艾叶精油蒸馏制取对相应水提液活性成分的影响及其抑菌性能比较

甘昌胜[1]， 尹彬彬[1]， 张靖华[2]， 高娅华[2]， 赵珍珍[1]

（1. 合肥工业大学 农产品生物化工教育部工程研究中心，安徽 合肥 230009；2. 安徽省泽平制药有限公司，安徽 合肥 230088）

摘要： 艾叶中富含精油以及多糖、黄酮等多种功能性成分。采用水蒸气蒸馏法提取艾叶精油，通过正交试验优化水蒸气蒸馏提取精油的工艺条件；GC-MS 分析精油成分，同时考察了对应水提液中多糖和黄酮的含量变化，并通过菌落计数法比较艾叶精油和水提液的抑菌效果。结果表明，精油抑菌能力强，水提液抑菌能力一般。

关键词： 艾叶；精油；多糖；黄酮；抑菌

中图分类号： Q 946.887 **文献标志码：** A **文章编号：** 1673—1689(2015)12—1327—05

Effects of the Extraction of Essential Oil from Folium *A. argyi* on the Activity Components of the Related Water Extraction and the Comparison of Their Antibacterial Activity

GAN Changsheng[1]， *YIN Binbin*[1]， *ZHANG Jinghua*[2]， *GAO Yahua*[2]， *ZHAO Zhenzhen*[1]

（1. Engineering Research Center of Bio-process of Ministry of Education，Hefei University of Technology，Hefei 230009；2. Anhui Zeping Pharmaceutical Co.，Ltd.，Hefei 230088）

Abstract： Folium Artemisiae argyi is rich in essential oil and various functional components，such as polysaccharides and flavones. The essential oil was extracted from Folium Artemisiae argyi using steam distillation. The extraction conditions were optimized by orthogonal analysis. The essential oil components were analyzed by GC-MS. The changes of polysaccharides and flavones contents in the water extraction were also investigated. The antibacterial activity of the essential oil and water extraction was compared using colony-counting method. The results indicated that the antibacterial activity of the essential oil was quite strong，while the water extraction was just an ordinary bacteria inhibitor.

Keywords： folium *Artemisiae argyi*，essential oil，polysaccharide，flavone，antibacterial effect

收稿日期： 2014-10-12

基金项目： 安徽省教育厅产学研重点项目（KJ2012A236）。

作者简介： 甘昌胜（1972—），男，安徽合肥人，工学博士，副研究员，主要从事农产品加工和天然药物化学研究。
E-mail：gancs7894@163.com

艾叶(Folium *Artemisia argyi*)为菊科蒿属草本植物艾(*Artemisia argyi*)的叶(干燥),全国大部分地区均产,具有驱邪净化之功效,温经活络、驱寒止痛、美容养颜、延缓衰老之功能[1]。现代药理研究表明,艾叶有抗菌抗病毒、镇咳平喘、护肝利胆、抗过敏、增强免疫力等作用[2-5],艾叶还可作"艾叶茶"、"艾叶汤"、"艾叶粥"等饮食,以增强人体对疾病的抵抗力。

艾叶中富含精油以及多糖、黄酮、鞣质等多种功效成分,艾叶的药用功能与其活性成分密切相关[6]。精油又称挥发油,大多具有芳香味,广泛应用于香料、化妆品等工业。艾叶精油是艾叶特有的药用活性物质,具有止咳平喘、消炎、镇痛、解热等功效[7]。目前,对于艾叶挥发性油的化学成分及其生物活性已有一些报道,但对其精油提取工艺优化研究的报道较少。同时,艾叶经水蒸气蒸馏后生成大量的水提液,其中含有丰富的多糖、黄酮等重要生物活性物质[8],目前尚缺乏对这部分水提液的研究。因而,为提高艾叶的综合利用价值,有必要研究热水浸提下它们的含量变化。本文作者采用水蒸气蒸馏法,优化了艾叶挥发油的提取工艺,并分析了艾叶水提液中黄酮和多糖的含量变化,研究了艾叶挥发油和水提液的抗菌活性,为艾叶的综合开发利用提供了实验依据。

