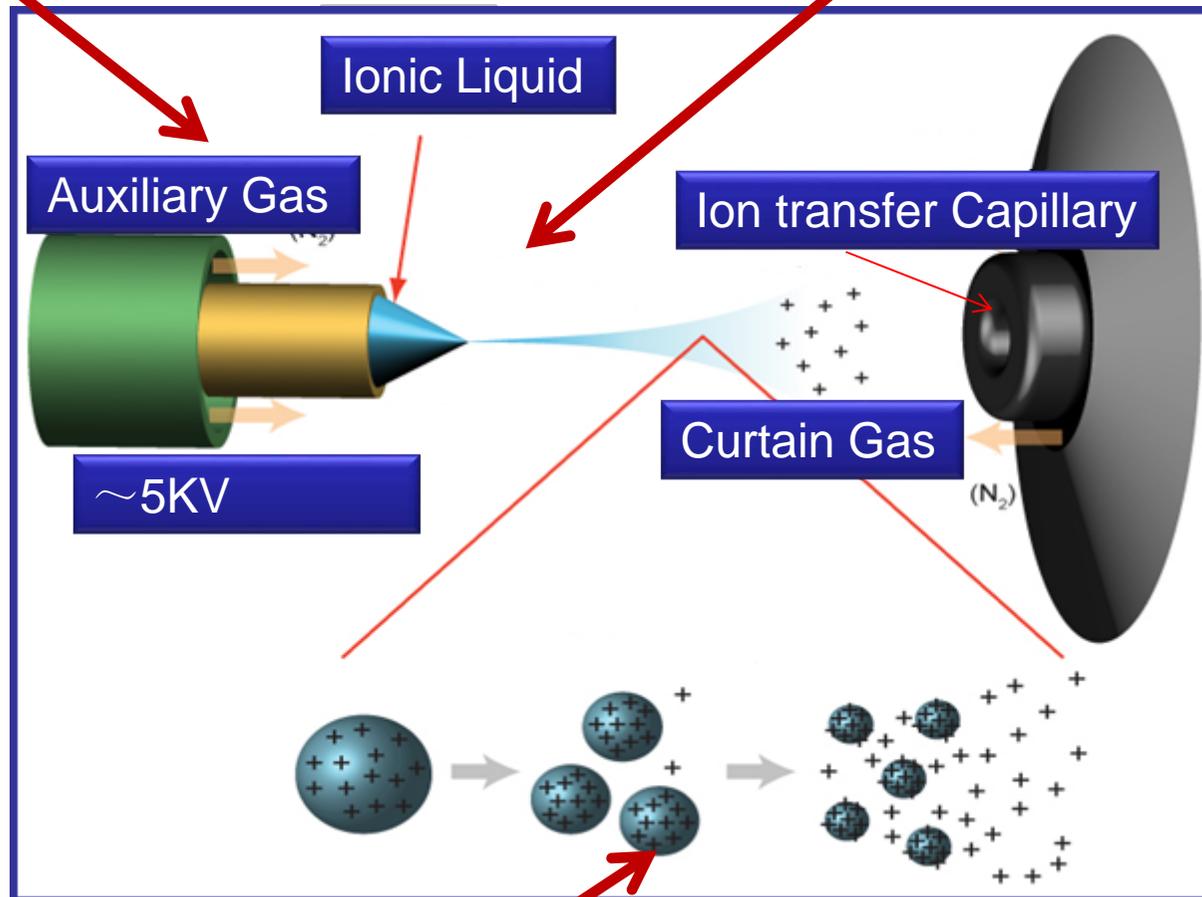


电喷雾离子源机理的修正及应用

ESI Source

1. Pneumatic Flow Field of ESI Cavity

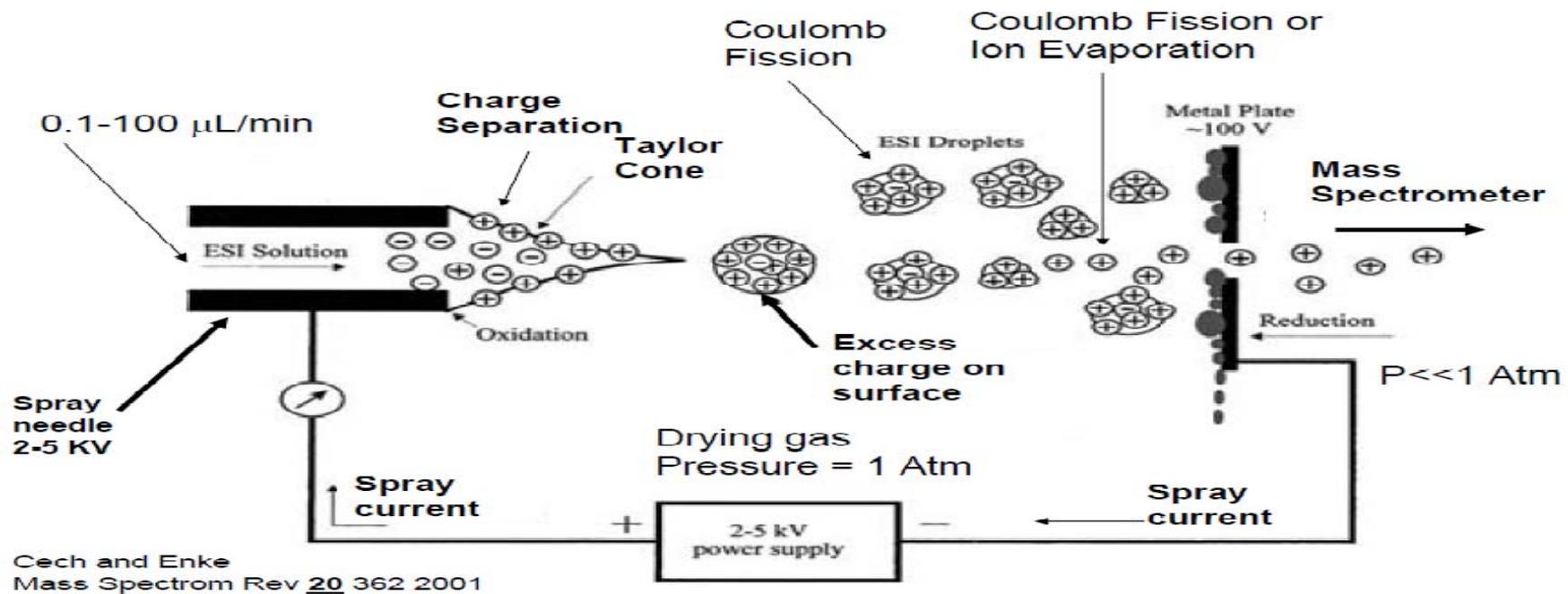
2. Stability of Taylor Cone



3. Molecular Ionization Process

Theoretical Foundation

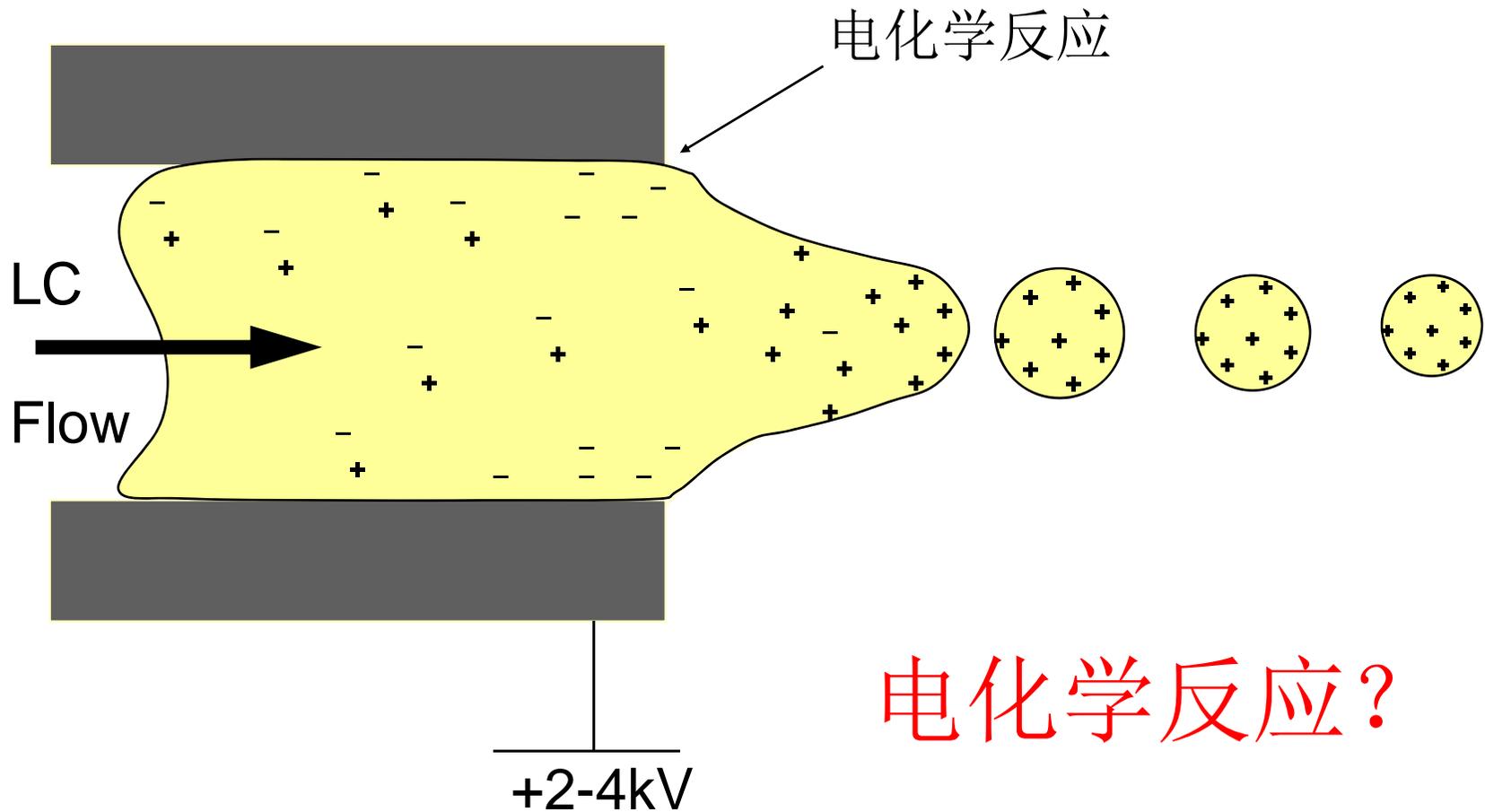
Electrospray Ionization



所有物质在电场中，没有改变状态以前，不可能有多余的静电荷存在。而且在液体内部应该是正负电荷是一一对应的形式存在，正负电荷不可能处于分离状态。

电喷雾离子化原理

形成带电液滴

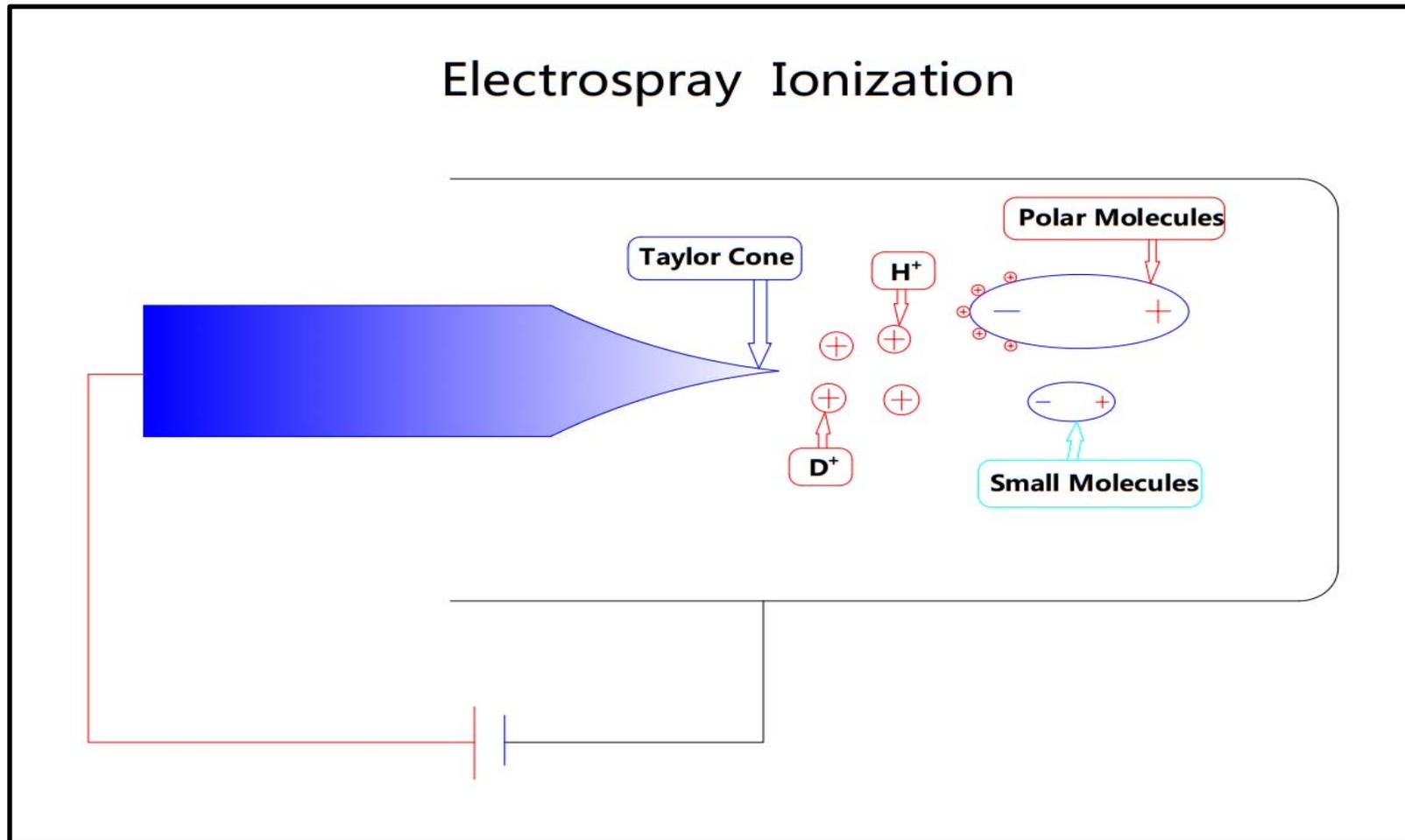


电化学反应?

