

## HRMS和统计分析在印度香米真伪和潜在的食品掺假调查中的应用

---

Gareth E. Cleland, Adam Ladak, Steven Lai, Jennifer A. Burgess

Waters Corporation

---

### 摘要

印度香米的真伪在世界范围内受到越来越多的关注。多年来，部分商家采取以次充好的做法，将质量较差的大米假冒成长粒香米。根据一家位于印度的DNA大米真伪鉴别服务机构得出的结论，在流通于美国和加拿大的零售市场的印度香米中，有30%以上掺入了劣质谷物。2005年，英国食品标准局(Food Standard Agency)发现，在售出的印度香米中，约有一半掺入了其他品种的长粒米。真正的印度香米生长在喜马拉雅山脚下。哪些外部因素左右着大米的生长过程呢？来自其他产地的印度香米品种可以归类为印度香米吗？本应用纪要确立了一种原理论证方法，可用于评价超市所出售的印度香米样品的真伪。APGC、SYNAPT G2-Si和Progenesis QI软件联用可实现灵活的配置，对食品掺假和食品真伪鉴别应用均有很大帮助。

### 优势

- 食品真伪鉴别
  - 检测食品掺假行为
  - 代谢组学
- 

### 简介

---

印度香米的真伪在世界范围内受到越来越多的关注。多年来，美国、加拿大和欧盟等主要市场上的部分商家采取以次充好的做法，将质量较差的大米假冒成长粒香米。根据一家位于印度的DNA大米真伪鉴别服务机构得出的结论，在流通于美国和加拿大的零售市场的印度香米中，有30%以上掺入了劣质谷物<sup>1</sup>。2005年，英国食品标准局(Food Standard Agency)发现，在售出的印度香米中，约有一半掺入了其他品种的长粒米<sup>2</sup>。

真正的印度香米生长在喜马拉雅山脚下。哪些外部因素左右着大米的生长过程呢？来自其他产地的印度香米品种可以归类为印度香米吗？

本研究利用高分辨率GC-MS硬件和信息学技术的最新进展，确立了一种评估超市所售印度香米样品真伪的理理论证方法。该方法通过SPME和顶空法从加热后的干燥大米中提取挥发性目标化合物。待完成一般的GC分离后，使用Waters SYNAPT G2-Si MS在HDMS<sup>E</sup>模式下进行检测<sup>3</sup>。鉴于在GC或UPLC分离之后基于化合物的大小、形状和电荷进行正交的离子淌度分离，因此HDMS<sup>E</sup>数据集的收集可以实现高度特异性。

Progenesis QI是沃特世新推出的组学信息学套装，旨在利用SYNAPT G2-Si HDMS<sup>E</sup>采集过程中产生的四维数据。此方法首先对齐所有进样，然后执行创新的峰共检测过程，确保每个样品中的分析物测量结果数量相同，并且没有遗漏值。然后对来自同一母体化合物的所有同位素和加合物的数据去卷积，得到该母体化合物的单一稳定且准确的测量值。借助各种多变量分析(MVA)技术突出显示目标化合物，并使用软件平台内的解析工具和相关数据库搜索进行鉴定。

---

## 实验

### 样品前处理

如表1所示，研究人员从当地超市购买了来自不同生产商的几种大米。为避免暴露品牌，用样品ID编号。称取10 g干燥大米加入20 mL琥珀色顶空样品瓶中。大米样品一式三份，每个样品重复进样三次，无需返回同一样品瓶。将每种大米样品各取100 g并混合，然后剔除样品瓶的重量10 g，制得混合样品。所有样品均置于自动进样器托盘中，按照随机样品列表采集数据。

样品	说明	样品编号
1	印度香米生产商1	BAS M1
2	印度香米生产商2	BAS M2
3	长颗粒米生产商3	LG M3
4	印度香米生产商4	BAS M4
5	泰国香米生产商5	JAS M5
6	印度香米生产商3	BAS M3
7	泰国香米生产商4	JAS M4
8	混合样品	合并

表1.本研究使用的现成大米样品

## 结果与讨论

按照图1所示的分析工作流程，采集和解析全面的APGC/HDMS<sup>E</sup>非靶向数据集。大气压气相色谱(APGC)是一种“软”电离技术，与常规电子电离(EI)相比，产生的化合物碎片较少<sup>4</sup>。

母离子丰度增加有助于提升目标化合物的灵敏度。现在，母离子碎裂可以通过高分辨率MS<sup>E</sup> (HDMS<sup>E</sup>)采集来控制，此举也有助于提升特异性。

HDMS<sup>E</sup>在交替的MS功能模块中收集精确质量数母离子和精确质量数碎片离子数据（在高碰撞能量下），结合离子淌度分离，仅需一次进样即可提供经过时间校准、漂移校准的精确质量数母离子和精确质量数子离子信息<sup>2</sup>。在离子淌度的帮助下，本研究所用的色谱方法实现了更高分离，并且整体峰容量也相比常规GC-MS技术有所提升。



