

УДК 547.458.02 : 543.51

© А. Н. Веренчиков, Н. В. Краснов, М. З. Мурадымов, Ю. И. Хасин

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРИБОРОВ ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Рассматриваются современное состояние, основные конструктивные особенности и некоторые приложения времяпролетной масс-спектрометрии. Даются основные этапы совершенствования аналитических характеристик основных анализаторов: линейного и отражающего анализаторов с ортогональным вводом ионного пучка. Отмечаются основные преимущества этих анализаторов по сравнению с другими аналитическими приборами и, в частности, возможность сочетания с источниками ионов непрерывного действия.

ВВЕДЕНИЕ

Представление о том, что ни один из существующих типов масс-анализаторов не может решить весь круг задач, стоящих перед масс-спектрометрией как аналитическим методом, что каждый тип анализатора обладает своими неоспоримыми достоинствами, но при этом каждый имеет и определенные ограничения либо принципиальные, либо технические — блестяще обосновано и проиллюстрировано в обзоре [1]. При этом очевидно, что появление удачного технического решения, освоение новой методики, прогресс в смежной области или даже переосмысление ранее использовавшихся идей может привести к внезапно быстрому развитию одной из областей масс-спектрометрии. В последнее время именно такой прорыв можно наблюдать в области времяпролетной масс-спектрометрии. Плодотворные идеи, получившие удачное техническое решение, прогресс в области импульсной и цифровой электроники привели к тому, что современные приборы на основе времяпролетных масс-анализаторов обладают аналитическими характеристиками, сравнимыми в большинстве случаев с анализаторами других типов, а во многих случаях и превышающими их. И хотя основные идеи, вызвавшие бурное развитие времяпролетной масс-спектрометрии, предложены и реализованы были российскими учеными, серийных приборов такого типа наша промышленность почти не выпускает. Целью настоящего обзора является определение современного состояния приборного оснащения времяпролетной масс-спектрометрии. Для более детального ознакомления с принципами функционирования времяпролетных масс-спектрометров, отдельных их узлов и методов анализа с их помощью можно обратиться к статьям и монографиям [2–9].

НЕМНОГО ИСТОРИИ

Первый коммерческий времяпролетный масс-спектрометр фирмы Bendix, появившийся в 50-х годах XX века, обладал разрешающей способностью в несколько сотен единиц. Одной из основных причин, ограничивающих разрешающую способность, является разброс образующихся при ионизации ионов по энергиям. В течение почти 20 лет при использовании обычного линейного анализатора и из-за ограниченных возможностей электронных систем не удавалось найти сколь-нибудь перспективных способов заметного улучшения этого параметра. В этот период времяпролетные масс-спектрометры находили применение в областях, где требовалась предельно быстрая запись спектров, например при изучении реакций, происходящих при взрывах.

Времяпролетные анализаторы получили принципиальный толчок в своем развитии после работ Б.А. Мамырина с сотрудниками [10], предложивших и осуществивших анализатор, получивший название рефлектрон. В анализаторе этого типа достигается энергетическая фокусировка при помощи электростатического ионного зеркала и в результате частичная компенсация начального разброса ионов по кинетической энергии.

Весьма важным событием в истории развития времяпролетных анализаторов оказалось сочетание такого анализатора в 1987 г. [11] с источником ионов, в котором был реализован способ получения ионов из матрицы под действием лазерного импульса (MALDI). Импульсный по своей природе метод прекрасно сочетался с времяпролетным анализатором, а образующиеся при ионизации этим методом тяжелые однозарядные ионы сразу привлекли внимание к таким приборам исследователей, занимающихся анализом широкого

круга биоорганических веществ, в том числе пептидов, протеинов и нуклеотидов. Таким образом, расширился круг задач, решение которых достигалось средствами времяпролетной масс-спектрометрии. При этом понадобилось еще почти десять лет напряженной работы, прежде чем MALDI—TOF анализаторы преодолели рубеж разрешающей способности 10 000.

Аналитические характеристики времяпролетных анализаторов стали резко и быстро улучшаться после "второго открытия" принципа ортогонального ускорения группой А.Ф. Додонова [12]. Работа в этом направлении велась практически одновременно и независимо двумя исследовательскими группами [13–17]. Впервые ортогональное ускорение ионов использовалось еще в 60-х годах при создании Bendix Plasma Mass Spectrometer [18], однако тогда потенциальные возможности этого усовершенствования времяпролетного масс-спектрометра не были правильно оценены. Применение ортогонального ввода ионов в анализатор кроме принципиального улучшения аналитических характеристик времяпролетных приборов (разрешающей способности, чувствительности, точности определения масс) позволило решить проблему сочетания источников ионов, работающих в непрерывном режиме, с импульсным анализатором. Это сделало возможным самые разнообразные сочетания способов ионизации и ввода анализируемых веществ с времяпролетным анализатором, тем самым почти неограниченно расширило область аналитического применения масс-спектрометров с времяпролетным анализатором с ортогональным вводом пучка (о-TOF).

ОСНОВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ о-TOF

Самой характерной особенностью анализатора типа о-TOF является использование различных направлений движения ионов при вводе непрерывного ионного пучка и при анализе ионов по времени пролета, причем эти направления ортогональны. На рис. 1 приведена схема основных компонентов современного времяпролетного масс-спектрометра. На схеме непрерывный ионный пучок входит в анализатор слева. В случае положительных ионов область образования ионов находится под потенциалом $U_{beam}(+)$, так что ионы пучка ускоряются до соответствующей энергии и входят в ортогональный ускоритель, находящийся под нулевым потенциалом. Перед входом в ортогональный ускоритель имеется специальная оптика, формирующая параллельный ионный пучок. Непрерывный ионный пучок заполняет ортогональный ускоритель до момента включения выталкивающего импульса. Выталкивающий импульс

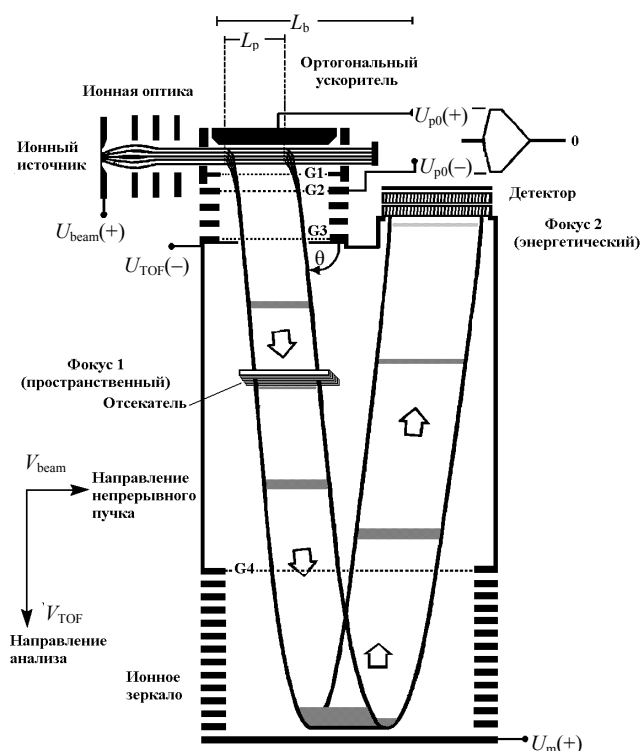


Рис 1. Основные компоненты о-TOF и их взаимное расположение в анализаторе типа рефлектрон.