有3个问题

- 1、质子（氢离子）来自哪里？
- 2、为什么只有电喷雾离子化才可以产生多电荷分子离子？
- 2、为什么会有离子抑制现象？

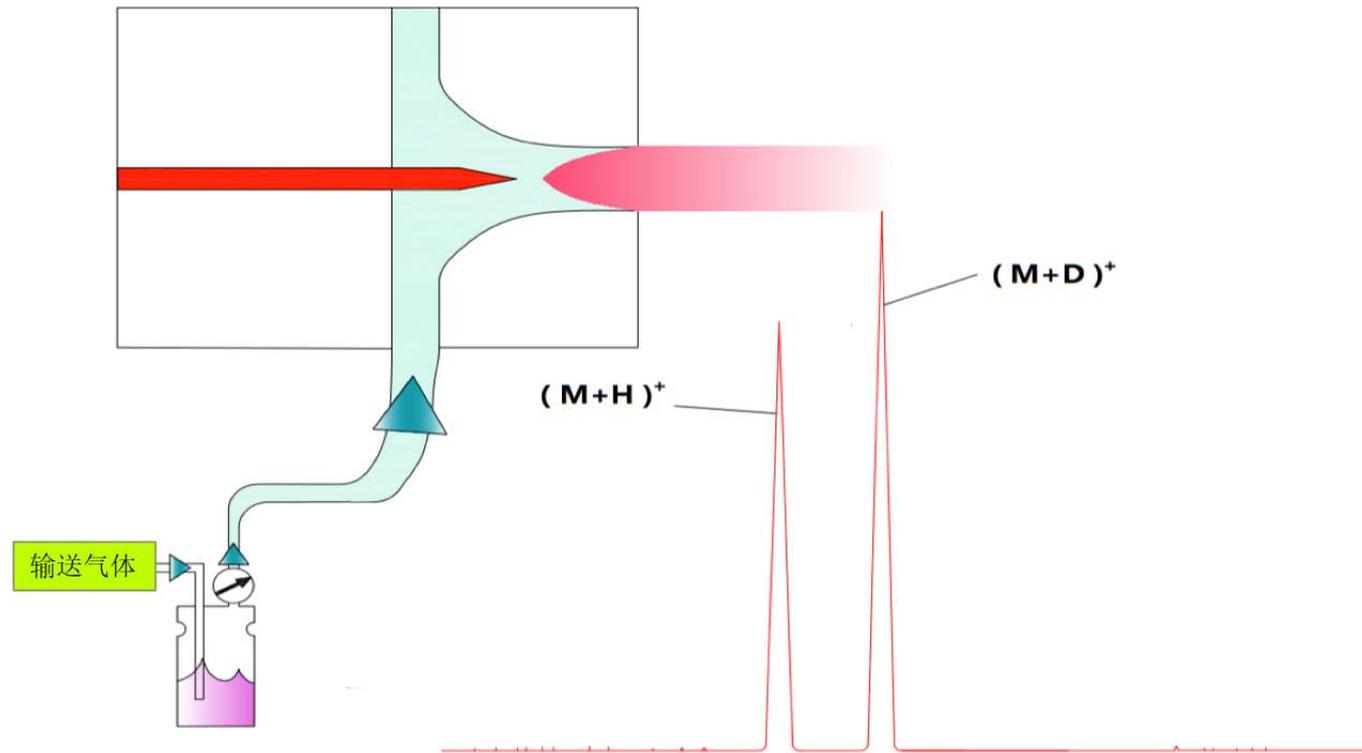
Electrospray Ionization



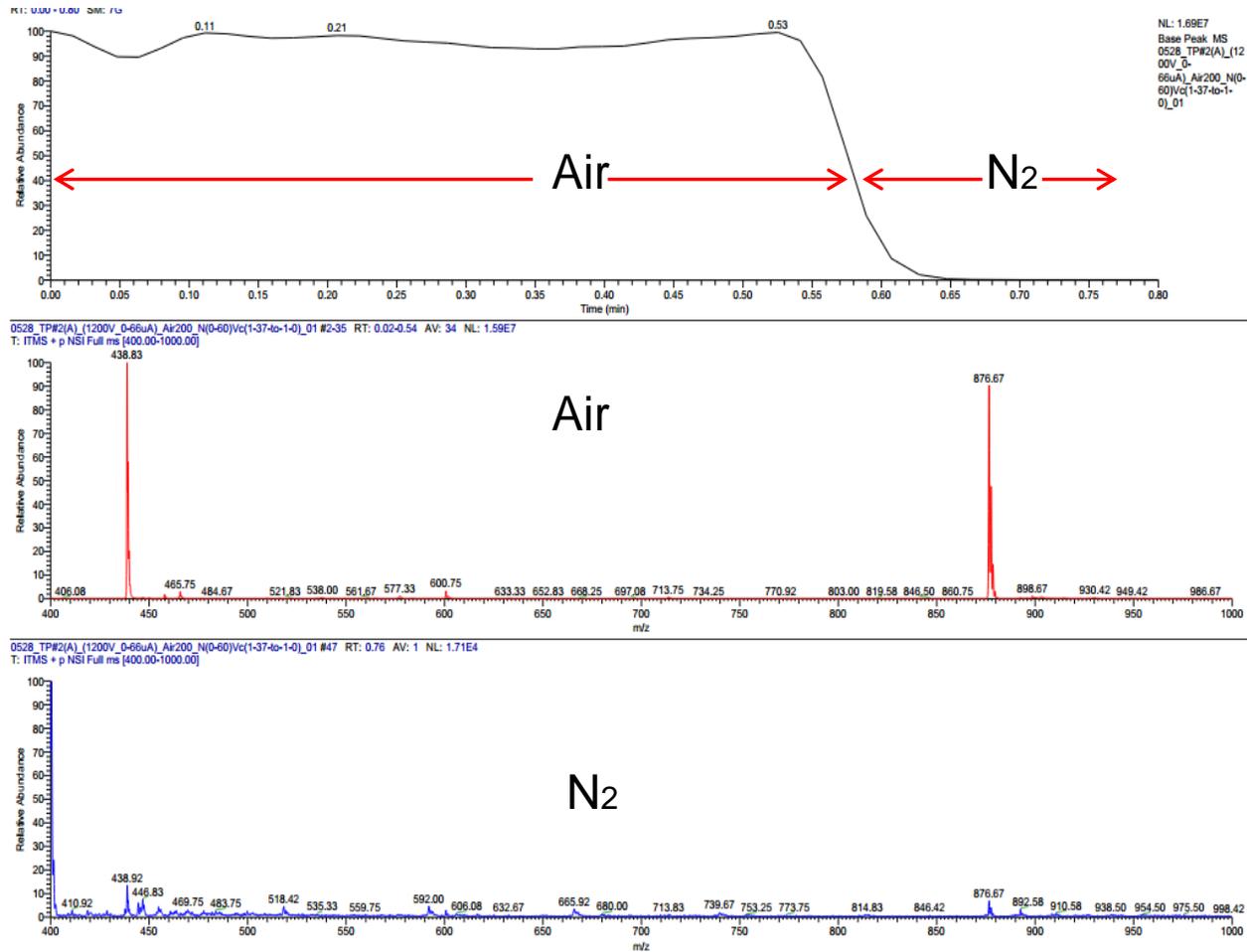
我认为，在发射针上加上正电压以后，发射针内的液体形成泰勒锥（**Taylor Cone**），由于泰勒锥的曲率半径很小（2.9纳米左右）所以产生高电场 $1.5V/A^0$ 左右，将其周围的水蒸气场致异裂（将水分子异裂为 H^+ 与 OH^- ），形成（ H^+ ）氢离子，极性分子经过Taylor Cone的强电场作用，将其极化，极化后的大分子，吸附Taylor Cone附近的氢离子，形成多电荷离子束团。

更简单地说就是：质子氢，来自于泰勒锥外（from out of Taylor Cone），而不是来自于泰勒锥 from Taylor Cone，极性分子的极化来自于泰勒锥 Taylor Cone，

Experiment Schematic Diagram



Nitrogen significantly reduce the signals.



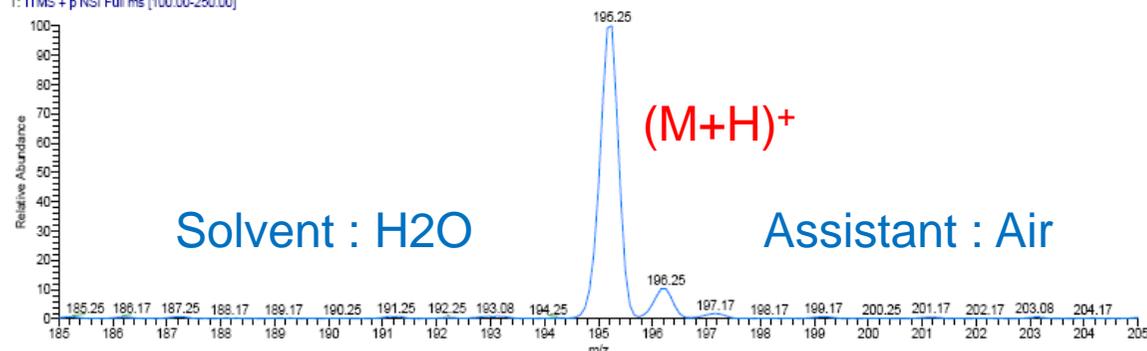
1pm peptide peptide YIYGSKF was infused at the flow rate of 2 μ L/min.
Air or nitrogen was used as assistant gas.

Where does the H⁺ come from?

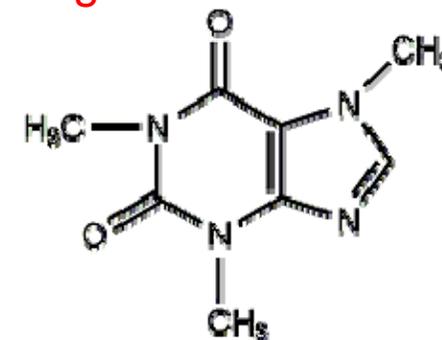
0827_Caf_20ug_ml_D2O_Solvent_Air

2014-08-27 16:12:32

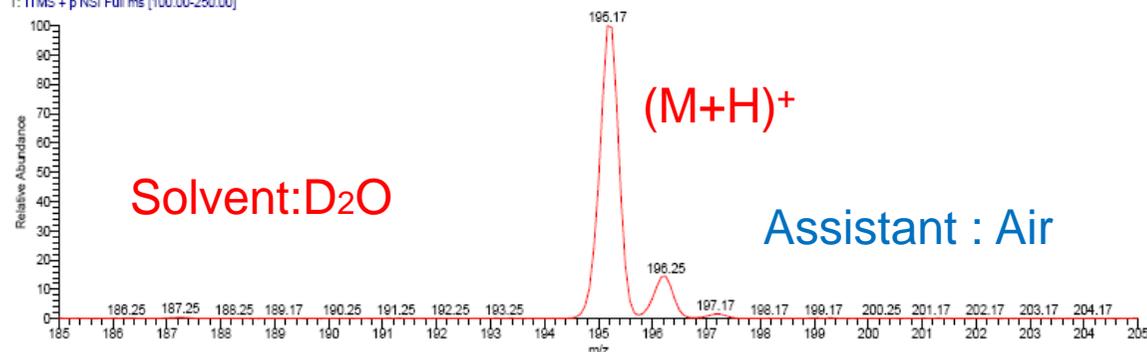
0827_Caf_20ug_ml_H2O_Solvent_Air#16 RT: 0.06 AV: 1 NL: 1.98E6
T: ITMS + p.NSI Full ms [100.00-250.00]



Caffeine: C₈H₁₀N₄O₂
m/z: 194.19
Charge: 1⁺



0827_Caf_20ug_ml_D2O_Solvent_Air#6 RT: 0.02 AV: 1 NL: 3.01E6
T: ITMS + p.NSI Full ms [100.00-250.00]



上图：用水H₂O溶解咖啡因，在空气状态下得到的谱图；(M+H)=195.2

下图：用氘水(D₂O)溶解咖啡因，在空气状态下得到的谱图。(M+H)=195.2

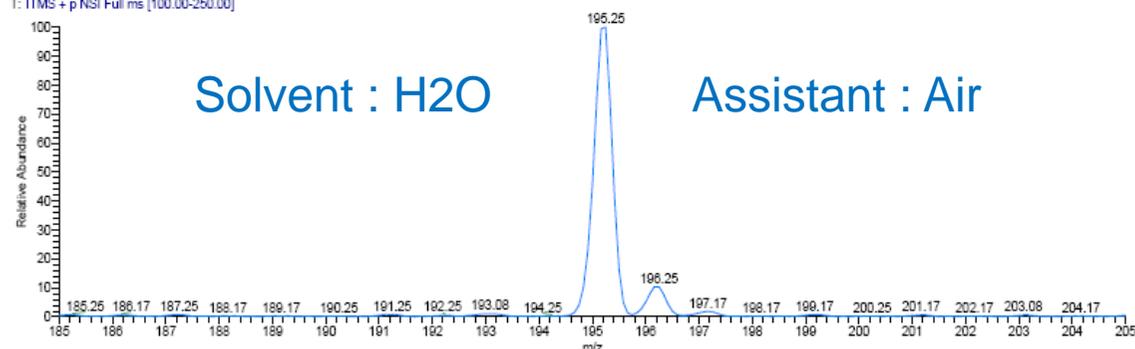
由于咖啡因没有OH键，所以无法产生氢氘交换。如果H⁺氢离子来自于流动相，在用氘水溶解咖啡因时，出现的图谱应该是(M+D)=(194.19+2)=196.2，但得到的谱峰还是与水的时候一样，等于195.2，所以可以说明氢离子不是来自于流动相。

Where does the H⁺ come from?

