

## 二氧化钛纳米线阵列富集与内部萃取 电喷雾电离质谱联用检测大豆磷脂

寇伟<sup>1</sup> 张华<sup>1</sup> 卢海艳<sup>1</sup> 朱丽雪<sup>1</sup> 刘爱英<sup>1</sup> 黄科科<sup>\*1</sup> 陈焕文<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup>(吉林大学, 无机合成与制备化学国家重点实验室, 长春 130012)

<sup>2</sup>(东华理工大学, 江西省质谱科学与仪器重点实验室, 南昌 330013)

**摘要** 通过水热合成方法,在掺杂 F 的 SnO<sub>2</sub> 导电玻璃 (FTO) 基底上制备了 TiO<sub>2</sub> 纳米线阵列结构,并与内部萃取电喷雾电离质谱法 (iEESI-MS) 联用,实现了大豆中磷脂类物质的选择性富集和直接质谱分析。系统考察了三氟乙酸 (TFA)-甲醇比例、吸附时间、洗脱剂组成以及洗脱流速对大豆中磷脂类物质检测的影响。结果表明,在萃取液为 2% (V/V) TFA-甲醇、吸附时间为 60 s、洗脱剂为 1.5% (V/V) 氨水-甲醇、洗脱流速 7 μL/min 的条件下,可以获得最佳的磷脂类成分信号。在优化条件下,从大豆研磨液中检测到了 18 种磷脂类成分,基于此可利用主成分分析 (PCA) 对产自黑龙江、江苏、四川、山东和河南的大豆进行初步区分。本方法对大豆磷脂定量分析的检出限 ( $S/N \geq 3$ ) 为 0.01 μg/L,相对标准偏差 (RSD,  $n=3$ ) 为 1.6% ~ 6.5%,表明本方法具有较高的检测灵敏度。此外,本方法还可用于对大豆商品油品质进行快速准确筛查。本方法具有样品耗量少、分析速度快、操作简便等优势,有望为大豆中磷脂类物质的快速检测提供一种新方法。

**关键词** 二氧化钛纳米线阵列;内部萃取电喷雾电离质谱;大豆磷脂;产地区分

### 1 引言

磷脂是构成生物膜的重要组成部分,磷脂类物质在细胞构造、信息传递、能量存储等过程中发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。大豆中磷脂主要有磷脂酰胆碱 (PC)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰丝氨酸 (PC) 和磷脂酰肌醇 (PI) 等<sup>[2]</sup>,其结构中含有的大量不饱和脂肪酸,在维持细胞功能、改善大脑记忆力、延缓衰老、降低血脂等方面具有重要的生理作用。由于大豆磷脂含量丰富,结构多样,在食品、饲料、化妆品等领域广泛应用<sup>[3]</sup>,因此,对大豆磷脂的检测尤为重要。

目前,对于磷脂类物质的检测方法主要有薄层色谱法 (TLC)<sup>[4]</sup>、气相色谱-质谱联用法 (GC-MS)<sup>[5]</sup>、液相色谱-质谱联用法 (LC-MS)<sup>[6-8]</sup>、基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱法 (MALDI-TOF-MS)<sup>[9]</sup> 等。TLC 干扰因素较多,灵敏度较低;GC-MS 和 LC-MS 的灵敏度虽然较高,但是进样前通常需要萃取、离心、过滤、干燥、再溶解等复杂的样品预处理过程<sup>[10]</sup>,影响分析速度和效率,而且,在预处理过程中,有机溶剂的频繁使用也会造成资源浪费和环境污染。MALDI-TOF-MS 在分析生物大分子具有一定的优势,但是基质的制备过程通常较为耗时,操作繁琐,导致准确度不高,重现性较差。因此,建立操作简单、快速高效的磷脂类物质检测方法具有十分重要的意义。

内部萃取电喷雾电离质谱 (iEESI-MS) 技术可以在无需样品预处理的前提下,直接对复杂整体样品 (如动物组织,植物组织) 中的化学组分进行直接质谱分析<sup>[11-14]</sup>,并且在药物检测<sup>[15]</sup>、环境分析<sup>[16]</sup>、肉类品质鉴定<sup>[17,18]</sup> 等领域得到了应用。根据文献研究,金属氧化物 (如 TiO<sub>2</sub>、ZrO<sub>2</sub>、Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 等) 对磷脂类物质具有选择性吸附作用<sup>[19]</sup>,制备的金属氧化物纳米粒子可以将血浆<sup>[3]</sup>、牛奶<sup>[20]</sup>、黄油<sup>[20]</sup> 等复杂基质中的磷脂进行富集,并用于后续的检测。近年来,采用表面修饰后的基底对待测物进行富集,然后进行质谱分析的实验方法取得了较快发展,如采用修饰后的木尖富集,实现水产品中孔雀石绿的快速分析<sup>[21]</sup>;对纸基底进行表面修饰后,在无需样品预处理的前提下,用于对可卡因<sup>[22]</sup> 和蛋白<sup>[23]</sup> 的检测等。本研究利用 TiO<sub>2</sub> 纳米线阵列对大豆磷脂进行富集,然后利用 iEESI-MS 技术对吸附在 TiO<sub>2</sub> 纳米线上的磷脂进行

在线萃取和质谱分析,实现了大豆中磷脂类物质的快速检测。根据检测到的成分,利用主成分分析(PCA)对产自黑龙江、江苏、四川、山东和河南的大豆进行初步区分,大豆磷脂的检出限( $S/N \geq 3$ )为  $0.01 \mu\text{g/L}$ ,相对标准偏差(RSD,  $n=3$ )为  $1.6\% \sim 6.5\%$ 。本方法具有较高的检测灵敏度,还可用于对品质较差的大豆商品油进行快速准确筛查。本方法有望为大豆中磷脂类物质的快速检测提供一种新方法。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

iEESI 离子源(本实验室自制);Orbitrap Fusion™ Tribrid™ 质谱仪并配有 Xcalibur 3.0 数据处理系统(美国 Thermo Scientific 公司);Helios Nanolab 600i 双束扫描电子显微镜(美国 FEI 公司);石英毛细管(内径  $0.10 \text{ mm}$ ,外径  $0.19 \text{ mm}$ ,美国 Agilent Technologies 公司);艾卡 M20 通用研磨机(德国 IKA 公司);进样针( $1 \text{ mL}$ ,北京博朗宁科技有限公司)。甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司);三氟乙酸(色谱纯,上海麦克林生化科技有限公司);氨水(色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);HCl(分析纯,北京化工厂); $\text{TiCl}_4$ (化学纯,国药集团化学试剂北京有限公司);FTO 导电玻璃(合肥科晶材料技术有限公司);大豆磷脂酰胆碱标准品<sup>d</sup>PC 34:2(纯度  $\geq 98\%$ ,上海摩贝生物科技有限公司);实验用水由 Milli-Q 超纯水净化装置(美国 Millipore 公司)制备。

