

基于 UPLC-MS/MS 的油茶种仁成分差异分析 及其油脂抗氧化活性研究

王 溢, 黄润生, 程俊森, 李永泉*, 张庆威, 张 晖

(仲恺农业工程学院 园艺园林学院 广州 510225)

摘要 为研究油茶种仁的主要代谢成分, 分析高州油茶和普通油茶内种仁成分差异, 比较 2 种油茶种仁油脂的抗氧化活性。采用超高效液相色谱-串联质谱广泛靶向代谢组技术, 通过聚类分析、样本相关性分析和正交偏最小二乘判别分析等方法, 比较相同生境下高州油茶和普通油茶内种仁的代谢物质成分的异同, 最后以索氏提取法提取种仁油脂, 比较油脂抗氧化活性差异。结果表明: 从 2 种油茶种仁中共检出 11 类 536 种代谢物, 其中高州油茶种仁特有代谢物 25 种, 普通油茶种仁特有代谢物 16 种。2 种油茶种仁筛选得到差异代谢物 197 种, 占总代谢物的 36.75%, 其中高州油茶种仁相对普通油茶种仁有 103 种代谢物含量较高, 占总差异代谢物 52.28%, 94 种成分含量较低, 占总差异代谢物 47.72%; 197 种差异代谢物主要分布在 20 条代谢途径中, 前 4 条通路分别是黄酮生物合成通路、苯丙烷生物合成通路、酪氨酸代谢通路和花青素生物合成通路。两种油茶种仁油脂的抗氧化活性: 高州油茶茶籽油的 DPPH 自由基清除率在油脂质量浓度大于 6.0 mg/mL 时略高于普通油茶, 且当油脂质量浓度超过 0.4 mg/mL 时, 高州油茶茶油的羟基清除率略高于普通油茶。高州油茶种仁含有丰富的黄酮类和酚酸类化合物, 且脂质的种类与含量比普通油茶种仁丰富。油茶种仁的代谢物差异可能是影响两种茶油成分、抗氧化活性不同的关键因素。

关键词 油茶种仁; 差异代谢物; 高州油茶; 普通油茶; 种仁油脂; 抗氧化活性

文章编号 1009-7848(2023)08-0329-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.08.033

油茶是我国特有的木本油料树种。油茶的种类很多, 普通油茶 (*Camellia oleifera*) 和华南地区本土的高州油茶 (*Camellia drupifera*) 是最具代表性的种类。我国普通油茶的种植面积和产量均居世界第一, 主要分布于湖南、江西、福建、广西和浙江等省^[1-2]。高州油茶, 果实较大, 果皮较厚, 又称大果油茶、华南油茶, 主要分布于广东、海南、云南文山、广西柳州等华南地区, 是培育果大、皮薄和高产油茶新品种的重要种质资源^[3-4]。油茶种仁是含油率最高的部位, 富含脂质、蛋白质、淀粉、茶皂素、酚类、甾醇和磷脂等物质^[5-6]。在油茶种子成熟过程中脂质含量增长最快, 包括油酸、亚油酸、亚麻酸等不饱和脂肪酸^[7-9]。研究表明, 高州油茶种仁的主要生物活性物质 α -生育酚、总酚、角鲨烯和 β -谷甾醇含量范围分别为 11.70~30.00 mg/100 g, 3.69~17.05, 107.0~695.6, 286.5~750.3 mg/kg^[10]。普通油茶的茶籽油中脂肪酸主要由油酸、亚油酸、

棕榈酸和硬脂酸组成, 其中油酸的质量分数高达 79.60%~86.73%, 亚油酸质量分数为 1.68%~9.49%, 棕榈酸的质量分数为 6.94%~11.30%, 硬脂酸质量分数为 1.25%~3.09%^[11]。种仁是提取油脂的部位, 研究高州油茶和普通油茶的种仁成分对于解析不同油茶品种茶油品质差异具有重要的生物学意义。

植物代谢组学是研究植物器官或组织所有小分子代谢物(氨基酸、糖醇类化合物、脂类等)在不同生长环境、时期以及外界刺激下的代谢应答变化规律的科学, 属于系统生物学的重要组成部分^[12-14]。基于 UPLC-MS/MS 技术的代谢组学可对生物体在某一特定生理时期所有代谢物进行定性、定量分析, 直接反映生物体在该生理时期的生长状态, 是解析农产品品质^[12]、分析品种特殊成分^[13]和鉴定农作物产地^[14]的重要手段。Zhang 等^[15]基于代谢组学对华金和华硕两个主栽油茶品种进行油脂成分及含油率的比较, 结果表明: 华金种子积累油脂的时间比华硕早, 种仁中不饱和脂肪酸含量以华金较高。杨颖等^[16]利用 GC-MS 对不同产区(广东高州、广东阳春、广东揭阳)高州油茶种仁

收稿日期: 2022-08-19

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目(2020B020215003)

第一作者: 王溢, 男, 博士, 讲师

通信作者: 李永泉 E-mail: yongquanli@zhku.edu.cn

油脂成分及含量进行分析,发现高州油茶因不同栽植地区地理因素(经纬度、海拔、年均气温和年均降水)差异,其油脂含量及成分均不同,其中含油率以高州地区最高,阳春地区最低。陈亨业等^[17]发现树龄高的高州油茶种子含油率最高,且果实含油率随果实采摘时间的延长而升高,然而不饱和脂肪酸含量变化不显著。为揭示高州油茶与普通油茶果实性状差异的关键代谢物及其分子机制,本文以2种油茶果实的种仁为研究材料,利用广泛靶向代谢组学方法鉴定种仁代谢物种类,从差异代谢物的角度分析种仁内含物差异,为普通油茶和高州油茶种仁中营养成分和功能研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试材料来自广东省惠州市丰基油茶科技有限公司油茶资源圃的高州油茶和湘林1号(普通油茶),于2020年10-11月果实成熟期采摘,每个品种随机选择3棵盛果期单株,每株采集树冠中上部成熟果实,去除果蒲。成熟的高州油茶和普通油茶果实与种仁形态如图1所示,将普通油茶和高州油茶果实的种仁分别装入冻存管中,标记为PTI-1、PTI-2、PTI-3、GZI-1、GZI-2和GZI-3,迅速放入液氮中并保存在-80℃超低温冰箱中备用。



图1 普通油茶(左)和高州油茶(右)果实与种仁形态
Fig.1 The fruit and kernel morphology of *Camellia oleifera* (left) and *Camellia drupifera* (right)

吡啶(纯度 $\geq 99.9\%$)、甲醇(均为色谱纯级),美国Fisher公司;甲氧基胺盐酸盐(纯度98%)、

N,O-双(三甲基硅)三氟乙酰胺【*N,O*-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, BSTFA】(含1%三甲基氯硅烷)麦克林试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

