

使用 Agilent 5977A GC/MSD 对威士忌样品进行化学计量学分析

应用简报

食品检验与农业

作者

Takeshi Serino 和 Brian Hom
安捷伦科技有限公司
圣克拉拉，加利福尼亚州
美国

Sadao Nakamura
安捷伦科技（日本）有限公司
Hachioji-Shi, 东京
日本

摘要

本文使用带高灵敏的 Extractor EI 离子源的 Agilent 5977A 系列 GC/MSD，利用非目标化合物分析和统计工具，对化合物进行分析，以区分五种不同品牌的威士忌。



Agilent Technologies

前言

气相色谱/质谱 (GC/MS) 技术广泛应用于食品的产品研发、质量控制和品质保证分析中。GC/MS 性能的提高已经可以实现对众多天然产物中常见的大量痕量化合物进行可靠的检测。虽然人类的感官测试（气味和味道）仍然是香精质量控制必不可少的一部分，但是对于主成分和痕量组分在浓度上的变化和差异，GC/MS 可以提供更多有价值的细节，且不受限于人类的感官。

化学计量学可同时解决描述性和预测性问题。在描述性应用中，为了了解系统的内在联系和结构，我们可对化学系统的性能进行建模。在预测性应用中，通过化学系统性能的建模来预测关注的新性能或者表现。在描述性和预测性化学计量学中，GC/MS 技术常用作生成数据的分析手段。在预测性模式中，该技术已用于预测橄榄油是否会通过特级初榨感官测试 [1]、葡萄酒种类辨识 [2]，以及（日本）烧酒是否在生产过程中被污染 [3]。在描述性模式中，可使用该技术区别密切相关的食品，如不同品牌的威士忌。

虽然这些化学计量学分析经常使用功能强大的 MS 仪器，但较低成本的单四极杆质谱检测器同样也可提供有用的信息。本文描述

了通过对 5977A GC/MSD 生成的数据进行复杂的统计分析，来辨识五种不同品牌威士忌之间的差异。5977A MSD 和 7890B GC 联用仪，是一个理想的分析平台，可以对威士忌等食品进行高灵敏的鉴定分析和复杂的统计分析，并且 PAL 自动样品进样器上的自动固相微萃取 (SPME) 装置可以实现威士忌样品中芳香类化合物的高灵敏度顶空进样。Mass Profiler Professional (MPP) 软件可以利用一系列统计工具实现复杂样品（如威士忌）组份的分类。

本研究使用非目标化合物分析和单因素方差分析 (ANOVA)、主成分分析 (PCA) 和层序聚类分析 (HCA) 等统计工具，来鉴定不同品牌威士忌之间的差异。数据和统计分析使用 NIST AMDIS（自动质谱解卷积和鉴定系统）、Agilent MassHunter ID 浏览器和 Mass Profiler Professional 软件。根据 46 种不同组分的相对浓度，该方法可将这些威士忌分为四组。

实验部分

样品

五种不同的威士忌购于美国，详见表 1。

表 1. 研究中使用的威士忌样品

样品	说明	主观气味
知名品牌 (PB)	市场上最知名的威士忌酒	一款与微甜品相比清淡的软饮料
竞争品牌 (A)	描述为优质威士忌	与 PB 类似
竞争品牌 (B)	流行的山寨威士忌	具有轻度焦糖甜味和香草味。比 PB 更强的香味
竞争品牌 (C)	声称比 PB 的品质更高	甜香，比 PB 稍强
竞争品牌 (D)	声称为一款浓香威士忌	含蜂蜜、黄油和少许深色水果（梅子、葡萄干）。具有比 PB 更强的香味

仪器

本研究采用配备带有自动固相微萃取 (SPME) PAL 自动采样进样器的 Agilent 7890B GC, 并与带有 Extractor EI 离子源的单四极杆 5977A MSD 联用。仪器条件列于表 2 和表 3。

样品制备

每种样品中的挥发性组分和芳香成分通过顶空 SPME 采集。取 5 mL 威士忌样品置于 10 mL 顶空样品瓶中。取一根 50 μm \times 2 cm DVB/CAR/PDMS 萃取纤维头置于样品顶空中, 60 $^{\circ}\text{C}$ 下加热并不断搅拌 10 min。挥发性组分被吸附到 SPME 纤维头上, 然后在 240 $^{\circ}\text{C}$ 下热解吸 1 min 进入进样口。

