

# 炎症和免疫相关代谢物定量方法结合 化学计量学鉴别猪“淋巴肉”

汪薇, 江丰\*, 吴婉琴, 陈冉, 朱晓玲, 李贝贝

(湖北省食品质量监督检验研究院, 国家市场监督管理总局重点实验室(动物源性食品中重点化学危害物检测技术), 湖北省食品质量安全检测工程技术研究中心, 湖北武汉 430075)

**摘要:** 该文研究了基于炎症和免疫相关代谢物的高效液相色谱-串联质谱定量分析结合化学计量学鉴别“淋巴肉”方法。样品经 80% 乙腈水提取, 正己烷除脂。选用 BEH C18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) 色谱柱进行分离, 以 5 mmol/L 乙酸铵溶液-乙腈为流动相, 25 min 梯度洗脱, 正负离子同时扫描, 建立基于 UPLC-MS/MS 的 38 种炎症和免疫相关代谢物的定量方法, 并对淋巴肉和猪肉中的炎症和免疫代谢物进行定量分析, 结合化学计量学构建淋巴肉判别模型。结果表明, 各目标化合物的在浓度范围内有良好的线性关系, 低浓度加标回收率范围为 50.3%~118.8%, 高浓度加标回收率范围为 57.0%~127.0%, RSDs 均在 20% 以下。基于 PCA 模型和 OPLS-DA 模型, 淋巴肉与猪肉两组样本能被很好地区分开, 对于淋巴肉掺入比例超过 20% 的样本可以从猪肉样本中鉴别出来, R<sup>2</sup> 和 Q<sup>2</sup> 分别为 0.954 和 0.858, 模型无过拟合现象, 有良好的预测能力。利用炎症和免疫相关代谢物含量结合化学计量学可以有效区分淋巴肉与猪肉样本, 为淋巴肉鉴别提供了一种可靠的方法。

**关键词:** 淋巴肉; 免疫; 炎症; 化学计量学; 食品欺诈

文章编号: 1673-9078(2024)03-309-318

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.3.0269

## Identification of Lymphoid Tissues in Pork by an Inflammation and Immunity-related Metabolite Quantification Combined with Chemometrics

WANG Wei, JIANG Feng\*, WU Wanqin, CHEN Ran, ZHU Xiaoling, LI Beibei

(Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Key Laboratory of Detection Technology of Focus Chemical Hazards in Animal-derived Food for State Market Regulation, Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Quality and Safety Test, Wuhan 430075, China)

**Abstract:** Identification of pork with lymphoid tissues based on quantitative analysis of inflammation and immunity-related metabolites through ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was studied. Samples were extracted with 80% acetonitrile-water and degreased with n-hexane. The separation was carried

引文格式:

汪薇, 江丰, 吴婉琴, 等. 炎症和免疫相关代谢物定量方法结合化学计量学鉴别猪“淋巴肉” [J]. 现代食品科技, 2024, 40(3): 309-318.

WANG Wei, JIANG Feng, WU Wanqin, et al. Identification of lymphoid tissues in pork by an inflammation and immunity-related metabolite quantification combined with chemometrics [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(3): 309-318.

收稿日期: 2023-03-07

基金项目: 国家市场监督管理总局科技计划项目 (2021MK070); 国家重点研发计划项目 (2018YFC1602303)

作者简介: 汪薇 (1989-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品分析, E-mail: wangwei\_hbqt@163.com

通讯作者: 江丰 (1985-), 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品分析, E-mail: 349136833@qq.com

out using a BEH C18 column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), with 5 mmol/L ammonium acetate solution-acetonitrile as the mobile phase. Gradient elution was conducted for 25 min, and positive and negative ions were determined simultaneously. A quantitative method for 38 inflammation and immunity-related metabolites based on UPLC-MS/MS was established to quantitatively examine these metabolites in ordinary pork and pork with lymphoid tissues, and the identification model for the latter was constructed by chemometrics. The results reveal a good linear relationship between the target compounds in the concentration range of interest. The recoveries of low concentration spiked samples range from 50.3% to 118.8%, and the recoveries of high concentration spiked samples range from 57.0% to 127.0%, with RSDs below 20%. Based on the PCA and OPLS-DA models, the pork samples with lymphoid tissues and ordinary pork samples can be well identified, and the samples with lymphoid tissue proportions more than 20% can be distinguished from ordinary samples. The R<sup>2</sup> and Q<sup>2</sup> were 0.954 and 0.858, respectively, and the model showed no over-fitting and good prediction performance. The contents of inflammation and immunity-related metabolites combined with chemometrics can effectively distinguish pork samples with lymphoid tissues from ordinary pork samples, providing a reliable method for the identification of pork with lymphoid tissues.

**Key words:** pork with lymphoid tissues; immunity; inflammation; chemometrics; food fraud

淋巴组织是机体的免疫器官，能反映机体的病理状态，生猪屠宰检疫过程中淋巴结的检验是不可缺少的环节<sup>[1]</sup>。淋巴结主要截留异物和各种病原微生物，还含有大量致癌物质和内分泌激素等，食用后可能感染疾病，危害人体健康<sup>[2-4]</sup>，因此会在胴体出厂前剔除淋巴结分布较集中的组织，如颌下、支气管及腹股沟处。2016年某饲料油加工厂被爆出将含有淋巴结的猪边肉制成饺子馅，“淋巴肉”进入人们视线，引起社会的高度关注。淋巴肉广义上指带有比较明显淋巴结的肉<sup>[2]</sup>。《食品安全法》等法律明令禁止含有三腺的肉类流向市场，属于非食品原料<sup>[5]</sup>。一些不法商贩面对暴利诱惑开始打起了淋巴肉的主意，将淋巴肉与品质好的肉搭配，制成肉馅流入了百姓的餐桌。在经过绞碎、添加香料等多道工序做成肉馅后，外观、口感与正常的肉馅没有太大差别，很难区分，不仅威胁着食品供应链的安全，扰乱了市场经济，还可能给公众健康带来风险<sup>[6]</sup>。目前没有有效的淋巴肉识别和确证的技术手段。

