



引用格式: 原 晓, 王欢利, 王奇志, 等. 南京椴花化学成分鉴定及不同发育时期黄酮类化合物差异分析[J]. 西北植物学报, 2024, 44(2): 0270-0279. [YUAN X, WANG H L, WANG Q Z, et al. Identification of chemical composition and metabolic analysis of flavonoids in flowers of *Tilia miqueliana* Maxim. [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2024, 44(2): 0270-0279.] DOI: 10.7606/j.issn.1000-4025.20230485

南京椴花化学成分鉴定及不同发育时期 黄酮类化合物差异分析

原 晓^{1,2}, 王欢利^{2,3}, 王奇志^{1,2,3}, 黄 犀^{2,3}, 严灵君^{2,3}, 汤诗杰^{1,2,3*}

(1 南京中医药大学, 南京 210023; 2 江苏省中国科学院 植物研究所, 南京 210014; 3 江苏省植物资源研究与利用重点实验室, 南京 210014)

摘 要 【目的】研究南京椴花化学成分及其主要成分黄酮类化合物在不同发育时期的变化规律, 为后续采用多组学手段探究椴树花中重要药用化合物的代谢通路及调控机制解析奠定基础, 同时为椴树花的采收提供理论依据。【方法】以 10 年生南京椴为试验材料, 用超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS) 技术分析南京椴花中代谢物组分及类黄酮含量差异。【结果】(1) 南京椴花中共鉴定得到 46 种化合物, 其中有机酸及其衍生物 13 种、香豆素及其衍生物 4 种、酯 1 种、类黄酮 28 种。(2) 盛花期是南京椴花中代谢物发生显著变化的分界点, 与蕾期相比, 开花期间代谢物变化更明显。(3) 多重比较分析显示: 26 种黄酮类化合物在不同时期花中含量差异显著 ($P < 0.05$), 阿福豆苷、山奈苷、槲皮苷、橙皮苷、花旗松素和芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸在盛花期相对含量较高, 原花青素 A2 和 3 种原花青素三聚体在末蕾期含量较高。【结论】发育状态可作为判断南京椴花中次级代谢物含量的重要因素, 末蕾期的标志性化合物是原花青素 A2, 盛花期的标志性化合物是芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸, 末蕾期和盛花期均具有采收价值。
关键词 南京椴; 椴花; 代谢组学; 黄酮类化合物; UPLC-MS/MS

中图分类号 Q946.8; S792.36 文献标志码 A

Identification of chemical composition and metabolic analysis of flavonoids in flowers of *Tilia miqueliana* Maxim.

YUAN Xiao^{1,2}, WANG Huanli^{2,3}, WANG Qizhi^{1,2,3},
HUANG Xi^{2,3}, YAN Lingjun^{2,3}, TANG Shijie^{1,2,3*}

(1 Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2 Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 3 Jiangsu Key Laboratory for the Research and Utilization of Plant Resources, Nanjing 210014, China)

Abstract [Objective] To lay a foundation for the use of multi-omics methods to explore the metabolic pathways and regulatory mechanisms of important medicinal compounds of *Tilia miqueliana* Maxim. and to provide a basis for the harvesting of flowers, the chemical composition of *T. miqueliana* flowers, the

收稿日期: 2023-07-24; 修改稿收到日期: 2023-09-25

基金项目: 国家自然科学基金项目“基于低拷贝基因的椴树属系统发育及生物地理研究”(31700477); 江苏省农业科技自主创新资金项目“椴树属特色种质资源挖掘、评价及繁育技术集成”[CX(22)3177]; 南京市科技发展计划项目“银毛椴‘斯特林’选育及应用示范”(2022CX56); 南京市绿化园林局科技项目“优良乡土树种糯米椴资源挖掘及繁育技术研究”(YLKJ202214JH)

作者简介: 原 晓(1999—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物学研究。E-mail: 1466625194@qq.com

* 通信作者: 汤诗杰, 博士, 研究员, 主要从事植物资源学研究。E-mail: tangshijie69@aliyun.com

content changes of its signature components (flavonoids) at different growing stages were investigated. [Methods] The 10-year-old *T. miqueliana* was used as the test material. The experiments were conducted to analyze chemical components of flowers and differences in flavonoid contents using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). [Results] (1) A total of 46 compounds were identified, including 13 organic acids and their derivatives, 4 coumarins and their derivatives, 1 ester, and 28 flavonoids. (2) Flower opening stage was the cut-off point for significant changes in metabolites. Compared with the bud stage, the metabolites changed more significantly during flowering. (3) Multiple comparison analysis showed that the content of 26 flavonoids differed significantly ($P < 0.05$) in flowers at different phenological stages. Afzelin, kaempferitrin, quercitrin, hesperidin, taxifolin, and apigenin 7-*O*-glucuronide were higher at flower opening stage. Final bud stage had higher concentration of proanthocyanidin A2 and three proanthocyanidin trimers. [Conclusion] The development status may be an important factor in determining the content of secondary metabolites in the flowers of *T. miqueliana*. The signature compound at the final bud stage was proanthocyanidin A2 and at full bloom stage was apigenin-7-*O*-glucuronide, both of them were valuable for harvesting.

Key words *Tilia miqueliana* Maxim.; linden flowers; metabolomics; flavonoids; UPLC-MS/MS

椴树属(*Tilia* Linn.)隶属于锦葵科(Malvaceae)椴树亚科(Tilioideae),落叶乔木,主要分布于温带及亚热带地区,全球共 23 种,东亚 17 种,其中中国特有 15 种。绝大多分布分布于黄河流域以南,五岭以北广大温带及亚热带地区,只有少数种分布于北回归线以南或华北及东北地区。另外,在 20 世纪 90 年代,中国东北、华北及华东等地相继开展了欧美椴树品种的引种工作,包括心叶椴(*Tilia cordata* Mill.)和阔叶椴(*T. platyphyllos* Scop.)等品种^[1]。椴树栽培历史悠久,具有优良的观赏及经济价值,是优良的蜜源、材用、药用、纤维用及园林观赏植物^[2]。南京椴作为华东地区特色的乡土树种,具有良好的生长适应性及开发应用前景。随着南京椴繁殖及栽培技术的突破,目前江苏省的南京椴苗木数量已初具规模。然而,在现有资源基础上,开发南京椴相关产品,为苗木产业提质增效具有十分积极的作用。

