

应用纪要

# 使用非靶向高清质谱代谢组学工作流程甄别不同的单花种蜂蜜

---

Antonietta Wallace, Joanne Connolly, Sara Stead, Simon Hird

Waters Corporation



---

## 摘要

蜂蜜是一种高价值食品，与之相关的欺骗性、误导性产品标识以及掺假现象屡见不鲜。代谢组学工作流程已日渐成为为食品掺假检测寻找生物标志物的强大方法。Progenesis Q1工作流程是一套简便易用且可扩展的系统，可执行如下的食品代谢组学数据分析：实现准确的峰对齐和峰提取；通过多变量统计分析对样品进行分类；定量分析每个样品类别的标志物的相对丰度；通过数据库搜索（基于结构表征工具）鉴定标志物。

## 优势

- 甄别蜜源不同的蜂蜜。
- 使用UPLC-MS/MS验证不同蜜源的蜂蜜中特定的标志物。

---

## 简介

食品掺假是一个综合的概念，它包括食品成分的替换、添加、变更行为，还包括蓄意虚报食品成分或食品包装材料，以及为了经济利益而发布虚假/误导性产品说明的行为<sup>1</sup>。近年来不少食品掺假丑闻更是证明这种行为还可能导致重大食品安全问题。

蜂蜜是一种高价值食品，与之相关的欺骗性、误导性产品标识以及掺假现象屡见不鲜。欧盟委员会(EC) 2015协调控制计划期间查处的不合规产品多数与糖类掺假(6%)和蜜源虚报(7%)有关。虚报产地的不合规产品有所减少(2%)，不过该问题的相关检测难度较大<sup>2</sup>。最近，人们开始审视蜂蜜的质控分析方法<sup>3</sup>。

蜂蜜的营养特性依赖于特定的化学成分，而这些成分随蜜源不同而变化。此外，这些特性还赋予了不同单花种蜂蜜独有的感官特征。因此，单花种蜂蜜的价格高于多花种蜂蜜。近年来，向高价值花种蜂蜜中掺杂低价值花种蜂蜜的掺假行为频繁出现。以麦卢卡蜂蜜为例，随着越来越多的人认识到这种蜂蜜提高抗菌活性、改善人类健康的优点，加之其产量有限，在巨大商业利益的驱使下，掺假事件频发。监管部门现在已就麦卢卡蜂蜜的产品标识要求以及特性定义给出了指导原则<sup>4</sup>。

蜂蜜花种的鉴定通常采用基于花粉表征的蜂蜜孢粉学分析方法，辅以感官和理化分析。然而，花粉鉴定对技术水平要求较高，且有时会给出错误结果，还有可能无法区分近似物种（例如麦卢卡树和卡奴卡树）。利用光谱和质谱技术同时检测多种成分并结合统计学方法进行分析，是一种非常有潜力的蜜源甄别方法<sup>5</sup>。LC-HRMS技术被广泛用于食品和饮料行业的代谢分析<sup>6,7,8</sup>，其中就包括蜂蜜分析<sup>9</sup>。

本研究将沃特世超高效液相色谱(UPLC)与高清质谱(HDMS)联用，配合多变量统计分析方法组成一套非靶向代谢组学工作流程，考察了该工作流程是否能够区分蜜源不同的蜂蜜。HDMS将离子淌度质谱与高清质谱相结合，让研究人员能够根据离子的大小、形状、所带电荷以及质量数对其进行分析。我们使用UPLC与串联四极杆(TQ)质谱联用的靶向方法验证了不同蜜源的特定标志物。

---

## 实验

实验样品为来源可靠的正品油菜(3)、石南(9)、荞麦(5)和麦卢卡(8)单花种蜂蜜。每种蜜源的蜂蜜都包括来自不同国家/地区（挪威、丹麦、立陶宛、波兰和新西兰）且采集年份不同的独立样品，因此每种蜜源都有多个生物重复样。蜂蜜样品的制备过程极为简单：用10 mL甲醇/1%甲酸水溶液（50:50，v/v）稀释蜂蜜样品(0.5 g)、振摇、超声处理(20 min)并离心。样品均按随机顺序分析，其中包括出于质控目的穿插的混合蜂蜜样品。

