

营养代谢组学 使用三重四极杆质谱仪 LCMS™-8060NX 进行葡萄酒分析



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。代谢组学是指解析细胞代谢产生的氨基酸和有机酸等低分子代谢产物，明确多个代谢途径差异的学术领域，与其他组学相比，对象组分较少，因而易于进行代谢结构分析。最初，这是一项在医学领域取得初步成果的技术，例如使用临床样本搜索诊断标记以及使用模型动物进行病原分析。工业领域和食品领域的厂商也使用同样的解析方法进行产品和原材料产地比较，应用机会在日益增多。如此将代谢组学应用于活体以外，应用于食品当中的部分被称为“营养代谢组学”。

本文将列举营养代谢组学的其中一例，向您介绍产地、葡萄品种不同的葡萄酒的分析案例。为全面分析葡萄酒中的亲水性组分，使用高效液相色谱质谱联用仪（LC/MS/MS），以 2 种方法进行了测定。

T. Hattori, Y. Yamada

■ 样品

从不同的产地和葡萄品种中采样了 6 种类型的红酒。表 1 所示为样品的详细情况。

表 1 样品详细情况

	产地	葡萄品种
葡萄酒 A	法国	赤霞珠
葡萄酒 B	法国	梅乐
葡萄酒 C	法国	98% 黑比诺, 2% 波侯皮诺
葡萄酒 D	美国	赤霞珠
葡萄酒 E	智利	赤霞珠
葡萄酒 F	澳大利亚	赤霞珠

■ 预处理

在短链脂肪酸 / 有机酸分析的预处理中，为了保留在 ODS 色谱柱上并提高 MS 检测的灵敏度，将样品用 3- 硝基苯胍 (3-NPH) 衍生化。使用膜过滤器过滤葡萄酒后，添加 3-NPH (衍生化试剂)、吡啶 (催化剂)、碳二亚胺 (缩合剂)、2-Ethylbutyric acid (内标物质)，在室温下反应 30 分钟。反应后，使用含有甲酸的甲醇溶液稀释 5 倍。

在用以同时分析亲水性代谢产物的预处理当中，使用膜过滤器过滤葡萄酒后，使用超纯水稀释 100 倍。稀释时，添加 2-Morpholinoethanesulfonic acid (MES) 作为内标物质，内标物质浓度为 1 μmol/L。

■ 分析条件

使用 LC/MS/MS 方法包里面的短链脂肪酸参数和 LCMS-8060 NX 进行短链脂肪酸 / 有机酸分析。本分析方法可分析醋酸、丙酸、丁酸等 6 种短链脂肪酸以及有关中心代谢路径的 16 种有机酸。由于葡萄酒中富含酒石酸，因此也将酒石酸添加入了方法中。表 2 所示为 HPLC 及 MS 的分析条件。

表 2 分析条件 (短链脂肪酸、有机酸分析)

[HPLC 条件] (Nexera™ X3)	
色谱柱	: Mastro™ C18 (150 mm×2.0 mm I.D., 3.0 μm)
流动相	: A) 0.1% 甲酸水溶液 B) 乙腈
模式	: 梯度洗脱
流速	: 0.35 mL/min
进样量	: 3 μL
[MS 条件] (LCMS-8060NX)	
离子源	: ESI (正负模式)
模式	: MRM
雾化气流量	: 2.0 L/min
干燥气流量	: 10.0 L/min
加热气流量	: 10.0 L/min
DL 温度	: 250 °C
加热模块温度	: 400 °C
接口温度	: 300 °C

亲水性代谢产物的分析利用 LC/MS/MS 方法包的初级代谢产物 ver.2 中含有的液质采集方法，采用 LCMS-8060NX 进行。本分析方法可实现对生命科学领域的代谢组学解析中已知重要的氨基酸、有机酸、核苷、核苷酸等 97 种亲水性代谢产物同时进行分析。表 3 所示为 HPLC 及 MS 的分析条件。

表 3 分析条件 (亲水性代谢产物同时分析)

