

doi:10.11707/j.1001-7488.20221112

香榧种子生长发育过程中假种皮挥发油的变化*

郑刘辉 侯宇 张新风 喻卫武 曾燕如 戴文圣

(浙江农林大学省部共建亚热带森林培育国家重点实验室 杭州 311300)

摘要: 【目的】探究香榧假种皮不同制备方式与分析方法对挥发油成分含量测定的影响,揭示香榧种子生长发育过程中假种皮挥发油成分动态变化规律,为香榧假种皮的利用提供参考。【方法】结合气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术,优化水蒸气蒸馏法(SD)和顶空固相微萃取法(HS-SPME)样品制备条件,选择适合的方法测定香榧种子生长发育过程中假种皮挥发性油成分与含量。【结果】1) 基于 GC-MS 的分析结果,从成分种类及含量上来看,SD 更适合香榧假种皮挥发油分析样品的制备。2) 用 SD-GC-MS 分析,检测出假种皮挥发油成分有 47 种,包含萜烯类 21 种(柠檬烯、 α -蒎烯、 δ -杜松烯等)、萜醇类 15 种(芳樟醇、冰片、榄香醇等)、萜烯酯类 3 种(乙酸冰片酯、乙酸松油酯、乙酸香叶酯)、其他化合物 8 种(胡椒酮、抗氧化剂 264、棕榈酸等)。3) 种子生长发育过程中,假种皮中的挥发性成分呈一定的变化规律,其中蒎烯、 β -蒎烯、萜品油烯等含量 5—9 月均呈上升趋势;部分成分 5—8 月上升到最大值后开始下降,如 α -蒎烯、桉烯、月桂烯等;5—6 月和 8—9 月单萜类和倍半萜类成分呈明显的负相关趋势,而 6—7 月由于假种皮处于生长时期,单萜类和倍半萜类组分均呈增加趋势。主成分分析发现,假种皮挥发油成分在 5 月和 6 月、7 月和 8 月比较相似。【结论】香榧假种皮挥发油 SD 提取条件为料液比为 1:10、浸泡时间为 1 h、提取时间为 4 h;通过 SD-GC-MS 检测出 47 种化合物,共 13 483.14 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,主要成分为柠檬烯、 α -蒎烯等萜烯类化合物;不同种实生长发育期的香榧假种皮中挥发性组分差异较大,化合物种类从 5 月份的 35 种增加到了 9 月份的 47 种,倍半萜类和含氧衍生物积累增多,挥发油成分的总含量从 5—9 月份先升后降;5—6 月、7—8 月的假种皮挥发油成分组成及含量比较接近,而 9 月份与其他 4 个月份差异较大。

关键词: 香榧;假种皮;水蒸气蒸馏法;顶空固相微萃取;挥发性成分;气质联用分析法

中图分类号: S718.43 文献标识码: A 文章编号: 1001-7488(2022)11-0127-10

Changes of Volatile Oil Composition in Aril during the Growth and Development of *Torreya grandis* 'Merrillii' Seeds

Zheng Liuhui Hou Yu Zhang Xinfeng Yu Weiwu Zeng Yanru Dai Wensheng

(State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University Hangzhou 311300)

Abstract: 【Objective】This study aims to explore the influence of different preparation and analysis methods on the determination of volatile oil composition and the contents, and reveal the dynamic changes of the contents in the *Torreya grandis* 'Merrillii' aril during the seed growth and development, as so to provide the rationale for the utilization of the aril. 【Method】Steam distillation (SD) and headspace solid phase microextraction (HS-SPME) techniques were used and optimized for the sample preparation. The gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to determine the volatile components and the contents in the aril during the growth and development of *T. grandis* seeds. 【Result】1) Based on GC-MS analysis, SD was more suitable for the sample preparation of volatile oil from *T. grandis* seeds in terms of the component and content. 2) The SD-GC-MS analysis showed that there were 47 volatile oil components in the aril, including 21 terpenes (limonene, α -pinene, δ -juniene, etc.), 15 terpene alcohols (linalool, borneol, elemol, etc.), three terpene esters (bornyl acetate, pine oil acetate, and geranyl acetate), and eight other compounds (piperone, antioxidant 264, palmitic acid, etc.). 3) The volatile components in the aril during seed growth and development showed certain regular changes. Among them the content of camphene, β -pinene, and terpinolene increased from May to September; the content of such ingredients as α -pinene, cypressene, and myrcene gradually rose to the peak

收稿日期: 2021-03-21; 修回日期: 2022-10-20。

基金项目: 浙江省科学技术重点研发计划项目(2016C02052-12)。

* 戴文圣为通讯作者。

value from May to August and then declined. The monoterpenoids and sesquiterpenoids showed an obvious negative correlation during May to June and from August to September, while the monoterpenoids and sesquiterpenoids showed an increasing trend from June to July because the aril was growing. PCA suggested that the volatile oil components of aril in May were similar to those in June 【Conclusion】 The extraction condition for *T. grandis* ‘Merrillii’ aril is the ratio of material to liquid set as 1:10, and soak time as 1 hour, extraction time as 4 hours. Through the SD-GC-MS detection, 47 compounds were identified, with a total of 13 483.14 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. The main ingredients include limonene and α -pinene compounds. The volatile components in the aril of *T. grandis* ‘Merrillii’ are significantly different at different seed growth and development stages. The number of compounds increased from 35 in May to 47 in September. Sesquiterpenoids and oxygenic derivatives increased, and the total content of essential oil increased first and then decreased from May to September. The composition and content of essential oil in the aril were similar from May to June and July to August, but they were significantly different from those in September.

Key words: *Torreya grandis*; aril; SD; HS-SPME; volatile components; GC-MS

香榧(*Torreya grandis* ‘Merrillii’)是红豆杉科(Taxaceae)榧属(*Torreya*)榧树(*T. grandis*)中的优良变异经过人工选育、嫁接栽培的品种类型(黎章矩等, 2005; 2004),是集食用、药用、材用、油用和绿化为一身的特色经济树种,也是我国著名的干果树种。香榧种实自5月份进入膨大期,到9月份种实成熟,其成熟种实假种皮占比为50%~60%,但作为香榧加工后的残余物质,并未得到有效利用,造成较大的资源浪费。香榧假种皮含有独特香气,有关其挥发性成分的研究也取得了一定进展,采用超临界 CO_2 萃取法结合气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)分析可鉴定香榧干燥假种皮中的40个挥发性组分,且大多为萜类化合物(王贝贝, 2008);利用水蒸气蒸馏法(steam distillation, SD)结合GC-MS分析9月成熟后的新鲜及干燥假种皮,鉴定出柠檬烯、 α -蒎烯和 β -蒎烯等43种化合物(李彪等, 2017),且新鲜假种皮的挥发油含量高于干燥假种皮。目前,关于香榧假种皮挥发性成分在种实发育过程中的变化规律尚未有研究,鉴于此,本研究通过结合GC-MS技术,使用水蒸气蒸馏法和顶空固相微萃取(head space solid phase micro-extraction, HS-SPME)2种制备方法对挥发性成分进行定性和定量分析,并确定适合的方法,旨在揭示5—9月生长期的新鲜香榧假种皮挥发性成分变化规律,为其开发利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 供试样品

