

基于UPLC-QE-Orbitrap-MS的宁夏枸杞鲜果和枸杞干果差异性代谢物分析

汤丽华, 张 瑶, 马雪梅, 马桂娟, 杨建兴

Analysis of Differentially Expressed Metabolites of Fresh and Dried Wolfberry Fruit in Ningxia Based on UPLC-QE-Orbitrap-MS

TANG Lihua, ZHANG Yao, MA Xuemei, MA Guijuan, and YANG Jianxing

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022080184>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

壳聚糖-山梨酸钾复合涂膜对鲜果枸杞保鲜品质的影响

Effect of chitosan-potassium sorbate compound liquid film coating on preservation of fresh wolfberry

食品工业科技. 2017(09): 257-260 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.09.040>

冷鲜滩羊肉微生物菌群代谢物与其关联性分析

Correlation analysis of microbial community and their metabolites in cold fresh Tan lamb

食品工业科技. 2017(08): 322-325 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.08.054>

基于代谢组学分析工夫红茶发酵过程中代谢物的变化

Metabolomics Analysis of Changes in Metabolites During the Fermentation Process of Congou Black Tea

食品工业科技. 2021, 42(21): 8-16 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030361>

基于UPLC-Q-TOF-MS的植物乳杆菌P-8发酵乳代谢物轮廓分析

Metabolites Profile Analysis of Fermented Milk with *Lactobacillus plantarum* P-8 Based on Ultra-performance Liquid Chromatography-quadrupole-time of Flight Mass Spectrometry(UPLC-Q-TOF-MS)

食品工业科技. 2019, 40(11): 152-160 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.11.026>

不同枸杞挥发油提取工艺优化及其得率的差异性分析

Optimization of Extraction Process of Volatile Oil from Different *Lycium barbarum* L. and Analysis of Its Difference in Yield

食品工业科技. 2018, 39(20): 118-122 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.20.020>

靶向代谢组学技术在营养性疾病研究中的应用

Application of targeted metabolomics technology in nutritional diseases

食品工业科技. 2017(18): 323-327 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.18.061>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

汤丽华, 张瑶, 马雪梅, 等. 基于 UPLC-QE-Orbitrap-MS 的宁夏枸杞鲜果和枸杞干果差异性代谢物分析 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(8): 9–16. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080184

TANG Lihua, ZHANG Yao, MA Xuemei, et al. Analysis of Differentially Expressed Metabolites of Fresh and Dried Wolfberry Fruit in Ningxia Based on UPLC-QE-Orbitrap-MS[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(8): 9–16. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080184

· 未来食品 ·

基于 UPLC-QE-Orbitrap-MS 的宁夏枸杞 鲜果和枸杞干果差异性代谢物分析

汤丽华, 张 瑶, 马雪梅, 马桂娟, 杨建兴

(宁夏食品检测研究院(国家市场监督管理总局重点实验室(枸杞和葡萄酒质量安全)), 宁夏银川 750001)

摘 要:为研究不同宁夏枸杞果实的差异性, 以枸杞鲜果和枸杞干果为样品, 利用非靶向代谢组学方法分析枸杞鲜果和枸杞干果的差异性代谢物。采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法建立非靶向代谢组学方法, 通过主成分分析(PCA)、偏最小二乘法分析(PLS-DA)模型、单变量统计分析、聚类分析、火山图等统计学方法对所有代谢物进行鉴定分析, 筛选出差异性代谢物。结果表明, 枸杞鲜果和枸杞干果可以明显区分, 枸杞鲜果和干果中共鉴定出 35 种差异代谢物, 其中有机酸、氨基酸、黄酮类化合物呈上调表达, 核苷酸类、酚酸类、香豆素类化合物呈下调表达。本研究基于非靶向代谢组学揭示了宁夏枸杞鲜果和枸杞干果的代谢产物差异性以及特征化合物, 为研究不同枸杞果实的物质基础提供理论依据。

关键词:枸杞鲜果, 枸杞干果, 非靶向代谢组学, 差异性代谢物

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)08-0009-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080184



本文网刊:

Analysis of Differentially Expressed Metabolites of Fresh and Dried Wolfberry Fruit in Ningxia Based on UPLC-QE-Orbitrap-MS

TANG Lihua, ZHANG Yao, MA Xuemei, MA Guijuan, YANG Jianxing

(Ningxia Food Testing and Research Institute (Key Laboratory of Quality and Safety of Wolfberry and Wine for State Administration for Market Regulation), Yinchuan 750001, China)

Abstract: The project studied the differences of dried and fresh wolfberry fruit in Ningxia region. Using non-targeted metabolomics analysed the differential metabolites of wolfberry fruit. The observed variables were determined using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry (UPLC-QE-Orbitrap-MS). Differential metabolites were screened out by mathematical statistical methods (principal component analysis (PCA), partial least squares analysis (PLS-DA), univariate statistical analysis, cluster analysis, volcano plot) to identify and analyse all metabolites. The results showed that 35 different metabolites were identified in the fresh and dried wolfberry fruit. The expression of organic acids, amino acids and flavonoids was up-regulated, while the expression of nucleotides, phenolic acids and coumarin compounds was down-regulated. This study revealed the characteristic compounds of fresh and dried wolfberry fruit in Ningxia. The research would provide a theoretical basis for the material basis of different wolfberry fruits.

Key words: fresh wolfberry; dried wolfberry; untargeted metabolomics; differential metabolites

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)茄科、枸杞属植物, 是药食同源的植物资源, 也是唯一载入 2010 年版《中国药典》的品种^[1]。宁夏枸杞因富含多糖、氨基

酸、多酚及多聚糖复合物^[2-3]等物质, 具有抗氧化、抗衰老、免疫调节、保肝抗癌等作用而备受市场青睐^[4-5]。枸杞鲜果皮薄多汁、组织在外力作用下容易

收稿日期: 2022-08-18

基金项目: 宁夏自然科学基金项目(2021AAC03422); 宁夏药物创制与仿制药研究重点实验室开放课题。

作者简介: 汤丽华(1986-), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 食品检测, E-mail: tanglihua532@163.com。

受到损伤,并且鲜枸杞采摘收获后,果实容易腐烂,因此干制依然是当前枸杞的主要加工方式^[6-7]。由于枸杞鲜果和干果的贮存条件、加工方式有所不同,可能会导致枸杞中化学成分的组成及含量存在差异,进而影响其品质功效价值。

