

肉类和植物性替代品的 LC/Q-TOF 分析和非靶向化学计量分析

使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪和 Agilent 6546 Q-TOF 进行食品感官检测

作者

Toh Seok Hwa,
Upendra Khurana,
Tarun Anumol 和
Daniel Cuthbertson
安捷伦科技有限公司

摘要

由于消费者喜好、法规变化和全球食品系统的综合作用，肉类蛋白替代品（包括植物性和细胞性食品）在全球范围内越来越受欢迎。例如，新加坡计划到 2030 年通过自主生产满足本国 30% 的食品量需求，因此许多成熟的食物公司和初创公司都在开发肉类替代产品。新加坡食品生产目标的主要驱动因素围绕健康和环境问题。从历史上看，植物性肉类替代食品一直难以拥有与动物肉类相同的口感和味道。然而，近年来由于生产方法上的技术进步，植物性肉类似物在味道、口感和成分上与传统肉类越来越接近。本应用简报介绍了一种使用高分辨率精确质量 LC-Q/TOF 表征未知食品化学成分的非靶向分析方法。此外，还介绍了各种统计工具，它们可以将精确质量 LC/Q-TOF 数据转化为更易于理解的信息。数据的主成分分析 (PCA) 可用于鉴定化合物、化合物在不同样品中的丰度分布，以及化合物如何与目标味道特征相对应。原料的热图和层次聚类分析显示具有相同目标味道特征的样品蛋白质分布相似。

前言

食品感官评估是评估食品风味质量的关键方法，因为它衡量的是消费者的直观感受，但其具有主观性。随着技术的进步，将使用更客观和可测量的方法，例如液相色谱-质谱联用系统 (LC/MS)。现在可以通过 LC/MS 表征五种基本味道（即甜味、咸味、酸味、苦味和鲜味），获得的数据可用于优化食品的整体味道。

肉类替代品主要用于代替动物性肉类。但其味道、口感和营养价值被认为是阻碍消费者购买的主要因素。检测对于确保消费者在食用肉类替代品时获得相同的健康利益和体验至关重要。因此，许多研究比较了动物源性肉类和肉类替代产品在营养价值 and 味道上的差异^[1]。

靶向分析主要用于各种已知的营养物质或风味化合物。靶向分析方法和感官评估检测的结果可能会有所不同，因为不在目标列表中的化合物可能会影响整体味道。相比之下，非靶向高分辨率精确质量分析并不局限于特定的一组化合物。它可以无偏倚地对蛋白质中的化合物进行分析、鉴定，并对肉类替代品和真正的肉类进行比较。与食品感官分析检测一样，非靶向 LC/MS 方法不是分析特定的风味特征，而是进行无偏倚分析，专注于总的化合物特征，就像味蕾一样。

除了找到形成各种味道特征的不同化合物外，这些化合物在每种蛋白质中的丰度也同样重要。虽然通常没有适用的标准品来进行定量分析，但可以使用各种蛋白质中化合物的相对强度差异来区分它们。人们可能只会在某些化合物的丰度存在巨大差异时才能区分出不同味道。本研究使用四极杆飞行时间 (Q-TOF) 液质联用系统和统计软件识别和区分风味特征。该方法有助于开发与动物肉具有相同风味特征的植物性蛋白质食品。

实验部分

溶剂

使用安捷伦 LC/MS 级超纯甲醇（部件号 5191-4497）、乙腈（部件号 5191-4496）和水（部件号 5191-4498）。还使用用于 LC/MS 的甲酸（Fluka，现属于 Honeywell）和甲酸铵 (LiChropur, MerckMillipore)。

