

线性离子阱飞行时间质谱仪的研制及性能表征

黄晓¹, 田琴琴³, 范荣荣¹, 李辉², 黄保², 邹星²,
朱辉^{1*}, 黄正旭^{2,3}

(1. 昆山禾信质谱技术有限公司, 江苏 昆山 215300; 2. 广州禾信仪器股份有限公司, 广东 广州 510632;
3. 暨南大学 质谱仪器与大气环境研究所, 广东 广州 510632)

摘要: 基于飞行时间质谱技术、线性离子阱技术、大气压电离源等核心技术, 自制了一款台式高分辨线性离子阱飞行时间联用质谱仪(LIT-TOF MS)。以电喷雾离子源对仪器性能进行表征: LIT-TOF MS的质量分辨率超过12 000(利血平 m/z 609), 质量范围达到33~1 922 amu, 灵敏度为1 $\mu\text{g/L}$; 能够实现 MS^3 的三级质谱分析效果。对氨基酸进行了定性及定量的初步应用分析, 结果表明: LIT-TOF MS可为代谢组学研究中实时、在线、高通量测定生物复杂样品中氨基酸的含量及其变化提供一定依据。该仪器能与多种常压电离技术联用, 有望用于药品、环境、食品等领域。

关键词: 电喷雾离子源; 线性离子阱; 飞行时间质谱仪; 联用质谱

中图分类号: O657.63; TL626 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2018)11-1322-06

Development and Performance Characterization of a Linear Ion Trap Time-of-Flight Mass Spectrometer

HUANG Xiao¹, TIAN Qin-qin³, FAN Rong-rong¹, LI Hui², HUANG Bao²,
ZOU Xing², ZHU Hui^{1*}, HUANG Zheng-xu^{2,3}

(1. Kunshan Hexin Mass Spectrometry Technology Co., Ltd., Kunshan 215300, China; 2. Guangzhou Hexin Instrument Co., Ltd., Guangzhou 510632, China; 3. Institute of Mass Spectrometry and Atmospheric Environment, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: A high resolution hybrid linear ion trap time-of-flight mass spectrometer(LIT-TOF MS) was constructed, which is based on the time-of-flight mass spectrometry, linear ion trap, atmospheric pressure ionization source and other core technologies. The performance of the instrument was characterized with an electric spraying ion source. The resolution of LIT-TOF MS was over 12 000 (Reserpine, m/z 609), the mass range was 33-1 922 amu, and the sensitivity was 1 $\mu\text{g/L}$. It was also demonstrated that MS^3 could be readily performed in the LIT. The qualitative and quantitative analyses on amino acids were carried out by the LIT-TOF MS, and results showed that it could be used in the real-time, on-line and high-throughput determination of contents and variations of amino acids in biological complex samples. Besides, the instrument, combined with a variety of atmospheric pressure ionization techniques, could be applicable for determination in fields of medicine, environment and foods, etc.

Key words: electrospray ion source; linear ion trap; time-of-flight mass spectrometer; hybrid mass spectrometer

近十年来, 随着电喷雾电离(Electrospray ionization, ESI)和基质辅助激光解吸电离(Matrix assisted laser desorption ionization, MALDI)等软电离技术的日趋成熟^[1-2], 生物质谱技术得到了长足发展, 亦使仪器装置的竞争达到了白热化的程度。飞行时间质谱仪(Time-of-flight mass spectrometer, TOF MS)具有灵敏度好、质量分辨率高、分析速度快、质量检测上限只受离子检测器限制等优点^[3-5], 结合ESI源, 还可得到较宽的质量范围, 非常适合于有机聚合物、大分子及生物样品的检测^[6-8]。但是, 脉冲

收稿日期: 2018-02-27; 修回日期: 2018-05-24

基金项目: 2016广州市产学研协同创新重大专项产业技术研究(201604010065); 重大科学仪器设备开发专项(2017YFF010600005)

* 通讯作者: 朱辉, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 质谱仪器研究, E-mail: h.zhu@hxmass.com

