
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

УДК 543+ 544.173+ 504.064

© Я. В. Русских, Е. Н. Чернова, Л. В. Некрасова,
В. С. Царев, Е. П. Подольская, З. А. Жаковская

СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИАНОТОКСИНОВ (АНАТОКСИНА-А И МИКРОЦИСТИНА-RR) МЕТОДОМ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ ИОННЫХ ЛОВУШЕК

В работе сравниваются результаты хромато-масс-спектрометрического определения цианобактериальных токсинов на примере анатоксина-а (Ana-a) и микроцистина-RR (MC-RR) на приборах с различными типами ионных ловушек. Рассматриваются данные, полученные на хромато-масс-спектрометрах LCMS-IT-TOF (фирмы "Shimadzu") и LTQ Orbitrap (фирмы "Thermo Finnigan"). Исследования проводили на растворах стандартов и модельных системах.

Кл. сл.: цианотоксины, хроматография, масс-спектрометрия, tandemная масс-спектрометрия, преобразование Фурье, линейная ионная ловушка

ВВЕДЕНИЕ

В связи с увеличением антропогенной нагрузки вегетация (цветение) сине-зеленых водорослей (цианобактерий) становится все более интенсивной и широко распространенной даже в ранее "нецветущих" водоемах. Известно, что некоторые метаболиты цианобактерий — цианотоксины — представляют опасность для здоровья людей и животных [1–3]. Цианотоксины различают по способу воздействия на живые организмы на несколько групп, из которых для пресноводных водоемов наиболее актуальны нейротоксины (анатоксины) и гепатотоксины (микроцистины) [2, 4–7].

Биоаналитические методы определения микроцистинов (иммуноферментный анализ ELISA и исследования ингибирования фосфатазной активности белков) [8–10] успешно применяются в качестве первичного тестового анализа в полевых условиях. Однако для нейротоксинов и микроцистинов требуются раздельное ферментное ингибирование и иммуноферментный анализ.

Для раздельного определения данных групп токсичных соединений используются различные физико-химические методы [11–13]. С их помощью возможно проводить разделение компонентов смеси и их количественное определение, т. к. различные микроцистины обладают различной токсичностью. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием, широко использовавшийся ранее, может быть недостаточно селективным и определять в основном общее количество микроцистинов, поскольку они

имеют сходные УФ-спектры поглощения, а анатоксины практически не поглощают в УФ-диапазоне [12]. Надежная идентификация в этом случае требует дорогостоящих стандартных образцов всех обнаруженных токсинов. Кроме того, влияние матрицы может уменьшать чувствительность аналитического определения.

Метод жидкостной хроматографии—масс-спектрометрии (LC-MS) лишен этих недостатков, особенно в сочетании с tandemной масс-спектрометрией (MS-MS) высокого разрешения, применяемой в анализе цианотоксинов в последние годы [14–16]. В этом случае надежность идентификации достигается сочетанием информации, полученной из фрагментных масс-спектров и точных значений молекулярных масс, избирательно характеризующих определяемые соединения.

В последнее время уделяется большое внимание проблеме интеркалибрации результатов, полученных различными лабораториями на разном оборудовании. Поэтому было интересно сравнить результаты хромато-масс-спектрометрического определения цианобактериальных токсинов на примере анатоксина-а и микроцистина-RR, полученные на хромато-масс-спектрометрах LCMS-IT-TOF (фирмы "Shimadzu") и LTQ Orbitrap (фирмы "Thermo Finnigan"). Была разработана методика определения присутствия цианотоксинов в природной воде методом высокоэффективной жидкостной хроматографии—масс-спектрометрии высокого разрешения с использованием tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения.

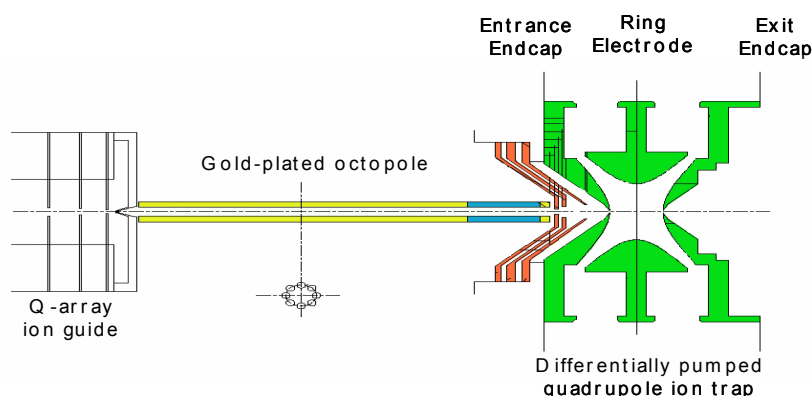


Рис. 1. Принципиальная схема прибора LCMS-IT-TOF (фирмы "Shimadzu")

