

表面解吸常压化学电离质谱原位检测 萝卜中芥子碱及其含量衰减

姜翠翠^a 罗丽萍^b 胡斌^a 汤亮^a 陈焕文^{a*}

(^a东华理工大学应用化学系 抚州 344000; ^b南昌大学生命科学与食品工程学院 南昌)

摘要 采用表面解吸常压化学电离串联质谱(SDAPCI-MSⁿ)技术,直接检测了白萝卜中的芥子碱,并考察了不同环境下芥子碱的衰减规律。结果表明,常温下(25 ℃)白萝卜中的芥子碱浓度随时间迅速下降,在短时间衰减到一定程度后趋于平稳。在低温下(≤4 ℃),白萝卜中的芥子碱衰减速度则非常缓慢,有利于保持白萝卜中芥子碱水平。萝卜鲜汁中的芥子碱在接触空气后的衰减速度是日常存储条件下的300多倍。虽然在不同的条件下,芥子碱衰减的速度不同,但均符合一级反应的衰减规律。

关键词 表面解吸常压化学电离串联质谱,芥子碱,白萝卜,衰减曲线,一级反应

中图分类号:O657.6

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2011)04-0432-06

DOI:10.3724/SP.J.1095.2011.00379

芥子碱(sinapine)为季铵盐生物碱,常以芥子碱硫氰酸盐的形式广泛存在于十字花科植物种子中,是一种有效的抗辐射、抗衰老、抗氧化和抗肿瘤的化合物^[1]。萝卜是十字花科植物中种植面积较大的蔬菜作物,产量高,价格适宜,深受大众欢迎。目前,测定芥子碱的方法有高效液相色谱法、电化学法、光谱法和荧光扫描法等^[1]。这些方法均需要提取、分离等复杂的前处理过程,存在着操作复杂、费时费力等缺点。萝卜中的芥子碱含量较低,且在不适宜温度、pH值、光照等条件下容易衰减,传统方法很难对其含量变化进行研究^[2]。表面解吸常压化学电离串联质谱(SDAPCI-MSⁿ)灵敏度高,特异性强,可直接用于蔬菜^[3,4]、茶叶^[5]、海参^[6]和果汁^[7]等食品中痕量有机物的快速检测。本文采用SDAPCI-MSⁿ技术直接检测了萝卜中芥子碱的含量,考察了不同存储温度萝卜中芥子碱的衰减过程,为研究芥子碱在植物体内的代谢和生理效应机制提供快速检测技术和有益信息。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

SDAPCI离子源由实验室自制,详细见参考文献^[8-10]。实验采用LTQ-XL型线性离子阱质谱仪(美国Finnigan公司),配有LTQ Xcalibur 2.0软件处理系统。

甲醇(HPLC纯,美国Dikmapure公司);芥子碱硫氰酸盐标准品(纯度>99%,中国药品生物制品检定所)。实验用水为自制二次蒸馏水。

1.2 样品制备及检测方法

实验所使用离子源为改进的表面解吸电离源,主要改进部分包括涂有绝缘层的放电针和2个不锈钢三通套管。2个三通套管同轴串联使用,其中1个不锈钢套管通入萃取溶液,另外1个通入解吸气N₂气;而放电针从二者的轴心穿过。萃取溶液流入石英毛细管,并在鞘气的作用下雾化成细小的液滴,然后通过电晕放电使其带电,带电的液滴再与样品表面相互作用,发生能量转移或电荷转移反应将表面的分析物萃取出来形成待测物的离子。辅助解吸气(N₂气)气压为1.8 MPa,解吸剂为甲醇水溶液(体积比1:1),流速为7 μL/min。质谱入口与放电针距离15 mm;放电针尖与样品表面的距离2 mm;喷雾针与样品表面的角度45°;样品表面与质谱仪入口毛细管的角度15°~30°。