式工作方式的 TOF MS 结合产生连续离子流的 ESI 源, 存在仪器占空比低及离子利用率不高的问题^[9]。为解决此问题, Chernushevich 等^[10-11]先后开发了一种将离子囚禁后再定时释放的垂直引入式 TOF 分析器, 其占空比接近 100%, 但质量范围很窄。为此, Okumura 等^[12]将三维(3-Dimensional, 3-D)离子阱和 TOF 杂化联用以提高质量范围, 但 3-D 离子阱存在空间电荷效应, 离子容量较小, 灵敏度低。由于 LIT(Linear ion trap, LIT)在离子捕获、存储效率和质量分辨率等方面比 3-D 离子阱更有优势, Douglas^[13]、Hashimoto^[14]等先后开发出 LIT 与 TOF 的联用技术, 在 m/z 174 ~ 1 922 质量范围内仪器的占空比提高到 60% 以上, 极大提高了 TOF 的灵敏度。

本研究将 ESI 源、LIT 和 TOF 结合, 研制了一款具有线性离子阱功能的飞行时间质谱仪—LIT-TOF MS, 开发出 LIT 与 TOF 的联动脉冲技术, 进一步提升了仪器的占空比, 从而获得更好的灵敏度。本文详细介绍了该自制 LIT-TOF MS 的结构, 并通过对比仪器的质量分辨率、质量范围、灵敏度和多级质谱能力的考察, 展示了该仪器在药品、环境、食品等领域的应用潜力。

1 仪器研制

自制的 LIT-TOF MS 仪器结构如图 1 所示, 按功能分为质谱接口、离子导引射频四极杆、线性离子阱、离子光学系统及飞行时间质量分析器 5 个部分。分析物离子由大气压下电离源(如 ESI 等)产生, 在电场牵引下, 被送入质谱仪器的接口, 经过加热不锈钢毛细管(Capillary)、管型透镜(Tube lens)、分离锥(Skimmer), 进行差分真空后进入射频四极杆(Radio frequency quadrupole, RFQ)中, 再聚焦在中心轴附近进入 LIT 中, 离子在 LIT 内按需要经母离子筛选、碰撞诱导解离(Collision induced dissociation, CID)等后引入直流四极杆(DC Quadrupole, DCQ)及离子光学透镜(Lens), 聚焦后进入 TOF 分析器进行检测。

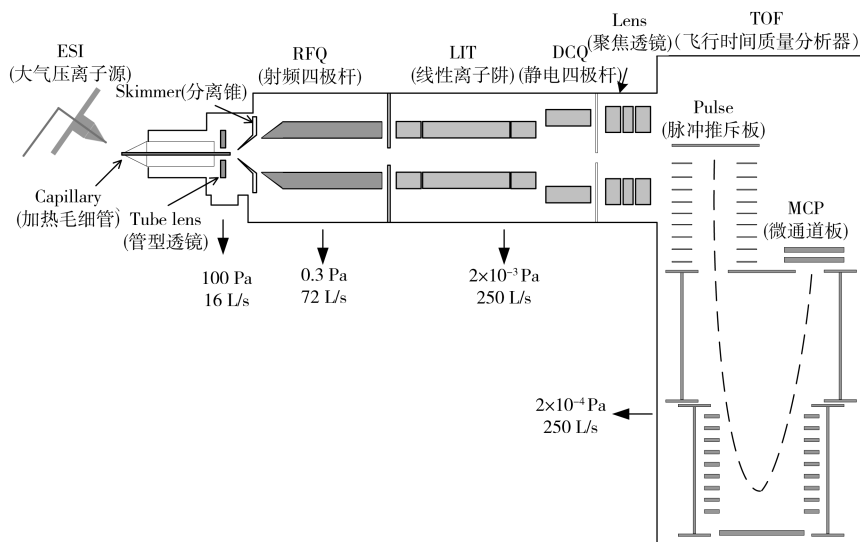


图 1 仪器结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the instrument

LIT-TOF MS 可在 3 种模式间自由切换: (1) TOF 模式: ESI 源产生的连续离子流在 LIT 中只进行碰撞冷却, 被 TOF 直接检测; (2) Trap 模式: 结合 LIT 的囚禁功能, 使离子源产生的连续离子流变为脉冲式离子流, 提高仪器占空比; (3) LIT-TOF 联用模式: 通过离子阱上的宽频率扫描对目标离子进行隔离, 然后通过辅助射频信号进行裂解, 再进入 TOF MS 检测, 记录隔离母离子的碎片谱图。3 种模式可通过改变控制时序、离子阱的入口和出口电势、激发频率及幅值等参数来自由转换。

