режима сканирования зависел от схемы эксперимента (табл. 1)

Табл. 3. Времена элюирования искоемых пиков и параметры их сканирования

№	Действующее вещество	RT, sec	Quantifier Ion	Qualifier Ion 1	Qualifier Ion 2
1	Meprobramate	257.0	83	114	144
2	Methaqualone	440.0	235	250	233
3	Amitriptyline	454.0	58	58	-
4	Doxepin	472.0	58	59	165
5	Nortriptyline	464.0	44	202	-
6	Strychnine	600.0	334	335	120

На рисунке 3 представлена масс-хроматограмма смеси действующих веществ лекарственных средств.

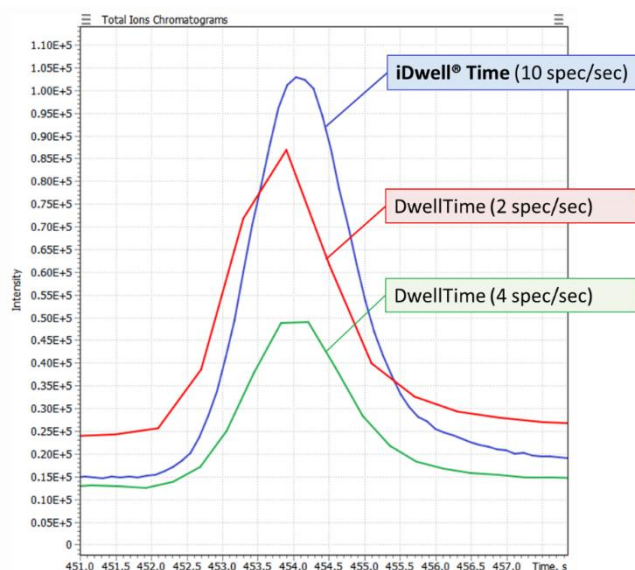
Рис. 3. Масс-хроматограмма стандартной смеси действующих веществ.



1. Meprobramate; 2. Methaqualone; 3. Amitriptyline; 4. Nortriptyline; 5. Doxepine.
(пик стрихнина не отображён на хроматограмме).

Результаты

Результаты эксперимента наглядно продемонстрировали эффект работы автоматического алгоритма iDwell®Time.

