
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

УДК 621.384.668.8: 537.534.7

© А. Н. Веренчиков

**ПАРАЛЛЕЛЬНЫЙ (МС-МС)-АНАЛИЗ
ВО ВРЕМЯПРОЛЕТНОМ ТАНДЕМЕ.
ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ, МЕТОД И СХЕМЫ ПРИБОРОВ**

Для повышения скорости и чувствительности tandemного масс-спектрометрического (МС-МС)-анализа предложено использовать тандем из двух времяпролетных анализаторов (ВПА) в принципиально новом режиме "вложенных времен": медленное разделение родительских ионов в первом анализаторе происходит на миллисекундной временной шкале, а быстрая фрагментация и быстрый масс-анализ фрагментов во втором анализаторе — на микросекундной шкале. Режим вложенных времен позволяет осуществлять так называемый "параллельный анализ" фрагментных спектров для всех родительских ионов в рамках единичного цикла разделения в ВПА1. Для реализации метода предложены "медленные" ВПА нового типа, сочетающие поперечное удержание ионного пучка с высоким порядком времяпролетной фокусировки по энергии ионов. Для поперечного удержания предложены радиочастотные (РЧ) или периодические электростатические поля. В работе анализируются характеристики ключевых компонент тандема, включая "медленный" ВПА, ионный источник с накопителем ионов и фрагментную ловушку с быстрым пропуском ионов.

ВВЕДЕНИЕ

До начала 80-х tandemная масс-спектрометрия (МС-МС) была представлена дорогостоящими и громоздкими четырех-секторными магнитными приборами, в основном используемыми для структурного анализа летучих соединений [1, 2]. По мере развития масс-анализаторов, а также после введения мягких методов ионизации ESI [3–6] и MALDI [7–9] проявился потенциал tandemной масс-спектрометрии как мощного аналитического инструмента. Выявились такие исключительные свойства (МС-МС)-инструментов, как высокая специфичность и высокая селективность при анализе сложных смесей [10, 11]. Кроме того, стало ясно, что предельная чувствительность одиночного масс-спектрометра теперь ограничена химическим шумом матриц или компонент растворителя. Селективность (МС-МС)-анализа позволяет снизить порог обнаружения минорных компонент и делает (МС-МС)-анализ незаменимым.

В последнее десятилетие (МС-МС)-инструменты значительно усовершенствовались [12]. Так, возникли тандемы квадруполь—времяпролетный МС (Q-TOF), линейные ионные ловушки (LIT MS), тандем ловушки и МС с преобразованием Фурье (LIT-FTMS) и tandemные времяпролетные МС (ВПМС, TOF-TOF). В таких тандемах достигаются высокая чувствительность в диапазоне не менее 10 фмоль (10^{-14} моль) и высокая скорость анализа фрагментов, до 1 спектра в секунду [13, 14]. Новые возможности (МС-МС)-анализа оказались особенно востребованы в биотехнологических приложениях, где необходим анализ слож-

ных смесей в большом диапазоне концентраций компонент. В результате сегодня биотехнология стала основным потребителем (МС-МС)-инструментов, а (МС-МС)-методы — наиболее информативными и наиболее достоверными методами анализа в биотехнологии.

Несмотря на большое многообразие tandemных (МС-МС)-приборов, все они имеют один общий недостаток — они используют лишь один вид родительских ионов в данный момент времени. Все другие родительские ионы выводятся из первичного ионного пучка и теряются. Поочередный, или "последовательный", анализ родительских ионов замедляет полный (МС-МС)-анализ до 1 секунды на компоненту и снижает его чувствительность в случае, если анализируются сложные смеси. Снижение производительности (МС-МС)-анализа особенно сильно сказывается в приложениях к задачам протеомики. Например, бактерия кишечной палочки (E-Coli) является одним из основных инструментов для биотехнологической экспрессии протеинов. Для исследования биохимических процессов в E-Coli необходимо анализировать состав смеси белков и изменения их концентраций. Для верхней оценки сложности смеси учтем, что бактерия имеет приблизительно 6000 генов, что соответствует примерно 15 000 белков, а при анализе белков по пептидным картам максимальное количество пептидов может достигать 1 000 000. В задачах, связанных с протеомом человека, цифры еще более внушительные — 30 000 генов, до 1 000 000 белков, соответствующих максимальному количеству 100 000 000 пептидов. Такие смеси слишком сложны для (МС-МС)-анализа даже

с учетом предварительного сепарирования на фракции с последующим разделением в жидкостном хроматографе (ЖХ). В настоящее время применение высокоавтоматизированных МС-МС типа LIT MS и Q-TOF позволяет определить лишь несколько тысяч пептидов за (ЖХ-МС-МС)-анализ, длящийся несколько часов [13, 15]. Производительность известных (МС-МС)-приборов прежде всего ограничена скоростью записи фрагментного спектра, составляющего около 1 секунды, а также последовательной схемой (МС-МС)-анализа.

Попытки параллельного анализа предприняты с использованием тандема "спектрометр подвижности—времяпролетный масс-спектрометр" (IMS-TOF), где масс-спектры фрагментов записывались параллельно для всех фракций ионной подвижности во время разделения в IMS [16, 17]. Однако низкая разрешающая способность IMS по массам (10–15) сильно ограничивает возможности тандема. Принцип вложенных времен применялся ранее и в двойном ВПМС-тандеме для изучения вторичной эмиссии тяжелых ионов в большом диапазоне масс от 300 до 130 000 Да [18, 19]. Однако тандем еще не был применен к (МС-МС)-анализу, а низкие параметры применяемых линейных ВПМС были непривлекательными для аналитических приложений.

В данной работе предложены времяпролетные тандемы нового типа, позволяющие проводить параллельный (МС-МС)-анализ в приборах со значительно более высокой разрешающей способностью, что предположительно повысит производительность МС-МС на два порядка — около 100 000 пептидов за (ЖХ-МС-МС)-анализ и позволит анализировать более сложные смеси.

ИДЕЯ ПАРАЛЛЕЛЬНОГО АНАЛИЗА ВО ВРЕМЯПРОЛЕТНОМ ТАНДЕМЕ

Идея параллельного (МС-МС)-анализа в ВПМС-тандеме нового типа была высказана автором в [20]. Предложено использовать два времяпролетных масс-спектрометра, в которых времена пролета отличаются на три порядка. Это позволяет достичь разумной $R = 300$ –500 разрешающей спо-

собности выделения ионов, типичной для 3-Q и Q-TOF. Поскольку масс-анализ во втором ВПМС занимает десятки микросекунд, то ВПМС1 должен проводить разделение ионов в диапазоне десятков миллисекунд — слишком долгое время для реализации на существующих ВПМС-приборах без катастрофического ухудшения параметров.

Для устранения ионных потерь при больших временах пролета предлагаются времяпролетные анализаторы (ВПА) нового типа, одновременно достигающие времяпролетную фокусировку по энергии и осуществляющие устойчивый захват ионного пучка за счет радиочастотных (РЧ) полей или за счет периодических статических полей. В настоящей работе рассматриваются три характерных примера таких новых анализаторов, способных работать в качестве ВПМС1 при низкой энергии ионов (1–100 эВ). Кроме того, обсуждаются принципы импульсных источников ионов с накоплением в РЧ-ловушке, а также принципы ячеек фрагментации (СИД-ячеек) со скоростным пропусканием ионов, оптимально совместимых с новыми ВПМС-тандемами.

ОБСУЖДЕНИЕ МЕТОДА ПАРАЛЛЕЛЬНОГО АНАЛИЗА В ВПМС

Блок-схема тандемного ВПМС нового типа изображена на рис. 1. Прибор работает следующим образом: импульсный источник ионов формирует пакет первичных (родительских) ионов и вводит ионы в первый времяпролетный анализатор ВПМС1 с малой энергией ионов ε в диапазоне от 1 до 100 эВ и большой длиной ионной траектории L в диапазоне от 10 до 100 м, что позволяет значительно замедлить процесс разделения родительских ионов в ВПА1. В качестве рабочего примера примем $L = 30$ м и $\varepsilon = 50$ эВ. Для типичных родительских ионов с отношением массы к заряду $m/z = 10^5$ кг/Кл (1000 а.е.м.) скорость составит $V = 2e \varepsilon / (m/z) = 3000$ м/с, а время пролета $T = L / V$ около 10 мс. Время между выходом разделяемых компонент (включающих группу из трех изотопов) составит более 15 мкс.

