

ОСНОВНІ ПУБЛІКАЦІЇ

УДК 543.544.942, 543.51

Ж. ЗРОСТЛІКОВА, Ж. БИНКЛЕЙ, П.ВОЙТОВИЧ, Т.АДАМ³

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛНОЙ ДВУМЕРНОЙ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ВРЕМЯ-ПРОЛЕТНЫМ МАСС-СПЕКТРАЛЬНЫМ ДЕТЕКТОРОМ В ИССЛЕДОВАНИИ МЕТАБОЛМИКИ ЧЕЛОВЕКА.

Время-пролетная масс-спектрометрия в сочетании с газовой хроматографией (ГХ x ГХ – время-пролетная МС) обладает рядом преимуществ, таких как высокая селективность разделения веществ, большая скорость получения, и обработки данных, их достоверность, хорошая воспроизводимость результатов, большой диапазон определяемых количеств веществ. Это позволяет широко использовать метод для изучения метаболизма человека. Авторами разработан алгоритм автоматизированной обработки данных определения маркеров наследственного нарушения обмена веществ (IMDs) на базе ГХ x ГХ – время-пролетной МС.

Ключевые слова: двумерная газовая хроматография, время - пролетная масс-спектрометрия, квадрупольный масс-анализатор, маркеры наследственного нарушения обмена веществ.

Час-пролітна мас-спектрометрія в поєднанні з газовою хроматографією (ГХ x ГХ - час-пролітна МС) має ряд переваг, таких як висока селективність розділення речовин, велика швидкість одержання, і обробки даних, їх достовірність, хороша відтворюваність результатів, великий діапазон визначуваних кількостей речовин. Це дозволяє широко використовувати метод для вивчення метаболіки людини. Авторами розроблений алгоритм автоматизованої обробки даних визначення маркерів спадкового порушення обміну речовин (IMDs) на базі ГХ x ГХ - час-пролітної МС

Ключові слова: двовимірна газова хроматографія, час-пролітна мас-спектрометрія, квадрупольний мас-аналізатор, маркери спадкового порушення обміну речовин.

Time-of-flight mass spectrometry in coupling with gas chromatography (GC x GC time-of-flight MS) possesses a number of the advantages, such as high selectivity of substances division, high speed of reception, and processing of data, their authenticity, good reproduced of results, large range of determined quantities of the substances. It allows widely use this method for the investigation of human metabolomic. Authors developed algorithm of the automated processing of markers data determination of inherited metabolic disorders (IMDs) on the base GC x GC time-of-flight MS.

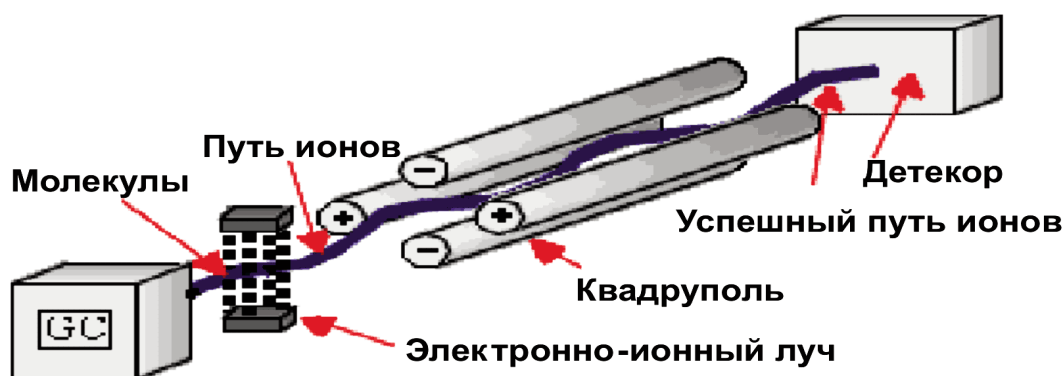
Keywords: two-dimensional gas chromatography, time-of-flight mass spectrometry, metabolomic of man, quadrupole mass analyzer markers of inherited metabolic disorders.

1. Сравнительные характеристики время-пролетного и квадрупольного масс-спектрометров

Квадрупольный масс-спектрометр – сканирующий анализатор масс ионов, в котором используется стабильность траекторий ионов в осциллирующих электрических полях, что приводит к их разделению в соответствии с отношением массы к заряду (m/z). Ионный пучок вводится в пространство между четырьмя параллельными стержнями, на которые подаются постоянный и переменный токи. Для получения масс-спектра потенциалы постоянного и переменного тока должны быть сканированы в постоянном отношении на всем протяжении (см. рис. 1).

Преимущества квадруполя включают в себя его низкую стоимость, возможность выполнения качественного и количественного анализа, а также возможность повышения чувствительности через режим SIM (мониторинг выбранных ионов). Основным недостатком квадрупольных анализаторов является то, что их сканирующая конструкция ограничивает скорость сбора данных и приводит к искажению спектров.

Рис. 1. Схема квадрупольного масс-анализатора



Во время-пролетном масс-спектрометре (TOF MS) ионы выходят из источника порциями. "Пакеты" ионов ускоряются таким образом, чтобы иметь равные кинетические энергии, когда они входят в область свободного дрейфа, также известной как пролетная труба (см. рис. 2). Поскольку кинетическая энергия ионов равна $1/2 mv^2$, где m -масса иона, а v - его скорость, ионы с меньшей массой иона имеют выше скорость и, соответственно, меньшее время полета. На основании времени пролета ионов, определяемых с помощью микроканального детектора, рассчитывается масс-спектр.

Время-пролетный MS не является сканирующим инструментом, что дает ему множество преимуществ, таких, как большая скорость сбора данных, непрерывность спектров и исключительный динамический диапазон. Возможность использования полного диапазона масс без ущерба для скорости или чувствительности делает TOF MS отличным выбором для качественного и количественного анализа в широком динамическом диапазоне в присутствии сложных матриц.

