

Orbitrap Exploris GC结合Compound Discoverer软件分析酒中的风味物质及其差异性标记物

赵紫珺

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词

SPME Arrow; Orbitrap GC; Compound Discoverer; 酒; 风味

1. 引言

酒中风味物质的种类和含量十分丰富，主要包括醇类、醛类、酸类、酯类、芳香族化合物等多种类型化合物，这些物质是决定酒类香气、口感和风格的关键。气相色谱质谱联用仪由于其分离效果好、分析速度快且尤其适用于低沸点、挥发性物质分析等优点，已经成为酒类风味物质研究的主要手段。传统GC-MS对于风味物质的定性分析主要采用“色谱优先”的方法，通过积分算法进行色谱峰的检测，然后将色谱峰与谱库进行比对和匹配，以匹配度高低确认化合物。这种方法的缺点之一就是无法鉴定共流出物，尤其是在低浓度的情况下。赛默飞GC-MS自带的解卷积软件在进行定性分析时采用“质谱优先”的方法，能够有效分离色谱上共流出但质谱顶点依然分离的化合物。随着高分辨质谱技术的发展和运用，酒类风味物质的研究又多了一种新的手段和方案，高分辨质谱的高灵敏度和超高的分辨率可帮助我们发现其他分析手段可能忽视的特征物质。赛默飞全新Orbitrap Exploris GC系列高分辨气质联用仪具有业界最高的240,000分辨率（ $m/z=200$ ），并提供fg级全扫描HRAM数据，低于1ppm的质量精度，可以满足复杂基质样品的分析需求，是酒类风味成分定性定量分析的强有力工具。

通过研究酒中特征性风味化合物的差异可有效鉴别酒的类别，更好的分析不同类型酒的差异性。功能强大的组学分析软件Compound Discoverer可以实现对复杂的GC-MS数据的提取和分析，并通过统计学分析功能，快速找到样品组之间的差异性标记物，逐一研究各个组分的分布趋势，为研究酒类风味物质分析提供了有力的工具。

本文采用Thermo Scientific™ Orbitrap Exploris GC 240超高分辨静电场轨道阱气质联用仪，结合SPME Arrow自动固相微萃取技术分

析不同酒类中的风味物质及其差异性标记物，采用Compound Discoverer软件进行解卷积和统计学分析。

2. 实验条件

2.1 样品：

本地购买8种不同类型的市售酒类样品（酱香型白酒A，酱香型白酒B，清香型白酒A，清香型白酒B，保健酒，威士忌，白兰地，朗姆酒），分别各取1ml酒样，4ml去离子水及2.0g氯化钠于20mL顶空瓶中，每个样品准备平行样品3个。

2.2 仪器耗材：

使用Thermo Scientific™ Orbitrap Exploris GC 240质谱仪，配备Thermo Scientific™ TriPlus RSH自动进样器及Thermo Scientific™ TRACE 1310 气相色谱仪进样分析。采用Thermo Scientific™ TraceGOLD TG-WaxMS（30m*0.25mm*0.25μm，P/N 26088-1420）毛细管色谱柱实现色谱分离。

2.2.1 SPME Arrow参数

萃取头1.1mm/110 μm DVB/Carbon WR/PDMS SPME Arrow萃取头（P/N 36SA11T3）

孵化&萃取温度：60℃ 孵化时间：5min 萃取时间：20min

解析速度：40mm/sec 解析时间：3min

老化温度：260℃ 老化时间：解析前10min，解析后3min

2.2.2 GC参数

SSL进样口：250℃，分流进样，分流比10:1；

载气：高纯氮气（99.999%），柱流速：1.0ml/min

柱温箱：35℃保持5min，5℃/min升温至150℃，20℃/min升温至240℃，保持10min

传输线温度：240℃

2.2.3 Orbitrap参数

分辨率选择：60,000 FWHM（200 m/z）

扫描范围：33-400 m/z，全扫描（Fullscan模式）

EI模式下离子源温度：280℃；电子能量：70eV

2.3 数据处理

使用Thermo Scientific™ TraceFinder 5.1进行数据采集。通过Thermo Scientific™ Compound Discoverer 3.3对数据进行非靶向定性分析。Compound Discoverer非靶向定性分析工作流程包括：原始数据自动化解卷积、保留时间对齐、谱库检索、归一化以及统

