

在食品分析中使用Waters ACQUITY RDa检测器联合多变量分析探索化学指纹图谱 - 鉴别大麦粉中的燕麦

Gitte Barkowitz, Sara Stead, Graham Mullard, Vicki Knox, Nicolai Zederkopff Ballin

Waters Corporation, The Danish Veterinary and Food Administration

摘要

本应用纪要评估了RDa检测器作为一款设计紧凑的常规精确质量数测量工具，在加工食品化学特征研究中的应用；以不同种类的谷物粉样品(n=49)为例。数据采集和处理以及后续的多变量分析均在单一平台上进行。主成分分析(PCA)能够无监督区分按种类划分的组和按加工和生长条件划分的亚组。该系统的技术差异很小，质量控制(QC)样品紧密组合在一起，为通用代谢组学方法奠定了基础。

该系统支持食品与饮料生产行业中专注组学的研究，有助于了解生产工艺、储存条件和批次变化的差异。

优势

ACQUITY RDa检测器系统提高了液相色谱(LC)-高分辨率质谱(HRMS)飞行时间(Tof)分析的易用性，并能够通过数据解析鉴别食品真伪。在适合预期目标的高分辨率平台上精简数据采集和处理流程，支持用户调整数据审查。

简介

食品制造商生产的成品要能符合客户要求的一致标准，必须要求供应商提供质量一致且安全的正品原料。采购的原料可能已经过部分加工，例如碾碎的谷粒、捣碎的草药和香料。实施令人满意的目视质量检查可能很困难，甚至不可能做到，因此通常依靠技术来确保批次质量的一致性。

对食品的任何改变，无论是无意的还是故意的（例如受经济利益驱动做出的掺假行为），都可能对消费者构成潜在的安全风险。消费者可能对某些类型的原料不耐受或过敏，食品行业必须标明产品中含有的应申报过敏原。欧盟食品法规目前规定了14种需要申报为过敏原的食物，其中包括含麸质的谷物（例如大麦和黑麦）¹。2015年，美国食品药品监督管理局报告了一起食品安全事件：在孜然粉香料中检测到因添加花生壳作为填充剂而引入的花生蛋白过敏原。花生蛋白可能导致敏感个体在接触或食用含有这些致敏蛋白的食品后发生重度或危及生命的过敏反应。

草药、香料、茶叶和谷物粉等干制食品经常成为“食品造假”和各种形式食品掺假的目标。这些食品掺假行为包括添加木屑等填充材料，或者用成本较低的替代品代替价值更高的原料，以便提高利润率。

食品真伪检测广泛采用LC-HRMS结合食品组学和多变量分析的方法，例如牛至掺假²、卷心菜中的多酚调查³、绿茶成分分析^{4,5}以及红葡萄酒产地调查⁶。

本应用纪要使用ACQUITY RDa检测器联合ACQUITY UPLC I-CLASS二元液相色谱系统（一台简便易用、设计紧凑的LC-飞行时间质量分析器），通过解析所生成的化学指纹谱图，并在UNIFI中集中处理数据，重点考察谷物粉的物质形成。利用简化的UNIFI工作流程测量精确质量数，在食品生产的常规供应链控制中进行食品筛查。

实验

参比样品由合作者提供，包含不同类型的碎谷物（小麦、硬粒小麦、燕麦、大麦和黑麦）。根据通用样品萃取方法制备谷物粉样品(n=49)，使用ACQUITY RDa检测器重复分析三次。利用所有样品提取物生成QC混合样品，以评估分析方法的技术重现性。系统由UNIFI软件控制，该软件可自动完成设置和校准程序，从而简化操作。进样次数约300次（包括空白样），数据采集连续运行约三天。

萃取方法

根据调整后的天然毒素多分析物分析方案制备样品提取物⁷。将10 mL乙腈/水(84/16, v/v)加入2.5 g样品中，振摇混合。使样品混合物在室温下静置1 h。将萃取管离心(2000 rcf, 10 min)，取所得上清液的0.5 mL等分试样再次离心(15,000 rcf, 5 min)。取上清液的0.25 mL等分试样用等体积1%乙酸的水溶液稀释。将混合物再次离心(15,000

rcf, 5 min), 然后转移至自动进样器样品瓶中并使用ACQUITY RDa检测器进行分析。

仪器设置

优化的仪器条件见表1-3。

表1.用于分析谷物样品的超高效液相色谱分离方法

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS T3 2.1 × 100 mm, 1.8 μm (部件号: 186003539)
流动相A:	含0.3%甲酸和10 mM甲酸铵的水溶液
流动相B:	含0.3%甲酸和10 mM甲酸铵的甲醇溶液
柱温:	45 °C
进样体积:	5 μL

