

## 基于GC-MS代谢组学的云南紫菀和臭蚤草的多元统计分析 分析及抑菌活性研究

李 丽, 张英秀, 赵日杂, 蔡汶甫, 张志锋\*

(西南民族大学药学院、青藏高原研究院, 青藏高原民族药用资源保护与利用国家民委重点实验室,  
四川 成都 610041)

**摘要:** 本研究为明确云南紫菀和臭蚤草的代谢物组异同及抑菌活性, 以至正本清源、更有效利用药用植物资源。采用样品衍生化、气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 技术对云南紫菀和臭蚤草的化学指纹进行非靶向代谢组学研究, 并利用无监督的主成分分析 (PCA)、有监督的偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 等多元统计分析方法, 对云南紫菀和臭蚤草进行差异代谢物筛选, 并通过相关性分析来衡量显著差异代谢物之间的相关密切程度, 进而对差异代谢物进行代谢通路富集分析, 以确定差异样品中代谢途径的变化机制。同时对云南紫菀和臭蚤草挥发油进行抑菌活性研究。结果共鉴定出包括氨基酸及其衍生物、苯丙素类、芳香族、苷类、核苷酸、黄酮类、生物碱类、糖类、维生素、有机酸、脂类、酯类、醇类等在内的 384 种代谢产物。对显著变化 ( $P < 0.05$ ,  $VIP > 1$ ) 的差异代谢物进行鉴定, 共筛选出 92 种差异代谢物, 它们在含量上存在显著差异。抑菌活性表明, 云南紫菀和臭蚤草对 5 种临床致病菌具有较弱的抑菌作用。因此, 本研究建立了一种基于柱前衍生与 GC-MS 代谢组学的方法比较云南紫菀和臭蚤草, 为其基原鉴别及临床合理应用提供了科学依据。

**关键词:** 云南紫菀; 臭蚤草; 气相色谱-质谱联用; 代谢组学; 抑菌活性

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)11-3118-12

## Multivariate statistical analysis based on GC-MS metabolomics and antibacterial activity of *Aster yunnanensis* and *Pulicaria insignis*

LI Li, ZHANG Ying-xiu, ZHAO Ri-za, CAI Wen-fu, ZHANG Zhi-feng\*

(College of Pharmacy, Institute of Tibetan Plateau, Southwest Minzu University, Tibetan Plateau Ethnic Medicinal Resources Protection and Utilization Key Laboratory of National Ethnic Affairs Commission, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** The study was undertaken to clarify the differences in metabolite groups between *Aster yunnanensis* and *Pulicaria insignis* to establish plant origin and identify plant resources. Non-target metabolomics of *A. yunnanensis* and *P. insignis* was undertaken with sample derivatives and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Principal component analysis (PCA), partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were used to characterize the differing metabolites of *A. yunnanensis* and *P. insignis*. Correlation analysis of these metabolites and metabolic pathway analysis allowed us to identify metabolic pathway changes between samples. Characterization of the antibacterial activity of the essential oil from *A. yunnanensis* and *P. insignis* showed that 384 metabolites were identified in the two species, including amino acids and peptides, phenylpropanoids, aromatics, glycoside, nucleotide, flavonoid, alkaloids, saccharides,

收稿日期: 2021-04-21; 修回日期: 2021-08-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31870314); 四川省科技厅区域创新合作项目 (2020YFQ0007); 西南民族大学中央高校基本科研业务专项基金项目 (2021HQZZ01).

\*通讯作者 Tel: 86-28-89165778, E-mail: zhangzhf99@gmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0568

vitamin, organic acid, lipids, esters, alcohol. A total of 92 differential metabolites with significant differences in content ( $P < 0.05$ ,  $VIP > 1$ ) were identified. In conclusion, a new method based on pre-column derivatives and GC-MS metabolomics was used to distinguish and compare *A. yunnanensis* and *P. insignis* metabolites.

**Key words:** *Aster yunnanensis*; *Pulicaria insignis*; GC-MS; metabolomics; antibacterial activity

云南紫菀和臭蚤草是藏医传统习用药材,云南紫菀为菊科多年生草本植物云南紫菀 (*Aster yunnanensis* Franch.) 的干燥全草,生于高山及亚高山草地,海拔 2 500~4 500 m,用于治流行性感冒、发烧、食物中毒、疮疖、癣症、清瘟病时疫热,解痉挛<sup>[1]</sup>。臭蚤草为菊科植物臭蚤草 (*Pulicaria insignis* Drumm ex Dunn) 的干燥全草,多年生草本植物,生于山脊岩石、石砾坡地和草丛中,海拔 2 800~4 310 m,具有散肿止痛之功效,用于治热性炭疽、疗疮等<sup>[2]</sup>。这两种药材在藏区被广泛使用,然而国内外对其研究较少。Shao 等<sup>[3-10]</sup>先后从云南紫菀中分离鉴定 15 个三萜皂苷类化合物。课题组前期对臭蚤草进行了生药学研究<sup>[11]</sup>,化学成分研究表明臭蚤草主要含有苯丙素苷类<sup>[12]</sup>、二萜苷类<sup>[13]</sup>、倍半萜<sup>[14-16]</sup>等。

藏医药典籍《晶珠本草》记载臭蚤草花蕊色黑状如紫菀,故可作为替代品<sup>[17]</sup>,而《藏药晶镜本草》记载:云南紫菀和臭蚤草同属于“敏间”类,味苦治疗疮,具有较浓郁的特殊恶臭气味<sup>[18]</sup>。因此,在藏医药民间,这两种植物常被混淆使用。然而,它们分属于菊科紫菀属和蚤草属,亲缘关系相差较远,现阶段对其物质基础研究薄弱,临床应用存在较大的安全隐患。近年来,基于液相色谱质谱联用(LC-MS)、气相色谱质谱联用(GC-MS)的代谢组学技术在中药及民族医药的研究中得到了广泛应用<sup>[19]</sup>。GC-MS具有可靠的硬质电离技术,可提供可重现的分子片段化,同时,拥有更确定的丰富的数据库利于代谢物的识别,被广泛应用于代谢组学分析<sup>[20-22]</sup>。云南紫菀和臭蚤草代谢物结构类型复杂,且它们的代谢物的脂水分配系数差异极大,涵盖了水溶

性的糖及其衍生物到脂溶性的脂类等数百种代谢物。由于LC-MS对不同类型化合物的响应差异较大,如对苯丙素类和芳香类化合物常需要负离子模式,而生物碱类则需要正离子模式,难以统一;另外,生物碱类化合物的质谱响应极强,造成即使低含量的生物碱也对相对高含量的其他类化合物形成明显的离子抑制,影响化合物的鉴定<sup>[23]</sup>。而用于代谢组学研究的分析技术应同时分析样品中尽可能多的成分,样品衍生化以后,GC-MS可对样品中的不挥发性成分和热不稳定成分进行同时分析和鉴定。在本课题组前期分别使用GC-MS和LC-MS开展的预实验中,发现LC-MS分离及鉴定的化合物数量远不及GC-MS,因此,本次研究选择云南紫菀和臭蚤草样品衍生化以后,采用GC-MS代谢组学技术对其代谢物进行全面分析、鉴定和比较。同时,对其挥发油的抑菌活性进行初步研究,为藏药材“敏间”的正本清源和临床安全应用提供科学依据。

## 材料与amp;方法

**实验材料** 实验药材云南紫菀 *Aster yunnanensis* Franch. (YNZW) 和臭蚤草 *Pulicaria insignis* Drumm ex Dunn (CZC) 的干燥全草均为作者实地采集并鉴定。样品来源详细信息见表 1。

**仪器** 气相色谱-质谱联用仪 (7890B-5977A, Agilent); 色谱柱 (DB-5MS, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, Agilent); 多点接种仪 (Denley A400, 英国 Denley 仪器有限公司); 隔水式恒温培养箱 (GNP-9080, 上海精宏实验设备有限公司); 立式压力蒸汽灭菌器 (LDZX-75KBS, 上海申安医疗器械厂); MH (A) 培养基 (批号:

**Table 1** Sample information of *Aster yunnanensis* and *Pulicaria insignis*. YNZW: *Aster yunnanensis*; CZC: *Pulicaria insignis*

No.	Collecting spot	Altitude /m	Collecting time	Longitude and latitude
YNZW-1	Cuo 'a Mountain, Dege County, Sichuan	3 910	2020.7.30	E99°31'45", N31°46'00"
YNZW-2	Hongxing Town, Ruoergai County, Sichuan	3 471	2020.7.26	E102°36'24", N33°56'43"
YNZW-3	Marong Township, Baiyu County, Sichuan	3 676	2020.7.13	E99°18'58", N31°04'57"
YNZW-4	Xinrong Township, Shiqu County, Sichuan	4 018	2020.7.30	E98°18'33", N33°03'04"
YNZW-5	Tangke Town, Ruoergai County, Sichuan	3 463	2020.7.26	E102°35'30", N33°11'25"
YNZW-6	Ranch, Shiqu County, Sichuan	3 977	2020.7.30	E98°38'46", N32°22'00"
CZC-1	Quxia Town, Lazi County, Rikeze City, Tibet	4 000	2019.7.21	E87°24'15", N28°47'24"
CZC-2	Angke Township, Gongjue County, Tibet	3 900	2019.8.10	E98°30'15", N30°32'17"
CZC-3	Jiangzi County, Tibet	4 170	2019.8.24	E89°45'39", N28°50'39"
CZC-4	Qiere Township, Angren County, Tibet	4 240	2019.9.01	E87°17'13", N29°12'33"
CZC-5	Xuejila Mountain, Jiangda County, Tibet	3 720	2019.9.12	E93°06'11", N30°01'24"
CZC-6	Tongkong Village, Basu County, Tibet	3 260	2019.8.24	E96°11'27", N30°29'34"

