

讲座

激光质谱及其在分子中的应用

齐颖华 陈天禄 姜洪焱 徐纪平

(中国科学院长春应用化学研究所, 长春, 130022)

提要 激光质谱作为一种快速而方便的测量高分子分子量和分子量分布的手段, 越来越受到人们的重视。近年来, 其发展极快, 已经被广泛地用于高分子的分析中, 并得到了令人满意的结果。在本文中, 对激光质谱的原理、基体与阳离子的选择及在分子中的应用等几个方面进行了介绍。

关键词 激光质谱, 高聚物, 被分析物, 分子离子

激光质谱(MALDI-TOF), 全称为基体辅助的激光解吸/离子化飞行时间质谱。是一种新发展起来的软离子技术, 是测定高分子分子量的有效方法, 它可不依赖于任何聚合物标样来同时测得高分子的分子量和分子量分布, 并已被 GPC 等多种测试手段所证实。近年来, 其发展速度极快, 已经从最初应用在生物高分子上^[1~5], 到现在广泛地用在 PS^[6~8]、PEG^[7~9]、PMMA^[8~10]、带有非线性光活性基团的金属复合物^[11]、树枝状聚酯^[12]、树枝状聚醚^[13]及环状低聚物^[14~18]等领域的表征中, 并已成为表征合成高分子及齐聚物分子量的有效手段。现在, 可应用的基体也已由最初的几种发展为几十种, 仪器也不断更新, 并日趋完善, 以达到更高的分辨本领和分子量。目前, 激光质谱的测试能力最高可达 430000Da^[8]。由于激光质谱的不断发展, 因此本文仅以文献及作者的工作加以综述以飨读者。

概述

我们知道, 传统的质谱方法在测定小分子化合物上比较有效, 而对高分子的测量则显得有些无能为力, 因为这些方法难以把凝聚相中的大分子转化为气相的、完整的分子离子。因此, 人们一直在寻找一些新的离子化技术来解决

这一问题, 其中, 电喷雾离子化^[19,20]和基体辅助激光解吸离子化法被证明在大分子的分析中较为可靠。

在 60 年代早期, 激光就已经被应用到质谱技术中^[21], 研究者们把不同波长(从远 UV 到远 IR)及不同脉冲宽度的激光和与之相联的各种类型的质谱计应用到无机和有机中的痕量分析中。而激光首次应用在有机物的分析中是在 70 年代^[22]。在这些早期的应用中, 人们发现了一个使分子作为完整离子被解吸的“上限”, 这个上限与分子结构和激光参数有关, 对于生物高分子来说约为 1000Da, 而对合成高分子约为 9000Da。这是由于被分析物所吸收的激光能量破坏了大分子, 使分子裂解, 因而这个“上限”极大地限制了激光在分子分析中的应用。这时, 人们开始意识到了添加基体来解决这一问题^[23]。并且由于激光离子源和其它离子源相



齐颖华 生于 1974 年 1 月, 黑龙江省牡丹江人。1989 年~1993 年就读于黑龙江大学化学系, 1994 年考入中国科学院长春应用化学研究所攻读硕士学位, 1997 年 1 月直接攻读博士学位, 师从于徐纪平、陈天禄两位导师,

主要从事芳香环状低聚物的合成和功能化的研究。

比,作用的时间短和激光光束较易集中在一个极小的区域内,使离子在时间上和空间上以一点源的形式产生,因此,这一特点可使激光离子源适合与飞行时间质谱计联用,发展成为现在的激光质谱

1 激光质谱仪器

激光质谱的工作原理概括如下:^[24, 25]把被分析物基体(在有些情况下还需适当的盐)按一定比例配成溶液,涂于探头的表面,激光辐照在混合物上,使被分析物形成气相离子,并在一高场作用下引出、加速,进入一无电场的漂移区,离子的速度正比于 $(m/z)^{-1/2}$ (m/z 为质荷比),因此在漂移区中,这些不同 m/z 的离子分成一系列离散的、独立的离子束,然后撞击在漂移区末端的检测器,产生信号,根据到达时间的不同来检测质量不同的离子。

