

# 基于UPLC-MS/MS的不同产地蜂糖李果实 初生代谢差异分析

张琴<sup>1</sup>, 董晓庆<sup>1,\*</sup>, 林欣<sup>1</sup>, 彭俊森<sup>1</sup>, 罗登灿<sup>1</sup>, 黄世安<sup>1</sup>, 朱守亮<sup>2</sup>

(1. 贵州大学农学院, 贵州省果树工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省果树蔬菜工作站, 贵州 贵阳 550025)

**摘要:** 采用超高效液相色谱-串联质谱技术对贵州省3个产地的蜂糖李果实初生代谢物进行代谢组学研究, 通过主成分分析、正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)等多元统计分析和代谢途径分析, 探讨产地对蜂糖李初生代谢产物的影响。实验共鉴定出307种代谢物, 分析发现产地对蜂糖李代谢物的种类和含量均有影响。良田蜂糖李相比六马蜂糖李存在13种差异代谢物, 惠水蜂糖李相比六马蜂糖李、良田蜂糖李都存在49种差异代谢物。同时OPLS-DA结果表明, 不同产地蜂糖李区分明显, 均有显著样本聚集区, 说明产地对蜂糖李初生代谢的影响很大。代谢通路分析发现, 不同产地间蜂糖李初生代谢差异机制主要在于氨基酸类物质的代谢, 对氨基酸类物质的影响最为显著。本研究可为蜂糖李产地鉴别提供理论依据, 为蜂糖李产地溯源提供一定参考。

**关键词:** 产地; 蜂糖李; 初生代谢; 超高效液相色谱-串联质谱; 代谢组学

## Ultra-high Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry-Based Metabolomic Analysis of Primary Metabolites in 'Fengtang' Plum Fruits from Different Geographical Origins

ZHANG Qin<sup>1</sup>, DONG Xiaqing<sup>1,\*</sup>, LIN Xin<sup>1</sup>, PENG Junsen<sup>1</sup>, LUO Dengcan<sup>1</sup>, HUANG Shi'an<sup>1</sup>, ZHU Shouliang<sup>2</sup>

(1. Guizhou Engineering Research Center for Fruit Crops, College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Workstation for Fruits and Vegetables, Guiyang 550025, China)

**Abstract:** Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)-based metabolomics was used to investigate primary metabolites in 'Fengtang' plum fruits from three production regions in Guizhou province. Multivariate statistical analyses such as principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) as well as metabolic pathway analysis were employed to explore the effect of the geographical origin on the primary metabolites of 'Fengtang' plum fruits. The results showed that a total of 307 metabolites were identified, and the geographic affected the type and content of metabolites in 'Fengtang' plum fruits. Meanwhile, 13 differential metabolites were identified between 'Fengtang' plum fruits from Liangtian and Liuma, and 49 differential metabolites were identified in 'Fengtang' plum fruits from Huishui versus Liuma, and Huishui versus Liangtian. In addition, the OPLS-DA results showed a clear discrimination between 'Fengtang' plum fruits from different geographical origins, and the samples showed an obvious clustering distribution, indicating that the geographical origin had a profound impact on the primary metabolites of 'Fengtang' plum fruits. Metabolic pathway analysis showed that the major mechanism for the difference in the primary metabolites of 'Fengtang' plum fruits from different production areas lay in the metabolism of amino acids, and it was found that the geographical origin imposed the most significant impact on amino acids. The results from this study can provide a theoretical basis for identifying and tracing the geographical origin of 'Fengtang' plum fruits.

**Keywords:** geographical origin; 'Fengtang' plum; primary metabolism; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; metabolomics

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220401-014

中图分类号: TS255.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)08-0284-09

收稿日期: 2022-04-01

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31960620)

第一作者简介: 张琴(1998—)(ORCID: 0000-0001-9287-2188), 女, 硕士研究生, 研究方向为果蔬采后生理与贮藏保鲜。

E-mail: 1872563440@qq.com

\*通信作者简介: 董晓庆(1980—)(ORCID: 0000-0003-0239-8633), 女, 副教授, 博士, 研究方向为果蔬采后生理与分子生物学。E-mail: xiaoqingdong09@163.com

引文格式:

张琴,董晓庆,林欣,等.基于UPLC-MS/MS的不同产地蜂糖李果实初生代谢差异分析[J].食品科学,2023,44(8):284-292. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220401-014. <http://www.spkx.net.cn>

ZHANG Qin, DONG Xiaoqing, LIN Xin, et al. Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based metabolomic analysis of primary metabolites in 'Fengtang' plum fruits from different geographical origins[J]. Food Science, 2023, 44(8): 284-292. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220401-014. <http://www.spkx.net.cn>

李 (*Prunus salicina* L.) 是蔷薇科 (Rosaceae) 李属 (*Prunus*) 多年生核果类树种, 中国的李种植面积和产量稳居全球第一<sup>[1]</sup>。蜂糖李 (*P. salicina* 'Fengtang') 是贵州农产品地理标志水果, 具有果大味甜、肉质酥脆、香味浓郁、营养丰富等优点而深受消费者青睐<sup>[2-3]</sup>。蜂糖李果实色泽鲜艳、质优味美, 虽价格较高, 但仍供不应求。故市场中频繁出现蜂糖李品质参差不齐的现象, 违法者以次充好损害消费者利益, 严重破坏市场秩序与原产地产品的价值, 进而影响产品销售和品牌推广。鉴于此, 区分出不同产地的蜂糖李果实对其品质的控制极其重要, 因此探究一种科学的蜂糖李产地与品质鉴别技术十分必要。

代谢组学是研究生物体内内源性代谢产物及其变化规律的一门学科<sup>[4-5]</sup>, 是系统生物学的重要组成部分, 其主要研究对象是相对分子质量小于1 000的小分子代谢产物, 包括有机酸、氨基酸、脂类、糖醇类化合物等物质<sup>[6]</sup>。目前, 基于超高效液相色谱-串联质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 的广泛靶向代谢组学技术具有优良的色谱分离度、高灵敏度及高分辨率而被广泛用于食品科学、医学和植物学等多个领域<sup>[7-10]</sup>。Nicholson等<sup>[11]</sup>对不同地区的拟南芥进行代谢组学研究, 发现不同的生长环境对拟南芥中氨基酸、糖的含量及种类有显著影响。林洁鑫等<sup>[12]</sup>通过UPLC-MS/MS技术对不同产地红茶的代谢物进行研究, 发现不同产地红茶的氨基酸类和黄酮类物质存在较大差异。Wang Yajun等<sup>[13]</sup>利用UPLC-MS/MS技术对宁夏3个不同产地的枸杞代谢物进行分析, 发现不同产地枸杞代谢物的种类和含量相差很大, 温度、海拔等外部因素也会不同程度改变枸杞中代谢物种类和含量。然而, 目前关于不同产地蜂糖李的代谢组学研究鲜见报道。

本研究采用UPLC-MS/MS的广泛靶向代谢组学技术对贵州省3个不同产地的蜂糖李果实进行代谢物比较分析, 探究产地对蜂糖李初生代谢物及代谢途径的影响, 并从差异代谢物的角度着手, 筛选对区分贵州省3个蜂糖李产地具有重要作用的差异代谢物, 以期对蜂糖李产地鉴别及溯源提供数据支持和理论参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

