



基于非靶向代谢组学的沙枣花、叶片和幼枝的挥发性成分分析

解庆, 刘志红*

山西农业大学林学院, 山西晋中030801

*通信作者(zhihongliu1230@163.com)

摘要: 本文运用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术(HS-SPME-GC-MS)研究了不同发育阶段沙枣花(花蕾、全开和凋谢)、叶片和幼枝的挥发性成分, 并采用主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)等方法筛选出差异代谢物。结果表明, 沙枣挥发油以酯类、烃类、醇类和醛类物质为主, 主要成分为肉桂酸乙酯、 β -罗勒烯和4-己烯-1-醇乙酸酯等。代谢组学分析共筛选出17种差异代谢物。其中沙枣花蕾中的特征成分为 α -橙花叔醇、反式-2-己烯醇、十一醛和 β -罗勒烯; 沙枣花全开时的特征成分为肉桂酸乙酯和安息香酸乙酯; 凋谢后沙枣花的特征成分为癸醛、庚醛、植酮和2-甲基丁酸乙酯; 沙枣叶片的特征成分为4-己烯-1-醇乙酸酯和叶醇而沙枣幼枝的特征成分为壬醛、顺式-3-己烯基异戊酸酯、苯乙醇和3-己烯-1-醇。沙枣花、叶片和幼枝挥发性成分的代谢组学分析, 可为沙枣精油的综合开发利用提供一定理论依据。

关键词: 沙枣; 挥发性成分; 顶空固相微萃取; 气相色谱-质谱联用; 非靶向代谢组学

Analysis of volatile components in flowers, leaves and young shoots of *Elaeagnus angustifolia* based on untargeted metabolomics approach

XIE Qing, LIU Zhihong*

College of Forestry, Shanxi Agriculture University, Jinzhong, Shanxi 030801, China

*Corresponding author (zhihongliu1230@163.com)

Abstract: In this study, the volatile components in flowers (bud stage, blooming stage, and flower withering stage), leaves and young shoots of *Elaeagnus angustifolia* were studied by headspace solid phase microextraction, gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS). Moreover, the differential metabolites were screened by principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). The results showed that the volatile components were mainly composed of esters, hydrocarbons, alcohols and aldehydes, and the main components were ethyl cinnamate, β -ocimene and 4-hexene-1-ol acetate. A total of 17 different metabolites were identified by metabolomics analysis. The characteristic components of the bud stage were α -nerolidol, (E)-2-hexen-1-ol, undecanal and β -ocimene. The characteristic components of the blooming stage were ethyl cinnamate and benzoic acid, ethyl ester. The characteristic components at the flower withering stage were decanal, heptal, heptanal,

收稿 2023-03-02 修定 2023-10-08

资助 山西省应用基础研究计划项目(201901D211360)、山西省基础研究计划项目(202103021224141)和山西省高等学校教学改革创新项目(J20230345)。

and butanoic acid, 2-methyl, ethyl ester. The leaves were characterized by 4-hexene-1-ol acetate and leaf alcohol, while the young shoots were characterized by nonanal, (Z)-hex-3-enyl isovalerate, benzeneethanol and 3-hexene-1-ol. The metabolomics analysis of volatile components in flowers, leaves and young shoots of *E. angustifolia* can provide a basis for the comprehensive development and utilization of essential oils.

Key words: *Elaeagnus angustifolia*; volatile components; HS-SPME; GC-MS; untargeted metabolomics

沙枣又名七里香、香柳、桂香柳等,属胡颓子科(Elaeagnaceae)胡颓子属(*Elaeagnus*)的落叶乔木或灌木。沙枣适应性强,对土壤、温度、湿度要求不甚严格,广泛分布于我国的西北、华北和东北地区(中国科学院中国植物志编辑委员会1983)。沙枣花呈漏斗形、银白色或淡黄色、小而香,开放时释放出独特而浓郁持久的芳香气味,被誉为“飘香沙漠的桂花”。沙枣鲜花中的精油含量为0.2%~0.4%,其精油为高级香精油,具有抗氧化、抑菌、镇痛、抗焦虑、止咳平喘等多种效用(王妍等2007; Torbati等2016; 张瑜和程卫东2018),除药用外,沙枣精油还可用作食品、饮料和化妆品的调香原料(乔海军等2011; 张佳妮等2022),具有较大的开发利用价值。

植物在发育过程中,不同发育阶段的挥发性成分差异较大(刘志红和解庆2020; 张文武等2021; 蒲俊杰等2022),不同采收时节将对沙枣花精油的品质产生较大影响,如Liu等(2021)对宁夏银川的沙枣在初花期、盛花前期、盛花期和谢花期的精油品质进行了分析,发现不同时期沙枣精油的品质具有显著差异,认为盛花前期和盛花期的沙枣精油品质更佳。此外,不同组织部位沙枣精油的化学成分差异也十分显著,如Incilay (2014)分析了沙枣不同组织部位的精油成分,结果表明沙枣花中挥发性成分较多,果实中的成分最少,叶中的精油具有潜在的应用价值。Torbati等(2016)对沙枣花和叶的精油成分进行了对比,发现两者的主要成分皆为酯类物质,但花中的精油成分远多于叶中。

目前,多采用传统的水蒸汽蒸馏法提取植物精油,但该方法存在样品需求量大、提取率低、耗时长等问题。与传统方法相比,顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术(headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, HS-SPME-GC-MS)是一种分离能力强、重复性好、选择性好、灵敏度高的植物精油成分分析技术(Zhou等2022)。非靶向代谢组学能够分析来自不同类别的代谢产物,并已普遍应用于不同组样品的小分子成分的比较和鉴定(田晓明等2021; 高龙飞等2022)。本研究利用基于HS-SPME-GC-MS技术的非靶向代谢组学分析不同发育阶段沙枣花(花蕾、全开和凋谢)、叶片和幼枝的挥发性成分,利用主成分分析(principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA)等多元统计学分析方法,寻找出发生显著变化的特征成分,旨在为沙枣精油的品质提升及综合利用提供依据。

try, HS-SPME-GC-MS)是一种分离能力强、重复性好、选择性好、灵敏度高的植物精油成分分析技术(Zhou等2022)。非靶向代谢组学能够分析来自不同类别的代谢产物,并已普遍应用于不同组样品的小分子成分的比较和鉴定(田晓明等2021; 高龙飞等2022)。本研究利用基于HS-SPME-GC-MS技术的非靶向代谢组学分析不同发育阶段沙枣花(花蕾、全开和凋谢)、叶片和幼枝的挥发性成分,利用主成分分析(principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA)等多元统计学分析方法,寻找出发生显著变化的特征成分,旨在为沙枣精油的品质提升及综合利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

沙枣(*Elaeagnus angustifolia* L.)叶片、幼枝和不同发育阶段的花朵于2021年5月18日采自山西农业大学植物园。沙枣花采摘时,依据花瓣盛开情况将其分为3种:花蕾(F1,花瓣完全闭合)、全开(F2,花瓣完全开放)和凋谢(F3,花瓣萎蔫脱落)。

主要仪器: Trace 1300 ISQ型气相色谱质谱联用仪(美国Thermo Scientific公司); 50/30 μm DVB/CAR/PDMS SPEM固相萃取头(美国Supelco公司); TriplusTM RSH气相/气质自动进样器(美国Thermo Scientific公司); OM-5MS色谱柱(美国Omni Gene LLC公司, 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm)。

1.2 试验方法

1.2.1 HS-SPME条件

依据Meltem等(2018)的方法并做相应修改后进行,即称取供试材料0.5 g(精确到0.01 g)置入20 mL顶空瓶中,在80 $^{\circ}\text{C}$ 孵化45 min,相同温度下萃取

10 min后, 将萃取头插入气相色谱进样口250°C解吸5 min, 进行GC-MS分析。每个样品设置3个生物学重复。

1.2.2 GC-MS条件

色谱条件: 载气为氦气, 流速为1.0 mL·min⁻¹; 不分流进样模式, 进样口温度为250°C。升温程序: 60°C保持3 min, 以4°C·min⁻¹升至160°C, 再以20°C·min⁻¹升至240°C, 保持5 min。