2010-06-29 收稿,2010-09-24 修回

国家自然科学基金仪器专项(20827007)和国家自然科学基金面上(31071551)资助项目

通讯联系人:陈焕文,教授; Tel/Fax:0791-3896370; E-mail:chw8868@gmail.com; 研究方向:分析化学

质谱条件:设置 SDAPCI-MS 为正离子检测模式,质谱检测扫描范围为 m/z 200 ~ 400;离子源电压为 4.0 kV;毛细管温度为 275 °C;在串联质谱时,母离子的选择窗口为 1.4 Da,碰撞时间为 30 ms,碰撞能量为 10% ~ 30%,质谱检测扫描范围为 m/z 80 ~ 400。所有质谱记录时间为 1 min。其它参数由 LTQ-MS 系统自动优化。

芥子碱硫氰酸盐标准谱图:将 0.023 g/L 的芥子碱标准品溶液滴在洗净晾干的白萝卜根切面上,进行质谱检测,得到芥子碱硫氰酸盐标准谱图。

萝卜根:选取种植 100 d 的成熟白萝卜 (*Raphanus sativus* L., 南畔洲品种,抚州当地种植),去叶,洗净,分别在室温 (25 °C, 相对湿度 45% ~ 60%) 放置 0 ~ 7 d 后将白萝卜根切片,直接放于离子源下进行检测,可以获得芥子碱的信号。测定时,每天取 4 个萝卜,每个萝卜测定 12 次。

萝卜汁:选择新鲜萝卜,采用洁净的市售榨汁机 (九阳 JYZ-12 型) 压榨,新鲜萝卜汁置于烧杯中,视实验需要,分别在室温 25 °C 或冰箱 (4 °C) 放置一定时间,备用。使用时取萝卜汁 50 μ L 涂于 2.5 cm² 洗净晾干的萝卜表面直接进行测定。

2 结果与讨论

2.1 芥子碱的 SDAPCI-MSⁿ 检测

芥子碱硫氰酸盐是季铵盐 (结构式如图 1A 所示)。在正离子模式下,对萝卜片上芥子碱硫氰酸盐标准品进行检测,得到其标准谱图 (图 1)。由图 1 可知,在众多来自萝卜样品的不同物质的信号中,芥子碱硫氰酸盐标准品的一级质谱以离子峰 m/z 310 为基峰,没有聚合及其它加合现象,和文献报道一致^[11]。

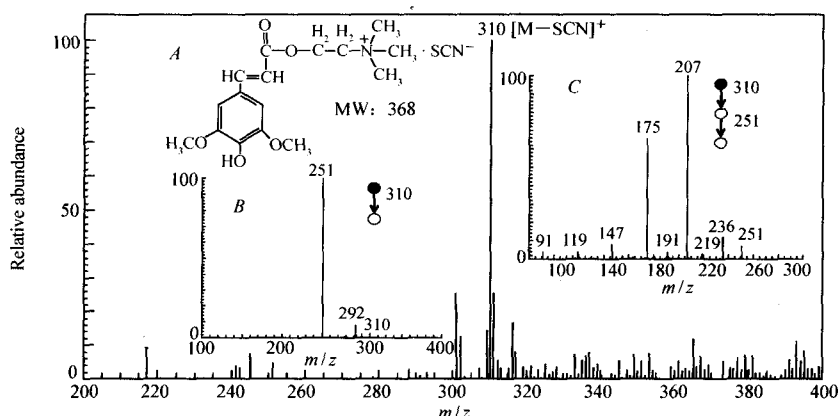


图 1 芥子碱硫氰酸盐一级质谱图及芥子碱硫氰酸盐结构式 (A)、 m/z 310 二级串联质谱 (B) 和 m/z 310 三级质谱 (C)

Fig. 1 Mass spectra of sinapine cyanide sulfonate

Structural formula of sinapine cyanide sulfonate (A), MS² mass spectrum of m/z 310 (B), and MS³ spectrum of m/z 310 (C)