### 第1部分：UPLC-HDMS

在SYNAPT G2-Si质谱仪上，采用正离子和负离子电喷雾电离模式以及HDMS<sup>F</sup>采集模式对样品重复执行三次分析。HDMS<sup>F</sup>数据非依赖型分析能够测定所有可检出离子（包括母离子和碎片离子）的精确质量数。母离子和碎片离子数据的谱图及漂移时间对齐功能有助于将碎片离子分配给质量数或保留时间接近的母离子。

### UPLC条件

UPLC系统：	配备FTN自动进样器的 ACQUITY UPLC I-Class系统
色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH C <sub>18</sub> , 1.7 μ m, 2.1 × 100 mm
流动相A：	10 mM醋酸铵(水溶液)
流动相B：	乙腈
流速：	0.5 mL/min

进样体积: 5  $\mu$ L和9  $\mu$ L

柱温: 45  $^{\circ}$ C

样品温度: 5  $^{\circ}$ C

运行时间: 12 min

## 梯度

时间( min)	%A	%B	曲线
0.00	99	1	-
0.75	99	1	6
2.00	95	5	6
3.00	95	5	6
6.50	45	55	6
8.50	10	90	6
9.00	10	90	6
9.10	99	1	6

## MS条件

MS系统: SYNAPT G2-Si HDMS

采集模式：	ESI+, ESI-; 分辨率模式; HDMS <sup>E</sup>
采集质量数范围：	50~1200 <i>m/z</i>
扫描时间：	0.1 s
实时质量校正标样：	<i>m/z</i> 556.2766 (亮氨酸脑啡肽 )
碰撞能量范围：	15~55 eV
毛细管电压：	3.1 kV
脱溶剂气温度：	600 °C
脱溶剂气流速：	800 L/h
离子源温度：	130 °C
锥孔电压：	30 V
锥孔气流速：	35 L/h
喷雾器气压：	5 Bar
缓冲气体：	N <sub>2</sub>
IMS波速范围：	650 m/s
IMS波高：	40 V+

IMS气体流速:	90 mL/min
数据采集软件:	MassLynx 4.1版
生物信息学软件:	Progenesis QI (2.2), 带 EZinfo (MKS Data Analytics Solutions, 瑞典), 可访问多 个数据库, 包括: HMDB、 Metlin和MassBank

## 第2部分: UPLC-MS/MS

### UPLC条件

UPLC系统:	配备FTN自动进样器的 ACQUITY UPLC I-Class系统
色谱柱:	ACQUITY UPLC CSH苯己基1.7 $\mu\text{m}$ , 2.1 x 100 mm
流动相A:	0.1 %甲酸 (水溶液)
流动相B:	乙腈
流速:	0.4 mL/min
进样体积:	5 $\mu\text{L}$
柱温:	40 $^{\circ}\text{C}$
样品温度:	15 $^{\circ}\text{C}$

## UPLC条件

运行时间: 9 min

时间(min)	%A	%B	曲线
0.00	90	10	-
3.00	60	40	6
5.00	10	90	6
7.00	10	90	6
7.10	90	10	6

## MS条件

MS系统: Xevo TQ-S

采集模式: ESI+

毛细管电压: 2.0 kV

脱溶剂气温度: 500 °C

脱溶剂气流速: 1000 L/h

离子源温度: 150 °C

锥孔气流速: 150 L/h

碰撞气体流速:	0.15 mL/min
雾化器气压:	7 Bar
独麦素的MRM通道。	581>211和581>323[来自Kato等人, (2014)]
锥孔电压:	34 V
碰撞能量:	分别为16和22 eV (使用麦卢卡蜂蜜样品进行了优化)
驻留时间:	35 ms
数据采集软件:	MassLynx v.4.1
数据处理软件:	TargetLynx XS应用软件

---

## 结果与讨论

### 第1部分: UPLC-HDMS

图1是在负离子模式下采用低能量条件进行HDMS<sup>E</sup>实验得到的混合QC蜂蜜样品基峰强度(BPI)谱图, 尽管谱图中有一些峰, 但无法解析蜂蜜样品萃取物的复杂程度。插图表明大量代谢物存在共流出现象, 这妨碍了鉴定工作。因此, 我们需要对数据进行更加深入的评估。

