

# 超高结构分辨二维离子迁移质谱联用仪

李俊晖<sup>1,2,3</sup>, 刘容<sup>1,2,3</sup>, 胡中瀚<sup>1,2,3</sup>, 吴勇<sup>1,2,3</sup>, 王陈璐<sup>1,2,3</sup>, 高文清<sup>1,2,3</sup>, 俞建成<sup>1,2,3</sup>, 唐科奇<sup>1,2,3</sup>

(1.宁波大学质谱技术与应用研究院, 浙江 宁波 315211; 2.高端质谱技术和临床应用浙江省工程研究中心, 浙江 宁波 315211; 3.宁波镇海质谱技术研究院, 浙江 宁波 315200)

**摘要:** 为解决离子迁移谱技术结构分辨率不足的问题, 将传统离子迁移谱 (IMS) 和高场非对称波形离子迁移谱 (FAIMS) 相结合, 开发了超高结构分辨二维 FAIMS-IMS 分离设备, 并对+1 价和+2 价缓激肽离子进行了研究。实验显示, FAIMS 可以分离 IMS 无法分离的结构, 而 IMS 同样可以分离 FAIMS 无法分离的结构。这说明 FAIMS 与 IMS 高度正交, 二维 FAIMS-IMS 分辨力应与单一 FAIMS 和 IMS 分辨力的乘积成正比。最优条件下, 对于+1 价和+2 价缓激肽离子, FAIMS-IMS 能实现的最大分辨力分别约为 1020 和 1400, 明显高于已商业化离子迁移谱技术的分辨力。因此, 二维 FAIMS-IMS 技术可以作为一种强大设备被用于更好地探索分子结构多样性。

**关键词:** 离子迁移谱; 高场非对称波形离子迁移谱; 二维离子迁移谱; 分辨力; 异构体分离

## 1 引言

对于各类生物分子, 包括多肽、DNA 和蛋白质, 其功能和活性在很大程度上取决于分子的三维结构<sup>[1-2]</sup>。众所周知, 对于特定的生物大分子, 其功能团可以存在多种排序序列及不同的区域连接位点, 由此将产生大量的同分异构体。而这样的同分异构体很难通过传统的质谱检测法来进行有效的分析表征<sup>[3-4]</sup>。为解决这一难题, 研究人员提出了多种同分异构体分离技术, 包括液相色谱<sup>[5]</sup>、毛细管电泳<sup>[6]</sup>及离子迁移谱<sup>[7]</sup>等, 并将其与质谱技术进行联用, 由此在分离离子异构体的同时进一步分析离子的质荷比。而在上述技术中, 离子迁移谱作为一类快速、高效的气相离子分离技术, 可以在分离离子异构体的同时提供相应离子异构体的结构信息, 因此被广泛应用于生物分子的结构表征<sup>[8-10]</sup>。

离子迁移谱技术最早发明于上世纪初, 其能够依据不同离子在气体中迁移率的差异, 对质荷比相同但结构不同的离子异构体实现分离定性<sup>[8-10]</sup>。传统的离子迁移谱技术目前称为漂移管离子迁移谱技术, 其也是最经典的离子迁移谱技术。漂移管离子迁移谱技术通常由一个

离子漂移管组成，在此漂移管内填充有氮气或氦气等惰性缓冲气体，并在此环境下通过一系列接电且等间距排列的环形电极建立一个均匀的静电场 ( $E$ ) [8-10]。当离子混合物进入离子漂移管后，在静电场的作用下，不同电荷及不同结构的离子将产生不同的迁移率 ( $K$ )，并以不同的漂移速度向漂移管的离子出口方向移动从而实现分离。而离子的漂移速度 ( $v$ ) 可以根据其在给定长度和电场强度的离子漂移管中迁移所用的漂移时间 ( $t_D$ ) 来进行计算。而离子的实际迁移率可以通过公式 (1) 计算：

$$K = v/E \quad (1)$$

在公式 (1) 中，离子的迁移率与离子的结构直接相关，并且可以通过 Mason-Schamp 方程进行计算：

$$K_0 = (3ze/16N) \cdot (2\pi/\mu k_B T)^{1/2} / \Omega_{av}^{(1,1)} \quad (2)$$

$$K_0 = K \cdot (P/760) \cdot (273.15/T) \quad (3)$$

$$\mu = m \cdot M / (m + M) \quad (4)$$

其中  $K_0$  代表离子在标准大气压 (760 Torr) 和温度 (273.15 K) 条件下的迁移率， $z$  为离子的带电状态， $e$  是电子电荷 ( $1.6 \times 10^{-19}$  Coulomb)， $T$  和  $P$  是 IMS 漂移管内的温度和气体压力， $N$  是气体的数密度， $k_B$  是玻尔兹曼常数， $\mu$  代表给定离子/气体分子对的约化质量， $m$  是离子质量， $M$  是气体分子质量， $\Omega_{av}^{(1,1)}$  是离子在 IMS 漂移管内漂移时的平均碰撞横截面积，其大小与离子的结构直接相关[11]。并且， $\Omega_{av}^{(1,1)}$  既可以通过 IMS 进行测量，也可以通过严格的分子动力学模型进行计算[3,11-13]。因此，漂移管离子迁移谱技术检测得到的  $\Omega_{av}^{(1,1)}$  可以用于推导离子的潜在结构，这使得 IMS 技术在同分异构体结构表征领域独树一帜。

而在近 30 年，另一种基于变化电场来分离离子异构体的迁移谱技术 FAIMS，即高场非对称波形离子迁移谱技术，也获得了快速的发展。根据已有研究，不同结构离子在强电场和弱电场条件下会存在一个特定的迁移率差 ( $\Delta K$ )，充分利用这一迁移率差即可实现不同结构离子的分离[14-15]。因此，FAIMS 技术利用一种周期性非对称变化的高压波形，即 FAIMS 分离电压 (FAIMS DV)，在两块金属电极板之间的间隙中建立一个非对称变化的交变电场 ( $E_D$ ) 以分离离子混合物。这两块金属极板可以是同轴圆柱形 (圆筒型 FAIMS, c-FAIMS)，或是平行平面形 (平板型 FAIMS, p-FAIMS)。通常，当施加的交变电场强度超过特定阈值时，离子的迁移率  $K$  将随着电场强度的改变而呈非线性变化[11]。如公式 (5) 所示，不同离子迁移率的非线性变化过程各异，而对于某一特定离子，其在高电场条件下迁移率  $K(E)$  的变化过程通常可以用一个归一化电场强度 ( $E/N$ ) 的偶次幂多项式来进行估算[14-15]：

$$K_0(E) = K_0 \cdot [1 + a \cdot (E/N)^2 + b \cdot (E/N)^4 + c \cdot (E/N)^6 + \dots] \quad (5)$$

