

应用纪要

# 使用RADIAN ASAP LiveID常规筛查解决方案检测干草药中的掺假替代物

Sara Stead, Nicola Dreolin, Tito Damiani, Giuseppe Sammarco, Michele Suman, Chiara Dall'asta

Waters Corporation, 帕尔马大学食品与药品系(Parco Area delle Scienze), Barilla G.R. F.lli SpA, 研究、开发与质量部门

## 摘要

食品生产行业目前用于质量控制检测的多数方法都是基于光谱技术。相比之下，直接质谱(MS)是一种相对新颖的技术，经证明在速度和易用性方面与光谱技术相当，同时能够发挥更高的选择性和灵敏度，还能提供用于诊断的化学信息。研究人员考察了多种用于食品真伪分析的质谱方法，包括靶向检测掺假标志物或开发多变量分类模型。本研究评估了RADIAN ASAP结合LiveID用于化学计量学建模并进行实时质量控制检测的性能。作为案例研究，向干燥的地中海牛至中粗略加入基体材料。使用由正品干牛至、橄榄叶（经常报道的掺假物）及混合制品组成的样品组。使用RADIAN ASAP分析每个样品得到化学特征谱图，利用LiveID中的PCA/LDA算法以质谱图的物种诊断区域生成多变量模型。独立验证结果表明，该二元模型的预测准确度为100%。然后使用该模型对一组棘手样品进行实时分类。模型中不包含以下四种草药：马郁兰、百里香、薄荷和岩蔷薇，其代表性样品被归类为“离群值”。

”，估算出牛至中橄榄叶和岩蔷薇叶掺假的筛查阈值 $\leq 30\%$  (w/w)。

## 优势

- 简便易用 – 直接分析，样品前处理工作非常少甚至没有，并且基本无需进行仪器优化
- 快速提供准确的结果 – 借助直接分析和LiveID实时识别功能，从执行分析到制定明智的决策在数秒内即可完成
- 仪器紧凑 – 体积小，能够灵活部署到常规实验室环境中

---

## 简介

评估RADIANT ASAP结合化学计量学软件包LiveID (v2.0)用作食品原料快速筛查工具进行质量控制检测的性能。作为案例研究，向干草药中粗略加入外来基体材料，代表由经济利益驱动的食品掺假行为。地中海牛至是一种广受喜爱的烹调用草药，也用作食品制剂、香水和化妆品中的功能成分。科学文献中曾报道过地中海牛至中具有相似外观特性但经济成本较低的植物叶片（例如漆树、岩蔷薇、桃金娘、橄榄叶）替代物，以及非质谱检测方法的应用<sup>1-4</sup>。目前，食品生产行业针对此类检测使用的大多数筛查方法都是基于振动光谱或DNA的技术<sup>5</sup>。直接质谱法经证明具有相当的速度和易用性，同时能够发挥更高的选择性和灵敏度，并且能够提供与诊断标志化合物或意外污染物等相关的其他有用化学信息。

RADIANT ASAP是一种体积小巧的新型仪器，采用了成熟的ACQUITY QDa质谱检测器和可直接进样的大气压固相分析探头(ASAP)技术。ASAP的电离机制是大气压化学电离(APCI)，其适用于极性至中等极性范围内各种热稳定性的低分子量挥发性和半挥发性化合物。

进样时可使用一次性玻璃毛细管简单浸取样品，也可以将固定体积的样品提取物分配至毛细管末端，具体取决于分析需求。使用浸取方式时，根据样品形式不同，可将毛细管浸入样品或在样品表面擦拭。取样前，将玻璃毛细管装入仪器中，执行自动清洗步骤（称为烘干功能）以去除玻璃表面上存在的任何污染物。

RADIANT ASAP的离子源几何构造固定，结合了水平上样机制。由于取样毛细管固定在APCI针和电离区域附近的合适位置，这种固定的离子源几何构造可大幅减少方法开发工作。电离和采样锥区域偏离质谱检测器的轴线，这种设计可避免某些中性物质和离子流进入离子导向区，从而减少粗制样品引起的检测器污染，提高分析稳定性。

