

• 药材与资源 •

苹果属植物叶片的代谢组学分析及 5 种成分的含量测定研究

李 珮^{1,2}, 申 洁^{1,2}, 毕 武^{1,2,3}, 何春年^{1,2*}, 肖培根^{1,2}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

2. 教育部中草药物质基础与资源利用重点实验室, 北京 100193

3. 中南大学湘雅医院 卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室, 湖南 长沙 410008

摘要: 目的 对不同来源的苹果属植物叶片进行化学成分分析比较, 为苹果属植物叶片的综合利用及资源开发奠定基础。方法 采用 UPLC-DAD 技术测定 5 种主要成分(根皮苷、三叶苷、根皮素、芦丁和槲皮苷)的含量, 采用 UPLC-Q-TOF-MS 代谢组学技术对苹果属不同种(品种)、不同产地来源的 20 种共 40 份叶片进行了化学成分检测, 并结合统计软件对各组间化学成分进行了比较分析。结果 5 种成分在苹果属不同来源植物叶片中含量差异较大, 其中根皮苷普遍含有, 质量分数相对较高, 在 1.01%~17.15%, 根皮素、芦丁和槲皮苷也较广泛存在, 而三叶苷则仅在真正苹果组的山荆子系和花楸苹果组中存在, 苹果系和栽培品种中未检测到。代谢组学分析结果表明真正苹果组中苹果系和山荆子系化学成分差异显著, 共发现 26 个差异标志物; 不同产地来源的植物叶片化学成分有所不同; 野生种与栽培种植物叶片化学成分相似。结论 苹果属植物叶片普遍含有根皮苷等多酚类成分, 是潜在的药物和保健产品资源; 该属植物叶片的化学成分种类和含量在不同组、系及产地间具有一定的差异, 为合理利用该属植物奠定基础; 另外, 苹果属植物叶片资源丰富且可再生, 值得进一步深入研究和开发。

关键词: 苹果属; 苹果属叶片; 根皮苷; 代谢组学; 资源利用

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)22-5378-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.22.024

Metabolomics analysis and quantitative determination of five components in *Malus* leavesLI Pei^{1,2}, SHEN Jie^{1,2}, BI Wu^{1,2,3}, HE Chun-nian^{1,2}, XIAO Pei-gen^{1,2}

1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science, Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Beijing 100193, China

3. Key Laboratory of Cancer Proteomics of Ministry of Health of China, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Abstract: Objective The aim of this experiment is to compare the chemical composition of *Malus* leaves from different origins, which can be as a fundamental research for the comprehensive utilization and resource development. **Methods** A UPLC-DAD method has been developed for the determination of five compounds (phlorizin, trilobatin, phloretin, rutin, and quercitrin) in *Malus* leaves, and UPLC-QTOF-MS based metabolomics was applied to the comparison among different groups from different origins and species. **Results** There were significant difference in the content of five compounds, of which phlorizin was widely contained and its content was relatively high in the range of 1.01%—17.15%. Phloretin, rutin, and quercitrin were also widespread, while the trilobatin was only in Ser. *Baccatae* (Rehd.) Rehd and Sect. *Sorbomalus* Zabel, which was not detected in the cultivating-varieties. The results of metabolomics showed that the chemical composition in leaves of *Malus* between Ser. *Pumilae* (Rehd.) Rehd and Ser. *baccatae* (Rehd.) Rehd were clearly distinguished, and 26 discrimination markers as the basis for distinction were identified; The chemical composition of *Malus* leaves from different sources of origins were different while the wild species were similar to the cultivating-varieties. **Conclusion** The *Malus* leaves generally contain phlorizin and other polyphenols, which are the potential drugs and health

收稿日期: 2018-03-06

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助(2016-I2M-1-012)

作者简介: 李 珮(1995—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为中药及天然药物药效物质基础研究及质量评价。

Tel: 18310753160 E-mail: lee_p1214@163.com

*通信作者 何春年(1978—), 男, 副研究员, 研究方向为中药及天然药物药效物质基础研究及质量评价。

Tel: (010)57833165 E-mail: cnhe@implad.ac.cn

products resources; There is certain difference in chemical composition and content of *Malus* leaves, which provide the scientific basis for the next utilization; *Malus* leaves are so rich and renewable that are worthy of further research and development.

Key words: *Malus* Mill.; *Malus* leaves; phlorizin; metabonomics; resource utilization

苹果属 *Malus* Mill. 植物属于蔷薇科 (Rosaceae), 广泛分布于亚洲、欧洲和北美洲^[1]。中国是苹果 *M. pumila* Mill. 的起源地之一, 关于苹果属果树的记载最早出现在西汉时期^[2]。目前对苹果属植物的研究多集中在栽培技术、总黄酮提取工艺、果实风味等方面, 对该属植物化学成分的研究仅涉及到了几个品种, 如苹果树枝^[3]、西府海棠 *M. micromalus* Makino 花^[4]、垂丝海棠 *M. halliana* (Anon.) Koehne 叶^[5]等, 多数品种叶片的物质基础研究尚属空白。据文献记载, 苹果属植物叶片也具有一定的保健作用, 如湖北海棠 *M. hupehensis* (Pamp.) Rehd. 嫩叶晒干可做茶叶, 俗称花红茶、三皮罐, 具有消食化积等功效^[6]; 林檎 *M. asiatica* Nakai. 的叶可解毒杀虫、止痒清肺、疗癣, 在我国湖南、广西一带, 民间有饮用林檎茶叶的习惯^[7]; 光叶陇东海棠 *M. kansuensis* f. *Calva* 的叶具有解毒的作用^[8]; 山荆子 *M. baccata* (L.) Borkh. 叶在许多地区煮茶用于减肥^[9]。目前国内外研究者已经从苹果属植物中分离出多种化合物, 其中叶片主要含有黄酮类和多酚类化合物, 具有降糖、调脂, 抗氧化、抗肿瘤等作用^[10-14], 本课题组前期的研究也发现多数苹果属植物叶片提取物都具有较强的降糖活性^[15]。我国苹果属植物资源量大, 在全国各地均有分布, 其中苹果属植物叶片作为可再生资源, 符合资源可持续发展的原则, 因此有必要对化学成分进行深入研究, 为其资源综合利用奠定基础。