质谱条件: 离子源为电子轰击(electron ionization, EI)离子源, 电子能量为70 eV, 离子源温度为280°C, 质谱传输线280°C, 质量扫描范围为30~500 amu。

1.2.3 数据分析

经GC-MS分析所得挥发性成分的总离子流色谱图(图1), 各组分质谱数据经NIST (MS Search 2.0) 标准质谱库检索进行匹配, 优先选择正向匹配度与反向匹配度均大于800且得分最高的化合物, 并参考已发表文献(Incilay 2014; Torbati等2016; Liu等2021)对各组分进行初步确认, 再通过查阅NIST Chemistry WebBook (<https://webbook.nist.gov/chemistry/>)中各化合物的保留指数(RI), 对各化合物的出峰顺序进行核对, 进一步核实各组分的真实性(RI值越小, 出峰越早)。GC-MS检出的各组分按峰面积归一化法确定各自相对含量。运用SIMCA 14.1软件进行主成分分析PCA与正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)。根据代谢物对分组贡献值VIP≥1、代谢物在组间变化的显著性($P<0.05$)及代谢物在组间的差异倍数(fold change, FC≥2或FC≤0.5)进行沙枣精油差异性代谢物的筛选。利用KEGG、PLANTCYC和HMDB数据库对筛选出的差异代谢物进行注释。使用TBtools软件对差异代谢物进行聚类分析。

2 实验结果

2.1 沙枣花、叶、幼枝挥发性成分鉴定与比较

采用HS-SPME-GC-MS技术对不同发育阶段沙枣花(花蕾、全开和凋谢)、叶片和幼枝的挥发性成分进行分析, 共检测出60种成分, 主要来源于酯类、烃类、醇类和醛类(表1), 总含量范围从95.99% (幼枝)到98.61% (F3)。

沙枣花全开(F2)以及叶片中的主要成分相似, 皆以酯类为主, 分别占总成分的73.94%和53.68%; 花蕾(F1)的挥发性成分以烃类物质为主, 占总含量的51.66%; 凋谢后的沙枣花(F3)以酯类(34.01%)、烃类(29.37%)和醛类(22.55%)为主; 而幼枝则以烃类和醛类为主, 分别占总成分的35.21%和28.24%。

60种化合物中相对含量超过5%的共有9种, 分别为肉桂酸乙酯(0.00%~58.86%)、 β -罗勒烯(5.83%~49.42%)、4-己烯-1-醇乙酸酯(0.02%~45.11%)、壬醛(1.75%~17.31%)、叶醇(0.00%~14.58%)、顺式-3-己烯基异戊酸酯(0.23%~9.70%)、十一醛(2.17%~9.67%)、苯乙醇(1.89%~8.99%)和苯乙酸乙酯(0.15%~7.28%)。沙枣不同供试样品间的挥发性成分差异大, 沙枣花蕾的挥发性成分以 β -罗勒烯(49.42%)、肉桂酸乙酯(11.62%)和十一醛(9.67%)为主; 沙枣花全开时的主要成分为肉桂酸乙酯(58.86%)、苯乙酸乙酯(6.85%)和 β -罗勒烯(5.83%); 凋谢后的沙枣花主要成分排名前三的为 β -罗勒烯(27.95%)、肉桂酸乙酯(18.37%)、壬醛(9.01%); 叶片中的主要成分为4-己烯-1-醇乙酸酯(45.11%)、叶醇(14.58%)和壬醛(10.27%); 幼枝的主要成分以 β -罗勒烯(34.33%)、壬醛(17.31%)、顺式-3-己烯基异戊酸酯(9.70%)为主。

2.2 不同发育阶段沙枣花代谢物分析

2.2.1 差异性比较

利用SIMCA 14.1软件对沙枣花不同发育阶段(花蕾、全开和凋谢)的挥发性成分进行主成分分析(PCA)。结果(图2-A)可以看出, 第1主成分(R2X[1])方差贡献率为57.8%, 第2主成分(R2X[2])方差贡献率为37.9%, 两者的累计方差贡献率为97.7%, 说明这2个主成分基本包含了沙枣花不同发育阶段供试样品挥发性成分的绝大部分信息。PCA分析结果表明相同发育阶段的沙枣花聚集程度好, 不同发育阶段间离散程度高, 挥发性成分差异明显。

图2-B显示, 沙枣花不同发育阶段所含代谢物挥发性种类差别不大, 花蕾中有47种成分, 全开时含40种成分, 而凋谢后的花中含43种成分。三阶段共有成分有33种; 花蕾与全开时以及花蕾与凋谢后的沙枣花共有成分皆有36种, 而全开时与

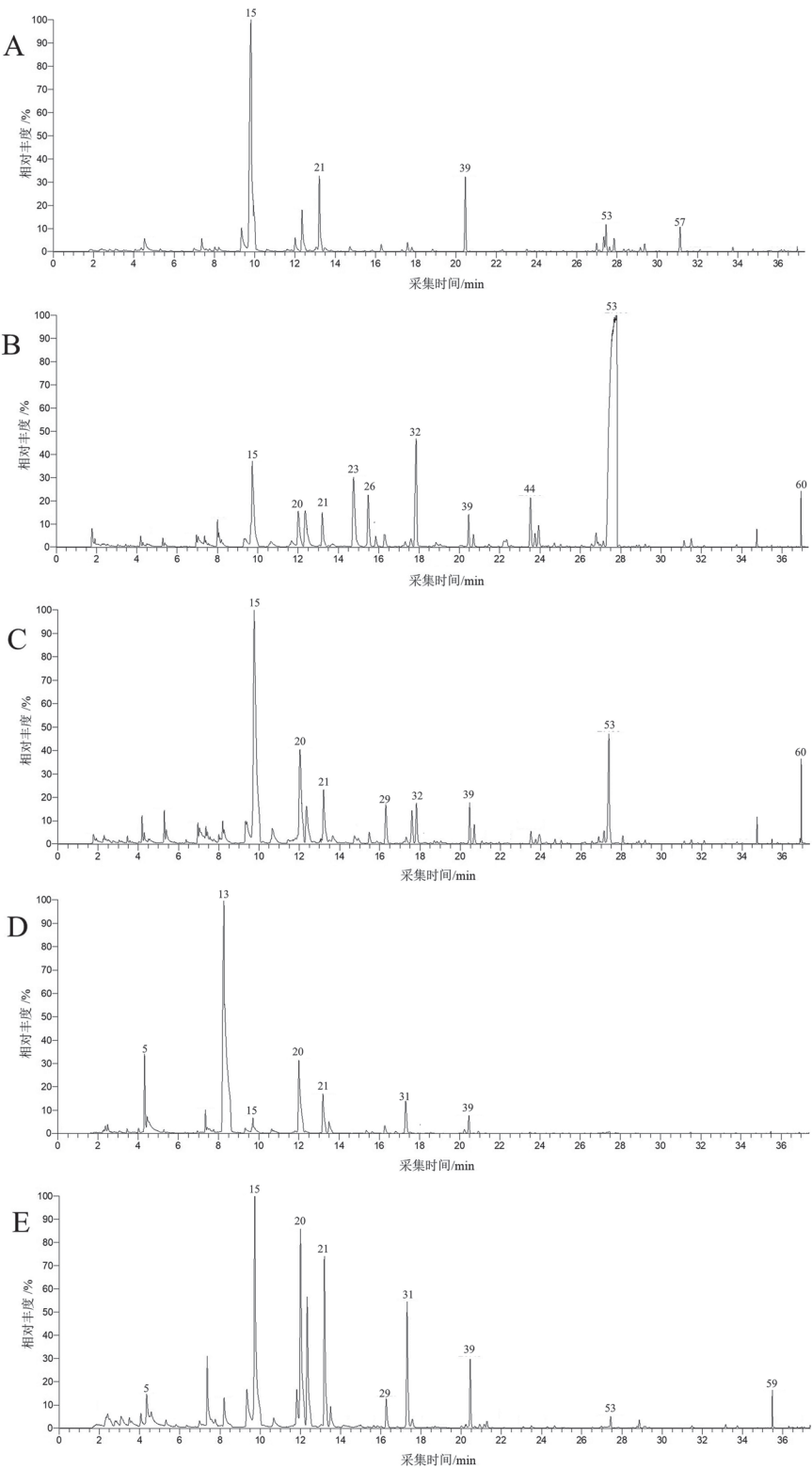


图1 沙枣花、叶、幼枝挥发性成分总离子流程图

Fig. 1 Total ion flow chart of volatile components in flowers, leaves and young shoots of *E. angustifolia*
A~E: 沙枣花花蕾(F1)、全开(F2)、凋谢(F3)、沙枣叶片(L)和幼枝(B1); 图中主要应化合物序号与表1一致。