在实际样品检测时,需要采用多级串联质谱对获得的信号进行结构鉴定,以排除假阳性信号。因此,首先在实验条件下对芥子碱标准品进行串联质谱研究。实验选择 m/z 310 为母离子,获得二级质谱图如图 1B 所示。从图中可见,母离子 m/z 310 丢失 $N(CH_3)_3$ 后得到基峰 m/z 251,说明母离子 m/z 310 很容易丢失 $N(CH_3)_3$ 形成一个相对稳定的碎片离子 m/z 251。母离子 m/z 310 丢失 H_2O 形成 m/z 292 碎片离子。由于在实际样品中,可能存在芥子碱的同分异构体,所以需要再次选择二级质谱中的基峰 m/z 251 进行碰撞诱导解离 (CID) 实验,获得三级质谱图。在三级质谱 (图 1C) 中,母离子 m/z 251 丢失 CO_2 、 CH_3 、 CH_3OH 和 CH_3COOH 分别形成 m/z 207、236、219 和 191 等碎片离子峰。其中 m/z 207 碎片离子峰相对丰度最高,表明该裂解途径占优势。由于多级质谱中给予离子的总能量较高,能进行深度裂解,所以碎片离子 m/z 207 继续丢失 CH_3OH 得到碎片离子 m/z 175,该碎片继续丢失 CH_2CH_2 得到碎片

离子 m/z 147。碎片离子 m/z 147 可能再次丢失 CH_2CH_2 而得到碎片离子 m/z 119, 而碎片离子 m/z 119 还可丢失 CO 形成碎片离子 m/z 91。这些特征的碎片为直接鉴定复杂物质中的芥子碱提供了实验基础。

在实际样品分析时,首先将白萝卜根切开后直接放于离子源下进行检测,得到一级质谱图(图 2)。对母离子 m/z 310 进行串联质谱研究,得到的二级质谱图(图 2A)中最大丰度的离子峰为 m/z 292, 该碎片的丰度与标准品中相应离子的丰度有很大区别,说明萝卜中还可能不存在不是芥子碱的同分异构体物质。因此,需要对样品进行三级串联质谱分析。在样品的二级质谱特征峰值 m/z 251 的碎片谱图中,所获得主要碎片离子的种类和相对丰度与标准品相应谱图一致,如图 2B 所示。因此,可以确定所检测的样品中存在芥子碱硫氰酸盐。实验还对牛皮纸、滤纸进行了空白测定,二级质谱图中未发现目标离子 m/z 251, 未检测到芥子碱。

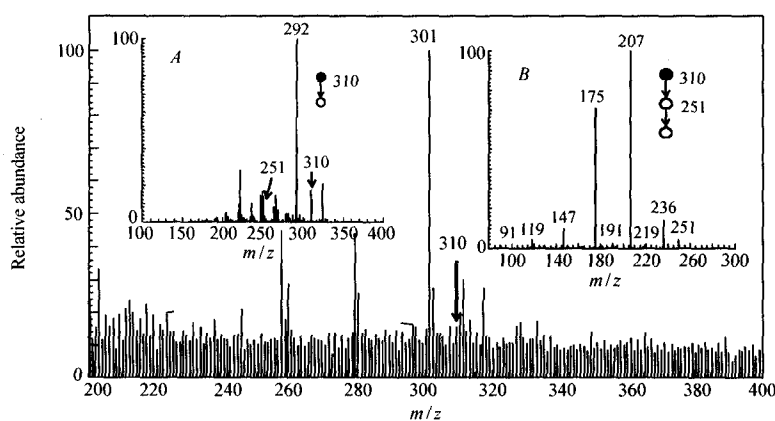


图 2 白萝卜一级质谱图及白萝卜样品中 m/z 310 二级串联质谱(A)和 m/z 310 三级质谱(B)

Fig. 2 Mass spectra of radish taproot

MS^2 (A) and MS^3 (B) spectra of m/z 310 for the radish taproot samples

2.2 萝卜及萝卜汁存放条件对芥子碱含量的影响

实验发现 m/z 251 的净响应信号强度与芥子碱浓度成正相关,因而将二级质谱中获得的信号扣除背景后($S/N \geq 30$),以 m/z 251 的净响应信号强度作为芥子碱含量高低的标准。从室温放置($25\text{ }^\circ\text{C}$)的萝卜鲜汁的测定过程中发现萝卜汁中芥子碱的含量随放置时间的延长而降低。图 3 表明,将新鲜萝卜汁暴露在空气中后,溶液中芥子碱的浓度迅速下降,放置 40 min 后芥子碱的含量衰减速率减慢并逐渐趋于稳定。

