

ALL IONS MS/MS: НОВЫЙ МЕТОД СКРИНИНГА ДЛЯ ЖИДКОСТНЫХ МАСС-СПЕКТРОМЕТРОВ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ КОМПАНИИ AGILENT

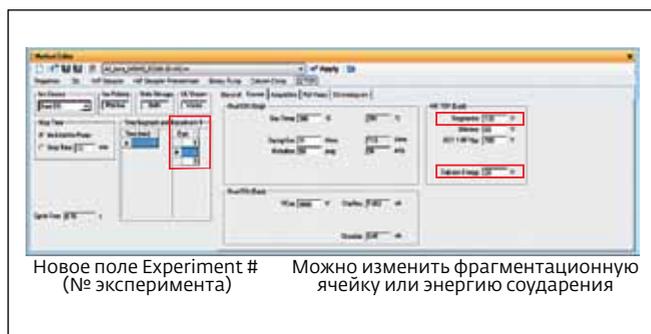
Р.Герасимов, Agilent Technologies
roman.gerasimov@agilent.com

Методика All Ions MS/MS доступна на времяпролетных и квадрупольно-времяпролетных масс-спектрометрах высокого разрешения компании Agilent. В рамках этой методики для идентификации соединений используются собственные персональные библиотеки точных масс компании Agilent (PCDL) со сведениями о молекулярных и фрагментных ионах. Библиотеки PCDL с богатым информационным наполнением включают сведения о точно измеренных массах тысяч соединений. Внедрение инструментальных средств обработки All Ions MS/MS в ПО MassHunter обеспечивает точную идентификацию соединений с возможностью удобного просмотра. В результате алгоритм All Ions MS/MS позволяет уменьшить время, затрачиваемое на настройку методик, улучшить производительность и проводить достоверный высокочувствительный количественный и качественный анализ на одном приборе в одном аналитическом цикле.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОСРЕДСТВОМ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ ИОНАМИ- ПРЕДШЕСТВЕННИКАМИ И ФРАГМЕНТНЫМИ ИОНАМИ

В методике All Ions MS/MS сбор данных по точно измеренным массам с высоким разрешением (HRAM) осуществляется при разных условиях. В одних случаях при низком значении энергии соударений, в других – при одном или нескольких высоких значениях энергии. Низкоэнергетические спектры преимущественно отображают только молекулярные ионы (или ионы-предшественники) соединений, тогда как высокоэнергетические – ионы-предшественники и их фрагментные ионы.

Этот аналитический метод легко настраивается с помощью ПО MassHunter Workstation Acquisition для времяпролетных и квадрупольно-времяпролетных приборов (начиная с версии B.05.01). На



Новое поле Experiment # (№ эксперимента) Можно изменить фрагментационную ячейку или энергию соударения

Рис.1. Вкладка Q-TOF (Квадрупольный времяпролетный) в редакторе методов MassHunter Acquisition

рис.1 показана новая возможность в ПО для сбора данных: поле Experiment #, в котором допускается использование разных значений параметров в рамках одного временного сегмента. Например, можно

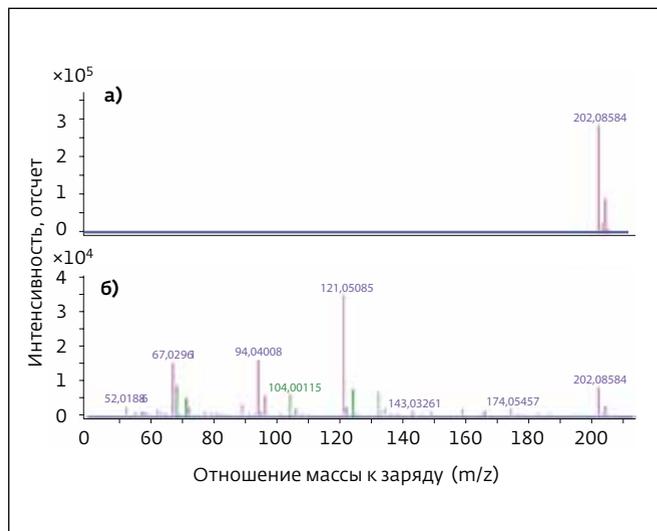


Рис.2. а) масс-спектр симазина при энергии соударения 0 В; б) средние значения спектров симазина при энергиях соударения 20 и 40 В. Присутствует ион-предшественник с m/z 202,08584 (розовый) и фрагментные ионы (зеленый)

настроить для первого эксперимента энергию соударений 0 В, а для второго и третьего экспериментов – энергии соударений 20 и 40 В соответственно.

