

宁夏不同产地枸杞叶生物碱组成与活性差异

武彧兴, 马瑞雪, 卢 顺, 张惠玲, 范艳丽*

(宁夏大学食品科学与工程学院 银川 750021)

摘要 以宁夏 3 个产地(银川、中宁、固原)“宁杞菜 1 号”枸杞叶为材料,基于植物广泛靶向代谢组技术研究其生物碱组成和体外抗氧化活性差异。结果表明,3 个产地样品的生物碱提取物均具有体外抗氧化活性。其中,对 ABTS⁺的清除能力,中宁(35.4%)>银川(29.6%)>固原(28.9%);对超氧阴离子清除能力,银川(84.8%)>固原(83.9%)>中宁(82.1%);总还原能力中宁(0.46)>固原(0.45)>银川(0.41)。3 个产地共检出 12 类 162 种生物碱代谢物,在差异倍数 ≥ 2 或 ≤ 0.5 , $P < 0.05$,VIP ≥ 1 的筛选条件下,银川和固原比较组中显著变化的生物碱差异代谢物有 53 种(其中上调 21 种,下调 32 种),中宁和固原比较组中显著变化的差异代谢物有 25 种(其中上调 16 种,下调 9 种),银川和固原比较组中显著变化的差异代谢物有 59 种(其中上调 31 种,下调 28 种)。3 个产地同时比较,筛选出差异显著的生物碱代谢物有 5 种(二氢咖啡酰腐胺、泛酰巯基乙胺、枸杞素 D、对乙酰氨基酚、3,4-二甲氧基苯甲酰胺),KEGG 数据库通路富集分析发现 5 种差异显著生物碱代谢物主要分布在 4 条代谢途径中,分别为代谢途径、次生代谢产物的生物合成、碳青霉烯生物合成、泛酸盐和辅酶 A 生物合成途径。本研究为宁夏不同产地“宁杞菜 1 号”枸杞叶的营养物质挖掘提供理论基础。

关键词 枸杞叶; 生物碱; 抗氧化; 代谢组学; 产地差异

文章编号 1009-7848(2024)10-0394-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.10.036

枸杞(*Lycium barbarum* L.)属茄科落叶灌木,原产于我国西北部,其果实作为中国传统中药材已有 2 000 多年的历史^[1-4]。近年来研究发现枸杞叶有较好的营养价值和药用价值等多种生理功能,药学著作《名医别录》中记载枸杞叶具有清热明目、补虚益精等多种功效^[5-7]。“宁杞菜 1 号”是绿色、营养性菜用枸杞叶的一种,具有较强的抗逆性,产菜量高,营养丰富,口感好,近年来宁夏地区对该品种种植规模逐步增大^[7]。

生物碱是含氮的有机化合物中的一类,通常有抗菌、抗氧化、消炎、镇痛、止咳、抗癌等药理功效。大多数生物碱有复杂的环状结构,有明显的生物活性^[8-10]。刘建飞等^[10]对已报道的 124 种枸杞属生物碱类化学成分和生物活性进行总结分析,结果表明枸杞属植物中大多数生物碱具有一定的生理药理活性,然而,宁夏不同产地枸杞叶的生物碱组成和生物活性差异未被完全揭示。植物广泛靶向代谢组学技术利用超高效液相色谱串联质谱

(Ultra performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry)可检测植物组织、器官代谢物和次生代谢物^[11-13]。本文基于此技术研究宁夏 3 个产地(银川、中宁、固原)“宁杞菜 1 号”枸杞叶生物碱组成和体外抗氧化活性差异,为“宁杞菜 1 号”枸杞叶营养物质挖掘及其产品开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

“宁杞菜 1 号”枸杞叶于 2022 年 7 月份采自宁夏回族自治区的银川(YC)、中宁(ZN)、固原(GY)3 个产地。采用五点取样法随机取样,每个产地 3 个生物学重复样本。采摘后置于液氮罐冷冻,带回室内于-80℃冰箱保存。采样地的地理信息分别为:银川(东经 106°04'59" 北纬 38°39'33",海拔 1 097.19 m,中温带大陆性气候),中宁(东经 105°40'34"北纬 37°31'13",海拔 1 124.65 m,北温带大陆性气候),固原(东经 106°06'19" 北纬 36°18'10",海拔 1 518.34 m,温带大陆性气候)。

试剂:色谱级甲醇、色谱级乙腈、色谱级甲酸,美国默克公司;ABTS,美国 Sigma-Aldrich 公司;过硫酸钾、无水乙醇、浓盐酸、Tris-HCl 溶液、邻苯

收稿日期: 2023-10-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(32160534);宁夏重点研发项目(2022BBF02006)

第一作者: 武彧兴,男,硕士生

通信作者: 范艳丽 E-mail: fanyanli_fyl@163.com

三酚、铁氰化钾、盐酸、三氯醋酸、石油醚,山东创赢化工有限公司;抗坏血酸、甜菜碱标准品,北京谱析标准技术有限公司;溴化钾、乙醚、丙酮、雷氏盐,日照力德士化工有限公司。

1.2 仪器与设备

V-1300PC 可见分光光度计,上海美析仪器有限公司;WT-CH 型玻璃罩精密天平,常州万泰天平仪器有限公司;Spectrum Tow 傅里叶变换红外光谱仪,美国 PerkinElmer 公司;1260UPLC-G6530Q-TOF-MS 液-质谱联用仪,美国安捷伦公司;R-1010 型旋转蒸发器,巩义市京华仪器有限公司;MM 400 冷冻研磨仪,德国 Retsch 公司;DHG 鼓风干燥箱,上海善志仪器设备有限公司;HMS-901 磁力搅拌器,深圳市博大精科技实业有限公司;WK-600A 型高速中药粉碎机,上海新诺仪器设备厂;LGJ-25C 型冷冻干燥机,四环福瑞科仪科技发展(北京)有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 “宁杞菜 1 号”枸杞叶生物碱的提取方法

按潘诗哲等^[14]试验方法并稍加修改,将采集的样品叶烘干、粉碎、过筛,按照料液比 1:30,采用 70%乙醇溶液超声萃取。萃取前用浓盐酸调节 pH 值为 2,超声温度 70℃,功率 150 W,时间 30 min,4 900 r/min 离心弃残渣,上清液加入石油醚脱除叶绿素,在分液漏斗中弃除石油醚,旋转蒸发后真空冷冻干燥,即得到“宁杞菜 1 号”枸杞叶生物碱提取物。

