

蒲公英叶脂溶性成分的 GC-MS 分析及其活性探讨

段红波^{1,2}, 宦臣臣^{1,2}, 梁引库^{1,2*}, 徐仲阳³, 任晓峰⁴

- (1. 陕西理工大学 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723000;
2. 陕西理工大学 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000; 3. 青海大学 农林科学院, 西宁 810016;
4. 汉中天然谷生物科技股份有限公司, 陕西 汉中 723000)

[摘要] 目的:研究蒲公英叶脂溶性成分的组成及其抗氧化活性和抑菌活性。方法:利用索氏提取法提取蒲公英叶中的脂溶性成分,采用气相色谱质谱联用法(GC-MS)对其组成进行分析鉴定,分别采用磷钼络合物法、邻苯三酚自氧化分光光度法和 Fenton 氧化法测定其抗氧化活性,纸片抑菌法和微孔扩散法测定其抑菌活性。结果:以该法提取的蒲公英叶脂溶性成分约有 36 种。蒲公英叶脂溶性成分的总抗氧化活性及其对超氧阴离子自由基($O_2^- \cdot$)和羟基自由基($\cdot OH$)的清除率均随样品浓度的增加而增大,但总抗氧化活性、对 $O_2^- \cdot$ 和 $\cdot OH$ 的清除作用均低于维生素 C。蒲公英叶脂溶性成分对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌具有较好的抑菌和杀菌作用,其最小抑菌浓度和最小杀菌浓度分别为 0.5, 1.72, 2.46, 3.58 $g \cdot L^{-1}$ 和 0.84, 1.88, 3.62, 4.74 $g \cdot L^{-1}$, 尤其对金黄色葡萄球菌的抑菌和杀菌效果最好。结论:该研究表明蒲公英叶脂溶性成分的组成较为复杂,且有一定的抗氧化活性和良好的抑菌效果,可为蒲公英资源的开发利用提供参考和依据。

[关键词] 蒲公英叶; 气相色谱质谱联用仪; 脂溶性成分; 抗氧化活性; 抑菌

[中图分类号] R979.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)01-0060-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2018010060

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171011.1439.064.html>

[网络出版时间] 2017-10-11 14:39

GC-MS Analysis and Activity Research of Liposoluble Constituents from *Taraxacum mongolicum* Leaves

DUAN Hong-bo^{1,2}, HUAN Chen-chen^{1,2}, LIANG Yin-ku^{1,2*}, XU Zhong-yang³, REN Xiao-feng⁴

- (1. Shaanxi Province Key Laboratory of Bio-Resources, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China;
2. School of Biological Science & Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China;
3. Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining 810016, China;
4. Hanzhong TRG Biotechnology Co. Ltd., Hanzhong 723000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the composition, antioxidant activity and antimicrobial activity of liposoluble constituents from *Taraxacum mongolicum* leaves. **Method:** Soxhlet extraction was used to extract the liposoluble constituents from dandelion leaves (LCDLs), and their compositions were studied by using GC-MS. The antioxidant activity was determined by phosphomolybdate complex method, pyrogallol autoxidation spectrophotometry and Fenton oxidation method, while the antimicrobial activity was determined by the slip method and microporous diffusion method. **Result:** There were about 36 kinds of LCDLs extracted by this method. With

[收稿日期] 20170705(022)

[基金项目] 陕西省科技厅陕西省资源生物重点实验室项目(SZS-15-03);陕西省科技厅社会发展项目(2014K13-23);秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心项目(QBXT-Z(Y)-15-2)

[第一作者] 段红波,在读硕士,从事应用生物化学研究, Tel: 18391468093, E-mail: duanhongbo1991@163.com

[通信作者] *梁引库,博士,副教授,硕士生导师,从事天然产物活性物质开发利用研究, Tel: 13892607820, E-mail: liangyinku26@163.com

the increase of sample concentration, the total antioxidant activity of LCDLs and their clearance for the superoxide anion ($O_2^- \cdot$) and hydroxyl radical ($\cdot OH$) were all enhanced. However, their total antioxidant activity and scavenging effect on the $O_2^- \cdot$ and $\cdot OH$ were lower than those of Vit C (VC). LCDLs had good antibacterial and bactericidal effect against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*, with MIC and MBC of 0.5, 1.72, 2.46, 3.58 $g \cdot L^{-1}$ and 0.84, 1.88, 3.62 and 4.74 $g \cdot L^{-1}$ respectively. Especially, it showed best antimicrobial and bactericidal effect against *S. aureus*. **Conclusion:** This study showed that the LCDLs were complex and had a certain antioxidant activity and good antimicrobial effect, providing reference and basis for the development and utilization of *T. mongolicum* resources.

