

The Preliminary Study on the Extraction and Function of Volatile Oil from *Ledum palustre* L.

Yunfei Zhang, Huizhu Fan, Huaying Yang, Danni Wang, Tong Wang, Ruijian Wang*, Jinling Wang*

Forestry College of Beihua University, Jilin
Email: wrjww@163.com, wjlbhdx@qq.com

Received: Mar. 11th, 2019; accepted: Mar. 22nd, 2019; published: Mar. 29th, 2019

Abstract

Using steam distillation method, the volatile oil was extracted from *Ledum palustre* L., its chemical compositions were analyzed by GC-MS. Finally, the antioxidant activity was detected by DPPH scavenging method, and the antibacterial activity was examined using antibacterial ring and MIC method. Results: 32 chemical constituents were identified from *Ledum palustre* L. volatile oil of *Ledum palustre* L., including beta-Phellandrene (43.55%), 4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-Cyclohexen-1-ol (11.86%), and so on. Antioxidant activity of the volatile oil was approximately 4.16 times of Vc. The volatile oil has inhibitory activity to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. Conclusion: The volatile oil is abundant in *Ledum palustre* L., and has stronger antioxidant and antimicrobial activity. *Ledum palustre* L. volatile oil can be used as a source of natural antioxidant and bacteriostat.

Keywords

Ledum palustre L., Volatile Oil, GC-MS, Antioxidant Activity, Antibacterial Activity

长白山杜香挥发油提取及功能初步研究

张云飞, 范慧珠, 杨华英, 王丹妮, 王彤, 王瑞俭*, 王金玲*

北华大学林学院, 吉林
Email: wrjww@163.com, wjlbhdx@qq.com

收稿日期: 2019年3月11日; 录用日期: 2019年3月22日; 发布日期: 2019年3月29日

*通讯作者。

文章引用: 张云飞, 范慧珠, 杨华英, 王丹妮, 王彤, 王瑞俭, 王金玲. 长白山杜香挥发油提取及功能初步研究[J]. 自然科学, 2019, 7(3): 81-87. DOI: 10.12677/ojns.2019.73013

摘要

本文以长白山宽叶杜香为研究对象,采用水蒸气蒸馏法提取杜香挥发油,利用GC-MS分析挥发油化学组成,并对其抗氧化活性及抑菌活性进行分析。结果:从长白山杜香挥发油中鉴定出32种化学成分,主要成份为 β -水芹烯(43.55%),萜烯醇(11.86%)等,杜香挥发油抗氧化活性为Vc的4.16倍,并对大肠杆菌、金黄葡萄杆菌及枯草芽孢杆菌均具有抑菌作用。结论:杜香中挥发油含量较高,有较强的抗氧化及抑菌活性,可作为天然抗氧化剂和抑菌剂来源。

关键词

长白山杜香, 挥发油, GC-MS分析, 抗氧化, 抑菌

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

杜香(*Ledum palustre* L.)是杜鹃花科(Ericaceae)杜香属(*Ledum linn*)常绿灌木,植株全株富有芳香气味。在世界各地分布着10种杜香属植物,其中大多数生长在北半球的寒温带和温带等地方[1],如欧洲的中部、北部,美洲和亚洲北部[2],在我国主要分布于吉林长白山地区[3]和大、小兴安岭,生长在湿润的苔藓地、洼地等地区。日本、朝鲜、北欧和西伯利亚等地分布也比较丰富[4]。在我国有1种杜香属植物和杜香的两种变型,分别为杜香(*Ledum palustre* L. *palustre*, 又叫狭叶杜香、细叶杜香、绊脚丝)、小叶杜香(*Ledum palustre* L. var. *decumbens* Ait)和宽叶杜香(*Ledum palustre* L. var. *dilatatum* Wahl) [5]。杜香是我国传统药材,具有止咳、平喘、抑菌、止痒等药用价值,杜香的枝叶中可提取出挥发性的芳香油[6],且有芳香价值。挥发油不仅具有药用价值,还可作为日用香皂、香精和洗发水等原料。当前对杜香挥发油研究较多,不同产地、不同部位、不同生长阶段杜香挥发油成分差异较大[5]。对于杜香挥发油功能研究较少,仅见早期对大兴安岭杜香的抑菌功能进行研究[6]。长白山有以宽叶杜香为主的丰富野生杜香资源,该资源尚未得到开发利用。本文利用水蒸气法提取长白山杜香挥发油,经GC-MS分析其化学组成,采用DPPH清除、抑菌圈、最低抑菌浓度等对杜香挥发油的抗氧化性及抑菌性进行评价,为长白山杜香资源开发提供参考。