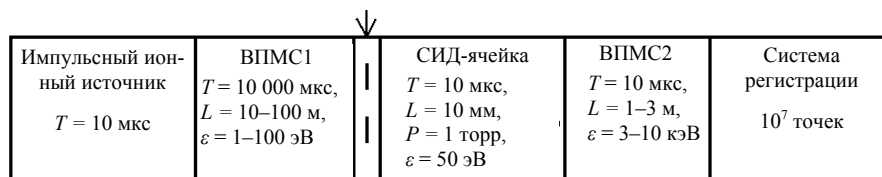


Рис. 1. Тандемный ВПМС с параллельным (МС-МС)-анализом (блок-схема)

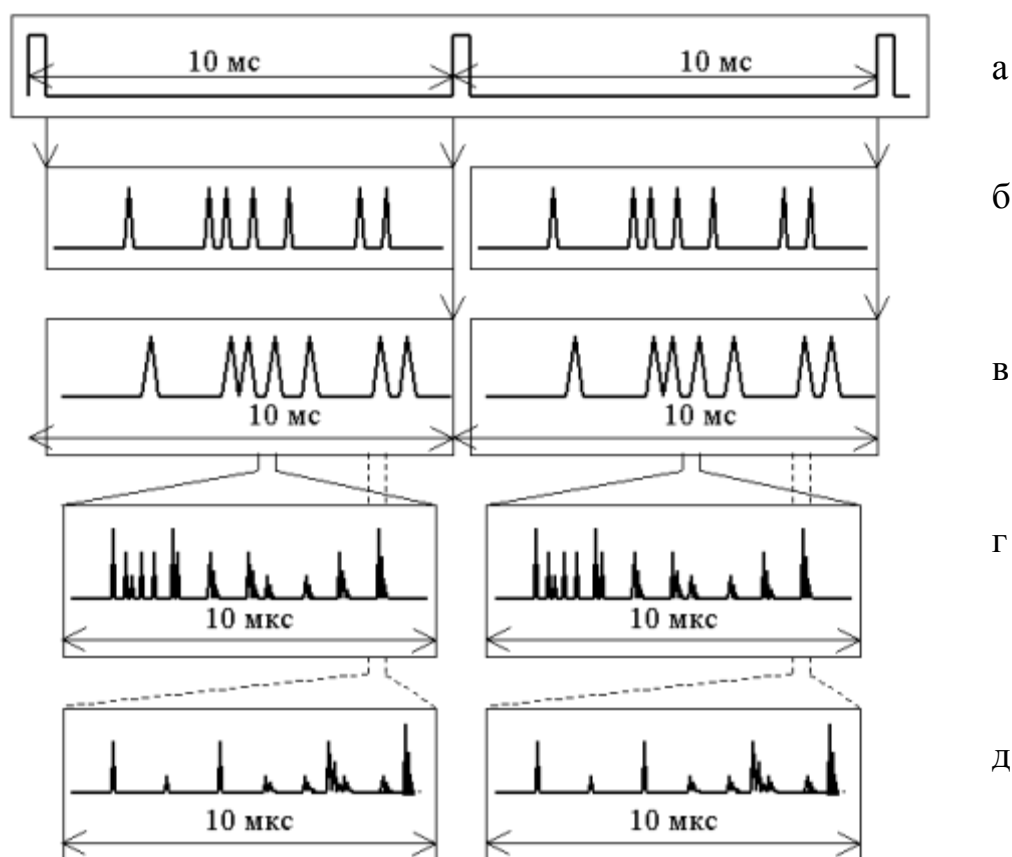


Рис. 2. Временная диаграмма цикла регистрации в ВПМС-тандеме с вложенными временами анализа.

а — импульсы смеси ионов из источника; б — разделение первичных ионов в ВПМС1; в — фрагментация и прохождение СИД-ячейки; г — масс-анализ фрагментов в ВПМС2; д — масс-анализ фрагментов другой компоненты

На рис. 2 приведена типичная временная диаграмма, иллюстрирующая способ tandemного анализа в режиме вложенных времен. Верхний график а представляет цикл регистрации, в котором ионы вводятся из источника ионов каждые 10 мс. Родительские ионы разделяются в первом времяпролетном анализаторе в течение 10 мс, и столкновительная ячейка получает последовательность ионных пакетов, разделенных в соответствии с массами родительских ионов, — график б. Родительские ионы подвергаются фрагментации в ячейке, и благодаря быстрому прохождению ячейки фрагментные ионы достигают второго времяпролетного анализатора, оставаясь в рамках одного импульсного пакета, — график в. Каждая

новая семья ионов вводится во второй времяпролетный анализатор, формируя масс-спектры на его выходе для различных родительских ионов, — графики г и д. Спектры с одинаковой временной меткой суммируются для множества импульсов источника ионов для улучшения качества спектров.

ИМПУЛЬСНЫЕ ИСТОЧНИКИ ИОНОВ ДЛЯ ВПМС-ТАНДЕМА

Во избежание ионных потерь источник ионов работает с частотой повторения импульсов около 100 Гц, что сочетается с 10 мс временным циклом МС-МС. Метод напрямую совместим как с им-

пульсными источниками типа MALDI, так и с непрерывными ионными источниками. В этом случае непрерывный поток ионов накапливается в накопителе и периодически инжектируется в ВПА1. Большинство источников совместимы с требованиями ВПМС-тандема, поскольку позволяют создать пучки с низкой энергией (1–100 эВ), сохраняя умеренный энергетический разброс (1–10 эВ), малую длительность (10 мкс) и расходимость (менее 10 мрад) ионного пакета (рис. 3).

Вакуумный источник MALDI

При использовании метода лазерной десорбции из специальных матриц MALDI [7–9] (рис. 3, а) анализируемые образцы (3) растворены с матрицей и наносятся на подложку (2) для высыхания и кристаллизации. Образец помещают в вакуумную камеру (1). Импульсный лазер (4), например азотный лазер (337 нм, 2нс), освещает 100 мкм пятно с плотностью энергии около 10 мДж/см², образуя ионы матрицы и преимущественно ионы образца, ускоряемые полем по направлению к выходной диафрагме (5) источника.

Оценим временной, энергетический и пространственный разбросы ионов в источнике MALDI. Известно, что ионы выходят со скоростью $V = 300\text{--}600$ м/с [21–24], скорее всего навязанной импульсной струей матрицы. Для ионов

с массой 1 кДа это соответствует энергетическому разбросу в ± 5 эВ. Можно оценить и временной разброс dt пучка, предполагая ускоряющее поле 1 В/мм: $dt = dV / A$, где dV — разброс по скорости, равный 300 м/с, и A — ускорение, равное 10^8 м/с². Таким образом, получаем временной разброс $dt = 3$ мкс. Угловой размер пучка da определяется начальным разбросом радиальной скорости — около 150 м/с [17]. При ускорении ионов до 50 эВ продольная скорость 1 кДа ионов составит 3000 м/с, и $da = 2 \cdot 150 / 3000 = 100$ мрад. Поскольку некоррелированный пространственный разброс пакета очень мал и равен диаметру лазерного пятна 0.1 мм, то угловой размер пучка da может быть снижен до 3–10 мрад за счет увеличения диаметра пакета до 1–3 мм. Необходимо учесть, что вакуумный источник ионов типа MALDI производит возбужденные ионы, не стабильные на больших временах пролета, поэтому предпочтительно использовать "холодные" матрицы, инфракрасный лазер или охлаждение ионов газом [25–28].