1.1 激光离子源

所有的质谱仪器都由进样系统、离子源、质量分析器和离子检测器4个部分组成。现在用于MALDI离子源的激光有UV激光(包括N₂激光、激发态粒子激光和Nd-YAG激光)及IR激光等等,所用激光的脉冲宽度为(1~200)ns。激光通过一可调的衰减器后,经聚焦并通过一个小孔进入到质谱计中,激光焦点的大小和激光通过样品表面的入射角度并不重要,一般情况下,光束斑的直径为(10~300) μm ,入射角为30°~75°时,对所得的信号都没有明显的改变。可通过移动光轴或移动样品来改变激光照在样品表面的位置。

对于MALDI离子源来说,一个关键的参数是辐照在样品单位面积上的激光光强。它有一个临界值,即为 $1\text{MW}/\text{cm}^2$ 。低于此值时,离子的产生极少,而高于此值时不利于分子离子的产生,一般来说,最适宜的激光辐照是不大于该值的20%,因此控制激光光强和照在样品表面光束的均匀度是十分必要的。可通过在激光光路上放置一可调的衰减器来有效地控制激光光强。

1.2 飞行时间质谱计

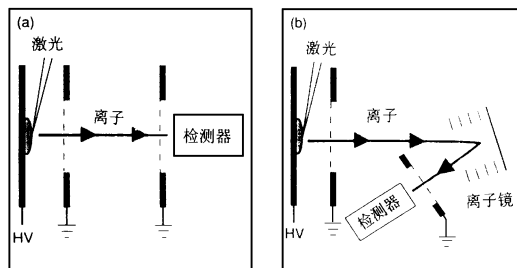


图1 (a)线性和(b)反射式飞行时间质谱计

飞行时间质谱计作为激光质谱的质量分析部分,是一种检测信号为时间函数的质谱计。图1a为一带有激光离子源的线性质谱计。离子束是由样品吸收脉冲激光而产生的,这些离子由一平板电极间的静电场加速,然后经一无场区到达检测器。在这类质谱计中,加速电压多为(1~30)kV,飞行路径为(0.1~3)m。

图1b为带有激光离子源的反射式质谱计,这种质谱计在离子飞行路径上有一离子镜,即一组由不同电压组成的电极,这时,质量相同但是速度不同的离子在不同时刻进入到离子镜中,其中能量较高即速度较快的离子在偏转前进入较深,因而能和速度较慢的离子同时飞出一一起到达检测器,从而可校正由离子能量分布所造成的对分辨本领的影响,提高了分辨本领。

1.3 离子检测器

离子监测器由转换电极、电子倍增器、放大器、示波器、记录器等组成。为检测一束质量一定的分子离子,这束分子离子需在一转变电极上转变为电子或质量低的二次离子,然后在电子倍增器中进行倍增并被检测。从转变电极上产生的电子或二次离子的产率是被检测离子速度的函数^[26]。由单次激光发射产生的信号可在一示波器上直接看到,而连续的多重的激光发射产生的信号则可被记录、累加得出信号。因而多重激光发射可提高信号/噪声比及峰形,进而提高质谱的测量精度。

2 基体和阳离子的选择

2.1 基体的选择

如前所述,激光质谱的一个重要特点就是基体的添加 基体选择的正确与否是做好一个谱图的关键 表 1 表 2 分别列出了常用于生物高分子与合成高分子分析中的基体

激光质谱中基体的作用是:
(1)吸收激光能量并把能量转移给被分析物。这样不仅可把能量转移给被分析物使其形成分子离子,还可避免由于过量的能量使被分析物裂解;

(2)包埋被分析物,使被分析物分子之间彼此隔离,避免被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)适当的基体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被分析物,从而加强被分析物分子离子的形成^[1]。

