

## 基于不同提取溶剂和色谱分离模式的芒果浆代谢组学研究

张楠, 王雪, 王珂雯, 米璐, 杨诗妮, 徐雷, 徐贞贞

### Comparative Study of Different Extraction Solvents and Liquid Chromatography Separation Modes on Metabolomics Analysis of Mango Pulp

ZHANG Nan, WANG Xue, WANG Kewen, MI Lu, YANG Shini, XU Lei, and XU Zhenzhen

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024080198>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 响应面法优化黄浆水超滤工艺及其代谢组学分析

Optimization of Ultrafiltration Process of Yellow Serofluid by Response Surface Methodology and Its Metabolomics Analysis

食品工业科技. 2022, 43(7): 224–232 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021080098>

#### 基于代谢组学辨析广西长寿饮食模式对机体的有益影响

Exploring the Beneficial Effects of Guangxi Longevity Dietary Patterns on Human Body Based on Metabolomics

食品工业科技. 2022, 43(15): 9–18 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022010237>

#### 响应面法优化黄浆水絮凝工艺及其代谢组学分析

Optimization of Flocculation Process of Yellow Serofluid by Response Surface Methodology and Its Metabolomics Analysis

食品工业科技. 2022, 43(1): 244–252 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021080097>

#### 基于代谢组学研究红曲霉奶酪的代谢产物特征

Study on the Characteristics of Metabolites in *Monascus* Cheese Based on Metabolomics

食品工业科技. 2023, 44(21): 18–29 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023030126>

#### 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

Comparison of Metabolite Characteristics of Blueberry Jiaosu and Sea-buckthorn Jiaosu Based on Non-targeted Metabolomics Approach

食品工业科技. 2022, 43(19): 160–166 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021120282>

#### 基于广泛靶向代谢组学的不同产地红茶代谢产物比较分析

Comparative Analysis of Black Tea Metabolites from Different Origins Based on Extensively Targeted Metabolomics

食品工业科技. 2022, 43(2): 9–19 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021040110>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

张楠, 王雪, 王珂雯, 等. 基于不同提取溶剂和色谱分离模式的芒果浆代谢组学研究 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(12): 10–19. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024080198

ZHANG Nan, WANG Xue, WANG Kewen, et al. Comparative Study of Different Extraction Solvents and Liquid Chromatography Separation Modes on Metabolomics Analysis of Mango Pulp[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(12): 10–19. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024080198

·特邀主编专栏—组学分析技术在食品品质研究中的应用（客座主编：徐贞贞、张良晓、洪惠）·

# 基于不同提取溶剂和色谱分离模式的 芒果浆代谢组学研究

张 楠<sup>1</sup>, 王 雪<sup>1</sup>, 王珂雯<sup>1,2</sup>, 米 璐<sup>1,2</sup>, 杨诗妮<sup>1,2</sup>, 徐 雷<sup>1,\*</sup>, 徐贞贞<sup>1,2,\*</sup>

(1. 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 农业农村部农产品质量安全重点实验室,  
北京 100081;

2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

**摘要:** 本研究基于 UHPLC-QTOF-MS 代谢组学技术, 开展了 4 种提取溶剂和 2 种色谱模式对芒果浆代谢组学分析的比较研究, 旨在通过优化提取溶剂和色谱模式, 提出一种优化的代谢组学分析策略。采用四种提取溶剂 (纯水、0.1% 乙酸水、50% 甲醇水、0.1% 乙酸 50% 甲醇水, 分别记为 H<sub>2</sub>O、H<sub>2</sub>O+A、Me 和 Me+A 组) 及两种色谱模式 (HILIC 与 RPLC) 进行比较, 结果表明: 提取溶剂中添加 0.1% 乙酸可提高样品中 MS1 和 MS2 的采集数量及峰面积, 特别在峰面积为 10<sup>7</sup> 以上的高响应区间, 且样品的可注释组分数量提高, H<sub>2</sub>O+A 组为 H<sub>2</sub>O 组的 1.39 倍, Me+A 组为 Me 组的 1.15 倍, 同时, 添加乙酸组的 MS2 谱图更加清晰, 噪音干扰少; (H<sub>2</sub>O+A) + HILIC 和 (Me+A) +RPLC 模式表现出较强的互补性, 与传统仅使用 (Me+A) +RPLC 相比, 联用策略在芒果浆中共注释 311 种组分, 覆盖率增加了近 1 倍、极性范围扩大了 2.4 倍。本研究提出的 (H<sub>2</sub>O+A) +HILIC 和 (Me+A) +RPLC 联用分析策略, 显著提高了样品中组分的覆盖率和注释率, 为芒果浆等果蔬制品中组分解析提供了更加全面的分析方法。

**关键词:** 代谢组学, 提取溶剂, 色谱分离模式, 芒果浆

中图分类号: TS255.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)12-0010-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024080198

本文网刊: 

## Comparative Study of Different Extraction Solvents and Liquid Chromatography Separation Modes on Metabolomics Analysis of Mango Pulp

ZHANG Nan<sup>1</sup>, WANG Xue<sup>1</sup>, WANG Kewen<sup>1,2</sup>, MI Lu<sup>1,2</sup>, YANG Shini<sup>1,2</sup>, XU Lei<sup>1,\*</sup>, XU Zhenzhen<sup>1,2,\*</sup>

(1. Institute of Quality Standard & Testing Technology for Agro-products, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Agro-food Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100081, China;

2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** This study employed UHPLC-QTOF-MS based metabolomics to investigate the effect of different extraction solvents and chromatography separation modes on the metabolomic analysis of mango pulp, providing a comprehensive and high-throughput analytical method mango pulp. Four extraction solvents—H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O with 0.1% acetic acid (H<sub>2</sub>O+A), 50% MeOH (Me), and 50% MeOH with 0.1% acetic acid (Me+A)—were utilized alongside two chromatography modes, HILIC and RPLC. The results indicated that the addition of 0.1% acetic acid significantly enhanced the quantity and peak area of

收稿日期: 2024-08-22

基金项目: “十四五”国家重点研发计划项目课题 (2022YFD2100805)。

作者简介: 张楠 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 芒果基料品质评价, E-mail: 82101225512@caas.cn。

\* 通信作者: 徐雷 (1992-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 农产品质量与加工, E-mail: xulei03@caas.cn。

徐贞贞 (1985-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 果蔬基料加工与质量控制技术, E-mail: xuzhenzhen@caas.cn。

MS1 and MS2 particularly in the high-response region (peak area $>10^7$ ). Annotation results revealed that the number of annotated components in the H<sub>2</sub>O+A group was 1.39 times greater than that of the H<sub>2</sub>O group, and the Me+A group annotated 1.15 times more than that of the Me group. Additionally, MS2 spectra from the H<sub>2</sub>O+A and Me+A groups were cleaner, with less noise interference, leading to more accurate annotation results. The combination of (H<sub>2</sub>O+A)+HILIC and (Me+A)+RPLC exhibited strong complementarity. This strategy resulted in the annotation of 311 metabolites across mango pulp samples, nearly doubling quantity and expanding the polarity range by 2.4 times compared to the conventional method of (Me+A)+RPLC alone. Combining (H<sub>2</sub>O+A)+HILIC with (Me+A)+RPLC significantly enhanced metabolite coverage and annotation accuracy. It provides a more comprehensive analytical method for the analysis of components in fruit and vegetable products such as mango pulp.

