

Direkte analyse med DESI-MS

Cochenillelusens røde farvestof, carminsyre, kan analyseres direkte fra insektet og fra fødevarer ved desorption elektro-spray-ioniserings massespektrometri – DESI-MS

Af Janina Thunig, Frants R. Lauritsen, Steen H. Hansen og Christian Janfelt, Institut for Farmaci og Analytisk Kemi, KU og Carsten Christophersen, Kemisk Institut, KU

Cochenille (E120) – den røde farve fra kaktuslusen *Dactylopius coccus* bruges i vid udstrækning til farvning af mad, kosmetik og til amatørfarvning af tekstiler. Cochenilles carminsyre er blandt de mest ugiftige, skinnende, vandopløselige, varmostabile, lysægte og oxidationsstabile farver. Carminsyre bestemmes almindeligvis ved ekstraktion fulgt af kromatografisk (HPLC) analyse med UV-detektion.

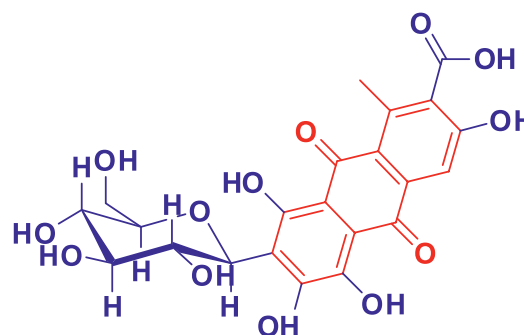
En ny massespektrometrisk teknik, DESI-MS, gør det nu muligt at påvise carminsyre på en overflade uden nogen form for forudgående prøvetilberedning. Anvendeligheden af DESI-MS demonstreres ved en påvisning af carminsyre på overfladen af tørrede cochenillelus og vingummi.

DESI-MS

DESI er en videreudvikling af elektro-spray-teknikken, hvor ioniseringen sker ved, at prøven forstøves vha. nitrogen ved højt tryk under en påtrykt højspænding mellem prøven og massespektrometret.

I DESI, hvor analytten befinder sig på en overflade, er sprayen rettet mod overfladen og indeholder kun rent opløsningsmiddel. Solvent-ioner fra sprayen ioniserer stoffer på overfladen, som pga. trykket fra sprayen frigives og bliver analyseret i massespektrometret. De molekyler, som kan ioniseres med DESI, er de samme, som kan analyseres ved elektro-spray, dvs. polære molekyler.

DESI-analysen, der blev beskrevet i 2004 [1], tillader hurtig screening af mange prøver, da en prøve i visse tilfælde kan analyseres på få sekunder. Den leverer i modsætning til analyse



Carminsyre med anthraquinonkromoforen (rød) er rød til gul afhængig af pH. Den er vandopløselig pga. de hydrofile grupper (blå). Bemærk at carminsyre indeholder 1-deoxyglucose bundet til phenylringen og derfor er et C-glycosid.

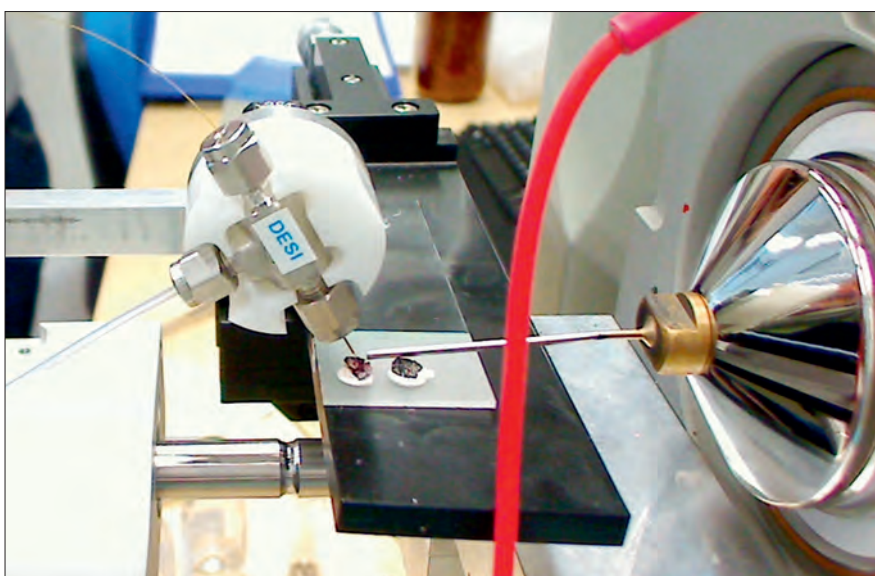
af ekstrakter information om den rumlige fordeling af stoffer på overfladen, hvilket kan udnyttes i analyse af f.eks. TLC-plader (tyndlagschromatografi) [2], plantedele [3-5] og vævsprøver [6].

