

基于代谢组学的黑龙江省不同产地大豆的代谢产物分析

张丽媛¹, 代安娜¹, 于润众^{2,3}, 阮长青¹, 李志江^{1,4}, 张东杰^{1,3,5}

(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319) (2. 黑龙江八一农垦大学电气与信息学院, 黑龙江大庆 163319) (3. 北大荒现代农业产业技术省级培育协同创新中心, 黑龙江大庆 163319)

(4. 黑龙江省杂粮加工及质量安全工程技术研究中心, 黑龙江大庆 163319)

(5. 国家杂粮工程技术研究中心, 黑龙江大庆 163319)

摘要: 基于气相色谱-质谱法非靶向代谢谱分析, 分离和鉴定了来自三个产地(北安龙门、尾山和引龙河)的黑河43号大豆的代谢产物。采用80%甲醇提取大豆样品中代谢产物, N,O-双(三甲基甲硅烷基)三氟乙酰胺进行衍生, HP-5ms柱进行分析, GC-MS进行检测, 通过KEGG注释分析差异代谢物的代谢途径, 并对代谢机制进行阐述。在样品中共检测到68种代谢产物, 分离鉴定出62种代谢产物, 包括22种糖类及其衍生物, 14种脂肪酸及其衍生物, 7种醇类, 4种酯类, 2种氨基酸和13种中间体, 推断出6种未知代谢产物结构, WS-soy样品4种, YLH-soy样品2种。不同产地大豆代谢产物和代谢机制存在差异, 带有产地属性。这不仅为寒地大豆品质分析提供理论基础, 也为大豆的分类加工或不同产地提取功能性成分提供依据。

关键词: 代谢物; 大豆; 气相色谱-质谱法(GC-MS); 分离; 鉴定

文章编号: 1673-9078(2021)06-287-295

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.6.1032

Analysis of Metabolites of Soybeans from Different Producing Origins in Heilongjiang Province Based on Metabonomics

ZHANG Li-yuan¹, DAI An-na¹, YU Run-zhong^{2,3}, RUAN Chang-qing¹, LI Zhi-jiang^{1,4}, ZHANG Dong-jie^{1,3,5}

(1.College of Food, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China) (2.College of Electrical Information, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China) (3.Heilongjiang Province Cultivating Collaborative Innovation Center for the Beidahuang Modern Agricultural, Industry Technology, Daqing 163319, China) (4.Heilongjiang Engineering Research Center for Coarse Cereals Processing and Quality Safety, Daqing 163319, China) (5.Chinese National Engineering Research Center, Daqing 163319, China)

Abstract: Metabolites of Heihe 43 soybeans in three origins (Beian Longmen, Weishan and Yinlong River) were isolated and identified using non-targeted metabolic profiling based on gas chromatography-mass spectrometry. The metabolites in the soybean samples were extracted by 80% methanol, derivatized with N,O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide, eluted on an HP-5ms column, detected with GC-MS. The metabolic pathways of the differential metabolites were analyzed by KEGG annotation, the metabolic mechanisms were explored. A total of 68 metabolites were detected in soybean samples, and 62 metabolites were isolated and identified, included 22 carbohydrates and their derivatives, 14 fatty acids and their derivatives, 7 alcohols, 4 esters, and 2 amino acids, and 13 kinds

引文格式:

张丽媛,代安娜,于润众,等.基于代谢组学的黑龙江省不同产地大豆的代谢产物分析[J].现代食品科技,2021,37(6):287-295,+319

ZHANG Li-yuan, DAI An-na, YU Run-zhong, et al. Analysis of metabolites of soybeans from different producing origins in Heilongjiang province based on metabonomics [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(6): 287-295, +319

收稿日期: 2020-11-09

基金项目: 黑龙江省应用技术与开发计划重大项目(GA18B102); 黑龙江八一农垦大学三横三纵资助项目(ZRCQC201906); 黑龙江省农垦总局重点研发项目(HKKY190407)

作者简介: 张丽媛(1981-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全与质量溯源, 食品分析与检测

通讯作者: 阮长青(1969-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品化学; 张东杰(1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全

of intermediates, inferring the structure of 6 kinds of unknown metabolites, 4 kinds of WS-soy samples, 2 kinds of YLH-soy samples. Soybean metabolites and metabolic mechanisms were different in different producing areas, and they had the attributes of producing areas. This not only provides a theoretical basis for the quality analysis of soybeans in cold regions, and also provides a basis for soybean classification and processing or extraction of functional components by origin.

Key words: metabolites; soybean; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); separation; identification

大豆 (*Glycine max* (Linn.) Merr.) 最早源自中国, 已有 5000 多年种植历史, 种植区主要分布在东北、华北、陕西、四川及长江中下游地区^[1]。大豆含有蛋白质、脂肪、膳食纤维、异黄酮等多种营养物质^[2-4]。近年来, 国内外对大豆的研究主要包括豆制品、大豆油脂、大豆蛋白质以及生理活性物质等^[5-7]。而比较不同地区同种大豆代谢产物的研究较少, 主要是不同的品种、育成年份、生长阶段, 或加工处理后的代谢物, 以及在真菌酸碱胁迫下的次生代谢产物^[8-12]。大豆的代谢产物也受不同因素 (氮、硅及磷含量等) 影响^[13-15], 其可溶性糖含量与其育成年代也呈显著正相关^[16]。

