

基于非靶向代谢组学的怀珍珠菊和野菊花化学成分差异性分析

杨晓萌^{1,2,3}, 赵楠³, 刘欣欣³, 张立新^{1,2*}, 张晓哲^{3*}, 张丽华³

1. 沈阳化工大学化学工程学院, 辽宁 沈阳 110142

2. 沈阳化工大学功能分子研究所, 辽宁省绿色功能分子设计与开发重点实验室, 沈阳市靶向农药重点实验室, 辽宁 沈阳 110142

3. 中国科学院分离分析化学重点实验室, 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023

摘要: 目的 研究典型食用菊怀珍珠菊 *Chrysanthemum morifolium* 与典型药用菊野菊花 *C. indicum* 的差异性成分。方法 采用 UPLC/Q-TOF-MS 结合非靶向代谢组学方法, 筛选怀珍珠菊与野菊花的差异性成分。结果 从怀珍珠菊中共鉴定出包括黄酮类、萜类、苯丙素类、有机酸类等化合物在内的 80 个代谢产物, 其中木犀草苷、艾黄素、秦皮乙素等 19 个代谢产物是与野菊花具有显著差异性的分子。结论 萜类化合物为怀珍珠菊和野菊花的主要差异性代谢物, 这些代谢物与抗炎、抑菌和抗虫害密切相关, 值得进一步研究。

关键词: 怀珍珠菊; 野菊花; UPLC/Q-TOF-MS; 主成分分析; 差异性分析; 萜类化合物; 木犀草苷; 艾黄素; 秦皮乙素
中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)19-6496-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.19.005

Non-targeted metabolomics study on differential chemical constituents of *Chrysanthemum morifolium* and *Chrysanthemum indicum*

YANG Xiaomeng^{1,2,3}, ZHAO Nan³, LIU Xinxin³, ZHANG Lixin^{1,2}, ZHANG Xiaozhe³, ZHANG Lihua³

1. School of Chemical Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China

2. Shenyang Key Laboratory of Targeted Pesticides, Liaoning Province Key Laboratory of Green Functional Molecular Design and Development, Institute of Functional Molecules, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China

3. CAS Key Laboratory of Separation for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

Abstract: Objective To study the differential components of typical edible chrysanthemum ‘HZZJ’ (*Chrysanthemum morifolium*) and typical medicinal chrysanthemum ‘YJH’ (*C. indicum*). **Methods** The differential components of ‘HZZJ’ and ‘YJH’ are screened by UPLC/Q-TOF-MS combined with non-target metabolomics method. **Results** A total of 80 metabolites including flavonoids, terpenoids, phenylpropanoids, organic acids and other compounds are identified in this study, of which 19, such as luteolin, artemisinin and aesculetin, are molecules with significant differences from wild chrysanthemums. **Conclusion** Terpenoids are the main differential metabolites of ‘HZZJ’ and ‘YJH’, and these metabolites are closely related to anti-inflammatory, bacteriostatic and pest resistance, and deserve further study.

Key words: *Chrysanthemum morifolium* Ramat.; *Chrysanthemum indicum* L.; UPLC-QTOF-MS; principal component analysis; difference analysis; terpenoids; luteolin; artemisinin; aesculetin

菊花为菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序, 由于其具有散风清热、平肝明目、清热解毒等功效, 在中国、日本和印度等亚

洲国家以及一些欧洲国家已被用作功能性食品^[1-2]。菊花品种丰富多样, 《中国药典》2020 年版按产地和加工方法不同, 将菊花分为“毫菊”“滁菊”“贡菊”

收稿日期: 2024-02-16

基金项目: 辽宁省民生科技项目 2021JH2/10200004; 贵州省科技支撑项目 (黔科合支撑 [2020] 4Y218 号)

作者简介: 杨晓萌 (1997—), 女, 硕士, 研究方向为中药质量控制。Tel: 15309892660 E-mail: yangxiaomeng@dicp.ac.cn

*通信作者: 张立新 (1966—), 男, 博士, 教授, 博士生导师。Tel: (024)89385080 E-mail: zhanglixin@syuct.edu.cn

张晓哲 (1974—), 男, 博士, 研究员, 博士生导师。Tel: (0411)84379667 E-mail: zhangxz@dicp.ac.cn

“杭菊”和“怀菊”。怀菊花是我国四大怀药之一^[3]，因其独特的疗效和上乘的品质在国内外享有极高声誉。怀珍珠菊作为怀菊花中的 1 个稀有品种，主要用作茶饮，已栽种于我国河南省温县、武陟县等地，并以独特的风味和稀缺性受到市场的广泛认可^[4]。然而，目前对于怀珍珠菊的研究较少，特别是其化学组成和药用活性鲜有报道^[4-5]。先前的研究表明，怀菊能够显著降低正常大鼠物质能量代谢水平，与黄连、黄芩等典型寒性中药趋势相同^[6]。另一项研究表明，从怀菊中提取到的一种新的化合物菊花环氧木脂素 A (dendranlignan A)，其能够抑制脂多糖诱导的 H9c2 心肌细胞中炎症介质的产生，从而起到保护心肌细胞免受损伤的作用^[7]。因此，怀珍珠菊中的药效物质基础值得深入研究。

代谢组学是系统研究植物代谢成分的有效方法，已开始被应用在菊花的研究中。例如，采用高通量液相质谱代谢组学技术对 4 种杭白菊提取物样本代谢物组定性解析，共检出 776 种代谢物，主要包括醇类、氨基酸类、糖类、黄酮苷类等^[8]。野菊花为菊科菊属植物野菊 *C. indicum* L. 的干燥头状花序，是临床常用的清热泻火药，具有疏风消肿、清热解毒、泻火平肝等功效^[9]。为深入理解怀珍珠菊的化学成分特征，本研究采用基于 UPLC/Q-TOF-MS/MS 的非靶向代谢组学方法，以主要活性成分已被广泛研究的野菊花作为对照组，研究怀珍珠菊与野菊花的差异性成分，并对其进行鉴定，以期揭示怀珍珠菊的化学组成。

1 材料与试剂

1.1 仪器与试剂

1290 Infinity 超高效液相色谱仪、6520 四极杆-飞行时间质谱联用仪 (Q-TOF-MS, 美国 Agilent 公司); Milli-Q 超纯水仪 (美国 Milli-pore 公司); YQ-1000C 型超声仪 (上海易超净公司); 1-16K 型微型冷冻离心机 (德国 Sigma 公司); 基因条形码测试 (数字本草中医药检测有限公司)。

HPLC 级甲醇和乙腈 (德国 Merck 公司); HPLC 级甲酸 (天津市科密欧化学试剂有限公司); 二甲基亚砜 (天津市福晨化学试剂厂); Milli-Q 超纯水; 对照品绿原酸 (批号 C109403)、木犀草苷 (批号 C110086)、异绿原酸 A (批号 I117946)、蒙花苷 (批号 L115186)、芹菜素 (批号 A106676)，质量分数均 $\geq 98.0\%$ 。购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 样品

共采购 68 批怀珍珠菊 (编号 HZZJ1~HZZJ33, 产地河南) 与野菊花药材 (编号 YJH1~YJH16 和 YJH17~YJH35, 产地分别为安徽和河南)，经大连市食品药品检验所陈代贤药师通过性状和基因条形码等鉴定怀珍珠菊为菊科菊属植物菊花 *C. morifolium* R. 的干燥头状花蕾，野菊花为菊科菊属植物野菊 *C. indicum* L. 的干燥头状花序。