表 1 适用于生物高分子中的基体

基体	适用的 激光波长	应用对象
2, 5-二羟基苯甲酸	266nm 337nm	低分子卟啉 肽
烟酸	266nm	膜蛋白
3 羟基吡啶羧酸	337nm	低聚核苷酸
5 氯水杨酸	266nm 337nm	细菌视紫红质、卟吩 胆固醇脂酶
2-(4 羟基苯基偶氮)苯甲酸	337nm	肽、多肽、膜蛋白
2 羟基萘酸	226nm 355nm	膜蛋白
芥子酸	266nm	蛋白质、T 酸糖蛋白
芥子酸	337nm 355nm	人体血浆高密度脂 蛋白未分级混合物、 牛血清蛋白、膜蛋白
T 氯基 -4 羟基肉桂酸	337nm 355nm	低分子卟啉、 肽、膜蛋白
3, 4-二羟基肉桂酸	266nm 355nm	膜蛋白
4 羟基 -3 甲氧基肉桂酸	337nm	膜蛋白的非共价 键复合物
对硝基苯胺	355nm	舒缓肌肽、 牛血清胰岛素 肌红蛋白
6 氯杂环 -2 硫代胸腺嘧啶	337nm	膜蛋白
2, 4, 6-三羟基苯乙酮	337nm	膜蛋白

表 2 适用于合成高分子中的基体

基体	适用的 激光波长	应用对象
芥子酸	266nm 337nm 355nm	聚丙烯酸 磺化聚苯乙烯
2, 5-二羟基苯甲酸	266nm 355nm 337nm	PEG 及其混合物 PMM A PV Ac 聚 (R)-3 羟基丁酸脂 树脂状聚酯
1, 8, 9-蒽三酚	337nm	PS PMM A PEG PLM A 芳香环状低聚物
反式 -3 吡啶丙烯酸	337nm	树枝状聚醚, PMM A PS PV G PV R PC 聚 12 羟基硬脂酸
2-(4 羟基苯基偶氮)苯甲酸	337nm	PV G PC 邻苯二酚邻苯二甲酸酯

PLM A 为聚甲基丙烯酸十二烷酯。

实验结果表明,基体与被分析物的分子摩尔比在 100∶ 1~ 50000∶ 1 的范围内对分子离子的形成都比较合适。另外,脉冲激光经基体转移给被分析物能量的多少同激光光强、基体的性质、样品的性质及被分析物在样品中的分布有关,因此,在基体的选择上主要考虑以下两点

- (1)是否能有效吸收光波,
- (2)与被分析物是否相容,可否能形成稳定的均相溶液

目前,在基体的选择上还没有一个成型的理论可遵循,其影响因素很多。从表 1 中我们可看到在生物高分子的分析中应用的基体可按其分子所具有的官能团大体分为 3 类: 苯甲酸系列,肉桂酸系列和苯胺系列,这些基体显然都和蛋白质等被分析物带有相似的基团(羟基或氨基),因此在适当的激光波长下其成为这些生物高分子分析中有效的基体。在合成高分子中,目前已被成功分析的样品其分子结构多含芳香结构,因而合成高分子分析中常用的基体也都是芳香族化合物。由以上分析可看出,结构上的相近是基体选择中的一个重要的先决条件。并且由于吸收光波属于基体的自身属性,因而在基体的选择上主要考虑基体与被分析物的相容性

问题,可把相似相容原理作为一个规律考虑进来。例如,2,5-二羟基苯甲酸是极性物质,所以其广泛用于 PEG和 PMMA等极性高分子的分析中,而对于弱极性聚合物如 PS则效果不好,当它们混合时会发生相分离。而1,8,9-蒽三酚在适当的阳离子存在下则是 PS等比较有效的基体

当然要预先推测一种化合物是否和被分析物形成均相溶液是困难的,这就意味着每种新基体材料的发现都是一个不断尝试的过程,并且由于高分子的种类繁多,所以,要为一特定的高分子寻找适合的基体是一个非常困难的过程。

