



# 葡萄酒真伪测定：采用 UHPLC ESI/Q-TOF MS 进行代谢组学分析

## 应用简报

### 作者

Shen Han, Jinhua Wang, Ying Liu,  
Qi Zhou  
北京出入境检验检疫局  
中国北京

Meiling Lu, Shan Zhou  
安捷伦科技（中国）有限公司  
中国北京

### 摘要

本文展示了联用 Agilent 1290 Infinity LC 系统和 Agilent 6530 Q-TOF LC/MS，以及多元统计分析进行葡萄酒代谢谱分析的优势。该方法可以对法国和中国等不同地区的葡萄酒进行区分，并有望实现葡萄酒生物标记物的鉴定。

### 前言

葡萄酒的化学成分可因很多种因素出现差异。这主要是由葡萄的品种、其生长环境（如气候和土壤），以及酿酒师种植葡萄的方式不同造成的。另外，酵母菌株、发酵和老化过程也会影响葡萄酒的味道和质量。当前葡萄酒代谢谱分析中，色谱联用精确质量和高分辨质谱是公认的十分有效的方法。它通常用于分析葡萄酒的化学多样性 [1-3]，有利于发现葡萄酒的生物标记物。本文对上述方法提高葡萄酒质量控制和真伪辨别的潜力进行了更深入的分析。本研究联用超高效液相色谱 (UHPLC) 和电喷雾离子化四极杆飞行时间 (ESI-Q-TOF) 质谱，以及多元统计分析，实现了葡萄酒的分析。本研究的目标是发现能用来辨别来自中国 and 法国不同地区葡萄酒的特有特征。



**Agilent Technologies**

## 实验部分

### 样品前处理

葡萄酒样品首先采用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜进行过滤，随后采用 UHPLC 梯度洗脱，并采用扫描模式下的电喷雾 Q-TOF 质谱进行检测。然后从 MassHunter 定性分析软件所采集的数据中提取出化合物的数据，提取以无偏向或非目标方式进行，采用分子特征提取 (MFE) 算法。提取出的化合物数据以化合物交换文件 (.cef) 的格式导出，并导入 Mass Profiler Professional (MPP) V.12.5 软件中。该软件是一款用于数据整理、过滤、统计和聚类分析的化学计量学软件。MPP 分析过程中，空白溶剂的特征被排除在外。首先，通过去除那些在所有样品中出现频率低于 25% 的特征来过滤数据。进一步过滤掉那些至少在一个组的所有文件中出现频率低于 60% 且变异系数 (CV) 大于 50% 的化合物。对剩余的化合物进行方差分析 (ANOVA)，在葡萄酒组间进行差异显著性检验，并采用主成分分析 (PCA) 直观显示。然后对得到的特征标记物进行目标 MS/MS 分析，完成进一步鉴定。

从法国和中国贸易的出入境检验葡萄酒中，收集了大约 200 个葡萄酒样品。其中来自法国四个不同主要酒庄的样品都不少于 6 个，这些样品的年份从 1985 年至今都有，跨度很大。中国葡萄酒样品共 3 种品牌，每个品牌包括 30 个样品。所有中国葡萄酒直接来自厂商。其他不同年份的未知样品声称是来自四个法国酒庄之一，但需要进一步确证。

## 仪器

### 仪器条件

#### 液相色谱条件

仪器	内置脱气机的 Agilent 1290 Infinity 二元泵，带温控的 1290 Infinity 自动进样器，以及 1290 Infinity 柱温箱
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 $\times$ 100 mm, 1.8 $\mu\text{m}$
柱温	30 $^{\circ}\text{C}$
流动相	溶剂 A) 0.1% FA/5 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 水溶液 溶剂 B) 0.1% FA/5 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 甲醇/水 (95:5) 溶液
流速	0.4 mL/min
进样量	2 $\mu\text{L}$
后运行时间	3 min
梯度洗脱程序	0–1 min, B% 保持在 1% 1–8 min, B% 从 1% 升至 15% 8–15 min, B% 从 15% 升至 45% 15–17 min, B% 从 45% 升至 90% 17–20 min, B% 保持在 90%

