

基于 GC-MS 指纹图谱和多元统计学区分四川保宁醋和山西老陈醋的挥发性差异代谢产物

邝格灵, 李树, 宁甜甜, 赵国忠*

(天津科技大学, 省部共建食品营养与安全国家重点实验室, 食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 本文旨在研究四川保宁醋和山西老陈醋 2 种四大名醋的挥发性差异代谢产物。通过气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术建立食醋的定量化学指纹图谱, 基于色谱、质谱信息和保留指数定性和定量了 6 种四川保宁醋和 9 种山西老陈醋的挥发性化合物。利用 SIMCA-P+14.1 软件先进行无监督的主成分分析(Principal Component Analysis, PCA) 来观察各样本之间的总体分布和整个分析过程的稳定性, 然后用有监督的正交偏最小二乘判别分析(Orthogonal Partial Least Squares Discrimination Analysis, OPLS-DA) 来区分各组间代谢轮廓的总体差异, 最后选取位于 S-plot 图两端并且 VIP (Variable Influence on Projection) > 1 的点作为对区分 2 种醋差异贡献最大的潜在标志物, 找到组间的差异代谢。多元数据分析表明, 糠醛, 乙酸乙酯, 2, 4-二叔丁基酚, 醋酸, 乙酸苯乙酯和苯乙醇这 6 种风味物质是对 2 种食醋差异贡献最大的潜在标志物。

关键词: 气相色谱-质谱法; 食醋; 多元统计分析; 差异代谢

The Differential volatile metabolites of Sichuan Baoning Vinegar and Shanxi aged Vinegar were distinguished by GC-MS fingerprint and Multivariate Statistics

KUANG Geling, LI Shu, NING Tiantian, ZHAO Guozhong*

(State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: This paper aims to study the volatile metabolites of Sichuan Baoning Vinegar and Shanxi aged Vinegar. The volatile compounds of six kinds Sichuan Baoning vinegar and nine kinds of Shanxi aged vinegar were qualitatively and quantitatively determined by GC-MS. Using SIMCA - P + 14.1 software to unsupervised principal component analysis (Principal Component Analysis, PCA) to see the samples between the population distribution and stability of the whole process of analysis, and then used supervised orthogonal partial least-squares discriminant analysis (Orthogonal Partial Least Squares Discrimination Analysis, OPLS-DA) to differentiate between the metabolic profile of the overall difference between groups. Finally, the points located at both ends of s-plot and VIP(Variable Influence on Projection) >1 are selected as the potential markers that contribute the most to the differentiation of differences between the two kinds of vinegar, and the differential metabolites between groups were found. Multivariate data analysis showed that six flavor substances, furfural, ethyl acetate, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol, acetic acid, phenyl ethyl acetate and phenyl ethanol, were the potential markers that contributed the most to the differences of the two vinegars.

Key words: gas chromatography-mass spectrometry; vinegars; multivariate statistical analysis; differential metabolites

基金项目: 天津科技大学省部共建食品营养与安全国家重点实验室开放课题资助项目(SKLFNS-KF-201816);天津科技大学大学生实验室创新基金项目(1914A201)

第一作者简介: 邝格灵(1991-) (0000-0001-9584-3868), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物学。

E-mail: 1175020233@qq.com

*通讯作者: 赵国忠(1983-) (0000-0002-7992-4331), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品微生物学与食品风味组学。E-mail: zgzzjiangnan@163.com

中图分类号: TS207.3 文章编号: A

DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20190827-289

在世界上,几乎所有的国家都将醋作为酸性调味品,醋的生产和消费在中国已有 3000 多年的历史,每个地区都有自己的地方醋。山西老陈醋是中国最著名的传统食醋之一,由高粱、豌豆、麦麸、谷糠和稻壳经多种真菌和细菌开放式固态发酵(SSF)发酵而成,已有近 3000 年的历史,被选为国家非物质文化遗产^[1]。四川保宁醋,起源于 1618 年的阆中市,是四川最著名的麸皮醋,是以生麦麸为主要原料,以蒸高粱或糯米为主要原料,通过增加中国传统草药,如杜仲、砂仁、甘草等发酵而成^[2]。由于原料基础不同、加工工艺不同、参与发酵的优势微生物群落不同,造就它们在品质风格上存在一定差异。醋的香气成分对醋的品质有很大的影响,对醋的品质起着至关重要的作用。对醋的香气进行表征和鉴定,将有助于解释不同产品之间的差异^[3]。

气相色谱-质谱联用技术因其高分辨率和高灵敏度而被认为是一种稳健、合适的代谢组学工具^[4],是目前应用最广泛的食品挥发物分析技术和方法之一^[5]。PCA 是一种无监督的多元变量统计分析方法,是在多元分析中使用最多的工具^[6]。它使用少量的综合变量(主成分)来取代原先的复杂多变量,从而能在最大程度保留数据原有信息的情况下,降低数据复杂度,并对数据进行可视化处理^[7]。而 OPLS-DA 是一种有监督的多元统计方法,用以加强 PCA 中已经建立的观察组之间的弱分离,从而更好地区分两组之间的差异^[8]。它不仅能实现样品差异的鉴别,还能获得样品差异的特征标记物,有利于对样品不同产地、不同部位、不同加工方式等的快速鉴别^[9]。