[**Key words**] *Taraxacum mongolicum* leaves; GC-MS; liposoluble constituents; antioxidant activity; antimicrobial

蒲公英又名婆婆丁菜、蒲公英、黄花三七、华花郎等^[1],被 2015 年版《中国药典》收载为菊科植物蒲公英、碱地蒲公英或同属数种植物的干燥全草^[2]。蒲公英在中国、朝鲜、蒙古和俄罗斯的中低海拔地区包括山坡草地、路边、田野、河滩均有分布,是一种药食两用的宿根草本植物。

蒲公英在临床方面应用广泛,主要表现在抑菌^[3]、抗病毒^[4]、消炎止痛、抗氧化^[5]、抗肿瘤、降血脂^[6]等方面,尤其在抗氧化和抑菌方面应用较多且效果良好。目前对蒲公英提取物活性的研究较多。研究发现,用蒲公英花提取物中 2 种关键诱导酶(诱导型一氧化氮合酶和环氧合酶-2)在细菌脂多糖激活小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中抑制产生一氧化氮和前列腺素 E_2 ,从而对细胞具有一定的保护作用^[7]。蒲公英水提物能增加机体内源性抗衰老物质活性,抑制脂质过氧化反应,具有清除自由基作用。蒲公英提取物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、沙门氏菌、肺炎双球菌、脑膜炎球菌、白喉杆菌、绿脓杆菌、痢疾杆菌、伤寒杆菌等有较强的抑菌活性^[8-9]。蒲公英抗氧化和抑菌成分的研究主要有黄酮类^[10]、绿原酸^[11]、糖蛋白^[12]、多糖、多酚^[13]、根脂溶性成分^[14],而对叶脂溶性成分的组成及活性研究却鲜有报道。

为了全面探究蒲公英叶的化学成分,以及筛选出具有更好生物活性的天然产物。本研究以蒲公英叶为原材料,采用索氏提取法提取其脂溶性成分,采用气相色谱质谱联用法(GC-MS)对脂溶性成分组成进行分析鉴定,结果从中鉴定出 36 种组分。在此基础上分析蒲公英叶脂溶性成分的抗氧化活性和抑菌活性,结果表明蒲公英叶脂溶性成分有一定的抗氧化活性,并对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌具有较好的抑菌和杀菌作用。

1 材料

蒲公英叶于陕西省汉中市中药材市场购买,经陕西理工大学吴三桥教授鉴定为菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* 的叶。标本(SG-20160925)现存于陕西理工大学陕西省资源生物重点实验室。

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,批号 ATCC25925),枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*,批号 CMCC63501),大肠埃希菌(*Escherichia coli*,批号 ATCC25922)和白色念珠菌(*Candida albicans*,批号 CMCC85021),以上 4 种菌株冻干菌种由陕西理工大学陕西省资源生物重点实验室菌种保藏中心提供,-80 °C 低温冰箱冻存,实验前复苏传代使用。维生素 C(VC,分析纯,天津市天新精细化工开发中心,批号 201307Q4),其他实验过程中所用试剂均为国产分析纯(天津市富宇精细化工有限公司)。

FA2204B 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),EYELA N1000 型旋转蒸发仪(上海爱郎仪器有限公司),ITQ900 型气相色谱质谱仪(美国热电),GZX-GF101-3BS-Ⅱ型电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司),XMTD-8222 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),UV2550 型分光光度计(日本岛津公司),HH-S4 型电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司),THZ-82 气浴恒温振荡器(常州市国立实验设备研究所),TGL-20 型台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),DHP-9162 型电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),SW-CJ-1D 型单人超净工作台(上海苏净实业有限公司),YXQ-LS-50S Ⅱ型全自动立式压力蒸气灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

