

大气压基体辅助激光解析离子源发展及其应用

黄正旭¹, 郭长娟¹, 陈华勇¹, 周振^{1,2*}

1. 中国科学院广州地球化学研究所, 有机地球化学国家重点实验室, 广东 广州 510640
2. 上海大学环境与化工学院, 环境污染与健康研究所, 上海 200027

摘要 介绍了国际上新出现的一种离子源——大气压基体辅助激光解析离子源(atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization, AP-MALDI)。该离子源是在真空 MALDI 的基础上研究发展起来的, 广泛应用于生物大分子及其相关领域的研究。该离子源较真空 MALDI 电离更加柔和, 产生的碎片离子更少, 又由于其工作在大气压下, 可作为外接离子源方便地与各类质谱分析器联用, 大大扩展了基体辅助激光解析离子源的应用范围。文章详细介绍了 AP-MALDI 的基本原理、结构及技术进展。此外, 还对该离子源在生物高聚物分析方面的最新应用进行了介绍。

关键词 大气压基体辅助激光解析离子源; 飞行时间质谱; 离子阱质谱; 生物高聚物

中图分类号: TH701 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2007)10-1910-07

引言

20 世纪 80 年代末, 质谱技术得以迅速发展, 相继发明了两种“软电离”技术, 即电喷雾电离(electrospray ionization, ESI^[1])和基体辅助激光解析电离(matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI^[2])。这两种方法都成功地使生物大分子相互完整地分离, 同时也被电离, 它们的发明使有机质谱的应用拓展到分析高极性、难挥发和热不稳定样品的范围, 奠定了对生物大分子进行进一步分析的基础。MALDI 相对于 ESI 的优势在于样品制备简单、产生的多为单电荷离子、碎片离子较少、谱图简洁易辨认等, 所以被广泛地应用于蛋白质、多肽、核酸和药物的测定等领域。

常规的 MALDI 离子源位于分析器的高真空中, 分析物在高真空中发生离子化, 由于高真空下进样相当复杂, 于是 Loboda 尝试将 MALDI 置入仪器的低压区, 即在 1.33×10^2 Pa 左右的气压下使样品电离。这种改进有效地减少了亚稳碎片的出现, 且大质量的分子离子亚稳碎片更少^[3]。这一创举启发了 Laiko, 而后 Laiko 成功地发明了大气压基体辅助激光解析电离源(atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption ionization, AP-MALDI^[4])。该离子源最大的特点是离子化发生在大气压下, 离子通过大气压接口引入到高真空的质量分析器中。这样 AP-MALDI 作为一种相对独立的模块化的离子源, 可以灵活地与各种形式的质量分析器联

用。此外, AP-MALDI 较 MALDI 电离更柔和, 产生的碎片更少, 且离子流连续、稳定, 更适合于易碎分子离子的研究。鉴于 AP-MALDI 上述的特点, 本文简要地介绍了 AP-MALDI 的原理、发展及其应用前景。

1 AP-MALDI 基本原理及结构

1.1 基本原理

AP-MALDI 工作原理与 MALDI 基本相同, 如图 1 所示, 是将低熔点的小分子有机物作底物(基质), 与待分析的化合物按体积摩尔比(通常大于 1 000 : 1)均匀混合, 基质对待分析物起着溶剂的作用, 把分析物分子彼此分离开, 从而减少分子间较强的相互作用力, 使形成待分析物簇群的可能性减至最小。当激光(通常是紫外光)脉冲照射时, 由于基质浓度远高于待分析物浓度, 激光能量大部分被基质吸收, 并转变成基质的电子激发能, 瞬间使其由固态转变成气态, 并被电离成基质离子。在中性待分析物和基质离子、质子之间的碰撞过程中, 发生了待分析物分子的电离, 从而产生了质子化分子或阳离子化分子^[5]。AP-MALDI 不同于 MALDI 之处在于其电离发生在大气压下, 由于带电离子通过与辅气分子碰撞达到热平衡, 形成较均匀的离子云, 电离更柔和。因此, AP-MALDI 相当于一个能提供稳定离子流的准连续离子源。另外从样品的表象来看, MALDI 的样品在电离以前已经形成晶状, 而 AP-MALDI 工作在大气压下, 则样品可以

