DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260607002
引用格式: 陈庭宇, 李向安, 吴雨杨, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法测定白桦汁采集期代谢物动态变化[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(18): 123–131.
Chen Tingyu, Li Xiangan, Wu Yuyang, et al. Determination of dynamic metabolite variations in *Betula pendula* Roth juice during the harvesting period by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(18): 123–131. (in Chinese with English abstract).

超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法测定白桦汁采集期代谢物动态变化

陈庭宇[1], 李向安[1], 吴雨杨[1], 孙继鹏[1], 韩 笑[2], 蔡妍妍[2], 季 超[1], 赵良娟[1], 郑文杰[1*]
(1. 天津师范大学生命科学学院, 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387; 2. 内蒙古大兴安岭林下产品有限公司, 牙克石 022150)

摘 要: 目的 研究白桦汁在采集期内代谢物的动态变化规律, 分析其与可溶性固形物含量、pH 及电导率等理化指标的内在关联。**方法** 以采自中国内蒙古牙克石产区连续 7 d 的白桦汁为对象, 经甲醇-水(7:3, *V*:*V*)冰浴超声提取、离心及 0.22 μm 滤膜过滤前处理后, 采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(ultra performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry, UPLC-Q-Exactive-MS)进行非靶向代谢组学分析; 以主成分分析(principal component analysis, PCA)考察代谢组的整体变化趋势, 以变量投影重要性(variable importance in projection, VIP)>1 且 P<0.05 筛选差异代谢物, 结合 UpSet 图、火山图及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析解析关键代谢途径, 并测定可溶性固形物含量、pH 与电导率, 采用 Spearman 秩相关分析构建代谢物-理化指标相关性网络。**结果** 白桦汁代谢组沿采集时间可划分为 3 个阶段, D1~D3, 生物碱与有机酸等胁迫响应类代谢物上调, 毛果芸香碱与 *α*-酮戊二酸的 $\log_2$FC 分别为+0.88 和+2.68, 且 D1 与 D2 间的差异代谢物多达 119 种(其中 41 种为该比较所特有); D4~D6, 碳水化合物、脂质与氨基酸占主导, 磷酸戊糖途径、淀粉与蔗糖代谢及苯丙素生物合成途径显著富集, *α*-亚麻酸($\log_2$FC=+4.21)与茉莉酸甲酯($\log_2$FC=+2.95)在该阶段达到峰值; D7, 多数功能性代谢物下调, 而与香气相关的苯系化合物选择性升高, D6 与 D7 间仅检出 4 种差异代谢物, 提示代谢组趋于稳定。采集期内白桦汁的 pH 为 4.11~6.99, 电导率为 211.16~608.40 μS/cm, 可溶性固形物含量为 0.80~2.66 °Brix; 相关性网络显示, 可溶性固形物含量与多种碳水化合物及有机酸呈强正相关, *DL*-苹果酸和乙酸是同时连接多项理化指标的代谢枢纽化合物。**结论** 白桦汁的代谢组成在 7 d 采集期内即呈现明显的阶段性演变, D4~D6 为功能性代谢物最为丰富的阶段, *DL*-苹果酸和乙酸可作为其品质评价的候选标志物; 研究结果为白桦汁采收窗口的科学界定、品质评价及高值化利用提供了理论依据。

关键词: 白桦汁; 非靶向代谢组学; 代谢物动态变化; 采集期; 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法
中图分类号: TS207.7 **文献识别码:** A **文章编号:** 2095–0381(2026)18–0123–09

收稿日期: 2026-06-07
第一作者: 陈庭宇(2000—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为农食产品质量安全与评价。E-mail: 1064757047@qq.com
***通信作者:** 郑文杰(1969—), 女, 博士, 研究员, 主要研究方向为农食产品质量安全与评价。E-mail: skyzwj@tjnu.edu.cn

Determination of dynamic metabolite variations in *Betula pendula* Roth juice during the harvesting period by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry

CHEN Ting-Yu[1], LI Xiang-An[1], WU Yu-Yang[1], SUN Ji-Peng[1], HAN Xiao[2], CAI Yan-Yan[2], JI Chao[1], ZHAO Liang-Juan[1], ZHENG Wen-Jie[1*]

(1. *College of Life Sciences*, *Tianjin Normal University*, *Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance*, *Tianjin* 300387, *China*; 2. *Inner Mongolia Greater Khingan Range Forest Understory Products Co*., *Ltd.*, *Yakeshi* 022150, *China*)

ABSTRACT: Objective To investigate the dynamic changes of metabolites in *Betula pendula* Roth juice during the harvesting period, and analyze their intrinsic associations with physicochemical indices including soluble solid content, pH and electrical conductivity. **Methods** *Betula pendula* Roth juice collected on 7 consecutive days from the Yakeshi production region in Inner Mongolia, China, was pretreated by methanol-water (7:3, *V*:*V*) ultrasonic extraction in an ice-water bath, centrifugation and 0.22 μm membrane filtration, and was then analyzed by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive-MS) based untargeted metabolomics. Principal component analysis (PCA) was used to examine the overall variation of the metabolome, differential metabolites were screened with variable importance in projection (VIP)>1 and P<0.05, key metabolic pathways were resolved by UpSet plots, volcano plots and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis, and the soluble solid content, pH and electrical conductivity were determined to construct a metabolite-physicochemical index correlation network by Spearman rank correlation analysis. **Results** The results showed that the metabolome of *Betula pendula* Roth juice could be divided into 3 stages along the harvesting period: D1–D3, stress-responsive metabolites such as alkaloids and organic acids were up-regulated, with $\log_2$FC of +0.88 for pilocarpine and +2.68 for alpha-ketoglutaric acid, and as many as 119 kinds of differential metabolites (41 kinds of them unique to this comparison) were detected between D1 and D2; D4–D6, carbohydrates, lipids and amino acids predominated, the pentose phosphate pathway, starch and sucrose metabolism and phenylpropanoid biosynthesis were significantly enriched and alpha-linolenic acid ($\log_2$FC=+4.21) and methyl jasmonate ($\log_2$FC=+2.95) peaked at this stage; D7, most functional metabolites were down-regulated whereas aroma-associated benzenoids increased selectively, and only 4 kinds of differential metabolites were detected between D6 and D7, indicating that the metabolome tended to be stable. During the harvesting period, the pH, electrical conductivity and soluble solid content of *Betula pendula* Roth juice ranged from 4.11 to 6.99, from 211.16 to 608.40 μS/cm and from 0.80 to 2.66 °Brix, respectively; the correlation network showed that the soluble solid content was strongly and positively correlated with various carbohydrates and organic acids, and *DL*-malic acid and acetic acid acted as metabolic hub compounds simultaneously linking multiple physicochemical indices. **Conclusion** The metabolite composition of *Betula pendula* Roth juice undergoes a clearly stage-dependent evolution within a harvesting period of only 7 d, D4–D6 represent the stage richest in functional metabolites, and *DL*-malic acid and acetic acid can serve as candidate markers for quality evaluation; these findings provide a theoretical basis for scientifically defining the harvesting window and for the quality evaluation and high-value utilization of *Betula pendula* Roth juice.