2 方法

2.1 蒲公英叶脂溶性成分的提取工艺 取在 70 °C 干燥至恒重的蒲公英叶置于粉碎机将其粉碎后过

60 目筛,精密称取 3 份,每份 15.00 g,用滤纸包裹分别置于索氏提取仪中,以乙醚为提取溶剂在 40 ℃ 恒温水浴锅中回流提取 8 h,40 ℃ 蒸馏回收乙醚,分别得黄绿色的蒲公英叶脂溶性成分,浓缩干燥后,称定质量为 0.43 g,得率 2.87%。

2.2 GC-MS 测定蒲公英叶脂溶性成分

2.2.1 样品溶液配制 将蒲公英叶的脂溶性成分 1 g 放入 100 mL 量瓶中,加入苯和石油醚(1:1)的混合液 16 mL,充分溶解。再加入 0.8 mol·L⁻¹ 的 KOH-CH₃OH 溶液,震荡 5 min,用去离子水定容至刻度线。静置 30 min 后用微量注射器吸取一定量的上层液,再用苯和石油醚(1:1)混合液稀释,GC-MS 检测^[14]。

2.2.2 色谱条件 HP-5MS 型弹性石英毛细管柱(0.25 mm×30 m,0.25 μm),程序升温(初始温度 80 ℃,以 8 ℃·min⁻¹ 升温至 150 ℃,再以 3 ℃·min⁻¹ 升温至 180 ℃,保持 3 min,再以 4 ℃·min⁻¹ 升温至 210 ℃,再以 5 ℃·min⁻¹ 升温至 270 ℃,保持 15 min),载气氦气(99.999%),流速 1 g·L⁻¹,进样量 0.2 μL,进样温度 250 ℃,分流比 40:1。

2.2.3 质谱条件 EI 离子源 70 eV,离子源温度 230 ℃,传输线温度 250 ℃,溶剂延迟 3 min,扫描质量范围 *m/z* 50~550。

2.2.4 定性和定量分析 结合脂溶性成分的保留时间和 Nist08.L 标准质谱图库及文献解析,确认蒲公英叶脂溶性化学成分,按峰面积归一化法进行计算求出各化学成分的相对质量分数。

2.3 蒲公英叶脂溶性成分的抗氧化活性测定

2.3.1 磷钼络合物法对总抗氧化活性的测定 ① 样品溶液配制:将蒲公英叶脂溶性成分 0.6 g 放入 100 mL 量瓶中,加入 50% 乙醇 80 mL,充分溶解,再用 50% 乙醇定容至刻度线,即得到 6 g·L⁻¹ 样品母液。将母液稀释配比成 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 g·L⁻¹ 的质量浓度梯度。

② VC 溶液配制:分别称定 VC 0.02 和 0.2 g 放入 100 mL 量瓶中,加入去离子水 80 mL,充分溶解,定容至刻度线,即得到 0.2 和 2.0 g·L⁻¹ VC 母液。将 0.2 g·L⁻¹ 母液稀释配比成 0.02,0.04,0.06,0.08,0.10,0.12 g·L⁻¹ 的质量浓度梯度。

③ 依次向 20 mL 试管中加入磷钼试剂液(磷酸钠 2.66 g,钼酸铵 1.235 g 和浓硫酸 8.33 mL)8 mL,不同浓度梯度的样品提取液和 VC 溶液 0.8 mL,0 g·L⁻¹ 为空白对照,于 95 ℃ 恒温水浴锅中水浴 90 min,测其吸光度 A_{695 nm}^[15]。每组浓度设置 3 个平行。

2.3.2 邻苯三酚自氧化分光光度法对超氧阴离子自由基(O₂⁻·)清除的测定 ① 供试品溶液制备:10 mmol·L⁻¹ 盐酸, pH 8.2 Tris-HCl 缓冲液,45 mmol·L⁻¹ 邻苯三酚(溶于 10 mmol·L⁻¹ 盐酸);将 6 g·L⁻¹ 样品母液按比例稀释成 0.4,0.6,0.8,1.0,1.2,1.4,1.6 g·L⁻¹ 的浓度梯度;将 0.20 g·L⁻¹ VC 母液按比例稀释成 0.04,0.06,0.08,0.10,0.12,0.14,0.16 g·L⁻¹ 的浓度梯度。

