

高效液相色谱检测器——高分辨飞行时间质谱仪的研制

贾韦韬¹, 徐国宾¹, 姚均¹, 何坚³, 周振⁴, 陆豪杰^{1,2}, 杨芃原^{1,2,*}

(1. 复旦大学化学系, 上海 200433; 2. 复旦大学生物医学研究院, 上海 200032;

3. 厦门大学机电工程系, 福建 厦门 361005; 4. 中国科学院广州地球化学研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 本文研制的质谱仪是具有电喷雾离子源和射频四极杆接口的高分辨飞行时间质谱仪(ESI QQQ TOF MS)。该仪器的特点如下: 采用可三维调节、带有加热雾化气的电喷雾源液质联用接口; 采用由三组四极杆组成、可有效调制离子束的离子光学系统; 采用正负双脉冲推斥和垂直引入方式; 采用经优化设计的二级网状反射器。该仪器分辨本领优于 11 000(Full Width at Half Maximum, FWHM), 质量测定精度优于 10×10^{-6} , 最低检测限低于 $3 \text{ fmol}/\mu\text{L}$ 。可作为高效液相色谱优良的质谱检测器。

关键词: 飞行时间质谱; 电喷雾; 高效液相色谱检测器

中图分类号: O 657.63; O 644 文献标识码: A 文章编号: 1004 2997(2006)03 129 06

Development of TOF MS Used as the Detector of HPLC

JIA Wei tao¹, XU Guo bin¹, YAO Jun¹, HE Jian³,
ZHOU Zhen⁴, LU Hao jie^{1,2}, YANG Peng yuan^{1,2,*}

(1. Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China;

2. Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China;

3. Department of Mechanical and Electrical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

4. Guangzhou Institute of Geochemistry Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Time of flight mass spectrometry (TOF-MS) is widely used in protein chemistry and proteomics research due to its high sensitivity, high resolution and high accuracy. Recently two Q TOF MS analytical systems are developed. Both systems are equipped with electrospray ionization source which could be directly hyphenated with HPLC as an outstanding detector. The ESI triple quadrupole orthogonal acceleration reflecting TOF mass spectrometer has some promising features, such as a ESI source with heatable nebulizer set

收稿日期: 2005 11 28; 修回日期: 2006 04 17

基金项目: 本研究受到科技部“十五”科学仪器攻关重大项目(2001BA210A01), 973 基金(01CB510202), 863 重大专项基金(02BAC11A11), 上海市创新团队基金(03DZ14024), 上海市重大基础研究(04DZ14005), 国家自然科学基金(20405003), 863 人肝专项基金(2004BA 711A 18)和 973 人肝新技术基金(2004CB520804)支持。

作者简介: 贾韦韬(1980~), 男(汉), 山东人, 硕博连读生, 从事生物质谱仪的研制及其在蛋白质组学中的应用。E-mail: jaweitao@yahoo.com

* 通讯作者: 杨芃原(1949~), 男(汉族), 上海人, 教授, 从事高分辨质谱仪研制与蛋白质组学研究。E-mail: pyyang@fudan.edu.cn

tled on a smart triaxiality moving stage, an excellent ion optics system composed with triple quadruple, double pulse acceleration, and a double stage reflector with homemade grids. The Gramicidin S sample concentration below to 3 fmol/ μ L can be identified by these instruments under the optimized conditions. The mass range of these instruments is from 50 u to 6 000 u with a general ESI interface to the HPLC. The optimal mass resolution exceeds 11 000 (Full Width at Half Maximum, FWHM) and the signal/noise ratio of reserpine (10 pg/ μ L) is greater than 100.