计分析（主成分分析和差异分析）。其中谱库检索可同时使用GC-Orbitrap/MS高分辨自建库和商业数据库（NIST、Wiley以及香精香料库等），并通过高分辨过滤分值（HRF Score）、谱库比对的正/反向匹配度（SI/RSI值）和保留指数（Retention Index, RI）等信息，共同确证未知化合物的定性结果。

3. 结果与讨论

3.1 Compound Discoverer 非靶向定性分析工作流程

将不同酒类的样品（酱香型A, 酱香型B, 清香型A, 清香型B, 保健酒, 威士忌, 白兰地, 朗姆酒）的GC-Orbitrap/MS分析数据导入Compound Discoverer 3.3软件，并根据酒的类别对数据进行分类，继而运行Compound Discoverer非靶向定性分析流程（图1）。流程首先根据设定阈值（如：TIC Area、S/N、Mass error等）进行峰检测；然后基于设定的离子重合度（Ion overlap window%）等参数进行自动化解卷积（Deconvolution）和样品峰对齐（RT Alignment）处理，峰对齐处理可以弥补样品间细小的保留时间差异，并对低于阈值的色谱峰进行Gap filling处理；接着，软件针对峰对齐后的化合物列表进行谱库检索，获取未知化合物的定性分析结果；最后，通过筛选工具和统计学分析（PCA、聚类、差异分析等）对数据结果进行深入的分析。