代谢组学通过分析技术对生物样品中小分子代谢物的组成、含量及其变化进行定性和定量分析,从而发现代谢物信息与生物体生理变化之间相关联系^[8]。经多年发展,代谢组学已广泛应用于食品研究。串联质谱(tandem mass spectrometry, MS/MS)技术具有高灵敏度、高特异性,可对复杂体系进行全面的定性定量分析,在食品研究等多个研究领域中得到广泛的应用^[9]。Qin 等^[10]研究了盐胁迫下黑果枸杞和红枸杞转录组、代谢组和激素的分析变化,发现红枸杞的黄酮和类黄酮发生明显变化。Spano 等^[11]对意大利两个不同品种的新鲜枸杞做了糖类、氨基酸、有机酸、脂肪酸、多酚和萜烯等化合物的研究对比。李丽等^[12]对发酵前后黑果枸杞浆的成分进行分析,发现发酵后乳酸菌含量增加,而嘌呤类物质的含量降低。宁夏枸杞鲜果和枸杞干果的功效成分复杂,难以运用某一特定的方法把功效成分全部检测出来,而代谢组学可以全面宏观的检测出各样品间的主要差异性物质。目前,利用非靶向代谢组学技术研究枸杞鲜果和干果中差异性代谢物质鲜有报道。

本研究以鲜果枸杞为原料,采用自然晾干的方式制得枸杞干果,使用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-QE-Orbitrap-MS)测定枸杞鲜果和干果中全部代谢物质的丰度,结合多元统计分析方法筛选差异代谢物,找出枸杞鲜果和干果之间的主要差异代谢物,为枸杞果实中特征性成分的研究奠定基础,对研究宁夏枸杞加工的物质基础提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

宁夏鲜果枸杞 采摘自宁夏吴忠市红寺堡区大河乡百瑞源枸杞基地,每个样品设 6 个采集点,每个采点各采集 2 批次,选取无机械损伤、无霉变、成熟度相同且大小均一的果实进行试验;枸杞干果 取上述部分鲜果干制而成;甲醇 色谱级,赛默飞世尔科技有限公司;碳酸氢铵 国药集团化学试剂有限公司;甲酸 色谱纯,德国希格玛公司;去离子水 通过 Millipore 系统制得。

3-15 冷冻离心机 德国希格玛公司;涡旋混匀器 美国 Scientific Industries 公司;BS224 电子天平

德国赛多利斯科学仪器公司;IKA T25 均质器 德国 IKA 公司;KQ-500B 超声波清洗器(功率:500 W) 上海昆山超声仪器有限公司;Q-Exactive-Ultimate 3000 超高效液相色谱-高分辨质谱仪 美国赛默飞世尔公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的制备及处理

1.2.1.1 样品的制备 枸杞鲜果匀浆后,备用;枸杞干果用粉碎机粉碎后过 40 目筛,备用;设置 6 个重复样本。

1.2.1.2 样品的处理 准确称取枸杞样本 1.00 g 于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 甲醇溶液(甲醇:水=5:5),均质 1 min 后,超声提取 10 min,于 9000 r/min 离心 10 min,取上清液 1 mL 于 EP 管中,12000 r/min 离心 10 min,将上清液置于新的 EP 管中,-20 °C 冷冻保存,待测。

1.2.2 仪器检测条件 超高效液相色谱条件:采用 Thermo Ultimate 3000 仪器进行色谱分离,正模式扫描:使用 BEH C₈ 柱(1.7 μm, 2.1×100 mm)色谱柱,流速为 0.35 mL/min,色谱柱温度维持在 50 °C,进样 5 μL 进行梯度洗脱,A 相:水(含 0.1% 甲酸),B 相:乙腈(含 0.1% 甲酸),梯度洗脱程序:0~1 min, 5%(B);1~24 min, 5%~100%(B),24.1~27.5 min, 100%(B);27.6~30 min, 5%(B)。负模式扫描:A 相:水(含 6.5 mmol/L 碳酸氢铵),B 相:95% 甲醇水(含 6.5 mmol/L 碳酸氢铵),梯度洗脱程序:0~1 min, 5%(B);1~18 min, 5%~100%(B);18.1~22 min, 100%(B);22.1~25 min, 5%(B)。

1.2.3 质谱分析条件 质谱一级全扫描+DDA 二级子离子扫描。正离子模式:喷雾电压: +3.8 kV;毛细管温度: 320 °C;辅燃气加热器温度: 350 °C;护套气体流量: 35 Arb;辅助气体流量: 8 Arb;质量范围(m/z): 100~1200;全 ms 分辨率: 70000;MS/MS 分辨率: 17500;负离子模式:喷雾电压: -3.0 kV;毛细管温度: 320 °C;辅燃气加热器温度: 350 °C;护套气体流量: 35 Arb;辅助气体流量: 8 Arb;质量范围(m/z): 70~1050;全 ms 分辨率: 70000;MS/MS 分辨率: 17500。一级质谱分辨率为 35000 FWHM(半峰宽),自动增益控制(AGC)为 5×10⁶,扫描范围为 120~1000 Da;二级碎裂方式选择高能碰撞诱导裂解模式(HCD),碰撞能量为 20 eV,分辨率为 17500 FWHM,自动增益控制(AGC)为 5×10⁶。

1.3 数据处理

采用 Xcalibur4.0 软件收集数据,利用大连达硕信息技术有限公司开发的 One-MAP/PTO 软件对数据进行峰提取、峰对齐、峰积分、基线矫正等分析处理。对于多元变量分析,采用主成分分析方法(principal components analysis, PCA),使用 R² 和 Q² 进行主成分分析(PCA)和偏最小二乘法判别分析 PLS-DA(Partial Least Squares Discriminant Analysis),根据 T 检验的 P<0.05,同时 PLS-DA 模型主成分的 VIP 值>1,进行差异性代谢物的筛选。

2 结果与分析

2.1 不同宁夏枸杞样本数据质量控制

在采集宁夏枸杞鲜果(K)和枸杞干果(A)样本数

据前, 会先采集质控样本(quality control, QC)的数据, 判断系统是否稳定。QC 由枸杞鲜果和干果的提取液等量混合所制, 是进行高质量代谢组学研究的基础^[13]。分别在正、负离子采集分析时, 采用组间穿插进样、组内随机进样的方式进行检测^[14]。由图 1、图 2 可知, 物质出峰的保留时间和峰面积都重叠较好。结果表明, 液相色谱条件梯度合理, 仪器稳定性良好。