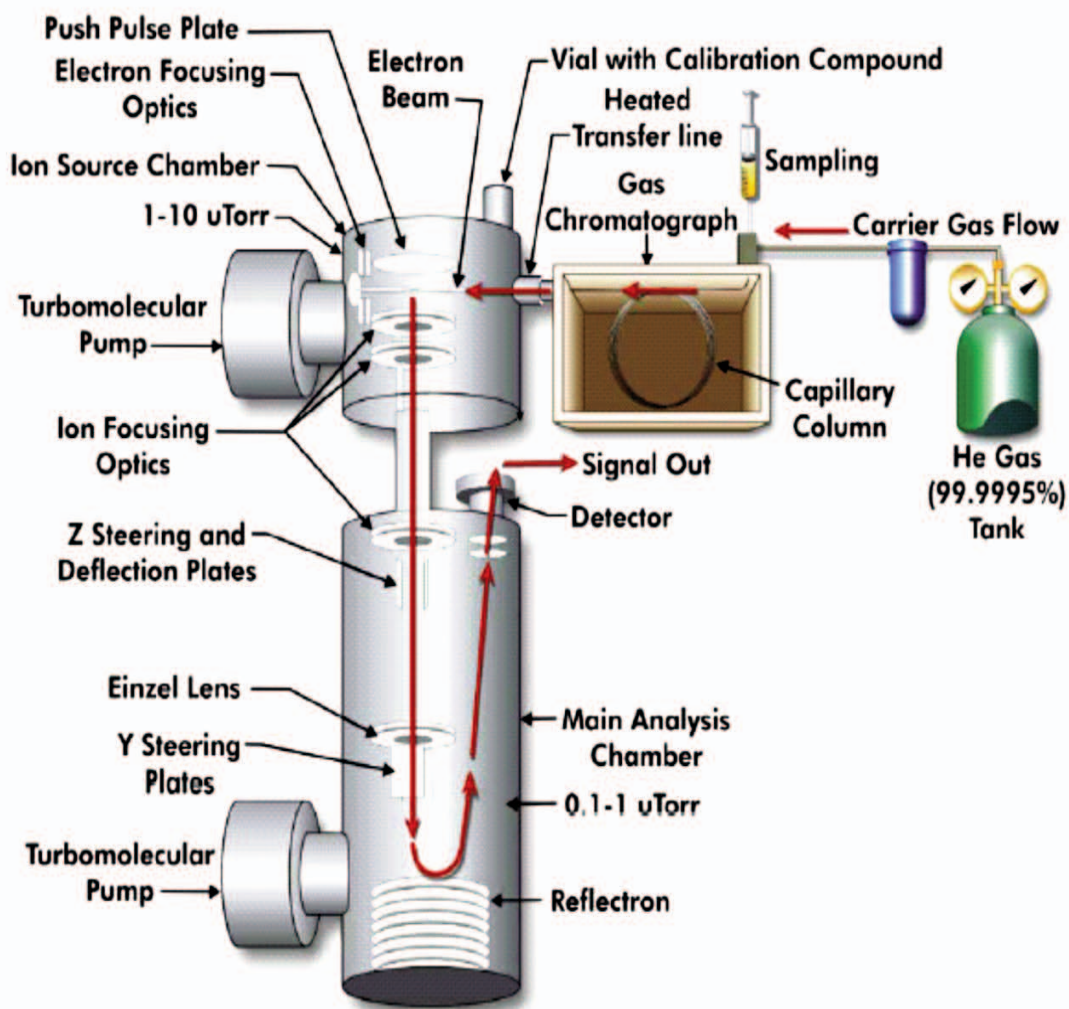


Рис. 2. Схема время-пролетного масс-анализатора.

Некоторые из характеристик время-пролетных и квадрупольных масс-анализаторов будут более детально сопоставлены в следующих параграфах

1.1 Скорость сбора данных

Рабочая скорость детектора является важным параметром при выборе детектора для работы с газовым хроматографом (ГХ). С развитием технологии газовой хроматографии, включая капиллярную ГХ малого диаметра, высокоскоростную ГХ и полную двумерную ГХ (ГХ x ГХ), ширины пиков становятся более узкими. Для количественного анализа, что хорошо известно, требуется, чтобы детектор выдавал не менее 10 точек на хроматографический пик. В таблице 1 приведены отношения между шириной пика и скоростью, необходимой для получения 10 точек данных на пик.

В сканирующих инструментах, таких как квадруполь, скорость зависит от диапа-

зона масс и определяется в а.е.м./сек. Типичная скорость квадрупольного МС составляет примерно 10.000 а.е.м/сек, что приводит к максимальным скоростям сканирования, приведенным в табл. 2.

Из двух таблиц видно, что пик шириной менее 500 миллисекунд (мс) не может быть корректно определен с помощью квадрупольных МС, поскольку необходимая для этого скорость от 20 Гц и выше. Это делает использование квадрупольного МС для высокоскоростной ГХ и ГХ x ГХ невозможным, поскольку в этих случаях могут получаться более узкие пики, чем 100 мс. Время-пролетный МС способен генерировать спектры со скоростью до 500 спектров в секунду, независимо от диапазона масс, что даёт ему отличные возможности для работы в качестве МС детектора для высокоскоростной ГХ и ГХ x ГХ.

Таблица 1

Ширины пиков и рекомендуемые минимальные скорости для корректного расчета количеств веществ.

Ширина пика	Необходимая скорость
1 с	10 Гц
0.5 с (500 мс)	20 Гц
0.2 с (200 мс)	50 Гц
0.1 с (100 мс)	100 Гц
0.05 с (50 мс)	200 Гц