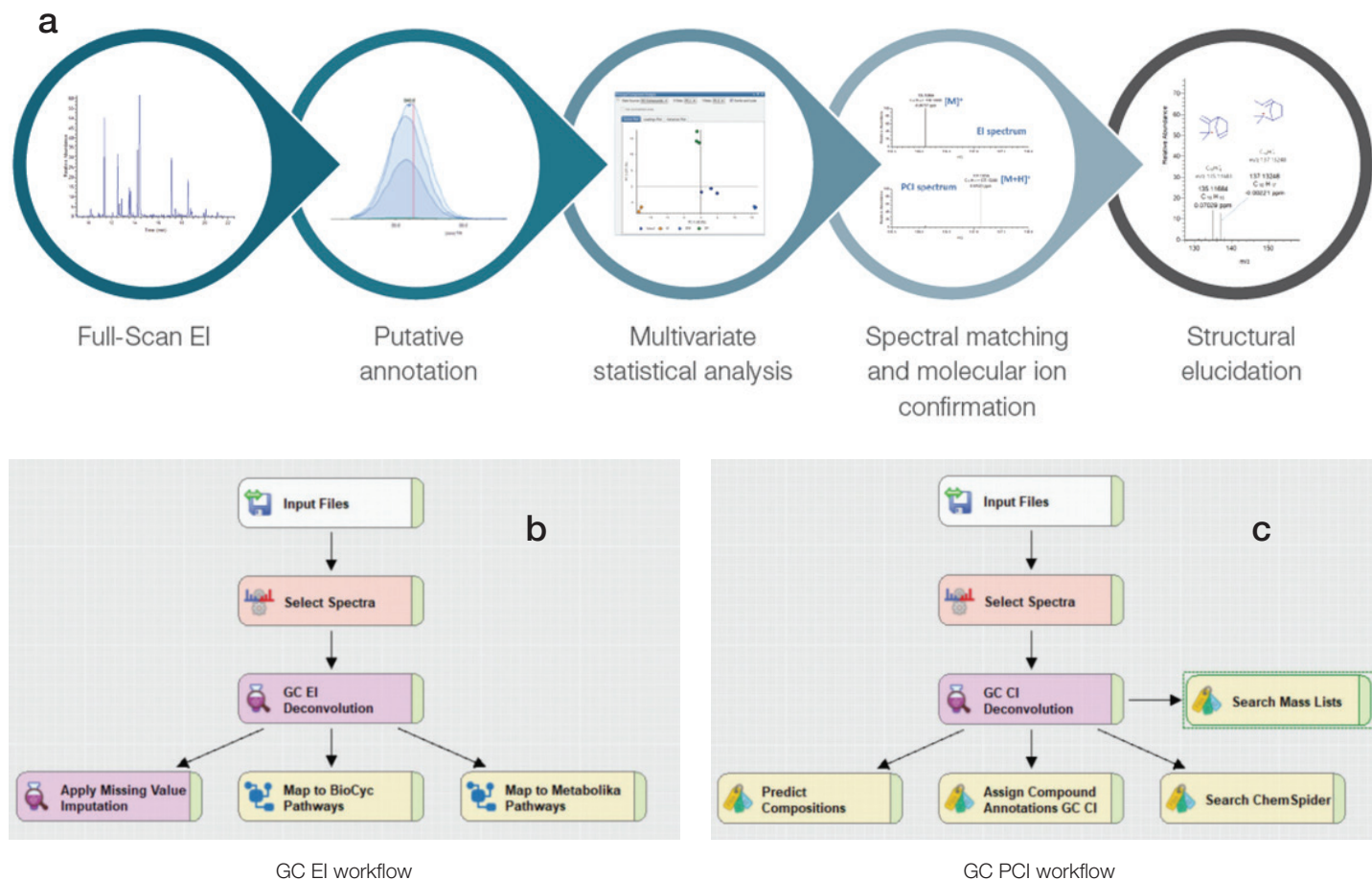


图1. Compound Discoverer 非靶向定性分析工作流程

(a.非靶向定性分析流程；b.GC EI workflow；c. GC PCI workflow)

3.2 化合物定性分析

GC-MS对未知化合物进行定性分析，通常通过将化合物实测的质谱图与标准品自建的数据库或单位质量的商业谱库（NIST,Wiley以及香精香料库等）进行比较，通过评判正向/反向匹配度（SI/RSI）进行判断。而GC-Orbitrap/MS的数据包含了精确质量数信息的质谱图，可以通过高分辨过滤分值（HRF Score）的算法进一步对化合物的定性结果进行评价。该算法充分考虑了化合物的每个碎片离子的实测质荷比与搜库结果的碎片理论值之间的质量偏差情况，并将碎片强度计算入内，HRF Score越接近100，表明该定性结果的准确度越高。此外，软件还可以通过实测保留指数（Retention Index, RI）与谱库中理论RI值进行对比，进一步通过色谱分离结果对化合物进行定性判断。