Key words: time of flight mass spectrometer; electrospray ionization; detector of HPLC (high performance liquid chromatography)

世界上第一台质谱仪于 1910 年由英国物理学家 J. J. Thomson (1906 年诺贝尔物理学奖获得者) 研制成功, 当时的质谱只是一种没有进行聚焦的抛物线质谱装置。随着离子光学理论的发展和完善, 通过对离子运动规律的理论研究, 发现适当的电场和磁场组合具有方向和速度聚焦的特性, 于是质谱仪的质量分辨能力有了很大程度上的提高。到 20 世纪 20 年代, 质谱逐渐成为一种分析手段被化学家采用。从 40 年代开始, 质谱广泛应用于有机物质分析, 有机质谱提供了有机化合物最直观的特征信息, 即分子质量及官能团碎片结构信息, 而且可以获知其元素组成, 因此逐渐成为有机化合物结构和成分分析的主要工具, 与核磁共振谱、红外光谱、紫外光谱一起被称为有机结构分析的“四大谱”。到了 80 年代左右, 随着快原子轰击 (FAB)、电喷雾 (ESI) 和基质辅助激光解析 (MALDI) 等新软电离技术的出现, 质谱能用于分析高极性、难挥发和热不稳定样品后, 生物质谱飞速发展^[1], 有关生物质谱的国际会议频频举行, 已成为现代科学前沿的热点之一。最近, 在对生物大分子及其复合物的非共价结构研究方面也取得了很大进展。2002 年的诺贝尔化学奖授予了两位质谱研究人员, 美国科学家 J. B. Fenn (ESI MS) 和日本科学家 K. Tanaka (MALDI MS), 以表彰他们在生物质谱领域中里程碑的贡献, ESI MS 和 MALDI MS 技术的成熟极大的扩展了质谱在化学和生物领域的应用。

众所周知, 后基因组学时代的蛋白质组学已是 21 世纪国际生命科学研究的的前沿领域, 也是分析化学研究领域的最前沿^[2], 利用蛋白质组学可以分离和分析细胞与组织的全部蛋白, 直接找

到一组或几组功能蛋白, 并研究它们与功能基因 (组) 的内在联系。现在生物质谱是蛋白质组学技术平台的最重要组成部分之一^[3], 利用生物质谱可测定生物大分子结构、鉴定组成及进行痕量分析, 还可以测定非共价键作用。目前用于生物质谱分析的主要有四极杆式质谱 (Q MS)、离子阱质谱 (IT MS)、飞行时间质谱 (TOF MS) 和傅立叶变换离子回旋共振质谱 (FTICR MS)。近年来, 随着国际上对生物化学、基因蛋白质工程和生物制药等领域的不断深入, 作为在该领域中重要的分析研究工具, 飞行时间质谱仪 (TOF MS) 以它微秒级的快速检测速度、高离子传输率、高灵敏度和精度以及理论上无质量检测上限, 尤其是近几年来 TOF MS 在分辨率上有质的飞跃 (优于 10^4) 等众多优点, 而逐渐成为质谱仪家族中发展势头最为迅猛的仪器^[4-6]。

然而, 大多数的高分辨率质谱仪的核心技术都被垄断在少数几个发达国家的厂商手中, 国内在高分辨质谱领域特别是作为高效液相色谱的质谱检测器领域进展缓慢。目前, 商品化 LC/TOF MS 几乎完全由国外厂商垄断, 主要生产商包括美国应用生物系统公司 (Applied Biosystems Corp.)、德国布鲁克·道尔顿公司 (Bruker Daltonics, Inc.) 和美国安捷伦公司 (Agilent Technologies)。Applied Biosystems 公司生产的最新 Q star XL 串联四极杆飞行时间质谱仪, 分辨率可超过 10 000, 精度好于 5×10^{-6} 。国家每年要花费巨额外汇去购买国外厂商昂贵的质谱仪, 因此, 研制出具有我国自主知识产权、适合我国国情的高分辨率飞行时间质谱仪, 以满足我国日益增长的科研工作的需要, 提高我国质谱仪器研制和应用的水平, 具有明显的经济和社会

