

Application News

No. C203

LC-MS

营养代谢组学 利用 LC/MS/MS 进行酒类变质分析

近年来，代谢组学技术因其能全面分析体内代谢产物而成为研究热点。营养代谢组学则是将该项技术应用在食品领域，并以此为基础而发展起来。一直以来，人们在评价食物时，都是根据人的感官分析，即通过味道、香气、口感、等级等进行评价。所谓营养代谢组学，是通过全面分析食品中的代谢产物，并与人类感官分析等评价结果进行比较，从而更加科学地进行食品的“品质评价预测”与“机能性成分的探索”。

本研究将介绍一种采用营养代谢组学进行食品变质解析的分析方法。实验中，将市售日本清酒与白葡萄酒在不利条件下保存后，采用高效液相色谱质谱联用技术 (LC/MS/MS) 对其进行整体分析，全面考察氨基酸、有机酸、核苷、核苷酸等亲水性代谢产物的变化。

N. Kato Y. Inohana

■ 样品与变质实验

样品选取两种市售日本清酒（冷藏）和一种白葡萄酒。样品详细情况如表 1 所示。为了加快变质实验，将样品按照表 2 所示的各种实验条件进行保存。目前，酒类产品在国内外均有销售，并存在大量的进口与出口销售。因此，这些酒类产品在运输过程中要保证其品质不受损，才能保持商品价值。本研究中所使用的实验条件，将再现日照、高温、震动等运输时可能会影响品质的状况，并对其进行评价。

对各条件下存放的样品，以 12,000 rpm/min 离心 5 min，取上清液用超纯水稀释 100 倍后，使用 LC/MS/MS 进样分析。

表 1 样品详细情况

样品	
日本清酒 -1	纯米大吟酿（品质上乘的清酒）， 精米打磨精度 =50%，酒精度 =15 度
日本清酒 -2	吟酿酒，酿造酒精添加，精米打磨精度 =50%， 酒精度 =15 度
白葡萄酒	澳大利亚生产、含有抗氧化剂（亚硫酸盐）， 酒精度 =13 度

表 2 样品变质实验条件

存放条件	
A	冷藏、避光条件下存放 2 周
B	室温、日照下存放 2 周
C	冷藏、避光条件下存放 2 周后，加热至 50°C、 避光保存 24h
D	冷藏、避光条件下存放 2 周后，室温、避光条件下 振荡 24h

■ 分析条件

利用初级代谢产物 LC/MS/MS Ver. 2 方法包中含有的液质采集方法，采用 LCMS-8060（图 1）进行实验。通过使用方法包中的分析方法，可实现对生命科学领域中已知重要的 97 种亲水性代谢产物同时进行检测分析。HPLC 及 MS 的分析条件见表 3。

表 3 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera™ X2)	
Column	: Reversed-phase column
Mobile phases	: A) 0.1% Formic acid in water B) 0.1% Formic acid in acetonitrile
Mode	: Gradient elution
Flow rate	: 0.25 mL/min
Injection volume	: 3 μL
[MS conditions] (LCMS-8060)	
Ionization	: ESI (Positive and negative mode)
Mode	: MRM
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 10.0 L/min
Heating gas flow	: 10.0 L/min
DL temp.	: 250°C
Block heater temp.	: 400°C
Interface temp.	: 300°C



图 1 Nexera™ X2 及 LCMS™ -8060

■ 代谢组分析

利用 LC/MS/MS 检测各样品。根据各成分峰面积，结合 Traverse-MS 软件进行主成分分析 (Principal Component Analysis: PCA) 和单因素方差分析 (one-way ANOVA)。

经过主成分分析，结果表明，在不同存放条件下储存的所有酒类样品未产生明显的差异。相比之下，详细的方差分析结果显示，一些成分的增加或减少与酒类样品的类型及储存条件有关。以日本清酒 -1 为例，储存条件对其影响的方差分析结果如图 2 所示。图中绿色框表示不同保存条件下各组分的检测结果 ($p < 0.05$)，差异具有统计学意义。