表2.配备专用电喷雾离子源的ACQUITY RDa检测器的质谱设置

质谱检测器:	ACQUITY RDa检测器
模式:	包括碎片的全扫描
质量范围:	低(50–2000 <i>m/z</i>)
极性:	正离子
扫描速率:	10 Hz

锥孔电压：	30 V
碎裂锥孔电压阶梯：	60–120 V
毛细管电压：	1.5 kV
脱溶剂气温度：	550 °C

使用waters_connect (1.2.0版) 上的UNIFI结合EZinfo (3.0.3版, Umetrics) 采集并处理数据：采用UNIFI进行峰提取；采用EZinfo进行多变量分析。

时间 (min)	流动相 B (%)	曲线设置
0.0	5	初始
1.5	5	6
3.0	60	6
5.0	80	6
10.0	80	6
10.5	99	6
13.0	99	6
14.0	5	6
16.0	5	6

表3.ACQUITY UPLC I-Class PLUS上用于分离谷物样品的梯度，流速为0.5 mL/min

RDa仪器集成了SmartMS技术，只需将制造的即用型溶液瓶放置在质谱仪前部内置流路单元的适当位置，即可自

动完成检测器设置、自动调谐和质量数校准程序。完成自动设置和健康状态检查程序之后，RDa系统会在准备就绪或需要任何维护时通知分析人员（图1）。

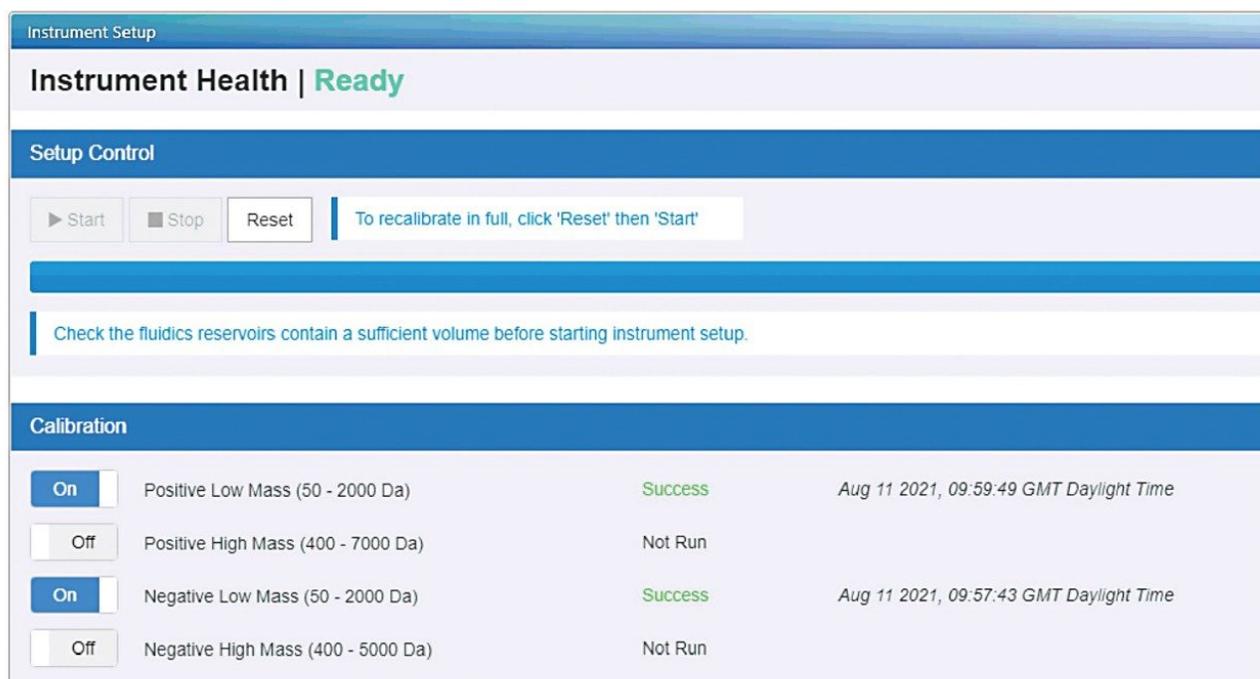


图1. SmartMS技术中方便用户操作的仪器健康状态显示，用于配置校准程序和启动仪器设置。

针对靶向和非靶向筛查、标志物选择和多变量分析提供预定义的UNIFI工作流程，简化数据采集和处理。

实验设计

工作流程见图2。使用由实验得出的数据构建的定制版UNIFI筛查数据库，初步筛查样品中是否存在达到或高于欧盟法规限值的天然毒素。由于该数据库中定义的自然毒素未在任何显著水平下检出，故将研究重点放在表征谷物与任何潜在标志物之间的差异或其他属性（例如采收时间或生长条件）上。为此，我们利用了UNIFI多变量分析(MVA)工作流程。作为UNIFI处理程序的一部分，将谱图数据归一化至总离子流色谱图(TIC)，以说明分析过程中的任何强度变化。将UNIFI数据导出至EZinfo，并在随后的统计和多变量分析之前根据Pareto分布进行缩放。