意义^[7]。

在国家“十五”科学仪器攻关重大项目“色谱仪及专用部件的研制和开发”的支持下, 我们所研制的电喷雾垂直引入反射式飞行时间质谱仪已达到国外同类产品的性能指标, 为今后我国高效液相色谱质谱检测器的产业化奠定了基础。

1 质谱仪工作原理

图 1 是采用电喷雾离子源的垂直引入式、有网双场反射式的三级四极杆飞行时间质谱仪 (ESI QQQ TOF MS) 的结构示意图。该仪器具体工作流程是: HPLC 流出的组分经由 ESI 离子源气化形成离子, 再经过三级四极杆离子光学系统的调制形成可控离子束进入飞行时间质量分析器, 离子束被垂直引入加速区加速, 进入无场漂移区, 经过二级反射镜后再返回, 打在微通道板 (MCP) 上产生电脉冲信号, 然后经峰值鉴别器 (CFD) 和时间数字分辨器 (TDC) 记录并输出色谱—质谱二维图 ($t-m/z$)^[8]。TOF MS 在质量范围原理上的优势已众所周知, 但如何提高仪器的分辨率一直是该仪器发展的焦点。最前沿的研究集中在如何使离子在进入调制区时能量降至最低, 以及如何实现空间聚焦。解决前者的有效途径是采用离子冷却技术, 而解决后者的较好方式是设计与制作以均匀场为指导的无场飞行区和反射器。

2 质谱仪硬件构成

该仪器包括真空系统、ESI 离子源、三级四极杆离子光学系统、飞行时间质量分析器和信号采集处理系统五大部分。

2.1 真空系统

仪器采用先进的三级差动真空系统, 一台抽速 110 L/s 的涡轮分子泵 (北京中科科仪技术发展有限责任公司, 中科科仪) 保证了分析器内的最佳真空度优于 5×10^{-6} Pa, 另一台抽速 450 L/s 的涡轮分子泵 (北京中科科仪) 保证离子光学区的真空度可控制在 1×10^{-4} Pa。调节狭缝不仅可以控制离子的入射宽度, 还可以起到类似真空阀门的作用, 关闭分析器与离子光学系统之间的真空连接。这样系统可以在不关闭分析器的情况下, 更换离子源和离子调制与传输系统。

如图 1 所示。

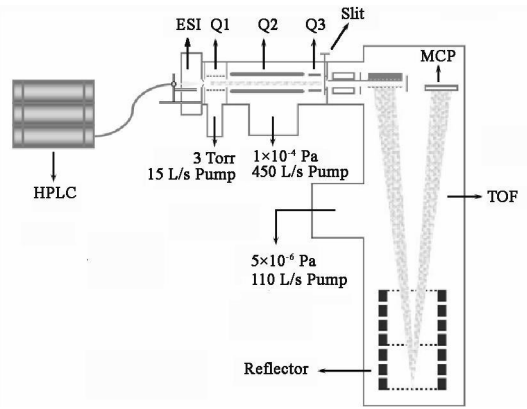


图 1 高效液相色谱检测器电喷雾离子源四极杆飞行时间质谱结构示意图

Fig. 1 Schematic overview of the ESI QQQ TOF MS (HPLC Detector)

2.2 电喷雾离子源 (ESI)

电喷雾离子源属于一种软电离源, 能使大质量的有机分子生成带多电荷的离子, 通常认为电喷雾可以用两种机制来解释。(1) 小分子离子蒸发机制: 在喷针针头与施加电压的电极之间形成强电场, 该电场使液体带电, 带电的溶液在电场的作用下向带相反电荷的电极运动, 并形成带电的液滴, 由于小雾滴的分散, 比表面增大, 在电场中迅速蒸发, 结果使带电雾滴表面单位面积的场强高达 1×10^8 V/cm², 从而产生液滴的“爆裂”。重复此过程, 最终产生分子离子。(2) 大分子带电残基机制: 首先也是电场使溶液带电, 结果形成带电雾滴, 带电的雾滴在电场作用下运动并迅速去溶, 溶液中分子所带电荷在去溶时被保留在分子上, 结果形成离子化的分子。一般来讲, 电喷雾方法适合使溶液中的分子带电而离子化。离子蒸发机制是主要的电喷雾过程, 但对质量大的分子化合物, 带电残基的机制也会起相当重要的作用。电喷雾也可测定中性分子, 它是利用溶液中带电的阳离子或阴离子吸附在中性分子的极性基团上而产生分子离子^[7]。

