

AXIMA-CFR

基质辅助激光离子化飞行时间质谱仪

应用文集 No. 1



测定原理和生物样品的分析实例

1. 要点
2. 由 MALDI 进行离子化的原理
3. 由 TOF 进行质量分离的原理
4. Pulsed Extraction 的原理
5. 线性方式的分析
6. Reflectron 方式的分析
7. 由 PSD 进行分析(MS/MS)

1. 要点

AXIMA-CFR 其特长不仅仅是具有高分辨率、高灵敏度及高精度，而且可根据 CFR 进行 PSD 分析的飞行质谱仪。本数据集简单介绍 MALDI-TOF MS 的原理以及使用 AXIMA-CFR 获得的数据。

2. MALDI(基质辅助激光离子化)的原理

图 1 显示了 MALDI(基质辅助激光离子化)的原理，在样品板上将样品与基质溶液混合后使其干燥。然后，在其结晶上采用脉冲激光(氮激光，波长 337nm)照射，基质吸收激光能量并将能量传导给样品，该能量使样品产生离子化。

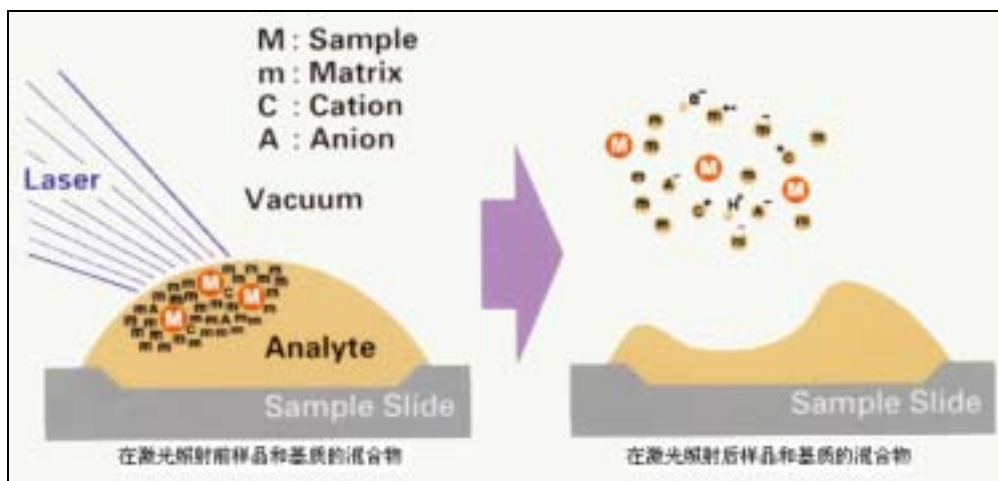


图 1：MALDI 的原理

3. TOF 进行质量分离的原理

已经离子化的样品被栅极(Grid)间的加速电压所加速，被加速的离子被飞行检测器检测出其飞行距离 (Drift Space)。这时，质量电荷比(m/z)小的分子提前到达检测器，而质量电荷比大的分子则延迟到达检测器，这样质量便被分离了。

