

基于表面解吸常压化学电离质谱法快速评价咖啡种子活力

殷勤 罗火林 刘星星 黄学勇 罗丽萍*

(南昌大学生命科学学院, 南昌 330031)

摘要 为快速、无损地区分不同活力的咖啡种子,采用自行研制的表面解吸常压化学电离质谱(DAPCI-MS),在无需样品预处理的前提下,获得咖啡种子表面的化学指纹图谱,并分别进行了主成分分析(PCA)、聚类分析(CA)和判别分析(DA),获得不同活力的咖啡种子样品的质谱信息特征。结果表明,在正离子模式下,DAPCI-MS结合多变量分析方法能有效区分不同活力的咖啡种子。PCA提取了3个主成分,累计贡献率达到92.2%;CA可以将相同活力的咖啡种子聚在一起,准确率为100%;DA对训练样本的回判正确率为100%,交叉验证分析成功率为100%,对外部验证样本进行DA,正确率95.7%。本方法具有无需样品预处理,分析速度快,灵敏度高,对种子无损伤等优点,能为其它种子活力测定提供参考。

关键词 表面解吸常压化学电离质谱;咖啡;种子活力;多变量分析

1 引言

种子活力(Seed vigor)是指在广泛田间条件下,决定种子迅速整齐出苗和长成正常幼苗的潜在能力的种子特性,是衡量种子质量高低的一项重要指标。传统的种子活力测定方法存在检测速度慢、具有破坏性、预处理过程复杂等问题,因此快速、准确和无损伤测定成为当前种子活力测定方法的一个重要发展趋势。表面解吸常压化学电离质谱(Surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, DAPCI-MS)可在常温、常压和未经样品预处理的前提下对样品表面进行直接分析^[1~3]。Chen等^[4]采用DAPCI-MS对茶叶样品直接进行检测,成功区分了40种茶叶样品。Wu等^[5]采用DAPCI-MS对干海参样品进行检测,成功区分了不同生境下的干海参样品。罗丽萍等^[6]采用DAPCI-MS结合化学计量学方法,实现了新鲜和陈年莲子的快速鉴别。

咖啡(*Coffea arabica* L.)属于茜草科(Rubiaceae)咖啡(*Coffea*)属植物,有103种^[7]。咖啡种子在常温下最多能储存2~6个月,之后活力会迅速丧失,严重影响咖啡的生产效益和种质资源保存^[8]。目前,咖啡种子研究主要集中于其收获后加工方法对咖啡风味的影响、咖啡中的化学成分及其结构、不同基因型咖啡的鉴别等方面,而对咖啡种子活力测定方法的研究较少。

本研究采用DAPCI-MS对不同活力的咖啡种子表面直接进行检测,获得其DAPCI-MS指纹图谱,结合多变量分析,对不同活力的咖啡种子进行分析,建立了咖啡种子快速、无损、灵敏的活力检测方法,为咖啡种子的贮藏及种质资源的保存和定时更新繁殖提供参考依据。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与材料

DAPCI离子源(东华理工大学研制);线性离子阱质谱仪(Finnigan LTQ XL),配有LTQ Xcalibur 2.0软件处理系统(美国Finnigan公司);LH-150S型种子老化试验箱(浙江托普仪器有限公司);GXZ-380B智能光照培养箱(宁波东南仪器有限公司)。

甲醇(色谱纯,美国Dikmapure公司)。实验室用水为自制二次蒸馏水,其它试剂均为分析纯。

小粒咖啡(*C. arabica* L.)种子,2014年11月收获,由热带作物研究所提供。种子含水量为26.15%,千粒重为182.34 g。

2.2 实验方法

2.2.1 人工加速老化 参照国际种子检验协会(International Seed Testing Association, ISTA)^[9]的人工加速老化方法,老化箱温度为40℃,箱内相对湿度100%。老化时间分别为0,1,2,3,4,5和6 d,老化处理后的种子置于室温放置3~4 d,确认种子含水量降至原状态,再进行发芽实验和质谱检测。