代谢组学是对小分子化合物 (分子量 1000 u 以下), 运用色谱、质谱、核磁共振和毛细管电泳等技术进行研究^[17,18]。它可被应用在食品造假鉴定、食品产地溯源^[19-21]、食品真实属性鉴别、发酵食品有毒代谢产物分析及植物源性食品等方面^[22,23]。杨冬爽等基于代谢组学研究野大豆 (*Glycine soja*) 的耐盐机理^[24], 张圳等利用高效液相色谱法测定了体外大鼠肠道菌液中大豆苷及其代谢物^[25], 张玉梅等进行了菜用大豆籽粒代谢物的相关性分析^[26]。而非靶向代谢组学则是在有限的相关研究和背景知识的基础上整个代谢组进行系统全面的分析获取大量代谢物的数据, 并对其进行处理从而找出差异代谢物的一种研究方法^[27]。近年来许多学者利用非靶向代谢组学研究人参治疗脾气虚症、汉麻籽生理活性物质、转基因奶牛的血清和牛奶的代谢产物等^[28-30]。

本研究利用气相色谱-质谱法 (GC-MS) 非靶向代谢谱技术分析了寒地三个不同产区同一品种的大豆代谢产物和代谢途径, 分离和鉴定了差异代谢产物, 并对其代谢机制进行了探索。这可为寒地大豆品质分析提供理论基础, 也为大豆进行分类加工或分产地提取功能性成分提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

研究的黑河 43 号品种大豆来自黑龙江省北安

龙门 (BALM-soy)、尾山 (WS-soy) 和引龙河 (YLH-soy) 三个产地。按照保护范围内具有代表性的抽样原则, 采用棋盘抽样法随机抽取来自三个产地的大豆样品。

甲醇、异丙醇和乙腈 (色谱级), 美国 Fisher 技术公司; N,O-双 (三甲基硅基) 三氟乙酰胺 (BSTFA), 甲氧胺盐酸盐和吡啶, 美国 Sigma-Aldrich 公司; 结构鉴定的标准物质, 美国 Sigma-Aldrich 公司, 北京国家药品和生物制品控制研究所; 色谱级用水, 美国米利波尔公司的 Milli-q 水净化系统; 其他分析级试剂均来自北京化工厂。

1.2 仪器与设备

GC-MS-QP 2010 (配备 EI 离子源), 四极质量分析仪及 AOC-20 i 自动采样器, 日本岛津技术有限公司; HP-5 ms 分离柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm), 美国 Agilent 有限公司; KQ2200E 型超声波清洗机 (40 kHz, 100 W), 昆山超声仪器有限公司; 昆山恒温均衡器, 昆山恒温均衡器有限公司; MSC-100 恒温均衡器, 杭州澳盛仪器有限公司; Alpha1-2Ldplus 冷冻干燥机, 德国 CHRIST 公司; TGL-16B 高速离心机, 安亭仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 大豆代谢物的提取与衍生化

大豆在液氮作用下粉碎, 经 100 目筛网筛分, 保存于 -80 °C, 将 100.0 mg 大豆样品, 800 μL 80% 甲醇水溶液和 10 μL 内标 (2-氯苯丙氨酸) 置于 EP 管中。均质化前充分搅拌 30 s。从大豆样品中提取极性代谢物组分。为提高提取效率, 将含有该混合物的 EP 管在 35 °C 80 W 超声 9.0 min, 并剧烈摇动 1 min, 4 °C, 12,000 r/min 离心 10.0 min。取 200 μL 上清液转移至 1.5 mL 自动样品瓶, 冷冻干燥器中干燥过夜。残余物 37 °C 在 30 μL (20 mg/mL) 甲氧基胺盐酸盐和吡啶中溶解 60 min, 加入 30 μL BSTFA, 70 °C 60 min 衍生化处理后, 24 h 内分析所得溶液。

1.3.2 GC-MS 分析

自动取样器注入 1 μL 样品液, 色谱柱: Agilent J&W Scientific HP-5ms (30 m×0.25 mm×0.25 μm);

升温程序: 80 °C, 保持 2 min, 10 °C/min 的速度升至 320 °C, 保持 6 min; 80 °C 下进行温度平衡 6 min, 然后再注入下一次样品。仪器参数设定为: 进样口温度 280 °C, EI 离子源温度 230 °C, 四极杆温度 150 °C, 高纯氦气 (纯度大于 99.999%) 作为载气, 进样量 1.0 μL, 不分流进样。采用全扫描模式进行质谱检测, 质谱检测范围: 50~550 *m/z*。

1.3.3 代谢物定性分析与定量分析

定性分析: 将获得的大豆代谢物数据与 NIST 14 数据库进行比较以获得结构信息并分类, 并研究大豆样品的差异代谢产物。

定量分析: 采用峰面积归一化法进行各大豆样品成分相对含量的计算, 每个样品重复 3 次, 取平

均值。

1.3.4 代谢机制分析

通过 KEGG 数据库比较代谢物的代谢途径。利用 KEGG 代谢途径检索中的富集分析来分析不同品种大豆的代谢机制。在 KEGG 筛选的差异代谢物中发现了相关的代谢途径, 推断不同产地的大豆样品代谢过程的变化。

1.3.5 数据处理

采用 Excel 软件对 GC-MS 数据进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 GC-MS 结果分析

