

冷水花挥发油 GC-MS 指纹图谱及抗菌活性

甘秀海¹, 梁志远^{1*}, 周欣², 赵超², 姜金仲¹

(1. 贵州师范学院 化学与生命科学学院, 贵阳 550018;
2. 贵州师范大学 天然药物质量控制研究中心, 贵阳 550001)

[摘要] **目的:**建立冷水花挥发油 GC-MS 指纹图谱,测定其抗菌活性。**方法:**利用 GC-MS 法分析 10 批次冷水花挥发油样品,采用“中药色谱指纹图谱计算机相似性评价系统”软件进行模式分析及相似度计算,对共有特征峰成分进行识检;采用滤纸片法测试了挥发油的抗菌活性。**结果:**建立了冷水花挥发油 GC-MS 指纹图谱,标定并鉴定了 16 个共有特征峰;冷水花挥发油对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌具有一定的抑菌活性。**结论:**该方法重复性好,所建立的指纹图谱为贵州冷水花挥发油的质量控制提供了有效手段,为冷水花挥发油的利用提供了重要依据。

[关键词] 冷水花; 挥发油; 气相色谱-质谱; 指纹图谱; 抗菌活性

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)17-0063-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015170063

GC-MS Fingerprint and Antimicrobial Activities of Volatile Oils from *Pilea aquarum* GAN Xiu-hai¹, LIANG Zhi-yuan^{1*}, ZHOU Xin², ZHAO Chao², JIANG Jin-zhong¹ (1. School of Chemistry and Life Science, Guizhou Normal College, Guiyang 550018, China; 2. Research Center for Quality Control of Natural Medicine, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish characteristic fingerprint of volatile oils from *Pilea aquarum* by gas chromatography-mass spectrometry to determine the antimicrobial activities of volatile oils. **Method:** Chemical components of volatile oil from ten batches of *P. aquarum* were analyzed by GC-MS method, the common model and similarity of the TIC profiles were analyzed by “Computer Aided Similarity Evaluation System”, and the components of common characteristic peaks in chromatograms were identified. Antimicrobial activities of volatile oils were tested by filtering paper method. **Result:** Fingerprint of volatile oils from *P. aquarum* were established, sixteen characteristic peaks in GC-MS specific chromatogram of volatile oils from *P. aquarum* were identified and defined. The results also showed that the volatile oils of *P. aquarum* showed a certain effect against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Conclusion:** With a good reproducibility, the established characteristic fingerprints of volatile oil from *P. aquarum* can be used for quality control and provide important basis for application of volatile oils from *P. aquarum*.

[Key words] *Pilea aquarum*; volatile oil; GC-MS; fingerprint; antimicrobial activity

冷水花是贵州苗族药品种之一,全草可供药用,具有清热,利湿,退黄等功效,用于治疗黄疸,肺结核等疾病^[1-3]。药理活性研究显示冷水花具有抗菌、抗炎及镇痛作用^[4-5]。前期本课题组对冷水花化学成分及薄层指纹图谱鉴别开展了一定的研究^[6-9],其中发现采用水蒸气法提取的挥发油中含有较多的

α -法呢烯,大根香叶烯 D,石竹烯,水杨酸甲酯及 1-萘胺等成分,而固相微萃取所得挥发油含有的主要成分则为 1-甲基-5-甲烯基-8-(1-异丙基)-[s-(E, E)]-1,6-环癸二烯、石竹烯、1-萘胺、愈创兰油烃及 N-(4-羟苯基)-丁酰胺,两者所含组分和组分含量存在较大差异。因此,有效控制冷水花挥发油的质量

[收稿日期] 20141231(010)

[基金项目] 贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字[2010]2213 号);贵州特色生物资源开发利用重点实验室项目(2012009)