淋巴结除过滤作用外，还会产生免疫反应<sup>[7,8]</sup>，进而表现为淋巴结中免疫与炎症相关代谢物的变化<sup>[9]</sup>。已有研究表明，炎症可导致犬尿氨酸相关代谢产物犬尿氨酸、3-羟基犬尿氨酸的波动。精氨酸、色氨酸代谢产物如肌酸等被确定为炎症相关生物标志物<sup>[10]</sup>。花生四烯酸等多不饱和脂肪酸及其衍生物、溶血磷脂酰胆碱和磷脂酰胆碱在调节免疫和炎症相关反应中起着至关重要的作用<sup>[11,12]</sup>。通过分析炎症和免疫相关代谢物的含量为鉴别淋巴肉与可食用猪肉提供了新的方法。这些代谢物在以往的研究中有部分报道<sup>[13]</sup>，但仍缺乏具体的定量方法。免

疫与炎症相关代谢物理化性质的多样性增加了同时制备和分析这些化合物的难度。高效液相色谱-串联质谱(Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, UPLC-MS/MS)具有抗干扰能力强、定量准的优势，可以提高定量分析的准确性<sup>[14,15]</sup>。

本文通过优化色谱和质谱参数、探索高效的前处理条件，建立基于UPLC-MS/MS的38种炎症和免疫相关代谢物的定性定量方法，用于淋巴肉中炎症和免疫相关代谢物的定量分析，结合化学计量学构建淋巴肉判别模型，为淋巴肉鉴别提供了一种可靠的方法，为打击淋巴肉违法使用提供有力的技术支撑，填补了淋巴肉检测方法的空白，在动物源性食品真实性标准化中的应用打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料与试剂

38种标准品购于First Standard(中国)和CATO公司(中国)，化合物信息见表1。

乙腈(分析纯)，国药集团化学试剂有限公司；乙腈、甲醇、乙酸乙酯、氯仿、正己烷、甲酸(色谱纯)，德国默克公司；水为经Millipore净化的超纯水。

猪淋巴肉样本由定点屠宰场提供，共50批次；优质猪腿肉购于超市。

### 1.2 仪器与设备

超高效液相色谱质谱联用仪Exion LC/Triple Quad 4500，美国AB SCIEX公司；ME203电子天平，梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司；涡旋混合

器, 广州得泰仪器科技有限公司; 翻转混合器, 艾卡(广州)仪器设备有限公司; 离心机 5810, 艾本德中国有限公司; 快速溶剂蒸发仪, 英国 Genevac 公司; 0.22  $\mu\text{m}$  有机相微孔滤膜, 天津津腾公司; 超纯水仪 Milli-Q 法国密理博公司。

### 1.3 标准溶液的制备

根据各化合物的溶解性, 选择乙腈、丙酮、甲醇/氯仿等溶剂配制质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准储备液。吸取各化合物标准储备液配制成 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  混合标准中间液, 均在  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  避光保存。

### 1.4 掺假样品的制备

淋巴肉和猪肉样本分别用绞肉机绞碎, 尽可能避免样本间相互污染。将淋巴肉和猪肉按 0%、20%、40%、60%、80% 和 100% (质量分数) 的比例混合, 用搅拌机混匀 2 min, 得到均匀的淋巴肉和猪肉混合物, 样品于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  冷冻保存。

### 1.5 样品前处理

称取样品 5 g (精确至 0.01 g) 于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 80% 乙腈水 (体积分数), 涡旋 1 min, 振荡提取 20 min, 4000 r/min 离心 5 min。取全部上清液, 加入 10 mL 乙腈饱和的正己烷, 涡旋 1 min, 3000 r/min 离心 3 min, 弃去正己烷层, 取乙腈层  $40\text{ }^\circ\text{C}$  氮吹至近干, 用 50% 甲醇-水 (体积分数) 溶解并定容至 1.0 mL, 过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜, 待测定。质控样本 (Quality Control, QC) 是通过所有样品等体积混合制成<sup>[16]</sup>。

### 1.6 UPLC-MS/MS 分析

采用超高效液相色谱质谱联用仪测定, 样本随机排序。每 10 个样本后插入 QC 分析序列, 以监测系统的稳定性。ACQUITY UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱分离, 柱温  $35\text{ }^\circ\text{C}$ , 进样量 5  $\mu\text{L}$ 。流动相 A 为含 5 mmol/L 乙酸铵的去离子水, 流动相 B 为乙腈, 流速 0.3 mL/min。梯度洗脱条件: 0~2 min, 5% B; 2~8 min, 5%~50% B; 8~17 min, 50%~95% B; 17~20 min, 95% B; 20~21 min, 95%~5% B; 21~25 min, 5% B。

电离方式为电喷雾离子源 (ESI), 正、负离子同时扫描, 采集模式为多反应监测模式 (Multiple Reaction Monitoring, MRM), 电喷雾电压为 5 500V/-4 500 V, 离子源温度为  $550\text{ }^\circ\text{C}/450\text{ }^\circ\text{C}$ , 气帘气流速为 35 L/min, 雾化气流速为 55 L/min。根

据质谱响应, 对每种分析物的定性定量离子对、碰撞能量、去簇电压等质谱参数进行了优化, 优化的相关质谱参数见表 1。

### 1.7 方法学评价

评估了方法的线性范围、定量限 (Limit of Quantitation, LOQs)、回收率和精密度。通过绘制分析物的峰面积与浓度的关系构建校准曲线。根据线性回归方程的  $R^2$  值确定线性范围。LOQs 是根据信噪比的 10 倍确定。方法的准确性基于回收率进行评估, 计算各化合物在低、中、高浓度三种浓度下的回收率, 每个浓度水平 6 个重复。精密度以相对标准偏差 (Relative Standard Deviations, RSDs) 表示, 采用日内精密度 (6 个重复) 测定<sup>[15]</sup>。

### 1.8 判别模型构建

将炎症和免疫相关代谢物的定量结果形成数据矩阵, 通过化学计量学对得到的样品数据分组进行模型构建, 模型包括主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA)、正交偏最小二乘判别分析 (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis, OPLS-DA) 等, 选择合适的模型用于淋巴肉判别。通过置换检验对所建模型的准确度进行评估。

