

基于非靶向代谢组学探究海南油茶的特征标志物

唐樱冉^{1,2,3} 李强强^{2,3} 赵柳微^{2,3} 戚华沙¹ 杨慧鹏^{2,3} 李小英^{2,3} 郑道君¹ 吴黎明^{1,2,3}

(1 海南省农业科学院热带园艺研究所, 海口 571100; 2 中国农业科学院国家南繁研究院, 三亚 572024;

3 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093)

摘要: 为探究海南油茶独特品质, 研究采用非靶向代谢组学技术, 对海南产区及其他产区 (包括广东、广西、江西、浙江) 的蜜蜂授粉油茶样品进行系统分析。通过Agilent 6545超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱系统 (UPLC-QTOF-MS) 全面检测, 并使用SIMCA 14.1多元统计分析 (主成分分析、偏最小二乘判别分析) 对数据进行处理。研究表明, 海南油茶与其他产地的油茶样本在代谢物组成上存在显著差异。通过变量重要性投影值筛选及统计学检验, 成功鉴定出一个具有显著差异的代谢物作为潜在的特征标志物, 即磷脂酰肌醇 (16:0/18:3 (9顺, 12顺, 15顺))。本研究筛选并鉴定了海南油茶的特征性标志物, 不仅为海南油茶的地理溯源与真实性鉴别提供了一定科学依据, 也为产品的后续开发奠定了一定的理论基础。

关键词: 油茶; 代谢组学; 特征标志物

1 前言

油茶 (*Camellia oleifera*) 属于山茶科 (Theaceae) 山茶属 (*Camellia*) 植物, 是重要的木本油料作物, 在我国已有两千多年的栽培历史, 主要分布于我国南方湖南、江西与广西等地, 油茶果实去除外果皮即为油茶籽, 榨取的食用油即为茶油^[1-3]。油茶籽油是我国传统木本植物油, 无机元素含量丰富, 富含单不饱和脂肪酸、角鲨烯、茶多酚等, 而不饱和脂肪酸具有降血脂、抗肿瘤、抗氧化等多种生理功能活性, 这种由种子提取的油被称作“东方橄榄油”, 被联合国粮食与农业组织 (FAO) 列为健康的食用油, 油茶也因其经济植物开发潜力和健康益处而受到更多关注^[4-7]。近年来, 油茶产业大力发展, 油茶籽油等产品在发展经济、促进林业可持续发展、促进生态环境恢复与健康发展、助力乡村振兴等方面具有重要意义^[8,9]。

海南省地处热带季风海洋性气候区, 具有显著的高温多雨特征, 油茶种植历史悠久, 资源丰富。近年来, 该省油茶林面积大幅增加, 随着蜜蜂授粉技术的推广应用, 传统油茶成林存在的“千花一果”问题也逐步得到改善^[10]。然而, 目前关于海南省在蜜蜂授粉条件下油茶特征性标志物的挖掘与鉴定仍较为缺乏,

制约了海南油茶产品的品质控制与标准化发展。由于不同产地的油茶在代谢物组成上可能存在显著差异, 这些差异代谢物可作为识别其地理来源的特征标志物。因此, 为深入解析海南油茶的代谢特性, 揭示其独特品质, 并进一步提升产品附加值和产业可持续发展能力, 本研究采用现代代谢组学技术, 系统比较海南油茶与其他产区油茶的代谢差异, 对阐明其独特品质形成的化学基础具有重要科学意义。

非靶向代谢组学能够无偏性地发现未知差异化合物^[11], 目前已被广泛应用于食品分析, 是筛选生物标志物的强大工具。本研究采用Agilent 6545超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱系统 (UPLC-QTOF-MS) 筛选并鉴定海南油茶的特征性标志物, 通过UPLC-QTOF-MS技术, 我们能够获得海南油茶与其他地区油茶的代谢组学数据, 再借助多元统计分析 (如主成分分析、正交偏最小二乘判别分析等), 并利用主成分分析产生的数据筛选出具有显著差异的潜在标志物, 通过标准品验证对差异代谢物进行定量。这种特征标志物可直接阐明海南油茶的独特之处, 为后续海南油茶品质评价提供一定科学依据, 并为海南油茶的保护及高附加值特色产品的开发提供一定理论支撑。

