

· 研究报告 ·

不同化学型樟树叶挥发性成分组成的多变量分析

刘星星^{1, 2}, 张茜^{1, 2}, 郭夏丽^{1, 2}, 龚上信^{1, 2}, 江香梅³, 付宇新³, 罗丽萍^{1, 2*}

¹南昌大学生命科学与食品工程学院, 南昌 330031; ²江西省植物资源重点实验室, 南昌 330031

³江西省林业科学研究院, 南昌 330013

摘要 为明确不同化学型樟树(*Cinnamomum camphora*)叶挥发性成分的异同, 以5种不同樟树叶的25个样本为实验材料, 采用静态顶空-气相色谱-质谱联用法(SHS-GC-MS)研究了其挥发性成分组成, 并运用主成分分析(PCA)、聚类分析(CA)和判别分析(DA)等对不同化学型樟树叶挥发性成分组成进行了多变量分析。研究结果表明, 不同化学型樟树叶的挥发性成分共有8种: β -芳樟醇、莰烯、 β -愈创木烯、 γ -松油烯、 α -侧柏烯、2-乙基呋喃、 α -石竹烯和大牻牛烯; 不同化学型樟树叶的挥发性化合物种类和含量存在显著差异。检测出的平均化合物数量分别为52(异樟)、40(脑樟)、37(油樟)、34(芳樟)和33(龙脑樟)。主成分分析提取了3个主成分因子, 累计贡献率达到86.40%。聚类分析和判别分析结果表明, 其中的12种挥发性成分能够对5种化学型樟树进行较好的区分, 准确率分别为96%和100%。实验结果说明, 这12种挥发性成分可以较好地用于樟树化学型分类。

关键词 樟树, 化学型, 静态顶空-气相色谱-质谱, 多变量分析法

刘星星, 张茜, 郭夏丽, 龚上信, 江香梅, 付宇新, 罗丽萍 (2014). 不同化学型樟树叶挥发性成分组成的多变量分析. 植物学报 49, 161–166.

在长期进化过程中樟属(*Cinnamomum*)分化出不同化学型, 这是其生物多样性的独特表现形式, 为该属植物的开发利用提供了宝贵资源。樟树(*Cinnamomum camphora*)是樟科(Lauraceae)樟属植物中经济价值较高的树种之一, 富含多种芳香油。樟树的根、茎、叶、枝条和果实都含有精油, 但叶部不仅油含量高, 而且主要成分含量也高(孟小雄, 1988), 包括芳樟醇、樟脑、1,8-桉叶油素、龙脑和异橙花叔醇等。据《中国植物志》记载樟树按精油化学成分可分为本樟(以樟脑为主)、芳樟(以芳樟醇为主)和油樟(以松油醇为主)3个类型(李锡文, 1982)。随着研究的不断深入, 又有新的化学型被发现。为便于开发利用, 根据叶精油成分不同又将樟树划分为芳樟、脑樟、桉樟、龙脑樟和异樟等化学型(程必强等, 1997)。生产实践中主要依据人为嗅觉经验确定樟树的化学型, 正确率往往不高, 且受经验局限, 不利于发现新的化学型。

目前, 对樟树叶挥发性成分的研究一般采用传统水蒸气蒸馏法或同时进行蒸馏萃取等(吴航等, 1992;

张国防和陈存及, 2007; 张国防等, 2008; 刘亚等, 2008; 周翔等, 2011)。这些方法首先需要通过溶剂提取制备获得挥发性成分, 之后经气质联用检测化学组成。由于制备工艺不同致使提取不完全或在提取过程中部分化学成分受到破坏等原因, 影响了研究结果的可靠性及应用。

静态顶空-气相色谱-质谱联用法(static head-space-gas chromatography-mass spectrometry, SHS-GC-MS)是将未经溶剂预处理的样品置于顶空瓶中, 经过加热, 使样品中的挥发性成分直接进入GC-MS分析系统。该方法具有快速、自动化程度高、被分析挥发性成分损失少、样品消耗量少和易标准化等优点(巩丽丽, 2011)。然而目前尚无该方法应用于樟树化学成分分析的报道。