香榧采自浙江农林大学校园,树龄15年,均采自香榧的阳面中上部。2019年9月20日采集香榧样品用于SD与HS-SPME条件优化;2020年5月20日、6月20日、7月20日、8月20日和9月20日,采集样品用于种实生长发育过程中挥发性成分变化规

律试验。

1.2 气相色谱与质谱(GC-MS)条件

参照童晓青等(2011)的方法进行GC-MS分析,具体条件:30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm 的石英毛细管柱;初始柱温50 $^{\circ}\text{C}$,保持2 min,以5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至150 $^{\circ}\text{C}$,保持1 min,再以8 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至280 $^{\circ}\text{C}$,保持2 min;载气为高纯He气,流速1 ml $\cdot\text{min}^{-1}$,分流比15:1。质谱条件为EI源,电子能量70 eV,扫描质量范围33~550 amu,倍增电压1 000 V,溶剂延迟时间3 min。

1.3 测定方法

1.3.1 SD法条件优化 取新鲜假种皮样品100 g,用料理机搅碎15 s后,参照何凤平等(2020)进行蒸馏提取,收集油水混合物,分别用40、20、10 mL乙醚萃取过滤3遍得到乙醚萃取液;通过无水硫酸钠去除多余的水分;滤液挥发掉乙醚,直到质量不再改变;淡黄色挥发油样品;置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内(锡铂纸包裹)密封避光保存。采用单因素变量法,分别从料液比(质液比)(1:5、1:7.5、1:10、1:12.5、1:15)、浸泡时间(0、1、2、3、4 h)和提取时间(2、3、4、5、6 h)3个方面优化SD的提取条件。

1.3.2 HS-SPME法条件优化 参照徐萌等(2016)的方法采用手持固相微萃取设备对新鲜假种皮样品进行顶空固相微萃(HS-SPME)吸附处理,再结合GC-MS分析挥发性成分,将样品中3个稳定且含量较高的挥发性化合物 α -萜烯油烯、(E)- β -金合欢烯、 δ -杜松烯的含量作为因变量分析。采用单因素变量法,分别从样品用量(0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 g)、加热温度(50、60、70、80、90 $^{\circ}\text{C}$)和吸附时间(30、40、50、60、70 min)3个方面优化HS-SPME的吸附条件。

1.3.3 生长发育过程中假种皮挥发油成分分析

采用优化后的 SD 提取条件和 HS-SPME 吸附条件结合 GC-MS 分析挥发油的成分,加入正己烷稀释的香叶醇($0.80 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)作为内标物,比较 2 种提取方法的,选取种实生长发育过程中的香榧假种皮挥发油定性和定量分析最适方法。

1.4 保留指数测定

取 $0.1 \mu\text{L}$ 的正构烷烃混标(C7-30)进样,运用线性升温公式计算每种烷烃化合物的保留指数值(Retention index, RI):

$$RI = 100n + 100(t_x - t_n)/(t_{n+1} - t_n)。$$

式中: t_x 为分析组分出峰的保留时间(min), t_n 和 t_{n+1} 是碳原子数为 n 和 $n+1$ 的正构烷烃的出峰保留时间(min)。

1.5 数据处理与统计分析

利用 Xcalibur 工作站中 NIST12 标准质谱对样品中的未知挥发性物质进行手工检索,选择较

高匹配度($SI>800$)的检索结果,结合相关文献和保留时间进行人工解谱,并采用内标法确定各化合物的绝对含量(刘文涵等, 2013; 张胜龙等, 2015)。

应用 OriginPro8.6 进行制表绘图,采用 SIMCA 13.0 软件对挥发性成分进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)。采用 SPSS25.0 软件对数据进行单因素方差分析,并用邓肯复极差法(Duncan's)进行多重显著性差异分析,结果以平均值 \pm 标准差表示,显著性水平为 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 SD 提取的条件优化

根据单因素试验结果可知,使用水蒸气蒸馏法提取香榧挥发油的最佳条件是料液比(质液比)为 1:10、浸泡时间为 1 h、蒸馏提取时间为 4 h(图 1)。

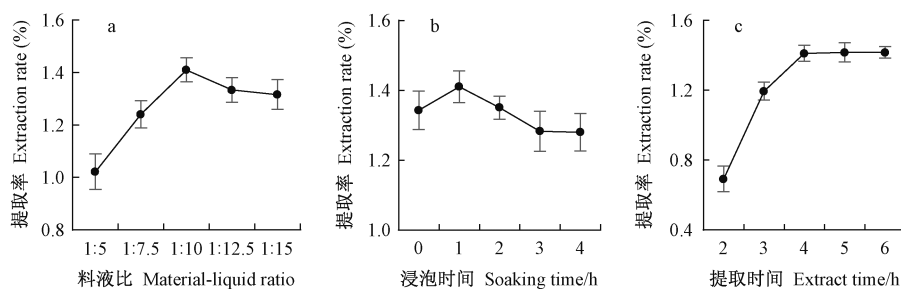


图 1 不同因素对香榧假种皮精油提取率的影响

Fig. 1 Effects of different factors on the extraction rate of essential oils

2.2 HS-SPME 条件的优化

根据单因素试验结果可知,使用顶空固相微萃

取的最佳条件是样品用量为 1.4 g、加热温度为 70°C 、吸附时间为 50 min(图 2)。

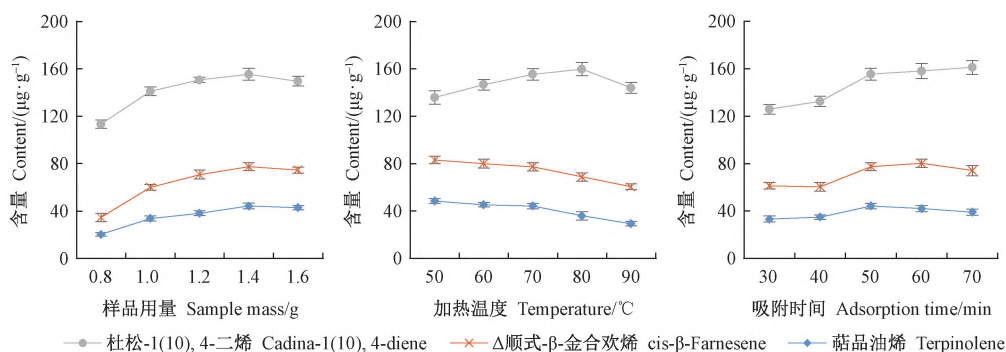


图 2 不同因素对香榧假种皮萃取效果的影响

Fig. 2 Effects of different factors on the extraction effect

2.3 SD 与 HS-SPME 挥发性组分的对比

通过 GC-MS 分析,分别对 2 种提取方法下的香榧假种皮挥发性组分进行分析(表 1),共鉴定出 48 种挥发性化合物,其中 SD 提取样品有 47 种,HS-