En forudsætning for DESI-teknikken er, at de ioner, der er ▶

DESI-MS i Danmark

Udvikling af DESI-MS i Danmark startede på Det Farmaceutiske Fakultet, KU, i efteråret 2008 og tog fart i 2009 med en donation af et ionfælde-massespektrometer fra Carlsbergfondet. DESI-MS er en enkel teknik, både i princippet og i konstruktionen. Et velfungerende værksted kan konstruere en DESI-kilde, eller den kan købes.

Lige nu arbejdes der på en DESI-imaging kilde, dvs. en DESI-kilde som kan scanne en prøve med sprayen, mens massespektre opsamles. Massespektrene kan efterfølgende vha. et computerprogram behandles, så de tilsammen afbilder fordelingen af stoffer på analysens overflade [8]. Udviklingsarbejdet sker i samarbejde med en førende DESI-gruppe på universitetet Giessen i Tyskland, ligesom der samarbejdes med den gruppe på Purdue University i USA, der opfandt DESI.



I en DESI-MS-analyse placeres prøven – i dette tilfælde tørrede cochenillelus – under en spray ved indgangen til et massespektrometer. Sprayen ioniserer stoffer på overfladen, som detekteres i massespektrometret og straks viser sig i massespektret.

Foto: Frants R. Lauritsen,



Cochenillelusene tørres, farvestoffet udtrækkes og bruges til farve af slik, fødevarer og kosmetik.
Foto: Carsten Christophersen, 2010.

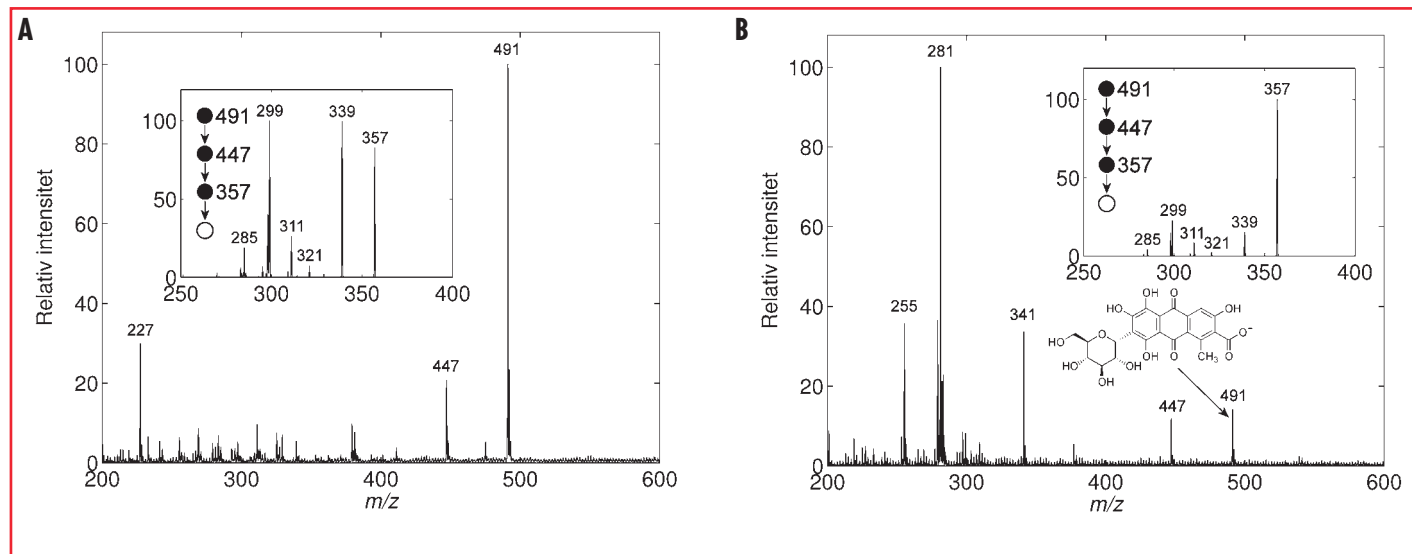
dannet ved atmosfæretryk, kan bringes ind i massespektrometers højvakuum, hvor de analyseres.

