研 究 快 报

鸡蛋中三聚氰胺的表面解吸常压化学电离串联质谱法成像

杨水平[1] 陈焕文*[1,2] 杨宇玲[1] 胡 斌[1] 张 燮[1]
周瑜芬[1] 张丽丽[2] 顾海威[1]
[1](东华理工大学应用化学系, 抚州 344000) [2](吉林大学化学院, 长春 130023)

摘 要 以表面解吸常压化学电离 (SDAPCI)串联质谱中获得的三聚氰胺特征碎片离子 (m/z 85)为探针, 对熟鸡蛋切面进行二维质谱扫描, 用不同颜色表示三聚氰胺信号强度的高低, 获得了熟鸡蛋切面中三聚氰胺的质谱影像。三聚氰胺的空间分辨率达 0.06 mm^2, 最小采样面积占成像面积的十万分之五。图像表明, 绝大部分三聚氰胺 (>99.8%), 分布在蛋清中, 但分布不均匀; 而蛋黄中基本不含三聚氰胺。

关键词 表面解吸常压化学电离, 串联质谱, 成像, 三聚氰胺, 鸡蛋

1 引 言

质谱学方法是一种同时具备高特异性和高灵敏度的普适性方法, 而利用新兴质谱技术在无需任何样品前处理的情况下对生物组织的成像则是当前研究的前沿和热点之一。质谱成像属于分子成像技术之一, 可以对样品 x、y、z 三维方向顺次进行质谱扫描, 获得各点的质谱数据, 然后用不同颜色代表某一探测组分含量的高低, 按其空间位置作出质谱影像图。显然, 采样点的面积越小, 表明影像图的空间分辨率越好; 质谱强度分辨率越高, 则需要的颜色种类越多。与常规的光谱影像不同, 质谱能够对特定的某一化学成分进行成像, 甚至获得超低含量组分的空间分布信息, 提供其它方法无法获得的丰富的分子层次的影像信息, 对生物医学研究具有重要意义。常用于成像的质谱技术是基体辅助激光解吸电离质谱 (MALDI-MS)[1,2], 但一般在真空下进行。利用电喷雾解吸电离质谱 (DESI-MS)[3~5]可在常压下对生物组织成像, 但一般利用一级质谱信号进行。本实验采用自行研制的表面解吸常压化学电离 (SDAPCI)源[6~10]具有较高的灵敏度, 能够在串联质谱中获得痕量待测物的特征离子, 从而可以排除采用一级质谱信号成像可能存在的干扰。

在采用光谱和质谱技术对食品中三聚氰胺的快速检测[11]研究过程中发现三聚氰胺与蛋白质具有特殊的亲和作用。本实验首次采用 SDAPCI-MS/MS中三聚氰胺的特征碎片为信号, 在无需样品预处理条件下获得了鸡蛋切面的三聚氰胺分布影像, 结果发现鸡蛋中三聚氰胺都集中分布在蛋清中。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

SDAPCI离子源: 实验室自制[6~10], 配有可控温解吸气加热装置, 解吸气出口喷嘴直径为 0.1 mm, 其中的放电针直径为 0.05 mm, 空间分辨率约为 0.25 mm×0.25 mm。LTQ XL增强型线性离子阱质谱仪, 配有 Xcalibur数据处理系统: 美国 Finnigan公司。三聚氰胺: 分析纯, 天津博迪化工有限公司, 使用时配制成 10.0 mg/kg水溶液备用。鸡蛋样品购于某地超市, 常规方法煮熟后冷却, 去壳后切成厚约 5 mm 的切片, 备用。

2.2 实验方法

设置 SDAPCI离子源为正离子检测模式, 质量范围为 50~220 Da, 电离电压为 3.0 kV, 离子传输管

2009-01-20收稿; 2009-01-26接受
本文系科技部创新方法基金 (No. 2008IM040400)和江西省科技支撑项目资助
* E-mail: dhw8868@gmail.com

温度为 275 ℃; 解吸气 (N_2)气压为 0.2 MPa, 从装有水的锥形瓶通过, 以 α为 30°角喷出, 解吸气温度为 200 ℃。实验时小心地将鸡蛋切片置于具有三维调节功能的样品台上, 使解吸气出口到测定点距离为 1~2 mm, 测定时线性地改变样品台位置, 每间隔 0.25 mm 采集一次数据。二级质谱记录时间为 10 s, 选定离子的隔离宽度为 1.6 Da, 碰撞能量为 36%, 其它条件系统自动优化。记录各采样点对应二级质谱中 m/z 85碎片离子净响应信号的平均值, 将各点数据 (z值)按其相应空间坐标位置 (x, y)输入 Excel 工作表中, 由 Excel软件作出三维曲面图, 设置视图格式为 90°仰角, 即获得影像图。