Непрерывные источники ионов с накопителем

Непрерывный источник ионов (рис. 3, б) (1) может быть преобразован в импульсный источник, применяя линейную ионную ловушку (LIT) как РЧ-накопитель (2) (список подходящих источников

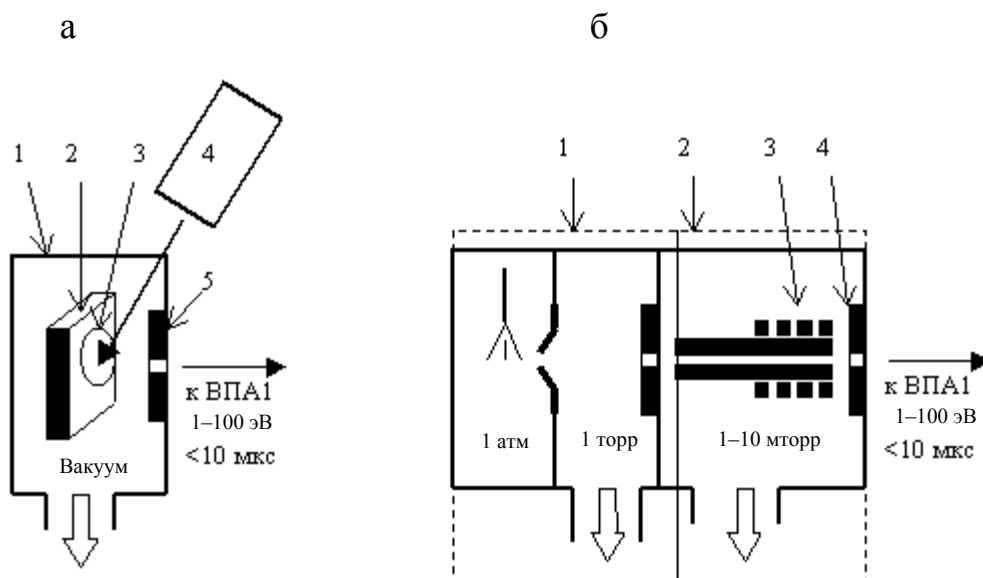


Рис. 3. Схемы импульсных источников для ВПМС-тандема

включает: ESI, APCI, LD, MALDI, источник PI — с фото-ионизацией или CI — с химической ионизацией). В линейной ионной ловушке РЧ-поле между квадрупольными стержнями сжимает и удерживает ионы вблизи оси. Электростатические потенциалы от дополнительных электродов провисают между стержней, тем самым создавая плавный градиент статического поля на оси ловушки. В фазе накопления ионов создается электростатическая потенциальная яма вблизи выходного конца ловушки. Столкновения с газом при давлении 1–10 мторр снижают кинетическую энергию ионов и сжимают ионы на дне потенциальной ямы. Периодически потенциалы дополнительных электродов и выходной диафрагмы изменяются так, чтобы импульсно вывести накопленные ионы.

Характерные параметры ионного пучка на выходе накопителя определяются объемным зарядом ионов. Так, в ионных источниках ESI ионный ток на входе в накопитель может быть оценен по аналогии с (3-Q)-приборами как $I \sim 10^{-11} - 10^{-10}$ А, т. е. приблизительно $10^8 - 10^9$ ионов в 1 секунду. Таким образом, за 10 мс в накопитель попадут около $N = 10^6 - 10^7$ ионов. Предположим, что время накопления регулируется автоматически для ограничения числа ионов на уровне $N = 10^6$. Предположим, что потенциальная яма для накопления ионов сформирована в цилиндрической зоне с характерной длиной $L = 10$ мм. Потенциал объемного заряда $U = N \cdot e / 2\pi\epsilon_0 L$ составит от 0.1 эВ. Это означает, что разброс по скоростям в уловленном сгустке 1 кДа ионов составляет $dV = 300$ м/с. Прикладывая ускоряющее поле $E = 5$ В/см, формируем

ионный пакет с энергетическим разбросом $d\epsilon = EL = 5$ эВ. При этом временной разброс определяется временем разворота ионов $dt = dV / A = 5$ мкс, где A — ускорение, равное 10^8 м/с².

Энергетический разброс ионов определяет и пространственно-угловые характеристики ионного пучка. При радиальном разбросе 0.1 эВ и продольной энергии 50 эВ угловой разброс составляет $da = 100$ мрад. Желательно уменьшить угловой разброс пучка. В этом случае очень полезным оказывается сильное радиальное сжатие пучка в РЧ-поле. Так, при использовании РЧ-напряжения $V \cdot R \cdot F = 1000$ В и при захвате ионов с параметром $q = 0.1 - 1$ эффективный динамический потенциал составит $D(r) = q \cdot V \cdot R \cdot F / 4 \cdot (r / R_0)^2$, достигая максимальной глубины 25–250 эВ у стержней, т. е. при $r = R_0$. Для оценки радиуса пучка приравняем энергетический разброс ионов к глубине динамической ямы $D(r)$, сжимающей ионный пучок, и тогда получим $r = 0.1 - 0.3$ мм. Используя телескопическую систему линз можно снизить угловой разброс до $da = 20$ мрад ценой расширения диаметра ионного пучка до $r = 0.5 - 1.5$ мм.

Параметры пакета из $N = 10^6$ ионов массой 1 кДа, ускоренных до 50 эВ

Энергетический разброс	5 эВ
Временной разброс	5 мкс
Угловой разброс	100 мрад, 20 мрад (после линз)
Пространственный разброс	0.1 мм, 1 мм (после линз)

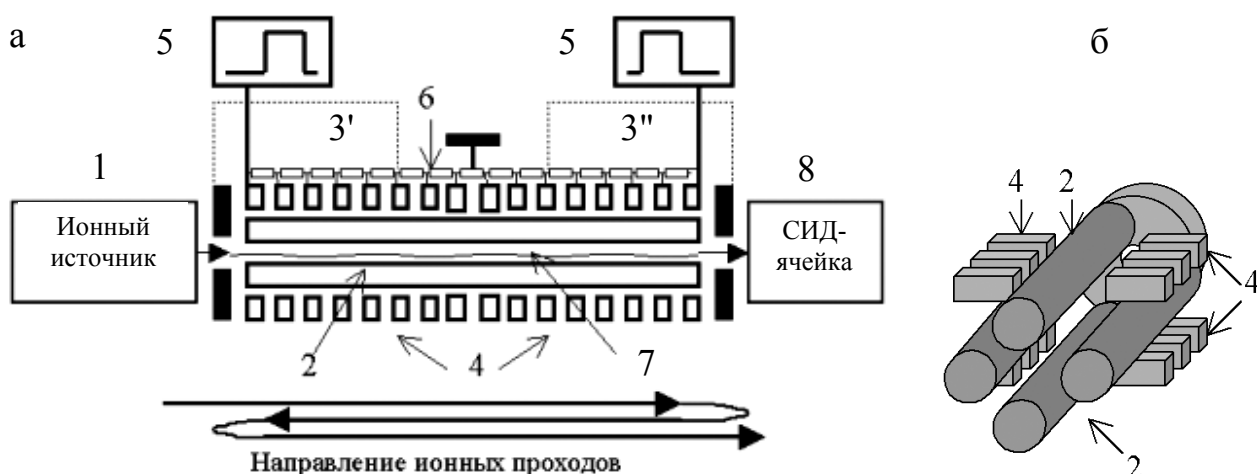


Рис. 4. Линейный ВП-анализатор с радиочастотным удерживанием ионов

НОВЫЕ ВПМС-АНАЛИЗАТОРЫ С РАДИАЛЬНЫМ УДЕРЖАНИЕМ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ ФОКУСИРОВКОЙ ПО ЭНЕРГИЯМ

Принцип новых ВПМС

Как уже отмечалось, для проведения параллельного анализа в ВПМС-тандемах разделение родительских ионов в первом ВПА должно быть сильно замедлено — до десятков миллисекунд. Для сохранения пучка на больших длинах и временах разделения предлагаются новые схемы ВП-анализаторов с поперечным удержанием ионного пучка. Первый тип нового ВПА осуществляет радиочастотное удержание пучка в линейном радиочастотном (РЧ) мультиполе, второй — в РЧ-канале, третий — в системе периодических электростатических линз. Во всех анализаторах применяется времяпролетная фокусировка по энергии.

Схема 1. Линейный ВПА с РЧ-удержанием ионов

Линейный ВПА (рис. 4, а) включает РЧ-мультиполь (2) (рис. 4, б) и электростатические зеркала (3', 3''), сформированные внешними электродами (4). Генератор (5) и резистивный делитель (6) из малых резисторов (10–100 Ом) используются для импульсного переключения зеркал, сохраняя квадратичное распределение потенциала внутри зеркал. Ионы вводятся из импульсного источника (1) через выключенное входное зеркало (3'), проходят серию отражений, вызванных включением обоих зеркал, и выводятся через выходное зеркало (3'') после его выключения в СИД-ячейку (8). Во все время анализа ионная траектория (7) остается захваченной вблизи оси мультиполя.