蜂糖李于2020年6月分别采自贵州省惠水 (HS)、

良田 (LT) 和六马 (LM) 三个产地, 每个产地选择5株健康生长、长势和坐果率基本一致的李果树, 从每株树的树冠外围中部沿东南西北4个方位随机选取20个果实, 每个产地共100个果实。各产地采摘后立即运抵贵州大学园艺实验室, 分别挑选大小均匀、色泽及成熟度 (8成熟) 一致、无损伤和病虫害的果实进行处理, 每个产地的果实均分为3份 (即3次重复), 去核后迅速置于液氮中, 随后转移至-80℃超低温冰箱冷冻保存备用。

甲醇、乙腈 (均为色谱纯) 德国Merck公司; 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 美国Sigma-Aldrich公司。

### 1.2 仪器与设备

Nexera X2 HPLC仪 日本岛津公司; 4500 QTRAP串联质谱仪 美国应用生物系统公司; Scientz-100F冻干机 宁波新芝生物科技股份有限公司; MM 400研磨仪 德国Retsch公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 样品制备

将超低温冷冻保存试样放置冻干机中进行真空冷冻干燥, 用研磨仪研磨 (30 Hz, 1.5 min) 至粉末状; 准确称取100 mg粉末, 溶解于1.2 mL 70%甲醇提取液中; 溶解后置于4℃冰箱过夜, 期间涡旋6次, 每30 min涡旋一次, 每次持续30 s; 12 000 r/min离心10 min后, 吸取上清液, 用0.22 μm微孔滤膜过滤, 并保存于进样瓶中, 用于UPLC-MS/MS分析。

#### 1.3.2 UPLC-MS/MS分析

参照张琴等<sup>[14]</sup>的分析条件。

色谱条件: Agilent SB-C<sub>18</sub>色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)。流动相: A为超纯水 (加0.1%的甲酸), B为乙腈 (加0.1%的甲酸); 梯度洗脱程序: 0.0~9.0 min, 95%~5% A、5%~95% B, 保持1 min; 10.0~11.1 min, 5%~95% A、95%~5% B, 并平衡至14.0 min; 流速0.35 mL/min; 柱温40℃; 进样量4 μL。

质谱条件: 电喷雾离子源温度500℃, 质谱电压5 500 V, 离子源气体I、气体II和帘气分别设置50、60、25 psi, 碰撞诱导电离参数设置为高。在三重四极杆中, 每个离子对根据优化的去簇电压和碰撞能进行扫描检测。

1.4 数据分析

基于迈维(武汉)技术有限公司自建MWDB数据库和代谢物信息公共数据库,根据二级谱信息进行物质定性;通过多反应监测模式扫描,利用物质检测的5个参数,分别为去簇电压、碰撞能、保留时间、母离子分子质量、特征碎片离子分子质量,以检测不同样本中的物质相对含量,获得物质的定性定量数据<sup>[15]</sup>。获得不同样本的代谢物质谱并对所有物质质谱峰进行峰面积积分,对其中同一代谢物在不同样本中的质谱出峰进行积分校正<sup>[16]</sup>。

对3个地区的蜂糖李果实代谢物进行两两比较,分别记为LM vs HS、LM vs LT、LT vs HS。采用多元统计分析,对3组供试样本进行主成分分析(principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)和聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)探析3个不同产地间的蜂糖李代谢特征。根据OPLS-DA模型获得的变量重要性投影(variable importance in the projection, VIP)值 $\geq 1$ 、差异倍数(fold change, FC) $\geq 2$ 或 $\leq 0.5$ 和t检验的 $P < 0.05$ 筛选组间差异代谢物<sup>[17]</sup>,最后利用京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库对相应差异代谢物进行代谢通路分析。

2 结果与分析

2.1 不同产地蜂糖李代谢组成分总体分析

3个产地共鉴定出6类307种代谢物(表1),其中脂质78种,氨基酸及其衍生物75种,有机酸54种,糖及醇类47种,核苷酸及其衍生物41种,维生素12种。惠水地区鉴定出306种代谢物,六马地区鉴定出299种代谢物,良田地区鉴定出300种代谢物;3产地蜂糖李共有的代谢物296种,惠水地区独有的代谢物有5种(S-烯丙基-L-半胱氨酸、N-乙酰-L-亮氨酸、2-氨基嘌呤、溶血磷脂酰胆碱15:1、溶血磷脂酰胆碱16:2)。

2.2 不同产地蜂糖李代谢组学差异分析

2.2.1 PCA和聚类分析

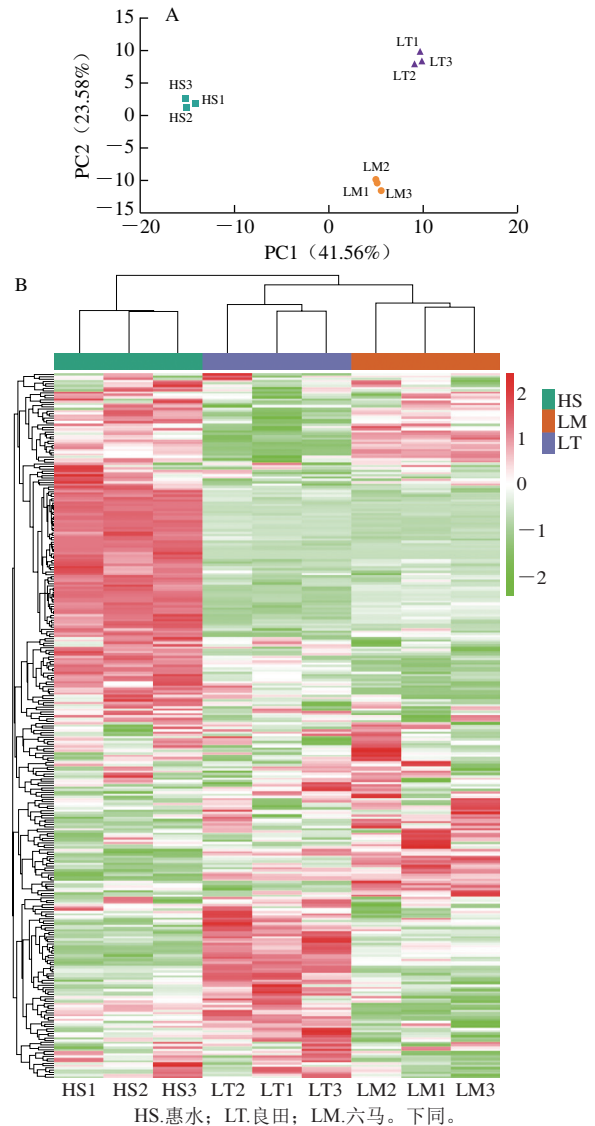


图1 PCA得分图(A)和聚类分析图(B)  
Fig. 1 PCA score plot (A) and cluster analysis (B)

表1 3个产地蜂糖李果实初生代谢物数量统计

Table 1 Statistics of primary metabolites in 'Fengtang' plum fruits from three production areas