2375735, 英国 Oxoid 有限公司); 冷冻浓缩离心干燥器 (LNG-T98, 太仓市华美生化仪器厂)。

**试剂和药品** 11种脂肪酸甲酯: 辛酸甲酯 C<sub>8</sub> (批号: G162300)、壬酸甲酯 C<sub>9</sub> (批号: N-9M-AU4-B)、癸酸甲酯 C<sub>10</sub> (批号: N-10M-A18-D)、十二烷酸甲酯/月桂酸甲酯 C<sub>12</sub> (批号: N-12M-AU15-D)、十四烷酸甲酯/肉豆蔻酸甲酯 C<sub>14</sub> (批号: N-14M-A24-E)、十六烷酸甲酯/棕榈酸甲酯 C<sub>16</sub> (批号: G161798)、十八烷酸甲酯/硬脂酸甲酯 C<sub>18</sub> (批号: N-18M-O9-C) (瑞典 Larodan 公司); 二十烷酸甲酯/花生酸甲酯 C<sub>20</sub> (批号: N-20M-J27-E)、二十二烷酸甲酯/山俞酸甲酯 C<sub>22</sub> (批号: N-22M-JY30-E)、二十四烷酸甲酯/木蜡酸甲酯 C<sub>24</sub> (批号: N-24M-S6-A)、二十六烷酸甲酯 C<sub>26</sub> (批号: N-26M-A6-E) (美国 Nu-Chek 公司); 吡啶 (批号: W296600)、*O*-甲基羟胺盐酸盐 (97%) (批号: M0343)、BSTFA+1% TMCS (批号: B3402) (上海安谱实验科技有限公司); *L*-2-氯苯丙氨酸 (批号: S60230, 上海恒创生物有限公司)。乳酸左氧氟沙星氯化钠注射液 (批号: 118190906, 规格: 500 mg/250 mL, 浙江医药股份有限公司); 左氧氟沙星药敏纸片 (批号: 2529788, 规格: 5 μg, OXOID Ltd. UK); 氯化钠注射液 (批号: M20040806C, 四川科伦药业股份有限公司); DMSO (批号: 2022/12, 北京生物顶科技有限公司)。

**供试菌株** 临床分离致病菌: 甲氧西林敏感金葡菌 (MSSA) 5株; 产超广谱 β-内酰胺酶大肠埃希菌 (E-) 5株; 肺炎克雷伯菌 (E-) 5株; 铜绿假单胞菌 5株; 鲍曼不动杆菌 5株 (四川抗菌素工业研究所)。质控菌株: 金葡菌 ATCC29213、大肠埃希菌 ATCC25922 (北纳创联生物技术研究院)。

**GC-MS 代谢组学样品前处理** 精密称取供试品 60 mg, 放入 1.5 mL 的离心管中, 加入 40 μL 内标 (*L*-2-氯-苯丙氨酸, 0.3 mg·mL<sup>-1</sup>, 甲醇配置), 依次加入两颗小钢珠, 360 μL 的预冷的甲醇, 在 -20 °C 冰箱中放置 5 min; 取出, 放入研磨机中研磨 (60 Hz, 2 min), 冰水浴超声提取 30 min; 加入 200 μL 的氯仿, 再加入 400 μL 的水, 涡旋仪中涡旋 2 min; 然后冰水浴超声提取 30 min; -20 °C 静置 30 min 后低温离心 10 min (13 000 r·min<sup>-1</sup>, 4 °C), 取 150 μL 的上清液装入玻璃衍生瓶中。质控样本 (QC) 由所有样本的提取液等体积混合制备而成, QC 的体积与样本相同。用离心浓缩干燥器挥干样品, 向玻璃衍生小瓶中加入 80 μL 的甲氧胺盐酸盐吡啶溶液 (15 mg·mL<sup>-1</sup>), 涡旋震荡 2 min 后, 于震荡培养箱中 37 °C 中 90 min 进行脎化反应; 将样本取出后再加入 80 μL 的 BSTFA (含 1% TMCS) 衍生试剂和 20 μL 正己烷, 加入 11 种内标 (C<sub>8</sub>/C<sub>9</sub>/C<sub>10</sub>/C<sub>12</sub>/C<sub>14</sub>/C<sub>16</sub>, 0.16 mg·mL<sup>-1</sup>; C<sub>18</sub>/C<sub>20</sub>/C<sub>22</sub>/C<sub>24</sub>/C<sub>26</sub>,

0.08 mg·mL<sup>-1</sup>, 均为氯仿配置) 10 μL, 涡旋震荡 2 min 后, 于 70 °C 反应 60 min; 取出样本后, 在室温放置 30 min, 进行 GC-MS 代谢组学分析。

**GC-MS 色谱条件** DB-5MS 毛细管柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, Agilent J&W Scientific, Folsom, CA, USA), 载气为高纯氦气 (纯度不小于 99.999%), 流速 1.0 mg·mL<sup>-1</sup>, 进样口的温度为 260 °C。进样量 1 μL, 不分流进样, 溶剂延迟 5 min。程序升温: 柱温箱的初始温度为 60 °C, 保持 0.5 min; 以 8 °C·min<sup>-1</sup> 程序升温至 125 °C; 4 °C·min<sup>-1</sup> 升温至 210 °C; 5 °C·min<sup>-1</sup> 升温至 270 °C; 10 °C·min<sup>-1</sup> 升温至 305 °C, 保持 3 min。

**GC-MS 质谱条件** 电子轰击离子源 (EI), 离子源温度 230 °C, 四级杆温度 150 °C, 电子能量 70 eV。扫描方式为全扫描模式 (SCAN), 质量扫描范围: *m/z* 50~500。

**数据处理及统计分析** UNIFI 1.8.1. 软件用于原始数据的采集; 将 GC/MS 的原始数据 (D 格式) 经 Analysis Base File Converter 软件转换为分析基本文件 abf 格式以便快速检索数据, 之后导入 MS-DIAL 软件进行峰检测, 峰识别, MS2Dec 反卷积, 定性, 峰对齐, 滤波, 缺失值插值等一系列预处理。将预处理完毕的数据矩阵归一化后导入 SIMCA-P 软件进行主成分分析 (PCA)、偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 等多元统计分析<sup>[24,25]</sup>, 再依据变量对分组贡献得分 (VIP > 1) 和组间变化的差异检验 (*t* 检验) 显著性 (*P* < 0.05) 为差异性代谢产物的筛选标准。基于 KEGG 数据库对差异代谢物进行代谢通路富集分析<sup>[26]</sup>, 应用超几何检验, 找出与整个背景相比, 在显著性差异表达代谢物中显著富集的通路条目, 其计算公式为:

$$P = 1 - \sum_{i=0}^{m-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}} \quad (1)$$

式 1 中, *N* 为代谢物总数; *n* 为 *N* 中差异表达代谢物的数目; *M* 为注释为某特定通路的代谢物数目; *m* 为注释为某特定通路的差异代谢物数目。以 *P* ≤ 0.05 为阈值, 满足此条件的通路为在差异代谢物中显著富集的通路。

**挥发油的提取** 分别取云南紫菀样品 (YNZW-5) 和臭蚤草样品 (CZC-4) 粉末 (过 2 号筛) 各 300 g, 置 2 L 圆底烧瓶中, 照挥发油测定法乙法<sup>[27]</sup> 测定, 将收集的挥发油转移置于 20 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 脱水, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液, 挥发油的提取率分别为 0.30% 和 0.24%。

**测试菌株培养方法** 每株细菌在试验前经琼脂平板划单菌落分纯, 35~37 °C培养后挑取单菌落, 麦氏比浊法调至约0.5麦氏单位 (约 $1 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>), 再将此混悬菌液进行100倍稀释, 使菌悬液最终浓度约为 $1 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup>。用多点接种仪接种稀释后的菌液于制备好的MH琼脂平皿上, 每点接种量约 $1 \times 10^4$  CFU/点, 35~37 °C孵育24 h。

**抑菌圈测定** 牛津杯法: 将菌液调至麦氏浊度0.5, 约 $1 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>, 然后稀释100倍, 取稀释后的菌液100 μL, 均匀涂布至制备好的MH (A) 琼脂培养基上, 待表面干燥后, 放置牛津杯, 每孔加入供试品液100 μL, 对照孔加入50 μg·mL<sup>-1</sup>的左氧氟沙星100 μL, 放入培养箱培养24 h后量取抑菌圈直径。

