
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ.

ПРИБОРЫ

УДК 621.384.668.8: 537.534.1/. 8

© С. Н. Кириллов, А. В. Замятин, Д. Н. Алексеев, В. Н. Демидов,
С. В. Максимов, М. З. Мурадымов, А. Н. Веренчиков

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЯЧЕЙКИ ДЛЯ БЫСТРОЙ ФРАГМЕНТАЦИИ
И СТОЛКНОВИТЕЛЬНОГО ОХЛАЖДЕНИЯ**

В статье описываются конструкция и результаты исследования специально разработанной ячейки для столкновительно-индуцированной диссоциации (СИД) с ускоренными диссоциацией, пропуском и охлаждением ионов. Основными отличиями данной СИД-ячейки от стандартных являются ее малые размеры (5 см) и работа на достаточно высоком давлении в десятки мТорр. Проведенное экспериментальное исследование показало высокую эффективность ввода и транспортировки ионов через ячейку с коэффициентом передачи 80 %. Продемонстрированы быстрая трансмиссия и охлаждение ионов за десятки микросекунд. На примере двухзарядных ионов $(M+2H)^{2+}$ грамицидина С продемонстрированы эффективная и информационная фрагментация ионов. Таким образом, показана адекватность ячейки СИД для параллельного анализа в тандемном времяпролетном масс-спектрометре.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее интересных и быстро развивающихся направлений в области масс-спектрометрии является тандемная масс-спектрометрия (МС-МС). МС-МС получила приложение в различных областях науки, в частности в фармацевтике и протеомике, где активно используется для структурного анализа и идентификации веществ в составе смесей.

Методика МС-МС состоит из следующих операций:

- 1) разделение в первой МС-ступени первичных, или "родительских", ионов и селекция ионов с определенным отношением массы к заряду (m/z);
- 2) фрагментация этих ионов с образованием структурно значимых ионных фрагментов, называемых вторичными, или "дочерними", ионами;
- 3) масс-спектрометрический анализ дочерних ионов.

В настоящее время в биотехнологии применяются такие тандемы, как квадрупольный (q-Q-q); тандем квадрупольного и времяпролетного масс-анализаторов (Q-TOF); ионная ловушка с масс-спектрометром с фурье-трансформацией в тандеме с линейной ионной ловушкой; тандем двух времяпролетных масс-анализаторов. Несмотря на такое многообразие тандемных (МС-МС)-приборов, все они используют лишь один вид родительских ионов в данный момент времени. Поочередный, или "последовательный", анализ родительских ионов замедляет полный (МС-МС)-анализ и снижает его чувствительность в случае, если анализируются сложные смеси. В настоящее время такие задачи

становятся все более актуальными. Так, например, в биотехнологических приложениях приходится анализировать сложные смеси в большом диапазоне концентраций компонент и идентифицировать минорные примеси в присутствии сложных биологических матриц (тканей, плазмы крови и т. д.). Уже давно обсуждались идеи "параллельного" анализа всех родительских ионов для повышения чувствительности и скорости анализа, однако реализация параллельного анализа стала возможной лишь в настоящее время с появлением новых типов времяпролетных анализаторов.

В работах [1, 2] предлагаются идея, схема и метод параллельного (МС-МС)-анализа нового типа с использованием двух времяпролетных масс-спектрометров (ВПМС), времена пролета ионов в которых различаются на три порядка. Разрешающая способность выделения пиков в первой ступени в таком случае достигает 300–500, типичной для приборов q-Q-q и Q-TOF. На рис. 1 приведена блок-схема тандемного ВПМА нового типа.

Родительские ионы разделяются в первом ВП-анализаторе в течение 10 мс, и фрагментационная ячейка получает последовательность ионных пакетов, разделенных в соответствии с массами родительских ионов. Ожидается, что пакеты разделены по времени не менее 10 мкс. Родительские ионы входят в газонаполненную ячейку с энергией в десятки электрон-вольт и подвергаются фрагментации. Благодаря быстрому прохождению ячейки за время порядка $T = 10$ мкс фрагментные ионы достигают второго времяпролетного анализатора, оставаясь в рамках одного импульсного пакета. Каждая новая "семья" ионов (т. е. группа

Импульсный ионный источник $T = 10$ мкс	ВПМС1 $T = 10$ мс $L = 10\text{--}100$ м $\varepsilon = 1\text{--}100$ эВ	СИД-ячейка $T = 10$ мкс $L = 10$ мм $P = 1$ Торр $\varepsilon = 50$ эВ	ВПМС2 $T = 10$ мкс $L = 0.3\text{--}1$ м $\varepsilon = 3\text{--}10$ кэВ	Система регистрации 10 мегаточек
--	--	--	--	--

Рис. 1. Тандемный ВПМС с параллельным (МС-МС)-анализом. Блок-схема из работы [2]

родительских ионов одной массы и их фрагменты) вводится во второй быстрый ($T = 10$ мкс) ВП-анализатор со временем анализа порядка 10 мкс. Поскольку ионы регистрируются во втором анализаторе до прихода следующего пакета, то на выходе ВПМС2 формируются разделенные масс-спектры для каждого типа родительских ионов. Раздельные спектры записываются для всех родительских ионов за один выстрел ионного источника, тем самым устраняя ионные и временные потери, типичные для всех остальных — сканирующих тандемов.

Ожидается, что тандем с параллельным анализом значительно повысит скорость и чувствительность анализа и позволит анализировать сложные смеси в большом диапазоне концентраций компонент. Реализация ВПМС-тандема с параллельным анализом требует решения двух нетипичных для ВПМС задач: а) создания ВПМС1, в котором время разделения ионных пакетов составляло бы 10 мс; б) создания быстрой ячейки фрагментации, в которой ионы фрагментируют, охлаждаются и проходят ячейку за времена порядка 10 мкс.

Первая задача практически решена в работах нашей лаборатории [3–6]. Предложена схема многоотражательного ВПМС [3] с планарными электростатическими зеркалами и системой периодических линз. Авторами продемонстрирована возможность применения данного ВПМС в режиме медленного разделения во времени. Ионные пакеты устойчиво транспортировались и разделялись при низких энергиях — до 10 эВ, большой длине траектории — до 1 км и в диапазоне времен до 100 мс [5, 6].

Оставалось неясным, возможно ли решение второй задачи. В стандартных фрагментационных ячейках, применяемых в тройных квадруполях и в приборах Q-TOF, время прохождения ионных пакетов составляет 300 мкс–3 мс в зависимости от выбранных режимов [7–9]. Это значительно превышает время 10 мкс, требуемое для реализации параллельного анализа. Поэтому актуальной задачей является создание столкновительной ячейки с ускоренными фрагментацией, транспортировкой и охлаждением фрагментных ионов.

