

电喷雾萃取电离质谱法在土壤分析中的应用^①

潘素素¹, 赵娜², 丁健桦^{1*}, 陈焕文¹, 贾滨¹, 王姜¹

(1 东华理工大学江西省质谱科学与仪器重点实验室, 南昌 330013; 2 江西省测绘地理信息局, 南昌 330025)

摘要: 采用电喷雾萃取电离质谱法(EESI-MS), 对荒草、马尾松、木荷等 3 种根际土壤样品溶液进行了直接快速质谱分析, 区分了 3 种土壤中有有机物质组成的差异。该方法能够承受土壤样品中复杂基质的影响, 根据所得到的一级谱图可以发现 3 种土壤样品中化学组成的差异; 采用串联质谱(IT-MS)法, 则鉴定出马尾松根际土壤样品溶液中含有去氢枞酸, 而木荷根际土壤样品溶液中含有丁香醛和松脂素。

关键词: 电喷雾萃取电离质谱; 荒草; 马尾松; 木荷; 土壤分析

中图分类号: S151.9; O657.6

植物在生长过程中会向周围的环境(土壤与大气)释放一系列化学物质^[1-2], 并对与其相邻的植物或后茬植物产生有利或不利的影 响。人们把这种植物间相生相克的作用称为化感作用^[3]。此外, 植物分泌物还会影响周围微生物的生长活动^[4-5]。

植物的分泌物进入土壤的途径主要有淋洗、凋落物分解及根系分泌等。现已发现, 根系是植物分泌物进入环境的重要通道。目前, 根系分泌物的研究一般有两个步骤: 第一是根系分泌物的收集; 第二是根系分泌物的鉴定, 常规的根系分泌物的鉴定技术主要有气相色谱、高效液相色谱、气相色谱质谱联用以及核磁共振谱等^[6-7]。由于土壤中成分极其复杂, 且植物分泌物通过根系进入土壤的浓度比较低, 有时达不到常用分析仪器的检测限, 因此收集根系分泌物时需要通过萃取法、树脂法、层析法、分子膜及超滤等技术对其进行分离和浓缩, 过程复杂且费时费力。新兴直接离子化质谱技术(如电喷雾萃取电离质谱, EESI-MS)能够耐受复杂基质的干扰, 可以对复杂基质样品(如土壤样品溶液等)进行无需样品预处理的快速、实时和在线的直接分析^[8-10], 且具有灵敏度高、特异性好等特点^[8,11-15]。本文即采用 EESI-MS 技术对荒草、马尾松、木荷的 3 种土壤样品溶液进行直接分析, 找出了 3 种土壤样品化学组成的差异, 并鉴定了荒草、马尾松和木荷土壤中可能存在的一些特有化合物。

1 实验部分

1.1 土壤采集和处理方法

荒草地土壤、20 年生马尾松根际土壤和 20 年生木荷根际土壤于 2010 年 4 月采自江西鹰潭中国科学院红壤生态实验站(116°55' E, 28°15' N)长期试验区, 采样深度均为 0 ~ 20 cm。土壤均为典型红黏土发育的红壤(普通简润富铁土), 采集的新鲜土壤样品去除肉眼可见根系、砾石外, 放入冰箱 0~4℃ 保存, 1 周内浸提检测。

称取 5 g 土壤样品, 加入甲醇/水(1:1, v/v) 溶液 20 ml, 浸泡 5 min, 超声波处理 5 min 后, 冷却, 过滤。滤渣再分别加入 20 ml 甲醇/水(1:1, v/v) 溶液浸泡 5 min, 超声波处理 5 min 后, 冷却, 过滤, 合并滤液, 即得土壤样品溶液, 冷冻保存, 备用。

1.2 仪器与试剂

LTQ XL 离子阱质谱仪(美国 Finnigan 公司); EESI 电离源^[9-16](本实验室自行研制, 其结构和原理如图 1 所示); Xcalibur 数据处理系统(美国 Finnigan 公司); 超声波清洗器(KQ3200B, 昆山超声仪器有限公司)。

甲醇(色谱纯, Burdick&Jackson, SK Chemical, Ulsan, Korea); 冰乙酸(分析纯, 上海试剂化学有限公司)。

基金项目: 科技部国际科技合作项目(2009DFA41880)、中国科学院知识创新工程重要方向性项目(KZCX2-YW-438)和江西省自然科学基金项目(2010GZH0002)资助。

* 通讯作者(dingjianh2004@126.com)