物质分类	总数	共有	不同产地蜂糖李果实的初生代谢物数量统计		
			惠水	六马	良田
氨基酸及其衍生物	75	70	75	71 (S-烯丙基-L-半胱氨酸、N-乙酰-L-亮氨酸、N-乙酰-L-色氨酸、S-(5-腺苷)-L-高半胱氨酸)	72 (N-甲基甘氨酸、S-烯丙基-L-半胱氨酸、N-乙酰-L-亮氨酸)
有机酸	54	54	54	54	54
核苷酸及其衍生物	41	39	41	40 (2-氨基嘌呤)	39 (2-氨基嘌呤、环-3',5'-腺嘌呤核苷酸)
脂质	78	74	77 (10-十七碳烯酸)	75 (溶血磷脂酰胆碱15:1、溶血磷脂酰胆碱16:2、溶血磷脂酰胆碱18:0 (2n异构))	76 (溶血磷脂酰胆碱16:2、溶血磷脂酰胆碱 15:1)
糖及醇类	47	47	47	47	47
维生素	12	12	12	12	12
总计	307	296	306	299	300
特有代谢物			S-烯丙基-L-半胱氨酸、N-乙酰-L-亮氨酸、2-氨基嘌呤、溶血磷脂酰胆碱15:1、溶血磷脂酰胆碱16:2	—	—

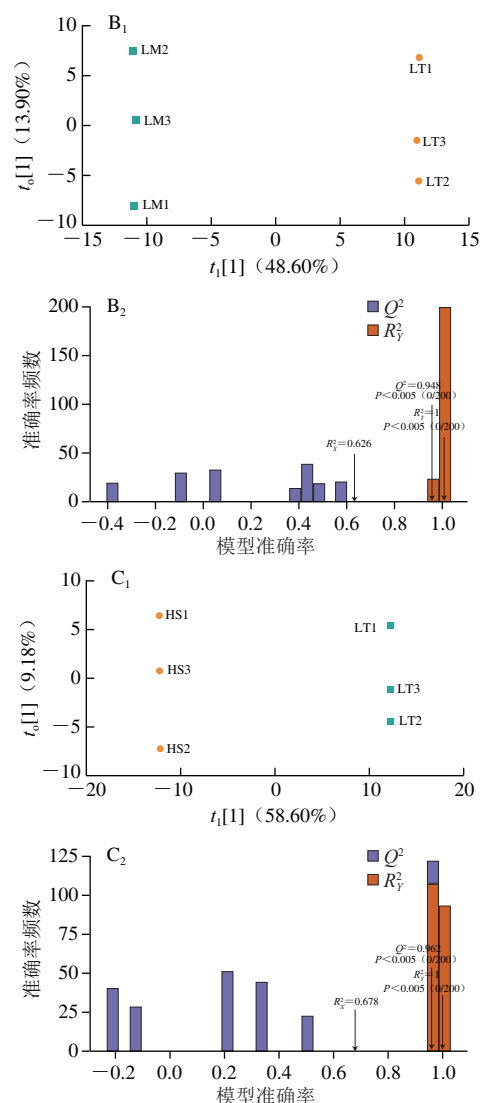
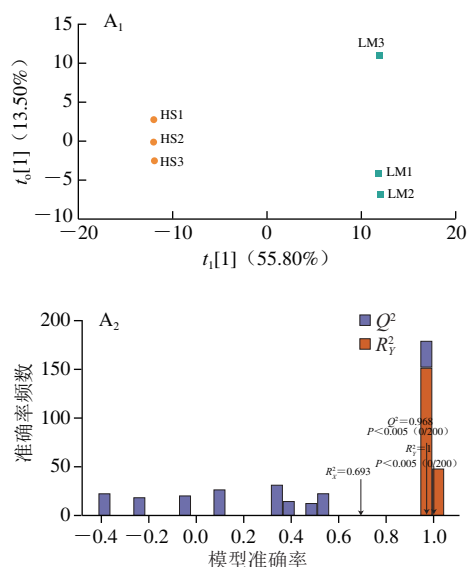
注: 括号内为未检测到的代谢物; —未检出, 下同。

对3个不同产地蜂糖李果实的总代谢物进行PCA(图1A), PC1的贡献率为41.56%, PC2的贡献率为23.58%。各组蜂糖李样本内部聚集在一起,不同产地间分离趋势明显,从PCA结果上总体反映了蜂糖李不同产地间的代谢物差异。聚类分析表明(图1B),不同产地蜂糖李存在明显的分组模式,良田蜂糖李和六马蜂糖李的代谢物种类与含量较为接近,聚为同一类;惠水蜂糖李单独聚在一类,与良田、六马蜂糖李差异较大。结合PCA和聚类分析共同表明,3个不同产地的蜂糖李果实具有不同的代谢特征。

### 2.2.2 OPLS-DA分析和置换检验分析

OPLS-DA是多元统计分析方法中一种有监督模式的分析方法,通过去除代谢物中与分类变量不相关的正交变量,从而获取更加可靠的代谢物的组间差异的相关程度信息筛选差异变量<sup>[18]</sup>。分别对六马蜂糖李、良田蜂糖李和惠水蜂糖李进行两两比较,由OPLS-DA得分图(图2A<sub>1</sub>、B<sub>1</sub>、C<sub>1</sub>)可知,LM vs HS的PC1贡献率为55.80%, PC2贡献率为13.50%; LM vs LT的PC1贡献率为48.60%, PC2贡献率为13.90%; LT vs HS的PC1贡献率为58.60%, PC2贡献率为9.18%,各比较组均表现出明显的分离趋势。

OPLS-DA模型验证(图2A<sub>2</sub>、B<sub>2</sub>、C<sub>2</sub>)表明LM vs HS组 $R_X^2$ 、 $R_Y^2$ 、 $Q^2$ 值,分别为0.693、1、0.968; LM vs LT组 $R_X^2$ 、 $R_Y^2$ 、 $Q^2$ 值,分别为0.626、1、0.948; LT vs HS组 $R_X^2$ 、 $R_Y^2$ 、 $Q^2$ 值,分别为0.678、1、0.962。各组OPLS-DA模型的评价参数中各指标均大于0.5且 $Q^2 > 0.9$ ,说明模型构建良好,预测性可靠。为避免过拟合,对OPLS-DA模型进行置换检验( $n=200$ ,即进行200次排列实验),实验结果显示,3组模型的原始 $R^2$ 和 $Q^2$ 均大于Y置换后的相应值,表明模型有意义,不存在过拟合现象,可根据VIP值分析筛选其差异代谢物。



A. LM vs HS; B. LM vs LT; C. LT vs HS。下同。下标1、2为OPLS-DA得分图和验证图。

图2 OPLS-DA得分图和验证图

Fig. 2 OPLS-DA score plot and permutation test of OPLS-DA model

### 2.2.3 不同产地蜂糖李差异代谢物的筛选

根据OPLS-DA结果,一般以 $VIP \geq 1$ ,  $FC \geq 2$ 或 $FC \leq 0.5$ 为标准筛选出显著差异代谢物。差异代谢物筛选结果如图3、表2所示,LM vs HS筛选到49种差异代谢物,包括14种氨基酸及其衍生物、8种核苷酸及其衍生物、25种脂质、2种有机酸,其中上调的物质45种,占91.84%;下调物质4种,占8.16%。LM vs LT筛选到13种差异代谢物,包括5种氨基酸及其衍生物、2种核苷酸及其衍生物、3种脂质、2种糖及醇类和1种有机酸,其中上调表达的物质有8种,占比61.54%;下调表达物质5种,占比38.46%。LT vs HS筛选到49种差异代谢物,包括脂质18种、氨基酸及其衍生物15种、核苷酸及其衍生物10种、糖及醇类2种、脂质2种及有机酸2种,其中43种物质上调,占比为87.76%;6种物质下调,占比为12.24%。



