

LC/Mass Spectrometry
ICP-Mass Spectrometry

作者:

Catherine Stacey

Robert Seward

Ewa Pruszkowski

PerkinElmer, Inc.
Waltham, MA USA

Robert Hoult

PerkinElmer, Inc.
Seer Green, Beaconsfield
HP9 2FX United Kingdom利用先进 “Spotfire Analytics”
平台结合LC/MS和ICP-MS
数据辨别威士忌酒源区

1 引言

本研究采用TIBCO SpotfireR统计分析，调查威士忌化合物组成是否与区域来源相关。麦芽威

士忌含有大量的化合物，这些化合物与当地的原料，发酵，蒸馏和成熟过程有关。测定了来自于苏格兰和加拿大的威士忌中非挥发有机物和无机化合物。融合分析结果得到了每个样品的成分组成。

统计分析显示相似区域样品聚类，而与其它不同区域样品实现分离。这些结果证实了样品组成与地理来源和突出标志化合物强烈相关。

这种方法可以扩展到检测掺假的威士忌，而不适合辨别单一麦芽威士忌和混合威士忌成分组成。

2 实验

不同地理源区的威士忌样品采用LC/MS和ICP-MS准确分析，得到详细的非挥发性有机和无机成分信息。

购买商品化的苏格兰和加拿大威士忌存放于塑料微型瓶中。2个加拿大品牌，3个苏格兰品牌威士忌和1个苏格兰麦芽。10mL样品室温蒸发至近干去除乙醇和挥发成分。

用水稀释每个蒸干样至原始样品10倍，采用LC/MS检测低挥发性成分。采用一个精确质量TOF（PerkinElmer AxION 2 TOF和Flexar 15 UHPLC系统）的LC/MS在正和负模式下测定三次。

LC条件:

- 泵: PerkinElmer Flexar FX-15泵
- 流速: 0.4 mL/min
- 流动相A: 水+0.1%甲酸+5mM醋酸铵
- 流动相B: 乙腈+0.1%甲酸
- 梯度条件: 100% A 至70% B 10分钟
- 注射体积: 5µL 提取液
- 色谱柱: PKI Brownlee 2 mm x 10 cm C18 UHPLC column

质谱条件:

- 质谱: PerkinElmer AxION 2 TOF
- 电离源: PerkinElmer Ultraspray TM 2 (双ESI源)
- 电离模式: 正或负
- 采集速度: 3 spectra/s

在正模式下大多数化合物以[M+NH₄]⁺或[M+Na]⁺离子形式检测，负模式检测[M+H]⁻离子。总共检出超过100种化合物，其中一些化合物同时被正负模式检出。利用AxION eCID软件所具有的准确质量和同位素模式信息，获得多种化合物的最佳匹配信息。多种已知化合物能被

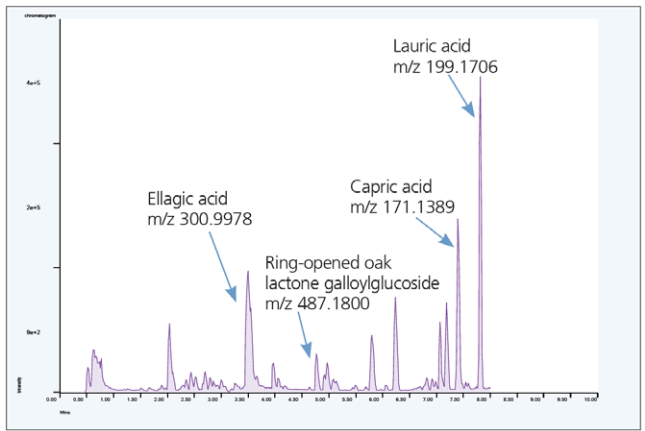


图1. 威士忌非挥发性化合物分离例子，轨迹表示负模式下被检出化合物。标记峰是准确质量数匹配的主要成分。

信息匹配，一些被鉴别是酚类物质，来源于用于成熟威士忌的橡木桶和使用发酵原料的大麦。

元素分析：每个威士忌蒸发至近干，酸性溶液中重新溶解，采用PerkinElmer NexION 300 ICP-MS在碰撞模式下分析三次。

等离子体质谱操作条件:

- 雾化器: Meinhard 玻璃微量同心
- 雾化室: 玻璃旋流
- 三锥接口: Ni/Al材料
- 等离子体气流速: 16.0L/min
- 辅助气流速: 1.2L/min
- 雾化气流速: 1.00L/min
- 样品提升速率: 250 µL/min
- RF功率: 1600W
- 重复次数/样: 3
- 操作模式: He碰撞

数据处理与统计

LC/MS数据集均采用定制软件重新处理，减少全谱和时间信息的复杂性。将复杂三维信息减少为质量、时间和信号强度的一组重要特性。

这些特性与所有数据组相关，同时允许分析中质量数和保留时间的细小变化，为产生一系列唯一（质量、时间）对，所有样本平均值精确到小数点后三位。数据处理后输出一个表，以所有检出特性作为列，每个样品相对信号强度作为行。

从仪器软件中直接导出ICP-MS分析每个样品的元素含量。

三个表，(a) LC/MS正模式特性，(b) LC/MS负模式特性和(c) ICP-MS元素含量，被导入TIBCO Spotfire软件进行统计分析，用于区分样品和得到可视化结果。新表也由可以从单独的表合并提供更全面的统计分析。

一个标准S plus 主成分分析算法被用于统计计算，结果采用分数和载荷图得到可视化2维和3维图形，不同颜色样品表示品牌名称或地理源区。

结果

负模式LC/MS

负模式结果PCA统计分析的主成分分数图(图2)显示样品组可明显区分开，加拿大威士忌与苏格兰威士忌样本中区分。

载荷图 (图2)显示不同样品组之间，标记物具有明显不同的强度。在一个单独的数据集中，每个标记物的(质量、时间)特性标签被用于提取准确的质量数。质量数值与威士忌中已知化合物相匹配。