作者简介: 潘素素(1987—), 女, 江西永新人, 硕士研究生, 主要从事有机质谱分析。E-mail: pansusu0611@163.com

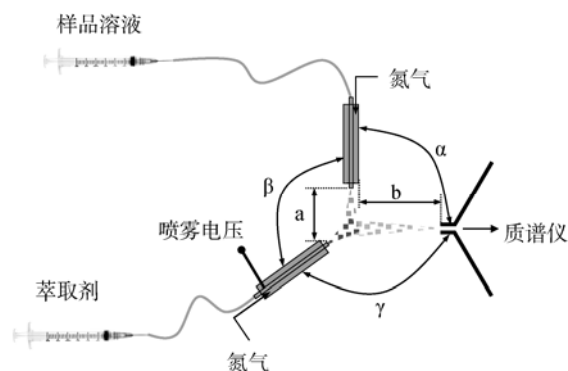


图 1 EESI 源的原理简图

Fig. 1 Schematic diagram of EESI source

1.3 质谱条件与分析方法

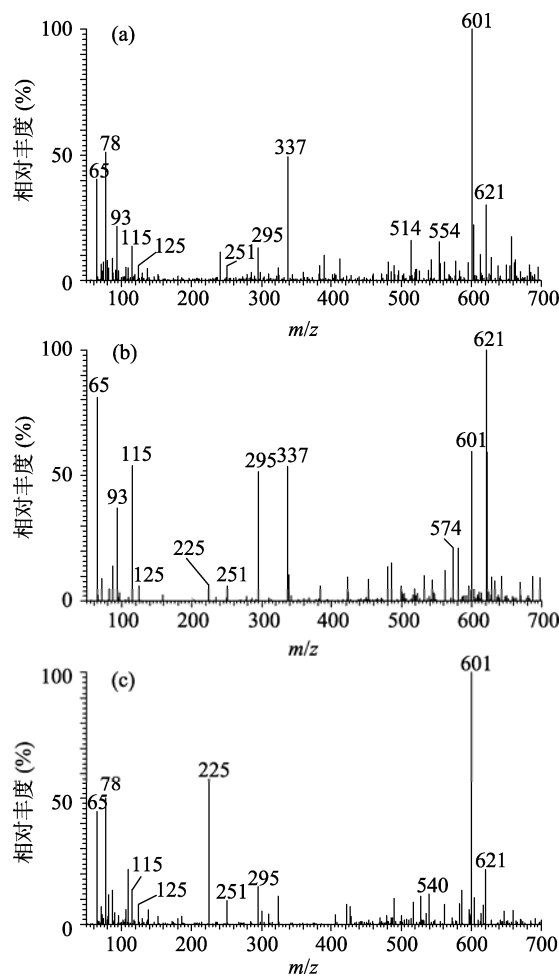
设置 LTQ-MS 为正(负)离子检测模式, 质谱扫描范围为核质比(m/z)50~700; 喷雾电压为 3.5 kV; 毛细管温度为 180℃; 萃取剂为甲醇/乙酸的混合溶液(4:1, v/v); 喷雾气(N_2)压力为 1.4 MPa; 溶剂和样品溶液流速均为 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。在进行串联质谱分析时, 母离子的隔离宽度为 1.0 Da, 碰撞时间为 30 ms, 碰撞能量为 10% ~ 25%。图 1 中角度 α 、 β 和 γ 分别为 90°、120°和 150°, 距离 a 和 b 分别是 1~2 mm 和 5 mm。其他参数由 LTQ-MS 系统自动优化。

2 结果与讨论

2.1 土壤样品溶液的 EESI-MS 谱图

土壤成分复杂, 承接了植物根系分泌物、脱落物, 以及微生物分泌物等。马尾松、木荷会向土壤分泌一些有机物, 从而改变土壤的化学组成。这些分泌物主要是酚、羧酸、醇、烯烃、醛、酮等化合物。可能是由于烯烃沸点比较低, 进入土壤的含量极少, 且本实验条件需要加热加电, 并没有得到相关烯烃的信号。