随着电场强度  $E$  的增加, 离子的迁移率可能会逐渐提高 (A 类离子)、逐渐降低 (C 类离子) 或是先提高后降低 (B 类离子)。通常, 小质量和刚性结构的离子属于 A 类离子, 而大质量且结构易变的离子属于 C 类离子, 例如肽类和蛋白质类离子<sup>[15-16]</sup>。因此, FAIMS 通过利用不同离子在高、低电场间迁移率差的不同来实现不同结构离子的分离。当气相离子在流速均匀的惰性气流携带下进入 FAIMS 极板间隙后, 在 FAIMS DV 电压每个周期的变化过程中, 根据离子类型的不同, 不同离子的运动轨迹都将会向其中任意一块极板发生偏移<sup>[17-19]</sup>。而经过多轮 FAIMS DV 电压周期后, 离子将陆续撞击在其中一块极板上并被中和。为了让特定  $\Delta K(E)$  的离子能够通过 FAIMS 极板间的间隙, 特定的直流补偿电压 (FAIMS CV) 将被叠加在 FAIMS DV 上并建立一个补偿电场 ( $E_C$ ), 以抵消离子在每一轮 FAIMS DV 周期内发生的偏转<sup>[17-19]</sup>。由此, 这些特定  $\Delta K(E)$  的离子可以在恒定载气气流的带动下, 离开 FAIMS 极板间隙, 并最终被 FAIMS 出口处的电荷收集器或质谱仪所检测到。因此, 通过一个持续扫描的 FAIMS CV 源, 就可以获得不同  $\Delta K(E)$  离子的 FAIMS 谱图<sup>[17-20]</sup>。

尽管 IMS 和 FAIMS 技术已被广泛应用于分离离子异构体, 但它们在分析生物分子异构体时的有效性仍然受限于现有仪器的低结构分辨力<sup>[11]</sup>。通常, 现有商业化 IMS 和 FAIMS 仪器可实现的最佳分辨力分别为 200 和 30<sup>[3,11]</sup>。因此, 在分析包含大量相似结构的生物大分子时, 现有商业化仪器的分辨力依旧难以对各离子异构体实现高效分离。为了解决这一极具挑战性的问题, 有研究人员提出将 FAIMS 与 IMS 技术进行联用 (FAIMS-IMS), 以形成更高效的二维气相离子结构分离技术<sup>[3,11]</sup>。联用后的 FAIMS-IMS 技术的一大关键优势在于: FAIMS 和 IMS 技术依赖于不同机理实现离子异构体的分离, 因此这两种技术在结构分离维度上基本是正交的<sup>[3,11]</sup>。将 FAIMS 和 IMS 技术进行联用, 联用后 FAIMS-IMS 技术的整体分辨力应该与单一 FAIMS 和 IMS 技术分辨力的乘积成正比关系, 因而可以更有效地分离不同结构的离子异构体。尽管在已有研究中已经证明 FAIMS-IMS 技术较单一的 FAIMS 及 IMS 技术具有更高的分辨力, 并且可以分离出更多的蛋白质及肽类离子的异构体, 但联用后的 FAIMS-IMS 技术的实际分辨力尚未经过仔细评估。并且现在 FAIMS-IMS 技术的分辨力在一定程度上受限于 c-FAIMS 技术的低分辨力, 还有明显的提升空间。

为建立超高结构分辨的离子迁移谱技术, 将高分辨的 p-FAIMS 与已商业化的 IMS-MS 仪器进行联用, 建立了平板型 FAIMS-IMS-MS 联用系统。缓激肽作为一种常用的标准肽样品, 已经被研究人员广泛应用于 MS<sup>[21-22]</sup>、IMS<sup>[23-24]</sup>及 FAIMS<sup>[25-26]</sup>设备的研究。因此, 利用该物质评估了所搭建 FAIMS-IMS-MS 联用平台的结构分离效果。通过系统性的实验研究,

探讨了 FAIMS 和 IMS 技术之间的结构正交性、FAIMS-IMS 联用技术可实现的整体分辨力以及 FAIMS-IMS 技术与高分辨质谱结合后在表征不同结构肽类离子时的有效性。

## 2 实验部分

### 2.1 主要材料与试剂

缓激肽样品 (Bradykinin, 分析纯) 为美国 MedChem Express 生物科技公司产品; 甲醇 (Methanol, 色谱纯) 为美国 Fisher Scientific 公司产品; 超纯水利用美国 Millipore 公司的 Milli-Q 系统制备。样品溶剂为甲醇/超纯水 (50:50, v:v) 的混合试剂; 缓激肽溶液的制备过程为: 首先将样品直接溶解在超纯水中制备浓度为 10 mM 的缓激肽存储液, 然后通过样品溶剂将缓激肽存储液分别稀释至 100  $\mu$ M 和 5  $\mu$ M。

配置样品溶剂仅采用甲醇及超纯水, 而不添加任何乙酸。并且在缓激肽溶液配制的过程中也配备了浓度高达 100  $\mu$ M 的样品溶液。上述操作主要是为了增加样品溶液中缓激肽分子的数量, 并减少溶液中氢离子的数量。由此, ESI 离子源在产生分析物离子的过程中, 可以产生更多低价位的分析物离子。

### 2.2 主要仪器与装置

如图 1 所示, 平板型 FAIMS-IMS-QTOF MS 联用设备是通过将 p-FAIMS 系统<sup>[27-29]</sup>结合到安捷伦公司 Agilent 6560 IMS-QTOF MS 平台上完成的。根据已有研究为实现 p-FAIMS 模块的最佳分辨率、离子传输效率和灵敏度, 所有的实验测试都将采用以下实验条件: (1) p-FAIMS 模块的离子出口与 IMS-QTOF MS 平台的毛细管离子入口的中心相互对齐, 而两者之间将保留一条 3 mm 的间隙以保证电路绝缘, 同时也用于避免 FAIMS DV 极板与 IMS-QTOF MS 毛细管离子入口处因距离太近而发生放电击穿; (2) FAIMS 的 DV 电压将采用 1 kV 的双正弦波形 (主频为 965 kHz, 次频为 1930 kHz, 振幅比 2:1); (3) FAIMS CV 电压采用锯齿扫描波, 扫描范围为 -25 V 至 5 V, 扫描速度为 0.1 V/s; (4) 使用纳升级电喷雾 (Nano-ESI) 离子源来产生所有的分析物离子, 其进样流速稳定在 0.35  $\mu$ L/min, IMS-QTOF MS 平台毛细管入口处的电压为 0 kV, FAIMS 帘幕电极的电压为 1 kV, Nano-ESI 毛细管喷头处的直流电压设定为 0 kV; (5) 氮气及氦气的混合气体将以 3.5 L/min 的流速引入 p-FAIMS 模块, 用于带电液滴的去溶剂并携带气相离子通过 FAIMS 极板间隙。在实验过程中将分别使用两个数字流量计, 即 MFC2242-DJ-U0 和 MFC2242-CF-U0 (Axetris, Kagiswil, Switzerland) 调节氮气和氦气的气体流速和气体组成比例。在实验过程中, 氦气的体积比例将在 0%到 40%的范围内调整, 以避免 FAIMS 极板内发生放电击穿。