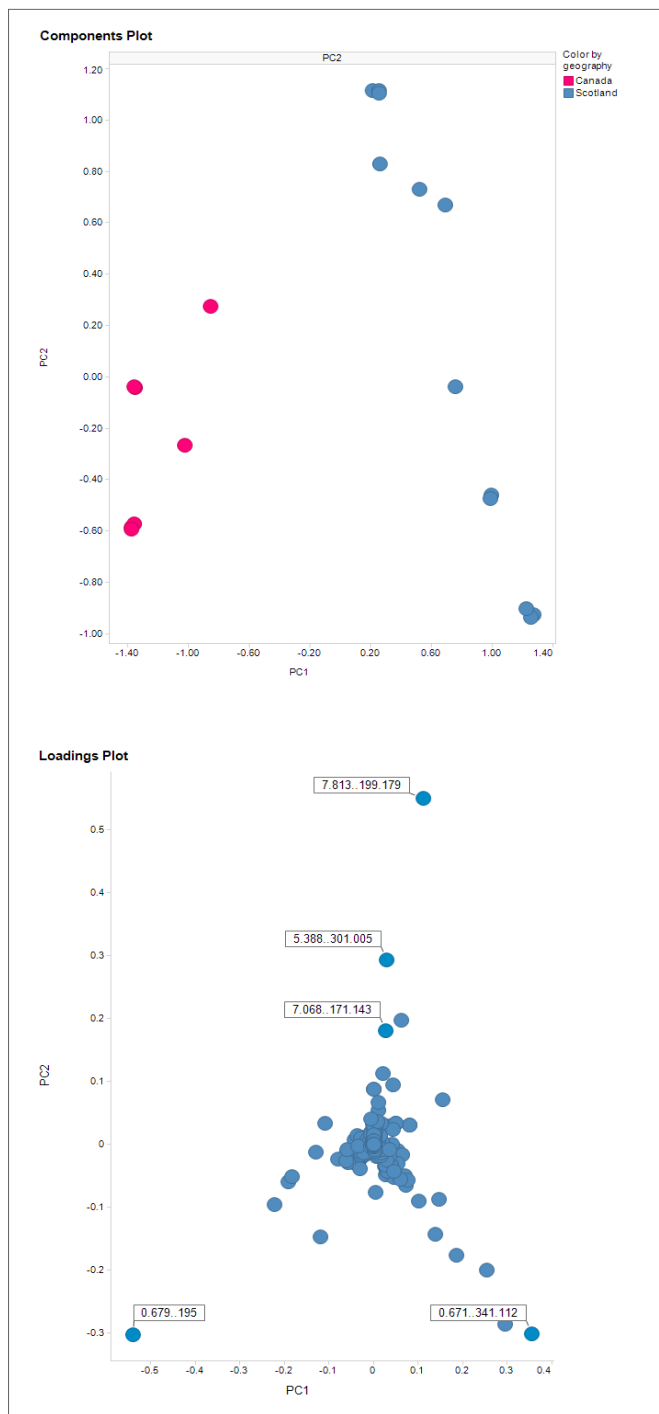


图2. 负模式分数图PC1vPC2显示两个加拿大（红色）和4个苏格兰（蓝色）样品组。负模式载荷图显示了威士忌中标记化合物具有明显不同。强标记物为m/z 199.1706 (月桂酸), m/z 297.2435和171.1389 (癸酸), m/z 300.9978 (鞣花酸), m/z 195.0489 (葡萄糖酸)和m/z 341.1065 (麦芽糖)。

负模式载荷图显示了威士忌中标记化合物具有明显不同。强标记物为m/z 199.1706 (月桂酸), m/z 297.2435和171.1389 (癸酸), m/z 300.9978 (鞣花酸), m/z 195.0489 (葡萄糖酸)和m/z 341.1065 (麦芽糖)。