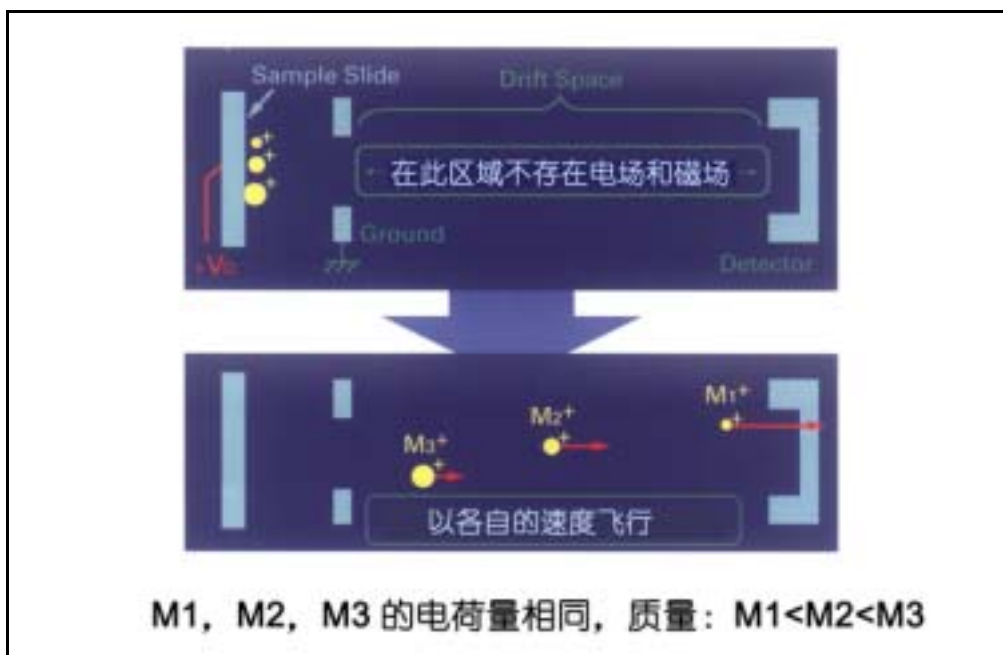


图 2：描述了 TOF 进行质量分离的原理图

4. 脉冲萃取(Pulsed Extraction)的原理

样品在激光照射后延迟、形成离子化。其后，由于某些时间离子继续生成而形成固定的时间分布，如图 3-(1&2)。从前离子加速由于采用施加加速电压，而造成离子分布时间扩大、分辨率下降的原因。Pulsed Extraction 是在离子生成时间段保持不加速状态，而在适当的时刻，瞬间施加加速电压，让已生成的离子同时加速如图 3-(3)。此项功能可以在短时间的状态下让离子群飞行，实现高分辨率的测定。

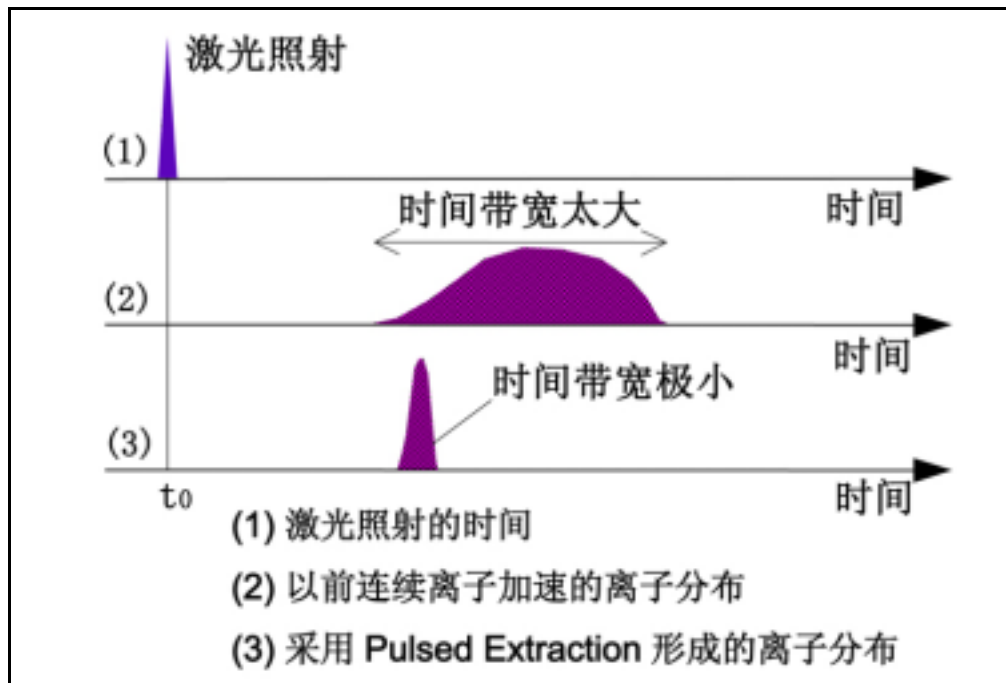


图 3：从离子源出来后的离子分布

5. 线性方式(Liner Mode)分析

线性方式是将已经离子化的样品施加加速电压，利用在其飞行直线上的检测器检测的最单纯的检测方式，如图 2 所示。如图 4 显示了采用 AXIMA-CFR 分析胰岛素β链(Insulin β chain)的质谱图。即使在线性方式进行分析，胰岛素β链的同位体分布也被检测出来，其分辨率约为 6,000。

