

基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪的离子 延时引出新技术研究

赵善楷* 何维得 查庆民

(中山大学测试中心 广州 510275)

摘要 为了提高基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)的分辨率,在自行研制的研究级激光飞行时间质谱仪上进行了离子延时引出(Delay Extraction, DE)新技术的实验研究,建立了新结构离子源和离子延迟引出的电子控制系统及相应软件。通过电场模拟和实验,研究了样品相对质量、延迟引出时间、引出电压对提高分辨率的影响。在使用 40MHz 瞬态记录仪的情况下,测得环十肽($m/z=1214$)分辨率为 1734,胰岛素($m/z=5375$)分辨率为 2124。

关键词 激光飞行时间质谱仪 延时引出 高分辨率

基体辅助激光解吸电离新技术^[1]面世以来已广泛应用于生命科学研究,特别近几年来随着引入了离子延时引出新技术,高分辨 MALDI-TOF-MS 技术已成为生命科学研究的重要手段。

在 MALDI 离子源中产生的离子具有不同初始速度,从而导致以不同时间飞抵检测器而影响分辨率。这种离子能量分散对分辨率的影响可以通过离子反射透镜加以消减,但对线性仪器则形成主要影响。激光离子源虽然是一类表面电离源,但实际上解吸电离有些是在激光短脉冲过程中产生,有些则是在解吸后飞行过程中通过碰撞产生,这也造成了离子的空间分散和能量的进一步分散。此外,激光解吸电离的中性粒子或离子在真空中是角分散的,这也是空间分散的一个来源。

早在 1955 年, Wiley 和 McLaren^[3]在其电子轰击离子源的飞行时间质谱仪上,曾提出用时间滞后来实现到达检测器平面的一阶能量聚焦,其延迟时间 t (以 μs 计)可由下式确定

$$t = 0.144d_1(m/zV_x)^{1/2}[1/w + (T/V_x)^{1/2}]$$

式中 d_1 为第一电场的长度(mm); V_x 为引出脉冲电压(V); T 为离子最可能的初始动能(eV); w 由下式给定:

$$w = (x/1+x)^{3/2}[(L/2d_1) - (d_2/d_1)(1+x)] + x(d_2/d_1) - 1$$

这里 $x = V_x/V_1$, V_1 为中间电极电位; d_2 为第二加速电场的长度(mm); L 是无场漂移长度。这也是 MALDI-TOF-MS 的延时聚焦技术的理论基础。事实上,由于 MALDI 形成的离子的物理特性,延迟引出技术大大克服了离子的空间分散、时间分散和能量分散造成的影响,显著提高了仪器线性和

反射的分辨率。

参照近年来国外有关研究成果^[2-6]笔者在自行研制的研究级激光飞行时间质谱仪上^[7],进行了离子延迟引出技术的实验研究,其基本思想就是让激光解吸电离的离子产生于一个无场区,经过一段时间延时,再迅速施加电场,将离子引出。这样,不同时间形成的离子将被置于同一起跑时间上,不同初速度离子在施加电场时,由于距离引出极不同,所受场强不同,将会使距离远的离子以更快的速度飞向引出极,从而达到不同初速离子同时引出的效果。

1 实验装置

1.1 基本仪器

实验在本室 1992 年底自行研制成功的研究级激光微探针飞行时间质谱仪上进行其仪器结构图如图 1。激光器为 SpectraPhysics 公司的 GCR-11-3 型 Nd:YAG 激光器。经 3 倍频后得到 355nm 的紫外激光,脉宽 6~8ns。飞行管为线性和反射两种兼备,飞行距离分别为 1.1m 和 1.5m。离子检测器为微通道板和电子倍增管的耦合结构。信号经放大后由 40MHz 瞬态记录板(德国 IMTEK 公司)采集并送计算机处理。

1.2 带有 DE 功能的离子源

图 2 是具有 DE 的离子源及控制框图,离子源的推斥电极 P_1 、第一电极 P_2 第二电极 P_3 为直径 10cm 并略带聚焦面的平行平板, P_2 、 P_3 中孔径 6mm,并装有透过率为 90% 的栅网。 P_1 、 P_2 相距 6cm, P_2 、 P_3 相距 13cm。 P_1 、 P_2 通常处于同一电位,由 HV_1 提供恒稳高压(可调),其间为近似无场

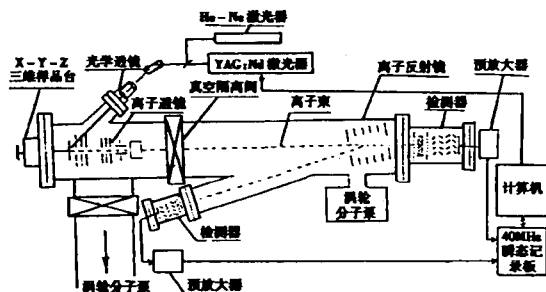


图1 激光解吸飞行时间质谱仪结构图

区, P_3 接地。由激光产生的离子被局限在 P_1, P_2 之间, 经过一段延时之后, 再在 P_2 上加一个负的阶跃高压脉冲, 使其电位瞬时降低, 将离子引出并加速, 进入无场飞行区。