欧洲药典 9.0 中有关椴树花(*Tiliae flos*)的专论介绍,将其定义为采自 *T. platyphyllos* Scop.、*T. cordata* Mill.、*T. × vulgaris* Hayne(syn. *T. × europaea* L.)的整枝干花或其混合物^[3]。在中医上用于治疗偏头痛、瘰病、肝胆疾病、动脉硬化性高血压、支气管炎等,同时可作为镇静剂、利尿剂、祛痰剂以及发汗剂。欧洲委员会将其列为食品香料的天然来源(N2 类)^[4]。此外,菩提茶具有保湿和收敛性,可作为化妆品的原料^[5]。迄今为止,该属植物中已分离到上百种天然产物,包括黄酮类(flavonoids)、有机酸(organic acids)、萜类(terpenes)、挥发油类(essential oils)、生物碱类(alkaloids)、甾体类(steroids)、烷烃类(alkanes)、糖类(saccharides)和苯丙

素类(phenylpropanoids)等。

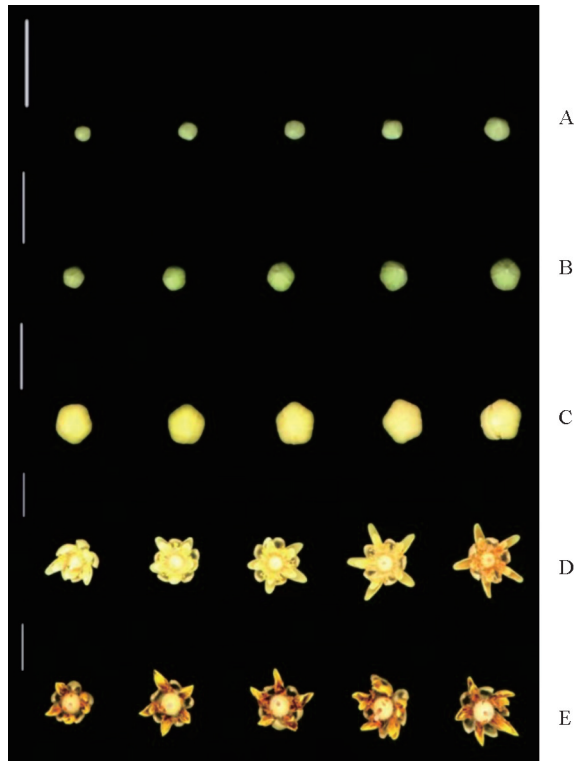
椴树花的主要成分为黄酮类化合物^[5]。Frezza 等在银毛椴花序中鉴定出 13 种化合物,主要由黄酮类化合物组成,其次是有机酸和五环三萜类化合物^[6]。Karioti 等在阔叶椴花序中鉴定到 31 种化合物,黄酮类化合物及其衍生物有 23 种^[5]。小叶椴花中总黄酮含量达到 13.32 mg/g^[7],Fawzy 等在小叶椴中鉴定并分离得到 6 种酚类物质(山奈酚、槲皮素、牡荆素、山奈酚 3-*O*- α -鼠李糖苷、槲皮素 3-*O*- β -半乳糖苷和山奈酚 3-*O*-芸香糖苷)^[8]。黄酮类化合物最初被命名为维生素 P,具有维持毛细血管通透性的作用^[9];同时,黄酮类化合物可以干扰肿瘤细胞的增殖和转移,抑制肿瘤组织血管的形成,诱导肿瘤细胞自噬或凋亡,并阻止肿瘤的侵袭^[10];其次,黄酮类化合物具有清除自由基、调节脂蛋白、保护线粒体和改善心肌细胞纤维化,对心血管疾病具有治疗潜力^[11];另外,在控制体重和肥胖方面有潜在的作用,如黄酮类化合物对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶功能有抑制作用^[12]。也有研究表明,黄酮类化合物不仅具有清除活性氧(reactive oxygen species)能力,还可以作为信号分子激活防御相关的信号通路^[13]。

南京椴(*T. miqueliana* Maxim.)作为江苏省的乡土树种,其花器官的化学成分尚未展开详细研究,研究用 UPLC-MS/MS 鉴定南京椴花的化学成分,分析不同发育阶段花中差异代谢物含量变化规律,为后续用多组学手段探究椴树花中重要药用化合物的代谢通路及调控机制解析奠定基础,同时为椴树花的采收提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料 with 处理

试验材料:选取种植于江苏省中国科学院植物研究所种植园(32.05°N,118.83°E)的 10 年生南京椴植株,设置 3 个生物学重复(3 个南京椴单株)。依据花朵形态将采样期共分为 5 期(图 1):始蕾期(2022 年 4 月 25 日,A)、中蕾期(5 月 14 日,B),末蕾期(6 月 2 日,C)、盛花期(6 月 2 日,D)和败花期(6 月 10 日,E)。样品采集后以锡箔纸包裹,液氮速冻后置于 55℃烘箱内脱水至恒重,随即存放于-20℃冰箱保存备用。



A. 始蕾期;B. 中蕾期;C. 末蕾期;D. 盛花期;E. 败花期。
比例尺代表 1 cm。

图 1 南京椴花不同时期采集的样本

A. Bud initiation stage. B. Middle bud stage. C. Final bud stage.
D. Flower-opening stage. E. Final flowering period.
The bar in the top-left corner represents 1 cm.

Fig.1 Phenotypic traits of *T. miqueliana* Maxim. flowers at various developmental stages

1.2 试剂与仪器

甲醇(色谱级)、乙腈(色谱级)。标准品:对香豆酸(sangon biotech,A506158-0250)、绿原酸(中检所 110753-200413)、原儿茶酸(Y-031-130711)、儿茶素(E-011-130816)、槲皮素(中检所,100081-200907)、

芦丁(中检所,100080-9504)、黄芩苷(中检所,110715-200514)。

液质联用仪(Agilent 1260 UPLC-DAD-6030 ESI-QTOF,美国 Aglient 公司)、超声波清洗仪(KQ-400DE,昆山禾创超声仪器有限公司)、真空干燥箱(GZX-9070MBE,上海博讯实业有限公司)、电子计重秤(ACS-10,凯丰集团有限公司);1/10 000 电子天平(瑞士 Mettler-Toledo AE240,瑞士苏黎世梅特勒—托利多集团)、纯水机(SPING-S5i,南京妙之仪电子科技有限公司)、一次性带针注射器(1 mL,江阴市医疗器械有限公司)、一次性针式过滤器(0.45 μm,津腾实验设备有限公司)、移液枪(100~1 000 μL,Dragonlab)、高通量组织研磨机(LISK-48,南京立思高仪器有限公司)。

1.3 化合物提取及成分鉴定

1.3.1 供试品、标准品制备

选取盛花期(D)样本为试验材料,准确称量 0.1 g 南京椴花,按照 1:15 料液比加入 50%甲醇溶液,在 350 W 下超声提取 20 min,取出后冷却室温,补足溶液并摇匀,用 0.22 μm 滤膜过滤后备用。

