

ПОДХОД К ОПТИМИЗАЦИИ ПАРАМЕТРОВ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ПРИ ИДЕНТИФИКАЦИИ СВЕРХМАЛЫХ КОЛИЧЕСТВ ВЫСОКОТОКСИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ

© 2025 г. М. Ш. Айгумов^{a,*}, С. А. Савчук^{b, c}

^aНоябрьский психоневрологический диспансер
просп. Мира, 37Б, Ноябрьск, 629806 Россия

^bАссоциация специалистов по химико-токсикологическому и судебно-химическому анализу
просп. Науки, 17, корп. 6, лит. А, пом. 95Н, Санкт-Петербург, 195220 Россия

^cИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН
Ленинский просп., 31, корп. 4, Москва, 119071 Россия

*E-mail: aygumov.m@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.07.2024 г.

После доработки 06.08.2024 г.

Принята к публикации 09.08.2024 г.

Описана процедура оптимизации следующих параметров: скорости сканирования, длительности регистрации селективных переходов (dwell time), длительности задержки при переходе от одного селективного перехода к другому (pause time). В работе использовали хроматограф для ВЭЖХ с трехквадрупольным масс-спектрометрическим детектором (LC-MS/MS Shimadzu 8050). Хроматографическое разделение осуществляли на колонке с обращенно-фазовым сорбентом Phenomenex Kinetex C18. В качестве подвижной фазы А использовали 0.1 %-ный раствор муравьиной кислоты в воде с добавлением 10 ммоль/л формиата аммония, в качестве подвижной фазы Б – 0.1 %-ный раствор муравьиной кислоты в метаноле с добавлением 10 ммоль/л формиата аммония. Установлены оптимальные параметры для подтверждающих методов: длительность регистрации селективных переходов – не менее 10 мс, длительность задержки при переходе от одного селективного перехода к другому – 1 мс, скорость сканирования – от 1000 до 5000 сканирований в секунду. Данная методика успешно применена при проведении рутинных химико-токсикологических исследований проб мочи с низким содержанием различных наркотических и лекарственных веществ.

Ключевые слова: ВЭЖХ-МС/МС, время цикла, длительность регистрации селективных переходов (dwell time), скорость сканирования, длительность задержки при переходе от одного селективного перехода к другому (pause time).

DOI: 10.31857/S0044450225020043 **EDN:** adwual

Большинство производителей аналитического оборудования при создании методов анализа используют схожие подходы, которые сводятся к совместному использованию динамического и триггерного MRM (multiple reaction monitoring).

При работе на оборудовании производства SCIEX (Канада) предлагается регистрация MRM-переходов для каждого конкретного соединения только в течение ожидаемого времени его элюирования, что уменьшает количество одновременно отслеживаемых MRM-переходов в любой момент времени и позволяет отслеживать большее число

соединений. Метод настраивается таким образом, что основные (первичные) MRM-переходы “запускают” регистрацию дополнительных (вторичных) MRM-переходов при достижении заданного заранее порога. Сбор полного масс-спектра происходит лишь при достижении нужного порога всеми первичными и вторичными MRM-переходами. При этом пороговые значения могут быть установлены индивидуально. При низких содержаниях веществ в пробе пороговые значения устанавливаются равными нулю, чтобы обеспечить получение полных масс-спектров независимо от их интенсивности.

Качество получаемых данных также зависит от установленных значений длительности регистрации селективных переходов и времени цикла. При уменьшении длительности регистрации селективных переходов страдает качество получаемых данных, при увеличении – растет время цикла, что также приводит к снижению качества данных. Максимально возможная длительность регистрации селективных переходов и оптимальное время цикла для каждого MRM-перехода обеспечивают сохранение необходимой точности при большом числе одновременно исследуемых соединений. При высокой концентрации соединений в пробе целесообразно устанавливать небольшие длительности регистрации селективных переходов, тогда как для соединений с низкой концентрацией длительность регистрации селективных переходов должна быть больше. Правильно настроенная длительность регистрации селективных переходов позволяет повысить отношения сигнал/шум для определяемых веществ и сохранить оптимальное время цикла [1–3].

При работе на оборудовании Agilent (США) предлагается использование триггерного MRM-анализа (tMRM). При работе в режиме триггерного MRM-метода для каждого целевого анализа в методе определяется до 10 переходов MRM (первичных и вторичных). Первичные MRM-переходы регистрируются для всех определяемых веществ, но когда сигнал одного из первичных MRM-переходов превышает заданный пользователем порог, запускается сканирование вторичных MRM-переходов. С помощью tMRM вторичные спектры MRM, полученные в ходе экспериментов tMRM, объединяются со спектрами первичных переходов MRM для конкретного определяемого вещества для получения полного масс-спектра. Этот масс-спектр затем используется для библиотечного поиска и идентификации интересующих соединений. Основное преимущество использования tMRM для получения этих продуктов на спектрах, а не обычных методов полного ионного сканирования, заключается в том, что получение всех 10 переходов MRM занимает менее 50 мс, в то время как типичное ионное сканирование продукта на ионной ловушке или тройном квадрупольном приборе занимает приблизительно 200 мс. Такое малое время цикла позволяет регистрировать большее число сканов на пик, а получаемые количественные данные становятся более чувствительными и надежными [4, 5].

При работе на оборудовании Shimadzu (Япония) предлагается использование триггерного MRM-анализа, когда сканирование полного масс-спектра начинается при превышении заранее заданной интенсивности целевого MRM-перехода. Метод позволяет одновременно сканировать три иона-продукта с разным значением энергии соударения для одного события

MRM с последующим получением объединенного масс-спектра [6]. В некоторых работах также предлагается режим MRM-Spectrum, который предполагает снятие большого числа MRM-переходов (более 10) и использование полученных данных для библиотечного поиска. Число используемых MRM-переходов для каждого соединения ограничено лишь химической структурой исследуемого вещества [7].

Производители аналитического оборудования в своих методических решениях ограничиваются лишь описанием общих подходов, без представления детальной информации по настройке тех или иных параметров, влияющих на качество получаемых данных. С целью определения оптимальных значений таких параметров, как длительность регистрации селективных переходов, длительность задержки при переходе от одного селективного перехода к другому, скорость сканирования, провели их оптимизацию с использованием пробы мочи, содержащей в своем составе α-пирролидиновалероферон.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. Использовали ацетонитрил (HPLC-gradient grade, ≥99.9%, Sigma-Aldrich, США), муравьиную кислоту ч. д. а. (ООО “Компонент-реактив”, Россия), для получения воды применяли систему Milli-Q (Millipore, Франция).

