

SHIMADZU: ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕШЕНИЯ И ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНЫЕ НОВИНКИ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ И КЛИНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ

К 140-летию компании Shimadzu

С.Жохов, к.х.н.

Корпорация Shimadzu – одна из старейших приборостроительных компаний мира – была основана в 1875 году. Ее штаб-квартира расположена в Киото, древней столице Японии. Корпорация имеет около 70 подразделений по всему миру, в ней работают свыше 10 тысяч сотрудников. Большую часть производимой компанией про-

дукции, около 60%, составляет аналитическое и измерительное оборудование. Еще примерно по 20% приходится на медицинские диагностические приборы для клиник и оборудование для самолетостроения и промышленности. В Европу и страны СНГ продукция поставляется европейским подразделением Shimadzu – Shimadzu



Казуя Огава (Kazuya Ogawa), заместитель старшего менеджера Европейского подразделения компании Shimadzu – Shimadzu Europa (Дуйсбург, Германия):

"Компания Shimadzu видит для себя большие перспективы на российском фармацевтическом рынке – в 2014 году он составил порядка

10–15% от общего товарооборота компании в России. Так же значим для нас и рынок клинической диагностики, который на сегодняшний день является одним из наиболее обещающих. Shimadzu уже сейчас предлагает приборы и решения, необходимые для нужд этого рынка.

На рынке оборудования для фармацевтики мы выделяем два основных направления – оборудова-

ние для входного и выходного контроля продукции и оборудование для разработки новых лекарственных средств и научных исследований. Практически во всех линейках наших приборов существуют как относительно дешевые приборы для рутинного анализа, так и приборы высочайшего класса для исследовательских целей. Для входного и выходного контроля продукции компания Shimadzu предлагает жидкостные хроматографы, спектрофотометры, атомно-абсорбционные спектрометры. Среди приборов для исследований и разработки новых лекарств основное место занимают масс-спектрометры, жидкостные и газовые хроматографы с масс-спектрометрическими детекторами, масс-микроскопы. Хочу особо подчеркнуть, что компания Shimadzu предлагает не только отдельное оборудование и приборы, но и готовые системы для решения конкретных исследовательских задач. При этом все методики, которыми снабжаются

Euroa GmbH, штаб-квартира которого находится в г. Дуйсбург, Германия.

Примерно 10% дохода Shimadzu стабильно тратится на научные исследования и разработку нового оборудования. Компания имеет собственные крупные исследовательские центры, а также поддерживает партнерские связи с научными группами и лабораториями по всему миру. Эти связи служат основой для совместных разработок новых приборов, методологических подходов и практических решений.

Shimadzu производит практически весь спектр аналитического оборудования. Это жидкостные хроматографы и хромато-масс-спектрометры (ВЭЖХ-МС), газовые хроматографы и хромато-масс-спектрометры (ГХ-МС), спектрофотометры разных типов, в том числе ИК-Фурье и атомно-абсорбционные спектрометры (ААС), рентгенофлуоресцентные спектрометры и дифрактометры, масс-спектрометры MALDI, масс-микроскопы, секвенаторы белков, анализаторы общего органического углерода и азота. Каждая модель оборудования компании Shimadzu имеет свою "изюминку", уникальные возможности, которые выгодно отличают ее от продукции других конкурирующих компаний.

Компания придерживается политики полной доступности и открытости всех технических данных и параметров оборудования. Все интере-

сующие характеристики нужных моделей можно найти в буклетах или на сайте компании. Данная статья посвящена не столько описанию самих приборов, сколько аспектам их применения в фармакологии, для клинических анализов и биомедицинских исследований, а также готовым практическим решениям от Shimadzu для этих областей.

ЖИДКОСТНЫЕ ХРОМАТОГРАФЫ И ГОТОВЫЕ РЕШЕНИЯ НА ИХ ОСНОВЕ

Системы жидкостной хроматографии составляют одну из наиболее обширных линеек аналитической продукции Shimadzu. Здесь представлены практически все типы существующего на сегодняшний день оборудования. Простейшие аппараты – системы для изократического элюирования с ручным вводом пробы. По цене они сравнимы с приборами российских производителей. Наиболее сложные системы предназначены для препаративной и многомерной хроматографии. Здесь есть даже препаративные хроматографы, управляемые масс-спектрометрами.

Особое место среди продукции Shimadzu занимают готовые решения "из коробки". Это системы, адаптированные для конкретных практических задач, снабженные предустановленными методиками и комплектуемые нужными компонентами и расходными материалами – хроматографиче-

приборы для фармацевтического рынка, соответствуют нормам российской фармакопеи.

Российский рынок во многом отличается от европейского или японского. Из-за недостатка финансирования многие лаборатории могут позволить себе купить прибор лишь раз в 10 лет, а то и реже. Нередко возникают сложности с техническим обслуживанием и доставкой расходных материалов. На это накладывается и нынешняя нестабильная экономическая ситуация в стране. Мы знаем все особенности российского рынка и учитываем их в своей работе. Большое внимание уделяется технической и методической поддержке. В отличие от многих других компаний, мы обеспечиваем поставки и качественный сервис оборудования в восточных регионах России.