图1.本研究中大米样品的分析工作流程

本研究的数据处理采用了Progenesis Q1，这是沃特世新推出的组学软件包，能够充分利用HDMS<sup>F</sup>数据集中提供的信息。Progenesis Q1是一款创新的软件平台，能够执行对齐、峰提取和数据挖掘，定量分析并鉴定样品组之间的显著分子差异。

在对齐、峰检测和去卷积之后，研究了3885种化合物离子。首先进行主成份分析(PCA)，得到的得分图见图2。重复样品和集中混合/合并样品的进样表现出紧密的合并，表明该数据集具有统计学意义。一些印度香米样品落在左上象限，泰国香米样品落在右下象限，而长粒米样品则落在右上象限。在两个印度香米样品中观察到不同大米类型混合的异常结果。其中一个样品与泰国香米来自同一生产商，与其他的泰国香米合并(BAS M4)。第二个印度香米异常值(BAS M3)来自于长粒大米的同一生产商，该样品是与长粒大米样品混合的样品(LGM3)。

鉴于这些从商店购买的样品来源基本上未知，因此无法对样品的来源或纯度下结论。本研究的目的是设计一种原理论证方法，用于调查印度香米的真伪和潜在的食品掺假行为。因此，我们需要使用大量经过充分表征的样品开展研究，这些样品包括正品和仿冒印度香米样品。如果我们能通过这项新研究发现特色目标标志物，那么就希望基于质量控制实验室中更为常用的仪器（例如单四极杆或串联四极杆）确立质检方法。

采取正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)模型对数据进行进一步研究。为此，将图2中印度香米样品（BAS M1和BAS M2）进样的标志物（用蓝色方块突出显示）与长粒米样品(LG M3)的标志物（图2中用红色方块突出显示）进行比较。分析得到的S-Plot如图3所示，其中x轴表示特定分析物的变化幅度，y轴表示两组比较结果中分析物

的显著性。在图3中用红色方块突出显示的重要标志物或目标离子是代表两种大米之间差异最大的重要标志物的离子。突出显示后，只需单击鼠标右键即可标记一组标志物。然后，我们可以在Progenesis Q1中为分析物子集分配“标签”，以供进一步探讨。