**Key words:** metabolomics; extraction solvents; chromatographic separation modes; mango pulp

近年来,代谢组学技术的迅速发展为食品及植物样品中小分子组分的分析提供了强有力的工具<sup>[1]</sup>,不同提取溶剂<sup>[2]</sup>和色谱模式的选择会显著影响代谢物的覆盖率和注释率<sup>[3~4]</sup>。在植物源食品代谢组学分析的样品制备中,常见的提取溶剂包括水和50%甲醇溶液(添加或不添加乙酸),能够有效地提取不同极性的代谢物<sup>[5]</sup>。Doppler等<sup>[6]</sup>的研究结果显示,与纯水溶剂和50%的乙腈水溶剂相比,50%甲醇水溶剂可以从大麦中提取到更多的极性和中极性组分,和50%甲醇相比,水溶剂更利于极性组分的提取<sup>[7~9]</sup>。本课题组前期研究也证实,与纯甲醇相比,50%甲醇水溶剂能够有效提高针叶樱桃粉组分的覆盖率<sup>[10]</sup>。此外,有文献报道,向植物的提取溶剂中添加微量乙酸(0.1%~1%)可以提高检测组分的峰强和覆盖范围,进一步提高分析的灵敏度和准确性<sup>[6,11~12]</sup>。反相液相色谱(Reversed Phase Liquid Chromatography, RPLC)和亲水作用色谱(Hydrophilic Interaction Liquid Interaction Chromatography, HILIC)是代谢组学分析中常用的色谱分离模式。前者主要通过疏水作用分离中低极性组分,后者则主要通过氢键、范德华力和离子相互作用分离极性组分<sup>[13~14]</sup>。HILIC与RPLC在分离选择性上存在显著差异,二者相互补充<sup>[15]</sup>,能够显著拓宽代谢物的覆盖范围,从而提高组学分析的全面性和准确性<sup>[16~17]</sup>。尽管代谢组学技术在果蔬及其制品中的应用日益增多,但关于不同提取溶剂和色谱模式组合对代谢组学分析影响的系统性比较研究相对较少。

热带水果在全球食品市场中占据重要地位,芒果(*Mangifera indica L.*)因其丰富的营养价值和独特风味,被誉为“热带水果之王”,占据全球热带水果市场的50%以上<sup>[18~19]</sup>。芒果浆作为芒果的重要加工产品,富含酚类、氨基酸、脂质等多种植物化学成分,这些成分不仅为芒果浆带来独特的风味,还具有抗氧化、抗炎等生物活性,赋予了其潜在的健康价值<sup>[20]</sup>。近年来,随着新茶饮等新消费形态的兴起,芒果浆作为高端果品基料,受到了市场的广泛关注。但现有研究对芒果浆的代谢组学分析仍不全面,尚需进一步系统性的方法研究来提升其成分解析的深度和广度,以推动其潜在健康价值的发掘。针对上述不足,本研究

以芒果浆为研究对象,系统比较了四种提取溶剂(纯水、0.1%乙酸水、50%甲醇水、0.1%乙酸+50%甲醇水)及两种色谱模式(HILIC和RPLC)在代谢组学分析中的表现。通过分析不同溶剂和色谱模式对代谢物的覆盖率、极性分布及注释效率的影响,本研究旨在提出一种优化的代谢组学分析策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

芒果浆 广州市领航食品有限公司提供(2022年7月),由台农芒果制成,采样后立即冷冻并保存于-20℃,冷冻贮藏保质期18个月;乙腈、甲醇 质谱纯, Fisher公司;甲酸 色谱纯, 迪科马公司;乙酸 色谱纯, 麦克林公司;乙酸铵 分析纯, 阿拉丁公司;纯净蒸馏水 广州屈臣氏食品饮料有限公司。

UHPLC-QTOF 6600 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用仪(配有电喷雾离子源(ESI)) 美国 SCIEX 公司; InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 色谱柱(3.0 mm×100 mm, 2.7 μm) 美国安捷伦科技有限公司; Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) 美国沃特世公司; Vortex Genius 3 涡旋混合仪 德国 IKA 公司; SK8200LHC 超声波清洗器 上海科导超声仪器有限公司; 08F107-42 天平 武汉艾德姆衡器有限公司; XS204 分析天平

瑞士 Mettler Toledo 公司; 3K15 高速冷冻离心机 扬州曦玛离心机有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 芒果浆样品前处理 以 Wang 等<sup>[10]</sup>的方法为基础并稍作修改,使用四种提取溶剂:纯水(H<sub>2</sub>O)、0.1%乙酸水溶液(H<sub>2</sub>O+A)、50%甲醇水溶液(Me)、0.1%乙酸+50%甲醇水溶液(Me+A)进行提取。称取3.00 g的芒果浆置于9 mL提取溶剂中、涡旋混匀10 s,在4℃下水浴超声30 min,9000 r/min离心15 min,取上清液依次过0.45 μm和0.22 μm的针式过滤器,得到待测样品。

采用上述四组溶剂对芒果浆进行提取,每种提取重复6次。并制备QC样品用于数据质量控制分析。所有样品均于-80℃条件下保存备用。

1.2.2 UHPLC 条件 UHPLC 条件以 Wang 等<sup>[10]</sup>的方法为基础并稍作修改。HILIC 色谱条件:流动相

A: 10 mmol/L 乙酸铵水溶液, 流动相 B: 乙腈, 梯度洗脱程序: 0~2.00 min, 5% A; 2.00~7.00 min, 5%~20% A; 7.00~13.00 min, 20%~32% A; 13.00~16.00 min, 32%~35% A; 16.00~16.01 min, 35%~5% A; 16.01~18.00 min, 5% A。柱温 40 °C, 自动进样器温度 4 °C, 进样量 2.0 μL, 流速 0.50 mL/min。RPLC 色谱条件: 流动相 A: 0.2% 甲酸水, 流动相 B: 乙腈, 梯度洗脱程序: 0~11.5 min, 5%~30% B; 11.5~11.51 min, 30%~100% B; 11.51~15.00 min, 100% B; 15.01~15.01 min, 100%~5% B; 15.01~18.00 min, 5% B。柱温 40 °C, 自动进样器温度 4 °C, 进样量 2.0 μL, 流速 0.30 mL/min。

水相( $H_2O$  和  $H_2O+A$ )和醇相(Me 和 Me+A)提取液分别使用亲水作用色谱柱和反相液相色谱柱进行色谱分离, 具体信息详见表 1。

表 1 提取溶剂及色谱柱类型

Table 1 Extraction solvent and chromatographic column types

提取溶剂	编号缩写	色谱柱	溶剂pH
水	$H_2O$	HILIC-Z	6.12
水+0.1%乙酸	$H_2O+A$	HILIC-Z	2.67
50%甲醇	Me	BEH C <sub>18</sub>	5.98
50%甲醇+0.1%乙酸	Me+A	BEH C <sub>18</sub>	3.14

1.2.3 QTOF-MS 条件 在正离子模式下使用信息依赖型(Information Dependent Acquisition, IDA)质谱模式采集数据, IDA(Cycle Time 为 551 ms)由 TOF MS 扫描(Accumulation Time 为 50 ms)和高灵敏度模式下的产物离子扫描(Accumulation Time 为 30 ms)组成。质谱条件: 电喷雾离子源(ESI<sup>+</sup>), 一级母离子质谱扫描范围为 100~1500 Da, 离子碰撞能量(Collision Energy, CE)为 10 eV; 产物离子质谱扫描范围为 50~1500 Da, CE 为 35 eV, 离子碰撞能量范围(Collision Energy Spread, CES)为 15 eV; 去簇电压(Declustering Potential, DP)为 60 V, 离子源温度为 500 °C, 雾化器气压(Ion Source Gas 1)为 50 psi, 辅助加热气气压(Ion Source Gas 2)为 50 psi, 气帘气气压(Curtain Gas)为 25 psi。整个运行过程中, 每间隔 5 针样品采集一次 QC 样品, 用于监测仪器的稳定性。同时, 每采集 5 次样品后, 通过 CDS 输送校正液, 经由 APCI 源进入离子源, 对仪器进行校正。

### 1.3 数据处理

UHPLC-QTOF-MS 数据通过 MS-DIAL 软件(版本 5.12)进行处理<sup>[21]</sup>, 包括峰提取、峰对齐、与公共数据库和本地数据库中化合物匹配定性。峰提取时, MS 的质量允许偏差设置为 15 ppm。峰对齐时, 保留时间(Retention Time, RT)允许偏差设置为 0.1 min, MS 质量允许偏差为 10 ppm, 保留在 QC 组中检出率<80% 且相对标准偏差<30% 的 MS1 用于覆盖率、注释率、组分极性范围和谱图分析。组分匹配定性时, MS 和 MS/MS 质量允许偏差分别设置为

10 ppm 和 25 ppm, 并筛选峰面积大于 5000 的色谱峰, 剔除和数据库中 MS/MS 谱图镜像图匹配较差的色谱峰, 组分的相关信息通过 PubChem 和 ChemSpider 网站查询, 数据归一化采用总峰面积归一化, 标准化采用 Auto scaling, 使用 King Draw 绘制化学式, 使用 R 4.3.2 和 Origin 2021 进行可视化分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 一级质谱信息与覆盖率