本研究采集了四川保宁醋 6 份,山西老陈醋 9 份,以此为研究对象,采用 GC-MS 指纹图谱对其挥发性成分进行分析,并结合 PCA 和 OPLS-DA 等多变量统计分析方法探讨出对山西老陈醋和四川保宁醋的差异贡献最大的潜在标志物。本实验拟为进一步研究和分析不同食醋的质量和风格特色的形成提供了新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

实验所用原料购自当地超市及网上专卖店,样品常温保存。S1-S6 为四川保宁醋, S7-S15 是山西老陈醋。样品信息见表 1

表 1 样品信息

Table 1 The samples information list

| | | | |
|--------|-----|-------|----|
| 保宁特级五年 | S5 | 四川保宁醋 | BN |
| 保宁特级十年 | S6 | 四川保宁醋 | BN |
| 东湖陈酿三年 | S7 | 山西老陈醋 | SX |
| 东湖陈酿五年 | S8 | 山西老陈醋 | SX |
| 东湖陈酿十年 | S9 | 山西老陈醋 | SX |
| 水塔陈酿三年 | S10 | 山西老陈醋 | SX |
| 水塔陈酿五年 | S11 | 山西老陈醋 | SX |
| 水塔陈酿十年 | S12 | 山西老陈醋 | SX |
| 紫林陈酿三年 | S13 | 山西老陈醋 | SX |
| 紫林陈酿五年 | S14 | 山西老陈醋 | SX |
| 紫林陈酿十年 | S15 | 山西老陈醋 | SX |

1.1.2 试剂

2-辛醇, AlfaAesar 公司; C6-C25 正构烷烃, 美国 AccuStandard 公司; 氯化钠, 上海。所使用的所有其他化学品都为分析纯。

1.2 仪器与设备

GC-MS 联用仪日本岛津公司; 75 μ mCAR/PDMS 萃取头、顶空瓶 上海安谱; 磁力搅拌器 德国 IKA; ME3002E 电子分析天平 梅特勒-托利多仪器有限公司

1.3 方法

1.3.1 样品前处理

用蒸馏水将样品稀释 10 倍, 吸取 6mL 于 15mL 顶空瓶中, 加入 1.5g 氯化钠和 30 μ L 二辛醇 (0.125 mg/L 的 2-辛醇甲醇溶液), 并加转子, 聚四氟乙烯封口, 于 50 $^{\circ}$ C、600r/m 磁力搅拌器水浴平衡 10min, 然后插入 75 μ mCAR/PDMS 萃取头 (使用前按说明进行老化) 顶空吸附 40min, 吸附结束后拔出萃取头, 迅速插入 GC-MS 进样口中, 于 250 $^{\circ}$ C 条件下解析 5min, 同时启动仪器采集数据。

1.3.2 GC-MS 条件

GC 条件: 色谱柱采用 Rtx-5MS 石英毛细管柱 (30m \times 0.25mm \times 0.25 μ m); 升温程序: 40 $^{\circ}$ C 保持 3min, 以 4 $^{\circ}$ C/min 升温至 150 $^{\circ}$ C, 保持 1min, 再以 8 $^{\circ}$ C/min 升温至 250 $^{\circ}$ C; 进样口温度为 250 $^{\circ}$ C; 载气: 氦气, 纯度 99.999%, 流速 1mL/min; 进行方式: 手动; 进样模式: 分流进样, 分流比为 10: 1。

MS 条件: 电离方式为 EI 源, 电子能量 70eV, 离子源温度 200 $^{\circ}$ C, 传输线温度 220 $^{\circ}$ C, 溶剂延迟时间 1.5 min, 质量扫描范围 35~500 m/z, 扫描模式为全扫描。

1.3.3 数据分析

定性和定量分析: 采用正构烷烃(C6-C25)的标准溶液, 利用 Rtx-5MS 计算每种物质的相对保留指数, 并对比文献资料中 Rtx-5MS 色谱柱下每种物质的相对保留指数, 同时结合标准谱库 NIST11 和 Wiley 准确鉴定 15 个样品的挥发性成分。同时采用内标法进行半定量, 得到各组分的相对含量。利用 SIMCA-P+14.1 软件, 采用主成分分析(PCA)方法对保宁醋和山西醋的质量稳定性和一致性进行了评价, 同时基于偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)找出潜在标志性差异性化合物。

2 结果与分析

2.1 四川保宁醋和山西老陈醋挥发性风味物质测定

经 SPME-GC-MS 分离和鉴定，6 款四川保宁醋分别鉴定出 89、86、94、90、98、102 种化合物，其中在 6 款保宁醋中均检测到的化合物有 26 种，作为四川保宁醋的特征风味物质；9 款山西老陈醋分别鉴定出 91、89、106、110、87、71、94、96、86 种化合物，9 款山西老陈醋中 8 款以上检测到的物质有 27 种，视为山西老陈醋的特征风味物质。将两者各自的特征物质结合在一起，共得到 35 种物质，包括醇、醛、酸、酯、酚、酮以及杂环化合物，详细信息见表 2。序号 1~8 为保宁醋特有特征物质，序号 9~25 为保宁醋和山西醋的共有特征物质，序号 26~35 为山西醋特征物质。以此为指标通过 PCA 和 OPLS-DA 等多元统计学方法来分析四川保宁醋和山西老陈醋的挥发性差异代谢产物。