由于 QC 样品可以提供非常重要的数据质量分

析与校正分析的信息, 采用质谱特征在不同 QC 样品中的变化情况(RSD)的数据统计分析方法可以考察 QC 样品的稳定性与一致性, 从而评价数据质量及实验分析过程的可靠性。由图 3 可知, 不同 QC 样品中质谱特征的 RSD 小于 50% 所占的比例, 大于 70%。结果表明, 数据质量较高, 分析结果准确可靠。

2.2 不同宁夏枸杞样本代谢物单变量统计分析

对不同样本进行单变量统计分析, 常用的分析包括变异倍数分析、T 检验/非参检验单变量分析, 对

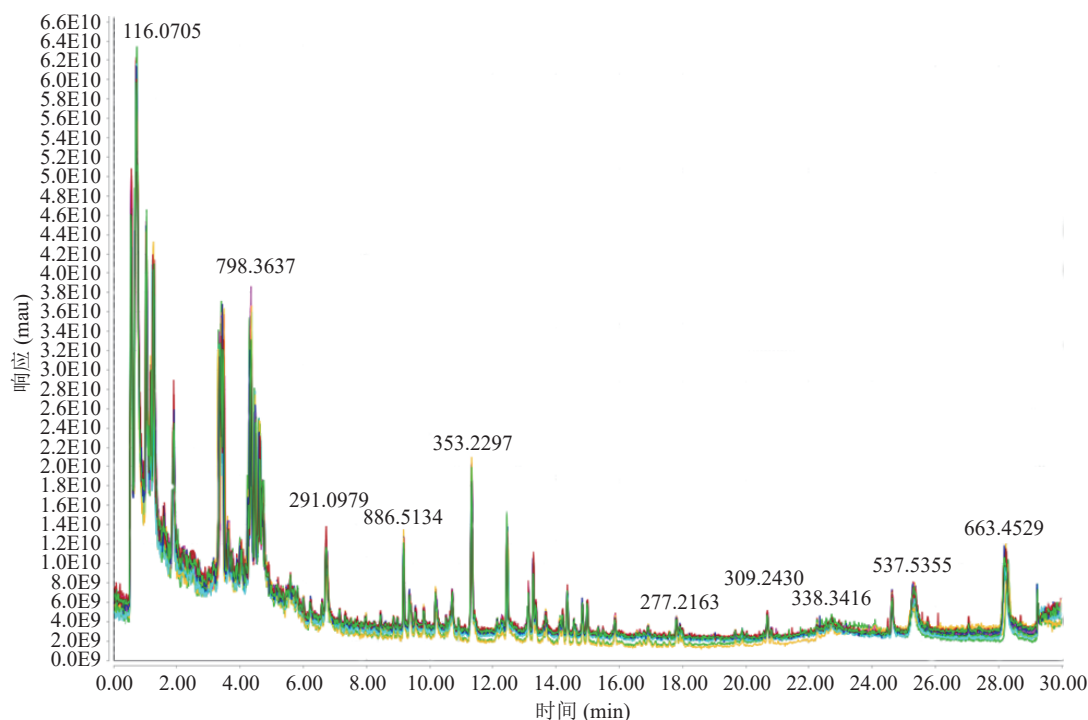


图 1 QC 样本质谱检测正模式 TIC 重叠图

Fig.1 TIC overlap mass spectrometry of QC samples in positive ion modes

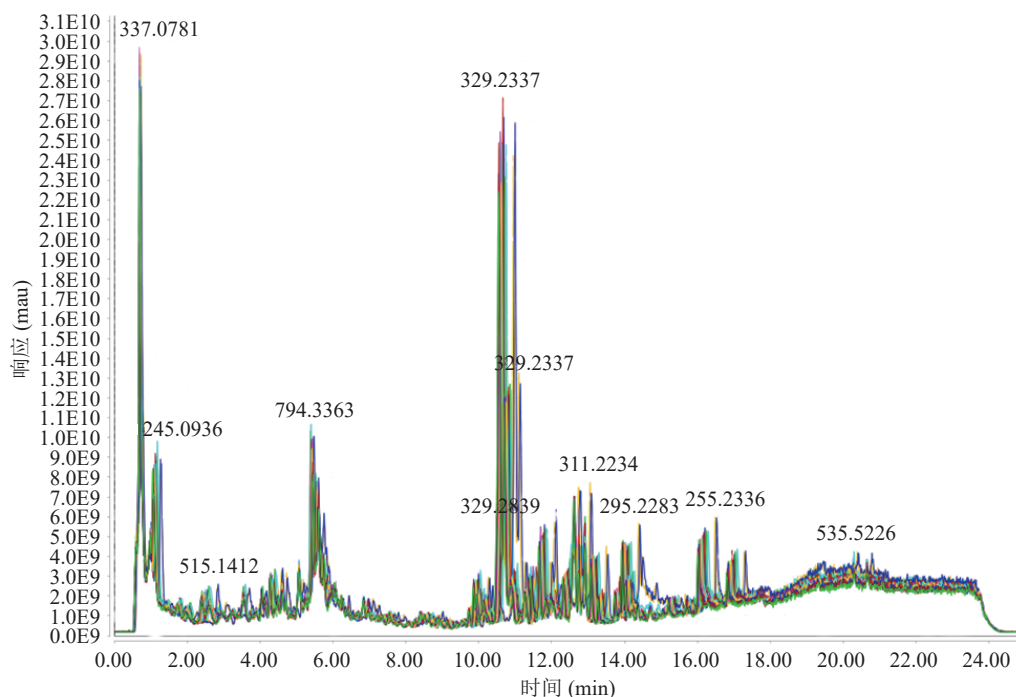


图 2 QC 样本质谱检测负模式 TIC 重叠图

Fig.2 TIC overlap mass spectrometry of QC samples in negative ion modes

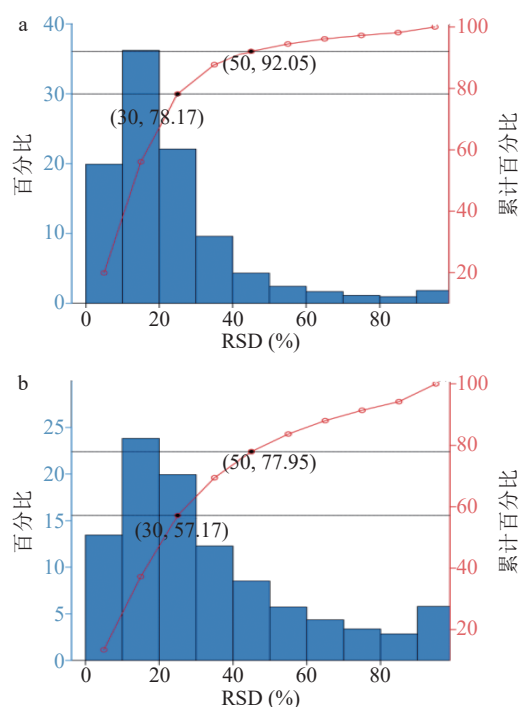


图3 正(a)、负离子(b)模式下QC样品的RSD分析结果图
Fig.3 RSD results of QC sample in positive (a) and negative (b) ion modes