由于试验中所用 Nano-ESI 离子源中产生的带电液滴在 FAIMS 离子源处已完成去溶剂化, 因此在实验过程中, 可以将 IMS-QTOF MS 平台的毛细管干燥气体 (氮气) 流速和温度分别降至 1.5 L/min 和 20°C。IMS 漂移管中氮气缓冲气体的压力将稳定在 00 Torr。IMS 漂移管的离子漂移时间设置为 70 ms。集离子漏斗的离子填充时间和离子释放时间分别设置为 69 ms 和 150  $\mu$ s。IMS 漂移管入口处电压强度设置为 1.3 kV。常规高压离子漏斗和捕集离子漏斗的射频电压均设置为 150 V。IMS-QTOF MS 平台的其他参数保持默认值。

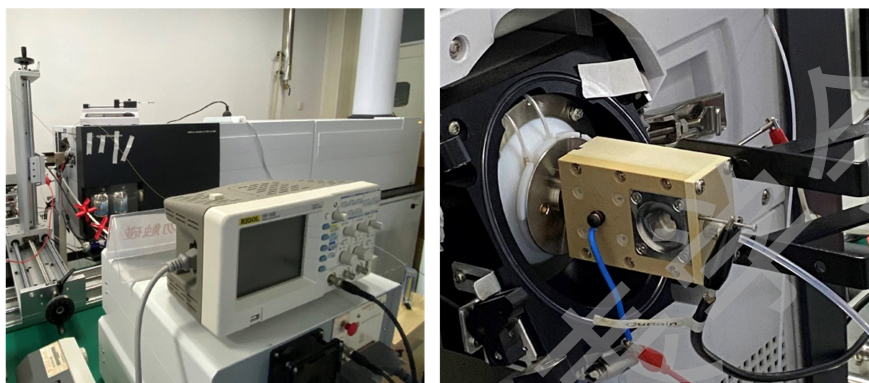


图 1 平板型 FAIMS-IMS-QTOF MS 联用平台示意图

### 3 结果与讨论

在实验过程中, 首先利用搭建的 ESI-FAIMS-IMS-QTOF MS 联用设备对 100  $\mu$ M 缓激肽溶液产生的离子质荷比进行了分析, 其结果如图 2 所示。根据+1 价及+2 价缓激肽离子( $BK + H^+$ )<sup>+</sup>及( $BK + 2H^+$ )<sup>2+</sup>的特定质荷比 (1060.79 和 530.55), 在 100  $\mu$ M 样品浓度条件下, 利用搭建的联用设备, 可以轻松检测到上述两种价位的缓激肽离子。

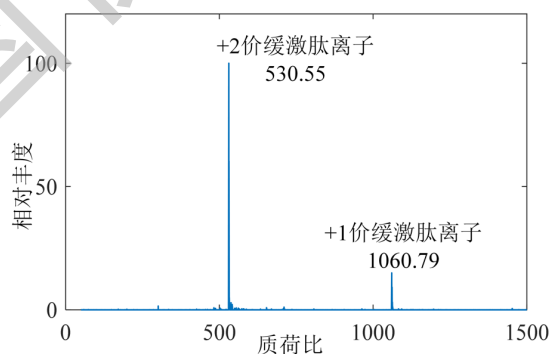
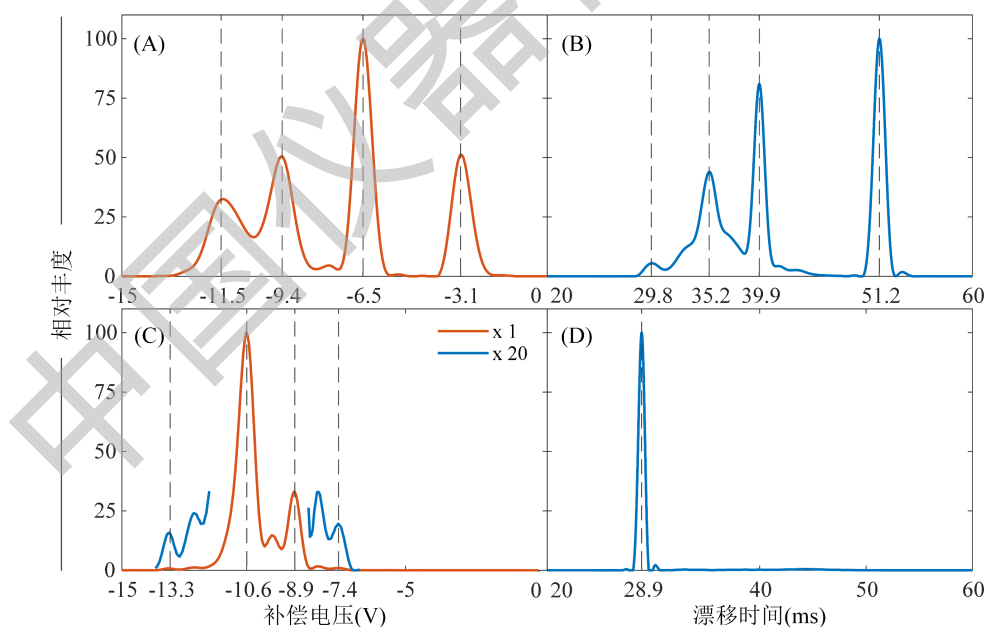


图 2 利用 100  $\mu$ M 缓激肽溶液检测得到的质谱图

在实验过程中, 首先以 100%纯氮气作为 p-FAIMS 模块的载气, 并在此条件下利用二维 FAIMS-IMS 平台对( $BK + H^+$ )<sup>+</sup>和( $BK + 2H^+$ )<sup>2+</sup>离子进行了检测。图 3 显示了在此条件下检测得到的( $BK + H^+$ )<sup>+</sup>离子和( $BK + 2H^+$ )<sup>2+</sup>离子的 FAIMS 谱图 (图 3(A)及 3(C)) 和 IMS 谱图 (图 3(B)和 3(D))。而上述谱图中的实验结果与已有研究中获得的谱图相类似<sup>[23,25]</sup>。在图 3(A)及