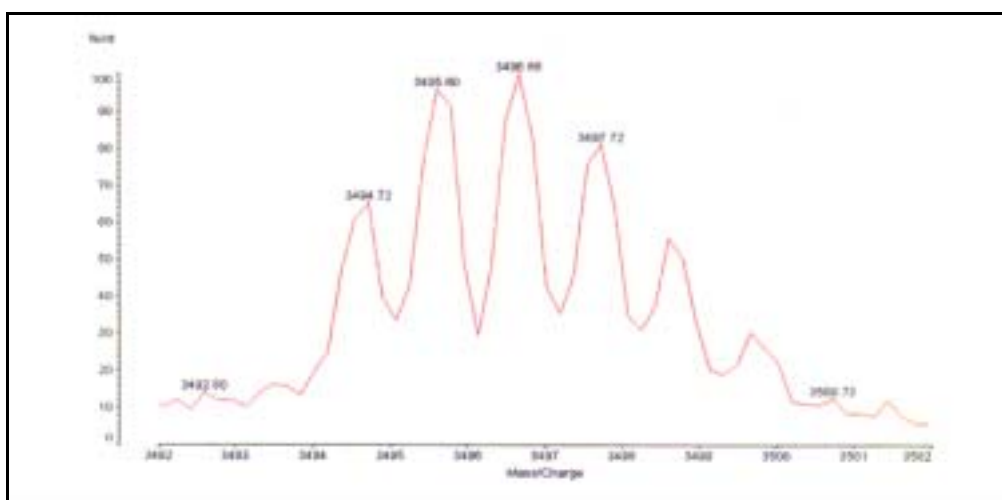


图 4：在线性分析方式下胰岛素β链分析

在图 5 显示了分析 β -乳球蛋白 A(β -Lactoglobulin A)和 β -乳球蛋白 B(β -Lactoglobulin B)混合物分离的质谱图。 β -乳球蛋白 A 的分子量约为 18,280、 β -乳球蛋白 B 的分子量约为 18,360，在分子量为 18,000 其分子量差为 80 的情况都被明确地分离。而且，此时的分辨率为 1,800。

