

ORBITRAP – СОЗВЕЗДИЕ УНИКАЛЬНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Рассказывает директор по глобальным исследованиям в области масс-спектрометрии для наук о жизни компании Thermo Fisher Scientific, к.ф.-м.н. **Александр Алексеевич Макаров**



В 2005 году на конференции Американского масс-спектрометрического общества в Сан-Антонио был представлен новый коммерческий прибор компании Thermo Electron (сейчас – Thermo Fisher Scientific) – тандемный масс-спектрометр LTQ-Orbitrap. В его основе лежала орбитальная электростатическая ловушка Orbitrap – единственный фундаментально новый масс-анализатор, созданный за последние 30 лет. Практически сразу LTQ-Orbitrap удостоился Золотой медали выставки Pittcon. В последующее десятилетие компания Thermo Fisher Scientific выпустила три поколения приборов с этой ловушкой, а создатель метода Александр Макаров стал лауреатом практически всех наиболее престижных наград в области масс-спектрометрии, в том числе медали Томсона Международного масс-спектрометрического общества. До А.Макарова этой медали удостоивался только один российский ученый – сам Виктор Львович Тальрозе. Всемирное признание было не случайным, ведь технология Orbitrap радикально расширила арсенал современной масс-спектрометрии, в том числе в области протеомики и структурной биологии в целом.

Технологии Orbitrap посвящено немало публикаций, в том числе и в российских журналах. Но кто лучше ее создателя расскажет о ключевых особенностях Orbitrap, о перспективах технологии и приборов на ее основе, об основных трендах современной масс-спектрометрии? Обо всем этом – наш разговор с директором глобальных исследований в направлении масс-спектрометрии для наук о жизни компании Thermo Fisher Scientific, профессором Утрехтского университета **Александром Алексеевичем Макаровым**.

Александр Алексеевич, какие ключевые особенности обусловили выдающиеся технические характеристики масс-спектрометров с орбитальными ловушками Orbitrap?

Прежде всего, Orbitrap – это комплекс различных технологий. Ввод и обработка ионов включает несколько шагов, и каждый из них – это уникальная особенность метода.

В общем случае, ионы из внешнего источника накапливаются в специальной С-образной линейной ионной ловушке. Ввод ионов в Orbitrap происходит дискретно, но за счет накопления мы можем в принципе избежать их потерь. Если в масс-спектрометрах на основе ионно-циклотронного резонанса (ИЦР) или во времяпролетных масс-спектрометрах (ВП МС) для

анализа обычно используется порядка 1–5% ионов от источника, мы можем работать более чем с 50% всех ионов. Это существенно повышает чувствительность метода.

Из С-образной ловушки ионы короткими пакетами инжектируются в электростатическую орбитальную ловушку Orbitrap и удерживаются в ней с помощью метода электродинамического захвата. Импульсная

инжекция позволяет одновременно вводить в ловушку ионы с широким диапазоном масс. Причем для инициирования аксиальных колебаний не нужны дополнительные механизмы возбуждения.

В орбитальной ловушке ионы движутся по круговым траекториям вокруг центрального электрода, осциллируя в радиальном и аксиальном направлениях. Частота аксиальных колебаний (вдоль центрального электрода) зависит только от отношения массы иона к его заряду (m/z). Мы определяем ее, детектируя токи, наведенные на внешние электроды, и обрабатывая сигналы методом быстрого преобразования Фурье. Этот метод оказался очень плодотворным, поскольку задача сразу сводится к определению частот, что можно делать с очень высокой точностью. Проблема в том, что у нас нет механизма усиления полезного сигнала по отношению к шуму – мы детектируем сигнал непосредственно с внешних электродов, подавая его на аналоговый дифференциальный предусилитель. Однако уже к 1990-м годам были разработаны малошумящие усилители, которые обеспечивают предел обнаружения до единиц элементарных зарядов. Поэтому МС с ловушкой Orbitrap позволяет без труда детектировать единичные многозарядные ионы белков. Благодаря преимуществам метода наведенных токов мы смогли значительно повысить и чувствительность, и разрешение прибора.

Конечно, технология Orbitrap базируется на всех предшествующих достижениях масс-спектрометрии. Изначально я занимался времяпролетными

масс-спектрометрами, поэтому многие детали работы Orbitrap напоминают работу ВП МС. Например, инжекция ионов в ловушку короткими импульсами. Причем длительность этих импульсов более характерна для ВП МС, чем, например, для систем на основе ИЦР. Да и само движение ионов в ловушке Orbitrap происходит по тем же законам, что и в ВП МС – воздействующие на ионы силы, обусловленные потенциальными полями, не зависят от их массы. Поэтому частота колебаний ионов пропорциональна квадратному корню из масс. В то же время, благодаря методу регистрации наведенных токов, разрешение Orbitrap превышает 100 тыс. – это больше, чем можно достичь на серийных ВП МС. Кроме того, в Orbitrap не образуются вторичные ионы, что характерно для ВП МС, которые значительно снижают эффективность детектирования высоких масс.

С точки зрения регистрации частоты колебаний методом Фурье-анализа наведенных токов технология Orbitrap близка к ИЦР МС. Однако в ИЦР МС движение ионов происходит в магнитных полях, тогда как в Orbitrap – в электростатических. В результате в ИЦР частота осцилляций ионов обратно пропорциональна их массе. Поэтому при больших массах ионов разрешение электростатической ловушки принципиально выше, чем ИЦР МС.