表1 沙枣花、叶片和幼枝挥发性成分及其相对含量
Table 1 Composition and relative content of volatile components in flowers, leaves and young shoots of *E. angustifolia*

序号	保留时 间/min	化合物名称	Cas登录号	NIST库的 保留指数	正向匹配		反向匹		相对质量分数/%				
					配度	829	配度	846	F1	F2	F3	L	B1
1	2.87	乙基异丙基酮	565-69-5	752	829			846	-	-	-	0.05±0.01 ^b	0.26±0.06 ^a
2	3.49	己醛	66-25-1	802	842			852	0.27±0.10 ^b	-	-	0.16±0.05 ^c	0.56±0.11 ^a
3	4.06	2-异丙基丁醛	26254-92-2	NA	801			899	0.20±0.04 ^c	0.02±0.02 ^d	0.09±0.02 ^d	0.47±0.10 ^b	0.89±0.07 ^a
4	4.21	2-甲基丁酸乙酯	7452-79-1	851	833			912	0.05±0.02 ^c	0.35±0.10 ^b	1.74±0.04 ^a	-	-
5	4.32	叶醇	928-96-1	857	937			944	-	0.13±0.03 ^b	0.75±0.05 ^b	14.58±1.14 ^a	-
6	4.35	3-己烯-1-醇	544-12-7	858	817			852	0.39±0.03 ^b	0.09±0.03 ^c	-	-	4.87±0.36 ^a
7	4.53	反式-2-己烯醇	928-95-0	863	924			943	2.15±0.12 ^a	0.11±0.04 ^c	0.29±0.04 ^b	-	-
8	5.30	庚醛	111-71-7	899	869			914	0.24±0.07 ^b	0.37±0.08 ^b	2.68±0.26 ^a	0.50±0.10 ^b	0.40±0.10 ^b
9	5.82	己酸甲酯	106-70-7	920	890			898	0.11±0.03 ^a	-	-	0.03±0.02 ^b	0.16±0.04 ^a
10	6.37	2-甲基丁酸丙酯	37064-20-3	944	870			907	0.06±0.03 ^c	-	0.37±0.12 ^a	0.23±0.09 ^b	0.16±0.04 ^b
11	6.98	苯甲醛	100-52-7	958	899			923	0.38±0.04 ^b	0.45±0.07 ^b	1.55±0.14 ^a	0.22±0.12 ^b	0.44±0.10 ^b
12	8.02	正己酸乙酯	123-66-0	996	903			916	0.43±0.05 ^b	0.81±0.11 ^a	0.38±0.02 ^b	0.04±0.03 ^c	0.04±0.02 ^c
13	8.26	4-己烯-1-醇乙酸酯	72237-36-6	NA	942			977	0.45±0.05 ^{bc}	0.12±0.07 ^c	1.97±0.07 ^{bc}	45.11±2.17 ^a	2.05±0.06 ^b
14	9.35	苯甲醇	100-51-6	1 033	803			887	2.98±0.17 ^a	0.41±0.05 ^c	1.65±0.08 ^b	0.70±0.05 ^c	2.78±0.33 ^a
15	9.81	β-罗勒烯	13877-91-3	1 040	958			958	49.42±1.49 ^a	5.83±0.41 ^d	27.95±1.75 ^c	6.16±0.22 ^d	34.33±0.83 ^b
16	10.66	正辛醇	111-87-5	1 075	800			844	0.15±0.05 ^d	0.38±0.06 ^c	1.40±0.09 ^a	0.52±0.13 ^b	0.72±0.08 ^b
17	11.44	2-壬酮	821-55-6	1 091	853			880	-	-	0.31±0.08	-	-
18	11.60	苯甲酸甲酯	93-58-3	1 093	810			874	0.20±0.06 ^a	-	-	-	0.08±0.02 ^b
19	11.67	庚酸乙酯	106-30-9	1 099	800			807	-	-	-	-	0.04±0.03
20	12.01	壬醛	124-19-6	1 102	916			926	1.75±0.06 ^d	1.75±0.11 ^d	9.01±0.39 ^c	10.27±0.57 ^b	17.31±1.54 ^a
21	13.20	苯乙醇	60-12-8	1 113	853			890	6.56±0.32 ^b	1.89±0.14 ^c	3.59±0.19 ^d	4.24±0.15 ^c	8.99±0.86 ^a
22	14.30	反式-2-壬烯醛	18829-56-6	1 165	875			931	0.10±0.02 ^c	-	0.10±0.02 ^c	0.14±0.04 ^b	0.22±0.03 ^a
23	14.79	安息香酸乙酯	93-89-0	1 170	893			899	0.60±0.04 ^b	4.07±0.07 ^a	0.67±0.11 ^b	-	0.02±0.01 ^c
24	14.93	苯乙酸甲酯	101-41-7	1 177	808			894	-	-	0.26±0.03 ^a	0.11±0.02 ^c	0.18±0.02 ^b
25	15.36	反式-己-3-烯基丁酸酯	53398-84-8	1 180	811			893	0.04±0.01 ^c	-	-	0.48±0.05 ^a	0.14±0.04 ^b
26	15.46	4-辛烯酸乙酯	NA	NA	854			869	0.13±0.03 ^c	2.58±0.13 ^a	1.00±0.57 ^b	-	0.09±0.02 ^c
27	15.64	水杨酸甲酯	119-36-8	1 191	863			887	-	-	-	0.24±0.02 ^a	0.16±0.02 ^b
28	15.85	辛酸乙酯	106-32-1	1 194	900			910	0.21±0.06 ^b	0.45±0.04 ^a	0.20±0.09 ^b	-	0.13±0.04 ^b
29	16.28	癸醛	112-31-2	1 205	923			925	0.94±0.25 ^c	0.80±0.05 ^c	3.91±0.45 ^a	1.28±0.13 ^c	2.24±0.17 ^b
30	16.80	β-环柠檬醛	432-25-7	1 223	804			857	0.05±0.02 ^c	0.02±0.00 ^c	-	0.38±0.06 ^a	0.12±0.03 ^b

表1 (续1)