## 实验

### 正品

为进行建模和验证，直接从市场上购得或从已知物种、原产国和收获年份的种植园采集以下物种的正品创建一组表征分析物：地中海牛至(*Origanum vulgare* & *O. vulgare* spp. *heracleoticum*)  $n=35$ 、橄榄(*Olea europaea*)  $n=20$ 、马郁兰(*Origanum majorana*)、岩蔷薇(*Cistus incanus*)、百里香(*Thymus vulgaris*)和薄荷(*Mentha spicata*)。

根据与牛至的种系接近程度选择可能的代表性替代物。所选物种中有三个属于同一科（唇形科），其中两个还与牛至属于同一属（牛至属）。本研究还包括另外两个属于不同科的物种（木犀科和半日花科），这些物种以前曾被报道为草药掺假的填充剂<sup>1</sup>。

按照重量比（在0~30%的范围内）制得正品牛至及其他草药物种的共混物，模拟使用替代物掺假的情况。

### 提取方案

称取干燥植物的均质材料(0.2 g)，用10 mL甲醇进行提取。使用旋转振荡器在1300 rpm下将混合物振摇10 min。将提取物在1000 rpm下离心4分钟，然后取一份所得上清液(400  $\mu$ L)注入1 mL自动进样器样品瓶中。



图1.从样品干燥、磨碎草药材料到最终结果的分析工作流程步骤图示

### 进样

将预先清洗过的玻璃毛细管浸入含有提取物的自动进样器样品瓶中至最大深度，与溶液接触约5 s。随后立即将玻璃毛细管放入RADIAN ASAP上样器中，引入离子源区域。在提取物仍处于湿润状态时进行分析，有助于促进质子转移电离机制。

表1. RADIAN ASAP参数和设置

参数	设置
电离模式	ASAP+
电晕针	3 $\mu$ A (缺省值)
脱溶剂气体(N <sub>2</sub> )温度	450 °C
采样锥孔	12 V (缺省值)
采集模式	全扫描 (连续谱图)
质量范围	100–1000 Da
扫描速度	2 Hz
取样方式	毛细管蘸取

表 2. LiveID化学计量学模型参数和设置

参数	设置
用于建模和识别的相对峰检测阈值	50%
模型算法	PCA/LDA
PCA成分	3
LDA成分	1
离群值方法	标准偏差
离群程度	3
分箱分辨率	1 Da
质量范围	300–750 Da

利用LiveID 2.0版进行化学计量学建模、验证和实时识别。有关LiveID化学计量学软件的更多信息，请参见应用纪要720006205EN<sup>6</sup>。

## 结果与讨论

### LiveID建模

选择一组包含35个不同正品牛至和18个不同橄榄叶的样品建立LiveID真伪鉴别模型。由一名分析人员分两天利用同一台仪器以随机顺序分析样品，每个样品生成两个技术重复结果，从而得到70个牛至样品和36个橄榄叶样品的结果集。正品牛至和其他草药样品的RADIAN ASAP谱图表现出优异的重复性（技术重复）、重现性（生物重复）、特征丰富的谱图。采用LiveID（2.0版）创建并验证化学计量学模型，以区分正品牛至样品和掺假牛至样品。

将MassLynx原始数据导入LiveID和预处理步骤；根据总离子流(TIC)进行归一化，并应用平均值居中进行缩放，以说明仪器在灵敏度上的任何波动。谱库集的LiveID工作流程步骤见图2。