7890A/5975C GC-MS联用仪、HP-5ms色谱柱(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m)、Agilent LC-C18色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m)美国Agilent公司;HWS-系列电热恒温水浴锅;全波长酶标仪,美国MD SpectraMax 190;MTN-2800D氮吹浓缩装置,天津奥特赛恩斯仪器有限公司;恒温箱,上海森信实验仪器有限公司;Freezone 7948030真空冷冻干燥机,美国Labconco公司;TGL-16B台式离心机,上海安亭科学仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 油茶种仁样品预处理 代谢物提取参照Yang等^[18]的步骤并加以改进。分别取2g油茶种仁样品于冻干机(Scientz-100F)中真空冷冻干燥,然后转移至研磨机中研磨成粉末;准确称取100mg的粉末,溶解于1.2 mL 70%甲醇提取液中;溶解后的样品4℃冰箱过夜,期间涡旋6次,提高提取率;离心(转速12 000 r/min, 10 min)后,吸取上清,用微孔滤膜(0.22 μ m pore size)过滤样品,并保存于进样瓶中,用于UPLC-MS/MS分析。

1.3.2 色谱质谱采集条件 数据采集仪器系统主要包括超高效液相色谱(Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC)(SHIMADZU Nexera X2, <https://www.shimadzu.com.cn/>)和串联质谱(Tandem mass spectrometry, MS/MS)。

1) 液相条件 色谱柱为Agilent SB-C18(1.8 μ m, 2.1 mm \times 100 mm);流动相A相为超纯水(加入0.1%的甲酸),B相为乙腈(加入0.1%的甲酸);洗脱梯度:0.00 min, B相比比例为5%;9.00 min内B相比比例线性增加到95%,并维持在95% 1 min;10.00~11.10 min, B相比比例降为5%,并以5%平衡至14 min;流速0.35 mL/min;柱温40℃;进样量4 μ L。

2) 质谱条件 电喷雾离子源(Electrospray ionization, ESI)温度550℃,质谱电压5 500 V(正模式)/-4 500 V(负模式),帘气(Curtain gas, CUR)172.4 kPa,碰撞诱导电离(Collision-activated dissociation, CAD)参数设置为高。在三重四级杆

(QQQ) 中, 每个离子对是根据优化的去簇电压 (Declustering potential, DP) 和碰撞能 (Collision energy, CE) 进行扫描检测。

1.4 种仁油脂提取及其抗氧化活性测定

种仁油脂的提取参照索氏提取法^[19]: 取 100 g 样品, 装入滤纸筒中, 取 50 mL 石油醚 (30~60 ℃), 于 80 ℃ 提取 3 h, 收集石油醚, 减压浓缩后, 于 105 ℃ 干燥至恒重。DPPH 自由基和羟自由基清除率试验参照文献[20-21]方法进行。

1.5 数据处理

数据的特征峰提取和预处理在 R 软件平台采用 XCMS 软件包条件下进行, 将处理的数据矩阵导入 SIMCA-P 软件, 进行主成分分析 (Principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘-判别分析 (Orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 等多元统计分析, 再根据变量对分组贡献值 (Variable importance in the projection, VIP) 的大小和组间变化的显著性 ($P < 0.05$) 进行差异性代谢产物的筛选。

2 结果与分析

2.1 油茶种仁代谢组成分总体分析

高州油茶和“湘林 1 号”种仁分别进行 3 次生物学重复试验, 根据保留时间及质荷比 (m/z), 采用 Progenesis QI 代谢处理软件基于公共数据库 (<http://www.hmdb.ca/> 和 <http://www.lipidmaps.org/>) 及武汉迈特维尔生物科技有限公司自建数据库进行定性和定量分析。在高州油茶和普通油茶种仁中共检测出 11 类 536 种代谢物, 其中高州油茶种仁特有的代谢物有 8 类 25 种, 普通油茶种仁特有的代谢物有 6 类 16 种 (表 1)。

2.2 高州油茶和普通油茶种仁代谢组学差异分析

2.2.1 PCA 分析 为了分析 2 个油茶种仁之间的总体代谢差异和组内之间的变异度大小, 采用主成分分析 (Principal component analysis, PCA) 研究各组之间代谢组的分离趋势 (图 2)。结果显示, 2 个主成分 PC1 和 PC2 分别占比 63.79% 和 16.1%, 其和大于 50%, 说明该 PCA 图结果可靠, 且 2 组样本在二维图上表现出明显的分离趋势,

高州油茶和普通油茶种仁的数据点在得分图上可以明显区分, 组内间高州油茶种仁的分离大于普通油茶种仁。PCA 结果表明高州油茶和普通油茶样品中的代谢物种类及表达量存在明显差异, 能够从总体上反映出 2 组样品之间的代谢物差异。

2.2.2 OPLS-DA 分析 通过 OPLS-DA 模型对 536 种代谢物数据进行分析, 普通油茶种仁样品分布在置信区间右侧, 高州油茶种仁样品分布在置信区间左侧 (图 3), 2 组样品的区分效果明显。由 OPLS-DA 验证图 (图 4) 可发现, 在该模型中得到 2 个主成分, 分别为 R^2X 和 R^2Y , 其值分别为 0.798 和 1.000, 同时 $Q^2=0.974$, R^2 和 Q^2 均大于 0.5, 说明该模型拟合效果好。同时, R^2 与 Q^2 的 P 值均小于 0.005, 且 R^2 与 Q^2 的差小于 0.300, 说明此次置换检验中, 200 次随机排列试验中仅有 1 个随机分组模型结果优于本 OPLS-DA 模型, 说明模型有意义, 可根据 VIP 值分析筛选其差异代谢物。

2.3 高州油茶与普通油茶种仁的差异代谢物鉴定与分析

2.3.1 差异表达代谢物的筛选与鉴定 结合 OPLS-DA 模型的 VIP 值 (阈值 >1), 以差异倍数 ≥ 2.00 倍或 ≤ 0.50 倍且 P 值 ≤ 0.05 为标准筛选差异表达代谢物, 筛选出 197 个差异表达代谢物, 并绘制差异代谢物聚类热图 (图 5)。与普通油茶种仁代谢物相比, 高州油茶种仁代谢物下调 94 个, 即相对含量降低, 占总差异代谢物的 47.72%; 高州油茶种仁代谢物相较于普通油茶种仁代谢物上调 103 个, 即相对含量升高, 占总差异代谢物的 52.28%。根据物质分类, 高州油茶和普通油茶中的 197 个差异代谢物质可划分为黄酮类、脂质类、酚酸类、有机酸类、萜类、鞣质、生物碱类、氨基酸及其衍生物、木脂素和香豆素、核苷酸及其衍生物等 (图 5)。油茶种仁差异代谢物主要是黄酮类、酚酸类、脂质和有机酸等, 从定性定量结果中计算同一类别物质中发生差异表达的代谢物所占比例 (表 1), 发现 62.16% 的黄酮类化合物、51.81% 的酚酸类和 62.5% 的鞣质在高州油茶和普通油茶种仁差异表达, 表明黄酮类、酚酸类和鞣质可能是影响高州油茶和普通油茶种仁性状的关键因素。

