

火炬松针叶与树皮代谢组比较分析*

曾韦珊¹ 黄林旺¹ 陈曼钰¹ 毛积鹏^{1,2}
黄少伟¹ 宁华琪³ 刘天颐¹

(1. 华南农业大学 林学与风景园林学院 / 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广东 广州 510642;

2. 台山市红岭种子园, 广东 台山 529223; 3. 英德市林业科学研究所, 广东 英德 513055)

摘要 火炬松 *Pinus taeda* 是一种生长迅速、适应性强的针叶用材树种, 针对火炬松针叶和树皮组织中的代谢产物的利用开发仍处于初级阶段, 因此探究火炬松针叶和树皮组织的代谢产物具有重要的实际意义。研究利用超高效液相色谱和质谱联用技术 (UPLC-MS/MS) 对火炬松的针叶和树皮中的代谢物成分进行鉴定, 并采用主成分分析、正交偏最小二乘法分析、聚类分析和富集分析等方法对火炬松针叶和树皮中的代谢物成分进行比较分析。结果表明, 从火炬松的针叶和树皮中共鉴定出 523 种代谢物成分, 主要为氨基酸类、酚酸类、有机酸类、鞣质、脂质类和黄酮类等化合物。火炬松针叶和树皮组织部位之间代谢物成分含量差异显著, 其中槲皮素、矢车菊素、原花青素、丁香树脂酚、表儿茶素等物质在树皮组织中的含量显著高于针叶组织, 而柚皮素、山姜素、山奈酚、泽兰黄素、秦皮甲素等物质则在火炬松针叶组织中含有量更高。此外, 302 种含量差异显著的代谢物显著富集于类黄酮生物合成通路、黄酮与黄酮醇生物合成通路、氨酰 tRNA 生物合成通路、氨基酸生物合成通路及淀粉和蔗糖代谢通路。

关键词 火炬松; UPLC-MS/MS; 代谢组分析

中图分类号: Q944 文献标志码: A 文章编号: 2096-2053 (2022) 01-0051-11

Comparative Analysis of Metabonomics Between Needles and Bark of *Pinus taeda*

ZENG Weishan¹ HUANG Linwang¹ CHEN Manyu¹ MAO Jipeng^{1,2}
HUANG Shaowei¹ NING Huagong³ LIU Tianyi¹

(1. Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm / College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China; 2. Taishan Hongling Seed Orchard, Taishan, Guangdong 529223, China; 3. Yingde Institute of Forestry, Yingde, Guangdong 513055, China)

Abstract *Pinus taeda* is a fast-growing and highly adaptable coniferous tree species. The exploitation of metabolites in the needles and bark tissues of *P. taeda* is still in its early stages, so it is of practical importance to investigate the metabolites in the needles and bark tissues of *P. taeda*. In this study, UPLC-MS/MS was used to identify the metabolites in the pine needles and bark of *P. taeda*, and the principal component analysis, orthogonal partial least squares analysis, and polymerization were used to identify the components of the metabolites in the pine needles and bark of *P. taeda*. Methods such as class and enrichment analysis are used to compare and analyze the composition of their metabolites. The results showed that a total of 523 metabolite components were identified from the bark and pine needles of *P. taeda*, mainly including amino acids, phenolic acids, organic acids, tannins,

基金项目: 广东省重点领域研发计划资助 (2020B020215001)。

第一作者: 曾韦珊 (1998—), 女, 在读硕士, 研究方向为林木遗传育种研究, E-mail: 13522592177@163.com。

通信作者: 刘天颐 (1976—), 女, 副教授, 主要从事林木遗传育种研究, E-mail: tianyiliu@scau.edu.cn。

lipids and flavonoids. There are significant differences in the content of metabolites between bark and pine needle tissue of *P. taeda*. Among them, the content of quercetin, cyanidin, proanthocyanidin, eugenol, and epicatechin in the bark tissue were significantly higher than that in the pine needle tissue, while naringenin, kaempferin, kaempferol, zearanthin and aesculin were higher in needle tissue. In addition, 302 metabolites with significantly different contents were significantly enriched in the flavonoid biosynthesis pathway, biosynthesis of secondary metabolites pathway, biosynthesis of pathway amino acids, and starch and sucrose metabolism pathway.

Key words *Pinus taeda*; UPLC-MS/MS; metabonomic analysis

由于松属植物中含有丰富的化学物质,常作药用植物,据《本草纲目》记载:“松叶,名为松毛,性温苦,无毒,入肝、肾、肺、脾诸经,治各脏肿毒,风寒湿症。还能治疗肿毒,促进毛发再生,强健肝、肾、心、脾、肺五脏,能够充饥,延年益寿”^[1]。据分析,松属植物松针中含有萜类、黄酮类、木质素类、挥发油类、氨基酸类等化学物质,如南方马尾松 *Pinus massoniana* 松针中含有单萜和倍半萜^[2],王巍等^[3]从马尾松松针中分离出木犀草素、槲皮素、双氢槲皮素等黄酮类化合物,周维纯等^[4]从马尾松松针中测定出18种氨基酸,从黑松 *P. thunbergii* 针叶中亦测定出18种氨基酸,高岩等^[5]从红松 *P. koraiensis* 松针中分离出7个黄酮苷类化合物,松针活性成分逐步被明晰,这也使其在医药保健应用中广受关注^[6]。

火炬松 *P. taeda* 为松科松属乔木,原产北美东南部,是美国南方松中最重要的速生针叶树种之一^[7-8]。我国引种火炬松已有70多年的历史,但对火炬松松针和树皮中活性成分的研究尚未见有关报道。鉴于此,本研究利用UPLC-MS/MS代谢组学技术对火炬松的主要药用部位包括针叶、树皮部位主要代谢物成分进行测定并做比较分析,旨在为火炬松代谢物成分鉴定、分布特性及其开发应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

火炬松样本材料取自于广东省英德市林业科学研究所(N 23°50'31", E 112°45'15")。2019年8月随机选取9个8年生的火炬松无性系(28-7-43、19-11-44、7-15-14、15-4-15、44-2-6、34-1-9、44-13-5、26- III -4、西 2-1-1)取样,采取了生长旺盛、无病虫害的火炬松针叶和树皮组织部位,将任意3个无性系的相同部位混在一块作为一份样

本,每个样本3个生物学重复,剪碎后放入50 mL 无菌的离心管中,随即放入液氮中,在-80℃条件下保存。

1.2 样品制备

在冻干机(Scientz-100F)中真空冷冻干燥火炬松各组织部位样品,之后用研磨仪(MM 400, Retsch)研磨样品至粉末状,称取约100 mg粉末溶解于1.2 mL 70% 甲醇(色谱级, Merck)中。在4℃条件下提取12 h,每2 h涡旋震荡1次,以提高提取率。12 000 rpm 条件下离心10 min,然后取上清,用微孔滤膜(0.22 μm, pore size)过滤样本,随后保存于进样品中用于UPLC-MS/MS分析。