Таблица 2

Диапазон масс квадруполя и соответствующая максимальная скорость сканирования

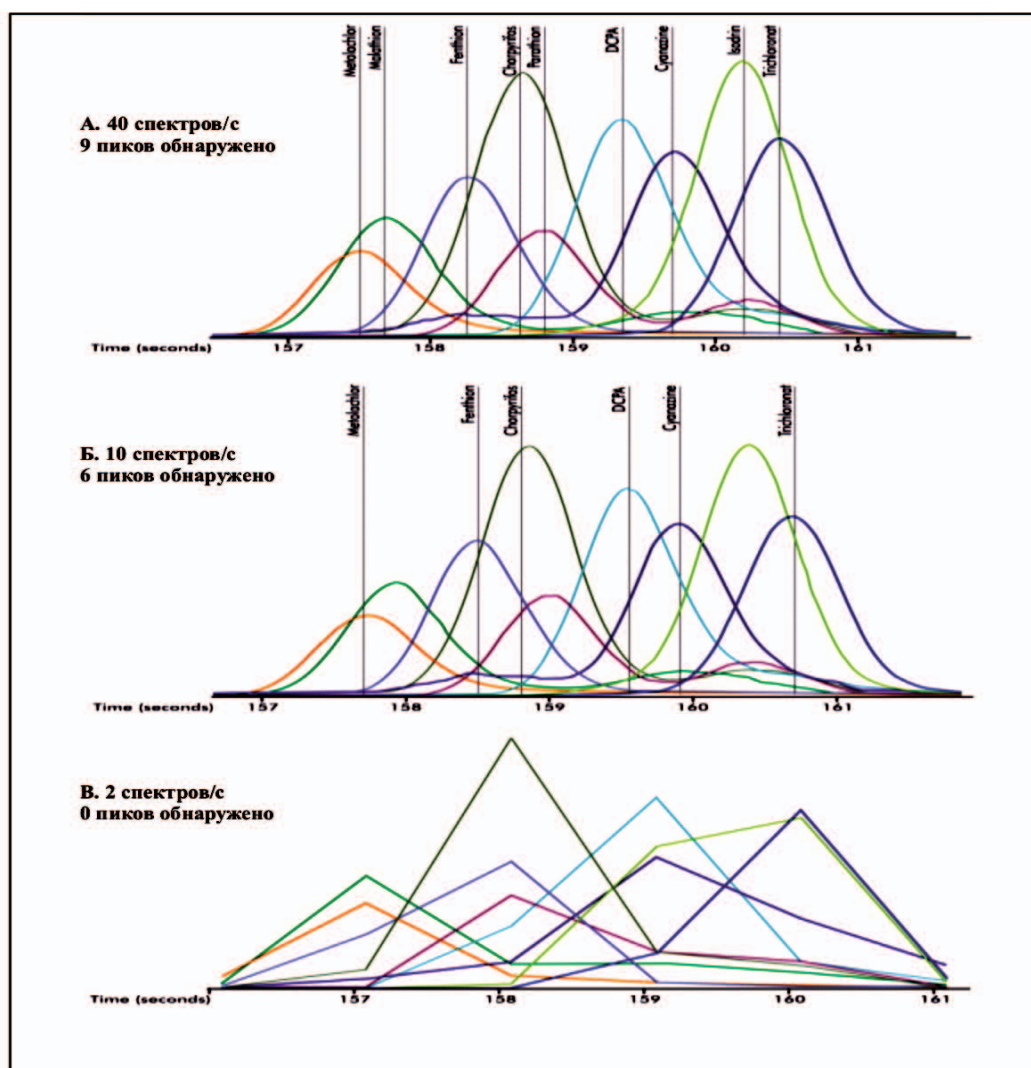
1.2 Деконволюция масс-спектров

Диапазон масс (m/z)	Максимальная скорость (Сканов/с)
50-1050	8.3
50-1000	8.66
50-950	9.05
50-900	9.48
50-850	9.95
50-800	10.47
50-750	11.04
50-700	11.69
50-650	12.42
50-600	13.24
50-550	14.18
50-500	15.26
50-450	16.52
50-400	18.01
50-350	19.79
50-300	21.96
50-250	24.67
50-200	28.14
50-150	32.74
50-100	39.15

Деконволюция масс-спектров является математическим алгоритмом, который отделяет масс-спектры хроматографически коэлюирующих (выходящих из

колонки совместно) соединений. Этот алгоритм может быть применен к данным, полученным от ГХ-квадрольный МС и от ГХ-время-пролетный МС. Существуют, однако, два основных преимущества в отношении выполнения алгоритма деконволюции для масс-спектров, полученных при помощи время-пролетного масс-детектора. Во-первых, высокая скорость генерирования спектров время-пролетным МС обеспечивает плотность данных, необходимую для успешной масс-спектральной деконволюции. В предыдущем параграфе было показано, что необходимо 18-20 точек данных на пик для точной количественной деконволюции хроматографически неразрешенных пиков [1]. На рис. 3 иллюстрируется влияние скорости сбора данных на производительность деконволюции. Этот пример показывает участок хроматограммы быстрой ГХ- время-пролетной МС, в котором выходят девять хроматографически неразделенных пестицидов. На рис. 3А, скорость составляла 40 спектров в секунду (соответствует приблизительно 20 точкам данных на пик) и при этом были обнаружены и идентифицированы все девять соединений. На рис. 3Б, скорость составила 10 спектров в секунду (5 точек/пик), при этом были обнаружены и идентифицированы шесть соединений. На последнем рис, 3В., скорость была 2 спектра в секунду (1 точка данных на пик), и ни одно из анализируемых соединений не было обнаружено.

Рис. 3. Влияние скорости сбора данных на производительность деконволюции



1.3 Постоянство и неискаженность масс-спектров

Вторым и, возможно, самым важным отличием между время-пролетным и сканирующим приборами является полученная спектральная непрерывность. В сканирующих инструментах, таких как квадрупольные МС, интенсивность отдельных масс ионов измеряется последовательно во время сканирования масс-спектрометром диапазона масс. Поскольку пик элюируется из хроматографической колонки, то концентрации анализируемого вещества в источнике ионов изменяются до того, как завершено сканирование масс-спектрометром. В результате, измеренные соотношения ионов искажаются (см. рис. 4). Это значительно усложняет математику деконволюции в случае перекрывающихся спектров. Правильный масс-спектр должен быть получен как средний по всей ширине хроматографического пика.

В тоже время системой LECO Pegasus HT TOF MS в секунду анализируются 500 полных спектров по всему диапазону масс. За это время пакеты ионов формируются, выделяются, и массы анализируются практически одновременно. Таким образом, изменения концентраций, происходящих в источнике в течение выхода пика, не влияют на непрерывность спектров. Результатом являются неискаженные масс-спектры, которые позволяют получить оптимальную производительность алгоритма деконволюции масс-спектров.

