

### 使用多变量分析评估食物变质情况

食品研发初期会进行理化检测、微生物检测和感官评价，依据客观性指标设定保质（消费）期。在目前商品数量庞大、商品周期较短的市场中，虽然能够保证保质（消费）期内的安全性和质量，但每种商品的变质特征很难预估。此外，消费者对商品开封后的保质（消费）期的认知存在一定差异，因此，需要开发一种可以对随时间推移产生的变质进行预测的方法。

食品的变质是由微生物、水、氧气、温度以及光线等作用产生的，蛋白质、碳水化合物和脂肪等高分子分解成小分子。以蛋白质为例，在分解成肽和氨基酸之后，会生成胺和有机酸。

本文的目的是跟踪开封后的牛奶的变质情况。介绍通过 Smart Metabolites Database™ 鉴定氨基酸、有机酸、糖等的亲水性成分，利用多变量分析软件 Traverse MST™ 分析上述成分随时间而产生变化的结果。

Y. Kawakita, Y. Sakamoto

#### ■ 样品制备及分析条件

检测样品为市售牛奶（纸袋装）。为了跟踪随时间而变化的情况，将开封日期定为第 0 天，分别在第 3 天、第 7 天、第 14 天、第 21 天后进行采样。除采样时外，均在冰箱内保存。

取 100 μL 牛奶至 1.5 mL 离心管中，加入 10 μL 核糖醇水溶液（0.2 mg/mL）作为内标。添加亲水性成分的萃取溶剂，水：甲醇：三氯甲烷 = 1：2.5：1 的混合溶剂 500 μL，在 37°C 条件下振荡 30 min 后离心（4°C、3000 g、10 min），取上层相（水 / 甲醇相）450 μL。然后添加超纯水 400 μL，再次离心 5 min，取上清液 500 μL。之后，用离心蒸发器使甲醇气化，通过冷冻干燥使之充分干固。在干固后的残渣中添加甲氧基胺盐 - 吡啶溶液（20 mg/mL）200 μL，在 30°C 条件下振荡 90 min。然后，添加 N-甲基-N-(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺（MSTFA）100 μL，在 37°C 条件下振荡 30 min，用于 GC-MS/MS 分析。GC-MS/MS 的测定使用可以对 475 种成分一起分析的 MRM Smart Metabolites Database，测定条件如表 1 所示。

表 1 测定条件

GC-MS	: GCMS-TQ™ 8040 NX
自动注射器	: AOC-20i + s
色谱柱	: BPX-5 (30 m×0.25 mm×0.25 μm)
[GC]	
气化室温度	: 250 °C
柱温箱温度	: 60°C (2 min) ⇒ (15°C/min) ⇒ 330°C (3 min)
进样模式	: 分流
分流比	: 30
载气	: He
载气控制模式	: 39.0 cm/s (恒线速度)
进样量	: 1 μL
[MS]	
离子源温度	: 200 °C
接口温度	: 280 °C
数据采集模式	: MRM
循环时间	: 0.25 秒

#### ■ 结果

图 1 所示为开封时牛奶的 TIC 图（总离子流图）。从开封时的牛奶中检测到了乳糖、氨基酸、以软脂酸为主的饱和脂肪酸等共计 106 种成分（94 种化合物）。所检测出的化合物见表 2。