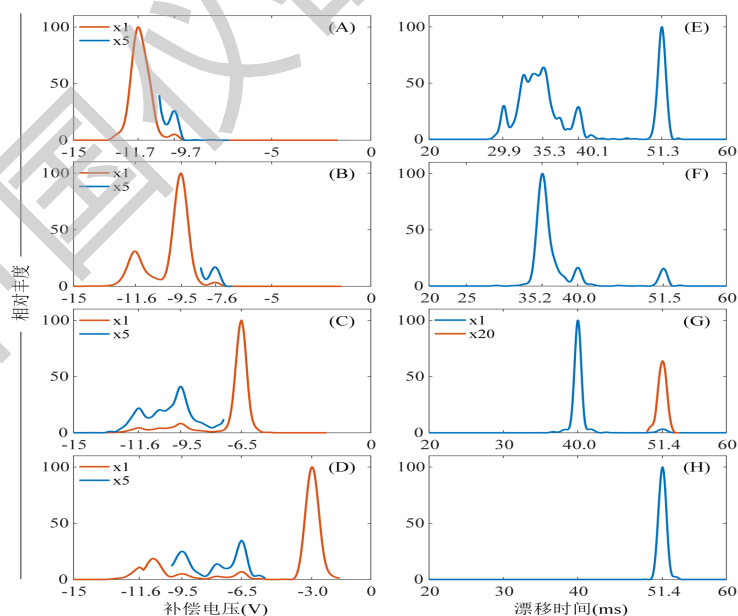
3(B)中可以发现, 对于 $(BK + H^+)^+$ 离子, 其 FAIMS 及 IMS 谱图中均显示出 4 个被良好分离的主峰, 这意味着 $(BK + H^+)^+$ 离子至少存在 4 种不同异构体。而图 3(C)进一步显示了 $(BK + 2H^+)^{2+}$ 离子的 FAIMS 谱图。在其中可以发现 7 个不同的信号峰, 虽然这些峰没有被完全分离。并且这 7 个峰之间也存在明显的丰度差异, 因为其中 4 个峰需要放大 20 倍才能被明显观察到。而在图 3(D)显示的 $(BK + 2H^+)^{2+}$ 离子的 IMS 谱图中, 仅能观察到单个主峰, 在主峰两侧的肩部虽然存在两个细微的小峰, 但基本可以忽略不计。在已有研究中已经证明, 与低价位离子相比, 蛋白质和肽类离子在高价位时, 受到库仑排斥作用影响将更倾向于展开结构<sup>[3,30]</sup>。而图 3(C)和 3(D)中的结果似乎也与此前的研究结果相一致, 即对于高价位的蛋白质及肽类离子, 其通常包含多个横截面积相类似的异构体, 且这些异构体无法靠分辨力有限的 IMS 设备进行分离。这说明相较于 IMS, FAIMS 设备对于离子的结构差异往往更为敏感, 因此可以更有效地分离此类离子异构体<sup>[3,31]</sup>。此外, 图 3 中的实验结果还表明, 在相似的 FAIMS CV 和 IMS 漂移时间条件下,  $(BK + H^+)^+$ 离子的 FAIMS 和 IMS 谱图中的峰宽要明显大于 $(BK + 2H^+)^{2+}$ 离子的峰宽。这可能意味着单独的 FAIMS 或 IMS 技术对 $(BK + H^+)^+$ 离子的分辨力有限, 因此在上述谱图中可能还存在着其他未被分离的异构体峰。而利用联用的 FAIMS-IMS 平台来进一步探索 $(BK + H^+)^+$ 离子的其它异构体将是研究的重点。



**图 3**  $(BK + H^+)^+$ 和 $(BK + 2H^+)^{2+}$ 离子的 FAIMS 及 IMS 谱图: (A)  $(BK + H^+)^+$ 离子的 FAIMS 谱图; (B)  $(BK + H^+)^+$ 离子的 IMS 谱图; (C)  $(BK + 2H^+)^{2+}$ 离子的 FAIMS 谱图; (D)  $(BK + 2H^+)^{2+}$ 离子的 IMS

谱图

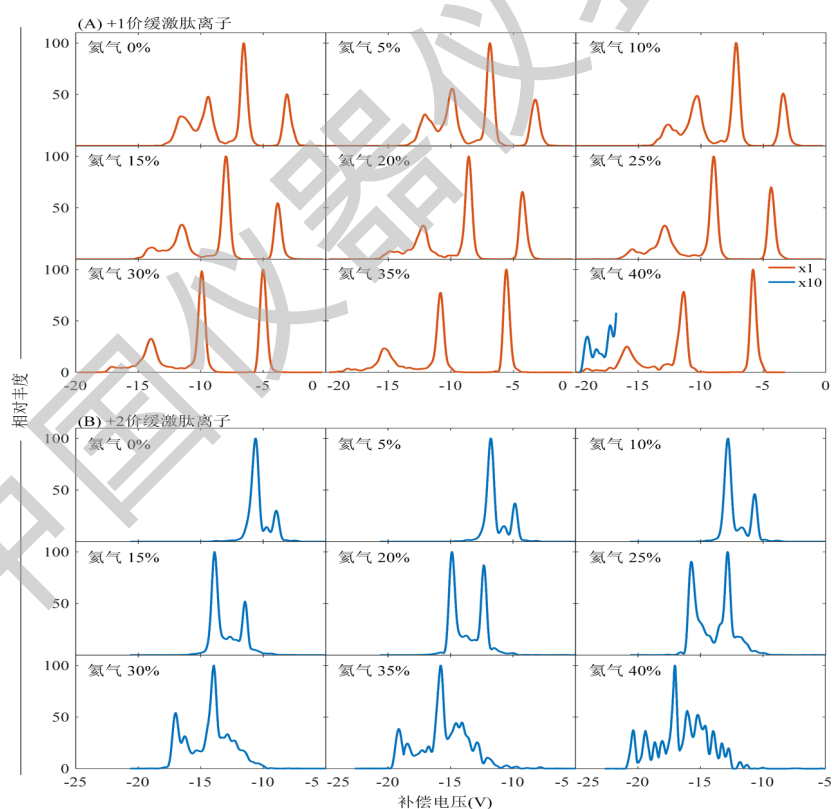
在已有研究中已经充分证明，将 FAIMS-IMS 二维气相分离技术与高分辨质谱进行联用后，能够在复杂生物样品中检测出更多肽类异构体，并且也可以更好解析蛋白质离子异构体的结构多样性<sup>[3,11]</sup>。因此，为充分发挥 FAIMS-IMS 二维分离的优势，筛选了特定 IMS 漂移时间 ( $t_D$ -selected) 条件下的 FAIMS 谱图和特定 FAIMS CV 电压 (CV-selected) 条件下的 IMS 谱图，由此进一步探索了(BK + H<sup>+</sup>)<sup>+</sup>离子的结构多样性，其结果如图 4 所示。其中，图 4(A)至图 4(D)中的实验结果表明，在图 3(B)中 4 个 IMS 主峰所对应的  $t_D$ -selected FAIMS 谱图中，均包含有多个  $t_D$  值相同但 CV 值完全不同的 FAIMS 谱峰。并且，图 4(E)至图 4(H)的结果进一步显示，在图 3(A)中 4 个 FAIMS 主峰所对应的 CV-selected IMS 谱图中，同样包含多个 CV 值相同但  $t_D$  值完全不同的 FAIMS 谱峰。特别是在图 4(D)所示的  $t_D = 51.2$  ms 的 FAIMS 谱图和图 4(E)所示的 CV = -11.5 V 的 IMS 谱图中，可以轻松观察到五个以上的异构体峰。因此，图 4 所示的实验结果有力地证实了 FAIMS 可以分离 IMS 所无法分离的异构体离子，而 IMS 同样可以分离 FAIMS 所无法分离的异构体离子，联用后的 FAIMS-IMS 技术确实可以分离出更多(BK + H<sup>+</sup>)<sup>+</sup>离子的异构体。同样值得注意的是，对于特定(BK + H<sup>+</sup>)<sup>+</sup>离子的 IMS 异构体峰，其对应  $t_D$ -selected FAIMS 谱图中 FAIMS 主峰的 CV 绝对值往往会随着 IMS 漂移时间的增加而减小。这意味着具有扩展结构（即  $t_D$  较大）的(BK + H<sup>+</sup>)<sup>+</sup>离子倾向于有更小的 CV 绝对值。而这一现象与已有研究中利用 FAIMS-IMS 对蛋白质异构体进行分离时的结果相一致，说明 FAIMS 和 IMS 技术在结构分离维度上高度正交性但非完全正交。