Для работы в составе тандемного анализатора необходимо вводить и выводить ионы с разных сторон анализатора. Поэтому зеркала переключаются импульсно, позволяя вводить ионы в ВПА, улавливать ионы для колебаний внутри ВПА и впоследствии выводить ионы через противоположный конец ВПА. В более общем случае произвольного числа полных оборотов N эффективная длина пролетной траектории возрастает приблизительно в $k = N \cdot \pi + 1$ раз по отношению к длине анализатора L , а массовый диапазон сужается, как $M_{\text{макс}} / M_{\text{мин}} = [k / (k - \pi)]^2$ (заметим, что формулы точны только в приближении малого энергетического разброса). В результате РЧ-удерживание и многочисленные отражения позволяют продлить время разделения без потерь ионов, а квадратичный потенциал увеличивает разрешающую способность ВПА1 и обеспечивает

разделение медленных ионных пучков с большим относительным энергетическим разбросом.

Идеальная квадратичная схема нарушается из-за беспольных участков, возникающих при выключении зеркал. По данным [29], присутствие значительных зон, свободных от поля, может быть компенсировано распределением поля в зеркале. Даже в случае высокого энергетического разброса до 50 % и высокой доле беспольной траектории до 30 % $L_{\text{эфф}}$ достижимо разрешение по массам около 2000. Чтобы длина беспольной траектории не превышала $0.3 L_{\text{эфф}}$, необходимо не менее 5 отражений, или двух полных оборотов ($N = 2$). Это помогает увеличить $L_{\text{эфф}}$ до $7.3L$, но уменьшает диапазон масс родительских ионов до отношения, равного двум, т. е. $M_{\text{макс}} / M_{\text{мин}} < 2$. В целом линейный сепаратор с РЧ-удержанием ионов дает ограниченный выигрыш по длине пролета, сужает массовый диапазон и требует импульсного переключения зеркал.

Схема 2. W-образный ВПА с удержанием ионов в РЧ-канале

Схема иллюстрируется рис. 5. РЧ-канал (2) сформирован, например, параллельными стержнями (3). Стержни (+) и (–) соответствуют разным полюсам РЧ-сигнала. РЧ-канал окружен дополнительными электродами (4) с постоянными потенциалами, квадратично распределенными через резистивный делитель (5). Ионы вводятся из импульсного источника (1) в ВПМС через отклоняющую пластину (6) для регулирования угла наклона траектории ионов, обозначенной (7). Ионы выводятся из ВПМС через границу РЧ-канала и попадают на приемник (8).

При работе анализатора РЧ-канал возвращает ионы в Z -направлении и удерживает ионы около центральной плоскости. Электростатический потенциал с квадратичным распределением вдоль оси X приводит к отражению ионов в X -направлении. Ионы вводятся под малым углом к оси X . Движение ионов представляет собой комбинацию медленного дрейфа в направлении Y с многократными отражениями вдоль оси X . В результате траектории ионов имеют волнообразную форму, ограниченную границами РЧ-канала. На выходе ВПА ионы приобретают некоторый пространственный разброс, который частично компенсируется последующим ускорением ионов и фокусировкой с помощью линз.

Результаты моделирования с помощью программы SIMION показывают, что даже при 50 % энергетическом разбросе прибор с размерами 50×30 см обеспечивает $N = 4$ –5 пар отражений без смешивания ионов на соседних оборотах. Эффективная длина траектории в данном устройстве равна $L_{\text{эфф}} = L \cdot 2\pi \cdot N$ и достигает $L_{\text{эфф}} = 15$ м.

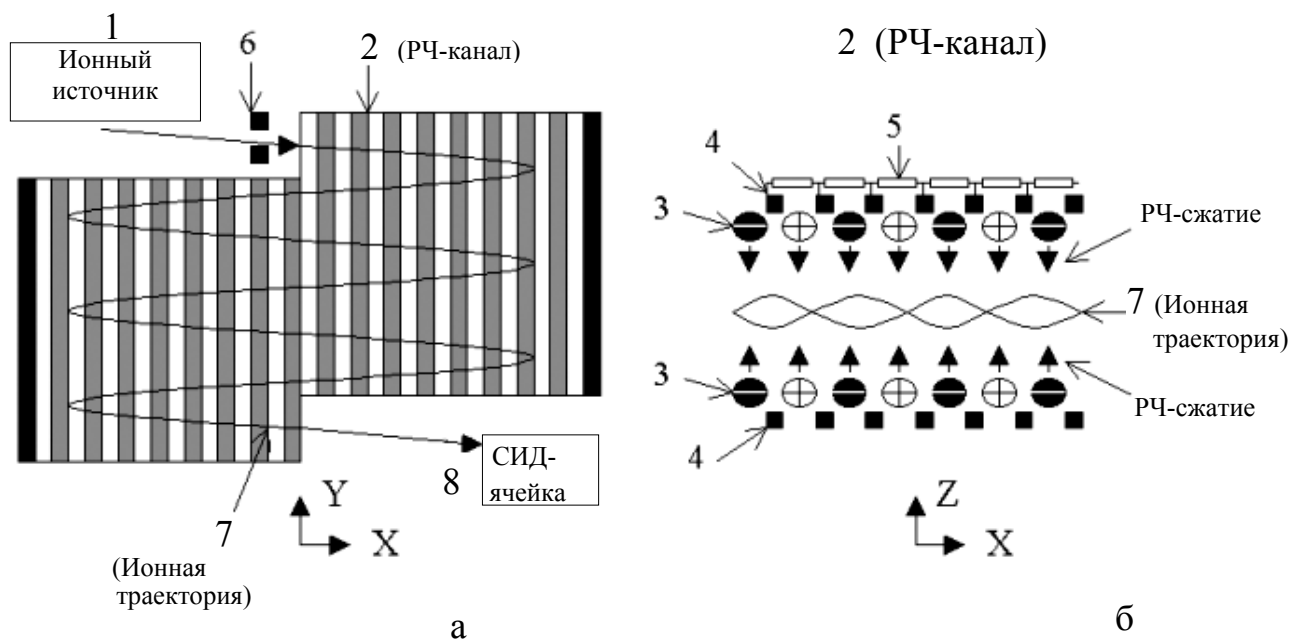


Рис. 5. Схема W-образного ВПМС с удержанием ионов в РЧ-канале

РЧ-поле не ограничивает разрешение ВПА1 вплоть до $R = 1000$. Очевидно, второй тип ВПА1, который может быть назван W-образным ВПА с РЧ-удерживанием, обеспечивает более простые условия работы и большее разрешение ВПА1 с меньшими ограничениями на временной масштаб ВПА2. Сложная геометрия электродов РЧ-канала может быть выполнена, используя технологии печатных плат.

Схема 3. Многоотражательный статический ВПА

Длительные времена пролета могут быть достигнуты и в статических анализаторах. Поскольку статические напряжения могут быть возмущены в пределах десятков и сотен милливольт за счет наводок, поверхностных пленок и разностей поверхностного потенциала, то представляется разумным увеличить энергию ионов до десятков эВ и увеличить длину ионной траектории за счет количества отражений в электростатическом ВПА-анализаторе. С повышением средней энергии снижается относительный энергетический разброс и становится возможным применение ВПА-схем с более низким порядком фокусировки по энергии, например схемы рефлектрона.

Многоходовые ВПА уже исследовались ранее. В работах Н. Wollnik и др. [30] была продемонстрирована устойчивость движения ионов в многоотражательных коаксиальных зеркалах. В работе М. Toyoda и др. [31] в многоповоротных ВПА на базе электростатических секторов достигнута разрешающая способность 350 000. Однако в обеих схемах с увеличением числа отражений N происходит неизбежное сужение массового диапазона, как

$$M_{\text{макс}} / M_{\text{мин}} = [N / (N - 1)]^2,$$

делая эти схемы непригодными для параллельного анализа. Проблема сохранения массового диапазона была решена в теоретических работах Е.А. Якушева и др. [32, 33], где предлагается пропускать ионы по W-траектории между двумя планарными бессеточными электростатическими зеркалами. Предлагаемый в данной работе анализатор использует более совершенные четырехэлектродные планарные зеркала и, кроме того, систему периодических линз для управления движением в направлении дрейфа. Периодические поля зеркал и линз приводят к устойчивому удержанию ионного пучка, в значительной степени сходному с удержанием радиочастотными полями [34] (рис. 6).

Планарные бессеточные электростатические зеркала (2) (нумерация элементов на рис. 6, а, б, в одина) собраны из параллельных электродов (3), например, имеющих форму прямоугольных рамок. Посередине бесполевого пространства (4) между

зеркал расположена система периодических линз (5). Ионы вводятся в ВПА извне из источника ионов (6), проходят по W-образной траектории (7) и попадают на приемник (8).

