

基于高分辨质谱的组学分析方法 在白酒香型鉴别中的应用

程明川, 李晨, 吕辰, 江峥

赛默飞世尔科技(中国)公司, 上海, 中国 201206

关键词

Q Exactive; 静电场轨道阱高分辨质谱; 组学分析; 白酒; 香型鉴别

1. 引言

白酒在中国有着悠久的历史, 是我国优秀而宝贵的民族遗产, 与白兰地、威士忌、伏特加、朗姆酒、金酒并列为世界 6 大蒸馏酒。我国固态发酵白酒质量的影响因素很多, 每个生产批次所产酒的酒质是不一致的。为了统一达到本品所固有的各种微量成分和它们之间适宜的比例, 就必须进行勾兑。经过勾兑后的成品白酒, 具有其固定的化学成分组成以及这些成分之间的固定量比关系, 从而形成各自不同的香型和风味^[1]。目前对白酒香气成分的分析多采用 GC 或 GC/MS 的方法^[2]。而对于香型的鉴定, 主要依靠品酒师的感官鉴别。该方法简单快捷, 但对人员要求较高, 且较为主观。也有采用电子舌技术对不同香型的白酒进行区分^[3], 但电子舌技术尚有待进一步发展

且通用性较差。本实验采用超高效液相色谱(UHPLC)和基于 Orbitrap 高分辨质谱技术的 Q Exactive 台式质谱仪, 结合组学分析软件 SIEVE 和统计学软件 SIMCA 对不同香型的白酒进行了组学研究, 利用多元统计分析建立了一种快速、准确、客观地鉴别白酒香型的新方法, 并对找到的标志物进行了鉴定。

2. 样品信息及分析流程

实验分别收集了浓香型、酱香型和清香型三种香型的白酒样品。每种香型内均包含不同品牌, 不同品质等级等多个样本。因白酒样本复杂, 在不同品牌或是同一品牌不同等级之间存在多样性和差异性, 为减少不确定因素, 先将三个香型的样本分成不同品牌和同一品牌不同等级两个组, 分别进行分析和比较。

不同品牌组: 每种香型包含各个名优品牌中最具有代表性的高端酒样, 每个样本均是对应香型中的典型样本。力求通过对该组的分析找出不同品牌之间按照香型区分的标志物。具体样品信息见表 1。

表 1. 不同品牌组样品信息表

组别	香型	样品 (酒精度)		
A1	酱香型 (J)	郎酒 (酱, 53°)	仙潭 (53°)	
A2	浓香型 (N)	泸州老窖 (52°)	五粮液尖庄 (52°)	剑南春 (46°)
A3	清香型 (Q)	宝丰 (大曲清香, 52°)	江津 (小曲清香, 52°)	红星二锅头 (麸曲清香, 56°)

不同等级组: 每种香型包含同一典型品牌中从高端到低端的不同等级的样本。对该组的分析可以找出不同等级的样本之间共有的可以区分其他香型的标志性化合物, 也可验证在对不同品牌组分析中找到的典型标志性化合物是否存在于该品牌各个等级的样品中。具体样品信息见表 2。

表 2. 不同等级组样品信息表

组别	香型	样品
B	浓香型 (N)	五粮液 level.1-level.4
C	酱香型 (J)	郎酒 level.1-level.5
D	清香型 (Q)	宝丰 level.1-level.5

为了最大程度地保留样本内的化学成分，样本仅使用 0.22 μm 的滤膜过滤后，即采用正负切换扫描的方式对数据进行采集。数据用 SIEVE 软件进行峰提取、过滤、对齐和差异化比较；使用 SIMCA 进行 PCA、OPLS-DA 等多元统计分析，并利用建立的数学模型对未知样品进行判别预测，分析流程见图 1。

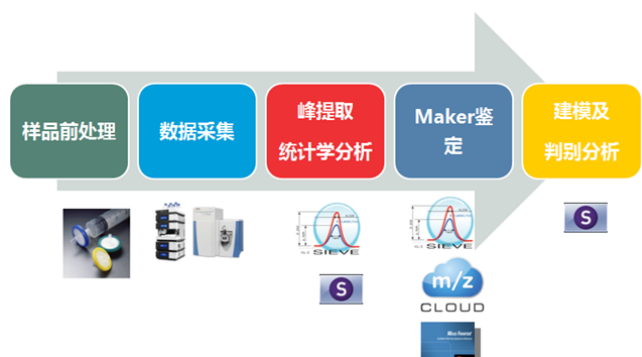


图 1. 基于组学分析方法的全流程解决方案

3. 实验条件

3.1 液相色谱条件

色谱仪：Thermo Scientific™ Ultimate 3000 RSLC

色谱柱：Thermo Scientific™ Accucore C8 (100 \times 2.1, 2.6 μm)