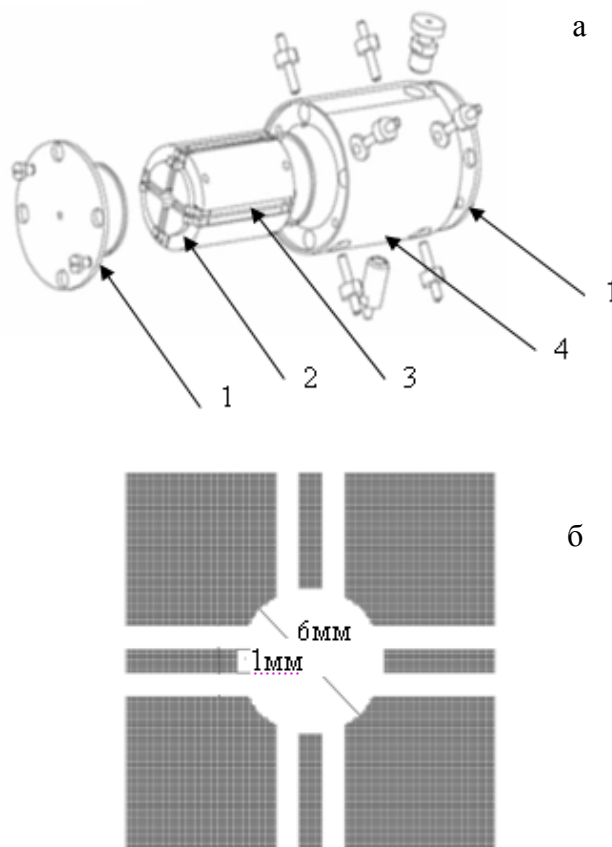


Рис. 2. Столкновительная ячейка в разборе (а) и поперечное сечение электродов (б). 1 — входная и выходная диафрагмы; 2 — электроды квадруполь; 3 — клинья; 4 — корпус

ОПИСАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ УСТАНОВКИ

Для исследования свойств и определения характеристик столкновительной ячейки с ускоренным пропусканием ионов разработана и изготовлена ячейка длиной 5 см (рис. 2, 3). Для того чтобы удерживать ионы в радиальном направлении, в ячейку встроен радиочастотный квадруполь.

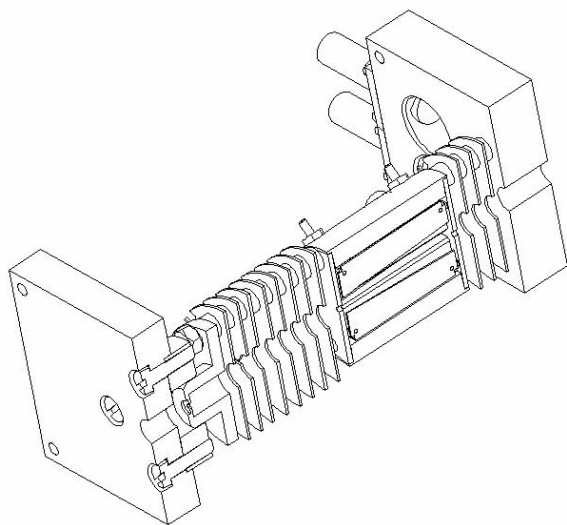


Рис. 3. Сборка СИД-ячейки, входной и выходной ионной оптики на фланце (продольный разрез)

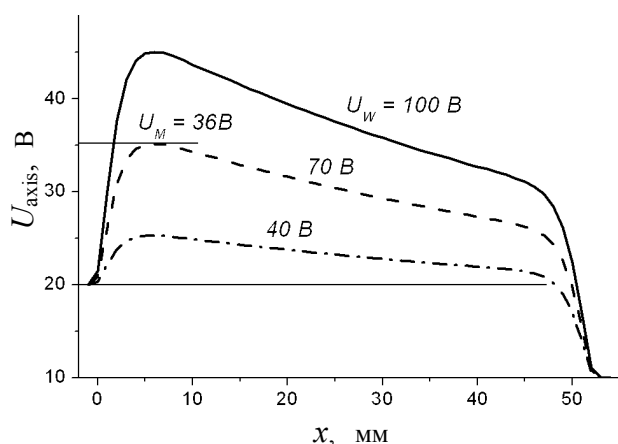


Рис. 4. Распределение потенциала на оси столкновительной ячейки при различных потенциалах клиньев U_w : 40, 70 и 100 В. Напряжения на диафрагмах $U_{in} = 20$ В, $U_{out} = 10$ В; статическая составляющая потенциала на электродах квадруполя $U_{DC} = 18$ В

Для удобства изготовления электроды квадруполя выполнены в виде секторов цилиндра. Между секторами через диэлектрик крепятся дополнительные электроды клиновидной формы (клинья). Данные электроды позволяют создать продольное электрическое поле, которое ускоряет прохождение ионов через ячейку. Снаружи ячейку ограничивают входная и выходная диафрагмы диаметром 1 мм. Вся конструкция заключена в цельный ди-

электрический корпус, в котором сделаны отверстия, необходимые для подводки питания и буферного газа.

Длина ячейки была выбрана так, чтобы обеспечить ее работу при среднем давлении газа порядка 30–100 мТорр. Такое давление прежде всего необходимо для скоростного охлаждения ионов за времена порядка 10 мкс. Напуск воздуха внутрь ячейки производится через натекатель и контролируется механическим клапаном. Реальное давление газа в ячейке вычисляется по проводимости двух 1-мм диафрагм и было в 1000–1200 раз выше, чем измеряемое давление газа в камере.

Распределение потенциала на оси СИД-ячейки моделировалось с помощью программы SIMION 7 при разных напряжениях на электродах. Пример распределения потенциала показан на рис. 4. Как видно из рисунка, клиновидная форма электродов позволяет варьировать проникновение их потенциала между стержнями квадруполя и тем самым создавать продольный градиент. Прямой наклонной формы клиньев достаточно для создания линейного градиента. Потенциал на оси может быть аппроксимирован следующим выражением:

$$U_A(x) = U_{DC} + K(x)(U_w - U_{DC}),$$

где U_{DC} — потенциал на стержнях квадруполя; U_w — потенциал на клиньях; $K(x)$ — коэффициент проникновения поля от клиньев, который меняется от 0.3 на входе в ячейку до 0.1 на выходе из ячейки. На примере рис. 4 также видно, что потенциалы апертур выбраны существенно более отрицательными в основном для улучшения трансмиссии.

Схема экспериментальной установки для измерений временных характеристик столкновительной ячейки представлена на рис. 5, а. Экспериментальная установка состоит из источника "электроспрей", линейной ионной ловушки, камеры СИД с входной и выходной ионно-оптическими системами, камеры детектора с сеточным коллектором и вторично-электронным умножителем на прямом пролете.

Источник ионов мог переключаться между методами ионизации при атмосферном давлении (API) и электроспрей (ESI). Основные эксперименты были проведены с методом электроспрей, используя модельный циклический пептид грамицидин С с молекулярной массой 1140 Да и доминирующим пиком в спектре $(M+2H)^{2+}$ $m/z = 571$. Часть экспериментов была сделана на ацетоне ($m/z = 59$) с ионизацией API. Ионы отбирались через систему сопло—скиммер в линейную ловушку со средним ионным током порядка 10–30 пА. Апертуры интерфейса выбраны так, чтобы давление в линейной ловушке поддерживалось на уровне 5 мТорр.