表 1 三个产地大豆样品中的代谢产物

Table 1 Metabolites form soybean samples from three producing areas

序号	保留时间	化合物名称	化合物种类	Area/%		
				BALM	WS	YLH
1	5.06	Boron, trihydro(pyridine)-, (T-4)	中间体	-	-	0.11
2	5.068	1-Butylpyridinium bromide	中间体	-	9.53	-
3	5.338	1-Pentanol	醇类	-	2.87	-
4	5.482	Formamide	中间体	-	2.78	-
5	5.755	Trans-4,5-Epoxyonane	未知物	-	2.71	-
6	6.849	Cycloheptanol	醇类	-	0.58	-
7	7.091	1,8-Di(4-nitrophenylmethyl)	未知物	-	0.78	-
8	7.336	1,2,3-Butanetriol,	醇类	0.87	-	0.15
9	8.551	N,N-Dimethyloctylamine	中间体	-	1.14	-
10	8.74	Valdetamide	中间体	-	0.90	-
11	8.811	Glycerol,	脂肪酸	0.63	-	-
12	9.281	2-Methyl-4H,6H-thieno	未知物	-	1.13	-
13	10.096	Anethole	中间体	-	3.59	0.16
14	10.605	1-Hexyne	中间体	-	0.72	-
15	10.676	DL-Proline	氨基酸	-	5.47	-
16	11.201	Homocysteine	氨基酸	0.59	-	-
17	11.917	Benzoic acid	脂肪酸	-	0.63	-
18	13.354	6-hexadecenoic acid	脂肪酸	-	1.33	0.18
19	14.23	D-glucofuranoside	糖类	-	-	0.12
20	14.395	D-Ribofuranose	糖类	-	-	0.13
21	14.512	D-Tagatofuranose,	糖类	0.25	-	0.13
22	14.79	Octanoic acid	脂肪酸	-	0.46	-
23	14.794	Uridine	中间体	-	-	0.24
24	14.928	D-Erythrose	糖类	-	-	0.19
25	15.854	1H-2-Benzopyran-3-carboxylic acid	未知物	-	0.72	-
26	16.008	Phthalic acid,	脂肪酸	-	0.79	-
27	16.454	Butylphosphonic acid	脂肪酸	1.01	-	1.65

转下页

接上页

28	16.928	L-Threose	糖类	-	-	0.80
29	17.562	D-Tagatose	糖类	-	-	0.60
30	17.604	Myo-Inositol	中间体	0.96	-	0.15
31	17.702	D-Psicose	糖类	0.41	-	-
32	17.728	D-Ribose	糖类	-	-	14.62
33	17.877	D-Arabinopyranose	糖类	-	-	0.42
34	17.994	3,6,10,13-Tetraoxa-2,14-disilapentadecane	未知物	-	-	2.31
35	18.038	3,7,11,15,18-Pentaoxa-2,19-disilaicosane	未知物	-	-	0.71
36	18.29	D-Fructose	糖类	0.99	-	3.15
37	18.33	D-Xylose	糖类	1.65	-	2.00
38	18.495	D-Talose	糖类	2.91	-	-
39	18.75	D-Allose	糖类	0.46	-	1.39
40	18.945	Tetradecanoic acid, ethyl ester	酯类	-	2.43	-
41	18.974	Erythritol	醇类	0.75	-	-
42	19.017	beta-Sorbitol	醇类	0.83	-	-
43	19.061	Ribitol	醇类	0.25	-	-
44	19.362	Eicosanoic acid	脂肪酸	-	3.85	-
45	19.384	L-Arabitol	醇类	1.25	-	-
46	20.761	Pentadecanoic acid	脂肪酸	0.22	-	-
47	21.147	8,11-Octadecadienoic acid	脂肪酸	0.45	-	-
48	21.459	6-Octadecenoic acid	脂肪酸	5.14	1.07	-
49	21.577	Methyl stearate	酯类	-	2.31	-
50	21.606	13-Teradecenal	中间体	2.98	-	-
51	22.383	Octadecanoic acid	脂肪酸	0.73	0.93	-
52	22.424	9,12-Octadecadienoic acid	脂肪酸	1.83	-	-
53	22.493	9-Octadecadienoic acid	脂肪酸	0.74	-	-
54	25.292	Sucrose	糖类	0.61	-	-
55	25.632	1,3-dipalmitoylglycerol	酯类	0.29	-	-
56	25.694	D-Trehalose	糖类	0.69	-	0.31
57	26.127	Hexadecanoic acid	脂肪酸	-	0.72	-
58	26.878	1,2-O-Isopropylidene-D-glucofuranose	糖类	39.07	-	-
59	27.446	D-Turanose	糖类	2.32	-	-
60	27.582	D-Galactopyranoside	糖类	0.56	-	-
61	27.922	2-Monostearin	酯类	2.78	-	0.87
62	28.017	Squalene	中间体	2.60	-	-
63	28.066	beta-D-Lactose	糖类	1.53	-	0.19
64	28.261	Methyl Galactoside	糖类	0.52	-	-
65	29.657	Sitosterol	中间体	0.25	-	-
66	28.673	9-Octadecenamamide	中间体	-	0.65	-
67	30.689	beta-Arabinopyranose	糖类	-	-	0.42
68	34.987	Mannobiose	糖类	0.41	-	11.43