При изменении напряжения на фрагментационной ячейке или энергии соударений создается файл данных с низкоэнергетическим каналом, который содержит преимущественно ионы-предшественники, и одним или несколькими высокоэнергетическими каналами, которые содержат ионы-предшественники и фрагментные ионы. На

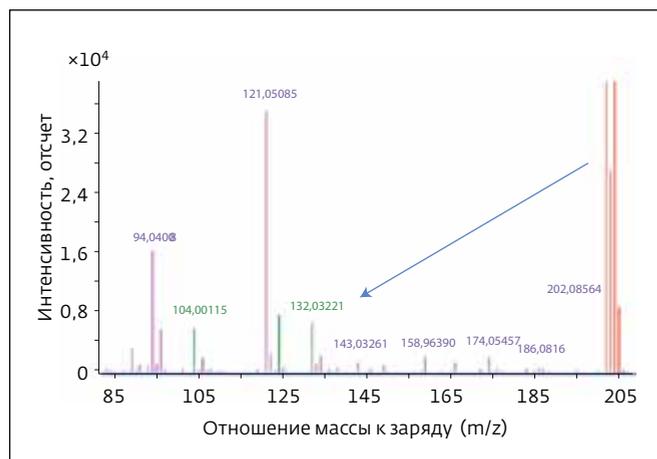


Рис.3. Масс-спектр симазина. Ион-предшественник симазина с m/z 202,08564 (красный) коррелирует с фрагментным ионом m/z 132,03221 (зеленый) при использовании алгоритма All ions MS/MS

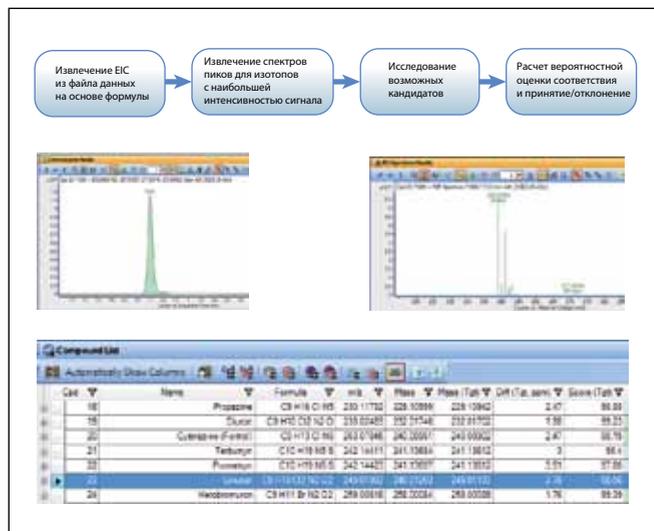


Рис.4. Алгоритм поиска по формуле FBF (Find by Formula)

рис.2а показан спектр симазина с энергией соударения 0 В, в котором присутствует заметный пик иона-предшественника при m/z 202,08584. На рис.2б изображен усредненный спектр с энергиями 20 и 40 В, содержащий ион-предшественник и несколько фрагментных ионов.

Режим All Ions MS/MS в ПО MassHunter Qualitative Analysis выполняет корреляцию между профилем элюирования иона-предшественника в низкоэнергетическом канале и фрагментами, созданными при более высоких энергиях. Например, на рис.3 показан предшественник (красный) и фрагмент со значением m/z 132,03221 с квалифицирующим созданием (зеленый). Это достигается с помощью сведений о фрагментах из библиотеки Agilent PCDL, которая содержит MS/MS спектры, полученные при разных значениях энергии соударений [1]. Кроме того, библиотеки PCDL включают сведения о соединении: название, формулу, точно измеренную массу, структуру и идентификаторы базы данных, например номер CAS. Библиотека PCDL используется для выбора возможных фрагментных ионов, для которых затем анализируется соотношение с ионом-предшественником.

