

野生白苏子中挥发油的研究

蒋翔*, 曹恒, 刘湘博, 田光辉

(陕西理工学院化学学院, 陕西 汉中 723000)

[摘要] **目的:**提取野生白苏子中的挥发油,确定其挥发油中的组分,探讨其生物活性,为开发利用这一资源提供理论依据。**方法:**用水蒸气蒸馏法从白苏子中提取挥发油,用气相色谱-质谱联用技术对挥发油组分进行分离和结构确定,对白苏子挥发油进行抗氧化试验和抗菌试验。**结果:**从白苏子挥发油中鉴定出 56 个组分,占全油的 92.77%,白苏子挥发油有显地地抗氧化活性和抗菌活性。**结论:**白苏子挥发油中主要以单萜和倍半萜为主,含量较高的组分是紫苏酮 10.32%,异白苏烯酮 9.73%,丁香烯 7.69%, α -里哪醇 6.32%,瓜菊酮 5.28%等。白苏子挥发油对 $\cdot\text{OH}$ 有明显的清除作用,白苏子挥发油对实验菌株均有明显的抑制和灭活作用,特别是对金黄色葡萄球菌 CMCC26112 株和白色假丝酵母菌 CMCC850216 株的作用表现得更为显著。

[关键词] 白苏子;挥发油;气相色谱-质谱;抗氧化活性;抗菌活性

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)11-0056-05

Study on Essential Oil Obtained from Seed of Herbal *Perilla frutescens*

JIANG Xiang*, CAO Heng, LIU Xiang-bo, TIAN Guang-hui

(School of Chemistry, Shaaxi University of Technology, Hanzhong 723000, China)

[Abstract] **Objective:** The essential oil was extracted from the seed of wild *Perilla frutescens*, and the constituent was analyzed to provide scientific proof for the search of biological activity compositions from *P. frutescens* to empolder the natural resource. **Method:** The essential oil from the seed of wild *P. frutescens* was extracted by steam distillation, and the components of the essential oil were separated and structurally identified by gas chromatography-mass spectrometry. The essential oil was investigated by anti-oxidation activities and antimicrobial activities. **Result:** Fifty-six components were identified and accounted for 92.77% of the all peak area. The essential oil had anti-oxidation activity and antimicrobial activity. **Conclusion:** The main chemical constituents of the essential oil were monoterpenoids and sesquiterpenoids compounds. The major components were perillaketone (10.32%), isoegomaketone (9.73%), caryophyllene (7.96%), α -linalool (6.32%), cinerone (5.28%). The essential oil had obvious anti-oxidation activities for scavenging of $\cdot\text{OH}$, killed and inhibited the growth of testing bacteria, especially against *Staphylococcus aureus* CMCC26112 and *Candida albicans* CMCC850216.

[Key words] *Perilla frutescens*; the essential oil; gas chromatography-mass spectrometry; anti-oxidation activity; antimicrobial activity

白苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 是唇形科紫苏

属中的一种一年生草本植物,又称为赤苏、紫苏、苏叶等,是民间常用的中草药,全草均可入药,其性温、味辛,归肺、脾、胃经,具有解毒,散寒,行气和胃等功效,用于风寒感冒,咳嗽,呕恶,妊娠呕吐,解鱼蟹虫毒等。嫩尖也可当茶用,有清热解毒之功效。白苏的分布极为广泛,资源丰富,是我国传统的药食两用

[收稿日期] 20100428(001)

[基金项目] 陕西省教育厅专项科研项目(04JK137)