对照品贮备液:称取 1 mg 对香豆酸、绿原酸、原儿茶酸、儿茶素、槲皮素、芦丁 6 种对照品,配制 1 mg/mL 储备溶液。

1.3.2 LC-MS/MS

液质联用仪,美国安捷伦 Agilent 1260 UPLC-DAD-6030 ESI-QTOF MS;LC-MS 色谱柱,Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18(3.0 mm×100 mm,2.7 μm);流动相:水(0.1%甲酸,A 相)、乙腈(B 相);梯度洗脱程序:0 min,8%B;0~10 min,8%B;10~20 min,8%B~13%B;20~50 min,13%B~35%B;50~70 min,35%B~100%B。流速 0.3 mL/min;进样量 5 μL;柱温 30℃。质谱条件:质谱检测器 ESI 离子源,负离子模式;全扫范围 100~1 700 m/z;雾化器压力 344 738 Pa;干燥气流速 10 mL/min;干燥气温度 350℃;毛细管电压 3 500 V;碎裂电压 190 V。

1.3.3 数据处理

用 agilent mass hunter qualitative analysis software (Version 10.0)对 LC-MS 数据文件进行初步评估,通过比对标准品、自建数据库、本地数据库(PCDL 公共数据库)和文献资料,根据保留时间、分子离子峰、碎片离子峰和紫外吸收等鉴定南京椴花中的代谢物。

1.4 不同发育期间椴树花代谢组份分析

1.4.1 样品处理

真空冷冻干燥后的植物材料研磨并准确称取 0.1 g 粉末置于离心管,溶解在 50% 甲醇溶液中,在 30 ℃ 下加入 1.5 mL 溶剂超声萃取 20 min,随后将试管在室温下以 10 000 r/min 离心 10 min,上清液用 0.22 μm 滤膜过滤并转移到色谱进样瓶中,用于 LC-MS/MS 分析。选取黄芩苷 Baicalin 化合物作为内标,购买自中国食品药品鉴定研究院(110715-200514),浓度为 0.05 mg/mL。

1.4.2 数据处理

用 Agilent MassHunter Profinder (Version 10.0) 和 MPP (mass profiler professional, Version 15.1) 对南京椴花不同期液质检测数据开展批量预处理,提高数据分析的质量。用 SIMCA 14.1 (Umetrics, 瑞典) 软件进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法判别分析 (partial least squares discrimination analysis, PLS-DA) 和正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA)。用

OriginPro 2023 进行聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA), 用 SPSS 27.0 软件进行显著性差异分析。

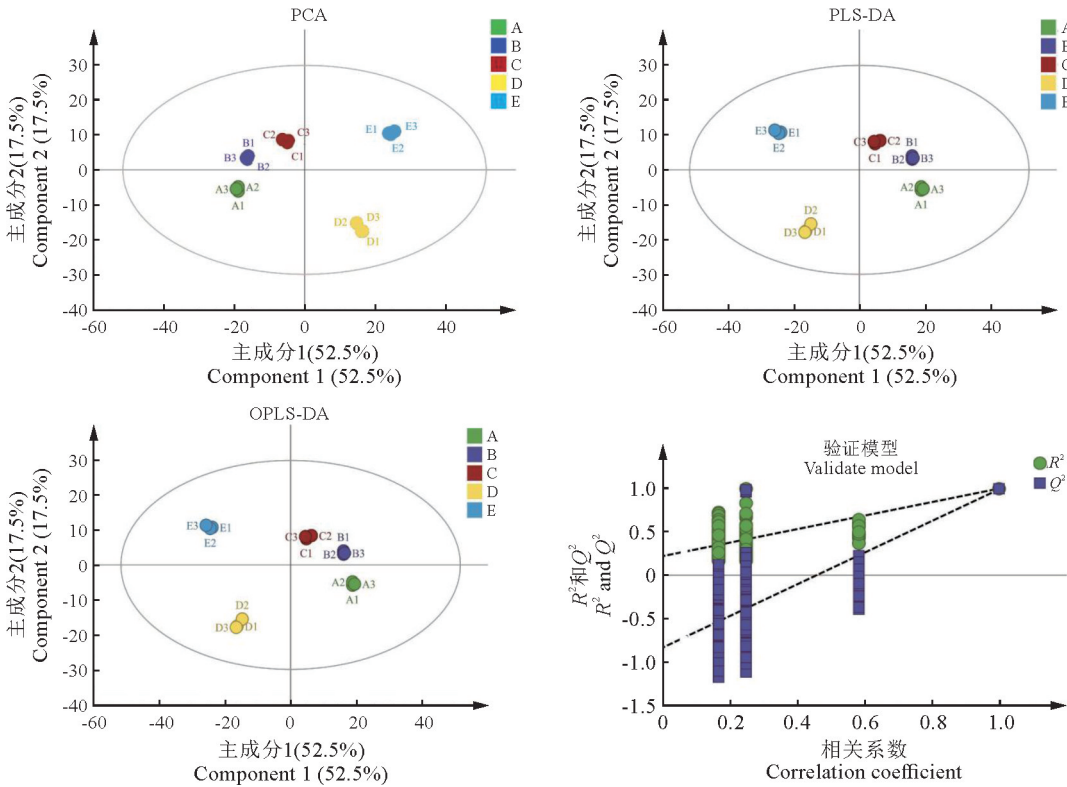
2 结果与分析

2.1 南京椴花中化合物成分鉴定

用超高效液相色谱-串联质谱法对南京椴花进行 UPLC-MS/MS 分析。解析负离子模式下南京椴花醇提取物一、二级质谱图, 比对数据库和文献, 根据分子离子峰、碎片离子峰、保留时间、紫外吸收波长等指标对化合物进行鉴定, 初步分析得到 46 种化合物 (见表 1)。有机酸及其衍生物 13 种; 香豆素及其衍生物 4 种; 1 种酯; 类黄酮 28 种, 包括 4 种黄酮, 16 种黄酮醇, 5 种黄烷-3-醇和 3 种二氢黄酮。

2.2 主成分分析和 OPLS-DA 分析

用 MPP 软件对不同期液质检测数据进行均一化处理, 根据 $P < 0.05$ 结合差异性倍数 ($FC \geq 2$) 筛选组间差异代谢物, 在 5 个时期南京椴花中共筛选出差异代谢物 620 种。为了分析样品组内和组间的变异度, 对 15 个样本进行 PCA 分析 (图 2)。



图中的数字(1-3)表示 5 个时期样本的 3 个生物学重复。

图 2 PCA 分析、PLS-DA 分析、OPLS-DA 分析和 OPLS-DA 验证模型

The numbers (1-3) in the figure represent the three biological replicates of samples from five different periods.