3 结果与讨论

3.1 鸡蛋中三聚氰胺的定性鉴定

按拟定实验方法对生鸡蛋清进行质谱检测, 在一级质谱中发现了质子化的三聚氰胺 (m/z 127), 其二级质谱中存在特征离子 m/z 110, 85, 68和 60等碎片 (如图 1所示), 与文献报道一致[11], 表明蛋清中存在三聚氰胺。但是, 鸡蛋黄的一级质谱虽然有疑似信号 (m/z 127), 但在二级质谱中无法获得 m/z 85和 68等信号。因此, 表明鸡蛋黄中不含有三聚氰胺[12]。熟鸡蛋质谱鉴定结果与生鸡蛋结果一致。

采用二级质谱中碎片离子 m/z 85的信号强度为指标, 对各个实验参数进行了系统优化。值得注意的是, 离子源出口到样品测定点最佳距离为 1~2 mm。距离太近信号不稳定, 太远则影响空间分辨率。在实验条件下可获得的空间分辨率为 0.06 mm^2, 这可能与所用的喷嘴孔径较小和气体压力较低有关。解吸气体的温度的控制也很关键, 温度低于 50 ℃时信号强度显著下降; 而高于 250 ℃也引起三聚氰胺和蛋白质等热解, 导致信号强度降低。

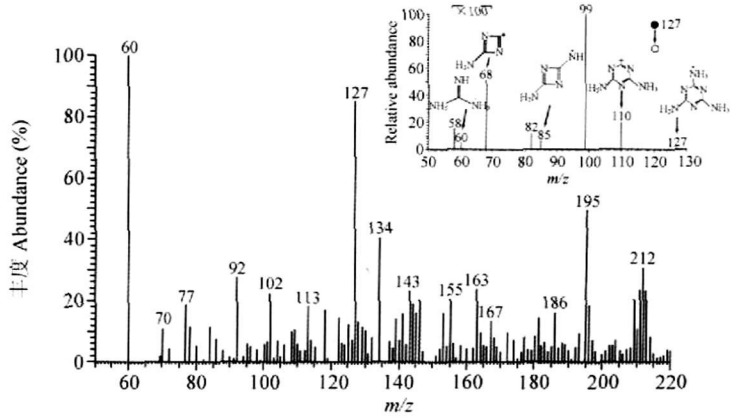

图 1 含有三聚氰胺的鸡蛋的一级质谱和质子化三聚氰胺 (m/z 127)的二级谱图

Fig. 1 Surface desorption atmospheric pressure chemical ionization (SDAP-CI)-MS spectrum of a melamine tainted egg sample; the inset shows the MS/MS spectrum of ions detected at m/z 127

3.2 三聚氰胺在熟鸡蛋切面的质谱影像

按实验方法获得的熟鸡蛋切面 (近似圆形, 半径为 19.9 mm, 面积约 1244 mm^2)上三聚氰胺的质谱影像见图 2b。由图 2可见, 鸡蛋的质谱影像呈现出与鸡蛋切面类似的轮廓, 二者的尺寸和形状完全一致。但是, 质谱影像与光谱影像 (即照片)不同, 照片中看到的是各种物质反射光谱成像的结果, 无法从中获得特定物质 (如三聚氰胺)的空间分布。理论上, 质谱影像可以获得各个不同待测物的空间分布, 获得丰富的分子层次的信息, 具有常规光谱成像 (如照相)难以比拟的优点。本实验通过二级质谱屏蔽了其它非三聚氰胺信号。因此, 图 2b中的质谱影像仅仅是三聚氰胺在鸡蛋中的分布情况。图 2表明虽然肉眼或普通的照片无法展现, 但三聚氰胺在鸡蛋中分布极不均匀, 一枚鸡蛋中的三聚氰胺几乎都集中在蛋白中, 占三聚氰胺含量的 99.8% 以上。蛋白区的主要成分是各种蛋白质。三聚氰胺中含有多个氨基, 能够通过形成很强的氢键等与不同的蛋白质相互作用, 当蛋白质的空间构象合适时, 甚至形成多个结合位点, 导致难以在常温下将三聚氰胺从蛋白中解吸出来。显然, 鸡蛋中含有多种不同的蛋白质, 这些蛋白质与三聚氰胺的结合能力不一定相同。质谱影像表明, 三聚氰胺在蛋白中分布不均匀, 煮熟后蛋白内外表面的三聚氰胺含量相对较低, 蛋白中间部分三聚氰胺含量升高, 而且蛋白层越厚其中间部分的三聚氰胺含量越高 (如影像中上部)。从图 2a中可以看出, 在蛋黄区的中心部分, 有些微微泛白的区域 (对应于胚胎发育的脐带部分), 表明该区域含有部分蛋白。在质谱影像中, 蛋黄区基本不含三聚氰胺, 但只有在微微泛白的蛋黄中心区可检测出很弱的信号。此外, 从质谱影像中还看到三聚氰胺有聚集分

