

组培柠檬桉叶绿素和挥发油研究

谷瑶^{1,2}, 周丽珠^{1*}, 李桂珍¹, 韦颖文¹, 杨漓¹, 温如斯¹

(1. 广西壮族自治区林业科学研究院, 广西南宁 530002; 2. 北京林业大学经济管理学院, 北京 100083)

摘要 [目的]研究柠檬桉叶绿素和挥发油含量。[方法]采用分光光度法测定柠檬桉叶绿素含量,对比不同提取液对柠檬桉叶绿素提取效果,采集不同季节柠檬桉,采用传统水蒸气蒸馏法对挥发油含量以及成分进行分析。[结果]丙酮:乙醇=1:1(V/V)混合提取液对柠檬桉叶绿素的提取效果最佳,叶绿素 a/叶绿素 b 为 3.580。季节对组培柠檬桉挥发油得率有一定的影响,10 月份采集柠檬桉挥发油含量相对较高,绝干得油率为 3.526%,1 月份最低,仅为 2.880%(以绝干计)。[结论]组培柠檬桉的生长情况较好,但挥发油含量总体偏低,建议进行合理管理,有效提高柠檬桉鲜叶挥发油含量。

关键词 柠檬桉;浸提液;香茅醛;得油率中图分类号 O629.6;0 629.9;TQ 654⁺.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)19-0120-03**Study on Chlorophyll and Essential Oil Content of *Eucalyptus citriodora***GU Yao^{1,2}, ZHOU Li-zhu¹, LI Gui-zhen¹ et al (1. Guangxi Zhuang Autonomous Region Academy of Forestry, Nanning, Guangxi 530002; 2. School of Economics and Management, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract [Objective]To study chlorophyll and volatile oil content of *Eucalyptus citriodora*, respectively. [Method]The chlorophyll content of *Eucalyptus citriodora* was determined by UV spectrophotometry, and the effect of different extract-solution on chlorophyll extraction was compared. *Eucalyptus citriodora* oil from fresh leaves in different seasons was obtained by steam distillation, and the chemical compositions of *Eucalyptus citriodora* oil were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). [Result]Acetone:ethanol = 1:1 (V/V) mixed extract had a better effect on the extraction of chlorophyll from *Eucalyptus citriodora*. The ratio of chlorophyll a/ chlorophyll b was 3.580. Moreover, the essential oil yield of *Eucalyptus citriodora* showed certain difference in different seasons, the relatively higher in October (3.526%) and the lowest in January (2.880%). [Conclusion]The growth situation of *Eucalyptus citriodora* with tissue culture was good, but the content of volatile oil was generally low. Thus, it was suggested that reasonable management could improve the quality of *Eucalyptus citriodora*.

Key words *Eucalyptus citriodora*; Extract solution; Citronellal; Yield of essential oil

柠檬桉 (*Eucalyptus citriodora* Hook) 是桃金娘科 (Myrtaceae) 伞房属 (*Corymbia*) 树种,原产地澳大利亚,我国引种已有近百年历史,在我国海南、福建、广东、广西均有栽培,鲜叶含挥发油 0.80%~2.12%^[1],主要成分有香茅醛、新异胡薄荷醇、异胡薄荷醇、香茅醇、乙酸香茅酯、对盖烷-3,8-二醇、 β -石竹烯等^[2],广泛应用于日化、食品以及医药等行业^[3-5]。