2 方法

2.1 样品制备

精密称取 100.0~100.5 mg 干燥样品粉末浸入 1 mL 50% 甲醇水中 30 min，配成 100 mg/mL，然后在室温下超声提取 30 min。在 12 000 r/min 离心 30 min，精密量取上清液置于 4 °C 冰箱中备用。同时，等量混合 68 个菊花样品 (20 μ L) 涡旋后，获得 10 组质量控制样品 (QC)，将其转移到样品瓶中，用于评价代谢组学分析过程。

2.2 DNA 条形码制备

以实验室采购的怀珍珠菊和野菊花为送检样品，委托数字本草检测科技有限公司运用 DNA 条形码分子鉴定技术，将怀珍珠菊、野菊花与数据库近似菊科品种对比，辅助验证结果的可靠性。

2.3 非靶向代谢组学分析

采用 Eclipse Plus C₁₈ RPHD 色谱柱 (150 mm $\times$ 3.0 mm, 1.8 μ m) 进行样品分离，二元梯度洗脱体系的流动相分别为 0.1% 甲酸水溶液 (A 相) 和 0.1% 甲酸的乙腈溶液 (B 相)，梯度洗脱 (0~15.00 min, 5%~100% B; 15.00~18.00 min, 100% B; 18.00~18.01 min, 100%~5% B; 18.01~21.00 min, 5% B)，柱温为 40 °C，进样量为 5 μ L，体积流量为 0.3 mL/min。

使用配备电喷雾离子源 (ESI) 的 Q-TOF 6520 系统，在正离子模式下采集组学数据。毛细管温度为 345 °C，毛细管电压为 3.5 kV，Fragmentor 电压为 200 V，Skimmer 电压为 65 V，全扫描模式，采集范围为 m/z 100~2 000。在整个分析过程中，每间隔 7 个样品采集 1 组 QC 样品数据，以验证数据的可重复性。为了保持样品分析过程中 Q-TOF 仪器的质量精度，对每个样品进行实时校正。采用强度依赖的方法获取非靶向 MS/MS 数据，从每次 TOF-MS 扫描中选择前 10 个离子作为 AUTOMS/MS 碎片前体。设置 MS² 的碰撞能量为 25 eV，质量范围为 m/z 50~1 500。采用分析仪软件 (Agilent

MassHunter Qualitative Analysis B.06.00) 进行数据分析。

2.4 代谢组学数据处理

将采集的 UPLC-Q-TOF-MS 原始数据以 Centroided 数据格式导入 Progenesis QI 2.3 (Nonlinear, Dynamics, Newcastle, UK) 中, 设置数据过滤强度阈值为 0.3, 离子噪音绝对峰强度 1 000, 保留时间范围为 0.1~15 min。经过峰对齐、峰提取等数据处理后, 导出化合物测量值到 Excel 文件中。将上述数据经过处理后, 保留原始丰度中同位素不为 100、以及删除特征强度小于质控数据的相对标准偏差 30%的特征化合物。

将上述处理后的数据集, 导入到代谢组学数据分析和注释的在线开源生信平台 MetaboAnalyst 5.0 (www.metaboanalyst.ca) [10], 依次经过对数变换和帕累托缩放法后, 实现数据归一化。然后, 利用相对峰强度执行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和偏最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA), 对组间进行分类和区分。方差重要性投影 (variable importance in projection, VIP) 值是评价代谢标志物筛选的重要指标。因此, 选择 VIP>1.0 和 $P<0.05$ 的代谢物作为差异性显著的化合物。具有 VIP>1.0 的前 100 个变量被认为是与群体歧视相关, 并通过自建数据库 (self-built asteraceae database) 进行结构鉴定、通过 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Massbank (<http://www.massbank.jp/>) 数据库进行谱图比对验证, 以及通过 HMDB (<https://hmdb.ca/>)、TCMSP (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 对差异成分进行活性分析。在 TCMSP 上搜索菊科植物中含菊花、野菊花、金盏菊花、菊苣 4 个植物在内的

476 个化合物的信息, 并对相关的研究或报告进行收集与汇集, 最终整合建立 SDF 数据库共含有 863 个化合物。然后, 将这些化合物的结构用 Pubchem 数据库进行整理后以 .sdf 格式保存。最后, 使用 Progenesis SDF Studio (Nonlinear Dynamics) 进行整合并建立完整数据库。

此外, 将全部样本分析得到的峰强度平均值进行比较, 使用在线开源生信平台 MetaboAnalyst 5.0, 通过模块 Pathway analysis 调用 KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) 建立通路分析。本次通路选择植物拟南芥通路库^[8]进行代谢通路分析, 寻找可能的代谢通路, 再利用包括人类代谢组学数据库在内的参考文献和数据库进一步解释生物标志物的其他可能途径。

3 结果与分析

3.1 DNA 条形码分析

本研究通过 DNA 条形码技术^[11]结合非靶向代谢组学, 分析怀珍珠菊与野菊花的差异性。以菊花、小红菊、楔叶菊、紫花毛山菊、皇帝菜、野菊花为对照组, 送检的怀珍珠菊、野菊花为实验组, 开展基因测序。如图 1 所示, 1~15 号为基因库对照条形码。其中, 14 个菊科菊属植物的条形码相比 13 号菊科茼蒿属皇帝菜的多处基因位点具有显著差异。而 16~17 号待测样品与 13 号菊科茼蒿属皇帝菜的基因序列中多处碱基同样存在显著差异, 但是与其他 14 个菊科菊属植物的对照条形码序列高度一致。由此, 可以将怀珍珠菊明确鉴定为菊科菊属植物。同时, DNA 序列显示, 怀珍珠菊与野菊花这一最具代表性药用菊属植物^[12]的 DNA 序列存在明显的碱基差异。基于此, 进一步采用 UPLC-Q-TOF/MS 对 2 种菊属植物的化学成分进行差异性分析。

1. 菊花 (AB064274.1)
2. 菊花 (AB064283.1)
3. 菊花 (AB064275.1)
4. 菊花 (AB064276.1)
5. 菊花 (AB064277.1)
6. 菊花 (AB064278.1)
7. 菊花 (AB064282.1)
8. 菊花 (AB064284.1)
9. 菊花 (AB064285.1)
10. 小红菊 (KY312481.1)
11. 楔叶菊 (AF314595.1)
12. 紫花毛山菊 KY312487.1)
13. 皇帝菜 (EF577292.1)
14. 野菊花 (KY312488.1)
15. 野菊花 (MT644716.1)
16. 怀珍珠菊 (159)
17. 野菊花 (160)

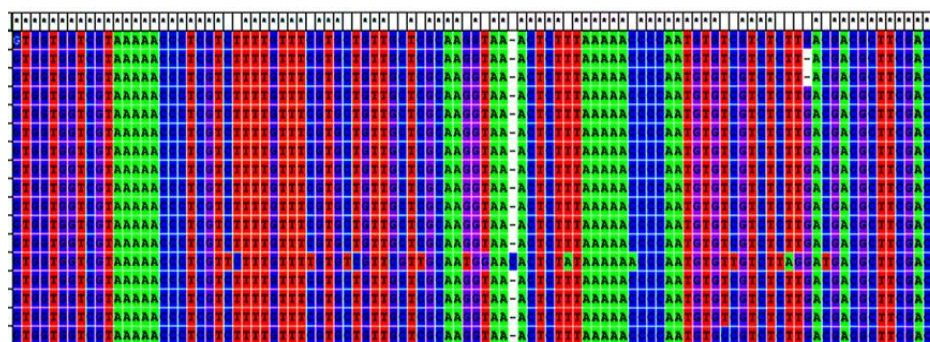


图 1 多种菊科植物基因条形码比较

Fig.1 Comparison of gene barcoding of various compositae plants

3.2 怀珍珠菊和野菊花的差异分析

选择野菊花为对照样品, 采用 UPLC-Q-TOF/MS 结合多变量统计分析法对怀珍珠菊的潜在差异性成分进行筛选和鉴定。为了更好地说明两者的差异性, 首先比较了怀珍珠菊和野菊花的生物学性状, 其次对两者的化学成分进行多变量统计分析。如图 2 所示, 野菊花的头状花序呈类球形, 花黄, 其瓣状如舌, 与形如珍珠, 色如翡翠的怀珍珠菊的生物学性状差异显著。同时, 怀珍珠菊和野菊花在总离子流图的轮廓上具有一定的相似性, 说明二者具有相似的化学成分。但含量和组成上也具有大量的差异性成分, 因此有必要采用多变量统计分析进一步阐