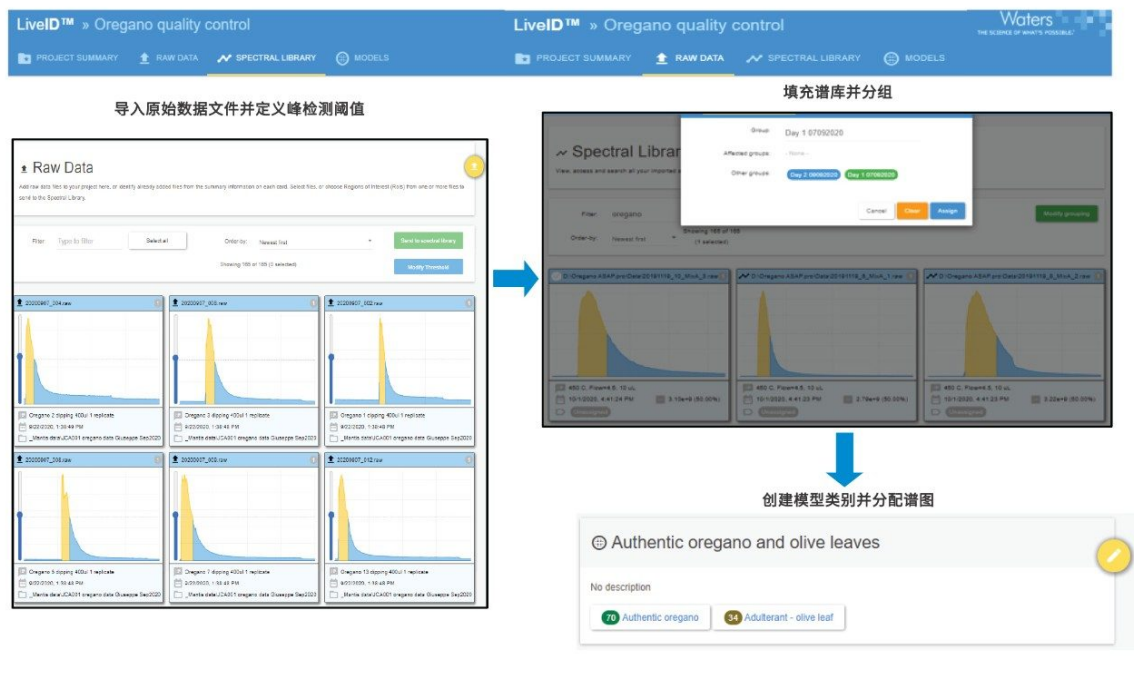


图2.LiveID工作流程，显示了原始数据导入、峰检测阈值、谱库填充、分组和模型类别创建等步骤。

在模型优化阶段，使用采集的完整光谱范围( $m/z$  100~1000)和五种主成分创建无人监管的主成分分析(PCA)模型。应用1 Da单位的分箱分辨率（相当于RADIAN ASAP检测器的质量分辨率）。LiveID PCA单组分散点图的解析结果表明，统计学相关的 $m/z$ 特征是不同草药物种各自聚集的原因。

由于发现的最大诊断光谱范围在 $m/z$  300~750之间，因此在后续的建模和验证阶段使用该范围。生成PCA/LDA模型，然后将监管式算法“线性判别分析”应用于该PCA模型。保留了三种主成分以解释数据中96%以上的总方差。应用一个线性判别式简化数据集。在类别周围结合得分以及与类别中心的残差距离定义了三个标准偏差（97%置信区间）的离群程度。

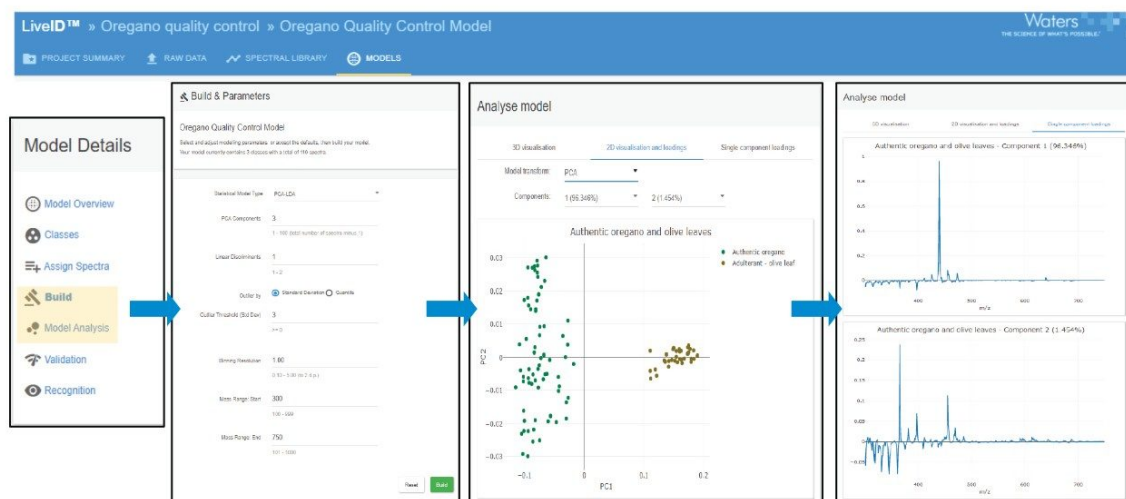


图3.LiveID牛至模型优化参数、PCA模型2D得分图以及PC 1和2的单组分散点图

## LiveID交叉验证

使用LiveID中提供的两种验证方法执行自动化模拟交叉验证。利用“leave one file out”方法确定掺假判别的预测准确度(%), 利用“leave one group out”方法评估日间模型稳定性。