表 2. PAL 自动采样进样器 SPME 条件

样品体积	5 mL 威士忌置于 10 mL 样品瓶中
进样针	2 cm 纤维 50/30 μm DVB/CAR/PDMS
预保温时间	60 秒
保温温度	60 $^{\circ}\text{C}$
预保温搅拌速度	500 rpm
搅拌时间	0 s 时开始, 2 s 时结束
样品瓶中进样针插入深度	11 mm
样品瓶中纤维头探出	22 mm
吸附时间	600 秒
解吸至	分流/不分流进样口
进样深度	32 mm
进样时纤维头探出	22 mm
解吸时间	60 秒

表 3. 气相色谱和质谱仪条件

GC 运行条件

分析柱	HP INNOWAX (25 m \times 0.20 mm, 0.40 μm) (部件号 19091N-202)
进样方法	SPME (50/30 μm DVB/CAR/PDMS)
进样口温度	260 $^{\circ}\text{C}$ 恒温
进样模式	分流模式, 分流比 50: 1
柱箱温度	40 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1.5 min 以 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度从 40 $^{\circ}\text{C}$ 升至 240 $^{\circ}\text{C}$ 240 $^{\circ}\text{C}$ 保持 3 min
柱流量	1.1 mL/min, 恒流
载气	氮气
传输线温度	255 $^{\circ}\text{C}$
GC 运行时间	16 min

MS 条件

离子化模式	EI, 70 eV
离子源温度	230 $^{\circ}\text{C}$
四极杆温度	150 $^{\circ}\text{C}$
采集模式	全扫描 (50–550 amu), 常规模式
A/D 样品	4
EM 增益	1.0
阈值	150
痕量离子检测	开
调谐	etune.u 和 atune.u

数据处理和统计分析

采用 Agilent MSD Productivity 化学工作站 (F.01.00 版) 上的 AMDIS 对 GC/MS 数据进行组分提取。将 AMDIS 生成的 .ELU 文件输入 Mass Profiler Professional (MPP) 进行差异性分析。MPP 12.1 用于数据过滤和统计分析, 使用 NIST 11 MS 谱库和 Agilent MassHunter ID 浏览器进行化合物鉴定。这些软件包的设置见表 4。

结果与讨论

痕量化合物的检测, Etune 与 Atune

5977A GC/MSD 拥有一个独特的 Extractor EI 离子源及 Etune 调谐协议, 它可以提高 MSD 的检测灵敏度, 实现更低的检测限, 改善痕量化合物的鉴定。Extractor EI 离子源也可使用前几代安捷伦质谱检测器的 Atune 算法。本文中, 两种调谐模式均用于威士忌样品芳香物质中痕量化合物的检测, 以比较它们的相对效率。

表 4. 数据处理和统计分析软件设置

解卷积 (AMDIS 2.67)	
组分宽度	12
忽略质量数 m/z	0 (TIC)、207、267
相邻峰扣除	2
分辨率	中
灵敏度	低
峰形	中
组分创建 (Mass Profiler Professional 12.1)	
化合物质量得分	> 20
最小丰度	> 1000
离子	> 3
RT 公差	< 0.10
匹配因子	> 0.3
归一化类型	无
化合物鉴定 (NIST MS 谱库和 Agilent MassHunter ID 浏览器)	
MS 谱库	NIST 11
匹配因子	> 50, 最佳匹配

采用 Etune 和 Atune 调谐模式分析样品，通过 4 次重复进样，得到一个包括了 142 个组分的列表。通过比较相对强度发现，142 种组分中有 48 种在两种调谐模式间的倍率变化大于 2，在概率 $p < 5\%$ 时通过 t 检验，见图 1 中火山图的红色部分。与 Atune 相比，采用 Etune 模式时所有 48 个组分都表现出更高的强度。实际上，在相同的 AMDIS 参数下（图 2），采用 Etune 检测到的四个组分在 Atune 模式下却未检出。