Аппаратура ВЭЖХ-МС/МС и условия хроматографирования и масс-спектрометрического детектирования. Использовали трехквадрупольный масс-спектрометрический детектор Shimadzu LCMS-8050 с жидкостным хроматографом Nexera X2 Shimadzu (Япония). Хроматографическое разделение осуществляли на колонке с обращенно-фазовым сорбентом Phenomenex Kinetex C18 (2.1 мм × 100 мм, 2.6 мкл) с предколонкой SecurityGuard ULTRA Cartridges UHPLC. Подвижная фаза А – 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты в воде, подвижная фаза Б – 0.1%-ный раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Программа градиентного элюирования для всех методов была одинаковой. Продолжительность анализа 15 мин, с 0 до 7.5 мин содержание фазы Б увеличивалось с 5 до 95% и сохранялось в течение 2.5 мин, с 10.01 мин в течение 5 мин колонку уравновешивали 95%-ной подвижной фазой А. Температура термостата колонки при анализе составляла 40 °С, скорость потока 0.3 мл/мин. Объем инъекции 5 мкл.

Применили ионизацию электрораспылением (ESI). Использовали рекомендуемые производителем параметры настройки масс-спектрометра: поток через распылитель (Nebulizing Gas Flow) – 3 л/мин, поток осушающего газа (Drying Gas Flow) – 10 л/мин, поток нагреваемого газа (Heating Gas Flow) – 10 л/мин, температура осушающего

газа (DL Temp) – 250 °C, температура интерфейса – 400 °C, параметры масс-спектрометрического детектирования приведены в табл. 1.

Таблица 1. Параметры масс-спектрометрического детектирования α -пирролидиновалерофенона в режиме MRM при регистрации положительно заряженных ионов

Ион-предшественник, $(M+H)^+, m/z$	Ион-продукт, m/z	Энергия соударения, эВ (Shimadzu)
232.15	91.15	–24.0
	126.10	–26.0
	105.10	–26.0

Хромато-масс-спектры регистрировали с помощью программного обеспечения LabSolutions. Для библиотечного поиска использовали библиотеки масс-спектров, включенные в пакет методов Forensic Toxicology DB (Shimadzu).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В комплекте с лабораторным высокоэффективным жидкостным хроматографом с tandemным масс-спектрометрическим детектором Shimadzu 8050 имеются рекомендации по настройкам прибора для двух скрининговых методов: метода ODS на колонке Phenomenex Kinetex C18 и метода Biphenyl на колонке Restek Raptor Biphenyl. Метод ODS предполагает скрининг 1277 соединений, а метод Biphenyl – 1276 соединений.

Алгоритм работы, предложенный производителем оборудования, предполагал анализ проб в скрининговых методах только в режиме MRM с последующим исследованием сомнительных результатов подтверждающими методами с одновременным снятием полных спектров ионов-продуктов по трем энергиям соударений с последующим получением объединенного масс-спектра и его использованием для библиотечного поиска.

Данный подход неудобен для практической работы, поэтому для своих рутинных исследований мы используем метод, охватывающий около 300 наиболее актуальных для нас соединений. При этом съемка ведется в режиме триггерного MRM-метода, при котором регистрация полного масс-спектра начинается при достижении заранее заданного порога интенсивности, выбранного MRM-перехода.

В MRM-скрининговом методе чаще всего используются следующие настройки: длительность регистрации селективных переходов – 2 мс, длительность задержки при переходе от одного селективного перехода к другому – 1 мс. В режиме регистрации полных спектров ионов-продуктов скорость сканирования устанавливают на уровне

15–30 тыс. сканирований в секунду, при этом максимальное время цикла для скринингового метода составляет около 2 с, что при средней ширине пика 6–7 с и при оптимальной настройке порога включения триггерных MRM позволяет получать до 6–8 сканов на пик, что является достаточным для целей качественного анализа [8].

При значительном содержании целевого аналита в пробе данный подход позволяет в 85–90% случаев получать хорошие и воспроизводимые масс-спектры. Но при низком содержании целевого компонента в пробе качество получаемых масс-спектров снижается, и при библиотечном поиске мы получаем 30–60% совпадений с библиотечными масс-спектрами, что недостаточно для идентификации анализаторов. Для подтверждения наличия в пробе целевого аналита необходимо провести повторный анализ подтверждающим методом с оптимизированными параметрами с целью получения более качественных данных. Для оптимизации значений параметров, которые предпочтительно использовать при создании подтверждающих методов, использовали пробу мочи РТ-36, которую ранее рассыпала “Ассоциация специалистов по химико-токсикологическому и судебно-химическому анализу” в рамках 10 раунда межлабораторных сличительных испытаний. В данной пробе всеми лабораториями-участниками выявлен широкораспространенный представитель группы синтетических катионов α -пирролидиновалероферон (рис. 1, 2). α -Пирролидиновалероферон содержался в пробе в значительной концентрации, поэтому ее разводили в 4000 раз до получения неидентифицируемых масс-спектров, совпадение с библиотечным масс-спектром составляло менее 30 % (рис. 3).

Далее оптимизировали условия детектирования α -пирролидиновалероферона, взяв за основу параметры настройки скринингового метода (длительности регистрации селективных переходов – 2 мс, длительность задержки при переходе от одного селективного перехода к другому – 1 мс, скорость сканирования – 30 000 Да/с) и меняя значение одного из параметров. Полученные данные сравнивали в первую очередь по проценту совпадения получаемых масс-спектров с библиотечным масс-спектром, а также оценивали получаемые формы хроматографических профилей.

При оптимизации параметра длительности задержки при переходе от одного селективного перехода к другому установили, что ее изменение от 1 мс до 10 мс не влияет на качество получаемых масс-спектров и профиль формы MRM-хроматограмм (рис. 4). При изменении длительности регистрации селективных переходов от 0.8 мс до 10 мс лучшие результаты получены при 10 мс (рис. 5). При дальнейшем увеличении длительности регистрации селективных