Men de fleste moderne instrumenter er født med atmosfæriske interfaces, der tillader det. Kravet er blot, at ionerne dannes i umiddelbar nærhed af interfacet. Ioniseringen kan ske på flere måder, som højspænding (som i tilfældet med DESI), UV-lys, laserlys (UV, synligt eller IR), varme, plasma eller mekaniske

kræfter (f.eks. forstøvning ved højt tryk), hvilket gennem de seneste år har affødt en hel zoologisk have af lignende teknikker til overfladeanalyse med massespektrometri [7].

Det er carminsyre

De tørrede cochenillelus analyseres for carminsyre vha. negativ-ion MS på denne måde. DESI-massespektret viser de stoffer



A. DESI-massespektrum af en tørret cochenillelus. Spektret viser de stoffer på lusens overflade, som lader sig omdanne til negative ioner, og heriblandt er farvestoffet carminsyre ved $m/z=491$ særligt fremtrædende. Det lille spektrum i figuren er et MS^2 -spektrum, som viser brudstykker som følge af en række kollisioner i massespektrometret og udgør dermed et "fingeraftryk" af carminsyre.

B. DESI-massespektrum af en rød Haribo Roulette-vingummi farvet med E-120. Carminsyre viser sig ved $m/z = 491$. Toppene i MS^2 -spektret, der er identiske med dem i figuren t.v., bekræfter, at der er tale om samme stof som i cochenillelusen.

Cochenille

Cochenillelusen (*Dactylopius coccus* eller *Coccus cacti*) er en skjoldlus, der stammer fra området omkring Oxaca i det sydlige Mexico.

Insektet snylter på kaktusplanter. Hunnerne producerer cochenille, hvor hovedbestanddelen er carminsyre, som holder angribere på afstand. Den var næst efter sølv den største eksportartikel fra Mexico og bragte ufattelige rigdomme til den spanske krone. Brugen faldt efter de syntetiske pigmenter vandt frem, men i de seneste år har cochenille oplevet en renæssance som farvestoffet E120 [9].



Cochenillelus foretrækker at leve på kaktus fra slægten *Opuntia*. De beskytter sig under et hvidt vokslag som her på Tenerife.
Foto: Carsten Christophersen.

på lusens overflade, som lader sig omdanne til negative ioner, heriblandt carminsyre ved m/z 491. At denne top rent faktisk repræsenterer carminsyre, bekræftes af MS^4 -spektret, som er en slags fingeraftryk af stoffet (se boks om $MS/MS/MS$).

