

УДК 621.384.668.8: 537.534.3

© П. С. Корякин, И. А. Краснов, Н. В. Краснов, М. З. Мурадымов, М. Н. Краснов

ИОН-ДРЕЙФОВЫЙ СПЕКТРОМЕТР С ЭЛЕКТРОРАСПЫЛИТЕЛЬНЫМ ИСТОЧНИКОМ ИОНОВ КАК ДЕТЕКТОР ЖИДКОСТНОГО ХРОМАТОГРАФА

Экспериментально показана возможность использования ион-дрейфового спектрометра в качестве детектора жидкостного хроматографа на примере регистрации спектров подвижности разделенного на жидкостном хроматографе "Милихром А-02" раствора тестовой смеси бацитрацина А и альфа и бета субъединиц гемоглобина человека. Компоненты хроматограммы тестовой смеси для сравнения зарегистрированы при помощи оптического УФ-детектора хроматографа на длине волны 214 нм и спектрометра ионной подвижности с электрораспылителем и источником ионов при потоке элюента 100 мкл/мин при нормальных условиях.

Кл. сл.: спектрометр ионной подвижности, жидкостный хроматограф, электрораспыление растворов

ВВЕДЕНИЕ

Более сорока лет интенсивно развивается метод плазменной хроматографии [1] в различных вариантах приборного исполнения [2]. К настоящему моменту разработаны и выпускаются ион-дрейфовые спектрометры (ИДС) как самостоятельные приборы [3], так и в составе аналитических комплексов, например в сочетании с газовыми хроматографами в качестве высокочувствительного селективного и быстродействующего детектора [4]. Также ион-дрейфовые спектрометры применяются в составе сложных исследовательских приборных комплексов ЖХ—ИДС—МС, в которых используются ион-дрейфовые спектрометры как "классического" исполнения [5, 6], с длиной области дрейфа 10–15 см, работающие при атмосферном давлении и напряженности электрического поля в зоне дрейфа порядка 10^2 – 10^3 В/см, так и спектрометры с длинной областью дрейфа, порядка 0.5–1 м, давлением в единицы торр и напряженностью электрического поля в дрейфовой трубе от 6 до 16 В/см [7–9]. При всех своих положительных качествах (высокой чувствительности, селективности, быстродействию, малых габаритах, массе и простоте) в таком сочетании ИДС является узким местом, т. к. в электроспрей-источнике ионов даже при потоке элюента 3–20 мкл/мин, как в [5, 6], или 0.18–1.5 мкл/мин, как в [7–10], имеют место испарившиеся микрокапли анализируемого раствора, что существенно мешает стабильной работе комплекса. Стоит отметить, что использование столь малых потоков распыляемого раствора приводит к получению и малого количества заряженных

частиц, поступающих на вход в ион-дрейфовый спектрометр, порядка 10^7 в секунду (ток порядка 10^{-12} А) [8], поэтому перед входом в спектрометр подвижности устанавливают накопительную линейную октопольную ловушку, работающую в импульсном режиме.

Стыковка ион-дрейфового спектрометра с жидкостным хроматографом требует решения ряда технических проблем, основной из которых является конденсация элюента, поступающего из жидкостного хроматографа в область источника ионов с электрораспылением, на элементах ион-дрейфового спектрометра в области распыления, камере десольватации, затворе и непосредственно в зоне дрейфа. Кроме того, необходимо решить проблемы стабильности электрораспыления элюента, согласование его потока, поступающего из хроматографической колонки, и потока распыляемого элюента в источнике ионов. Это позволит использовать существующие методики, применяемые в жидкостной хроматографии при потоках элюента порядка 100–1000 мкл/мин. С другой стороны, в настоящий момент в качестве детектора для ЖХ разработано уже порядка двух десятков типов детекторов — оптические, электрические, электрохимические, радиоактивные и т. д. В свою очередь оптические детекторы для ЖХ делятся на классы по длинам волн. При реализации оптических детекторов учитывают объем ячейки, источник излучения, влияние температурной стабильности детектора и растворителя, влияние вибраций и организацию оптической системы — фильтровые фотометры, широкополосные интерференционные фильтры и другие специализированные элементы

оптической системы, реализующей выбранный тип или класс детектора для ЖХ. Приборный комплекс ЖХ—ИДС может иметь самостоятельный интерес, где ион-дрейфовый спектрометр выступает в качестве детектора жидкостного хроматографа, что оказывается полезным, когда оптический детектор жидкостного хроматографа не регистрирует сигнала от разделенных веществ или не может их разрешить, например изомеры [11, 12].