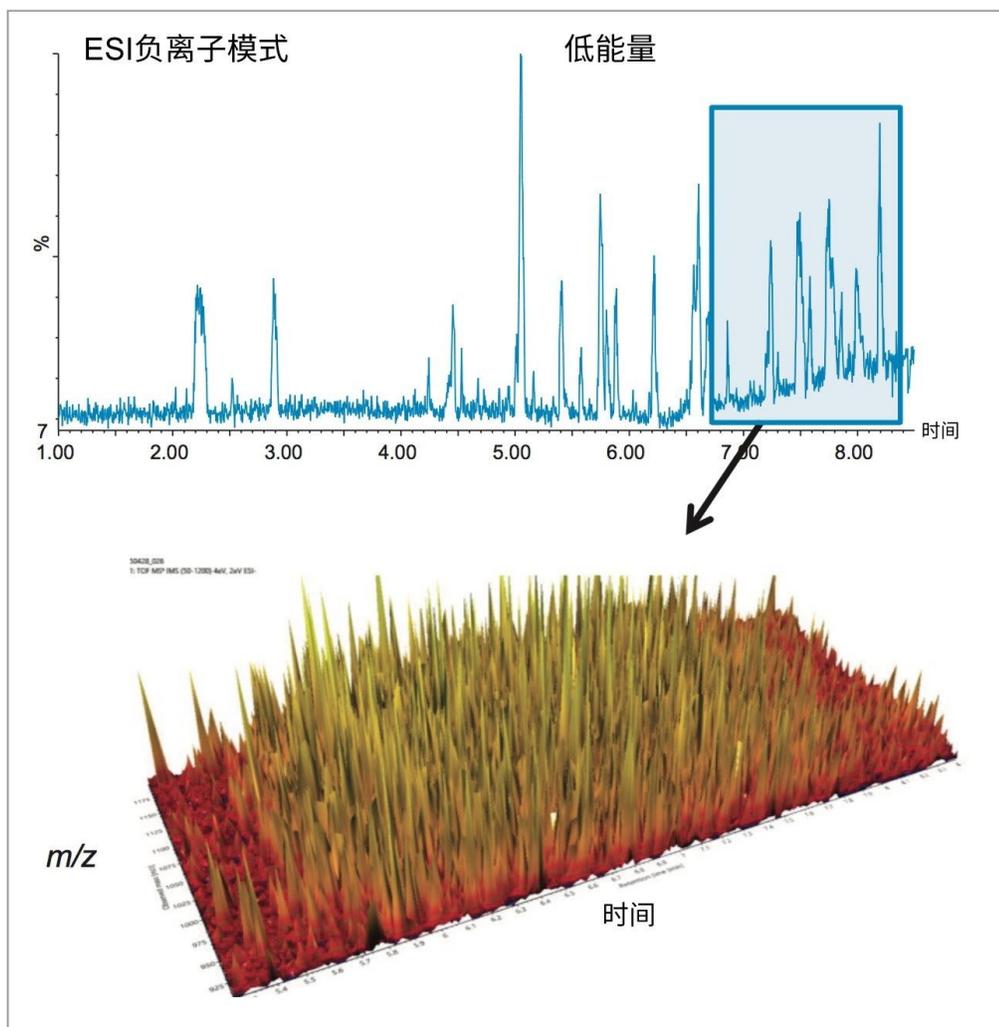


图1.使用UPLC-MS（ESI负离子模式，低能量， $HDMS^E$ 数据）分析混合QC蜂蜜样品得到的典型基峰强度(BPI)谱图，以及数据子集的3D图。

在ESI正离子和ESI负离子模式下采集到的两个数据集都被导入Progenesis Q1数据分析软件，用以搜索和识别蜜源的独有标志物。该软件利用用户友好的工作流程比对多个样品，从而识别出不同单花种蜂蜜之间的显著差异。

使用Progenesis Q1完成对齐、峰检测和去卷积后，采用主成分分析(PCA)法对提取自ESI负离子 $HDMS^E$ 数据的9000种化合物进行初步研究，以确定数据中是否存在异常值以及样品分组情况。此时我们并未尝试将数据分类为不同单花种蜂蜜；PCA分析可以评估数据集内的差异，并据以判断样品间的偏差是否高于蜜源间的差异。将数据导出至EZInfo后，进行Pareto缩放并执行PCA分析。缩放即缩小或放大各变量差异，以确保得分与载荷相比不会过小，导致其在图中不可见。Pareto缩放通常用于降低高强度峰产生的影响，同时对强度较弱但可能具有较高显著