SPME 吸附样品有 25 种,共有化合物 24 种;蒎烯类化合物 22 种,SD 样品 21 种,HS-SPME 样品 17 种,共有化合物 16 种,含量较高的有柠檬烯、 α -蒎烯、 δ -杜松烯等;SD 样品鉴定出 15 种蒎醇类化合物,

而 HS-SPME 样品中只鉴定出了 5 种; SD 样品鉴定出乙酸冰片酯、乙酸松油酯和乙酸香叶酯 3 种萜烯酯类化合物,而在 HS-SPME 样品中并未发现萜烯酯类化合物。SD-GC-MS 测定的化合物种类基本包含

了 HS-SPME-GC-MS 测定的化合物种类,且含量更高,故选择 SD-GC-MS 鉴定香榧假种皮在不同发育时期的挥发性成分。

表 1 2 种方法检测到的香榧假种皮挥发性组分^①

Tab.1 Volatile components identified by SD-GC-MS and HS-SPME-GC-MS

组分编码 No.	保留时间 Retention time/min	保留指数 Reteneion index	化合物 Compounds	分子式 Molecular formula	化合物含量 Compound content/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	
					水蒸气蒸馏法 SD	顶空固相萃取 HS-SPME
萜烯类 Terpenes						
A1	7.04	940	α -蒎烯 α -pinene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	1 711.06 \pm 82.19	284.23 \pm 11.99
A2	7.45	954	莜烯 Camphene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	458.39 \pm 20.24	101.58 \pm 10.07
A3	8.17	978	桉烯 Sabinene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	15.04 \pm 0.98	—
A4	8.23	980	β -蒎烯 β -pinene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	440.10 \pm 25.43	23.27 \pm 1.30
A5	8.64	994	月桂烯 Myrcene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	250.91 \pm 9.53	55.03 \pm 2.85
A6	9.84	1 033	柠檬烯 Limonene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	4 681.36 \pm 131.08	592.42 \pm 30.05
A7	10.67	1 061	罗勒烯 Ocimene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	21.61 \pm 0.44	—
A8	11.5	1 090	萜品油烯 Terpinolene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	245.03 \pm 14.52	44.37 \pm 2.29
A9	12.7	1 129	别罗勒烯 Alloocimene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	16.94 \pm 1.80	—
A10	18.47	1 337	δ -榄香烯 δ -elemene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	80.41 \pm 4.82	18.32 \pm 1.89
A11	18.77	1 349	α -葎澄茄油烯 α -cubebene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	214.38 \pm 9.95	60.81 \pm 2.77
A12	19.86	1 392	古巴烯 Copaene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	380.39 \pm 18.41	—
A13	20.67	1 424	反式石竹烯 <i>trans</i> -caryophyllene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	163.13 \pm 7.72	30.03 \pm 1.24
A14	21.55	1 459	(E)- β -金合欢烯 (E)- β -farnesene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	390.67 \pm 16.51	77.70 \pm 3.19
A15	22.05	1 480	δ -杜松烯 δ -cadinene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	814.25 \pm 34.24	155.33 \pm 2.27
A16	22.14	1 483	(+)- γ -杜松烯 (+)- γ -Cadinene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	75.76 \pm 6.41	13.74 \pm 0.60
A17	22.25	1 492	葎澄茄油烯 Cubebene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	717.41 \pm 29.19	90.77 \pm 1.19
A18	22.42	1 494	(-)- β -花柏烯 (-)- β -chamigrene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	33.37 \pm 1.4	27.10 \pm 1.36
A19	22.75	1 503	α -衣兰油烯 α -muurolene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	252.45 \pm 10.03	27.10 \pm 0.69
A20	23.31	1 512	β -愈创木烯 β -guaiene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	41.85 \pm 2.07	—
A21	31.36	1 998	异扁枝烯 Isophyllocladene	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}$	—	4.73 \pm 0.23
A22	32.85	2 105	松香-7,13-二烯 Abieta-7,13-diene	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}$	76.68 \pm 6.86	21.25 \pm 0.69
总和 Total					11 081.18 \pm 398.14	1607.43 \pm 34.14
醇类 Terpene alcohols						
B1	11.84	1 098	芳樟醇 Linalol	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	29.58 \pm 2.46	—
B2	13.84	1 170	冰片 Borneol	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	72.44 \pm 5.42	—
B3	14.14	1 181	(-)-4-萜品醇 (-)-4-Terpineol	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	182.94 \pm 11.92	—
B4	14.55	1 196	(+)- α -松油醇 (+)- α -terpineol	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	289.09 \pm 10.20	—
B5	15.55	1 228	R-(+)- β -香茅醇 (R)-(+)- β -citronellol	$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}$	287.18 \pm 8.79	—
B6	24.05	1 551	橙花叔醇 Nerolidol	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	41.91 \pm 5.38	—
B7	24.66	1 593	桉油烯醇 Spathulenol	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	227.57 \pm 11.2	—
B8	24.96	1 595	榄香醇 Elemol	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	20.23 \pm 1.44	11.64 \pm 1.04
B9	25.64	1 617	葎澄茄油烯醇 Cubenol	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	169.20 \pm 5.01	—
B10	25.89	1 632	T-衣兰油醇 T-muurolol	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	104.85 \pm 5.16	11.04 \pm 0.39
B11	26	1 639	香榧醇 Torreyol	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	310.20 \pm 9.14	—
B12	26.15	1 648	α -毕澄茄醇 α -cadinol	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	102.08 \pm 7.54	6.01 \pm 0.34
B13	30.72	1 937	维西醇 Victiol	$\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}$	25.43 \pm 3.23	13.36 \pm 0.47
B14	32.04	2 032	13-表迈诺醇 13-epimanol	$\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}$	86.52 \pm 4.23	—
B15	36.13	2 406	脱氢枞醇 Dehydroabietinol	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$	16.00 \pm 1.31	6.83 \pm 0.47
总和 Total					1 965.21 \pm 86.14	48.87 \pm 0.39