1.3 色谱和质谱数据采集

色谱数据采集仪器:超高效液相色谱(SHIMADZU Nexera X2, <https://www.shimadzu.com.cn>)。采集条件:Agilent SB-C18 色谱柱(1.8 μm, 2.1 mm × 100 mm); A相超纯水(加入0.1%的甲酸), B相乙腈(色谱级, Merck)的流动相;洗脱梯度:0.00 min, B相比比例为5%, B相比比例在9.00 min内线性增加到95%,并维持95% 1 min, 10.00—11.10 min, B相比比例降至5%,在5%条件下平衡至14 min;流速设为0.35 mL/min,柱温40℃,进样量4 μL。

质谱数据采集仪器:串联质谱(Applied Biosystem 4500 QTRAP, <http://www.appliedbiosystem.com.cn>)仪器。采集条件为:温度550℃电喷雾离子源(Electrospray Ionization, ESI), 质谱电压5 500 V(正模式)/-4 500 V(负模式),帘气(Curtain gas, CUR) 25 psi, 碰撞诱导电离(Collision-Activated Dissociation, CAD)参数设置为高。根据优化的簇电压(Declustering Potential, DP)和碰撞能进行三重四级杆中每个离子对的扫描检测^[9]。

1.4 代谢物定性与定量分析

委托迈特维尔生物科技有限公司基于自建数

数据库 MWDB (metware database) 根据二级谱信息对物质进行定性分析, 分析时将含 K^+ 离子、 Na^+ 离子 NH_4^+ 离子和同位素信号重复信号去除。利用三重四级杆质谱的多反应检测模式进行代谢物定量分析。首先四级杆筛选出目标物质的前体离子, 前体离子经过诱导电离后形成碎片离子, 之后碎片离子通过三重四级杆过滤选择出特征碎片离子。随后进行峰面积积分, 并积分校正其中同一代谢物在不同样本中的质谱出峰^[10]。

1.5 数据分析

质谱数据的处理: 利用 MultiaQuant 软件和 Analyst 1.6.3 软件打开和处理数据。随后积分并校正色谱峰, 每个色谱峰的面积代表对应物质的相对含量, 最后导出所有色谱峰面积积分数据保存。样本数据分析: 用主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (Orthogonal Partial Least Squares—Discriminant Analysis, OPLS-DA) 方法进行分析, PCA 用 R 软件中的 Prcomp 函数对进行归一化处理后的数据进行分析, OPLS-DA 在原始数据进行 log2 转换后, 再进行中心化处理, 利用 R 软件中的 MetaboAnalystR 包的 OPLSR.Anal 函数进行分析。差异代谢物的筛选: 通过载荷图和变量重要性投影 (Variable Importance in Projection, VIP) 值大于等

于 1 来筛选差异代谢物。

2 结果与分析

2.1 代谢物鉴定

利用 UPLC—MS/MS 法可从火炬松针叶和树皮组织中共鉴定出 523 种代谢物成分, 其正离子模式下混合样本的质谱分析总离子流图如图 1 所示, 各峰分离效果良好。其中氨基酸及其衍生物 40 种、酚酸类物质 66 种、核苷酸及其衍生物 38 种、类黄酮化合物 165 种、木脂素和香豆素类化合物 28 种、鞣质类 20 种、生物碱 24 种、萜类化合物 4 种、有机酸 30 种、脂质 55 种、其它类化合物 53 种。165 种类黄酮代谢化合物中, 查尔酮有 4 种、二氢黄酮 10 种、二氢黄酮醇 6 种、花青素 17 种、黄酮 55 种、黄酮醇 59 种、黄酮碳糖苷 1 种、黄烷醇类 11 种、异黄酮 2 种。

2.2 多元统计分析

为比较火炬松针叶和树皮样本之间总体代谢差异和组内样本之间的变异度大小, 对火炬松针叶和树皮代谢物进行主成分 (PCA) 分析 (图 2A)。结果表明, 第一主成分 (PC1) 的解释率达到 61.95%, 第二 (PC2) 和第三主成分 (PC3) 共解释了 25.58%, 其中 PC2 的解释率为 18.73%。如图 2B 所示, 火炬松树皮 (SP) 3 个样品均位于

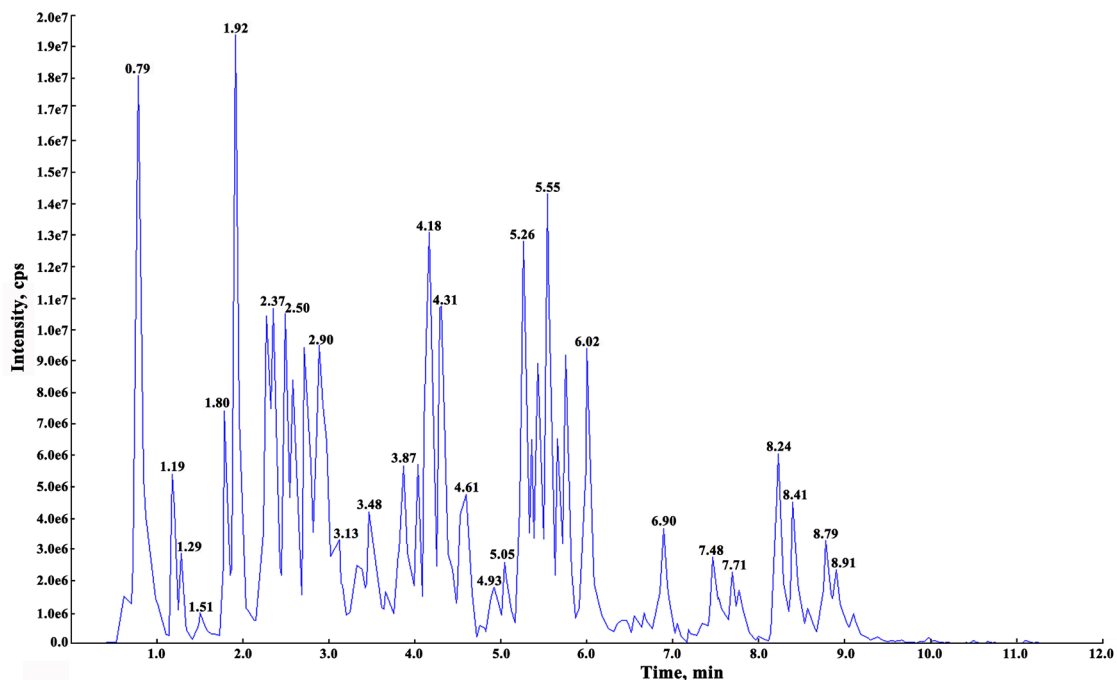
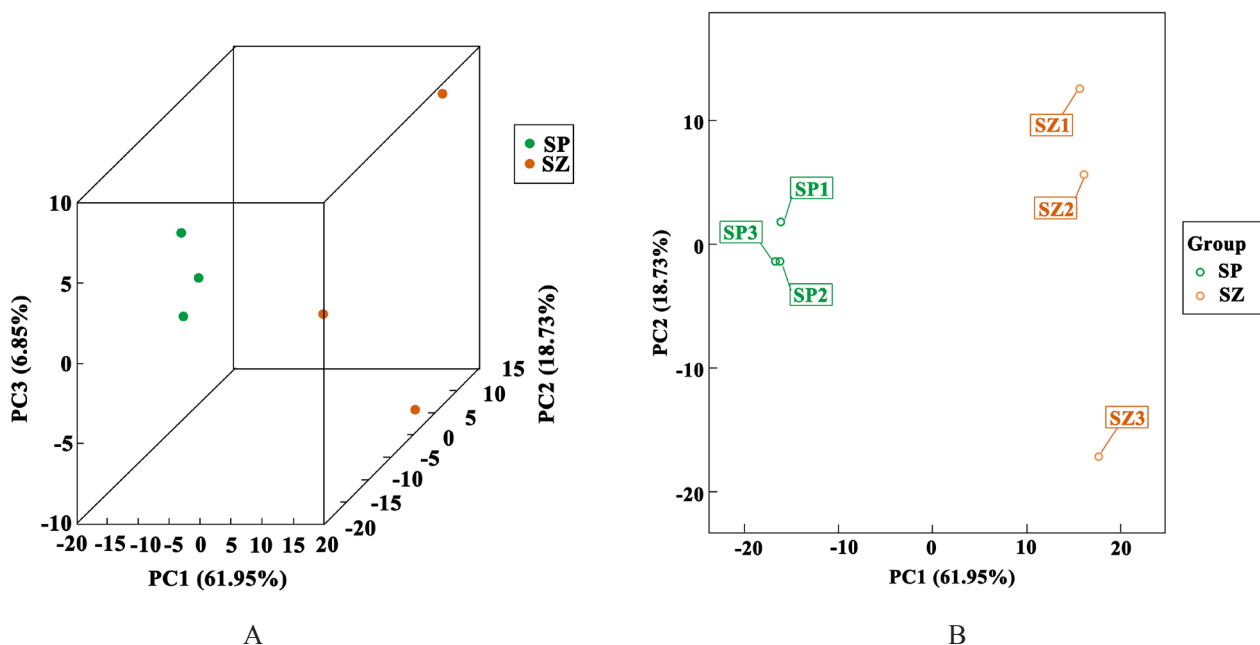


