

基于超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱 高分辨质谱法结合化学计量学鉴别新鲜和 反复冻融牛肉

何启川^{1,2}, 杨敏莉¹, 王秀娟^{1*}, 陈相峰², 闫晓婷¹

[1. 中国检验检疫科学研究院, 食品安全研究所, 北京 100176;
2. 齐鲁工业大学(山东省科学院), 山东省分析测试中心, 济南 250014]

摘 要: **目的** 建立超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(ultra performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry, UPLC-Q-Orbitrap HRMS)结合化学计量学鉴别新鲜和反复冻融牛肉的分析方法。**方法** 样本经过前处理后, 采用 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 获得新鲜和反复冻融牛肉指纹图谱信息。运用 SIMCA 软件结合模式识别方法对数据进行分析, 建立新鲜和反复冻融牛肉的主成分分析(principal component analysis, PCA)模型和正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)模型。**结果** PCA 模型选择了前 10 个主要成分, 解释了总方差(R^2)的 70.9%, 其预测能力(Q^2)为 52.1%, 结果表明 PCA 模型可以对新鲜和反复冻融牛肉进行有效区分。OPLS-DA 模型中的 R^2 、 Q^2 均接近于 1, 说明模型的预测能力及准确性较好。采用变量重要性因子(variable importance factor, VIP)筛选出冻融过程中 11 种可能的差异代谢物, 进一步进行结构确证, 确定了乳酸、烟酸和酪胺为生物标志物。**结论** UPLC-Q-Orbitrap HRMS 结合化学计量学的方法可以用于新鲜和反复冻融牛肉的有效鉴别。**关键词:** 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法; 化学计量学; 牛肉; 冻融

Identification of fresh and frozen-thawed beef based on ultra performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry combined with chemometrics

HE Qi-Chuan^{1,2}, YANG Min-Li¹, WANG Xiu-Juan^{1*}, CHEN Xiang-Feng², YAN Xiao-Ting¹

[1. Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection & Quarantine, Beijing 100176, China; 2. Qilu University of Technology (Shandong Academy of Science), Shandong Analysis and Test Center, Jinan 250014, China]

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for fresh and frozen-thawed beef by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap HRMS) combined with chemometrics. **Methods** After pretreatment, UPLC-Q-Orbitrap HRMS was used to obtain fingerprint

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1601600)、泰山学者计划项目(陈相峰)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Programs of China (2017YFC1601600), and the Program for Taishan Scholars of Shandong Province (X. Chen)

*通信作者: 王秀娟, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为食品质量安全。E-mail: xjwangcaiq@163.com

*Corresponding author: WANG Xiu-Juan, Master, Associate Professor, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Ronghua South Road, Yizhuang Economic Development Zone, Beijing 100176, China. E-mail: xjwangcaiq@163.com

information of fresh and frozen-thawed beef. The SIMCA software combined with pattern recognition method was used to analyze the data, and the principal component analysis (PCA) model and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) model of fresh and frozen-thawed beef were established. **Results** The first 10 main components were selected in the PCA model, which explained 70.9% of the total variance (R^2), and the prediction ability (Q^2) was 52.1%. The results showed that the PCA model could effectively distinguish between fresh and frozen-thawed beef. R^2 and Q^2 in OPLS-DA model were both close to 1, indicating that the prediction ability and accuracy of the model were good. 11 kinds of possible differential metabolites during the frozen-thawed process were screened out using variable importance factor (VIP) for further structural confirmation, and lactic acid, nicotinic acid and tyramine were identified as biomarkers. **Conclusion** UPLC-Q-Orbitrap HRMS combined with chemometrics can be used to effectively identify fresh and frozen-thawed beef.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry; chemometrics; beef; frozen-thawed

0 引言

牛肉是重要的食用肉资源, 提供人体所需的高蛋白和营养物质, 例如必需氨基酸、不饱和脂肪酸、矿物质和维生素等^[1], 其品质已成为消费者关心的主要问题^[2]。目前, 冷冻存储已成为延长肉和肉制品保质期的流行方法。在现实情况中, 由于冷链技术不完善, 新鲜牛肉在储存、运输、销售过程中不可避免地会出现反复冻融现象^[3]。反复冻融会导致水份重新分配, 并影响肌肉组织中冰晶的大小和分布, 细胞冰晶的形成将引起严重的肌肉组织机械损伤, 并加速脂质氧化和蛋白质变性^[4]。因此反复冻融不利于肌肉的理化性质和质地, 例如汁液损失增加^[5]、嫩度降低^[6]、风味变差^[7]。在市场上新鲜牛肉的价格高于冷冻牛肉, 使得部分不法商贩用冻融牛肉冒充新鲜牛肉, 从中获取非法利益。消费者从感官上很难鉴别新鲜牛肉和冻融牛肉, 因此, 开发一种高效、简便、实用的鉴别方法尤为重要。