Fig. 2 Analysis of PCA, PLS-DA, OPLS-DA and validation model of OPLS-DA

表 1 南京椴花化合物鉴定

Table 1 Identification of compounds from flowers of <i>T. miqueliana</i> Maxim.					
峰号 No.	保留时间 RT/min	紫外吸收波长 UV/nm	二级质谱碎片 MS ²	化合物 Compounds	参考文献 References
1	2.088	256,288	85,87,111,191	奎宁酸 Quinic acid	[14]
2	2.904	213,272	79,124,125,169	没食子酸 Gallic acid	[5]
3	3.822	210,292	73,111,155,173	莽草酸 Shikimic acid	[15]
4	5.504	203,267	108,109,153	原儿茶酸 Protocatechuic acid	标准品 Station
5	5.606	261,292	122,135,164,179	咖啡酸 Caffeic acid	
6	7.085	219,267,340	133,177,339	秦皮甲素 Esculin	[17]
7	7.646	207,258,295	164,179,387	咖啡酸衍生物 I Caffeic acid-derivate I	[16]
8	9.788	257	65,93,94,137	水杨酸 Salicylic acid	[18]
9	10.246	239,310	89,181,323,551	4-(1-羟基-1-甲基乙基)环烷-1,3-二烯-羧酸 β -龙胆二糖酯 β -gentobiosyl ester of 4-(1-hydroxy-1-methylethyl) cyklohepta-1,3-diene-carboxylic acid	[5]
10	13.663	258,297,344	105,133,177	秦皮乙素 Esculetin	[17]
11	15.753	240,285	135,179,387	咖啡酸衍生物 II Caffeic acid-derivate II	[16]
12	19.476	280	125,289,407,577	原花青素二聚体 I Procyanidin dimer I	[19]
13	21.752	234,283,310	93,119,163	对香豆酸 p-Coumaric acid	标准品 Station
13	22.382	226,264	125,203,245,289	表儿茶素(-)-Epicatechin	
15	23.657	239,266,334	108,152,167	香草酸 Vanillic acid	[20]
16	24.932	238,301	89,149,191,461	奎宁酸衍生物 I Quinic acid-derivate I	[14]
17	25.799	237,278	89,149,191,461	奎宁酸衍生物 II Quinic acid-derivate II	[14]
18	26.003	234,280	177,353,515	秦皮乙素衍生物 I Esculetin-derivate I	[17]
19	26.156	279	125,287,407,577,865	原花青素三聚体 Procyanidin trimer	[19]
20	27.124	231,256,352	300,301,446,625	槲皮素二己糖苷 Quercetin-dihexoside	[14]
21	27.277	235,270,	300,301,433,609	橙皮苷 Hesperidin	[21]
22	27.838	280	287,575,865,115	原花青素四聚体 Procyanidin tetramer	[19]
23	27.991	232,280,322	134,178,193	阿魏酸 Ferulic acid	[22]
24	28.960	233,280,324	289,407,577	原花青素二聚体 II Procyanidin dimer II	[19]
25	29.725	267,283,350	284,285,609	芦丁 Rutin	标准品 Station
26	29.878	279,351	133,177,353	秦皮乙素衍生物 II Esculetin-derivate II	
27	30.260	228,280	300,301,595	槲皮素衍生物 Quercetin-derivate	[5]
28	31.458	230,270,350	151,300,301,463	异槲皮素 Isoquercitrin	[23]
29	31.968	228,354	300,301,463	金丝桃苷 Hyperoside	[8]
30	32.886	231,280	284,285,579	山奈酚衍生物 I Kaempferol-derivate I	[21]
31	33.396	230,278	151,285,579	山奈酚衍生物 II Kaempferol-derivate II	[21]
32	33.651	265,352	300,433	扁蓄苷 Avicularin	[3]
33	33.753	232,280,350	284,285,447	紫云英苷 Astragalin	[5]
34	33.957	230,275	151,300,505	槲寄生新苷 Viscumneoside	[24]
35	34.671	267,349	300,301,433	番石榴苷 Guajaverin	[3]
36	34.875	268,349	284,447	木犀草苷 Luteoloside	[21]
37	35.844	270,354	151,284,417	山奈酚 O-戊糖苷 Kaempferol O-pentoside	[5,25]
38	36.201	232,280	301,477	槲皮素葡萄糖醛酸 Quercetin glucuronide	[26]
39	37.449	232,282	284,285,489	穿心莲黄酮苷 E Andrographidine E	[27]
40	37.466	234,280	151,285,489,533	木犀草素 7-O-6'-丙二酰葡萄糖苷 Luteolin 7-O-6'-malonylglucoside	[28]
41	43.849	234,276,314	107,15,301	槲皮素 Quercetin	标准品 Station
42	44.002	234,281	285,447,593	反式银椴苷 Trans-Tiliroside	
43	44.308	233,280	171,257,301	橙皮素 Hesperetin	[29]
44	45.073	236,280	285,447,593	顺式银椴苷 Cis-Tiliroside	[3]
45	49.611	240,273,365	185,229,285	山奈酚 Kaempferol	[21]
46	55.016	240,282	155,285	木犀草素 Luteolin	[21]

5个样品之间的总体化合物差异主成分分析结果显示:第一和第二主成分分别占52.5%和17.5%的差异,化合物组分的差异对不同时期样品的特征解释率为70.0%(PC1+PC2),基本可以反映南京椴花的主要特征信息;样品组内变异度均较小,说明实验重复性好;不同期样本呈分离趋势,说明组间差异较大;与蕾期相比,开花后代谢物变化明显,其中盛花期(D)和败花期(E)明显区别于其他期。

为了阐明南京椴花中代谢物在不同时期的变化规律,用(图2)PLS-DA和OPLS-DA模型对5个不同样本中化合物种类和丰度进行整合,以确定不同阶段化合物的差异。在OPLS-DA模型中,自变量拟合指数(R^2X)、因变量拟合指数(R^2Y)和模型预测指数(Q^2)值分别为0.94、0.997和0.989,表明该模型的高精度和稳定性,以及解释样本变化的可靠性^[30]。OPLS-DA置换检验结果表明模型不存在拟合现象,可用于后续代谢物的筛选工作。蕾期到花期代谢物组间差异显著,由此推测,盛花期是南京椴花代谢产物发生显著变化的分界点。

2.3 黄酮类化合物聚类分析

目前,已经从不同的来源分离出5 000多种黄酮类化合物,并确定了它们的结构。椴属中已被报道的黄酮类化合物约有80种。根据OPLS-DA模型的变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)鉴定差异代谢物^[31],设置VIP值大于1,在5个时期花中共筛选得到244种差异代谢物,进一步得到26种黄酮类差异代谢物(图3),包括4