Вот эти основные особенности и привели к тому, что технология Orbitrap с самого начала смогла обеспечить и высокую разрешающую способность, и высокую чувствительность, и очень высокую точность определения масс.



Журнал Американского масс-спектрометрического общества, посвященный технологии Orbitrap. 2009 год

Технологии Orbitrap более 15 лет. В какую сторону она развивается сегодня?

Orbitrap развивается непрерывно. За десятилетие мы создали три поколения приборов на основе орбитальной ловушки. В 2005 году был реализован первый коммерческий прибор LTQ Orbitrap. До этого компания Thermo Electron (будущая Thermo Fisher) выпускала масс-спектрометр LTQ-FTICR, который сочетал линейную ионную ловушку с ИЦР-детектором. По сути, ловушка Orbitrap заменила в этом приборе ИЦР-анализатор.

Уже через три года мы представили второе поколение приборов – платформу Exactive. В 2008 году были продемонстрированы приборы с орбитальной ловушкой и мультипольным транспортным устройством ионов из источника. Еще через три года мы выпустили гибридный прибор Q Exactive, дополненный первичным ква-



Обложка журнала The Analytical Scientist с большой статьей "Orbitrap – вопреки всему. Рассказ изобретателя Александра Макарова об упорстве, удаче и, конечно, успехе". 2013 год

друпольным масс-фильтром и высокоэффективной камерой соударений. В 2013 году на рынок вышел прибор третьего поколения – гибридный масс-спектрометр Orbitrap Fusion, оснащенный, помимо квадрупольного масс-фильтра и орбитальной ловушки Orbitrap, еще и линейной ионной ловушкой.

В целом, развитие было направлено на то, чтобы сделать технологию Orbitrap количественным методом анализа. За это нам пришлось бороться 10 лет. Проблема в том, что традиционно количественный метод ассоциируется с непрерывными ионными источниками и непрерывными ионными пучками. А приборы с предварительным накоплением ионов считались несовместимыми с количественным анализом.

Количественный анализ подразумевает линейную зависимость между входным пото-

ком ионов и выходным сигналом. В Orbitrap точность измерения масс ограничивают нелинейные эффекты сдвига частот аксиальных колебаний, обусловленные объемным зарядом ионов в ловушке. Их можно компенсировать специальными калибровками. Такие калибровки эффективны при примерно постоянном и известном числе ионов в ловушке. Поэтому необходим четкий контроль за количеством ионов, входящих в Orbitrap, следовательно, и за объемным зарядом в ловушке. А входной поток ионов очень резко меняется, особенно при предварительном хроматографическом разделении. Чтобы работать в таких условиях, была разработана методика автоматической регулировки усиления (АРУ). В нашем случае АРУ означает возможность очень быстро и в широких пределах менять длительность накопления ионов в С-образной ловушке: в случае сильного ионного тока время накопления снижается, для слабого – увеличивается. В итоге в Orbitrap вводится примерно одинаковое число ионов. Это был первый шаг к тому, чтобы сделать метод Orbitrap количественным.

Дальнейшее улучшение было связано с существенным увеличением динамического диапазона. Это очень важно при работе с современными сложными смесями. Сегодня все хотят непосредственно, без предварительной пробоподготовки, вводить в аналитическую систему кровь, мочу и другие биологические жидкости. Чтобы в такой сложной матрице выявить целевые аналиты, особенно в следовых количествах, необходим колоссальный динамический диапазон.

Изначально динамический диапазон в одном спектре Orbitrap составлял порядка 10^4 . Был разработан метод, позволяющий предварительно разделять ионы по массе и накапливать их в С-образной ловушке. При этом для каждого диапазона масс тщательно контролируется число ионов – индивидуально задается время накопления (метод АРУ). Затем весь этот пакет ионов вводится в орбитальную ловушку и измеряется спектр колебаний. В результате динамический диапазон измерений расширяется на порядки величин – до 10^6 . Метод АРУ позволил одновременно достигать и высокого динамического диапазона, и высокой точности масс.

Проблема в том, что бюджет любого анализатора ограничен. Например, с помощью Orbitrap можно надежно измерять спектр миллиона ионов. А из современного источника поступает, скажем, 10 млрд. ионов в секунду. При попытке измерить их одновременно мы столкнемся с множеством проблем. Конечно, можно эволюционно наращивать динамический диапазон прибора, но такой путь едва ли эффективен, и выигрыша в порядки величин на этом пути достичь очень трудно. Поэтому мы не пытаемся решать проблему в лоб, а более разумно используем возможности прибора. Можно предварительно выбрать область анализа, например, получив обзорный спектр, а затем сконцентрироваться только на важных для нас участках спектра. Это одно из основных направлений развития масс-спектрометрии, которое называют "интеллектуальным накоплением" (intelligent filling).

Такой метод позволяет улучшить динамический диапазон прибора не в пять раз, как за счет эволюционного улучшения самой ловушки, а в десятки и сотни раз.

Следующая ступень на пути к количественному анализу – совместимость с высокими скоростями современных методов разделения, прежде всего, жидкостной хроматографии высокого и сверхвысокого давления, а также газовой хроматографии. Чтобы решить данную задачу, нам пришлось пройти длинный путь. Но в результате за десятилетие почти на порядок выросла максимальная скорость регистрации спектров. Это позволило вывести на рынок прибор QExactive GC, который работает совместно с газовым хроматографом и обрабатывает пики, ширина которых по основанию составляет всего 1-2 с. И подобное быстродействие – далеко не предел.

