

**DIPLOMA** — экспериментальная система для изучения мегаэлектронвольт- и килоэлектронвольт-частиц и индуцированной фотонами десорбции молекул/ П.Хаканссон, Г.Бринк-малм, Дж.Кьеллберг, В.У.Р.Сандквист// Научное приборостроение. — 1991. — Т. 1. — № 3. — С. 124-131.

Описан времяпролетный масс-спектрометр с высоким разрешением, в котором образцы могут бомбардироваться ионами мегаэлектронвольт и килоэлектронвольт и ультрафиолетовыми фотонами. Возможности системы продемонстрированы на результатах нескольких различных экспериментов, включающих: спектр масс высокого разрешения молекулярных ионов, десорбированных из образца на химизиновой подложке с помощью ионов мегаэлектронвольт, многофотонный спектр ионизации бензола в газовой фазе и индуцированный лазерным излучением десорбционный спектр глико-протеина. Новый источник килоэлектронвольт-ионов может применяться как в масс-спектрометрии вторичных ионов, так и для визуализации и микромеханической обработки поверхностей. Библ. — 13 назв. Ил. — 5.

П.Хаканссон, Г.Бринкмалм, Дж.Кьеллберг, В.У.Р.Сандквист

(Уппсальский университет, Швеция)

## **DIPLOMA – ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕГАЭЛЕКТРОНВОЛЬТ- И КИЛОЭЛЕКТРОНВОЛЬТ-ЧАСТИЦ И ИНДУЦИРОВАННОЙ ФОТОНАМИ ДЕСОРБЦИИ МОЛЕКУЛ**

В течение последнего десятилетия методы и технологии масс-спектрометрии стремительно развивались. Среди новых технологий можно отметить, например, изучение протеина с помощью плазменной десорбционной масс-спектрометрии (ПДМС) [1], вторично-ионной масс-спектрометрии (ВИМС) [2], лазерно-индуцированной десорбции (ЛИД) [3] или резонансно-стимулированной многофотонной ионизации (РСМФИ) [4]. Для сравнения относительных достоинств этих методов была создана гибкая система, работающая по принципу определения времени пролета (ВП), в которой можно десорбировать и ионизировать молекулы мегаэлектронвольт-ионами (ПДМС), килоэлектронвольт-ионами (ВИМС) или лазерным излучением (ЛИД). Преследовалась также цель разработки масс-спектрометра с высоким разрешением масс, помещенного в сверхвысокий вакуум без масел. Система названа DIPLOMA, что означает "Десорбционная ионизация бомбардировкой частицами (фотонами) для анализа больших органических молекул".

Чтобы понять механизм ПДМС, т.е. электронного распыления, было проведено множество различных измерений в течение нескольких лет, но в этих экспериментах исследовались главным образом десорбированные вторичные ионы [5]. Тем не менее, было продемонстрировано, что при электронном распылении органических соединений эжектированные частицы преимущественно нейтральны [6]. Для многослойного образца, бомбардируемого ионами  $90 \text{ МэВ } ^{127}\text{I}$ , отношение десорбционного выхода нейтральных молекул к выходу ионов составляет примерно 10 000. Один из путей к достижению большего выхода эжектированных нейтральных частиц -- последующая ионизация этих молекул в процессе многофотонного поглощения. Такие сведения о десорбированных нейтральных частицах являются полезным вкладом в теоретическую модель электронного распыления. С использованием лазера на красителе с эксимерной накачкой и масс-спектрометра DIPLOMA была предпринята попытка детектирования нейтральных молекул бензола в газовой фазе методом РСМФИ.

Большое достижение в области масс-спектрометрии было сделано в 1988 г., когда М.Карас и Ф.Хилленкамп [3] представили спектр протеина с массой более 100 000 а.е.м., десорбция осуществлялась с помощью импульсного лазерного УФ-света (АИД), а анализ масс -- методом измерения времени пролета. Применение лазера на красителе с эксимерной накачкой и масс-спектрометра DIPLOMA послужило толчком к началу исследований возможностей ЛИД.