KEY WORDS: *Betula pendula* Roth juice; untargeted metabolomics; dynamic metabolite variations; harvesting period; ultra performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry

0 引 言

白桦汁是经树皮切口或树干钻孔采集的新鲜木质部汁液，呈无色至淡黄色、无沉淀和杂质，并具白桦特有的淡淡香气，仅在北半球冬末至早春分泌，季节性明显。凭借较高的营养价值，白桦汁长期在加拿大、东欧及中国部分地区备受重视，全球市场近年稳步扩大[1–4]。其营养成分包括有机酸(琥珀酸、柠檬酸、苹果酸及脂肪酸)、无机盐、氨基酸与多肽，以及维生素 C、黄酮类和单宁等抗氧化物质和钙、磷、铁、镁、铜等矿物质与 B 族维生素[5–7]；氨基

酸质量浓度为 100~500 mg/L, 以谷氨酰胺、瓜氨酸、谷氨酸、异亮氨酸、缬氨酸及天冬酰胺为主, 于春季达到峰值[2,8]; 总碳水化合物含量因产地而异, 通常为 1.0%~2.6%, 以葡萄糖和果糖为主, 脂肪酸组成多样且以芥酸占比最高(41.92%)[9–10]。然而, 有关白桦汁采集期内成分动态变化的研究仍相对有限[11]。

代谢组学可系统表征多类代谢物, 已广泛应用于食品品质提升与食品真实性研究[12–13], 如通过捕捉掺假物引起的细微代谢扰动实现可可粉掺假的精准检测[14], 或通过追踪加工与贮藏过程中的代谢动态为工艺优化与品质保持提供依据[15–17], 为食品品质监测提供了更精准、高效的技术支撑。就白桦汁而言, 其成分在采集季内并非一成不变: 游离氨基酸呈显著逐日变化, 谷氨酰胺、瓜氨酸及异亮氨酸等于采集季中期达峰后下降[2]; 溶解糖与有机酸亦随采集日期显著改变, 气候导致的休眠解除时间差异会加速或延迟不同采集季间的成分转变[10]; 逐日监测还显示, 与抗病及非生物胁迫耐受相关的防御蛋白含量随采集季末期升高, 说明数天内树体生理状态即可显著改变[18]。可见, 采集日期对白桦汁的营养与功能特性具有决定性影响, 阐明采集季内的代谢动态是合理设计品质导向采集方案的前提[19]。

然而, 现有研究多依赖靶向分析方法[如基于高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)的糖定量、电感耦合等离子体质谱法(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)矿物质分析及针对单一抗氧化物的酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定], 仅能覆盖代谢组的一小部分, 白桦汁采集期的整体代谢图谱及次级代谢物、脂质等的动态变化仍基本未被表征。基于超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(ultra performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry, UPLC-Q-Exactive-MS)等高分辨平台的非靶向代谢组学无需靶标先验知识, 可对跨多个化学类别的数千种代谢物进行无假设同步分析[12–13,20], 并已在茶叶、苹果等复杂食品基质的时序代谢监测中成功解析靶向方法难以发现的阶段特异性富集模式与调控途径[15,21–22]。基于此, 本研究以连续 7 d 采集的白桦汁为对象, 采用 UPLC-Q-Exactive-MS 非靶向代谢组学结合可溶性固形物含量、pH 及电导率测定, 系统表征其采集期内的代谢动态变化, 并通过京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析及代谢物–理化指标相关性网络分析, 鉴定关键代谢途径与品质相关枢纽代谢物, 以期为白桦汁采收窗口的科学界定、品质评价与高值化利用提供分子层面的科学依据。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

白桦汁采于2024年白桦汁采集季(4月26日至5月2日), 采样地点为内蒙古自治区呼伦贝尔市牙克石市孤山景区内的天然白桦次生林。该林分以白桦(*Betula pendula* Roth)为建群种, 林木分布较均匀, 相邻林木中心间距大于 6 m(最小不低于 5 m), 据此折算林分密度约为 280~400 株/hm^2; 所选样树茎径相近, 树龄 35~45 a, 胸径约 18 cm, 生长健康、树势一致, 无明显病虫害及机械损伤。每日于同一时段选取 6 株样树, 在树干距地面 50 cm 处钻孔取汁, 孔径 10 mm、孔深 5 cm, 采集后随即封孔; 同一样树需钻取多个孔时, 相邻钻孔的水平间距大于等于 15 cm, 以避免前次钻孔形成的伤流区及愈伤组织影响后续汁液的代表性。如此连续采集 7 d, 所采样品立即分装, 于–20 ℃保存, 分析前于 4 ℃冷藏解冻。

甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 甲酸、冰乙酸(色谱纯, 日本东京化成工业株式会社); 1,1-二苯基-2-苦肼基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)(纯度≥99%, 上海阿拉丁试剂有限公司); 2,4,6-三吡啶基三嗪(2,4,6-tripyridyl-s-triazine, TPTZ)(纯度≥99%, 北京索莱宝科技有限公司)。