目前, 已有许多学者针对新鲜肉和冻融肉的鉴别进行了研究, 分析方法主要包括酶法^[8]、PCR 检测法^[9]、光谱法^[10]、生物成像法^[11]、感官评价法^[12]等。 β -羟基辅酶 A 脱氢酶(β -hydroxyacyl-coenzyme A-hydrogenase, HADH)是通常被检测的酶, 但 HADH 的释放需要冻藏温度达到 $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或者更低, 不能因为 HADH 的水平较低就断定肉没有经过冻融^[13]。PCR 检测技术的灵敏度会受到 DNA 断链和链间的影响, 因此 PCR 技术在检测过程中灵敏度较低^[14]。光谱法作为一种无损的检测方法, 在现场分析中具有巨大潜力。但样品表面的血渍、水渍等杂质会对光谱数据采集造成较大影响。生物成像在鉴别新鲜与冻融肉方面的性能取决于微观结构恶化程度与冻融条件之间的确切关系, 但在某些冻融条件下, 无法观察到对微观结构的明显破坏^[13]。感官检验结论会因感觉器官的局限性、人的主观性造成出入^[13]。因此, 有必要开发一种稳定、准确鉴别新鲜和冻融

牛肉的检测方法。

近年来, 针对海量数据挖掘与处理、分析信号的提取和分析方面, 化学计量学作为一种强大的手段, 解决了食品分析中现代仪器数据多维化、复杂化的难题, 已广泛应用于产地溯源、食品掺假鉴别等相关领域^[15-16]。超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(ultra performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry, UPLC-Q-Orbitrap HRMS)具有样本预处理简单、数据量丰富、选择性高、灵敏度高等优点, 可以根据检测要求选择不同的色谱分离类型和质谱类型, 具有更广泛的应用^[17]。目前, UPLC-Q-Orbitrap HRMS 与化学计量学的结合主要应用在不同种类肉掺假、风味变化等领域, 例如, 尤丽琴等^[18]利用超高效液相色谱-质谱法结合化学计量学检测滩羊宰后成熟过程中风味前体物质的变化, 而在新鲜肉和冻融肉鉴别方面未见报道。本研究以牛肉为研究对象, 采用 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 对牛肉进行分析, 并结合化学计量学筛选出牛肉在反复冻融过程中潜在的差异标志物, 从而开发出快速、简便的新鲜和冻融牛肉识别方法, 为牛肉的质量控制和市场上用冻融牛肉冒充新鲜牛肉的判别提供相关依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Q-Exactive-Ultimate 3000 超高效液相色谱-质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (3.0 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μm , 美国 Waters 公司); T25 均质器(德国 IKA 公司); Centrifuge 5430R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); VORTEX KB-3 涡旋混匀器(美国 Scientific Instruments 公司)。

甲醇(色谱纯, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 甲酸(色谱级, 北京百灵威科技有限公司); 实验用水由

Milli-Q 超纯水系统制备。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理

牛肉购于北京牛羊肉交易市场, 选用 2~3 岁鲁西黄牛中的公牛, 屠宰后排酸 12 h, 于实验室分割成 2 cm×4 cm×2 cm 条状, 去除脂肪和结缔组织后置于聚乙烯自封袋中, 随后于-20 °C 冰箱储存。将牛肉在-20 °C 条件下冷冻 72 h, 随后转移到 4 °C 冰箱中解冻 12 h 为 1 次冻融循环, 本研究一共做了 5 次冻融循环。每次冻融循环精确称量 3 g 样品于 50 mL 离心管并制备 8 个平行样本, 使用 30 mL(甲醇:水=9:1, V/V)进行均质提取, 均质 5 min, 转速 8000 r/min。均质后离心 15 min, 转速 10000 r/min, 离心后取上清液 2 mL 再次离心 15 min, 转速 14000 r/min。之后过 0.22 μm 微孔滤膜保存在进样小瓶中, 所有的样本均储存在-80 °C 冰箱中集中进样。

1.2.2 质控样本制备

质控样本(quality control, QC)用于考察分析方法的稳定性以及重复性。从每个样本中等量量取 10 μL 放入进样小瓶中并混合均匀, 制备 QC 样本。

1.2.3 色谱分析条件

柱温 40 °C; 流速 0.3 mL/min; 流动相组成 A: 甲醇(0.1%甲酸), B: 水(0.1%甲酸); 梯度洗脱条件见表 1。进样量为 5 μL, 自动进样器温度为 4 °C。

表 1 UPLC-Q-Orbitrap 梯度洗脱程序
Table 1 UPLC-Q-Orbitrap gradient elution program

进样时间/min	流速/(mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%
0.000	0.300	5.0	95.0
0.500	0.300	5.0	95.0
2.500	0.300	40.0	60.0
4.500	0.300	70.0	30.0
10.000	0.300	100.0	0
12.000	0.300	5.0	95.0
15.000	0.300	5.0	95.0