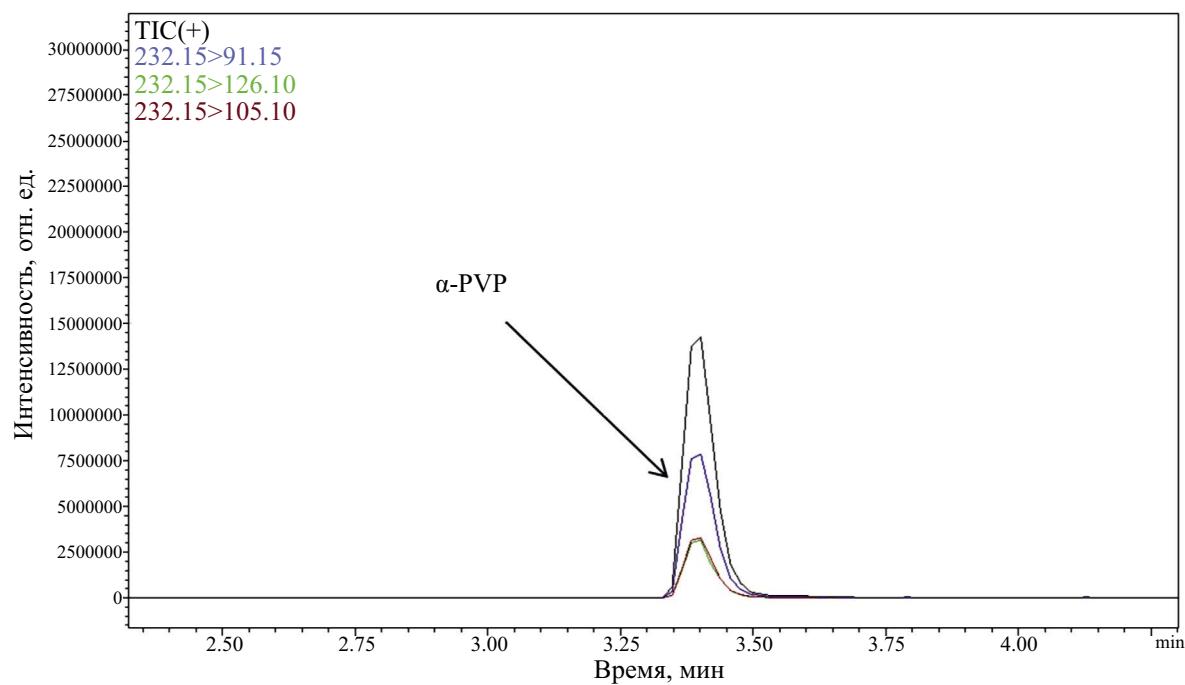


Рис. 1. Хроматографический профиль пробы мочи PT-36.

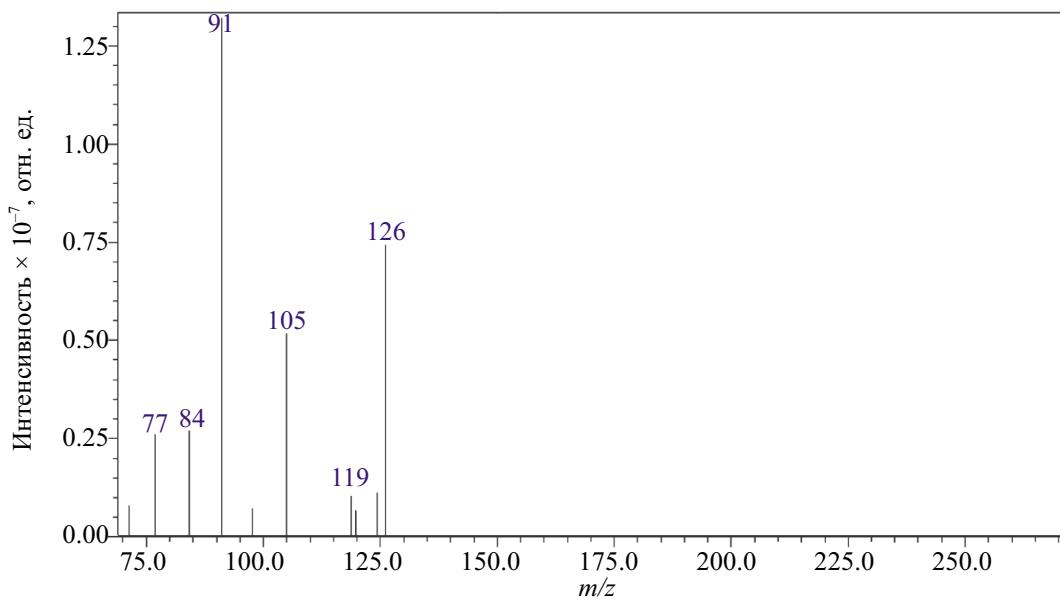


Рис. 2. Масс-спектр а-пирролидиновалерофенона при энергии соударения 30 эВ.

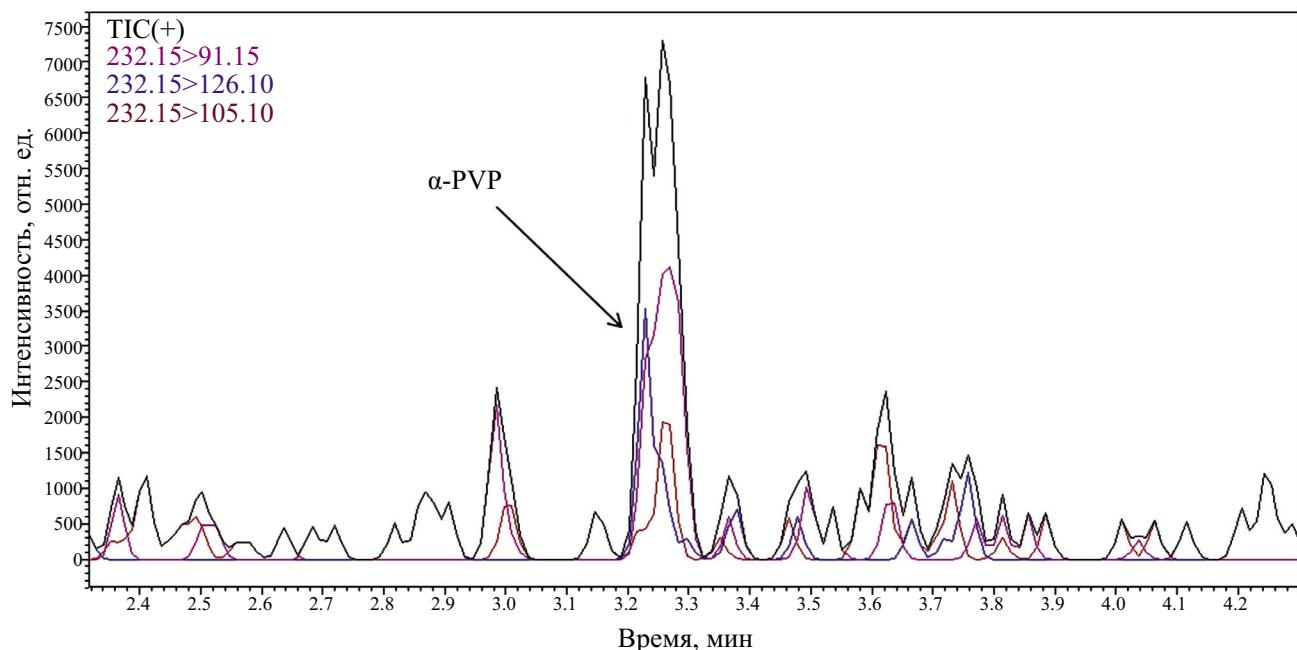


Рис. 3. Хроматографический профиль пробы мочи PT-36 в разбавлении 1/4000. Метод – скрининговый, более 300 определяемых веществ. Масс-спектр неидентифицируемый, совпадение с библиотечным масс-спектром α -пирролидиновалерофенона менее 30%.

переходов до 25/50 мс существенных улучшений качества получаемых масс-спектров не наблюдали. При оптимизации параметра скорости сканирования лучшие масс-спектры получили при скорости сканирования от 1000 до 5000 Да/с (рис. 6).