序号	保留时间/min	化合物名称	Cas登录号	NIST库的		正向匹配度	反向匹配度	相对质量分数/%				
				保留指数	配度			F1	F2	F3	L	B1
31	17.31	顺式-3-己烯基异戊酸酯	35154-45-1	1 245	917	926		0.23±0.03 ^d	0.25±0.03 ^d	0.62±0.04 ^c	7.02±0.12 ^b	9.70±0.22 ^a
32	17.87	苯乙酸乙酯	101-97-3	1 250	902	904		1.82±0.05 ^b	6.85±0.15 ^a	7.06±0.26 ^a	0.15±0.03 ^d	0.77±0.07 ^c
33	18.26	2-甲基己酸丁酯	2601-13-0	1 256	892	906		—	—	0.10±0.02 ^a	—	0.02±0.00 ^b
34	18.37	β-环高柠檬醛	472-66-2	1 258	819	825		—	—	—	0.10±0.02	—
35	18.69	反式-2-癸烯醛	3913-81-3	1 264	872	921		—	—	—	0.04±0.01 ^b	0.11±0.03 ^a
36	18.83	3,5-二甲氧基甲苯	4179-19-5	1 265	854	887		0.30±0.02 ^a	0.16±0.02 ^b	0.18±0.01 ^b	—	0.06±0.03 ^c
37	19.04	苯甲酸丙酯	2315-68-6	1 266	868	887		0.04±0.02 ^b	0.06±0.03 ^b	0.21±0.03 ^a	—	—
38	20.05	吡啶	120-72-9	1 288	909	932		0.03±0.02 ^c	0.11±0.03 ^b	0.10±0.02 ^b	0.09±0.02 ^b	0.16±0.01 ^a
39	20.46	十一醛	112-44-7	1 305	906	967		9.67±0.25 ^a	2.17±0.30 ^c	4.77±0.13 ^b	2.76±0.12 ^c	4.67±0.39 ^b
40	20.93	茶香螺烷	36431-72-8	1 310	889	890		—	—	—	0.43±0.07 ^b	0.52±0.02 ^a
41	21.53	苯甲酸异丁酯	120-50-3	1 320	825	871		—	0.11±0.05 ^a	0.14±0.03 ^a	—	—
42	21.92	反式-戊酸-2-己烯酯	NA	1 340	823	849		0.05±0.01 ^b	0.04±0.01 ^b	0.14±0.03 ^a	—	—
43	22.30	α-萜澄茄油烯	17699-14-8	1 351	880	884		0.26±0.06	—	—	—	—
44	23.51	α-可巴烯	NA	1 377	910	915		0.38±0.04 ^c	2.53±0.16 ^a	1.00±0.05 ^b	0.20±0.03 ^d	0.17±0.03 ^d
45	23.75	顺式-3-己烯醇己酸酯	31501-11-8	1 386	890	897		—	0.59±0.02 ^a	0.34±0.05 ^b	0.08±0.02 ^c	—
46	23.95	桂酸甲酯	103-26-4	1 380	804	843		0.07±0.01 ^b	1.08±0.08 ^a	1.09±0.07 ^a	—	—
47	24.63	十四烷	629-59-4	NA	926	929		—	—	—	—	0.15±0.02
48	24.70	6,10-二甲基-2-十一烷酮	1604-34-8	1 403	858	872		0.08±0.01 ^c	0.18±0.02 ^b	0.40±0.03 ^a	0.16±0.03 ^b	—
49	25.02	月桂醛	112-54-9	1 407	897	916		—	0.11±0.02 ^b	0.27±0.05 ^a	—	0.02±0.01 ^c
50	25.33	β-石竹烯	87-44-5	1 418	916	918		0.16±0.03 ^a	0.05±0.03 ^b	0.07±0.02 ^b	—	—
51	26.56	香叶基丙酮	3796-70-1	1 455	849	886		0.07±0.02 ^c	0.19±0.05 ^b	0.26±0.03 ^a	0.04±0.01 ^c	0.07±0.02 ^c
52	26.77	反式-β-金合欢烯	18794-84-8	1 458	907	914		0.10±0.02 ^b	0.64±0.07 ^a	—	—	—
53	27.80	肉桂酸乙酯	103-36-6	1 462	922	965		11.62±1.30 ^c	58.86±1.68 ^a	18.37±1.00 ^b	—	—
54	28.75	金合欢烯	502-61-4	1 508	944	952		0.26±0.03 ^c	0.06±0.01 ^d	0.35±0.05 ^b	0.09±0.02 ^d	0.67±0.03 ^a
55	29.37	δ-杜松烯	483-76-1	1 527	914	928		1.02±0.06 ^a	—	—	—	0.04±0.01 ^b
56	29.93	1,4-卡达二烯	16728-99-7	1 533	886	900		0.06±0.03	—	—	—	—
57	31.13	α-橙花叔醇	40716-66-3	1 564	952	960		3.05±0.15 ^a	0.25±0.03 ^b	0.21±0.02 ^b	—	—
58	31.48	顺式-3-己烯醇苯甲酸酯	25152-85-6	1 570	842	885		0.10±0.02 ^c	0.33±0.02 ^a	0.35±0.04 ^a	0.19±0.03 ^b	0.19±0.01 ^b
59	35.48	肉豆蔻醛	124-25-4	1 611	939	958		0.15±0.04 ^c	—	0.17±0.01 ^{bc}	0.29±0.03 ^b	1.26±0.13 ^a
60	36.95	植酮	502-69-2	1 846	888	940		0.21±0.02 ^c	0.81±0.04 ^b	2.54±0.23 ^a	—	0.03±0.01 ^d

表1 (续2)

序号	保留时 间/min	化合物名称	Cas登录号	NIST库的 保留指数	正向匹		反向匹		相对质量分数/%			
					配度	配度	F1	F2	F3	L	B1	
		酯类					16.08±0.54 ^d	73.94±1.67 ^a	34.01±1.76 ^c	53.68±2.25 ^b	13.84±1.06 ^d	
		烃类					51.66±1.56 ^a	9.14±0.58 ^d	29.37±1.73 ^c	6.45±0.18 ^e	35.21±0.83 ^b	
		醇类					15.28±0.06 ^c	3.26±0.19 ^e	7.89±0.22 ^d	20.04±1.10 ^a	17.36±1.77 ^b	
		醛类					13.75±0.22 ^d	5.69±0.14 ^c	22.55±0.83 ^b	16.60±0.36 ^c	28.24±0.60 ^a	
		酮类					0.36±0.11 ^c	1.18±0.11 ^b	3.51±0.20 ^a	0.25±0.04 ^c	0.36±0.03 ^c	
		其他					0.46±0.07 ^b	2.85±0.08 ^a	1.28±0.60 ^b	0.52±0.09 ^b	0.98±0.03 ^b	
		总计					97.59±1.16	96.06±1.86	98.61±2.32	97.54±1.00	95.99±0.54	

“-”表示未检出;“NA”表示无;同行不同小写字母表示在Duncan多重比较检验中各化合物在0.05水平上差异显著;F1、F2、F3、L和B1分别代表花蕾期、全开时和凋谢后的沙枣花以及叶片和幼枝,下同。

凋谢后的沙枣花的共有成分有37种;花蕾中有8种特有的代谢物,全开时无特有代谢物,凋谢后则有3种。

2.2.2 差异代谢物筛选

运用SIMCA 14.1软件对沙枣花不同发育阶段检测所得代谢物进行OPLS-DA分析,结果表明不同发育阶段两两之间(F1 vs F2、F1 vs F3、F2 vs F3)代谢物差异明显,不同试样在水平方向上均可很好地分为两组(图3-A、D和G)。对OPLS-DA模型分别进行200次置换检验,在各组模型检验中,所有左边的蓝色Q2值均比右边的原始点低,且Q2点的蓝色回归线与垂直轴(左侧)相交点低于零,表明原始模型是有效的(图3-B、E和H)。

对沙枣花不同发育阶段代谢物进行两两比较,筛选出组间发生显著变化($P<0.05$)且差异倍数明显($FC\geq 2$ 或 $FC\leq 0.5$)的代谢物。分别从F1 vs F2中筛选出28种, F1 vs F3中筛选出32种, F2 vs F3中筛选出33种代谢物。进一步通过S-plot分析以筛选出VIP>1的关键代谢物,位于S-plot图右上方和左下方的代谢物为关键代谢物(图3-C、F和I),最终得到沙枣花不同发育阶段的差异代谢物: F1 vs F2中有7种, F1 vs F3中有10种, 而F2 vs F3中有6种(表2)。

2.3 沙枣不同组织部位代谢物分析

2.3.1 差异性比较

沙枣3个不同组织部位(花、叶和幼枝)的挥发性代谢物PCA分析结果见图4-A, 表明第一主成分(R2X[1])方差贡献率为66.9%, 第二主成分(R2X[2])方差贡献率为26.1%, 两者的累计方差贡献率为93.0%, PCA结果表明沙枣不同组织部位内样品聚集程度好, 不同组织部位间离散程度高, 挥发性代谢物差异明显。