本研究以产自江西省的异樟、脑樟、油樟、芳樟和龙脑樟5种化学型樟树叶为实验材料, 采用SHS-GC-MS方法分别对其挥发性成分进行检测, 并运用主成分分析(primary component analysis, PCA)、聚类分析(cluster analysis, CA)和判别分析(discrimin-

收稿日期: 2013-06-14; 接受日期: 2013-10-30

基金项目: 江西省科技厅项目(No.2010AZX00500, No.20123BCB22004)和江西省教育厅项目(No.KJLD12051)

* 通讯作者。E-mail: lluo2@126.com

ant analysis, DA)等多变量分析方法, 揭示不同化学型樟树挥发性成分的异同及组成规律, 以期明确不同化学型樟树化学组成的差异, 为科学判定樟树的化学类型和快速筛选新化学型提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验样品采自江西省林业科学院院内实验地, 由江香梅研究员提供并鉴定, 采集时间为2011年10月上旬, 采集树龄在8~10年之间, 所采样品为当年生长出来的新叶, 颜色为墨绿色。样品叶采集后, 随即阴干、粉碎、过60目筛并封袋冷藏备用。所采樟树(*Cinnamomum camphora* (L.) Presl)叶包括5种化学型, 每种化学型采集5个样品, 分别为: 异樟(YZ-1、YZ-2、YZ-3、YZ-4和YZ-5)、脑樟(NZ-1、NZ-2、NZ-3、NZ-4和NZ-5)、油樟(UZ-1、UZ-2、UZ-3、UZ-4和UZ-5)、芳樟(FZ-1、FZ-2、FZ-3、FZ-4和FZ-5)和龙脑樟(LN-1、LN-2、LN-3、LN-4和LN-5)。

1.2 实验仪器

实验用Agilent19091S-433 HP-5ms(0.25 mm×30 m ×0.25 μm)、6890N/5973i型气相色谱-质谱联用仪(gas chromatograph-mass spectrometer-computer, GC-MS)、COMBI PAL自动进样器、顶空分析自动控制系统PAL System和10 mL顶空瓶均购自美国Agilent公司。JA1003N型分析天平购自上海沪粤明科学仪器有限公司。

1.3 仪器分析条件

分别称取1.000 g樟树叶样品放入10 mL顶空瓶中, 密封后置顶空进样器中进样。

静态顶空: 样品瓶加热温度为60°C, 加热时间20分钟(巩丽丽, 2011)。

色谱柱: 柱箱采用程序升温, 起始温度为60°C, 保持2分钟, 之后以每分钟8°C升至250°C, 保持10分钟, 总分析时间为35.75分钟。进样口温度为250°C, 以He为载气, 其流速为每分钟1.0 mL, 压力为56 kPa, 流出物分流比为1:1。

质谱条件: 质谱电离方式为EI, 接口温度为280°C, 电子能量为70 eV, 四级杆温度为150°C, 离

子源温度为230°C, 溶剂延迟2分钟。质谱质量扫描范围为33~400 amu, 电子倍增器电压为1 941.2 V(张松山等, 2009)。利用检索谱库(NIST02.L)对样品进行定性分析, 并采用峰面积归一化法对各样品成分进行定量分析。

1.4 数据统计与分析

采用SPSS19.0软件(IBM SPSS Statistics)对GC-MS分析结果进行PCA、CA和DA分析。

2 结果与讨论

2.1 5种化学型樟树叶中的挥发性成分

从5种化学型樟树(即异樟、脑樟、油樟、芳樟和龙脑樟)叶中鉴定出的挥发性化合物数量依次为52种、40种、37种、34种和33种; 共鉴定出171种化合物。其中, β-芳樟醇、莰烯、β-愈创木烯、γ-松油烯、α-侧柏烯、2-乙基呋喃、α-石竹烯和大牻牛儿烯8种化合物在所有样品中均检测到。与已有的关于樟树精油成分的文献对比(程必强等, 1997; 张国防和陈存及, 2007; 张国防等, 2008; 刘亚等, 2008; 周翔等, 2011), 发现这8种挥发性成分除2-乙基呋喃外, 其余7种均存在。

