

## 使用基于快速蒸发电离质谱和LiveID软件的实时脂类组学分析方法进行海产品掺假检测

---

Sara Stead, Nathaniel Martin, Connor Black, Olivier Chevallier, Chris Elliott

Waters Corporation, Institute for Global Food Security, Advanced ASSET Centre, Queen's University Belfast

---

### 摘要

在本应用纪要中，我们将REIMS与LiveID软件实时执行的化学计量学建模相结合，在物种水平准确鉴定了五种市售常见、外观和遗传相似的白海鱼种。

采用LiveID技术的REIMS无需样品制备，可提供几乎即时的准确结果。与当前基于PCR的方法相比，REIMS缩短了分析和数据解析所需的时间，显着提高了操作效率。REIMS与LiveID的结合已被证明是检测市售鱼肉掺假的补充技术。

### 优势

- 无需样品制备或色谱分离即可在物种水平上对基因相似的鱼类进行实时鉴定。
- 适用于受控点的定性检测，所需的样品操作很少。
- 针对各种食品真伪鉴别、完整性检验和质量控制难题开发可靠的模型并进行验证。
- 通过直观的软件，非专家水平的用户也能轻松上手，可针对各种食品的真伪鉴别、完整性检验、质量控制难题开发可靠的模型并进行验证。

---

## 简介

由经济利益驱动的海产品掺假(EMA)是一个全球性问题，其发生率高得惊人，据估计，平均有30%的在售鱼产品存在虚报或贴错标签<sup>1</sup>。据联合国粮食及农业组织(FAO)估计，全球海产品行业每年估值为4000亿美元（全球行业分析师预计截止2018年这一估值将升至4300亿美元），那么掺假的估值就相当于全球海产品行业的近1200亿美元份额<sup>2</sup>。

基因组学、蛋白质组学、代谢组学和脂质组学是食品掺假检测研究中常用的四种系统生物学方法，在某些情况下互为补充技术<sup>3</sup>。大多数鱼肉掺假检测研究都会利用基因组分析，因为DNA存在于所有细胞和生物体中，检测人员可以分析所有组织类型中的DNA，包括新鲜捕获的鱼到经过加工和烹饪的样品<sup>4</sup>。虽然使用聚合酶链式反应(PCR)可以获得非常准确的定性和定量结果，但其通常需要经过长时间且步骤复杂的样品制备，分析运行时间也较长，有时甚至需要一个工作日以上。对于管理快速流动的供应链中的欺诈行为而言，这是一个很大的缺点。

快速蒸发电离质谱(REIMS)是常压电离质谱的一种，与许多创新分析技术一样，专为医学研究目的而开发。此技术采用电切刀或两极钳进行操作，切割组织样品时会生成气溶胶（烟雾）。从样品排出的气溶胶通过传输管路进入质谱仪的电离源，在电离源的加热碰撞表面上发生电离。虽然大多数涉及REIMS的出版资料都集中在医学和细菌鉴定方面的应用<sup>5,6</sup>，但早期也报道过用于检测食品掺假的应用<sup>7</sup>。通过此技术几乎可以在瞬间(2-3 s)获得结果，无需任何形式的样品制备即可轻松得到固体样品的结果。

在本应用纪要中，我们将REIMS与LiveID软件实时执行的化学计量学建模相结合，在物种水平准确鉴定了五种市售常见、外观和遗传相似的白海鱼种：大西洋鳕(cod)、绿青鳕(coley)、黑线鳕(haddock)、青鳕(pollock)和牙鳕(whiting)。不同于目前用于食品中物种水平鉴定的大多数其他分析系统，配备iKnife采样设备和LiveID的Waters REIMS研究系统能够实时确定结果。质谱数据与化学计量学建模相结合非常有利于食品行业快速鉴定鱼肉的掺假行为，包括物种水平鉴定、捕获方法、原产地以及潜在的受控点检测。

---

## 实验

### 采样条件

采样设备： iKnife（单极电切刀）

透热发生器： Erbe VIO 50 C

透热模式：自动切割(Autocut)