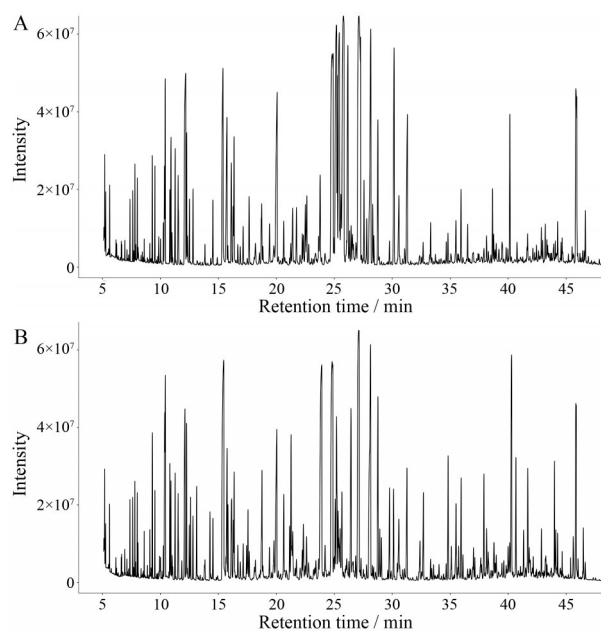
纸片法: 将菌液调至麦氏浊度0.5, 约 $1 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>, 然后稀释100倍, 取稀释后的菌液100 μL, 均匀涂布至制备好的MH (A) 琼脂培养基上, 待表面干燥后, 放置直径5 mm的空白纸片, 每片加入供试品液20 μL, 对照使用5 μg/片的左氧氟沙星纸片, 放入培养箱培养24 h后量取抑菌圈直径。

**最低抑菌浓度 (MIC) 的测定** 采取美国国家临床实验室标准化委员会 (CLSI) 推荐的琼脂二倍稀释法进行MIC的测定。于无菌平皿内加入1 mL供试药液, 再加入融化的50 °C MH (A) 培养基14 mL, 混匀。待冷却后用多点接种仪接种细菌, 接种菌量约为 $1 \times 10^4$  CFU/点, 盖上皿盖, 在35~37 °C培养箱中孵育24 h。培养结束后, 进行肉眼观察, 平皿内未见细菌生长的最低样品浓度即为其MIC。同时设立不加任何样品的空白菌对照及加入DMSO的溶媒对照。

## 结果

### 1 云南紫菀和臭蚤草的GC-MS结果

GC-MS对云南紫菀和臭蚤草进行分析, 得到其总离子流图 (图1)。GC/MS的原始数据经过预处理以后, 采用LUG数据库 (Untarget database of GC-MS from Lumingbio) 进行检索匹配以及查阅相关文献资料<sup>[28-30]</sup>, 对色谱峰进行鉴定分析, 最终得到384种代谢物, 见表2。主要包括61种氨基酸及其衍生物、13种苯丙素类、38种芳香族、13种苷类、36种核苷酸、7种黄酮类、40种生物碱类、47种糖类、3种维生素、52种有机酸、57种脂类、8种酯类、9种醇类。同时采用内标对代谢物进行定量分析, 即每个样本中, 添加L-2-氯苯丙氨酸和11种脂肪酸甲酯内标, 根据内标的离子碎片及其保留时间进行人工定性检测, 将所有样本中RSD > 0.3的内标删除, 保留RSD < 0.3的内标, 将样品代谢物按保留时间分段进行内标归一化, 并将每个峰信号强



**Figure 1** Total ion chromatogram (TIC) of *Pulicaria insignis* (A) and *Aster yunnanensis* (B)

度转化成在该谱图中该时间段的相对内标强度, 以此来计算其定量。

### 2 多元统计分析及差异代谢物的筛选

总离子流图显示了云南紫菀和臭蚤草化学轮廓的异同, 为肃清云南紫菀和臭蚤草之间化学成分的差异, 采用多元统计分析方法对其代谢物进行分析。首先采用无监督的PCA对云南紫菀和臭蚤草的GC-MS数据从整体上进行评价, 观察各样本间的总体分布和整个分析过程的稳定性, 直观描述各主成分的差异 (图2A)。云南紫菀样本都集中于PC1负半轴, 臭蚤草样本都集中于PC1正半轴, 二者明显分开, 说明这两个物种代谢物存在显著差异。但是YNZW-4与其他云南紫菀相距较远、离群, 可能是其地理环境、海拔等因素造成的个体差异。

为进一步明确两物种间的差异代谢, 采用有监督的PLS-DA及OPLS-DA来区分各组间代谢轮廓的总体差异, 找到组间的差异代谢物。PLS-DA加入分组变量, 可弥补PCA方法不能忽略组内误差, 消除与研究目的无关的随机误差的不足。对云南紫菀和臭蚤草建立的PLS-DA模型参数解释率 $R^2Y(\text{cum})$ 为0.999, 预测率 $Q^2(\text{cum})$ 为0.985, 两者很接近1, 说明该PLS-DA模型能很好地解释和预测云南紫菀和臭蚤草样本之间的差异, 模型预测能力极好。得到的PLS-DA得分图如图2B所示, 两物种明显分开, 表明两物种代谢物存在显著差异。OPLS-DA在PLS-DA的基础上进行修正, 滤除与分类信息无关的噪音, 提高模型的解析能力和有效性, 最大化地凸显模型内部不同组别之间的差

**Table 2** 384 differential metabolites in *Pulicaria insignis* and *Aster yunnanensis*. Rt: Retention time

Rt/min	Compound	Rt/min	Compound	Rt/min	Compound	Rt/min	Compound
5.269	Methylamine	15.508	Erythritol	23.249	3-Dehydroshikimic acid	32.938	3-Hydroxypalmitic acid
5.916	Diacetone alcohol	15.72	<i>L</i> -Asparagine	23.288	3-Deoxyhexitol	33.011	Oleic acid
6.349	Butane-2,3-diol	15.819	Salicylic acid	23.436	<i>L</i> -Cysteine-glycine	33.153	Elaidic acid
6.584	Pyruvic acid	15.999	Cytosin	23.629	Hypoxanthine	33.305	Alloxanoic acid
6.638	Phenol	15.112	<i>D</i> -Threitol	23.727	3,4-Dihydroxybenzoic acid	33.341	Sinapinic acid
6.655	<i>L</i> -Lactic acid	15.215	Nicotinamide	23.77	Citric acid	33.444	Stearic acid
6.78	2-Ketobutyric acid	15.309	Parabanic acid	23.922	Isocitric acid	33.497	Spermidine
6.929	Glycolic acid	15.381	5,6-Dihydrouacil	23.944	Citrulline	33.567	<i>L</i> -Cystine
6.97	Isobutene glycol	15.414	Adipic acid	23.959	<i>O</i> -Phosphoserine	33.583	Xanthurenic acid
6.986	Cyclohexylamine	15.425	Malic acid	24.136	3-(3-Hydroxyphenyl)-3-hydroxypropionic acid	33.991	<i>D</i> -Fructose-6-phosphate
7.251	Maleimide	15.508	Erythritol	24.19	<i>D</i> -Tagatose	34.38	<i>D</i> -Fructose-1-phosphate
7.26	Acetophenone	15.72	<i>L</i> -Asparagine	24.197	4-Aminobenzoic acid	34.509	Glycerol-3-galactoside
7.365	<i>L</i> -Alanine	15.819	Salicylic acid	24.304	Myristic acid	34.703	Diclofenac
7.399	Hydroxylamine	15.999	Cytosin	24.434	1,5-Anhydroglucitol	35.209	Pseudo uridine
7.432	Butylamine	16.113	Methionine	24.545	Hippuric acid	35.358	Eicosanoic acid methyl ester
7.64	Oxalic acid	16.12	Oxoproline	24.788	Adenine	35.363	Mannose 6-phosphate
7.758	2-Hydroxybutanoic acid	16.135	Aspartic acid	24.814	Quinic acid	35.505	Ricinoleic acid
7.883	2-Hydroxy-2-methylbutanoic acid	16.315	4-Hydroxyproline	24.913	Dehydroascorbic acid	35.698	Glucose 6-phosphate
7.937	Sarcosine	16.351	4-Aminobutyric acid	25.129	<i>D</i> -Fructose	35.957	1-Methyladenosine
7.982	2-Ketoisovaleric acid	16.641	Pyrogallol	25.255	Phenaceturic acid	36.093	Eicosapentaenoic acid
8.061	3-Hydroxypropionic acid	16.68	<i>L</i> -Threonic acid	25.375	<i>N</i> -Carbamylglutamate	36.144	Arachidonic acid
8.084	Butyrolactam	16.896	5-Hydroxynorvaline	25.411	Gluconic acid lactone	36.395	6-Phosphogluconic acid
8.094	Piperidone	16.962	<i>L</i> -Cysteine	25.435	Altrose	36.42	<i>D</i> -Myo-inositol 4-phosphate
8.291	Benzylalcohol	17.041	Phenylethylamine	25.619	Glucose	36.572	<i>N</i> -Acetyl- <i>D</i> -tryptophan
8.325	3-Hydroxybutyric acid	17.099	Creatinine	25.71	Syringic acid	36.632	<i>cis</i> -Gondoic acid
8.365	Sulfuric acid	17.149	Isothreonic acid	26.036	Tryptophol	36.67	Oleamide
8.527	<i>N</i> -Methylalanine	17.256	3-Hydroxybenzoic acid	26.049	Glucosamine	36.741	<i>D</i> -Erythro-sphingosine
8.597	4-(5-Methyl-2-furanyl)-2-butanone	17.257	Dodecanol	26.061	Isopentadecanoic acid	36.745	<i>N</i> -Acetyl-5-hydroxytryptamine
8.642	2-Ketoisocaproic acid	17.389	Tyrosol	26.1	<i>L</i> -Histidine	36.872	Dehydroabietic acid
8.877	$\beta$ -Alanine	17.427	2-Isopropylmalic acid	26.122	Mannitol	37.254	5-Methoxytryptamine
9.082	Malonic acid	17.465	7-Hydroxynicotinic acid	26.182	Tyramine	37.308	Abietic acid
9.122	2-Hydroxyvaleric acid	17.501	Glycoamine	26.293	<i>L</i> -Lysine	37.404	Uridine
9.192	3-Aminoisobutyric acid	17.539	<i>L</i> -2-Hydroxyglutaric acid	26.314	<i>N</i> -Carbamoylaspartate	37.475	Saccharopine
9.28	Methylmalonic acid	17.63	$\alpha$ -Ketoglutarate	26.339	Sorbitol	37.823	5-Methyluridine
9.293	<i>L</i> -Valine	17.645	3-Phenyllactic acid	26.495	Galactitol	37.909	Homocystine
9.465	Norvaline	17.651	4-Aminophenol	26.64	<i>L</i> -Tyrosine	38.375	Serotonin
9.564	Phenylethanol	17.753	Phosphoenolpyruvate	26.667	4-Hydroxycinnamic acid	38.824	Arbutin
9.615	2-Hydroxyhexanoic acid	18.041	<i>L</i> -Alanine-alanine	26.763	3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid	38.847	Leucrose
9.649	Pyrophosphate	18.12	1,2,4-Benzenetriol	26.802	Pentadecanoic acid	39.126	Inosine
9.681	4-Hydroxybutyric acid	18.12	Digitoxose	26.957	Adrenaline	39.435	1-Monopalmitin
9.894	Urea	18.195	3-Hydroxy-3-methylglutaric acid	27.045	Ononitol	39.46	Nicotianamine
9.899	Benzoic acid	18.298	2,3-Dihydro-8-methoxyfuro (2,3-b) quinoline	27.104	Indole-3-acetate	39.524	Docosaehaenoic acid
9.91	Dihydroxyacetone	18.307	Pimelic acid	27.13	Conduritol- $\beta$ -epoxide	39.674	Phytosphingosine
10.188	Thymidine	18.367	3-Hydroxyphenylacetic acid	27.154	Ascorbic acid	40.002	Erucic acid
10.254	Ethanolamine	18.547	Ornithine	27.28	Galacturonic acid	40.08	Adenosine
10.319	Epsilon-caprolactam	18.69	Glutamic acid	27.284	Lipoic acid	40.176	Sucrose
10.349	Leucine	18.739	Phenylalanine	27.323	2,6-Diaminopimelic acid	40.243	Glycyl tyrosine
10.402	Glycerol	18.831	4-Hydroxybenzoate	27.665	Glycyl proline	40.333	Behenic acid