Конечно, скорость всегда сопряжена с определенными компромиссами. Чем быстрее мы накапливаем ионы, тем ниже разрешающая способность, чувствительность и динамический диапазон. Но особенность Orbitrap – если мы сокращаем время накопления в 10 раз, то отношение сигнал/шум падает лишь в 3 раза. Тогда как ВП МС оно снижается пропорционально, то есть в 10 раз. Поэтому мы можем ускорять накопление в более широких пределах. А дальше это ускорение должно сочетаться с увеличением чувствительности детектирования наведенных токов и другими улучшениями прибора.

Одним из таких методов стало создание ловушки с высо-

ким полем – Orbitrap HF. Это прямое решение проблемы скорости. Мы снижаем физические размеры ловушки Orbitrap в 1,5 раза, уменьшая центральный электрод всего на 20%. В результате зазор между электродами сокращается вдвое. Поэтому, прикладывая к центральному электроду то же напряжение, мы увеличиваем напряженность поля в ловушке,

улучшая уровень с точки зрения управления С-образной ловушкой, простоты прибора, обработки способа его промышленного производства. Позднее мы привнесли в нее технологию ловушки с высоким полем. И дальнейшая эволюция прибора будет идти в сторону снижения размеров, но при этом – увеличения возможностей и все большей интеллектуальности.

Нам пришлось бороться 10 лет за то, чтобы сделать технологию Orbitrap количественным методом анализа

а следовательно – частоту аксиальных колебаний. Это означает увеличение спектральной полосы, в результате за единицу времени мы можем получить более высокую разрешающую способность. Кроме того, за счет снижения размеров ловушки уменьшается ее электрическая емкость, что позволяет поднять чувствительность. В результате при том же отношении сигнал/шум мы можем накапливать ионы значительно быстрее.

В целом, все эти отдельные усовершенствования стали ступеньками на пути к конечной цели – к количественному анализу. Уже во втором поколении приборов с ловушкой Orbitrap – в платформе Exactive – нам удалось свести воедино все эти методы. Не было никаких прорывов в конструкции самого анализатора, но мы вышли на следу-

Возможна ли дальнейшая миниатюризация самой ловушки?

Мы регулярно обсуждаем этот вопрос. Уменьшение размеров связано с ростом требований к точности механической обработки. Для компактной высокополевой ловушки Orbitrap точность обработки поверхностей должна составлять нанометры. Более того, важна не только точность поверхности, но и взаимное расположение частей анализатора. Причем стабильность столь прецизионной обработки необходима не на отдельных экземплярах, а при выпуске тысяч устройств. Чтобы ее достичь, нам пришлось очень много общаться с производителями, налаживать с ними партнерство.

Если мы уменьшим ловушку, например, в 10 раз, то и допустимые отклонения должны снизиться в 10 раз, и в какой-то

момент мы приблизимся к размеру атомов. Пока запас для масштабирования есть, но не хватает технологий экономического и воспроизводимого изготовления столь прецизионных узлов. Подобные задачи решают современные литографические

Программные методы обработки сигналов тоже развиваются?

С точки зрения развития методов обработки Orbitrap происходит ту же эволюцию, что и ИЦР, но с некоторыми особенностями. Например, в ИЦР все

случае для оптимизации можно использовать тот факт, что спектры сигнала довольно разрежены – даже в случае сложного спектра число пиков намного меньше, чем точек в выборке. И здесь мы видим возможности увеличения скорости как минимум в два-три раза при заданном разрешении. Конечно, за быстроедействие придется платить увеличением объемов вычислений практически на три порядка, но производительность компьютеров растет постоянно. Пока мы рассматриваем подобный подход как один из путей развития технологии. Он еще не вышел из стадии исследований, мы опубликовали первые результаты только в 2016 году. Но вскоре, полагаю, новый алгоритм будет реализован в каждом приборе с Orbitrap.

Однако не стоит забывать, что программное обеспечение (ПО) – это не только алгоритмы обработки сигналов. Масс-спектрометры подобны современным самолетам, которые могут летать, только пока ими управляет компьютер. Аналогично и в масс-спектрометрии: без активного управления потоками ионов нереально достичь высоких характеристик. Поэтому возможности технологии Orbitrap связаны с развитием ПО на всех уровнях: от пользовательских приложений и интерфейсов до управления и синхронизации работы каждого узла прибора. Более того, ПО, особенно на нижних уровнях, по сути, является главным средством защиты наших приборов от копирования.

Развитие программных методов коррекции, калибровки и т.п. позволяет делать приборы более надежными и произво-

Мы уже достигли разрешающей способности в миллион и более. До Orbitrap это было возможно только в ИЦР МС

технологии, но они слишком дороги для нашего устройства.

Один из возможных путей развития – тот, по которому пошли производители компьютеров или автомобилей. Мы уже привыкли к 4- или 6-цилиндровым двигателям, к 12-ядерным процессорам и т.п. Аналогичный подход возможен и в масс-спектрометрии – в какой-то момент эффективнее окажется просто поставить несколько ловушек Orbitrap в параллель, а не снижать их размеры. При этом возможны различные архитектуры прибора – например, все орбитальные ловушки будут обслуживаться одной С-образной ловушкой, или для каждой ловушки Orbitrap можно использовать индивидуальную С-образную ловушку, но с общей системой высоковольтного напряжения. У каждого из вариантов свои достоинства. Пока мы не выбрали этот путь, поскольку были резервы повышения характеристик отдельного анализатора. Но он вполне возможен.

