

TripleTOF® 5600⁺ 质谱系统在浆果果汁掺假代谢组学中的应用

Metabolomic Approach for the Authentication of Berry Fruit Juice by TripleTOF® 5600⁺

李志远, 张九凯, 程海燕, 刘冰洁, 李立军, 郭立海
Li Zhiyuan, Zhang Jiukai, Cheng Haiyan, Liu Bingjie, Li Lijun, Guo Lihai

SCIEX中国应用支持中心(北京)
SCIEX China, Asia Pacific application support center (Beijing)

Key Words: Metabolomic, Berry fruit juice, Authentication, Adulteration, PeakView®, MasterView™, MarkerView™, TripleTOF® 5600⁺

简介

以蓝莓和蔓越莓汁为代表的浆果果汁因其营养和健康益处而越来越受欢迎。然而在市场上, 在浆果果汁中掺入便宜的替代品是经常发生的。本研究建立了一种利用TripleTOF® 5600⁺质谱系统对浆果果汁进行掺假鉴定的组学研究方法。通过对已知果汁特征标记物如黄酮类化合物、花青素等的组学分析, 可以很好地分离出掺假果汁和浆果果汁。进行非靶向代谢组学分析时, 进行统计学分析, 采用主成分分析法对蓝莓汁、蔓越莓汁及其掺假苹果汁、葡萄汁进行了鉴别。通过对不同果汁样品中标记物的比较, 筛选出18种鉴别浆果果汁及其掺假物的特征标记物。这些结果表明, 将非靶向代谢组学方法与靶向代谢组学的方法相结合, 对浆果果汁的掺假鉴定具有很大的意义。

技术特点

1. 本实验通过TOF MS-IDA-MS/MS模式采集数据(见图1), 可以实现一针进样采集数据, 就可以获得组学分析中需要鉴定的化合物的高分辨一级母离子数据和高分辨二级子离子数据。该方法简单、快速, 无需二次采集数据, 可以大大提高组学样品采集的效率。
2. PeakView®和MasterView™软件可以对化合物进行快速的筛查鉴定, 利用保留时间、精确质量数、同位素模式和MS/MS谱库搜索等方面的信息, 可以实现自动化数据筛查和鉴定。此外, 结

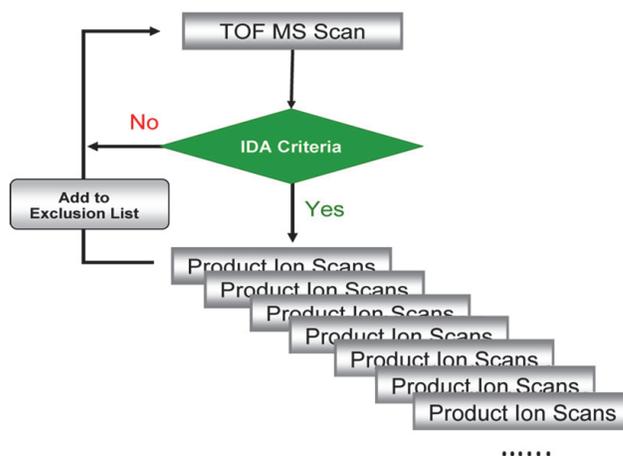


图1. TOF MS-IDA-MS/MS扫描模式。

合Chemspider在线数据库的支持, 都可以大大提升无论是靶向或是非靶向化合物的快速鉴定, 提高工作效率。

3. 对于差异性分析, MarkerView™软件可以帮助用户进行多种的统计学数据处理模式, 通过T检验等统计学手段找到影响最大的差异组分, 进行标记, 为组学分析提供有力的数据支持。

样品及样品处理^[1]

实验共收集了山东、辽宁、贵州、吉林、江苏等地水果种植基地的蓝莓(n = 18)、蔓越莓(n = 18)、苹果(n = 30)、葡萄(n = 30)共96个样本, 其都经当地种质资源专家鉴定。然后, 在实验室里用这些水果相应地配制出新鲜的果汁。其他还收集了24种浓缩果汁, 包括12种蓝莓果汁和12种蔓越莓果汁, 均购自中国零售市

场，并通过DNA条形码方法（数据未显示）验证了这些果汁的品种真伪。分别以10%、20%、30%、40%、50%（体积比）的比例将实验室制得的苹果汁和葡萄汁加入蓝莓汁和蔓越莓汁中，模拟掺假样品。