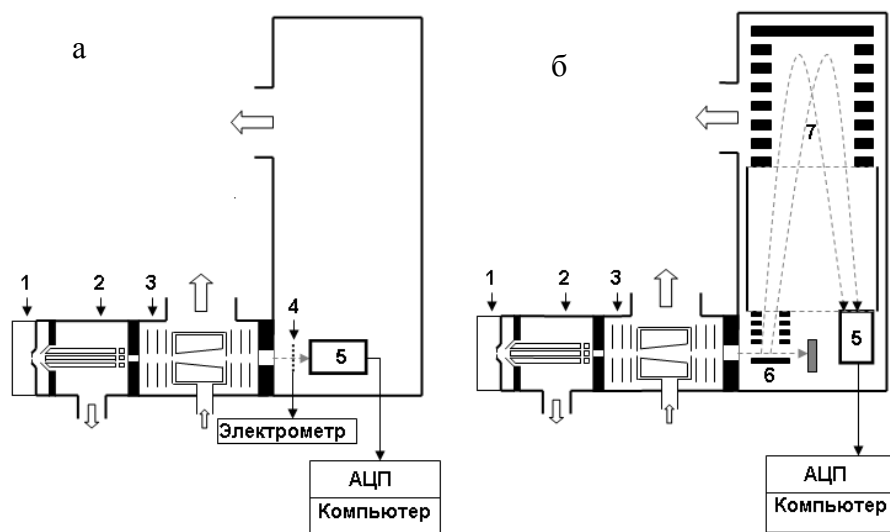


Рис. 5. Схема экспериментальной установки со столкновительной ячейкой. а — схема измерения временных характеристик СИД-ячейки; б — схема измерения спектра фрагментных ионов. 1 — ионный источник электроспрей; 2 — линейная ионная ловушка; 3 — камера столкновительной ячейки с входной и выходной ионной оптикой; 4 — сеточный коллектор; 5 — вторично-электронный умножитель (ВЭУ); 6 — ортогональный ускоритель; 7 — отражатель

Газонаполненная линейная квадрупольная ионная ловушка подробно описана в работе [10] и применяется как импульсный источник ионов для исследования характеристик СИД-ячейки. Она состоит из металлического квадрупольа с короткими (6 мм) насадками — "таблетками" у выходной диафрагмы, к которым прикладывается одинаковый радиочастотный (РЧ) сигнал, но отличная от потенциала стержней постоянная составляющая потенциала. При отрицательном смещении потенциала на "таблетках" образуется область с локальным минимумом статического потенциала, в которой накапливаются ионы. Вывод ионов из ловушки осуществляется подачей отрицательного импульса на выходную диафрагму. Вытягивающее поле слабо проникает в область накопления ионов, поэтому ожидается, что энергетический разброс мал, а энергия ионного пакета определяется в большей степени потенциалом на "таблетках". Входная апертура ловушки (скиммер) всегда открыта для напуска ионов. Таким образом, заряд ионных пакетов определяется периодом между выбросами ионов. Ионные пакеты с управляемой энергией направлялись в СИД-ячейку.

Описанная выше СИД-ячейка окружена с обеих сторон линзовыми элементами для фокусировки ионов как на входе, так и на выходе из ячейки. Оптика собрана из дисковых электродов с отверстиями 5 и 10 мм. Часть последовательных элек-

тродов электрически соединена в группы для формирования линз. Отклоняющие системы изготовлены из аналогичных разрезанных надвое дисков. Откачка камеры СИД производится турбомолекулярным насосом. При типичных давлениях в ячейке до 100 мТорр давление в камере поддерживается менее 10^{-4} Торр. На выходе СИД-ячейки ионы ускорялись до энергии 30 эВ, фокусировались на выходной линзе и направлялись на детектор.

На пути к детектору установлен сеточный коллектор для измерения энергетического разброса ионов и оценки ионного тока пучка. В качестве детектора был выбран вторичный электронный умножитель (ВЭУ) с дискретными диодами и заземленным выходом. Сигнал с детектора пропускали через широкополосный усилитель ($\times 10$) и регистрировали на плате скоростного АЦП с усреднением сигналов. Камера детектора откачивается турбомолекулярным насосом. Входная диафрагма диаметром 3 мм применена для обеспечения высокого вакуума в камере детектора (менее 10^{-6} Торр).

Для анализа массового состава ионов на выходе из ячейки (рис. 5, б) использовался времяпролетный масс-анализатор с ортогональным ускорителем (ОУ) и ионным зеркалом. Полная длина траектории в анализаторе — 1.2 м, а ускоряющее напряжение — 5 кВ. Ионы из области накопления ОУ длиной 25 мм выталкивались в пространство

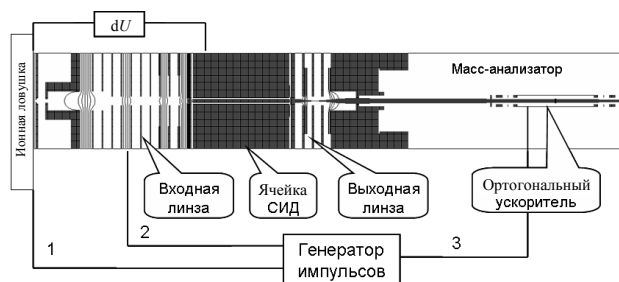


Рис. 6. Ионно-оптическая схема установки от выхода линейной ионной ловушки до ортогонального ускорителя. 1 — импульс эжекции ионов из ловушки; 2 — импульс селекции родительских ионов; 3 — выталкивающий импульс масс-анализатора

дрейфа, отражались в ионном зеркале и попадали на вторично-электронный умножитель с входом, подвешенным на потенциал дрейфа. Для оцифровки сигнала использовалась та же система регистрации (скоростной АЦП). Старт системы регистрации осуществлялся одновременно с выталкивающим импульсом. Полученные времяпролетные спектры считывались и обрабатывались компьютером. Входная щель ортогонального ускорителя была увеличена до 2 мм для увеличения чувствительности, в результате чего разрешающая способность прибора снижена до 3000–3500, что вполне достаточно для идентификации ионных фрагментов в данном эксперименте.

Измерение времяпролетных спектров проводилось в двух режимах синхронизации. В синхронном режиме, где старт масс-анализатора (импульс 3 на рис. 6) осуществлялся с управляемой задержкой относительно импульса открытия линейной ионной ловушки (импульс 1 на рис. 6). Варьируя задержку между импульсами, анализировали время выхода различных фрагментных ионов из СИД-ячейки.

В асинхронном режиме задержка варьировалась случайным образом в течение всего суммирования времяпролетных спектров. В результате во фрагментном спектре были представлены все компоненты независимо от их времени доставки в ортогональный ускоритель.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Первым шагом были измерены параметры ионной ловушки при вытягивающем импульсе от 12 до 20 В. В этих экспериментах СИД-ячейка работала как вакуумная транспортная система. Газ не напускался, давление было менее $3 \cdot 10^{-6}$ Торр, радиочастотное напряжение на квадруполе было

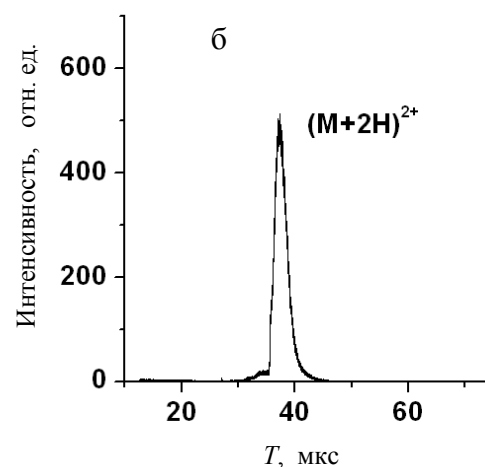
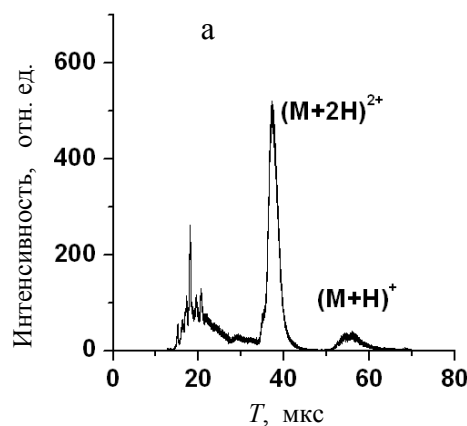