ионы входят в центр ловушки, и далее их необходимо возбуждать с помощью внешних РЧ-полей. В Orbitrap ионы инжектируются коротким импульсом, в результате все они обладают общей фазой, то есть существует виртуальная точка, из которой расходятся все колебания. Если в этой точке зеркально отобразить синусоиду по оси времени, можно удвоить базу детектируемого сигнала. По сути, это означает удвоение разрешающей способности либо скорости анализа. Этот метод – eFT (улучшенный фурье-анализ) – мы впервые продемонстрировали в приборах семейства Q Exactive пять лет назад.

Следующий шаг состоит в том, чтобы выйти за пределы ограничений, накладываемых фурье-анализом. Ведь чем выше разрешение, тем дольше длится детектирование спектра. Собственно, над этой проблемой выдающиеся математики работают более 200 лет, созданы альтернативные методы. В нашем

дительным. По сути, мы постоянно накапливаем знания о приборах в виде программного кода, делая их все более совершенными. Мы наблюдали этот процесс при переходе от платформы LTQ Orbitrap к Q Exactive. Новое ПО резко снизило проблемы с точностью определения изотопов, с линейностью и т.д., характерные для первых приборов Orbitrap. Например, изначально в LTQ Orbitrap мы получали лишь три спектра в секунду, хотя могли бы регистрировать пять-шесть спектров. Это было связано только с тем, что различные узлы прибора работали последовательно.

В современных приборах различные узлы работают в параллель. Например, в MS Orbitrap Fusion, где эта технология была продемонстрирована впервые, три анализатора: квадрупольный масс-фильтр, линейная ловушка и Orbitrap – функционируют, с одной стороны, синхронно, но с другой, каждый независимо делает свою работу, лишь на заключительной стадии обмениваясь ионами. Так, обзорный спектр в Orbitrap может детектироваться параллельно с 20 MS/MS-анализами в линейной ловушке. В результате чрезвычайно увеличивается производительность масс-спектрометра, причем именно за счет программных средств – само оборудование остается неизменным.

В целом, мы уже достигли разрешающей способности в миллион и более. До Orbitrap это позволяли ИЦР MS. В рамках существующей технологии возможно и дальнейшее улучшение разрешения, но тогда анализ становится все медленнее. А медленный прибор, с учетом развития хроматографических

методов, нужен все меньшему числу потребителей. Ведь большинство современных аналитических задач связано с предварительным разделением, поэтому необходимо, чтобы скорость анализов более или менее соответствовала ширине хроматографических пиков.

Технология Orbitrap появилась на рынке позже других. Насколько успешно ей удается завоевывать себе место под солнцем?

Конечно, Orbitrap приходится вступать в борьбу с традиционными методами, превозмогать инерцию пользователей. Наша технология сможет пробиться, только если обеспечит скачок по качеству и цене анализа.

Прежде всего, принципиально новое качество Orbitrap – сочетание скорости анализа с очень высокой разрешающей способностью (более

фрагментов, тройной квадруполь сможет проанализировать их только последовательно. В то время как Orbitrap, как и любой панорамный масс-спектрометр, позволяет измерять все фрагменты одновременно. Высокое разрешение и точность масс – до третьего или четвертого знака после запятой – позволяет надежно приписывать эти фрагменты целевому иону-предшественнику, на фоне самой сложной матрицы. Например, при анализе витамина D или тестостерона, который требует хороших пределов обнаружения в очень сложных матрицах, мы можем выйти на уровень, который до сих пор был подвластен только лучшим тройным квадрупольям.

В каких приложениях наиболее востребованы приборы на основе Orbitrap?

Области применения наших приборов обусловлены досто-

Львиная доля современного рынка протеомики принадлежит приборам Orbitrap

500 тыс.) и точностью масс (ниже ppm). Оно позволяет сжать временные масштабы при работе с жидкостными разделениями – можно параллельно разделять гораздо больше соединений, чем, например, используя тройной квадруполь.

Кроме того, Orbitrap обеспечивает очень высокую степень подтверждения результатов. Например, если исходный ион распадается на пять или более

инструментами технологии Orbitrap. Основным приложением метода с самого начала стала протеомика. С одной стороны, это связано с тем, что компания Thermo Fisher к середине 2000-х годов занимала в протеомике достаточно сильные позиции, прежде всего, благодаря своим успехам в области линейных ионных ловушек и прибору LTQ-FTICR. Заменяв в нем ИЦР-анализатор на Orbitrap, мы

получили качественно новый прибор – LTQ Orbitrap.

Другим, еще более важным фактором, стала высокая разрешающая способность и точность определения масс. Причем очень надежно, на уровне рутинных анализов, без сбоев. Высокая емкость ионов в ловушке Orbitrap обеспечила ее лучшую чувствительность по сравнению с ИЦР или ВП МС. Именно поэтому львиная доля современного рынка протеомики принадлежит приборам Orbitrap.

