

· 研究简报 ·

拓展基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪的检测范围

陈晋安, 黄慧英, 黄河清

(厦门大学生命科学学院分析测试中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 选用多壁碳纳米管(CNT)作为基质辅助激光解吸电离化飞行时间(Matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight, MALDI-TOF)质谱仪的基质,对分子量小于 0.8 ku 的小分子化合物进行检测,克服了 MALDI-TOF MS 中的基体干扰,适合进行小分子分析.实验先在正离子模式下检测氨基酸及其衍生物,在正电场条件下清晰地观察到样品的碱金属加合峰 $[M + K]^+$ 和 $[M + Na]^+$ 分子离子峰,几乎看不到加氢的离子峰 $[M + H]^+$.又在负离子模式下以 CNT 作为基质对氨基酸样品进行质谱分析,得到单一 $[M - H]^-$ 负的分子离子峰,所得到的谱图几乎没有背景干扰,信噪比高.结果证实在负离子模式下可以方便快捷地进行氨基酸检测,从而拓宽了 MALDI-TOF MS 的应用范围.

关键词: MALDI-TOF MS; 基质; 小分子化合物; 负离子模式

中图分类号: O 657

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2007)06-0875-05

随着质谱技术的发展,基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)在生物化学和临床医学等领域的应用日益广泛^[1-3].作为一种离子化方法, MALDI 源具有灵敏度高,对样品要求低,能耐高浓度盐和缓冲剂等优点.但传统的 MALDI-TOF MS 因基质自身离子化造成低质荷比(m/z)范围的背景干扰,使其很难适合低分子量化合物的分析.在自然界中,相当数量的具有重要意义的分子量在 0.8 ku 以下的化合物几乎不能通过 MALDI-TOF MS 来检测和分析.因此,开发和研究新的方法,克服现有的缺陷,已成为 MALDI-TOF 的一个重要研究内容.用 MALDI-TOF MS 技术进行低分子量化合物的分析受到了人们越来越多的关注^[4-7].中国科学院大连化学物理研究所邹汉法教授报道了^[8-10]选用多壁碳纳米管作为 MALDI-TOF MS 的基质,进行小分子化合物质谱检测.本文进一步以这种无机材料为突破点,探索出能够适合于采用 MALDI-TOF 质谱仪直接分析小分子信息的方法,使得该质谱仪不仅适合于生物大分子分析,而且又能对小分子化合物进行检测.从而拓展 MALDI-TOF MS 的检测范围,增加其分析检测功能.我们采取多种形式的实验和优化方法,以达到好用、通用和易用的目的,拓展生物质谱仪的分析功能,以达到简便快速而准确地分析各种生物大分子和部分小分子结构信

息的目的.同时,我们所选用的碳纳米管是一种新型的自组装纳米材料,由于其独特的结构和众多奇特物理力学性能,自 90 年代初被发现以来一直受到物理、化学、材料学和许多高新技术产业部门的重视,我们这一研究也将有利于提高碳纳米管的应用价值.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

REFLEX(tm) III 型 MALDI-TOF 质谱仪(德国, Bruker Daltonic Inc.); 氮激光器, 激光波长 337 nm, 激光脉冲宽度为 3 ns, 加速电压 - 20 ~ + 25 kV, 质量分析器(TOF)长度 3.0 m, 采用正离子和负离子模式反射检测方式进行实验.

氨基酸及其衍生物(购自 Sigma 公司). 甲醇(德国, Merck)色谱纯, 其它国产有机试剂均为色谱纯, 无机试剂为分析纯. 实验用水均为 Milli-Q 超纯水. 实验中所用多壁碳纳米管由中国科学院大连化学物理研究所提供.

1.2 实验方法

将样品溶于(1 : 1, by vol.)水和甲醇中备用,取碳纳米管配成 2 mg/mL 水悬浮溶液,悬浮液在超声波震荡器超声 5 min,使碳纳米管在水中充分扩散均匀.然后,取新配的碳纳米管溶液 1 μ L 点在样品靶上,待溶剂挥发干形成碳纳米管薄层后取 0.5 μ L 的样品(氨基酸及其衍生物)溶液点在碳纳米管薄层上,然后放在室温下自然干燥.待样品干燥后送入 MALDI-TOF MS