[通讯作者] * 蒋翔,主要从事天然产物开发利用研究, E-mail: jiang_xiang2007@126.com, Tel:13209257763

植物之一,在白苏中挥发油含量丰富且具有抗菌活性^[1],已经从新鲜的白苏叶子和全草提取出了挥发油,并利用多种方法对其化学组分进行了细致的分析^[2-3],对白苏叶、茎中的挥发油化学成分已经过气相色谱-质谱法分析^[4],从白苏叶的挥发油中鉴定出了多种生物活性成分,但对白苏子的研究报道尚少,这里主要是对秦巴山区野生的白苏子通过水蒸气蒸馏法提取挥发油,用气相色谱-质谱法对白苏子挥发油进行组分分离和结构确定,并对白苏子挥发油进行抗氧化试验和抗菌试验研究,探讨白苏子挥发油的生物活性,为充分利用白苏植物这一野生资源提供一些有益参考。

1 材料

1.1 药材 白苏子于 2009 年 10 月中旬收集于陕西南部的秦巴山区,经本院赵桦教授鉴定确认为是白苏 *P. frutescens* (L.) Britt 的籽。MH 肉汤,肉汤培养基,普通琼脂平板培养基。活性试验所用标准菌株冻干品购自中国预防医学科学院中国药品生物制品检定所中国医学细菌保藏中心。

1.2 试剂 无水硫酸钠(分析纯,天津化学试剂厂),乙醚和氯化钠、邻二氮菲、硫酸亚铁、过氧化氢、磷酸氢钠(含结晶水)、磷酸二氢钠(含结晶水)等(分析纯,西安化学试剂厂),水为蒸馏水。150 mmol·L⁻¹的 pH 为 7.4 的 PBS 溶液的配置,准确称取磷酸氢钠 7.164 g 和磷酸二氢钠 3.121 g 定容于 100 mL 量瓶中,分别吸取磷酸氢钠溶液 81.0 mL 和磷酸二氢钠溶液 19.0 mL,定容于 150 mL 的量瓶中。

1.3 仪器 GC/MS 仪(Finnigan-Trace DSQ 型 GC/MS 仪,美国热电公司),7550 紫外-可见分光光度计(上海分析仪器厂),水蒸气蒸馏装置,96 孔培养板,普通培养箱。

2 方法

2.1 挥发油的提取 准确称取新鲜白苏子 100 g,捣碎成泥浆状,采用水蒸气蒸馏法提取挥发油 8 h^[5],馏出液经 NaCl 饱和后用乙醚萃取 3 次,萃取液用无水硫酸钠干燥过夜,蒸馏回收乙醚后得到一种有清香气味的淡黄色挥发油 1.7 g,得油率为 1.7%,密封,0 °C 下保存备用。

2.2 GC/MS 工作条件 Finnigan-Trace DSQ 型 GC/MS 仪,色谱柱型号 DB-5MS (0.25 mm × 30 m, 0.25 μm),载气为 He 气,柱温 40 °C ~ 250 °C;初始

温度为 40 °C,保持 1 min,以 8 °C·min⁻¹程序升温,升至 200 °C 并保持 2 min 后;再以 10 °C·min⁻¹程序升温,升至 250 °C 并保持 2 min;进样口温度为 250 °C,衡流模式流量为 1 mL·min⁻¹,进样量为 0.5 μL,分流比为 30:1,色质界面温度为 250 °C。质谱条件 EI 离子源,电离能量 70 eV,离子源温度 250 °C,倍增器电压 980 V,扫描范围 45 ~ 550 质量单位,扫描模式全扫描。

2.3 定性和定量方法 各色谱峰对应的质谱图经联用仪的计算机谱库检索进行定性,质谱库为 NIST 库(Library version 2.0),相似度(SI)均为 85% 以上,再经过核对质谱图,结合质核比确定物质的分子结构。各组分的相对含量是根据总离子流图由计算机采用峰面积归一化法计算来进行确定。