Еще одной областью, где технология Orbitrap оказалась очень востребованной, стал антидопинговый контроль. Здесь важно сочетание очень высокой надежности результатов с разрешающей способностью и чувствительностью. Не случайно Orbitrap стал ведущим методом анализа во всех антидопинговых лабораториях мира – к сожалению, и в допинговых тоже. "Гонка

уже в олимпийской антидопинговой лаборатории в Пекине в 2008 году, а в 2012 году в Лондоне использовалось уже двузначное число приборов семейства Exactive. Этот результат был не очень ожидаемым, но неизбежным. Ведь если раньше компания Thermo Fisher поставляла масс-спектрометры с магнитными секторами (например, DFS Magnetic Sector GC-HRMS), то теперь они используются для такого анализа гораздо реже – большинство тестов, в том числе количественных, можно выполнять с помощью Orbitrap.

Но только протеомикой и антидопинговым контролем поле деятельности Orbitrap не ограничивается?

Конечно же, нет. Orbitrap все шире используется и в других областях, традиционных для масс-спектрометрии. Например, мы рассчитываем на быструю

а сегодня это лидирующий метод в данной области.

Постепенно все идет к тому, что Orbitrap начнут использовать для контроля качества на биофармацевтических производствах. Для этого мы провели мощные разработки в области ПО и самого оборудования. Наша новая платформа – Q Exactive BioPharma – подходит практически для всех аспектов характеристики антител, от анализа в естественных условиях, анализа агрегатов, анализа нековалентно-связанных комплексов с антителом, вплоть до детального анализа гликанов и т.д.

Биофармацевтика – первое индустриальное применение, где мы прошли весь путь от первого лабораторного эксперимента до реально рутинного метода анализа. Надеемся повторить этот путь и в других областях, например, в задачах экологического мониторинга. Но конечно же, не во всех сразу.

Развитие приборов Orbitrap связано с общим трендом, характерным для всей масс-спектрометрии, – хорошо отработанные приборы становятся все более рутинными, простыми в эксплуатации, все более массовыми. Изначально масс-спектрометры были очень дорогими, нежными и капризными, с трудом работали с хроматографами. Но по мере развития они превращаются в рутинные детекторы. Процесс аналогичен тому, что мы наблюдаем в компьютерной индустрии. К сожалению, в масс-спектрометрии он идет гораздо медленнее, поскольку область применения не столь широка. К тому же мы не можем обойтись без вакуумных систем – этого проклятия масс-спектрометрии. Но развитие в сторону все более ком-

Orbitrap стал ведущим методом анализа во всех антидопинговых лабораториях мира – к сожалению, и в допинговых тоже

вооружений" не останавливается, но внедрение аналитических методов на основе Orbitrap оставляет на порядки меньше шансов тем, кто употребляет допинги. Ведь если раньше производительность оборудования позволяла протестировать лишь малую долю атлетов, то сегодня за время соревнований каждого можно проверить десятки раз. Достаточно сказать, что МС LTQ Orbitrap появились

экспансию Orbitrap в биофармацевтическую промышленность. Наши приборы уже применяются в фармацевтике для ADMET-анализов (absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity): анализ всасывания, распределения, метаболизма, выделения и токсичности лекарственных средств. Только в 2010–2011 годах мы научились анализировать антитела с помощью технологии Orbitrap,

пактных масс-спектрометров не остановить – они становятся все более автоматизированы, требуют все меньшего обслуживания и вообще превращаются для пользователя в "черный ящик". И чем дальше, тем больше масс-анализаторов будут попадать в этот класс. Сегодня в нем уже находятся одиночные квадруполь, и мне хочется, чтобы следующими там оказались анализаторы Orbitrap. С точки зрения техники и экономики это вполне возможно.

Но для этого необходимо снижение цены Orbitrap. Это возможно?

Конечно. Мы начинали продвигать технологию Orbitrap, позиционируя ее как замену ИЦР, поэтому приборы оказались в самом вершине стоимостной линейки. А выпущенный в 2015 году Q Exactive Focus по цене соответствует верхнему уровню линейки тройных квадруполь, то есть находится в совершенно другой категории. Этот масс-спектрометр стал первым шагом на пути к переводу систем Orbitrap в ценовую нишу ниже типичных квадрупольных времяпролетных МС, на уровень верхних и отчасти средних моделей тройных квадруполь.

Начав с конкуренции только против ИЦР, а затем и ВП МС, технология Orbitrap способна вторгнуться на рынок, который до сих пор был занят только тройными квадрупольными. Не сомневаюсь, что на современном уровне технологии есть возможность для гораздо более смелых ценовых решений, которые существенно расширили бы пользовательскую базу приборов Orbitrap.

Означает ли это, что Orbitrap в перспективе вытеснит тройные квадруполь?

Ни в коей мере. Есть методы анализа, где у тройного квадруполь всегда будет преимущество. Например, не слишком сложные смеси, где для иден-

Снижение цены любого прибора происходит прежде всего за счет повышения его технологичности. Возможно ли это в отношении столь сложной системы, как МС с ловушкой Orbitrap?

Масс-анализатор Orbitrap фундаментально очень прост,

Технология Orbitrap способна вторгнуться на рынок, который до сих пор был занят тройными квадрупольными

тификации достаточно одного-двух фрагментов на исходный ион. Либо в случаях достаточно качественного хроматографического разделения, когда вероятность ложноположительного определения очень низка. Но при очень сложных смесях, или если нет времени на качественное разделение, технология Orbitrap – лучшее решение.