布的现象, 导致三聚氰胺的相对含量差异达到 3个多数量级。显然, 鸡蛋在熟化过程中经历了蛋白质变性等复杂的物理化学变化, 这可能削弱部分蛋白质与三聚氰胺的结合能力, 导致三聚氰胺局部浓度变化。与均一的溶液不同, 生鸡蛋清中蛋白质本身可能分布不均一, 如果三聚氰胺恰好与该蛋白质具有较强的选择性相互作用, 则同样可能导致三聚氰胺分布不均匀。虽然还需要深入研究才能够对三聚氰胺的不均匀分布的具体机理等作出合理的解释, 但该质谱影像已经清晰地表明三聚氰胺能够选择性地与蛋白质发生较强的相互作用。

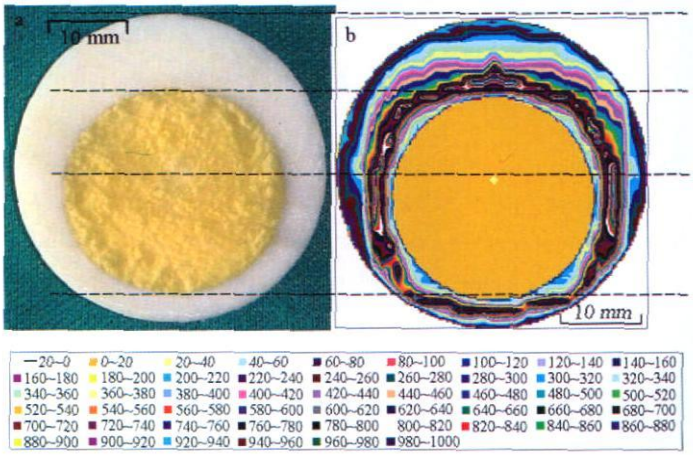

图 2　鸡蛋切面照片 (a)及其三聚氰胺分布影像 (b) (虚线表示质谱影像在鸡蛋中的相应部位)

Fig. 2　Picture(a) and SDAPCI-MS/MS imaging(b) of an egg containing melamine

空间分辨率 (special resolution): 0.06 mm^2, 含量分辨率 (content resolution): 0.9 mg/kg.

实验发现, 本方法二级质谱中 m/z 85离子的净信号的测量精度较高, 多次测量的相对偏差 RSD为 1.29% (n = 6)。在相同实验条件下测定空白值的标准偏差 (n = 20, σ = 1.2), 按 S/N = 3计算本方法直接测定鸡蛋中的三聚氰胺的检出限为 0.045 mg/kg。计算表明, 图 2影像中三聚氰胺含量分辨率为 0.9 mg/kg, 如果采用专门的绘图软件, 其含量分辨率可以显著提高。对所购得的 5个鸡蛋样品取蛋清按实验方法测定, 均检测出三聚氰胺, 其含量为 1.3~65.0 mg/kg。实验中空间分辨率达 0.06 mm^2, 而所用鸡蛋的面积约 1244 mm^2, 单位采样面积与成像面积的比 (SIR)为十万分之五。因此, 本工作是迄今为止的质谱成像中 SIR最小的研究。

初步实验表明, 加热解吸气对鸡蛋样品中三聚氰胺的离子化及测定起重要作用, 这可能与三聚氰胺与蛋白质的强相互作用有关。如进一步减小离子源出口的直径, 减少解吸气体的流速, 则可以显著减小解吸气喷在样品上的解吸斑点的大小 (如直径减小到 0.05 mm), 则可显著提高 SDAPCI-MS质谱成像的分辨率, 有望广泛地应用于生物样品的高分辨质谱成像研究。