[第一作者] 甘秀海,副教授,从事天然药物化学的教学、科研工作, E-mail: gxh200719@163.com

[通讯作者] *梁志远,教授,从事天然产物化学研究, Tel:0851-5816647, E-mail: gzwh24000@sina.com

是其挥发油利用的关键。为了充分开发和应用冷水花资源,本实验依据《中国药典》2010 年版一部附录 XD“挥发油测定法”项下的方法提取冷水花挥发油,并运用 GC-MS 法对其主要成分进行定性及定量分析,通过国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱计算机相似性评价系统”(2004A 版)软件进行模式分析及相似度计算,建立了冷水花挥发油指纹图谱,同时测定了不同产地冷水花挥发油的抗菌活性,以期为冷水花挥发油质量标准的建立及药材资源的综合开发提供科学依据。

1 材料

Hewlett Packard 6890-5973 型气相色谱-质谱联用仪(美国惠普公司),AL204 型电子分析天平(梅特勒-托利多),2 L 同时蒸馏-萃取(SDE)装置(南京鑫玉石化仪器有限公司),ZNHW-II 型智能 2 L 加热套(河南爱博特科技发展有限公司),中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版,国家药典委员会),其他试剂均为分析纯。

湿生冷水花新鲜药材于 2011 年 8 ~ 10 月采自贵州省境内(见表 1),经贵州师范学院化学与生命科学学院朱富寿教授鉴定为荨麻科湿生冷水花(*Pilea aquarum*)的全草。

表 1 冷水花样品来源信息

Table 1 Sources of *Pilea aquarum* samples

No.	产地	采集时间	No.	产地	采集时间
S1	贵州纳雍	2011-09	S6	贵州息烽	2011-09
S2	贵州贵阳	2011-08	S7	贵州惠水	2011-10
S3	贵州凯里	2011-09	S8	贵州遵义	2011-10
S4	贵州天柱	2011-09	S9	贵州盘县	2011-08
S5	贵州正安	2011-08	S10	贵州玉屏	2011-08

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 参照《中国药典》2010 年版一部附录 XD 挥发油测定方法甲法—水蒸气蒸馏法,取 10 个不同产地的冷水花药材 100 g,各置于 2 L 圆底烧瓶中,加 10 倍量的水及数粒沸石,振摇均匀,浸泡 2 h,连接挥发油测定装置及回流冷凝管,置加热套中,加热,待测定器中挥发油的量不变时,停止加热,冷却,所得挥发油用无水硫酸钠干燥,取挥发油 20 μL ,用干燥正己烷定容至 10 mL,摇匀后过 0.45 μm 滤膜,取续滤液作为 GC-MS 分析供试品溶液;取挥发油,用吐温无菌水稀释成 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为抗菌活性测定供试品溶液。

2.2 GC-MS 分析条件 HP-1 弹性石英毛细管柱

(0.25 mm \times 25 m, 0.25 μm),载气高纯 He;柱温采用程序升温,初始温度 50 $^{\circ}\text{C}$,保持 1 min,以 4 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$,升至 180 $^{\circ}\text{C}$,再以 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$,升至 250 $^{\circ}\text{C}$,保持 10 min;进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$,进样量 1 μL ,载气流量 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,分流进样,分流比 20:1, EI 离子源,电子能量 70 eV,离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$,容积延迟 4 min,离子源扫描范围 m/z 20 ~ 500。

2.3 指纹图谱方法学考察

2.3.1 稳定性试验 取贵州贵阳产冷水花(S1)挥发油供试品溶液,利用 2.2 项分析条件,在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 各进样 1 μL ,采用“中药色谱指纹图谱计算机相似性评价系统”(2004A 版)软件计算得相似度均为 1.00,其中主要峰相对峰面积的 RSD 均 < 2.0%,说明各样品成分在 24 h 内均稳定。

2.3.2 重复性试验 取贵州贵阳产冷水花(S1)样品,分别制备 6 份供试品溶液,在 2.2 项条件下进样分析,计算得相似度 > 0.99,其中主要峰相对峰面积的 RSD 均 < 4.0%,表明本试验方法重复性良好,符合指纹图谱要求。