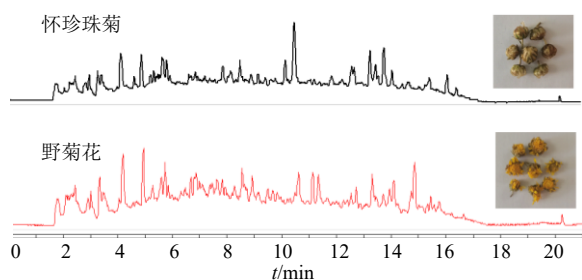


图 2 怀珍珠菊与野菊花 TIC 图

Fig. 2 Total ion current diagram of HZZJ and YJH

明二者之间的差异性成分。

采用 PCA 考察怀珍珠菊与野菊花样本间的化学差异性。如图 3-A 所示, 10 个 QC 样本紧密聚类, 表明实验仪器稳定, 数据可靠可以用于进一步分析。由 PCA 得分图可以看出, 怀珍珠菊与野菊花样本边界清晰, 无交叉重叠, 具有明显的聚类趋势, 表明二者化学成分存在显著的表达差异。

进一步采用 PLS-DA 最大化分离不同组别的实验样本, 以更好地实现怀珍珠菊与野菊花的聚类分析。如图 3-B 所示, PLS-DA 能够使两组样本明显分开, 特别是组内样本聚类更加紧密, 有利于二者差异成分的发现。同时, 采用了交叉验证 (CV) 评价 PLS-DA 模型的可靠性 (R^2) 和预测能力 (Q^2)。如图 3-C 所示, 本实验建立的 PLS-DA 模型 R^2 为 0.99, Q^2 为 0.98 (成分数量=5 时), 表明模型具有良好的拟合和预测能力, 所建模型可靠。

3.3 怀珍珠菊和野菊花差异成分筛选与鉴定

如图 3-D 所示, 从 LC-MS 数据中共提取得到 87 250 个离子特征, 经过同位素分布、特征缺失和 RSD 过滤等筛选获得 25 722 个离子特征。本研究选择 $VIP > 1$ 、 $P < 0.05$ 以及 $FC > 2$ 的共有代谢特征, 筛选获得 468 个差异性特征。最终, 通过选择 m/z

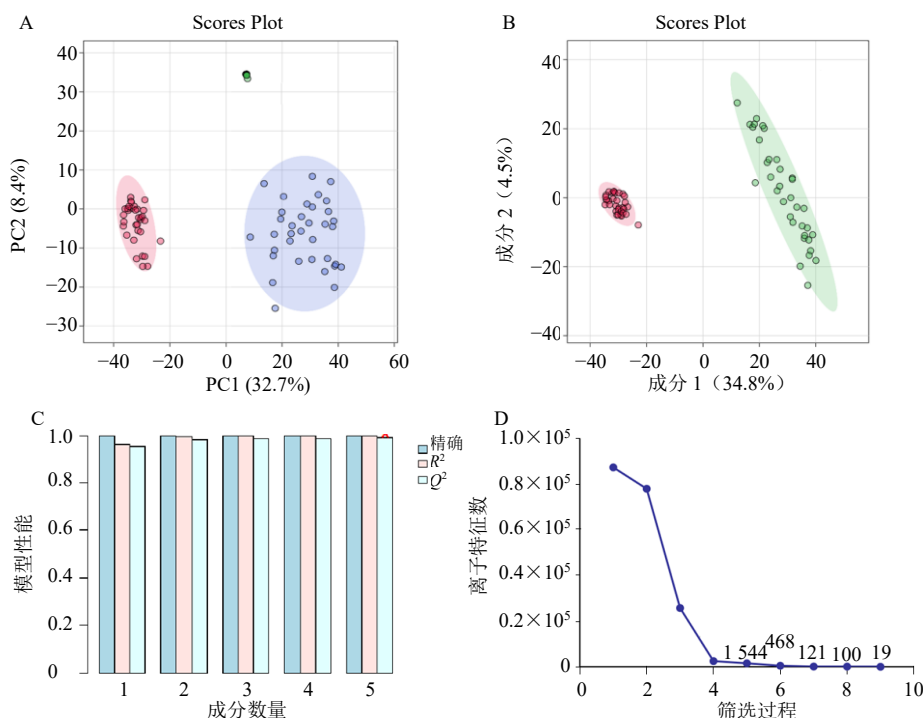


图 3 怀珍珠菊与野菊花的 PCA (A)、PLS-DA 及交叉验证 (B、C) 结果与怀珍珠菊显著差异性代谢物的筛选过程 (D)

Fig. 3 PCA (A), PLS-DA and cross-validation (B, C) of HZZJ and YJH, and screening process of significant differential metabolites of HZZJ (D)

为 1、峰强度缺失值少于 1/3 以及原始谱图比对后，保留 100 个特征作为怀珍珠菊和野菊花的显著差异特征，并采用 MS/MS 鉴定。

本研究通过比较已知标准化合物的确切质量、保留时间和同位素模式，结合数据库检索、文献一致性和研究样本的概率，最终确认了其中 19 个显著差异性成分，分别归属于黄酮类、萜类、挥发油类、苯丙素类、有机酸类及其他类化合物，信息见表 1。

据现有文献报道，黄酮和黄酮醇类化合物多以

糖苷配基或葡萄糖苷的形式存在。酸性条件下，极易失去糖基，产生相应的苷元^[13-14]。根据 MS 和 MS/MS 信息，本研究推测了差异化合物木犀草苷的裂解模式，如图 4 所示。在正离子模式下，化合物 1 在 m/z 449.222 6 处质子化后，得到前体母离子。根据主要碎片特征苷元离子 m/z 287.056 9，推断其为黄酮类化合物木犀草素的衍生物。在化合物 1 的 MS² 谱图中， m/z 449.222 6 处的离子裂解 $[M+H-162]^+$ 成为 m/z 287.056 9 处的离子，表明其失去 1