$U_{p0}(+)$, $U_{p0}(-)$ — амплитуды положительного и отрицательного выталкивающих импульсов;
 U_{TOF} — напряжение, определяющее энергию ионов в пространстве дрейфа;
 U_m — напряжение на ионном зеркале;
 L_p — длина ионного пакета;
 L_b — расстояние, которое прошел бы ион некоторой массы за время движения иона такой же массы через источник и дрейфовое пространство до детектора;
 $G1, \dots, G4$ — сетки;
 θ — угол наклона траектории движения ионов в дрейфовом пространстве по отношению к направлению дрейфа

имеет фронт 3–100 нс и длительность 5–10 мкс. Во время действия выталкивающего импульса ионы испытывают силу, строго перпендикулярную оси ионного пучка. Под действием этой силы пакет ионов длиной L_p отбирается и, пройдя через сетку $G3$, входит в дрейфовое пространство с энергией, соответствующей потенциалу $U_{TOF}(+) U_p/2$. Результирующая скорость ионов в дрейфовом промежутке будет векторной суммой скорости ионов, с которой они входили в ортогональный ускоритель (V_{beam}), и скорости, приобретенной ионами при отборе из ортогонального ускорителя и последующем ускорении (V_{TOF}). Причем приобретенная при отборе и ускорении компонента скорости не

зависит от осевой скорости ионов в непрерывном пучке. Ионы, вошедшие в анализатор, сохраняют ту компоненту скорости, которую они имели в ионном пучке на входе в ортогональный ускоритель. По этой причине траектории ионов в дрейфовом промежутке будут наклонены по отношению к направлению анализа по времени пролета. Угол наклона определяется соотношением компонент скоростей в ионном пучке и скорости дрейфа. Для источников, формирующих ионы с постоянным отношением кинетической энергии к заряду, этот угол можно определить, исходя из значений приложенных потенциалов:

$$\theta = \arctg \left(\frac{U_{\text{beam}}}{U_{\text{TOF}}} \right)^{\frac{1}{2}},$$

где U_{beam} — потенциал, определяющий энергию ионов непрерывного пучка ионов; U_{TOF} — потенциал, определяющий энергию ионов в дрейфовом промежутке.

Направление дрейфа не следует путать с направлением анализа по времени пролета. Последнее перпендикулярно направлению ионного пучка в ортогональном ускорителе. Поэтому детектор ионов располагается строго параллельно направлению ввода ионного пучка. Зеркало настраивается таким образом, чтобы в плоскости детектора ионов образовывался пространственно-временной фокус. В то время, когда ионный пакет движется в пространстве дрейфа, ортогональный ускоритель снова заполняется ионным пучком. За время дрейфа иона с некоторой массой m ионы с такой же массой пройдут в ортогональном ускорителе расстояние L_b . Соотношение величин L_p и L_b вместе с проницаемостями сеток G1–G4 являются главными факторами, определяющими эффективность анализатора.

Таким образом, независимость направлений ионного пучка и анализа по времени пролета приводит к очевидным преимуществам такого анализатора:

1) возможность уменьшения средней начальной компоненты скорости ионов в направлении анализа до нуля и одновременное уменьшение разброса компонент скорости в направлении анализа;

2) возможность подбирать энергию ионов непрерывного пучка и энергию ионов в пространстве дрейфа таким образом, чтобы время, требующееся для заполнения пучком ортогонального ускорителя, и время прохождения ионами дрейфового пространства до детектора, были бы приблизительно равны.

Первое преимущество способствует достижению высокой разрешающей способности, воспроизводимости и линейности массовой калибровки

$t \approx (m/z)^{\frac{1}{2}}$. Второе определяет высокую чувствительность таких анализаторов.

Современный масс-спектрометр с о-TOF анализатором характеризуется чувствительностью, в 10–100 раз превышающей чувствительность квадрупольного и статического масс-анализаторов, и существенно большей скоростью сканирования, достигающей 10–100 спектров в секунду. Он обладает сравнимым со статическими приборами разрешением (5000–50 000) и точностью определения масс (несколько ppm), но при этом гораздо более компактен и значительно более дешев.

За последние 5 лет ортогональный TOF стал основным анализатором при разработке различных масс-спектрометрических приборов. Приблизительно треть выпускаемых сегодня и до 90 % заново разрабатываемых приборов используют в качестве масс-анализатора ортогональный TOF. На рис. 2 приведена диаграмма, иллюстрирующая рост количества работ, посвященных о-TOF, с 1989 г. (по данным Американского масс-спектрометрического общества).

Существующие масс-спектрометры с ортогональным TOF-анализатором можно разделить на две группы:

- просто масс-спектрометры с различными типами источников ионов, включая EI, ICP, ESI/APCI и столкновительный MALDI;
- второй масс-спектрометр в приборах MS—MS, как правило, в приборах типа Q—о-TOF (квадруполь—ортогональный TOF) и типа QIT—о-TOF (квадрупольная ионная ловушка—ортогональный TOF);

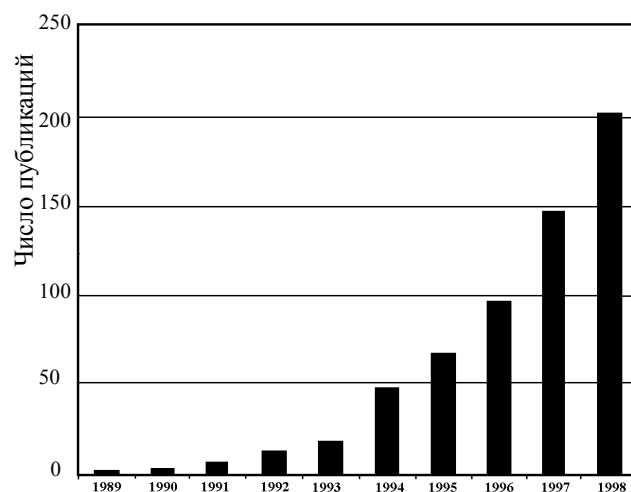


Рис 2. Рост числа публикаций, посвященных о-TOF анализаторам и их применениям

ПРИБОРЫ ТИПА ESI—o-TOF

Признанным лидером в создании прибора, сочетающего источник ионов ESI с o-TOF анализатором, является группа А.Ф. Додонова. Ими в 1987 г. был взят патент на устройство ввода непрерывного пучка ионов во времяпролетный анализатор [12]. В 1991 г. и в последующие годы они опубликовали первые результаты [14, 17].

На рис. 3 приведена схема o-TOF масс-спектрометра с источником ионов с электрораспылением (ES), описанного в 1991 г. [14]. В этом приборе ионы, возникающие при распылении раствора вблизи конца капилляра 1, проходят три стадии промежуточной откачки, обеспечиваемой насосами 3 и 5, скиммер и попадают в область накопления ионов 6. Так эту область называли авторы тогда, теперь в литературе эта часть прибора, как правило, называется устройством ортогонального ввода. В этой области ионы продолжают двигаться с энергиями около 10 эВ. Вытягивающие импульсы прикладываются к затвору области накопления ионов с частотой в несколько кГц, ионы разгоняются до энергии около 4 кэВ в направлении ионного зеркала. Прибор мог работать в линейном режиме (детектор 1), но основным режимом был отражающий режим (детектор 2), в котором за счет частичной компенсации пространственного и энергетического разбросов ионов достигалась разрешающая способность свыше 2000. При этом диапазон масс регистрируемых ионов в масс-спектрах достигал нескольких десятков тысяч дальтон.