2.2.2 标准发芽实验 参照《国际种子检验规程》中的发芽条件进行发芽实验^[10]。培养皿内垫3层滤纸作为发芽床,每个培养皿放25粒咖啡种子,3个重复;将培养皿置于25℃光照培养箱中暗培养,每隔24 h统计一次发芽的种子数,直至无萌发时结束实验。以胚根长度为种子长度的1/2时为发芽标准,统计各处理种子的发芽势(GP)、发芽率(GR)、幼苗单株鲜重,并计算发芽指数(GI)和活力指数VI。

$$GP = (EGN/SSN) \times 100\% \quad (1)$$

$$GR = (TGN/SSN) \times 100\% \quad (2)$$

$$GI = \sum(G_t/D_t) \quad (3)$$

$$VI = GI \times S \quad (4)$$

其中,EGN和TGN分别为发芽初期的发芽数和发芽终期的发芽数;SSN为供试种子数; G_t 为第 t 天发芽数, D_t 为相应发芽天数;GI为发芽指数; S 为幼苗单株鲜重(g)。

2.2.3 DAPCI-MS分析条件 如图1所示,采用液体辅助DAPCI,LTQ-MS为正离子检测模式,质谱检测扫描范围为 m/z 50~500;离子源电压为3.5 kV;毛细管温度为100℃;辅助解吸气(N_2)气压为0.8 MPa;解吸剂为甲醇/水溶液(4:1, V/V),流速为3 μ L/min。质谱入口与离子源距离为10 mm;离子源与样品表面的距离为5 mm;喷雾针与样品表面的角度为50°;样品表面与质谱仪入口毛细管的角度为15°~30°。其它参数采由LTQ-MS系统自动优化。

2.3 数据分析

采用SPSS19.0软件(IBM SPSS statistics)进行方差分析、聚类分析(Cluster analysis, CA)和判别分析(Discriminant analysis, DA)。利用Matlab软件(7.0版,美国Mathworks公司)进行主成分分析(Principal component analysis, PCA)。

3 结果与讨论

3.1 老化时间对咖啡种子发芽指标和种子活力的影响

咖啡种子老化不同天数后,发芽指标和种子活力指数变化如表1所示,未老化咖啡种子的发芽指标和活力指数与老化后的咖啡种子之间的差异极显著,随老化时间的延长,咖啡种子的发芽指标和活力指数均呈下降趋势,老化至第6 d时,咖啡种子的发芽指标和活力指数均为0。说明在人工老化过程中,

表1 人工老化过程中咖啡种子发芽情况和活力指数

Table 1 Germination and vigor indexes of coffee seeds by artificial aging

老化时间 Aging time (d)	发芽势 Germination potential (%)	发芽率 Germination ratio (%)	发芽指数 Germination index (GI)	活力指数 Vigor index (VI)
0	42.67±2.31Aa	86.67±2.31Aa	2.42±0.24Aa	0.90±0.05Aa
1	23.00±1.73Bb	52.00±0Bb	1.75±0.12Bb	0.59±0.08Bb
2	20.33±6.66Bb	37.33±2.31Cc	1.36±0.13Bc	0.42±0.04Cc
3	18.67±2.31BCb	29.33±2.31Cd	0.93±0.03Cd	0.26±0.02Dd
4	9.33±2.31CDe	12.00±4.00De	0.76±0.07Cd	0.22±0.02Dd
5	5.33±2.31Ded	5.33±2.31DEf	0.14±0.03De	0.04±0.0Ee
6	0Dd	0Ef	0De	0Ee

注:不同小写字母表示处理间差异显著($p \leq 0.05$),不同大写字母表示处理间差异极显著($p \leq 0.01$)。

Note: Different lowercase letters were significantly different at $p \leq 0.05$, different capital letters were significantly different at $p \leq 0.01$.

