

安捷伦离子淌度 Q-TOF 质谱系统

技术概述

作者

Ruwan Kurulugama, Ken Imatani 和
Lester Taylor
安捷伦科技有限公司
加利福尼亚州圣克拉拉

安捷伦离子淌度 Q-TOF 质谱系统

- 提供额外维度的分离
- 对碰撞截面进行直接精确测量
- 保留了分子构象的结构特征
- 扩展了对复杂样品的覆盖率

引言

Agilent 6560 离子淌度四极杆飞行时间 (IM-QTOF) 液质联用 (LC/MS) 系统，能够在没有同类型校正标准品的情况下，实现高效的离子淌度测量和非常精准的碰撞截面 (CCS 或 Ω) 测量。安捷伦离子淌度装置在均匀的低电场条件下运行，因此可将离子的漂移时间信息直接转化为碰撞截面信息。该仪器采用创新的离子漏斗技术，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。

Agilent IM-QTOF 系统是市场上首款匀场离子淌度系统，与 Agilent 1290 UHPLC 联用后，可有效结合液相色谱 (LC)、IM 和质谱 (MS) 技术的分离能力和选择性。离子淌度测量提供的另一维分离和结构信息，可加快从事前沿研究实验室的研究进程，并使其对化合物鉴定更有信心。该仪器是目前市场上唯一一款漂移管离子迁移高分辨（淌度和质量）LC/MS 系统，可同时提供高灵敏度和精确的碰撞截面测量。



Agilent Technologies

安捷伦离子淌度系统是与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，当进行复杂样品分析时，与单用高分辨质谱技术相比，该仪器展现出更强大的分析能力。

研究人员的报告显示，在高分辨质谱成为蛋白质组学、代谢组学以及其它需要分析非常复杂的样品领域的基础装备后，人们又将目光投向了实现其他维度分离的超快速正交技术。这款全新的离子淌度系统将为研究人员提供前所未有的分析能力。

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向前运动，而运动中由这些离子与静态缓冲气体分子发生碰撞而产生的阻力，则对抗驱动该离子的电场力。离子遇到的阻力与其碰撞截面（是其大小和形状的函数）、电荷和质量有关。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更容易与缓冲气体发生碰撞，因而在漂移管中具有更慢的迁移速度。离子与缓冲气体分子碰撞所产生的阻力阻碍了电场对其加速。因此，离子将迅速达到平衡状态，随后开始匀速 (V_d) 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。受扩散限制的分辨能力取决于漂移池的长度 (L)、电场强度 (E)、待测离子的电荷态 (Q)，以及缓冲气体的温度 (T)。

$$V_d = KE$$

淌度是该离子与缓冲气体的相互作用、以及离子的质量数和电荷数的函数。此外，折合离子淌度 (K_0) 还取决于气体温度和缓冲气体分子的质量。

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

其中， L 是漂移池的长度， t_d 是校正的漂移时间， E 是漂移池中的电场强度， P 是漂移池的压力， T 是缓冲气体的温度。

Agilent IM-QTOF 系统

Agilent IM-QTOF 系统具有以下特点：

- 离子淌度的分辨率大于 60
- 无需校正标准品即可自动计算准确的碰撞截面 (~ 1%)
- 对痕量化合物具有高灵敏度
- 强大的数据浏览和挖掘工具

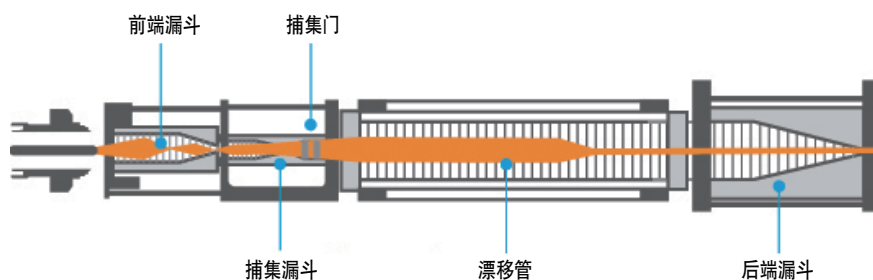


图 1. 离子淌度仪示意图。离子源内产生的离子通过一个单孔毛细管被带入前端离子漏斗。前端离子漏斗有效地将气态离子转入捕集漏斗，并抽走多余的气体 and 中性分子，提高了灵敏度。捕集漏斗将离子聚集并释放到漂移管中。漂移池约 80 cm 长，一般在 20 V/cm 漂移电场下操作。离子离开漂移管后进入后端离子漏斗，经重新聚焦后转入质量分析器