1.2.4 质谱条件

离子源: 加热电喷雾电离源 (heated-electrospray ionization, H-ESI), 离子传输管温度: 350 °C。扫描方式: 正、负离子模式同时扫描, 扫描范围为 70~1000 *m/z*。采用全扫描/数据依赖性质谱扫描模式 (full MS/data-dependent-MS2, Full MS/dd-MS2), 其中全扫描的分辨率设定为 70000 FWHM, 二级扫描的分辨率设定为 17500 FWHM。归一化碰撞能量(normalized collision energy, NCE): 15、30、和 45 eV, 喷雾电压: 3.6 kV, 鞘气流速: 40 Arb, 辅助气流速: 10 Arb。

1.2.5 数据处理和差异标志物的鉴定

使用 Xcalibur 3.0 对原始数据进行峰检测、峰比对、峰面积归一化和过滤等操作。将处理后的数据导入 Compound Discoverer 3.1 软件进行保留时间和质荷比的校正, 保留时间偏差设置为 12 s, 质量偏差为 5×10⁻⁶。选取响应强度大于 100000 的峰, 搜索 mzCloud 数据库进行代谢物鉴定。使用空白样本(甲醇:水=9:1, V/V)去除背景离子, QC 样本用作归一化。从 Compound Discoverer 3.1 软件鉴定的结果中筛选 *P*<0.05 的化合物导入 Simca-P (14.1)进行多元统计分析。主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)用来揭示不同冻融次数组与新鲜组代谢轮廓的变化, 变量重要性因子(variable importance factor, VIP)值通过 OPLS-DA 模型计算得出, 选取 VIP>1 及 *P*<0.05 为筛选差异标志物条件。

2 结果与分析

2.1 不同冻融次数牛肉与新鲜牛肉代谢轮廓分析

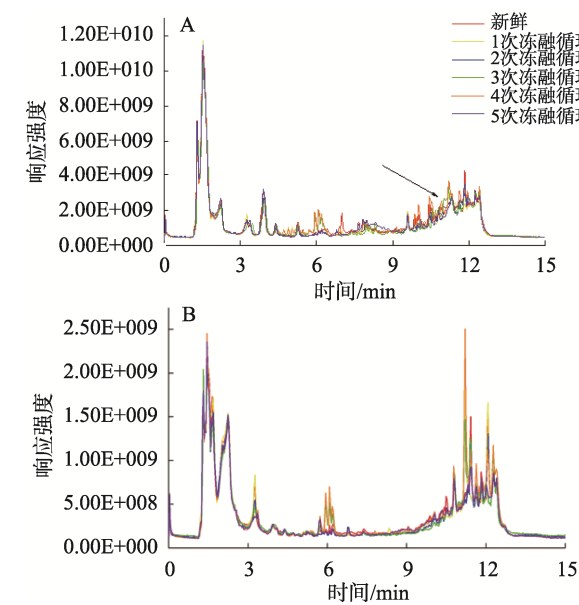
通过高通量、高灵敏度的 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术同时对正、负离子模式下新鲜和冻融 1 次、冻融 2 次、冻融 3 次、冻融 4 次、冻融 5 次的牛肉进行数据采集, 生成总离子流图。正、负离子模式下提取离子峰 5064 个, 可以发现新鲜组与不同冻融次数组峰的强度、数量及时间均有明显差异(图 1), 但仅从峰的改变很难直观地看出冻融过程中代谢物的变化, 需依据化学计量学技术对样品特征离子进行分析、筛选。

2.2 不同冻融次数牛肉与新鲜牛肉的化学计量学分析

PCA 作为无监督模型, 对获得的原始数据进行降维处理, 可将无序数据转变为有序信息^[19]。图 2 中每个点代表一个样本, 颜色相同的点表示来自同一组(新鲜组或某一冻融次数组)样本, 每个点之间的距离表示样本中代谢产物之间的差异或相似性。PCA 模型选择了前 10 个主要成分, 解释了总方差(*R*²)的 70.9%, 其预测能力(*Q*²)为 52.1%。PCA 结果表明, 新鲜组与不同冻融次数组可以有效区分, 区分程度随冻融次数的增多而升高。PCA 图中样本点总体分布是按冻融次数顺序排列的, 并且 5 个不同冻融次数组的点与新鲜组的点相距较远。这些数据表明, 反复冻融牛肉中的代谢物倾向于随冻融次数而变化, 这可能是由于冻融过程中的蛋白质变性或者脂质氧化程度不同。为了考察所建模型的数据稳定性和可靠性, 在分析序列中每隔 5 个样品加入一个 QC 样本, QC 样本在 PCA 分数图上较好地聚集表明在分析过程中仪器设备是稳定的, 数据是可靠的。

OPLS-DA 是一种有监督的模型, 解释了导致 2 组之

间显著差异的相关代谢物信息, 消除了与分类不相关的噪音信息^[20]。为了确定新鲜和不同冻融次数牛肉样本中代谢物之间的差异及变化趋势, 本研究分别选用新鲜组、冻融 3 次组和冻融 5 次组建立 2 个二元 OPLS-DA 模型。OPLS-DA 用于 2 组之间的对比, R^2Y 代表模型对 Y 变量的解释性, Q^2 代表模型的预测能力。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^[21]。表 2 中的数据表明, 2 个 OPLS-DA 模型是可靠的, 并且具有良好的预测能力。