表 2 样品的挥发性成分及其相对含量

Table 2 Chemical compositions and relative amounts of volatile components of simples

| 序号 | 中文名称 | 相对含量 (%) | | | | | | | | | | | | | | |
|----|--------------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | S13 | S14 | S15 |
| 1 | 十六酸乙酯 | 0.03 | 0.08 | 0.41 | 1.72 | 0.07 | 2.06 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 2 | 3-(甲基硫)丙醇乙酸酯 | 0.04 | 0.06 | 0.06 | 0.04 | N.D. | 0.09 | 0.19 | 0.12 | 0.16 | 0.21 | 0.3 | N.D. | N.D. | N.D. | 0.39 |
| 3 | 异丁醛二乙基乙缩醛 | 0.5 | 0.35 | 0.13 | 0.23 | 0.06 | 0.05 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 4 | 5-甲基-2-苯基-2-己烯醛 | 0.46 | 0.34 | 0.08 | 0.15 | 0.07 | 0.06 | 0.27 | 0.36 | 0.06 | 0.15 | 0.09 | 0.09 | N.D. | N.D. | N.D. |
| 5 | 2,3-丁二醇 | 0.11 | 0.04 | 0.06 | 0.82 | 0.13 | 0.11 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 6 | 乙酸甲酯 | 0.03 | 0.03 | 0.05 | N.D. | 0.08 | 0.09 | 0.4 | 0.2 | 0.04 | 0.09 | N.D. | N.D. | 0.11 | 0.16 | 0.13 |
| 7 | 3-(2-呋喃基)-2-苯基丙烯醛 | 1.22 | 1.13 | 0.58 | 0.37 | 0.08 | 0.21 | 0.29 | 0.79 | 0.27 | 0.59 | 0.45 | 0.27 | N.D. | N.D. | N.D. |
| 8 | alpha-酮戊二酸 | 0.88 | 0.95 | 0.43 | 1.17 | 0.17 | 0.04 | N.D. | N.D. | N.D. | 0.57 | 0.34 | 0.05 | N.D. | N.D. | N.D. |
| 9 | 乙醇 | 0.29 | 0.19 | 1.25 | 0.52 | 0.2 | 0.48 | 1.16 | 0.3 | 0.07 | 0.19 | 0.49 | 0.09 | 0.02 | 0.32 | 0.08 |
| 10 | 醋酸 | 4.08 | 4.36 | 4.89 | 3.54 | 1.26 | 4.36 | 2.65 | 5.61 | 15.6 | 5.83 | 13.35 | 39.29 | 1.66 | 3.22 | 8.95 |
| 11 | DL-2-羟基己酸乙酯 | 0.18 | 0.17 | 1.29 | 0.5 | 0.11 | 0.66 | 0.76 | 0.72 | 0.21 | 0.62 | 0.8 | 0.15 | 1.57 | 0.95 | 0.24 |
| 12 | 邻苯二甲酸二丁酯 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.06 | 0.06 | 0.1 | 0.22 | 0.68 | 0.38 | 0.2 | 0.63 | 0.52 | 0.28 | 0.11 | 0.14 |
| 13 | 2-甲基丁醛 | 0.89 | 0.7 | 0.38 | 0.81 | 1.05 | 0.64 | 0.08 | 0.09 | 0.34 | 0.35 | 0.56 | N.D. | 0.16 | 0.18 | 0.18 |
| 14 | 壬醛 | 0.44 | 0.46 | 0.41 | 0.73 | 0.44 | 0.43 | 1.06 | 0.77 | N.D. | 1.66 | 1.45 | 0.57 | 1.13 | 1.09 | 1.04 |
| 15 | 乙酸乙酯 | 1.19 | 0.74 | 4.47 | 4.97 | 4.38 | 5.64 | 34.35 | 20.08 | 6.04 | 16.44 | 13.66 | 17.24 | 11.78 | 19.56 | 5.35 |
| 16 | 异戊醛 | 1.81 | 1.28 | 0.86 | 1.44 | 0.85 | 0.48 | 0.15 | 0.4 | 0.57 | 0.53 | 1.16 | N.D. | 0.43 | 0.44 | 0.59 |
| 17 | 2-戊二酰-1,3-二氧杂环乙烷 | 3.29 | 2.03 | 0.87 | 2.98 | 1.84 | 0.68 | 0.11 | 0.73 | 3.76 | 2.86 | 2.14 | 0.04 | 0.17 | 0.51 | 1.9 |