2. 材料与实验步骤

2.1. 仪器设备与实验材料

2.1.1. 实验材料

无水 Na_2SO_4 、正己烷、无水乙醇、Vc、DMF(N,N-二甲基甲酰胺)、氯化钠等均为分析纯试剂;DPPH、卡那青霉素、蛋白胨、酵母粉、氯化钠、琼脂粉等均为生化试剂。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus Subtill*)为本课题组保存菌种。

2.1.2. 仪器

10 L 挥发油提取器、电子调温电热套、离心机、GC-MS (安捷伦 6890N/5973I)、恒温振荡培养箱、生化培养箱、MF6 显微细胞分析联用仪(杭州迅数)、手持式 OD 扫描仪(Buglab OD Scanner)、紫外-可见分光光度计、超声波清洗器、电子分析天平等。

2.2. 实验步骤

2.2.1. 样品采集

七月初, 在杜香生长旺盛期, 采集杜香地上部分, 于 4℃低温箱(加冰袋)中保存, 2 天内趁新鲜提取挥发油。

2.2.2. 杜香挥发油的提取

将新鲜的杜香地上部分切成 0.5~1.0 cm 小段, 与蒸馏水以 1:6 (W/V)的比例, 加热回流。将提取的挥发油于 12,000 rpm 离心, 去除下层水分, 加入无水 Na₂SO₄脱水 12 h, 过滤后得到杜香挥发油。计算得率并测定杜香挥发油密度。

2.2.3. 挥发油的成分分析

分析仪器为安捷伦 5973I/6890N GC-MS 系统, 分析条件: DB-1 毛细管柱(30 × 0.25 × 0.25), 进样口 T = 250℃, 分流比 20:1, 流速 1.0 mL/min, 柱温: 60℃, 1 min; 程序升温 8℃/min 至 240℃, 保持 10 min。EI 电离源, 全扫描方式, 扫描范围 m/z = 35~500, 溶剂延迟 5.0 min。

2.2.4. 挥发油抗氧化活性分析

取 DPPH 溶液(1 mg/mL) 2 mL 加入到 5 mL 离心管中, 依次加入杜香挥发油和无水乙醇, 使杜香挥发油和无水乙醇总体积为 500 μL, 充分混合, 密闭避光静置 30 min 后, 以无水乙醇为空白, 测定 519 nm 处吸光值。以 Vc (1 mg/mL)为阳性对照同种方法测定。每组设 3 个平行实验。计算 DPPH 相对清除率(%), 绘制相对清除率曲线。

按下列公式计算 DPPH 清除率:

$$\text{Inhibition\%} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%, \text{ 其中 } A_0 \text{ 为未加样品的 DPPH 溶液吸光值, } A \text{ 为样品吸光值。}$$

依据杜香挥发油及 Vc 标准液的线性方程可以求得 DPPH 自由基的半清除率(IC₅₀), Vc 与样本的 IC₅₀ 比值为挥发油的相对抗氧化活性。

2.2.5. 挥发油抑菌活性分析

分别用抑菌圈和最低抑菌浓度(平板法), 对杜香挥发油的大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌等抑菌活性进行分析。每组设 3 个平行实验。

1) 抑菌圈实验

将杜香挥发油用 DMF 稀释为不同浓度梯度, 滴在灭菌滤纸片中, 平放于含三种菌的固体培养基上, 于 37℃倒置恒温培养。用含 DMF 及卡那青霉素(5 mg/mL)的滤纸片为空白及阳性对照。用 MF 显微细胞分析仪测量抑菌圈及滤纸片直径, 并计算抑菌圈大小, 对杜香挥发油抑菌效果进行评价。

2) 最低抑菌浓度测定

将不同浓度的杜香挥发油加入 LB 固体培养基中, 在固体培养基上涂布三种细菌, 于 37℃倒置恒温培养。当菌不在生长时, 所对应的挥发油浓度即为其最低抑菌浓度。

3. 结果与讨论

3.1. 结果与分析

3.1.1. 杜香挥发油提取

挥发油提取方法较多, 如溶剂提取、CO₂ 超临界萃取法等, 本文中采用经典的水蒸气蒸馏法。该方法提取的杜香挥发油得率为 1.5%, 挥发油呈无色至浅黄色, 为澄清透明液体, 挥发性成分含量高。提取的长白山杜香挥发油有强烈的松油味、木香味, 密度为 0.88 mg/mL。