在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下放置不同时间的萝卜汁暴露在空气中检测,芥子碱的含量较为稳定(图 4)。可见低温可降低萝卜中芥子碱的衰减速率。

实验发现,在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 、相对湿度 45% ~ 60% 条件下白萝卜中芥子碱的含量也会随时间延长而衰减(图 5)。存储 2 d 的萝卜中芥子碱的含量基本相同,存储 24 h 后芥子碱的含量开始下降。存储第 4 d 的白萝卜中芥子碱的含量衰减到初始浓度的 1/4, 4 d 后芥子碱衰减速度变慢,其浓度趋于稳定。

上述结果提示,萝卜收获后 2 d 内,芥子碱含量变化不大,延长存储期或常温储存后易造成萝卜中芥子碱消解。

2.3 芥子碱消解反应级数的确定

中药和食品中的药用或营养成分的消解过程可用反应动力学方程^[12-13], $d\rho/dt = k\rho^n$ 来描述。式中,

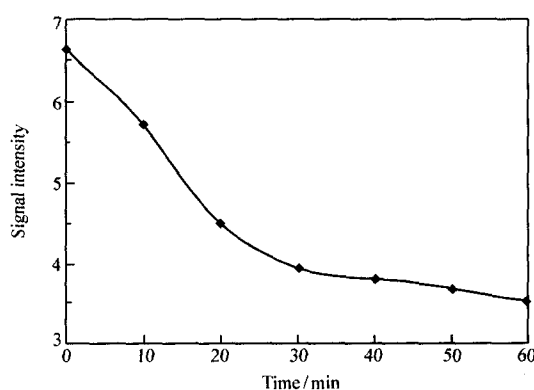


图 3 室温放置萝卜鲜汁芥子碱硫氰酸盐衰减曲线
Fig. 3 Sinapine decline curve for radish juice at room temperature($25\text{ }^\circ\text{C}$)

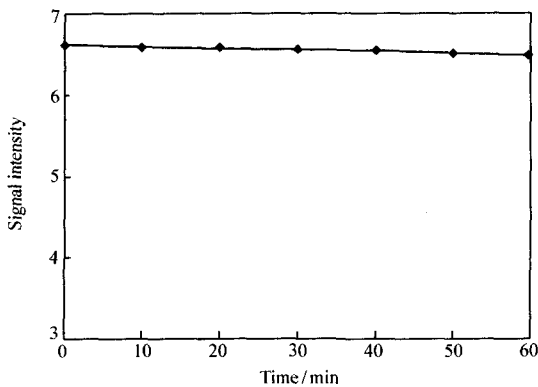


图 4 4 °C 放置萝卜鲜汁芥子碱硫氰酸盐衰减曲线
Fig. 4 Sinapine decline curve for radish juice at 4 °C temperature

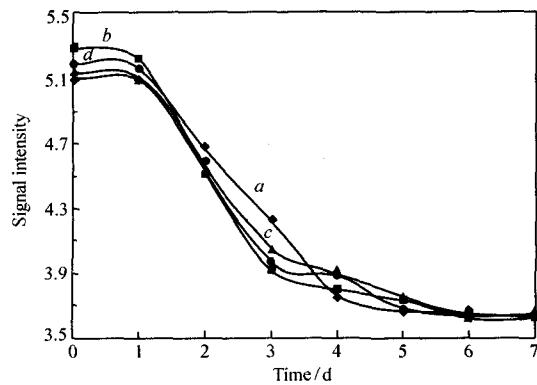


图 5 存储条件下萝卜中芥子碱硫氰酸盐衰减曲线
Fig. 5 Sinapine decline curves for radish taproot under simulated storage conditions
a. sample 1; b. sample 2; c. sample 3; d. sample 4

ρ 为有效成分质量浓度, k 为速率常数, n 为反应级数, t 为反应时间。若为一级反应, 则 $\ln(\rho/\rho_0) = -kt$ 。

因为在同一反应中的起始浓度是不变的, 所以有 $\ln \rho = -kt + \ln \rho_0$; 由于 ρ_0 是定值, 芥子碱的净响应信号强度与芥子碱的浓度成正相关, 则 $\ln I = -kt + \ln I_0$ 。