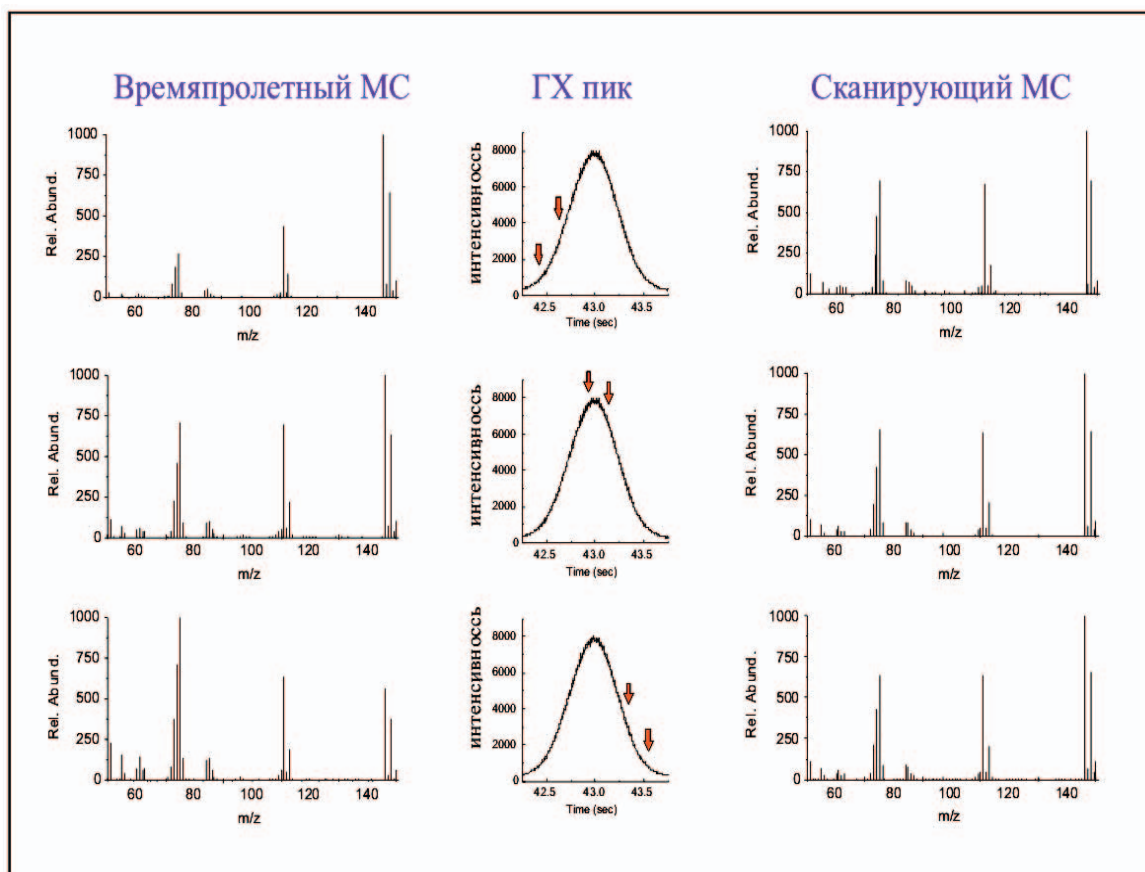


Рис. 4. Примеры постоянных спектров (слева, получены от время-пролетного МС) и искаженных спектров (справа, получены от сканирующего МС)

На рис. 5 показан пример образца нефти Juniper, который был проанализирован в одинаковых хроматографических условиях на квадрупольном и время-пролетном масс-детекторах. При оценке обеих систем по описанным выше характеристикам:

скорость и неискаженность спектров на протяжении пика, преимущества время-пролетного МС становятся очевидными. На этом примере, при использовании время-пролетного МС, 137 компонентов были обнаружены и идентифицированы; средняя степень сходимости с библиотечными спектрами для них составила 85%. В том же образце квадрупольным МС, были обнаружены и идентифицированы только 96 компонентов, средняя степень сходимости составила 75% [2].

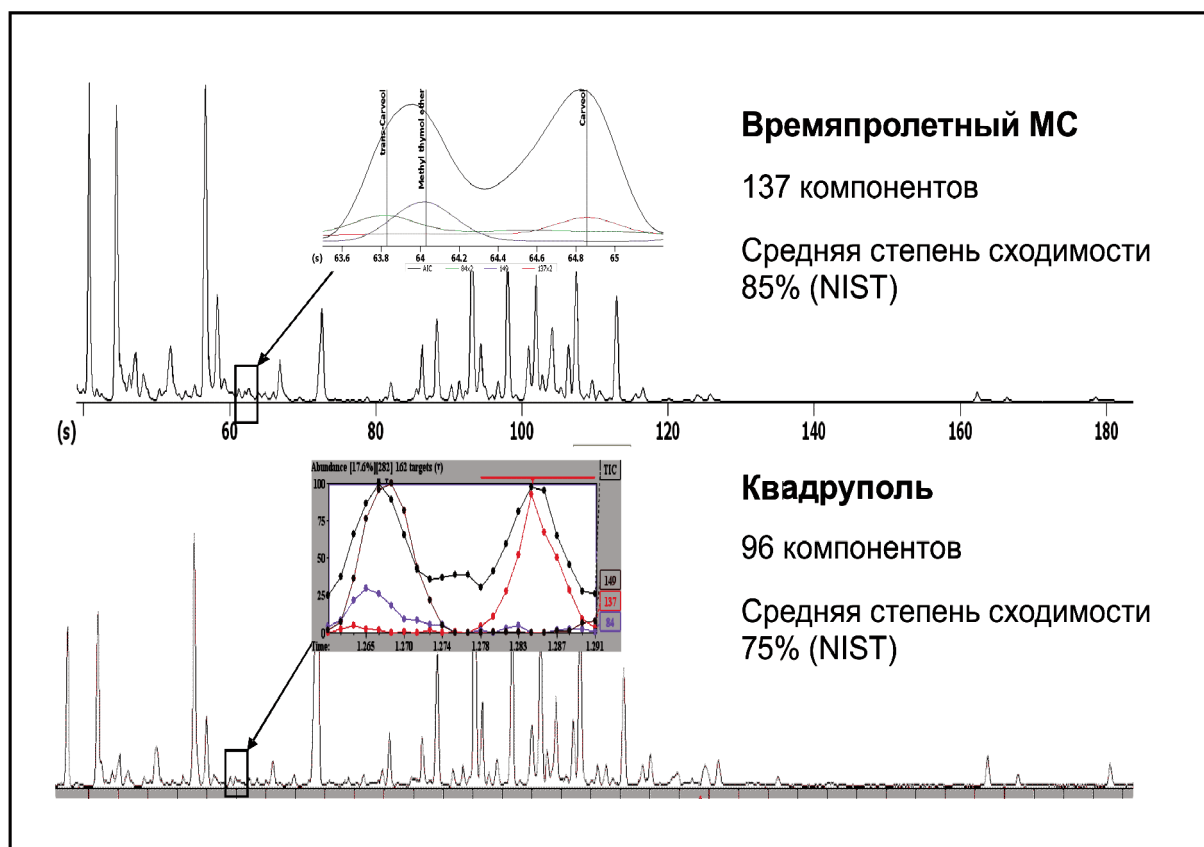


Рис. 5. Сопоставление хроматограмм по общему ионному току (ТІС) образца нефти Juniper, проанализированного с помощью время-пролетного МС (сверху) и с помощью квадрупольного МС (снизу)

1.4 Количественное определение

Существуют распространенные заблуждения о том, что время-пролетные МС нельзя использовать в качестве инструмента для количественного определения веществ. На самом деле, современные время-пролетные инструменты способны успешно выполнять количественный анализ.

Если рассмотреть динамический диапазон, то он выше в случае TOF МС по сравнению с квадруполем. Это отражено на рис. 6, где проведено сравнение линейных динамических диапазонов для квадруполя Agilent 5975 MSD и LECO Pegasus HT TOF MS. На этом рисунке представлены кривые отклика детектора от концентрации гексахлорбензола (ГХБ). Каждый прибор ГХ-МС был соединен с одинаковым хроматографом Agilent 7890; условия также были идентичны. Стандарты ГХБ были проанализированы в диапазоне концентраций от 2 до 20000 пг. Кривая динамического диапазона для квадруполя охватывает 3 порядка (от 2 до 2000 пг), а для TOF — 4 порядка (от 2 до 20000 пг).

