

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ НА ОСНОВЕ ОРБИТАЛЬНОЙ ЛОВУШКИ ИОНОВ: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

А.Макаров, к.ф.-м.н., Thermo Fisher Scientific
alexander.makarov@thermofisher.com

Аналитическая химия получила свое развитие в значительной степени благодаря открытиям в области масс-спектрометрии. Высокое разрешение и чувствительность, которыми обладают современные масс-спектрометры, стали основой для решения аналитических задач как в фундаментальных исследованиях, так и в рутинной лабораторной практике. Последняя новинка в семье масс-спектрометров – анализатор Orbitrap, который позволил получать результаты с ультравысоким разрешением. Оборудование, созданное на базе технологии Orbitrap, закрепило свои позиции в важнейших направлениях исследований: протеомика, метаболомика, анализ метаболитов, липидомика, антидопинговый контроль, определение остаточных количеств пестицидов и лекарственных средств в пищевых продуктах, сырье и объектах окружающей среды.

Развитие Александром Макаровым прибора, использующего движение заряженных частиц в электростатических полях, привело к созданию в 2005 году серийного масс-спектрометра с орбитальной ловушкой ионов с фурье-преобразованием сигнала Orbitrap [1, 2]. С тех пор несколько тысяч приборов с этим анализатором были произведены, установлены и с успехом используются во множестве аналитических лабораторий во всем мире.

КАК УСТРОЕНА ОРБИТАЛЬНАЯ ЛОВУШКА ИОНОВ

Orbitrap состоит из трех электродов, как показано на рис.1. Этот рисунок демонстрирует как стандартную ловушку, представленную в 2005 году [3], так и так называемую высоко-полевую ловушку, созданную в 2011 году. Внешние электроды имеют форму чаши и разделены

между собой промежутком толщиной в волос с помощью центрального кольца из диэлектрика.

Попадая в ловушку, ионы начинают движение по устойчивым траекториям, которое сочетают три периодических движения [4]:

- вращательное движение вокруг центрального электрода с частотой вращения ω_{ϕ} ;
- радиальное движение с частотой ω_r ;
- осевые колебания вдоль центрального электрода с частотой ω .

Хотя траектория иона принимает форму сложной спирали, важно отметить, что осевое движение остается абсолютно независимым от вращательного движения.

Чтобы обеспечить круговую траекторию движения ионов, их тангенциальная скорость должна быть такой, чтобы центробежная сила компенсировала силу, созданную радиальным электрическим полем.

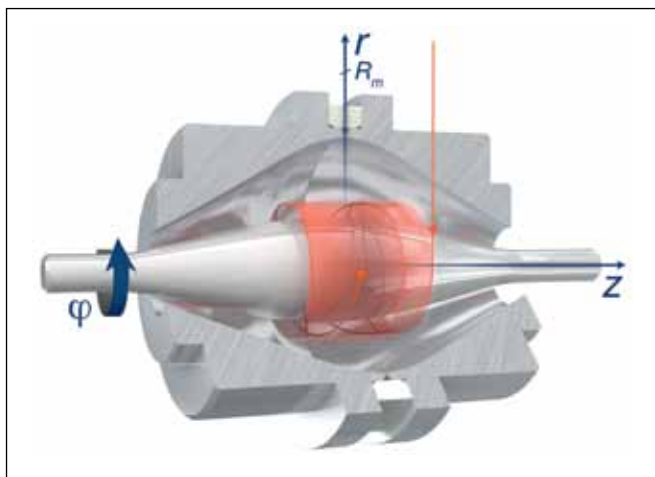


Рис.1. Схема орбитальной ионной ловушки

Для радиуса R этой спирали частота углового вращения ω_ϕ :

$$\omega_\phi = \omega \sqrt{\frac{\left(\frac{R_m}{R}\right)^2 - 1}{2}},$$

где R_m – характеристический радиус электрода.