本课题组收集了来源于北京市和辽宁兴城市的 40 份苹果属植物叶片, 包括含有花楸苹果组和真正苹果组的 25 份野生种样品和 15 份常见栽培种样品。由于植物叶片的化学成分较为复杂, 以单体或某一类化合物作为指标无法全面阐述其物质基础, 而植物代谢组学在研究植物繁多的初生或次生代谢产物时表现出明显优势, 其采取高灵敏度、高通量的检测方法以及各种分析化学手段, 从整体角度出发, 可以无差别的对植物体内所有代谢物进行定量或定性分析^[16], 因此本实验采用 UPLC-DAD 技术结合 UPLC-Q-TOF-MS 代谢组学技术对 40 份苹果属植物叶片化学成分进行了系统分析和比较研究。

1 材料、仪器及试剂

1.1 材料

苹果属植物叶片于 2014 年 9 月底和 10 月初采自

北京市和辽宁省兴城市, 由中国农业科学院果树研究所程存刚研究员和北京农学院姚允聪研究员鉴定, 样本保存在中国医学科学院药用植物研究所亲缘中心植物样品陈列室, 参照 1974 年版《中国植物志》第 36 卷中对苹果属的分类系统^[17], 样品信息见表 1。

1.2 仪器

Acquity UPLC Synapt G2 HDMS 系统 (美国 Waters 公司, 包括真空脱气机、二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器和 ESI 电离源 Q-TOF 检测器)。Dionex UitiMate 3000 (Thermo Fisher 科技有限公司), AL204 电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司), 数控超声波清洗器 (KQ5200DE 型, 40 kHz, 昆山市仪器超声有限公司), 微孔滤膜 0.22 μm (天津津腾有限公司), BJ150 型高速多功能粉碎机 (浙江湖州德清拜杰电器有限公司)。

1.3 试剂

甲醇, 乙腈为色谱纯级 (Fisher Scientific 公司); 甲酸为色谱纯级 (上海安谱实验科技股份有限公司), 超纯水 (Millipore 公司, 美国); 其余试剂均为分析纯级 (北京化学试剂公司); 对照品根皮苷、根皮素和三叶苷 (自制, 为本实验室从多穗柯甜茶中分离得到, 质量分数均大于 98%); 对照品槲皮苷 (批号 14041809) 和芦丁 (批号 7040743) 质量分数大于 98%), 购于成都普瑞法科技开发有限公司。

2 方法

2.1 样品溶液的制备

苹果属植物叶片阴干, 粉碎, 精密称取约 0.1 g 样品粉末, 放至 10 mL 量瓶中, 加入适量 70% 乙醇作为提取溶剂, 超声 30 min 后冷却至室温, 再加入 70% 乙醇定容至刻度, 摇匀, 静置。吸取上清液用 0.22 μm 微孔膜滤过, 取续滤液至液相小瓶中备用。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取根皮苷 20.30 mg、三叶苷 5.60 mg、根皮素 5.10 mg、芦丁 9.50 mg 和槲皮苷 10.10 mg 于 10 mL 量瓶中, 加入适量甲醇溶解后定容至刻度, 摇匀, 静置, 作为储备液。使用前分别精密量取适量体积的上述对照品溶液, 混合, 摇匀, 作为混合对照品溶液。

表 1 苹果属植物叶片样品信息

Table 1 Information of *Malus* leaves samples

编号	分组	样品名称	拉丁名	采集地点
pgs-03	真正苹果组 Sect. <i>Malus</i> 苹果系 Ser. <i>Pumilae</i> (Rehd.) Rehd.	新疆野苹果	<i>M. sieversii</i> (Ledeb.) Roemer	北京市海淀区
pgs-04		新疆野苹果		北京市昌平区
pgs-37		新疆野苹果		辽宁省兴城市
pgs-02		西府海棠	<i>M. micromalus</i> Makino	北京市海淀区
pgs-14		土库曼苹果	<i>M. orientalis</i> Uglitzk. subsp. <i>turkmenorum</i>	北京市昌平区
pgs-33		花红	<i>M. asiatica</i> Nakai	辽宁省兴城市
pgs-50		楸子	<i>M. prunifolia</i> (Willd.) Borkh.	辽宁省兴城市
pgs-51		林檎(花红)	<i>M. asiatica</i> Nakai	辽宁省兴城市
pgs-09	真正苹果组 Sect. <i>Malus</i> 山荆子系 Ser. <i>Baccatae</i> (Rehd.) Rehd.	垂瓣垂丝海棠	<i>M. halliana</i> Koehne	北京市昌平区
pgs-10		湖北海棠	<i>M. hupehensis</i> (Pamp.) Rehd.	北京市昌平区
pgs-07		红花丽江山荆子	<i>M. rockii</i> Schneid.	北京市昌平区
pgs-01		垂瓣垂丝海棠	<i>M. halliana</i> Koehne	北京市海淀区
pgs-38		平邑甜茶	<i>M. hupehensis</i> (Pamp.) Rehd.	辽宁省兴城市
pgs-39		湖北海棠		辽宁省兴城市
pgs-12		紫果丽江山荆子	<i>M. baccata</i> Borkh.	北京市昌平区
pgs-47		丽江山荆子	<i>M. rockii</i> Schneid.	辽宁省兴城市
pgs-48		毛山荆子	<i>M. mandshurica</i> (Maxim.) Kom.	辽宁省兴城市
pgs-49		山荆子	<i>M. baccata</i> (L.) Borkh.	辽宁省兴城市
pgs-11		锡金海棠	<i>M. sikkimensis</i> (Wenzig) Koehne.	北京市昌平区
pgs-40		德钦海棠		辽宁省兴城市
pgs-13	花楸苹果组 Sect. <i>Sorbomalus</i> Zabel 陇东海棠系 Ser. <i>Kansuenses</i>	小金海棠	<i>M. xaojinensis</i> Cheng et Jiang	北京市昌平区
pgs-44		陇东海棠	<i>M. kansuensis</i> (Batal.) Schneid.	辽宁省兴城市
pgs-45		变叶海棠	<i>M. toringoides</i> (Rehd.) Hughes.	北京市昌平区
pgs-46		小金海棠	<i>M. xaojinensis</i> Cheng et Jiang	辽宁省兴城市
pgs-41	花楸苹果组 Sect. <i>Sorbomalus</i> Zabel 三叶海棠系 Ser. <i>Sieboldianae</i>	红果三叶海棠	<i>M. sieboldii</i> (Regel.) Rehd.	辽宁省兴城市
pgs-32	苹果栽培品种	金冠(黄元帅)	<i>M. domestica</i> Borkh	辽宁省兴城市
pgs-30		黄元帅		北京市昌平区
pgs-34		寒富		辽宁省兴城市
pgs-35		富士		辽宁省兴城市
pgs-29		富士		北京市昌平区
pgs-36		乔纳金		辽宁省兴城市
pgs-52		砧山 1-2		辽宁省兴城市
pgs-53		砧山 1-3		辽宁省兴城市
pgs-54		砧山 1-4		辽宁省兴城市
pgs-55		砧山 1-5		辽宁省兴城市
pgs-56		砧山 1-6		辽宁省兴城市
pgs-57		砧山 1-7		辽宁省兴城市
pgs-59		砧山 1-9		辽宁省兴城市
pgs-60		砧山 1-10		辽宁省兴城市
pgs-61		砧山 1-11		辽宁省兴城市