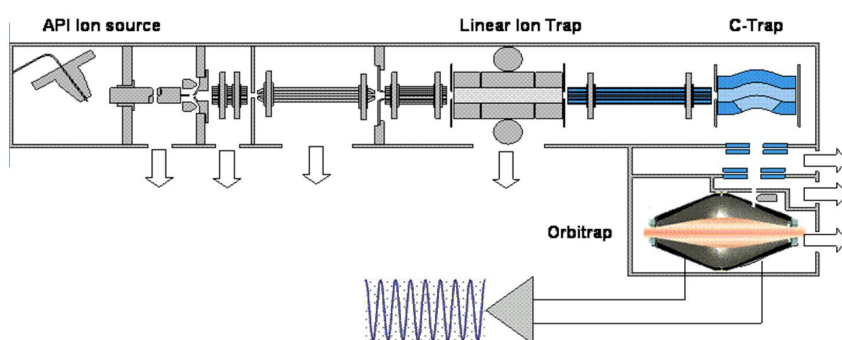


Рис. 2. Принципиальная схема прибора LTQ Orbitrap (фирмы "Thermo Finnigan")

Хромато-масс-спектрометр LCMS-IT-TOF (Shimadzu) является комбинацией жидкостного хроматографа и масс-спектрометра с системой ввода образца электроспреей (ESI), ионной ловушкой и времяпролетным детектором. Прибор может одновременно регистрировать спектры положительных и отрицательных ионов (время переключения 100 мс). Эффективность ввода ионов в ионную ловушку и высокую чувствительность в MS^n -режимах (CID) (чувствительность по резерпину в MS - MS режиме — 5 пг при соотношении сигнал/шум 50:1) обеспечивает устройство компрессионной инжекции ионов в систему ионной оптики из жидкостного хроматографа. Прибор оснащен квадрупольной ионной ловушкой с технологией "охлаждения" ионов с использованием аргона. Двухступенчатый рефлектор (DSR) и баллистическая экстракция ионов (BIE) позволяют проводить MS^n -анализ до MS^{10} , обеспечивая высокое разрешение ($R \geq 10\,000$) и высокую точность (5 ppm — с внутренним стандартом и 10 ppm — с внешним) во всех использовавшихся режимах работы: MS , MS - MS (MS^2) и MS - MS - MS (MS^3). Рабочий режим находится в интервале масс m/z от 50 до 5000 (3000 при MS - MS). Рекомендуемая точность выделения иона-прекурсора — 3 Да. Принципиальная схема прибора LCMS-IT-TOF представлена на рис. 1.

LTQ Orbitrap (Thermo Finnigan) является комбинацией высокоэффективного жидкостного хроматографа и tandemного масс-спектрометра высокого разрешения. В приборе предусмотрены различные способы ионизации образца: электроспреей (ESI), химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI), атмосферная фотоионизация (APPI). Разделение ионов осуществляется в двух видах ионных ловушек: в линейной квадрупольной ловушке CID, которая может работать как отдельный прибор, и в орбитальной ловушке. Стандартный режим работы LTQ Orbitrap предусматривает время сканирования в 1 с, из которых 750 мс ионы находятся в орбитальной ловушке, где происходит их детектирование. Так как путь переноса ионов в орбитальную ловушку короток и ионы ускоряются линзами ионной оптики переноса, отсутствует эффект дискриминации по массам за счет времяпролетного эффекта. А малая величина целевого значения ионного времени позволяет повысить качество MS^n .

Прибор имеет широкий динамический диапазон (m/z от 50 до 2000 или от 200 до 4000), высокую чувствительность (при использовании внешнего стандарта — 5 ppm, при использовании внутреннего стандарта — 2 ppm), разрешение 30 000 или 60 000. Tandемные масс-спектры можно регистрировать в ионной ловушке в CID-режиме и/или

в орбитальной ловушке в HCD или PQR-режимах при заданной варьируемой энергии столкновений в диапазоне от 1 до 100 %. Точность определения масс не зависит от интенсивности пиков и является достаточно постоянной величиной в пределах калибровки (от недели до месяца) при неизменной температуре в помещении.

Принципиальная схема прибора LTQ Orbitrap (фирмы "Thermo Finnigan") приведена на рис. 2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе использованы следующие реактивы: ацетонитрил сорта "0" Кριοхром и Super Gradient (LAB SCAN, Ireland); метанол марки LC-MS CHROMASOLV (Fluka); бидистиллированная вода, полученная с помощью системы Milli-Q (Millipore, электропроводность 0.056 мкСм/см при 25 °C); трифторуксусная кислота (ТФУ), очищенная перегонкой. Аналитические стандарты: анатоксин-а фумарат (A. G. Scientific, Inc., CA и TOCRIS bioscience, UK), микроцистин-RR (Alexis Biochemicals).

Использовали растворы смеси стандартов различной концентрации и модельные растворы, которые готовили следующим образом. К 100 мл природной воды добавляли по 10 мкг каждого аналитического стандарта и выдерживали в течение 40 мин. pH полученной смеси доводили до 10 добавлением 1 М раствора NaOH по каплям, а затем пропускали через диски для твердофазной экстракции ENVI-18 DSK (диаметр 47 мм, Supelco) в течение 40 мин. После фильтрации диски сушили в токе воздуха до постоянной массы. Аналиты элюировали 50 мл метанола в течение 15 мин. Фильтрацию и элюирование проводили с по-

мощью водоструйного насоса. Элюат концентрировали до влажного остатка на роторном испарителе и перерастворяли в 1.5 мл водно-ацетонитрильной (95:5) смеси, содержащей 0.01 % ТФУ.