2.4 清除·OH 作用的方法 将白苏子挥发油配成 2 g·L⁻¹的溶液,体外抗氧化试验采用 H₂O₂/Fe²⁺体系法^[6],取 8 支试管,分别加入 0.75 mmol·L⁻¹邻二氮菲溶液 1 mL,150 mmol·L⁻¹的 pH 为 7.4 的 PBS 1.5 mL,充分混匀后再加 0.75 mmol·L⁻¹FeSO₄ 1 mL 立即混匀,然后向 6 支试管分别加入不同梯度的白苏子挥发油溶液混匀,另 2 支分别为损伤和未损伤管,不加白苏子挥发油溶液,而在损伤管中加入 0.01% 的 H₂O₂ 1 mL,未损伤管不加 H₂O₂,对 8 支试管并以蒸馏水补充到相同的体积,将 8 支试管置于普通培养箱在 37 °C 保温 1 h,测 A₅₃₆值。重复 3 次,取平均值。

利用式子·OH 清除率 = (A₂ - A₁) / (A₀ - A₁) × 100%,计算对·OH 的清除率,其中 A₀ 为未损伤管的吸光度,A₁ 为损伤管的吸光度,A₂ 为加白苏子挥发油溶液的吸光度。

2.5 抗菌试验方法 实验菌液的配置方法是将细菌接种于 MH 肉汤,置普通培养箱 37 °C,24 h 培养,比浊法计数。用培养液调配成 10⁶CFU·mL⁻¹,培养基使用肉汤培养基和普通琼脂平板培养基,采用微量二倍连续梯度稀释法测定最小抑菌浓度(MIC),平板转种法测定最小杀菌浓度(MBC)^[7]。体外抗菌试验菌株为金黄色葡萄球菌 CMCC26112 株,大肠埃希菌 CMCC44113 株,乙型溶血性链球菌 CMCC32210 株,伤寒沙门菌 CMCC50127 株,福氏志贺氏菌 CMCC51573 株,肺炎球菌 32201 株 32201,肠炎沙门菌 50040 株 50040,鼠伤寒沙门菌 50013 株 50013,白色假丝酵母菌 CMCC850216 株,8 个细菌和 1 个酵母菌。

3 结果与讨论

3.1 白苏子挥发油中组分分析 白苏子挥发油经 GC/MS 分离分析和结构鉴定,根据总离子流图采用峰面积归一化法计算的相对含量均列于表 1 中。从表 1 的结果可以看出,白苏子中挥发油的种类繁多,主要以醇,酮,酯类居多,其中醇类有 16 种,主要是 α -里哪醇,1-辛烯-3-醇,沉香螺醇,海松-7,15-二烯-3-醇,相对含量为 14.38%;酮类有 10 种,主要是紫苏酮,异白苏烯酮,瓜菊酮,马鞭草烯酮,相对含量为 35.69%;酯类有 6 种,主要是 1,2-苯二甲酸二异戊酯,3-甲基丁酸芳樟酯,亚麻酸乙酯,乙酸乙酯,相对含量为 5.60%。烯类与酸类各 5 种,烯类主要是丁香烯,金合欢烯,2,4,6-三甲基-1,3,6-庚三烯,相对含量为 15.40%;酸类主要是油酸,棕榈酸,十八碳烯酸,相对含量为 5.09%。还有一些微量的酚如 3-

烯丙基-6-甲氧基苯酚,氧化物如反式-里哪醇氧化物,醛类物质如苯甲醛等,可见相对含量占多数的物质是酮类物质。

白苏子挥发油中含量较高的组分是紫苏酮 10.32%,异白苏烯酮 9.73%,丁香烯 7.69%, α -里哪醇 6.32%,瓜菊酮 5.28% 等,这些主要组分占全油的 39.34%。其中紫苏酮是一种对试验动物肺部具有潜在毒性的物质,是 3 位取代的呋喃类化合物,其结构与腐烂甘薯的有毒成分甘薯芳醇为同类化合物,有药理毒性,紫苏酮会产生神经毒抑制中枢作用,如食草动物的肺水肿,肺充血等^[8],紫苏酮在 50~100 mg·kg⁻¹下,能完全抑制莴苣和大马唐的生长,可用于农药生产。白苏精油及脂溶性提取物中含有大量的紫苏酮可能会导致神经毒,对机体运动,呼吸及循环中枢产生广泛抑制作用,具有一定的毒性。