ПОИСК ПО ФОРМУЛЕ

Методика All Ions MS/MS является расширением уникального алгоритма поиска по формуле (Find by Formula или FBF) в ПО MassHunter Qualitative Analysis (рис.4). Алгоритм поиска по формуле использует в качестве отправной точки формулу соединения (например, из PCDL) и рассчитывает моноизотопную массу и соотношение изобарных

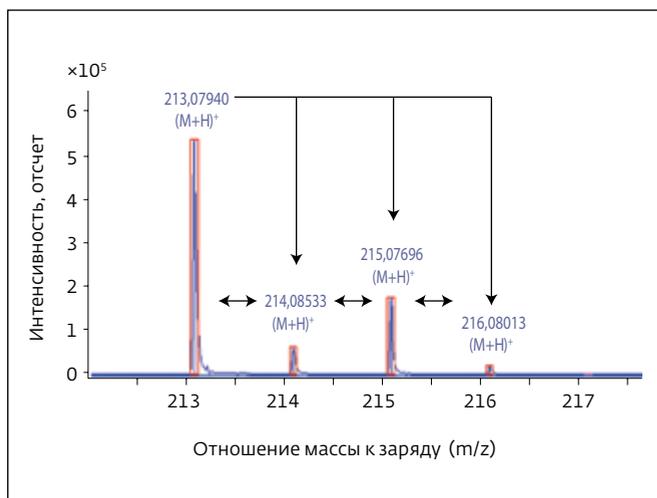


Рис.5. Пример идентификации соединения с помощью алгоритма FBF. Используются три характеристики изотопного кластера иона-предшественника: точно измеренная масса каждого изотопа, его интенсивность (выделены красными прямоугольниками) и интервалы относительно других изотопов

пиков. Затем из файла данных на основе наиболее распространенных изотопов извлекаются хроматограммы по выделенному иону (EIC) для каждого выбранного носителя заряда и средние спектры из первых 50% проинтегрированных пиков. Таким образом, если соединение присутствует в файле данных, оно должно отображаться в виде хроматографического пика для каждого из своих основных молекулярных ионов.

Извлеченные из пика масс-спектры исследуются для обнаружения возможных кандидатов на основе брутто-формулы соединения. Для каждого кандидата рассчитывается вероятностная оценка соответствия на основе его массы, соотношения изобарных пиков и интервала между ними (рис.5). Если соединение проходит фильтр по оценке соответствия, оно помечается как идентифицированное. Алгоритм поиска по формуле является быстрым и может проверять файл данных по базам точно измеренных масс (CSV, PCD или PCDL), которые содержат тысячи формул, за несколько минут.

ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ФРАГМЕНТА

В методике All Ions MS/MS алгоритм поиска по формуле усовершенствован благодаря дополнительному шагу подтверждения фрагмента с использованием одного или нескольких высокоэнергетических каналов. Если для соединения существует хотя бы один спектр MS/MS в библиотеке PCDL, наиболее распространенные ионы-продукты в библиотечных

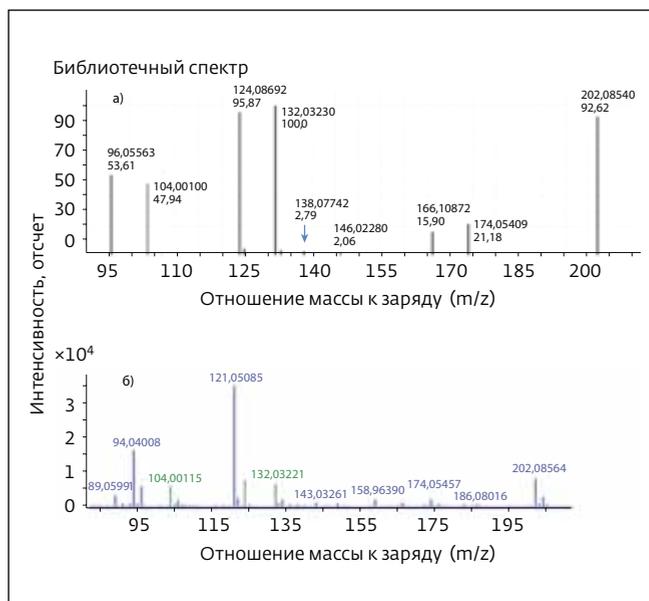


Рис.6. а) Библиотечный MS/MS спектр, полученный при энергии соударения 20 В. Он показывает ионы-продукты для соединения, включая m/z 104,00 и 132,03. Эти ионы видны (показаны зеленым цветом) на нижнем спектре (б) в высокоэнергетическом канале, несмотря на ионы с более высокой интенсивностью при m/z 94,04 и 121,05