1 实 验

1.1 材料与设备

1.1.1 实验材料 艾叶,产地为湖北蕲春,蕲春李时珍地道中药材有限公司提供;芦丁,纯度≥98%,中国药品生物制品检定所提供;其他试剂均来自国药集团化学试剂有限公司。金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC27664,肠炎沙门氏菌 *Salmonella enteritidis* CICC21482,大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC11246,合肥工业大学实验室保存菌种。

1.1.2 仪器设备 UV-1600 型紫外/可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司制造;中草药粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司制造;Clarus 600 型 GC-MS 联用仪,美国 Perkin Elmer 公司制造。

1.2 提取方法

准确称取 30 g 粉碎的艾叶,置于 1 000 mL 的圆底烧瓶中,按一定的料液比加入超纯水,浸泡相应时间后,根据前期试验结果和文献报道,采用中国药典一部附录中的水蒸气蒸馏法,以艾叶精油的主要影响因素:料液比、浸泡时间、提取时间为实验条件,选用 $L_9(3^3)$ 正交实验(见表 1),以精油得率、水提液中多糖及黄酮的含量为考察指标进行实验。平行实验 3 次,计算精油得量、水提液中多糖及黄酮的含量。

表 1 正交实验的因素水平设计

Table 1 Orthogonal experiment with 3 factors and 3 levels

水平	*A* 料液比	*B* 浸泡时间 /h	*C* 提取时间 /h
1	1:5	3	3
2	1:10	5	4.5
3	1:20	8	6

1.3 定量分析方法

1.3.1 苯酚-硫酸法测多糖含量 参照文献[9],取不同浓度的葡萄糖溶液,依次加入质量分数 5%苯酚和浓硫酸。用蒸馏水作空白对照,在 486 nm 处测定其吸光度值,得回归方程

$$y=0.133x+0.088\ 9,\quad R^2=0.999\ 1 \tag{1}$$

1.3.2 $NaNO_2$-$Al(NO_3)_3$ 法测黄酮含量 参照文献[10],取不同量 0.1 mg/mL 芦丁标准液,依次加入质量分数 5%$NaNO_2$、质量分数 4% $Al(NO_3)_3$ 和质量分数 10% NaOH 溶液,再用体积分数 30%乙醇定容,摇匀。以体积分数 30%乙醇为空白参比,在 505 nm 处测定吸光度,得回归方程

$$y=0.010\ 1x+0.021\ 2,\quad R^2=0.999\ 7 \tag{2}$$

1.3.3 气质联用(GC-MS)分析精油成分 将提取的艾叶精油以 1:6 的体积比溶于乙酸乙酯,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,进样量 0.5 μL,分流比 1:10,载气 He,体积流量 1 mL/min。进样口温度 220 ℃,色谱柱初始温度 50 ℃,保持 3 min 后以 3 ℃/min 升温至 250 ℃并保持 15 min。质谱条件:EI,温度 290 ℃,电子能量 70 eV,溶剂延迟 1 min。

1.4 抑菌实验方法

菌种活化实验:在无菌条件下,分别将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌接种到营养肉汤中,于 37 ℃恒温培养 24 h,备用。将活化的实验用菌稀释,使其浓度达 10^8 cfu/mL,备用。

以大肠杆菌为例,在无菌条件下,取 4 个培养皿,吸取 0.5 mL 菌悬液加入 1 号培养皿中,0.5 mL 菌悬液和 0.5 mL 体积分数 75%乙醇加入 2 号培养

皿中，0.5 mL 菌悬液和 0.5 mL 水提液加入 3 号培养皿中，0.5 mL 菌悬液和 0.5 mL 精油（体积分数 75%乙醇稀释）加入 4 号培养皿中。然后在各培养皿中加入经高压灭菌并冷却至 46 ℃的琼脂培养基，摇匀冷却后在 37 ℃下恒温培养，观察计数。金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的实验方法同上。详见文献[11]。