Система DIPLOMA включает в себя хорошо фокусируемый источник ионов килоэлектронвольт новой конструкции, который можно применять для исследования ПДМС, а также для визуализации и обработки поверхностей новыми методами. С помощью сканирования килоэлектронвольт-пучка и вторичной электронной эмиссии можно получить субмикронное изображение определенной структуры. Затем, используя тот же самый луч, но более высо-

кой интенсивности, можно производить обработку поверхности. Конечный результат можно проверить, возвратившись в режим визуализации и получив новый образ.

**Спектрометр.** Система DIPLOMA представляет собой времяпролетный масс-спектрометр, построенный по типу спектрометров со сверхвысоким вакуумом. На рис.1 приведена схема спектрометра. Накачка системы прово-

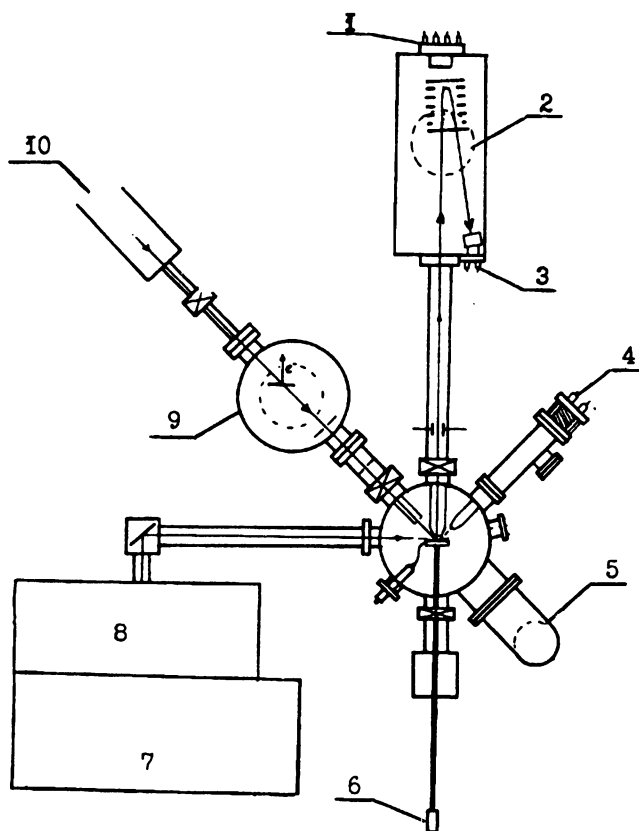


Рис. 1. Схема спектрометра DIPLOMA (вид сверху): 1 - стоп-детектор 1; 2 - электростатическое зеркало; 3 - стоп-детектор 2; 4 - источник килоэлектронвольт-ионов; 5 - турбонасос; 6 - образец-нагрузка; 7 - эксимерный лазер; 8 - лазер на красителе; 9 - пушковой детектор; 10 - мегаэлектронвольт-ионы из ускорителя

дится с помощью двух криогенных насосов (Leybold Heraeus RPK 900, скорость накачки  $900 \text{ с}^{-1}$ ) и турбонасосом с магнитами (Leybold Heraeus Turbovac 550 M, скорость накачки  $500 \text{ с}^{-1}$ .) Базовое давление — в диапазоне  $10^{-9}$  Торр. Вакуумное блокировочное устройство позволяет загружать за один раз один образец. Можно облучать образец мегаэлектронвольт-ионами с помощью ускорителя Uppsala EN-Tandem, van de Graaff, килоэлектронвольт-ионами  $\text{Ga}^+$  с помощью жидкого металлического ионного источника и УФ-фотонами с помощью лазера на красителе с эксимерной накачкой. Масса десорбированных и ионизированных молекул анализируется с помощью прямого времяпролетного спектрометра или с применением электростатического зеркала. Коллиматоры, определяющие размер пучка мегаэлектронвольт-ионов, могут регулироваться с внешней стороны спектрометра. Энергию пучка мегаэлектронвольт-частиц можно измерить с помощью "чашки" Фарадея с подавлением вторичных электронов. Десорбированные вторичные ионы фокусируются с помощью эйнцелева объектива и направляются во времяпролетный масс-спектрометр с помощью набора отклоняющих пластин. Мегаэлектронвольт-ионы, перед тем как удариться в образец, проходят через тонкую углеродную фольгу, расположенную перпендикулярно к лучу. Вторичные электроны из фольги отклонены на  $90^\circ$  в канально-пластинный детектор, который дает пусковой импульс для время пролетных измерений. Время пролета измеряется с помощью многостопного цифрового преобразователя (СТ-М2, Институт ядерной физики, Орсей, Франция) с разрешением 0.5 нс, временным диапазоном 256 мкс и возможностью одновременного использования трех стоп-детекторов. Временные спектры накапливаются на персональном компьютере Atari Mega PC с внутренней памятью 4 Мбайта. Система обработки данных может обрабатывать спектры с максимальным размером 512 000 каналов.