功率设置：30 W

使用一根长3 m、直径1 cm的超柔性管路（抽真空/排放管路）连接REIMS离子源与单极电切刀（PS01-63H型，杭州懿宇科技有限公司，中国嘉兴市）。

## 质谱条件

质谱系统：Xevo G2-XS QToF，灵敏度模式

离子源：REIMS

采集模式：TOF MS

电离模式：ESI-

质量数范围：200~1200  $m/z$ （连续采集）

扫描速度：每次扫描0.5秒

锥孔电压：30 V

加热器偏差：40 V

## 仪器校准和准确质量数校准

分析之前，使用5 mM甲酸钠溶液（溶于90% IPA）以0.2 mL/min的流速对Xevo G2-XS QToF质谱仪进行校准，持续2 min。以0.1 mL/min的连续流速注入亮氨酸脑啡肽（Leu Enk,  $m/z$  554.2615, 2 ng/ $\mu$ L）的异丙醇(IPA)锁定质量数溶液，进行准确质量数校准。

## 模型训练样品

使用五种市售常见的白肉鱼种训练分析模型。鳕鱼、绿青鳕、黑线鳕、青鳕和牙鳕的所有组织样品（鱼片、尾部

和未指定区域) 均购自值得信赖的供应商, 并储存在-80 °C下。进行REIMS分析之前, 将样品置于通风橱中于室温下解冻2小时, 然后进行REIMS采样。

## iKnife采样功能

所有实验中的电刀切割均采用Erbe VIO 50C发生器 (Erbe Medical UK Ltd, 英国利兹市) 完成。发生器在自动切割(Autocut)模式下运行, 功率设置为30 W。所有样品均在返回电极板上切割, 由氮气(1 bar)驱动的文丘里气体喷射泵将样品位置产生的气溶胶排向加热的Kanthal线圈, 运行功率为6.4 W (2.3 V, 2.8 A)。

根据样品大小, 对每个组织样品进行8~12次重复性取样, 每次切割持续约3~5 s, 这样就可以涵盖每个组织样品上的多个位置。采样与信号出现之间的延迟时间约为2 s, 在每次灼烧和/或样品之间未观察到残留效应。

## LiveID化学计量学建模软件

使用多变量统计软件包LiveID (1.1版) 作为建模和识别工具。为了根据在MassLynx MS软件 (4.1版) 中采集的非靶向分析REIMS ToF MS数据生成模型, 我们执行了以下数据预处理步骤: 使用Leu Enk离子在 $m/z$  554.2615处应用锁定质量数校准; 将每个“灼烧事件”中包含的所有谱图 (称为目标区域(ROI)) 合并, 形成单个连续谱图; 应用自适应背景扣除(ABS)算法降低合并谱图中的化学背景; 执行数据重采样 (合并至0.5 Da) 以降低数据维度; 使用总离子流色谱图(TIC)对所得谱图进行归一化。所有化学计量学模型均使用600–950  $m/z$ 的质量数区域进行计算。LiveID在文件之间根据最小谱图强度值加上最大与最小强度之间差值的10%来自动设置峰检测阈值。

$$T = \text{强度}_{\text{最小值}} + 0.1 * (\text{强度}_{\text{最大值}} - \text{强度}_{\text{最小值}})$$

完成数据预处理步骤后, 生成主成份分析(PCA)/线性判别分析(LDA)模型。首先, 对谱图数据应用无人监管PCA (奇异值分解算法) 变换, 计算得分图和Loadings plot; 然后对PCA变换计算的得分应用监管式LDA变换。LDA变换能够在最大化类别间方差的同时使类别内方差最小化, 从而使投影结果中同类别的实例间投影距离变小, 同时尽可能增加不同类别中心间的距离 (平均值)。PCA-LDA 虽然不是真正的正则化方法, 但通常能够减少单纯采用LDA 模型时可能出现的过度拟合问题。