Частота радиальных колебаний ω_r описывается формулой:

$$\omega_r = \omega \sqrt{\left(\frac{R_m}{R}\right)^2 - 2},$$

частота осевых колебаний ω :

$$\omega = \sqrt{\frac{e}{(m/z)}} \cdot k,$$

где k – константа кривизны поля, e – заряд электрона ($1,602 \cdot 10^{-19}$ Кл).

Вращательная и радиальная частоты зависят от начального радиуса R . В то же время осевая частота абсолютно независима от всех начальных скоростей и координат ионов. Поэтому только частота осевых колебаний может использоваться для определения отношения массы к заряду (m/z).

Поскольку невозможно поместить источник ионов внутрь ловушки, они генерируются вне анализатора Orbitrap и захватываются с помощью "электродинамического сжатия": попадая в электрическое поле анализатора, ионы подвергаются воздействию быстро возрастающего поля. Потенциал внешних электродов остается посто-

янным, в то время как потенциал центрального электрода понижается для положительно заряженных ионов. Попавшие в поле ионы не могут вернуться назад к точке входа, поскольку за время, прошедшее с момента попадания в ловушку, между ними и местом входа образуется потенциальный барьер. Поскольку сначала захватываются ионы с меньшими значениями m/z , а более тяжелые ионы запаздывают, постоянная времени возрастания поля выбирается таким образом, чтобы обеспечить наиболее широкий диапазон значений m/z захваченных ионов (обычно 30–50 мкс). Сжатие останавливается, когда траектория движения ионов достигает желаемого радиуса (обычно на одинаковом удалении от внешнего и центрального электродов), и потенциал центрального электрода стабилизируется. Поскольку вращательные и колебательные частоты очень сильно зависят от энергий ионов, углов и начального положения, каждый пакет ионов распределяется по угловым и радиальным координатам и формирует тонкое вращающееся кольцо. Частоты аксиальной осцилляции ионов могут быть измерены по наведенному току на внешних электродах ловушки, детектируемому дифференциальным усилителем. Широкополосный частотный сигнал оцифровывается и конвертируется путем преобразования Фурье в частотный спектр, а затем – в спектр отношений массы к заряду.

Процесс детектирования ничем не отличается от используемого в масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса (ИЦР). Существенная разница заключается в том, что, под воздействием электростатического поля падение разрешающей способности с ростом m/z происходит гораздо медленнее по сравнению с ИЦР. Для детектирования наведенных ионных токов необходимо сконцентрировать все ионы с одинаковым m/z в компактные пакеты, размеры которых значительно меньше в аксиальном направлении, чем амплитуда колебаний. Кроме того, в большинстве практических приложений ионы генерируются непрерывным источником ионов, а вводить их в ловушку необходимо в виде коротких импульсов. Для этого используют устройство, расположенное вне орбитальной ловушки и представляющее собой газонаполненную искривленную линейную ионную ловушку (С-образная ловушка). Для выталкивания ионов радиочастотное напряжение на электродах ловушки быстро выключается и

