

程明川, 姜川, 杨宇, 等. 基于高分辨质谱和代谢组学分析方法的白酒成分分析和香型鉴别[J]. 环境化学, 2016, 35(12): 2618-2621.
CHENG Mingchuan, JIANG Chuan, YANG Yu, et al. Metabolomics approach applied to the components analysis and flavour types discrimination of chinese liquors based on high resolution mass spectrometry[J]. Environmental Chemistry, 2016, 35(12): 2618-2621.



基于高分辨质谱和代谢组学分析方法的白酒成分分析和香型鉴别

程明川¹ 姜 川² 杨 宇³ 李 晨¹ 吕 辰¹ 江 峥¹

(1. 赛默飞世尔科技有限公司, 上海, 201206; 2. 丽水市食品药品与质量技术检验检测院, 丽水, 323000;
3. 四川省食品药品检验检测院, 成都, 611731)

摘 要 采用超高效液相色谱和四极杆-静电场轨道阱(Orbitrap)质谱联用技术结合代谢组学分析软件 Compound Discoverer 来分析和鉴定中国白酒中的化学成分, 发掘可以用来区分酱香型、浓香型和清香型白酒的特征标记物, 并通过建立数学模型来对该 3 种香型的白酒进行鉴别. 结果表明, 通过将实测二级谱图与理论谱图库比对可直接鉴定到白酒样品中的 57 种微量成分, 共找到 18 个化合物可作为特征标记物来区分 3 种香型的白酒. 通过所建的正交偏最小二乘法-判别分析(Orthogonal single collection partial least squares discriminate analysis, OPLS-DA)模型, 可以成功地对酱香型、浓香型和清香型白酒进行鉴别.

关键词 静电场轨道阱(Orbitrap)质谱, 代谢组学, 中国白酒.

白酒在中国有着悠久的历史, 是我国优秀而宝贵的民族遗产. 白酒的主要成分是乙醇和水(占总量的 98% — 99%), 而溶于其中的酸、酯、醇、醛等种类众多的微量有机化合物(占总量的 1% — 2%)作为白酒的呈香呈味物质, 却决定着白酒的风格(又称典型性, 指酒的香气与口味协调平衡, 具有独特的香味)和质量. 中国白酒种类繁多, 风格迥异. 以往对白酒产品的区分, 主要依靠品酒师的感官进行判别, 但是这种鉴别方法不仅需要长期的经验积累, 而且受人的感官和精神状态影响较大, 稳定性和准确性难以保证. 随着现代仪器分析技术的发展, 对酒样中微量成分分析的方法也越来越多, 包括色谱技术、质谱技术、光谱技术等. 越来越多白酒中的风味物质得以鉴定和定量, 可以利用这些特征风味物质作为标记物来区分不同类型的白酒, 或者以这些标记物建立的数据模型来区分不同类型的白酒.

代谢组学是基于全面分析样品成分组成的整体分析方法, 现在被广泛应用于食品相关研究中. 该技术利用高通量、高灵敏度、高分辨率的实验仪器来定性定量分析样品中所有的小分子物质, 然后利用多元统计分析方法, 通过对比样品, 从海量数据中比较分析出有意义的标记物, 然后再对该标记物进行验证、解释和分析.

本实验借鉴代谢组学的分析思路, 采用超高效液相色谱(UHPLC)和基于静电场轨道阱(Orbitrap)高分辨质谱技术的 Q Exactive 台式质谱仪联用, 结合组学分析软件 Compound Discoverer 和统计学软件 SIMCA 分析了酱香型、浓香型和清香型等 3 种香型的白酒, 对其中的微量成分进行了鉴定, 同时发掘和验证了可以用来区分该 3 种香型白酒的标记物, 建立了一种快速、准确、客观地鉴别白酒香型的新方法.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

白酒样本: 实验选择了目前市场上最主流的浓香型、酱香型和清香型等 3 种香型的白酒样品为分析对象. 因白酒样品复杂, 在不同品牌或是同一品牌的不同品质等级的样品之间均存在多样性和差异性, 实验针对每种香型分别收集了不同品牌和不同品质等级的样本, 共计 19 个. 为找出不同品牌之间共有的特征香型标记物, 选择了每种香型中的名优品牌和最具有代表性的高端酒样, 具体信息如下: 酱香型(J): 郎酒和仙潭; 浓香型(N): 泸州老窖、五粮液和剑南春; 清香型(Q): 宝丰(大曲清香)、江津(小曲清香)和红星二锅头(麸曲清香). 为找出各个等级之间共有的特征香型标记物, 选择了同一典型品牌中从高端到低端的不同等级的样本, 具体如下: 酱香型(J): 郎酒(含 5 个不同品质等级的酒样); 浓香型(N): 五粮液(含 4 个不同品质等级的酒样); 清香型(Q): 宝丰(含 5 个不同品质等级的酒样).