收稿日期: 2006-06-16, 修订日期: 2006-10-28

基金项目: 广东省科技攻关计划项目(2003B12007)和广州市科技攻关计划项目(2004Z2-D9051)资助

作者简介: 黄正旭, 1982 年生, 中国科学院广州地球化学研究所硕士研究生 *通讯联系人 e-mail: zhouzhen@gig.ac.cn

呈液态。

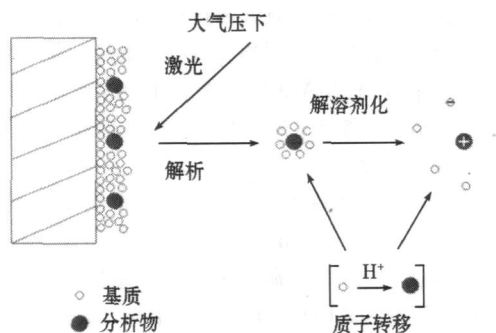


Fig 1 The principle of AP-MALDI

1.2 基质

激光在 AP-MALDI 中提供气化和离子化能量，而基质担负着另一个关键的角色，它吸收激光的能量，并保护待分析物分子，由于待分析物分子不直接接受激光的能量，因而不产生分解^[6]。较好的基质应具备下述条件：(1) 强烈吸收入射的激光；(2) 较低的气化温度(最好以升华的方式气化)；(3) 与待测物可找到共同的溶剂；(4) 在固相体系中能分离和包围待分析物分子，同时不能有分子间的相互作用^[7]。

自 MALDI 发明之后，已有几百种基质被研究过，但适合用来分析生物大分子的基质不多。实验中常用的基质有：2,5-二羟基苯甲酸 (DHB)、芥子酸 (SPA)、-羟基-4-羟基肉桂酸 (CHCA)、3,5-二甲氧-4-羟基肉桂酸 (SA)、3-吡啶丙烯酸 (IAA) 等，这些基质一样适合在 AP-MALDI 中应用。

1.3 装置

早期实验室自制 AP-MALDI 离子源比较简单，其结构如图 2 所示^[8]。离子源选用 N₂ 激光器或 Nd:YAG 激光器，波长 337 或 355 nm、一般工作频率为 10~20 Hz、产生脉宽为 3~5 ns，能量为 1 mJ 的激光脉冲。激光经一个石英透镜 (F=50 mm) 以及反射镜组成的光学系统聚焦到不锈钢样品靶表面。在样品靶及大气压接口之间施加一高压(约 3 kV)，由激光解析产生的离子在高压及辅助气体 (N₂) 的作用下经毛细管传输到质谱分析器中。

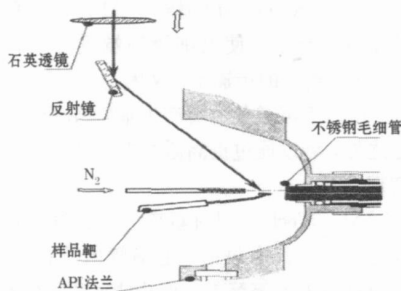


Fig 2 Schematic of the original lab built AP-MALDI

2 AP-MALDI 的技术进展

虽然 AP-MALDI 发明至今仅仅数年，但人们已在许多方面对装置进行改进以提高其性能。其中包括：激光的波长

及频率选择、靶样式及入射方式改进、大气压接口的改进、脉冲动态聚焦技术的应用等等。

2.1 靶样式及激光入射方式

2.1.1 反射式

最初的 AP-MALDI 离子源是依据商品仪器 Finnigan LCQ Classic ITMS 的接口来设计的，如图 2 所示。为了在不影响仪器接口的情况下，可直接替换该仪器配备的 ESI 源，样品靶被设计为一可更换的小不锈钢片 (1.5 mm × 2.5 mm)，水平放置在距仪器标准真空接口 1~4 mm 处，在靶与毛细管之间施加约 2.7 kV 的高压及辅气 (N₂)，激光脉冲在样品上方直接聚焦反射到样品表面，产生的离子由毛细管接口直接进入分析器。用此离子源对几种肽的混合物进行分析，结果表明该离子源的灵敏度相当高，单级质谱 (MS) 的检测限为 2~50 fmol，串联 MS/MS 和 MS³ 的检测限分别为 20~50 和 200~500 fmol。

2001 年，MassTech 公司着手商品化 AP-MALDI^[9]，如图 3 所示，重新设计了样品靶，新型离子源增大了靶面积，含有约 100 个样品点，竖直放置，并由电脑控制沿 x-y 方向移动。由于新离子源中靶的位置与仪器原标准大气压接口有一定的距离，所以另行增加了一延伸至电离室的不锈钢毛细管，毛细管尖端距样品的距离很近(通常为 1~2 mm)，由光纤引入的激光脉冲，经透镜聚焦后，反射至样品表面，产生的离子在靶高压 (1.5~3 kV) 的作用下，通过延伸的毛细管引入到分析器中。新型的样品靶不仅实现了多样品的高通量分析，同时提高了分析的重现性。