由表1可知, 异樟和油樟叶片中虽然挥发性成分含量最高的均为桉叶油素, 但是两种化学型气味明显不同; 而靠观察和嗅觉较难区分的脑樟和龙脑樟, 其最高含量化合物却不同。脑樟、油樟、芳樟和龙脑樟的标志性成分分别为樟脑、桉叶油素、β-芳樟醇和(-)-龙脑; 异樟的标志性成分不明显。Yang等(2010)对蜂胶的研究表明, 人体嗅觉对化合物气味的感知与其含量和气味阈值都有关, 含量高的化合物可能由于气味阈值高而不易感知。故一些含量不是十分显著的化合物对樟树叶片气味的形成起到了一定作用。

2.2 主成分分析

主成分分析(PCA)主要是通过降维, 用较少的指标来代替和综合反映原来较多的信息, 这些综合后的指标是原来多指标的主要成分(陈超和邹滢, 2009)。在樟树叶的挥发性成分中, 选择出现频数≥22的共计12种化合物进行PCA、CA和DA分析, 这12种化合物为β-愈创木烯、2-乙基呋喃、α-石竹烯、大牻牛儿烯、δ-

表1 5种化学型樟树叶中含量最高的10种挥发性成分**Table 1** Top 10 volatile components in the five chemotypes of *Cinnamomum camphora* leaves

Chemotypes	Top 10 kinds of volatile components
Isoborneol-type	Eucalyptol (11.69–14.26); Caryophyllene (9.55–13.15); Nerolidol (8.76–18.17); α -Pinene (5.01–7.76); Camphor (3.88–7.72); Camphene (2.52–4.79); β -Linalool (2.38–9.30); 3-Hexen-1-ol, (Z)-(1.44–4.21); 2-Ethylfuran (0.99–3.05); Hexanal (0.94–2.15)
Camphora-type	Camphor (35.78–41.39); α -Pinene (8.24–9.38); Limonene (11.13–13.67); Camphene (6.86–7.92); (-)- β -Pinene (5.27–6.86); β -Myrcene (4.76–5.39); Caryophyllene (1.70–3.59); α -Terpinene (1.21–1.48); Terpinen-4-ol (1.11–1.37); Borneol (1.07–1.43)
Cineole-type	Eucalyptol (35.36–39.67); α -Terpineol (9.34–11.35); γ -Terpinene (12.61–19.67); β -Pinene (2.46–4.02); Terpinen-4-ol (2.56–2.99); Caryophyllene (1.67–2.87); β -Linalool (1.55–2.46); α -Thujene (1.49–1.95); Camphene (0.99–1.30); α -Selinene (0.44–1.12)
Linalool-type	β -Linalool (61.79–66.81); Eucalyptol (6.70–8.18); α -Pinene (1.91–7.76); β -Pinene (1.66–4.67); β -Myrcene (1.44–3.77); 3-Hexen-1-ol (1.15–2.00); Camphene (0.83–4.79); Caryophyllene (0.81–13.15); 2-Ethylfuran (0.78–2.70); α -Caryophyllene (0.42–2.56)
Borneol-type	(-)Borneol (32.7–38.44); Eucalyptol (11.42–13.68); α -Pinene (5.84–8.49); (-)- β -Pinene (3.95–6.89); Camphor (3.17–8.37); β -Myrcene (2.91–3.92); α -Terpineol (1.95–2.22); Caryophyllene (1.94–3.88); β -Linalool (1.65–10.66); α -Caryophyllene (1.40–2.47)

括号内数值为百分含量(%)。The values in brackets are the percentage contents of the volatiles(%).