本研究在正(负)离子模式下对荒草、马尾松及木荷根际土壤样品溶液进行了 EESI-MS 直接分析, 获得了相应的质谱图(图 2 和图 3)。如图 2 所示, 3 种土壤样品溶液在正离子模式下的质谱图比较相似, 如都含有 m/z 65、115、125、251、295、601 和 621 等离子峰。但是 3 种土壤样品在负离子模式下的质谱图有明显差异(图 3), 比如马尾松土壤样品溶液中有较明显的 m/z 299、301、314 和 394 等离子峰, 而木荷土壤样品溶液中则有较明显的 m/z 181、357、397 和 425 等离子峰。这可能是因为在正离子模式下, 马尾松和木荷林土壤中部分物质(如酚、羧酸等)比较难质子化, 难以检测出信号峰, 并且 3 种土壤样品溶液中能在正离子模式下检测出信号的物质比较接近, 所以



(a: 荒草地土壤; b: 马尾松土壤; c: 木荷土壤)

图 2 正离子模式下 3 种根际土壤样品溶液的 EESI-MS 质谱图

Fig. 2 EESI-MS spectra of extracts from rhizosphere soil samples, recorded in positive ion detection mode

3 种土壤样品溶液的一级质谱图比较相似; 在负离子模式下, 可以检测出比较容易去质子化的物质(如酚、羧酸等), 从一级谱图(图 3)中得到的信息更加丰富, 从而显示了 3 种土壤样品化学组成的差异。

2.2 土壤样品溶液化学成分串联质谱分析

负离子模式下, 采用 EESI-MS 检测木荷和马尾松根际土壤样品溶液, 在一级质谱(图 3)中观测到了多种可能的化学成份的去质子化分子离子峰 $[M-H]^-$, 如去氢枞酸、丁香醛、松脂素等。本研究采用串联质谱方法对这些成分进行了分析鉴定。

图 4 为木荷根际土壤样品溶液中丁香醛(MW182)和松脂素(MW358)的二级谱图。从丁香醛的二级谱图(图 4a)中观察到有 m/z 166、153 和 149 碎片峰, 分别是母离子丢失 CH_3 、 CO 和 CH_3OH 得到, 这与文献[17]中报道的碎裂方式是一致的。但是由于本研究

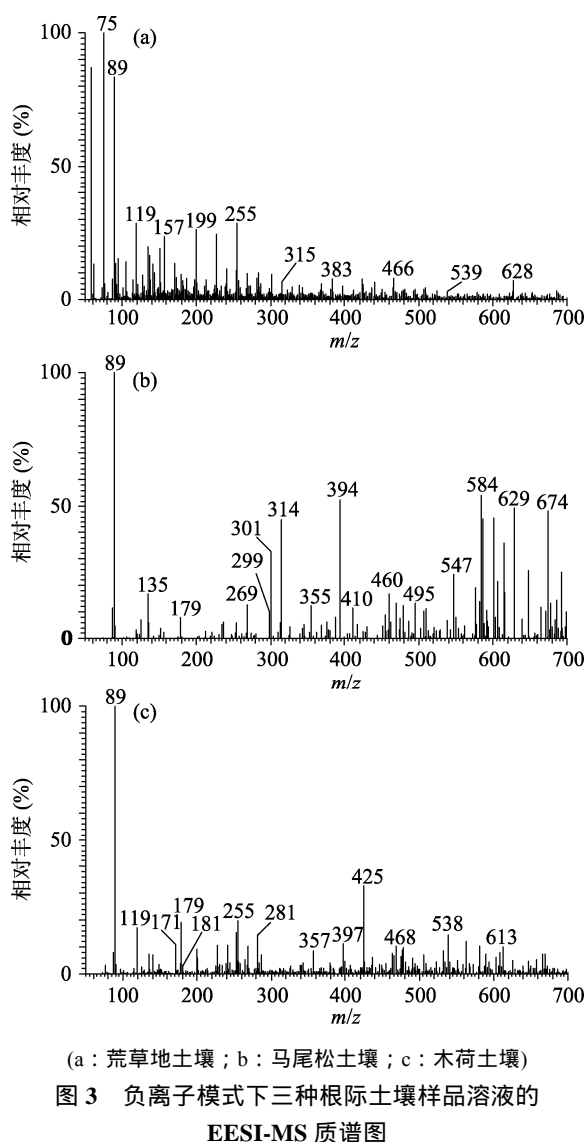


Fig. 3 EESI-MS spectra of extracts from rhizosphere soil samples, recorded in negative ion detection mode