注: A: 正离子模式; B: 负离子模式。
图 1 新鲜与冻融 1 次、2 次、3 次、4 次、5 次牛肉样品的色谱图

Fig.1 Chromatograms of fresh and 1, 2, 3, 4, 5 frozen-thawed cycles beef samples

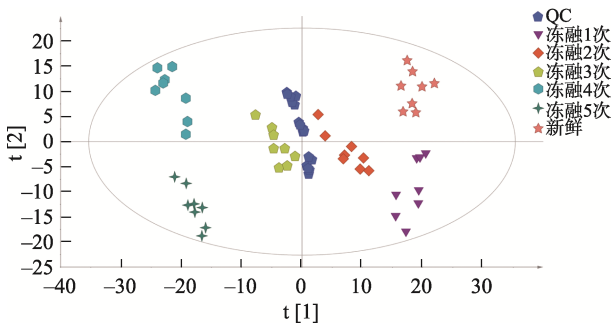


图 2 新鲜组与不同冻融次数组的 PCA 得分图
Fig.2 PCA score chart of fresh and different frozen-thawed times groups

通过 Hotelling's T^2 图进一步研究了模型中的异常值, 超过置信区间界限 95%和 99%被认为是可疑和强异常值, 图

3 显示 2 个模型中均无超过置信区间 95%的点, 无异常值存在。

对 OPLS-DA 模型进行置换检验, 判断模型是否发生过度拟合。置换检验中, 模型右侧 Q^2 值在 Y 轴上的截距小于 0, 则认为 OPLS-DA 模型较好, 无过度拟合现象^[22]。200 次循环迭代后的置换检验结果如图 4, 说明模型无过拟合现象, 有良好的预测能力。

2.3 差异标志物的鉴定与筛选

通常认为 OPLS-DA 模型计算的 VIP 值及单变量分析 P 值为选取化合物的指标, 本研究选取 $VIP>1$ 及 $P<0.05$ 为筛选差异标志物条件。为了保证所选标志物是稳定、可靠的, 需是 2 个 OPLS-DA 模型所筛选的共有代谢物。根据图 5 及表 3, 初步筛选出 11 种潜在的差异代谢物, 进一步通过二级质谱数据与 mzCloud 数据库比对, 确证了乳酸、烟酸和酪胺为差异标志物。乳酸与肉的嫩度相关^[23], 烟酸与肉色相关^[24], 酪胺为风险成分^[25]。

表 2 不同冻融次数组与新鲜组比较的 R^2 、 Q^2
Table 2 R^2 and Q^2 of different frozen-thawed times groups compared with fresh group

不同冻融次数组 VS 新鲜组	R^2Y	Q^2
冻融 3 次组 VS 新鲜组	0.997	0.987
冻融 5 次组 VS 新鲜组	0.995	0.987

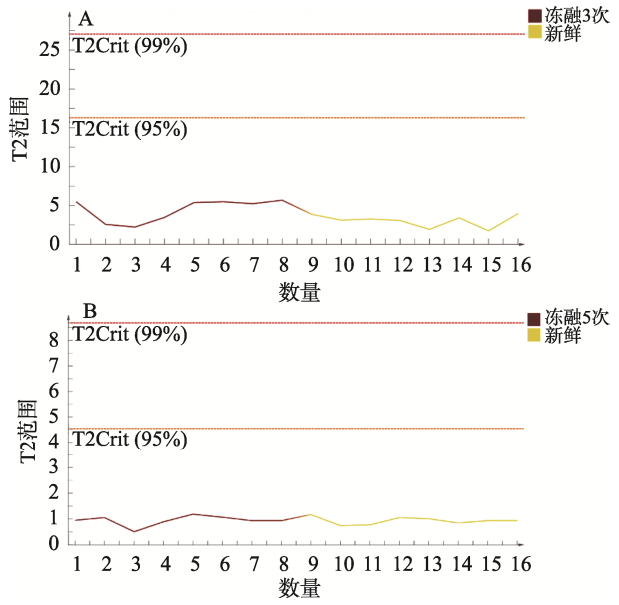


图 3 新鲜组与冻融 3 次组(A)、冻融 5 次组(B) OPLS-DA 模型 Hotelling's T^2 图
Fig.3 Hotelling's T^2 charts of OPLS-DA model in fresh group and 3 frozen-thawed cycles group (A) and 5 frozen-thawed cycles group (B)