Несмотря на нынешнюю нестабильность экономической ситуации в России и колебания курса рубля, компания Shimadzu не планирует сдавать

свои позиции на российском рынке. Делая шаг навстречу клиентам, мы уже объявили о снижении валютных цен для России в первом квартале 2015 года. Разумеется, оборудование не может продаваться дешевле его себестоимости, но компания готова пожертвовать частью собственной прибыли. Надеемся, что рублевые цены при этом останутся на уровне, доступном для российских лабораторий. Такая политика, возможно, будет продлена и на больший срок. Мы также серьезно рассматриваем возможность строительства завода Shimadzu на российской территории, что особенно актуально в свете наблюдаемой тенденции к импортозамещению.

Конечно же, мы надеемся, что экономическая и финансовая ситуация в России в скором времени стабилизируется, и это придаст новый стимул научным исследованиям и внедрению передовых технологий в вашей стране".

скими колонками, внутренними стандартами, подвижными фазами и т.д. Такие законченные решения позволяют сразу же начать работу даже тем пользователям, которые слабо знакомы с теорией и методами хроматографии.

Все хроматографы Shimadzu зарекомендовали себя как исключительно надежные приборы, способные непрерывно работать более десяти лет без единого выхода из строя. Нужно только вовремя проводить профилактическое обслуживание. Если есть намерение заменить старый прибор более новым, нет смысла ждать, пока старый сломается – этого может не произойти никогда.

Самая популярная линейка жидкостных хроматографов Shimadzu – LC-20 Prominence. Выбор составляющих модулей здесь чрезвычайно широк: четыре типа насосов, семь моделей автоматических дозаторов, в том числе с системами охлаждения и автоматической пробоподготовки, несколько моделей колоночных термостатов и практически полный спектр детекторов – диодно-матричные, спектрофотометрические, спектрофлуориметрические, кондуктометрические и рефрактометрические. В данной серии может быть реализована технология "быстрой хроматографии" UFLC, рассчитанная на использование колонок с диаметром гранул сорбента 2,2 мкм и менее. С применением LC-20 Prominence достигается пятикратный выигрыш во времени анализа по сравнению с традиционной ВЭЖХ.

LC-20 Nexera XR – модификация линейки Prominence, компоненты которой рассчитаны на работу при давлении подвижной фазы до 66 МПа (660 бар).



Рис.1. Система сверхбыстрой высокоэффективной жидкостной хроматографии LC-30 Nexera X2

Модули системы самой совершенной серии – LC-30 Nexera X2 – способны работать при давлении подвижной фазы уже до 130 МПа (1300 бар). Общий вид системы показан на рис.1. Термостат колонок поддерживает температуру подвижной фазы до 150°C, что делает возможным проведение так называемой "зеленой хроматографии", когда подвижная фаза не содержит органических компонентов. Система работает с любыми типами колонок, включая колонки с субмикронными размерами частиц сорбента и микроколонки. Специально для нее была разработана специальная серия колонок Shim-pack XR-ODS III с размером частиц 1,6 мкм. Подключив их к данной системе, можно разделять десятки, а иногда и сотни пиков всего за одну минуту.

На базе компонентов систем серий LC-20 и LC-30 компания Shimadzu разработала готовые решения для многих практических задач. Отметим наиболее важные из них. TOX.I.S. II – система для быстрой диагностики острых интоксикаций. В биологических жидкостях можно выявлять широкий спектр лекарственных препаратов, наркотиков, психотропных средств, алкалоидов, растительных ядов, пестицидов и экотоксикантов. Прилагаемая библиотека содержит 2860 УФ-спектров соединений. Система комплектуется колонками, внутренними стандартами и подвижной фазой.

CoSense – система анализа нативных биологических жидкостей на присутствие различных низкомолекулярных соединений, в частности, лекарственных средств и их метаболитов. Она способна осуществлять автоматическую пробоподготовку биологических жидкостей для последующих анализов на ЯМР- и масс-спектрометрах. Из образца удаляются белки, пептиды и другие высокомолекулярные примеси, а целевые низкомолекулярные компоненты концентрируются с помощью специальной колонки-ловушки Shim-pack MAYI-ODS. В качестве детектора может использоваться масс-спектрометр (LCMS-2020 или тандемные масс-спектрометры серии UFMS). Система CoSense нашла широкое применение в фармакокинетических исследованиях.

Perfinity iDP, новинка прошлого года, осуществляет автоматическую пробоподготовку белков для протеомных анализов методом масс-спектрометрии. Система содержит три последовательно соединенные колонки – для трипсинового гидролиза, обессоливания и разделения полученных триптических пептидов. В качестве детек-

тора может быть установлен масс-спектрометр LCMS-2020. Преимущества такой пробоподготовки очевидны: ее полный цикл занимает всего 30 мин, а при обычной ручной подготовке одна только стадия трипсинового гидролиза требует 18 ч. Трипсиновое расщепление протекает столь быстро и полно благодаря особой, сильно разветвленной структуре сорбента гидролизующей колонки, обеспечивающей весьма тесный контакт белка с иммобилизованным трипсином.