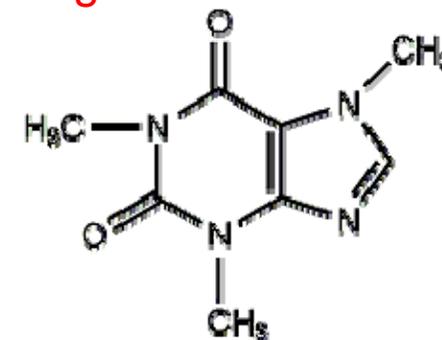
0827_Caf_20ug_ml_H2O_Solvent_D2O

2014-08-27 16:03:23

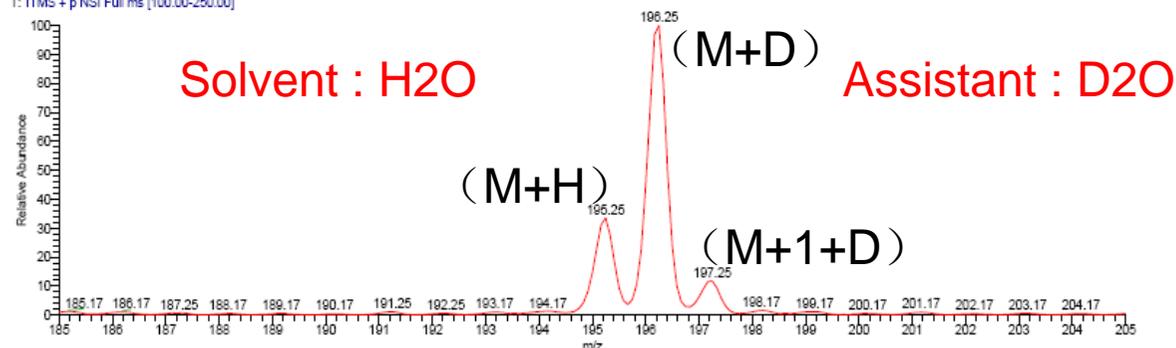
0827_Caf_20ug_ml_H2O_Solvent_Air #1-31 RT: 0.00-0.11 AV: 31 NL: 1.04E6
T: ITMS + p NSI Full ms [100.00-250.00]



Caffeine: C₈H₁₀N₄O₂
m/z: 194.19
Charge: 1⁺



0827_Caf_20ug_ml_H2O_Solvent_D2O #22 RT: 0.08 AV: 1 NL: 1.41E6
T: ITMS + p NSI Full ms [100.00-250.00]



图上：用水H₂O溶解咖啡因，在Air状态下得到的谱图(M+H)=195.2

图下：用水H₂O溶解咖啡因，在发射针的周围用(D₂O)辅助的状态下得到的谱图。出现了(M+D)=196.2

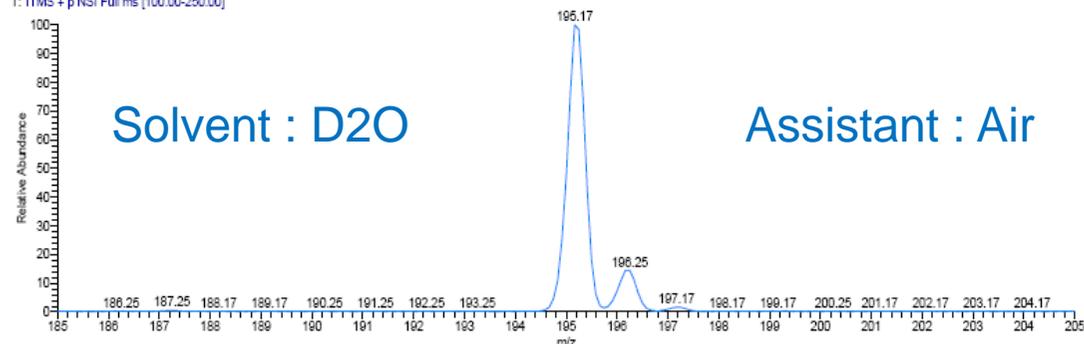
这就说明了D⁺离子来自于气相状态。

Where does the H⁺ come from?

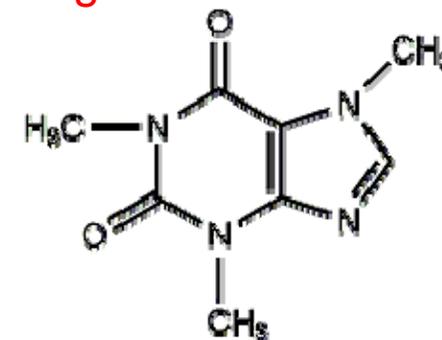
0827_Caf_20ug_ml_D2O_Solvent_Air

2014-08-27 16:12:32

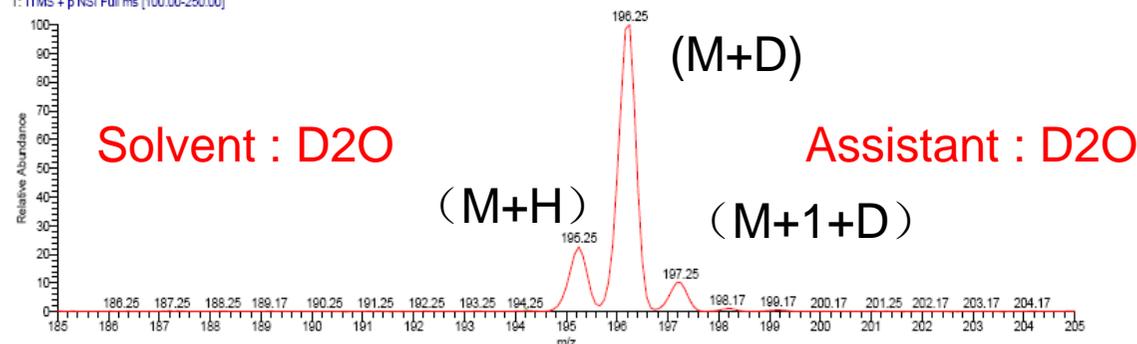
0827_Caf_20ug_ml_D2O_Solvent_Air #1-6 RT: 0.00-0.02 AV: 6 NL: 2.98E6
T: ITMS + p NSI Full ms [100.00-250.00]



Caffeine: $C_8H_{10}N_4O_2$
m/z: 194.19
Charge: 1⁺



0827_Caf_20ug_ml_D2O_Solvent_D2O_Ass #1-6 RT: 0.00-0.02 AV: 6 NL: 3.23E6
T: ITMS + p NSI Full ms [100.00-250.00]

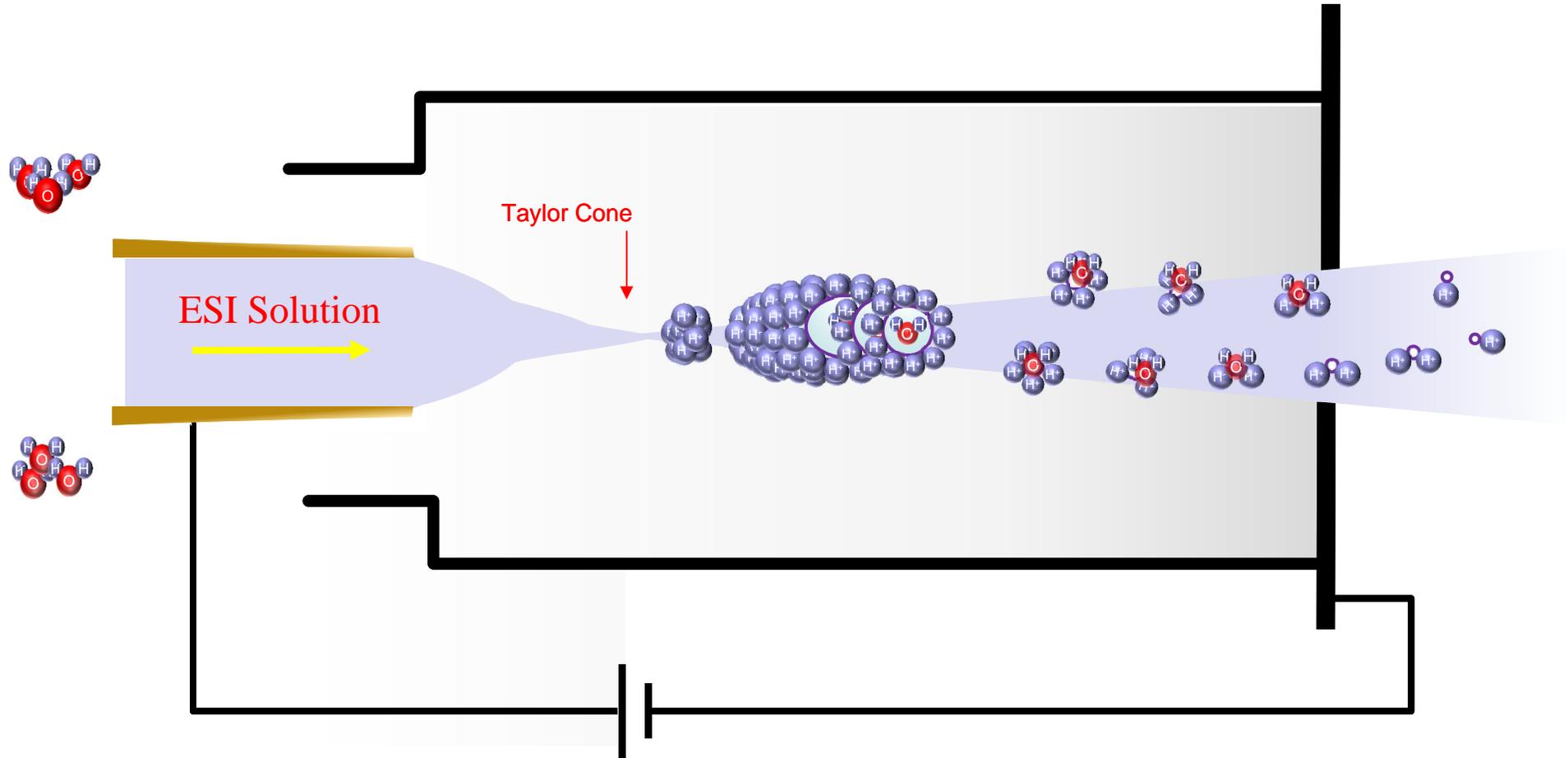


图上：用水D₂O溶解咖啡因，在Air状态下得到的谱图(M+H)=195.2

图下：用水D₂O溶解咖啡因，在发射针的周围用(D₂O)辅助的状态下得到的谱图。出现了(M+D)=196.2

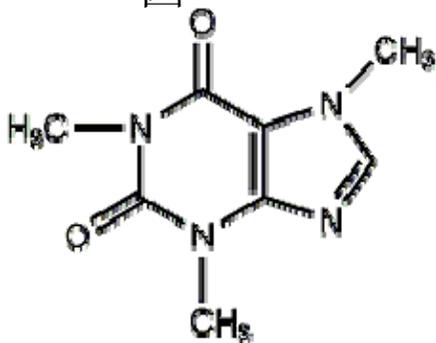
这就说明了D⁺离子来自于气相状态。

Electrospray Ionization

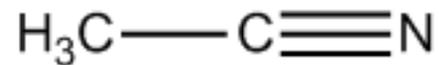


样品：咖啡因（1ng/ul）
进样方式：Infusion，0.5ul/min
溶剂：100% CAN
输送气体：N₂，CO₂，压缩空气
质谱仪：FINNIGAN LTQ

咖啡
因

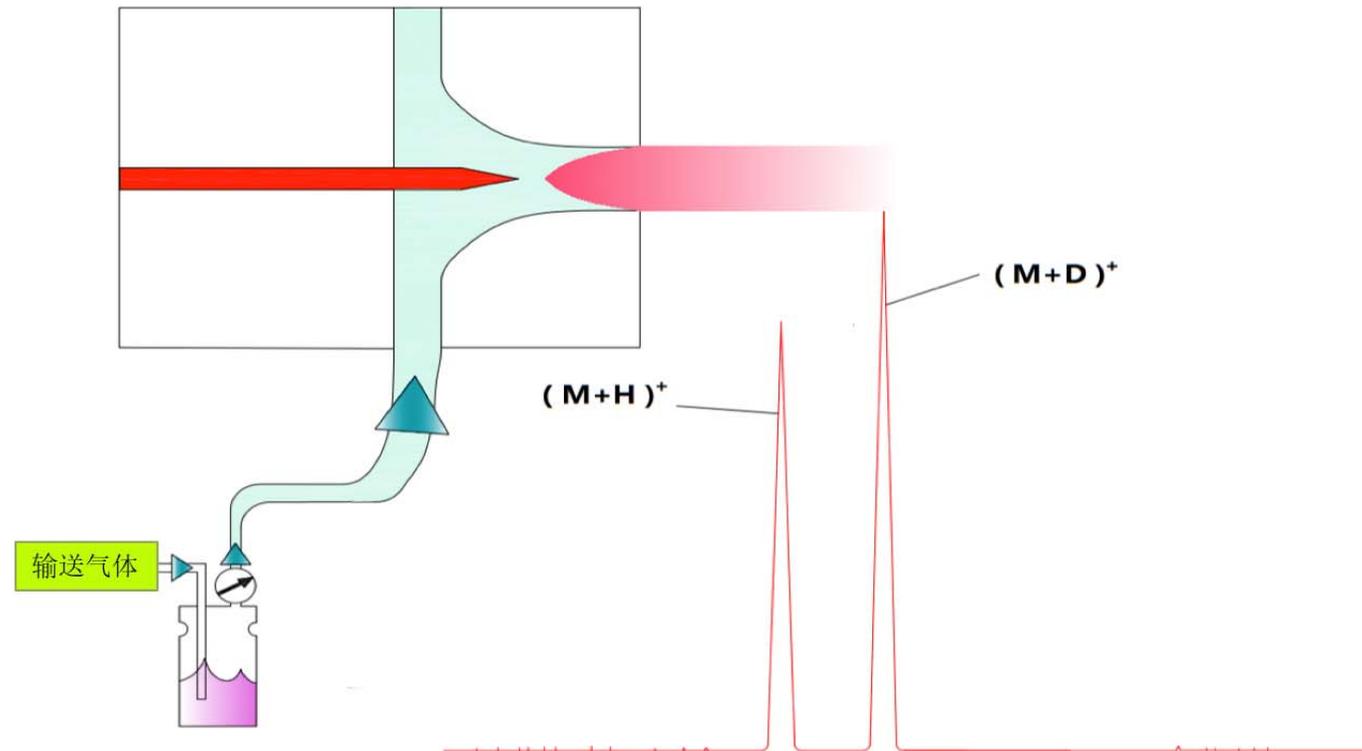


乙腈

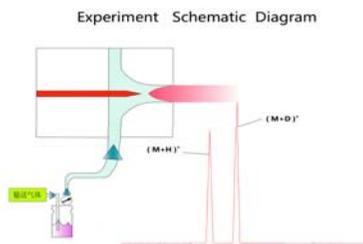


因为溶剂和样品都不具有产生氢离子的机会，如果能得到分子离子峰（M+H），就可以说明氢离子离子源流动相以外的气氛当中。

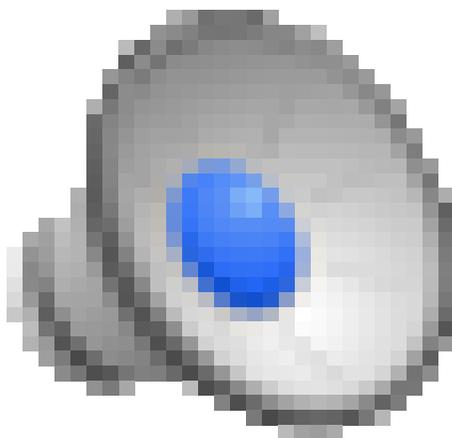
Experiment Schematic Diagram



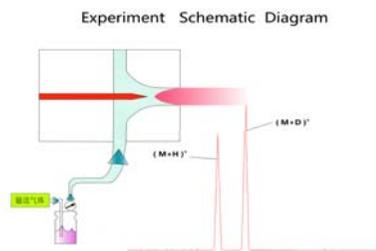
将不同比例的氘/氢水 (D_2O/H_2O) 的混合液体，作为辅助液，用不同的输送气体将辅助液的Vapor送入到离子源的离子化室。如果得到的分子离子峰 $(M+D)/(M+H)$ 之比与液体 (D_2O/H_2O) 的比例相一致，这就证明了电喷雾离子化产生的分子离子中的氢离子来自于气相分子。



