



AGILENT 6560 离子淌度 Q-TOF 液质联用系统 为您的研究增添新的维度

The Measure of Confidence

Ken Imatani
安捷伦 Q-TOF LC/MS 产品经理

David Wong 博士
高级应用科学家

应用聚焦

Agilent 6560 离子淌度 Q-TOF 液质联用系统是市场上首款匀场离子淌度系统。该系统与 Agilent Infinity II UHPLC 系统联用后，结合液相色谱、离子淌度和质谱技术的选择性，为分离能力提供了一个全新的维度。

离子淌度测量提供了额外的淌度分离维度和碰撞截面以及结构信息，使实验室能够加快研究进程，并对化合物鉴定更有信心。该装置可同时实现高灵敏和精确的碰撞截面测量。本文给出了技术概述和实际应用示例以展示该系统的性能。

什么是离子淌度？

离子淌度分离的原理

在经典的匀场漂移管中，漂移池内的电场驱动离子通过该装置，在运动中离子与静态缓冲气体分子发生碰撞而产生对抗驱动离子电场力的阻力。离子经受的阻力与其碰撞截面（是其大小和形状的函数）、电荷量以及质量有关。与单电荷离子相比，多电荷离子受到的电场力更强，能更有效地通过缓冲气体。截面较大的离子由于与缓冲气体发生碰撞，因而在漂移管中更容易减缓迁移速度。离子与缓冲气体分子碰撞所产生的阻力妨碍了其加速。因此，离子将迅速达到平衡状态，随后开始匀速 (V) 运动，其速度与所施加的电场强度 (E) 成正比。比例常数 (K) 即为该离子的气相淌度。这一过程可用如下公式表示： $V = KE$ 。



Agilent Technologies

淌度是该离子与缓冲气体相互作用以及离子的质量、电荷量的函数。此外，淌度还取决于气体温度和缓冲气体分子的质量。

$$K_0 = \frac{L}{t_d E} \frac{P}{760} \frac{273.2}{T}$$

- L 是漂移池的长度
- t_d 是校正的漂移时间
- E 是跨越漂移池的电场
- P 是漂移池的压力
- T 是缓冲气体的温度

为什么采用离子淌度？

在复杂样品分析中获得更多的信息

6560 系统是由许多研究所和政府实验室的科学家合作开发而成。多项研究证明，在复杂样品分析时，相比于单纯的高分辨质谱技术，该仪器展现出有效揭示更多分析信息的能力。

研究人员的报告显示，在高分辨质谱法成为蛋白质组学、代谢物组学及其他高复杂样品分析的基石之后，人们又将目光投向了提供附加维度分离的超快速正交技术。

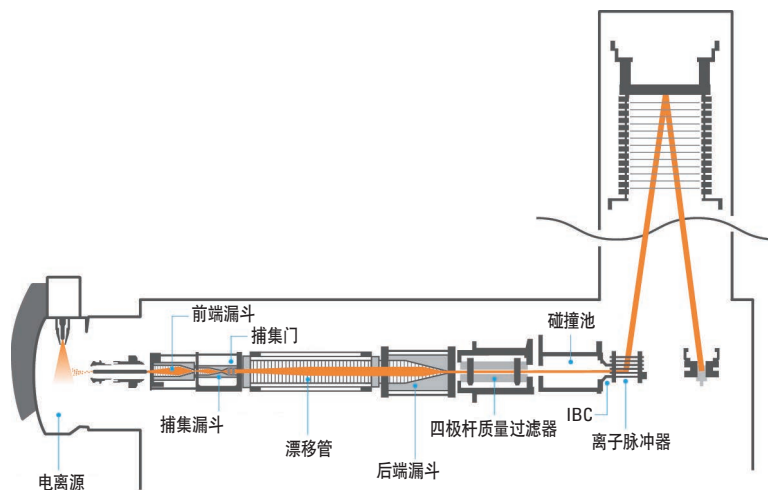


图 1. 用六极离子导向器将安捷伦匀场漂移管与四极杆飞行时间质谱仪相联的示意图。Q-TOF MS 的质量分辨率大于 40000, Q-TOF 操作模式下动态范围可达 5 个数量级

Agilent 6560 离子淌度系统在应对以下分析难题时赋予了研究人员更多的分析信息：

分离结构异构体

- 利用高分辨率的离子淌度分离功能探查分子结构和肽以及蛋白质的构象
- 通过碰撞截面直接测定分子大小，无需使用参比标样或者校准表

提高峰容量

- 结合 UHPLC、离子淌度和质谱的综合能力，实现复杂混合物中单个组分的有效分离
- 利用双栅捕集技术获得最优的离子淌度分离

发现和确认微量组分

- 电动力漏斗技术可轻松应对复杂基质中低至飞克级的分析物检测
- 通过全离子的 MS/MS 分析可靠地鉴定化合物

保留蛋白质构象

- 轻松研究气相中肽和蛋白质的结构
- 有效降低离子热效应以保留分子构象

安捷伦离子淌度： 在痕量水平上获得高质量的 MS/ MS 谱图

Agilent 6560 离子淌度 Q-TOF 液质联用系统能够在没有校准标样的情况下实现直接的碰撞截面 (CCS 或 Ω) 测量。其在均匀的低电场条件下运行，可将离子的漂移时间信息用于碰撞截面测量。该仪器采用安捷伦独有的 iFunnel 技术，显著增加了进入质谱仪的离子数量，从而能够在痕量水平上获得更高质量的 MS/MS 质谱图。要了解更多有关该技术的详细信息，请参阅安捷伦技术概述 5991-3244CHCN。

使离子淌度分析性能获得显著提高

6560 系统提供了最优的均匀漂移电场淌度池和高分辨 Q-TOF 仪器的接口，使离子淌度分析性能得到了显著提高。近三年来在三重四极杆和 Q-TOF 仪器上采用安捷伦首创的离子漏斗技术造就了新的 IM-QTOF 系统，从而将优异的离子淌度分离和高灵敏度的质量分辨结合起来。

本文中的应用证明该仪器具有以下优势：

- 更好地分离脂类和糖肽化合物
- 更精确地测量碰撞截面，提高了结构构象和同分异构体表征的可信度
- 能够分析复杂基质中更多的痕量级肽类
- 保留了溶液中金属蛋白的结构真实性

为了最大限度地提高该系统的分析实用性，安捷伦还为离子淌度数据的可视化开发了软件工具。安捷伦 MassHunter 软件可以让研究人员查询淌度/质量范畴的数据，以高的精密度和准确性轻松地确定碰撞截面值。安捷伦还提供了先进的浏览功能和特征查找工具以伺机利用淌度数据。

在以下页面中，我们将分享来自合作者使用 Agilent 6560 的各种分析应用。如上所述，这些示例分为四类，展示了该系统的关键功能：

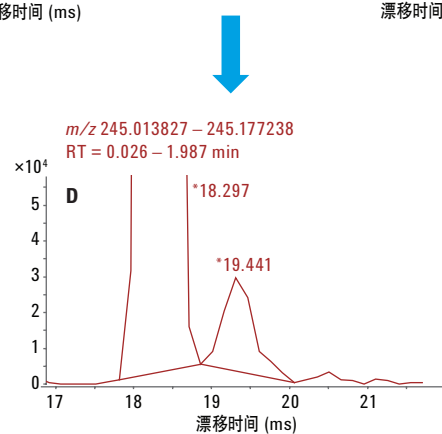
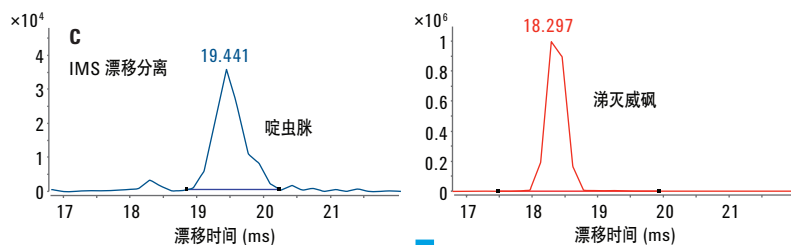
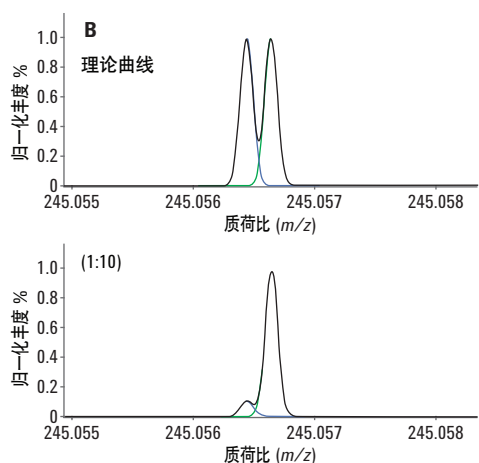
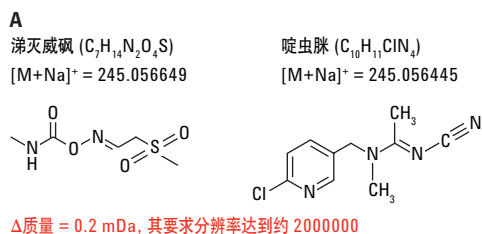
1. 分离结构异构体
2. 提高峰容量和特异性
3. 发现和确认微量组分
4. 保留蛋白质构象



分离结构异构体

应用示例

分离同重农药

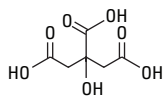


本示例显示了 UHPLC、离子淌度的分离能力与质量分辨率的有效结合。两种农药的质量差异小于 0.2 毫道尔顿，要求总体分辨能力达到约 2000000 才可将其分离。B) 显示了这两种化合物的理论曲线。C) 和 D) 显示了这两种化合物的 IMS 漂移分离（蓝色和红色），两者分离的漂移时间相差 1.144 毫秒。即使在两种化合物的浓度差异为 10:1 的情况下，漂移分辨率仍足以分离这两种同质异构化合物，而不需要使用 UHPLC。

