

基于广泛靶向代谢组学分析香樟不同部位挥发性次生代谢产物差异

雷金梅^{1,2†}, 江冰冰^{1,2†}, 杨芳^{1,2},
郭存武³, 夏宇薪⁴, 邓秀娟^{1,2}, 刘晓慧^{1,2}, 王白娟^{1,2*}

¹云南农业大学茶学院 云南省高校智能有机茶园建设重点实验室; ²云南农业大学云南有机茶产业智能工程研究中心;

³云南农业大学植物保护学院 农业生物多样性应用技术国家工程研究中心;

⁴云南农业大学机电工程学院, 昆明 650201

摘要: 香樟是宝贵的芳香植物资源, 研究香樟不同部位的挥发性成分可为进一步提取和筛选香樟天然活性物质提供依据。本研究以香樟的鲜叶和鲜果为材料, 利用顶空固相微萃取-气质联用技术(HS-SPME-GC-MS)进行广泛靶向代谢组学分析。叶片和果实共检测出1 158种次生代谢产物, 包括萜类、酯、杂环化合物、烃类、酮、醛等16类, 其中萜类、酯和杂环化合物三类次生代谢产物占比最高。通过PCA和聚类分析发现, 叶片与果实相比, 存在141种差异代谢产物上调和417种下调。KEGG富集分析发现, 叶片与果实的差异代谢物主要涉及倍半萜类和三萜类生物合成、单萜类生物合成、苯丙烷类生物合成等途径。萜类在叶片的相对含量占比达到92.33%, 果实中的相对含量占比达到82.73%, 是香樟中主要的挥发性成分, 也是重要的药理活性物质。研究结果表明香樟叶片和果实挥发性次生代谢物的种类和含量差异较大, 本研究可为香樟叶片和果实资源的精细开发和利用提供理论依据。

关键词: 香樟; 挥发性成分; 代谢组学; 活性物质

中图分类号: S792.23

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)10-1679-13

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.10.004

Differential analysis of volatile metabolites in different parts of *Cinnamomum camphor* by widely-targeted volatilomics method

LEI Jin-mei^{1,2†}, JIANG Bing-bing^{1,2†}, YANG Fang^{1,2},
GUO Cun-wu³, XIA Yu-xin⁴, DENG Xiu-juan^{1,2}, LIU Xiao-hui^{1,2}, WANG Bai-juan^{1,2*}

¹Key Laboratory of Intelligent Organic Tea Garden Construction in Universities of Yunnan Province, College of Tea Science, Yunnan Agricultural University; ²Yunnan Organic Tea Industry Intelligent Engineering Research Center, Yunnan Agricultural University; ³National Engineering Research Center for Applied Technology of Agricultural Biodiversity, College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University; ⁴College of Mechanical and Electrical Engineering, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract: *Cinnamomum camphor* is a valuable aromatic plant resource. Studying the volatile components of different parts of *C. camphor* can provide a basis for further extraction and screening of natural active substances. In this study, fresh leaves and fruits of *C. camphor* were used as materials, and the headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) was used for broad targeted metabolomics analysis. A total of 1 158 secondary metabolites were detected in leaves and fruits, including 16 categories, such as terpenes, esters, heterocyclic compounds, hydrocarbons, ketones and aldehydes, among which terpenes, esters and heterocyclic compounds accounted for the highest proportion of secondary metabolites. PCA and cluster analysis showed that compared with the fruits, there were 141 up-regulated metabolites and 417

收稿日期: 2024-04-03 接受日期: 2024-09-10

基金项目: 云南省勐海县智慧茶产业科技特派团(202304BI090013); 云南省茶产业人工智能及大数据应用创新团队(202405AS350025); 云南省教育厅科学研究基金项目青年人才基础研究(2024J0406); 云南农业大学科研启动项目(2023-09-2022081)

† 共同第一作者

* 通信作者 Tel: 86-871-65228806; E-mail: wangbaijuan2023@163.com

down-regulated metabolites. KEGG enrichment analysis showed that the differential metabolites of leaves and fruits mainly involved in the biosynthesis of sesquiterpene and triterpenes, monoterpenes, phenylpropanoids and other pathways. The terpenes were the main volatile components in *C. camphor* while the relative contents of terpenes in leaves and in fruits accounted for 92.33% and 82.73%, respectively. The results revealed the categories and relative content of secondary metabolites in leaves and fruits of *C. camphor* were quite different. This study provided a theoretical guidance for the fine exploitation and utilization of leaves and fruits of *C. camphor*.

Key words: *Cinnamomum camphora*; volatile component; metabolomics; active substances

香樟 *Cinnamomum camphora* (Linn.) Presl 为樟目樟科樟属亚热带常绿乔木^[1],起源于中国的西南部和东南部,是国家二级保护植物。其资源丰富,栽培历史悠久,主要集中分布在湖南、福建、广西、江西、广东和台湾等区域^[2]。香樟集香料、药用、材用等多功能于一体,广泛应用于工业和制药领域^[3,4]。香樟是宝贵的芳香植物资源,香樟精油功能丰富具有抗细菌、抗真菌、抗氧化、抗炎、等生物活性^[5,6],是全球精油生产的重要原料,香樟不同部位(根、茎、叶、籽)均含有丰富的精油成分^[7,8]。研究发现,香樟具有多种药理活性,其中樟脑具有镇痛生理活性,临床常用来止痛;含有右旋龙脑的复方制剂冰砂酊和冰星液,对于改善癌症所导致的疼痛感有明显减弱作用;芳樟醇能够缓解谷氨酸所导致的急性疼痛。香樟还是一种著名的行道树,具有避臭、驱虫、防止和滞留烟尘以及吸附和富集重金属的能力,是城市绿化的常用树种,在世界范围内广泛种植。

植物挥发物是指挥发性次生物质,主要由醇、醛、酮、酯、炔类与萜类化合物等组成^[9,10]。研究表明香樟中含有丰富的挥发性成分,以萜烯类成分为主,主要包括芳樟醇、樟脑、龙脑、橙花叔醇和蒾烯等成分。其中,樟脑和芳樟醇是主要的两类化学物质,具有显著的抑菌效果。从香樟果皮中提取的花色苷,具有一定的抗氧化作用^[11]。香樟果实挥发油中的丁香酚和异丁香酚对多种病原菌具有较强抑菌效果^[12],如香樟果实挥发油对番茄灰霉病具有显著的抑菌效果^[13]。与香樟叶片挥发油相比,香樟果实挥发油对草莓灰霉病菌具有更强的抑菌活性。以上研究结果表明香樟不同部位挥发物差异较大,其物质组分复杂多样,香樟叶片和果实资源有待于精细开发和利用。

代谢组学技术是目前在植物及其次生代谢物研究领域较先进可靠的研究手段,根据检测方式,代谢组学分为靶向和非靶向。非靶向代谢组学可以检测出样品中所有的代谢产物,发现新的化合物,但由于数据库不全,定性困难,并且只能进行相对定