### 1.9 数据分析

试验重复 3 次, 通过 Analyst 软件采集质谱数据, MultiQuant 软件进行各化合物的定性和定量分析。应用 SIMCA14.1 和 GraphPad Prism 5 软件对实验数据进行统计分析和绘图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 仪器参数优化

为达到满意的色谱分离效果, 对流动相试剂、洗脱梯度、色谱柱类型等条件进行优化。考察了 0.1% 甲酸水溶液-乙腈、去离子水-乙腈、5 mmol/L 乙酸铵溶液-乙腈和 5 mmol/L 乙酸铵溶液-甲醇四种流动相对各化合物色谱行为的影响 (图 1), 结果显示去离子水作流动相时, 基线较高且部分化合物无法有效分离, 甲酸的加入会抑制负离子化合物的电离导致响应下降。5 mmol/L 乙酸铵可提高化合物的离子化效率, 信号响应增强, 改善化合物的峰形。相较于甲醇, 流动相为乙腈时, 各化合物的峰分离度较好, 保留时间分布合理。因此, 选择 5 mmol/L 乙酸铵溶液-乙腈流动相。

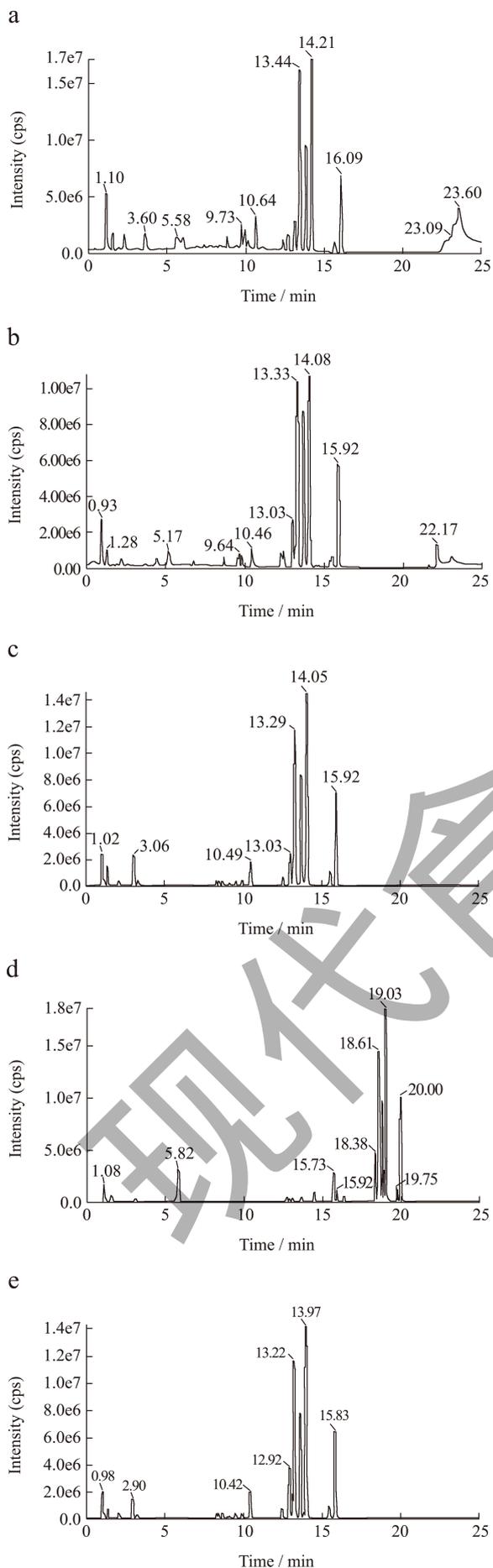


图 1 不同液相条件下的色谱图

Fig.1 Chromatogram under different liquid phase conditions

注: (a) 去离子水-乙腈; (b) 0.1% 甲酸水溶液-乙腈; (c) 5 mmol/L 乙酸铵溶液-乙腈; (d) 5 mmol/L 乙酸铵溶液-甲醇; (e) C<sub>18</sub> 色谱柱; (f) T<sub>3</sub> 色谱柱。

比较了 ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) 和 UPLC HSS T<sub>3</sub> (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) 两种型号色谱柱的分离效果, 除精氨酸、胍基乙酸等强极性化合物在 C<sub>18</sub> 色谱柱中的保留不足外, 大多数化合物在 C<sub>18</sub> 柱中均有较好的保留, 响应和峰形优于 T<sub>3</sub> 柱 (图 1)。综上, 选用 BEH C<sub>18</sub> 色谱柱进行分离, 以 5 mmol/L 乙酸铵溶液-乙腈为流动相, 25 min 梯度洗脱, 正负离子同时扫描, 各目标化合物响应、峰形、分离度较好, 灵敏度高, 满足定量分析的要求, 色谱图如图 2 所示。

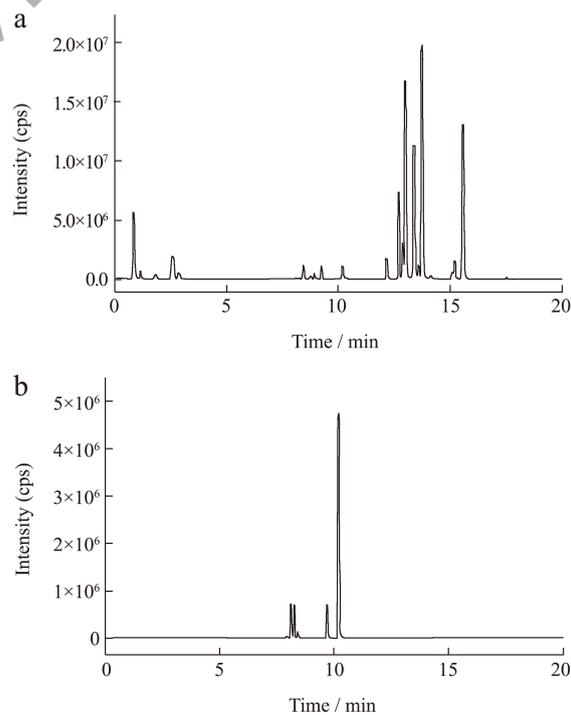


图 2 目标化合物正负离子同时扫描模式下的 TIC 图

Fig.2 Total ion chromatogram (TIC) of target compounds in simultaneous scanning mode of positive and negative ions