### 2.2 实验材料

原产自黑龙江、江苏、山东、四川和河南的大豆均购于当地超市。将大豆研磨成粉末,然后向  $0.2 \text{ g}$  研磨粉中加入  $1 \text{ mL}$   $2\%$  ( $V/V$ ) 三氟乙酸-甲醇萃取溶液进行浸泡,使得大豆研磨粉的化学成分溶于甲醇中,便于后续的取样实验。一级、二级和三级大豆油均购于当地超市。

### 2.3 $\text{TiO}_2$ 纳米线阵列的制备

$\text{TiO}_2$  纳米线阵列的制备参照文献[24]的方法。依次量取  $15 \text{ mL}$  纯水和  $15 \text{ mL}$  HCl 加入到烧杯中,混合均匀后,逐滴加入  $0.45 \text{ mL}$   $\text{TiCl}_4$  溶液,超声  $1 \text{ min}$ 。然后,置于  $50 \text{ mL}$  带有聚四氟乙烯内衬的高压反应釜中,再放入边长约  $2 \text{ cm}$  的正三角形 FTO 导电玻璃片,导电面向上。反应釜完全密封后放入烘箱, $180^\circ\text{C}$  下反应  $2 \text{ h}$ ,自然冷却至室温。制备的  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列用纯水多次清洗至洗涤液呈中性,自然晾干。用扫描电子显微镜(SEM)对生成的二氧化钛纳米线阵列进行形貌表征。

### 2.4 $\text{TiO}_2$ -iEESI-MS 实验条件和方法

质谱仪设置正离子检测模式,质量扫描范围为  $m/z$   $100 \sim 1500$ ;离子源电压  $+5.5 \text{ kV}$ ;离子传输管温度为  $320^\circ\text{C}$ ;在进行碰撞诱导解离(CID)实验时,设置母离子隔离宽度为  $1.0 \text{ Da}$ ,碰撞能量  $30\% \sim 40\%$ ,碰撞时间  $100 \text{ ms}$ 。其它检测参数由质谱仪系统自动优化得到。

$\text{TiO}_2$ -iEESI-MS 的实验原理如图 1 所示。向  $0.2 \text{ g}$  大豆研磨粉中加入  $1 \text{ mL}$   $2\%$  ( $V/V$ ) TFA-甲醇萃取溶液进行浸泡,吸取  $0.5 \mu\text{L}$  浸泡后的溶液(上层清液)滴加至正三角形  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列前端,形成一层薄的液膜,液膜面积约占整体面积的  $10\%$ ,静置  $60 \text{ s}$ ,使制备的  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列对溶液中的磷脂进行吸附。然后用  $100 \mu\text{L}$   $2\%$  ( $V/V$ ) TFA-甲醇溶液对吸附了磷脂的  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列进行清洗,除去不能被

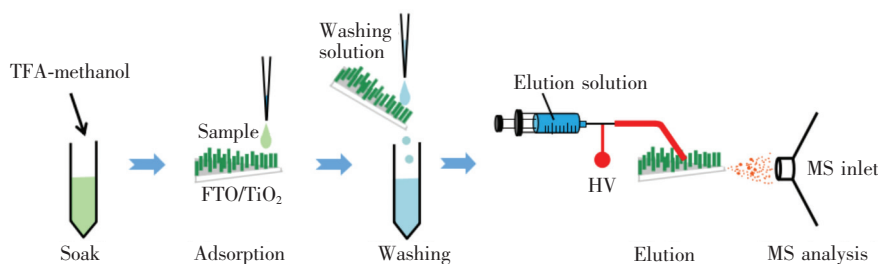


图 1 二氧化钛纳米线阵列富集与结合内部萃取电喷雾电离质谱联用( $\text{TiO}_2$ -iEESI-MS)实验原理示意图

Fig. 1 Schematic illustration of protocol of  $\text{TiO}_2$ -internal extractive electrospray ionization-mass spectrometry ( $\text{TiO}_2$ -iEESI-MS). TFA, trifluoroacetic acid; FTO, Fluorine-doped tin oxide.

吸附的杂质。最后, 将进样针与石英毛细管相连, 石英毛细管的另一端与吸附了磷脂的  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列上表面相接触, 吸附了磷脂的  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列尖端与质谱口的距离为 4 ~ 5 mm, 采用 1.5% (V/V) 氨水-甲醇溶液作为洗脱剂, 以 7  $\mu\text{L}/\text{min}$  的流速对  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列上吸附的磷脂进行洗脱, 使得磷脂与  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列得到分离, 重新溶解在洗脱溶液中。在进样针的钢针部位施加 5.5 kV 的正电压, 在电场的作用下, 含有磷脂的洗脱溶液向着质谱口的方向移动, 并在接近质谱口的  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列尖端形成电喷雾, 进入质谱仪进行分析, 单个样品的洗脱分析时间约为 20 s。大豆样品的总离子流图 (TIC) 和 3 种特征离子 ( $m/z$  782.57198,  $m/z$  758.57143,  $m/z$  740.52499) 的提取离子流图 (EIC) 如图 2 所示。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 $\text{TiO}_2$ 纳米线阵列的形貌分析

采用水热法制备的  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列结构的 SEM 图如图 3A 所示,  $\text{TiO}_2$  纳米线取向性好, 排列紧密。吸附大豆磷脂, 并用 100  $\mu\text{L}$  2% (V/V) TFA-甲醇溶液清洗杂质后, 获得  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列的扫描电镜图如图 3B 所示, 可以清晰地看到二氧化钛纳米线阵列的表面吸附了一层无定形态的物质, 由于强的吸附作用这些物质不会被 2% (V/V) TFA-甲醇溶液清洗掉。利用 1.5% (V/V) 氨水-甲醇溶液对吸附了磷脂的  $\text{TiO}_2$  纳米线表面进行洗脱后的 SEM 图如图 3C 所示, 无定形态的磷脂被洗脱, 纳米线的形貌轮廓清晰可见。根据 SEM 图结果并参考文献[3, 19, 20] 的研究结果, 可以判断制备的  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列能够对磷脂类物质进行吸附, 所选用的洗脱剂可以很好地洗脱磷脂。

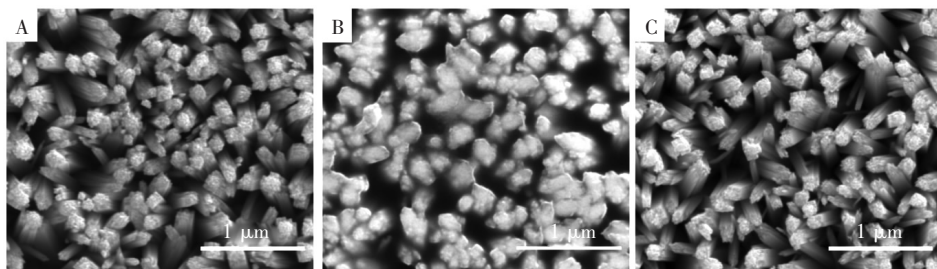


图 3  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列的扫描电镜图: (A)  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列、(B) 吸附了磷脂后的  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列和 (C) 洗脱后的  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列