Безусловно, не существует идеального масс-спектрометра, как и идеального аналитического метода в целом. Однако технологии развиваются. Раньше возможность применения Orbitrap во многих областях даже не обсуждалась, поскольку и чувствительность, и стоимость этих приборов были совершенно неконкурентоспособными. Но ситуация меняется. И по мере того, как все больше масс-спектрометров Orbitrap появляется в лабораториях, уходят в прошлое старые догмы, что высокое разрешение и точные массы – это обязательно сложно, не автоматизируемо и дорого.

именно поэтому у него большое будущее. Ведь если Orbitrap заработал, то он обеспечивает и высокое разрешение, и точное определение масс без каких-либо подстроек, вообще без участия оператора. И эти характеристики остаются стабильными в течение многих лет.

Сама ловушка – это, по сути, три куска металла, обработанные с точностью, пусть и чуть выше чем у квадруполь, но того же порядка. В качестве системы сбора данных используется обычный компьютер с простым дифференциальным усилителем. Конечно, анализатору необходима сверхточная высоковольтная электроника, но все сводится к стабилизации заданного напряжения на единственном центральном электроде. Мы пытаемся также максимально упростить конструкцию всего прибора. Например, если в LTQ Orbitrap высоковольтная электроника термостатировалась с помощью водяного охлаждения, то в более современных приборах

мы используем воздушное охлаждение.

Конечно, упростить можно не все. Например, в ловушке велики требования к вакууму, поскольку длина свободного пробега ионов в Orbitrap составляет сотни километров. Глубокий вакуум необходим, в частности, для top-down-анализа белков, с которым связано одно из главных направлений прогресса в протеомике. Нужен глубокий вакуум и для структурного анализа белковых комплексов с помощью так называемой нативной МС (native MS). Когда мы только начинали работать с Orbitrap, единственным типом приборов с примерно

В целом же, масс-спектрометрия – изначально физическая технология. Ее создатели и предположить не могли, что она будет использоваться для анализа биологических объектов или в повседневных задачах экологического мониторинга. Новые технологии всегда дороги, сначала они находят себе место в тех областях, где за результат готовы платить любые деньги. И постепенно, если технология способна развиваться, она проникает в область рутинных анализов. Именно этот процесс будет происходить и с Orbitrap.

мер, один 10-зарядный ион убиквитина формирует в высокополевой ловушке Orbitrap (Orbitrap HF) сигнал с отношением сигнал/шум, равным четырем. Причем сигнал квантуется – мы получаем соотношения 4, 8, 12 и т.д. Поэтому нет сомнений, что мы видим именно индивидуальные ионы, а не ансамбли.

По сути, при работе с белковыми структурами в большинстве случаев мы ограничены сложностями, связанными с их десольватацией. Однако и эта проблема решается. Так, в 2016 году в журнале Nature Methods опубликованы две наши статьи*, где мы показали возможность анализа труднорастворимых комплексов мембранных протеинов с липидами. Эти белково-липидные комплексы могут находиться в газовой среде, только будучи окруженными мицеллами из липидов. Когда мицелла попадает в вакуум, она разрушается, высвобождая протеиновый комплекс с липидом. Если правильно подобрать – конечно, вручную – условия, то можно разбить внешнюю оболочку мицеллы, но сохранить липид внутри белка. Мы показали, что Orbitrap позволяет анализировать эти протеин-липидные комплексы методами МС.

Масс-анализатор Orbitrap фундаментально очень прост, именно поэтому у него большое будущее

таким же уровнем вакуума были просвечивающие электронные микроскопы (ПЭМ). С тех пор объем производства Orbitrap превысил выпуск ПЭМ на порядки. Чтобы достичь надежного вакуума при таких сериях, пришлось серьезно поработать. Как результат, при переходе от LTQ Orbitrap к Q Exactive число вакуумных насосов снизилось с пяти до двух. Теперь вакуумирование масс-спектрометра – стандартный процесс, который пользователь даже не замечает: включили прибор вечером, и наутро он готов к работе. Мы научились обеспечивать в каждом приборе вакуум, который существует только в глубоком космосе.

Стремясь сделать Orbitrap рутинным прибором, вы не отказываетесь от создания инструментов верхнего уровня для исследовательских задач?

Ни в коей мере. Мы активно развиваем решения для исследовательского рынка, пример тому – платформа Fusion. Оказалось, что технология Orbitrap очень эффективна для анализа высокомолекулярных соединений, порядка 10^5 – 10^6 Да. Это протеиновые комплексы, вирусы и т.п. Прежде подобные анализы считались уделом только ВП МС. Но поскольку метод наведенных токов позволяет детектировать отдельные ионы, он оказался весьма эффективным именно для тяжелых молекул. Напри-

* См.: Gault J., Donlan J., Liko I., Hopper J., Kallol Gupta, Housden N., Struwe W., Marty M., Mize T., Bechara C., Ya Zhu, Beili Wu, Kleanthous C., Belov M., Damoc E., Makarov A., Robinson C. High-resolution mass spectrometry of small molecules bound to membrane proteins // Nature Methods. 2016. № 13. P. 333–336. doi:10.1038/nmeth.377.
Skinner O., Havugimana P., Haverland N., Fornelli L., Early B., Greer J., Fellers R., Durbin K., Do Vale L., Melani R., Seckler H., Nelp M., Belov M., Horning S., Makarov A., LeDuc R., Bandarian V., Compton P., Kelleher N. An informatic framework for decoding protein complexes by top-down mass spectrometry // Nature Methods. 2016. № 13. P. 237–240. doi:10.1038/nmeth.3731.

