

## ОБЛАДНАННЯ

К. МИЛЛЕР, Б. МИЛЛЕР,  
П. ПЕРКИНС, А. МОРДЕХАЙ

### НОВАЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ИОННАЯ ЛОВУШКА ДЛЯ ВЭЖХ/МС

#### Введение

Масс-спектрометрическая (МС) часть прибора «LC/MSD Trap XCT» фирмы *Agilent Technologies* (в дальнейшем – *Agilent*) серии 1100 – высшее достижение многочисленных исследований и улучшений. Оптимизированы такие характеристики: разрешение по массе, скорость и периодичность сканирования, чувствительность и динамический диапазон. Осуществлён ряд дополнительных усовершенствований с целью повышения эффективности прибора и обеспечения более полной автоматизации режимов настройки и сбора данных масс-спектров фрагментов (МС<sup>n</sup>), что позволяет оператору использовать альтернативные возможности при планировании, автоматизации эксперимента, а также в процессе сбора и анализа данных.

В настоящей публикации рассмотрены оригинальные технические решения в аппаратной и программной частях прибора «LC/MSD Trap XCT», позволившие добиться прекрасных результатов в сложных случаях применения режимов МС и МС<sup>n</sup>.

#### Общие сведения об ионных ловушках

Схематическое изображение масс-анализатора масс типа «ионная ловушка» прибора «LC/MSD Trap XCT» показано на рис. 1.

Ионная ловушка фирмы *Agilent* включает центральный кольцевой электрод, расположенный между двумя концевыми полюсами. Напряжения на электродах можно изменять так, чтобы система работала в режимах захвата, фрагментации и удаления ионов. Концевые полюса имеют отверстия, через которые ионы поступают в ловушку и удаляются из неё.

Ионная ловушка представляет собой последовательный масс-анализатор, реализующий ступенчатый процесс, где ионы на первом этапе накапливаются в ловушке, затем сортируются, после чего выделяются ионы с определенным

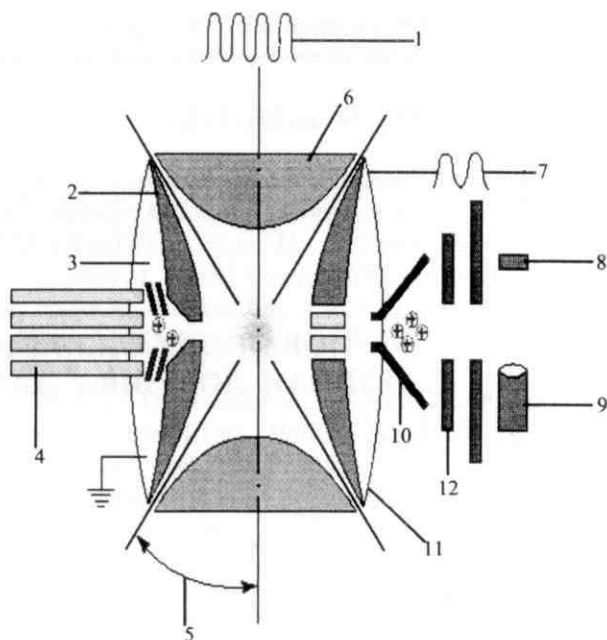


Рис. 1. Конструкция (запатентованная) многополюсной ионной ловушки:

- 1 – основное РЧ-напряжение; 2 – концевой полюс; 3 – линзы;
- 4 – октуполь; 5 – асимптоты оптимизированы; 6 – центральный электрод;
- 7 – напряжение для образования диполя – 1/3 частоты основного РЧ-напряжения;
- 8 – диодный преобразователь; 9 – электронный умножитель; 10 – апертурная диафрагма;
- 11 – концевой полюс; 12 – фокусирующая система

соотношением  $m/z$ , которые впоследствии фрагментируются и анализируются. Характерный цикл сканирования масс-спектра, полученный при помощи ионной ловушки, включает стадии накопления ионов и собственно их сканирования. Характерный цикл сканирования в режиме МС/МС включает накопление ионов, выделение первичных ионов, возбуждение (фрагментацию) первичных ионов и собственно сканирование масс-спектра (МС/МС) полученных фрагментов. В приборе «LC/MSD Trap XCT» каждый из этих процессов оптимизирован.

### Накопление ионов, накопительная ёмкость и чувствительность

#### Накопление ионов

Первым этапом анализа при помощи ионной ловушки является накопление ионов. На кольцевой электрод подаётся радиочастотное (РЧ) напряжение, вследствие чего в полости ловушки образуется мультиполь. Ионы с отношением  $m/z$ , которое ниже некоторого предельного значения, циркулируют внутри ловушки, а ионы с меньшими значениями  $m/z$  удаляются из неё. Наименьшее значение  $m/z$ , при котором ионы циркулируют в ловушке при данных частоте и амплитуде РЧ-напряжения, называют массой отсечки.

### **Накопительная ёмкость**

Накопительная ёмкость ионной ловушки – важная характеристика, влияющая на чувствительность и динамический диапазон устройства в целом. Действительно, задача состоит в том, чтобы в ловушке циркулировало как можно больше ионов, но не настолько много, чтобы проявилось вредное воздействие пространственного заряда. Пространственный заряд появляется, когда слишком много ионов (заряженных частиц) оказываются в ограниченном пространстве и непосредственной близости друг от друга. При этом имеют место процессы (как кулоновского отталкивания, так и фрикционного сцепления), приводящие к ухудшению как показателя разрешения, так и точности при измерении масс.

В приборе «LC/MSD Trap XCT» накопительная ёмкость ловушки увеличена за счёт её оптимизированной геометрии, более высокой механической стабильности и улучшенных рабочих параметров. Благодаря высокой накопительной ёмкости, увеличена чувствительность, расширен динамический диапазон, а также достигнута возможность получения высококачественных масс-спектров путем усреднения меньшего количества сканирований. Как будет описано в следующем разделе, фирма *Agilent* разработала и запатентовала «интеллектуальный» метод регулирования заполнения ионной ловушки, имеющий целью наиболее полного использования имеющейся накопительной ёмкости. Если такая возможность в масс-спектрометре не предусмотрена, приходится заполнять ловушку с осторожностью, вследствие чего в большинстве циклов сканирования фактически не используется от половины до двух третей теоретически имеющейся накопительной ёмкости ловушки.

### **Контроль заряда ионов**

Способ контроля заряда ионов (КЗИ) фирмы *Agilent* был использован в начальной модификации уже в более ранних конструкциях. Способ позволяет всегда обеспечивать заполнение ловушки оптимальным количеством ионов и предполагает интегрирование совокупного сигнала ионов, получаемого в каждом масс-спектре, и, на этой основе, подстройку продолжительности накопления следующих ионов. Например, по мере того, как возрастает концентрация аналита при элюирования пика ЖХ, увеличивается и количество ионов, генерируемых ионным источником в единицу времени. Если программа КЗИ обнаруживает больше ионов, пропорционально уменьшается и продолжительность накопления, чтобы количество ионов внутри ловушки оставалось оптимальным. Продолжительность накопления также используется для нормализации интенсивности сигнала ионов, измеряемого при записи масс-спектра. Все нужные вычисления выполняются автоматически.

В приборе «LC/MSD Trap XCT» использован оригинальный запатентованный подход к контролю заряда ионов, более сложный, чем изначальный. Он получил названия соответственно: «интеллектуальный КЗИ» (Smart ICC) и «интеллектуальная цель» (Smart Target). Интеллектуальный КЗИ основан на двух положениях:

1) воздействие пространственного заряда на ион зависит от отношения массы к заряду этого иона;

2) ионы с близкими отношениями массы к заряду занимают близкие положения внутри ионной ловушки и наиболее подвержены нежелательным воздействиям пространственного заряда.

Алгоритм «интеллектуальная цель» предполагает оценку в режиме реального времени распределения отношений массы к заряду в ионном токе для каждого масс-спектра (точнее, инерции результирующего заряда). Далее вводится соответствующая поправка в определённое пользователем базовое целевое значение, которое будет использовано для построения следующего масс-спектра. Если общее распределение ионов в текущем масс-спектре более узкое или смещено в сторону более высоких значений отношения массы к заряду, алгоритм автоматически уменьшает заданное пользователем целевое значение. Если же распределение более широкое или смещено в сторону более низких значений отношения массы к заряду, алгоритм сохраняет максимальное целевое значение. Таким образом, «интеллектуальная цель» позволяет задавать большее базовое целевое значение, приближающееся к пределу по ёмкости, а не вводить изначально поправку в сторону уменьшения (на возможное переполнение ловушки при изменении масс-спектральных условий в процессе анализа). Благодаря этому достигается оптимальное использование всей накопительной ёмкости ловушки для любого масс-спектра, а значит, повышается чувствительность по отношению к компонентам, содержащимся в малых концентрациях, достигаются наилучшие разрешение и точность по массе и хорошая линейность в широком диапазоне концентраций анализируемых веществ. Если в масс-спектрометре с ионной ловушкой приёмы типа интеллектуального КЗИ не используются, приходится задавать целевые значения с некоторым запасом, чтобы не допустить переполнения ловушки, когда в процессе анализа меняются условия распределения ионов. В этом случае не удаётся полностью использовать теоретическую накопительную ёмкость ловушки.