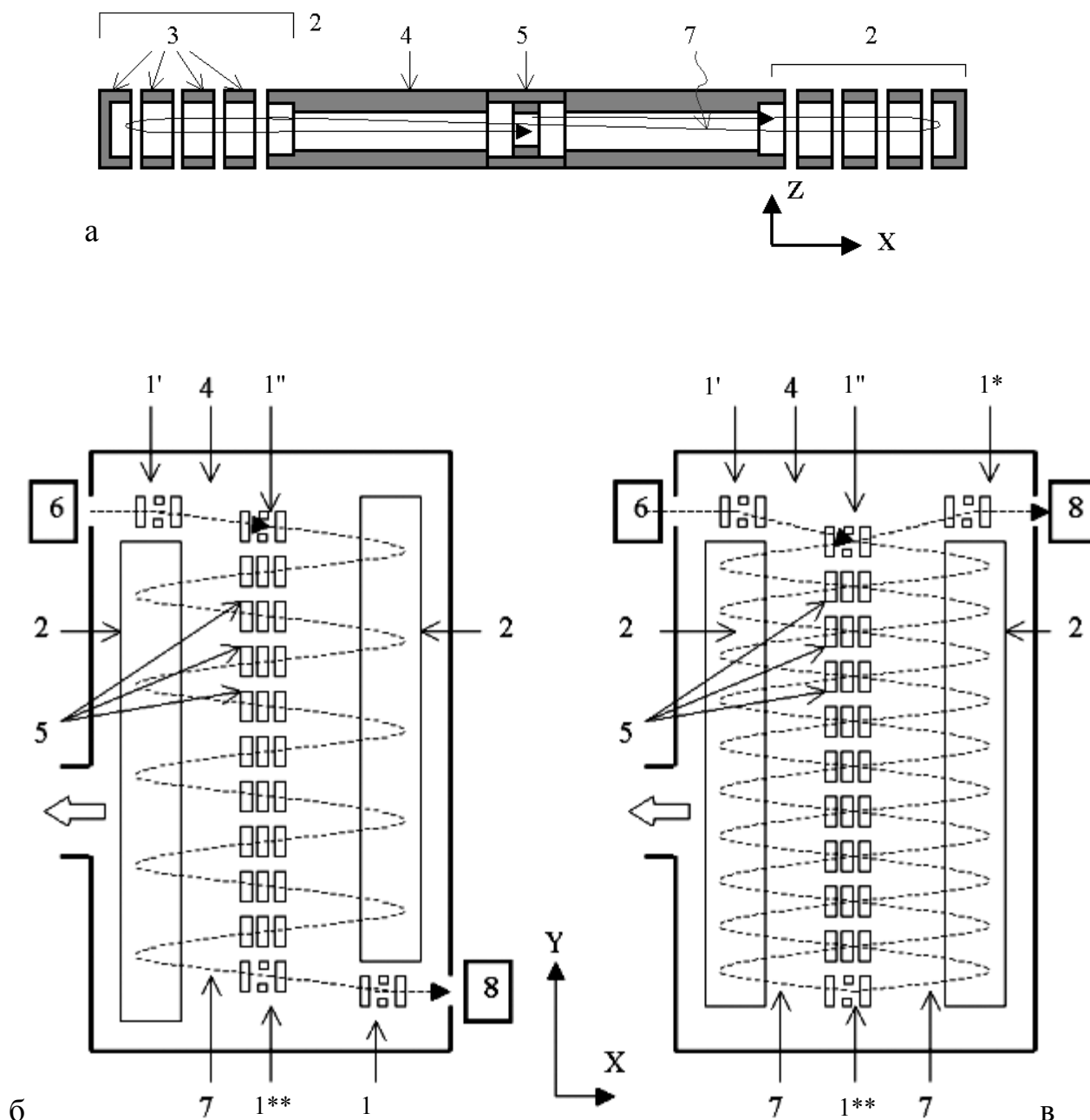


Рис. 6. Схема многоотражательного статического ВПА.

а — упрощенная принципиальная схема; б — устройство с однократным проходом;

в — устройство с многократным проходом

Для того чтобы использовать планарный анализатор как W-образный ВПА, необходимо устранить смешивание ионных пакетов с разным количеством отражений. Для этой цели можно применять ионные источники со слаборасходящимся пучком (например, ортогональный ускоритель). В данной работе предлагается устойчиво захватывать ионы вдоль W-образной траектории использованием системы периодических линз. Для увеличения длины ионной траектории также применены торцевые отражения ионов, достигаемые за счет поворота пучка в краевых линзах (1") и (1**), также используемых как отклоняющие пластины (рис. 6, б, в). При этом однократное отражение достигается в статическом режиме и, следовательно, без сужения массового диапазона. Ионы вводятся из источника (б), отклоняются пластинами (1') и (1'') для регуляции положения и наклона ионной траектории. В нижнем торце ионы отклоняются в статической линзе (1**), проходят полный цикл отражений и выводятся через отклоняющие пластины (1) или (1*). Поскольку ионы всех масс проходят по одной траектории и в статических полях, то схема позволяет проводить времяпролетное разделение (или измерения) без сужения массового диапазона, что очень выгодно отличает данный ВПА от других бессеточных ВПА с многократным отражением. Импульсное включение линз позволяет дальнейшее увеличение длины траектории за счет сужения массового диапазона.

Новый ВПА позволяет достичь 100 м длины траектории в компактном 1м анализаторе без сужения массового диапазона. При такой большой длине нет необходимости спускаться слишком далеко по энергии ионов. При целевом времени пролета 10 мс (скорость 10 км/с) для массы 1 кДа достаточно опустить энергию ионов до 500 эВ. Однако с учетом диссоциативных столкновений с фоновым газом предпочтительно снизить и энергию, и длину пролета. При наиболее оптимальной энергии 50 эВ время разделения 10 мс достигается при длине пролета 30 м. Именно такие параметры ВПМС1 предлагаются как оптимальные. Ионно-оптические исследования, описанные в статье М. Явора и др. [35], показывают, что такой анализатор обладает разрешающей способностью по основанию более 500 при акцептансе прибора:

Ширина и высота сечения пучка	2 мм
Угловая расходимость	20 мрад
Энергетический разброс	10 эВ
Временной разброс	10 мкс

Заметим, что акцептанс прибора превышает оцененный ранее эмиттанс ЛИТ-накопителя.

СТОЛКНОВИТЕЛЬНАЯ ЯЧЕЙКА ДЛЯ ВПМС-ТАНДЕМА

Столкновительные (СИД) ячейки широко применяются в тандемной масс-спектрометрии, например в тройных квадруполях и в приборах Q-TOF для фрагментации родительских ионов и последующей релаксации кинетической энергии фрагментов [36, 37]. Такие ячейки имеют длину от 10 до 20 см и работают при давлении газа (азота, воздуха или аргона) около 0.01 торр. В последнее время ячейки оснащены дополнительными электродами для создания осевого электростатического поля [38], ускоряющего прохождение ионов до 200–400 мкс.

Для целей ВПМС-тандема принципиально снизить временное уширение ионных пакетов менее 10 мкс. Только так возможно сохранить информацию о времени разделения в первом ВПМС. Быстрая столкновительная релаксация на микросекундной шкале времени может быть достигнута только при высоком давлении газа в ячейке, на уровне $P = 0.2\text{--}1$ торр, оптимально 0.5 торр. Быстрая трансмиссия, менее 10 мкс, может быть достигнута при малой длине ячейки L ($L = 5$ мм). Несмотря на короткую длину L , произведение $P \cdot L > 0.2$ торр·см остается достаточным для охлаждения ионов. Прохождение ионного пучка через ячейку может быть ускорено и с помощью продольного электростатического поля. Такое поле ограничено только осевой скоростью ионов. При скорости дрейфа 500 м/с время прохождения ионов менее 10 мкс, а временной разброс ожидается

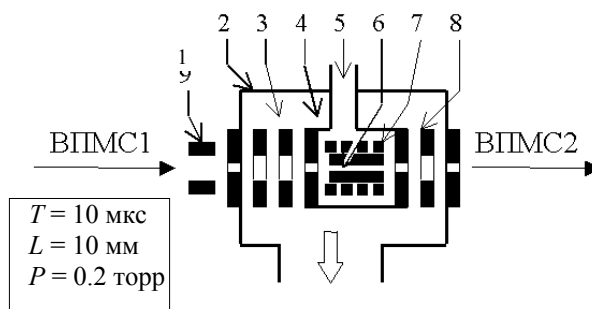


Рис. 7. Схема столкновительной ячейки для быстрой фрагментации, охлаждения и трансмиссии ионов. Ячейка включает как опцию временной селектор (1); вакуумную камеру (2); входную линзу (3); камеру столкновительной ячейки (4) с газовым вводом (5); РЧ-мультиполь (6) с дополнительными электродами (7); выходную линзу (8)

ниже 5 мкс. Вывод ионов из ячейки может быть модулирован за счет модуляции продольного поля.