威士忌中芳香化合物的轮廓分析

为全面表征五种威士忌样品中芳香物质的化合物组成，所有五个威士忌样品的 GC/MS 分析均重复进行三次。然后使用降噪 75% 的变异系数 (CV) 过滤器过滤检测到的组分，结果显示五个威士忌样品中有 74 个相同组分。然后将这些组分分为两组（图 3），即相对峰强度 < 1000000 （中低等丰度）的组分，以及相对峰强度 ≥ 1000000 （高丰度）的组分。

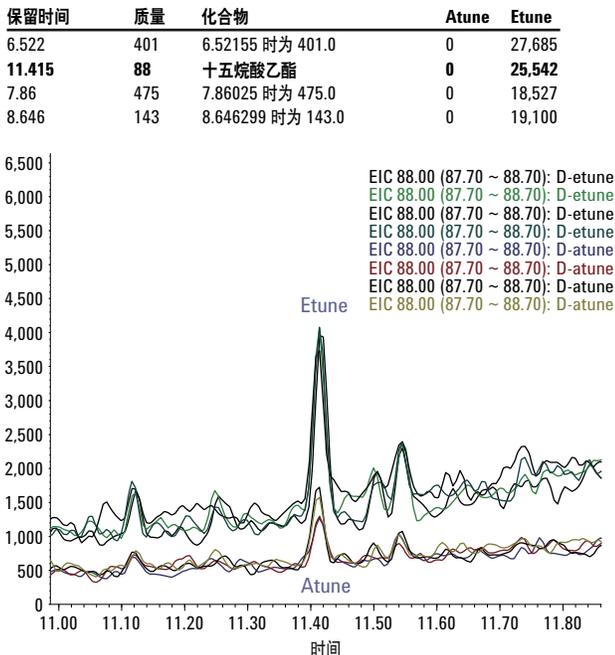


图 2. 样品 D 进行 4 次重复分析，采用 Etune 模式可检测到的 4 种化合物（上图），但在相同的 AMDIS 积分阈值下采用 Atune 模式未检出此 4 种化合物。下图为四次重复测定的得到的 88u 离子（十五烷酸乙酯）的提取离子谱图 (EIC)，同时采用了 Etune 模式和 Atune 模式

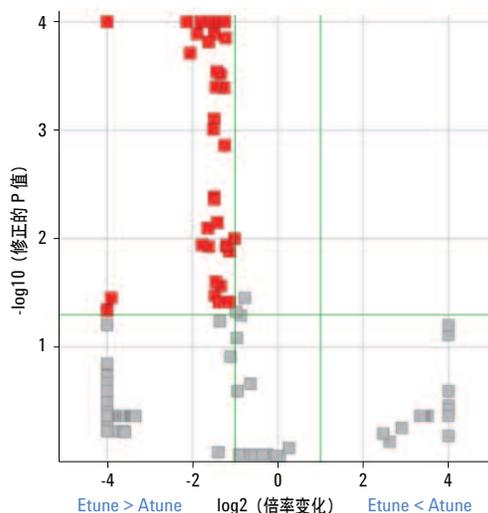


图 1. 样品 D 中检测到的化合物在 tune 与 Etune 模式下倍率变化比较的火山图。绿线为倍率变化 (≥ 2) 的截止值和概率 p 值 ($< 5\%$)，满足条件的组分用红色显示。要注意的是，所有满足这些条件的化合物在 Etune 调谐下的强度比 Atune 调谐下大至少两倍