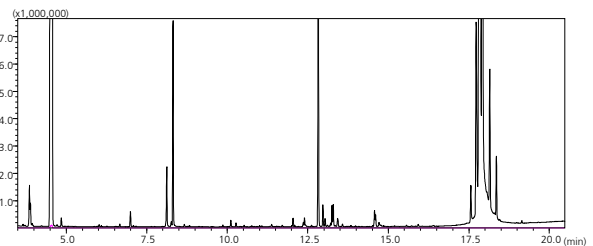


图 1 开封时的牛奶分析结果

表 2 从牛奶中检测到的成分

糖/糖醇/糖酸	2- 脱氧葡萄糖	阿拉伯糖	阿糖醇	赤藓酮糖	果糖	岩藻糖
	半乳糖	半乳糖醛酸	葡萄糖酸	葡萄糖	葡萄糖醛酸	甘油酸
	甘油	肌醇	乳糖醇	乳糖	麦芽糖	甘露糖
	N- 乙酰甘露糖胺	核糖醇 (内部标准物质)	核糖酸	核糖	核酮糖	蔗糖
	苏糖酸	木糖酸	木糖	木酮糖		
糖磷酸	3- 磷酸甘油酸	二羟丙酮磷酸	6- 磷酸果糖	6- 磷酸葡萄糖	2- 磷酸甘油	3- 磷酸甘油
	6- 磷酸甘露糖	5- 磷酸核糖	5- 磷酸核酮糖	7- 磷酸景天庚酮糖		
氨基酸	2- 氨基庚二酸	3- 氨基戊二酸 (β- 谷氨酸)	3- 氨基丙酸 (β- 丙氨酸)	4- 氨基丁酸 (GABA)	4- 羟基脯氨酸	5- 氧脯氨酸
	丙氨酸	天冬氨酸	肌肝	半胱氨酸	二甲基甘氨酸	谷氨酸
	甘氨酸	牛磺酸	异亮氨酸	亮氨酸	赖氨酸	苯丙氨酸
	脯氨酸	丝氨酸	苏氨酸	酪氨酸	脲基琥珀酸	缬氨酸
饱和脂肪酸	己酸	葵酸	月桂酸	肉豆蔻酸	壬酸	辛酸
	棕榈酸	硬脂酸				
有机酸	2- 酮戊二酸	2- 羟基戊二酸	3- 羟基丁酸	3- 羟基异戊酸	3- 羟基丙酸	乌头酸
	苯甲酸	柠檬酸	富马酸	乙醇酸	乙醛酸	乳酸
	苹果酸	丙酮酸	琥珀酸			
其他	2- 氨基乙醇	尿囊素	多巴胺	磷酸乙醇胺	乳清酸	泛酸
	磷酸	尿嘧啶	尿素	黄嘌呤核苷酸		

## ■ 基于时间序列的多变量分析

变量分析软件 Traverse MS™ (Reifycs 公司) 是一种使用 GC-MS/MS 获取的 MRM 数据, 进行多变量高速分析的综合分析软件。采用 MRM 数据专用峰识别算法和具有简易操作图形的用户界面, 能够更加“准确、快速、简单”地完成峰处理和识别。另外, 可通过图表显示样品组之间的波动, 同时支持层次聚类, 主成分分析 (PCA) 和代谢途径, 通过各种分析方法对数据间的差异进行直观评价。Traverse MS™ 可直接读取通过 GCMSsolution™ 获取的 qgd 文件 (MRM 数据)。

以牛奶中检测出来的上述 106 种成分为目标, 使用 Traverse MS™ 进行分析。在各采样日期对三个样品进行分析, 使用核糖醇作为内标物质, 对各样品检出的化合物强度进行了归一化。在 Traverse MS™ 中使用主成分分析 (PCA) 的得分图对各采样日期的差异进行分析的结果如图 2 所示。从第 1 主成分 (横轴、PC1) 来看, 按照第 0 天、第 3 天、第 7 天、第 14 天、第 21 天的顺序从正向负分布, 第 0 天和第 3 天为正, 第 14 天和第 21 天为负。该结果表明, 第 1 主成分随时间而变化。