甲醇(色谱纯), 美国 ThermoFisher Scientific 公司; 甲酸(色谱纯)美国 Supelco 公司; 甲酸铵(色谱纯)美国 Sigma-Aldrich 公司.

Ultimate 3000 RSLC 超高效液相色谱仪联用 Q Exactive MS 台式高分辨质谱仪(配有电喷雾离子源)美国 ThermoFisher Scientific 公司.

质控(Quality Control, QC)样本的制备,将所有实验选取的样本各取 1 mL,混匀即得。

1.2 前处理方法

为了最大程度地保留样本内的化学成分,样本仅使用 0.22 μm 的滤膜过滤后,即上机测试。

1.3 色谱条件

色谱柱:Accucore C8 (100 $\times$ 2.1, 2.6 μm);柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;流速:0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;进样量:5 μL ;分析时间:30 min(含 5 min 色谱柱平衡)。流动相 A 为 98%:2% (水相:有机相);流动相 B 为 2%:98% (水相:有机相),其中水相为 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵及 0.1% 甲酸水溶液;有机相为 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵及 0.1% 甲酸甲醇溶液。梯度洗脱程序:0—1 min, 100% A;1—10 min, 100% A—85% A;10—15 min, 85% A—55% A;15—20 min, 55% A—0% A;20—25 min, 0% A。

1.4 质谱条件

离子源参数:喷雾电压:3000 V(+), 2500 V(-);加热温度:300 $^{\circ}\text{C}$;鞘气气压:35 arb;辅助气压:10 arb;毛细管温度:350 $^{\circ}\text{C}$ 。

质谱参数:扫描方式:FullMS-ddMS2 (Top3);扫描范围:100—900 m/z ;一级全扫描分辨率 70000 (FWHM);数据依赖二级扫描分辨率 17500 (FWHM)。

2 结果与讨论

2.1 实验条件的选择

为保证白酒样本中尽可能多的成分能够被有效地测定,本实验对多支不同填料和键合相的色谱柱进行了考察,包括:Accucore aQ, Accucore Hilic, Accucore C8, Synchronis C18 和 Hypercarb。实验结果表明,Accucore C8 色谱柱在正离子模式下能够对白酒样品中的化合物进行较好的分离和有较高的响应。

2.2 数据重现性考察

在代谢组学相关试验中,方法的重现性至关重要,需要保证数据在质量精度、保留时间及响应强度等方面具有很好的重现性。本实验在进样序列中穿插了 QC 样品,对系统的稳定性进行了考察。在整个进样周期(48 h)内,保留时间(RT)偏差 <2 s,响应值(NL),相对标准偏差 RSD 为 10% 左右,以某一化合物考察的质量精度偏差在 1 ppm 以内。实验结果表明,采用外标法进行一次校正后,系统有良好的稳定性、重现性和质量精度。

2.3 数据分析

2.3.1 分析流程

实验数据采用 Compound Discoverer 2.0 软件进行智能分析,包括:峰提取、峰对齐、背景扣除、化合物鉴定和多元统计学分析等。

2.3.2 未知成分的鉴定

在液质联用技术中,由于标准数据库和谱图库的缺乏,对未知化合物的鉴定是最困难的部分之一。通过 Compound Discoverer 2.0 软件中的上述流程,可以实现多种方式对未知成分的智能鉴定:1)通过精确分子量和一级质谱的同位素分布来预测分子式;2)通过在线搜索 ChemSpider 数据库结合 FISh Scoring 功能来确认化合物的结构式。FISh Scoring 功能可以根据所提供的母离子结构式信息自动地将该结构式可能产生的理论碎片和采集的二级质谱图进行匹配,从而对从 ChemSpider 搜索到的化合物进行确认,实现对未知物的鉴定;3)通过在线搜索 mzCloud 谱图库来实现对未知物的鉴定。mzCloud 是针对 Orbitrap 静电场轨道阱高分辨质谱打造的谱图库云平台,可以通过采集的二级(或多级)质谱图和谱图库中的标准谱图进行比对,从而实现便捷而准确的未知物鉴定分析。在本实验中,通过 mzCloud 可直接鉴定到白酒样本中的 57 个微量成分。