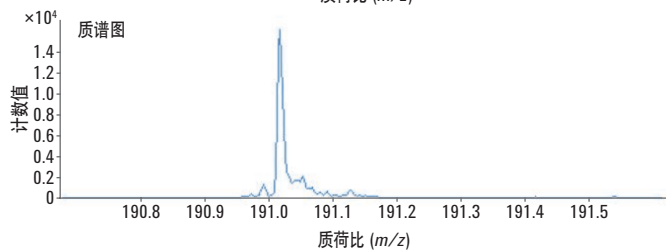
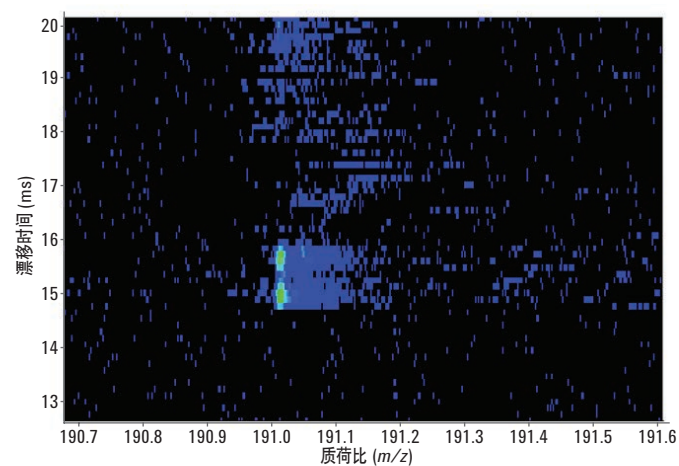
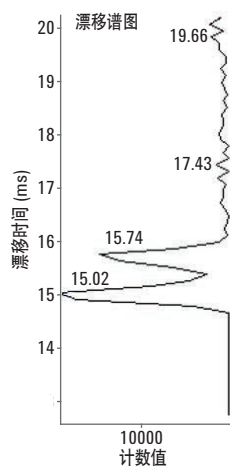
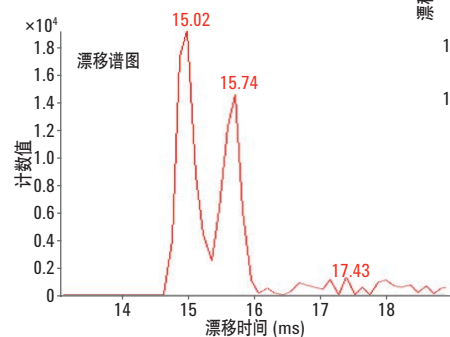
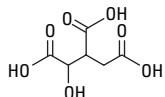
分离结构异构体示例

异构体的分离: 柠檬酸和异柠檬酸

柠檬酸 ($C_6H_8O_7$)



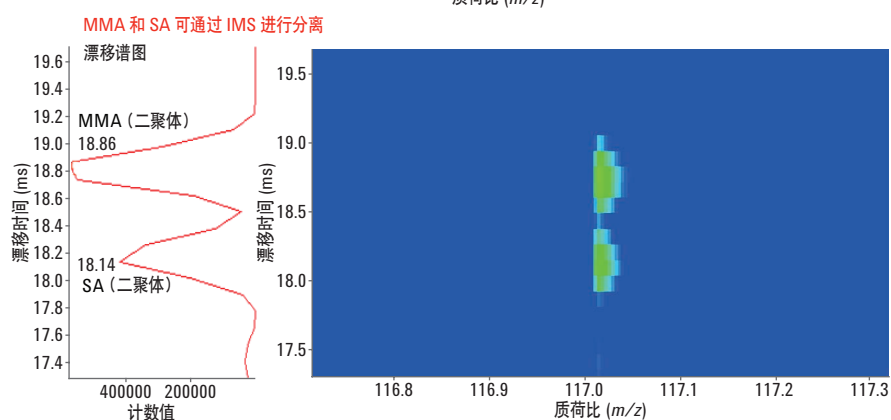
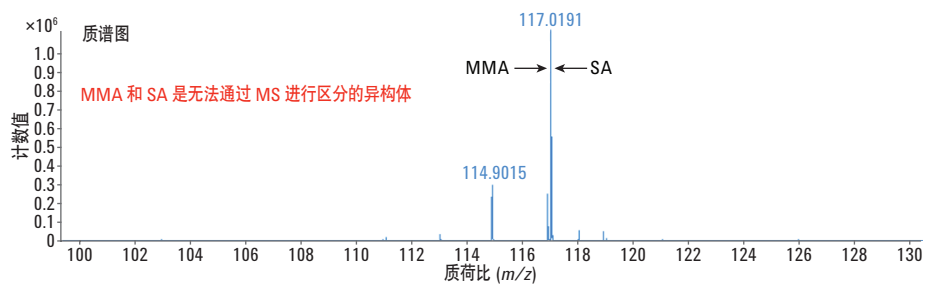
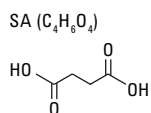
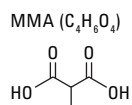
异柠檬酸 ($C_6H_8O_7$)



柠檬酸和异柠檬酸是在物理性质和结构上非常相似的异构体。这为它们的生物分析表征带来了挑战。Agilent 6560 离子淌度 Q-TOF LC/MS 系统能够清晰分辨这两种异构体。

分离结构异构体示例

甲基丙二酸 (MMA) 和丁二酸 (SA) 的分离

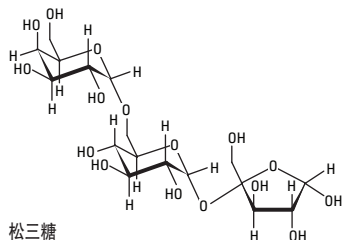


这是另一个示例，显示了 MMA 异构体的离子淌度分离，MMA 是维生素 B12 缺乏的标记物。在人血浆中，MMA 异构体 (SA) 的浓度大约比 MMA 高 20 至 100 倍。这些异构体因其极性很难通过 HPLC 进行分离。我们的数据表明 6560 系统能够清晰分离这些异构体，并且结果可用于准确定量分析。

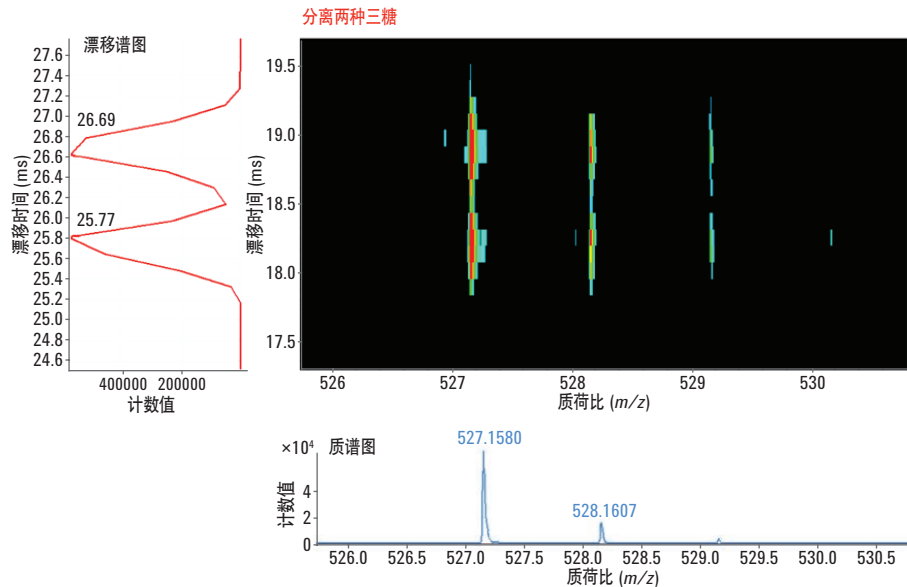
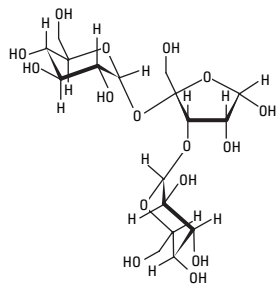
分离结构异构体示例