### ***Практические пределы накопления ионов***

Если предположить, что фоновый шум отсутствует, чувствительность ионной ловушки, в конечном счёте, определяется интенсивностью входящего ионного пучка и продолжительностью накопления ионов внутри ловушки. Практически верхний предел продолжительности накопления определяется типом анализа. Если масс-спектрометр используется как детектор ВЭЖХ, наименьшая частота выборки, необходимая для правильного представления хроматографического пика, находится обычно в пределах одной–двух записей масс-спектра в секунду. Если хроматографическое разделение не осуществляется, а ввод веществ для анализа происходит постоянно, выборка может осуществляться и реже.

### ***Чувствительность детектора в режимах МС и МС/МС***

Наиболее высокая накопительная ёмкость – не единственный фактор, от которого зависит чувствительность детектора на основе ионной ловушки.

При равных условиях удерживания и детектирования ионов на чувствительность детектора влияют как количество ионов, накопленных за цикл сканирования, так и скорость сканирования. Важную роль играет также «химический» фоновый шум, т. к. зачастую именно он определяет эффективный предел обнаружения для решения конкретной задачи. Преимущества прибора «LC/MSD Trap XCT», по сравнению с предыдущими моделями, состоят в повышенной накопительной ёмкости ловушки, увеличенной скорости сканирования и уменьшенном «химическом» фоне. Эти улучшения позволили повысить чувствительность на порядок, по сравнению с предыдущей моделью прибора.

Рис. 2 иллюстрирует показатели чувствительности прибора «LC/MSD Trap XCT» в режиме МС/МС. Оценка чувствительности осуществлена в изократическом режиме элюирования ЖХ-МС/МС при повторных вводах непосредственно в колонку холостых проб и проб резерпина в количестве 1,0 нг.

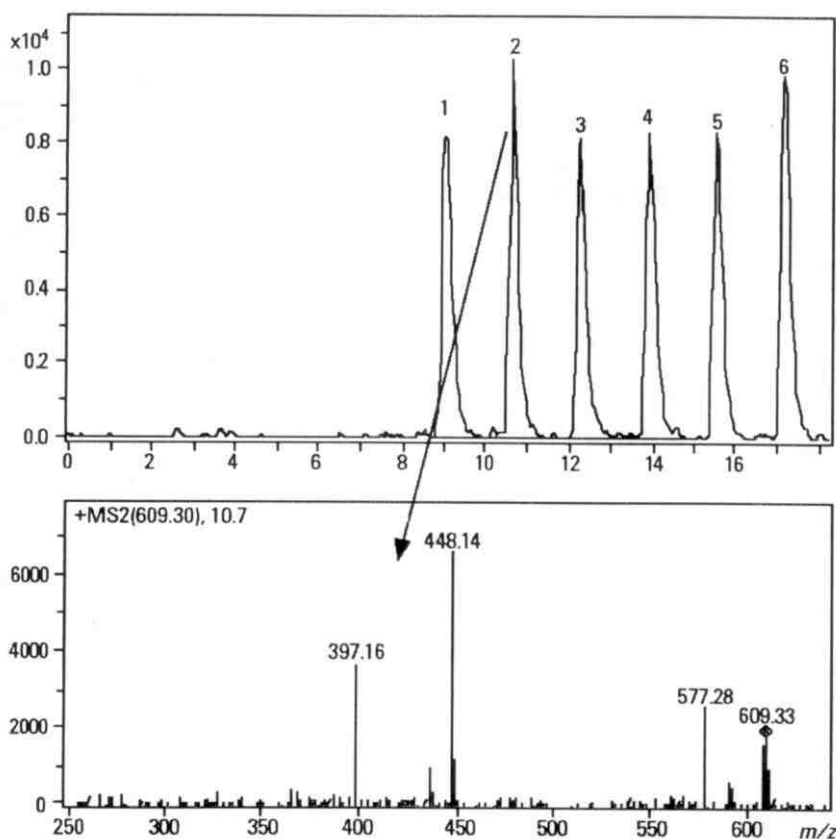


Рис. 2. Иллюстрация чувствительности прибора «LC/MSD Trap XCT» (1 нг резерпина в режиме МС/МС)

На рис. 2 показана характерная хроматограмма как сумма двух хроматограмм, выделенных по основным осколочным ионам резерпина ( $m/z$  397 и 448) из хроматограммы по полному ионному току. Масс-спектр одного из шести повтор-

ных вводов пробы репрезентативен при количестве 1 нг анализируемого вещества.

В таблице 1 приведены сводные данные о параметрах пиков (высоте, площади) и расчётные значения отношения сигнал–шум (S/N) для каждого ввода пробы. Практика показывает, что оптимизация конструкции ловушки позволяет добиваться более точных значений чувствительности детектора и воспроизводимости результатов.

Таблица 1

№ пика	Время удерживания (RT), мин	Высота	Площадь	Отношение сигнал–шум (S/N)
1	9,1	8 061	150 256	269,1
2	10,7	10 190	153 679	340,2
3	12,3	6 136	121 698	204,8
4	13,9	7 792	139 614	260,1
5	15,5	7 984	132 579	266,5
6	17,1	9 392	156 182	313,5

На рисунках 3–5 приведены данные о чувствительности прибора «LC/MSD Trap XCT» при проведении анализа больших природных биомолекул (протеомика). На рис. 3 показаны результаты разделения гидролизата бычьего сывороточного альбумина (BCA) методом ЖХ-МС/МС с непосредственным вводом в колонку всего 100 пмоль пробы.

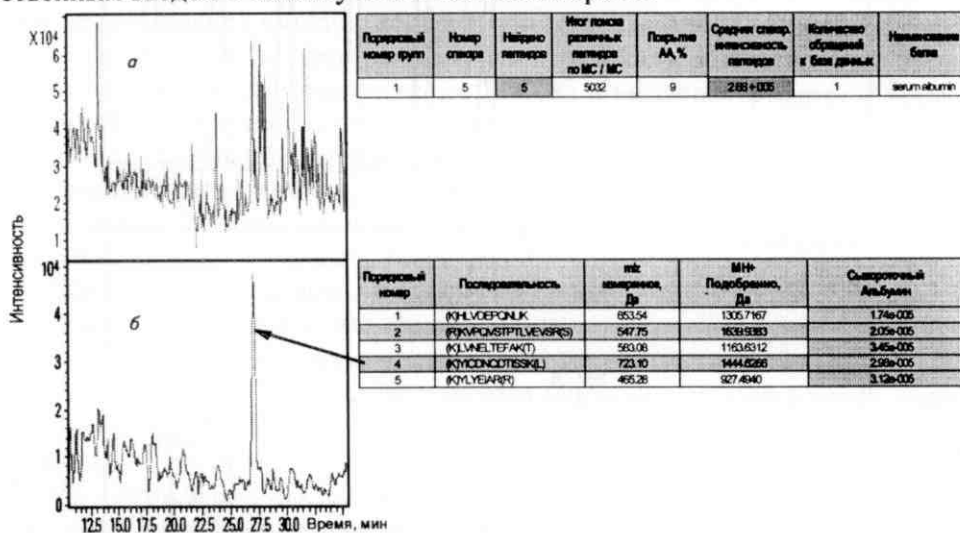


Рис. 3. Иллюстрация чувствительности прибора «LC/MSD Trap XCT» для анализа с непосредственным вводом в колонку 100 мкмоль гидролизата BCA в режиме МС/МС и самонастройкой при сборе данных

а – первичная хроматограмма: гидролизат BCA, 100 пмоль;

б – хроматограмма удаленных ионов:  $m/z = 723,1$

Анализ позволил уверенно идентифицировать БСА по базе данных белков, имеющейся в комплексе для протеомики «Spectrum Mill MS» Agilent.