1.3.2 提取物的生物碱含量测定 参照国家标准^[15]测定“宁杞菜 1 号”枸杞叶中生物碱含量(以甜菜碱含量计)。

1.3.3 超氧阴离子清除活性测定 参考 Zhang 等^[16]方法并略作改动,测定“宁杞菜 1 号”枸杞叶生物碱提取物对超氧阴离子的清除能力。

1.3.4 ABTS⁺自由基清除活性测定 参考 Zhang 等^[17]和 Werf 等^[18]方法并适当调整,测定“宁杞菜 1 号”枸杞叶生物碱提取物清除 ABTS⁺自由基的能力。

1.3.5 总还原能力测定 参考范艳丽等^[19]方法并稍加修改,测定“宁杞菜 1 号”枸杞叶生物碱提取物的总还原能力。

1.3.6 傅里叶红外光谱分析 利用傅里叶变化红外光谱技术测定 3 个产地“宁杞菜 1 号”枸杞叶生物碱提取物的红外光图谱。取 3 个产地样品与烘干后的溴化钾粉末按照 1:100 的比例放入玛瑙研钵中搅磨均匀^[20],压片后置于傅里叶红外光谱仪上扫描,得到红外光谱图。

1.3.7 广泛靶向代谢组样品制备 采摘于 7 月中旬的“宁杞菜 1 号”枸杞叶样品保存于-80℃冰箱中。样品经冻干机干燥,研磨(30 Hz, 2.0 min)至粉末状。称取 50 mg 该粉末,加入 1.2 mL 70%甲醇充分溶解,每隔 30 min 涡旋 1 次,共 6 次,每次持续 30 s,离心后吸取上清液,用 0.22 μm 有机滤膜过滤,置进样瓶中保存,用于 UPLC-MS/MS 分析。

1.3.8 UPLC-MS/MS 条件 色谱柱:Agilent SB-C18 柱(1.8 μm, 2.1 mm × 100 mm)。流动相:A 相为超纯水(含 0.1%甲酸),B 相为乙腈(含 0.1%甲酸)。洗脱条件:0.00 min, B 相比比例为 5%;9.00 min 内 B 相比比例先增加到 95%并维持 1 min;10.00~11.10 min, B 相比比例降为 5%并维持至 14 min。流速 0.35 mL/min;柱温 40℃。

MS/MS 条件:电喷雾离子源(Electrospray ionization, ESI)温度 500℃;离子喷雾电压(IS)5 500 V(正离子模式)/-4 500 V(负离子模式);离子源气体 I (GSI)设置为 50 psi,气体 II (GS II)和气体 III (CUR)分别设置为 60 psi 和 25 psi,碰撞诱导电离参数设置为高。QQQ 扫描使用 MRM 模式,并将碰撞气体(氦气)设置为中等。进一步优化去簇电压(DP)和碰撞能(CE),根据每个时期内洗脱的代谢物,监测 1 组特定 MRM 离子对。

1.3.9 数据处理 理化指标用 Origin 2021 软件绘图,Excel 2019 软件进行数据处理与分析。代谢组学数据在 R 软件平台利用 XCMS 软件包对数据进行预处理,处理后对数据进行主成分分析、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,根据变量对分组贡献值 VIP ≥ 1 和组间变化的显著性(P < 0.05),差异倍数 ≥ 2 或 ≤ 0.5 进行差异性代谢物筛选,通过 KEGG 数据库对差异代谢物通路富集进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同产地枸杞叶生物碱提取物含量分析

通过国标^[15]方法测得甜菜碱标准曲线 $Y = 0.9783X - 0.0202$, $R^2 = 0.9996$ 。如表 1 所示, 3 个产地“宁杞菜 1 号”枸杞叶生物碱提取物的总生物碱含量差异不大, 其中中宁产地样品(ZN)生物碱含量最高($P < 0.05$), 银川产地样品(YC)生物碱含量最低($P < 0.05$), 可能与不同产地的气候、土壤、降水等自然因素有关。

2.2 不同产地枸杞叶生物碱提取物对超氧阴离子清除活性差异

如图 1 可知, 3 个产地样品对超氧阴离子自由基的清除能力均随样品浓度的增大而增大, 且均低于 VC。样品质量浓度为 0.5 mg/mL 时, VC 清除率为 88.6%, 银川、固原、中宁样品的清除率均在 80% 以上, 依次为银川(84.8%) > 固原(83.9%) > 中宁(82.1%), 表明 3 个产地样品对超氧阴离子自由基有较好的清除率能力。

2.3 不同产地枸杞叶生物碱提取物对 ABTS⁺清除活性差异

如图 2 所示, 3 个产地样品对 ABTS⁺清除活性能力均随质量浓度(0.1~0.5 mg/mL)的增加而增加, 然而, 均低于 VC, 表现较好的浓度依赖关系。在质量浓度 0.1~0.2 mg/mL 范围中宁样品的清除能力稍高于固原和银川, 在质量浓度 0.3~0.5 mg/mL 范围中宁样品的清除能力明显高于其它两个产地, 在质量浓度为 0.5 mg/mL 时 3 个产地样品清除率均达到最大值, 依次为中宁(35.4%) > 银川(29.6%) > 固原(28.9%)。

2.4 不同产地枸杞叶生物碱提取物的总还原能力差异

3 个产地样品生物碱提取物还原能力如图 3 所示。阳性对照 VC 具有很强的还原能力, 各样品还原能力均随样品质量的浓度增加而增加, 在质量浓度 0.1~0.5 mg/mL 范围中宁和固原产地样品还原能力明显高于银川产地。在质量浓度为 0.5 mg/mL 时, 3 个产地样品吸光度值均达到最大值, 依次为中宁(0.46) > 固原(0.45) > 银川(0.41)。此时, VC 的吸光度值达 0.89, 说明“宁杞菜 1 号”枸杞叶生物碱提取物有一定还原能力。

表 1 宁夏不同产地“宁杞菜 1 号”枸杞叶生物碱提取物的总生物碱含量差异

Table 1 Differences in total alkaloid content between the extracts from ‘Ningqicai No.1’ Goji leaves in three origins of Ningxia