UF Amino Station – сверхбыстрый аминокислотный анализатор, созданный на основе хроматографической системы серии LC-30 и масс-спектрометра LCMS-2020. С его помощью пептид из 38 аминокислот может быть качественно и количественно проанализирован за 9 мин. Традиционный метод ионообменной хроматографии с постколоночной дериватизацией требует около 3 ч для анализа того же пептида. Анализатор может быть использован в медицине, пищевой промышленности, экологическом контроле и других отраслях.

Nexera Scouting System, еще одна новинка прошлого года, будет интересна каждому, кто разрабатывает новые методы хроматографии или оптимизирует условия разделения известных или новых соединений. Система подбирает оптимальные условия разделения путем перебора всевозможных комбинаций режимов элюирования, компонентов подвижной фазы, типов колонок. Можно устанавливать до шести различных колонок и произвольно комбинировать до восьми компонентов подвижной фазы. Общее число комбинаций может достигать 960. В программное обеспечение входит программа Nexera Method Scouting, способная быстро создать файлы всех этих 960 комбинаций в автоматическом режиме, без утомительного ручного ввода параметров в каждый файл.

Система препаративной хроматографии Stude2Pure способна выделить, сконцентрировать, очистить и провести высушивание целевого компонента из любого сырья. После основной препаративной колонки нужное соединение поступает на концентрирующую "колонку-ловушку", отмывается от мешающих компонентов, затем смывается в улавливающий патрон и высушивается. Чистота конечных продуктов находится в районе 99,9%, их можно использовать для фармакокинетических исследований и приготовления готовых лекарственных форм. Стоимость такой системы далеко не бюджетная,

однако крупные фармацевтические компании и исследовательские лаборатории стремятся ее приобрести, чтобы существенно повысить эффективность работы.

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРЫ – ВНЕДРЕНИЕ СВЕРХБЫСТРЫХ ТЕХНОЛОГИЙ UF (ULTRA FAST) ОТ SHIMADZU

Масс-спектрометрическое детектирование уже давно стало неотъемлемой частью хроматографических анализов, а в ряде случаев оно совершенно незаменимо. Так, при анализе чистоты лекарственных препаратов примеси могут не иметь функциональных групп, поглощающих в ультрафиолетовой и видимой областях спектра, – они не будут обнаружены спектрофотометрическим детектором. Бывают случаи, когда при изменении условий хроматографии (например, состава подвижной фазы) меняется порядок выхода пиков, а вид самой хроматограммы остается неизменным – времена удерживания и интенсивности пиков вроде бы такие же, как раньше. При наличии только лишь классических детекторов это осталось бы незамеченным.

Главное направление, в котором Shimadzu совершенствует свои приборы – повышение производительности и чувствительности. Для масс-спектрометров были разработаны сразу несколько "сверхбыстрых" технологий UF (Ultra Fast): технология сверхбыстрого сканирования диапазона масс (UFScanning), сверхбыстрого переключения полярности ионизации (UFSwitching), сверхбыстрой соударительной диссоциации (UF MRM), а также технология сохранения чувствительности прибора при повышении его быстродействия (UFSensitivity). После практической реализации этих технологий за Shimadzu стали "подтягиваться" и другие производители, но пока они не достигли таких же высоких характеристик.

"Топовая" модель LCMS-8050 – абсолютный рекордсмен по быстродействию. Этот тандемный квадрупольный масс-спектрометр обеспечивает скорость сканирования 30 кДа/сек и время переключения полярности ионизации 5 мсек. Может показаться, что регистрируются ионы сразу обеих полярностей. Производительность хромато-масс-спектрометрической системы с анализатором LCMS-8050 впечатляюще высокая – 3,5 тысячи анализов в сутки. Более бюджетные модели этой же линейки – LCMS-8030 и LCMS-8040 – уступают прибору LCMS-8050 только по уровню чувстви-



Рис.2. Тандемный квадрупольный масс-спектрометр LCMS-8040



Рис.3. Гибридный масс-спектрометр высокого разрешения LC IT-TOF

тельности. "Средняя" модель LCMS-8040 наиболее популярна, именно на ее базе реализовано около 90% всех практических решений в области токсикологии и клинической диагностики. Внешний вид такого прибора показан на рис.2.

Наиболее продвинутый из представленных сегодня приборов – гибридный масс-спектрометр высокого разрешения LC IT-TOF (рис.3). Он сочетает в себе квадрупольную ионную ловушку для многостадийной последовательной фрагментации ионов и времяпролетный анализатор с высочайшей точностью определения массы, пригодной для определения брутто-формулы неизвестных соединений, анализа их структуры, а также анализа метаболитов лекарственных препаратов.

Запас быстродействия масс-спектрометров Shimadzu достаточен для проведения комбинированных измерений, когда в ходе одного анализа сочетаются разные режимы работы масс-спектрометра. Тандемная масс-спектрометрия MRM (multiple reaction monitoring) может вестись одновременно со сканированием дочерних ионов,

ионов-предшественников или полного диапазона масс. Технология UFScanning обеспечивает получение точных результатов в каждом из режимов. Кроме того, в ходе анализа могут варьироваться энергии фрагментации родительских ионов, что сильно расширяет диапазон получаемой информации о структурах соединений.