 $MS/MS/MS$

Med bløde ioniseringsteknikker som elektropray og DESI giver et stof oftest kun anledning til én top i massespektret, typisk $[M+H]^+$ -toppen i positiv-ion MS og $[M-H]^-$ -toppen i negativ-ion MS, idet ioniseringen kan ske ved hhv. optagelse eller tab af en proton. Denne ene top giver værdifuld information om molekylets masse, men ingen information om strukturen. Den bløde ionisering er en fordel ved DESI, hvor man ikke har nogen forudgående separation af stofferne på overfladen – et DESI-spektrum af en overflade med 20 forskellige molekyler ville hurtigt blive uoverskueligt, hvis hvert stof pga. fragmentering bidrog til fem toppe i spektret. I stedet kan information om strukturen opnås ved, at man isolerer en ion af interesse og slår den i stykker ved kollision med andre molekyler, hvorpå man optager et nyt massespektrum af brudstykkerne. Denne teknik kaldes MS/MS eller *tandem-massespektrometri*. Da massen af brudstykkerne relaterer sig til molekylets struktur, vil dette MS/MS spektrum være karakteristisk for det pågældende molekyle og derfor give en meget sikker identifikation. Med et ionfælde-massespektrometer, som det vi her benytter, er det muligt at gøre dette i flere led (brudstykker af brudstykker etc.). Dette betegnes MS^n (MS/MS svarer til MS^2) og giver en endnu mere sikker identifikation, ligesom det kan være til hjælp i forbindelse med strukturopløsning af ukendte stoffer.

Hvis der, som i dette tilfælde, sammenlignes med ren carminsyre, er identifikationen så godt som sikker.

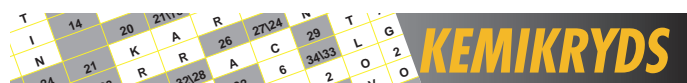
For at afprøve metoden gentages forsøget med en rød Roulette-vingummi fra Haribo. Også her fås en top ved m/z 491, som giver anledning til samme MS^4 -spektrum. Der er ingen tvivl – vingummiet er farvet med E 120 ligesom andre fødevarer (pølser, Campari mv.) og kosmetikprodukter, såsom læbestift.

E-mail-adresse

Christian Janfelt: cja@farma.ku.dk

Referencer

1. Z. Takats, J.M. Wiseman, B. Gologan and R.G. Cooks, *Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization*. Science, 2004. 306(5695): p. 471-473.
2. G.J. Van Berkel and V. Kertesz, *Automated sampling and imaging of analytes separated on thin-layer chromatography plates using desorption electrospray ionization mass spectrometry*. Anal. Chem., 2006. 78(17): p. 6283-6283.
3. C. Christophersen, *Alger afviser attentat*. Dansk Kemi, 2009. 90(8): p. 6-7.
4. A.L. Lane, L. Nyadong, A.S. Galhena, T.L. Shearer, E.P. Stout, R.M. Parry, M. Kwasnik, M.D. Wang, M.E. Hay, F.M. Fernandez and J. Kubanek, *Desorption electrospray ionization mass spectrometry reveals surface-mediated antifungal chemical defense of a tropical seaweed*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2009. 106(18): p. 7314-7319.
5. E. Esquenazi, Y.L. Yang, J. Watrous, W.H. Gerwick and P.C. Dorrestein, *Imaging mass spectrometry of natural products*. Nat. Prod. Rep., 2009. 26(12): p. 1521-1534.
6. J.M. Wiseman, D.R. Ifa, Y.X. Zhu, C.B. Kissinger, N.E. Manicke, P.T. Kissinger and R.G. Cooks, *Desorption electrospray ionization mass spectrometry: Imaging drugs and metabolites in tissues*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2008. 105(47): p. 18120-18125.
7. H.W. Chen, G. Gamez and R. Zenobi, *What Can We Learn from Ambient Ionization Techniques?* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009. 20(11): p. 1947-1963.
8. J.M. Wiseman, D.R. Ifa, A. Venter and R.G. Cooks, *Ambient molecular imaging by desorption electrospray ionization mass spectrometry*. Nat. Protoc., 2008. 3(3): p. 517-524.
9. E.A. Gonzalez, E.M. Garcia and M.A. Nazareno, *Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of cochineal (Dactylopius coccus C.) extracts*. Food Chem., 2010. 119(1): p. 358-362.

**Se Kemikryds**

Side 33, 20 lodret: Findes i mange variationer