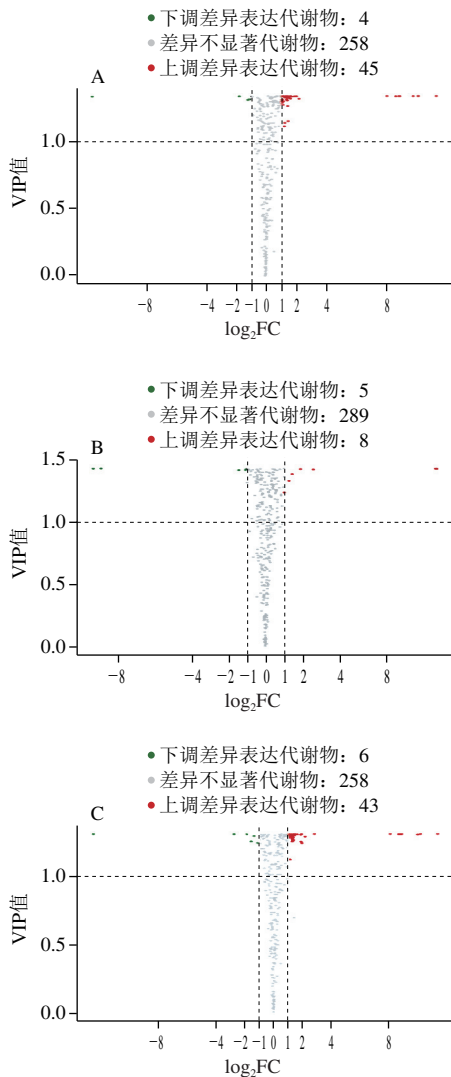


图3 差异代谢物火山图

Fig. 3 Volcano plots of differential metabolites

表2 不同产地蜂糖李果实间差异代谢物数量统计

Table 2 Statistics of differential metabolites in 'Fengtang' plum fruits from different geographical origins

物质分类	显著差异代谢物数量		
	LM vs HS	LM vs LT	LT vs HS
氨基酸及其衍生物	14	5	15
核苷酸及其衍生物	8	2	10
有机酸	2	1	2
脂质	25	3	20
糖及醇类	—	2	2
维生素	—	—	—
总计	49	13	49

### 2.3 不同产地蜂糖李差异代谢物分析

#### 2.3.1 不同产地蜂糖李差异代谢物热图分析

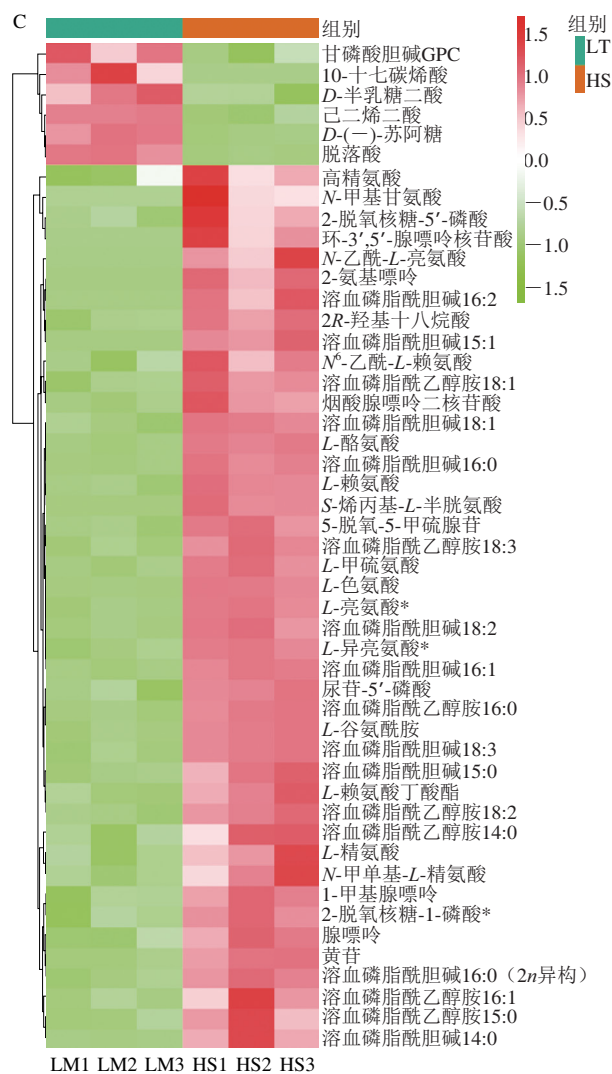
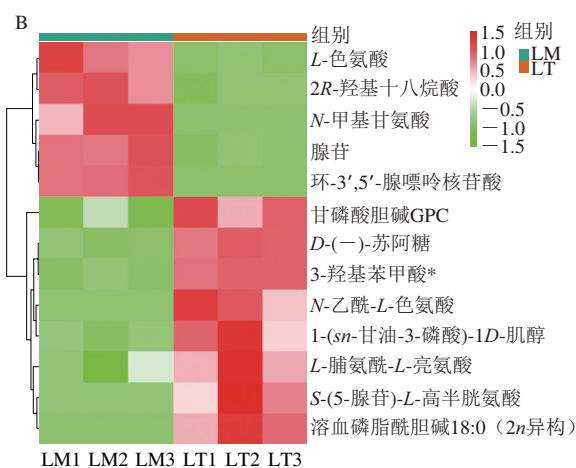
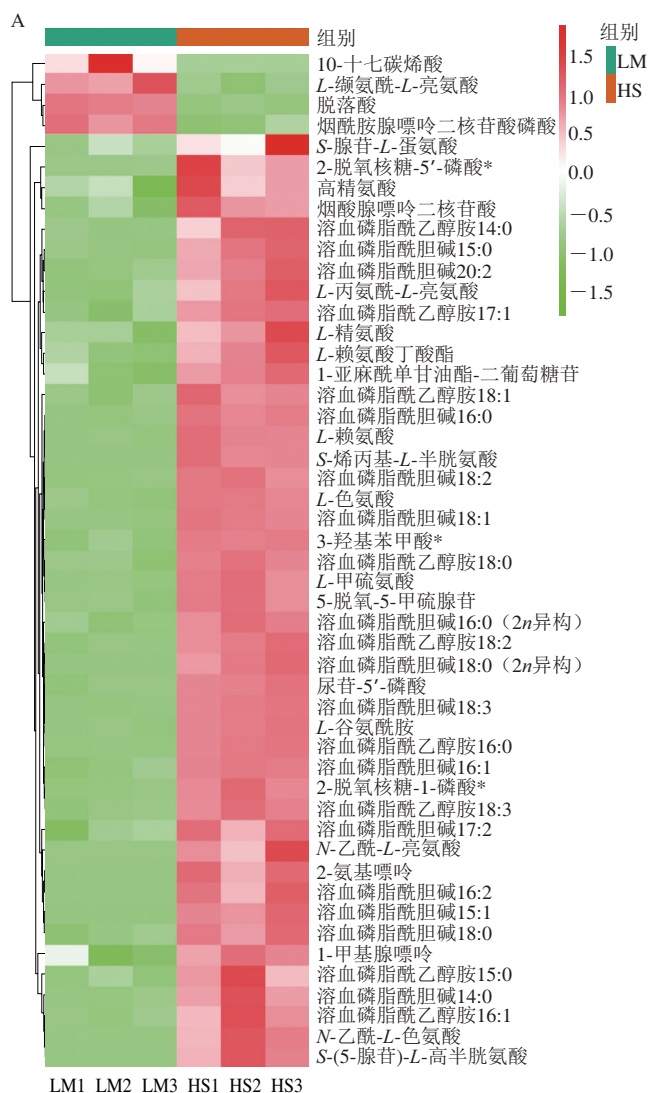
为方便直接观察代谢物变化规律,对显著差异代谢物进行热图分析,结果如图4所示,图中红色区域代表差异代谢物的高表达区,绿色区域代表差异代谢物的低