ГОТОВЫЕ РЕШЕНИЯ НА ОСНОВЕ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРОВ

Решения, разработанные компанией Shimadzu, изменили устоявшееся представление о жидкостной хромато-масс-спектрометрии как о сугубо исследовательской технике, далекой от практики. Компания снабдила свое оборудование наборами готовых методик "Method Packages" для решения конкретных аналитических задач. Они уже содержат предустановленные условия хроматографического разделения, режимы работы хромато-масс-спектрометра, описание пробоподготовки, калибровочные кривые и библиотеки масс-спектров целевых соединений. Такие "готовые наборы" предлагаются для клинических анализов, метаболомики, липидомики, ветеринарии, токсикологического скрининга, наркологии, судебной медицины, контроля качества воды, сельского хозяйства, диагностики наследственных заболеваний у новорожденных. Многие решения были разработаны европейским подразделением компании Shimadzu Europa GmbH в сотрудничестве с организациями и научными группами Европы.

Системы лекарственного мониторинга наркотических соединений и их производных для клинической практики и судебной медицины были разработаны совместно с организацией IATDMCT (International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology). Предел обнаружения Δ^9 -тетрагидроканнабинола и двух его метаболитов в цельной крови, плазме и моче удалось снизить до 100 мкг/л. Могут также определяться опиаты, наркотики кокаиновой группы и их метаболиты, амфетамины и родственные им соединения. Калибровочные графики всех определяемых соединений уже предустановлены – пользователю не нужно тратить время на их построение.

Совместно с компанией Recipe, производителем готовых тест-наборов для клинической диагностики, были разработаны законченные решения на основе масс-спектрометров LCMS-8030 и LCMS-8040 для определения в плазме и сыворотке

крови иммунодепрессантов, бензодиазепинов, гидроксильных производных витаминов D2/D3, метилмалоновой кислоты. Совместно с научной группой профессора G. La Marca из Флоренции были разработаны решения для высокоточного определения ряда стероидов, гомоцистеина, фумарилацетоксусной кислоты и некоторых других соединений в биологических жидкостях.

Для практической токсикологии предлагается новое решение Rapid Tox Screening Package – быстрый полуколичественный скрининг широкого спектра наркотических и лекарственных средств, включая психотропные и гипнотические препараты. Весь процесс, начиная от взятия образца, занимает несколько десятков минут. Максимально упрощена пробоподготовка – используется оригинальная технология QuEChERS, не включающая длительных стадий и сложных манипуляций.

Сотрудничество Shimadzu с немецкой компанией ChromSystems привело к созданию законченных решений на базе хромато-масс-спектрометров для определения в крови протеаз, психотропных средств, иммунодепрессантов, а также маркеров наследственных заболеваний у новорожденных. Для диагностики наследственных нарушений, кроме аппаратного обеспечения, предлагаются разработанные Shimadzu программы, прежде всего Neonatal Solution, позволяющие использовать тест-наборы многих сторонних производителей на оборудовании Shimadzu.

Система для экспрессного скрининга онкологических заболеваний PESI, использующая электроспрей-ионизацию с помощью зонда, – совсем свежая разработка компании. Распыляющая игла совершает возвратно-поступательные движения наподобие иглы швейной машины, захватывая мельчайшие частицы ткани пациента, которые ионизируются и распыляются этой же иглой. Образовавшиеся ионы поступают в анализатор масс. Такая передвижная масс-спектрометрическая установка может быть привезена, например, в операционную клинику, где с ее помощью можно будет оперативно исследовать образцы тканей во время проведения операций. В дополнение к этому решению Shimadzu предлагает специализированные библиотеки масс-спектров для диагностики разных типов онкологических нарушений.

Компания Shimadzu не обошла вниманием и газовую хромато-масс-спектрометрию. Был

представлен новый tandemный газовый хромато-масс-спектрометр GCMS-TQ8040 с интеллектуальным управлением. В нем реализована автоматическая оптимизация режимов tandemной масс-спектрометрии, а также интеллектуальные базы данных, включающие оптимизированные режимы для определения сотен соединений. Методы не нужно создавать вручную, требуется лишь выбрать целевые компоненты – и прибор готов к работе. Если каких-то компонентов нет в базе данных, можно провести их контрольный анализ, и программа автоматически подберет оптимальный режим работы прибора для их определения. Подобные интеллектуальные системы создания методов измерения сейчас разрабатываются и для жидкостных хромато-масс-спектрометров, и в скором времени ими будут оснащены все масс-спектрометры Shimadzu.

В качестве полезного аксессуара Shimadzu предлагает картриджи для отделения плазмы крови "Plasma separation cards". Пробоподготовка образцов плазмы, используемой во многих клинических анализах, теперь проводится очень просто. После нанесения капли крови на картридж, плазма отделяется от эритроцитов за три минуты, и в специальном контейнере оказывается 2,5 мкл чистой плазмы, пригодной к транспортировке, хранению и анализу. Чистая плазма показывает заметно более воспроизводимые результаты анализов, чем цельная кровь.