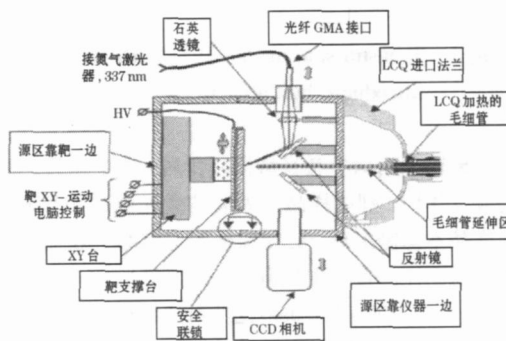


Fig 3 Scheme of commercial AP-MALDI produced by MassTech Corporation

2.1.2 传输式

Danell 等引进了一种 AP-MALDI 探针技术^[10]，其结构如图 4 所示。探针由石英毛细管制成，激光 (Nd:YAG 激光器，波长：355 nm) 通过光纤从后方照射在已被干燥的样品上，被电离的样品由标准 ESI 接口直接进入高真空的分析器中。用这种方法来电离分析样品，其检测极限可以达到 pmol 级，虽然在谱图中也同时出现基质-分析物簇离子峰和多电荷的分析物离子峰。不过在进一步的研究中发现，在石英毛细管上添加了加热装置，在电离时，通过给离子源加热(约 225 °C)，可以得到的离子大多为单电荷的分子离子，有效地消除了簇离子，提高了分析重现性，并使检测极限降低了 3 个数量级。

另一种传输式 AP-MALDI 是由 Callahan 等设计^[11], 如图 5 所示, 样品靶中心的基底滑片由透明的材料制成, 其导电性对离子源的性能影响不大, 滑片放置在两片有孔的金属片中间, 在金属片上施加高压, 波长为 337 nm 的氮气激光由滑片后面聚焦入射, 穿过透明的滑片照射在样品上, 使其发生解析电离。传输式的信号强度比反射式低一个数量级, 但传输式结构很好地去除了分析物-基质簇离子。

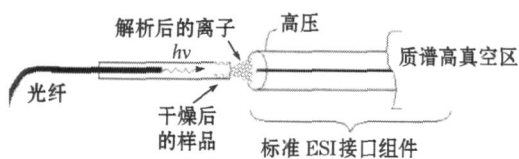


Fig 4 Transmission mode AP-MALDI ion source introduced by Danell and Gish

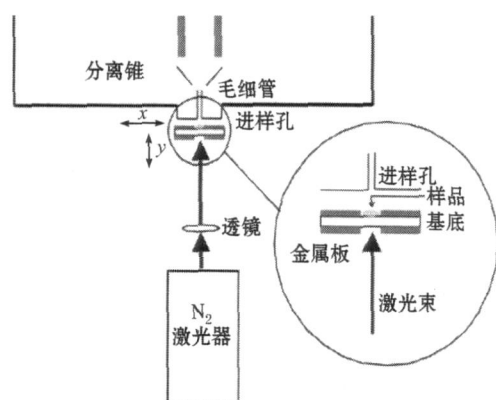


Fig 5 Transmission mode AP-MALDI ion source introduced by Callahan etc.

由于传输式结构中激光从样品背后入射, 基质对激光有强烈的吸收作用, 到达样品上表面的激光能量明显减弱, 为使表面样品不抑制电离, 必须保证到达样品上表面的激光能量足够使表面样品首先发生电离。通过实验比较可知, 传输式结构 (150 ~ 190 $\mu\text{J}/\text{pulse}$) 比反射式结构 (25 $\mu\text{J}/\text{pulse}$) 需要更多的激光能量。所以在这种结构下, 对样品的制备也提出了很高的要求 (常用电喷雾沉积法), 干燥后的样品层既要薄 (由基质性质决定, 通常小于 100 nm), 又要均匀 (受滑片的亲疏水性影响), 而常用的样品制备技术是很难达到这个要求的, 这是制约该传输式结构 AP-MALDI 发展和推广的一个重要因素。

2.2 激光的波长及频率

2.2.1 波长

最初的 MALDI 源均采用紫外 (UV) 波长段 ($\lambda = 337$ 或 355 nm) 的激光器, 紫外激光以其实用性广, 容易电离, 得以广泛应用; 但由于紫外激光能量较高, 电离产生的离子往往具有较高的内能, 容易继续裂成碎片。这在分析生物大分子样品时, 可能达不到要求。于是, 人们开始探索用低能量的红外 (IR) 激光来取代紫外 (UV) 激光。

常规 UV-MALDI 发明不久, IR-MALDI^[12] 相继问世。IR-MALDI 在许多分析方面明显优于 UV-MALDI, 因为它

的电离更柔和, 产生离子碎片更少。更重要的是, 在紫外光谱范围内新的、有效的基质很难找到。相反, 在红外光谱范围内许多分子混合物都能强烈吸收红外激光, 这样就有许多潜在的基质适合 IR-MALDI。另外, 红外激光对样品的穿透性能远远优于紫外激光, 这样对一些特殊样品, 如细菌孢子的分析是非常有效的。

考虑到红外激光在真空 MALDI 上取得的成功。Laiko 首次将一个波长为 3 μm 的红外激光应用在 AP-MALDI 上^[13], 并首次在 MALDI 源上采用液体基质, 如水和甘油, 而在传统的真空 MALDI 上是不允许有液体的, 因为在高真空中液体会很快耗尽。实验结果发现, AP-IR-MALDI 显示出对激光影响变化有较大的容忍度, 产生的碎片及簇离子更少。由于 IR-MALDI 有如此多的优点, 所以目前商品 AP-MALDI 中同时配备了紫外和红外两种激光源, 红外激光的光谱可调范围为 1.5 ~ 4 μm 。