性的峰进行强化。Pareto缩放功能可使强信号对应的载荷减少，使弱信号对应的载荷增加。EZInfo根据ESI负离子HDMS<sup>F</sup>数据生成的单花种蜂蜜PCA得分图表明，混合QC、荞麦、石南、油菜和麦卢卡蜂蜜都分别聚集成为独立的集群（图2）。所有混合QC样品都紧紧聚集在PCA得分图中心，这表明该方法的重现性良好并且数据处理过程未引入任何偏差。

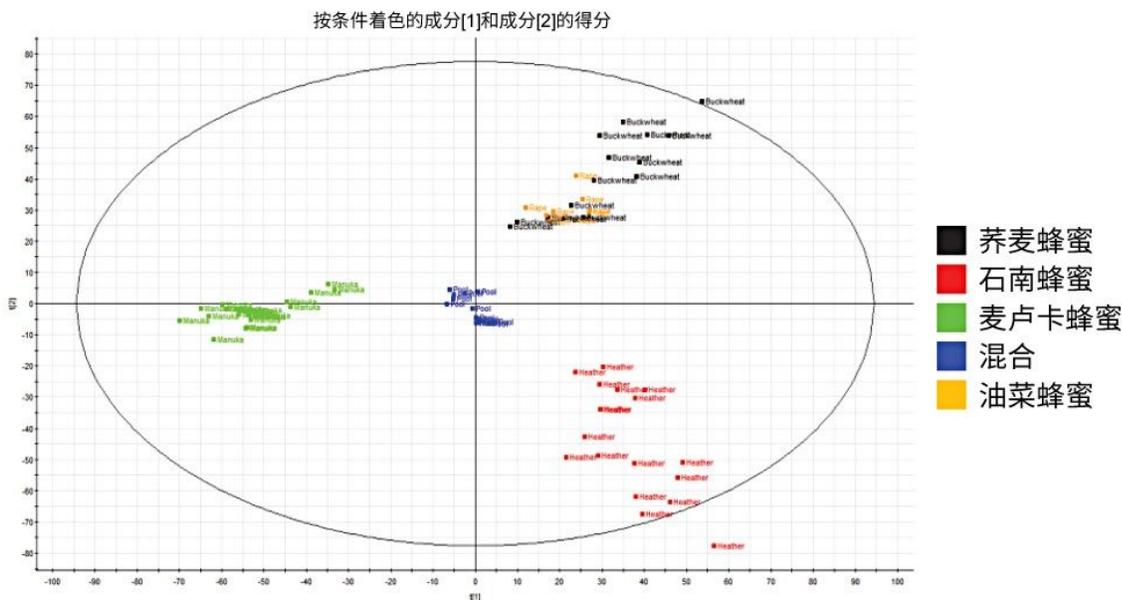


图2. EZInfo生成的主成分分析(PCA)得分图 (ESI负离子HDMS<sup>F</sup>数据)。

为更好地掌握不同类型单花种蜂蜜之间的分离情况并鉴定各单花种蜂蜜的潜在特征标志物，本研究采用正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)方法进行了监督式多变量分析。OPLS-DA是一种监督式技术，其利用回归和预测方法将化合物离子归入可用分组。OPLS-DA的优势在于其能够显示出哪些变量与分类有关，因此可协助结果解析。根据ESI负离子HDMS<sup>F</sup>数据生成的单花种蜂蜜OPLS-DA得分图（图3）展示了化合物离子的分类情况，它们被归入各个蜂蜜分组，包括混合QC、荞麦、石南、油菜和麦卢卡蜂蜜。

