

高分辨电喷雾离子源三级四极杆-飞行时间质谱仪的研制

何 坚¹ 杨鹏原² 庄峙厦¹ 王小如¹ 杨小东¹ 宋浩威² 于文佳¹ 魏俊飞²
周 振³ A. F. Dodonov⁴

¹(厦门大学现代分析科学教育部重点实验室 厦门 361005) ²(复旦大学化学系 上海 200433)

³(II Physical Institute, Giessen University, 35392 Giessen, Gemany)

⁴(Institute of Energy Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Science, 142432 Chernogolovka, Moscow, Russia)

摘要 报道了实验室研制的电喷雾离子源,具有射频四极杆接口的高分辨飞行时间质谱(ESI-QQQ-TOFMS)仪器。该仪器具有以下特点:在离子调制区使用三组四极杆,有效地减少离子束的空间分散和能量分散;采用正负双脉冲排斥和离子垂直引入方式;经过优化设计的二级有网反射器;新颖的MCP安装方法。经初步调试,该仪器的分辨本领已优于10,000,质量测定精度优于 10×10^{-6} 。该仪器于2002年6月通过了国家教育部科技成果鉴定[鉴字[教2002]第008号],其主要性能指标已经达到了国际先进水平。

关键词 飞行时间质谱 电喷雾 反射器 高分辨率

The Development of a High Resolution ESI-QTOFMS Coupled with Three Sect Quadrupoles

He Jian¹ A. F. Dodonov⁴ Zhuang Zhixia¹ Yang Pengyuan² Yu Wenjia¹ Wei Junfei²
Zhou Zhen³ Yang Xiaodong¹ Song Haowei² Wang Xiaoru¹

¹(Key Laboratory of Analytical Sciences of MOE, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

²(Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China)

³(Institute of Energy Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Science, 142432 Chernogolovka, Moscow, Russia)

⁴(II Physical Institute, Giessen University, 35392 Giessen, Gemany)

Abstract An high resolution ESI-QQQ-TOFMS coupled with three sect quadrupoles is reported. The home-made instrument in the laboratory has a number of features. It can be used as tandem MS (MS/MS) owing to three sect quadrupoles used in the ion modulation part; the TOFMS analyzer adopted positive-negative double extrusion pulse and orthogonal injection way; two grade ion reflector with grids designed by computer simulation, and new micro-channel plate (MCP) mounting method. This instrument has already been in working condition after preliminary adjustment, and the resolution over 10,000 was achieved.

Key words Time of flight mass spectrometry (TOFMS) ESI Reflector High-resolution

1 引 言

众所周知,蛋白质组学是国际生命科学研究的前

沿^[1],它已成为分析化学研究领域的最前沿研究热点^[2],而生物质谱,是蛋白质组学首选的方法学之一^[3]。近年来,由于基体辅助激光解吸离子源(MALDI源)和电喷雾离子源(ESI源)的成熟,ESI-MS和

* 本文于2002年3月收到,系国家自然科学基金资助项目(专项H-29927002和重点29245110),教育部现代分析科学重点实验室开放课题。

MALDI-MS 已成为分析和检测生物大分子最主要的手段之一。对于生物质谱仪而言,它比一般无机、有机质谱要求更大的质量分析上限 (> 3kDa)、更高的分辨率、灵敏度和质量分析精度。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)和傅里叶变换离子回旋共振质谱(FTICR-MS)。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等众多优点,再加上近几年来 TOF-MS 的分辨率又有了长足进步(优于 10^4),使得 ESI/MALDI-TOF-MS 成为生物质谱最佳的分析手段之一^[4]。由于 ESI-TOF-MS 的重要性,这里通过国际合作的方式,研制了一台高分辨率、高精度的电喷雾离子源三级四极杆-飞行时间质谱仪。

