

Анализ вещества

УДК 543.51

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ С ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНЫМ УПРАВЛЕНИЕМ ИЗМЕРЕНИЯМИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПОДЛИННОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ПЕПТИДНОЙ И БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ

© Е. И. Беризовская¹, В. А. Максимов¹, К. Ю. Васильев¹, А. А. Ихалайнен¹,
А. М. Антохин¹, В. Ф. Таранченко¹, В. М. Гончаров¹, Д. А. Митрофанов¹,
А. В. Удинцев¹, А. В. Аксенов¹, И. А. Родин², О. А. Шпигун²

Статья поступила 9 июня 2015 г.

Описано использование масс-спектрометрии высокого разрешения в режиме интеллектуального управления измерениями для оценки подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы. Выбраны параметры масс-спектрометрического детектирования: потенциал и температура распылительного капилляра, диапазон масс детектируемых ионов и их зарядовых состояний, количество и время накопления ионов в орбитальной ловушке, длительность динамического исключения, ширина изоляции масс и энергия соударений.

Ключевые слова: рекомбинантный инсулин человека; рекомбинантный соматотропный гормон человека; высокоэффективная жидкостная хроматография; масс-спектрометрия; интеллектуальное управление измерениями.

В России участились случаи фальсификации лекарственных средств на основе биологически активных пептидов и белков [1 – 3], поэтому одной из актуальных задач является проверка подлинности их действующих веществ.

В настоящее время высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией (МС) является одним из самых распространенных методов в исследованиях пептидов и белков [4]. Для повышения производительности и достоверности установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы представляется целесообразным использовать алгоритм интеллектуального управления измерениями [Data Dependent Acquisition (DDA)], позволяющий в соответствии с заданными настройками автоматически выбирать ион-предшественник для фрагментации.

Группа Kalli A. проводила исследования по оптимизации условий анализа при интеллектуальном управлении измерениями с использованием масс-спектрометра высокого разрешения с орбитальной ловушкой LTQ-Orbitrap [5]. Показано влияние изменения таких параметров, как продолжительность динамического исключения, время накопления ионов, чис-

ло МС/МС экспериментов, энергия соударений [6, 7], разрешающая способность [8] на результаты идентификации пептидов и белков. Вышеприведенные исследования показали, что оптимизация данных параметров позволяет улучшить результаты идентификации высокомолекулярных соединений и тем самым повысить достоверность анализа.

Целью данной работы являлся выбор параметров масс-спектрометрического детектора высокого разрешения QExactive в режиме интеллектуального управления измерениями для увеличения надежности идентификации действующих компонентов лекарственных средств пептидной и белковой природы.

Реагенты и исследуемые соединения. Для проведения исследований использовали: рекомбинантный инсулин человека «Актрапид® НМ» (Novo Nordisk, Дания), рекомбинантный соматотропный гормон «Растан» (Фармстандарт-Уфавита, Россия). Препараты приобретены в сети розничных аптек г. Москвы.

Для приготовления подвижной фазы использовали ацетонитрил «для хроматографии» Chromasolv® (Merck, Германия), муравьиную кислоту (Fluka, Швейцария) и деионизованную воду с удельным сопротивлением 18,2 МОм/см, полученную с помощью установки NANO Pure (Thermo Scientific, США).

Для ферментативного расщепления готовили следующие растворы: денатурирующий буфер, восста-

¹ ФГУП «Научный центр «Сигнал», Москва, Россия;
e-mail: eiberizovskaya@rambler.ru

² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия.

навливающий буфер, раствор для алкилирования, буферный раствор для протеолиза и раствор трипсина.

Денатурирующий буфер. В мерную колбу вместимостью 10 мл вносили 1,52 г тиомочевина (Sigma, Германия), добавляли 8 мл воды, перемешивали вручную до полного растворения. Добавляли 49,86 мг натриевой соли дезоксихолевой кислоты (Sigma, США), 9,306 мг двузамещенного этилендиаминтетраацетата натрия (Sigma, США) и 90,75 мг Tris-HCl (Sigma, США), перемешивали и доводили объем раствора водой до 10 мл. Значение pH полученного раствора должно быть порядка 8.

Восстанавливающий буфер. В микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл (Eppendorf, Германия) вносили 132,95 мкл денатурирующего буфера, приготовленного по описанной ранее схеме, затем добавляли 4 мкл 500 мМ раствора трис-2-карбоксиэтилфосфина гидрохлорида (Sigma, США) и 26,1 мкл 1 М дитиотреитола (Sigma, США).

Раствор для алкилирования. В полипропиленовую пробирку объемом 1,5 мл вносили 10 мкл 9,2 М раствора 4-винилпиридина (Sigma, США), разбавляли в 10 раз добавлением 90 мкл диметилформамида (Sigma, США) и добавляли 100 мкл денатурирующего буфера. Проверили значение pH полученного раствора с помощью индикаторной бумаги (Sigma, Германия). Оно должно составлять порядка 9.

Буферный раствор для проведения протеолиза. В полипропиленовую пробирку объемом 1,5 мл вносили 40 мкл 1 М раствора триэтиламония бикарбоната (Sigma, США), 20 мкл 100 мМ раствора хлорида кальция (Sigma, США), добавляли 940 мкл воды и перемешивали.

Раствор трипсина из свиной поджелудочной железы. Трипсин из свиной поджелудочной железы (Sigma, США) поставляется в виалах, содержащих 20 мкг лиофилизированного продукта. Для получения раствора протеазы с концентрацией 200 нг/мкл содержимое виалы ресуспендировали в 100 мкл 1 мМ раствора HCl.