收稿日期: 2006-12-18

基金项目: 厦门大学科技创新项目(2004xdcx206)资助

Email: jachen@xmu.edu.cn

表 1 CNT 为基质,正、负加速电压方式检测几种氨基酸及其衍生物的结果

Tab. 1 Ions observed in the CNT MALDI mass spectrum of some amino acids and amino acid derivatives in pos. & neg. mode

分析物	[M]	正电压			负电压
		[M + H] ⁺	[M + Na] ⁺	[M + K] ⁺	[M - H] ⁻
丝氨酸 Ser	105.10	106.01	128.02	144.00	103.90
苏氨酸 Thr	119.10		142.04	158.02	118.02
赖氨酸 Lys	146.00		169.12	185.10	145.20
酪氨酸 Tyr	181.20		204.02	219.97	179.82
色氨酸 Try	204.00		227.12	243.12	203.14
Fmoc-甘氨酸	297.31		320.31	336.30	
Fmoc-缬氨酸	339.40		362.38	378.34	
Fmoc-苯丙氨酸	387.40		410.34	426.33	
Fmoc-Lys(BOC)-OH	468.50		491.40	507.38	
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610.70		633.05	649.02	

注:“-”表示没有获此数据.

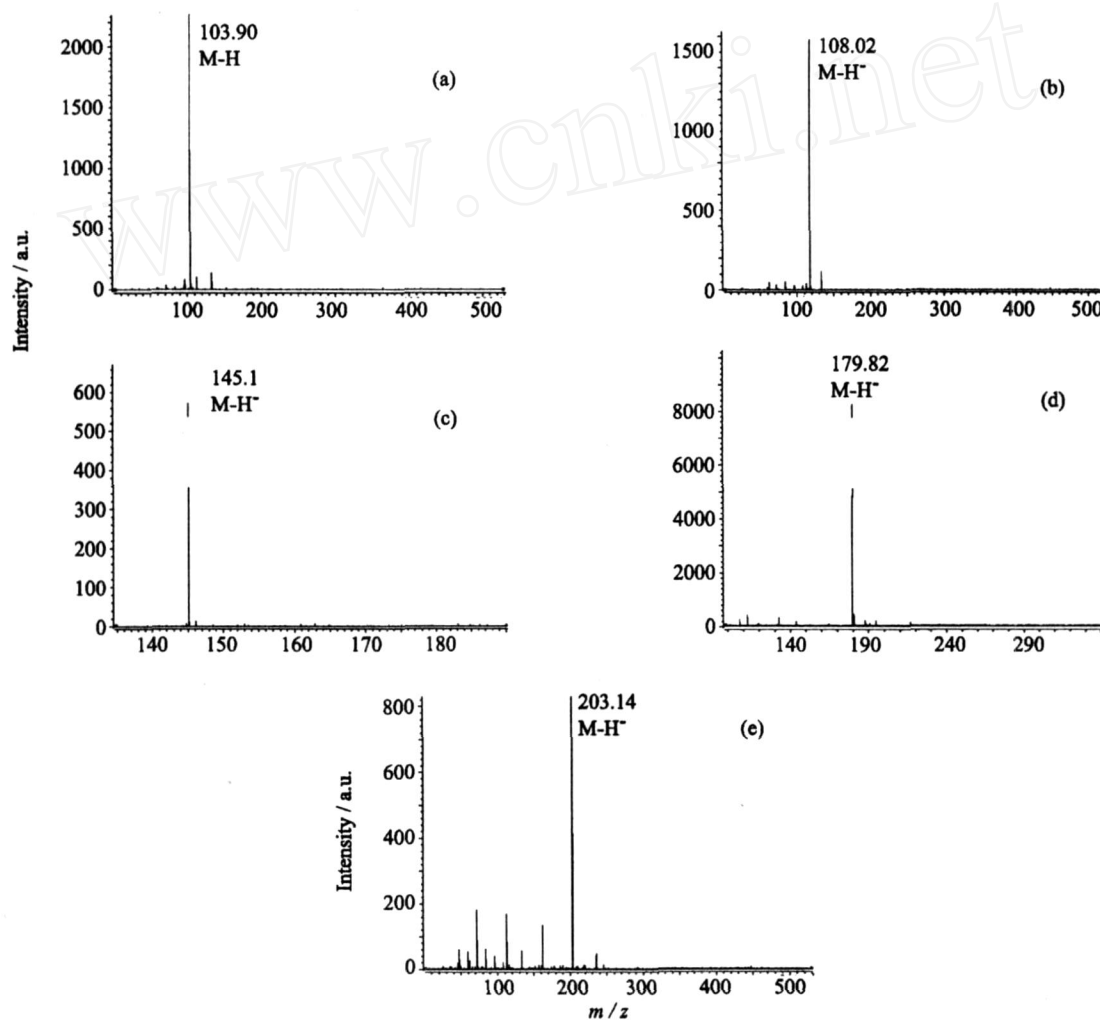


图 1 5 种氨基酸负离子模式 MALDI-TOF 质谱图

Fig. 1 CNT MALDI mass spectra of five amino acids

(a) serine at m/z 103.9 [M - H]⁻; (b) threonine at m/z 118.0 [M - H]⁻; (c) lysine at m/z 145.2 [M - H]⁻; (d) tyrosine at m/z 179.8 [M - H]⁻; (e) tryptophane at m/z 203.1 [M - H]⁻ detected in negative reflection mode