样品	总生物碱含量/%(以甜菜碱计)
YC	1.011 ± 0.020 ^a
ZN	1.114 ± 0.011 ^b
GY	1.054 ± 0.025 ^c

注: 肩标小写字母表示具有显著性差异($P < 0.05$)。

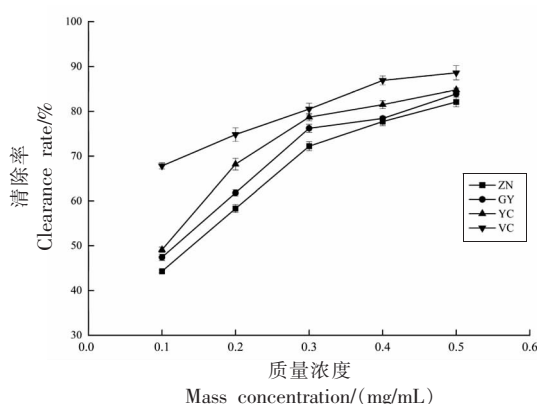


图 1 宁夏不同产地“宁杞菜 1 号”枸杞叶生物碱提取物对超氧阴离子自由基的清除能力

Fig.1 Superoxide anion radical scavenging ability of the alkaloid extract from ‘Ningqicai No. 1’ Goji leaves in three origins of Ningxia

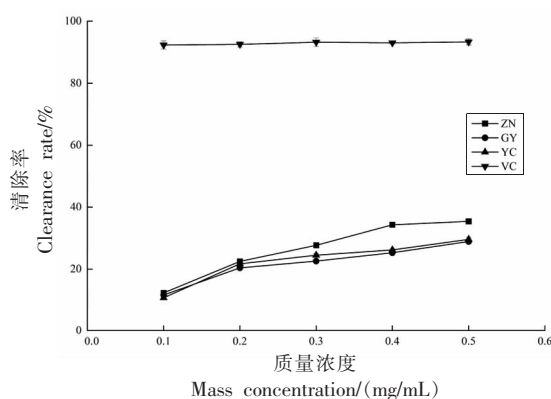


图 2 宁夏不同产地“宁杞菜 1 号”枸杞叶生物碱提取物对 ABTS⁺清除活性能力

Fig.2 ABTS⁺ scavenging activity of the alkaloid extract from ‘Ningqicai No. 1’ Goji leaves in three origins of Ningxia

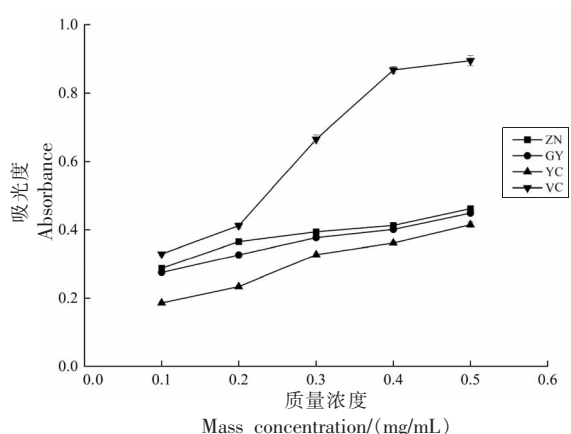


图 3 宁夏不同产地“宁杞菜 1 号”枸杞叶生物碱提取物总还原能力

Fig.3 Total reducing capacity of the alkaloid extract from ‘Ningqicai No. 1’ Goji leaves in three origins of Ningxia

2.5 傅里叶红外光谱分析

固原、中宁、银川产地的样品红外光谱图均出现多个吸收峰,峰型基本相似,如图 4 所示。在 2929 cm^{-1} 附近,3 个产地样品的红外图谱均出现属于生物碱分子羟基振动的吸收峰;在 1735 cm^{-1} 附近,是生物碱特有的羰基振动吸收峰; 1513 cm^{-1} 处为苯环的特征吸收峰;在 1329 cm^{-1} 附近是 C-N 的伸缩振动引起的吸收峰; 1169 cm^{-1} 处为 C-C 吸收峰,是酮类基团含有的特征峰;在 $1700\sim 1630\text{ cm}^{-1}$ 波数范围, C=O 伸缩振动较强,说明含有较多的有机氧基团化学物质;在 $1650\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ 范围均有吸收峰,为酰胺 I 带振动吸收峰等^[20-22]。3 个产地样品的红外光谱中均出现生物碱化合物的吸收峰,均存在相同的多个吸收峰,占全部峰的绝大部分,然而,峰强度和宽度存在差异,推断不同产地样品生物碱化合物组成可能相同而其含量存在差异。

2.6 代谢组数据稳定性考察

图 5 表明 3 个产地样本的 3 个生物学重复以及 3 个 QC 样品均汇集在一起,说明各产地的样本代谢组数据的稳定性较好,测定结果较为准确,未呈现明显偏差。通过 PCA 分析出 4 个主成分,其中主成分 1 (PC1) 贡献率为 46.3%,主成分 2 (PC2) 贡献率为 25.0%,各产地不同样本在两个维度上表现出较为明显的分离趋势^[23-24],说明不同产地的枸杞叶具有一定的差异性。

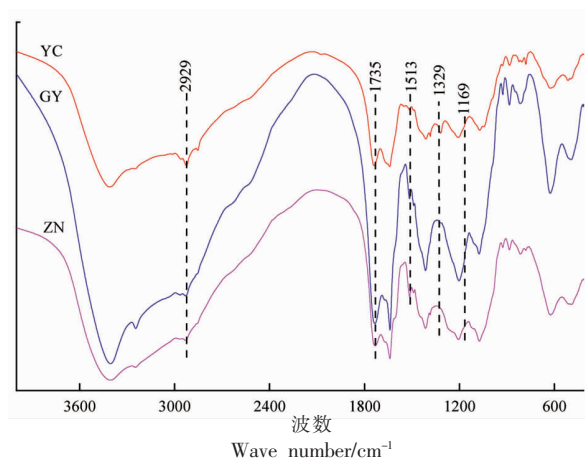


图 4 宁夏不同产地“宁杞菜 1 号”枸杞叶生物碱提取物红外光谱图

Fig.4 Infrared spectra of the alkaloid extract from ‘Ningqicai No. 1’ Goji leaves in three origins of Ningxia

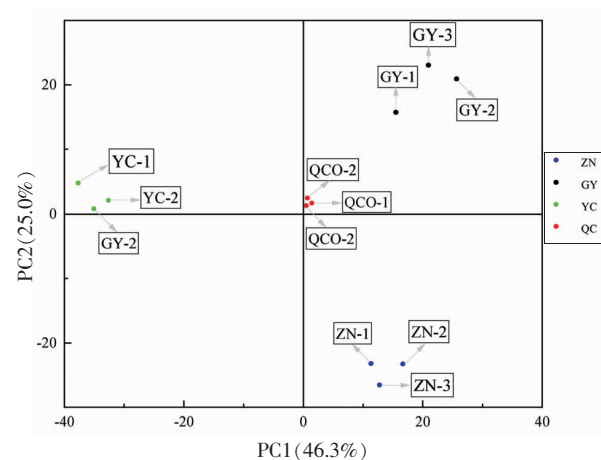


图 5 各组样本与质控样本质谱数据 PCA 得分图

Fig.5 PCA scores of essential spectral data of each group of samples and quality control samples