总离子流色谱图(Total Ion Chromatogram, TIC)如图 1a 所示, 每个数据点都代表一个 MS1 峰, 通过 QC 样本进行数据质量控制, 验证了数据的可靠性和重复性。根据峰面积的大小, 将 MS1 分为 5 个区间( $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$  和  $10^7$  以上(图中简写为  $10^7-$ )), 并通过堆叠柱状图(图 1b)展示 QC 样品的 MS1 在不同提取溶剂和色谱模式下的分布情况。结果表明, HILIC 和 RPLC 四组样品中, 峰面积大于  $10^4$  的 MS1 占比均超过 98%, 大部分集中在  $10^4$  至  $10^5$  区间。相比于  $H_2O$  组和 Me 组,  $H_2O+A$  组和 Me+A 组在  $10^3$  区间内的 MS1 数量更少, 而峰面积大于  $10^6$  的 MS1 数量在  $H_2O+A$  组中提高了 38.09%, 在 Me+A 组中提高了 40.30%。此外, 在  $10^7$  以上的区间内,  $H_2O+A$  组和 Me+A 组的 MS1 数量分别是  $H_2O$  组和 Me 组的 5 倍和 3 倍。

采用 Upset 图(图 1c)分析芒果浆中共有和特有的组分。在 HILIC 模式下,  $H_2O+A$  组与  $H_2O$  组共有的 MS1 数量为 7542 个, 分别占各自总 MS1 数量的 93.68% 和 85.31%;  $H_2O$  组和  $H_2O+A$  组特有的 MS1 数量分别为 509 个和 1299 个。在 RPLC 模式下, Me 组和 Me+A 组共有的 MS1 数量为 3355 个, 分别占各自总 MS1 数量的 89.95% 和 81.51%; 375 个 MS1 仅出现在 Me 组, 761 个 MS1 仅出现在 Me+A 组。研究结果表明, 提取溶剂中添加 0.1% 乙酸有助于增加 MS1 的采集数量, 尤其是在  $10^4$  以上的区间内, 而在  $10^3$  区间内则表现出一定的抑制作用。

上述研究和与前人研究一致, De 等<sup>[22]</sup>的研究结果显示, 与 75% 甲醇相比, 0.1% 甲酸+75% 甲醇在拟南芥中能够提取到更多的 MS1 数量; Zhang 等<sup>[23]</sup>的研究表明, 和 0.1% 甲酸相比, 在提取溶剂中添加 0.1% 的乙酸后采集的 MS1 数量提升 3 倍、峰面积明显提升。在正离子模式下, 乙酸可以促进质子化使得在高响应区间内的代谢物更容易被离子化, 从而提高 MS1 的采集数量和强度。而低响应区间的某些组分, 可能由于质子化程度的增强, 导致竞争性抑制, 影响它们的有效离子化, 进而导致 MS1 信号减弱<sup>[24~25]</sup>。

### 2.2 二级质谱信息与注释率

如图 2a 所示, 在不同提取溶剂和色谱模式下, 具有 MS2 的 MS1 数量占整体的 70% 以上, 且 99% 的 MS2 对应的 MS1 峰面积高于  $10^4$ ; 在  $10^7$  以上的高响应区间内  $H_2O+A$  组的 MS2 数量比  $H_2O$  组多

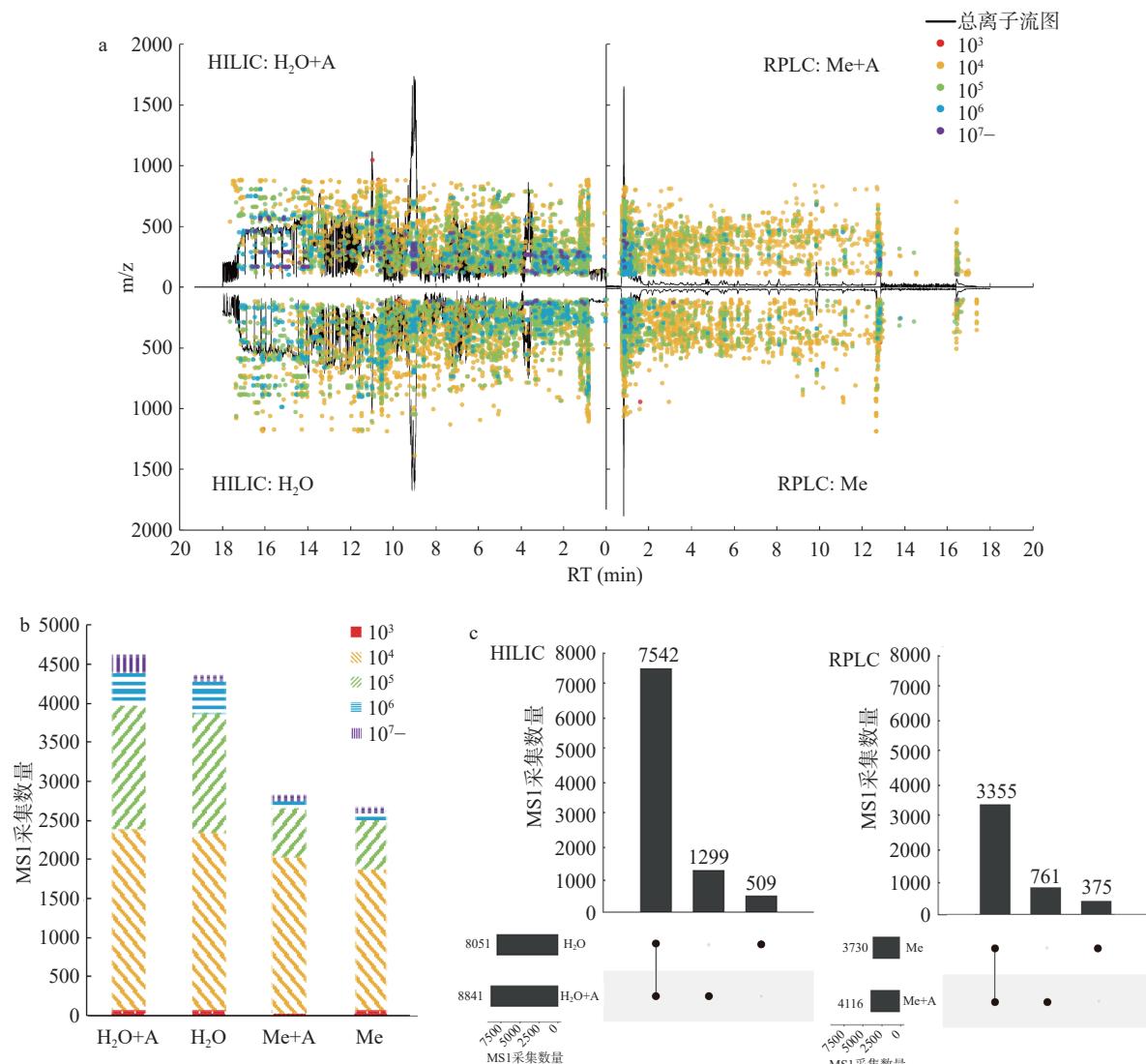


图 1 不同提取溶剂和色谱柱分析的 MS1 信息

Fig.1 Number of MS1 obtained by different extraction solvents and chromatography modes

注: a: 不同提取溶剂和色谱柱分析的 MS1 信息气泡图; b: 不同提取溶剂和色谱柱分析的 MS1 信息堆叠柱状图; c: 不同提取溶剂和色谱柱分析的 MS1 信息 Upset 图。