柠檬桉作为一种遗传相对稳定的树种,一直在广西推广种植。由于其枝叶内含物丰富,用其茎尖诱导产生丛生芽难以成功,无性系选育一直受扦插育苗、组培育苗成活率低(几乎等于零)的限制,广西渠黎林场成功地进行柠檬桉幼苗的嫁接,嫁接苗成活率提高到 75%以上^[6-7]。1994 年广西壮族自治区林业科学研究院对柠檬桉茎尖进行组培繁育,茎尖诱导筛选出适合柠檬桉继代培养和生根培养的培养基^[8]。目前针对柠檬桉组培苗移栽后生长情况的研究鲜见报道。笔者选取广西壮族自治区林业科学研究院组培柠檬桉(6 年生),测定柠檬桉生物量、叶绿素以及挥发油含量,旨在为柠檬桉油用林合理经营提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况 柠檬种植试验地位于广西壮族自治区林业科学研究院试验苗圃内(108°21'E, 22°56'N),海拔 90~100 m,该区域属亚热带季风气候,年平均气温约 21.6℃,极

端最高气温 39.4℃,极端最低气温为 12.8℃,雨量充沛,年平均降水量 1 304.2 mm,平均相对湿度 79%。

1.2 仪器与药品 超声波水浴锅 (CS-24,常州朗博仪器制造有限公司);UV-2550 型紫外-可见分光光度计;TP3200 电子天平;EGLL-230B 电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);不锈钢电热蒸馏水器 (TT-98-III,天津市泰斯特仪器有限公司);TQ456 气质联用仪(美国 BRUKER 公司);Aglient 7890A 气相色谱仪,弹性石英毛细管柱 BR-5 (30.00 m×0.25 mm×0.25 μ m)。

丙酮、乙醇、甲醇 (AR 级,西陇化工股份有限公司);95% 乙醇(广东光华化学厂有限公司)。

1.3 叶绿素提取 随机抽采 2017 年 8 月广西壮族自治区林业科学研究院试验苗圃内 6 年生组培柠檬桉鲜叶,记录鲜叶总量,去除黄叶和枯叶,洗净后切成 0.5 cm 段,备用;丙酮、甲醇和乙醇均为 AR 级,蒸馏水自制。按体积比配制提取液(表 1)。

表 1 提取液配制

Table 1 Preparation of extract liquid

提取液编号 Extract number	提取液配比 Extract solution ratio	提取液编号 Extract number	提取液配比 Extract solution ratio
1	70%丙酮	7	丙酮:乙醇:水=2:2:1
2	80%丙酮	8	95%乙醇
3	90%丙酮	9	丙酮:甲醇=1:1
4	100%丙酮	10	丙酮:甲醇=2:1
5	丙酮:乙醇=1:1	11	丙酮:甲醇:水=2:2:1
6	丙酮:乙醇=2:1		

将一定量切碎处理后的柠檬桉鲜叶样品,放入试管中,

基金项目 广西林科院基本科研业务费专项(林科 201818 号);广西林科院基本科研业务费专项(林科 201821 号)。

作者简介 谷瑶(1988—),女,湖南湘潭人,工程师,在读博士,从事林化产品研发、林业经济管理。* 通讯作者,高级工程师,从事林化产品研发与开发。

收稿日期 2018-02-26

在试管中分别加入 10 mL 1[#]~11[#]提取液,密封试管口。然后将盛有样品的试管置于超声水浴锅中,在黑暗条件下超声一定时间后,当肉眼观察叶组织完全变白时,说明浸提完全,收集浸提液。叶绿素 a 和叶绿素 b 的最大吸收波长分别为 663 和 645 nm,在 663 和 645 nm 波长下分别测定吸光度,以提取液做空白对照,将所得数据按公式(1)、(2)和(3),分别计算柠檬桉鲜叶在不同浸提液下提取的叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量(mg/g)。

$$\text{叶绿素 a} = (12.7A_{663} - 2.69A_{645}) \times V / 1000 \times m \quad (1)$$

$$\text{叶绿素 b} = (22.9A_{645} - 4.67A_{663}) \times V / 1000 \times m \quad (2)$$

$$\text{总叶绿素} = (8.02A_{663} + 20.21A_{645}) \times V / 1000 \times m \quad (3)$$