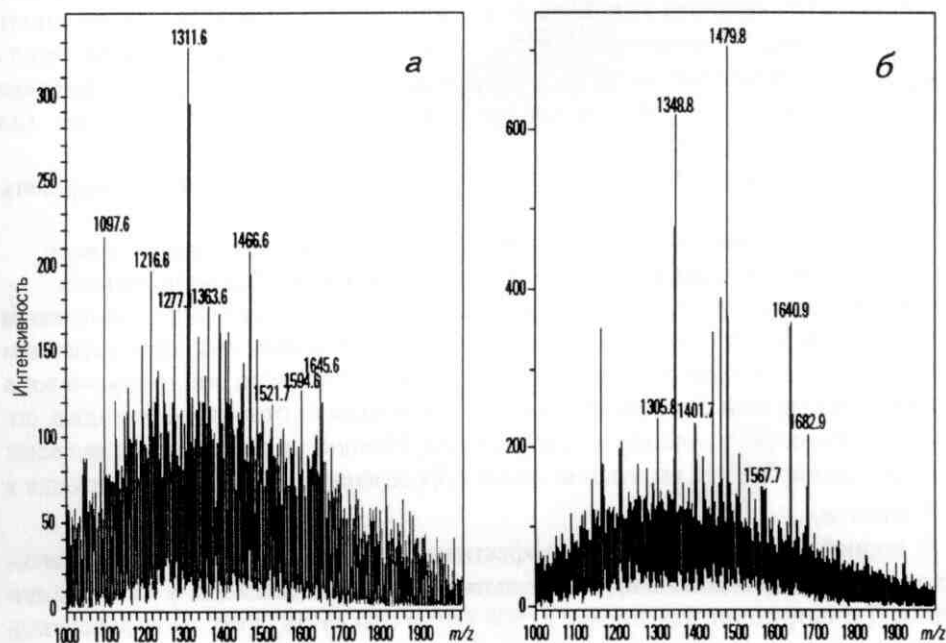


Рис. 4. Иллюстрация чувствительности «LC/MSD Trap XCT» при МС-анализе с матричной лазерно-десорбционной ионизацией при вводе 30 пмоль: а – гидролизата апотрансферина; б – гидролизата БСА

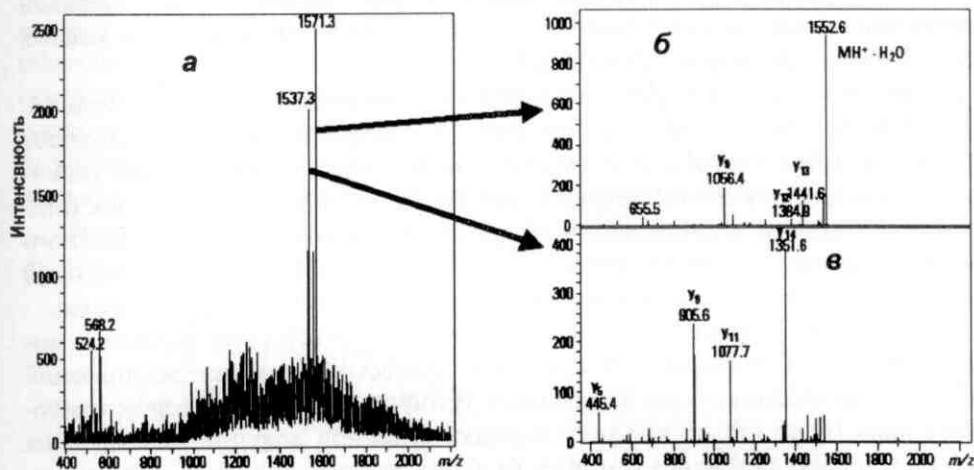


Рис. 5. Иллюстрация чувствительности прибора «LC/MSD Trap XCT» при вводе фибринопептидов

а – смесь фибринопептидов по 250 мкмоль каждого МС (усреднение по 16 опытам);  
 б – спектр (Glu)<sup>1</sup>-фибринопептида В (МС/МС,  $m/z = 1571,3$ );  
 в – спектр фибринопептида А (МС/МС,  $m/z = 1537,3$ )

На рисунках 4 и 5 показаны результаты анализа пептидов методом ЖХ-МС на приборе «LC/MSD Trap XCT» с матричной лазерно-десорбционной ионизацией при атмосферном давлении AP-MALDI. На рис. 4 показаны результаты МС-анализа гидролизатов апотрансферина и БСА, по 30 пмоль каждого, на рис. 5 – спектры МС/МС двух фибринопептидов, по 250 пмоль каждого. Приведенные данные подтверждают, что конструкция и высокая чистота системы ЖХ-МС позволили достичь возможно высоких (на сегодняшний день) результатов.

Поиск по базе данных «Spectrum Mill» позволил идентифицировать пять триптических пептидов БСА.

### **Оптимизация скорости сканирования и разрешения по массе в ионной ловушке с патентованной геометрией мультиполя**

Следующим за накоплением ионов этапом является получение масс-спектра или переход к МС/МС-анализу. На все ионы с отношением  $m/z$ , превышающим массу отсечки, действует возвращающая сила, вследствие чего они циркулируют в поле внутри ловушки. Возвращающая сила, зависящая от отношения  $m/z$  иона, определяет резонансную частоту его обращения. Именно на резонансных явлениях основано сканирование, выделение ионов определённой массы и фрагментация в МС<sup>n</sup>-анализе.

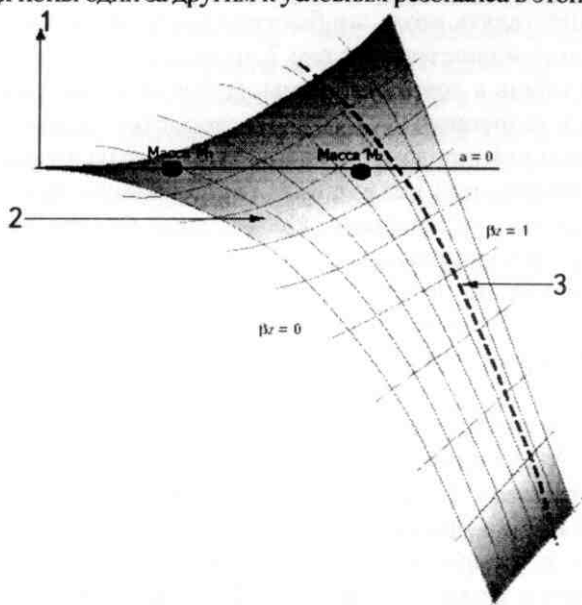
В ионной ловушке от *Agilent* эффективность анализатора и качество масс-спектров определяются геометрией мультиполя, которая заложена в её оптимизированной конструкции. Так же, как в своё время при разработках проходных квадрупольных масс-фильтров, на ранних стадиях создания ионных ловушек, конструкторы исходили из предположения, что оптимальные показатели детектора достигаются при использовании строго квадрупольной геометрии поля. Однако более поздние исследования в области масс-спектрометрии с мультипольными ионными ловушками позволили понять, как использовать нелинейные резонансные явления для улучшения показателей устройства [1].

В ионной ловушке *Agilent* формируются нелинейные поля мультиполей. При этом формы центрального кольцевого электрода и концевых полюсов оптимизированы так, чтобы величина угла асимптоты превосходила типичное для квадрупольной геометрии значение  $35,26^\circ$ , благодаря чему достигается возможность сканирования посредством нелинейного резонансного удаления ионов из ионной ловушки с мультиполем. При этом достигнуты большие скорости сканирования, чем в других аналогичных конструкциях.

Устойчивому нахождению ионов в ловушке соответствует область с амплитудами РЧ-напряжения для которой существует множество значений (прямые, проходящие через эту область устойчивости), при которых компонента поля мультиполей высшего порядка в ионной ловушке действует на ионы в условиях резонанса (см. рис. 6). Одна из точек резонанса обусловлена гексопольной компонентой мультипольного поля. В этой рабочей точке резонансная частота иона в точности равна  $1/3$  частоты РЧ-напряжения. Когда между концевыми полюсами образуется дипольное поле, создаётся возможность для резонансного возбуждения колебаний ионов внутри ловушки.



В особенности это справедливо для мультипольной точки резонанса. Масс-спектр получают, приводя ионы один за другим к условиям резонанса в этой рабочей точке.

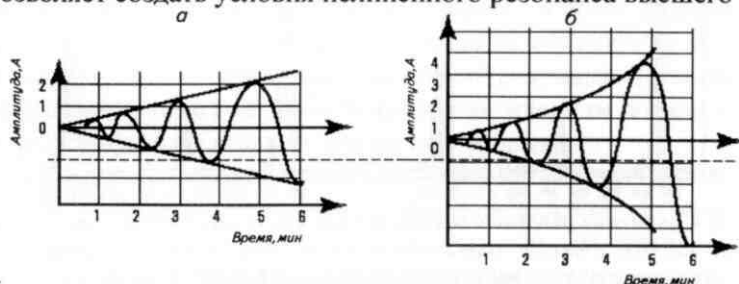


**Рис. 6. Области устойчивости на диаграмме Матье**

- 1 – Увеличение амплитуды постоянной составляющей напряжения;
- 2 – Увеличение амплитуды РЧ-составляющей напряжения;
- 3 – Резонансные условия удаления ионов из ловушки на 1/3 частоты

В этих нелинейных условиях резонанса амплитуда колебаний иона быстро возрастает до тех пор, пока он не удаляется сквозь отверстие в концевом полюсе. Гексопольная компонента мультипольного поля действует таким образом, что почти все удаляемые из ловушки ионы проходят именно сквозь отверстие в полюсе и попадают на детектор – двухкомпонентный преобразователь, состоящий из динода и электронного умножителя. Благодаря этому отпадает необходимость применения более дорогостоящего двухдетекторного решения для достижения более высокой эффективности детектирования.