Условия ферментативного расщепления. В виале вместимостью 15 мл взвешивали (10 ± 2) мг исследуемого образца лекарственного средства, добавляли 10 мл деионизованной воды, закрывали крышкой и тщательно перемешивали с помощью мешалки «Вортекс».

В хроматографическую виалу вместимостью 15 мл вносили 0,1 мл исследуемого раствора лекарственного средства в деионизованной воде с концентрацией 1 мг/мл, приливали 9,9 мл метанола (Merck, Германия), закрывали крышкой, тщательно перемешивали с помощью орбитального шейкера и обрабатывали в ультразвуковой ванне. В микроцентрифужную пробирку объемом 2,0 мл (Eppendorf, Германия) переносили 10 мкл полученного раствора, добавляли 10 мкл восстанавливающего буфера, и полученную смесь инкубировали в течение 1 ч при температуре

42 °C для восстановления дисульфидных связей. Затем в раствор добавляли 1,8 мкл раствора для алкилирования и выдерживали 1 ч в темноте при комнатной температуре.

После алкилирования образцы разбавляли буферным раствором для проведения протеолиза в 10 раз и подвергали обработке трипсином, инкубируя в течение 6 ч при температуре 38 °C при молярном соотношении фермента и общего белка 1:50. Протеолиз останавливали добавлением в каждую пробу 2,5 мкл 5 %-ной муравьиной кислоты (Fluka, Германия). Полученный раствор центрифугировали с использованием центрифужных фильтров (Agilent Technologies, США) при $13\,000 - 15\,000 \text{ мин}^{-1}$ в течение 15 – 20 мин.

Условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования. Хроматографическое разделение проводили на колонке Zorbax 300SB-C18, $250 \times 2,1$ мм, размер частиц 5 мкм, размер пор 300 Å (Agilent Technologies, США). В качестве подвижных фаз использовали 0,1 %-ный раствор муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил: вода в объемном отношении 5:95 (А) и 0,1 %-ный раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (Б). Скорость потока подвижной фазы была постоянной и составляла 0,5 мл/мин. Состав элюента изменялся в соответствии с градиентом: 0 мин — 5 % Б; 2 – 20 мин — 5 – 95 % Б; 20 – 25 мин — 95 % Б; 25 – 25,01 мин — 95 – 5 % Б; 25,01 – 30 мин — 5 % Б. Время анализа с учетом стабилизации системы перед вводом следующего образца составляло 30 мин. Для обеспечения воспроизводимости времен удерживания колонку термостатировали при 30 °C. Объем вводимой пробы — 3 мкл.

Детектирование проводили с использованием масс-спектрометра с орбитальной ионной ловушкой QExactive (Thermo Scientific, Германия) и источником ионизации IonMax HESI-II, соединенным с высокоэффективным жидкостным хроматографом Ultimate 3000, который оснащен автосамплером Dionex Ultimate 3000 RS Autosampler, градиентным насосом Dionex Ultimate 3000 RS Pump, дегазатором и блоком для термостатирования хроматографической колонки в режиме регистрации положительных ионов. Напряжение на капилляре составляло 2 – 6 кВ, температура капилляра — 50 – 400 °C, скорость потока распыляющего газа (азота) — 40 ед., скорость потока вспомогательного газа (азота) — 10 ед. Измерения выполняли в диапазоне $50 - 2000 \text{ m/z}$. Тип ячейки соударительной диссоциации — HCD. Энергия диссоциации — $(30 \pm 15) \%$. Детектируемые зарядовые состояния — 2 – 5. Время накопления ионов в ловушке составляло 40 – 200 мс, количество ионов в орбитальной ионной ловушке — $2 \cdot 10^4 - 5 \cdot 10^6$, продолжительность динамического исключения — 20 – 110 мс, ширина изоляции масс — $1 - 4 \text{ m/z}$. Высокая разрешающая способность (35 000) позволила определять соотношения массы к заряду с точностью менее 5 ppm