3.1.2. 杜香挥发油 GC-MS 分析

对杜香挥发油进行 GC-MS 分析, 杜香挥发油成分鉴定结果见表 1。从长白山杜香挥发油中鉴定出 32 种化学成分, 其中含量较高的组分为 β -水芹烯(43.55%), 萜烯醇(11.86%), 3,5,6,7,8,8a-六氢-4,8a-二甲基-6-(1-甲基乙基)-2-(1H)萘酚(6.91%), γ -松油烯(5.34%), 5-异丙基-二环[3.1.0]-己 3-烯-2-酮(4.73%), (+)-4-萜烯(4.09%), 螺[2.4]庚-4,6-二烯(3.99%), 桃金娘烯醛(2.45%), 4-异丙基苯甲醛(2.07%), 对伞花烃(2.05%), 桃金娘烯醇(1.64%), 异松油烯(1.22%)等。

Table 1. GC-MS analysis of the volatile oil from *Ledum palustre*

表 1. 杜香挥发油成分的 GC-MS 分析

序号	保留时间	组分	面积%
1	4.328	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-didehydro deriv	4-甲基-1-(1-甲基乙基)二环[3.1.0]-2-己烯 0.88
2	4.434	alpha-Pinene	α -蒎烯 0.42
3	4.557	(1-nitropropyl)-Benzene	1-硝基丙基苯 0.10
4	4.963	beta-Phellandrene	β -水芹烯 43.55
5	5.087	beta-Myrcene	β -月桂烯 0.26
6	5.31	alpha-Phellandrene	α -水芹烯 0.32
7	5.469	(+)-4-Carene	萜烯 4.09
8	5.569	1-methyl-4-(1-methylethyl)-Benzene	对伞花烃 2.05
9	5.639	2-Thujene	2-侧柏烯 0.55
10	5.681	(E)-1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-	罗勒烯 0.61
11	5.822	(Z)-1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-	罗勒烯异构体 0.22
12	6.01	1-methyl-4-(1-methylethyl)-1,4-Cyclohexadiene	γ -松油烯 5.34
13	6.116	cis-beta-Terpineol,	松油醇 0.16
14	6.386	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-	异松油烯 1.22
15	6.516	cis-1-methyl-4-(1-methylethyl)-2-Cyclohexen-1-ol	顺式-1-甲基-4-(1-甲基乙基)-2-环己烯-1-醇 0.20
16	6.804	5-(1-methylethyl)-Bicyclo[3.1.0]hex-3-en-2-one	5-异丙基-二环[3.1.0]-己 3-烯-2-酮 4.73
17	7.292	(1R,5S)-sabina ketone	桉酮 1.36
18	7.569	4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-Cyclohexen-1-ol	萜烯醇 11.86
19	7.633	(1R)-(-)-Myrtenal	桃金娘烯醛 2.45
20	7.704	6,6-dimethyl-Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene-2-methanol	桃金娘烯醇 1.64
21	8.051	3-(1-methylethyl)-Phenol	3-(1-甲基乙基)苯酚 0.29
22	8.304	Benzaldehyde, 4-(1-methylethyl)-	4-异丙基苯甲醛 2.07
23	8.875	Spiro[2.4]hepta-4,6-diene	螺[2.4]庚-4,6-二烯 3.99

Continued

24	9.298	4-(1-methylethyl)-1,4-Cyclohexadiene-1-methanol	1-甲基-4-(1-甲基乙基)-1,4-环己二烯	0.51
25	9.833	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-acetate	乙酸牻牛儿酯	0.32
26	10.304	α -Gurjunene	α -古芸烯	0.60
27	10.875	Alloaromadendren	香树烯	0.75
28	11.021	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	十四甲基环庚硅氧烷	0.50
29	12.222	(+)- γ -Gurjunene	(+)- γ -古芸烯	0.00
30	12.339	Ledol	杜香醇	0.96
31	13.651	8,9-epoxy-Neoisolongifolene	8,9-环氧新异长叶烯	0.56
32	13.833	3,5,6,7,8,8a-hexahydro-4,8a-dimethyl-6-(1-methylethyl)-2(1H)Naphthalenone	3,5,6,7,8,8a-六氢-4,8a-二甲基-6-(1-甲基乙基)-2(1H)萘酮	7.45