143,  $\text{Me}+\text{A}$  组比  $\text{Me}$  组多 42; 而在  $10^3$  的低响应区间内, 仅  $\text{H}_2\text{O}$  组和  $\text{Me}$  组采集到部分 MS2 信息。如图 2b、图 2c 所示,  $\text{H}_2\text{O}+\text{A}$  组注释组分数量是  $\text{H}_2\text{O}$  组的 1.39 倍, 两组共有组分 137 个,  $\text{Me}+\text{A}$  组注释组分数量是  $\text{Me}$  组的 1.15 倍, 两组共有组分 117 个。图 2d 显示芒果浆注释组分的峰面积范围大多集中在  $10^5$  到  $10^6$  内, 在  $10^3$  的低响应区间内未注释到组分, 表明该区间内的 MS2 可能来源于背景噪声或其他干扰信号; 添加乙酸组在低响应区间采集到的信号较少。结果表明提取溶剂中添加 0.1% 乙酸有助于提高离子化效率<sup>[25-26]</sup>, 提高代谢物响应强度, 高响应区间的 MS2 采集数量和可注释组分数量更多。此外, 添加乙酸可以促进酚类取代基的释放, 有助于酚类化合物的提取<sup>[27-28]</sup>,  $\text{H}_2\text{O}+\text{A}$  组比  $\text{H}_2\text{O}$  组多检测到 12 种酚类, 包括 7-O-甲基芒果苷, 甘草黄酮 B 和芥子醛葡萄糖苷等。前人研究也表明添加乙酸可提高酚类化合物的检出, 如 Azman 等<sup>[24]</sup>发现 pH 为

1.5 的乙酸缓冲液提取的黑醋栗皮中检测到更多的酚类化合物; Herrera-Pool 等<sup>[27]</sup>的研究也表明, 与水溶剂相比, 1% 乙酸水溶剂作为提取溶剂提高了辣椒叶中酚类化合物的响应, 木犀草素和芹菜素等酚类仅在 1% 乙酸水提物中检测到, 而未在水提物中检测到。

### 2.3 注释组分的极性比较

芒果浆注释组分的 RT 及其在相应流动相中的位置如图 3a 和图 3b 所示, 疏水常数 LogP 表示物质在水油两相中的分配系数, LogP 越小越亲水, 极性越强<sup>[13]</sup>。HILIC 色谱模式中, LogP 和 RT 呈负相关性<sup>[13]</sup>, 组分主要以 5%~35% 的水相比例中流出, 其中低极性组分( $\text{LogP}>4$ )在 RT 为 1~7 min 段洗脱, 而极性组分( $\text{LogP}<-4$ )在 RT 为 8~16 min 段洗脱, 此时流动相中的水相浓度较高, 有机相浓度较低, 亲水相互作用使得极性组分流出。Wang 等<sup>[14]</sup>研究结果也表明在该洗脱梯度更易于强极性组分的洗脱。

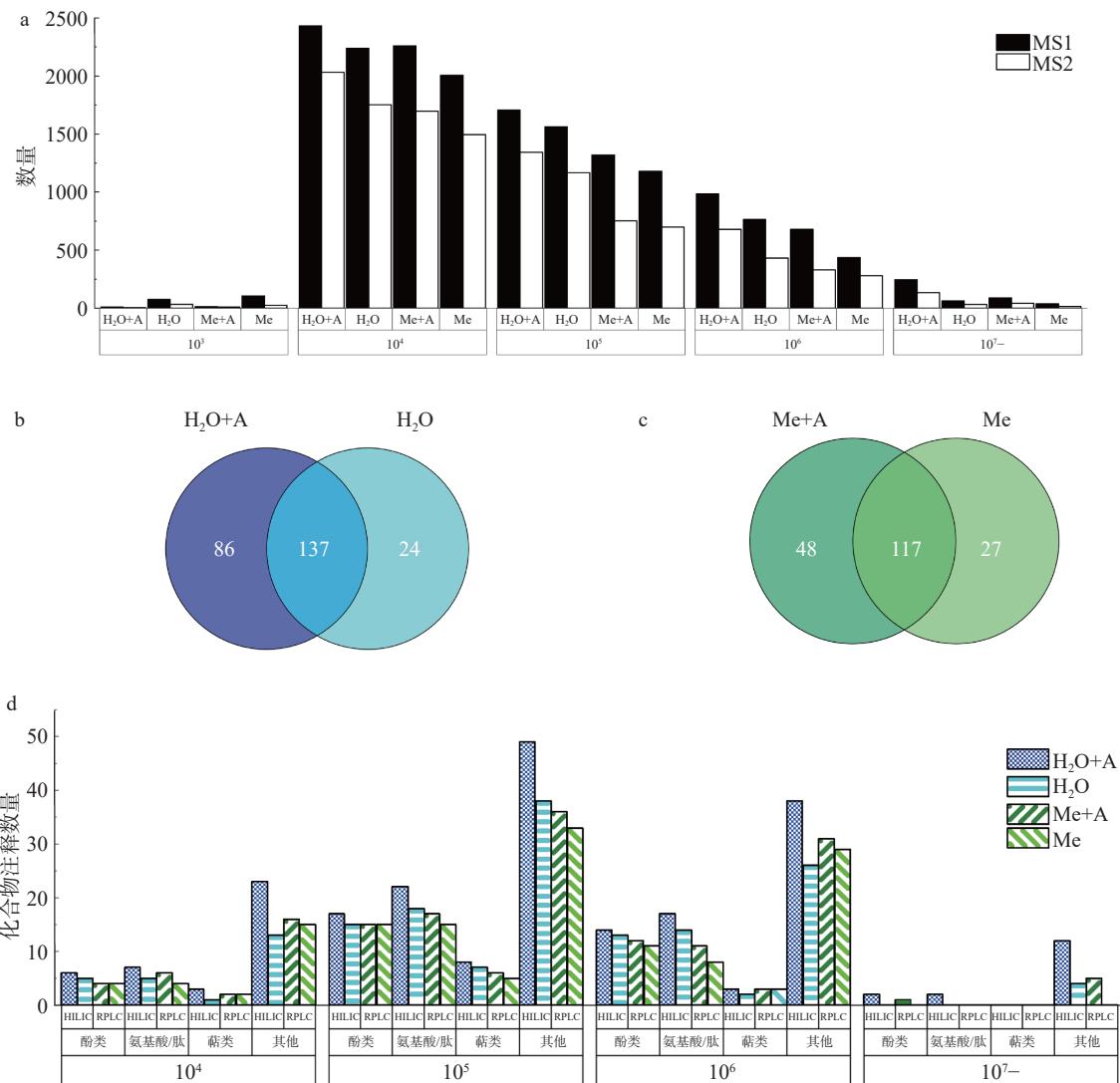


图 2 不同提取溶剂和色谱柱分析的 MS2 和注释组分信息

Fig.2 Number of MS2 and annotated compounds obtained by different extraction solvents and chromatography modes

注: a: 不同区间内 MS1 和 MS2 数量柱状图; b: HILIC 色谱定性结果韦恩图; c: RPLC 色谱定性结果韦恩图; d: 各类注释组分数量。

RPLC 色谱模式中组分的保留主要受疏水相互作用影响, LogP 和 RT 呈正相关性<sup>[29]</sup>, 组分主要在 5%~30% 的乙腈比例下流出, 其中低极性组分(LogP>4)在 RT 为 10~13 min 处洗脱, 极性组分(LogP<-2)主要在 RT 为 0~3 min 的低有机相比例下快速洗脱<sup>[13~14]</sup>。此外, RPLC 色谱模式中高响应区间注释组分主要在 5%~20% 的乙腈比例下流出, 且响应在 10<sup>7</sup> 以上的注释组分仅在 Me+A 组检出。如图 3c 和图 3d 所示, 不同提取溶剂在 HILIC 和 RPLC 色谱模式中的疏水常数 LogP 范围不同。H<sub>2</sub>O 组中 LogP 范围为 -9.1~13.6, H<sub>2</sub>O+A 组的 LogP 范围扩大为 -9.1~22.4; 与 H<sub>2</sub>O 组相比, H<sub>2</sub>O+A 组多注释到了 3 种中低极性的氨基酸、肽类化合物和 12 种酚类化合物, 极性脂质 β-甘油磷酸和低极性脂质油酰二棕榈酸酯、三油酸甘油酯(图 2d); Me 组和 Me+A 组注释组分的 LogP 范围差异较小, 分别为 -4.5~8.2 和 -4.8~8.54。结果表明, 提取溶剂对注释组分的极性分布有一定影响, 添加 0.1% 乙酸后 HILIC 色谱的极