Fig. 3 Scanning electron microscopy (SEM) image of (A)  $\text{TiO}_2$  nanowire array, (B)  $\text{TiO}_2$  nanowire array after adsorbing phospholipid and (C)  $\text{TiO}_2$  nanowire array after eluting

#### 3.2 实验条件的优化

利用黑龙江大豆作为实验样本, 考察了萃取液中 TFA 的比例、吸附时间、洗脱剂中氨水比例以及洗脱流速等条件对实验结果的影响。萃取液中加入 TFA 可以促进  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列对磷脂的吸附, 为了得到最佳的实验结果, 考察了萃取液中 TFA 与甲醇的体积比对实验结果的影响。控制吸附时间 1 min, 采用 1.5% (V/V) 氨水-甲醇的洗脱剂比例, 洗脱流速 7  $\mu\text{L}/\text{min}$  的条件下, 改变 TFA 在甲醇中的比例 (0%、1%、2%、3% 和 4%), 得到 3 种磷脂  $^1\text{PC}$  34:4 ( $m/z$  740.52499)、 $^d\text{PC}$  34:2 ( $m/z$  758.57143) 和  $^d\text{PC}$  36:4 ( $m/z$  782.57198) 的信号强度随 TFA-甲醇比例 (V/V) 变化的曲线, 如图 4A 所示。随着 TFA

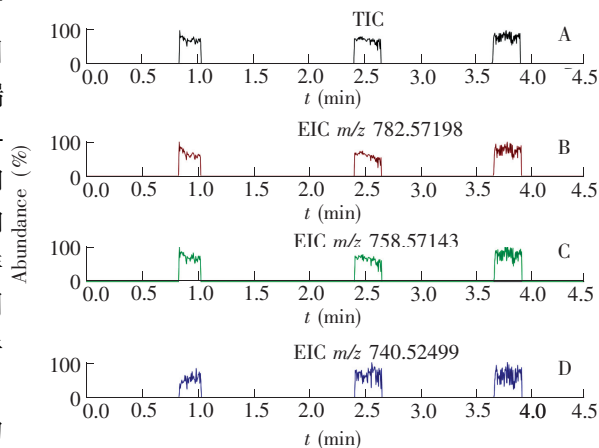


图 2  $\text{TiO}_2$ -iEESI-MS 分析大豆磷脂的总离子流色谱图 (TIC, A) 和提取离子流色谱图 (EIC, B ~ D)

Fig. 2 Typical total ion chromatogram (TIC, A) and extracted ion chromatogram (EIC, B - D) of phospholipids in soybean by  $\text{TiO}_2$ -iEESI-MS

比例的增加,信号强度逐渐增加,当 TFA 比例超过 2% 时,信号强度基本不再随 TFA 比例的增加而变化。原因是 TFA 比例的增加促进了  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列与磷脂的路易斯酸碱相互作用,从而增加了对磷脂的吸附量,在 2% 时吸附作用达到最大;当 TFA 比例超过 2% 后,磷脂的信号强度不再增加。因此选择最佳的 TFA-甲醇比例为 2%。

在萃取液为 2% (V/V) TFA-甲醇,采用 1.5% (V/V) 氨水-甲醇的洗脱剂比例,进样流速 7  $\mu\text{L}/\text{min}$  的条件下,改变不同的吸附时间(10、20、30、60、90、120、180 和 300 s),探究了吸附时间对磷脂信号强度的影响,结果如图 4B 所示。随着吸附时间的延长,磷脂的信号强度逐渐增强。因为  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列对磷脂的吸附需要一定的时间,时间越久,吸附量越大;当吸附时间超过 60 s 后,由于  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列对磷脂的吸附量达到饱和,故继续延长吸附时间,磷脂的信号强度不再增加。实验选择最佳的吸附时间为 60 s。

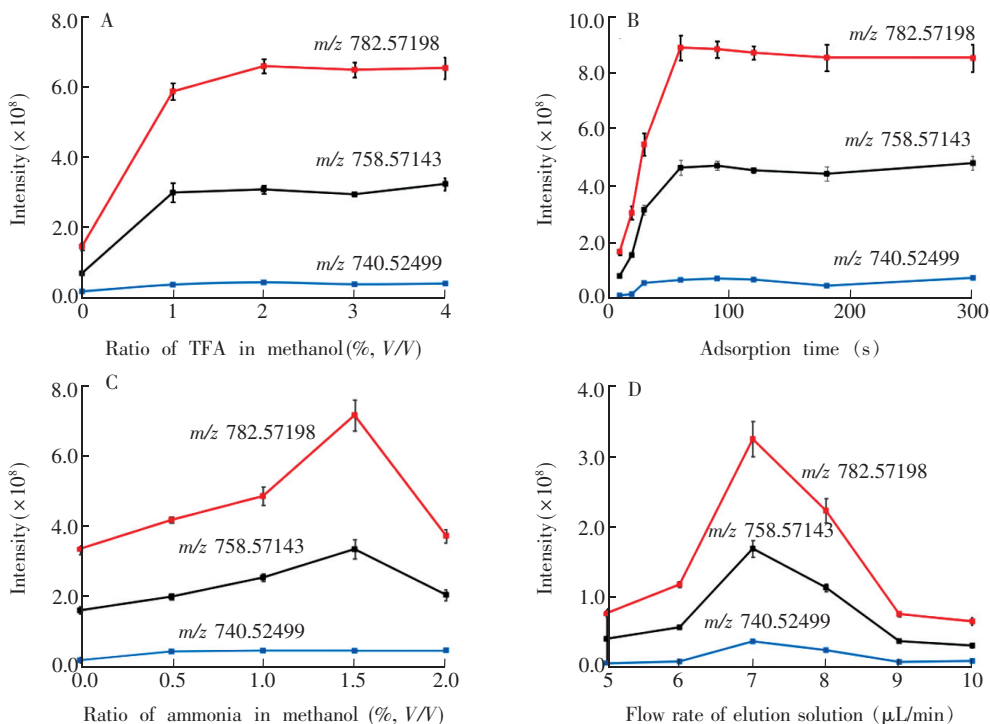


图 4  $\text{TiO}_2$ -iEESI-MS 实验条件的优化:(A) TFA-甲醇比例,(B) 吸附时间,(C) 氨水-甲醇比例,(D) 洗脱剂流速( $n=3$ , 误差棒表示两倍的标准偏差)