#### ESI-Q-TOF MS 条件

仪器	配备安捷伦双喷射流技术的 Agilent 6530 精确质量 Q-TOF LC/MS 系统
干燥气温度	325 $^{\circ}\text{C}$
干燥气流速	11 L/min
雾化气压力	45 psi
鞘气温度	350 $^{\circ}\text{C}$
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	3500 V (+)/3000 V (-)
喷嘴电压	500 V (+)/1000 V (-)
碎裂电压	130 V
截取锥电压	65 V
$m/z$ 扫描范围	MS 为 100–1100 MS/MS 为 50–1000
采集速率	MS 2 张谱图/s MS/MS 3 张谱图/s
参比离子	121.0509 和 922.0098 (+) 112.9856 和 1,033.9831 (-)

## 结果与讨论

### 数据重现性

采用 UHPLC 反相梯度洗脱，葡萄酒中的许多化合物都可以从 LC 柱中被洗脱出来，然后采用 ESI-Q-TOF MS 全扫描模式进行检测。它们可以根据保留时间、精确  $m/z$ ，或两者兼用实现彼此分离。同一样品两次不同进样分析的重叠色谱图（图 1）表明，保留时间的重复性在 0.5% (RSD) 以内，而采用参比离子进行在线校准，可保持质量准确度在 5 ppm 以内。

### 数据提取

针对四组法国葡萄酒的采集数据使用了分子特征提取算法。所有离子种类通过相应的共流出曲线进行关联。将每个数据文件导入 MPP 软件，校准后按照保留时间和  $m/z$  将它们分类。数据校准后，在正离子和负离子模式下分别获得多达 32116 和 43236 个成分，需要进一步进行数据过滤。

### 数据过滤

按照至少在一个条件下有 60% 的出现频率，以及每组变异系数低于 50% 的样品变异性，对上述数据进行过滤。通过方差分析 (ANOVA,  $p < 0.01$ ) 和倍数变化 ( $FC > 2$ ) 对剩余成分进行进一步过滤。最后留下了能展示四组间具有显著差异的正离子模式下的 55 个成分。从原始总离子流色谱图中提取出的这些成分表明，这些成分大多数是样品中真实存在的化合物，它们的含量在组间差异显著。EIC 图如图 2 所示。结果表明，这些组分可用做标记物来区分不同来源的葡萄酒。