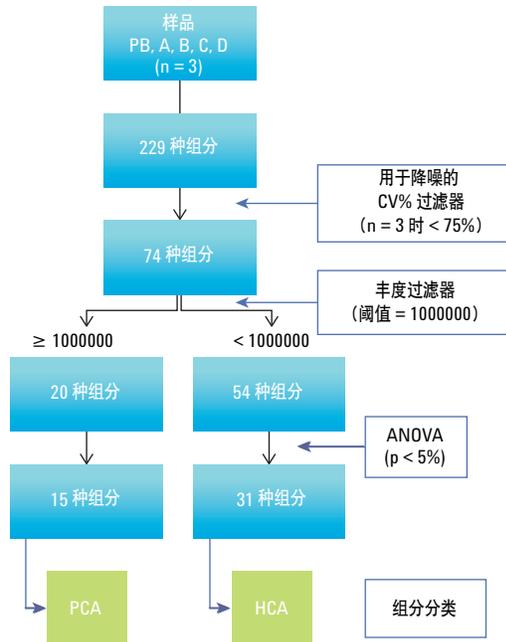


图 3. 威士忌样品化学计量学差异分析的工作流程，最终均以主成分分析 (PCA) 或层序聚类分析 (HCA) 对相关化合物进行分类

高丰度组分

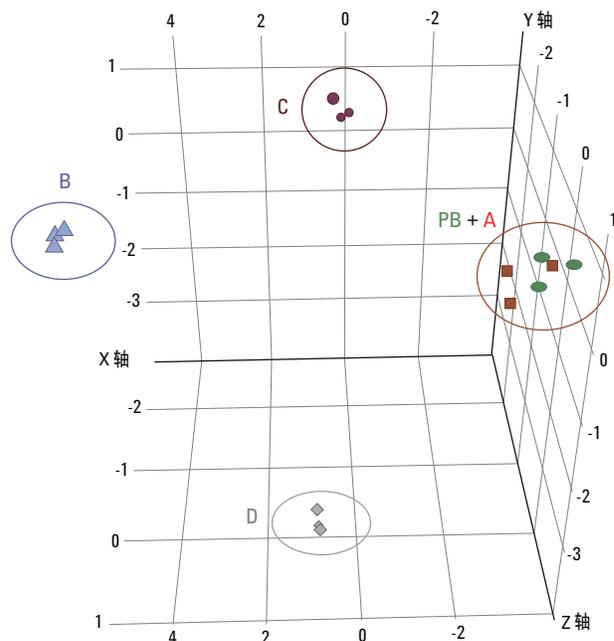
使用 Mass Profiler Professional (MPP) 鉴定出 20 种峰强度 ≥ 1000000 的化合物。为了对调谐的差异进行比较，我们仍然使用了 Atune 和 Etune 两种模式。采用单因素方差分析 (ANOVA) 过

滤这些组分， $p < 5\%$ ，发现 15 种化合物有统计学意义 (图 4)。对这 15 种化合物进行主成分分析 (PCA)，可以将它们分为四组可区分的样品，即 PB+A、B、C 和 D (图 5)。

Retention Time	Mass	Compound	[PB]	[A]	[B]	[C]	[D]
2.590	61.0	Trimethylsilylmethanol	3759228	4107974	3257738	6529116	8362442
4.515	74.0	2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol	3863118	3302027	1622565	2550368	1281017
4.772	70.0	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	3286931	3442918	1255734	584678	384032
5.724	88.0	Hexanoic acid, ethyl ester	855511	840595	2161864	991785	1130796
7.246	88.0	Octanoic acid, ethyl ester	6435439	7319735	35215980	7083341	16339178
7.590	96.0	3-Furaldehyde	3406372	3151482	1785684	1587822	3265564
7.937	88.0	Nonanoic acid, ethyl ester	619252	708628	1281332	674696	716060
8.593	88.0	Decanoic acid, ethyl ester	9160368	10945965	91484704	15420839	43557596
8.721	70.0	Octanoic acid, 3-methylbutyl ester	99822	132939	1301459	366510	160848
8.767	110.0	Ethyl trans-4-decenoate	528019	555572	1170285	717243	240995
9.803	88.0	Dodecanoic acid, ethyl ester	1428005	1770075	31862326	3835626	14279053
9.912	70.0	(-)-1-Methylbutyl decanoate	35299	45598	1048773	303444	187453
10.348	91.0	Phenylethyl Alcohol	1451716	1323375	2749470	2825832	1035489
10.901	88.0	Tetradecanoic acid, ethyl ester	183026	188006	3107707	483733	1213085
11.906	88.0	Hexadecanoic acid, ethyl ester	343726	300003	2559052	741498	1686823