2.3.3 标记物的发现

通过 Compound Discoverer 2.0 软件中的火山图(Volcano plot)和 3 组样本各成分的峰面积比率值(Ratio),可以找出在 3 种香型的白酒中含量表达有明显差异的化合物,以此作为可以代表某一种香型白酒区分另外两种的标志物。最终鉴定到 13 种酱香型白酒的标记物,5 种浓香型白酒的标记物,例如,脯氨酸(Proline)在酱香型白酒中有明显的高表达,而已酸乙酯(Ethyl caproate)在浓香型白酒中有明显的高表达(图 1)。在清香型白酒中未发现标记物,可能因为所选清香型白酒包含大曲清香、小曲清香和麸曲清香三种亚型,组内差异较大所致。所鉴定的 18 种标记物,见表 1。

2.3.4 建模与预测

代谢组学分析得到的数据是大量的多维数据,为了挖掘所获数据中的潜在规律,需要借助一系列的多元统计分析方法进行降维处理和分析。常用的分析方法包括多变量数据分析、主成分分析、偏最小二乘法-判别分析、正交偏最小二乘法-判别分析和支持向量机分析等。本实验采用 Compound Discoverer 2.0 软件对白酒样本进行了无监督 PCA 分析(图 2),结果表明,3 种香型的白酒能各自较好的分开,聚类趋势明显。

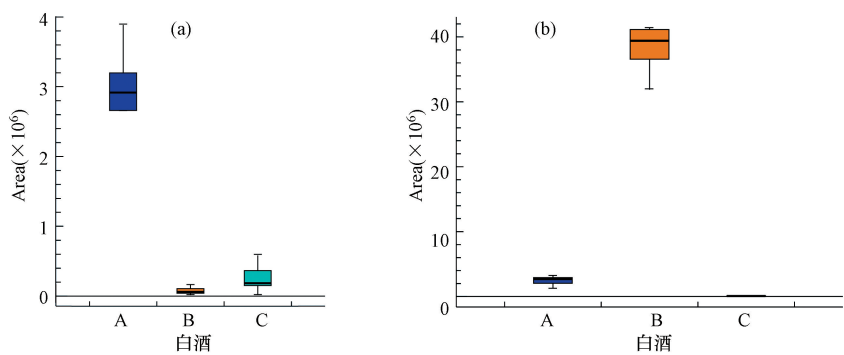


图 1 D-(+)-Proline(a) 和 Ethyl caproate(b)在三种香型白酒中的含量比较
(A)酱香型;(B)浓香型;(C)清香型

表 1 标记物列表

香型	标记物	分子式	精确分子量	保留时间/min
酱香型	D-(+)-Proline	C ₅ H ₉ NO ₂	115.06362	0.78
	DL-Carnitine	C ₇ H ₁₅ NO ₃	161.10524	0.729
	Betaine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.07922	0.746
	Choline	C ₅ H ₁₃ NO	103.10009	0.731
	Bis(2-ethylhexyl) adipate	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	370.30823	21.747
	Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.09474	0.931
	2,6-Dimethyl-γ-pyrone	C ₇ H ₈ O ₂	124.05272	12.935
	DL-Arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.11166	0.688
	3-Hydroxy-2-methylpyridine	C ₆ H ₇ NO	109.0532	11.683
	(1-Cyclopentyl-3-oxo-piperazin-2-yl) -acetic acid ethyl ester	C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₃	254.16303	18.434
	Choline O-Sulfate	C ₅ H ₁₃ NO ₄ S	183.05665	0.744
	(2E) -1-(2-Furyl) -3-phenyl-2-propen-1-one	C ₁₃ H ₁₀ O ₂	198.0682	18.241
	2-Isobutyl-3,5,6-trimethylpyrazine	C ₁₁ H ₁₈ N ₂	178.1471	19.153
浓香型	Ethyl caproate	C ₈ H ₁₆ O ₂	144.11513	19.277
	Methyl caproate	C ₇ H ₁₄ O ₂	130.09955	19.278
	1-(Ethylsulfanyl) -3-methoxy-2-propanyl acetate	C ₁₀ H ₁₃ N ₂ P	192.08213	13.448
	Ethyl isobutyrate	C ₆ H ₁₂ O ₂	116.0837	19.276
	Ethyl 4-oxocyclohexanecarboxylate	C ₉ H ₁₄ O ₃	170.0944	19.444