Оригинальная конструкция мультипольной ионной ловушки фирмы *Agilent* позволяет создать условия нелинейного резонанса высшего порядка,

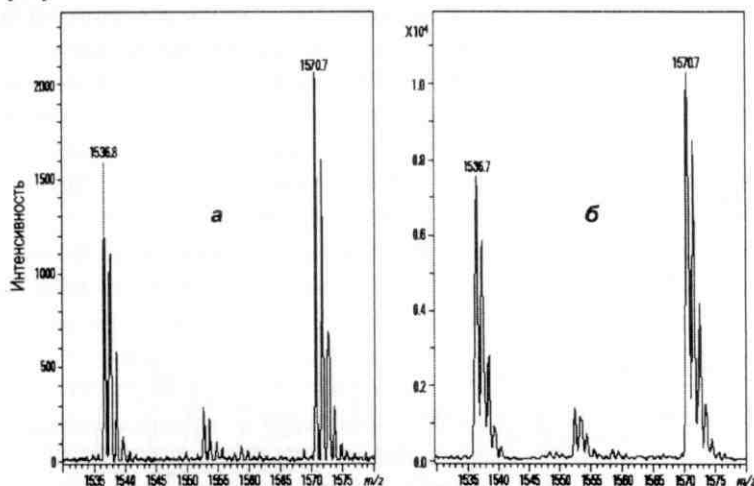


**Рис. 7. Сравнение режимов линейного и нелинейного сканирования:**  
*а* – линейное сканирование; *б* – нелинейное сканирование *Agilent*

необходимые для ускорения удаления ионов из ловушки. Условия нелинейного резонанса, реализованные в других конструкциях ионных ловушек, не позволяют осуществлять столь же быстрое удаление ионов. Сравнение двух типов конструкций иллюстрирует рис.7, из которого видно, что высокая скорость удаления ионов в ловушке фирмы *Agilent* обеспечивает отличное сочетание точности и разрешения по массе со скоростью сканирования.

При линейном сканировании значение амплитуды возрастает во времени по линейному закону, при нелинейном сканировании *Agilent* – по гиперболическому. Ионы при нелинейном сканировании быстро приобретают энергию и так же быстро удаляются из ловушки, что обеспечивает большую скорость сканирования и лучшее разрешение. Использование в приборе «LC/MSD Trap XCT» нелинейного режима обеспечивает более высокую скорость сканирования, сохраняя при этом отличное масс-спектральное разрешение.

Рис. 8 иллюстрирует хорошее разрешение, которое достигается прибором «LC/MSD Trap XCT» при приемлемой, с точки зрения практики анализа, скорости сканирования. На рис. 8а можно видеть, что ширина пика составляет менее 0,35 а. е. м. при скорости сканирования 8 100 а. е. м./с, а на рис. 8б – менее 0,6 а. е. м. при скорости 26 000 а. е. м./с. На рис. 9 показано разрешение по ионам с зарядом +2 при скорости сканирования 8 100 а. е. м./с. В отличие от конкурентных приборов, в которых для достижения разрешения такого уровня приходится сильно снижать скорость сканирования, прибор «LC/MSD Trap XCT» позволяет достичь такого разрешения при малой продолжительности цикла сканирования, приемлемой даже для самых трудных хроматографических анализов.

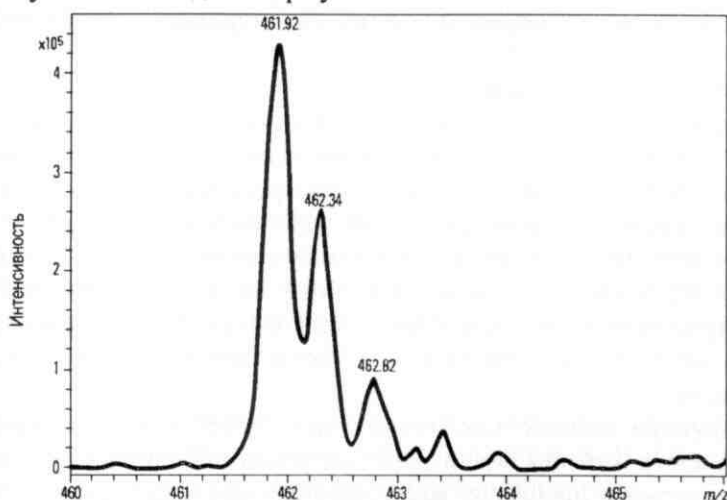


**Рис. 8.** Сравнение режимов сканирования для ионов  $Mn^+$  фибринопептидов при анализе с матричным лазерно-десорбционным возбуждением (комнатной температуре) на приборе «LC/MSD Trap XCT»

а – стандартный улучшенный режим – 8100 а. е. м./с; ширина пиков 0,31 (1536,8 и 1570,7);

б – Режим «Ультраскан» – 26 000 а. е. м./с; ширина пиков – 0,48 (1536,7) и 0,49 (1570,7)

Режим сканирования пептидов – уникальная функция, оптимизированная с целью максимизации чувствительности и возможностей секвенирования при анализе биомолекул. Здесь высокая точность определения массы первичных ионов и наилучшие условия возбуждения сочетаются с малой продолжительностью цикла, поскольку уже нет необходимости сканирования в малом диапазоне масс и при высоком разрешении. Благодаря этому, на сложных хроматограммах удаётся снять гораздо больше спектров МС/МС. Режим сканирования пептидов в сочетании с другой оригинальной разработкой фирмы *Agilent* – выбором заряда иона (рассмотрена ниже) – обеспечивает возможность анализа большого количества пептидов в единицу времени. Соответственно, можно идентифицировать большее количество белков и получать более надёжные результаты.



**Рис. 9. Разрешение ионов с зарядом +2 при анализе методом ЖХ-МС/МС денатурированного БСА**

Скорость сканирования – 8 100 а. е. м/с. Ширина пика – 0,24 полной ширины на полувысоте.

### ***Повышение воспроизводимости условий сканирования посредством фазовой синхронизации***

Ионная ловушка фирмы *Agilent* работает в условиях, когда дипольное и РЧ-поля имеют общую составляющую, обеспечивающую фазовую синхронизацию их колебаний. Запатентованное техническое решение в части фазовой синхронизации дипольного и РЧ-напряжений обеспечивает постоянную воспроизводимость (от сканирования к сканированию) условий резонанса. Таким образом, фазовая синхронизация позволяет добиться высокой точности по массе и разрешения при усреднении по нескольким циклам сканирования.

### ***Сокращение продолжительности цикла сканирования***

Продолжительность цикла сканирования радикально сказывается на показателях масс-спектрометра, используемого как детектор для ВЭЖХ. Именно продолжительность цикла сканирования определяет, сколько масс-спектров можно записать в единицу времени, а значит, насколько хорошо

будет отображена форма хроматографического пика. Более того, чем больше спектров регистрируется в единицу времени, тем больший динамический диапазон и выше сходимость измерений площади пика (меньше среднеквадратичное отклонение RSD). Скорость сканирования в приборе «LC/MSD Тгар ХСТ» – 26 000 а. е. м./с и ширина пика – менее 0,6 а. е. м – на сегодня непревзойдённые показатели для серийно выпускаемых приборов.

### ***Масс-спектрометрия фрагментов (МС/МС)***

МС/МС предполагает два дополнительных этапа в цикле масс-анализа: выделение и фрагментацию первичных ионов. Таким образом, цикл масс-анализа в МС/МС выглядит так: накопление ионов, выделение первичных ионов, фрагментация первичных ионов, сканирование осколочных ионов МС/МС.

#### ***Выделение ионов по массе***

Выделение по массе осуществляется по-разному в приборах МС/МС разных типов. В системах с тройным квадруполем и квадрупольно-время-пролётной (Q-TOF) первый квадруполь настроен на определённое значение  $m/z$  так, что дальше передаются только первичные ионы заданной массы. В системах с ионной ловушкой из ловушки удаляются все ионы, кроме первичных, представляющих интерес. В отличие от системы с тройным квадруполем, разрешение, с которым ионная ловушка выбирает первичные ионы, слабо сказывается на количестве ионов, впоследствии претерпевающих фрагментацию.

Конструкция ионной ловушки фирмы *Agilent* позволяет выделять по массе отдельные изотопы анализируемых веществ с единичным зарядом по всему стандартному диапазону масс. Возможность выделения ионов с высоким разрешением обеспечивается формированием на концевых полюсах диполя с высокой точностью.