1.2　仪器与设备

Vanquish Flex 超高效液相色谱仪、Q-Exactive 高分辨质谱仪(配大气压电离源, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ACQUITY HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm, 美国 Waters 公司); PR32 数显折光仪(日本爱拓 ATAGO 公司); PHB-4 型 pH 计、DDB-303A 型电导率仪(上海雷磁公司); 3K15 通用型台式高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); MCT-200-C 型 2.0 mL 离心管(美国 Corning 公司); 0.22 μm 有机相尼龙针式滤膜(天津市津腾实验设备有限公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　样品采集与预处理

提取前, 将冷冻的白桦汁样品于 4 ℃缓慢解冻并充分涡旋以保证均一。准确移取 300 μL 白桦汁至无菌 2.0 mL 离心管中, 加入 1.5 mL 预冷(–20 ℃)的提取溶剂(甲醇:水=7:3, *V*:*V*), 以沉淀残留蛋白质并充分提取代谢物。混合物剧烈涡旋 3 min (2500 r/min), 随后超声辅助提取(37 kHz, 500 W) 1 h; 为防止热敏感代谢物降解, 超声提取在冰水浴中进行。提取后, 样品于 4 ℃、10000×*g* 离心 10 min 以沉淀杂质。最后小心收集 1.0 mL 上清液, 经 0.22 μm 有机相尼龙针式滤膜过滤至进样瓶中, 立即进行 UPLC-Q-Exactive-MS 分析。同时制备提取空白, 并按照已建立的代谢组学方法, 取各样品上清液 20 μL 混合制备质量控制(quality control, QC)样品[23]。

1.3.2　非靶向代谢组学分析

采用 ACQUITY HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)进行分离, 串联配备大气压电离(atmospheric pressure ionization, API)源的 Q-Exactive 高分辨质谱仪进行检测。UPLC 梯度洗脱

程序为: 0 min, 95% A; 0~1.0 min, 95%~45% A; 1.0~6.0 min, 45%~30% A; 6.0~12.0 min, 30%~5% A; 12.0~15.0 min, 5% A; 15.0~17.0 min, 5%~95% A; 17.0~17.5 min, 95% A。流动相 A 为超纯水(含 0.1%甲酸, *V*:*V*), 流动相 B 为乙腈(含 0.1%甲酸, *V*:*V*)。流速 0.25 mL/min, 进样量 10 μL。质谱检测采用全扫描+数据依赖二级质谱(data-dependent MS/MS, ddMS2)模式, 正、负离子模式同时采集; 扫描范围 *m*/*z* 120~1400, 碰撞能量分别为 20、40、60 eV; 喷雾电压 3.2 kV; 一级质谱(全扫描)分辨率[半高宽(full width at half maximum, FWHM)]设为 70000, 二级质谱分辨率设为 17500。

代谢物鉴定与质量控制原始质谱数据采用 Compound Discoverer 3.3 Untargeted Metabolomics 工作流处理, 依次进行谱图筛选、保留时间校正、特征峰检测与分组、缺失值填补、化合物组装、数据库检索及注释指认。保留时间校正采用自适应曲线模型, 最大位移 2 min; 特征峰检测的质量偏差小于等于 5×10^{-6}, 母离子质量容差 0.025 Da, 最小峰强度大于等于 1×10^{4}, 最小谱图数大于等于 3, 去除单峰并对 Br、Cl 进行同位素归并; 特征峰分组的保留时间容差 0.2 min、最小谷值 10%。化合物组装时母离子质量容差小于等于 5×10^{-6}, 高、低精度碎片离子容差分别为 2.5 mmu 和 0.5 Da, 优选$[M+H]^{+}$与$[M-H]^{-}$作为二级质谱母离子。代谢物定性依次检索 mzCloud 谱库、ChemSpider、HMDB 质量列表、预测分子式及 Metabolika 通路数据库; mzCloud 检索采用余弦相似度算法, 匹配因子阈值大于等于 60; 注释指认以质量偏差小于等于 5×10^{-6} 校验, 综合 FISh score、mzLogic score 与谱图相似度评分确定最终结果。

本研究共检出并注释代谢物 305 种, 质量偏差均小于等于 5×10^{-6}(中位值 2.12×10^{-6}, 66.2%的化合物小于等于 3×10^{-6}), 保留时间分布于 0.11~18.67 min。鉴定结果按代谢组学标准倡议(metabolomics standards initiative, MSI)置信度分级标注: 具实验二级碎片谱并与 mzCloud 谱库匹配者 30 种(匹配因子中位值 82.3, 范围 50.7~99.3), 归属 MSI II 级; 仅依据精确质量数、分子式及质量列表匹配而无二级谱验证者 127 种, 归属 MSI III级; 其余 148 种仅获分子式预测与名称匹配, 归属 MSI IV级。本研究未使用化学标准品进行保留时间与二级谱的双重比对, 故未作出 MSI I级鉴定, 本研究中所述代谢物均为推定鉴定。质量控制方面, 取各样品上清液 20 μL 等体积混合制备 QC 样品, 随样品序列间隔进样, 同时制备提取空白随行进样以扣除背景干扰; 以特征峰在 QC 样品中的峰面积相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)小于 30%作为保留标准。保留的特征峰经归一化方法、log 转换及 Pareto 标度化后导入 MetaboAnalyst 6.0 进行多元统计分析。

1.3.3 理化指标测定

采用 PR32 数显折光仪测定白桦汁的可溶性固形物含量(以°Brix 计)。采用 PHB-4 型 pH 计和 DDB-303A 型电导率仪分别直接测定 pH 和电导率(electrical conductivity, EC)。测定时, 取适量新鲜白桦汁滴加于折光仪检测棱镜上, 确保完全覆盖且无气泡或颗粒杂质。所有测定均重复 3 次, 以保证分析的可靠性和重现性。