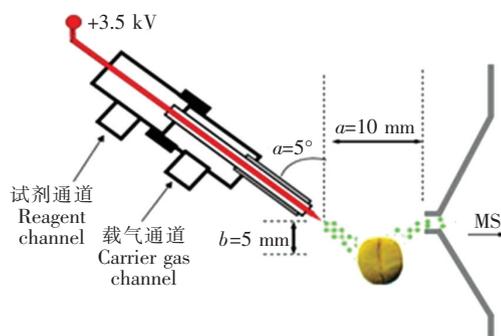


图1 DAPCI-MS检测咖啡种子结构示意图

Fig.1 Schematic diagram of coffee seeds detection by surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (DAPCI-MS)

咖啡种子活力随着老化时间的延长而降低,直至完全丧失。老化处理的咖啡种子活力指标与老化时间的相关关系如表 2 所示,咖啡种子的活力指标与老化时间都呈负相关,且都达到极显著水平。说明不同的人工老化时间使咖啡种子形成不同的活力水平。

Rendón 等^[11]研究发现,咖啡种子在储存过程中会发生脂质氧化反应,同时也观察到细胞结构损伤,种子活力下降和感官变化,与谷物在存储过程中发生的氧化过程一致。因此,采用本方法获取咖啡种子表面的物质信息,鉴别咖啡种子活力是可行的。

Dussert 等^[12]研究富含油脂的咖啡种子的贮存时发现,脂肪酶在调节中性脂质的水解过程中表现出促进游离脂肪酸生成的特性。因此,咖啡种子在人工老化过程中活力迅速下降,可能是由于在高温高湿的条件下脂质氧化反应增强,随着人工老化时间延长,种子劣变程度不断加剧,人工老化处理显著抑制了种子萌发,导致种子活力下降,直到完全丧失。

3.2 不同老化时间咖啡种子的 DAPCI-MS 分析

DAPCI-MS 可以得到不同活力咖啡种子的指纹特征。如图 2 所示,不同活力的咖啡种子的 DAPCI-MS 谱图既有相同之处,也有明显的差异。在所有谱图中, m/z 100 ~ 400 之间产生的质谱峰都很多,因为咖啡的化学组成复杂,就咖啡香气而言就有近千种挥发性化合物^[13],因此在咖啡种子表面积累了很多物质。在 $m/z > 400$ 处,质谱峰较少,可能是因为本实验以甲醇-水(4:1, V/V)溶液为解吸剂,一些大分子物质很难从样品表面有效地解吸出来。

所有咖啡种子样品的指纹图谱中均存在信号峰 m/z 55, 274, 302, 318, 400, 473 和 489,且 m/z 274 和 318 均是最强的, m/z 473 在老化 0 和 1 d 的样品中信号强度相差不大,在老化 2 和 3 d 的样品中信号强度明显增强,但在老化 4、5 和 6 d 的样品中信号强度又明显下降。因为挥发性香气成分是种子的次级代谢产物,多由异戊二烯、类苯基丙烷、氨基酸和脂肪酸产生^[14]。在人工老化过程中,一些挥发性化合物很快就挥发了,另一些则保持不变,随着老化时间延长,易挥发的物质逐渐减少,所以利用 DAPCI-MS 技术得到不同活力咖啡种子的指纹图谱中,有很多信号峰存在于所有图谱中,一些信号峰的