表 1 白苏子挥发油中的化学成分

No.	保留时间 /min	化合物名称	分子式	相对含量/%
1	2.63	乙酸乙酯 ethyl acetate	C ₄ H ₈ O ₂	0.64
2	2.98	3-甲基环己烯 3-methyl-1-cyclohexene	C ₇ H ₁₂	0.11
3	3.16	乙基环己烷 ethylcyclohexane	C ₈ H ₁₆	0.53
4	3.30	2,4-戊二酮 2,4-pentanedione	C ₅ H ₈ O ₂	1.08
5	4.27	4,4-二甲基-2-丁酸-4-内酯 4,4-dimethyl-2-buten-4-olide	C ₆ H ₈ O ₂	0.21
6	4.68	苯甲醛 benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	0.47
7	5.52	1-辛烯-3-醇 1-octen-3-ol	C ₈ H ₁₆ O	2.13
8	6.37	苯甲醇 benzyl alcohol	C ₇ H ₈ O	0.32
9	6.83	苯乙醛 benzenacetaldehyde	C ₈ H ₈ O	0.21
10	8.01	2,4,6-三甲基-1,3,6-庚三烯 2,4,6-trimethyl-1,3,6-heptatriene	C ₁₀ H ₁₆	2.76
11	8.45	3-辛醇 3-octanol	C ₈ H ₁₈ O	0.19
12	8.84	4,4-二甲基环己二烯酮 4,4-dimethyl cyclohexadienone	C ₈ H ₁₀ O	2.68
13	9.01	反式-里哪醇氧化物 trans-linaloloxide	C ₈ H ₁₈ O ₂	1.47
14	9.56	苯乙酮 acetophenone	C ₈ H ₈ O	0.86
15	9.68	顺式香叶醇 cis-geraniol	C ₁₀ H ₁₆ O	1.12
16	9.86	瓜菊酮 (Z)-cinerone	C ₁₀ H ₁₄ O	5.28
17	10.35	2-烯丙基二环[2.2.1]庚烷 2-allylbicyclo[2.2.1]heptane	C ₆ H ₁₆	1.02
18	10.67	薄荷-1-烯-8-醇 menth-1-en-8-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.27
19	10.92	α -里哪醇 α -linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	6.32
20	11.26	3-甲基-2,3-二氢化-1-苯并呋喃 3-methyl-2,3-dihydro-1-benzofuran	C ₉ H ₁₀ O	1.64
21	11.78	马鞭草烯酮 2-pinen-4-one	C ₁₀ H ₁₄ O	3.19
22	12.15	(R)-(-)-p-薄荷-1-烯-4-醇 (R)-(-)-p-menth-1-en-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.21
23	12.37	3-叔丁基-4-羟基茴香醚 3-tertbutyl-4-hydroxyanisole	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	1.87

