

## 延时提取正交发射 MALDI 技术研究

顾学军\*, 方黎, 郑海洋, 周留柱, 王振亚, 张为俊

(中国科学院安徽光学精密机械研究所环境光谱学实验室, 合肥 230031)

盛六四, 张允武

(中国科学技术大学国家同步辐射实验室, 合肥 230029)

**摘要:** 在反射式飞行时间质谱仪上,采用脉冲电场延时提取技术及离子正交发射采样方式,进行了基质辅助激光解吸电离技术(MALDI)的研究.实验所用激光波长为266 nm,基质为2,5-二羟基苯甲酸,样品为孔雀石绿和多肽.得到了上述样品在MALDI条件下离子的质谱图和初速度分布.质谱测量的分辨率达到4000,质量测量的线性相关度好于0.9999,平均误差小于0.0075%.

**关键词:** 反射式飞行时间质谱仪; 延时提取; 基质辅助激光解吸电离; 正交发射

中图分类号: O657.63 文献标识码: A

## Research of Orthogonal-injection and Delayed-extraction MALDI

Gu Xuejun\*, Fang Li, Zheng Haiyang, Zhou Liuzhu, Wang Zhenya, Zhang Weijun

(Lab of Environmental Spectroscopy, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031)

Sheng Liusi, Zhang Yunwu

(National Synchrotron Radiation Laboratory, University of Science and Technology of China, Hefei 230029)

**Abstract** An orthogonal injection (OI) home-made reflector type time-of-flight (TOF) mass spectrometer has been constructed with a matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) source. Ions generated by MALDI are measured using a pulsed voltage delayed extraction method. The laser used is a frequency quadrupled Nd:YAG laser with output at wavelength of 266 nm, the matrix used here is 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), and the analytes are Malachite green and peptides. Measurements of resolving power and statistical evaluation of the mass accuracy are reported here. The results indicate that resolving power in the range of 3400 to 4000 (full width at half maximum), the average error of the mass accuracy is below 0.75%, A perfectly linear  $(m/z)^{1/2}$  versus  $t$  plot is found. Finally, the initial velocity distribution of analyte and matrix ions in the range of 400 ~ 1000 m/s is measured.

**Key words** RTOF, Delayed extraction, MALDI, Orthogonal injection

### 1 引言

基质辅助激光解吸电离(MALDI)<sup>[1-2]</sup>是一种新的软电离技术,出现于20世纪80年代后期.其原理是将待测物质与大量被称为基质的小分子化合物充分混合,用脉冲激光轰击其表面,基质强烈吸收激

光能量并转化为晶格的激发能.激光能量使样品表面升温,基质发生相变或升华,夹带着存在于其晶格中的待测物分子脱离固态表面,迅速扩散,并在此过程中发生一系列分子、离子及光化学反应,形成质子化、碱金属加成的一系列准分子离子.

MALDI通常与飞行时间质谱仪(TOF)联用,

\* Corresponding author, Email: xjgu@aiofm.ac.cn Received 13 March 2004; in final form 2 June 2004.

TOF 是依据离子在加速区和自由漂移区飞行时间的不同而对其进行检测的. 由于 MALDI 离子具有很宽的初始速度分布<sup>[3,4]</sup>, 从而导致质荷比相同的离子以不同的时间飞抵检测器而影响分辨率. 同轴离子延时提取 (delayed extraction) 技术<sup>[5,6]</sup> 的引入, 使 MALDI-TOF 的分辨率得到了极大的提高. 该技术的基本思想是让 MALDI 离子产生于无场区, 经过一段预设的延时时间, 再迅速施加一个脉冲电场将离子引出, 以达到动能补偿的效果. 该方法的缺点是, 不同质量的离子其最佳的延时聚焦条件不同, 一套实验参数所补偿的质量范围很窄, 大范围内分析不同质量数的离子需要相应调整延时时间和脉冲电压. 另外, 由于延时时间的引入, 破坏了原有的离子质量和飞行时间的标定公式, 为了得出准确的质量数值, 就需要采用更加复杂的校准程序.