2.2 阳离子的选择

在聚合物的检测中,离子化(或质子化)是一个非常关键的过程。大多数生物高分子是以质子化的形式被检测的,而对于许多合成高分子来说,在其中添加金属盐是一个重要的离子化途径,此离子化的机理尚不十分清楚,估计是在气相中阳离子和聚合物链相碰撞,使阳离子吸附在聚合物中富集电子的区域而形成了分子离子。

对于特定的化合物来说,它与不同的金属离子显示不同的亲和性,也就是说,不同阳离子的添加所起的作用不同。Llenes和 O'Malley^[27]提出了用软硬酸碱理论来解释这一现象。简单地说,是把中性的聚合物链看作富有电子(如孤电子对、芳香 π 电子)的碱,而把阳离子看作是缺电子的酸,酸碱之间的结合在很大程度上依赖于酸、碱的软硬程度。软碱带有易于接近的价电子,因而很容易与在外层轨道上有大量未成对电子的软酸结合。另一方面,那些体积较小、电负性很强并带有许多孤电子对的硬碱根据软硬酸碱理论则更易于与硬酸相结合,大量的实验事实为这些假设提供了依据。例如,PS带有芳香 π 电子,倾向于与 Ag^+ 结合。而 PEG, PMMA和 PVP等带有硬碱基团(O, N),因此易于与硬酸 Na^+ , K^+ 结合。

软硬酸碱理论只能看作为阳离子选择中的

一个规则,对于一特定的化合物来说,它与某一阳离子的亲和性还与聚合物的本质,聚合物链的形态,空间结构等因素有关。

3 在高分子分析中的应用

激光质谱最初是在分析生物高分子中发展起来的,它广泛地用在蛋白质、低聚核苷酸、低分子吡啶、低分子吡吩、肽等生物高分子的分析中。图2为蛋白质 ARPP-16的激光质谱谱图^[1]。ARPP之后的词尾16代表蛋白质的表观分子量(16kDa),这个分子量是通过12烷基硫酸钠凝胶电泳法(SDS-PAGE)测得的。

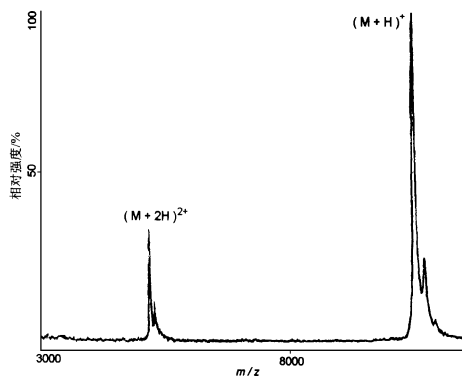


图2 蛋白质 ARPP-16的激光质谱谱图
基体为芥子酸;线性质谱计

图中显示了两个强的谱峰,分别代表单质子和双质子的蛋白质分子,从这两个谱峰中可得出其分子量为10,708.8Da,此测量值远远低于通过SDS-PAGE法测得的分子量,但与从cDNA序列结构中推测得到的数值($M=10,665.2\text{Da}$)十分接近,两者之间的差值仅为43.6Da,这个差别是胺端基封闭组分中的乙酰基团引起的。

目前,激光质谱已逐步成为合成高分子表征中的强有力的手段,它不仅给出聚合物的分子量和分子量分布,还可给出聚合机制等其它方面的信息。图3是一用AIBN做引发剂合成的PLMA的激光质谱谱图^[8]。从图中看出,每个重复单元峰为双峰, α 和 β 重复单元之

间的差值均为 254, 每个双峰中较高的峰 α 比 β 谱峰的质量数多 68, 说明了 α 代表偶合终止, 而 β 代表歧化终止, 它们的差值为异丁氰的质量数

近几年来, 芳香环状低聚物的合成已经越来越受到人们的重视^[28], 由于环状低聚物与线性低聚物之间性质和结构上的近似, 其表征与分离始终是这方面研究工作的难点。