Для хроматографического разделения использовали колонку с обращенной фазой C-18 Thermo Hypersil Gold 100 × 3 мм, зернение 3 мкм, в градиентном режиме хроматографирования. Элюент А — 0.01 %-й водный раствор ТФУ. Элюент В — 0.01 %-й раствор ТФУ в ацетонитриле. Градиент: 0–2 мин — 5 % В; 2–12 мин — 5–75 % В; 17.0–17.1 мин — 75–5 % В. Поток элюента 0.2 мл/мин.

Масс-спектрометрический анализ на обоих приборах проводили в условиях электрораспылительной ионизации в режиме регистрации положительных ионов. На LCMS-IT-TOF масс-спектры регистрировали в интервале масс m/z 100–650 Да, напряжение на детекторе составляло 1.6 кВ.

MS²-режим: CID (ионная ловушка), энергия столкновений 5–50 %, энергия газа (соударений) Col. Gas 50 %, q (Frequency) = 0.169. На хромато-масс-спектрометре Orbitrap масс-анализатор в режиме MS¹ — орбитальная ловушка, разрешение 30 000. Диапазон масс m/z 100–1200 Да. MS²-режим: HCD (орбитальная ловушка) или CID (ионная ловушка), энергия столкновений 5–45 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С использованием описанных выше приборов были получены УФ- и масс-спектры растворов исследуемых стандартов (анатоксина-а и микроцистина-RR) и модельных растворов, содержащих добавки указанных стандартов. При сравнении УФ-спектров проб отмечено, что лучшее разделение,

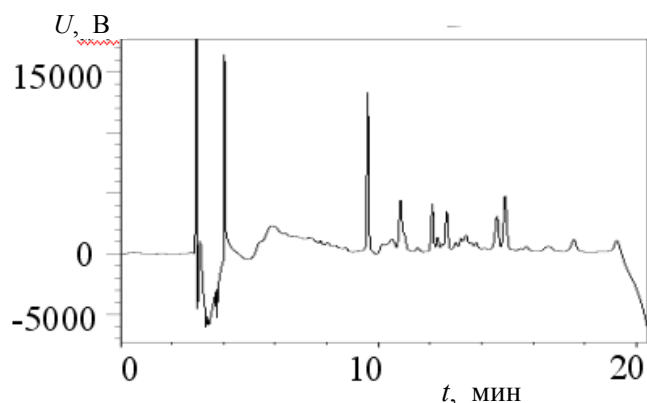


Рис. 3. Хроматограмма раствора смеси стандартов MC-RR и Ана-а (по 3.5 нг на ввод), полученная с использованием PDA-матрицы прибора LCMS-IT-TOF

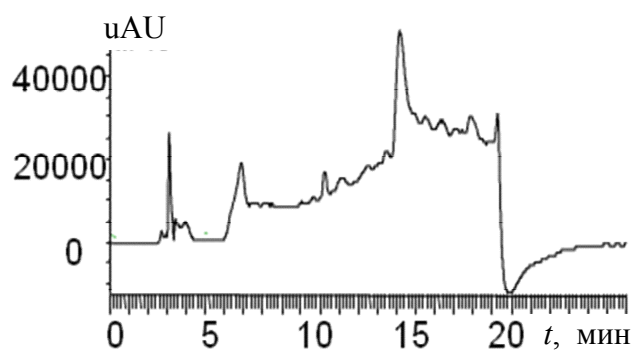


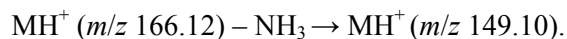
Рис. 4. Хроматограмма раствора смеси стандартов MC-RR и Ана-а (по 1 нг на ввод), полученная с использованием хроматографа Accela (LTQ Orbitrap)

более четкие пики и ровная фоновая линия достигаются на PDA-матрице хроматографа фирмы "Shimadzu" (рис. 3). Хроматограммы, полученные с помощью хроматографа Accela ("Thermo Finnigan"), часто не дают нужной информации, т. к. имеют нестабильную "плывущую" фоновую линию, что существенно осложняет обработку нужного хроматографического пика (рис. 4).

При анализе масс-спектрометрических данных идентификацию соединений проводили по точным массам ионов и хроматографическим временам удерживания (совпадение с аналитическим стандартом в пределах 0.3 мин). Для анатоксина-а характерным является положительно-заряженный ион MH^+ с m/z 166.12, микроцистин-RR отслеживали по двухзарядному иону $M2H^+$ с m/z 519.79. Результаты определения аналитов в модельных растворах выборочно подтверждали фрагментными спектрами MS-MS, сравнивая экспериментальные масс-спектры модельных растворов со спектрами аналитических стандартов анатоксина-а и микроцистина-RR. При анализе стандарта MC-RR (в концентрации 100 нг/мл) мы практически не наблюдали пика однозарядного протонированного иона 1038.57, но четко фиксировали сигнал двухзарядного протонированного иона 519.79 (см. Приложение, рис. П1, П2). В структуре MC-RR содержится 2 концевых остатка аргинина с легко протонируемыми фрагментами гуанидина, что и приводит к появлению сигнала двухзарядного протонированного иона в его масс-спектре [16, 17] в отличие от большинства других микроцистинов и нодуларинов (представители второй группы гепатотоксинов). Поэтому именно этот ион был выбран в качестве родительского иона для (MS-MS)-анализа. Порог устойчивого обнаружения микроцистина-RR из растворов стандарта составлял 0.5 нг на ввод в SIM-режиме — для LCMS-IT-TOF и 0.1 нг на ввод — для LTQ Orbitrap. Для анатоксина-а эти величины составили 0.25 и 0.05 нг на ввод соответственно (Приложение, рис. П3).