续表1 Continued

组分编码 No.	保留时间 Retention time/min	保留指数 Reteneion index	化合物 Compounds	分子式 Molecular formula	化合物含量 Compound content/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	
					水蒸气蒸馏法 SD	顶空固相微萃取 HS-SPME
萜烯酯类 Terpene esters						
C1	17. 16	1 289	乙酸冰片酯 Bornyl acetate	$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_2$	24. 91±1. 19	—
C2	18. 85	1 352	乙酸松油酯 Terpinyl acetate	$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_2$	24. 02±3. 19	—
C3	19. 2	1 366	乙酸香叶酯 Geranyl acetate	$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_2$	20. 71±2. 27	—
总和 Total					69. 65±6. 57	—
其他 Others						
D1	16. 4	1 261	胡椒酮 Piperitone	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$	29. 63±2. 12	—
D2	16. 7	1 272	二氯乙酸癸酯 Decyl dichloroacetate	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{O}_2$	61. 56±3. 00	—
D3	23. 14	1 503	抗氧剂 264 Butylated Hydroxytoluene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	128. 78±3. 51	6. 76±0. 60
D4	26. 44	1 665	2,6,10-三甲基十四烷 2,6,10-Trimethyltetradecane	$\text{C}_{17}\text{H}_{36}$	15. 03±0. 45	—
D5	30. 58	1 925	棕榈酸 Palmitic acid	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	45. 63±3. 39	—
D6	34. 13	2 218	9-顺式-视黄醛 9-cis-Retinal	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}$	19. 71±2. 56	12. 16±0. 39
D7	35. 52	2 348	(4R)-松香-7,13-二烯-18-醛 (4R)-Abieta-7,13-dien-18-al	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$	25. 37±1. 26	10. 51±0. 65
D8	36. 25	2 419	新松香醛 Neoabietal	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$	41. 41±3. 50	—
总和 Total					367. 11±12. 82	39. 43±0. 34

①：“—”未检出 Not detected.

2.4 种实生长发育过程中的假种皮挥发油动态变化

2.4.1 假种皮挥发性成分的测定 通过 SD-GC-MS 分析 5—9 月份的香榧假种皮样品挥发性成分可知(表 2),不同发育时期的香榧假种皮挥发性组分差异较大,在 5、6、7、8、9 月份化合物数量分别有

35、41、43、45、47 种。6 月份新增芳樟醇、乙酸冰片酯等 6 种化合物,7 月份新增 β -愈创木烯和冰片 2 种化合物,8 月份新增 2,6,10-三甲基十四烷和棕榈酸 2 种化合物,9 月份新增别罗烯和(-)- β -花柏烯 2 种化合物。

表 2 不同月份香榧假种皮挥发性组分

Tab.2 The components of the essential oil of *T. grandis* aril in different months

组分编码 No.	化合物 Compounds	化合物含量 Compound content/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)				
		5 月 May	6 月 June	7 月 July	8 月 August	9 月 September
萜烯类 Terpenes						
A1	α -蒎烯 α -pinene	1 347. 72±134. 63c	1 367. 83±46. 37c	1 508. 40±61c	2 013. 85±101. 72a	1 711. 06±82. 19b
A2	莜烯 Camphene	130. 46±8. 29d	152. 19±14. 32d	205. 97±6. 73c	252. 81±24. 23b	458. 39±20. 24a
A3	桉烯 Sabinene	93. 09±4. 72c	92. 55±6. 54c	126. 68±2. 16b	149. 90±12. 54a	15. 04±0. 98 d
A4	β -蒎烯 β -pinene	208. 43±13. 93c	218. 09±12. 48c	233. 48±4. 21c	279. 85±6. 47b	440. 10±25. 43a
A5	月桂烯 Myrcene	183. 37±10. 31d	201. 31±12. 52c	253. 93±9. 39b	310. 40±3. 00a	250. 91±9. 53b
A6	柠檬烯 Limonene	4 477. 46±200. 62ab	4 075. 81±210. 07c	4 304. 16±159. 14bc	4 398. 74±181. 71abc	4 681. 36±131. 08a
A7	罗勒烯 Ocimene	30. 46±4. 24cd	38. 82±3. 15bc	41. 31±6. 89b	56. 26±6. 61a	21. 61±0. 44d
A8	萜品油烯 Terpinolene	192. 64±6. 84b	209. 87±13. 90b	207. 98±23. 08b	237. 21±10. 25a	245. 03±14. 52a
A9	别罗勒烯 Alloocimene	—	—	—	—	16. 94±1. 80
A10	δ -榄香烯 δ -elemene	79. 58±2. 03b	83. 61±10. 52b	98. 41±5. 03a	97. 53±7. 81a	80. 41±4. 82b
A11	α -萜澄茄油烯 α -cubebene	130. 25±3. 45 d	149. 48±8. 58c	175. 44±11. 54b	184. 45±10. 61b	214. 38±9. 95a
A12	古巴烯 Copaene	203. 59±4. 39 d	217. 24±11. 85 d	252. 89±5. 83c	303. 44±13. 75b	380. 39±18. 41a