性分布更为广泛, 且极性组分的注释数量增加。

#### 2.4 注释组分的谱图比较

HILIC 色谱模式中, 分别选择 H<sub>2</sub>O 和 H<sub>2</sub>O+A 组芒果浆共有和特有注释组分进行谱图比较研究。以共有组分 7-O-甲基芒果苷为例, 其镜像图和峰面积如图 4a 所示。与 H<sub>2</sub>O 组相比, H<sub>2</sub>O+A 组的注释组分镜像图更为干净, 噪音干扰少, 同时峰面积从 4.7×10<sup>5</sup> 提高到 1.8×10<sup>6</sup>。图 4b 为 H<sub>2</sub>O+A 组特有组分 N-甲基-L-脯氨酸在 H<sub>2</sub>O+A 组和 H<sub>2</sub>O 组中的镜像图, 其特征峰为 130.08, 在两组中均检测到对应的 MS2, 但在 H<sub>2</sub>O 组中 77.03 和 103.05 的杂峰和特征峰高度相当, 干扰组分的注释, 定性得分仅为 40, 而在 H<sub>2</sub>O+A 组中, 峰面积从 3.8×10<sup>5</sup> 增加到 1.5×10<sup>6</sup>, 且谱图没有噪音干扰, 定性得分 78, 因此 N-甲基-L-脯氨酸在 H<sub>2</sub>O+A 组中被成功注释。此外, 提取溶剂对不同极性组分的检测也有显著影响, 乙酸的添加能够促进极性组分的检测, 但部分中低极性组分可能会受到离子抑制<sup>[30]</sup>。如图 4c 所示, 东莨菪碱(LogP 为

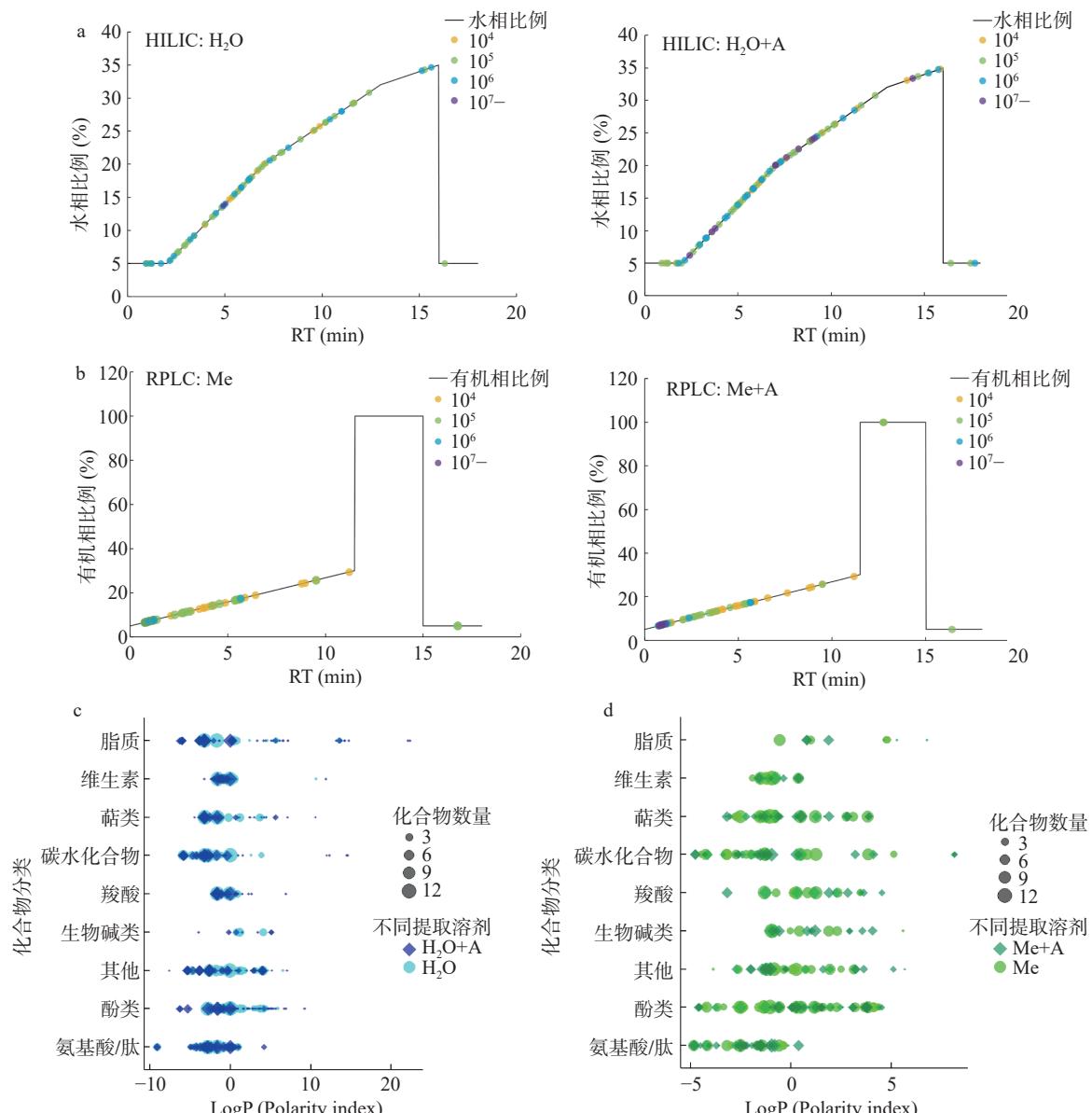


图 3 不同提取溶剂和色谱柱分析所得注释组分的洗脱梯度和极性分布

Fig.3 Elution gradient and polarity distribution of annotated compounds obtained by different extraction solvents and chromatography modes

注: a: HILIC 注释组分的保留时间(RT)和相应的流动相; b: RPLC 注释组分的保留时间(RT)和相应的流动相; c: HILIC 色谱模式下 H<sub>2</sub>O+A 和 H<sub>2</sub>O 组注释组分的极性范围; d: RPLC 色谱模式下 Me+A 和 Me 组注释组分的极性范围; 当有多个组分极性一致时, 根据数量多少依次变大。

-1.1)仅在 H<sub>2</sub>O+A 组中注释出, 而 β-萘基黄酮(LogP 为 4.4)仅在 H<sub>2</sub>O 组中检测到 MS2。

RPLC 色谱模式中, 分别选择 Me 和 Me+A 组芒果浆共有和特有注释组分进行谱图比较研究。以共有组分阿魏酸为例, 其镜像图和峰面积如图 5a 所示。与 Me 组相比, Me+A 组的注释组分镜像图更为干净, 噪音干扰少, 同时小提琴图显示其峰面积也更高。图 5b 为 Me+A 组特有组分岩豆素在 Me+A 组和 Me 组中的镜像图, 其特征峰为 367.08, 在两组中均检测到对应的 MS2, 但在 Me 组由于 MS2 噪音干扰较多, 部分杂峰与特征峰的高度相当, 干扰组分的注释, 定性得分为 50。尽管 Me+A 组中也存在噪音干扰, 但由于噪音高度相对较低, 能够明显区分特征

峰, 定性得分为 87, 表明岩豆素在 Me+A 组中被成功注释。同样, RPLC 色谱模式中, 提取溶剂对不同极性组分的检测也有不同影响。如图 5c 所示, 中低极性组分 2-乙酰基毛蕊花糖苷(LogP 为 3.04)仅在 Me+A 组中得到注释, 而在 Me 组中未检测到相应的 MS2 信号。相反, N,N-二甲基甘氨酸(LogP 为 -2.9)仅在 Me 组中得到注释, 在 Me+A 组中未检测到对应的 MS2。

综上所述, 与 H<sub>2</sub>O 组和 Me 组相比, H<sub>2</sub>O+A 组和 Me+A 组可以采集到更多、响应更高的 MS1 以及更加干净的 MS2, 得到的定性代谢物的覆盖率和极性范围更广。因此采用(H<sub>2</sub>O+A)+HILIC 与(Me+A)+RPLC 作为最佳方案进行后续研究。

