

长春七根部挥发油的测定及抑菌活性研究

葛晓晓¹, 姚 成¹, 边 敏¹, 曹 莉²

(1. 南京工业大学理学院, 江苏 南京 211816)

(2. 南京工业大学食品与轻工学院, 江苏 南京 211816)

[摘要] 研究了长春七根部挥发油的提取方法, 结合该部位的抑菌活性测试, 提高挥发油的综合利用价值. 采用挥发器测定和索式抽提两种方法和不同溶剂分别对长春七根部进行挥发油的提取, 通过 GC-MS 联用技术测定分析有效成分, 并进行比对, 同时测试了其大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性. 结果表明, 两种方法的提取率和提取成分的种类与含量存在差异. 抑菌活性测试表明长春七根部挥发油对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均能产生明显的抑制作用. 两种方法可以互补地用于长春七根部中的有效成分的提取, 结合挥发油的抑菌活性, 进一步明确了该部位的应用前景.

[关键词] 长春七, 挥发油, 气相色谱-质谱分析, 抑菌活性

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-1292(2015)01-0067-06

Analysis of Essential Oil from the Roots of *Libanotis buchtormensis* and Antibacterial Activity Test

Ge Xiaoxiao¹, Yao Cheng¹, Bian Min¹, Cao Li²

(1. College of Science, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China)

(2. College of Food Science and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China)

Abstract: The aim of this article is to improve comprehensive value of essential oils through studying the extraction methods of essential oils from roots of *Libanotis buchtormensis* (Fisch) DC and the antibacterial activity test. The essential oils are extracted by steam distillation and soxhlet extraction with different solvents. The chemical constituents of essential oils are identified and analyzed by GC-MS. The colon bacillus and staphylococcus aureus are used for antibacterial activity test. There are differences in extraction rate, kinds and contents with the different methods and different solvents. The antibacterial activity test proves that propagate frequency of colon bacillus and staphylococcus aureus are obviously restrained by essential oils from roots of *Libanotis buchtormensis* (Fisch) DC. Many compounds are isolated and identified for the first time. Effective constituents can be extracted by two methods in the general. Combining with the antibacterial activity test, essential oils from roots of *Libanotis buchtormensis* (Fisch) DC will get a very wide application foreground.

Key words: *Libanotis buchtormensis* (Fisch) DC, essential oil, GC-MS analysis, antibacterial activity

长春七 [*Libanotis buchtormensis* (Fisch) DC]^[1] 是伞形科岩风属草本植物, 其性微甘、味酸, 主要分布于新疆、甘肃、四川和陕西等省区, 为陕西太白七药之一, 在陕西民间有很好的应用疗效. 一般以根茎入药, 主治风寒感冒、咳嗽、关节肿痛、跌打损伤、风湿筋骨痛等病症. 长春七根部挥发油具有浓郁的气味, 有研究表明^[2], 长春七根茎的中性油和酚酸性部分在生物实验中具有很好的退热、止痛、消炎等疗效. 植物的挥发油提取物的成分和含量与多种因素有关, 例如生长环境、炮制方法^[3] 及提取方法^[4]. 本实验以长春七根部为研究对象, 分别用挥发油测定器法和索式抽提法提取挥发油, 并通过 GC-MS 测定挥发油的成分, 研究和比对不同提取方法所提取组分的种类和含量, 考察相关影响因素. 同时以大肠杆菌 and 金黄色葡萄球菌为供试菌种, 采用平板打孔法初步测定挥发油的抑菌活性, 采用试管稀释法测定挥发油最低抑菌浓度和最低杀菌浓度.

收稿日期: 2014-10-28.

通讯联系人: 姚成, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 现代分析及精细有机合成. E-mail: yaocheng@njtech.edu.cn

1 仪器与试剂

1.1 仪器

7820A-5975 气质联用系统(Agilent),隔水式恒温培养箱(PYX-DHS500BS,上海跃进医疗器械有限公司),台式全温振荡器(TQ2-31,上海精宏实验设备有限公司),立式压力蒸汽灭菌锅(YXQ-LS-50S,上海讯博实业有限公司),超净工作台(SW-CJ-1FD,苏净安素)。