为了克服同轴延时提取技术的缺点, 有人提出了采用正交发射<sup>[7-9]</sup> MALDI 离子源结构的脉冲电场延时提取方式. 即将样品靶置于引出场外部, 靶面的法线与引出电场方向垂直, 激光垂直入射靶面. MALDI 离子产生于无场区, 经过一段时间的自由飞行达到引出场区, 随着脉冲电场的到来而被引出. 由于离子在引出电场方向的初速度分量很小, 且其初速度与离子的质量无关, 离子的动能发散得到了自然的补偿, 从而大大提高了质谱的分辨率和质量标定的准确性. 采用类似方法研究团簇和激光溅射/气相化学反应的实验已有报道<sup>[10,11]</sup>, 本文介绍了我们采用该方法进行 MALDI 研究的一些结果.

## 2 实验

### 2.1 实验装置

实验是在中国科学技术大学国家同步辐射实验

室的反射式飞行时间质谱仪上进行的. 实验装置见图 1. ① 离子源: 引出电场和加速电场都采用了多块电极结构. 第 1 和第 4 电极之间为引出场区, 第 4 和第 8 电极之间为加速场区, 其它电极为电压分配电极. 电极 1 接脉冲电源, 脉冲电压的幅度为 161 V. 电极 2 接地. 电极 8 为 -1000 V, 离子总的加速电压为 1161 V. 其他各极板上的电压通过分压电阻实现, 电压匹配满足离子的二阶空间聚焦条件. 离子源区还安装了一个对离子起聚焦作用的 einzel 透镜. ② 离子反射器: 离子反射器用于能量聚焦、提高质量分辨率. 离子离开离子源区后, 在 -1000 V 的浮地电场内自由飞行, 然后进入离子反射系统. ③ 进样部分: 进样系统如图 1, 样品靶置于离子源轴线外 5 cm 处, 进样杆的轴线与质谱计中离子飞行轨迹的轴线垂直. 另外, 进样杆的轴线与入射激光的光轴不重合. 这样做的好处是, 通过不停地转动进样杆, 可以使新鲜的样品表面进入激光作用区, 因而无须频繁地更换样品, 大大延长了实验的时间. ④ 光源: 激光光源是 Nd:YAG 激光器经四倍频产生的 266 nm 激光. 光路上还安置了一个焦距为 27 cm 的石英透镜和一个激光能量衰减器, 激光的功率密度控制为解吸电离所需的阈值  $1 \sim 10 \text{ GW/cm}^2$ . ⑤ 真空系统: 实验时整个系统的真空度维持在  $30 \mu\text{Pa}$ . 真空是由两台抽速为 1500 L/s 的涡轮分子泵来维持的, 它们的前级泵分别为 2x-70 和 2x-15 型机械真空泵. ⑥ 时序: 首先由 GH022 五通道数字延时脉冲发生器发出一个脉冲信号触发 Nd:YAG 激光器 and 高速瞬态记录卡 (EGG), 经过一定的延时后 (几到几十微秒) 数字延时脉冲发生器发出另一路脉冲信号触发脉冲电源. 通过调节以上两路脉冲之间的延时, 可以将离子提取出来. ⑦ 信号采集: 离子经过加

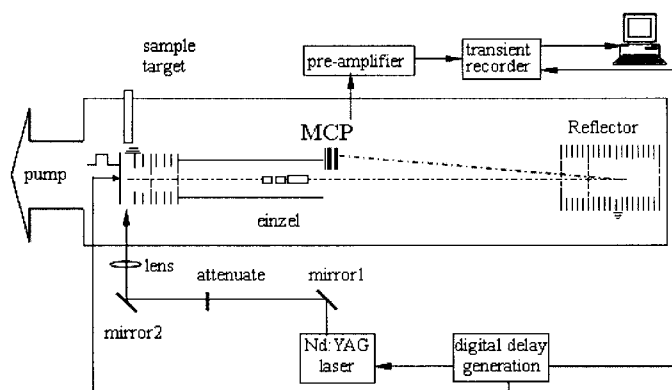


图 1 正交发射 MALDI 质谱仪示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the orthogonal MALDI-RROF

速区、自由飞行区和反射器后被微通道板(通常为 +1100 V)接收后转换为电信号,再经前置放大器放大后进入高速瞬态记录卡,最后由计算机处理和输出.为了提高信噪比,信号采用10次平均的结果.