2.3 UPLC-DAD 色谱条件

Waters BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)。流动相为 1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 柱温为 40 ℃, 体积流量为 0.3 mL/min。洗脱程序: 0~8 min, 15%~35% B; 8~10 min, 35%~50% B; 10~11 min, 50%~100% B; 11~12 min, 100% B;

12~13 min, 100%~15% B; 13~16 min, 15% B。进样体积 2 μL, 检测波长 280 nm。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液适量, 用甲醇作溶剂依次稀释, 配制成一系列质量浓度梯度溶液。按照“2.3”项下色谱条件测定, 并以质量浓

度为横坐标 (X), 峰面积响应值为纵坐标进行线性回归, 得到槲皮苷、根皮素、根皮苷、三叶苷和芦丁的线性回归方程, 见表 2。

表 2 线性回归方程

Table 2 Linear regression equation

对照品	回归方程	线性范围/(mg·mL ⁻¹)	R^2
三叶苷	$Y=204.7X+0.0364$	0.007 0~0.560 0	0.999 7
根皮素	$Y=269.15X+0.218 1$	0.001 9~0.510 0	0.999 9
槲皮苷	$Y=112X-0.113 9$	0.008 8~1.010 0	0.999 9
芦丁	$Y=76.501X-0.115 5$	0.005 9~0.950 0	1.000 0
根皮苷	$Y=122.6X+3.217 6$	0.050 8~2.030 0	0.999 5

2.5 定量测定

按照“2.3”项下色谱条件测定样品, 并按照“2.4”项下线性回归方程分别计算样品中槲皮苷、根皮苷、根皮素、芦丁和三叶苷的量。

2.6 UPLC-Q-TOF-MS 检测条件

2.6.1 色谱条件 Waters BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)。流动相为 1% 甲酸水 (A)-乙腈 (B), 柱温为 30 °C, 体积流量 0.3 mL/min。洗脱程序为 0~3 min, 2%~4% B; 3~4 min, 4%~13% B; 4~6 min, 13%~15% B; 6~7 min, 15%~21% B; 7~9 min, 21%~22% B; 9~10 min, 22%~25% B; 10~15 min, 25%~60% B; 15~16 min, 60%~80% B。进样体积 2 μL。

2.6.2 质谱条件 采用电喷雾正离子和负离子检测电离模式, 雾化气为高纯度 N₂, 碰撞气为高纯度 He, 质量扫描范围: m/z 100~1 200。负离子模式锥孔电压 40 V, 毛细管电压 2.4 kV, 离子源温度 100 °C, 脱溶剂气温度 350 °C, 脱溶剂气体积流量 900 L/h, 锥孔气体积流量 50 L/h, 碰撞能量 (CE) 20~40 eV, LockMass: 亮氨酸脑啡肽, m/z 为 554.261 5。正离子模式锥孔电压 40 V, 毛细管电压 3.5 kV, 离子源温度 100 °C, 脱溶剂气温度 350 °C, 脱溶剂气体积流量 900 L/h, 锥孔气体积流量 50 L/h, CE 20~40 eV, LockMass: 亮氨酸脑啡肽, m/z 为 556.277 1。

2.7 数据处理

将 UPLC 检测得到的样品数据导入 SPSS (22.0 版本) 进行组间含量差异分析和整体聚类分析。将经超高效液相色谱-质谱联用 (UPLC-Q-TOF/MS) 得到的样品数据导入 Waters Masslynx 4.1 软件中, 在 MakerLynx application manager Version 4.1 编辑,

进行峰识别、峰对齐、基线校正和归一化等预处理, 再将处理过的数据导入 Progenesis QI (美国 Waters 公司) 软件中, 输出三维数据矩阵 (由保留时间、精确相对分子质量和峰面积组成), 最后将得到的矩阵导入 Simca-P 软件 (13.0 版本) 进行主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法判别分析, 对不同种系和不同产地的苹果属植物进行模式识别, 寻找组间差异较大的植物代谢物。

3 结果与分析

3.1 UPLC 检测分析结果

样品含量测定结果表明 (表 3), 苹果属植物

表 3 样品中 5 种成分含量

Table 3 Contents of five compounds in samples

编号	质量分数/%				
	根皮苷	根皮素	槲皮苷	芦丁	三叶苷
pgs-03	7.16	—	—	0.17	—
pgs-04	10.35	0.10	0.08	0.22	—
pgs-37	6.34	0.02	—	0.14	—
pgs-02	1.73	0.02	—	—	—
pgs-14	1.01	—	—	—	—
pgs-33	10.74	0.04	0.09	0.18	—
pgs-50	8.60	0.04	0.08	0.24	—
pgs-51	8.70	0.03	0.06	0.15	—
pgs-09	15.84	0.02	0.08	0.17	1.30
pgs-10	16.78	—	0.06	0.11	1.50
pgs-07	17.15	—	0.07	0.31	0.03
pgs-01	15.19	—	0.10	0.10	0.03
pgs-38	15.76	0.02	0.01	0.16	—
pgs-39	15.53	—	0.10	0.18	0.03
pgs-12	9.37	0.02	0.12	0.28	—
pgs-47	13.46	0.10	0.07	0.17	—
pgs-48	7.58	0.04	0.07	0.13	—
pgs-49	11.05	0.11	0.08	0.31	0.02
pgs-11	10.99	0.02	0.16	0.26	—
pgs-40	15.10	0.02	0.13	0.30	—
pgs-13	11.90	0.04	0.11	0.25	—
pgs-44	4.77	0.03	—	0.12	0.80
pgs-45	15.78	0.06	0.07	0.08	—
pgs-46	12.26	—	0.15	0.47	0.02
pgs-41	7.30	0.05	—	0.24	0.88
pgs-32	10.65	0.06	0.12	0.35	—
pgs-30	8.31	0.02	0.07	0.21	—
pgs-34	7.77	0.03	0.09	0.20	—
pgs-35	11.38	0.06	0.11	0.29	—
pgs-29	8.42	0.09	0.07	0.20	—
pgs-36	11.39	0.04	0.09	0.20	—
pgs-52	8.99	0.01	0.12	0.24	—
pgs-53	12.38	0.03	0.14	0.34	—
pgs-54	11.03	—	0.08	0.31	—
pgs-55	11.15	—	0.14	0.31	—
pgs-56	11.22	—	0.11	0.29	—
pgs-57	8.49	—	—	0.12	—
pgs-59	11.71	—	0.10	0.27	—
pgs-60	9.30	0.01	0.14	0.27	—
pgs-61	12.08	0.01	0.07	0.18	—