**Электростатическое зеркало.** Представляет собой времяпролетное зеркало первого порядка с компенсацией начального разброса скоростей вторичных ионов, работающее по принципам, изложенным В.А.Мамирианом и др. в [7]. Зеркало состоит из 25 равномерно расположенных колец, генерирующих однородное электрическое поле, и двух решеток: одна на входе, другая за зеркалом. Экстра-стоп-детектор расположен за зеркалом. Зеркало наклонено под углом  $1^\circ$  по отношению к оси спектрометра. Зеркало улучшает разрешение масс примерно в три раза по сравнению с прямым спектрометром. Наилучшее полученное разрешение составляет  $8400 \text{ M}/\Delta\text{M}_{\text{FWHM}}$  для кластеров  $\text{Cs}_3\text{Br}_2^+$  (масса 558 а.е.м.), распыленных из  $\text{CsBr}$  мишени. Для десорбции ионов использовался пучок ионов  $72.3 \text{ МэВ } ^{127}\text{I}^{13+}$ , коллимированный в пятно диаметром 0.25 мм.

На рис. 2 приведен пик молекулярных ионов для образца на химозино-вой подложке с молекулярной массой 1801 а.е.м. Спектр на рис. 2, а записан в прямом режиме, т.е. зеркало не работает, и различные изотопы молекулы не разрешаются. На рис. 2, б записан спектр с использованием зеркала, и изотопы могут быть адекватно разрешены. В этом случае разрешение масс составляет 4500. Для сравнения на рис. 2, в показано теоретическое распределение. Разрешение для органических ионов в общем случае ниже, чем для неорганических. Возможно, это следствие высоких значений радиальных составляющих начальных скоростей молекулярных ионов [8] и означает, что используется большая геометрическая поверхность зеркала, чем в случае неорганических ионов.

При электронном распылении биомолекул существует проблема калибровки, обусловленная начальными осевыми скоростями ионов, которые раз-

личны для разных ионов, а также зависят от толщины мишени в случае ионов водорода [9]. Последнее обстоятельство вызывает особенно много неудобств, поскольку водород часто используют в качестве калибровочного пика для неизвестного спектра. Эта проблема решается с помощью зеркала системы DIPLOMA, так как зеркало компенсирует разброс начальных осевых скоростей ионов и процедура калибровки становится простой. В приведенном спектре в случае химозиновой подложки, массы, соответствующие пикам различных изотопов, определяются с максимальной ошибкой 0.2 а.е.м., тогда как ошибка в прямом режиме составляет примерно 1 а.е.м. Эта разница в точности демонстрирует основное преимущество применения зеркала в измерениях ПДМС, основанных на электронном распылении.

С помощью системы DIPLOMA также можно изучать распад метастабильных ионов [10]. Рассмотрим молекулу, которая после ускорения распадается на один нейтральный и один заряженный фрагменты. Нейтральный фрагмент пройдет прямо через зеркало и будет детектироваться экстра-стоп-детектором на конце зеркала. Заряженный фрагмент будет детектироваться детектором для отраженных ионов и, сформировав спектр совпадения показаний двух детекторов, можно изучать метастабильный распад.