2.2.2 频率

随着 MALDI 和 ESI 对生物样品电离方法的出现, 各种类型的质量分析器也快速地发展和进步, 其中, TOF-MS 以其高分辨率、高精度、高灵敏度及理论上无质量上限的优势成为生物大分子分析的首选工具。而常用 AP-MALDI 的激光器频率通常为 1 ~ 30 Hz, 当与 TOF-MS 相联使用时, 限制了 TOF-MS 的高利用率高通量的优势。为了提高 AP-MALDI 的性能, 2003 年, Mclean^[14] 等首次在 AP-MALDI-TOFMS 上采用频率为 1 kHz 的固态 Nd:YAG 激光器, 激光能量为 21 $\mu\text{J}/\text{pulse}$, 并分析了标准肽。分别用 1 kHz 和 30 Hz 的激光分析 5 pmol 的血管紧张素, 前者采集 1 s 所得的谱图相当于后者采集 20 s 的结果, 且基质加合物离子峰的相对强度较低。相同扫描时间, 应用 1 kHz 激光所得的离子信号强度是 30 Hz 激光的 20 倍, 最高可达 80 倍。总体来看, 采用 1 kHz 的激光提高了灵敏度, 质量精度以及谱图质量, 同时大大提高分析速度。

2.3 大气压接口 (API) 的改进

由于离子源结构的改进, 如图 3 所示, 样品靶距大气压接口较远, 所以改进后的离子源在靶和原标准 ESI 的大气压接口 (atmospheric pressure interface, API) 之间新设计了一延伸至电离室的毛细管, 使毛细管顶端到样品靶的距离为 2 ~ 3 mm, 以保证离子的传输率。又因为 AP-MALDI 是更柔和的电离源, 所以不可避免地要产生基质-分析物簇离子。改善这一不足之处, 可以通过提高激光能量或优化大气压接口的参数来实现。

2002 年, Mass Tech 公司对新离子源大气压接口的参数优化做了大量实验, 其中包括: 毛细管内管径大小、管长、材料导电性及加热温度等等^[9]。通过对血管紧张素的分析中发现, 离子信号强度的大小与毛细管的管径大小关系不是很大, 而与其长度成指数关系^[15], 如图 6 所示, 长度增加, 信号强度迅速降低。至于材料导电性, 实验分别用不锈钢和 PEEK 两种材料制成毛细管, 其结果表明, 两种情况下的离子传输率并无差别。

温度是大气压接口的另一个重要参数, 已有许多实验及文献证实, 加热毛细管有助于减少基质-分析物簇离子, 所以

在这延伸的毛细管上也添加有加热装置,然后在不同的温度下对几种肽的混合物进行分析,通过实验发现,当温度加到 250 时,簇离子明显减少,而太高的温度将导致碎片离子产生。所以,保持优化后的温度对提高 AP-MALDI 的灵敏度和混合物分析中每个混合物产生单电荷离子峰是非常重要的。并通过进一步的分析可知,优化后的毛细管温度受基质选用的影响不大。

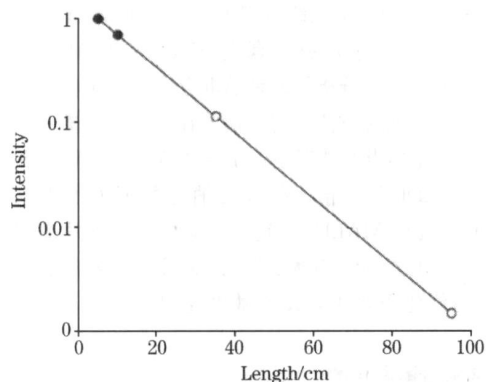


Fig 6 Dependence of the ion signal upon the extended capillary length

此外,为提高大气压电离源的离子利用率,近几年在大气压接口(APD)性能的其他方面也做了许多研究,例如:采用射频四极杆(RF-only ion guide)聚焦带电离子,抽除中性离子;采用新型的离子漏斗,提高进口孔(Inlet orifice)和分离锥(Skimmer)之间的离子传输率^[16, 17]。通过这样改进的接口性能可以把 AP-MALDI 的灵敏度提高到真空 MALDI 的水平。

2.4 脉冲动态聚焦技术的应用

AP-MALDI 中,由于离子在从大气压到分析器的真空传输过程中造成损失,所以灵敏度不高。Tan^[18]等应用脉冲动态聚焦(pulsed dynamic focusing, PDF)技术使离子传输率和仪器灵敏度提高了 1 个数量级。应用 PDF 技术,当每个激光脉冲产生的离子运动到毛细管真空接口处时,使高压电场瞬间置零,并维持一小段时间,以便让辅气气流可以更有效的携带离子通过毛细管进入分析器。实验表明,在 PDF 模式下,通过优化靶高压引出场置零的延迟时间、提高靶高压伏值及增大激光聚焦斑点的面积,可以提高灵敏度 10 倍左右。此外,将仪器灵敏度对激光斑点背离中轴的容忍度提高至 1.2 mm,使离子源对激光聚焦点位置不再那么敏感,这不仅提高了其稳定性,而且也提高了分析重现性。