识别过程中, 模型会将采集自测试样品 (分类未知) 的谱图转换至相关模型坐标系中, 之后由分类器确定谱图所属类别 (如果有)。模型分类器将使用各模型类别的多变量正态分布 (MVN)。用户在模型建立阶段构建上述分布, 方法是转换训练谱图以针对目标模型生成 $n$ 主成份/线性判别条件的得分。MVN中的维度数也等于 $n$ 。MVN会为每个类别生成一个可能性度量, 然后应用贝叶斯规则导出后验概率。

我们执行了模拟5倍分层验证, 确定鱼类物种模型的预测准确度。将建模数据集分为五个分区 (5倍), 每个分区都包含该分区 (分层) 内每个类别的代表性比例。在与原始模型相同的条件下, 将数据集的四个分区(80%)用于构建模型。利用该模型预测被排除在外的训练数据集中一个分区(20%)的分类。该循环反复重复五次, 并使用基于其

他四个分区的模型对每个分区执行一次预测。验证输出结果将详细列出正确和错误分类结果的总数，以及异常值数量。根据相对最近的类别中心的马氏距离<sup>8</sup>计算异常值。如果该距离大于异常值阈值，则该样品将被视为异常值。

使用Progenesis Q1 (NonLinear Dynamics, 英国纽卡斯尔市)、EZInfo和SIMCA-P (Umetrics Sartorius Stedim Biotech, 瑞典) 进行其他补充统计分析, 确定候选生物标志物的化学鉴定结果以及可能涉及的离散生化途径。

## 结果与讨论

### REIMS鱼类物种模型

由正品鳕鱼(n = 194)、绿青鳕(n = 51)、黑线鳕(n = 133)、青鳕(n = 50)和牙鳕(n = 50)样品获得的原始光谱数据(图1), 对478个样品进行了预处理并进行多变量分析, 使用LiveID依次应用PCA和监管式LDA。

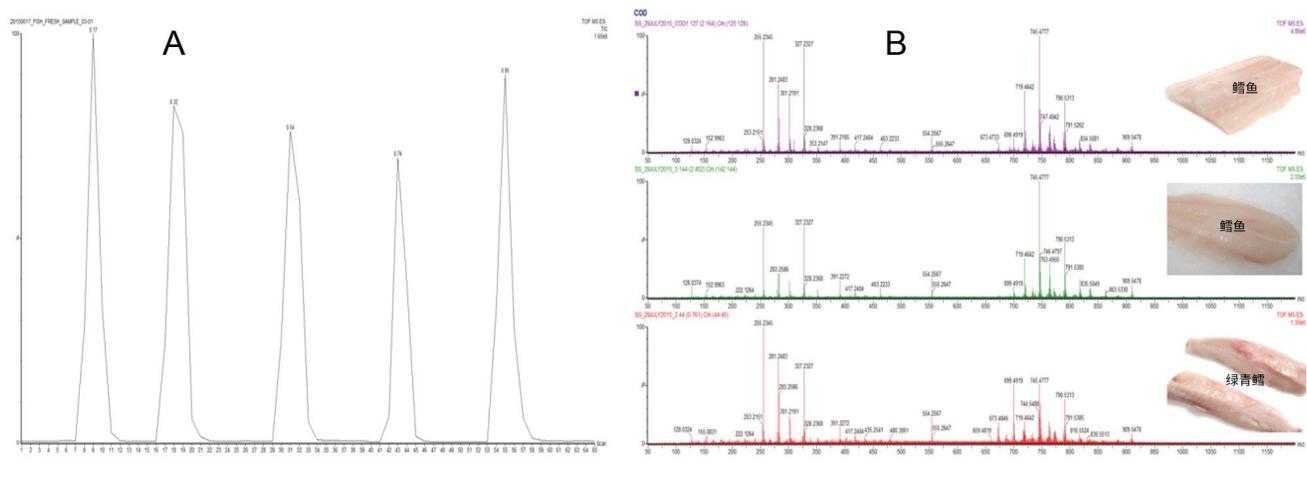


图1.REIMS总离子流色谱图(A), 包含鳕鱼肌肉组织的重复测定结果; 组合质谱数据(6次扫描)(B), 在负极性模式下、 $m/z$  50~1200之间测定三种不同鱼类(鳕鱼、牙鳕和绿青鳕)获得。