表 1 怀珍珠菊与野菊花之间的显著差异成分

Table 1 Components with significant difference between HZZJ and YJH

序号	化合物	分子式	理论质荷比	测定质荷比	质量偏差	变量权重	倍数变化	化合物类型
1	luteolin-7-O-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.114 8	449.112 4	-5.34×10 ⁻⁶	1.38	18.50	黄酮类
2	artemetin	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	389.126 2	389.229 5	2.65×10 ⁻⁴	1.55	47.98	
3	esculetin	C ₉ H ₆ O ₄	179.034 8	179.034 7	-5.59×10 ⁻⁷	1.67	117.15	苯丙素类
4	cumambrin A	C ₁₇ H ₂₂ O ₅	307.157 8	307.156 8	-3.26×10 ⁻⁶	1.68	46.47	萜类
5	cumambrin B	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	265.145 5	265.143 9	-6.03×10 ⁻⁶	1.21	49.82	
6	L-carvone	C ₁₀ H ₁₄ O	151.112 7	151.110 7	-1.32×10 ⁻⁵	1.54	45.54	
7	calacorene	C ₁₅ H ₂₀	201.165 0	201.163 2	-8.95×10 ⁻⁶	1.08	4.41	
8	chrysanthediacetate C	C ₁₉ H ₂₈ O ₄	321.208 8	321.205 7	-9.65×10 ⁻⁶	1.66	52.99	
9	chrysanthediacetate B	C ₁₉ H ₂₈ O ₄	321.208 8	321.206 6	-6.85×10 ⁻⁶	1.44	38.76	
10	chamazulene	C ₁₄ H ₁₆	185.132 6	185.131 0	-8.64×10 ⁻⁶	1.01	12.80	
11	cis-ascaridole	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	169.123 3	169.122 0	-7.69×10 ⁻⁶	1.15	14.66	
12	2-octenal	C ₈ H ₁₄ O	127.112 3	127.109 6	-2.12×10 ⁻⁵	2.24	278.21	挥发油
13	decanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	173.154 6	173.152 5	-1.21×10 ⁻⁵	1.20	14.64	
14	salicylic acid	C ₇ H ₆ O ₃	139.039 6	139.039 4	-1.44×10 ⁻⁶	1.50	52.00	有机酸
15	benzyl benzoate	C ₁₄ H ₁₂ O ₂	213.093 0	213.091 2	-8.45×10 ⁻⁶	1.92	91.34	其他
16	apocynin	C ₉ H ₁₀ O ₃	167.071 4	167.080 9	5.69×10 ⁻⁵	1.76	108.10	
17	methylheptadienone	C ₈ H ₁₂ O	125.096 7	125.094 1	-2.08×10 ⁻⁵	1.23	16.50	
18	isophorone	C ₉ H ₁₄ O	139.112 4	139.111 7	-5.03×10 ⁻⁶	1.62	28.72	
19	deoxylapachol	C ₁₅ H ₁₄ O ₂	227.108 5	227.101 7	-2.99×10 ⁻⁵	1.43	50.95	

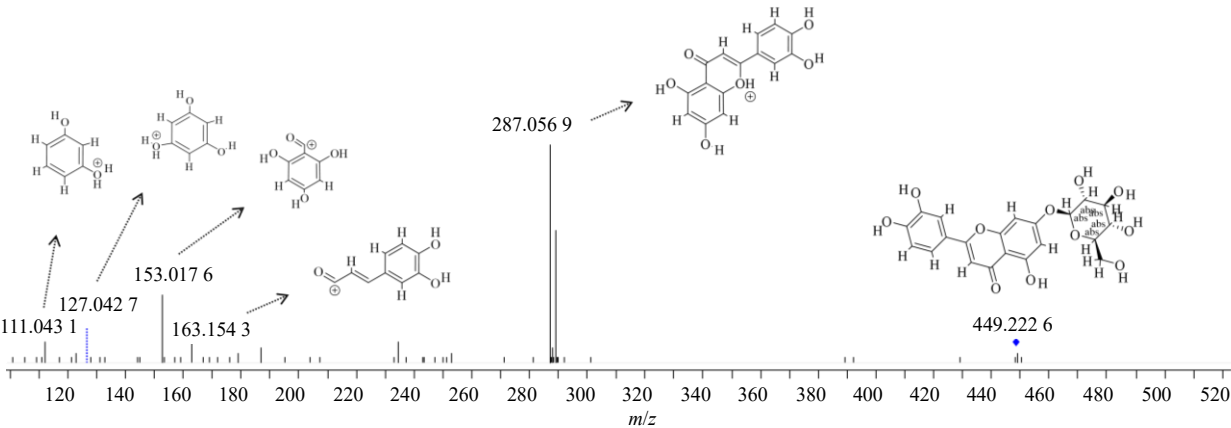


图 4 木犀草素-7-O-葡萄糖苷在正离子模式下的碎裂模式

Fig. 4 Fragmentation pattern of luteolin-7-O-glucoside in positive ion mode

个糖基^[15-16]。接着对质子化的木犀草素的裂解方式进行推断。由于 O 原子上裸露着 2 个电子, 所以 O 原子极易被质子化而带正电; 又因为 C-O 单键比 C=O 双键更易断键, 所以杂环上 C-O 单键优先断键, 进而使 C=C 双键因为失去电子而带正电; 同时, 又因为 C=O 极易质子化, 推断在 m/z 163.154 3 处的碎片为 C-C 单键断裂后形成质子化的 3,4-二羟基苯丙烯酮; 在 m/z 153.017 6 处形成质子化的 2,4,6-三羟基苯甲醛; 在 m/z 127.042 7 处脱掉羰基形成质子化的 2,4,6-三羟基苯; 在 m/z 111.043 1 处脱掉 1 分子 H_2O 形成质子化的邻二苯酚。结合关

于合成木犀草素的已有文献报道^[17-18]以及 Pubchem 数据库中提供的二级谱信息, 确认了本研究的推断。

3.4 代谢通路分析

本研究提供了已鉴定化合物参与形成以及所涉及的许多化合物生成途径的信息。选择植物拟南芥通路库进行代谢通路分析, 并设置富集方法参数为超几何测试、拓扑分析参数为相对中介中心性。如图 5-A 所示, 产生的主要通路有黄酮类生物合成和黄酮醇类的生物合成、氨酰基-tRNA 生物合成、亚油酸代谢以及各种氨基酸的生物合成。

本研究描述了黄酮和黄酮醇类化合物合成途

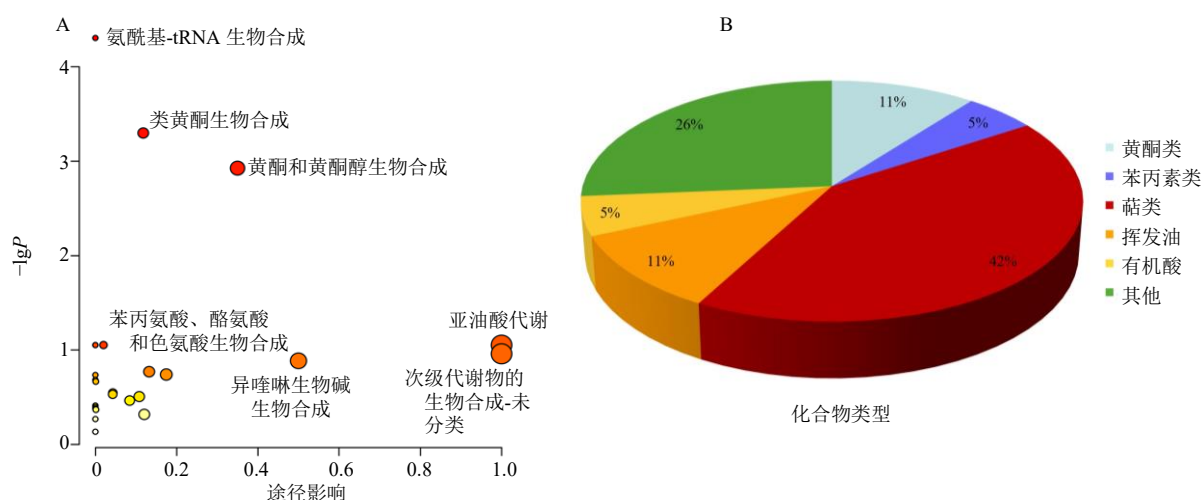


图 5 怀珍珠菊差异分子的代谢通路分析 (A) 及差异化合物百分比 (B)

Fig. 5 Metabolic pathway analysis of differential molecules (A) and percentage of differential compounds (B) in HZZJ

