

内部萃取电喷雾电离质谱法分析红辣椒

张 华,任盼盼,陈 健,王礼治,贺含毅,欧阳永中,陈焕文

(东华理工大学,江西省质谱科学与仪器重点实验室,江西 南昌 330013)

摘要:本研究采用内部萃取电喷雾电离质谱法(iEESI-MS),以甲醇-水溶液(1:1,V/V)作为电喷雾萃取剂,对4种红辣椒组织内的胆碱、果糖、蔗糖等主要组分进行直接质谱分析,并研究红辣椒在储存过程中组织内化学成分的变化。结果表明,红辣椒在25℃,湿度60%条件下储存时,组织中的胆碱、糖含量的比值随着储存时间的增加而呈线性减少的趋势,并得到相应的代谢衰减曲线,依据该曲线可以直观地判断红辣椒的新鲜程度。与常规果蔬产品化学成分分析方法相比,本方法具有无需样品预处理、检测简单快速等优点,在果蔬产品品质的实时监控及快速检测方面有着广阔的应用前景。

关键词:内部萃取电喷雾电离质谱(iEESI-MS);红辣椒;胆碱;蔗糖;果糖;保鲜期

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2015)05-0411-06

doi:10.7538/zpxb.youxian.2015.0032

Direct Analysis of Red Peppers Using Internal Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry

ZHANG Hua, REN Pan-pan, CHEN Jian, WANG Li-zhi, HE Han-yi,
OUYANG Yong-zhong, CHEN Huan-wen

(*Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation,
East China Institute of Technology, Nanchang 330013, China*)

Abstract: Internal extractive electrospray ionization mass spectrometry (iEESI-MS) was employed to directly analyse the choline, fructose and sucrose in four kinds of red peppers under positive ion detection mode in the mass range of m/z 50-1 000. Changes of the chemical constituents in red pepper during storage period were directly followed, and principal component analysis (PCA) was used to differentiate freshness of red pepper. The result indicates that the relative abundance ratios of choline to fructose and sucrose to fructose in red peppers are linearly decrease during the storage at 25 °C and humidity of 60%, and the corresponding decline curves which associate with the metabolism of the red pepper are plotted. Based on the ratio of choline/fructose or sucrose/fructose, the freshness and quality of the red pepper can be identified by iEESI-MS at

收稿日期:2014-09-29;修回日期:2015-03-11

基金项目:国家自然科学基金(21365001,31370384);长江学者和创新团队发展计划项目(IRT13054)资助

作者简介:张 华(1990—),男(汉族),江西兴国人,硕士研究生,从事有机物质谱分析研究。E-mail: zhanghua808@gmail.com

通信作者:陈焕文(1973—),男(汉族),江西兴国人,教授,从事质谱分析研究。E-mail: chw8868@gmail.com

网络出版时间:2015-06-02;网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20150602.0851.008.html

the molecular level. In comparison with other methods for the analysis of fruits and vegetables, the method shows the merit of such as minimum sample pretreatment, simplicity and rapid analysis, which has promising applications in food safety and quality control analysis.

Key words: internal extractive electrospray ionization mass spectrometry (iEESI-MS); red pepper; choline; sucrose; fructose; freshness

辣椒(*Capsicum annuum* L.)属茄科植物^[1],果实为长指形或圆粒状,未成熟时呈绿色,成熟后变成红色、黄色或紫色,其中以红色最为常见。辣椒果实中含有色素、辣椒碱、维生素、糖类和矿物质等多种营养成分^[2],其味辛辣,可作为蔬菜或菜肴调料。红辣椒因色泽鲜艳、风味独特、营养丰富,兼有镇痛、解热、预防癌症、降脂减肥等保健功能,在我国乃至全世界都深受喜爱^[3]。但是,成熟的红辣椒在采摘后由于机械损伤和呼吸作用,保鲜期非常短,容易失水发蔫甚至腐烂,使其商品价值和食用价值受到很大损害^[4]。此外,由于辣椒腊质表皮的包裹作用,辣椒腐败过程中内部物质的变化难以监控。