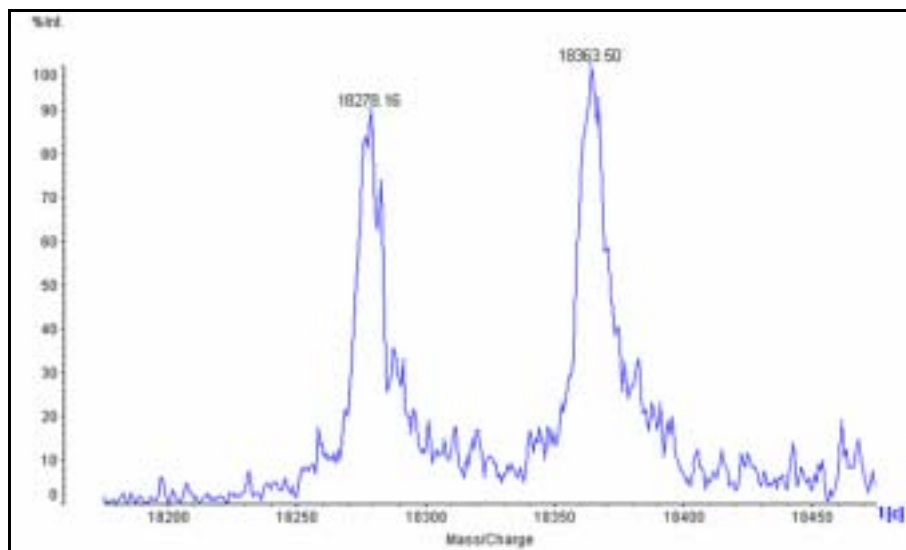


图 5：在线性方式下 β -乳球蛋白 A 和 β -乳球蛋白 B 混合物的分析

图 6 显示分析对 500 a mol 的牛胰岛素(Bovine insulin)分析的质谱图。对如此微量样品，同样可以进行高灵敏度的分析。

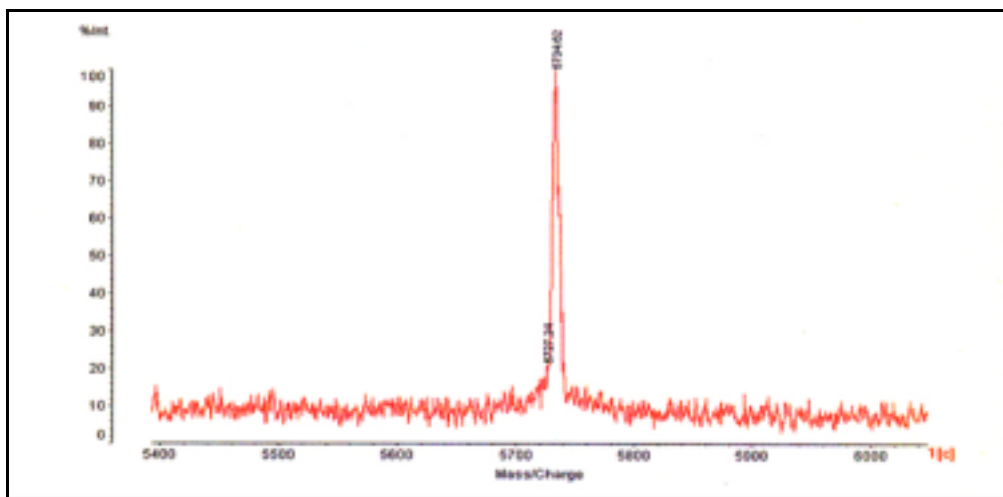


图 6：在线性方式下对 500 amol 牛胰岛素的分析

6. 反射方式(Reflectron Mode)的分析

反射方式(Reflectron Mode)是在离子化后施加加速电压飞行后, 沿离子群飞行方向施加反向电场, 检测折返离子群的分析方式, 如图 7 所示。由于施加与飞行反方向的电场, 可进一步收缩离子群的时间分布, 同时延长飞行距离, 可进行比线性方式更高分辨率的分析。

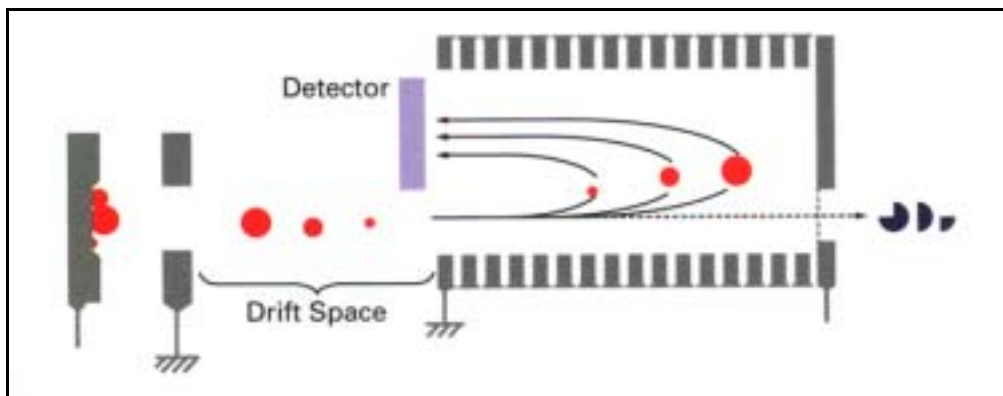


图 7：反射方式分析的原理图

图 8 显示了 AXIMA-CFR 在反射方式分析羊胰岛素(Sheep insulin)、牛胰岛素(Bovine insulin)、猪胰岛素(Porcine insulin)和人胰岛素(Human insulin)以及混合物分离的质谱图, 图 9 显示了图 8 中各种胰岛素放大的质谱图。这样, 分子量在 5,700 ~ 5,800 之间峰通过同位体分离被检测出来。此时, 各种胰岛素峰的分辨率达 15,000 以上。