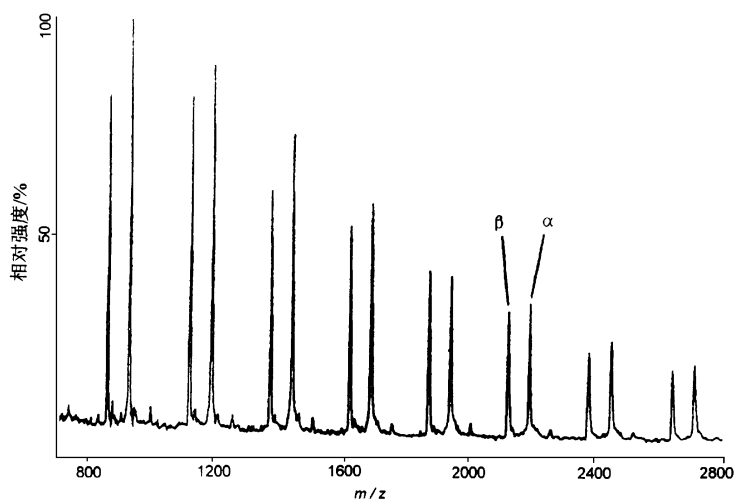


图 3 PLMA 的激光质谱图

基体为 1, 8, 9-蒽三酚; 阳离子剂: NaCl; 反射质谱计

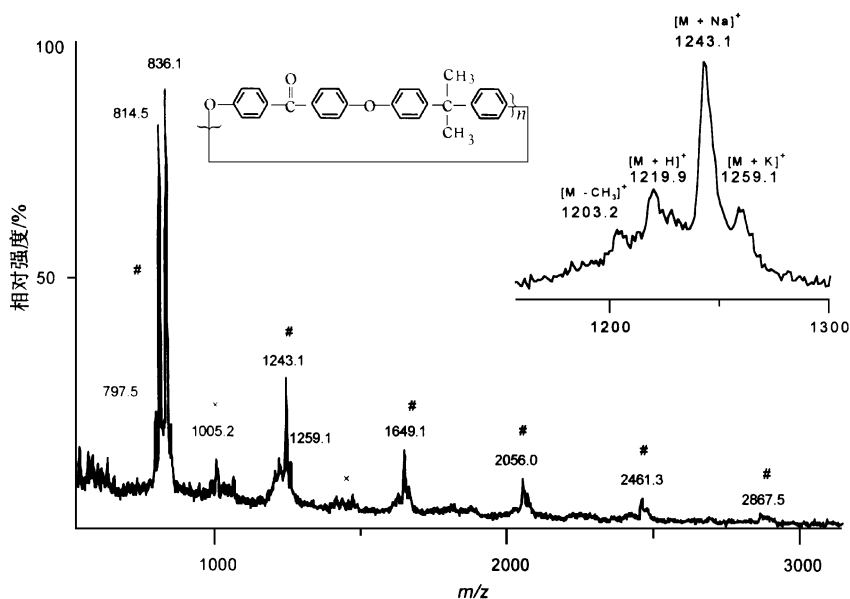


图 4 芳香环状聚醚酮的激光质谱图

基体为 2, 5-二羟基苯甲酸; 阳离子剂: NaCl; 线性质谱计

图 4为作者实验室合成的一种芳香环状聚醚酮(见分子式)反应混合物的激光质谱谱图,图中用# 标识的系列峰为 $n= 2\sim 7$ 时的环状低聚物的谱峰,而用× 标识的系列峰则为线性低聚物的分子离子峰。环状低聚物的谱峰包括 4 组峰,其中最强的一组峰对应着 $[M+ Na]^+$ 的分子离子峰,另一组较强的峰对应于 $[M+ H]^+$ 的分子离子峰,而较低的一组峰则为 $[M+ K]^+$ 的分子离子峰,这一组峰是由于残存在产物中的催化剂 K_2CO_3 所造成的,强度最低的一组峰为 $[M- CH_3]^+$ 的谱峰。线性低聚物的谱峰由两组峰组成,其中质量数较大的一组峰为 $[M+ Na]^+$ 的分子离子峰,而质量数较小的一组峰则为丢失 4个甲基之后的分子离子峰。从这个谱图我们可直接确认反应产物的组成,即有环状低聚物又有少量线性产物,其中环状二聚体为主要产物。结合 GPC曲线得到环状低聚物的产率约为 62%。

表 3为聚芳醚酮环状低聚物的 M ALDI和 GPC分析结果。根据缩聚高分子的环化理论 (Jacobson-Stockmayer Theory),环状低聚物的分布应遵循如下公式

$$C_n = Bn^{-V}i^n$$

其中 C_n 是聚合度为 n 的环状低聚物的浓度, i 是已反应的末端基所占的比率, B 是与反应物和溶剂有关的常数。当反应程度很大时, i 将接近于常数。这样 $\ln(C_n)$ 对 $\ln(n)$ 作图将得到一条直线,直线的斜率为 $-V$ 。 V 值越大越有利于生成小环化合物。