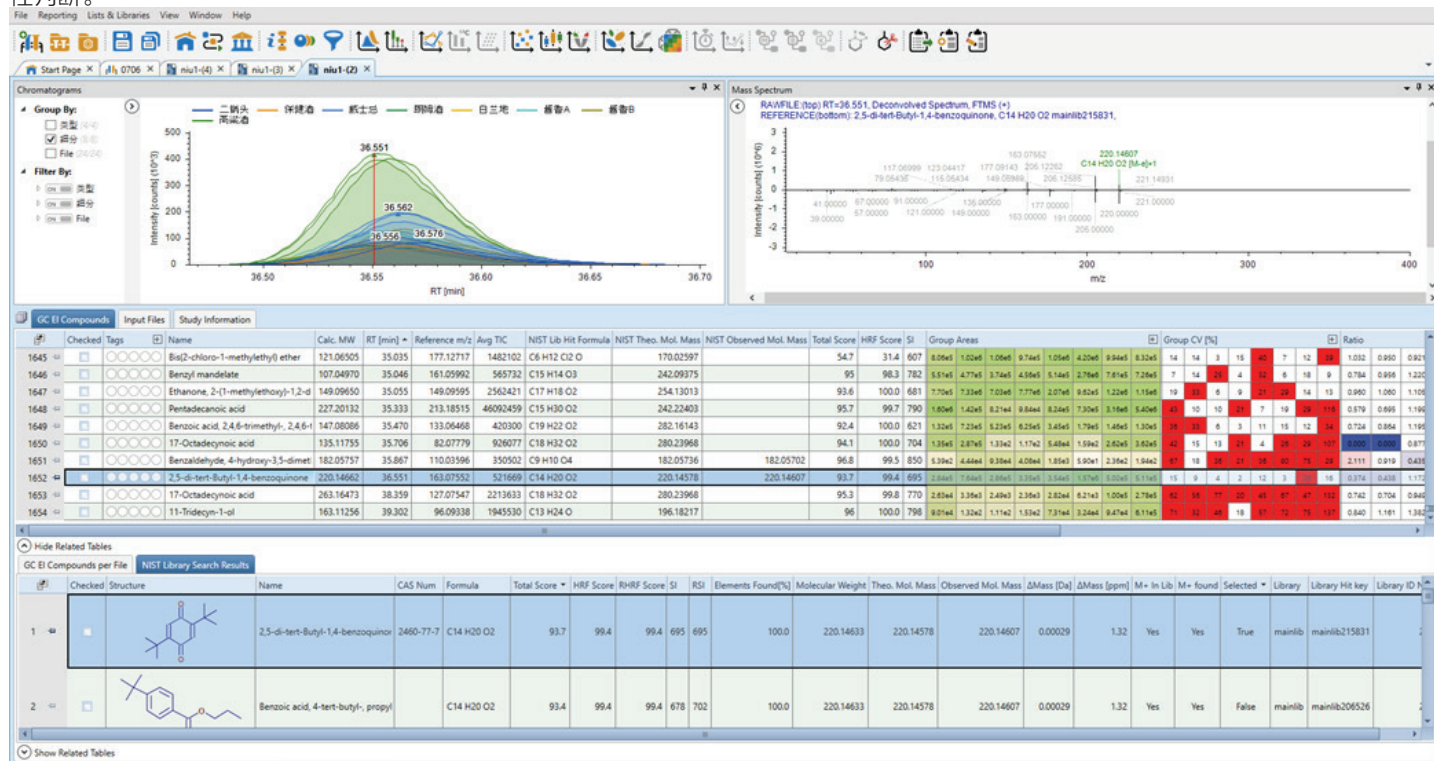


图2. Compound Discoverer 非靶向定性分析结果展示

通过Compound Discoverer对8个样品进行定性分析，共检出1654个化合物（TIC阈值1000000，SI/RSI阈值600），其中主要包含酯类，醇类，酸类，芳香胺，杂环类化合物(图2)。用户可通过软件的过滤功能，对结果进行筛选（图3.A）。此外，在软件中可对所有检出组分进行标签分类，方便后续结果查看及数据分析（图3.B）。

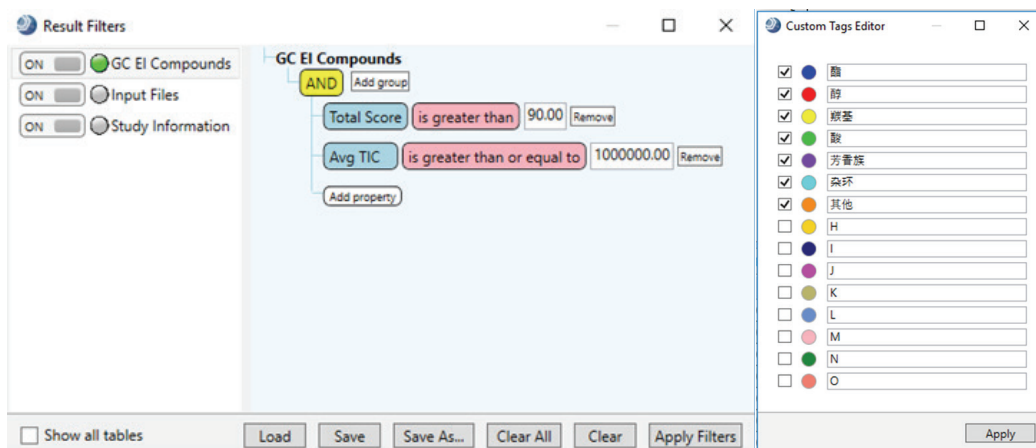


图3. Compound Discoverer 数据过滤功能（a）及峰标签分类功能（b）

3.3 应用Compound Discoverer统计学分析寻找组间差异化合物

非靶向组学分析的总体目标主要是检测和标记组间差异性标记物，可以运用同样的统计学分析方法对不同酒样进行成分分析，寻找各个酒样的化合物分布特征。通过Compound Discoverer软件对样品数据进行主成分分析（PCA）和差异分析(图4)。PCA结果显示，同一分组下的不同样品有一定差异，但不同组的样品点能够通过PCA分析有效地聚在一起，PC1、PC2两个主成分可以解释55.8%的变异性（PC1 40.7%，PC2 15.1%）。