1.4 数据处理

数据采用 Microsoft Excel、SPSS 22.0 及 Origin 9.0 进行处理。所有结果以平均值±标准偏差表示, *n*=3(指每个采集日独立采集、独立前处理并独立进样的 3 份样品, 即生物学重复)。组间差异显著性采用单因素方差分析结合多重比较检验, $P<0.05$ 表示差异显著。非靶向代谢组学数据采用 Compound Discoverer 3.3 处理, 并上传至 MetaboAnalyst 6.0 平台进行主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)、正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)及层次聚类分析(hierarchical clustering analysis, HCA)。以变量投影重要性(variable importance in projection, VIP)>1 且 $P<0.05$ 的变量鉴定为潜在差异代谢物。代谢途径采用 KEGG 数据库进行注释[24]。

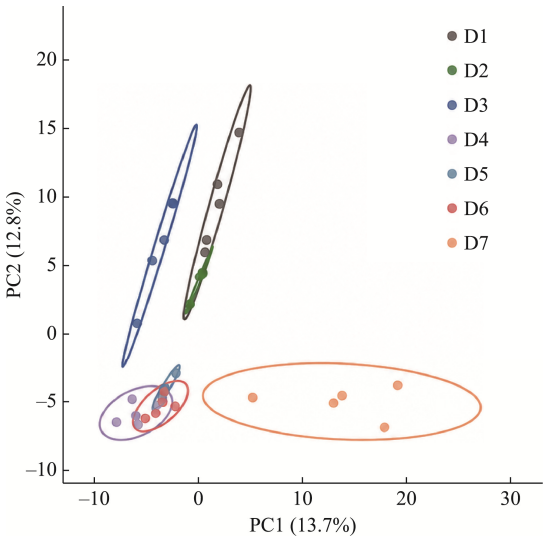
2 结果与分析

2.1 白桦汁代谢组的多元统计分析

采用 MetaboAnalyst 6.0 对原始数据矩阵进行预处理, 包括缺失值填补、标准化及归一化。随后采用 PCA 这一无监督多元方法, 在不对分组结构作任何先验假设的情况下, 探究采集期白桦汁代谢组的整体变化趋势。如图 1 所示, 前两个主成分(PC1 和 PC2)共解释了总方差的 26.5% (PC1: 13.7%; PC2: 12.8%)。该累积解释方差水平符合非靶向代谢组学数据集的高维特征。值得注意的是, 尽管数据维度较高, 样品仍沿采集时间呈现清晰且可重现的聚类模式: 沿 PC1 的时序轨迹可划分为 3 个明显的代谢阶段——前期(D1~D3)、中期(D4~D6)和后期(D7)。各阶段内样品紧密聚集, 阶段间则在两个主成分上呈现明显分离, 表明牙克石白桦汁的代谢组成在采集期内发生了系统性、时间依赖的变化。上述结果表明, PCA 可有效捕获白桦汁采集期的代谢动态变化, 为后续差异代谢物筛选与通路分析奠定基础。

2.2 采集期白桦汁差异代谢物分析

为进一步以逐日分辨率阐明白桦汁代谢组的时序动态特征, 采用 UpSet 分析系统可视化相邻采样日之间差异代谢物集合的交集结构(图 2)。D1 与 D2 比较在所有两两比较中产生的差异代谢物数目最多, 共鉴定出 119 种, 其中 41 种为该比较所特有。采集初期即出现如此高比例的特有差异代谢物, 提示该阶段存在尤为强烈且特异的代谢响应, 可能反映了白桦树对机械损伤的初始生理应答以及冬



注: 不同颜色符号代表连续采集日(D1~D7)的样品, 每组均绘制95%置信椭圆。

图 1　牙克石产区白桦汁采集期 7 d 代谢组的 PCA 得分图

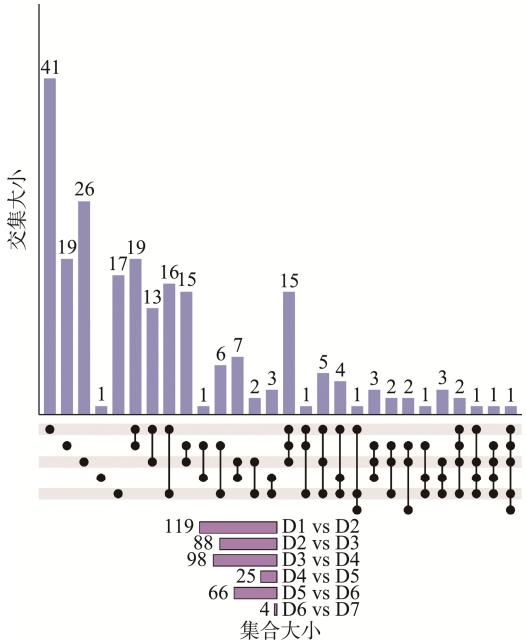
Fig.1　PCA scores plot of the *Betula pendula* Roth juice metabolome over the 7 d harvesting period collected from the Yakeshi region

季休眠后木质部汁液活跃流动的恢复。D3 与 D4 比较(对应前期向中期的转变)产生 26 种特有差异代谢物, 提示树体由胁迫主导响应转向支持活跃生长的代谢模式时发生了第二波代谢调控。随着采集进入后期, 特有差异代谢物数目大幅减少; 在 D6 与 D7 比较中仅检出 4 种差异代谢物, 且无特有组分, 表明代谢组在采集末期已逐渐趋于稳定, 主要的代谢重组在前期阶段已基本完成。

除阶段转变特异性响应外, 另有 19、13、16 及 15 种代谢物在 2 个或更多连续两两比较中持续差异表达。此类持续性差异代谢物更可能反映采集期内核心代谢途径的持续调控, 而非单日波动所致的瞬时变化, 可作为表征白桦汁采集期整体代谢轨迹的候选生物标志物。

