

## 爆炸条件下溶菌酶反应产物的基质辅助激光解吸-飞行时间质谱分析

刘素红<sup>a</sup> 夏攀<sup>b</sup> 张成功<sup>\*,b</sup> 张立<sup>\*,a</sup> 郭寅龙<sup>a</sup><sup>a</sup>中国科学院上海有机化学研究所上海质谱中心 上海 200032)<sup>b</sup>上海市现场物证重点实验室 上海 200042)

**摘要** 以爆炸条件下溶菌酶的反应产物为研究对象,运用基质辅助激光解吸-飞行时间质谱的方法研究其反应产物与不同炸药的反应特征性。结果显示,雷管的使用不会对溶菌酶有影响,而在有爆炸物爆炸的条件下,除了正常溶菌酶酶解多肽信号外,一些[MH+17]<sup>+</sup>, [MH+18]<sup>+</sup>, [MH+28]<sup>+</sup>, [MH+32]<sup>+</sup>和[MH+44]<sup>+</sup>的加合峰信号也能被检测到。这可能是在炸药爆炸过程中产生的一些活性小分子(如 NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, CO/N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>)与溶菌酶发生反应得到的反应产物。不同炸药生成的活性小分子能够分别与溶菌酶的某些反应位点反应生成特征性的反应产物,有利于这些炸药的分析与检测。

**关键词** 爆炸物; 基质辅助激光解吸-飞行时间质谱; 梯恩梯(TNT); 黑索今(RDX); 太恩(PETN); 黑火药; 烟火药; 硝酸铵

## Analysis of Reaction Products of Lysozyme under the Explosion Condition by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry

Liu, Suhong<sup>a</sup> Xia, Pan<sup>b</sup> Zhang, Chenggong<sup>\*,b</sup> Zhang, Li<sup>\*,a</sup> Guo, Yinlong<sup>a</sup><sup>a</sup> Shanghai Mass Spectrometry Center, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)<sup>b</sup> Shanghai Institute of Forensic Science, Shanghai 200042)

**Abstract** Identification and determination of explosives and explosive residues were a subject of continuing strong interest in analytical chemistry and forensic science. In this paper, the reaction products of lysozyme under the explosion condition were analyzed by a MALDI-TOFMS (Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) method. There was no difference in the tryptic digest between the normal lysozyme and the reaction products generated by detonator, while some adduct peaks such as [MH+17]<sup>+</sup>, [MH+18]<sup>+</sup>, [MH+28]<sup>+</sup>, [MH+32]<sup>+</sup>, and [MH+44]<sup>+</sup> were discovered in the explosives. This may be attributed to the reaction between the lysozyme and the active small molecule gases such as NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, CO/N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, which were generated during the explosion. Characteristic peaks which were produced by lysozyme and the active small molecule gases from different explosives can be used to discriminate the six explosives. For example, H<sub>2</sub>O molecules which were generated during the exploration by tri-nitrotoluene (TNT) can specifically react with VFGRCE-LAAAMKRHGLDNYR (*m/z* 2307) to produce a characteristic peak at *m/z* 2325 (2307+18). Also, H<sub>2</sub>O molecules which were generated by hexahydro-1,3,5-trinitroazine (RDX) can completely react with IVSDGNGMNAWVAVRNRCK (*m/z* 2177) to produce a characteristic peak at *m/z* (2177+18). Characteristic peak at *m/z* 1301 was produced by GYSLGNWVCAAK (*m/z* 1269) and O<sub>2</sub> molecules for the identification of pentaerythritol tetranitrate (PETN). While for black powder, O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O can both react with IVSDGNGMNAWVAVR (*m/z* 1676) to produce product ions peaks at *m/z* 1694 and 1708. However, only the O<sub>2</sub> molecules can react with IVSDGNGMNAWVAVR for pyrotechnic composition. As for ammon explosive, which is a mixture of inorganic explosives and organic explosives, CO<sub>2</sub> molecules can react with a plurality of reaction sites of lysozyme to produce a series of characteristic peaks signals such as *m/z* 1313 (1269+44), 1720 (1676+44), 1848 (1804+44), 2722 (2678+44).