Следует подчеркнуть еще раз, что описанный в работе [14] прибор был далеко не совершенен, полученные результаты — довольно скромные, и тем не менее это был скачок вперед в то время, когда времяпролетная масс-спектрометрия уже вступила в период подъема, во многом благодаря совершенствованию масс-спектрометрии MALDI (работа [11]). Работа А.Ф. Додонова с сотрудниками была сразу замечена и оценена рядом специалистов-аналитиков, быстро включившихся в разработку и совершенствование методик анализа на подобных приборах. Сочетание источника ионов с электрораспылением с анализатором o-TOF сулило исследователям (и их ожидания во многом оправдались) повышение чувствительности, увеличение скорости работы систем MS и MS—MS в сочетании с жидкостным хроматографом, большой диапазон масс и отличную точность определения массы.

Среди многих проблем, с которыми столкнулись разработчики системы ESI—o-TOF, отметим проблему, связанную с природой самого способа ионизации. Ионы в пучках, формируемых источниками с ионизацией при атмосферном давлении, имеют тенденцию характеризоваться скорее одина-

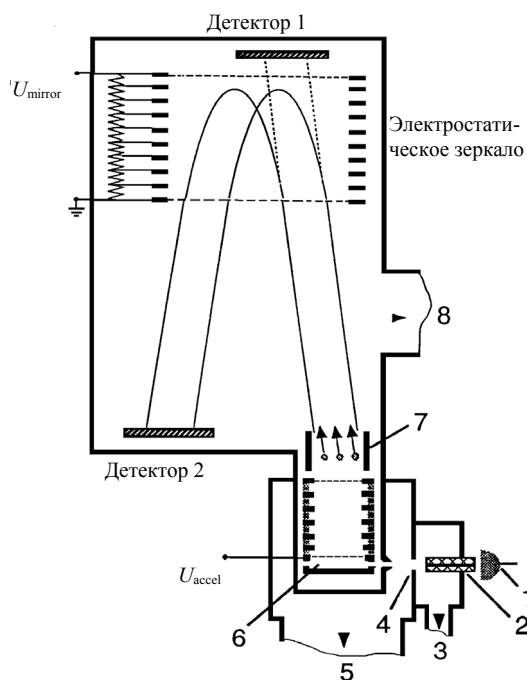


Рис. 3. Схема отражающего o-TOF масс-спектрометра с источником ионов с электрораспылением (из работы [14]).

- 1 — электрораспылительный капилляр;
- 2 — прогреваемый металлический капилляр;
- 3 — механический насос, 12 л/с;
- 4 — скиммер;
- 5 — турбомолекулярный насос, 500 л/с;
- 6 — область накопления ионов;
- 7 — отклоняющие пластины;
- 8 — крионасос, 1000 л/с

ковостью своих скоростей, чем равенством кинетических энергий. Причина этого явления кроется в особенностях процессов столкновений, происходящих при направленном сверхзвуковом расширении газа через диафрагму, отделяющую область атмосферного давления от области высокого вакуума. При этом оказывается, что в сверхзвуковых пучках энергия ионов зависит от массы. Для таких пучков оказывается, вообще говоря, что ионы с разными массами проходят пространство дрейфа по отличающимся траекториям. Следствием этого являются значительные дискриминации по массам. Для решения этой проблемы многие исследователи использовали отклоняющие пластины, помещенные в пространство дрейфа, которые позволяли выбирать регистрируемый диапазон масс [15, 17, 19, 20]. Проблема особенно остро стоит в тех случаях, когда необходимо регистрировать широкие диапазоны масс.

Хорошим решением проблемы оказалось использование мультипольных приборов, заполненных

газом при давлении несколько торр, и питаемых только радиочастотным напряжением (RF—only multipole). При движении в области быстропеременного электрического поля ионы вынуждены совершать колебания около оси пучка, испытывая при этом множество столкновений с молекулами газа. Эти столкновения уменьшают среднюю энергию ионов до энергии молекул газа, а ионы стягиваются к области оси пучка. В реальных системах используются для этих целей квадруполь и гексаполи [21]. На рис. 4 приведена схема ESI—o-TOF прибора, использующего интерфейс с радиочастотным газонаполненным квадруполем, в котором осуществляется столкновительная фокусировка пучка. На рис. 5 приводятся результаты моделирования траекторий ионов в системе радиочастотного мультиполя. В последнее время очень много усилий прилагается исследователями для создания моделей явлений, сопровождающих движение ионов в мультипольных переменных электрических полях с учетом столкновений с фоновым газом при сравнительно больших давлениях. В работе [22] рассматривается применение модели столкновительного охлаждения к ионным пучкам малых масс. В работе [23] предложена теоретическая модель столкновительного охлаждения. Совершенствование подобных систем является одним из основных направлений улучшения аналитических характеристик систем ESI—o-TOF. На рис. 6 приводится схема более совершенной системы согласования ионного пучка, содержащая в своем составе не только радиочастотный квадруполь, но и дополнительный секционированный радиочастотный квадруполь с продольным постоянным электрическим полем [24].

Одной из особенностей ионизации электрораспылением растворов биомолекул является образование ионов, несущих не один, а много зарядов, при этом становится возможным регистрация в масс-спектрах ионов очень больших масс, так как величина m/kz (k — число единичных зарядов z , которые несет ион) уменьшается. При этом ионы, недоступные для наблюдения на квадрупольных приборах, становятся доступными при использовании времяпролетных. Высокая разрешающая способность TOF-анализатора позволяет определять зарядность по расстоянию между изотопными пиками. С другой стороны, большой диапазон масс, регистрируемых с достаточной разрешающей способностью, свойственный современному TOF-анализатору, позволяет анализировать протеины и их нековалентные комплексы в физиологических условиях ($\text{pH} = 7$), когда образование многозарядных ионов снижается.

Совершенствование системы ESI—o-TOF привело к тому, что уже в 1992–1993 гг. эта система по своим основным аналитическим характеристикам (разрешающая способность, диапазон масс и

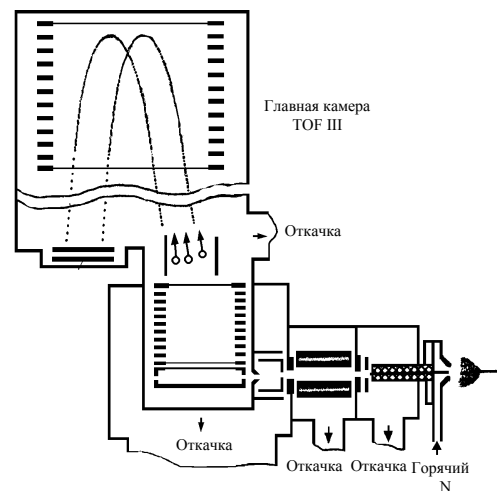


Рис. 4. Схема масс-спектрометра с o-TOF анализатором и источником ионов типа ESI, с встроенным радиочастотным квадруполем, используемым для столкновительной фокусировки ионного пучка перед вводом в ортогональный ускоритель (из работы [21])