[HPLC 条件] (Nexera X3)	
色谱柱	: 反相柱
流动相	: A) 0.1% 甲酸水溶液 B) 0.1% 甲酸乙腈溶液
模式	: 梯度洗脱
流速	: 0.25 mL/min
进样量	: 3 μL
[MS 条件] (LCMS-8060NX)	
离子源	: ESI (正负模式)
模式	: MRM
离子聚焦电压	: ±2 kV
雾化气流量	: 3.0 L/min
干燥气流量	: 10.0 L/min
加热气流量	: 10.0 L/min
DL 温度	: 250 °C
加热模块温度	: 400 °C
接口温度	: 300 °C



■ 利用 IonFocus™ 离子化单元提高灵敏度

LCMS-8060NX 的 IonFocus 离子化单元 (图 1) 通过传输离子用的聚焦电极，高效地将离子导入质谱仪，去除多余的中性粒子。因此，即使是活细胞、食品样品等基质较多的样品，也可兼顾高灵敏度分析和较高仪器耐用性。针对从葡萄酒中检测出的亲水性代谢产物，确认 IonFocus 离子化单元的效果后发现，在约 90% 的化合物中，灵敏度平均提高约 1.5 倍。图 2 所示为 IonFocus 离子化单元提高灵敏度的案例。

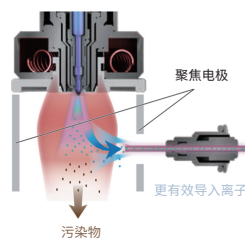


图 1 IonFocus 离子化单元的概念示意图

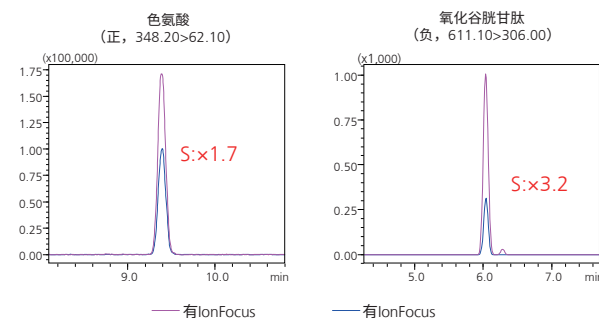


图 2 IonFocus 离子化单元提高灵敏度

■ Peakintelligence™ 波形处理

利用 LabSolutions Insight™ 的增值软件 Peakintelligence 对检测出的峰值进行波形处理。Peakintelligence 会使 AI 学习熟练操作者进行的波形处理，实现与熟练者同等水平的解析。即使是图 3 中 S/N 比较低、附近有来自其他组分的峰值的情况下，Peakintelligence 也可以正确地进行检测、波形处理。由此可降低误检测率、未检测峰值数，缩短确认和修改波形处理结果所需的时间。

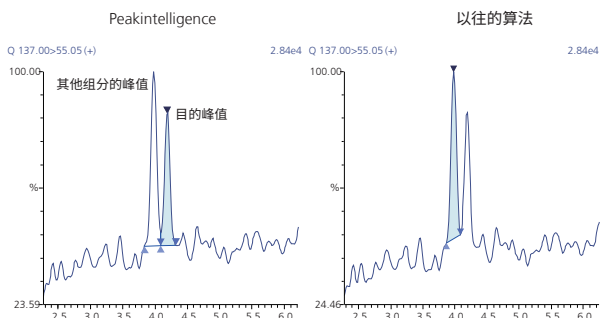


图 3 Peakintelligence 波形处理

由此可知，葡萄酒中的亲水性代谢产物（特别是氨基酸）受不同葡萄品种的影响。而短链脂肪酸和有机酸则受葡萄酒产地（栽培葡萄的土壤、气候、葡萄酒的酿造工艺等）影响，而不是葡萄品种。众所周知，葡萄酒的酿造工艺会影响葡萄酒中的短链脂肪酸和有机酸。通常在葡萄酒的发酵工艺当中，酒精发酵后会产生苹果乳酸发酵。苹果乳酸发酵时，在乳酸菌的作用下，果汁和葡萄酒中含有的苹果酸会分解为乳酸和二氧化碳。据说经苹果乳酸发酵，葡萄酒的酸味会变得醇和。图 6 所示为各个葡萄酒中所含短链脂肪酸、有机酸的比例。发现法国葡萄酒 A、B、C、智利葡萄酒 E、澳大利亚葡萄酒 F 的乳酸比例高于苹果酸比例，苹果乳酸发酵正在进行。