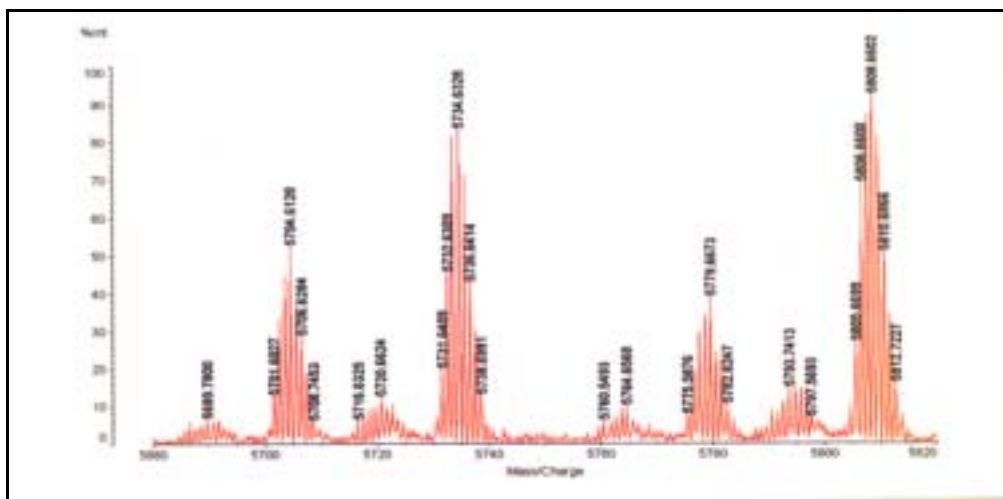


图 8：采用反射方式分析各种胰岛素以及混合物分离的质谱图

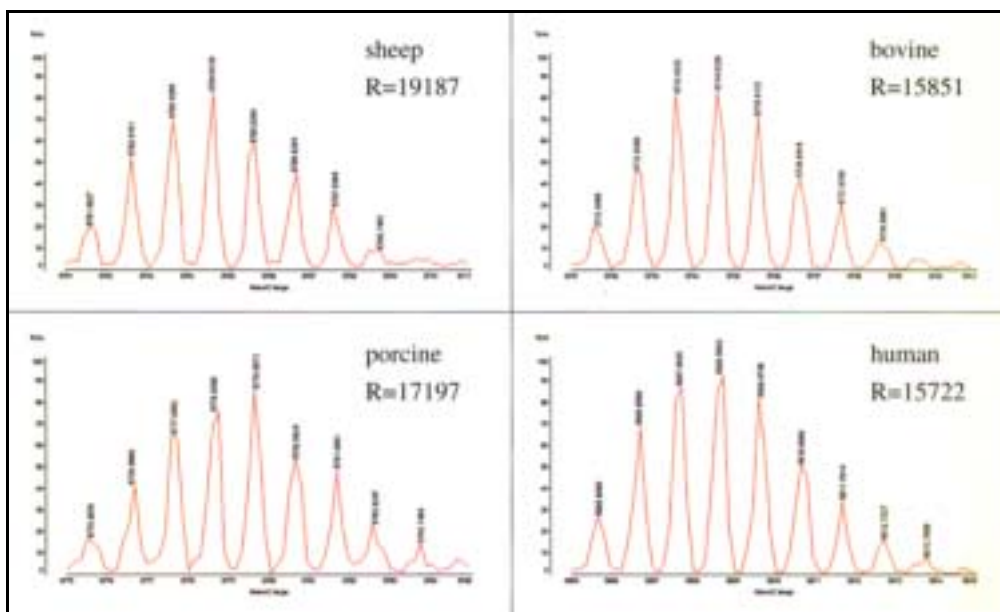


图 9：各种胰岛素放大的单个质谱图

表 1 为选定图 8 中人胰岛素 5,808.6602 (m/z)和羊胰岛素 5,704.6128 (m/z)的峰作内标，计算各个峰与理论值之间的误差，结果各峰的误差平均为 2.7ppm。

表 1：内标法质量校正精度

species	MH+ exp.	MH+ theor.	Mass difference	ppm	species	MH+ exp.	MH+ theor.	Mass difference	ppm
sheep	5701.6027	5701.6027	0.0000	0.01	porcine	5775.6562	5775.6395	0.0167	2.88
	5702.6181	5702.6061	0.0120	2.11		5776.5969	5776.6429	-0.0460	7.96
	5703.6266	5703.6094	0.0172	3.01		5777.6562	5777.6462	0.0100	1.72
	5704.6128	5704.6128	Calibrant			5778.6369	5778.6496	-0.0127	2.20
	5705.6264	5705.6161	0.0103	1.80		5779.6249	5779.6529	-0.0281	4.86
	5706.6284	5706.6195	0.0089	1.56		5780.6624	5780.6563	0.0061	1.06
	5707.6364	5707.6228	0.0136	2.38		5781.6861	5781.6596	0.0265	4.58
bovine	5731.6489	5731.6133	0.0356	6.21	human	5805.6699	5805.6501	0.0198	3.41
	5732.6309	5732.6167	0.0142	2.48		5806.6600	5806.6535	0.0065	1.13
	5733.6232	5733.6200	0.0032	0.56		5807.6625	5807.6568	0.0057	0.98
	5734.6328	5734.6234	0.0094	1.65		5808.6602	5808.6602	Calibrant	
	5735.6132	5735.6267	-0.0135	2.36		5809.6746	5809.6635	0.0111	1.91
	5736.6414	5736.6301	0.0113	1.98		5810.6866	5810.6669	0.0197	3.40
	5737.6759	5737.6334	0.0425	7.41		5811.7014	5811.6702	0.0312	5.37

