

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201409017

王庆玲,董涛,杜文玉,等. 模拟氮沉降对紫苏叶挥发油主要成分的影响 [J]. 广西植物, 2016, 36(3):369-372

WANG QL, DONG T, DU WY, et al. Effects of simulated nitrogen deposition on main components of volatile oil in *Perilla frutescens* [J]. Guihaia, 2016, 36(3):369-372

模拟氮沉降对紫苏叶挥发油主要成分的影响

王庆玲,董涛,杜文玉,李凯明,吕朝磊,张子龙*,王宝华

(北京中医药大学 中药学院,北京 100102)

摘要:我国为世界三大高氮沉降区之一,氮沉降严重影响了植物生长发育。该研究采用喷施硝酸铵(NH_4NO_3)模拟氮沉降,分析了不同浓度氮沉降作用下紫苏叶中紫苏醛、D-柠檬烯、 α -蒎烯等3种挥发油成分的变化规律。结果表明:随喷施氮盐浓度不断提高,紫苏叶挥发油的3种主要成分含量均有显著下降趋势;氮盐浓度升至 $0.044 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,紫苏醛、D-柠檬烯、 α -蒎烯的含量降至最低,之后趋于稳定;氮盐浓度对3种挥发油成分含量的比例也有影响;不同氮盐浓度处理下,3种挥发油成分的变异系数不同,紫苏醛的变异系数为0.692 9,D-柠檬烯的变异系数为0.460 1,而 α -蒎烯的变异系数为0.271 6,即紫苏醛含量变化最大, α -蒎烯含量最为稳定。大气氮沉降浓度对紫苏叶挥发油主要成分含量有显著影响,随氮盐浓度不断提高,紫苏醛、D-柠檬烯、 α -蒎烯等3种挥发油成分含量呈降低趋势,尤以紫苏醛含量的降低最为剧烈。氮沉降增加对紫苏叶有效成分含量有降低的作用。

关键词:氮沉降,紫苏,紫苏醛,D-柠檬烯, α -蒎烯

中图分类号: Q946.889 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2016)03-0369-04

Effects of simulated nitrogen deposition on main components of volatile oil in *Perilla frutescens*

WANG Qing-Ling, DONG Tao, DU Wen-Yu, LI Kai-Ming,
LÜ Zhao-Lei, ZHANG Zi-Long*, WANG Bao-Hua

(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: Our country is one of the three nitrogen settlement areas in the world, and nitrogen deposition seriously affects the growth and development of plants. We analyzed the changing rule of the three kinds of volatile oil components, Perilla aldehyde, D-Limonene, α -Pinene in the leaves of *Perilla frutescens*, under different concentrations of nitrogen deposition, by spraying ammonium nitrate nitrogen deposition (NH_4O_3) simulation. The results showed that with the continuous improvement of salt spraying nitrogen, the main components of the volatile contents of the three kinds of *Perilla frutescens* oil were significantly downward; Salt concentration of nitrogen at $0.044 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Perilla aldehyde, D-Limonene, the content of α -Pinene fell to the lowest, after stabilizing; Nitrogen salt concentration on the proportion of three kinds of volatile oil contents were also affected; Under different nitrogen salt concentrations processing, variation coefficients of three kinds of volatile oil compositions were different. Perilla aldehyde of variation coefficient was 0.692 9, D-Limonene variation coefficient was 0.460 1, and α -Pinene variation coefficient was 0.271 6. The Perilla aldehyde content

收稿日期: 2014-12-03 修回日期: 2015-03-26

基金项目: 北京市教委大学生创新创业项目(BJGJ1333)[Supported by the Undergraduates Innovation and Pioneering Project of Beijing Municipal Education Commission(BJGJ1333)].

作者简介: 王庆玲(1993-),女,湖南常德人,硕士,主要从事中药药剂学研究,(E-mail)1042818394@qq.com.