Тандемная масс-спектрометрия на хромато-масс-спектрометрах LCMS-IT-TOF (фирмы "Shimadzu") и LTQ Orbitrap (фирмы "Thermo Finnigan") имеет существенные отличия.

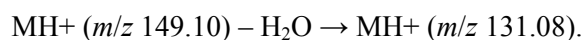
При использовании LCMS-IT-TOF (временнóлетного хромато-масс-спектрометра) получали тандемные спектры с варьированием величины энергии столкновительной диссоциации CID (от 1 до 50 %). В этих условиях на (MS-MS)-спектре анатоксина-а присутствуют только 2 фрагмента с массами m/z : 166.12 — протонированный молекулярный ион и 149.10 — фрагментарный ион, полученный при потере родительским ионом анатоксина-а молекулы аммиака NH_3 (Приложение, рис. П4):



На LTQ Orbitrap тандемные спектры получали в 2-х режимах:

- с фрагментацией в линейной ловушке и регистрацией полученных фрагментов в орбитальной ловушке (CID—FTMS)

- и с фрагментацией и регистрацией в орбитальной ловушке (HCD—FTMS). Это позволило получить точные значения фрагментных масс. В обоих случаях на тандемных спектрах анатоксина-а кроме указанных уже ионов наблюдается также ион с m/z 131.08 (приложение, рис. П5), который соответствует потере воды ($-H_2O$) [17]:



В спектре MS-MS микроцистина-RR, полученном на LCMS-IT-TOF, наблюдали дочерние ионы с m/z 440.98, 298.17 и 135.10 (рис. П6). Дочерний ион с m/z 135.11 является характерным для всех микроцистинов ионом, соответствующим немодифицируемому Adda-фрагменту конечного распада микроцистинов — эритро-2-метил-3-метокси-4-фенилмасляной кислоты ($PhCH_2CH(OCH_3)CH(CH_3)COOH$) [7, 14].

Тандемные спектры MC-RR, полученные на LTQ Orbitrap в режимах HCD—FTMS и CID—FTMS (энергия разбиения от 5 до 45 %) представлены на рис. П7. В режиме HCD—FTMS не удалось подобрать мягких условий фрагментации, и молекулы MC-RR либо не претерпевали деструкции (при 5–25 %), давая в масс-спектре лишь ион прекурсора, либо фрагментировались (при 25–45 %) до четкого интенсивного пика Adda-фрагмента с m/z 135.08 (рис. П7, а).

В режиме CID при малой величине энергии (10–15 %) также регистрировали только двухзарядный ион, но при ее увеличении наблюдали интенсивные ионы фрагментов (рис. П7, б).

Для анализа данных, полученных из тандемных масс-спектров, была использована программа Mass Frontier 5.0 ("Thermo"), которая позволяет рассчитать все теоретически возможные варианты фрагментации этого соединения и структуры заряженного и нейтрального фрагментов. Такая информация значительно облегчает идентификацию изомеров, а в случае исследования проб неизвестного состава позволяет уточнить структуры исследуемых соединений.

Известно, что MC-RR имеет два изомера (рис. 5). Сопоставление теоретических данных, полученных при помощи программы Mass Frontier 5.0 для фрагментации изомеров 1 и 2, с данными реального спектра показало, что в спектре MS-MS стандарта MC-RR наряду с ионами, встречающимися