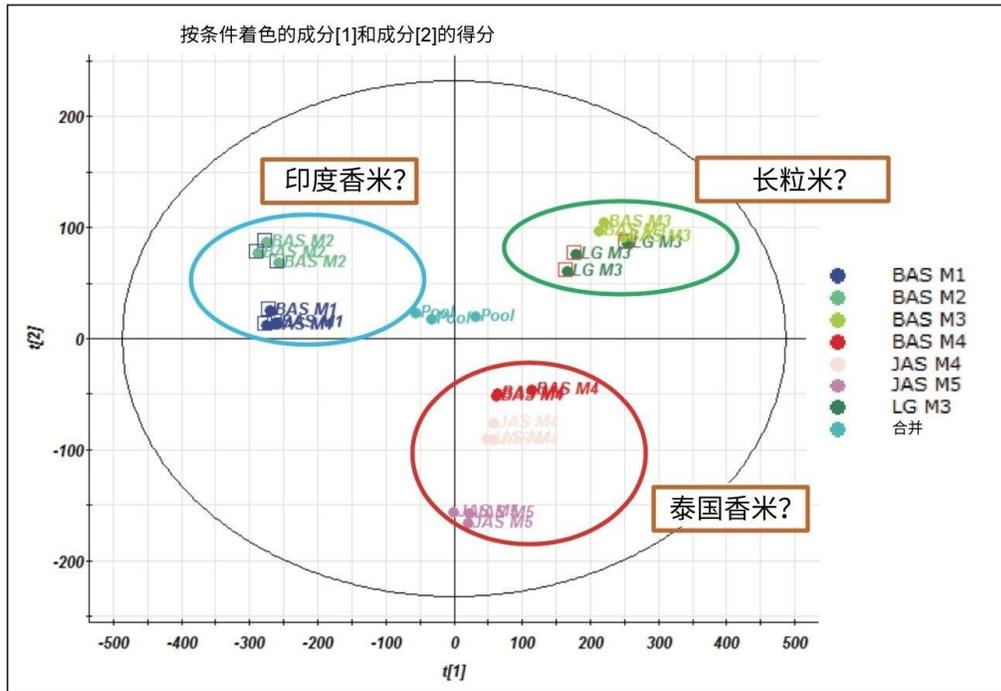


图2.大米样品PCA分析得分图。

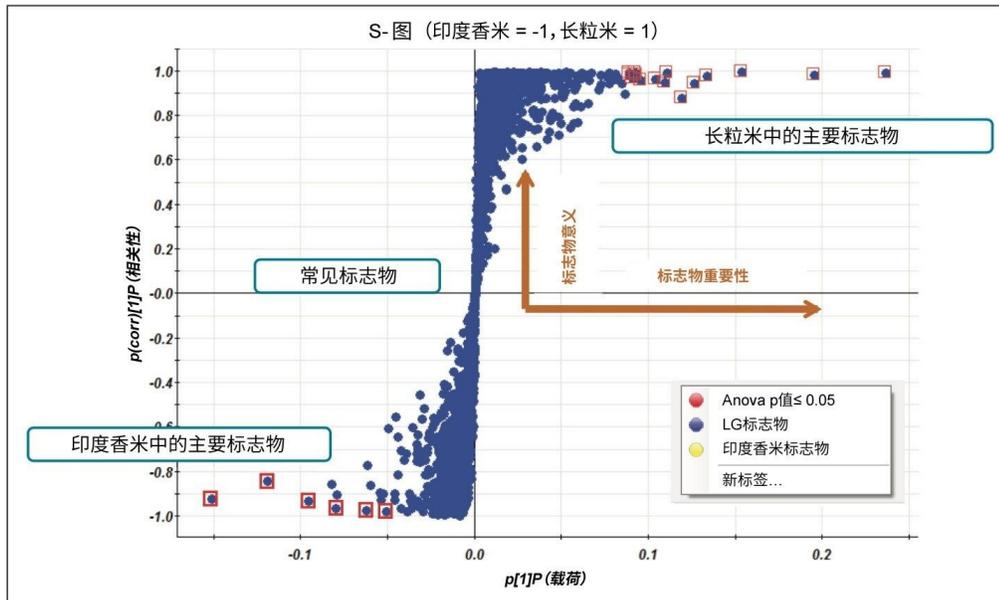


图3.显示印度香米和长粒米样品之间差异的OPLS-DA模型。

图4显示了印度香米中标记的六种标志物的标准化丰度谱图。标准化丰度曲线（也称为趋势图）显示了与所有其他进样相比，在印度香米 M1和M2样品中丰度靠前的六大目标标志物的归一化强度。考虑到混合样品（合并）中包含M1和M2样品，因此预期存在以上标志物。

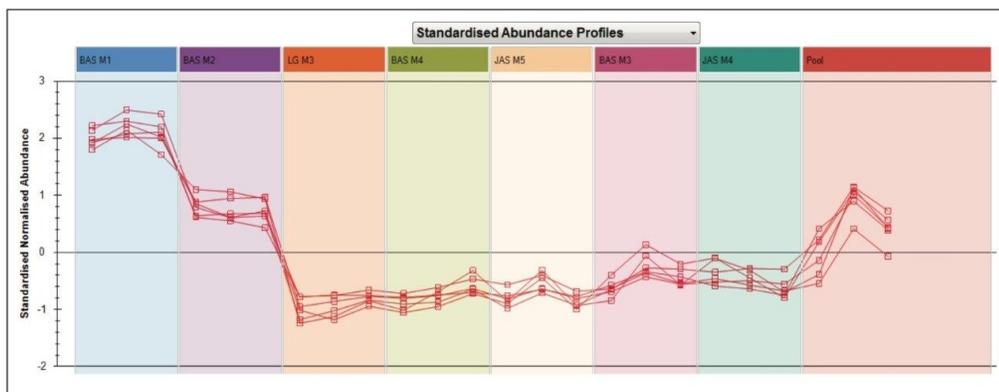


图4.六种印度香米相关标志物的标准化丰度谱图。

使用Progenesis QI中默认的快速标记筛选器和相关性分析功能进一步解析3885种化合物离子。对ANOVA P值(

$p < 0.05$ 应用快速标记筛选器，从最初生成的3885个离子中集中筛选出2907个具有统计学意义的离子。图5显示了满足ANOVA P值筛选条件(A)的标志物列表。图3中还显示了之前通过S-图获得的目标标志物的标准化丰度谱图(B)。从突出显示的下拉菜单(C)中选择相关性分析，将生成标志物的树状图。相关性分析根据化合物在所有样品中丰度特征的相似程度对其进行分组。目标标志物用圆圈突出显示的红线来表示(D)。在同一树状图分支中发现了表现出相似丰度特征的标志物。