操作说明

如图 1 所示，安捷伦离子淌度系统由前端漏斗、捕集漏斗、捕集门和后端漏斗组成，后者通过一个六极杆与 Q-TOF 质量分析器相连。前端漏斗在高压下工作，该漏斗的 DC 和 RF 电压推动离子向捕集漏斗运动。前端离子漏斗的主要功能是富集样品离子并去除多余的气体。

电喷雾过程产生的连续离子束，在进行离子淌度分离之前被转换成脉冲离子束。捕集漏斗首先保存离散的离子包，然后将其释放到漂移池中。

离子在通过离子淌度池的过程中，根据其大小和电荷得到分离。与碰撞截面小的离子相比，碰撞截面大的离子与漂移气体分子发生碰撞的次数更多。因此，大离子在漂移管中的运动速度比小离子慢。另外，高电荷态离子与低电荷态离子相比，前者获得了更大的电场力，因此其运动速度更快。该仪器的漂移池在低电场限制条件下工作，可产生精确的化合物结构信息。在低电场条件下，淌度与电场无关，而是与分子的结构及其与缓冲气体的相互作用相关。

离开漂移管的离子被后端离子漏斗再次聚焦，然后进入六极杆离子导向器。

性能优化 — 漂移时间分辨率

对于离子淌度测量来说，漂移分辨率取决于扩散峰展宽、初始离子包的宽度，以及空间电荷效应。这三个因素中最重要的是扩散峰展宽。受扩散限制的分辨能力取决于漂移池的长度 (L)、电场强度 (E)、待测离子的电荷态，以及缓冲气体的温度。漂移管越长，离子漂移时间便越长，从而可以获得更好的离子分离和漂移分辨率。

$$R = \frac{t_D}{\Delta t} = \sqrt{\frac{LEQ}{16k_b T \ln 2}}$$

安捷伦离子淌度漂移管的长度约为 80 cm，在设计上优化了分辨率，并最大限度地减少了信号损失。用氮气作为缓冲气体，可在较高的漂移管电压下提供稳定操作，使小分子和大分子的漂移分辨率大于 60。

高漂移分辨率的另一个影响因素是初始离子包的宽度。该仪器采用双栅捕集漏斗装置，为得到更高离子容量和更窄离子包进行了优化。设置适当的离子门脉冲时间，这将决定后续进入离子淌度池的离子包中的离子数量。脉冲时间通常在 60 到 100 毫秒之间。