2.7 代谢物定性分析

基于武汉迈特维尔生物科技有限公司自建数据库并依据化合物二级谱信息进行物质定性。3 个产地共监测出 12 类 162 种生物碱代谢物,包括 74 种酚胺,吲哚类生物碱 25 种,吡咯类生物碱 3 种,甾体类生物碱 9 种,异喹啉类生物碱 1 种,萜萜烷类生物碱 3 种,哌啶类生物碱 2 种,喹啉类生物碱 2 种,吡啶类生物碱 8 种,阿朴啡型生物碱 1 种,苄基苯乙胺类生物碱 1 种,生物碱 33 种(图 6a)。各类生物碱占比如图 6b 所示,162 种生物碱

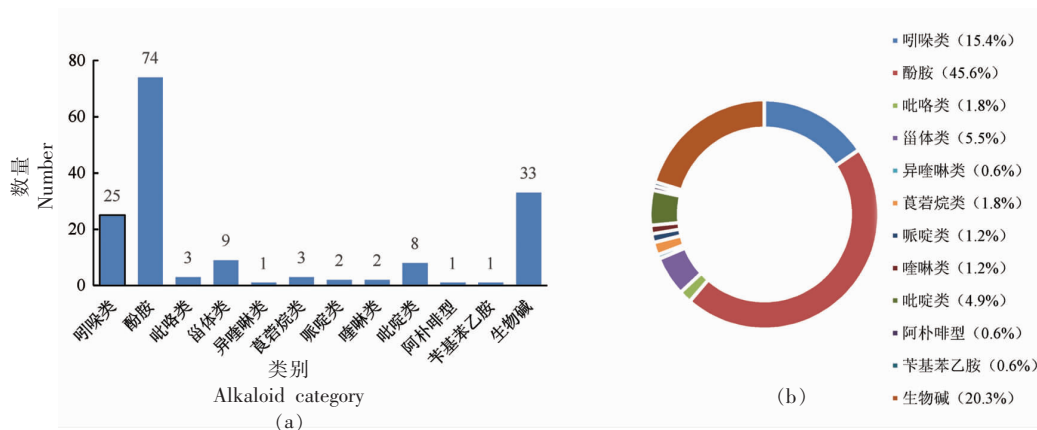


图6 生物碱代谢物类别组成柱状图(a)和环形图(b)

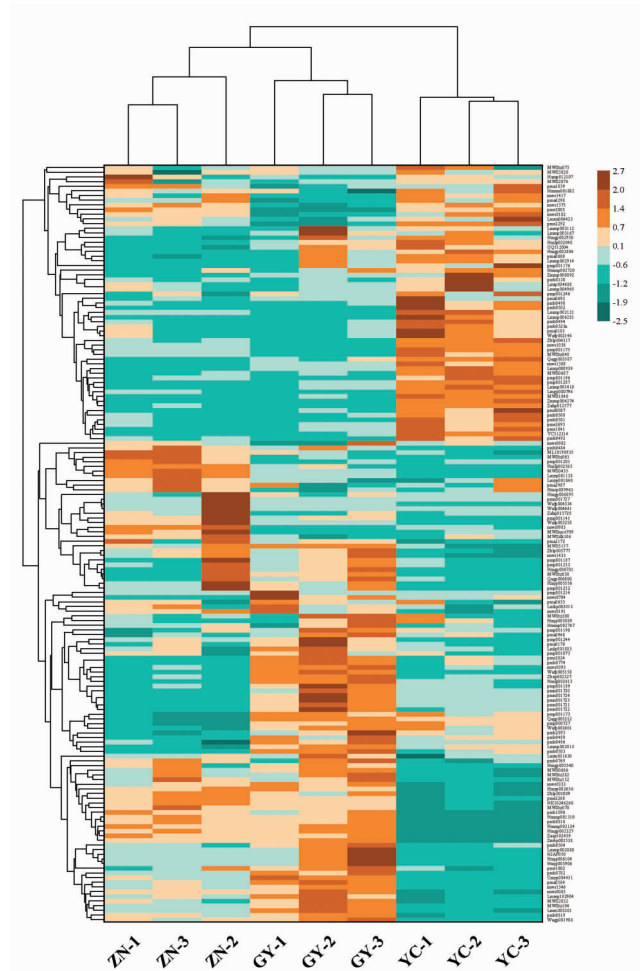
Fig.6 Bar (a) and ring (b) charts of alkaloid metabolite class composition

代谢物主要以酚胺(45.6%)、生物碱(20.3%)、吡啶类生物碱(15.4%)为主,其它类生物碱含量较少。

3个产地生物碱代谢物相对含量差异较为明显,如图7所示。中宁产地相对含量最高的生物碱化合物是*N*-阿魏酰苯乙胺-葡萄糖苷,其相对含量是固原产地的3.82倍,是银川产地的32.28倍。固原产地相对含量最高的生物碱化合物是*L*-酪胺,其相对含量是中宁产地的1.15倍,是银川产地的2.57倍。银川产地相对含量最高的生物碱化合物是咖啡酰腐胺,其相对含量是中宁产地的3.75倍,是固原产地的6.83倍。3个产地大多数生物碱化合物相对含量均有差异。

2.8 差异代谢物筛选

2.8.1 两产地差异代谢物筛选 差异代谢物是不同产地共有且含量上差异显著,在VIP≥1、*P*-value<0.05、差异倍数≥2或≤0.5的条件下筛选差异代谢物^[23]。如图8a所示,银川和固原产地共筛选出53种差异代谢物,占生物碱代谢产物总数的32.7%,其中阿朴啡型生物碱1种(1.9%)、吡啶类生物碱3种(5.7%)、吡咯类生物碱1种(1.9%)、酚胺17种(32.1%)、喹啉类生物碱2种(3.8%)、萜类生物碱2种(3.8%)、生物碱12种(22.6%)、吡啶类生物碱14种(26.4%)、甾体类生物碱1种(1.9%)。如图8b所示,上调21种,下调32种,上调前10种化合物依次是泛酰巯基乙胺、澳洲茄烯胺、*N,N*-二甲基甲酰胺、枸杞素D、吡啶-3-甲酸、巴豆酰萜类碱、打碗花精A3、咖啡酰腐胺、十八碳二烯酰腐胺、蕨内酰胺;下调的前



注:1/2/3代表3次生物学重复试验。

图7 宁夏不同产地“宁杞菜1号”枸杞叶生物碱代谢物类比组成及含量聚类热图

Fig.7 Alkaloid analogy composition and content clustering heat map of ‘Ningqicai No. 1’ Goji leaves from three origins of Ningxia