Источник килоэлектронвольт-ионов. Недавно в спектрометр DIPLOMA был введен источник килоэлектронвольт-ионов производства компании FEI, Бивертон, США. Он представляет собой жидкий металлический источник ионов с двумя эйнцелевыми объективами для фокусировки пучка и двумя октупольными линзами для сканирования и перемещения пучка. Пушка накачивается маленьким ионным насосом, не внося дополнительного количества газа в остальную часть спектрометра. Максимальная энергия луча 25 кэВ, источник снабжен окончанием от очищенного от изотопов галлия. Наконец можно легко заменить, введя другие ионы, скажем висмут. Две апертуры дают возможность выбора между режимами с малым током и низким разрешением (60 пА, размер пятна 50 нм) или с большим током и низким разре-

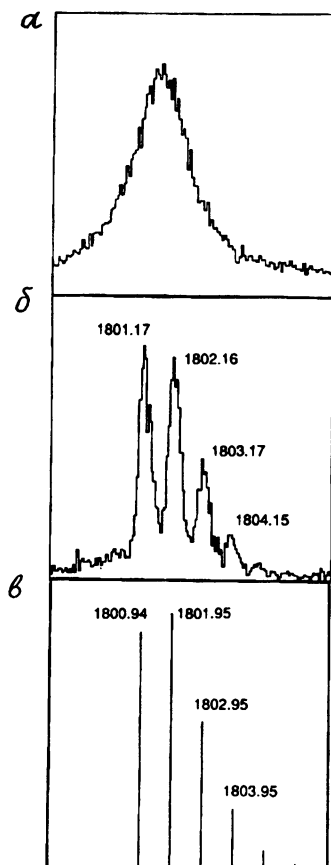


Рис. 2. Молекулярный ионный пик для образца на химозиновой подложке, записанный с помощью: а - прямого времяпролетного спектрометра; б - спектрометра с электростатическим зеркалом; в - теоретическое распределение изотопов

шением (2 нА, размер пятна 500 нм) для статического коллимированного луча. Большой ток при маленьком пятне приводит к очень большой плотности тока — максимум  $2.5 \text{ А/см}^2$ . Такая высокая плотность тока позволяет использовать пушку для дробления ионов или микрообработки.

Пучок можно растривать на поверхность мишени с видеоскоростью. Вход вторичных электронов (или ионов) измерен как функция от положения луча с помощью каналотронного детектора, который управляет интенсивностью соответствующего элемента изображения на видеомониторе, воспроизводя образ поверхности мишени. Поле обзора можно изменять от 1 мм (увеличение в 100 раз) до 1 мкм (увеличение в 100 000 раз).

Рис. 3 демонстрирует возможность визуализации и микрообработки. Мишенью является решетка с диаметром прутьев  $d_{\text{пр}} \sim 8 \text{ мкм}$ . При установ-