Высокое давление в ячейке создает опасность газового разряда. Это требует снижения амплитуды РЧ-сигнала менее 300 В (порог разряда) в сочетании со снижением РЧ-частоты ниже 1 МГц. Успешное функционирование ячейки при пониженном РЧ-сигнале показано в [25–27]. Высокое давление в ячейке также требует введения дифференциальной системы откачки, малых (1 мм) диафрагм и линз. Встает вопрос об эффективности трансмиссии ионов через диафрагмы.

Столкновительное охлаждение в ячейке приводит к высокому радиальному сжатию пучка, что значительно облегчает вывод ионов из ячейки. Высокоэффективное извлечение ионов из квадрупольных ионных проводников продемонстрировано в технике ВПМС с ортогональным ускорением [39–42]. Возможность эффективной трансмис-

сии ионов из глубокого вакуума в столкновительную ячейку высокого давления продемонстрирована в работах [43–45] на примере tandemного прибора MALDI-TOF-o-TOF. Высокая чувствительность тандема (1 фемтомоль пептидов) подтверждает эффективность ввода через 1 мм диафрагму. Таким образом, параметры ячейки: давление $P = 0.5$ торр; длина $L = 5$ мм; РЧ-амплитуда 300 В и скорость дрейфа в осевом поле 500 м/с — позволяют достичь быстрой и эффективной трансмиссии при временном расширении менее 10 мкс, сохраняющей разрешение ВПМС1.

РЕЖИМЫ РАБОТЫ ТАНДЕМНОГО ВПМС

Рассмотрим рабочий пример ВПМС-тандема с параллельным (МС-МС)-анализом (рис. 8).

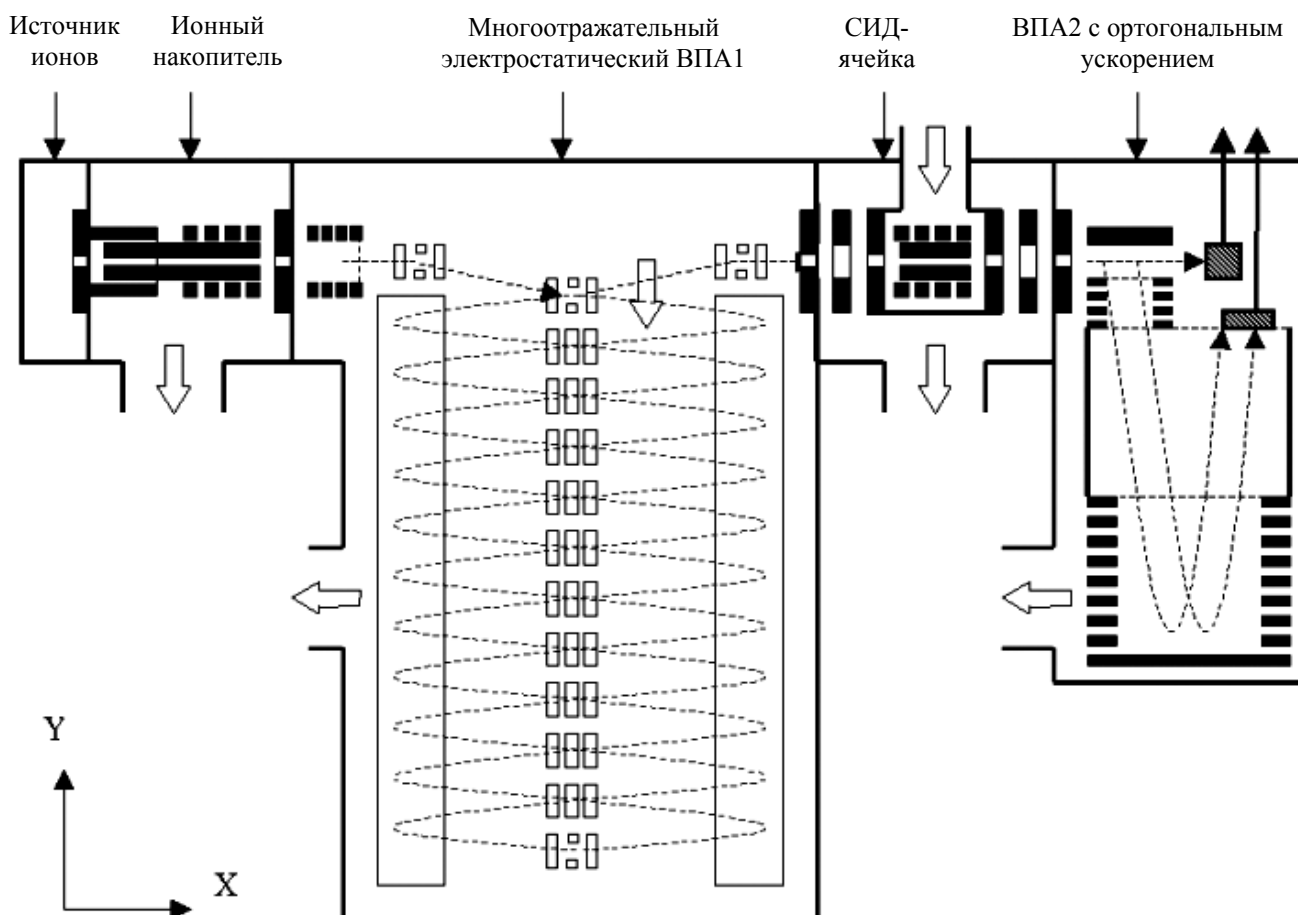


Рис. 8. Пример ВПМС-тандема с параллельным (МС-МС)-анализом

Источник ионов — электроспрей, модулирован с частотой 100 Гц с помощью линейного квадрупольного накопителя ионов. Для разделения первичных ионов используется электростатический многоотражательный ВПА1 с эффективной длиной пролета 30 м и рабочей энергией ионов 50 эВ. Высокий (третий) порядок времяпролетной фокусировки по энергии позволяет провести изохронное разделение в ВПА1, несмотря на 5 эВ разброс. За ВПА1 расположена короткая (5 мм) фрагментная ячейка, наполненная газом при давлении 0.5 торр, пропускающая ионные пакеты за времена порядка 10 мкс. На выходе ячейки применена модуляция ионного пучка для синхронизации с ускоряющими импульсами второго масс-анализатора, производящего масс-анализ фрагментов.

В основном режиме система регистрации записывает индивидуальные спектры ВПА2, не смешивая спектры для различных семейств. Однако, используя повторяемость сигнала от импульса к импульсу источника, можно проводить усреднение сигнала с периодом 10 мс. В этом режиме параметры работы прибора остаются неизменными и данные суммируются в оперативной памяти системы регистрации в течение 1–2 секунд. Вся информация в виде спектров родительских ионов и фрагментных спектров извлекается в процессе последующей обработки данных. В типичной конфигурации [46] система регистрации имеет память в 10 миллионов точек, что позволяет записать около 2000 спектров с временным разрешением 1 нс. Выигрыш с фактором 2 появляется за счет пропорционального изменения длительности фрагментных спектров с временем разделения в ВПА1. Такая запись не только увеличивает емкость спектров, но и позволяет сохранить разрешение ВПА1 во всем диапазоне масс.

В альтернативном режиме "информационно-зависимой регистрации" (ИЗР) (МС-МС)-анализ распадается на два этапа. На первом этапе определяется масс-спектр родительских ионов на выходе ВПА1, например с помощью дополнительного детектора. На втором этапе прибор работает в ранее описанном тандемном режиме МС-МС с фрагментацией. Однако регистрация производится только во время прибытия значимых (или интересных) сигналов родительских ионов. В режиме ИЗР селекция родительских ионов может быть улучшена применением временного селектора. Временной селектор может быть использован и для лучшего разделения родительских ионов с близкими массами. Попеременная регистрация соседних масс в чередующихся импульсах источника приведет, однако, к пропорциональной потере чувствительности.