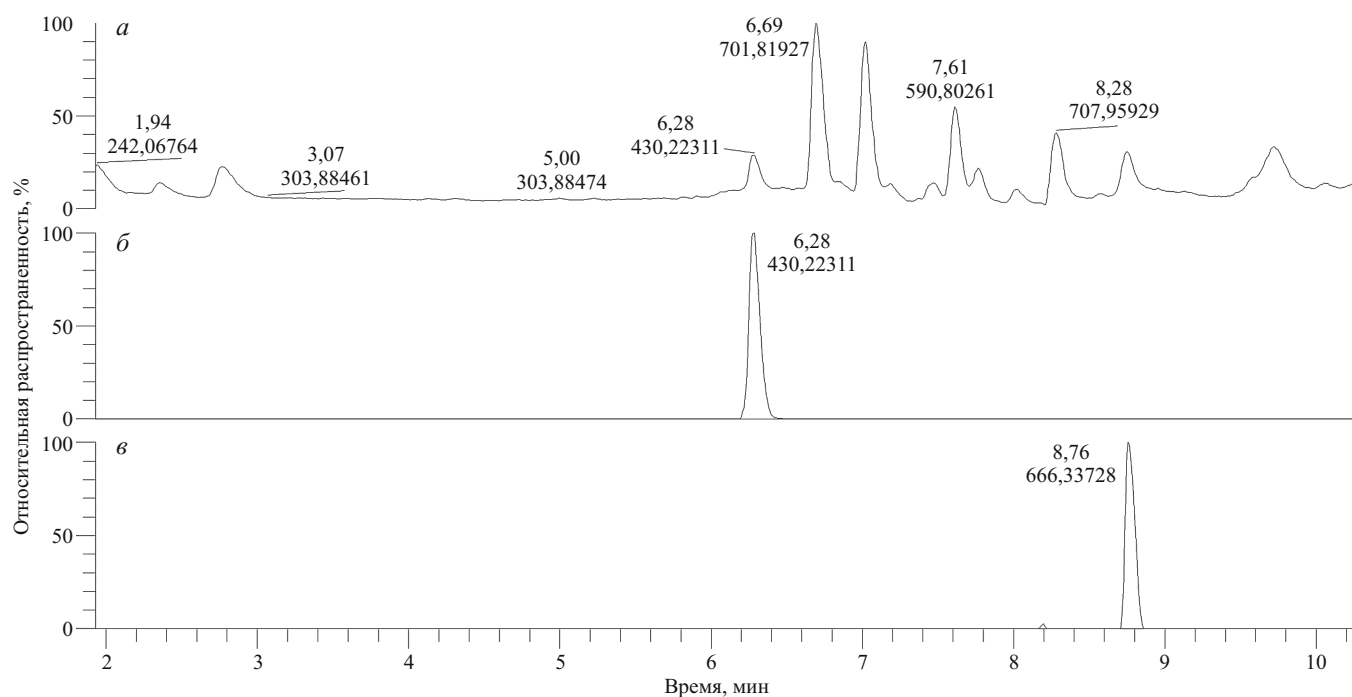


Рис. 1. Масс-хроматограммы раствора трипсинолизата рекомбинантного инсулина человека: *a* — по полному ионному току; *б* — по выделенному иону с m/z 430,2213; *в* — по выделенному иону с m/z 666,3381

и тем самым различать аминокислоты и их модификации с одинаковыми целочисленными массами. Фильтр для изоляции прекурсоров — квадрупольный фильтр масс. Прекурсор — моноизотопный пик из общего изотопного распределения.

Обработку данных проводили с применением программного обеспечения Xcalibur 2.2 (Thermo Finnigan, США). Для обработки масс-спектров и подтверждения аминокислотной последовательности использовали алгоритмы PEAKS PTM и SPIDER программного обеспечения PeakStudio 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Канада).

Для успешного применения алгоритма интеллектуального управления измерениями необходимо получить интенсивные сигналы ионов-предшественников исследуемых соединений для их дальнейшей фрагментации. На интенсивность сигнала влияют такие параметры источника ионизации, как потенциал, прикладываемый к капилляру, и его температура [9]. Для получения в автоматическом режиме информативных масс-спектров вторичных ионов необходимо оценить влияние параметров работы масс-спектрометра: энергии соударений, диапазона детектируемых зарядовых состояний, времени накопления ионов в ловушке, ширины изоляции масс, длительности динамического исключения, количества ионов в орбитальной ионной ловушке, диапазона сканирования детектируемых ионов [10].

Оценку влияния вышеуказанных параметров на результаты анализа проводили на примере рекомбинантного инсулина человека (РИЧ). Были выбраны два характеристических иона пептидов, полученных после расщепления трипси-

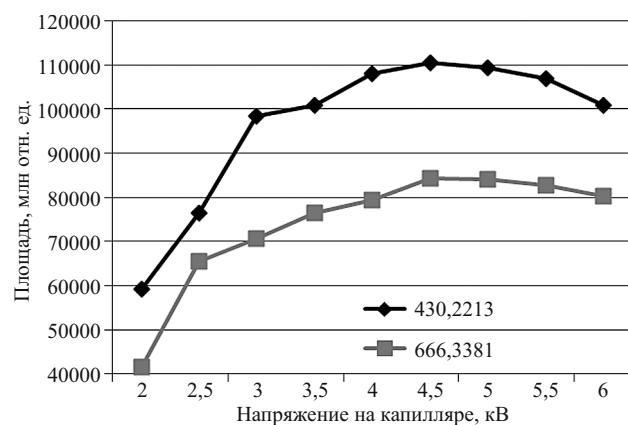


Рис. 2. Зависимость площадей пиков ионов с массами 430,2213 и 666,3381 от потенциала на капилляре источника электро-распыления

ном: GFFYTPK $[M+2H]^{2+}$ с m/z 430,2213 и FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK $[M+3H]^{3+}$ с m/z 666,3381. Масс-хроматограмма полученного лизата РИЧ представлена на рис. 1. Критерием установления оптимальных значений параметров источника ионизации является максимальная интенсивность сигналов выбранных ионов в масс-спектре.

Для установления оптимального значения потенциала на капилляре сравнивали площади пиков соответствующих ионов при напряжении от 2 до 6 кВ с шагом в 0,5 кВ. Полученные результаты представлены на рис. 2.