续表 1

No.	保留时间 /min	化合物 名称	分子式	相对含量/%
24	12. 69	顺式香叶醇 <i>cis</i> -geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	0. 37
25	12. 89	2,3,4-三甲基-2-环戊烯酮 2,3,4-trimethyl-2-cyclopenten-1-one	C ₈ H ₁₂ O	1. 68
26	13. 35	反式香叶醇 <i>trans</i> -geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	0. 95
27	14. 12	3-丙烯基-6-甲氧基苯酚 3-propenyl-6-methoxyphenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	0. 13
28	14. 36	3-甲基-2-戊烯基环戊-2-烯酮 3-methyl-2-pent-cyclopent-2-enone	C ₁₁ H ₁₆ O	1. 28
29	15. 03	异白苏烯酮 isoegomaketone	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	9. 73
30	15. 68	3-烯丙基-6-甲氧基苯酚 3-allyl-6-methoxyphenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	2. 96
31	15. 82	2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚 butylated hydroxytoluene	C ₁₅ H ₂₄ O	0. 51
32	15. 95	沉香螺醇 agaruspirol	C ₁₅ H ₂₆ O	1. 82
33	16. 27	王草素 osthole	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	0. 65
34	16. 39	橙花叔醇 nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O	0. 27
35	16. 56	石竹烯氧化物 caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	1. 21
36	16. 92	丁香烯 caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄ O	7. 69
37	17. 42	没药烯环氧化物 bisabolene epoxide	C ₁₅ H ₂₄ O	0. 67
38	17. 83	紫苏酮 perillaketone	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	10. 32
39	18. 25	1,2-苯二甲酸二异戊酯 1,2-benzenedicarboxylicacid diisaoctylester	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	1. 72
40	18. 46	金合欢烯 farnesene	C ₁₅ H ₂₄	3. 86
41	18. 67	(-)-斯巴醇 (-)-sphthulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	0. 28
42	18. 91	棕榈酸 n-hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	2. 02
43	19. 03	3-甲基丁酸芳樟酯 linalyl-3-methylbutanoate	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	1. 53
44	19. 21	邻苯二甲酸二异丁酯 phthalic acid, diisobutyl ester	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	0. 29
45	19. 85	油酸 oleic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	2. 72
46	20. 53	葎草烯 humulene	C ₁₅ H ₂₄	0. 98
47	20. 70	2,6,10,15-四甲基十七烷 2,6,10,15-tetramethylheptadecane	C ₂₁ H ₄₄	0. 16
48	21. 15	海松-7,15-二烯-3-醇 pimara-7,15-dien-3-ol	C ₂₀ H ₃₂ O	1. 15
49	21. 58	亚麻酸 linolenic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	0. 35
50	22. 75	十六酸 palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	0. 23
51	23. 43	22,23-二氢-豆甾醇 22,23-dihydro-stigmasterol	C ₂₉ H ₅₀ O	0. 48
52	23. 26	亚麻酸乙酯 linolenic acid, ethyl ester	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	1. 21
53	24. 52	十八碳烯酸 octadecenoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	0. 58
54	25. 68	胆固醇 cholesterol	C ₂₇ H ₄₆ O	0. 13
55	26. 58	8,13-环氧赖百当-14-烯-3-酮 8,13-epoxy-labd -14-en-3-one	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	0. 19
56	27. 89	22,23-二氢-豆甾醇 22,23-dihydro-stigmasterol	C ₂₉ H ₅₀ O	0. 07
			合计	92. 77

3.2 白苏子挥发油对·OH的清除作用 按 2.4 项下方法来确定白苏子挥发油对·OH 的清除作用,当白苏子挥发油的加入量为 0.1,0.4,0.8,1.2,1.6,2.0 mL 时,对·OH 的清除率分别为 0.5%,1.9%,5.7%,11.2%,21.6% 和 31.5%,白苏子挥发油对 H₂O₂/Fe²⁺ 体系通过 Fenton 反应产生的·OH 有显

的清除作用,且随着加入量的增加清除率呈上升趋势,清除率和挥发油的用量存在一定的量效关系。羟基自由基在活性氧中是化学性质最为活泼的一种,许多疾病如肿瘤、炎症、癌症、冠心病、衰老、动脉粥样硬化等大多是由于自由基得不到及时地消除而引起的,白苏子挥发油对·OH 有清除作用。