注: (a) 正离子; (b) 负离子。

## 2.2 样品前处理优化

样品制备是同时从基质中提取所有不同理化性质的分析物,有效去除基质干扰,提高方法灵敏度的关键步骤<sup>[15]</sup>。目标化合物表现出不同的理化性质,覆盖范围不仅包括亲水化合物,如氨基酸类,还包括疏水化合物,如甾醇激素类<sup>[11]</sup>,需要优化提取方法,以满足尽可能广泛覆盖目标化合物。乙腈、乙酸乙酯、甲醇、氯仿等溶剂对极性和非极性化合物都有较强的萃取能力,广泛用于广靶代谢物的提取<sup>[16-18]</sup>。以猪肉为典型基质,比较了甲醇、乙腈、乙酸乙酯、80%乙腈水(体积分数)、甲醇-二氯甲烷(1:1,体积分数)五种溶剂提取下目标化合物的回收率,如图3所示。

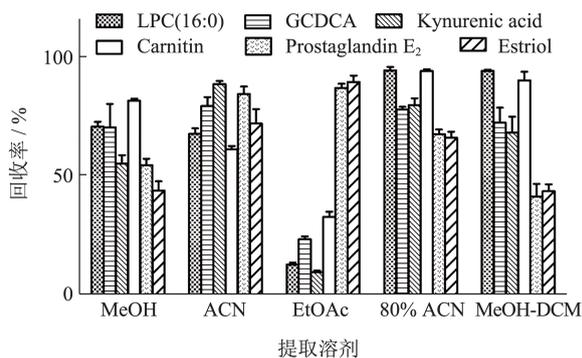


图3 不同溶剂对部分典型化合物提取效率的影响

Fig.3 Effects of different solvents on extraction efficiency of typical compounds

由结果可知,乙腈在提取目标物的同时能较好的沉淀蛋白,提取效率优于甲醇。乙酸乙酯对极性化合物提取率低,且会提取大量基质中的非极性组分,干扰分析。80%乙腈水对极性化合物有较好的提取效果,对疏水性化合物提取率略低于乙腈。乙腈在提取肉类样本时,样本极易成团包裹目标物,加入水可使样本分散均匀,有利于目标化合物的释放和提取。因此,选择80%乙腈水(体积分数)作为提取溶剂。考虑到样本脂肪含量高,基质干扰严重,造成仪器堵塞和污染,采用液液萃取净化,样本经80%乙腈水提取后,加入乙腈饱和的正己烷除脂净化。

## 2.3 方法学评价

如表1所示,各化合物在浓度范围内有良好的线性关系,除胍基乙酸、左旋肉碱和胆酸外,其余化合物的相关系数均大于0.99。低浓度(LOQs和2倍LOQs)加标回收率范围依次为50.3%~118.8%,41.8%~114.5%,高浓度(10倍LOQs)加标回收率范围为57.0%~127.0%,RSDs均在20%以下(表2)。结果表明,方法的准确度和精密度均能满足定量分析的要求,该方法具有良好的性能。

## 2.4 方法在淋巴肉样本分析中的应用

根据所建立的方法,对实际样品进行分析,正、负离子模式下淋巴肉和猪肉的典型色谱图如图4。测定了淋巴肉和猪肉样本中免疫与炎症相关代谢物的含量,计算QC样品间各化合物的变异系数(表2),所有化合物RSDs均小于20%,其中RSDs小于15%的化合物占82.5%,表明在真实样品分析过程中,该方法具有较好的稳定性和适用性。

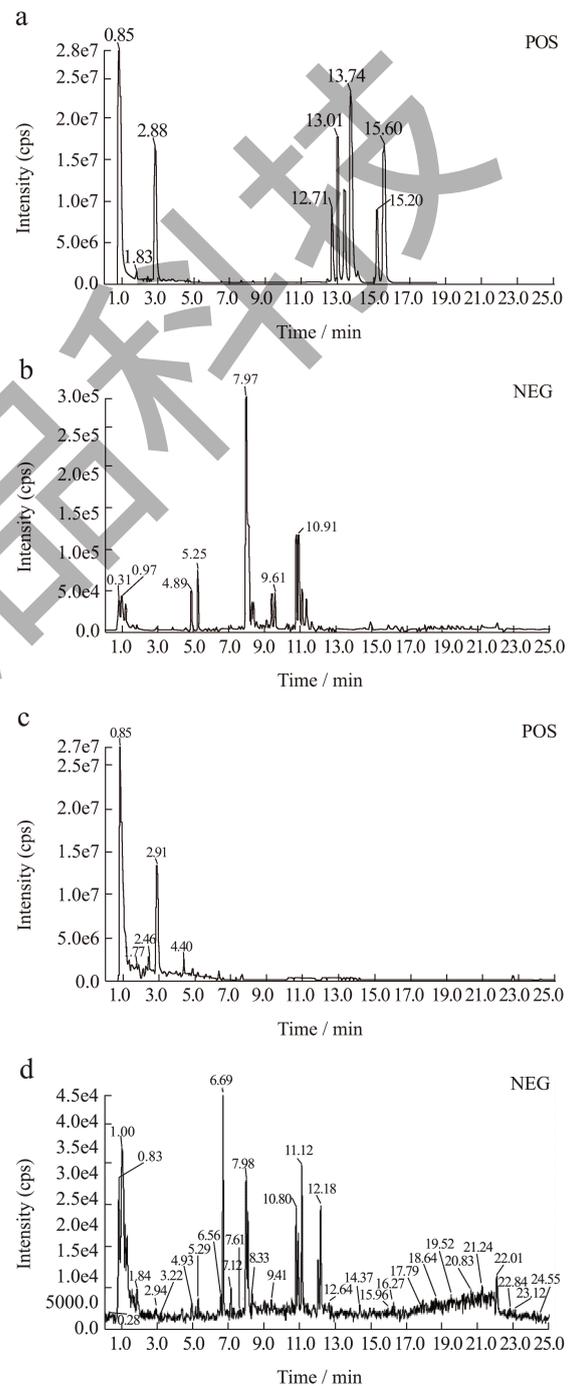


图4 淋巴肉和猪肉的典型色谱图

Fig.4 The typical base peak chromatograms (BPCs) of lymphatic meat and pork in both positive and negative ion mode