Из полученных результатов следует, что оптимальное значение потенциала на капилляре составляет 4,5 кВ. Это значение соответствует рекомендо-

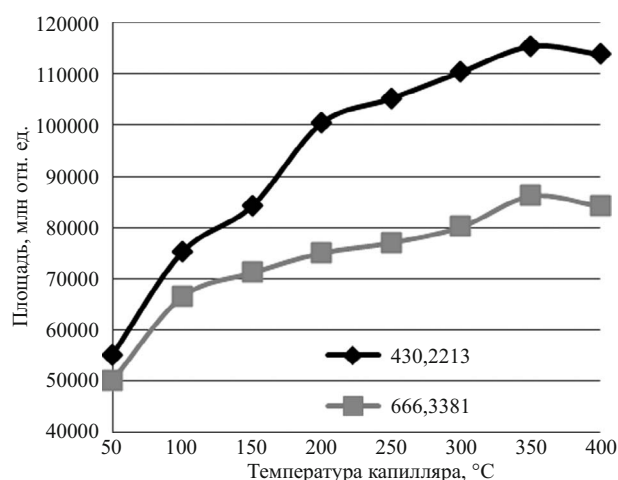


Рис. 3. Зависимость площадей пиков ионов с массами 430,2213 и 666,3381 от температуры капилляра

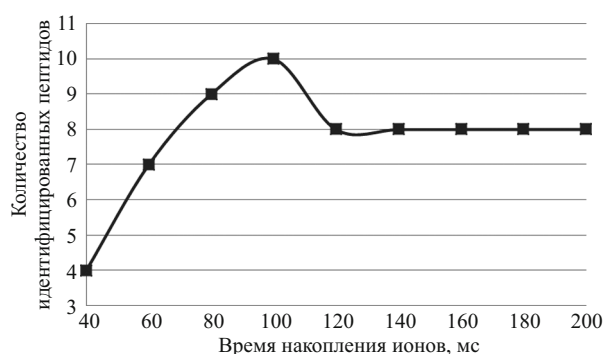


Рис. 4. Зависимость количества идентифицированных пептидов РИЧ от времени накопления ионов в орбитальной ионной ловушке

му диапазону значений данного параметра для масс-спектрометрического анализа высокомолекулярных соединений 3 – 6 кВ [11]. При напряжении на капилляре выше 5 кВ интенсивность сигналов выбранных ионов в масс-спектре снижается вследствие их фрагментации.

Для установления оптимального значения температуры капилляра сравнивали площади соответствующих ионов РИЧ при значениях оптимизируемого параметра от 50 до 400 °C с шагом в 50 °C. Полученные результаты представлены на рис. 3.

Из полученных результатов следует, что при используемом в работе потоке подвижной фазы 0,5 мл/мин оптимальное значение температуры капилляра составляет 350 °C. При температуре 400 °C интенсивность сигналов выбранных ионов РИЧ снижается вследствие их термолабильности.

Для получения масс-спектров вторичных ионов использовали профилирование энергии столкновений для HCD фрагментации со значением $(30 \pm 15) \%$.

Диапазон детектируемых зарядовых состояний в автоматическом режиме устанавливали от 2 до 5. Однозарядные ионы не использовали для МС/МС экспе-

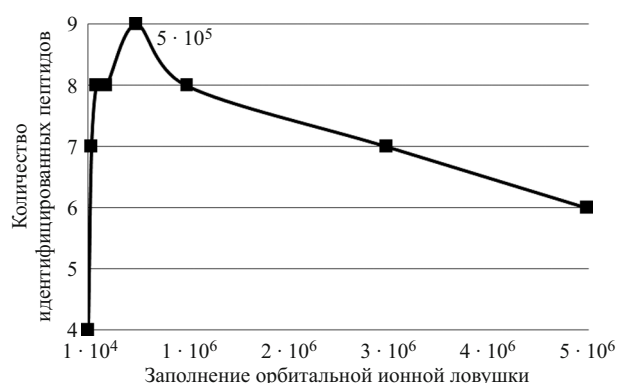


Рис. 5. Зависимость количества идентифицированных пептидов РИЧ от количества ионов в орбитальной ионной ловушке

риментов, поскольку в этом случае масс-спектры не являлись информативными, так как в основном принадлежали матрице. Полученные в ходе протеолиза короткие однозарядные пептиды не влияют на степень покрытия аминокислотной последовательности, поскольку для идентификации белков по базам данных требуются пептиды, состоящие минимум из 6 – 7 аминокислот.

Для оценки оптимального значения времени накопления ионов в орбитальной ионной ловушке сравнивали количество идентифицированных пептидов при значениях оптимизируемого параметра от 40 до 200 с шагом в 20 мс. Результаты представлены на рис. 4.

Из полученных результатов следует, что максимальное число идентификаций достигается при 100 мс накопления.

Для оценки оптимального значения количества ионов в орбитальной ионной ловушке сравнивали количество идентифицированных пептидов при вариации значений данного параметра от $2 \cdot 10^4$ до $5 \cdot 10^6$. Полученные результаты представлены на рис. 5.

Из полученных результатов следует, что оптимальное количество ионов в орбитальной ионной ловушке составляет $5 \cdot 10^5$.

Важно отметить, что количество и время накопления ионов в орбитальной ионной ловушке не являются независимыми параметрами. Получением масс-спектров второго порядка в автоматическом режиме будет управлять параметр, заданное значение которого достигается в первую очередь (если накопление установленного количества ионов в орбитальной ионной ловушке занимает больше заданного времени накопления ионов, то измерениями будет управлять второй параметр, а если меньше — первый).