1.2 试剂

长春七药材 2 kg,产地陕西太白山,购于安徽省亳州市辉睿中药科技有限公司,由南京中医药大学刘圣经老师鉴定为长春七。所用试剂等均为分析纯。

2 实验方法

2.1 检测条件

GC-MS 工作条件:Agilent GC/MS 7820A-5975,DB-5MS 弹性石英毛细管柱(30 m×0.25 mm,膜厚 0.25 μm)。测定条件:载气为高纯氮气,流量 1.5 mL/min;分流比 1:30;色质界面温度为 250 $^{\circ}\text{C}$,衡流模式(流量为 1 mL/min),采用程序升温:40 $^{\circ}\text{C}$ 保留 3 min,以 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 上升到 180 $^{\circ}\text{C}$,再以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 上升到 220 $^{\circ}\text{C}$,最后以 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 上升到 280 $^{\circ}\text{C}$,保留 2 min。质谱条件:EI 电流源,电子能量 70 eV,扫描范围 30~500 质量单位,进样量 1.0 μL (1:100(体积分数)丙酮稀释液),全扫描方式。

2.2 样品处理方法

2.2.1 挥发油测定器法

将长春七的根部药材粉碎,过 40 目筛,称取 100 g 粗粉装入挥发油测定器,加入 500 mL 蒸馏水。加热并保持微沸约 8 h,至挥发油测定器中油量不再增加时停止加热^[5]。取下冷凝管,在挥发油测定器中加入 2 mL 正己烷,待完全分层后,取出上层淡黄色油状液体,约 0.2 g,即为溶有挥发油提取物的正己烷。加入适量的无水硫酸钠干燥,过滤,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱里保存备用。

2.2.2 索式抽提法

称取 60 g 粗粉,加入圆底烧瓶中,加入 200 mL 乙醚作为提取溶剂,加热搅拌 24 h,低温旋干,得到挥发油提取物 0.68 g;另取 1 份使用正己烷作为提取溶剂进行相同操作,得到挥发油提取物 1.07 g。

2.3 挥发油抑菌活性测试

对挥发油测定器法和分别用乙醚、正己烷索式提取法得到的 3 个挥发油样品进行抑菌活性测试。

LB 培养基:蛋白胨 10 g,酵母浸粉 5 g,NaCl 10 g,加蒸馏水至 1 000 mL,固体培养基加琼脂粉 20 g,121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。

2.3.1 菌悬液的制备

将菌种接种到液体培养基中进行振荡培养,至对数生长期时对其进行计数,然后用无菌生理盐水稀释至 $2\times 10^7\sim 5\times 10^7$ cfu/mL。

2.3.2 挥发油体外抑菌活性

分别移取 100 μL 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌菌悬液在直径 9 cm 平板均匀涂布,在平板中央打 1 个直径 3 mm 的孔,向孔内滴加 5 μL 的挥发油,对照板加 5 μL 灭菌水,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 20 h,培养结束后测量抑菌圈的直径。

2.3.3 最小抑菌浓度(MIC)的测定

大肠杆菌和金黄色葡萄球菌 MIC 值测定采用液体培养基二倍稀释法,在试管中加入一定量的液体培养基、菌悬液和挥发油,使得挥发油体积分数分别为 10.000、5.000、2.500、1.250、0.625、0.312 和 0.156 $\mu\text{L}/\text{mL}$,同时以不加挥发油的空白管为对照(CK)。每个浓度接种 3 管,重复 3 次。采用 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养,培养结束肉眼观察试管的浑浊程度。溶液澄清无菌生长的最大稀释度为最小抑菌浓度。

2.3.4 最低杀菌浓度(MBC)的测定

取上述肉眼观察无菌生长的培养液,加入到没有添加挥发油的培养基中,按上述条件再培养,仍无生长的为最低杀菌浓度。

3 结果与讨论

3.1 挥发油测定器法

采用 GC-MS 法,从长春七根部挥发油中分离出 23 个色谱峰,第 2 个峰是正己烷溶剂峰,通过数据库 NIST11、mainlib、replib 进行检索匹配、人工解析和核对有关文献资料^[6],鉴定了 16 个化合物,并以面积归一化法进行定量分析,如表 1 所示。