Fig. 4 Optimization of  $\text{TiO}_2$ -iEESI-MS experimental conditions: (A) Ratio of TFA in methanol, (B) Adsorption time, (C) Ratio of ammonia in methanol and (D) flow rate of elution ( $n=3$ , the error bar represents two times of standard deviation)

洗脱剂中加入氨水,可以促进磷脂类物质从  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列上洗脱,有利于后续质谱检测。在萃取液为 2% (V/V) TFA-甲醇、吸附时间 1 min、进样流速 7  $\mu\text{L}/\text{min}$  的条件下,考察了洗脱剂中不同的氨水比例(0%、0.5%、1%、1.5% 和 2%)对磷脂信号强度的影响。如图 4C 所示,随着氨水浓度的增加,磷脂的信号强度也逐渐增加;当氨水浓度超过 1.5% 之后,磷脂的信号强度会下降。这是因为氨水促进了磷脂的洗脱,但是氨水浓度太高,会对磷脂分子产生电离抑制,进而导致磷脂信号强度下降,故选择氨水在甲醇中的比例为 1.5%。

此外,还考察了洗脱剂的流速对磷脂信号强度的影响。在萃取液为 2% (V/V) TFA-甲醇、吸附时间 1 min、采用氨水-甲醇(1.5%, V/V) 为洗脱剂条件下,改变不同的洗脱流速(5、6、7、8、9 和 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ),得到磷脂的信号强度随流速的变化趋势(图 4D)。在 5~7  $\mu\text{L}/\text{min}$  范围内,磷脂的信号强度随着流速的增大而增大,这是由于流速增加促进了磷脂的洗脱;在 7~10  $\mu\text{L}/\text{min}$  范围内,磷脂的信号强度随着流速的增大而减小,原因是流速太大导致洗脱剂在接近质谱口的  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列尖端汇聚形成液滴,使得形成的电喷雾不够稳定,进而影响质谱的响应信号。因此,得到最佳的洗脱流速为 7  $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

### 3.3 大豆磷脂的定性分析

以黑龙江大豆为实验样本,在优化的实验条件下,分别采用 FTO 导电玻璃与  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列对大豆磷脂进行富集,然后进行 iEESI-MS 检测。选取质量扫描范围  $m/z$  700 ~ 900 的一级指纹谱图分别如图 5A 和 5B 所示。从图 5A 中可以看到  $m/z$  740.52499、 $m/z$  758.57143、 $m/z$  782.57198、 $m/z$  784.58548 等信号峰,信号强度较低,信噪比较差;从图 5B 中可以看到  $m/z$  740.52499、 $m/z$  754.53935、 $m/z$  758.57143、 $m/z$  760.57962、 $m/z$  782.57198、 $m/z$  784.58548、 $m/z$  786.60363 和  $m/z$  852.56023 等信号峰,信号强度较高,信噪比较好。对检测到的成分进行碰撞诱导解离 (CID) 实验,特征离子  $m/z$  758.57143、 $m/z$  782.57198 的二级质谱图如图 6 所示。 $m/z$  478 和  $m/z$  502 分别是质子化的准分子离子  $m/z$  758.57143  $[\text{M}+\text{H}]^+$  丢失亚油酸 (18:2, MF: 280.24) 和棕榈酸 (16:0, MF: 256.24) 得到的碎片 (图 6A);  $m/z$  502 是质子化的准分子离子  $m/z$  782.57198  $[\text{M}+\text{H}]^+$  丢失亚油酸 (18:2, MF: 280.24) 得到的特征碎片 (图 6B)。其它磷脂的高分辨数据及 CID 碎片信息列于表 1。经过高分辨数据和 CID 的结果分析,以及与文献 [25 ~ 27] 的对比,采用 FTO-iEESI-MS 共检测到 7 种磷脂酰胆碱 ( $^d\text{PC}$  34:4、 $^d\text{PC}$  34:3、 $^d\text{PC}$  34:2、 $^d\text{PC}$  36:5、 $^d\text{PC}$  36:4、 $^d\text{PC}$  36:3 和  $^d\text{PC}$  36:2);  $\text{TiO}_2$ -iEESI-MS 共检测到了 18 种磷脂酰胆碱 (表 1),结果表明,经过  $\text{TiO}_2$  表面修饰后的 FTO 导电玻璃对于大豆磷脂的富集效果较好,  $\text{TiO}_2$ -iEESI-MS 实验方法可以很好地用于大豆磷脂的检测。

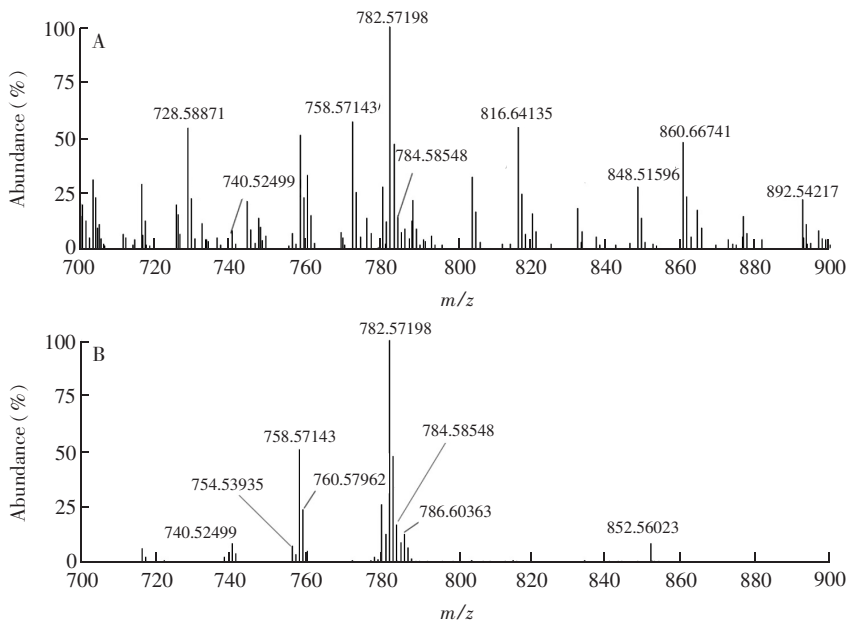


图 5 (A) FTO-iEESI-MS 和 (B)  $\text{TiO}_2$ -iEESI-MS 对黑龙江大豆磷脂检测的一级质谱图

Fig. 5 Mass spectra of phospholipid from Heilongjiang Province using (A) FTO-iEESI-MS and (B)  $\text{TiO}_2$ -iEESI-MS