2 结果与讨论

2.1 提取工艺

正交试验结果见表 2，首先分析精油得率，通过直观分析，比较极差，得出各因素的影响顺序为 $A>C>B$，料液比对挥发油得率的影响最大，其次为提取时间，最后是浸泡时间。得出最优化组合为 $A_3B_1C_3$，即料液比 1:20，浸泡时间 3 h，提取时间 6 h，提取率达 0.73%。

艾叶精油的提取因素中料液比影响最大，由于在整个水蒸气蒸馏过程中，物料的稀释程度直接影响到水与艾叶表面的接触面积，一定比例的水浸入后，在高温下将油带出。实验表明，料液比 1:20 能最大化地提取精油。

表 2　提取正交试验

Table 2　Orthogonal experiments of the extraction procedure

试验号		因素			精油量/mL	水提液中活性物质	
		A	B	C		多糖质量/mg	黄酮质量/mg
1		1	1	1	0.14	1 751.4	1 533.0
2		1	2	2	0.12	2 161.2	2 155.8
3		1	3	3	0.21	1 804.5	1 611.0
4		2	1	2	0.20	2 311.2	2 482.5
5		2	2	3	0.16	3 158.8	2 470.0
6		2	3	1	0.15	3 375.3	2 030.4
7		3	1	3	0.22	3 604.1	3 218.4
8		3	2	1	0.20	2 675.4	2 363.4
9		3	3	2	0.18	2 418.6	3 254.4
精油	K_1	0.157	0.187	0.163			
	K_2	0.170	0.160	0.167			
	K_3	0.200	0.180	0.197			
	R	0.043	0.027	0.034			
多糖	K_1	1 905.7	2 222.2	2 600.7			
	K_2	2 948.4	2 665.1	2 297.0			
	K_3	2 566.0	2 532.8	2 522.5			
	R	1 042.7	442.9	303.7			
黄酮	K_1	1 766.6	2 411.3	1 975.6			
	K_2	2 327.6	2 329.7	2 630.9			
	K_3	2 945.4	2 298.6	2 433.1			
	R	1 178.8	112.7	655.3			

注：表中 K_1、K_2、K_3 分别为 1、2、3 水平数据的综合平均值，R 为同因素 K_1、K_2、K_3 的极差。

浸泡时间由于设置区间较短，且在常温下浸泡，影响较小。提取过程中提取时间越长，出油率越高，但超过一定时间后出油量增加不明显，说明可能此时精油已基本被蒸出。

由于水蒸气蒸馏时会产生大量的水提液，而水提液中亦含有较多的多糖、黄酮等活性物质，作者对其中的这两类主要活性物质也进行了考察。多糖含量分析，比较各因素的影响顺序为 $A>B>C$，即料液比对提取艾叶多糖含量的影响最大，其次为浸泡时间，较优组合为 $A_2B_2C_1$，即料液比 1:10，浸泡时间 5 h，提取时间 3 h。黄酮含量通过比较极差，得出各因素的影响顺序 $A>C>B$，即料液比影响最大，其次为提取时间，最后是浸泡时间。较优组合为 $A_3B_2C_2$，即料液比 1:20，浸泡时间 5 h，提取时间 4.5 h。

多糖是一类水溶性较高的化合物，高温下易降解氧化，需控制适当的料液比和提取时间。而黄酮类化合物水溶性不高，热水可提取部分黄酮苷，适当提高料液比和提取时间有利于黄酮的提取，但黄酮也存在着高温下易氧化的问题。