② 依次向试管中加入在 25 ℃ 下预热 20 min 的 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2)18.0 mL,以 10 mmol·L⁻¹ 盐酸作为溶剂的 45 mmol·L⁻¹ 邻苯三酚溶液 80.0 μL,每隔 30 s 测定 1 次吸光度,即为邻苯三酚的自氧化速率 ΔA₀/ΔT;3 min 后加 VC 溶液 1 滴立即混匀,室温下放置 2 min 后测其吸光度 A₄₂₀,即为经抗氧化剂 VC 抑制后的邻苯三酚自氧化速率 ΔA₁/ΔT。一定量的不同浓度梯度样品加入到 Tris-HCl 缓冲液中,再按照以上的方法来测定邻苯三酚的自氧化速率,同理得到 ΔA₁/ΔT,与此同时,测一组空白试剂(0 g·L⁻¹),并计算其变化率 ΔA₂/ΔT。每组浓度设置 3 个平行^[16-17],并按下式计算清除率:

$$O_2^- \cdot \text{清除率} = \frac{\frac{\Delta A_0}{\Delta T} - \frac{\Delta A_1}{\Delta T} - \frac{\Delta A_2}{\Delta T}}{\frac{\Delta A_0}{\Delta T}} \times 100\% \quad (1)$$

2.3.3 Fenton 氧化法对羟基自由基(·OH)清除的测定 ① 供试品溶液制备:将 6 g·L⁻¹ 样品母液按比例稀释成 0.4,0.6,0.8,1.0,1.2,1.4,1.6 g·L⁻¹ 的浓度梯度;将 2.0 g·L⁻¹ 样品母液按比例稀释成 0.4,0.6,0.8,1.0,1.2,1.4,1.6 g·L⁻¹ 的质量浓度梯度。

② 依次取 0.15 mol·L⁻¹ 的磷酸缓冲溶液(PBS,pH 7.4),40 mg·L⁻¹ 番红花红溶液,0.945 mmol·L⁻¹ EDTA-Fe(II)溶液(新鲜配制)各 2.0 mL,不同浓度梯度的样品溶液 1.0 mL(脂溶性成分,VC),3% 的 H₂O₂ 溶液(新鲜配制)2.0 mL,将以上溶液混合后在 37 ℃ 水浴中反应 30 min,测其吸光度 A_{S520 nm}。以蒸馏水 1.0 mL 代替样品测定吸光度 A_{0520 nm} 作为空白组,以蒸馏水 3.0 mL 代替 H₂O₂ 和样品测定吸光度 A_{520 nm} 作为对照组,用蒸馏水 7.0 mL 代替番红花红,EDTA-Fe(II),H₂O₂,样品,加入 PBS 2.0 mL 调零^[18-19]。每组浓度设置 3 个平行,并按下式计算清除率:

$$\cdot OH \text{ 清除率} = \frac{A_s - A_0}{A - A_0} \times 100\% \quad (2)$$

2.4 脂溶性成分抑菌活性测定

2.4.1 菌种活化和浓度调制 将实验细菌和真菌

(酵母菌)菌种复苏,分别传代于 LB 液体培养基和沙氏液体培养基并用 37 °C, 170 r·min⁻¹ 和 37 °C, 200 r·min⁻¹ 培养 6~7 h 和 8~9 h。用分光光度计测定细菌和真菌 A_{600 nm}。当 A_{600 nm} = 0.6~0.75 时,菌液备用;若 A_{600 nm} > 0.75 时,用液体培养基进行适当稀释(菌液浓度范围为 1.0 × 10⁶ ~ 1.0 × 10⁷ CFU·mL⁻¹)。

2.4.2 梯度浓度样品溶液配制 取 DMSO 1 mL 加入到精确称定质量的样品瓶,用力振摇使油剂样品充分溶解,将溶解的样品完全吸出至无菌试管。再将样品瓶精确称定质量,利用减重法计算样品量和样品溶液浓度,用无菌 20% DMSO 溶液调配样品浓度至待测浓度,再将样品溶液在 96 孔板上做连续二倍梯度稀释 6 个梯度,每个梯度 0.25 mL。