表 3 聚芳醚酮环状低聚物
的 M ALDI和 GPC分析结果

n	GPC		M ALDI-TO F-M S	
	(wt)%	$C_n \times 10^4 L^{\circ} mol^{-1}$	(wt)%	$C_n \times 10^4 L^{\circ} mol^{-1}$
2	34.24	39.55	39.68	45.83
3	11.75	9.05	11.15	8.58
4	7.36	4.25	5.58	3.22
5	5.91	2.73	2.68	1.34
6	5.02	1.90	1.65	0.64
7	—	—	0.60	0.22

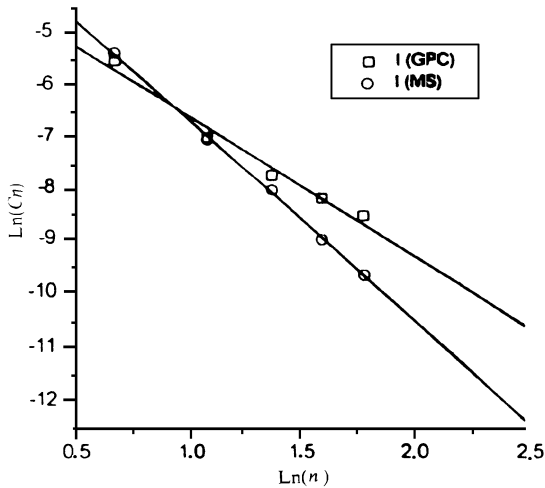


图 5 $\ln(C_n)$ 对 $\ln(n)$ 曲线

根据 M ALDI和 GPC分析结果计算出环状低聚物不同聚合度组分的重量百分率,进而计算出聚合度为 n 的环状低聚物的浓度 C_n 。 $\ln(C_n)$ 对 $\ln(n)$ 作图得到很好的线性关系(图 5), V 分别为 3.8 和 2.7。由于 GPC分辨率不高,无法分开环状低聚物和与其相对应的线性低聚物,并且作者的实验是在反应单体浓度极低 ($< 10^{-4} L^{\circ} mol^{-1}$) 的条件下进行的,以牺牲大环化合物的产率为代价来提高小环化合物的产率,因此 V 应较大,所以作者认为激光质谱更真实地反映了高稀释状态下聚芳醚酮环状低聚物的组分分布。因此,不用经过分离和提纯即可通过激光质谱得到反应的原始信息,为进一步改善反应条件提供提高环状化合物的产率提供了方便。作者还利用 M ALDI技术对环状聚芳酯、环状聚芳醚酮及其它种类环状聚芳醚酮进行了表征,结果表明激光质谱是分析环状低聚物准确快速的工具。