材料

流动相使用带盖的 Agilent InfinityLab 溶剂瓶（部件号 9301-6528）。开口配有 Agilent InfinityLab Stay Safe 溶剂瓶安全盖，GL45，1 个插口，1 个 InfinityLab 放空阀，外径 3.2 mm 接头 PTFE 插件（部件号 5043-1217）。重型真空瓶盖上的 O 形圈用于密封瓶中的 PTFE 插件。标准 PTFE 溶剂管线穿过 PTFE 插件。然后将安捷伦不锈钢 12–14 μm 溶剂瓶入口过滤器（部件号 01018-60025）安装到溶剂管线上。

样品

表 1 中所列的植物性肉类为市售产品。真正的肉类包括从市场购买的剁碎的牛肉。

表 1. 植物性肉类替代品的样品和样品编号

样品编号	食品描述
PBC 1	植物性鸡肉
PBC 2	植物性鸡肉
PBB 3	植物性牛肉
PBB 4	植物性牛肉
PBP 5	植物性猪肉
PBP 6	植物性猪肉
PBP 7	植物性猪肉

样品前处理

所有的样品采集和前处理步骤均在聚乙烯或聚丙烯容器中完成。全程使用 15 mL 和 50 mL 带塞帽的高性能聚丙烯离心管 (VWR International Ltd., UK)。使用带螺口盖（部件号 5185-5862）的安捷伦 2 mL 螺口棕色玻璃自动进样器样品瓶

(部件号 5182-0716)。称取样品置于离心管中，然后按 1:2 的比例将 70/30 甲醇/水加入样品中。将样品涡旋混合 10 分钟，并在 4000 rpm 的转速下离心 15 分钟。在相同的条件下重新萃取样品。然后使用安捷伦 0.45 μm 聚醚砜 (PES) 过滤器 (部件号 5190-5276) 将提取物过滤到自动进样器样品瓶中。

仪器

将配置 Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (部件号 G7120A) 的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪用作 HPLC。该系统还包括配备 Agilent InfinityLab 样品恒温箱和 Infinity 多重清洗选件的 Agilent 1290 Infinity II Multisampler (部件号 G7167B)。液相色谱仪包括 Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (部件号 G7116B)。使用 Agilent 6546 Q-TOF 质谱系统 (部件号 G6546A) 进行精确质量测定。质谱仪在“非数据依赖型全离子碎裂”扫描采集模式下运行，其中所有离子通过在正离子极性下运行的 Q-TOF 碰撞池。

使用 Agilent MassHunter 定性分析 10.0、Profinder 10.0 和 Mass Profiler Professional 15.1 软件进行数据分析。

表 2. Agilent 6546 LC/Q-TOF LC/MS 系统 (G6546A) 操作条件

HPLC 条件			
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 \times 100 mm, 2.7 μm (部件号 695975-302)		
进样量	5 μL		
流动相	A) 10 mmol/L NH_4F + 0.1% FA 的去离子水溶液 B) 乙腈		
初始	A) 98% 10 mmol/L NH_4F + 0.1% FA 的去离子水溶液 B) 2% 乙腈		
梯度	时间 (min)	%A	%B
	0.30	98.0	2.0
	7.27	20.0	80.0
	10.27	1.0	99.0
	12.00	1.0	99.0
	12.10	98.0	2.0
15.00	98.0	2.0	
流速	0.4 mL/min		
质谱条件			
ESI	正离子		
离子源参数			
气体温度	300 $^{\circ}\text{C}$		
气体流速	11 L/min		
雾化器	35 psi		
鞘气温度	350 $^{\circ}\text{C}$		
鞘气流速	11 L/min		
毛细管	3500 V		
充电电压	1000		

结果与讨论

使用 m/z 100–1700 Da 的全离子全扫描和三种不同碰撞能量 (10、20 和 40 V) 下的碎裂谱图采集 LC/Q-TOF 数据。在化合物鉴定中，根据定制 MS 碎片离子库 (其中包含可能影响味道的化合物) 对精确质量数据进行了搜索。这些化合物包括氨基酸、短链肽、核苷酸、脂肪酸和各种维生素。