续表2 Continued

组分编码 No.	化合物 Compounds	化合物含量 Compound content/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)				
		5 月 May	6 月 June	7 月 July	8 月 August	9 月 September
A13	反式石竹烯 <i>trans</i> -caryophyllene	168.02±3.41bc	167.96±14.62bc	185.38±9.40 ab	190.76±14.40a	163.13±7.72c
A14	(E)- β -金合欢烯 (E)- β -farnesene	360.23±11.75c	408.62±19.08b	452.63±37.15a	466.24±17.98a	390.67±16.51bc
A15	δ -杜松烯 δ -cadinene	957.23±50.24b	1034.45±46.55b	1182.84±46.35a	1257.25±63.22a	814.25±34.24c
A16	(+)- γ -杜松烯 (+)- γ -cadinene	63.09±2.45c	63.76±5.17c	96.84±0.24a	97.13±10.18a	75.76±6.41b
A17	萜澄茄油烯 Cubebene	679.57±23.30c	781.92±38.60b	843.83±29.77a	871.46±31.27a	717.41±29.19b
A18	(-)- β -花柏烯 (-)- β -chamigrene	—	—	—	—	33.37±1.40
A19	α -衣兰油烯 α -muurolene	155.45±8.11c	152.81±9.34c	179.50±16.11b	183.05±12.82b	252.45±10.03a
A20	β -愈创木烯 β -guaiene	—	—	67.02±1.06a	47.05±1.53b	41.85±2.07c
A21	松香-7,13-二烯 Abieta-7,13-diene	155.67±21.53a	162.53±5.16a	114.84±6.28b	131.99±2.56b	76.68±6.86c
	总和 Total	9 616.33±461.57c	9 578.86±413.79c	10 531.53±402.29b	11 529.37±456.19a	11 081.18±398.14 ab
醇类 Terpene alcohols						
B1	芳樟醇 Linalol	—	14.02±3.08c	23.87±1.92b	25.93±0.80 ab	29.58±2.46a
B2	冰片 Borneol	—	—	31.36±4.61c	50.38±0.37b	72.44±5.42a
B3	(-)-4-萜品醇 (-)-4-terpineol	43.98±2.29 d	50.95±6.24 d	76.00±0.70c	95.04±2.26b	182.94±11.92a
B4	(+)- α -松油醇 (+)- α -terpineol	74.09±2.46 d	83.98±7.31 d	137.19±8.93c	180.94±3.88b	289.09±10.20a
B5	R-(+)- β -香茅醇 (R)-(+)- β -citronellol	33.43±1.63 e	68.20±4.30 d	162.56±9.23c	229.52±10.23b	287.18±8.79a
B6	橙花叔醇 Nerolidol	33.47±1.87c	34.48±4.42bc	38.22±2.35bc	46.12±5.02a	41.91±5.38 ab
B7	桉油烯醇 Spathulenol	174.36±4.92c	176.62±10.96c	193.38±10.89c	261.73±12.24a	227.57±11.20b
B8	榄香醇 Elemol	23.28±0.94 ab	22.33±4.32 ab	25.82±0.39a	23.04±0.71a	20.23±1.44b
B9	萜澄茄油烯醇 Cubenol	186.14±2.30b	167.80±8.99c	170.08±12.34bc	224.78±11.82a	169.20±5.01bc
B10	T-衣兰油醇 T-muurolol	111.36±4.06b	110.95±4.69b	110.78±2.35b	130.14±7.65a	104.85±5.16b
B11	香榧醇 Torreyol	356.46±10.57b	354.74±11.01b	392.33±26.89a	395.18±15.57a	310.20±9.14c
B12	α -毕澄茄醇 α -cadinol	95.27±3.27 ab	103.10±8.89a	99.36±2.17 ab	89.32±5.87b	102.08±7.54a
B13	维西醇 Victiol	87.68±5.40a	71.25±4.77b	67.05±5.10b	64.83±3.13b	25.43±3.23c
B14	13-表迈诺醇 13-epimanool	19.51±2.55b	18.37±1.70b	21.89±4.08b	16.31±0.37b	86.52±4.23a
B15	脱氢枞醇 Dehydroabietinol	16.55±3.00b	16.58±1.83b	14.91±0.43b	53.26±0.41a	16.00±1.31b
	总和 Total	1 255.58±32.74d	1 293.38±51.50d	1 564.79±75.51c	1 886.53±74.14b	1 965.21±86.14a
萜烯酯类 Terpene esters						
C1	乙酸冰片酯 Bornyl acetate	—	13.56±1.14c	14.91±0.43c	17.28±0.53b	24.91±1.19a
C2	乙酸松油酯 Terpinyl acetate	—	14.88±2.34b	22.90±2.93a	20.16±0.62a	24.02±3.19a
C3	乙酸香叶酯 Geranyl acetate	—	14.01±1.91b	20.87±2.64a	15.85±1.68b	20.71±2.27a
	总和 Total	—	42.44±5.32c	58.67±4.97b	53.30±2.52b	69.65±6.57a

续表2 Continued

组分编码 No.	化合物 Compounds	化合物含量 Compound content/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)				
		5 月 May	6 月 June	7 月 July	8 月 August	9 月 September
其他 Others						
D1	胡椒酮 Piperitone	—	12.25±1.10 d	37.30±5.74a	20.59±3.12c	29.63±2.12b
D2	二氯乙酸癸酯 Decyl dichloroacetate	—	20.54±1.70c	36.13±6.57b	24.48±0.76c	61.56±3.00a
D3	抗氧化剂 264 Butylated hydroxytoluene	132.52±4.42c	153.51±14.69b	307.01±5.34a	128.70±5.56c	128.78±3.51c
D4	2,6,10-三甲基十四烷 2,6,10-trimethyltetradecane	—	—	—	26.42±1.54a	15.03±0.45b
D5	棕榈酸 Palmitic acid	—	—	—	14.90±1.22b	45.63±3.39a
D6	9-顺式-视黄醛 9-cis-retinal	39.85±4.80b	58.52±1.81a	28.72±4.39c	22.12±2.29 d	19.71±2.56 d
D7	(4R)-松香-7,13-二烯-18-醛 (4R)-abieta-7,13-dien-18-al	56.06±11.30a	54.70±9.03a	37.74±1.01b	24.55±4.50c	25.37±1.26bc
D8	新松香醛 Neoabietal	109.68±5.86a	110.13±6.31a	62.24±8.49b	61.33±5.13b	41.41±3.50c
总和 Total		338.11±25.21 cd	409.65±25.49b	509.13±7.93a	323.08±12.09d	367.11±12.82c

2.4.2 假种皮挥发性组分的动态变化 不同月份的假种皮中挥发性组分会呈现一定的变化规律,其中蒎烯、 β -蒎烯等 7 种化合物的含量 5—9 月份均呈上升趋势(图 3A); α -蒎烯、桉烯等 9 种化合物的含量从 5 月份开始增加,到 8 月份达到最高值后开

始下降(图 3B 和 C)。除 6—7 月外,单萜类和倍半萜类含量的变化趋势相反;萜醇类化合物总含量自 5 月不断上升,而萜烯类化合物总含量则在 8 月达到顶峰后降低,总体呈现先平缓后升高再减少的趋势(图 3D)。