Рис. 7. Полный времяпролетный спектр сигнала грамицидина (а) и спектр с выделением только пика двухзарядного грамицидина (б)

включено для улучшения ионной трансмиссии. Тем самым СИД-камера использовалась как короткий времяпролетный анализатор с низким разрешением. На энергиях ионов от 20 до 100 В мы могли различать главные компоненты ионного пучка. Энергетическое распределение ионов было измерено по уменьшению сигнала на детекторе при подаче задерживающего потенциала на коллекторную сетку. При импульсе вытягивания 12 В и давлении в ловушке 5 мТорр ширина энергетического распределения по пику двухзарядного грамицидина была меньше 2 В. При использовании импульса 15–20 В сформированный ионный пакет имеет длительность 1–2 мкс и умеренный угловой ($5\text{--}10^\circ$ при 20 эВ) и энергетический (15–20 %) разбросы. Такие ионные пакеты удобны для исследования быстрых процессов в СИД-ячейке.

В серии предварительных экспериментов также была оптимизирована процедура выделения индивидуальных ионных компонент с помощью им-

пульсов, приложенных к отклоняющим пластинам входной оптической системы. Для выделения ионов на вертикальные отклоняющие пластины, расположенные на расстоянии 45 мм от выхода линейной ловушки, подавалось импульсное напряжение 30 В. На рис. 7 представлены сигналы на детекторе для двух случаев — с выделением и без. Несмотря на низкую разрешающую способность в линейном спектре, возможно надежное выделение двухзарядных ионов грамицидина.

Следующим шагом стало испытание самой газонаполненной СИД-ячейки. Информацию прежде всего получали, сравнивая ионные сигналы с напуском газа и без. Отношение интенсивностей получаемых пиков позволяет оценить пропускание ионов через ячейку. Временная задержка и временное уширение пика определялись при прямом

наблюдении формы накопленного сигнала. Среди главных изменяемых параметров были: энергия ионов в ячейке (от 10 до 200 В); давление газа в ячейке (10–100 мТорр); напряженность продольного поля, изменяемая потенциалом клиньев (0–100 В). При варьировании энергии инжекции потенциалы всех электродов от сопла до последнего сегмента входной линзы СИД смещались на одинаковую величину. При этом изменяется лишь поле непосредственно перед входом в ячейку, а время импульса селекции не менялось.

Рассмотрим влияние давления газа в ячейке. Как выяснилось, результаты сильно зависят и от энергии ввода ионов. В этом эксперименте были установлены следующие напряжения: на ловушке $U_{\text{ЛГ}} = 44$ В, на входной диафрагме $U_{\text{in}} = 20$ В, на выходной диафрагме $U_{\text{out}} = 10$ В, на электродах квадруполя $U_{\text{DC}} = 18$ В, на клиньях $U_{\text{W}} = 18$ В. Определим энергию инжекции ионов как разность между потенциалом ионной ловушки $U_{\text{ЛГ}}$ и максимальным потенциалом на оси СИД-ячейки U_{M} . Как видно из расчетного распределения поля на рис. 4, при заданных потенциалах U_{M} достигает 36 В, а значит, энергия инжектированных ионов $\Delta E = \Delta U \cdot q = (U_{\text{ЛГ}} - U_{\text{M}}) \cdot q = 8$ [В] $\times$ заряд, т. е. 16 эВ для двухзарядных ионов грамицидина.

Пропуская ионы через газонаполненную ячейку при фиксированной энергии 16 эВ, были получены временные профили сигналов при различном давлении газа в ячейке (рис. 8). Как будет показано ниже, энергия 16 эВ недостаточна для фрагментации двухзарядного грамицидина, т. е. в данном эксперименте получены временные профили трансмиссии молекулярных родительских ионов.

Из профилей видно, что столкновения с буферным газом задерживают и уширяют ионный пакет. Ширина на полувысоте профиля (FWHM) остается менее 10 мкс (требования параллельного анализа) только при давлении газа в ячейке менее 16 мТорр. С другой стороны, исходя из критерия 200 см $\cdot$ мТорр [11] для столкновительного охлаждения ионов, необходимо увеличить давление газа в ячейке до 40 мТорр. В этом случае временная ширина пика увеличивается уже до FWHM = 20 мкс. Таким образом, желательно точнее определить порог по давлению, достаточный для ионного охлаждения.

Для определения оптимального давления газа были измерены трансмиссия ионов через ячейку и энергетический разброс выходного ионного пучка. На рис. 8, б представлен ионный сигнал (полный интеграл под временным профилем) в зависимости от давления в ячейке. Помимо этого, на графике представлены зависимость временной задержки ионов в ячейке и ее временной разброс (вертикальными линиями). Из графика видно, что охлаждение ионов слабо влияет на трансмиссию.

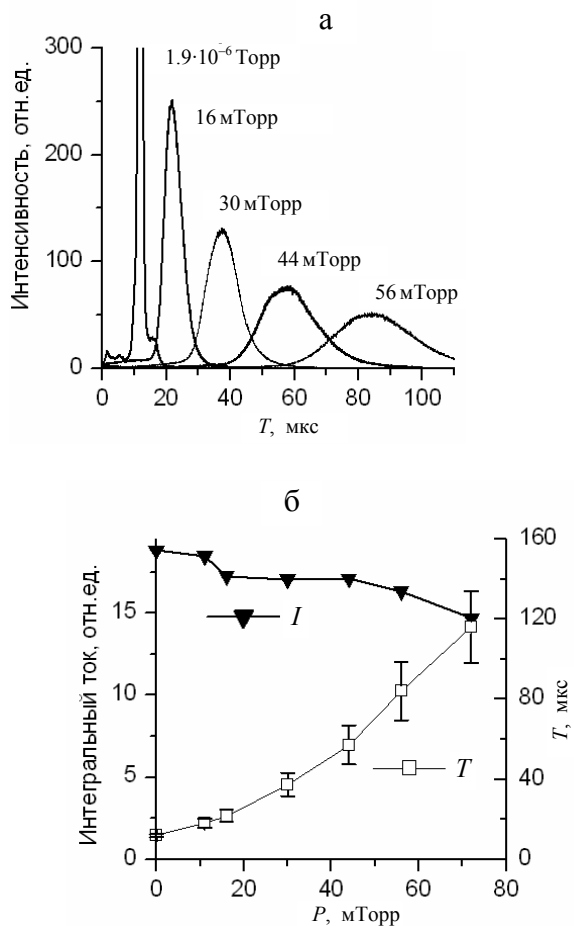


Рис. 8. Временные профили двухзарядного грамицидина как функции давления газа в столкновительной ячейке (а). Время задержки T и его временной разброс, полный и ионный токи I как функции давления в ячейке (б). Энергия инжекции $\Delta E = 8$ В $\times$ заряд = 16 эВ