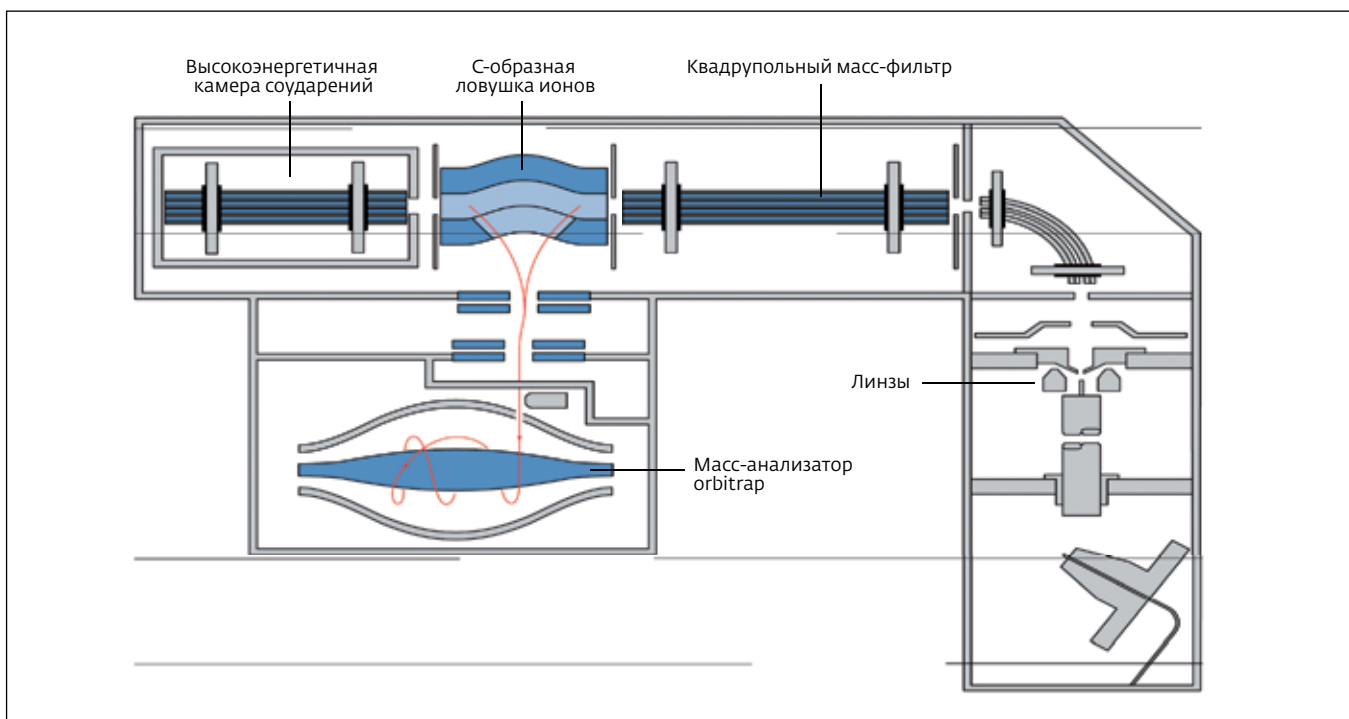


Рис.2. Схема линейного квадрупольного масс-фильтра/орбитальной ловушки ионов

между ними прикладывается импульсное напряжение таким образом, что ионы оказываются в сильном вытягивающем поле. Вероятность столкновительной диссоциации ионов минимальна за счет того, что ионы находятся на малом удалении от выходного отверстия. Ионы с индивидуальными величинами отношений массы к заряду инжектируются в виде плотных пакетов через входное отверстие в орбитальную ловушку и начинают когерентные аксиальные осцилляции. Смещение этого отверстия от оси определяет амплитуду колебаний. В идеальных условиях ионы могут оставаться в ловушке сколь угодно долго. К сожалению, столкновения с остаточным газом приводят к рассеиванию ионов и уменьшают это время до нескольких секунд. При давлении в ловушке 10^{-10} мбар за время меньше одной секунды можно разрешать изотопные пики белков малого и среднего размеров, а при дальнейшем улучшении вакуума возможны измерения белков с массами в десятки и даже сотни кДа.

Другим эффектом, ограничивающим разрешение и чувствительность орбитальной ловушки ионов, является, безусловно, образование пространственного заряда. Однако этот эффект также минимизируется оптимизацией конструкции ловушки.

Если проводить фрагментацию ионов внутри ловушки за счет столкновения с молекулами газа или, например, освещения импульсами лазерного излучения, фрагменты до 40–50% по m/z будут падать на центральный электрод, в то время как фрагменты с меньшим зарядом – на внешний электрод, вследствие того что фрагменты будут обладать такой же скоростью, как ионы-предшественники, и, соответственно, их энергии будут пропорциональны m/z , а орбиты – вытягиваться в длинные эллипсы. Поэтому во всех практических применениях Orbitrap используется лишь как детектор точных масс, а фрагментация производится вне анализатора.

СЕМЕЙСТВО СЕРИЙНЫХ МАСС-СПЕКТРОМЕТРОВ ORBITRAP

Поскольку МС/МС-фрагментацию в орбитальной ловушке проводить нецелесообразно, первые приборы с ее использованием были гибридными, где первый анализатор – линейная квадрупольная ионная ловушка, а между ней и орбитальной ловушкой располагается С-образная ловушка. Такая геометрия позволяет выбирать ионы-предшественники и разнообразные методы фрагментации.