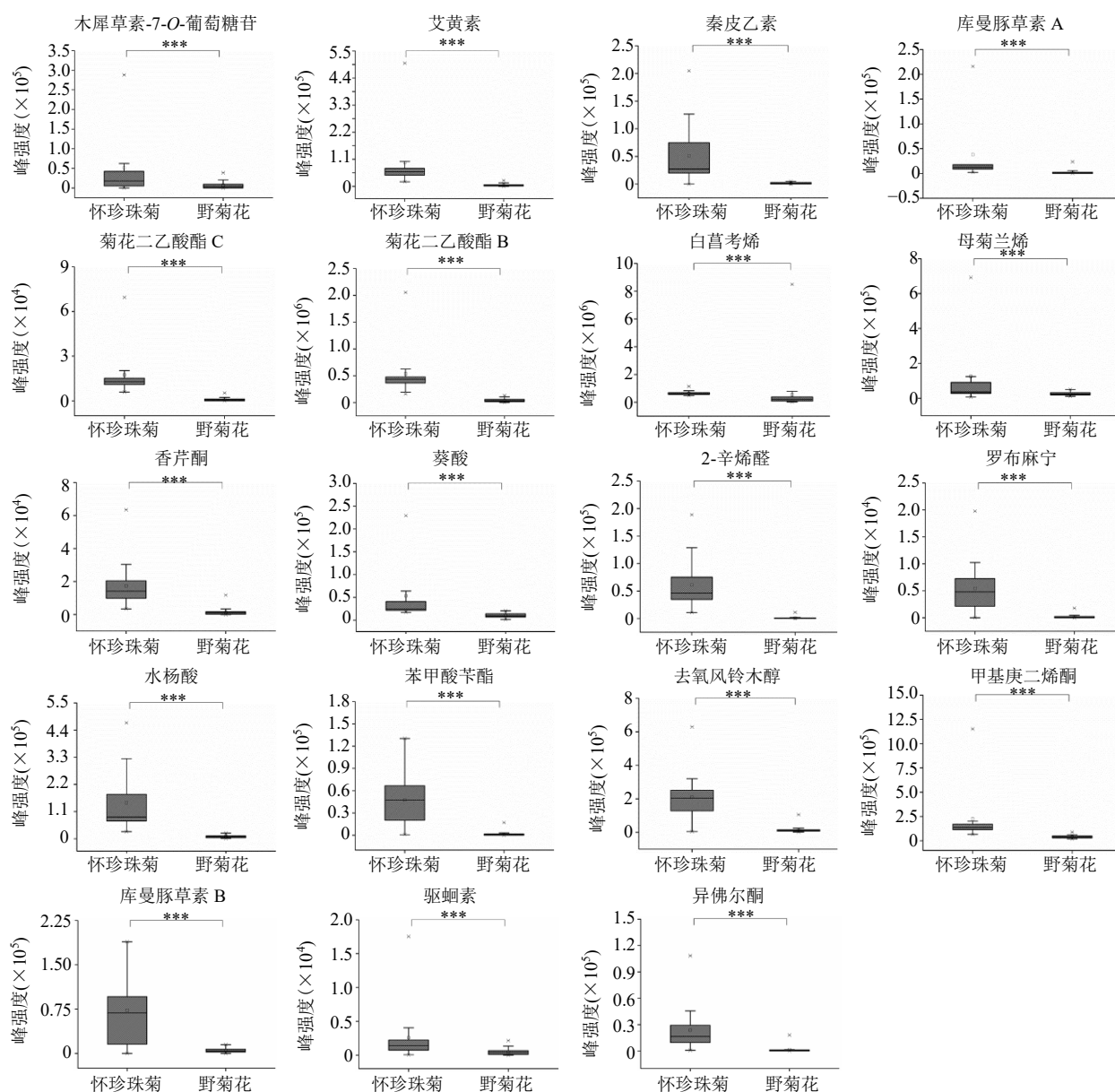
径、亚油酸类代谢途径和氨基酸类代谢途径。由于黄酮和黄酮醇类化合物结构特殊而具有良好的生物活性, 如抗氧化、抗病毒、抗肿瘤等^[19], 因此在医药食品等方面得到了广泛的应用。亚油酸是人和动物营养中必须的不饱和脂肪酸^[20], 除作为乳化剂等表面活性剂外, 在医药上可用于治疗高脂血症、动脉硬化及脂肪肝等症状。氨基酸^[21]是动物营养所需蛋白质的基本物质, 其能够促进植物根系生长, 起到壮苗、健株、增强光合作用以及抗病虫害作用。3 种代谢通路分析表明, 除了黄酮和黄酮醇类化合物是怀珍珠菊的主要来源外, 亚油酸和氨基酸也是其来源之一, 进而表明怀珍珠菊存在一定活性与药效性。

3.5 怀珍珠菊显著差异代谢物的分析

如图 5-B 所示, 在怀珍珠菊中鉴定出包括黄酮类、萜类及苯丙素类等化合物在内的 19 个显著差异化合物, 其中萜类化合物为主要差异化合物。箱型图是一种既能反映原始数据分布特征, 又能比较

多组数据分布特征的统计图。其最大的优点就是在异常值存在的情况下, 依旧能够直观准确稳定地描绘出数据的离散分布情况。如图 6 所示, 由怀珍珠菊与野菊花两者各自总体样本的显著性差异成分的峰强度绘制而成的箱型图, 直观准确地展示了两者的差异成分含量的显著差异性。通过对显著差异性成分的功能分析, 提示怀珍珠菊具有的潜在功能特性, 为下一步的活性研究奠定基础。

3.5.1 黄酮类及苯丙素类差异代谢物的分析 木犀草素-7-O-葡萄糖苷 (luteolin-7-O-glucoside) 是木犀草素在 C-7 位被 β -D-吡喃葡萄糖基取代而形成糖苷键的一种糖氧苷黄酮, 具有降低氧化应激和炎症机制方面的活性。鼻咽癌是一种不引人注意的恶性肿瘤, 其具有很高的淋巴转移潜力, 在亚洲的患病率很高。Ho 等^[22]研究发现木犀草苷能够通过蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 信号通路调节细胞凋亡, 进而抑制人鼻咽癌细胞增殖。de Stefano 等^[23]研



*** $P < 0.001$ 表示两组的差异性显著；方框代表数据的第 25、第 50 (中位数) 和第 75 个百分点数。

*** $P < 0.001$ means significant differences between two groups. The boxes represent the 25th, 50th (median) and 75th percentiles of data.

图 6 怀珍珠菊 ($n = 33$) 和野菊花 ($n = 35$) 中 19 个差异成分相对含量的箱线图

Fig. 6 Boxplots of relative content of 19 differential components in HZZJ ($n = 33$) and YJH ($n = 35$)

究发现木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷能够抑制人脐静脉内皮细胞中 STAT3 通路而起到抗增殖作用和抗氧化特性。Palombo 等^[24]研究表明菜蓟苷(cynaroside)在角质形成细胞中能够通过激活 JAK/STAT3 通路和促炎基因转录来抵消 *IL-22* 和 *IL-6* 的基因转录。

艾黄素 (artemetin) 是黄酮醇醚，具有抗炎、抗氧化和抗凋亡等作用。Kim 等^[25]研究表明艾黄素通过抑制人低密度脂蛋白和高密度脂蛋白氧化对动脉粥样硬化能够起到保护作用。Wee 等^[26]发现在蔓荆

子叶中提取分离到的艾黄素对于脂多糖诱导的人 U937 巨噬细胞中的促炎细胞因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 和白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 具有抑制作用。Shi 等^[27]充分证明了艾黄素能够逆转血管和内皮损伤，从而对内皮细胞起保护作用。

秦皮乙素 (esculetin) 是一种来自多种植物的天然香豆素衍生物，具有多种药理作用。Pullaiah 等^[28]通过体内外实验表明秦皮乙素能够对异丙肾上腺素