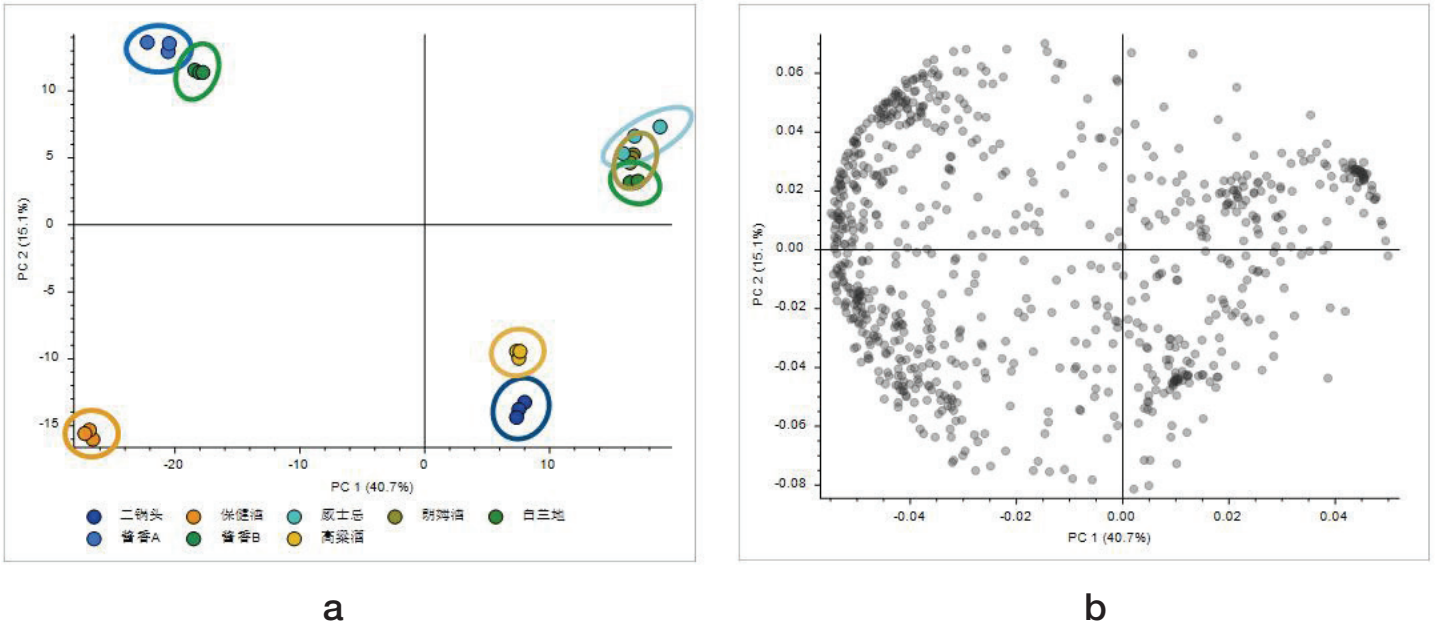


图4. 不同酒类样品的PCA分析图（a）及载荷图（b）

差异分析的结果以火山图呈现，以Log₂ Fold Change为横坐标，-Log₁₀ P-value为纵坐标，设置P-value为0.05，Log₂ Fold Change为1对8个样品进行分析。对比酱香型和清香型两种不同类型的白酒，火山图标记出共696种差异性化合物，其中上调化合物503个，下调化合物193个（图5.a）。对比同一品牌两种不同的酱香型白酒，通过火山图标记出79种重要的化合物，其中上调化合物50个，下调化合物29个（图5.b）。