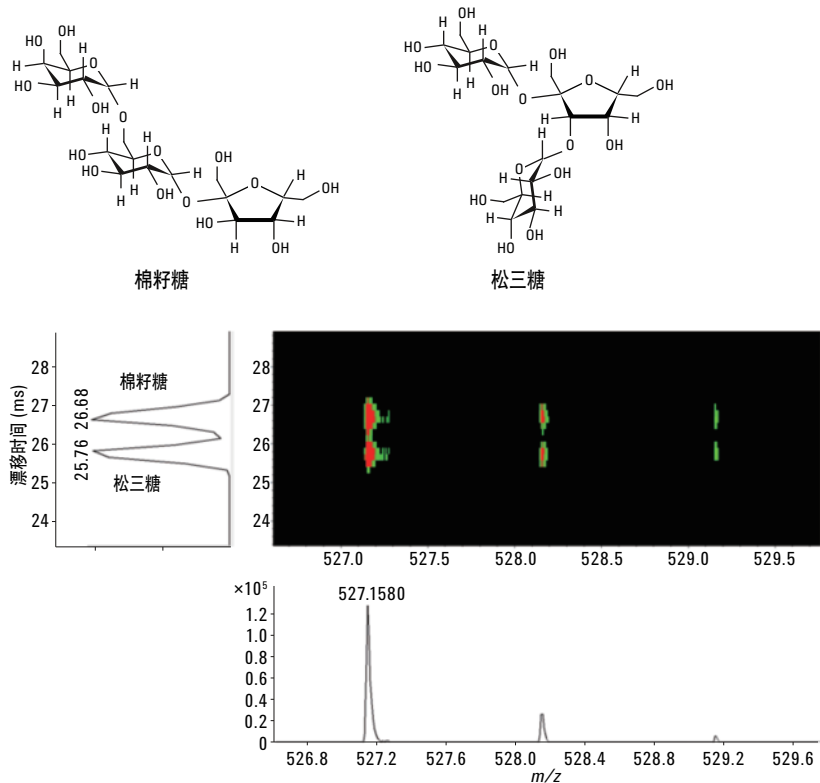


图 2. IM-QTOF 分离同重三糖。用注射泵注入松三糖和棉籽糖的 1:1 混合物。用离子淌度漂移管对这两种碳水化合物进行基线分离，用 Q-TOF 质量分析器检测其钠加合物。该分离的离子淌度分辨率为 60

最后，为了将离子包聚焦到漂移管内，以防止离子丢失，并提高分辨率和灵敏度，我们为捕集漏斗出口区设计了锥形截面。

最终结果是让高丰度、聚焦的离子包进入到漂移区内，从而获得高漂移分辨率和高灵敏度。

灵敏度优化

匀场离子淌度仪已经存在了许多年，历经无数研究设计。这些匀场设计表明，在漂移管前的离子选通区存在极高的离子丢失率 (> 99.9%)。另外，由于出口孔很小，在漂移管出口处也会丢失大量的离子。

而由 PNNL 的 Richard Smith 团队所发明的现代电动力离子漏斗技术，使匀场漂移管设计的灵敏度得到了极大提高。PNNL 捕集离子漏斗是第一台在高压下捕集离子的装置。系统的灵敏度性能取决于离子化效率、进出漂移管区域有效的离子传输，以及离子源和质谱仪之间传输损失的最小化。

Agilent IM-QTOF 的示意图见图 3。安捷伦喷射流离子源具有非常高的离子化效率，与标准电喷雾设计相比，其灵敏度提高了 5 倍。第一级离子漏斗有效地去除了多余气体，并为第二级捕集漏斗聚焦离子束。

在漂移管出口处，后端漏斗对离子包进行再聚焦，使其在进入质谱仪离子光学部分之前形成更窄的离子束。高效离子捕集和后端漏斗相结合，其灵敏度比以往的无漏斗设计高出了 1000 倍。