所致大鼠心肌毒性有保护作用。Cheng 等^[29]研究发现秦皮乙素不仅能够明显减轻脓毒症小鼠肺组织损伤,还能够抑制早期败血症中大肠杆菌引起的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、趋化因子 2 (chemokine 2, CCL2) 和诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 等炎症因子的产生,从而起到抗炎作用。Wang 等^[30]研究发现秦皮乙素通过抑制肝脏中黄嘌呤氧化酶的表达与活性以及调节肾脏中尿酸的转运蛋白,促进尿酸排泄,保护氧化应激损伤和减少肾纤维化,从而起到保护肾脏的作用。

3.5.2 萜类及挥发油类差异代谢物的分析 库曼豚草素 A (cumambrin A) 是从菊属中分离出来的一种倍半萜内酯。Zhou 等^[31]通过研究发现库曼豚草素 A 可以通过抑制 NF- κ B 的配体 RANKL 诱导 NF- κ B 的受体激活剂并活化 T 细胞活性的核因子和 ERK 磷酸化以及抑制包括组织蛋白酶 K、降钙素受体和 V-ATPase d2 在内的破骨细胞标记基因的表达,从而防止因雌激素戒断引起的骨质流失。库曼豚草素 B (cumambrin B) 同样是从菊属植物中分离出的一种倍半萜内酯类化合物。Jang 等^[32]研究表明库曼豚草素 B 具有抗微生物活性。

白菖考烯 (calacorene) 是倍半萜类化合物,是具有 3 个连续异戊二烯单元的萜烯。Amparo 等^[33]通过分子对接研究表明, α -白菖考烯和 α -欧洲赤松烯 (α -muurolene) 对新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 生命周期必不可少的 4 种靶蛋白的结合效果最好,且毒性低,具有实现细胞渗透性和用作药物的良好潜力。

母菊兰烯 (chamazulene), 倍半萜类化合物,是一种具有抗氧化、抗炎特性的天然化合物。Ma 等^[34]研究表明母菊兰烯能够对 IL-1 β 诱导的软骨细胞骨关节炎炎症起到很好的保护作用,且能够显著保护大鼠后踝组织免受完全弗氏佐剂诱导的骨关节炎炎症,可被推荐作为治疗骨关节炎炎症的临床试验治疗剂。Russo 等^[35]研究表明,富含母菊兰烯的精油对黑色素瘤细胞特别活跃 (IC₅₀ 值为 6.7、4.5 μ g/mL),很可能能够引发干扰内源性防御机制的细胞凋亡。

L-香芹酮 (L-carvone) 是一种单萜酮,是多种植物物种的主要活性成分,具有镇痛、抑菌等作用。Patel 等^[36]研究表明 L-香芹酮能够抑制乳腺癌 MCF 7 和 MDA MB 231 细胞的增殖进而抑制乳腺癌细胞系的迁移。Klyš 等^[37]研究发现随着 L-香芹酮和葛缕

子精油浓度的不断增加对-米象虫的迁移、驱避和死亡率也不断增加。

顺式蛔虫昔 (cis-ascaridole) 是一种对薄荷烷单萜类化合物,它是在 C-1 位至 4 位上具有过氧基的对薄荷烷-2-烯,能够作为抗线虫药物、植物代谢物和抗寄生虫剂而起到作用。Doughon 等^[38]研究表明顺式蛔虫昔和对伞花烃可以通过激活 GABA 系统促进睡眠,进而表明它们可以作为潜在的天然产物用于治疗睡眠障碍和中枢神经系统相关疾病。Patel 等^[39]通过分子对接研究表明,蛔虫昔可以通过干扰拓扑异构酶 I 和 II、乙酰胆碱酯酶、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的结合位点来治疗阿尔茨海默病。

菊花二乙酸酯 B 和 C (chrysanthediacetate B 和 C) 是倍半萜醇类化合物,是菊花中的天然产物^[40],暂时没有相关文献对其活性进行报道。

2-辛烯醛有 (E)-异构体,能够作为抗真菌剂的挥发油成分而起到作用。Dorota 等^[41]表明 2-辛烯醛等挥发性物质可以用作克罗地亚 18 种特级初榨橄榄油中酚酸的生物活性标志物。Gahleitner 等^[42]通过代谢组学研究表明,2-辛烯醛等挥发性物质可作为判断哮喘儿童和健康儿童的标志物。

癸酸 (decanoic acid) 是一种 C10 直链饱和脂肪酸,具有抗炎抑菌的作用,可作为挥发油成分、植物代谢物和藻类代谢物以及人体代谢物^[43]。Warren 等^[44]在离体大鼠脑组织和患有临床相关疾病的患者的人类 iPSC 衍生的星形胶质细胞中进行研究。结果表明,广泛使用药用饮食的关键成分癸酸能够降低 mTORC1 活性。Rial 等^[45]研究表明,中链脂肪酸在治疗非酒精性脂肪肝时能够保持最佳的胰岛素敏感性,甚至能够促进 Akt-mTOR 通路的基础和胰岛素依赖性磷酸化。

3.5.3 有机酸类及其他类差异代谢物的分析 水杨酸 (salicylic acid) 是一种单羟基苯甲酸,是苯环 C-4 上带有羟基取代基的苯甲酸,来自于植物代谢物和藻类代谢物,具有抗炎抑菌及延缓果实成熟和衰老的作用^[46]。Librando 等^[47]研究证明外用 0.1% 水杨酸能够替代外用前列腺素类似物,作为治疗原发性开角型青光眼患者慢性睑结膜炎的有效抗炎药。Moosa 等^[48]研究发现水杨酸和肉桂组合可以调节防御相关基因的表达,进而抑制柑橘的绿色和蓝色霉菌。

罗布麻宁是一种芳香酮,是在 C-4 位被羟基和 C-3 位被甲氧基取代的 1-苯乙酮。可以作为非麻醉

性镇痛药、非甾体抗炎药、抗风湿药、周围神经系统药、氧化酶抑制剂和植物代谢物起到作用。Kapoor 等^[49]研究表明罗布麻宁作为一种 NADPH 氧化酶组装抑制剂,对大鼠脑缺血后铁稳态紊乱起到保护作用。Barbieri 等^[50]研究发现罗布麻宁作为 NADPH 氧化酶抑制剂,可以降低由亚慢性强迫游泳压力测试引起的小鼠焦虑的有害影响。Cagin 等^[51]研究表明罗布麻宁可通过降低氧化应激和增加抗氧化活性来保护电离辐射所致的大鼠肝损伤。

异佛尔酮(isophorone)是一种具有类似樟脑气味的环状酮和烯酮类化合物,其化学结构为环己-2-烯-1-酮,在 C-3、5 和 5 有甲基取代,其可作为溶剂和植物代谢物。Liu 等^[52]基于异佛尔酮设计了一种具有细胞膜渗透性的新型近红外荧光探针,已成功应用于 HeLa 细胞内半胱氨酸的生物测定。

苯甲酸苄酯(benzyl benzoate)又叫 ascabiol,是治疗疥疮的老制剂之一,可用作治疗疥疮的药物、杀死蜱、螨和虱子的杀虫剂、增塑剂、香料中的固定剂、食品添加剂、溶剂^[53]。