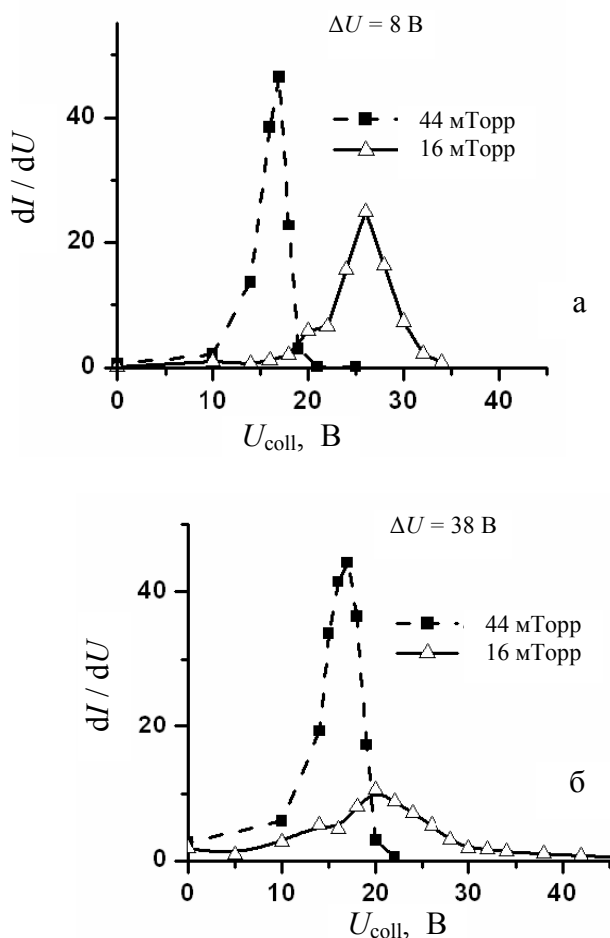


Рис. 9. Энергетическое распределение ионов после столкновительной ячейки при энергии инжекции $\Delta E = 8 \text{ В} \times \text{заряд}$ (а) и $38 \text{ В} \times \text{заряд}$ (б)

Слабое (5–10 %) падение трансмиссии при увеличении давления, возможно, происходит из-за:

а) рассеяния ионов при входе в ячейку, где радиочастотного удержания еще не происходит, и

б) слишком быстрого охлаждения ионов еще до максимума потенциала в ячейке.

Заметим, что более быстрое уменьшение трансмиссии наблюдается для более легких родительских ионов, например ацетона ($m/z = 59$). В этом случае влияние рассеяния на буферном газе — воздухе проявляется сильнее.

Скоростную релаксацию ионов можно оценить по временной задержке. Движение релаксированных (термализованных) ионов определяется их подвижностью. Напряженность поля по условиям эксперимента равна приблизительно 2 В/см. Подвижность ионов грамицидина при давлении 75 мТорр составляет $10^4 \text{ см}^2/\text{В} \cdot \text{с}$, и в таком случае

ожидаемая скорость протягивания — 20 см/мс. Тогда время прохождения ионов на участке со слабым продольным полем длиной 4 см (с учетом быстрой трансмиссии в краевых полях) должно быть 200 мкс. Однако экспериментально наблюдаемая задержка во всей СИД-ячейке меньше 110 мкс (учитывая время 10 мкс пролета в вакууме). То есть ионы пролетают значительную часть ячейки с высокой энергией, до того как полностью охлаждаются. Такие оценки показывают, что при 70 мТорр охлаждение происходит приблизительно на середине ячейки. Соответственно при давлении порядка 40 мТорр термализация должна наступить лишь у выхода из ячейки. Эксперименты подтверждают предыдущие оценки и необходимость высокого давления порядка 40 мТорр.

Проверяя степень охлаждения ионов в ячейке, мы провели измерение энергетического разброса ионов на выходе. Для этого был использован метод энергетической отсечки ионов сеточным коллектором перед ВЭУ. Измерения проводились при двух давлениях в ячейке 16 и 44 мТорр (рис. 9).

Видно, что в случае $P = 44$ мТорр энергия ионного пучка соответствует постоянному потенциалу на стержнях квадрупольной СИД-ячейки, как и ожидалось для полного охлаждения ионов. При более низком давлении газа 16 мТорр остается избыток энергии ионов около 7 В, означающий неполное охлаждение, которое будет уменьшать разрешение и трансмиссию ионов во втором масс-анализаторе при параллельном (МС-МС)-анализе.

Для измерения временных характеристик СИД-ячейки в режиме фрагментации родительских ионов аналогичные измерения были проведены для других энергий инжекции $\Delta U = 38 \text{ В}$ и $\Delta U = 88 \text{ В}$ (рис. 10 и 11 соответственно). Следует обратить внимание, что при $\Delta U = 38 \text{ В}$ и давлении газа в ячейке 16 мТорр ионный пакет раздваивается. При этом передний фронт пакета приходит на детектор раньше, чем при вакууме в ячейке. Этот факт является индикатором появления фрагментных ионов, т. к. только ионы с меньшим отношением m/z и той же энергией могут попасть на детектор быстрее родительского иона. При увеличении давления пакеты ионов разных масс перекрываются, давая один широкий максимум. При большей энергии инжекции ионов в ячейку временной разброс ионов в пучке при одном и том же давлении увеличивается, что также может быть косвенным подтверждением фрагментации ионов в ячейке.

Заметно, что задержка в столкновительной ячейке с ростом энергии ионов получается более короткой. Это может означать, что а) ионы проходят через СИД-ячейку раньше их охлаждения, б) большая доля фрагментных ионов смещает максимум временного профиля в сторону меньших времен. Для давления 16 мТорр время прихода меньше, чем вычисленное время для грамицидина — 29 мкс,

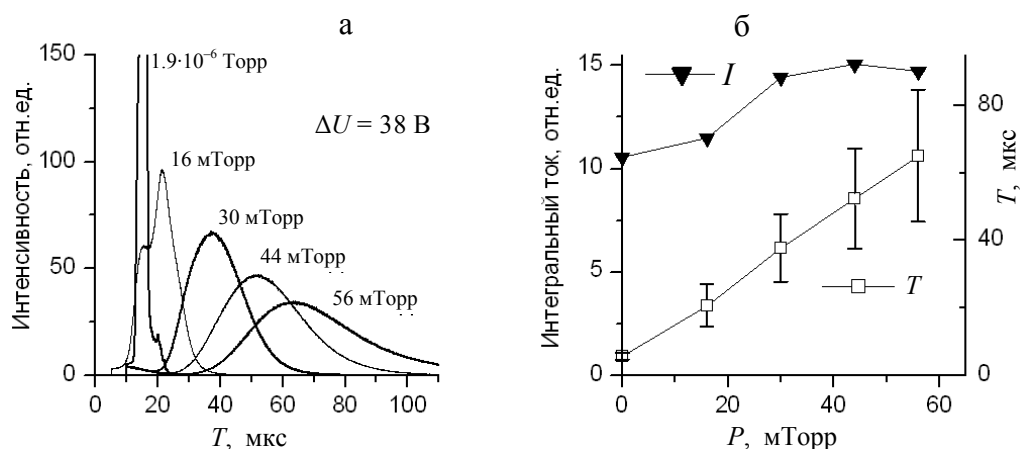


Рис. 10. Временные профили двухзарядного грамицидина в зависимости от давления газа в ячейке (а). Время задержки, его временной разброс и полный ионный ток в зависимости от давления в столкновительной ячейке (б). Энергия инжекции $\Delta E = 38 \text{ В} \times \text{заряд} = 76 \text{ эВ}$