### 3.4 大豆磷脂的定量分析

选取大豆磷脂酰胆碱 ( $^d\text{PC}$  34:2) 作为检测的标准物质进行定量分析。以 2% (V/V) TFA-甲醇为溶剂,配制一系列不同浓度 (0.1 ~ 1000  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) 的  $^d\text{PC}$  34:2 标准溶液,进行  $\text{TiO}_2$ -iEESI-MS 分析。以  $^d\text{PC}$  34:2 的特征碎片离子 ( $m/z$  502) 的信号强度为纵坐标,标准溶液浓度为横坐标,绘制工作曲线,得到线性回归方程为  $y = 2.8045x + 45.441$ ,相关系数  $R^2 = 0.9914$ 。以 3 倍的信噪比 ( $S/N$ ) 定义方法的检出限,得到本方法的检出限 (LOD) 为 0.01  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 3 次测量的相对标准偏差 (RSD) 为 1.6% ~ 6.5%。

向不含  $^d\text{PC}$  34:2 的 2% (V/V) TFA-甲醇溶液中加入 5、100 和 500  $\mu\text{g}/\text{L}$  的  $^d\text{PC}$  34:2,进行加标回收实验。每个样品平行测定 3 次,结果如表 2 所示,  $^d\text{PC}$  34:2 的回收率为 97.4% ~ 103.0%, RSD 为 4.4% ~ 5.3%,表明本方法的重现性良好,可以满足定量检测的需要。

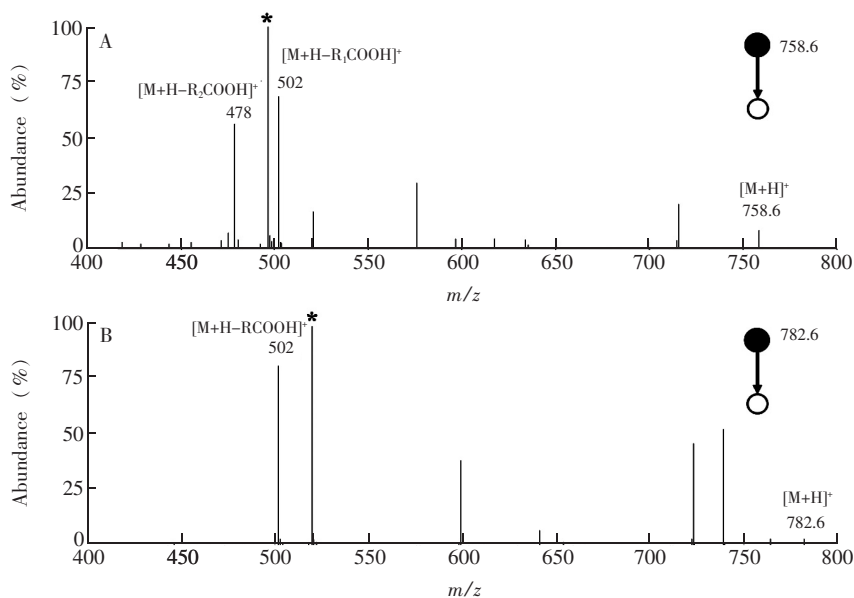


图 6 二级质谱图: (A)  $m/z$  758.6; (B)  $m/z$  782.6 (\* 表示背景离子)

Fig. 6 MS/MS spectra of (A)  $m/z$  758.6 and (B)  $m/z$  782.6 (\* represents background ion)

表 1 黑龙江大豆中检测到的磷脂种类

Table 1 Molecular species of phospholipids detected in soybean from Heilongjiang Province

分子种类 Molecular species	结构 Structure	碎片离子 Fragment	$[M+H]^+$ 计算值 Calculated	$[M+H]^+$ 实验值 Experimental	误差 Error (ppm)
<sup>a</sup> PC 34:4	16:1-18:3	486,462	740.52248	740.52499	3.39
<sup>a</sup> PC 34:3	16:1-18:2	488,462	742.53816	742.53996	2.42
<sup>a</sup> PC 34:2	16:1-18:1	490,462	744.55378	744.55587	2.81
<sup>d</sup> PC 34:4	16:1-18;3	500,476	754.53813	754.53935	1.62
<sup>d</sup> PC 34:3	16:0-18:3	500,478	756.55378	756.55584	2.72
<sup>d</sup> PC 34:2	16:0-18:2	502,478	758.56943	758.57143	2.64
<sup>d</sup> PC 34:1	16:0-18:1	504,478	760.58508	760.57962	-7.17
<sup>d</sup> PC 34:0	16:0-18:0	506,478	762.60073	762.59650	-5.55
<sup>d</sup> PC 36:6	18:3-18;3	500	778.53813	778.54059	3.16
<sup>d</sup> PC 36:5	18:2-18:3	500,502	780.55378	780.55581	2.60
<sup>d</sup> PC 36:4	18:2-18:2	502	782.56943	782.57198	3.26
<sup>d</sup> PC 36:3	18:1-18:2	502,504	784.58508	784.58548	0.51
<sup>d</sup> PC 36:2	18:0-18:2	502,506	786.60073	786.60363	3.69
<sup>d</sup> PC 36:1	18:0-18:1	504,506	788.61638	788.61081	-7.06
<sup>d</sup> PC 42:11	20:5-22:6	550,524	852.55378	852.56023	7.57
<sup>d</sup> PC 42:10	20:4-22:6	550,526	854.56943	854.56998	0.64
<sup>a</sup> PC 44:6	22:0-22:6	536,548	876.55378	876.55984	6.91
<sup>a</sup> PC 44:4	22:0-22:4	540,548	880.58508	880.59191	7.76

注:分子种类形式(<sup>a/d</sup>PC 34:4),“a”表示 Sn-1 位脂肪酸链与甘油结构以烷酰基键相连,“d”表示 Sn-1 位脂肪酸链与甘油结构以烯酰基键相连。“34”表示 Sn-1 位与 Sn-2 位总碳原子个数,“4”表示 Sn-1 位与 Sn-2 位总双键个数。结构表示形式(16:1-18:3),“16”和“18”分别表示 Sn-1 位与 Sn-2 位的总碳原子个数,“1”和“3”分别表示 Sn-1 位与 Sn-2 位的总双键个数。

Note: The form of molecular species (<sup>a/d</sup>PC 34:4), ‘a’ means the fatty acid chain at Sn-1 position is connected to the glycerol structure with alkylacyll bond, and ‘d’ means the fatty acid chain at Sn-1 position is context to the glycerol structure with diacyll bond. ‘34’ means the summed number of carbon atoms at both the sn-1 and sn-2 positions, and ‘4’ means the summed number of double bonds at both the Sn-1 and Sn-2 positions. The representation of structure (16:1-18:3), ‘16’ and ‘18’ means the summed number of carbon atoms at both the Sn-1 and Sn-2 positions, and ‘1’ and ‘3’ means the summed number of double bonds at both the Sn-1 and Sn-2 positions.