2.5 仪器联用进展

鉴于这种 AP-MALDI 的灵敏度还不够高,目前这种离子源主要考虑与具有高离子利用率的质谱(TOFMS, ITMS, FTMS 等)联用。TOFMS 具有无质量上限的优点,ITMS, FTMS 具有多级质谱能力,是分析生物样品的重要工具。AP-MALDI 和垂直引入式飞行时间质谱 oa-TOFMS^[19] 相联的优势主要体现在:(1)均为脉冲式,能很好地互补,灵敏度高;(2)TOFMS 无质量上限,较适合分析生物大分子;(3)与真空 MALDI 相比,在大质量范围里有相同的分辨率。但是

TOFMS 有一个主要的劣势,即多级质谱结构分析方面。每增加一级质谱,都得串上 1 个 TOF 分析器,这将使仪器体积不断增大,在应用上是不现实的。ITMS 最大的优势就是能方便地进行多级质谱分析。目前 AP-MALDI 多与 Thermo Finnigan 公司的 ITMS 相联。

虽然,AP-MALDI 自发明到现在只有短短的 6 年时间,但其发展较为迅速,现实意义重大。目前 Mass Tech 公司生产的商品化 AP-MALDI 离子源已成功地与多种商品化质谱仪联用(见表 1)。

Table 1 The coupled instruments of commercial AP-MALDI

联用仪器公司	仪器类型
Agilent Technologies	Agilent 1 100 LC/MSD Trap (SL, VL and XCT) Agilent 1 100 LC/MSD TOF
Applied Biosystems/MDS SCIEX	4 000 Q TRAP ⁺ LC/MS/MS System
Bruker	Bruker Esquire (2 000, 3 000 plus, Esquire-LC and HCT) Bruker Bio TOF (Bio TOF-Q) and APEX FTMS
IonSpec	IonSpec FTMS
JEOL	JEOL AccuTOF
Thermo Finnigan	LTQ Linear Ion Trap, and LTQ FTLCQ Deca XP, XP Plus and AdvantageLCQ Classic, Duo and Deca
Waters/Micromass	Waters/Micromass Q-ToF2, Q-ToF Ultima and Q-ToF Micro

3 AP-MALDI 的优缺点

AP-MALDI 除了具有与传统真空 MALDI 离子源一样的制样简单、高通量、复杂混合物的谱图简单易辨认等特点外,还有以下几个优势。

- (1) 样品处理均在大气压下完成,避免把样品载入质谱真空系统的麻烦;
- (2) 是一种更柔和的离子源,只需较低的能量就能产生离子,并能减少亚稳离子碎片的出现;
- (3) 可作为相对独立的离子源灵活地与各种形式质谱分析器直接相联;
- (4) 离子源对质谱仪器的质量精度和分辨率没有实质性的影响;
- (5) 在大气压下,电离时形成均匀的离子云,使电离更加连续稳定。

AP-MALDI 较 MALDI 的不足之处主要表现在。

- (1) 位于大气压下,对源区气体流速、电压、温度变化较灵敏,较难把各参数调整到并保持在最优化条件下;
- (2) 大气压接口(APD)处的离子损失对灵敏度有较大影响,需要通过更多且更加充分地消耗样品来部分改善;
- (3) 为了去簇离子,提高谱图质量,需要加热 AP-MALDI 离子源,这可能会使目标板上的部分样品发生热降解;
- (4) 会出现基质和分析物的簇离子,虽然可以通过提高

激光能量或调整大气压接口参数来改善。

目前, AP-MALDI 的检测灵敏度主要依赖于接口部件的精密设计及电、气参数的控制, 例如样品靶几何形状及相对于进口孔的位置、靶端电压、靶表面激光束的能量密度、延伸毛细管长度、孔径等。选择合适的源参数、实验条件以及应用具有更高离子利用率的质量分析器可以进一步提高灵敏度。

4 AP-MALDI 的应用

MALDI 通过与各种形式的质量分析器联用已经广泛应用于生物大分子及其相关领域的研究, 取得许多研究成果。例如, MALDI 与 TOFMS 结合可以扩展质量分析范围及提高分辨率, 是分析生物高聚物有力工具。新出现的 AP-MALDI 具有样品处理简单、电离更柔和以及可作为外离子源等优点, 将成为 MALDI 家族中最具发展前景的一员。目前, 这一技术已成功用于许多典型的生物高聚物的分析, 如蛋白质、多肽、寡核苷酸、寡糖以及许多人工合成高聚物^[9, 20-24]。