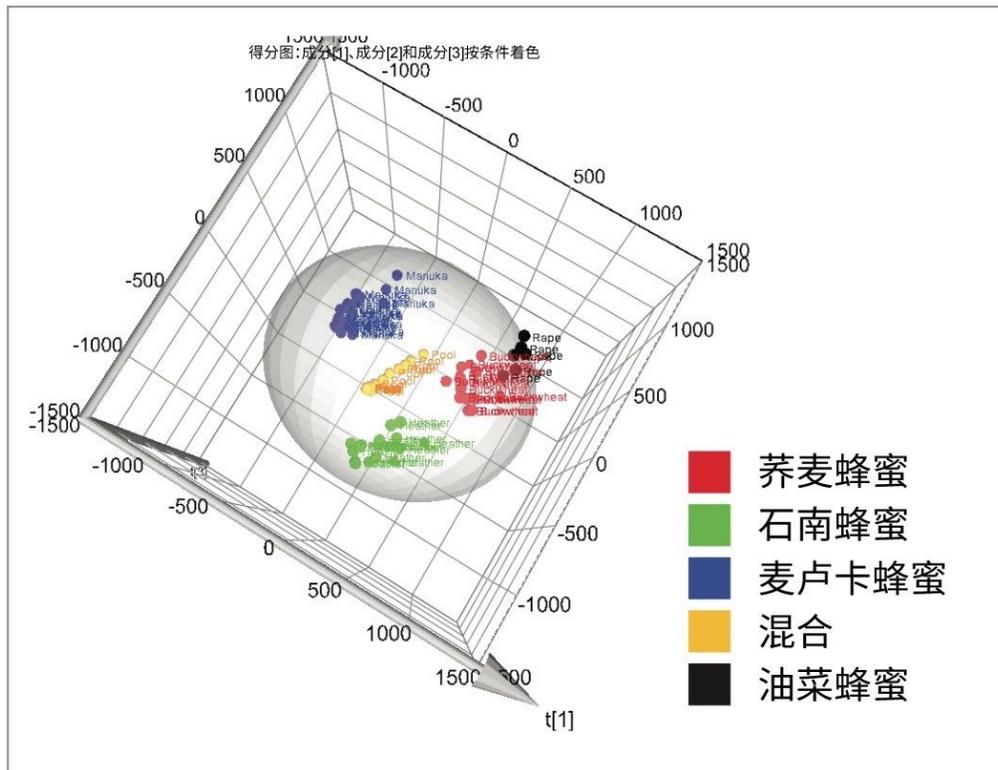


图3.EZInfo生成的OPLS-DA得分图（ESI负离子HDMS<sup>E</sup>数据）。

此外，还可创建如图4所示的S-plot，用以快速突出那些最可能导致不同单花种蜂蜜间出现差异，且对这些差异贡献最大的特征（图4中用红线突出显示的区域）。随后可根据S-plot选择某些特征，导入Progenesis Q1并标记，以便对其进行独立筛选和审查。图4所示为根据ESI负离子HDMS<sup>E</sup>数据生成的麦卢卡蜂蜜和石南蜂蜜的S-plot。分析人员还可以将目标样品组（例如麦卢卡蜂蜜）与所有其他蜂蜜样品进行比较，方法是创建一个包含所有其他单花种蜂蜜的新组。我们标记了S-plot中最显著的标志物，然后将数据导回Progenesis Q1接受验证和进一步评估（例如鉴定）。