3.3 体外抗菌活性结果 白苏子挥发油对试验所选用的 9 个标准菌株均有抑制作用和灭活作用。白苏子挥发油对金黄色葡萄球菌 CMCC26112 株的 MIC 和 MBC 分别是 $3.86 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $4.62 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明该挥发油对金黄色葡萄球菌 CMCC26112 株有显著的抑制和灭活作用; 对白色假丝酵母菌 CMCC850216 株的 MIC 和 MBC 分别是 $4.12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $5.68 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 说明白苏挥发油对白色假丝酵母菌 CMCC850216 株也具有显著的抑制和灭活作用, 对其他实验菌株的 MIC 值最大为 $10.34 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, MBC 值最大为 $12.38 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 说明对其他试验菌株的抑制和灭活作用也非常明显, 见表 2。

表 2 白苏挥发油对标准菌株的 MIC 和 MBC $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

菌株	挥发油	
	MIC	MBC
金黄色葡萄球菌 CMCC26112 株	3.86	4.62
大肠埃希菌 CMCC44113 株	6.82	7.04
乙型溶血性链球菌 CMCC32210 株	10.34	11.26
伤寒沙门菌 CMCC50127 株	6.36	8.20
福氏志贺氏菌 CMCC51573 株	7.88	9.04
肺炎球菌 32201 株 32201	10.22	12.38
肠炎沙门菌 50040 株 50040	6.58	7.82
鼠伤寒沙门菌 50013 株 50013	7.98	9.16
白色假丝酵母菌 CMCC850216 株	4.12	5.68

4 结论

利用水蒸气蒸馏法提取白苏子中的挥发油简单、方便, 所用设备廉价易得, 提取和分析白苏子挥发油成分, 并进行抗菌和抗氧化试验尚属首例。白苏子挥发油的组分种类复杂多样, 主要以单萜和倍半萜类为主, 以醇, 酮, 酯类物质居多。白苏子挥发油对 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 体系通过 Fenton 反应产生的 $\cdot\text{OH}$ 有明显的清除作用, 这和白苏子挥发油中复杂多样的

化学成分密切相关, 其清除 $\cdot\text{OH}$ 的机制还需要进一步探讨。体外抗菌实验结果表明白苏子挥发油对实验所选用的 9 个实验菌株均有明显的抑制和灭活作用, 对金黄色葡萄球菌 CMCC26112 株和白色假丝酵母菌 CMCC850216 株的抑制和灭活作用表现得更为显著。这里也仅对其挥发油生物活性做了初步地实验, 由于白苏子挥发油组分种类的复杂多样性, 其他生物活性的实验还有深入研究的价值和意义。

[参考文献]

[1] Kang Raphael, Helms Randi, Stout Michael J, et al. Antimicrobial activity of the volatile constituents of *Perilla frutescens* and its synergistic effects with polygodial[J]. J Agri Food Chem, 1992, 40(11):2328.

[2] Morinaka Yoichi, Fukuda Naoya, Takayanagi Kenji. Evaluation of perilla (*Perilla frutescens*) aroma. Analysis of volatile aromatic components in fresh perilla leaves by adsorptive column method[J]. J Jpn Soc Hor Science, 2002, 71(3):411.

[3] Koezuka Y, Honda G, Tabata M. Genetic control of the chemical composition of volatile oils in *Perilla frutescens* [J]. Phytochemistry, 1986, 25(4):859.

[4] Chen Guogiang, Zhang Jiyong, Guo Yinlong. Analysis of volatile components of fresh *Perilla frutescens* (L.) Britt. var. *acuta* (Thunb.) Kudo by headspace GC/MS[J]. J Essential Oil Research, 2004, 16(5):435.

[5] 田光辉, 刘存芳, 王晓. 四川杜鹃花中挥发性成分的研究[J]. 陕西理工学院, 2007, 23(2):49.

[6] 田光辉, 刘存芳, 辜天琪, 等. 衰落桂花香气成分的 GC-MS 分析[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(17):7214.

[7] 刘存芳. 三种真菌子实体脂溶性成分的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(3):172.

[8] 王有书. 水牛白苏中毒五例报告[J]. 畜牧与兽医, 1986, 18(6):261.

[责任编辑 顾雪竹]