负离子模式下, 威士忌之间具有很强差异性, 包括癸酸和月桂酸。这些酸来自于大麦脂质和在威士忌蒸馏器蒸

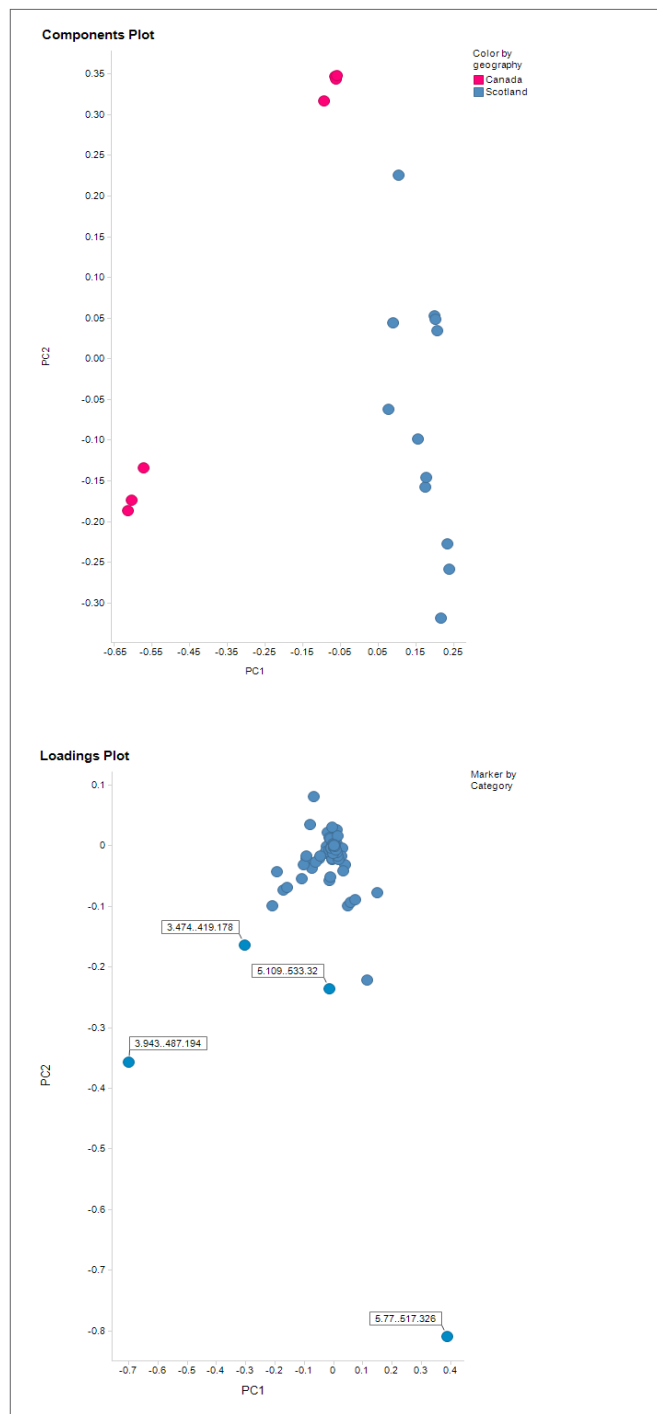


图3. 负模式下不同威士忌中高质量数(>m/z 450)标记化合物的分数图和载荷图。标记物包括m/z 517.3151和487.1820。

馏后铜盆上残留。它们在苏格兰威士忌中被检测出具有更高含量。加拿大威士忌中另外一个强的差别是m/z 194.9976, 在分离开始时就出峰, 通过质量和同位素模式鉴别为含硫, 可能与这些品牌中合法添加的焦糖有关。质量数m/z 301.00 ($C_{14}H_6O_8$) 鞣花酸是大麦丹宁酸降解的最终产物, 同时也存在于柞木中, 在某些苏格兰威

士忌中被检测出高浓度。一个非保留标记m/z 341.1065 是一种二糖如蔗糖、麦芽糖、或二者混合物，在苏格兰威士忌含量较高，这种化合物在正模式下被检出。

仅使用高质量特性计算的一个独立主成分分析，在高质量范围内具有突出的成分差异。载荷图(图3)显示了一个在m/z 487.1820标记物，在一个加拿大威士忌中信号更强，已有报道表明为一个开环顺式内酯没食子酸葡萄糖苷2。一个在m/z 517.3151的标记物，可用于区分单一麦芽和混合物，可能来源于橡木桶。而在加拿大混合威士忌中，m/z 515.2144豆糖 (coumaryl glycate) 标记物信号很强。

另外一个视图的信息是每个样品可由TIBCO Spotfire软件形成差异条形图(图4)。这几个不同颜色编码标记化合物的平均值显示了不同国家和混合的威士忌分组。

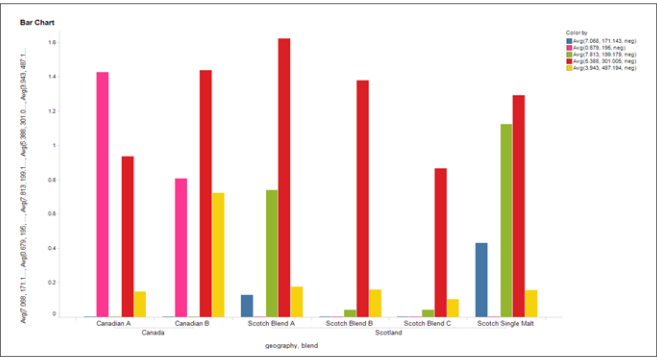


图4. 条形图显示高丰度负模式标记物的平均强度值(m/z 171, 195, 199, 301和487)。所有混合物在m/z 301处(red)具有相似的浓度。单一麦芽在m/z 171(蓝色)和199(绿色)，只有加拿大样品中含有m/z 195(粉红色)；含硫化物，一个加拿大品牌中具有较高含量的m/z 487(黄色)。