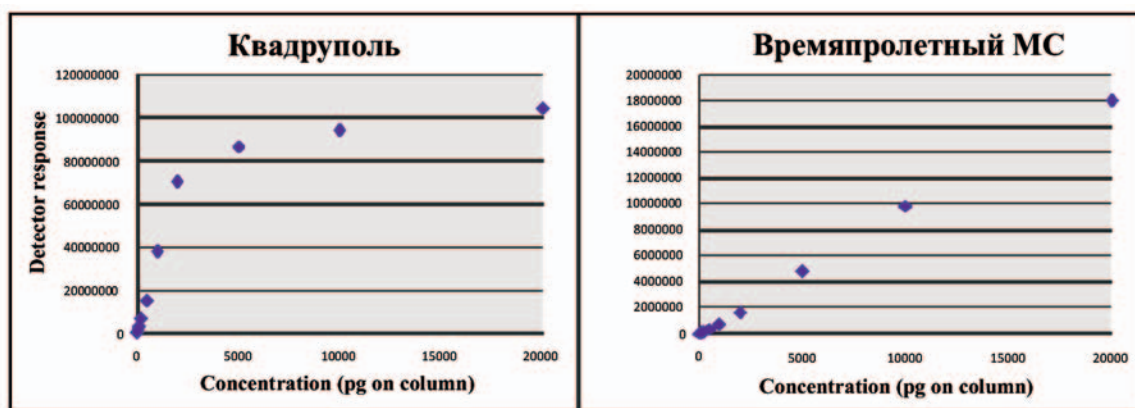


Рис. 6. Динамический диапазон квадрупольного МС в сравнении с время-пролетным МС, ввод ГХБ в диапазоне концентраций 2 – 20 000 пг.

Что касается повторяемости количественных результатов, можно отметить, что во время-пролетном МС, повторяемые количественные анализы могут быть выполнены без необходимости запускать режим мониторинга отдельных ионов (SIM), типичного для квадрупольных инструментов.

В табл. 2 показано сравнение значений относительного стандартного отклонения (СКО) в процентах для десяти повторных инъекций стандарта, содержащего октафторнафталин (ОФН), дибромбензол (ДББ), трибромбензол (ТББ), бензофенон (БЗФ), тетрабромтиофен (ТБТФ), гексахлорбензол (ГХБ) и гексабромбензол (ГББ). Значения представленных СКО площадей пиков основаны на расчете по одной массе для каждого вещества. Также сравнивались результаты, полученные от десяти повторных инъекций на квадруполе, работающем в сканирующем режиме и в режиме SIM, с результатами, полученными на время-пролетном МС, который всегда даёт полные масс-спектры. Эти данные показывают, что воспроизводимость квадрупольного прибора меньше при работе в режиме сканирования, чем в режиме SIM. Это одна из причин, по которым SIM наиболее часто выбирают для количественного анализа. К сожалению, это требует дважды проводить анализ образцов нецелевых соединений: один раз в режиме сканирования для идентификации присутствующих соединений, и потом в режиме SIM для улучшения количественных результатов. С другой стороны, время-пролетный МС показывает исключительную воспроизводимость благодаря генерированию полных спектров во всем диапазоне масс. Это упрощает процесс количественного определения для образцов, содержащих нецелевые соединения.

Таблица 2.

Сравнение значений относительного стандартного отклонения (СКО) для площадей пиков семи соединений, полученных с помощью квадруполь (скан), квадруполь (SIM) и время-пролетного МС

	ОФН	ДББ	ТББ	БЗФ	ТБТФ	ГХБ	ГББ
Квадруполь (скан)	5.6	2.7	4.1	8.0	3.0	1.9	9.7
Квадруполь (SIM)	1.5	1.1	1.4	4.6	1.8	1.3	4.0
Времяпрол. МС	0.9	0.7	0.8	0.7	1.0	0.4	2.5

2.ГХ2. ГХ х ГХ время-пролетный МС в сравнении с ГХ-квадрупольный МС в анализе маркеров наследственных нарушений обмена веществ

Унаследованные метаболические нарушения, как правило, вызываются генетическими ошибками, которые вызывают отсутствие определенного фермента или его недостаточное количество в организме. В результате этого метаболизм в организме не идет по нормальному механизму, что приводит к нарушению некоторых функций организма. Одной из подгрупп метаболических заболеваний являются органическая ацидурия, которая характеризуется наличием органических кислот в моче или увеличением их количества. Органическая ацидурия обычно диагностируется с помощью анализа мочи после экстракции в кислой среде и дериватизации с получением триметилсилиловых эфиров (ТМС) для ГХ-МС. Диагноз ставят на основании обнаружения характерных маркеров заболевания.

С аналитической точки зрения, моча представляет собой чрезвычайно сложную матрицу, так как она является смесью нескольких тысяч соединений (на сегодняшний день в кислом экстракте были определены более 5000). Кроме того, концентрации веществ в моче могут различаться на несколько порядков, и интенсивные пики естественных соединений могут маскировать миноритарные соединения, представляющие интерес для диагностики. Что касается концентраций патологических маркеров, то они могут быть очень высокими у больных на острых стадиях болезни, однако с другой стороны, у больных без симптомов или при медикаментозной терапии уровни маркеров могут быть очень низкими и сопровождаться коэлюциями.

В последнее десятилетие полная двумерная ГХ проявила себя, как мощный метод в анализе сложных матриц. Принцип и преимущества этой техники были описаны в нашей последней работе [3]. В следующих пунктах будут продемонстрированы некоторые результаты применения ГХ х ГХ-МС для рутинного определения маркеров патологической органической ацидурии. Полное собрание этих работ было недавно опубликовано [4].

2.1. Образцы

Были проанализированы подвергнутые дериватизации (ТМС) экстракты мочи пациентов, страдающих от различных унаследованных метаболических нарушений. Образцы готовили следующим образом: 2 мл мочи были проэкстрагированы и дериватизированы с использованием метода, основанного на работах Танаки и др. [5]. Этот метод состоит этоксимации, подкисления, экстракции этилацетатом и триметилсилилировании.

2.2. Метод ГХ х ГХ-время-пролетная МС

В исследованиях использована система Pegasus 4D, состоящая из газового хроматографа Agilent 7890A, оборудованного инжектором с делением и без деления потока, автосамплер 7683 серии В (Agilent Technologies, Пало-Альто, Калифорния, США) и время-пролетным масс-спектрометром Pegasus HT (LECO Corporation, Сент-Джозеф, Мичиган, США). Система ГХ х ГХ является двухступенчатой, оснащена криомодулятором с четырьмя форсунками и вторичной печью, встроенной в основную печь хроматографа. Использовался вариант модулятора без дополнительно расходуемых материалов (consumable-free). Для горячих и холодных форсунок применялся сжатый воздух.