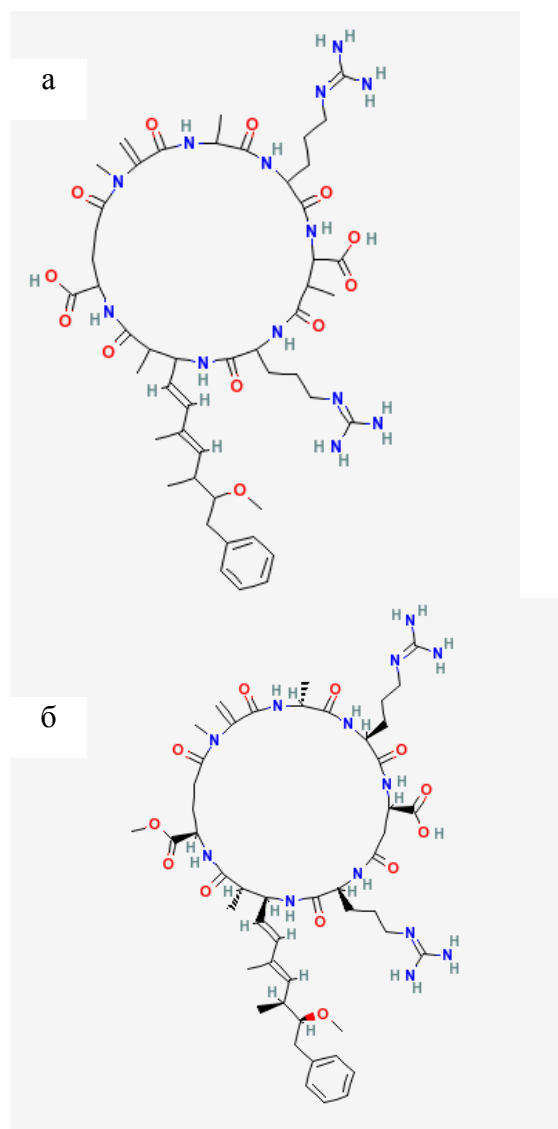


Рис. 5. Структуры изомеров MC-RR $C_{49}H_{75}N_{13}O_{12}$, $M_{\text{Ex}} = 1038.1997$ [г/моль].
 а — изомер 1 (CID: 4111340);
 б — изомер 2 (CID: 23248162)

при распаде обоих изомеров (m/z 1020.56, 519.79, 505.79, 452.75, 311.18, 157.11, 135.08), присутствуют ионы, характерные только для фрагментации изомера 1, — 440.22, 423.20, 357.19, 213.09. Следовательно, данный спектр можно приписать изомеру 1 стандарта MC-RR. Данный вывод можно было сделать лишь на основе результатов масс-спектрометрического анализа, выполненного на приборе LTQ Orbitrap, т. к. сигналы, соответствующие ионам при фрагментации изомера 1, в масс-спектрах на LCMS-IT-TOF отсутствуют. Возможно, это связано с трудностями подбора условий для удачного протекания данного пути фрагментации.

Из полученных данных можно заключить, что оба прибора позволяют надежно обнаруживать и идентифицировать цианотоксины, в том числе в составе сложных матриц. Использование прибора LTQ Orbitrap позволяет получить более полную информацию о структуре исследуемых соединений.

Работа выполнена при поддержке проекта РФФИ № 10-08-00895-а "Создание портативной биоаналитической системы для определения нейротоксинов на основе планарных электрохимических биосенсоров для целей экологического мониторинга".

ПРИЛОЖЕНИЕ

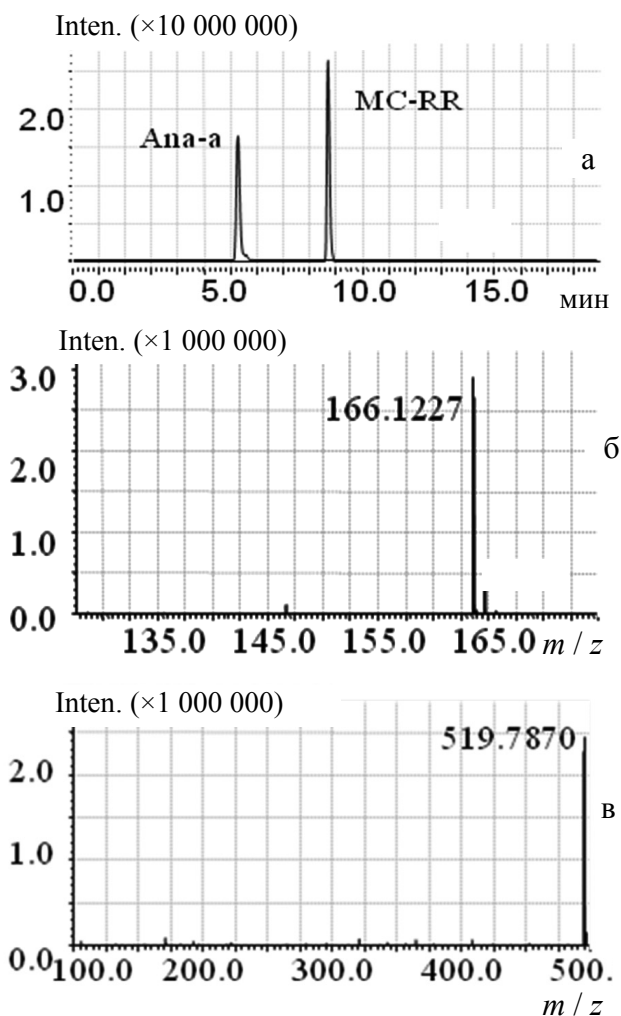


Рис. П1. Результаты анализа LCMS-IT-TOF.
 а — масс-хроматограмма (SIM) раствора смеси стандартов MC-RR и Ана-а (по 3.5 нг на ввод);
 б — масс-спектр раствора стандарта Ана-а (3.5 нг на ввод);
 в — масс-спектр раствора стандарта MC-RR (3.5 нг на ввод)