Три года спустя появилась отдельно стоящая орбитальная ловушка, в которой первый масс-анализатор заменили простым мультиполь-

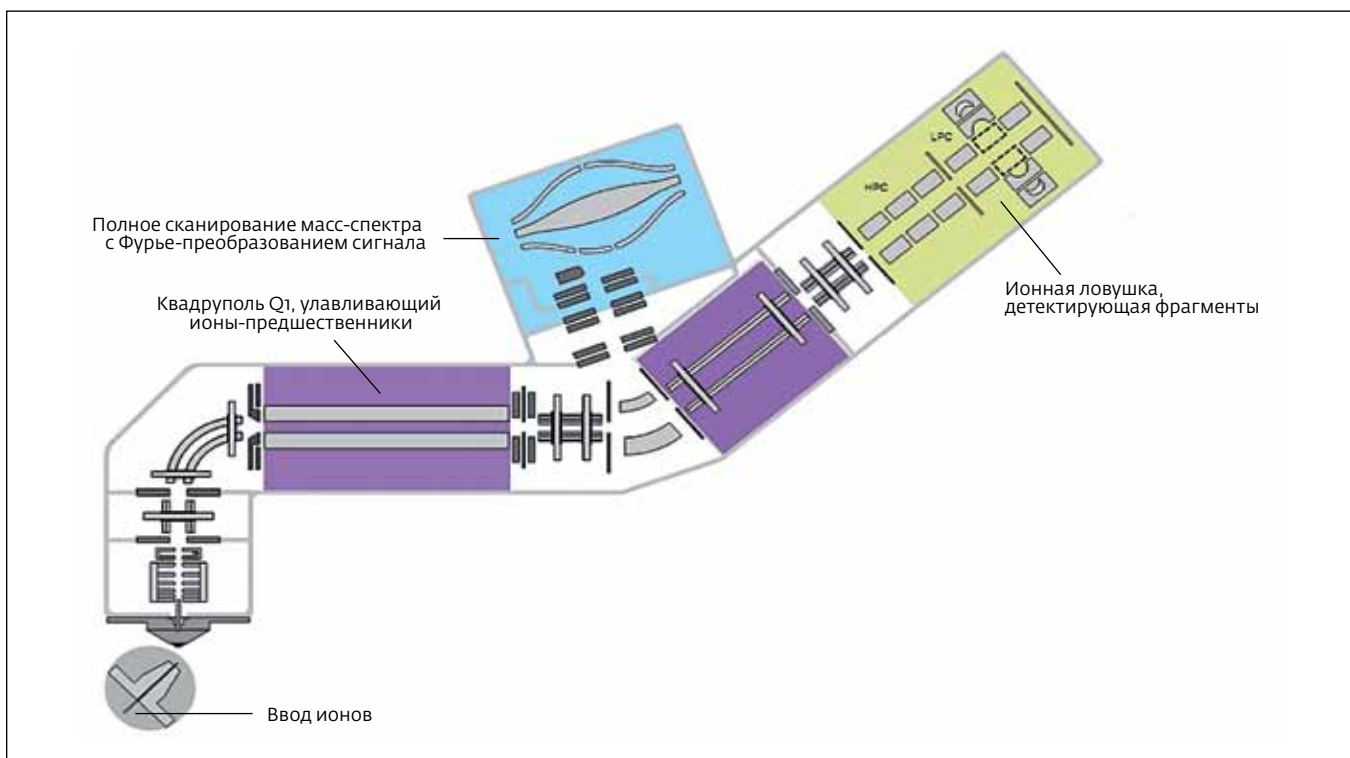


Рис.3. Схема трибридного масс-спектрометра

ным устройством транспорта ионов из ионного источника. Этот прибор позволяет производить скрининг в широком диапазоне масс.