2.3 基于火山图与 KEGG 富集的白桦汁代谢通路分析

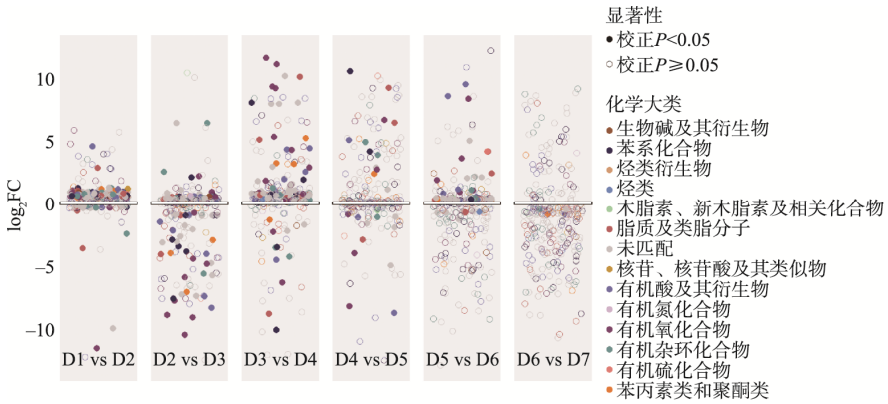
采用火山图分析对 3 个采集阶段间的两两比较结果进行可视化, 解析代谢物变化的方向与幅度(图 3)。在采集前期(D1~D3), 生物碱类衍生物明显上调, 毛果芸香碱的 $\log_2$FC 为 +0.88, 同时有机酸(包括 α-酮戊二酸, $\log_2$FC=+2.68)上调。该阶段生物碱和有机酸的同步富集与胁迫响应主导的代谢模式相一致, 即白桦树在树干钻孔的机械刺激下同时动员初级碳代谢物和与防御相关的次级代谢物。中期(D4~D6)以脂质及类脂分子的显著积累为特征, 其中以 α-亚麻酸($\log_2$FC=+4.21)和茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA) ($\log_2$FC=+2.95)最为突出, 标志着采集期代谢活性的峰值阶段。至后期(D7), 多数代谢物丰度显著下降, 而苯系化合物选择性富集, 提示随着春季生长的高能耗需求逐步得到满足, 代谢重心转向与香气相关的次级代谢物合成。



注: 左侧柱表示各两两比较的显著差异代谢物总数(集合大小); 顶部竖柱表示交集大小(即各比较间共有差异代谢物数目); 底部相连黑点表示该交集所包含的具体两两比较。

图 2　牙克石产区相邻采样日白桦汁显著差异代谢物交集的 UpSet 图

Fig.2　UpSet plot illustrating the overlap of significantly differential metabolites in *Betula pendula* Roth juice between adjacent sampling days for the Yakeshi region samples

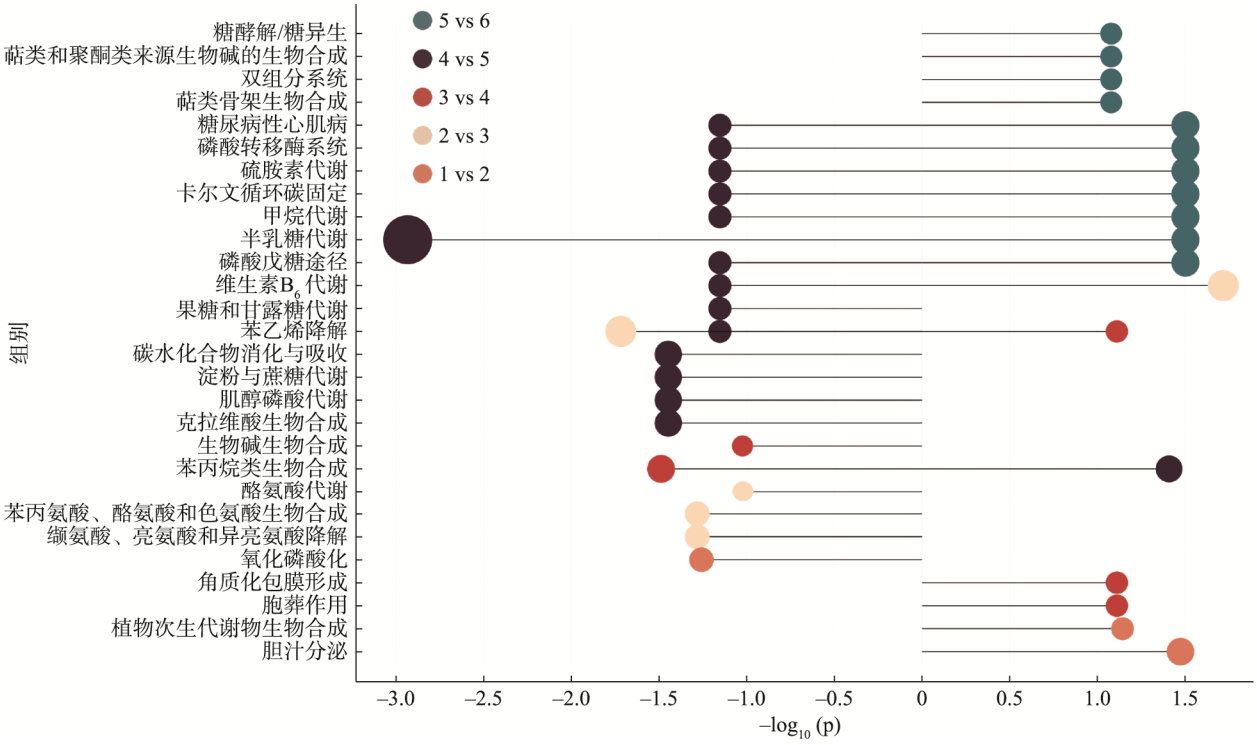


注: 各子图纵轴表示以 2 为底的差异倍数对数($\log_2$FC), 按代谢物所属化学大类(以颜色区分)展示相邻采样日间显著变化的代谢物。

图 3　牙克石产区相邻采样日差异代谢物的火山图

Fig.3　Volcano plots of differential metabolites from adjacent-day comparisons in the Yakeshi region samples