Для исследования аналитических возможностей такого детектора с электрораспылительным высокостабильным источником ионов, работающего с хроматографическими потоками элюента, разработан ион-дрейфовый спектрометр, по структуре представляющий собой "классическую" соосную последовательность узлов прибора: источник ионов, десольватационная камера, затвор Бредбери—Нильсена, дрейфовая камера, коллектор. В качестве электрораспылительного источника ионов для растворов использовано устройство, описанное в [13, 14], работающее при нормальных условиях, как и весь ион-дрейфовый спектрометр. Источник ионов стабильно работает с потоками элюента до 200 мкл/мин. Использованный источник ионов позволяет не перегружать элементы десольватационной камеры и дрейфовой зоны спектрометра каплями раствора и не забрызгивать управляющий затвор Бредбери—Нильсена. Узел электрораспыления, через который подается элюент и производится откачка излишков распыляемого раствора в виде парогазовой смеси, находится под нулевым потенциалом, соответственно под этим же потенциалом находится и система подачи раствора от жидкостного хроматографа. Такое подключение узла электрораспыления позволяет улучшить электробезопасность работы на комплексе. Подробное описание ион-дрей-

фового спектрометра, использованного в экспериментах, приведено в [15].

Регистрация экспериментальных данных и их обработка в комплексе ЖХ—ИДС позволяет проводить регистрацию отдельных спектров подвижности, их серию по времени, проводить для наглядности наложение единичных спектров подвижности с совмещением начала регистрации спектров, выделять интересующую область спектра подвижности и представлять в выбранном из меню программ обработки виде. Для полноценной работы с программами необходима операционная система MS Windows XP.

В экспериментах использовался микроколоночный жидкостный хроматограф "Милихром А-02" и хроматографическая колонка с внутренним диаметром 2 мм, длиной 75 мм и с обращенной фазой типа "С18", диаметр зерна адсорбента 5 мкм (ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова", г. Новосибирск, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для определения аналитических характеристик ион-дрейфового спектрометра в качестве детектора жидкостного хроматографа при детектировании разделенной хроматографически смеси в режиме регистрации положительных ионов с электрораспылительным источником ионов проведены первые измерения тестового раствора, состоящего из полипептида бацитрацина А (10 аминокислотных остатков, молекулярная масса 1 421.74 Да) и смеси альфа и бета полипептидных субъединиц гемоглобина человека (141 и 146 аминокислотных остатков, молекулярные массы 15 258 и 15 998 Да соответственно).

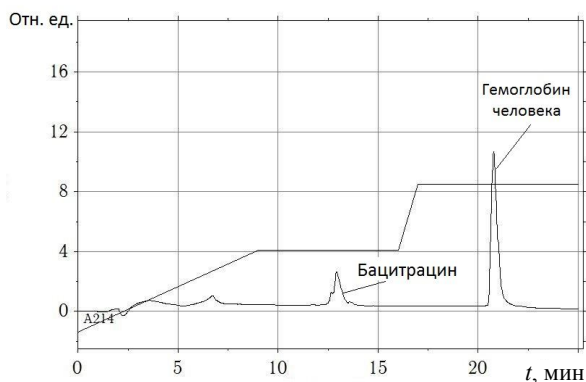


Рис. 1. Хроматограмма тестовой смеси бацитрацина и гемоглобина с регистрацией УФ-детектором хроматографа на длине волны 214 нм