本工作中使用的是自制的、可精确三维调节、带有加热雾化气 (N₂) 的电喷雾源——液质联用接口, 简单高效, 适配性强。经 Agilent 1100 HPLC 分离的样品以微升级的流速经过一个两通阀进入带有加热雾化器的不锈钢喷针, 被离子化进入质谱。此电喷雾接口放置模式有

两种:一种是垂直正交转移模式;另一种是同轴转移模式。前者重现性要优于后者,因为其喷雾方向与质谱仪入口轴向成 90° 正交,这样雾滴的方向和离子被吸入的方向垂直,故玷污较小,同时也提高了灵敏度与信噪比,入口的堵塞问题也随之大大减轻。加热雾化气是高纯氮气,温度可精确控制在 $25 \sim 350^\circ\text{C}$,即使在较高流速下也可满足样品雾化要求。ESI 源产生的电喷雾通过逆向气帘去溶剂化后进入离子光学系统。气帘距离电喷雾喷针 $0.5 \sim 1.5\text{ cm}$ 。本系统的电喷雾接口也可直接以离线方式 (offline) 进样或使用蠕动泵推动进样,如使用 $50 \sim 75\ \mu\text{m}$ 内径的石英毛细管电喷雾则可实现纳喷雾。

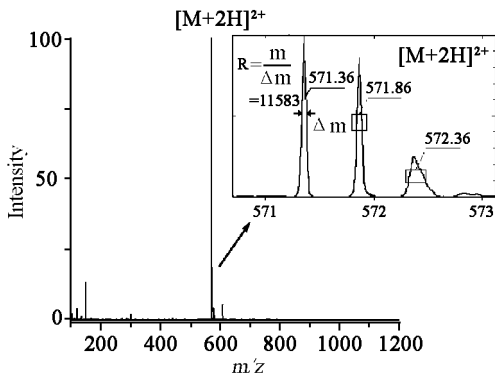


图 2 1 pmol/L 短杆菌肽溶于 80% 甲醇 / 20% 水 / 1% 乙酸溶液的质谱图, $R = 11\ 583$ (FWHM)

Fig. 2 Mass spectrum of 1 pmol/L Gramicidin S in 80 : 20 methanol and water with 1% acetic acid ($R = 11\ 583$ FWHM)

2.3 离子光学系统

离子光学系统 (调制与传输系统) 采用三组不同功能四极杆。第一组射频四极杆称为分子离子反应器 (molecular ion reactor)^[9], 结构小巧, 整个四极杆总长不到 22 mm。离子进入此四极杆后, 在射频场的作用与氮气分子发生频繁碰撞和分子离子反应, 一方面可增加去溶剂化效果, 实现碰撞冷却聚焦, 另一方面通过控制射频电压的幅值和频率可以打碎离子进行串级质谱分析; 第二组射频四极杆是离子光学系统的核心, 总长 179 mm, 可对离子运用碰撞冷却聚焦离子传输方式 (collisional focusing ion guide)^[10]。离子自第一组四极杆经过分离锥进入第二组四极杆后, 在强射频电场的作用下, 与缓冲气体分子发生频繁碰撞, 实现冷却聚焦, 能

