

三苯胺偶氮化合物的 MALDI-TOF 质谱研究

王振鹏, 赵镇文, 辛 斌, 胡伟华, 熊少祥

(中国科学院化学研究所北京质谱中心, 北京 100080)

摘要: 利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法分析三苯胺偶氮化合物。在正、负离子检测模式下, 考察了基质、离子化试剂、样品浓度对分析结果的影响。结果表明: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱表征三苯胺偶氮化合物时, 用吡啶作基质, 负离子检测, 可以得到较好的质谱图。

关键词: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法 (MALDI-TOF MS); 三苯胺偶氮化合物

中图分类号: O657. 63; R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2007)01-27-04

Analysis of Triphenylamine Azo Compounds by MALDI-TOF MS

WANG Zhen-peng, ZHAO Zhen-wen, XIN Bin, HU Wei-hua, XIONG Shao-xiang

(Beijing Mass Spectrometry Center, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The triphenylamine azo compounds were successfully characterized by matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The influence of matrix, ion detection mode and concentration of sample was investigated in detail. The satisfactory mass spectra can be obtained using norharmane as matrix under negative ion detection mode.

Key words: MALDI-TOF MS; triphenylamine azo compounds

基质辅助激光解吸电离 (MALDI) 作为 80 年代末发展起来的一种“软电离”质谱技术, 具有分子离子峰强、灵敏度高等优点^[1], 已经广泛应用于生物化学、有机化学等领域, 显示出强大的定性分析功能^[2-4]。本工作利用 MALDI-TOF MS 技术, 对用电子轰击 (EI) 等质谱电离技术未能得到合理表征的三苯胺偶氮化合物进行测定, 并对影响 MALDI-TOF MS 测定结果的多种因素, 如基质、离子化试剂、样品浓度, 进行较为详细的探讨。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

BIFLEX III 型 MALDI-TOF 质谱仪; Bruk-

er 公司产品; 氮气激光器, 激光波长 337 nm; 采用离子延迟引出技术 (delayed extraction) 和反射模式 (reflectron), 在正、负离子两种检测模式下进行测定。

实验所用基质 α -萘基-4-羟基肉桂酸 (CCA), 2,5-二羟基苯甲酸 (DHB), 吡啶 (nH), 葱三酚 (DI), 3-氨基喹啉 (3-AQ) 及离子化试剂醋酸银和氯化钠均购自 Sigma 公司; 三苯胺偶氮化合物样品由大连理工大学提供, 其结构列于表 1。

1.2 样品制备及分析方法

用色谱纯的氯仿作溶剂将样品溶解成 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液。将 CCA、DHB、nH、3-AQ、DI 五种基质溶解成 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 基质溶液, AgAc、NaCl 这

两种离子化试剂也溶解成饱和溶液。3 μL 基质溶液和 1 μL 样品溶液在离心管中混合均匀后,取约 0.5 μL 点在不锈钢靶面上,室温下待溶剂挥发析出结晶后送入质谱仪,分别用正、负离子两种模式检测,累加 20~80 次单次扫描数据得到质谱图。

2 结果与讨论

2.1 基质对分析结果的影响

选用 CCA 等五种基质在正、负离子检测模式下分析三苯胺偶氮化合物,实验结果见列于 2。只有 CCA、nH 和 DI 作基质时,能得到样品检测信号。

在 CCA 作基质的情况下,正、负离子两种检测方式均可得到信号。但是正离子检测结果明显好于负离子检测结果,表现为正离子图中分

子离子峰强度大于负离子图,分辨率比负离子图高,信噪比也比负离子图好。第 1 号样品的正离子质谱图示于图 1A,图中除了分子离子 $[M]^+$ 峰 m/z 1 112.5,还出现了准分子离子 $[M+Na]^+$ 峰 m/z 1 135.5。

DI 是 MALDI-TOF 质谱分析时经常用到的另一种基质,一般与醋酸银离子化试剂配合使用,通常可以检测到准分子离子 $[M+Ag]^+$ 峰。但本试验中将基质换成 DI 并加入醋酸银离子化试剂,在正离子模式下检测,并未检测到 $[M+Ag]^+$ 峰,只出现了强度和信噪比都非常差的分子离子 $[M]^+$ 峰 m/z 1 112.6,结果示于图 1B。

DHB、3-AQ 也是较为常用的基质,但是未能得到信号,说明它们并不适合作为分析该类化合物的基质。

当使用碱性基质 nH 时,正离子检测没有得

表 1 样品信息
Table 1 The information of samples

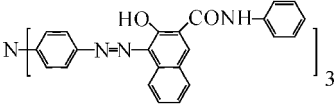
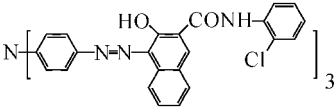
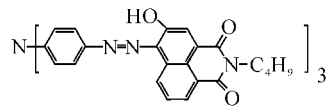
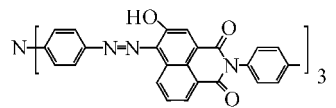
样品序号 No.	分子式 Molecular formula	相对分子质量 Molecular weight	结构式 Structure formula
1	C ₆₉ H ₄₈ N ₁₀ O ₆	1 112.4	
2	C ₆₉ H ₄₅ N ₁₀ O ₆ Cl ₃	1 214.3	
3	C ₆₆ H ₅₄ N ₁₀ O ₉	1 130.4	
4	C ₇₅ H ₄₈ N ₁₀ O ₉	1 232.5	