2.4.3 抑菌实验 ①纸片抑菌法:配制 LB 琼脂培养基和沙氏琼脂培养基,分别于 121.3 °C 下灭菌 20 min 和 115 °C 下灭菌 30 min,制备平板。用移液器吸取 100 μL 实验菌液至平板表面,用无菌 L 形玻璃棒涂匀菌液。再取不同浓度梯度的样品液 10 μL 分别滴加到直径 6 mm 无菌滤纸片上,滤纸片适当烘烤,将其贴于平板表面。含 20% DMSO 10 μL 的纸片作为溶剂对照,含 0.5% 碘伏溶液 10 μL 的纸片作为阳性对照。

②微孔扩散法:首先向培养皿中各加入实验菌液 0.2 mL,接着分别加入冷却至 50 °C 的 LB 琼脂培养基和沙氏琼脂培养基各 20 mL,快速混匀,于室温静置冷凝,最后用 3 mm 打孔器在平板上打孔。加入各梯度浓度样品液 20 μL/孔并做标记。以加 20% DMSO 20 μL 的孔作为溶剂对照,以加 0.5% 碘伏溶液 20 μL 的孔作为阳性对照。

2.4.4 微生物培养及结果测定 将涂布有金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌和白色念珠菌的培养基平板于 37 °C 倒置培养 18~36 h,观察实验结果,并测定抑菌环直径大小。

2.5 数据分析 利用 SPSS 22.0, Origin 8.0 等软件进行数据的统计与分析、图表的制作等,结果取 3 次平行实验的平均值。

3 结果与讨论

3.1 GC-MS 对蒲公英叶脂溶性成分分析 GC-MS 测定蒲公英叶脂溶性成分发现(图 1,表 1),蒲公英叶中含有 36 种化合物,对这 36 种化合物进行分析,蒲公英叶中有烷类、烷酸类、烯酸类、醇类等,含量较高的成分依次为 9,12,15-十八烷三烯酸(Z,Z,Z)(27.69%),9,12-十八烷二烯酸(Z,Z)(19.99%),

十六酸(15.54%),3,7,11,15-四甲基-2-十六烷烯-1-醇(9.72%),菜油甾醇(6.20%)和十八酸(3.99%),6 种物质相对含量的总和占脂溶性成分的 73.42%。

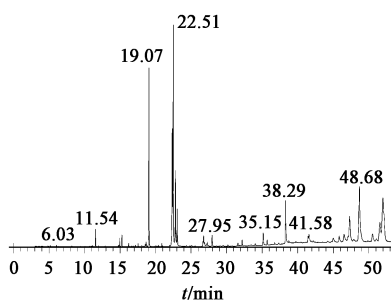


图 1 蒲公英叶脂溶性成分的 GC-MS

Fig. 1 GC-MS of liposoluble constituents of *Taraxacum mongolicum* leaves

3.2 蒲公英叶脂溶性成分的抗氧化活性

3.2.1 对总抗氧化活性 由图 2,3 可知,蒲公英叶脂溶性成分和 VC 的总抗氧化活性都随其浓度的变化而变化。蒲公英叶脂溶性成分的吸光度随着浓度的增加而增加,根据磷钼酸络合物法的测定原理可知,蒲公英叶脂溶性成分的总抗氧化活性随其浓度的增加而逐渐增加,而在此浓度范围内 VC 的吸光度均 > 1,为了减小误差,进一步确定 VC 在此测定体系下的抗氧化活性,将 VC 浓度缩小 25 倍后研究其抗氧化活性发现 VC 的抗氧化活性随着浓度的增加而增加并且都在 0~1,表明 VC 具有一定的抗氧化能力。对比 VC 的吸光度与蒲公英叶脂溶性成分的吸光度发现,在 VC 浓度低于蒲公英叶脂溶性成分浓度 25 倍的情况下,蒲公英叶脂溶性成分的吸光度仍然小于 VC 的吸光度,表明蒲公英叶脂溶性成分的总抗氧化活性远低于 VC 的总抗氧化活性。