#### ***Фрагментация***

После выделения по массе в ионной ловушке остаются только заданные первичные ионы. Фрагментация этих ионов осуществляется за счёт соударений с частицами газообразного гелия внутри ловушки. Этот процесс называется ударной диссоциацией. Чтобы начать фрагментацию, на концевые полюсы ловушки подают дополнительное напряжение. Частота этого напряжения находится в узком диапазоне, соответствующем резонансной частоте в области  $m/z$  ионов, фрагментацию которых нужно осуществить. По мере того, как первичные ионы приобретают энергию, их колебания усиливаются, ионы распределяются всё дальше от центра ловушки. Они также претерпевают соударения с частицами газообразного гелия и начинают диссоциировать.

На протекание этого процесса оказывают существенное влияние четыре фактора. ***Первый*** – напряжённость удерживающего РЧ-поля в ловушке. Для конкретного значения  $m/z$  напряжённость удерживающего поля прямо определяет глубину потенциальной ямы, в которой удерживается ион. Если потенциальная яма

неглубока, то ионы, приобретая энергию в процессе резонансного возбуждения, легко покидают ловушку без фрагментации. Эффективная глубина потенциальной ямы определяется амплитудой РЧ-напряжения на центральном кольцевом электроде. Как уже говорилось, эта величина зачастую выражается через наименьшее значение  $m/z$  ионов, которые могут удерживаться ловушкой при данном РЧ-напряжении, т. н. массу отсечки.

При МС/МС-анализе с ионной ловушкой приходится выбирать между удерживанием первичных ионов в ловушке в процессе фрагментации и возможностью наблюдать осколочные ионы малой массы. Если повысить амплитуду напряжения на кольцевом электроде, первичные ионы удерживаются лучше, но масса отсечки осколочных ионов становится выше. По умолчанию в приборе «LC/MSD Trap XCT» масса отсечки составляет 27 % от массы первичного иона. Для большинства соединений это – разумный компромисс, тем не менее, программное обеспечение прибора оставляет достаточную свободу выбора оператору, чтобы при необходимости задать меньшую массу отсечки.

**Второй** важный фактор, влияющий на фрагментацию, – это ширина спектра резонансных частот напряжения, прилагаемого к концевым полюсам. Если она равна нулю, фрагментация вообще не имеет места. Если она слишком велика, из ловушки удаляются все ионы. Оптимизация ширины этого спектра частот означает, что первичным ионам будет передаваться оптимальная энергия, благодаря чему их фрагментация достигает максимума, а потери ионов из ловушки минимизируются. В приборе «LC/MSD Trap XCT» имеются два оригинальных программных решения, обеспечивающих наилучшую фрагментацию любой молекулы. Это – модули «Smart Frag» (интеллектуальная фрагментация) и «Adjustable Fragmentation Width» (регулируемый диапазон фрагментации). Они будут рассмотрены ниже.

**Третий** фактор – давление гелия в ловушке. При более высоком давлении первичные ионы соударяются с частицами гелия чаще. Однако при этом время накопления первичными ионами энергии между соударениями меньше, значит, для достижения того же уровня возбуждения требуется большая амплитуда.

**Четвёртый** фактор – продолжительность процесса возбуждения. В отличие от более высокоэнергетичных процессов, которые встречаются в приборах с квадрупольными и секторными магнитами, в масс-детекторах с ионными ловушками ударная диссоциация достигается посредством процесса так называемой активации многократным соударением. Поскольку это – процесс низкоэнергетичный, продолжительность возбуждения обычно задаётся в пределах от 20 до 60 мс.

Преимуществом использования диссоциации за счёт многократных низкоэнергетичных соударений является упрощённый спектр МС/МС. Это заметно по МС/МС-спектру пептидов на приборе с ионной ловушкой: поскольку ненужная фрагментация сведена к минимуму, фрагменты пептидов серий *b*- и *y*- значительно более выражены и характерны. Соответственно, результаты проще использовать для секвенирования пептидов (рис. 10).

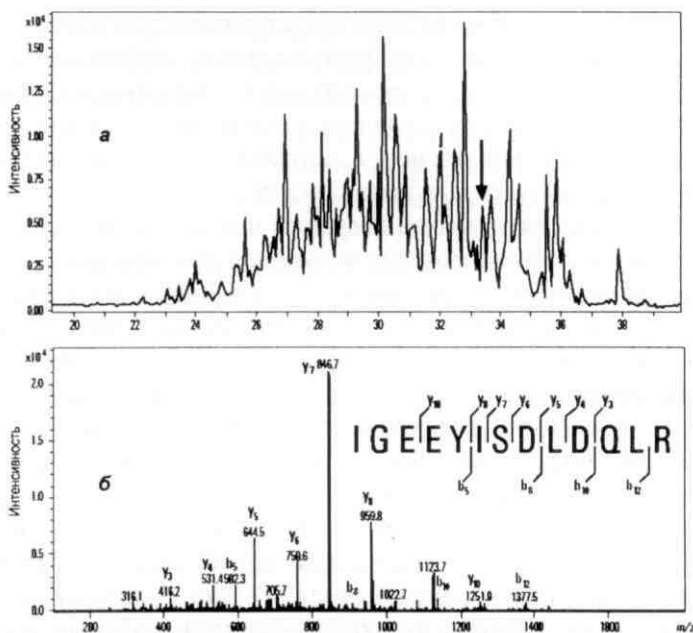


Рис. 10. Иллюстрация хроматограммы триптического гидролизата смеси 16 белков  
 а – первичная хроматограмма  $m/z$  100–2000  $\pm$  All MS;  
 б – спектр MS/MS фосфорилазы В первичных двухзарядных ионов  $m/z$  776,6 33,3–33,4 мин

### Оптимизация диапазона масс MS и MS/MS-сканирования

Прибор «LC/MSD Trap XCT» позволяет задавать диапазоны сканирования в режимах MS и MS/MS независимо, что также рассчитано на минимизацию продолжительности цикла сканирования. Это – полезная возможность для многих типов анализа, в частности, анализа пептидов, где представляющий интерес диапазон масс в режиме MS/MS обычно гораздо шире, чем в режиме MS. Если задать различные диапазоны масс, сканирование осуществляется быстрее и без потерь ценной информации, при этом химический шум вне диапазона масс, представляющего интерес, устраняется.

### Получение спектров MS/MS/MS и MS<sup>n</sup>

После фрагментации цикл: выделение по массе – фрагментация можно повторять. Будет получен спектр MS/MS/MS или MS<sup>3</sup>. Повторяя далее цикл: выделение по массе – фрагментация до сканирования, получают MS<sup>4</sup> и т. д. до MS<sup>n</sup>. Прибор «LC/MSD Trap XCT» реализует получение спектра до MS<sup>11</sup>. Циклы выделения по массе и фрагментации определяющим образом влияют на эффективность анализа на последующих этапах MS. Реализация MS<sup>n</sup> – одно из важнейших преимуществ применения ионной ловушки, т. к. этот режим даёт возможность постепенно фрагментировать молекулу аналита и полнее определять её структуру.

### *Автоматическая самонастройка при сборе данных в режиме МС<sup>n</sup>*

Прибор «LC/MSD Trap XCT» фирмы Agilent отличается высокой степенью автоматизации при управлении МС<sup>n</sup> в реальном масштабе времени. Ручное управление МС<sup>n</sup>-анализом крайне трудоёмко. Представим себе хроматограмму с десятью пиками, где для МС/МС-анализа нужно выделить основной ион каждого пика. На следующем этапе МС/МС должен быть выделен основной осколочный ион и т. д. Вручную выбор должен осуществляться либо в пределах времени выхода размытого хроматографического пика, либо в нескольких опытах с последовательными вводами проб. Из этого очевидно следует важность автоматизации при МС<sup>n</sup>-анализе. При её наличии управление осуществляется на основе оценки в режиме реального времени данных регистрируемого масс-спектра и применения критериев выбора первичных ионов, предварительно заданных оператором. Прибор «LC/MSD Trap XCT» реализует до пяти этапов с автоматизированным (МС<sup>n</sup>) и до одиннадцати (МС<sup>n</sup>) с ручным управлением.

Функции автоматизации МС<sup>n</sup> прибора «LC/MSD Trap XCT» значительно упрощают эксплуатацию. До начала анализа оператор задаёт типы ионов, по которым нужен сбор данных МС<sup>n</sup>. Это могут быть конкретные целевые ионы, ионы с содержанием свыше порогового значения или ионы с определённым зарядом. Оператор может исключить некоторые типы ионов, например, ионы растворителя или другие фоновые ионы, а также пики изотопов. Можно исключить и те ионы, для которых спектр МС/МС уже был снят в аналитическом опыте. Табл. 2 иллюстрирует функции самонастройки прибора «LC/MSD Trap XCT» при сборе данных. Эти функции позволяют повысить эффективность анализа за счёт увеличения количества этапов сканирования, на которых можно получить существенную информацию.