流动相组成和梯度洗脱条件见表 3。

表 3. 流动相组成及梯度洗脱表

流动相	描述
水相 (W)	5 mM 甲酸铵以及 0.1% 甲酸水溶液
有机相 (M)	5 mM 甲酸铵以及 0.1% 甲酸甲醇溶液

Time (min)	%A	%B
-5	100	0
0	100	0
1	100	0
10	85	15
15	55	45
20	0	100
25	0	100

A: 98; 2 (W:M) B: 2; 98 (W:M)

表 4. 质谱扫描参数设置

质谱扫描参数	设定值
Scan Mode	Full MS-ddMS2 (TOP 3)
Full MS scan range	100-900 m/z
Resolution	70,000 (FWHM) at m/z 200, Full MS 17,500 (FWHM) at m/z 200, MS/MS
Isolation width	2.0 m/z
NCE(Stepped NCE)	40 (50%)

RT: 0.00 - 25.01

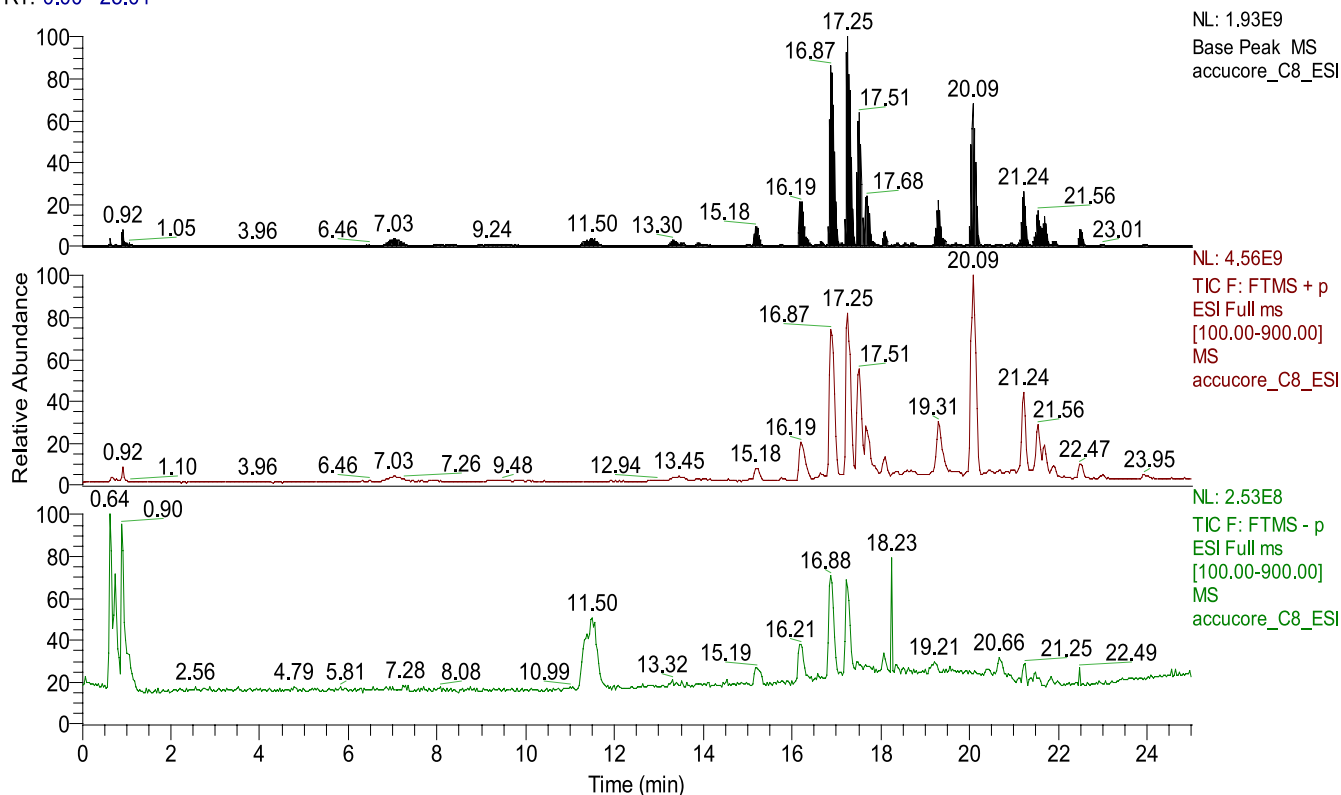


图 2. Accucore C8 色谱柱的 BP(±)、TIC(+) 和 TIC(-) 色谱图

4. 结果与讨论

4.1 实验条件的选择

为保证白酒样品中尽可能多的成分能够有效地被测定，本实验对不同型号的色谱柱进行了考察，包括：Accucore aQ、Accucore Hilic、Accucore C8、Synchronis C18 和 Hypercarb。实验结果表明 Accucore C8 色谱柱在正离子模式下能够对白酒样品中的化合物进行较好的分离和有较高的响应（图 2）。

4.2 数据重现性

在组学相关试验中，方法的重现性至关重要，需要保证数据在质量精度、保留时间及响应强度等方面具有很好的重现性。本实验在进样序列中穿插了 QC 样品，对系统的稳定性进行了

考察。在整个进样周期（48 小时）内，保留时间（RT）偏差 < 2 s，以某一化合物考察的响应值（NL）RSD 为 10% 左右，质量精度偏差在 1 ppm 以内。实验结果表明，采用外标法进行一次校正后，系统有良好的稳定性、重现性和质量精度。

4.3 统计学分析

采用 SIEVE 软件对组分进行提取、过滤（P-Value < 0.05）及统计学分析。不同品牌组 and 不同等级组分别得到 486 个和 1246 个化合物。通过 SIMCA 软件对上述化合物的 PCA 分析表明，在这两个分析组中 3 种香型的白酒均能较好的分开，聚类趋势明显，无明显离群组分且与其他组别有较明显差异（图 3）。