图 1 正离子模式下火炬松混合样本的质谱分析总离子流

Fig.1 Total ions current of mass spectrometry analysis of mixed samples of *P. taeda* in positive ion mode

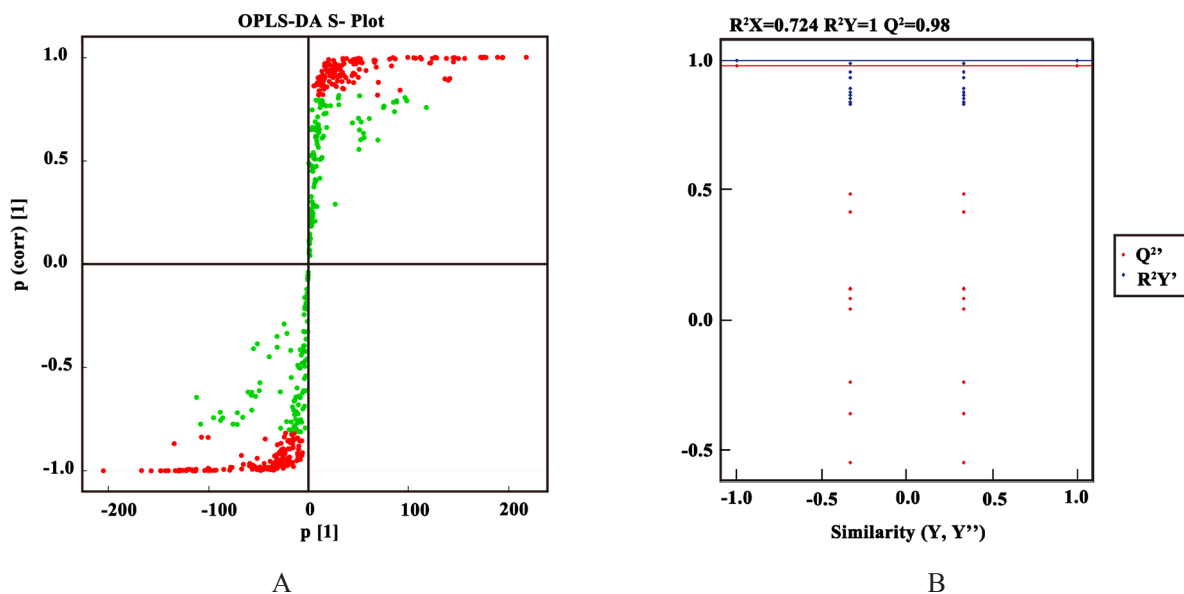


注：A：三维 PCA 分析，PC1、PC2 和 PC3 分别表示第一、第二和第三主成分；B：二维 PCA 分析，PC1 表示第一主成分，PC2 表示第二主成分，百分比表示该主成分对数据集的解释率。SP 表示树皮组织，SZ 表示针叶组织。

Note: A: three-dimensional PCA analysis, PC1, PC2 and PC3 represent the first, second and third principal components respectively. B: two-dimensional PCA analysis, PC1 represents the first principal component, PC2 represents the second principal component, percentage represents the interpretation rate of the principal component to the data set. SP is bark tissue. SZ is pine needle tissue.

图 2 火炬松针叶和树皮组织样本的多元统计分析

Fig.2 Figure 2 Multivariate statistical analysis of *Pinus taeda* needle and bark tissue samples



注：A：OPLS-DA 统计分析图。横坐标表示主成分与代谢物的协方差，纵坐标表示主成分与代谢物的相关系数，红色表示代谢物的 VIP 值大于或等于 1，绿色表示代谢物的 VIP 值小于 1。B：OPLS-DA 模型验证图。

Note: A: OPLS-DA statistical analysis chart. The abscissa represents the covariance between the principal component and the metabolite, the ordinate represents the correlation coefficient between the principal component and the metabolite, red indicates that the VIP value of the metabolite is greater than or equal to 1, and green indicates that the VIP value of the metabolite is less than 1. B: OPLS-DA model verification diagram.