Continued

Rt/min	Compound	Rt/min	Compound	Rt/min	Compound	Rt/min	Compound
10.709	2-Deoxyerythritol	18.886	Acetaminophen	27.728	Galactonic acid	40.363	Spermine
10.727	<i>L</i> -Isoleucine	19.003	Lyxose	27.789	Hexose	40.634	Xanthosine
10.777	<i>L</i> -Threonine	19.129	Tartaric acid	27.938	<i>N</i> -Acetylmethionine	40.69	Lactulose
10.807	Nicotinic acid	19.135	4-Hydroxyphenylacetic acid	28.01	Pantothenic acid	40.846	Cytidine
10.84	<i>L</i> -Proline	19.402	<i>D</i> -Arabinose	28.025	Gluconic acid	40.852	Cellobiose
10.916	Phenylacetic acid	19.414	Lauric acid	28.088	Isohexonic acid	41.163	<i>D</i> -Fructose-1,6-bisphosphate
10.964	Maleic acid	19.439	<i>D</i> -Xylose	28.238	Urocanic acid	41.308	2-Monoolein
11.032	Glycine	19.445	2,4-Hexadienedioic acid	28.298	Saccharic acid	41.317	Lactose
11.194	Catechol	19.552	<i>N</i> -Acetylaspartic acid	28.322	3-Hydroxy-3-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)propionic acid	41.516	Trehalose
11.264	Succinic acid	19.79	<i>D</i> -Ribose	28.494	Glucosaminic acid	41.666	Resveratrol
11.41	2-Methylglyceric acid	19.822	Taurine	28.509	Xanthine	41.745	1-Monoolein
11.494	Glyceric acid	19.907	3-Ureidopropionate	28.665	Palmitoleic acid	41.881	<i>D</i> -Maltose
11.583	2,3-Dihydroxybutanoic acid	19.969	Guanidinosuccinate	28.719	$\beta$ -Hydroxymyristic acid	41.917	2'-Deoxyguanosine
11.609	2-Picolinic acid	20.113	<i>N</i> -Cyclohexylsulfamic acid	28.899	Scopoletin	42.085	5'-Deoxy-5'-methylthio-adenosine
11.695	Uracil	20.159	<i>D</i> -Xylulose	29.061	Hexaric acid	42.134	Lactitol
11.73	1-Methylhydantoin	20.215	Tranexamic acid	29.077	2,4,7-Trihydroxypteridine	42.181	Guanosine
11.809	2-Deoxytetronic acid	20.566	<i>D</i> -Xylitol	29.245	Palmitic acid	42.27	Sophorose
11.842	Citraconic acid	20.618	Levoglucosan	29.523	<i>DL</i> -Dopa	42.316	1-Monostearin
11.991	Pyrrole-2-carboxylic acid	20.7	2,4-Diaminobutyric acid	29.624	Glutamyl-valine	42.693	$\beta$ -Gentiobiose
12.109	Fumaric acid	20.78	Arabitol	29.9	<i>N</i> -Acetylgalactosamine	42.724	Lactobionic acid
12.241	Serine	20.892	Phthalic acid	29.919	Allantoic acid	42.808	Uridine 5'-monophosphate
12.312	Pelargonic acid	21.061	Metharbital	30.127	<i>D</i> -Ribose-5-phosphate	42.863	Epicatechin
12.329	Pipecolic acid	21.138	<i>N</i> -Acetylputrescine	30.13	<i>myo</i> -Inositol	42.87	Maltitol
12.488	Cyano-L-alanine	21.142	<i>D</i> -Fucose	30.214	Ferulic acid	42.907	4',5'-Dihydroxy-7-glucosyloxyflavanone
12.537	Erythronic acid	21.156	$\alpha$ -Amino adipic acid	30.313	Dimethyluric acid	42.981	Melibiose
12.722	Salicylaldehyde	21.267	Ribitol	30.423	Naproxen	43.05	Catechin
12.727	4-Methylcatechol	21.558	Putrescine	30.449	Uric acid	43.222	Digalacturonic acid
12.807	Allothreonine	21.594	Orotic acid	30.452	<i>D</i> -Ribulose 5-phosphate	43.501	Piceatannol
12.888	Resorcinol	21.628	Diglycerol	30.511	<i>N</i> -Acetylmannosamine	43.546	Formononetin
13.065	<i>O</i> -Acetylserine	21.698	UDP-glucuronic acid	30.602	Isoheptadecanoic acid	43.679	Isomaltose
13.131	Thymine	21.699	Ciliatine	30.732	Linoleic acid	43.777	Epigallocatechin
13.204	Hydroquinone	21.781	6-Deoxyglucitol	30.932	Guanine	43.862	Palatinitol
13.306	Glutaric acid	21.819	Xylonic acid	30.939	<i>N</i> -Acetyl- <i>D</i> -hexosamine	43.862	Gallocatechin
13.379	Biphenyl	21.834	Agmatine	30.942	Isoxanthopterin	43.911	5,7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavone
13.561	2-Methylglutaric acid	22.051	3,6-Anhydro- <i>D</i> -galactose	31.258	3,4-Dihydroxycinnamic acid	44.312	3'-Adenylic acid
13.974	1,3-Dihydropyridine	22.054	Aconitic acid	31.348	Heneicosanoic acid	44.547	Daidzein
14.339	Homoserine	22.254	3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid	31.401	Noradrenaline	44.709	Coniferin
14.397	Dihydroxymalonic acid	22.319	Vanillic acid	31.456	Octadecanol	44.889	$\gamma$ -Tocopherol
14.422	Threose	22.335	Ribonic acid	31.585	<i>L</i> -Kynurenine	44.984	Isochlorogenic acid
14.584	Capric acid	22.369	Glycerol 3-phosphate	31.883	Glutathione	45.119	1-Methylinosine
14.686	<i>N</i> -Methylglutamic acid	22.479	Homovanillic acid	31.97	Phytol	45.204	Cerotic acid
14.801	Aminomalate	22.492	Glucose-1-phosphate	32.224	7-Methylguanine	45.729	Adenosine-5'-monophosphate
14.83	Citramalic acid	22.616	<i>L</i> -Glutamine	32.31	Phytanic acid	45.848	Chlorogenic acid
14.878	Phenylacetamide	22.714	<i>N</i> -Acetylglutamate	32.371	Indole-3-lactate	45.866	Galactinol
15.112	<i>D</i> -Threitol	22.746	4-Hydroxymandelic acid	32.436	<i>L</i> -Cystathionine	46.654	Trehalose-6-phosphate
15.215	Nicotinamide	22.818	5-Thymidyllic acid	32.555	$\beta$ -Mannosylglycerate	46.802	Alpha tocopherol
15.309	Parabanic acid	22.976	Shikimic acid	32.666	<i>L</i> -Tryptophan	47.582	Cholesterol
15.381	5,6-Dihydrouracil	23.102	3-Phosphoglycerate	32.666	5-Hydroxy-3-indoleacetic acid	47.681	Dihydrocholesterol
15.414	Adipic acid	23.105	Terephthalic acid	32.753	<i>D</i> -Fructose 2,6-bisphosphate	47.876	Zymosterol
15.425	Malic acid			32.867	Linolenic acid	48.298	Cholesterol