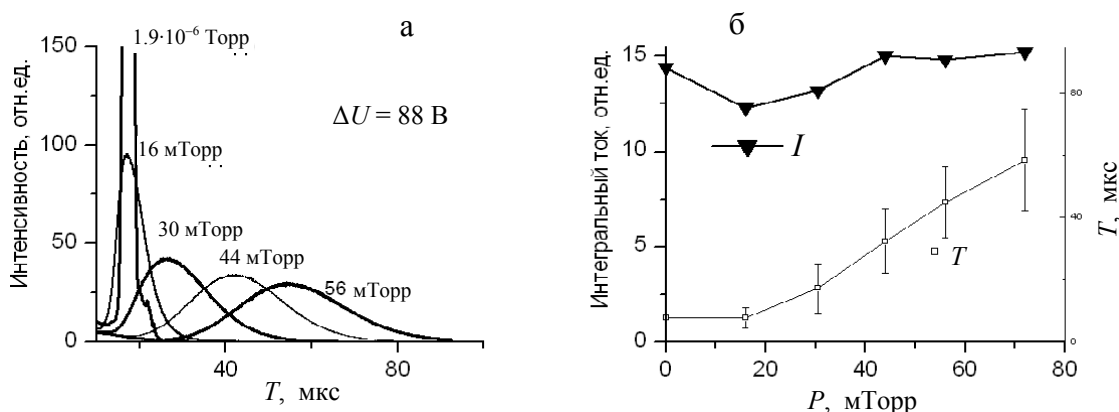


Рис. 11. Временные профили двухзарядного грамицидина как функции давления газа в ячейке (а). Время задержки, его временной разброс и полный ионный ток как функции давления в столкновительной ячейке (б). Энергия инжекции $\Delta E = 88 \text{ В} \times \text{заряд} = 176 \text{ эВ}$

и даже меньше вычисленного времени для фрагментного иона с $m/z = 100$, что еще раз подтверждает неполную релаксацию энергии при 16 мТорр.

Для энергий инжекции $38 \text{ В} \times \text{заряд}$ и $88 \text{ В} \times \text{заряд}$ измеренный ионный ток на сеточном коллекторе не уменьшался с увеличением давления, а для $\Delta U = 38 \text{ В}$ даже увеличился примерно на 30 % и составлял 1–1.2 пА. Для периода стартов 2.5 мс такой ток соответствует примерно 15 000 ионов на выстрел. Таким образом, трансмиссия близка к 100 %. Увеличение сигнала, вероятно, связано с тем, что более легкие фрагментные ионы дают

большой сигнал на детекторе, чем родительский ион грамицидина.

Интерпретация предыдущих измерений в значительной степени ограничена из-за незнания массового состава ионных фрагментов. Следующие эксперименты проводились с масс-спектрометрической регистрацией ионных пучков в соответствии со схемой на рис. 5, б. Для определения зависимости степени фрагментации ионов грамицидина S в столкновительной ячейке от энергии родительского иона использовался асинхронный режим работы ортогонального ускорителя.

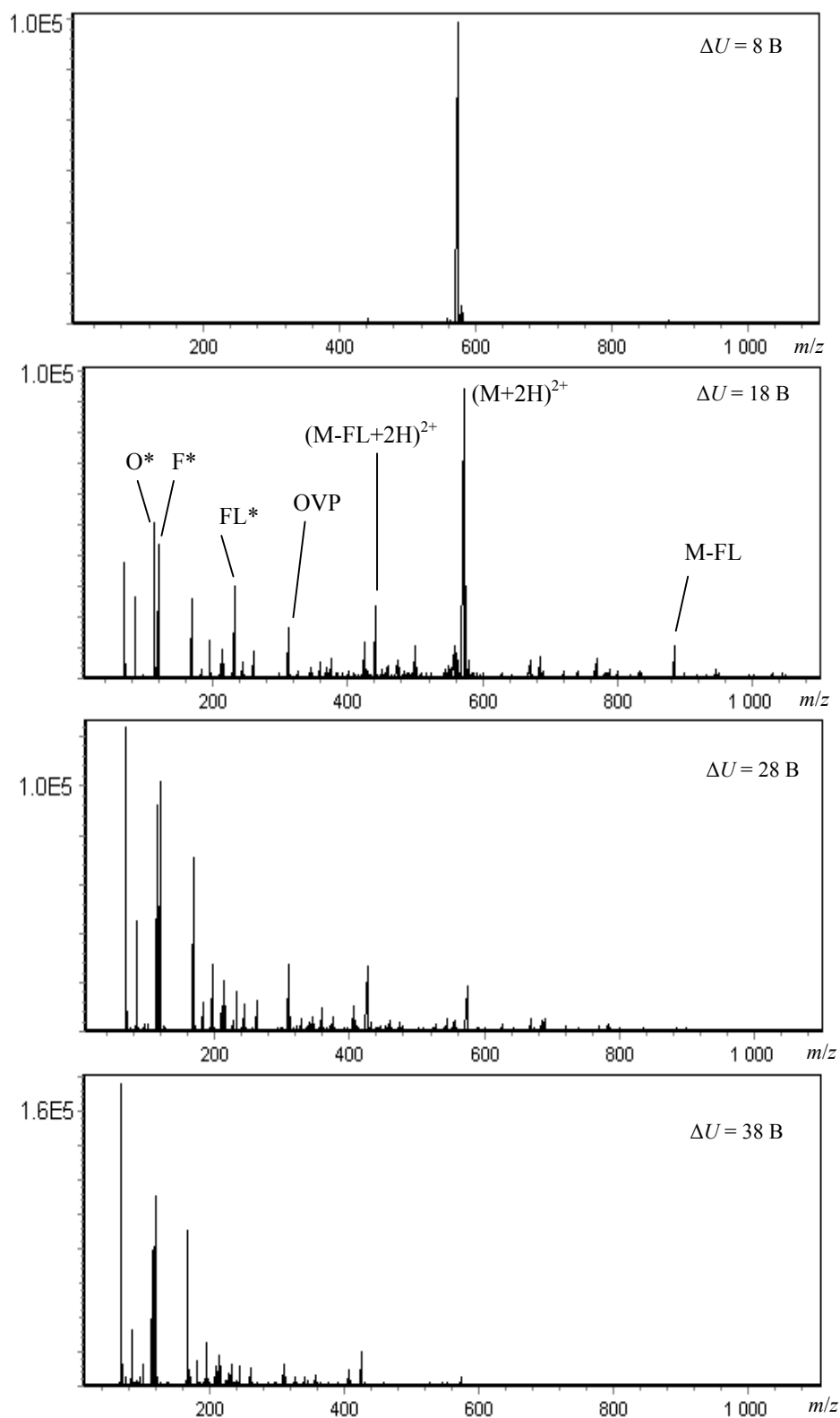


Рис. 12. Спектр грамицидина С, полученный в асинхронном режиме при 20 000 стартах, давлении в СИД-ячейке 44 мТорр. Потенциал инжекции ΔU изменялся от 8 В до 38 В. Вертикальная шкала немного варьируется (около 10^5 , что соответствует 10^4 ионов на канал)

В таком режиме в спектре можно видеть сразу все массовые компоненты. На рис. 12 показаны масс-спектры, накопленные за 20 с (20 000 стартов) при различных 4 потенциалах инжекции ΔU (от 8 до 38 В). Как можно видеть, для двухзарядного грамицидина С при $\Delta U = 8$ В (энергия инжекции 16 эВ для 2 зарядов) фрагментации не наблюдается. С увеличением энергии удастся провести фрагментацию грамицидина, несмотря на его стабильную замкнутую структуру. Самая информативная фрагментация наблюдается при $\Delta U = 18$ В. При этом пик родительского иона еще имеет максимальную амплитуду в спектре и хорошо видны крупные однозарядные фрагменты ($m/z > 600$ а.е.м.). На рисунке приведена идентификация наиболее интенсивных пиков. При дальнейшем увеличении энергии наблюдаются только маленькие фрагменты, что затрудняет расшифровку спектра.