使用80个PCA组分和4个LDA组分生成化学计量学模型。在使用组分1、2和3得到的三维(3-D) PCA得分图中, 聚类很明显, 由此可以解释大约78%的方差(图2a)。但是, 在使用组分1、2和3的3-D PCA/LDA得分图中观察到五种鱼类之间的清晰分离(图2b)。

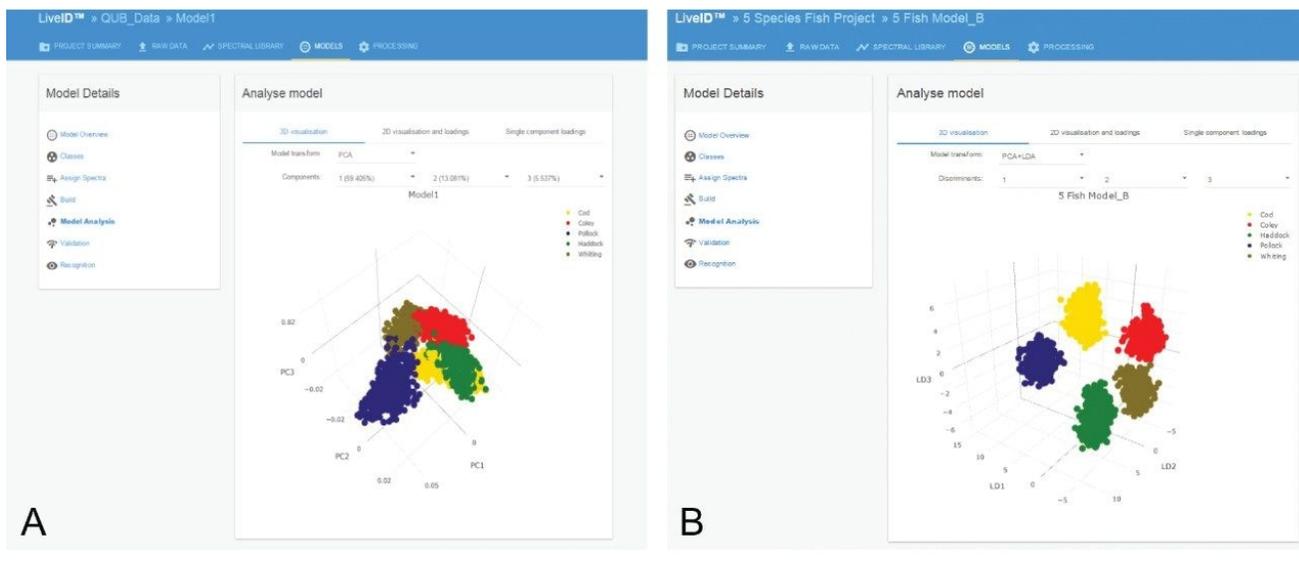


图2.在LiveID中为REIMS多物种鱼类分类模型生成的PCA (A)和PCA/LDA (B)得分图，该模型由478个生物重复样（每个样品具有8-12个测量值）组成的训练集创建。

## 模型验证和实时识别

实验采用“留20%法”对多种类鱼类分类PCA/LDA模型进行模拟交叉验证（图3）。验证结果表明，分类正确率为99.9%，没有错误分类，仅一个鳕鱼和两个绿青鳕样品被归类为异常值。此外，我们还通过“留一法”验证了PCA/LDA模型，该方法系统地将每个训练数据文件从模型中排除，并将其归类为独立样品；在本例中，分类正确率达到98.9%，没有错误分类。结果中观察到更多的异常值（数据未示出）。

本研究执行了独立验证以确保模拟验证所得结果的有效性。我们针对从一组验证样品中采集到的原始数据进行了交叉验证，这与“留20%法”模拟验证时相同。该模型采用精简的训练样品组(n=379)创建，不包括指定为验证组的99个样品。然后为每个验证样品分配鱼类物种分类。总体分类正确率为98.9%，与使用LiveID交叉验证工具获得的分类率完全一致。