图 10 表示采用反射方式分析 500 amol 血管紧张素 (Angiotensin) 的质谱图。在反射方式下进行高灵敏度的分析。

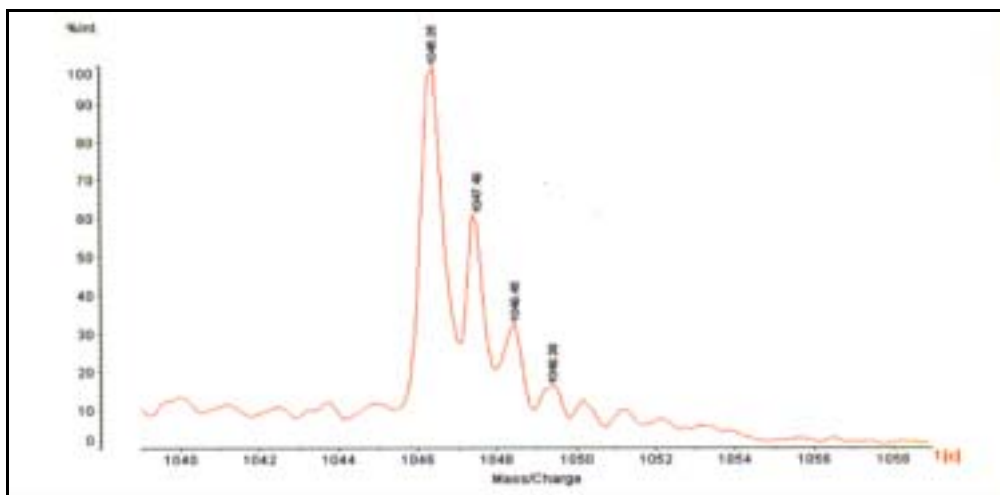
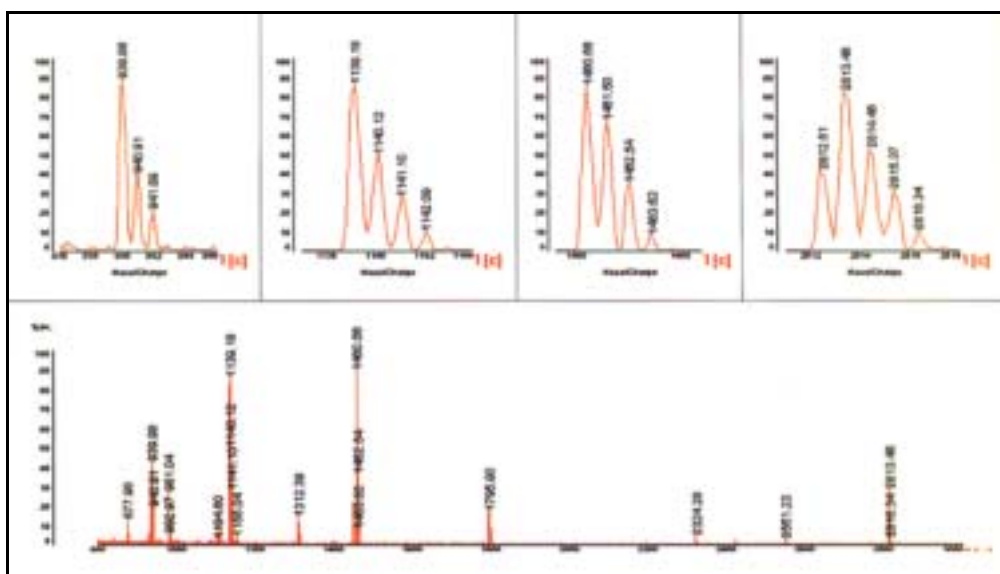


图 10 : 500 amol 血管紧张素 的质谱图

图 11 表示蛋白质的酶消解混合物的质谱图，上面一行是各个峰放大的质谱图。由此可见，各种各样的峰经过同位体分布的分离处理，可以在宽阔的质量范围内被进行高分辨率的检测。



7. 采用 PSD 进行 MS/MS 分析

采用 MALDI 进行分析时，通常可以通过提高激光的功率，检测出碎片离子。Precursor Ion 在提高激光功率的情况下，其离子化变得不稳定，在被加速电压加速后进入飞行区域进一步分裂，生成碎片离子继续等速飞行，其不能在线性方式分析，在反射方式由检测折返可被分离。如图 12 所示，在 AXIMA-CFR，由于采用了独特的曲线区域反射结构(Curved Field Reflectron, CFR)技术，不需要根据碎片离子的质量，而改变反射电场，一次分析就可以检测出全范围内的碎片离子。