表 1 挥发油化学成分分析结果
Table 1 The analysis of essential oil

峰编号	出峰时间/min	分子式	面积百分比/%	物质
1	1.696	C ₆ H ₁₄	1.09	3-甲基戊烷
2	1.770	C ₆ H ₁₄	36.18	正己烷(溶剂)
3	1.953	C ₆ H ₁₄	1.83	甲基环戊烷
4	3.366	C ₆ H ₁₄ O ₂	1.34	2,2-二甲氧基丁烷
5	6.880	C ₆ H ₁₂ O ₂	2.73	3-甲基戊酸
6	15.222	C ₁₅ H ₂₄	3.64	(1S,4R,8R)-1,4,10,10-四甲基-2,3,4,5,6,7,8,9-八氢-1H-甲桥环戊基[8]轮烯
7	15.835	C ₁₅ H ₂₄	2.27	1-石竹烯
8	16.241	C ₁₅ H ₂₄	1.91	塞舌尔烯
12	17.540	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	1.15	(6R,7E,9R)-9-羟基-4,7-巨豆二烯-3-酮
15	19.399	C ₁₅ H ₂₄	3.08	长叶烯
16	19.531	C ₁₅ H ₂₆ O	4.08	百秋李醇
17	19.972	C ₁₅ H ₂₄ O	1.33	4,8a-二甲基-6-(1-甲基乙烯基)-1,2,3,5,6,7,8,8a-八氢-2-萘醇
18	20.292	C ₁₅ H ₂₄	3.73	1-卡拉烯
21	27.696	C ₂₂ H ₄₆	5.71	二十二烷
22	28.841	C ₂₆ H ₅₄	5.97	二十六烷
23	29.762	C ₂₄ H ₅₀	2.28	二十四烷

挥发油测定器方法是测定挥发油使用最广泛的方法之一,采用该法,挥发油的提取率为 0.2%。通过对正己烷(溶剂)进行空白测定,确定 C₆H₁₄ 同分异构体 3-甲基戊烷和甲基环戊烷是溶剂本身具有的。所以得到的已鉴定的挥发油中的化合物共 14 种,占长春七根部挥发油总量的 39.22%。挥发油测定器法提取的烷烃类和烯烃类的物质较多,且首次鉴别出多种直链烷烃,如二十二烷、二十六烷、二十四烷等。直链烷烃广泛分布在药用植物的挥发油中。除此之外,还检测出一些酯类、酮类和其他类型的化合物。除 1-石竹烯、长叶烯外,其他均为首次鉴别。挥发油测定器法利用水蒸气蒸馏得到挥发油,其含量虽能得到较好的控制,但挥发油是混合物,其组成不稳定,提取的量也需要研究,对其组成也有影响;长时间的微沸状态会使挥发性物质不能被有效保留或已被破坏,也可能使部分活性物质衍生化^[7],且也不适用于易水解成分和水中溶解度大的成分的提取。

3.2 索式提取法

采用 GC-MS 法分别对乙醚和正己烷的索式抽提物进行分离测定。从长春七根部挥发油中分别分离出 10 个和 27 个色谱峰,分析方法同 3.1,分别鉴定了 7 个和 19 个化合物,以面积归一化法进行定量分析,结果如表 2 和表 3 所示。

表 2 挥发油化学成分分析结果-乙醚提取
Table 2 The analysis of essential oil-ethyl ether extraction

峰编号	出峰时间/min	分子式	面积百分比/%	物质
3	2.600	C ₁₅ H ₁₀ O	5.54	3-戊酮
4	3.395	C ₆ H ₁₄ O ₂	35.68	2,2-二甲氧基丁烷
5	4.711	C ₅ H ₁₀ O ₂	5.46	异戊酸
6	4.911	C ₆ H ₁₂ O ₃	11.01	3,3-二甲氧基-2-丁酮
7	5.037	C ₈ H ₁₈ O ₂	6.67	异丁醛二乙缩醛
8	10.010	C ₁₁ H ₂₄	7.83	正十一烷
10	32.680	C ₂₂ H ₄₃ NO	9.62	芥酸酰胺

表 3 挥发油化学成分分析结果-正己烷提取
Table 3 The analysis of essential oil-*n*-Hexane extraction

峰编号	出峰时间/min	分子式	面积百分比/%	物质
1	8.52	C ₅ H ₁₀ O ₂	3.54	异戊酸
2	10.74	C ₁₃ H ₂₈	0.87	十三烷
3	12.92	C ₉ H ₁₀ O ₂	0.99	3-苯基丙酸
4	13.08	C ₅ H ₁₀ O ₃	0.82	2-甲基-2,4-戊二醇
6	17.78	C ₈ H ₁₄ O ₂	8.73	异戊酸烯丙酯
7	18.46	C ₁₆ H ₃₄	1.27	十六烷
9	19.08	C ₁₄ H ₂₂ O	2.14	2,4-二叔丁基苯酚
10	21.60	C ₁₃ H ₂₈	1.46	2,4,6-三甲基癸烷
11	21.92	C ₁₅ H ₂₆ O	0.89	百秋李醇
12	26.19	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	1.44	(Z)-7-甲基-8-十四烯-1-乙酸酯
13	26.52	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	8.54	十六烷酸
14	27.59	C ₁₅ H ₂₄ O	4.89	4,8a-二甲基-6-(1-甲基乙烯基)- 八氢萘-1(2H)-酮
16	29.41	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	32.60	亚油酸乙酯
17	29.50	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	15.61	亚麻酸
18	29.62	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	1.73	硬脂酸
20	30.89	C ₄₄ H ₉₀	0.90	四十四烷
21	31.03	C ₂₂ H ₃₀ O ₈	1.26	戊曲酯
22	31.49	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	1.37	二十酸甲酯
25	32.57	C ₂₆ H ₅₄	1.07	3-乙基-5-(2-乙基丁基)十八烷