## Leave 20% out validation

### Validation report

[Download as .csv](#)

Description :  
Created : 1/5/2018, 9:19:06 AM

### Model details

Name : 5 Fish Model\_B  
Type : PCA-LDA  
Outlier threshold : 5 (standard deviations)  
PCA components : 80  
LDA discriminants : 4  
Mass range : 600 - 950 (m/z)  
Bin size : 0.5 (m/z)

### Validation parameters

Validation type : 5 fold

### Results summary

	Spectra	Passes	Failures	Outliers	Correctness score
Total	2795	2792	0	3	99.89%

### Confusion matrix

	Cod	Coley	Haddock	Pollock	Whiting	Outlier	Total
Cod	590	0	0	0	0	1	591
Coley	0	568	0	0	0	2	570
Haddock	0	0	567	0	0	0	567
Pollock	0	0	0	578	0	0	578
Whiting	0	0	0	0	489	0	489

图3.对根据正品鱼478个生物样品（8-12次重复测定）的2795张谱图创建的REIMS鱼类模型进行交叉验证（留20%法）的结果。总体正确度得分为99.89%，仅1个鳕鱼重复测定和2个绿青鳕测定被归类为异常值。

成功构建并验证后，使用PCA/LDA白肉鱼模型对鱼肉样品进行实时鉴定。通过软件实时采集并运行原始数据文件，鉴定结果几乎是瞬时获得（图4），不包括从采集到出现信号之间约2 s的延迟。使用标准偏差 $5\sigma$ 进行分类。将光谱强度限值设置为 $1e8$ 计数，从而确保仅针对切割样品分配物种分类，排除所有背景噪音。在所有情况下，样品均实现正确鉴定。