以实验室生产的鲜果汁为原料，随机选择鲜榨蓝莓汁、蔓越莓汁、苹果汁和葡萄汁，每种果汁的浓度均为25% (v/v)，共制备了12个质量控制（QC）样品。所有样品（50 mL）室温下离心20分钟，过0.2 μm PTFE膜后，所有样品用去离子水稀释20倍，置于-80°C保存，直至使用。

仪器设备：

ExionLC™ 液相系统+TripleTOF® 5600*质谱系统



色谱条件：

色谱柱： Phenomenex C18, 2.1 × 100 mm, 2.6 μm
 流动相A： 水（含0.1%甲酸）
 流动相B： 甲醇（含0.1%甲酸）
 柱温： 40 °C
 进样量： 2 μL

采用梯度洗脱，如下所示

Time (min)	Flow rate (mL/min)	B%
0.0	0.3	2
2.0	0.3	2
14.0	0.3	95
17.0	0.3	95
17.1	0.3	2
20.0	0.3	2

质谱条件：

源参数	ESI源	正、负离子模式
	CUR	25 psi
	GS1	50 psi
	GS2	50 psi
	IS	+5500 V、-4500 V
	TEM	550°C
TOFMS	Declustering Potential (DP)	60 eV
	TOF Mass Range	50-1000 Da
IDA mode		
TOFMSMS	MS/MS Mass Range	50-1000 Da

数据分析工具：



图2. PeakView®、MasterView™和MarkerView™软件。

1. 通过使用MarkerView™软件，通过主成分分析(PCA)或主成分-判别分析(PCA-DA)方法处理在未分类工作流程中采集的数据。此方法可比较多个样品的数据，揭示数据集间的分组，并在得分图中用图形显示分组情况。从载荷图中可以获得样品聚类有用的信息，并且能够说明被标记物向上或向下调节。主成分变量分组可帮助发现谱峰之间的关系，并将相关的谱峰手动或自动分配到一个特定组中。为了突出关系，这些相关峰组在荷载图中以不同颜色显示。当存在两个或更多的预定样品类别时，T检验分析技术非常有用，能够帮助确定到底是哪些化合物引起类别间的显著差异。
2. 通过PeakView® 软件快速获得数据解析，利用保留时间、精确质量数、同位素模式和 MS/MS 谱库搜索等方面的信息，通过处理 LC-MS/MS 数据实现峰自动筛查和鉴定。
3. 通过MasterView™ 软件根据靶向化合物名单准确筛查未知样品，从而完成快速鉴定。此外，结合Chemspider数据库的支持，同样可以快速高效的完成非靶向化合物的鉴定。

化合物鉴定

从文献中收集关于浆果果汁样品中一些已知化合物的信息。总共筛选出43种化合物作为目标筛查的一部分，包括果汁中常见的花青素、黄酮类化合物和酚酸等（如表1所示）。

表1. 文献中报道的浆果中提取的化合物列表^[1]。

no.	metabolites	reference	no.	metabolites	reference
	anthocyanins		25	kaempferol-3-O-rutinoside	25
1	delphinidin 3-O-galactoside	23, 24	26	luteolin 3-O-glucoside	26
2	delphinidin 3-O-glucoside	23-25	27	luteolin 3-O-galactoside	26
3	delphinidin 3-O-arabinoside	23, 24	28	luteolin 3-O-arabinoside	26
4	cyandin 3-O-galactoside ^a	23-25, 27	29	vitexin	26
5	cyandin 3-O-glucoside	23-26	30	laricitrin 3-O-hexoside	28
6	cyandin 3-O-arabinoside	23, 25	31	procyanidin B	24
7	petunidin 3-O-galactoside	23-25	32	catechin	24, 27
8	petunidin 3-O-glucoside	23	33	epicatechin	24, 27
9	petunidin 3-O-arabinoside	23, 24		phenolic acids	
10	petunidin 3-O-xyloside	25	34	chlorogenic acid	23, 25
11	peonidin 3-O-galactoside	23, 24	35	coumaroylquaric acid	24, 25
12	peonidin 3-O-glucoside	23-25	36	coumaroylquinic acid	24, 25
13	peonidin 3-O-arabinoside	24, 25	37	hydroxyrosolic acid	27
14	malvidin 3-O-galactoside	23-25	38	p-hydroxybenzoic acid	24, 25
15	malvidin 3-O-glucoside	23, 24	39	salicylic acid	28
16	malvidin 3-O-arabinoside	23-25	40	m-coumaric acid	25, 28
	flavonols		41	caffeic acid	25, 27
17	myricetin-pentoylhexoside	23, 25	42	ferulic acid	25, 27
18	myricetin-hexoside	23, 25	43	sinapic acid	25, 28
19	quercetin 3-O-galactoside	23, 25			
20	quercetin 3-O-glucoside ^a	23-25, 27			
21	quercetin 3-O-arabinoside ^a	23, 25			
22	kaempferol-3-O-galactoside	25			
23	kaempferol-3-O-glucoside	25			
24	kaempferol-3-O-arabinoside	25			