将离子汇聚成直径小于 0.2 mm 的离子束, 大大减小其空间分散。另外, 由于离子与气体分子发生频繁的剧烈碰撞, 离子动能大幅度衰减, 又可有效减小离子的初始能量分散。这些是提高分析器分辨率的重要因素^[11]。第三组四极杆, 用来精确控制离子束入射方向, 保证离子束准确通过入射的中心到达飞行时间分析器的垂直加入区。离子经离子光学系统调制后, 用一台自制的 pA 级微电流放大器测量法拉第筒收集到的总离子流。

2.4 飞行时间质量分析器

近年来 TOF MS 无论在分辨率方面, 还是在质量测量精度上都有了质的进步。除了运用垂直引入、反射器、碰撞冷却聚焦和源后延迟引出等技术来提高飞行时间质谱的性能指标之外, 对分析器的优化设计和精心制作仍然是至关重要的一环。整个分析器可分为离子排斥区、加速区、无场漂移区、双级反射区和微通道板检测区五部分, 飞行管长约 0.6 m (图 1)。采用正负双脉冲排斥电压, 可有效减小回头时间造成的影响。加速区、反射区和微通道板检测区完全对称排列, 以保证电场的均匀性。在研制中如何使电场尽可能地接近理论计算值是主要难题, 尤其是如何解决在不同区域的电场渗透问题。由于采用了有网式二级补偿反射器 (如图 1 所示), 不仅可以增加离子的有效飞行长度, 还能更有效地空间聚焦, 减小能量分散的影响, 因此可以大大提高分析器的分辨本领。

2.5 离子检测系统

本套质谱仪器的离子检测系统采用目前 TOF MS 最常用的检测器——微通道板检测器 (MCP), 并且设计了新颖的、饱和状态式 MCP 安装方法。由于离子束被调制成矩形, MCP 也用相应的形状 ($62\text{ mm} \times 42\text{ mm}$)。整个检测器用不锈钢片屏蔽防止电渗。同以往使用较多的喇叭形阳极相比, 在这里使用的平板阳极具有更高的响应速度, 并会使 MCP 一直工作在饱和状态, 也就是说无论何种离子何时打在 MCP 上都将得到相同峰宽和强度的单离子峰信号, 从而可以用累加计数的方式记录谱图。不采用常规接法下的模拟信号, 可以得到数字信号, 不仅可以提高质量测定精度, 而且有助于提高仪器的分