\* E-mail: zhangli7488@sioc.ac.cn

Received April 15, 2014; accepted May 26, 2014; published online June 11, 2014.

Project supported by the Open Project of Shanghai Institute of Forensic Science (No. 2012XCWZK07) and the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21202192, 21275155).

上海市现场物证重点实验室开放课题(No. 2012XCWZK07)及国家自然科学基金(Nos. 21202192, 21275155)资助项目.

**Keywords** explosive; MALDI-TOFMS; TNT; RDX; PETN; black powder; pyrotechnic composition; ammon explosive

炸残留物进行定性定量分析, 对于快速确认炸药种类、确定爆炸装置, 为侦破爆炸案件提供线索和证据具有重要意义. 针对爆炸残留物的分析检验, 近年来出现了多种检测手段的分析方法, 如高效液相色谱质谱联用<sup>[1-4]</sup>、气相色谱质谱联用<sup>[5-7]</sup>、二维气相色谱<sup>[8]</sup>、毛细管电泳<sup>[9,10]</sup>、离子色谱<sup>[11-15]</sup>、实时直接分析质谱<sup>[16,17]</sup>等方法, 但由于爆炸残留物具有不稳定性, 容易分解, 含量低的特点, 对于分析方法不断提出新的挑战. 在以前的研究中都是直接针对爆炸物或爆炸残留物进行分析, 本研究提出了将爆炸物与生物组织的反应产物作为研究对象, 研究其与不同炸药的反应特征性, 有望提供现有技术无法发现的爆炸物信息, 开辟爆炸残留物检测的新领域.

相比于爆炸残留物不稳定性, 容易分解, 含量低的特点, 蛋白类证物的分析具有易发现、易收集的特点, 因此将爆炸物与生物组织的反应产物作为研究对象将有助于开拓爆炸物分析的新领域. 基质辅助激光解吸(MALDI)是一种软电离质谱离子化方式. 与其它离子化方式相比, MALDI 具有耐较高浓度盐、缓冲液和其它非挥发性成分的优点, 因此 MALDI 的优点允许在分析复杂的生物样品时无需一些分离纯化的步骤就达到高灵敏度, 高通量的目的. 近年来已被广泛应用在蛋白质学<sup>[18-21]</sup>、代谢组学<sup>[22,23]</sup>、多肽<sup>[24-26]</sup>等的研究中. 本研究小组近年来运用 MALDI-TOFMS 对溶菌酶<sup>[27-29]</sup>、磷酸化多肽<sup>[30,31]</sup>进行了相关方面的研究. 在此基础上, 本文以溶菌酶作为我们的模型蛋白, 研究在不同炸药爆炸条件下其反应产物的特异性, 以便发现新的爆炸物信息, 为快速确认炸药种类提供新的研究方向.

## 1 结果与讨论

爆炸条件下溶菌酶反应产物经胰蛋白酶酶解后出现的主要肽段如表 1 所示.

### 1.1 空白试验

雷管: 为了排除引爆剂雷管对实验的影响, 我们选取了雷管作为空白实验的研究对象. 结果表明, 溶菌酶与雷管爆炸后, 其酶解肽段没有出现异常的质谱信号, 可以说明雷管作为引爆剂不会对溶菌酶有影响.

### 1.2 不同炸药爆炸条件下溶菌酶的反应特征分析

#### 1.2.1 不同炸药爆炸条件下溶菌酶反应产物的初步定性分析

爆炸条件下的溶菌酶反应产物经酶解后运用 MALDI-TOFMS 检测, 可以发现除了正常溶菌酶酶解

多肽信号外, 一些 $[\text{MH}+17]^+$ ,  $[\text{MH}+18]^+$ ,  $[\text{MH}+28]^+$ ,  $[\text{MH}+32]^+$ 和 $[\text{MH}+44]^+$ 的加合峰信号也能被检测到(典型的质谱图如图 1 所示). 这些加合峰信号的获得可能是因为在爆炸的过程中炸药能够发生高速的化学反应, 经一系列的分解、氧化、还原反应生成了许多的活性小分子气体产物(表 2), 在剧烈冲击、放热、燃烧的情况下, 这些活性小分子可能会和溶菌酶上的某些活性反应位点发生反应, 进而在 MALDI-TOFMS 的分析中可以检测到原有肽段和这些小分子气体加合的信号.

