

Скрининговые процедуры при анализе объектов биологического происхождения методом жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии: возможные затруднения

Григорьев А.М. к.х.н., судебный эксперт (эксперт-химик)
Реброва С.Г. врач — судебно-медицинский эксперт
Крупина Н.А. врач — судебно-медицинский эксперт

ГБУЗ Московской области «Бюро судебно-медицинской экспертизы»
111401, Москва, 1-я Владимирская ул., д. 33, корп. 1

Автор для корреспонденции. Григорьев Андрей Михайлович; e-mail: chrzond4250@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 15.08.2016.

Обзорный (скрининговый) анализ объектов биологического происхождения на присутствие опасных для жизни и здоровья ксенобиотиков и их метаболитов является доминирующей частью современных судебно-химических и химико-токсикологических процедур. До недавнего времени основным инструментом скринингового анализа был газовый хроматограф, соединенный с масс-спектрометром. Совершенствование и удешевление масс-спектрометров, ориентированных на ввод жидкостных потоков позволяет внедрять в практику лабораторий метод жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии ввиду ряда его безусловных преимуществ. В настоящей публикации рассмотрены основные ограничения применения метода жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии для скрининга биообъектов. Понимание этих ограничений, возможно, будет полезным для аналитиков, планирующих расширение общих схем анализа за счет внедрения нового метода.

Ключевые слова: ЖХ-МС, ГХ-МС, скрининг, биологические объекты

Введение

Метод жидкостной хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией (жидкостная хроматография/масс-спектрометрия, ЖХ-МСⁿ) — наиболее современный и динамично развивающийся метод анализа [1]. Об этом свидетельствует, в частности, обилие публикаций в международных научных журналах, посвященных различным аспектам практического применения метода и разработкам новых подходов. Возможности метода ЖХ-МСⁿ непосредственно пересекаются с потребностями судебно-химического и химико-токсикологического анализа (СХА и ХТА), и это закономерно выражается в вытеснении им ранее доминирующего метода газовой хроматографии/масс-спектрометрии (ГХ-МС) [2—4].

Сама специфика СХА и ХТА содержит важнейшую компоненту, а именно обширный и непрерывно расширяющийся список подконтрольных соединений. Следствием является преобладание в СХА и ХТА скринингового направления.

Основной задачей скринингового анализа мы считаем возможность определения (обнаружения) всех подконтрольных соединений, встречающихся в био-

логических образцах, включая их метаболиты, артефакты и возможные дериваты, причем эта задача должна быть выполнена с применением максимально унифицированных методик. В идеальном варианте, ответы на все вопросы СХА и ХТА должны быть получены при единичном анализе биологического образца, приготовленного по определенной (и несложной) методике.

Безусловно, метод ЖХ-МСⁿ, предоставляет значительно более широкие возможности для анализа биологических образцов по сравнению с ГХ-МС, и его достоинства, которые сложно переоценить, широко освещены в научной литературе. Тем не менее, любой метод имеет собственную специфику и связанные с ней ограничения, и мы полагаем, что ограничения метода ЖХ-МСⁿ рассмотрены недостаточно. Учет этих ограничений формирует аргументацию в важном вопросе: может ли ЖХ-МСⁿ полностью заменить ГХ-МС, по крайней мере, в области скринингового анализа, принятого в СХА и ХТА?

В силу ограничений формата, данная публикация не является полноценным сравнением методов. Также не рассмотрены сравнительные характеристики

ЖХ-МСⁿ-оборудования различных производителей, кроме обязательного учета типов масс-спектрометров. Вместо этого мы сосредоточились на перечислении возможных ограничений метода ЖХ-МСⁿ, возникающих при организации скринингового анализа биологических образцов. Вся изложенная далее информация основана на практическом опыте авторов.

Результаты и обсуждение

1. ЖХ-МСⁿ-системы работают в условиях жесткого дефицита времени.

Можно напомнить, что важнейшим достоинством метода ГХ-МС, обуславливающим пригодность для скринингового анализа, следует считать универсальность детектирования, являющуюся следствием применяемого стандартизированного способа ионизации, т.е. электронная ионизация (ИЭ) при постоянной энергии электронов (70 эВ). Такой способ обеспечивает фрагментацию практически всех соединений, поступающих из колонки в масс-спектрометр, причем позволяет получать воспроизводимые масс-спектры, мало зависящие от модели и ее производителя. Получаемые ионные хроматограммы содержат информацию обо всех соединениях, содержащихся во вводимой пробе и хроматографируемых в условиях ГХ. В случае получения ложнотрицательных результатов, причинами которых были, например отсутствие соединения в поисковых библиотеках, малое содержание или термическая нестабильность, аналитик обычно имеет возможность ретроспективной обработки ионных хроматограмм и исправления возможных ошибок.

Ионизация при атмосферном давлении (ИАД), различные варианты которой применяются в методе ЖХ-МСⁿ, выполняется в гораздо более мягких условиях, нежели электронная ионизация, характерная для ГХ-МС. Кроме того, процесс ИАД при ЖХ-МСⁿ сопряжен с сушкой водосодержащего элюата, выходящего из хроматографической колонки. По этой причине значительная часть ионов, генерируемых ион-

ным источником, являются протонированными или депротонированными молекулами (для положительного или отрицательного режимов ионизации, соответственно). В связи с тем, что информации о молекулярных массах аналитов в большинстве случаев явно недостаточно для их идентификации в биообъектах, то получаемые ионы должны быть фрагментированы. В каждый момент времени масс-спектрометр занят процессингом только одного иона-предшественника — т.е. его фрагментацией и сканированием спектра получаемых ионов-продуктов.

В отличие от ГХ-МС, спектры ЖХ-МС¹ всегда обогащены продуктами ионизации разнообразных фоновых соединений, присутствующих в элюате; это объясняется большей загрязненностью жидкостей по сравнению с баллонными газами и несравненно большим количеством соединений, наблюдаемых в условиях ЖХ-МС¹ (рис. 1). Поэтому ионов-«кандидатов» на последующую обработку всегда очень много, и ЖХ-МСⁿ-система сможет отобрать лишь небольшую часть из них. Указанное затруднение может быть решено лишь паллиативными способами.

Целевой скрининг. Выбирают ряд соединений, интересующих аналитика и составляют список соответствующих ионов-предшественников, подлежащих обработке, согласуя его со временами удерживания. Преимущества способа: вероятность обнаружения аналита несколько выше, нежели при нецелевом скрининге; недостатки: получаемая информация будет содержать сведения только о выбранных соединениях, а ретроспективный анализ по спектрам МС² невозможен.

Нецелевой скрининг. Списка предпочитаемых ионов-предшественников нет, а ЖХ-МСⁿ система настроена на работу в информационно-зависимом режиме (DDA). При этом указывают критерии отбора ионов-предшественников (в первую очередь — их интенсивность и время активного исключения). На приведенном примере (рис. 1) спектр МС¹ содер-

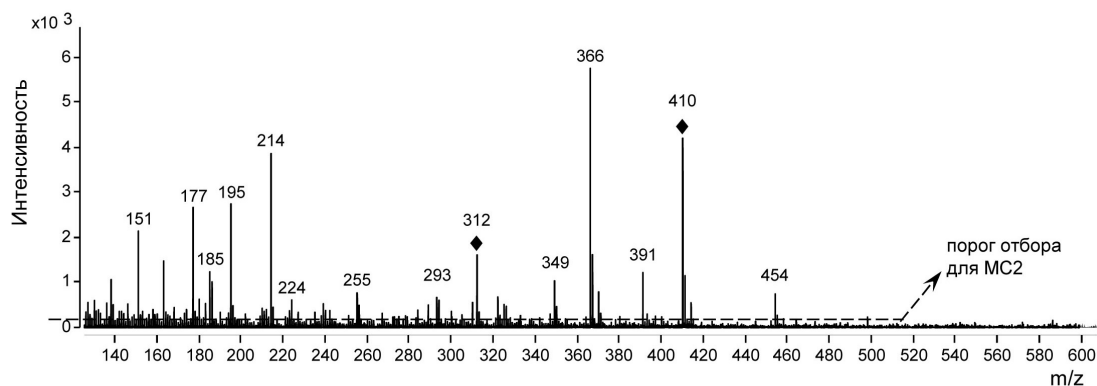


Рис. 1. Пример масс-спектра элюата. Порог интенсивности ионов, отбираемых для МС², установлен равным 200 ед.