革澄茄烯、己醛、可巴烯、莰烯、 γ -松油烯、 α -水芹烯、 β -芳樟醇和 α -侧柏烯。以各化合物百分含量为测定指标(Sun et al., 2005), 累计贡献率达到85%以上; 以特征值大于1来确定主成分的个数(陈超和邹滢, 2009; Gong et al., 2012)。特征值大于1的主成分有3个, 组分1、2和3分别代表了变量总方差的47.01%、22.57%和16.82%, 累计86.40%。根据0.5原则, pc1代表化合物 β -愈创木烯、2-乙基呋喃、 α -石竹烯、大牻牛儿烯、 δ -革澄茄烯、己醛和可巴烯; pc2代表化合物莰烯、 γ -松油烯和 α -水芹烯; pc3代表化合物 β -芳樟醇和 α -侧柏烯(表2)。

将25个樟树叶样品对pc1和pc2作散点图(图1)。由图1可知, 25个样品有规律地聚集和分散: 同种化学型聚在一定的区域内, 不同化学型分散在不同的区域。脑樟和龙脑樟所占区域比较紧密, 说明这两种化学型樟树叶中的挥发性成分在种类及含量上比较接近。

2.3 聚类分析

聚类分析(CA)的基本思想是依据事物的数值特征观察样品间的亲疏关系。而样品间的亲疏关系则由样品之间的距离衡量, 一旦定义了样品间的距离, 就把距离近的样品归为一类(陈超和邹滢, 2009)。聚类分析将樟树挥发性成分之间的内在组合客观地反映在聚类图上。聚类分析中没有产生新变量, 结论形式简明

表2 主成分因子载荷矩阵**Table 2** The loadings of the first three rotated principal components

Component	The loadings		
	pc1	pc2	pc3
β -Linalool	-0.119	0.254	-0.949
Camphene	0.020	-0.929	0.304
β -Guaiene	0.948	0.156	0.105
γ -Terpinene	-0.466	0.618	0.543
α -Thujene	-0.440	0.461	0.737
2-Ethylfuran	0.735	0.336	-0.004
α -Caryophyllene	0.793	-0.326	0.216
D-Germacrene	0.932	0.091	0.134
δ -Cadinene	0.923	0.152	0.098
Hexanal	0.839	0.207	0.175
α -Phellandrene	0.047	-0.930	0.159
Copaene	0.849	0.057	-0.212

且直观。采用SPSS19.0软件包中的CA程序, 计算25个樟树叶样品之间的欧几里德距离(高祥宝和董寒青, 2007; 肖俊松等, 2010), 进行分层聚类分析。SPSS软件自动将各类间的距离映射到0–25之间, 并将凝聚过程近似地表示在图上(图2)。

由图2可知, 当距离临界值取1时, 25个樟树叶样品分别聚为6类。第1类包含4个样品, 分别为LN-1、LN-5、LN-4和LN-2, 均为龙脑樟; 第2类包含5个样品, 分别为NZ-3、NZ-4、NZ-5、NZ-1和NZ-2, 均为

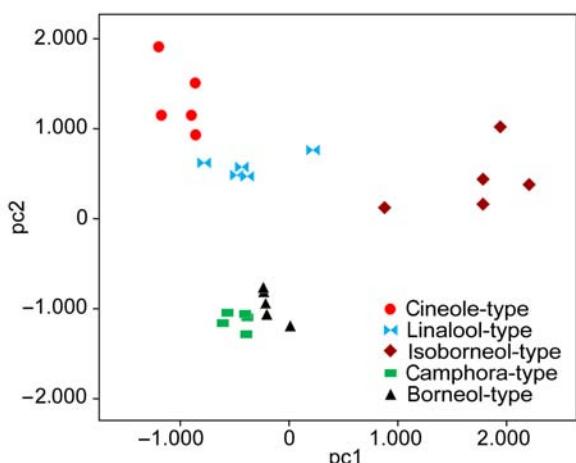


图1 25个樟树叶样品主成分分析(PCA)得分图

Figure 1 The score plots of 25 samples of *Cinnamomum camphora* leaves by primary component analysis (PCA)