通过PeakView[®]软件和MasterView[™]软件共同对数据进行靶向和非靶向化合物的筛查鉴定，通过浆果果汁样品中各化合物的强度、信噪比、同位素匹配等信息获得所有初步鉴定的MS谱图，结合SCIEX高分辨二级数据库和Chemspider在线数据库进行比对。同时通过30种市售标准品如quercetin 3-β-D-glucoside, trans-cinnamaldehyde, cyanidin 3-O-glucoside, kaempfero等化合物使用相同的条件来进一步验证。最终鉴定出花青素、黄酮类化合物、酚酸类化合物三大类共41种化合物（如表2所示）。

组学分析

采用非靶向代谢组学分析，以获得有关果汁以及掺假果汁代谢产物的全面信息。对不同种类的果汁进行了20分钟的色谱梯度洗脱，保证了最大限度的色谱分离性能。

果汁样品在正离子模式下的基峰色谱图（BPC）如图2所示。其色谱峰数量、峰位、峰高有显著差异。4组果汁样品的化学成分差异在5-10和11-16 min之间。通过数据挖掘和比对，选择代表单同位素离子的峰共4088个，进行统计学分析。

通过MarkerView[™]软件，采用PCA-DA统计模型，根据前期实验的结果，在代谢组学分析中只使用正离子模式，这是因为在正离子模式下得到的样品聚类更明显，化合物的数量也比在负离子模式下得到的多。此外，为了研究数据的可靠性，使用QC样品对色谱和质谱数据质量进行了验证。在PCA-DA统计模式下QC样品间呈紧密的聚类关系，且QC样品的位置在坐标原点附近。这些结果