| 18 | 4-酮庚乙酸 | 1.12 | 0.66 | 0.26 | 0.86 | 0.61 | 0.21 | 0.05 | 0.06 | 1.07 | 1.81 | 1.21 | 0.03 | 0.08 | 0.25 | 0.16 |
| 19 | 乙酸苯乙酯 | 0.45 | 0.56 | 2.43 | 0.47 | 0.76 | 0.79 | 7.88 | 4.55 | 2.58 | 4.57 | 3.4 | 2.24 | 3.91 | 3.57 | 6.86 |
| 20 | 2,4-二叔丁基酚 | 18.65 | 20.45 | 17.11 | 15.55 | 12.36 | 14.04 | 7.25 | 6.79 | 7.74 | 9.17 | 6.95 | 4.91 | N.D. | 9.22 | 11.21 |
| 21 | 丙二醇甲醚醋酸酯 | 0.17 | 0.29 | 0.23 | 0.28 | 0.22 | 0.16 | 0.68 | 3.25 | 3.3 | 1.37 | 3.54 | 0.6 | 0.07 | 0.12 | 0.83 |
| 22 | 正癸醛 | 0.35 | 0.38 | 0.34 | 0.29 | 0.3 | 0.25 | 0.67 | 0.64 | 0.58 | 0.52 | 1.39 | 0.63 | 1.52 | 0.31 | 0.53 |
| 23 | 川芎嗪 | 0.14 | 0.17 | 0.05 | 0.06 | 12.14 | 28.2 | 1.67 | 3.38 | 11.13 | 0.38 | 0.09 | N.D. | 3.51 | 6.25 | 18 |
| 24 | 苯乙醛 | 0.32 | 0.28 | 0.29 | 0.51 | 0.32 | 0.25 | 0.22 | 0.38 | 0.28 | 0.45 | 0.49 | 0.32 | 0.45 | 0.11 | 0.62 |
| 25 | 糠醛 | 43.85 | 47.57 | 41.91 | 45.48 | 33.7 | 19.6 | 4.89 | 4.03 | 19.35 | 26.11 | 24.52 | 17.87 | 17.56 | 26.62 | 3.53 |
| 26 | 2-苯基-2-叔丁氧基环丙二酸乙酯 | 0.5 | 0.32 | N.D. | N.D. | 0.2 | N.D. | 0.11 | 0.46 | 0.45 | 0.68 | 1.22 | N.D. | 0.22 | 0.11 | 0.64 |
| 27 | 苯甲醛 | 1.62 | 1.39 | 1.24 | 1.21 | 0.84 | 0.93 | 1.26 | 2.59 | N.D. | 0.09 | 0.93 | N.D. | 4.23 | 3.85 | 2.55 |
| 28 | alphi-戊基-gama-丁内酯 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 1.1 | 0.94 | 0.2 | 0.24 | 0.12 | N.D. | 0.42 | 0.55 | 0.28 |
| 29 | 乙酸异戊酯 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 1.56 | 0.32 | N.D. | 0.23 | 0.05 | 0.04 | 0.36 | 0.36 | 0.09 |
| 30 | 4-乙基-2-甲氧基苯酚 | N.D. | 0.05 | 0.07 | 0.04 | N.D. | N.D. | 0.11 | 2.7 | 0.04 | 0.1 | 0.23 | N.D. | 0.51 | 0.21 | 0.23 |
| 31 | 2,4,5-三甲基-1,3-二氧戊环 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.03 | N.D. | 0.36 | 0.21 | 0.46 | 0.03 | 0.34 | 0.5 | 0.03 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 32 | α -亚乙基-苯乙醛 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.18 | 0.27 | 0.03 | 0.14 | 0.14 | 0.14 | 0.46 | 0.19 | 0.05 |
| 33 | 3-羟基-2-丁酮 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.76 | 0.27 | 0.19 | 0.51 | 0.04 | 0.09 | N.D. | 0.7 | 1.63 | 0.79 |
| 34 | 苯乙醇 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 5.58 | 3.62 | 2.95 | 3.05 | 2.99 | 0.52 | 6.88 | 3.64 | 8.8 |
| 35 | 邻苯二甲酸二异丁酯 | 0.03 | 0.03 | 0.01 | 0.02 | N.D. | 0.03 | 0.09 | 0.06 | 0.07 | 0.05 | 0.23 | 0.1 | 0.17 | 0.02 | N.D. |