#### 1.2.2 不同炸药爆炸条件下溶菌酶的反应特征产物

从表 1 中也可以看出, 不同炸药产生相同的活性小分子能够和溶菌酶上的同一种反应位点进行反应. 但同时也出现了一些非常特征的反应产物, 如 TNT 中形成的水能够特异性地和 VFGRCELAAAMKRHGLDNYR ( $m/z$  2307)结合生成相应的产物 $[m/z$  2325 ( $2307+18$ ), 44], 而 RDX 产生的水分子气体能够将 IVSDGNGMNAWVAWRNRCK ( $m/z$  2177)肽段完全反应 $[m/z$  2195 ( $2177+18$ , 100)], 在检测的时候仅仅只能得到其产物离子的信号, 不能检测到  $m/z$  2177 的信号. PETN 中生成的  $m/z$  1301 信号是 GYSLGNWVCAAK ( $m/z$  1269)与  $\text{O}_2$  反应得到的产物, 可以用于区分 PETN 和其他炸药. 而黑火药产生的水分子和氧气分子都能和同一肽段 IVSDGNGMNAWVAWR [ $m/z$  1676 (78)]发生反应得到  $m/z$  1694 ( $1676+18$ , 11)]和  $m/z$  1708 ( $1676+32$ , 11)的产物离子. 烟火药仅仅只检测到氧气分子反应生成的产物信号  $m/z$  1708 ( $1676+32$ , 48). 硝酸炸药作为有机炸药和无机炸药混合体, 其产生的  $\text{CO}_2$  分子可以和溶菌酶上的多个反应位点进行反应, 生成一系列的特征离子峰信号, 如 $[\text{GYSLGNWVCAAK}+44]^+$  [ $m/z$  1313 ( $1269+44$ , 27)],  $[\text{IVSDGNGMNAWVAWR}+44]^+$  [ $m/z$  1720 ( $1676+44$ , 11)],  $[\text{KIVSDGNGMNAWVAWR}+44]^+$  [ $m/z$  1848 ( $1804+44$ , 16)],  $[\text{GYSLGNWVCAAK-FESNFNTQ ATNR}+44]^+$  [ $m/z$  2722 ( $2678+44$ , 27)]. 特征离子峰的获得可能与溶菌酶反应位点不同有关. 在不同的爆炸物所产生的爆炸过程中, 微小的差异可能会引起溶菌酶空间构象的改变, 从而产生不同的反应结果, 当然这也是我们的推测, 深入合理的探讨可能还需要结合其他方面的进一步实验. 不同爆炸物爆炸条件下溶菌酶能够生成特征性的反应产物, 这一结果的发现为确认这些炸药种类提供了新的思路 and 方向, 同时还可以结合现有的爆炸残留物分析, 为爆炸物的分析提供补充和参考.

表 1 爆炸条件下溶菌酶反应产物酶解液主要肽段<sup>a</sup>

Table 1 The major peptides of tryptic digest of the reaction products of lysozyme under the explosion condition

序号	肽段序列	M	m/z(相对百分含量/%)						
			雷管	TNT	RDX	PETN	黑火药	烟火药	硝酸铵
1	HGLDNYR	873	—	—	—	874 (47)	874 (47)	874 (47)	874 (54)
2	WWCNDGR	936	937 (100)	—	—	937 (77)	937 (72)	937 (75)	937 (82)
3	GYSLGNWVCAAK	1268	—	—	—	1269 (80)	1269 (100)	1269 (100)	1269 (73)
4	FESNFNTQATNR	1428	1429 (100)	—	—	1429 (88)	1429 (88)	1429 (88)	1429 (86)
5	IVSDGNGMNAWVAVR	1675	—	1676 (100)	1676 (100)	1676 (100)	1676+17 (11)	—	1676+17 (12)
6	NTDGSTDYGLQINSR	1753	1754 (100)	—	—	1754 (96)	—	—	1754 (95)
7	KIVSDGNGMNAWVAVR	1803	1804 (100)	—	—	1804 (100)	1804+17 (13)	—	1804+17 (17)
8	IVSDGNGMNAWVAVRNRCR	2176	—	2177 (33)	2177+18 (100)	—	—	—	—
9	VFGRCLAAAMKRHGLDNYR	2306	—	2307 (56)	—	—	—	—	—
10	NLCNIPCSALLSSDTASVNCAR	2336	—	—	—	2337 (70)	2337 (73)	—	2337 (83)
11	GYSLGNWVCAAESNFNTQATNR	2677	—	—	—	—	—	—	2678 (73)
									2678+44 (27)

