

열증착 시료 제작법이 적용된 MALDI 질량분석법에 의한 불용성 Sorbitol 유도체의 분자량 결정

신철민¹, 남해선², 김성호^{1,2*}

¹순천향대학교 화학과 ²순천향대학교 의공·의료정보연구원

Application of Thermal Vapor Deposition Method for MALDI-MS : Molecular Weight Determination of Insoluble Sorbitol Derivatives

Chul-Min Shin¹, Hae-Seon Nam², Sung-Ho Kim^{1,2*}

¹Department of Chemistry Soonchunhyang University

²Bio-Medical Technology & Information Research Center Soonchunhyang University
Asan 336-745, Korea

요 약

A thermal vapor deposition method for crystallization of insoluble analytes with matrix is established as a new sample preparation method for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS). A mixture of mono, bis and tris(*p*-ethyl benzylidene) sorbitols was incorporated into microcrystals of ferulic acid, which was confirmed by confocal micrographs. Molecular masses of sorbitol derivatives were determined in this way by MALDI-MS without thermal decomposition.

1. 서 론

매트릭스 보조 레이저 탈착 / 이온화 (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)는 시료를 매트릭스로 희석시키고, 매트릭스에 조사된 레이저 빛에 의해 이온화된 매트릭스로 인해 시료분자가 이온화되는 연성이온화방법이다.⁽¹⁻⁵⁾ 매트릭스와 시료 혼합물의 결정 생성 방법은 좋은 스펙트럼을 얻을 수 있는 중요한 인자이다. 이에 시료-매트릭스 결정 생성 방법은 여러 가지로 개발이 되어 있다. 그러나 시료가 용매에 용해되어야만 매트릭스와 혼합결정을 생성시킬 수 있다. 폴리프로필렌의 투명성을 향상시키기 위해 첨가되는 sorbitol 유도체들은 불용성 화합물로서, 매트릭스와 혼합된 결정을 생성시킬 수 없었다.⁽⁶⁻⁷⁾

본 연구에서는 열 증착법 (Thermal Vapor Deposition Method, TVD)의 응용범위를 확대하기 위하여, bis (*p*-ethyl benzylidene) sorbitol의 분자량 측정을 위한 열 증착 조건을 찾았으며, mono, tris (*p*-ethyl benzylidene) sorbitol이 불순물로 포함되어 있는 것을 질량 스펙트럼으로부터 확인하였다.

2. 실험 방법

2.1 시약

시약은 Sigma 사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입한 *t*-4-hydroxy-3-methylcinnamic acid (Ferulic Acid, FA)를 매트릭스로 사용하였다. 불용성 화합물인 Bis (*p*-ethyl benzylidene) sorbitol은 Mitsui Toatsu Chemicals Inc. (Toyko, Japan)에서 공급되었다.

2.2 분자량 및 결정 표면 상태 측정

질량분석은 0.65m 직선형 시간 비행형 (Time-of-Flight, TOF) 질량분석관이 장착된 MALDI II (Kratos Co., Manchester, UK)를 사용하였다. Power source로 사용된 파장 337nm의 N₂ 펄스 레이저를 이용하여 시료의 직경 30um 범위에 70%의 세기로 조사하였다. 생성된 이온들은 20kV로 고정된 전압에 의하여 Field Free 관으로 가속되어지고, dual microchannel plate에 충돌하여 검출된다. 시료의 질량은 펩티드인 Substance P (M.W. 1348.6)를 이용하여 질량 교정하였다.

시료의 결정 모양은 할로젠 램프가 사용된 광섬유 냉광원(Fiber-Optic Cold Light Source) (SCHOTT KL1500, Germany)을 이용하여 광학현미경으로 비

교 관찰하였다.

2.3 시료 준비

열 증착법을 이용하여 매트릭스, 시료 및 매트릭스-시료 혼합물의 결정을 형성시키기 위하여 그림 1과 같은 직접 제작한 증착 장치를 사용하였다. 그림에서 보는 바와 같이 시료 위에 프로브를 고정하고, 온도 측정을 위한 열전쌍은 그 사이에 설치하였다. 또 온도 조절은 가열기를 이용하여 150~160 °C를 유지하였으며, 증착기 내의 압력은 진공 펌프를 이용하여 10~15 Torr 로 조절하였다. 매트릭스와 시료는 100:1의 비율로 혼합하여 막자 사발을 이용하여 균일화 하였다. 총 증착 시간은 3시간이었다.

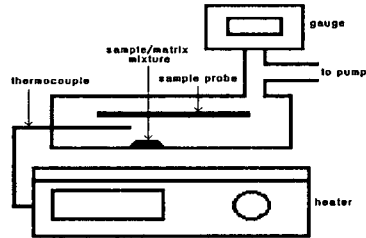


Figure 1. Sample preparation apparatus.

3. 실험 결과 및 고찰

3.1 결정 모양

그림 2의 (a)는 매트릭스를 증착하여 얻은 결정을 200배와 800배로 확대하여 얻은 사진이다. 사진에서 FA의 결정은 대략 20~30um 정도의 파편과 같은 형태를 보인다. 이는 짧은 시간동안만 결정이 자라기 때문이다. 그림 2의 (b)는 매트릭스와 시료 혼합물을 증착하여 얻은 사진이다. 사

진에서 매트릭스만 증착했을 때와는 달리 표면이 검게 나온 부분이 관찰된다. 이는 매트릭스 (m.p. 168~171°C)보다 녹는점이 높은 시료(m.p. 240~255°C)는 늦게 승화되며, 이로 인해 매트릭스의 표면에서 결정을 형성하여 검은 색으로 관찰되는 것으로 추측된다.