KEGG 通路富集分析进一步验证并阐释了上述阶段特异性代谢动态(图 4)。在牙克石样品中，戊糖磷酸途径、淀粉与蔗糖代谢及苯丙烷类生物合成在采集中期显著富集。此外，半乳糖代谢、苯乙烯降解及苯丙烷类生物合成被鉴定为整个采集期各组间显著差异的通路。这些富集通路共同反映了一个连贯且整合的代谢程序：戊糖磷酸途径的富集表明还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)和生物合成前体的生成加快，以支持活跃的细胞增殖；淀粉与蔗糖代谢的富集则反映了贮藏碳储备的大规模重新分配，以满足打破冬季休眠和启动芽萌发的高能量需求；苯丙烷类生物合成的同步富集与苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)催化的酚类化合物和木质素前体合成通量上调相一致，是创伤愈合和防御响应的一部分。



注：气泡图展示显著富集的通路，气泡大小与映射到各通路的代谢物数目成正比，颜色表示采样日比较。

图 4 牙克石产区相邻采样日差异代谢物的 KEGG 通路富集分析

Fig.4 KEGG pathway enrichment analysis of differential metabolites between adjacent sampling days for the Yakeshi region samples

采集期观察到的明显代谢变化与白桦树从冬季休眠向春季活跃生长的生理转变及其对机械采集的响应密切相关。具体而言，中期 α-亚麻酸和 MeJA ($\log_2$FC=+2.95)的显著上调，强烈提示损伤诱导的防御信号级联被激活。茉莉酸甲酯是一种特征明确的植物激素，经十八碳烷酸途径由 α-亚麻酸合成，已知会在树干钻孔等机械损伤后迅速积累[25–26]。其在 D4~D6 达到峰值，表明茉莉酸介导的信号响应在中期达到最大强度，驱动下游苯丙烷类生物合成及其他防御相关次级代谢物途径的诱导。与此同时，该阶段戊糖磷酸途径和淀粉与蔗糖代谢的显著富集，反映了对维持春季生长启动高能量需求至关重要的碳储备动态重新动员。

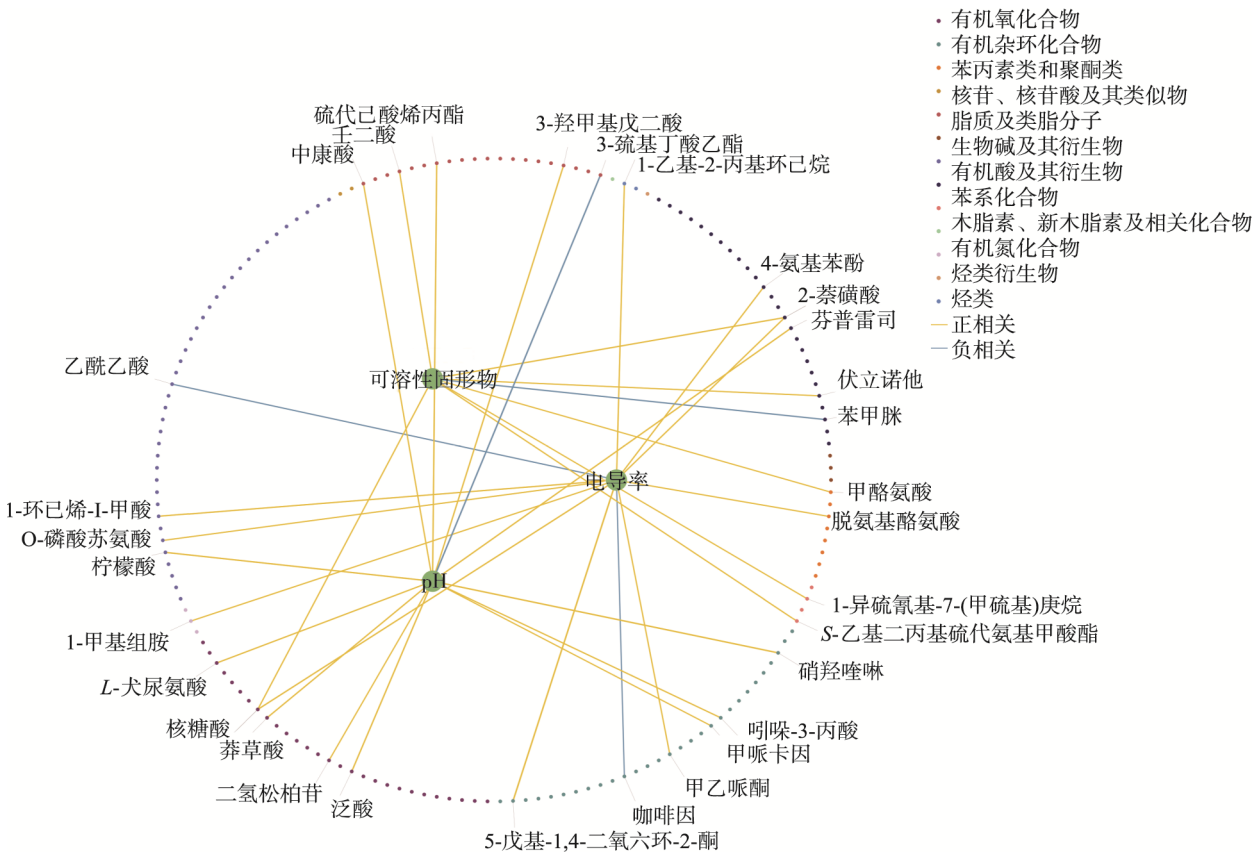
2.4 白桦汁代谢物与理化指标的相关性网络分析

为进一步阐明代谢物与牙克石白桦汁理化特性(表 1)之间的内在关联，构建了代谢物-理化指标相关性网络(图 5)。采用 Spearman 秩相关分析，仅保留同时满足$|\rho|>0.5$ 且 $P<0.05$ 的相关关系纳入网络，以确保仅可视化稳健且具有统计学意义的关联。

表 1 牙克石产区白桦汁的理化参数(n=3)

Table 1 Physicochemical parameters of *Betula pendula* Roth juice from the Yakeshi region (n=3)

采集时间/d	pH	电导率/(μS/cm)	可溶性固形物含量/°Brix
1	6.96±0.16	608.40±366.36	2.66±0.66
2	6.29±0.36	513.40±82.52	1.28±0.15
3	6.99±0.10	211.16±82.88	0.80±0.21
4	5.91±0.32	557.80±136.39	1.54±0.11
5	5.19±0.42	276.42±93.56	1.04±0.34
6	6.58±0.23	338.00±109.93	0.86±0.29
7	4.11±0.28	600.60±180.86	1.08±0.33