Для успешного функционирования ВПМС-тандема необходима автоматическая регуляция сигнала. Как уже отмечалось, объемный заряд

в линейной ловушке — накопителе ограничивает время накопления ионов. Так, при применении источника ионов ESI 10^6 ионов с потенциалом объемного заряда около 0.1 эВ накапливаются за 1–10 мс. Дальнейшее накопление уже привело бы к ухудшению параметров ионных пакетов и к ионным потерям в ВПА1. Большое количество ионов опасно и тем, что в случае концентрации сигнала в одной или нескольких мажорных компонентах произойдет насыщение детектора и превышение динамического диапазона системы регистрации. Таким образом, представляется разумным регулировать количество ионов в накопителе за счет изменения времени импульсного ввода ионов из источника в накопитель по аналогии с регуляцией сигнала в ионных ловушках (Automatic Gain Control, AGC). Регуляция сигнала ограничивает статистику спектров до 10^8 в 1 секунду. Предположив минимальное число ионов во фрагментном пике равным 10, а минимальное число ионов для записи интерпретируемого фрагментного спектра равным 100 и оценив потери в анализаторах как фактор 10, получим, что около 100 компонент родительского спектра могут быть записаны с динамическим диапазоном 1000 за 1 секунду.

Предложенный ВПМС позволяет повысить разрешение каждой из ступеней МС-анализа. Однако при этом необходимо либо продлить время между импульсами накопителя, либо производить отбор временным селектором. Последнее в свою очередь приведет либо к потере чувствительности, либо к потере полноты (МС-МС)-анализа. Как показали первые эксперименты Ю.И. Хасина и др. [47], многоотражательный ВПА позволяет достичь разрешающей способности более 5000 даже при умеренной энергии ионов (10 эВ). Известно также, что ортогональный ВПМС достигает разрешения около 20 000 [48], однако при более длительной временной шкале, около 100 мкс.

КОМБИНАЦИЯ ВПМС-ТАНДЕМА С ДРУГИМИ ПРИБОРАМИ

Быстрая и полная запись (МС-МС)-спектров в течение 1–2 секунд позволяет совмещать ВПМС-тандем с другими методами разделения в реальном масштабе времени.

Тройной МС-анализ (МС³) с двухступенчатой фрагментацией применяется для анализа структуры соединений, для повышения селективности анализа, а также для снижения порога обнаружения над высоким химическим шумом. Тандемный ВПМС становится идеальным инструментом для второй и третьей ступеней МС³-спектрометра. При этом в качестве первой ступени могут применяться квадрупольный МС или линейная ловушка (например, совмещенная с накопителем).

В МС³ интенсивность ионного пучка на входе второй ступени снижается (за счет отбора одной компоненты из смеси), что значительно ослабляет ограничения, связанные с объемным зарядом, и позволяет увеличить разрешение в ступенях ВПМС, предпочтительно разрешение последней ступени.

Время единичного (МС-МС)-анализа (1–2 с) в ВПМС-тандеме значительно меньше времени типичной ширины хроматографического пика (20–30 с). Следовательно, возможен (ЖХ-МС-МС)-анализ в реальном масштабе времени без каких-либо предварительных ограничений, таких как алгоритм "динамического исключения пиков", часто используемый в ионных ловушках и приборах типа Q-TOF. Однако для более полной реализации возможностей нового ВПМС-тандема желательно использовать более быстрые системы разделения с типичной шириной пиков в несколько секунд, такие как капиллярный электрофорез или скоростные ЖХ, включая тандемные ЖХ-ЖХ. По мнению автора, комбинация методов предварительного ЖХ-разделения с последующим ЖХ-МС³ с использованием ВПМС-танDEMОВ имеет большой потенциал для анализа сложных смесей в задачах протеомики.

СЛОЖНОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ ТАНДЕМНОГО ВПМС

При реализации тандемного ВПМС нового типа предстоит решить ряд задач, связанных с освоением необычных режимов и параметров работы ВПМС-компонент. Это прежде всего относится к очень большим временам разделения в ВПА1, накоплению значительного объемного заряда в накопителе, необычно быстрой трансмиссии в СИД-ячейке, к проблеме эффективной трансмиссии ионов в системе с большой разницей давлений, а также к необычно большому динамическому диапазону детектора. Кроме того, необходимо решить практические вопросы быстрого накопления, свертки и передачи колоссального потока информации (1 Гбайт/с), частично решенные в [46]. Принципиальным является и ускорение интерпретации (МС-МС)-спектров до 100 фрагментных спектров в 1 секунду, что превышает скорость существующих программ на 2 порядка.

Изначально наиболее сомнительной представлялась стабильность ионной траектории при большом количестве отражений и при малой энергии ионов. Ожидалось, что малейшая неточность настройки должна привести к лавинообразному нарастанию aberrаций высокого порядка, и в конечном счете пространственному расхождению пучка, и к потере времяпролетного разрешения. Эти взгляды были опровергнуты в теоретической работе [34], где была показана фундаментальная

устойчивость системы с пространственно-периодическими полями. Сомнения были полностью устранены в экспериментальных испытаниях многооборотного ВПА1 при энергии ионов 10 эВ [47].

ВЫВОДЫ

Предложена новая схема тандемного времяпролетного масс-спектрометра с параллельным (МС-МС)-анализом. Ожидается, что схема повысит производительность (МС-МС)-анализа на два порядка — до 100 (МС-МС)-спектров в 1 секунду. Параллельный анализ предполагает "медленное" разделение в первой ступени тандема, которое в свою очередь становится возможным с введением ВП-анализатора нового типа. Наиболее перспективным признан многоотражательный электростатический анализатор с периодической системой линз, сочетающий поперечное удержание ионного пучка с высоким порядком времяпролетной фокусировки по энергии ионов.

На основе теоретических оценок выбраны параметры ключевых компонент тандема. Источники ионов с радиочастотным накопителем способны создать ионные пакеты с подходящей длительностью (5 мкс) и умеренным энергетическим разбросом (5 эВ). Это позволяет снижать энергию ионов в "медленном" ВП-анализаторе до 50–100 эВ, сохраняя разрешающую способность более 500. Даже в компактном многоотражательном ВПА размером менее 1 м длина ионной траектории может быть увеличена до 50 м, что достаточно для достижения времени разделения 10 мс. Скоростная 10 мкс фрагментация и релаксация ионов достижимы в ячейках высокого давления (0.2–1 торр), а скоростной анализ — в коротком (менее 1 м) ортогональном ВПМС при высокой энергии ускорения (3–10 кВ).

Предстоит решение многочисленных технических задач, связанных с необычными параметрами ВПМС-компонент, большим потоком информации (1 Гбайт/с) и скоростной интерпретацией 100 (МС-МС)-спектров в 1 секунду.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Beynon J.H., Cooks R.G., Amy J.W. et al.* Design and Performance of a mass analyzed ion kinetic energy spectrometer // *Anal. Chem.* 1973. V. 45. P. 1023A–1027A.
2. *Tandem Mass Spectrometry* / Ed. McLafferty F.W. NY.: John Wiley and Sons, 1983. 532 p.
3. *Александров М.Л., Галль Л.Н., Краснов Н.В. и др.* // Доклады АН СССР. 1984. Т. 277. С. 374.
4. *Александров М.Л., Галль Л.Н., Краснов Н.В. и др.* Метод масс-спектрометрического анализа