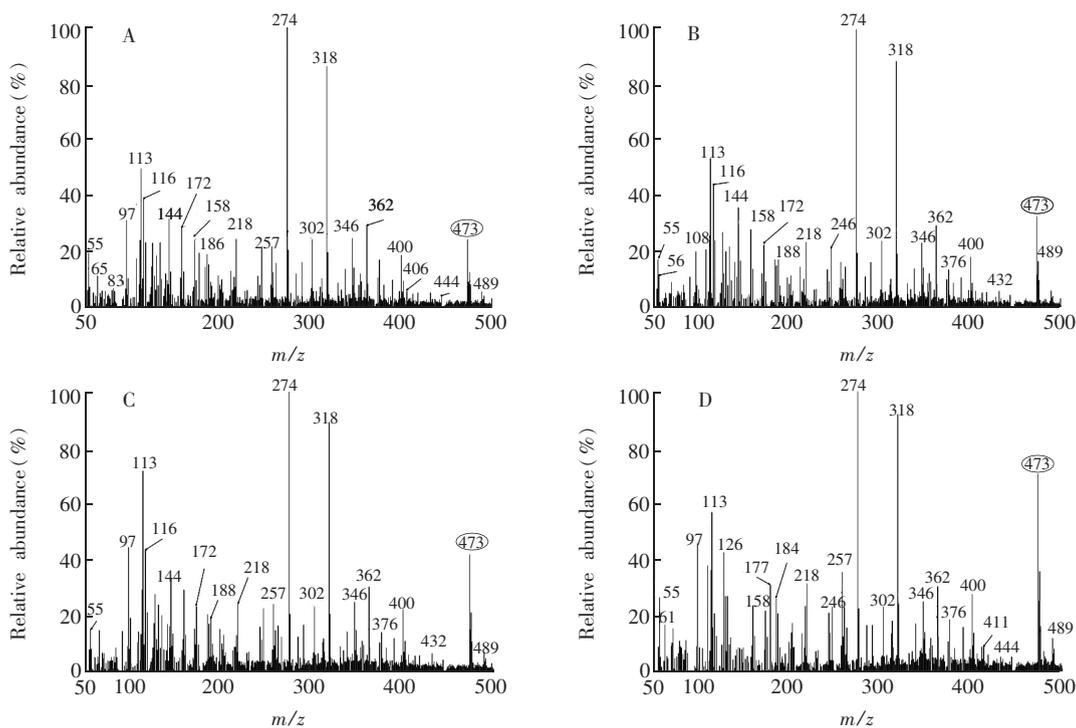
表 2 咖啡种子人工老化过程中活力指标与老化时间之间的相关分析

Table 2 Correlation analysis between vigor indexes and artificial aging time

活力指标 Vigor indexes	与老化时间的相关系数 Aging time
发芽势 Germination potential	-0.954 *
发芽率 Germination ratio	-0.960 *
发芽指数 Germination index	-0.988 *
活力指数 Vigor index	-0.969 *

*: 表示极显著水平($p \leq 0.01$)。

*: Indicates 0.01 significance level.