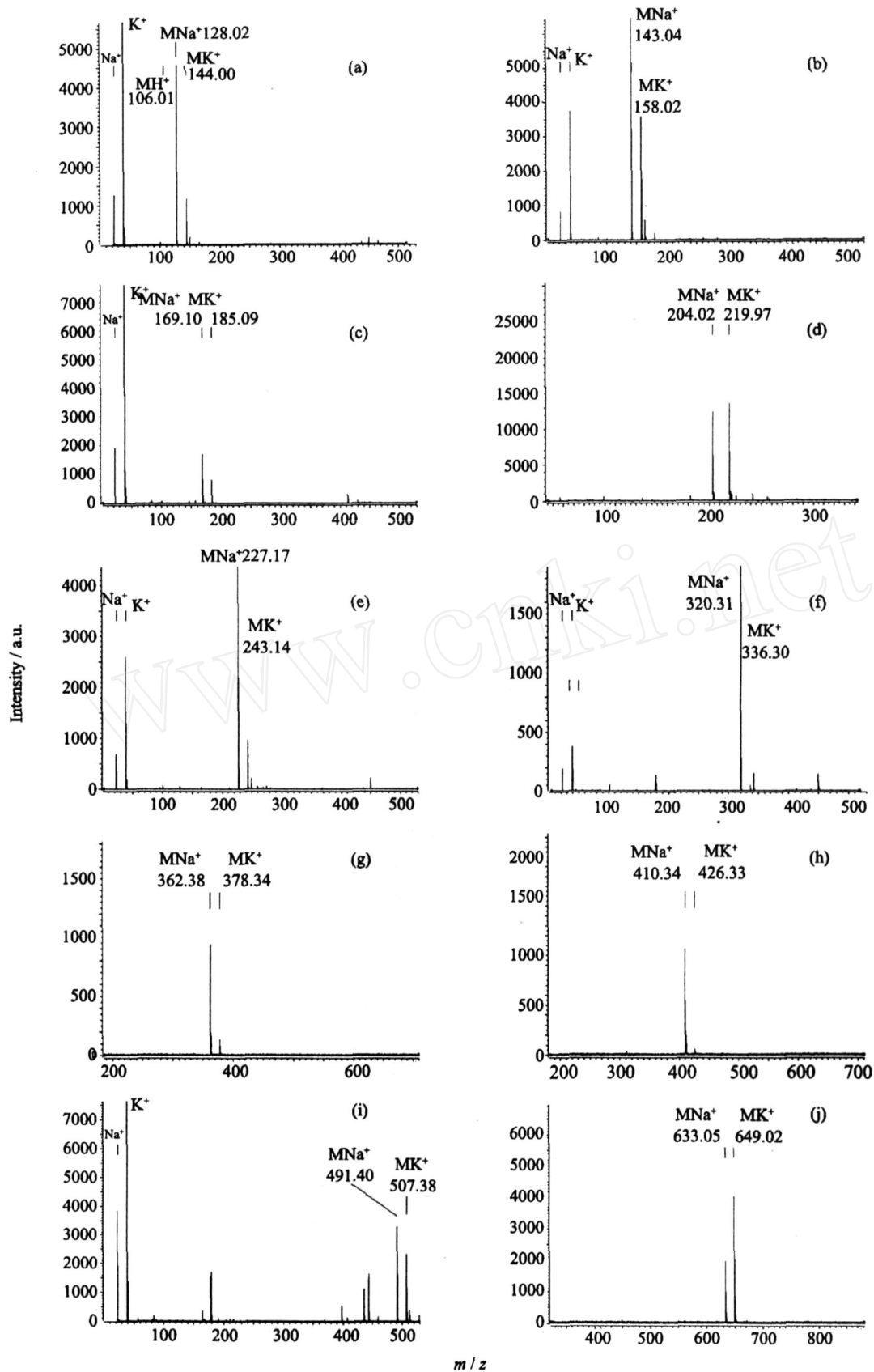


图 2 10 种氨基酸及其衍生物的正离子模式 MALDI-TOF 质谱图

Fig. 2 CNT MALDI mass spectra of (a) serine, (b) threonine, (c) lysine, (d) tyrosine, (e) tryptophane at $m/z [M + Na]^+$ and $[M + K]^+$ in positive ion reflection mode, (f) fmoc-glycine, (g) fmoc-valine, (h) fmoc-phenylalanine, (i) fmoc-Gln(Trt)-OH, (j) Fmoc-Lys(BOC)-OH at $m/z [M + Na]^+$ and $[M + K]^+$ in positive ion reflection mode

的离子源内,进行质谱分析,所有谱图均为累加 10 ~ 50 次激光照射激发分析物得到的信号谱图.正离子模式检测时利用 Na^+ 和 K^+ 特征峰作为内标,对仪器进行内标法标定;负离子模式检测时采用外标法进行质量校正.

2 结果与讨论

2.1 实验结果

表 1 是我们以碳纳米管(CNT)为基质,分别用正、负加速电压的方式检测几种氨基酸及其衍生物得到的结果.

在正离子模式中所得到的峰一般是 $[\text{M} + \text{H}]^+$, $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 和 $[\text{M} + \text{K}]^+$ 分子离子峰,在负离子模式中得到单一 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 离子信号,重复激发时也没有碎片峰出现,碳纳米管有效地分散了样品分子,防止样品分子聚合在一起,同时完成激光能量的传递,是待测样品分子解吸离子化.与传统基质相比低质量区的背景信号干扰被消除.

2.2 结果分析和讨论

实验中尝试了 3 种样品制备法:1)传统的混合点样法,将样品与碳纳米管悬浊液,然后取 1 μL 点样与样品靶上;2)先将基质悬浊液点于样品靶上,待溶剂挥发碳纳米管在靶上形成均匀薄层,后将样品溶液点于 CNT 薄层上;3)夹心法,将样品置于两层基质中间,先将基质点于靶上,待干燥后点测试样品,等测试样品溶剂干后再次覆盖上基质.