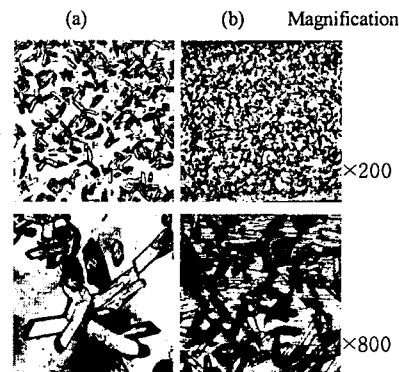


Figure 2. Confocal micrographs ($\times 200$ and $\times 800$) of the crystal formed from (a) FA by TVD, and (b) a mixture of FA and sorbitols by TVD.

3.2 질량 스펙트럼

그림 3은 FA를 TVD로 결정을 생성시켜 측정한 질량 스펙트럼이다. 그림 중 m/z 194.3과 177.4는 각각 $[M+H]^+$ 이온과 $[M-H_2O]^+$ 이온의 스펙트럼이다. 또 m/z 388.1 이온은 매트릭스의 이합체에 의한 것이며, m/z 370.6은 이합체로부터 탈수가 일어나 생성된 것이다. 이 스펙트럼으로부터 TVD로 인하여 매트릭스의 열분해가 일어나지 않았음을 알 수 있다. 그림 4는 FA와 시료 혼합

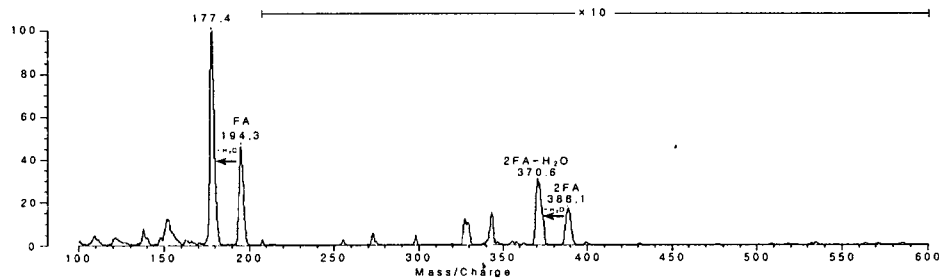


Figure 3. MALDI spectra of FA deposited by TVD.

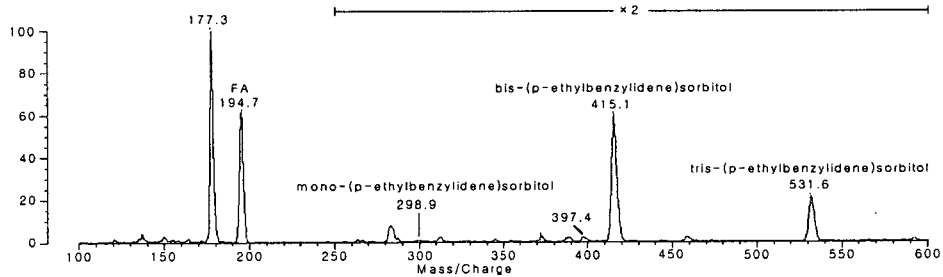


Figure 4. MALDI spectra of the mixture of *mono*, *bis* and *tris* (*p*-ethyl benzylidene) sorbitol by TVD.

물의 스펙트럼이다. m/z 194.7과 177.3은 매트릭스에 의한 것이다. m/z 298.9, 415.1, 531.6는 각각 *mono*, *bis* 그리고 *tris* (*p*-ethyl benzylidene) sorbitol의 $[M+H]^+$ 이온이다. *Mono*, *bis* (*p*-ethyl benzylidene) sorbitol의 경우 탈수가 일어난 이온을 얻을 수 있었다. 그러나 -OH 기를 가지고 있지 않은 *tris* (*p*-ethyl benzylidene) sorbitol은 탈수된 이온에 의한 스펙트럼을 얻을 수 없었다. 이 스펙트럼으로부터 *mono*, *tris* (*p*-ethyl benzylidene) sorbitol이 불순물로 포함되어 있다는 것을 알 수 있다.

이와 같이, 본 연구를 통하여 TVD 방법을 이용하여 불용성 화합물에 대한 분자량을 측정할 수 있었다. 그러나 일반적인 시료 준비법과 달리 시료에 따라 열 증착 조건이 달라지므로, 조건 확립에 시간이 소요되는 문제를 해결할 수 있도록 연구가 수행되어야 할 것이다.

(감사의 글 : 본 연구과제는 2002년도 순천향대학교 학술연구조성비 일반연구과제로 지원을 받아 수행하였음)

4. 참고 문헌

1. M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, **60**, 2299, 1988
2. M. Karas, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process*, **78**, 53, 1987
3. R. Beavis, B. Chait, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **3**, 432, 1988
4. R. Beavis, B. Chait, *ibid*, **3**, 233, 1989
5. Tammy L. Smith, Divakaran Masilamai, Long Kim Bui, Raymond Brambilla, Yash P. Khanna, Kristina A. Gabriel, *J. Appl. Polym. Sci.*, **52**, 591, 1994
6. R. H. Ebengou, *J. Polym. Sci. B : Polym. Phys.*, **35**, 1333, 1997