分离糖结构异构体 $C_{18}H_{32}O_{16}$

棉籽糖



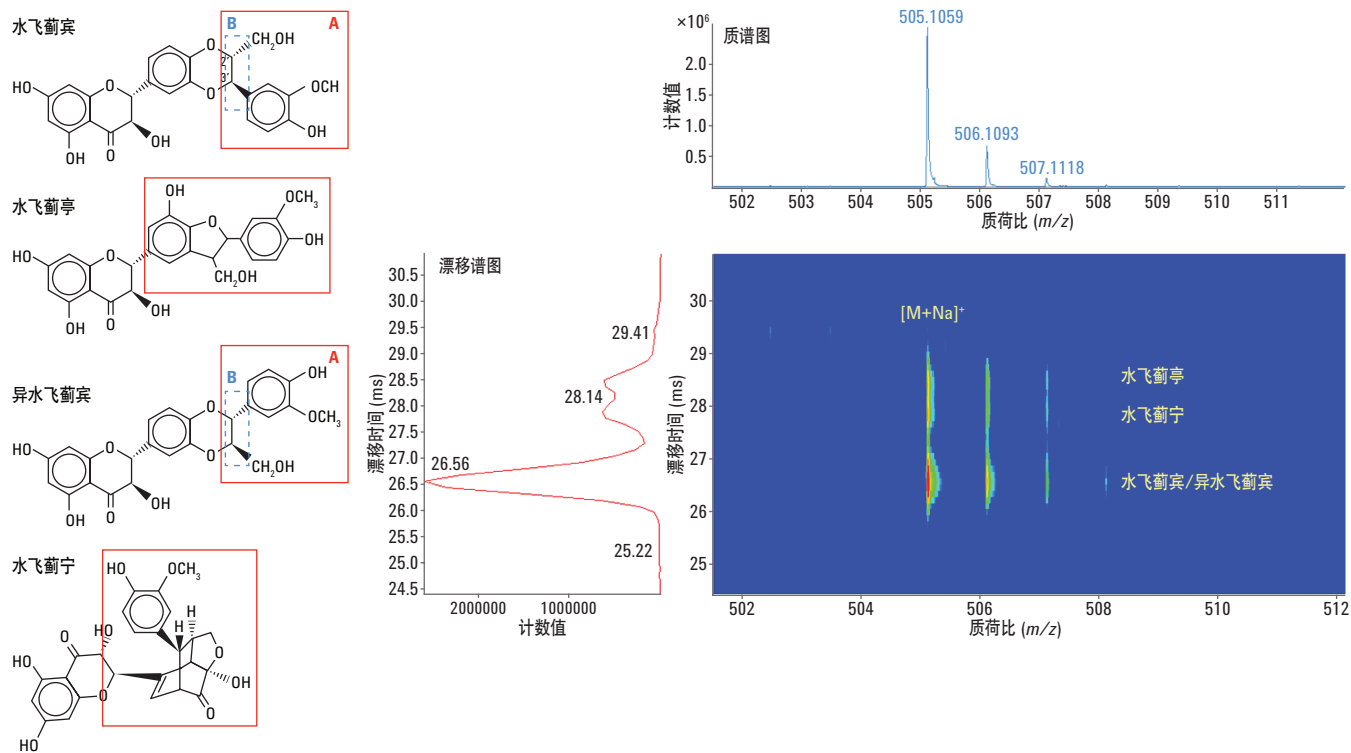
松三糖



本示例展示了离子淌度如何用于分离具有相同精确质量数的两种不同的三糖。这些异构体的结构差异不可能使用传统的优级高分辨质谱系统进行区分。

分离结构异构体示例

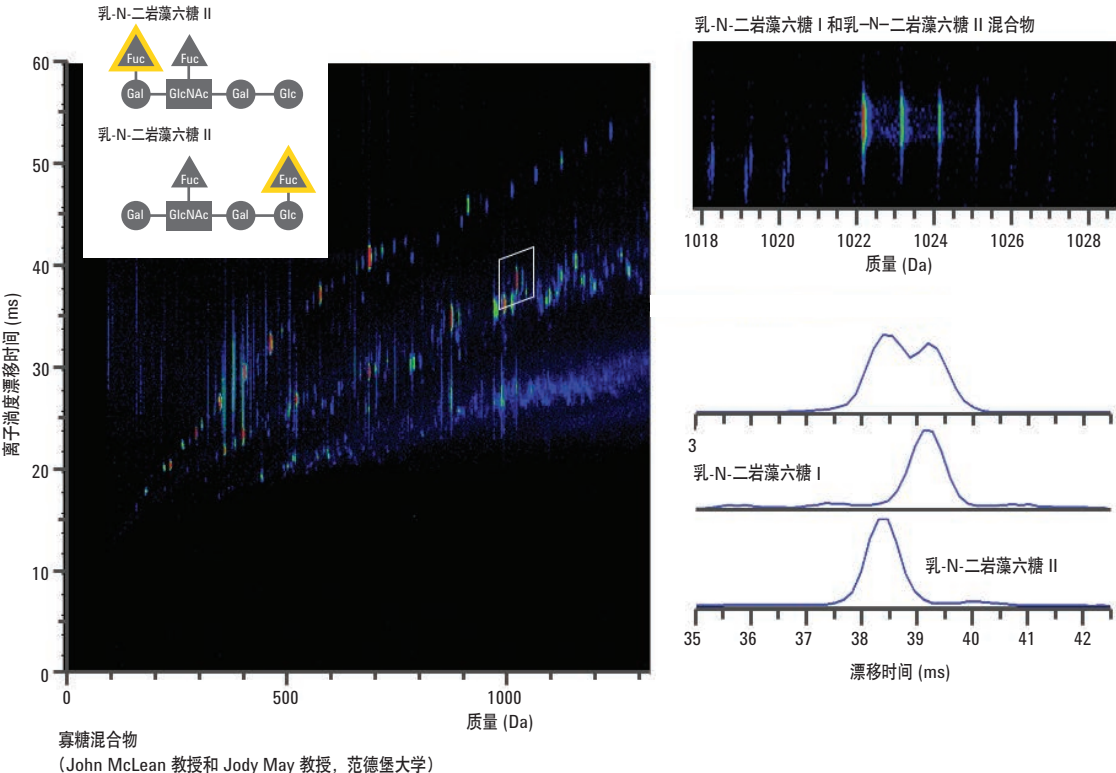
水飞蓟素属的 IM Q-TOF 分析



水飞蓟素是从植物中提取的活性物质，包含由水飞蓟宾、异水飞蓟宾、水飞蓟亭、水飞蓟宁等组成的黄酮木脂素类混合物。水飞蓟素中活性最高的化合物是水飞蓟宾。其广泛用于治疗肝脏疾病患者。离子淌度可用于表征这些水飞蓟素异构体。在本研究中，分离了水飞蓟素的各种异构体，并测定了它们独特的碰撞截面值（数据未出示）。

分离结构异构体示例

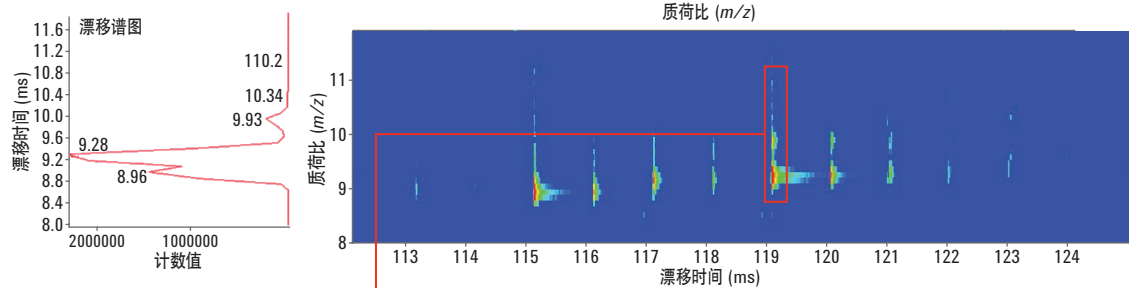
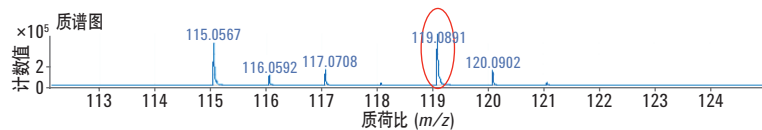
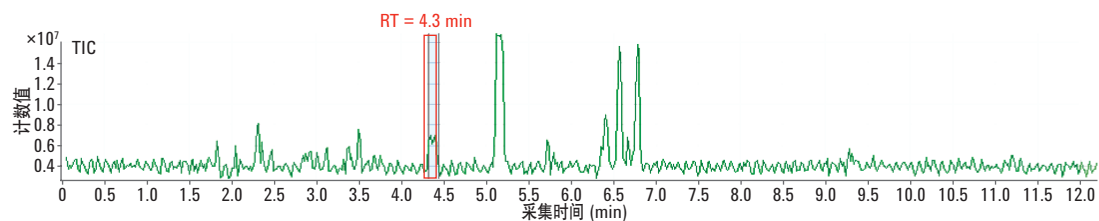
糖类的 IM-MS 分析



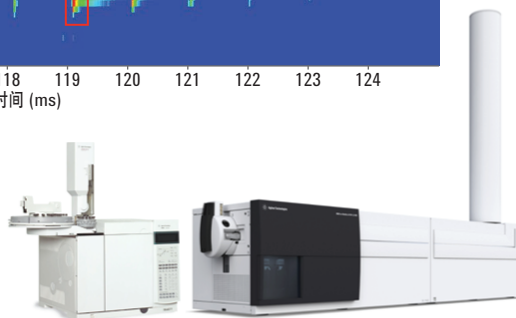
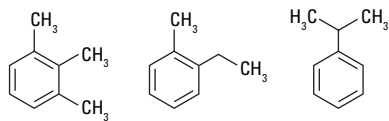
使用 6560 IM-Q-TOF 在复杂的样品混合物中发现了乳-N-二岩藻六糖 I/II 异构体混合物，这些异构体的果糖基团位置存在差异。基于对标准品的单独分析，确认了两种母乳寡糖异构体的观测结果。

分离结构异构体示例

ASTM 混合物的 GC-APCI/IMS-Q-TOF 分析



一些可能的
异构体结构

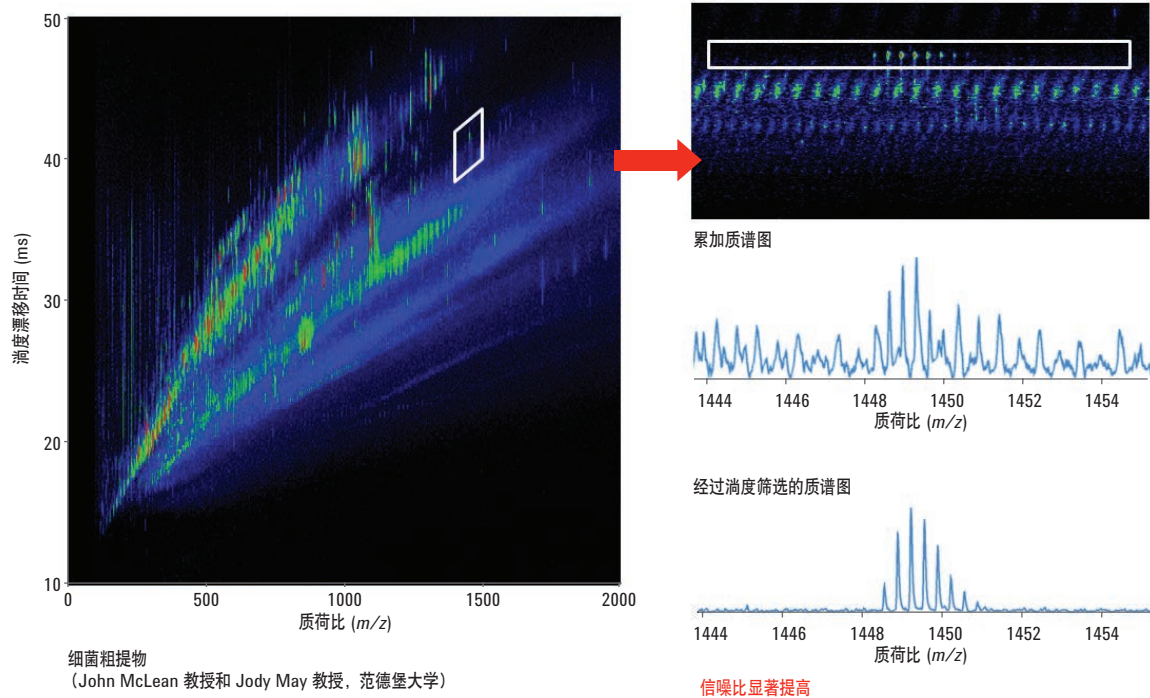


在本研究中，我们使用 GC-APCI 接口与离子淌度联用以分析 ASTM 化合物混标。例如，在气相色谱峰的 4.3 分钟处，发现了三种以上的分离化合物，其在 110 至 125 Da 的质量范围内具有许多相关联的异构体。因此，Agilent 6560 提供了更高的峰容量，能够成功分离不同的异构体。