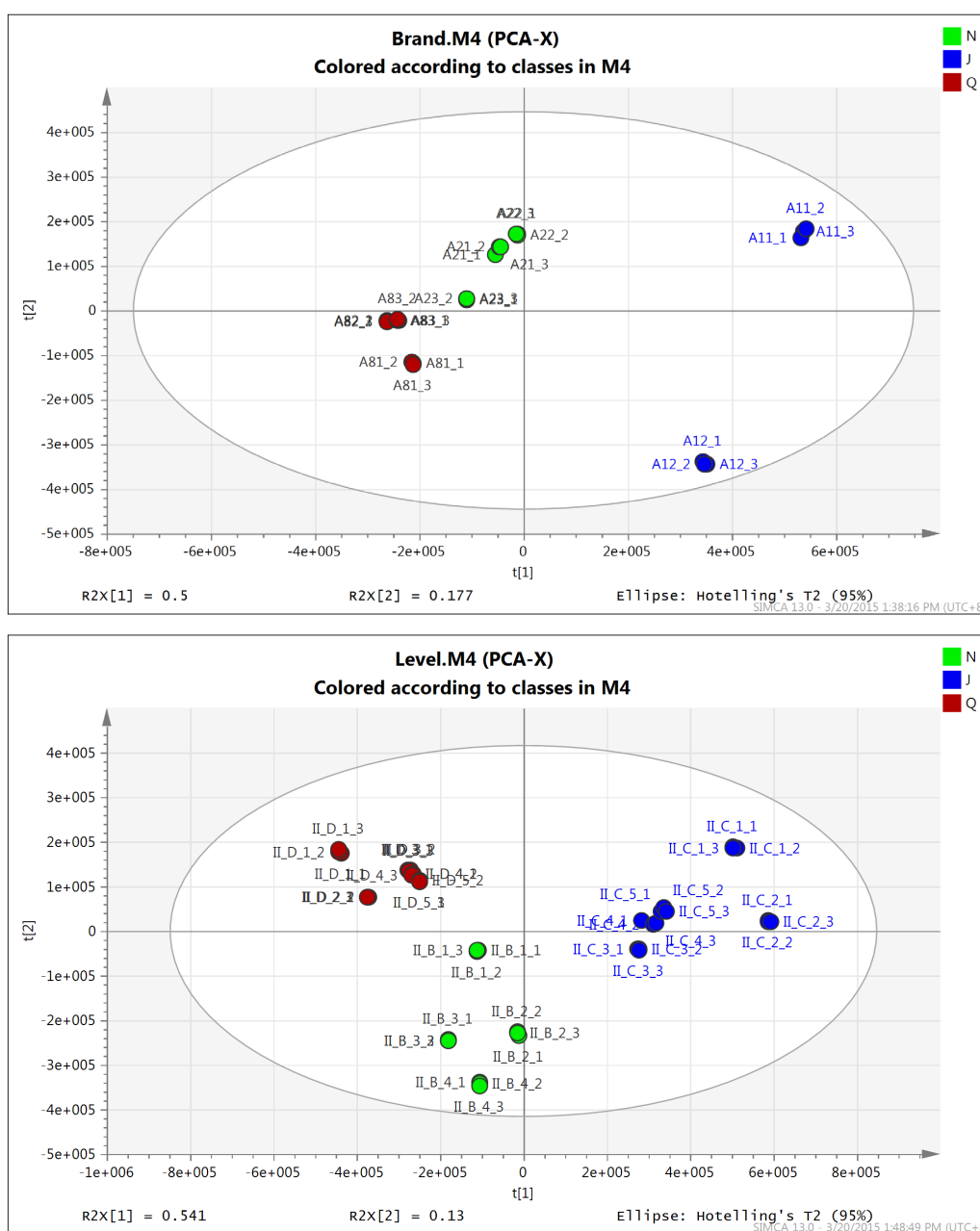


图 3. 三种香型白酒的主成分分析（PCA）图。（A：不同品牌组；B：不同等级组）

采用 SIEVE 软件找出所得化合物中 ratio 差别较大, 且在 XIC 图中有明确色谱峰的化合物, 作为潜在标志物, 如图 4 所示 (以化合物 S1 示例)。最终在两个分析组中分别确定的标志物见表 5 和表 6。其中有 5 个化合物为两个分析组的共有标志物。以这 5 个共有标志物为指标, 采用 SIMCA 软件进行正交校正偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA), 最大化地凸显模型内部不同组别之间的差异。分析结果表明三种香型的白酒可以得到良好的区分 (图 5)。