жит более сотни ионов, удовлетворяющих условию интенсивности. В качестве ионов-предшественников будут выбраны два иона (m/z 312 и 410); пять других наиболее интенсивных ионов были отобраны во время нескольких предыдущих циклов и поэтому в настоящем цикле исключены из рассмотрения. Для обработки почти всех остальных (менее интенсивных) ионов у системы времени уже не остается, поскольку время полного цикла (регистрация спектра MS^1 , фрагментация нескольких ионов-предшественников и регистрация спектров MS^2) обычно составляет около одной секунды, а состав элюата постоянно меняется. Преимущество способа: возможен ретроспективный анализ (по крайней мере, для соединений, чьи ионы достаточно интенсивны). Недостатки: меньшая надежность обнаружения малоконцентрированных аналитов (повышение пределов обнаружения).

Данный недостаток является источником ложноотрицательных результатов.

2. В большинстве случаев спектры MS^2 , получаемые методом ЖХ- MS^2 весьма бедны по сравнению со спектрами ГХ-МС (ИЭ) — рис. 2. Этот факт приводит к необходимости использования специализированных алгоритмов идентификации (отличающихся от используемых в системе NIST [5]), обычно заключающихся в обязательном и жестком учете относительной интенсивности пиков ионов. Учитывая то, что вид спектров ионов-продуктов определяется рядом настраиваемых аппаратных параметров (в первую очередь, энергией фрагментации и давлением газа для диссоциации, индуцируемой соударением, ДИС), для надежной идентификации при проведении анализа необходимо превентивно регистрировать спектры всех аналитов, которые могут быть обнаружены. Подобный подход используется рядом нацио-

нальных и международных организаций и, в том числе, Антидопинговым агентством (WADA) [6]. В целом, использование библиотечного поиска как единственного способа идентификации не рекомендовано многими профессиональными сообществами [7].

Однако, существование обширного и постоянно увеличивающегося списка соединений, подконтрольных для лабораторий СХО и ХТЛ, а также затруднения в приобретении стандартных соединений делает этот подход мало реализуемым не только для России. Поэтому важность роли библиотечного поиска растет наряду с появлением обширных аппаратно-ориентированных ЖХ- MS^n библиотек [8—12].

Согласно нашему опыту, идентификация аналитов в биоматрицах на основе сравнения получаемых спектров MS^2 низкого разрешения и времен удерживания с библиотечными характеристиками содержит недопустимо высокую вероятность ложноположительных обнаружений. В особенности, это относится к весьма распространенным случаям, когда концентрация аналита в пробе невысока, и получаемые спектры MS^2 сильно загрязнены ионами матричных соединений, либо относительная интенсивность пиков ионов искажена. Использование идентификации по спектрам MS^2 можно считать допустимым лишь при наличии дополнительной информации о пробе, которая в большинстве случаев приобретает при проведении подтверждающих обнаружений иными методами анализа.

Однако, добиться повышения информативности единичного ЖХ- MS^n анализа в скрининговом режиме можно выбором типа масс-анализатора. Поскольку достоверность анализа растет при увеличении числа ионов-предшественников (и ионов-продуктов) и при увеличении разрешения масс-спектров [7], то наиболее пригодными типами следует считать ионные ловушки (при регистрации спектров MS^2 , MS^3) и масс-спектрометры высокого разрешения (в первую очередь, квадруполь-времяпролетные системы, Q-TOF). По нашему мнению, выбор между этими двумя типами определяется возможностями лаборатории или предпочтениями аналитиков: так, преимуществом ловушек является возможность быстрого переключения полярности, меньшая стоимость и простота обслуживания, а Q-TOF — возможностью идентификации в режиме MS^1 и ориентированность на поиск ранее неизвестных соединений. По всем указанным критериям масс-спектрометры типа тройной квадруполь (или квадруполь-линейная ловушка, настроенного на режим регистрации спектров MS^2), следует считать менее пригодными для скринингового анализа с использованием библиотек.

3. Стоимость самих ЖХ- MS^n -систем, их эксплуатации и обслуживания гораздо выше, нежели ГХ-МС. Затраты на ЖХ- MS^n -анализ относятся не только к са-

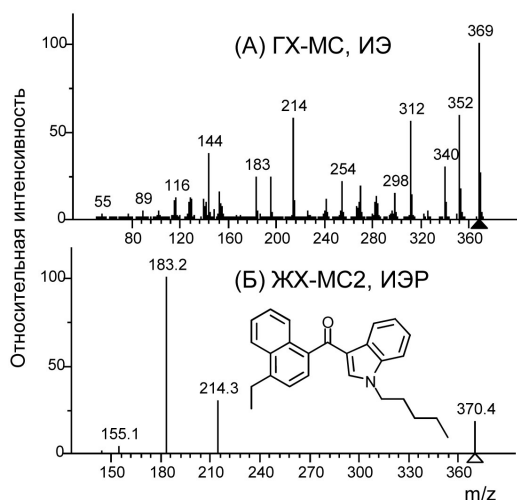


Рис. 2. Сравнение масс-спектров синтетического каннабимиметика JWH-210, полученных при электронной ионизации, ГХ-МС, (А) и при ионизации электрораспылением с последующей ДИС, ЖХ- MS^2 (Б)

мим хроматографам/масс-спектрометрам, но и к потребляемым высокочистым растворителям (вода, ацетонитрил или метанол), к генераторам азота и пр.

4. По своей сути, метод жидкостной хроматографии является универсальным инструментом. Возможность варьирования видов сорбентов и составов подвижных фаз, определяющих механизм удерживания, объясняет разнообразие химических свойств разделяемых соединений. Однако, необходимость соблюдения совместимости составов подвижных фаз с возможностями ионных источников масс-спектрометров, в первую очередь, в плане летучести компонентов фаз и ионизируемости аналитов, приводит к резкому сокращению возможностей ЖХ как самостоятельного метода.

5. Эффективность жидкостно-хроматографических набивных колонок, как правило, значительно ниже, нежели эффективность капиллярных ГХ колонок. На рис. 3 приведено сравнение примерных ширин хроматографических пиков для ультравысокоэффективной ЖХ колонки (100 мм × 2,1 мм, фракция сорбента 2,2 мкм) и капиллярной ГХ колонки (30 м × 0,25 мм, толщина неподвижной фазы 0,25 мкм). Значительная ширина ЖХ пиков ограничивает возможности для разделения аналитов и использования программ, использующих алгоритмы деконволюции (подобных AMDIS для ГХ).

6. Поскольку компоненты растворителя пробы принимают участие в элюировании аналитов, то процесс ЖХ весьма чувствителен к макросоставу вводимой пробы. Желательно, чтобы элюирующая сила растворителя пробы (для обращенно-фазовой ЖХ соответствующая концентрации органического растворителя) не превышала соответствующей характеристики для элюента, подаваемого в колонку в момент ввода. Несоблюдение этого правила приводит к ускоренному

элюированию («вымыванию») аналитов, что выражается в искажении формы пиков слабоудерживаемых соединений и к некоторому снижению времен удерживания — для сильноудерживаемых. С ростом удерживания эти эффекты ослабевают; однако, соединения, достоверное обнаружение которых чрезвычайно важно для практики СХО и ХТА: некоторые опиаты (морфин, кодеин, их глюкурониды) и производные амфетамина, и пр. относятся к аналитам со сравнительно невысоким удерживанием.