4.1 细菌

细菌的检测和鉴定在环境监测、食品加工、工业应用、军事及医学中都很重要, 其重点主要在于细菌的分类鉴定上。在对细菌进行检测和鉴定时, 根据细菌的组成成分, 测定其全细胞指纹谱, 通过分析找出种间和株间特异保守峰作为生物标记分子 (Biomarker), 然后与细菌图谱库中的图谱比较, 以此来对细菌进行鉴定。质谱软电离技术的出现大大提高了细菌鉴定的速度, 目前, ESI 和 MALDI 技术已可以在其全细胞水平展开。与各种分析器联用, 能给出微生物多方面的信息, 包括分子量和结构信息等, 用于微生物的各种研究中。

AP-MALDI 作为一种新型离子源在细菌检测方面的应用受到越来越多的关注。并展现出其在孢杆菌全细胞谱检测上的能力。Madonna^[25] 等利用 AP-MALDI-FTMS 对杆状菌类的环状脂肽生物标志分子进行检测, 检测物为被冷却干燥后的孢子和 *Globigii* 杆状菌 (BG) 的培养菌, 约 5 mg 的 BG 细胞在紫外脉冲激光的照射下, 测得环状脂肽生物标志分子。此外, 利用串联质谱对环状脂肽生物标志分子的母离子进行分析, 得到其确定的氨基酸序列信息。

此后, Pribil^[26] 等又分别利用 AP-MALDI-FTMS 对孢杆菌的全细胞蛋白成分及多肽成分进行分析, 从成分标志分子及氨基酸序列上成功鉴定了几种不同的孢杆菌。

4.2 蛋白质组学 (蛋白质和多肽)

蛋白质组学 (Proteomics) 是以细胞内全部蛋白质的存在及其活动方式为研究对象。其研究包括蛋白质的结构和功能两个方面。蛋白质组学是连接基因、蛋白质和疾病的纽带, 对蛋白质表达的变化或差异的分析将具有重要的生物学意义和医学价值。为适应大规模蛋白质组分析, 质谱已逐渐成为蛋白质鉴定的最有效手段, 其对蛋白质点的鉴定主要是通过多肽、蛋白质的质量测定、肽指纹谱测定以及氨基酸序列测定等方法来完成。其中以肽指纹的 MALDI-TOF-MS 测定与

串联质谱所进行的序列测定为目前采用最多的两种方法。

AP-MALDI 自发明以来, 在蛋白质及多肽的鉴定方面也进行了大量的研究。Laiko^[27] 等首次采用实验室自制的 AP-MALDI 对几种肽 (1~2.4 kDa) 的混合物进行分析。该离子源与一台垂直加速飞行时间质谱仪相联, 肽检测限为 60~100 fmol。随后又与离子阱质谱仪相联分析了四种肽 (0.8~1.7 kDa) 混合物, 得到单级质谱肽检测限为 2~50 fmol, 二级质谱为 20~50 fmol, 三级质谱为 200~500 fmol。

Schneider^[28] 等分别用真空 MALDI 和 AP-MALDI 与 QqLIT 相联, 对比分析了四种肽混合物以及蛋白消化物。实验结果显示这两种方法所得的谱图在质量和数量上惊人的相似。在信噪比相当的情况下, 真空 MALDI 的离子信号强度比 AP-MALDI 高 2 倍; 在蛋白消化物碎片分析时, AP-MALDI 和真空 MALDI 得到了相似的结构碎片谱图。因为 AP-MALDI 的性能受气流、电压、温度等参数的影响, 所以在适当的优化条件下, 其灵敏度是可以接近真空 MALDI 的。

4.3 寡核苷酸和核酸

生物质谱技术在核酸化学中的应用主要是对寡核苷酸和只含有几十个碱基的核酸片段进行分子量及序列测定。MALDI 质谱技术具有分析速度快, 高通量的优点, 是寡核苷酸及其类似物的结构和序列分析较好的方法。其中在单核苷酸多态性片段 (SNP) 的测定应用上最为广泛, 通过其准确的分子量测定, 确定 SNP 与突变前多态性片段分子量的差异。

AP-MALDI 出现后, 在核酸的应用上显示出良好的前景, Doroshenko^[9] 等在 AP-MALDI-LCQ 上分析了八种肽核酸 (PNA) 的混合物, 每种肽核酸的样品量为 25 fmol。

Kellersberger^[29] 等用 AP-MALDI-FTMS 分析了正常和化学修饰的 DNA 和 RNA。在分析 7-碱基寡脱氧核糖核酸时, 检测限为 585 fmol 时的信噪比可达 34:1, 低于 10 fmol 的谱图则明显变差。在分析 10-碱基寡核糖核酸时, m/z 为 2998.328 处的半峰宽分辨率为 90000, 质量精确度可达 $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。实验结果显示应用该离子源很容易在共价修饰碱基上形成气相碎片, 非常适用于由化学探测和核酸酶消解复杂 RNA 所产生的样品混合物的结构分析。