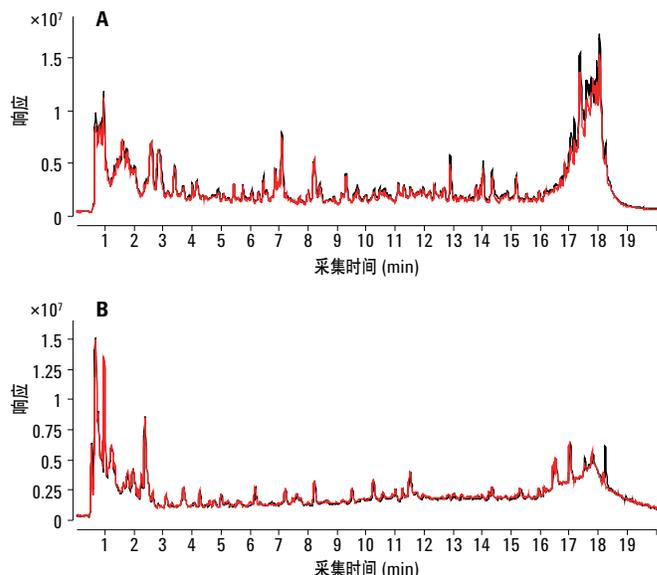


图 1. 典型的总离子流色谱图，采用正离子 ESI 和负离子 ESI 两种模式。A. 正离子 ESI。B. 负离子 ESI

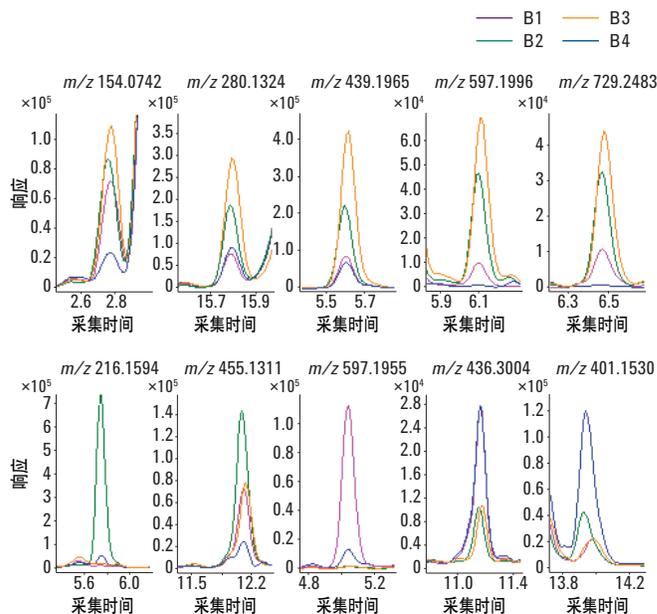


图 2. 可用于判别来自四个法国酒庄葡萄酒的标记物的 EIC 图。通过上部的 5 个标记物，可以将 B2 和 B3 与 B1 和 B4 区分开；同时使用  $m/z$  216.1594 离子，可以将 B2 与其他三类进一步区分开。B1 与 B4 在  $m/z$  597.1955 和 401.1530 处可以彼此区分开

## 主成分分析 (PCA)

上述 55 个成分的 PCA 分析表明，四个不同法国酒庄的葡萄酒可以得到良好分离（图 3）。如图所示，B2 与 B3 在成分 1 和 2 处很接近（X, Y 平面），但可以在成分 2 和 3 处（Y, Z 平面）分开。这表明 B2 和 B3 相对于其他组来说相对更类似。这与图 2 的结果相一致，与其他组相比，B2 和 B3 间大多数标记物显示的差异相对较小。

## 区分法国和中国葡萄酒

为了确定提取的成分是否可以将收集的法国酒庄葡萄酒与中国产葡萄酒分开，对两种品牌的中国葡萄酒进行了相同的分析。主成分分析 (PCA) 图表明中国葡萄酒与法国葡萄酒明显不同（图 4）。未知来源的某批葡萄酒（粉红色）与中国葡萄酒更相似，虽然它们以本文涉及的某个法国酒庄葡萄酒的名义在销售。

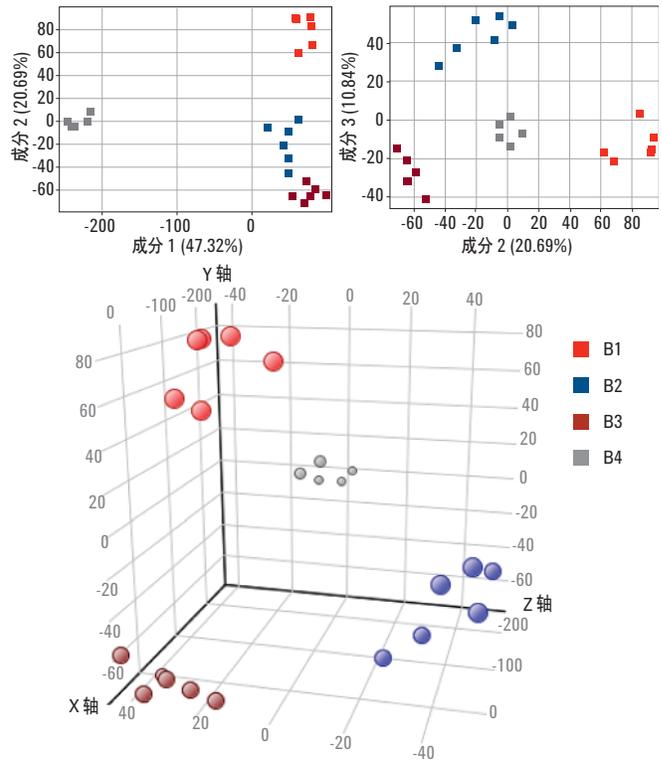


图 3. 四个法国酒庄葡萄酒的 2D 和 3D 主成分分析 (PCA) 图表明，根据 ANOVA ( $P < 0.01$ ) 和倍数变化 ( $FC > 2$ ) 筛选的 55 个成分，可以明确区分这四组葡萄酒