异。OPLS-DA 分析以变量重要性为依据进行差异代谢物筛选,更能把握多位数据整体特征和变异规律<sup>[31]</sup>。在云南紫菀和臭蚤草 OPLS-DA 得分图上,有两种主成分,即预测主成分和正交主成分,  $R^2X = 0.669$ ,  $R^2Y = 0.999$ ,  $Q^2 = 0.955$ , 3 个参数均大于 0.5, 说明所建立的模型能够较好地解释两物种间的代谢差异, 如图 2C 所示, 云南紫菀主要分布在置信区间的左侧, 臭蚤草主要分布在置信区间的右侧, 也进一步说明云南紫菀和臭蚤草代谢物存在显著差异。

为防止模型过拟合, 采用七次循环交互验证和 200 次响应排序检验 (response permutation testing, RPT) 的方法来考察模型的质量。RPT 是一种用来评价 OPLS 模型准确性的随机排序方法, 用来避免监督性学习方

法获得分类不是偶然的。对所建立的云南紫菀和臭蚤草的 OPLS-DA 模型进行了 200 次响应排序检验, 建立对应的 OPLS-DA 模型以获取随机模型的  $R^2$  和  $Q^2$  值, 与原模型的  $R^2Y$ 、 $Q^2Y$  进行线性回归, 得到的回归直线与 y 轴的截距值分别为  $R^2$  和  $Q^2$ , 用来衡量模型是否过拟合。结果如图 2D 所示,  $R^2Y$  和  $Q^2Y$  直线的斜率均大于 0, 模型质量良好, 不存在过度拟合, 可用于云南紫菀和臭蚤草代谢物的差异分析。

为进一步分析具体的差异物质, 采用载荷图 (loading 图) 和 S 型曲线图 (splot) 标识差异代谢物。在云南紫菀和臭蚤草的载荷图 (图 3A) 中, 接近于 -0.1 或 0.1 的载荷表明变量对分组影响越强, 黄色点代表的物质对分组影响较强, 绿色点代表的物质对分组的影响很弱。

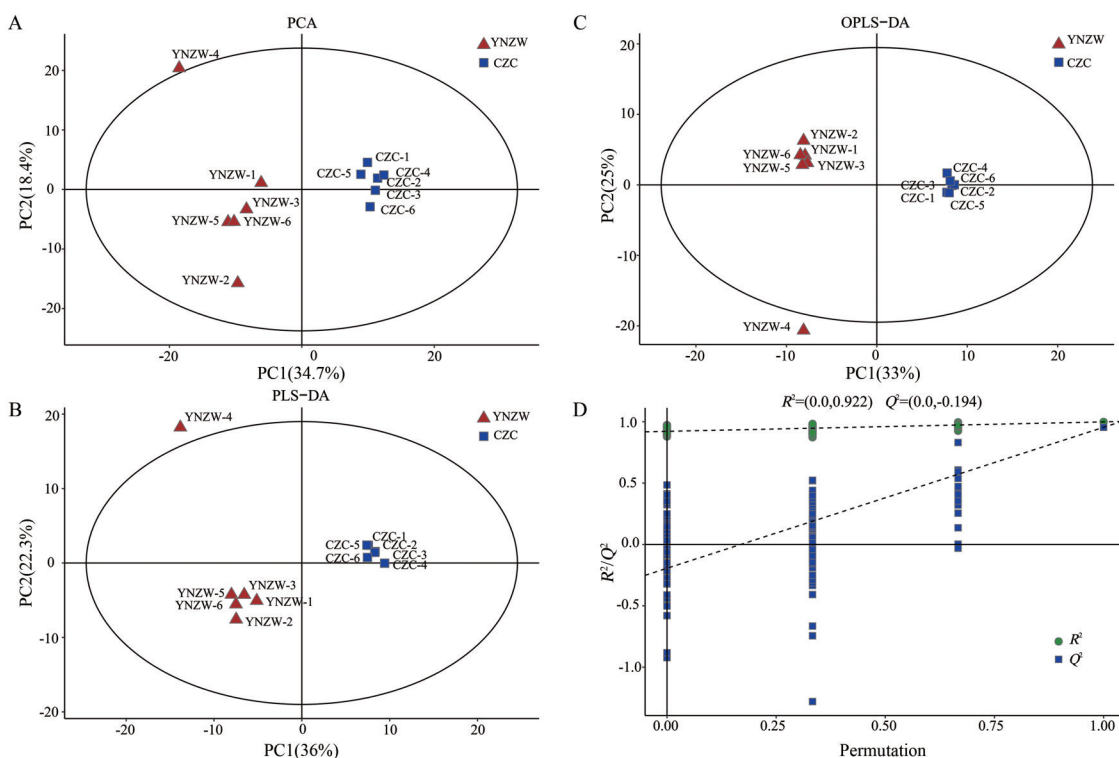


Figure 2 Multivariate statistical analysis (A-D) of YNZW and CZC

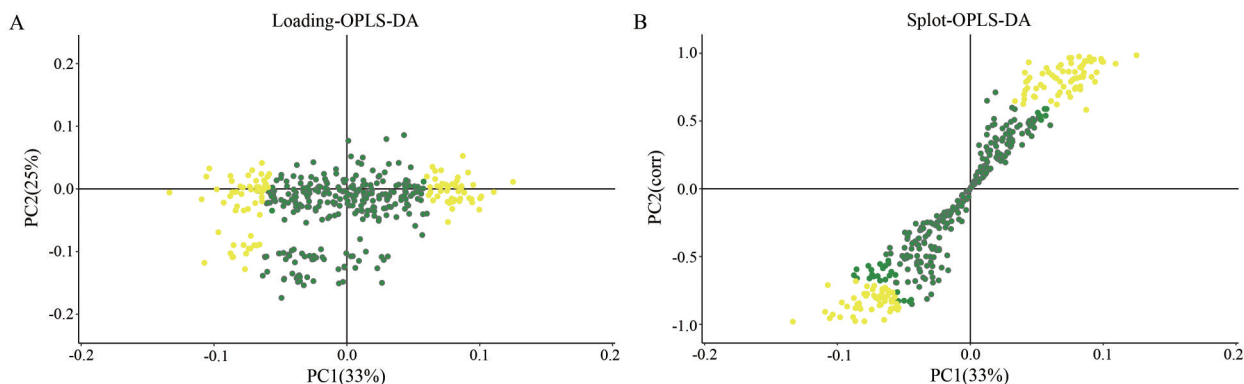


Figure 3 Loading plot (A) and Splot (B) of *Aster yunnanensis* and *Pulicaria insignis*. The yellow dots represent substances that have a strong influence on the grouping, and the green have a very weak influence