## 2.2 样品及配置

基质为2,5-二羟基苯甲酸(DHB, Sigma公司),溶剂为乙腈(分析纯)和去离子水,并加入少量三氟乙酸(化学纯)以改善溶液的PH值.样品为孔雀石绿(天津大茂)和多肽(中国科学技术大学生物系赵志强老师提供).采用液滴干燥法配制样品:(a)将3 mg样品溶于3 mL 0.1%三氟乙酸溶液中;(b)将上述溶液稀释10倍;(c)将10 mg DHB溶于2 mL体积比为1:1的0.1%三氟乙酸/乙腈溶液中;(d)将(c)与(b)以体积比10:1的比例混合后,振荡均匀;(e)吸取(d)中配制好的混合溶液10  $\mu$ L滴到不锈钢靶上,在室温下静置.待溶液蒸发后,即可将样品靶放入真空腔.

## 3 结果及分析

### 3.1 质谱分析

图2是实验中得到的孔雀石绿的MALDI质谱图.在图2中,低质量区有三个由基质产生的峰.分别是DHB失去一个羟基的碎片离子峰 $[M-OH]^+$ 、DHB的自由基离子峰 $M^+$ 和碱金属加合离子峰 $[MNa]^+$ .在高质量区的两个峰是由孔雀石绿产生的,分别为自由基离子峰 $A^+$ 和质子加合离子峰 $[AH]^+$ .图中箭头所指是样品信号放大后的结果.

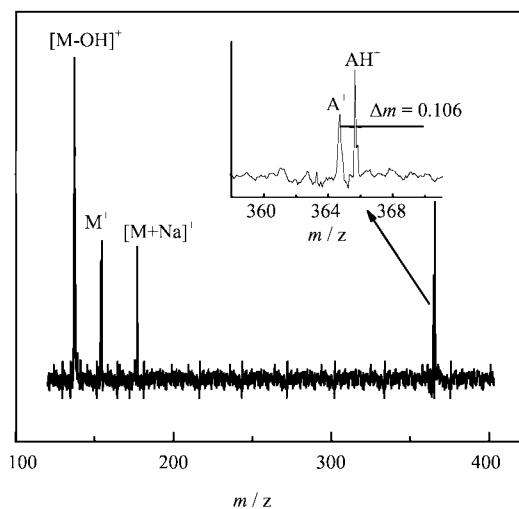


图2 孔雀石绿的MALDI质谱图  
Fig.2 MALDI mass spectrum of Malachite green

这时可以清楚地读出 $A^+$ 峰的质量为364.73,  $[AH]^+$ 峰的质量为365.68.对 $[AH]^+$ 峰而言,其半高宽(FWHM)只有0.106 Da,这时质量分辨率( $M/\Delta M$ )已达3450.

图3是多肽样品的MALDI质谱结果.低质量区的两个峰是由基质产生的,分别为 $[M-OH]^+$ 和 $M^+$ .高质量区也有两个峰,从放大图上可以读出它们的质量数分别为615.4、616.4.该多肽样品的质量数是614.1,经标识这两个峰都是多肽的质子加合峰 $[AH]^+$ ,但是后者中有一个 $^{13}C$ 同位素.这里, $[AH]^+$ 峰的半高宽只有0.153 Da,其质量分辨率已达4000以上.