注: 绿色节点代表 3 项理化指标(可溶性固形物、电导率、pH), 外周彩色节点代表各代谢物, 并按其化学大类聚类(见图例); 黄色连线表示显著正相关(Spearman 秩相关系数, $|\rho|>0.5$, $P<0.05$), 蓝色连线表示负相关。

图 5　白桦汁代谢物与理化指标的相关性网络

Fig.5　Correlation network of metabolites and physicochemical indices in *Betula pendula* Roth juice

可溶性固形物含量与单糖、双糖及糖醇等多种碳水化合物, 以及 *DL*-苹果酸和 4,5,7-三羟基香豆素等有机酸均呈强正相关。该结果表明, 可溶性固形物含量不仅反映白桦汁的总糖浓度, 还可指示碳水化合物与有机酸代谢途径的整体活性, 可作为评估采集期代谢丰富度的快速实用指标。EC 与多种有机酸及其衍生物, 以及含氮、含硫代谢物呈正相关, 这与解离的有机酸阴离子和带电含氮化合物对溶液电导率的离子贡献相一致; 相反, EC 与某些苯系化合物和生物碱呈负相关, 后者在生理 pH 下基本不带电, 因而对电导率贡献甚微。pH 与包括柠檬酸和乙酰乙酸在内的三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环中间体呈负相关, 与其在活跃氧化代谢期间作为质子供体导致汁液酸化的作用相符; 相反, pH 与 1-甲基组氨酸、*L*-酪氨酸等胺类、核苷类似物及芳香碱呈正相关, 此类化合物作为质子受体可将汁液 pH 缓冲至较高水平。值得注意的是, *DL*-苹果酸与乙酸同时与多项理化指标相关联, 凸显其作为整合碳代谢、有机酸状态及汁液离子组成的代谢枢纽化合物的核心地位。这种多指标连接性提示, 二者可作为白桦汁采集期的整合性品质指标[21,27]。

3　讨论与结论

本研究采用 UPLC-Q-Exactive-MS 非靶向代谢组学技术, 系统分析了中国内蒙古牙克石白桦汁在连续 7 d 采集期内的动态代谢变化。PCA 结果表明, 其代谢组在采集期呈现 3 个时间上明显的阶段: 前期(D1~D3)以生物碱和有机酸等胁迫响应代谢物为主导; 中期(D4~D6)以类脂分子和与活跃生长相关的碳水化合物的峰值积累为特征; 后期(D7)整体代谢下降, 并伴随苯系化合物的选择性富集。UpSet 分析进一步表明, 代谢特异性在采集初期最高, 并向后期逐渐减弱, 提示代谢组随时间逐步趋于稳定。火山图与 KEGG 通路富集分析鉴定出戊糖磷酸途径、淀粉与蔗糖代谢及苯丙烷类生物合成是采集中期显著调控的关键代谢途径, 反映了涵盖损伤响应、碳储备动员及次级代谢物合成的整合性生理程序。具体而言, 树干钻孔产生的机械损伤可激活茉莉酸类物质的从头生物合成, 进而促进 MeJA 积累并上调苯丙烷类生物合成途径, 使 PAL 催化的酚类化合物合成通量显著增强, 最终在采集中期富集大量抗氧化和抗菌代谢物[25–26,28–30]。相关性网络分析进一步揭

示，*DL*-苹果酸和乙酸是连接多项理化品质指标的代谢枢纽化合物，而可溶性固形物含量、电导率和 pH 分别反映白桦汁代谢状态中互补的不同维度。综上，采集中期(D4~D6)的代谢物谱最为丰富多样。研究结果为优化白桦汁采集策略提供了分子层面的依据，也为其作为功能性食品资源的品质评价与高值化利用提供了科学基础。需要指出的是，本研究仅在单一产区、单一采集年份内进行了连续 7 d 的采样，未设置不同采集年份、不同立地条件及不同树龄白桦的对照样本，样品代表性有限；样本量相对较小，Spearman 秩相关分析在小样本条件下的统计效力较低，相关性网络所揭示的关联主要反映变化趋势，其稳健性尚需在更大样本量及多产区、多年份条件下进一步验证。因此，本研究结论的适用范围应限于所研究产区及相近立地条件的白桦林。

基于上述阶段性代谢特征，本研究可为白桦汁的生产实践提供如下采收建议：若以抗氧化功能及功能性次生代谢物(生物碱、苯丙素类、有机酸等)为目标，宜在采集期第 1~3 d 采收，此阶段胁迫响应型次生代谢物富集程度最高；若以碳水化合物、脂质及氨基酸等营养成分的产量与种类为目标，宜在第 4~6 d 采收，此阶段磷酸戊糖途径、淀粉与蔗糖代谢最为活跃，功能性代谢物种类最为丰富，可作为白桦汁原汁及功能性饮料加工的最佳采收窗口；若以香气品质为导向，可延长至第 7 d，此时苯系香气化合物选择性升高，但功能性成分整体下降，不宜单独用于高值化功能产品开发。企业在实际生产中可将采收期划分为“功能成分期(第 1~3 d)—营养富集期(第 4~6 d)—风味形成期(第 7 d)”，并按产品定位分段采收、分级利用。

参考文献

[1] Beck P S A, Caudullo G, De Rigo D, et al. Betula pendula, Betula pubescens and other birches in Europe: distribution, habitat, usage and threats [M] Luxembourg: European atlas of forest tree species, 2016: 70–73.

[2] Kallio H, Ahtonen S, Raulo J, et al. Identification of the sugars and acids in birch sap [J]. Journal of Food Science, 1985, 50(1): 266–269.

[3] Kuka M, Čakste I, Geršebeka E. Determination of bioactive compounds and mineral substances in Latvian Birch and Maple Saps [J]. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences, 2013, 67(4–5): 437–441.