2.2 精油成分分析

如图 1 所示。经 GC-MS 分析，艾叶精油中可鉴别出 50 余种化合物。

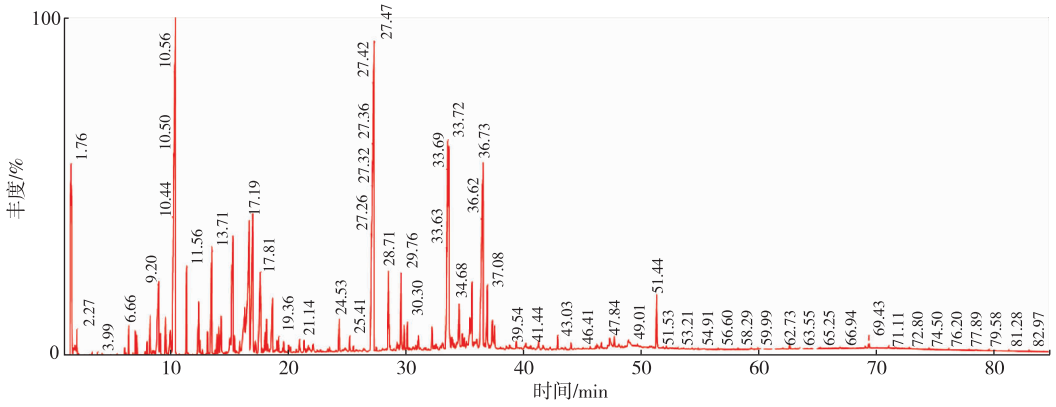

图 1 精油的 GC-MS 分析总离子流图

Fig. 1 Total ionic chromatogram of GC-MS analysis of the essential oil

按面积归一法计算各组分的含量（面积分数），其中面积分数较高的有桉油精（10.66%）、侧柏酮（2.4%）、左旋樟脑（3.2%）、马鞭烯醇（6.5%）、反式石竹烯（12.1%）、氧化石竹烯（10.2%）、3,3,6-三甲基-1,4-庚二烯-6-醇（2.1%）、4-萜品醇（4.0%）、蓝桉醇（6.7%）。其中桉油精、石竹烯等可能发挥较强的抑菌效果[12-13]。

2.3 抑菌活性

采用菌落计数法比较了艾叶精油和水提液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌的抑菌效果，结果如表 3 所示。

表 3 艾叶精油及水提液的抑菌效果 1)

Table 3 Antibacterial effect of the essential oil and water extraction from Folium Artemisiae argyi

活性成分	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌	大肠杆菌
空白对照	+++	+++	+++
体积分数 75%乙醇	+	+	+
艾叶水提液	++	+++	++
艾叶精油 2)	–	–	–

注：1)“–”表示无菌生长，“+”表示少数菌落生长，“++”表示稍多菌落生长，“+++” 表示菌落生长良好；空白组为不加任何活性成分；2)艾叶精油的质量浓度为 0.008 g/mL。

试验结果表明，艾叶精油对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、大肠杆菌的抑制能力最强，体积分数 75%乙醇次之，艾叶水提液较差。

艾叶精油导致微生物死亡的可能机理是：由于破坏了细胞膜的通透性，从而阻碍了细菌的呼吸作用[14]。

3 结 语

利用水蒸气蒸馏法，采用正交试验，分析了料液比、浸泡时间、提取时间等因素对艾叶挥发油以及水提液中多糖和黄酮含量的影响，并得出了优化组合。当料液比 1:20，浸泡时间 3 h，提取时间 6 h 时，艾叶挥发油得率最高。

论文还对艾叶经水蒸汽蒸馏后水提液中多糖和黄酮的含量变化进行了研讨。抑菌实验表明，艾叶精油对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、大肠杆菌的抑制效果都很好，而水提液的抑菌效果一般。推测可能的原因是水提液中既含有抑菌成分，又含有对细菌生长有利的营养物质，导致总体抑菌效果较差[15]。

本研究成果为艾叶的进一步综合开发利用提供了前期实验基础。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中国药典（一部）[M]. 北京：中国医药科技出版社，2010：82-83.

[2] 蔡平. 艾叶的药理作用及应用[J]. 时珍国医国药，2001，12（12）：1137-1139.

CAI Ping. The pharmacological action and application of Artemisiae argyi [J]. **Lishizhen Medicine and Materia Medica**

Research,2001,12(12):1137-1139.(in Chinese)

[3] Adams M,Efferth T,Bauer R. Activity-guided isolation of scopoletin and isoscopoletin,the inhibitory active principles towards CCRF-CEM leukaemia cells and multi-drug resistant CEM/ADR5000 cells,from Artemisia argyi [J]. **Planta Medica**,2006,72:862-864.