注:(a)和(b)为淋巴肉,(c)和(d)为猪肉。

表 1 化合物的定性、定量离子、质谱分析参数、线性关系、相关系数和定量限  
 Table 1 Qualitative and quantitative ions, mass spectrometry parameters, linear relationships, correlation coefficients and limits of quantitation of compounds

中文	英文	CAS 号	电离方式	母离子 ( $m/z$ )	子离子 ( $m/z$ )	去簇电压/V	碰撞能量/eV	保留时间/min	线性范围/(ng/mL)	$R^2$	LOQs/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
1-十六酰-SN-丙三醇-磷酸胆碱	LPC(16:0)	17364-16-8	ESI+	496.2	184.1*/104.1/478.5	80	35/30/27	13.76	20-150	0.998	5
花生四烯酸乙醇胺	Arachidonylethanolamide	94421-68-8	ESI+	348.2	62.1*/203.2/287.3	80	20/18/14	15.11	20-200	0.996	10
孕烯醇酮	Pregnenolone	145-13-1	ESI+	317.3	299.3*/159.2/281.3	170	10/30/20	8.79	20-150	0.995	4
黄体酮	Progesterone	57-83-0	ESI+	315.4	109.1*/97.2	160	30/27	12.17	20-200	0.995	4
去氧皮质酮	Deoxycorticosterone	64-85-7	ESI+	331.2	97.1*/109.2	160	30/35	10.19	20-150	0.997	4
脱氧可的松	Cortisolone	152-58-9	ESI+	347.3	97.1*/109.1	170	30/35	9.27	20-200	0.998	4
氢化可的松	Hydrocortisone	50-23-7	ESI+	363.4	121.1*/327.4	170	35/20	8.46	20-200	0.986	4
脱氢表雄酮	Dehydroepiandrosterone	53-43-0	ESI+	289.3	253.1*/271.1	150	15/10	10.64	20-200	0.995	5
溶血磷脂酰胆碱 LPC(18:2)	LPC(18:2)	22252-07-9	ESI+	520.4	184.1*/104.2	80	30/30	13.03	20-150	0.992	5
1-硬脂酰-SN-甘油-3-磷酸胆碱	LPC(18:0)	19420-57-6	ESI+	524.4	184.1*/104.2	130	35/30	15.57	25-375	0.994	5
甘氨酸脱氧胆酸	Glycochenodeoxycholic cid(GCDCCA)	640-79-9	ESI+	450.3	432.3*/414.3/357.4	180	13/20/25	8.93	25-375	0.987	5
精氨酸	L-Arginine	74-79-3	ESI+	175.1	70.1*/157/116.1	130	28/15/18	0.86	20-200	0.998	10
天冬氨酸	L-Aspartic acid	56-84-8	ESI+	134.1	116*/88.1	80	10/13	0.83	20-200	0.995	10
肌酸	Creatine	57-00-1	ESI+	132.1	90.1*/114.3	90	17/16	0.88	20-200	0.995	10
色氨酸	L-tryptophan	73-22-3	ESI+	205.2	188.1*/146.1	90	14/25	2.83	20-200	0.994	5
犬尿氨酸	L-kynurenine	2922-83-0	ESI+	209.2	94.1*/146.1/192.1	90	18/27/12	1.81	25-375	0.997	5
犬尿喹啉酸	Kynurenic acid	492-27-3	ESI+	190.1	144.1*/162.1/116.1	130	30/25/43	2.53	25-250	0.989	5
胍基乙酸	Guanidinoacetate	352-97-6	ESI+	118.1	72.1*/76.1/101.1	100	20/15/14	0.86	20-150	0.969	5
3-羧基犬尿氨酸	3-HK	484-78-6	ESI+	225.2	110.1*/162.2/208.1	110	25/30/12	1.18	20-150	0.992	5
左旋肉碱	Carnitin	541-15-1	ESI+	162.1	60.1*/103.1	90	20/22	0.86	20-200	0.972	5
前列腺素 E <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>	363-24-6	ESI-	351.3	189.1*/271.1/315.1	-40	-32/-34/-25	8.25	25-375	0.999	5
5-羧基二十碳四烯酸	5-Hydroxyicosatetraenoic acid (5-HETE)	70608-72-9	ESI-	319.2	115*/257.4/203.1	-100	-20/-20/-20	11.67	50-200	0.997	10
8-羧基二十碳四烯酸	8-Hydroxyicosatetraenoic acid (8-HETE)	79495-84-4	ESI-	319.2	155*/163.1/257.2	-130	-20/-23/-20	11.44	50-200	0.999	10
亚油酸下游产物 (9-HODE、13-HODE)	9-hydroxy-10E,12Z-octadecadienoic acid (9-HODE)	98524-19-7	ESI-	295.2	171*/277.2	-150	-27/-25	10.92/11.13	50-375	0.997	10
9,10-二羧基-12-十八碳烯酸	9,10-DHODE	263399-34-4	ESI-	313.4	277.4*/295.4/171.2	-110	-17/-18/-22	9.59	50-375	0.997	10
花生四烯酸	Arachidonic acid	506-32-1	ESI-	305.1	59*/233.1	-100	-30/-25	15.96	50-200	0.995	10