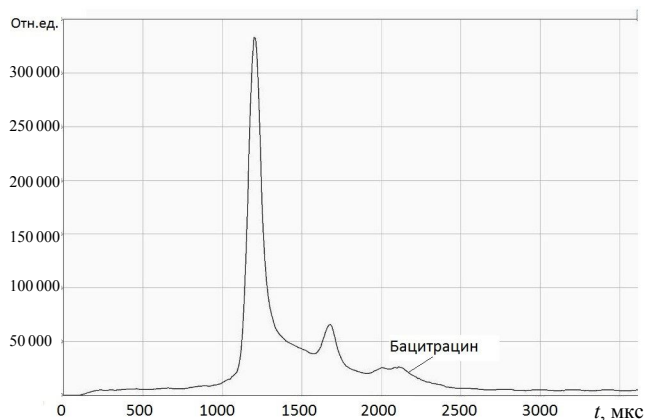


Рис. 2. Спектр подвижности бацитрацина на 787-й с от начала хроматографирования

Тестовая смесь приготавливалась следующим образом. К 10 мг сухих препаратов смеси субъединиц гемоглобина человека и 10 мг бацитрацина А добавили 650 мкл и 7 мл воды соответственно и получили их растворы с концентрацией 10^{-3} М каждого. В виалу для хроматографа отбирали 10 мкл раствора гемоглобина и 30 мкл раствора бацитрацина А. В качестве элюентов использовались ацетонитрил (элюент Б) и деионизованная вода (элюент А) с добавлением муравьиной кислоты до концентрации 0.1 %. Хроматографическое разделение проводилось в градиенте ацетонитрил—вода со скоростью потока 100 мкл/мин. Градиент от 5 % ацетонитрила до 30 % за 9 мин; с 9-й по 16-ю мин — изократический режим при 30 % ацетонитрила; а с 16-й по 17-ю мин градиент ацетонитрила с 30 до 50 %

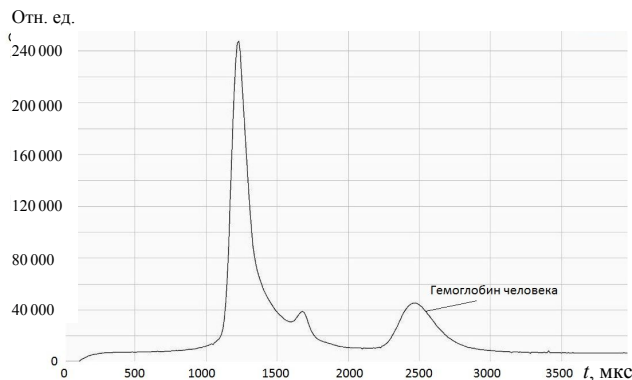


Рис. 3. Спектр подвижности гемоглобина на 1290-й с от начала хроматографирования

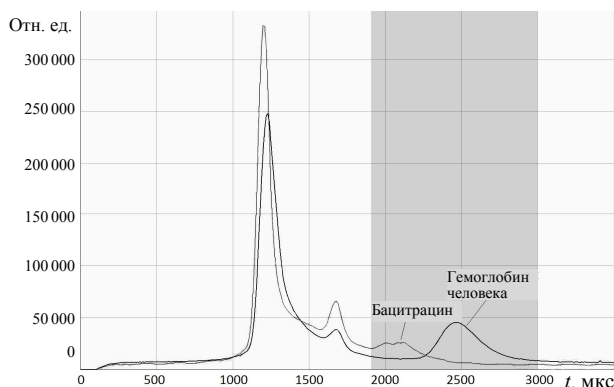


Рис. 4. Совмещенные по времени начала записи спектры подвижности бацитрацина и гемоглобина

и с 17-й по 25-ю мин — изократический режим 50 %. На рис. 1 представлена хроматограмма тестовой смеси бацитрацина и гемоглобина с регистрацией УФ-детектором хроматографа на длине волны 214 нм. Время выхода бацитрацина — 787-я с от начала хроматографии, а гемоглобина 1290-я с.

Для экспериментов по определению аналитических возможностей ион-дрейфового спектрометра в качестве детектора для жидкостного хроматографа выход хроматографической колонки напрямую подключался ко входу в электрораспылительный источник ионов, работающий при нормальных условиях. При вышеописанной хроматографической методике разделения тестовой смеси проводилась регистрация ионного тока во времени. На рис. 2 представлен спектр подвижности бацитрацина на 787-й с от начала хроматографии, а на рис. 3 спектр подвижности гемоглобина человека на 1290-й с, записанные в процессе детекции результатов хроматографического разделения. На рис. 4 представлены совмещенные по времени начала записи спектры подвижности, приведенные на рис. 2 и 3. Стоит отметить, что шкала времени на этих спектрах измеряется в микросекундах. Также программно выделяется часть совмещенных спектров подвижности, соответствующих пикам бацитрацина и гемоглобина человека, — на рис. 4 затенена. Выделенная на рис. 4 область совмещенных спектров подвижности, преобразованная в масштабе времени хроматографии — минуты (сотни секунд), — представлена на рис. 5, где пики по времени выхода соответствуют бацитрацину и гемоглобину человека в сравнении с УФ-детекцией на рис. 1.