Таблица 2

#### *Функции самонастройки при сборе данных в режиме МС<sup>n</sup>*

<b>Функция самонастройки</b>	<b>Преимущество</b>
Количество (N) наиболее распространённых первичных ионов	Увеличивается количество неповторяющихся первичных ионов, для которых выполняется сбор данных. Особенно полезно в случае одновременного элюирования нескольких пиков
Исключение изотопов	Предотвращается сбор ненужных данных МС/МС изотопов ( <sup>13</sup> C и пр.)
Статический перечень включения	Обеспечивается сбор данных по целевым ионам, даже при их небольшом содержании
Статический перечень исключения	Предотвращается сбор данных МС/МС по ионам растворителя и других фоновых компонентов
Статический перечень предпочтения <sup>1</sup>	Обеспечивается сбор данных по целевым ионам, если они присутствуют; если нет, разрешён сбор данных по другим ионам

Функция самонастройки	Преимущество
Выбор предпочтительного заряда <sup>1</sup>	Обеспечивается выбор ионов пептидов с зарядом 2 – с целью повышения качества данных МС/МС
Активное исключение – повторный подсчёт	Увеличивается количество неповторяющихся данных посредством исключения сбора данных МС/МС по одному и тому же иону в количестве повторений свыше заданного оператором
Активное исключение – продолжительность исключения	Из перечня активного исключения удаляются ионы по прошествии заданного оператором времени, с целью возобновления сбора данных, если имеется более одного хроматографического пика
Пороговое значение – абсолютное	Сбор данных осуществляется только по ионам, содержание которых превышает заданное оператором абсолютное значение <sup>1</sup>
Пороговое значение – относительное	Сбор данных осуществляется только по ионам, отношение содержания которых к содержанию ионов, наибольшему в МС-спектре, превышает заданное оператором значение <sup>1</sup>
Пороговое значение – абсолютное	Сбор данных осуществляется только по ионам, содержание которых превышает заданное оператором абсолютное значение <sup>1</sup>
Пороговое значение – относительное	Сбор данных осуществляется только по ионам, отношение содержания которых к содержанию ионов, наибольшему в МС-спектре, превышает заданное оператором значение <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Только в моделях SL и ХСТ

Две чрезвычайно полезные функции самонастройки при сборе данных (табл. 2) заслуживают особого упоминания (конкурентные приборы такими функциями не обладают).

**Первая** включает статический перечень. Он даёт возможность оператору задать перечень ионов для МС<sup>n</sup>-анализа так, чтобы эксперимент осуществлялся по этим ионам независимо от интенсивности их сигналов по отношению к остальной части пробы. Это весьма полезно при изучении компонентов пробы, содержащихся в малых количествах, например, метаболитов и примесей. Если эти ионы не обнаружены при первом сканировании первичных ионов, МС<sup>n</sup> переходит к обычной работе с первичными ионами находящимися в более высоких концентрациях.

**Вторая** оригинальная функция – выбор предпочтительного заряда ионов. Она используется, в первую очередь, для целей анализа пептидов, где целесообразно для МС/МС-анализа выбирать ионы с зарядом больше единицы. Такие ионы обычно дают более богатые МС/МС-спектры, по которым можно получить больше информации для секвенирования, а при определении веществ заново обеспечить более высокую достоверность результатов поиска по базе данных. Выбор предпочтительного заряда ионов может осуществляться по ходу анализа. Если ионы с зарядами +2 и +3 не обнаружены, МС/МС переходит к обработке ионов с зарядом +1.



### *Получение максимума данных фрагментации при меньшем количестве этапов MS<sup>n</sup>*

Как уже было показано, MS/MS-спектры, полученные на приборах с ионной ловушкой, как правило, содержат меньше фрагментов, чем спектры, полученные на приборах с тройным квадруполем. Во многих случаях простота MS/MS-спектра прибора с ионной ловушкой представляет собой достоинство, особенно, когда необходимо реализовать множество этапов MS/MS управляемым образом, чтобы отслеживать пути фрагментации с целью определения структуры молекул. В других случаях желательнее быстрее получить как можно больше данных по фрагментации, но не прибегая к режиму MS<sup>n</sup>. Для таких условий прибор «LC/MSD Trap» обладает двумя оригинальными функциями, способствующими фрагментации ионов. Это режимы ударной диссоциации (SmartFrag) и регулируемый диапазон фрагментации (AFW).

При ударной диссоциации амплитуда напряжения возбуждения изменяется по линейному закону в процессе фрагментации, так что каждый первичный ион с максимальной вероятностью набирает энергию, необходимую для фрагментации без его перевозбуждения и удаления из ловушки. В результате мы имеем оптимизированный спектр, полученный в результате ударной диссоциации, отличающийся высокой эффективностью и образованием большого количества фрагментов. При этом исключается необходимость трудоёмких экспериментов по оптимизации для конкретных соединений. Кроме того, режим SmartFrag гораздо более универсален с точки зрения применения для разнообразных химических соединений, чем другие методы, в которых амплитуда напряжения активации просто задаётся как простейшая функция массы или отношения массы к заряду.

Рис. 11 иллюстрирует сравнение MS/MS-спектров пептидов, полученных при оптимизации вручную и в режиме SmartFrag. Усреднённые MS/MS-спектры были получены на первичных ионах с зарядом +2 и  $m/z$  649,3 при непосредственном вводе ангиотензина I с концентрацией 1,6 пмоль/мкл со скоростью 15 мкл/ч. Верхний спектр получен при оптимизированной вручную амплитуде фрагментации 1,55 В, функция SmartFrag отключена. Нижний спектр получен при первоначальной амплитуде фрагментации 1,3 В в режиме SmartFrag (30–200 %). Нетрудно видеть, что режим SmartFrag даёт столь же богатый масс-спектр без необходимости трудоёмкой оптимизации параметров вручную.

Регулируемый диапазон (до 300 а. е. м.) используется для расширения диапазона масс фрагментируемых ионов в районе некоторой заданной центральной точки. Этот приём позволяет получить больше информации о структуре для классов соединений, где во всех прочих случаях доминируют низкоэнергетичные пути диссоциации, например, потеря воды, что в обычных случаях ограничивает информативность MS/MS-спектра. Режим AFW оставляет большую свободу оператору, чем другие алгоритмы, в которых диапазон масс имеет фиксированное значение 20 а. е. м.

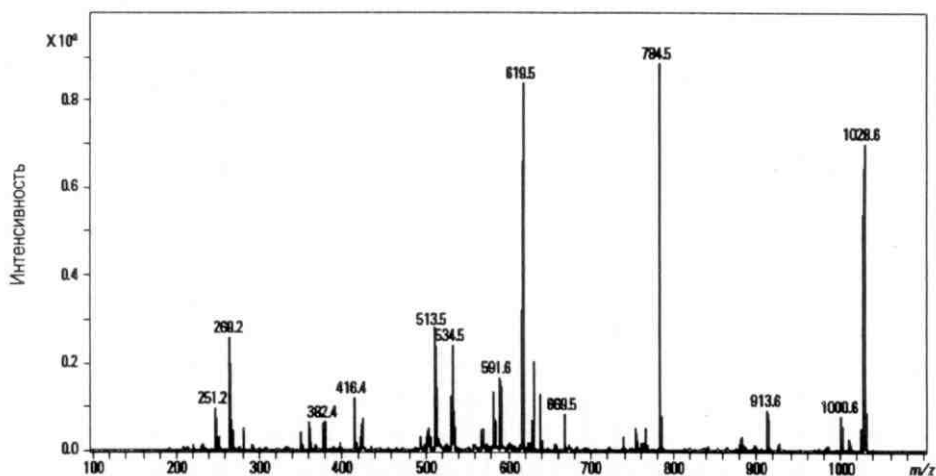
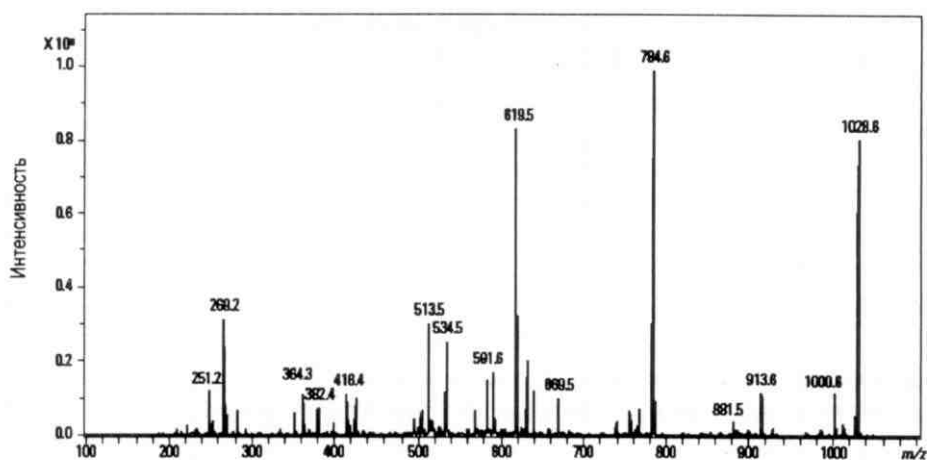


Рис. 11. Сравнение МС/МС-спектров, полученных при ручной оптимизации амплитуды фрагментации (вверху) и в режиме SmartFrag (внизу)

### Контроль заданной реакции и нескольких реакций

Рассмотрев применение ионной ловушки в качественном анализе (для исследования структуры), приведем возможности её применения в количественном анализе. В ряде случаев, например, при анализе целевого соединения, единственная задача состоит в том, чтобы контролировать отдельный осколочный ион, характерный для пути фрагментации определяемого вещества. Соответствующий приём называют «контроль заданной реакции» (selected reaction monitoring – SRM).