Точность метода достаточна для определения массы этих липидов.

Другое исследовательское приложение для структурного анализа протеинов, которое очень активно развивается на основе платформы Fusion – так называемый кросслинкинг (ковалентная фиксация). В рамках этого метода структуру белков определяют путем связывания определенных пар аминокислот и анализа получившегося в результате комплекса. Развиваются и количественные методы на основе изобарных химических меток (ТМТ). Масс-спектрометрия оказалась комплементарной криоэлектронной микроскопии, которая сейчас переживает фазу революционного развития и становится важным методом для структурного анализа белков.

Конечно, анализ гликопептидов, гликопротеинов и т.п. – это удел трибридной масс-спектрометрической платформы Orbitrap Fusion, которая находится на самом верху линейки цен. Такие методы не скоро станут рутинными анализами. С другой стороны, и ориентированная на рутинные анализы платформа Q Exactive позволяет проводить анализ белков и даже протеиновых комплексов.

Если посмотреть на масс-спектрометрию в целом, какие вызовы сегодня наиболее актуальные для создателей новых приборов и аналитических методов на их основе?

Одно из главных направлений развития масс-спектрометрии – стремление к полной утилизации образца. Сегодня источник позволяет получить десятки миллиар-

дов ионов, однако для анализа используется не более 0,1% из них. Конечно, это неправильно. Необходимо анализировать всю информацию от образца, чтобы повысить динамический диапазон. Но при

Технология Orbitrap очень эффективна для анализа высокомолекулярных соединений – протеиновых комплексов, вирусов и т.п.

огромных ионных токах, которые обеспечивают современные источники, определяющей становится задача: как без потерь выбрать целевые ионы и при этом не переполнить прибор ионами матрицы? Эта борьба между очень низкими пределами обнаружения и необходимостью избавиться от ионов матрицы является одним из основных вызовов для всей масс-спектрометрии. И ответ на него пока не найден.

Еще 15 лет назад появилась волна работ по так называемой двумерной масс-спектрометрии. В случае МС с традиционным масс-фильтром из потока выделяются целевые ионы, а остальные отбрасываются. При двумерной МС используется весь ионный ток за счет параллельной селекции ионов – каждая популяция ионов в заданном диапазоне масс находит свой канал анализа. А затем в отдельных каналах второй анализатор определяет спектры фрагментов от каждой из этих

масс. Идея замечательная, у меня тоже были работы в этом направлении. Однако светосила ионных источников растет столь стремительно, что за ними не поспевают возможности МС-анализа. В резуль-

тате разработанные методы двумерной МС оказались нерезализуемыми – они были рассчитаны на 10–100 тыс. ионов, накапливаемых за долгие миллисекунды. А сегодня эти процессы длятся микросекунды, МС-анализаторы просто не успевают обработать столько ионов. Вот характерный пример, когда реальности химической физики отменяют хорошие, работающие идеи. Тем не менее, эту проблему придется решать, над ней работают многие специалисты.

Сотрудничаете ли вы в области развития технологии Orbitrap с российскими научными центрами?

Конечно. Например, уже много лет мы работаем вместе с Институтом проблем химической физики РАН в Черноголовке над улучшением интерфейса между источником ионов и вакуумной системой МС. Исторически мы тесно сотрудничаем с группой профессора М.А.Монастырского



Насколько масс-спектрометрические системы на основе технологии Orbitrap представлены на российском рынке? Об этом нам рассказал ведущий специалист компании "МС-Аналитика" Михаил Рыков.

Компания "МС Аналитика" – авторизованный дистрибьютор корпорации Thermo Fisher

Scientific в области масс-спектрометрии и хроматографии. Мы работаем с продукцией этой компании и ее предшественников (начиная с Finnigan, а затем и Thermo Electron) на российском рынке свыше четверти века.

Могут отметить, что приборы по технологии Orbitrap появились в России практически сразу после того, как в конце 2005 года было объявлено о начале их коммерческих продаж. Первые два анализатора LTQ Orbitrap мы поставили в сентябре 2006 года. Аналитические

системы на основе Orbitrap оказались очень востребованными, несмотря на их высокую стоимость. Поэтому не удивительно, что в России мы уже продали свыше 40 приборов с орбитальной ионной ловушкой. Сегодня в нашей стране представлена вся линейка Orbitrap, включая наиболее продвинутые модели Orbitrap Fusion.

Области применения анализаторов Orbitrap совершенно различны: от антидопингового контроля, контроля наркотиков, определения дизайнерских наркотиков до биологических исследований. Причем интерес к приборам Orbitrap не ослабевает, невзирая на трудные времена. Мы видим тенденцию к сохранению и даже увеличению объема рынка этих масс-спектрометров. В определенной степени этому способствует и политика снижения цен на Orbitrap – разумеется, в долларах. В этой связи появляются новые применения. Например, в нашей стране, как и во всем мире, приборы Orbitrap мало используются в технологических целях. Однако уже несколько анализаторов Orbitrap используются в российском фармацевтическом производстве. Вероятно, это только начало применения технологии Orbitrap в промышленных задачах.