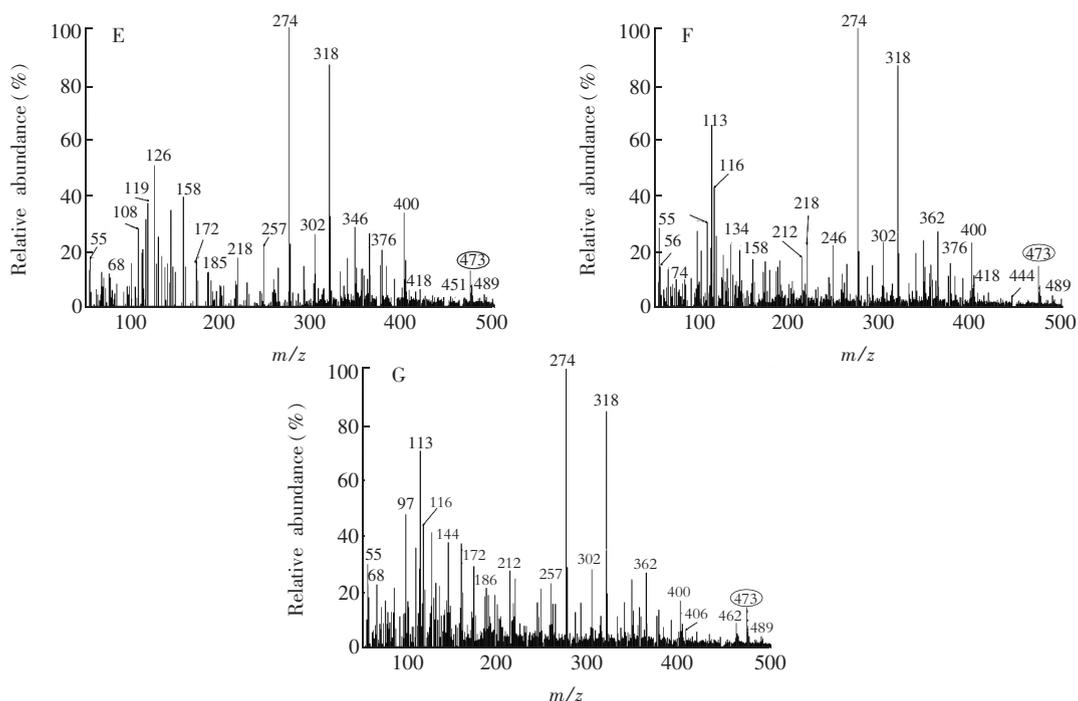


图2 不同老化时间咖啡种子的 DAPCI-MS 质谱图

Fig. 2 Mass spectra of different aging time coffee seeds samples using DAPCI-MS

A, 0 d; B, 1 d; C, 2 d; D, 3 d; E, 4 d; F, 5 d; G, 6 d

丰度保持不变,而另一些信号峰则在老化过程中先增强,后下降。

3.3 主成分分析

以 m/z 值为自变量,信号强度为因变量,利用 Matlab 软件对质谱实验得到的数据(每种样品选择 50 个,共 350 个)进行 PCA,计算特征值、特征向量及累计贡献率。图 3A 是在正离子模式下的 PCA 得分图,PC1、PC2 和 PC3 分别代表了变量总方差的 77.8%、11.1% 和 3.3%,累积 92.2%,这 3 个主要成分包含了被分析样本的绝大部分信息。图 3B 是相应的载荷图,对 PC1 贡献最大的质谱信号是 m/z 302,318,346,362,400,473 等,说明不同活力的咖啡种子样品,其表面化学成分或含量发生了变化。所有咖啡种子有规律地聚集和分散,活力相同的种子聚在一定的区域内,活力不同的种子分散在不同的区域。结果表明,DAPCI-MS 结合 PCA 可以有效区分不同活力的咖啡种子。

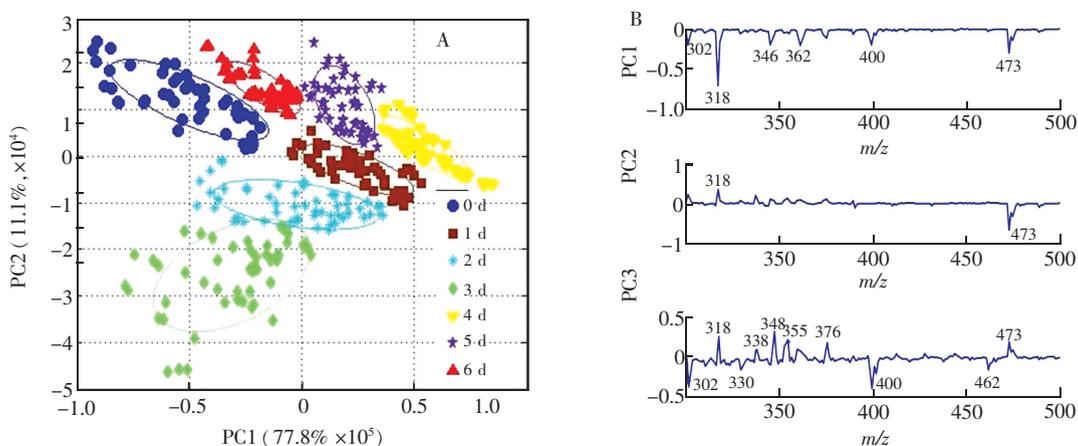


图3 咖啡种子 PCA 得分图(A)和载荷图(B)

Fig. 3 Score plots (A) and corresponding loading plots (B) of coffee seeds by principal component analysis

3.4 聚类分析

采用 SPSS 软件计算 105 个咖啡种子样品(每种样品选择 15 个)之间的欧氏距离,结果如图 4 所示,相同活力的咖啡种子都分别聚在一起,CA 准确率为 100%。当临界值为 10 时,105 个咖啡种子样品分别聚为 4 类。第一类包含老化 1, 2 和 4 d 的咖啡种子样品,特别是老化 1 和 2 d 的样品间的距离较小,表明它们之间的差异较小。第二类包含老化 3 d 的咖啡种子样品,与其它 3 类的距离较大,表明它们之间的差异也较大。第三类包含老化 5 和 6 d 的咖啡种子样品,因为它们的活力指数差异不显著。第四类包含未老化(0 d)的咖啡种子样品,因为它与其它 3 类咖啡种子的活力指数差异极显著。结果表明,DAPCI-MS 结合 CA 可以有效区分不同活力的咖啡种子。

3.5 判别分析

按统计量 Wilk's λ 最小值原则选择变量,进行逐步 DA,建立判别方程。根据非标准化判别方程系数,得到的判别函数方程组的变量与系数见表 3。计算各咖啡种子得分,以 F_1 为横坐标、 F_2 为纵坐标,得到咖啡种子判别图(图 5)。计算判别函数 F_1 、 F_2 的特征值分别为 38.553 和 12.004,典型相关系数分别