Приборы серии «LC/MSD Trap» позволяют реализовать контроль заданной реакции двумя способами. Благодаря тому, что конструкции ионной ло-

вушки фирмы *Agilent* присущи высокая скорость сканирования в сочетании с высокой чувствительностью, масс-спектр осколочного иона может быть получен в широком диапазоне масс. Получив такой масс-спектр, для количественного определения можно использовать сигнал как отдельного осколочного иона, так и сумму сигналов от нескольких ионов, с целью повышения эффективности детектирования. При регистрации полного МС<sup>2</sup>-спектра для количественного определения не наблюдается проигрыша по чувствительности, по сравнению режимом измерения одного-двух осколочных ионов, в тоже время, полный спектр осколочных ионов повышает уверенность в идентификации определяемого вещества.

Во многих случаях при проведении количественного анализа в режиме МС/МС регистрацию выполняют как по иону аналита, так и по элюируемым одновременно с ним ионам внутреннего стандарта, чтобы иметь возможность внести поправку на изменчивость отклика прибора, условий пробоподготовки и влияния матрицы. Иногда в этом случае говорят о контроле нескольких реакций (multiple reaction monitoring – MRM). Приборы серии «LC/MSD Trap» могут работать в обоих режимах.

### **Детектирование ионов и снижение шума**

Для детектирования ионов, удалённых из ловушки, используется высокоэнергетичный детектор-преобразователь, включающий диод и электронный умножитель. Как уже было сказано, в конструкции приборов серии «LC/MSD Trap» достаточно только одного детектора. Особенностью детектора является увеличение чувствительности прибора с ростом отношения  $m/z$  ионов. С целью уменьшения случайного шума выходной сигнал детектора модулируется так, чтобы усиливались сигналы только в той части периода основного РЧ-напряжения именно в тот момент, когда имеет место удаление ионов из ловушки. Этот промежуток времени хорошо определён благодаря запатентованному способу фазовой синхронизации РЧ-напряжения на основном кольцевом электроде ловушки и дипольного напряжения возбуждения. В результате удаётся добиться высокой чувствительности детектирования при низком уровне шума.

### **Переключение полярности**

Зачастую желательно получить спектры положительных и отрицательных ионов в одном аналитическом опыте. Это даёт возможность сэкономить время и материал пробы, если предпочтительный режим ионизации заранее неизвестен, либо если проба содержит смесь соединений, ионизируемых в разных режимах. Прибор «LC/MSD Trap ХСТ» позволяет быстро (примерно через каждые 1,25 с) менять полярность и реализовать полный цикл МС по положительным и отрицательным ионам. В отличие от более медленной смены полярности в конкурентных приборах, такая высокая скорость изменения полярности хорошо согласуется с хроматографической шкалой времени, то есть позволяет описывать пики достаточным количеством точек, чтобы надлежащим образом охарактере-

ризовать и описать элюируемые пики [2]. При регистрации веществ, отклик которых зависит от полярности ионов, можно задать различные наборы параметров, чтобы в каждом режиме ионизации обеспечить максимальные чувствительность и качество данных.

### **Функции настройки для ускорения работы**

#### ***Автоматическая калибровка оси масс и фирменные настроечные смеси***

Все приборы серии «LC/MSD Trap» поставляются вместе со сложным программным обеспечением, позволяющим ускорить работу за счёт автоматизации калибровки оси масс на этапах сканирования, выделения и фрагментации – в режиме не только стандартного, но и расширенного диапазона масс. Для дальнейшего упрощения процедуры калибровки к каждому прибору серии «LC/MSD Trap» прилагаются фирменные калибровочные растворы («настроечные смеси»). В программном обеспечении имеются перечни масс ионов для каждой такой смеси. Для случаев, когда требуется особый калибровочный раствор, программное обеспечение даёт возможность выполнить калибровку в диалоговом режиме – по пользовательскому перечню масс ионов. По окончании калибровки прибор работает весьма устойчиво и крайне редко нуждается в повторной калибровке.

#### ***Интеллектуальная установка параметров***

Хотя иногда желательно управлять всеми параметрами ионной ловушки, обычно в этом нет необходимости. Если оператору нужно настроить прибор как можно быстрее, используется режим интеллектуальной установки параметров (Smart parameter setting – SPS), в котором ряд параметров прибор задаёт автоматически. В этом режиме программное обеспечение устанавливает параметры ионной ловушки на основании введённых пользователем данных об устойчивости соединения, массе целевого иона, предполагаемом распределении осколочных ионов. Благодаря этому настройка ионной ловушки осуществляется проще и быстрее, а кроме этого, при автоматизированной работе МС<sup>П</sup> обеспечивается оптимальная чувствительность при выборе первичных ионов по ходу анализа.

#### ***Автоматическая оптимизация параметров в зависимости от соединения***

Если использование интеллектуальной установки параметров нецелесообразно по каким-то причинам, для ускорения настройки прибора можно перейти в режим оптимизации параметров в зависимости от соединения (*Smart Ramp*). Режим *Smart Ramp* позволяет оператору задать конкретную массу для оптимизации капилляра и параметров линз ионного источника. В этом случае прибор автоматически линейно изменяет напряжение на элементах источника и выбирает оптимальные его значения. Пользователь может оптимизировать параметры ионной оптики, вводя в прибор либо настроечные смеси фирмы *Agilent*, либо растворы аналитов, представляющих интерес.

## Функции анализа данных, ускоряющие работу

### Дерево навигации

Приборы с ионной ловушкой могут генерировать большие массивы данных МС/МС и МС<sup>n</sup> за весьма короткое время. Чтобы эффективно использовать эти данные, программы анализа должны обладать достаточным «интеллектом» для организации и извлечения этих данных. В приборах серии «LC/MSD Trap» все результаты МС<sup>n</sup> аналитического опыта хранятся в одном файле, с целью упрощения работы с ним. Дерево навигации анализа данных даёт пользователю возможность быстро находить требуемые результаты измерений. Иерархическая структура дерева навигации содержит ряд узлов для хроматограмм и спектров и позволяет одновременно открывать несколько файлов. Фильтры для результатов измерений позволяют извлекать и организовывать конкретные подмножества данных.

### Поиск соединений (Find Compounds)

Функция «Find Compounds» (поиск соединений) программного обеспечения приборов серии «LC/MSD Trap» – оригинальное мощное средство поиска и просмотра данных сложных опытов МС<sup>n</sup>. Функция «Find Compounds» автоматизирует процесс поиска отдельных соединений при хроматографическом анализе и анализе с непосредственным вводом в масс-спектрометр. При этом прибор находит в хроматографическом пике взаимосвязанные МС- и МС<sup>n</sup>-спектры. Дополнительно можно построить ионные хроматограммы для каждого из первичных ионов и поместить их в папку хроматограммы. Кроме того, прибор генерирует усреднённые спектры по взаимосвязанным данным МС первичных ионов и МС<sup>n</sup> осколочных ионов и размещает их по иерархическому принципу в папке спектров соединения. Возможность автоматического поиска соединений и организации данных экономит многие часы работы при необходимости поиска релевантной информации в сложных файлах данных. На рис. 12 показано дерево навигации и функция «Find Compounds» программного обеспечения для анализа данных приборов серии «LC/MSD Trap».