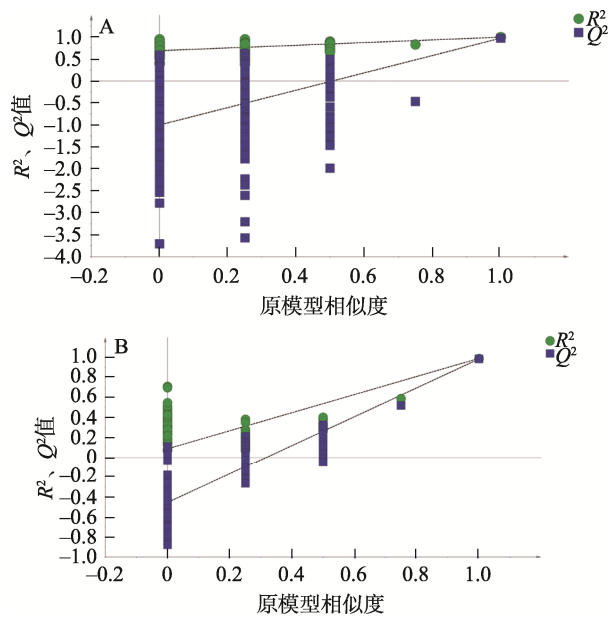


图 4 新鲜组与冻融 3 次组(A)、冻融 5 次组(B) OPLS-DA 模型置换检验图

Fig.4 OPLS-DA model replacement test diagrams of fresh group, 3 frozen-thawed cycles group (A) and 5 frozen-thawed cycles group (B)

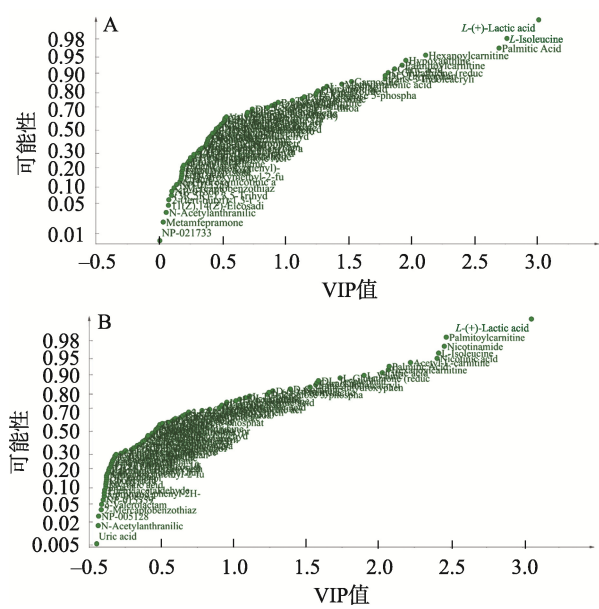


图 5 新鲜组与冻融 3 次组(A)、冻融 5 次组(B) OPLS-DA 模型 VIP 预测值

Fig.5 VIP prediction values of OPLS-DA model in fresh group, 3 frozen-thawed cycles group (A) and 5 frozen-thawed cycles group (B)

表 3 新鲜和不同冻融次数牛肉差异标志物 VIP 和 P 值

Table 3 VIP and P values of different markers between fresh beef and beef with different frozen-thawed times

代谢物	电离模式	分子式	相对分子质量	变量值重要性 VIP		P 值	
				新鲜 VS 冻融 3 次	新鲜 VS 冻融 5 次	新鲜 VS 冻融 3 次	新鲜 VS 冻融 5 次
乳酸	[M-H] ⁻	C ₃ H ₆ O ₃	89.02441	3.02	3.06	4.2E-02	6.0E-03
酪胺	[M+H] ⁺	C ₈ H ₁₁ NO	138.09102	1.06	1.02	1.0E-15	1.0E-15
软脂酸	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	274.27313	2.70	2.08	2.2E-04	2.0E-05
烟酸	[M+H] ⁺	C ₆ H ₅ NO ₂	124.03916	1.31	2.41	1.0E-15	1.0E-15
L-缬氨酸	[M+H] ⁺	C ₅ H ₁₁ NO ₂	118.08084	1.25	1.90	8.3E-03	8.1E-07
酪氨酸	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₁ NO ₃	182.08084	1.33	1.11	1.0E-15	1.0E-15
L-异亮氨酸	[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132.10160	2.76	2.42	8.1E-06	7.9E-10
次黄嘌呤	[M+H] ⁺	C ₅ H ₄ N ₄ O	137.04552	1.96	1.04	1.6E-03	5.9E-03
色氨酸	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	188.07011	1.8	1.59	1.0E-15	1.0E-15
柠檬酸	[M-H] ⁻	C ₆ H ₈ O ₇	191.01973	1.87	2.03	1.0E-15	1.0E-15
肌肽	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₄ N ₄ O ₃	227.11308	1.53	1.58	2.6E-02	4.0E-02

乳酸是一种普遍存在于生物体内的有机弱酸，是一种无氧代谢的产物。动物死后，在贮藏期间，糖原含量降低，氧气供给停止，从而促进了无氧酵解的发生，最终形成了乳酸并积累^[26]。图 6A 表明，从新鲜到冻融 1 次，乳酸的含量呈上升趋势，可能是刚屠宰后牛肉的肌细胞尚未死亡，只能进行无氧呼吸，从而造成大量乳酸的生成。从冻融 2 次到冻融 5 次乳酸含量逐渐下降，可能是因为糖原酵解酶活性降低，