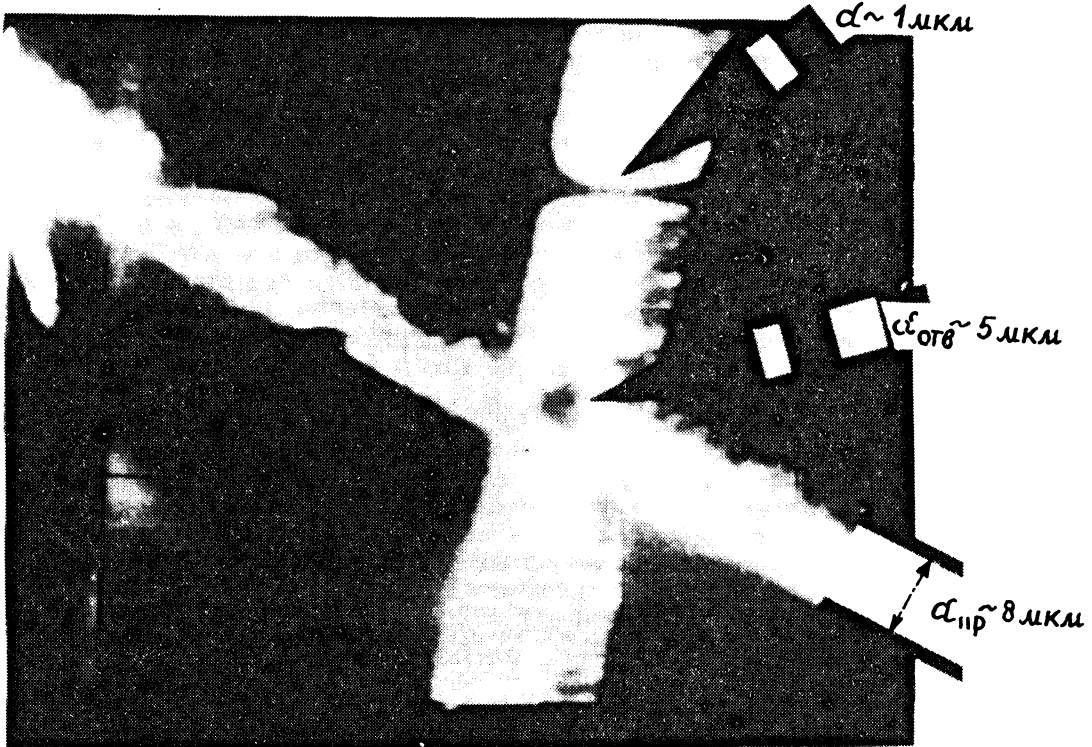


Рис. 3. Фотография с экрана видеомонитора с изображением прутьев тонкой решетки, полученным растровым сканированием пучка килоэлектронвольт-ионов и измерением выхода вторичных электронов в каждой точке. Разрез прутка и отверстие получены тем же ионным пучком путем сканирования пучка в одном направлении и фокусировки пучка в пятно, соответственно

лении луча на одно из пересечений решетки было проделано отверстие диаметром  $d_{\text{отв}} \sim 5 \text{ мкм}$ , после сканирования луча в одном направлении один из прутьев был разрезан.

Источник снабжен комплектом запирающих пластин, на которые можно подавать импульсы для измерения время пролета ПДМС. Длину импульса можно изменять от 5 до 100 нс. Первые полученные спектры не показали наличия интерференции, обусловленной мультиплетно-заряженными ионами

галлия или кластерными ионами галлия, которая могла бы быть проблемой при использовании источника такого типа.

Дополнив систему компьютерной программой и аналого-цифровыми преобразователями, ее также можно использовать для визуализации химических элементов. Можно сканировать пучок растром по поверхности, но в импульсном режиме. Записывая спектр ПДМС в каждой точке, можно получить карту, показывающую пространственное распределение определенного элемента.

**Лазерная система.** Спектрометр DIPLOMA снабжен лазерной системой на красителе с эксимерной накачкой производства Lambda Physik, Германия. Эксимерный лазер имеет максимальную энергию импульса 180 мДж и максимальную импульсную частоту 200 Гц. Лазер заполнен смесью газов ксенона и хлора, которая генерирует оптическое излучение с длиной волны 308 нм. Лазер на красителе управляется микропроцессором и имеет кристалл SHG для удвоения частоты. Максимальная энергия импульса в УФ-области составляет 3 мДж при импульсах в 10 нс. Лазерный луч может фокусироваться или прямо на мишень, или параллельно поверхности мишени. В случае матричной ЛИД приготавливается смесь из подходящей матрицы и молекулярного образца в мольном отношении 10 000:1. При облучении смеси УФ-светом матрица сильно поглощает, что ведет к взаимному проникновению молекул матрицы и образца. Одной из таких матриц является укропная кислота [11], которая сильно поглощает на 266 нм. Типичная плотность мощности облучения составляет примерно  $10^6$  Вт/см<sup>2</sup>. Многие из десорбированных молекул ионизированы и, таким образом, могут быть исследованы с помощью времяпролетного метода. Каждый лазерный "выстрел" производит много ионов и для получения спектров используют текущие аналого-цифровые преобразования сигналов детектора с помощью рекодера на переходных процессах Ле Кроа с разрешением 10 нс. Чтобы предотвратить насыщение стоп-детектора ионами с низкой массой, эти ионы удаляются двумя отклоняющими пластинами, на которые подается импульс, расположенными в той части спектрометра, где нет электрического поля. Уникальной особенностью метода матричной ЛИД является возможность исследования биомолекул с очень большой массой. Имеется сообщение о десорбции ионов с массой более 100 000 а.е.м. [3].