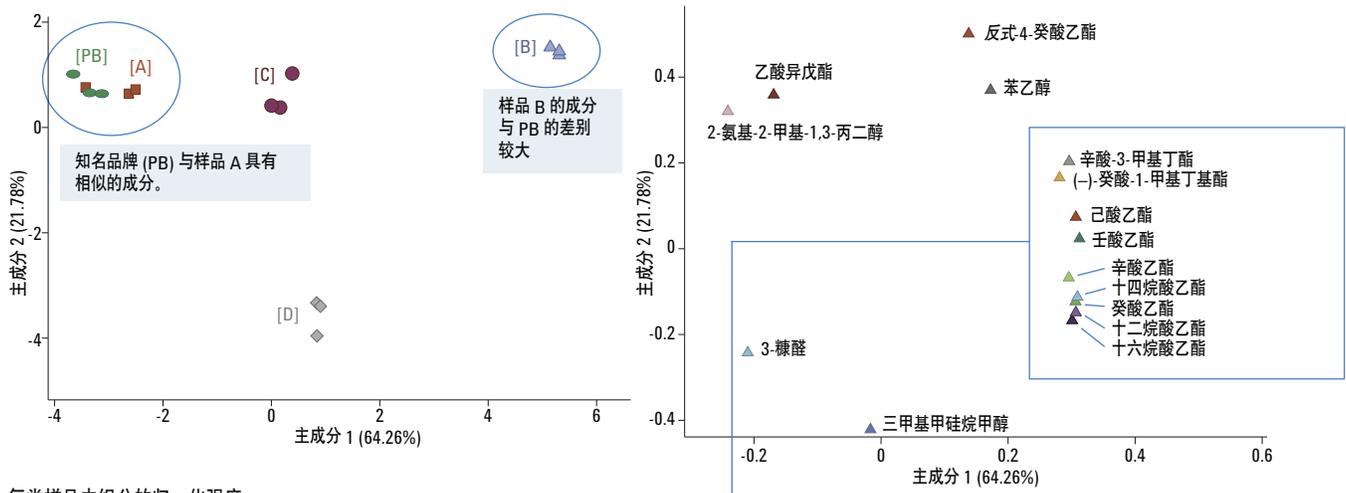
图 4. 采用 MPP 鉴定的 15 种高丰度化合物，同时在 $p < 5\%$ 下，经过 ANOVA 筛选，以确保其具有统计学意义

在主成分 1 中，样品 B 在 PCA 得分图中有一个很高的正得分，而样品 A 和 PB 为负得分 (图 5)。根据主成分 1 和 2 的载荷，这些组分分布在 PCA 载荷图中 (图 6)。在 PCA 载荷图中，专属于样品 B 的组分位于主成分 1 的正载荷位置。通过比较 PCA 得分图 (图 6A) 和载荷图 (图 6B)，我们可以鉴定出能够区分不同威士忌样品的独特组分。图 6 中的表格展示了样品 B 中的独特组分，这些是使样品 B 在主成分 1 中具有很高得分的组分，即 PCA 载荷图中的 x 轴 (图 5)。另外，每组成分的相对峰强度也表征了该组样品的特性 (图 6)。



主成分	负 (-)	中性 (接近 0)	正 (+)
1 (64%) X 轴	A, PB	C, D	B
2 (22%) Y 轴	D	-	A, B, C, PB
3 (11%) Z 轴	C	-	A, B, D, PB

图 5. 通过 PCA 分析将高丰度组中 15 种相关化合物分为可以显著区分的四个样品组别，除了 A 和 PB 外，可以区分其他所有的样品。



每类样品中组分的归一化强度

保留时间	质量数	化合物	[A]	[B]	[C]	[D]	[PB]
8.593	88	癸酸乙酯	10,945,965	91,484,704	15,420,839	43,557,596	9,160,368
7.246	88	辛酸乙酯	7,319,735	35,215,980	7,083,341	16,339,178	6,435,439
9.803	88	十二烷酸乙酯	1,770,075	31,862,326	3,835,627	14,279,053	1,428,005
10.901	88	十四烷酸乙酯	188,006	3,107,707	483,733	1,213,085	183,026
11.906	88	十六烷酸乙酯	300,003	2,559,052	741,498	1,686,823	343,726
5.724	88	己酸乙酯	840,595	2,161,864	991,785	1,130,796	855,511
8.721	70	辛酸-3-甲基丁酯	132,939	1,301,459	366,510	160,848	99,822
7.937	88	壬酸乙酯	708,628	1,281,332	674,696	716,060	619,252
9.912	70	(-)-癸酸-1-甲基丁基酯	45,598	1,048,773	303,444	187,453	35,299