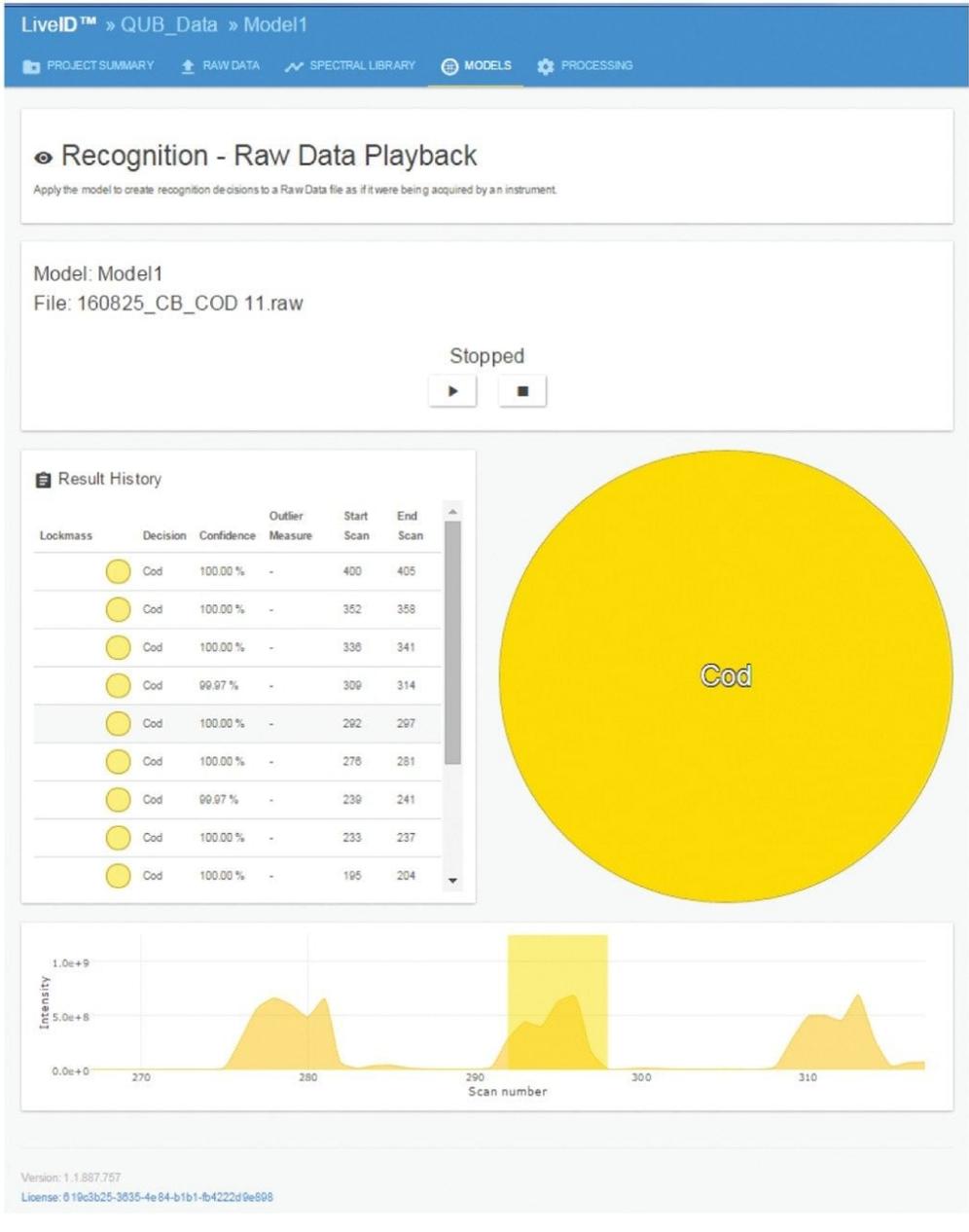


图4.使用独立的鳕鱼验证样品对PCA/LDA模型进行验证后得到的LiveID实时识别结果（ $n=3$ 次测定）。

## 实验室间重复性

将68个训练样品的子集（约占总样品量的14%）送至第二个实验室机构，使用另一台REIMS仪器进行分析，测试

该模型的实验室间重复性。使用主研究中心生成的训练集数据对第二个研究中心的数据进行分类，结果显示正确分类率为95.6%，这是由于三个黑线鳕样品被错误分类为鳕鱼所致。

## 实时识别石斑鱼和海鲷样品

为确定分类保真度，通过LiveID回放识别器功能运行获自模型中未展示的正品鱼类[石斑鱼*Dicentrarchus labrax* (n=6)和海鲷*Sparus aurata* (n=8)]样品的原始光谱数据，由此获得分类结果。在分析的14个样品中，13个样品(92.8%)被正确识别为“异常值”，其中1个样品在多个烧灼区域内同时被归类为异常值(预测确定性为66%)和绿青鳕(预测确定性为34%)。

## 生物标志物发现数据分析软件PROGENESIS QI

使用Progenesis Bridge应用程序，通过MassLynx软件的Sample List(样品列表)处理MS数据文件，将包含多个采样事件(烧灼区域)的文件转换为每个烧灼区域采用高斯峰格式的单文件。在此步骤中我们还进行了锁定质量数校准和ABS。随后将经过预处理的数据文件导入Progenesis QI软件(v.2.4)，执行直接分析工作流程生成多变量统计模型和特征丰度图(图5A)。

使用EZInfo(v.3.0.0.0)创建一系列OPLS-DA S-图，确定在PCA/LDA模型中对物种水平分离影响最大的重要离子。S-图中上方靠近顶部和下方靠近底部区域的离子(在图5C中以红色框突出显示)被视为是与物种归类相关的重要离子，可在Progenesis QI中使用ChemSpider和LipidMaps数据库针对这些离子进行数据库搜索(图5B)。随后进行REIMS MS/MS实验，在Xevo G2-XS QToF的四极杆区域中分离母离子，并施加25 eV的碰撞能量生成碎片离子谱图，协助进行化学解析和初步鉴定过程(图5D)。谱图解析结果表明，二酰基甘油磷酸乙醇胺(PE)、磷脂酰肌醇(PI)、鞘磷脂(SM)和游离脂肪酸在鱼类物种的归类过程中发挥了重要作用。