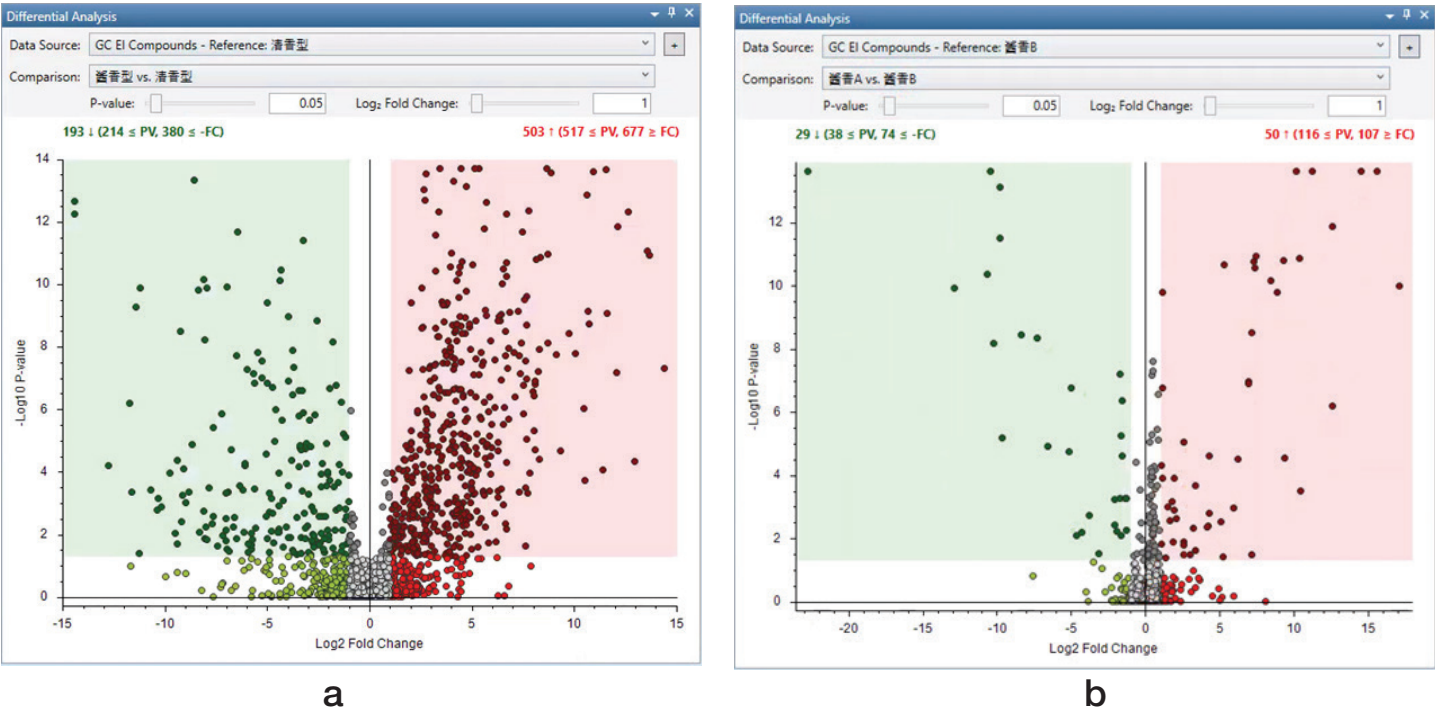


图5 基于酱香型和清香型样品数据生成的火山图

(a.为酱香型和清香型白酒对比；b.为同一品牌两种不同酱香型白酒对比)

通过火山图可以快速的对所有上调和下调化合物进行标记，并且每一个点均可直接关联对应化合物的定性结果。此外，软件可直接展示该组分的MS谱图镜像对比，基峰（Base Peak）在不同样品间谱图叠加，以及基峰峰面积在不同样品间的差异趋势图。