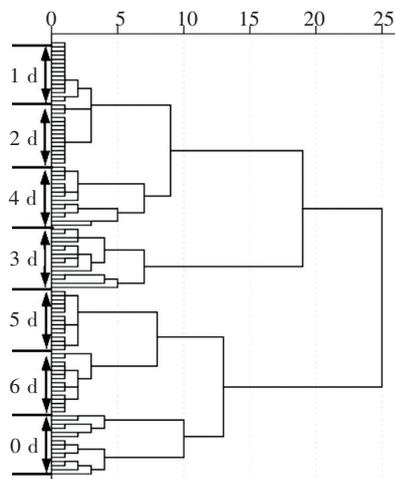


图 4 咖啡种子 CA 的树形图

Fig. 4 Dendrogram of coffee seeds by cluster analysis

表 3 不同老化时间咖啡种子的判别函数变量及其系数

Table 3 Variable and coefficient of discriminant functions of different aging time for coffee seeds

变量 Variable (m/z)	判别函数 Discriminant function		变量 Variable (m/z)	判别函数 Discriminant function		变量 Variable (m/z)	判别函数 Discriminant function	
	F_1	F_2		F_1	F_2		F_1	F_2
常量 Constant	0.63725	-3.92663	360	-0.00001	-0.00133	441	-0.00024	0.00230
301	0.00051	0.00002	365	-0.00025	0.00025	442	0.00139	0.00110
308	-0.00138	0.00092	366	0.00063	0.00075	464	0.00016	-0.00045
310	0.00112	-0.00117	372	0.00044	-0.00073	467	-0.00011	0.00159
311	0.00021	-0.00005	376	0.00019	-0.00013	470	0.00042	0.00020
316	-0.00052	0.00012	380	-0.00173	-0.00126	476	-0.00057	0.00096
318	0.00003	0.00003	402	0.00013	-0.00033	478	0.00203	-0.00125
323	-0.00120	-0.00109	411	-0.00236	-0.00297	479	0.00163	-0.00076
324	0.00033	0.00119	432	0.00080	0.00118	489	-0.00068	-0.00125
327	0.00075	-0.00043	437	-0.00086	0.00087	490	-0.00394	0.00049
351	0.00031	0.00136	438	0.00182	-0.00077	492	0.00087	0.00014
353	-0.00003	0.00083	440	0.00051	0.00265			

为 0.987 和 0.961,方差分析证明其类间差异极显著($p < 0.01$),判别结果有效。对 350 个训练样本(每种样品选择 50 个)的回判,正确率为 100%,交叉验证分析成功率 100%,说明得到的判别方程稳定性良好;对 140 个外部验证样本(每种样品选择 20 个)进行判别,有 6 个老化 1 d 的样本错判为老化 2 d 的样本,正确率 95.7%。

从图 5 可见,不同活力的咖啡种子样本都能完全分开,老化 0, 1 和 2 d 的咖啡种子样本距离较近,但它们的活力指数之间差异极显著,因此能完全分开。老化 3 d 的咖啡种子样本与其它样本距离较远,可能是因为它们活力指数之间差异极显著。老化 4, 5 和 6 d 的咖啡种子样本,虽然分布仍能各自成群,但间距较小,部分样本容易混淆,可能是因为老化 5 和 6 d 的咖啡种子的活力指数差异不显著。结果表明,DAPCI-MS 结合 DA 可以有效区分不同活力的咖啡种子。

4 结论

在无需样品预处理的前提下,采用 DAPCI-MS 直接对咖啡种子表面进行检测,获得其正离子模式下的指纹图谱。PCA 提取了3个主成分,累计贡献率达到 92.2%。CA 可将相同活力的咖啡种子聚在一起,准确率为 100%。DA 对训练样本的回判正确率为 100%,交叉验证分析成功率为 100%,对外部验证样本进行 DA,正确率为 95.7%。DAPCI-MS 结合多变量分析可以有效区分不同活力的咖啡种子。本研究为建立快速、无损、灵敏的种子活力检测新方法提供了参考。