注：“-”表示未检测到代谢产物。

三个产地大豆的 GC-MS 总离子流图如图 1、2 和 3 所示。

从三个总离子流图可以看出产地不同，品种相同的大豆样品的代谢产物明显存在不同。三个产地的大豆样品中共检测到 68 种代谢产物（表 1）。其中 62 种化合物经 NIST 数据库精确表征，包括 22 种糖类及其衍生物，14 种脂肪酸及其衍生物，7 种醇类，4 种酯类，2 种氨基酸和 13 种中间体，6 种化合物推断出可能结构。BALM-soy 样品中检测到 34 种代谢物，其中 Area>1%的代谢物占总量的 65.18%。WS-soy 样品中检测到 20 种代谢物和 4 种未知化合物，其中 Area>1%的代谢物占总量的 40.21%。YLH-soy 样品中检测到 23 种代谢物和 2 种未知化合物，其中 Area>1%的代谢物占总量的 36.55%。

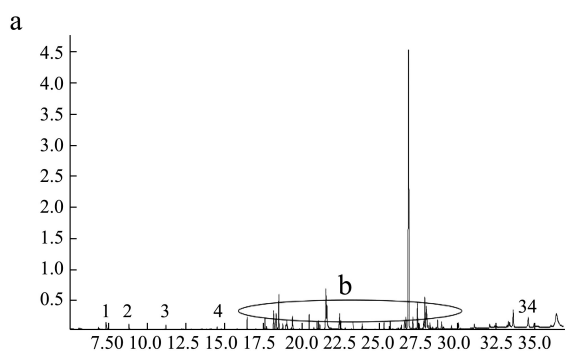


图 1 北安龙门大豆总离子流图

Fig.1 Totalion flow diagram of BALM-soy samples

注: (a): BALM-soy 样品的完整谱图范围, 0.0~35.0 min;

(b): BALM-soy 样品的部分谱图范围, 16.0~30.0 min。

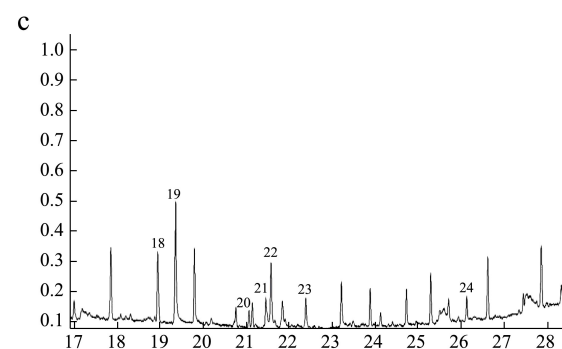
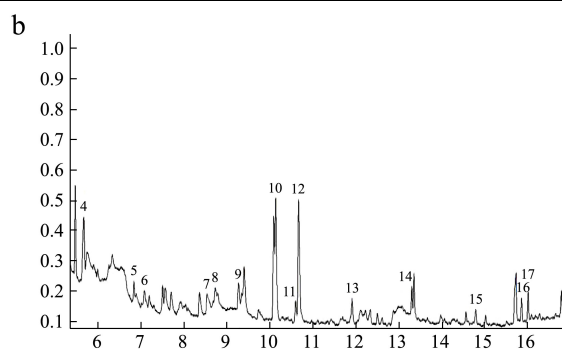
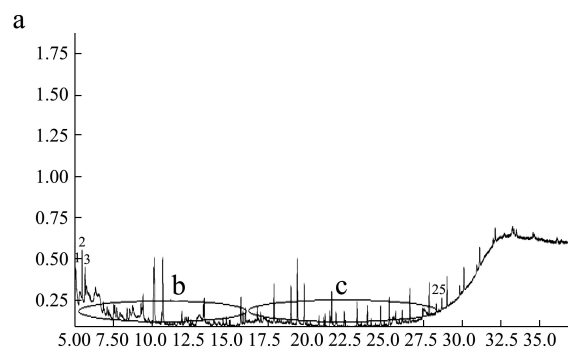


图 2 尾山大豆总离子流图

Fig.2 Total ion flow diagram of WS-soy samples

注: (a): WS-soy 样品的完整谱图范围, 5.0~35.0 min;

(b): WS-soy 样品的部分谱图范围, 5.5~16.5 min; (c): WS-soy 样品的部分谱图范围, 17.0~28.0 min。

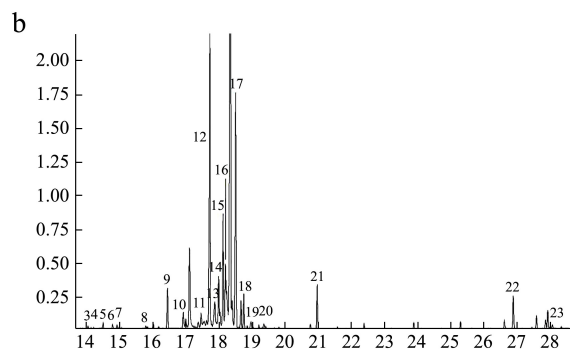
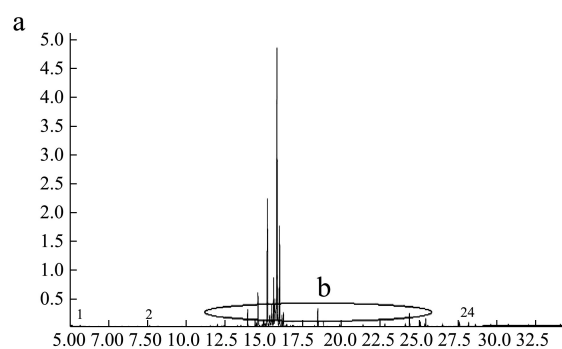
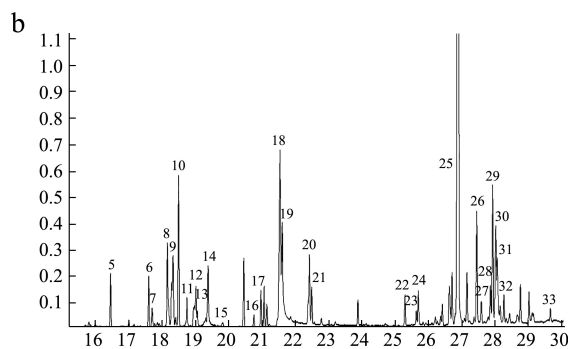