量^[14]。靶向代谢组学是针对一类特定代谢物进行分析,可以绝对定量代谢产物的含量^[15,16],为开发和利用新化合物提供了可靠的研究手段。

目前对香樟物质组分的研究集中于叶片精油的提取和鉴定,但香樟中还存在多种生理活性的挥发性物质,其有待于进一步地挖掘。关于香樟不同部位挥发性成分的研究尚未见系统报道,在一定程度上制约了香樟资源的开发和利用。因此本文基于广泛靶向代谢组学对香樟叶片和果实的挥发性次生代谢产物进行分析比较,为后续叶片和果实活性成分的精细提取和筛选提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜、无病斑、无病虫害的香樟叶片和果实采自云南农业大学校园内,经本校植物分类学教学名师张雪梅副教授鉴定为樟 *Cinnamomum camphora* (Linn.) Presl^[17],采摘时间为2023年10月,叶片样品编号为XL1、XL2、XL3,果实样品编号为XF1、XF2、XF3。

仪器:8890-7000DGC-MS(美国Agilent公司);DB-5MS(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)色谱柱(美国Agilent公司);120 μm DVB/CAR/PDMS 萃取头(美国Agilent公司);MM400 球磨仪(德国Retsch公司);MS105DU 电子天平(美国Mettler Toledo公司);SPME Arrow 固相微萃取装置(瑞士思特斯分析仪器有限公司);Fiber Conditioning Station 老化装置(瑞士思特斯分析仪器有限公司);Agitator 样品加热箱(瑞士思特斯分析仪器有限公司)。

试剂:氯化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);正己烷(分析纯,Merck);标准品(色谱纯, BioBioPha/Sigma-Aldrich)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品提取和制备

将新鲜样品进行液氮研磨,涡旋混合均匀,每个样本称取约500 mg(液体1 mL)于顶空瓶中;分别加入饱和NaCl溶液,20 μL(10 μL g/mL)内标溶液;采

用 HS-SPME 进行样本萃取,以供 GC-MS 分析。

1.2.2 色谱质谱采集条件

HS-SPME 萃取条件:在 60 °C 恒温条件下,震荡 5 min,120 μm DVB/CWR/PDMS 萃取头插入样品顶空瓶,顶空萃取 15 min,于 250 °C 解析 5 min,然后进行 GC-MS 分离鉴定。采样前萃取头在 Fiber Conditioning Station 中 250 °C 下老化 5 min。

色谱条件:载气为高纯氦气(纯度不小于 99.999%),恒流流速 1.2 mL/min,进样口温度 250 °C,不分流进样,溶剂延迟 3.5 min。程序升温:40 °C 保持 3.5 min,以 10 °C/min 升至 100 °C,再以 7 °C/min 升至 180 °C,最后以 25 °C/min 升至 280 °C,保持 5 min。

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,质谱接口温度 280 °C,电子能量 70 eV,扫描方式为选择离子检测模式(SIM),定性定量离子精准扫描(GB23200.8-2016)。

代谢物定性定量分析:基于武汉迈特维尔生

物科技有限公司自建数据库,对样本的代谢物进行了质谱定性定量分析。用 MassHunter 定量软件打开样本下机质谱文件,进行积分和校正工作。

1.3 数据处理与分析

对两种香樟代谢物进行对比,记作 XL vs XF。采取多元统计分析,对两种样本代谢物数据进行主成分分析(principal components analysis, PCA)、正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)、聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)等^[18]。

2 结果与分析

2.1 香樟叶片与果实代谢成分分析

通过与数据库进行对比分析确定了代谢产物的结构,从香樟的叶片和果实中共鉴定出 16 类 1 158 种代谢物(见表 1),其中萜类、酯类和杂环化合物三类代谢物占比较高,萜类占总代谢物的 24.35%,酯类占总代谢物的 16.93%,杂环化合物占总代谢物的 15.28%。

表 1 叶片和果实的代谢产物
Table 1 Metabolites of leaves and fruits

种类 Class	数量 Number	占比 Proportion(%)
萜 Terpenoids	282	24.35%
酯 Esters	196	16.93%
杂环化合物 Heterocyclic compounds	177	15.28%
烃 Hydrocarbons	87	7.51%
酮 Ketones	86	7.43%
醇 Alcohols	75	6.48%
醛 Aldehydes	65	5.61%
芳烃 Aromatics	62	5.35%
酚 Phenols	39	3.37%
酸 Acids	34	2.94%
胺 Amines	23	1.99%
含硫化合物 Sulfur compounds	11	0.95%
含氮化合物 Nitrogen compounds	8	0.69%
其他类 Others	6	0.52%
醚 Ethers	4	0.35%
卤代烃 Halogenated hydrocarbons	3	0.26%
总计 Total	1 158	