2.3.3 精密度试验 取贵州贵阳产冷水花(S1)挥发油供试品溶液,在 2.1 项分析条件下,连续进样 6 次分析,计算得相似度均为 1.00,其中主要峰相对峰面积的 RSD 均 < 1.0%,表明仪器精密度良好。

2.4 指纹图谱的建立与分析 取 10 批冷水花样品,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下方法分析样品,得到 10 批冷水花挥发油样品的定性及定量数据,将 GC-MS 数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A 版)”^[11],经校准后得到 10 批样品的总离子流叠加,见图 1;通过数据分析建立了冷水花 GC-MS 指纹图谱的共有模式,见图 2。以 8 号峰(石竹烯)为参照峰,共标定了 16 个共有峰作为冷水花指纹图谱的特征峰。通过 G1701BA 化学工作站数据处理系统,并检索 Nist98 和 Wiley275 质谱图库,再结合有关文献^[6-7,11]进行人工谱图解析,确定了 16 个共有峰的化学成分,依次为 α -蒎烯, β -蒎烯, β -月桂烯, *D*-柠檬烯, 3-萜烯, 胡椒烯, 1-甲基-1-乙烯基-2, 4-二丙烯基-环己烷, 石竹烯, 大根香叶烯 D, 大根香叶烯 B, α -法呢烯, 十六醛, 邻苯二甲酸二丁酯, 2, 4-癸二烯醛, 1-十八烯, 叶绿醇;用峰面积归一化法测得各化学成分在总挥发油中的相对含量,结果见表 2。10 批冷水花样品中 16 个共有特征峰的相对含量总和占总挥发油的 66.35% ~ 88.64%。

2.5 相似度分析 将 10 批冷水花指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版)

表 2 冷水花 GC-MS 指纹图谱共有峰归属认定

Table 2 Common peaks identification of GC-MS fingerprint of *Pilea aquarum*

峰号	相对保留值	化合物名称	各峰的相对质量分数/%									
			S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.33	α -蒎烯	4.15	1.84	5.58	4.60	2.13	7.76	7.24	4.91	6.15	0.75
2	0.37	β -蒎烯	5.16	2.20	4.04	2.68	0.79	4.53	4.91	2.78	4.21	0.92
3	0.39	β -月桂烯	12.08	6.54	13.24	24.31	17.49	25.56	27.47	16.17	18.29	11.31
4	0.40	D-柠檬烯	1.81	1.55	0.95	0.77	1.10	1.26	0.91	0.88	0.37	0.33
5	0.42	3-萜烯	6.60	1.03	7.92	7.63	11.66	11.16	8.44	7.11	4.61	4.54
6	0.77	胡椒烯	1.35	1.96	1.10	0.83	0.73	0.75	0.69	0.97	1.19	1.38
7	0.80	1-甲基-1-乙烯基-2, 4-二丙烯基-环己烷	6.32	5.46	2.17	7.45	9.80	3.94	5.27	6.84	8.87	11.46
8	0.86	石竹烯	17.65	12.29	15.88	11.03	20.51	15.16	16.38	23.82	13.15	20.34
9	0.92	大根香叶烯 D	2.58	3.90	2.81	1.40	2.13	1.32	1.41	1.94	2.07	2.47
10	1.00	大根香叶烯 B	18.66	16.14	22.09	17.64	15.64	11.56	9.30	13.10	20.29	21.95
11	1.06	α -法呢烯	5.46	3.73	2.40	2.61	2.32	3.05	3.57	4.08	3.30	2.97
12	1.57	十六醛	0.36	2.53	1.04	0.49	0.64	0.18	0.20	0.30	0.17	0.46
13	1.87	邻苯二甲酸二丁酯	0.75	0.37	0.33	1.17	0.33	0.98	1.41	0.88	0.69	0.42
14	1.92	2, 4-癸二烯醛	0.44	1.14	0.20	0.69	0.25	0.59	0.83	0.56	0.44	0.43
15	2.02	1-十八烯	0.95	0.75	0.65	0.85	0.14	0.03	0.21	0.59	2.00	2.60
16	2.05	叶绿醇	0.32	4.93	0.29	0.34	0.98	0.49	0.14	0.55	0.48	2.41