РЕШЕНИЯ SHIMADZU НА ОСНОВЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ MALDI

Масс-спектрометрия с MALDI-ионизацией открывает уникальные возможности для медицины, фармакологии и смежных областей. Метод используется в протеомике для секвенирования белков и изучения посттрансляционных модификаций, в метаболомике – для изучения вторичных метаболитов организма, в медицине и фармакологии – для идентификации активных ингредиентов лекарственных средств и оценки биоэквивалентности, в фармакокинетике – при исследовании процессов накопления и метаболизации лекарств в тканях организма, при изучении кинетики воздействия лекарства на пораженную ткань. Этот список далеко не исчерпывающий.

Одним из разработчиков метода MALDI был сотрудник корпорации Shimadzu, профессор Киочи Танака. За эту разработку он стал одним из наиболее молодых лауреатов Нобелевской пре-

мии, удостоившись ее в возрасте 43 лет. Поскольку компания Shimadzu стояла у истоков создания метода, она имеет самый большой опыт производства приборов с его использованием.

С начала 2000-х годов все MALDI масс-спектрометры Shimadzu производятся в Манчестере на заводах компании Kratos Analytical, входящей в состав Shimadzu Corporation. Оптимальной была признана напольная вертикальная конструкция масс-спектрометров, линейка таких приборов получила название AXIMA (рис.4). Данная конструкция обеспечивает практически ортогональную геометрию лазерного импульса, при этом образуется очень узкий шлейф ионизированного материала, практически весь объем которого поступает в масс-анализатор. Поэтому чувствительность приборов с такой компоновкой непревзойденно высокая. Кроме того, отвесное падение луча дает возможность локализовать нужный фрагмент гетерогенного образца. Азотный лазер приборов AXIMA имеет нормативный срок службы 60 миллионов вспышек (реально – гораздо больше), и весь этот срок покрывается гарантией Shimadzu.

Серия масс-спектрометров AXIMA включает четыре модели, каждая последующая из них базируется на предыдущей. Простейший прибор AXIMA Assurance, имеющий линейный времяпролетный анализатор масс, предназначен для рутинных анализов относительно простых образцов. Прибор может быть удачно использован в биотехнологическом производстве для контроля качества, в молекулярно-генетических исследованиях при различении образцов ДНК с близкими массами, с разницей всего в несколько дальтон. Следующая модель линейки – AXIMA Confidence – использует времяпролетный масс-анализатор с рефлектроном искривленного поля, благодаря чему относится уже к масс-спектрометрам высокого разрешения. С его помощью можно точно идентифицировать белки и пептиды, анализировать их трипсиновые гидролизаты. Он используется для идентификации микроорганизмов, молекулярного профилирования биологических объектов. Модель AXIMA Performance, также имеющая масс-анализатор с рефлектроном, содержит ячейку для соударительной диссоциации, позволяющую проводить тандемную масс-спектрометрию в режиме TOF/TOF. Он может использоваться для секвенирования белков и пептидов, изучения посттрансляционных модификаций, анализа вторичных

метаболитов человека и различных организмов. Самая продвинутая модель этой линейки – AXIMA Resonance – гибридный масс-спектрометр. В дополнение к времяпролетному анализатору масс с рефлектроном он содержит квадрупольную ионную ловушку, дающую возможность многостадийной последовательной фрагментации ионов. Прибор предназначен для продвинутых, углубленных исследований структуры молекул, особенно высокомолекулярных природных полимеров, таких как разветвленные полисахариды, лигнин, смолы, битумы.

AXIMA iD^{Plus} – программно-аппаратный комплекс, включающий в себя масс-спектрометр AXIMA и экспертную систему идентификации iD^{Plus}, разработанную на основе ранее существовавшей системы экспресс-идентификации микроорганизмов SARAMIS (Spectral ARchive And Microbial Identification System). Система iD^{Plus} позволяет, помимо идентификации микроорганизмов, осуществлять молекулярное профилирование любых сложных биологических объектов, изучать вторичные метаболиты микроорганизмов, в частности, маркеры их устойчивости к антибиотикам, контролировать качество пищевой продукции и выявлять ее фальсификаты в экспрессном режиме.

Принцип работы системы iD^{Plus} такой же, как и у SARAMIS. Каждый микроорганизм имеет свой характеристический "отпечаток пальцев" – набор специфических масс-спектров белков. Для каждого вида выбираются наиболее характеристические и устойчивые белки (как правило, рибосомальные), и масс-спектры смеси этих белков будут характеризовать данный вид. Путем наложения, усреднения и статистической обработки подобных спектров, полученных от множества штаммов и изолятов данного вида, получают искусственные, условные спектры – так называемые "суперспектры", которые заносятся в библиотеку iD^{Plus} и в дальнейшем могут использоваться при идентификации видов. Подобным образом создаются суперспектры высших уровней, для родов и семейств микроорганизмов.