Результаты моделирования несоответствия элюирующей силы пробы и элюента приведены на рис. 4 для колонки размером 4,6 мм × 150 мм в условиях изократического элюирования (5 об.% ацетонитрила в водном растворе 0,2 об.% ортофосфорной кислоты; скорость потока элюента 1 мл/мин; объем вводимой пробы 20 мкл; детектирование УФ, 285 нм). При введении раствора тестового вещества (морфин) в воде получали нормальный хроматографический пик со временем удерживания 3,69 мин. При добавке в пробу 20 об.% ацетонитрила (с сохранением концентрации морфина) наблюдали ускоренное элюирование морфина, сопровождаемое сильным искажени-

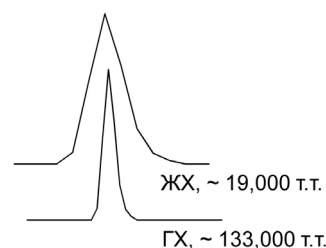


Рис. 3. Сравнение ширин хроматографических пиков для набивной колонки (ультравысокоэффективная ЖХ) и капиллярной колонки (ГХ) при одинаковом удерживании и при указанных значениях числа теоретических тарелок

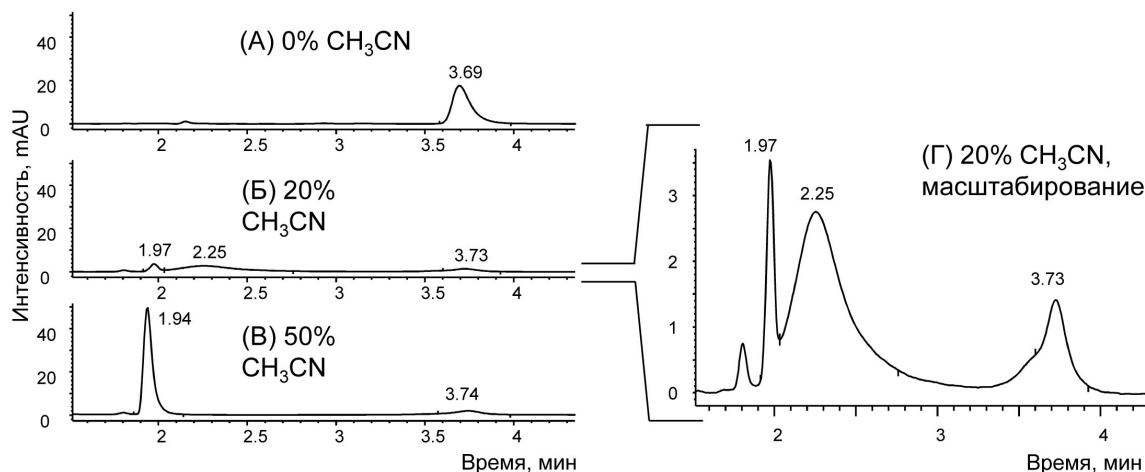


Рис. 4. Хроматограммы, получаемые при вводе раствора морфина в водно-ацетонитрильных смесях при концентрации ацетонитрила 0% (А), 20% (Б) и 50% (В). Масштабирование хроматограммы для 20% (Г). Изократическое элюирование, детектирование УФ, 285 нм

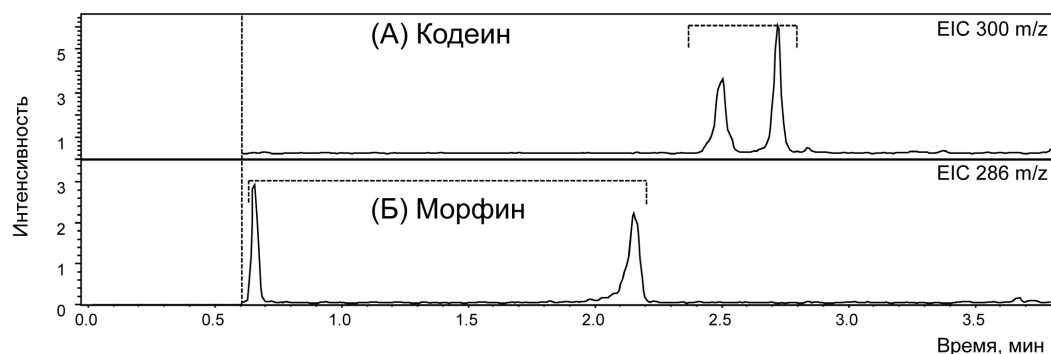


Рис. 5. Размывание хроматографических зон. Ионные хроматограммы кодеина (А) и морфина (Б) при анализе образца крови, введенного в ЖХ в растворе 50% об. ацетонитрила в воде, градиентное элюирование

ем формы его пика. При увеличении содержания ацетонитрила в пробе до 50 об. % морфин почти полностью элюируется вблизи мертвого времени колонки. Для сравнения получаемых интенсивностей пиков хроматограммы на рис. 4 приведены в одинаковом масштабе. Как можно убедиться, неверный макросостав пробы приводит к снижению интенсивности пика и (или) снижению времени удерживания. Эти эффекты уменьшают вероятности обнаружения аналита при качественном анализе и искажению получаемой концентрации — при количественном.

К сожалению, поддержание оптимальных для применяемых ЖХ условий содержания органического

растворителя во вводимых пробах при практической работе малоосуществимо. Обычно при скрининговом анализе градиентное элюирование начинают примерно с 2—10 об.% органического растворителя. Сухие остатки, получаемые при пробоподготовке образцов мочи (с деконъюгированием и концентрированием) или крови (с концентрированием) в таких смесях растворимы не полностью. В качестве распространенного компромиссного решения (например, [13]) сухие остатки растворяют в смесях, содержащих 50% органического растворителя в воде. Как правило, пики слабоудерживаемых компонентов при этом искажены (рис. 5). В подобных случаях несколько увеличить чувствительность удастся снижением объема вводимой пробы, а при использовании ацетонитрила как компонента элюента — растворять сухие остатки в смесях воды и метанола.

7. Обращенно-фазовая ЖХ, в целом, малоприменяема для разделения изомеров. Иногда изменение градиентных условий или смена органического модификатора с ацетонитрила на метанол (или наоборот) позволяет добиться приемлемого результата (рис. 6). Однако, такая процедура противоречит исходным условиям скринингового анализа; тем более, при этом сильно изменяются времена удерживания (обычно для метанола они больше). Если изомеры не разделены (рис. 6, Б), то получаемый спектр МС² будет суммой спектров отдельных изомеров, и обнаружение любого из изомеров будет затруднено.

8. Образование хроматографических артефактов отнюдь не является особенностью исключительно ГХ. В водных растворах значительное число тематических аналитов существует в виде нескольких форм, доли которых связаны определенными равновесиями. Равновесные формы обладают, как правило, различным удерживанием.