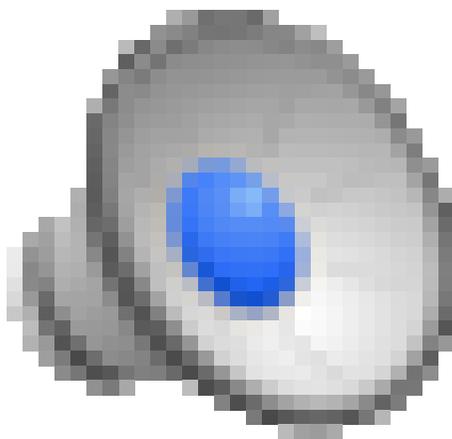
空气-氮气-空气



视频中可以看到，将离子化室充满氮气 N_2 时，离子信号消失，将氮气移除，分子离子信号恢复。

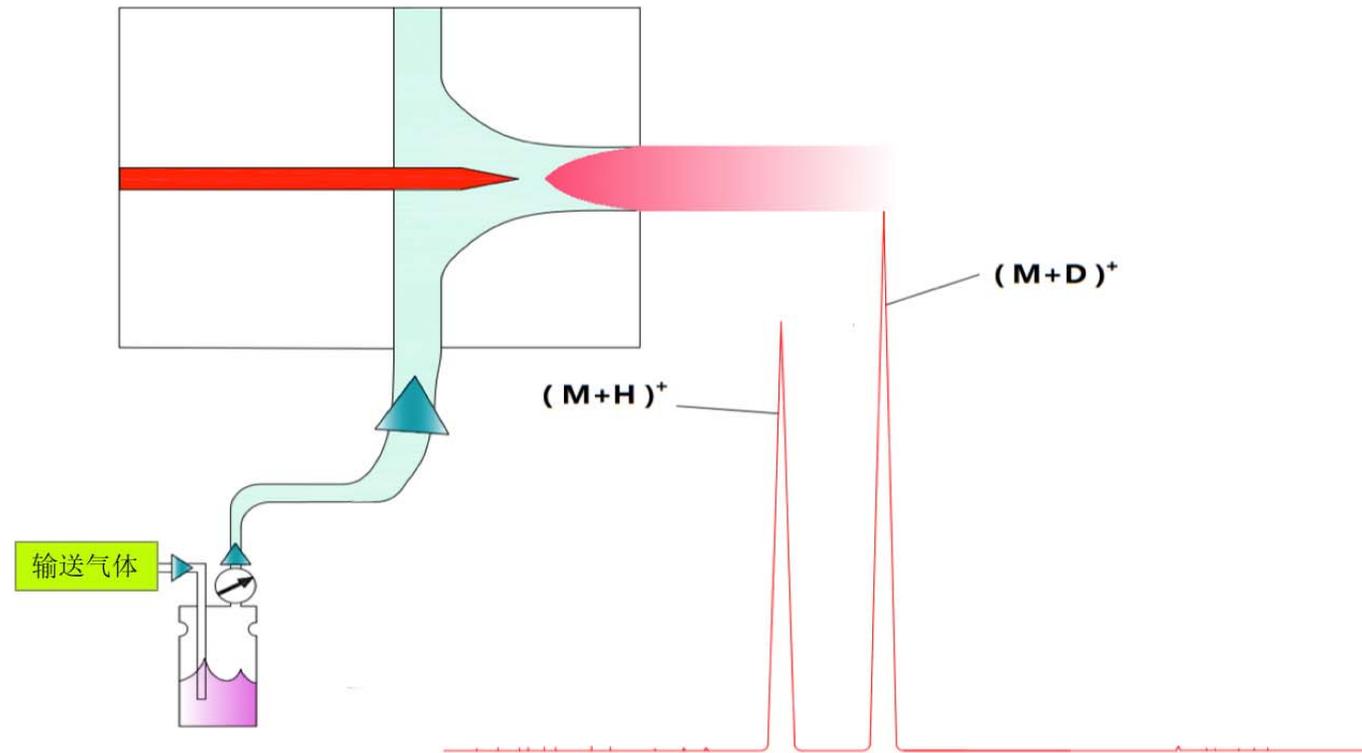


空气-氘水



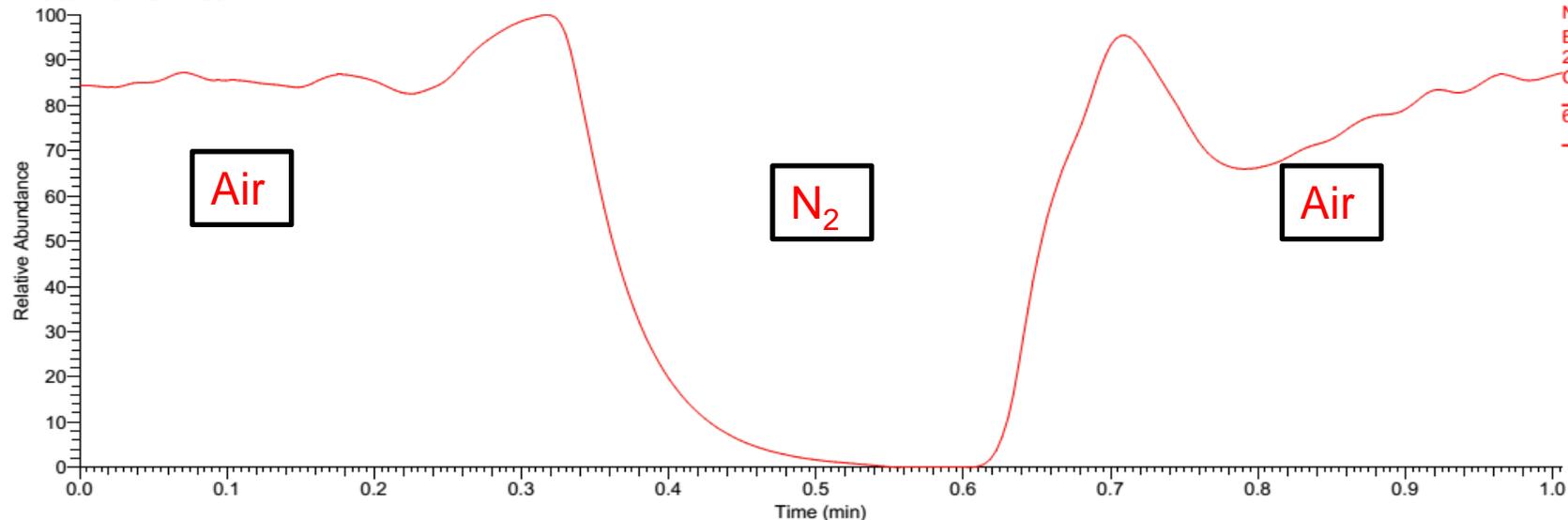
视频中可以看到，将离子化室充满D₂O的过程中，(M+H)向(M+D)过度。

Experiment Schematic Diagram



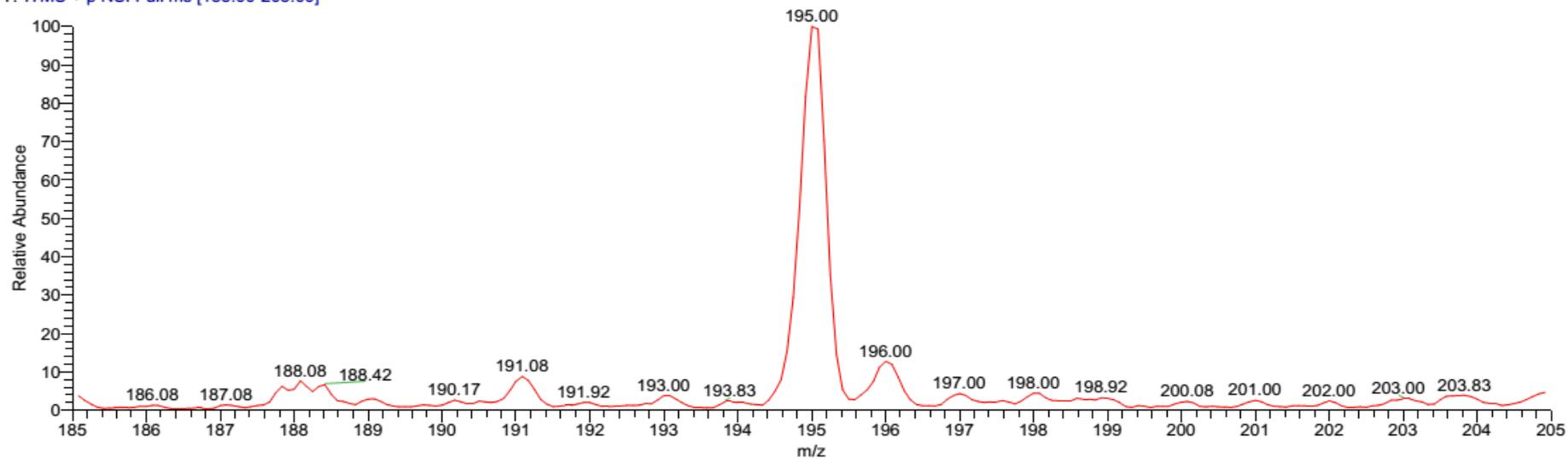
将不同比例的氘/氢水 (D_2O/H_2O) 的混合液体，作为辅助液，用不同的输送气体将辅助液的Vapor送入到离子源的离子化室。

RT: 0.00 - 1.01 SM: 13G



NL: 2.17E6
Base Peak MS
20190626_1ng_ul_
Caffeine_H2O_02ul
_min_1-
6Kv_Air_To_N2_Air
_01

20190626_1ng_ul_Caffeine_H2O_02ul_min_1-6Kv_Air_To_N2_Air_01 #194-203 RT: 0.69-0.72 AV: 10 NL: 2.04E6
T: ITMS + p NSI Full ms [185.00-205.00]



好创生物
ULTRA-FAST

氮气

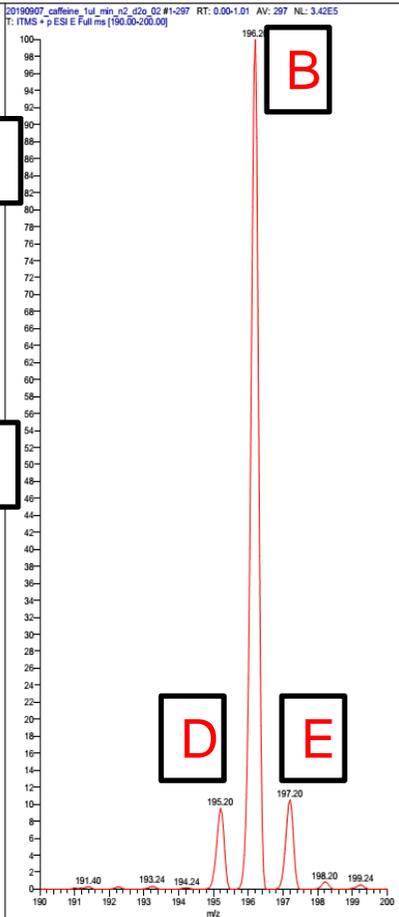
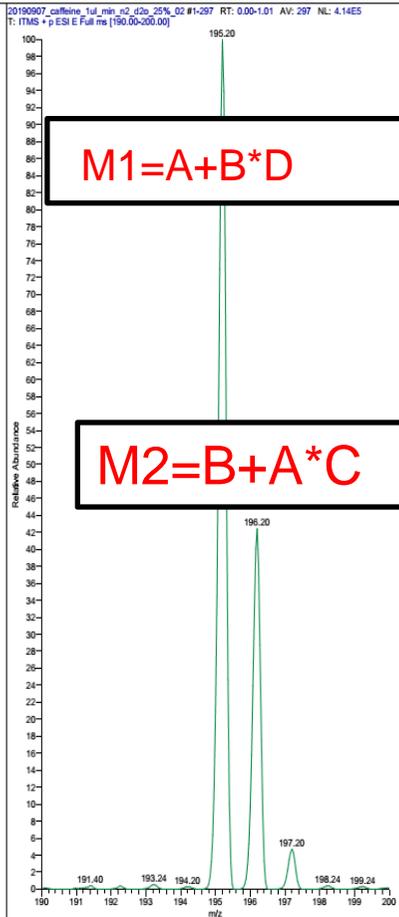
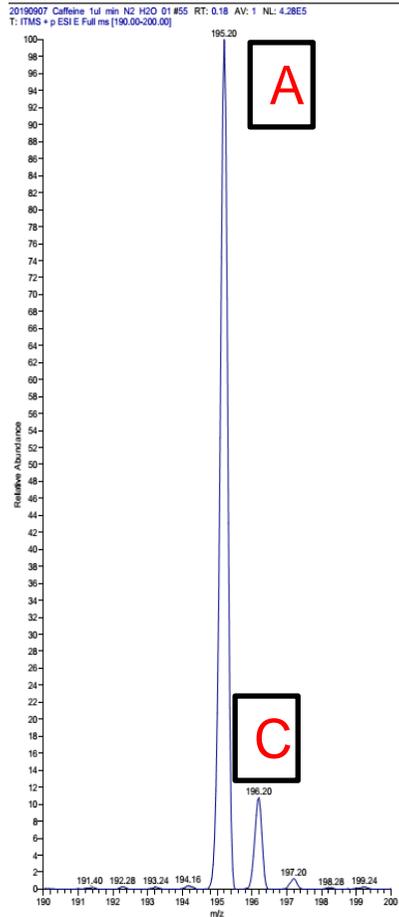
a=0%