设 $\ln I = y$, $-\ln I_0 = b$ (b 为定值), 则有: $y = -kt + b$ ^[2]。

暴露在空气中的萝卜鲜汁里芥子碱净响应信号强度取对数和时间的关系作图, 得回归方程 $y = -0.0418x + 1.8648$ ($R^2 = 0.9482$) (如图 6A 所示), 可见 $\ln I$ 和时间 t 有比较明显的线性关系。从图 6A 可以看出, m/z 251 的净响应信号强度由 0 时的 6.634 下降至 40 min 时的 3.802, 衰减速率为 0.07082/min 或 102.0/d。同样, 室温存储白萝卜中芥子碱净响应信号的平均强度和时间的关系作图得到回归方程 $y = -0.07654x + 1.6664$ ($R^2 = 0.9496$) (如图 6B 所示), $\ln I$ 和时间 t 有比较明显的线性关系。在 5 d 内, m/z 251 的净响应信号强度由 5.178 下降至 3.704, 衰减速度为 0.2947/d。因而白萝卜组织内芥子碱浓度衰减也符合一级化学反应^[14-15] 规律。结果也表明, 暴露在空气中的萝卜鲜汁里芥子碱含量衰减速度比室温存储白萝卜中芥子碱衰减速度快 300 多倍。

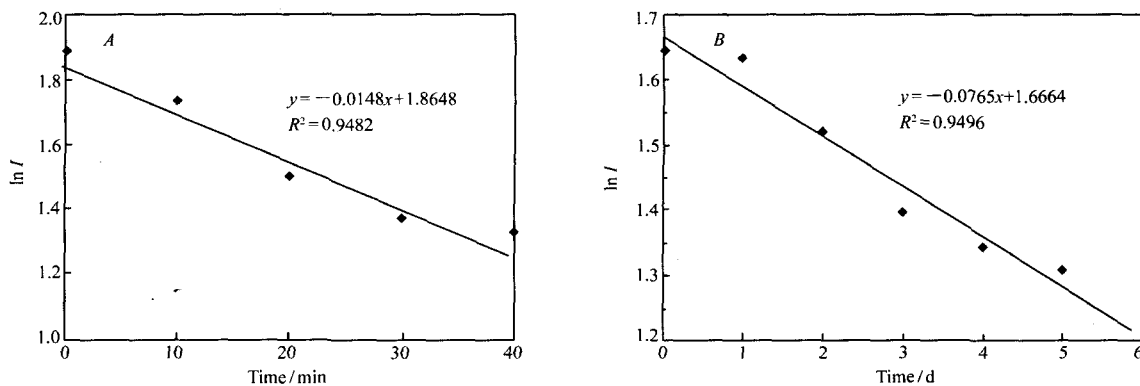


图 6 室温(25 °C)放置萝卜鲜汁芥子碱硫氰酸盐衰减曲线和衰减方程(A), 存储条件下萝卜中芥子碱硫氰酸盐衰减方程(B)

Fig. 6 Decline equations of sinapine for radish juice at 25 °C (A) and in radish taproot under simulated storage conditions(B)

因为芥子碱可通过清除·OH 和转移碱基电子来保护机体^[16], 从而有效地抗氧化抗辐射和抗细胞凋亡^[17]。萝卜鲜汁直接暴露在空气中, 其溶解氧会将芥子碱氧化, 导致芥子碱的含量减少。另外, 溶液的 pH 值和温度也会影响芥子碱的酶转化过程^[18]。存储过程中的白萝卜细胞凋亡比较缓慢, 萝卜自身生化过程导致的芥子碱含量的衰减比较缓和; 而暴露在空气中的萝卜鲜汁中芥子碱含量的衰减速度要比