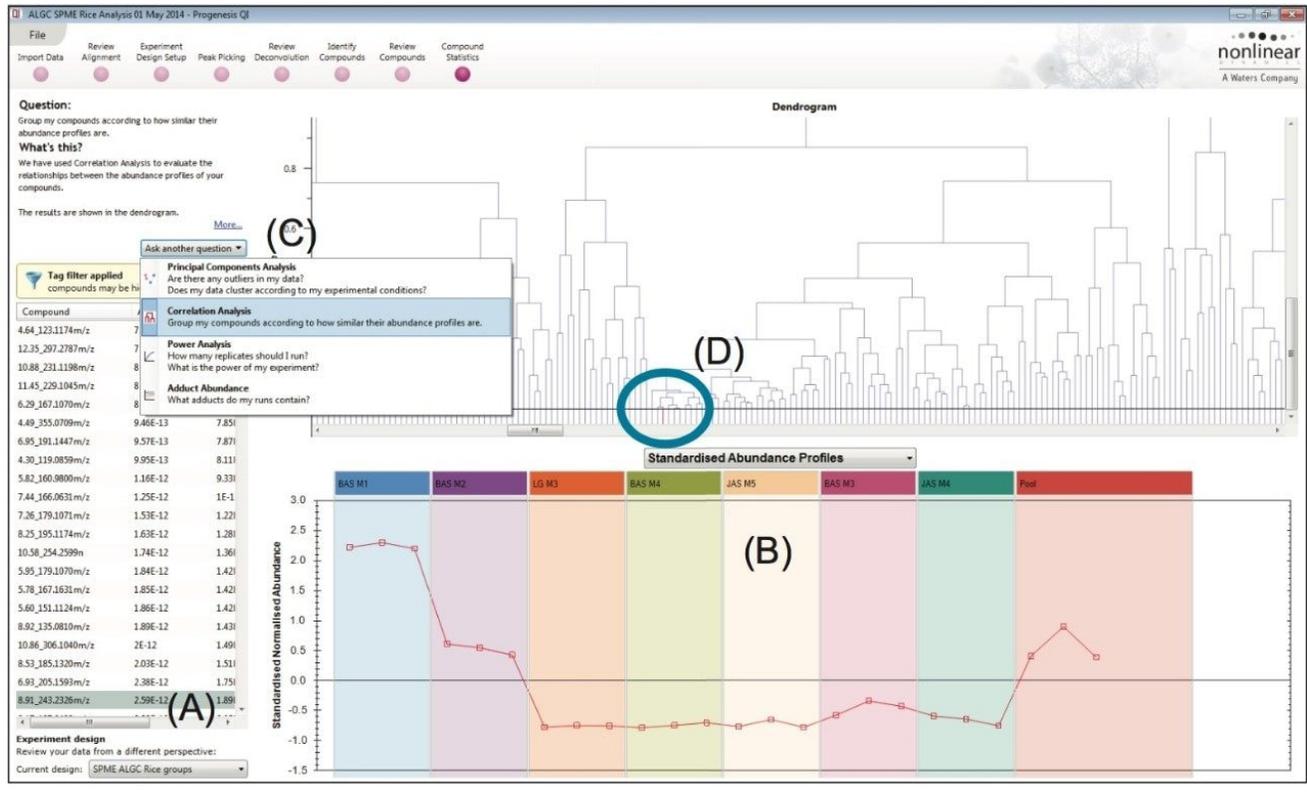


图5.在Progenesis Q1中找到并使用相关性分析(C), 该功能让用户能够进一步提取与所选标志物具有相似谱图的目标离子(B)。

使用“相关性分析”中的“树状图”，可以轻松分离、查看和标记与突出显示的标志物特征相似的这些标志物，如图6所示。在所有进样中，印度香米中超过50种表现出相似趋势的目标标志物现已得到分离和标记。