В данной статье метод ЛИД проиллюстрирован рис. 4, где приведен спектр многодоменного целлюлолитического фермента СВН1, полученного из грибка Ph. Chr [12]. Определена молекулярная масса —  $57\,840 \pm 190$  а.е.м. Это первое точное определение массы данной молекулы. Обычно используемый для определения массы образцов такого рода метод SDS-PAGE ненадежен из-за связанных гидроуглеродных цепей. Левый пик спектра обусловлен инсулином, который был добавлен в небольшом количестве как внутренний калибр.

Когда лазерный луч параллелен поверхности образца, молекулы, которые десорбируются в случае распыления или десорбции, могут быть постионизированы. В пробном эксперименте вся система проверялась путем добавления небольшого количества бензола в камеру до парциального давления  $10^{-10}$  Торр. С помощью лазерного луча, сфокусированного параллельно поверхности мишени и проходящего прямо над ней, ионизированные молекулы ускоряются внутрь спектрометра, так, как-будто они вылетели из мишени. Изменяя длину волны лазера на красителе, был обнаружен острый резонансный пик в процессе двухфотонной ионизации, о котором ранее сообщалось Е.Уи.Шлагом и др. в [13]. На рис. 5 показан выход ионов бензола

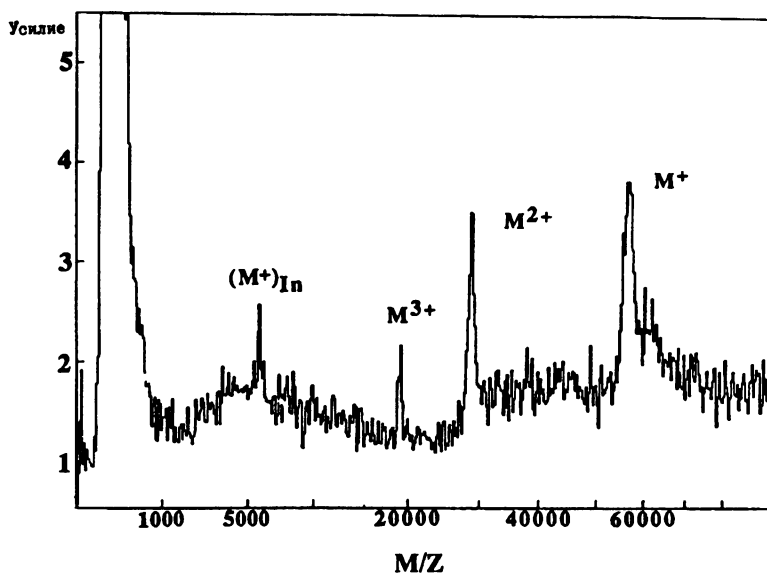


Рис. 4. Спектр гликопротеина с оцененной массой  $57\,840 \pm 190$  а.е.м., десорбированный с помощью лазерного излучения с длиной волны 266 нм в матрице ferulic кислоты. Левый пик спектра, обозначенный  $(M^+)In$ , соответствует молекулярному иону инсулина, который был добавлен в небольшом количестве как внутренний калибрانت. Спектр усреднен по 10 лазерным "выстрелам"