Идентификация происходит сверху вниз. Сначала масс-спектр анализируемого образца сравнивается с суперспектром семейства, затем рода и вида. Если видовой суперспектр отсутствует в библиотеке, то все равно можно определить род или хотя бы семейство. Если сравнение с суперспектрами вообще не дает результатов, система проводит сравнение с индивидуаль-



Рис.4. Масс-спектрометр MALDI серии AXIMA

тикам. По сходным принципам система iD^{Plus} используется для молекулярного профилирования и анализа продуктов питания и выявления фальсификатов. Необходимые для этого библиотеки суперспектров и индивидуальных спектров отдельных образцов созданы и доступны.

Молекулярная визуализация, или масс-визуализация – технология на основе масс-спектрометрии MALDI, позволяющая наблюдать пространственное распределение молекул в биологических образцах, например в гистологических срезах тканей. Результатом является "масс-спектрометрическое изображение" – картина распределения тех или иных компонентов по поверхности образца. Для обнаружения интересных молекул больше не нужны изотопные, флуоресцентные метки или антитела. Такая технология могла бы иметь широчайшее применение в клинических и фармацевтических исследованиях, если бы не цена приборов, далеко не всегда доступная российским пользователям.

Несколько месяцев назад компания представила уникальный по своим возможностям масс-микроскоп iMScore TRIO, позволяющий одновременно проводить оптическую (микроскоп), молекулярную (масс-спектрометр) и флуоресцентную визуализацию, а также структурный анализ наблюдаемых молекул (тандемная масс-спектрометрия). Возможности данного прибора и его практические применения подробно описаны в посвященной ему статье [1] в предыдущем номере журнала.

Наконец, самый совершенный из масс-спектрометров Shimadzu, новинка 2013 года – MALDI-TOF/TOF спектрометр MALDI 7090. Как и предыдущий прибор, он также может применяться для молекулярной визуализации. Типичное изображение гистологического среза, выполненное данным прибором с использованием запатентованной технологии высокого разрешения ViewHD, представлено на рис.5.

В масс-спектрометре внедрены сразу два комплекса оригинальных технологий Shimadzu – Multiplex и Hyper-MS². Первый обеспечивает высокую производительность, второй – эффективность масс-спектрометрического анализа. Комплекс Multiplex включает в себя прежде всего сверхбыстрый твердотельный УФ-лазер 355 нм, запатентованный Shimadzu. Как и в серии AXIMA, применена ортогональная геометрия луча. Диаметр лазерного пучка может изменяться

ными спектрами отдельных штаммов, которые также содержатся в библиотеке iD^{Plus}. Идентификацию микроорганизмов можно проводить даже в загрязненных, контаминированных культурах – программа умеет отличать характеристические пики различных микроорганизмов от прочих пиков. Можно анализировать даже смешанные культуры, состоящие из двух микроорганизмов. Дополнительные возможности идентификации включают анализ вторичных метаболитов микроорганизмов, в том числе маркеры их устойчивости к различным антибио-

в пределах от 10 до более 100 мкм. Для молекулярной визуализации необходимо ионизировать участки образца минимальной площади, а для гомогенных образцов, напротив, нужны усредненные данные по большой площади. Особая конструкция ионной оптики обеспечивает сфокусированный поток ионов. Используется система автоматической очистки источника ионизации TrueClean™: очистка проводится тем же лазером, что и сама ионизация. Прибор совместим со всеми типами матриц, стандартов и планшетов, имеется встроенный 10-планшетный загрузчик, в котором образцы могут храниться в инертной атмосфере азота.

Комплекс Hyper-MS² включает прежде всего систему управления потоком ионов ASDF (Axial Spatial Distribution Focusing), запатентованную разработку Shimadzu. Она обеспечивает дополнительную фокусировку ионов после ионизации вплоть до того, как будет получено дополнительное ускоряющее напряжение. Это позволяет избежать флуктуаций начальной скорости ионов из-за неравномерной геометрии образца, вариации энергии лазера и т.п. Благодаря такой системе данная модель не имеет аналогов в мире по разрешению по массам именно в режиме тандемной масс-спектрометрии. Разрешение составляет 10 тысяч, и оно практически не зависит от энергии лазерного луча. Точность определения массы в режиме тандемной масс-спектрометрии – точнее 50 ppm. Ионная оптика высокого разрешения обеспечивает исключительную селективность при захвате родительских ионов для последующей фрагментации. Прибор обеспечивает высокую энергию соударительной диссоциации – например, при секвенировании пептидов можно фрагментировать не только линейную цепь, но и боковые радикалы, что бывает важно при различении изобарических аминокислот, прежде всего, лейцина и изолейцина.

СПЕКТРОФОТОМЕТРЫ И ИК-ФУРЬЕ СПЕКТРОМЕТРЫ

Спектрофотометр – это неотъемлемая часть любой лаборатории. В линейке Shimadzu спектрофотометры представлены в широком выборе. Некоторые из них имеют непревзойденные характеристики, пока что не достигнутые другими производителями.

Простейший прибор – UV 1240 mini, компактный и дешевый спектрофотометр для рутинных анализов. Прибор характеризуется высокой

производительностью и, по большому счету, не имеет конкурентов с точки зрения соотношения "цена – возможности". Это идеальная замена старым отечественным спектрофотометрам серий КФК-2 или КФК-3. Еще одна "хорошая рабочая лошадка", но уже классом выше – двухлучевой сканирующий спектрометр UV-1800, идеально подходящий для рутинных повседневных задач.