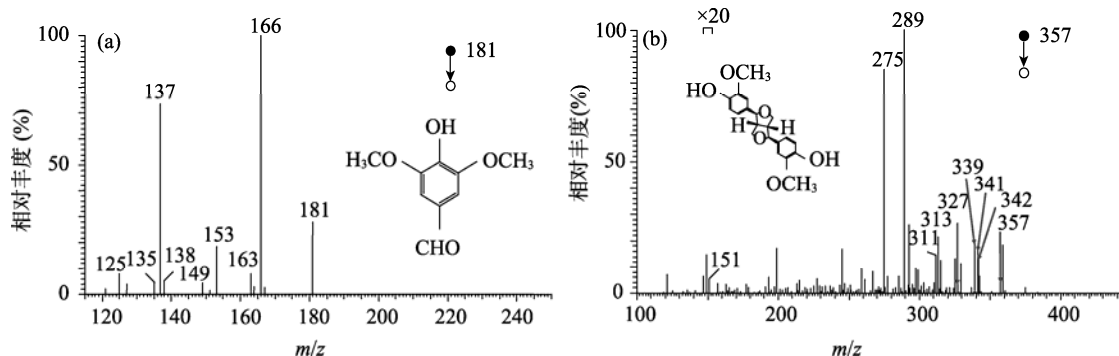


Fig. 4 MS/MS spectra of syringaldehyde (a) and pinosresinol (b) detected in rhizosphere soil samples in which *Schima superba* Gardn. et. Champ. were growing

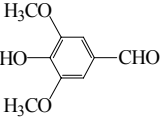
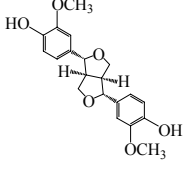
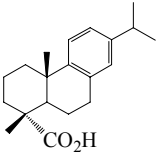
采用的离子源与文献[17](采用化学电离源)不一样, 所得的碎片也存在差异, 如文献[17]得到的基峰是丢失 CO 的离子峰, 但本研究得到的基峰是母离子丢失 CH₃ 的离子峰 m/z 166。丁香醛的以上碎片离子和其他碎片离子(如 m/z 125、135、137、138 和 163 等)的相对丰度和丢失的碎片信息见表 1; 丁香醛的二级谱图(图 4a)中其他的一些碎片峰则可能是来自土壤中所含的杂质。

图 4b 为木荷根际土壤样品溶液中松脂素(MW358)的二级谱图, 母离子可丢失 CH₃ 得到碎片 m/z 342; 母离子的四氢呋喃环上丢失 CH₂O 得到碎片 m/z 327; 母离子同时丢失苯环上的 CH₃ 和 CH₂OH 得到碎片 m/z 311, 这些与文献[18]中报道的结果一致。并且正如文献[18-19]报道, 由于松脂素结构中四氢呋喃环的裂解, 会获得碎片离子 m/z 151, 但是相对丰度比较低(仅约为 5%, 图 4b 中 m/z 151 离子峰局部放大 20 倍)。此外, 本研究采用 EESI 源得到的其他主要碎片离子有 m/z 341、339、313、289 和 275 等, 表 1 列出了这些主要碎片离子的断裂方式。其他丰度较低的碎片峰可能来自土壤中的杂质。

马尾松根际土壤样品溶液中去氢枞酸(MW300)的二级谱图如图 5 所示, 主要碎片离子有 m/z 237、253、255 和 281, 其中 m/z 237 是母离子同时丢失 HCOOH 和 CH₄ 后获得的碎片离子, 与文献[20]采用 EI-MS 对去氢枞酸进行分析时丢失 CH₃ 和 HCOOH 的裂解方式相似; 去氢枞酸得到的主要碎片峰还有 m/z 253、255 和 281, 分别由母离子丢失 HCOOH、CO₂ 和 H₂O 得到。其他丰度较低的碎片峰可能来自土壤中其他微量物质。

表 1 木荷和马尾松根际土壤样品中部分化学成分的串联质谱分析

Table 1 Principal fragments produced by CID experiments on $[M-H]^-$ ions of partial components in rhizosphere soil samples in which *Schima superba* Gardn et. Champ. and *Pinus massoniana* were growing respectively