检测到的所有代谢物进行差异性分析^[15]。李峰庆等^[16]研究表明,加工过程中的温度、时间、含水量等变化会打破药用植物体内正常代谢及生理生化过程的稳定性,诱导与次生代谢产物合成相关酶的表达,从而促进次生代谢产物的生成。

采用 $\log_2(FC)$ 值和 $-\log_{10}(p)$ 值对宁夏鲜果枸杞和干果枸杞的数据进行分析,结果如图4。图中的每个点代表一个代谢物,平行于Y轴的两条直线分别是 $X=1$ 和 $X=-1$,在 $X=-1$ 左侧的点是下调1.5倍以上的代谢物,而在 $X=1$ 右侧的点则是上调1.5倍以上的代谢物。同时,平行于X轴有一条直线为 $Y=1.30$,即 $-\log_{10}(0.05)$,在直线以上的点表示显著性 $P<0.05$ 的代谢物。由火山图可知,宁夏枸杞鲜果和干果之间有677个代谢物,其中上调代谢物478个,下调代谢物199个。结果表明,不同枸杞果实超过70%的代谢物呈上调表达趋势,在加工过程中代谢反应活跃。

2.3 不同宁夏枸杞样本代谢物多变量统计分析

2.3.1 主成分分析(PCA) 多变量分析是在上述单变量分析所得结果的基础上进行的。多变量分析的主要目的是构建不同样本间的关系,研究不同代谢物对分类不同样本的能力,主要采用主成分分析(PCA)、特征选择算法,以及多变量建模等分析算法。

主成分分析法是一种非监督数据分析方法,借助一个正交变量将原本鉴定到的所有代谢物重新线性组合,形成一组新的综合变量,使其尽可能多的反映原有的变量信息,以达到降维的目的,同时对系统

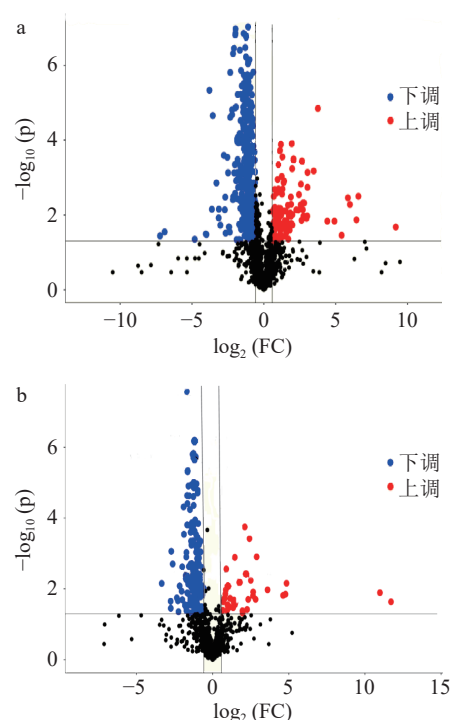


图4 正(a)、负离子(b)模式下差异代谢物单变量火山图分析

Fig.4 Univariate volcanic map analysis of metabolites in positive (a) and negative (b) ion modes

稳定性进行评价^[17-18]。不同宁夏枸杞果实的主成分分析图如图5所示。在正模式下,第一主成分(PC1)的贡献率是64.1%,第二主成分(PC2)的贡献率是7.7%,两者的总贡献率是71.8%。在负模式下,第一主成分(PC1)的贡献率是62.4%,第二主成分(PC2)

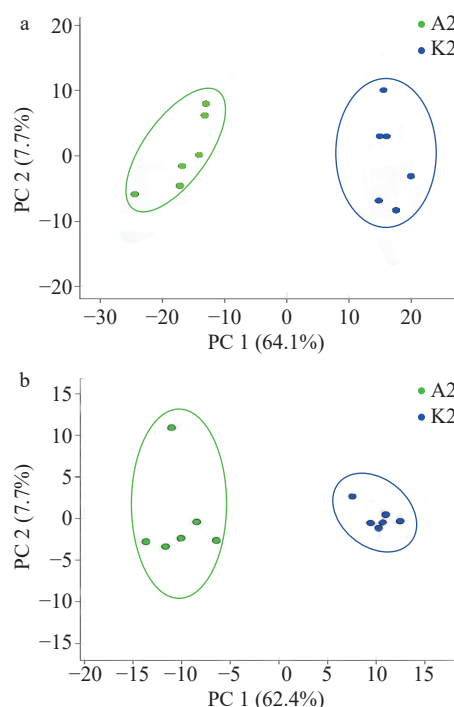


图5 正(a)、负离子(b)模式下差异代谢物的PCA得分图
Fig.5 PCA score chart of metabolites in positive (a) and negative (b) ion modes

的贡献率是 7.7%, 两者的总贡献率是 70.1%。结果表明, 检测样本都在各组 95% 置信区间内, 说明实验的重现性良好, 能够保证试验结果的可靠性, 从整体上可以反应出两组样品的差异性。

2.3.2 偏最小二乘法分析(PLS-DA) PLS-DA 可以使组间区分效果最优化, 有利于寻找差异代谢物^[19]。由于 PLS-DA 在建模时对样品进行指定和分组, 所以能更大地区分两组间差异, 但这也导致数据的 PLS-DA 模型存在过拟合的问题, 因此采用随机置换检验法对模型进行外部交叉验证^[20]。模型中 R^2X 和 R^2Y 分别表示所建模型对 X 和 Y 矩阵的解释率, 越接近于 1 说明模型拟合度越好。如图 6 所示, 与图 5 相比, 各分组样品之间聚集更加紧密。在正模式下, R^2X 值、 R^2Y 值、 Q^2 值分别为 0.993、0.988、0.951; 在负模式下, R^2X 值、 R^2Y 值、 Q^2 值分别为 0.976、0.964、0.943, 均接近 1, 说明建立的模型符合样本真实数据情况, 能很好的解释样本之间的差异性。

