

# 快速鑑別臺灣扁柏屬植物之新利器 —靜態頂空萃取分析

- ◎行政院農委會林業試驗所·陳盈如
- ◎國立臺灣大學實驗林管理處·鄭森松
- ◎國立臺灣大學森林環境暨資源學系·林群雅、張上鎮 (peter@ntu.edu.tw)

## 前言

植物的萜類化合物(terpenoids)是一個極古老的化學特徵，它在自然界的種類豐富多變，除了物種間的多樣性與其自身的多種異構體，更曾經由不同的化學作用使其結構產生變異。儘管在結構和功能上各不相同，但是卻都來自共同的生合成起始分子。由於萜類化合物在生合成起始途徑上的一致性、結構的多樣性以及植物界中分布的廣泛性，使得以萜類成分作為分類依據十分可行(Zhao and Luo 2007)。

而今，藉由氣相層析質譜儀(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)技術的進步，萜類化合物更容易進行定量與定性的化學差異比較，能提高物種間親緣關係鑑定的「靈敏度」，進而推導種與種、種與亞種以及雜交種之間的鑑別，使許多植物分類學上未知待解的謎團獲得有力的佐證。許多研究結果已證實，透過植物精油萜類化合物的組成分析，能夠順利區別「種(species)」以下階層之個體發育(ontogenetic)及品系變化，甚至監測季節性化學成分的改變(Paolini et al. 2010, Chen et al. 2011)經由GC-MS分析獲得的化學成分資料，再透過統計軟體的分析與繪圖，使得物種彼此間的親緣關係更容易區別。

筆者曾利用GC-MS分析臺灣不同地區的紅檜(*Chamaecyparis formosensis*)、臺灣扁柏(*C. obtusa* var. *formosana*)與日本扁柏(*C. obtusa*)等親緣關係相近之柏科植物葉子精油，成功利用其精油成分之差異性進行區隔，並

發現臺灣所生長的紅檜、臺灣扁柏以及日本扁柏的精油成分分別以  $\alpha$ -pinene、thujopsene 以及  $\alpha$ -terpinyl acetate 為其代表性化合物，同時更進一步發現臺灣扁柏有三種化學品系—thujopsene、 $\beta$ -elemol 及 *cis*-thujopsenal (Chen et al. 2011)。隨後，Lin 等人(2011)利用固相微萃取(solid-phase microextraction)技術分析此三樹種之葉子揮發成分，證實利用此簡便快速的方法不但能有效縮短萃取時間，並可根據樹種間揮發成分的特異性進行區別，然而因吸附纖維具選擇性吸附的特性，此分析方法未能如實反映精油組成的特性。相形之下，靜態頂空(static-headspace)萃取乃為一理想的前處理法，利用全自動化的進樣系統，不僅具有極佳的再現性，同時提高對低分子量與高揮發性化合物的分析靈敏度。

## 頂空萃取前處理法的優勢與應用

過去十年，頂空萃取技術已廣泛應用於食物與香料化學等領域之揮發成分檢測，其中包括植物油品質優劣/真偽之檢測、葡萄香氣檢測，做為葡萄酒品質管控之工具、以及茶葉品系與香味成分之鑑定等應用。一般而言，氣態樣品之分析大多受限於氣相層析儀注射口的樣品承載量(0.1 - 2.0 mL)，因此氣態樣品需要足夠的濃度方能獲得良好的分析效果。利用頂空技術，僅達百萬分之一(ppm)濃度之揮發物即可偵測並具有良好的再現性。而平衡溫度(equilibrium temperature)亦是影響萃取效率的重要關鍵，對於一些擴散

速率較慢的樣品(如油品)，利用提高平衡溫度(160~200°C)以加速揮發成分在樣品瓶中達到平衡，或延長平衡時間可獲得不錯的分析效果；相對地，對於單萜類與倍半萜類等易揮發的萜類化合物而言，頂空前處理正好提供一簡便、快速、低污染且準確可靠的萃取技術。