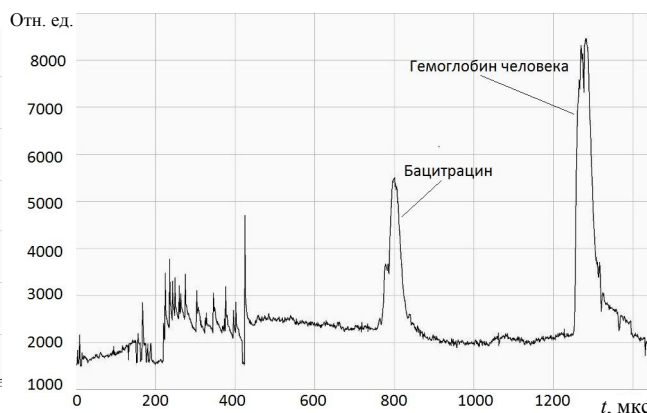


Рис. 5. Фрагмент хроматограммы тестовой смеси бацитрацина и гемоглобина, полученный из спектров подвижности отдельных веществ (рис. 4)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментально показаны возможности работы ион-дрейфового спектрометра с электрораспылительным источником ионов с динамическим делением потока распыляемого раствора при нормальных условиях в качестве детектора жидкостного хроматографа. Хроматографическое разделение проводилось при скорости потока 100 мкл/мин. Конструкция ион-дрейфового спектрометра проста в изготовлении, за исключением затвора Нильса—Бредбери, и позволяет проводить регистрацию хроматографического разделения в двух модах — положительной и отрицательной, что расширяет возможности спектрометра в качестве детектора хроматографа. Отдельного исследования требует определение предела детектирования, которого можно ожидать, исходя из определения параметров спектрометра [16], порядка 10^{-7} – 10^{-8} г/мл. По сравнению с оптическими детекторами хроматографа нет влияния температуры и вибраций на стабильность и воспроизводимость работы прибора, отсутствуют источники света, имеющие ограниченный ресурс, и нет зависимости от используемого в детекторе спектрального диапазона при решении различных классов задач. Можно отметить, что ион-дрейфовый спектрометр в качестве детектора жидкостного хроматографа достаточно универсален по сравнению с оптическими: фотометрическим, ультрафиолетовым, рефрактометрическим, флуориметрическим и т. д. В ион-дрейфовом спектрометре отсутствует понятие "ячейка" в отличие от оптических детекторов. Кроме того, из комплекса ЖХ—ИДС легко конструктивно собрать комплекс ЖХ—ИДС—МС, где МС, желательнее, — времяпролетный масс-спектрометр с интерфейсом для ортогонального ввода ионов с атмосферного давления в вакуум прибора; при этом легко достигается скорость записи спектров порядка 150 с^{-1} , что вполне информативно.