References

1　Caprioli R M, Farmer T B, Gile J. *Anal. Chem.*, **1997**, 69: 4751~4760

2　Todd P J, Schaaff T G, Chaurand P, Caprioli R M. *J. Mass Spectrom.*, **2001**, 36(4): 355~369

3　Chen H W, Talaty N N, Takats Z, Cooks R G. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(21): 6915~6927

4　Wiseman J M, Ifa D R, Song Q Y, Cooks R G. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45(43): 7188~7192

5　Wiseman J M, Ifa D R, Zhu Y X, Kissinger C B, Manicke N E, Kissinger P T, Cooks R G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, 105(47): 18120~18125

6　Chen H W, Zheng J, Zhang X, Luo M B, Wang Z C, Qiao X L. *J. Mass Spectrom.*, **2007**, 42(8): 1045~1056

7　Chen Huan-Wen (陈焕文), Lai Jin-Hu (赖劲虎), Zhou Yu-Fen (周瑜芬), Li Jian-Qiang (李建强), Zhang Xie (张燮), Luo Ming-Biao (罗明标), Wang Zhi-Chang (王志畅). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(8): 1233~1235

8　Chen H W, Liang H Z, Ding J H, Lai J H, Huan Y F, Qiao X L. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55(25): 10093~10100

9 Liang Huar-Zheng (梁华正), Chen Huan-Wen (陈焕文). *Chinese J. Appl. Chem.* (应用化学), **2008**, 25(5): 519~523
10 Zhu L, Gamez G, Chen H W, Chingin K, Zenobi R. *Chem. Commun.*, **2009**, (5): 559~561
11 Yang Shui-Ping(杨水平), Hu Bin(胡 斌), Li Jian-Qiang (李建强), Han Jing (韩 京), Zhang Xie(张 燮), Chen Huan-Wen (陈焕文). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 待发表(in press)
12 Determination of Melamine in Raw Milk and Dairy Products (原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法). *National Standards of the People's Republic of China*(中华人民共和国国家标准) GB/T 22388-**2008**

Imaging Melamine in Egg Samples by Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry

YANG Shui-Ping[1], CHEN Huan-Wen*[1,2], YANG Yu-Ling[1], HU Bin[1],
ZHANG Xie[1], ZHOU Yu-Fen[1], ZHANG Li-Li[2], GU Hai-Wei[1]
[1] *(Department of Applied Chemistry, East China Institute of Technology, Fuzhou 344000)*
[2] *(College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130023)*

Abstract For the first time, the characteristic fragment (m/z 85) of protonated melamine generated in MS/MS spectra recorded using surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry has been employed as a molecular probe to image melamine distributed in boiled eggs. With a special resolution of 0.06 mm^2, the imaging obtained in x, y dimensions visualized extremely uneven distribution of melamine in the egg samples (ca 1244 mm^2), and most melamine (99.8%) was distributed in egg white region. The ratio of the unit sampling area to the imaging area achieved was less than 50 ppm.

Keywords Surface desorption atmospheric pressure chemical ionization, tandem mass spectrometry, imaging, melamine, egg

(Received 20 January 2009; accepted 26 January 2009)

编 者 按

本刊从2009年起增设"研究快报"栏目,在收稿2~3月内刊出。对该栏目稿件的要求是论文的创新性强,学术价值重大,不追求论文的完整性(不会影响作者后续工作的整体发表),作者需突出论文的创新思想和初步的研究结果,撰写格式除正文外还包括中英文摘要、关键词和参考文献,将篇幅控制在3000字左右,并提供全文的英文译稿(在ScienceDirect网同步发表)。该栏目不收取任何费用。

陈焕文课题组的"鸡蛋中三聚氰胺的表面解吸常压化学电离串联质谱法成像"一文,首次证实了SDAPCI-MS成像技术的可能性,并且获得了较好的空间分辨率;首次观测到三聚氰胺在鸡蛋中的分布,证明三聚氰胺与蛋白质具有较强的选择性相互作用,导致三聚氰胺全部分布在蛋清中。这些结果不仅对质谱技术的发展具有重要的推动作用,也可能促进三聚氰胺的生物效应研究。该论文从2009年1月20日收稿到发表仅用了49天!

本刊希望将我国的分析化学家创新性的研究成果通过本刊"研究快报"栏目,以最快的速度发布,推动我国分析化学学科的快速发展。