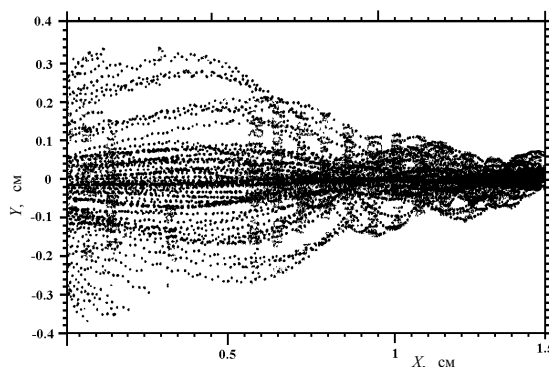


Рис. 5. Результат моделирования ионных траекторий в радиочастотном квадруполе. По оси Y отложены радиальные отклонения ионов, по оси X — расстояние вдоль движения ионного пучка (из работы [21])

чувствительность) превысила возможности квадрупольных систем. В 1994 г. А.Н. Веренчиковым с сотрудниками [25] был описан o-TOF масс-спектрометр, предназначенный в качестве детектора для жидкостного хроматографа (LC). Прибор демонстрировал разрешающую способность свыше 4000 и был способен зарегистрировать менее 10^{-14} М пептида neurotensin. Работа продемонстрировала многообещающие перспективы аналитических возможностей системы ESI—o-TOF/LC.

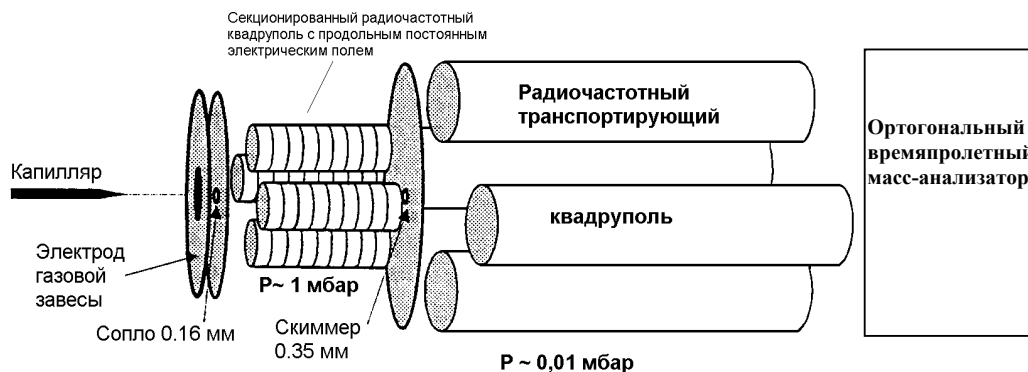


Рис. 6. Схема конструкции сложного квадрупольного интерфейса, включающего в себя секционированный радиочастотный квадруполь с продольным электрическим полем (из работы [24])

Уже в 1996 г. был выпущен и продан первый коммерческий прибор такого типа. Это Mariner, выпущенный фирмой Perseptive Biosystems. Он представлял собой масс-спектрометр с анализатором типа *o*-TOF и с источниками ионов типа ESI и APCI, разработанный в качестве детектора жидкостного хроматографа.

Этот прибор обладал следующими характеристиками:

- вес настольного (bench-top) прибора около 70 кг;
- разрешающая способность больше 5000;
- точность определения масс лучше чем 5 ppm с внутренней калибровкой;
- массовая стабильность лучше чем 50 ppm за 8 ч;
- чувствительность 10^{-15} М по пептидам и в 10–100 раз выше чувствительности квадрупольных приборов в режиме сканирования;
- скорость сканирования 10 сканов в секунду;
- диапазон масс 30–10 000 D с полным представлением всего диапазона;
- программное обеспечение совместимое с основными типами жидкостных хроматографов и автосамплеров.

Основное применение прибора — быстрое определение малых молекул для фармацевтической промышленности. Прибор совмещен с 8-канальным автосамплером Guilson, способным ввести до 8 образцов в минуту. Точное определение массы позволяет устанавливать элементный состав малых молекул лекарственных препаратов и их метаболитов (до 500 D).

Другим важным применением прибора является определение с помощью комплекса LC—MS

набора белков (протеинов) для международной программы "Протеома". LC-разделение обеспечивает природную чистоту загрязненных образцов, экстрагируемых из двумерных гелей (2D gels). Чувствительность оказывается достаточной для наблюдения слабых пептидных компонент (менее 10^{-4} основной компоненты). Разрешение оказывается достаточным для автоматического определения зарядового состояния, и, следовательно, молекулярный вес пептидов определяется с высокой точностью по массе, что дает однозначные результаты поиска в базах данных.

Производство LCT (Micromass) начато в 1997 г. Прибор очень похож на Mariner и предназначен для тех же применений. Прибор снабжен более удобным программным обеспечением, имеет более устойчиво работающий источник ионов, позволяющий работать с более грязными образцами. По сравнению с Mariner прибор имеет меньшую точность определения масс и меньшую стабильность определения масс (10 ppm и 100 ppm соответственно).

BRUKER разработал прибор с большим разрешением $(10-15) \cdot 10^3$ и большей точностью определения масс (1–3 ppm). Ощутимые размеры прибора и высокая стоимость (около \$250 000) ограничивают его распространение.

HP и ThermoQuest одновременно разрабатывают похожие приборы с источниками ионов ESI/APCI. Обе компании пытаются выступить с недорогим и надежным прибором, предназначенным главным образом для фармацевтических приложений. Рынок постоянно расширяется и прибор типа ESI—*o*-TOF становится настоящей "рабочей лошадью" для быстрых качественных анализов.

Эти приборы продолжают вытеснять квадрупольные масс-спектрометры с ESI источником. По-видимому, рынок о-TOF приборов будет значительно расширяться, как только приборы будут адаптированы для количественных анализов. Делаются усилия для преодоления существующих ограничений в системах счета и представления данных. В ближайшие два года ожидается, что этот прибор станет одним из самых популярных приборов подобного класса.

ПРИБОРЫ ТИПА MALDI—O-TOF

MALDI является по природе своей импульсным процессом ионизации, совместимым с обычным времяпролетным анализатором. Самые ранние попытки работать с этим способом получения ионов были проделаны с обычным линейным TOF-анализатором [26].

Разрешающая способность и точность определения масс в этих экспериментах были довольно низкими. Главной причиной этого является кинетическая энергия ионов, образующихся при лазерной десорбции/ионизации. Образующиеся ионы имеют большие кинетические энергии, увеличивающиеся с массой, и эти энергии распределены в широком диапазоне. Применение ионного зеркала позволило частично скомпенсировать энергетический разброс и улучшить разрешающую способность. Следующим шагом, позволившим еще более повысить разрешающую способность и улучшить точность определения массы, было применение так называемой задержанной экстракции [27, 28]. К сожалению, длительность задержки должна регулироваться для выбранного диапазона масс. Следующим шагом явилось применение о-TOF

анализатора, что позволило еще увеличить разрешающую способность приборов.