2.2 PCA 与聚类热图分析

为了解叶片与果实之间的差异,对样品进行 PCA 分析(见图 1A),结果显示主成分 1 的贡献率

为 58.83%,主成分 2 的贡献率为 21.78%。各组香樟样本组内聚集在一起,组内变异度较小重复性高;组间明显分离,说明不同叶片与果实代谢物组分有

明显差异。将代谢物数据进行归一化处理,对所有样品进行聚类分析。结果显示(见图1B),在不同

的分组模式,叶片代谢成分主要集中在萜类和杂环化合物,果实代谢成分主要是萜类、酮、酯类。

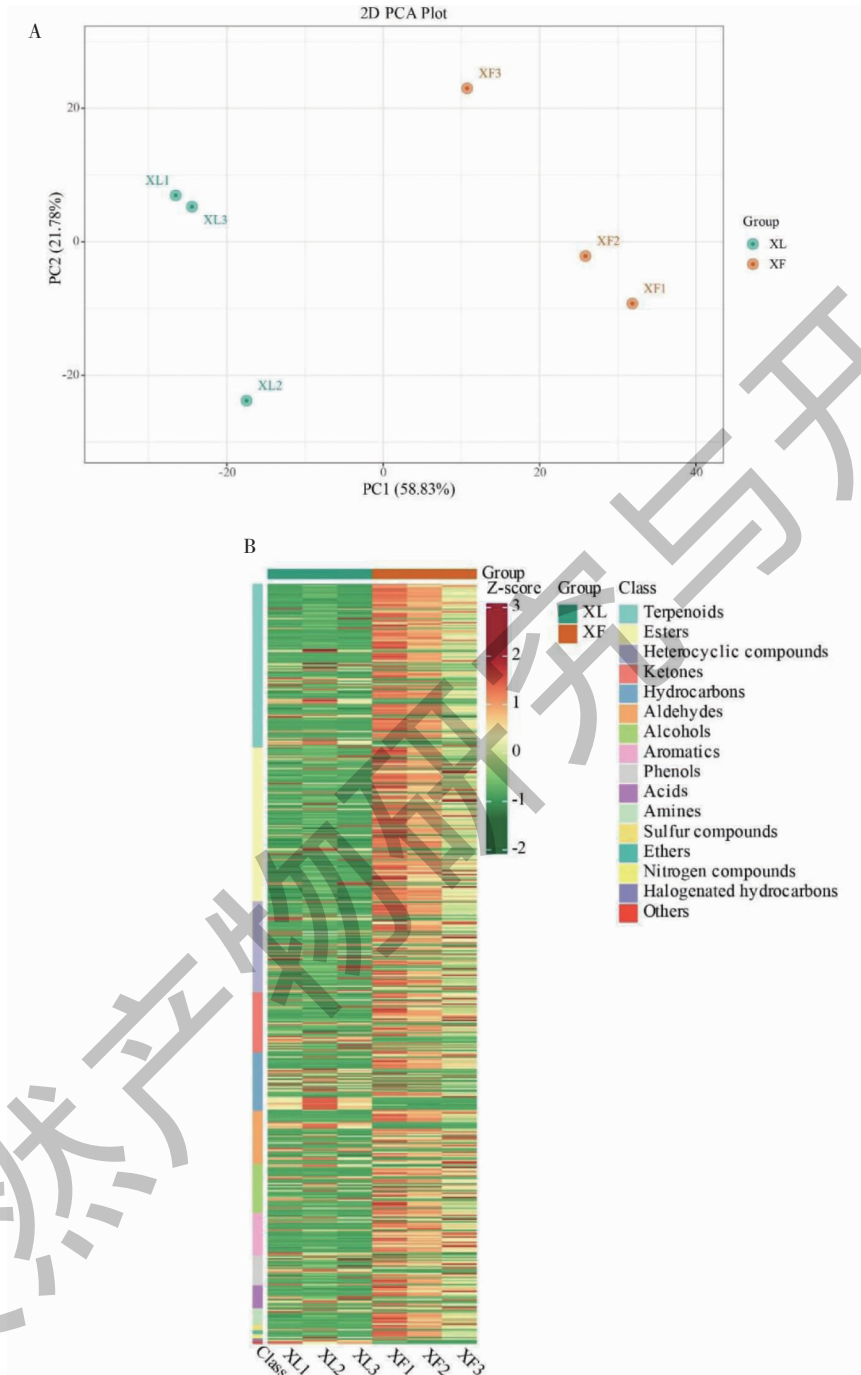


图1 PCA与聚类热图

Fig. 1 PCA and clustering heat map

2.3 OPLS-DA分析和模型验证

在OPLS-DA得分图中(见图2A),叶片与果实在第一主成分轴上明显分离,横向距离越远说明两种代谢物之间成分具有差异,图中数据说明两组样本间存在明显差异。在OPLS-DA模型评价参数中

(见图2B), $R^2 X$ 代表的是模型 X 矩阵解释率, $R^2 Y$ 代表的 Y 矩阵解释率,其中 $R^2 X = 0.823$, $R^2 Y = 0.998$, $Q^2 = 0.96$ 均大于0.5,且 $Q^2 > 0.9$,表明OPLS-DA模型构建的效果良好,具有较为可靠的预测功能,可将VIP值作为差异代谢物的筛选条件。

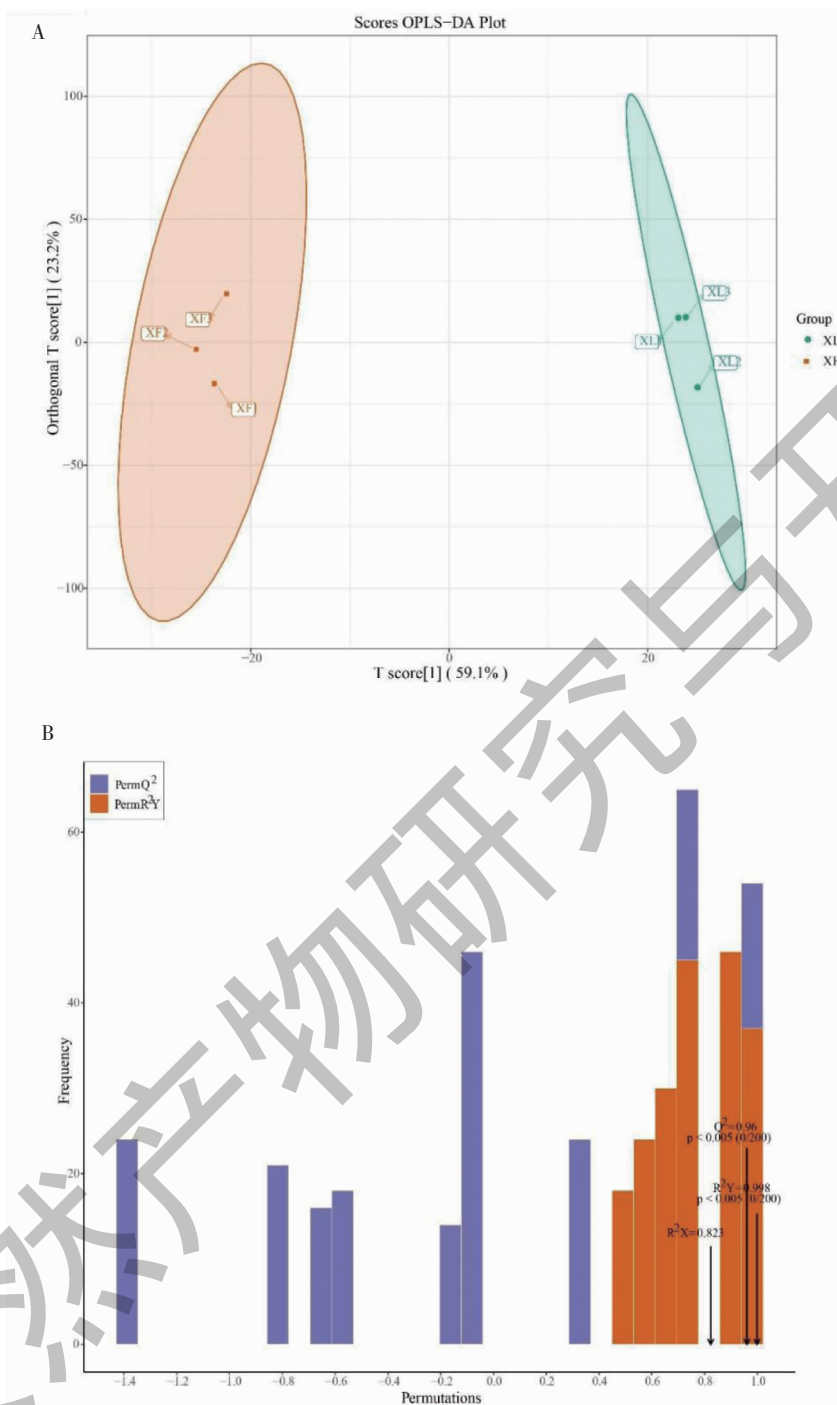


图2 OPLS-DA 得分图和模型验证

Fig.2 OPLS-DA score chart and model validation

2.4 叶片和果实相同次生代谢产物分析

叶片和果实中相同的次生代谢产物共检出 1 158 个。从叶片和果实次生代谢产物中最多的四类化合物中筛选出每类化合物中前十的代谢产物(见表 2)。

在香樟叶片和果实中共有的代谢产物有 13 种,

其中叶片中相对含量最高的代谢产物是(-)- γ -榄香烯,果实中相对含量最高的代谢产物为 1-(3-乙氧基苯基)丙酮和萆澄茄烯(见图 3);果实中的萆类和酮中相对含量前十的代谢物总的相对含量高于叶片,尤其是萆澄茄烯、(-)- α -雪松烯、1-(3-乙氧基苯基)丙酮、1-苯基-1-戊酮。