常见的植物组织成分分析方法有光谱法^[5-6]、气相色谱法^[7-9]、高效液相色谱法^[10]等,但是这些方法都需要对样品进行预处理,操作繁琐,耗时较长。近年来发展的常压质谱法,如电喷雾解吸电离(DESI)^[11]、激光消融电喷雾电离(LAESI)^[12]、探针电喷雾电离(PESI)^[13]和中性采样-电喷雾萃取电离(ND-EESI)^[14-15]等技术已成功实现了在无需样品预处理的情况下对植物组织的化学成分进行分析。但是,由于取样方式的限制,这些电离方法主要用于分析块状样品的表层,而无法直接分析样品的内部化学成分。对于块状样品而言,仅由样品表面得到的化学信息是有限的,样品内部蕴含了更丰富的化学成分信息,可为实际样品的研究提供更多的科学依据。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条件下实现对复杂基体样品的直接分析,已初步应用于植物代谢组学的研究,如大蒜、草莓、银杏等^[16]。

本研究利用自制的 iEESI 源,在无需样品预处理的前提下,对不同新鲜程度的红辣椒果肉组织进行直接质谱分析,得到样品的一级质谱指纹图谱,并对辣椒的主要化学成分进行鉴定。通过结合主要成分分析法(PCA)^[17],希望

建立一种快速区分不同新鲜程度红辣椒的方法,为果蔬产品的品质检测提供技术支持。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LTQ-XL 型线性离子阱质谱仪:美国 Finnigan 公司产品,配有 Xcalibur 型数据处理系统;微量进样针(250 μL):美国 Hamilton 公司产品;石英毛细管(内径 0.10 mm,外径 0.15 mm):美国 Agilent 公司产品;甲醇(HPLC 级):美国 Newark 公司产品;iEESI 源和二次去离子水:实验室自制。

1.2 实验材料

4 种新鲜红辣椒,包括小米椒(*Capsicum frutescens* L.)、朝天椒(*Capsicum annuum* L. var. *conoides* (Mill.) Irish)、簇生椒(*Capsicum annuum* L. var. *fasciculatum* (Sturtev.) Irish)、菜椒(*Capsicum annuum* L. var. *grossum* (Willd.) Sendtn.),均购于当地超市。

1.3 实验条件与方法

采用甲醇-水溶液(1:1, V/V)作为萃取剂,流速为 4 $\mu\text{L}/\text{min}$;石英毛细管电压为 +4.5 kV;石英毛细管前端与样品尖端的距离约为 2~3 mm,样品尖端与质谱仪入口的距离为 4 mm;离子传输管温度为 150 $^{\circ}\text{C}$;其他实验参数由系统自动优化。进行串联碰撞诱导解离(CID)质谱分析时,选择母离子隔离宽度为 1.0 u,碰撞能量为 14%~25%。为了使样品分析程序标准化,去除辣椒表皮后,取少量的组织样品(距离辣椒柄端 2 cm 处)切成三角形状,厚度约 2 mm,边长约 6 mm。

采用主成分分析法(PCA)从指纹图谱中提取与植物组织样品有关的分子信息,建立不同类别植物样品的识别模式^[17-18]。用 PCA 将 iEESI-MS 所记录的植物样品的质谱指纹图谱数据导出,并将数据整理为每列代

表 1 个样本,每行代表 1 个质荷比(m/z)值的矩阵 X 。用 Matlab Toolbox 软件中的 Princomp 函数对矩阵 X 进行处理,得到 PCA 分析结果。上述数据处理方法均在 Matlab 7.8 中编程实现。

2 结果讨论

2.1 iEESI-MS 分析辣椒组织的原理与装置

内部萃取电喷雾电离质谱原理示于图 1。用铁架台等承接装置将内部萃取电喷雾电离质谱装置固定在合适的位置。切取一定体积的样品,将石英毛细管直接插入样品内部且与样品前端保持一定的距离,石英毛细管的另一端与微量进样器相连。调节毛细管末端水平,且与样品前端、质谱仪入口保持同轴。微量进样器内部装有萃取剂,并由进样泵控制流速,将萃取剂推入到样品内部。在微量进样器的进样针端加上大小可调节的直流电压,电压通过微量进样器内的萃取剂直接导入到被分析的样品上。在电场作用下,注入的萃取剂朝着质谱仪入口方向移动,样品内部的物质被萃取剂选择性地萃取,在样品前端产生电喷雾,从而实现样品内部成分的离子化,离子化的待测物进入质谱仪检测。