В большинстве случаев эти равновесия имеют ионную (обычно протолитическую) природу, и поэтому очень быстры. Существование ионных равновесий

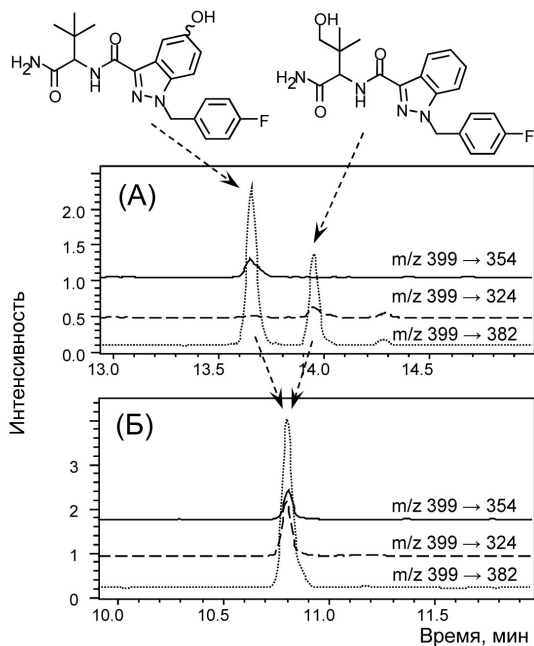


Рис. 6. Разделение изомеров по положению гидроксильной группы в молекулах метаболитов синтетического каннабимиметика ADB-FUBINACA (положение гидроксильной группы в индазольном остатке неизвестно). Элюент с добавками метанола (А) и ацетонитрила (Б), градиентное элюирование

почти не влияет на вид получаемых хроматограмм при градиентном элюировании в присутствии буферов и при практически достигаемом поддержании постоянства условий анализа.

Однако, если аналиты вступают в равновесия, связанные с изменением их структур (обычно внутримолекулярной и гидратной природы), то их существование по причине малой скорости реакций хорошо заметно на хроматограммах. На рис. 7 приведен пример хроматограммы мочи с метаболитами синтетического каннабимиметика UR-144 в виде термоизомеров [14]. Удержание дегидратных (циклизованных) форм значительно больше, нежели гидратированных, а скорость переходных реакций между формами достаточно мала, что приводит к возможности разделения. В данном случае смещения равновесия в сторону дегидратированных (сильноудерживающихся) форм можно добиться повышением рН элюента, но даже

установлением рН 8,5 (максимально возможной величины для большинства колонок с сорбентом на основе силикагелевой матрицы) недостаточно для получения качественных хроматограмм. Следует отметить, что подобные эффекты будут проявляться и при элюировании метаболитов иных каннабимиметиков [15], содержащих тетраметилциклопропильный остаток, а также всех остальных соединений, для которых характерны подобные равновесия.

9. Сам принцип реализации процесса ионизации при распылении элюата (ИЭР и иные варианты ИАД) предполагает непрерывное загрязнение деталей ионного источника. В случае анализа пробы, высококонцентрированной по какому-либо тематическому аналиту, существует значительная вероятность его отложения в источнике и постоянного присутствия его ионов в спектрах (рис. 8). Это приводит к ложноположительным результатам, причем если автоматическая

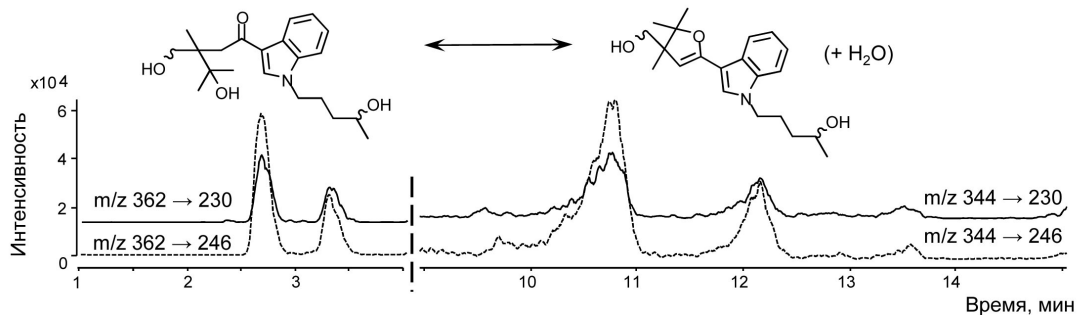


Рис. 7. Пример проявления медленных (гидратных) равновесий. Ионные хроматограммы мочи с метаболитами термического изомера синтетического каннабимиметика UR-144 (положение гидроксильных групп, отмеченных волнистой линией связи, неизвестно в пределах остатка)

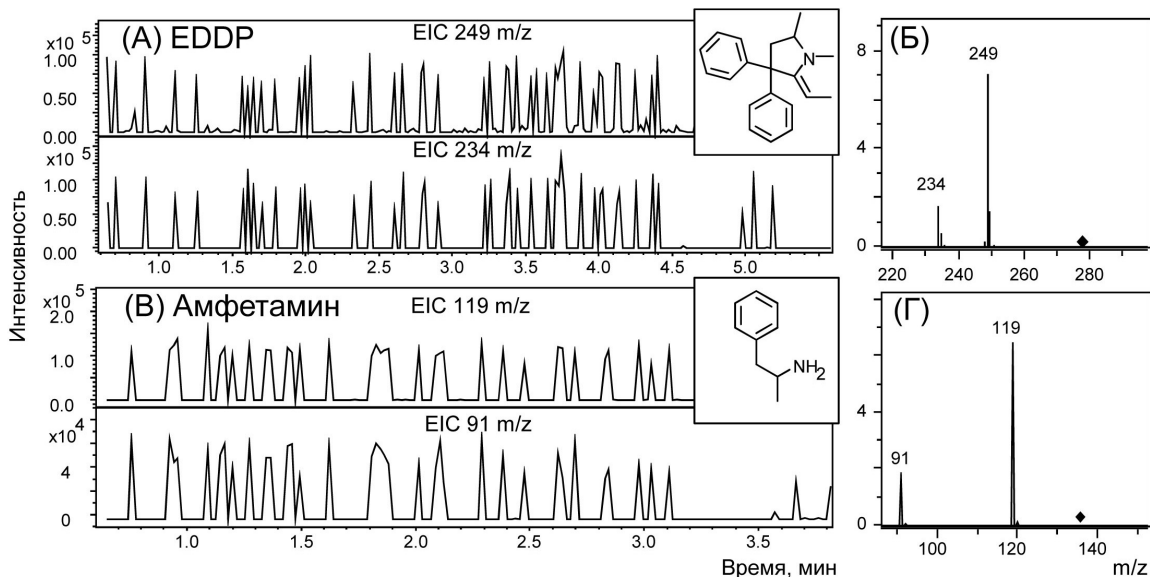


Рис. 8. Присутствие ионов аналитов-загрязнителей: EDDP (А) и амфетамина (В), поступающих из ионного источника, на ионных хроматограммах холостого образца. Масс-спектры EDDP (Б) и амфетамина (Г)

поисковая система настроена на дискриминацию находок анализов по временам удерживания, то положение пика ошибочно обнаруженного соединения будет соответствовать допустимому окну времени его удерживания, создавая полное впечатление истинно-положительного результата. Присутствие хотя бы одной пробы, содержащей высокую концентрацию аналита в последовательности проб может привести к ложным обнаружениям загрязнителя во всех пробах, анализируемых впоследствии. Подобные загрязнения могут присутствовать в источнике в течение длительного времени (дни), а их эффективное удаление возможно только при тщательной очистке источника. Применение в методе чередования анализа рабочих и холостых проб не решает данную проблему полностью, особенно в случаях малого содержания загрязнителя в камере ионизации и, следовательно, его нечеткого обнаружения. Кроме того, серьезным недос-

татком подобного приема является значительное увеличение времени анализа.