3.2.2 对超氧阴离子自由基(O₂^{-·})的清除作用

由图 4 可知,在质量浓度为 0.4~1.6 g·L⁻¹ 时,蒲公英叶脂溶性成分对超氧阴离子的清除率随着质量浓度的增加而不断增大,在质量浓度为 0.8~1.0 g·L⁻¹ 时,超氧阴离子的清除率变化最明显。当质量浓度为 1.6 g·L⁻¹ 时,对超氧阴离子的清除率达到 36.2%。同等条件下,测得 VC 对(O₂^{-·})清除率依次增加,当 VC 的质量浓度 ≥ 0.8 g·L⁻¹,VC 对超氧阴离子的清除率达到 100%。其中蒲公英叶脂溶性成分对超氧阴离子的清除率(36.2%)小于等浓度 VC 的清除率(100%),说明蒲公英叶脂溶性成分对超氧阴离子清除作用远低于 VC。

3.2.3 对羟基自由基(·OH)的清除作用

表 1 GC-MS 分析蒲公英叶脂溶性成分

Table 1 GC-MS determination of liposoluble constituents of *Taraxacum mongolicum* leaves

No.	化合物名称	分子式	t_R /min	相对质量分数/%
1	十二酸 dodecanoic acid	$C_{12}H_{24}O_2$	11.54	1.28
2	反-2-十三烯醇 (<i>E</i>)-2-tridecen-1-ol,	$C_{13}H_{26}O$	14.77	0.13
3	5,6-双(三甲基硅烷基)-癸烷 (<i>E,Z</i>) (<i>E,Z</i>)-decane,5,6-bis(trimethylsilyl)	$C_{16}H_{38}Si$	14.96	0.67
4	十四酸 tetradecanoic acid	$C_{14}H_{28}O_2$	15.26	1.02
5	反-9-十四烯酸 (<i>E</i>)-9-tetraacenoic acid,	$C_{14}H_{26}O_2$	16.21	0.36
6	十五酸 pentadecanoic acid	$C_{15}H_{30}O_2$	17.16	0.16
7	6,10,14-三甲基-2-十五烷酮 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone	$C_{18}H_{36}O$	17.54	0.28
8	邻苯二甲酸异丁酯 1,2-benzenedicarboxylic acid, butyl 2-methylpropyl ester	$C_{16}H_{22}O_4$	18.05	0.15
9	正十六烷 hexadecane	$C_{16}H_{34}$	18.54	0.18
10	棕榈油酸 9-hexadecenoic acid	$C_{16}H_{30}O_2$	18.66	0.50
11	十六酸 hexadecanoic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	19.07	15.54
12	反-2-十六烯酸 (<i>E</i>)-2-hexadecenoic acid	$C_{16}H_{30}O_2$	20.00	0.15
13	正十七烷 heptadecane	$C_{17}H_{36}$	20.39	0.16
14	14-甲基-十六酸乙酯 hexadecanoic acid,14-methyl-, ethyl ester	$C_{18}H_{36}O_2$	20.89	0.34
15	(<i>Z,Z,Z</i>)-6,9,12-十八烷三烯酸 (<i>Z,Z,Z</i>)-6,9,12-octadecatrienoate	$C_{18}H_{30}O_2$	21.97	0.14
16	(<i>Z,Z</i>)-9,12-十八烷二烯酸 (<i>Z,Z</i>)-9,12-octadecadienoic acid	$C_{18}H_{32}O_2$	22.35	19.99
17	(<i>Z,Z,Z</i>)-9,12,15-十八烷三烯酸 (<i>Z,Z,Z</i>)-9,12,15-octadecatrienoic acid	$C_{18}H_{30}O_2$	22.51	27.69
18	3,7,11,15-四甲基-2-十六烷烯-1-醇 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	$C_{20}H_{40}O$	22.80	9.72
19	十八酸 octadecanoic acid	$C_{18}H_{36}O_2$	23.05	3.99
20	叔十六烷硫醇 tert-hexadecanethiol	$C_{16}H_{34}S$	25.07	0.17
21	2-[[2-[(2-乙基环丙基)甲基]环丙基]甲基]-环丙烷辛 2-[[2-[(2-ethylcyclopropyl)methyl]cyclopropyl]methyl]-cyclopropanoic acid	$C_{21}H_{36}O_2$	26.67	0.59
22	(<i>Z,Z,E</i>)-6,9,11-十八烷三烯酸 (<i>Z,Z,E</i>)-6,9,11-octadecatrienoic acid	$C_{18}H_{30}O_2$	26.77	1.60
23	(<i>Z,Z,Z</i>)-9,12,15-十八烷三烯酸甘油酯 (<i>Z,Z,Z</i>)-9,12,15-octadecatrienoic acid,2,3-dihydroxypropyl ester	$C_{21}H_{36}O_4$	26.91	0.50
24	正二十烷 eicosane	$C_{20}H_{42}$	27.26	0.48
25	二十酸 eicosanoic acid	$C_{20}H_{40}O_2$	27.95	1.44
26	2-甲基-十八烷 2-methyl-octadecane	$C_{19}H_{40}$	29.54	0.14
27	14-甲基-二十酸 14-methyl-eicosanoate	$C_{21}H_{42}O_2$	30.19	0.21
28	正二十一烷 heneicosane	$C_{21}H_{44}$	31.59	0.39
29	二十二酸 docosanoic acid	$C_{22}H_{44}O_2$	32.19	0.76
30	21-甲基-二十二酸 21-methyl-docosanoate	$C_{23}H_{46}O_2$	34.03	0.31
31	2-(十八烷氧基)乙醇 2-(octadecyloxy)-ethanol	$C_{20}H_{42}O_2$	35.16	1.77
32	二十四酸 tetracosanoic acid	$C_{24}H_{48}O_2$	35.69	0.69
33	二十五酸 pentacosanoic acid	$C_{25}H_{50}O_2$	36.75	0.27
34	菜油甾醇 campesterol	$C_{28}H_{48}O$	38.29	6.20
35	豆甾醇 stigmasterol	$C_{29}H_{48}O$	45.00	0.88
36	羽扇豆醇 lupeol	$C_{30}H_{50}O$	45.84	1.16