### 3.5 不同产地大豆的分析

不考虑品种的影响,选取了黑龙江、江苏、四川、山东和河南 5 个不同产地的大豆作为研究对象,分别进行 FTO-iEESI-MS 和 TiO<sub>2</sub>-iEESI-MS 分析。质量扫描范围  $m/z$  700 ~ 900 的一级指纹谱图如图 7 所

示,经 FTO-iEESI-MS 分析后获得的磷脂类物质的特征信号峰较少(7 种),信号强度较低,信噪比较差;经 TiO<sub>2</sub>-iEESI-MS 分析后获得的 5 种产地大豆中的磷脂类成分的特征信号峰较为丰富(18 种),信号强度较高,信噪比较强。将已鉴定出的 18 种磷脂类成分的绝对信号强度数据导入 matlab 软件(V9.0.0.341360)进行 PCA 分析,结果如图 8 所示。PCA 三维得分图的结果表明,5 种不同产地的大豆(黑龙江 34 例,江苏 22 例,四川 45 例,山东 34 例,河南 30 例)可以得到初步区分。黑龙江大豆、山东大豆和河南大豆的数据分布区域较为相近,可能的原因是这 3 个地区大豆的磷脂成分含量较为接近,致使 PCA 的区分效果不够明显;四川大豆、江苏大豆与这 3 种产地的大豆磷脂数据分布区域较远,可能的原因是磷脂的成分含量差别较大,使得 PCA 的区分效果也较为明显。本研究可以根

表 2 <sup>d</sup>PC 34:2 加标回收实验结果

Table 2 Recoveries for determination of <sup>d</sup>PC 34:2 in spiked samples

加标浓度 Spiked(μg/L)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD(%, n=5)
5	98.4	4.6
100	97.4	5.3
500	103.0	4.4

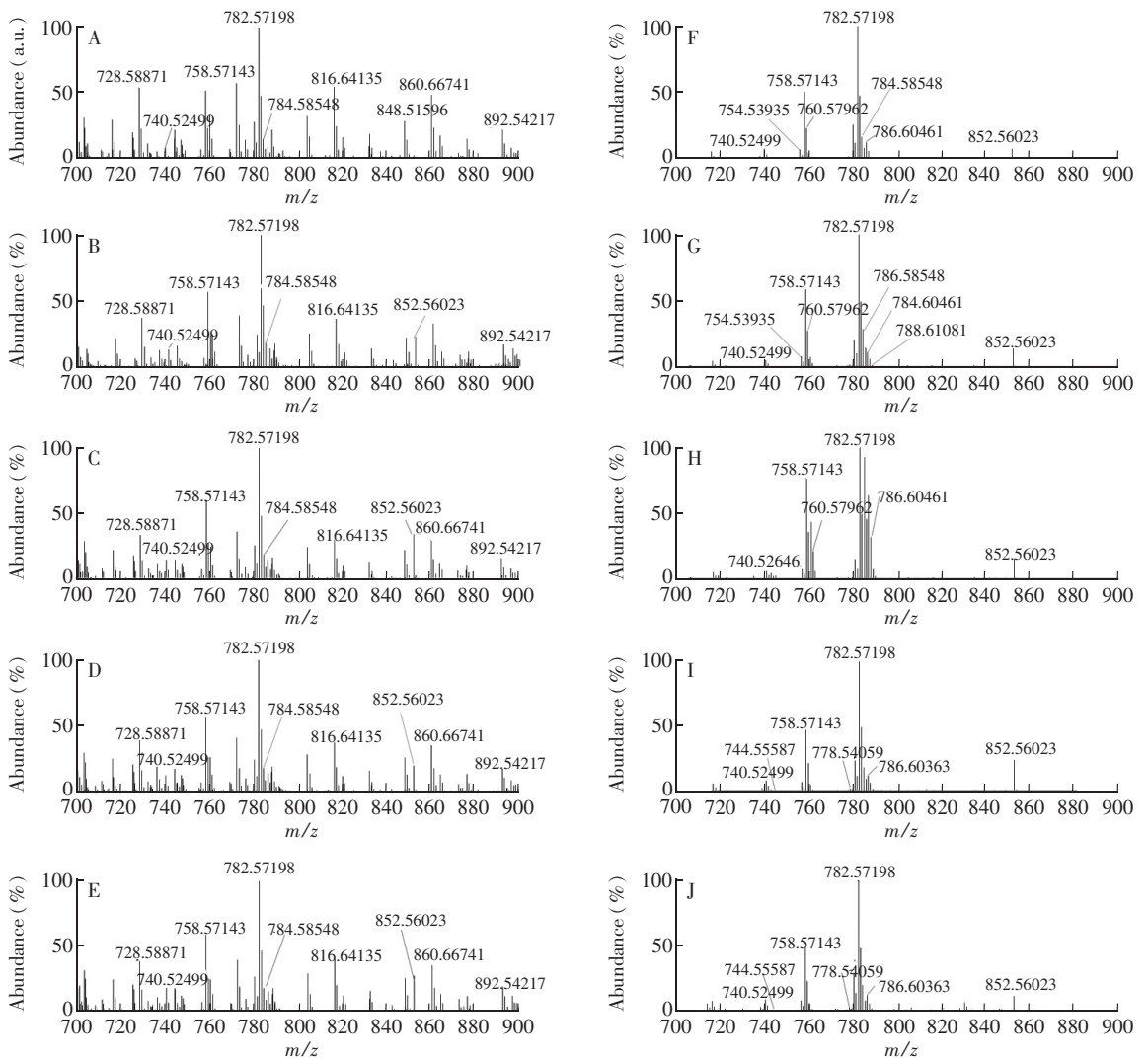


图 7 FTO-iEESI-MS (A ~ E) 和 TiO<sub>2</sub>-iEESI-MS (F ~ J) 对 5 种不同产地的大豆磷脂检测质谱图

(A,F) 黑龙江, (B,G) 江苏, (C,H) 四川, (D,I) 山东, (E,J) 河南

Fig. 7 MS spectra of phospholipids from five different regions using FTO-iEESI-MS (A-E) and TiO<sub>2</sub>-iEESI-MS (F-J)

(A,F) Heilongjiang, (B,G) Jiangsu, (C,H) Sichuan, (D,I) Shandong and (E,J) Henan.