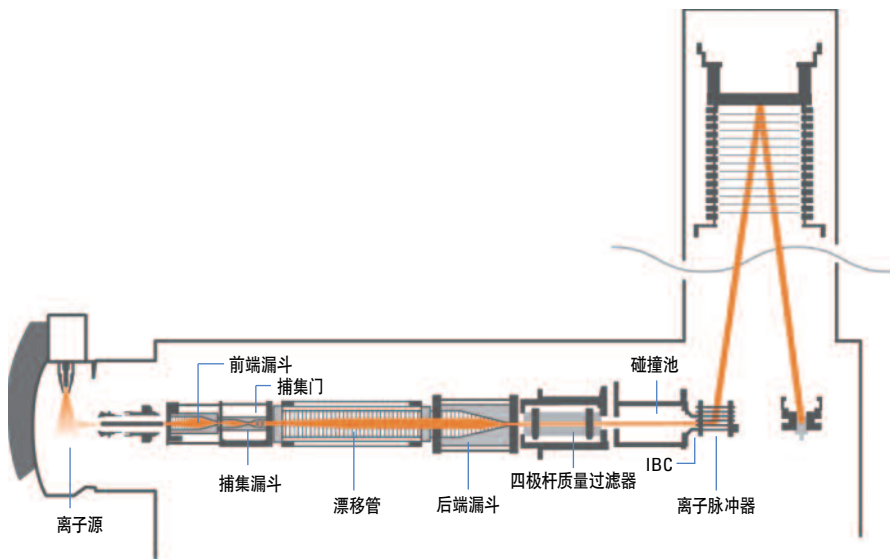


图 3. Agilent IM-QTOF 仪器示意图。用六极离子导向器将离子淌度测定仪与四极杆飞行时间质谱仪相联

精确碰撞截面测量的开发

碰撞截面值来自对离子淌度的测量。决定离子淌度的所有一阶方程均适用于低电场条件。匀场漂移管设计一般在低电场下工作，能进行极易预测的精确淌度测量。

常规的匀场漂移管离子淌度系统提供了直接计算碰撞截面 (Ω) 的方法，即：通过下面给出的 Mason-Schamp 方程计算：

$$\Omega = \frac{(18\pi)^{1/2}}{16} \frac{ze}{(k_b T)^{1/2}} \left[\frac{1}{m_i} + \frac{1}{m_B} \right]^{1/2} \frac{t_d E}{L} \frac{760}{P} \frac{T}{273.2} \frac{1}{N}$$

其中， Ω 是旋转平均碰撞截面， k_b 是 Boltzman 常数， T 为缓冲气体的温度， m_i 是待测离子的质量， m_B 是缓冲气体分子的质量， t_d 是校正漂移时间， ze 是待测离子的电荷态， E 是电场强度， L 是漂移池的长度， P 是漂移池的压力， N 是漂移池内的数密度。需要注意的重点是 t_d 可以用 IMS QTOF 系统中的总离子漂移时间测定。一旦计算出 t_d 值，即可直接用于 CCS 测量。

碰撞截面计算的准确度，取决于淌度实验过程中实验参数（压力、温度和电场）保持的稳定程度。只要离子溢出指定的漂移区产生“末端效应”，就会导致测量准确度损失。用匀场漂移管通常可以获得变异 2% 以内的高准确度 CCS 测量。

表 4. 一系列四烷基季铵 (TAA) 盐的碰撞截面数据。将 TAA 盐的混合物分别以 7 个不同的电场条件直接注入安捷伦 IM-MS 仪中。以漂移时间对 1/电压作图，得到每种盐的 t_0 值。然后用校正的漂移时间计算 CCS 值

分析物	质量 (Da)	CCS 文献值* (\AA^2)	CCS 安捷伦 IM-MS (\AA^2)	来自文献的 %偏差
TAA-3	186.22	143.8 ± 0.1	146.1 ± 1.0	1.54
TAA-4	242.28	166.0 ± 0.3	167.3 ± 0.9	0.77
TAA-5	298.35	190 ± 0.1	190.3 ± 1.1	0.10
TAA-6	354.41	214.0 ± 0.3	213.9 ± 0.6	0.04
TAA-7	410.47	236.8 ± 0.2	237.7 ± 0.4	0.37
TAA-8	466.54	258.0 ± 0.4	258.7 ± 0.4	0.14
TAA-10	578.66	—	296.2 ± 0.4	—
TAA-12	690.79	—	325.5 ± 0.5	—
TAA-16	915.04	—	365.6 ± 0.7	—

*Campuzano, I., Bush, M. F., Robinson, C. V., Beaumont, C., Richardson, K., Kim, H., Kim, H. I. Anal Chem 2012, 84(2) 1026-33. Structural Characterization of Drug-like Compounds by Ion Mobility Mass Spectrometry.

保留分子构象的结构特征

碰撞截面的测量取决于气相中分子结构的保留，研究显示，减少离子加热可以保留结构构象。由于安捷伦离子淌度系统采用直流电 (DC) 驱动离子在漂移池中运动，所以从设计上实现了离子加热最小化。

Agilent IM-QTOF 系统还采用了可调节捕集电压设置，以实现从不稳定到极稳定的各类化合物的结构构象保留。离子漏斗上的可调节 RF 电压能针对特定研究进行优化，可实现离子加热最小化。将电场强度、漂移池中的压力和 Q-TOF 接口进行优化后，能最大限度地减少离子通道中的碎裂。