2 仪器原理与结构

TOF-MS 在质量范围的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。

图 1 是采用电喷雾离子源的垂直引入式、有网双

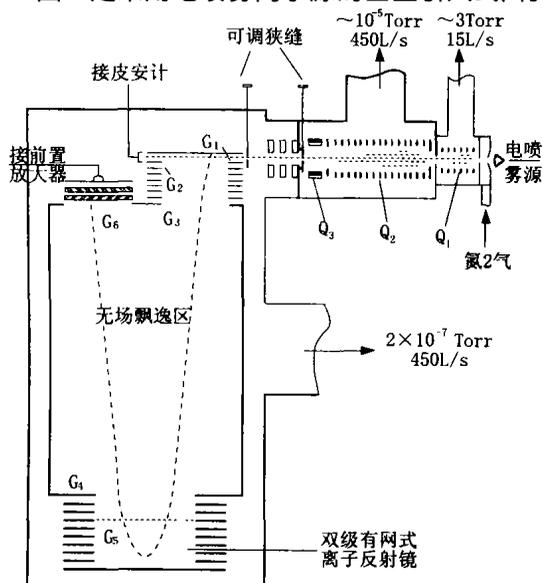


图 1 高分辨电喷雾离子源串联飞行时间质谱仪的结构图(Q₁~Q₃ 三组功能不同的四极杆 G₁~G₆ 栅网)

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。仪器采用三级差动真空系统,两台 450L/s 抽速的分子泵(型号 F450, 浙江大学机械厂)保证了分析器内的最佳真空度优于 1×10^{-7} Torr,离子调制区的真空度亦可控制在 10^{-5} Torr。调节狭缝既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,关闭分析器与离子调制区之间的真空连接,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。这里研制的电喷雾质谱仪从结构上可以分为三大部分:电喷雾离子源(ESI)、离子调制与传输部分和飞行时间分析器。

2.1 电喷雾离子源(ESI)

电喷雾离子源是一种软电离源,能使大质量的有机分子生成带多电荷的离子,已有不少理论解释,在这不再赘述^[5,6]。本工作中使用的是自制的 ESI 源,结构上非常简单。根据样品的浓度和样品电喷雾的效率,可以选用 1~10 μ l 的微量注射器进样。具体做法是:先用一根内径约 0.5mm 的聚四氟乙烯管与微量注射器相连,然后与一小段不锈钢毛细管相接,再通过一段 10mm 左右长的相同聚四氟乙烯管与内径 50 μ m、外径 0.5mm 的石英毛细管连在一起。电喷雾高压加在不锈钢毛细管上,并使用一个可调速的平流泵控制进样的速度。进样速度可以在 0.1~1 μ l/min 之间选择。在低流量时,也可以不用平流泵,只需将聚四氟乙烯管竖起,依靠溶液的本身重力来维持电喷雾。气帘距离电喷雾石英毛细管 0.5~1mm。

2.2 离子调制传输部分

离子调制与传输系统采用三组不同功能四极杆。第一组四极杆称为分子离子反应器(Molecular ion reactor)^[7,8],其结构非常小巧,整个四极杆总长不到 22mm。当 MIR 内的气压维持在 0.2~5Torr 时,离子进入四极杆后,离子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。一方面既可以增加去溶的效果,又可以实现碰撞冷却聚焦,另一方面通过控制射频电压的幅值和频率对离子还可以做串级质谱^[8];第二组四极杆是离子调制与传输系统的核心,其总长 179mm,其工作原理和制作方法与第一组四极杆基本相同,可以称之为碰撞冷却聚焦离子传输方式(Collisional Focusing Ion Guide)。工作时背景气体压强控制在 10^{-2} Torr 左右,离子自第一组四极杆经过分离锥 1(Skimmer1)进入第二组四极杆后,在强射频电场的作用下,与背景气体分子发生频繁碰撞,实现冷却聚焦。最佳时能将离子汇聚成直径小于 0.2mm 的离子束,这样可以大大减小空间分散,提高分析器的分辨率。另外,由于离子与气体分子发生频繁的

剧烈碰撞,使得离子动能得到了大幅度衰减,从而有效地减小了离子的初始能量分散。这也是提高分析器分辨率的重要因素之一;第三组四极杆,用来控制离子束的方向,保证离子束准确通过入射的中心。离子经离子调制与传输区后,用一台自制的皮安计测量法拉第筒收集到的总离子流。

2.3 飞行时间质量分析器

近年来随着人们对 TOFMS 工作原理理解的逐渐深入,TOFMS 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(Post Source Delay Extraction)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 1.1m(如图 1)。采用正负双脉冲排斥电压,其主要目的是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,这有利于保证电场的均匀性。从本质上讲,飞行时间分析器仍然完全有一些场强不同的静电场组成。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。