使用“leave one group out”方法时, 将第1天和第2天采集的样品重复测定结果分配给LiveID谱库中的一个组。根据分析日分组创建模型, 随后利用隔天采集的重复测定数据进行验证, 反之亦然。

使用上述模型参数, 在两种验证模式下获得的总体正确度得分(预测准确度)均为100%, 表明该模型能够根据化学特征差异可靠地区分模型中包含的两种草药叶。日间模型稳定性良好, 表明不同分析日之间的技术差异可忽略不计。

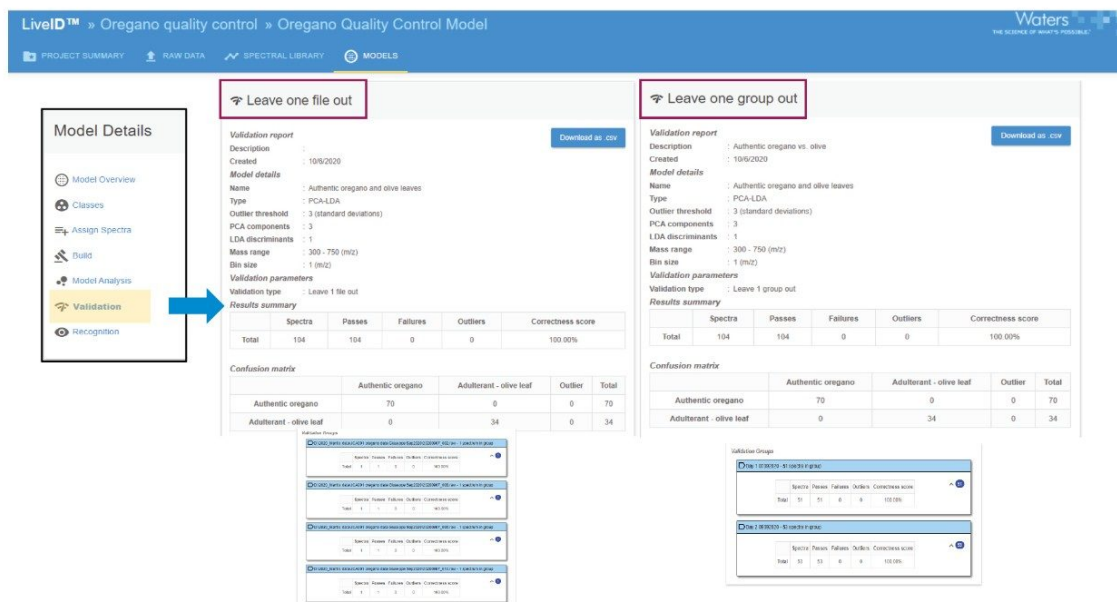


图4.根据“leave one file out”和“leave one group out”模式得到的牛至模型的LiveID交叉验证结果

## 使用LiveID识别进行独立验证

为进一步评估重现性、稳定性和预测准确度，利用各种掺假物模拟预期的掺假情况（作为100%掺假物）以及建模时未使用的一组正品牛至和橄榄叶样品对该模型进行验证。

安排三名分析人员在四台不同的仪器上使用蘸取或移液技术对随机选择的七个正品牛至和两个橄榄叶样品（占建模集的20%）进行检测。在所有情况下，LiveID回放识别均以100%的可信度得分返回了正确的分类结果。该验证研究还考察了模型中不存在的四种不同草药物种（马郁兰、百里香、岩蔷薇和薄荷）的代表性样品。模型的分类结果返回“离群值”，表明在定义的离群程度内，其化学特征未被识别为与模型中包含的正品牛至或单一掺假物类别（橄榄叶）匹配。