提高峰容量/特异性

应用示例

离子淌度提供了更高的特异性



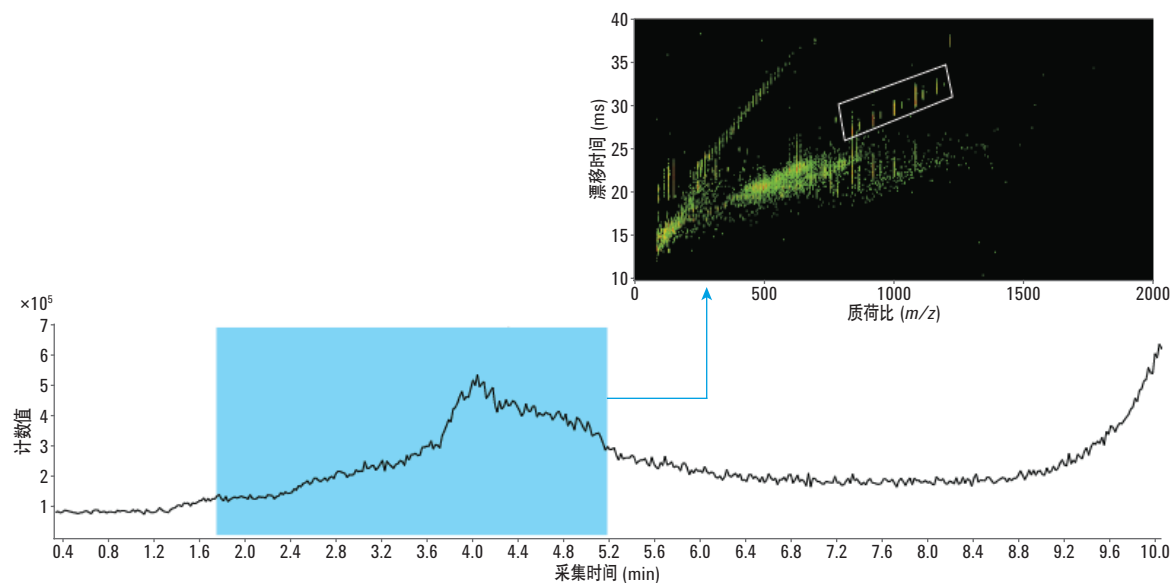
离子淌度的另一个价值在于能够有效除去细菌粗提物中的化学背景噪音。该淌度热点图表明样品中包含数百种组分，几乎每个 m/z 值处都存在相重叠的化合物。在该热点图中突出显示的多边形区域中，可以看到累加的质谱图中包含过多的离子，导致无法实现可靠的化合物鉴定。下图显示了经过淌度筛选的质谱图，其中消除了许多重叠的化学背景离子。这样能够实现快速可靠的化合物鉴定。

提高峰容量/特异性示例

离子淌度提供了更高的特异性

RNaseB 天然聚糖分析

能够从基质中提取目标离子系列（一组糖基）以供进一步研究（Cathy Costello 教授，波士顿大学）

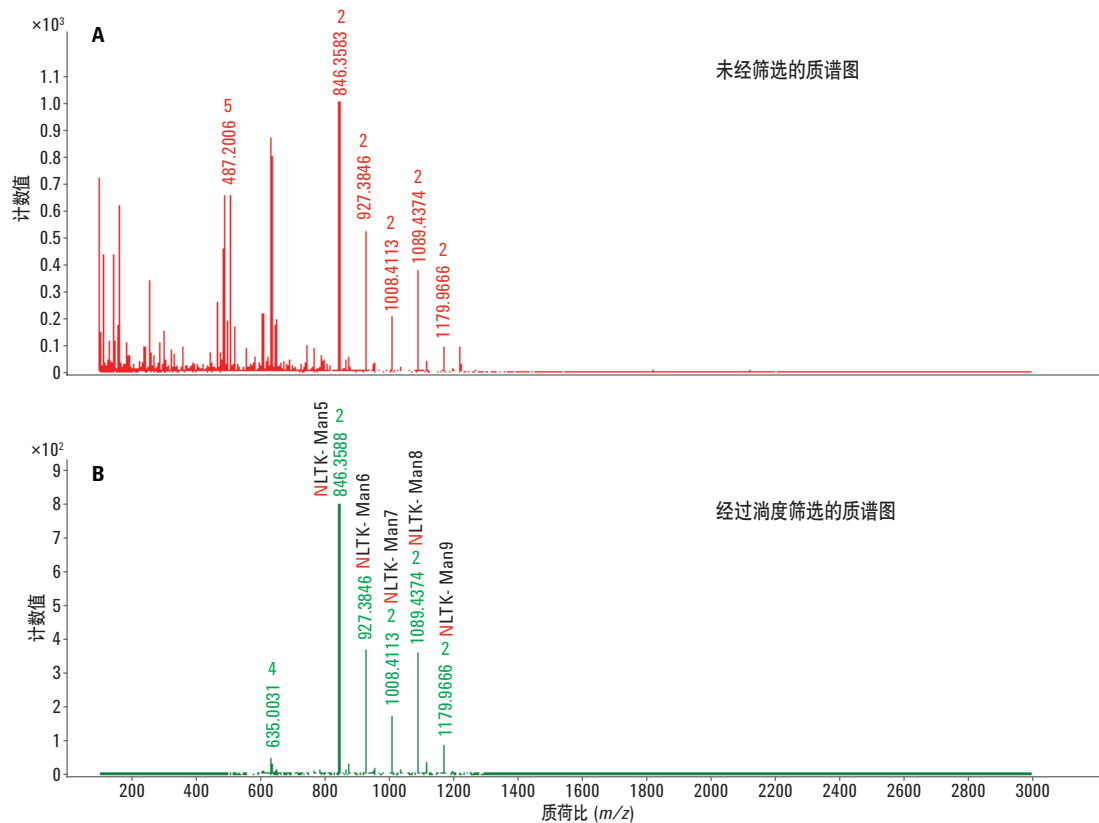


在本示例中，波士顿大学的 Cathy Costello 教授使用 Agilent 6560 离子淌度 Q-TOF 液质联用系统从背景基质中选择性地分离出一组 RNaseB 糖肽。IMS-MS 热点图（插图）中显示了液相色谱图的选定区域（蓝色）。可轻易地辨认出由趋势线所示的一个明显的质量差异区域（白色框），该趋势线显示出糖肽组分中单糖数量的不断增加。可在淌度迹线中选择这些糖肽离子的信号并与谱图所包含的其他离子相分离，以供进一步研究。

提高峰容量/特异性示例

离子淌度简化了复杂的谱图

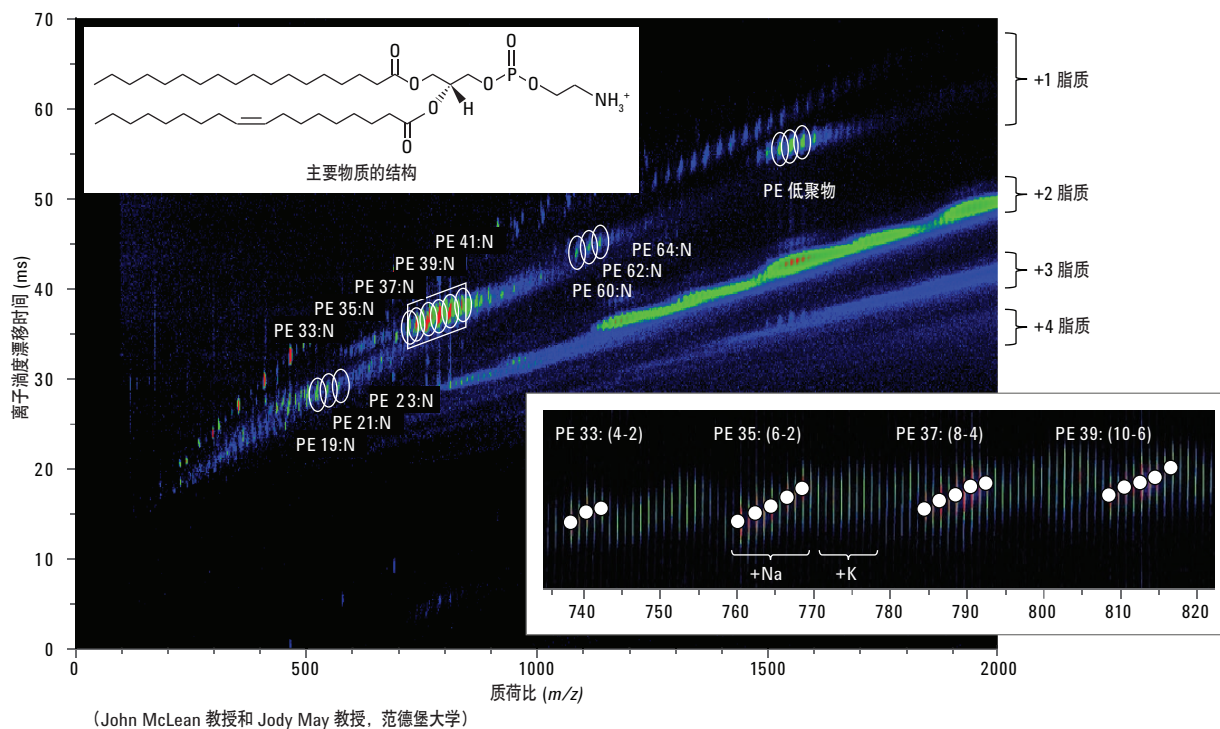
RNaseB 糖肽 NLTK- Man5 到 NLTK- Man9



在本示例中，使用离子淌度简化了复杂的糖肽谱图。A) 在 6560 系统的定制 HILIC-C18 HPLC 芯片上得到的 RNaseB 糖肽图显示了在所选保留时间窗口中洗脱的化合物对应的所有结合离子。B) 在具有 ISM 分离功能的 6560 系统 HILIC-C18 芯片上得到的 RNaseB 糖肽图显示了一种糖肽的不同糖型的简化淌度谱图。具有特征增量 162 的色谱峰对应于高甘露糖 N-连接的糖肽 NLTK 中数量不断增加的甘露糖单元，如图上的标记所示。