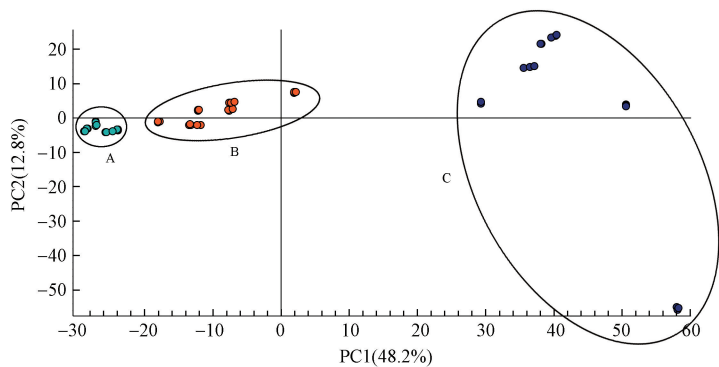


图 2 三种香型白酒中的 PCA 得分图：
(A)酱香型;(B)浓香型;(C)清香型

采用 SIMCA 软件以所选标记物为指标,对白酒样本进行有监督 OPLS-DA 分析,最大化地凸显模型内部不同组别之间的差异(图 3),结果表明三种香型的白酒可以得到良好的区分.以此 OPLS-DA 分析模型对已知另一典型浓香型白酒样品(沱牌曲酒)进行预判分析,来考察此模型对三种香型白酒的鉴别能力.结果表明,测试样品可以很好的和浓香型样品聚合在一起,和另外两种组能很好的区分,判断结果正确,如图 3 所示.

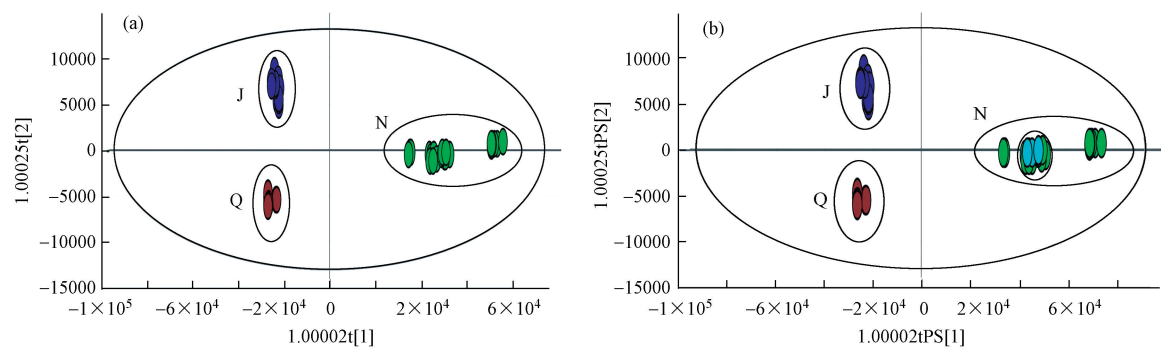


图 3 三种香型白酒中的 OPLS-DA 分析图(a)和预测分析图(b)
(J)酱香型;(N)浓香型;(Q)清香型

3 结论

本实验展示了基于代谢组学的分析方法在食品成分鉴定和种类鉴别中的工作流程.同时,结果也表明 Orbitrap 高分辨质谱技术结合组学分析软件 Compound Discoverer 2.0 及统计学分析软件 SIMCA,可以有效地鉴别浓香、酱香和清香等 3 种香型的白酒.本实验通过 mzCloud 谱图库比对可直接鉴定出 57 个白酒中的微量成分.从所选取的样本中找到共 18 个标记物,其中包括酱香型白酒因采用高温堆积发酵法通过微生物细胞蛋白产生的氨基酸类物质,如脯氨酸(Proline),以及浓香型白酒被广为认知的特征成分己酸乙酯(Ethyl caproate).与既有研究一致,也表明所选标记物具有极高的可信度.通过对已知样本的预判测试,显示出所建立的模型可以很好的用于对该 3 种香型白酒的判别分析.利用本文建立的这一套工作流程,可以推广到食品组学研究领域更广范围的品种鉴别、产地溯源、质量控制等各个研究方向.