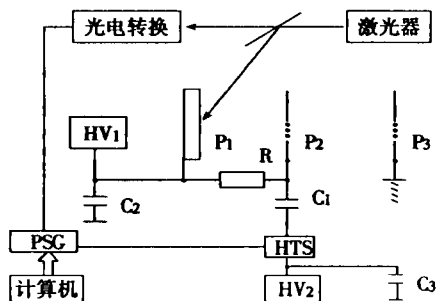


图2 具有DE的离子源及控制框图

1.3 DE的支持电路与控制

如图2所示, 两组独立的恒稳高压 HV_1, HV_2 被接入离子源。 HV_1 为 $0 \sim +30kV$ 可调(以下均对正离子而言, 作负离子时则极性相反), 直接接到 P_1 上, 并经一个 $R = 5m\Omega$ 的电阻接到 P_2 上。 HV_2 为负高压($0 \sim -10kV$ 可调)。HTS是超快速瞬态高压开关, 开关电压 $15kV$, 上升时间(达到 $80\% V_{out}$) $14ns$ 。HTS 关断, R 上无电流, 故 P_1, P_2 同电位。PSC为精密延时矩脉冲发生器, 延时从 $10ns$ 到 $32s$, 步长最小 $10ns$, 脉宽可调, 参数均由计算机设定。激光光脉冲经光电耦合转换成同步的电讯号触发 PSC, 再经一个预设的延时时间触发 HTS 导通, 由电容的瞬态特性可知, HV_2 ($0 \sim -10kV$ 可调) 将通过高压电容 C_1 耦合到 P_2 上, 使 P_2 产生一负阶跃脉冲, 将陷于 P_1, P_2 间的离子同时拉动及加速引出。事实上, 靠近 P_2 处的离子先被拉出 P_2 出口; 而靠近 P_1 处的离子则较迟, 但由于电场梯度的存在, 靠近 P_2 处的离子所获能量则较低; 而靠近 P_1 处的则较高, 两相补偿, 有利于提高分辨率。

2 延时时间、引出电压及不同质荷比离子与分辨率关系的电场模拟

从理论分析可知, 延时聚焦时间、引出电压、被分析离子质量、激光强度形成的离子分散以及离子源的结构等, 都对获得最佳分辨率造成影响。我们从实验中也观察到这些影响。为从理论上作系统分析, 我们用了 SIMION 软件, 并编制了一个简单程序, 使该软件在离子飞行计算中加入了变动引出电压和延时时间两个参量, 求得了不同条件下所能获得的最佳分辨率。我们选用三种不同质荷比物质: 环十肽 ($m/w = 1214$)、胰岛素 ($m/w = 5733$)、细胞色素 C ($m/w = 12360$), 对每一组设定五个不同起始能量的离子, 从 $10eV$ 到 $50eV$ (以 $10eV$ 递增), 使用 $10kV$ 的加速电压, 分别采用不同引出电压、不同延时时间, 计算出五个不同初始能量的离子到达检测器的飞行时间, 从中求得不同引出电压下的最佳分辨率的延时时间。

从模拟计算可知, 在不加延时聚焦的情况下, 不同恒定电压获得的分辨率都约为 200。而施加不同脉冲延时引出电压后, 只要调节最佳延时时间, 都可获得十倍以上, 即高于 200 的分辨率。如所预计, 脉冲引出电压越高, 所需最佳延时时间越长。这也说明使用脉冲延时引出技术分析不同质量数的离子需要相应调整延时时间和或引出电压。

此外, 离子在离子源内不同出射角所导致的分辨率下降还未见报道, 为观察使用脉冲延时引出技术的效果, 我们做了一组改变离子出射角的模拟计算。以固定 $10eV$ 初始能量的离子, 当加速电压为 $10kV$, 引出电压为 $1kV$ 时, 变化其离子散射角 $-30^\circ \sim +30^\circ$, 在没有使用延时引出时分辨率为 1503。调至最佳延时时间时, 分辨率即可提高十倍, 达 16566。从这些数据也可看出脉冲延时引出技术对校正离子空间分散的良好效果。表 1 是模拟计算结果的简表。

表1 不同质荷比离子在不同引出电压 V_{ext} (V) 下获得最佳分辨率的延时时间 t_d (ns)

m/z	500	1000	2000	3000	4000	5000	6000	7000	8000
1214	30	30	35	40	50	60	-	-	250
5734	60	65	70	90	110	135	-	-	540
12360	90	95	110	130	160	200	-	-	800

(注)上述数据是应用 SIMION 软件模拟计算的结果, 模拟用离子源结构为本仪器所用结构。引出电压在 6000 和 7000 时找不到能达到 1000 以上分辨的最佳延时时间。