种黄酮,分别是田蓟苷、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸、木犀草素和木犀草苷;10种黄酮醇,分别是阿福豆苷、山奈苷、槲皮苷、芦丁、槲皮素-3-*O*-葡萄糖-7-*O*-鼠李糖苷、鼠李素、番石榴苷、山奈酚、异槲皮素和槲皮素;5种二氢黄酮,分别是橙皮苷、新橙皮苷、柚皮苷、圣草酚和圣草酚-*O*-己糖苷;1种二氢黄酮醇,是花旗松素;5种黄烷-3-醇,分别是表儿茶素、原花青素A2、原花青素三聚体I、原花青素三聚体II、原花青素三聚体III;1种异黄酮,是奥洛波尔。

阿福豆苷含量在A和C期较低,在B、D和E期升高。新橙皮苷、芦丁和槲皮素-3-*O*-葡萄糖-7-*O*-鼠李糖苷含量在A和D期比其他期较低,在B、C和D期含量均有所升高。原花青素A2和山奈苷含量在C和D期最高,A、B和E期含量降低。花旗松素、橙皮苷和槲皮苷呈现先降低后上升趋势,在A期含量较高,B和C期稍有降低,D和E期含量又升高。芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸含量在D期显著区别于其他时期,含量最高。

原花青素三聚体I、II和III 3种黄烷-3-醇和柚皮苷在生长阶段有着相同的变化趋势,在A期含量最低,随后含量升高并保持稳定。

奥洛波尔和鼠李素含量在南京椴花的整个生长期无变化,在D期略有降低;番石榴苷、山奈酚、木犀草素、木犀草苷、异槲皮素含量在B、C、D和E期略高于A期;槲皮素、圣草酚和圣草酚-*O*-己糖苷含量在C、D和E期稍高于前两期;表儿茶素和田蓟苷含量在B期降低,其他时期含量基本无明显变化。

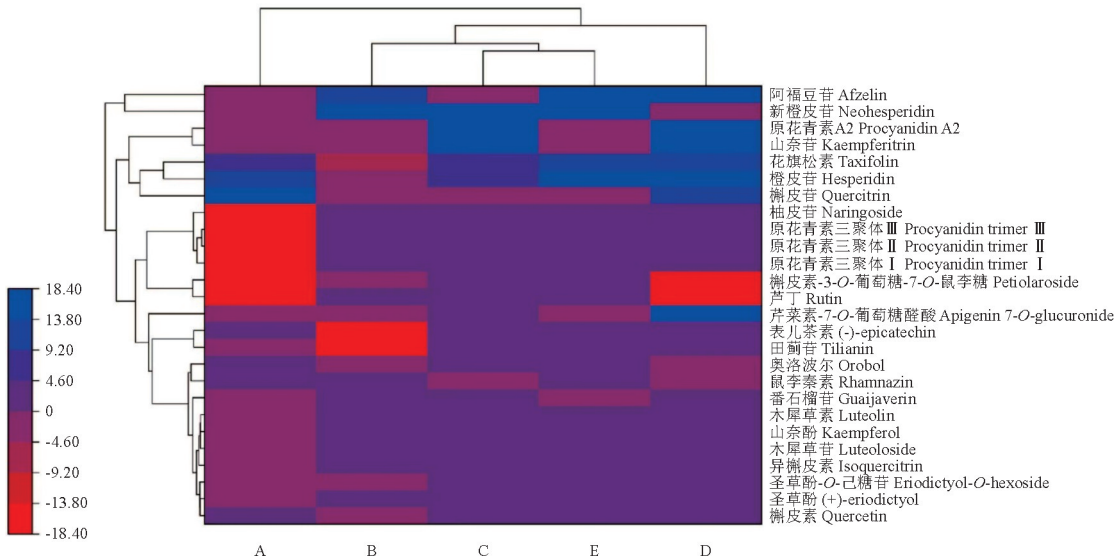


图3 26种关键黄酮类化合物在5个时期内含量变化
Fig.3 Variation of the content of 26 flavonoids within five stages

聚类热图结果(图 3)显示,26 种黄酮类化合物含量变化主要呈现以下 5 种趋势:(1)随着时间延长差异代谢物含量呈升高趋势,且在盛花期(D)含量较高,包括槲皮素、异槲皮素、山奈酚、木犀草素、木犀草苷、原花青素三聚体 I、原花青素三聚体 II、原花青素三聚体 III、柚皮苷、圣草酚和圣草酚-*O*-己糖苷。(2)随时间延长含量先升高后降低,原花青素 A2、山奈苷、番石榴苷、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸、芦丁和槲皮素-3-*O*-葡萄糖-7-*O*-鼠李糖苷,前 4 种化合物在 D 期含量较高,后 2 种化合物在 A 和 D 期含量最低。(3)随时间延长含量先降低后升高,表儿茶素、田蓟苷、槲皮苷、橙皮苷、花旗松素和鼠里素素,

前 5 种化合物在 A 和 D 期含量相对较高,鼠里素素在 D 期略有降低。(4)随时间延长含量先升高后降低再升高,阿福豆苷在 D 期含量相对较高,新橙皮苷在 D 期含量降低。(5)随时间延长含量呈先降低后升高再降低,奥洛波尔在 D 期含量有所降低。

2.4 黄酮类化合物显著性分析

对不同时期南京椴花中黄酮类化合物进行单因素方差分析,表 2 显示了 26 种黄酮类化合物在 5 个时期内相对平均含量。多重比较分析表明,这些化合物在不同时期花中含量差异显著($P<0.05$),说明发育状态是判断南京椴花中次级代谢物含量的重要因素。

表 2 不同时期花中黄酮类化合物相对含量平均值
Table 2 Mean values of flavonoid relative content in inflorescences at different time periods