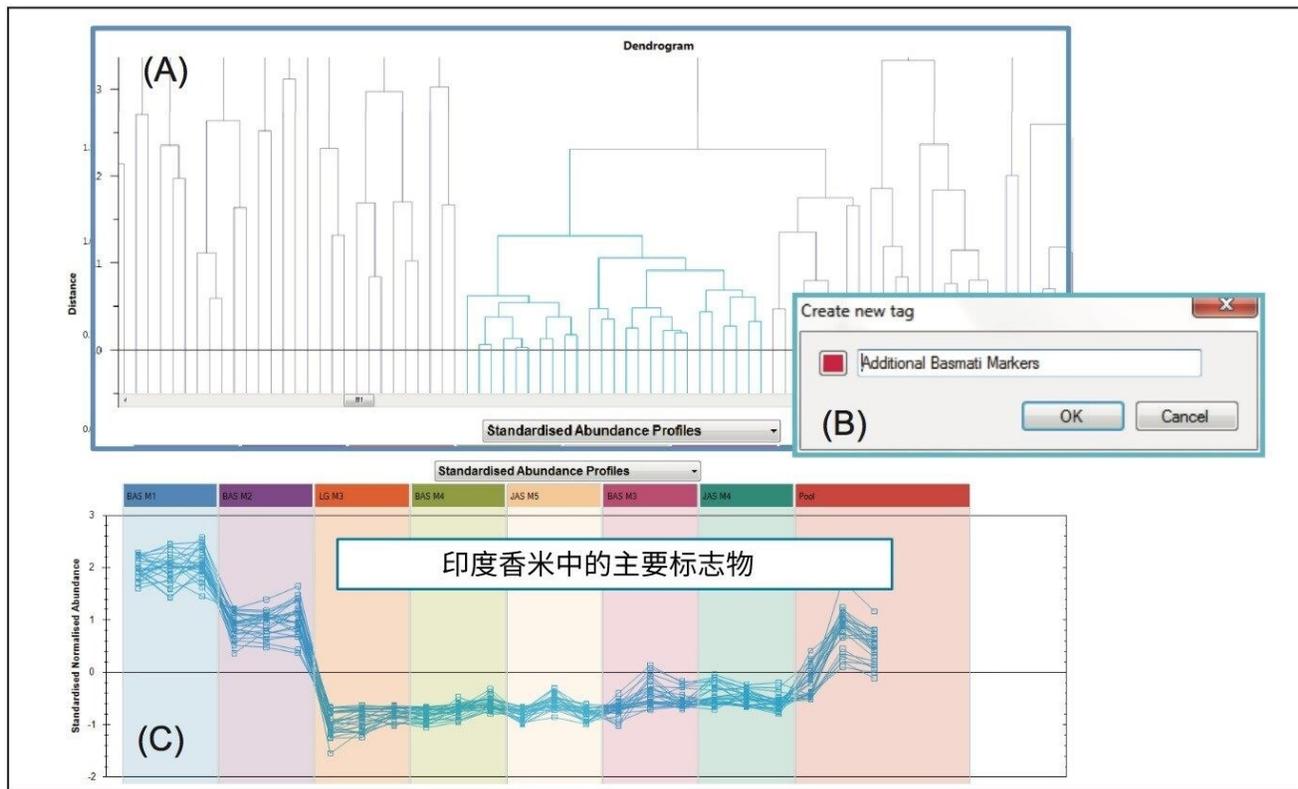


图6.(A)在印度香米中使用Progenesis QI中的相关性分析分离的更多目标标志物。(B)单击鼠标右键可以轻松标记这些标志物以进行解析。(C)所有57种分离标志物在所有进样中的标准化丰度谱图。

按照相同的步骤筛选长粒大米样品(LGM3)中的关键标志物。图7显示了使用Progenesis QI中的相关性分析提取的长粒米中26种目标标志物的标准化丰度谱图。从图7中可以看出，来自同一生产商的印度香米与长粒米在相同的目标标志物上表现出非常相似的丰度特征；而在其他印度香米样品中则未观察到这些标志物。这可能意味着该生产商的印度香米样品与长粒米样品之间的差异非常小。这也可能意味着包装材料对我们的分析产生了影响。