表达区。在LM vs HS比较组中(图4A),惠水蜂糖李差异代谢物主要集中在红色的高表达区域,而六马蜂糖李差异代谢物则主要集中在绿色的低表达区域,惠水蜂糖李中有4种(10-十七碳烯酸、*L*-缬氨酰-*L*-亮氨酸、脱落酸、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)差异代谢物的表达量显著低于六马蜂糖李;惠水地区的45种差异代谢物的表达量要明显高于六马地区,多数为脂质类物质,其中溶血磷脂酰胆碱类物质的含量变化与疾病类型和严重程度密切相关<sup>[19]</sup>,这类物质在临床病理研究、疾病诊断及预防等方面具有重要作用。

在LM vs LT比较组中(图4B),良田蜂糖李中有8种(*L*-脯氨酰-*L*-亮氨酸、*N*-乙酰-*L*-色氨酸、*S*-(5-腺苷)-*L*-高半胱氨酸、*D*-(一)-苏阿糖、1-(*sn*-甘油-3-磷酸)-1*D*-肌醇、3-羟基苯甲酸、甘磷酸胆碱GPC、溶血磷脂酰胆碱18:0(2*n*异构))差异代谢物的表达量明显高于六马蜂糖李,且主要集中在红色的高表达区,多为氨基酸类物质、糖及醇类物质,其中*S*-(5-腺苷)-*L*-高半胱氨酸和3-羟基苯甲酸的表达量较高,含有半胱氨酸的小分子肽具有较高的抗氧化活性<sup>[20]</sup>,常用作抗氧化剂应用于食品、药品等方面<sup>[21-22]</sup>。3-羟基苯甲酸可作为抗氧化剂,通过清除自由基,促进人体健康,同时激活体内的羧酸受体从而减少脂肪细胞的分解,以维持正常的血脂水平<sup>[23]</sup>。良田蜂糖李有5种(*N*-甲基甘氨酸、*L*-色氨酸、腺苷、环-3',5'-腺嘌呤核苷酸、2*R*-羟基十八烷酸)差异代谢物的表达量明显低于六马蜂糖李,且主要集中在绿色的低表达区域,说明良田地区蜂糖李差异代谢物的含量积累更高,代谢更为活跃。其中腺苷物质是一种内源性嘌呤核苷,腺苷与其腺苷受体相互作用启动腺苷信号及其通路,而腺苷信号及其通路作为中枢和周围神经系统中重要的信号通路之一<sup>[24]</sup>,不仅参与睡眠、运动、记忆等多种生理功能的调节,也在癫痫、疼痛、局部缺血、炎症和癌症等各种疾病状态下发挥着重要作用<sup>[25]</sup>。值得注意的是,LM vs LT的差异代谢物只有13种,明显少于其他两组,其可能原因是贵州六马和良田产地的地理位置相近,其生长环境相似,均属于典型的中亚热带气候,两地海拔(分别为1 264、1 182 m)、年日照时数(分别为1 327、1 408 h)相对接近,LM vs LT相比较,其代谢物的种类、数量和含量具有一定的相似性,显著差异代谢物较少。而惠水与六马、良田地理位置相距较远,惠水属于亚热带季风气候,海拔1 451 m、年日照时数1 165.6 h,与其他两地相比较具有一定的差异性。不同产地的海拔、光照、环境温度和土壤类型等生态因子均会引起蜂糖李中代谢物质的变化。

在LT vs HS比较组中(图4C),惠水蜂糖李差异代谢物主要集中在红色的高表达区,而良田蜂糖李则主要集中在绿色的低表达区,表明惠水地区的蜂糖李样品中

差异代谢物的含量普遍高于良田地区，惠水蜂糖李样品中的差异代谢物，其代谢机能更为活跃。产地不同其环境特点也各不相同，尽管六马地区、良田地区和惠水地区都位于同省份内，且均适合蜂糖李果树的生长，但惠水地处高原黄壤带区，属亚热带季风气候，年平均气温15.2℃，年平均降水量1178.2mm，而六马地区和良田地区均属典型的中亚热带气候，年平均气温分别为19.7、19.1℃，年平均降水量为1025、1100mm，气温、降水量均有差异，所以各产地生长的蜂糖李为适应环境会通过调节其代谢水平来适应环境，以便更好地生长，从而使得各产地蜂糖李的代谢物含量会出现差异，同时也会赋予蜂糖李果实不同的品质。此外，通过差异代谢物热图分析发现，产地对蜂糖李果实中各类代谢物的含量和种类具有显著影响，而差异代谢物是众多代谢物中因产地不同而引起含量明显变化的物质，因而差异代谢物对于蜂糖李产地鉴别具有一定的参考意义。



\*.该物质存在同分异构体，下同。

图4 差异代谢物热图

Fig. 4 Heatmaps of differential metabolites

### 2.3.2 不同产地蜂糖李共有差异代谢物分析

由图5得知，在LM vs HS、LM vs LT和LT vs HS比较组中，3个比较组间共同认定1个标志性物质鉴定为L-色

氨酸,表明该物质在3个不同产地蜂糖李的代谢物中贡献率最大,与PCA结果相互佐证。

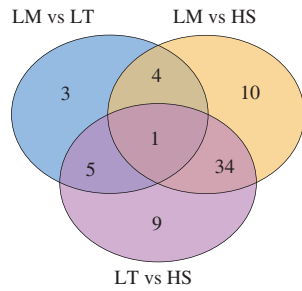


图5 差异代谢物Venn图

Fig. 5 Venn diagram of differential metabolites

### 2.3.3 不同产地蜂糖李特有差异代谢物分析

如图5所示,特有差异代谢物以LM vs HS最多为10种,LT vs HS次之9种,LM vs LT最少3种。由表3可知,LM vs HS的特有差异代谢物主要以脂质和氨基酸及其衍生物类物质为主,其中L-丙氨酰-L-亮氨酸、S-腺苷-L-蛋氨酸、1-亚麻酰单甘油酯-二葡萄糖苷、溶血磷脂酰乙醇胺17:1、溶血磷脂酰乙醇胺18:0、溶血磷脂酰胆碱17:2、溶血磷脂酰胆碱18:0、溶血磷脂酰胆碱20:2含量在惠水蜂糖李中显著上调,为六马蜂糖李的1.95~3.03倍;而L-缬氨酰-L-亮氨酸和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸的含量在惠水蜂糖李中显著下调,不及六马的1/2。由表4可知,LM vs LT的特有代谢物有3种,良田蜂糖李中1-(sn-甘油-3-磷酸)-1D-肌醇和L-脯氨酰-L-亮氨酸的含量显著上升;而腺苷含量则显著下降。由表5可知,LT vs HS的特有代谢物有9种,包括氨基酸及其衍生物类、核苷酸及其衍生物、糖及醇类物质,其中L-异亮氨酸\*、L-亮氨酸\*、腺嘌呤、L-酪氨酸、N<sup>6</sup>-乙酰-L-赖氨酸、N-单甲基-L-精氨酸、黄苷等物质的含量在惠水蜂糖李中上调表达,为良田蜂糖李的1.41~2.54倍;下调的代谢物有2种,分别为己二烯二酸、D-半乳糖二酸,且仅为良田的1/4~1/2。以上分析发现各组间的特有差异代谢物也在含量上差异显著,进一步说明了产地对蜂糖李果实代谢物含量的重要影响。