表2 叶片和果实中代谢物的相对含量

Table 2 Relative content of metabolites in leaves and fruits

种类 Class	叶片 Leaf			果实 Fruit		
	化合物 Compound	CAS	相对含量 Relative content(%)	化合物 Compound	CAS	相对含量 Relative content(%)
萜 Terpenoids	(-)- γ -榄香烯 (-)- γ -Elemene	29873-99-2	6.91 \pm 0.47	毕澄茄烯 Cubebene	13744-15-5	7.05 \pm 0.94
	左旋龙脑 (-)-Menthol	464-45-9	5.37 \pm 1.57	(-)- α -雪松烯 (-)- α -Cedrene	65354-33-8	6.39 \pm 0.91
	龙脑 Borneol	507-70-0	5.37 \pm 1.57	古巴烯 Copaene (+)-环苜蓿烯 1, 2, 4-Metheno-1H-indene, octa-	3856-25-5	2.67 \pm 0.21
	柠檬烯 Limonene	138-86-3	3.36 \pm 1.09	hydro-1, 7 α -dimethyl-5-(1-methyl-	22469-52-9	2.67 \pm 0.21
	1,7-二甲基-4-异亚丙基三环[4.4.0.0.2,7]癸烷-3-酮结构式 4-Isopropylidene-1, 7-dimethyltricyclo[4.4.0.0]decan-3-one	62332-96-1	1.30 \pm 1.03	thyl)-, (1S, 2S, 3 α R, 4R, 5S, 7 α S, 8R)-		
	(-)- α -葑澄茄油烯 α -Cubebene	17699-14-8	1.26 \pm 0.51	乙酸香叶酯 Methyl eugenol	105-87-3	2.54 \pm 1.04
	β -檀香醇 β -Santalol	77-42-9	1.25 \pm 1.09	甲基丁香酚 Methyl eugenol	123123-37-5	2.37 \pm 0.27
	长叶烯 Longifolene	475-20-7	1.05 \pm 0.17	δ -杜松烯 δ -Cadinene	483-76-1	2.37 \pm 0.27
	4 α ,8-二甲基-2-(丙-1-烯-2-基)-1,2,3,4,4 α ,5,6,7-八氢萘 4 α , 8-Dimethyl-2-(prop-1-en-2-yl)-1,2,3,4,4 α ,5,6,7-octahydronaphthalene	103827-22-1	0.88 \pm 1.11	β -杜松烯 β -Cadinene	523-47-7	2.37 \pm 0.27
	1-(1,5-二甲基己基)4-甲基-苯 Benzene, 1-(1,5-dimethylhexyl)-4-methyl-	1461-02-5	0.88 \pm 0.25	长叶烯 Longifolene	475-20-7	2.31 \pm 0.48
酯 Esters	丁酸香叶酯 Butanoic acid, 3,7-dimethyl-2,6-octadienyl ester, (E)-	106-29-6	2.35 \pm 1.82	(-)- γ -榄香烯 (-)- γ -Elemene	29873-99-2	1.85 \pm 0.28
	2-蒎烯-10-基异丁酸酯 2-Pinen-10-yl isobutyrate	29021-37-2	1.65 \pm 0.25	2-羟乙基苯甲酸酯 1,2-Ethandiol, monobenzoate	94-33-7	0.73 \pm 0.17
	邻氨基苯甲酸甲酯 Methyl anthranilate	134-20-3	0.97 \pm 0.32	5-己烯基己酸酯 Hexanoic acid,5-hexenyl ester	108058-81-7	0.69 \pm 0.22
	2-羟乙基苯甲酸酯 1,2-Ethandiol, monobenzoate	94-33-7	0.52 \pm 0.22	2-蒎烯-10-基异丁酸酯 2-Pinen-10-yl isobutyrate	29021-37-2	0.56 \pm 0.10
	肉桂酸甲酯 2-Propenoic acid, 3-phenyl-, methyl ester	19713-73-6	0.36 \pm 0.01	己酸己酯 Hexanoic acid, hexyl ester	6378-65-0	0.54 \pm 0.09
	脱氢戊二酸内酯 Dehydromevalonic lactone	2381-87-5	0.20 \pm 0.05	肉桂酸甲酯 2-Propenoic acid, 3-phenyl-, methyl ester	19713-73-6	0.51 \pm 0.34
	(1R,5R,8R)-7,7-二甲基-6-亚甲基三环[6.2.1.0.1,5]十一-2-酮 (3 α R, 6R, 8 α R)-7,7-Dimethyl-8-methylenehexahydro-1H-3a,6-methanoazulen-3(2H)-one	30557-76-7	0.16 \pm 0.04	(E)-肉桂酸甲酯 2-Propenoic acid, 3-phenyl-, methyl ester, (E)-	1754-62-7	0.33 \pm 0.06
11-十二烷基-1-基乙酸酯 11-Dodecen-1-yl acetate	35153-10-7	0.16 \pm 0.03	3-苯基-1-丙醇乙酸酯 3-Phenyl-1-propanol, acetate	122-72-5	0.31 \pm 0.06	
			邻氨基苯甲酸甲酯 Methyl anthranilate	134-20-3	0.31 \pm 0.04	

续表 2(Continued Tab. 2)