注：N.D.表示未检出

2.2 四川保宁醋和山西老陈醋的代谢组学差异分析

2.2.1 PCA 结果

利用两种食醋的香气组分的相对含量进行 PCA，提取得到 2 个主成分，累计贡献率为 65.03%，基本可以表征所涉及的化学成分信息。从图 1 可以看出，在 95%置信区间内，两组样本本具有明显的区域分布特征且表现出聚类趋势，但组间样品点比较散。

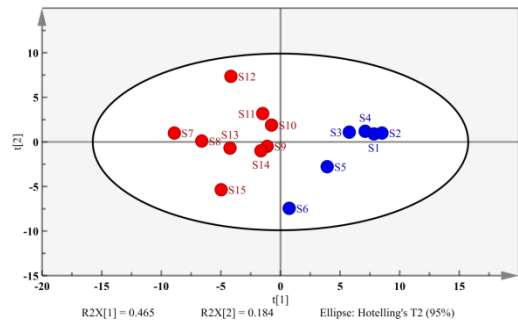


图 1 两种食醋挥发性风味组分 PCA 的分数散点图

Fig. 1 Score scatter plot based on PCA model for volatile flavor components in two vinegars

2.2.2 OPLS-DA 结果

PCA 分析虽然能反映出四川保宁醋和山西老陈醋的明显差异，但其仅反映了数据的原始状态，忽略了数据间的整体性特征与变化规律，不利于寻找组间差异代谢物^[10]。为更好地观察四川保宁醋和山西老陈醋挥发性成分的差异和特征，找到能够标记差异的信号分子，从而筛选出差异形成的潜在的标记物，采用有监督的 OPLS-DA 的模式识别方法对两种四大名醋样品数据进行了建模分析。OPLS-DA 参数 R^2X 描述了 X 变量中有多少变化可以用所选的组件来解释。 R^2 描述了模型的拟合程度。 Q^2 表示 X 对 y 的预测能力， R^2 和 Q^2 的取值范围为 0 到 1，其中 1 表示完全适合度和预测能力^[11]。由分数散点图图 2 可见，两组样本在 OPLS-DA 得分图上聚类良好，显著分离

($R^2X=0.615$, $R^2=0.903$, $Q^2=0.822$)。 $R^2X=0.615$ ，表明所选组件可以对数据集中 61.5%的变化进行建模，又因为 R^2 和 Q^2 参数数值接近 1，所以 OPLS-DA 模型的可解释度和模型拟合很好。与无监督的 PCA 分析得分散点图相比，山西老陈醋和四川保宁醋样本有了最大程度的分离，且降低了样品的组内差异，这样便于更准确地寻找两者的化学差异成分。

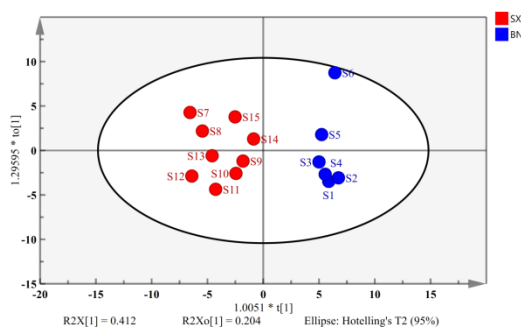


图2 两种食醋挥发性风味组分 OPLS-DA 的分数散点图

Fig. 2 Score scatter plot based on OPLS-DA model for volatile flavor components in two vinegars

2.2.3 OPLS-DA 模型评价

OPLS-DA 是一种有监督的多元统计方法，有监督的分类模型缺点是可能会出现过拟合（over-fitting）现象，即模型可以很好地将样本进行区分，但用来预测新的样本集时却表现很差。因此我们采用 SIMCA-P 软件对建立的 OPLS-DA 模型进行置换检验（Permutation test）和交叉验证方差分析（CV-ANOVA）来验证模型的可靠性需要验证模型的可靠性。

当原始数据中没有添加额外的数据或噪声，置换检验更有助于进行模型的验证^[12]。它是通过随机改变分类变量 Y 的排列顺序，多次建立对应的 OPLS-DA 模型以获取随机模型的 R^2 和 Q^2 值，在避免检验模型的过拟合以及评估模型的统计显著性上具有重要作用。对 OPLS-DA 模型的置换检验结果如 3 图所示，横坐标表示置换检验的置换保留度（置换保留度等于 1 处的点即为原模型的 R^2 和 Q^2 值），所有 R^2 点从左到右均低于最右的原始的 R^2 点，所有 Q^2 点均低于右侧的原始 Q^2 点，且点的回归线与横坐标交叉或者小于 0，一般认为 Q^2 为负值，这说明统计模型是有效的，没有过拟合^[13]。另外，将 OPLS-DA 模型进行 CV-ANOVA 分析，结果显示统计值 $P=9.15E-4$ ，也小于 0.05，具有统计学意义，这进一步表明模型稳定可靠^[14]。

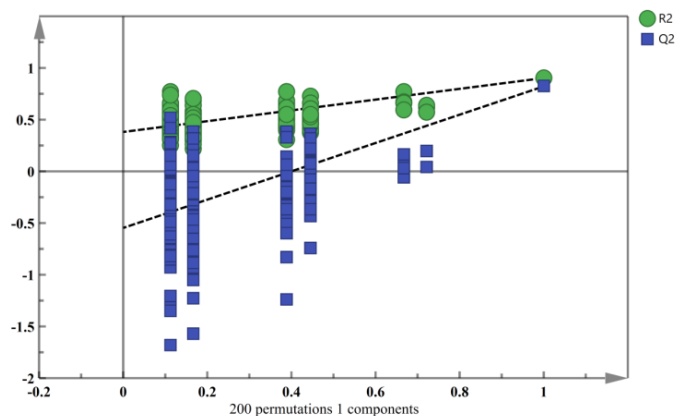


图3 两种食醋样品 OPLS-DA 置换检验结果图

Fig. 3 OPLS-DA replacement test results of two vinegars

2.2.4 潜在差异标志物

为进一步找出对结果分型起贡献作用的变量，得到了 OPLS-DA 模型的和 S-plot 图和 VIP 图如图 4 和图 5。S-plot 最初是由 Wiklund 等人首次用来鉴定两个样本之间的化学差异，它显示了代谢物和模型类指定之间的协方差和相关性，是将多元分类模型可视化和解释的工具^[15]。因此，S-plot 图