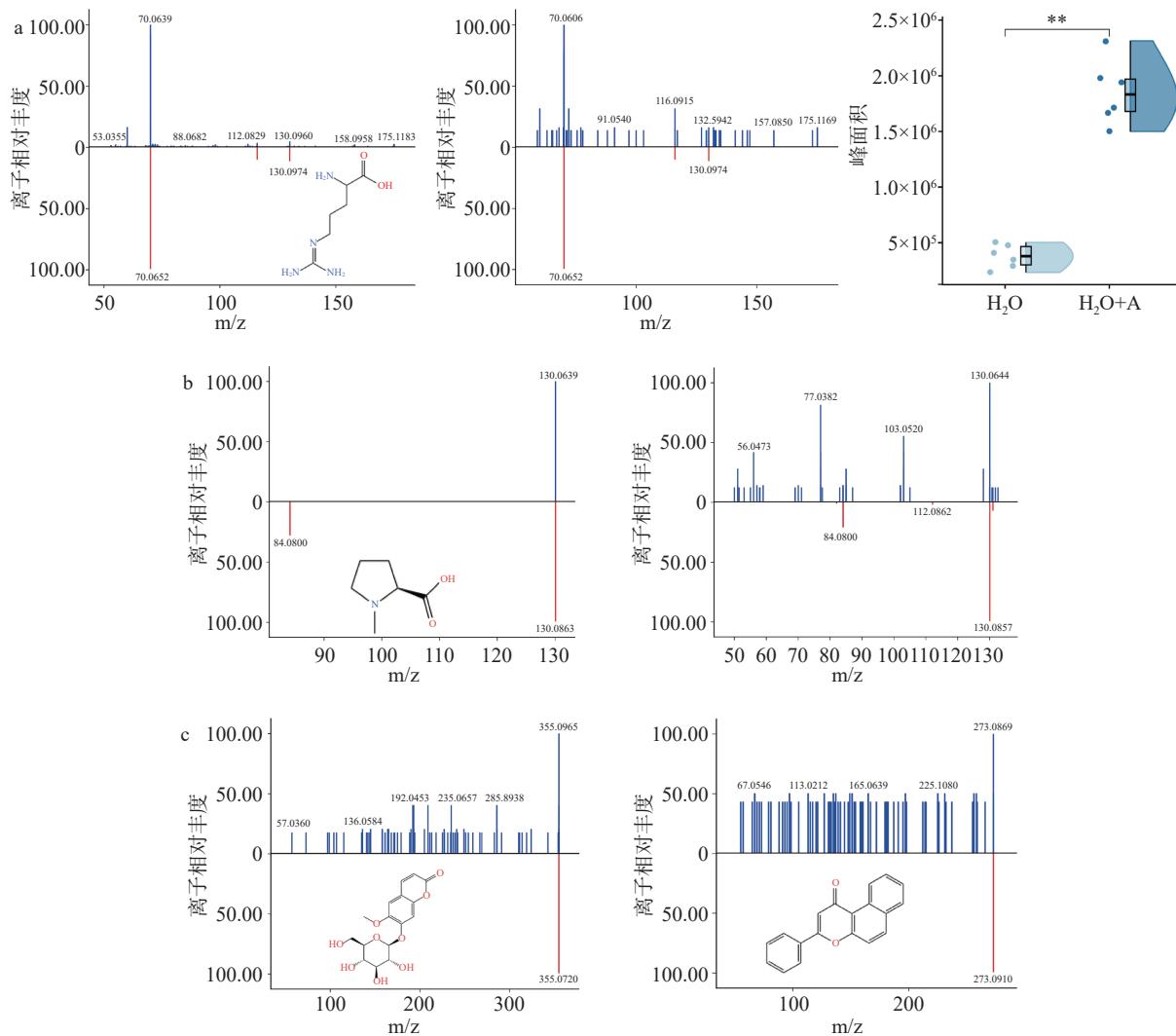
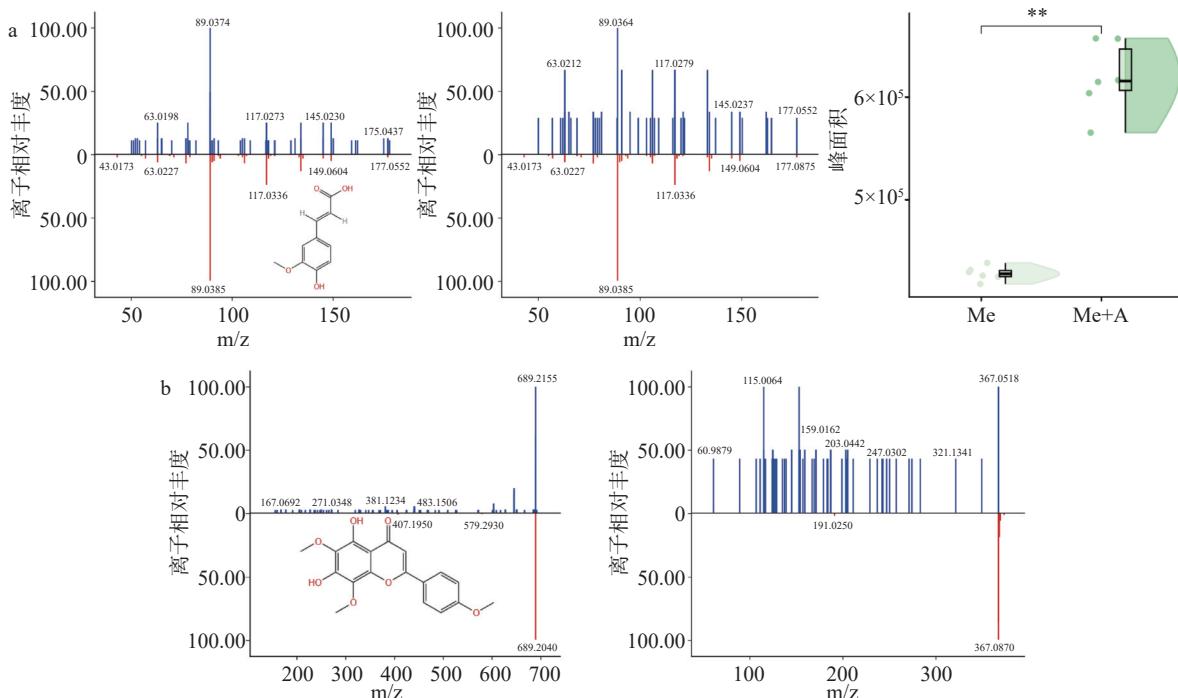


图 4 HILIC 色谱模式下不同提取溶剂中注释组分镜像图

Fig.4 Mirror plots of annotated compounds obtained by different extraction solvents and HILIC chromatography mode

注: a:  $\text{H}_2\text{O}+\text{A}$ (左)和 $\text{H}_2\text{O}$ (右)组共有组分 7-O-甲基芒果苷的镜像图和峰面积对比; b:  $\text{H}_2\text{O}+\text{A}$ 组特有组分 N-甲基-L-脯氨酸在 $\text{H}_2\text{O}+\text{A}$ (左)和 $\text{H}_2\text{O}$ (右)组的镜像图; c: 仅在 $\text{H}_2\text{O}+\text{A}$ 组(左, 东莨菪苷)/ $\text{H}_2\text{O}$ 组(右,  $\beta$ -萘基黄酮)注释到的特有组分; \*\*表示 T 检验  $P<0.01$ , 表明结果具有统计显著性; 图 5 同。