种类 Class	叶片 Leaf			果实 Fruit		
	化合物 Compound	CAS	相对含量 Relative content (%)	化合物 Compound	CAS	相对含量 Relative content (%)
酯 Esters	(Z)-8-十二烷基乙酸酯 8-Dodecen-1-ol, acetate, (Z)-	28079-04-1	0.16 ± 0.04	2-二甲氨基苯甲酸甲酯 Benzoic acid, 2-(dimethylamino)-, methyl ester	10072-05-6	0.29 ± 0.25
	4-戊烯-1-醇丙酸酯 4-Penten-1-olpropanoate	30563-30-5	0.04 ± 0.04	苯甲酸丁酯 Butyl benzoate	136-60-7	0.22 ± 0.06
杂环化合物 Heterocyclic compounds	倍半乳糖呔喃 Sesquirosefuran	39007-93-7	6.23 ± 4.75	天芥菜定 (1S,7αR)-2,3,5,7α-Tetrahydro-1-hydroxy-1H-pyrrolizine-7-methanol	520-63-8	0.90 ± 0.25
	哌甲酯 Methylphenidate	113-45-1	2.38 ± 1.87	6-氨基-1,4-苯并二氧杂环 1,4-Benzodioxan-6-amine	22013-33-8	0.31 ± 0.08
	1-(2-呔喃基)-1-戊酮 1-Pentanone, 1-(2-furanyl)-	3194-17-0	1.21 ± 0.35	5,6-二氢-6-戊基-2H-吡喃-2-酮 2H-Pyran-2-one, 5,6-dihydro-6-pentyl-	54814-64-1	0.29 ± 0.08
	6-氨基-1,4-苯并二氧杂环 1,4-Benzodioxan-6-amine	22013-33-8	0.72 ± 0.11	1H-替硝唑-5-胺 1H-Tetrazol-5-amine	4418-61-5	0.27 ± 0.15
	3-戊基-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑 3-Pentyl-4,5,6,7-tetrahydro-1H-imidazole	22122-91-4	0.54 ± 0.44	2-吡啶甲胺 2-Pyridinemethanamine	3731-51-9	0.24 ± 0.11
	3-咪唑-1-基丙腈 3-Imidazol-1-ylpropanenitrile	23996-53-4	0.36 ± 0.10	2-(1-甲基乙基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶 1H-Pyrrolo[2,3-b]pyridine, 2-(1-methylethyl)-	27257-18-7	0.23 ± 0.04
	2-甲基-3(2-呔喃基)丙烯醛 2-Methyl-3(2-furyl)acrolein	874-66-8	0.28 ± 0.24	2-乙酰基苯并呔喃 2-Acetylbenzofuran	1646-26-0	0.22 ± 0.03
	天芥菜定 (1S,7αR)-2,3,5,7α-Tetrahydro-1-hydroxy-1H-pyrrolizine-7-methanol	520-63-8	0.27 ± 0.33	4-(1,2,4-三唑-4-基)-1,2,4-三氮唑 4,4'-Bitriazolyl	16227-15-9	0.17 ± 0.03
	7-甲氧基-4-甲基-1,3-二氢-2H-1,5-苯并二氮杂-2-酮 7-Methoxy-4-methyl-1,3-dihydro-2H-1,5-benzodiazepin-2-one	64376-03-0	0.16 ± 0.12	1H-吡咯-2-腈 1H-Pyrrole-2-carbonitrile	9513-94-4	0.17 ± 0.08
	1H-吡咯-2-腈 1H-Pyrrole-2-carbonitrile	9513-94-4	0.11 ± 0.05	1H-吡咯-3-腈 1H-Pyrrole-3-carbonitrile	7126-38-7	0.17 ± 0.08
酮 Ketones	1-(3-乙氧基苯基)丙酮 1-(3-Ethoxyphenyl)acetone	23037-47-0	5.84 ± 0.15	1-(3-乙氧基苯基)丙酮 1-(3-Ethoxyphenyl)acetone	23037-47-0	7.60 ± 5.34
	4'-羟基-苯乙酮 Acetophenone, 4'-hydroxy-	99-93-4	3.09 ± 0.54	1-苯基-1-戊酮 1-Pentanone, 1-phenyl-	1009-14-9	5.45 ± 0.81
	4-己烯-3-酮 4-Hexen-3-one	2497-21-4	1.36 ± 0.39	(E)-8-甲基-5-(1-甲基乙基)-6,8-壬二烯-2-酮 6,8-Nonadien-2-one, 8-methyl-5-(1-methylethyl)-, (E)-	54868-48-3	1.26 ± 0.34
	1-苯基-1-戊酮 1-Pentanone, 1-phenyl-	1009-14-9	0.63 ± 0.36	4'-羟基-苯乙酮 Acetophenone, 4'-hydroxy-	99-93-4	0.84 ± 0.14
	2,2,3-三甲基环丁酮 Cyclobutanone, 2,2,3-trimethyl-	1449-49-6	0.44 ± 0.13	2-乙酰氧基苯乙酮 2-Acetoxyacetophenone	7250-94-4	0.47 ± 0.18
	2-乙酰氧基苯乙酮 2-Acetoxyacetophenone	7250-94-4	0.33 ± 0.29	1-氢茛酮 1H-Inden-1-one, 2,3-dihydro-	83-33-0	0.42 ± 0.30
	(E)-6,10-二甲基-5,9-十一碳烯-2-酮 5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (E)-	3796-70-1	0.32 ± 0.03	4''-羟基苯丙酮 Paroxypropione	70-70-2	0.19 ± 0.02

续表 2 (Continued Tab. 2)

种类 Class	叶片 Leaf			果实 Fruit		
	化合物 Compound	CAS	相对含量 Relative content (%)	化合物 Compound	CAS	相对含量 Relative content (%)
酮 Ketones	(<i>E</i>)-8-甲基-5-(1-甲基乙基)-6,8-壬二烯-2-酮 6,8-Nonadien-2-one, 8-methyl-5-(1-methylethyl)-, (<i>E</i>)-	54868-48-3	0.11 ± 0.10	[1,1'-双环戊基]-2-酮 [1,1'-Bicyclopentyl]-2-one	4884-24-6	0.13 ± 0.04
	艾地骨化醇中间体 Eldecalcitol intermediate	66748-84-3	0.10 ± 0.03	(<i>E</i>)-6,10-二甲基-5,9-十一碳烯-2-酮 5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (<i>E</i>)	3796-70-1	0.11 ± 0.02
	4''-羟基苯丙酮 Paroxypropione	70-70-2	0.09 ± 0.07	4,7,9-巨豆三烯-3-酮 Megastigmatrienone	38818-55-2	0.08 ± 0.01

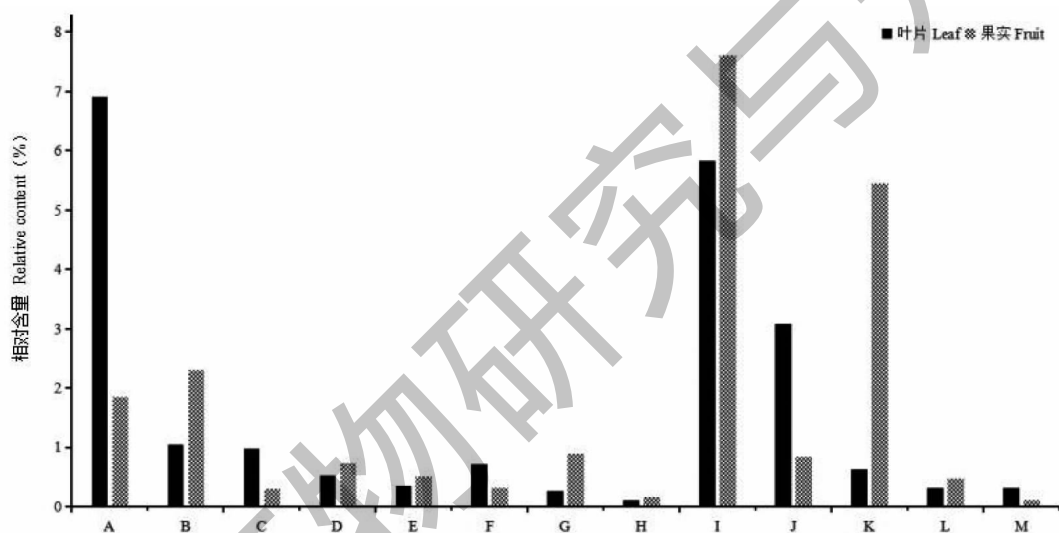


图 3 同一种代谢物在叶片和果实中的相对含量

Fig. 3 Relative content of the same metabolite in leaves and fruits

注: A: (-)- γ -榄香烯; B: 长叶烯; C: 邻氨基苯甲酸甲酯; D: 2-羟乙基苯甲酸酯; E: 肉桂酸甲酯; F: 6-氨基-1,4-苯并二氧杂环; G: 天芥菜定; H: 1H-吡咯-2-腈; I: 1-(3-乙氧基苯基)丙酮; J: 4'-羟基-苯乙酮; K: 1-苯基-1-戊酮; L: 2-乙酰氧基苯乙酮; M: (*E*)-6,10-二甲基-5,9-十一碳烯-2-酮。Note: A: (-)- γ -Elemene; B: Longifolene; C: Methyl anthranilate; D: 1,2-Ethanediol, monobenzoate; E: 2-Propenoic acid, 3-phenyl-, methyl ester; F: 1,4-Benzodioxan-6-amine; G: (1*S*,7*αR*)-2,3,5,7*α*-Tetrahydro-1-hydroxy-1*H*-pyrrolizine-7-methanol; H: 1*H*-Pyrrole-3-carbonitrile; I: 1-(3-Ethoxyphenyl) acetone; J: Paroxypropione; K: 1-Pentanone, 1-phenyl-; L: 2-Acetoxyacetophenone; M: 5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (*E*)-.