续表 1

中文	英文	CAS 号	电离子方式	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电压/V	碰撞能量/eV	保留时间/min	线性范围/(ng/mL)	R <sup>2</sup>	LOQs/(μg/kg)
雌三醇	Estriol	50-27-1	ESI-	287.1	145.2*/171	-180	-50/-45	7.95	20-200	0.998	5
睾酮	Testosterone	58-22-0	ESI-	287.1	109.1*	-100	-45	9.75	20-200	0.990	5
美睾酮	Mesterolone	1424-00-6	ESI-	303.2	285*/273.2	-120	-40/-40	10.20	25-375	0.993	5
雄甾酮	Androsterone	53-41-8	ESI-	289.2	231.1*/109.2	-130	-40/-45	10.20	25-375	0.991	5
四氢化-11-脱氧皮质醇	Tetrahydrocortisolone	68-60-0	ESI-	349.2	319.2*/303.2	-130	-25/-40	10.19	25-250	0.993	5
11-酮本胆烷醇酮	11-Oxoetiocholanolone	739-27-5	ESI-	303.1	285.1*/231.2/109	-200	-35/-45/-45	9.75	25-375	0.995	5
表睾酮	Epitestosterone	481-30-1	ESI-	287.1	231.4*/135.1	-280	-30/-40	7.75	20-200	0.998	5
9,10,13-三羟基-11-十八碳烯酸	9,10,13-THODE	29907-57-1	ESI-	329.4	171.3*/139.4	-140	-20/-30	7.96	50-375	0.997	5
醛固酮	Aldosterone	52-39-1	ESI-	359.2	189.1*/315.1	-180	-30/-30	8.11	20-150	0.993	10
甘氨酸	Glycolic acid (GCA)	475-31-0	ESI-	464.2	74*/402.2/262.2	-130	-80/-50/-60	8.40	20-200	0.999	5
胆酸	Cholic acid (CA)	81-25-4	ESI-	407.2	343.4*/289.2	-240	-45/-50	8.63	20-150	0.974	5
去氧胆酸	Deoxycholic acid (DCA)	83-44-3	ESI-	391.1	345.1*/327.3	-200	-45/-50	9.70	25-375	0.999	5

注: \*表示定量离子。

表 2 猪肉中目标物的回收率和精密度

化合物	添加水平 LOQs		添加水平 2 倍 LOQs		添加水平 10 倍 LOQs		淋巴 (n=20)		猪肉 (n=10)	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
1-十六酰-SN-丙三醇-磷酸胆碱	78.75	14.50	82.14	18.81	89.39	2.51	13.34	26.18~43.12	ND~10.53	
花生四烯酸乙醇胺	69.66	4.91	51.19	5.64	57.02	5.11	10.74	11.12~16.14	ND	
孕烯醇酮	76.80	9.96	89.76	7.32	103.90	9.35	9.45	20.55~271.17	1.74~6.28	
黄体酮	93.50	10.79	84.45	9.69	88.47	9.09	12.98	ND	ND	
去氧皮质酮	100.29	15.86	95.99	11.52	107.62	7.61	9.05	ND	ND	
脱氧可的松	104.69	11.43	114.49	9.68	127.04	10.78	15.40	ND	ND	
氢化可的松	71.29	6.32	82.50	0.23	80.11	1.72	7.91	ND	ND	
脱氢表雄酮	70.72	2.57	82.80	19.10	81.66	14.87	15.54	ND	ND	
LPC(18:2)	50.99	4.45	49.09	9.11	46.52	4.70	7.90	148.02~198.01	25.42~125.63	
1-硬脂酰-SN-甘油-3-磷酸胆碱	82.56	9.52	101.35	8.98	99.33	13.41	7.89	151.47~933.67	7.91~594.63	

续表 2

化合物	添加水平 LOQs		添加水平 2 倍 LOQs		添加水平 10 倍 LOQs		QC	淋巴 (n=20)		猪肉 (n=10)	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%		RSD/%	/(μg/kg)	/(μg/kg)	/(μg/kg)
甘氨酸脱氧胆酸	90.79	7.40	85.38	11.42	84.33	14.37	10.64	14.28~109.49	ND-8.93		
精氨酸	118.84	11.56	97.39	8.08	108.80	3.79	10.62	4 791.14~9 131.65	1 947.19~5 296.34		
天冬氨酸	64.56	3.60	62.83	6.79	77.72	13.02	11.12	1 531.98~3 443.89	252.64~474.72		
肌酸	68.61	3.83	53.61	6.18	68.10	5.57	11.17	4 062.57~8 575.08	10 278.49~12 443.52		
色氨酸	65.11	3.33	41.76	12.41	62.94	9.16	10.72	1 421.01~4 074.79	22 17.01~3 858.55		
犬尿氨酸	61.81	14.50	70.52	3.56	70.02	7.94	10.35	73.75~314.02	32.91~65.97		
犬尿喹啉酸	70.32	15.03	74.50	4.29	75.02	1.55	10.36	11.73~25.00	ND-17.60		
胍基乙酸	65.31	3.34	67.77	34.59	65.19	6.52	6.44	8 224.29~16 023.05	5 990.04~11 911.39		
3-羧基犬尿氨酸	67.42	3.59	68.75	14.74	68.54	7.35	11.27	ND-15.66	15.37~27.70		
左旋肉碱	76.97	4.41	69.74	15.47	77.52	5.13	9.54	27.03~67.80	68.51~99.65		
前列腺素 E <sub>2</sub>	50.32	4.58	76.53	8.44	83.20	8.56	9.64	8.18~35.87	ND-8.087		
5-HETE	70.66	16.18	72.67	3.51	77.02	1.30	16.33	6.01~5.70	ND		
8-HETE	62.26	11.33	60.35	1.50	71.02	1.22	14.74	25.60~61.72	ND		
亚油酸下游产物 (9-HODE、13-HODE)	80.57	8.72	84.06	8.92	90.17	14.12	9.90	55.85~1 332.42	6.51~132.86		
9,10-DHODE	85.19	8.44	86.51	2.00	88.27	9.10	14.94	90.85~140.42	4.89~11.06		
花生四烯酸	76.95	8.94	82.24	1.70	117.30	6.57	12.64	11.72~15.66	11.92~17.78		
雌三醇	70.99	15.96	69.24	0.17	70.02	4.77	15.13	ND-6.04	ND		
睾酮	70.33	13.08	75.13	2.12	84.02	7.48	10.14	ND	ND		
美睾酮	65.72	5.57	76.62	6.91	73.73	7.53	10.15	ND	ND		
雄甾酮	58.56	5.14	65.14	6.44	69.88	6.67	15.23	5.51~41.89	ND		
四氢化-11-脱氧皮质醇	54.27	5.50	69.97	8.79	82.00	8.57	12.98	ND	ND		
11-酮本胆烷醇酮	59.81	5.22	78.95	6.72	79.04	7.79	15.20	ND	ND		
表睾酮	60.33	14.66	78.41	5.77	74.36	4.05	10.61	ND	ND		
9,10,13-THODE	70.66	17.26	80.30	7.40	81.33	6.50	6.08	875.37~7 648.12	205.80~1 078.43		
醛固酮	64.51	2.34	79.27	5.71	72.86	4.22	7.58	10.38~37.87	ND		
甘氨酸胆酸	53.68	2.39	64.53	5.43	81.97	14.00	8.95	19.06~382.27	16.06~36.02		
胆酸	69.61	2.99	66.48	6.64	65.82	7.44	4.66	5.12~52.46	ND-11.52		
去氧胆酸	71.63	4.82	70.19	2.96	81.01	0.11	8.88	ND	ND		