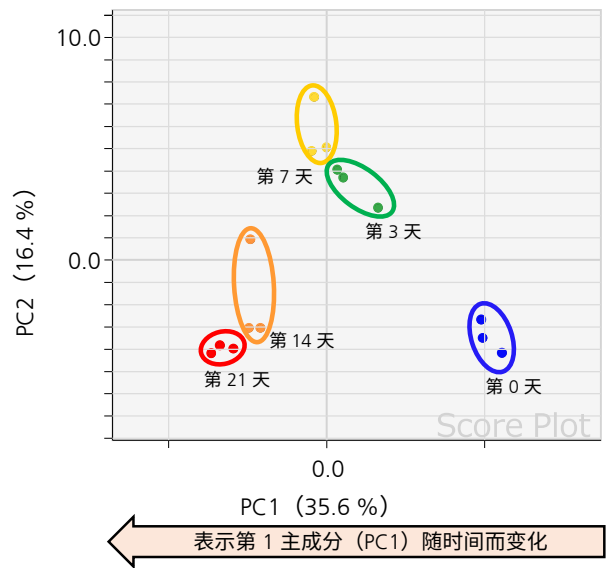


图 2 各样品按主成分分析 (PCA) 得分图分布

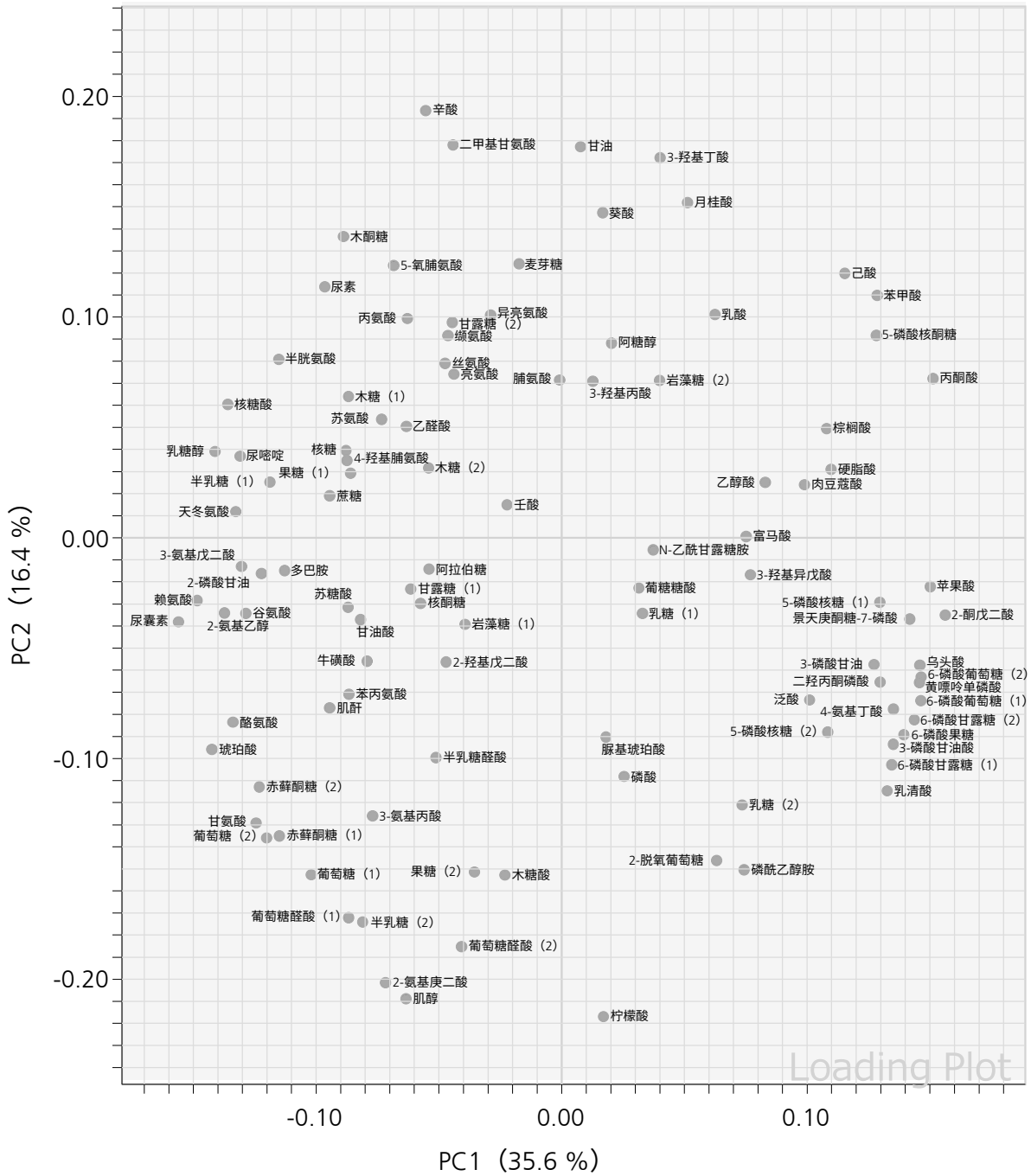


图 3 各成分按主成分分析 (PCA) 因子载荷图分布

此外, 主成分分析的因子载荷图如图 3 所示。按第 1 主成分 (横轴、PC1) 呈正向分布的成分是在刚开封的新鲜牛奶中大量含有的成分, 呈负向分布的成分在牛奶中的含量具有随着时间的推移而增加的趋势。第 1 主成分为正的具有代表性的成分为苹果酸, 2- 酮戊二酸, 丙酮酸等有机酸、饱和脂肪酸、糖磷酸等。此外, 在第 1 主成分为负的成分中, 可以观察到以琥珀酸, 尿囊素、甘氨酸为主的氨基酸, 葡萄糖, 赤藓酮糖等糖。

然后, 按日期进行分类, 依据方差分析 (ANOVA) 计算 p 值。在 p 值 < 0.01 的成分中, 用条形图表示可以观察到呈增加或减少趋势的部分成分的定量值类内平均值 (图 4)。2- 酮戊二酸、苹果酸、6- 磷酸葡萄糖等随着时间的推移会减少, 而琥珀酸、甘氨酸、赖氨酸等氨基酸、葡萄糖等糖类随着时间的推移会增加。上述结果表明, 随着天数的增加, 部分蛋白质被分解, 氨基酸增加, 部分糖磷酸分解为糖。