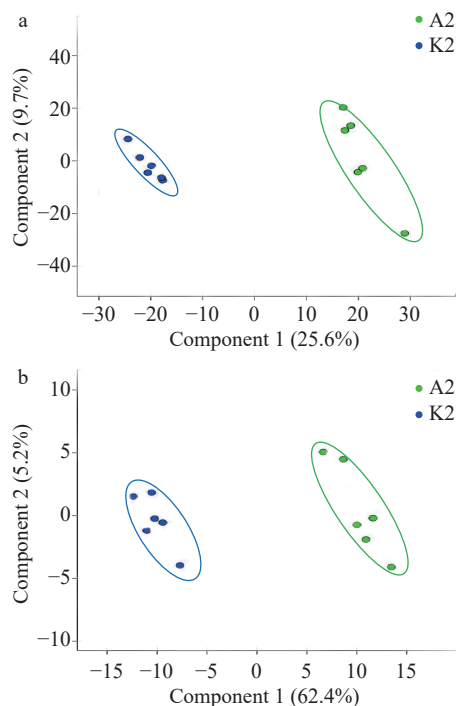


图 6 正(a)、负离子(b)模式下差异代谢物的 PLS-DA 得分图

Fig.6 PLS-DA score chart of metabolites in positive (a) and negative (b) ion modes

为防止模型过拟合, 采用 200 次响应的置换检验对模型进行验证, 如图 7 所示, 其中 R^2 、 Q^2 为回归直线与 y 轴的截距值, R^2 表示模型能够解释的方差总和, Q^2 表示模型的预测能力, 结果表明, 在正离子模式下, 宁夏枸杞鲜果、枸杞干果代谢物符合 $R^2=1$, $Q^2=0.95$ (图 7a); 在负离子模式下, $R^2=0.97$, $Q^2=0.95$ (图 7b)这 2 个模型的值均大于 0.9, 说明本研究建立的 PLS-DA 模型稳定且参数合理, 预测能力较强。

2.4 差异代谢物的聚类分析

代谢物分布可在视觉上分为上调和下调^[21]。为

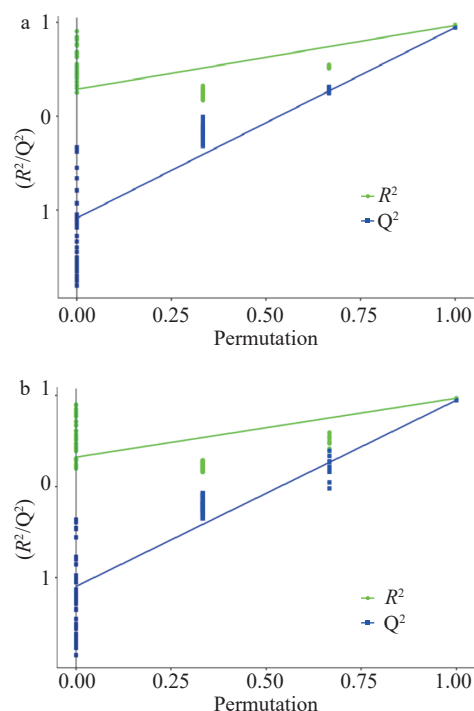


图 7 正(a)、负离子(b)模式下差异代谢物的置换检验图
Fig.7 Replacement chart of metabolites in positive (a) and negative (b) ion modes

了观察枸杞鲜果与干果差异代谢物的浓度变化趋势, 将所有样本及差异代谢物的表达量进行距离矩阵计算, 并进行层次聚类分析(hierarchical clustering analysis, HCA), 建立样本层次聚类树, 如图 8 所示。图中横坐标和纵坐标分别为样本和代谢质谱特征, 点的颜色表征对应样本, 蓝色为鲜果, 红色为干果, 对应代谢质谱特征的强度。结果表明, 聚类结果可信度较高, 聚类热图分析的结果可靠。根据样本聚类的树状图, 可以分成两个区域, 蓝色的枸杞鲜果 6 个平行样本为第 1 区域, 红色的枸杞干果 6 个平行样本为第 2 区域, 可见枸杞鲜果代谢物颜色与干果区别较大, 不同枸杞果实中各类代谢物的含量具有显著影响, 对鉴别枸杞鲜果和干果的代谢产物具有一定的参考意义。

2.5 差异代谢物的筛选和分析

采用多维分析和单维分析相结合的办法来筛选组间差异代谢物, 根据 PLS-DA 模型分析结果, 筛选第一主成分的变量的权重值(variable important in projection, VIP)>1 为条件^[22], T 检验 P 值<0.05 的差异代谢物进行汇总, 如表 1 所示。由表 1 可知, 宁夏枸杞果实加工过程中差异代谢物主要有有机酸类及其衍生物(10 种)、氨基酸类及其衍生物(6 种)、类黄酮(8 种)、核苷酸类(1 种)、酚酸类(7 种)、香豆素(1 种)、其它(2 种), 共 35 种。其中, $\log_2(FC)>1$ 表示差异代谢物上调, $\log_2(FC)<-1$ 表示差异代谢物下调, 筛选出的差异性代谢物中有 17 种上调, 18 种下调。