### 臺灣扁柏屬植物之快速化學鑑別與揮發成分特徵

藉由過去成功利用葉子精油進行扁柏屬植物分類的經驗，筆者嘗試以頂空萃取技術搭配氣相層析質譜儀進行紅檜、臺灣扁柏與日本扁柏葉子揮發成分之分析與鑑定，期以更快速且精確的方法鑑別三樹種，並且做為具潛力特殊精油成分之探勘工具。首先，我們分別秤取20毫克來自臺灣不同地區之紅檜、臺灣扁柏與日本扁柏新鮮葉子，接著分別以50°C、100°C與150°C之平衡溫度，以及30 min與50 min之平衡時間進行揮發成分之萃取，將不同試驗條件所得此揮發成分與該樣本之精油成分以皮爾森相關係數(Pearson's correlation analysis)進行檢定。試驗結果發現，以150°C平衡30 min之頂空萃取法獲得之各樣本揮發成分與其精油成分具有良好之相關( $r = 0.584 \sim 0.980$ ;  $p < 0.01 \sim 0.001$ )，顯示適當的頂空萃取條件可獲得與精油成分一致的特徵圖譜，並充分展現不同樹種精油之特色。

為更進一步瞭解頂空萃取法獲得之揮發成分是否可做為樹種鑑別之快速工具，我們利用上述最佳化之萃取條件分析不同來源的紅檜、臺灣扁柏與日本扁柏葉子揮發成分，並以統計方法之群團分析(cluster analysis)比較親緣相似度，結果如圖1所示，不同來源

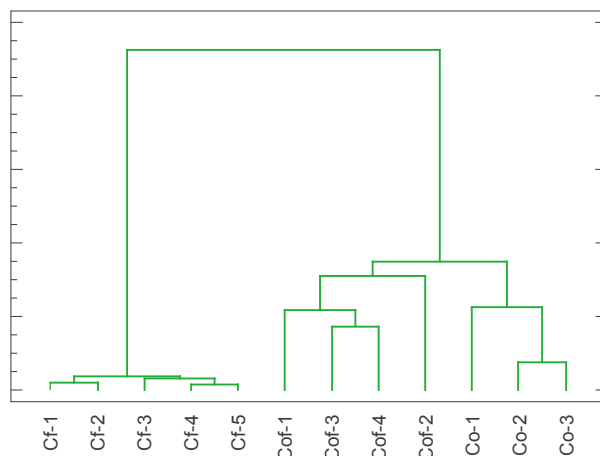


圖1 不同地理來源之紅檜、臺灣扁柏與日本扁柏葉子揮發成分經群團分析統計結果。Cf：紅檜；Cof：臺灣扁柏；Co：日本扁柏

地之試材依其揮發成分相似度，分別形成紅檜、臺灣扁柏與日本扁柏3個族群；臺灣扁柏與日本扁柏之相似度為25.12%，而紅檜與前二者之相似度僅4.01%。另根據主成分分析(principal component analysis)結果亦顯示，紅檜( $\alpha$ -pinene)、臺灣扁柏(thujopsene、*cis*-thujopsenal與 $\beta$ -elemol)與日本扁柏( $\alpha$ -terpinyl acetate、L-bornyl acetate、sabinene與limonene)分別根據其主要特徵成分而明顯區分為3個族群。此結果不僅與我們根據精油成分之化學分類法一致，同時也與過去形態學分類及分子親緣關係研究結果相呼應。

植物體內能合成的二次代謝產物種類非常多，它們常以植物鹼、精油，或色素分子如花青素的形式貯存在體內。各種分子都能以簡單的形式或形成複雜的聚合物含在植物的葉、花、果實、樹皮等不同部位中。這些產物不是細胞生長所必須的物質，但每一種植物在特定的環境條件下，具有製造特定化

表1 紅檜、臺灣扁柏與日本扁柏葉子之特徵成分

化合物	紅檜	臺灣扁柏	日本扁柏
主要特徵成分			
$\alpha$ -pinene	<sup>a</sup> △		
sabinene			△
limonene			△
L-bornyl acetate			△
$\alpha$ -terpinyl acetate			△
thujopsene		△	
cis-thujopsenal		△	
$\beta$ -elemol		△	
微量特徵成分			
$\beta$ -pinene	△		
$\gamma$ -terpinene			△
terpinolene			△
L-borneol			△
$\alpha$ -terpineol			△
isobornyl acetate			△
$\beta$ -cedrene		△	
thujopsadiene		△	
$\beta$ -chamigrene		△	
cuparene		△	

<sup>a</sup>△表示化合物為該樹種之特徵化合物且在不同樹種間具顯著性差異(Scheffé,  $P = 0.05$ )