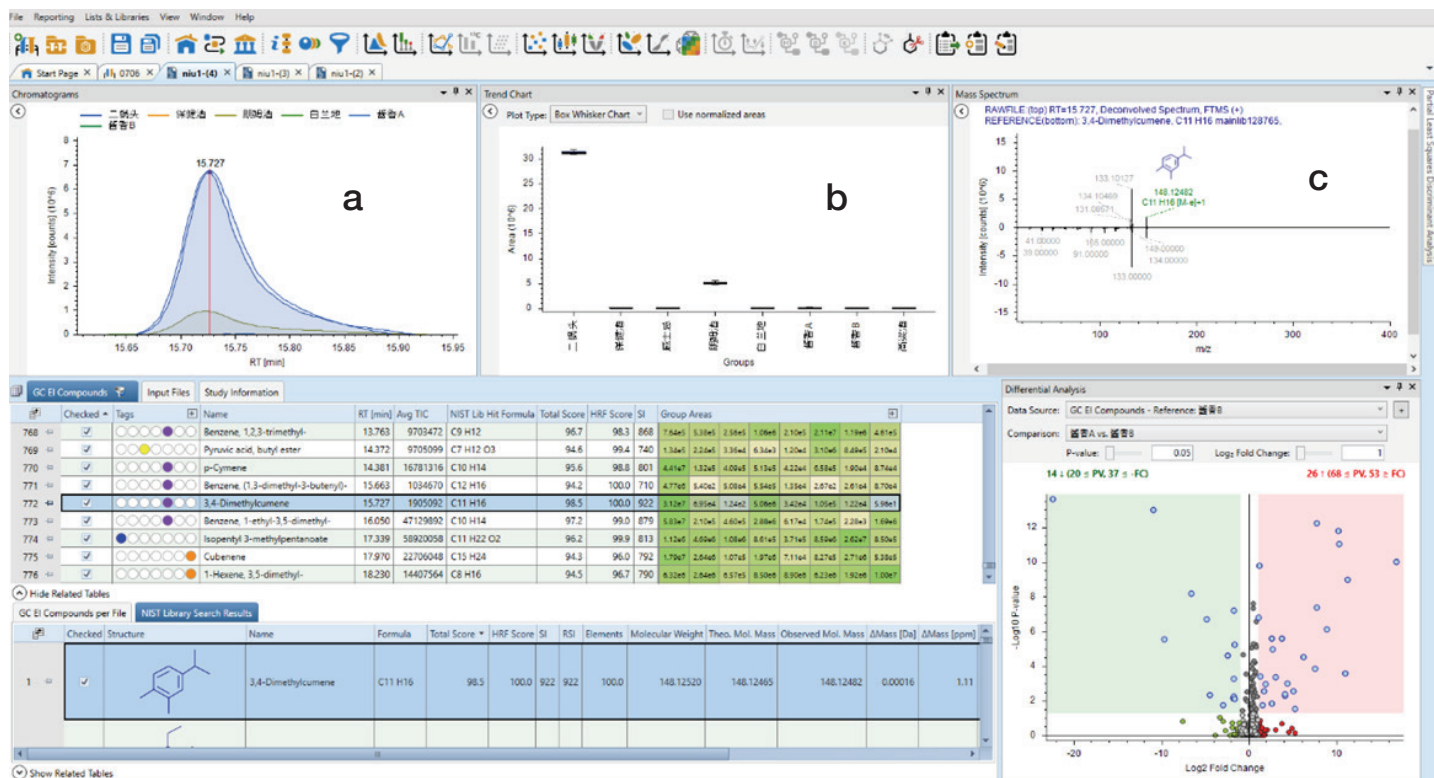


图6 差异性标记物3,4-二甲苯基丙苯结果展示

(a.基峰谱图叠加;b.基峰峰面积趋势图;c. MS谱图镜像对比)

结论

Orbitrap Exploris GC系列高分辨气质联用仪，具有数据质量精度高、分析动态范围宽、高分辨、高灵敏度的特点，可提供ppt级全扫描HRAM数据，低于1ppm的质量精度，可满足各种检测需求，借助独有的Compound Discoverer软件中的统计学比较工具，可以快速、可靠分离样品中的目标组分，发现样品集之间的真正差异，是酒中风味物质研究的强有力工具。

- (1) 通过高分辨静电场轨道阱气质联用仪（GC-Orbitrap/MS）对8种不同的酒类样品进行风味成分分析，结合Compound Discoverer软件的非靶向未知物定性分析流程，共定性分析出1654个化合物。
- (2) 主成分分析（PCA）结果表明，不同组的样品点有效地聚在一起。PC1、PC2两个主成分可以解释55.8%的变异量，（PC1 40.7%，PC2 15.1%）。
- (3) 通过火山图（P-value<0.05, Log2 Fold Charge>1）对比酱香型和清香型两种不同类型的白酒，火山图标记出共696种差异性化合物，其中上调化合物503个，下调化合物193个。对比同一品牌两种不同的酱香型白酒，通过火山图标记出79种重要的化合物，其中上调化合物50个，下调化合物29个。
- (4) 高分辨静电场轨道阱气质联用仪（GC-Orbitrap/MS）结合组学分析软件Compound Discoverer，以组学分析思路对酒类进行成分分析，快速寻找其中关键的标志化合物，为风味的分析提供新的方法和思路。



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

Thermo Fisher
SCIENTIFIC