据磷脂类物质的成分差异对 5 种产地的大豆进行初步区分,有望为大豆产地的鉴别提供一种新方法。

### 3.6 $\text{TiO}_2$ -iEESI-MS 应用于大豆油中磷脂的检测

大豆油是世界上产量最多的油脂,具有很高的营养价值。但是磷脂的存在会对其稳定性和风味产生很大影响,因此在大豆油加工工艺中会将其去除<sup>[28]</sup>。根据大豆油气味、色泽、透明度等质量品质的不同,我国将食用大豆油分为三个等级<sup>[29]</sup>:一级和二级大豆油无异味、色泽较浅;三级大豆油具有大豆固有的“豆腥味”,并且色泽较重。文献报道了磷脂等物质的残留是导致大豆油“豆腥味”<sup>[30]</sup>和色泽较重<sup>[31]</sup>的原因。本研究选取了市售一级大豆油、二级大豆油和三级大豆油作为样品,将  $\text{TiO}_2$ -iEESI-MS 应用于大豆油中磷脂的检测。首先向 1 mL 大豆油样品中加入 20  $\mu\text{L}$  三氟乙酸(TFA),充分混匀,然后吸取 0.5  $\mu\text{L}$  样品滴加到正三角形  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列上,静置 60 s,使大豆油中的磷脂被  $\text{TiO}_2$  纳米线吸附,接着用 100  $\mu\text{L}$  2% (V/V) TFA-乙酸乙酯溶液对吸附了磷脂的  $\text{TiO}_2$  纳米线阵列进行清洗,将不能被吸附的大豆油基质清洗干净。最后按照  $\text{TiO}_2$ -iEESI-MS 的实验方法对大豆油中的磷脂进行分析。质量扫描范围  $m/z$  700 ~ 1000 的一级指纹谱图如图 9 所示,在一级大豆油(图 9A)和二级大豆油(图 9B)中未检测到磷脂,在三级大豆油(图 9C)中检测到了

$^d\text{PC } 34:2$  ( $m/z$  758.57143)、 $^d\text{PC } 34:0$  ( $m/z$  762.59650)、 $^d\text{PC } 36:4$  ( $m/z$  782.57198)、 $^d\text{PC } 36:3$  ( $m/z$  784.58548)和 $^d\text{PC } 36:2$  ( $m/z$  786.60363)共 5 种磷脂类成分,证明了本方法在大豆油中痕量磷脂类物质检测中的可行性,有望为大豆油中磷脂的测定及大豆油品质筛查提供一种新的质谱分析方法。

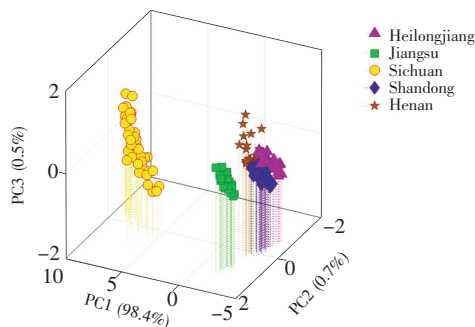


图 8 5 种不同产地大豆的 PCA 三维得分图

Fig. 8 3D plots of PCA score of the soybeans from five different regions

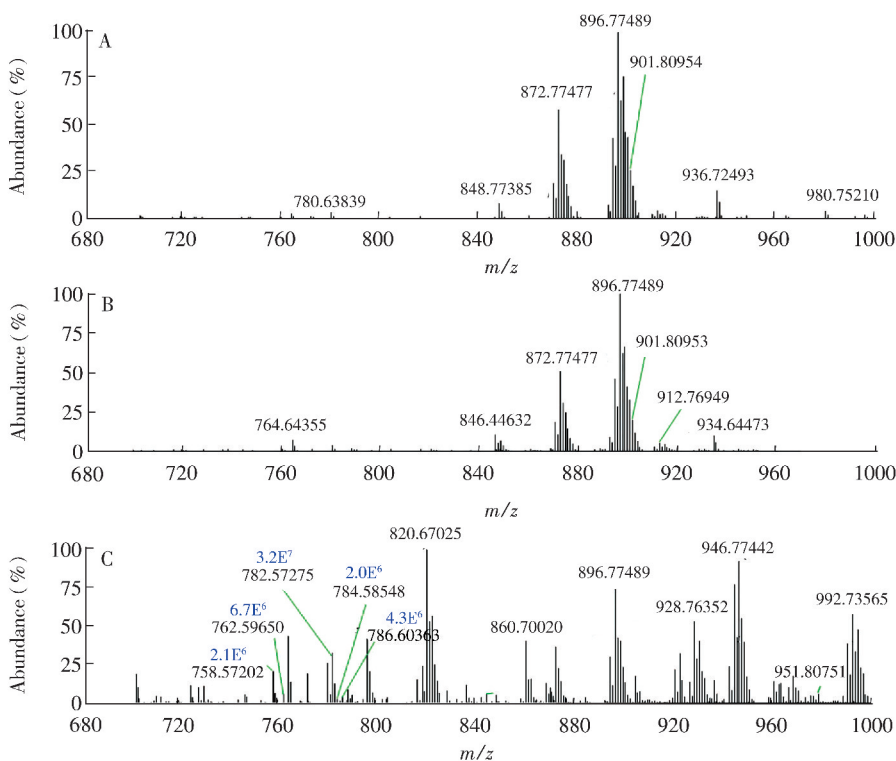


图 9  $\text{TiO}_2$ -iEESI-MS 对 3 种大豆油检测的质谱图: (A) 一级大豆油, (B) 二级大豆油, (C) 三级大豆油

Fig. 9 MS spectra of three kinds of soybean oils: (A) first grade soybean oil, (B) second grade soybean oil and (C) third grade soybean oil using  $\text{TiO}_2$ -iEESI-MS



## 4 结论

通过水热合成方法,在 FTO 导电玻璃基底上制备了 TiO<sub>2</sub> 纳米线阵列结构,并与内部萃取电喷雾电离质谱法(iEESI-MS)联用,实现了大豆中磷脂类物质的快速质谱分析。在优化的实验条件下,对原产自黑龙江、江苏、四川、山东和河南的大豆进行检测,并利用主成分分析(PCA)对数据结果进行初步地区分。在大豆磷脂的定量分析中具有较高的检测灵敏度和准确度。此外,还可用于对品质较差的大豆商品油进行快速准确筛查。本方法具有样品耗量少、分析速度快、操作简便等优势,实现了大豆中磷脂类物质的快速检测,有望为大豆中磷脂类物质的检测提供一种新方法。