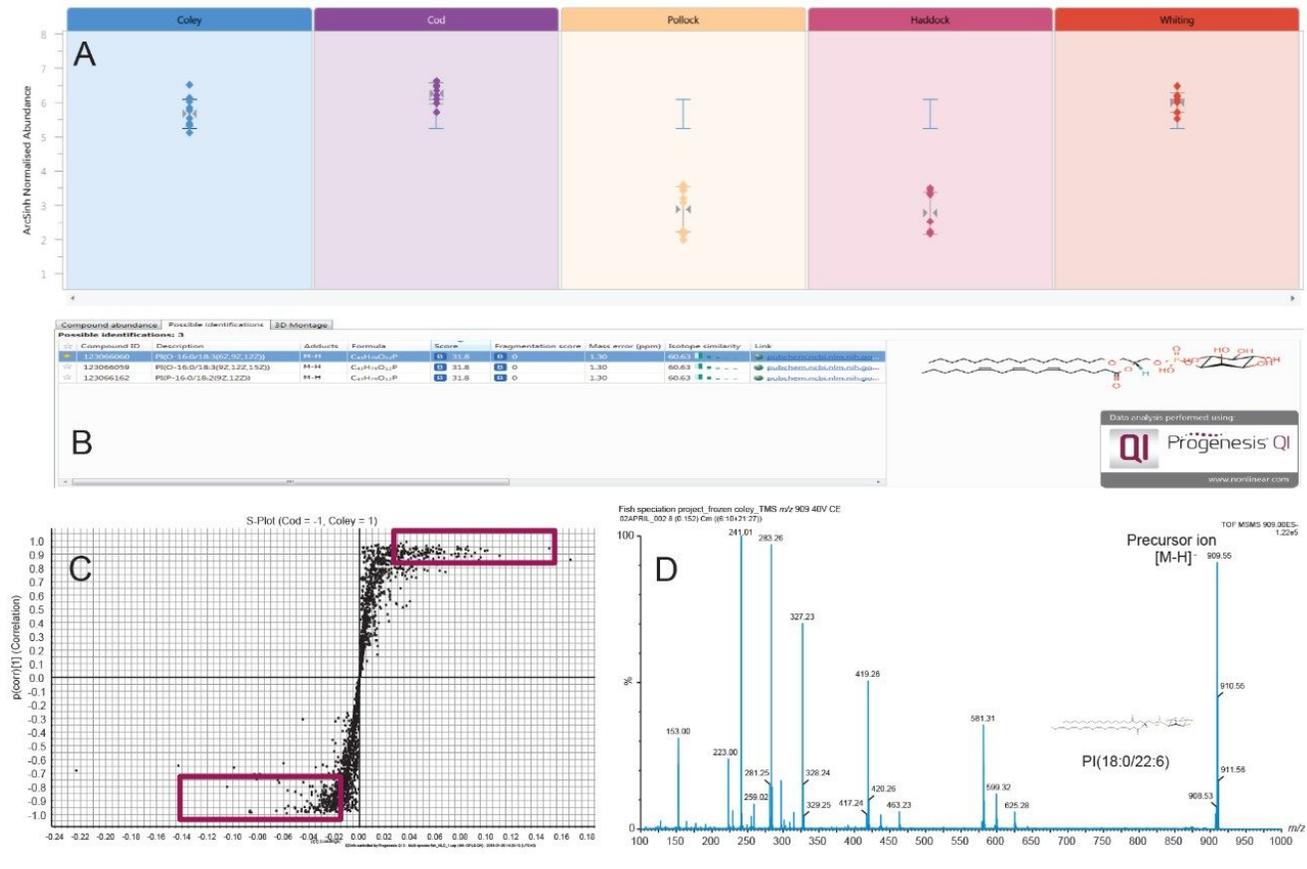


图5.五种鱼类在 $m/z$  909.5处的特征相对丰度(A)，使用LipidMaps进行数据库搜索后获得的可能鉴定结果(B) 鳕鱼和绿青鳕物种的OPLS-DA S-图模型(C)，以及在 $m/z$  909.5处获得的REIMS MS/MS碎片离子质谱图(D)。