导致了乳酸生成速率小于乳酸降解的速率。烟酸是维生素 B₃，又名维生素 PP，也称抗癞皮病维生素，包括尼克酸和尼克酰胺(烟酸和烟酰胺)，是水溶性维生素^[27]。烟酸的含量与肉色直接相关，而肉色是衡量肉品质的一个重要指标，直接影响到消费者购买欲。JIANG 等^[28]研究发现烟酸能够显著降低肉鸡的亮度(L*)、红度(a*)和黄度(b*值)。烟酸也是辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide，

NAD⁺/NADH)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP⁺/NADPH)的重要前体物质, NAD⁺用于糖酵解, 会抑制乳酸代谢途径, 从而降低乳酸的生成^[29]。图 6B 表明, 在整个冻融期间烟酸的含量一直上升。生物胺是一类具有生物活性的小分子化合物, 由前体氨基酸脱羧形成。大量研究表明生物胺存在于许多不同的食品中, 例如水产品 and 肉类产品^[30]。酪胺是其中的一种微量

胺, 低浓度的酪胺对人体无害, 由于运输、储藏条件的不当会逐渐积累至对人体有害的浓度, 美国的食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 已规定鱼中酪胺含量不得超过 100 mg/kg^[31]。图 6C 表明, 在新鲜肉至冻融 2 次期间, 酪胺的含量缓慢上升, 冻融 3 次后酪胺的含量急剧增加。新鲜牛肉在存储、运输、消费过程中冻融次数最好不要超过 2 次。

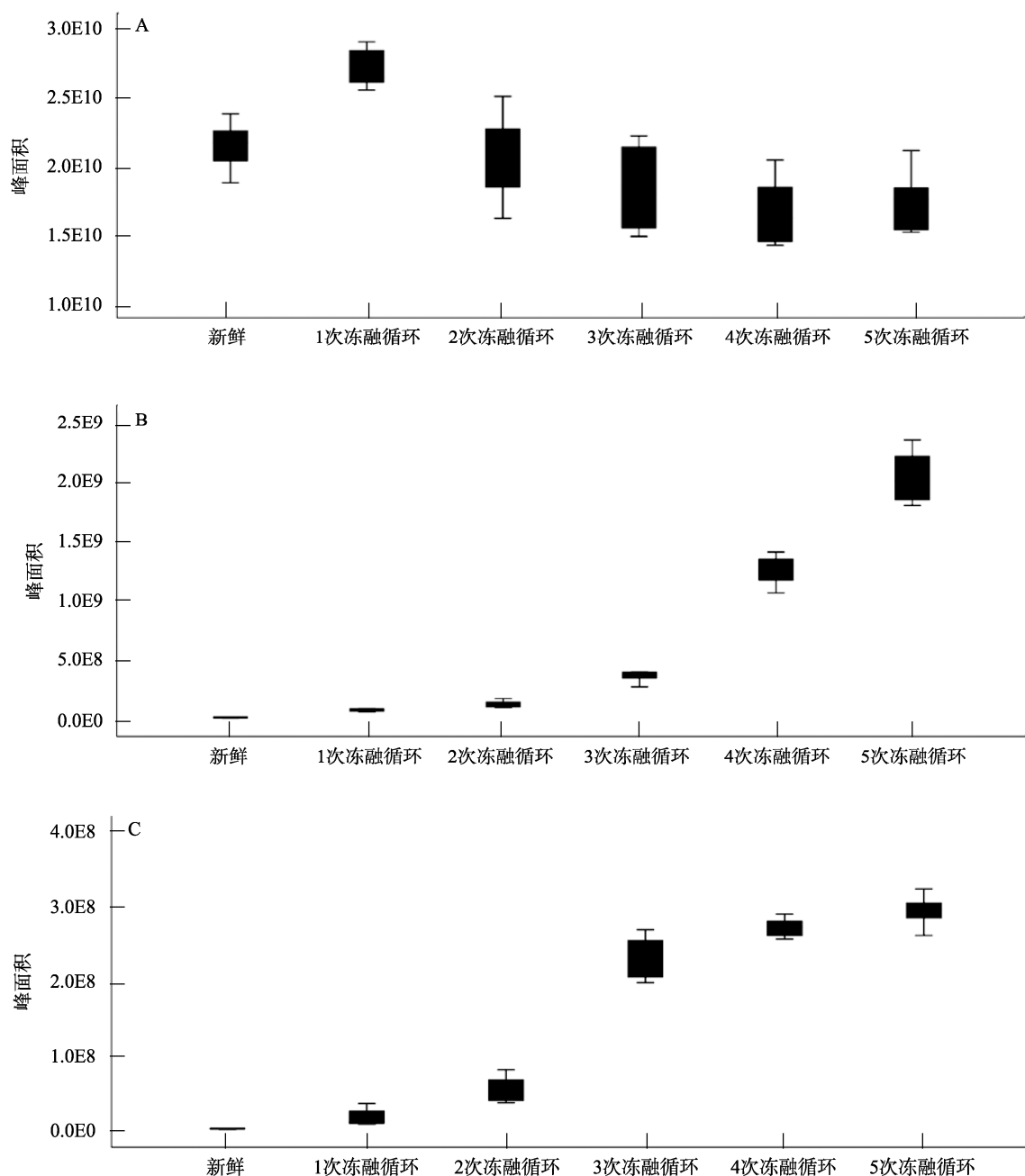


图 6 乳酸(A)、烟酸(B)和酪胺(C)相对含量变化趋势

Fig.6 Variation trends of relative content of lactic acid (A), nicotinic acid (B), tyramine (C)