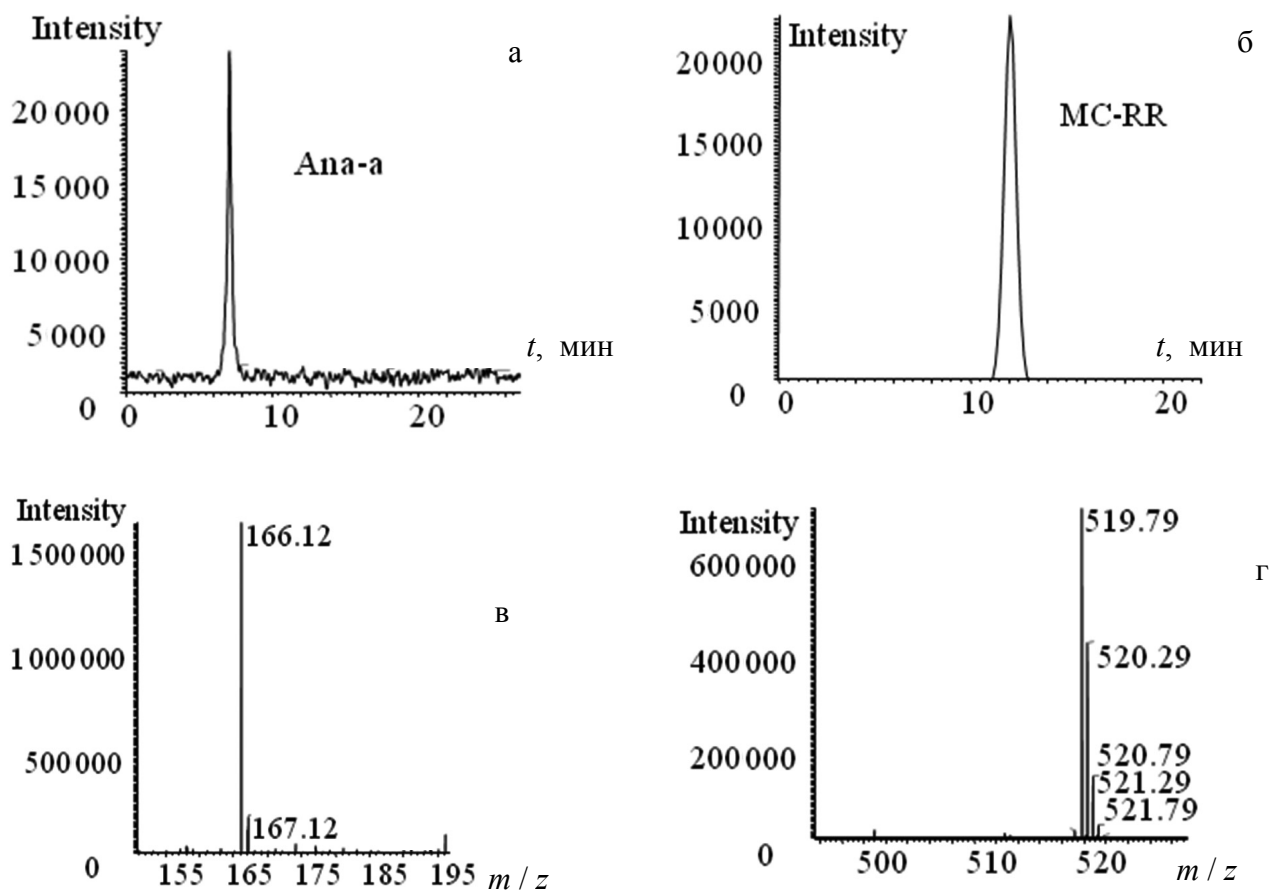


Рис. П2. Результаты анализа LTQ Orbitrap.

а — масс-хроматограмма (SIM) раствора стандарта Ана-а (1 нг на ввод); б — масс-хроматограмма (SIM) раствора стандарта MC-RR (1 нг на ввод); в — масс-спектр раствора стандарта Ана-а (1 нг на ввод); г — масс-спектр раствора стандарта MC-RR (1 нг на ввод)

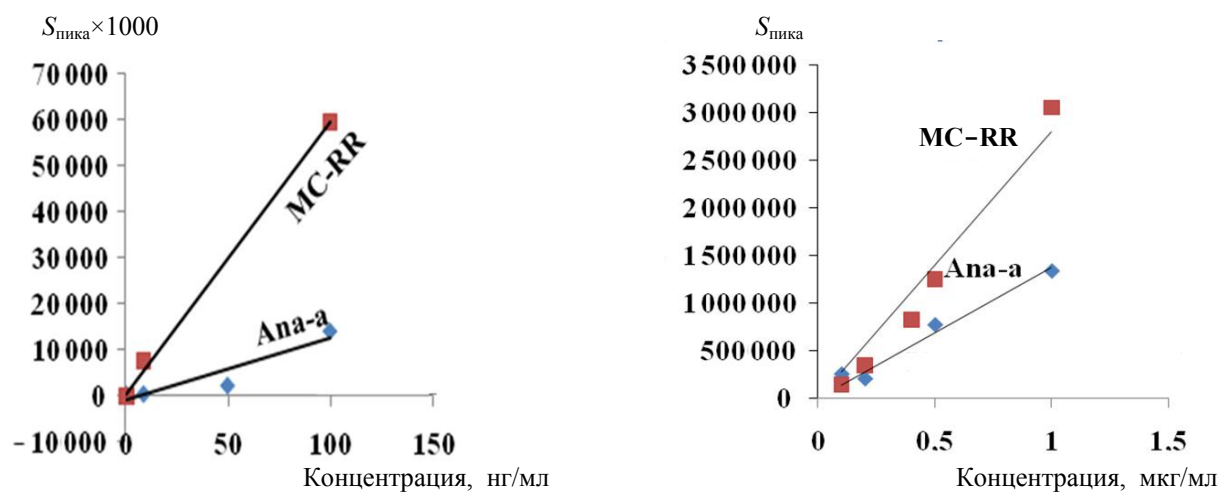


Рис. П3. Концентрационная зависимость, полученная для растворов стандартов MC-RR и Ана-а.