图 4 显示了通过可调节捕集电压对不同电荷态的泛素进行 IMS-TOF 分离，以保留低能量结构。

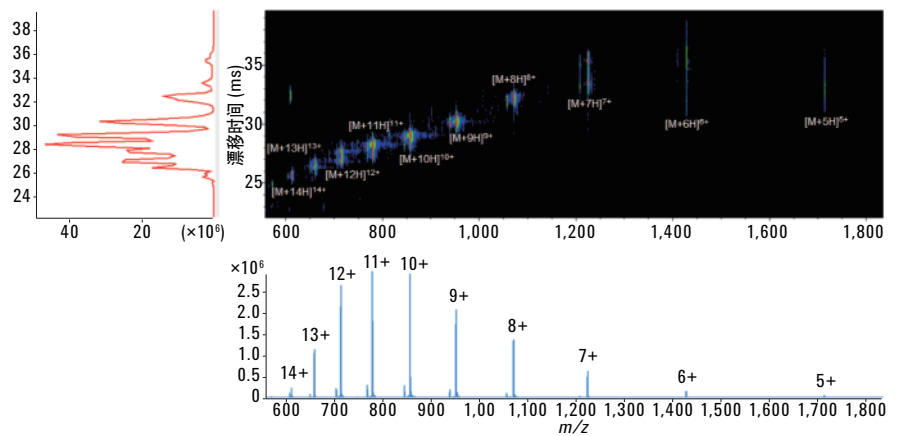


图 4. 泛素电荷态的 IM-QTOF 分离。将泛素溶解在含 0.1% 醋酸的水:甲醇 (50:50) 溶液中，将其注入 IM-QTOF 仪器。漂移时间对 m/z 的 3D 图谱显示了在漂移和 m/z 空间的电荷态分布。综合所有不同电荷态的漂移分布得到了左侧显示的漂移时间分布图。某些电荷态显示了对应于多种构象的多个漂移峰

改善分离和峰容量

对于含有多种化合物类型的复杂混合物的分析来说，分离能力尤为重要。要进行深度分析，单独的色谱分离已经无能为力，因为其无法对从一个液相色谱峰中洗脱出来的几种化合物进行表征。另外，高分辨质谱也可能受限于 MS 扫描速度，并且如果没有有效的前端分离，也不能得到样品中所有化合物的数据。一般来说，数据依赖型 MS/MS 实验经常会丢失低丰度峰。

离子淌度分离的速度（毫秒）介于 HPLC（秒）和 TOF 分析器（微秒）的时间范围内。离子淌度系统能够分离色谱无法分离的痕量化合物。在传统的 MS/MS 条件下，使用四极杆来选择母离子，以进行裂解。在全离子 MS/MS 实验中，不用选择母离子，而是将所有离子都送入碰撞池进行裂解。与传统 MS/MS 相比，全离子 MS/MS 的优势是能收集所有存在的化合物的结构信息。全离子 MS/MS 与离子淌度联机后会变得更为强大，因为漂移时间分离可提供有助于了解样品复杂性的补充分离，并且更容易将碎片与母离子相关联。使用检测限更低的全离子 MS/MS 分析痕量化合物时，这种联机能更准确地对化合物进行鉴定。

例如，范德堡大学最近的一项研究表明，使用 Agilent IM-QTOF 系统能使脂类的总覆盖率提高 5 倍。同样，西北太平洋国家实验室在最近的一项蛋白质组学研究发现，使用 IM-QTOF 鉴定出来的多肽和蛋白质的数量比单独使用 LC/MS 分析增加了 3 倍，如图 5 所示。

分离能力常用的度量标准是峰容量，可将其定义为任何多维方法中可以分离的最多峰数。如果各方法（LC、IMS 和 MS）的分辨率高，而且所用的分离机制差别（正交性）明显，则可以获得高峰容量。相对于单独使用质量分辨率来说，峰容量是分离能力的更好指标。在理想状态下，多维方法的峰容量为各维峰容量的乘积：