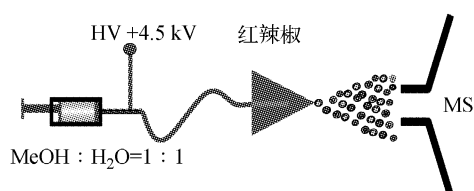


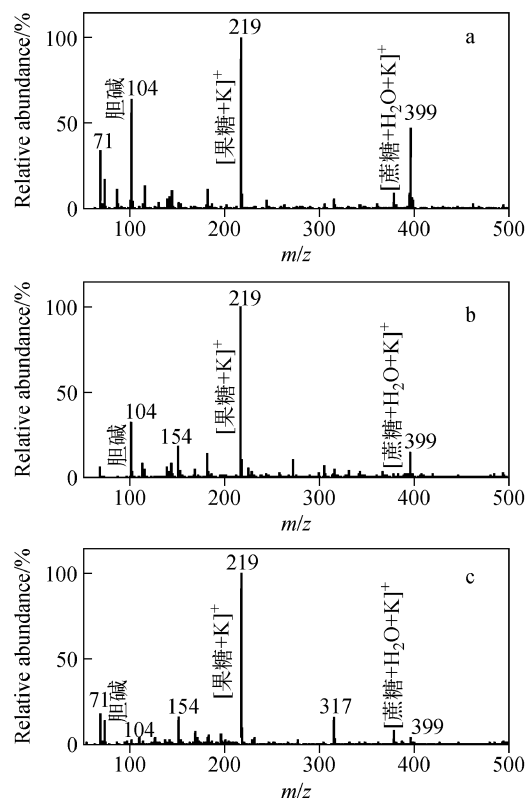
图 1 内部萃取电喷雾电离质谱原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the internal extractive electro spray ionization mass spectrometry

2.2 不同新鲜程度红辣椒的 iEESI-MS 分析

辣椒组织内化学成分比较复杂,含有糖类、有机酸、维生素 C 等,本研究采用甲醇-水溶液(1:1, V/V)作为萃取剂,可将组织中的胆碱和糖类等极性较强的小分子成分萃取出来。iEESI-MS 实验数据采集时,选取质谱信号稳定后的前 2 min 谱图数据进行分析,避免因长时间萃取带来的实验误差。实验获得的不同新鲜程度小米椒的指纹质谱图示于图 2。由图 2 可明显看出,新鲜小米椒与其他不同新鲜程度

小米椒的指纹图谱基本类似,但是新鲜小米椒中 m/z 104 和 m/z 399 的相对丰度明显高于腐败小米椒。对比储存了不同时间小米椒的化学指纹图谱,发现胆碱和蔗糖的相对丰度在储存 7 天后分别下降了 43% 和 58%,储存 12 天后分别下降了 74% 和 80%。此外,实验也对其他 3 种红辣椒进行了分析,结果表明,腐败红辣椒中胆碱和蔗糖的含量与新鲜红辣椒相比均是下降的。胆碱是人体内的一种重要的营养成分,它对人体内转甲基代谢、磷脂合成以及细胞信号传递具有重要作用。随着储存时间的延长,辣椒组织中的胆碱含量呈下降趋势,这有力地说明了新鲜红辣椒的营养价值比储存后红辣椒的营养价值高。