Первые результаты по MALDI—о-TOF были опубликованы в начале 90-х г. [26, 27, 28] и получены на приборе, схема которого приведена на рис. 7. Это линейный времяпролетный анализатор, образующиеся ионы двигаются перпендикулярно оси TOF-анализатора, мишень смещена на 8 мм от оси анализатора для достижения требуемой задержки между моментом образования ионов и временем их отбора в анализатор. Были зарегистрированы ионы протеинов с массами, превышающими 100 000 Da [26]. Разрешающая способность в спектрах не превышала 300. Но уже через четыре года появилась работа [29], в которой сообщалось о достижении разрешающей способности около 3000, причем это значение ограничивалось параметрами регистрирующей системы. Применение более совершенной системы регистрации позволило на той же установке достичь разрешающей способности, превышающей 4000 [30]. В работе [31] сообщалось о сочетании о-TOF анализатора (см. рис. 4), работавшего с источником ионов ES, с источником MALDI. При этом в составе прибора был сохранен газовый интерфейс со столкновительной фокусировкой. Достигнутая разрешающая способность превышала 5000, а точность определения массы равнялась приблизительно 30 ppm.

До сих пор были продемонстрированы только исследовательские прототипы. В течение 1998–1999 гг. исследовательские приборы проверялись в University of Manitoba, PE Bio, UCSF, Sciex и Rockefeller University. Весьма существенным оказалось изменение вакуумных условий в области мишени. Показано, что заполнение MALDI-источника газом при давлении от 100 мторр

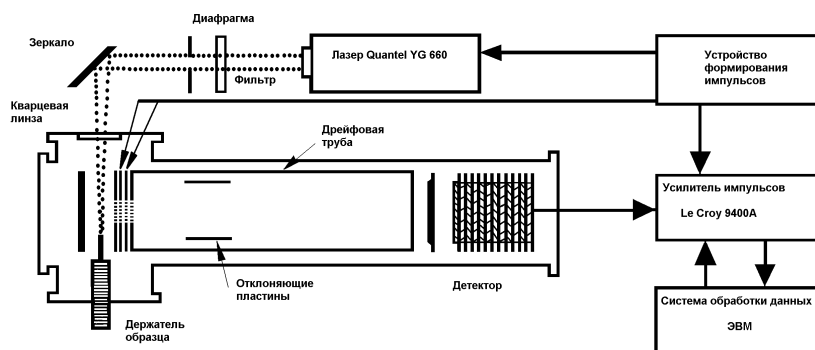


Рис. 7. Схема линейного о-TOF анализатора, работающего в режиме MALDI (из работы [26])

до 1 торр оказывает очень заметное влияние на работу источника [32]. Столкновения с газом охлаждают образовавшиеся ионы, и источник MALDI оказывается способным работать при значительно больших мощностях в импульсе лазера и при гораздо больших частотах повторения лазерных импульсов. В результате этого интенсивность сигнала увеличилась на 6–7 порядков (10^6 – 10^7). Благодаря охлаждению при столкновениях в транспортирующем квадруполье, измерение масс в TOF-анализаторе полностью независимо от условий в источнике ионов. Длительная игра, в которую превращалась настройка обычного MALDI TOF прибора, преодолена. Теперь нет нужды поиска наиболее эффективного пятна на MALDI мишени, специальной методики приготовления образцов и тщательного подбора энергии лазерного импульса. Прибор становится очень дружелюбным по отношению к пользователю.

Есть достаточные основания полагать, что в течение ближайших двух лет произойдет переход от обычного DE MALDI TOF (delayed extraction MALDI TOF) к столкновительному MALDI прибору, построенному на TOF анализаторе и работающему с высокой скоростью повторения импульсов лазера.

ПРИБОРЫ ТИПА GC—TOF

Ключевое преимущество систем EI—o-TOF реализуется в сочетании с газовым хроматографом (GC). Первое описание EI—o-TOF было опубликовано австралийскими исследователями [13, 16]. В первой статье приводились оценки разрешающей способности и чувствительности, которые можно ожидать от линейного TOF с источником EI. Исследовательский прибор длиной 1.5 м продемонстрировал параметры, лучшие чем ожидалось: разрешающую способность около 4000, прекрасную чувствительность и спектры электронного удара, великолепно совпадающие с табличными спектрами, снятыми на сканирующих приборах.

Хроматографическое разделение летучих органических соединений современными методами можно проводить с такими скоростями, которые недоступны сканирующим масс-анализаторам [33]. Принципиальное решение этой задачи — в использовании TOF MS. Правда, очень немногие попытки соединения источника ионов EI с TOF-анализатором давали в результате одновременную реализацию достаточно высокой разрешающей способности, чувствительности и сочетаемости экспериментальных масс-спектров с библиотечными. Прибор, описанный в [13, 16], использовался, в частности, для демонстрации его возможностей при работе в сочетании с высокоскоростным

газовым хроматографом. При этом прибор работал со скоростью 22 скана в секунду, а ошибка определения массы не превышала 26 ppm в диапазоне масс 27–204 [34].

Первая коммерческая система была произведена фирмой LECO в 1996 г. Прибор имеет огромную скорость обработки спектров — до 500 спектров в секунду, — что позволяет реализовывать быстрые GC—MS и GC—GC—MS. Просчеты в конструкции ограничивают разрешение прибора величиной 500, а чувствительность в 10 раз меньше чувствительности квадрупольных систем (электронный удар требует режима полного сканирования). Программное обеспечение слабо разработано по сравнению с основными системами GC-quad—MS. Продаются несколько десятков приборов в год.

Первой успешной моделью GC—TOF является прибор Tempus, разработанный фирмой ThermoQuest в 1999 г. Прибор имеет чувствительность, по крайней мере в 10 раз превышающую чувствительность системы GC-quad—MS, разрешение прибора более 1500, соответствующее требованиям систем GC—MS. Прибор работает со скоростью до 100 сканов в секунду, достаточной для быстрой GC—MS. Уникальной особенностью Tempus является широчайший динамический диапазон в 10^5 , обеспеченный трехканальной системой измерения. Система измерения сочетает в себе два счетных канала и один аналоговый канал. Программное обеспечение X-Calibur обеспечивает многочисленные стандартные применения GC—MS. ThermoQuest продает около 50 приборов в год, и число продаж стремительно растет.

Самый совершенный прибор GC—TOF создан фирмой Micromass в 1999 г. Разрешающая способность свыше 5000, и точность определения массы 10 ppm обеспечивают дополнительные возможности при идентификации молекул по библиотекам спектров электронного удара.

Ожидается, что GC—TOF заменит квадрупольные системы, как только производство их достигнет определенного уровня и цена упадет.

ПРИБОРЫ ТИПА ICP—TOF

В сочетании ICP—TOF времяпролетный анализатор обеспечивает два очевидных преимущества: скорость анализа и измерение всех элементов одновременно. Существует, однако, и третье менее очевидное преимущество при измерении изотопных отношений близких изотопов. Это преимущество, пока, скорее, ожидаемое, следует из того факта, что время отбора пакета ионов при использовании o-TOF анализатора мало по сравнению с периодом электрического шума в плазме. И поэтому ионы близких изотопов испытывают почти

одинаковое искажающее воздействие, что почти не сказывается при вычислении отношения.