2.5 差异代谢物分析

叶片与果实相比,一共有 558 个差异代谢物,以差异倍数(fold change, FC)作为上下调的一个标准,FC ≥ 2 为上调、FC ≤ 0.5 为下调。其中 141 个代谢物上调表达,417 个代谢物下调表达(见表 3 和图 4)。变量重要性投影(variable importance projection, VIP)描述了每一个变量对模型的总体贡献,通常设定阈值为 VIP > 1。火山图可以直观地显示差异代谢物的总体分布情况,红色为上调的差异代谢物,绿色为下调的差异代谢物,灰色为差异不显著的

代谢物。差异代谢物以下调模式占主导,萜类、酯、杂环化合物、酮为差异代谢物的主要成分。

对差异代谢物进行 \log_2 FC (差异倍数以 2 为底取对数)排序,筛选出差异倍数前 20 (上调和下调)的代谢物,结果如表 4 所示。叶片与果实中上调代谢物筛选出 1 个酚类(4-己基苯酚),下调代谢物有 19 个(4-己基苯酚、布洛芬、肉桂酸乙酯、十一醛、壬酸乙酯,2,3,5-三甲基-癸烷等),其中萜类 4 个、酸 3 个、酯 3 个、烃类 3 个、酮 2 个等。

表 3 代谢物在各部位差异表达情况

Table 3 Differential expression of metabolites in different parts

种类 Class	叶片 <i>vs</i> 果实 Leaf <i>vs</i> Fruit		
	总数 Total	上调 Up	下调 Down
萜 Terpenoids	120	26	94
酯 Esters	113	15	98
杂环化合物 Heterocyclic compounds	67	19	48
酮 Ketones	44	13	31
烃 Hydrocarbons	43	21	22
醛 Aldehydes	39	12	27
醇 Alcohols	36	10	26
芳烃 Aromatics	31	5	26
酚 Phenols	22	8	14
酸 Acids	17	5	12
胺 Amines	12	2	10
含硫化合物 Sulfur compounds	4	1	3
醚 Ethers	3	0	3
含氮化合物 Nitrogen compounds	3	1	2
卤代烃 Halogenated hydrocarbons	2	1	1
其他类 Others	2	2	0
总计 Total	558	141	417

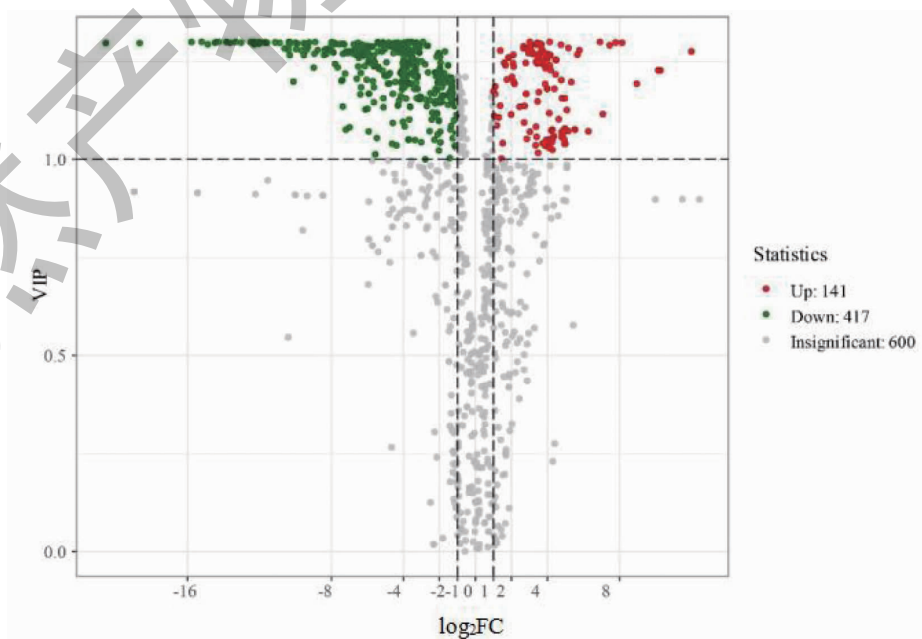


图 4 差异代谢物火山图

Fig. 4 Differential metabolite volcano map

表4 差异倍数前20的代谢物

Table 4 The metabolites of the top 20 fold change

序号 No	化合物 Compound	化学式 Formula	CAS	种类 Class	log ₂ FC	变化类型 Type of change
1	4-己基苯酚 Phenol,4-hexyl-	C ₁₂ H ₁₈ O	2446-69-7	酚	11.99	上调
2	布洛芬 Ibuprofen	C ₁₃ H ₁₈ O	15687-27-1	酸	-12.01	下调
3	肉桂酸乙酯 2-Propenoic acid,3-phenyl-, ethyl ester	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	103-36-6	酯	-12.02	下调
4	十一醛 Undecanal	C ₁₁ H ₂₂ O	112-44-7	醛	-12.28	下调
5	壬酸乙酯 Nonanoic acid,ethyl ester	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	123-29-5	酯	-12.30	下调
6	2,3,5-三甲基-癸烷 Decane,2,3,5-trimethyl-	C ₁₃ H ₂₈	62238-11-3	烃	-12.33	下调
7	反-2-十二烯醛 2-Dodecenal,(E)-	C ₁₂ H ₂₂ O	20407-84-5	醛	-12.47	下调
8	β-菖蒲烯醇 β-Acorenol	C ₁₅ H ₂₆ O	28400-11-5	萜	-13.01	下调
9	2-乙酰基-3-甲基苯并[b]噻吩 2-Acetyl-3-methylbenzo[b]thiophene	C ₁₁ H ₁₀ OS	18781-31-2	杂环化合物	-13.32	下调
10	3-羟基肉桂酸 3-(3-Hydroxyphenyl)acrylic acid	C ₉ H ₈ O ₃	588-30-7	酸	-13.63	下调
11	(2R-顺式)-1,2,3,4,4α,5,6,7-八氢-α,α,4α,8-四甲基-2-萘甲醇 2-Naphthalenemethanol,1,2,3,4,4α,5,6,7-octahydro-α,α,4α,8-tetramethyl-,(2R-cis)-	C ₁₅ H ₂₆ O	1209-71-8	萜	-13.83	下调
12	表桉叶油醇 10-epi-γ-Eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	15051-81-7	萜	-13.83	下调
13	7-辛二烯双环[4.1.0]庚烷 7-Octylidenebicyclo[4.1.0]heptane	C ₁₅ H ₂₆	82253-11-0	烃	-14.28	下调
14	2-硝基苯基乙酸酯 2-Nitrophenyl acetate	C ₈ H ₇ NO ₄	610-69-5	酯	-14.43	下调
15	[1R-(1α,5α,6β)]-6-甲基-2-亚甲基-6-(4-甲基-3-戊烯基)-双环[3.1.1]庚烷 Bicyclo[3.1.1]heptane,6-methyl-2-methylene-6-(4-methyl-3-pentenyl)-,[1R-(1α,5α,6β)]-	C ₁₅ H ₂₄	55123-21-2	萜	-14.47	下调
16	2-乙硫酰硫基乙酸 Acetic acid,2-[(1-thioethyl)thio]-	C ₄ H ₆ O ₂ S ₂	17930-82-4	酸	-14.86	下调
17	丁基化羟基甲苯 Butylated hydroxytoluene	C ₁₅ H ₂₄ O	128-37-0	芳烃	-15.21	下调
18	4,7,9-巨豆三烯-3-酮 4,7,9-Megastigmatrien-3-one	C ₁₃ H ₁₈ O	38818-55-2	酮	-15.77	下调
19	1-二氢茛酮 1H-Inden-1-one,2,3-dihydro-	C ₉ H ₈ O	83-33-0	酮	-18.65	下调
20	2-甲基-1,4-双(1-甲基乙基)-苯 Benzene,2-methyl-1,4-bis(1-methylethyl)-	C ₁₃ H ₂ O	58502-85-5	芳烃	-20.53	下调