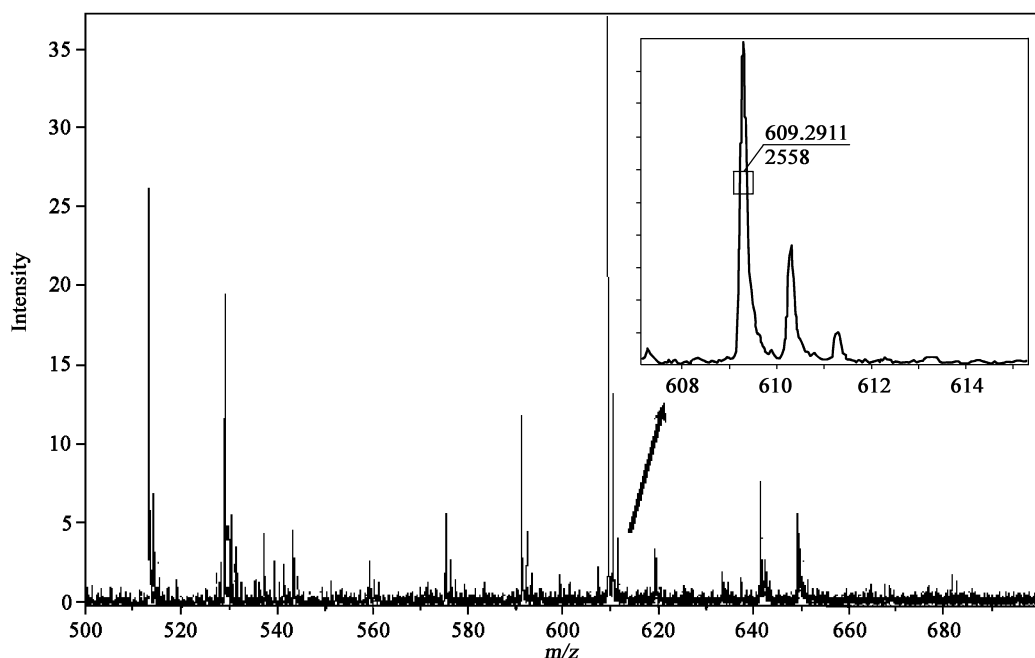


图3 10 pg/L 利血平(溶于80%甲醇 20%水 1%乙酸溶液)的质谱图(S/N> 100)

Fig. 3 Mass spectrum of 10 pg/L reserpine in 80 : 20 methanol and water with 1% acetic acid(S/N> 100)

分辨率。

3 质谱仪软件

本套质谱仪操作和数据处理软件基于 Windows 平台,采用面向对象的可视化编程语言 Visual Basic 6.0 开发。其各部分都采用模块化封装,拥有良好的操作环境适应性和友好的软件界面,适用于 Windows 98/NT/2000/XP 系统的台式 PC 机。本套质谱仪软件设有 8 个主菜单,功能完善,包含有文件、编辑、采集显示、数据分析、校正、图像处理、帮助等。可自动控制质谱仪采集数据和校正操作,显示总离子强度图(TIC)、选择离子强度图(XIC)、质谱图(m/z)和色谱—质谱二维图($t-m/z$)。可以随时切换窗口,可实时计算、显示质谱峰的分辨率、信噪比、峰高、半峰宽、飞行时间、峰值列表等质谱参数,对质谱图进行降噪处理、高斯平滑等操作,对数据窗口进行任意区域放大或缩小,对多张质谱图进行累加操作。

4 性能与指标

研制的电喷雾质谱仪的具体技术指标如下。质量范围: 50 ~ 6 000 u; 分辨率: 实际质量分辨率优于 6 000(FWHM), 最佳分辨率达到

11 000(FWHM)以上(如图 2 所示); 灵敏度: 10 pg/L 利血平, MS 全扫描, S/N > 100(如图 3 所示); 2 pmol/L 的溶菌酶样品, 主峰峰值强度大于 10^4 计数; 检测极限: 在仪器优化条件下, 符合 IUPAC 3 倍噪音水平定义的检出极限低于 3 fmol/L 短杆菌肽(Gramicidin S)样品。与液相色谱接口: 常规电喷雾。采用 Agilent 公司的 HP1100 微量高效液相色谱和研制的质谱仪通过 ESI 接口联机。混合样品为 1.25 ng/L 的利血平和 25 ng/L 的短杆菌肽。(色谱条件: 流动相 80%甲醇 20%水 0.1%甲酸; 柱子: ZORB AX 反相柱, 0.3 mm i. d., 10.0 cm, 填料粒度 3 μm , 孔径 300 \AA ; 流速: 1.5 $\mu\text{L}/\text{min}$)。色谱图如图 4 所示。

5 质谱仪特点

该质谱仪器的主要技术特点归结如下:

(1) 采用可精密三维调节、带有加热雾化气的电喷雾源——液质联用接口;

(2) 采用由三组四极杆组成、可有效调制离子束、控制其空间分散和能量分散的离子光学系统;