表3 LM vs HS特有差异代谢物

Table 3 Differential metabolites of LM vs HS plum fruits

序号	差异代谢物	VIP值	FC	log <sub>2</sub> FC	类型
1	L-丙氨酰-L-亮氨酸	1.301	2.055	1.039	上调
2	L-缬氨酰-L-亮氨酸	1.314	0.467	-1.097	下调
3	S-腺苷-L-蛋氨酸	1.113	2.358	1.238	上调
4	1-亚麻酰单甘油酯-二葡萄糖苷	1.273	2.230	1.157	上调
5	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸	1.309	0.438	-1.189	下调
6	溶血磷脂酰乙醇胺17:1	1.324	2.157	1.109	上调
7	溶血磷脂酰乙醇胺18:0	1.327	2.630	1.395	上调
8	溶血磷脂酰胆碱17:2	1.288	2.129	1.090	上调
9	溶血磷脂酰胆碱18:0	1.324	2.686	1.425	上调
10	溶血磷脂酰胆碱20:2	1.324	2.890	1.531	上调

表4 LM vs LT特有差异代谢物

Table 4 Differential metabolites of LM vs LT plum fruits

序号	差异代谢物	VIP值	FC	log <sub>2</sub> FC	类型
1	1-(sn-甘油-3-磷酸)-1D-肌醇	1.389	2.708	1.437	上调
2	L-脯氨酰-L-亮氨酸	1.240	2.033	1.023	上调
3	腺苷	1.428	0.479	-1.059	下调

表5 LT vs HS特有差异代谢物

Table 5 Differential metabolites of LT vs HS plum fruits

序号	差异代谢物	VIP值	FC	log <sub>2</sub> FC	类型
1	L-异亮氨酸*	1.299	2.223	1.152	上调
2	L-亮氨酸*	1.303	2.090	1.064	上调
3	腺嘌呤	1.276	2.055	1.039	上调
4	己二烯二酸	1.290	0.389	-1.358	下调
5	L-酪氨酸	1.304	2.747	1.458	上调
6	N <sup>6</sup> -乙酰-L-赖氨酸	1.259	2.516	1.331	上调
7	N-单甲基-L-精氨酸	1.268	2.455	1.296	上调
8	D-半乳糖二酸	1.250	0.338	-1.561	下调
9	黄苷	1.301	2.264	1.179	上调

### 2.4 不同产地蜂糖李差异代谢物的代谢通路分析

植物生长过程中经过多种物质和反应共同调控,是非常复杂的代谢过程,并不能从某一种物质含量的高低进行整体判断,因而需进一步对其代谢通路进行分析<sup>[26]</sup>。3个蜂糖李产地间的差异代谢物KEGG富集分析结果如图6所示,LM vs HS中的差异代谢物共分布于38条代谢通路(图6A),其中显著差异代谢通路有4条( $P < 0.05$ ),分别为氨基酰-tRNA生物合成、氨基酸生物合成、半胱氨酸和蛋氨酸代谢和玉米素生物合成途径。惠水相较于六马蜂糖李,氨基酰-tRNA生物合成途径有5种差异代谢物参与,均为氨基酸及其衍生物包括L-谷氨酰胺、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-精氨酸、L-色氨酸,其中L-谷氨酰胺和L-精氨酸不仅具有很高的营养价值,而且在治疗心血管、神经和免疫系统等疾病方面也具有显著的药用价值<sup>[27]</sup>,惠水蜂糖李中L-甲硫氨酸显著上调了3.77倍,是人体内必需氨基酸之一,在生命体活动过程中发挥着重要作用<sup>[28]</sup>,由于人体无法合成,所以日常饮食中的摄入非常重要。此结果有利于惠水地区开发和生产富含L-甲硫氨酸的蜂糖李。氨基酸生物合成途径有7种氨基酸及其衍生物参与,分别为L-谷氨酰胺、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-精氨酸、L-色氨酸、S-(5-腺苷)-L-高半胱氨酸、S-腺苷-L-蛋氨酸均在惠水蜂糖李中显著上调,其中S-(5-腺苷)-L-高半胱氨酸是惠水蜂糖李独有的差异代谢物,可作为判别惠水蜂糖李的标志性代谢物。半胱氨酸和蛋氨酸代谢途径有4种差异代谢物参与,包括3种氨基酸(L-甲硫氨酸、S-(5-腺苷)-L-高半胱氨酸、S-腺苷-L-蛋氨酸)和1种核苷酸及其衍生物(5-脱氧-5-甲硫腺苷),其中S-腺苷-L-蛋氨酸又称S-腺苷-L-甲硫氨酸,对治疗扁头痛、关节炎、抑郁症等多种疾病具有显著作用<sup>[29]</sup>。玉米素生物合成途径有3种差异代谢物参

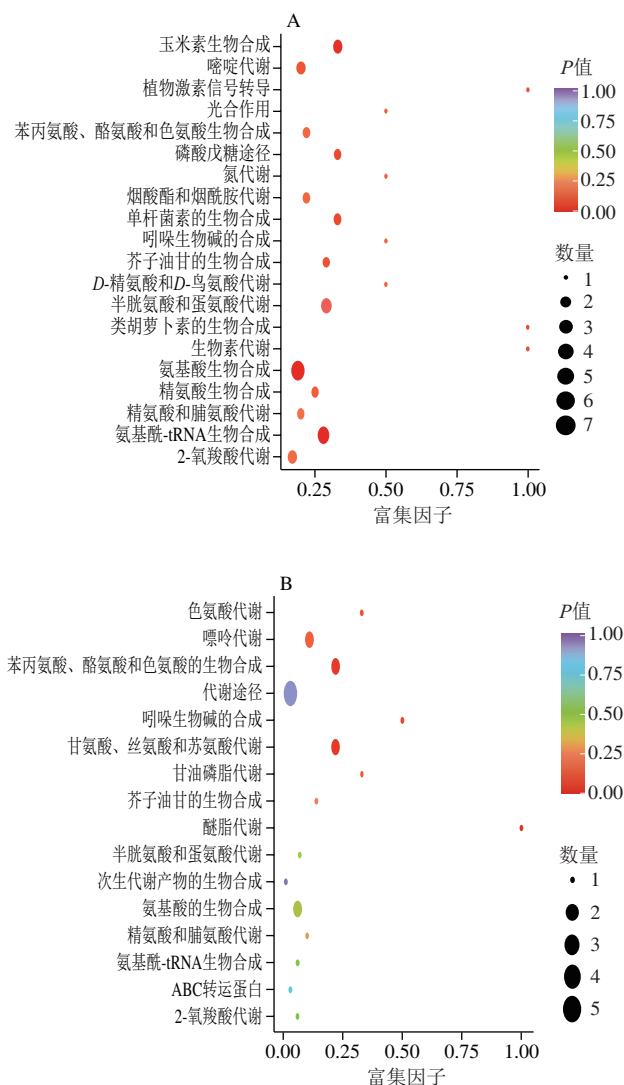


与, 包括2种核苷酸及其衍生物(5-脱氧-5-甲硫腺苷、尿苷-5'-二磷酸)和1种氨基酸及其衍生物(*S*-腺苷-*L*-蛋氨酸)。以上分析表明, 氨基酸类物质参与多条代谢通路, 说明不同产地对蜂糖李代谢中的氨基酸及其衍生物具有一定影响, 且同一代谢物同时参与多条代谢通路, 映射出的差异代谢物对通路影响较大。