土壤样品	化合物	分子式	结构式	MW	$[M-H]^-$	主要产物离子 m/z 和相对丰度	丢失的碎片
木荷根际土壤	丁香醛	$C_9H_{10}O_4$		182	181	166 ^[17] (100%) 163 (8%) 153 ^[17] (19%) 149 ^[17] (5%) 138 (5%) 137 (74%) 135 (5%) 125 (8%)	CH ₃ H ₂ O CO CH ₃ OH CO + CH ₃ CO + CH ₄ CO + H ₂ O
	松脂素	$C_{20}H_{22}O_6$		358	357	342 ^[18] (11%) 341 (15%) 339 (18%) 327 ^[18] (5%) 313 (22%) 311 ^[18] (15%) 289 (100%) 275 (86%) 151 ^[19] (5%) 281 (14%) 253 (100%) 237 ^[20] (7%)	2CO CH ₃ CH ₄ H ₂ O CH ₂ O CO + CH ₄ CH ₃ + CH ₂ OH 2H ₂ O + CH ₃ OH H ₂ O + 2CH ₃ OH C ₁₂ H ₁₄ O ₃ H ₂ O
马尾松根际土壤	去氢枞酸	$C_{20}H_{28}O_2$		300	299	281 (14%) 253 (100%) 237 ^[20] (7%)	HCOOH HCOOH + CH ₄

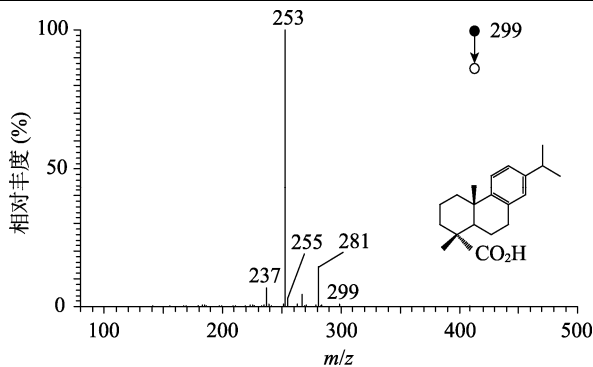


图 5 马尾松根际土壤样品中去氢枞酸的二级谱图

Fig. 5 MS/MS spectrum of Dehydroabietic acid detected in the rhizosphere soil sample in which *Pinus massoniana* were growing

表 1 列出了木荷和马尾松土壤样品中所检测出的 3 种化合物的结构、主要碎片离子及丢失的碎片等信息。根据相关文献,丁香醛和松脂素存在于木荷茎中^[21-22],去氢枞酸则是马尾松松香的组成成分之一^[23]。而采用本法在木荷林根际土壤中检测到丁香醛和松脂素,在荒草地土壤和马尾松林根际土壤无丁香醛和松脂素存在,证明了丁香醛和松脂素可能是木荷根际土壤中的特有化合物,可能来自木荷生长过程中的分泌物或凋落物分解;在马尾松林根际土壤中检测到去氢枞酸,在荒草地和木荷林土壤中均无去氢枞酸存在,则说明去氢枞酸可能是马尾松林土壤中的特有化合物,可能来自马尾松生长过程中的分泌物或凋落物分解。可见,EESI-IT-MS 可用于鉴定不同利用

方式下土壤中特有的化合物。

3 结论

本文采用 EESI-MS 技术对荒草、马尾松及木荷根际土壤样品进行了快速分析,得到了 m/z 50 ~ 700 范围内的质谱图,并对木荷中的丁香醛、松脂素和马尾松中的去氢枞酸进行了多级质谱分析。结果显示,EESI-MS 不但可以快速获得土壤样品的一级谱图,而且结合串联质谱技术能够有效地检测出不同利用方式下土壤特有化合物;这些特有化合物也同时存在于相应的植株体,它们可能通过植物分泌或凋落物分解而进入土壤。

参考文献:

- [1] Rovira AD. Plant Root Exudates[J]. Botanical Review, 1969, 35(1): 35-57
- [2] 王占义, 潘宁, 罗茜, 沈宏. 一种新型根系分泌物收集装置与收集方法的介绍[J]. 土壤学报, 2010, 47(4): 747-752
- [3] Rice EL. Allelopathy-an overview[J]. American Chemical Society, 1987: 8-22
- [4] Shi SJ, Richardson AE, O' Callaghan M, DeAngelis KM, Jones EE, Stewart A, Firestone MK, Condon LM. Effects of selected root exudate components on soil bacterial communities[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 77(3): 600-610
- [5] Schroth MN, Hildebrand DC. Influence of plant exudates on root-infecting fungi[J]. Annual Review of Phytopathology, 1964, 2: 101-132