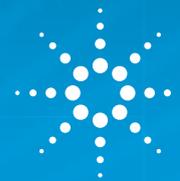
спектрах извлекаются в виде EIC из соответствующего высокоэнергетического канала. Например, на рис.6а показан библиотечный спектр MS/MS симазина при энергии соударения 20 В из библиотеки пестицидов PCDL. На рис.6б приведен высокоэнергетический спектр пробы, которая содержит симазин. Используя библиотеку PCDL, программе удалось определить фрагменты при значениях m/z 104,00 и 132,03, несмотря на наличие посторонних ионов с большей интенсивностью сигнала при m/z 94,04 и 121,05.

Фрагменты из спектров MS/MS в библиотеке PCDL извлекаются в виде EIC и налагаются на EIC иона-предшественника. Если в библиотеке PCDL отсутствуют MS/MS спектры для соединения, извлекаются и налагаются EIC для наиболее распространенных фрагментов в среднем всех спектров высокоэнергетического канала. Эти наложенные EIC оцениваются с использованием уникального параметра оценки коэффициента соэлюирования. Оценка соэлюирования рассчитывается по методике, аналогичной чистоте пика [2], используемой в УФ-хроматографии, в которой программа рассчитывает значение на основе интенсивности, формы (симметричности), ширины пика и времени удерживания. Нормализованное отношение интенсивностей фрагментных ионов и иона-пред-



СЭКОНОМЬТЕ НА ВЭЖХ СИСТЕМЕ С НОВОЙ ПРОГРАММОЙ ПОДДЕРЖКИ ОТ AGILENT TECHNOLOGIES

The Measure of Confidence



**ВОСПОЛЬЗУЙТЕСЬ СПЕЦИАЛЬНЫМ
ПРЕДЛОЖЕНИЕМ ОТ AGILENT TECHNOLOGIES
И ПОЛУЧИТЕ СКИДКУ 50% НА ВЭЖХ
СИСТЕМУ INFINITY 1290 ПРИ ЗАКАЗЕ
ЛЮБОГО ХРОМАТО-МАСС-
СПЕКТРОМЕТРА СЕРИИ 6500**

**Новые возможности вашего анализа
при использовании приборов серии
6500 от Agilent:**

- Использование режима MS/MS, который позволяет собрать больше структурной информации путем анализа спектров дочерних ионов с высоким разрешением
- Библиотеки точных масс от Agilent включая MS/MS-спектры
- Готовые отраслевые наборы для ВЭЖХ-МС (пищевая безопасность, токсикология, метабомика и анализ объектов окружающей среды)
- Уникальный алгоритм «All Ions MS/MS» для качественного и количественного анализа в рамках одного эксперимента



При обращении в представительство Agilent Technologies за
подробной информацией или коммерческим предложением,
пожалуйста, указывайте код акции – **RU_1405_LCMS**

1. Указанные цены являются ориентировочными и могут отличаться в зависимости от комплектации и условий приобретения покупаемого прибора.
2. Указанные условия действуют при заказе приборов у партнеров компании Agilent Technologies в период с 1 июня 2014 г. по 31 декабря 2014 г. (* Сроки проведения данной акции могут быть изменены без предварительного предупреждения).
3. Партнеры компании Agilent Technologies, участвующие в данной акции, указаны на вебсайте: <http://www.chem.agilent.com/en-US/Contact-Us/Pages/Russian-Federation.aspx> Наиболее подробную информацию о размещении заказов в рамках данной акции можно узнать у любого партнера компании Agilent Technologies, участвующего в акции.
4. Скидка не распространяется на масс-спектральный детектор и расходные материалы.

Agilent Products are for Research Use Only.
Not for use in diagnostic procedures.
Information, descriptions and specifications in this
publication are subject to change without notice.