图 3 引龙河大豆总离子流图

Fig.3 Total ion flow diagram of YLH-soy samples

注: (a): YLH-soy 样品的完整谱图范围, 5.0~35.0 min;

(b): YLH-soy 样品的部分谱图范围, 14.0~28.0 min。

2.2 BALM-soy 样品的差异代谢分析

表 2 BALM-soy 样品的差异代谢物

Table 2 Differential metabolites of BALM-soy samples

序号	保留时间	化合物名称	化合物分类
1	8.811	Glycerol	脂肪酸
2	11.201	Homocysteine	氨基酸
3	17.702	D-Psicose	糖类
4	18.495	D-Talose	糖类
5	18.974	Erythritol	醇类
6	19.017	D-Sorbitol	醇类
7	19.061	Ribitol	醇类
8	19.384	L-Arabitol	醇类
9	20.761	Pentadecanoic acid	脂肪酸
10	21.147	8,11-Octadecadienoic acid	脂肪酸
11	21.606	13-Teradecenal	中间体
12	22.424	9,12-Octadecadienoic acid	脂肪酸
13	22.493	9-Octadecadienoic acid	脂肪酸
14	25.292	Sucrose	糖类
15	25.632	1,3-Dipalmitin	酯类
16	27.582	D-Galactopyranoside	糖类
17	27.922	2-Monostearin,	酯类
18	28.017	Squalene	中间体
19	28.066	beta-D-Lactose	糖类
20	28.261	Methyl Galactoside	糖类
21	29.657	beta-Sitosterol	中间体

相比较其他两个产区大豆样品, BALM-soy 样品有 21 种差异代谢物(6 种糖类, 5 种脂肪酸, 4 种醇类, 2 种酯类, 1 种氨基酸和 3 种中间体)(表 2)。差异代谢物主要涉及氨基酸代谢(半胱氨酸和蛋氨酸代谢途径)、糖类代谢(半乳糖代谢途径、蔗糖和淀粉代谢、甲基半乳糖苷转运系统^[31]、赤藓糖醇转运系统、果糖和甘露糖代谢)、脂质代谢(甘油脂质代谢、亚油酸代谢、脂肪酸生物合成和不饱和脂肪酸生物合成)及其他代谢途径(甾体生物合成)。糖酵解, 脂肪酸的氧化合成和 TCA 循环之间存在一定的关系, 而碳水化合物代谢, 脂代谢会产生一些代谢产物参与上述过程, 此地大豆样品产生的差异代谢物如 D-阿洛酮糖(0.41%), D-塔罗糖(2.91%), 蔗糖(0.61%)及甘油(0.63%)与其有关, 北安龙门产区属中温带大陆性季风气候, 降水较多且集中在夏季, 适宜大豆的生长, 夏季光照时间长, 有利于进行光合作用, 积累蔗糖, 半乳糖(0.56%)等糖类, 并通过半乳糖代谢途径等过程进行转化。该产地土壤为黑土, 土壤中含有腐殖质

层, 肥力水平高, 为作物提供养分, 雨水与土体内盐基相遇, 碳酸盐移出土体, 土壤呈中性至微酸性, pH 在 6.0~8.5 之间, 有利于 D-阿洛酮糖和 D-塔罗糖的产生。饱和脂肪酸的碳链延长在线粒体进行, 不饱和脂肪酸在微粒体中进行去饱和作用, 充足的日照有利于植物进行氧化代谢, 生成饱和脂肪酸包括甘油和十五烷酸(0.22%), 以及不饱和脂肪酸包括 8,11-十八碳二烯酸(0.45%), 9,12-十八碳二烯酸(1.83%), 9-十八碳二烯酸(0.74%)。

2.3 WS-soy 样品的差异代谢分析

表 3 WS-soy 样品的差异代谢物

Table 3 Differential metabolites of WS-soy samples

序号	保留时间	化合物名称	化合物分类
1	5.068	1-Butylpyridinium bromide	中间体
2	5.338	1-Pentanol	醇类
3	5.482	Formamide	中间体
4	6.849	Cycloheptanol	醇类
5	8.551	N,N-Dimethyloctylamine	中间体
6	8.74	Valdetamide	中间体
7	10.605	1-Hexyne	中间体
8	10.676	DL-Proline	氨基酸
9	11.917	Benzoic acid	脂肪酸
10	13.354	6-hexadecenoic acid	脂肪酸
11	14.79	octanoic acid	脂肪酸
12	16.008	Phthalic acid	脂肪酸
13	18.945	Tetradecanoic acid, ethyl ester	酯类
14	19.362	Eicosanoic acid	脂肪酸
15	21.577	Methyl stearate	酯类
16	28.673	9-Octadecenamamide	中间体