- [6] 孔垂华, 徐效华. 有机物的分离和结构鉴定[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003
- [7] 梁文举, 张晓珂, 姜勇, 孔垂华. 根分泌的化感物质及其对土壤生物产生的影响[J]. 地球科学进展, 2005, 20(3): 330–337
- [8] 丁健桦, 王兴祥, 张慧, 潘素素, 罗明标, 李建强, 陈焕文. 芹菜素的电喷雾萃取电离串联质谱[J]. 高等学校化学学报, 2011, 32(8): 1 714–1 719
- [9] Chen HW, Venter A, Cooks RG. Extractive electrospray ionization for direct analysis of undiluted urine, milk and other complex mixtures without sample preparation[J]. Chemical Communications, 2006, 19: 2 042–2 044
- [10] Zhu L, Hu Z, Gamez G, Law WS, Chen HW, Yang SP, Chingin K, Balabin RM, Wang R, Zhang TT, Zenobi R. Simultaneous sampling of volatile and non-volatile analytes in beer for fast fingerprinting by extractive electrospray ionization mass spectrometry[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 398(1): 405–413
- [11] Li X, Hu B, Ding JH, Chen HW. Rapid characterization of complex viscous samples at molecular levels by neutral desorption extractive electrospray ionization mass spectrometry[J]. Nature Protocols, 2011, 6(7): 1 010–1 025
- [12] Chen HW, Zenobi R. Neutral desorption sampling of biological surfaces for rapid chemical characterization by extractive electrospray ionization mass spectrometry[J]. Nature Protocols, 2008, 3(9): 1 467–1 475
- [13] Chen HW, Yang SP, Li M, Hu B, Li JQ, Wang J. Sensitive detection of native proteins using extractive electrospray ionization mass spectrometry[J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2010, 49(17): 3 053–3 056
- [14] Law WS, Chen HW, Ding JH, Yang SP, Zhu L, Gamez G, Chingin K, Ren YL, Zenobi R. Rapid characterization of complex viscous liquids at the molecular level[J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2009, 48(44): 8 277–8 280
- [15] Chen HW, Wortmann A, Zhang WH, Zenobi R. Rapid *in vivo* fingerprinting of nonvolatile compounds in breath by extractive electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2007, 46(4): 580–583
- [16] 丁健桦, 杨水平, 刘清, 吴转璋, 陈焕文, 任玉林, 郑健, 刘清珺. 电喷雾萃取电离质谱快速测定牙膏胶体中的二甘醇[J]. 高等学校化学学报, 2009, 30(8): 1 533–1 537
- [17] Flamini R, Vedova AD, Cancian D, Panighel A, De Rosso M. GC/MS-positive ion chemical ionization and MS/MS study of volatile benzene compounds in five different woods used in barrel making[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2007, 42(5): 641–646
- [18] Guo H, Liu AH, Ye M, Yang M, Guo DA. Characterization of phenolic compounds in the fruits of *Forsythia suspensa* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007, 21(5): 715–729
- [19] Ye M, Yan YN, Guo DA. Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug Tu-Si-Zi by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005, 19(11): 1 469–1 484
- [20] Regert M, Rolando C. Identification of archaeological adhesives using direct inlet electron ionization mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2002, 74(5): 965–975
- [21] 徐文, 周光雄, 戴毅. 木荷茎的化学成分研究[J]. 中草药, 2010, 41(6): 863–866
- [22] 徐文, 周光雄, 姚新生. 木荷茎中木脂素类化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(6): 945–948
- [23] 王振洪, 宋湛谦, 商士斌, 叶伯蕙. 气相色谱用马尾松松香标准样品的定值[J]. 生物质化学工程, 2009, 43(4): 9–14

Application of Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry in Soil Analysis

PAN Su-su¹, ZHAO Na², DING Jian-hua^{1*}, CHEN Huan-wen¹, JIA Bin¹, WANG Jiang¹

(1 Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation, East China Institute of Technology, Nanchang 330013, China; 2 Jiangxi Bureau of Surveying and Mapping, Nanchang 330025, China)

Abstract: A method based on extractive electrospray ionization mass spectrometry (EESI-MS) was developed to obtain the mass spectra of three types of soil samples with minimal sample pre-treatment. EESI could tolerate the complex matrices of soil sample solutions and readily generate mass spectra without sample cleaning. The mass spectra clearly demonstrated the differences of organics among three types of soil samples. Dehydroabietic acid and the combination of syringaldehyde and pinoresinol were detected in extracts of *Pinus massoniana* and *Schima superba* Gardn et. Champ. respectively by extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry (EESI-MS/MS).

Key words: Extractive electrospray ionization mass spectrometry (EESI-MS), Grass, *Pinus massoniana*, *Schima superba* Gardn et. Champ., Soil analysis