混合点样法中,由于碳纳米管悬浊液自身的分布不均匀,混合样品后再点样得到的信号峰不强,可能是混合后溶液不均一造成的,夹心点样法同样没能提高检测样品峰的信号强度,可能是在样品表面形成一物理屏蔽层,削弱样品逸出的能力.第二种点样法效果最佳,我们只需将预先配制好的碳纳米管溶液点于样品靶上,待溶剂挥发干后,可以将待测样品点于碳纳米管的薄层上,等样品溶剂干燥后可送入 MALDI 源内进行检测.在碳纳米管薄层表面不被破坏的情况下隔数日后再次点测试样也不影响其检测效果.所以样品的制备过程简单省时,技术上易于操作.

从图 1 可以看到在负离子模式下分析氨基酸时,得到很强的准分子离子峰 $[\text{M} - \text{H}]^-$,以及观测到强度较弱的由碳纳米管本身产生的一组排列有序的,相差 12 u 的背景峰.从图谱中我们可以直接找到与被测氨基酸样品一一对应的分子离子峰 $[\text{M} - \text{H}]^-$,没有碎片峰的干扰,也没有复杂的加合物峰的出现,使得对被测样品的分析变得简单,也节省了分析时间,比正离子模

式下的检测分析更具有优势.

图 2 是正离子模式下分析不同浓度的氨基酸及其衍生物,我们均得到信噪比好分辨率高的质量图谱.样品分子与碱金属钠和钾离子的加合峰 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 、 $[\text{M} + \text{K}]^+$ 及碱金属钠离子 Na^+ 和钾离子 K^+ 自身的离子峰强度都很强.图谱中 Na^+ 和 K^+ 的离子峰可作为内标对被测分析物进行内标校正,提高了检测精度.证明碳纳米管在正离子模式下,以固体形式参与解吸离子化过程,可以用于分析小分子分析物.同时我们也发现这种存在纳米管状结构的无机材料不仅能在正电场模式下有效地把激光能量传递给被测小分子分析物,也能在负电场模式下扮演对小分子分析物的解吸离子化的角色,而且得到的图谱更简单易于分析,自身产生的噪音强度很低,对样品背景干扰少.证明我们选择的基质和方法可以有效地对氨基酸及其衍生物等小分子分析物进行 MALDI TOF 检测.