10 种化合物依次是 lyciumamide M (2)、DL-2-氨基己二酸、N-阿魏酰腐胺-N-葡萄糖苷、3,4-二甲氧基苯甲酰胺、甲基-二氧吲哚-乙酸、N-阿魏酰苯乙胺葡萄糖苷、升麻酰胺、(2E)-3-(4-羟基苯基)-N-[2-(4-羟基苯基)乙基]-2-丙烯酰胺、N-二甲基-5-甲氧基色胺、O-甲基球紫堇碱。

如图 8c 所示，中宁和固原产地共筛选出 25

种生物碱差异代谢物，占生物碱代谢物总数的 15.4%，其中吡咯类生物碱 2 种(8%)、酚胺 10 种(40%)、喹啉类生物碱 1 种(4%)、哌啶类生物碱 1 种(4%)、生物碱 5 种(20%)、吲哚类生物碱 4 种(16%)、甾体类生物碱 2 种(8%)。如图 8d 所示，上调 16 种，下调 9 种。其中，上调的前 10 种化合物依次是番茄皂苷元 A-27-O-葡萄糖苷、N-羟基色

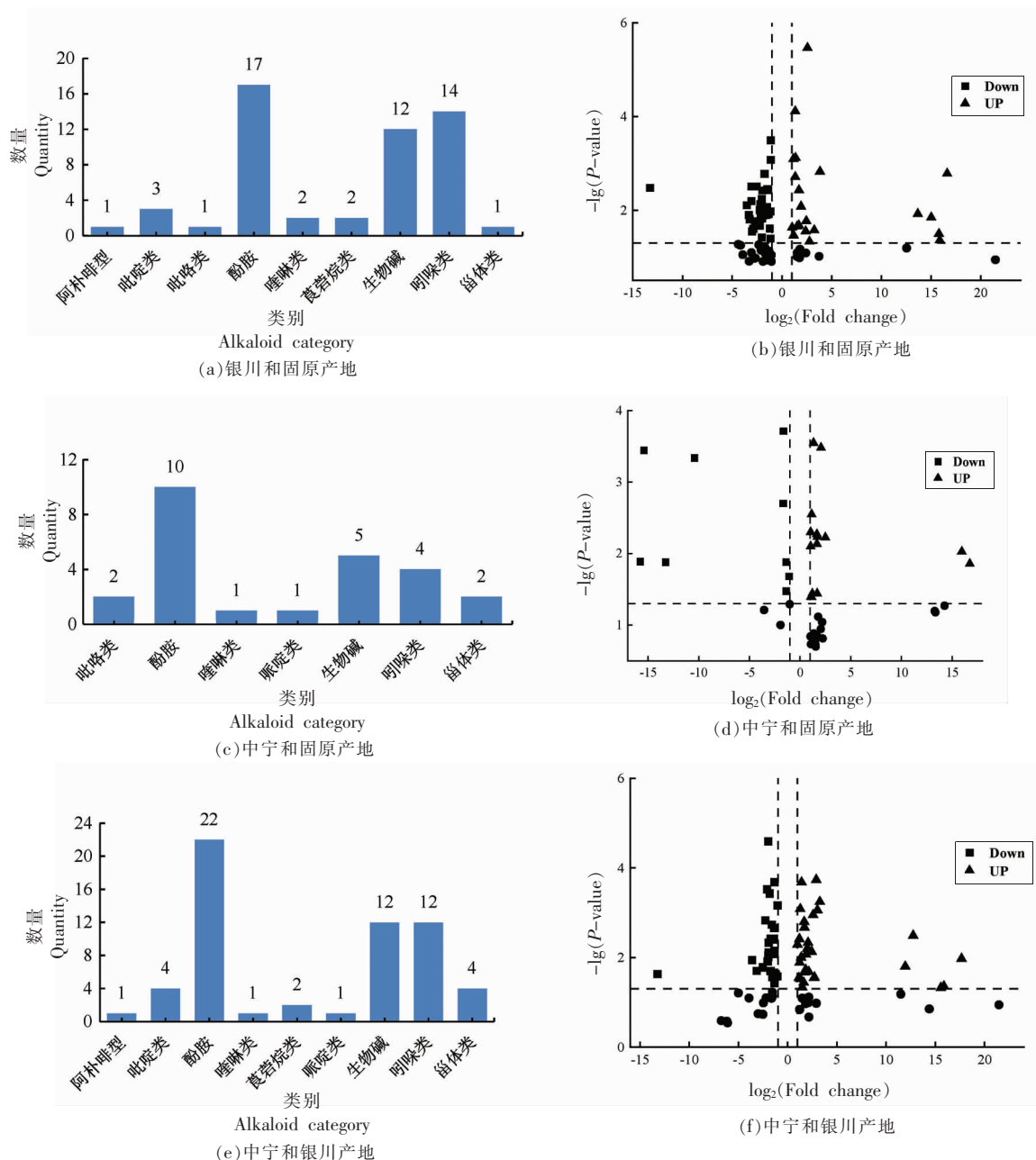


图 8 宁夏不同产地“宁杞菜 1 号”枸杞叶生物碱差异代谢物类比组成柱状图和火山图

Fig.8 Analogy composition and volcano map of alkaloid difference metabolites between ‘Ningqicai No. 1’ Goji leaves from different origins of Ningxia

胺、5-羟色胺、阿魏酰组胺、枸杞素 B、*N*-阿魏酰甲基胍丁胺、*N*-(4'-*O*-葡萄糖基)-阿魏酰胍丁胺、*N*-阿魏酰高胍丁胺、二氢阿魏酰腐胺、3,4-二甲氧基苯甲酰胺, 下调 9 种化合物依次是 *N*, *N*-二甲基甲酰胺、泛酰巯基乙胺、枸杞素 D、双(二氢咖啡酰)精胺、油酰单乙醇胺、蕨内酰胺、对乙酰氨基酚、2-乙基-2,6,6-三甲基派啶-4-酮、2-羟基苯并噻唑。

如图 8e 所示, 中宁和银川产地共筛选出 59 种生物碱差异代谢物, 占生物碱代谢物总数的 36.4%, 其中阿朴啡型生物碱 1 种(1.7%)、吡啶类生物碱 4 种(6.8%)、酚胺 22 种(37.3%)、喹啉类生物碱 1 种(1.7%)、莨菪烷类生物碱 2 种(3.4%)、哌啶类生物碱 1 种(1.7%)、生物碱 12 种(20.3%)、吲哚类生物碱 12 种(20.3%)、甾体类生物碱 4 种(6.8%)。如图 8f 所示, 上调 31 种, 下调 28 种。其中, 上调前 10 种化合物依次是番茄皂苷元 A-27-*O*-葡萄糖苷、澳洲茄烯胺、*N*, *N*-二甲基苯胺、枸杞亚精胺 A、枸杞亚精胺 B、枸杞亚精胺 H、巴豆