表2. 41种鉴定的化合物^[1]。

no.	metabolites	formula	m/z (MS) ^a	m/z (MS/MS)	mass error (ppm)	RT ^b (min)
				anthocyanin		
1	delphinidin 3-O-galactoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₂	465.1031	303.0484	-1.2	9.1
2	delphinidin 3-O-glucoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₂	465.1726	303.0498	-0.3	9.2
3	delphinidin 3-O-arabinoside	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₁	435.0914	303.0493	1.0	9.6
4	cyandin 3-O-galactoside ^a	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₁	449.1063	287.0561	2.1	7.1
5	cyandin 3-O-glucoside ^a	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₁	449.1066	287.0545	0.6	9.5
6	cyandin 3-O-arabinoside	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₀	419.0971	287.0543	0.5	9.7
7	petunidin 3-O-galactoside	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₂	479.1168	317.0645	1.6	7.3
8	petunidin 3-O-glucoside	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₂	479.1195	317.0661	-0.2	9.8
9	petunidin 3-O-arabinoside	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₁	449.1063	317.0653	-1.6	10.3
10	petunidin 3-O-xyloside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₁	449.1071	317.0656	-1.0	9.9
11	peonidin 3-O-galactoside	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₁	463.1238	301.0690	-0.2	7.2
12	peonidin 3-O-glucoside	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₁	463.0847	301.0690	-1.3	7.6
13	peonidin 3-O-arabinoside	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₀	433.1078	317.0647	1.2	9.5
14	malvidin 3-O-galactoside ^a	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₂	493.1341	331.0803	0.9	6.7
15	malvidin 3-O-glucoside	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₂	493.1997	331.0823	-0.7	7.8
16	malvidin 3-O-arabinoside	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₁	463.1229	331.0808	-0.8	8.7
				flavonols		
17	myricetin-pentoylhexoside	C ₃₂ H ₃₄ O ₁₇	613.1387	481.0992	0.3	1.6
18	myricetin-3-O-hexoside ^a	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	481.0969	319.0450	-0.4	6.7
19	quercetin 3-O-galactoside ^a	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₂	465.0954	303.0523	1.2	9.2
20	quercetin 3-O-glucoside ^a	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₂	465.0853	303.0640	0.2	14.5
21	quercetin 3-O-arabinoside ^a	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₁	435.0923	303.0521	-0.5	15.1
22	kaempferol-3-O-glucoside ^a	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	449.1079	287.0533	0.1	6.4
23	kaempferol-3-O-glucoside ^a	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	449.1630	287.0533	0.1	7.0
24	kaempferol-3-O-arabinoside	C ₂₀ H ₂₂ O ₁₀	419.0971	287.0543	-0.3	7.5
25	kaempferol-3-O-rutinoside ^a	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.1638	287.0546	0.4	9.2
26	luteolin 3-O-glucoside	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	449.1066	287.0533	1.4	6.9
27	luteolin 3-O-galactoside	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	449.1630	287.0533	-1.5	6.7
28	luteolin 3-O-arabinoside	C ₂₀ H ₂₂ O ₁₀	419.0971	287.0543	-0.2	7.5
29	vitexin	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	433.1130	433.1130	-1.8	7.7
30	laricitrin 3-O-hexoside	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₃	495.1126	333.0595	-0.1	10.1
31	procyanidin B	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₂	579.1502	287.0565	0.6	9.3
32	catechin ^a	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	291.0868	165.0559	0.3	6.2
33	epicatechin ^a	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	291.0868	165.0559	0.2	7.2
				phenolic acids		
34	chlorogenic acid ^a	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	355.1016	191.0554	1.1	18.5
35	coumaroylquaric acid	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	357.0644	165.0560	0.8	6.7
36	coumaroylquinic acid	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	339.1074	165.0546	0.3	7.2
37	salicylic acid ^a	C ₇ H ₆ O ₃	171.1469	139.0317	1.2	5.0
38	m-coumaric acid ^a	C ₉ H ₈ O ₃	165.0474	147.0438	-1.2	6.5
39	caffeic acid ^a	C ₉ H ₈ O ₄	181.0423	117.0363	0.5	7.4
40	ferulic acid ^a	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	195.0579	177.0544	0	12.9
41	sinapic acid ^a	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	225.0685	207.0703	1.1	12.1

^aConfirmed by standard. ^bThe detected and theoretical masses are for the molecular ions [M + H]⁺. ^cRetention time.

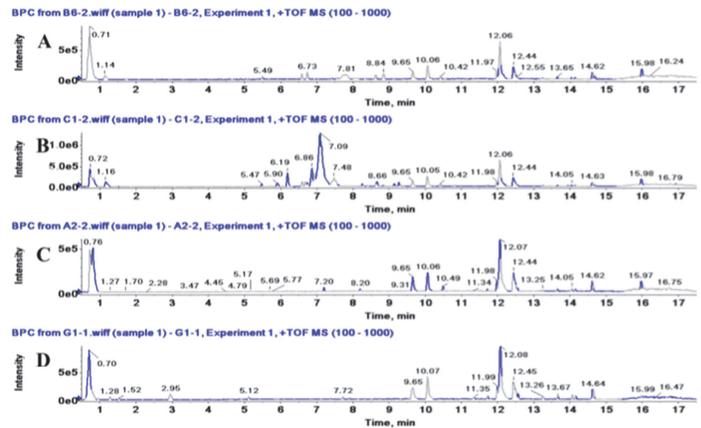


图2. 果汁的正离子BPC图：(A)蓝莓汁、(B)蔓越莓汁、(C)苹果汁、(D)葡萄酒汁^[1]。

清楚地证实了分析方法的稳定性和重现性。如图3所示，我们将样本明确分为5组：蓝莓汁(n= 30)、蔓越莓汁(n= 24)、苹果汁(n= 30)、葡萄酒汁(n= 30)和质控组(QC, n= 12)。这些结果表明，果汁可以根据其特征标记物来进行区分。