样品代码	供应商代码、 原产地和收获年份	所用仪器和 分析日期	操作员	进样技术	LiveID分类和 (可信度得分)
正品牛至-2	A 意大利, 2018年	仪器1 2019年11月14日	操作员3	移液	牛至(100%)
正品牛至-21	B 意大利, 2019年	仪器2 2020年9月7日	操作员2	蘸取	牛至(100%)
正品牛至-37	C 意大利, 2019年	仪器3 2020年9月9日	操作员1	蘸取	牛至(100%)
正品牛至-45	D 意大利, 2018年	仪器2 2020年9月7日	操作员2	蘸取	牛至(100%)
正品牛至-53	E 意大利, 2019年	仪器3 2020年9月7日	操作员1	蘸取	牛至(100%)
正品牛至-69	F 希腊, 2018年	仪器4 2020年9月7日	操作员3	移液	牛至(100%)
正品牛至-85	F 未知	仪器3 2020年9月9日	操作员1	蘸取	牛至(100%)
橄榄-17	G 意大利, 2019年	仪器3 2020年9月11日	操作员1	蘸取	橄榄(100%)
橄榄-20	G 意大利, 2019年	仪器3 2020年9月7日	操作员1	蘸取	橄榄(100%)
岩蔷薇-1	德国, 2019年	仪器3 2020年9月7日	操作员1	蘸取	离群值(4.4%)
马郁兰-UK	英国, 2020年	仪器2 2020年9月7日	操作员2	蘸取	离群值(3.1%)
薄荷-UK	H 英国, 2020年	仪器3 2020年9月11日	操作员1	蘸取	离群值(4.5%)
百里香-1	H 意大利, 2019年	仪器3 2020年9月11日	操作员1	蘸取	离群值(3.5%)

表3.在重现性评估条件下, 使用随机选择的正品牛至、橄榄及其他潜在掺假物种进行独立验证得到的结果

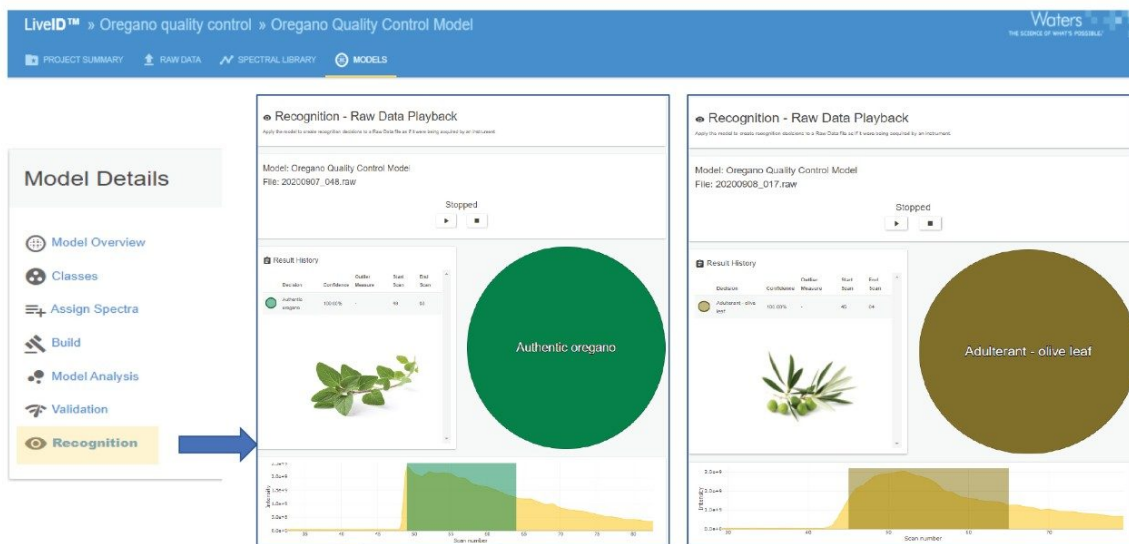


图5.在两台不同的RADIAN-ASAP仪器上获得的两个独立验证样品（牛至-45和橄榄-2）的LiveID实时识别结果示例

为估计分析筛查检测限(SDL)，在正品牛至中掺入10%和30% (w/w)的单一掺假物种（橄榄和岩蔷薇）制成共混物。分两天使用同一台仪器分析该共混物(n=6)，并通过LiveID实时识别进行分类。估计橄榄和岩蔷薇的SDL均小于或等于30%，表明这两个物种的稳定筛查阈值可以确定为30%。后续还需要进一步研究来确定其他潜在掺假物或混合制品的截止水平。