**图 4 (BK + H<sup>+</sup>)<sup>+</sup>离子的  $t_D$ -selected FAIMS 谱图及 CV-selected IMS 谱图：(A)  $t_D = 29.8$  ms；(B) 35.2 ms；(C) 39.9 ms；(D) 51.2 ms 时的 FAIMS 谱图；(E) CV = -11.5 V；(F) -9.4 V；(G) -6.5 V；(H) -3.1 V 时的 IMS 谱图**



已有研究中已经充分证明，使用氮气和氦气的混合气体作为 FAIMS 载气可以显著提高 FAIMS 模块的分辨力<sup>[32-33]</sup>。因此，为了进一步评估 FAIMS-IMS 二维气相分离技术可实现的 最大结构分辨力，使用不同体积比的氮气/氦气混合气体作为该 p-FAIMS 模块的载气，并由 此进一步分离了缓激肽离子中未被分离的异构体峰。通过将混合气体中氦气的比例由 0%提 升至 40%，图 5(A)及 5(B)分别显示了在不同氦气比例条件下采集得到的 $(BK + H^+)^+$ 离子及  $(BK + 2H^+)^{2+}$ 离子的 FAIMS 谱图。如图 5 所示，所有缓激肽离子谱峰的 CV 绝对值都随着混 合气体中氦气比例的增加而明显提升。与 0%氦气条件下采集得到的 FAIMS 谱图相比，当 混合气体中氦气的比例达到 40%时，可以发现在采集得到的 $(BK + H^+)^+$ 离子及 $(BK + 2H^+)^{2+}$  离子的 FAIMS 谱图中，有更多的异构体峰被分离解析出来。并且，由于有更多异构体峰被 完整分离出来，在 40%氦气条件下采集得到的 FAIMS 谱图中， $(BK + 2H^+)^{2+}$ 离子谱峰的峰宽 也较纯氮气时下降了约 20% - 30%。因此，图 5 中显示的实验结果清楚地表明，随着 FAIMS 载气中氦气比例的增加，FAIMS 模块的分辨力可以得到显著提升。并且 FAIMS 分辨力的提 升也进一步提高了 FAIMS-IMS 二维气相分离技术的整体分辨力。



**图 5 不同氦气比例下采集得到的 $(BK + H^+)^+$ 离子及 $(BK + 2H^+)^{2+}$ 离子的 FAIMS 谱图：(A) 不同氦气比 例下采集得到的 $(BK + H^+)^+$ 离子的 FAIMS 谱图；(B) 不同氦气比例下采集得到的 $(BK + 2H^+)^{2+}$ 离子的 FAIMS 谱图**



如图 6 所示, 随着 FAIMS 模块中氦气比例的提升, 在  $t_D$ -selected FAIMS 谱图中, 也可以发现更多缓激肽离子的异构体峰。当氦气比例达到 40% 时, 已经可以发现超 20 种的  $(BK + H^+)^+$  离子异构体峰及超 10 种的  $(BK + 2H^+)^{2+}$  离子异构体峰。而在已报道的文献中, 已有的高分辨离子迁移谱设备, 包括 SLIM-IMS、IMS-IMS 和 TIMS 也曾被用于探索  $(BK + 2H^+)^{2+}$  离子的结构多样性。根据已有文献报道, 使用上述技术分别可以分离出 2 个、2 个和 3 个  $(BK + 2H^+)^{2+}$  离子的异构体峰, 远少于使用搭建的 FAIMS-IMS 设备所能分离的结果。遗憾的是, 在已有文献中未能找到使用高分辨离子迁移谱技术分离  $(BK + H^+)^+$  离子的实验结果, 但  $(BK + 2H^+)^{2+}$  离子的结果仍然表明, 搭建的 FAIMS-IMS 二维气相分离技术的分辨力要远高于任何已有基于离子迁移谱技术的分析设备。