Исходя из полученных при оптимизации данных, создали подтверждающий метод для детектирования только α -пирролидиновалерофенона. Оптимальные настройки: скорость сканирования – 5000 Да/с, длительность регистрации селективных переходов – 10 мс, длительности задержки при переходе от одного селективного перехода к другому – 1 мс. Пробу мочи PT-36 в разведении 1/4000 исследовали предложенным подтверждающим методом. Как видно из рис. 7, в сравнении с результатами, полученными скрининговым методом до проведения оптимизации, удалось значительно улучшить форму пика и качество получаемого масс-спектра.

Предложенный алгоритм показал свою эффективность на практике при рутинных химико-токсикологических исследованиях проб мочи на содержание различных наркотических и лекарственных веществ.

Пример 1. При исследовании пробы мочи скрининговым методом получили пик в окне сертраплина, при библиотечном поиске удалось получить лишь 35 % совпадения. Создание подтверждающего метода на одно соединение с оптимизированными параметрами позволило получить масс-спектр лучшего качества. Совпадение с библиотечным масс-спектром составило 86% (рис. 8).

Пример 2. При исследовании пробы мочи скрининговым методом получили пик в окне 11-нор-дельта-9-тетрагидроканнабинол-9-карбоновой кислоты, при библиотечном поиске удалось получить лишь 33% совпадения. Создание подтверждающего метода на одно соединение с оптимизированными параметрами позволило получить масс-спектр лучшего качества. Совпадение с библиотечным масс-спектром составило 88% (рис. 9).

Пример 3. При исследовании пробы мочи скрининговым методом получили пик в окне фентанила, при библиотечном поиске удалось получить лишь 34% совпадения. Создание подтверждающего метода на одно соединение с оптимизированными параметрами позволило получить масс-спектр лучшего качества, совпадение с библиотечным масс-спектром составило 91% (рис. 10).

Оптимизированы значения параметров для подтверждающих методов: длительность регистрации селективных переходов – не менее 10 мс, длительность задержки при переходе от одного селективного перехода к другому – 1 мс, скорость сканирования – 1000/5000 Да/с. Данний подход успешно применен на практике при рутинных химико-токсикологических исследованиях проб мочи с низким содержанием различных наркотических и лекарственных веществ.

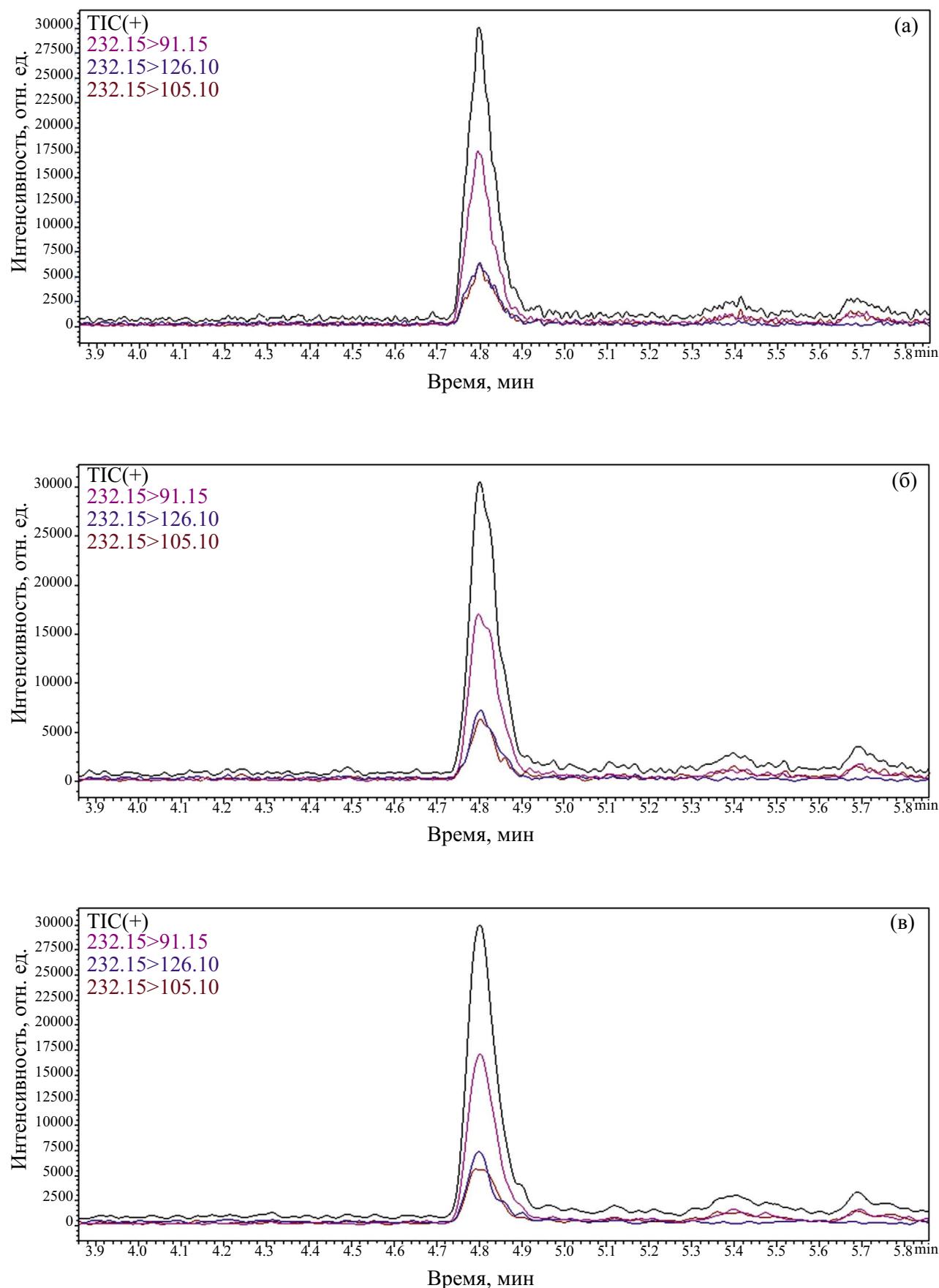


Рис. 4. Результаты, полученные при оптимизации длительности задержки при переходе от одного селективного перехода к другому, (а) установленное значение – 1 мс, (б) установленное значение – 5 мс, (в) установленное значение – 10 мс.