脑樟；第3类只含龙脑樟LN-3；第4类为芳樟FZ-2、FZ-5、ZF-4、FZ-3和FZ-1；第5类为油樟UZ-2、UZ-4、UZ-1、UZ-5和UZ-3；第6类为异樟YZ-2、YZ-3、YZ-4、YZ-5和YZ-1(范国强等, 2001)。聚类准确率为96%。当距离临界值取5时, 25个樟树样品可聚为4类。其中龙脑樟和脑樟聚为一类, 其它按照临界值取1时聚集。

分析上述结果, 可能的原因是脑樟和龙脑樟的成分及含量较为相似。通过对比脑樟和龙脑樟的成分, 发现两种化学型樟树叶片中选作分析的12种挥发性成分有6种分别在其数量级上比较含量极为相近, 它们为莰烯、 β -愈创木烯、 γ -松油烯、 α -侧柏烯、2-乙基呋喃和可巴烯。此外, 樟脑在脑樟和龙脑樟叶中都存在, 但在龙脑樟叶中含量仅为8.37%, 在脑樟叶中含量则为39.56%。异樟叶中的化学成分较为复杂, 实

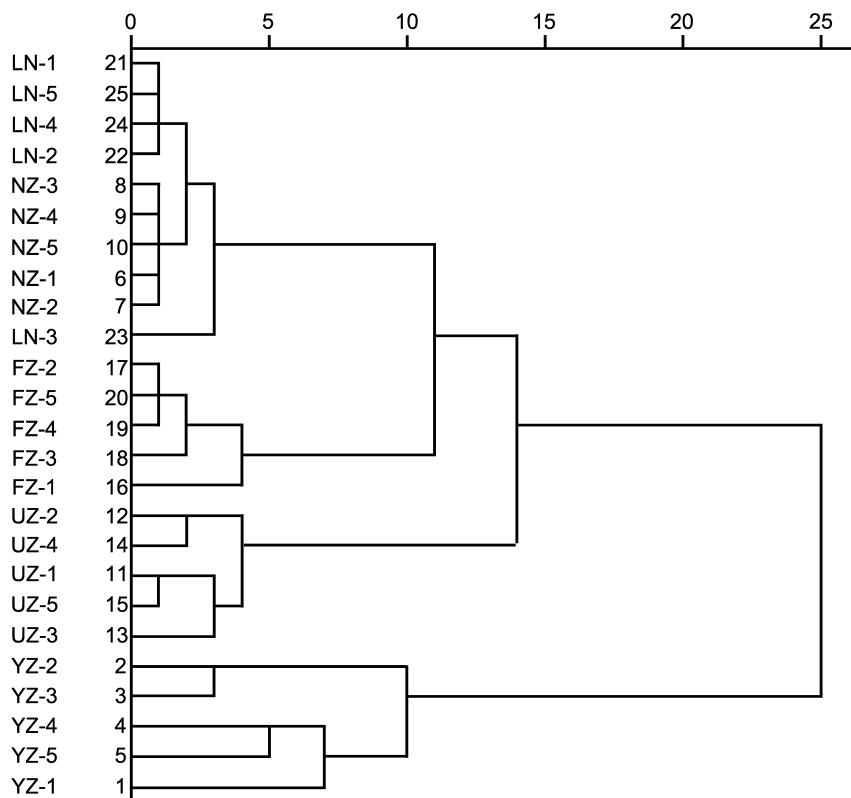


图2 分层聚类分析的树形图

Figure 2 Dendrogram of cluster analysis

验所用5个样品中, 所含化学成分数最高为65, 最低为47, 平均每个样品含有52种化合物, 正是因为异樟中的化合物复杂, 所以其组内差异较大。

2.4 判别分析

判别分析(DA)为类别明确的一种分析技术, 它根据观测到的某些指标对所研究的对象进行分类, 得到判别函数, 然后再使用判别函数对为之分类的样品进行分类(陈超和邹滢, 2009)。用SPSS19.0软件包, 采用Wilk'lambda法进行逐步DA, 通过Fisher准则特征变量选择程序, 对樟树叶12种挥发性成分(选择成分与PCA时相同)进行特征变量选择。其中, 有6种成分被选为用于判别的特征变量, 25个樟树叶样品的分类均正确, 判断正确率为100%。得到的典型判别函数代表的方差为72.6%, 函数表达式为: $Y=-10.866+0.512x_1+0.221x_2+0.548x_3-0.474x_5+0.603x_6-0.447x_7$, 其中 x_1 为 β -芳樟醇, x_2 为莰烯, x_3 为 β -愈创木烯, x_5 为 α -侧柏烯, x_6 为2-乙基呋喃, x_7 为 α -石竹烯。

聚类分析(CA)和DA正确率分别为96%和100%。两者有差异的原因是CA未产生新变量, 通过把原来的对象集合分成相似的组或族, 来获得某种内在的数据规律, 正确率直接取决于原始数据的规律; DA对原来的对象进行分类, 生成判别函数(李建军等, 2007), 正确率的高低取决于生成的判别函数。因此, CA可客观地反映出5种化学型樟树叶挥发性成分的规律; DA用判别函数替代原始数据, 能更准确的区别5种化学型。

3 结论

静态顶空-气相色谱-质谱联用法(SHS-GC-MS)的测定结果表明, 从25个样品中共鉴定出171种化合物。其中, β -芳樟醇、莰烯、 β -愈创木烯、 γ -松油烯、 α -侧柏烯、2-乙基呋喃、 α -石竹烯和大牻牛儿烯8种化合物在所有样品中均可检测到。5种化学型樟树叶挥发性成分种类及其含量存在较大差异。对12种成分进行主成分分析表明, β -愈创木烯、2-乙基呋喃、 α -石竹烯、大牻牛儿烯、 δ -荜澄茄烯、己醛和可巴烯7种挥发性成分是5种化学型樟树分类的重要判定变量。聚类分析和判别分析的正确率分别为96%和100%。采用SHS-GC-MS法定性和定量分析挥发性成分, 并结合