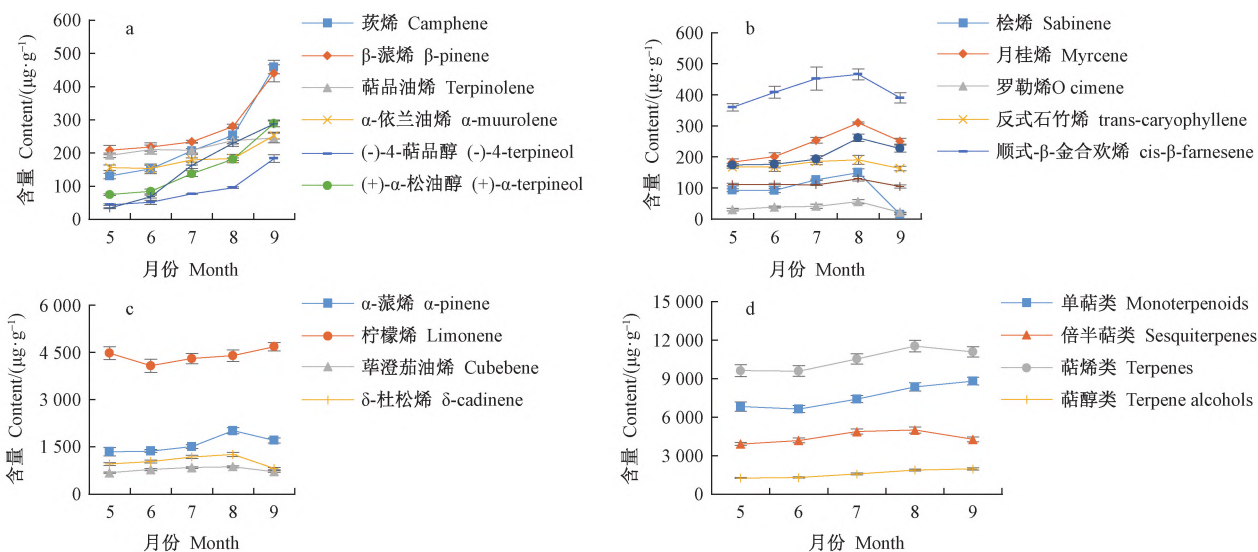


图 3 不同月份假种皮精油含量的动态变化

Fig. 3 Dynamic changes of essential oil content in arils in different months

2.4.3 假种皮挥发性化合物的主成分分析(PCA)

对 5 个月份假种皮的挥发性成分含量进行 PCA,模型自动拟合选择了 3 个主成分,累计贡献率 89.1%。由图 4 可知,样品均落在了 95%的置信区间内,5—9 月的假种皮精油组成有差异,且 5 月份和 6 月份、7 月份和 8 月份的假种皮精油组成比较相似,9 月份的假种皮精油与另外 4 个月份组成差

异较大。

2.4.4 假种皮挥发性化合物的正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)

在 PCA 基础上采用监督模式识别方法进行组间的 OPLS-DA,评价 OPLS-DA 模型的 3 个指标:模型拟合参数 $R^2X = 0.964$, $R^2Y = 0.989$,模型预测参数 $Q^2 = 0.952$,均大于 0.9。样品均落在了 95%的置信区间内,且 OPLS-DA 的分

类结果与 PCA 的分类结果一致(图 5A)。OPLS-DA 的载荷分布图(图 5B)可知,7 月份假种皮挥发性物质的特征性变量为抗氧化剂 264,其具有 7 月份假种

皮的最敏感判断能力;8 月份为(E)- β -金合欢烯和 δ 杜松烯;9 月份为别罗勒烯、(-)- β -花柏烯和 13-表迈诺醇。

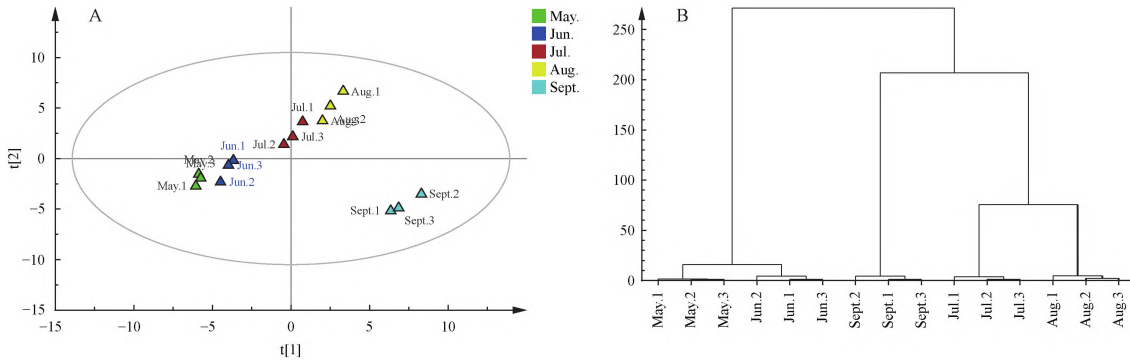


图 4 5 个月份假种皮挥发性化合物含量 PCA 得分图和 HCA 分析

Fig. 4 The PCA score graph and HCA analysis graph of the content of volatile compounds in arils at different growth stages
A: PCA 得分图 PCA score graph; B: HCA 分析图 HCA analysis graph. May: 5 月; Jun.: 6 月; June: 7 月 July; Aug.: 8 月 August; Sep: 9 月; September. 下同。The same below.

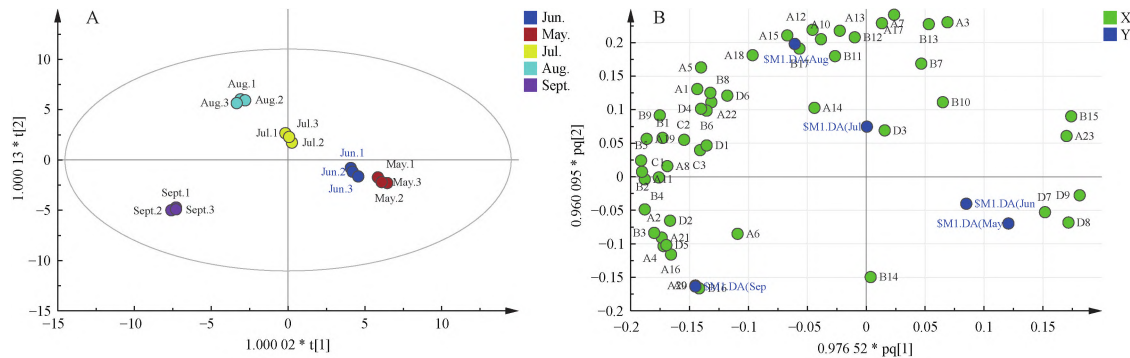


图 5 5 个月份假种皮挥发性物质含量 OPLS-DA 得分图和载荷

Fig. 5 OPLS-DA score graph and load graph and volatile matter content of aril in 5 months

A: OPLS-DA 得分图 OPLS-DA score graph; B: OPLS-DA 载荷图 OPLS-DA score graph.