叶片中普遍含有根皮苷。槲皮素、根皮素和芦丁也广泛存在,三叶苷则只存在于少部分样品中。根皮苷量最高的是红花丽江山荆子(pgs-07),达 17.15%;根皮素量最高的是山荆子(pgs-49),为 0.11%;槲皮苷量最高的是锡金海棠(pgs-11),为 0.16%;芦丁量最高的是小金海棠(pgs-46),为 0.47%;三叶苷量最高的是湖北海棠(pgs-10),为 1.50%。

用 SPSS (22.0 版本) 计算苹果属植物叶片样本各组中 5 种成分含量分布范围,并对不同组系及不同产地的 5 种成分含量进行了组间含量差异分析,其结果显示(表 4),样本中山荆子系中的 5 种成分含量均明显高于苹果系,苹果系中未能检测到三叶苷的存在;真正苹果组中的根皮苷、槲皮苷和芦丁含量高于花楸苹果组,但花楸苹果组的三叶苷

含量高于真正苹果组,2 组植物叶片中的根皮素含量相近;栽培种植物叶片中未检测到三叶苷存在,其他 4 种成分在野生种和栽培种中含量分布相近;来自北京市的样本三叶苷含量明显高于来自辽宁省兴城市的样本,其他 4 种成分在 2 个产地的植物叶片中含量分布相近。

将 40 个苹果属植物按照这 5 种成分的含量进行聚类分析,采用离差平方和法将含量接近的样品聚为一类,聚类结果显示样品分布没有明显的规律,与传统植物学分类也并不一致。

上述测定结果在一定程度上反映了不同来源苹果属植物叶片中这 5 种成分含量的差异,为了更全面揭示该属植物叶片的化学物质基础,本实验进一步采用无偏差的代谢组学进行分析。

表 4 各组中 5 种成分含量分布范围及组间含量方差分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Content range of five components in each group and Anova analysis between groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品组别	样本数	质量分数/%				
		根皮苷	根皮素	槲皮苷	芦丁	三叶苷
苹果系	8	6.83 ± 3.44**	0.01 ± 0.03	0.02 ± 0.04**	0.05 ± 0.09*	—
山荆子系	12	13.65 ± 3.00**	0.03 ± 0.04	0.09 ± 0.04**	0.21 ± 0.08*	0.24 ± 0.52
陇东海棠系	4	11.18 ± 4.00	0.03 ± 0.02	0.08 ± 0.06	0.23 ± 0.15	0.21 ± 0.34
三叶海棠系	1	7.30	0.05	—	0.24	0.88
野生苹果组	20	10.92 ± 4.62	0.03 ± 0.03	0.07 ± 0.04	0.18 ± 0.09	0.15 ± 0.42
野生花楸苹果组	5	10.40 ± 3.90	0.04 ± 0.02	0.07 ± 0.06	0.23 ± 0.14	0.34 ± 0.41
野生种	25	10.82 ± 4.49	0.03 ± 0.03	0.07 ± 0.05*	0.19 ± 0.10*	0.18 ± 0.42
栽培种	15	10.28 ± 1.50	0.02 ± 0.03	0.10 ± 0.04*	0.25 ± 0.06*	—
北京	14	10.32 ± 5.00	0.03 ± 0.03	0.07 ± 0.05	0.18 ± 0.09*	0.22 ± 0.50
辽宁兴城	26	10.76 ± 2.81	0.03 ± 0.03	0.08 ± 0.05	0.23 ± 0.09*	0.06 ± 0.22

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ “—” 未检测到色谱峰

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ “—” No peak detected

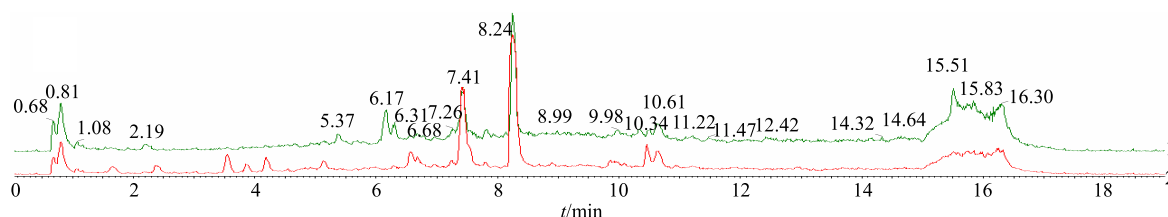
3.2 UPLC-Q-TOF-MS 代谢组学分析结果

代表性的苹果属植物叶片的 UPLC-Q-TOF-MS 总离子色谱图如图 1 和 2 所示,从轮廓图中可见不同样品间色谱图相似性较高,但也存在一定差异。如在正、负离子模式下,真正苹果组中的山荆子系和苹果系都存在主要色谱峰的差异。为了揭示不同来源苹果属叶片化学成分的差异,本研究利用统计学软件对数据做进一步处理。

3.2.1 基于 UPLC-Q-TOF-MS 负离子检测数据的苹果属植物叶片化学成分多元统计分析结果 首先将 25 个野生种样品按照苹果属植物传统形态学分类进行分组,对 UPLC-Q-TOF-MS 负离子检测数据进行分析,数据由 Progenesis QI 分析处理后,共得到 725 个变量。将其质荷比、保留时间和峰面积组成的三维矩阵导入 Simca-P 软件 (13.0 版本) 进行下一步分析。

PCA 得分图中,样品分布点越靠近,表明样本中所含有的变量组成及含量越接近。苹果属植物野生种 2 个组(花楸苹果组和真正苹果组)的 PCA 得分散点图(图 3-A)中,第 1 主成分和第 2 主成分共解释了 64.6% (PC1: 46.7%, PC2: 17.9%) 的原始变量信息。从图 3-A 中可以看出,pgs-9(垂瓣垂丝海棠)和 pgs-10(湖北海棠)为 2 个异常样本值,可能是由于检测不当所造成;花楸苹果组的部分样品 pgs-41(红三叶海棠)和 pgs-44(陇东海棠)与真正苹果组有分离趋势,而其余 3 个样本 pgs-13(小金海棠)、pgs-45(变叶海棠)和 pgs-46(小金海棠)未与真正苹果组的样本得到分离。