酰莨菪碱、双(二氢咖啡酰)亚精胺、十八碳二烯酸酰胺、打碗花精 A3; 下调前 10 种化合物依次是芥子碱、对乙酰氨基酚、甲基-二氧吲哚-乙酸、*N*-阿魏酰腐胺-*N*-葡萄糖苷、甲氧基吲哚乙酸、3,4-二甲氧基苯甲酰胺、*N*, *N*-二甲基-5-甲氧基色胺、*N*-(4-氨基丁基)苯甲酰胺、3-吲哚丙烯酸、吲哚-3-甲醛。

3 个产地均位于同一省份, 而自然环境不同。中宁产地属北温带大陆性气候, 年平均温度 11.5 °C, 平均降水量 205.4 mm。固原产地属温带大陆性气候, 年平均温度 6.8 °C, 平均降水量 300~550 mm。银川产地属中温带大陆性气候, 年平均温度 8.5 °C, 平均降水量 150~300 mm。气温、降水量均有差异, 可能造成不同产地间代谢物含量不同。

2.8.2 3 个产地差异代谢物筛选 在 $VIP \geq 1$ 、 P -value < 0.05、差异倍数 ≥ 2 或 ≤ 0.5 的条件下筛选 3 个产地差异代谢物^[23]。筛选出共同的差异显著的代谢物有 5 种, 定性结果见表 2。

表 2 3 个地区样品差异代谢物的定性结果

Table 2 Qualitative results of different metabolites in samples from the three regions

序号	化合物	英文名称	质荷比	保留时间/ min	分子式	电离模式	KEGG 编码
1	二氢咖啡酰腐胺	Dihydrocaffeoylputrescine	253.1547	1.87	C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	—
2	泛酰巯基乙胺	Pantetheine	277.1228	2.75	C ₁₁ H ₂₂ N ₂ O ₄ S	[M-H] ⁻	C00831
3	枸杞素 D	Lyciumin D	900.425	4.91	C ₄₅ H ₅₇ N ₉ O ₁₁	[M+H] ⁺	—
4	对乙酰氨基酚	Acetaminophen	150.0561	3.89	C ₈ H ₉ NO ₂	[M-H] ⁻	—
5	3,4-二甲氧基苯甲酰胺	3,4-Dimethoxybenzamide	182.0811	3.43	C ₉ H ₁₁ NO ₃	[M+H] ⁺	—

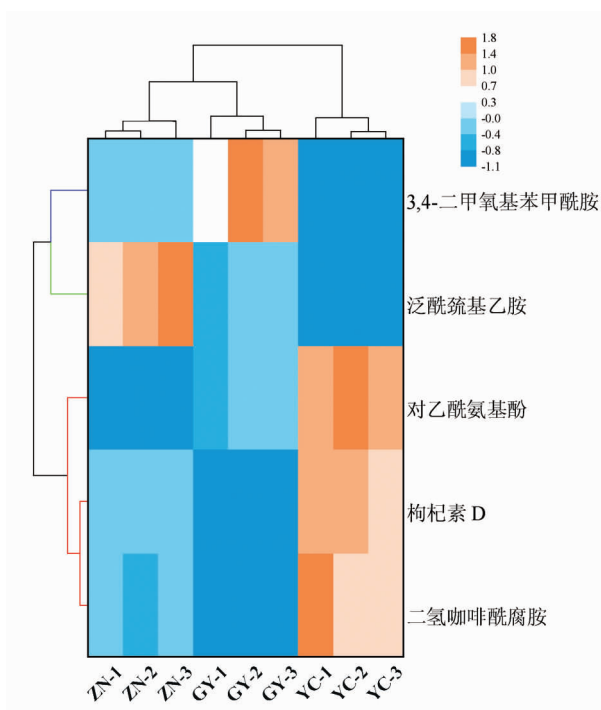
3 个产地共筛选出 5 个生物碱类差异代谢物, 其中二氢咖啡酰腐胺和对乙酰氨基酚、3,4-二甲氧基苯甲酰胺均为酚胺类生物碱, 泛酰巯基乙胺是其它类生物碱, 枸杞素 D 是吲哚类生物碱。其中对乙酰氨基酚, 又称扑热息痛, 在新冠疫情期间也作为对症治疗药物上市, 是治疗发热和镇痛的主要药物之一^[25-27]。

2.8.3 差异代谢物聚类及通路分析 根据筛选出的差异代谢物特征进行聚类分析, 如图 9 所示, 中宁产地相对于其它两个产地上调的化合物是对乙酰氨基酚, 固原产地上调的化合物是 3,4-二甲氧基苯甲酰胺, 银川产地上调的化合物是二氢咖啡

酰腐胺、泛酰巯基乙胺、枸杞 D。通过 KEGG 通路富集分析发现, 5 种显著差异生物碱代谢物主要分布在 4 条代谢途径中, 分别为代谢途径、次生代谢产物的生物合成、碳青霉烯生物合成、泛酸盐和辅酶 A 生物合成。

3 结论

本文通过抗氧化试验对比宁夏 3 个产地(中宁、固原、银川)“宁杞菜 1 号”枸杞叶生物碱提取物的生物活性差异, 结果表明: 对 ABTS⁺ 的清除能力: 中宁(35.4%) > 银川(29.6%) > 固原(28.9%); 对超氧阴离子清除能力: 银川(84.8%) > 固原



注:1/2/3 代表 3 次生物学重复试验。

图 9 3 个产地生物碱差异代谢物聚类热图

Fig.9 Heat map of clustering of differential metabolites of alkaloids of three origins

(83.9%)>中宁(82.1%);总还原能力:中宁(0.46)>固原(0.45)>银川(0.41)。3 个产地样品的抗氧化能力有一定的差异,中宁产地样品总体抗氧化能力较强。在此基础上,基于植物广泛靶向代谢组学技术探究 3 个产地的“宁杞菜 1 号”枸杞叶生物碱组成及差异,通过 UPLC-MS/MS 技术,共筛选出 12 类 162 种生物碱代谢产物,包括 74 种酚胺,25 种吲哚类生物碱,3 种吡咯类生物碱,9 种甾体类生物碱,1 种异喹啉类生物碱,3 种萜萜烷类生物碱,2 种哌啶类生物碱,2 种喹啉类生物碱,8 种吡啶类生物碱,1 种阿朴啡型生物碱,1 种苄基苯乙胺类生物碱,33 种生物碱。银川和固原产地筛选出 53 种生物碱差异代谢物,上调 21 种,下调 32 种。中宁和固原产地筛选出 25 种生物碱差异代谢物,上调 16 种,下调 9 种。银川和固原产地筛选出 59 种生物碱差异代谢物,上调 31 种,下调 28 种。3 个产地差异显著的生物碱代谢物有 5 种,分别为二氢咖啡酰腐胺、对乙酰氨基酚、3,4-二甲氧基苯甲酰胺、泛酰巯基乙胺、枸杞素 D。通路富集分析发现 5 种显著生物碱差异代谢物主要分布在代