基金项目: 海南油茶授粉增产技术及茶油品质特征研究 (HAAS2024ZDGZ03); 海南油茶授粉技术创新及茶油品质特征研究 (YYLH2504)

作者简介: 唐樱冉 (2001-), 硕士研究生, E-mail: t13275446215@163.com

通讯作者: 郑道君 (1979-), 研究员, E-mail: daojunzh@163.com; 吴黎明 (1973-), 二级研究员, E-mail: apiswu@126.com

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

色谱级乙腈、甲醇、甲酸购自Thermo Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA)。Agilent 6545液质联用系统 (UPLC-QTOF-MS) 用于化合物定性分析和定量检测, 色谱柱选用Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 2.0 × 150 mm, 2.7 μm, 数据处理采用Agilent Masshunter工作站。

2.2 方法

2.2.1 样品收集与处理

收集海南产区及其他产区 (包括广东、广西、江西、浙江) 的蜜蜂授粉油茶样品, 将油茶果粉碎后, 取150 mg样品, 加入150 μL水, 涡旋混匀, 再加入600 μL乙醇/正己烷 (2:1, V/V) 涡旋30 s, 然后超声提取10 min后, 每个样品再涡旋10 s, 于4° C, 8000 r/min下离心5 min, 取300 μL上清液旋蒸干燥, 最后, 将干燥物于100 μL乙醇/正己烷 (2:1, V/V) 中复溶。在室温下将样品涡旋2 min, 将样品转移到带玻璃内插管的2 mL样品瓶中, 等待仪器进样。

2.2.2 UPLC-QTOF-MS 条件

利用Agilent 6545液质联用系统 (UPLC-QTOF-MS) 检测所述油茶样品, 所述液质联用系统检测的液相条件如下: 采用Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 2.0 × 150 mm, 2.7 μm色谱柱, 以水/甲醇 (9:1, v/v), 加入10 mmol/L乙酸铵为流动相A, 以乙腈/甲醇/异丙醇 (2:3:5, v/v/v), 加入10 mmol/L乙酸铵为流动相B; 采用梯度洗脱程序分离: 0 min, 60%的流动相B; 5 min, 65%的流动相B; 23 min, 100%的流动相B; 26 min, 100%的流动相B; 27 min, 60%的流动相B, 后运行时间4 min。柱温为60°C, 流动相的流速为0.40 mL/min, 液质联用系统的质谱条件如下: 采用飞行时间质谱, ESI离子源, 负离子扫描模式; 干燥气温度: 250°C; 干燥气流速: 11 L/min; 鞘气温度: 300°C; 鞘气流速: 12 L/min; 雾化器压力: 35 psi; 毛细管电压: 正离子4000 V。

2.3 统计学分析

将UPLC-QTOF-MS采集的原始数据通过安捷伦MassHunter Profinder软件进行处理, 将.d格式的数据转换为.cef格式。随后, 将所得.cef文件导入安捷伦Mass Profiler Professional (MPP) 软件, 进行主成分分析 (PCA), 以揭示不同样品间的物质组成差异。进一步通过AgtIDBrowser软件结合Metlin数据库对潜在

差异物质进行鉴定, 得出具体化合物名称。最后, 将PCA分析结果导入SIMCA 14.1软件, 采用正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 获取各组差异物质的变量重要性投影 (VIP) 值, 并对VIP值较高的化合物进行筛选最终确定海南油茶的特征标志物。

3 结果与分析

3.1 通过多元统计学方法对海南油茶和其他油茶实现分类

为探究海南油茶与其他产区油茶之间的代谢物差异, 在获得非靶向代谢组学的原始质谱数据并进行筛选后, 研究采用了多元统计分析方法对数据进行深入解析。首先, 利用安捷伦Mass Profiler Professional (MPP) 软件中的韦恩图进行可视化分析。如图1所示, 该图直观地展示了海南油茶组与其他产区油茶组之间独有及共有的代谢物数量。图中各区域的集合关系明确揭示, 海南油茶具有130个独有代谢物, 这些物质是其区别于其他产区油茶的潜在标志性成分。同时, 共有代谢物区域则代表了不同产地油茶所共有的核心化学成分。韦恩图为后续的精筛提供了目标范围。