a=25%

a=100%

20190907_caffeine_1ul_min_n2_d2o_25%_02

2019-9-11 14:49:13



$$A=(M+H)$$

$$B=(M+D)$$

$$C=(M_d+H)$$

$$D=(M+H)_b$$

$$E=(M_d+D)$$

a=D₂O在辅助液中的比例

M_d表示分子的同位素，D表示氘
理论上E=C

$$D=9.35\%$$

$$C=10.56\%$$

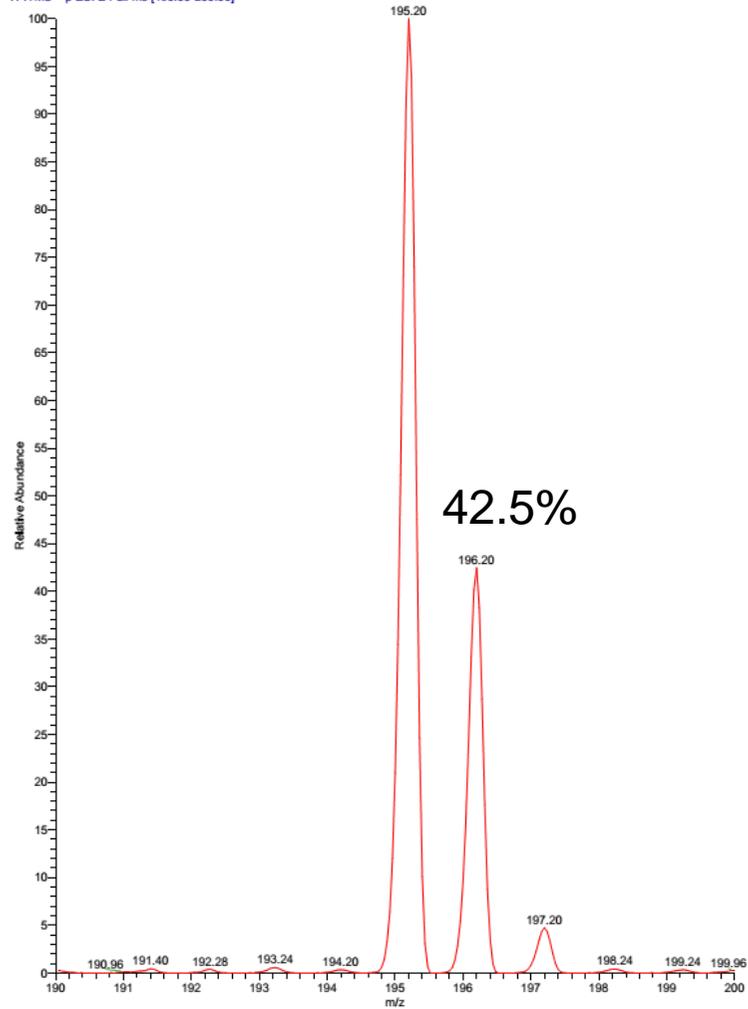
M1=A+B*D, A表示分子量中带上H氢离子(M+H)的信号强度，
M2=B+A*C, B表示分子量M中带上D氘离子(M+D)的信号强度。
C代表分子氘同位素的比例，D代表在100% D2O辅助下的H离子本底噪声比例。



好创生物
ULTRA-FAST

a=25%

20190907_Caffeine_1ul_min_N2_D2O_25%_02 2019-9-11 14:49:13
20190907 Caffeine 1ul min N2 D2O 25%_02 #1-297 RT: 0.00-1.01 AV: 297 NL: 4.14E5
T: ITMS + p ESI E Full ms [190.00-200.00]



$$M1=A+B*D, \quad M2=B+A*C$$

$$D=9.35\%, \quad C=10.56\%$$

$$M1=100, \quad M2=42.5$$

$$A=(M1-M2*D)/(1-C*D)=1.01(M1-0.0935*M2)$$

$$B=M2-A*C$$

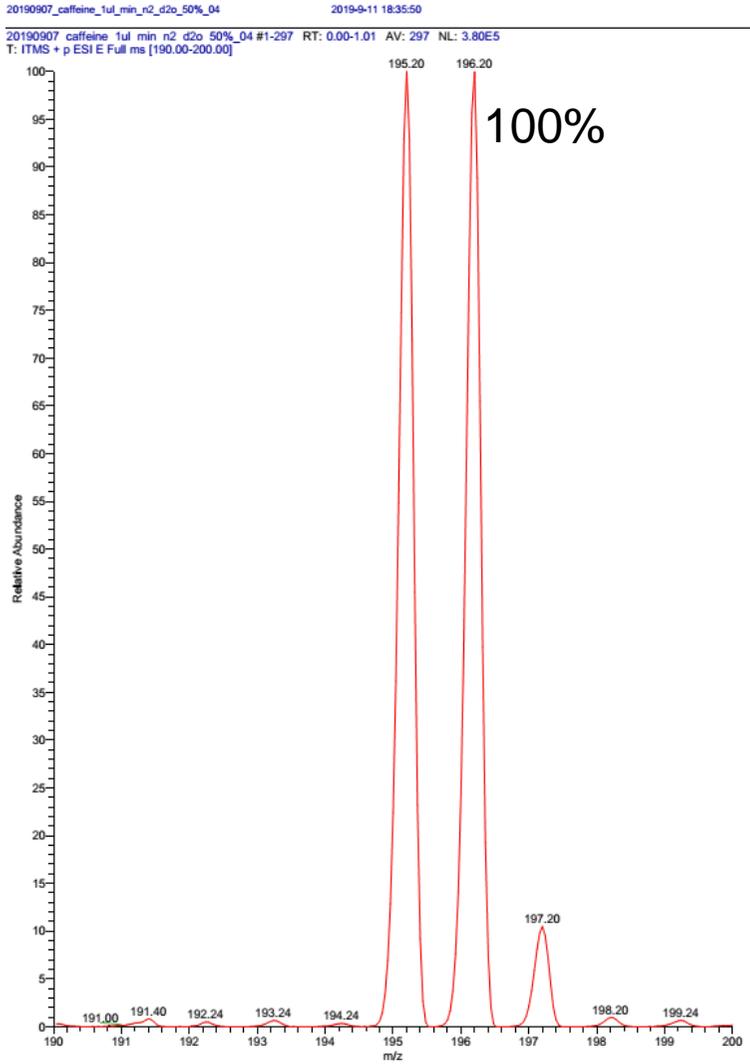
$$A=96.99, \quad B=32.26$$

$$B/(A+B)=24.96\%$$



好创生物
ULTRA-FAST

a=50%



$$M1=A+B*D, \quad M2=B+A*C$$

$$D=9.35\%, \quad C=10.56\%$$

$$M1=100, \quad M2=100$$

$$A=(M1-M2*D)/(1-C*D)=1.01(M1-0.0935*M2)$$

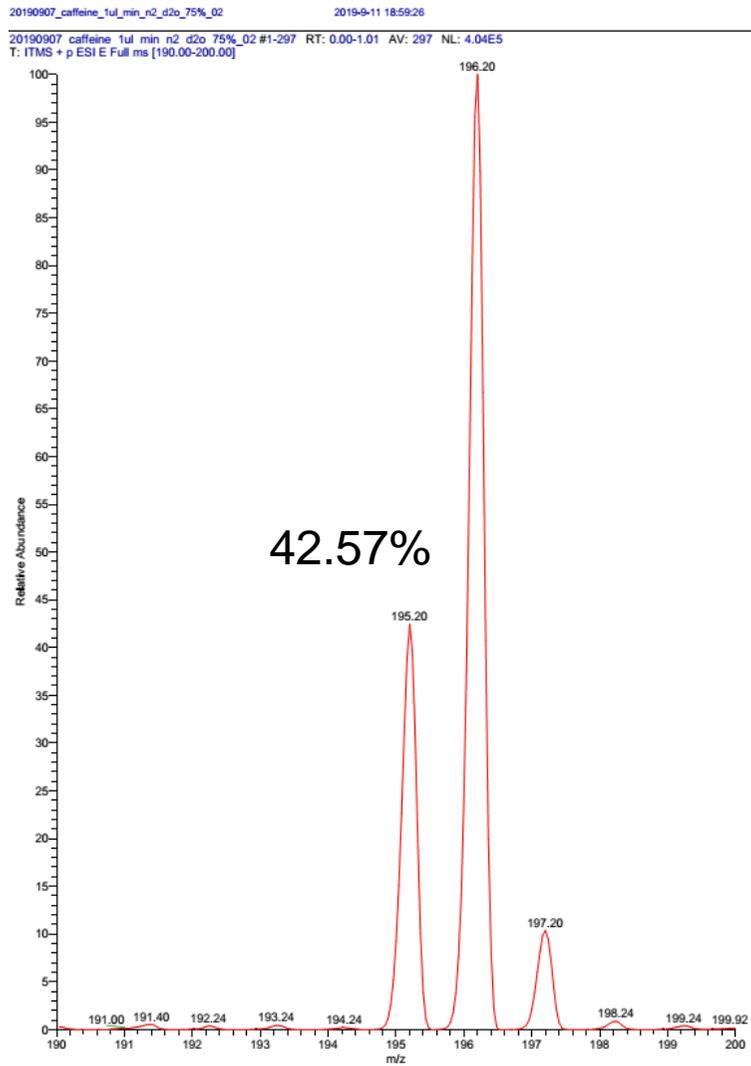
$$B=M2-A*C$$

$$A=91.56, \quad B=90.33$$

$$B/(A+B)=49.66\%$$



a=75%



$$M1=A+B*D, \quad M2=B+A*C$$

$$D=9.35\%, \quad C=10.56\%$$

$$M1=42.57, \quad M2=100$$

$$A=(M1-M2*D)/(1-C*D)=1.01(M1-0.0935*M2)$$

$$B=M2-A*C$$

$$A=32.33, \quad B=96.59$$

$$B/(A+B)=74.92\%$$

a=25%
a=24.96%

a=50%
a=49.66%

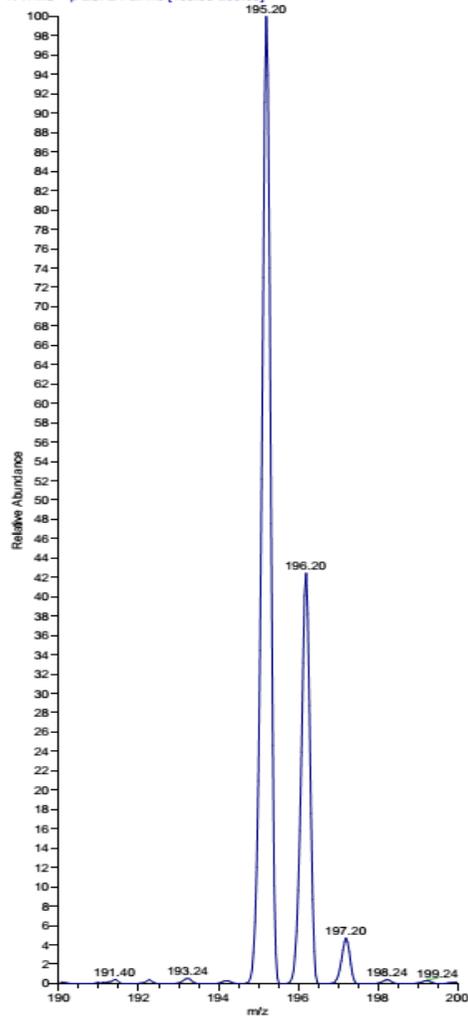
a=75%
a=74.92%

a=100%

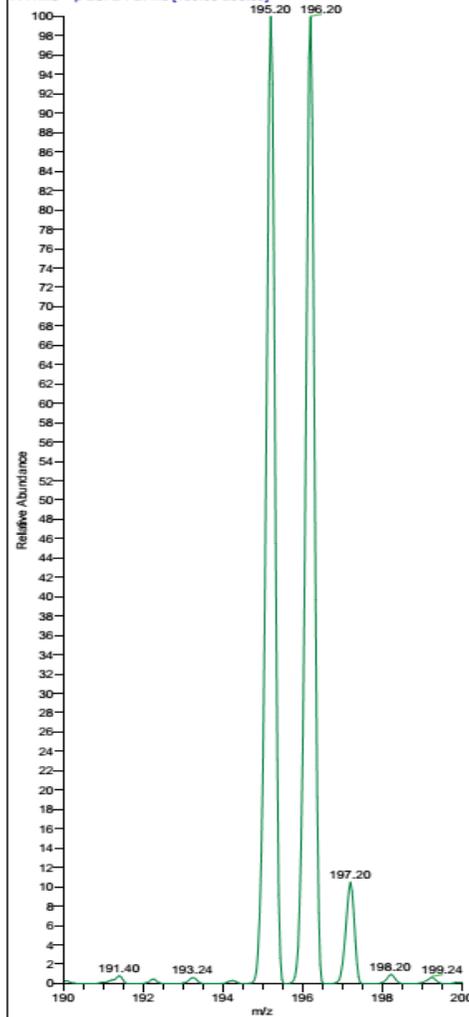
20190907_caffeine_1ul_min_n2_d2o_02

2019-9-11 18:03:25

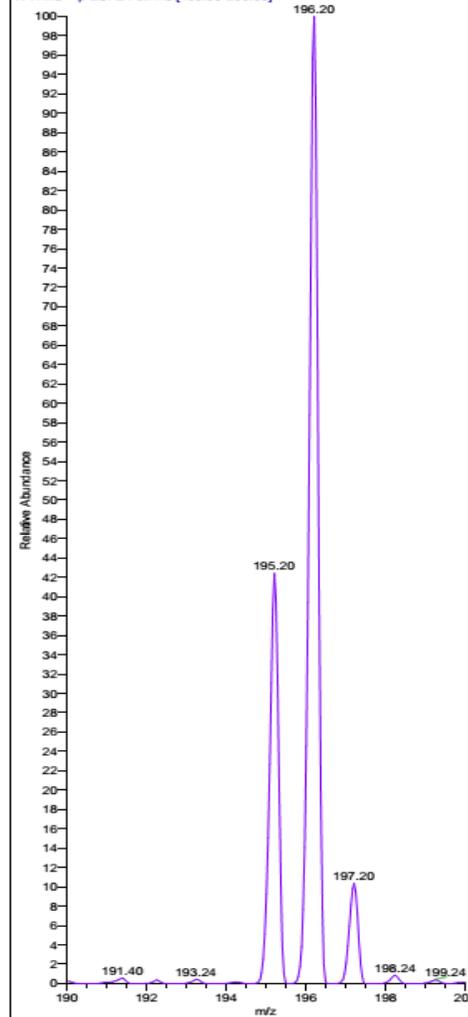
20190907_caffeine_1ul_min_n2_d2o_25%_02 #1-297 RT: 0.00-1.01 AV: 297
T: ITMS + p ESI E Full ms [190.00-200.00]