Исследовательские задачи требуют более сложной техники. Самый простой из приборов исследовательского класса – UV-2600, а также его модификация UV2700. Уникальная характеристика последней модификации – широчайший фотометрический диапазон: от -8 до +8 единиц опти-



Рис.5. Молекулярная визуализация гистологического среза с помощью MALDI-TOF/TOF масс-спектрометра MALDI 7090

ческой плотности, что позволяет измерять поглощение даже абсолютно черных и непрозрачных на вид растворов. Такой диапазон не поддерживает ни один из приборов других компаний. Более простая модификация UV-2600 отличается высоким спектральным разрешением и возможностью расширения спектрального диапазона в ближнюю ИК-область (до 1400 нм).

Исследовательский спектрофотометр UV-3600 Plus, новинка 2014 года – пока что единственный в мире прибор, использующий сразу три детектора: фотоэлектронный умножитель (ФЭУ), свинцово-сульфидный и индий-галлий-арсенидный. Благодаря такой комбинации, можно проводить измерения при длинах волн от 185 до 3300 нм со спектральным разрешением до 0,1 нм. Расши-



Рис.6. Инфракрасный микроскоп AIM-8800

Он обеспечивает разрешение до $0,25 \text{ см}^{-1}$ при соотношении сигнала к шуму на уровне 60000 : 1. Такие характеристики пока что не достигнуты другими производителями. Важная черта этого прибора – наличие системы автоматической осушки отсека интерферометра, что решает проблему "старения" оптики вследствие присутствия паров воды. К обеим моделям спектрометров можно подключать приставки нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО), что даст возможность исследовать полимерные пленки, анализировать жидкие, твердые образцы и суспензии практически без пробоподготовки. Можно регистрировать спектры примесей на поверхности лекарственных таблеток таким образом, что они абсолютно не будут перекрываться со спектрами основных компонентов таблетки.

Еще одной уникальной особенностью инфракрасных спектрометров с Фурье-преобразованием Shimadzu является предустановленная в программном обеспечении библиотека на 12 тысяч спектров для идентификации соединений. Кроме стандартных спектров полимеров, спиртов, растворителей и т.п., библиотека содержит часть, включающую спектры лекарственных и фармацевтических препаратов, пищевых добавок и родственных им соединений, основных классов примесей пищевых продуктов и лекарств, а также пластиков и упаковочных материалов. Программное обеспечение позволяет проводить быстрый и информативный поиск по всей библиотеке.

Инфракрасный микроскоп AIM-8800, представленный на рис.6, незаменим для анализа неоднородностей, включений, инородных частиц на поверхности твердых тел и суспензий, если размер этих неоднородностей очень мал – всего лишь несколько микрометров. К прибору можно присоединять различные приставки и оборудование для решения широкого круга задач, в частности, НПВО объективы, ПО для картирования поверхности и т.д. Отметим один из примеров успешного использования данного микроскопа в ветеринарной клинике. Анализ мельчайших жировых капель в молоке показал, что если молочные коровы получают определенный препарат, он концентрируется именно в жировой фракции молока. То есть, если в целом молоко таких коров содержит этот препарат в очень малых, допустимых концентрациях, оно оказывается непригодным для производства сливок и масла.

рять диапазон в более дальнюю ультрафиолетовую область не имело смысла – там уже начинают поглощать компоненты воздуха. С помощью этого прибора можно решать любые спектрофотометрические задачи, проводить как рутинные анализы, так и сложные научные исследования. В условиях клинической лаборатории можно в автоматическом режиме измерять многие медицинские и биохимические показатели, прежде всего, содержание гемоглобина и креатинина.

Инфракрасные спектрометры с Фурье-преобразованием – еще одна линейка приборов Shimadzu. Метод ИК-спектроскопии незаменим в задачах идентификации веществ. В фармацевтике это прежде всего анализ лекарственных препаратов на предмет подлинности, а также обнаружение примесей, которые могут образовываться при хранении и транспортировке препаратов. Компания представила два прибора, IRAffinity-1S и IRTracer-100. Более подробно о них можно прочитать в статье [2]. Спектрометр IRTracer-100 был представлен около года назад и пришел на смену прежней серии IRPrestige-21.

СПЕКТРОМЕТРЫ ДЛЯ ЭЛЕМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Важность элементного анализа в клинике определяется, в первую очередь, необходимостью тщательного контроля за содержанием тяжелых металлов, например, в ходе диагностических процедур. Компания Shimadzu представила атомно-абсорбционный спектрофотометр AA-7000 (рис.7), в котором реализована ее инновационная разработка – быстрое автоматическое переключение между пламенной и электротермической атомизацией. Прибор использует две системы коррекции фона: по саморасщеплению спектральной линии и с помощью дейтериевой лампы. В отличие от приборов с Зеемановской коррекцией, он не создает вокруг себя нежелательных магнитных полей. В конструкции AA-7000 реализована еще одна новаторская разработка Shimadzu – система микродозирования в пламя. Образец впрыскивается дозами от 50 до 90 мкл, а не по непрерывной схеме. Это исключает засорения щелей горелок даже при работе с сильно засоленными объектами или сложными биологическими матрицами.