Еще через три года появилась версия гибрида, в котором на первой стадии применяют квадрупольный масс-анализатор, позволяющий делать выборку ионов с высокой скоростью (рис.2). Выбранные ионы затем фрагментируются в высокоэнергетической камере соударений (HCD). Заполнение ионами HCD или C-образной ловушки происходит одновременно с детектированием в Orbitrap ионов из предыдущего цикла. Это позволяет сосредоточить большую часть времени на накоплении ионов (70–95% цикла), благодаря чему возрастает чувствительность без снижения скорости анализа и качества спектров.

В 2013 году новое поколение приборов с орбитальной ловушкой впервые ввело в масс-спектрометрическую терминологию слово "трибрид". Новый прибор соединяет в себе квадрупольный анализатор и двухкамерную квадрупольную линейную ионную ловушку с орбитальной ловушкой ионов, на которой можно достичь разрешающей способности 450 000 (рис.3).

Естественно, в процессе совершенствования технологии основные аналитические параметры – разрешение, точность измерения массы,

диапазон масс, чувствительность – постоянно улучшаются. Благодаря этому неуклонно расширяются области практического применения приборов Orbitrap для аналитических измерений.

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ORBITRAP

Технология Orbitrap получила широкое применение для множества практических задач в различных областях анализа. Высокое разрешение по массам, точность измерения масс и широкий динамический диапазон позволяют использовать масс-спектрометры на его основе для анализа состава сложных смесей. Гибридная и трибридная версии приборов дают возможность проведения многоуровневых MSⁿ-экспериментов с целью выяснения детальной структуры сложных молекул, например, идентификации белков без их предварительного гидролиза. В то же время относительно простые одностадийные приборы с успехом используются во многих областях, требующих точного измерения масс органических соединений: анализ метаболитов и фармакокинетики, скрининг неизвестных соединений и остаточных количеств экзогенных примесей – пестицидов, микотоксинов, ветеринарных препаратов – и множество других задач.

ПИЩЕВАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ И ОБЪЕКТЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

В вопросах пищевой безопасности и анализа объектов окружающей среды чем сложнее матрица образца, в котором нужно определить экзогенные компоненты, и чем ниже требуемый предел обнаружения, тем выше должна быть селективность. Это позволит избежать ложноположительных или ложноотрицательных результатов.

Неуклонно растет число исследований токсинов, пестицидов и остаточных количеств ветеринарных препаратов, основанных на масс-спектрометрии высокого разрешения [5]. Исследования показали, насколько важна точность измерения массы при исследовании сложных матриц образца [6].

Результаты, полученные при различных величинах разрешающей способности (от 10 000 до 100 000 на половине высоты пика с m/z 200), показали, что для надежного определения точной массы (отклонение менее 2 ppm) анализируемых соединений в сверхмалых количествах в сложной матрице требуется высокое разрешение. При использовании разрешения менее 50 000, снижается точность определения массы из-за интерфе-

ренции создаваемых (фоновых) соединений с такой же номинальной массой, как и у анализируемого.

Для повышения производительности анализа с масс-спектрометром Orbitrap использовали систему хроматографии в турбулентном потоке [7]. В этом хроматографическом методе анализируемые соединения отделяются от матрицы на специфических колонках с большим размером частиц, благодаря чему относительно небольшие молекулы анализируемых соединений удерживаются фазой, а большие молекулы – такие как белки или липиды – вымываются из колонки. Такая полностью автоматизированная система анализа использовалась для быстрого скрининга и подтверждения по точным массам ионов пестицидов на уровне концентраций много ниже жестких требований Европейского Союза [5]. Получение масс-спектров высокого разрешения в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов в одной хроматографической разгонке позволяет детектировать с высокой чувствительностью такие загрязнители, как биогенные амины, морские биотоксины и микотоксины [8]. Источником загрязнений могут быть и упаковоч-

ные материалы. Разработана методика быстрого высокочувствительного и высокоселективного определения бензофенона с применением высокого разрешения [9]. Orbitrap может быть соединен с источником DART (прямой анализ в реальном времени), позволяющим проводить прямой анализ с поверхности образца [10, 11]. Такую систему использовали для определения остаточных количеств пестицидов, она требует гораздо меньше трудозатрат и времени по сравнению с традиционными методами.