[4] 徐凌霏, 张国锋, 王伟伟, 等. 桦树汁功能活性及产品开发现状[J]. 食品与机械, 2024, 40(12): 210–216.
Xu Lingfei, Zhang Guofeng, Wang Weiwei, et al. Review of the active function of birch juice and its product development [J]. Food & Machinery, 2024, 40(12): 210–216.

[5] Semjonovs P, Denina I, Fomina A, et al. Development of birch (*Betula pendula* Roth.) sap based probiotic fermented beverage [J]. International Food Research Journal, 2014, 21(5): 1763–1767.

[6] Bilek M, Stawarczyk K, Gostkowski M, et al. Mineral content of tree sap from the Subcarpathian region [J]. Journal of Elementology, 2016, 21(3): 669–679.

[7] Bilek M, Szwerc W, Kuźniar P, et al. Time-related variability of the mineral content in birch tree sap [J]. Journal of Elementology, 2017, 22(2): 497–515.

[8] Peev C, Dehelean C, Mogosanu C, et al. Spring drugs of *Betula pendula* Roth. : biologic and pharmacognostic evaluation [J]. Studia Universitatis “Vasile Goldis” Arad, Seria Stiintele Vietii, 2009, 19(2): 275–280.

[9] 盛艳, 吴泽柱. 桦树汁营养成分及功能利用研究进展[J]. 农产品加工, 2017(7): 49–52.
Sheng Yan, Wu Zezhu. Research progress in nutrient composition function and utilization of birch sap [J]. Farm Products Processing, 2017(7): 49–52.

[10] Łuczaj Ł, Bilek M, Stawarczyk K. Sugar content in the sap of birches, hornbeams and maples in southeastern Poland [J]. Central European Journal of Biology, 2014, 9(4): 410–416.

[11] 郑家英, 李语诺, 梁高泽, 等. 不同乳酸菌发酵对白桦树汁营养成分及挥发性化合物的影响[J]. 食品工业科技, 2026, 47(5): 301–314.
Zheng Jiaying, Li Yunuo, Liang Gaoze, et al. Effects of different lactic acid bacteria fermentation on nutritional composition and volatile components of birch sap [J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(5): 301–314.

[12] Zhong Peng, Wei Xiaoqun, Li Xiangmei, et al. Untargeted metabolomics by liquid chromatography-mass spectrometry for food authentication: a review [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2022, 21(3): 2455–2488.

[13] 沈央红, 方金玉, 朱军莉, 等. 代谢组学在食品质量安全领域的应用进展[J]. 食品科学, 2023, 44(5): 282–289.
Shen Yanghong, Fang Jinyu, Zhu Junli, et al. Advance in the application of metabonomics in the field of food safety and quality [J]. Food Science, 2023, 44(5): 282–289.

[14] Greño M, Plaza M, Luisa Marina M, et al. Untargeted HPLC-MS-based metabolomics approach to reveal cocoa powder adulterations [J]. Food Chemistry, 2023, 402: 134209.

[15] Huang Yingyi, Liu Huahong, Zhang Xiaohua, et al. Impact of storage time on non-volatile metabolites and fungal communities in Liupao tea using LC-MS based non-targeted metabolomics and high-throughput sequencing [J]. Food Research International, 2023, 174: 113615.

[16] Sun Qifang, Wu Furu, Wu Wei, et al. Identification and quality evaluation of Lushan Yunwu tea from different geographical origins based on metabolomics [J]. Food Research International, 2024, 186: 114379.

[17] Wang Zhaoxiang, Chen Xiaoyi, Liu Qianqian, et al. Untargeted metabolomics analysis based on LC-IM-QTOF-MS for discriminating geographical origin and vintage of Chinese red wine [J]. Food Research International, 2023, 165: 112547.

[18] Sancho A I, Birk T, Gregersen J M, et al. Microbial safety and protein composition of birch sap [J]. Journal of Food Composition and Analysis,

2022, 107: 104347.

[19] Losso A, Gauthey A, Choat B, et al. Seasonal variation in the xylem sap composition of six Australian trees and shrubs [J]. AoB Plants, 2023, 15(5): plad064.

[20] Eliuk S, Makarov A. Evolution of orbitrap mass spectrometry instrumentation [J]. Annual Review of Analytical Chemistry, 2015, 8: 61–80.

[21] Xu Jidi, Yan Jinjiao, Li Wenjie, et al. Integrative analyses of widely targeted metabolic profiling and transcriptome data reveals molecular insight into metabolomic variations during apple (*Malus domestica*) fruit development and ripening [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(13): 4797.

[22] Zhang Zhiwei, Han Yuanxi, Liu Zhendong, et al. Altitude and regional differentiation of dark tea using non-targeted metabolomics based on UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS [J]. European Food Research and Technology, 2025, 251(5): 785–798.

[23] Godzien J, Alonso-Herranz V, Barbas C, et al. Controlling the quality of metabolomics data: new strategies to get the best out of the QC sample [J]. Metabolomics, 2015, 11(3): 518–528.

[24] Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, et al. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation [J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(D1): D457–D462.

[25] Morin H, Chételat A, Stolz S, et al. Wound-response jasmonate dynamics in the primary vasculature [J]. The New Phytologist, 2023, 240(4): 1484–1496.

[26] Wasternack C, Song Susheng. Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription [J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(6): 1303–1321.

[27] Zhou Jingting, Yang Shuaiwei, Ma Yan, et al. Soluble sugar and organic acid composition and flavor evaluation of Chinese cherry fruits [J]. Food Chemistry: X, 2023, 20: 100953.

[28] Sharma A, Shahzad B, Rehman A, et al. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress [J]. Molecules, 2019, 24(13): 2452.

[29] Ramaroson M L, Koutouan C, Helesbeux J J, et al. Role of phenylpropanoids and flavonoids in plant resistance to pests and diseases [J]. Molecules, 2022, 27(23): 8371.

[30] Chang S, Lee W H, Lee H J, et al. Transcriptomic analysis of the combined effects of methyl jasmonate and wounding on flavonoid and anthraquinone biosynthesis in *Senna tora* [J]. Plants, 2024, 13(20): 2944.

(责任编辑: 曹岱琳　蔡世佳)