有助于根据对模型的贡献及其可靠性，能够识别具有统计意义和潜在生物化学意义的代谢物^[16]。“S”两端的点表示潜在的化学标记，具有较高的置信度，即对分型贡献较小的变量会聚集在原点附近，而对分型贡献较大的变量则分散在“S”型的两端^[17]。VIP 值的大小反映了每个品质成分对模型贡献率的大小，值越大贡献越大^[18]。以 VIP 值大于 1 为界限进行筛选并结合 S-plot 图可以看出，糠醛，乙酸乙酯，2，4-二叔丁基酚，醋酸，乙酸苯乙酯和苯乙醇这 6 种风味物质是对 2 种四大名醋差异贡献最大的潜在标志物。

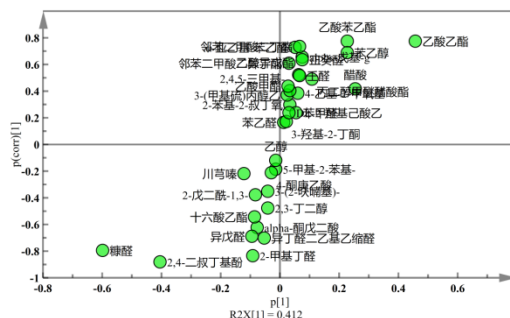


图 4 基于 OPLS-DA 模型分析的 S 型载荷图

Fig. 4 S-plot based on OPLS-DA model analysis

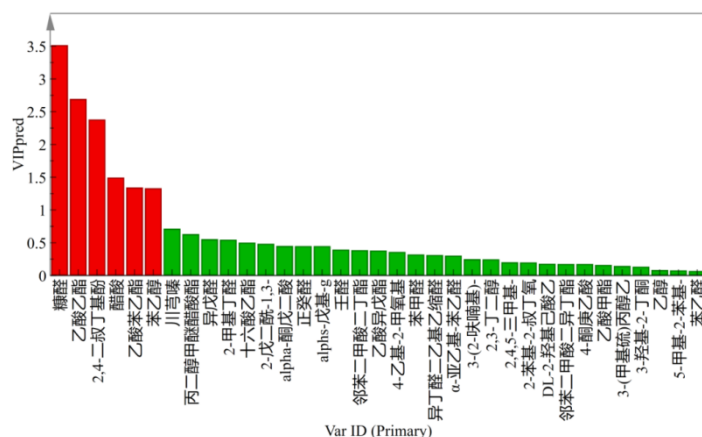


图 5 基于 OPLS-DA 模型分析的 VIP 预测值分布图

Fig. 5 Distribution of VIP forecast values based on OPLS-DA model analysis

2.2.5 差异性成分在四川保宁醋和山西老陈醋相对含量分析

对获得的 6 个差异性较大的挥发性变量在四川保宁醋和山西老陈醋的相对含量进行热图分析，如图 5 所示，糠醛、2，4-二叔丁基酚在四川保宁醋中的相对含量比在山西老陈醋中的相对含量高，苯乙醇在四川保宁醋中的未检测到或含量很低。而醋酸、乙酸乙酯和乙酸苯乙酯在山西老陈醋中的相对含量远远高于其在四川保宁醋中的相对含量。

糠醛、苯乙醇、醋酸、乙酸乙酯和乙酸苯乙酯这 5 种物质是我们非常熟悉的风味物质，糠醛具有又称呋喃甲醛或麸醛，有助于杏仁，烤土豆，面包，烧焦味^[19]，主要是由戊聚糖分解或酵母发酵所产生^[20]。苯乙醇具有蜂蜜香和玫瑰香，是酵母菌的代谢产物，来源于酒精发酵过程中苯丙氨酸的降解^[21]。乙酸乙酯具有果香、酒香，是酵母细胞质中糖酵解产生的乙醇或乙酸与线粒体呼吸产生的乙酰辅酶 A 发生酯化反应生成的^[22]。乙酸苯乙酯具有蜜甜香，少量产生于酒精发酵阶段，大量产生于醋酸发酵阶段，由苯乙醇在酯酶的作用下合成^[23]。我们对它们的来源和气味已经有了很深入的了解，但目前关于 2，4-二叔丁基酚的风味及来源还不清楚，经查阅文献，

我们发现 2, 4-二叔丁基酚在酒、醋、茶^[24]中被广泛检测到, 尤其是药酒, 药醋, 比如怀山药^[25], 葛根酒^[26]等。此外, 我们发现 2, 4-二叔丁基酚还能在中草药中被检测出, 比如沉香^[27]、姜黄^[28]、香草兰^[29]、三角梅^[30]等。所以, 我们可以猜测保宁醋中高含量的 2, 4-二叔丁基酚可能与加入的中草药有关。