2.6 差异代谢物代谢通路分析

利用KEGG数据库对香樟叶片和果实的差异代谢物进行通路分析,差异代谢物共分布到30条代谢通路。如图5所示,差异代谢物主要注释和富集在次生代谢物的生物合成、倍半萜类和三萜类生物合成、单萜类生物合成、苯丙烷类生物合成、烟酸和

烟酰胺代谢、苯丙氨酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、丙酸代谢、酪氨酸代谢等生物合成等途径。其中具有显著差异的通路有3条(P -value < 0.05),分别为倍半萜类和三萜类生物合成、单萜类生物合成和苯丙烷类生物合成通路,共有15种代谢物参与(见表5)。其中,有3个代谢物上调表达分别是(E)-法

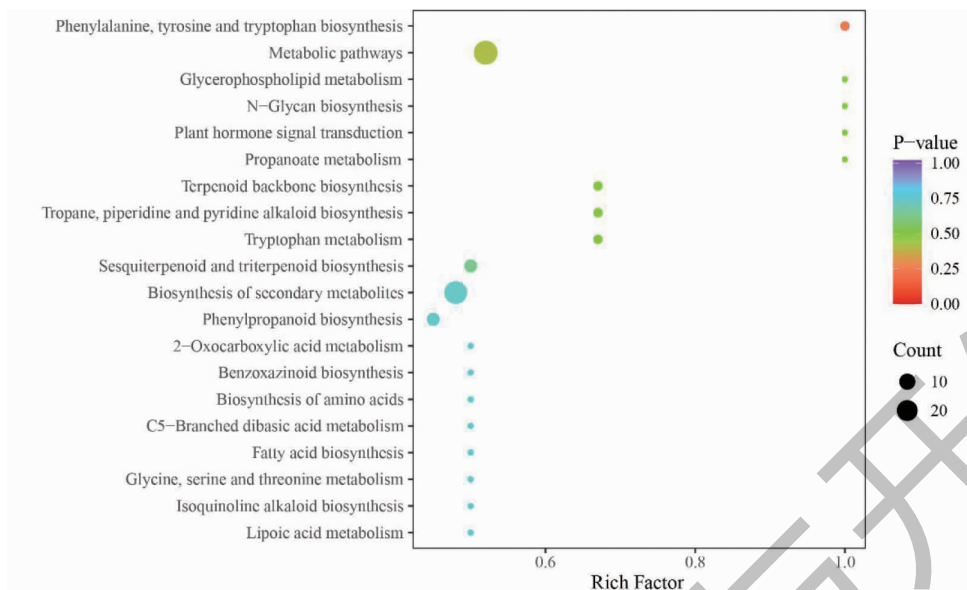


图5 差异代谢物 KEGG 富集图

Fig. 5 KEGG enrichment of differential metabolites

表5 显著富集通路代谢物

Table 5 Metabolites in significant enrichment pathway

序号 No.	化合物 Compound	化学式 Formula	CAS	种类 Class	变化类型 Type of change
1	(E)-1-甲基-4-(6-甲基庚-5-烯-2-亚烷基)环己-1-烯 (E)-1-Methyl-4-(6-methylhept-5-en-2-ylidene)cyclohex-1-ene	C ₁₅ H ₂₄	53585-13-0	萜	下调
2	3,7,11-三甲基-1,6,10-十二碳三烯-3-醇 1,6,10-Dodecatrien-3-ol,3,7,11-trimethyl-	C ₁₅ H ₂₆ O	7212-44-4	萜	下调
3	长叶烯 Longifolene	C ₁₅ H ₂₄	475-20-7	萜	下调
4	δ-杜松烯 δ-Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	483-76-1	萜	下调
5	(E)-法尼醇 (E)-Farnesol	C ₁₅ H ₂₆ O	106-28-5	萜	上调
6	3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇 2,6-Octadien-1-ol,3,7-dimethyl-	C ₁₀ H ₁₈ O	624-15-7	萜	下调
7	2,6-二甲基-2,7-辛二烯-1,6-二醇 2,7-Octadiene-1,6-diol,2,6-dimethyl-	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	64142-78-5	萜	下调
8	右旋香芹酮 D-Carvone	C ₁₀ H ₁₄ O	2244-16-8	萜	下调
9	香叶醇 Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	106-24-1	萜	下调
10	薄荷醇 Levomenthol	C ₁₀ H ₂₀ O	2216-51-5	萜	上调
11	茴香脑 Anethole	C ₁₀ H ₁₂ O	104-46-1	芳烃	下调
12	4-羟基-3-甲氧基肉桂醛 Coniferyl aldehyde	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	458-36-6	醛	上调
13	4-烯丙基苯甲醚 Estragole	C ₁₀ H ₁₂ O	140-67-0	芳烃	下调

续表 5 (Continued Tab. 5)

序号 No.	化合物 Compound	化学式 Formula	CAS	种类 Class	变化类型 Type of change
14	甲基丁香酚 Methyleugenol	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	93-15-2	酚	下调
15	(<i>E</i>)-茴香脑 (<i>E</i>)-Anethole	C ₁₀ H ₁₂ O	4180-23-8	芳烃	下调

尼醇、薄荷醇、4-羟基-3-甲氧基肉桂醛。

3 讨论与结论

挥发性成分是香樟重要生理功能及药理学活性的物质基础,在环境条件适宜时,香樟以一定的组成和比例释放挥发物^[19]。本研究发现萜类是香樟中主要的挥发性成分,其在叶片和果实中的相对含量均最高,分别为 92.33% 和 82.73%。这些萜类挥发物中有多个被证实具有重要的药理活性和抑菌活性,如长叶烯对细菌、真菌、藻类的生长有一定的抑制作用^[20],其在香料、医药、农药等行业有重要的应用及发展潜力;(-)- γ -榄香烯具有安全性高、广谱抗肿瘤、廉价、不良反应轻微等优势,目前已广泛应用于临床^[21];左旋龙脑具有镇痛、抗炎、抗氧化和抗菌的药理活性^[22],广泛应用于日化行业;柠檬烯具有良好的抗炎、抗氧化、抗肿瘤等活性,已广泛应用于农业领域^[23]。

本研究结果与他人报道的利用其他方法检测香樟挥发物的成分和含量存在一定差异。本研究明确了香樟最主要的挥发性物质是(-)- γ -榄香烯、左旋龙脑、龙脑、柠檬烯、(-)- α -蒎烯、 β -檀香醇、长叶烯等,并首次鉴定出 1-(3-乙氧基苯基)丙酮,其在果实中的含量最高,其相对含量为 7.6%,表明不同的提取技术和检测方法会影响香樟挥发性物质的检测结果。