宁夏枸杞果实中含有的有机酸、氨基酸、黄酮类化合物多数呈上调表达, 有机酸是一种代谢活性溶

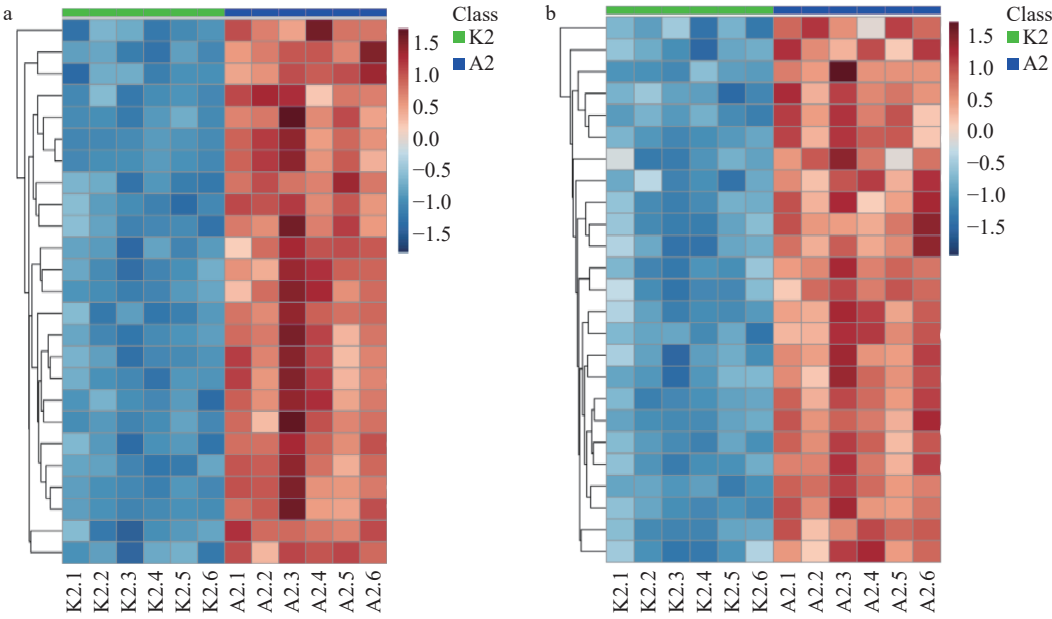


图 8 正(a)、负离子(b)模式下差异代谢物的层次聚类热图结果

Fig.8 Hierarchical clustering heat map of metabolites in positive (a) and negative (b) ion modes

表 1 宁夏枸杞鲜果和枸杞干果差异性代谢物

Table 1 Differential metabolites in fresh wolfberry and dried wolfberry of Ningxia

序号	差异性代谢物	m/z	保留时间(min)	VIP	P	Fold Change (FC)	log ₂ (FC)
1	DL-乳酸	89.0230	23.92	1.13	3.2E-5	0.59	-0.75
2	2-氨基苯酚	108.0461	23.95	1.49	8.1E-4	0.41	-1.29
3	尿嘧啶	111.0150	0.91	1.42	2.5E-3	0.64	-0.64
4	D-脯氨酸	114.0555	0.8	1.59	3.9E-4	0.32	-1.65
5	马来酸	115.0047	0.66	1.52	4.8E-6	1.91	0.93
6	L-天冬氨酸	131.0501	0.72	1.47	5.2E-7	1.71	0.77
7	DL-苹果酸	133.0154	0.65	1.74	4.3E-5	1.96	0.97
8	N-氧代烟酰胺	137.0278	0.77	1.37	4.0E-6	1.59	0.67
9	L-谷氨酸	145.0628	0.72	1.54	1.7E-5	2.01	1.01
10	DL-谷氨酸	146.0475	0.68	1.29	3.7E-8	1.69	0.76
11	L-蛋氨酸	148.0483	0.94	1.51	2.5E-6	0.42	-1.25
12	2,4-二羟基苯甲酸	153.0221	0.79	1.18	3.1E-7	1.61	0.68
13	4-羟基肉桂酸	163.0424	1.02	1.76	9.4E-5	0.22	-2.16
14	D-苯丙氨酸	164.0727	2.11	1.26	7.3E-4	2.57	1.36
15	三羟基苯甲酸	169.0229	1.04	1.34	5.6E-6	0.47	-1.09
16	5-羟基吡啶-2-甲酸	176.0418	0.98	1.42	3.3E-7	4.09	2.03
17	4-吡啶酸	182.0524	2.26	1.39	2.8E-5	0.39	-1.35
18	东莨菪亭	191.0381	4.72	1.37	5.3E-6	0.60	-0.74
19	芥子酸	223.0654	1.65	1.09	4.7E-4	1.82	0.86
20	2-(2-羧乙基)-4-甲基-5-丙基咪唑-3-羧酸	240.0907	3.15	1.61	5.5E-4	0.52	-0.93
21	熊果苷	271.0858	1.13	1.48	6.2E-7	2.01	1.07
22	红景天苷	299.1173	4.51	1.52	3.2E-5	0.42	-1.26
23	橙皮素	301.0764	7.12	1.54	9.6E-5	2.94	1.56
24	花生四烯酸	303.2371	15.95	1.07	5.7E-4	0.14	-2.86
25	绿原酸	353.0938	2.41	1.28	4.6E-5	2.74	1.46
26	对羟基肉桂酸	165.0545	6.08	1.16	5.5E-6	0.28	-1.86
27	阿魏酸	195.0652	5.23	1.41	3.9E-5	2.86	1.52
28	4-羟基-3,5-二甲氧基肉桂酸	225.0758	4.84	1.26	4.7E-7	0.46	-1.13
29	5,6,7,3',4'-五甲氧基黄酮	373.1279	14.12	1.55	3.8E-8	0.28	-1.83
30	芦丁(槲皮素-3-B-D-芸香糖甙)	610.5223	4.99	1.33	3.1E-5	2.12	1.08
31	异鼠李素-3-O-芸香糖苷	625.1756	7.33	1.58	2.E-5	0.43	-1.23
32	山柰酚-3-O-芸香糖苷(烟花苷)	594.5265	10.68	1.48	6.4E-5	3.25	1.74

续表 1

序号	差异性代谢物	m/z	保留时间(min)	VIP	P	Fold Change (FC)	log ₂ (FC)
33	姜黄素	367.1098	4.36	1.70	7.3E-5	1.91	0.93
34	五羟基黄酮	611.1597	5.98	1.69	4.5E-6	3.09	1.63
35	山奈酚-7-O-B-D-葡萄糖苷	447.1011	5.90	1.08	8.3E-6	0.44	-1.19