學成分的特性，此特性是該種植物的生理生化特徵，也可能與其適應環境或演化過程有關，利用這些特徵化合物可做為釐清分類定位上的輔助證據(Stuessy 2009)。

由筆者的研究結果也發現，除上述的幾種主要代表性化合物之外，三樹種的許多微量成分亦有顯著性差異，整理如表1。這些化合物雖然常見於許多針葉樹精油中，然而許多成分的特殊分布趨勢已成為重要的指標化合物，例如：cedrene、chamigrene以及cuparene等成分經常與柏科(Cupressaceae)植物有關聯，而 $\beta$ -pinene與 $\gamma$ -terpinene則已被許

多研究證實與植物抵抗水分逆境有關。

萜類化合物的種類雖然多不勝數，但單萜類與二萜類主要都是經由methylerythritol phosphate(MEP)生成途徑所產生；而倍半萜類與三萜類等化合物則是經由mevalonic acid(MVA)生成途徑所產生。無論是何種生成途徑，皆是以isopentenyl diphosphate(IDP)為起始物，透過IDP異構酶(isomerase)產生dimethylallyl diphosphate (DMAPP)後，再經縮合反應與萜類合成酶(terpene synthase)催化形成不同之萜類化合物。例如：紅檜與日本扁柏之特徵化合物主要來自位在plastid胞器中

的MEP生合成途徑，IDP由糖分解的中間產物—pyruvate與glyceraldehyde 3-phosphate (G3P)經由1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate(DOXP)生合成途徑而產生，接著IDP與DMAPP進行縮合反應產生geranyl diphosphate(GDP)，最後透過萜類合成酶催化產生紅檜的特徵成分— $\alpha$ -pinene、 $\beta$ -pinene與日本扁柏的特徵成分—sabinene、limonene、 $\gamma$ -terpinene、terpinolene、L-borneol、 $\alpha$ -terpineol、L-bornyl acetate、isobornyl acetate、 $\alpha$ -terpinyl acetate等單萜類化合物；而臺灣扁柏的特徵化合物則主要來自位在cytosol的MVA生合成途徑，IDP是由acetyl-CoA的縮合反應及MVA生合成途徑所產生，2個IDP分子與DMAPP進行縮合反應產生farnesyl diphosphate(FDP)，再經萜類合成酶將FDP轉換為 $\beta$ -cedrene、thujopsene、thujopsadiene、 $\beta$ -chamigrene、cuparene、*cis*-thujopsenal、 $\beta$ -elemol等倍半萜類特徵化合物。

一些研究結果證實，倍半萜類與二萜類化合物在許多植物中扮演著植物防禦素(phytoalexins)的角色，它們和植物與環境/生物圈之間存在著錯綜複雜的交互關係，例如授粉傳播、間接防禦天敵等(Kumari et al. 2013)。而最新的研究結果更顯示，相較於主要成分，微量成分對於這些生物活性表現的調控更為重要(McCormick et al. 2014)。一般而言，植物會將養分能源用於促進生長，或用來產生特定的防禦成分，亦或二者同時進行，此可能會隨著物種、生理階段、年齡以及基因型等不同而改變(Burney and Jacobs 2013)。

萜類化合物是自然界組成最為複雜的二次代謝產物，同時也是長久以來植物與其生態演變關聯最廣為探討之化合物(Theis and

Lerdau 2003)。根據筆者野外觀察以及初步的試驗發現，紅檜與臺灣扁柏不僅生育地分布不同，水分使用效率亦有所差異。儘管學界至今關於非生物逆境對植物精油成分之影響尚未有定論，然而其特定成分相對含量顯著性的改變可視為一種防禦機制或環境適應的表現(Rebey et al. 2012)。因此紅檜、臺灣扁柏與日本扁柏三種植物彼此間具顯著性差異的特徵成分，以及這些化合物所代表的生合成路徑與樹種間的關聯是否具有隱含的特殊性意義，值得我們未來更進一步的深入探討。

## 結語

整體而言，頂空萃取是一項非常簡便、快速且精確的前處理技術，根據我們所設定的最佳化萃取條件搭配氣相層析質譜儀，不僅為植物化學分類法提供了一個高效率而準確的分析策略，同時也可做為快速檢測樹種特徵精油成分之工具，透過頂空萃取法取代傳統的水蒸餾法，可有效節省時間和成本，避免耗費大量試材及能源，能在符合環保的原則下，篩選具特殊精油成分與開發潛力的樹種；此外，對於許多可能具功能性的特殊成分在植物面對逆境或環境適應中所扮演的角色，乃至在演化過程中是否具特殊意義，亦值得我們後續進行更深入的追蹤研究。(感謝科技部計畫經費補助與林試所葉辰影小姐及研究室所有團隊夥伴。)

參考文獻：請逕洽作者