3 讨论

3.1 SD 与 HS-SPME 的比较

本研究采用 SD 和 HS-SPME2 种方法并结合 GC-MS,分析了香榧假种皮的挥发性成分。SD-GC-MS 鉴定出了 47 种化合物,包含了 HS-SPME-GC-MS 所鉴定的所有 25 种组份。这表明 SD 与 HS-SPME 相比 SD 可测得的化合物种类更多,且含量更高,这与 SD 和 HS-SPME 的原理有关(Qi *et al.*, 2020; 陈菲等, 2014)。HS-SPME 样品用量比 SD 样品少、环境友好(余正文等, 2011; Shen *et al.*, 2014),但选择 SD 用于分析香榧假种皮的挥发油成分更加合适。

3.2 假种皮挥发性成分

采用 SD-GC-MS 鉴定的化合物包括萜烯类 21 种、萜醇类 15 种、萜烯酯类 3 种,其中富含柠檬烯、 α -蒎烯、 β -蒎烯、芳樟醇、冰片等成分,与李彪等(2017)用 GC-MS 分析出的香榧假种皮精油成分相

同,只是含量有所不同香榧假种皮中的挥发性化合物具有药用等功能,柠檬烯不仅具有抑菌、抗氧化等作用,可能对抗抑郁等也有作用; α -蒎烯用于香料,具有放松情绪等效果(孙旻恺等, 2020);芳樟醇具有抗菌和抗癌作用(Guo *et al.*, 2021);冰片具有止痛、防腐、抗炎、镇静、抗心肌缺血等作用。香榧假种皮中挥发油组成及含量丰富,在化妆品和药用等领域具有非常大的研发潜力(童晓青等, 2011)。

3.3 假种皮挥发性组分的变化

从不同发育时期香榧种实假种皮挥发油变化结果来看, α -蒎烯、月桂烯和反式石竹烯等化合物含量在 5—9 月份先上升后下降,与佛手精油的变化趋势相同(汤酿等, 2020),这些可能与种实成熟度、生长时期和温度有关。而 8 月份香榧假种皮中的挥发性物质含量最高可能与其是非呼吸跃变型果实有关(Chen *et al.*, 2019; 易官美等, 2013; 施要强等, 2020)。因此,后期在对香榧假种皮和其他野生榧

树假种皮可以结合种实及假种皮的资源利用需求, 开发利用时考虑不同时期组分含量变化(郭威等, 2017)。此外, 香榧种实在 5 月份进入膨大期, 此时假种皮中鉴定挥发性物质多为低沸点的萜类, 这期间由于降雨等原因会造成严重落果现象, 可以收集利用落果种实(黎章矩等, 2004)。

通过 PCA 和 OPLS-DA 的分析和参数表明, 建立的数学模型稳定且预测能力极强(黄紫炎等, 2019; 郝敏等, 2018), 可以避免单一或几种成分所造成的局限性。虽然一种成分的重要性不仅与它的活性有关, 还与它的治疗窗口有关, 但是建立其标志物是一切的前提。这些特征化合物给各发育时期假种皮带来了不同的生理活性意义, 对不同发育时期模型做出了很大贡献, 为香榧假种皮的质量控制和资源合理应用提供了参考(蓝振威等, 2020; 李园等, 2020)。

4 结论

1) 香榧假种皮挥发油的提取 SD 优于 HS-SPME 的吸附, 提取条件为料液比为 1:10、浸泡时间为 1 h、提取时间为 4 h。

2) 对香榧假种皮进行挥发油成分的 SD-GC-MS 定性与定量分析, 检测出 47 种化合物, 共 13 483. 14 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 主要成分为柠檬烯、 α -蒎烯等萜烯类化合物。

3) 不同种实生长发育期的香榧假种皮中挥发性组分差异较大, 化合物种类从 5 月份的 35 种增加到了 9 月份的 47 种, 倍半萜类和含氧衍生物积累增多, 挥发油成分的总含量从 5—9 月份先升后降。5—6 月、7—8 月的假种皮挥发油成分组成及含量比较接近, 而 9 月份与其他 4 个月份差异较大。

参 考 文 献

陈 菲, 王建美, 马 丽. 2014. 顶空进样法和水蒸汽蒸馏法提取佛手挥发性成分分析. 中医药导报, 20(8): 77-78.
 (Chen F, Wang J M, Ma L. 2014. Analysis of volatile components in bergamot collected by headspace sampling and steam distillation. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 20(8): 77-78. [in Chinese])
 郭 威, 王 亮, 周 倩, 等. 2017. 基于特征图谱的黄芩黄酮类成分固相萃取研究. 山东科学, 30(2): 13-19.
 (Guo W, Wang L, Zhou Q, et al. 2017. Solid phase extraction of flavonoids from radix scutellariae based on specific chromatogram. Shandong Science, 30(2): 13-19. [in Chinese])
 何凤平, 雷朝云, 范建新, 等. 2020. 水蒸气蒸馏法提取澳洲坚果叶精油工艺. 食品工业, 41(1): 176-180.
 (He F P, Lei C Y, Fan J X, et al. 2020. Hydrodistillation extraction

technology of the essential oil from macadamia internifolia leaves. The Food Industry, 41(1): 176-180. [in Chinese])
 郝 敏, 陆兔林, 毛春芹, 等. 2018. 3 种温郁金根茎炮制品的 UPLC 指纹图谱与多成分含量测定研究. 中国中药杂志, 43(11): 2288-2294.
 (He M, Lu T L, Mao C Q, et al. 2018. UPLC fingerprint and multi-components determination of three processed products of rhizome of *Curcuma wenyujin*. China Journal of Chinese Materia Medica, 43(11): 2288-2294. [in Chinese])
 黄紫炎, 沈钱能, 李 平, 等. 2019. 不同产地葛根饮片的 UPLC 指纹图谱结合多成分含量测定研究. 中国中药杂志, 44(10): 2051-2058.
 (Huang Z Y, Shen Q N, Li P, et al. 2019. Quality research of *Puerariae lobata* radix from different habitats with UPLC fingerprint and determination of multi-component content. China Journal of Chinese Materia Medica, 44(10): 2051-2058. [in Chinese])
 蓝振威, 季 德, 王淑美, 等. 2020. 电子鼻融合 BP 神经网络鉴别生、醋广西莪术及姜黄素类成分的含量预测. 中国中药杂志, 45(16): 3863-3870.
 (Lan Z W, Ji D, Wang S M, et al. 2020. Identification of curcumin content in raw and vinegar-processed rhizomes of *Curcuma kwangsiensis* based on electronic nose combined with back propagation neural network. China Journal of Chinese Materia Medica, 45(16): 3863-3870. [in Chinese])
 李 彪, 倪伟超, 倪 穗. 2017. 新鲜与干燥香榧假种皮精油成分及抑菌效果比较研究. 中国野生植物资源, 36(3): 14-17.
 (Li B, Ni W C, Ni S. 2017. Component analysis and comparison of inhibitory effect of essential oil from fresh and dried aril of *Torreya grandis*. Chinese Wild Plant Resources, 36(3): 14-17. [in Chinese])
 李 园, 李秀丽, 王 淑, 等. 2020. 不同淫羊藿羊脂油烘制品的 HPLC 指纹图谱建立、多元统计分析及烘制工艺优化. 中国药房, 31(12): 1480-1486.
 (Li Y, Li X L, Wang S, et al. 2020. Establishment of HPLC fingerprint, multivariate statistical analysis and processing technology of different suet oil-baked epimedium brevicornum. China Pharmacy, 31(12): 1480-1486. [in Chinese])
 黎章矩, 程晓建, 戴文圣, 等. 2005. 香榧品种起源考证. 浙江林学院学报, 22(4): 443-448.
 (Li Z J, Chen X J, Dai W S, et al. 2005. A research on the origin of the *Torreya grandis*. Journal of Zhejiang Forestry College, 22(4): 443-448. [in Chinese])
 黎章矩, 程晓建, 戴文圣, 等. 2004. 浙江香榧生产历史、现状与发展. 浙江林学院学报, 21(4): 113-116.
 (Li Z J, Chen X J, Dai W S, et al. 2004. The production history, current situation and development of *Torreya grandis* in Zhejiang. Journal of Zhejiang Forestry College, 21(4): 113-116. [in Chinese])
 刘文涵, 何晶晶, 滕渊洁. 2013. 顶空液液萃取-气相色谱-质谱法用于白术挥发性成分的分析. 分析化学, 41(8): 1226-1231.
 (Liu W H, He J J, Teng Y J. 2013. Analysis of volatile components of *Atractylodes macrocephaloidz* by headspace liquid phase-liquid-phase extraction coupled with gas chromatography-mass