1.1 真空系统

仪器采用四级差分真空系统, 一级真空(大气压接口)压强 100 Pa, 由 1 台 16 L/s 的旋片式机械泵(SV65 BI, 德国莱宝公司)来保证; 二级真空(RFQ)压强 0.3 Pa, 三级真空(LIT)压强 2 × 10⁻³ Pa, 四级真空(TOF)压强 2 × 10⁻⁴ Pa, 分别由 1 台 Hipace80 分子泵、2 台 Hipace300 分子泵(德国 Pfeiffer 公司)及 1 台 6 L/s 的旋片式机械泵(RVP-6, 北京中科科仪公司)作为前级泵获得所需的差分真空。每

个真空区域各设一个真空规实时监控。

1.2 线性离子阱(LIT)

LIT 由一组四极杆及前后端盖电极组成, 通过施加在端盖电极上的阻挡电势, 在 LIT 轴向上形成势阱, 从而将离子束缚住。四极杆上分别施加一组幅值相等、相位相差 180° 的射频信号, 其频率为 1 MHz、最大幅值为 2 kVpp。其中一组电极上叠加有辅助射频信号, 用于离子阱扫描过程或 CID 过程时, 输出单频正弦信号; 用于离子质量隔离时, 输出数字存储傅立叶反变换波形(Stored waveform inverse Fourier transform, SWIFT)。

1.3 飞行时间质量分析器(TOF)

TOF 采用垂直引入双场加速反射式飞行时间结构, 由离子调制传输器、加速器、无场飞行区、反射器和离子检测器构成。推斥板与反射板距离仅 550 mm, 但离子的有效飞行距离达 1.3 m。

1.4 LIT 与 TOF 联动脉冲控制技术

LIT 与 TOF 联用时, 离子引出方式为轴向引出, 为提高离子利用率和仪器占空比, LIT 端盖电极脉冲与 TOF 的推斥脉冲采用联动控制(如图 2 所示)。将离子阱内离子引出到 TOF 时, 端盖电极上的电压由高电平变为低电平, 相当于门开, 离子被引出, 此时同步产生一个 5 VTTL 信号给 TOF 脉冲板, 经过一定的延时(t_1)后, 脉冲板在推斥板上产生一串脉冲串, 可通过设置不同的脉冲持续时间(t_2)、脉冲周期(t_5)调节施加的脉冲个数。通过将 LIT 端盖电极脉冲与 TOF 的推斥脉冲联动控制, 根据目标离子的质荷比大小, 设置合适的脉冲延时(t_1), 目标离子漂移至推斥区时, 再施加推斥脉冲, 可大大提高目标离子的利用率和仪器占空比。

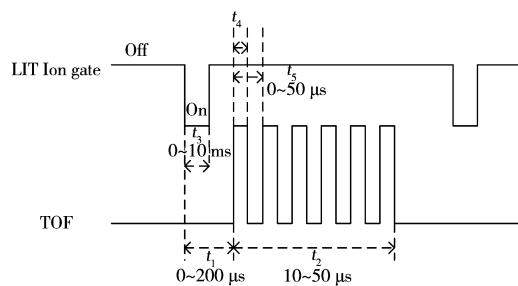


图 2 LIT 与 TOF 脉冲时序图

Fig. 2 Pulse sequence diagram of LIT and TOF

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

线性离子阱飞行时间质谱仪 LIT-TOF MS(自主研发); Sartorius 万分之一天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, 安徽天地高纯溶剂有限公司); 实验标准品利血平(分析标准品, $\geq 99.5\%$)、L-脯氨酸(分析标准品, 99%)购于阿拉丁试剂(上海)有限公司; 质谱标准物 Ultramark1621(分析标准品)购于美国 Alfa Aesar 公司。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制 分别准确称取 10 mg 利血平、Ultramark1621 和 L-脯氨酸标准品, 用甲醇溶解并定容至 10 mL, 配制成 1 000 mg/L 的标准储备液。分别从 1 000 mg/L 的利血平和 Ultramark1621 标准储备液中移取 10 μ L 至 100 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释并定容, 配制成 100 μ g/L 的标准溶液。从 1 000 mg/L 的 L-脯氨酸标准储备液中分别移取 1、5、10、50、100、200 μ L 至 100 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释并定容, 配制成质量浓度分别为 10、50、100、500、1 000、2 000 μ g/L 的 L-脯氨酸溶液。