WS-soy 样品有 16 种差异代谢物(5 种脂肪酸, 2 种醇类, 2 种酯类, 1 种氨基酸和 6 种中间体)(表 3)。差异代谢物主要涉及氨基酸代谢(精氨酸和脯氨酸代谢途径)、脂质代谢(苯丙氨酸代谢、脂肪酸生物合成、不饱和脂肪酸生物合成)及其他代谢途径(氮代谢途径和氨基氨基酸代谢途径^[32])。尾山产地属寒温带大陆季风气候, 夏季短促, 气温较温带季风气候低, 使其脂肪酸类产物不同, 碳水化合物较少。其大豆样品的差异代谢物主要是一些酸类, 酯类, 可能是该大豆在脂肪酸生物合成、脂肪酸降解、花生四烯酸代谢过程中产生了 6-十六碳烯酸(1.33%)、辛酸(0.46%)、花生酸(0.79%)和邻苯二甲酸(3.83%)。该产地土壤为黑钙土, 其肥力不及黑土, 但也有腐殖质层, 含有丰富的氮素以

及磷和钾,降水也比北安龙门少,有利于脯氨酸(5.47%)的积累,此外渗入土体的重力水流只能对钾、钠等一价盐离子进行充分淋溶,而钙、镁等二价盐离子只能部分淋溶,产生了不同的差异代谢物。

表4 YLH-soy 样品的差异代谢物

Table 4 Differential metabolites of YLH-soy samples

序号	保留时间	化合物名称	化合物分类
1	5.06	Boron, trihydro(pyridine)-(T-4)	中间体
2	14.395	D-Ribofuranose	糖类
3	14.794	uridine	中间体
4	14.928	D-Erythrose	糖类
5	16.928	L-Threose	糖类
6	17.562	D-Tagatose	糖类
7	17.728	D-Ribose	糖类
8	17.877	D-Arabinopyranose	糖类
9	30.689	beta-Arabinopyranose	糖类

2.4 YLH-soy 样品的差异代谢分析

YLH-soy 样品有 9 种差异代谢产物(7 种糖类和 2 种中间体)(见表 4 所示)。差异代谢物主要

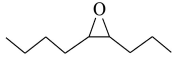
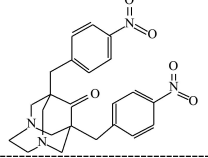
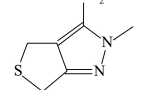
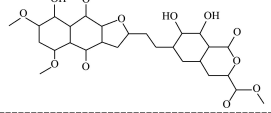
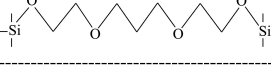
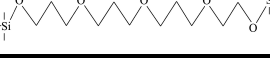
涉及糖类代谢(半乳糖代谢途径、戊糖磷酸代谢途径)及其他代谢途径(嘧啶代谢途径)。该样品产地与 BALM-soy 产地同属中温带大陆季风气候,其差异代谢物主要是糖类,而且与 BALM-soy 代谢产物中一些糖类不同,可能是因为碳水化合物代谢过程中如半乳糖代谢途径产生塔格糖(0.60%),戊糖磷酸途径产生核糖(14.62%),以及嘧啶代谢途径产生尿苷(0.24%)等。糖类的产生是由于播种时期不同,气温的影响导致光合作用程度不同。

2.5 未知化合物结构分析

根据质谱图中碎片离子峰的质荷比,推测 6 种未知结构代谢产物(见表 5 所示),其中 $C_9H_{18}O$ 为(2S,3S)-2-丁基-3-丙基环氧乙烷, $C_{23}H_{24}N_4$ 为 1,8-二(4-硝基苯甲基)-3,6-二氮杂胺-9-酮,推测 $C_6H_9N_3S$ 为 2-甲基-2,6-二氢-4H-噻吩并[3,4-c]吡唑-3-胺,推测 $C_{27}H_{20}O_{12}$ 为 α -玉红霉素,推测为 $C_{13}H_{32}O_4Si_2$ 为 3,6,10,13-四氧合-2,14-二硅戊烷,2,2,14,14-四甲基硅烷;推测 $C_{17}H_{40}O_5Si_2$ 为 3,7,11,15,18-五氧杂-2,19-二硅二十烷,2,2,19,19-四甲基硅烷。

表5 未知化合物结构列表

Table 5 Unknown compound structure list

序号	保留时间	分子式	推测化合物名称	化合物名称	分子结构
1	5.755	$C_9H_{18}O$	(2S,3S)-2-butyl-3-propyloxirane	(2S, 3S)-2-丁基-3-丙基环氧乙烷	
2	7.091	$C_{23}H_{24}N_4$	1,8-Di(4-nitrophenylmethyl)-3,6-diazahomoadamantan-9-one	1,8-二(4-硝基苯甲基)-3,6-二氮杂胺-9-酮	
3	9.281	$C_6H_9N_3S$	2-methyl-4,6-dihydrothieno[3,4-c]pyrazol-3-amine	2-甲基-2,6-二氢-4H-噻吩并[3,4-c]吡唑-3-胺	
4	15.854	$C_{27}H_{20}O_{12}$	methyl 7,8-dihydroxy-6-[2-(8-hydroxy-5,7-dimethoxy-4,9-dioxobenzofuran-2-yl)ethyl]-1-oxoisochromene-3-carboxylate	α -玉红霉素	
5	17.994	$C_{13}H_{32}O_4Si_2$	3,6,10,13-Tetraoxa-2,14-disilapentadecane, 2,2,14,14-tetramethyl-	3,6,10,13-四氧合-2,14-二硅戊烷, 2,2,14,14-四甲基硅烷	
6	18.038	$C_{17}H_{40}O_5Si_2$	3,7,11,15,18-Pentaoxa-2,19-disilaicosane, 2,2,19,19-tetramethyl-	3,7,11,15,18-五氧杂-2,19-二硅二十烷, 2,2,19,19-四甲基硅烷	