植物挥发性物质存在变化快、时间短、难收集的特点,因此选择合适的富集手段和检测方法对保障结果的准确性至关重要。目前,香樟挥发物的提取方法主要有水蒸气蒸馏法、酶提取法、有机溶剂提取法等。其中,水蒸气蒸馏法是香樟工业提取的主要方法,该法具有设备简单、操作简便、生产成本低等优势,但存在一定的缺点,其提取过程时间长、温度高、系统开放,易造成热不稳定及易氧化成分的破坏,不利于扩大生产^[24];酶提取法,其程序复杂、变量较多,难以标准化^[25];有机溶剂提取法,该方法消耗大量的有机溶剂,影响生态环境安全^[26]。本研究利用顶空固相微萃取-气质联用技术(HS-SPME-GC-

MS),其具有样本需求小、操作简便、灵敏度高等优点^[27,28],能够准确检测挥发物,目前广泛应用于植物挥发性物质的检测分析。

本研究利用 HS-SPME-GC-MS 技术从香樟叶片和果实鉴定出 1 158 种代谢产物。其中,558 种代谢物在表达量上具有差异,分别有 141 种代谢物上调和 417 种下调。这些差异代谢物主要为萜类、酯、杂环化合物、酮、烃类、醛、醇、芳烃、酚、酸,共富集到以倍半萜类和三萜类生物合成、单萜类生物合成和苯丙烷类生物合成途径为主的通路中,本研究结果为香樟的精细开发和多样化利用提供重要的理论参考。

参考文献

- Li Z, Wu Q, Peng Y, et al. Diurnal, seasonal, and vertical changes in photosynthetic rates in *Cinnamomum camphora* forests in subtropical China[J]. *Forests*, 2024, 15: 183.
- Yatong X, Min L, Fengmao C. Root rot of *Cinnamomum camphora* (Linn) Presl caused by *Phytophthora vexans* in China [J]. *Plants*, 2023, 12: 1072-1072.
- Guo X. Analysis on flower volatile components of *Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* [J]. *J Plant Resour Environ (植物资源与环境学报)*, 2020, 29: 69-71.
- Xiang S, Sun WH, Wan XH, et al. Analysis of relationship between *Cinnamomum camphora* and its relatives [J]. *J Fujian Agric Forest Univ: Nat Sci (福建农林大学学报: 自科版)*, 2022, 51: 204-209.
- Zhang F, Bi LW, Zhao ZD. Research progress on plant resources distribution and chemical composition of camphor tree [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2017, 29: 517-31.
- Bhramikia S, Drikvandi P. The abundance of camphor, as a plant essential oil, in various plants and their different parts [J]. *Nat Prod Res*, 2022, 38: 174-175.
- Lee SH, Kim DS, Park SH, et al. Phytochemistry and applications of *Cinnamomum camphora* essential oils [J]. *Molecules*, 2022, 27: 2695.
- Ouyang SH, Liu YF, Han YM, et al. Plant volatiles release

- characteristics and influencing factors of research progress [J]. *J Forest Ecol Sci* (林业与生态科学) 2023, 38: 375-384.
- 9 Bhandari U, Kumar A, Lohani H, et al. Chemical composition of essential oil of camphor tree (*Cinnamomum camphora*) leaves grown in doon valley of Uttarakhand [J]. *J Essen Oil Bear Plants*, 2022, 25: 548-54.
- 10 Zheng CR, Hu YB, Tan YQ, et al. HS-SPME-GC-MS analysis of the variation of volatile components of flower organs in different flowering stages of 'Fanyun' Hanxiao [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2024, 36: 453-463.
- 11 Deng M, Qin FY, Li ZY, et al. Analysis of the volatile components in different parts of *Zingiber mioga* Rosc. based on HS-SPME-GC-MS [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2023, 35: 1338-1347.
- 12 Mujawaha AH, Abdallah EM, Alshoumar SA, et al. GC-MS and *in vitro* antibacterial potential of *Cinnamomum camphora* essential oil against some clinical antibiotic-resistant bacterial isolates [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2022, 26: 5372-5379.
- 13 Wang MD, Yong XH, Yin M, et al. Application of metabolomics technology in regulation of plant secondary metabolism [J]. *Chin J Plant Sci* (植物科学学报), 2023, 41: 269-278.
- 14 Yang M, Yin MZ, Chu SS, et al. Colour, chemical compounds, and antioxidant capacity of *Astragalus Radix* based on untargeted metabolomics and targeted quantification [J]. *Phytochem Anal* (植物化学的分析), 2022, 33: 599-611.
- 15 Xia SQ, Zhou CC, Guo CQ, et al. Differential analysis of volatile metabolites in different parts of *Ormosia henryi* by using widely-targeted volatilomics method [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2023, 35: 2027-2039.
- 16 Xliao Q, Mu XK, Liu S, et al. Plant metabolomics: a new strategy and tool for quality evaluation of Chinese medicinal materials [J]. *Chin Med* (中国医药), 2022, 17: 45.
- 17 Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 2001: 12.
- 18 Lan T, Duan GZ, Qi YC, et al. Widely targeted metabolomic analysis of yellow wolfberry and black wolfberry [J]. *Food Sci* (食品科学), 2024, 45: 52-58.
- 19 Xian Y. Determination of volatile components of five aromatic plants and their effects on anxiety of college students [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University (江西农业大学), 2023.
- 20 Agola AM, Mukherjee S, Parekh A, et al. Silica functionalized with propylsulfonic acid as an efficient metal-free catalyst for isomerization of longifolene to iso-longifolene [J]. *Catal Lett*, 2023, 154: 2294-2304.
- 21 Yang YC, Chen J, Ma LT, et al. Research progress on the analgesic effect of elemene extract [J]. *World Chin Med* (世界中医药), 2023, 18: 3449-3456.
- 22 Huang YH. Synthesis and antibacterial properties of natural *L*-bornyl polymer [D]. Guangzhou: South China University of Technology (华南理工大学), 2021.
- 23 Barroso SA, Massing TL, Suemitsu C, et al. Volatile constituents of some myrtaceous edible and medicinal fruits from the Brazilian Amazon [J]. *Foods*, 2024, 13: 1490.
- 24 Qin GZ, Ding JP, Dou DY, et al. Study on supercritical extraction of camphor leaf essential oil [J]. *J Wannan Med Coll* (皖南医学院学报), 2011, 30: 362-364.
- 25 Zhang F. Study on the viability of essential oil from camphor tree leaves and its bioactivity [D]. *Chin Acad Forest* (中国林业科学研究院), 2018.
- 26 Zeng MX, Yang WS. Study on microwave-assisted extraction of camphor leaf essential oil [J]. *China Sci Technol Inform* (中国科技信息), 2014, 11: 50-51.
- 27 Wang K. Study on rapid measurement method of plant volatiles based on infrared spectroscopy [D]. Guilin: Guilin University of Electronic Science and Technology (桂林电子科技大学), 2023.
- 28 Li JH, Zeng YY, Xiong YB, et al. Evaluation and analysis of key flavor and overcooked flavor of prepared preserved pork with preserved cabbage based on HS-SPME-GC-MS and electronic tongue [J/OL]. *Food Ind Sci Technol* (食品工业科技): 1-23 [2024-03-31]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023110208>.