日常存储条件下白萝卜中芥子碱含量的衰减速度快得多。

3 结 论

采用表面解吸常压化学电离串联质谱(SDAPCI-MSⁿ)技术直接检测了萝卜中芥子碱含量,该方法快速、直接、无需样品前处理。萝卜中芥子碱在常温下衰减速度较快而在低温下衰减速度较慢,但衰减速度都符合一级反应规律。上述研究为植物体内芥子碱的生理生化效应提供了新的检测技术和有益信息。

参 考 文 献

- [1] KE Mugen, WU Guoxin, LIN Yanni, *et al.* Survey of Studies on Sinapine[J]. *Chinese Tradit Herbal Drugs*, 2007, **38**(9): 1436-sheet 3 (in Chinese).
柯木根, 吴国欣, 林燕妮, 等. 芥子碱的研究概况[J]. *中草药*, 2007, **38**(9): 1436-附3.
- [2] HUANG Dejuan, WANG Jiang, JIANG Cuicui, *et al.* Measuring Sinapine Thiocyanate in Fresh Juice of *Raphanus Sativus* L.'s Root by HPLC[J]. *Food Sci Technol*, 2009, **34**(10): 259-262 (in Chinese).
黄德娟, 王姜, 姜翠翠, 等. HPLC法检测白萝卜鲜汁蕴含的芥子碱硫氰酸盐[J]. *食品科技*, 2009, **34**(10): 259-262.
- [3] LIANG Huazheng, YANG Shuiping, CHEN Shuangxi, *et al.* Rapid Determination of Fingerprinting of Condiment Vegetables by Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry[J]. *Chinese J Appl Chem*, 2010, **27**(5): 606-610 (in Chinese).
梁华正, 杨水平, 陈双喜, 等. 表面解吸常压化学电离质谱快速测定香辛蔬菜化学指纹[J]. *应用化学*, 2010, **27**(5): 606-610.
- [4] LIANG Huazheng, YANG Shuiping, XUN Yanfu, *et al.* Determination of Carbamate Pesticides in Vegetables by Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry[J]. *Chinese J Appl Chem*, 2009, **26**(10): 1222-1226 (in Chinese).
梁华正, 杨水平, 徐延富, 等. 表面解吸化学电离质谱法快速检测蔬菜中痕量氨基甲酸酯[J]. *应用化学*, 2009, **26**(10): 1222-1226.
- [5] Chen H W, Liang H Z, Ding J H, *et al.* Rapid Differentiation of Tea Products by Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2007, **55**: 10093-10010.
- [6] Wu Z C, Chen H W, Wang W L, *et al.* Differentiation of Dried Sea Cucumber Products from Different Geographical Areas by Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, **57**(20): 9356-9364.
- [7] WANG Jiang, YANG Shuiping, YAN Feiyan, *et al.* Rapid Determination of Dimethoate in Nanoliter of Juices Using Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry[J]. *Chinese J Anal Chem*, 2010, **38**(4): 453-457 (in Chinese).
王姜, 杨水平, 鄢飞燕, 等. 微量果法中痕量乐果的快速成质谱检测[J]. *分析化学*, 2010, **38**(4): 453-457.
- [8] CHEN Huanwen, LAI Jinhua, ZHOU Yufen, *et al.* Instrumentation and Characterization of Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry[J]. *Chinese J Anal Chem*, 2007, **35**(8): 1233-1242 (in Chinese).
陈焕文, 赖幼虎, 周瑜芬, 等. 表面解吸常压化学电离源的研制及应用[J]. *分析化学*, 2007, **35**(8): 1233-1242.
- [9] YANG Shuiping, HU Bin, LI Jianqiang, *et al.* Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry for Direct Detection melamine in Powered Milk Products[J]. *Chinese J Anal Chem*, 2009, **37**(5): 691-694 (in Chinese).
杨水平, 胡斌, 李建强, 等. 表面解吸常压化学电离质谱法直接测定奶粉中三聚氰胺[J]. *分析化学*, 2009, **37**(5): 691-694.
- [10] Yang S P, Ding J H, Zheng J, *et al.* Detection of Melamine in Milk Products by Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2009, **81**(7): 2426-2436.
- [11] CHEN Tianwen. Determination of Sinapine by Liquid Chromatography-electrospray Ion-trap Mass Spectrometry[J]. *Chinese J Anal Lab*, 2008, **27**(5): 115-117 (in Chinese).