■ A: 冷藏、避光条件下存放 2 周
■ B: 室温、日照下存放 2 周
■ C: 冷藏、避光条件下存放 2 周后, 加热至 50°C、避光保存 24h
■ D: 冷藏、避光条件下存放 2 周后, 室温、避光条件下振荡 24h
 成分 (p < 0.05)

图 2 不同储存条件对日本清酒 -1 中各组分影响的方差分析结果

本实验中，在室温、日照的条件下存放 2 周（储存条件 B）的日本清酒 -1 样品中，检测到部分成分与保存在其他条件下的样品有显著性差异。日本清酒 -2 和白葡萄酒也观察到类似的趋势。实验结果显示一些储存条件，如加热至 50°C 或振荡约 24 小时，并不足以对包括氨基酸和有机酸在内的亲水化合物产生显著影响。仅仅根据这项研究的结果很难得出明确的结论。然而，结果表明，在购买产品后的运输或储存过程中，即使产品偶然暴露在高温、震动等条件下，也不太可能在短时间内对产品质量产生重大影响。

在日本清酒 -1 中，储存 B 条件下与其他条件下出现显著性差异 ($p < 0.05$) 的成分有：半胱氨酸、蛋氨酸亚砷、尿酸。此外还观测到了白葡萄酒特有的变化成分。各酒类样品中变化成分的比较结果如图 3 至图 6 所示。

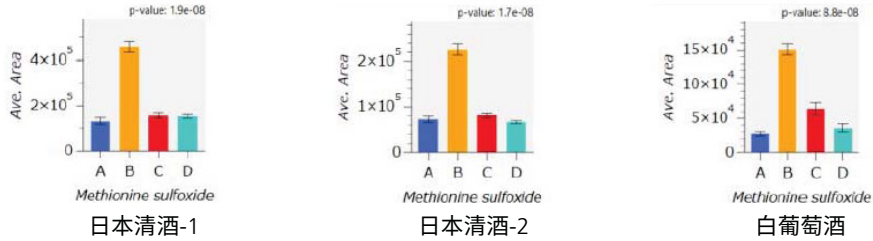


图 3 蛋氨酸亚砷的方差分析结果

图 3 所示为蛋氨酸亚砷在各类酒中的统计分析结果。分析结果表明，无论何种类型的酒类样品，在室温、日照的条件下存放 2 周（储存条件 B）的样品中，蛋氨酸亚砷有明显增加的趋势。蛋氨酸是一种氨基酸残基，更容易发生老化相关氧化，因此被认为是体内氧化蛋白损伤增加的原因之一，在细胞内氧化应激条件下可迅速氧化为蛋氨酸亚砷。由此可知，蛋氨酸亚砷可作为酒类成分氧化标志物进行使用。

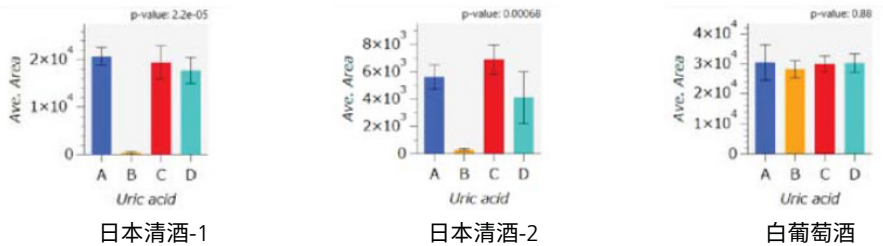


图 4 尿酸的方差分析结果

图 4 所示为尿酸在各类酒中的统计分析结果。分析结果表明，只有日本清酒在室温、日照的条件下存放 2 周（储存条件 B）的样品中，尿酸成分有明显减少的趋势。尿酸在生理学上，具有与 L-抗坏血酸同样的强抗氧化作用，其自身具有易氧化的特性。由于白葡萄酒中添加了亚硫酸盐作为抗氧化剂，因此尿酸本身几乎没有被氧化。