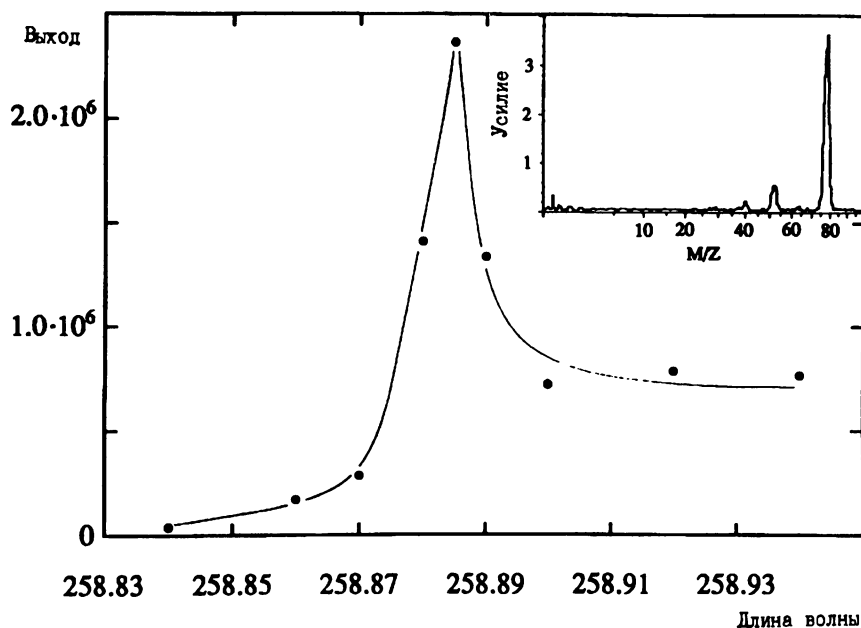


Рис. 5. Выход бензола как функция длины волны ионизирующего лазерного излучения, полученный многофотонной ионизацией бензола в газовой фазе в ускорительной части спектрометра (на вставке приведен спектр времен пролета для бензола)



как функция от длины волны ионизирующего лазерного света. На вставке приведен спектр постиионизированных молекул с большим бензольным пиком и некоторыми характерными фрагментами. Эффективность ионизации оценена примерно в 0.3%.

В заключение можно отметить, что вторичную электронную эмиссию, вызванную быстрыми ионами (электронное распыление), килоэлектронвольтовыми ионами (ядерное распыление) или импульсным УФ-лазерным излучением (лазерно-индуцированная десорбция), можно исследовать в одной и той же системе и, в принципе, на одном образце. Система также позволяет постиионизацию эжектированных нейтральных частиц, получающихся в результате процессов, описанных выше, хотя это еще надо продемонстрировать. Спектрометр позволяет исследовать стабильные вторичные ионы с высоким разрешением масс. С помощью комбинации прямого времяпролетного масс-спектрометра и времяпролетного масс-спектрометра с зеркалом можно исследовать распад метастабильных ионов. Источник килоэлектронвольт-ионов также можно использовать в системах для дробления ионов и ионной микроскопии. В ближайшем будущем полученное пространственное разрешение будет повышено путем уменьшения вибрации в системе.

Авторы выражают признательность за поддержку Национальному Совету Швеции по исследованиям в области естественных наук и благодарны Курту Рейманну за внимательное прочтение рукописи.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Sundqvist B., Macfarlane R.D.*// *Mass Spectrom Rev.* -1985. - N 4. - P. 421 - 460.
2. *Honig R.E.*// *J. Mass Spectrom Ion Proc.* - 1985. - N 66. - P. 31 - 54.
3. *Karas M., Hillenkamp F.*// *Anal. Chem.* - 1988. - N 60. - P. 2299.
4. *Grottemeyer J., Boesl U., Walter K., Schlag E.W.*// *Org. Mass Spectrom.* - 1986. - N 21. - P. 645 - 653.
5. *Sundqvist B.U.R.*// *Nucl.Instr. Meth.* - 1990.- B 48. - P. 517 - 524.
6. *Salehpour M., Hakansson P., Sundqvist B., Widdiyasekera S.*// *Nucl.Instr. Meth.* - 1986. - B 13. - P. 278.
7. *Mamyrian B.A., Karataev V.I., Shmikk D.V., Zagulin V.A.*// *Sov. Phys JETP.* - 1973. - N 37. - P. 45.
8. *Ens W., Sundqvist B.U.R., Hakansson P., Hedin A., Jonsson G.*// *Phys Rev.* - 1989. - B 39. - P. 763 - 766.
9. *Widdiyasekera S., Hakansson P., Sundqvist B.U.R.*// *Nucl.Instr. Meth.* - 1988. - B 33. - P. 836 - 839.
10. *Negra Della S., Beyec Y.Le.*// *Anal. Chem.* - 1985. - N 57. - P. 2035 - 2040.
11. *Beavis R.C., Chait B.T.*// *Rapid Commun in Mass Spectrom.* - 1989. - N 3. - P. 432.
12. *Perera I.K., Uzcategui E., Hakansson P., Brinkmalm G., Pettersson G., Johansson G., Sundqvist B.U.R.*// *Rapid Commun in Mass Spectrom.* - 1990. - N 4. - P. 285 - 289.
13. *Kuhlewind H., Neusser H.J., Schlag E.W.*// *Int. J. Mass Spectrometry Ion Phys.* - 1983. - N 51. - P. 255 - 265.