

难溶有机化合物分子质量的测定

欧燕飞^a, 林志为^b

(厦门大学 a. 分析测试中心; b. 化学化工学院 福建 厦门 361005)

摘要: 介绍如何对基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)的样品靶进行加工改造,并针对不同类型的样品,如难溶有机物、金属配合物、高聚物、稠环芳烃或富勒烯、簇合物、挥发性差的液体等。采用不同的制样方式,提供了一种操作简便、通用性强的检测分子质量的表征方法,弥补了这些复杂化合物难以获得准确分子质量的不足,为解析这些化合物结构信息提供有力证据。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 质谱; 难溶物质

中图分类号: O 621.4

文献标志码: A

文章编号: 1006-7167(2015)01-0060-03

Determination of Molecular Mass of Insoluble Organic Compounds

OU Yan-fei^a, LIN Zhi-wei^b

(a. Analyzing and Testing Center; b. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometer (MALDI-TOF-MS) has very advantages such as less sample volume, fast detection, resistant to high salt content. Hence it has been widely used in biological molecules, polymers, organic compounds and so on, and generally is mixed with a certain proportion matrix after dissolving samples. In practice, some samples are extremely difficult to dissolve, or cannot find suitable solvent, so they cannot be used by the traditional method to obtain molecular weight on CGMS or LCMS. This paper presented to transform MALDI-TOF-MS sample target for different types of samples, such as insoluble organic compounds, metal complexes, polymers, polycyclic aromatic hydrocarbons or fullerene clusters. With different preparation methods, a convenient method of molecular detection was provided to obtain the accurate molecular mass. The method provides strong evidence for the analysis of the structure information.

Key words: matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS); mass spectrometry; insoluble material

0 引言

20世纪80年代末发展起来的基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪(Matrix-Assisted Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS)是激光电离技术和高速数据采集处理系统相结合的产

物,它具有高灵敏度、高通量、快速、准确、耐盐量高等特点,已成功应用于蛋白质、DNA/RNA、多糖等生物大分子的检测,并获得了2002年的诺贝尔化学奖^[1-9]。

MALDI-TOF-MS的原理是是将微量样品与过量小分子基质的混合液体点到样品靶上,经加热或者风吹干形成共结晶,放入离子源室内,达到一定真空后,激光照射到靶上样品,基质从激光中吸收能量,传递给样品分子,使其瞬间汽化,并将质子转移到样品分子使其离子化。然后进入飞行时间质量分析器,根据它们各自的质荷比(m/z)进行检测,处理数据后得到质谱图。其中的基质是一种可通过其分子的光激发或光离子化作用而把质子转移给分析物,从而加强分析物分子离子形成的物质。在MALDI中基质起到的作用主要如

收稿日期: 2014-03-14

作者简介: 欧燕飞(1966-),女,广东茂名,工程师,现主要从事公共检测平台管理和贵重仪器设备的应用与研究,以及计量认证工作。

Tel.: 0592-2188336; E-mail: oyf@xmu.edu.cn

通信作者: 林志为(1977-),女,福建永春,硕士,工程师,现主要从事MALDI-TOF-MS与FT-ICR-MS的应用与管理。

Tel.: 0592-2188712; E-mail: zwlin123@xmu.edu.cn

下:①吸收激光能量并把能量转移给分析物。这样不仅可将能量转移给分析物使其形成分子、离子,还可避免由于过量的能量使分析物裂解;②包埋分析物,使分析物分子之间彼此隔离,避免分析物分子之间的缔合,这种缔合会导致质量的复杂化,以至无法进行解吸;③适当的基质还会通过其分子的光激发或光离子化作用而把质子转移给分析物,从而加强分析物分子离子的形成。常用的基质有 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)、2,5-二羟基苯甲酸(DHB)、芥子酸(SA)、2,4,6-三羟基苯乙酮(THAP)、葱三酚(DI)、3-吡啶丙烯酸(IAA)等。采用MALDI-TOF-MS检测分子质量具有以下优势:①除检测问题以外, m/z 范围无限制;②无需精选狭缝,不用扫描就能在同一时间检测整个 m/z 范围的离子;③离子传送效率高。此外,MALDI是一种软电离技术,在线性模式下不产生或者产生很少的碎片离子,可直接应用于混合物分析,也可用来检测样品中是否含有杂原子及杂质分子质量^[10-11]。

传统的分析方法需要将基质和样品分别溶解并配制成一定比例的溶液,再把两种溶液按照不同浓度的比例混合后进行测试,但是这个比例的大小往往很难把握,使得样品制备具有难度,对操作者的经验要求高^[12-17]。并且,有一部分样品在各种溶剂中十分难溶解,或者可溶解的溶剂挥发性差,如甲基亚砜(DMSO),甚至有些样品在溶剂溶解后失去原有的性质,这些都不适合样品以液体形式与基质的溶液混合后在靶上吹干共结晶。