3 结论与讨论

本研究开发了一种基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 结合化学计量学的分析方法,对新鲜和反复冻融牛肉进行了鉴别。利用 PCA 模型可以将新鲜与不同冻融次数的牛肉有效区分,利用 OPLS-DA 模型中的 VIP 值筛选出乳酸、烟酸、酪胺 3 种差异标志物,对 3 者的含量随着冻融次数的变化规律进行了研究。结果表明,乳酸相对含量在冻融期间呈现先上升后下降的趋势,烟酸和酪胺相对含量在冻融期间逐渐上升。未来的研究中,将继续获取不同品种、不同部位的牛肉进行验证。该方法可以为筛选新鲜肉和冻融肉之间的差异标志物提供初步的数据支持,同时为鉴别来源于其他哺乳动物的新鲜肉和冻融肉提供一种新思路,并通过对生物标志物的准确定量,用于评估食用肉的质量。该方法的拓展对于未来食品质量研究具有一定意义。

参考文献

- [1] BIESALSKI HK. Meat as a component of a healthy diet are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? [J]. Meat Sci, 2005, 70(3): 509–524.
- [2] 熊偲皓, 王东阳, 胡志全. 我国牛肉供需及国际竞争力研究[J]. 中国农业资源与区划, 2020, 41(10): 89–100.
XIONG SH, WANG DY, HU ZQ. Research on china's beef supply, demand and international competitiveness [J]. Chin J Agric Res Reg Plan, 2020, 41(10): 89–100.
- [3] 李慧芝, 谢含仪, 赵燕芳, 等. 反复冻融过程对肉类氧化关键指标的影响[J]. 食品科技, 2020, 45(11): 102–109.
LI HZ, XIE HY, ZHAO YF, *et al.* Effect of multiple freeze-thaw cycles on the key oxidation indicators of meat samples [J]. Food Sci Technol, 2020, 45(11): 102–109.
- [4] ZHANG MC, LI FF, DIAO XP, *et al.* Moisture migration, microstructure damage and protein structure changes in porcine longissimus muscle as influenced by multiple freeze-thaw cycles [J]. Meat Sci, 2017, 133: 10–18.
- [5] TEUTEBERG V, KLUTH IK, PLOETZ M, *et al.* Effects of duration and temperature of frozen storage on the quality and food safety characteristics of pork after thawing and after storage under modified atmosphere [J]. Meat Sci, 2021, 174: 108419.
- [6] HC A, SS A, EYJ B, *et al.* Comparison of beef quality influenced by freeze-thawing among different beef cuts having different muscle fiber characteristics [J]. Meat Sci, 2020, 169: 108206.
- [7] PINTO VS, FLORES IS, FERRI PH, *et al.* NMR approach for monitoring caranha fish meat alterations due to the freezing-thawing cycles [J]. Food Anal Method, 2020, 13(12): 2330–2340.
- [8] BOERRIGTER-EENLING R, ALEWIJN M, WEESEPOEL Y, *et al.* New approaches towards discrimination of fresh/chilled and frozen/thawed chicken breasts by HADH activity determination: Customized slope fitting and chemometrics [J]. Meat Sci, 2017, 126: 43–49.
- [9] BELLETE B, FLORI P, HAFID J, *et al.* Influence of the quantity of nonspecific DNA and repeated freezing and thawing of samples on the quantification of DNA by the Light Cycler® [J]. J Microbiol Meth, 2003, 55(1): 213–219.
- [10] HASSOUN A, SHUMILINA E, DI DF, *et al.* Emerging techniques for differentiation of fresh and frozen-thawed sea foods: Highlighting the potential of spectroscopic techniques [J]. Molecules, 2020, 25(19): 4472.
- [11] CHENG WW, SUN DW, PU HB. Characterization of myofibrils cold structural deformation degrees of frozen pork using hyperspectral imaging coupled with spectral angle mapping algorithm [J]. Food Chem, 2018, 239: 1001–1008.
- [12] GOMES CL, SILVA TJ, PFLANZER SB, *et al.* Impact of frozen temperature and thawing methods on the Brazilian sensory profile of nellore beef [J]. Sci Agric, 2021, 78(6): e20200067.
- [13] BALLIN NZ, LAMETSCH R. Analytical methods for authentication of fresh vs. thawed meat-A review [J]. Meat Sci, 2008, 80: 151–158.
- [14] PARK JH, HYUN CK, JEON SK, *et al.* Use of the single cell gel electrophoresis assay (Comet assay) as a technique for monitoring low-temperature treated and irradiated muscle tissues [J]. Int J Food Sci Technol, 2000, 35: 555–561.
- [15] 张宏蕊, 张九凯, 韩建勋, 等. 基于代谢组学技术的玛咖产地鉴别[J]. 食品科学, 2019, 40(20): 217–226.
ZHANG HR, ZHANG JK, HAN JX, *et al.* Identification of geographical origin maca based on metabolomics [J]. Food Sci, 2019, 40(20): 217–226.
- [16] DUPONT MF, ELBOURNE A, COZZOLINO D, *et al.* Chemometrics for environmental monitoring: A review [J]. Anal Methods, 2020, 12(38): 4597–4620.
- [17] MAKAROV A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis [J]. Anal Chem, 2000, 72(6): 1156–1162.
- [18] 尤丽琴, 罗瑞明, 苑昱东, 等. 超高效液相色谱-质谱法检测滩羊宰后成熟过程中风味前体物质的变化[J]. 食品科学, 2020, 41(8): 171–176.
YOU LQ, LUO RM, YUAN YD, *et al.* Changes in flavor precursors during postmortem ageing of tan sheep meat as determined by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Food sci, 2020, 41(8): 171–176.
- [19] LI Y, QUAN W, WANG JH, *et al.* Effects of ten vegetable oils on heterocyclic amine profiles in roasted beef patties using UPLC-MS/MS combined with principal component analysis [J]. Food Chem, 2021, 34: 128996.
- [20] THÉVENOT EA, ROUX A, XU Y, *et al.* Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses [J]. J Proteome Res, 2015, 14(8): 3322–3335.
- [21] WEN DL, LIU Y, YU Q. Metabolomic approach to measuring quality of chilled chicken meat during storage [J]. Poult Sci, 2020, 99(5): 2543–2554.
- [22] 张琪, 董旭阳, 许秀丽, 等. 基于靶向代谢组学法鉴别真伪海鸭蛋[J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32(3): 250–256.
ZHNG Q, DONG XY, XU XL, *et al.* Authentication method of sea duck