<sup>a</sup>“—”代表未检出; 括号里的数值代表反应肽段和反应产物之间的相对百分含量, 为三次重复实验数据的平均值。

表 2 不同炸药产生的典型活性小分子气体

Table 2 the active small molecule gases from different types of explosives

样品	典型活性小分子
TNT	H <sub>2</sub> O, CO, NO, CO <sub>2</sub>
RDX	H <sub>2</sub> O, CO, CH <sub>2</sub> O, CO <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> O
PETN	H <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O, CO, N <sub>2</sub> , NO, O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>
黑火药	CH <sub>4</sub> , NH <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O, CO, N <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> S, CO <sub>2</sub>
烟火药	H <sub>2</sub> O, CO, N <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>
硝酸铵炸药	NH <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O, CO, N <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> O

## 2 结论

本文运用基质辅助激光解吸-飞行时间质谱的方法研究了在爆炸条件下溶菌酶的反应产物。一些加合峰信号如[MH+17]<sup>+</sup>, [MH+18]<sup>+</sup>, [MH+28]<sup>+</sup>, [MH+32]<sup>+</sup>和[MH+44]<sup>+</sup>被同时检测到。加合峰信号的获得可能是由于炸药在爆炸过程中生成的活性小分子气体(如 NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, CO/N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>)与溶菌酶反应形成的反应产物。溶菌酶经不同炸药的爆炸后生成了一系列特征性的反应产物, 这些反应特征产物的生成将有利于这些炸药的

分析与检测。

## 3 实验部分

### 3.1 样品及试剂

有机炸药: 硝基化合物类炸药(三硝基甲苯, TNT)、硝基胺类炸药(黑索今, RDX)、硝酸脂类炸药(太恩, PETN)。无机炸药: 黑火药、烟火药。混合炸药: 硝酸铵炸药由南京理工大学提供。溶菌酶(lysozyme, FW 14303)购自国药集团, 胰蛋白酶(trypsin)购自 Sigma 公司, 三丁基膦(tri-*n*-butylphosphine, TBP)购自 TCI 公司。全部实验使用色谱纯甲醇和乙腈。Milli-Q 去离子水(Millipore, El Paso, TX), 18 MΩ·cm<sup>-1</sup>。其余试剂: 碳酸氢氨、尿素、氯化钙等均为分析纯。

### 3.2 爆炸试验

将 5 mg/mL 的溶菌酶溶液均匀地涂抹在纱布上, 将纱布裹在六种炸药上, 收集爆炸后的布料, 碎絮, 所有样品分别经胰蛋白酶酶解后, 进行 MALDI-TOFMS 分