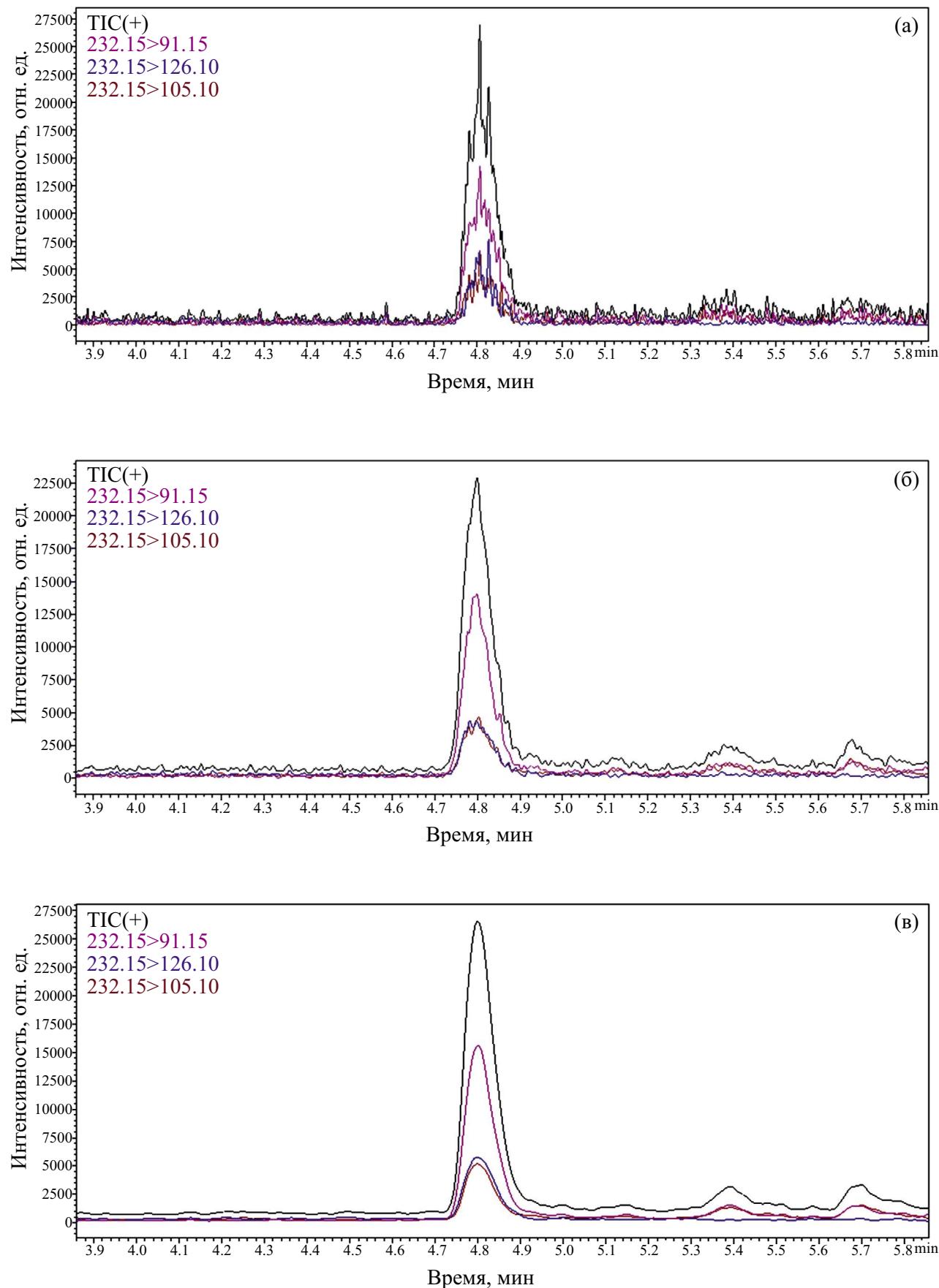


Рис. 5. Результаты, полученные при оптимизации длительности регистрации селективного перехода, (а) установленное значение – 0.8 мс, (б) установленное значение – 5 мс, (в) установленное значение – 10 мс.

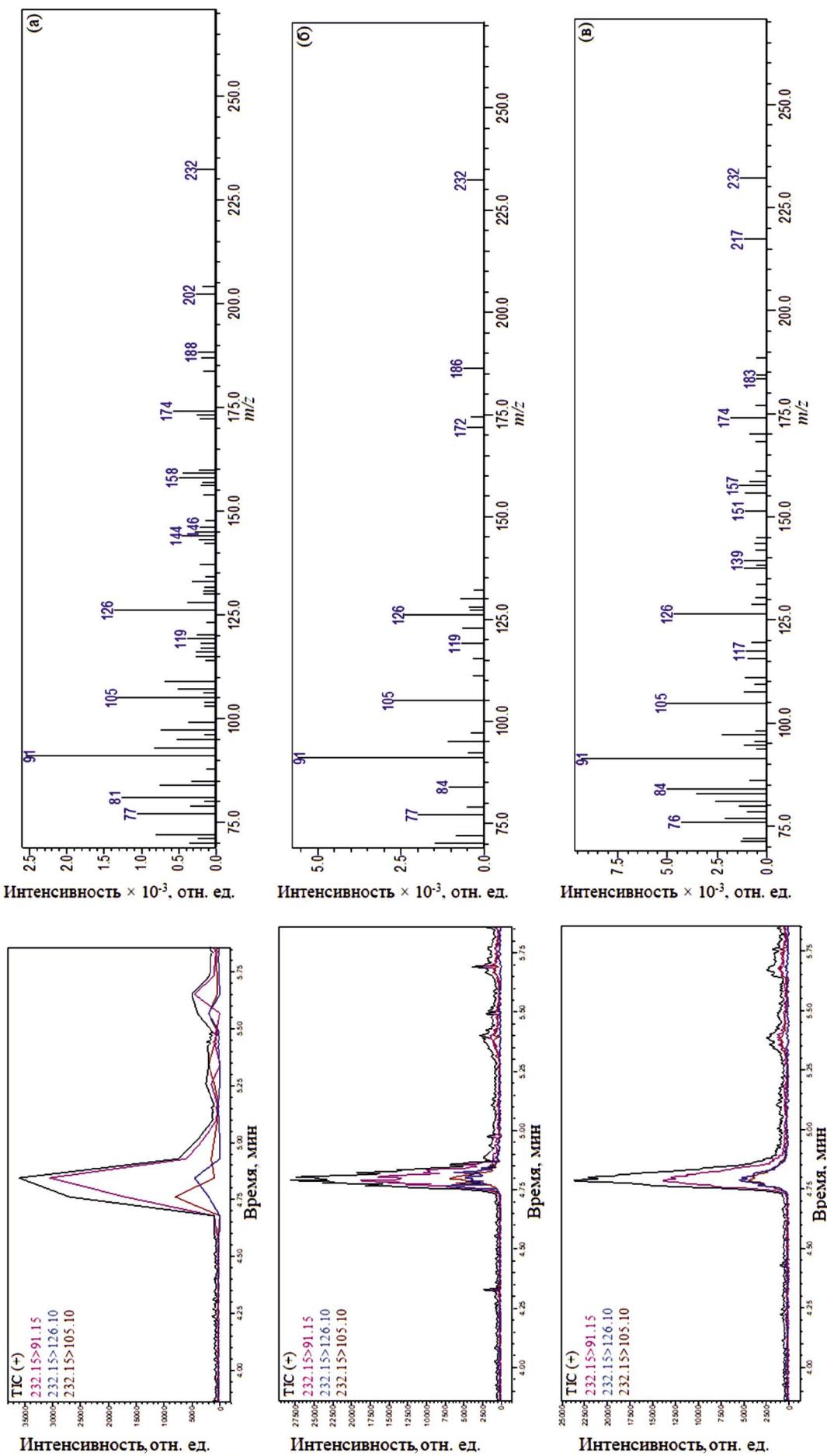


Рис. 6. Результаты, полученные при оптимизации скорости сканирования, (а) установленное значение – 40 Да/с, совпадение полученного масс-спектра с библиотечным масс-спектром – 51%, (б) установленное значение – 1000 Да/с, совпадение полученного масс-спектра с библиотечным масс-спектром – 70%, (в) установленное значение – 30 000 Да/с, совпадение полученного масс-спектра с библиотечным масс-спектром – 54%.