采用该法,挥发油的提取率分别为 1.13%、1.78%。得到已鉴定化合物分别占长春七根部挥发油总量的 81.81%、90.12%。索式抽提法提取的烷烃类、羧酸类和酯类物质较多。用乙醚提取的种类较少,其中 2,2-二甲氧基丁烷的含量较高,占总量的 35.68%;用正己烷提取的挥发油中物质的种类较多,其中亚油酸乙酯的含量较高,占总量的 32.60%。索式抽提法的优点是所得挥发油的提取率高,但最大的缺点是在去除溶剂的同时损失了一部分的香味成分。因此在用本身具有易挥发性的乙醚作提取剂时,提取的挥发油的种类和含量相对偏少。

3.3 抑菌活性测试结果

3.3.1 挥发油体外抑菌活性

加入挥发油的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的平板上形成了抑菌圈,抑菌圈直径如表 4 所示。可见,长春七根部挥发油对 2 种供试菌有一定的抑制活性。

表 4 长春七根部挥发油对菌种的抑菌圈直径
Table 4 Antimicrobial cycle diameter of essential oil from roots of *Libanotis buchtormensis*

	大肠杆菌抑菌圈平均直径/mm	金黄色葡萄球菌抑菌圈平均直径/mm
挥发油测定器法	13.2	15.4
乙醚提取	16.3	19.6
正己烷提取	10.7	12.5
空白对照	6.0	6.0

3.3.2 最小抑菌浓度(MIC)的测定结果

大肠杆菌、金黄色葡萄球菌培养结束后菌液的浑浊程度如表 5 所示。挥发油测定器法、乙醚-索式提取法、正己烷-索式提取法分别标识为 1、2 和 3 号。

从表 5 可见,挥发油测定器法提取的长春七根部挥发油对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 值为 5 和 2.5 μL/mL,乙醚-索式提取法对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 分别为 2.5 和 1.25 μL/mL,正己烷-索式提取法对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 分别为 10 和 5 μL/mL。

表 5 长春七根部挥发油作用后菌种的浑浊程度
Table 5 Turbidity of strains after treated with essential oil from roots of *Libanotis buchtormensis*

组别	体积分数/ ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	大肠杆菌			金黄色葡萄球菌		
		1	2	3	1	2	3
CK	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++
挥发油提取物	10.000	—	—	—	—	—	—
	5.000	—	—	+	—	—	—
	2.500	+	—	+	—	—	+
	1.250	+	+	++	+	—	+
	0.625	+	+	++	+	+	++
	0.312	++	++	++	+	+	++
	0.125	++	++	+++	++	++	+++

注:“—”表示溶液澄清,无菌生长;“+”表示菌液浑浊程度

3.3.3 最低杀菌浓度(MBC)的测定结果

平板培养的结果表明,挥发油测定器法提取的挥发油对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MBC 分别为 5 和 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$,乙醚-索式提取法提取的挥发油对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MBC 分别为 2.5 和 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$,正己烷-索式提取法提取的挥发油对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MBC 都为 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

本研究的供试菌种分别属于革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌.实验结果表明,长春七根部挥发油对这两种供试菌有一定的抑菌活性,但对革兰氏阳性菌的抑菌效果强于对革兰氏阴性菌的抑菌效果,挥发油中化合物的羟基及不饱和双键是其抑菌作用的重要结构基础^[8].挥发油是粗提取物,是很多成分的混合体系,抗菌作用效果可能是多种成分协同、多靶点作用的结果^[9-12].

4 结语

本实验研究了两种提取挥发油的方法,挥发油测定器法的提取率为 0.2%,以乙醚和正己烷为提取剂的索式抽提法的提取率分别为 1.13%和 1.78%,并首次鉴定出多种化合物.两种方法可以互补以便更全面地对长春七根部挥发油中的物质进行分析,为生物学和药学研究提供了依据.长春七根部挥发油对供试菌有一定的抑菌活性,是一种利用价值很高的潜在抗菌药源,值得进一步的研究开发.