3.1.3. 杜香挥发油的抗氧化活性

根据预实验结果中杜香挥发油及 Vc 清除 DPPH 自由基的最大用量, 设置杜香挥发油及 Vc 的浓度梯度。以杜香挥发油浓度为横坐标, 以平均相对清除率为纵坐标, 绘制杜香挥发油相对清除率曲线, 如图 1 所示, 平均清除率在加入量低时呈急速上升状态, 在杜香挥发油所加入量接近最大用量后增加趋势逐渐趋于平稳。杜香挥发油及 Vc 的 IC_{50} 值分别为 14.08 mg/mL 和 58.63 mg/mL。杜香挥发油的抗氧化活性是 Vc 的 4.16 倍。

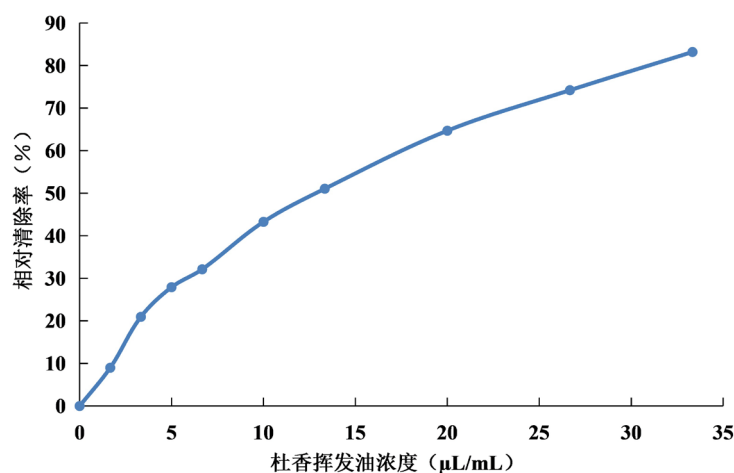


Figure 1. DPPH scavenging curve of volatile oil from *Ledum palustre*

图 1. 杜香挥发油的 DPPH 清除曲线

3.1.4. 杜香挥发油的抑菌活性

根据抑菌圈的大小可以判断杜香挥发油的抑菌能力, 杜香挥发油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的抑制作用见图 2。结果显示, 杜香挥发油对三种菌的抑制作用随浓度的增加而增强, 高浓度挥发油对金黄色葡萄球菌抑制效果最好, 对大肠杆菌作用最差。枯草杆菌对挥发油较为敏感, 在低浓度时就有较好的抑制作用, 高浓度(100%)时抑制作用反而下降。

杜香挥发油的最低抑菌浓度实验结果显示, 三种菌的最低抑菌浓度由低到高依次为大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌(表 2), 即对大肠杆菌抑制作用最强, 对枯草杆菌抑制作用最弱。这一结果与抑菌圈结果有较大差异。我们分析可能是该实验加入挥发油量过高, 在培养基不能完全溶解而导致产生较大差异。

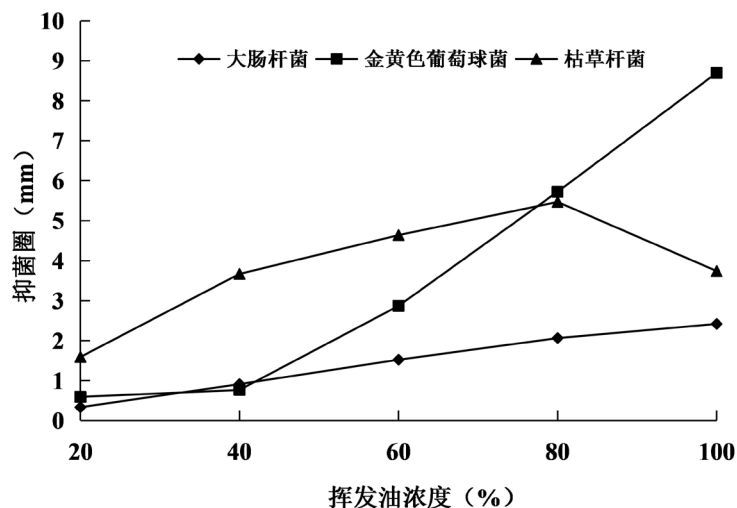


Figure 2. Bacteriostasis of volatile oil from *Ledum palustre*
图 2. 杜香挥发油的抑菌作用

Table 2. The lowest bacteriostatic concentration of volatile oil from *Ledum palustre*
表 2. 杜香挥发油的最低抑菌浓度