表 2 用不同基质分析样品的情况
Table 2 Performances of samples analyzed using different kinds of matrix

序号 No.	CCA		DHB		nH		3-AQ		DI	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1	√	√	×	×	×	√	×	×	√	×
2	√	×	×	×	×	√	×	×	√	×
3	√	√	×	×	×	√	×	×	√	×
4	√	√	×	×	×	√	×	×	√	×

注:“+”、“-”表示正、负离子检测模式;“√”表示检测到信号;“×”表示未检测到信号

到任何信号,但是在负离子模式下却得到了很好的谱图示于图 2。不但分子离子峰的强度非常高,而且其他杂峰少,质谱图非常干净。四个样品的分子离子峰强度均在 600~1 000 之间,比使用其他基质得到的信号强度都大数倍,分辨率、信噪比都改善很多。

三苯胺偶氮化合物,用 MALDI-TOF 质谱分析时,显示出具有较大共轭结构分子所具有的富电子特征。在正、负离子检测时,既可以失去一个电子,也可以得到一个电子,生成相应的正、负分子离子峰。但是,负离子检测时,可能受分子中酚羟基的影响,在分子离子峰前,伴随有少量 $[M-H]^-$ 离子峰的出现。

2.2 离子化试剂的影响

离子化试剂是一些能在溶剂中溶解,并游离出金属阳离子的钠盐、钾盐、银盐。它们的作用是结合到样品分子上,使样品分子带上电荷变成离子而被检测到。

用 CCA 作基质时,试验中虽然没有加入 Na^+ ,但是质谱图中却出现了 $[M+Na]^+$ 准分子

离子峰,这说明环境中存在的 Na^+ 离子有助于样品离子化。分析时人为加入 NaCl 后,四个样品质谱图中均出现了强度不等的 $[M+Na]^+$ 准分子离子峰。较之未加钠的谱图, $[M+Na]^+$ 准分子离子峰的强度和分辨率都有不同程度的升高结果示于图 3。

醋酸银在溶剂中游离出银离子。由于银离子体积比较大,一般和 DI 联用来分析聚苯乙烯^[5]。在试验中用 DI 作基质,醋酸银为离子化试剂时质谱图中未出现 $[M+Ag]^+$ 峰,而是以分子离子峰形式被检测到。由此可见,样品对银离子没有明显的亲合作用。

2.3 基质浓度对试验结果的影响

为了考察基质和样品浓度对试验结果的影响,用氯仿配成 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 样品溶液,与 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ nH 基质溶液混合制备样品,所得谱图示于图 4,与样品浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的结果(图 3)相比,两者没有明显区别。说明基质与样品浓度及比例对结果影响不明显。

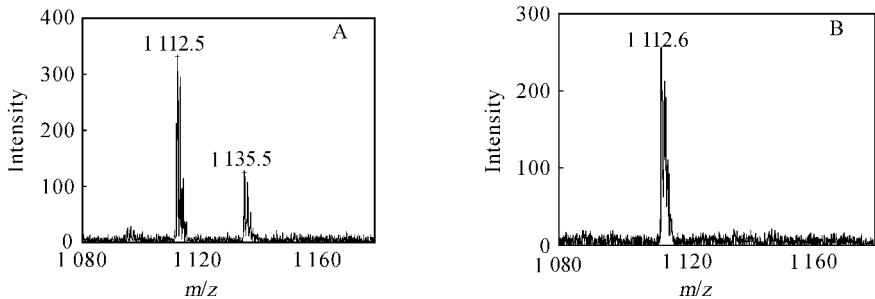


图 1 使用 CCA 基质(A)和 DI 基质(B)测得的 1 号样品的正离子质谱图
Fig. 1 Positive ion mass spectra of sample 1 detected using CCA(A) or DI (B) as matrix

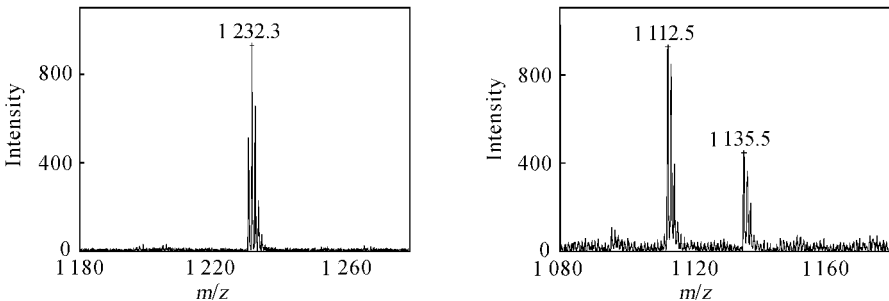


图 2 使用 nH 基质测得的 4 号样品负离子质谱图
Fig. 2 Negative ion mass spectrum of the sample 4 detected using nH as matrix