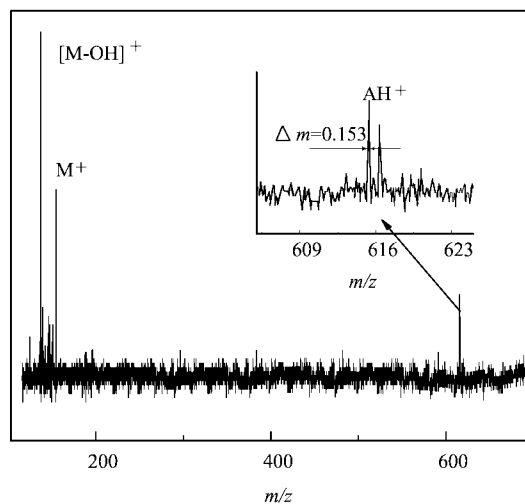


图3 多肽的MALDI质谱图  
Fig.3 MALDI mass spectrum of peptides

### 3.2 质量标定

TOF的质量标定公式是:

$$(m/z)^{1/2} = at + b$$

式中 $m/z$ 为离子的质荷比; $t$ 为离子的飞行时间; $a$ 与 $b$ 为与仪器几何尺寸、电场电压有关的常数.一般的定标方法是首先测出两个已知质量离子的飞行时间,带入上式,算出 $a$ 、 $b$ 的值,然后再通过公式推算出其他离子的质量.对同轴发射MALDI而言,由于离子初动能随着质量的增加而增加, $(m/z)^{1/2}$ 与 $t$ 已不成简单的线性关系了,如果在一个很宽的质量范围内都用同一个公式标定的话,将会使测量结果出现很大的误差.采用正交发射MALDI离子源,离子在提取电场方向上的初速度分量几乎为0,离子初动能对质量标定的影响降到最小,因而在获得高分辨质谱的同时,质量标定也更准确.表1列出了孔雀

石绿和多肽 MALDI 实验中各质谱峰的实测值、理论值和平均误差. 其中孔雀石绿的平均误差是 3.75‰, 多肽为 0.75‰, 两者相差较大, 我们认为这与样品制备有关. 多肽和 DHB 的共溶效果好, 重结晶以后样品表面均匀、光滑. 孔雀石绿与 DHB 的共溶效果

差, 重结晶后样品表面较为粗糙. 我们分别将两幅谱图中所有的质谱峰依据上述质量标定公式进行了拟合, 线性相关度好于 0.9999, 质量测量的准确性可见一斑.

表 1 MALDI 离子的实测值和误差  
Table 1 Experiment date and error of MALDI ions

Malachite green				Peptides			
Ion	Calculation	Experiment	Error/%	Ion	Calculation	Experiment	Error/%
[M-OH] <sup>+</sup>	137.10	137.28	0.13	[M-OH] <sup>+</sup>	137.10	136.91	-0.14
M <sup>+</sup>	154.10	153.85	-0.16	M <sup>+</sup>	154.10	154.24	0.09
A <sup>+</sup>	364.92	364.73	-0.05	AH <sup>+</sup>	615.12	615.37	0.04
AH <sup>+</sup>	365.92	365.68	-0.07	AH <sup>+</sup> ( <sup>13</sup> C)	616.12	616.35	0.04
Average error			-0.0375	Average error			0.0075

### 3.3 初速度分布测量

测量 MALDI 离子初速度分布的方法很简单: 调节脉冲激光和脉冲引出电场之间的延时时间, 记录不同延时时间下离子信号的强度, 从而计算出离子初速度的分布情况. 在本装置中, 靶面距引出电场中心为 50 mm, 从靶平面上被激光解吸的离子, 在延时时间内以各自的初速度在无场区作自由飞行, 距离除以时间即为离子的速度, 离子速度不同到达引出场中心的时间也就不同. 由于引出极栅网有一定的

尺寸, 所以每次收集的都是一定速度范围内的离子. 测量结果如图 4 所示, MALDI 离子的初速度分布在 400 ~ 1000 m/s, 其中以分布在 600 ~ 700 m/s 的离子居多; 基质离子和样品离子有着同样的初速度分布规律, 说明样品的是从高速扩散的基质中释放出来的; 离子的初速度与其质量大小无关, 但是初动能却与质量线性相关, 这是造成分辨率和测量准确性下降的主要原因.