如前所述，我们需要使用大量经过充分表征的样品来测试这种原理论证方法，这些样品包括正品和仿冒印度香米样品。

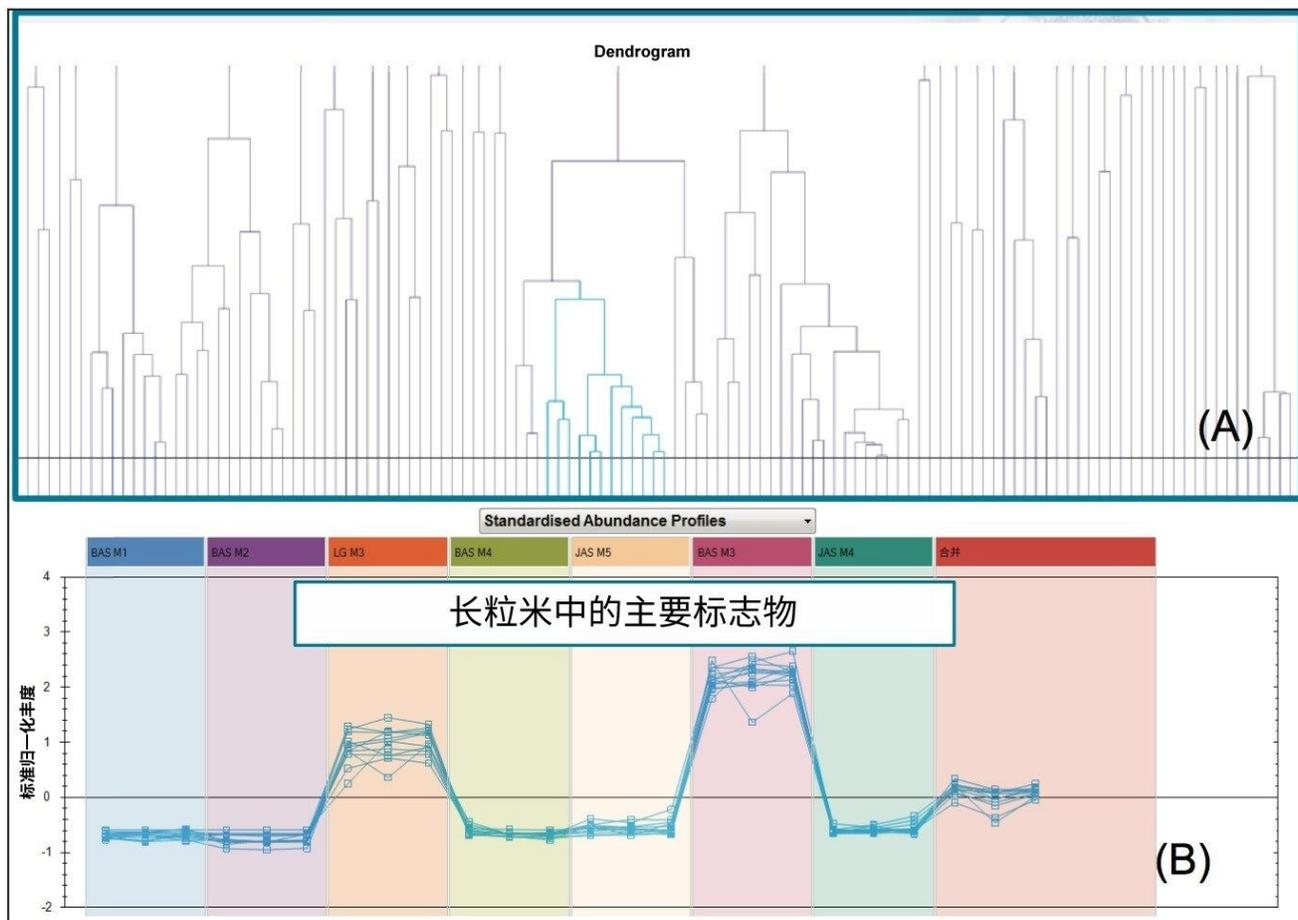


图7.(A)长粒大米中使用相关性分析分离的目标标志物。(B)所有26种分离标志物在所有进样中的标准化丰度谱图。

分离出目标标志物后，可采用以下几种方法进行解析和鉴定：

1. MassLynx软件中的结构表征。
2. Progenesis QI中的批处理数据库搜索。
- 3.使用Progenesis QI以外的方法进行批次数据库搜索。

## 结构表征

为确定目标离子的结构，需要将质量数或化学式（通过元素组成计算）提交至化学结构数据库，例如 ChemSpider。使用MassFragment工具检查搜索所得的选定结构，看是否匹配高能量精确质量数碎片离子。图

8总结了通过OPLS-DA分析获得的标志物271.2644 Da (10.79 min (10.79\_271.2644))的结构表征步骤。为确认结构提案，必须使用GC-MS/MS分析外购或合成的标准品。