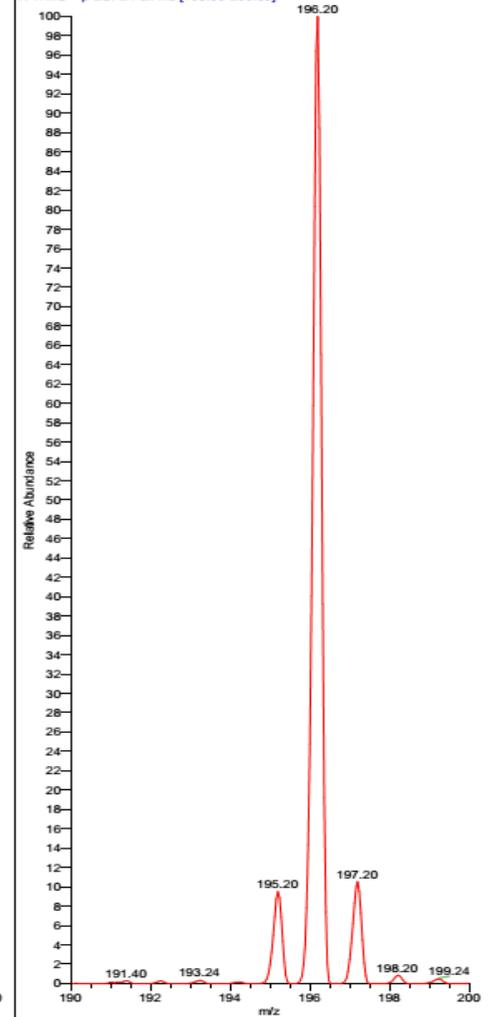
20190907_caffeine_1ul_min_n2_d2o_50%_04 #1-297 RT: 0.00-1.01 AV: 297
T: ITMS + p ESI E Full ms [190.00-200.00]



20190907_caffeine_1ul_min_n2_d2o_75%_02 #1-297 RT: 0.00-1.01 AV: 297
T: ITMS + p ESI E Full ms [190.00-200.00]



20190907_caffeine_1ul_min_n2_d2o_02 #1-297 RT: 0.00-1.01 AV: 297
T: ITMS + p ESI E Full ms [190.00-200.00]



二氧化碳

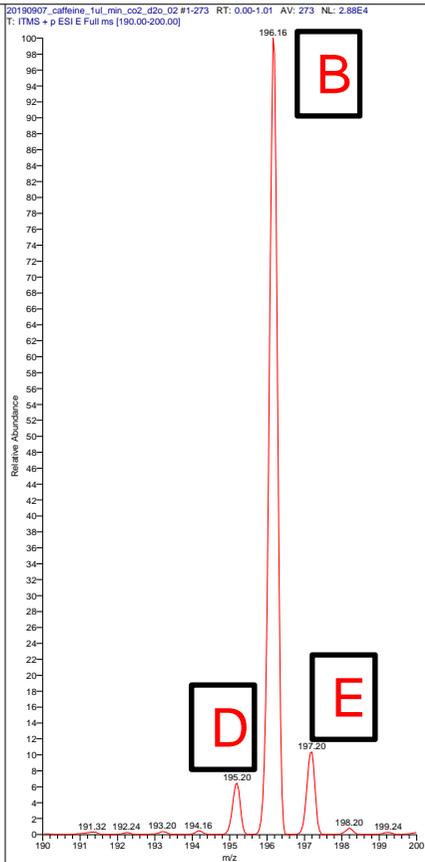
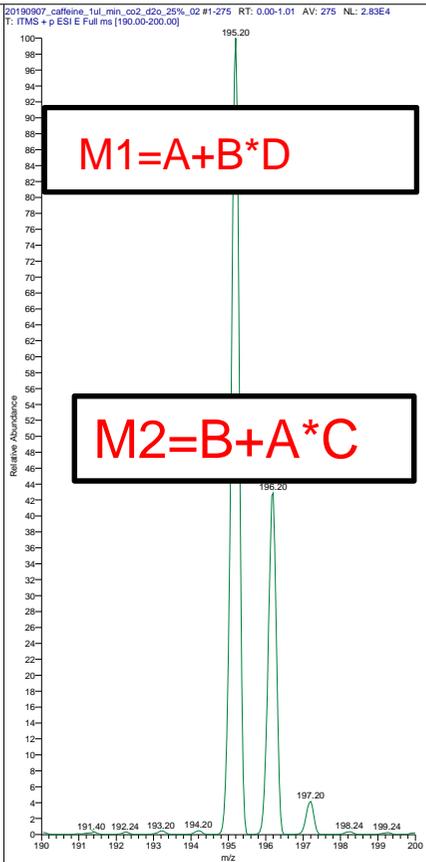
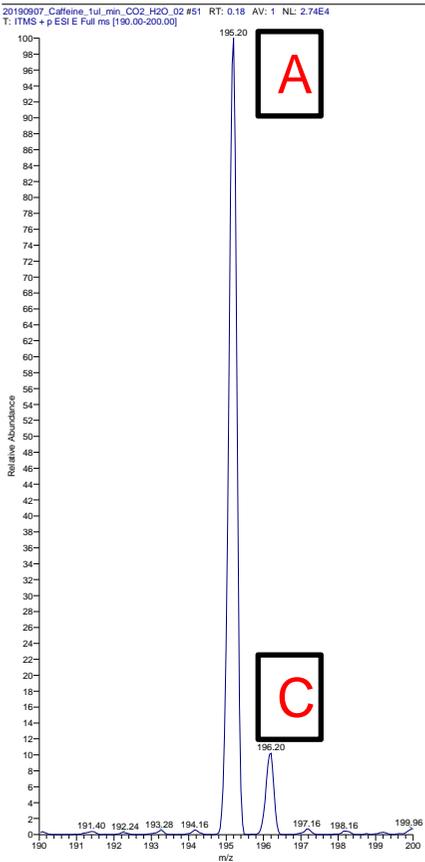
a=0%

a=25%

a=100%

20190907_caffeine_1ul_min_co2_d2o_25%_02

2019-9-11 14:58:08



A=(M+H)
 B=(M+D)
 C=(M_d+H)
 D=(M+H)_b
 E=(M_d+D)

a=D₂O在辅助液中的比例

M_d表示分子的同位素，D表示氘
 理论上E=C
 D=6.43%
 C=10.35%

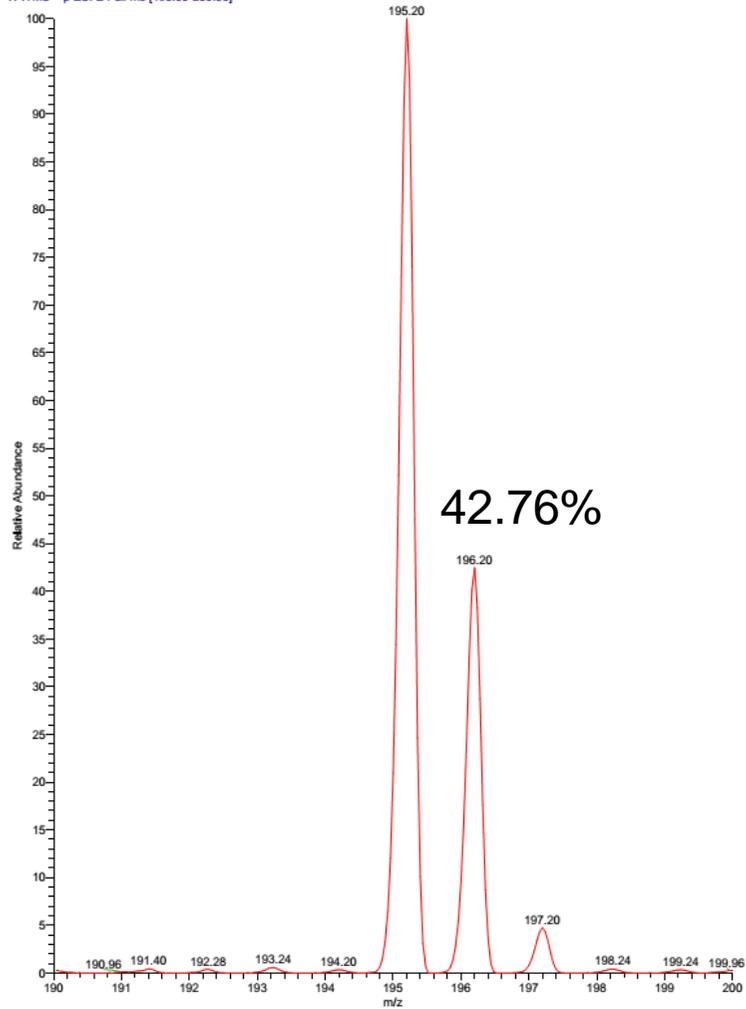
M1=A+B*D, A表示分子量中带上H氢离子(M+H)的信号强度,
 M2=B+A*C, B表示分子量M中带上D氘离子(M+D)的信号强度。
 C代表分子氘同位素的比例, D代表在100% D2O辅助下的H离子本底噪声比例。



好创生物
 ULTRA-FAST

a=25%

20190907_Caffeine_1ul_min_N2_D2O_25%_02 2019-9-11 14:49:13
20190907 Caffeine 1ul min N2 D2O 25%_02 #1-297 RT: 0.00-1.01 AV: 297 NL: 4.14E5
T: ITMS + p ESI E Full ms [190.00-200.00]