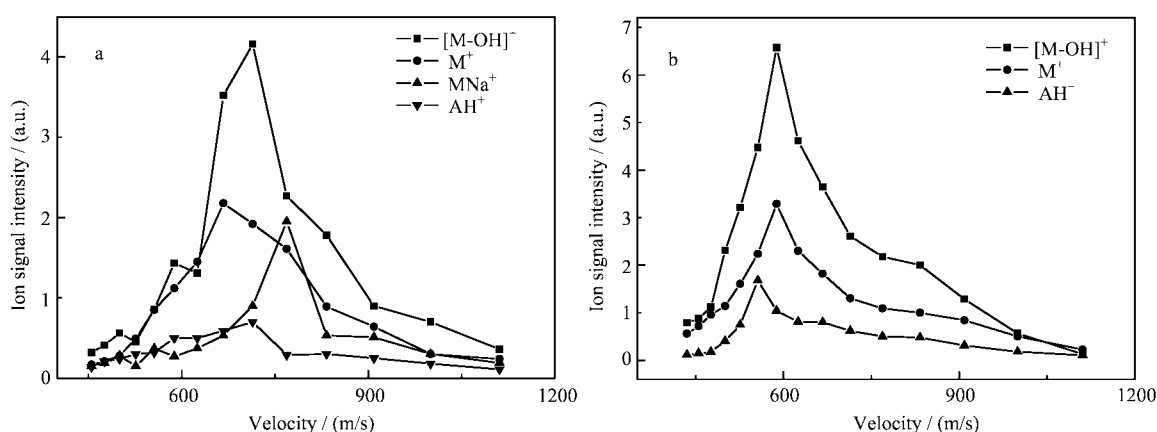


图 4 MALDI 离子的初速度分布  
a. 孔雀石绿; b. 多肽.

Fig. 4 Velocity distribution of MALDI ions  
a. Malachite green; b. Peptides.

## 4 讨 论

与同轴延时提取方法相比,采用正交发射的MALDI离子源每次提取的只是一定初速度范围内的离子,测量的灵敏度有所下降,但是分辨率的显著提高足以弥补这一损失.另外,由于将离子初速度的影响降到最小,质量标定也更加准确.与同轴结构相比,这里的延时时间更长,使气相分子离子反应更加彻底;分子得到有效的冷却,减少了由于亚稳态分子源后降解所造成的质量分辨下降的影响,质谱图变得更加简单、好认.

### 参 考 文 献

- [1] Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F. *Int. J. Mass Spectrum Ion Proc.*, 1987, **78**: 53
- [2] Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T. *Rapid Commun. Mass Spectrum.*, 1988, **2**: 151
- [3] Beavis R C, Chait B T. *Chem. Phys. Lett.*, 1991, **181**: 479
- [4] Zhou J, Ens W, Standing K G, Verentchikov A V. *Rapid Commun. Mass Spectrum.*, 1992, **6**: 671
- [5] Brown R S, Lennon J J. *Anal. Chem.* 1995, **67**: 1998
- [6] Colby S M, King T B, Reilly J P. *Rapid Commun. Mass Spectrum.*, 1994, **8**: 865
- [7] Mlynski V, Guilhaus M. *Rapid Commun. Mass Spectrum.*, 1996, **10**: 524
- [8] Krytchinsky A N, Loboda A V, Spicer V L, Dworschak R, Ens W, Standing K G. *Rapid Commun. Mass Spectrum.*, 1998, **12**: 508
- [9] Ying P, Robert J C. *Org. Mass Spec.* 1992, **27**: 3
- [10] Wang J (王进), Zhang Y W (张允武), Sheng L S (盛六四), *et al. Acta. Phys. Chem. Sin.* (化学物理学报), 2002, **15**: 331
- [11] Xing X P (邢小鹏), Zhu Q H (朱起鹤), Tang Z C (唐紫超), *et al. Acta. Phys. Chem. Sin.* (化学物理学报), 2002, **15**: 83