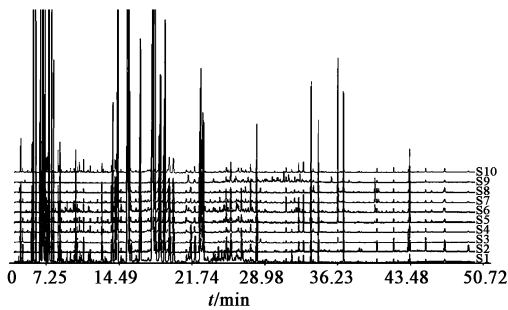


图 1 10 批冷水花样品 GC-MS 指纹谱

Fig. 1 GC-MS fingerprint of ten batches of *Pilea aquarum*

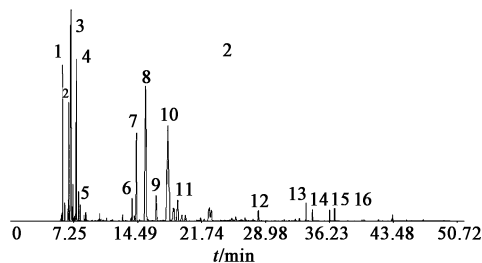


图 2 冷水花挥发油共有峰指纹谱

Fig. 2 Fingerprint of common peaks of essential oil of *Pilea aquarum*

软件,以共有模式为对照图谱,采用相关系数法(中位数)进行相似度计算^[12],结果得到 10 批冷水花挥

发油指纹图谱与共有模式对照指纹图谱的相似度分别为 0.87, 0.71, 0.90, 0.89, 0.72, 0.91, 0.88, 0.86, 0.90, 0.68。

2.6 抑菌圈的测定 采用纸片扩散法测定抑菌圈,将 102 型新华滤纸打成直径为 6 mm 的圆形滤纸片,灭菌,将其放入已涂布菌液的培养基培养皿中,用移液器吸取 2.1 项下的挥发油供试品溶液 10 μ L 注入滤纸的中央,于 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后用游标卡尺测量抑菌圈大小 (mm)。以溶剂作为空白,用 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 庆大霉素无菌水溶液作为阳性对照,10 批不同产地挥发油样品对供试菌株的抑制活性结果见表 3。

由表 3 可知,冷水花挥发油对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌有一定的抑菌活性,其中抑菌活性顺序为枯草芽孢杆菌 > 金黄色葡萄球菌 > 大肠埃希菌,而对铜绿假单胞菌和伤寒沙门氏菌未表现出抑菌活性。

3 讨论

本实验在文献[6-7]报道的基础上考察了升温程序对色谱峰分离度的影响,结果发现本实验所用的升温程序较好,即初始温度 50 $^{\circ}$ C,保持 1 min,以 4 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹,升至 180 $^{\circ}$ C,再以 5 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹,升至

表 3 冷水花挥发油的抑菌效果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	抑菌圈				
	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	枯草芽孢杆菌	铜绿假单胞菌	伤寒沙门氏菌
S1	9.81 ± 1.21	9.35 ± 0.96	11.15 ± 1.05	-	-
S2	-	-	9.28 ± 1.08	-	-
S3	9.56 ± 1.03	-	10.04 ± 0.85	-	-
S4	-	-	9.05 ± 0.56	-	-
S5	10.09 ± 0.86	9.87 ± 1.12	11.58 ± 0.98	-	-
S6	-	-	10.25 ± 1.04	-	-
S7	9.86 ± 1.03	-	10.21 ± 0.68	-	-
S8	10.21 ± 0.65	9.64 ± 1.23	11.34 ± 1.24	-	-
S9	-	-	9.19 ± 0.57	-	-
S10	9.58 ± 1.04	9.19 ± 0.76	11.02 ± 1.12	-	-
庆大霉素	27.38 ± 1.13	27.24 ± 0.99	28.14 ± 0.89	27.65 ± 1.03	27.64 ± 1.16