化合物 Compounds	采样期 Harvesting stages				
	A	B	C	D	E
阿福豆苷 Afzelin	-1.245±0.220e	13.675±0.474c	-0.239±0.195d	15.265±0.225b	16.351±0.293a
新橙皮苷 Neohesperidin	-1.362±0.221b	15.746±0.995a	15.639±0.611a	-1.538±0.860b	16.367±0.101a
原花青素 A2 Procyanidin A2	-1.244±0.237d	-0.500±0.287c	18.352±0.554a	15.743±0.374b	-1.345±0.168d
山奈苷 Kaempferitrin	-1.028±0.231b	-0.378±0.288b	14.863±2.369a	15.492±0.324a	-1.222±0.169b
花旗松素 Taxifolin	6.462±0.100b	-7.037±0.293c	7.017±5.183ab	10.244±0.133ab	10.530±0.502a
橙皮苷 Hesperidin	12.770±0.257ab	-0.149±0.678c	8.844±8.088b	15.195±0.401ab	15.719±0.103a
槲皮苷 Quercitrin	15.216±2.299a	-0.394±0.305b	-0.129±0.219b	13.617±1.339a	-1.379±0.183b
柚皮苷 Naringoside	-18.397±0.220c	0.567±0.304ab	0.485±0.483ab	1.213±0.819a	0.016±0.496b
原花青素三聚体 I Procyanidin trimer I	-16.625±0.264c	0.427±1.414b	2.009±0.401a	0.162±0.413b	1.924±0.037a
原花青素三聚体 II Procyanidin trimer II	-16.511±0.357c	1.877±1.869ab	2.561±0.498a	0.678±0.456b	0.619±0.153b
原花青素三聚体 III Procyanidin trimer III	-16.448±0.220c	1.635±0.920a	2.427±0.377a	0.169±0.071b	0.207±0.371b
槲皮素-3- <i>O</i> -葡萄糖-7- <i>O</i> -鼠李糖苷 Petiolaroside	-16.677±0.222c	-0.241±0.229b	1.151±0.240a	-16.575±0.792c	0.630±0.011a
芦丁 Rutin	-15.628±0.355c	1.256±1.977b	3.787±0.049a	-15.530±0.802c	0.755±0.242b
芹菜素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸 Apigenin 7- <i>O</i> -glucuronide	-1.040±0.277c	-0.267±0.295b	0.110±0.209b	15.598±0.550a	-1.055±0.176c
表儿茶素 (-)-Epicatechin	0.448±0.484c	-14.834±0.382d	2.088±0.262b	0.655±1.080c	3.063±0.264a
田蓟苷 Tiliandin	-1.246±0.891c	-14.560±0.438d	0.128±0.779b	1.638±0.353a	1.796±0.767a
奥洛波尔 Orobol	0.665±0.140b	-0.742±0.083c	2.153±0.430a	-1.899±0.692d	0.332±0.315b
鼠李素 Rhamnazin	0.163±0.050a	0.195±0.192a	-1.518±1.006b	-2.313±0.363b	0.341±0.303a
番石榴苷 Guajaverin	-1.671±0.647c	0.570±0.530b	1.016±0.217b	2.905±0.760a	-1.425±0.414c
木犀草素 Luteolin	-0.962±0.732c	0.304±0.236b	1.645±0.215a	0.519±0.667b	0.608±0.233b
山奈酚 Kaempferol	-1.267±0.535d	1.180±0.242ab	1.661±0.228a	0.724±0.698bc	0.191±0.224c
木犀草苷 Luteoloside	-1.954±0.463c	0.398±0.173b	1.534±0.452a	0.267±0.282b	0.027±0.012b
异槲皮素 Isoquercitrin	-2.205±0.305e	0.515±0.119d	1.774±0.086a	0.829±0.115c	1.351±0.054b
圣草酚- <i>O</i> -己糖苷 Eriodictyol- <i>O</i> -hexoside	-0.397±0.365c	-0.779±0.111d	2.202±0.245a	1.921±0.112a	0.736±0.148b
圣草酚 (+)-Eriodictyol	-1.014±0.269d	0.034±0.084c	2.438±0.582a	1.563±0.309b	1.345±0.143b
槲皮素 Quercetin	0.033±0.187c	-0.324±0.217c	2.086±0.473a	1.312±0.233b	1.710±0.522ab

注:同行不同字母表示差异具有统计学意义($P<0.05$,多重比较分析)。
Note: Different letters in the same line indicate statistically significant differences ($P<0.05$, multiple comparison test).

A 期橙皮苷和槲皮苷含量最高,分别为 12.770,15.216;B 期新橙皮苷、柚皮苷、原花青素三聚体、鼠里素素和山奈酚含量最高,分别为 15.746,0.567,1.756,0.195,1.180;C 期新橙皮苷、原花青素 A2、山奈苷、花旗松素、柚皮苷、原花青素三聚体、芦丁、槲皮素-3-O-葡萄糖-7-O-鼠李糖苷、奥洛波尔、山奈酚、木犀草素、木犀草苷、槲皮素、异槲皮素、圣草酚和圣草酚-O-己糖苷 16 种化合物含量最高,分别为 15.639,18.352,14.863,7.017,0.485,2.332,1.151,3.787,2.153,1.645,1.661,1.534,1.774,2.202,2.438,2.086;D 期山奈苷、花旗松素、橙皮苷、槲皮苷、柚皮苷、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸、田蓟苷、番石榴苷和圣草酚-O-己糖苷 9 种化合物含量最高,分别为 15.492,10.244,15.195,13.617,1.213,15.598,1.683,2.905,1.921;E 期阿福豆苷、新橙皮苷、花旗松素、橙皮苷、原花青素三聚体、槲皮素-3-O-葡萄糖-7-O-鼠李糖苷、表儿茶素、田蓟苷、鼠里素素和槲皮素含量最高,分别是 16.351,16.367,10.530,15.719,1.924,0.630,3.063,1.796,0.341,1.710。

3 讨 论

黄酮类化合物是椴树属植物的主要次生代谢产物^[32],目前,已经从椴树属植物中发现约 80 种黄酮类化合物。Pavlović 等基于高分辨质谱仪(HRMS)在 4 种椴树花序样本中初步鉴定了 46 种代谢产物,包含 14 种酚酸及其衍生物、24 种黄酮类化合物及其衍生物和 8 种原花青素^[23]。Ziaja 等在 5 种椴树花序中检测到 42 种酚类化合物,并用儿茶素、表儿茶素、蒙花苷和 4 种槲皮素衍生物对心叶椴(*Tilia cordata* Mill.)、阔叶椴(*Tilia platyphyllos* Scop.)、*Tilia* × *vulgaris* Hayne、银毛椴(*Tilia tomentosa* Moench.)、美洲椴(*Tilia americana* L.) 5 个椴树种进行了区分^[3]。本研究基于 UPLC-MS/MS 在南京椴花中检测到 46 种化合物,包括 13 种有机酸(9 种酚酸及其衍生物);4 种香豆素及其衍生物;1 种酯;28 种类黄酮(4 种黄酮,16 种黄酮醇,5 种黄烷-3-醇,3 种二氢黄酮)。此外,通过比对标准品,在南京椴花中检测到芦丁的存在,可将其与银毛椴花进行区分;并未检测到儿茶素的存在,此前研究已证明美洲椴花中无儿茶素^[3]。