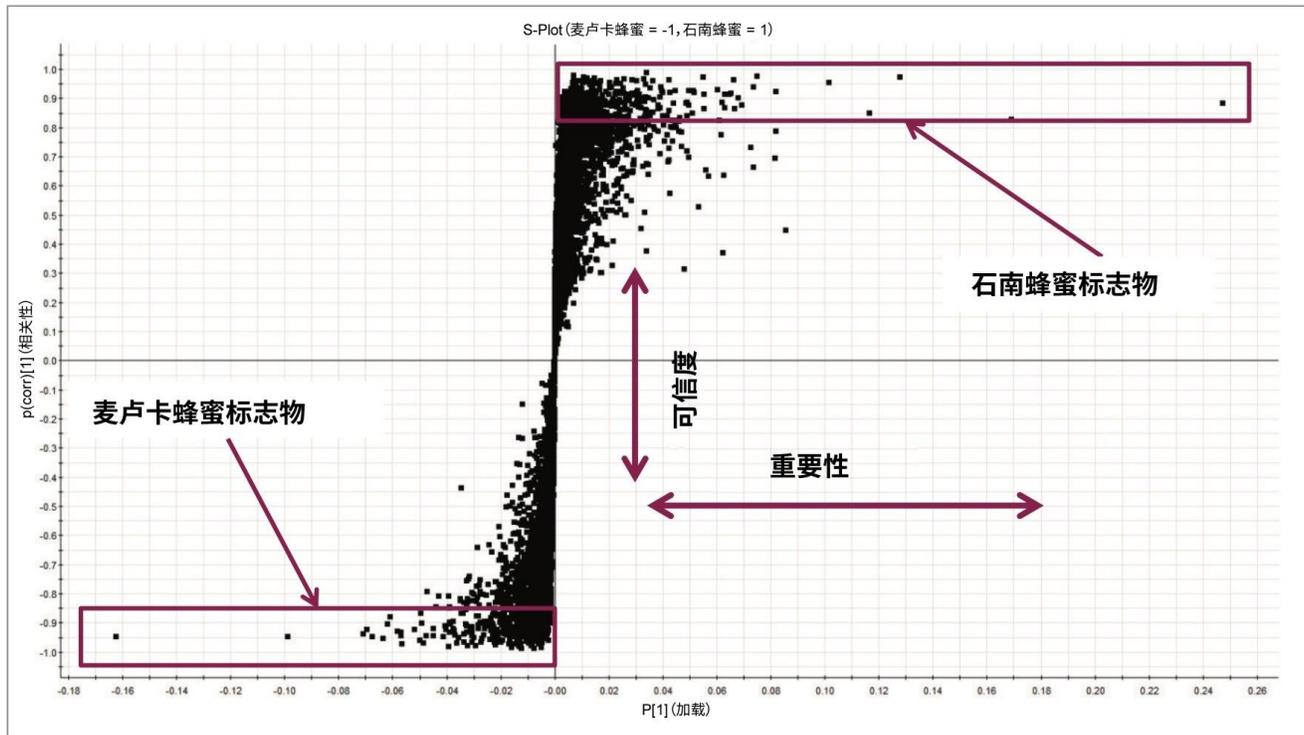


图4.通过EZInfo得到的S-plot，比较了麦卢卡蜂蜜与石南蜂蜜（ESI负离子 $HDMS^E$ 数据）。

将EZinfo标记的标志物数据导回Progenesis Q1之后，软件先通过数据筛选来验证所选的标志物，然后再进行鉴定。选择表现出显著差异（方差分析p 值 $< 0.0001$ ）且在某一种单花种蜂蜜中丰度最高（高于其他蜂蜜5倍或以上）的标志物进行进一步研究。使用Progenesis Q1搜索引擎中的Progenesis MetaScope搜索工具检索公开数据库（图5）。



从数据库检索到的标识物条目

图5.通过数据库搜索得到的标志化合物初步鉴定结果示例。

搜索参数均经过自定义设置，旨在最大限度从数据库中获取有关目标数据各个方面的有用信息。系统根据总体得分对各标志物可能的鉴定结果进行排序，打分依据包括：质量误差、同位素相似性（通过比较测得的化合物同位素分布与基于化合物化学式的理论分布之后计算而得）和碎片离子得分。为提高化合物鉴定结果的可信度，我们还对候选列表中的化合物进行了模拟理论碎裂，然后将得到的模拟碎裂结果与该化合物的测定/实测碎片离子进行匹配。由于数据分析软件能够对四维HDMSE谱图数据进行时间和漂移校准，因此谱图专属性极高（谱图净化）。

系统突出显示了鉴定出的代谢物中能够区分麦卢卡蜂蜜样品的代谢物，即文献已报道过的麦卢卡蜂蜜标志物<sup>10</sup>。图6以图示形式展示了其中三种标志化合物的标准化丰度特征，从而提供了有关不同类型单花种蜂蜜间化合物丰度差异的信息，以及所观察到的差异的可靠性信息。附表中列出了分配的鉴定结果及统计值。