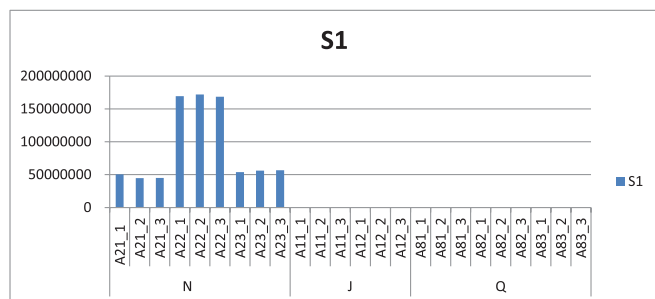


图 4. 不同品牌组中化合物 S1 (m/z221.1209; RT:17.5 min) 分别在三种香型的样品中响应强度图

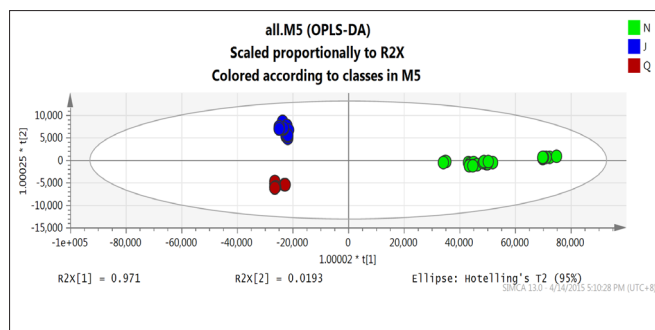


图 5. 三种香型白酒的 OPLS-DA 分析图 (以 5 个共有标志物为指标)

4.5 标志物鉴定

根据标志物的精确质量数、同位素分布和二级碎片离子等信息, 采用 Xcalibur 软件、MassFrontier 软件和 ChemSpider 网络数据库进行了鉴定和确证, 鉴定结果见表 7。

表 7. 鉴定标志物信息表 (“*” 为共有标志物)