- труднолетучих термически нестабильных веществ, основанный на экстракции ионов из раствора при атмосферном давлении // ЖАХ. 1985. Т. 40, № 6. С. 160–172.
5. Yamashita M. and Fenn J.B. // J. Phys. Chem. 1984. V. 84. P. 4671.
 6. Fenn J.B., Mann M., Meng C.K. et al. // Science. 1989. V. 246. P. 64–71.
 7. Tanaka K., Waki H., Ido Y. et al. // Rapid Comm. Mass Spectrom. 1988. N 2. P. 151.
 8. Karas M., Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons // Anal. Chem. 1988. V. 60. P. 2299–3201.
 9. Karas M., Hillenkamp F. // Advances in Mass Spectrometry / Ed. P. Longevialle. Heyden, London, 1989. P. 416.
 10. Lee M.S., Kerns E.H. LC-MS application in drug development // Mass Spectrom. Rev. 1999. V. 18. P. 187–279.
 11. Graves P.R., Haystead T.A.J. Molecular Biologist's Guide to Proteomics // Microbiology Mol. Biology Rev. March 2002. P. 39–63.
 12. Aebersold R., Mann M. // Nature. 2003. V. 422. P. 198–203.
 13. Pandey A., Mann M. Proteomics to study genes and genomes // Nature. 2000. V. 405. P. 837–846.
 14. Yates J.R.III, McCormack A.L., Schieltz D. et al. Direct analysis of protein mixtures by tandem mass spectrometry // J. Protein Chem. 1997. V. 16. P. 495–497.
 15. Smith R.D., Anderson G.A., Lipton M.S. et al. An accurate mass tag strategy for quantitative and high-throughput proteome measurements // Proteomics. 2002. V. 2, N 5. P. 513–523.
 16. Clemmer D.E., Reilly J.P. Ion Mobility and mass spectrometer. International patent WO 00/70335, filed 17 May 1999.
 17. Henderson S.C., Valentine S.J., Counterman A.E., Clemmer D.E. ESI-Ion Trap—Ion Mobility—Time-of-flight Mass Spectrometry for Rapid and Sensitive Analysis of Biomolecular Mixtures // Anal. Chem. 1999. V. 71. P. 291–301.
 18. Verentchikov A., Ens W., Martens J., Standing K.G. Detection of Large Molecular Ions by Secondary Ion and Secondary Electron Emission // Int. J. Mass Spectrom. and Ion Processes. 1993. V. 126. P. 75–83.
 19. Martens J., Ens W., Standing K.G., Verentchikov A.N. Secondary Ion Desorption by Bombardment with Large Molecular Ions // Proceedings of 40th ASMS conference, 1992. P. 458–459.
 20. Verentchikov A.N. Tandem Time of Flight Mass Spectrometer and Method of Use. GB Patent, GB2390935, filed on July 16, 2002; International Patent WO 2004/008481 A1.
 21. Beavis R., Chait B. Velocity distributions of intact high mass polypeptide molecule ions produced by matrix assisted laser desorption // Chem. Phys. Lett. 1991. V. 181, N 5. P. 479–484.
 22. Juhasz P., Vestal M.L., Martin S.A. // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1997. N 8. P. 209.
 23. Verentchikov A.N., Ens W., Martens J., Standing K.G. Experimental Study of Ion Ejection Processes in Matrix Assisted Laser Desorption // Proceedings of 40th ASMS Conf., 1992. P. 360–361.
 24. Zhou J., Ens W., Standing K.G., Verentchikov A.N. Kinetic Energy Measurements of Molecular Ions Ejected into Electric Field by Matrix Assisted Laser Desorption // Rapid Comm. Mass Spectrom. 1992. V. 6. P. 671–678.
 25. Krutchinsky A.N., Loboda A.V., Spicer V. et al. // Rapid Comm. Mass Spectrom. 1998. N 12. P. 508.
 26. Krutchinsky A.N., Chernushevich I.V., Spicer V. et al. A MALDI Ion Source with Collisional Cooling for Orthogonal-Injection TOF // ASMS abstracts, 1998. WOD (www.asms.org).
 27. Verentchikov A., Smirnov I., Vestal M.L. Method and Apparatus for Determining Molecular Weight of Large Molecules. Patent US 6504150, filed 1999, issued in 2001.
 28. Verentchikov A., Smirnov I., Vestal M. Mechanism of Ion Formation in Orthogonal MALDI with Collisional Damping // Proceedings of 47th ASMS conference, 1999. ThPC 061 (www.asms.org).
 29. Makarov A.A., Raptakis E.N., Derrick P.J. Pitfalls on the road to the ideal time-of-flight mirror: ideal time focusing in the second stage of tandem mass spectrometer // Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1995. V. 146/147. P. 165–182.
 30. Wollnik H. and Casares A. An energy-isochronous multi-pass time-of-flight mass spectrometer consisting of two coaxial electrostatic mirrors // Int. J. Mass Spectrom. 2003. V. 227, N 2. P. 217–222.
 31. Toyoda M., Okumura D., Ishibara M., Katakuse I. Multi-turn time-of-flight mass spectrometers with electrostatic sectors // J. Mass Spectrom. 2003. V. 38, N 11. P. 1125–1142.
 32. Glickman L.G., Goloskokov Yu.V., Karet-skaya S.P. Schemes for mass analysis based on mirrors with two-plate electrodes // Nuclear Instr. Meth. Phys. Res. 1995. V. A363. P. 451–453.
 33. Назаренко Л.М., Секунова Л.М. и Якушев Е.А. Времяпролетный масс-спектрометр с многократным отражением. А. с. СССР № 1725289, 20.07.89.
 34. Verentchikov A. and Yavor M. Dynamic Well in Purely Electrostatic Periodic Systems // Extended abstracts on ASMS, 2003. TPJ 187 (www.asms.org)
 35. Явор М.И., Веренчиков А.Н. Планарный многоотражательный времяпролетный масс-анализатор, работающий без ограничения диапазона

- масс. // Здесь. С. 38–45.
36. Douglas D.J., French J.B. Collisional focusing effects in radio frequency quadrupoles // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1992. V. 3, N 4. P. 398–408.
 37. Douglas D.J., French J.B. Mass Spectrometer and method of improved ion transmission. Patent US 4963736, filed Dec 12, 1988.
 38. Thomson B.A., Jolliffe C.L. Spectrometer with axial field. Patent US 5847386, filed Feb 6, 1997.
 39. Krutchinsky A.N., Chernushevich I.V., Spicer V. et al. Collisional Damping Interface for an Electrospray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1998. V. 9, N 6. P. 569–579.
 40. Додонов А.Ф., Додонова Т.Ф., Чернушевич И.В., Разников В.В., Тальрозе В.Л. Изобретение СССР: 1681340 А1 (февраль 1987).
 41. Verentchikov A., Gabele S., Takach E. et al. A New Orthogonal TOF Optimized for Coupling to Chromatography // Extended abstracts on ASMS, 1997. ThPB 044 (www.asms.org).
 42. Verentchikov A.N., Ens W., Standing K.G. Reflecting Time-of-Flight Mass Spectrometer with Electrospray Ion Source and Orthogonal Extraction // Anal. Chem. 1994. V. 66, N 1. P. 126–133.
 43. Verentchikov A., Hayden K.M. and Vestal M.L. Tandem Time of Flight Mass Spectrometer with Damping in Collisional Cell and Method for Use. Patent US 6534764, 2003.
 44. Verentchikov A., Cambell J. Tandem TOF-o-TOF Mass Spectrometer with Collisional Damping in CID Cell // Proceedings of 48th ASMS conference, 2000. WPI 035 (www.asms.org).
 45. Verentchikov A.N., Vestal M.L. and Hayden K.M. Tandem Mass spectrometer with damping in collisional cell and method for use. Patent US, WO 00/77823 A2 (ep.espacent.com).
 46. Макаров В., Самокиш А., Лютвинский Я. Метод извлечения значимой информации из масс-спектров пептидов // Здесь. С. 96–104.
 47. Хасин Ю.И., Веренчиков А.Н., Явор М.И. Первые экспериментальные исследования планарного многоотражательного ВПМС // Здесь. С. 59–71.
 48. Веренчиков А.Н., Краснов Н.В., Мурадымов М.З., Хасин Ю.И. Простая качественная модель времяпролетного масс-спектрометра // Научное приборостроение. 2002. Т. 12, № 4. С. 63–69.

*Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург*

Материал поступил в редакцию 7.04.2004.

PARALLEL MS-MS ANALYSIS IN A TIME-OF-FLIGHT TANDEM. PROBLEM STATEMENT, METHOD, AND INSTRUMENTAL SCHEMES

A. N. Verenchikov

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

To increase the speed and sensitivity of the tandem mass spectrometric MS-MS analysis, a tandem of two time-of-flight analyzers (TOFA) is proposed to be used in a novel mode of "nested times": slow separation of parent ions in the first analyzer occurs on the millisecond time scale while fast fragmentation and rapid mass analysis of the fragments in the second analyzer — on the microsecond scale. The nested time mode allows a so called "parallel analysis" of fragment spectra for all parent ions within a single separation cycle of TOFA1. "Slow" TOFA of a new type are introduced to implement this method. They combine transverse confinement of an ion beam with high-order time-of-flight energy focusing. Radiofrequency (RF) or periodic electrostatic fields are suggested to achieve the transverse confinement. The paper presents performance analysis of the key tandem components including a "slow" TOFA, ion source with an ion storage, and a fragment cell with fast ion transmission.