Минимальный сигнал иона-предшественника автоматически выбирается программным обеспечением Xcalibur 2.2 в зависимости от установленного количества ионов в орбитальной ионной ловушке. При низких минимальных значениях данного параметра масс-спектр вторичных ионов включает очень много информации, что может привести к значительным нагрузкам на вычислительную систему, а при высоких

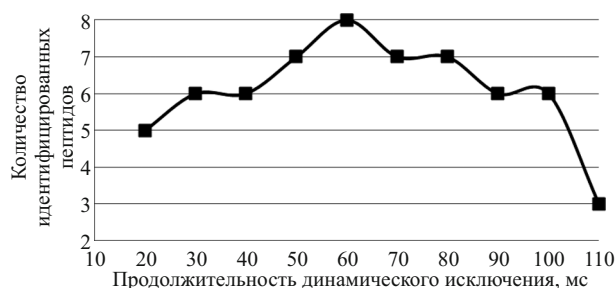


Рис. 6. Зависимость количества идентифицированных пептидов РИЧ от продолжительности динамического исключения

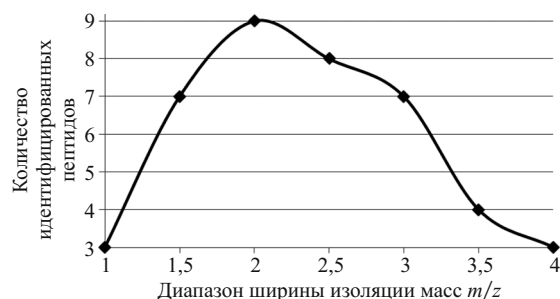


Рис. 7. Зависимость количества идентифицированных пептидов РИЧ от диапазона ширины изоляции масс

значениях данного параметра не будут получены масс-спектры вторичных ионов пептидов с небольшими интенсивностями сигналов ионов-предшественников и, следовательно, степень покрытия снизится.

Продолжительность динамического исключения является еще одним параметром интеллектуального управления измерениями. При использовании данного параметра фрагментированный ион помещается в список исключений и не подвергается повторной фрагментации в течение определенного времени. Для оптимизации длительности динамического исключения сравнивали количество идентифицированных пептидов при изменении данного параметра от 20 до 110 мс с шагом в 10 мс. Полученные результаты представлены на рис. 6.

Из полученных результатов следует, что оптимальное значение данного параметра составляет 60 мс. Для масс-спектрометров с орбитальной ионной ловушкой максимальное число исключения ионов составляет 500.

Диапазон ширины изоляции масс используют в режиме интеллектуального управления измерениями для изоляции ионов-предшественников. С целью оптимизации данного параметра сравнивали количество идентифицированных пептидов при его значениях от 1 до 4 шагом в 0,5 m/z . Полученные результаты приведены на рис. 7.

Из полученных результатов следует, что оптимальное значение данного параметра составляет 2 m/z . Установка узкого диапазона ширины изоляции масс приводит к снижению чувствительности вследствие потери информативных ионов, а широкий диапазон изоляции масс может привести к совместной изоляции и софрагментации соседних пептидов, что отрицательно скажется на степени идентификации аминокислотной последовательности.

При использовании интеллектуального управления измерениями была задействована опция, при которой для фрагментации отбирается моноизотопный пик из общего кластера изотопного распределения. Применение данного параметра значительно влияет на полноту покрытия аминокислотной последовательности.

Для установления оптимального значения диапазона сканирования детектируемых ионов сравнивали

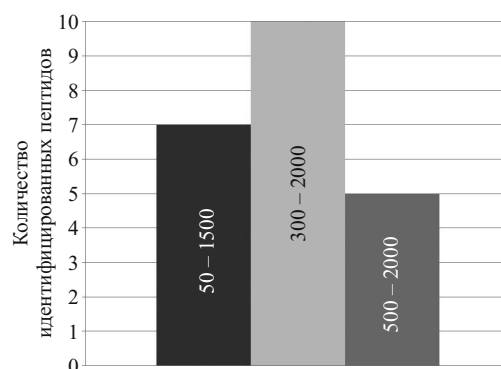


Рис. 8. Зависимость количества идентифицированных пептидов от диапазона сканирования детектируемых ионов для РИЧ

количество идентифицированных пептидов при значениях диапазонов масс детектируемых ионов 50 – 1500, 300 – 2000 и 500 – 2000 m/z . Результаты представлены на рис. 8.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что оптимальный диапазон масс детектируемых ионов — 300 – 2000 m/z , поскольку данный интервал позволяет детектировать короткие пептиды, но при этом не перегружен масс-спектрами вторичных ионов матрицы.

По результатам масс-спектрометрического анализа рекомбинантного инсулина человека с использованием оптимизированных параметров режима интеллектуального управления измерениями в растворе идентифицировано 10 пептидов, которые составили 100 % покрытия аминокислотной последовательности исследуемого анализата. Схема покрытия идентифицированного пептида представлена на рис. 9.

В результате проведенных исследований были выбраны параметры масс-спектрометрического детектирования с использованием режима интеллектуального управления измерениями. Условия, применяемые для оценки подлинности действующих веществ пептидной и белковой природы, представлены ниже:

Наименование параметра	Значение
Тип источника ионизации	HESI II
Напряжение на капилляре распылителя, кВ	4,5
Температура распылителя, °С	270

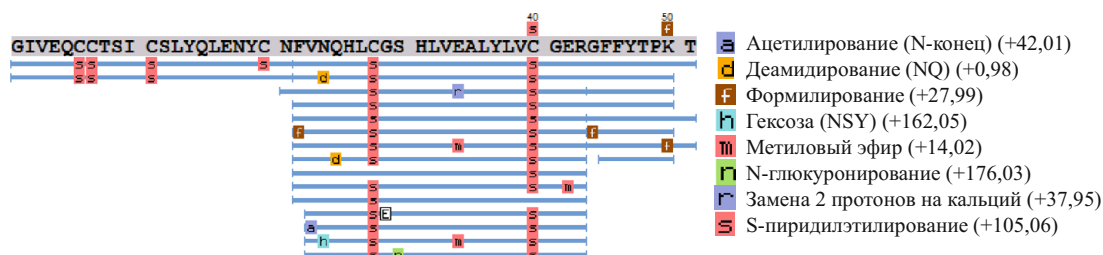


Рис. 9. Схема покрытия идентифицированного пептида — рекомбинантного инсулина человека