Авторы выражают благодарность Федеральному медико-биологическому агентству за поддержку работы, проводимой в рамках Федеральной целевой программы "Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы)".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cohen M.J., Karasek F.W. Plasma chromatography — a new dimension for gas chromatography and mass spectrometry // *J. Chrom. Sci.* 1970. Vol. 8, No. 6. P. 330–337.
2. Kanu A.B., Dwivedi P., Tam M., Matz L., Hill (jr.) H.H. Ion mobility—mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* 2008. Vol. 43, No. 1. P. 1–22. DOI: 10.1002/jms.1383.
3. Coy S.L., Krylov E.V., Nazarov E.G., Fornace A.Y. et al. Differential mobility spectrometry with nanospray ion source as a compact detector for small organics and inorganics // *Int. J. Ion Mobil. Spec.* 2013. Vol. 16, No. 3. P. 217–227. DOI: 10.1007/s12127-013-0136-3.
4. URL: (<http://imspex.com/products/gc-ims/>).
5. Guevremont R., Siu K.R.M., Wang J., Ding L. Combined ion mobility / time-of-flight mass spectrometry study of electrospray-generated ions // *Anal. Chem.* 1997. Vol. 69, No. 19. P. 3959–3965.
6. Hoiness H., Almirall J. Speciation effect of solvent chemistry on the analysis of drugs and explosives by electrospray ion mobility mass spectrometry // *Int. J. Ion Mobil. Spec.* 2013. Vol. 16, No. 3. P. 237–246. DOI: 10.1007/s12127-013-0136-2.
7. Hiderbrand A.E., Myung S., Barnes C.A.S. et al. Development of LC-IMS-CID-TOF MS techniques analysis of a 256 component tetrapeptide combinatorial library // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003. Vol. 14, No. 12. P. 1424–1436. DOI: 10.1016/j.jasms.2003.08.002.
8. Sowell R.A., Koeniger S.L., Valentine S.J. et al. Nano-flow LC/IMS-MS and LC/IMS-CID/MS of protein mixtures // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004. Vol. 15, No. 9. P. 1341–1353. DOI: 10.1016/j.jasms.2004.06.014.
9. Baker E.S., Livesay E.A., Orton D.J., Moore R.J. et al. An LC-IVS-MS platform providing increased dynamic range for high-throughput proteomic studies // *J. Proteome Rev.* 2010. Vol. 9, No. 2. P. 997–1006. DOI: 10.1021/pr900888b.
10. Merkley E.D., Baker E.S., Crowell K.L., Orton D.J. et al. Mixed-isotope labeling with LC-IMS-MS for characterization of protein-protein interactions by chemical cross-linking // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2013. Vol. 24, No. 3. P. 444–449. DOI: 10.1007/s13361-012-0565-x.
11. Kurnin I.V., Kayumov A.A., Muradymov M.Z. et al. Coupling of liquid chromatograph with ion-mobility spectrometer // *Int. J. Ion Mob. Spec.* 2013. Vol. 16, No. 3. P. 169–176. DOI: 10.1007/s12127-012-0110-4.
12. Zhang X., Chiu V.M., Stoica G., Lungu G. et al. Metabolic analysis of striatal tissues from Parkinson's disease-like rats by electrospray ion mobility mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2014. Vol. 86, No. 6. P. 3075–3083.
13. Samokish V.A., Krasnov N.V., Muradymov M.Z. Electrospray ion source with a dynamic liquid flow splitter // *Rapid Commun. Mass Spectrometry.* 2013. Vol. 27, No. 8. P. 904–908. DOI: 10.1002/rcm.6524.
14. Arseniev A.N., Krasnov N.V., Muradymov M.Z. Investigation of electrospray stability with dynamic liquid flow splitter // *J. Anal. Chem.* 2014. Vol. 69, No. 14. P. 1320–1322. DOI: 10.1134/S1061934814140020.
15. Арсеньев А.Н., Алексеев Д.Н., Бельченко Г.В. и др. Спектроскопия пептидов, белков и олигонуклеотидов из растворов методом ионной подвижности // *Научное приборостроение.* 2015. Т. 25, № 1. С. 17–26.

16. Самокиш В.А., Мурадымов М.З., Самокиш А.В. и др. Комплекс жидкостный хроматограф—ион-дрейфовый спектрометр для скринингового контроля в задачах химической и биологической безопасности // Химическая и биологическая безопасность. 2012. Специальный выпуск. С. 87–91.
- Институт аналитического приборостроения РАН, г. Санкт-Петербург** (Корякин П.С., Краснов И.А., Краснов Н.В., Мурадымов М.З.)
- ООО "Грант Инструмент", г. Санкт-Петербург** (Краснов М.Н.)

Контакты: Краснов Николай Васильевич,
krasnov@alpha-ms.com

Материал поступил в редакцию: 2.03.2015

ION MOBILITY SPECTROMETER WITH AN ELECTROSPRAY ION SOURCE AS DETECTOR LIQUID CHROMATOGRAPHY

P. S. Koriakin, I. A. Krasnov, N. V. Krasnov, M. Z. Muradymov, M. N. Krasnov

¹*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg, Russia*

²*Inc. Ltd "Grant Instrument", Saint-Petersburg, Russia*

Experimentally demonstrated the possibility of using ion mobility spectrometer as a detector for a liquid chromatograph for example registration mobility spectra divided by the liquid chromatograph "Milichrome A-02" solution of the test mixture of bacitracin A and alpha and beta subunit of human hemoglobin. The components of the test mixture chromatograms recorded for comparison with an optical detector UV chromatograph wave length 214 nm spectral, and ion mobility spectrometer with an electrospray ion source at a flow of eluent 100 μL / min under normal conditions.