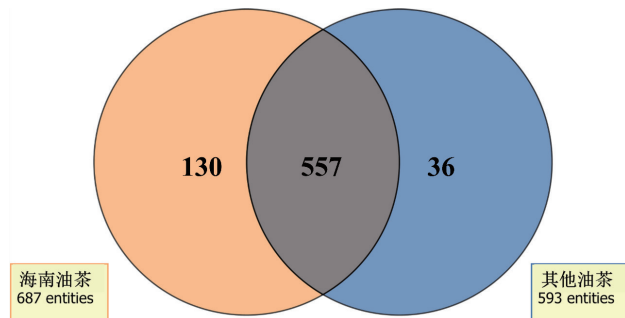


图1 海南油茶与其他产地油茶差异代谢物韦恩图

此外, PCA可以通过对高维数据进行降维, 减少变量间冗余^[12]。利用PCA进行无监督的模式识别^[13], 可以直观地展现样本间的自然聚集趋势和整体分离情况。分析结果如图2a所示, 海南油茶与对照其他地区油茶的样本在PCA得分图上呈现分离的趋势, 这表明海南油茶和其他油茶样品存在差异。在此基础上, 为进一步放大组间差异并筛选出特征性标志物, 研究采用了OPLS-DA进行进一步分析。OPLS-DA是一种多变量分析方法, 已广泛应用于食品追溯与代谢组学差异物筛选与鉴定中, 该模型采用监督模式识别法, 可以更好地观察组间差异^[14, 15]。最后, 结果如图2b所示, 海南油茶与其他油茶之间存在高度显著的分离, 且模型通过了严格的置换检验, 如图2c, 有效避免了

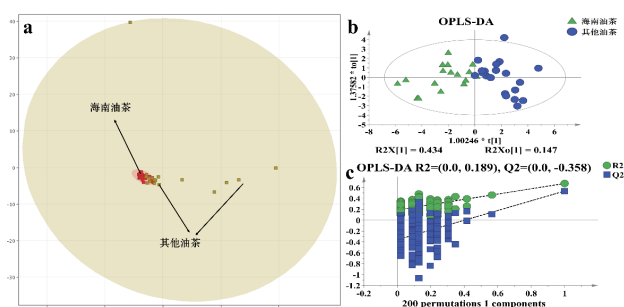


图2 海南油茶与其他产地油茶的多元统计分析
(a) 主成分分析得分图；(b) 正交偏最小二乘判别分析得分图；(c) OPLS-DA模型200次置换检验结果。

表1 VIP值高于0.9的化合物

化合物名称	VIP值
Tetradecyl isobutyrate	1.16265
Hydroxyphthioceranic acid	1.13463
Hentriacontan-16-one	1.11799
Gheddic acid	1.07384
Decaprenol	1.06748
15-Hydroxy-pentacosanoic acid	1.05735
TG (20:0/20:2(11Z,14Z)/20:2(11Z,14Z))	1.0536
Japonicumins A	1.01819
Vitamin D3 butyrate	0.926688
1-(10-methyl-hexadecanoyl)-2-(8-[3]-ladderane-octanyl)-sn-glycerol	0.919496
PI (16:0/18:3(9Z,12Z,15Z))	0.901915

模型过拟合。

获得OPLS-DA模型后，可以通过软件得出每一个代谢物变量的变量重要性投影（VIP）值。VIP值定量地反映了每个变量对组间区分贡献度的大小。本研究将VIP>0.9设定为关键的筛选阈值，那些VIP值大于该值的代谢物被视为导致海南油茶和其他油茶代谢差异的核心标志物，表1为VIP值大于0.9的代谢物列表。

3.2 差异物质分析

PCA与OPLS-DA结果表明海南油茶样品与其他产区油茶样品呈现出分离趋势，这种有效的分类模式验证了地理来源对油茶代谢物的影响，这表明海南油茶可能具备特征标志物。