$$M1=A+B*D, \quad M2=B+A*C$$

$$D=6.43\%, \quad C=10.35\%$$

$$M1=100, \quad M2=42.75$$

$$A=(M1-M2*D)/(1-C*D)=1.007(M1-0.0643*M2)$$

$$B=M2-A*C$$

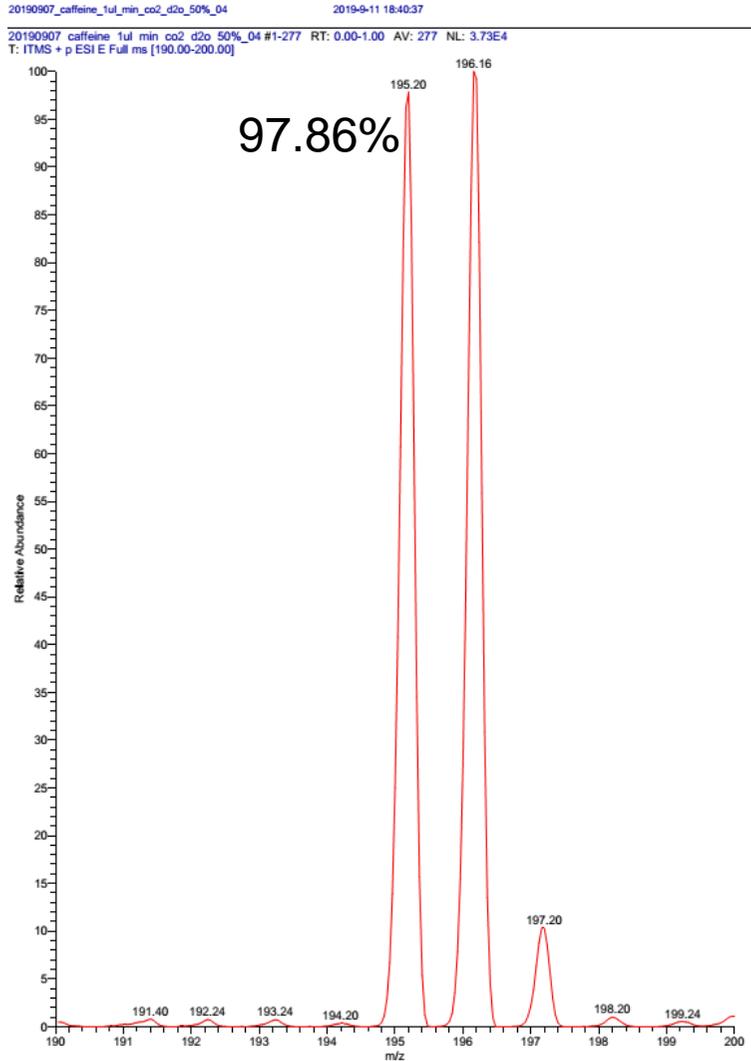
$$A=97.93, \quad B=32.61$$

$$B/(A+B)=24.98\%$$



好创生物
ULTRA-FAST

a=50%



$$M1=A+B*D, \quad M2=B+A*C$$

D=6.43%, C=10.35%

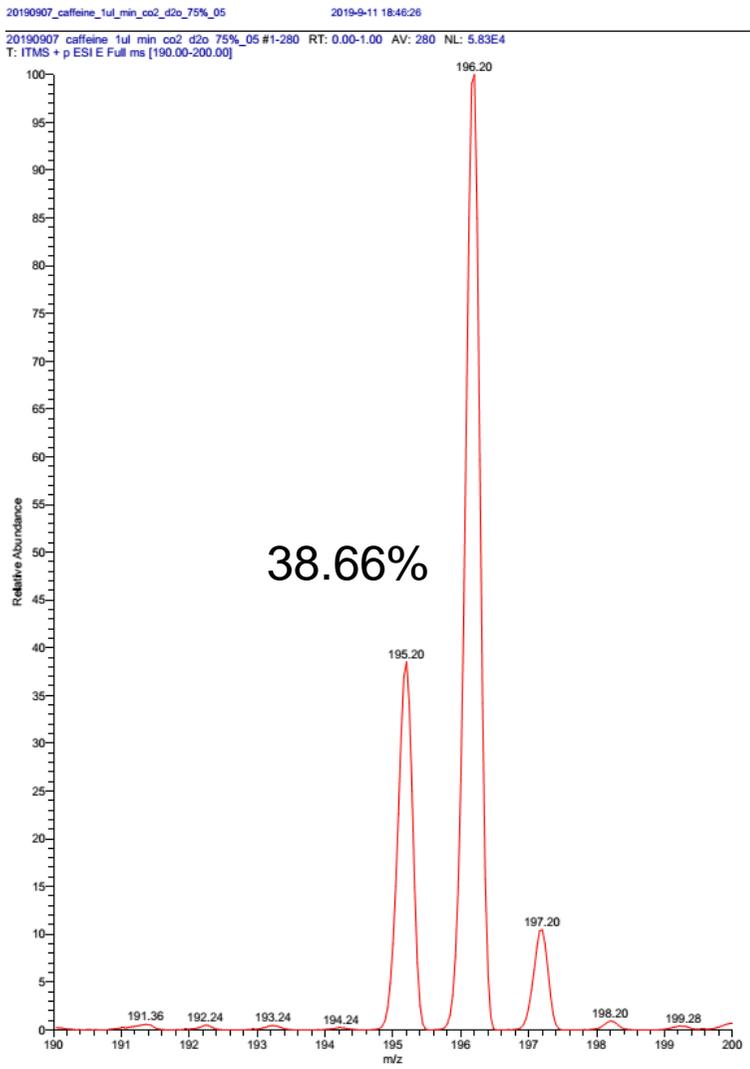
M1=97.86, M2=100

$$A=(M1-M2*D)/(1-C*D)=1.007(M1-0.0643*M2)$$
$$B=M2-A*C$$

A=92.06, B=90.47

$$B/(A+B)=49.56%$$

a=75%



$$M1=A+B*D, \quad M2=B+A*C$$

D=6.43%, C=10.35%

M1=38.66, M2=100

$$A=(M1-M2*D)/(1-C*D)=1.007(M1-0.0643*M2)$$

$$B=M2-A*C$$

A=32.46, B=96.64

$$B/(A+B)=74.86%$$

a=25%
a=24.98%

a=50%
a=49.56%

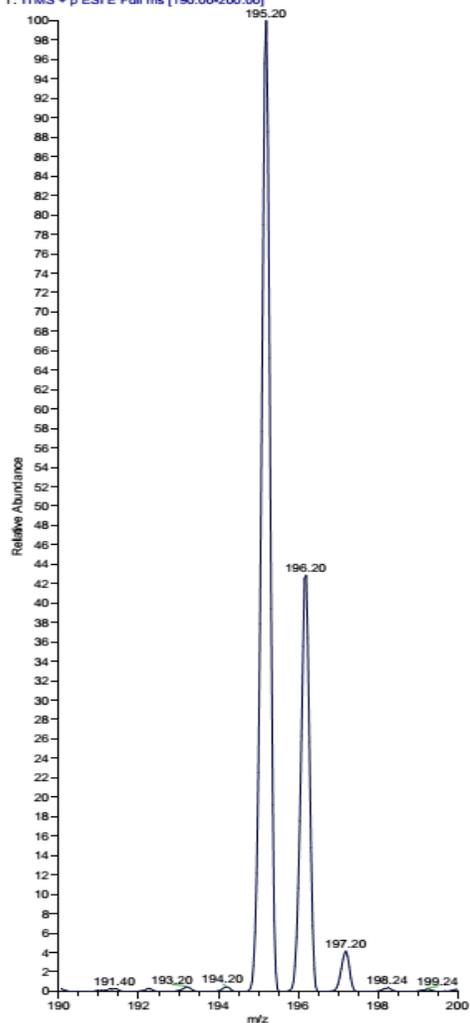
A=75%
a=74.86%

a=100%

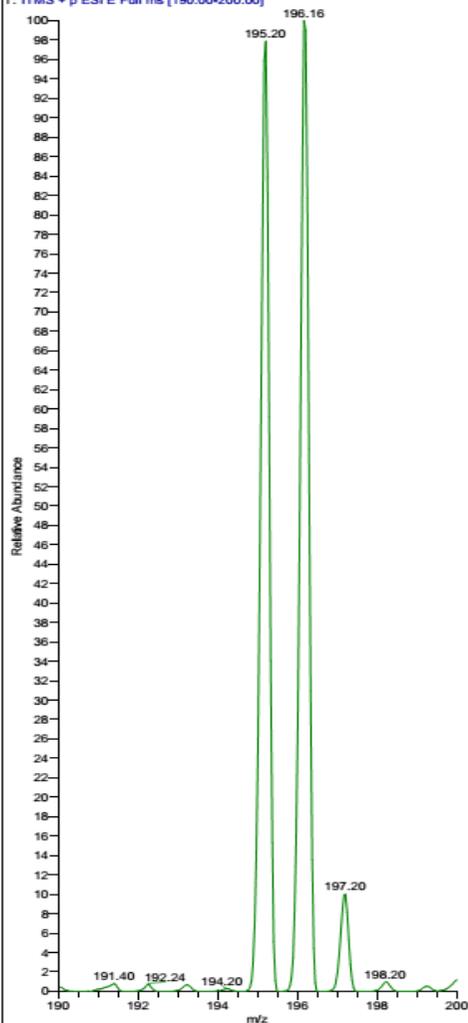
20190907_caffeine_1ul_min_co2_d2o_25%_02

2019-9-11 14:58:08

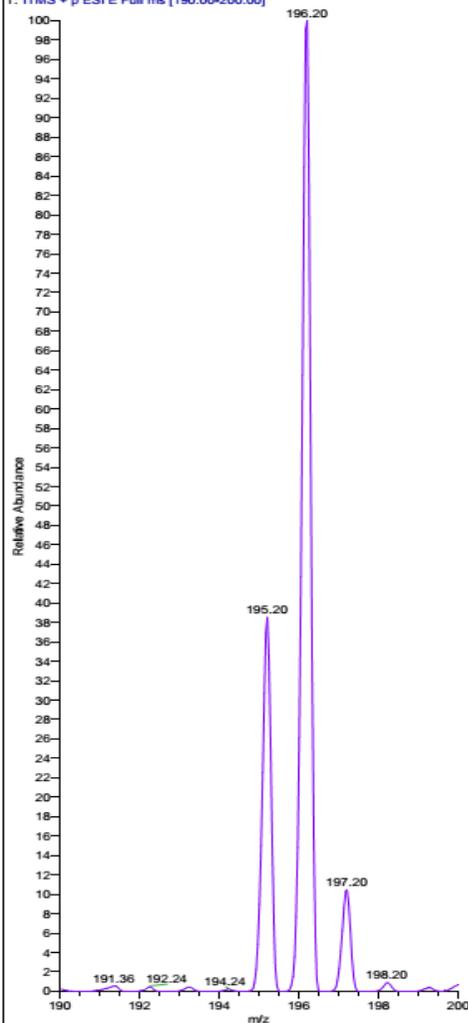
20190907_caffeine_1ul_min_co2_d2o_25%_02 #1-275 RT: 0.00-1.01 AV:
T: ITMS + p ESI E Full ms [190.00-200.00]



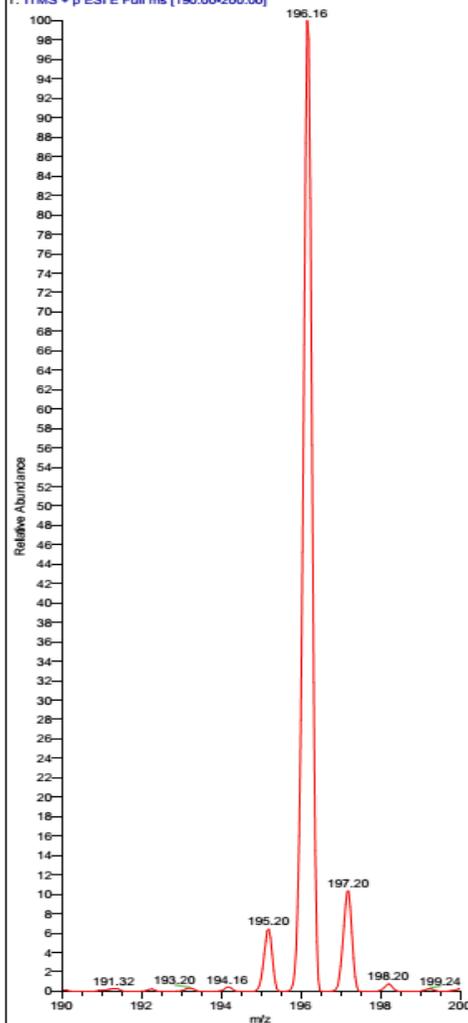
20190907_caffeine_1ul_min_co2_d2o_50%_05 #1-278 RT: 0.00-1.01 AV:
T: ITMS + p ESI E Full ms [190.00-200.00]



20190907_caffeine_1ul_min_co2_d2o_75%_05 #1-282 RT: 0.00-1.01 AV:
T: ITMS + p ESI E Full ms [190.00-200.00]



20190907_Caffeine_1ul_min_CO2_D2O_02 #1-273 RT: 0.00-1.01 AV: 273
T: ITMS + p ESI E Full ms [190.00-200.00]



氘水比例	25%	50%	75%
输送气体			
氮气	24.96%	49.66%	74.92%
二氧化碳	24.98%	49.56%	74.98%

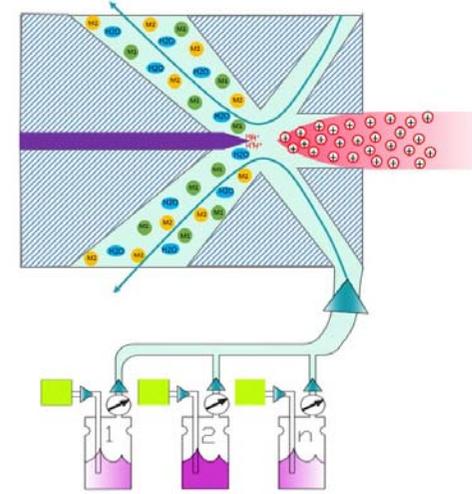
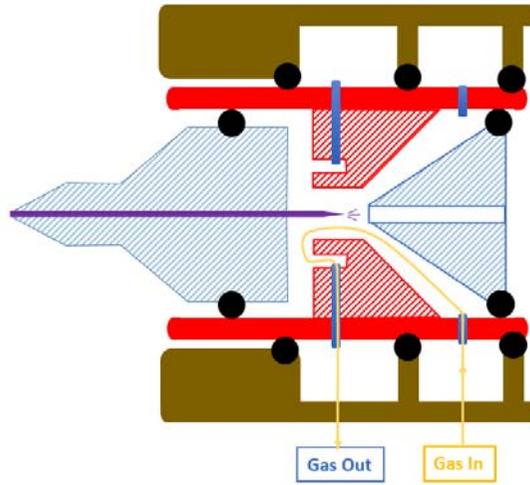
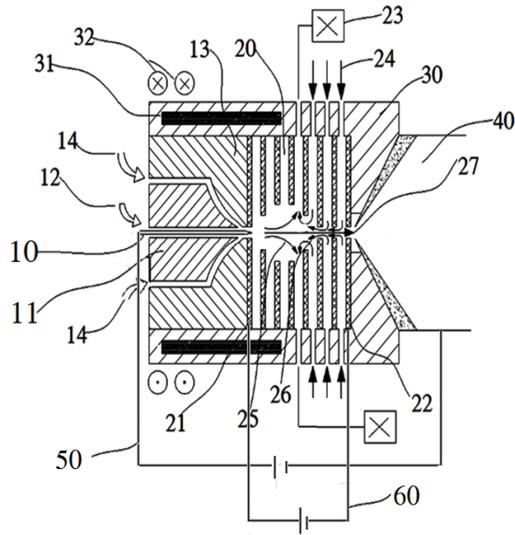
将不同比例的氘/氢水 (D_2O/H_2O) 的混合液体，作为辅助液，用不同的输送气体将辅助液的Vapor 送入到离子源的离子化室。

上图的结果表明，得到的分子离子峰 $(M+D)/(M+H)$ 之比与液体 (D_2O/H_2O) 的比例几乎完全一致，这就证明了电喷雾离子化产生的分子离子中的氢离子来自于气相分子。

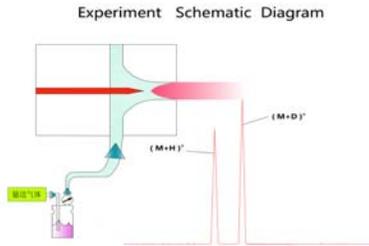
由于可以计算出分子合氘离子的信号强度，就可以用这一方法研究 **Intact Protein** 的氢氘交换现象，为蛋白结构的研究提供简单快速且可靠的研究方法。

离子源设计关键点

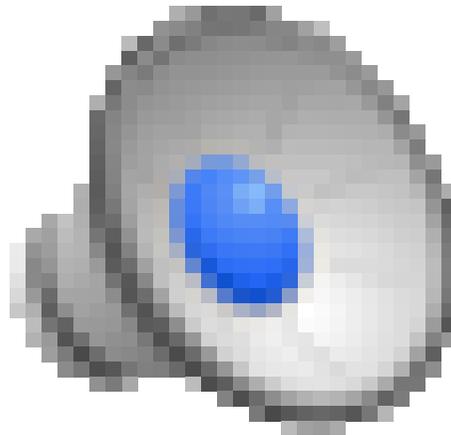
- 1、生成稳定泰勒锥的工作环境；
- 2、产生足够多的质子氢。



我们应用专利《一种应用于质谱仪的电喷雾离子源及质谱分析方法》
 （中国专利号：201510700128.3，美国专利号：US20170117128A1）本专利
 的特点在于反吹气（左图中的24）的作用，将离子源中的没带上电荷的中性
 分子，以及离子化室中中性杂质分子，吹出离子化室，基本保证只有带电的
 分子离子进入质谱质量分析器。不仅提高了离子源的离子化效率，同时大大
 延长了质谱仪质量分析器的清洗周期。而且可以做各种离子分子反应，为科
 学家提供一个复杂化学反应过程的研究方法！