表 1 油茶种仁差异代谢物分类

Table 1 Classification of differential metabolites between two <i>Camellia</i> kernel samples		普通油茶种仁特有代谢物		高州油茶种仁特有代谢物	
类别	总数	差异代谢物数目	物所占比/%	差异代谢物数目	物所占比/%
黄酮类化合物	111	69	62.16	10【木犀草苷、柠檬素-3-O-阿拉伯糖苷、槲皮素-3-O-(2''-没食子酰)-阿拉伯糖苷、香叶木苷、牵牛花素-3-O-葡萄糖苷*】	3(牡蛎黄素、飞燕草素 3-q-葡萄糖苷、柚皮苷*)
酚酸类	83	43	51.81	8(对香豆酸、新绿原酸、咖啡酰烟酰酒石酸、1,3-三角酸、阿魏酰阿魏酰酒石酸、芥子酰-P-香豆酰氨基酸、阿魏酰芥子酰酒石酸、芥子酰芥子酰酒石酸)	6(对香豆醛、香草酸、苯甲酰苹果酸、丁香醛-葡萄糖苷、香草酰咖啡酰酒石酸、3,6'-二芥子酰基蔗糖)
脂质	66	17	25.76	1【PE(18:3/18:3+O ₃)】	2(抗坏血酸、对香豆酸-白藜芦醇苷)
其它类	51	11	21.57	1(杜鹃花醇)	1(邻氨基苯甲酸甲酯)
有机酸	41	8	19.51	1(对羟基苯甲醛)	-
核苷酸及其衍生物	36	6	16.67	1(5-尿嘧啶核苷酸)	-
氨基酸及其衍生物	33	9	27.27	-	2(N-苯乙酰甘氨酸、N-乙酰-L-酪氨酸)
鞣质	32	20	62.50	2(木麻黄鞣质、木麻黄鞣宁)	2(木麻黄鞣质、肉桂单宁 B2)
生物碱	25	3	12.00	-	-
木脂素和香豆素	14	7	50.00	1(5-甲氧基罗汉松脂苷)	-
萜类	11	4	36.36	-	-
总计	536	197	25	25	16

注:其它类包括萜类、糖及醇类、维生素等; *表示同分异构体。

2.3.2 主要差异代谢成分分析 比较“湘林 1 号”和高州油茶种仁中代谢物定量信息的差异倍数变化,将差异倍数进行对数处理(\log_2FC),将变化排在前的 20 种差异代谢物列于如图 6 中。与普通油茶相比,高州油茶种仁中有 3 种酚酸类化合物(新绿原酸、咖啡酰烟酰酒石酸、1,3-三角酸)、5 种黄酮类化合物【木犀草苷、矢车菊素-3-O-(6-O-(E)-对香豆酰-葡萄糖苷)-5-O-葡萄糖苷、香叶木苷、槲皮素-3-O-(2''-没食子酰)-阿拉伯糖苷、山奈酚-3-O-葡萄糖基-(6→1)-2'''',3'''-O-二乙酰

基- α -L-鼠李糖基-(4→1)- α -L-鼠李糖苷]、1 种鞣质(木麻黄鞣亭)和 1 种木脂素和香豆素(5'-甲氧基罗汉松脂苷)相对含量显著增加;同时,3 种酚酸类化合物(苯甲酰苹果酸、丁香醛-葡萄糖苷、对香豆醛)、2 种黄酮类化合物(飞燕草素 3-O-葡萄糖苷、柚皮苷*)、2 种鞣质(肉桂单宁 B2、木麻黄鞣质)、2 种木脂素和香豆素(杜仲树脂酚乙酰葡萄糖、松脂醇-乙酰葡萄糖)和 1 种芪类化合物(对香豆酸-白藜芦醇苷)相对含量显著下降。