*通讯作者: 张子龙,博士,副研究员,硕士生导师,从事中药资源与生态、中药材规范化生产与质量控制研究,(E-mail)zhangzilong76@163.com.

displayed the biggest change, while the α -Pinene content was the most stable. In conclusion the concentrations of atmospheric nitrogen deposition had significant effects on the main volatile oil contents in *P. frutescens* leaves. With the increase of salt concentration in nitrogen, The volatile oil contents, Perilla aldehyde, D-Limonene, α -Pinene etc. showed a trend of reduce, especially in the lower levels of the most dramatic perillaldehyde. Increased nitrogen deposition would decrease the quality of *P. frutescens*.

Key words: nitrogen deposition, *Perilla frutescens*, Perilla aldehyde, D-Limonene, α -Pinene

氮沉降是大气中的氮化合物(包括自然来源和人类活动来源)通过非生物途径进入生态系统的过程。自工业革命以来,诸如矿物燃料的燃烧、含氮化肥的生产使用、畜牧业等人类活动日益扩展,使得向大气中排放含氮化合物迅速增加(张炜等,2008;孙本华等,2006;樊后保等,2007),导致大气氮沉降强度剧增(张维娜等,2009)。我国已成为世界三大高氮沉降区之一,许多地区存在高氮现象(Galloway et al, 2003;荣海等,2011)。氮沉降严重影响了植物的生长发育,但以往多以森林生态系统为主要研究对象,很少探讨药用植物对氮沉降的响应规律。目前我国有40%的植物类药材供应主要依靠栽培品种,因此探讨氮沉降对药用植物生长发育,尤其是对其有效成分含量的影响尤为重要及紧迫。

紫苏叶为唇形科植物紫苏(*Perilla frutescens*)的干燥叶(或带嫩枝),有解表散寒,行气和胃的功效(国家药典委员会,2015)。紫苏叶挥发油的有效成分主要是紫苏醛,另外还有少量的D-柠檬烯和 α -蒎烯。紫苏栽培历史悠久,目前分布于全国20多个省,但主要产于江苏、安徽和湖南等南方地区。而上述地区正是我国的主要氮沉降区域,大气氮沉降量在 $5.1\sim 25.6\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}\cdot\text{a}^{-1}$ 之间。因此,本研究拟通过喷施不同浓度氮盐模拟不同程度大气氮沉降,通过挥发油提取、气相-质谱分析(任洁等,2006),分析氮沉降增加对紫苏叶挥发油成分的影响,以期揭示大气氮沉降增加背景下紫苏叶品质变化规律,对于阐明氮沉降对药用植物的影响机制,全面了解氮沉降生态效应具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与器材

1.1.1 实验材料 紫苏种子购自北京市芳萱苑种子有限公司,经鉴定为唇形科紫苏属植物种子。在北京市园林科学研究所进行试验,2014年3月下旬播种,待苗高 $5\sim 6\text{ cm}$ 时移至田间,常规管理。7月下旬收获成熟紫苏叶,清洗干燥后备用。

1.1.2 实验器材 挥发油提取器(2 000 mL烧瓶型号:BB89-2000),美国Agilent(安捷伦)7890A-5975C气质联用仪。

1.2 试验设置

设置5种不同浓度氮盐(NH_4NO_3)模拟大气氮沉降,由低至高分别为0、0.011、0.022、0.044、0.088 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,从4月开始,每月的月中和月末各进行1次喷洒,其中氮浓度为0的对照组喷洒等量蒸馏水。

1.3 挥发油提取

按国家药典委员会(2010)中挥发油提取方法提取。采用水蒸气蒸馏法,每处理约100 g紫苏叶,加入600 mL蒸馏水,蒸馏6 h得到浅黄色紫苏挥发油样品。

1.4 GC-MS分析

色谱条件:用美国安捷伦公司7890A-5975C气质联用仪,色谱柱是19091S-433-Agilent HP-5ms 5% Phenyl Methyl Silox 气相毛细管柱($30\text{ m}\times 250\text{ }\mu\text{m}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$),进样口采用Agilent分流/不分流进样口,进样口温度为 $250\text{ }^\circ\text{C}$,不分流,进样量 $2\text{ }\mu\text{L}$,程序升温:初始温度 $95\text{ }^\circ\text{C}$, $20\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 到 $190\text{ }^\circ\text{C}$ 持续1 min, $5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 到 $230\text{ }^\circ\text{C}$ 持续1 min, $25\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 到 $290\text{ }^\circ\text{C}$ 持续20 min(王琦等,2009;卢汝梅等,2006)。电离方式为EI源,离子源温度为 $230\sim 250\text{ }^\circ\text{C}$,四级杆 $150\sim 200\text{ }^\circ\text{C}$ 。