2.2.2 质谱条件 电喷雾电离源(ESI), 采集模式: 正离子检测模式, 雾化气: 氮气(纯度 99.999%), 样品进样流速为 5 μ L/min。优化后的质谱参数如表 1 所示。

表 1 质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters

MS condition	Parameter	MS condition	Parameter
Capillary voltage	120 V	B-plate voltage	1 312 V
Focus lens voltage	110 V	Focus voltage	-480 V
Out plate voltage	55 V	ACCE voltage	-4 600 V
Skimmer 1 voltage	27 V	MCP voltage	-2 750 V
MIR - B voltage	78 V	ESI voltage	4 000 V
MIR - E voltage	53 V	Capillary temperature	150 $^\circ$ C
Grid voltage	-24.5 V	Nebulizer gas pressure	0.5 MPa

3 结果与讨论

3.1 性能表征

3.1.1 质量分辨率 分别取 100 μ g/L 的利血平标准溶液和 Ultramark1621 标准溶液, 仪器设置为

TOF 模式, 得到 m/z 609 的 $[\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_9]^+$ (利血平离子) 和 m/z 1 222 的 $[\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{N}_3\text{P}_3\text{F}_{36}]^+$ (Ultramark1621 离子) 的质量分辨率分别为 13 367 (图 3A) 和 15 549 (图 3B)。

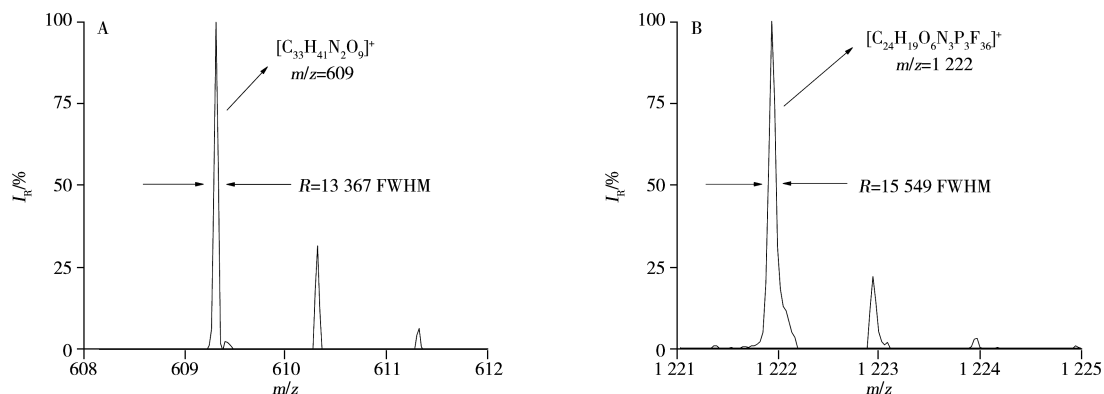


图3 利血平离子(A)和 Ultramark1621 离子的质谱图(B)

Fig. 3 Mass spectra of reserpine(A) and Ultramark1621(B)

3.1.2 质量范围 分别取纯甲醇和 100 $\mu\text{g/L}$ 的 Ultramark1621 标准溶液, 仪器设置为 TOF 模式, 最小可测到 m/z 33 的 $[\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}]^+$ 峰 (图 4A), 其信噪比大于 10; 最大可检测到 m/z 1 922 的 $[\text{C}_{38}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{N}_3\text{P}_3\text{F}_{64}]^+$ 峰 (图 4B), 其信噪比大于 3。