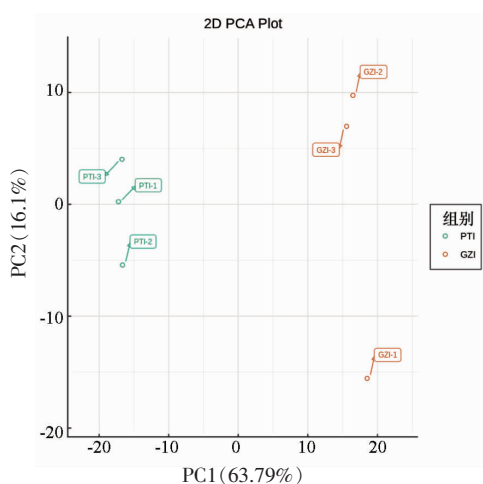


图 2 2 个油茶品种种仁的 PCA 得分图

Fig.2 PCA scores plot of two *Camellia* kernel samples

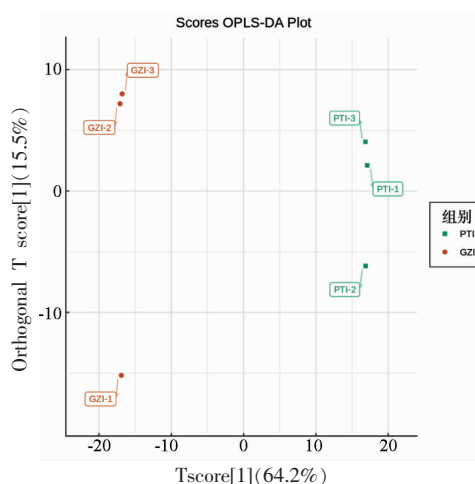


图 3 2 个油茶品种种仁的 OPLS-DA 得分图

Fig.3 OPLS-DA scores plot of two *Camellia* kernel samples

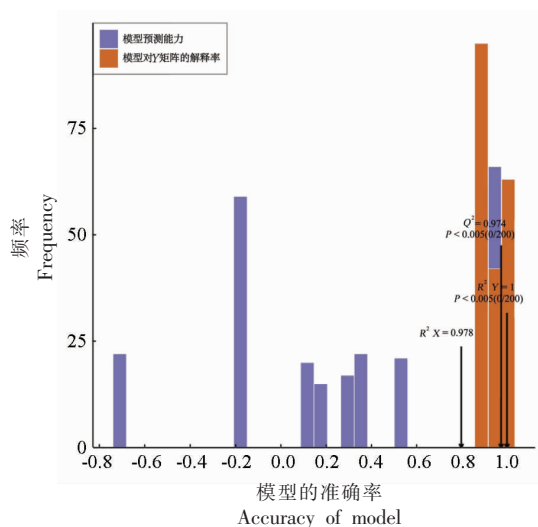


图 4 2 个油茶品种种仁的 OPLS-DA 验证图

Fig.4 OPLS-DA permutation test of two *Camellia* kernel samples

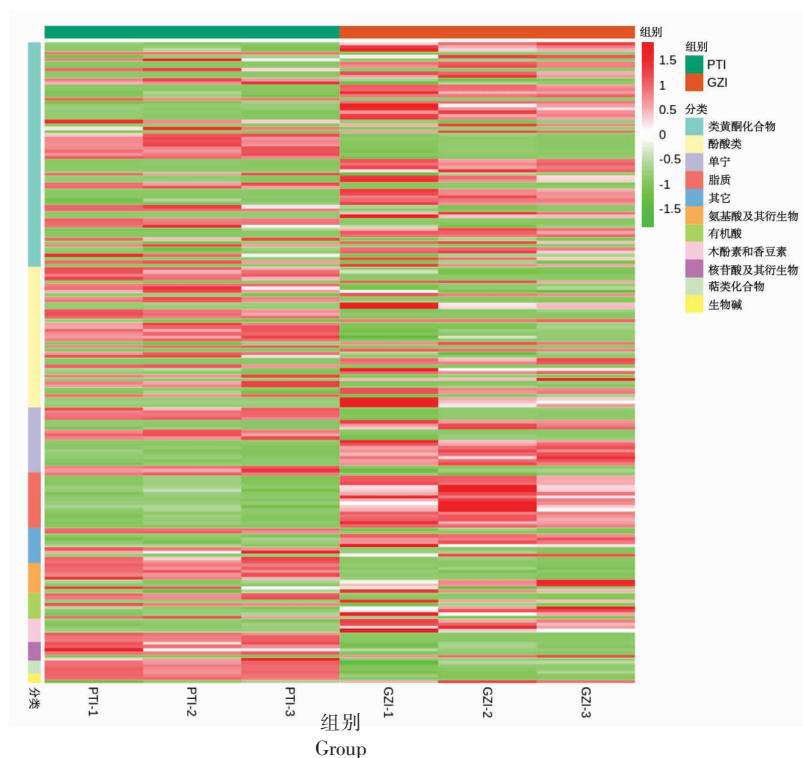
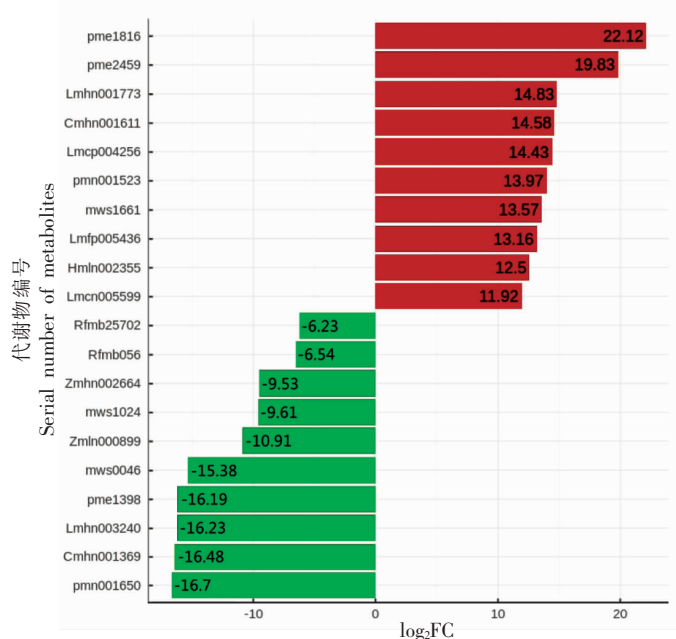


图5 2个油茶种仁样品中差异代谢物聚类热图

Fig.5 Clustering heatmap of differential accumulation metabolites in two *Camellia* kernel samples

注:纵轴编号表示代谢物的序号;高州油茶种仁中上调的前10种差异代谢物:pm1816. 新绿原酸,pme2459. 木犀草素-7-O-葡萄糖苷(木犀草苷),Lmhn001773. 咖啡酰烟酰酒石酸,Cmhn001611. 木麻黄鞣亭,Lmcp004256. 矢车菊素-3-O-[6-O-(E)-对香豆酰-葡萄糖苷]-5-O-葡萄糖苷,pmn001523. 1,3-三角酸,mws1661. 香叶木苷,Lmfp005436. 槲皮素-3-O-(2''-没食子酰)-阿拉伯糖苷,Hmln002355. 5'-甲氧基罗汉松脂苷,Lmcn005599. 山奈酚-3-O-葡萄糖基-(6→1)-2'''',3'''-O-二乙酰基-α-L-鼠李糖基-(4→1)-α-L-鼠李糖苷;高州油茶种仁中下调的前10种差异代谢物:Rfmb25702. 松脂醇-乙酰葡萄糖,Rfmb056. 杜仲树脂酚乙酰葡萄糖,Zmhn002664. 对香豆酸-白藜芦醇苷,mws1024. 对香豆酰,Zmln000899. 丁香醛-葡萄糖苷,mws0046. 柚皮素-7-O-新橙皮糖苷(柚皮苷)*,pme1398. 飞燕草素3-O-葡萄糖苷,Lmhn003240. 苯甲酰苹果酸,Cmhn001369. 木麻黄鞣质,pmn001650. 肉桂单宁B2.

图6 2个油茶品种种仁log₂FC的20种含量差异最大的代谢物Fig.6 Top 20 differential accumulation metabolites in two *Camellia* kernels based on their log₂FC

2.3.3 两种油茶种仁脂质类化合物差异分析 为了比较普通油茶和高州油茶脂质代谢物的差异,197 个差异表达代谢物中包含 17 个脂质类化合物,其差异倍数与物种名称如表 2 所示。相对于普通油茶,高州油茶种仁中含有更多的溶血磷脂酰乙醇胺 17:1(2n 异构)(4.77 倍)、溶血磷脂酰乙醇胺 18:0 (2.23 倍)、溶血磷脂酰乙醇胺 18:1(2.85 倍)、溶血磷脂酰乙醇胺 18:2(4.16 倍)、溶血磷脂酰乙醇胺 18:3(3.02 倍)、溶血磷脂酰乙醇胺 20:2 (4.64 倍)、溶血磷脂酰乙醇胺 20:3(6.00 倍)、溶血磷脂酰乙醇胺 20:4(3.12 倍)、溶血磷脂酰胆碱 15:0(2.21 倍)、溶血磷脂酰胆碱 17:0(2.72 倍)、溶血磷脂酰胆碱 18:4(2.43 倍),分别属于溶血磷脂酰乙醇胺和溶血磷脂酰胆碱。为方便观察脂质类化合物在普通油茶和高州油茶中的变化规律,对差异显著的 17 种脂质类化合物进行归一化处理,并绘制聚类热图,结果如图 7 所示。相对于普通油茶,高州油茶种仁中脂质类化合物含量丰富,15 种脂质类化合物在高州油茶中的含量显著高于普通油茶,仅有 2 种脂质类化合物在高州油茶中的含量下降。