注：“-”表示不明显或无抑菌圈。

250 ℃, 保持 10 min; 另外还考察了不分流进样和分流比分别为 20:1, 40:1, 80:1 进样对各色谱峰分离度的影响, 结果发现分流比为 20:1 分流进样时, 各色谱峰的分离效果较好, 且基线较平稳。

参照峰的选择方面, 在冷水花挥发油气相色谱图中, 石竹烯(8), 大根香叶烯 D(9 号) 及大根香叶烯 B(10 号) 均有较好的分离度, 但石竹烯^[13] 具有较好的抑菌作用, 因此确定石竹烯(8) 峰为参照峰, 用于标定其他共有色谱峰的相对保留值。

相似度评价结果显示各批样品与共有模式的相似度均偏低, 尤其是样品 S2(贵州贵阳), S5(贵州正安), S10(贵州玉屏) 与共有峰的相似度 < 0.80, 表明不同产地冷水花样品之间具有差异性。因此, 本实验建立的 GC-MS 指纹图谱分析方法可用于冷水花真伪及产地的鉴定, 为冷水花药材的质量控制提供一定的科学依据。

抑菌活性测定结果表明冷水花挥发油具有一定的抑菌活性, 但抑菌活性具有一定的差异, 这与不同产地冷水花挥发油化学成分的差异有关, 其抑菌活性的差异可能与挥发油成分中石竹烯含量不同而导致挥发油对细菌细胞膜破坏能力不同有关^[13]; 另外, 可能与冷水花挥发油成分中多种萜类成分含量差异而导致抑制细菌生长的协同作用不同有关。

所建立的指纹图谱分析方法操作简单, 重复性好, 且所得指纹图谱能全面、综合和准确地反映冷水花药材的质量, 为冷水花挥发油的质量控制提供了有效手段, 为冷水花药材全面的质量控制奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 汪毅. 中草药彩色图集[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2001: 96.
- [2] 贵州省药品监督管理局编. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003: 202.
- [3] 邱德文, 杜江. 中华本草(苗药卷)[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2005: 311-312.
- [4] 孙春龙, 郑庆霞, 李洪庆. 苗药冷水花提取物抗炎镇痛活性的研究[J]. 贵州大学学报, 2009, 26(6): 67-69.
- [5] 孙春龙, 杜文, 李洪庆. 苗药冷水花提取物的抑菌作用[J]. 山地农业生物学报, 2009, 28(5): 468-470.
- [6] 梁志远, 冉小燕, 甘秀海. 冷水花挥发油化学成分的 GC-MS 分析[J]. 贵州教育学院学报, 2009, 20(12): 1-3.
- [7] 甘秀海, 梁志远, 王瑞, 等. SPME/GC-MS 分析冷水花的挥发性成分[J]. 光谱实验室, 2011, 28(6): 3008-3011.
- [8] 甘秀海, 梁志远, 杨小生, 等. 冷水花化学成分研究[J]. 中成药, 2012, 34(4): 689-691.
- [9] 甘秀海, 梁志远, 王婕. 冷水花的薄层指纹图谱研究[J]. 贵州师范学院学报, 2010, 26(3): 34-35.
- [10] 耿放, 王发善, 朱魁元, 等. 五加生化胶囊的 GC-MS 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 89-92.
- [11] 丛浦珠. 质谱在天然有机化合物中的应用[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [12] 张宁, 郭司群, 王发善, 等. 地黄饮子的 GC-MS 指纹图谱研究[J]. 中成药, 2012, 34(3): 394-397.
- [13] 周金沙, 朱良, 李乐, 等. 褐苞蒿挥发油成分及其抗菌活性研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(2): 152-155.

[责任编辑 顾雪竹]