式中, A_{663} 和 A_{645} 分别表示特定波长下叶绿素提取液的吸光度; V 表示提取液的体积(mL); m 表示所用柠檬桉鲜叶组织鲜重(g)。

1.4 柠檬桉挥发油提取与测定 挥发油提取参考《中华人民共和国药典》2005 年版第一部附录 XD 中挥发油测定法甲法中水蒸气蒸馏法^[2]。采集柠檬桉组培苗,将柠檬桉鲜叶切成断,取一定量的叶装入 2 000 mL 圆底烧瓶,装上挥发油测定器和冷凝管,控制回流速度为 1 滴/s,蒸馏时间为 2 h,收集油样。

采用气相色谱对柠檬桉叶油进行定量分析,并参照黎贵卿等^[1]和田玉红等^[2]气-质联用的定性分析数据以及 GB/T 22179—2008,确定主要成分及含量。

GC 定量分析条件:载气为 N_2 ,升温程序:70 °C (1 min)

$\xrightarrow{2\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 220 °C,汽化室 250 °C,进样口 200 °C,分流比

1:100,进样量 0.5 μL 。

GC-MS 定性分析条件:载气为高纯 He;升温程序:70 °C (5 min) $\xrightarrow{2\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 80 °C $\xrightarrow{1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 85 °C $\xrightarrow{5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 120 °C $\xrightarrow{10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 220 °C (3 min);检测器温度 250 °C;进样口 250 °C。质谱条件:EI 离子源;电离电压 70 eV;扫描范围 45–350 amu;全扫描方式,溶剂延迟 5 min;进样量 0.5 μL (1%乙醇溶液)。

2 结果与分析

2.1 叶绿素 采用不同提取液进行叶绿素提取,在分光光度计上扫描叶绿素浸提液的吸收光谱。结果表明,所得到的吸收光谱基本相似,长波长段的吸收峰也基本相似(图 1)。说明所用提取液针对叶绿素溶解的化学性质基本相同,采用公式(1)、(2)、(3)计算叶绿素含量,结果见表 2。

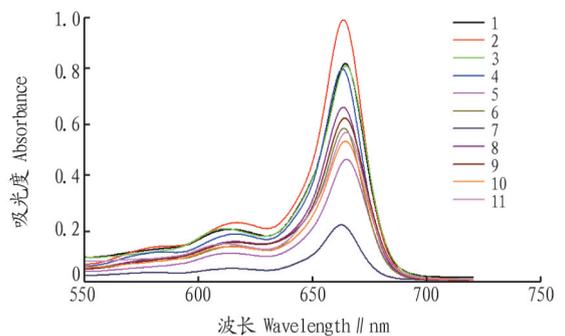


图 1 柠檬桉鲜叶叶绿素在不同提取液中的吸收光谱

Fig. 1 The absorption spectra of chlorophyll of *Eucalyptus citriodora* in different extracts

表 2 不同提取液对柠檬桉叶绿素的提取效果

Table 2 The extraction effect of different extracts on chlorophyll of *Eucalyptus citriodora*

提取液编号 Extract solution number	柠檬桉叶质量 The weight of <i>Eucalyptus citriodora</i> leaves/g	$A_{645\text{ nm}}$	$A_{663\text{ nm}}$	叶绿素 a Chlorophyll a mg/g	叶绿素 b Chlorophyll b mg/g	总叶绿素 Total chlorophyll mg/g
1	0.266	0.215	0.557	1.222	0.437	1.659
2	0.297	0.308	0.818	1.611	0.545	2.156
3	0.234	0.215	0.579	1.448	0.474	1.923
4	0.245	0.077	0.213	0.510	0.157	0.667
5	0.321	0.344	0.990	1.815	0.507	2.323
7	0.393	0.304	0.806	1.199	0.407	1.606
6	0.286	0.283	0.804	1.650	0.476	2.126
8	0.218	0.156	0.453	1.222	0.334	1.555
9	0.208	0.218	0.616	1.740	0.509	2.249
10	0.223	0.231	0.659	1.741	0.497	2.238
11	0.205	0.192	0.527	1.510	0.473	1.983