注:a. 新鲜的;b. 储存 7 天后;c. 储存 12 天后

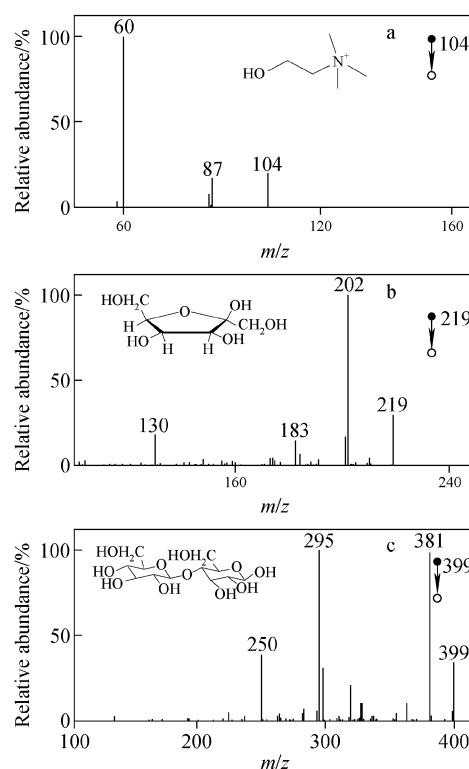
图 2 不同新鲜程度小米椒的一级指纹质谱图

Fig. 2 Fingerprint spectra of *Capsicum frutescens* L. with different freshness

由于采用 iEESI 对辣椒样品进行直接萃取且电喷雾产生于样品尖端,组织中的无机离子(如 K^+ 等)也可能参加电离反应^[19-21],使组织

中相关成分形成加钾的离子峰。经串联质谱分析,所得 m/z 104 为胆碱, m/z 219 为[果糖 + K]⁺, m/z 399 为[蔗糖 + H₂O + K]⁺, 这与 Cooks 等^[22]的研究报道一致,其部分主成分的串联质谱图示于图 3。图 3a 中,选择 m/z 104 离子做碰撞诱导解离实验(CID),在 28% 碰撞能量下,母体离子丢失 C₂H₄O,得到碎片离子 (CH₃)₃NH⁺ (m/z 60),同时获得的低丰度碎片离子 m/z 87 是母离子丢失 ·OH 后的产物。依据上述碎裂规律^[23],可以确定 m/z 104 为胆碱的正离子峰。图 3b 中,在 14% 碰撞能量下,母体离子[果糖 + K]⁺ m/z 219 丢失 ·OH 得到以 m/z 202 为特征的质谱峰,而 m/z 183、130 则是[果糖 + K]⁺ 丢失 2H₂O、[·OH、C₃H₄O₂]形成的碎片离子。图 3c 中,在 18% 碰撞能量下,[蔗糖 + H₂O + K]⁺ 离子丢失 C₄H₈O₃、H₂O 得到 m/z 295、381 离子碎片。

不同新鲜程度的红辣椒组织内的主要成分具有一定的相似性,但主要成分的比例存在明显差异。为进一步判断不同新鲜程度红辣椒的化学成分差异情况,选择主成分分析法对红辣椒的 iEESI-MS 指纹图谱数据进行分析,结果示于图 4。由图 4a 可知,在 m/z 50~500 范围内,3 个坐标所代表的主成分 PC1、PC2、PC3 对方差的总贡献率达到了 93.9%,包含了原样本的大部分信息。由图 4b 可以看出,PC1、PC2 方向上 m/z 219、381 和 399 的贡献量最大,也就是说,新鲜小米椒与腐败小米椒相比,蔗糖与果糖的相对含量有明显差异。



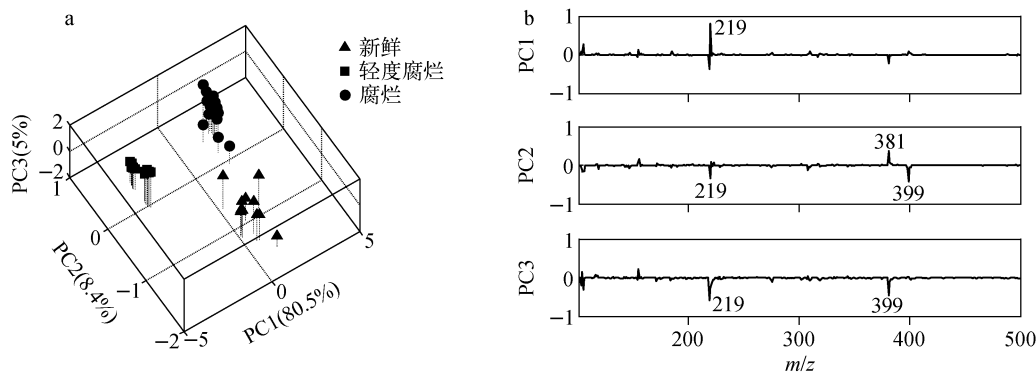
注:a. 胆碱;b. 果糖;c. 蔗糖

图 3 部分主成分的串联质谱图

Fig. 3 Tandem mass spectra of the main components

2.3 红辣椒中的主要化学成分含量随储存时间的变化情况

在温度 25 °C,湿度 60% 的环境中,对新鲜红辣椒密封储存 12 天,并对储存的红辣椒化学成分进行连续监测。以红辣椒 iEESI-MS 指纹图谱中主要成分的相对丰度比值(胆碱/果糖、



注:a. 三维得分图;b. 主成分上的 PCA 载荷分布图

图 4 3 种不同新鲜程度小米椒的 iEESI-MS 数据 PCA 分析结果

Fig. 4 PCA results of iEESI-MS data of three different freshness of *Capsicum frutescens* L.