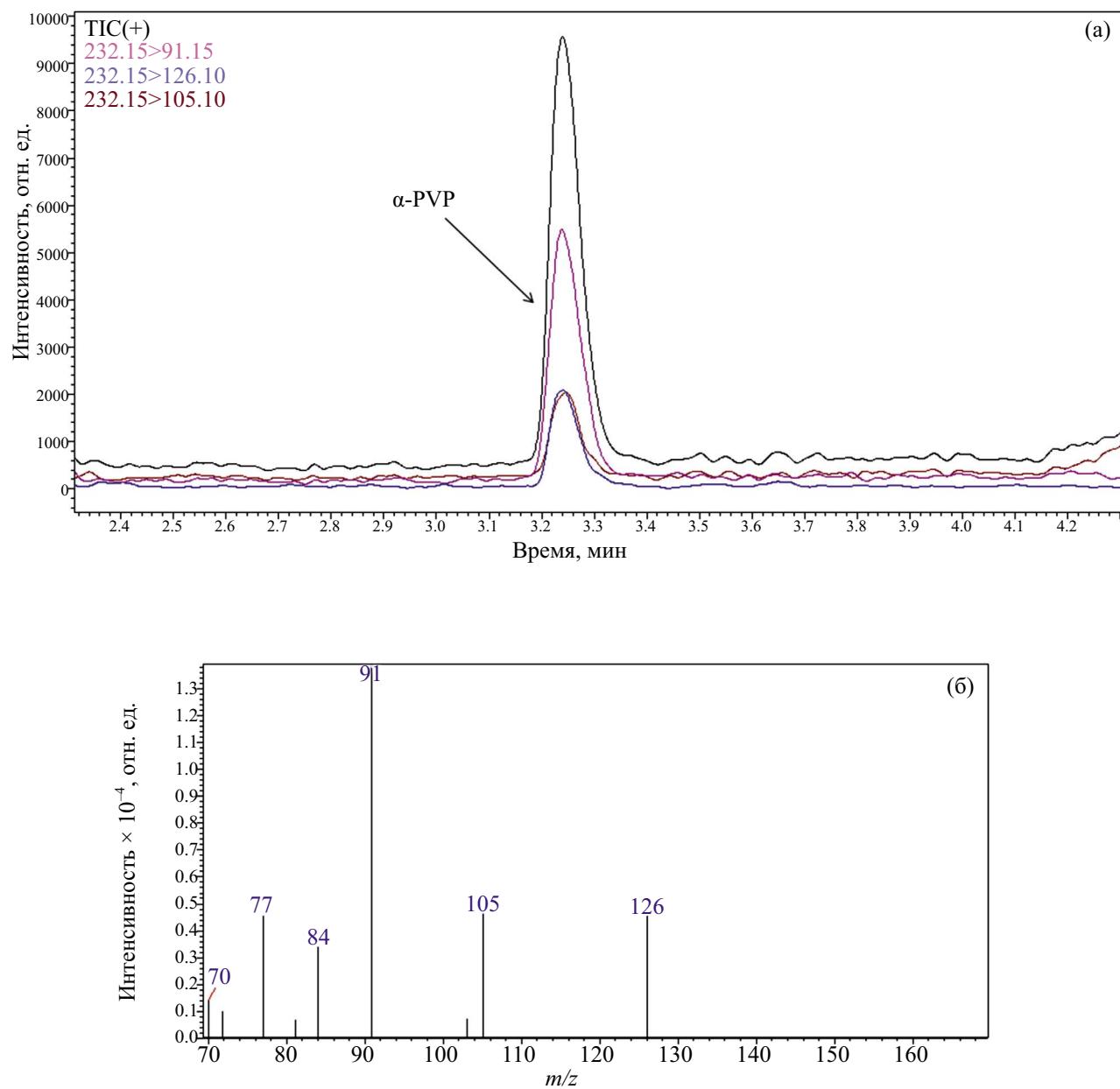


Рис. 7. (а) Хроматографический профиль пробы мочи РТ-36 в разбавлении 1/4000, полученный оптимизированным подтверждающим методом, совпадение с библиотечным масс-спектром α -пирролидиновалерофенона 61%, (б) масс-спектр α -пирролидиновалерофенона при энергии соударения 30 эВ.