Szücs 等通过分析阔叶椴苞片整个发育期间的代谢组变化,发现苞片在早期发育阶段含有大量的儿茶素衍生物和黄酮苷,在果实生长阶段含有丰富

的秦皮苷和奎宁酸衍生物^[14]。练冬梅等研究发现,黄秋葵花黄酮从花蕾期至花谢期呈现出累积过程,花谢期黄酮含量达到最高^[33]。邵郅胜等研究表明欧李叶片的各酚类物质含量随着生长期推进均呈现先升高后降低的趋势,均于果实膨大期达到最高^[34]。本文着重研究南京椴花不同时期黄酮类化合物的含量变化。OPLS-DA 分析结果显示,盛花期是南京椴花中代谢物发生显著变化的分界点,现蕾期和开花期代谢物差异较大。显著性分析可知,黄酮类化合物含量在不同时期花中差异显著($P < 0.05$)。在黄酮醇生物合成途径上^[35],山奈苷、阿福豆苷和槲皮苷这 3 种化合物显著积累,在盛花期含量极高,Fawzy 等通过角叉菜胶诱导的大鼠足肿胀法表明山奈酚及衍生物、槲皮素及衍生物有强烈的抗炎作用^[8];相反,槲皮素-3-O-葡萄糖-7-O-鼠李糖苷和芦丁 2 种槲皮素衍生物在盛花期含量极低。原花青素 A2 和原花青素三聚体等黄烷-3-醇类化合物含量在末蕾期最高,前者在盛花期含量也较高,Cz-erwinska 等分离和鉴定了小叶椴花中的 10 种原花青素,都能减少 N-甲酰-甲硫氨酰-亮氨酰-苯丙氨酸(f-mlp)刺激的中性粒细胞产生的活性氧且大多数都能抑制脂多糖(LPS)诱导的 IL-8 释放^[36];表儿茶素在败花期含量最高,Lee 等研究发现表儿茶素对谷氨酸诱导的 HT22 细胞神经毒性具有明显的保护作用^[37]。橙皮苷和花旗松素含量在发育后期增加,橙皮苷已经被证明有降脂^[38]和神经保护活性^[39];花旗松素可用于治疗胃癌^[40]和脊髓损伤^[41]。芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸含量在盛花期最高,Hu 等研究表明该物质可抑制 LPS 诱导的炎症反应^[42]。绝大多数黄酮类化合物含量在末蕾期或盛花期达到最高,末蕾期的标志性化合物是原花青素 A2,盛花期的标志性化合物是芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸,末蕾期和盛花期均具有采收价值。

4 结 论

该研究基于 UPLC-MS/MS 检测和自建数据库对南京椴花化学成分进行鉴定,初步分析得到 46 种化合物,包括 13 种有机酸(9 种酚酸及其衍生物);4 种香豆素及其衍生物;1 种酯;28 种类黄酮(4 种黄酮,16 种黄酮醇,5 种黄烷-3-醇,3 种二氢黄酮)。多元分析结果表明,蕾期到花期代谢物组间差异显著,盛花期是南京椴花中代谢物发生显著变化的分界点。多重比较分析表明,26 种黄酮类化合物含量在 5 个时期花中差异显著($P < 0.05$),阿福豆苷、山奈

苷、槲皮苷、橙皮苷、花旗松素和芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸含量在盛花期相对较高,槲皮素-3-*O*-葡萄糖-7-*O*-鼠李糖苷和芦丁含量在始蕾期和盛花期极低,原花青素 A2 和 3 种原花青素三聚体含量在末蕾期

较高。因此,发育状态可作为判断南京椴花中次级代谢物含量的重要因素,后续可借助转录组学揭示有效成分的生物合成途径,筛选南京椴花中药理活性成分调控基因并验证其功能。

参考文献:

[1] WU Z Y, RAVEN P H, HONG D Y, *et al.* Flora of China [M]. Beijing: Science Press, 2013.

[2] 史锋厚, 卢芳, 沈永宝, 等. 椴树属植物研究进展[J]. 林业科技开发, 2006, 20(1): 12-15.

SHI F H, LU F, SHEN Y B, *et al.* Research progress of *Tilia* plants[J]. *Journal of Forestry Engineering*, 2006, 20(1): 12-15.

[3] ZIAJA M, PAWŁOWSKA K A, JÓZEFczyk K, *et al.* UH-PLC-DAD-MS/MS analysis of extracts from linden flowers (*Tiliae flos*): Differences in the chemical composition between five *Tilia* species growing in Europe[J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, 154: 112691.

[4] DÉNES A, PAPP N, BABAI D, *et al.* Wild plants used for food by Hungarian ethnic groups living in the carpathian basin [J]. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 2012, 81(4): 381-396.

[5] KARIOTI A, CHIARABINI L, ALACHKAR A, *et al.* HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS analyses of *Tiliae flos* and its preparations [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 100: 205-214.

[6] FREZZA C, DE VITA D, SPINACI G, *et al.* Secondary metabolites of *Tilia tomentosa* Moench inflorescences collected in Central Italy: Chemotaxonomy relevance and phytochemical rationale of traditional use[J]. *Natural Product Research*, 2020, 34(8): 1167-1174.

[7] MITIC M, JANKOVIC S, MITIC S, *et al.* Optimization and kinetic modelling of total phenols and flavonoids extraction from *Tilia cordata* M. flowers[J]. *South African Journal of Chemistry*, 2021, 75: 64-72.

[8] FAWZY G, YOUNES K, WAKED E, *et al.* Anti-inflammatory, antinociceptive and nephroprotective activities of *Tilia cordata* and isolation of bioactive compounds[J]. *Journal of Materials and Environmental Science*, 2018, 9(6): 1908-1914.

[9] RUSZNYÁK S, SZENT-GYÖRGYI A. Vitamin P: Flavonols as vitamins[J]. *Nature*, 1936, 138: 27.

[10] ROMAGNOLO D F, SELMIN O I. Flavonoids and cancer prevention: A review of the evidence[J]. *Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics*, 2012, 31(3): 206-238.

[11] WEN K M, FANG X C, YANG J L, *et al.* Recent research on flavonoids and their biomedical applications[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2021, 28(5): 1042-1066.

[12] ZHANG B, DENG Z Y, RAMDATH D D, *et al.* Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase[J]. *Food Chemistry*, 2015, 172: 862-872.

[13] LANDI M, TATTINI M, GOULD K S. Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2015, 119: 4-17.

[14] SZÜCS Z, CZIÁKY Z, KISS-SZIKSZAI A, *et al.* Comparative metabolomics of *Tilia platyphyllos* Scop. bracts during phenological development[J]. *Phytochemistry*, 2019, 167: 112084.

[15] 刘江. 八角茴香中莽草酸的快速制备及其波谱检测[J]. 粮食科技与经济, 2012, 37(2): 26-27.

LIU J. The rapid preparation and spectrum detection of shikimic acid from *Illicium verum* [J]. *Grain Science and Technology and Economy*, 2012, 37(2): 26-27.

[16] CHÁVEZ-MORALES Y, JIMÉNEZ-FERRER E, MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ G B, *et al.* Effect of standardized fractions and tiliroside from leaves of *Tilia americana* on depression tests in mice[J]. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 2019, 18(4): 1931-1946.