蔗糖/果糖)来考察其化学成分随时间的变化情况。对检测的某一储存批次红辣椒而言,组织中的胆碱、果糖、蔗糖等化学成分处在相同的基质中,因此,物质的相对含量变化情况可以在一定程度上反映红辣椒组织中化学成分随储存时间的变化关系。在储存期间,小米椒的胆碱和蔗糖相对于果糖的相对丰度比值的变化曲线示于图5。由图5a可见,小米椒中的胆碱与果糖的相对丰度比值从第0天的55.4%降至第12天的14.8%,其代谢衰减曲线为 $y = -0.0324x + 0.5298$ 。同样地,在图5b中,小米椒中的蔗糖与果糖的相对丰度比值从第0天的35.1%下降到第12天的0.7%,其代谢衰减曲线为 $y = -0.0237x + 0.2941$ 。出现上述变化趋势的原因可能是由于红辣椒在收获后仍然是一个有生命的有机体,新陈代谢作用还在不断地进行,不断地分解在生长过程中积累的果糖,同时,红辣椒内部的蔗糖被大量地分解为果糖来维持其生命活动,这就造成了红辣椒在储存期间蔗糖含量逐渐减少,果糖含量逐渐增加,从而使新鲜红辣椒在储存期间的胆碱或蔗糖与果糖的相对丰度比值呈下降趋势。通过对其他3种红辣椒在储存期间的胆碱或蔗糖与果糖的相对丰度比值进行连续监测,得到了与小米椒变化趋势类

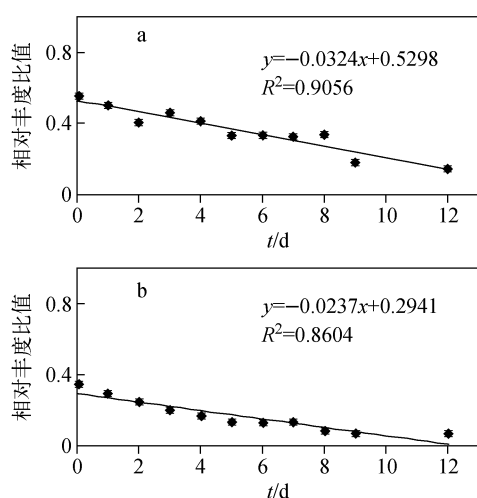
似的代谢衰减曲线。依据上述代谢衰减曲线,可以模拟红辣椒腐败的代谢变化情况,通过胆碱、蔗糖和果糖的相对丰度比值,可以直观地判断红辣椒的新鲜程度。

3 结论

本工作利用 iEESI-MS 技术对红辣椒样品进行直接分析,得到了 m/z 50~800 范围内的一级指纹图谱。同时,对红辣椒的腐败过程进行了跟踪监测,利用 PCA 区分了不同新鲜程度的红辣椒。结合胆碱或蔗糖与果糖相对丰度比值的代谢衰减曲线,可预测其在特定条件下的保鲜期。在无需样品预处理的条件下,本方法实现了对红辣椒品质的简单、快速分析,可为蔬菜水果的品质保障提供技术参考。

参考文献:

- [1] BARCHI L, BONNEL J, BOUDET C, et al. A high-resolution, intraspecific linkage map of pepper (*Capsicum annuum* L.) and selection of reduced recombinant inbred line subsets for fast mapping[J]. *Genome*, 2007, 50(1): 51-60.
- [2] 徐秋兰,庞杰. 辣椒化学成分的开发利用[J]. *中国辣椒*, 2003, (1): 32-35.
XU Qiulan, PANG Jie. Utilization of the chemical matters in *Capsicum*[J]. *Zhongguo Lajiao*, 2003, (1): 32-35(in Chinese).
- [3] BIGNARDI C, CAVAZZA A, CORRADINI C, et al. Evaluation of the effect of red chilli addition to food products on their shelf-life[J]. *Presentation to the XXIV Symposium of the Division of Analytical Chemistry*, 2013: 15-19.
- [4] DU J H, FU M R, LI M M, et al. Effects of chlorine dioxide gas on postharvest physiology and storage quality of green bell pepper (*Capsicum frutescens* L. var. *Longrum*) [J]. *Agricultural Science*, 2007, 6(2): 214-219.
- [5] BULSKA E, WYSOCKA I A, WIERZBICKA M H, et al. In vivo investigation of the distribution and the local speciation of selenium in *Allium cepa* L. by means of microscopic X-ray absorption near-edge structure spectroscopy and confocal microscopic X-ray fluorescence analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(22): 7 616-7 624.
- [6] QIN J J, JIN H Z, FU J J, et al. Japonicones A-