3 结论

对大豆中的代谢产物进行分离和鉴定,共检测到68种代谢产物,其中62种精确鉴定,包括22种糖类及其衍生物,14种脂肪酸及其衍生物,7种醇类,4种酯类,2种氨基酸和13种中间体,并推断出6种未知代谢产物结构,WS-soy样品4种,YLH-soy样品2种。通过对大豆样品的比较发现BALM-soy样品存在21种差异代谢产物,包括6种糖类,5种脂肪酸,4种醇类,2种酯类,1种氨基酸和3种中间体。WS-soy样品有16种差异代谢产物,包括5种脂肪酸,2种醇类,2种酯类,1种氨基酸和6种中间体。YLH-soy样品有9种差异代谢产物,包括7种糖类和2种中间体。通过KEGG数据库确定代谢产物的代谢途径,包括氨基酸代谢,碳水化合物代谢,脂质代谢等,BALM-soy样品不同代谢途径包括半胱氨酸和蛋氨酸代谢途径、蔗糖和淀粉代谢途径、甲基半乳糖苷转运系统、果糖和甘露糖代谢途径、赤藓糖醇运输系统,甘油代谢,亚油酸代谢和甾体生物合成。WS-soy样品的不同代谢途径为精氨酸和脯氨酸代谢途径,苯丙氨酸代谢途径、氰基氨基酸代谢途径和氮代谢途径。YLH-soy样品的不同代谢途径是戊糖磷酸代谢途径和嘧啶代谢途径。BALM-soy和YLH-soy两产地属中温带大陆性季风气候,有利于糖的积累,WS-soy产地属寒温带大陆性季风气候,有利于脂肪酸的积累。大豆样品产地的温度、降水、土壤等会导致代谢途径和代谢机制的差异。

参考文献

- [1] 郭天宝.中国大豆生产困境与出路研究[D].长春:吉林农业大学经济管理学院,2017
GUO Tian-bao. Research on the dilemma and outlet of soybean production in China [D]. Changchun: College of Economics and Management, Jilin Agricultural University, 2017
- [2] HUANG Guo-cheng, CAI Wei-xi, XU Bao-jun. Improvement in beta-carotene, vitamin B₂, GABA, free amino acids and isoflavones in yellow and black soybeans upon germination [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 75: 488-496
- [3] Marco A Lazo-velez, Daniela Guardado-felix, Jonnatan Aviles-gonzalez, et al. Effect of germination with sodium selenite on the isoflavones and cellular antioxidant activity of soybean (*Glycine max*) [J]. LWT, 2018, 93: 64-70
- [4] XU Xiu-ping, LIU Hui, TIAN Li-hong, et al. Integrated and comparative proteomics of high-oil and high-protein soybean seeds [J]. Food Chemistry, 2015, 172: 105-116
- [5] Bellaloui Nacer, Smith James, Mengistu Alemu, et al. Evaluation of exotically-derived soybean breeding lines for seed yield, germination, damage, and composition under dryland production in the Midsouthern USA [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 176
- [6] Schenfert Tamara-Araujo, Ratke Rafael-Felippe, Casarin Valter, et al. Lime and gypsum in the implantation no-till system promote the nutrition and yield of soybean [J]. Journal of Plant Nutrition, 2020, 43(5): 641-654
- [7] 郝怡宁,初晨露,陈尚兵,等.大豆水溶性蛋白提取工艺优化[J].中国油脂,2019,44(5):79-81
HAO Yi-ning, CHU Chen-lu, CHEN Shang-bing, et al. Optimization of the extraction process of soybean water-soluble protein [J]. China Oils and Fats, 2019, 44(5): 79-81
- [8] Prochazka Pavel, Stranc Premysl, Pazderu Katerina, et al. Effects of biologically active substances used in soybean seed treatment on oil, protein and fibre content of harvested seeds [J]. Plant, Soil and Environment, 2017, 64: 564-568
- [9] YANG Dong-shuang, ZHANG Jin, LI Ming-xia, et al. Metabolomics analysis reveals the salt-tolerant mechanism in glycine soja [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2017, 36(2): 460-471
- [10] 龚一耘.基于四种中日大豆酿造酱油中代谢产物的解析及比较[D].成都:四川农业大学,2019
LONG Yi-yun. Based on the analysis and comparison of metabolites in four kinds of soybean soy sauce brewed in China and Japan [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2019
- [11] Moreira, Moraes, Furlan, et al. Effect of glyphosate and zinc application on yield, soil fertility, yield components, and nutritional status of soybean [J]. Communications in Soil Science & Plant Analysis, 2016, 47(8): 1033-1047
- [12] 孔庆林,罗丹,杨赫,等.野生大豆内生真菌酸碱胁迫下次生代谢产物分析[C].2018 全国植物生物学大会论文集:植物免疫与作物抗病,2018:1
KONG Qing-lin, LUO Dan, YANG He, et al. Analysis of secondary metabolites of wild soybean endophytic fungi under acid-base stress [C]. Proceedings of the 2018 National Plant Biology Conference: Plant Immunity and Crop Disease Resistance, 2018: 1
- [13] Jeudy Christian, Ruffel Sandrine, Freixes Sandra, et al. Adaptation of *Medicago truncatula* to nitrogen limitation is