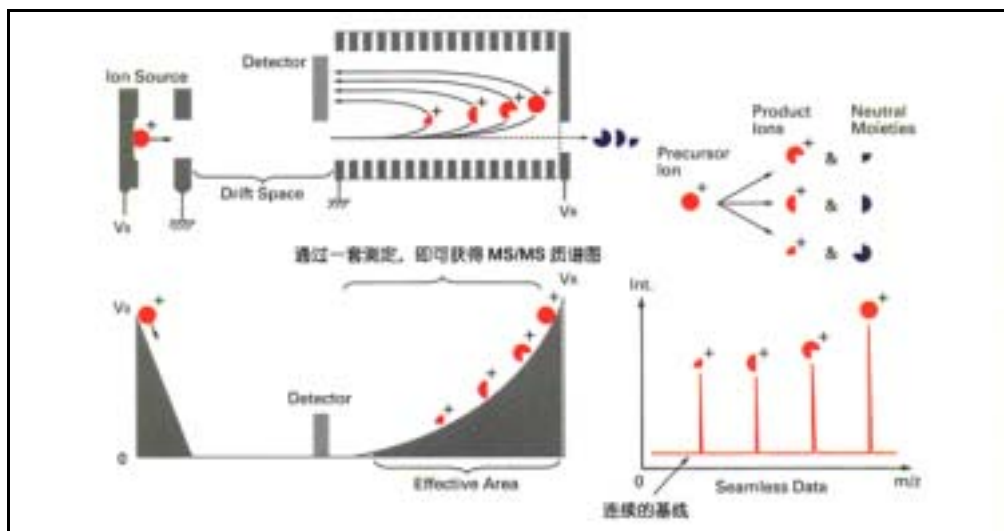


图 12：Curved Field Reflectron 的 PSD 原理

而且，可以根据使用离子门 (Ion Gate)功能，从生成离子中选择 Precursor Ion，进行 MS/MS 分析。如图 13 表示采用 MALDI-TOF MS 进行 MS/MS 分析的原理。生成的离子 M1、M2 和 M3 被加速电压加速。在通过离子门时，因不同的离子会产生时间差。控制离子门只允许目标离子(M2)通过。通过离子门的离子(M2) 在飞行区域被分裂形成碎片离子。根据该碎片离子在反射方式折返的情况，就可以检测出在所生成的全质量范围的碎片离子。

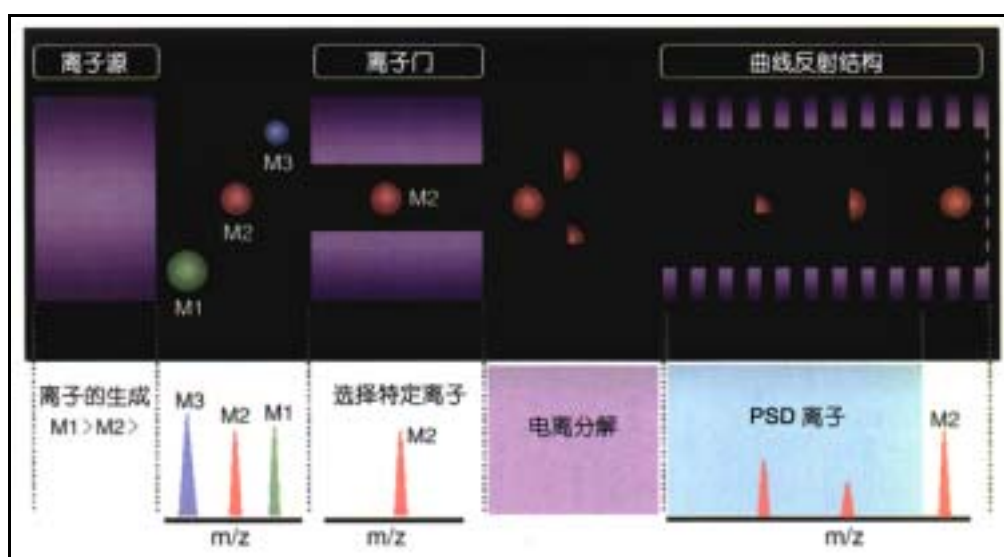


图 13：MALDI-TOF MS 的 MS/MS 原理

如图 14 表示由 AXIMA-CFR 处理的血管紧张素 (Angiotensin) PSD 质谱图, 而且在图 15 显示了在图 14 的碎片离子放大质谱图。利用血管紧张素的 PSD 质谱图将碎片离子分离成同位体检测出来。