图 6. PCA 得分表明了四类样品的分组情况 (上部得分图), 并且每个分组中各成分的相对归一化强度也表征了本组别的特性 (下表)。PCA 载荷图中一些成分因为具有相似的成分而互相重叠。红色: 非常高的强度; 橙色: 高强度; 黄色: 中等强度; 绿色: 低强度

中低等丰度组分

采用 Etune 检测出 54 种峰强度 < 1000000 的组分，并采用 Mass Profiler Professional (MPP) 进行了鉴定。采用 ANOVA 在 $p < 5\%$ 时筛选这些组分，发现有 31 种化合物具有统计学意义。对这

31 种化合物进行层序聚类分析 (HCA)，又可以将样品分为四组，即 PB+A、B、C 和 D (图 7)。然后，根据归一化强度分布的相似性，采用 HCA 将这 31 种化合物再分为 8 类，详见图 8。

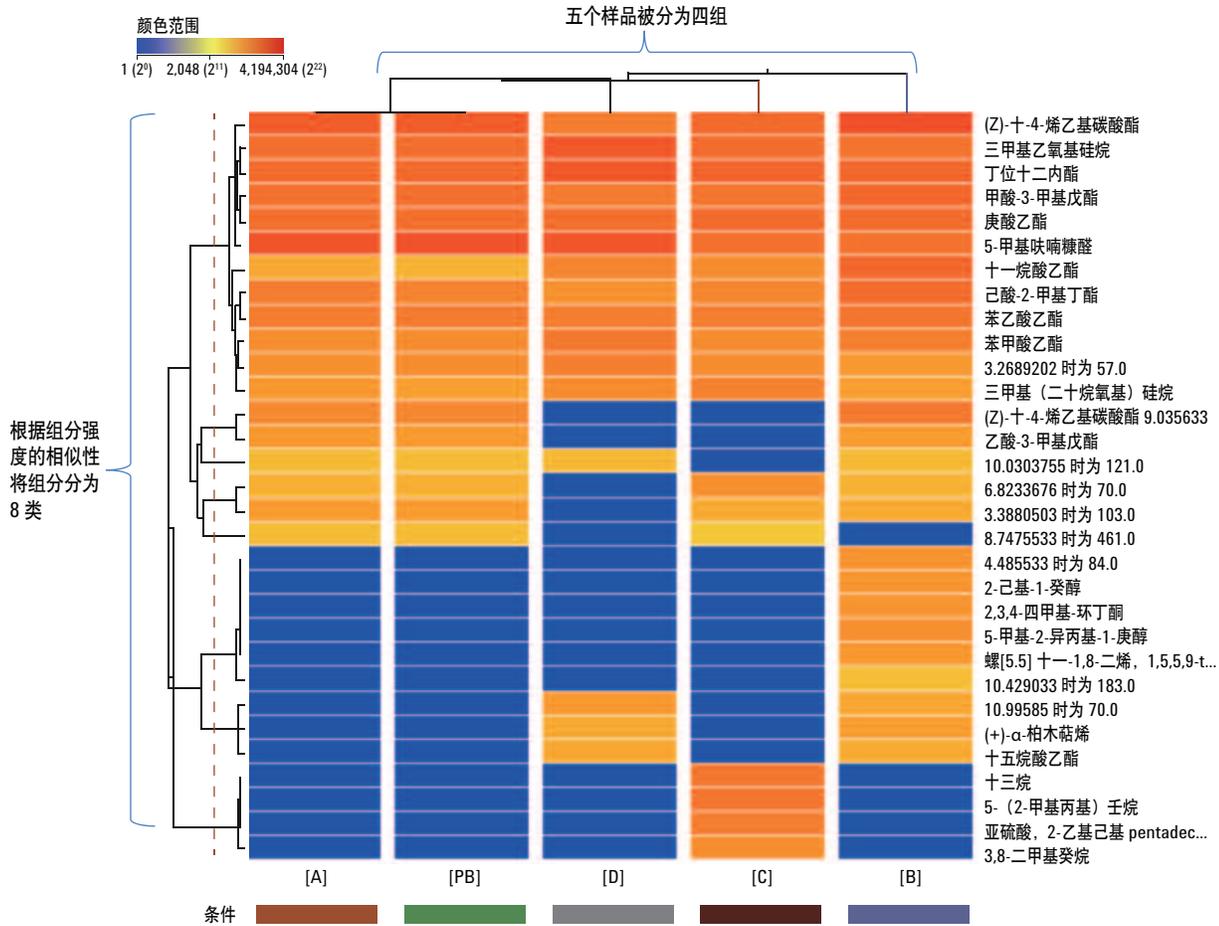


图 7. 采用那些归一化强度 < 1000000 的组分和 HCA 对样品和组分进行分类。根据组分的相似性，将样品被分为四组，组分为 8 类

在所有五个样品中均含有的 12 种组分 (0 类) 中, 有一个未鉴定, 另有两个为系统空白。剩余的 9 种组分根据其强度被分为三组可区分的样品: PB+A、C+D 和 B (图 9)。归一化强度的范围为 14000 – 500000。

样品 B 和 D 均包含类 6 中的三个组分 (图 10)。其中一个为十五烷酸乙酯, 它在先前的 Atune 和 Etune 调谐模式的比较中在样品 D 中已被鉴定出。该化合物仅在 Etune 模式下才能检测到。