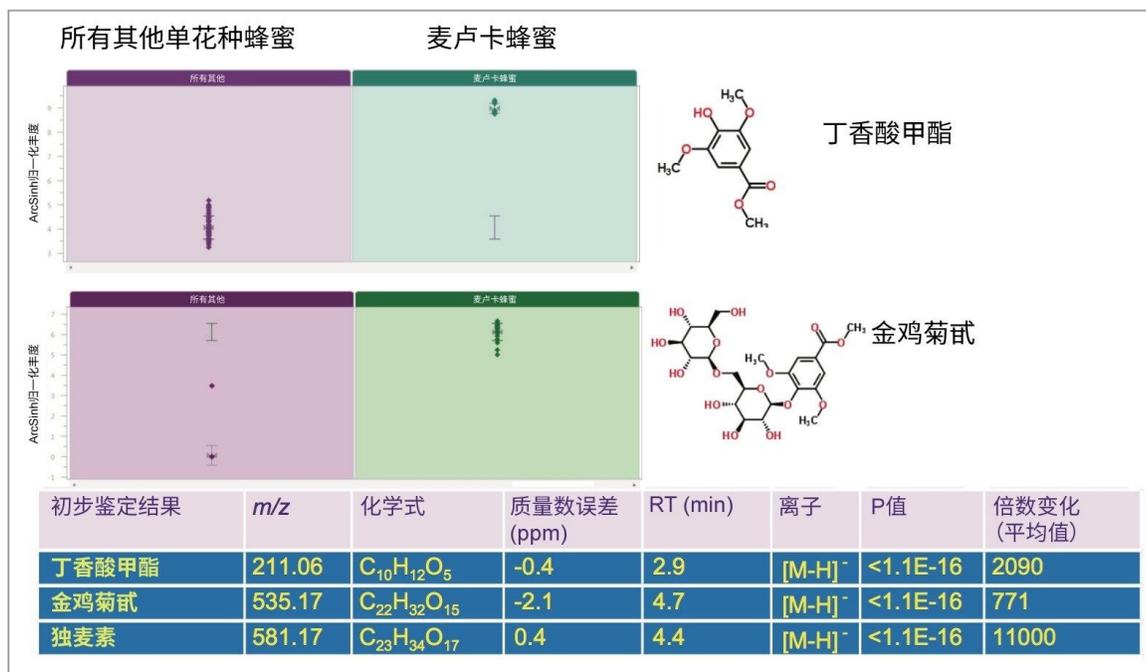


图6. Progenesis Q1软件中麦卢卡蜂蜜三种标志物的标准化丰度特征和鉴定分配结果。

## 第2部分：UPLC-MS/MS

我们采用MRM模式下的靶向UPLC-MS/MS方法对独麦素（根据UPLC-HDMS数据鉴定出的麦卢卡蜂蜜标志物之一）单独进行了鉴定。由图7所示的MRM色谱图可见，麦卢卡蜂蜜样品中检出了独麦素，而在石南蜂蜜样品中未检出该化合物。