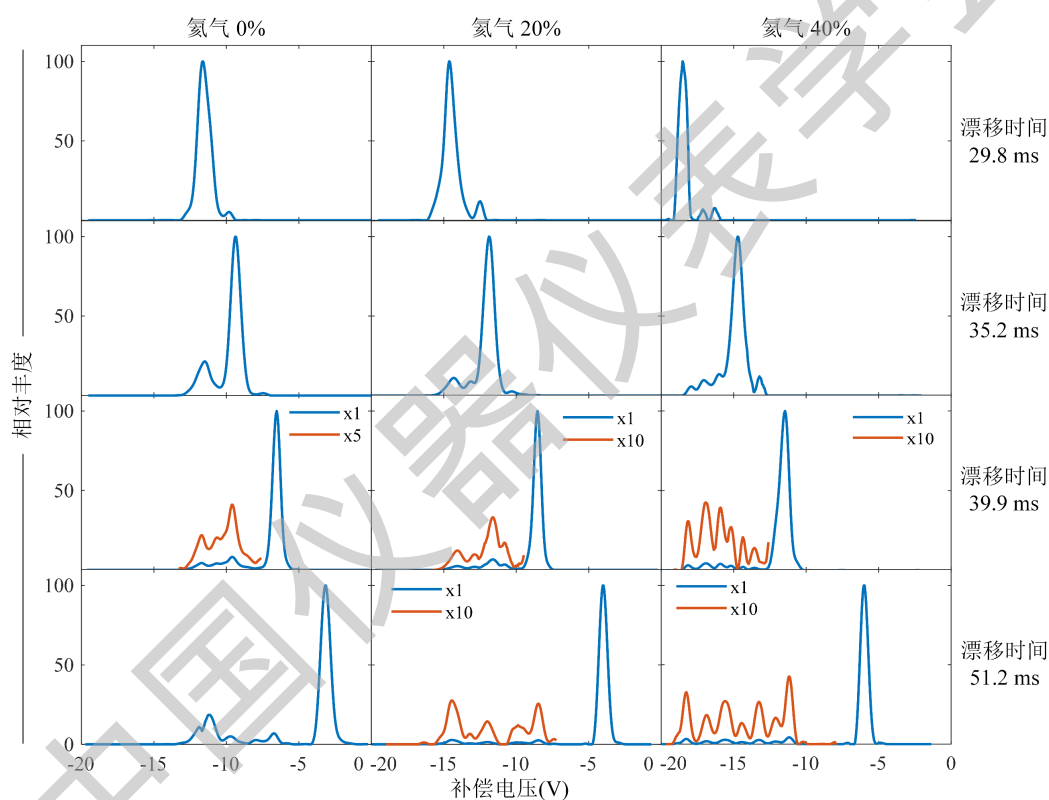


图 6 在不同氦气比例下采集得到的  $(BK + H^+)^+$  离子的  $t_D$ -selected FAIMS 谱图

为了进一步评估搭建的 FAIMS-IMS 二维气相分离设备的整体分辨力, 根据上述实验结果对仪器的整体结构分辨力进行了理论计算。其中 FAIMS-IMS 的整体分辨力 (resolving power,  $R_{F/I}$ ) 可以通过下式进行计算:

$$R_{F/I} = (1 - r_{F/I}) \cdot R_F \cdot R_I \quad (6)$$

其中,  $R_F$  代表 FAIMS 模块的分辨力,  $R_I$  表示 IMS 模块的分辨力,  $r_{F/I}$  则是 FAIMS 及 IMS 之间的相关性系数, 而这一系数可以通过以下公式进行计算<sup>[34]</sup>:

$$r_{F/I} = \frac{\text{Cov}([\text{CV}], [t_D])}{\sqrt{\text{Var}([\text{CV}]) \cdot \text{Var}([t_D])}} \quad (7)$$

其中  $[\text{CV}]$  和  $[t_D]$  是所有  $(\text{BK} + \text{H}^+)^+$  离子及  $(\text{BK} + 2\text{H}^+)^{2+}$  离子异构体峰所对应的 CV 值和 IMS 漂移时间的数据集,  $\text{Cov}([\text{CV}], [t_D])$  是  $[\text{CV}]$  与  $[t_D]$  之间的协方差,  $\text{Var}([\text{CV}])$  和  $\text{Var}([t_D])$  为  $[\text{CV}]$  和  $[t_D]$  的方差。为了计算 FAIMS 和 IMS 模块之间的实际相关性系数, 采集了所有氦气比例条件下所能检测到的  $(\text{BK} + \text{H}^+)^+$  离子及  $(\text{BK} + 2\text{H}^+)^{2+}$  离子异构体峰的 CV 值和 IMS 漂移时间, 其结果如图 7 所示。尽管  $(\text{BK} + \text{H}^+)^+$  离子及  $(\text{BK} + 2\text{H}^+)^{2+}$  离子的 CV 绝对值以及分离出的异构体峰的数量都随着载气中氦气比例的增加而明显增加, 但相关异构体峰的 FAIMS CV 绝对值及 IMS 漂移时间在不同氦气比例下都遵循类似的分布趋势。而如表 1 所示, 在不同氦气比例下, 计算得到的 FAIMS 及 IMS 之间相关系数分布在 0.33 至 0.42 的范围内, 其平均值为 0.36。

表 1 中的计算结果证明了 FAIMS 和 IMS 分离之间确实高度正交性。为了进一步计算 FAIMS-IMS 的整体结构分辨力, 可利用下式分别计算 IMS 及 FAIMS 的结构分辨力<sup>[35-37]</sup>:

$$R_I = \frac{t_p}{w_I}, R_F = \frac{CV_p}{w_F} \quad (8)$$

在上述公式中,  $t_p$  是 IMS 谱峰在最大峰强处所对应的漂移时间,  $w_I$  是该 IMS 谱峰的半峰宽,  $CV_p$  是 FAIMS 谱峰在最大峰强处所对应的 CV 绝对值,  $w_F$  是该 FAIMS 谱峰的半峰宽。在 40% 氦气的条件下, 对于  $(\text{BK} + \text{H}^+)^+$  离子, FAIMS 和 IMS 的最佳分辨力分别为 53.5 ( $t_p = 51.32 \text{ ms}$ ,  $w_I = 0.96 \text{ ms}$ ) 和 29.9 ( $CV_p = 18.53 \text{ V}$ ,  $w_F = 0.62 \text{ V}$ )。而对于  $(\text{BK} + 2\text{H}^+)^{2+}$  离子, FAIMS 和 IMS 的最佳分辨力分别为 56 ( $t_p = 28.93 \text{ ms}$ ,  $w_I = 0.53 \text{ ms}$ ) 和 40.1 ( $CV_p = 20.43 \text{ V}$ ,  $w_F = 0.51 \text{ V}$ )。根据公式 (6), 利用  $r = 0.36$  的平均值, 可以计算得到  $(\text{BK} + \text{H}^+)^+$  离子及  $(\text{BK} + 2\text{H}^+)^{2+}$  离子所对应的 FAIMS-IMS 二维气相分离技术的最佳整体分辨力分别约为 1020 和 1400, 这明显要高于任何已知商业化离子迁移率分离技术所能实现的分辨力。并且, 随着  $R_F$  和  $R_I$  的提升, FAIMS-IMS 的整体分辨力还可以实现进一步的提升, 这使得 FAIMS-IMS 能够作为一种非常有应用前途的超高分辨离子异构体结构解析技术被普及推广。