甲基二庚烯炔酮^[54]是一种有机化合物,分子式为 $C_8H_{12}O$ 。其类别为酮香精,可用于香料研究(RIFM)香精成分的安全性评估。

去氧风铃木醇(deoxylapachol)是萘醌和对醌的成员。它是大肠杆菌硝酸还原酶 A(NarGHI)的底物,在 NarGHI 醌醇氧化位点形成稳定的半醌中间体。Sumthong 等^[55]在柚木锯末的醇提取物中分离的去氧风铃木醇能够抑制真菌和纤维素酶的活性,起到抗木材腐烂的作用。Sumthong 等^[56]研究表明来自柚木锯末提取物的去氧风铃木醇能够诱导真菌细胞壁应激进而抑制黑曲霉的生长。

特别地,菊属植物是化学成分多样性的丰富来源,近年来一直是天然产物化学研究的重点^[57]。而且,萜类化合物更是菊属报道的主要化学成分之一,其中已发现的某些化合物的体外活性优于阳性对照药物^[58]。由表 1 可知,在怀珍珠菊与野菊花的所有差异性成分中,萜类化合物为主要差异性成分,主要为单萜类和倍半萜类,这些化合物的含量显著高于野菊花,表明怀珍珠菊富含萜类化合物。倍半萜类化合物已被证明具有广谱药理活性,尤其在抗炎、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗糖尿病和抗肥胖活性方面。值得一提的是,萜类中的愈创木脂倍半萜类化合物^[59],表现出很好的抗炎、抑菌、抗虫活性,而且已从信号通路和靶点方面解释了其作用机制,与

传统中医认为的清热解毒作用一致。

4 讨论

本研究建立了一种基于 UPLC/Q-TOF-MS 的非靶向代谢组学方法,结合多变量分析方法,系统地对怀珍珠菊与野菊花差异性进行分析。本研究共鉴定到 19 个差异成分,其中萜类为主要化合物类型,表明怀珍珠菊很可能是富含萜类化合物的良好资源。木犀草苷、艾黄素、秦皮乙素、母菊兰烯、L-香芹酮等在内的 10 个差异成分均具有显著的抗炎抑菌作用。此外,L-香芹酮、顺式蛔虫苷、苯甲酸苄酯等差异成分具有良好的驱虫杀虫作用。由此推测,怀珍珠菊很可能在抗炎、抑菌、抗虫害等活性上优于野菊花。与此同时,本实验还对鉴定到的怀珍珠菊代谢产物简单地进行了代谢组学途径方面的分析研究。在已经获得的 3 种主要代谢途径中,怀珍珠菊主要含有的生物合成途径是黄酮和黄酮醇类、脂肪酸类以及氨基酸类合成途径,表明怀珍珠菊是富含黄酮类、脂肪酸类以及氨基酸类的丰富资源。本研究通过系统分析和对比怀珍珠菊的分子组成,为进一步认识怀珍珠菊这一菊属植物及其代谢物潜在功能特性提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zheng J Y, Lu B Y, Xu B J. An update on the health benefits promoted by edible flowers and involved mechanisms [J]. *Food Chem*, 2021, 340: 127940.
- [2] Wang Y X, Xu Z Z, Wen X, *et al.* The formation and bioactivities of green substances in *Chrysanthemum morifolium* tea [J]. *Food Chem*, 2019, 286: 268-274.
- [3] 纪宝玉,王炫璿,裴莉昕,等.不同商品规格怀菊花无机元素的 ICP-MS 分析 [J]. *中药材*, 2021, 44(8): 1914-1920.
- [4] 苏迪,刘晓薇,陈随清.怀菊花不同商品规格的质量评价分析 [J]. *中国现代中药*, 2019, 21(5): 603-608.
- [5] 刘晓薇,张飞,陈随清,等.不同商品规格怀菊花的质量特征分析 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(6): 2650-2655.
- [6] 米汪洋,杨翠兰,克迎迎,等.基于正常大鼠物质能量代谢状况探讨怀菊花的寒热药性 [J]. *中草药*, 2021, 52(3): 799-807.
- [7] Zeng M N, Li M, Chen Y J, *et al.* A new bisepoxy lignan dendranlignan A isolated from *Chrysanthemum* Flower inhibits the production of inflammatory mediators via the TLR4 pathway in LPS-induced H9c2 cardiomyocytes [J].

- Arch Biochem Biophys*, 2020, 690: 108506.
- [8] 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.
- [9] Shao Y H, Sun Y D, Li D, *et al.* *Chrysanthemum indicum* L.: A comprehensive review of its botany, phytochemistry and pharmacology [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(4): 871-897.
- [10] Pang Z Q, Zhou G Y, Chong J, *et al.* Comprehensive meta-analysis of COVID-19 global metabolomics datasets [J]. *Metabolites*, 2021, 11(1): 44.
- [11] Cheng X W, Chen X H, Su X Q, *et al.* DNA extraction protocol for biological ingredient analysis of Liuwei Dihuang Wan [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2014, 12(3): 137-143.
- [12] 陈小梅. 野菊米挥发性成分的提取及分析研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2006.
- [13] Guo X F, Yue Y D, Tang F, *et al.* A study of characteristic fragmentation of different C- and O-glycosylation position flavonoids and their aglycone by quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *Adv Mater Res*, 2013, 781/782/783/784: 1052-1059.
- [14] He M, Wu H, Nie J, *et al.* Accurate recognition and feature qualify for flavonoid extracts from Liang-Wai Gan Cao by liquid chromatography-high resolution-mass spectrometry and computational MS/MS fragmentation [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 146: 37-47.
- [15] Chen S, Liu J, Dong G Q, *et al.* Flavonoids and caffeoylquinic acids in *Chrysanthemum morifolium* Ramat flowers: A potentially rich source of bioactive compounds [J]. *Food Chem*, 2021, 344: 128733.
- [16] Li Y F, Yang P Y, Luo Y H, *et al.* Chemical compositions of *Chrysanthemum* teas and their anti-inflammatory and antioxidant properties [J]. *Food Chem*, 2019, 286: 8-16.
- [17] Debrauwer L, Riu A, Jouahri M, *et al.* Probing new approaches using atmospheric pressure photo ionization for the analysis of brominated flame retardants and their related degradation products by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1082(1): 98-109.
- [18] 刘克建, 邓冬莉. 木犀草素合成研究进展 [J]. 广州化工, 2013, 41(11): 29-31.
- [19] Patel D K, Patel K. Bioactivities and protective effects of flavonoid pectolinarin in the management of hepatocellular carcinoma: Medicinal importance and therapeutic benefit in the medicine [J]. *Ann Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2021, 25(1): S293.
- [20] Li M, Yu R, Fu R X, *et al.* Limited hydrolysis of glycosylated whey protein isolate ameliorates the oxidative and physical stabilities of conjugated linoleic acid oil-in-water emulsions [J]. *Food Chem*, 2021, 362: 130212.
- [21] Ma Q X, Hill P W, Chadwick D R, *et al.* Competition for S-containing amino acids between rhizosphere microorganisms and plant roots: The role of cysteine in plant S acquisition [J]. *Biol Fertil Soils*, 2021, 57(6): 825-836.
- [22] Ho H Y, Chen P J, Lo Y S, *et al.* Luteolin-7-O-glucoside inhibits cell proliferation and modulates apoptosis through the AKT signaling pathway in human nasopharyngeal carcinoma [J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(10): 2013-2024.
- [23] de Stefano A, Caporali S, di Daniele N, *et al.* Anti-inflammatory and proliferative properties of luteolin-7-O-glucoside [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3): 1321.
- [24] Palombo R, Caporali S, Falconi M, *et al.* Luteolin-7-O- β -D-glucoside inhibits cellular energy production interacting with HEK2 in keratinocytes [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): 2689.
- [25] Kim J Y, Shim S H. Anti-atherosclerotic effects of fruits of *Vitex rotundifolia* and their isolated compounds via inhibition of human LDL and HDL oxidation [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(11): 727.
- [26] Wee H N, Neo S Y, Singh D, *et al.* Effects of *Vitex trifolia* L. leaf extracts and phytoconstituents on cytokine production in human U937 macrophages [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 91.
- [27] Shi H R, Mao X B, Zhong Y C, *et al.* Digoxin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(9): 1517-1528.
- [28] Pullaiah C P, Nelson V K, Rayapu S, *et al.* Exploring cardioprotective potential of esculetin against isoproterenol induced myocardial toxicity in rats: *In vivo* and *in vitro* evidence [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2021, 22(1): 43.
- [29] Cheng Y J, Tian X L, Zeng Y Z, *et al.* Esculetin protects against early Sepsis via attenuating inflammation by inhibiting NF- κ B and STAT1/STAT3 signaling [J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(6): 432-441.
- [30] Wang Y M, Kong W, Wang L, *et al.* Multiple-purpose connectivity map analysis reveals the benefits of esculetin