10. При положительной ионизации многих соединений в условиях электрораспыления формируются катионированные молекулы с ионами аммония и щелочных металлов (Na, K), причем интенсивность пиков этих ионов нередко сравнима с интенсивностью протонированных молекул (рис. 9). Часто подобные аналиты являются карбоновыми кислотами или амидами. Поскольку образование катионированных молекул с участием ионов щелочных металлов характерно для элюентов, приготавливаемых без участия соответствующих элементов, то относительная интенсивность пиков катионированных молекул определяется состоянием ЖХ-МС системы (возможно, хроматографической колонки и деталей узла десольватации). Некоторого (обычно небольшого) снижения интенсивности пиков Na- и K-катионированных мо-

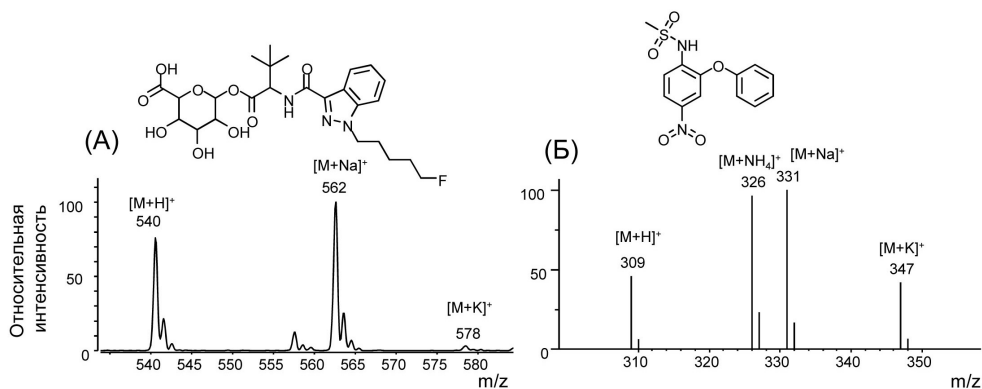


Рис. 9. Сравнение интенсивностей пиков ионов, соответствующих протонированным и катионированным молекулам. Глюкуронидированный метаболит синтетического каннабимиметика 5F-ADB (5F-ADB-PINACA) (А), нимесулид (Б)

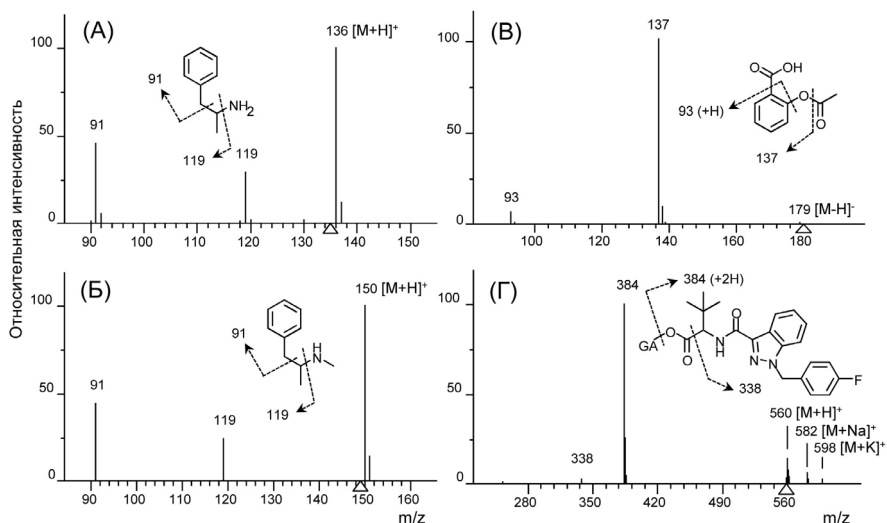


Рис. 10. Фрагментация в ионных источниках. Масс-спектры МС1 и схемы фрагментации амфетамина (А), метамфетамина (Б), ацетилсалициловой кислоты (В) и глюкуронидированного метаболита синтетического каннабимиметика MDMB-FUBINACA (ADB-FUBINACA) (Г). Полярность ионизации положительная (А), (Б), (Г); отрицательная (В). GA — остаток глюкуроновой кислоты

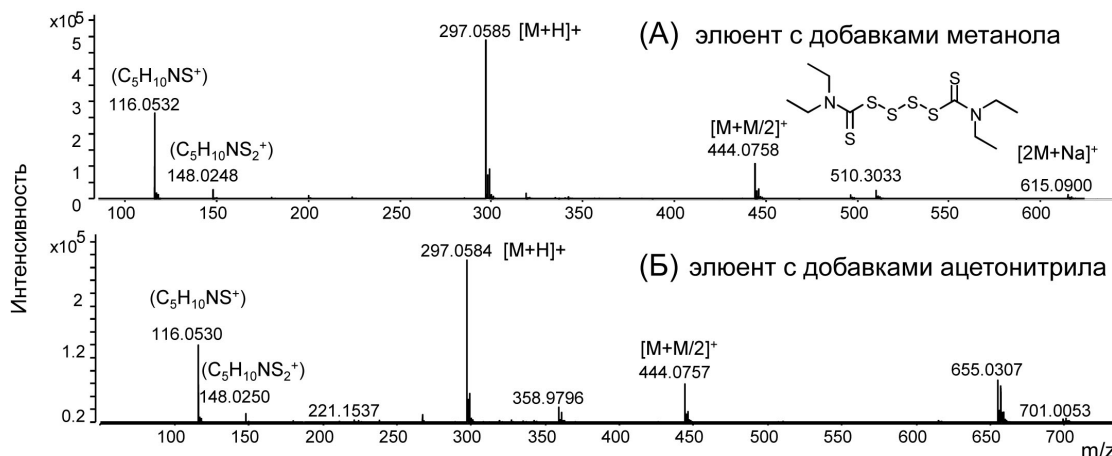


Рис. 11. Фрагментация дисульфирама и образование продуктов ион-молекулярных реакций в ионном источнике. Элюент с добавками метанола (А) и ацетонитрила (Б)

лекул удается добиться введением в элюенты ионов аммония. Присутствие катионированных молекул может быть полезным при проведении идентификации неизвестных ранее соединений, однако всегда снижает чувствительность определения и усложняет спектры МС¹.

При отрицательной ионизации обычным является образование ионов вида $[M+HCOO]^-$ и $[M+Cl]^-$.

11. Несмотря на сравнительно мягкие условия ионизации, некоторые аналиты склонны к фрагментации в ионном источнике (например, фенэтиламины — рис. 10, А, Б), деградации (например, сложные эфиры — рис. 10, В, Г) и совокупности этих и ряда других процессов (например, дисульфирам — рис. 11). В этих случаях интенсивности ионов в спектрах МС¹, соответствующих протонированным и депротонированным молекулам (при положительной или отрицательной ионизации, соответственно), снижаются. Подобные процессы имеют следствием не только снижение чувствительности, но и неизбежные потери времени, вызываемые отвлечением системы в режиме DDA на обработку ионов-продуктов, поступающих из источника. Иногда интенсивность ионов, соответствующих протонированным или депротонированным (рис. 10, Г и В, соответственно) молекулам, становится незначительной, и это вынуждает аналитика использовать фрагментные ионы в качестве предшественников. Следствие такого (всегда компромиссного) выбора — снижение селективности (достоверности) обнаружения.

12. Чувствительность определения многих тематических аналитов может быть недопустимо малой из-за плохой ионизируемости в условиях электрораспыления. Обычно это касается соединений, не содержащих азота в структурах (напр. пропופол, многие анаболические и другие стероиды, производные нафталина и

ибупрофена, в некоторой степени — производные тетрагидроканнабинола и пр.). На рис. 12 приведено сравнение хроматограмм смеси 1-нафтола и 1-нафтиламина при УФ и МС-детектировании. Очевидно, что обнаружение 1-нафтола (либо его метаболитов) методом ЖХ-МСⁿ (ИЭР) затруднено, и этот факт может привести к необходимости пользоваться методом ГХ-МС при выявлении случаев употребления соединений, имеющих подобные метаболиты (каннабимиметики СВL-2201, FDU-PB22, пропранолол и т.п.). Добиться увеличения чувствительности можно посредством дериватизации (например, дансилхлоридом [15]), но подобный путь требует проведения полностью специфичной аналитической процедуры. Дериватизированная проба непригодна для общего скрининга, поскольку подобные задачи считаются редкими для метода ЖХ-МСⁿ, и соответствующие дериваты отсутствуют в поисковых библиотеках.