С другой стороны, применение ICP—o-TOF связано с преодолением довольно серьезных трудностей. Плазменный источник работает при высокой температуре и формирует очень интенсивный пучок ионов. В основном это ионы Ag^+ или, например, ионы Na^+ , если матрица образца содержит морскую воду. Попадание этих ионов на детектор сильно сокращает срок его службы. Проблема в значительной степени решается введением с состав прибора гасителя (quencher). Оказалось, что можно подобрать амплитуду, длительность и время действия импульса, подаваемого на гаситель, такие, что интенсивность нежелательных ионов на детекторе падает на 5–6 порядков.

Ионы пучка испытывают газодинамическое ускорение при вводе в анализатор и имеют почти одинаковые скорости при широком диапазоне масс. Это является серьезной проблемой для o-TOF, так как является причиной значительных дискриминаций по массам. До сих пор не опубликованы попытки преодолеть эти трудности применением столкновительной фокусировки.

И все-таки самой главной технической проблемой ICP—TOF MS является достижение динамического диапазона, превышающего 10^6 .

Подробное описание системы ICP—o-TOF содержится в работах [35–37].

Существует единственный прибор, разработанный и выпускающийся австралийской фирмой GBC Scientific Equipment, Melbourne, который пе-

рекрывает динамический диапазон в 6 порядков по амплитуде. Требования большого динамического диапазона в o-TOF трудно совместимы с высоким разрешением (неприемлемы сетки), быстрой регистрацией (не получить достаточного счета за короткое время) и высокой чувствительностью (чувствительность ограничивается химическим шумом и рассеянными ионами). Поэтому нет ни одного очевидного приложения, где o-TOF давал бы решающее преимущество. Техника пока находится в стадии исследований.

АНАЛИЗАТОР O-TOF В СОСТАВЕ MS—MS КОМПЛЕКСА

Анализатор o-TOF оказался весьма перспективным вторым анализатором в комплексах MS—MS, где он подчас успешно заменяет квадрупольные и статические анализаторы. Одной из наиболее успешных реализаций такого использования o-TOF анализатора является коммерческий статический масс-спектрометр с двойной фокусировкой AutoSpec TOF [38]. Прибор может работать как в режиме ESI, так и в режиме MALDI. Основным преимуществом такого сочетания является одновременная регистрация всех фрагментов, образующихся в столкновительной ячейке. Это обеспечивает повышение чувствительности при условии высокой эффективности времяпролетного анализатора. На рис. 8 приведена схема этого комплекса. В работе [39] показано, что

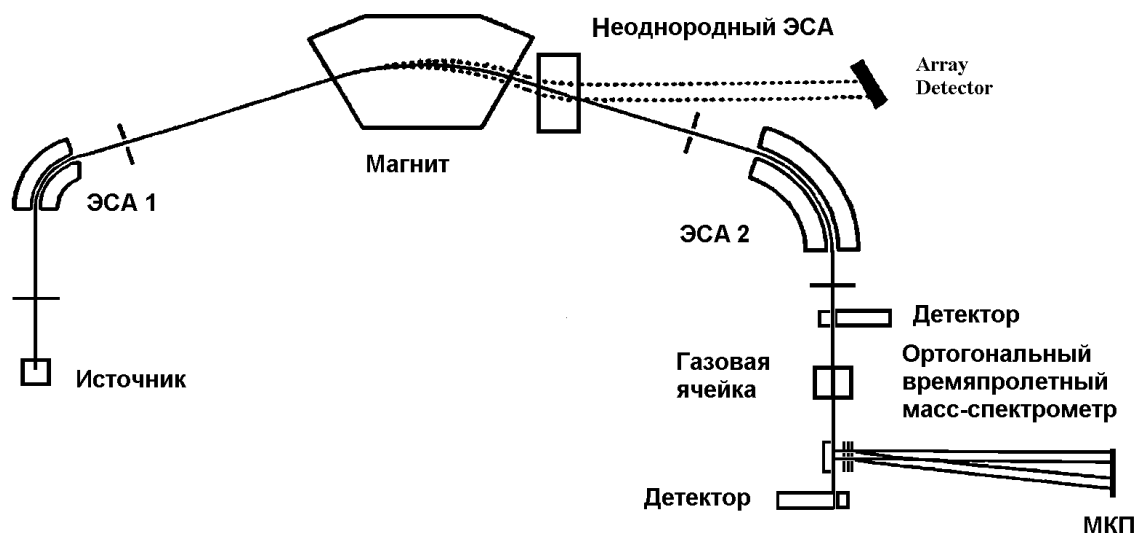


Рис. 8. Схема масс-спектрометра AutoSpec TOF, состоящего из статического масс-спектрометра с двойной фокусировкой, столкновительной газовой ячейки и o-TOF анализатора (из работы [37])

чувствительность этого прибора при анализе структуры нуклеотидов превышает чувствительность тройного квадруполя.

В режиме MALDI при анализе структуры *renin* substrate ($m/z = 1758.9$) были получены те же ионные последовательности, что и при использовании четырехкаскадного секторного прибора [38].

ПРИБОРЫ ТИПА Q—TOF

В 1996 г. появилось сообщение об очень удачном сочетании *o*-TOF анализатора с квадрупольным анализатором (Q). Схема прибора приведена на рис. 9. Он включает в себя квадруполь и столкновительную ячейку (MS1), заимствованные из тройного квадруполя, и отражающий *o*-TOF анализатор (MS2). На приборе продемонстрированы разрешающая способность MS2 около 5000, чувствительность на уровне 10^{-15} – 10^{-18} моля, прекрасная точность определения масс, простая и воспроизводимая калибровка и высокая скорость анализа в режиме MS/MS [40]. Авторы утверждали, что сочетание жидкостного хроматографа, источников ионов ES и наноспрея с данным прибором позволило повысить чувствительность и раз-

решающую способность при MS/MS анализе структуры сложных пептидов в 10–100 раз. Возможности масс-спектрометрического анализа с высокой чувствительностью были продемонстрированы при секвенировании биополимеров с использованием жидкостного хроматографа и при анализе гликопротеинов [41].

Подобный прибор был использован для высокоэффективного секвенирования белков с использованием изотопной метки ^{18}O в сочетании с наноспреем [42].

В сочетании с жидкостным хроматографом в режиме MS/MS прибор типа Q—TOF в некоторых случаях дает 50-кратное увеличение чувствительности по сравнению со сканирующим квадруполом.