4.4 寡糖

糖类在涉及免疫系统的细胞交互作用中起着重要作用。通常糖类非共价联合体的交互作用是用核磁共振来分析的, 但采用该技术得到的分析结果往往较复杂, 谱图解释费时、费力。过去几年也曾有人尝试用 MALDI 来研究糖类的弱非共价交互作用, 但由于大部分 MALDI 采用的酸性基质会使盐桥破碎, 使得这一技术不能很好地用于研究弱非共价交互作用。随着 AP-MALDI 的出现, 这一局限得以改善。AP-MALDI 是一种更柔和的电离源, 能产生低内能的离子, 同时伴生的亚稳离子较少。这些低内能的离子以及糖类联合会尽可能少的受到分裂, 这使得这一技术能很好地应用于弱非共价交互作用的研究。

Seggern^[30] 等用波长为 $2.94 \mu\text{m}$ 的红外 AP-MALDI-FTMS 研究了非共价糖-糖联合体。实验中采用的基质为液态甘

油,可提供接近于生理环境的条件,确保非共价联合体的形成。同时由于红外 AP-MALDI 是一种极弱的离子源,这使得联合体在离子化过程中也能幸存下来。实验结果显示:不同强度、不同亲和力的糖-糖非共价联合体具有不同的碎片模式;非共价联合体的形成和及其碎片是由于糖的特性决定的,因为不同的糖有不同的亲和力和碎片模式。因此,应用这一技术可以确定不同联合体之间及它们内部键能的相对大小。这样就可以通过研究联合体的交互作用来研究它们在细胞交互作用中的作用。

Zhang^[31]等将 AP-MALDI 与具有高分辨率、高精度的 FT-ICR-MS 联用,用 337 nm 的紫外激光照射,对多种从糖蛋白中提取出来的不稳定寡糖进行分析,并将结果与真空 MALDI 直接进行比较,结果表明,在正或负离子检测模式下,AP-MALDI 较真空 MALDI 产生更低能量的离子,且几乎无碎片离子及簇离子产生,谱图清晰易辨。并用标准的麦芽糖来检测仪器的灵敏度,当消耗样品 20 fmol,信噪比 $S/N > 10$,外标法质量精度为 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

4.5 药学

近年来质谱在药物代谢方面的研究进展迅速。其主要研究药物在体内过程中发生的变化,阐明药物作用的部位、强弱、时效及毒副作用,从而为药物设计、合理用药提供实验和理论基础。质谱的高灵敏度和高分辨率以及快速检测为代谢物鉴定提供了保证。

通常, MALDI-TOF 被广泛应用于大分子的定性,如蛋白质、寡糖等。由于技术原因,其很少应用于定量分析,特别是小分子 (m/z 小于 500, 比如药物) 分析,因为基质离子会强烈干扰分析物,不过这可以通过选择合适的基体来消除。

崔蒙等^[32]首次应用 AP-MALDI-ITMS 直接分析了从尿样中固相萃取出来的麦角酸酐二乙胺 (LSD, 迷幻药的一

种), 通过其碎片离子谱图来鉴定 LSD。此外,还采用同位素标记的 LSD-d3 作内标,应用选择反应监测方法实现了 LSD 的定量分析。该方法标准曲线的线性范围为 $1 \sim 100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 决定系数 $R^2 = 0.9917$, 并通过计算得到检测限为 $0.7 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。上述结果与 HPLC/ESI-MS 得到的基本一致,但相对于 HPLC/ESI-MS 该方法则避免了费时的样品衍生化和色谱分离。

5 结 语

生物大分子研究的需要一直是质谱新技术和新仪器发展的动力之一,质谱新技术的发展使得十年前十分复杂的生物样品分析能在几分钟得以完成。AP-MALDI 的发明使 MALDI 源跳出真空的局限,可以灵活地与其他分离分析技术相联,又因为它是一种更加柔和的离子源,使得它在一些特定分析(诸如,易碎生物分子、弱非共价交互作用等)中显示出独一无二的优势,极大地扩展了其应用领域。过去几年许多不同配置的 AP-MALDI 相继涌现,MassTech 公司商品化的 AP-MALDI 通过与各种形式的质谱方便地联用,被各分析仪器公司广泛选用,以 2004 年为例,17% 的 MALDI-TOF 相关产品使用了该公司的 AP-MALDI^[33]。我国质谱仪器技术的发展总体上与先进国家有一定差距,但是在激光诱导等离子体及质谱接口技术方面做了许多工作^[34],这为 AP-MALDI 在中国开展研究打下一定的基础。Laiko 博士十分关心 AP-MALDI 在中国的推广,在他的帮助下,我室已成功研制出国内第一台 AP-MALDI,并在自制高分辨垂直引入式飞行时间质谱仪上获得首张多肽谱图。在接下来的时间里,我们将通过优化离子源各参数、改进飞行时间质谱仪的真空接口,来提高其性能特别是提高 AP-MALDI 的灵敏度。