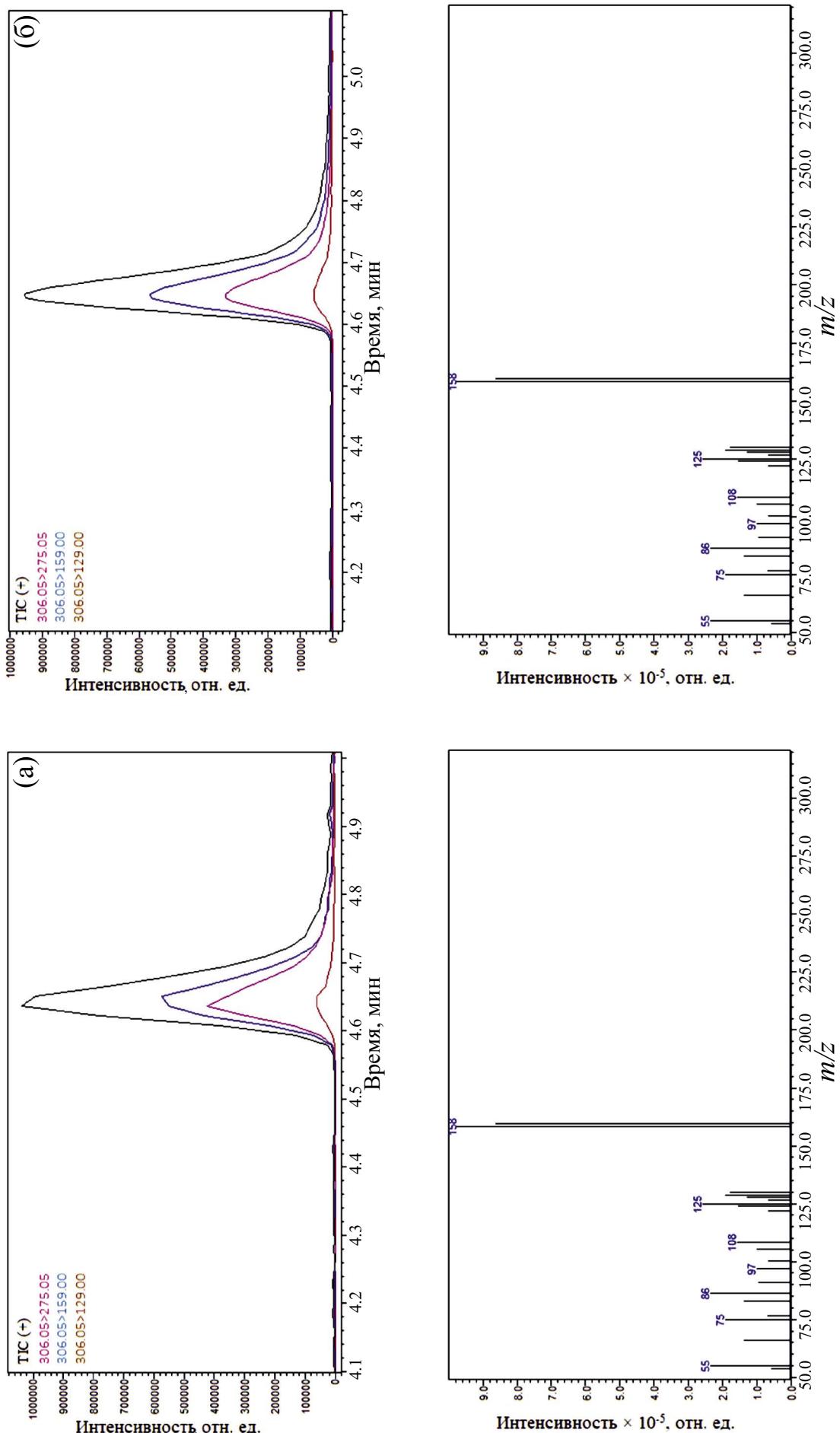


Рис. 8. Хроматографические профили и масс-спектры пробы мочи, полученные (а) скрининговым и (б) подтверждающим методами. Настройки скринингового метода: длительность регистрации селективного перехода – 2 мс, длительности задержки при переходе от одного селективного перехода к другому – 1 мс, скорость сканирования – 30 000 сканирований в секунду. Совпадение с библиотечным масс-спектром – 35%. Настройки подтверждающего метода: длительность регистрации селективного перехода – 10 мс, длительности задержки при переходе от одного селективного перехода к другому – 1 мс, скорость сканирования – 5000 сканирований в секунду. Совпадение с библиотечным масс-спектром – 86%.

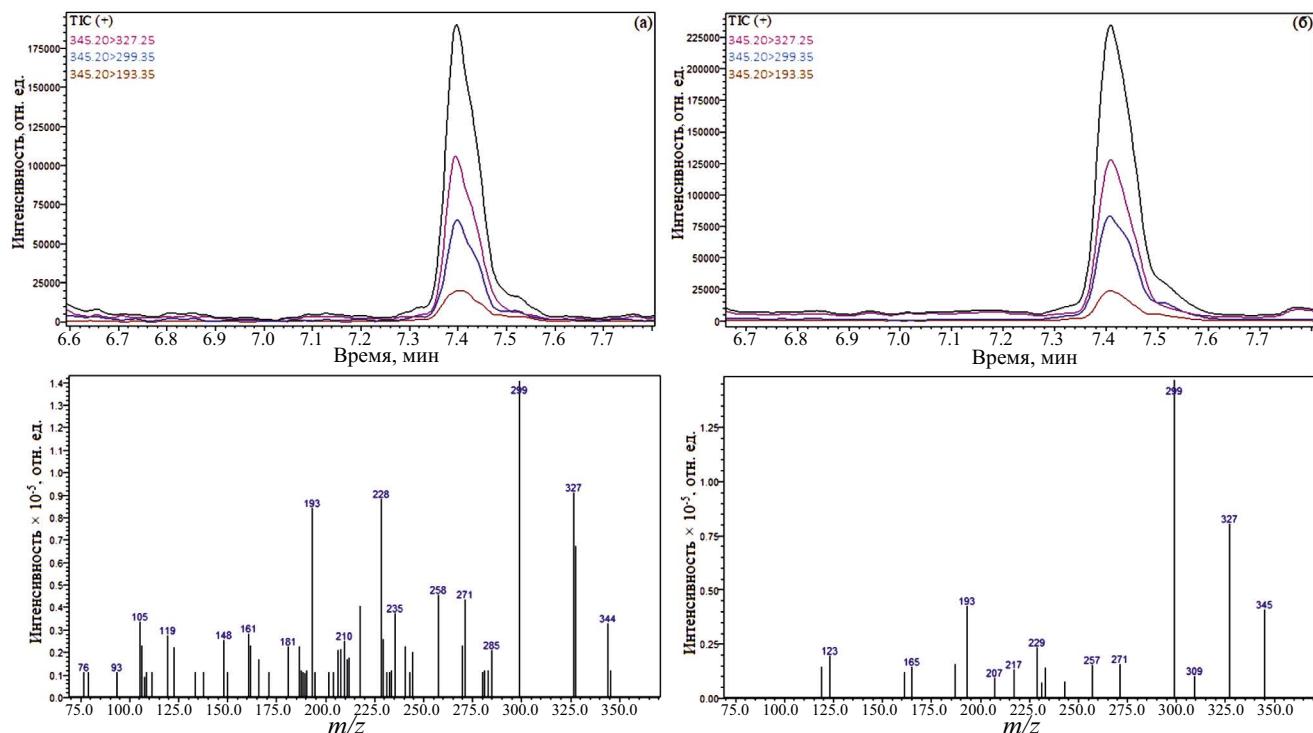


Рис. 9. Хроматографические профили и масс-спектры пробы мочи, полученные (а) скрининговым и (б) подтверждающим методами. Настройки скринингового метода: длительность регистрации селективного перехода – 2 мс, длительности задержки при переходе от одного селективного перехода к другому – 1 мс, скорость сканирования – 30 000 сканирований в секунду. Совпадение с библиотечным масс-спектром – 33%. Настройки подтверждающего метода: длительность регистрации селективного перехода – 10 мс, длительности задержки при переходе от одного селективного перехода к другому – 1 мс, скорость сканирования – 5000 сканирований в секунду. Совпадение с библиотечным масс-спектром – 88%.