在具体制作过程中应注意以下环节:(1)栅网和极片的精心制作与装配;(2)电源的选用,高压电源的稳定度是影响分析器分辨率和质量分析精度的直接因素之一。该仪器使用了两台高稳定度电源(稳定度 $< 5 \times 10^{-5}$,型号 S25Q, S500, Stanford Research)。(3)工作参数的设计,分析器所有的电参数和机械参数都经计算机模拟优化设计,根据电源的不同工作模式,采用不同引入方式。由于采用了有网式二级补偿反射器,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。

如图 2 所示的 MCP 安装方式是该分析器的另一个新颖之处。使用的是两片 $42\text{mm} \times 62\text{mm}$ 的方形微通道板(MCP)。阳极的形状和接法都与常规不同,平常多使用喇叭形阳极,而在这里使用的是平板阳极。这种接法比以往的接法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。这样就可以用累加计数的方式记录谱图。不同于常规接法下的模拟信号,这种接法得到的是数字式信号,这样不仅可以提高质量测定精度,而且也有助于提高仪器的分辨率。

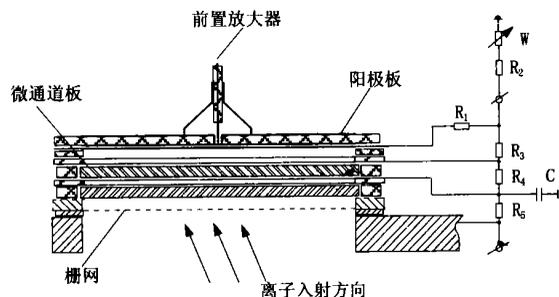


图 2 离子检测系统采用两层微通道板和平板式阳极

3 测试结果

目前经过初步调试,该仪器的主要指标已经达到国际先进水平,具体指标如下:

- (1) 质量分辨率 $R = 10,000$ (FWHM) (最佳分辨率 $R = 13,000$,如图 3)。
- (2) 质量测定精度 10×10^{-6} 。
- (3) 检测灵敏度 $S/N = 100:1$ (用 10pg 利血平)。

4 结 论

整台仪器的研制过程是典型的从理论到实践的过程,它建立在垂直引入、双场反射及均匀场理论的基础上,并应用射频四极杆技术减少离子流的空间及能量分散,从而使仪器获得了较高性能。这是在国内研制成功的、最高分辨率的飞行时间质谱仪,其主要指标也到达了国际先进水平。

参考文献

- 1 A. Pandey, M. Mann Nature, 2000, 405: 837~ 846
- 2 Editor report, CHEM. & ENG. NEWS, 2001, 79: 43~ 46
- 3 M. Wilm, A. Shevchenko, T. Houthaev, et al NATURE, 1996, 379: 466~ 469
- 4 M. Guilhaus, D. Selby, V. Mlynski Mass Spectrometry Review s, 2000, 19: 65~ 103
- 5 Richard D. Smith, Joseph A. Loo, Rachel R. Ogorzalek Loo, Mark Busman, Harold R. Udeseth. Mass Spectrometry Review s, 1991, 10: 359~ 451
- 6 A. L. Burlingame, Robert K. Boyd, sion J. Gaskell, Anal. Chem., 1996, 68: 599R~ 651R.
- 7 A. F. Dodonov, V. I. Kozlovski, A. V. Loboda, V. I. Raznikov, I. V. Sumlinenkov, A. V. Tomachev, A. F.

(下转第 604 页)

为提高转换精度,除利用硬件取得 $+U_{REF}$ 电荷平衡周期数与单斜读数精确的比例关系外,还需通过软件来校正。其实现较为简单:断开输入信号即 $m=0$,取 p_1 (可适当增加 p_1 个数来提高精度)个 $+U_{REF}$ 充电的电荷平衡周期 T 对电容充电,并经单斜放电,得总读数 s_{10} 。利用(6)式得, $k_s = p_1/s_{10}$ 。

5.3 正负基准电压的校正

对正负基准电压的校正措施是,断开输入信号,用 $+U_{REF}$ 基准对电容充电 p_2 个电荷平衡周期 T ,并引起 $-U_{REF}$ 基准的反向充电 n_1 个周期 T ,并通过单斜过程求出剩余电荷的读数 s_2 。由(6)式得 $p_1 = k_s s_2 + k_n n_1$,可得 $k_n = (p_1 - k_s s_2)/n_1$,由此来确定正负基准的比例关系。