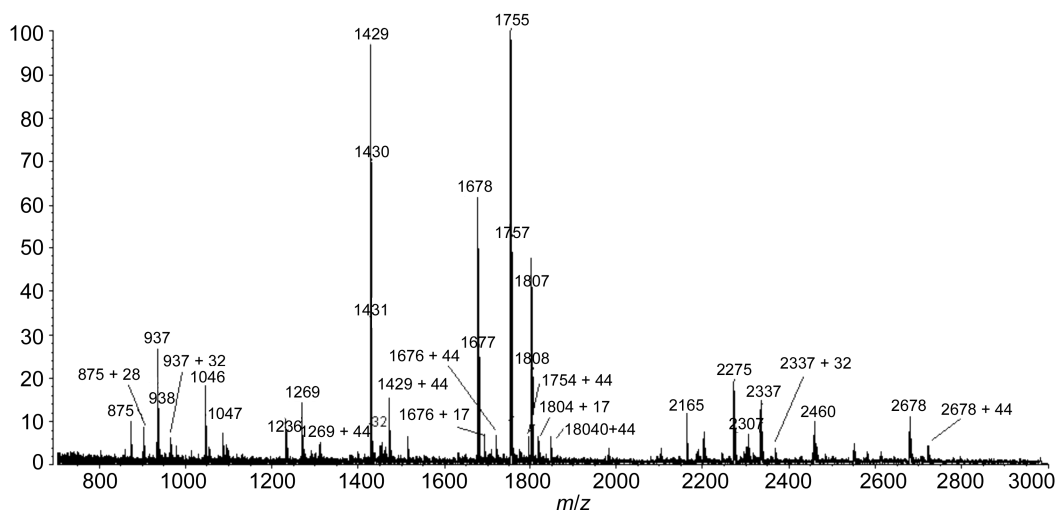


图1 溶菌酶与硝酸铵爆炸后其反应物酶解液的 MALDI-TOFMS 质谱图

**Figure 1** The MALDI-TOF mass spectrum for tryptic digest of reaction products of lysozyme under the explosion condition with ammon explosive

析.

### 3.3 爆炸物残留物酶解试验

称取 2 g 爆炸碎絮, 剪碎后用 2 mL 50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  缓冲溶液(内含 8 mol/L 尿素和 20 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , pH 8.2)溶解, 加入 2  $\mu\text{L}$  三丁基膦, 37  $^\circ\text{C}$  温浴 3 h. 以蛋白: 胰蛋白酶 50 : 1 (w/w) 的比例加入胰蛋白酶, 37  $^\circ\text{C}$  酶解 6 h, 酶解液存放在  $-20$   $^\circ\text{C}$  冰箱中备用.

### 3.4 仪器

基质辅助激光解吸离子化-飞行时间串联质谱仪 (AXIMA Performance, Shimadzu Biotech, Manchester, UK), 所有质谱图均在正离子、反射模式下进行采集, 每张图谱采集 100 次. 质量校正采用 MALDI-TOFmix ( $m/z$  700~4000) 作为外标.

### 3.5 MALDI-TOF MS 分析

以  $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)作为基质. CHCA 溶于 1 : 1 乙腈/水溶液(内含 0.1% TFA), 配成 5 mg/mL 基质溶液. 将 1  $\mu\text{L}$  基质溶液点于不锈钢样品靶, 室温干燥后, 从反应体系取出 1  $\mu\text{L}$  酶解液点于基质上层, 自然干燥后, 即可进入离子源进行质谱分析.