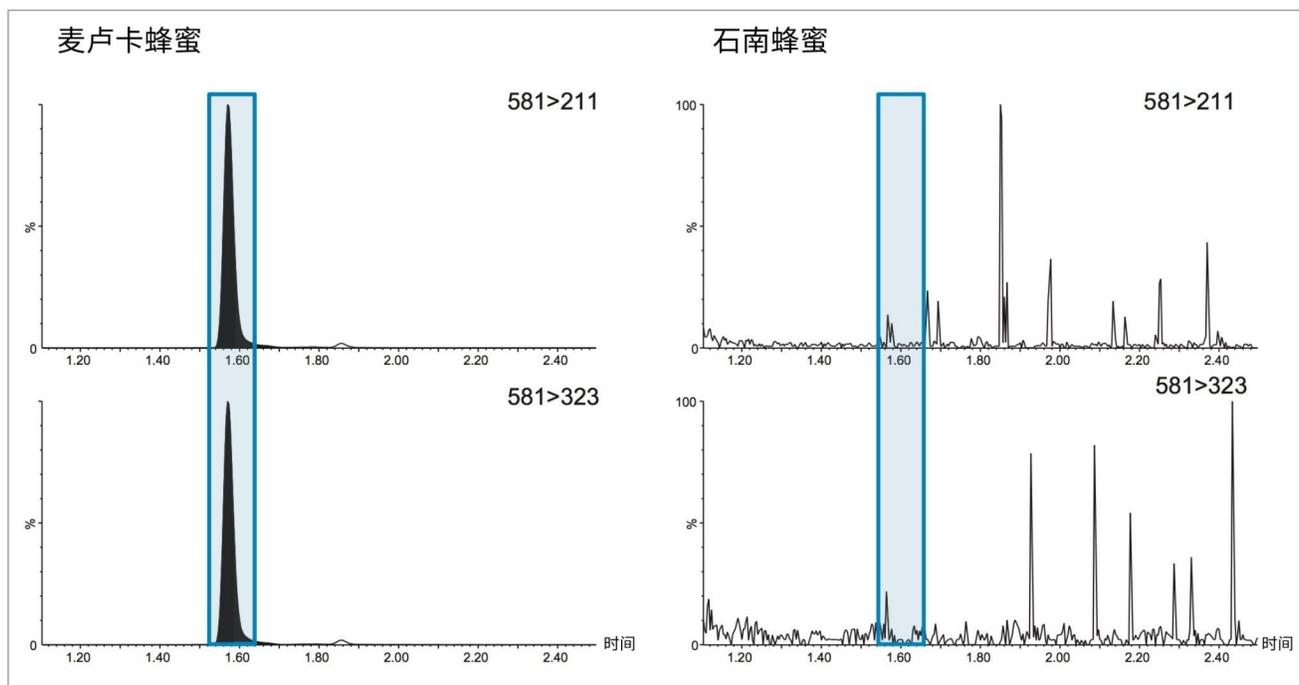


图7.检测麦卢卡蜂蜜样品和石南蜂蜜样品中的独麦素时所得的MRM色谱图。

## 结论

代谢组学工作流程已日渐成为为食品掺假检测寻找生物标志物的强大方法。UPLC可实现高效分离，而全面的无偏HDMS<sup>F</sup>采集则能够提供信息量丰富的数据，包括母离子和碎片离子的精确质量数及同位素分布信息。离子淌度技术的加入提高了峰容量、改善了异构体分离并有效净化了谱图。Progenesis Q1工作流程是一套简便易用且可扩展的系统，可执行如下的食品代谢组学数据分析：实现准确的峰对齐和峰提取；通过多变量统计分析对样品进行分类；定量分析每个样品类别的标志物的相对丰度；通过数据库搜索（基于结构表征工具）鉴定标志物。

## 参考资料

1. Spink and Moyer. Defining the public health threat of food fraud. *J Food Sci.* 76 (9): R157–R163, 2011.

2. [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/official-controls\\_food-fraud\\_honey\\_controlplan-results.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/official-controls_food-fraud_honey_controlplan-results.pdf)
3. Pita-Calvo et al. Analytical methods used in the quality control of honey. *J Agric. Food Chem.* 65: 690–703, 2017.
4. <https://www.mpi.govt.nz/growing-and-producing/bees-and-other-insects/manuka-honey/>
5. Spiteri et al. Combination of <sup>1</sup>H NMR and chemometrics to discriminate manuka honey from other floral honey types from Oceania. *Food Chem.* 217: 766-772, 2017.
6. Jandric et al. Assessment of fruit juice authenticity using UPLC–QToF MS: A metabolomics approach. *Food Chem.* 148: 7-17, 2014.
7. Dai et al. Nontargeted analysis using ultraperformance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry uncovers the effects of harvest season on the metabolites and taste quality of tea (*Camellia sinensis* L.). *J Agric. Food Chem.* 63: 9869-9878, 2015.
8. Black et al. A comprehensive strategy to detect the fraudulent adulteration of herbs: The oregano approach. *Food Chem.* 210: 551-557, 2016.
9. Jandric et al. An investigative study on discrimination of honey of various floral and geographical origins using UPLC-QToF MS and multivariate data analysis. *Food Control.* 72: 189-97, 2017.
10. Kato Y et al. (2014). Plausible authentication of manuka honey and related products by measuring leptosperin with methyl syringate. *J Agric. Food Chem.* 62(27): 6400–7, 2014.

## 致谢

沃特世非常感谢Fera Science Ltd协助进行Xevo TQ-S分析。

---

## 特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

SYNAPT G2-Si高清质谱仪 <<https://www.waters.com/134740622>>

---

[MassLynx质谱软件 <https://www.waters.com/513164>](https://www.waters.com/513164)

[Progenesis QI <https://www.waters.com/134790652>](https://www.waters.com/134790652)

[Xevo TQ-S <https://www.waters.com/10160596>](https://www.waters.com/10160596)

[TargetLynx <https://www.waters.com/513791>](https://www.waters.com/513791)

720005963ZH, 2017年4月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)