谢途径、次生代谢产物的生物合成、碳青霉烯生物合成、泛酸盐和辅酶 A 生物合成这 4 条代谢途径中。这些差异显著的生物碱代谢物可能对不同产地“宁杞菜 1 号”枸杞叶品质差异的形成具有指导意义,可能作为区分 3 个产地菜用枸杞的重要依据。同省份、跨度距离极近的不同产地“宁杞菜 1 号”枸杞叶在代谢产物中生物碱上存在差异,主要是含量上的差异^[28-30],导致抗氧化性有差异。研究结果为宁夏“宁杞菜 1 号”枸杞叶的活性物质挖掘及其产品研发提供了参考。

参 考 文 献

- [1] 李克剑,李伊姣,王储,等. 菜用枸杞叶的营养价值及营养等级评价[J]. 中国食物与营养, 2016, 22(4): 69-73.
LI K J, LI Y J, WANG C, et al. Nutrition value and nutritional rating of vegetable wolfberry leaves[J]. Food and Nutrition in China, 2016, 22(4): 69-73.
- [2] 廖家乐,方甜,范艳丽. 枸杞叶黄酮对胰脂肪酶活性的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2022, 22(5): 43-53.
LIAO J L, FANG T, FAN Y L. Inhibitory effects of *Lycium barbarum* leaves flavonoids on pancreatic lipase activity[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(5): 43-53.
- [3] LEI Z L, CHEN X Q, CAO F L, et al. Phytochemicals and bioactivities of goji (*Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill.) leaves and their potential applications in the food industry: A review [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2021, 57(3): 1451-1461.
- [4] YU C X, CHEN Y H, AHMADI S, et al. Goji berry leaf exerts a comparable effect against colitis and microbiota dysbiosis to its fruit in dextran-sulfate-sodium-treated mice[J]. Food & Function, 2023, 14(7): 3026-3037.
- [5] YANG L L, LIANG Q, ZHANG Y J, et al. Variation of phytochemical composition of *Lycium chinense* leaves as an endemic high-value healthy resource[J]. Scientia Horticulturae, 2021, 281(8): 109910.
- [6] 邹立思,李会伟,严辉,等. 枸杞叶新资源药材的生药学研究[J]. 中国现代中药, 2022, 24(1): 20-

- 27.
- ZOU L S, LI H W, YAN F, et al. Pharmacognostic study of *Lycii folium*[J]. Modern Chinese Medicine, 2022, 24(1): 20–27.
- [7] 祝元春, 钱涛, 周小波, 等. 叶用枸杞应用现状及产业发展策略[J]. 现代园艺, 2022, 45(24): 37–38.
- ZHU Y C, QIAN T, ZHOU X B, et al. Application status and industrial development strategy of leaf *Lycium barbarum*[J]. Modern horticulture, 2022, 45(24): 37–38.
- [8] CRISTINA A, MEIRA D, JOSÉ D, et al. Recent trends in pharmacological activity of alkaloids in animal colitis: Potential use for inflammatory bowel disease[J]. Evidence-Based Complementray and Alternative Medicine, 2017, 2017: 8528210.
- [9] ARIJIT M, ARIJIT G, CARMELA F, et al. Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives[J]. European Journal of Pharmacology, 2019, 858: 172472.
- [10] 刘建飞, 巩媛, 杨军丽, 等. 枸杞属植物中生物碱类成分研究进展[J]. 科学通报, 2022, 67(4/5): 332–350.
- LIU J F, GONG Y, YANG J L, et al. Advance on alkaloids of *Lycium* genus[J]. Chinese Science Bulletin, 2022, 67(4/5): 332–350.
- [11] 康子悦, 沈蒙, 葛云飞, 等. 基于植物广泛靶向代谢组学技术探究小米粥中酚类化合物组成及其抗氧化性[J]. 食品科学, 2021, 42(4): 206–214.
- KANG Z Y, SHEN M, GE Y F, et al. Analysis of phenolic composition in millet porridge using widely-targeted metabolomics and evaluation of antioxidant activity[J]. Food Science, 2021, 42(4): 206–214.
- [12] 沈央红, 方金玉, 朱军莉, 等. 代谢组学在食品安全领域的应用进展[J]. 食品科学, 2023, 44(5): 282–289.
- SHEN Y H, FANG J Y, ZHU J L, et al. Advance in the application of metabonomics in the field of food safety and quality[J]. Food Science, 2023, 44(5): 282–289.
- [13] 洪雅萍, 谷梦雅, 高婷, 等. 福州单瓣茉莉和双瓣茉莉不同组织的广泛靶向代谢组学分析[J]. 食品科学, 2023, 44(8): 184–193.
- HONG Y P, GU M Y, GAO T, et al. Widely targeted metabolomic analysis of different tissues of fuzhou single- and double-petal jasmines [J]. Food Science, 2023, 44(8): 184–193.
- [14] 潘诗哲, 但凡, 樊洁敏, 等. 响应面法优化荷叶生物碱盐提取工艺及其纯化[J]. 精细化工, 2019, 36(8): 1598–1603, 1609.
- PAN S Z, DAN F, FAN J M, et al. Optimization of extraction process by response surface methodology and purification of alkaloid salts from lotus leaves[J]. Fine Chemicals, 2019, 36(8): 1598–1603, 1609.
- [15] 中华人民共和国农业部. 甜菜中甜菜碱含量测定比色法 比色法: NY/T 1746–2009[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009: 1–4.
- Ministry of Agriculture of the People’s Republic of China. Colorimetric method for the determination of betaine content in sugar beets colorimetric method: NY/T 1746–2009[S]. Beijing: China Standard Press, 2009: 1–4.
- [16] ZHANG Q A, WANG X, SONG Y, et al. Optimization of pyrogallol autoxidation conditions and its application in evaluation of superoxide anion radical scavenging capacity for four antioxidants[J]. Journal of AOAC International, 2016, 99(2): 1–8.
- [17] ZHANG S I, DENG P, XU Y C, et al. Quantification and analysis of anthocyanin and flavonoids compositions, and antioxidant activities in onions with three different colors[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2016, 15(9): 2175–2181.
- [18] VAN DER WERF R, MARCIC C, KHALIL A, et al. ABTS radical scavenging capacity in green and roasted coffee extracts[J]. LWT – Food Science and Technology, 2014, 58(1): 77–85.
- [19] 范艳丽, 韩丽娜, 付丽霞, 等. 枸杞叶黄酮类化合物体外清除自由基作用研究[J]. 中国调味品, 2017, 42(12): 32–37.
- FAN Y L, HAN L N, FU L X, et al. Study on free radical scavenging effect of flavonoids from *lycium barbarum* leaves *in vitro*[J]. China Condiment, 2017, 42(12): 32–37.
- [20] 龚受基, 李佳银, 杨新河, 等. 傅里叶变换红外光谱分析 6 种不同陈化时间六堡茶[J]. 食品科学, 2012, 33(24): 222–225.
- GONG S J, LI J Y, YANG X H, et al. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of Liupu tea with different aging times[J]. Food Science, 2012, 33(24): 222–225.
- [21] 王志睿, 张兰兰, 黄昌全, 等. 粤东产钩吻生物碱提