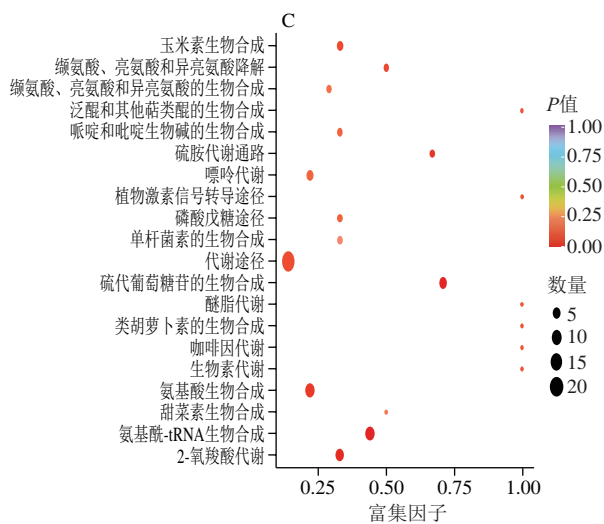
LM vs LT中的差异代谢物共分布于18条代谢途径(图6B), 其中显著差异代谢通路有3条( $P < 0.05$ ), 分别是苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成途径, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径和醚脂代谢途径。苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成途径有2种差异代谢物参与, 分别为1种有机酸(3-羟基苯甲酸)和1种氨基酸及其衍生物(*L*-色氨酸), 其中3-羟基苯甲酸显著上调3.80倍; *L*-色氨酸在六马蜂糖李中积累量更多, 上调2.26倍, 可提供更强的药理功效, 如治疗抑郁症、精神分裂症、防治高血压、减少疼痛等<sup>[30]</sup>。甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径有2种氨基酸及其衍生物参与分别是*N*-甲基甘氨酸和*L*-色氨酸, 其中*N*-甲基甘氨酸是六马蜂糖李特有代谢物, 可作为判别六马蜂糖李的标志性代谢物; *L*-色氨酸参与的代谢通路有3条, 说明该差异代谢物是处于多条代谢通路的交集处, 对通路的影响较大。醚脂代谢途径有1种脂质(甘磷酸胆碱GPC)参与, 表明甘磷酸胆碱GPC在良田蜂糖李中代谢更为活跃, 为六马蜂糖李的2.62倍。甘磷酸胆碱GPC又称甘磷酰胆碱、甘油卵磷脂, 是一种水溶性磷脂代谢物, 具有提高记忆力、抗衰老、降血脂、保肝、健脑等多种功效<sup>[31]</sup>。

LT vs HS中的差异代谢物共参与48条代谢途径(图6C), 显著差异代谢通路有5条( $P < 0.05$ ), 分别为氨基酰-tRNA生物合成、硫代葡萄糖苷的生物合成、2-氧羧酸代谢、硫胺代谢和氨基酸生物合成途径。其中氨基酰-tRNA生物合成途径共有8种氨基酸及其衍生物参与, 分别为*L*-异亮氨酸\*、*L*-亮氨酸\*、*L*-谷氨酰胺、*L*-赖氨酸、*L*-甲硫氨酸、*L*-精氨酸、*L*-色氨酸在惠水蜂糖李中代谢更为活跃, 含量更高, 为良田蜂糖李的2.92~3.53倍; *L*-酪氨酸的代谢则在良田产地中更旺盛, 积累量更多, 为惠水蜂糖李的3.70倍。*L*-酪氨酸作为一种芳香氨基酸, 能促进人体内儿茶酚胺、甲状腺激素、黑色素的合成, 对人和动物的生长发育、新陈代谢等方面起着重要的作用<sup>[32]</sup>。硫代葡萄糖苷的生物合成途径有5种氨基酸及其衍生物参与, *L*-异亮氨酸\*、*L*-亮氨酸\*、*L*-甲硫氨酸、*L*-酪氨酸、*L*-色氨酸, 其中*L*-异亮氨酸\*是人体必需氨基酸之一, 作为生物活性分子参与了营养物质的合成及代谢, 其广泛应用于食品、医药和饲料等行业<sup>[33]</sup>。2-氧羧酸代谢途径有6种差异代谢物参与, 分别为*L*-异亮氨酸\*、*L*-亮氨酸\*、*L*-赖氨酸、*L*-甲硫氨酸、

*L*-酪氨酸、*L*-色氨酸, 其中*L*-赖氨酸是人体必需氨基酸, 不仅为人类提供必要营养, 维持机体正常功能, 还具有促进个体发育、增强机体免疫和预防心血管疾病等重要功能<sup>[34]</sup>。氨基酸生物合成途径有8种差异代谢物参与, 分别为*L*-异亮氨酸\*、*L*-亮氨酸\*、*L*-谷氨酰胺、*L*-赖氨酸、*L*-甲硫氨酸、*L*-精氨酸、*L*-色氨酸, 表明这类物质在氨基酸生物合成途径中代谢活跃。硫胺代谢途径仅有1种核苷酸及其衍生物(烟酸腺嘌呤二核苷酸)参与, 惠水蜂糖李的烟酸腺嘌呤二核苷酸代谢更为活跃, 含量更高, 是良田蜂糖李的2.28倍。代谢通路分析发现*L*-异亮氨酸\*、*L*-亮氨酸\*、*L*-甲硫氨酸、*L*-色氨酸等参与了多条代谢通路, 说明这些物质对代谢通路影响较大, 处于复杂的网络代谢通路的节点上, 是连接各通路的枢纽<sup>[35]</sup>。此外, 分析发现良田蜂糖李和惠水蜂糖李在代谢中最大的差异是氨基酰-tRNA生物合成和氨基酸生物合成代谢过程, 说明产地对蜂糖李中氨基酸类物质的影响较大, 但其受产地影响的机理目前尚不明确。







点的颜色为P值(越红表示富集越显著), 点的大小为所富集的差异代谢物个数(越大表示个数越多)。

图6 差异代谢物KEGG富集图

Fig. 6 KEGG enrichment maps of differential metabolites

### 3 结论

基于UPLC-MS/MS代谢组学技术对不同产地蜂糖李初生代谢产物进行研究, 3个产地共鉴定出307种代谢物, LM vs HS、LM vs LT和LT vs HS分别鉴定出49、13、49种显著差异代谢物, 各占总代谢物的15.97%、4.23%、15.97%, 且主要以上调为主, 说明不同产地的蜂糖李代谢物质差异显著。产地不同, 不同代谢物的种类和含量存在显著差异, 其差异代谢物可作为蜂糖李产地区分的参考依据。KEGG代谢通路分析发现, 显著富集的代谢通路主要为氨基酸类代谢通路, 而产地对蜂糖李中氨基酸类物质的影响最为显著, 且不同产地间蜂糖李代谢差异机制主要在于氨基酸类物质的代谢, 说明氨基酸类代谢途径对研究产地对蜂糖李果实品质的影响具有重要指导意义。

### 参考文献:

[1] YU J W, LI W, YOU B Y, et al. Phenolic profiles, bioaccessibility and antioxidant activity of plum (*Prunus salicina* Lindl.)[J]. Food Research International, 2021, 143(9): 110300. DOI:10.1016/J.FOODRES.2021.110300.