Для многоэлементного анализа, когда необходимо за один анализ определить десятки элементов, выпущена новая серия эмиссионных спектрометров ICPE-9800. Типичный образец такого прибора показан на рис.8. Атомизация происходит в индуктивно-связанной плазме. Приборы имеют передовой ПЗС-детектор (прибор с зарядовой связью) с матрицей в один миллион пикселей, способный регистрировать одновременно все длины волн всех элементов. Теперь если после анализа образца на содержание определенных элементов возникнет необходимость посмотреть содержание других, результаты по ним будут также доступны, и не придется заново проводить анализ. Также не придется повторять эксперименты из-за спектральных интерференций, мешающих определить нужный элемент. Пределы обнаружения почти по всей периодической системе составляют 0,005 – 10 ppb. Спектрометры обеспечивают возможность двойного, аксиального и радиального наблюдения плазмы, что дает возможность определять высокие и низкие содержания элементов без перенастройки прибора. Наконец, значительно снижен расход аргона: в рабочем режиме он в 2–3 раза меньше, чем в приборах других производителей, а после включения выход на рабочий режим происходит всего за 10 мин. Такой прибор можно включать и выключать



Рис.7. Атомно-абсорбционный спектрофотометр AA-7000

для анализа каждого отдельного образца, не нужно накапливать образцы днями и неделями.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Биотехнологические лаборатории проводят исследования, результаты которых широко применяются в клинике и фармацевтике. Для них компания Shimadzu предлагает прежде всего современное оборудование для исследования биополимеров – белков и нуклеиновых кислот.

Автоматические секвенаторы белков и пептидов серии PPSQ используют деградацию по Эдману – методику, проверенную временем на



Рис.8. Эмиссионный спектрометр для многоэлементного анализа ICPE-9800



Рис.9. Спектрофотометр Bio-Spec Nano для определения белков и нуклеиновых кислот в капле жидкости

надежность. При поэтапном расщеплении полипептидной цепи образуются фенилтиогидантоиновые производные аминокислот, которые анализируются методом ВЭЖХ с изократической элюцией, а затем определяются высокочувствительными детекторами. Изократическая элюция показывает ряд преимуществ: стабильность базовой линии, минимальный разброс времен удерживания, экономный расход подвижной фазы. Программное обеспечение секвенаторов способно одновременно контролировать процессы деградации и хроматографического разделения и интерпретировать получаемые результаты в режиме реального времени.

Для работы с нуклеиновыми кислотами компания представила два решения: миниатюрный спектрофотометр Bio-Spec Nano и систему электрофореза на микрочипе MultiNA. Уникальная особенность спектрофотометра Bio-Spec Nano (рис.9) состоит в том, что определение количественного содержания нуклеиновых кислот производится непосредственно в капле образца. Капля, нанесенная на специальную мишень, растягивается

и фактически служит кюветой для измерений. Оптические кюветы использовать не нужно – это исключает риск загрязнения последующих образцов предыдущими. Прибор для электрофореза на микрочипе MultiNA может использоваться для разделения любых смесей нуклеиновых кислот – продуктов полимеразной цепной реакции, рестрикции, реакционных смесей после синтеза ДНК- и РНК-олионуклеотидов. Микрочип размером с предметное стекло микроскопа представляет собой пластину с выточенными микроканалами, где и происходит разделение. За счет малого внутреннего диаметра каналов достигается высокая эффективность и селективность процесса. В комплекте с прибором поставляются наборы реагентов для исследования различных классов образцов ДНК и РНК. Система электрофореза на чипе служит эффективной заменой традиционному гель-электрофорезу. Чувствительность определения, по данным Shimadzu, более чем в 10 раз превосходит результаты электрофореза с бромистым этидием, а стоимость одного анализа примерно такая же. Яркий пример успешного использования такой системы – проверка мясных продуктов на подлинность, то есть определение, от какого животного взят данный образец мяса.

Рассмотрев такое разнообразие оборудования и готовых решений от компании Shimadzu, можно с большой долей уверенности сказать, что компания способна оказать содействие в решении практически любой задачи современной фармацевтики или клиники. Благодаря стабильным инвестициям Shimadzu в научные разработки многие приборы по своим техническим характеристикам значительно превосходят аналогичные решения других производителей. Новейшие технологии последних лет, такие как визуализация молекул с помощью масс-спектрометрической микроскопии, несомненно, гарантируют большое будущее современной медицине, и Shimadzu здесь вновь опережает своих конкурентов. Очередной раз компания оправдывает свой собственный лозунг – "Мы делаем невидимое видимым и неизмеряемое измеряемым".

ЛИТЕРАТУРА

1. **Фармаковский Д.** Молекулярная визуализация с помощью масс-микроскопа iMScope TRIO. – Аналитика, 2014, № 6, с. 82–87.
2. **Цупрева В.** ИК-Фурье-спектрометры Shimadzu: области применения. – Аналитика, 2014, № 3, с. 94–96.