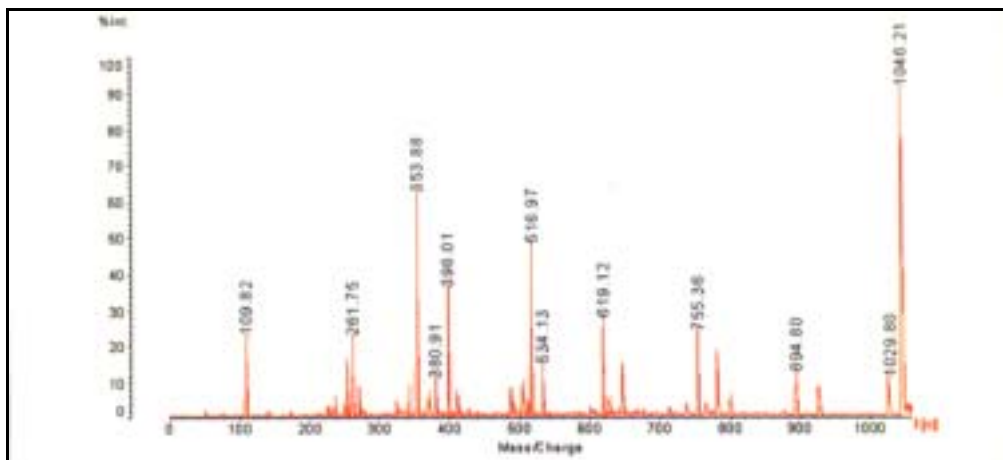


图 14 : 血管紧张素 的 PSD 质谱图

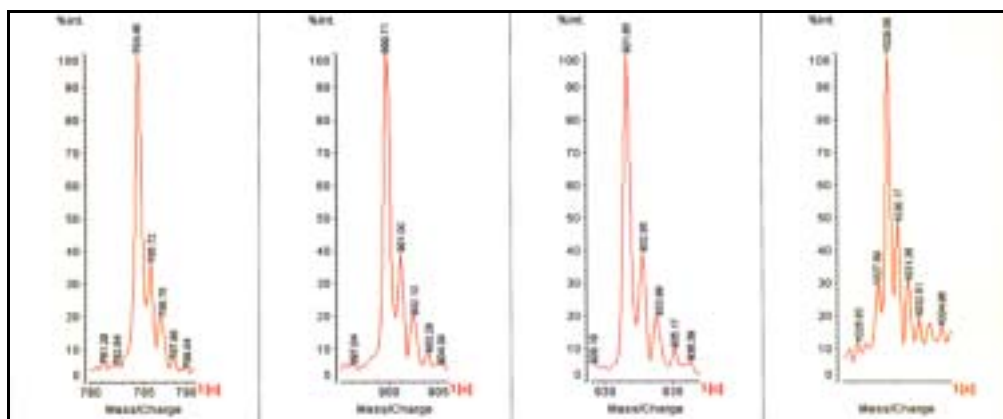


图 15 : 碎片离子放大的质谱图

图 16 显示了 100fmol 的胰岛素β链的 PSD 质谱图, 图 17 显示了 5fmol 的血管紧张素 的 PSD 质谱图, 可见如此微量的多肽也可以检测出碎片离子。

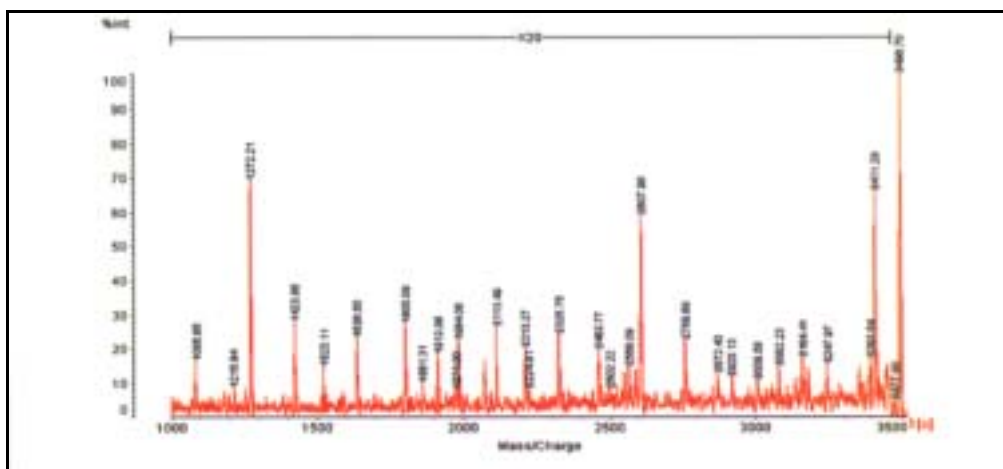


图 16 : 100fmol 的胰岛素β链的 PSD 质谱图