Прибор очень быстро завоевал популярность, и названный Q-TOF, был выпущен фирмой Micromass уже в 1997 г. Прибор был переделан из ESI—3Q (тройной квадруполь) путем замены последнего квадруполя на *o*-TOF. Прибор оказался очень удачным. Несмотря на высокую стоимость (начальная цена равнялась \$600 000, и в течение двух лет упала до \$450 000), прибор сразу же стал популярен на рынке аналитических приборов. Похожий прибор был выпущен фирмой Sciex

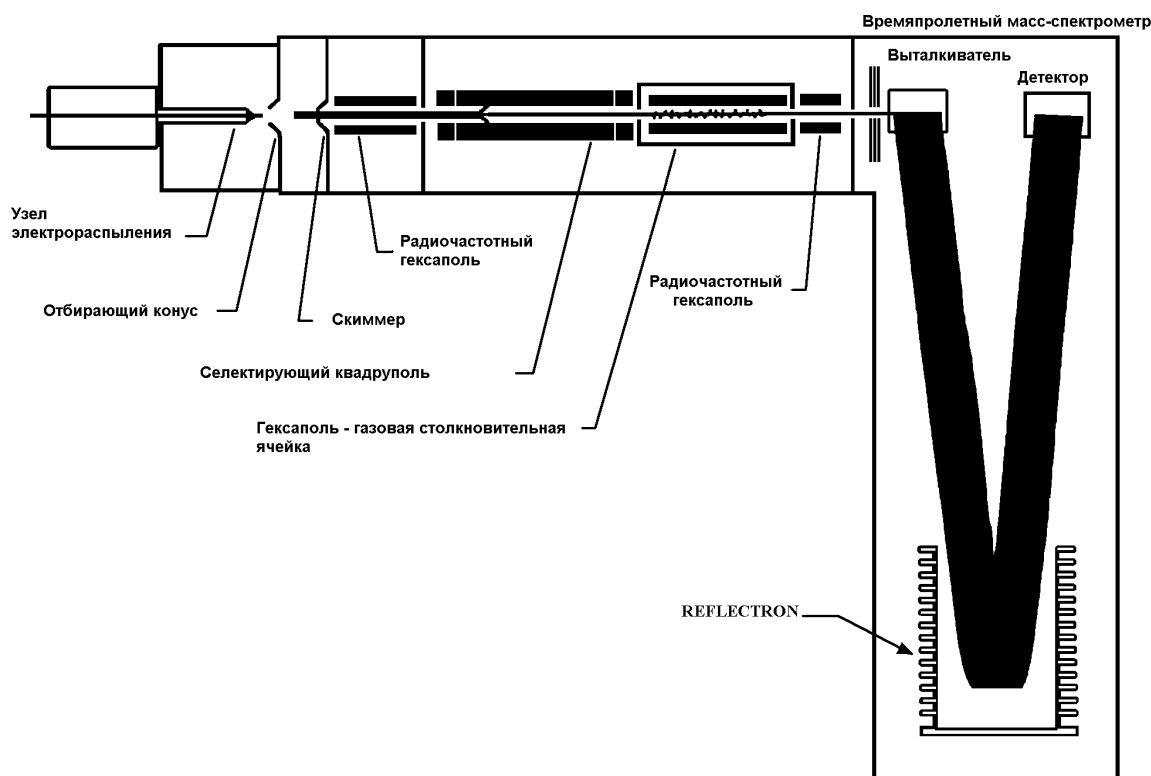


Рис. 9. Схема Q—TOF анализатора. Первый каскад и столкновительная ячейка заимствованы из тройного квадруполя; второй каскад — отражающий *o*-TOF (из работы [39])

в 1998 г. и назван Q-STAR. Недавно фирма дополнительно ввела в состав прибора столкновительный MALDI ионный источник.

Q—TOF приборы в большинстве случаев используются для расшифровки белков и для описания метаболизма лекарственных препаратов. Система обеспечивает анализ в режиме MS—MS с высокой определенностью (благодаря высокому разрешению и точности определения масс, обеспечиваемых о-TOF) и чувствительность в 10–100 раз превышающую чувствительность систем с тройным квадруполем. Очень показательно само по себе, что фирма Sciex, первая выпустившая тройные квадруполы, теперь полностью переключилась на Q—TOF приборы.

Система имеет характеристики, близкие к предельным возможностям о-TOF. Разрешающая способность у вновь разрабатываемых систем достигает 30 000, а точность определения масс лучше, чем 1 ppm. Чувствительность о-TOF улучшена с помощью так называемого пульсара (pulsar). Ионы выталкиваются импульсами из столкновительной CID-ячейки таким образом, что они без потерь используются при ортогональной инъекции в о-TOF. В результате чувствительность о-TOF системы в режиме сканирования полного спектра приближается к чувствительности тройного квадрупольного прибора в режиме мониторинга выбранного иона. В результате высокохарактеристический MS—MS прибор становится чувствительнее простого MS инструмента, чувствительность которого ограничена химическим шумом. В сочетании с микроколоночным жидкостным хроматографом с малой скоростью потока (меньше 1 мл/мин), либо с nano-spray источником ионов система достигает уровня детектирования 10^{-17} М.

Программное обеспечение обоих Q—TOF приборов адаптировано к циклу жидкостного хроматографа. Так называемые зависимые от получаемых данных алгоритмы позволяют автоматически переключать прибор из режима моно-MS в режим MS—MS в течение цикла работы жидкостного хроматографа по основным ионам. В результате в процессе работы системы LC—MS—MS получение данных происходит без необходимости принятия решений оператором в течение всего процесса разделения на LC. Сложные смеси, вроде смеси из 100 белков (protein digest), были успешно идентифицированы. Прибор оказался чрезвычайно полезным при секвенировании белков с неизвестной последовательностью аминокислот (de-novo proteins). Кроме того, он оказался очень эффективен при описании лекарственных смесей, основанном на комбинировании данных библиотек.

На сегодняшний день Q—TOF является самым эффективным прибором для определения сложных смесей, а также для использования в исследова-

тельских программах, подобных исследованию протеом, олигосахаридов и олиголипидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Даже из нашего краткого обзора очевиден необыкновенный подъем, переживаемый времяпролетной масс-спектрометрией с начала 90-х годов по настоящее время. Подъем этот выражается и во впечатляющем росте аналитических параметров анализаторов, расширении методических возможностей, увеличении скорости и информативности анализов. Многие приборостроительные фирмы переносят центр тяжести своих исследовательских и конструкторских работ на разработку приборов, являющихся различными сочетаниями времяпролетного анализатора с ортогональным вводом ионного пучка с системами ввода вещества (жидкостные и газовые хроматографы, приборы капиллярного электрофореза и т. д.) или с другими анализаторами (квадрупольный анализатор). Во всех случаях ключевым элементом разработки является ортогональный времяпролетный анализатор (о-TOF).

Разработка базового ортогонального TOF-анализатора и его основных компонент является жизненно важной задачей российского научного приборостроения. Только при этом условии будет возможно производить современные и конкурентоспособные приборы как для научных исследований, так и нужд промышленности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brunnee C. The Ideal Mass Analyzer: Fact or Fiction // Intern J. Mass Spectrom.: Ion processes. 1987. V. 76. P. 121–237.
2. Мамырин Б.А., Каратаев В.И., Шмигк Д.В., Загулин В.А. Масс-рефлектор: новый безмагнитный времяпролетный масс-спектрометр с высокой разрешающей способностью // ЖЭТФ. 1973. Т. 64. Вып. 1. С. 82–89.
3. Wiley W.C, McLaren I.H. Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution // Rev. Sci. Instrum. 1955. V. 26. P. 1150–1157.
4. Cotter R.J. Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules // Anal. Chem. 1992. V. 64. P. 1027A–1039A.
5. Cotter R.J. Time-of-flight mass spectrometry. Washington: American Chemical Society, 1994. 233 p.
6. Cotter R.J. Time-of-flight mass spectrometry: Instrumentation and applications in biological research. Washington: American Chemical Society, 1997. 326 p.