[参考文献](References)

- [1] 陕西省中医研究所革命委员会. 陕西草药[M]. 西安:陕西省中医研究所革命委员会,1970.
Chinese Medical Research Revolutionary Committee of Shanxi Province. Herb in Shanxi[M]. Xi'an:Chinese Medical Research Revolutionary Committee of Shanxi Province,1970.(in Chinese)
- [2] 陈光娟,沈亚琴,马树德. 长春七中性油及酚酸性部分药理作用初步研究[J]. 陕西新医药,1985,14(12):46-49.
Chen Guangjuan, Shen Yaqin, Ma Shude, et al. A preliminary study of the pharmacological effects on neutral oils and phenolic acids in *Libanotis buchtormensis*[J]. New Medicine of Shanxi, 1985, 14(12):46-49.(in Chinese)
- [3] 颜永刚,郭晓恒,邓翀,等. 云南产野生和栽培薄荷中挥发油的 GC-MS 比较分析[J]. 中草药,2011,42(6):1 090-1 092.
Yang Yonggang, Guo Xiaoheng, Deng Chong, et al. Comparative analysis on essential oil in wild and cultivated *Mentha haplocalyx* from Yunnan Province by GC-MS[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2011, 42(6):1 090-1 092.(in Chinese)
- [4] 梁呈元,佟海英,赵志强,等. 水蒸气蒸馏法与超临界 CO_2 萃取法提取薄荷油的化学成分比较[J]. 林产化学与工业, 2007, 27(1):81-84.
Liang Chengyuan, Tong Haiying, Zhao Zhiqiang, et al. Comparison of essential oils from *Mentha haplocalyx* Briq by steam distillation and supercritical carbon dioxide extraction[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2007, 27(1):81-84.(in Chinese)
- [5] 曾元儿. 中国药典 2010 年版(一部)化学成分分析简明手册[M]. 广州:中山大学出版社,2010.
Zeng Yuaner. Pharmacopoeia of The People's Republic of China[M]. Guangzhou:Press of Sun Yat-sen University, 2010.(in Chinese)
- [6] 石娟,靳菊情,马婧,等. 长春七二氧化碳超临界萃取物的化学成分研究[J]. 药物分析杂志,2004,24(增刊):49-50.
Shi Juan, Jin Juqing, Ma Jing, et al. Studies on the chemical constituents of the volatile oil from the roots of *Libanotis buchtormensis* by supercritical fluid extraction[J]. Chinese Journal of Pharmacy Analysis, 2004, 24(S):49-50.(in Chinese)

- [7] 盛菲亚,卢君蓉,彭伟,等. 香附炮制前后挥发油的 GC-MS 指纹图谱对比研究[J]. 中草药,2013,44(23):3 321-3 327.
Sheng Feiya, Lu Junrong, Peng Wei, et al. Comparative study on GC-MS fingerprints of volatile oil in crude and processed Cypripedium Rhizoma[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2013, 44(23): 3 321-3 327. (in Chinese)
- [8] 何跃君. 竹叶挥发油化学成分及其生物活性研究[D]. 北京:中国林业科学研究院国际竹藤中心,2009.
He Yuejun. Chemical components and biological activities of essential oils from the bamboo leaves[D]. Beijing: International Bamboo Centre, Chinese Academy of Forestry, 2009. (in Chinese)
- [9] Cox S D, Mann C M, Markham J L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91(3): 492-497.
- [10] 姜红霞,聂永心,冀海伟,等. 泰山野生白苏叶挥发油成分 GC-MS 分析与抑菌活性研究[J]. 中草药,2011,42(10):1 952-1 955.
Jiang Hongxia, Nie Yongxin, Ji Haiwei, et al. GC-MS analysis and antimicrobial activity study of essential oil from *Perilla frutescens* leaves[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2011, 42(10): 1952-1955. (in Chinese)
- [11] Denyer S P, Hugo W B. Mechanisms of Action of Chemical Biocides: Their Study and Exploitation[M]. Oxford: Oxford Blackwell Scientific Publication, 1991: 171-188.
- [12] Rasooli I, Rezaei M B, Allamech A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *thymus eriocalyx* and *thymus x-porlock* [J]. Food Control, 2006, 17(5): 359-364.

[责任编辑:严海琳]