Зависимость интенсивности родительского и фрагментных ионов от потенциала инжекции приведена на рис. 13. Как можно видеть, интенсивность пика двухзарядного грамицидина падает, а фрагментных ионов малых масс ($m/z \leq 170$) растет с ростом энергии. Максимальная интенсивность наиболее информативных фрагментных ионов средних масс ($m/z = 440$) наблюдается при $\Delta U = 18$ В, что согласуется с данными работы [13]. Оптимальная энергия фрагментации находится в достаточно узком интервале значений примерно 10 В. Как показано в [1, 12, 13], оптимальная энергия фрагментации увеличивается с ростом отношения массы к заряду m/z родительского иона,

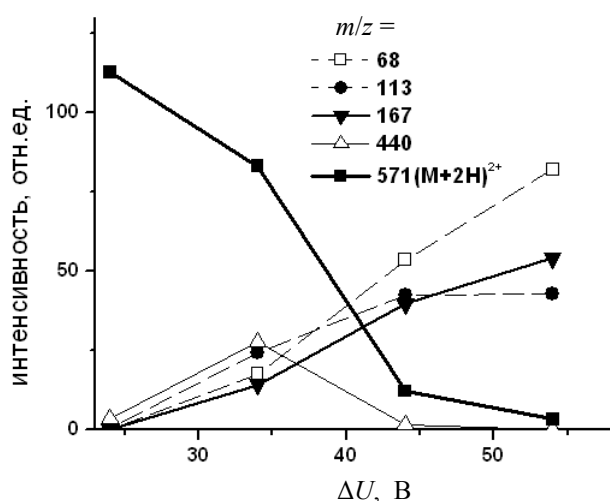


Рис. 13. Интенсивности (интеграл пика) родительского и фрагментных ионов различных масс в зависимости от потенциала инжекции. Интенсивность родительского иона ($M+2H$) уменьшена вдвое

т. е. для получения структурной информации необходимо менять энергию инжекции ионов в зависимости от их m/z .

Узкий диапазон оптимальных энергий родительских ионов представляет собой дополнительную проблему для (МС-МС)-анализа — необходимость менять потенциал инжекции за время разделения родительских ионов в ВПМС1 (т. е. в пределах 10 мс). Можно предложить несколько решений этой проблемы [1].

Решение 1. Варьирование энергии ВПМС1 или ВПМС2 путем синхронного изменения всех питающих напряжений. Решение очень неудобно, т. к. можно потерять массовую калибровку и выйти из оптимальных настроек по чувствительности и разрешению.

Решение 2. Использовать импульсную коррекцию ионной энергии непосредственно перед входом в СИД-ячейку. Так называемые импульсные элеваторы необходимо рассчитать и испытать.

Решение 3. Увеличить энергетическое окно за счет дополнительного возбуждения родительских ионов в СИД-ячейке. Осуществить такое возбуждение за требуемые времена порядка 10 мкс трудно.

Решение 4. Использовать больший разброс энергий родительских ионов. Это можно осуществить увеличением рабочей энергии ВПМС1 (например, до 1 кВ). Разброс энергий, пропускаемых многоотражательным ВПМС, будет 30–50 эВ [4–5]. Ионы будут тормозиться перед входом в СИД-ячейку, и такого разброса будет достаточно для перекрытия всего массового диапазона, хотя и приведет к уменьшению времени разделения в ВПМС1.

В настоящее время решения 2 и 4 представляются наиболее практичными.

Для изучения временных характеристик фрагментных ионов следующая серия экспериментов проводилась в синхронном режиме, т. е. импульс 3 был синхронизирован с импульсами 1 и 2 (см. рис. 6). Задержка между импульсами, открывающим ловушку и выталкивающим ионы из ортогонального ускорителя, изменялась, тем самым позволяя исследовать временные профили различных ионных компонент входящих в ускоритель. На рис. 14, а представлены временные профили, снятые при энергии инжекции $\Delta U = 8$ В. Интенсивность отложена в логарифмическом масштабе. Так как перед ячейкой вырезаны только ионы грамицидина, следовательно, все фрагментные ионы образуются в СИД-ячейке. Ширина временного профиля для всех ионов составляет примерно 20–25 мкс на половине высоты. Также отметим, что временные профили несимметричны: спад происходит заметно медленнее, чем подъем, т. е. имеется некоторый "хвост" ионов, медленно выходящих

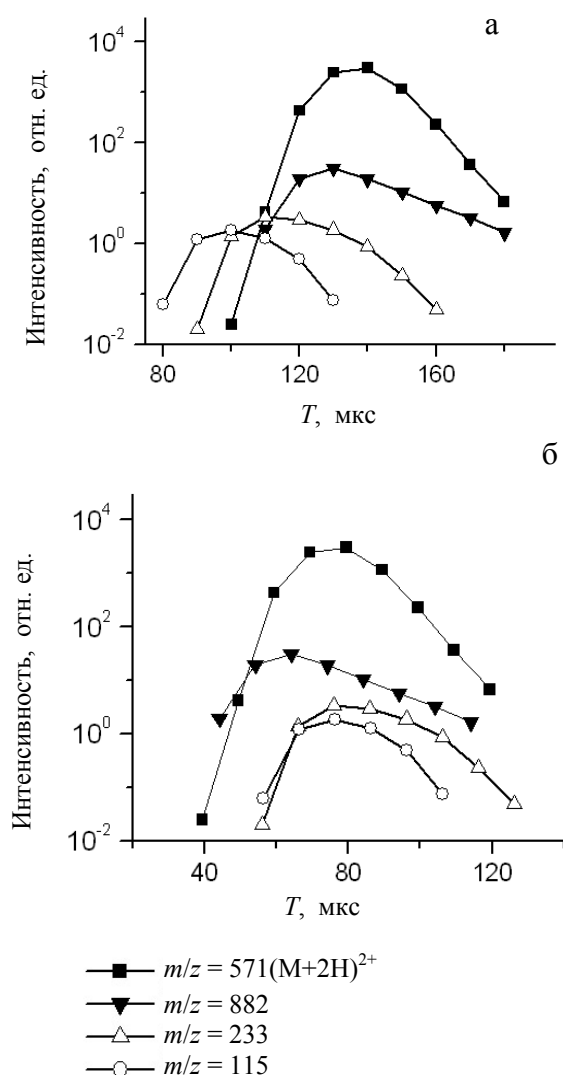


Рис. 14. Временные профили различных ионных компонент, входящих в ортогональный ускоритель (а); б — те же профили, но после вычета времени пролета от СИД-ячейки до ОУ масс-анализатора

из СИД-ячейки. При параллельном (МС-МС)-анализе это может привести к искажению фрагментного спектра, следующего за сильным пиком родительского иона.

Заметим, что форма временных сигналов на рис. 14, а значительно искажена по сравнению с уширением в СИД-ячейке. Возникает временная задержка, связанная с транспортом от СИД-ячейки до входа в ортогональный ускоритель. Эта задержка зависит от m/z ионов. Кроме того, конечная длина ортогонального ускорителя и детектора

дает дополнительное уширение пика (10 мкс для пика грамицидина для 25 мм ОУ и детектора). Видно, что измеренные временные профили различных масс сдвинуты. Сдвиг для крайних масс значительно превышает ширину пика.