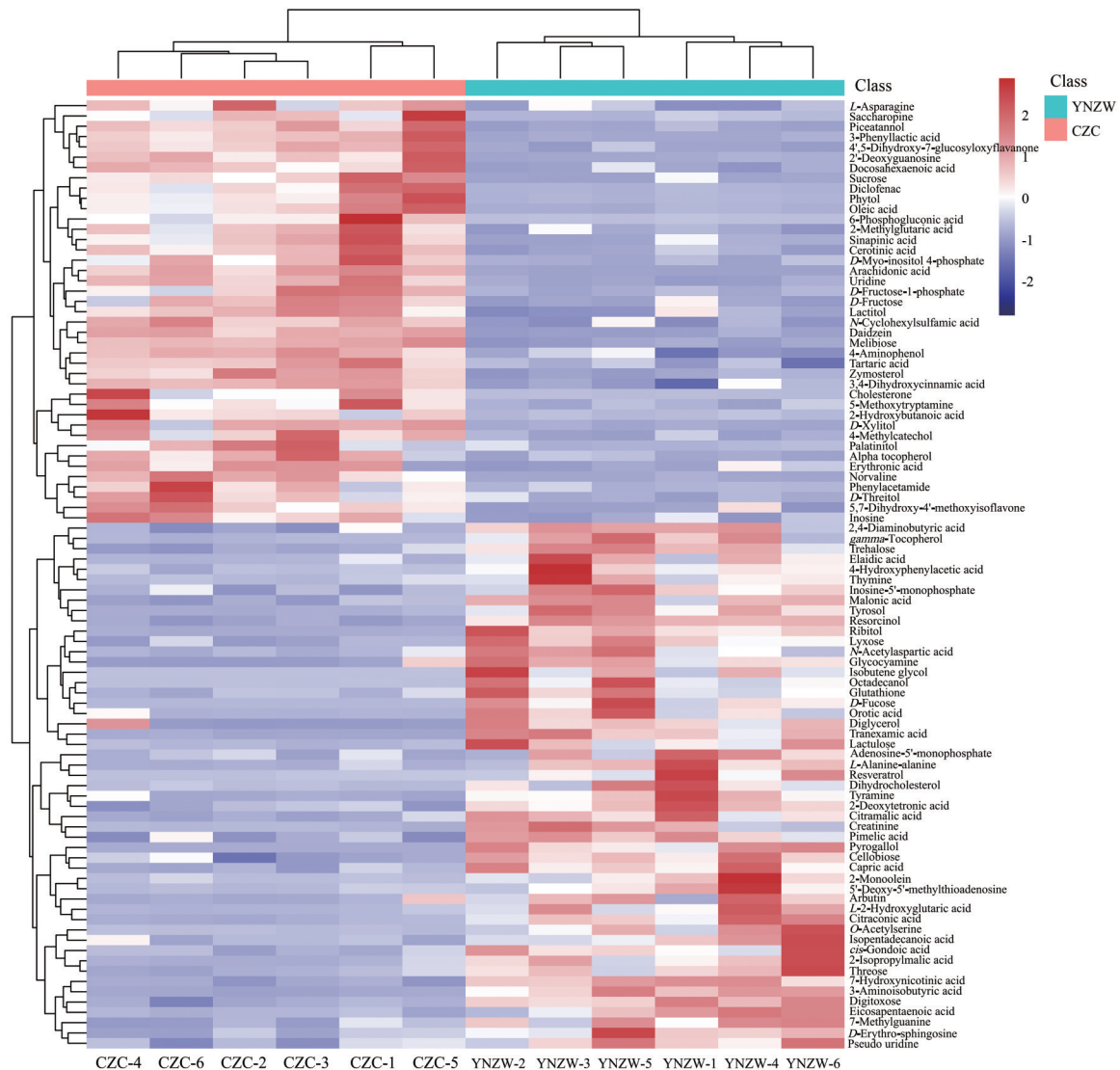
S型曲线图(图3B)中,越靠近右上角和左下角的代谢物(黄色点)表示其差异越显著,是云南紫菀和臭蚤草的差异标志物。

OPLS-DA分析中,变量权重值(variable important in projection, VIP)可用来衡量各代谢物的表达模式对各组样本分类判别的影响强度和解释能力, VIP越大,说明该变量对分组的贡献越大,从而挖掘具有生物意义的差异代谢物。

利用  $t$  检验验证组间差异代谢物是否具有显著性<sup>[32]</sup>。云南紫菀和臭蚤草差异代谢物筛选的标准为 OPLS-DA 模型第一主成分的 VIP > 1,  $t$  检验的  $P < 0.05$ 。共筛选到差异代谢物 92 种, 其中 51 种代谢物在云南紫菀中的相对含量远远高于臭蚤草, 且差异倍数的  $\log_2FC$  在 1.53~8.10 之间, 41 种代谢物在臭蚤草中的

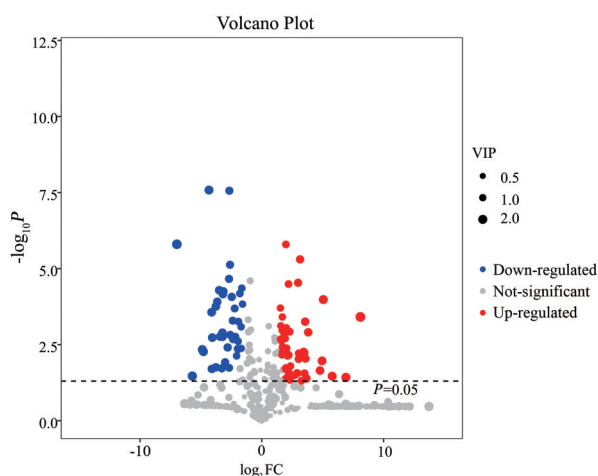
相对含量远远高于云南紫菀, 差异倍数的  $\log_2FC$  在 -6.98~-1.58 之间。其中, 焦性没食子酸、异丁烯醇、氨甲环酸、十八烷醇、*D*-岩藻糖、乙酰丝氨酸、对羟基乙醇、双甘油、核糖醇、2-异丙基苹果酸、*L*-丙氨酸、2-油酸甘油单酯、7-羟基烟酸、*L*-2-羟基戊二酸主要存在于云南紫菀中, 可以作为云南紫菀的特征标志物; 花生四烯酸、6-磷酸葡萄糖酸、双氯芬酸、叶绿醇、黄豆苷元、蔗糖、2'-脱氧鸟苷、油酸、3-苯乳酸、白皮杉醇、*D*-木糖醇、胆固醇、维生素 e、2-羟基丁酸、柚皮素-7-*O*-葡萄糖苷、*D*-果糖-1-磷酸酯主要存在于臭蚤草中, 可作为臭蚤草的特征标志物。

为了更直观地展示云南紫菀和臭蚤草代谢物在不同样本之间的表达差异, 对云南紫菀和臭蚤草中的所有显著差异代谢物表达量进行层次聚类(图4), 颜色从



**Figure 4** Heatmap of 92 differential metabolites in *Aster yunnanensis* and *Pulicaria insignis* ( $P < 0.05$ ,  $VIP > 1$ ). Rows represent samples; columns represent metabolites. The degree of color saturation indicates the metabolite expression values with blue representing the lowest expression and red representing the highest expression

蓝到红表示代谢物的表达丰度从低到高。从第一分类层次看,云南紫菀和臭蚤草的差异代谢物明显分为两大类,从L-天冬酰胺至肌苷的41种成分在臭蚤草中表达量较高,从2,4-二氨基丁酸至假尿苷的51种成分在云南紫菀中表达量较高,这与根据上述VIP值筛选出的结果一致。并利用火山图对 $P < 0.05$ 、VIP > 1和变异倍数分析(fold change)值 $\geq 2$ 的云南紫菀和臭蚤草中的差异代谢物进行可视化,如图5所示,红色表示云南紫菀中含量较高的差异代谢物,蓝色表示臭蚤草中含量较高的差异代谢物。



**Figure 5** Volcanic map of *Aster yunnanensis* and *Pulicaria insignis* (VIP > 1,  $P < 0.05$ ). The red indicates the high content of differential metabolites in *Aster yunnanensis*, and the blue indicates the high content of differential metabolites in *Pulicaria insignis*

为进一步了解生物状态变化过程中代谢物之间的相互关系,通过相关性分析来衡量显著差异代谢物之间的相关程度。相关性分析使用Pearson相关系数衡量两个代谢物之间的线性相关程度<sup>[33]</sup>。云南紫菀和臭蚤草差异代谢物相关性分析结果如图6所示,红色表示正相关,即一个成分含量增加,与之相关联的另一个成分的含量也增加;蓝色表示负相关,即一个成分含量增加,与之相关联的另一个成分的含量反而减少。表明云南紫菀和臭蚤草中各差异代谢物间协同或拮抗作用,共同影响着两物种间的异同。这也促使本课题组对这些差异代谢物做进一步分析,从代谢机制寻找它们的变化根源。

### 3 代谢通路富集分析

基于KEGG数据库对云南紫菀和臭蚤草的差异代谢物进行代谢通路富集分析,以助于理解在差异样品中代谢途径变化机制。 $P$ 值越小,则该代谢通路的差异性越显著。选择显著性富集通路进行云南紫菀和臭蚤草代谢通路气泡图绘制(图7A),红线示意 $P$ 值为

0.01,蓝线示意 $P$ 值为0.05,条柱的顶端高于蓝线时,其所代表的信号通路具有显著性。气泡图(图7B)中,纵坐标为代谢通路名称,横坐标为富集因子(显著差异代谢物个数/该通路中的总代谢物个数),富集因子越大,则说明富集程度越大;颜色由绿到红表示 $P$ 值依次降低;点越大,说明富集到该通路上的代谢物数目越多。通过KEGG pathway mapper功能对差异代谢通路进行展示,可以看出参与各代谢通路的差异代谢物。结果表明,云南紫菀和臭蚤草差异代谢物主要代谢途径为:不饱和脂肪酸生物合成途径,玉米素生物合成途径,嘌呤代谢途径,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成途径,二苯乙烯、二芳基庚烷和姜酚的生物合成途径,半胱氨酸和蛋氨酸代谢途径,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢途径,嘌呤嘧啶代谢缺陷途径等。这也与云南紫菀和臭蚤草代谢物主要有氨基酸、脂肪酸、核苷酸、糖类、有机酸、脂类、维生素等相吻合。