а — LCMS-IT-TOF; б — LTQ Orbitrap

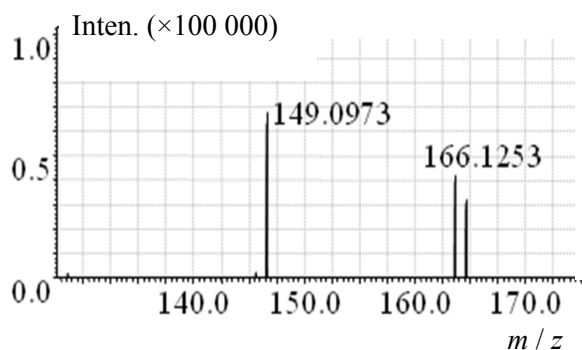


Рис. П4. Тандемный масс-спектр анатоксина-а, LCMS-IT-TOF (CID 10 %, Col. Gas. 50 %, $q = 0.169$)

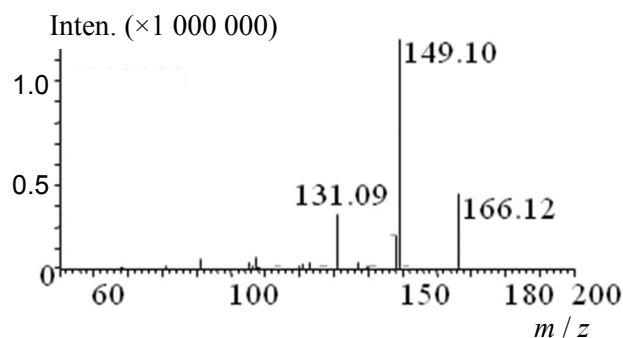


Рис. П5. Тандемный масс-спектр анатоксина-а, LTQ Orbitrap (MS²-CID 35 %)

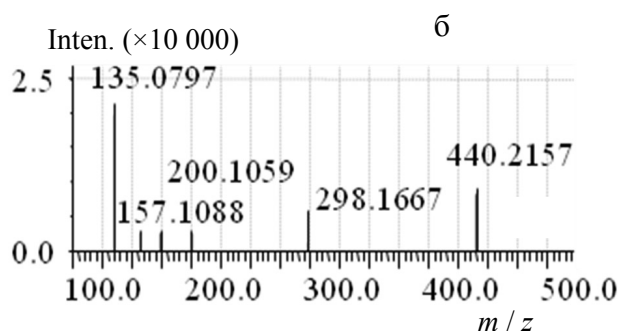
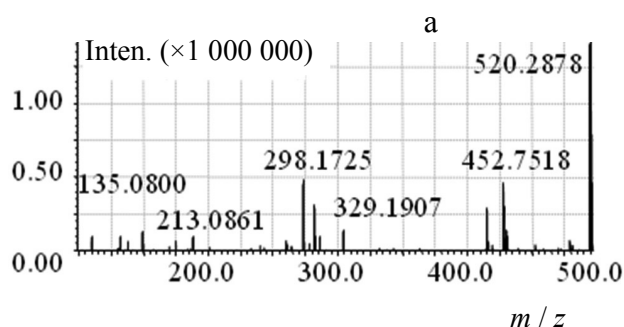


Рис. П6. Тандемный масс-спектр MC-RR, LCMS-IT-TOF.
а — CID 20 %, Col. Gas. 50 %, $q = 0.169$; б — CID 40 %, Col. Gas. 50 %, $q = 0.169$

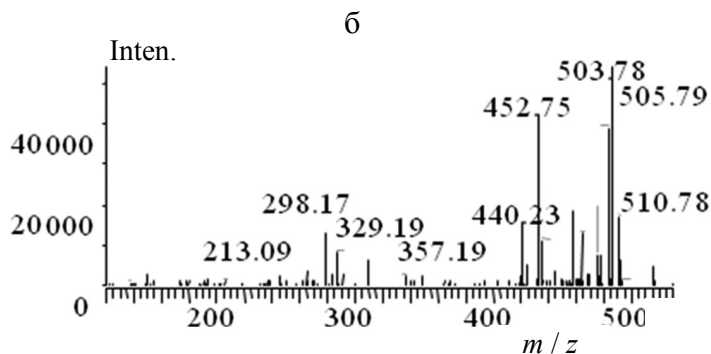
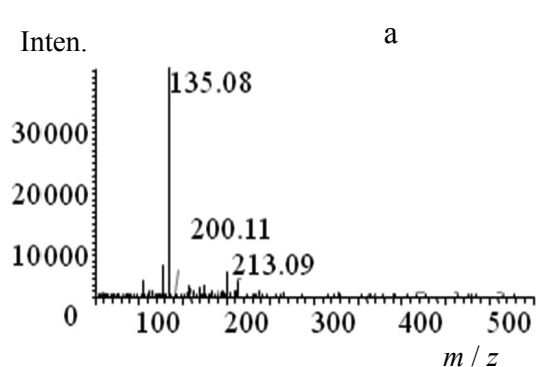