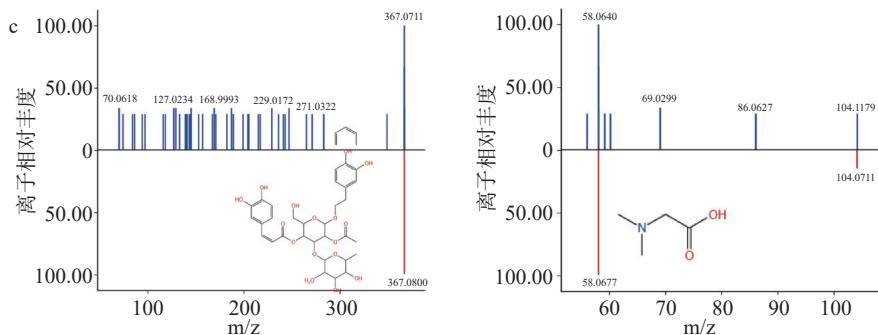


图 5 RPLC 色谱模式下不同提取溶剂中注释组分镜像图

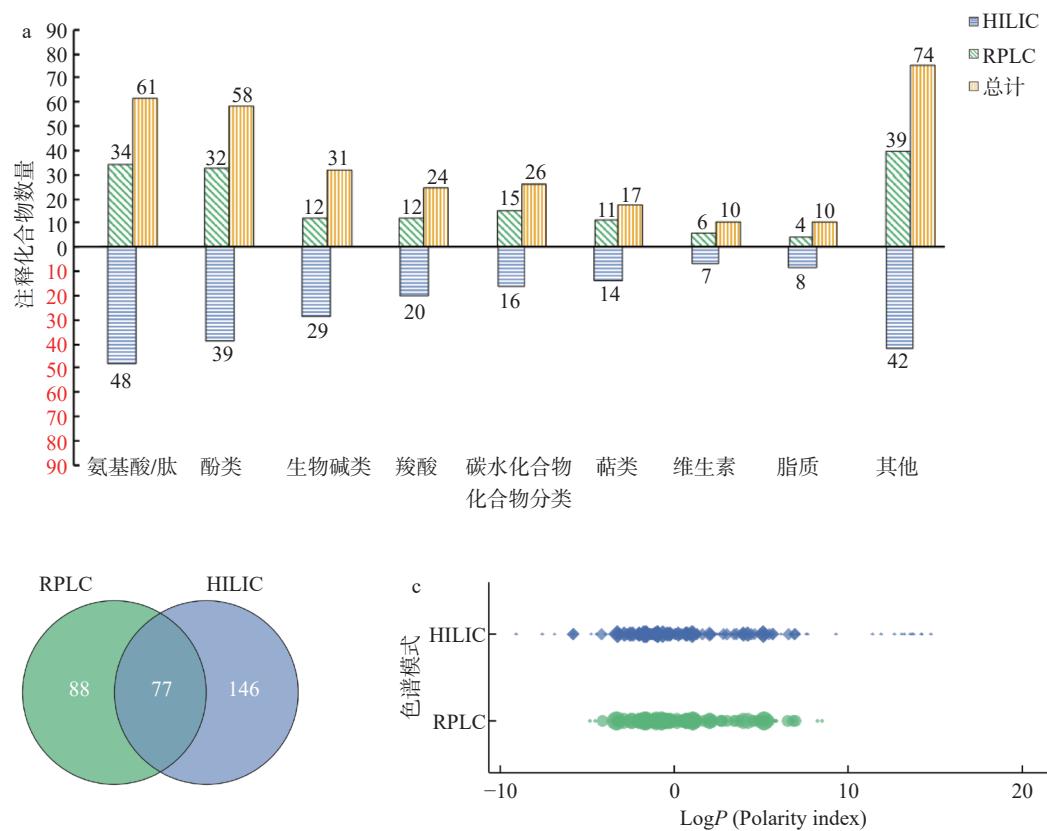
Fig.5 Mirror plots of annotated compounds obtained by different extraction solvents and RPLC chromatography mode

注: a: Me+A 组(左)和 Me 组(右)共有组分阿魏酸的镜像图和峰面积对比; b: Me+A 组特有组分岩豆素在 Me+A 组(左)和 Me 组(右)的镜像图; c: 仅在 Me+A 组(左), 2-乙酰基毛蕊花糖苷)/Me 组(右, N,N-二甲基甘氨酸)注释到的特有组分。

## 2.5 芒果浆的组分鉴定

如图 6a 和图 6b 所示, 将  $(\text{H}_2\text{O}+\text{A})+\text{HILIC}$  和  $(\text{Me}+\text{A})+\text{RPLC}$  两种模式芒果浆的注释结果进行比对, 和传统只使用  $(\text{Me}+\text{A})+\text{RPLC}$  模式相比, 联用分析策略所得可注释组分数量为传统方法的 1.9 倍。两种策略联用分析后, 在芒果浆样品中注释共到 311 种组分, 包括 61 种氨基酸、肽及其衍生物、58 种酚类、31 种生物碱类、26 种碳水化合物、24 种羧酸、17 种萜类化合物、10 种脂质、10 种维生素和 74 种其他类别化合物。其中酚类和氨基酸/肽类化合物注释数量提升 1.8 倍, 脂质注释数量提升 3.5 倍。如图 6c 所示, 和 RPLC 色谱相比 HILIC 色谱可注释组分的极性范围分布更广, 联用分析策略后可注释组分的 LogP 值范围为 -9.1~22.4, 是  $(\text{Me}+\text{A})+$

RPLC 模式的 2.4 倍。图 6d 进一步展示了 HILIC 和 RPLC 色谱模式中各类组分的 LogP 值分布, RPLC 色谱模式主要分离中低极性组分如 C17-鞘氨醇、四羟基-6,8-二异戊二烯基异黄酮、胆汁酸以及二芳基庚烷类芳香族天然产物。HILIC 色谱模式主要分离极性组分, 如二磷酸胆碱、三甲基赖氨酸、葫芦巴碱、甜菜碱等极性生物碱和极性脂质。此外, 还发现部分低极性的磷脂在 HILIC 色谱模式中被检测到, 这可能是由于这些磷脂含有磷酸基、糖基或其他极性基团, 使其能够在水溶剂中溶解并在 HILIC 色谱模式中实现有效检测<sup>[31]</sup>。本研究表明 HILIC 和 RPLC 色谱分离的化合物互补, 联用分析策略能够显著提高检测样品中的可注释组分数量和极性范围。



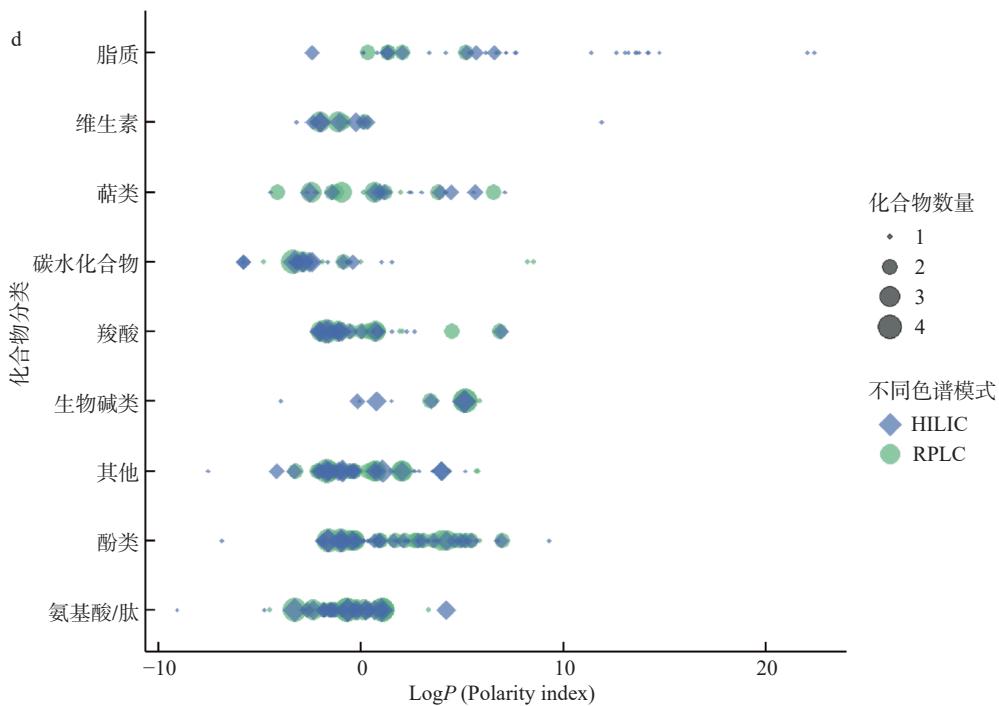


图 6 HILIC 和 RPLC 色谱分析注释组分信息

Fig.6 Annotated compounds obtained by HILIC and RPLC chromatography analysis

注: a: 各类注释组分的数量; b: 韦恩图; c: 注释组分极性范围; d: 各类组分极性分布; 当有多个组分极性一致时, 标志物根据数量多少依次变大。

### 3 结论

本研究采用基于 UHPLC-QTOF-MS 的代谢组学技术, 以芒果浆为研究对象, 系统比较了不同提取溶剂和色谱模式对代谢组学分析的影响。研究结果表明, 向提取溶剂中添加 0.1% 乙酸能够提高离子化效率, 可以增强代谢物的响应强度, 高响应区间内 MS1 和 MS2 数量显著增加。相比于  $\text{H}_2\text{O}$  组和 Me 组,  $\text{H}_2\text{O}+\text{A}$  组和 Me+A 组的谱图噪音干扰较少, 可注释组分数量增加、覆盖极性范围更广。不同色谱模式下代谢组学分析结果也有显著差异, 和 RPLC 色谱模式相比, HILIC 色谱模式中定性得到的代谢物覆盖率和极性范围更广, 二者具有较强的互补性。采用联用策略后, 可注释组分数量较传统的 (Me+A)+RPLC 模式提升了 1.9 倍, 极性范围扩大了 2.4 倍, 显著提高了代谢物的覆盖率和多样性, 联用策略在芒果浆中共检测到 311 种可注释组分。本研究提出了一种基于  $(\text{H}_2\text{O}+\text{A})+\text{HILIC}$  和  $(\text{Me}+\text{A})+\text{RPLC}$  的联用分析策略, 该策略有效拓宽了芒果浆样品中小分子组分的检测范围, 为高端果品基料的品质挖掘提供基础数据, 并为其他果蔬及其制品的代谢组学分析提供参考方法。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### 参考文献

[1] MANICKAM S, RAJAGOPALAN V R, KAMBALE R, et al.