	No.	m/z	RT (min)	Compound
浓香型	1	221.1206*	17.5	1-(Butylsulfanyl)-3-methoxy-2-propanyl acetate
	2	145.1224*	19.2	Ethyl caproate
	3	131.1067*	19.2	Methyl caproate
	4	207.1052	17.5	1-(Propylsulfanyl)-3-methoxy-2-propanyl acetate
	5	193.0894	13.4	1-(Ethylsulfanyl)-3-methoxy-2-propanyl acetate
酱香型	6	255.1702*	18.3	(1-Cyclopentyl-3-oxo-piperazin-2-yl)-acetic acid ethyl ester
	7	184.0640*	0.75	2-(Trimethylammonio)ethyl sulfate
	8	215.1279	15.8	Ethyl (2Z)-2-(ethoxymethylene)-3-oxohexanoate
	9	199.0755	18.2	(2E)-1-(2-Furyl)-3-phenyl-2-propen-1-one
	10	179.1543	19.2	2-Isobutyl-3,5,6-trimethylpyrazine

表 5. 不同品牌组中 6 个标志物 (“*” 为共有标志物)

浓香型 (N)			酱香型 (J)		
m/z	RT(min)	化合物	A1	RT(min)	化合物
221.1209*	17.5	S1	255.1702*	18.3	S4
145.1226*	19.2	S2	184.0641*	0.75	S5
131.107*	19.2	S3	215.1279	15.8	S6

表 6. 不同等级组中 9 个标志物 (“*” 为共有标志物)

浓香型 (N)			酱香型 (J)		
m/z	RT(min)	化合物	A1	RT(min)	化合物
221.1206*	17.5	T1	199.0755	18.2	T6
207.1052	15.8	T2	179.1543	19.2	T7
193.0894	13.4	T3	255.1703*	18.3	T8
145.1224*	19.2	T4	184.064*	0.75	T9
131.1067*	19.2	T5			

4.4 建模与预判

以此 OPLS-DA 分析的模型对已知另一典型浓香型白酒样品 (沱牌曲酒, 50°) 进行预判分析, 来考察选取的 5 个标志物对 3 种香型白酒的鉴别能力。结果表明, 测试样品可以很好的和浓香型样品聚合在一起, 和另外两种组能很好的区分, 判断结果正确 (图 6)。

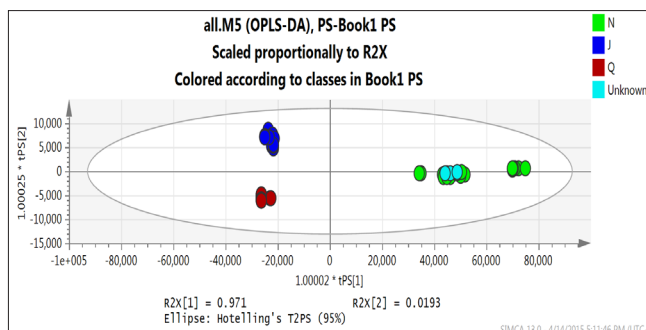


图 6. 预判分析图

5. 结论

本实验展示了基于组学的分析方法在食品种类鉴别中的工作流程。结果表明 Orbitrap 高分辨质谱技术结合组学分析软件 SIEVE 及统计学分析软件 SIMCA，可以有效地鉴别浓香、酱香和清香三种香型的白酒。在实验中鉴定到了 5 个共有标志物，其中包括浓香型白酒被广为认知的特征成分己酸乙酯，与既有研究一致，也表明所选标志物具有极高的可信度。通过对已知样本的预判测试，显示出所建立模型可以很好的用于三种香型白酒的区分。标志物未在清香型白酒中发现，可能与清香型白酒本身就分 3 种亚型有关。另外，通过样本量的增加，所建立的模型进行样品预测的准确度可能会进一步提高。后续还可采用该流程和方法对 12 种白酒香型中的其他香型和不同年份的白酒样品进行分析和比较。利用本文建立的这一套工作流程，可以推广到食品组学研究领域更广范围的品种鉴别、产地溯源、质量控制等各个研究方向。

参考文献

- [1] 周围，等。名优白酒质量指纹专家鉴别系统。分析化学，2006年4月，第32卷，735-740。
 [2] 柳军，等。应用GC-O分析比较兼香型和浓香型白酒中的香气化合物。酿酒，2008年5月35卷，103-107。
 [3] 王永维，等。基于电子舌的白酒检测与区分研究。包装与食品机械，2009年第27卷第5期，57-61。



Orbitrap 组学俱乐部



赛默飞小分子质谱应用技术群

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

www.thermoscientific.cn

全国服务热线：800 810 5118
400 650 5118 (支持手机用户)

AN_C_LCMSMS_11_201507Y

Thermo
 SCIENTIFIC
 A Thermo Fisher Scientific Brand