用不同提取液对柠檬桉鲜叶进行浸提,结果表明,不同提取液提取的叶绿素总量存在明显差异(表 2)。丙酮、乙醇混合液以及丙酮、甲醇混合液提取的叶绿素含量较高,显著高于 70%、80%、90% 丙酮以及无水丙酮。丙酮:乙醇 = 1:1 提取得到的柠檬桉叶绿素含量最高,为 2.323 mg/g,叶绿素 a/叶绿素 b 为 3.580。

2.2 挥发油 由图 2 和表 3 可知,柠檬桉鲜叶挥发油鉴定出 21 种化合物,占挥发油含量的 97.193%,其中含量最高的为香茅醛(76.873%),其次是香茅醇(7.46%),新异胡薄

醇和异胡薄荷醇含量共为 9.456%,乙酸香茅酯为 1.106%。

不同月份柠檬桉鲜叶含油率以及挥发油含量见表 4。由表 4 可知,试验地组培柠檬桉挥发油含量虽随着季节变化呈一定趋势,但总体差别不大,10 月的柠檬桉含油率最高,香茅醛含量最高,该地区组培柠檬桉油用林最佳采收时间为 10 月,其挥发油特征组分含量符合国家标准要求,得到的油质较好,仅 1 月柠檬桉挥发油得率较低,柠檬桉得到的挥发油特征组分含量也符合国家标准。

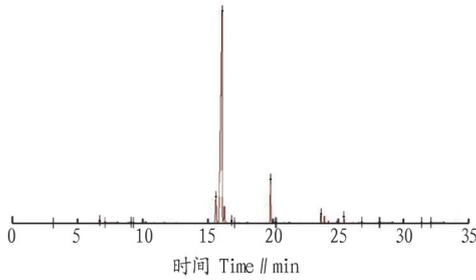


图2 柠檬桉叶挥发油总离子图

Fig. 2 Total current chromatogram of *Eucalyptus citriodora* oil

3 结论与讨论

叶绿素是衡量植物生长状况的重要指标之一。采用不同浸提液对组培柠檬桉鲜叶进行浸提,叶绿素测定结果整体存在显著差异。从试验结果看,丙酮、乙醇混合浸提液对柠檬桉鲜叶叶绿素提取效果最佳。

挥发油含量是衡量柠檬桉油用林品质的首要标准。通过不同月份采集柠檬桉鲜叶提取挥发油试验,结果发现,组培柠檬桉得油率不高,且随季节变化不显著,仅1月份柠檬桉得油率最低,但挥发油特征组分均符合柠檬桉(精)油国标要求。建议避开1月采叶蒸馏。

表3 柠檬桉叶挥发油成分

Table 3 Volatile constituents of *Eucalyptus citriodora*

序号 Serial number	保留时间 Retention time//min	化合物 Compound	分子式 Formula	匹配度 Similarity %	分子量 Molecular Weigh	相对含量 Relative content//%
1	6.780	β-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	892	136	0.114
2	7.173	β-月桂烯	C ₁₀ H ₁₆	821	136	0.059
3	8.878	苧烯	C ₁₀ H ₁₆	852	136	0.018
4	8.885	D-苧烯	C ₁₀ H ₁₆	841	136	0.014
5	9.008	1,8-桉叶素	C ₁₀ H ₁₈ O	860	154	0.092
6	9.181	反式β-罗勒烯	C ₁₀ H ₁₆	852	136	0.128
7	15.659	异胡薄荷醇	C ₁₀ H ₁₈ O	934	154	6.366
8	16.13	香茅醛	C ₁₀ H ₁₈ O	889	154	76.873
9	16.313	新异胡薄荷醇	C ₁₀ H ₁₈ O	930	154	3.090
10	19.844	香茅醇	C ₁₀ H ₁₈ O	807	154	7.460
11	23.704	对盖烷-3-8-二醇	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	870	172	1.026
12	23.962	乙酸香茅酯	C ₁₀ H ₂₂ O ₂	882	198	1.106
13	24.918	2-甲基乙酸苄酯	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	782	164	0.146
14	25.464	石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	927	204	0.497
15	26.138	萹草烯	C ₁₅ H ₂₄	859	204	0.026
16	26.584	β-古巴烯	C ₁₅ H ₂₄	748	204	0.041
17	26.831	γ-榄香烯	C ₁₅ H ₂₄	810	204	0.048
18	28.081	斯巴醇	C ₁₅ H ₂₄ O	780	220	0.016
19	28.158	环氧石竹烯	C ₁₅ H ₂₄ O	799	220	0.029
20	28.215	蓝桉醇	C ₁₅ H ₂₆ O	759	222	0.024
21	31.397	邻苯二甲酸二异丁酯	C ₁₆ H ₂₀ O ₄	836	276	0.020