注: a. S(胆碱)/S(果糖);

b. S(蔗糖)/S(果糖);果糖的绝对含量定义为1

图5 小米椒中主要成分

相对丰度随储存时间的变化曲线

Fig. 5 Changes of choline, fructose and sucrose in *Capsicum frutescens* L. during the storage

- D, Bioactive dimeric sesquiterpenes from *Inula japonica* Thunb[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 19(3): 710-713.
- [7] 许秀莹,施海燕,王明华. 气相色谱-质谱联用测定大米中6种烟碱类农药残留[J]. *质谱学报*, 2012, 33(2): 99-103.
XU Xiuying, SHI Haiyan, WANG Minghua. Determination of six neonicotinoid pesticides residue in rice by GC/MS[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2012, 33(2): 99-103(in Chinese).
- [8] HRENANDEZ-ORTE P, CACHO J F, FERREIRAE V. Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(10): 2 891-2 899.
- [9] LAHMEK M, RAMADAN A A. Determination of some pharmaceutical compounds using silanized Algerian bentonite (B-1100) as support in gas chromatographic analysis[J]. *Asian Journal of Chemistry*, 2008, 20(4): 2 969-2 978.
- [10] 刘春生,罗海英,洗燕萍,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定豆芽中7种药物残留[J]. *质谱学报*, 2014, 35(4): 302-310.
LIU Chunsheng, LUO Haiying, XIAN Yanping, et al. Determination of seven drug residues in bean sprouts by UPLC-MS/MS[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2014, 35(4): 302-310(in Chinese)
- [11] TAKATS Z, WISEMAN J M, GOLOGAN B, et al. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization [J]. *Science*, 2004, 306(5 695): 471-473.
- [12] NEMES P, BARTON A A, VERTES A. Three-dimensional imaging of metabolites in tissues under ambient conditions by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(16): 6 668-6 675.
- [13] YU Z, CHEN L C, SUZUKI H, et al. Direct profiling of phytochemicals in tulip tissues and in vivo monitoring of the change of carbohydrate content in tulip bulbs by probe electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 2009, 20(12): 2 304-2 311.
- [14] CHEN H W, SUN Y P, WORTMANN A, et al. Differentiation of maturity and quality of fruit using noninvasive extractive electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(4): 1 447-1 455.
- [15] CHEN H W, YANG S P, WORTMANN A, et al. Neutral desorption sampling of living objects for rapid analysis by extractive electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2007, 119(40): 7 735-7 738.
- [16] ZHANG H, ZHU L, LUO L P, et al. Direct assessment of phytochemicals inherent in plant tissues using extractive electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(45): 10 691-10 698.
- [17] JIA B, OUYANG Y, SODHIR N S, et al. Differentiation of human kidney stones induced by melamine and uric acid using surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2010, 46(3): 313-319.
- [18] ZHANG X, JIA B, HUANG K, et al. Tracing origins of complex pharmaceutical preparations using surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(19): 8 060-8 070.
- [19] VERY A A, SENTENAC H. Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2003, 54(1): 575-603.
- [20] LEIGH R, WYN J R. A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell [J]. *New Phytologist*, 1984, 97(1): 1-13.
- [21] HEBERT S C, DESIR G, GIEBISCH G, et al. Molecular diversity and regulation of renal potassium channels [J]. *Physiological Reviews*, 2005, 85(1): 319-371.
- [22] LIU J J, WANG H, COOKS R G, et al. Leaf spray: Direct chemical analysis of plant material and living plants by mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(20): 7 608-7 613.
- [23] ZEISEL S H. Dietary choline: Biochemistry, physiology, and pharmacology [J]. *Annual Review of Nutrition*, 1981, 1(1): 95-121.