参 考 文 献

- [1] Fenn J B, et al. Proc. 36th Ann. Conf. Am. Soc. MS., San Francisco, 5-10, June, 1988. 773.
- [2] Tanaka K, et al. Proc. 2nd Japan-China Joint Symp. on MS., Osaka, Jpn, 15-18, Sept. 1987. 185.
- [3] Loboda A V, Krutchinsky A N, Bromirski M, et al. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2000, 14: 1047.
- [4] Laiko V V, Burlingame A L. U. S. Patent, 5965884, 1999.
- [5] HE Mei-yu, HE Jiang-tao (何美玉, 何江涛). Journal of Chinese Mass Spectrometry Society (质谱学报), 2002, 23(1): 43.
- [6] LIU Shan (刘珊). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2003, 23(4): 829.
- [7] LI Yong-min (李永民). Analysis and Testing Technology of Instruments (分析测试技术与仪器), 2002, 8(3): 131.
- [8] Laiko V V, Moyer S C, and Cotter R J. Anal. Chem., 2000, 72: 5239.
- [9] Doroshenko V M, Laiko V V, Taranenko N I, et al. Int. J. Mass Spectrom., 2002, 221: 39.
- [10] Danell R M, Glish G L. Proc. 48th ASMA Conf. on MS and AT, American Society of Mass Spectrometry Long Beach CA, 2000.
- [11] Galicia M C, Vertes A, Callahan J H. Anal. Chem., 2002, 74: 1891.
- [12] Overberg A, Karas M, Bahr U, et al. Rapid Commun. Mass Spectrom., 1990, 4: 293.
- [13] Laiko V V, Taranenko N I, Berkout V D, et al. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2002, 13: 354.
- [14] Mclean J A, Russell W K, Russell D H. Anal. Chem., 2003, 75: 648.
- [15] Lin B, Sunner J. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 1994, 5: 873.
- [16] Shaffer S A, Prior D C, Anderson G A, et al. Anal. Chem., 1998, 70: 4111.
- [17] Shaffer S A, Tolmachev T, Prior D C, et al. Anal. Chem., 1999, 71: 2957.
- [18] Tan P V, Laiko V V, Doroshenko V M. Anal. Chem., 2004, 76: 2462.
- [19] Dodonov A F, Chernushevich L V, Laiko V V. Time-of-Flight Mass Spectrometry. ACS Symposium Series 549, Washington DC: Ameri-

- can Chemical Society, 1994, Chapter 7.
- [20] Moyer S C, Cotter R J, Woods A S. *Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2002, 13: 274.
- [21] Moyer S C, Cotter R J. *Anal. Chem.*, 2002, 74(17): 469A.
- [22] Moyer S C, VonSeggern C E, Cotter R J. *Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2003, 14: 581.
- [23] Levander F, James P. *Journal of Proteome Research*, 2005, 4: 71.
- [24] Seggern C E V, Moyer S C, Cotter R J. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 3212.
- [25] Madonna A J, Voorhees K J, Taranenko N I, et al. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 1628.
- [26] Pribil P A, Patton E, Black G, et al. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2005, 16: 464.
- [27] Laiko V V, Baldwin M A, Burlingame A L. *Anal. Chem.*, 2000, 72: 652.
- [28] Schneider B B, Lock C, Covey T R. *Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2005, 16: 176.
- [29] Kellersberger K A, Yu E T, Merenbloom S I, et al. *Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2005, 16: 199.
- [30] Seggern C E V, Cotter R J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2003, 14: 1158.
- [31] Zhang J H, Lamotte L, Dodds E D, et al. *Anal. Chem.*, 2005, 77: 4429.
- [32] Cui M, McCooye M A, Fraser C, et al. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 7143.
- [33] Strategic Directions International, Inc. *Mass Spectrometry Market Analysis and Perspectives Report*. October 2005.
- [34] ZHAO Shu-rui, CHEN Jin-zhong, WEI Yan-hong, et al (赵书瑞, 陈金忠, 魏艳红, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析)*, 2004, 24(2): 214.

The Development and Applications of Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization

HUANG Zheng-xu¹, GUO Chang-juan¹, CHEN Hua-yong¹, ZHOU Zhen^{1,2*}

1. Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangzhou 510640, China
2. Institute of Environmental Pollutant and Health, School of Environment and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200027, China

Abstract A kind of new ionization source, atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization (AP-MALDI), is introduced in the present paper. This ionization source was studied and developed on the basis of vacuum MALDI. It has been applied widely in the field of biomacromolecule. This ionization source has softer analyte ionization and produces fewer fragmentations compared with conventional vacuum MALDI. It works at atmospheric pressure, therefore eases to be coupled to mass spectrometers, acting as an external ion source, and greatly extends the application fields of MALDI. The principle, configuration and technical development of AP-MALDI are described detailedly. Moreover, the current applications and prospect of the device in analyzing biopolymers are summarized.

Keywords Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization (AP-MALDI); Time-of-flight mass spectrometer (TOFMS); Ion trap mass spectrometer (ITMS); Biopolymer

(Received Jun. 16, 2006; accepted Oct. 28, 2006)

* Corresponding author