## 结论

采用LiveID技术的REIMS无需样品制备，可提供几乎即时的准确结果。与当前基于PCR的方法相比，REIMS缩短了分析和数据解析所需的时间，显著提高了操作效率。REIMS与LiveID的结合已被证明是检测市售鱼肉掺假的补充技术。

除物种形成外，REIMS还能够从多个方面检测鱼肉掺假，例如线钓和拖网捕捞所得黑线鳕样品的分离。通过这种技术，我们还能够区分其他方面的信息，例如原产地、野生鱼与养殖鱼这些仅靠基因组分析无法发挥作用的领域

有关本研究的更多详细信息，请参阅期刊文章：Connor Black, Olivier P, Chevallier, Simon A. Haughey, Julia Balog, Sara Stead, Steven D. Pringle, Maria V. Riina, Francesca Martucci, Pier L. Acutis, Mike Morris, Dimitrios S. Nikolopoulos, Zoltan Takats, Christopher T. Elliott.使用基于快速蒸发电离质谱的实时代谢分析方法进行鱼肉掺假分析。 *Metabolomics* 2017, DOI 10.1007/s11306-017-1291-y.

---

## 参考资料

1. Pardo M Á, Jiménez E, Pérez-Villarreal B. (2016). Misdescription incidents in seafood sector. *Food Control*, 62(1): 277–283.
  2. M&A International Inc. (2013). The seafood industry: A sea of buyers fishing for M&A opportunities. Retrieved November 5, 2016, from: [http://web <http://web>.tmc.com/tmc/TMC\\_IMG/MAI/Reports/ MAI\\_F&B\\_2013.pdf](http://web.tmc.com/tmc/TMC_IMG/MAI/Reports/MAI_F&B_2013.pdf).
  3. Ellis D I, Muhamadali H, Allen D P, Elliott C T, Goodacre R. (2016). A flavour of omics approaches for the detection of food fraud. *Current Opinion in Food Science*, 10: 7–15.
  4. Nielsen E E, Cariani A, Aoidh E M, Maes G E, Milano I, Ogden R, Taylor M, Hemmer-Hansen J, Babbucci M, Bargelloni L, Bekkevold D, Diopere E, Grenfell L, Helyar S J, Limborg M T, Martinsohn J T, McEwing R, Panitz F, Patarnello T, Tinti F, Van Houdt J K J, Volckaert F A M, Waples R S, FishPop Trace Consortium, Carvalho G R. (2012). Gene-associated markers provide tools for tackling illegal fishing and false eco-certification. *Nature Communications*, 3: 851.
  5. Balog J, Sasi-Szabo L, Kinross J, Lewis M R, Muirhead L J, Veselkov K, Mirnezami R, Dezso B, Damjanovich L, Darzi A, Nicholson J K, Takats Z. (2013). Intraoperative tissue identification using rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Science Translational Medicine*, 5(194): 194ra93.
  6. Strittmatter N, Rebec M, Jones E A, Golf O, Abdolrasouli A, Balog J, Behrends V, Veselkov K A, Takats Z. (2014). Characterization and identification of clinically relevant microorganisms using rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 86(13): 6555–6562.
  7. Balog J, Perenyi D, Guallar-Hoyas C, Egri A, Pringle S D, Stead S, Chevallier O P, Elliott C T, Takats Z. (2016). Identification of the species of origin for meat products by rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(23): 4793–4800.
-

8. Mahalanobis P C. (1936) On the Generalized Distance in Statistics. *Journal of Genetics*, 41, 159–193.

---

## 特色产品

集成iKnife采样设备的REIMS研究系统 <<https://www.waters.com/134846529>>

Xevo G2-XS QToF四极杆飞行时间质谱仪 <<https://www.waters.com/134798222>>

Progenesis QI软件 <<https://www.waters.com/134790655>>

LiveID软件 <<https://www.waters.com/134939519>>

720006205ZH, 2018年2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