- eggs based on targeted metabolomics [J]. *Chin J Food Hyg*, 2020, 32(3): 250–256.
- [23] 王可, 祝超智, 赵改名, 等. 乳酸嫩化牦牛肉的工艺优化[J]. *肉类研究*, 2019, 33(4): 13–18.
- WANG K, ZHU CZ, ZHAO GM, *et al*. Process optimization for yak meat tenderization by lactic acid [J]. *Meat Sci*, 2019, 33(4): 13–18.
- [24] REAL DE, NELSEN JL, UNRUH JA, *et al*. Effects of increasing dietary niacin on growth performance and meat quality in finishing pigs reared in two different environments [J]. *J Anim Sci*, 2002, 80(12): 3203–3210.
- [25] YANG B, LIU XJ. Metabolite profile differences among different storage time in beef preserved at low temperature [J]. *J Food Sci*, 2019, 84(11): 3163–3171.
- [26] 朱学伸. 动物宰后肌肉成熟期间乳酸含量与 pH 的变化[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
- ZHU XS. Changes of pH value and lactic acid content in muscle during aging after postmortem [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007.
- [27] 韩奕奕, 王霞, 马颖清, 等. 乳粉中烟酸和烟酰胺含量测定能力验证结果与分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(17): 5879–5885.
- HAN YY, WANG X, MA YQ, *et al*. Results and analysis of proficiency testing for the determination of nicotinic acid and nicotinamide content in milk powder [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(17): 5879–5885.
- [28] JIANG RR, ZHAO GP, CHEN JL, *et al*. Effect of dietary supplemental nicotinic acid on growth performance, carcass characteristics and meat quality in three genotypes of chicken [J]. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 2011, 95(2): 137–145.
- [29] FELIPE F, KLEEREBEZEM M, WMD VOS, *et al*. Cofactor engineering: A novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled expression of NADH oxidase [J]. *J Bacteriol*, 1998, 180(15): 3804–3808.
- [30] 戴莹, 宋海勇, 吴曦, 等. 肉制品中生物胺的形成、检测和控制研究进展[J]. *肉类研究*, 2020, 34(11): 89–97.
- DAI Y, SONG HY, WU X, *et al*. Recent progress in the formation, detection and control of biogenic amines in meat products [J]. *Meat Res*, 2020, 34(11): 89–97.
- [31] HU Y, HUANG ZY, LI J, *et al*. Concentrations of biogenic amines in fish, squid and octopus and their changes during storage [J]. *Food Chem*, 2012, 135(4): 2604–2611.

(责任编辑: 张晓寒 郑丽)

作者简介



何启川, 硕士研究生, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: 1562604567@qq.com



王秀娟, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为食品质量安全。
E-mail: xjwangcai@163.com