### 4 挥发油的抑菌实验结果

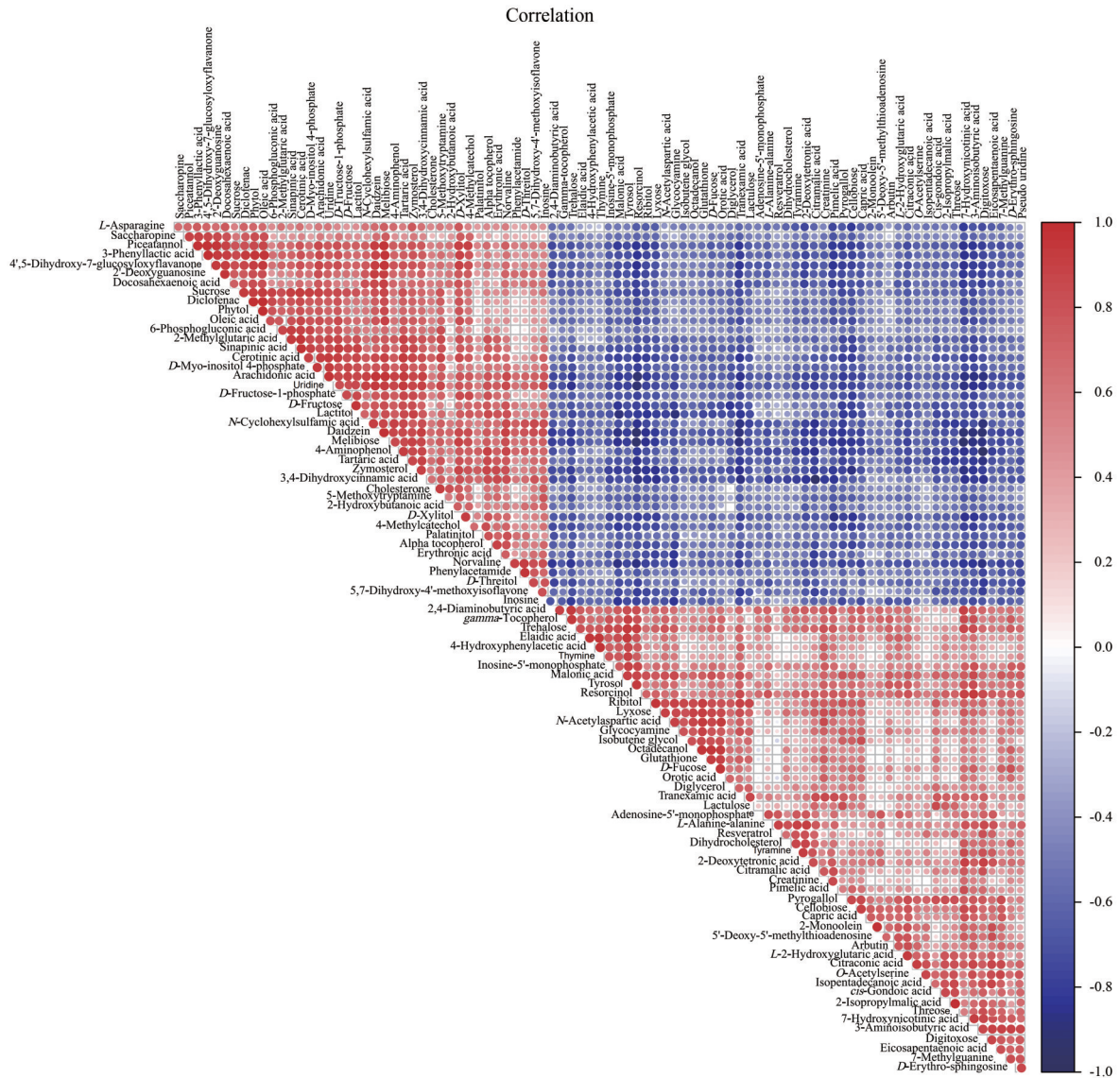
**4.1 抑菌圈的测定结果** 纸片法中,5  $\mu\text{g}$ 左氧氟沙星药敏纸片对ATCC25922和ATCC29213的抑菌圈直径分别为36.45和28.87 mm,符合CLSI中抑菌圈质控范围29~37 mm、25~30 mm的标准,表明实验方法可靠。臭蚤草挥发油对铜绿假单胞菌的抑菌圈直径分别为7.51 mm,表明臭蚤草挥发油具有较弱的抑菌作用。牛津杯法中,云南紫菀和臭蚤草对鲍曼不动杆菌104株的抑菌圈直径分别为15.9和16.3 mm,表明云南紫菀和臭蚤草具有较弱的抑菌作用。

**4.2 MIC测定结果** 结果表明,空白对照和溶媒对照的菌株均正常生长。对照品左氧氟沙星对质控菌株ATCC29213的MIC值为0.125  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,对ATCC25922的MIC值为 $\leq 0.008 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,符合CLSI M100中ATCC29213 0.06~0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、ATCC25922 0.008~0.06  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的范围标准,表明本实验系统和方法可靠。

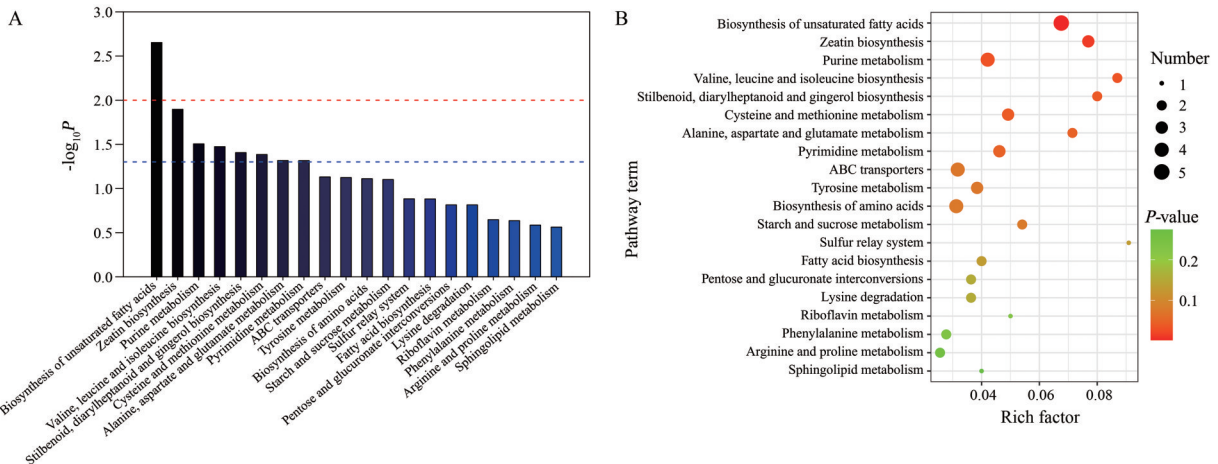
云南紫菀对受试的菌株MIC均 $> 2.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。臭蚤草对受试的产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶大肠埃希菌(E-),肺炎克雷伯菌(E-),铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌的MIC均 $> 3.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,对MSSA的MIC<sub>50</sub>为3.4  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,MIC<sub>90</sub>为 $> 3.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,MIC众数为3.4  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,表明臭蚤草对MSSA具有较弱的抑菌活性。

### 讨论

云南紫菀和臭蚤草植物形态相似,都具有特殊的恶臭气味,因此在藏医药中不加区别的入药。本研究通过柱前衍生与GC-MS代谢组学的方法共鉴定出两种植物中的384种代谢产物,其中的氨基酸及其衍生物、核苷酸、糖类、脂类、维生素等是机体将营养物质转



**Figure 6** Correlation analysis of the differential metabolites between *Aster yunnanensis* and *Pulicaria insignis*. Red is a positive correlation and blue is a negative correlation



**Figure 7** Metabolic pathway enrichment map (A) and bubble diagram (B) of TOP-20 of *Aster yunnanensis* and *Pulicaria insignis* differential metabolites

化为具生理活性的物质或为生长提供能量的物质基础,是机体生存必不可少的物质。云南紫菀和臭蚤草具有较多的芳香族化合物,该类化合物具有抗菌、抗炎之功效<sup>[34]</sup>。苯丙素类物质具有抗肿瘤、抗氧化、抗微生物、抗炎、保肝等活性<sup>[35]</sup>。苷类成分具有祛痰止咳的功效。生物碱类物质具有抗炎、抗肿瘤、降血糖、调血脂、细胞毒性等生物活性<sup>[36]</sup>。黄酮类化合物具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、降低血糖、保护心血管系统、抗菌、抗病毒的活性<sup>[37]</sup>。

对化学指纹进行 PCA、PLS-DA 和 OPLS-DA 等多元分析,共筛选出 92 种差异代谢物,它们在含量上存在显著差异。云南紫菀和臭蚤草在有机小分子水平上存在较大差异,这些代谢物是药材发挥疗效的物质基础,代谢物存在明显的差异,故从现代研究来看,这两种植物亲缘关系相差甚远,物质基础存在明显差异,因而,云南紫菀和臭蚤草应该进行区别应用于临床。