- to hyperuricemia and renal fibrosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7695.
- [31] Zhou L, Liu Q, Hong G J, *et al.* Cumambrin A prevents OVX-induced osteoporosis via the inhibition of osteoclastogenesis, bone resorption, and RANKL signaling pathways [J]. *FASEB J*, 2019, 33(6): 6726-6735.
- [32] Jang D S, Yang M S, Ha T J, *et al.* Structural analogues of cumambrin B from the flower of *Chrysanthemum boreale* [J]. *Arch Pharm Res*, 1998, 21(5): 591-594.
- [33] Amparo T R, Seibert J B, Silveira B M, *et al.* Brazilian essential oils as source for the discovery of new anti-COVID-19 drug: A review guided by in silico study [J]. *Phytochem Rev*, 2021, 20(5): 1013-1032.
- [34] Ma D, He J L, He D P. Chamazulene reverses osteoarthritic inflammation through regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and NF- κ B pathway in *in-vitro* and *in-vivo* models [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84(2): 402-410.
- [35] Russo A, Bruno M, Avola R, *et al.* Chamazulene-rich *Artemisia arborescens* essential oils affect the cell growth of human melanoma cells [J]. *Plants (Basel)*, 2020, 9(8): 1000.
- [36] Patel P B, Thakkar V R. L-carvone induces p53, caspase 3 mediated apoptosis and inhibits the migration of breast cancer cell lines [J]. *Nutr Cancer*, 2014, 66(3): 453-462.
- [37] Kłys M, Izdebska A, Malejko-Kłusek N. Repellent effect of the caraway *Carum carvi* L. on the rice weevil *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera, Dryophthoridae) [J]. *Insects*, 2020, 11(12): 836.
- [38] Dognon G, Ito M. Role of ascaridole and *p*-cymene in the sleep-promoting effects of *Dysphania ambrosioides* essential oil via the GABAergic system in a ddY mouse inhalation model [J]. *J Nat Prod*, 2021, 84(1): 91-100.
- [39] Patel D K. PND26 biological activity of ascaridole through interference of binding sites of topoisomerase I, topoisomerase II, acetylcholinesterase, SOD and catalase for the treatment of Alzheimer's disorders [J]. *Value Heal Reg Issues*, 2020, 22: S79.
- [40] Lihong Hu, Zhongliang Chen. Sesquiterpenoid alcohols from *Chrysanthemum morifolium* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 44(7): 1287-1290.
- [41] Dorota D, Rupert M, Wołosiak R, *et al.* Volatiles as markers of bioactive components found in Croatian extra virgin olive oils [J]. *LWT*, 2021, 139: 110532.
- [42] Gahleitner F, Guallar-Hoyas C, Beardsmore C S, *et al.* Metabolomics pilot study to identify volatile organic compound markers of childhood asthma in exhaled breath [J]. *Bioanalysis*, 2013, 5(18): 2239-2247.
- [43] Mett J, Müller U. The medium-chain fatty acid decanoic acid reduces oxidative stress levels in neuroblastoma cells [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 6135.
- [44] Warren E C, Dooves S, Lugarà E, *et al.* Decanoic acid inhibits mTORC1 activity independent of glucose and insulin signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(38): 23617-23625.
- [45] Rial S A, Ravaut G, Malaret T B, *et al.* Hexanoic, octanoic and decanoic acids promote basal and insulin-induced phosphorylation of the Akt-mTOR axis and a balanced lipid metabolism in the HepG2 hepatoma cell line [J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2315.
- [46] Zhao Y Y, Song C C, Brummell D A, *et al.* Salicylic acid treatment mitigates chilling injury in peach fruit by regulation of sucrose metabolism and soluble sugar content [J]. *Food Chem*, 2021, 358: 129867.
- [47] Librando A, Carlesimo S C, Albanese G, *et al.* Effectiveness of 0.1% topical salicylic acid on blepharoconjunctivitis affecting glaucoma patients treated with topical prostaglandin analogues: A prospective randomized trial [J]. *Int J Ophthalmol*, 2018, 11(12): 1936-1940.
- [48] Moosa A, Farzand A, Sahi S T, *et al.* Salicylic acid and *Cinnamomum verum* confer resistance against *Penicillium* rot by modulating the expression of defense linked genes in *Citrus reticulata* Blanco [J]. *Postharvest Biol Technol*, 2021, 181: 111649.
- [49] Kapoor M, Sharma S, Sandhir R, *et al.* Maintenance of iron homeostasis by apocynin during states of global ischemia in rat brain and *Retina* [J]. *Adv Redox Res*, 2021, 3: 100012.
- [50] Barbieri S S, Sandrini L, Musazzi L, *et al.* Apocynin prevents anxiety-like behavior and histone deacetylases overexpression induced by sub-chronic stress in mice [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(6): 885.
- [51] Cagin Y F, Parlakpinar H, Vardi N, *et al.* Protective effects of apocynin against ionizing radiation-induced hepatotoxicity in rats [J]. *Biotech Histochem*, 2022, 97(3): 228-235.
- [52] Liu H B, Xu H, Guo X, *et al.* A novel near-infrared fluorescent probe based on isophorone for the bioassay of endogenous cysteine [J]. *Org Biomol Chem*, 2021, 19(4): 873-877.

- [53] Pearson M A, Miller G W. *Encyclopedia of Toxicology* [M]. *Third Edition*. New York: Academic Press (USA), 2014: 433-434.
- [54] Api A M, Belsito D, Biserta S, *et al*. RIFM fragrance ingredient safety assessment, 6-methyl-3, 5-heptadien-2-one, CAS Registry Number 1604-28-0 [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 134(Suppl 2): 110903.
- [55] Sumthong P, Romero-González R R, Verpoorte R. Identification of anti-wood rot compounds in teak (*Tectona grandis* L.f.) sawdust extract [J]. *J Wood Chem Technol*, 2008, 28(4): 247-260.
- [56] Sumthong P, Damveld R A, Choi Y H, *et al*. Activity of quinones from teak (*Tectona grandis*) on fungal cell wall stress [J]. *Planta Med*, 2006, 72(10): 943-944.
- [57] Hodaie M, Rahimmalek M, Behbahani M. Anticancer drug discovery from Iranian *Chrysanthemum* cultivars through system pharmacology exploration and experimental validation [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 11767.
- [58] Jiang S, Wang M Y, Jiang Z C, *et al*. Chemistry and pharmacological activity of sesquiterpenoids from the *Chrysanthemum* genus [J]. *Molecules*, 2021, 26(10): 3038.
- [59] Kim J G, Lee J W, Le T P L, *et al*. Sesquiterpenoids from *Chrysanthemum indicum* with inhibitory effects on no production [J]. *J Nat Prod*, 2021, 84(3): 562-569.

[责任编辑 王文倩]

• 公益广告 •