© Agilent Technologies, Inc. 2013-2014
Published in Germany, May 2014



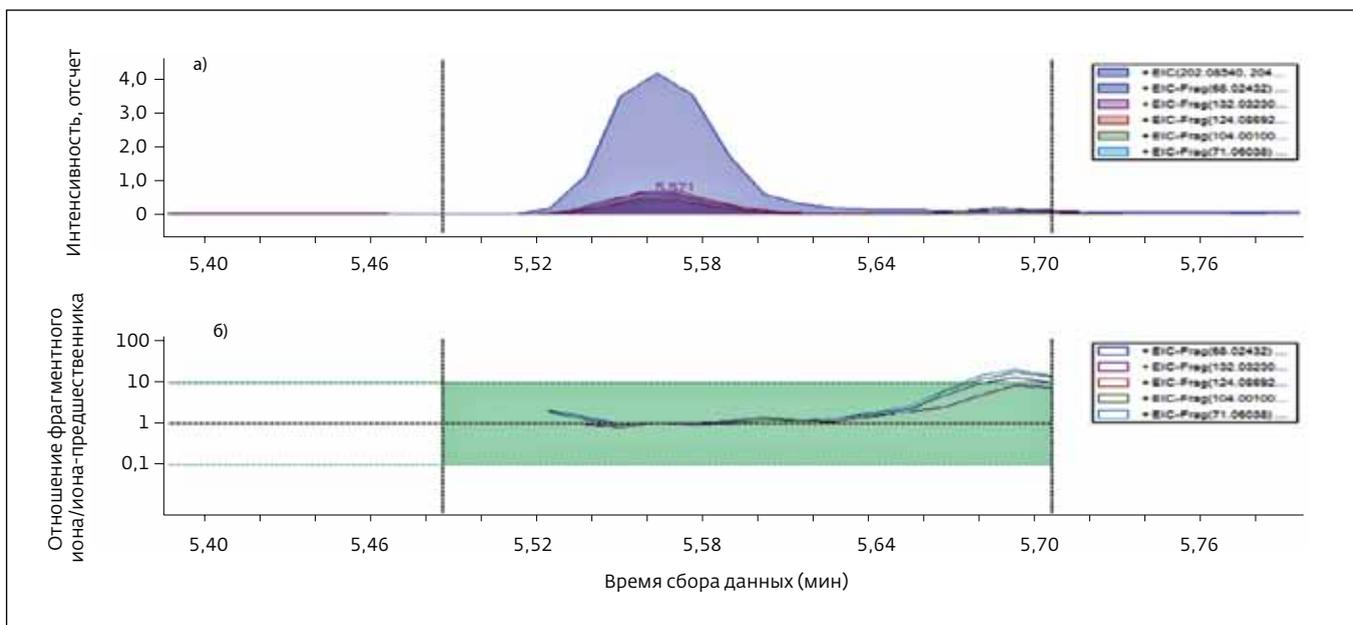


Рис.7. а) EIC для симазина с ионом-предшественником, выделенным синим цветом, и фрагментными ионами, обозначенными другими цветами. Все ионы имеют одинаковую хроматографическую вершину; б) график соэлюирования для симазина, на котором показано отношение нормализованной интенсивности фрагментных ионов к интенсивности иона-предшественника в течение времени удерживания

шественника отображается на графике соэлюирования поверх времени удерживания и доступно для просмотра пользователем. На рис.7а показаны наложенные EIC для симазина, а на рис.7б - график совместного элюирования со всеми ионами для одной вершины (5,571 мин). Фрагментные ионы демонстрируют отношения, приблизительно равные единице в середине пика предшественника, что свидетельствует о совместном соэлюировании всех ионов. Это подтверждает идентификацию симазина в пробе.

Для настройки параметров алгоритма работы All Ions MS/MS используется новая вкладка Fragment Confirmation (Подтверждение фрагмента) в области подтверждения по формуле в программе MassHunter Qualitative Analysis. На этой вкладке можно указать, какой спектр следует использовать, библиотечный или средний по фрагментам, и сколько наиболее распространенных ионов требуется извлекать. Можно также установить пределы для EIC фрагментных ионов на основе различий во времени удерживания, минимального соотношения "сигнал - шум" и коэффициента соэлюирования.