如图 1 所示，原始数据的整体概览表明，实际肉类和肉类替代品的谱图之间存在一些细微差异。此外，通过谱库进行筛选，然后通过谱库匹配来鉴定单个化合物会十分耗时。因此，统计分析工具非常适用于将来自非靶向分析的原始数据转换为更有用的信息。

在主成分分析 (PCA) 中，对每种提取物进行 3 次进样，通过观察样品的聚类来检查数据的重现性。总的来说，观察到每个食品样品的重复进样均紧密聚类，表明该方法具有较高的重现性 (图 2)。在图 2 的得分图视图下，每个点代表样品的一次进样。按目标风味特征为蛋白质样品分配不同颜色的数据点，并为各产品分配不同的形状以便区分。图 2 的得分图视图显示了样品组中导致风味特征和特定产品之间差异的趋势。此外，该图可以通过不同的样品在 PCA 得分图中是否共享相同的一般区域来显示其是否相似。结果表明，蛋白质替代食品在其目标风味特征中聚类良好，并且正如预期的那样，各食品类型的风味特征之间存在显著差异。与之不同的是，在 PCA 载荷图视图 (图 3B) 中，每个点代表一种化合物。该图提供了影响 PCA 中得分图的化合物信息。主成分中载荷最高的化合物 (由其符号表示) 与样品中这些化合物的较高丰度相关。

图 2 为不同类型的肉类及其植物性替代品概览。从非挥发性化合物的二维 (2D) PCA 图中可以看出，每种肉类 (例如鸡肉) 及其相应的植物性替代品 (例如 PBC 1 和 PBC 2) 与其他肉类 (例如牛肉或猪肉) 相比，前两者彼此之间更为相似。