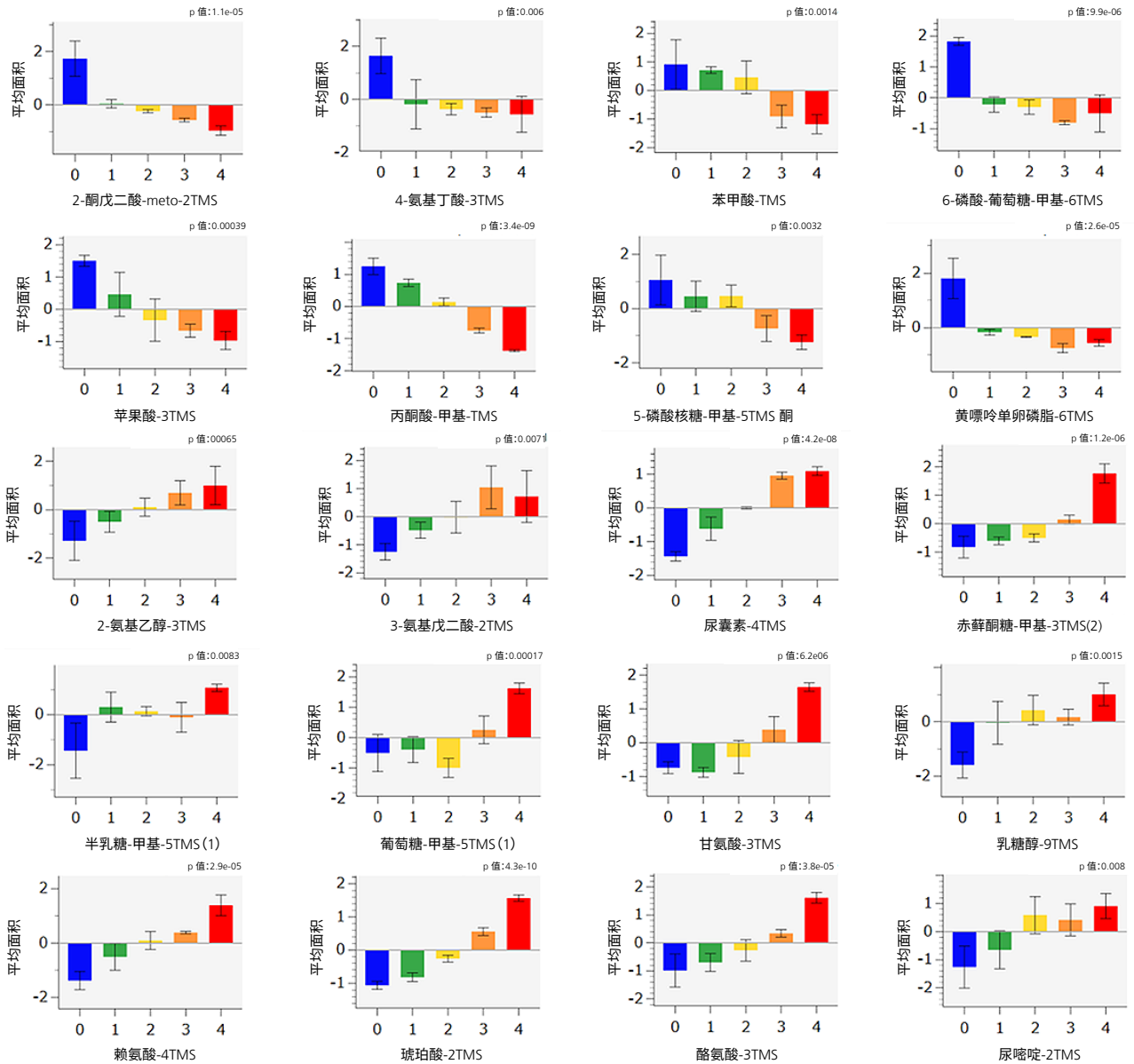


图4 方差分析 (ANOVA) 结果

0: 开封时; 1: 开封后经过3天; 2: 开封后经过7天; 3: 开封后经过14天; 4: 开封后经过21天  
(只记载了 p<0.01 的部分成分。条形图是类内平均值, 误差线是类内标准偏差。)

## 总结

使用 Smart Metabolites Database, 可以同时分析食品中所含的亲水性成分, 并通过使用该结果进行化合物的多变量分析, 观察到变质时增加的成分和减少的成分。

上述结果表明, 部分有机酸、氨基酸、糖可作为鲜度、变质指标的标志物使用。配合产品开发时的客观性评价, 可以更加详细地了解产品的特征。

岛津应用云



Smart Metabolites Database、GCMS-TQ 和 GCMSsolution 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 Reifycs 株式会社的商标。



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: 2020年6月