После завершения работы функции Find by Formula с подтверждением фрагментов можно просмотреть результаты для каждого соединения на панели результатов идентификации соединений (рис.8). Сверху отображается название соединения, его химическая формула и оценка вероятностного

соответствия из FBF. Ниже перечислены отдельные фрагментные ионы, используемые для идентификации, с оценкой соэлюирования, энергией соударения и указанием того, квалифицирован ли фрагмент. Если фрагмент не квалифицирован, приводится причина, например низкое соотношение "сигнал - шум".

ПРОСМОТР СВЕДЕНИЙ О СОЕДИНЕНИИ

Можно быстро проверить результаты работы алгоритма All Ions MS/MS в новом представлении сведений о соединениях (рис.9). Для просмотра всех соединений имеется возможность прокрутки списка. Также можно оперативно просматривать результаты совпадения в библиотеке, MS- и фрагментные спектры, наложенные EIC и графики соэлюирования.

К этому моменту пользователи разработают методы качественного анализа для идентификации соединений с использованием методики All Ions MS/MS. Они могут продолжить анализ проб без необходимости доступа к MS/MS спектрам в библиотеке PCDL, поскольку сведения о фрагментных ионах сохраняются в методе MassHunter Qualitative Analysis. В скрининг можно легко добавить новые соединения, дополнив PCDL и выполнив повторную обработку данных. Эта полезная опция позволяет выполнять последующие запросы данных без повторного анализа пробы.

Compound Identification Results: Cpd 27: 7.932 Chloroxuron: C15H15ClN2O2

Automatically Show Columns

ID Techniques Applied: FBF

Best	Name	Formula	Score	m/z	Mass	Mass (MFG)	Mass (Tgt)	Diff (ppm)	Diff (mDa)	Score (Tgt)	RT
97.5	Chloroxuron	C15H15ClN2O2	97.5	291.09049	313.07207	290.08322	290.08221	-3.49	-1.01	97.5	7.932

Coelution Score	CE	Flags (Fls)	Height	m/z	Compound Name	RT	RT Diff	SNR
99.4	20	Qualified	495535.9	72.04488	Chloroxuron	7.926	0.006	178.3
		EIC with zero abund		46.06513	Chloroxuron			
		Low S/N ratio	844.9	73.05222	Chloroxuron	7.965	0.032	2.4
99.6	20	Qualified	12832.4	218.03623	Chloroxuron	7.926	0.006	Infinity
98.9	20	Qualified	16211	164.09441	Chloroxuron	7.926	0.006	Infinity

Рис.8. Результаты идентификации соединения для хлороксурона. В первой строке таблицы название, формула и вероятностная оценка соответствия. В нижней части – фрагментные ионы с оценкой соэлюирования, энергиями соударения и результатами квалификации

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

После просмотра представления сведений о соединениях можно экспортировать данные в ПО MassHunter Quantitative Analysis в файле с форматом SEF (Compound Exchange Format). Файл SEF содержит сведения, необходимые для настройки количественного метода: название соединения,

время удерживания, ион-предшественник, фрагментные ионы (для создания квалифицирующих ионов), энергия соударения и относительные интенсивности. Это значительно ускоряет создание метода обработки количественных данных. ПО MassHunter Quantitative Analysis позволяет автоматически выбирать основные ионы-предшественники и фрагмент-