- 陈天文. 液相色谱-电喷雾离子阱质谱对芥子碱的测定方法[J]. 分析实验室, 2008, 27(5):115-117.
- [12] FAN Jinling, ZHU Wenxue, GONG Weidong, *et al.* Thermal Stability and Degradation Kinetics of Anthocyanin in Tree Penoy Extract[J]. *Chinese J Appl Chem*, 2010, 27(2):231-236 (in Chinese).
- 樊金玲, 朱文学, 巩卫东, 等. 牡丹花色苷的热稳定性和降解动力学[J]. 应用化学, 2010, 27(2):231-236.
- [13] SU Ziren, ZENG Huifang, ZENG Yuaner, *et al.* Study on Degradation Dynamics of Tanshinone II_A in Alcohol-Extract of Radix Salviae Miltiorrhizae during Evaporating, Concentrating and Drying Processes[J]. *Chinese Tradit Pat Med*, 1997, 12(12):1-3, 59 (in Chinese).
- 苏子仁, 曾惠芳, 曾元儿, 等. 丹参醇提工艺中丹参酮II_A降解动力学研究[J]. 中成药, 1997, 12(12):1-3, 59.
- [14] REN Difeng, WANG Jianzhong, WANG Xiaonan. Deteriorative Kinetics of Rehmannia Glutinosa and Ophiopogon Japonicus During Drying[J]. *J Beijing Forestry Univ*, 2004, 26(1):70-74 (in Chinese).
- 任迪峰, 王建中, 王晓楠. 地黄和麦冬干燥质量退化动力学研究[J]. 北京林业大学学报, 2004, 26(1):70-74.
- [15] HAN Degang, GAO Panliang. The Basis of Chemical Kinetics[M]. Beijing: Peking University Press, 1988 (in Chinese).
- 韩德刚, 高盘良. 化学动力学基础[M]. 北京: 北京大学出版社, 1988.
- [16] Thiyam U, Stöckmann H, Schwarz K. Antioxidant Activity of Rapeseed Phenolics and Their Interactions with Tocopherols During Lipid Oxidation[J]. *Am Oil Chem Soc*, 2006, 83:523-528.
- [17] YANG Chunyan, HE Ling. Neuroprotective Effects of Sinapine on PC12 Cells Apoptosis Induced by Sodium Dithionite[J]. *Chinese J Nat Med*, 2008, 6(3):205-209 (in Chinese).
- 杨春燕, 何玲. 芥子碱对连二亚硫酸钠引起的PC12细胞凋亡损伤的保持作用[J]. 中国天然药物, 2008, 6(3):205-209.
- [18] Lacki K, Duvnjak Z. Enzymatic Transformation of Sinapine Using Polyphenol Oxidase from *Trametes Versicolor*. Effect of pH and Temperature and Model Development[J]. *Chem Eng*, 1997, 65:27-36.

***In situ* Detection of Sinapine and Its Decline Studied in Radish Taproot by Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry**

JIANG Cuicui^a, LUO Liping^b, HU Bin^a, TANG Liang^a, CHEN Huanwen^{a*}

(^aDepartment of Applied Chemistry, East China Institute of Technology, Fuzhou 344000;

^bCollege of Life Science and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang)

Abstract Surface desorption atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry (SDAPCI-MSⁿ), a novel method, was developed for the direct detection of sinapine in radish taproot samples, which allowed quantitative *in situ* studies of the decline of sinapine in radish taproot samples under different circumstances. The data demonstrated that at room temperature (25 °C), sinapine in radish taproot declined gradually over a short time to a certain level, then the decline speed became slow. It was also found that sinapine declined very slowly at low temperature conditions (≤ 4 °C), suggesting that the fresh radish taproot should be stored at low temperature to maintain the maximal amount of sinapine. When the radish juice was exposed to the air, the sinapine decline rate was more than 300 times higher than that of daily stored radish. All the decline processes were fitted with a first order linear equation.

Keywords surface desorption atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry, sinapine, radish taproot, decline processes order linear equation