表4 不同月份柠檬桉鲜叶挥发油含量

Table 4 The volatile oil content of *Eucalyptus citriodora* leaves in different months

月份 Months	水分含量 Moisture content	得油率 The oil rate	绝对得油率 Relative oil rate	香茅醛含量 Citronellal content	新异胡薄荷醇+异胡薄荷醇 Neoisopulegol +Isopulegol	%
1	57.980	1.210	2.880	76.873	9.456	
4	56.180	1.500	3.423	76.450	9.553	
7	59.150	1.430	3.501	76.773	9.478	
10	51.640	1.705	3.526	76.912	9.032	

参考文献

[1] 黎贵卿,陆顺忠,曾辉,等. 柠檬桉枝叶挥发性成分的研究[J]. 广西林业科学,2012,41(4):352-355.

[2] 田玉红,刘雄民,周永红,等. 柠檬桉叶挥发性成分的提取及成分分析[J]. 色谱,2005,23(6):651-654.

[3] TOLBA H,MOGHRANI H,BENELMOUFFOK A,et al. Essential oil of Algerian *Eucalyptus citriodora*:Chemical composition,antifungal activity[J]. J Mycol Med,2015,25(4):128-133.

[4] LUQMAN S,DWIVEDI G R,DAROKAR M P,et al. Antimicrobial activity of *Eucalyptus citriodora* essential oil [J]. International journal of essential oil therapeutics,2008,2:69-75.

[5] 周贤闯. 桉叶精油对蚊虫的驱避与毒杀作用研究[D]. 南宁:广西工学院,2011.

[6] 项东云,郑白,周维,等. 广西桉树育种研究概述[J]. 广西林业科学,1999,28(2):71-80.

[7] 罗桂森. 柠檬桉幼苗嫁接及应用取得突破[J]. 广西林业,1989(2):28-29.

[8] 谢莉萍,蔡玲. 柠檬桉茎尖组培繁殖初报[J]. 广西林业科学,1994,23(4):192-193.

[9] 研究汇刊,1993(3):52-56.

[31] 吴柏林,陈双林,虞敏之,等. 毛竹纯林与竹杉混交林竹材形态质量的比较研究[J]. 浙江林业科技,2007,27(4):47-50.

[32] 曹永慧,萧江华,陈双林,等. 竹阔混交林中阔叶树对毛竹生长的影响及竞争关系[J]. 浙江林学院学报,2006,23(1):35-40.

[33] 何林,何小勇. 毛竹笋用林合理竹龄结构及其笋期生长规律[J]. 竹子

[34] 徐清乾,陈明泉,艾文胜. 丘岗山地毛竹低效林改造技术及效果[J]. 中南林业科技大学学报,2009,29(6):179-183.

[35] 卢炳立. 不同抚育经营措施对毛竹林改造效果分析[J]. 安徽农学通报,2013,19(15):104-105.

[36] 田晓凤. 毛竹林垦复对春笋生长的影响研究[J]. 林业科技,2014,39(5):38-39.

(上接第119页)