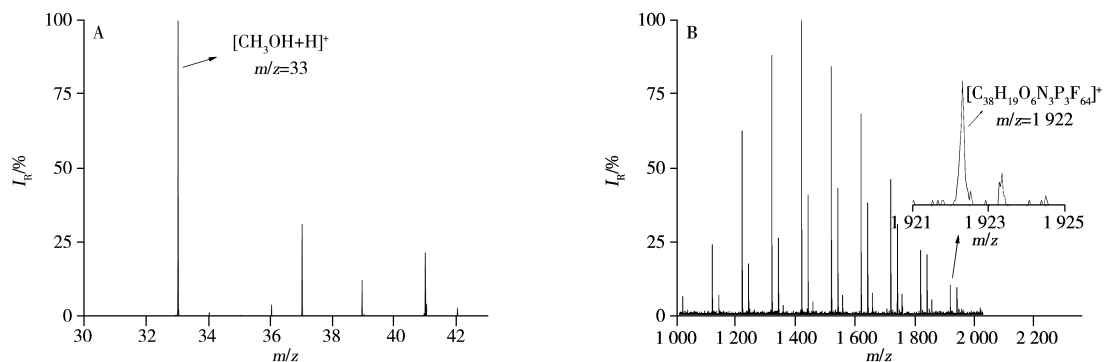


图4 $[\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}]^+$ (A) 及 $[\text{C}_{38}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{N}_3\text{P}_3\text{F}_{64}]^+$ (B) 的质谱图

Fig. 4 Mass spectra of $[\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}]^+$ (A) and $[\text{C}_{38}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{N}_3\text{P}_3\text{F}_{64}]^+$ (B)

3.1.3 灵敏度 分别取纯甲醇(空白)和 1 $\mu\text{g/L}$ 的利血平标准溶液, 仪器设置为 Trap 模式, 以 5 $\mu\text{L/min}$ 流速进样, 得到仪器的灵敏度谱图如图 5 所示。图中可见明显的谱峰, 噪音水平小于 5, 主峰信噪比 $S/N > 10$ 。

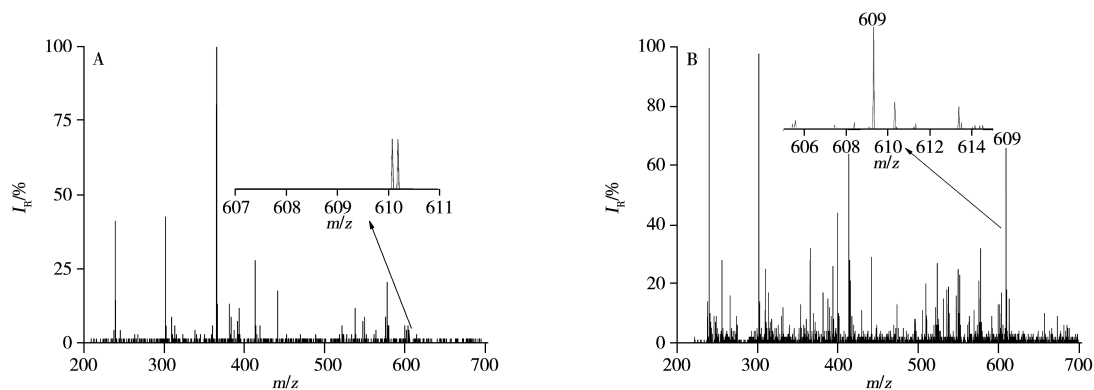


图5 空白样品(A)和 1 $\mu\text{g/L}$ 利血平标准溶液(B)的质谱图

Fig. 5 Mass spectra of blank sample(A) and 1 $\mu\text{g/L}$ reserpine(B)

3.1.4 多级质谱 取 100 $\mu\text{g/L}$ 利血平标准溶液, 仪器设置为 Trap 模式, 得到利血平的一级谱图如图 6A 所示。开启 LIT-TOF 联用模式, 设置辅助射频信号为 SWIFT 混频模式, SWIFT 频率缺口中心频率为 125 kHz (RF 频率 1 MHz, 幅值 600 V_{pp}, 场径 5.22 mm), 对母离子 m/z 609 进行捕获, 隔离窗口为