质,在植物体内参与渗透压的调节和阳离子的平衡,因此水分胁迫会促进有机酸的合成^[23]。有机酸作为一种光合作用的中间体,宁夏地区日照时间长会导致有机酸在枸杞中的高度积累^[24]。氨基酸及其衍生物是植物中重要组成部分,游离氨基酸除了具有生物学功能还具有鲜、甜、涩等特殊味道^[25]。酚酸类化合物具有良好的生物学活性,枸杞中酚酸类化合物,如绿原酸,可抗病毒、抗肿瘤、抗氧化,阿魏酸有消炎、抗血栓的作用^[26]。黄酮类物质也广泛的存在于自然界的浆果中,枸杞黄酮是众多生理实验中发挥抗氧化、治疗心脑血管疾病等药理活性的主要物质基础^[27-28]。黄酮类化合物属于植物的次生代谢产物,芦丁、槲皮素、橙皮素等黄酮类化合物都具有较强的抗氧化活性,因而大量积累后可增强植物的氧化应激,从而增加其抗旱性能。同时,由于宁夏紫外线强度高,在高光照强度下编码多酚黄酮类化合物生物合成的结构基因的表达和某些重要酶的活性会增加,因此多酚黄酮类化合物的含量也会随之增加^[29]。酚酸类呈下调表达可能是由于新鲜枸杞中酚酸积累较少,在干燥脱水过程中,随着水分的散失,细胞受到胁迫酚酸在某种机制作用下转变成游离态或大量积累。香豆素具有抗炎、镇痛以及降低尿酸等作用,枸杞中抑制 ACE 抑制肽活性的主要物质可能为香豆素类化合物^[30]。因此,宁夏枸杞鲜果含水量大、干物质少,枸杞鲜果经干燥加工后水分下降,不同的加工方式可能导致了枸杞鲜果和干果中有机酸、黄酮类、酚酸类等成分有极大的差异。

3 结论

本研究基于非靶向代谢组学技术对宁夏枸杞鲜果和枸杞干果的差异性代谢物进行鉴定,从代谢组学层面系统分析了宁夏枸杞果实加工前后的代谢物差异。新鲜枸杞经加工干燥后,代谢物含量显著增加,枸杞鲜果和干果中共鉴定出有机酸类、氨基酸类、黄酮类、核苷酸类、酚酸类、香豆素等 35 种差异代谢物。该模型的建立可以有效地对枸杞加工过程中有机酸、氨基酸、黄酮等生物活性物质含量变化进行区分,有助于宁夏枸杞加工过程的有效评价,为开发枸杞相关产品提供了理论参考。

参考文献

[1] 胡明珍,刘慧燕,潘琳,等. 基于非靶向代谢组学分析副干酪乳杆菌发酵枸杞汁各阶段代谢差异[J]. 食品科学, 2022, 43(8): 142-149. [HU M Z, LIU H Y, PAN L, et al. Non-targeted metabolomics analysis of differential metabolite profiles of Goji juice fermented by *Lactobacillus*[J]. Food Science, 2022, 43(8): 142-149.]

[2] B KULCZYŃSKI, ANNA GRAMZA-MICHAŁOWSKA. Goji berry (*Lycium barbarum*): Composition and health effects-a review[J]. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2016, 66(2).

[3] JELENA J VULIĆ, JASNA M ČANADANOVIĆ-BRUNET, GORDANA S ČETKOVIĆ, et al. Bioactive compounds and antioxidant properties of Goji fruits (*Lycium barbarum* L.)[J]. *Cultivated in Serbia, Journal of the American College of Nutrition*, 2016, 35(8): 692-698.

[4] VIDOVIĆ B B, MILINČIĆ D, MARČETIĆ M D, et al. Health benefits and applications of Goji berries in functional food products development: A review[J]. *Antioxidants*, 2022, 11: 248.

[5] DONNO D, BECCARO G L, MELLANO M G, et al. Goji berry fruit (*Lycium* spp.): Antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation[J]. *Funct Foods*, 2014, 18: 1070-1085.

[6] 程晓燕,葛向珍,薛华丽,等. 枸杞鲜果贮藏期间质量损失率与时间的拟合及与质构参数的关系[J]. *食品科学*, 2020, 41(17): 261-266. [CHENG X Y, GE X Z, XUE H L, et al. Relationship between mass loss percentage of fresh Goji berries and either storage time or texture parameters[J]. *Food Science*, 2020, 41(17): 261-266.]

[7] 王海,高月,王颖,等. 适宜干燥方法提高干制枸杞品质[J]. *农业工程学报*, 2015, 31(21): 271-276. [WANG H, GAO Y, WANG J, et al. Optimal drying method improving quality of *Lycium barbarum* L[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2015, 31(21): 271-276.]

[8] 龚意辉,周桂花,彭淑君,等. 基于非靶向代谢组学的柑橘果皮褐斑病发生过程中代谢差异分析[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(8): 316-324. [GONG Y H, ZHOU G H, PENG S J, et al. Differential analysis of the metabolites on citrus pericarp brownspot based on untargeted metabolomics[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(8): 316-324.]

[9] 张丽君,王丹,王育娇,等. 基于气相色谱-质谱联用技术的代谢组学在农产品产地溯源中的应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(6): 2197-2203. [ZHANG L J, WANG D, WANG Y J, et al. Application of metabolomics based on gas chromatography-mass spectrometry technology in the origin traceability of agricultural products[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2021, 12(6): 2197-2203.]

[10] QIN X Y, YIN Y, ZHAO J H, et al. Correction to: Metabolomic and transcriptomic analysis of *Lycium* Chinese and *L. ruthenicum* under salinity stress[J]. *BMC Plant Biology*, 2022, 22(1): 8.

[11] SPANO MATTIA, MACCELLI ALESSANDRO, DI MATTEO GIACOMO, et al. Metabolomic profiling of fresh Goji (*Lycium barbarum* L.) berries from two cultivars grown in central Italy: A multi-methodological approach[J]. *Molecules*, 2021, 26(17): 5412.