- 取物的红外光谱与核磁共振谱分析[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(1): 87-88, 92.
- WANG Z R, ZHANG L L, HUANG C Q, et al. Infrared spectrum and nuclear magnetic resonance analysis of the alkaloid extract of *Gelsemium* produced in east Guangdong province[J]. Journal of the First Military Medical University, 2005, 25(1): 87-88, 92.
- [22] ZHANG J D, ZHOU Q, YANG G Y, et al. The agronomic traits, alkaloids analysis, FT-IR and 2DCOS-IR Spectroscopy identification of the low-nicotine-content nontransgenic tobacco edited by CRISPR-Cas9[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2022, 27(12): 3817-3817.
- [23] 冯玉超, 王长远, 李雪, 等. 黑龙江省不同产地水稻的 GC-MS 代谢物差异分析[J]. 食品科学, 2019, 40(2): 208-214.
- FENG Y C, WANG L W, LI X, et al. Effect of geographical origin on rice metabolites as analyzed by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Food Science, 2019, 40(2): 208-214.
- [24] 严淘, 杨敏敏, 施琳, 等. 菊花不同提取物代谢组学分析及其抗氧化活性功效物质成分筛选[J]. 食品工业科技, 2021, 42(16): 8-19.
- YAN T, YANG M M, SHI L, et al. Metabonomics analysis of different extracts from *Chrysanthemum morifolium* and screening of its antioxidant active components[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(16): 8-19.
- [25] 陈华武. 布洛芬混悬液与对乙酰氨基酚在小儿高热治疗中的效果[J]. 中国实用医药, 2022, 17(9): 133-135.
- CHEN H W. The effect of ibuprofen suspension and paracetamol in the treatment of children with high fever[J]. China Practical Medicine, 2022, 17(9): 133-135.
- [26] BERGSTRÖM A, LIPCSEY M, LARSSON A, et al. Acetaminophen attenuates pulmonary vascular resistance and pulmonary arterial pressure and inhibits cardiovascular collapse in a porcine model of endotoxemia[J]. Shock, 2023, 59(3): 442-448.
- [27] 罗新娟, 马蕊, 闫宙洁. 布洛芬混悬液联合对乙酰氨基酚治疗小儿高热的临床疗效[J]. 当代医学, 2022, 28(18): 131-133.
- LUO X J, MA R, YAN Z J. Clinical efficacy of ibuprofen suspension combined with acetaminophen in the treatment of children with hyperthermia[J]. Contemporary Medicine, 2022, 28(18): 131-133.
- [28] ZHANG J S, AI Z Y, HU Y, et al. Remarkable impact of commercial sterilizing on ginsenosides transformation in fresh ginseng pulp based on widely targeted metabolomics analysis[J]. Food Chemistry, 2022, 15: 100415.
- [29] ZHOU J N, HOU D H, ZOU W Q, et al. Comparison of widely targeted metabolomics and untargeted metabolomics of wild *Ophiocordyceps sinensis* [J]. Molecules, 2022, 27(11): 1-13.
- [30] 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 metabonomics[J]. Food Science, 2021, 42(8): 206-213.

The Differences in Alkaloid Composition and Activity of Goji Leaves from Different Regions of Ningxia

Wu Yuxing, Ma Ruixue, Lu Shun, Zhang Huiling, Fan Yanli*
(School of Food Science & Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021)

Abstract In this study, the differences in alkaloid composition and antioxidant activities *in vitro* were investigated based on plant wide targeted metabolomic techniques using the ‘Ningqicai No. 1’ goji leaves from three origins in Ningxia (Yinchuan, Zhongning, and Guyuan). The results showed that the alkaloid extracts of the samples from the three origins all had *in vitro* antioxidant activities. Among them, the scavenging ability of ABTS⁺ is Zhongning (35.4%) > Yinchuan (29.6%) > Guyuan (28.9%). The scavenging ability of superoxide anion is Yinchuan (84.8%) > Guyuan (83.9%) > Zhongning (82.1%). The total reduction capacity is Zhongning (0.46) > Guyuan (0.45) > Yinchuan (0.41). A total of

12 categories and 162 alkaloid metabolites were detected in the three regions. Under the screening conditions of multiple difference ≥ 2 or ≤ 0.5 , $P < 0.05$, and VIP ≥ 1 , there were 53 significantly changed alkaloid differential metabolites in the comparison group between Yinchuan and Guyuan (including 21 up regulated and 32 down regulated), 25 significantly changed alkaloid differential metabolites between Zhongning and Guyuan (including 16 up regulated and 9 down regulated), and 59 different metabolites with significant changes between Yinchuan and Guyuan (including 31 up regulated and 28 down regulated). Five alkaloid metabolites with significant differences were identified through simultaneous comparison among the three production areas (dihydrocaffeoyl putrescine, panthenol mercaptoethylamine, wolfberry D, acetaminophen, and 3,4-dimethoxybenzamide). The KEGG database pathway enrichment analysis found that the five alkaloid metabolites with significant differences were mainly distributed in four metabolic pathways, namely metabolic pathway, biosynthesis of secondary metabolites, carbapenem biosynthesis, and pantothenate and CoA biosynthesis pathways. This study provides a theoretical basis for nutritional exploration of 'Ningqicai No.1' goji leaves from different regions in Ningxia.

Keywords goji leaves; alkaloid; antioxidant; metabolomics; origin differences