Помимо анализа "плохих" компонентов, на котором концентрируется большинство аналитиков, интерес представляет и анализ "хороших" компонентов. Например, антационы, ответственные за красный, пурпурный или темно-синий цвета многих фруктов, обладают положительным воздействием на функцию обучаемости человека. Благодаря высокой селективности при высоком разрешении анализ на Orbitrap во много раз более чувствителен по сравнению с тройными квадрупольными масс-спектрометрами и позволяет дифференцировать изобарные компоненты, массы которых различаются всего на 21 мДа с линейным динамическим диапазоном в четыре порядка [12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Масс-анализаторы Orbitrap радикально расширили арсенал современной масс-спектрометрии, увеличив достоверность и селективность исследовательского и серийного анализа в самых различных областях применений – от идентификации компонентов до следового анализа в сложных матрицах, в протеомике, исследовании метаболизма, допинговом контроле или детектировании загрязнителей в пищевых продуктах и объектах окружающей среды. Технология орбитальной ловушки ионов, без сомнения, будет развиваться и дальше в направлении увеличения скорости сканирования, разрешения, точности определения массы и чувствительности.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Makarov A.A.** Mass spectrometer. – US Patent, 5 886 346, 1999.
2. **Makarov A.A.** Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. – *Analytical Chemistry*, 2000, 72, p.1156–1162.
3. **Makarov A., Denisov E., Kholomeev A., Balschun W., Lange O., Strupat K. and Horning S.** Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. – *Analytical Chemistry*, 2006, 78, p.2113–2120.
4. **Makarov A.** Theory and practice of the Orbitrap mass analyzer. Practical aspects of trapped ion mass spectrometry. Ch. 3, vol. IV, Eds. **R.E. March, J.F.J. Todd.** – CRC Press, 2010, p.249–270.
5. **Alder L., Steinborn A. and Bergelt S.** Suitability of an Orbitrap mass spectrometer for the screening of pesticide residues in extract of fruits and vegetables. – *Journal of AOAC International*, 2011, 94, p.1–13.
6. **Kellmann M., Muenster H., Zomer P. and Mol H.** Full scan MS in comprehensive qualitative and quantitative residue analysis in food and feed matrices: how much resolving power is required. – *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2009, 20, p.1464–1476.
7. **Bernsmann T., Fuerst P. and Godula M.** Quick screening of priority β -agonists in urine using automated TurboFlow™-LC/Exactive mass spectrometry. – *Food Additives and Contaminants. Part A – Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 2011, 28, p.1352–1363.
8. **Blay P., Hui J.P.M., Chang J. and Melanson J.E.** Screening for multiple classes of marine biotoxins by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. – *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 400, p.577–585.
9. **Mol H.G.J., Van Dam R.C.J., Zomer P. and Mulder P.P.J.** Screening of plant toxins in food, feed and botanicals using full-scan high-resolution (Orbitrap) mass spectrometry. – *Food Additives and Contaminants. Part A – Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 2011, 28, p.1405–1423.
10. **Edison S.E., Lin L.A., Gamble B.M., Wong J. and Zhang K.** Surface swabbing technique for the rapid screening for pesticides using ambient pressure desorption ionization with high-resolution mass spectrometry. – *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2011, 25, p.127–139.
11. **Vaclavik L., Zachariasova M., Hrbek V. and Hajslova J.** Analysis of multiple mycotoxins in cereals under ambient conditions using direct analysis in real time (DART) ionization coupled to high resolution mass spectrometry. – *Talanta*, 2010, 82, p.1950–1957.
12. **Mullen W., Larcombe S., Arnold K., Welchman H. and Crozier A.** Use of accurate mass full scan mass spectrometry for the analysis of anthocyanins in berries and berry-fed tissues. – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58, p.3910–3915.

*Перевод с английского и подготовка к печати
М.Токарев, к.ф.-м.н., О.Прошенкина, "МС – Аналитика"*