从许多的工作中,作者发现激光质谱在高分子分析中有着优于 GPC, HPLC等方法的特点,即快速性、直观性和准确性。然而对于分子量分布较宽或分子量很高的聚合物来说,激光质谱的应用仍有其局限性,检测能力较差。并且基体及阳离子的选择、样品的制备、检测器的能

力等对激光质谱的测试都有很大影响,这些问题有待于解决,需要进一步的探索

4 参考文献

- 1 Hillenkamp F, Karas M, Beavis R C, et al. Anal Chem, 1991, 63 1193 A
- 2 Karas M, Bahr U, Giessmann U. Mass Spectrom Rev, 1992, 10 335
- 3 Spengler B, Pan Y, Cotter R J, et al. Rapid Commun mass Spectrom, 1990, 4 99
- 4 Stall B, Steup M, Karas M, et al. Anal Chem, 1991, 63 1463
- 5 Mock K K, Davey M, Cottrell J S. Biochem Biophys Res Commun, 1991, 177 144
- 6 Danis P O, Karr D E. Macromolecules, 1995, 28 8548
- 7 Chaudhary A K, Critchley G, Diaf A, et al. Macromolecules, 1996, 29 2213
- 8 Thomson B, Suddady K, Rudin A, et al. Eur Polym J, 1996, 32 239
- 9 Pasch H, Gores F. Polymer, 1995, 36 1999
- 10 Maloney D R, Hunt K H, Lloyd P M, et al. J Chem Soc, Chem Commun, 1995, 561
- 11 Vitalini D, Mineo P, Bella S D, et al. Macromolecules, 1996, 29 4478
- 12 Sahta H S, Lloyd P M, Yeates S G, et al. J Chem Soc, Chem Commun, 1994, 2445
- 13 Leon J W, Frechet J M J. Polymer Bulletin, 1995, 35 449
- 14 Ding Y, Hay A S. Macromolecules, 1996, 29 6386
- 15 Chan K P, Wang Y F, Hay A S. Macromolecules, 1995, 28 6705
- 16 Wang Y F, Chan K P, Hay A S. Macromolecules, 1995, 28 6371
- 17 Wang Y F, Pavent M, Hay A S. Polym Prepr 36(2): 128
- 18 Chan K P, Wang Y F, Hay A S. Macromolecules, 1995, 28 653
- 19 White H C M, Drey R N, Yamashita M, et al. Anal Chem, 1985, 57 675
- 20 Nohmi T, Fenn J S. J Am Chem Soc, 1992, 114 3241
- 21 Vastola F J, Mumma R O, Pirone A J. Org Mass Spectrom, 1970, 3 101
- 22 Possingham M A, Kistemaker P G, Meuzelaar H L C, et al. Anal Chem, 1978, 50 985
- 23 Karas M, Bachmann D, Bahr U, et al. Int J Mass Spectrom Ion Proc, 1987, 78 53
- 24 Chait B T, Kent S B. Science, 1992, 257 1885
- 25 Bearis R C. Org Mass Spectrom, 1992, 27 653
- 26 Beuhler R J. J Appl Phys, 1983, 54 4118
- 27 Llenes C F, O'Malley R M. Rapid Commun Mass Spectrom, 1992, 6 564
- 28 姜洪焱, 陈天禄, 徐纪平. 科学通报, 1996, 41(11): 1055

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry of Polymers

Qi Yinghua, Chen Tianlu, Jiang Hongyan, Xu Jiping

(Changchun Institute of Applied Chemistry, Academia Sinica, Changchun 130022)

Summary Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), which is a rapid and convenient method for the detection and identification of polymers, is gaining the attention of chemists. Recently, its development is very fast. It is used for measuring compounds with high molecular masses and satisfied results have been observed. In this paper we provide an overview of its principles, selection of matrix and cation, application to polymer analysis.

Key words MALDI-TOF MS, Polymer, Analyte, Molecular ion