对差异代谢物进行相关性分析、富集通路分析,共富集到 8 条主要代谢途径。其中,不饱和脂肪酸生物合成途径为云南紫菀和臭蚤草差异代谢物的最主要生物代谢途径,因为不饱和脂肪酸可为植物提供能量,且对植物本身的抗逆性起重要的作用,使其可以适应高海拔寒冷的生长环境<sup>[38]</sup>。这与云南紫菀和臭蚤草的高海拔生存环境密切相关。玉米素生物合成途径,嘌呤代谢途径,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成途径,半胱氨酸和蛋氨酸代谢途径,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢途径,嘌呤嘧啶代谢缺陷途径主要影响氨基酸及其衍生物、核苷酸类物质的合成与代谢,它们对植物生长发育起着重要作用。这也是云南紫菀和臭蚤草中该类物质成分较多的原因。二苯乙烯、二芳基庚烷和姜酚的生物合成途径可生成二苯乙烯类物质,二苯乙烯类化合物是一类以 1,2-二苯乙烯为母核的植保素,属于苯丙素家族,是植物抗病毒、抗病虫害或抗逆境反应的产物<sup>[39]</sup>。

通过对云南紫菀和臭蚤草挥发油的抑菌活性研究,发现云南紫菀对鲍曼不动杆菌有较弱的抑菌活性,臭蚤草对铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌有较弱的抑菌活性,其代谢物的差异可能是导致他们对不同的临床致病菌起抑制作用的原因。然而,其差异代谢物与抑菌活性的相关性分析,需要进一步研究。

**致谢:** 四川抗菌素工业研究所抗生素研究与再评价四川省重点实验室程强研究员团队对本课题提供抗菌实验研究。

**作者贡献:** 李丽采集样品、分析数据并撰写和修改论文;张英秀采集样品和参与实验;赵日杂和蔡汶甫进行方法学研

究和整理数据;张志锋进行项目构思和项目管理、监督。

**利益冲突:** 本文不存在任何利益冲突。

## References

- [1] Jia MR, Li XW. Chinese Ethnomedicine Annals (中国民族药志要) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2005, 9: 77-78.
- [2] Flora of China Editorial Committee, Chinese Academy of Sciences. Flora of China (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1979, 75: 292.
- [3] Shao Y, Zhou BN. Asteryunnanosides C and D, two novel triterpenoid saponins from *Aster yunnanensis* Franch [J]. Nat Prod J, 2006, 6: 87-93.
- [4] Shao Y, Zhou BN, Lin LZ, et al. Asteryunnanosides F and G: two new triterpenoid saponins from *Aster yunnanensis* [J]. Planta Med, 1995, 61: 446-449.
- [5] Shao Y, Zhou BN, Lin LZ, et al. Triterpene saponins from *Aster yunnanensis* [J]. Phytochemistry, 1995, 38: 1487-1492.
- [6] Shao Y, Zhou BN, Gao JH, et al. Glycosides from *Aster yunnanensis* [J]. Phytochemistry, 1995, 38: 675-680.
- [7] Shao Y, Zhou BN, Ma K, et al. A new triterpenoid saponin, asteryunnanoside H, from *Aster yunnanensis* [J]. Chin Chem Lett, 1994, 5: 839-842.
- [8] Shao Y, Zhou BN, Lin LZ, et al. Two new oleanolic acid saponin from *Aster yunnanensis* [J]. Chin Chem Lett, 1994, 5: 843-846.
- [9] Shao Y, Zhou BN, Lin LZ, et al. Asteryunnanoside E, a new triterpenoid saponin from *Aster yunnanensis* Franch. [J]. Chin Chem Lett, 1994, 5: 761-764.
- [10] Shao Y, Gao JH, Zhou BN. Asteryunnanoside A and B, two new triterpenoid saponin from *Aster yunnanensis* Franch. [J]. Chin Chem Lett, 1994, 5: 121-124.
- [11] Li L, Lv X, Su XY, et al. Pharmacognostical studies on Tibetan medicine *Pulicaria insignis* [J]. Chin Med Mat (中药材), 2021, 44: 318-321.
- [12] Hunag SZ, Jiang SP, Zhu HJ. A new phenylpropanoid glycoside from Tibetan medicine *Pulicaria insignis* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2009, 21: 549-552.
- [13] Fan HF, Huang SZ, Jiang SP, et al. A new phenylpropanoid glycoside from Tibetan medicine *Pulicaria insignis* [J]. Chem J Chin Univ (高等学校化学学报), 2011, 32: 292-295.
- [14] Huang SZ, Li LB, Jiang SP, et al. A rarely reported triterpenesquiterpene-type structure in an isolate from *Pulicaria insignis* [J]. Helv Chim Acta, 2010, 93: 1808-1811.
- [15] Huang SZ, Jiang SP, Zhu HJ. Sesquiterpenoids from Tibetan folk drug *Pulicaria insignis* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2010, 22: 736-739, 785.
- [16] Qi W, Li MW, Fu DH, et al. Sesquiterpene glycoside diversities with anti-nematodal activities from *Pulicaria insignis* [J]. Phytochem Lett, 2020, 38: 161-165.

- [17] Di MaErDZPC. Jingzhu Bencao (晶珠本草) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1986: 102-103.
- [18] Ga W. Zangyao Jingjing Bencao (藏药晶镜本草) [M]. Beijing: Nationalities Press, 1995: 261-262.
- [19] Zhi H, Ai D, Wu KX, et al. Comparison on chemical constituents between *Potentilla chinensis* and *P. acaulis* using GC-MS by metabolomics approach [J]. Bull Bot Res (植物研究), 2020, 40: 718-727.
- [20] Adebo OA, Oyeyinka SA, Adebisi JA, et al. Application of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics for the study of fermented cereal and legume foods: a review [J]. Int J Food Sci Tech, 2021, 56: 1514-1534.
- [21] Zeki ÖC, Eylem CC, Reçber T, et al. Integration of GC-MS and LC-MS for untargeted metabolomics profiling [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 190: 113509.
- [22] Papadimitropoulos MP, Vasilopoulou CG, Maga-Nteve C, et al. Untargeted GC-MS metabolomics [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1738: 133-147.
- [23] Beale DJ, Pinu FR, Kouremenos KA, et al. Review of recent developments in GC-MS approaches to metabolomics-based research [J]. Metabolomics, 2018, 14: 152.
- [24] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. Xenobiotica, 1999, 29: 1181-1189.
- [25] Trygg J, Wold S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS) [J]. J Chemometr, 2002, 16: 119-128.
- [26] Tsugawa H, Cajka T, Kind T, et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis [J]. Nat Methods, 2015, 12: 523-526.
- [27] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part IV. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 233.
- [28] Chen YJ, Wu H, Wei ZY, et al. Identification of chemical constituents in *Aster tataricus* by UHPLC-Q-TOF-MS [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 1645-1654.
- [29] Sun YP, Li L, Liao M, et al. A systematic data acquisition and mining strategy for chemical profiling of *Aster Tataricus* Rhizoma (Ziwan) by UHPLC-Q-TOF-MS and the corresponding anti-depressive activity screening [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 154: 216-226.
- [30] Zhao DX, Hu BQ, Zhang M, et al. Simultaneous separation and determination of phenolic acids, pentapeptides, and triterpenoid saponins in the root of *Aster tataricus* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. J Sep Sci, 2015, 38: 571-575.
- [31] Wang J, Xu DK, Xiao Y, et al. The OPLS-DA model of tobacco producing areas based on chemical measurements [J]. Chin Tob Sci (中国烟草科学), 2017, 38: 91-96.
- [32] Cheng Y, Xie G, Chen T, et al. Distinct urinary metabolic profile of human colorectal cancer [J]. J Proteome Res, 2012, 11: 1354-1363.
- [33] Kind T, Wohlgemuth G, Lee DY, et al. FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2009, 81: 10038-10048.
- [34] Huang LS, Gu YF, Li H. Advances in herbal volatile oil and aromatic herbs [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2009, 34: 1605-1611.
- [35] Gu XW, Chen Y, Wang M, et al. Progress in the research on the phenylpropanoids and its related chemical constituents of Malvaceae [J]. Chin Wild Plant Resour (中国野生植物资源), 2012, 31: 17-21.
- [36] Liu HD, Pan LL, Zhou X, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of alkaloids in Orchidaceae plants [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50: 731-744.
- [37] Zhao XW, Liu PY, Liu D, et al. Research progress in structure-activity relationship of flavonoids [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2015, 46: 3264-3271.
- [38] Kaplan F, Kopka J, Sung DY, et al. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content [J]. Plant J, 2007, 50: 967-981.
- [39] Zhao W. Screening and Analysis of 2, 3, 5, 4'-Tetrahydroxy Stilbene-2-O- $\beta$ -D-Glucoside Biosynthesis Related Transcripts from *Fallopia multiflora* (何首乌中二苯乙烯昔生物合成相关基因的筛选与分析) [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014.