PCA、CA和DA等多变量分析方法, 突破了传统的依赖经验判断, 可有效鉴别樟树的化学类型, 为发掘新的化学型和开发野生樟树资源提供了科学依据。

参考文献

- 陈超, 邹滢 (2009). SPSS 15.0中文版常用功能与应用实例精讲. 北京: 电子工业出版社. pp. 311-334.
- 程必强, 喻学俭, 丁婧凯 (1997). 中国樟属植物资源及其芳香成分. 昆明: 云南科学技术出版社. pp. 3-6.
- 范国强, 彭海风, 翟晓巧, 马新业, 蒋建平 (2001). 泡桐叶片蛋白质多态性及其聚类分析. 植物学通报 **18**, 739-743, 642.
- 高祥宝, 董寒青 (2007). 数据分析与SPSS应用. 北京: 清华大学出版社. pp. 1-9, 311-364.
- 巩丽丽 (2011). 静态顶空进样GC-MS分析三棱挥发性成分. 食品与药品 **13**, 349-350.
- 李建军, 丁正生, 张海燕 (2007). 常用判别分类方法分析. 西安科技大学学报 **27**, 138-142.
- 李锡文 (1982). 樟科. 见: 中国科学院中国植物志编辑委员会, 中国植物志(第31卷). 北京: 科学出版社. pp. 182-191.
- 刘亚, 李茂昌, 张承聪, 张莹, 赵荣, 李光雄 (2008). 香樟树叶挥发油的化学成分研究. 分析试验室 **27**, 88-92.
- 孟小雄 (1988). 樟树优良精油类型选择研究的新途径. 植物学通报 **5**, 99-99.
- 吴航, 王建军, 刘驰, 朱亮峰 (1992). 黄樟化学型的研究. 植物资源与环境 **1**, 45-49.
- 肖俊松, 袁英髦, 张爱雪, 曹雁平 (2010). 茶叶中茶多酚和生物碱的测定及聚类和线性判别分析. 食品科学 **31**, 343-348.
- 张国防, 陈存及 (2007). 不同化学型樟树的RAPD分析. 植物资源与环境学报 **16**, 17-21.
- 张国防, 陈存及, 陈志平, 陈瑞炎, 林贤松 (2008). 福建省樟树叶精油的主成分分析及其化学型. 植物资源与环境学报 **17**, 24-27.
- 张松山, 李海鹏, 孙宝忠 (2009). 发酵牛肉中香味活性化合物的分析. 食品科学 **30**, 316-319.
- 周翔, 莫建光, 谢一兴, 李奥峰 (2011). 广西芳樟醇型樟树精油成分的GC-MS研究. 食品科技 **36**, 282-284.
- Gong SJ, Luo LP, Gong W, Gao YY, Xie MY (2012). Multivariate analyses of element concentrations revealed the groupings of propolis from different regions in China. Food Chem **134**, 583-588.