6 结 论

这种A/D转换器的电路结构相对 $-\Delta$ 式A/D转换器来说,去除了噪声成形、抗混迭、数字抽取滤波等电路及技术;相对于诸数字多用表如HP3458A所采用的多斜II^[4]技术,又简化了电阻匹配精度要求极高的多斜积分电路部分,但低转换速率时取得了接近HP3458A中A/D转换器的精度。

许多积分式A/D转换器为简化电路,通过加入固定偏置电流来得到单极性电流以进行单向充电,但抬高了零输入信号时的电位,从而造成零点不稳定。此A/D转换器,在零输入电压附近时,退化成双斜式A/D转换器,

而保证了分辨率与稳定性。满量程输入时,由于筛选了低开关噪声的高性能模拟开关,对其读数稳定性影响很小。A/D转换器的线性由复合运放的高增益、高转换速率及高速、低阻的模拟开关等得以保证。

总之,高分辨率与高稳定性要由低频噪声小、偏置及漏电流小、高稳定性、低温漂的元器件及极其严密的电路设计等措施来保证。此A/D转换器在1s采样速率时,就可达到7位半分辨率。但由于运算放大器,尤其是基准电压的低频噪声的存在,象1281等八位半数字多用表一样,必须通过长时间如6至25s采样或滤波,才可得到八位半即28二进制位的分辨率。这种A/D转换器由于其简洁的电路,即使包括控制电路及处理部件,除积分电容、晶振、精密的积分电阻外,完全可以集成在一个芯片中。

参考文献

- 1 洪志良,曹先国,王晓悦 18位过采样 $-\Delta$ A/D转换器设计. 半导体学报, 1996, (11): 830~838
- 2 洪志良 用于18位 $-\Delta$ A/D转换器的降频和低通滤波器. 电子学报, 1995, (8): 84~86
- 3 中国惠普 HP3458A 8½位数字式万用表中的A/D转换器. 电子技术, 1992, (10): 26~29
- 4 李丽容,杨卫杰 积分式A/D转换器改进技术综述. 工业仪表与自动化装置, 1998, (4): 9~13

(上接第600页)

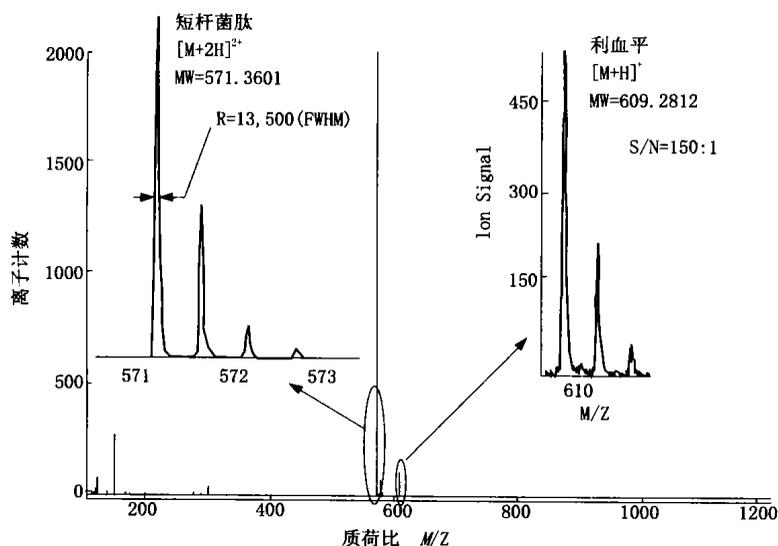


图3 短杆菌肽和利血平(10pg)样品的飞行时间质谱图

- Kraft, H. Wollnik. Rapid Communication in Mass Spectrometry, 1997, 11: 1649~1656
- 8 A. V. Loboda, V. I Kozlovski, E. V. Chardakova, A. V. Tolmachev, I V. Sumilimnikov, A. F. Dodonov, H. Wollnik. Rapid Communication in Mass Spectrometry, 1998, 12: 45~49
- 9 A. V. Loboda, A. N. Krutchinki, V. Spicer, W. Ens, K. G. Standing. Proc 46th ASM S Conf. Mass Spectrom., Orlando, Florida, 1998, 37.
- 10 J. M. Capbel, B. A. Collins, D. J. Douglas. Rapid Commun. In Mass Spectrom., 1998, 12: 1463~1474