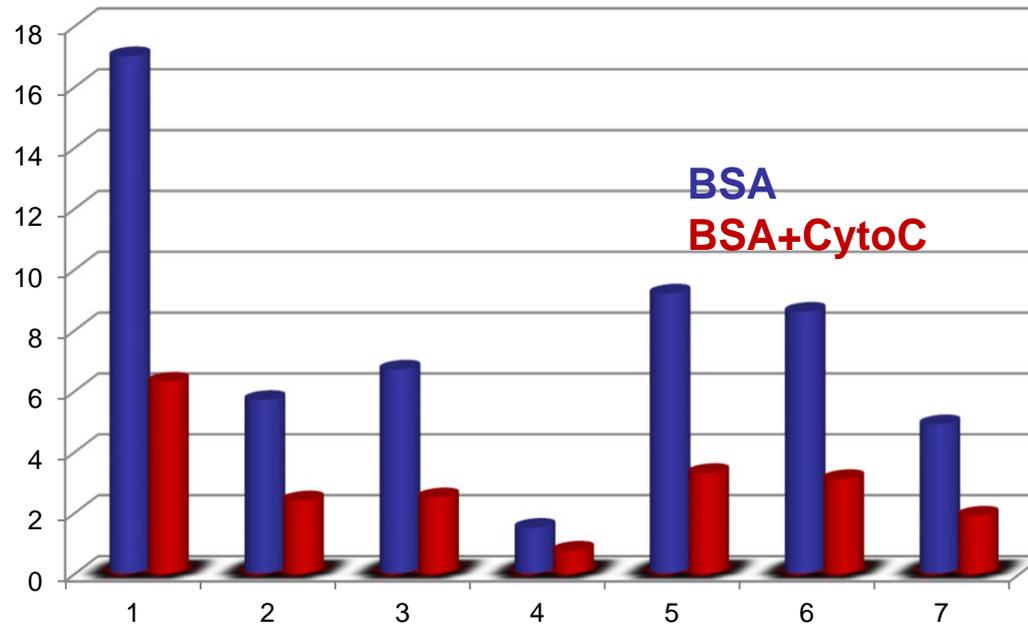


空气-辅助液体

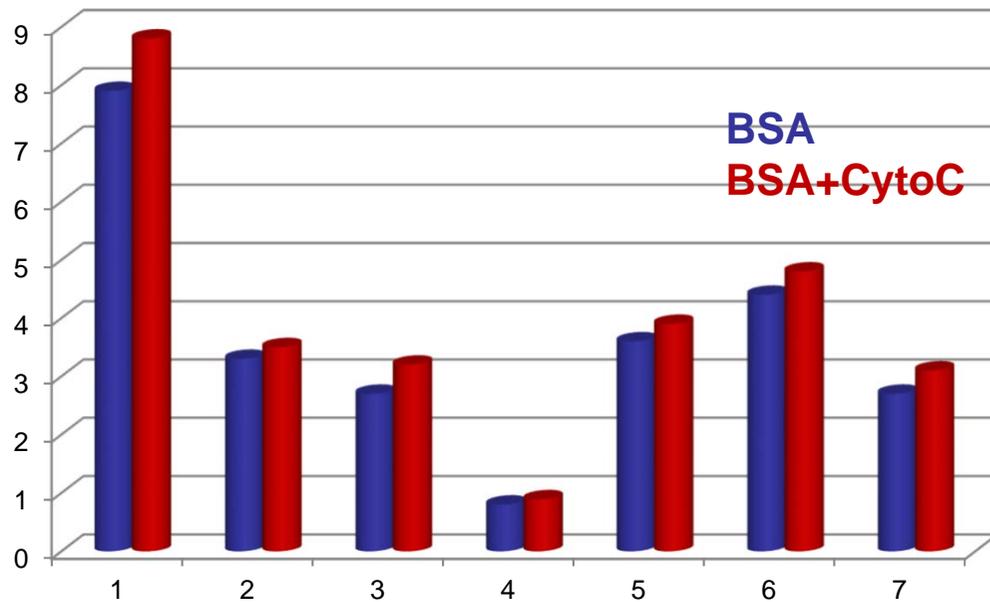


前面证明了电喷雾离子化产生的分子离子中的氢离子来自于气相分子，我们就可以在离子化室中，充满容易得到氢离子的辅助液Vapor，就可以提高分子离子信号。

视频展示了加上辅助液Vapor后，信号的上升过程。并且可见对3种不同极性的多肽都具有信号提升作用



Under air, CEESI has twice of sensitivity but severe ion suppression.



Under air + ACN, CEESI has fair sensitivity with almost no interference.

基本消除离子抑制效应!

Data from Prof. Pengyuan Yang, Fudan University



Improvement in Protein Quantitation

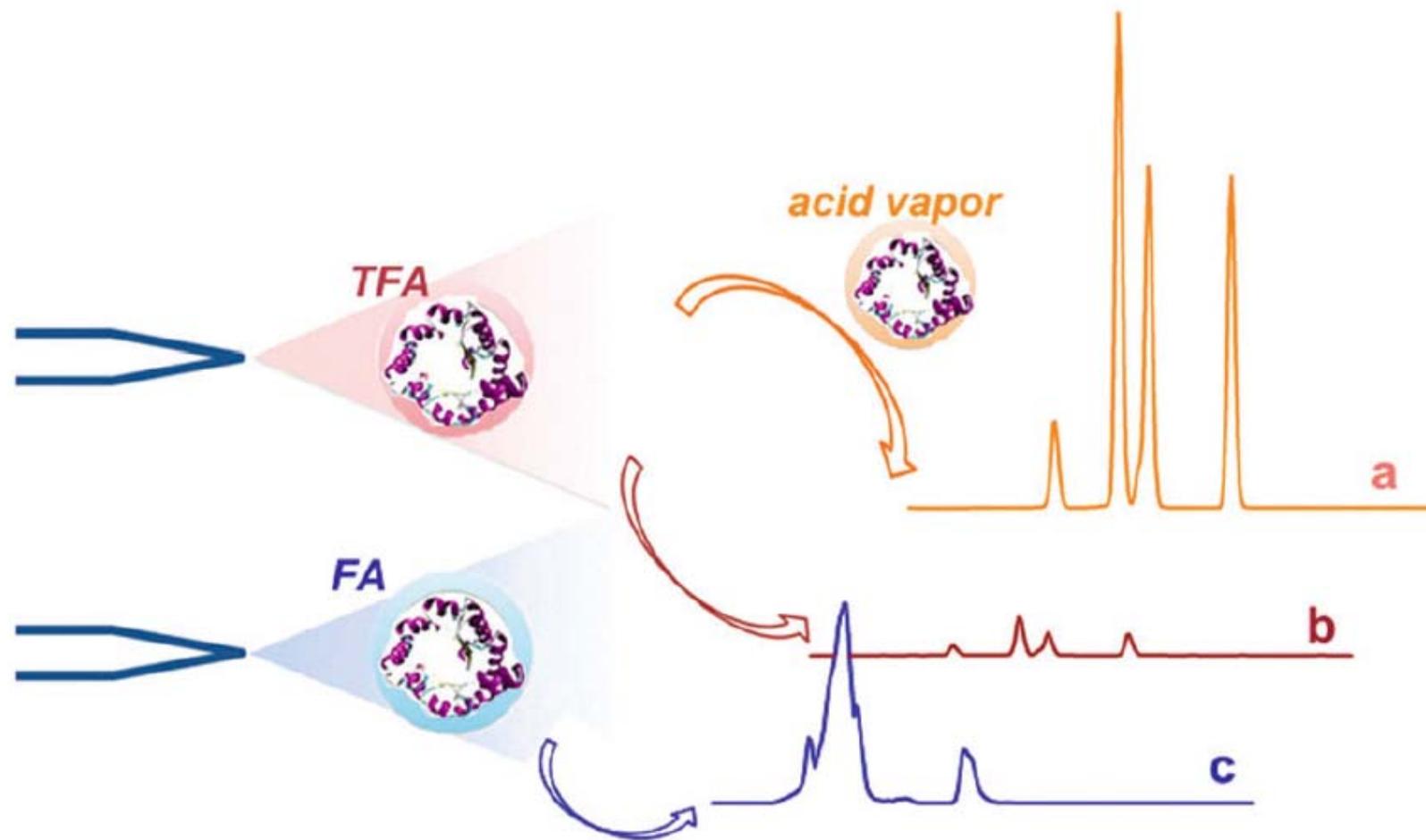
Ion source	Run1	Run2	Run3	Run4	Run5	Run6	Ave.	Quantified Peptide	Quantified Peptide(RSD <0.25)
Thermo	3387	3279	3260	3266	3294	3286	3295	1458	1114
CEESI (H ₂ O)	3808	3473	3462	3328	3159	3362	3432	1500	1298
CEESI (H ₂ O+ACN)	4386	4523	4743	4825	4794	4711	4664	2397	2210

More proteins were identified and quantified by CEESI source. All most two times (1.98) peptide were quantitated by CEESI source with water and ACN. (Hela Cell Digestion)

OrbiTrap XL was used as detector, and 90 min gradient separation time from 10-35% ACN was applied. 15 cm × 75 μm i.d C18 reversed phase separation column was utilized for separation at flow rate 200 nL/min.

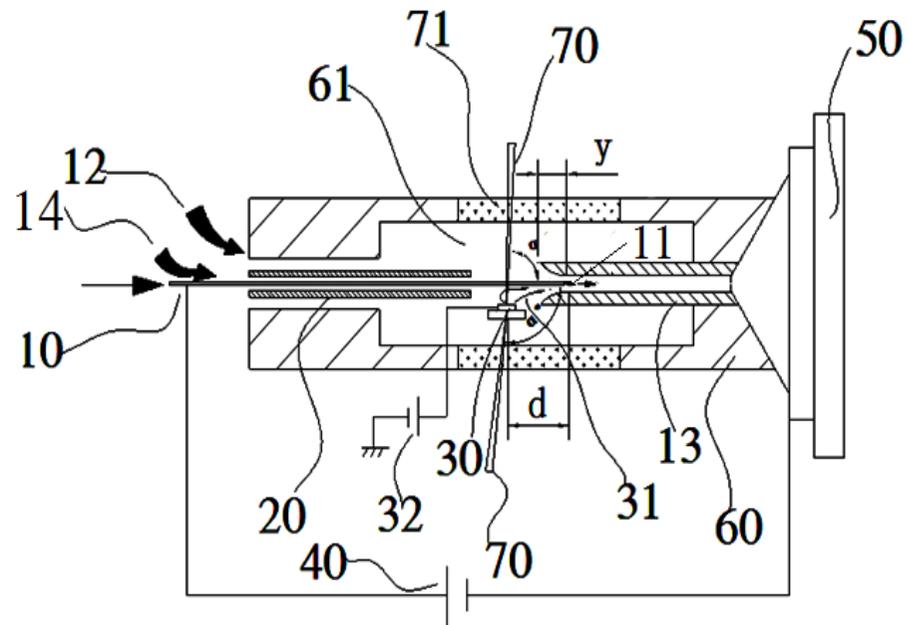
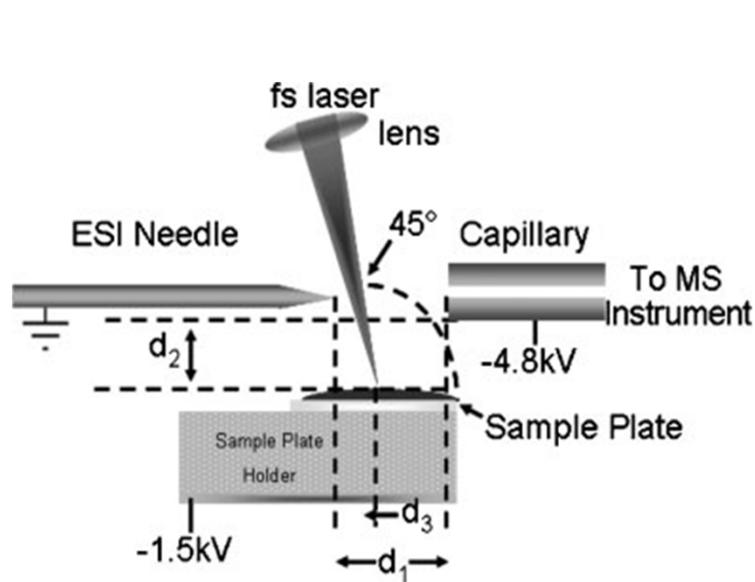
MaxQuant (v. 1.3.0.3) was utilized for database searching and label free quantification, and the false positive rate (FDR) was <1% for both peptides and proteins identification.

可定量多肽的鉴定数几乎提高了一倍！



辅助气氛的作用，解决了TFA的离子抑制现象，为 Intact Protein 的质谱分析提供了技术保障！

王方军等, CC,2015,51,14758



右图专利《激光电喷雾离子源》（中国专利号：201510702503.8，美国专利号：US10062559B2）本专与传统的激光辅助离子源的不同之处在于，左图的样品位于发射尖端与质谱仪离子入口之间，样品分子与电喷雾产生的离子进行分子-离子反应形成分子离子峰，其传输效率底下。

而本专利的样品位于发射针的后面的（30）样品台，激光束（70）打在样品上，溅射出样品分子和样品离子化合物（31）其中样品的分子离子由于与泰勒锥之间的库仑作用直接进入质谱仪离子入口，也是由于泰勒锥的强电场作用，不带电的样品分子向泰勒锥集聚，从而样品分子被电场极化，吸附泰勒锥周围的的氢离子，形成多电荷分子离子。其实这是一个激光送样的电喷雾离子源，可以大大的提高样品分子的离子化几率，从而提高分子离子信号。

这样的设计，可以大大提高样品的分析速度，为全自动、高效率的批量分析成为可能，使蛋白质组学尽快应用于临床，造福人类和社会。

专利目录

	序号	授权/受理时间	专利号/审中	专利名称
发明专利	1	2013年5月8日	201110036918.8	一种电喷雾离子发生器
	2	2016年4月20日	201410260432.6	一种制备分子加合同位素离子的方法
	3	2016年5月25日	201410261160.1	一种开放型分子加合同位素离子发生器
	4	2017年2月1日	201410261334.4	一种封闭型分子加合同位素离子发生器
	5	2017年6月16日	201510700128.3	一种应用于质谱仪的电喷雾离子源及质谱分析方法
	6	2017年10月27日	201510702503.8	激光电喷雾离子源
实用新型	1	2016年3月9日	201520828932.5	一种激光电喷雾离子源（实用新型）
	2	2016年3月16日	201520829369.3	一种应用于质谱仪的电喷雾离子源（实用新型）
	3	2018年6月19日	201721165158.x	一种耐压管路密封装置（实用新型）
美国专利	1	2018年8月28日	US10062559B2	LASER DESORPTION ELECTROSPRAY IONIZATION SOURCE
	2	2014年3月18日	US8674294B2	SYSTEM OF ELECTROSPRAY ION GENERATOR
	3	2018年5月15日	US20170117128A1	IONIZATION SOURCE FOR ELECTROSPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY AND MS ANALYSIS

谢谢