为了鉴定出对四个果汁组贡献最大的特征标记物，通过绘制loadings plot图中所选峰的强度分布图，分析不同组的离子响应。如图4所示，所有苹果汁样品中离子A的强度(m/z 291.1, RT 8.2min)都相对较高，但其他果汁样品中检测不到，说明可以选择与离子A对应的组分作为苹果汁的潜在特征标记物。同样，蓝莓汁、蔓越莓汁、葡萄汁中离子B(m/z 441.1, RT 6.6 min)、离子C(m/z 577.1, RT 8.3 min)、离子D(m/z 335.0, RT 5.3 min)的响应相对较高，表明它们有可能作为特征标记物。同样，我们选择了18个离子作为不同果汁中潜在的特征标记物(如表3所示)。

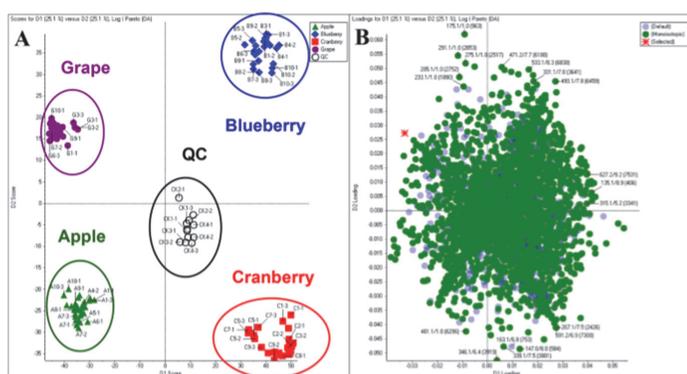


图3. 果汁(蓝莓组、蔓越莓组、苹果组和葡萄组)的PCA-DA统计结果:(A) Scores plot图;(B)loadings plot图。

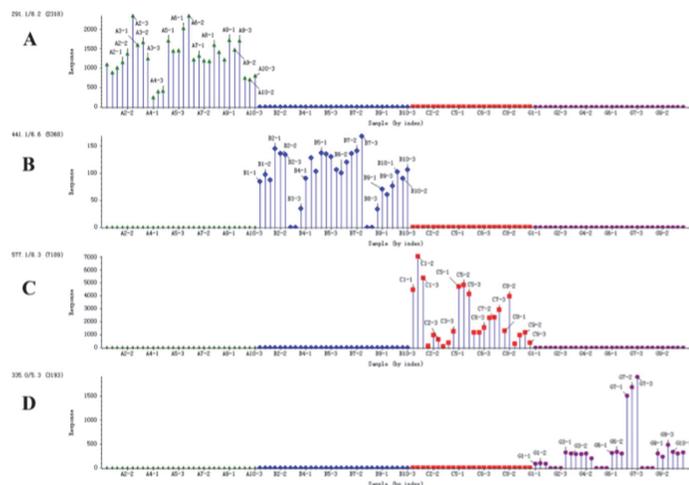


图4. 果汁中选定标记离子的响应(蓝色为蓝莓组;红色为蔓越莓组;绿色为苹果组;紫色为葡萄组);(A) m/z 291.1, RT 8.2 min;(B) m/z 441.1, RT 6.6 min;(C) m/z 577.1, RT 8.3 min;(D) m/z 335.0, RT 5.3 min^[1]。