为了更精确地筛选出具有统计学意义的差异代谢物，研究进一步绘制了火山图，结果如图3所示。火山图巧妙地以 $-\log_{10}(P \text{ Value})$ 为纵坐标，以 $\log_2(\text{Fold Change})$ 为横坐标，将代谢物点阵划分为三个关键区域：差异代谢物上调、差异代谢物下调以及无显著差异代谢物^[16]。火山图为最终确定海南油

茶的特征标志物奠定了坚实的数据基础。此外，我们列出了火山图数据中显著上调的差异代谢物，结果如表2所示。

经过对比，我们发现表1与表2共有8种化合物重合，分别为Hentriacontan-16-one、Vitamin D3 butyrate、Tetradecyl isobutyrate、PI (16:0/18:3 (9Z,12Z,15Z))、Japonicumins A、Hydroxyphthioceranic acid、Gheddic acid、15-Hydroxy-pentacosanoic acid，最后，通过查阅这些物质的相关功效成分进行最后一步筛选。

3.3 关键差异代谢物筛选

通过进一步筛选，可以发现PI (16:0/18:3 (9Z,12Z,15Z))即磷脂酰肌醇 (16:0/18:3 (9顺,12顺,15顺))的含量在不同产地油茶中差异显著。我们购买了磷脂酰肌醇 (16:0/18:3 (9顺,12顺,15顺))标准品进行定量，发现磷脂酰肌醇 (16:0/18:3 (9顺,12顺,15顺))在海南油茶中稳定存在，而在其他产地油茶中含量较少，因此，可以作为鉴别海南油茶的特征性标志物。磷脂酰肌醇 (16:0/18:3 (9顺,12顺,15顺))的具体质谱参数见表3，保留时间为16.69 min，质荷比为831.5029。

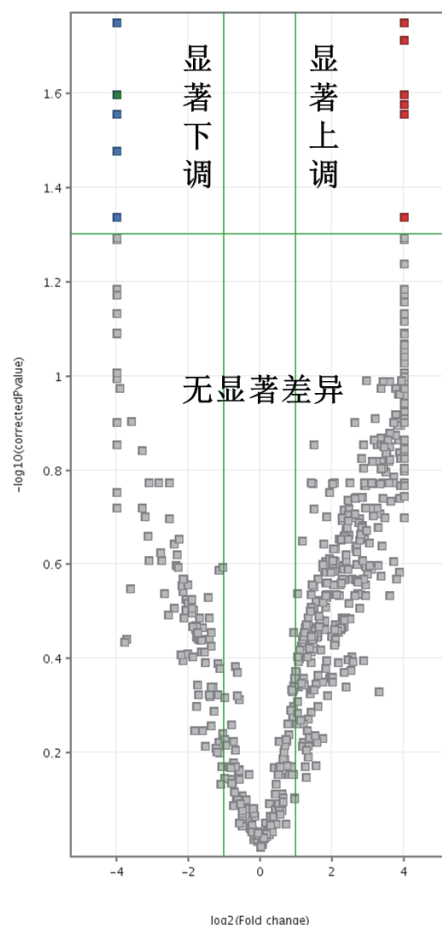


图3 海南油茶与其他产地油茶的差异代谢物火山图

表2 海南油茶与其他产地油茶相比显著上调的差异化化合物

化合物名称	P Value (海南油茶vs其他产地油茶)	Fold Change (海南油茶vs其他产地油茶)
Hentriacontan-16-one	1.87E-04	199.3041
Vitamin D3 butyrate	1.37E-04	379.4849
Tetradecyl isobutyrate	8.20E-04	736.9467
PI (16:0/18:3(9Z,12Z,15Z))	3.94E-04	158.0264
Mycolipanoic acid	5.75E-04	354.6465
Japonicumins A	4.02E-04	167.342
Hydroxyphthioceranic acid	4.02E-05	419.6623
Gheddic acid	7.55E-04	334.2966
5 α ,8 α -Epidioxy-stigmasta-6,9(11),22E-trien-3 β -ol	2.85E-04	405.4362
15-Hydroxy-pentacosanoic acid	5.94E-04	245.177