[17] LI Y Y, SONG Y Y, LIU C H, *et al.* Simultaneous determination of esculin and its metabolite esculetin in rat plasma by LC-ESI-MS/MS and its application in pharmacokinetic study[J]. *Journal of Chromatography B*, 2012, 907: 27-33.

[18] TEEARU A, VAHUR S, HALJASORG U, *et al.* 2, 5-dihydroxybenzoic acid solution in MALDI-MS: Ageing and use for mass calibration[J]. *Journal of Mass Spectrometry: JMS*, 2014, 49(10): 970-979.

[19] HALL A M, BASKIYAR S, HECK K L, *et al.* Investigation of the chemical composition of antibacterial *Psidium guajava* extract and partitions against foodborne pathogens [J]. *Food Chemistry*, 2023, 403: 134400.

[20] 赵珊, 仲伶俐, 周虹, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法鉴定和分析稻米中酚酸类化合物的组成及分布[J]. 中国农业科学, 2020, 53(3): 612-631.

ZHAO S, ZHONG L L, ZHOU H, *et al.* Identification and analysis of phenolic acids in rice using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(3): 612-631.

[21] CITTAN M, ALTUNTAŞ E, ÇELİK A. Evaluation of antioxidant capacities and phenolic profiles in *Tilia cordata* fruit extracts: A comparative study to determine the efficien-

- cy of traditional hot water infusion method[J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 122: 553-558.
- [22] WANG X Y, QIAN Y X, LI X, *et al.* Rapid determination of rosmarinic acid and its two bioactive metabolites in the plasma of rats by LC-MS/MS and application to a pharmacokinetics study[J]. *Biomedical Chromatography*, 2021, 35 (2): e4984.
- [23] PAVLOVIĆ T, DIMKIĆ I, ANDRIĆ S, *et al.* Linden tea from Serbia: An insight into the phenolic profile, radical scavenging and antimicrobial activities[J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, 154: 112639.
- [24] DAI J K, CAO D, LI C H, *et al.* Three new bioactive flavonoid glycosides from *Viscum album* [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2019, 17(7): 545-550.
- [25] VUKICS V, GUTTMAN A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2010, 29(1): 1-16.
- [26] IERI F, INNOCENTI M, POSSIERI L, *et al.* Phenolic composition of bud extracts of *Ribes nigrum* L., *Rosa canina* L. and *Tilia tomentosa* M. [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, 115: 1-9.
- [27] WANG Y Q, JIAO J J, YANG Y Z, *et al.* Screening and identification for immunological active components from *Andrographis herba* using macrophage biospecific extraction coupled with UPLC/Q-TOF-MS[J]. *Molecules*, 2018, 23 (5): 1047.
- [28] CHEN S, LIU J, DONG G Q, *et al.* Flavonoids and caffeoylquinic acids in *Chrysanthemum morifolium* Ramat flowers: A potentially rich source of bioactive compounds[J]. *Food Chemistry*, 2021, 344: 128733.
- [29] ZENG X, ZHENG Y Y, HE Y, *et al.* Microbial metabolism of naringin and the impact on antioxidant capacity[J]. *Nutrients*, 2022, 14(18): 3765.
- [30] LEHNER T B, SIEGMUND B. The impact of ventilation during postharvest ripening on the development of flavour compounds and sensory quality of mangoes (*Mangifera indica* L.) cv. Kent[J]. *Food Chemistry*, 2020, 320: 126608.
- [31] LIANG Z J, ZHANG P Z, FANG Z X. Modern technologies for extraction of aroma compounds from fruit peels: A review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(5): 1284-1307.
- [32] TOKER G, ASLAN M, YEŞİLADA E, *et al.* Comparative evaluation of the flavonoid content in officinal tiliae flos and turkish lime species for quality assessment[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001, 26 (1): 111-121.
- [33] 练冬梅, 姚运法, 洪建基, 等. 不同采收时期和干燥方法对黄秋葵花黄酮的影响[J]. 福建农业科技, 2018(8): 23-25.
- LIAN D M, YAO Y F, HONG J J, *et al.* Effects of different harvest time and drying methods on flavonoids content of okra[J]. *Fujian Agricultural Science and Technology*, 2018(8): 23-25.
- [34] 邵郅胜, 杨波, 朱成, 等. 不同生长阶段欧李叶片酚类物质含量及其抗氧化性[J]. 西北植物学报, 2022, 42(10): 1720-1727.
- SHAO Z S, YANG B, ZHU C, *et al.* Phenolic content and antioxidant activity in leaves of *Cerasus humilis* at different growth stages[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, 42(10): 1720-1727.
- [35] 孔兰, 林榕燕, 林兵, 等. 杂交兰及其花艺突变体中类黄酮成分差异的代谢-转录组联合分析[J]. 西北植物学报, 2023, 43(4): 559-568.
- KONG L, LIN R Y, LIN B, *et al.* Integrated metabolomics and transcriptomics analysis reveals differential flavonoids compounds of *Cymbidium* hybrid and its mutant[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2023, 43 (4): 559-568.
- [36] CZERWIŃSKA M E, DUDEK M K, PAWŁOWSKA K A, *et al.* The influence of procyanidins isolated from small-leaved lime flowers (*Tilia cordata* Mill.) on human neutrophils[J]. *Fitoterapia*, 2018, 127: 115-122.
- [37] LEE B, WEON J B, EOM M R, *et al.* Neuroprotective compounds of *Tilia amurensis* [J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2015, 11(Suppl. 2): 303-307.
- [38] XIONG H J, WANG J, RAN Q, *et al.* Hesperidin: A therapeutic agent for obesity[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2019, 13: 3855-3866.
- [39] ZHANG J W, JIANG H, WU F, *et al.* Neuroprotective effects of hesperetin in regulating microglia polarization after ischemic stroke by inhibiting TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Journal of Healthcare Engineering*, 2021, 2021: 9938874.
- [40] XIE J B, PANG Y S, WU X T. Taxifolin suppresses the malignant progression of gastric cancer by regulating the AhR/CYP1A1 signaling pathway[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2021, 48(5): 197.
- [41] HU Z X, XUAN L N, WU T T, *et al.* Taxifolin attenuates neuroinflammation and microglial pyroptosis via the PI3K/Akt signaling pathway after spinal cord injury[J]. *International Immunopharmacology*, 2023, 114: 109616.
- [42] HU W C, WANG X F, WU L, *et al.* Apigenin-7-O- β -D-glucuronide inhibits LPS-induced inflammation through the inactivation of AP-1 and MAPK signaling pathways in RAW 264. 7 macrophages and protects mice against endotoxin shock[J]. *Food & Function*, 2016, 7(2): 1002-1013.