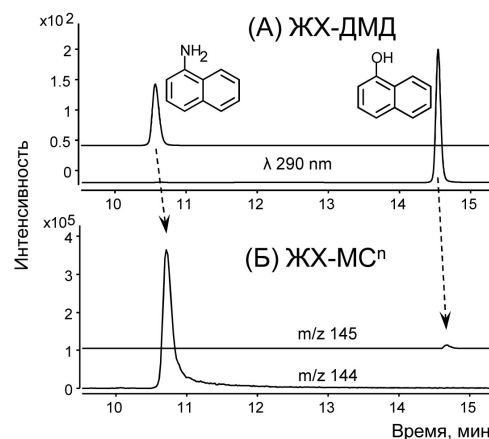


Рис. 12. Сравнение интенсивностей хроматографических пиков 1-нафтола и 1-нафтиламина при УФ-детектировании (А) и при регистрации ионных хроматограмм (Б)

13. Чувствительность и пределы обнаружения при анализе сложных проб методом ЖХ-МСⁿ чрезвычайно зависят от их состава, поскольку процесс ионизации происходит в условиях непосредственного контакта аналитов и матричных соединений. Снижение чувствительности при определении аналитов, находящихся в сложных матрицах может достигать более 50% [13, 17] что, учитывая переменный состав матриц биообъектов, влияет на воспроизводимость результатов.

14. Поскольку в методе ЖХ — в отличие от ГХ — элюирование производят жидкими составными элюентами, а число наблюдаемых соединений несравненно больше, то получение сколько-то чистых градиентных профилей в условиях лабораторий, выполняющих рутинные анализы, практически невозможно (рис. 13). Существует целый ряд публикаций (например, [18]), посвященных идентификации загрязнителей, детектируемых методом ЖХ-МСⁿ. Для лабораторий СХО и ХТЛ обычными загрязнителями являются компоненты моющих и антисептических средств. Они часто представляют собой четвертичные аммониевые основания, к которым метод ЖХ-МСⁿ обладают прекрасной чувствительностью благодаря их солевой природе. В том случае, когда вводят пробы, концентрированные при пробоподготовке, то соответственно, повышаются интенсивности пиков загрязнителей (на рис. 13, Б, В — более, чем в 10 раз). Присутствие загрязнителей осложняет обнаружение аналитов при анализе биопроб в режиме DDA, а также ручной поиск целевых компонентов в изъятых материалах.

15. Действительно, подготовка биологических объектов (кровь, моча, ткани внутренних органов) для последующего анализа методом обращенно-фазовой ЖХ-МСⁿ может быть значительно упрощена благодаря их водной матрице. Этим метод ЖХ-МСⁿ выгодно отличается от ГХ-МС, требующего перевода аналитов в легкокипящий растворитель. Тем не менее, неправильно выбранный метод пробоподготовки приводит к росту матричных эффектов, что — вместе с недостаточностью степени концентрирования аналитов — ведет к получению ложноотрицательных результатов.

Влияние указанных эффектов мы проиллюстрировали следующим образом [19]. Поверочный контроль мочи (ПКМ), содержащий 28 тематических соединений (Medidrug Drug U-Confirmation [20]), готовили двумя методами. Первый состоял в извлечении аналитов ацетонитрилом. К 100 мкл ПКМ добавляли 500 мкл ацетонитрила, перемешивали и охлаждали 10 мин при -18°C . 500 мкл верхней (водно-ацетонитрильной) фазы отбирали и упаривали досуха; сухой остаток растворяли в смеси ацетонитрила и воды (100 мкл, 1:10 об.). Вторым методом заключался в жидкостной экстракции. К 1 мл ПКМ добавляли избыток гидрокарбоната натрия, перемешивали и экстрагировали смесью хлорбутана и изоамилового спирта (1 мл, 99:1 об.). Отделяли органическую фазу и водную фазу вторично экстрагировали этилацетатом (1 мл). Органические экстракты объединяли, упаривали досуха и полученный остаток растворяли в 100 мкл смеси ацетонитрила и воды (1:1 об.). Степень концентрирования образца была 1 и 10 для первого и второго методов, соответственно. Содержание

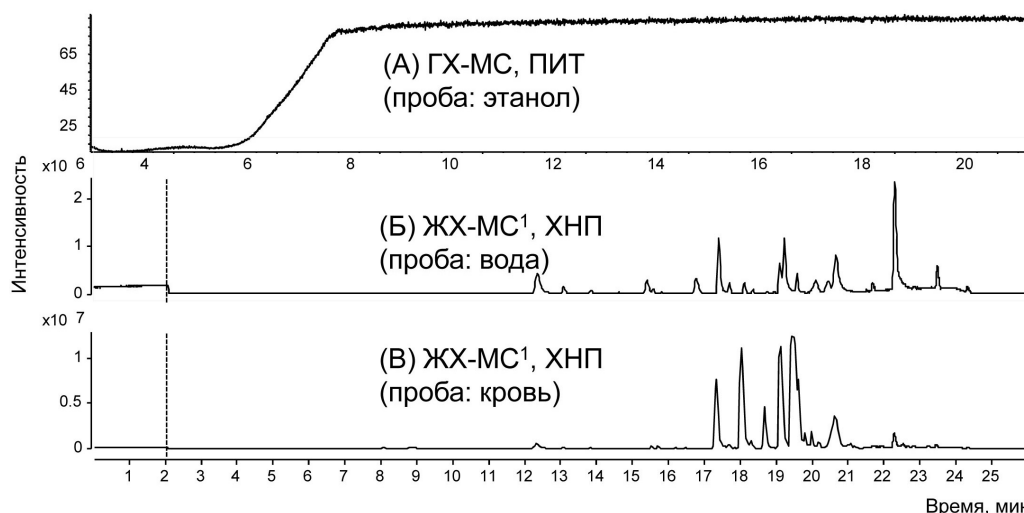


Рис. 13. Сравнение ионных хроматограмм, получаемых в условиях градиентного элюирования. Пробы: этанол, ГХ-МС (А); вода, ЖХ-МС1 (Б); кровь (после пробоподготовки) при степени концентрирования 10, ЖХ-МС1 (В). Хроматограмма по полному ионному току (А) и по наибольшему пикам (Б, В)

аналитов составляло 75% от величин, рекомендованных в качестве минимальных Европейским сообществом по тестированию на наркотики (EWDTs) [21]. Каждую пробу десятикратно вводили в ЖХ-МСп систему, настроенную на автоматический поиск в режиме целевого скрининга (п. 1) согласно рекомендациям производителя. Число обнаружений каждого аналита отмечали на диаграмме (рис. 14). Соединения расположены в порядке уменьшения их концентраций в исходном образце мочи. Получили следующий результат: способ подготовки пробы не оказал влияния на обнаружение восьми соединений (около 32% от всей выборки); вероятность обнаружения одиннадцати соединений (около 39%) возросла при увеличении степени концентрирования. К последней группе, в основном, относятся соединения, концентрация которых сравнительно невысока.