из Института общей физики (ИОФ) РАН. Без разработанного этой группой ПО мы не смогли бы правильно рассчитать геометрию ловушки, заложить основы производства Orbitrap. Поддерживаем тесные отношения и с лабораторией Лазерной диагностики ИОФ РАН, возглавляемой профессором С.С.Алимпиевым. Наше взаимодействие началось в 1990-х, когда я был научным сотрудником этой лаборатории, и не прекращается до сих пор.

Мы заинтересованы в расширении сотрудничества с ведущими лабораториями, чтобы исследовать новые, интересные области. Так, несколько лет назад мы стали сотрудничать с группой профессора А.Т.Лебедева в МГУ. Он занимается изучением естественных пептидов, которые выделяют

кожные железы лягушек*. На первый взгляд, очень специализированная область. Однако она имеет огромное значение для развития методов анализа пептидов в целом. Ведь изучаемые группой А.Т.Лебедева соединения отсутствуют в современных базах данных, ориентированных на пептиды, образованные с помощью трипсина. И это хороший вызов для таких сложных приборов, как Orbitrap Fusion.

Конечно, сегодня есть некоторое опасение в развитии сотрудничества с российскими организациями из-за санкций. Но реально они не являются принципиальным барьером для

нашей компании. Безусловно, фирма должна соблюдать требования законодателя, но если есть возможности для развития технологий, мы стремимся их изучать. Например, мы работаем с НАСА, с Японским и Европейским космическими агентствами над созданием МС на основе Orbitrap для космических применений. Компания Thermo Fisher готова сотрудничать и с Роскосмосом, но пока эта организация подобного интереса не выявила.

С чем связан интерес компании Thermo Fisher к космическим задачам?

Прежде всего, нам интересно подвергнуть Orbitrap новому испытанию. Кроме того, требуется вывести прибор на совершенно другой уровень тех-

* См.: Лебедев А., Самгина Т. О чем могут рассказать лягушки? Изучение пептидного состава кожного секрета амфибий // Аналитика. 2013. № 5. С. 38–47.

нического исполнения, когда он будет весить менее килограмма и потреблять меньше 3 Вт. Похоже, это возможно, нам интересно попробовать. В компании Thermo Fisher Scientific я ответственен именно за такие долгосрочные проекты, которые не приносят сиюминутной выгоды, но обуславливают развитие совершенно новых технологических подходов. По сути, они сводятся к двум глобальным задачам: на верхнем уровне – как утилизировать огромное число ионов, на нижнем – как упаковать Orbitrap в маленькую коробочку. Сегодня эти задачи нереализуемы, но мы надеемся, что сможем их решить. Над этими проблемами в компании работает не одна лаборатория. Поэтому не сомневаюсь, мы сможем продолжать инновации на рынке аналитических приборов.

Вы – создатель уникального метода масс-спектрометрического анализа. За последние три десятка лет в этой области никто не делал столь фундаментальных открытий. Однако созданная вами технология Orbitrap развивается в рамках глобальной корпорации Thermo Fisher Scientific. Оглядываясь назад, насколько верным было это решение?

Я выпускник МИФИ, и стал инженером-физиком вполне сознательно. Никогда не стремился открывать законы природы, но хотел научиться их использовать и дать возможность пользоваться ими другим людям. В этом смысле работа в крупной корпорации открывает уникальные перспективы, хотя и весьма специфична. С одной стороны, все вокруг делает тебя безликим винтиком огромной машины.

Но с другой, крупная компания позволяет достичь такого уровня распространения твоих идей и решений, которого никогда не добиться иным путем. Собственно, в этом противоречие всех современных корпораций. С одной

Технология Orbitrap уже обречена на долгосрочное присутствие в масс-спектрометрии

стороны, глобализация позволяет быстро распространять идеи, продукты, достижения человечества. С другой стороны, она же приводит к обезличиванию, к некоей унификации. И найти правильный баланс очень трудно.

Мне повезло в этом отношении. Благодаря стечению обстоятельств, иногда – уникальности ситуации, удалось очень быстро провести Orbitrap через все препоны и обеспечить его последующее развитие в течение десятилетия. Сегодня технология Orbitrap вышла на тот уровень, когда она уже обречена на долгосрочное присутствие в масс-спектрометрии.

Ваши личные планы как ученого связаны именно с технологией Orbitrap?

Мне пришлось сделать осознанный выбор – я достаточно долго оставался "человеком Orbitrap". Иначе вряд ли удалось довести технологию до той стадии развития, когда я смогу ее оставить. Но этот момент уже не так далек. Поэ-

тому, чтобы выйти на новый уровень собственных исследований, расти как ученому, я занимаюсь другими проектами. Они связаны не только с Orbitrap, но и с другими масс-спектрометрическими или смежными методами.

Собственно, это отражает и моя должность – возглавляя в Thermo Fisher Scientific подразделение исследований в области наук о жизни, я являюсь, по сути, одним из нескольких ведущих ученых во всей корпорации. Кроме того, будучи профессором Утрехтского университета, я официально веду собственную исследовательскую тематику. Сочетать эти две позиции не просто, такое доверие необходимо оправдывать. Надеюсь, смогу это сделать, когда удастся открыть новое направление исследований белковых комплексов в структурной биологии. Задача – сделать масс-спектрометрию таким инструментом в арсенале структурной биологии, который никогда не будет вытеснен методами секвенирования. Для этого масс-спектрометрия должна выйти на совершенно другой уровень, и одним Orbitrap там не обойтись.

Спасибо за интересный рассказ.

С.А.А.Макаровым беседовал
И.В.Шахнович