2.4 差异代谢物通路分析

通过 KEGG 数据库对鉴定出的 197 种差异代谢物进行通路富集分析,结果如图 8 所示,197 种差异代谢物主要富集在 20 条代谢通路中,差异代谢物种类富集最多的前 4 条通路:1) 黄酮生物合成通路,主要包括表阿夫儿茶精、山奈酚、圣草酚、儿茶素、二氢槲皮素、柚皮苷*、新橙皮苷等 7 种差异代谢物;2) 苯丙烷生物合成通路,主要包括对香豆醛、对-香豆醇、咖啡酸、芥子醛、松柏苷等 5 种差异代谢物;3) 酪氨酸代谢通路,主要包含酪胺、对羟基苯乙酸、3,4-二羟基苯乙酸、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸等 4 种差异代谢物;4) 花青素生物合成通路,主要包含飞燕草素 3-O-葡萄糖苷、天竺葵素-3-O-芸香糖苷、矢车菊素 3-O-芸香糖苷、飞燕草素-3-O-(6''-对香豆酰葡萄糖苷)等 4 种差异代谢物。前 4 条代谢通路分别是黄酮生物合成、苯丙烷生物合成、酪氨酸代谢和花青素生物合成,分别包括代谢物 7 种 (3.55%)、5 种 (2.54%)、4 种(2.03%)和 4 种(2.03%)。

表 2 2 个油茶品种种仁显著差异的脂质代谢物
Table 2 Significantly differential lipid metabolites in seed kernels of two *Camellia* varieties

物质名称	差异倍数
PE(18:3/18:3+O ₃)	2 386.70
溶血磷脂酰乙醇胺 20:2	4.64
溶血磷脂酰乙醇胺 20:4	3.12
溶血磷脂酰胆碱 17:0	2.72
溶血磷脂酰乙醇胺 20:3	6.00
溶血磷脂酰乙醇胺 18:0	2.23
2,3-二羟基丙基-9,12-十八碳二酸酯-葡萄糖苷-葡萄糖苷	3.43
溶血磷脂酰乙醇胺 17:1(2n 异构)	4.77
溶血磷脂酰胆碱 15:0	2.21
溶血磷脂酰胆碱 18:4	2.43
PC(oxo-11:0/18:2)	3.77
PE(oxo-11:0/16:0)	20.96
9,10,13-三羟基-11-十八二烯酸	0.39
1-(9Z-十八烯酰基)-2-(9-氧-壬酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱	3.47
溶血磷脂酰乙醇胺 18:2	4.16
溶血磷脂酰乙醇胺 18:1	2.85
溶血磷脂酰乙醇胺 18:3	3.02

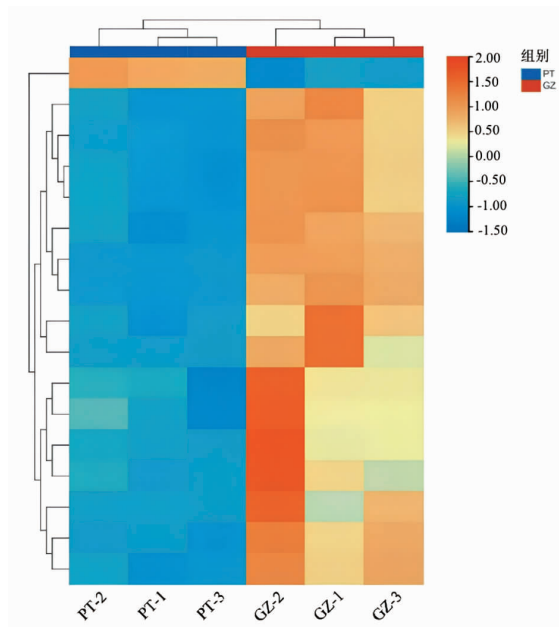


图 7 2 个油茶品种种仁差异脂质代谢物聚类热图
Fig.7 Hierarchical clustering of differential lipid metabolites in seed kernels of two *Camellia* varieties

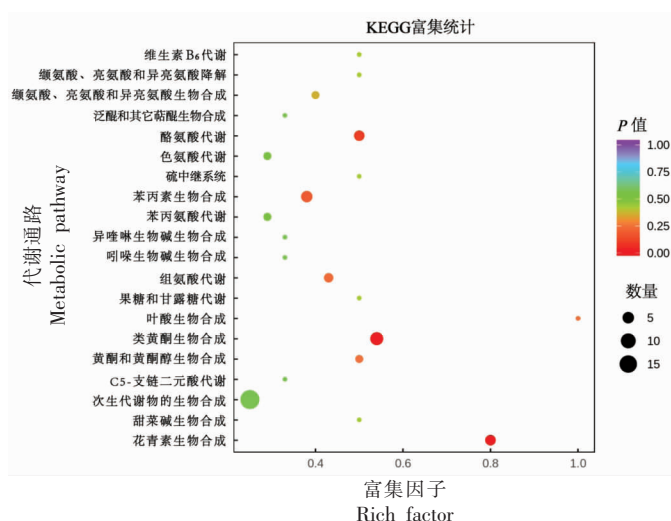


图 8 2 个油茶种仁差异代谢物所在 KEGG 通路富集

Fig.8 KEGG enrichment bubble plot of differential expressed metabolites in two *Camellia* kernels

2.5 高州油茶和普通油茶种仁油脂抗氧化活性比较

高州油茶与普通油茶种仁油脂中 DPPH 自由基清除率均随着茶油质量浓度的升高而升高,在油脂质量浓度小于 4.0 mg/mL 时两者相差无明显,而高州油茶种仁油的 DPPH 自由基清除率在油脂质量浓度大于 6.0 mg/mL 时高于普通油茶(图 9)。当茶油质量浓度为 6.0 mg/mL 时,高州油茶茶油对 DPPH 自由基的清除率达到 85.19%, 而普通油茶

的清除率为 81.92%(图 9)。羟自由基清除率是反应物质抗氧化作用的重要指标。当茶油质量浓度在 0.1~0.2 mg/mL 时,油茶种仁羟自由基清除率基本与对照组(VC)相同;茶油质量浓度在 0.2~0.4 mg/mL 时,两种油茶茶籽油的羟自由基清除率低于对照组,不同品种油茶种仁之间的羟自由基清除率差异不明显(图 10)。当油脂质量浓度超过 0.4 mg/mL 时,高州油茶茶油的羟基清除率略高于普通油茶,分别为 69.48%和 67.29%(图 10)。

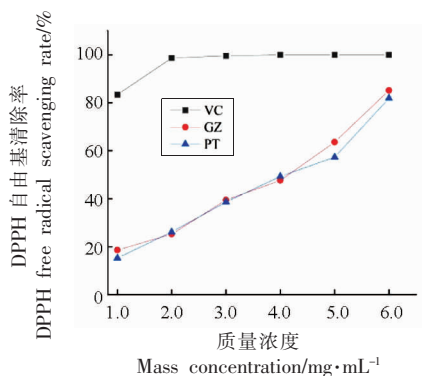


图 9 高州油茶和普通油茶种仁油脂的 DPPH 自由基清除率

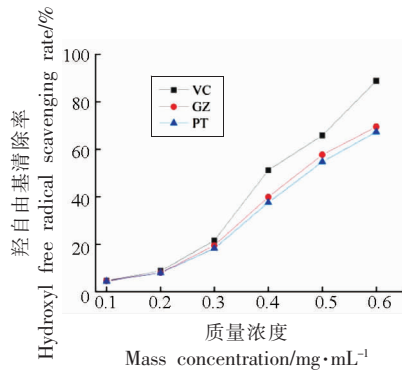
Fig.9 DPPH free radical scavenging rate of kernel oils in *Camellia oleifera* and *Camellia drupifera*