Диаграмма (рис. 14) позволяет сделать еще один важный вывод. Автоматизированный качественный анализ, дающий бинарный ответ («соединение найдено» — «соединение не найдено») не является надежным, по крайней мере, в области малых концентраций обнаруживаемых аналитов. Восемнадцать соединений (около 64% от выборки) были обнаружены менее 10 раз, т.е. случай, когда аналитик при двукратном анализе одного и того же объекта (с дополнительной пробоподготовкой или без нее) обнаружит соединение лишь один раз, следует считать нормой. Учитывая сказанное (п. 1), ручная обработка ионных хроматограмм, скорее всего, не позволит уточнить результат из-за отсутствия в них информации о фрагментации иона-предшественника аналита. Единствен-

ным выходом будет повторный ввод пробы в условиях постоянного наблюдения за этим ионом, что удлинит время, затраченное на работу с объектом.

16. Системы, реализующие технологии фокусировки зоны электрораспыления в ионном источнике и повышающие эффективность испарения и ионизации (например, *JetStream*, *Agilent*; *IonBooster*, *Bruker*) позволяют увеличивать чувствительность определения. Тем не менее, их использование осложнено целым рядом негативных явлений, перечисленных далее.

Вместе с ростом чувствительности, понимаемой как степень отклика детектора на концентрацию поступающего в него вещества, растет также и шум. Следовательно, снижение пределов обнаружения — величин, пропорциональных отношению уровней сигнала и шума — будет меньше, нежели рекламируемый рост чувствительности.

В связи с тем, что повышение эффективности испарения достигается дополнительным нагреванием зоны электрораспыления, степень разрушения термолабильных соединений растет, и чувствительность определения для них может даже снижаться. Наибольшее снижение чувствительности наблюдали для дисульфирама (п. 11). Кроме того, увеличивается степень фрагментации в источнике, что усложняет выбор ионов-предшественников при DDA (рис. 15).

Рост чувствительности определения для разных соединений различен. Поскольку при анализе сложных образцов аналиты неизбежно соэлюируются с матричными соединениями (чувствительность определения которых обычно также растет), то вероятность обнаружения аналитов может снижаться.

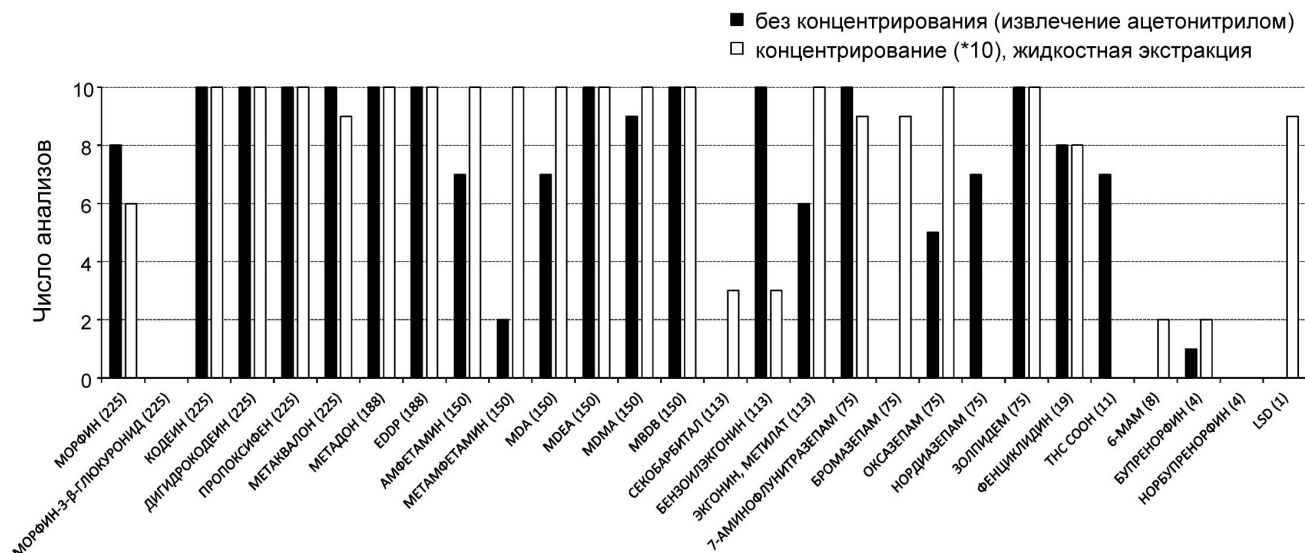


Рис. 14. Число обнаружений соединений, находящихся в поверочном контроле мочи Medidrug Drug U-Confirmation при десятикратном вводе. На подписях оси абсцисс указаны декларируемые концентрации аналитов до пробоподготовки (нг/мл)

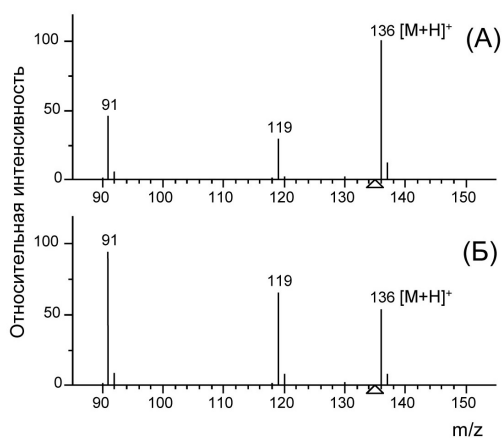


Рис. 15. Фрагментация в ионном источнике. Спектр MC1 амфетамина при использовании источников: обычный ИЭР (А) и фокусирующий ИЭР (Б)

Для иллюстрации действительных возможностей фокусирующих систем мы также выбрали образцы ПКМ Medidrug Drug U-Confirmation (п. 15), но содержание аналитов было 75% и 125% от минимальных величин, рекомендованных EWDTS. Каждый из образцов обрабатывали и анализировали теми же способами, что указаны в п. 15. Все измерения выполняли дважды, используя обычный электрораспылительный ионный источник и фокусирующий источник (при их настройке согласно рекомендациям изготовителя). Число обнаружений всех 28 соединений суммировали для каждого варианта анализа, т.е. при варьировании исходной концентрации, способа пробоподготовки и типа ионного источника. Вероятность обнаружения рассчитывали как отношение количества обнаружений всех соединений для каждого варианта анализа к максимальному количеству обнаружений (10×28 = 280). Результат приведен на рис. 16 (А). Для данной выборки тематических соединений применение фокусирующего источника позволило увеличить ве-

роятность обнаружения на 2-6%. Учитывая то, что вариации обнаружения определяются множеством факторов, рассмотрение которых выходит за рамки данной публикации и которые лишь частично приведены выше, найденные величины следует считать лишь ориентировочными. Вещества (8 шт.), которые обнаруживали надежно при использовании обычного электрораспылительного источника, не исключали из рассмотрения из-за возможности снижения вероятности их обнаружения с фокусирующим ионным источником.

Согласно нашему опыту, важным и несомненным достоинством фокусирующих источников является снижение вероятности их загрязнения при анализе проб с значительными концентрациями тематических аналитов (п. 9) и, следовательно, снижение вероятности получения ложноположительных результатов.

17. Метод ЖХ-МСп не предполагает использование унифицированных поисковых библиотек, по крайней мере, ввиду следующих причин:

- несмотря на то, что разнообразные варианты октадецильных сорбентов (С18) являются доминирующими неподвижными фазами в методе ЖХ-МСп, все они проявляют заметно различную селективность при разделении. Для метода ЖХ (в отличие от ГХ) к настоящему времени не созданы унифицированные неподвижные фазы;
- из-за возможности варьирования состава подвижных фаз (содержание органического растворителя, рН, ионная сила и способ ее создания) — т.е. причины, являющиеся безусловным преимуществом метода ЖХ по сравнению с ГХ в области селективного регулирования удерживания;
- из-за разнообразия способов фрагментации (тип узла фрагментации, его устройство, вид газа для столкновений, энергия фрагментации и пр.), спектры ионов-продуктов, получаемые на масс-спектрометрах различны.