[4] Zeng K W,Wang S,Dong X,et al. Sesquiterpene dimer (DSF-52)from *Artemisia argyi* inhibits microglia-mediated neuroinflammation via suppression of NF-kappa B,JNK/p38 MAPKs and Jak2/Stat3 signaling pathways [J]. **Phytomedicine**,2014,21(3):298-306.

[5] Seo J M,Kang H M,Son K H,et al. Antitumor activity of flavones isolated from *Artemisia argyi* [J]. **Planta Medica**,2003,69:218-222.

[6] Lao A,Fujimoto Y,Tatsuno T. Studies on the constituents of *Artemisia argyi* LEVL et VANT[J]. **Chem Pharm Bull**, 1984,32:723-727.

[7] Huang H C,Wang H F,Yih K H,et al. Dual bioactivities of essential oil extracted from the leaves of *Artemisia argyi* as an antimelanogenic versus antioxidant agent and chemical composition analysis by GC/MS [J]. **Int J Mol Sci**,2012,13:14679-14697.

[8] Bao X,Yuan H,Wang C,et al. Antitumor and immunomodulatory activities of a polysaccharide from *Artemisia argyi* [J]. **Carbohydrate Polymers**,2013,98:1236-1243.

[9] DuBios M,Gilles K A,Hamilton J K,et al. Colormetric method for the determination of sugars and related substances [J]. **Analytical Chemistry**,1956,28(3):350-356.

[10] 周华生,张连龙,成恒嵩,等. 保健食品中黄酮含量三种测定方法研究[J]. 现代食品科技,2009,25(11):1358-1362.
ZHOU Huasheng,ZHANG Lianlong,CHENG Hengsong,et al. A comparison of three methods for determination of flavonids in health foods[J]. **Modern Food Science and Technology**,2009,25(11):1358-1362.(in Chinese)

[11] 黄晓冬,刘剑秋. 赤楠叶精油的化学成分及其抗菌活性[J]. 热带亚热带植物学报,2004,12(3):233-236.
HUANG Xiaodong,LIU Jianqiu. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oil from the leaves of syzygium buxifolium[J]. **Journal of Tropical and Subtropical Botany**,2004,12(3):233-236.(in Chinese)

[12] 张丽佳,薛银,张岑容,等. 桉油精的抗菌抗炎作用研究[J]. 中国兽药杂志 ,2013,47(3):21-24.
ZHANG Lijia,XUE Yin,ZHANG Cenrong,et al. Antibacterial and antiinflammatory effects of eucalyptol [J]. **Chinese Journal of Veterinary Drug**,2013,47(3):21-24.(in Chinese)

[13] 凌玮玮,张正竹,凌铁军,等. 牡荆挥发油的组成及其抑菌活性研究[J]. 食品工业科技 ,2010,31(12):75-79.
LING Weiwei,ZHANG Zhengzhu,LING Tiejun,et al. Constituents in the essential oil of *Vitex negundo* Linn. var. *cannabifolia* (Sieb et Zucc)Hand.-Mazz. and their antibacterial activities [J]. **Science and Technology of Food Industry**,2010,31(12):75-79.(in Chinese)

[14] Lv F,Liang H,Yuan Q P,et al. Combination of essential oils for the application in antimicrobial food packaging[C]//Proceedings of the 17th IAPRI World Conference on Packaging. IRVIN:[s.n.],2010:77-85.

[15] 刘萍,刘巍,袁铭. 艾叶与复方艾叶水提液体外抗菌作用比较[J]. 医药导报,2007,26(5):484-485.
LIU Ping,LIU Wei,YUAN Ming. Comparison in vitro antibacterial activities of water extracts of *Artemisia argyi* [J]. **Herald of Medicine**,2007,26(5):484-485.(in Chinese)