图 3 OPLS-DA 分析 Fig.3 OPLS-DA analysis

PC1 负半轴，火炬松针叶（SZ）3 个样品均位于 PC1 正半轴，不同组织分离明显，说明 2 种不同部位样品在代谢物成分上有明显差异。同时，同一组织部位的不同样本也相对分散，说明组内样本间也存在一定差异。

另外，运用 OPLS-DA 法构建 S-plot（图 3A）可知，火炬松针叶和树皮区分明显，且很大一部分代谢物的 VIP 值大于或等于 1，表明这些代谢物成分在火炬松针叶和树皮中的含量差异显著。从 OPLS-DA 模型的置换验证结果发现（图 3B），建立的 OPLS-DA 模型共得到两个主成分， $R^2X=0.724$ ， $R^2Y=1$ ， $Q^2=0.98$ ，这 3 个模型参数均大于 0.5，OPLS-DA 模型拟合准确较好，具有意义，因此本研究建立的 OPLS-DA 模型能够有效解释火炬松针叶和树皮之间的代谢差异。

2.3 差异代谢物鉴定

差异代谢物的筛选根据单变量分析的差异倍数（Fold change）值和多元统计分析 OPLS-DA 模型的 VIP 值来选择，Fold change 小于等于 0.5 或大于等于 2，且 VIP 值大于等于 1 的代谢物认为

差异显著。鉴定到 523 种代谢物中，221 种代谢物成分的含量在火炬松的针叶和树皮组织部位中没有显著差异，另外 302 种代谢物成分则在火炬松的针叶和树皮组织部位中差异显著。差异显著的代谢物成分中，147 种代谢物成分在火炬松针叶组织部位中的含量高于树皮组织中的含量，其中包括 70 种类黄酮化合物和 7 种氨基酸及其衍生物，如表 1 所示。而另外 155 种代谢物成分则在火炬松树皮组织部位中的含量显著高于针叶组织，其中包含 35 种类黄酮化合物和 20 种氨基酸及其衍生物，如表 2 所示。此外，分析发现柚皮素、山姜素、山奈酚、泽兰黄素、秦皮甲素等在火炬松针叶组织中的含量显著高于树皮组织；而槲皮素、矢车菊素、原花青素、丁香树脂酚、表儿茶素等高生物代谢活性成分则在火炬松树皮组织中的含量显著高于针叶组织。

2.4 差异代谢物分析

为了对有显著差异代谢物的组织变化规律及其通路分布情况有更方便和直观的了解，我们对有显著差异的代谢物成分进行了聚类 and KEGG 富

表 1 在火炬松针叶组织中含量显著高于树皮组织的 70 种类黄酮化合物和 7 种氨基酸及其衍生物

Table 1 The content of 70 kinds of flavonoids and 7 kinds of amino acids and their derivatives in *P. taeda* needle tissue is significantly higher than that in bark tissue

化学式 Formula	物质 Compounds	物质二级分类 Class II	CAS 号 CAS Number	差异倍数 Fold change
C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	5,2'-二羟基-7,8-二甲氧基黄酮苷	黄酮	-	0.000 000
C ₁₆ H ₁₄ O ₄	山姜素	二氢黄酮	1090-65-9	0.000 002
C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	山奈酚-3-O-(2''-反式对香豆酰基)-β-D-葡萄糖苷	黄酮	137018-32-7	0.000 002
C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	山奈酚-乙酰葡萄糖苷	黄酮醇	-	0.000 003
C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	山奈酚-3-O-(6''-反式对香豆酰基)-β-D-葡萄糖苷	黄酮	68170-52-5	0.000 006
C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	山奈酚 7-O-β-d-(6''-O-(E)-p-香豆酰)葡萄糖苷	黄酮醇	-	0.000 006
C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄	槲皮素-3-O-(6''-反式对香豆酰基)-β-D-半乳糖苷	黄酮	-	0.000 006
C ₁₈ H ₁₆ O ₇	7,8-二羟基-5,6,4'-三甲氧基黄酮	黄酮	-	0.000 006
C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	山奈酚-3-O-(6''-反式对香豆酰基)-β-D-半乳糖苷	黄酮	-	0.000 007
C ₁₈ H ₁₆ O ₇	泽兰黄素	黄酮	855-96-9	0.000 007
C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	山奈酚-3-O-(6''-O-乙酰)-葡萄糖苷	黄酮醇	-	0.000 008
C ₁₆ H ₁₄ O ₄	球松素查耳酮	查耳酮	18956-15-5	0.000 019
C ₂₁ H ₂₂ O ₉	乔松素-7-O-β-D-葡萄糖苷(乔松苷)	黄酮	75829-43-5	0.000 021
C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	山奈酚-3,7-二-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	黄酮	-	0.000 027
C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	槲皮素-3,4'-O-二葡萄糖苷	黄酮醇	29125-80-2	0.000 048
C ₁₆ H ₁₂ O ₅	8-甲氧基白杨素(汉黄芩素)	黄酮	632-85-9	0.000 098
C ₁₆ H ₁₂ O ₅	芫花素(5,4'-二羟基-7-甲氧基黄酮)	黄酮	437-64-9	0.000 103