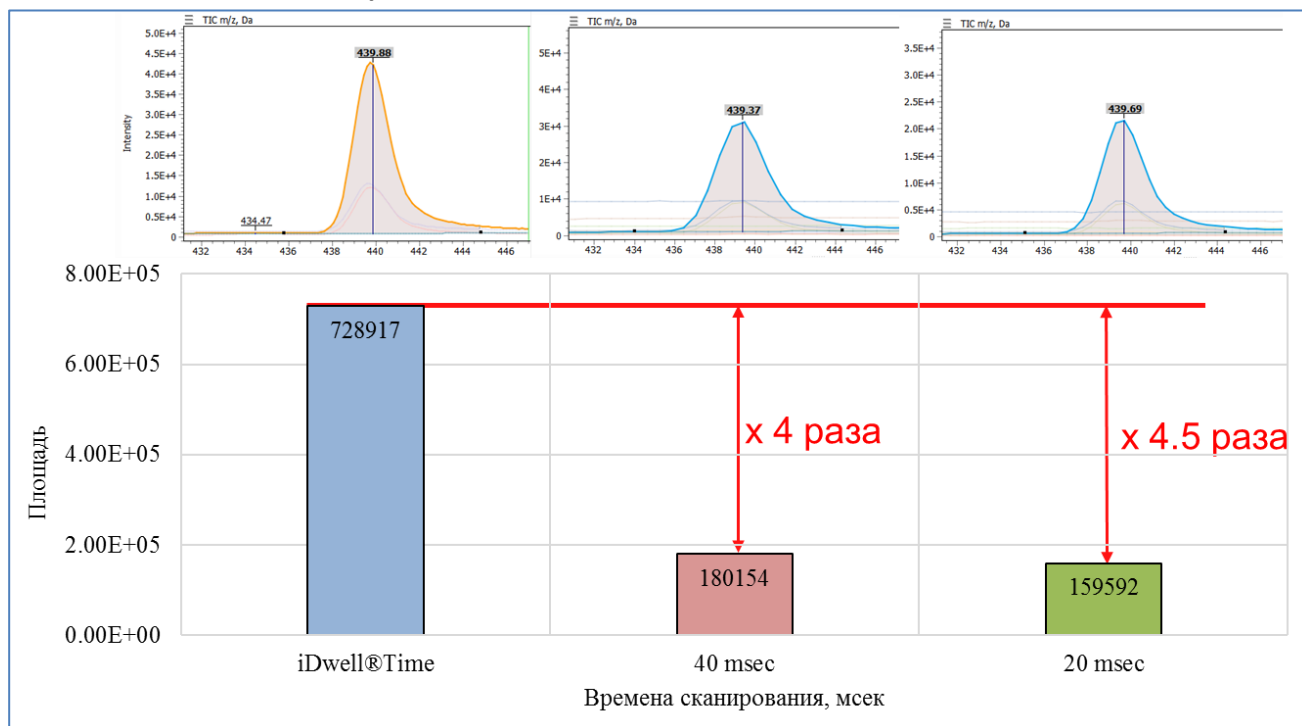


В частности, на рисунке 4 представлено сравнение формы и асимметрии детектируемых пиков, что соответственно играет важную роль в количественном обчёте данных. Правильная форма пика позволяет корректно работать инструментам интегрирования хроматограмм и соответствовать надёжным требованиям для калибровочных кривых количественного метода.

Рис. 4. Сравнение хроматограмм полного ионного тока Амитриптилина с различной частотой сбора данных

Проведённый эксперимент также позволил продемонстрировать изменения значений площадей пиков в зависимости от скорости сканирования данных, что непосредственного характеризует чувствительность метода. На рисунке 5 видно, что использование алгоритма iDwell®Time способствует корректной настройке стратегии SIM эксперимента, тем самым увеличивая чувствительность метода в 4 – 4,5 раза, в частности, при детектировании соединения Метаквалон (@ m/z 235Da) в поставленном эксперименте.

Рис. 5. Диаграмма изменения площади пика характерного иона с массой m/z 235 Da в зависимости от скорости сканирования данных. (выбранный ион соответствует соединению Метаквалон).



Выводы

1. Применение алгоритма iDwell®Time упрощает и автоматизирует стадии настройки SIM эксперимента, что зачастую требует от оператора лишь визуального контроля и подтверждения предложенной стратегии сканирования.
2. Алгоритм позволяет оператору всегда иметь оптимальное количество точек спектральных данных для каждой селектируемой массы и тем самым исключить возможные потери ионов в ходе эксперимента для достижения максимальной чувствительности аналитического метода.
3. Преимущества детального и корректного сегментирования хроматографического профиля обеспечивает присутствие в профиле пиков правильной формы, что исключает возможные систематические ошибки в процессе их интегрирования и соответствующего расчёта количественных показателей.
4. Алгоритм iDwell®Time непосредственно внедрён в программное обеспечение Маэстро-Оператор и может быть легко использован в рутинных лабораториях, в частности для экспериментов где необходима максимальная чувствительность и надёжность в получаемых результатах.

1. Poole C.F. *The Essence of Chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 2003. 65 - 70 p
2. Dallüge, J. et al., *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 608-614.
3. Hinshaw, J.V., *LCGC North Am.*, 2003, Vol 21, no. 3, 268-272.

За дополнительной информацией обращайтесь в компанию Интерлаб



interlab

127055, Москва, Тихвинский пер., д.11 стр.2
т. (495) 788-09-83, ф. (495) 755-77-61
www.interlab.ru
e-mail: interlab@interlab.ru

Екатеринбург:
т. (343) 379-57-33,
ф. (343) 379-57-34
e-mail: ural@interlab.ru

Новосибирск:
т. (383) 330-56-91
ф. (383) 330-56-03
e-mail: nsk@interlab.ru

Санкт Петербург:
т/ф. (812) 643-14-23
e-mail: spb@interlab.ru