Колонка первого измерения - 30м х 0.25мм х 0.25мкм Rxi-5 мс (Рестэк, Беллефонт, Пенсильвания, США); колонка второго измерения - 2.5м х 0.10мм х 0.10мкм ВРХ-50 (SGE, Рингвуд, Австралия).

Рабочие условия были следующими: ГХ х ГХ: температурный режим первичной печи: 40°С (2 мин), 8°С/мин до 155°С (0,2 мин), 10°С/мин до 255°С (0,20 мин), затем нагрев до 300°С в течение 11 минут. Температурный режим вторичной печи: сдвиг на 5°С вверх относительно температуры первичной печи; температура модулятора на 50°С выше температуры первичной печи; период модуляции: 3 с; газ-носитель: гелий; постоянный поток: 1 мл/мин; режим ввода: без деления потока, 2 мин; температура инжектора: 250 ° С, вводимый объем: 0,2 мкл. Время-пролетный МС: электронная ионизация (-70 эВ), температура ионного источника: 250°С;

рабочий диапазон масс: 35-550 m/z; скорость сбора данных: 125 спектров/с; задержка растворителя: 650 с; напряжение детектора: - 1600 В, температура трансфер-лайн: 250°C.

Программное обеспечение ChromaTOF, версия 4.24 (LECO Corporation, США), использовано для управления системой, сбора данных и обработки данных. Масс-спектральная библиотека NIST/EPA/NIH (2008) использована для предварительной идентификации соединений, с подтверждением с помощью сравнения индексов удерживания.

2.3. Результаты

2.3.1. Разделение и идентификация с помощью ГХ х ГХ - время-пролетной МС

На рисунках 7 показаны участки контурной хроматограммы, полученной с помощью ГХ х ГХ - МС анализа здоровой мочи, в которой были идентифицированы основные метаболиты. Очевидно, что экстракт мочи представляет собой хроматографически сложный материал. Использование ГХ х ГХ даёт дополнительное разделение во втором измерении и улучшенное разрешение пиков, коэлюирующих при анализе с помощью только первичной колонки. Полученные данные обрабатывались в автоматическом режиме с регистрацией пиков с соотношением сигнал/шум выше 200, в результате чего в образцах здоровой мочи обнаружено от 1353 до 3420 пиков. После отброса пиков фазы колонки и пиков, принадлежащих дериватизирующим реагентам, осталось около 60% от их общего количества. Предварительное определение этих пиков проводилось путём сравнения их спектров, очищенных деконволюцией, с эталонными спектрами из библиотеки NIST. С использованием дополнительного подтверждения идентичности, основанного на индексах удерживания, идентифицировано, по крайней мере, 200 соединений.

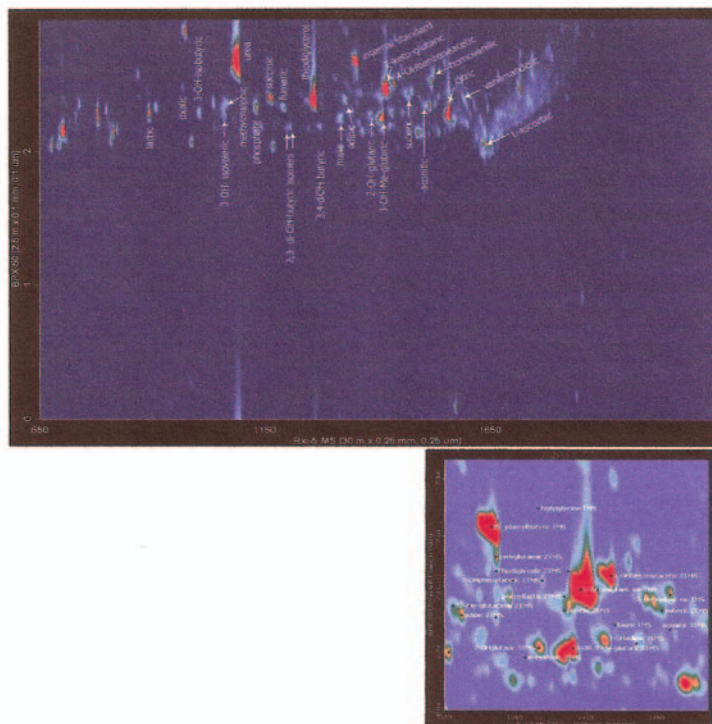


Рис. 7. Контурная хроматограмма анализа здоровой мочи с помощью ГХ×ГХ – время-пролетной МС

2.3.2. Автоматическое обнаружение и количественное определение маркеров патологии

Хотя классические подходы к поиску маркеров унаследованных метаболических нарушений состоят в индивидуальном ручном поиске, мы, используя особенности программного обеспечения ChromaTOF, разработали автоматизированный подход с использованием образцов для сравнения. В рамках процедуры «образца сравнения», был создан список, в котором содержалась информация о маркерах патологии: время удерживания по первому и второму измерениям, масс-спектры. Список содержал 21 маркер 6 различных заболеваний и, был использован для автоматизированной обработки неизвестных образцов. Проведен анализ нескольких образцов из профессиональной сети тестирования ERNDIM (Европейская исследовательская сеть для оценки и улучшения скрининговой диагностики и лечения наследственных нарушений обмена веществ) и один образец из рутинного диагностического процесса в больнице.

В табл. 3 приведены количественные результаты для отдельных образцов от пациентов с патологией. В этой таблице серым цветом выделены поля соответствующих маркеров, а цифры, напечатанные жирным шрифтом, показывают значения, превышающие диапазон допустимых содержаний исследуемых веществ для здоровой мочи. Звездочкой показаны случаи, когда стандартным ГХ-квадрупольным МС методом не удалось обнаружить и выявить маркеры. Из этой таблицы видно, что патологические маркеры были надёжно обнаружены и идентифицированы. Коэффициент совпадения спектра со спектром сравнения превышал 80% для всех маркеров. Особый интерес вызвали результаты, полученные для Hawkinsinuria, AADC и MCADD, так как в этих случаях классическим ГХ-квадрупольным МС не найдено ни один из возможных маркеров.

Таблица 3.