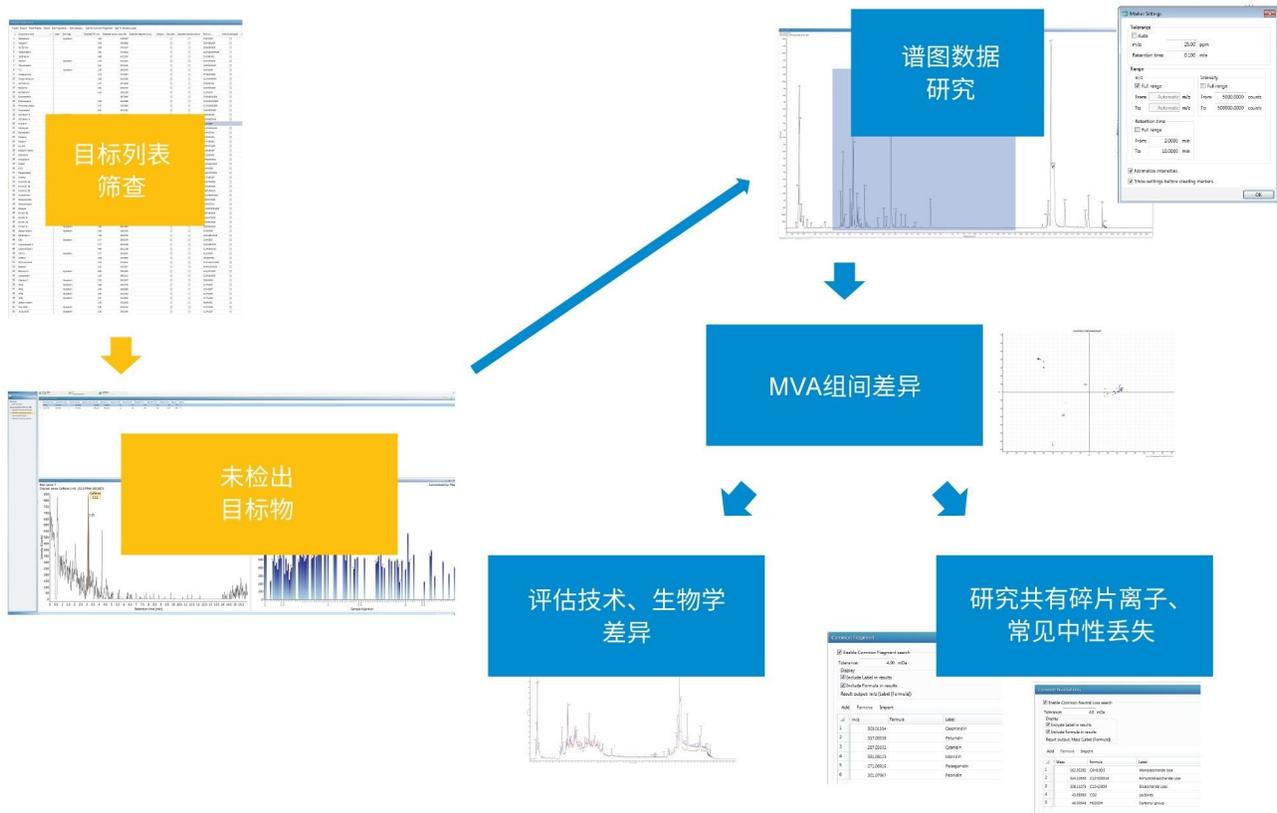


图2.采用UNIFI应用程序和EZinfo的ACQUITY RDa检测器工作流程

结果与讨论

1.使用RDa生成的谷物化学指纹图谱

图3显示了QC样品第15次进样和第167次进样的叠加色谱图，表明在谷物样品三天运行过程中的技术差异很小。在组学研究中，技术差异小、测量重现性好是实施分析的关键所在，只有这样才能鉴定导致组间分离的标志物。实验结果表明，系统需要约5次进样才能达到平衡，从而获得一致的结果。后续进样（红色）显示，在色谱分析后期洗脱的基质少于前期实验展示的结果，这是由于背景随样品数量的增加而降低，这种情况并不罕见。