## References

- 1 Wang H, Manicke N E, Yang Q, Zheng L, Shi R, Cooks R G, Ouyang Z. *Anal. Chem.*, **2011**, 83(4): 1197–1201
- 2 Lee S J, Choi J Y, Park S, Chung J I, Jin J S, Lee S J, Sung N J, Bae D W, Shin S C. *J. Food Compos. Anal.*, **2010**, 23(4): 314–318
- 3 Gonzalez A, Preinerstorfer B, Lindner W. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 396(8): 2965–2975
- 4 Pérez-Palacios T, Ruiz J, Antequera T. *Food Chem.*, **2007**, 102(3): 875–879
- 5 Peterson B L, Cummings B S. *Biomed. Chromatogr.*, **2006**, 20(3): 227–243
- 6 Wang C, Kong H, Guan Y. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(13): 4108–4116
- 7 Lisa M, Cifkova E, Holcapek M. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218(31): 5146–5156
- 8 Donato P, Micalizzi G, Oteri M, Rigano F, Sciarone D, Dugo P, Mondello L. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2018**, 410(14): 3297–3313
- 9 Al-Saad K A, Zabrouskov V, Siems W F, Knowles N R, Hannan R M, Hill H H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2001**, 12(15): 935–940
- 10 Paglia G, Ifa D R, Wu C, Corso G, Cooks R G. *Anal. Chem.*, **2010**, 82(5): 1744–1750
- 11 Zhang H, Gu H, Yan F, Wang N, Wei Y, Xu J, Chen H. *Sci. Rep.*, **2013**, 3(6148): 2495
- 12 Zhang H, Zhu L, Luo L, Wang N, Chingin K, Guo X, Chen H. *J. Agric. Food Chem.*, **2013**, 61(45): 10691–10698
- 13 KE Mu-Fang, HAN Jing, ZHU Teng-Gao, LIU Wen-Jie, ZHANG Hua, KOU Wei, LIANG Da-Peng. *Chem. J. Chinese Universities*, **2017**, 38(5): 738–742  
柯牡芳, 韩京, 朱腾高, 刘文杰, 张华, 寇伟, 梁大鹏. 高等学校化学学报, **2017**, 38(5): 738–742
- 14 LU Hai-Yan, ZHANG Jian-Yong, ZHOU Wei, WEI Yi-Ping, CHEN Huan-Wen. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2016**, 44(3): 329–334  
卢海艳, 张建勇, 周炜, 魏益平, 陈焕文. 分析化学, **2016**, 44(3): 329–334
- 15 Xu J, Xu S, Xiao Y, Chingin K, Lu H, Yan R, Chen H. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(21): 11252–11258
- 16 Kou W, Zhang H, Bibi A, Ke M, Han J, Xiong J, Su R, Liang D. *RSC Adv.*, **2018**, 8(31): 17293–17299
- 17 Song L, Xu J, Chingin K, Zhu T, Zhang Y, Tian Y, Chen H, Chen X. *J. Agric. Food Chem.*, **2017**, 65(32): 7006–7011
- 18 XIAO Yi-Po, LU Hai-Yan, LV Shao-Jun, XIE Shao-Xian, WANG Zhao-Zheng, CHEN Huan-Wen. *Chin. J. Anal. Chem.*, **2016**, 44(11): 1633–1638  
肖义坡, 卢海艳, 吕邵军, 谢少贤, 王兆征, 陈焕文. 分析化学, **2016**, 44(11): 1633–1638
- 19 Han G, Ye M, Zou H. *Analyst*, **2008**, 133(9): 1128–1138
- 20 Calvano C D, Jensen O N, Zamboni C G. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, 394(5): 1453–1461
- 21 Huang Y, Ma Y, Hu H, Guo P, Miao L, Yang Y, Zhang M. *RSC Adv.*, **2017**, 7(82): 52091–52100
- 22 Tavares L S, Carvalho T C, Romao W, Vaz B G, Chaves A R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2018**, 29(3): 566–572
- 23 Han F, Yang Y, Ouyang J, Na N. *Analyst*, **2015**, 140(3): 710–715
- 24 Liu B, Aydil E S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131(11): 3985–3990
- 25 Berdeaux O, Juaneda P, Martine L, Cabaret S, Bretillon L, Acar N. *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217(49): 7738–7748
- 26 Taguchi R, Hayakawa J, Takeuchi, Y, Ishida, M. *J. Mass Spectrom.*, **2000**, 8(35): 953–966
- 27 Pang L Q, Liang Q L, Wang Y M, Ping L, Luo G A. *J. Chromatogr. B*, **2008**, 869(1-2): 118–125

- 28 ZHU Sheng-Hui, BI Yan-Lan, FAN Lin-En, LIU Cui-Fang, MA Chuan-Guo, YANG Guo-Long, SUN Shang-De. *China Oils and Fats*, **2013**, 38(5): 16–19  
朱生辉, 毕艳兰, 范林恩, 刘翠芳, 马传国, 杨国龙, 孙尚德. *中国油脂*, **2013**, 38(5): 16–19
- 29 GB/T 1535-2017, Soybean oil. National Standards of the People's Republic of China  
大豆油. 中华人民共和国国家标准. GB/T 1535-2017
- 30 Endo Y, Endo H, Fujimoto K, Kaneda T. *J. Am. Oil Chem. Ind.*, **1991**, 68(10): 769–771
- 31 ZUO Qing, ZHANG Jia-Xin. *China Oils and Fats*, **2009**, 25(6): 79–81  
左青, 章家新. *中国油脂*, **2009**, 25(6): 79–81

## Determination of Phospholipids in Soybean by Titanium Dioxide Nanowires Array Enrichment Combined with Internal Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry

KOU Wei<sup>1</sup>, ZHANG Hua<sup>1</sup>, LU Hai-Yan<sup>1</sup>, ZHU Li-Xue<sup>1</sup>, LIU Ai-Ying<sup>1</sup>, HUANG Ke-Ke<sup>\*1</sup>, CHEN Huan-Wen<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup>(State Key Laboratory of Inorganic Synthesis and Preparative Chemistry, Jilin University, Changchun 130012, China)

<sup>2</sup>(Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation, East China Institute of Technology, Nanchang 330013, China)

**Abstract** Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanowires array prepared on the fluorine-doped tin oxide (FTO) substrate by the hydrothermal synthesis method was combined with internal extractive electrospray ionization mass spectrometry (iEESI-MS), allowing selective enrichment and direct analysis of the phospholipids from soybean. The experimental parameters including ratio of trifluoroacetic acid (TFA) in methanol, adsorption time, composition, and flow rate of eluent were investigated. The results showed that the optimal signal of phospholipids was obtained under the optimized conditions such as the extraction solution of 2% (V/V) TFA in methanol, adsorption time of 60 s, eluent of 1.5% (V/V) ammonia in methanol and flow rate of 7 μL/min. A total of 18 kinds of phospholipids were detected from the grinding soybean solution. Based on these components, the soybeans from Heilongjiang, Jiangsu, Sichuan, Shandong and Henan were preliminarily separated by principal component analysis (PCA). The limits of detection ( $S/N \geq 3$ ) were 0.01 μg/L and the relative standard deviations (RSDs,  $n=3$ ) were 1.6%–6.5%, showing high sensitivity in the quantitative analysis of phospholipids from soybean. Besides, accurate and rapid screening of the quality of commercial soybean oil was also achieved. This method was featured by less sample consumption, rapid analysis and simple operation, and could be used for direct and rapid detection of phospholipids in soybean.

**Keywords** Titanium dioxide nanowires array; Internal extractive electrospray ionization mass spectrometry; Phospholipids in soybean; Distinction of region

(Received 23 July 2018; accepted 28 September 2018)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21427802, 21605016, 21565004) and the Science and Technology Planning Project at the Ministry of Science and Technology of Jiangxi Province, China (No. 20171ACG70015).