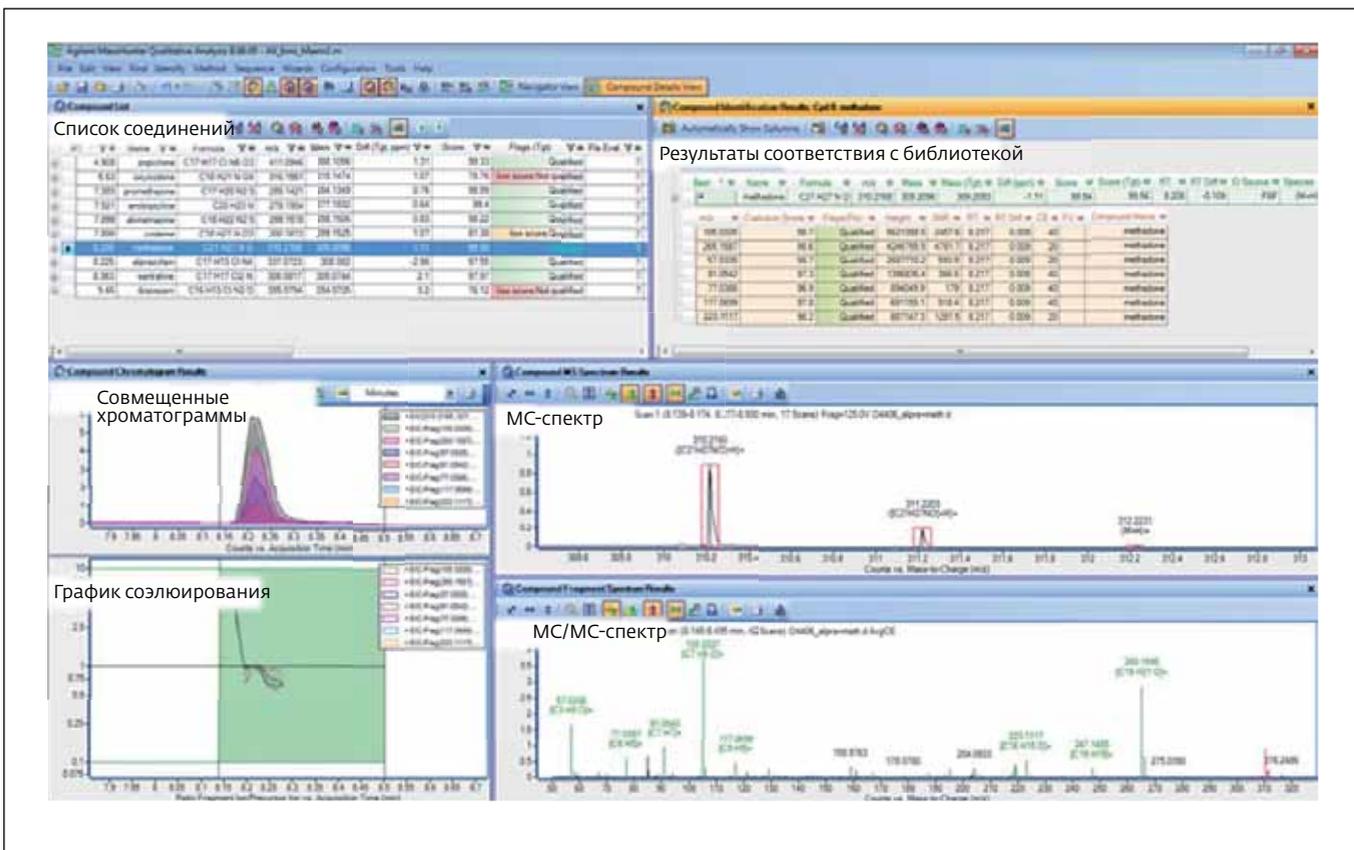


Рис.9. Представление сведений о соединениях (Compound Details View) в программе MassHunter Qualitative Analysis для быстрого просмотра результатов работы All Ions MS/MS

Qualifier	Name	TS	Transition	Scan	Type	Uncertainty
Qualifier						
Product Ion	Collision Energy	Rel. Resp.	Uncertainty	Area Sum		
124,0869	20.0	20.7	20.0			
68,0243	40.0	21.6	20.0			
204,0828	0.0	31.1	20.0			

Рис.10. Настройка метода в программе Agilent MassHunter Quantitative Analysis

ные ионы для каждого соединения с относительной интенсивностью выше 10%, упрощая трудоемкую обработку вручную. Программа может использовать

который сводит к минимуму ошибки пользователя при проведении качественных и количественных измерений. Этот рабочий процесс намного быстрее настройки количественных анализов с использованием ВЭЖХ-МС/МС систем с тройным квадруполом, для которой требуется многочасовой ввод сведений о соединениях и выбор ионов-квалификаторов с высокой интенсивностью. All Ions MS/MS – это удобный и надежный алгоритм для повседневной работы при проведении идентификации соединений, который не требует повторных измерений, поскольку данные сканирования