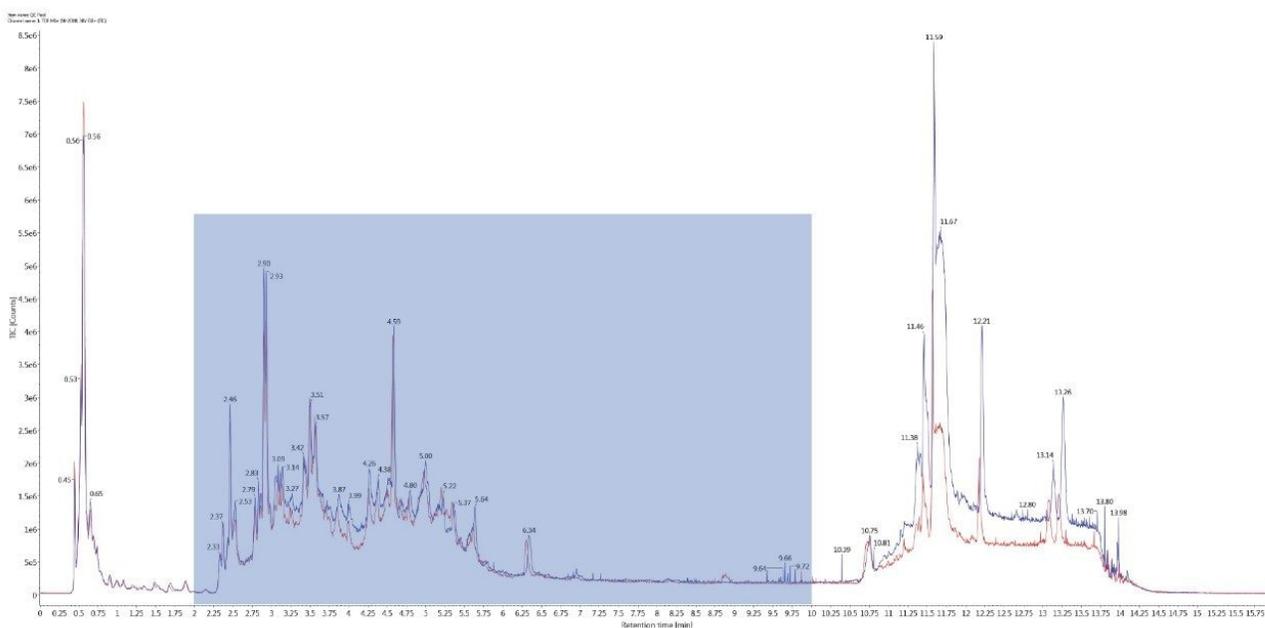


图3. QC混合样品第15次进样（蓝色）和第167次进样（红色）的TIC叠加图

选择用于生成标志物的目标区域（图3的蓝色方块）不包括早期色谱柱平衡和后期清洗步骤。根据所选的色谱柱和梯度，预计谷物代谢物（例如包含芳香环等亲脂性组分的初级和次级植物代谢物）将在选定的保留时间区域内洗脱。谷物的极性组分不太可能得到保留，但可以选择不同的色谱法进行分析，例如HILIC法。

由于该分析采用的样品前处理方法为通用方法，排除了额外的纯化步骤以避免丢失特征标志物，但所得基质很复杂，可能给LC-MS分析带来挑战。不过，相比于与HRMS联用的HPLC，UPLC分离技术的应用提高了系统的整体分离能力。ACQUITY RDa检测器可帮助用户克服典型的基质挑战，获得更优异的色谱峰分离和精确质量数信息，从而提高每次运行的峰容量和重现性，增强基于组学的调查的可信度。

2. 标志物选择过程

在UNIFI中完成峰检测并生成标志物后，数据会被自动传输至Ezinfo，以创建主成分分析(PCA)模型。限制选定标志物的数量，以剔除平衡/清洗步骤得到的非特异性化合物以及信号强度低的化合物（保留时间2-10 min，强度计数5,000-500,000，而质量范围保持满量程 m/z 50-2000）。与将样品中洗脱的所有化合物全都用于PCA相比，调整标志物设置，剔除低丰度化合物以及先洗脱和后洗脱化合物的方法获得了更清晰的组间分离。这种靶向组学方法需要对食品样品中的化学特征具有一定的先验知识，并且有意使模型产生偏差，而这样才能让用户更有效地发现存在差异和相似性的区域。总体而言，该工作流程使新手用户也能在指导下轻松开展组学方法，生成有意义的

结果。

3.用于种类层面鉴定的无监督PCA模型[EZinfo]