沙枣不同组织部位挥发性代谢物分布的韦恩图见图4-B, 各部位所含种类差别不大, 花中有40种成分, 叶有35种成分, 幼枝中含43种成分。花、叶、幼枝3个部位中共有成分有20种; 花与叶的共有成分有23种, 花与幼枝的共有成分有27种, 而叶与幼枝的共有成分有31种; 花有10种特有的挥发性代谢物, 叶特有的代谢物为1种, 幼枝特有的代谢物为5种。

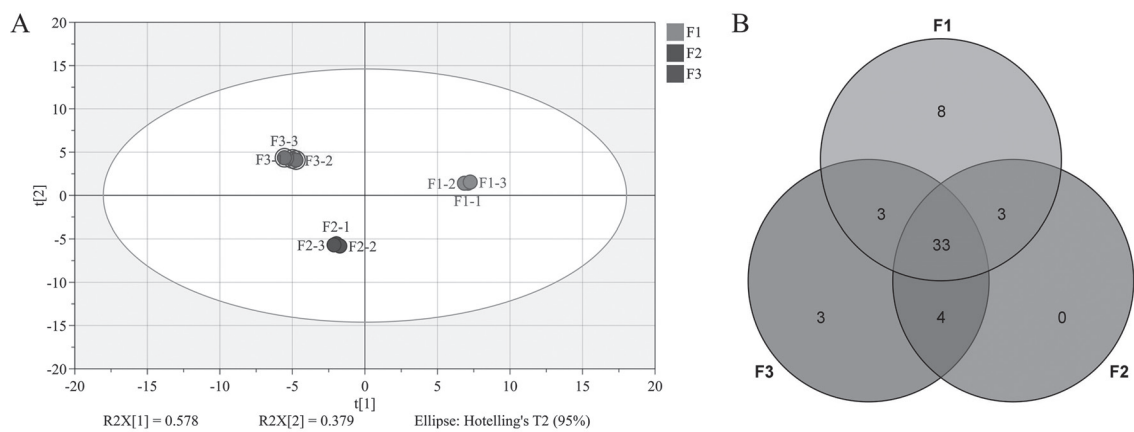


图2 沙枣不同花发育阶段挥发性成分的分析

Fig. 2 Analysis of volatile components in different flowering stages of *E. angustifolia*

A: 沙枣花不同发育阶段挥发性化合物的主成分分析; B: 沙枣花不同发育阶段挥发性化合物分布的韦恩图; F1、F2、F3分别代表花蕾、全开和凋谢时的沙枣花。

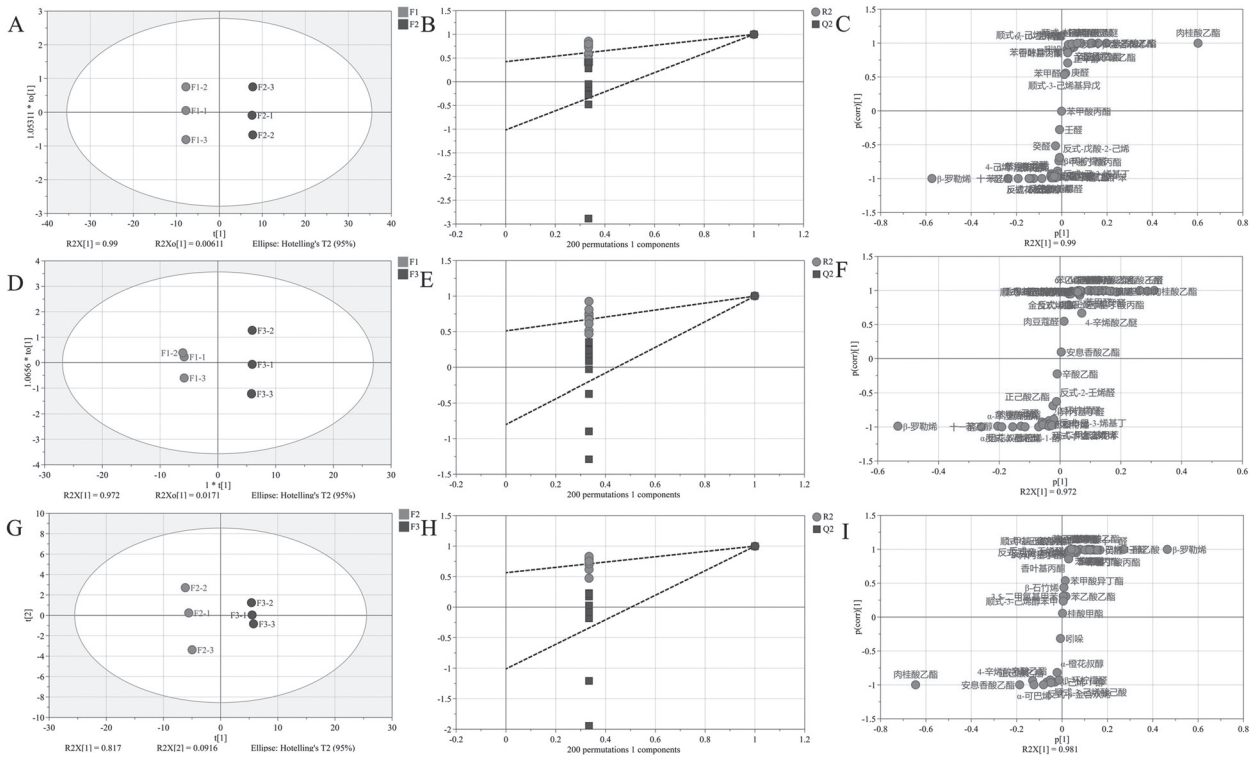


图3 沙枣不同花发育阶段代谢物的OPLS-DA分析

Fig. 3 OPLS-DA analysis of metabolites in different flowering stages of *E. angustifolia*

A、D、G分别为F1 vs F2、F1 vs F3、F2 vs F3的OPLS-DA散点图; B、E、H分别为F1 vs F2、F1 vs F3、F2 vs F3的200次置换检验; C、F、I分别为F1 vs F2、F1 vs F3、F2 vs F3的S-plot图。

表2 沙枣不同花发育阶段差异代谢物

Table 2 Different metabolites of *E. angustifolia* at different flowering stages

花发育阶段比较	序号	化合物名称	化合物类型	VIP值	KEGG ID	含量变化
F1 vs F2	1	肉桂酸乙酯	酯类	4.25	C06359	升高
	2	苯乙酸乙酯	酯类	1.39	NA	升高
	3	安息香酸乙酯	酯类	1.14	C01839	升高
	4	β-罗勒烯	烃类	4.05	C09873	降低
	5	十一醛	醛类	1.68	NA	降低
	6	苯乙醇	醇类	1.36	C05853	降低
	7	α-橙花叔醇	醇类	1.02	NA	降低
F1 vs F3	1	壬醛	醛类	2.25	NA	升高
	2	苯乙酸乙酯	酯类	1.91	NA	升高
	3	癸醛	醛类	1.35	C12307	升高
	4	庚醛	醛类	1.23	C14390	升高
	5	植酮	酮类	1.19	NA	升高
	6	2-甲基丁酸乙酯	酯类	1.10	NA	升高
	7	4-己烯-1-醇乙酸酯	酯类	1.02	NA	升高
	8	十一醛	醛类	1.88	NA	降低
	9	α-橙花叔醇	醇类	1.39	NA	降低
	10	反式-2-己烯醇	醇类	1.13	NA	降低
F2 vs F3	1	β-罗勒烯	烃类	3.15	C09873	升高
	2	壬醛	醛类	1.85	NA	升高
	3	癸醛	醛类	1.14	C12307	升高
	4	十一醛	醛类	1.04	NA	升高
	5	肉桂酸乙酯	酯类	4.38	C06359	降低
	6	安息香酸乙酯	酯类	1.26	C01839	降低