正模式LC/MS

正离子模式下结果，通过PC1 v PC2分数图（图5），一个加拿大威士忌可以与其它样品完全分开。载荷图显示一些苏格兰威士忌中存在一个m/z 420.3322强信号标记物，分子式 $C_{22}H_{42}O_6$ (一种未知化合物)的氨加合物，和m/z 203.0520葡萄糖加合物。其它明显标记物有m/z 173.0912香芹酮和m/z 110.0587儿茶酚碎片离子(在一个加拿大威士忌中较高)，m/z 249.1115($C_{14}H_{16}O_4$)，m/z 127.0387羟甲基糠醛，m/z 209.0805芥子醇，m/z 193.0495东莨菪素和m/z 361.2955落叶松树树脂醇，以上苏格兰威士忌中具有很高浓度。

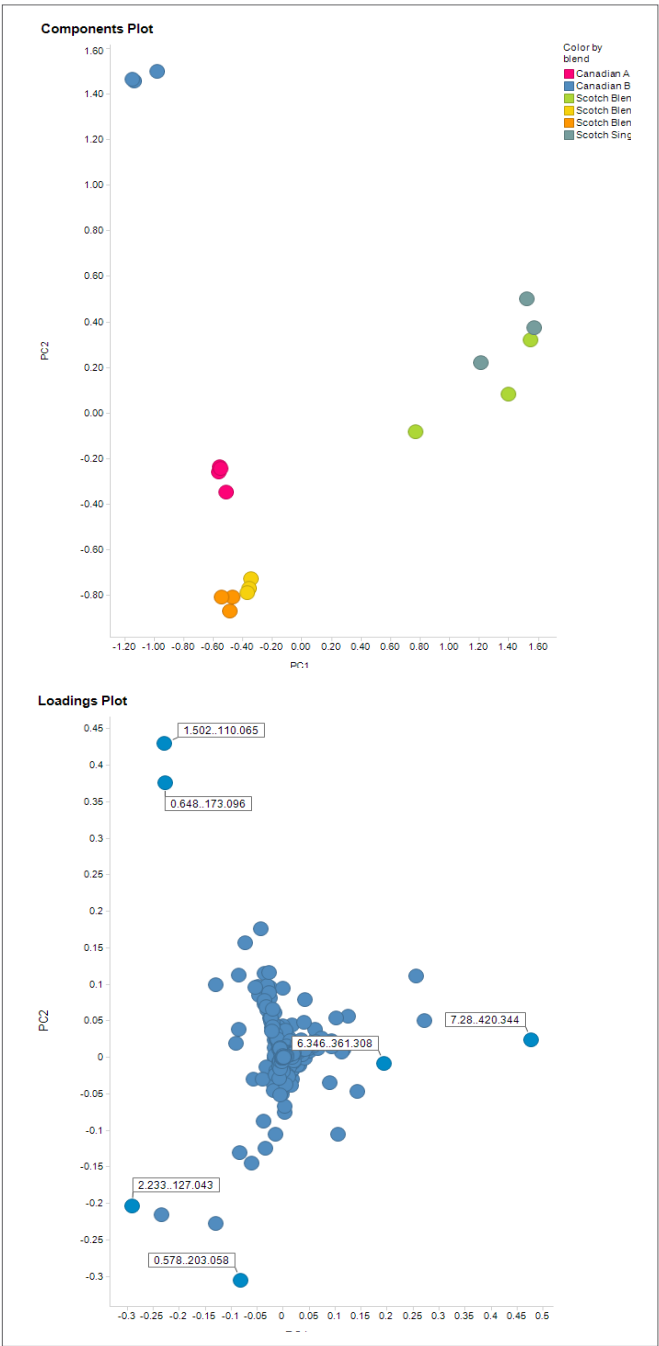
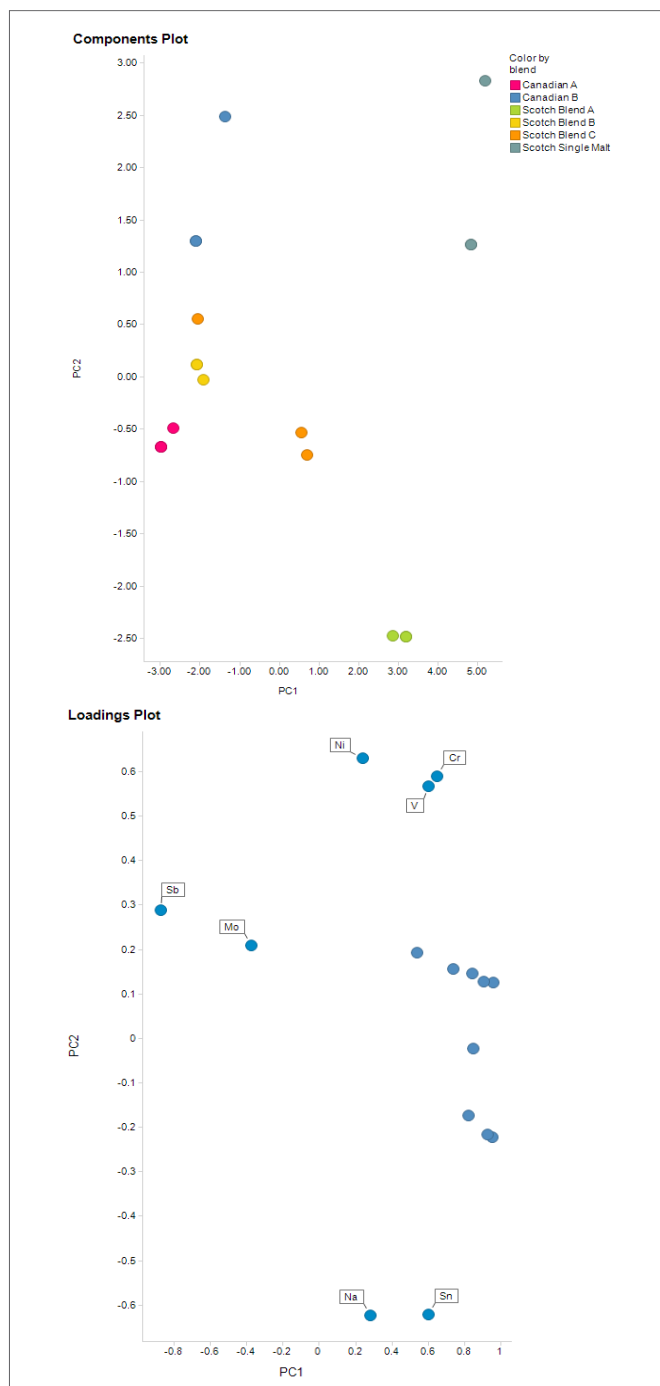