化学式 Formula	物质 Compounds	物质二级分类 Class II	CAS 号 CAS Number	差异倍数 Fold change
C ₁₆ H ₁₂ O ₇	鼠李素	黄酮醇	90-19-7	0.000 147
C ₁₆ H ₁₂ O ₆	羟基芫花素	黄酮	20243-59-8	0.000 621
C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄	槲皮素 -3-O-(6''- 反式对香豆酰基)-β-D- 葡萄糖苷	黄酮	-	0.000 699
C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	槲皮素 -3-O-(6''-O- 乙酰)- 半乳糖苷	黄酮醇	-	0.000 733
C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	山奈酚 -7-O-β-d-(6''-O-(E)- 对香豆酰) 半乳糖苷	黄酮醇	-	0.002 431
C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	木犀草素 - 咖啡酰鼠李糖苷	黄酮	-	0.002 974
C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	银锻苷	黄酮醇	20316-62-5	0.003 180
C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	山奈酚 -3-O-(2''- 反式对香豆酰基)-β-D- 半乳糖苷	黄酮	-	0.003 208
C ₁₇ H ₁₄ O ₇	3,7- 二 -O- 甲基槲皮素	黄酮醇	2068/2/2	0.003 963
C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	红车轴草素 -7-O- 吡喃葡萄糖苷	黄酮	36191-03-4	0.009 172
C ₁₇ H ₁₄ O ₈	丁香亭	黄酮醇	4423-37-4	0.009 769
C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	香叶木素 -7-O- 芸香糖苷	黄酮	-	0.010 681
C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	香叶木素 -7-O- 新橘皮糖苷	黄酮	38665-01-9	0.011 555
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	山奈酚 -7-O- 葡萄糖苷	黄酮醇	16290-07-6	0.012 044
C ₁₅ H ₁₂ O ₄	乔松素	二氢黄酮	480-39-7	0.018 814
C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	柠檬素 -3- 鼠李糖苷	黄酮	-	0.031 201
C ₁₅ H ₁₂ O ₅	柚皮素	二氢黄酮	480-41-1	0.039 770
C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	鸢尾新苷	异黄酮	94396-09-5	0.041 780
C ₁₅ H ₁₂ O ₅	短叶松素	二氢黄酮醇	548-82-3	0.041 861
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	山奈酚 -3-O- 葡萄糖苷 (紫云英苷)(黄芪苷)	黄酮醇	480-10-4	0.043 946
C ₁₅ H ₁₂ O ₅	柚皮素查耳酮	查耳酮	73692-50-9	0.044 580
C ₁₅ H ₁₂ O ₅	紫柳素	二氢黄酮	492-14-8	0.050 885
C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	异鼠李素 -3-O- 鼠李糖苷	黄酮醇	-	0.059 920
C ₁₇ H ₁₄ O ₆	5,6- 二羟基 -7,4'- 二甲氧基黄酮	黄酮	10176-71-3	0.066 028
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	山奈酚 -3-O- 半乳糖苷 (三叶豆苷)	黄酮醇	23627-87-4	0.074 476
C ₁₆ H ₁₄ O ₄	球松素	二氢黄酮	480-37-5	0.091 710
C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	胡桃苷	黄酮醇	5041-67-8	0.092 208
C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	甲基槲皮素 O- 己糖苷	黄酮醇	-	0.124 060
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	杨梅素 -3-O- 半乳糖苷	黄酮醇	15648-86-9	0.131 126
C ₂₈ H ₃₃ O ₁₆ ⁺	牵牛花素 -3-O- 芸香糖苷	花青素	-	0.179 466
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	6- 羟基山奈酚 -7-O- 葡萄糖苷	黄酮醇	-	0.189 316
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	芹菜素 5-O- 葡萄糖苷	黄酮	28757-27-9	0.190 507
C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅ ⁺	矢车菊素 3-O- 芸香糖苷	花青素	28338-59-2	0.207 924
C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	山奈酚 -3-O-β-D- 葡萄糖醛酸苷	黄酮醇	-	0.238 008
C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	木犀草素 -7-O- 芸香糖苷	黄酮	3563-98-2	0.252 641
C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	野黄芩素 -7- 氧 - 葡萄糖醛酸苷	黄酮	27740-01-8	0.254 472
C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	杨梅素 -3-O- 阿拉伯糖苷	黄酮醇	132679-85-7	0.267 021
C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	4- 羟基黄酮 -7-O- 葡萄糖苷	黄酮	-	0.269 932
C ₂₅ H ₃₁ O ₁₁ ⁺	锦葵色素 -3-O- 葡萄糖醛酸	花青素	-	0.288 216
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	槲皮素 -3-O-β-D- 葡萄糖苷 (异槲皮苷)	黄酮醇	482-35-9	0.320 298

化学式 Formula	物质 Compounds	物质二级分类 Class II	CAS 号 CAS Number	差异倍数 Fold change
C ₁₅ H ₁₄ O ₅	表阿夫儿茶精	黄烷醇类	24808-04-6	0.323 632
C ₁₅ H ₁₄ O ₇	表没食子酸儿茶素	黄烷醇类	970-74-1	0.327 900
C ₁₇ H ₁₄ O ₇	棕矢车菊素	黄酮	18085-97-7	0.329 250
C ₁₅ H ₁₄ O ₇	没食子儿茶素	黄烷醇类	970-73-0	0.335 938
C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀ ⁺	天竺葵素 3-O- 葡萄糖苷	花青素	47684-27-5	0.361 061
C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅ ⁺	天竺葵素 3,5-O- 二葡萄糖苷	花青素	17334-58-6	0.361 647
C ₁₅ H ₁₀ O ₆	山奈酚	黄酮醇	520-18-3	0.377 799
C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	异鼠李素 -3-O- 新橙皮糖苷	黄酮醇	55033-90-4	0.398 860
C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	山奈酚 -3-O- β-D- 槐糖苷 (槐属黄酮苷)	黄酮	19895-95-5	0.404 631
C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	苜蓿素 5-O- 葡萄糖苷	黄酮	32769-00-9	0.429 502
C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	异鼠李素 -3-O- 葡萄糖苷	黄酮醇	-	0.464 458
C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	异鼠李素 -7-O- 葡萄糖苷	黄酮醇	-	0.479 626
C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	樱桃苷	二氢黄酮	529-55-5	0.481 269
C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	谷胱甘肽还原型	氨基酸类	70-18-8	0.002 387
C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₁₂ S ₂	谷胱甘肽	氨基酸类	121-24-4	0.038 627
C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂	1- 甲基组氨酸	氨基酸类	368-16-1	0.039 864
C ₇ H ₁₄ NO ₂ ⁺	脯氨酸甜菜碱	氨基酸类	1195-94-4	0.144 535
C ₉ H ₁₁ NO ₄	3,4- 二羟基 -DL- 苯丙氨酸	氨基酸类	63-84-3	0.147 197
C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	L- 色氨酸	氨基酸类	73-22-3	0.176 079
C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	L- 胱硫醚	氨基酸类	56-88-2	0.346 268

注：差异倍数为 SP/SZ 值。SP 表示树皮组织，SZ 表示针叶组织。

Note: fold change value was calculated by SP/SZ. SP is bark tissue. SZ is pine needle tissue.

表 2 在火炬松树皮组织中含量显著高于松针组织的 35 种类黄酮化合物和 20 种氨基酸及其衍生物

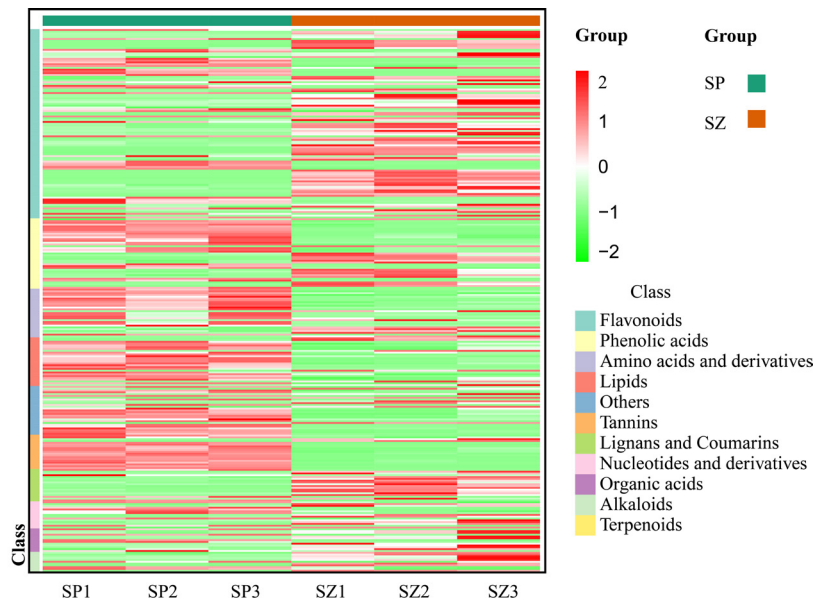
Table 2 The content of 35 kinds of flavonoids and 20 kinds of amino acids and their derivatives in *P. taeda* bark tissue are significantly higher than that in pine needle tissue