PCA能够无监督区分按种类划分的组。除在种类层面明显区分样品外，还观察到不同加工方法、采收时间和种植方法的组内分离，如图4中的小麦和燕麦样品所示。即使在如此小的样品量下，也能明显区分有机燕麦与常规燕麦和燕麦饲料。为进一步研究和鉴定标志物，例如在有机农业中，需要更大的样品量来验证这些结果。在整个采集过程中以一定间隔重复进样QC混合样品，以表征该分析的技术差异。结果发现，QC混合样品非常紧密地聚集在一起，表明总系统的技术差异很小，凸显了系统的稳定性。

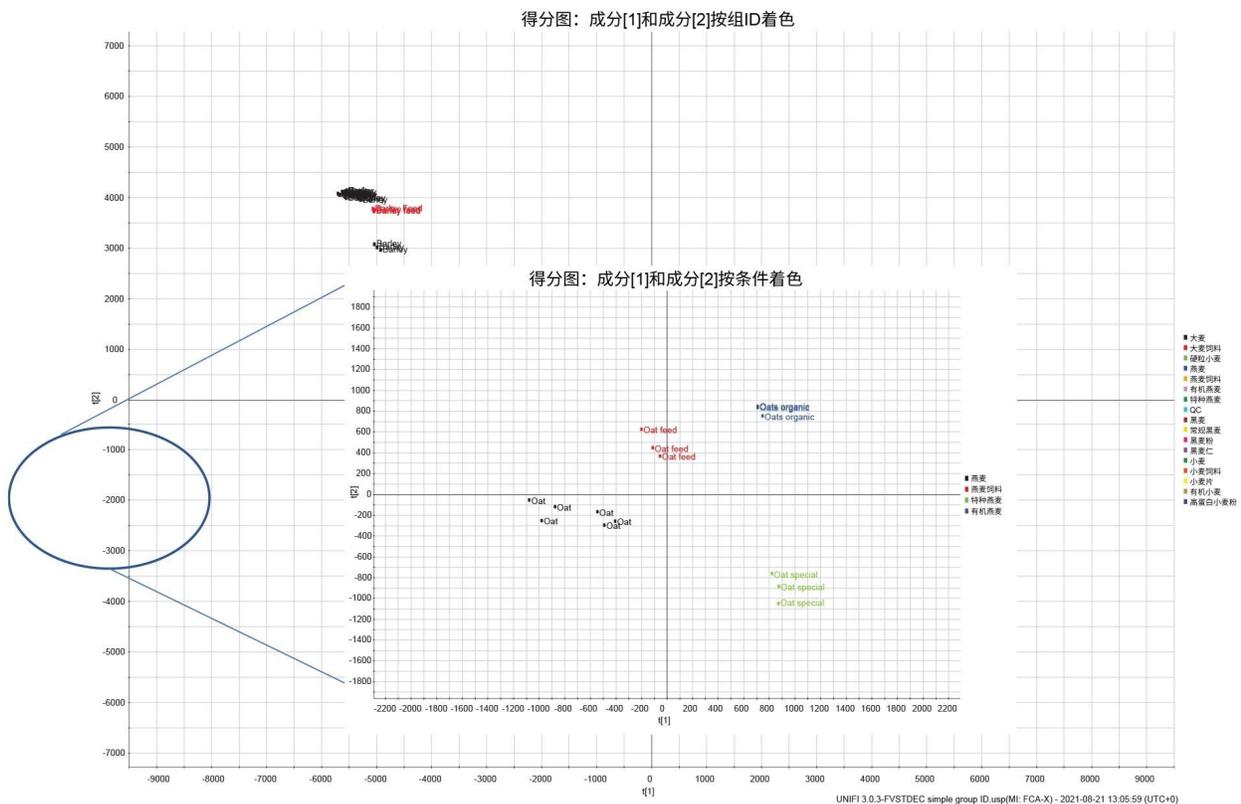


图4.EZinfo中谷物样品的PCA得分图以及仅针对燕麦样品的单独模型（所有样品均重复进样三次）

进一步研究相同数据的结果如图5所示。高质量数特征似乎与对不同组（例如高蛋白含量和低蛋白含量）提供的样品信息相关，筛选出C部分的独特特征。该工作流程使用户能够聚焦于感兴趣的标志物。可以A-B-C的顺序追踪标志物，然后将所选标志物传回UNIFI用作候选标志物，以筛查样品组或类似样品组。