± 3 amu 时, 目标离子的隔离效率 $\geq 80\%$ (图 6B)。设置 CID 过程中辅助射频信号为频率 124.5 kHz、幅度 0.35 V_{pp} 的单频正弦信号, 对母离子进行激发, 产生碎片离子 m/z 448、397、195, 碰撞诱导解离(CID)效率 $\geq 80\%$, 得到利血平的二级谱图(图 6B 插图)。继续设置辅助射频信号为 SWIFT 混频模式, SWIFT 频率缺口中心频率为 113 kHz(RF 频率 1 MHz, 幅值 400 V_{pp}, 场径 5.22 mm), 对母离子 m/z 448 进行捕获, 隔离窗口为 ± 3 amu 时, 目标离子的隔离效率 $\geq 80\%$ 。设置 CID 过程中辅助射频信号为频率 112.5 kHz、幅度 0.35 V_{pp} 的正弦信号, 对碎片离子 m/z 448 进行激发, 产生碎片离子 m/z 195、236, CID 效率 $\geq 80\%$, 得到利血平的三级谱图如图 6C 所示。

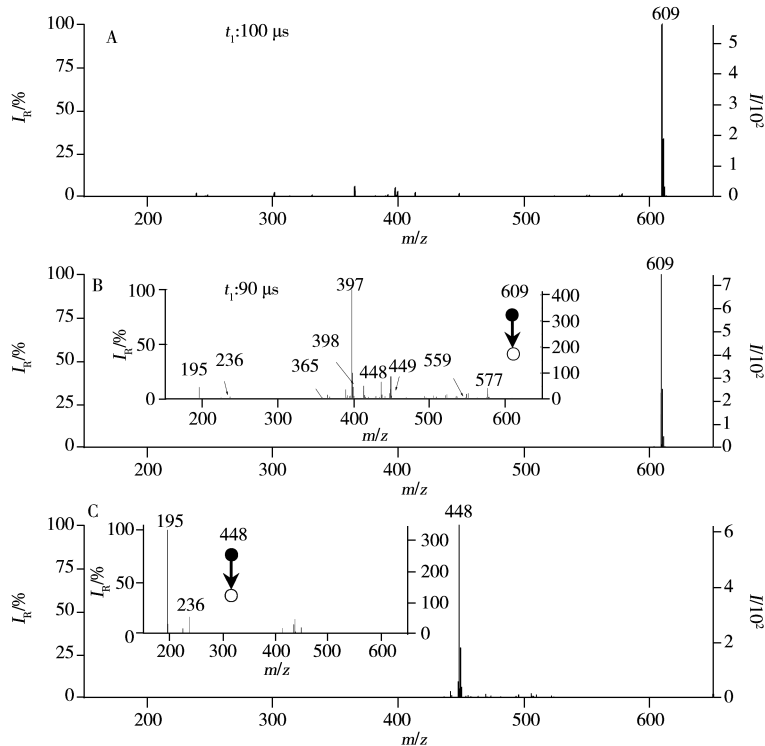


图 6 利血平离子的一级质谱图(A)、二级质谱图(B)、三级质谱图(C)

Fig. 6 MS spectrum of reserpine(A), MS/MS spectra of reserpine(B), MS³ spectra of reserpine(C)

3.2 氨基酸检测

氨基酸的常规检测手段包括气相色谱-质谱联用仪(Gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)^[15]、液相色谱-质谱联用仪(Liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS)^[16]及毛细管电泳(Capillary electrophoresis, CE)^[17], 这些检测方法由于需进行繁琐而费时的预处理, 难以实现对大量样品的快速检测^[18]。而 LIT-TOF MS 结合大气压电离源可对复杂基体样品进行直接检测, 无需预处理, 非常适用于氨基酸的直接快速检测。因此, 本研究以 *L*-脯氨酸作为检测样品进行初步的应用分析。分别取空白(纯甲醇), 以及质量浓度分别为 10、50、100、500、1 000、2 000 $\mu\text{g/L}$ 的 *L*-脯氨酸标准溶液, 在