- spectrometry. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 41 (8): 1226-1231. [in Chinese])
- 施要强, 张海朋, 刘翠华, 等. 2020. 不同发育时期莽山野柑果皮中挥发性物质代谢谱的变化. 华中农业大学学报, 39 (1): 34-43.
- (Shi Y Q, Zhang H P, Liu C H, et al. 2020. Changes in the metabolic spectrum of volatile substances in the pericarp of *Citrus nobilis* Lauriro. Journal of Huazhong Agricultural University, 39 (1): 34-43. [in Chinese])
- 孙旻恺, 金荷仙. 2020. 日本植物香气对人体健康影响研究进展. 世界林业研究, 33 (5): 108-112.
- (Sun W K, Jin H X. 2020. Research progress in the impact of plant aroma to human health in Japan. World Forestry Research, 33 (5): 108-112. [in Chinese])
- 汤 酿, 刘静宜, 陈小爱, 等. 2021. 基于 GC-MS 和 GC-IMS 联用法分析不同采收期广佛手精油挥发性成分. 食品科学, 42 (16): 193-202.
- (Tang N, Liu J Y, Chen X A, et al. 2021. Analysis of volatile components in essential oil of finger citron from Guangdong province at different picking times by GC-MS and GC-IMS. Food Science, 42(16): 193-202. [in Chinese])
- 童晓青, 许 琳, 刘本同, 等. 2011. 香榧假种皮精油提取工艺及 GC-MS 分析. 浙江林业科技, 31 (3): 11-14.
- (Tong X Q, Xu L, Liu B T, et al. 2011. Extraction technology and GC-MS analysis of essential oil from aril of *Torreya grandis* cv. Merrilli. Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology, 31 (3): 11-14. [in Chinese])
- 王贝贝. 2008. 香榧外种皮化学成分的提取研究. 南京: 南京林业大学.
- (Wang B B. 2008 Study on the chemical composition of the extractive from the episperm of *Torreya grandis*. Nanjing: Nanjing Forestry University. [in Chinese])
- 徐 萌, 张经纬, 吴令上, 等. 2016. HS-SPME-GC-MS 联用测定蜡梅属植物花的挥发性成分. 林业科学, 52 (12): 58-65.
- (Xu M, Zhang J W, Wu L S, et al. 2016. Determination of volatile components from chimonanthus flowers by HS-SPME-GC-MS. Scientia Silvae Sincae, 52 (12): 58-65. [in Chinese])
- 易官美, 邱迎君, 李晓花, 等. 2013. 榧树的地理分布与资源调查. 安徽农业科学, 41 (19): 8200-8202.
- (Yi G M, Qiu Y J, Li X H, et al. 2013. Geograpnic distribution and resource status of *Torreya grandis*. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 41 (19): 8200-8202. [in Chinese])
- 于勇杰, 张 晶, 戴智慧, 等. 2014. 不同方法提取香榧假种皮提取物成分的 GC-MS 分析. 核农学报, 28 (8): 1421-1429.
- (Yu Y J, Zhang J, Dai Z H, et al. 2014. Extraction of essential oil from *Torreya grandis* aril using different isolation method and identification of Its chemical compositions by GC-MS. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 28(8): 1421-1429. [in Chinese])
- 余正文, 王伯初, 杨占南, 等. 2011. 水蒸汽蒸馏法及顶空-固相微萃取法提取青蒿花挥发性成分比较分析. 光谱实验室, 28 (3): 1276-1279.
- (Yu Z W, Wang B C, Yang Z N, et al. 2011. Comparison for extraction of the volatile composition in *Artemisia Annu*a flowers by hydro-distillation and headspace solid-phase microextraction methods. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 28 (3): 1276-1279. [in Chinese])
- 张胜龙, 刘京晶, 楼雄珍, 等. 2015. 杉木抗压木木质部细胞形态特征及主要代谢成分表征. 北京林业大学学报, 37 (5): 126-133.
- (Zhang S L, Liu J J, Lou X Z, et al. 2015. Morphological characteristics of cells and main metabolic components in xylem of *Cunninghamia lanceolata* compression wood. Journal of Beijing Forestry University, 37 (5): 126-133. [in Chinese])
- Chen X W, Jin H B. 2019. A case study of enhancing sustainable intensification of Chinese *Torreya* forest in Zhuji of China. Environment and Natural Resources Research, 9(2): 53-60.
- Guo F Y, Liang Q, Zhang M, et al. 2021. Antibacterial activity and mechanism of linalool against *Shewanella putrefaciens*. Molecules, 26(1), 245.
- Kladniew B R, Castro M A, Crespo R, et al. 2020. Anti-cancer mechanisms of linalool and 1,8-cineole in non-small cell lung cancer A549 cells. Heliyon, 6(12): e05639.
- Qi H T, Ding S H, Pan Z P, et al. 2020. Characteristic volatile fingerprints and odor activity values in different citrus-tea by HS-GC-IMS and HS-SPME-GC-MS. Molecules, 25(24): 6027.
- Shen Q, Liu X B, Zhang X Q, et al. 2014. Chemical composition of essential oil from *Chimonanthus praecox* flower. Agricultural Science & Technology, 15 (13): 474-476.

(责任编辑 王艳娜)