## References

- [1] Detata, D. A.; Collins, P. A.; McKinley, A. J. *J. Forensic. Sci.* **2013**, *58*, 500.
- [2] Perret, D.; Marchese, S.; Gentili, A. *Chromatographa* **2008**, *68*, 517.
- [3] MacCrehan, W.; Moore, S.; Hancock, D. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 9054.
- [4] Liu, J.; Severt, S. A.; Pan, X.; Smith, P. N.; McMurry, S. T.; Cobb, G. P. *Talanta* **2007**, *71*, 627.
- [5] Tian, F. F.; Yu, J.; Hu, J. H.; Zhang, Y.; Xie, M. X.; Liu, Y.; Wang, X. F.; Liu, H. L.; Han, J. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 3521.
- [6] Burleson, G. L.; Gonzalez, B.; Simons, K.; Yu, J. C. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 4679.
- [7] Joshi, M.; Rigsby, K.; Almirall, J. R. *Forensic. Sci. Int.* **2011**, *208*, 29.
- [8] Lin, H. L.; Zhu, X. H.; Fu, Q.; Xu, X. S. *Forensic. Sci. Technol.* **2009**, (3), 37 (in Chinese). (林宏亮, 朱晓红, 付强, 徐雪松, 刑事技术, **2009**, (3), 37.)
- [9] Sarazin, C.; Delaunay, N.; Costanza, C.; Eudes, V.; Gareil, P. *Talanta* **2013**, *103*, 301.
- [10] Sarazin, C.; Delaunay, N.; Costanza, C.; Eudes, V.; Gareil, P. *Electrophoresis* **2011**, *32*, 1282.
- [11] Gilchrist, E.; Smith, N.; Barron, L. *Analyst* **2012**, *137*, 1576.
- [12] Johns, C.; Shellie, R. A.; Potter, O. G.; O'Reilly, J. W.; Hutchinson, J. P.; Guijt, R. M.; Breadmore, M. C.; Hilder, E. F.; Dicoski, G. W.; Haddad, P. R. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1182*, 205.
- [13] Tyrell, E.; Dicoski, G. W.; Hilder, E. F.; Shellie, R. A.; Breadmore, M. C.; Pohl, C. A.; Addad, P. R. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 3007.
- [14] Meng, H. B.; Wang, T. R.; Guo, B. Y.; Hashi, Y.; Guo, C. X.; Lin, J. M. *Talanta* **2008**, *76*, 241.
- [15] Xie, P.; Xu, J.; Hu, Z.; El-Sepai, F.; Peimin, Z.; Zhu, Y. *J. Chromatogr. Sci.* **2011**, *49*, 622.
- [16] Swider, J. R. *J. Forensic Sci.* **2013**, *58*, 1601.
- [17] Rowell, F.; Seviour, J.; Lim, A. Y.; Elumbaring-Salazar, C. G.; Loke, J.; Ma, J. *Forensic Sci. Int.* **2012**, *221*, 84.
- [18] Cheng, Y. L.; Zhang, G. Y.; Li, C.; Lin, J. *Oncol. Lett.* **2013**, *6*, 1222.
- [19] Liu, J.; Jiang, T.; Wei, L.; Yang, X.; Wang, C.; Zhang, X.; Xu, D.; Chen, Z.; Yang, F.; Li, J. C. *BMC Infect. Dis.* **2013**, *13*, 506.
- [20] Valero-Galván, J.; González-Fernández, R.; Navarro-Cerrillo, R. M.; Gil-Pelegrín, E.; Jorrín-Novo, J. V. *J. Proteome Res.* **2013**, *12*, 5110.
- [21] Fang, F.; Liu, P.; Wang, H. Y.; Zhang, L.; Zhang, J.; Gao, Y. P.; Zeng, L. M.; Guo, Y. L. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 1703.
- [22] Wang, J.; Zhou, Y.; Xu, M.; Rang, R.; Guo, Y. L.; Zhu, T. Y. *Transplant. Proc.* **2011**, *43*, 3738.
- [23] Holst, S.; Stavenhagen, K.; Balog, C. I.; Koeleman, C. A.;

- McDonnell, L. M.; Mayboroda, O. A.; Verhoeven, A.; Mesker, W. E.; Tollenaar, R. A.; Deelder, A. M.; Wührer, M. *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, *12*, 3081.
- [24] Lu, J. J.; Tsai, F. J.; Ho, C. M.; Liu, Y. C.; Che, C. *J. Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5685.
- [25] Leng, J. P.; Zhu, D.; Wu, D. J.; Zhu, T. Y.; Zhao, N. W.; Guo, Y. L. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, *26*, 2555.
- [26] Hong, S. M.; Tanaka, M.; Yoshii, S.; Mine, Y.; Matsui, T. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 10033.
- [27] Yu, C. T.; Guo, Y. L.; Zhang, Z. J.; Xiang, B. R. *Chin. J. Org. Chem.* **2000**, *20*, 629 (in Chinese).
- (余翀天, 郭寅龙, 张尊建, 相秉仁, 有机化学, **2000**, *20*, 629.)
- [28] Yu, C. T.; Guo, Y. L.; Zhang, Z. J.; Xiang, B. R.; An, D. K. *Acta Chim. Sinica* **2001**, *59*, 615 (in Chinese).
- (余翀天, 郭寅龙, 张尊建, 相秉仁, 安登魁, 化学学报, **2001**, *59*, 615.)
- [29] Fang, F.; Zhang, J.; Zhang, L.; Guo, Y. L. *Chin. J. Chem.* **2009**, *27*, 2397.
- [30] Zhu, L.; Zhang, J.; Ren, S. F.; Guo, Y. L. *Int. J. Mass. Spectrom.* **2013**, *34*, 323.
- [31] Zhu, L.; Zhang, J.; Guo, Y. L. *J. Proteomics* **2014**, *96*, 360.

(Lu, Y.)