图5. 正模式分数图PC1 vPC2显示较强区别1个加拿大混合威士忌与其它威士忌。载荷图显示标记物差别，加拿大混合B威士忌中高浓度m/z 110.06和173.10，苏格兰威士忌中高浓度m/z 110.06和173.10。



组合LC/MS结果

在PCA分数图中，正和负模式产生的信息可将苏格兰和加拿大威士忌组部分分离，但一些苏格兰威士忌在两种模式下均具有相似的化合物组成。从威士忌样品，正、负模式下两个详细信息表组合产生一个含有所有检出的非挥发性有机标志物的总表。在这种融合数据中，两个苏格兰混合威士忌样品仍然组合在一起（无法分开）。然而，无机标记物能够辨别出这两个混合样品。

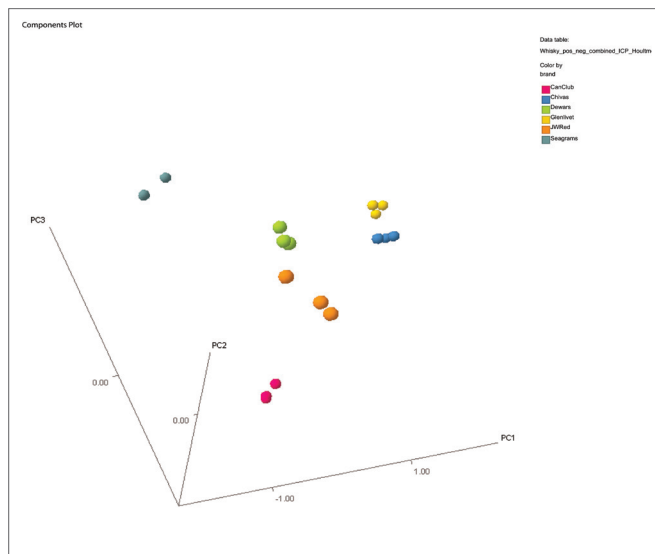
ICP-MS结果

基于ICP-MS分析元素浓度的统计表明每个样品具有突出的无机标记物。由于浓度范围较宽，每个浓度的平方根是用于主成分分析（PCA）计算。Na浓度在2000-8000 $\mu\text{g/L}$ ，大多数过度金属元素在0.1-20 $\mu\text{g/L}$ 。单个麦芽酒具有更高金属浓度，特别是Cr浓度 $\sim 10 \mu\text{g/L}$ ，而一个苏格兰混合酒具有更高浓度的Sn。这些金属被假定为来源于铜蒸馏器蒸馏时的少量杂质。含量水平与其他报道中的典型葡萄酒和烈酒相当4.6，而远低于饮用水的推荐值。

综合有机和无机结果

进一步细化LC/MS正、负模式和ICP-MS分析结果的组合信息可辨别出混合威士忌样品。在统计分析之前，数据融合标记物需要扩展不同类型的特性。三组独立强度值得正、负有机物和无机结果统一于最强成分集。(由于单个数据集之间的强度变化，所以平均使用了在每个正负模式组中的三个最大强度)。然后，元素结果进一步扩大5倍，以便PCA计算中，变化最大元素贡献与主要重要的LC/MS变量具有相同的权重。

有机和无机标志物融合形成一个表，在PCA统计分析中该表可完全分开的所有威士忌组(图7)。



5 结论

LC/MS和ICP-MS分析了威士忌中的化学物和元素，与生产中木材、成熟和蒸馏方法相关。在PCA主成分分析计算之前，这里我们使用结合了同一样品独立分析结果的融合数据。主成分分析输出提供了一个比单一分析方法更完整的混合差异。输出显示特征标记物，帮助确定不同威士忌的起源。

相似的分析可以用于辨别未知威士忌的地理源区，和突出掺假和欺骗性样品。

参考文献

1. *P. P. de Souza et al.* 'Brazilian cachaça: "Single shot" typification of fresh alembic and industrial samples via Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting', *Food Chemistry* 115 (2009) 1064-1068
2. *Kevin MacNamara, Dagmara Dabrowska, Meike Baden, Norbert Helle*, Advances in the Ageing Chemistry of Distilled Spirits Matured in Oak Barrels, *LCGC Europe Sep 1, 2011*
3. *Gilles Arramon, Cedric Saucier, Sophie Tijou and Yves Glories*; Estimation of triterpenes in wine, spirits and oak heartwoods by LC/MS, *LCGC Asia, Vol 7, Number 7, March 2004*
4. *Helene Hopfer, Jenny Nelson, Thomas S. Collins and Susan E. Ebeler*, Elemental Non-targeted Profiling of 78 Whiskies Using ICP-MS and MPP, *ASMS 2013 poster WP-338*
5. *Thomas Collins; Jerry Zweigenbaum; Susan E. Ebeler*, Non-volatile Profiling of Whiskies Using UHPLC/QTOF-MS, *ASMS 2013 Oral presentation*
6. *M. Navarro, C. Velasco A. Jodral, C. Teres, M. Olalla*, Copper, zinc, calcium and magnesium content of alcoholic beverages and by-products from Spain: nutritional supply, *Food Additives and Contaminants* 24, 07 (2007) 685-694

珀金埃尔默仪器（上海）有限公司
地址：上海 张江高科技园区 张衡路1670号
邮编：201203
电话：021-60645888
传真：021-60645999
www.perkinelmer.com.cn



要获取全球办事处的完整列表，请访问[http:// www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs](http://www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs)

版权所有 ©2014, PerkinElmer, Inc. 保留所有权利。PerkinElmer® 是PerkinElmer, Inc. 的注册商标。其它所有商标均为其各自所有者或所有者的财产。