2 结果与分析

2.1 氮沉降对挥发油主要成分含量影响

用毛细管气相色谱法对紫苏叶挥发油进行分析,采用色谱数据处理系统,以峰面积归一化法测得挥发油各组分相对含量(李健隽,2012;彭炳先等,2007)。本文重点考察紫苏叶中3种主要的挥发油成分:紫苏醛,D-柠檬烯和 α -蒎烯。不同氮沉降浓度下3种挥发油成分含量结果见表1,挥发油成分与氮沉降浓度线性关系见表2。挥发油成分含量对氮沉降浓度变化的响应规律见图1。

从图1可以看出,3种成分的相对含量都随着

表 1 不同浓度氮沉降作用下紫苏叶挥发油 3 种主要成分 GC-MS 分析结果
Table 1 Effects of different concentrations of nitrogen deposition on the three main components of volatile oil in *Perilla frutescens* leaves

浓度 Concentration (mol · L ⁻¹)	保留时间 Retention time (s)	名称 Designation	分子量 Molecular weight	匹配度 Mate linear	含量 Content (%)
0	5.352	α-Pinene (α-蒎烯)	136.125	97	0.59
	7.124	D-Limonene (D-柠檬烯)	136.125	94	23.07
	11.645	Perilla aldehyde (紫苏醛)	150.104	94	58.18
0.011	5.385	α-Pinene (α-蒎烯)	136.125	97	0.53
	7.144	D-Limonene (D-柠檬烯)	136.125	94	17.95
	11.862	Perilla aldehyde (紫苏醛)	150.104	49	47.40
0.022	5.358	α-Pinene (α-蒎烯)	136.125	97	0.52
	7.157	D-Limonene (D-柠檬烯)	136.125	95	13.91
	11.936	Perilla aldehyde (紫苏醛)	150.104	49	36.72
0.044	6.132	α-Pinene (α-蒎烯)	136.125	92	0.33
	7.049	D-Limonene (D-柠檬烯)	136.125	94	7.98
	11.624	Perilla aldehyde (紫苏醛)	150.104	94	9.26
0.088	6.132	α-Pinene (α-蒎烯)	136.125	64	0.32
	7.049	D-Limonene (D-柠檬烯)	136.125	94	7.98
	11.624	Perilla aldehyde (紫苏醛)	150.104	94	9.15

模拟氮沉降浓度的增加而减小。根据线性方程,紫苏醛的下降速度最快,即氮盐浓度在 0~0.044 mol · L⁻¹ 范围内,其浓度的变化对紫苏醛含量的影响最大,其次为 D-柠檬烯,最后是 α-蒎烯。由表 2 可知,紫苏醛与氮盐浓度线性关系较强 ($R^2 = 0.9954 > 0.99$),而对于 D-柠檬烯和 α-蒎烯,其线性关系相对较弱。

表 2 3 种主要挥发油成分与氮沉降浓度线性关系

Table 2 Linear relation of three main components and nitrogen deposition concentration

物质种类 Material kind	线性方程 linear equation	R^2 Correlation coefficient	线性范围 Linear limit (mol · L ⁻¹)
α-Pinene (α-蒎烯)	$y = -5.7922x + 0.604$	0.932 9	0~0.044
D-Limonene (D-柠檬烯)	$y = -336.65x + 22.208$	0.982 1	0~0.044
Perilla aldehyde (紫苏醛)	$y = -1115.4x + 59.356$	0.995 4	0~0.044