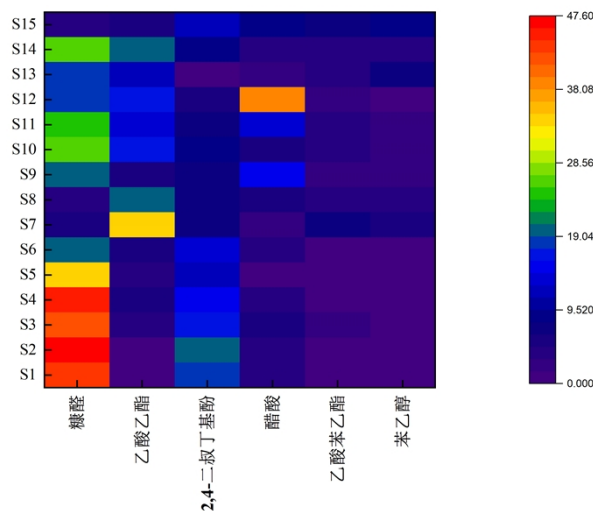


图 6 差异代谢物的热图分析

Fig. 6 The heatmap of different metabolites

3 结论

本研究基于 GC-MS 指纹图谱对 6 款四川保宁醋和 9 款山西老陈醋挥发性风味物质进行测定, 四川保宁醋得到 26 种共有物质, 山西老陈醋得到 27 种共有物质, 将两者各自的共有物质结合共得到 35 种物质。以这 36 种物质为研究对象, 结合 PCA 和 OPLS-DA 等多元数据变量进行统计分析, 结果显示: 山西老陈醋和四川保宁醋样本在散点图上分离良好; 以 VIP 值大于 1 为界限进行筛选并结合 S-plot 图共得到 6 种差异代谢物, 分别是糠醛、乙酸乙酯、2, 4-二叔丁基酚、醋酸、乙酸苯乙酯和苯乙醇; 通过热图对差异性代谢物分析, 可以发现糠醛、2, 4-二叔丁基酚在四川保宁醋中的相对含量比在山西老陈醋中的相对含量高, 而醋酸、乙酸乙酯和乙酸苯乙酯在山西老陈醋中的相对含量远远高于其在四川保宁醋中的相对含量, 另外, 苯乙醇在四川保宁醋中的未检测到或含量很低。这为食醋行业质量评价提供参考数据, 为进一步研究和分析不同食醋的质量和风格特色的形成提供了新的思路和方法。

参考文献

- [1] NIE Z, ZHENG Y, DU H, et al. Dynamics and diversity of microbial community succession in traditional fermentation of Shanxi aged vinegar[J]. Food Microbiology, 2015, 47: 62-68. DOI:10.1016/j.fm.2014.11.006
- [2] ZHANG L, HUANG J, ZHOU R, et al. Evaluating the feasibility of fermentation starter inoculated with *Bacillus amyloliquefaciens* for improving acetoin and tetramethylpyrazine in Baoning bran vinegar[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 255: 42-50. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.021
- [3] ZHANG X, WANG P, XU D, et al. Aroma patterns of Beijing rice vinegar and their potential biomarker for traditional Chinese cereal vinegars[J]. Food Research International, 2019, 119: 398-410. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.008>
- [4] XUE S Y, LI Z Y, ZHI H J, et al. Metabolic fingerprinting investigation of *Tussilago farfara* L. by GC-MS and multivariate data analysis[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2012, 41: 6-12. DOI:10.1016/j.bse.2011.11.003
- [5] CHENG H, CHEN J, LI X, et al. Differentiation of the volatile profiles of Chinese bayberry cultivars during storage by HS-SPME-GC/MS combined with principal component analysis[J]. Postharvest biology and technology, 2015, 100: 59-72. DOI:10.1016/j.postharvbio.2014.09.003
- [6] PEREIRA J C, AZEVEDO J C R, KNAPIK H G, et al. Unsupervised component analysis: PCA, POA and ICA data exploring-connecting the dots[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2016, 165: 69-84. DOI:10.1016/j.saa.2016.03.048
- [7] 尹洪旭, 杨艳芹, 姚月凤, 等. 基于气相色谱-质谱技术与多元统计分析对不同栗香特征绿茶判别分析[J]. 食品科学, 2019, 40(4):192-198. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180120-276
- [8] 潘静静, 陈智峰, 宋雪超, 等. 气相色谱-质谱联用结合化学计量学鉴别再生聚苯乙烯发泡餐盒[J]. 分析测试学报, 2019, 38(02):43-52. DOI:CNKI:SUN:TEST.0.2019-02-007
- [9] 李永迪, 张贻杨, 彭忠, 等. 基于正交偏最小二乘判别分析法分析茯砖茶和千两茶差异性品质成分[J]. 食品安全质量检测学报, 2017(11):302-307. DOI:CNKI:SUN:SPAJ.0.2017-11-056
- [10] 范玛莉, 邢婕, 李震宇, 等. 基于 NMR 代谢组学技术的白芍与赤芍化学成分比较研究[J]. 中草药, 2014, 45(22):3230-3237. DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2014.22.004
- [11] HUANG B M, ZHA Q L, CHEN T B, et al. Discovery of markers for discriminating the age of cultivated ginseng by using UHPLC-QTOF/MS coupled with OPLS-DA[J]. Phytomedicine, 2018, 45: 8-17. DOI:10.1016/j.phymed.2018.03.011.
- [12] TRIVEDI D K, ILES R K. The application of SIMCA P+ in shotgun metabolomics analysis of ZIC® HILIC-MS spectra of human urine-experience with the Shimadzu IT-TOF and profiling solutions data extraction software[J]. J Chromatogr Sep Tech, 2012, 3: 1-5. DOI: 10.4172/2157-7064.1000145
- [13] HONG Y S, AHN Y T, PARK J C, et al. 1H NMR-based metabolomic assessment of probiotic effects in a colitis mouse model[J]. Archives of Pharmacal Research, 2010, 33(7):1091-1101. DOI:10.1007/s12272-010-0716-1
- [14] AN L, SHI Q, FENG F. Metabolomics approach to identify therapeutically potential biomarkers of the Zhi-Zi-Da-Huang decoction effect on the hepatoprotective mechanism[J]. RSC Advances, 2015, 5(102): 84048-84055. DOI:10.1039/c5ra16563f
- [15] SUN J, CHEN P. Differentiation of *Panax quinquefolius* grown in the USA and China using LC/MS-based chromatographic fingerprinting and chemometric approaches[J]. Analytical and bioanalytical chemistry, 2011, 399(5):1877-1889. DOI:10.1007/s00216-010-4586-7
- [16] WIKLUND S, JOHANSSON E, SJÖSTRÖM L, et al. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models[J]. Analytical chemistry, 2008, 80(1): 115-122. DOI:10.1021/ac0713510
- [17] WAN J B, BAI X, CAI X J, et al. Chemical differentiation of Da-Cheng-Qi-Tang, a Chinese medicine formula, prepared by traditional and modern decoction methods using UPLC/Q-TOFMS-based metabolomics approach[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013, 83:34-42. DOI:10.1016/j.jpba.2013.04.019
- [18] ZHANG J, YANG W, LI S, et al. An intelligentized strategy for endogenous small molecules characterization and quality