По данным рис. 14, а и рассчитанным временам пролета от ячейки до ортогонального ускорителя (расстояние 12 см) были вычислены времена выхода ионов из СИД-ячейки. Для ионов грамицидина с энергией 20 В задержка составляет ~ 50 мкс. Из скорректированных профилей, представленных на рис. 14, б, видно, что основной сдвиг временных профилей объясняется разделением ионов после СИД-ячейки. Таким образом, чтобы избежать расщепления "семейства" ионов по массе фрагментов необходимо: 1) уменьшать расстояние от СИД-ячейки до ОУ анализатора; 2) использовать ионную оптику с высокой скоростью транспортировки, т. е. с большей энергией промежуточного ускорения; 3) использовать ВПМС2, работающий на больших энергиях ионов и/или имеющий большую длину ОУ.

ВЫВОДЫ

1. Сконструирована и исследована СИД-ячейка для быстрой фрагментации, трансмиссии и охлаждения ионов в газовых столкновениях. Ячейка приближается к требованиям, необходимым для реализации параллельного анализа во времяпролетном (МС-МС)-тандеме. Достижимы времена уширения ионных пакетов порядка 20 мкс при давлении газа порядка 50 мТорр и длине ячейки 5 см.

2. Для тяжелых родительских ионов ($m/z > 300$) наблюдается высокая (близкая к 100 %) ионная трансмиссия через СИД-ячейку. Потери малы в большом диапазоне давлений газа (от вакуума до 50 мТорр) и ионной энергии (от 8 В × заряд до 88 В × заряд). Для легких родительских ионов $m/z < 100$, не представляющих практического интереса в большинстве приложений, происходит расщепление и 2–5-кратные потери при входе в ячейку.

3. При давлениях, близких к 50 мТорр, термализация (т. е. столкновительная релаксация кинетической энергии ионов) происходит вблизи выхода из СИД-ячейки. В этом случае временное уширение ионного пакета минимально и составляет около 20 мкс.

4. При давлении газа выше 50 мТорр термализация происходит на более ранних стадиях, время транспортировки ионов возрастает и становится независимым от энергии инжектированных ионов. Например, при давлении 55 мТорр время задержки меняется от $T = 65$ мкс при $\Delta U = 38$ В до $T = 55$ мкс при $\Delta U = 88$ В. Не следует превышать давление выше порога охлаждения, т. к. это вызы-

вает дополнительное временное уширение ионных пакетов и дополнительную нагрузку на систему дифференциальной откачки.

5. Несмотря на фрагментацию, оптимальное временное уширение в СИД-ячейке остается приблизительно равным половине времени транспорта родительских ионов, как и было оценено в [1].

6. Требуемое для параллельного (МС-МС)-анализа время фрагментации и трансмиссии ≤ 10 мкс достигается при давлении 16 мТорр, недостаточном для полного охлаждения ионов. Нужно либо изменить времена в схеме (МС-МС)-анализа, либо использовать временной селектор и проводить полный анализ за 2–3 цикла. На каждом таком цикле измеряются фрагментные спектры от каждого второго-третьего родительского иона.

7. Продемонстрирована информационно-емкая фрагментация даже в случае неблагоприятного объекта — циклического пептида грамицидина С.

8. Для оптимальной фрагментации энергия ионов должна регулироваться в узком диапазоне и должна варьироваться пропорционально m/z ионов. Это представляет собой дополнительную проблему для (МС-МС)-анализа. Известно как минимум два практических подхода — импульсный элеватор энергии и уширение исходного энергетического разброса родительских ионов при повышении ускоряющего напряжения в ВПМС1.

9. Возникает дополнительная проблема временного разделения массовых компонент фрагментного спектра во время доставки от СИД-ячейки до ВПМС2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Verentchikov A.N.* Tandem time of flight mass spectrometer and method of use. GB patent: GB 2390935, filed on July 16, 2002. International Patent WO 2004/008481 A1.
2. *Веренчиков А.Н.* Параллельный (МС-МС)-анализ во времяпролетном тандеме. Постановка задачи, метод и схемы приборов // Научное приборостроение. 2004. Т. 14, № 2. С. 24–37.
3. *Веренчиков А.Н., Явор М.И., Хасин Ю.И., Гаврик М.А.* Многоотражательный планарный времяпролетный масс-анализатор. I. Анализатор для параллельного тандемного спектрометра // ЖТФ. 2005. Т. 75, № 1. С. 74–83.
4. *Явор М.И., Веренчиков А.Н.* Планарный многоотражательный времяпролетный масс-анализатор, работающий без ограничения диапазона масс // Научное приборостроение. 2004. Т. 14, № 2. С. 38–45.
5. *Хасин Ю.И., Веренчиков А.Н., Гаврик М.А., Явор М.И.* Первые экспериментальные исследования планарного многоотражательного ВПМС // Научное приборостроение. 2004. Т. 14, № 2. С. 59–71.
6. *Гаврик М.А.* Экспериментальное исследование свойств планарного многоотражательного времяпролетного масс-анализатора. Дис. ... канд. физ.-мат. наук. СПб.: ИАНП РАН, 2005.
7. *Thomson B.A., Jolliffe C.I.* Spectrometer with axial field. Patent US 5847386, 1997.
8. *Thomson B.A., Jolliffe C.I.* Quadrupole with axial DC field. Patent US 6111250, 1998.
9. *Tanner S., Bandura D.R., Baranov V., Beres S.* Controlling the temporal response of mass spectrometers for mass spectrometry. Patent WO 02071439, 2002.
10. *Веренчиков А.Н., Козлов Б.Н., Явор М.И., Труфанов А.С., Никитина Д.В.* Газонаполненная линейная квадрупольная ловушка с аксиальным выбросом как источник для многоотражательного времяпролетного масс-спектрометра // Научное приборостроение. 2005. Т. 15, № 2. С. 95–111.
11. *Douglas D.J., French J.B.* Mass spectrometer and method and improved ion transmission. Patent US 4964746, 1989.
12. *Verentchikov A., Hayden K., and Vestal M.* Tandem MALDI-TOF-o-TOF MS with collisional dampening // Extended abstract of ASMS 2000. (www.asms.org).
13. *Kinter M. and Sherman N.E.* Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. Wiley-Interscience, A John Wiley & Sons Inc., New York, 2000.

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург

Материал поступил в редакцию 8.06.2006.

EXPERIMENTAL STUDIES OF A COLLISIONAL INDUCED DISSOCIATION CELL WITH RAPID DISSOCIATION AND COLLISIONAL DAMPING

**S. N. Kirillov, A. V. Zamyatin, D. N. Alexeev, V. N. Demidov,
S. V. Maximov, M. Z. Muradymov, A. N. Verentchikov**

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

The paper describes a custom built collisional induced dissociation (CID) cell with rapid dissociation, and ion transfer. The cell differs from conventional fragmentation cells by the short length (5 cm) and relatively high gas pressure from 30 to 100 mTorr. The cell has a high transfer efficiency of at least 80 % and rapid ion transfer in the range of 10–20 μ s. Details are presented on time delay, time spread and energy spread of ion packets as a function of gas pressure. The example of doubly charged ions of gramicidin S there is demonstrated an efficient and information rich fragmentation. The cell appears nearly adequate for tandem time-of-flight mass spectrometers with parallel analysis of all parent ions.