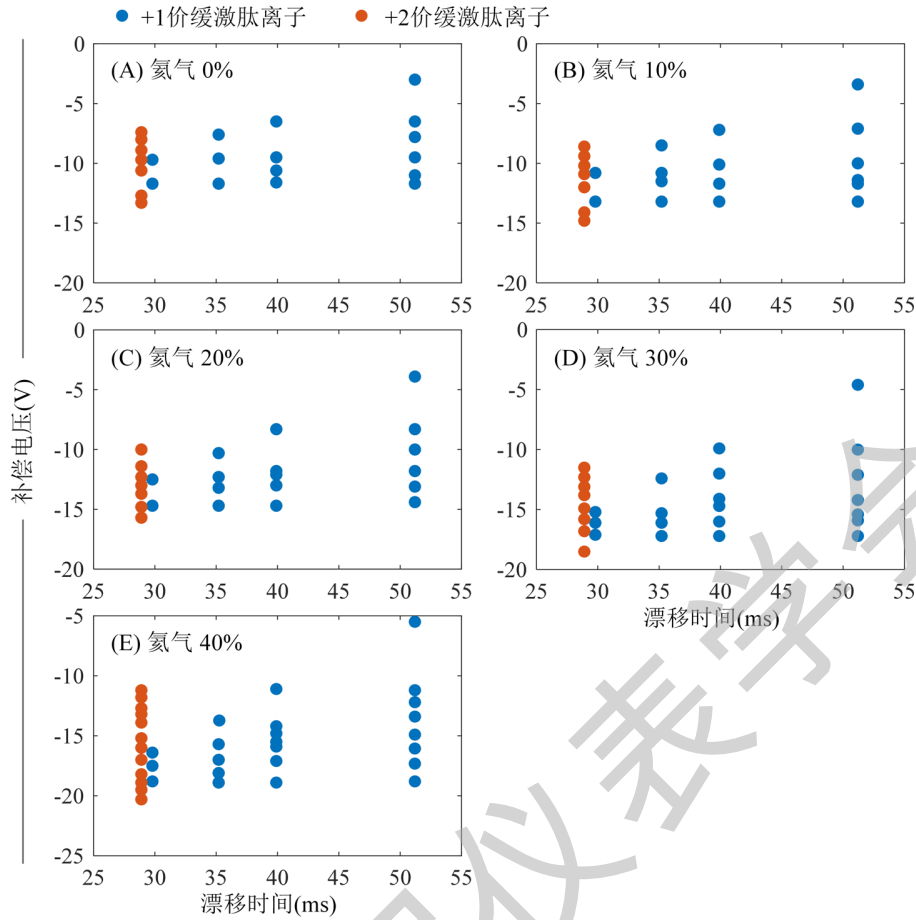


图 7 在不同氮气比例下采集得到的(BK + H<sup>+</sup>)<sup>+</sup>离子及(BK + 2H<sup>+</sup>)<sup>2+</sup>离子异构体峰所对应的 CV 值和漂移时间: (A) 0% 氮气; (B) 10%氮气; (C) 20%氮气; (D) 30%氮气; (E) 40%氮气

表 1 不同氮气比例下 FAIMS 及 IMS 之间的相关性系数

氮气比例	0%	10%	20%	30%	40%	平均值
$r$	0.34	0.33	0.42	0.34	0.36	0.36

## 4 结论

通过将高分辨率 p-FAIMS 模块与高性能 IMS-QTOF MS 系统进行联用, 成功开发了一款新型超高结构分辨率的 FAIMS-IMS-MS 联用设备, 并利用该设备对+1 价和+2 价缓激肽离子的结构多样性进行了详细的实验分析。以 100%纯氮气作为 FAIMS 模块的载气, 实验结果提供了一个令人信服的结论, 即 FAIMS 和 IMS 技术在结构分离维度上是高度正交的。具有不同 IMS 漂移时间的(BK + H<sup>+</sup>)<sup>+</sup>离子异构体可能具有相同的 FAIMS CV 值, 具有不同

FAIMS CV 值的 $(BK + H^+)^+$ 离子也可能具有相同的 IMS 漂移时间。依据这一结果可以判定, FAIMS-IMS 二维气相分离技术较单一的 FAIMS 或 IMS 分离技术可以获得比更高的分辨力。并且, 通过提高 FAIMS 或 IMS 的分辨力, 可以进一步提高 FAIMS-IMS 技术的整体分辨力。例如, 使用氮气/氦气的混合气体作为 FAIMS 载气, 可以有效提升 FAIMS 的分辨力, 进而可以显著提升 FAIMS-IMS 的整体分辨力。在氦气浓度为 40% 的条件下, 一共发现超 20 种的 $(BK + H^+)^+$ 离子异构体峰及超 10 种的 $(BK + 2H^+)^{2+}$ 离子异构体峰。通过计算 FAIMS 和 IMS 技术之间的相关性系数及 IMS 和 FAIMS 的分辨力, 计算结果显示利用 $(BK + H^+)^+$ 离子及 $(BK + 2H^+)^{2+}$ 离子, FAIMS-IMS 二维气相分离技术所能实现的最佳整体分辨力分别约为 1020 和 1400, 这一数值要远高于任何迄今为止已知的商业化离子迁移率分离技术的分辨率, 证明 FAIMS-IMS-MS 能够作为一种非常有应用前景的生物分子结构解析设备被普及推广。