7. Cotter R.J. The new time-of-flight mass spectrometry // *Anal. Chem.* 1999. V. 71. P. 445A–451A.
8. Wollnik H. Time-of-flight mass analyzers // *Mass Spectrom. Rev.* 1993. V. 12. P. 89–114.
9. Guilhaus M. Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* 1995. V. 30. P. 1519–1532.
10. Guilhaus M., Mlynsky V., Selby D. Perfect timing: time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997. V. 11. P. 951–962.
11. Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1987. V. 78. P. 53–68.
12. Dodonov A.F., Chernushevich I.V., Dodonova T.F. et al. Reflecting time-of-flight mass spectrometer with an API ion source and orthogonal extraction. Patent 1681340 A1 USSR, 25 February 1987.
13. Dawson J.H.J., Guilhaus M. Orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1989. V. 3. P. 155–159.
14. Dodonov A.F., Chernushevich I.V., Laiko V.V. Electrospray ionization on a reflecting time-of-flight mass spectrometer // 12th Int. Mass Spectrometry Conference. Amsterdam, August 1991. Extended Abstracts. P. 153.
15. Dodonov A.F., Chernushevich I.V., Laiko V.V. Electrospray ionization on a reflecting time-of-flight mass spectrometer // *Time-of-Flight Mass Spectrometry* / Ed. R.J. Cotter Washington, D.C., 1994. ACD Symposium. Series 549. P. 108.
16. Coles J., Guilhaus M. Orthogonal acceleration — a new direction for time-of-flight mass spectrometry // *Trends Anal. Chem.* 1993. V. 12. P. 203–213.
17. Mirgorodskaya O.A., Shevchenko A.A., Chernushevich I.V. et al. Electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry in protein chemistry // *Anal. Chem.* 1994. V. 66. P. 99–107.
18. Lehrle J.J., Robb J.C., Thomas D.W. A modified time-of-flight mass spectrometer for studying ion—molecule or neutral particle—molecule interactions // *J. Sci. Instrum.* 1962. V. 39. P. 458–463.
19. Boyle J.G., Whitehouse C.M. Time-of-flight mass spectrometry with an electrospray ion beam // *Anal. Chem.* 1992. V. 64. P. 2084–2089.
20. Sin C.H., Lee E.D., Lee M.L. Atmospheric pressure ionization time-of-flight mass spectrometry with supersonic ion beam // *Anal. Chem.* 1991. V. 63. P. 2897–2900.
21. Krutchinsky A.N., Chernushevich I.V., Spicer V.L. et al. Collisional damping interface for an electrospray ionization time-of-flight mass spectrometer // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998. V. 9. P. 569–579.
22. Kozlovsky V., Fuhrer K., Tolmachev A. Cooling of direct current beams of low mass ions // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1998. V. 181. P. 27–30.
23. Tolmachev A.V., Chernushevich I.V., Dodonov A.F., Standing K.G. A collisional focusing ion guide for coupling an atmospheric pressure ion source to a mass spectrometer // *Nucl. Instr. and Methods Phys. Rev. B.* 1997. V. 124. P. 112–119.
24. Dodonov A., Kozlovsky V., Loboda A., Raznikov V. A new technique for decomposition of selected ions in molecule ion reactor coupled with ortho-time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997. V. 11. P. 1649–1656.
25. Verentchikov A.N., Ens W., Standing K.G. Reflecting time-of-flight mass spectrometer with an electrospray ion source and orthogonal extraction // *Anal. Chem.* 1994. V. 66. P. 126–133.
26. Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F. Matrix assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1987. V. 78. P. 53–68.
27. Lennon J.J., Brown R.S. Pulsed ion extraction combined with high accelerating potential for matrix assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry // *Proceeding of the 42nd ASMS Conference on Mass spectrometry and Allied Topics.* Chicago, Illinois, 1994, May 29–June 3. P. 501.
28. Vestal M.L., Juhasz P., Martin S.A. Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1995. V. 9. P. 1044–1050.
29. Mlynski V., Guilhaus M. Matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight mass spectrometer with orthogonal acceleration geometry: preliminary results // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996. V. 10. P. 1524–1530.
30. Guilhaus M., Mlynski V., Selby D. Perfect timing: time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997. V. 11. P. 951–962.
31. Krutchinsky A.N., Loboda A.V., Spicer V.L. Orthogonal injection of matrix-assisted laser desorption/ionization ions into a time-of-flight spectrometer through a collisional damping interface // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998. V. 12. P. 508–518.
32. Verentchikov A., Smirnov I., Vestal M. Collision cooling and ion formation in orthogonal MALDI at intermediate gas pressure // *Proceeding of 47th ASMS Conf. "Mass Spectrom. And Applied Topics"* (1999). Dallas, Texas. P. 3052–3053.
33. Holland J.E., Enke C.G., Allison J. et al. Mass spectrometry on chromatographic time scale: realistic expectations // *Anal. Chem.* 1983. V. 55. P. 997A–1012A.
34. Van Ysacker P.G., Guilhaus M., Roach L. et al. High-speed narrow-bore capillary gas chromatography

- in combination with orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometric detection // Proc. 18th Int. Symp. Capillary Chrom. 1996. Riva del Garda, Italy. P. 638–639.
35. Myers D.P., Li G., Hieftje G.M. An inductively coupled plasma — time-of-flight mass spectrometer for elemental analysis. Part I: Optimisation and characteristics // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1994. V. 5. P. 920–927.
 36. Myers D.P., Li G., Mahoney P.P., Hieftje G.M. An inductively coupled plasma — time-of-flight mass spectrometer for elemental analysis. Part II: Direct current quadrupole lens system for improved analytical performance // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1995. V. 6. P. 400–410.
 37. Myers D.P., Li G., Mahoney P.P., Hieftje G.M. An inductively coupled plasma — time-of-flight mass spectrometer for elemental analysis. Part III: Analytical performance // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1995. V. 6. P. 411–420.
 38. Bateman R.H., Green M.R., Scott G., Clayton E.A. Combined magnetic sector — time-of-flight mass spectrometer for structural determination studies by tandem mass spectrometry // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1995. V. 9. P. 1227–1233.
 39. Boschenok J., Sheil M.M. Electrospray tandem mass spectrometry of nucleotides // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1996. V. 10. P. 144–149.
 40. Morris H.R., Paxton T., Dell A. High sensitivity collisionally — activated decomposition tandem mass spectrometry on novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1996. V. 10. P. 889–896.
 41. Morris H.R., Paxton T., Panico M. A novel geometry mass spectrometer, the Q—TOF, for low — femtomole/attomole — range biopolymer sequencing // J. Protein Chem. 1997. V. 16. P. 469–479.
 42. Shevchenko A., Chernushevich I., Ens W. Facile "de novo" protein sequencing by a combination of nanoelectrospray, isotopic labelling and a quadrupole/time-of-flight mass spectrometer // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1997. V. 11. P. 1015–1024.

*Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург*

Материал поступил в редакцию 26.05.2001.

THE CURRENT STATE OF TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY DEVICES

A. N. Verenchikov, N. V. Krasnov, M. Z. Muradymov, J. I. Khasin

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

The current state, main design features and some applications of time-of-flight mass spectrometry are considered. Given are essential stages of development of analytical characteristics of main types of analyzers: linear and reflecting analyzers with the orthogonal ion beam extraction. Advantages of these analyzers as compared to other analytical devices are discussed, in particular, the feasibility of their combination with ion sources with continuous ion extraction.