Количественные результаты определения патологических маркеров в моче

Название метаболита	Концентрации метаболитов [ммоль/моль креатинина]						Диапазон сравнения ¹⁾
	MNGIE	Mevalonic aciduria	Hawkin-sinuria	AADC	Propionic acidemia	MCADD	
Lactic acid	67.7	40.2	25.9	59.4	53.5	35.8	<80
3-Hydroxypropionic acid	18.6	7.5	5.1	4.2	54.9	7	3–10
3-Hydroxyvaleric acid	не ид.	не ид.	не ид.	не ид.	16.6*	не ид.	<2
Uracil	30.7	3.9	5.1	3.8	1.9	2.8	2–22
5-Hydroxyhexanoic acid	0.2	0.1	0.1	0.3	1.1	0.4	<7
Mevaloniclactone	2.1	51.8	0.4	0.2	0.4	0.4	<2
Thymine	27.3*	0.7	0.4	0.5	0.1	0.3	<2
Propionylglycine	не ид.	не ид.	не ид.	не ид.	11.2*	не ид.	<2
Adipic acid	8.6	4.4	3.9	11.3	12	6	<12
Mevalonic acid	не ид.	1.8*	0.2	0.8	n.d.	не ид.	<1
4-Hydroxycyclohexylacetic a.	0.2	2.2	58.8*	2	2.1	не ид.	<2
Hexanoylglycine	не ид.	0.3	0.1	0.6	1.6	4.6*	<2
Suberic acid	1.9	5	не ид.	9.1	9.3	14.8*	<12
Sebacic acid	0.6	0.3	не ид.	не ид.	0.6	0.6	<2
Methylcitric acid	11.4	8.3	2.9	11.7	97.1	3.8	<12
Decenedioic acid	не ид.	1.5	не ид.	0.5	2	1	<2
4-Hydroxyphenyllactic acid	11.6*	2.4	5.6	2.1	5.7	2.7	<6
Vanillylactic acid	1.3	0.7	0.1	5.5*	0.2	0.5	<2
Vanillylpyruvic acid	не ид.	не ид.	0.1	3.8*	0.5	не ид.	<2
N-Acetyltyrosine	1.6	0.6	0.4	2.8*	0.6	0.2	<2
Suberylglycine	не ид.	не ид.	0.1	не ид.	не ид.	1.3	<2

Описание: MNGIE – дефицит тимидинфосфолиразы, AADC – дефицит декарбоксилазы ароматической L-амино кислоты, MCADD – дефицит дегидрогеназы средне цепной ацил-КоА

1) Диапазон сравнения = содержание метаболитов в здоровой моче

2.3.3. Диагностирование MCADD: ГХ - квадрупольный МС в сравнении с ГХ x ГХ - время-пролетный МС

Дефицит дегидрогеназы среднецепного ациклоэнзима (MCADD) приводит к нарушению бета-окисления жирных кислот. Это нарушение, без соответствующего лечения, является фатальным, так как вызывает гипогликемию, дисфункцию печени и головного мозга. Лечение заключается в подходящей диете и лекарствах, однако поставить диагноз необходимо в первые дни жизни, чтобы предотвратить серьезный ущерб организму.

В настоящее время в Чешской Республике новорожденные дети проверяются на наличие этого заболевания. Проверка основывается на ЖХ/МС/МС. В случае возникновения подозрений на наличие заболевания, диагноз должен быть подтвержден путем проведения анализа органических кислот в моче. Хотя заболевание в кризисной стадии характеризуется наличием высоких уровней многих маркеров (в основном жирных кислот), в отсутствие симптомов у пациентов диагноз ставят на основании обнаружения небольшого количества маркера - гексаноил глицина. Как сообщалось в литературе, без проведения профессиональных тестов давалось до 30% ложно отрицательных результатов [6].

В нашей работе проанализирован образец от пациента с подозрением на MCADD. У пациента диагностирован MCADD на пятый день жизни, но каких-либо клинических признаков заболевания не было. На рис. 8 показана хроматограмма ГХ-квадрМС анализа этого образца. Как и было очевидно, маркер гексаноилглицина не был обнаружен. Напротив, использование техники ГХ x ГХ-время-пролетной МС, были обнаружены обе ТМС формы с высокой степенью достоверности (степень сходимости спектров более 80%) - см. рис. 9.