注：Progenesis QI V2.0（将于2014年底推出）将内置元素组成和ChemSpider搜索功能。此项目完成时，这些功能尚不可用。

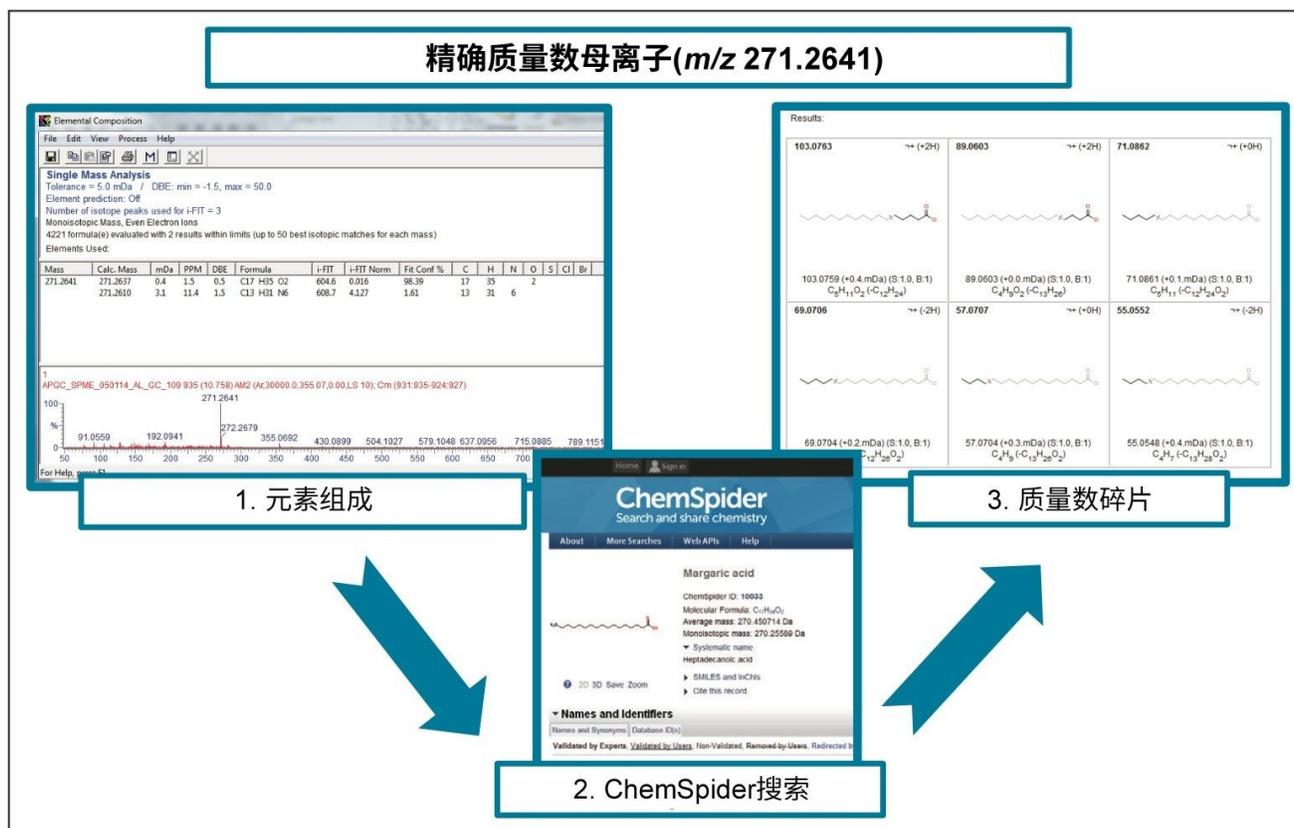


图8.使用MassLynx软件对分离的目标标志物进行结构表征的工作流程。

## 在Progenesis QI中进行数据库搜索

用户可以使用Progenesis QI的搜索引擎(Progenesis Metascope)查询内部数据库和公开数据库。搜索参数均经过自定义设置，旨在尽可能从数据库中获取有关目标数据各个方面的有用信息。软件将生成潜在鉴定结果列表，并根据质量精度、同位素分布、保留时间、漂移时间和碎片匹配等标准进行评分。如果所选数据库包含结构，则执行分子的理论碎裂，并使用碎裂得分将高能量精确质量数碎片离子的潜在鉴定结果与分子的理论解离程度进行排序。

图9突出显示了Progenesis QI软件中的这些可自定义的数据库搜索参数(A)。以及已经表征的标志物的鉴定示例(B)，通过搜索下载的多个公开数据库（NIST、ChEBI和HMDB）以及图9A中使用的搜索设置。由于软件能够对四维HDMS<sup>E</sup>采集数据进行时间和漂移校准，因此谱图专属性很高（谱图净化）。图9 (B)的高能量谱图中的所有碎片均按照数据库搜索得到的分子的理论解离碎片进行了分配，这增加了鉴定结果的可信度。通过MassLynx解析以及Progenesis QI中的数据库搜索来鉴定相同分子，也提高了鉴定结果的可信度。

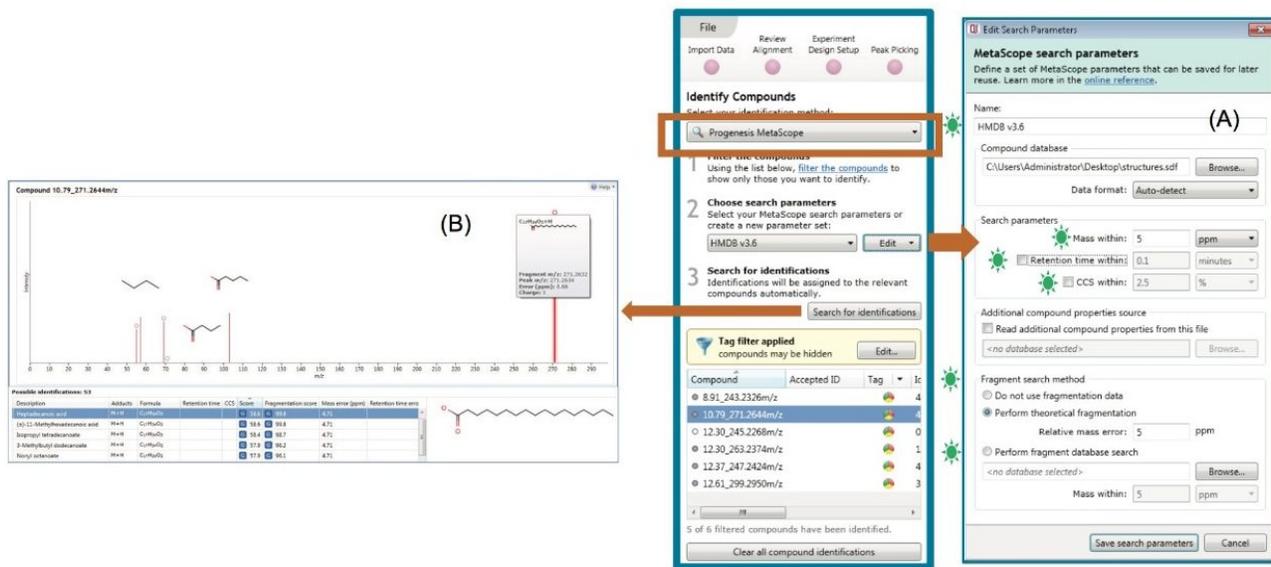


图9.Progenesis QI中可用的数据库和搜索设置(A)。典型鉴定结果示例(B)。

## 使用Progenesis QI以外的方法进行数据库搜索

如图10所示，也可以使用从Progenesis QI复制的质量数列表在剪贴板中批量提交至METLIN（代谢物和串联MS数据库）。用户将经过标签筛选的目标标志物列表复制到剪贴板后，代谢组学脚本中心网页会自动启动。METLIN数据库中的MS/MS谱图可用于与HDMS<sup>E</sup>采集获得的漂移和时间校准高能谱图进行比较。