(3) 飞行时间质量分析器采用正负双脉冲排斥和垂直引入方式, 并采用建立在双场反射及

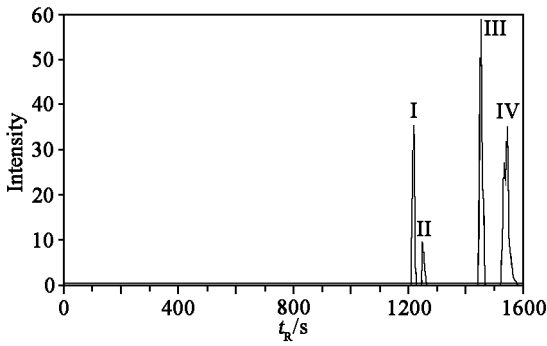


图 4 HPLC-MS 联用对短杆菌肽(25 ng/ μ L) 和利血平(1.25 ng/ μ L) 混合样品的 TIC 图 (峰 I: 1 207 s 至 1 227 s 利血平; 峰 III: 1 442 s 至 1 469 s 短杆菌肽; 峰 II 和 峰 IV 属未知杂质)。

Fig. 4 TIC spectrum of gramicidin S (25 ng/ μ L) and reserpine (1.25 ng/ μ L) separated by HPLC.

(Peak I: 1 207 s 1 227 s Reserpine;
Peak III: 1 442 s 1 469 s Gramicidin S;
Peak II & IV: Unknown contamination)

均匀场理论基础上的、经优化设计的二级有网反射器;

(4) 新颖的微通道板电子倍增器(MCP)安装方法。

6 结 论

本电喷雾 四极杆 飞行时间质谱仪的研制是建立在垂直引入、双场反射以及均匀场的理论基础,并应用射频四极杆技术有效减小离子束的空间与能量分散,运用先进合理的设计,依靠精密可靠的加工和制作,经过严密有效的调试,突破了部分关键技术,最终研制成功具有较高性能的、高分辨率和高灵敏度、可作为优良的高效液相色谱质谱检测器的飞行时间质谱仪,为其产业化奠定了技术基础。目前本高效液相色谱质谱检测器的产业化工作正在实施中。

致谢:感谢已故著名质谱学家、俄罗斯科学院 Dodonov AF 教授的指导。

参考文献:

[1] Weickhardt C, Moritz F, and Grotemeyer J. Time of Flight Mass Spectrometry: State of the Art in Chemical Analysis and Molecular Science [J]. Mass Spectrometry Reviews, 1996, 15 (3): 139-162.

[2] Pandey A, Mann M. Proteomics to Study Genes and Genomes [J]. Nature, 2000, 405(6788): 837-846.

[3] 钱小红. 蛋白质组与生物质谱技术 [J]. 质谱学报, 1998, 19(3): 48-54.

[4] Guilhaus M, Selby D, Mlynski V. Orthogonal Acceleration Time of Flight Mass Spectrometry [J]. Mass Spectrometry Reviews, 2000, 19 (2): 65-107.

[5] Mirgorodskaya O, Shevchenko A, Chernushevich I, et al. Electrospray Ionization Time of Flight Mass Spectrometry in Protein Chemistry [J]. Analytical Chemistry, 1994, 66(1): 99-107.

[6] Smith R, Loo J, Loo R, et al. Principles and Practice of Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Large Polypeptides and Proteins [J]. Mass Spectrometry Reviews, 1991, 10(5): 359-451.

[7] 杨芾原, 钱小红, 盛龙生. 生物质谱技术与方法 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 1-5.

[8] 何 坚, 杨芾原, 庄峙厦, 等. 高分辨电喷雾离子源三级四极杆 飞行时间质谱仪的研制 [J]. 仪器仪表学报, 2003, 24(6): 598-600.

[9] Dodonov A, Kozlovsky V, Loboda A, et al. A New Technique for Decomposition of Selected Ions in Molecule Ion Reactor Coupled with Ortho Time of Flight Mass Spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1997, 11 (15): 1 649-1 656.

[10] Campbell J, Collings B, Douglas D. A New Linear Ion Trap Time of Flight System with Tandem Mass Spectrometry Capabilities [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1998, 12 (20): 1 463-1 474.

[11] Loboda A, Kozlovski V, Chardakova E, et al. New Method for Ion Mobility Determination by Stability Threshold Measurement in Gas Filled Radio Frequency Quadrupoles [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1998, 12 (1): 45-49.