- evaluation of earthworm from two geographic origins by ultra-high performance HILIC/QTOF MSE and Progenesis QI[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016, 408(14):3881-3890. DOI:10.1007/s00216-016-9482-3
- [19] CEPEDA-VÁZQUEZ M, BLUMENTHAL D, CAMEL V, ET AL. Multivariate optimization of headspace trap for furan and furfural simultaneous determination in sponge cake[J]. TALANTA, 2017, 164: 708-715. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.10.073
- [20] 邱勇, 赵姗, 黄婕, 等. 紫外分光光度法测定黑曲霉发酵液中糠醛的含量. 山地农业生物学报, 2018. 35(7):80-83. DOI:10.15958/j.cnki.sdnyswxb.2018.05.016
- [21] 黄毅. 酱油中氨基酸和香气的分析及质量评价[D]. 保定: 河北农业大学, 2012. DOI:10.7666/d.y2143861
- [22] CHRISTIAN L, THANET U, PETER K, et al. Studies on the mechanism of synthesis of ethyl acetate in *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(3): 1131-1141. DOI:10.1007/s00253-014-6098-4
- [23] CALLEJÓN R M, TESFAYE W, TORIJA M J, et al. Volatile compounds in red wine vinegars obtained by submerged and surface acetification in different woods [J]. Food Chemistry, 2013, 113(4): 1252-1259. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.08.027
- [24] 冯林, 陈贤民, 沈强, 等. 肯尼亚红碎茶与中国工夫红茶香气成分比较分析[J]. 贵州茶叶, 2012(3):20-28.
- [25] 李大伟, 朱运平, 李秀婷, 等. 怀山药醋的风味成分分析[J]. 中国食品学报, 2019, 19(02):306-315. DOI:10.16429/j.1009-7848.2019.02.038
- [26] 蒋鹏飞. 葛根发酵酒品质分析及功能性评价[D]. 西安: 西北农林科技大学, 2017.
- [27] 梅文莉, 曾艳波, 刘俊, 等. 五批国产沉香挥发性成分的 GC-MS 分析[J]. 中药材, 2007, 30(5):551-555. DOI:10.3321/j.issn:1001-4454.2007.05.019
- [28] 孙敬茹, 卜俊玲, 赵欢, 等. 四种姜黄属药用植物根茎和块根挥发性代谢物的多元数据比较分析[J]. 药学报, 2018, 53(08): 27-36. DOI:10.16438/j.0513-4870.2018-0408
- [29] 徐飞, 李娜, 初众, 等. 香荚兰浸膏精制工艺优化及挥发性成分分析[J]. 食品科学, 2018, 39(4): 188-193. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201804028
- [30] 徐凤侠, 黄青云, 刘鸿洲, 等. 光叶三角梅 'Formosa' 叶片挥发性组分的 GC-MS 分析[J]. 亚热带植物科学, 2009, 38(04): 5-8. DOI:10.3969/j.issn.1009-7791.2009.04.