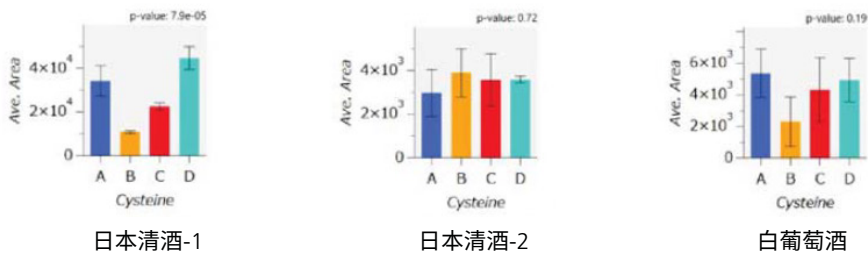


图 5 半胱氨酸的方差分析结果

图 5 所示内容为半胱氨酸在各类酒中的统计分析结果。分析结果表明，只有日本清酒 -1 在室温、日照的条件下存放 2 周（储存条件 B）的样品中，半胱氨酸中有明显减少的趋势。除了蛋氨酸，半胱氨酸也是变质的日本清酒产生恶臭的主要成分二甲基三硫（DMTS）的前体物质。如果半胱氨酸的减少会影响 DMTS 的生成，那么作为日本清酒 -1 与日本清酒 -2 的主要差别——酿造清酒是否添加，可能会影响清酒变质的敏感程度。

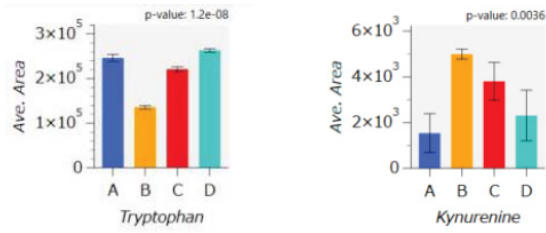


图 6 白葡萄酒中色氨酸及犬尿氨酸的方差分析结果

图 6 所示为白葡萄酒中色氨酸及犬尿氨酸的统计分析结果。分析结果表明，在室温、日照的条件下存放 2 周（储存条件 B）的样品中，色氨酸减少，犬尿氨酸提高。冷藏、避光条件下存放 2 周后，加热至 50°C、避光条件下保存 24h（储存条件 C）的样品也稍显与之相同的变化趋势，但变化幅度较小。色氨酸可通过犬尿氨酸的一条代谢途径代谢为犬尿氨酸（见图 7）。因此，本研究观测到的这些成分的变化，和通过它们与该条代谢通路的关系所预测的变化相一致。

结论

综上所述，利用 LC/MS/MS 进行营养代谢组学研究，可实现对酒类变质特征性成分的整体探索分析。

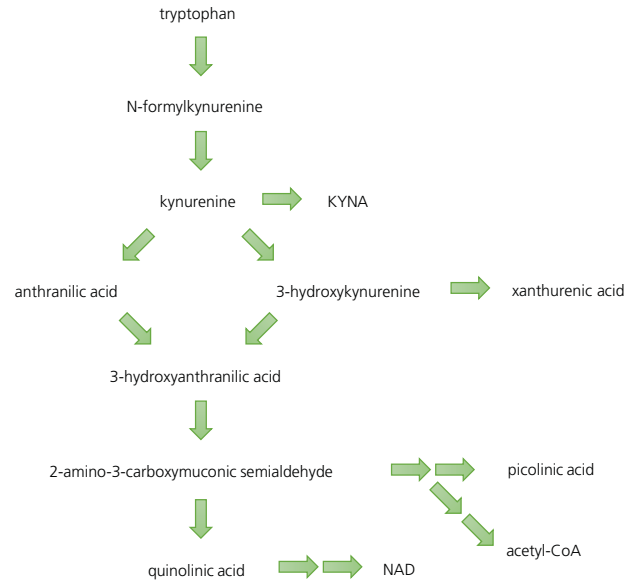


图 7 犬尿氨酸代谢途径

LCMS 及 Nexera 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家所使用的商标。
Traverse MS 是 Life Fix 株式会社的商标。

岛津应用云



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2019 年 10 月