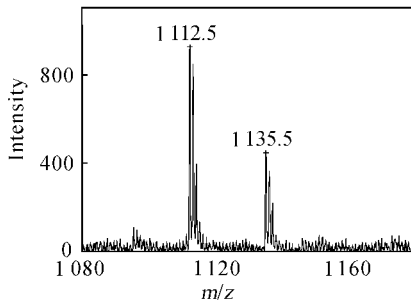


图 3 使用 CCA 基质 NaCl 作离子化试剂测得的 1 号样品正离子质谱图
Fig. 3 Positive ion mass spectrum of the sample 1 detected using CCA as matrix and NaCl as ionized reagent

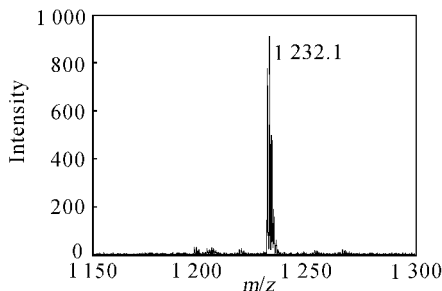


图 4 使用 nH 基质,样品浓度为 $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 4 号样品的负离子质谱图

Fig. 4 Negative ion mass spectrum of the sample 4 using nH as matrix with $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

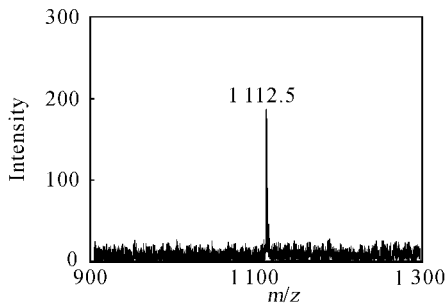


图 5 使用 nH 基质,样品浓度为 $0.001\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 1 号样品的负离子质谱图

Fig. 5 Negative ion mass spectrum of the sample 1 using nH as matrix with $0.001\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

2.4 检测灵敏度

为了考察 MALDI-TOF 质谱检测样品最低浓度是多少,用氯仿将样品溶解成 $0.001\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,进行质谱分析。用 nH 为基质时 1 号样品的质谱图示于图 5,所得分子离子峰的信噪比大于 40,检测灵敏度为 $1.0 \times 10^{-12}\text{ mol}$ 。

3 结 论

本工作应用 MALDI-TOF MS 技术,通过改变离子检测模式,选用不同基质,添加钠、银等离子化试剂和调整溶液浓度等手段,分别考察了各种条件对分析结果的影响。结果表明:用吡啶作基质,负离子检测,可以得到该类化合物较好的质谱图。

参考文献:

[1] 赵晓光,薛燕,刘炳玉. MALDI-TOF 质谱仪关

键技术及发展[J]. 现代仪器, 2003, (4): 17-20.

[2] 王京兰,万晶宏,罗凌,等. 蛋白质组研究中肽质量指纹谱鉴定方法的建立及应用[J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(4): 373-378.

[3] KUMARATHASAN P, MOHOTTALAGE S, GOEGAN P, et al. An optimized protein in-gel digest method for reliable proteome characterization by MALDI-TOF-MS analysis [J]. Anal Biochem, 2005, 346: 85-89.

[4] SOUTIF J, DOAN N T H, MONTEBAULT V. Determination by MALDI-TOF MS of the structures obtained from polytransesterification of diethyl 2,6-pyridinedicarboxylate and poly(ethylene glycol) [J]. European Polymer Journal, 2006, 42: 126-132.

[5] 何美玉,何江涛. MALDI-TOF MS 分析研究合成高分子的综述[J]. 质谱学报, 2002, 23(1): 43-55.

((上接第 26 页))

[6] 洪馨,宓穗卿,王宁生. 复方丹参滴丸中丹参素的药物动力学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2000, 11(5): 286-288.

[7] PEI W J, ZHAO P F, ZHU Z M, et al. Study of the determination and pharmacokinetics of compound danshen dripping Pills in human serum by column switching liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2004, 809(2): 237-242.

[8] 肖盛元,罗国安,王义明,等. LC-MS 鉴定中药三七及其复方制剂[J]. 药学学报, 2004, 39(2): 127-131.

[9] 万建波,黎畅明,李绍平,等. 加压溶剂提取与液相色谱-电喷雾质谱联用技术分析三七中皂苷类成分[J]. 中药材, 2005, 28(10): 885-890.

[10] 李丽,刘志强,许庆轩,等. 人参皂苷类化合物的 HPLC-ESI-MS 研究[J]. 分析测试学报, 2006, 25(1): 45-48.

[11] 韩凤梅,张玲,蔡敏,等. 三七药材皂苷类成分的电喷雾离子阱质谱特征图谱研究[J]. 湖北大学学报, 2006, 28(2): 176-180.

[12] 邹坤,朱妹,小松かつ子. HPLC 结合 API-MS/MS 法研究屏边三七的皂苷成分[J]. 三峡大学学报, 2002, 24(4): 355-357.