提高峰容量/特异性示例

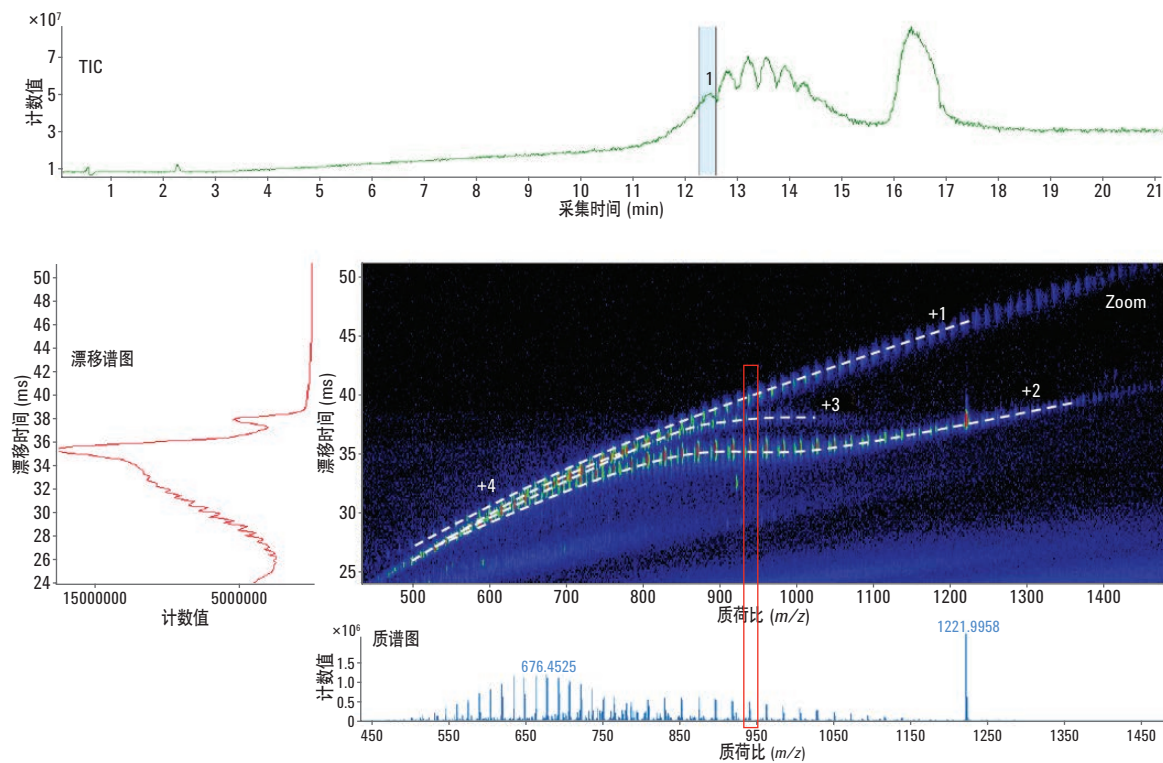
脂质分析: L- α -磷脂酰乙醇胺 (PE) 脂质混合物



在本示例中，一类脂质物即磷脂酰乙醇胺通过离子淌度得到了分离。范德堡大学的 John McLean 教授团队快速鉴别了落在特定趋势线上的 200 多种不同脂质和寡聚物。另一项有趣的发现是，他们对处于脂质主要趋势内数据进行评估的同时，也观察到由不同不饱和度组成的第二种趋势。