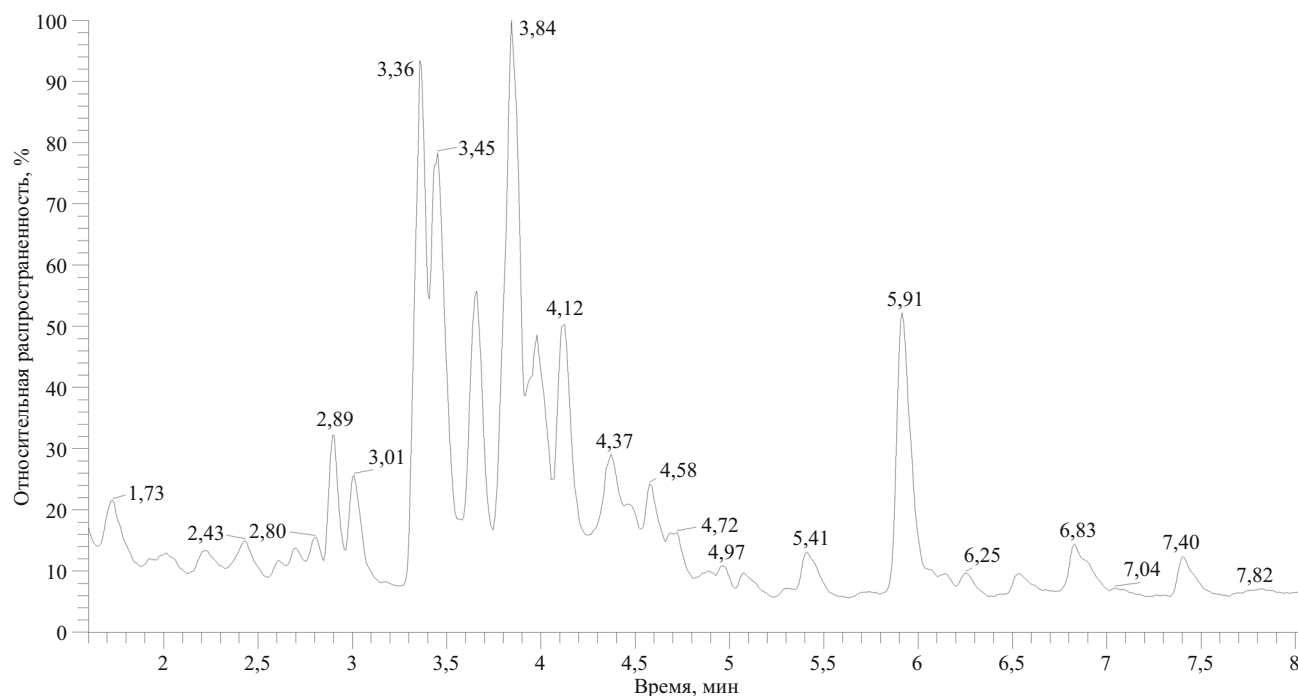


Рис. 10. Масс-хроматограмма раствора трипсинолизата соматотропина

Температура капилляра, °C 350
 Тип ячейки соударительной диссоциации Ячейка
 высокоэнергетической
 соударительной диссоциации (HCD)
 Энергия диссоциации, % 30 ± 15
 Детектируемое зарядовое состояние 2 – 5
 Количество ионов в орбитальной ионной ловушке. . . . $5 \cdot 10^5$
 Время накопления ионов, мс 100
 Продолжительность динамического исключения, мс. . . . 60
 Фильтр масс для изоляции прекурсоров Квадрупольный
 фильтр масс
 Ширина изоляции масс m/z 2,5
 Прекурсор Моноизотопный пик
 из общего изотопного распределения
 Диапазон детектируемых масс 300 – 2000
 Разрешение масс-спектрометра 35 000

Для апробации разработанного метода масс-спектрометрического детектирования с использованием режима интеллектуального управления измерениями был проанализирован препарат «Растан» на основе рекомбинантного соматотропного гормона человека (РСТГ).

Масс-хроматограмма полученного трипсинолизата РСТГ представлена на рис. 10.

Для обработки экспериментальных данных и подтверждения аминокислотной последовательности РСТГ использовали алгоритмы PEAKS PTM и SPIDER программного обеспечения PeakStudio 7.0. Схема покрытия идентифицированного аналита представлена на рис. 11.

По результатам масс-спектрометрического анализа в растворе идентифицировано 54 пептида, полученных в результате протеолиза РСТГ, которые составили 100 % покрытия аминокислотной последовательности исследуемого протеина.

Таким образом, в ходе проведенных исследований были выбраны условия масс-спектрометрического детектирования высокого разрешения при использовании режима интеллектуального управления измерениями, которые позволили достичь высокой степени идентификации компонентов лекарственных препаратов на основе рекомбинантного инсулина человека и рекомбинантного соматотропного гормона человека.