图 10 高州油茶和普通油茶种仁油脂的羟自由基清除率

Fig.10 Hydroxyl free radical scavenging rate of kernel oils in *Camellia oleifera* and *Camellia drupifera*

3 讨论

高州油茶是我国华南地区重要的木本食用油料树种,成熟的高州油茶果实纵径可达 7.48 cm,果实横径可达 8.27 cm,单果籽粒数变动幅度为 1~25 个^[22]。已有研究表明,高州油茶与普通油茶在鲜果重、干果重、果横径、干籽重、果纵径和鲜籽重等果实性状方面存在显著差异^[22-24]。为了探索 2 种油茶果实性状差异产生的分子基础,本研究采用广泛靶向代谢组学手段,以高州油茶和“湘林 1 号”果实种仁为材料,对二者代谢物种类及含量进行对比分析。从 2 种油茶种仁中检测到 536 种代谢物,其中差异代谢成分 11 类 197 种,占总检测到的代谢物总数(11 类 536 种)的 36.75%,其中含量差异较大的代谢物组分分别为酚酸类、黄酮类、鞣质、木脂素与香豆素以及芪类等化合物,表明酚酸类、黄酮类、鞣质、木脂素与香豆素以及芪类等化合物可能与油茶果实性状变异密切相关,是调控油茶果实种仁发育的关键物质。同时差异代谢物富集分析发现,差异代谢物富集最多的前 4 条代谢通路为黄酮生物合成通路、苯丙烷生物合成通路、酪氨酸代谢通路和花青素生物合成通路,表明两种油茶果实种仁可能存在不同的代谢机制,从而影响种仁代谢物的合成并导致油茶果实性状差异。此外,油茶种仁是提取茶籽油的重要部位,不同油茶品种的种仁含油率和茶籽油品质均存在差异^[25-27]。本研究中,相对于普通油茶,高州油茶种仁中脂质类化合物含量丰富,15 种脂质类化合物在高州油茶中的含量显著高于普通油茶,仅有 2 种脂质类化合物在高州油茶中的含量下降。脂质类化合物在植物应答非生物胁迫过程中发挥重要生理功能^[28-29],其中部分脂质类化合物是合成亚油酸的中间物质^[30-31],高州油茶脂肪酸主要组成是油酸、亚油酸、亚麻酸、棕榈酸和硬脂酸^[2],因此高州油茶种仁脂质化合物的差异可能是导致种仁含油率和茶籽油品质不同的原因。

抗氧化活性是评价油脂品质的重要指标,油茶籽油较好的抗氧化能力是其具有保健功能的重要因素^[32-33]。本研究中发现 2 种油茶种仁中富含黄酮类、脂质类、酚酸类、有机酸类、萜类等物质,从而使茶籽油中含有黄酮类、酚酸类、木脂素等化合物。谭传波等^[34]曾报道,鲜榨山茶油中多酚含量

271.6 mg/kg,黄酮含量 157.2 mg/kg,原花青素含量 1.40 mg/g,因此油茶种仁富含生物活性物质可能是茶籽油具有较强抗氧化能力的物质基础。与普通油茶种仁相比,10 种黄酮类和 8 种酚酸类化合物为高州油茶种仁所特有,例如木犀草苷、柚皮苷、香草酸、对香豆酸和新绿原酸等黄酮类^[35-36]和酚酸类物质^[37-39]具有较强的抗氧化、抗炎、抗肿瘤等活性。这些结果与两种油茶种仁油脂的抗氧化活性测试结果基本一致:高州油茶茶籽油的 DPPH 自由基清除率在油脂质量浓度大于 6.0 mg/mL 时高于普通油茶,同时当油脂质量浓度超过 0.4 mg/mL 时,高州油茶茶油的羟基清除率略高于普通油茶,分别为 69.48%和 67.29%。本研究对高州油茶种仁和普通油茶种仁代谢物进行比较,所检测到的物质可为茶籽油品质鉴定、油茶育种及进一步开发利用提供参考。

参 考 文 献

- [1] 奚如春, 邓小梅. 我国油茶产业化发展中的现状、要素及其优化[J]. 经济林研究, 2005, 23(1): 83-87.
XI R C, DENG X M. Industrializing oiltea *Camellia* production in China: Current status, limiting factors and optimal approaches[J]. Non-wood Forest Research, 2005, 23(1): 83-87.
- [2] 郭定荣, 王培娟, 霍治国, 等. 中国普通油茶种植气候适宜性区划[J]. 生态学杂志, 2021, 40(5): 1313-1323.
WU D R, WANG P J, HUO Z G, et al. Climatic suitability regionalization of *Camellia oleifera* Abel. in China[J]. Chinese Journal of Ecology, 2021, 40(5): 1313-1323.
- [3] 庄瑞林. 中国油茶(第 2 版)[M]. 北京: 中国林业出版社, 2008: 78-95.
ZHUANG R L. Chinese camellia oil (Second Edition)[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2008: 78-95.
- [4] ZHANG Y Z, ZHANG L B, WANG J, et al. Rapid determination of the oil and moisture contents in *Camellia gauchowensis* Chang and *Camellia semiserata* Chi seeds kernels by near-infrared reflectance spectroscopy[J]. Molecules, 2018, 23(9): 2332.
- [5] 陈欢, 罗昭标, 冯小艳, 等. 油茶籽油脂肪酸含量、