化学式 Formula	物质 Compounds	物质二级分类 Class II	CAS 号 CAS Number	差异倍数 Fold change
C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	木犀草素 -8-C- 己糖苷 -O- 己糖苷	黄酮	-	2.155 226
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	木犀草素 -4'-O- β-D- 葡萄糖苷	黄酮	6920-38-3	3.065 975
C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	圣草酚 -7-O- 葡萄糖苷	二氢黄酮	38965-51-4	3.174 847
C ₁₅ H ₁₄ O ₆	儿茶素	黄烷醇类	154-23-4	3.253 109
C ₁₅ H ₁₄ O ₅	阿夫儿茶精	黄烷醇类	2545-00-8	3.817 183
C ₂₇ H ₃₁ O ₁₄ ⁺	天竺葵素 -3-O- 芸香糖苷	花青素	-	6.201 892
C ₁₆ H ₁₂ O ₈	西伯利亚落叶松黄酮	黄酮醇	53472-37-0	8.842 252
C ₂₄ H ₁₉ O ₁₀ ⁺	矢车菊素 O- 丁香酸	花青素	-	9.793 812
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	槲皮素 -3-O- 鼠李糖苷 (槲皮苷)	黄酮醇	522-12-3	12.358 258
C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	山奈酚 -3,7-O- 二鼠李糖苷 (山奈苷)	黄酮醇	482-38-2	12.730 502
C ₁₅ H ₁₀ O ₇	6- 羟基木犀草素	黄酮	18003-33-3	13.228 100
C ₁₆ H ₁₂ O ₇	异鼠李素	黄酮醇	480-19-3	14.278 124
C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	牡荆素 -2''-O- 鼠李糖苷	黄酮碳糖苷	64820-99-1	15.153 199
C ₁₅ H ₁₀ O ₆	木犀草素	黄酮	491-70-3	18.674 362

化学式 Formula	物质 Compounds	物质二级分类 Class II	CAS 号 CAS Number	差异倍数 Fold change
C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	三儿茶素	黄烷醇类	-	20.210 911
C ₁₅ H ₁₄ O ₆	表儿茶素	黄烷醇类	490-46-0	20.264 574
C ₁₅ H ₁₄ O ₅	根皮素	查耳酮	60-82-2	25.415 505
C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	槲皮素 -3-O- 新橙皮糖苷	黄酮醇	117611-67-3	27.928 024
C ₁₅ H ₁₂ O ₅	3,4',7- 三羟基黄烷酮	黄酮醇	1226-22-8	34.515 983
C ₁₅ H ₁₂ O ₇	二氢槲皮素 (花旗松素)	二氢黄酮醇	480-18-2	44.495 680
C ₁₅ H ₁₂ O ₈	二氢杨梅素 (蛇葡萄素)	二氢黄酮醇	27200-12-0	45.485 710
C ₁₅ H ₁₂ O ₆	圣草酚	二氢黄酮	552-58-9	68.921 033
C ₁₅ H ₁₀ O ₈	杨梅素	黄酮醇	529-44-2	160.058 285
C ₁₀ H ₁₂ O ₅	没食子酸丙酯 (PG)	黄烷醇类	121-79-9	347.122 222
C ₂₀ H ₁₉ O ₁₁ +	飞燕草素 -3-O- 阿拉伯糖苷	花青素	-	568.666 667
C ₁₇ H ₁₆ O ₅	杜鹃素	二氢黄酮	24211-30-1	793.248 148
C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆	槲皮素 -3-O-(2"- 没食子酰基)-β-D- 葡萄糖苷	黄酮	69624-79-9	4 161.074 074
C ₂₃ H ₂₀ O ₁₃	山奈酚 -3-O-β-(2"-O- 乙酰基-β-D- 葡萄糖醛酸)	黄酮醇	-	4 276.629 630
C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	杨梅素 - 葡萄糖鼠李糖苷	黄酮醇	-	5 447.851 852
C ₂₆ H ₂₇ O ₁₅ +	锦葵色素 -3-O- 丙二酰葡萄糖苷	花青素	-	7 083.851 852
C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	木犀草素 -7-O-β-D- 龙胆糖苷	黄酮	-	7 257.444 444
C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁	表儿茶素表阿夫儿茶精	黄烷醇类	-	8 735.370 370
C ₁₅ H ₁₁ O ₆ +	矢车菊素	花青素	13306-05-3	43 612.222 222
C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄	槲皮素 -O- 阿魏酰戊糖苷	黄酮醇	-	90 676.296 296
C ₁₅ H ₁₀ O ₇	槲皮素	黄酮醇	117-39-5	1 139 088.888 889
C ₅ H ₉ N ₃	组胺	氨基酸类	51-45-6	2.161 149
C ₅ H ₁₁ NO ₂	5- 氨基戊酸	氨基酸类	660-88-8	2.629 235
C ₅ H ₁₁ NO ₂	L- 缬氨酸	氨基酸类	72-18-4	5.041 037
C ₆ H ₁₃ NO ₂	L- 异亮氨酸	氨基酸类	73-32-5	5.094 383
C ₆ H ₁₃ NO ₂	L- 亮氨酸	氨基酸类	61-90-5	5.252 556
C ₆ H ₁₃ NO ₂	L- 正亮氨酸	氨基酸类	327-57-1	5.610 261
C ₃ H ₇ NO ₃	D- 丝氨酸	氨基酸类	312-84-5	5.786 232
C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	L-(+)- 赖氨酸	氨基酸类	56-87-1	6.771 260
C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	L- 谷氨酰胺	氨基酸类	56-85-9	6.956 262
C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	L- 瓜氨酸	氨基酸类	372-75-8	7.880 096
C ₆ H ₁₁ NO ₂	嘧啶酸	氨基酸类	4043-87-2	8.193 481
C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	L- 组氨酸	氨基酸类	71-00-1	9.680 903
C ₄ H ₉ NO ₂	N,N- 二甲基甘氨酸	氨基酸类	1118-68-9	10.928 368
C ₄ H ₇ NO ₄	L- 天冬氨酸	氨基酸类	56-84-8	15.802 047
C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	L-(+)- 精氨酸	氨基酸类	74-79-3	36.253 576
C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	L- 天冬酰胺	氨基酸类	70-47-3	52.319 202
C ₅ H ₇ NO ₃	L- 焦谷氨酸	氨基酸类	98-79-3	913.537 037
C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O ₆ S	S- 甲基谷胱甘肽	氨基酸类	2922-56-7	2 659.555 556
C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	N6- 乙酰 -L- 赖氨酸	氨基酸类	692-04-6	3 305.888 889
C ₅ H ₉ NO ₅	4- 羟基 -L- 谷氨酸	氨基酸类	3913-68-6	6 172.222 222

注: 差异倍数为 SP/SZ 值。SP 表示树皮组织, SZ 表示针叶组织。

Note: fold change value was calculated by SP/SZ. SP is bark tissue. SZ is pine needle tissue.