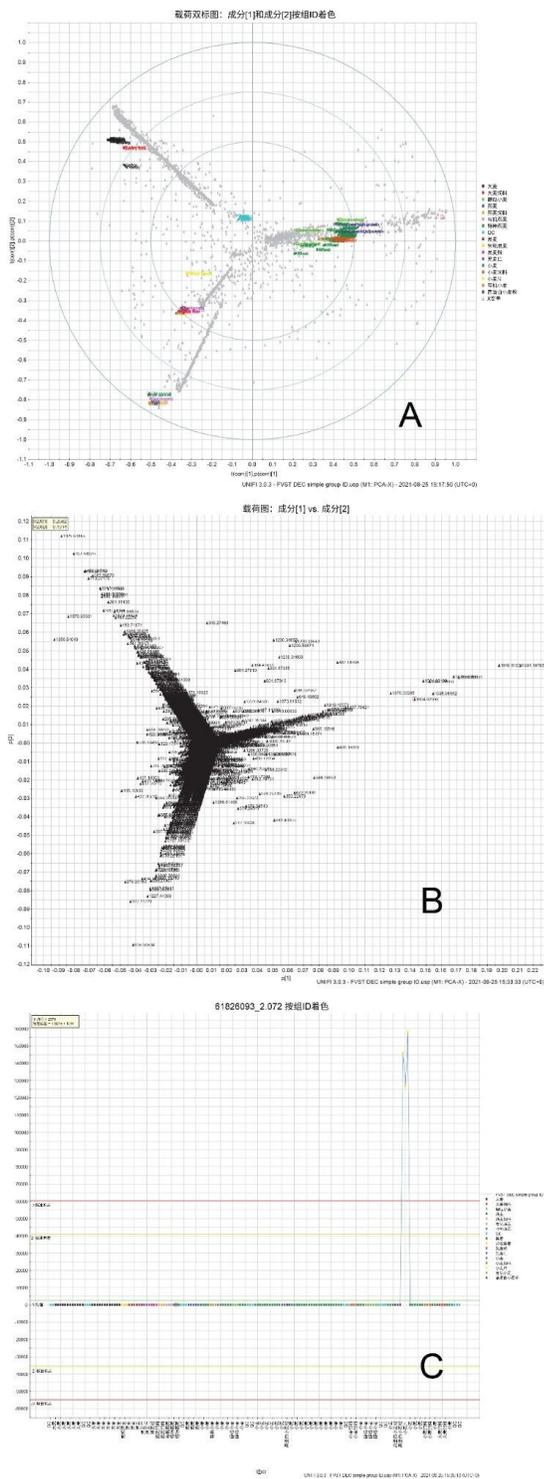


图5.A: 载荷双标图, B: 显示各组相关m/z的载荷图, C: 不同组中高丰度离子的变化趋势

在食品真伪检测中，LC-MS谱图数据分析对于模式识别以及鉴定这些模式的变化非常有用。分配化合物名称时，并不一定需要通过化学结构来鉴定化学标志物。如果模式可重现并且不受仪器差异的影响，则食品制造商只要发现批次之间存在差异，通常就足以评估生产工艺或原料批次。还可以通过分离区分标志物和分配精确质量数深入了解由季节变化、栽培种、品种或气候条件引起的生物学差异。

借助在锥孔电压碎裂下获得的精确质量数和碎片信息，可以在UNIFI中通过处理常见中性丢失或共有碎片离子进一步研究标志物，为分析人员提供有关导致组间分离的化合物类别（例如葡萄糖苷）的信息。图6显示了此类高级处理选项的结果示例，可以看到发生了单糖损失，结合所应用的样品萃取程序，这种损失在碳水化合物含量高的面粉样品中是可预期的。

Formula	Component name	Observed m/z	Mass error (mDa)	Mass error (ppm)	Observed RT (min)	Response	Adducts	Common Neutral Losses Found	Has Common Neutral Losses
1 C12H22O11	alpha-Lactose	360.1508	0.8	2.2	0.56	216911	+NH4, +H, +Na	162.05282 (Monosaccharide loss...	Yes
2 C12H22O11	beta-Maltose	360.1508	0.8	2.2	0.56	216911	+NH4, +H, +Na	162.05282 (Monosaccharide loss...	Yes
3 C24H32O9	Ursinliolide B	465.2074	-4.5	-9.6	0.73	121812	+H	162.05282 (Monosaccharide loss...	Yes
4	Candidate Mass 522.2036	522.2036			0.57	104325		162.05282 (Monosaccharide loss...	Yes
5	Candidate Mass 217.1067	217.1067			3.42	84664		162.05282 (Monosaccharide loss...	Yes
6	Candidate Mass 527.1586	527.1586			0.57	70504		162.05282 (Monosaccharide loss...	Yes
7	Candidate Mass 434.1665	434.1665			2.37	63948		162.05282 (Monosaccharide loss...	Yes
8	Candidate Mass 596.2203	596.2203			2.42	57619		162.05282 (Monosaccharide loss...	Yes
9	Candidate Mass 1866.6654	1866.6654			2.90	49553		308.11073 (Disaccharide Loss [C...	Yes
10	Candidate Mass 295.2269	295.2269			4.58	48905		46.00548 (Carbonyl group [HCO...	Yes
11	Candidate Mass 342.1411	342.1411			2.46	45067		162.05282 (Monosaccharide loss...	Yes
12	Candidate Mass 901.4810	901.4810			5.46	41505		162.05282 (Monosaccharide loss...	Yes
13	Candidate Mass 411.0995	411.0995			0.56	38288		162.05282 (Monosaccharide loss...	Yes
14	Candidate Mass 1237.4486	1237.4486			2.76	33909		308.11073 (Disaccharide Loss [C...	Yes
15 C24H32O9	Ursinliolide B	465.2074	-4.5	-9.8	0.65	30386	+H	162.05282 (Monosaccharide loss...	Yes