- 分析检测方法及其分子生物学研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(10): 345-349, 354.
- CHEN H, LUO Z B, FENG X Y, et al. Research progress on fatty acid contents, analytical methods and molecular biology of *Camellia oleifera* seed oil [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(10): 345-349, 354.
- [6] 黄安香, 王忠伟, 杨守禄, 等. 黔产油茶籽油不同制取方法营养成分差异分析及品质评价[J]. 食品工业科技, 2022, 43(7): 294-302.
- HUANG A X, WANG Z W, YANG S L, et al. Difference analysis and quality evaluation of *Camellia oleifera* seed oil produced in Guizhou by different preparation methods[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(7): 294-302.
- [7] 张帆航. 油茶4个主栽品种果实和种子发育比较研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2020.
- ZHANG F H. Comparative study on fruit and seed development of 4 *Camellia oleifera* cultivars [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2020.
- [8] 唐旭晓, 张应中, 王静, 等. GC-MS法结合酸酯化预处理测定不同地区油茶籽油脂脂肪酸含量[J]. 现代食品科技, 2021, 37(12): 286-293.
- TANG X X, ZHANG Y Z, WANG J, et al. Determination of fatty acid content of *Camellia* seeds oil in different regions by GC-MS combined with acid methyl esterification pretreatment [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(12): 286-293.
- [9] 王彦花, 王容, 张云, 等. 基于主成分分析的油茶果经济性状及茶油脂脂肪酸组成[J]. 食品工业科技, 2019, 40(1): 251-255.
- WANG Y H, WANG R, ZHANG Y, et al. Economic indexes of *Camellia oleifera* fruit and fatty acid composition of *Camellia* oil based on principal component analysis [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(1): 251-255.
- [10] 赵君茹, 朱周俊, 肖诗鑫, 等. 15个高州油茶无性系脂肪酸及微量营养成分比较分析[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(11): 102-109.
- ZHAO J R, ZHU Z J, XIAO S X, et al. Comparative analysis of fatty acids and micronutrients in 15 clones of *Camellia gauchowensis* Chang [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2021, 36(11): 102-109.
- [11] 王亚萍, 费学谦, 姚小华, 等. 不同产地油茶籽脂肪酸及甘油三酯的主成分分析和聚类分析[J]. 中国油脂, 2021, 46(9): 112-119.
- WANG Y P, FEI X Q, YAO X H, et al. Principal component analysis and cluster analysis of fatty acids and triglycerides in oil-tea camellia seeds from different origins [J]. China Oils and Fats, 2021, 46(9): 112-119.
- [12] 张舒, 王长远, 冯玉超, 等. 气相色谱-质谱联用代谢组学技术分析不同产地稻米代谢物[J]. 食品科学, 2021, 42(8): 206-213.
- ZHANG S, WANG C Y, FENG Y C, et al. Analysis of metabolites in rice produced in different regions by GC-MS-based metabolomics [J]. Food Science, 2021, 42(8): 206-213.
- [13] 蒋依辉, 朱慧莉, 刘伟, 等. 基于广泛代谢组学的荔枝果肉营养代谢物综合解析[J/OL]. 食品科学, (2021-12-16) [2022-02-19]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=YUk1thMFhg5NBaaRLwi3-ikZ5fzvligRX-2IkXh7Iz8UAh3Cw2E83EaWrXaV-2XPyiK0NwHTxdhBH3qxHTBOeiGc7epcPz7K78Z_fUccHSOPSwMeZ6qfmrR-rCoTWoeq0eKIPuHeVdQ=&uniplatform=NZKPT&language=CHS&version=LYDG.
- JIANG N H, ZHU H L, LIU W, et al. Widely targeted metabolomics analysis of the nutritional profile of litchi pulp [J/OL]. Food Science, (2021-12-16) [2022-02-19]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=YUk1thMFhg5NBaaRLwi3-ikZ5fzvligRX-2IkXh7Iz8UAh3Cw2E83EaWrXaV-2XPyiK0NwHTxdhBH3qxHTBOeiGc7epcPz7K78Z_fUccHSOPSwMeZ6qfmrR-rCoTWoeq0eKIPuHeVdQ=&uniplatform=NZKPT&language=CHS&version=LYDG.
- [14] LIU Z, ZHANG W X, ZHANG Y Z, et al. Assuring food safety and traceability of polished rice from different production regions in China and Southeast Asia using chemometric models [J]. Food Control, 2019, 99: 1-10.
- [15] ZHANG F H, LI Z, ZHOU J Q, et al. Comparative study on fruit development and oil synthesis in two cultivars of *Camellia oleifera* [J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1): 348-348.
- [16] 杨颖, 张鹏, 奚如春, 等. 高州油茶不同产区果实含油率及脂肪酸组成的变异特征[J]. 经济林研究, 2018, 36(4): 104-108, 144.
- YANG Y, ZHANG P, XI R C, et al. Variation characteristics of oil content and fatty acid composition in *Camellia gauchowensis* fruits at different pro-

- ducing areas[J]. Nonwood Forest Research, 2018, 36(4): 104-108, 144.
- [17] 陈亨业, 陈晓园, 梁增瑞, 等. 树龄及采摘时间对高州油茶经济指标及其茶油品质的影响[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(12): 78-81.
- CHEN H Y, CHEN X Y, LIANG Z R, et al. The influences of tree-age and picking time on the economic indexes and the seed oil quality of *Camellia gauchowensis*[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2013, 28(12): 78-81.
- [18] YANG C, HU Z Y, LU M L, et al. Application of metabolomics profiling in the analysis of metabolites and taste quality in different subtypes of white tea[J]. Food Research International, 2018, 106: 909-919.
- [19] 方敏, 丁小霞, 李培武, 等. 索氏抽提测定含油量的方法改良及其应用[J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(2): 210-214.
- FANG M, DING X X, LI P W, et al. Modification of oilseeds soxhlet extraction for determination of oil content[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2012, 34(2): 210-214.
- [20] 杨娜, 王鸿飞, 许凤, 等. 蕨麻多糖提取及抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2014, 14(2): 60-66.
- YANG N, WANG H F, XU F, et al. Study on extraction of polysaccharides and antioxidant activity of *Potentilla ancerina* L. polysaccharide[J]. 2014, 14(2): 60-66.
- [21] LIU L X, SUN Y, LAURA T, et al. Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng[J]. Food Chemistry, 2008, 112(1): 35-41.
- [22] 戚嘉敏, 张鹏, 奚如春, 等. 高州油茶果实性状的遗传变异特征[J]. 中南林业科技大学学报, 2018, 38(4): 108-113.
- QI J M, ZHANG P, XI R C, et al. Genetic variation and correlation analysis of fruit characters of *Camellia gauchowensis* Chang[J]. Journal of Central South University of Forestry and Technology, 38(4): 108-113.
- [23] 戚嘉敏. 高州油茶果实生长发育及主要经济性状特征[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
- QI J M. The fruit growth and main economic characters of *Camellia gauchowensis* Chang[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2018.
- [24] 吕欢欢, 伍岳峰, 李煜, 等. 普通油茶优良无性系果实性状变异分析及选择[J]. 森林与环境学报, 2021, 41(5): 519-526.
- LÜ H H, WU Y F, LI Y, et al. Variation and selection of excellent fruit traits in *Camellia oleifera* clones[J]. Journal of Forest and Environment, 2021, 41(5): 519-526.
- [25] 李海琳, 刘京晶, 朱国华, 等. HPLC法测定“长林”系列油茶籽种仁中2个主要黄酮苷含量[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(12): 124-128.
- LI H L, LIU J J, ZHU G H, et al. Determination of 2 major flavonoid glycosides in *Camellia oleifera* seeds from ‘Chang Lin’ Series by HPLC[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2014, 29(12): 124-128.
- [26] 沈冰, 吴雪辉, 李媛媛, 等. 三种红花茶油品质的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(3): 97-100, 104.
- SHEN B, WU X H, LI Y Y, et al. Study on the quality of three varieties of *Camellia chekiangoleosa* seed oils[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(3): 97-100, 104.
- [27] 田潇潇, 方学智, 孙汉洲, 等. 不同油茶物种及品种果实中甘油三酯成分分析[J]. 林业科学研究, 2018, 31(2): 41-47.
- TIAN X X, FANG X Z, SUN H Z, et al. Analysis of triacylglycerols in different oil-tea *Camellia* cones[J]. Forest Research, 2018, 31(2): 41-47.
- [28] 刘俊羽, 杨帆, 毛爽, 等. 植物脂质应答逆境胁迫生理功能的研究进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(8): 2658-2667.
- LIU J Y, YANG F, MAO S, et al. Advances in the physiological functions of plant lipids in response to stresses[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(8): 2658-2667.
- [29] WANG Y J, ZHANG X Y, HUANG G R, et al. Dynamic changes in membrane lipid composition of leaves of winter wheat seedlings in response to PEG-induced water stress[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 84.
- [30] 夏茂林. 基于脂质代谢研究发芽谷子挥发性物质形成机理[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2021.
- XIA M L. Study on the formation mechanism of volatile substances in germinated foxtail millet based on lipid metabolism[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2021.
- [31] LIU M Y, BURGOS A, MA L F, et al. Lipidomics