注：Group 为分组，Class 为物质类别；SP 表示树皮组织，SZ 表示针叶组织。

Note: Group for grouping. Class for substance category. SP is bark tissue. SZ is pine needle tissue.

图 4 差异代谢物聚类热图

Fig.4 Different metabolites cluster heatmap

集分析。由聚类分析热图可知，氨基酸及其衍生物、脂质和鞣质类化合物在树皮组织中的含量较针叶组织高，L-天冬氨酸是树皮组织中含量最高的氨基酸及其衍生物类物质，反油酸是树皮组织和针叶组织中含量最高的脂质类化合物，而圣草酚是树皮组织中含量最高的类黄酮物质。木脂素和香豆素类化合物在针叶组织中含量较高。此外，黄酮类物质和酚酸类物质在针叶和树皮组织中所占比重也较大，黄酮类化合物在针叶组织中含量高于树皮组织中的含量，其总量是树皮组织的 1.74 倍。通过结合两种不同组织的分组情况及定量信息，比较检测得到的化合物差异倍数变化，其中，树皮组织中含量高于针叶组织的差异化合物共有 155 个，而针叶组织中含量高于树皮组织的差异化合物共有 147 个。用 KEGG 数据库对检测得到的差异化合物进行通路富集分析，结果表明，含量差异显著的代谢物显著富集于类黄酮生物合成通路、黄酮与黄酮醇生物合成通路、氨酰 tRNA 生物合成通路、氨基酸生物合成通路及淀粉和蔗糖代谢通路（图 5）。

3 结论与讨论

从火炬松的针叶和树皮中共鉴定出 523 种代谢物成分，主要为氨基酸类、酚酸类、有机酸类、

鞣质、脂质类和黄酮类等化合物。其中，221 种代谢物成分的含量在火炬松的针叶和树皮组织部位中没有显著差异，另外 302 种代谢物成分则在火炬松的针叶和树皮组织部位中差异显著。火炬松针叶和树皮组织部位之间代谢物成分含量差异显著，其中槲皮素、矢车菊素、原花青素、丁香树脂酚、表儿茶素等物质在树皮组织中的含量显著高于针叶组织，而柚皮素、山姜素、山奈酚、泽兰黄素、秦皮甲素等物质则在火炬松针叶组织中含量更高。

目前，对代谢物的分析方法主要有核磁共振技术（NMR）、气相色谱—质谱联用技术（GC-MS）、液相色谱—质谱联用技术（LC-MS）、超高效液相串联质谱（UPLC-MS/MS）技术等，如户连荣等^[11]用 GC-MS 分析萼翅藤（*Calycopteris floribunda*）果实挥发油化学成分，袁兴华等^[12]用 GC-MS 技术对木荷 *Schima superba* 鲜花的挥发性成分进行了分析；黄浩等^[13]采用 GC-MS 技术分析了龙脑型阴香 *Cinnamomum burmannii* 叶片精油的主要成分。而 UPLC—MS/MS 代谢组学技术由于分离速度快、灵敏度高、准确性强而被广泛运用于植物高生物活性物质的鉴定，如陈张金等^[14]用 UPLC-MS/MS 方法分析测定了青钱柳 *Cyclocarya paliurus* 中 6 种黄酮类成分的含量；刘杰等^[15]

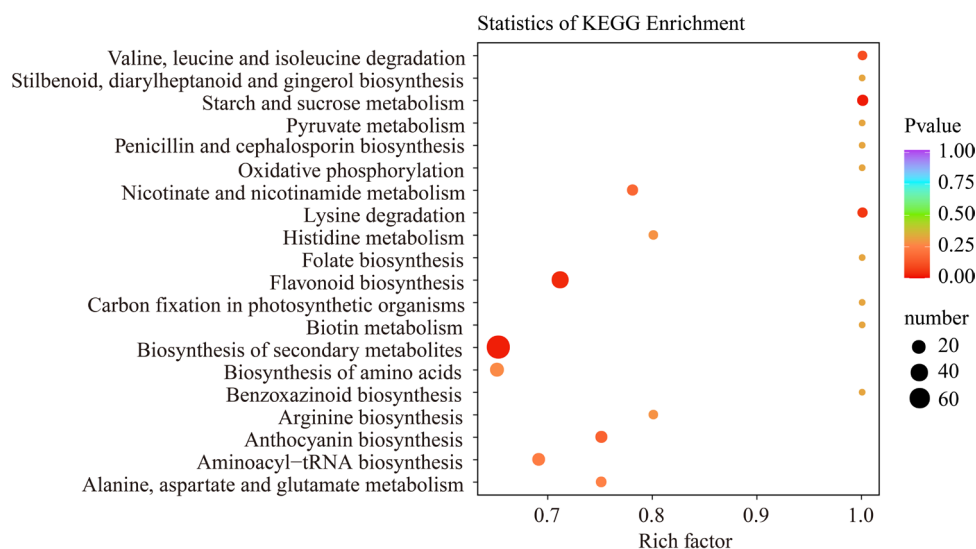


图 5 差异代谢物 KEGG 富集分析

Fig.5 The KEGG enrichment analysis of differential metabolites

用 UPLC—MS/MS 法测定白芍饮片中的 10 种主要成分, 宋楠楠等^[16]用 UHPLC-QTOF/MSE 技术对文冠果 *Xanthoceras sorbifolium* 的不同组织部位进行了代谢组学分析。本研究利用 UPLC—MS/MS 代谢组学技术对火炬松的针叶和树皮组织部位的代谢物成分进行了鉴定和分析。火炬松针叶和树皮组织部位中共鉴定出代谢物成分 523 种, 主要包括氨基酸及其衍生物、酚酸类、核苷酸及其衍生物、鞣质、脂质和黄酮等化合物。关于松属植物化学成分的研究之前已有报道, 如 Feng 等^[17]对云南松树皮的化学成分进行分析, 从中分离鉴定出 2 个新的二萜酸和 8 个已知的二萜类化合物; 钟胜佳等^[18]从油松 *P. tabulaeformis* 松针中分离鉴定出 4 个黄酮苷类化合物; 顾剑等^[19]对樟子松 *P. sylvestris* 树皮的水提液及醇提液进行纸色谱法、试管预试法检测, 从樟子松树皮中检测出多糖、黄酮、有机酸、鞣质、酚性物等成分; 王莉等^[20]采用试管预试法、纸色谱法对樟子松松塔提取物的不同极性部位检测, 鉴定出樟子松松塔中含有氨基酸、酚性物、黄酮、香豆素、挥发油、皂苷、蒽醌、油脂等化合物。