提高峰容量/特异性示例

聚合物油墨分散剂的离子淌度

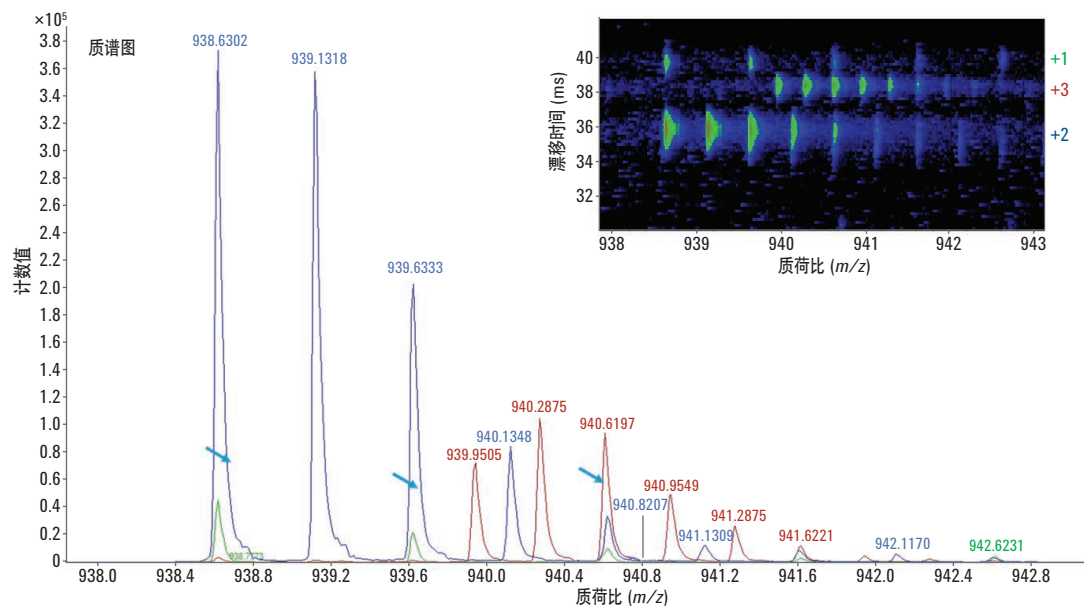


在本示例中，使用离子淌度鉴别聚合物油墨分散剂中不同烃类的离子系列。能清晰地分辨出各种带电态烃离子系列所图示的趋势线。此外，离子淌度特异性可显著降低背景基质效应。

提高峰容量/特异性示例

聚合物油墨分散剂 (烃类分子) 的离子淌度

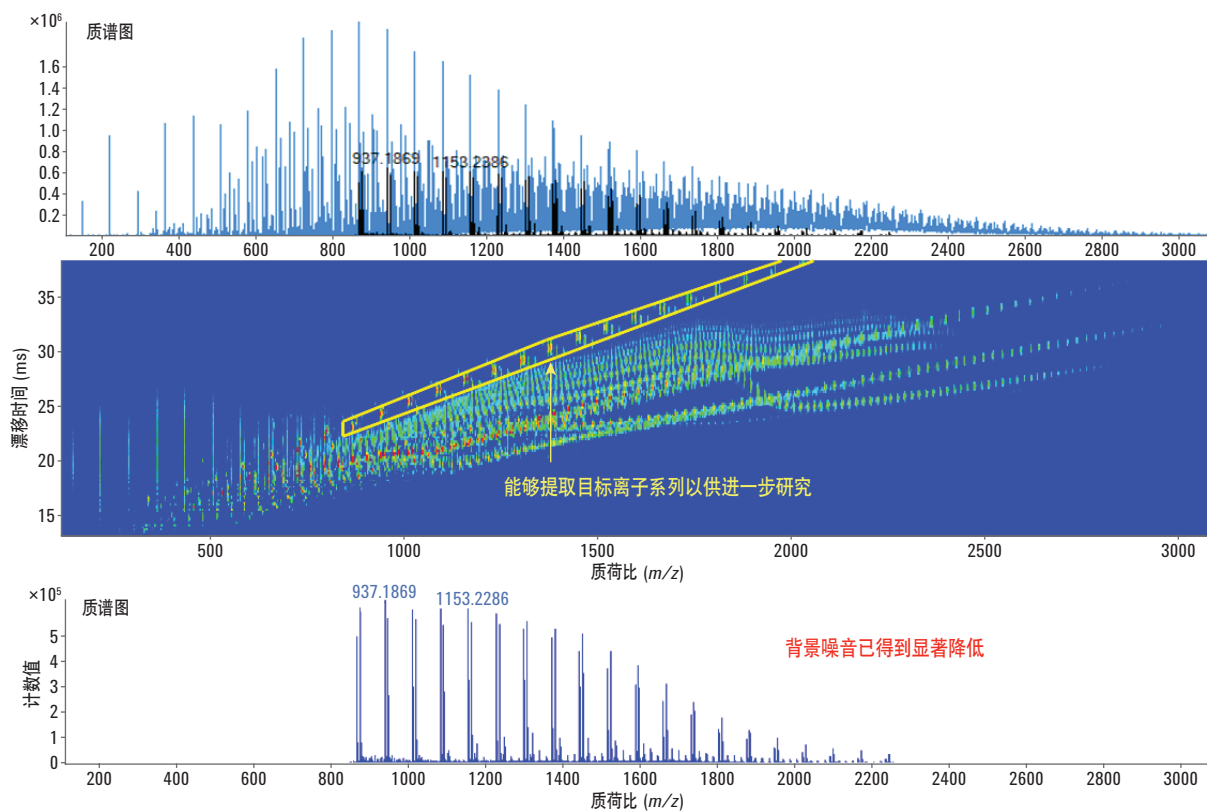
利用离子淌度分离重叠的电荷态同位素



在本示例中，使用离子淌度分离重叠的电荷态同位素，这些带电态同位素仅通过质量分辨无法得到分离。该信息可用于比较和确认各种油墨产品的质量等级。

提高峰容量/特异性示例

柴油(烃类)样品的离子淌度

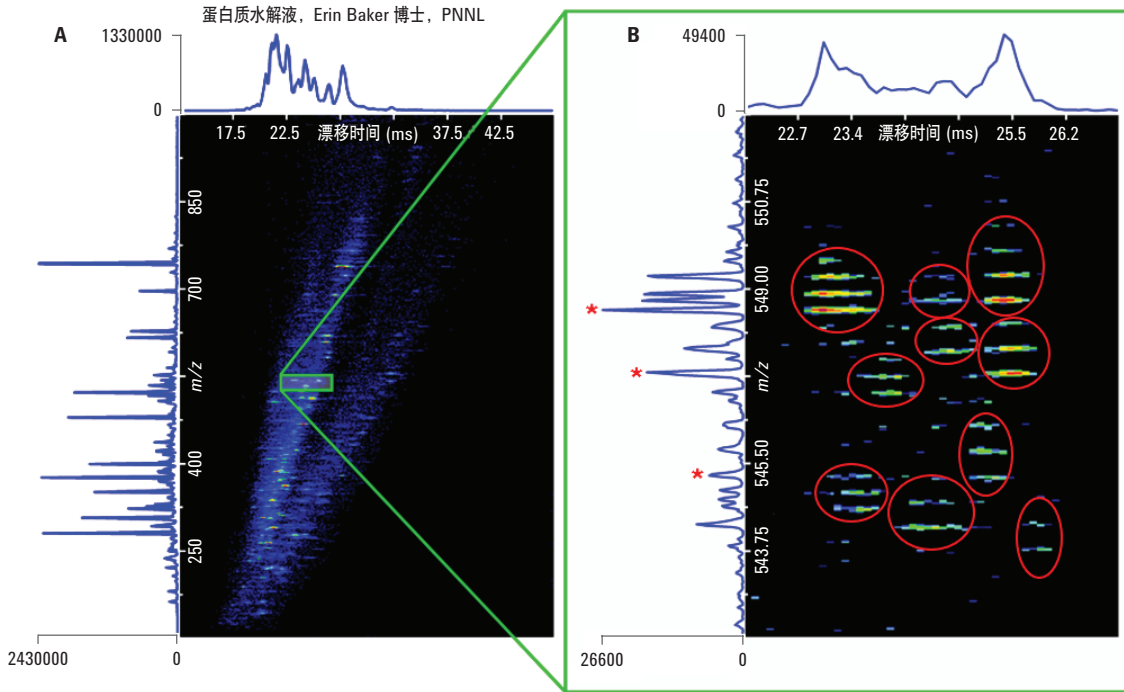


在本示例中，使用离子淌度鉴别柴油样品中的不同烃类离子系列。中图显示了离子淌度如何能够提取目标离子系列以供进一步研究。下图显示了离子淌度如何显著降低背景噪音。

发现和确认微量组分

应用示例

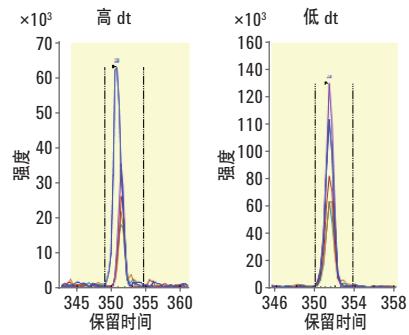
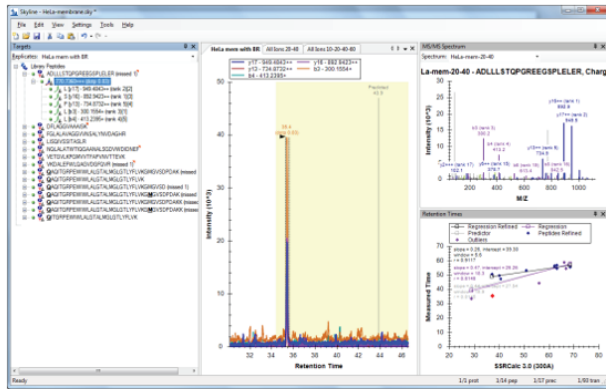
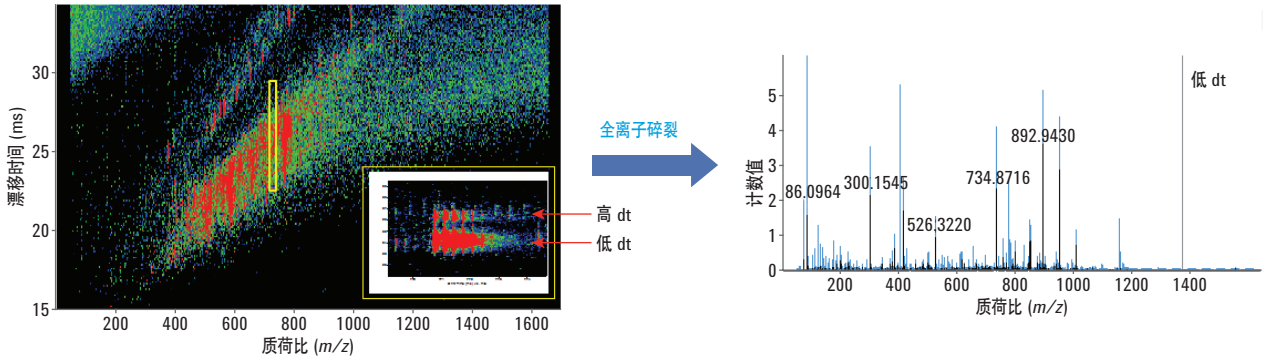
离子淌度提供了更强的蛋白质组学检测能力



在本示例中, 使用离子淌度增强对小鼠 (A) 和人血浆中胰蛋白酶肽的鉴定结果, 离子淌度非常适用于分析疾病状态。插图 (B) 显示了局部放大后的 3-D 图谱, 从图中看出通过 IMS 在 15 分钟 LC 运行的 0.5 秒内即可轻松鉴定出 10 个肽 (红色圆圈)。通过比较, 使用高分辨率质谱仪通过 100 分钟 LC 梯度运行的同一样品, 在同一区域内仅得到了三种鉴定结果 (以红色星号表示)。总而言之, 6560 系统检测到的肽数量增加了 3 倍, 并且分析速度提高了 5 倍。

发现和确认微量组分示例

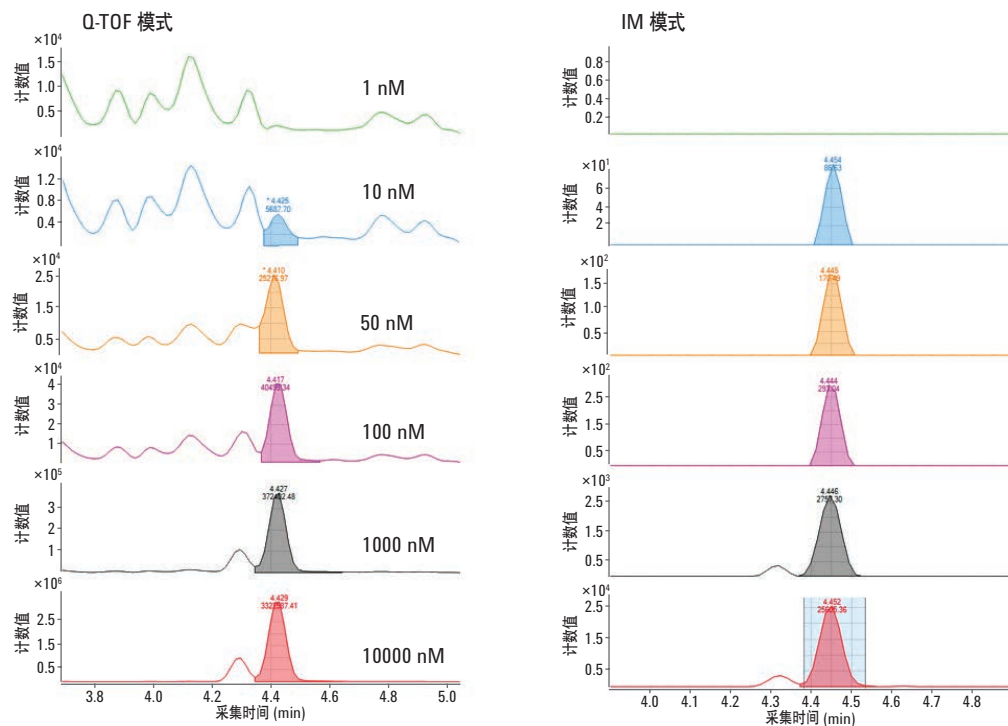
IMS-MS 用于发现蛋白质组学: HeLa 消解物的跨膜肽



在本示例中，我们使用离子淌度能够鉴别多种潜在的跨膜肽异型体。我们采用安捷伦全离子 MS/MS 和 Spectrum Mill 蛋白质组学软件中的 MS/MS 谱库，使用华盛顿大学 MacCoss 团队的 Skyline 软件将一些跨膜肽与已知螺旋结构进行匹配。通过这种方式，我们能够测定螺旋形式（浓缩形式，dt 较低）和变性形式（dt 较高）之间的相对定量比。

发现和确认微量组分示例

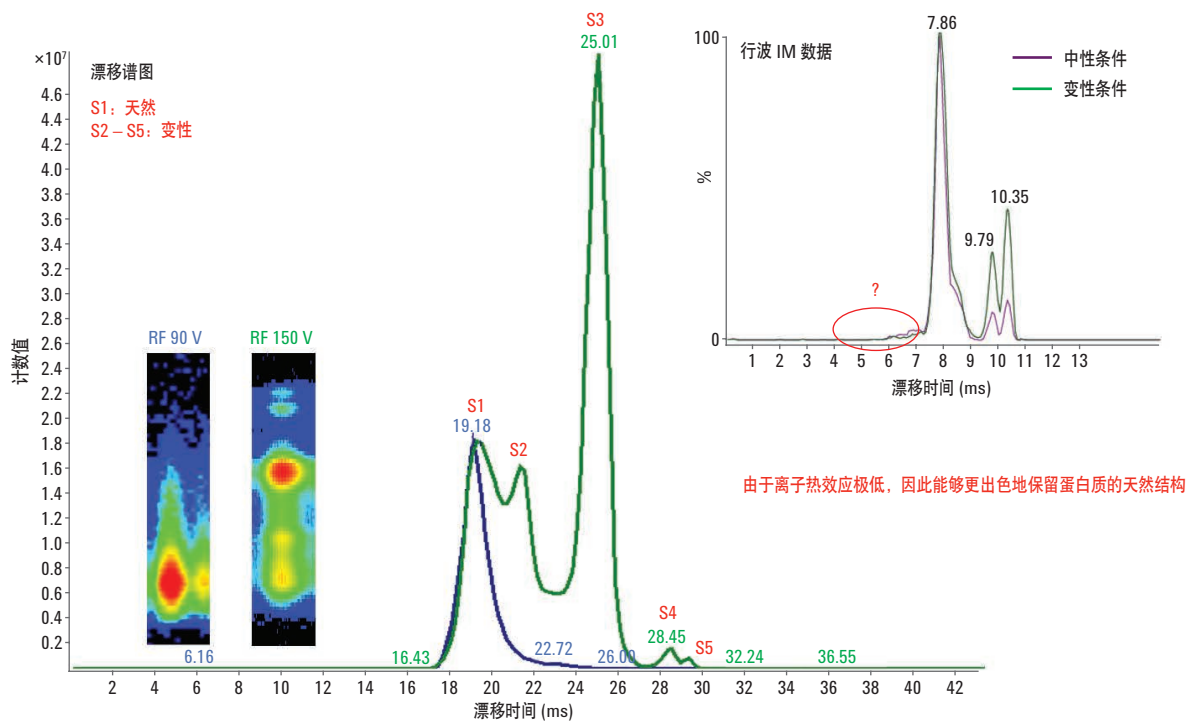
灵敏度：尿液中标化化合物的检出限



本示例显示了系统的 Q-TOF 和 IM Q-TOF 模式之间对尿液中标化合物（生物标记物）检出限的比较。尽管观察到这些数据采集模式之间的这种检出限 (LOD) 灵敏度非常相近，但采用 IM-Q-TOF 模式获得了卓越的信噪比 (S/N) 数据。由于其背景噪音水平低得多，因此获得了更出色的定量结果。