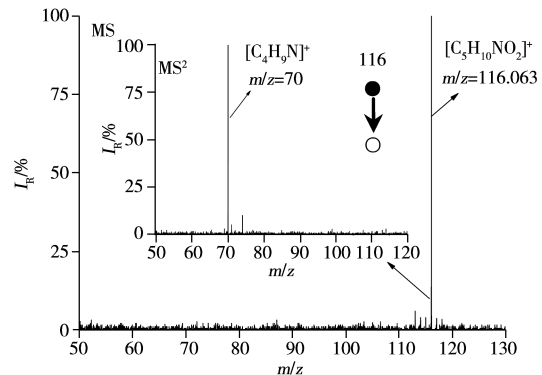


图 7 *L*-脯氨酸的质谱图

Fig. 7 MS spectrum of *L*-proline
insert: MS/MS spectrum of *L*-proline

LIT-TOF 联用模式下, 记录 *L*-脯氨酸碎片离子 $[M + H - CO - H_2O]^+$ (m/z 70) (图 7) 的峰面积, 以峰面积(y)对样品质量浓度(x , $\mu\text{g/L}$)进行回归分析。结果显示, *L*-脯氨酸在 10~2 000 $\mu\text{g/L}$ 质量浓度范围内与峰面积呈良好线性, 其线性方程为 $y = 0.446x + 16.367$, $r^2 = 0.991$ 。表明 LIT-TOF MS 可为代谢组学研究中实时、在线、高通量测定生物复杂样品中氨基酸的含量及其变化提供一定依据。

4 结 论

本研究设计并搭建了一款线性离子阱飞行时间质谱仪 LIT-TOF MS, 开发了 LIT 与 TOF 的联动脉冲技术。以电喷雾离子源对仪器的性能指标进行测试, 结果表明, 仪器的整体性能优异: 仪器质量分辨率为 13 367 (m/z 609) 及 15 549 (m/z 1 222), 质量检测范围为 m/z 33 ~ 1 922, 灵敏度为 1 $\mu\text{g/L}$, 能够实现离子碎裂、离子储存和 MS³ 三级质谱分析等功能。该仪器集成了线性离子阱的高容量、多级质谱能力和飞行时间质谱高速、高分辨的能力, 结合大气压电离技术, 可对复杂基体样品进行直接检测, 无需预处理, 在药品、环境、食品等领域有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Fenn J B. *J. Biomol. Technol.*, **2002**, 13(3): 101-118.
- [2] Clauser K R, Baker P, Burlingame A L. *Anal. Chem.*, **1999**, 71(14): 2871.
- [3] Verentchikov A N, Ens W, Standing K G. *Anal. Chem.*, **1994**, 66(1): 126-133.
- [4] Henderson S C, Valentine S J, Counterman A E, Clemmer D E. *Anal. Chem.*, **1999**, 71(2): 291-301.
- [5] Guilhaus M, Selby D, Mlynski V. *Mass Spectrom. Rev.*, **2000**, 19: 65-107.
- [6] Akıllıoğlu H G, Çelikkıçak Ömür, Salih B, Gökmen V. *Food Chem.*, **2017**, 217: 65.
- [7] Li H F, Liu J, Cai Z, Lin J M. *Electrophoresis*, **2008**, 29(9): 1889-1894.
- [8] Chernushevich I V, Ens W, Standing K G. *Anal. Chem.*, **1999**, 71: 452A-461A.
- [9] Purves R W, Li L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1997**, 8(10): 1085-1093.
- [10] Loboda A V, Chernushevich I V. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2009**, 20: 1342-1348.
- [11] Chernushevich I V. *Eur. Mass Spectrom.*, **2000**, 6: 471-479.
- [12] Okumura A, Hirabayashi A, Baba T, Hashimoto Y, Waki I, Yoshinari K. *Proceedings of the 51st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*. Canada: Quebec, **2003**.
- [13] Campbell J M, Collings B A, Douglas D J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1998**, 12: 1463-1474.
- [14] Hashimoto Y, Hasegawa H, Satake H, Baba T, Waki I. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2006**, 17: 1669-1674.
- [15] Kaspar H, Dettmer K, Gronwald W, Oefner P J. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, 393(2): 445-452.
- [16] Sarwar G, Botting H G. *J. Chromatogr. B*, **1993**, 615(1): 1-22.
- [17] Poinsot V, Gavard P, Feurer B, Couderc F. *Electrophoresis*, **2010**, 31(1): 105-121.
- [18] Xu N, Zhu Z Q, Yang S P, Wang J, Gu H W, Zhou Z, Chen H W. *Chin. J. Anal. Chem.* (许柠, 朱志强, 杨水平, 王姜, 顾海巍, 周振, 陈焕文. 分析化学), **2013**, (4): 523-528.