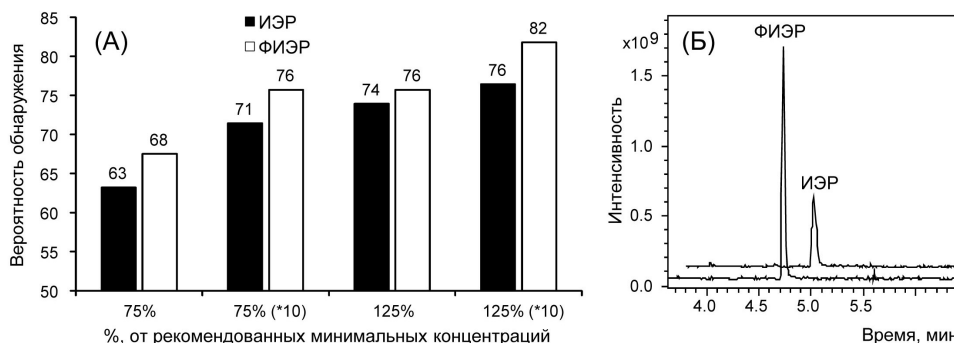


Рис. 16. Влияние вида ионного источника (обычного электрораспылительного, ИЭР, и фокусирующего, ФИЭР) на обнаружение 28 соединений в ПКМ Medidrug Drug U-Confirmation при десятикратном вводе (А). Увеличение интенсивности хроматографического пика метадона при переходе ИЭР → ФИЭР (Б)

Следствием этих причин является отсутствие в методе ЖХ-МСⁿ общепринятых способов измерения относительного удерживания (подобно индексам или фиксированным временам для ГХ). Основной величиной измерения удерживания являются абсолютные времена, жестко привязанные к условиям анализа. Большая часть распространяемых (коммерческих или бесплатных) библиотек времен удерживания не содержит.

Каждый производитель ЖХ-МСⁿ-систем создает собственные форматы хранения данных, причем единого обменного формата (подобно файлам MSP для ГХ-МС) не существует, а конвертация данных из одного формата в другой обычно затруднена.

Заключение

Несмотря на широчайшие возможности, метод жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии в его современной реализации не свободен от многочисленных ограничений. В области качественного скринингового анализа объектов биологического происхождения эти ограничения связаны, в основном, с дефицитом времени, неизбежно возникающем при информационно-зависимой регистрации масс-спектров, а также с их малой информативностью. Добиться снижения вероятности получения ложных результатов можно лишь комбинацией ЖХ-МСⁿ с иными методами, зарекомендовавшими себя в мировой практике судебного и токсикологического анализа и, в первую очередь, с газовой хроматографией/масс-спектрометрией. Учет возможностей и ограничений этих двух методов, дополняющих, но не заменяющих друг друга [4], необходим при проведении СХА и ХТА.

Список литературы

1. Niessen W.M.A. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, Third Edition. — Boca Raton, USA: CRC Press, 2006. — 632 p.
2. Al-Saffar Y., Stephanson N.N., Beck O. Multicomponent LC-MS/MS screening method for detection of new psychoactive drugs, legal highs, in urine — Experience from the Swedish population. *J. Chromatogr. B* 2013; 930: 112-120.
3. Maurer H.H. Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. *Clin. Biochem.* 2005; 38: 310-318.
4. Maurer H.H. What is the future of (ultra) high performance liquid chromatography coupled to low and high resolution mass spectrometry for toxicological drug screening? *J. Chromatogr. A* 2013; 1292: 19-24.
5. Website: <http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm> (accessed July, 2016).
6. Identification criteria for qualitative assays incorporating column chromatography and mass spectrometry, WADA Technical Document — TD2010IDCR. Website: http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/WADA_TD2010IDCRv1.0_Identification%20Criteria%20for%20Qualitative%20Assays_May%2008%202010_EN.doc.pdf (accessed September, 2012).
7. Bogusz M.J. Quality assurance aspects of identification with chromatographic — mass spectrometric methods. *Problems of Forensic Sciences* 2009; 77: 7-28.
8. Venisse N., Marquet P., Duchoslav E., et al. A general unknown screening procedure for drugs and toxic compounds in serum using liquid chromatography-electrospray-single quadrupole mass spectrometry. *J. Analyt. Toxicol.* 2003; 27: 7-14.
9. Weinmann W., Gergov M., Goerner M. MS/MS libraries with triple-quadrupole tandem mass spectrometers for drug identification and drug screening. *Analysis* 2000; 28: 934-941.
10. Wissenbach D.K., Meyer M.R., Remane D., Philipp A.A., Weber A.A., Maurer H.H. Drugs of abuse screening in urine as part of a metabolite-based LC-MSⁿ screening concept. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011; 40: 3481-3489.
11. Gergov M., Boucher G. B., Ojanpera I., et al. Toxicological screening of urine for drugs by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry with automated library search based on elemental formulas. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001; 15: 521-526.
12. Broecker S., Herre S., Pragst F. General unknown screening in hair by liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS). *Forensic Sci. Int.* 2012; 218: 68-81.
13. Kneisel S., Auwarter V. Analysis of 30 synthetic cannabinoids in serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry after liquid-liquid extraction. *J. Mass. Spectrom.* 2012; 47: 825-835.
14. Grigoryev A., Kavanagh P., Melnik A., Savchuk S., Simonov A. Gas and liquid chromatography-mass spectrometry detection of the urinary metabolites of UR-144 and its major pyrolysis product. *J. Anal. Toxicol.* 2013; 37: 265-276.
15. Shevyrin V., Melkozerov V., Nevero A., Eltsov O., Morzherin Y., Shafran Y. Identification and analytical properties of new synthetic cannabimimetics bearing 2,2,3,3-tetramethylcyclopropanecarbonyl moiety. *Forensic Sci. Int.* 2013; 226: 62-73.
16. *Handbook of Derivatives for Chromatography*, Second edition. Ed. by Blau K., Halket J.M. — Chichester, UK: — John Wiley & Sons, 1993. — 369 p.
17. Adamowicz P., Wrzesien W. Simple Approach for Evaluation of Matrix Effect in the Mass Spectrometry of Synthetic Cannabinoids *Journal of Analytical Chemistry.* 2016; 71: 794-802.
18. Keller B.O. Sui J. Young A.B., Whittall R.M. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2008; 627: 71-81.
19. Реброва С.И., Григорьев А.М., Крупина Н.А. Влияние вида электрораспылительного источника на обнаружение целевых аналитов в моче методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии. *Судебная медицина* 2016; 2: 109-110.
20. Website: http://www.medichem.de/PDF/DOA_E.pdf (accessed July, 2016).
21. Website: <http://www.ewdts.org> (accessed July, 2016).

**SCREENING PROCEDURES FOR ANALYSIS OF BIOLOGICAL OBJECTS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY:
POSSIBLE DIFFICULTIES**

Grigoryev A.M., Rebrova S.G., Krupina N.A.

Bureau of forensic-medical expertize
111401 Moscow, 1-th Vladimirskaya 33, build. 1

For correspondence: *Grigoriev Andrey*; e-mail: chrzond4250@yandex.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received: 15.08.2016.

The screening of biological objects for presence of xenobiotics which are dangerous to life and health is a dominant part of modern forensic-chemical and chemical-toxicological procedures. Until recently, the gas chromatograph coupled with mass spectrometer was the main screening tool. The improvement and cheapening of the mass spectrometers focused on the injection of liquid allows incorporating the liquid chromatography/mass spectrometry method into laboratory practice due to some of its undoubted advantages. This publication describes the main limitations of the method liquid chromatography/mass spectrometry application for screening of biological objects. Understanding of these limitations may be useful for analysts who plan the extension of the general analytical scheme by introducing a new method.

Keywords: LC-MS, GC-MS, screening, biological object