

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

신철민¹ · 남해선² · 김성호^{1,2}

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

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

Abstract 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 연성이온화 방법이다[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. 실험방법

2.1 시약

¹순천향대학교 화학과

²순천향대학교 의공 · 의료정보연구원

시약은 Sigma사(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 0.65 m 직선형 시간 비행형(Time-of-Flight, TOF) 질량분석관이 장착된 MALDI II(Kratos Co., Manchester, UK)를 사용하였다. Power source로 사용된 파장 337 nm의 N₂ 펄스 레이저를 이용하여 시료의 직경 30 μm 범위에 70%의 세기로 조사하였다. 생성된 이온들은 20 kV로 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 할로겐 램프가 사용된 광섬유 냉광원(Fiber-Optic Cold Light Source) (SCHOTT KL1500, Germany)을 이용하여 광학현미경으로 비교 관찰하였다.

2.3 시료 준비

열 증착법을 이용하여 매트릭스, 시료 및 매트릭스-시료 혼합물의 결정을 형성시키기 위하여 Fig. 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, 증

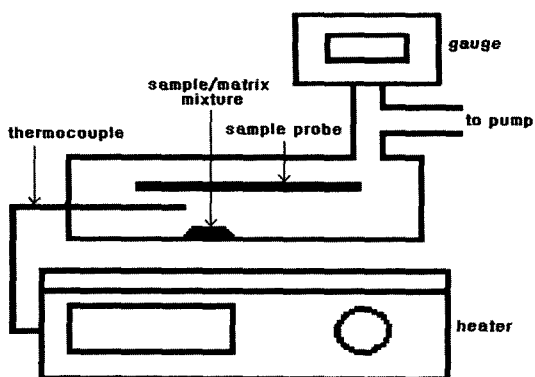


Figure 1. Sample preparation apparatus

착기 내의 압력은 진공 펌프를 이용하여 10~15 Torr 로 조절하였다. 매트릭스와 시료는 100:1의 비율로 혼합하여 막자사발을 이용하여 균일화 하였다. 총 증착 시간은 3시간이었다.

3. 실험 결과 및 고찰

3.1 결정 모양

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

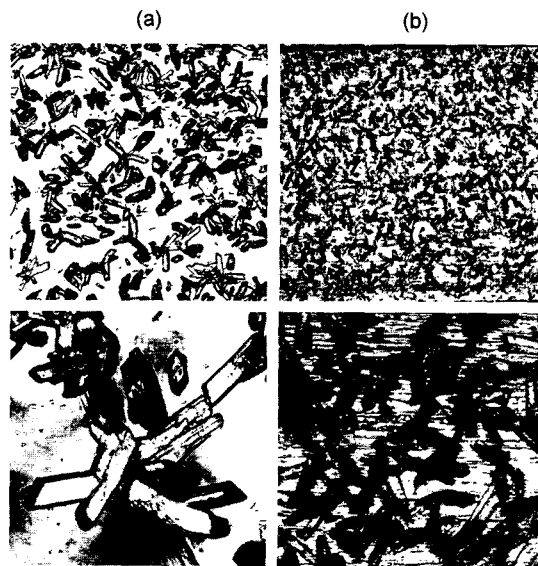


Figure 2. Confocal micrographs (top: ×200 and bottom: ×800) of the crystal formed from (a) FA by TVD, and (b) a mixture of FA and sorbitols by TVD

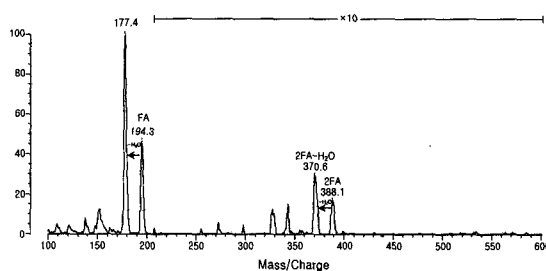


Figure 3. MALDI spectra of FA deposited by TVD

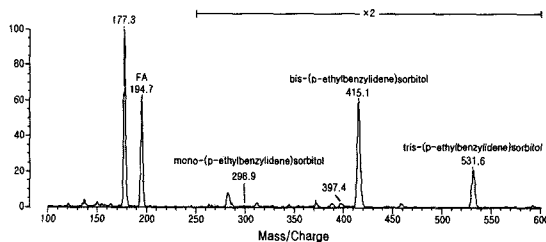


Figure 4. MALDI spectra of the mixture of mono, bis and tris (p-ethyl benzylidene) sorbitol by TVD

사진이다. 사진에서 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.

3.2 질량 스펙트럼

Fig. 3은 FA를 TVD로 결정을 생성시켜 측정된 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. Fig. 4는 FA와 시료 혼합물의 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. 그

러나 일반적인 시료 준비법과 달리 시료에 따라 열 증착 조건이 달라지므로, 조건 확립에 많은 시간이 소요되는 문제를 해결할 수 있도록 많은 연구가 수행되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구과제는 2002년도 순천향대학교 학술연구조성비 일반연구과제로 지원을 받아 수행하였음.

참고문헌

[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.