黄酮类化合物是一种重要的次生代谢产物, 在植物界中广泛存在, 其在植物体内的分布是不均匀的。如王琼等^[21]发现慈竹 *Neosinocalamus affinis* 叶中的总黄酮含量要显著高于枝和秆中; Wang 等^[22]研究发现兴安落叶松树皮中的总黄酮含量高于针叶、枝条和茎部组织, 本研究火炬

松中的总黄酮含量为针叶组织高于树皮组织的结果与之相反, 可能与植物种类不同有关; 唐纯翼等^[23]研究表明栎树 *Koelreuteria paniculata* 不同部位总黄酮含量不同, 其果实中的含量明显高于枝和叶。本研究发现总黄酮在火炬松针叶和树皮组织中均有分布, 但不同组织中含量有差异, 可能与植物组织所承担的功能有关。黄酮类化合物异槲皮苷在火炬松针叶和树皮组织中所占含量均较高, 报道显示, 其在抗高血压^[24]、抗氧化活性^[25]、抗癌^[26]、抗炎^[27]等方面具有积极作用, 这为火炬松在医学上的应用提供了一定信息。

本研究从火炬松针叶和树皮组织部位中鉴定出的化学成分与其他松属植物含有的化学成分类似, 如黄酮类物质中有与钟胜佳等^[18]从油松松针中鉴定出的异鼠李素-3-O-葡萄糖苷化合物; 王巍等^[3]从马尾松松针中分离纯化得到的木犀草素、槲皮素、二氢槲皮素、杨梅素类黄酮化合物, 在火炬松中也鉴定出; 在木脂素化合物中, 火炬松中鉴定出的 7S,8R- 苏式-3',4,9'-三羟基-3-甲氧基-7,8-二氢苯并呋喃-1'-丙醇基新木脂素-9-O- α -L-吡喃鼠李糖苷、7S,8R- 苏式-3',9,9'-三羟基-3-甲氧基-7,8-二氢苯并呋喃-1'-丙醇基新木脂素-4-O- α -L-吡喃鼠李糖苷、7S,8S- 苏式-3',4,7,9-四羟基-3-甲氧基-8-O-4'-新木脂素-9'-O- α -L-吡喃鼠李糖苷、7R,8S- 赤式-3',4,9,9'-四羟基-3-甲氧基-8-O-4'-新木脂素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷与张静娇等^[28]从红松松针中分离得到的木

脂素类化合物相同。用 UPLC—MS/MS 法测定更快捷、准确, 为火炬松代谢物成分的组织器官分布特征及其活性成分的鉴定提供了重要信息, 同时为火炬松药用价值上的研究提供了参考。

参考文献

- [1] 李寅珊, 刘光明, 李冬梅. 松属植物化学成分及抗肿瘤活性研究进展[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 726-727.
- [2] 郝强, 哈成勇. 南方马尾松松针挥发油成分的气相色谱/质谱分析[J]. 分析化学, 2000 (3): 300-302.
- [3] 王巍, 王晓华, 尹江峰, 等. 马尾松松针的黄酮类化学成分的分离鉴定[J]. 中国医院药学杂志, 2008 (7): 549-552.
- [4] 周维纯, 姜紫荣, 王金秋, 等. 针叶水溶性物质化学组成及其应用的研究[J]. 林产化工通讯, 2000 (5): 3-6.
- [5] 高岩, 袁久志, 王禹孝, 等. 红松松针中黄酮类成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(7): 539-543.
- [6] 胡丰林, 陆瑞利. 松针的利用价值分析[J]. 生物学杂志, 1996(2): 25-26.
- [7] 潘志刚. 15年生火炬松种源试验研究初报[J]. 林业科学, 2000(S1): 70-79.
- [8] BRUCE Z. The genetics and breeding of Southern Pine[J]. Forest Science, 1977(2): 2.
- [9] CHEN W, GONG L, GUO Z, 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.
- [10] 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.
- [11] 户连荣, 赵见明, 泽桑梓, 等. 萼翅藤果实挥发油的 GC-MS分析[J]. 广东林业科技, 2015, 31(6): 48-51.
- [12] 袁兴华, 梁柏, 谢正生. 木荷鲜花香气化学成分研究初报[J]. 广东林业科技, 2008, 24(5): 41-44.
- [13] 黄浩, 连辉明, 何波祥, 等. 龙脑型阴香叶片精油及其主要化学成分含量动态变化研究[J]. 林业与环境科学, 2019, 35(6): 22-26.
- [14] 陈张金, 余华丽, 毛菊华, 等. UPLC-MS/MS同时测定青钱柳中6种黄酮类成分[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(2): 201-206.
- [15] 刘杰, 许文, 李煌, 等. UPLC-MS/MS法同时测定白芍饮片片10种成分[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(4): 635-643.
- [16] 宋楠楠, 路撞, 肖姣, 等. 基于UHPLC-QTOF/MSE代谢组学方法研究文冠果不同部位化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2019, 36(10): 900-909.
- [17] FENG T, CAI X H, TAN Q G, et al. Abietane diterpenoids and a Lignan from *Pinus yunnanensis*[J]. Zeitschrift für Naturforschung B, 2014, 65(6): 765-769.
- [18] 钟胜佳, 高岩, 袁久志, 等. 油松松针中黄酮类成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(11): 889-892.
- [19] 顾剑, 张宇. 樟子松树皮有效成分的初步研究[J]. 黑龙江医药科学, 2009, 32(3): 4.
- [20] 王莉, 张宇, 赵艳. 樟子松松塔化学成分初步研究[J]. 黑龙江医药科学, 2008, 31(6): 10-11.
- [21] 王琼, 苏智先. 慈竹构件和分株水平总黄酮含量的变化[J]. 云南植物研究, 2004 (4): 458-464.
- [22] WANG W J, LI X Y, ZU Y G. Dynamic feature of flavonoids content in different organs of larch (*Larix gmelinii*)[J]. Journal of Forestry Research, 2005, 16(2): 89-92.
- [23] 唐纯翼, 丁文, 高中松. 栎树不同部位总黄酮的提取及含量测定[J]. 中国农学通报, 2005(5): 159-163.
- [24] JUNIOR A G, GASPAROTTO F M O, LOURENO E L B, et al. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme [J]. 2011, 134(2): 363-372.
- [25] SUKITO A, TACHIBANA S. Isolation of hyperoside and isoquercitrin from *Camellia sasanqua* as antioxidant agents [J]. Pak J Biol Sci, 2014, 17(8): 999-1006.
- [26] AMADO N G, CERQUEIRA D M, MENEZES F S, et al. Isoquercitrin isolated from *Hyptis fasciculata* reduces glioblastoma cell proliferation and changes beta-catenin cellular localization [J]. Anticancer Drugs, 2009, 20(7): 543-552.
- [27] ROGERIO A P, KANASHIRO A, FONTANARI C, et al. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma [J]. Inflamm Res, 2007, 56(10): 402-408.
- [28] 张静娇, 马跃平, 袁久志, 等. 红松松针中木脂素类成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(10): 797-802.