替代物	科和属	正品牛至的 替换百分比(%)	LiveID分类和 发生率(%) (n=6)	决策
橄榄： 油橄榄	木犀科 木犀榄属	10	“离群值” 30% 牛至 70%	<SDL
		30	“离群值” 100%	≥SDL
		0	“离群值” 100%	≥SDL
岩蔷薇： 灰白岩蔷薇	半日花科 岩蔷薇属	10	牛至 6/6	<SDL
		30	“离群值” 6/6	≥SDL
		0	“离群值” 6/6	≥SDL

表4.之前所述由经济利益驱动在干牛至中掺假的两种潜在掺假物的估计筛查检测限

---

## 结论

- 将RADIANT ASAP与LiveID建模软件相结合，可以开发一种稳定的模型来检测干牛至中使用替代物掺假的情况（作为概念论证应用），所需的方法开发和优化时间非常少。
- 非专家水平的操作人员也能在数分钟内生成易于解析的结果。
- 验证研究表明，RADIANT ASAP LiveID解决方案作为一种准确、稳定的常规筛查工具能够实时识别草药中的掺假情况，并可能适用于其他食品和饮料商品的质量控制。
- 为获得经济利益，通常以相对较高的替换水平发生稀释掺假。获得的性能表明，该方法适合作为行业可部署的解决方案，用于检测干草药中的掺假行为。

---

## 参考资料

1. Black, C., Haughey, S. A., Chevallier, O. P., Galvin-King, P., & Elliott, C. T. (2016). A Comprehensive Strategy to Detect the Fraudulent Adulteration of Herbs: The Oregano Approach. *Food Chemistry*, 210, 551–557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.004> <  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.004>>
2. Drabova, L., Alvarez-Rivera, G., Suchanova, M., Schusterova, D., Pulkrabova, J., Tomaniova, M., Kocourek, V., Chevallier, O., Elliott, C., & Hajslova, J. (2019). Food Fraud in Oregano: Pesticide Residues as Adulteration Markers. *Food Chemistry*, 276, 726–734. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.143> <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.143>>
3. Marieschi, M., Torelli, A., Bianchi, A., & Bruni, R. (2011a). Detecting *Satureja montana* L. and *Origanum majorana* L. by Means of SCAR-PCR in Commercial Samples of Mediterranean Oregano. *Food Control*, 22(3–4), 542–548. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.10.001> <  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.10.001>>
4. Wielogorska, E., Chevallier, O., Black, C., Galvin-King, P., Delêtre, M., Kelleher, C. T., Haughey, S. A., & Elliott, C. T. (2018). Development of a Comprehensive Analytical Platform for the Detection and Quantitation of Food Fraud using a Biomarker Approach. The Oregano Adulteration Case Study. *Food*

*Chemistry*, 239, 32-39.<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.083> <  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.083>>

5. Black, C., Chevallier, O. P., & Elliott, C. T. (2016). The Current and Potential Applications of Ambient Mass Spectrometry in Detecting Food Fraud. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 82, 268–278.  
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.005> <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.005>>
6. Black, C., Stead, S., Chevallier, O., Martin, N., Elliott, C. T. A Real Time Lipidomics Approach for Detecting Fish Fraud using Rapid Evaporative Ionisation Mass Spectrometry and LiveID software (2018). Waters Corporation Application Note, 720006205EN.  
[https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134968181&locale=en\\_GB](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134968181&locale=en_GB) <  
[https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134968181&locale=en\\_GB](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134968181&locale=en_GB)>

## 致谢

Sara Stead (沃特世公司)，Tito Damiani (帕尔马大学食品与药品系，Parco Area delle Scienze)，Nicola Dreolin (沃特世公司)，Giuseppe Sammarco (帕尔马大学食品与药品系，Parco Area delle Scienze；Barilla G.R. F.lli SpA，研究、开发与质量部门)，Michele Suma (Barilla G.R. F.lli SpA，研究、开发与质量部门)，Chiara Dall'Asta (帕尔马大学食品与药品系，Parco Area delle Scienze)。

---

## 特色产品

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

RADIAN ASAP直接质谱检测器 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135073413>>

720007045ZH，2020年10月

© 2023 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](#)