Keywords: ion mobility spectrometry, liquid chromatography, electrospray solutions

REFERENCES

- Cohen M.J., Karasek F.W. Plasma chromatography – a new dimension for gas chromatography and mass spectrometry. *J. Chrom. Sci.*, 1970, vol. 8, no. 6, pp. 330–337.
- Kanu A.B., Dwivedi P., Tam M., Matz L., Hill (jr.) H.H. Ion mobility—mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 2008, vol. 43, no. 1, pp. 1–22. doi: 10.1002/jms.1383.
- Coy S.L., Krylov E.V., Nazarov E.G., Fornace A.Y. et al. Differential mobility spectrometry with nanospray ion source as a compact detector for small organics and inorganics. *Int. J. Ion Mobil. Spec.*, 2013, vol. 16, no. 3, pp. 217–227. doi: 10.1007/s12127-013-0136-3.
- URL: (<http://imspec.com/products/gc-ims/>).
- Guevremont R., Siu K.R.M., Wang J., Ding L. Combined ion mobility / time-of-flight mass spectrometry study of electrospray-generated ions. *Anal. Chem.*, 1997, vol. 69, no. 19, pp. 3 959–3 965.
- Hoiness H., Almirall J. Speciation effect of solvent chemistry on the analysis of drugs and explosives by electrospray ion mobility mass spectrometry. *Int. J. Ion Mobil. Spec.*, 2013, vol. 16, no. 3, pp. 237–246. doi: 10.1007/s12127-013-0136-2.
- Hiderbrand A.E., Myung S., Barnes C.A.S. et al. Development of LC-IMS-CID-TOF MS techniques analysis of a 256 component tetrapeptide combinatorial library. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2003, vol. 14, no. 12, pp. 1 424–1 436. doi: 10.1016/j.jasms.2003.08.002.
- Sowell R.A., Koeniger S.L., Valentine S.J. et al. Nano-flow LC/IMS-MS and LC/IMS-CID/MS of protein mixtures. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2004, vol. 15, no. 9, pp. 1 341–1 353. doi: 10.1016/j.jasms.2004.06.014.
- Baker E.S., Livesay E.A., Orton D.J., Moore R.J. et al. An LC-IVS-MS platform providing increased dynamic range for high-throughput proteomic studies. *J. Proteome Rev.*, 2010, vol. 9, no. 2, pp. 997–1006.

- doi: 10.1021/pr900888b.
10. Merkley E.D., Baker E.S., Crowell K.L., Orton D.J. et al. Mixed-isotope labeling with LC-IMS-MS for characterization of protein-protein interactions by chemical cross-linking. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2013, vol. 24, no. 3, pp. 444–449. doi: 10.1007/s13361-012-0565-x.
 11. Kurnin I.V., Kayumov A.A., Muradymov M.Z. et al. Coupling of liquid chromatograph with ion-mobility spectrometer. *Int. J. Ion Mob. Spec.*, 2013, vol. 16, no. 3, pp. 169–176. doi: 10.1007/s12127-012-0110-4.
 12. Zhang X., Chiu V.M., Stoica G., Lungu G. et al. Metabolic analysis of striatal tissues from Parkinson's disease-like rats by electrospray ion mobility mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 2014, vol. 86, no. 6, pp. 3 075–3 083.
 13. Samokish V.A., Krasnov N.V., Muradymov M.Z. Electrospray ion source with a dynamic liquid flow splitter. *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, 2013, vol. 27, no. 8, pp. 904–908. doi: 10.1002/rcm 6524.
 14. Arseniev A.N., Krasnov N.V., Muradymov M.Z. Investigation of electrospray stability with dynamic liquid flow splitter. *J. Anal. Chem.*, 2014, vol. 69, no. 14, pp. 1 320–1 322. doi: 10.1134/S1061934814140020.
 15. Arseniev A.N., Alekseev D.N., Belchenko G.V. et al. [Spectroscopy of peptides, proteins and oligonucleotides from solutions by ion mobility]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Science Instrumentation], 2015, vol. 25, no. 1, pp. 17–26. (In Russ.).
 16. Samokish V.A., Muradymov M.Z., Samokish A.V. et al. [Complex the liquid chromatograph — an ion-drift spectrometer for screening control in problems of chemical and biological safety]. *Chimicheskaya i biologicheskaya bezopasnost'* [Chemical and biological safety], 2012, special issue, pp. 87–91. (In Russ.).

Contacts: *Krasnov Nikolay Vasil'evich*,
krasnov@alpha-ms.com

Article received in edition: 2.03.2015