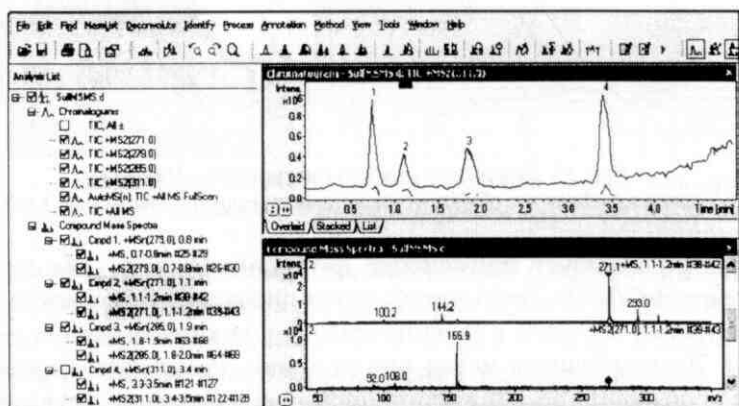


Рис. 12. Дерево навигации и функция «Find Compounds»

упрощают и ускоряют поиск важной информации в сложных наборах данных МС<sup>n</sup>

### Функция автоматического выявления компонентов пробы

В приборах серии «LC/MSD Trap» предусмотрен в качестве дополнительной функции алгоритм «Dissect», позволяющий быстро, в автоматическом режиме, находить в сложных массивах масс-спектральных данных сигналы компонентов пробы, содержащиеся в малых количествах. При работе по этому оригинальному алгоритму генерируются и интегрируются ионные хроматограммы (extracted ion chromatogram – EIC), извлечённые из общей хроматограммы по полному ионному току по каждой массе, а затем принимается решение (на основании симметрии, ширины и других параметров пиков), какие из пиков действительно являются хроматографическими. Далее программа использует принципы нечёткой логики для удаления всплесков шума и группировки пиков по соединениям. На следующем этапе алгоритм принимает решение по данным о ширине пика, его интенсивности, симметрии, отношению сигнал–шум (S/N) и времени удерживания, относятся ли два пика масс-спектра к одному или двум разным соединениям. В заключение алгоритм генерирует чистый масс-спектр для каждого соединения, частично элюируемого совместно с другим, посредством расчёта интенсивности MS-сигналов от этих соединений, вычитания фонового спектра и ввода поправки на перегрузку по интенсивности MS-сигнала.

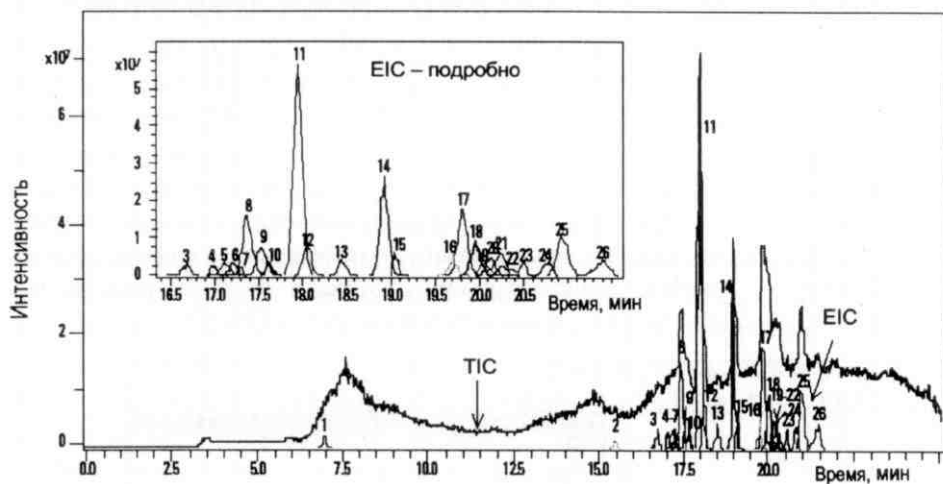


Рис. 13. Результаты работы алгоритма «Dissect»  
(26 пиков метаболитов обнаружены автоматически – менее чем за 1 мин)

Рис. 13 иллюстрирует применение функции «Dissect» для анализа на приборе серии «LC/MSD Trap» метаболитов препарата-антагониста альфа<sub>1A</sub>-адренореактивных веществ в печени крысы. Функция «Dissect» позволяет обнаружить 26 метаболитов менее чем за 1 мин. Результаты хорошо согласуются с полученными за 1 ч кропотливой идентификации вручную. Более того, несмотря на наличие множества совместно элюируемых компонентов, масс-спектры, реконструированные алгоритмом, хорошо разрешены.

## Программа «QuantAnalysis»

Приборы серии «LC/MSD Trap» оснащаются программой «QuantAnalysis», значительно упрощающей и ускоряющей получение количественных результатов. Все данные о пробах серии опытов могут быть быстро импортированы в программу для пакетной обработки. Программа выводит данные на экран в трёх основных вариантах представления: в виде рабочей таблицы, калибровочной кривой и хроматограммы-спектра. Рабочая таблица предназначена для задания набора и просмотра выводимых результатов. Структура таблицы может быть изменена пользователем и занесена в память. Три варианта представления количественных результатов могут выводиться на экран по отдельности или совместно, все они динамически связаны и обновляются автоматически. При повторном интегрировании пика стандарта калибровочная кривая и результаты в рабочей таблице динамически обновляются. Рис. 14 иллюстрирует три варианта представления данных программой «QuantAnalysis».

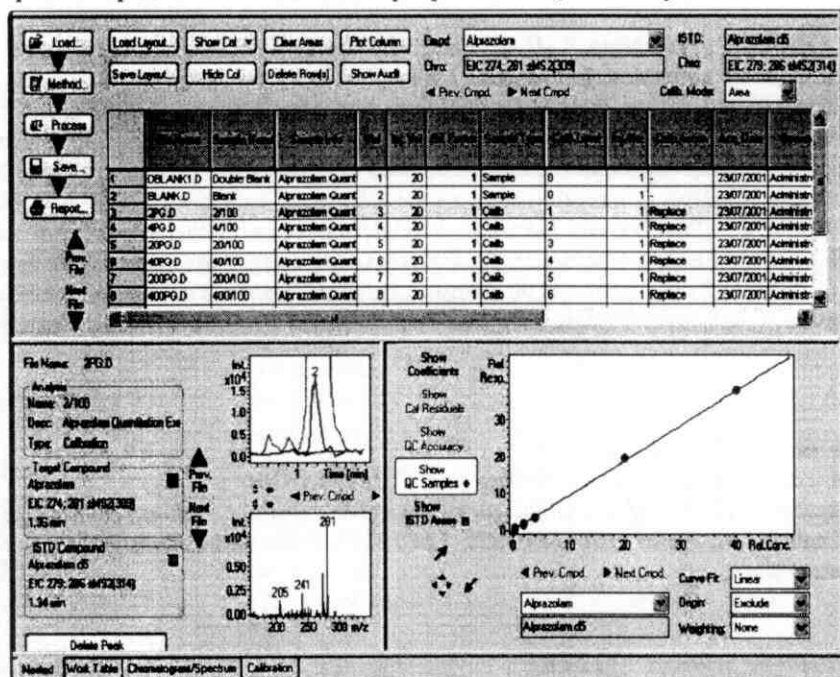


Рис. 14. Иллюстрация применения функции «Dissect» для анализа метаболитов препарата-антагониста 1A-адренореактивных веществ в печени крысы

## Дополнительные средства автоматизации и настройки прибора

Программное обеспечение масс-детекторов серии «LC/MSD Trap» фирмы Agilent имеет дополнительные средства автоматизации и настройки оператором. Например, пользователь может корректировать вид представления результатов анализа данных, изменяя расположение и свойства отдельных рамок графики и текста. Написание сценариев на языке Visual Basic – мощное средство автоматизи-

зации анализа данных и составления отчётов. Программное обеспечение включает также программу оформления отчётов для составления оператором отчёта на основе любого из широкого спектра комплектных шаблонов или самостоятельно, без опоры на шаблон. Все эти средства упрощают для пользователя получение результатов в желаемом виде.

### **Заключение**

Прибор «LC/MSD Trap XCT» фирмы *Agilent* – результат многолетних постоянных усовершенствований. В нём сочетаются последние достижения в разработке ионных ловушек и мощные средства автоматизации и анализа данных, благодаря чему достигаются непревзойдённые показатели ЖХ-МС<sup>n</sup> и простота эксплуатации.

### **Литература**

1. *Franzen J., Gabling R.-H., Schubert M., Wang Y.* “Nonlinear Ion Traps” (Нелинейные ионные ловушки) in Practical Aspects of Ion Trap Mass Spectrometry. Volume I. Fundamentals of Ion Trap Mass Spectrometry; *March R. E., Todd J. F. J.*, Eds. (Практические аспекты масс-спектрометрии с ионными ловушками. Т. 1. Теоретические основы масс-спектрометрии с ионными ловушками); CRC Press: Boca Raton, 1995, pp. 49–167.

2. *Miller C.* “Positive and Negative Mode Analysis with the Agilent 1100 Series LC/MSD Trap” (Анализ в режимах положительных и отрицательных ионов на приборах «LC/MSD Trap» серии 1100 фирмы *Agilent*); *Agilent Technologies* publication (Техническая информация фирмы *Agilent Technologies*) № 5988-7784EN, September, 2002.

*Фирма “Agilent Technologies”,*

*USA, 2850 Centerville Road Wilmington, DE 19808-1610*

*Фирма “АЛСИ” – официальный дистрибьютор фирмы “Agilent Technologies”*

*в Украине, тел./факс (044) 245 3224, 246 1017, e-mail: instruments@alsi.ua,*

*www.alsi.ua*

*Надійшла до редакції 22.12.04.*