Рис. П7. Тандемные масс-спектры MC-RR, LTQ Orbitrap.
MS²: а — HCD-FTMS 25 %; б — CID-FTMS 35 %

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carmichael W.W. Health effects of toxins – producing cyanobacteria: "the cyanoHABs" // Hum. Ecol. Risk. Assess. 2001. V. 7. P. 1393–1407.
2. Белякова Р.Н., Волошко Л.Н. и др. Водоросли, вызывающие "цветение" водоемов Северо-Запада России. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. 367 с.
3. Матишов Г.Г., Фуштей Т.В. К проблеме вредных "цветений воды" в Азовском море // Электронный журнал "Исследовано в России". 2003. № 6. С. 213–226. URL: (<http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2003/022.pdf>).

4. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management / Chorus I., Bartram J. (Eds). London: WHO, 1999. 432 p.
5. Carmichael W.W. The toxins of cyanobacteria // Scientific American. 1994. V. 270, N 1. P. 64–72.
6. Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D. Manual on harmful algal blooms // UNESCO press. 1995.
7. Metcalf J.S., Codd G.A. FWR: Cyanobacterial toxins in the water environment. A Review of Current Knowledge. University of Dundee. FR/R0009. Foundation for Water Research. Marlow, Bucks SL7 FD, UK, February 2004. 36 p. URL: (<http://www.fwr.org/cyanotox.pdf>).
8. Sivonen K., Jones G. // Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management / Chorus I., Bartram J. (Eds). London: WHO, 1999. P. 41–111.
9. Msagati T.A.M., Siame B.A., Shushu D.D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. Review // Aquatic Toxicology. 2006. V. 78, N 4. P. 382–397.
10. Meriluoto J. Chromatography of Peptides. Chromatography of microcystins // Analytica Chimica Acta. 1997. V. 352, N 1–3. P. 277–298.
11. Lawton L.A., Edwards C., Codd G.A. // Analyst. London, 1994. V. 119. P. 1525–1530.
12. Harada K.-I., Kondo F., Lawton L. // Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management / Chorus I., Bartram J. (Eds). London: WHO, 1999. P. 369.
13. Hummert C., Reichelt M., Weiß J., Liebert H.-P., Luckas B. Identification of microcystins in cyanobacteria from the Bleiloch former drinking-water reservoir // Chemosphere. Thuringia, Germany, 2001. V. 44, N 7. P. 1581–1588.
14. Diehnelt C.W., Peterman S.M., Budde W.L. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry and accurate *m/z* measurements of cyclic peptide cyanobacteria toxins // Trends in analytical Chemistry. 2005. V. 24, N 7. P. 622–634.
15. Yuan M., Namikoshi M., Otsuki A., Watanabe M.F., Rinehart K.L. // J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 1999. V. 10. P. 1138–1151.
16. Camean A., Moreno I.M., Ruiz M.J., Pico Y. Determination of microcistins in natural blooms and cyanobacterial strain cultures by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry // Anal. Bioanal. Chem. 2004. V. 380. P. 537–544.
17. Maizels M., Budde W.L. A LC/MS method for the determination of cyanobacteria toxins in water // Anal. Chem. 2004. V. 76. P. 1342–1351.

Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности РАН
(Русских Я.В., Чернова Е.Н., Некрасова Л.В., Царев В.С., Жаковская З.А.)

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург (Подольская Е.П.)

Контакты: Русских Яна Владимировна,
yana.rus@bk.ru

Материал поступил в редакцию 21.09.2010.

THE RESULTS COMPARISON OF THE DETERMINATION OF CYANOTOXINS (ANATOXINE-A AND MICROCYSTIN-RR) BY LIQUID CHROMATOGRAPHY / MASS SPECTROMETRY USING DIFFERENT TYPES OF ION TRAPS

Y. V. Russkikh¹, E. N. Chernova¹, L. V. Nekrasova¹, V. S. Tzarev¹,
E. P. Podolskaya², Z. A. Zhakovskaya¹

¹*Saint-Petersburg Research Center of Ecological Safety RAS*

²*Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg*

In this study the results of the liquid chromatography/mass-spectrometric detection of cyanobacterial toxins such as anatoxine-a and microcystin-RR, obtained on the equipment with ion traps of different types are compared. The results, obtained on LCMS-IT-TOF (Shimadzu corp.) and LTQ OrbiTrap (ThermoFinnigan) are considered. The investigations were carried out using the solutions of standards and model systems.

Keywords: cyanotoxins, high performance liquid chromatography, mass-spectrometry, tandem mass-spectrometry, Fourier transform, linear ion trap