峰容量 = UHPLC 分离能力 × IM 分离能力 × MS 分辨率 × 组分正交性

范德堡大学最近的一项研究显示，与以往的 LC/MS 方法相比，IM-QTOF 系统中单电荷化合物的峰容量增加了 5 倍。

Agilent IM-QTOF 系统同时将 UHPLC、IM 的分离能力和质量分辨率结合在了一起，得到了非常高的峰容量，且不影响灵敏度性能。如图 6 所示，一组质量差异不到 0.2 mDa 的近似同重农药得到了有效分离，而传统方法需要质量分辨率达到 2000000 才能进行有效分离。

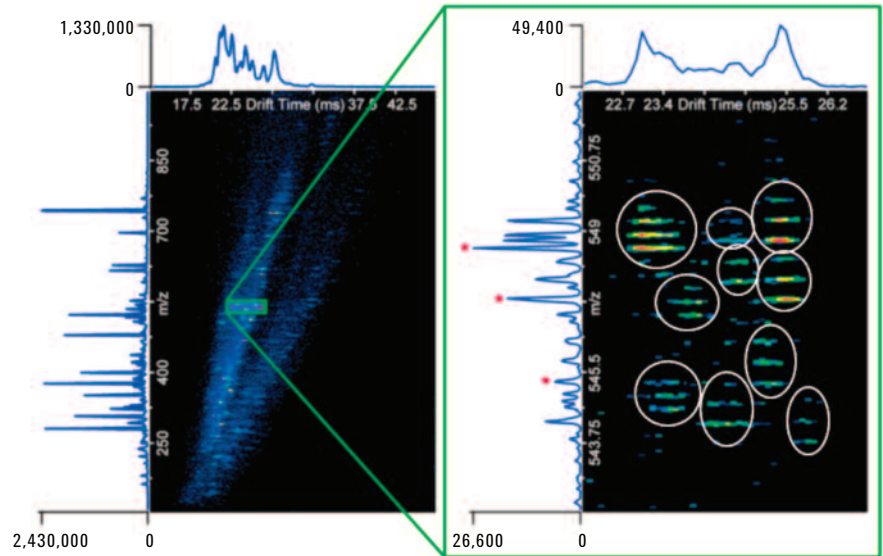
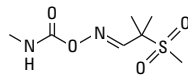
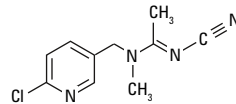


图 5. 用 Agilent IM-QTOF 仪器提高灵敏度。m/z 对漂移时间的谱图显示，对加入 20 种参比多肽的老鼠血浆样品的胰酶裂解多肽进行了分离。该样品在使用 IM-QTOF 分析前进行了 15 分钟的液相色谱分离。插图显示了局部放大后的 3D 图谱，从图中可看出 LC-IM-QTOF 实验鉴定了 10 个多肽。相同样品经 100 分钟液相色谱梯度分离后用 LTQ-FT-MS 进行分析，结果只鉴定出了 3 个多肽，如星号所示

涕灭威砜 (C₇H₁₄N₂O₄S)
[M+Na]⁺ = 245.056649



啶虫脒 (C₁₀H₁₁ClN₄)
[M+Na]⁺ = 245.056445



IMS 漂移分离

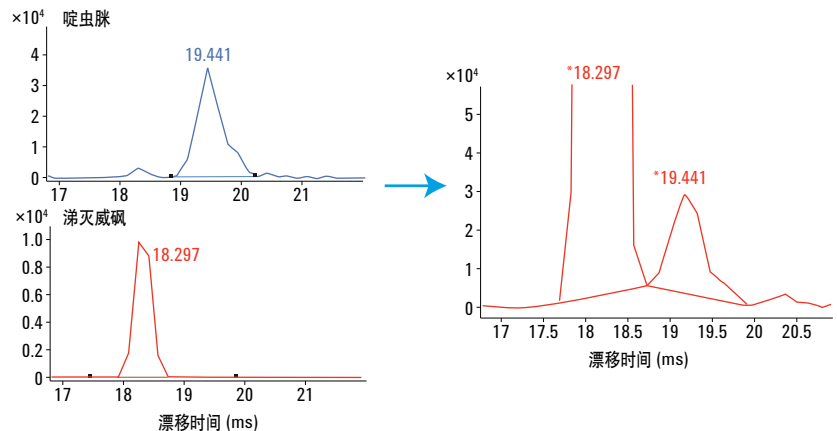


图 6. 农药涕灭威砜和啶虫脒的 IM-QTOF 分离，二者只有 0.2 mDa 的质量差异。用 m/z 分离这两个化合物需要有两百万左右的质量分辨率。由于这两种化合物之间存在结构差异，因此很容易进行漂移分离

峰容量以外 - 选择性的重要性!