2.2 氮沉降对 3 种主要成分比例影响

根据不同氮盐浓度下 3 种主要挥发性成分的相对含量,可计算出其比例关系,结果见表 3。可以看出,随着氮盐浓度不断增加,D-柠檬烯和紫苏醛相对于 α-蒎烯的比例不断减小,当浓度达到 0.044 mol · L⁻¹ 时,三者的比例关系趋于稳定,为 1 : 24 : 28,并

且此时各成分相对含量均为最低。

表 3 不同氮盐浓度下 3 种主要挥发性成分的比例

Table 3 Different nitrogen salt concentrations of three main components in proportion

氮盐浓度 Nitride concentration (mol · L ⁻¹)	α-蒎烯 : D-柠檬烯 : 紫苏醛 α-Pinene : D-Limonene : Perilla aldehyde
0	1 : 39 : 99
0.011	1 : 33 : 88
0.022	1 : 27 : 71
0.044	1 : 24 : 28
0.088	1 : 25 : 29

2.3 不同挥发油成分对氮沉降敏感性差异

对紫苏叶挥发油中 3 种主要成分相对含量变异系数进行分析,结果发现:3 种挥发油成分的变异系数大小为 α-蒎烯(0.692 9) > D-柠檬烯(0.460 1) > 紫苏醛(0.271 6)。说明不同氮盐浓度条件处理下,紫苏醛含量的变化比较大,而对 α-蒎烯在挥发油中的含量比较稳定。

3 结论

传统观点认为,自然生态系统对大气氮沉降相对不敏感,但也有研究认为应该重新评价自然生态

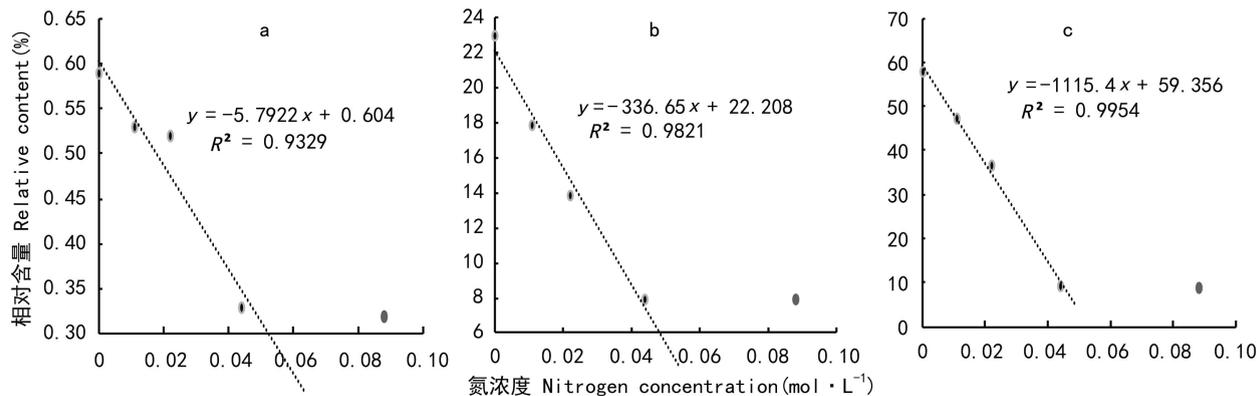


图1 紫苏叶挥发油3种主要有效成分随氮沉降浓度变化曲线 a. α -蒎烯; b. D-柠檬烯; c. 紫苏醛

Fig. 1 Linear relation of three main components of volatile oil in *Perilla frutescens* and nitrogen deposition concentration

a. α -Pinene; b. D-Limonene, c. Perilla aldehyde.