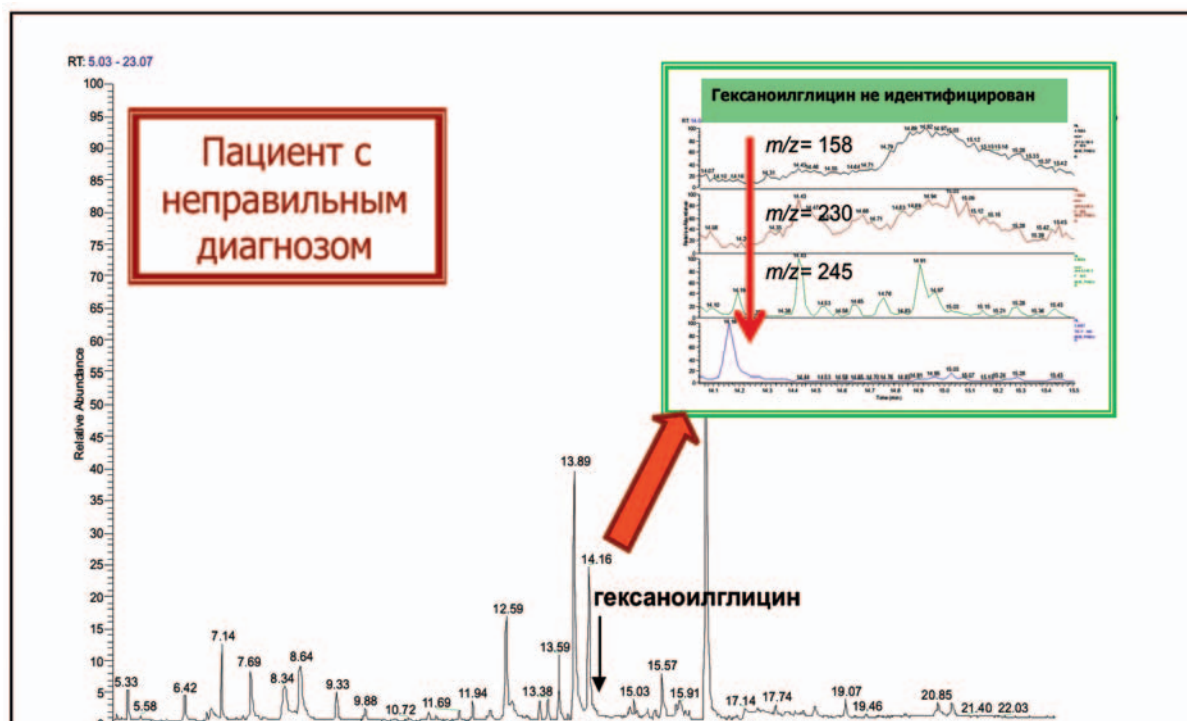


Рис. 8. Гексаноилглицин с помощью метода ГХ-квадрупольной МС не обнаружен

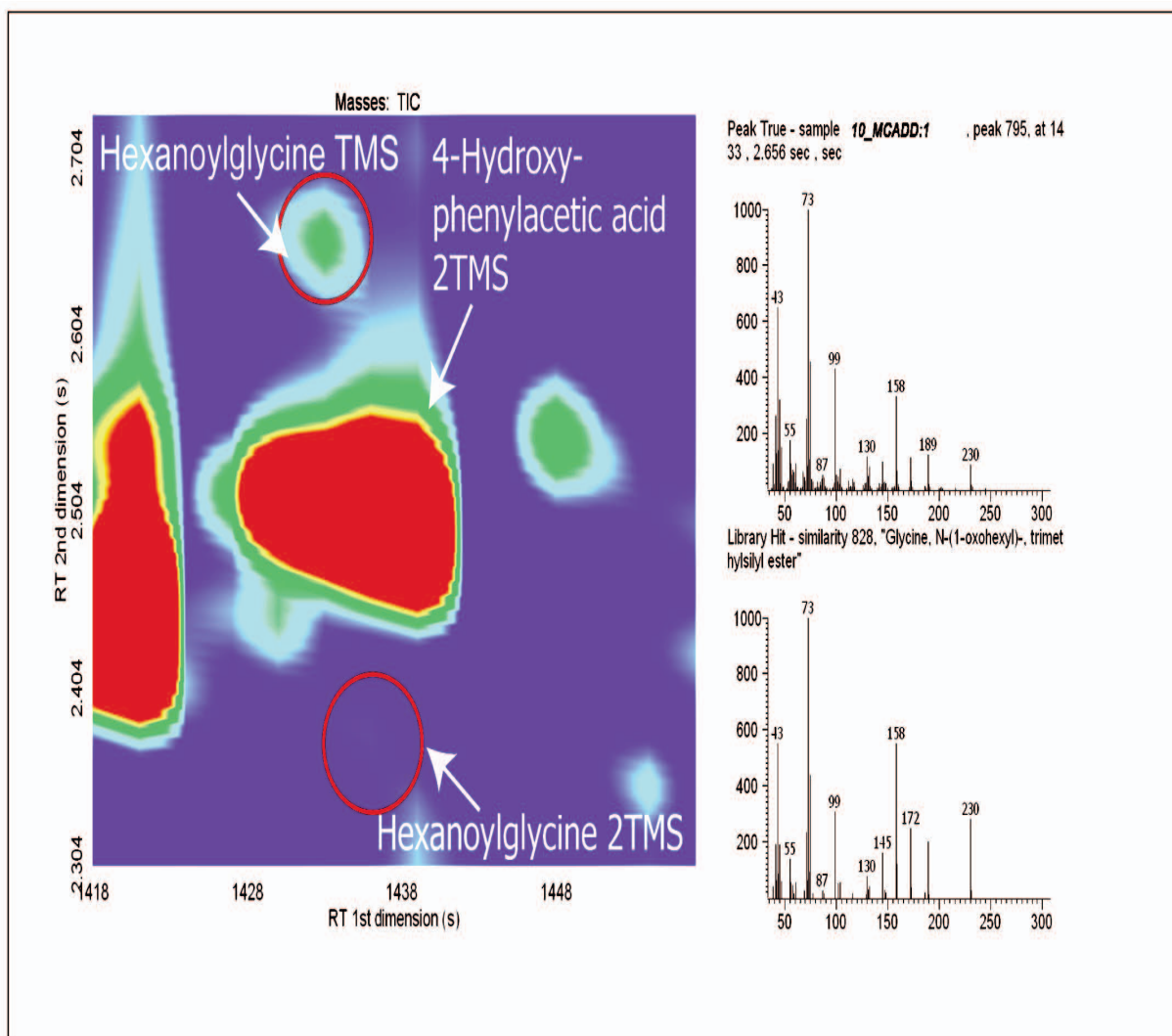


Рис.9. Гексаноилглицин с помощью ГХ x ГХ-время-пролетной МС обнаружен. Сходимость спектров ТМС производной гексаноилглицина составила 82,8 %.

Закключение

Использование техники время-пролетной масс-спектрометрии в сочетании с газовой хроматографией обладает рядом преимуществ по сравнению с традиционной квадрупольной МС. А именно: высокая плотность масс-спектров, получаемых при прохождении хроматографического пика, что приводит к более высокому качеству масс-спектральной деконволюции; высокие скорости сбора данных и большой динамический диапазон концентраций определяемых веществ.

Полная двумерная газовая хроматография является методом, который обладает высокой селективностью разделения сложных смесей. В представленной работе разработан ГХ x ГХ время-пролетный МС метод для определения маркеров наследственных нарушений обмена веществ. Используя алгоритм автоматизированной обработки данных удалось обнаружить маркеры 6 заболеваний в течение одного запуска процесса обработки данных. В сложных образцах все маркеры были надёжно определены.

ЛИТЕРАТУРА

1. ChromaTOF Auto Peak Find and convolution // http://www.leco.com/resources/application_note_subs_pdf/separation_science/performance_notes/209-076-016.pdf
2. **C. Von Muhlen, C.A. Zini, E.B. Caramao, P. Marriott**, Comparative study of Eucalyptus dunnii volatile oil composition using retention indices and comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight and quadrupole mass spectrometry. // J.Chromatogr A.- 2008.- Vol. 1200 (1).- P. 34-42.
3. **J. Binkley, M. Libardoni**, Comparing the capabilities of time-of-flight and quadrupole mass spectrometers// Current Trends in Mass Spectrometry 7/2010. – P. 28-33
4. **P. Wojtowicz et al.**, J. Chromatogr. A, in press.
5. **K. Tanaka, D.G. Hine, A. West-Dull, T.B. Lynn**. Gas-chromatographic method of analysis for urinary organic acids.// Clinical Chemistry.- 1980.- Vol 26.- P/ 1839-1846
6. **M. Downing, N. J. Manning, R. N. Dalton, S. Krywawych, J. Oerton**. Detection of urinary hexanoylglycine in the diagnosis of MCAD deficiency from newborn screening// Journal of Inherited Metabolic Disease.-2008,- Vol.31.- N. 4, P. 550,

LECO Corp., Application Laboratory Prague, Czech Republic
LECO Corp. Application Laboratory St. Joseph, Mi, USA
Laboratory of Inherited Metabolic Disorders, Palacký University Olomouc, Czech Republic

Поступило в редакцию 17.10.2010