Plant metabolomics: Current initiatives and future prospects[J].

*Current Issues in Molecular Biology*, 2023, 45(11): 8894–8906.

[2] DUPORTET X, AGGIO R B M, CARNEIRO S, et al. The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used[J]. *Metabolomics*, 2012, 8(3): 410–421.

[3] DOGAN H O. Metabolomics: A review of liquid chromatography mass spectrometry-based methods and clinical applications[J]. *Turkish Journal of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi*, 2024, 49(1): 1–14.

[4] LI D P, GAQUEREL E. Next-generation mass spectrometry metabolomics revives the functional analysis of plant metabolic diversity[M]//MERCHANT S S. Annual Review of Plant Biology, 2021, 72: 867–891.

[5] THEODORIDIS G, GIKA H, FRANCESCHI P, et al. LC-MS based global metabolite profiling of grapes: Solvent extraction protocol optimisation[J]. *Metabolomics*, 2012, 8(2): 175–185.

[6] DOPPLER M, KLUGER B, BUESCHL C, et al. Stable isotope-assisted evaluation of different extraction solvents for untargeted metabolomics of plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(7): 1017.

[7] KAROMAH A H, ILMIAWATI A, SYAFITRI U D, et al. LC-HRMS-based metabolomics of *Sida rhombifolia* and evaluation of its biological activity using different extracting solvent concentrations[J]. *South African Journal of Botany*, 2023, 161: 418–427.

[8] HENRY J A, KHATTRI R B, GUINGAB-CAGMAT J, et al. Intraspecific variation in polar and nonpolar metabolite profiles of a threatened Caribbean coral[J]. *Metabolomics*, 2021, 17(7): 60.

[9] MANNINO G, SERIO G, GAGLIO R, et al. Biological activity and metabolomics of *Griffonia simplicifolia* seeds extracted with different methodologies[J]. *Antioxidants*, 2023, 12(9): 1709.

[10] WANG K W, MI L, WANG X, et al. Integration of untargeted metabolomics and object-oriented data-processing protocols to

- characterize acerola powder composition as functional food ingredient[J]. *Antioxidants*, 2023, 12(7): 1341.
- [ 11 ] PILON A C, SELEGATO D M, FERNANDES R P, et al. Plant metabolomics: Methods and challenges[J]. *Quimica Nova*, 2020, 43(3): 329–354.
- [ 12 ] WANG J Y, JAYAPRAKASHA G K, PATIL B S. UPLC-QTOF-MS fingerprinting combined with chemometrics to assess the solvent extraction efficiency, phytochemical variation, and antioxidant activities of *Beta vulgaris* L.[J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2020, 28(2): 23–36.
- [ 13 ] DIAMANTIDOU D, SAMPSONIDIS I, LIAPIKOS T, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry metabolite library for metabolomics: Evaluating column suitability using a scoring approach[J]. *Journal of Chromatography A*, 2023, 1690: 463779.
- [ 14 ] WANG F, YANG F, LIU J W, et al. Studies on the retention mechanism of solutes in hydrophilic interaction chromatography using stoichiometric displacement theory II. HILIC/RPLC dual-retention mechanism of solutes in hydrophilic interaction chromatography over the entire range of water concentration in mobile phase[J]. *Talanta*, 2023, 265: 124858.
- [ 15 ] KOHLER I, VERHOEVEN M, HASELBERG R, et al. Hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry for metabolomics and proteomics: State-of-the-art and current trends[J]. *Microchemical Journal*, 2022, 175: 106986.
- [ 16 ] WANG W J, LIU Z Q, ROCHFORT S. Comprehensive analysis of phospholipids in pumpkin (*Cucurbita maxima*) seeds: Comparison with cashew nuts and almonds[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2024, 135: 106602.
- [ 17 ] XU Y Y, GAO Y, CHEN Z, et al. Metabolomics analysis of the soapberry (*Sapindus mukorossi* Gaertn.) pericarp during fruit development and ripening based on UHPLC-HRMS[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 11657.
- [ 18 ] NTSOANE M L, ZUDE-SASSE M, MAHAJAN P, et al. Quality assessment and postharvest technology of mango: A review of its current status and future perspectives[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 249: 77–85.
- [ 19 ] HERFORTH A, ARIMOND M, ALVAREZ-SÁNCHEZ C, et al. A global review of food-based dietary guidelines[J]. *Advances in Nutrition*, 2019, 10(4): 590–605.
- [ 20 ] YAHIA E M, DE JESU ORNELAS-PAZ J, BRECHT J K, et al. The contribution of mango fruit (*Mangifera indica* L.) to human nutrition and health[J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2023, 16(7): 104860.
- [ 21 ] XU L, XU Z Z, STRASHNOV I, et al. Use of information dependent acquisition mass spectra and sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion mass spectra for fruit juices metabolomics and authentication[J]. *Metabolomics*, 2020, 16(7): 81.
- [ 22 ] DE VOS R C H, MOCO S, LOMMEN A, et al. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(4): 778–791.
- [ 23 ] ZHANG X, CLAUSEN M R, ZHAO X, et al. Enhancing the power of liquid chromatography-mass spectrometry-based urine metabolomics in negative ion mode by optimization of the additive [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(18): 7785–7792.
- [ 24 ] AZMAN E M, CHARALAMPOPOULOS D, CHATZIFRAGKOU A. Acetic acid buffer as extraction medium for free and bound phenolics from dried blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) skins [J]. *J Food Sci*, 2020, 85(11): 3745–3755.
- [ 25 ] CREYDT M, ARNDT M, HUDZIK D, et al. Plant metabolomics: Evaluation of different extraction parameters for non-targeted UPLC-ESI-QTOF-Mass spectrometry at the example of white Asparagus officinalis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(48): 12876–12887.
- [ 26 ] BATTLELLINO T, OGATA K, SPICER V, et al. Acetic acid ion pairing additive for reversed-phase HPLC improves detection sensitivity in bottom-up proteomics compared to formic acid[J]. *Journal of Proteome Research*, 2023, 22(1): 272–278.
- [ 27 ] HERRERA-POOL E, RAMOS-DIAZ A L, LIZARDI-JIMENEZ M A, et al. Effect of solvent polarity on the Ultrasound Assisted extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from habanero pepper leaves (*Capsicum chinense*) and its identification by UPLC-PDA-ESI-MS/MS[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2021, 76: 105658.
- [ 28 ] CATENA S, RAKOTOMANOMANA N, ZUNIN P, et al. Solubility study and intensification of extraction of phenolic and anthocyanin compounds from *Oryza sativa* L. 'Violet Nori'[J]. *Ultrasound Sonochemistry*, 2020, 68: 105231.
- [ 29 ] LI J W. Evaluation of retention range of extractables under linear gradient conditions for Reversed-Phase chromatographic considerations and requirements in extractables analytical methods for chemical characterization of medical devices[J]. *Chromatographia*, 2022, 85(8): 755–771.
- [ 30 ] GUO R, ZHONG Q S, LIU J Q, et al. Polarity-extended liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry for simultaneous hydrophilic and hydrophobic metabolite analysis[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1277: 341655.
- [ 31 ] HINES K M, HERRON J, XU L B. Assessment of altered lipid homeostasis by HILIC-ion mobility-mass spectrometry-based lipidomics[J]. *Journal of Lipid Research*, 2017, 58(4): 809–819.