在真正苹果组植物的山荆子系和苹果系 PCA 得分散点图(图 3-B)中,第 1 主成分和第 2 主成分共解释了 70.4% (PC1: 53.0%, PC2: 17.4%)



1-垂丝海棠 pgs-09 (野生苹果组山荆子系) 2-西府海棠 pgs-02 (野生苹果组苹果系), 下图同
1-*M. halliana* Koehne pgs-09 [Ser: *Baccatae* (Rehd.) Rehd] 2-*M. micromalus* Makino pgs-02 [Ser: *Pumilae* (Rehd.) Rehd], same as below

图 1 苹果属植物叶片 UPLC-Q-TOF-MS^E 负离子检测色谱图

Fig. 1 UPLC-Q-TOF-MS^E total ion chromatography (TIC) of *Malus* leaves (negative ion mode)

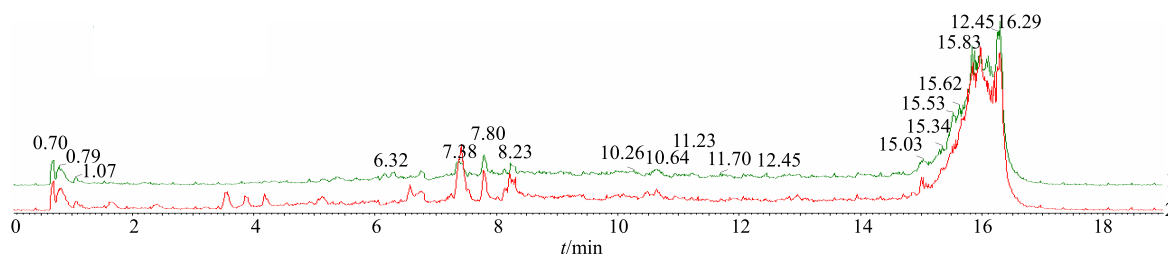


图 2 苹果属植物叶片 UPLC-Q-TOF-MS^E 正离子检测色谱图

Fig. 2 UPLC-Q-TOF-MS^E total ion chromatography (TIC) of *Malus* leaves (positive ion mode)

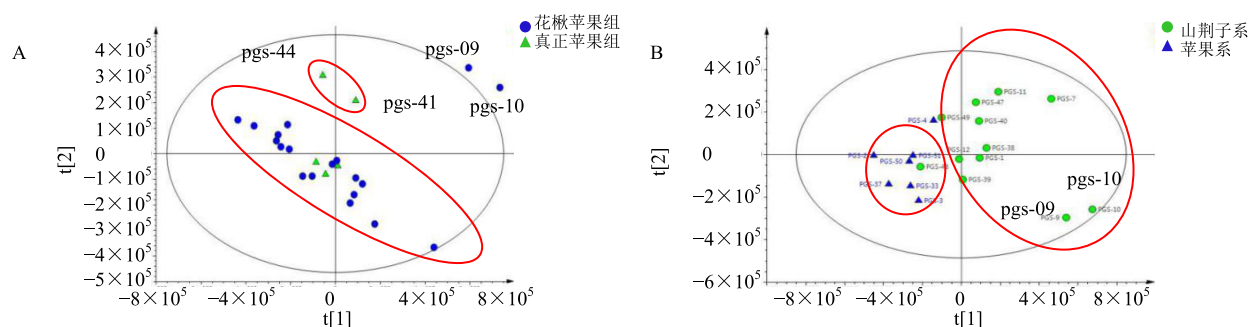


图 3 苹果属植物叶片野生种 (A) 与野生苹果组 (B) 植物叶片 PCA 得分图

Fig. 3 PCA of wild species (A) and Sect. *Malus* (B) of *Malus* leaves

的原始变量信息, 2 组植物之间有个别种未得到分离, 但总的来说具有较明显的分离趋势, 说明 2 组植物的化学成分存在一定的差异。此外, 从 PCA 得分图中还可以看出, 当苹果属内组间比较时, 山荆子系和苹果系之间差异不明显, 当去除花楸苹果组, 真正苹果组中的 2 个系得到了较好的分离。

为了确定真正苹果组中山荆子系和苹果系之间的化学成分差异, 进一步采用有监督的 PLS-DA 模型放大不同系之间的差异。交互排列模型验证结果 (图 4-A) ($R^2_X=68.2\%$, $R^2_Y=67\%$) 说明 2 个系之间既有相似性又有差异性。OPLS-DA (图 4-B) 模型分析结果表明除垂瓣垂丝海棠 (pgs-9) 和湖北海棠 (pgs-10) 2 个样本同系内其他样本有一定偏离外,

真正苹果组 2 个系的植物之间分离趋势较为明显。根据 PCA 载荷矩阵投影图 (图 5-A)、S-Plot 图 (图 5-B) 及 VIP>1.5 相对应的变量对山荆子系和苹果系之间的差异化合物进行了分析鉴定, 鉴定结果如表 5 所示。共找出 26 个差异化合物, 鉴定出 21 个化合物, 5 个化合物未鉴定出, 其中化合物槲皮苷、槲皮素、根皮素、根皮苷、三叶苷、金丝桃苷、香草酸、vanillyl mandelic acid、山柰酚、表儿茶素和没食子酸均已在文献中有过报道^[5], 其他化合物未见与苹果属植物叶片相关的报道。化合物根皮苷、根皮素、槲皮苷和三叶苷在“3.1”项下已经过 UPLC-DAD 检测, 同时也是代谢组学分析出的差异化合物, 因此进一步对这 4 种化合物在山荆子系和

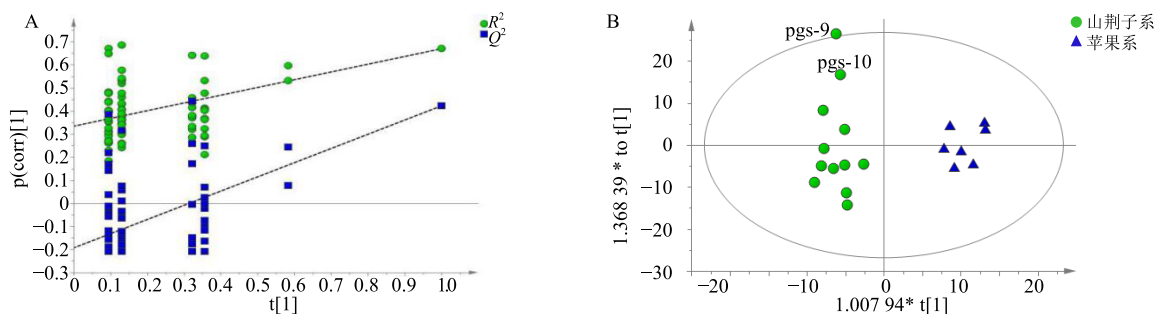


图 4 PLS-DA 分析的模型验证 (A) 和 OPLS-DA 得分 (B)