- analysis unravels the effect of nitrogen fertilization on lipid metabolism in tea plant (*Camellia sinensis* L.)[J]. BMC Plant Biology, 2017, 17(1): 165.
- [32] LEE C P, YEN G C. Antioxidant activity and bioactive compounds of tea seed (*Camellia oleifera* Abel.) oil [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(3): 779-784.
- [33] 刘晓慧. 油茶籽活性成分抗炎机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- LIU X H. Anti-inflammatory activity mechanisms of bioactive components from seeds of *Camellia oleifera* Abel.[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014.
- [34] 谭传波, 田华, 赖琼玮, 等. 鲜榨山茶油中生物活性物质研究[J]. 粮食与油脂, 2019, 32(11): 19-21.
- TAN C B, TIAN H, LAI Q W, et al. Research on bioactive substances from fresh pressed *Camellia* oil [J]. Cereals and Oils, 2019, 32(11): 19-21.
- [35] 焦兵, 许承婷, 黎青, 等. 油茶枯黄酮类化学成分及其体外抗炎活性[J]. 中成药, 2019, 41(2): 327-333.
- JIAO B, XU C T, LI Q, et al. Chemical constituents of the flavonoids from *Camellia oleifera* and their anti-inflammatory activities *in vitro*[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2019, 41(2): 327-333.
- [36] 侯留鑫, 王华清, 郑铁松, 等. 一种新型茶叶籽黄酮单体的分离鉴定及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2013, 34(21): 115-120.
- HOU L X, WANG H Q, ZHENG T S, et al. Isolation and identification of a new flavonoid from Tea (*Camellia sinensis*) seeds and its antioxidant activity [J]. Food Science, 2013, 34(21): 115-120.
- [37] 陈仕平, 黄燕, 吴磊, 等. 油茶果壳化学成分研究[J]. 生物化工, 2017, 3(6): 21-23.
- CHEN S P, HUANG Y, WU L, et al. Chemical constituents from fruit shells of *Camellia oleifera*[J]. Biological Chemical Engineering, 2017, 3(6): 21-23.
- [38] 罗凡, 费学谦, 方学智, 等. 固相萃取/高效液相色谱法测定茶油中的多种天然酚类物质[J]. 分析测试学报, 2011, 30(6): 696-700.
- LUO F, FEI X Q, FANG X Z, et al. Determination of phenols in *Camellia* oil by high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2011, 30(6): 696-700.
- [39] 陈志杰, 吴嘉琪, 马燕, 等. 植物食品原料中酚酸的生物合成与调控及其生物活性研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(7): 321-328.
- CHEN Z J, WU J Q, MA Y, et al. Biosynthesis, metabolic regulation and bioactivity of phenolic acids in plant food materials[J]. Food Science, 2018, 39(7): 321-328.

Differential Composition Analysis of Seed Kernels between Two *Camellia* Species by UPLC-MS/MS and the Antioxidant Activity Research of Seed Kernels Oil

Wang Yi, Huang Runsheng, Cheng Junsen, Li Yongquan*, Zhang Qingwei, Zhang Hui
(College of Horticulture and Landscape Architecture, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225)

Abstract In order to study the metabolic components of *Camellia oleifera* kernels, and metabolites difference in seed kernel in *Camellia drupifera* and *Camellia oleifera* were explored at the same time, then antioxidant activity of kernels oils in *Camellia drupifera* and *Camellia oleifera* were detected. Broadly targeted metabolomics based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was used to detect differential metabolites between *Camellia drupifera* and *Camellia oleifera*. The metabolites in the kernels of two *Camellia* species were compared via cluster analysis, correlation analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). Finally, the seed kernel oil was extracted by Soxhlet extraction method, and the difference in antioxidant activity of the oil was compared. The results showed that 25 metabolites *Camellia drupifera* owned and 16 metabolites *Camellia oleifera* owned were filtered in the 536 metabolites belonging to 11 classes detected in the kernels of two *Camellia* species. 197 differential metabolites were filtered among the whole 536 metabolites, and made up 36.75%. Among them, 103 metabolites were expressed higher in *Camellia drupifera* than *Camellia oleifera*, which made up 52.28% in total differentially expressed

metabolites; 94 metabolites were expressed in lower levels than *Camellia oleifera*, which made up 47.72% of 197 differential metabolites; These 197 metabolites differentially expressed in two *Camellia* species mainly participated in 20 pathways, flavonoid biosynthesis, phenylpropanoid biosynthesis, tyrosine metabolism and anthocyanin biosynthesis were the pathways occupying top 4 differential metabolites, and there were 7 metabolites (3.55%), 5 metabolites (2.54%), 4 metabolites (2.03%) and 4 metabolites (2.03%), respectively. The variety and content of flavonoids and lipids in *Camellia drupifera* were more abundant than *Camellia oleifera*. The antioxidant activity tests showed that the DPPH free radical scavenging rate of *Camellia drupifera* seed oil was slightly higher than that of *Camellia oleifera* when the oil mass concentration was greater than 6.0 mg/mL, and when the oil mass concentration exceeded 0.4 mg/mL, the hydroxyl clearance rate of *Camellia drupifera* was slightly higher than that of *Camellia oleifera*. The seed kernels of *Camellia drupifera* were rich in flavonoids and phenolic acid compounds, and the types and content of lipids are more abundant than those in *Camellia oleifera* seed kernels. The difference expression metabolites of seed kernels may be the key factor affecting the composition and antioxidant activity of the two types of *Camellia* oil.

Keywords *Camellia* seed kernels; differential metabolites; *Camellia drupifera*; *Camellia oleifera*; seed kernel oil; antioxidant activity