本文对MALDI-TOF-MS配备的样品靶进行了加工改进,并针对不溶有机物做了大量实验,总结出几种制样方法。以某化合物为例,介绍如何采用MALDI-TOF-MS检测在气相质谱(GC-MS)、液相质谱(LC-MS),包括常用的质谱离子源如电子轰击电离源(EI)、化学电离源(CI)、电喷雾电离源(ESI)、大气压化学电离源(APCI)等所不能适用的难溶化合物的分子质量。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

MicroFlex MALDI-TOF-MS,美国布鲁克公司,配有96个点的Micro SCOUT Plate(MSP)样品靶;盒式 N_2 激光器,激光波长337 nm,频率60 Hz,反射正离子模式检测。

2,5-二羟基苯甲酸、 α -氰基-4-羟基肉桂酸、葱三酚等基质由布鲁克公司提供。

1.2 实验方法

取样品靶于钻床上钻出直径 $\phi 1 \sim 2$ mm、深度0.5~1.0 mm的小圆孔(见图1中虚箭头所示),洗净后用丙酮、乙醇、超纯水各超声波清洗15 min,电吹风或者干燥箱烘干。将装有样品的靶放入离子源室内,抽

真空至0.3~0.5 mPa,设置电压Ion Source1为18.0~21.0 kV, Ion Source2为16.0~19.0 kV, lens 9.0~10.0 kV。调节激光能量大小,采集图谱。

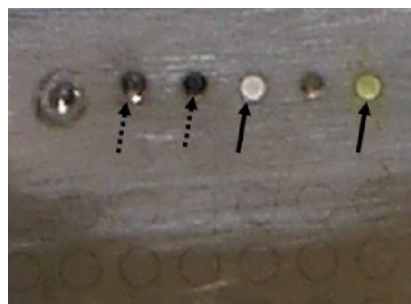


图1 经加工的样品靶(…空的孔洞,一孔洞中已填充)

2 结果与讨论

对于不同性质的复杂化合物,可以有以下几种制备方法:①对于固体样品,如金属有机配合物、高分子聚合物、笼状簇合物等等,先用玛瑙研钵研至粉末状,将此粉末与基质或碳纳米管充分混合后填满孔洞中。并用干净的载玻片压实,使样品的表面与靶面平齐(见图1中实箭头所示)。②如果是含有多苯环结构的固体有机化合物,可不加入基质,直接在孔洞中填充,压实。③固体块状物,如晶体,可直接用 $2 \mu\text{L}$ 不挥发的甘油或者具有黏性的物质使之在孔内固定,保持样品的表面与靶表面平齐。④有颗粒悬浮于溶剂中的样品可用移液枪取出 $5 \mu\text{L}$,与 $5 \mu\text{L}$ 基质溶液混匀后,捞出 $2 \mu\text{L}$,置于微测板样品靶上,用电风吹干,再用载玻片压结实,除去周边分散的不牢固的散状颗粒。针对上述几类化合物,结合DHB、CHCA等基质,分别摸索了各类化合物的最佳测试条件和参数,做了大量的实验,均获得较为理想的谱图。以某化合物为例,经过实验,发现该化合物不溶于甲醇、乙腈、四氢呋喃、二氯甲烷、氯仿等常见溶剂,于是将其分散在乙醇中形成悬浮液,用葱三酚(DIT)作为基质,以方法④制样,测试后得到了如图2所示的一系列谱峰。它们分别是该化合物的单体准分子离子峰 $[M+H]^+ m/z$

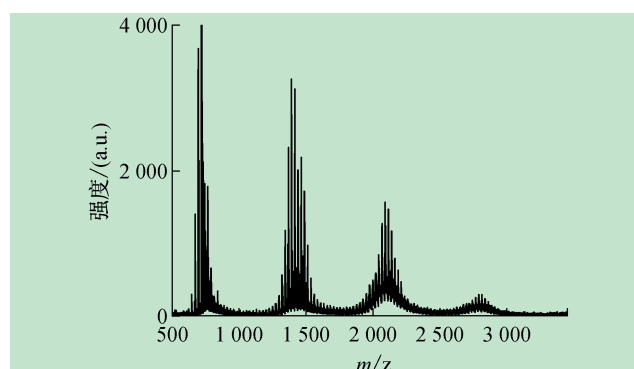


图2 某化合物采用固体上样法测得的MALDI-TOF-MS谱图

696.1; 二聚体 $[2M + H]^+$ m/z 1 392.9; 三聚体 $[3M + H]^+$ m/z 2 088.7; 四聚体 $[4M + H]^+$ m/z 2 784.9。

相对现有以液相或者气相进样的技术,固体进样法有如下优点和效果:

(1) 难溶有机物,尤其带有稠环的有机物或富勒烯,可不需要基质,直接用固体上样,方便快捷,并且减少了基质峰的干扰。

(2) 某些样品虽然可溶解,溶剂却很难挥发,如DMSO是一种重要的极性非质子溶剂,但挥发性差,需要大量时间才可除去溶剂,采用文中所述的方法,可以节约大量时间。

(3) 复杂固体化合物,无法用有机溶剂溶解,不能以液体形式点靶,如果用甘油固定住的进样方法,可在不破坏化合物性质的前提下,获得可靠的谱图。

(4) 各类基质都有可能出现 $[M + H]^+$ 、 $[M + Na]^+$ 、 $[2M + H]^+$ 、 $[2M + Na]^+$ 等一系列峰,干扰了本身 m/z 在 1 000 以内的小分子化合物的谱峰,使得难以分辨和解析。因此,对于小分子 ($m/z < 1 000$) 的化合物,可以将样品与碳纳米管等充分混匀,再填充于靶上小孔中或者直接在靶上压片,有效避免了基质各类峰的干扰,同时压实后碳纳米管等固体物不易疏松掉落,并不影响真空系统。

值得一提的是,由于在不同样品中基质发挥的效果不同,因此优化基质是非常必要的,这样可以改善结晶状况,使样品分布均匀并有效解吸电离,增强质谱信号,进而提高分析灵敏度、分辨率和重复性等^[10]。

3 结 语

文中对样品靶加工改进,为难溶有机物、稠环芳烃、挥发性差的液体等物质提供了检测分子质量的方法,弥补了这些复杂化合物难以获得准确分子质量的不足,为解析这些化合物结构信息提供了有力证据,这一结果对此类化合物的合成思路及实验设计具有十分重要的指导意义。但是不同性质的物质需要选择不同的基质,基质是否合适决定了实验的成败,因此选择最佳的基质和优化实验条件仍然是实验的关键。

参考文献(References):

- [1] Cohen S L, Chait B T. Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins [J]. *Analytical Chemistry*, 1996, 68: 31-37.
- [2] Tanaka K, Waki H, Ido Y, *et al.* Protein and polymer analysis up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1988(2): 151-153.
- [3] Andreas E Z, Wycliffe O M, Abdul M T, *et al.* Discrimination of multilocus sequence typing-based *Campylobacter jejuni* subgroups by

- MALDI-TOF mass spectrometry [J]. *BMC Microbiology*, 2013, 13: 247-254.
- [4] Lou XW, Buijtenen J, Bastiaansen J, *et al.* Characterizaion of some synthetic Ru and Ir complexes by Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2005, 40: 654-660.
- [5] Wyatt M F, Havard S, Stein B K. Analysis of transition-metal acetylacetonate complexes by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2008, 22: 11-48.
- [6] Ondrej S, Alexandr N, Lenka K, *et al.* Improvement of MALDI-TOF MS profiling for the differentiation of species within the *acinetobacter calcoaceticus*—*acinetobacter baumannii* complex [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2013, 36: 572-578.
- [7] Usbeck J C, Kern C C. Optimization of experimental and modelling parameters for the differentiation of beverage spoiling yeasts by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in response to varying growth conditions [J]. *Food Microbiology*, 2013, 36: 379-387.
- [8] Kuda T, Izawa Y, Yoshida S. Rapid identification of *Tetragenococcus halophilus* and *Tetragenococcus muriaticus*, important species in the production of salted and fermented foods, by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) [J]. *Food Control*, 2014, 35: 419-425.
- [9] Johansson A, Nagy E, SÓKi J. Detection of carbenemase activities of *Bacteroides fragilis* strains with matrix-assisted laser desorption ionization e Time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) [J]. *Anaerobe*, 2014, 26: 49-52.
- [10] Francisco S, Lorena P, Luisa D, *et al.* Breakthrough bacteremia due to *clostridium tertium* in a patient with neutropenic fever, and identification by MALDI-TOF mass spectrometry [J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2013, 17: 1062-1063.
- [11] 蒋娟娟,冯芳. 基质辅助激光解吸离子化中的基质和基质添加剂[J]. *药学进展*, 2004, 28(8): 349-354.
- [12] 卫军营,蔡耘,钱小红等. 基质辅助激光解析电离质谱靶上样品前处理方法研究进展[J]. *质谱学报*, 2007, 28(6): 122-128.
- [13] Raouf M, Salma M, Asma S, *et al.* Synthesis of biosourced polyether-amides from 1,4-3,6-dianhydrohexitols: Characterization by NMR and MALDI-ToF mass spectrometry [J]. *Comptes Rendus Chimie*, 2013, 16: 1127-1139.
- [14] Laurent B, Monique P, Céline C. Fast urinary screening of oligosaccharidoses by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry [J]. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2014(9): 19-30.
- [15] Kailasa S K, Cheng K H, Wu H F, *et al.* Semiconductor nanomaterials-based fluorescence pectroscopic and matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometric approaches to proteome analysis [J]. *Materials*, 2013(6): 5763-5795.
- [16] Zhang N, Doucette A, Li L. Two layer sample preparation method for MALDI mass preparation method for MALDI mass spectrometric analysis of protein and peptide samples containing sodium dodecyl sulfate [J]. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(13): 2968-2975.
- [17] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry based proteomics [J]. *Nature*, 2003, 422(6928): 198-207.