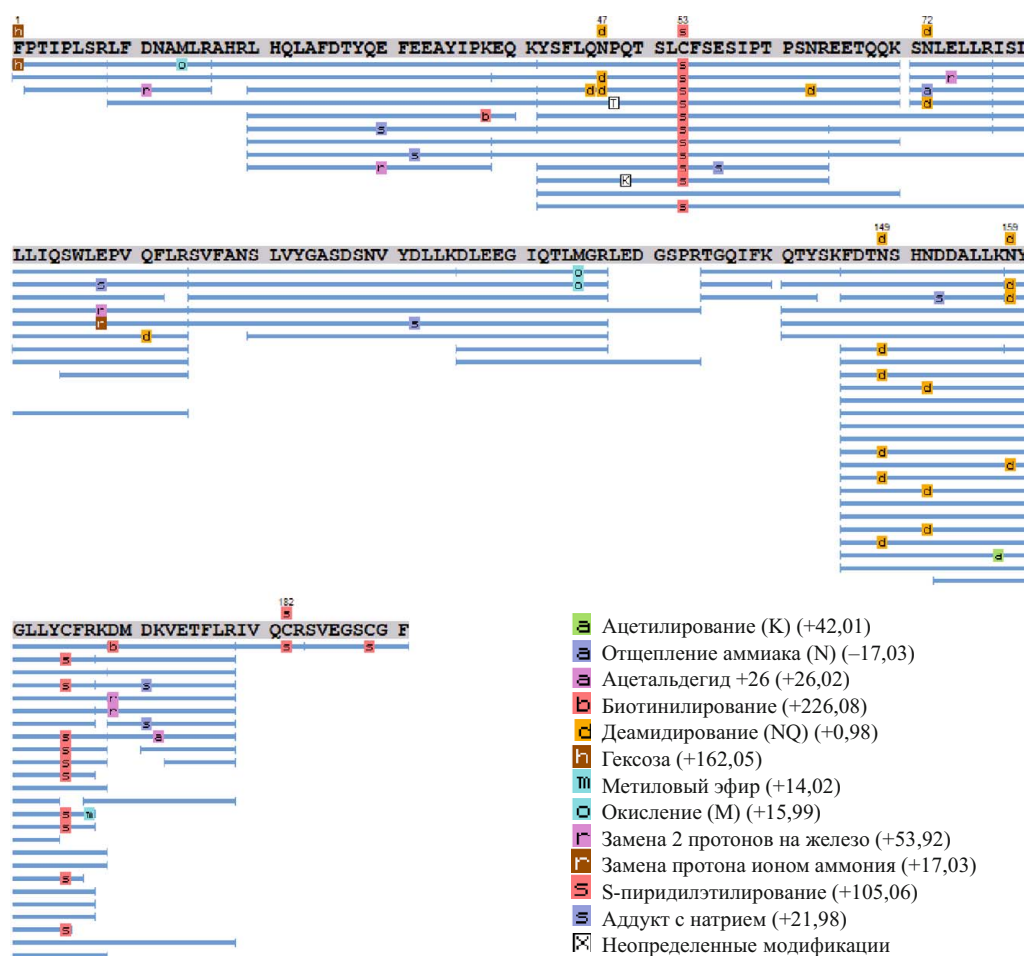


Рис. 11. Схема покрытия идентифицированного протеина — соматотропина

ЛИТЕРАТУРА

1. Ушкалова Е. А. Проблемы фальсификации лекарственных средств: фокус на антимикробные препараты / Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2005. Т. 7. № 2. С. 167 – 173.
2. Косенко В. В., Быков А. В., Мешковский А. П. Фальсифицированные лекарства — глобальная проблема / Вестник Росздравнадзора. 2009. № 3. С. 14 – 26.
3. Юмашева И. П. Фармацевтический рынок: проблема фальсификации лекарственных средств / Вестн. Томского гос. ун-та. 2011. Т. 16. № 3. С. 897 – 901.
4. Aebersold R., Mann M. Mass spectrometry-based proteomics / Nature. 2003. Vol. 422. N 6928. P. 198 – 207.
5. Kalli A., Smith G., Sweredoski M., Hess S. Evaluation and optimization of mass spectrometric settings during data-dependent acquisition mode: focus on LTQ-Orbitrap mass analyzers / J. Proteome Res. 2013. Vol. 12. N 7. P. 3071 – 3086.
6. Zhang Y., Wen Z., Washburn M., Florens L. Effect of dynamic exclusion duration on spectral count based quantitative proteomics / Anal. Chem. 2009. Vol. 81. N 15. P. 6317 – 6326.
7. Andrews G., Dean R., Hawkriged A., Muddiman D. Improving proteome coverage on a LTQ-Orbitrap using design of experiments / J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2011. Vol. 22. N 4. P. 773 – 783.
8. Kim M., Kandasamy K., Chaerkady R., Pandey A. Assessment of resolution parameters for CID-based shotgun proteomic experiments on the LTQ-Orbitrap mass spectrometer / J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2010. Vol. 21. N 9. P. 1606 – 1611.

9. Gaucher S., Taylor S., Fahy E., Zhang B., Warnock D., Ghosh S., Gibson B. Expanded coverage of the human heart mitochondrial proteome using multidimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry / J. Proteome Res. 2004. Vol. 3. N 3. P. 495 – 505.
10. Kalli A., Hess S. Effect of mass spectrometric parameters on peptide and protein identification rates for shotgun proteomic experiments on an LTQ-orbitrap mass analyzer / Proteomics. 2012. Vol. 12. N 1. P. 21 – 31.
11. Smith R., Loo J., Edmonds C., Barinaga C., Udseth H. New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization / Anal. Chem. 1990. Vol. 62. N 9. P. 882 – 899.