“NA”表示无; 筛选标准为VIP>1、P<0.05且代谢物在组间的差异倍数FC≥2或FC≤0.5。下表同此。

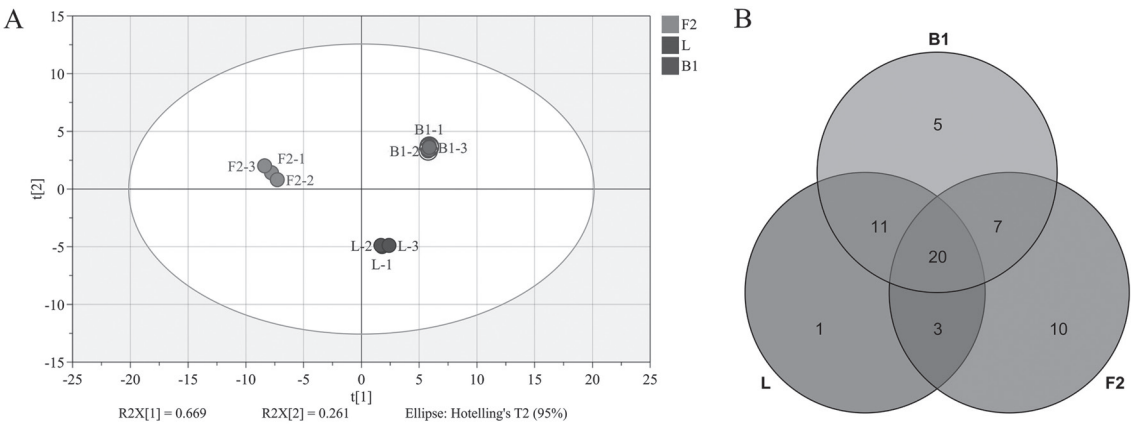


图4 沙枣不同组织部位挥发性成分的分析

Fig. 4 Analysis of volatile components in different parts of *E. angustifolia*

A: 沙枣3个组织部位挥发性代谢物的主成分分析; B: 3个组织部位挥发性代谢物分布的韦恩图; F2: 全开时的沙枣花, L: 沙枣叶片; B1: 沙枣幼枝。

2.3.2 差异代谢物筛选

对沙枣不同组织部位挥发性代谢物进行的OPLS-DA分析结果表明不同部位两两之间(F2 vs L、F2 vs B1、L vs B1)代谢物差异明显,不同试样在水平方向上均可很好的分为两组(图5-A、D和G)。对OPLS-DA模型分别进行200次置换检验,在每组模型检验中,所有左边的蓝色Q2值均比右边的原始点低,且Q2点的蓝色回归线与垂直轴(左侧)相交点低于零,表明原始模型是有效的(图5-B、E和H)。

对沙枣不同部位挥发性代谢物进行两两比较,筛选出组间发生显著变化($P < 0.05$)且差异倍数明显($FC \geq 2$ 或 $FC \leq 0.5$)的代谢物。分别从F2 vs L中筛选出28种, F2 vs B1中筛选出32种, L vs B1中筛选出33种代谢物。进一步通过S-plot分析以筛选出VIP>1的关键代谢物(图5-C、F和I),得到沙枣不同

部位差异代谢物: F1 vs F2中有7种, F1 vs F3中有8种, 而F2 vs F3中有5种(表3)。

2.4 差异代谢物聚类与通路分析

利用TBtools软件对沙枣不同花发育阶段与组织部位筛选出的17种差异代谢物进行聚类分析(图6), 与其他供试材料相比, 花蕾中有4种代谢物显著上调, 分别为 α -橙花叔醇、反式-2-己烯醇、十一醛和 β -罗勒烯; 与花蕾、叶片和幼枝相比全开时的沙枣花有3种代谢物显著上调, 分别为苯乙酸乙酯、肉桂酸乙酯和安息香酸乙酯, 而与凋谢后的沙枣花相比全开时的沙枣花中有肉桂酸乙酯和安息香酸乙酯2种代谢物显著上调; 较花蕾、叶片和幼枝, 凋谢后的沙枣花有5种代谢物显著上调, 分别为癸醛、庚醛、植酮、2-甲基丁酸乙酯和苯乙酸乙酯, 而与全开时相比, 凋谢后的沙枣花中有癸醛、庚醛、植酮和2-甲基丁酸乙酯4种代谢物显著上调; 叶片

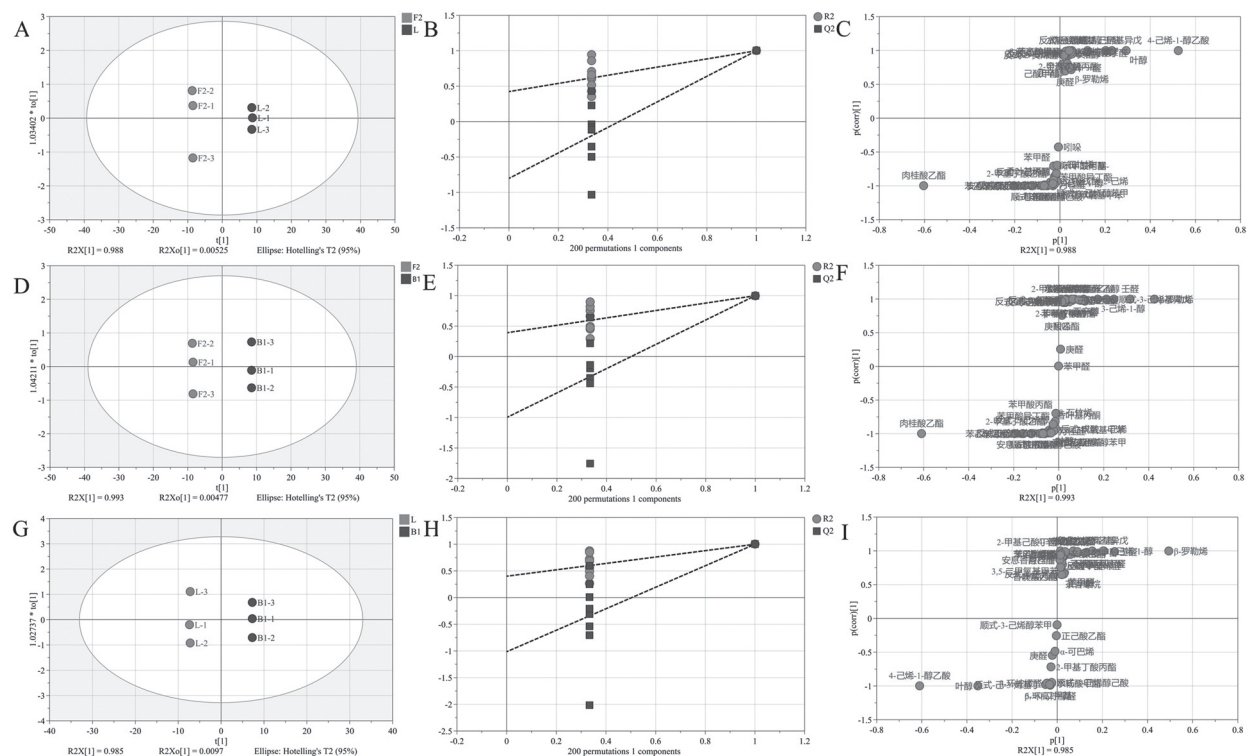


图5 沙枣不同组织部位挥发性代谢物的OPLS-DA分析

Fig. 5 OPLS-DA analysis of volatile components in different parts of *E. angustifolia*

A、D、G分别为F2 vs L、F2 vs B1、L vs B1的OPLS-DA得分图; B、E、H分别为F2 vs L、F2 vs B1、L vs B1的200次置换检验; C、F、I分别为F2 vs L、F2 vs B1、L vs B1的S-plot图。

表3 沙枣不同组织部位挥发性差异代谢物

Table 3 Different metabolites of volatile components in different parts of *E. angustifolia*