图6.UNIFI“常见中性丢失”处理功能的组分汇总表

4. 候选标志物选择和重现性

本研究将非靶向采集模式与多变量统计分析结合使用，便于选择一组指示谷物种类和类型的候选标志物。虽然候选标志物的化学鉴定并不一定是食品QC分析的必需要求，但仪器平台必须能够在长时间分析过程中以可接受的精密度水平(%RSD)在所有进样中可靠地检测标志物。图7显示了(a)监测标准参比化合物抑霉唑的响应时仪器的技术重现性（4天内的变化）和(b)同一时间段内抑霉唑的实测质量精度。

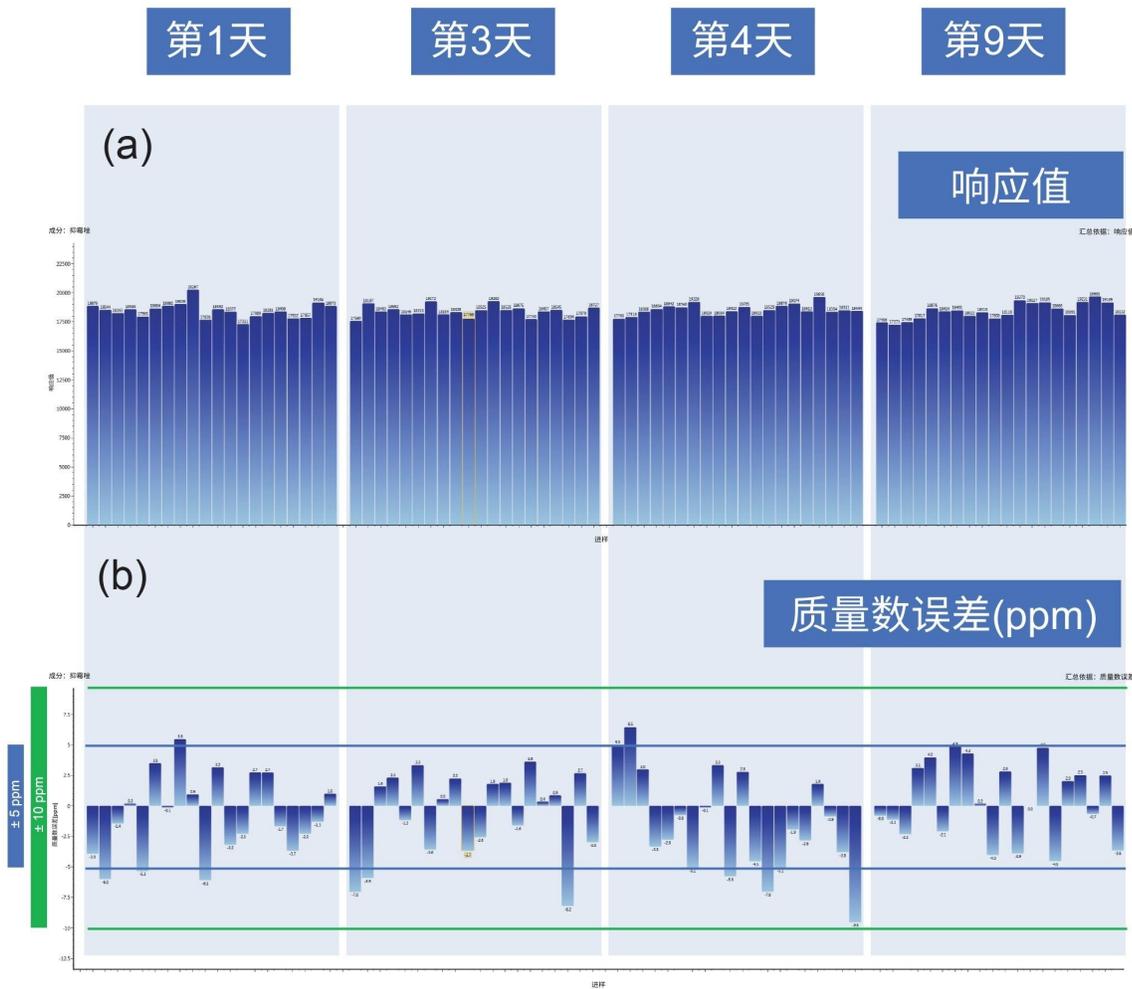


图7.4个不同分析日的混标（每天20次进样）中抑霉唑的响应值(a)和质量数误差图示(b)，由UNIFI中的数据改编而来，用线条标记出 $\pm 5 \text{ ppm}$ 和 $\pm 10 \text{ ppm}$ 的质量数误差区域。

重现性研究结果见图7和表4。在9天内的4个不同分析日，进样20次新鲜制备的标样，这些标样每次都用食品相关化合物（例如农药和真菌毒素）的同一种冷冻混合物制备，评估响应值和质量数误差值。在计算标准偏差和平均值之前，将质量数误差和响应值换算成绝对值。平均质量数误差为3.1 ppm，RMS为3.6 ppm，大部分结果处于 $\pm 5 \text{ ppm}$ 的范围内，为通过多变量分析来研究标志物变化提供了足够高的精密度。

	响应值	质量数误差 (ppm)
SD	574	2.0
平均值	18453	3.1
RMS	18462	3.6

表4.化合物抑霉唑的稳定性研究结果总结，以此为例评估ACQUITY RDa检测器的性能。

结论

- ACQUITY RDa检测器与waters_connect上的UNIFI应用程序为数据采集和处理提供了一个集成平台，使新手用户也能轻松开展代谢组学工作流程。
- 本研究分析了谷物数据以实施原理论证，并实现了种类层面的鉴定以及不同采收时间和生长条件的亚组分离。
- 锥孔电压碎裂可用于研究已知的常见丢失或其他碎片离子，从而收集有关特有标志物类别的更多信息。
- UNIFI/EZinfo中提供的多变量统计分析功能已被用于鉴定谷物种类和类型的候选标志物。UNIFI功能使分析人员能够监测与候选标志物选择相关的生物学和技术差异。
- 系统的稳定性为通用代谢组学方法奠定了基础。
- 在食品和饮料制造行业，多变量分析还可用于研究生产制度、储存条件和批次变化的差异。ACQUITY RDa检测器和内置软件包完全支持这些专注组学的研究。

致谢

本文作者由衷感谢丹麦兽医与食品管理局的Nicolai Zederkopff Ballin和Søren Johannesen在本项目实施过程中所提供的支持合作与讨论。

参考资料

1. Allergen Guidance for Food Businesses Food Standards Agency.[2021年8月17日引用] 参考网站：
<https://www.food.gov.uk/business-guidance/allergen-guidance-for-food-businesses> <
<https://www.food.gov.uk/business-guidance/allergen-guidance-for-food-businesses>> .