- modulated via local and systemic nodule developmental responses [J]. *New Phytologist*, 2010, 185(3): 817-828
- [14] 沈雪峰,李召虎,段留生,等.硅对大豆碳代谢及产量形成的影响 [J].*大豆科学*, 2013,32(2):193-196
SHEN Xue-feng, LI Zhao-hu, DUAN Liu-sheng, et al. The effect of silicon on soybean carbon metabolism and yield formation [J]. *Soybean Science*, 2013, 32(2): 193-196
- [15] 赵静,刘嘉儿,严小龙,等.磷有效性对大豆碳代谢的生理调控及基因型差异[J].*华南农业大学学报*,2010,31(3): 1-4
ZHAO Jing, LIU Jia-er, YAN Xiao-long, et al. The physiological regulation of phosphorus availability on soybean carbon metabolism and genotype differences [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2010, 31(3): 1-4
- [16] 王晓慧,徐克章,李大勇,等.大豆品种遗传改良过程中叶片可溶性糖含量和比叶重的变化[J].*大豆科学*,2007,6:879-884
WANG Xiao-hui, XU Ke-zhang, LI Da-yong, et al. Changes of soluble sugar content and specific leaf weight of leaves during genetic improvement of soybean varieties [J]. *Soybean Science*, 2007, 6: 879-884
- [17] FENG Zhe, DING Cheng-qiao, LI Wei-hao, et al. Applications of metabolomics in the research of soybean plant under abiotic stress [J]. *Food Chemistry*, 2020, 310(25): 125914
- [18] WANG Xiao-xia, GUO Rui, LI Ming-xia, et al. Metabolomics reveals the drought-tolerance mechanism in wild soybean (*Glycine soja*) [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2019, 41(9): 1-11
- [19] HONG Eun-young, LEE Sang-Yoo, JEONG Jae-Yun, et al. Modern analytical methods for the detection of food fraud and adulteration by food category [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(12): 3877-3896
- [20] 陈羽红,张东杰,张桂芳,等.代谢组学技术在食品产地溯源中的研究进展[J].*粮食与饲料工业*,2016,7:16-19,28
CHEN Yu-hong, ZHANG Dong-jie, ZHANG Gui-fang, et al. Research progress of metabonomics technology in the traceability of food origin [J]. *Food and Feed Industry*, 2016, 7: 16-19, 28
- [21] 俞邱豪,张九凯,叶兴乾,等.基于代谢组学的食品真实性鉴别研究进展[J].*色谱*,2016,34(7):657-664
YU Qiu-hao, ZHANG Jiu-kai, YE Xing-qian, et al. Research progress on the identification of true food attributes based on metabolomics [J]. *Chromatography*, 2016, 34(7): 657-664
- [22] 缪璐欢,杜静芳,白凤翎,等.代谢组学在发酵食品有毒代谢产物分析中的研究进展[J].*食品工业科技*,2016,37(5): 388-393
MIAO Lu-huan, DU Jing-fang, BAI Feng-ling, et al. Research progress of metabolomics in the analysis of toxic metabolites of fermented foods [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(5): 388-393
- [23] G Oms-oliu, I Odriozola-serrano, O MartIn-belloso. Metabolomics for assessing safety and quality of plant-derived food [J]. *Food Research International*, 2013, 54(1): 1172-1183
- [24] 杨冬爽.基于代谢组学的野大豆 (*Glycine soja*) 耐盐机理研究[D].长春:东北师范大学,2017
YANG Dong-shuang. Study on the salt tolerance mechanism of *Glycine soja* based on metabolomics [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2017
- [25] 张圳,冯家懿,果卉,等.高效液相色谱法测定体外大鼠肠道菌液中大豆昔及其代谢物[J].*药学实践杂志*,2018, 36(4): 347-350
ZHANG Zhen, FENG Jia-yi, GUO Hui, et al. Determination of daidzein and its metabolites in in vitro rat intestinal bacterial liquid by high performance liquid chromatography [J]. *Journal of Pharmaceutical Practice*, 2018, 36(4): 347-350
- [26] 张玉梅,胡润芳,陈宇华,等.菜用大豆籽粒代谢物的相关性分析[J].*大豆科学*,2018,37(2):231-238
ZHANG Yu-mei, HU Run-fang, CHEN Yu-hua, et al. Correlation analysis of metabolites in vegetable soybean seed [J]. *Soybean Science*, 2018, 37(2): 231-238
- [27] 时羽杰,李兴龙,唐媛,等.基于 GC-MS 分析两地白色藜麦种子的代谢差异[J].*浙江农业学报*,2019,6(7):1-9
SHI Yu-jie, LI Xing-long, TANG Yuan, et al. Analysis of metabolic differences of white quinoa seeds in the two regions based on GC-MS [J]. *Acta Agricultural Sciences*, 2019, 6(7): 1-9
- [28] WANG Ni, ZHANG Na, LI Tie, et al. Untargeted metabonomics study of ginseng in treatment of spleen-Qi deficiency [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2020, 45(2): 398-404
- [29] 董艳,杨庆丽,王宁,等.汉麻籽不同萌发时期的生长活性物质非靶向代谢组学研究[J].*生物资源*,2020,42(1):77- 86
DONG Yan, YANG-Qing-li, WANG Ning, et al. Non-targeted metabolomics study on growth active substances of hemp seeds at different germination stages [J]. *Bioresources*, 2020, 42(1): 77-86