在质量或其它物理性质存在差异时，高分辨率或峰容量非常有用。但在分析同重化合物时，即使质量分辨率 > 1000000，仍然可能无法对这些异构体进行分离鉴定。但可以用 CCS 值的测定功能对结构异构体进行鉴定，如下列图 7 对全甲基低聚糖的分析所示。

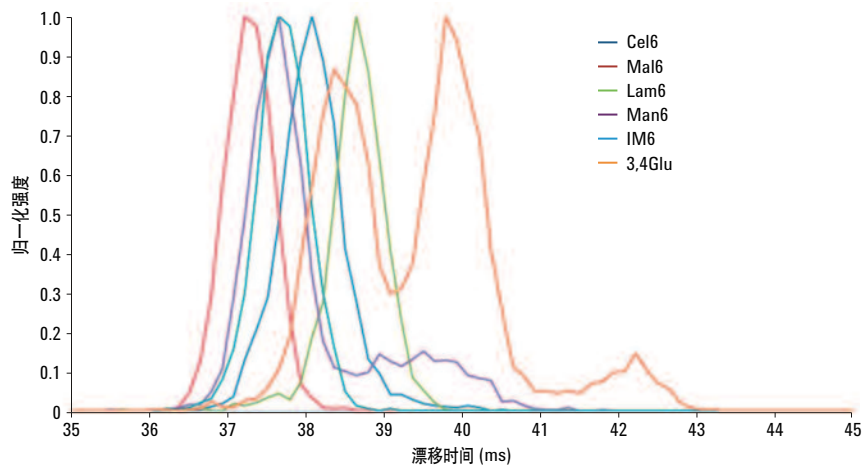


图 7. 各种全甲基低聚糖的 IM-QTOF 分离。分别注入这些低聚糖样品，并用 IM-QTOF 分析其钠加合物。这些同重己糖展现了不同的漂移分布，说明其存在结构差异。离子淌度分离是一种可以用于分离不同结构的同重化合物的有用技术

结论

Agilent IM-QTOF LC/MS 系统是商业化分析型离子淌度质谱开发中的重要进展。均匀漂移电场淌度池和高分辨 Q-TOF 接口的优化，使离子淌度分析性能得到了显著提高。新的 IM-QTOF 系统采用了安捷伦首创的离子漏斗技术，近三年来该技术已在三重串联四级杆和 Q-TOF 仪器上得到了运用。从而将优异的离子淌度分离和质谱的高灵敏度质量分辨率结合起来。

几家合作者的近期工作证明该仪器具有以下优势：

- 更好地分离脂类和糖肽
- 更精确地测量碰撞截面，提高了不同结构构象和同质化合物表征的可信度
- 能够分析复杂基质中更多的痕量水平多肽
- 保留了液相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。该软件可以让研究人员查询淌度/质量方面的数据，精密而准确地轻松确定碰撞截面值。

参考文献

漂移分辨率的影响因素

1. H.E. Revercomb, and E.A. Mason, "Theory of plasma chromatography/gaseous electrophoresis – a review", *Anal. Chem.*, **47**, 970-983, 1975.

Triwave 的说明与操作

2. K. Giles, S.D. Pringle, K.R. Worthington, D. Little, J.L. Wildgoose, and R.H. Bateman, "Applications of a travelling wave-based radio-frequency only stacked ring ion guide", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 2401-2414, 2004.
3. S.D. Pringle, K. Giles, J.L. Wildgoose, J.P. Williams, S.E. Slade, K. Thalassinos, R.H. Bateman, M.T. Bowers, and J.H. Scrivens, "An Investigation of the mobility separation of some peptide and protein ions using a new hybrid quadrupole/travelling wave IMS/oa-TOF instrument", *Int. J. Mass Spectrom.*, **261**, 1-12, 2007.