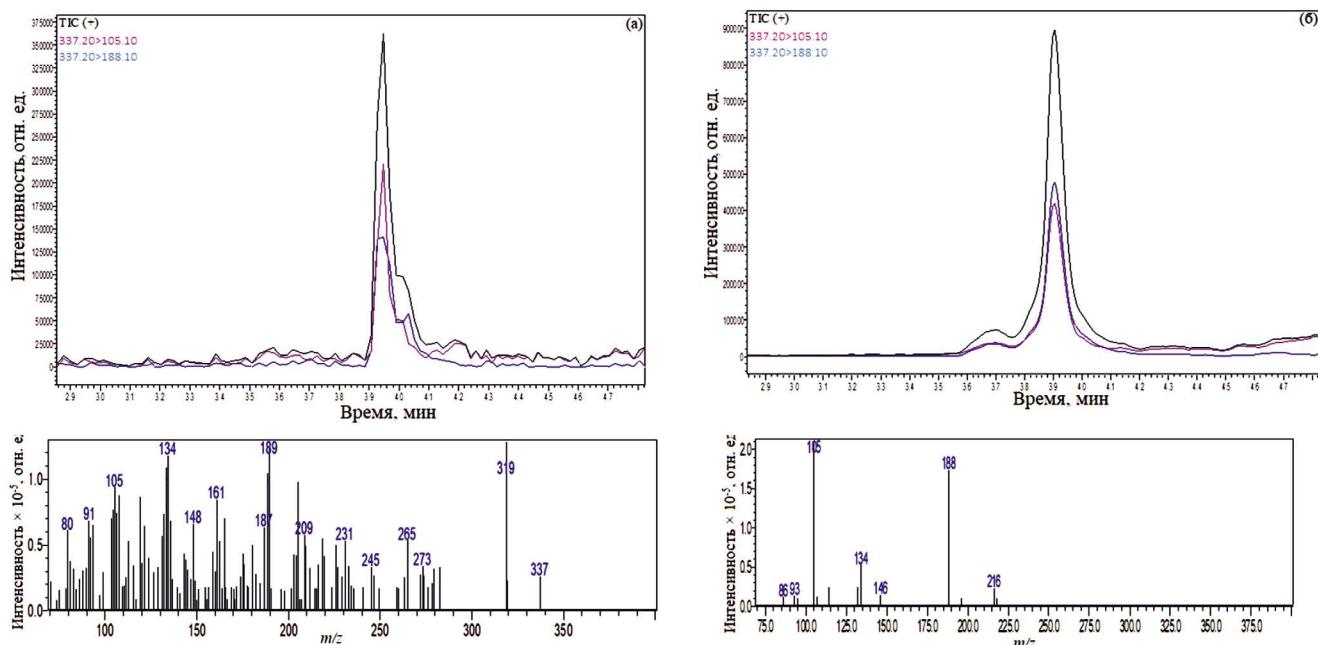


Рис. 10. Хроматографические профили и масс-спектры пробы мочи, полученные (а) скрининговым и (б) подтверждающим методами. Настройки скринингового метода: длительность регистрации селективного перехода – 2 мс, длительности задержки при переходе от одного селективного перехода к другому – 1 мс, скорость сканирования – 30 000 сканирований в секунду. Совпадение с библиотечным масс-спектром – 34%. Настройки подтверждающего метода: длительность регистрации селективного перехода – 10 мс, длительности задержки при переходе от одного селективного перехода к другому – 1 мс, скорость сканирования – 5000 сканирований в секунду. Совпадение с библиотечным масс-спектром – 91%.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Ноябрьского психоневрологического диспансера. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все биологические материалы, используемые в работе, являются обезличенными биологическими пробами. Пробы были изъяты из морозильной камеры химико-токсикологической лаборатории перед их утилизацией и для своего использования не требуют разрешения этического комитета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The Scheduled MRM algorithm Pro – Automated intelligent design of high throughput, high quality quantitation assays. SCIEX technical note RUO-MKT-02-8539-A.

2. Thomas S.N., French D., Jannetto P.J., Rappold B.A., Clarke W.A. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for clinical diagnostics// Nat. Rev. Methods Primers. 2022. V. 2. № 1. P. 96.
3. Clarke W., Molinaro R.J., Bachmann L.M., Botelho J.C., Cao Z., French D. et al. CLSI. Liquid chromatography-mass spectrometry methods; Approved guideline. CLSI document C62-A // CLSI. 2014. V. 34. № 16.
4. Stone P., Glauner T., Kuhlmann F., Schlabach T., Miller K. New Dynamic MRM Mode Improves Data Quality and Triple Quad Quantification in Complex Analyses. Agilent Technologies Technical Overview, publication number 5990-3595, 2009.
5. Triggered MRM: Simultaneous Quantification and Confirmation Using Agilent Triple Quadrupole LC/MS Systems, Agilent Technologies, publication number 5990-8461EN, 2013.
6. LC/MS/MS Forensic Toxicology DB, Instruction Manual, 225-28669A, April 2018.
7. Baker D., Fages L., Capodanno E., Loftus N. Multi-residue veterinary drug analysis of >200 compounds using MRM Spectrum mode by LC-MS/MS, ASMS 2017 TP-207, Shimadzu.
8. König S., Wüthrich T., Bernhard W., Weinmann W. Screening by LC-MS-MS and fast chromatography: An alternative approach to traditional immunoassays? // Spectrosc. Suppl. 2013. V. 11. № 2. P. 22.

APPROACH TO OPTIMIZATION OF MASS SPECTROMETRIC DETECTION PARAMETERS FOR IDENTIFICATION OF ULTRA-SMALL AMOUNTS OF HIGHLY TOXIC SUBSTANCES

M. Sh. Aigumov^{a,*}, S. A. Savchuk^{b, c}

^a*Noyabrsk Psychoneurological Dispensary
Noyabrsk, Russia*

^b*Association of Specialists in Chemical-toxicological and Forensic Chemical Analysis
St. Petersburg, Russia*

^c*The Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry RAS (IPCE RAS)
Moscow, Russia*

*E-mail: aygumov.m@yandex.ru

Abstract. The procedure of optimization of the following parameters is described: scanning speed, duration of registration of selective transitions (dwell time), duration of delay in transition from one selective transition to another (pause time). A chromatograph for HPLC with a three-quadrupole mass spectrometric detector (LC-MS/MS Shimadzu 8050) was used. Chromatographic separation was carried out on a column with reversed-phase sorbent Phenomenex Kinetex C18. As mobile phase A was used 0.1 % solution of formic acid in water with addition of 10 mM/L ammonium formate, as mobile phase B – 0.1 % solution of formic acid in methanol with addition of 10 mmol/L ammonium formate. The optimal parameters for confirmatory methods were established: duration of registration of selective transitions – not less than 10 ms, duration of delay in transition from one selective transition to another – 1 ms, scanning speed – from 1000 to 5000 scans per second. This technique has been successfully applied in routine chemical and toxicological studies of urine samples with low content of various narcotic and medicinal substances.

Keywords: HPLC-MS/MS, cycle time, duration of registration of selective transitions (dwell time), scanning speed, duration of delay in transition from one selective transition to another (pause time).