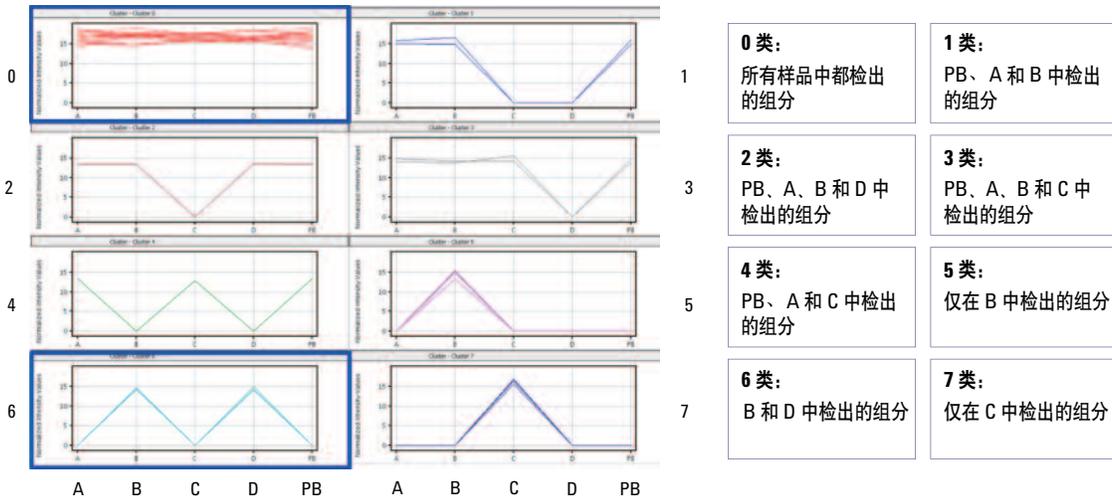


图 8. 中低等丰度的组分被分为 8 类, 在每类 (y 轴) 中将组分的强度对每个样品组 (x 轴) 作图

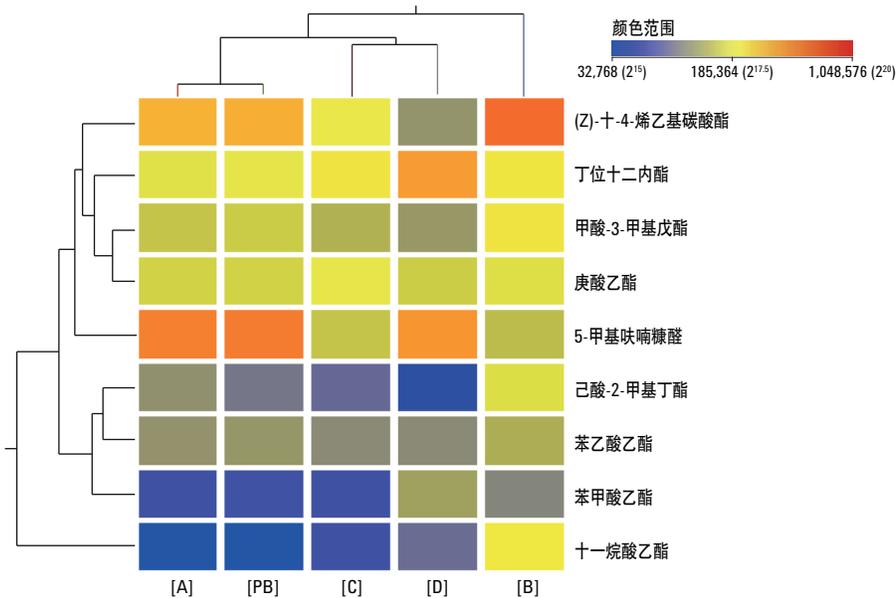
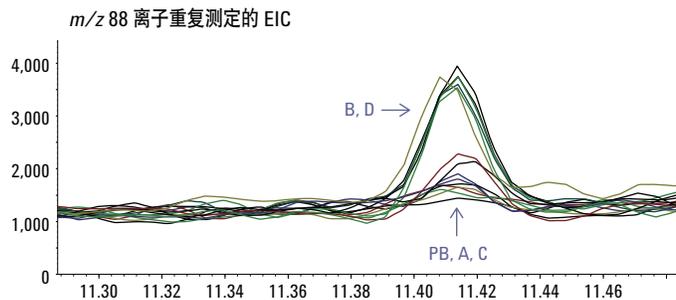


图 9. 对已鉴定出存在于所有五个样品中的 9 种化合物进行 HCA 分析, 发现按照 0 类化合物强度模式可将样品分为三组: PB+A、C+D 和 B



类别 6 中的组分

保留时间	质量数	化合物	[A]	[B]	[C]	[D]	[PB]
8.383	119	(+)- α -柏木萜烯	0	20,890	0	33,060	0
10.996	70	10.99585 时为 m/z 70.0	0	28,591	0	17,961	0
11.415	88	十五烷酸乙酯	0	18,581	0	21,067	0

图 10. 类别 6 中各组分的鉴定和归一化强度，以及对 5 种样品重复进样得到的 m/z 88u（十五烷酸乙酯）的提取离子谱图 (EIC)，均表明它仅存在于样品 B 和 D 中

结论

本方法运用化学计量学成功进行了分析，可以将五种威士忌样品分为四组，并且可以进一步用来应对突发污染物 [3]，优化产品贮存条件，和测定样品随时间的降解情况。

参考文献

1. S. Baumann and S. Aronova, "Olive Oil Characterization using Agilent GC/Q-TOF MS and Mass Profiler Professional Software" (使用安捷伦 GC/Q-TOF MS 和 Mass Profiler Professional 软件表征橄榄油), 安捷伦科技应用简报 5991-0106CHCN。
2. L. Vaclavik, , O. Lacina, J. Hajslova, J. Zweigenbaum, "The use of high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry coupled to advanced data mining and chemometric tools for discrimination and classification of red wines according to their variety.", *Anal Chim Acta*. 685, 45-51 (2011).
3. T. Serino, "Detecting Contamination in Shochu Using the Agilent GC/MSD, Mass Profiler Professional, and Sample Class Prediction Models" (使用安捷伦 GC/MSD、Mass Profiler Professional 软件和样品分类预测模型检测烧酒中的污染物), 安捷伦科技应用简报 5991-0975EN。

更多信息

这些数据代表了典型的结果。如需了解更多有关我们产品和服务的信息, 请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本材料可能存在的错误，或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明及技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
中国印刷
2013年6月14日
5991-2547CHCN



Agilent Technologies