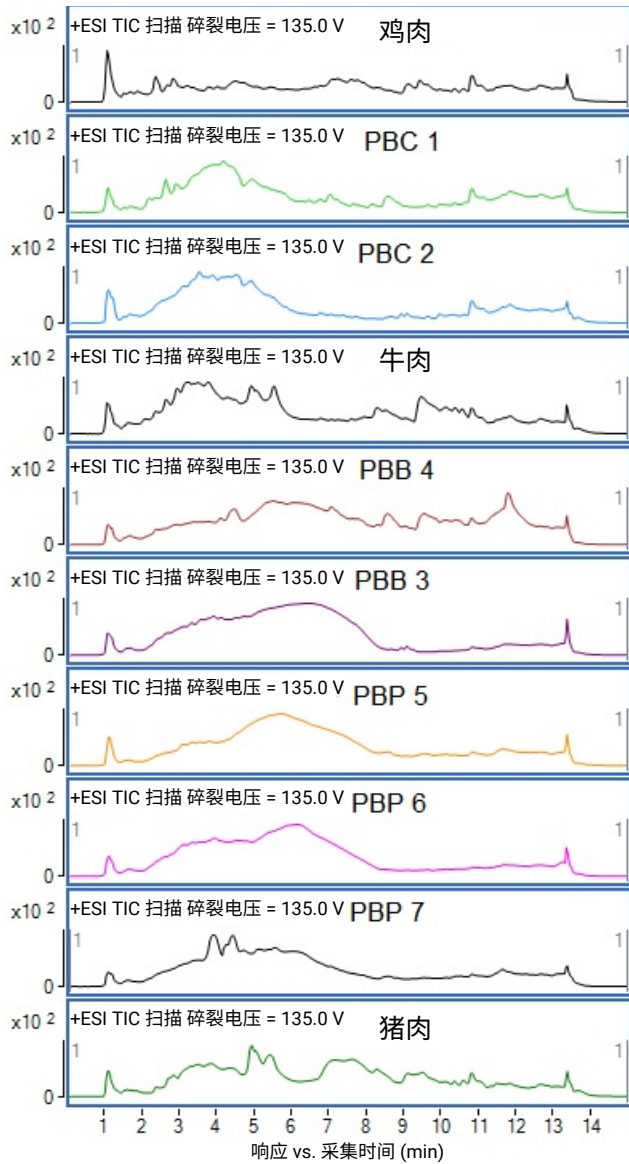


图 1. 实际肉类和相应植物性肉类替代品的 TIC 概览

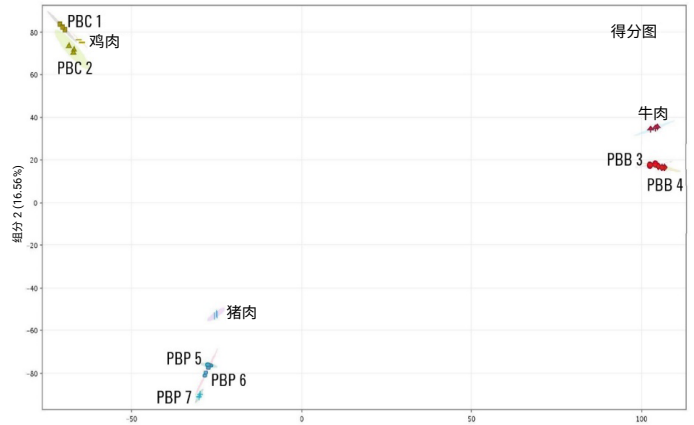


图 2. 猪肉、牛肉和鸡肉及其相应植物性替代品的 2D PCA 得分图

并列查看一种肉类的 PCA 得分图和载荷图，可以轻松地将与一组营养物质或风味化合物相关的化合物关联起来。图 3A 显示了鸡肉的 3D 得分图，不同的组沿各个轴分开。载荷图（图 3B）提供了导致得分图差异的化合物信息。

热图是一种数据可视化技术，通过颜色标度显示化合物的丰度，红色代表高丰度，蓝色代表低丰度。热图使用户能够快速查看一组特定风味特征的化合物丰度差异，如图 4 所示。

在典型的烹饪温度下，肉类表面形成的游离氨基酸提供了消费者喜欢的“烤肉”风味^[1]。因此，植物性牛肉食品的生产商对其产品中各种氨基酸丰度的控制非常重要。图 4 表明，植物性牛肉产品 PBB 3 和 4 中苦味氨基酸的丰度高于真正的牛肉。这些氨基酸可能会影响产品的最终味道。食品中氨基酸的分析数据可用于选择基础成分，从而提供与所需化合物丰度相似的一组风味化合物。

结论

肉类蛋白替代品的风味、口感和营养价值对于消费者的感知、接受度和价值评估至关重要。

使用高分辨率 Agilent 6546A Q-TOF LC/MS 系统的非靶向、非数据依赖型全离子工作流程成功地分析和鉴定了鸡肉、牛肉、猪肉及其植物性替代品中的许多风味化合物。使用 Agilent Mass Profiler Professional (MPP) 软件，通过先进的统计分析和可视化工具确定了真正肉类和植物性肉类替代品之间的关系。PCA 得分图和载荷图可用于比较食品中的各种化合物。热图也是对肉类和市售植物性肉类替代食品中的化合物（例如氨基酸）进行可视化分析的有用工具。

全面的 LC/MS 数据采集和统计工作流程为蛋白质替代食品的生产商提供了产品的关键分子信息。分析数据能够帮助生产商对产品成分进行更细致的调整，从而更好地复制动物源性肉类的味道。

参考文献

1. Kaczmarek, K. *et al.* Flavor and Metabolite Profiles of Meat, Meat Substitutes, and Traditional Plant-Based High-Protein Food Products Available in Australia. *Foods* **2021**, *10*(4), 801
2. Ueda, Y. *et al.* Flavor Characteristics of Glutathione in Raw and Cooked Foodstuffs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61*(12), 1977–80
3. Jakse, B. *et al.* Uric Acid and Plant-Based Nutrition. *Nutrients* **2019**, *11*(8), 1736

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE68216217

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2022
2022 年 7 月 26 日，中国出版
5994-5130ZHCN