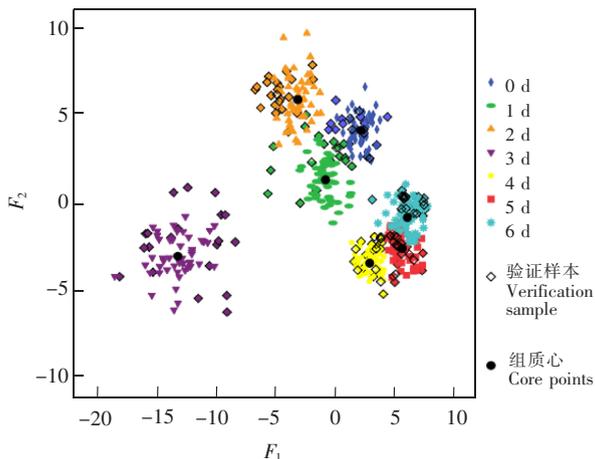


图5 咖啡种子训练样本和验证样本的 DA (F_1 、 F_2 为判别函数)

Fig.5 Discriminant classification of training samples and verification samples of coffee seeds (F_1 and F_2 are discriminant functions)

References

- LUO Li-Ping, WANG Jiang, ZHANG Wen-Jun, DAI Xi-Mo, FANG Xiao-Wei, ZHANG Xi, LIU Ya-Li, CHEN Huan-Wen. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2013**, 41(7): 1050–1056
罗丽萍, 王姜, 章文军, 戴喜未, 方小伟, 张茜, 刘亚丽, 陈焕文. *分析化学*, **2013**, 41(7): 1050–1056
- Alberici R M, Simas R C, Sanvido G B, Romão W, Lalli P M, Benassi M, Cunha I B S, Eberlin M N. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 398(1): 265–294
- WANG Nan-Nan, WANG Hai-dong, DING Jian-Hua, OUYANG Yong-Zhong, ZHU Xiao-Bin, CHEN Huan-Wen. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2014**, 42(4): 547–551
王楠楠, 王海东, 丁健桦, 欧阳永中, 朱小兵, 陈焕文. *分析化学*, **2014**, 42(4): 547–551
- Chen H W, Liang H Z, Ding J H, Lai J H, Huan Y F, Qiao X L. *J. Agr. Food Chem.*, **2007**, 55(25): 10093–10100
- Wu Z C, Chen H W, Wang W L, Jia B, Yang T L, Zhao Z F, Ding J H, Xiao X X. *J. Agr. Food Chem.*, **2009**, 57(20): 9356–9364
- LUO Li-Ping, ZHAO Zhan-Feng, DAI Xi-Mo, ZHANG Xi, LIU Ya-Li, ZHANG Xing-Lei, ZHANG Wen-Jun, OUYANG Yong-Zhong. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, **2013**, 29(7): 261–266
罗丽萍, 赵占峰, 戴喜未, 张茜, 刘亚丽, 张兴磊, 章文军, 欧阳永中. *农业工程学报*, **2013**, 29(7): 261–266
- Patui S, Clincon L, Peresson C, Zancani M, Conte L, Terra L D, Navarini L, Vianello A, Braidot E. *Plant Sci.*, **2014**, 219–220: 19–25
- Bytof G, Knopp S E, Kramer D, Breitenstein B, Bergervoet J H W, Groot S P C, Dirk S. *Ann. Bot.*, **2007**, 100(1): 61–66
- International Seed Testing Association. *The Manual Method of Determination of Seedling and Seed Vigor Evaluation*. Beijing, Beijing Agricultural University press, **1993**: 101–128
国际种子检验协会(ISTA). *种苗评定与种子活力测定方法手册*. 北京: 北京农业大学出版社, **1993**: 101–128
- International Seed Testing Association. *International Seed Inspection Procedure*. Beijing, China Agriculture Press, **1996**: 54–57
国际种子检验协会(ISTA). *国际种子检验规程*. 北京: 农业出版社, **1996**: 54–57
- Rendón M Y, Salva T D G, Bragagnolo N. *Food Chem.*, **2014**, 147(2014): 279–286
- Dussert S, Davey M W, Laffargue A, Doubeau S, Swennen R, Etienne H. *Physiol. Plantarum*, **2006**, 127(2): 192–204
- Toci A T, Farah A. *Food Chem.*, **2008**, 108(3): 1133–1141
- Goff S A, Klee H J. *Science*, **2006**, 311(5762): 815–819