Fig. 4 Model validation of PLS-DA (A) and score plot of OPLS-DA (B)

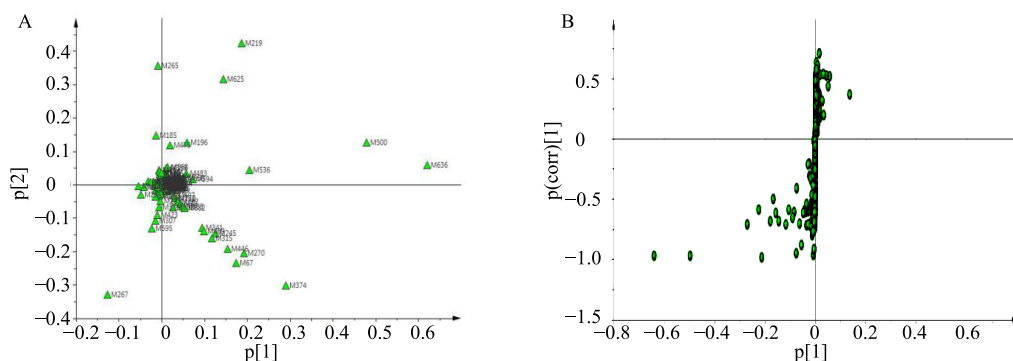


图 5 山荆子系与苹果系 PCA 分析载荷矩阵投影图 (A) 和 OPLS-DA 分析 S-Plot 图 (B)

Fig. 5 Loading plot of PCA between Ser. *Baccatae* and Ser. *Pumilae* (A) and S-Plot of OPLS-DA (B)

苹果系中的含量进行比较验证。代谢组学结果显示 4 种成分在山荆子系中平均含量都明显高于苹果系 (图 6), 其中根皮苷、根皮素和槲皮苷与 UPLC-DAD 分析结果相一致, 但在 UPLC-DAD 检测中未在苹果系中检测到三叶苷的存在, 可能是由于该化合物含量低于检测限所致。由于野生花楸苹果组样品数过少, 进行组内统计分析得到的结论会存在一定的偏差, 因此未做下一步分析。

另外, 本实验按照苹果属植物形态学分类中的野生种和栽培种对样本分组, 也进行了 PCA, 在得分散点图中显示 2 组未得到有效分离 (图 7-A); 利用同样的方法对不同产地的 2 组样本也进行了 PCA, 来源于北京市的和辽宁省兴城市的样本在负离子模式下未能分离 (图 7-B)。

3.2.2 基于 UPLC-Q-TOF-MS 正离子检测数据的苹果属植物叶片化学成分多元统计分析结果 UPLC-Q-TOF-MS 正离子检测数据由 Progenesis Q1 分析处理后, 共得到 903 个变量。对其分组进行 PCA 时发现, 北京市的样品和辽宁省兴城市的样品在该模式下能够得到有效分离。如图 8 所示, 在得分散点图中, 第 1 主成分和第 2 主成分共解

释了 65.2% (PC1: 47.0%, PC2: 18.2%) 的原始变量信息, 来自辽宁的样品组和来自北京市的样品组有明显的分离趋势。PLS-DA 交互排列模型验证结果 (图 8-A) ($R^2_X=64.9\%$, $R^2_Y=83.4\%$, $Q^2=76.8\%$) 说明 2 个组之间既有相似性又有差异性。OPLS-DA 模型分析结果 (图 8-B) 也表明除样本 pgs-13 (小金海棠) 有一定偏离外, 北京产地和辽宁产地 2 个组的样品分离趋势较为明显, 经分析也发现了 2 个产地间的差异化合物, 然而结构未能得到有效鉴定。在正离子模式下, 也按照传统形态学对样本分组后进行了 PCA, 结果显示不同组系的苹果属植物并未得到有效分离, 故未对其进行下一步分析。

4 讨论

苹果属作为蔷薇科的一个大属, 自 1754 年成立以来, 已经有了 260 多年的研究历史。过去的研究主要集中于该属植物的分类、花果化学成分分离和果实品质提升等内容上, 只有少部分研究涉及到叶片化学成分, 但也仅关注主流栽培品种的一些黄酮类化合物, 不同野生种和栽培品种之间的化学成分差异没有系统性的研究报道。本实

表 5 山荆子系和苹果系的差异化合物

Table 5 Identified markers in Ser. *Baccatae* and Ser. *Pumilae* by UPLC-Q-TOF-MS