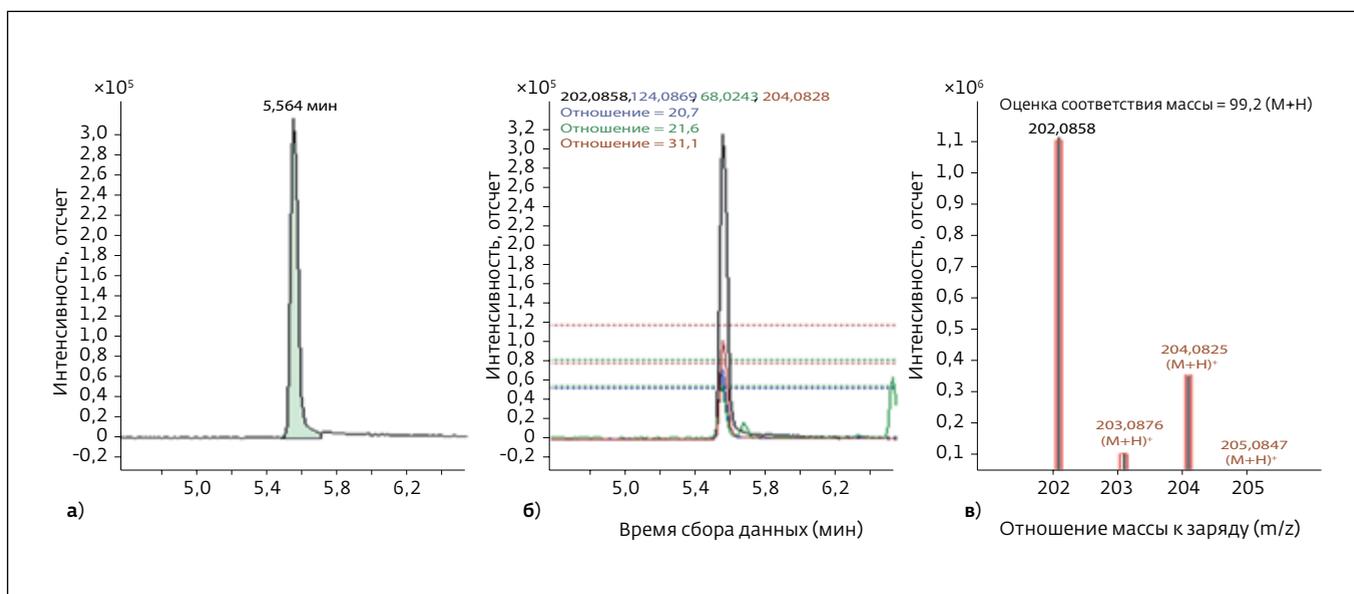


Рис.11. Хроматограммы по выделенному иону для иона-квантификатора (целевого иона) (а), квалификаторов и изотопного кластера молекулярного иона (б). Теоретический шаблон относительного изотопного состава обозначен красными прямоугольниками (в)

фрагментные ионы с разными энергиями соударения в ячейке соударений (рис.10). Можно также использовать в качестве квалифицирующего иона один из изотопов иона-предшественника из низкоэнергетического канала (рис.10, ион-продукт при m/z 204,0828). Программа количественного анализа извлекает хроматограммы для основного целевого иона (квантификатор), по которому будет проводиться количественная оценка, ионов-квалификаторов и изотопного кластера молекулярного иона. Можно проверить изотопные вариации, просмотрев их наложение на теоретический шаблон (рис.11).

ВЫВОДЫ

All Ions MS/MS – это новый революционный способ обработки масс-спектральных данных,

всегда под рукой. All Ions MS/MS – это уникальный метод, позволяющий проводить на масс-спектрометре высокого разрешения как качественный, так и количественный анализ в рамках одного эксперимента, выполнив всего один ввод образца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство по быстрому запуску персональной базы данных соединений и библиотеки точных масс для MassHunter, номер публикации G3336-90014, февраль 2011.
2. Hans-Jurgen P. Sievert, Anton C.J.H. Drouen. Spectral matching and peak purity in Diode Array Detection in High Performance Liquid Chromatography. – New York: Marcel Dekker, 1993.

бартерная реклама от насти -
будет в понедельник