[2] 黄世安, 董晓庆, 蔡明佳, 等. 褪黑素对采后“蜂糖李”果实品质和生理特性的影响[J]. 北方园艺, 2021(18): 103-110. DOI:10.11937/bfy.20210575.

[3] 高应梅. 蜂糖李贮藏保鲜技术及其应用前景[J]. 农业与技术, 2018, 38(24): 30. DOI:10.11974/myys.20181233018.

[4] ZHANG L Y, YU Y B, YU R Z. Analysis of metabolites and metabolic pathways in three maize (*Zea mays* L.) varieties from the same origin using GC-MS[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 1-10. DOI:10.1038/s41598-020-73041-z.

[5] ZHANG L Y, YU Y B, WANG C Y, et al. Isolation and identification of metabolites in Chinese northeast potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers using gas chromatography-mass spectrometry[J]. Food Analytical Methods, 2019, 12(1): 51-58. DOI:10.1007/s12161-018-1336-5.

[6] YANG Q, ZHANG A H, MIAO J H, et al. Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: a systematic review[J]. RSC Advances, 2019, 9(64): 37245-37257. DOI:10.1039/C9RA06697G.

[7] ZOU S C, WU J C, MUHAMMAD Q S, et al. Identification of key taste components in loquat using widely targeted metabolomics[J]. Food Chemistry, 2020, 323: 126822. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.126822.

[8] ZHAO M L, REN Y J, WEI W, et al. Metabolite analysis of jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) seedlings in response to polyethylene glycol-simulated drought stress[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(7): 3294. DOI:10.3390/IJMS22073294.

[9] 王乐飞, 古绍彬, 吴影. 基于UPLC-MS代谢组学技术的枣果皮黄酮类化合物分析[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 155-161. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20191018-195.

[10] YIN Q C, JI J B, ZHANG R H, et al. Identification and verification of key taste components in wampee using widely targeted metabolomics[J]. Food Chemistry: X, 2022, 13: 100261. DOI:10.1016/J.FOCHX.2022.100261.

[11] NICHOLSON J K, HOLMES E, LINDON J C, et al. The challenges of modeling mammalian biocomplexity[J]. Nature Biotechnology, 2004, 22(10): 1268-1274. DOI:10.1038/nbt1015.

[12] 林洁鑫, 王鹏杰, 金珊, 等. 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[J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 9-19. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2021040110.

[13] WANG Y J, LIANG X J, LI Y K, et al. Changes in metabolome and nutritional quality of lycium barbarum fruits from three typical growing areas of China as revealed by widely targeted metabolomics[J]. Metabolites, 2020, 10(2): 46. DOI:10.3390/metabo10020046.

[14] 张琴, 黄世安, 林欣, 等. 基于UPLC-MS/MS的3个李品种果实初生代谢物分析[J]. 食品科学, 2022, 43(16): 226-234. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20211009-085.

[15] CHEN W, GONG L, GUO Z L, et al. A novel integrated method for large-scale detection, identification, and quantification of widely targeted metabolites: application in the study of rice metabolomics[J]. Molecular Plant, 2013, 6(6): 1769-1780. DOI:10.1093/mp/sst080.

[16] FRAGA C G, CLOWERS B H, MOORE R J, et al. Signature-discovery approach for sample matching of a nerve-agent precursor using liquid chromatography-mass spectrometry, XCMS, and chemometrics[J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(10): 4165-4173. DOI:10.1021/ac1003568.

[17] ZHOU Y Q, SHAO L Y, ZHU J L, et al. Comparative analysis of tuberous root metabolites between cultivated and wild varieties of *Rehmannia glutinosa* by widely targeted metabolomics[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 1-12. DOI:10.1038/s41598-021-90961-6.

[18] 富天昕, 冯玉超, 张丽媛, 等. 基于GC-MS技术对不同产地稻米的代谢组学分析[J]. 食品科学, 2019, 40(12): 176-181. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180621-412.

[19] KRAUTBAUER S, EISINGER K, WIEST R, et al. Systemic saturated lysophosphatidylcholine is associated with hepatic function in patients with liver cirrhosis[J]. Prostaglandins and Other Lipid Mediators, 2016, 124: 27-33. DOI:10.1016/j.prostaglandins.2016.06.001.

[20] 韩国成. 几种含半胱氨酸的小分子功能肽的研究与应用[D]. 长沙: 中南大学, 2011. DOI:10.7666/d.y1918425.

[21] YIN J, REN W K, YANG G, et al. L-Cysteine metabolism and its nutritional implications[J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2016, 60(1): 134-146. DOI:10.1002/mnfr.201500031.

[22] ALI S, KHAN A S, MALIK A U, et al. Postharvest application of antibrowning chemicals modulates oxidative stress and delays pericarp browning of controlled atmosphere stored litchi fruit[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(3): e12746. DOI:10.1111/jfbc.12746.

[23] JUURLINK B H, AZOUZ H J, ALDALATI A M, et al. Hydroxybenzoic acid isomers and the cardiovascular system[J]. Nutrition Journal, 2014, 13(1): 1-10. DOI:10.1186/1475-2891-13-63.

[24] RICCIO D, MAGNI G, CERUTI S. Tackling chronic pain and inflammation through the purinergic system[J]. Current Medicinal Chemistry, 2018, 25(32): 3830-3865. DOI:10.2174/0929867324666170710110630.

[25] BOREA P A, GESSI S, MERIGHI S, et al. Adenosine as a multi-signalling guardian angel in human diseases: when, where and how does it exert its protective effects?[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2016, 37(6): 419-434. DOI:10.1016/j.tips.2016.02.006.

[26] 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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200409-128.

[27] 向仲朝, 杨文婉, 李佳佳. 饮料、发酵酒及调味品中L-谷氨酰胺的高效液相色谱测定法[J]. 现代预防医学, 2016, 43(15): 2736-2738. DOI:CNKI:SUN:XDYF.0.2016-15-015.

[28] KARAS K N. S-Adenosyl methionine in the therapy of depression and other psychiatric disorders[J]. Drug Development Research, 2016, 77(7): 346-356. DOI:10.1002/ddr.21345.

[29] 章泽. 治疗失眠症新药-唑吡坦[J]. 江苏药学与临床研, 2003(2): 15. DOI:10.13664/j.cnki.pcr.2003.02.006.

[30] 臧珊珊, 林涛, 郭兴, 等. L-色氨酸的系统代谢网络调控研究进展[J]. 生物技术, 2022, 32(1): 99-106; 84. DOI:10.16519/j.cnki.1004-311x.2022.01.0016.

[31] 卢志花, 江磊. 甘油磷酸胆碱医药领域专利现状与发展趋势分析[J]. 中国发明与专利, 2018, 15(2): 54-58. DOI:CNKI:SUN:FMYZ.0.2018-S2-013.

[32] 姚元锋, 赵广荣. L-酪氨酸代谢工程研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(5): 132-137. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2013.05.028.

[33] BAMPIDIS V, AZIMONTI G, BASTOS M, et al. Safety and efficacy of L-isoleucine produced by fermentation with corynebacterium glutamicum KCCM 80189 for all animal species[J]. EFSA Journal, 2020, 18(2): 6021. DOI:10.2903/j.efsa.2020.6021.

[34] 赖木兰, 万方, 朱蕾云, 等. 吐温-80对链球菌产L-赖氨酸的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(23): 173-177. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201623029.

[35] 冯玉超, 王长远, 李雪, 等. 黑龙江省不同产地水稻的GC-MS代谢物差异分析[J]. 食品科学, 2019, 40(2): 208-214. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180522-326.