Rapid Evaluation of Seed Vigor of Coffee by Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry

YIN Qin, LUO Huo-Lin, LIU Xing-Xing, HUANG Xue-Yong, LUO Li-Ping*

(School of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract To determine the seed vigor of coffee quickly and non-destructively, surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (DAPCI-MS) was used to obtain chemical fingerprints directly from the surface of the coffee seed, without any sample pretreatment. The mass spectral raw data were analyzed by multivariate analysis, including principal component analysis (PCA), cluster analysis (CA) and discriminant analysis (DA), to differentiate efficaciously the coffee seeds with different vigor. The experimental results demonstrated that in the positive ion mode, DAPCI-MS combined with multivariate analysis could effectively distinguish different seed vigor for coffee seed. Three principal components were extracted by PCA, and their cumulative contribution rate was 92.2%. Coffee seeds with the same vigor was packed closely together in CA analysis, and its accuracy was 100%. In DA analysis, the return discriminant ratio for the training muster was as high as 100%, while the cross validation analysis success rate was 100%. Thus, it was concluded that the coffee seeds with different vigor could be differentiated by DAPCI-MS, and the results provided a basis for establishing a fast, non-destructive and sensitive detection method of seed vigor.

Keywords Surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry; Coffee; Seed vigor; Multivariate analysis

(Received 4 July 2015; accepted 27 October 2015)

This work was supported by the Key Projects in the National Science & Technology Pillar Program during the Twelfth Five-year Plan Period (No. 2012BDA29B01) and the National Natural Science Foundation of China (No. 31370384)

沃特世与 BioCity 携手建立开放式分析实验室

位于英国阿尔德利园区 BioHub 生物科技中心的实验室建成后,将大力推动沃特世与科研人员的合作,帮助他们更方便地使用各种重要科研设施。

美国马萨诸塞州米尔福德市,2015 年 1 月 8 日沃特世公司(纽约证券交易所代码:WAT)与英国最大的生物科技培育公司 BioCity 共同宣布——将合作建立开放式分析实验室。该实验室位于阿尔德利园区 BioHub 生物科技中心,建成后将为制药和生命科学领域的科研人员提供先进的沃特世液相色谱(LC)、质谱(MS)和信息学技术以及全套分析平台。

“沃特世的威姆斯洛分部离阿尔德利园区 BioHub 生物科技中心很近,有利于我们与生物科技中心的科研人员保持密切联系,是推动我们与客户之间的业务和合作的良好契机。我们希望通过这种密切的关系更深入地了解客户的需求和他们面临的挑战,”沃特世制药事业部的高级总监 Richard Ladd 说道,“在阿尔德利园区中进行的科研项目涉及各个科学领域和技术水平,非常符合沃特世的创新战略方针,也很符合我们以健康和生命科学为核心的业务方向。”

该实验室将配备多款最新的沃特世技术成果,包括 ACQUITY®、QDa®、ACQUITY H-Class™、ACQUITY UPC2®和 ACQUITY PDA Detector™,沃特世将提供专业技术支持,充分发挥这些仪器平台的最佳性能。除此以外,该实验室还将配备由阿尔德利园区所有者曼彻斯特科技合作联合会提供的核磁共振(NMR)系统。

“这对于在 BioHub 生物科技中心开展业务的所有研究者来说都是一条振奋人心的消息!该实验室进一步完善了 BioCity 的培育模式,让我们能够为那些处于成长阶段的新兴公司提供获得成功所必需的工具、技术和知识——无论是在人才、资产还是技术方面,”BioCity 集团的 CEO Glenn Crocker 说道,“我们非常高兴能够拥有像沃特世公司这样高瞻远瞩的合作伙伴,他们不但完全认同我们发展策略,还积极帮助我们进一步扩展阿尔德利园区中的各种资源。”

沃特世/BioCity 实验室计划于 2016 年初揭幕,届时它将为阿尔德利园区悠久的科研历史添加浓墨重彩的一笔,并进一步完善该园区的前沿科研设施。

(下转 272 页)