系统中氮沉降的重要性(刘学军, 2004; 王体健等, 2008)。本研究发现大气氮沉降浓度与紫苏叶挥发油中主要成分含量密切相关, 而且随着氮沉降浓度升高, 紫苏叶挥发油成分含量显著降低, 因此, 氮沉降对于自然生态系统中药用植物有效成分的影响应该引起足够重视。

一定量的氮沉降可以增加植物的生产力, 当沉降量超过了植物和微生物对氮的需求时, 植物的生产力反而降低(李德军等, 2003; Nakaji et al, 2002)。调查表明, 我国降水 NO_3^- 离子浓度 ($0.32 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和沉降量 ($0.20 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与美国、日本接近, 而 NH_4^+ 浓度则更高, 其沉降量也更大, 分别是美国和日本的4倍和3.7倍(张颖等, 2006; 薛璟花等, 2005)。因此, 本研究中较高浓度氮沉降处理使紫苏叶挥发性成分含量降低, 可能是因为受到了 NH_4^+ 过量胁迫导致的。在后续研究中, 应该设置 NH_4^+ 和 NO_3^- 的单独对照试验, 进一步明确不同离子对紫苏叶3种成分含量及其合成过程的影响。此外, 本研究试验未排除自然条件下的大气氮沉降效应, 今后应采用大棚种植, 以隔绝大气氮沉降影响。同时增加实验组, 设置更低的 NH_4NO_3 浓度, 从而得到紫苏叶挥发油中主要有效成分在更低浓度氮沉降条件下的含量变化, 更加全面评估氮沉降对药用植物有效成分含量的影响。

参考文献:

CHINESE PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2015. Pharmacopoeia of People's Republic of China (Vol. 1) [M]. Beijing: China Medical Science Press; 318. [国家药典委员会. 2015. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 318.]

CHINESE PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2010. Pharmacopoeia of People's Republic of China (Vol. II) [M]. Beijing: China Medical Science Press; Appendix 87. [国家药典委员会, 2010. 中华人民共和国药典(二部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 附录 87.]

FAN HB, YUAN YH, WANG Q, et al, 2007. Effects of nitrogen deposition on soil organic carbon and total nitrogen beneath Chinese fir plantations [J]. J Fujian Coll For, 27(1): 1-6. [樊后保, 袁颖红, 王强, 等, 2007. 氮沉降对杉木人工林土壤有机碳和全氮的影响 [J]. 福建林学院学报, 27(1): 1-6.]

GALLOWAY JN, ALBER JD, ERISMAN JW, et al, 2003. The nitrogen cascade [J]. Biol Sci, 53(4): 341-356.

LI DJ, MO JM, FANG YT, et al, 2003. Impact of nitrogen deposition on forest plants [J]. Acta Ecol Sin, 23(9): 1881-1896. [李德军, 莫江明, 方运霆, 等, 2003. 氮沉降对森林植物的影响 [J]. 生态学报, 23(9): 1881-1896.]

LI JJ, 2012. Analysis the content of each component in mixed gas with area normalization method [J]. Metrol & Meas Technol, 39(4): 86-87. [李健隽, 2012. 面积归一化法分析混合气体中各组分含量 [J]. 计量与测试技术, 39(4): 86-87.]

Liu XJ, 2004. Atmospheric nitrogen deposition and its impact on China's farmland ecosystem nutrient inputs [J]. SW Chin J Agric Sci, 17(S): 185-186. [刘学军, 2004. 大气氮素沉降及其对我国农田生态系统养分输入的影响 [J]. 西南农业学报, 17(S): 185-186.]

LU RM, HE CW, PAN Y, 2006. An analysis of chemical constituents of volatile oils in *Uvaria microcarpa* Pa [J]. World Sci Technol/Mod Trad Chin Med Mat Med, 8(6): 40-42. [卢汝梅, 何翠薇, 潘英, 2006. 紫玉盘挥发油化学成分的分析 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 8(6): 40-42.]

NAKAJI T, TAKENAGA S, KUROHA M, et al, 2002. Photosynthetic response of *Pinus densiflora* seedlings to high nitrogen load [J]. Environ Sci, 9(4): 269-282.

PENG BX, HUANG ZZ, CHEN SH, 2007. Determination of chemical constituents in volatile oil from *Lysimachia congestiflora* Hemsl by GCMS [J]. 时珍国医国药, 18(10): 2465-2467. [彭炳先, 黄振中, 陈受惠, 2007. 色谱峰面积归一化法测定中药小过路黄挥发油化学成分 [J]. 时珍国医国药, 18(10): 2465-2467.]

(下转第328页 Continue on page 328)