2. Black C *et al.* A Comprehensive Strategy to Detect the Fraudulent Adulteration of Herbs: The Oregano Approach. *Food Chem.*2016 Nov 1;210:551–7.
3. Gonzales G *et al.*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Coupled With Multivariate Analysis for the Characterization and Discrimination of Extractable and Nonextractable Polyphenols and Glucosinolates From Red Cabbage and Brussels Sprout Waste Streams.*J Chromatogr A.*2015 Jul 10;1402:60–70.
4. Reid L 等人. 使用ACQUITY RDa检测器进行绿茶筛查.沃特世应用纪要, [720007226ZH](#), 2021年4月.
5. Wang H *et al.* Untargeted Metabolomics Coupled With Chemometrics Approach for Xinyang Maojian Green Tea With Cultivar, Elevation and Processing Variations.*Food Chem.*2021 Aug 1;352:129359.
6. Arapitsas P *et al.* Use of Untargeted Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Metabolome To Discriminate Italian Monovarietal Red Wines, Produced in Their Different Terroirs. *J Agric Food Chem* .2020 Apr 20;68(47):13353–66.
7. Mol H *et al.*Toward a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes.*Anal Chem* [Internet].2008 Dec 1;80(24):9450–9.

特色产品

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

ACQUITY RDa检测器 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077027>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134801648>>

[waters_connect <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165)

720007454ZH, 2022年1月

© 2022 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