组织比较	序号	化合物名称	化合物类型	VIP值	KEGG ID	含量变化
F2 vs L	1	4-己烯-1-醇乙酸酯	酯类	3.79	NA	升高
	2	叶醇	醇类	2.12	C08492	升高
	3	壬醛	醛类	1.67	NA	升高
	4	顺式-3-己烯基异戊酸酯	酯类	1.47	NA	升高
	5	安息香酸乙酯	酯类	1.14	C01839	降低
	6	肉桂酸乙酯	酯类	4.35	C06359	降低
	7	苯乙酸乙酯	酯类	1.48	NA	降低
F2 vs B1	1	β-罗勒烯	烃类	3.17	C09873	升高
	2	壬醛	醛类	2.38	NA	升高
	3	顺式-3-己烯基异戊酸酯	酯类	1.82	NA	升高
	4	苯乙醇	醇类	1.58	C05853	升高
	5	3-己烯-1-醇	醇类	1.29	NA	升高
	6	肉桂酸乙酯	酯类	4.55	C06359	降低
	7	苯乙酸乙酯	酯类	1.47	NA	降低
	8	安息香酸乙酯	酯类	1.19	C01839	降低
L vs B1	1	β-罗勒烯	烃类	3.39	C09873	升高
	2	3-己烯-1-醇	醇类	1.41	NA	升高
	3	苯乙醇	醇类	1.38	C05853	升高
	4	4-己烯-1-醇乙酸酯	酯类	4.18	NA	降低
	5	叶醇	醇类	2.41	C08492	降低

中共有4-己烯-1-醇乙酸酯和叶醇2种代谢物显著上调; 幼枝中显著上调的代谢物共有4种, 分别为壬醛、顺式-3-己烯基异戊酸酯、苯乙醇和3-己烯-1-醇。通过KEGG、PLANTCYC和HMDB等数据库对筛选出的差异代谢物进行通路富集分析, 17种差异代谢物中成功注释到7种代谢物(表2和3), 这些代谢物主要分布在2条代谢途径中, 分别为α-亚麻酸代谢途径和苯丙氨酸代谢途径。

3 讨论

HS-SPME-GC-MS技术分析结果表明, 沙枣不同花发育阶段(花蕾、全开和凋谢)、叶片和幼枝的挥发性成分差异较大。花全开时的挥发性成分中肉桂酸乙酯相对含量最高, 叶片中的4-己烯-1-醇乙酸酯的含量居首位, 而沙枣花蕾、凋谢后的沙枣花和幼枝中皆以β-罗勒烯含量为最(三者间在含量上差异显著)。王妍等(2007)、黄馨瑶等(2009)、吕虹霞(2018)利用HS-SPME-GC-MS技术分析沙枣

花盛花期的挥发性成分, 皆表明肉桂酸乙酯的相对含量最高, 在44.52%以上, 这与本研究的结果一致。也有研究认为沙枣花的主要挥发性成分为反式肉桂酸乙酯而非肉桂酸乙酯(顺式肉桂酸乙酯), 这可能是由于提取方法或分析条件的不同所造成(乔海军等2011; 吕金顺2007; 杨虎和高国强2013)。沙枣叶片的挥发性成分虽然亦以酯类为主, 但其主要成分与花不同, 为4-己烯-1-醇乙酸酯, 此结果与Torbati等(2016)和吕虹霞(2018)的研究结果相左, 后者认为沙枣叶中的主要挥发物与花相同, 皆为肉桂酸乙酯, 这种差异可能是由于植株基因型、环境条件(海拔高度、经纬度、土壤条件等)以及提取与检测方法等的不同所造成(Saeidi等2021), 后续有必要对不同分布区沙枣叶的挥发性成分进行较为系统的研究, 以便更好地揭示沙枣叶挥发性成分的变化规律。

利用OPLS-DA分析的VIP值、结合P值以及两两间差异倍数FC, 从沙枣样品中共筛选出17种差

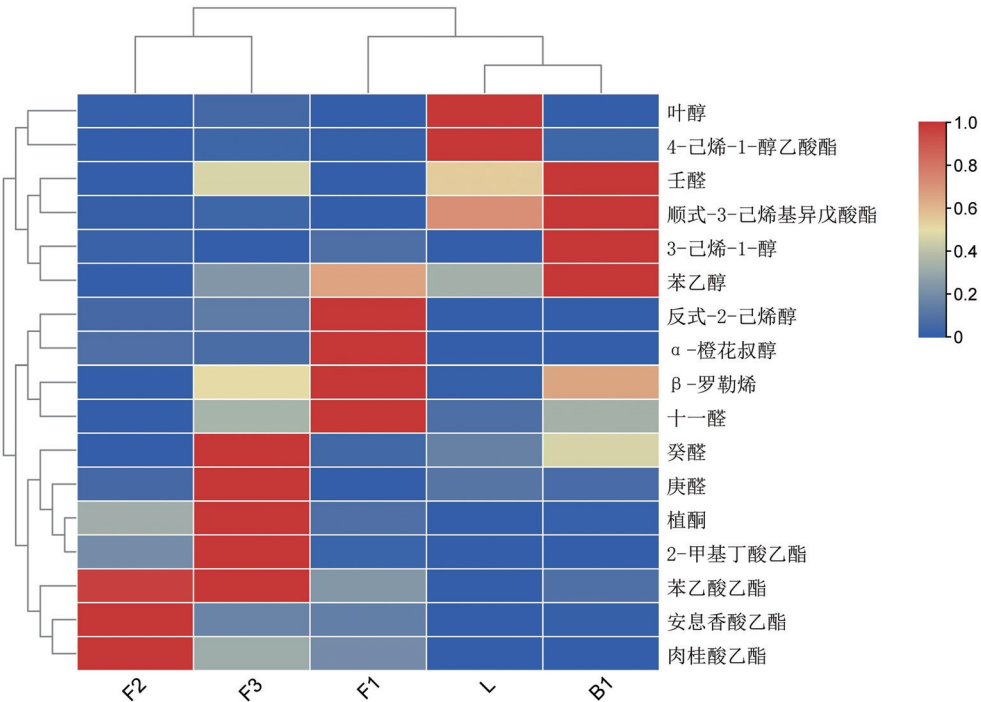


图6 沙枣不同花发育阶段与组织部位差异代谢物聚类分析
Fig. 6 Cluster analysis of differential metabolites among different flowering stages and parts of *E. angustifolia*

异代谢物, 其中植酮具有很强的抗菌、镇痛和抗炎活性(Avoseh等2021), 其余16种代谢物皆具有特殊香气, 可用于配制各种花香型或水果香型日用香精等, 如肉桂酸乙酯具有琥珀膏香、香脂香、蜜香和甜橙香, 其在食品、化妆品、医药领域应用广泛, 还可作为香烟的增香剂(Zhou等2021); 叶醇有着青香、药草香、绿叶香香气特性, 可用于草莓、浆果、甜瓜、茶香精中(孙宝国2000); 十一醛具脂蜡气和甜橙玫瑰样花香, 广泛用于化妆品、皂用香精中(孙宝国2000); β-罗勒烯具有花香、药草香和甜香, 可用于生产香料罗勒烯醇, 也可适量用于日化香精(王元成等2022), 另外其还在植物防御反应调控中起着重要作用(刘武等2012)。因此, 在供试样品中, 除盛开状态的沙枣花外, 其余发育阶段的花和叶片、幼枝的挥发性代谢物也具有较高的开发利用价值。

综上所述, 沙枣不同花发育阶段和组织部位的挥发性代谢物共有60种, 主要来源于酯类、烃类、醇类和醛类物质, 其中含量占比较高的有肉桂酸

乙酯、β-罗勒烯、4-己烯-1-醇乙酸酯、壬醛、叶醇、顺式-3-己烯基异戊酸酯、十一醛、苯乙醇和苯乙酸乙酯, 不同样品间精油成分差异较大。经代谢组学分析共筛选出17种差异代谢物, 这些代谢物均具有良好的应用前景。研究结果可为沙枣精油的综合开发利用提供一定理论依据。

参考文献(References)

Avoseh ON, Mtunzi FM, Ogunwande IA, et al (2021). *Albizia lebbbeck* and *Albizia zygia* volatile oils exhibit anti-nociceptive and anti-inflammatory properties in pain models. *J Ethnopharmacol*, 268: 113676

Chinese Academy of Sciences Editorial Committee of the Flora of China (1983). *Flora of China*. Vol 52, Part 2. Beijing: Science Press, 40 (in Chinese) [中国科学院中国植物志编辑委员会(1983). 中国植物志. 52卷, 2册. 北京: 科学出版社, 40]

Gao LF, Jia B, Zhang WH, et al (2022). Physiological characteristics and metabonomics analysis of blueberry leaves under salt stress. *Plant Physiol J*, 58 (1): 155–164 (in Chinese with English abstract) [高龙飞, 贾斌, 张卫华等 (2022). 盐胁迫下蓝莓叶片生理特性与代谢组学分析.