为揭示淋巴肉与猪肉样本中炎症和免疫相关代谢物的整体差异,基于所有目标化合物定量结果构建主成分分析(PCA)模型,以评价组内样本的相似性和组间样本的总体差异。结果表明,所有QC样本均集中分布在坐标轴中间,说明样本间分离是由于组间的差异变量、而非分析过程中的差异造成<sup>[19]</sup>。淋巴肉与猪肉两组样本能被很好地区分开,分离度较好(图5a)。通过Hotelling's  $T_2$  检验,模型中无超过置信区间95%的样本点,无异常值存在(图5b)。

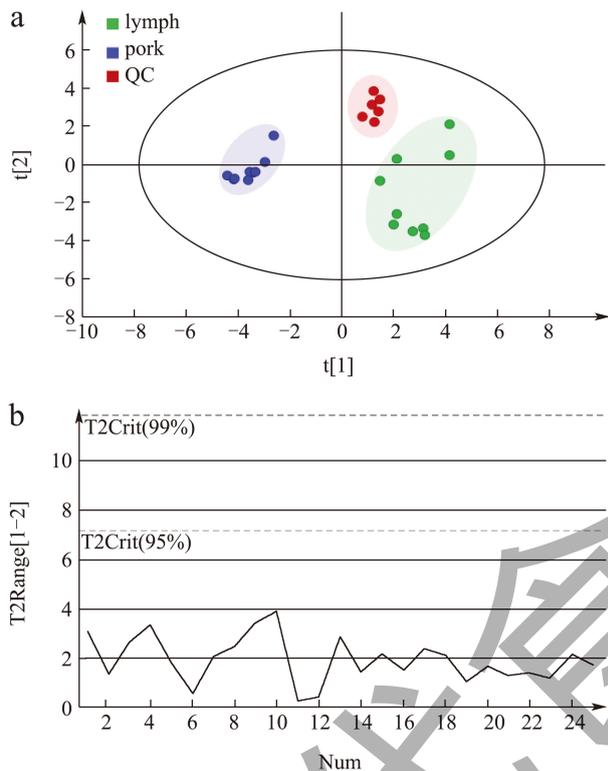


图5 淋巴肉和猪肉组的PCA得分图和Hotelling's  $T_2$  检验  
Fig.5 PCA plots and Hotelling's  $T_2$  of metabolite in lymphatic meat and pork

注:(a) PCA得分图;(b) Hotelling's  $T_2$  检验。

对于实际掺假产品,淋巴肉可能与猪肉混合。因此,制备不同掺假比例的淋巴肉与猪肉样本(0%、20%、40%、60%、80%和100%,质量分数),制成肉糜,模拟市场流通的掺假淋巴肉肉馅,以评价所建立的基于炎症和免疫相关代谢物定量方法结合化学计量学模型在预测淋巴肉掺假比例方面的有效性。如图6所示,通过正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)可以有效地将不同掺假比例的样本在得分图上进行分离,样本点分布与淋巴肉掺假含量递增呈线排列。在这些样本中,淋巴肉含量高的样本(40%~100%)分布在第一和第四象限,而淋巴肉含量低(0%~20%)的样本分布在第二和第三象

限(图6a)。结果表明当淋巴肉与猪肉混合后,混合样本组成发生了变化,淋巴肉掺入比例低至20%的样本能准确分类识别。 $R^2X$ 和 $R^2Y$ 分别表示所建模型对X和Y矩阵的解释率, $Q^2$ 表示模型的预测能力,当 $R^2$ 值接近1且 $Q^2$ 值大于0.6时,认为建立的模型是可靠的<sup>[20,21]</sup>。模型的 $R^2X$ 和 $R^2Y$ 分别0.796、0.954,表明模型具有良好的拟合性。同时,得到的 $Q^2$ 值为0.858,表明模型具有较好的预测能力。为避免数据出现过拟合现象,对模型进行置换检验,置换检验中 $Q^2$ 在Y轴上的截距小于0则认为模型无过度拟合。对OPLS-DA模型进行200次置换检验分析(图6b),结果显示置换检验产生的 $Q^2$ 的截距为-0.356,说明模型合理没有发生过拟合,模型可靠。

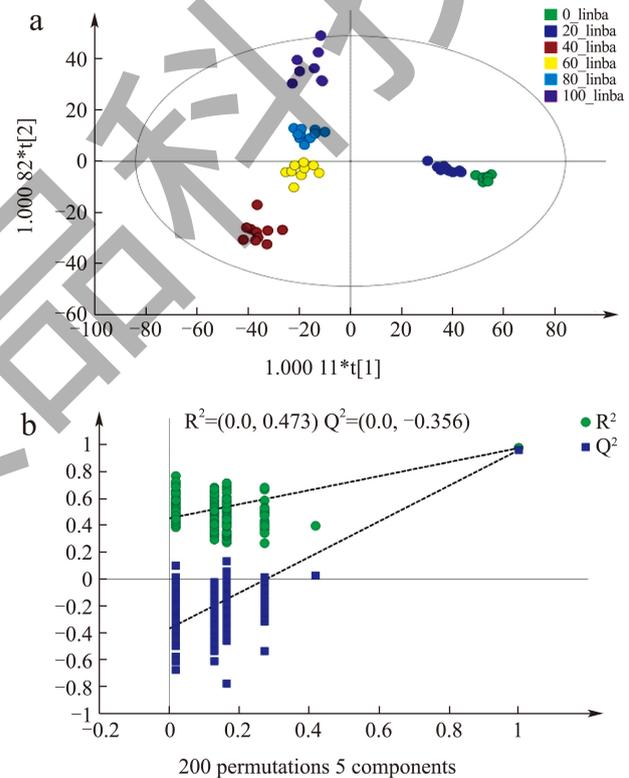


图6 不同掺杂比例样本组的OPLS-DA图和置换检验  
Fig.6 OPLS-DA plot and permutation test plot of sample groups with different doping ratios of lymphatic meat and pork