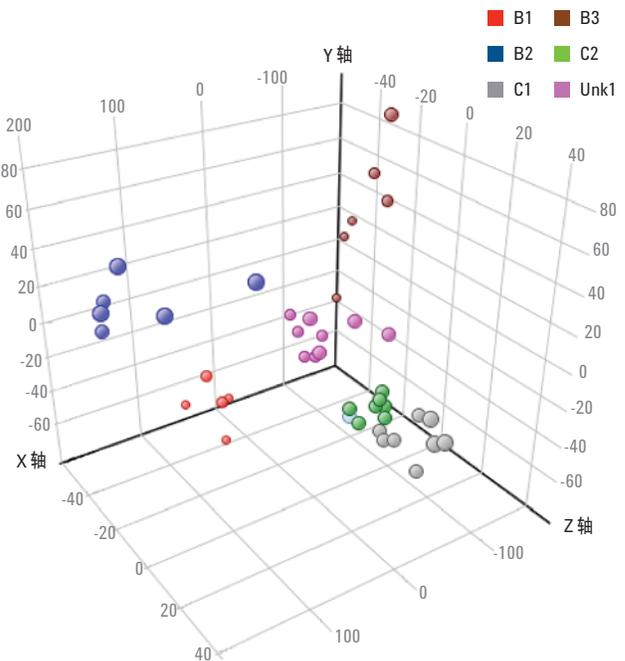


图 4. 根据对四种法国葡萄酒进行 MPP 分析后所提取的 55 个成分，法国葡萄酒 (B1-B3)、中国葡萄酒 (C1, C2) 和一种来源不明的葡萄酒样品 (Unk1) 的 PCA 分析

## 模型创建和预测

为了提高方法鉴定未知来源葡萄酒的能力，利用法国葡萄酒的提取成分建立了一个基于偏最小二乘法判别分析 (PLSDA) 的模型。如图 5 所示，来自四个酒庄的葡萄酒彼此充分分开。表 1 的混淆矩阵说明预测准确度达到 100%。在本研究中，平均预测置信度约为 78%，表明我们需要更多样品来建立更完善的模型。

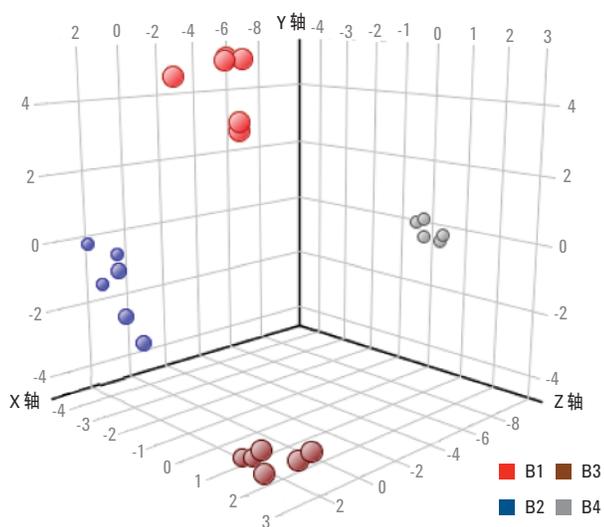


图 5. 根据 MPP 分析后所提取的 55 个成分建立的预测 PLSDA 模型

表 1. 从 PLSDA 模型得到的葡萄酒预测准确度，表明该方法具有极高的预测能力，平均预测置信度约为 78%

	B1	B2	B3	B4	准确度
(正) B1	6	0	0	0	100.00
(正) B2	0	6	0	0	100.00
(正) B3	0	0	6	0	100.00
(正) B4	0	0	0	5	100.00
总体准确度					100.00

## 标记物鉴定

对所得到的重要成分进行目标 MS/MS 分析。将获得的 MS/MS 谱图导入 MassHunter 分子结构关联计算软件，根据与 ChemSpider 数据库中所匹配化合物的 MS/MS 碎片，对候选化合物进行初步鉴定。如图 6 所示，检索到一个标记物的两个具有高匹配得分 (> 90) 的可能结构。