3 实验结果

在实验中使用了两种样品:①以 4HCCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) 为基体的环十肽 ($m_w = 1214$);②以 4HCCA 为基体的胰岛素 ($m_w = 5733$), 通过计算机电场模拟, 可以找到对不同质荷比离子在检测平面上聚焦的最佳延时时间和加在 P_1 、 P_2 上的引出电压。在实验过程中对不同质荷比分子离子, 经过适当地选择这些参数, 我们取得了 DE-MALDI 质谱图, 其分子离子峰的半峰宽 (FWHM) 为 $T = 25\text{ns}$ 的尖峰, 已达到所使用 40M 瞬态记录仪的最快采样间隔 25ns 。从图 3 测得环十肽 $\Delta M = 0.7\text{Da}$; 图 4 胰岛素 $\Delta M = 2.7\text{Da}$, 根据计算分辨率公式:

$$R_e = M/\Delta M = T/2\Delta T,$$

可计算得环十肽为 1734 (反射方式), 胰岛素为 2124。胰岛素已属大分子, 在通常 MALDI 法其峰很宽, 分子离子峰分辨率低, 只有 20~60 见图 5。

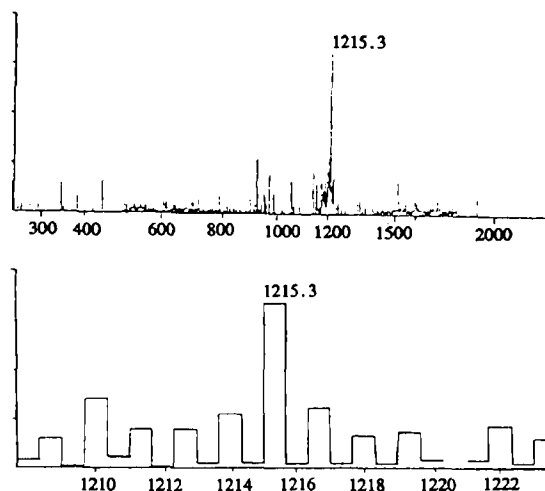


图 3 环十肽的 DE-MALDI 质谱图

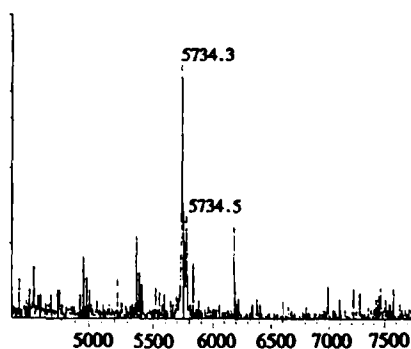


图 4 胰岛素的 DE-MALDI 质谱图

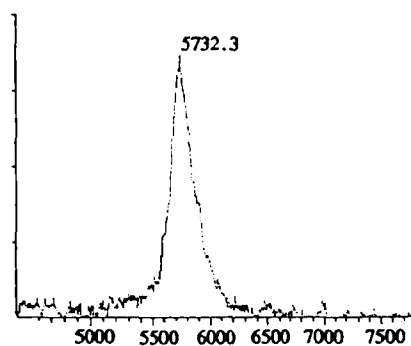


图 5 未加 DE 的胰岛素 MALDI 质谱图

参考文献

1. M. Karas, D. Bachman, U. Bahand, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom, Ion Processes*, 1987, 78:53 ~ 56
2. Robert S. Brown and John J. Lennon, *Anal. Chem.*, 1953, 67: 1998 ~ 2003
3. Wiley W C, McLaren I H. *Rew. Sci. Instrum.* 1995, 26: 1150, U. S. Patent 2,685,035
4. U. Bahr, J. Stahl-Zeng, E. Gleitsmann and M. Karas, *J. Mass Spectrom.*, 1995:32:1111 ~ 1116
5. Randy M. Whittal and Liang Li, *Anal. Chem.*, 1995, 67: 1950 ~ 1954
6. Colby S M, Reilly J P. *Anal. Chem.* 1996, 68: 1419
7. 赵善楷, 钟锋, 查庆民, 陈东. *分析化学*, 1994, 20: 1079 ~ 1081

A Study on Delayed Ion Extraction of Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry

Zhao Shankai He Weide Zha Qingmin

(Instrumentation Analysis&Research Center, Zhongshan University Guangzhou 510275)

Abstract In this paper a study on delayed ion extraction in laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry is described, which gives a much higher mass resolution compared with that the of previous continuous mode. By computer modeling and carefully selecting the parameters such as delayed time and voltage ratio (extracting volt/repelling volt), we have obtained the mass resolution up to 1734 (reflect mode) with gramicidine (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as matrix); 2124 with insulin (4HCCA as matrix) on our modified laboratory-built instrument.

Key words laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, delayed ion extraction