保留蛋白质构象的示例

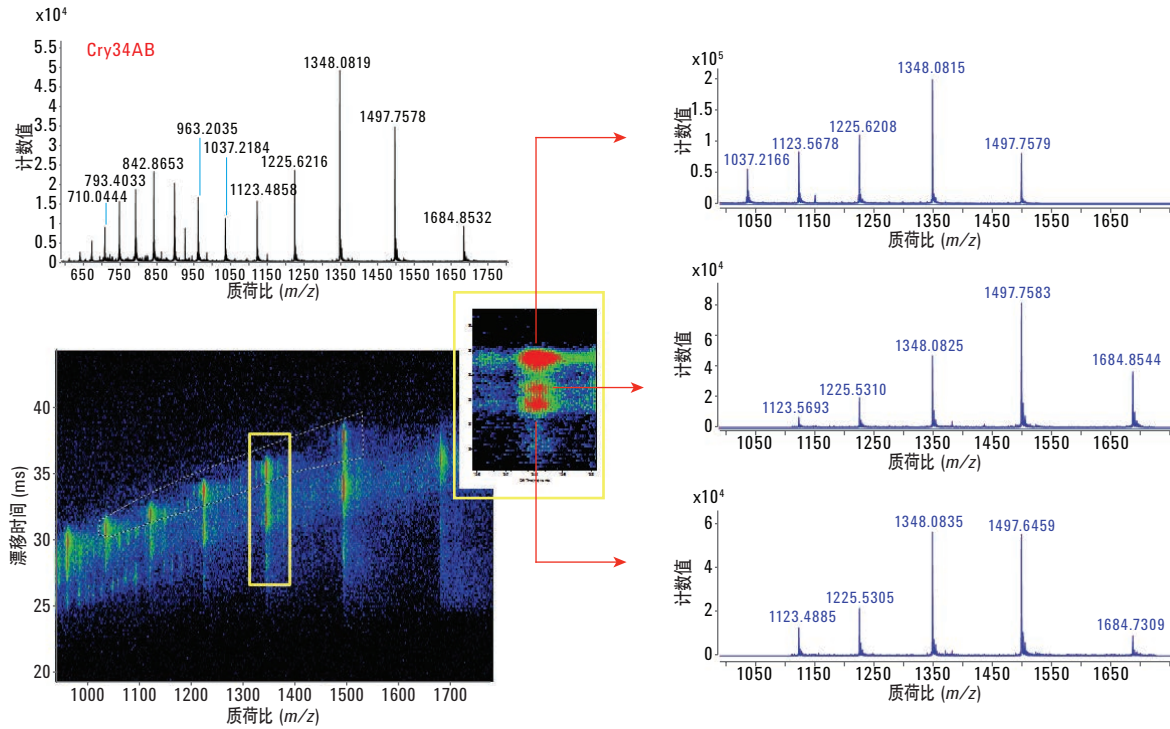
细胞色素 C (+8) 的 IM 比较: (匀场漂移管与行波)



Agilent 6560 离子淌度 Q-TOF 液质联用系统所具有的极小的离子热效应用于保持天然蛋白质的构象至关重要。通过调整捕集 RF 电压, 我们能够将蛋白质构象从其天然状态 (S1) 转变为各种不同程度的变性状态 (S2 - S5)。通过与另一种行波 IM 系统比较, 安捷伦漂移管 IM 系统需要的能量低得多, 从而最大限度降低了引起蛋白质分子变性的离子加热效应。

保留蛋白质构象的示例

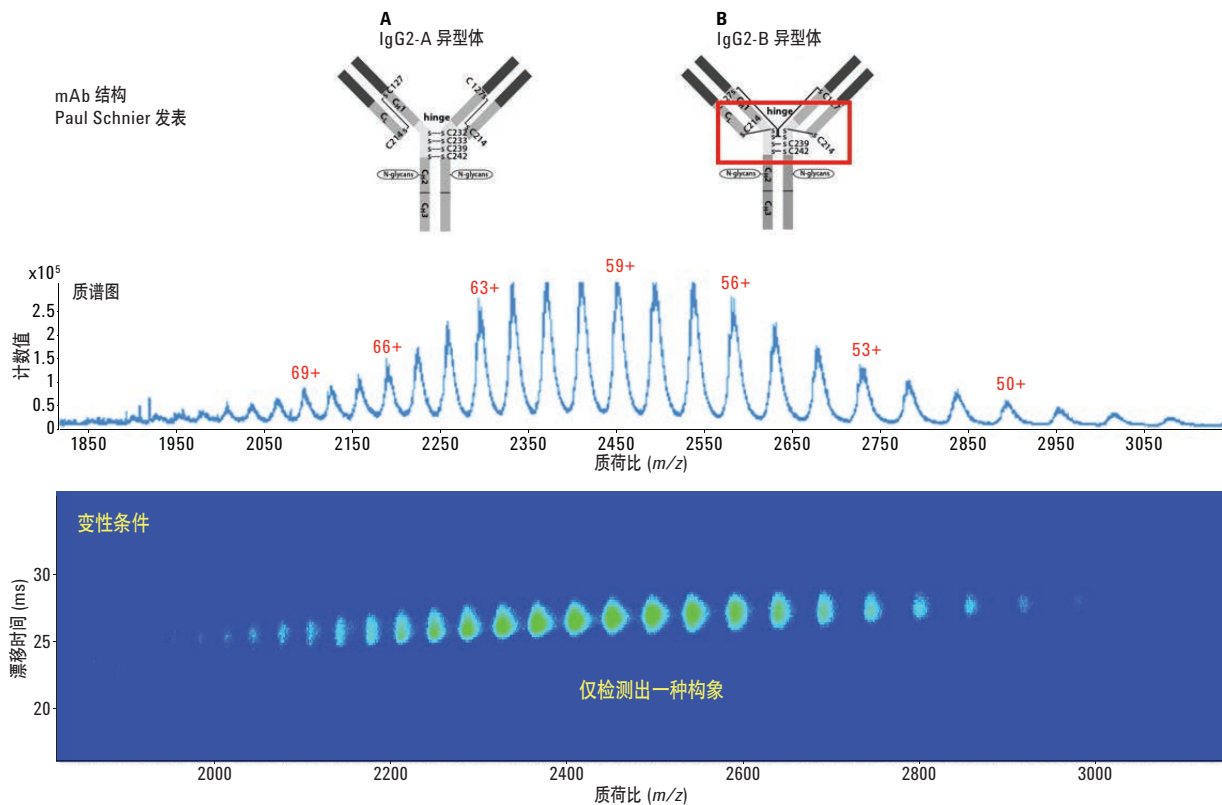
离子淌度 Q-TOF 在蛋白质异型体分析中的应用



使用离子淌度对一种处于天然条件和变性条件下的蛋白质样品 (CRY34AB) 进行了分析。仅使用 IM 信息，可以看到可能存在三种异型体，它们得到了完全的分。IM 结果还证明了不同异型体会生成不同的电荷分布包迹，显示了不同的蛋白质折叠结构，与耗时的 X 射线晶体学分析结果一致。

保留蛋白质构象的示例

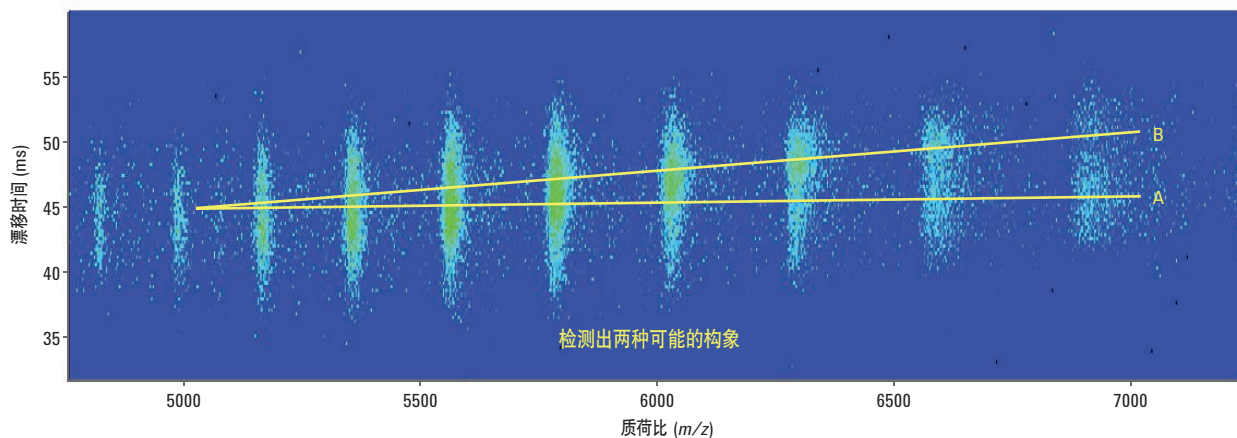
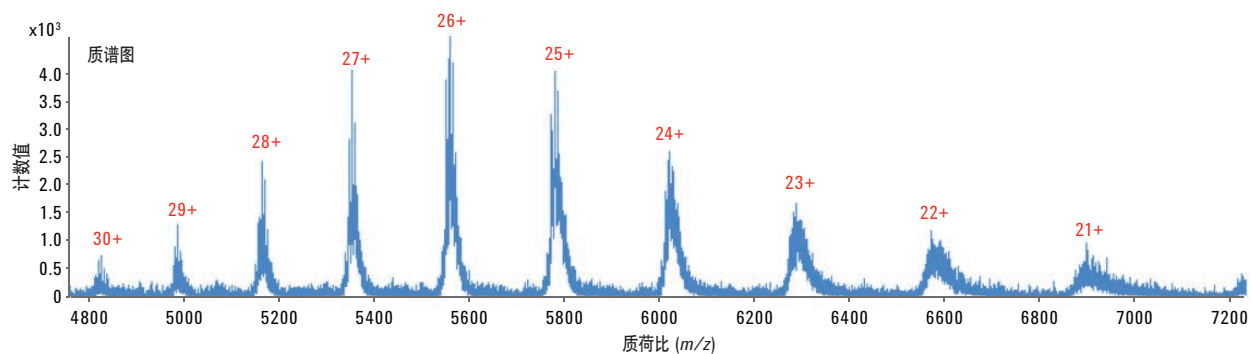
分离 IgG-2 异型体