表3. 果汁中检测到的特征标记物列表^[1]。

no.	m/z (MS)	RT ^a (min)	ion	m/z (MS/MS)	formula	mass error	identification (confirmed ^b and tentative ^c)	sample types ^d
1	481.0977	8.6	[M + H] ⁺	319.0429, 273.0355, 245.0426, 153.0173	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₃	-0.1	myricetin-3-glucoside ^e	B
2	355.1024	5.5	[M + H] ⁺	163.0385, 145.0281, 135.0433	C ₉ H ₁₀ O ₆	-1.6	chlorogenic acid ^b	B
3	171.0648	5.1	[M + CH ₃ OH + H] ⁺	139.0385, 111.0446, 93.0346, 65.0412	C ₇ H ₈ O ₅	-2.3	salicylic acid ^b	B
4	449.1063	10.3	[M + H] ⁺	317.0653	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	-1.6	petunidin-arabinoside ^e	C
5	481.1145	8.5	[M + H] ⁺	319.0429, 273.0355, 245.0426, 153.0173	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₃	-0.1	myricetin-3-O-galactoside ^e	C
6	395.0949	7.8	[M + H] ⁺	395.0930, 219.0609	C ₁₈ H ₁₈ O ₁₀	-0.3	unknown	C
7	319.0812	6.3	[M + H] ⁺	89.0407, 149.0608, 193.0490, 301.0742	C ₁₁ H ₁₆ O ₆	-1.0	myricetin ^b	G
8	335.0372	5.3	[M + K] ⁺	163.0386, 185.0200, 173.0048, 145.0288	C ₉ H ₁₀ O ₆	-0.9	2,3-di-O-carboxymethyl-o-glucoside ^b	G
9	385.1601	7.7	[M + NH ₄] ⁺	206.0812, 188.0700, 118.0654	C ₁₇ H ₁₁ NO ₈	-1.1	unknown	G
10	133.0648	6.9	[M + H] ⁺	133.0654, 105.0708, 103.0548, 79.0560	C ₆ H ₈ O	0.1	trans-cinnamaldehyde ^b	A
11	449.1079	7.0	[M + H] ⁺	287.0533, 449.1053	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	0.1	kaempferol-3-O-glucoside ^b	A
12	273.0869	8.2	[M + H] ⁺	167.0557, 159.0322, 185.0675, 200.0661	C ₁₄ H ₁₁ O ₇	1.0	α-naphthoflavone ^c	A
13	419.0973	7.4	[M + H] ⁺	287.0536, 241.0502, 213.0530, 185.0603	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	0.3	cyanidin-arabinoside ^b	B, C
14	449.1075	9.7	[M + H] ⁺	303.0491	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	-0.5	delphinidin-rhamnoside ^e	B, C
15	463.0847	7.2	[M + H] ⁺	301.0690	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₁	-0.2	peonidin-galactoside ^e	B, C
16	463.1229	8.7	[M + H] ⁺	331.0808	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	-0.8	malvidin-arabinoside ^e	B, C
17	465.1726	9.1	[M + H] ⁺	303.0498	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	-0.3	delphinidin-galactoside ^e	B, C
18	419.0971	7.5	[M + H] ⁺	287.0536	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	0.3	cyanidin-glucoside ^b	B, C

^aRetention time ^bConfirmed by standard. ^cTentative identification. ^dB: blueberry, C: cranberry, A: apple, G: grape.

验证特征标记物的可行性，通过统计学分析，使得蓝莓汁和蔓越莓汁与苹果汁和葡萄汁在10、20、30、40和50%体积比来模拟掺假下进行差异分析。蓝莓汁和蔓越莓汁与苹果汁和葡萄汁的混合比例在10%以上，可以通过绘制样本选定的特征标记物的图谱来进行验证，进而判断果汁的掺假情况^[1]。

结果与讨论

本研究采用靶向和非靶向代谢组学分析方法对蓝莓和蔓越莓果汁及其掺假果汁进行鉴定。

1. 结合强大的PeakView[®]软件和MasterView[™]软件共同对数据进行靶向和非靶向化合物的筛查鉴定，通过对样品中各化合物的高分辨率一级数据、同位素匹配等信息，再结合SCIEX高分辨二级数据库和Chemspider在线数据库进行比对鉴定。对目前已知的果汁类化合物如黄酮类化合物、花青素类化合物、酚酸类化合物进行了分析后，最终鉴定出41种备选化合物。
2. 通过MarkerView[™]软件的数据统计能力，结合得到的41种备选化合物的峰值强度，发现果汁及其掺假物之间存在显著差异，可以从整体的角度对浆果果实进行鉴定。并且通过差异分析，又挑选出18种化合物用来作为区分蓝莓和蔓越莓果汁及其掺假果汁的特征标记物。

参考文献

- [1] Jiukai Zhang, Qiu hao Yu, Haiyan Cheng, Yiqiang Ge, Han Liu, Xingqian Ye, Ying Chen. Metabolomic Approach for the Authentication of Berry Fruit Juice by Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Coupled to Chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(30), 8199–8208.

For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd., or their respective owners, in the United States and/or certain other countries.

RUO-MKT-02-10506-ZH-A

AB SCIEX™ is being used under license.

© 2019 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808 1388
传真：010-5808 1390

上海公司及中国区应用支持中心
地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419 7200
传真：021-2419 7333

广州分公司
地址：广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835

全国免费垂询电话：800 820 3488，400 821 3897 网址：www.sciex.com.cn 微博：@SCIEX