#### 参考文献:

- [1] Clemmer D E, Russell D H, Williams E R. Characterizing the Conformationome: Toward a Structural Understanding of the Proteome[J]. *Acc. Chem. Res.*, 2017, 50(3): 556-560.
- [2] Han L, Ruotolo B T. Ion mobility-mass spectrometry differentiates protein quaternary structures formed in solution and in electrospray droplets[J]. *Anal. Chem.*, 2015, 87(13): 6808-6813.
- [3] Shvartsburg A A, Li F, Tang K, et al. Characterizing the structures and folding of free proteins using 2-D gas-phase separations: observation of multiple unfolded conformers[J]. *Anal. Chem.*, 2006, 78(10): 3304-3315.
- [4] Badman E R, Hoaglund-Hyzer C S, Clemmer D E. Dissociation of different conformations of ubiquitin ions[J]. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2002, 13(6): 719-723.
- [5] Ilisz I, Aranyi A, Pataj Z, et al. Recent advances in the direct and indirect liquid chromatographic enantioseparation of amino acids and related compounds: A review[J]. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, 69: 28-41.
- [6] Kamencev M, Yakimova N, Moskvina L, et al. Fast isotopic separation of  $^{10}B$  and  $^{11}B$  boric acid by capillary zone electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2016, 37(22): 3017-3019.
- [7] Flick T G, Campuzano I D G, Bartberger M D. Structural resolution of 4-substituted proline diastereomers with ion mobility spectrometry via alkali metal ion cationization[J]. *Anal. Chem.*, 2015, 87(6): 3300-3307.
- [8] Dodds J N, Baker E S. Ion mobility spectrometry: fundamental concepts, instrumentation, applications, and the road ahead[J]. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2019, 30(11): 2185-2195.
- [9] Cumeras R, Figueras E, Davis C E, et al. Review on ion mobility spectrometry. Part 1: current instrumentation[J]. *Analyst*, 2015, 140(5): 1376-1390.
- [10] Cumeras R, Figueras E, Davis C E, et al. Review on ion mobility spectrometry. Part 2:

- hyphenated methods and effects of experimental parameters[J]. *Analyst*, 2015, 140(5): 1391-1410.
- [11] Tang K, Li F, Shvartsburg A A, et al. Two-dimensional gas-phase separations coupled to mass spectrometry for analysis of complex mixtures[J]. *Anal. Chem.*, 2005, 77(19): 6381-6388.
- [12] Mesleh M F, Hunter J M, Shvartsburg A A, et al. Structural information from ion mobility measurements: effects of the long-range potential[J]. *J. Phys. Chem.*, 1996, 100(40): 16082-16086.
- [13] Shvartsburg A A, Liu B, Siu K W M, et al. Evaluation of ionic mobilities by coupling the scattering on atoms and on electron density[J]. *J. Phys. Chem. A*, 2000, 104(26): 6152-6157.
- [14] Handy R, Barnett D A, Purves R W, et al. Determination of nanomolar levels of perchlorate in water by ESI-FAIMS-MS[J]. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 2000, 15(8): 907-911.
- [15] Barnett D A, Ells B, Guevremont R, et al. Evaluation of carrier gases for use in high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry[J]. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2000, 11(12): 1125-1133.
- [16] Gabryelski W, Froese K L. Rapid and sensitive differentiation of anomers, linkage, and position isomers of disaccharides using high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS)[J]. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2003, 14(3): 265-277.
- [17] Krylov E V, Nazarov E G, Miller R A. Differential mobility spectrometer: Model of operation[J]. *Int. J. Mass Spectrom.*, 2007, 266(1-3): 76-85.
- [18] Baird M A, Shliaha P V, Anderson G A, et al. High-resolution differential ion mobility separations/orbitrap mass spectrometry without buffer gas limitations[J]. *Anal. Chem.*, 2019, 91(10): 6918-6925.
- [19] Shvartsburg A A, Isaac G, Leveque N, et al. Separation and classification of lipids using differential ion mobility spectrometry[J]. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2011, 22(7): 1146-1156.
- [20] Barnett D A, Ells B, Guevremont R, et al. Separation of leucine and isoleucine by electrospray ionization-high field asymmetric waveform ion mobility spectrometry-mass spectrometry[J]. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1999, 10(12): 1279-1284.
- [21] Kopylov A T, Myasoedov N F, Dadayan A K, et al. Use of deuterium labeling by high-temperature solid-state hydrogen-exchange reaction for mass spectrometric analysis of bradykinin biotransformation[J]. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2016, 30(11): 1283-1294.
- [22] Gangnus T, Burckhardt B B. Improving sensitivity for the targeted LC-MS/MS analysis of the peptide bradykinin using a design of experiments approach[J]. *Talanta*, 2020, 218: 121134.
- [23] Guo Y, Wang J, Javahery G, et al. Ion mobility spectrometer with radial collisional focusing[J]. *Anal. Chem.*, 2005, 77(1): 266-275.
- [24] Pierson N A, Chen L, Valentine S J, et al. Number of solution states of bradykinin from ion mobility and mass spectrometry measurements[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133(35): 13810-13813.
- [25] Shvartsburg A A, Li F, Tang K, et al. High-resolution field asymmetric waveform ion mobility

- spectrometry using new planar geometry analyzers[J]. *Anal. Chem.*, 2006, 78(11): 3706-3714.
- [26] Shvartsburg A A, Danielson W F, Smith R D. High-resolution differential ion mobility separations using helium-rich gases[J]. *Anal. Chem.*, 2010, 82(6): 2456-2462.
- [27] Li J, Gao W, Wu H, et al. On the resolution, sensitivity and ion transmission efficiency of a planar FAIMS[J]. *Int. J. Mass Spectrom.*, 2022, 471: 116727.
- [28] Li J, Gao W, Wu H, et al. Application of zero-phase digital filtering for effective denoising of field asymmetric waveform ion mobility spectrometry signal[J]. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2022, 36(1): e9211.
- [29] Shvartsburg A A, Prior D C, Tang K, et al. High-resolution differential ion mobility separations using planar analyzers at elevated dispersion fields[J]. *Anal. Chem.*, 2010, 82(18): 7649-7655.
- [30] Valentine S J, Counterman A E, Clemmer D E. Conformer-dependent proton-transfer reactions of ubiquitin ions[J]. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1997, 8(9): 954-961.
- [31] Shelimov K B, Clemmer D E, Hudgins R R, et al. Protein structure in vacuo: gas-phase conformations of BPTI and cytochrome c[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119(9): 2240-2248.
- [32] Shvartsburg A A, Seim T A, Danielson W F, et al. High-definition differential ion mobility spectrometry with resolving power up to 500[J]. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2012, 24(1): 109-114.
- [33] Barnett D A, Ells B, Guevremont R, et al. Application of ESI-FAIMS-MS to the analysis of tryptic peptides[J]. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2002, 13(11): 1282-1291.
- [34] Amdisen A. Pearson's correlation coefficient, p-value, and lithium therapy[J]. *Biol. Psychiat.*, 1987, 22(7): 926-928.
- [35] Kolakowski B M, Mester Z. Review of applications of high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS) and differential mobility spectrometry (DMS)[J]. *Analyst*, 2007, 132(9): 842-864.
- [36] Shvartsburg A A, Tang K, Smith R D. Differential ion mobility separations of peptides with resolving power exceeding 50[J]. *Anal. Chem.*, 2010, 82(1): 32-35.
- [37] Xie C, Li L, Wu Q, et al. Effective separation of carbohydrate isomers using metal cation and halogen anion complexes in trapped ion mobility spectrometry[J]. *Talanta*, 2021, 225: 121903.