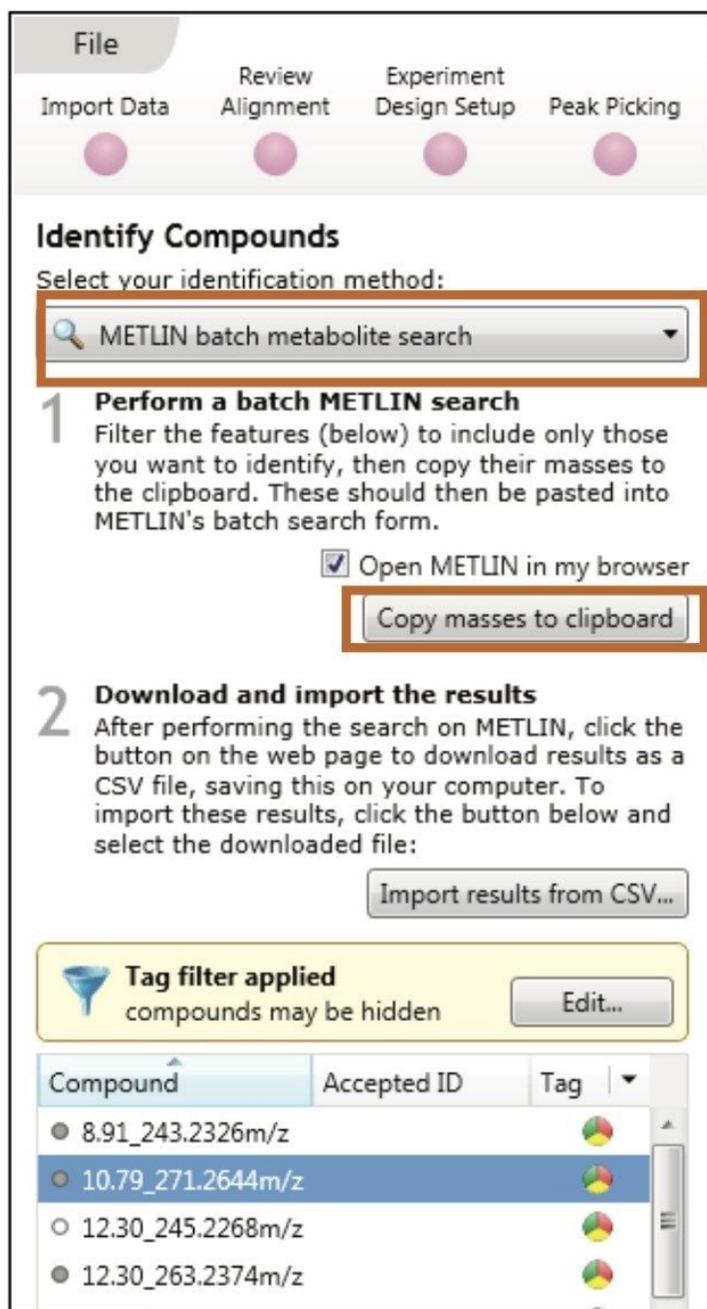


图10. Progenesis Q1中化合物鉴定页面的屏幕截图。突出显示的区域表示如何轻松地将目标标志物批量提交到外部(METLIN)数据库。

---

## 结论

- 借助数据独立、信息丰富的HDMS<sup>E</sup>采集功能，我们可以通过单次色谱运行获得母离子和子离子的精确质量数信息。
- APGC是一种软电离技术，可增加母离子的丰度，从而提高灵敏度和特异性。
- 通过将GC分离、HDMS<sup>E</sup>采集以及能够处理和审查四维数据的信息学工具相结合，我们可以将色谱运行中所有化合物的特异性带入全新的高度。
- Progenesis Q1中的对齐算法可在峰提取之前正确对齐进样中的特征。这有助于在一次分析的所有进样中更好地追踪目标离子。
- Progenesis Q1有效合理化并简化了复杂的非靶向未知物筛查工作流程，让化合物分离和鉴定更快、更轻松、更稳定。
- 软件中的统计分析模型（例如PCA、OPLS-DA和相关性分析）可轻松分离复杂基质中的目标离子。
- 借助简便易用的数据库搜索功能，我们可以从多个公开数据库中鉴定出目标离子。
- APGC、SYNAPT G2-Si和Progenesis Q1软件联用可实现灵活的配置，对食品掺假和食品真伪鉴别应用均有很大帮助。

---

## 参考资料

1. The Economic Times, “Basmati Export Adulteration Leaves Bad Taste in Mouth” , Prabha Jagannathan, Jul 6, 2007.[http://articles.economictimes.indiatimes.com/2007-07-06/news/28467196\\_1\\_basmati-rice-india-s-basmati-basmati-export](http://articles.economictimes.indiatimes.com/2007-07-06/news/28467196_1_basmati-rice-india-s-basmati-basmati-export)
2. Contamination concerns force new Basmati regulations, Fletcher A, August 2005.<http://www.foodnavigator.com/Legislation/Contamination-concerns-force-new-Basmati-regulations>
3. Waters SYNAPT G2-Si产品手册，P/N： 720004681ZH。

4. Waters APGC White Paper (《沃特世APGC白皮书》), P/N: 720004771EN。

---

## 特色产品

沃特世大气压气相色谱(APGC) <<https://www.waters.com/10100362>>

SYNAPT G2-Si高分辨率质谱仪 <<https://www.waters.com/134740622>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

Progenesis QI <<https://www.waters.com/134790652>>

720005218ZH, 2014年11月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号