发现美国葡萄酒 D 的苹果酸比例高于乳酸比例，苹果乳酸发酵并未进行。

■ 结论

综上所述，通过代谢分析葡萄酒中的短链脂肪酸、有机酸、亲水性代谢产物，可应用于葡萄酒的发酵工艺评价和与味道的相关性评价当中。本分析方法可应用于生产更加美味、更高质量的葡萄酒。

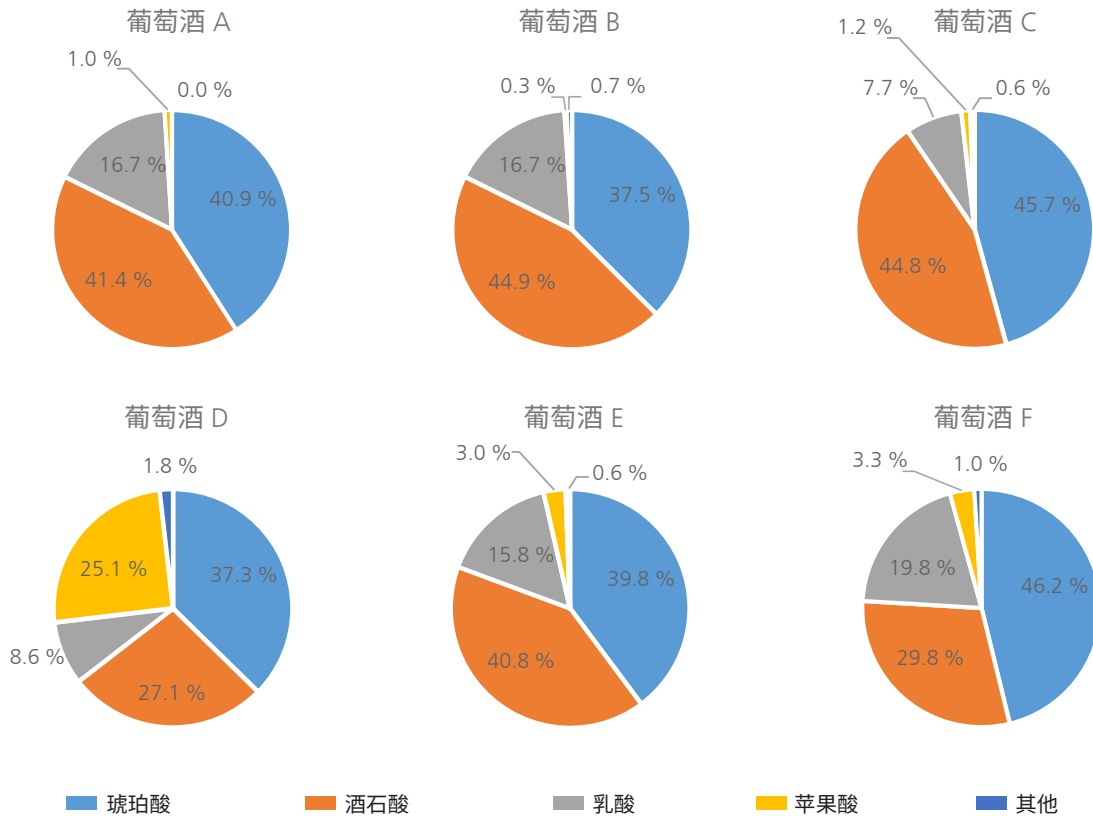


图 6 葡萄酒中短链脂肪酸、有机酸谱

LCMS、Nexera、IonFocus、Peakintelligence 和 LabSolutions Insight 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标
SIMCA 是 Sartorius Stedim Data Analytics AB 的注册商标。

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：2020年8月