序号	保留时间/ min	[M-H] ⁻ m/z			分子式	典型碎片	鉴定结果
		理论值	实测值	误差(×10 ⁻⁶)			
1 ⁻	0.80	165.121 4	165.029 9	0.14	C ₅ H ₁₀ O ₆	101.024 5	xylonic acid/ribonic acid/lyxonic acid/arbutic acid
2	0.86	203.126 3	203.019 4	-1.59	C ₇ H ₈ O ₇		1-oxo-1,2,4-butanetricarboxylic acid
3	2.19	315.252 8	315.071 6	-1.86	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	108.021 6	2,6-anhydro-1- <i>O</i> -(3,4,5-trihydroxybenzoyl)- <i>D</i> -mannitol
4 [*]	5.13	289.260 1	289.071 3	-1.55	C ₁₅ H ₁₄ O ₆		儿茶素/表儿茶素
5	6.56	479.410 8	479.118 7	-1.71	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₂	317.066 6	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6-methoxy-4-oxo-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -chromen-3-yl-β- <i>D</i> -threo-hexopyranoside
6 [*]	6.68	463.368 4	463.087 8	-0.96	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	227.034 9	金丝桃苷/异槲皮苷
7 ⁻	6.75	169.111 6	169.003 3	-2.48	C ₇ H ₆ O ₅		没食子酸
8	6.75	287.244 2	287.055 5	-2.28	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	135.044 5	奥卡宁
9	7.26	301.227 8	301.034 5	-2.86	C ₁₅ H ₁₀ O ₇		槲皮素
10 [*]	7.41	289.260 1	290.078 5	-1.93	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	123.045 1	3,4,7-trimethoxydibenzo [b,d] furan-2,8-diol/3,4,6-trimethoxydibenzo [b,d] furan-2,7-diol
11	7.41	167.138 8	167.034 6	-2.46	C ₈ H ₈ O ₄	135.045 1	香草酸
12 ⁻	7.42	917.792 9	917.225 0	-0.10	C ₄₂ H ₄₆ O ₂₃	447.093 2	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo-4 <i>H</i> -chromen-3-yl-6- <i>O</i> -[(2 <i>E</i>)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenoyl]-β- <i>D</i> -glucopyranosyl-(1→2)-β- <i>D</i> -glucopyranosyl-(1→2)-β- <i>D</i> -glucopyranoside
13	7.45	447.369 0	447.092 9	-0.84	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	225.029 8	槲皮苷
14	8.26	273.260 7	273.076 1	-2.76	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	179.035	根皮素
15	8.26	435.401 3	435.129 0	-1.58	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	273.076 8	根皮苷
16	8.27	168.147 0	167.034 6	-2.31	C ₈ H ₈ O ₄	123.045 1	3,5-cyclohexadiene-1,2-dicarboxylic acid
17 ⁻	8.27	198.173 0	197.034 7	-1.66	C ₉ H ₁₀ O ₅	123.045 1	vanillyl mandelic acid
18 ⁻	8.79	436.413 0	435.129 1	-1.24	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	273.076 8	三叶苷
19	9.18	286.236 0	285.040 0	-1.69	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	151.003 6	山柰酚
20	9.18	288.252 0	287.055 5	-2.18	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	151.003 7	圣草酚
21	9.36	436.366 0	435.092 2	-2.39	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₁		4,8-dihydroxy-6-methoxy-9-oxo-9 <i>H</i> -xanthen-1-yl-β- <i>D</i> -glucopyranoside
22	10.34	274.269 0	273.076 2	-2.23	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	123.045 1	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl-4-hydroxybenzoate
23 [*]	10.34	167.138 8	167.034 6	-2.31	C ₈ H ₈ O ₄	123.045 1	
24	10.54	641.596 0	641.187 5	-0.24	C ₃₂ H ₃₄ O ₁₄		6-hydroxy-5-methoxy-1-oxo-9-phenyl-1 <i>H</i> -phenalen-2-yl-4- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranosyl-β- <i>D</i> -glucopyranoside
25	10.66	629.585 3	611.176 9	-0.20	C ₃₁ H ₃₄ O ₁₄		2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4-oxo-4 <i>H</i> -chromen-3-yl-6- <i>O</i> -{[(4 <i>R</i>)-4-(2-hydroxy-2-propenyl)-1-cyclohexen-1-yl]carbonyl}-β- <i>D</i> -galactopyranoside
26	11.11	393.366 2	393.097 5	-1.18	C ₂₂ H ₁₈ O ₇		justicidin A

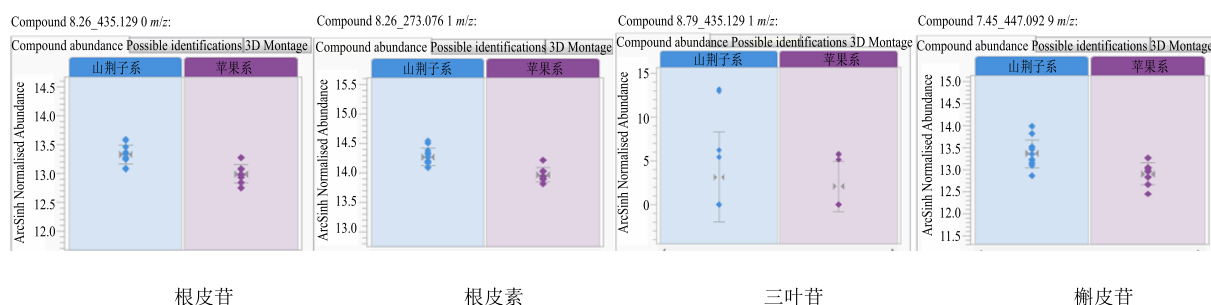
*表示该化合物未确定; ⁻表示该化合物检测到的离子为 [M-H₂O-H]⁻*compound was not identified; ⁻detected ion of compound was [M-H₂O-H]⁻

图 6 4 个化合物在 2 个系中的含量差异

Fig. 6 Content difference of four compounds between Ser. *Baccatae* and Ser. *Pumilae*

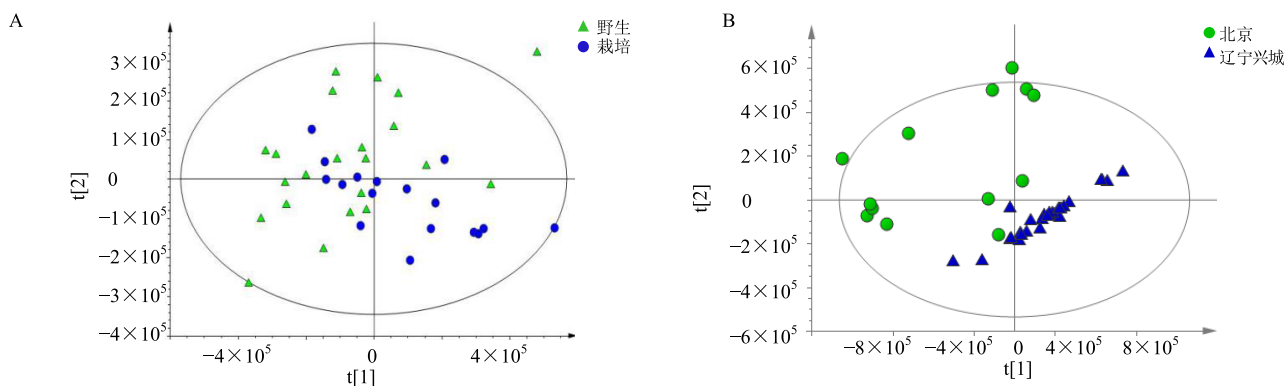


图 7 野生种和栽培种 PCA 得分图 (A) 和正离子模式下不同产地样品 PCA 得分图 (B)

Fig. 7 PCA of wild species and cultivated species (A) and PCA of samples from different regions under positive ion mode (B)