[12] 李丽,冯华峰,周淳. 植物乳杆菌发酵黑果枸杞的代谢组学

- 研究[J]. *化学试剂*, 2022, 44(8): 1088–1096. [LI L, FENG H F, ZHOU C. Metabolomics study of *Lactobacillus plantarum* fermented *Lycium ruthenicum* Murr[J]. *Chemical Reagents*, 2022, 44(8): 1088–1096.]
- [13] 李泽娜, 刘畅, 吴乾峰, 等. 基于超高效液相色谱-串联质谱的不同加工干燥方法下的杜仲代谢组学分析[J]. *分析测试学报*, 2022, 7(41): 98–106. [LI Z N, LIU C, WU Q F, et al. Metabolomics analysis of eucommiae cortex obtained by different processing and drying methods based on ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Fenxi Ceshi Xuebao (Journal of Instrumental Analysis)*, 2022, 7(41): 98–106.]
- [14] 沈旻, 杨奕, 王晶波, 等. 基于超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱的非靶向代谢组学用于不同来源单花蜜的差异分析[J]. *色谱*, 2021, 39(3): 291–300. [SHEN S, YANG Y, WANG J B, et al. Analysis of differences between unifloral honeys from different botanical origins based on non-targeted metabolomics by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2021, 39(3): 291–300.]
- [15] 张雷, 张璐璐, 孙洪蕊, 等. 基于非靶向代谢组学的焙焦油莎豆粕精酿啤酒主发酵期代谢物变化研究[J]. *中国酿造*, 2022, 41(5): 89–95. [ZHANG L, ZHANG L L, SUN H R, et al. Metabolite changes of craft beer of baked *Cyperus esculentus* meal during main fermentation based on untargeted metabolomics[J]. *China Brewing*, 2022, 41(5): 89–95.]
- [16] 李峰庆, 王福, 杨放晴, 等. 利用UHPLC-ESI-MS/MS法测定川陈皮与其混伪品中的黄酮类成分[J]. *天然产物研究与开发*, 2020, 32: 1324–1330. [LI F Q, WANG F, YANG F Q, et al. Analysis of flavonoids in Chuan citrus reticulata pericarpium and its adulterant using UHPLC-ESI-MS/MS[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2020, 32: 1324–1330.]
- [17] 张舒, 王长远, 冯玉超, 等. 气相色谱-质谱联用代谢组学技术分析不同产地稻米代谢物[J]. *食品科学*, 2021, 42(8): 206–213. [ZHANG S, WANG C Y, FENG Y C, et al. Analysis of metabolites in rice produced in different regions by GC-MS-based metabolomics[J]. *Food Science*, 2021, 42(8): 206–213.]
- [18] 金文刚, 赵萍, 刘俊霞, 等. 基于GC-MS代谢组学分析大鲵肉冷藏过程中肌肉代谢产物差异[J]. *食品科学*, 2022, 43(24): 192–201. [JIN W G, ZHAO P, LIU J X, et al. Analysis of muscle metabolites of giant salamander (*Andrias davidianus*) meat during cold storage based on gas chromatography-mass spectrometry metabolomics[J]. *Food Science*, 2022, 43(24): 192–201.]
- [19] 吴雅琼, 张春红, 杨海燕, 等. 基于代谢组学分析黑莓、黑树莓果实代谢物的差异[J]. *江苏农业学报*, 2022, 38(3): 790–797. [WU Y Q, ZHANG C H, YANG H Y, et al. Metabolomics analysis of differentially expressed metabolites in blackberry and black raspberry fruits[J]. *Jiangsu J of Agr Sci*, 2022, 38(3): 790–797.]
- [20] 姚沛琳, 刘梦茹, 杨澳, 等. 基于非靶向代谢组学的蓝莓酵素和沙棘酵素代谢产物特征比较[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(19): 160–166. [YAO P L, LIU M R, YANG A, et al. Comparison of metabolite characteristics of blueberry Jiaosu and sea-buckthorn Jiaosu based on non-targeted metabolomics approach[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(19): 160–166.]
- [21] YANG Y, DONG G Z, WANG Z, et al. Rumen and plasma metabolomics profiling by UHPLC-QTOF/MS revealed metabolic alterations associated with a high-corn diet in beef steers[J]. *PLoS One*, 2018, 13(11): e0208031.
- [22] 周婷, 田晓菊, 周桂珍, 等. 基于UPLC-LTQ-Orbitrap-MS的代谢组学方法分析枸杞酒发酵前后酚类物质的变化[J/OL]. *食品与发酵工业*: 1–9[2023-02-08]. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.030506. [ZHOU T, TIAN X J, ZHOU G Z, et al. Changes of phenolic substances in *Lycium barbarum* wine before and after the fermentation analyzed by UPLC-LTQ-Orbitrap-MS[J/OL]. *Food and Fermentation Industries*: 1–9[2023-02-08]. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.030506.]
- [23] 杨青青, 王智荣, 彭林, 等. 基于代谢组学分析两种产地青椒中非挥发性成分的差异[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(12): 216–223. [YANG Q Q, WANG Z R, PENG L, et al. Metabolomic analysis of non-volatile chemical components in *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc. from two origins[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(12): 216–223.]
- [24] 王兰兰, 宋晓卉, 杨笛, 等. 环境条件对植物有机酸影响研究进展[J]. *沈阳师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 37(3): 236–239. [WANG L L, SONG X H, YANG D, et al. Progress of the effects of environmental conditions on organic acids in plants[J]. *Journal of Shenyang Normal University (Natural Science Edition)*, 2019, 37(3): 236–239.]
- [25] 梁叶星, 张玲, 高飞虎, 等. 重庆水豆豉发酵过程中NaCl、还原糖和氨基酸变化与滋味的形成[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(18): 27–34. [LIANG Y X, ZHANG L, GAO F H, et al. Changes in NaCl, reducing sugar and amino acids and formation of tastes in Chongqing Shuidouchi during fermentation[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(18): 27–34.]
- [26] 刘少静, 刘萌, 郭秀英, 等. 枸杞润肤霜中两种酚酸类成分的高效液相色谱检测及质谱确证[J]. *分析科学学报*, 2016, 32(1): 133–136. [LIU S J, LIU M, GUO X Y, et al. Simultaneous determination of two phenolic acids components in wolfberry cream by high performance liquid chromatography and verification by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Analytical Science*, 2016, 32(1): 133–136.]
- [27] ZU M H, SONG H L, ZHANG J B, et al. *Lycium barbarum* lipid-based edible nanoparticles protect against experimental colitis[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2020, 187: 110747.
- [28] GAO Y, WEI Y, WANG Y, et al. *Lycium barbarum*: A traditional Chinese herb and a promising anti-aging agent[J]. *Aging and Disease*, 2017, 8(6): 778–791.
- [29] CHEYNIERV, COMTE G, DAVIES K M, et al. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 72(SI): 1–20.
- [30] 范彦娜, 赵俊香, 陈琨, 等. 枸杞ACE抑制肽成分提取及测定研究[J]. *中国卫生标准管理*, 2016, 7(20): 162–164. [FAN Y N, ZHAO J X, CHEN K, et al. Extraction and determination of ACE inhibitory peptide from Chinese wolfberry fruit[J]. *China Health Standard Management*, 2016, 7(20): 162–164.]