IgG-2 分子在天然条件下具有两种不同的构象（异型体 A 和 B）。然而，常规的 LC/MS 条件下采用高浓度有机溶剂和 0.1% 甲酸，将会破坏天然结构。因而只能检测出一种变性的蛋白质构象。

保留蛋白质构象的示例

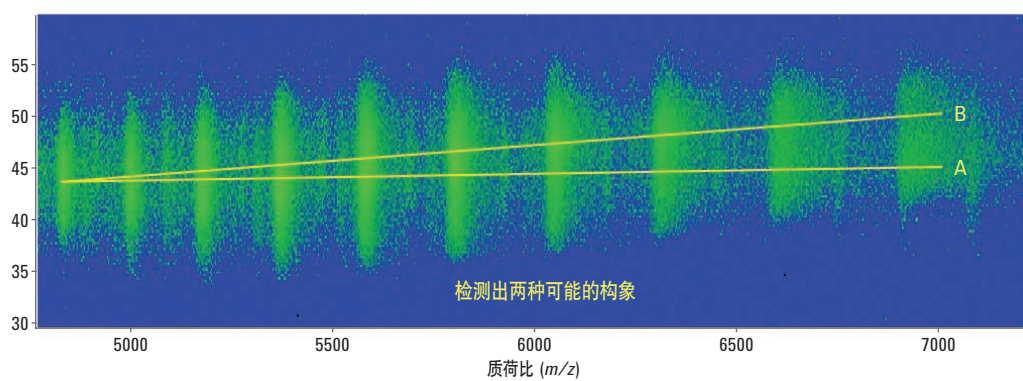
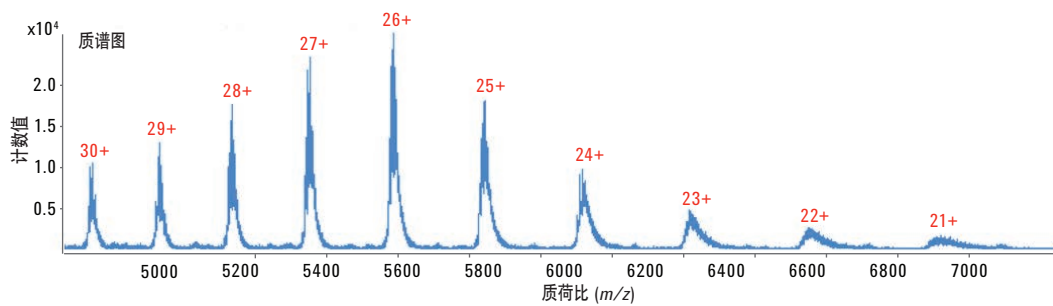
天然 IgG-2 的 IM-Q-TOF 分析



在天然条件下 (100 mM 乙酸铵), IgG-2 电荷分布包迹将移向至更高的 m/z (范围为 5000 – 7000)。可清晰地检测出两种蛋白质构象。异型体 A 是真正的天然结构, 而异型体 B 表示可能存在二硫键错配的 IgG-2。

保留蛋白质构象的示例

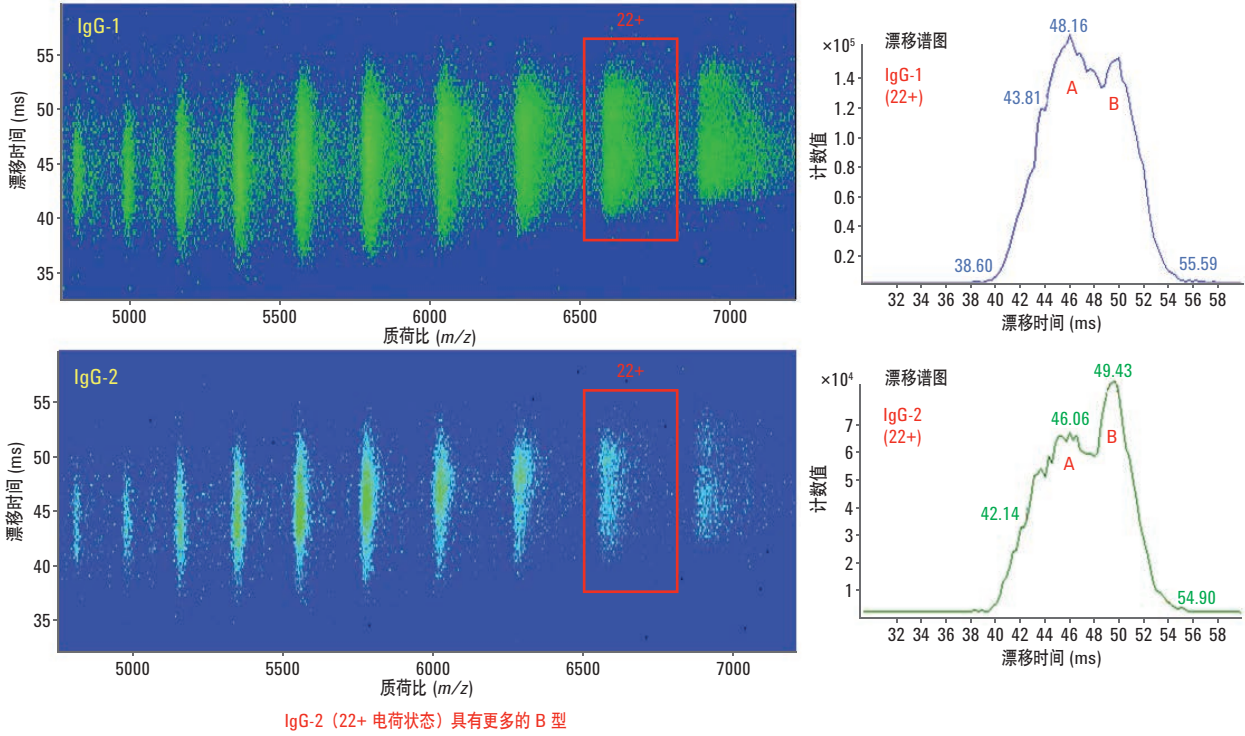
天然 IgG-1 的 IM-Q-TOF 分析



使用 6560 系统对天然 IgG-1 样品中的两种蛋白质构象进行了检测。

保留蛋白质构象的示例

IgG-1 和 IgG-2 的 IM-Q-TOF 比较



在本示例中，使用离子淌度测定 IgG-1 和 IgG-2 样品中异型体 A 和 B 的相对含量。在并列比较中，IgG-1 在其 22+ 电荷状态的分子中异型体 A (天然) 的百分比略高于异型体 B。相反，在 IgG-2 样品中检测到的异型体 B 的百分比更高。

离子淌度为您的研究增加一个新的维度

Agilent 6560 离子淌度 Q-TOF 液质联用系统是第一台能让研究人员真正轻松而有信心地解决结构、功能和复杂生理系统运行等基础问题的商用仪器。将液相色谱、质量测量和离子淌度等正交分离技术相结合,大大提高了峰容量,为您提供更为有效的表征各种分子的能力。

6560 IM Q-TOF 中采用的技术为应对分析挑战提供了重要优势:

- 提高对同分异构体的分离能力
- 提高峰容量/特异性
- 提高对极其复杂样品的选择性
- 降低化学背景效应
- 能够区分不同的蛋白质构象

简而言之,现在可以分离和检测比以往更多的化合物和组分。

致谢

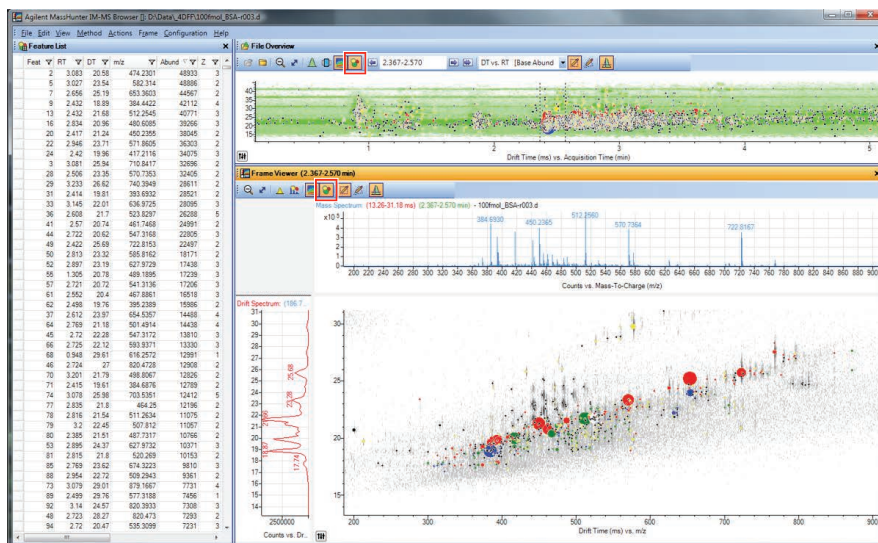
- Cathy Costello 博士, 波士顿大学
- Joseph Zaia 博士, 波士顿大学
- Rebecca S. Glaskin 博士, 波士顿大学
- Kshitij Khatri, 波士顿大学
- John McLean 博士, 范德堡大学
- Jody May 博士, 范德堡大学
- Cody Goodwin 博士, 范德堡大学
- Erin Baker 博士, 西北太平洋国家实验室
- 安捷伦科技公司科学家:
 - Huy Bui 博士
 - Crystal Cody 博士
 - Ed Darland 博士
 - John Fjeldsted 博士
 - Chris Klein 博士
 - Ruwan Kurulugama 博士
 - Sheher Mohsin 博士
 - Alex Mordehai 博士
 - Gregor Overney 博士
 - George Stafford 博士
 - Joachim Thiemann 博士
 - Bruce Wang

与离子淌度相结合的 MassHunter 软件新功能， 助您更深入地了解数据：

- 创新的群集自动调谐功能可在四分之一的时间内完成质谱仪调谐
- 在 IM-MS 浏览器中进行 4-D 特征查找
- 单场 CCS 计算
- 使用 Mass Profiler 进行差异分析，包括统计分析和 PCA 图

如需了解更多信息，请访问：

www.agilent.com/chem/masshunter



了解更多信息

www.agilent.com/chem/imq-tof

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

安捷伦客户服务中心：

800-820-3278

400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

安捷伦科技大学：

<http://www.lscachina.com.cn/agilent>

浏览和订阅 Access Agilent 电子期刊：

www.agilent.com/chem/accessagilent-cn

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2015

2015年5月29日中国出版

5991-5723CHCN



Agilent Technologies