REFERENCES

1. Ushkalova E. A. Problemy fal'sifikatsii lekarstvennykh sredstv: fokus na antimikrobnye preparaty [Problem of counterfeit drugs: focus on antimicrobials] / Klin. Mikrobiol. Antimikrob. Khimioter. 2005. Vol. 7. N 2. P. 167 – 173 [in Russian].
2. Kosenko V. V., Bykov A. V., Meshkovskiy A. P. Fal'sifitsirovannyye lekarstva — global'naya problema [Counterfeit drugs: a global issue] / Vestnik roszdravnadzora. 2009. N 3. P. 14 – 26 [in Russian].
3. Yumasheva I. P. Farmatsevticheskii rynek: problema fal'sifikatsii lekarstvennykh sredstv [Pharmaceutical market: problem of falsification of medical products] / Vestn. Tomsk. Gos. Univ. 2011. Vol. 16. N 3. P. 897 – 901 [in Russian].
4. Aebersold R., Mann M. Mass spectrometry-based proteomics / Nature. 2003. Vol. 422. N 6928. P. 198 – 207.
5. Kalli A., Smith G., Sweredoski M., Hess S. Evaluation and optimization of mass spectrometric settings during data-dependent

- acquisition mode: focus on LTQ-Orbitrap mass analyzers / J. Proteome Res. 2013. Vol. 12. N 7. P. 3071 – 3086.
6. Zhang Y., Wen Z., Washburn M., Florens L. Effect of dynamic exclusion duration on spectral count based quantitative proteomics / Anal. Chem. 2009. Vol. 81. N 15. P. 6317 – 6326.
 7. Andrews G., Dean R., Hawkriged A., Muddiman D. Improving proteome coverage on a LTQ-Orbitrap using design of experiments / J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2011. Vol. 22. N 4. P. 773 – 783.
 8. Kim M., Kandasamy K., Chaerkady R., Pandey A. Assessment of resolution parameters for CID-based shotgun proteomic experiments on the LTQ-Orbitrap mass spectrometer / J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2010. Vol. 21. N 9. P. 1606 – 1611.
 9. Gaucher S., Taylor S., Fahy E., Zhang B., Warnock D., Ghosh S., Gibson B. Expanded coverage of the human heart mitochondrial proteome using multidimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry / J. Proteome Res. 2004. Vol. 3. N 3. P. 495 – 505.
 10. Kalli A., Hess S. Effect of mass spectrometric parameters on peptide and protein identification rates for shotgun proteomic experiments on an LTQ-orbitrap mass analyzer / Proteomics. 2012. Vol. 12. N 1. P. 21 – 31.
 11. Smith R., Loo J., Edmonds C., Barinaga C., Udseth H. New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization / Anal. Chem. 1990. Vol. 62. N 9. P. 882 – 899.

УДК 543.421:546.19

ПЕРМАНЕНТНЫЕ СОРБЕНТЫ-МОДИФИКАТОРЫ ДЛЯ ЭЛЕКТРОТЕРМИЧЕСКОГО АТОМНО-АБСОРБЦИОННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЫШЬЯКА С ФОТОХИМИЧЕСКОЙ ГЕНЕРАЦИЕЙ ПАРОВ АНАЛИТА¹

© М. Ю. Бурылин, К. А. Романовский, А. В. Княгиничев²

Статья поступила 13 марта 2015 г.

Изучены свойства перманентных сорбентов-модификаторов (иридий, карбиды циркония и вольфрама) для концентрирования газообразного триметиларсина с последующим электротермическим атомно-абсорбционным определением мышьяка. Триметиларсин получали методом фотохимической генерации с использованием реактора оригинальной конструкции. Обоснована целесообразность введения активированного угля в процессе обработки графитовой печи вольфрамом для получения наночастиц карбида, которые повышают эффективность сорбции. Оптимизированы режимы фотохимической генерации и отгонки триметиларсина, а также температурные условия концентрирования и атомизации мышьяка. Разработанная аналитическая методика применена для определения As в водопроводной воде. Абсолютный и концентрационный пределы обнаружения мышьяка, вычисленные по 3 σ -критерию, составили 0,38 нг и 31 нг/л соответственно.

Ключевые слова: электротермическая атомно-абсорбционная спектроскопия; концентрирование; перманентные модификаторы; фотохимическая генерация паров; мышьяк; триметиларсин.

Важным направлением в развитии аналитической атомной спектроскопии является разработка альтернативного способа ввода проб путем генерации летучих производных аналита [1]. Предварительное выделение аналита в газовую фазу позволяет отделить матричные компоненты, повысить эффективность использования образца, осуществить нехроматографическое разделение форм и в итоге — значительно улучшить аналитические характеристики метода.

¹ Исследования проведены в рамках выполнения проектов Государственного задания Минобрнауки РФ (проект № 4.873.2014/К), Российского фонда фундаментальных исследований и Администрации Краснодарского края (гранты № 13-03-96500 р_юг_а и № 13-03-00392) с использованием научного оборудования ЦКП «Эколого-аналитический центр» КубГУ.

² Кубанский государственный университет, г. Краснодар, Россия; e-mail: romanum22@gmail.com

В электротермической атомно-абсорбционной спектроскопии (ЭТААС) графитовая печь (ГП) может быть использована для концентрирования газообразных соединений аналита с их последующей атомизацией, что существенно снижает пределы обнаружения вплоть до единиц нг/л [2].

Такой подход широко применяют при определении мышьяка. Летучие формы, которые используют при этом, включают: гидрид мышьяка (арсин), получаемый при химической генерации с тетрагидроборатом натрия [3] или электрохимически [4], хлорид мышьяка [4], а также различные алкилпроизводные, получаемые методом фотохимической генерации (ФХГ) [5]. Последний подход предусматривает ультрафиолетовое облучение анализируемого раствора с добавкой низкомолекулярного органического соединения (НМОС) (для мышьяка наиболее часто при-