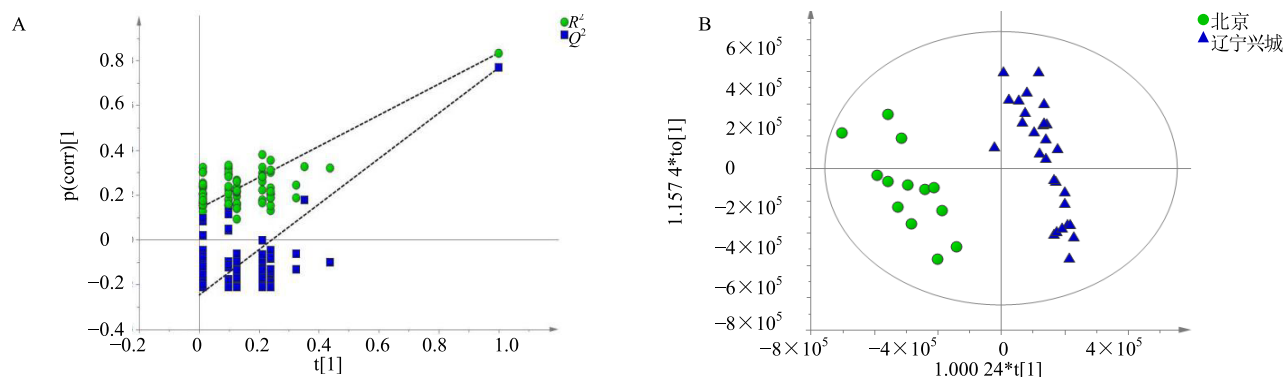


图 8 PLS-DA 分析的模型验证 (A) 和 OPLS-DA 得分图 (B)

Fig. 8 Mode validation of PLS-DA (A) and score plot of OPLS-DA (B)

验广泛取样, 首次采用 UPLC-DAD 技术结合 UPLC-Q-TOF-MS 代谢组学技术对 40 份苹果属植物叶片提取物进行了详细比较, 发现苹果属不同种(品种)、不同产地来源的植物叶片化学成分存在一定的异同, 为该属植物叶片资源的利用提供了一定的科学依据。

从 UPLC-DAD 含量测定数据分析结果来看, 苹果属分类学上不同组植物的叶片 5 种成分含量有较大差异。栽培种中的 5 种成分含量比野生种的更为稳定, 以根皮苷为例, 野生种的根皮苷含量变化为 1.01%~17.15%, 而栽培种为 7.77%~12.38%; 与野生种相比, 栽培种 15 个苹果叶片样品中均未检测到三叶苷的存在, 但其他 4 种成分含量未见两组有明显差异; 花楸苹果组和真正苹果组的 5 种成分含量高低相差较大, 但分布没有明显规律可循。相同组不同系内同一种成分含量也有所不同, 山荆子系中 5 种成分含量均明显高于苹果系, 同时在苹果系的 8 个种叶片中未检测到三叶苷的存在, 推测三叶苷可能为山荆子系与苹果系差异性成分; 在所检测的苹果属 40 个种叶片中, 根皮苷含量最大,

分布也最为广泛, 这与文献报道的根皮苷为苹果属植物特征化学成分相一致^[18]。

UPLC-Q-TOF-MS 分析结果表明, 山荆子系与苹果系之间的差异能够明显区分, 这与分类学上的内容基本一致, 也与 UPLC-DAD 含量检测结果相对应, 在差异化合物鉴定时, 可能受到了化合物离子化的局限, 未鉴定到芦丁的存在; 不同产地苹果属植物叶片之间存在着较大差异, 但未能鉴定出差异化合物, 这可能与正离子模式下所能检测到的化合物性质有关; 基于苹果属植物的植物代谢组学分析并没有完全区分野生种与栽培种, 与先前的苹果属植物叶片相关文献报道相符合^[14]。当然, 由于本研究样品采样时间都在成熟期, 研究结果只能反映出这一时期内的化学成分差异, 存在一定的局限性; 另外, 苹果属的多胜海棠组和滇池海棠系植物叶片样本由于各种原因未采集到, 因此其叶片的化学成分还需进一步研究。

我国苹果属植物资源丰富, 栽培面积大, 品种繁多, 目前已有少数种(品种)的叶片在提取物、食品和保健食品中得以初步开发和利用, 然而大部

分资源未能得到有效利用,如海棠类的植物也都只发挥了其园林观赏价值。利用药用植物亲缘学(pharmaphylogeny)理论,基于已有的研究和应用报道为线索,挖掘其叶片的食用和药用价值,可进一步扩展苹果属植物资源的综合利用。

志谢:所用苹果属植物样品在采集中得到中国农业科学院果树研究所王昆研究员、李壮博士和北京农学院秦晓晓博士的大力帮助!

参考文献

- [1] 钱关泽. 苹果属 (*Malus* Mill.) 分类学研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2005.
- [2] 刘振亚. 中国苹果栽培史初探 [J]. 河南农业大学学报, 1982(4): 74-77.
- [3] 魏小聪, 赵艳敏, 宋光明, 等. 苹果树枝的化学成分研究 [J]. 中草药, 2016, 47(11): 1845-1849.
- [4] 石磊, 李元元, 姬志强, 等. 西府海棠挥发性成分研究 [J]. 中国药业, 2009, 18(19): 6-8.
- [5] 冯发进. 垂丝海棠活性成分研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2015.
- [6] 李艳, 黎开燕. 湖北海棠的化学成分和药理活性研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(2): 226-229.
- [7] 曾晓雄, 谭淑宜, 罗泽民. 林檎保健茶主要化学成分分析 [J]. 湖南农学院学报, 1993, 19(5): 474-476.
- [8] 陆秋农, 贾定贤. 中国果树志·苹果卷 [M]. 北京: 中国农业出版社, 中国林业出版社, 1999.
- [9] 丁传波, 赵婷, 李永娟, 等. 山荆子叶醇提物对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(11): 1627-1628.
- [10] 李学鹏, 励建荣, 杨建荣. 苹果中多酚类物质 HPLC 检测方法的建立 [J]. 中国食品学报, 2008, 8(6): 116-121.
- [11] Liaudanskas M, Viškelis P, Raudonis R, et al. Phenolic composition and antioxidant activity of *Malus domestica* leaves [J]. *Sci World J*, 2014, 2014: 306217.
- [12] Jeanelle B, Hai L R. Apple phytochemicals and their health benefits [J]. *Nutrition J*, 2004, 3(1): 5-15.
- [13] 金靖谊, 杨广杰, 申乾, 等. 苹果属植物化学与药理学研究进展 [J]. 生物技术世界, 2012, 2012(8): 13-15.
- [14] 李萍. 苹果属植物叶片类黄酮的含量及多样性研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [15] 申洁, 李珮, 毕武, 等. 苹果属植物叶中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的初步研究 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(4): 533-538.
- [16] Gika H G, Theodoridis G A, Plumb R S, et al. Current practice of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics and metabonomics [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 87(1434): 12-25.
- [17] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第36卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1974.
- [18] Bai L, Guo S, Liu Q, et al. Characterization of nine polyphenols in fruits of *Malus pumila* Mill. by high-performance liquid chromatography [J]. *J Food Drug Anal*, 2016, 24(2): 293-298.