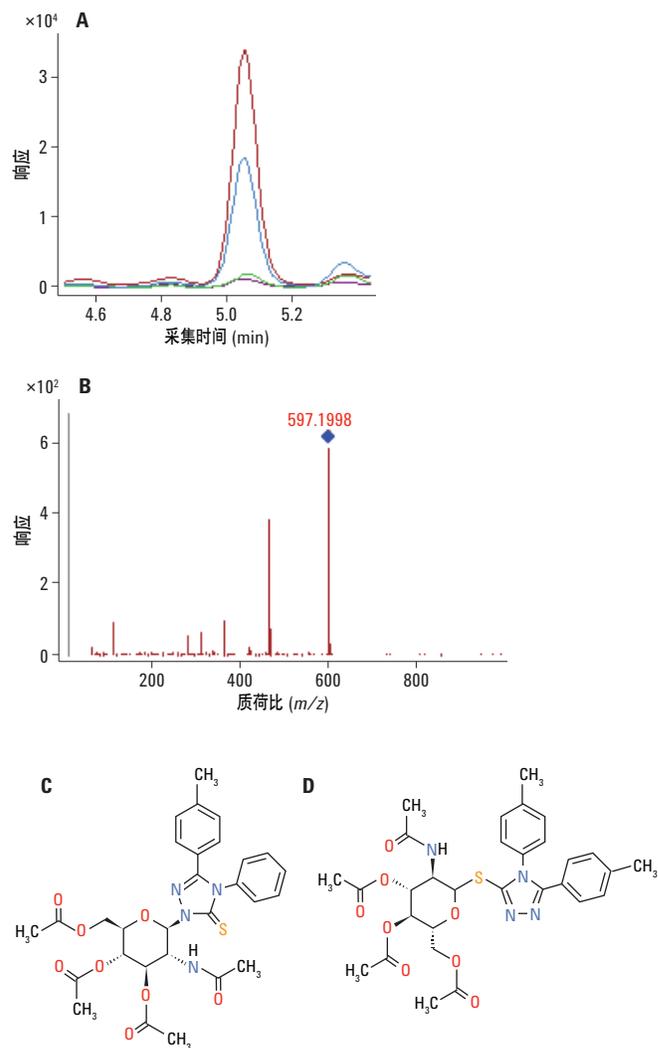


图 6. 一个典型标记物 ( $m/z$  597.1955,  $t_R$  5.045 min) 的初步鉴定。A) 一个标记物 ( $m/z$  597.1955,  $t_R$  5.045 min) 的 EIC 图。B) 标记物的目标 MS/MS 分析；C, D) 分子结构关联计算暗示有两个可能的结构，匹配得分 > 90

## 结论

本研究表明精确质量 Q-TOF LC/MS 是一种可实现不同来源葡萄酒代谢谱分析的强大技术。数据挖掘技术（如分子特征提取）和化学计量学软件（如 MPP）联用，可帮助我们快速有效地对齐和过滤数据。我们得到了来自四个主要法国酒庄葡萄酒的重要标记物。这些标记物可用于判别这四组葡萄酒，并且区分两种中国葡萄酒。未知来源葡萄酒的判别结果也与其他技术测定的结果一致。本文建立了一个 PLSDA 模型，它具有极高的准确度和合理的置信度。如果有更多的参比样品用于模型创建，我们使用所建立的模型进行样品预测的置信度可能会进一步提高。使用目标 MS/MS 实现标记物初步鉴定后，采用分子结构关联计算可生成一些潜在候选物，目前正在对其进行进一步研究。

## 参考文献

1. L. Vaclavik, O. Lacina, J. Hajslova, J. Zeigenbaum  
*Anal. Chim. Acta.* 2011, **685**, 45
2. A. Cuadros-Inostroza, P. Giavalisco, J. Hummel, *et al.*  
*Anal. Chem.*, 2010, **82**, 3573–3580
3. F. Mandel, ASMS2011 Poster WP-222

## 更多信息

这些数据代表典型的结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的网站：[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

安捷伦对本资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、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2014  
2014 年 3 月 20 日，中国印刷  
5991-3335CHCN



**Agilent Technologies**