- 植物生理学报, 58 (1): 155–164]
- Huang XY, Ma H, Wang XM, et al (2009). Survey of people's favorites and chemical analysis on the flowery aroma of Russian-olive (*Elaeagnus angustifolia*). Nat Prod Res Dev, 21 (3): 480–488, 464 (in Chinese with English abstract) [黄馨瑶, 马晖, 王小明等(2009). 沙枣花香气的香气调查及化学成分分析. 天然产物研究与开发, 21 (3): 480–488, 464]
- Incilay G (2014). Volatile composition, antimicrobial and antioxidant properties of different parts from *Elaeagnus angustifolia* L. J Essent Oil Bear Plant, 17 (6): 1187–1202
- Liu W, Ruan Y, Liu CL (2012). Research progress of plant defense signal molecule— β -ocimene. Plant Physiol J, 48 (2): 103–110 (in Chinese with English abstract) [刘武, 阮颖, 刘春林(2012). 植物防御信号分子 β -罗勒烯的研究进展. 植物生理学报, 48 (2): 103–110]
- Liu ZH, Xie Q (2020). SPME-GC-MS analysis of volatile components in *Euonymus sanguineus* var. *paedidus* flowers at various development stages. For Res, 33 (6): 131–138 (in Chinese with English abstract) [刘志红, 解庆(2020). 腥臭卫矛花发育过程挥发性成分的SPME-GC-MS分析. 林业科学研究, 33 (6): 131–138]
- Liu ZJ, Ding DG, Cui HP, et al (2021). A study on the volatile compounds in *Elaeagnus angustifolia* L. flowers during flowering season by gas chromatography-mass spectrometry coupled with advanced chemometrics. J Food Qual, 46: 7111120
- Lü HX (2018). Comparative study on volatile components of the flower and the leaves of *Elaeagnus angustifolia* L. Cereal Oils, 31 (9): 73–76 (in Chinese with English abstract) [吕虹霞(2018). 沙枣花及沙枣叶挥发性成分的对比研究. 粮食与油脂, 31 (9): 73–76]
- Lü JS (2007). Analysis of volatile and semi-volatile components from flower of *Elaeagnus angustifolia*, Sci Silvae Sin, 43 (3): 122–126 (in Chinese with English abstract) [吕金顺(2007). 沙枣花挥发性和半挥发性成分的分析. 林业科学, 43 (3): 122–126]
- Meltem K, Melek M, Paniz T, et al (2018). Analysis of *Echinacea* flower volatile constituents by HS-SPME-GC/MS using laboratory-prepared and commercial SPME fibers. J Essent Oil Res, 30: 1–9
- Pu JJ, Liu Q, Li J, et al (2022). Analyses of volatile components in *Lonicerae japonicae* Flos at different growth stages by HS-SPME-GC-MS. Tradit Herb Drugs, 53 (9): 2818–2824 (in Chinese with English abstract) [蒲俊杰, 刘谦, 李佳等(2022). 金银花不同发育时期挥发性成分的HS-SPME-GC-MS分析. 中草药, 53 (9): 2818–2824]
- Qiao HJ, Yang JT, Yang X, et al (2011). GC-MS analysis of chemical composition of volatile oil from flowers of *Elaeagnus angustifolia* L. Food Sci, 32 (16): 233–235 (in Chinese with English abstract) [乔海军, 杨继涛, 杨晰等(2011). 沙枣花挥发油化学成分的GC-MS分析. 食品科学, 32 (16): 233–235]
- Saeidi K, Moosavi M, Lorigooini Z, et al (2021). Chemical characterization of the essential oil compositions and antioxidant activity from Iranian populations of *Achillea wilhelmsii* k. koch. Ind Crop Prod, 112: 274–280
- Sun BG (2000). Flavors and Fragrances. Beijing: China Petrochemical Press (in Chinese) [孙宝国(2000). 香料与香精. 北京: 中国石化出版社]
- Tian XM, Yan LH, Jiang LY, et al (2021). Chemical comparison of different tissues of *Semiliquidambar cathayensis* Chang by UHPLC-QTOF/MS-based metabonomics. Plant Physiol J, 57 (6): 1311–1318 (in Chinese with English abstract) [田晓明, 颜立红, 蒋利媛等(2021). 基于UHPLC-QTOF/MS代谢组学技术比较分析半枫荷不同组织化学成分. 植物生理学报, 57 (6): 1311–1318]
- Torbati M, Asnaashari S, Afshar FH (2016). Essential oil from flowers and leaves of *Elaeagnus angustifolia* (Elaeagnaceae): composition, radical scavenging and general toxicity activities. Adv Pharm Bull, 6(2): 163–169
- Wang Y, Li L, Lian SG, et al (2007). Analysis of aroma components in flowers of *Elaeagnus angustifolia* L. in Ningxia province by headspace-solid phase microextraction. Chin Tradit Herb Drugs, 11 (11): 1620–1627 (in Chinese) [王妍, 李玲, 连松刚等(2007). 顶空-固相微萃取气质联用分析宁夏沙枣花中香气成分. 中草药, 38 (11): 1620–1627]
- Wang YC, Zhang M, Zhou XX, et al (2022). Floral volatile components from five *Dendrobium* Species based on SPME-GC-MS. Forest Res, 35 (1): 132–140 (in Chinese with English abstract) [王元成, 张萌, 周晓星等(2022). 基于GC-MS的五种石斛花朵挥发性成分鉴定与差异性分析. 林业科学研究, 35 (1): 132–140]
- Yang H, Gao GQ (2013). Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of essential oil extracted by supercritical CO₂ from flowers of *Elaeagnus angustifolia* L. Food Sci, 34 (14): 152–156 (in Chinese with English abstract) [杨虎, 高国强(2013). 超临界CO₂萃取及气质联用分析沙枣花精油成分. 食品科学, 34 (14): 152–156]
- Zhang JN, Du QY, Wang XC, et al (2022). Component analysis of *Elaeagnus angustifolia* L. flowers on different flowering stages based on UPLC-Q-TOF MS technology combined with chemometric data analysis strategy. J Instrum Anal, 41 (8): 1178–1184 (in Chinese with English abstract) [张佳妮, 都青钰, 汪兴财等(2022). 基于UPLC-Q-TOF MS技术结合化学计量学数据自动化解析的不同花期沙枣花成分分析. 分析测试学报, 41 (8): 1178–1184]

- Zhang WW, Zhang KC, Xu XY, et al (2021). Metabolomics analysis of essential oil in different flowering periods and different parts of lavender in Qinghai-Tibet Plateau. *Plant Physiol J*, 57 (12): 2310–2322 (in Chinese with English abstract) [张文武, 张宽朝, 徐晓宇等(2021). 青藏高原薰衣草不同花期及不同组织部位精油的代谢组学分析. *植物生理学报*, 57 (12): 2310–2322]
- Zhang Y, Cheng WD (2018). GC-MS analysis of the volatile compounds derived from *Elaeagnus angustifolia* under different extraction conditions, *Modern Food Sci Technol*, 34 (7): 241–250 (in Chinese with English abstract) [张瑜, 程卫东(2018). GC-MS 分析使用不同提取工艺获得的沙枣花挥发性成分. *现代食品科技*, 34 (7): 241–250]
- Zhou CQ, Li CZ, Siva S, et al (2021). Chemical composition, antibacterial activity and study of the interaction mechanisms of the main compounds present in the *Alpinia galanga* rhizomes essential oil. *Ind Crop Prod*, 112: 113–126
- Zhou XL, Zhu SY, Wei JN, et al (2022). Volatile metabolomics and chemometric study provide insight into the formation of the characteristic cultivar aroma of *Hemerocallis*. *Food Chem*, 47: 134495