PNNL 使用电动漏斗提高灵敏度的研究

4. K. Tang, A.A. Shvartsburg, H.N. Lee, D.C. Prior, M.A. Buschbach, F.M. Li, A.V. Tolmachev, G.A. Anderson, and R.D. Smith, "High-sensitivity ion mobility spectrometry/mass spectrometry using electrodynamic ion funnel interfaces", *Anal. Chem.*, **77**, 3330-3339, 2005.
5. Y. Ibrahim, M.E. Belov, A.V. Tolmachev, D.C. Prior, and R.D. Smith, "Ion funnel trap interface for orthogonal time-of-flight mass spectrometry", *Anal. Chem.*, **79**, 7845-7852, 2007.
6. B.H. Clowers, Y.M. Ibrahim, D.C. Prior, W.F. Danielson, M.E. Belov, and R.D. Smith, "Enhanced ion utilization efficiency using an electrodynamic ion funnel trap as an injection mechanism for ion mobility spectrometry", *Anal. Chem.*, **80**, 612-623, 2008.

研究显示了用 Triwave 系统对未知化合物进行截面测量的局限性。离子加热和几种参考物对校正的不良影响 — 离子的显著加热与 T-Wave 的参数有关

7. D. Morsa, V. Gabelica, and E. De Pauw, "Effective temperature of ions in traveling wave ion mobility spectrometry", *Anal. Chem.*, **83**, 5775–5782, 2011.

T-Wave 的离子加热理论

8. A.A. Shvartsburg and R.D. Smith, "Fundamentals of traveling wave ion mobility spectrometry", *Anal. Chem.*, **80**, 9689-99, 2008.
9. S.I. Merenbloom, T.G. Flick, and E.R. Williams, "How hot are your ions in TWAVE ion mobility spectrometry?", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **23**, 553-62, 2012.

蛋白质校正：校正曲线周围数据点的广泛分布（高达 $\pm 10\%$ ）。将检测到的少量细胞色素 C 的构象异构体（仅为去折叠构象），与 Clemmer 的数据进行对比

10. D.P. Smith, T.W. Knapman, I. Campuzano, R.W. Malham, J.T. Berryman, S.E. Radford, and A.E. Ashcroft, "Deciphering drift time measurements from travelling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry studies", *Eur. J. Mass Spectrom.*, **15**, 113–130, 2009.

用不同类型的蛋白质（如天然蛋白与变性蛋白）进行蛋白 CCS 校正，会导致严重误差（20%–30%）。在某些案例中，CCS 测量受波高影响。

11. M.F. Bush, Z. Hall, K. Giles, J. Hoyes, C.V. Robinson, and B.T. Ruotolo, "Collision cross sections of proteins and their complexes: A calibration framework and database for gas-phase structural biology. CCS values and increased coverage of lipids", *Anal. Chem.*, **82**, 9557–9565, 2010.

12. J. May, C. Goodwin, R.T. Kurulugama, A. Mordehai, G. Stafford, and J. McLean, "Ion mobility conformational space mapping for complex sample characterization", Vanderbilt University department of chemistry, Nashville, TN and Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, Oral session at 61st Annual ASMS conference, 2013, Minneapolis, MN.

分离与峰容量

13. P. Dwivedi, A.J. Schultz, and H.H. Hill Jr., "Metabolic profiling of human blood by high-resolution ion mobility mass spectrometry (IM-MS)", *Int. J. Mass Spectrom.*, **298**, 78-90, 2010.

14. C. Laphorn, F. Pullen, and B.Z. Chowdhry, "Ion mobility spectrometry-mass spectrometry (IMS-MS) of small molecules: separating and assigning structures to ions", *Mass Spectrom. Rev.*, **32**, 43-71, 2013.

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦公司对本材料中可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
中国印刷
2013 年 10 月 15 日
5991-3244CHCN



Agilent Technologies