通过实验,验证了碳纳米管作为基质适用于 MALDI TOF 对小分子化合物氨基酸及其衍生物的分析,正离子模式下可以高通量,高灵敏度,快速地对小分子量化合物进行检测.其他类型离子源(例如 ESI、APCI 等)的质谱仪对样品中的盐的含量要求比较苛刻.而使用碳纳米管作为基质,MALDI 源对分析物中少量的盐浓度并不影响谱图的效果.同时我们尝试了在负离子模式下分析小分子量化合物,负离子模式中分析氨基酸则得到单一的 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 负离子峰.显然用碳纳米管作为 MALDI TOF-MS 的基质,应用于小分子量化合物的研究很有潜力.由此可见,碳纳米管作为基质可以提高 MALDI TOF 分析小分子量化合物的能力,使之应用于快速分析分子量小于 0.8 ku 的小分子化合物.

致谢:感谢中国科学院大连化学物理研究所邹汉法教授的指导与帮助.

参考文献:

- [1] Gevaert K, Vandekerckhove J. Protein identification methods in proteomics[J]. Electrophoresis, 2000, 21 (6): 1145 - 1154.
- [2] Stahl B, Steup M, Karas M, et al. Analysis of neutral oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry[J]. Anal Chem, 1991, 63: 1463 - 1466.
- [3] 姜泓海, 邹汉法, 汪海林, 等. 固定化酶微升反应器与 MALDI TOF MS 联用技术用于蛋白质肽谱研究[J]. 中国科学(B 辑), 2000, 30: 385 - 391.
- [4] Kinumi T, Saisu T, Takayama M, et al. Matrix-assisted la-

- ser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using an inorganic particle matrix for small molecule analysis[J]. *J Mass Spectrom*, 2000, 35(3): 417 - 422.
- [5] Wei J, Buriak J M, Siuzdak G. Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon [J]. *Nature*, 1999, 399(6733): 243 - 246.
- [6] Michael J D, Richard K, Renato Z. Graphite/liquid mixed matrices for laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 1996, 68(19): 3321 - 3329.
- [7] 张清春, 邹汉法, 张强, 等. 多孔硅表面的激光解吸离子化质谱[J]. *分析化学*, 2001, 12: 1365 - 1369.
- [8] Xu S Y, Li Y F, Zou H F, et al. Carbon nanotubes as assisted matrix for laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2003, 75(22): 6191 - 6195.
- [9] Pan C S, Xu S Y, Zou H F, et al. Carbon nanotubes as adsorbent of solid-phase extraction and matrix for laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005, 16(2): 263 - 270.
- [10] Hu L G, Xu S Y, Pan C S, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry with a matrix of carbon nanotubes for the analysis of low-mass compounds in environmental samples[J]. *Environ Sci Technol*, 2005, 39(21): 8442 - 8447.

In Negative Ion Mode MALDI TOF MS Analysis of Amino Acids Using Carbon Nanotubes as Matrix

CHEN Jin-an, HUANG Hui-ying, HUANG He-qing

(Analysis Center, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract : Multiwalled carbon nanotubes were used as the matrix for analysis of small molecules by MALDI TOF MS, and it was observed tube able to eliminate interference of matrix background ions and suitable for analysis of small molecules (< 0.8 ku). Here, we demonstrated this method through analyze amino acids and amino acid derivatives in positive reflection mode. Mass spectra showed that the analytes were ionized as sodium adduct $[M + Na]^+$ and potassium adduct $[M + K]^+$, metal ions are the main chemical adduct and $[M + H]^+$ peaks of the analytes are not observed in the mass spectra. Previously reported method mainly focused on positive reflection mode. In this work we focused on the development of this new matrix for MALDI to analyze amino acids in negative reflection mode. It was observed from the mass spectra that there was only one intense peak, which was corresponding to $[M - H]^-$, and under optimal conditions, little or no background peaks appeared in the low mass region, and the intensity and S/N of peaks was enhanced. This method can be utilized in the rapid and sensitive analysis of amino acids, and expand the applied fields of MALDI TOF mass spectrometry.

Key words : MALDI TOF MS; matrix; low-mass compounds; negative reflection mode