注:(a) OPLS-DA图;(b) 200次置换检验。

以上多元统计分析表明,利用炎症和免疫相关代谢物含量差异可以有效区分淋巴肉与猪肉样本,对于淋巴肉掺入比例超过20%的样本可以从猪肉样本中鉴别出来。

### 3 结论

在本研究中,为了快速表征免疫和炎症相关代谢物的变化,我们开发了一种基于UPLC-MS/MS

的 38 种炎症和免疫相关代谢物定量分析方法,并结合化学计量学构建判别模型,应用于淋巴肉的分析 and 鉴别。各目标化合物的在浓度范围内有良好的线性关系,除胍基乙酸、左旋肉碱和胆酸外,其余化合物的相关系数均大于 0.99。低浓度加标回收率范围为 50.3%~118.8%,高浓度加样回收率范围为 57.0%~127.0%,RSDs 均在 20% 以下,方法评价证明了所建立方法的有效性。根据所建立的方法,分析了淋巴肉和猪肉样本中免疫与炎症相关代谢物的含量,利用 PCA 和 OPLS-DA 模型可以将不同掺假比例的淋巴肉与猪肉有效区分。该方法可以为筛选淋巴肉和猪肉之间的差异标志物提供初步的数据支持,同时为鉴别淋巴肉提供一种新思路,有望为未来筛选能够有效判定淋巴肉掺杂的手段提供依据。

### 参考文献

- [1] 白常贵.生猪屠宰检疫中的淋巴结检验[J].四川畜牧兽医,2023,50(1):49-50.
- [2] GRISPOLDI L, KARAMA M, HADJICHALAMBOS C, et al. Bovine lymph nodes as a source of *Escherichia coli* contamination of the meat [J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 331:108715.
- [3] LI M, MALLADI S, HURD H S, et al. *Salmonella* spp. in lymph nodes of fed and cull cattle: Relative assessment of risk to ground beef [J]. Food Control, 2015, 50:423-434.
- [4] PORWOLLIK S, GENOVESE K, CHU W, et al. Neutral barcoding of genomes reveals the dynamics of *Salmonella* colonization in cattle and their peripheral lymph nodes [J]. Veterinary Microbiology, 2018, 220:97-106.
- [5] 中华人民共和国食品安全法(2021年修正版)[M]. 北京:人民出版社,2021.
- [6] ZHANG J, HU Q, YU Q, et al. 2.12-Metabolomics Analysis in Food Authentication[M]. Cifuentes A. Comprehensive foodomics. The Netherlands: Elsevier, 2021.
- [7] TAKEDA A, SALMI M, JALKANEN S. Lymph node lymphatic endothelial cells as multifaceted gatekeepers in the immune system [J]. Trends in Immunology, 2023, 44(1): 72-86.
- [8] LI L, WU J, ABDI R, et al. Lymph node fibroblastic reticular cells steer immune responses [J]. Trends in Immunology, 2021, 42(8): 723-734.
- [9] GRASSO C, PIERIE C, MEBIUS R E, et al. Lymph node stromal cells: subsets and functions in health and disease [J]. Trends in Immunology, 2021, 42(10): 920-936.
- [10] CAO M, HAN Q A, ZHANG J, et al. An untargeted and pseudotargeted metabolomic combination approach to identify differential markers to distinguish live from dead pork meat by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2020, 1610:460553.
- [11] LU X, DOU P, XIE X, et al. Development of a novel analytical method for inflammation and immunity-related metabolites in serum based on liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Talanta, 2021, 234:122631.
- [12] LIU Z, LU Y, ZHONG K, et al. The associations between endocrine disrupting chemicals and markers of inflammation and immune responses: A systematic review and meta-analysis [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022, 234:113382.
- [13] LI H, GENG W, HARUNA S A, et al. Identification of characteristic volatiles and metabolomic pathway during pork storage using HS-SPME-GC/MS coupled with multivariate analysis [J]. Food Chemistry, 2022, 373:131431.
- [14] YOO K H, PARK D H, ABD EL ATY A M, et al. Development of an analytical method for multi-residue quantification of 18 anthelmintics in various animal-based food products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2021, 11(1): 68-76.
- [15] YAN Y, LIAN K, ZHANG H, et al. Doping-control analysis of 14 diuretics in animal-derived foods using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Microchemical Journal, 2022, 174:106948.
- [16] ZHOU Z, CHEN Y, GAO Y, et al. Development of a high-coverage metabolome relative quantitative method for large-scale sample analysis [J]. Analytica Chimica Acta, 2020, 1109:44-52.
- [17] LIU X, ZHOU L, SHI X, et al. New advances in analytical methods for mass spectrometry-based large-scale metabolomics study [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2019, 121:115665.
- [18] LU D, XUE L, FENG C, et al. A systemic workflow for profiling metabolome and lipidome in tissue [J]. Journal of Chromatography A, 2019, 1589:105-115.
- [19] HU Q, ZHANG J, XING R, et al. Integration of lipidomics and metabolomics for the authentication of camellia oil by ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry coupled with chemometrics [J]. Food Chemistry, 2022, 373:131534.
- [20] WINDARSIH A, SURATNO, WARMIKO H D, et al. Untargeted metabolomics and proteomics approach using liquid chromatography-Orbitrap high resolution mass spectrometry to detect pork adulteration in *Pangasius hypophthalmus* meat [J]. Food Chemistry, 2022, 386:132856.
- [21] QIE M, LI T, LIU C C, et al. Direct analysis in real time high-resolution mass spectrometry for authenticity assessment of lamb [J]. Food Chemistry, 2022, 390:133143.