表3 磷脂酰肌醇 (16:0/18:3 (9顺,12顺,15顺)) 相关质谱参数

化合物名称	CAS号	保留时间 (min)	质荷比 m/z	线性范围 ($\mu\text{g/g}$)	化学式
磷脂酰肌醇 (16:0/18:3 (9顺,12顺,15顺))	383907-36-6	16.69	831.5029	7.3~32.6	C ₄₃ H ₇₇ O ₁₃ P

4 结论

据新华网报道,截至目前,全国油茶种植面积已达7500多万亩,茶油产量约110万吨。在国家林业和草原局、国家发展和改革委员会、财政部联合印发的《加快油茶产业发展三年行动方案(2023—2025年)》中,海南省被列为油茶产业发展的重点拓展区。在此背景下,加强海南油茶特征化合物的研究,对推动区域产业健康可持续发展具有重要意义。基于非靶向代谢组学分析,本研究鉴定出磷脂酰肌醇(16:0/18:3(9顺,12顺,15顺))为海南油茶的一个关键特征标志物。该化合物被认为是一种具有潜在生物活性的次生代谢产物,其发现为区分海南油茶与其他产区产品提供了关键化学依据。这一结果不仅深化了对海南油茶独特品质的科学认知,也为后续开发高附加值、功能成分明确的产品指明了方向。因此,磷脂酰肌醇(16:0/18:3(9顺,12顺,15顺))的确定,不仅有助于实现海南油茶的精准产地溯源与真伪鉴别,也对提升产业竞争力、推动区域特色农业可持续发展具有重要意义。

参考文献

- [1] 覃雪晶,夏飞丝,张凌云.不同疏花强度对油茶果实产量和油脂品质的影响[J].森林与环境学报,2025,45(06):641-648.
- [2] 伍德林,杨俊华,刘芸,等.我国油茶果采摘装备研究进展与趋势[J].中国农机化学报,2022,43(01):186-194.
- [3] 陈永忠.我国油茶科技进展与未来核心技术[J].中南林业科技大学学报,2023,43(07):1-22.

[4] Liu J, Wu L, Chen D, et al. Development of a soil quality index for *Camellia oleifera* forestland yield under three different parent materials in Southern China[J]. Soil & Tillage Research, 2018, 176: 45-50.

[5] 郭丽,赵锋,吕海鹏,等.市售山茶油的脂肪酸组成及含量分析[J].食品工业,2020,41(05):333-336.

[6] 吴少锦,邹荣灿,石治敏,等.市售山茶油功能性脂肪酸组成分析[J].湖北农业科学,2017,56(04):733-735.

[7] 夏腾飞,陈加利,熊子君,等.海南岛不同油茶主产区油茶籽油营养成分分析及品质综合评价[J].中国油脂,2023,48(06):91-98.

[8] 刘定力.油茶种植技术对林业可持续发展的影响分析[J].种子科技,2025,43(17):213-215.

[9] 罗茂智.发展油茶产业助推乡村振兴[J].林业与生态,2021(07):31-32.

[10] 刘艳菊,徐玉芬,于钊妍,等.海南油茶林下经济模式分析[J].中国果业信息,2025,42(06):115-117.

[11] 王东,刘蓓,穆润,等.基于代谢组学研究白藜芦醇改善秀丽隐杆线虫脂质沉积的机制[J].成都中医药大学学报,2025,48(06):13-19.

[12] 杨鸿波.基于多变量回归分析与主成分分析的建筑工程环境因素影响评估与决策研究[J].黑龙江科学,2025,16(20):53-56.

[13] 周勤,王远军.基于PCA的无监督群组配准算法研究[J].生物医学工程学进展,2022,43(03):130-133,165.

[14] 刘养冉,由守昌,辛国凤,等.基于OPLS-DA和聚类分析评价西瓜皮的品质与利用潜力[J].山东农业大学学报(自然科学版),2025,56(05):831-840.

[15] 罗良渊,刘趣,徐文芬,等.白茅根HPLC指纹图谱及炮制前后化学成分分析[J].亚太传统医药,2021,17(03):51-59.

[16] 孙静波,于天宇,张西哲,等.不同盐胁迫下青甘韭代谢差异分析[J].植物遗传资源学报,2025,26(11):2264-2273. 