Sun FJ, Levin GA, Downie SR (2005). A multivariate analysis of *Cymopterus glomeratus*, formerly known as *C. Acaulis* (Apiaceae). *Rhodora* **107**, 359–385.

Yang C, Luo LP, Zhang HJ, Yang X, Lü Y, Song HL (2010). Common aroma-active components of propolis from 23 regions of China. *J Sci Food Agr* **90**, 1268–1282.

Multivariate Analyses of Volatile Chemical Composition in Leaves of Different *Cinnamomum camphora* Chemotypes

Xingxing Liu^{1,2}, Xi Zhang^{1,2}, Xiali Guo^{1,2}, Shangji Gong^{1,2}, Xiangmei Jiang³, Yuxin Fu³, Liping Luo^{1,2*}

¹College of Life Science and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031, China

²Key Laboratory of Plant Resources in Jiangxi Province, Nanchang 330031, China

³Academy of Forestry in Jiangxi Province, Nanchang 330013, China

Abstract We detected the chemical composition of volatiles in 25 leaf samples of 5 chemotypes of *Cinnamomum camphora* by static headspace-gas chromatography-mass spectrometry. Multivariate analysis, including principal component analysis (PCA), cluster analysis (CA), and linear discriminant analysis (DA), was used to reveal the relationship of chemical composition of volatiles in the 25 samples. We found 8 compounds in all samples: β-linalool, camphene, β-guaiene, γ-terpinene, α-thujene, 2-ethylfuran, α-caryophyllene and D-germacrene. The leaves of 5 chemotypes significantly differed in chemical composition and content of volatiles. The mean number of detected compounds was 52 (isoborneol-type), 40 (camphora-type), 37 (cineole-type), 34 (linalool-type) and 33 (borneol-type). Three principal components were formed, and their total accounted for 86.4% of the total variation. The results of CA and DA analyses showed that 12 volatiles are important discriminating variables to identify 5 chemotypes of *C. camphora* leaves. The accuracy rate of CA and DA analyses was 96% and 100%, respectively. These 12 volatile compounds can be used to classify chemotypes of *C. camphora*.

Key words *Cinnamomum camphora*, Chemotype, static headspace-gas chromatography-mass spectrometry, multivariate analysis

Liu XX, Zhang X, Guo XL, Gong SJ, Jiang XM, Fu YX, Luo LP (2014). Multivariate analyses of volatile chemical composition in leaves of different *Cinnamomum camphora* chemotypes. *Chin Bull Bot* **49**, 161–166.

* Author for correspondence. E-mail: lluo2@126.com

(责任编辑: 孙冬花)