菌种	最低抑菌浓度
大肠杆菌	1.26 mg/mL
金黄色葡萄球菌	1.52 mg/mL
枯草芽孢杆菌	2.53 mg/mL

3.2. 讨论

本实验采用水蒸气蒸馏法提取杜香叶中挥发油,并对其进行 GC-MS 分析,确定其中 32 种化学成分,含量较高的组分有 β -水芹烯(43.55%),萜烯醇(11.86%)等,但与王炎[7],尤莉艳[8]等文中的杜香挥发油的成分及含量有较大差异。通过对欧洲细叶杜香挥发油成分进行分析[9] [10] [11],与亚洲杜香成分及含量也不尽相同。可能由于采集的杜香产地不同,杜香生长的环境不同,提取杜香植株的部位不同,使杜香挥发油的成分及含量差别较大。

实验结果表明,长白山杜香挥发油有较强的抗氧化活性,为 Vc 的 4 倍以上。缪成贵等[12]采用 DPPH 法测定了四大名菊的抗氧化性,其中抗氧化效果最好的是滁菊,其 IC_{50} 值是 139.59 μ L/mL,而杜香挥发油的 IC_{50} 值为 15.93 μ L/mL,因此杜香挥发油是良好的天然抗氧化剂。

本文选择大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及枯草芽孢杆菌三种常见致病菌,检测挥发油抑菌能力。证实杜香挥发油对三种菌均有一定抑菌效果。江佩芬等考察了杜香挥发油对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的有效剂量分别为 5×10^{-3} ml/mL 和 1×10^{-3} ml/mL [6],即杜香挥发油对金黄色葡萄球菌的抑制作用较大肠杆菌高。这一结果与本文抑菌圈法实验结果相近。

4. 结论

采用水蒸汽蒸馏法提取杜香中挥发油,含量约 1.5%,其中萜烯醇、松油醇、松油烯等可能是其具有松香味的主要原因。杜香挥发油有很强的抗氧化活性,对常见细菌也有一定的抑制作用,是良好的天然抗氧化剂和抑菌剂的来源。本文研究成果为长白山区野生杜香资源的科学利用提供参考。

基金项目

吉林省大学生创新创业训练计划项目(201610201094), 吉林省科技发展计划项目(20180201006NY)。

参考文献

- [1] 赵子峰, 沙伟, 赵子云. 我国的杜香属植物及杜香属植物的应用[J]. 生物学教学, 2006, 31(4): 8-10.
- [2] Glenn, S.D. (2001) The Rediscovery of *Ledum groenlandicum* Oeder (Ericaceae) in New Jersey. *Journal of the Torrey, Botanical Society*, **128**, 407-408.
- [3] 赵子峰, 沙伟, 赵子云. 我国的杜香属植物及杜香属植物的应用[J]. 生物学教学, 2006, 31(4): 8-9.
- [4] 马雪梅. 资源植物杜香的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(6): 2949-2950.
- [5] 姜玮, 刘静波, 卢静, 等. 杜香挥发油研究概述[J]. 食品科学, 2010, 13(3): 337-341.
- [6] 江佩芬, 刘建国, 周勇, 等. 杜香植物资源开发利用的基础研究——II. 杜香油抗真菌及细菌作用的实验研究[J]. 天然产物研究与开发, 1993(1): 39-43.
- [7] 王炎, 赵敏. 大兴安岭地区细叶杜香挥发性成分的研究[J]. 色谱, 2003(6): 631.
- [8] 尤莉艳, 杨婷, 姜辉, 等. 杜香挥发油提取工艺研究及成分 GC-MS 分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(10): 1-3.
- [9] Ahmoud, A.A. and Ahmed, A.A. (2006) α -Pinene-Type Monoterpenes and Other Constituents from *Artemisia suksdorfii*. *Phytochemistry*, **67**, 2103-2109. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.06.013>
- [10] Belousova, N.V., Khan, V.A. and Berezovskaya, T.P. (1990) Intraspecies Chemical Variability of the Essential Oil of *Ledum palustre*. *Chemistry of Natural Compounds*, **26**, 398-405. <https://doi.org/10.1007/BF00598991>
- [11] Gretsusnikova, T., Jarvan, K., Orav, A., et al. (2010) Comparative Analysis of the Composition of the Essential Oil from the Shoots, Leaves and Stems the Wild *Ledum palustre* L. from Estonia. *Procedia Chemistry*, **2**, 168-173. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2009.12.024>
- [12] 缪成贵, 陈庆榆, 何华奇. 采用 DPPH 法测定四大药用名菊抗氧化活性[J]. 安徽科技学院学报, 2012, 26(4): 39-42.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2330-1724, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: ojs@hanspub.org