可知,蒲公英叶脂溶性成分和 VC 均具有明显的清除($\cdot OH$)作用且随着质量浓度的增加不断增加,对

($\cdot OH$)的清除能力也逐渐增强。在质量浓度为 $1.2 \sim 1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,脂溶性成分和 VC 对超氧阴离子

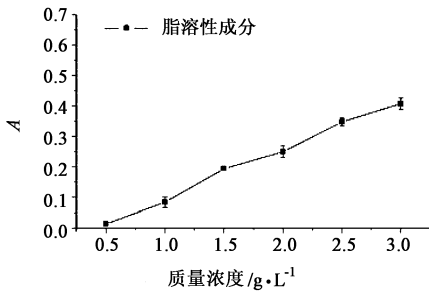


图 2 脂溶性成分的总抗氧化活性
Fig. 2 Total antioxidant activity of liposoluble constituents

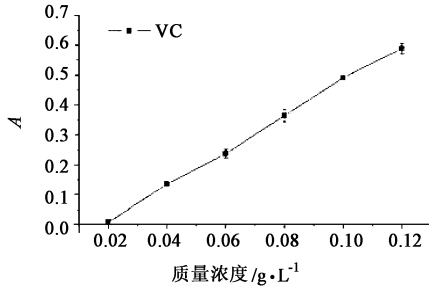


图 3 VC 浓度缩小 25 倍的总抗氧化活性
Fig. 3 Total antioxidant activity of VC concentration after narrowing 25 times

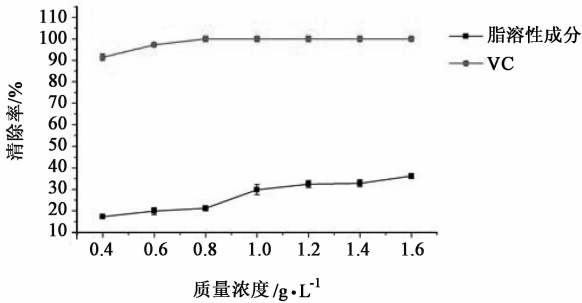


图 4 脂溶性成分和 VC 对 O₂⁻· 的清除作用
Fig. 4 Superoxide anion scavenging of liposoluble constituents and VC

的清除率变化均趋于平缓且当质量浓度为 1.6 g·L⁻¹ 时,蒲公英叶脂溶性成分和 VC 对 (·OH) 清除率分别达 86% 和 91.7%, 此时,蒲公英叶脂溶性成分的清除率(86%) 小于 VC 的清除率(91.7%)。

3.3 对蒲公英叶脂溶性成分的抑菌活性 本实验采用 2 种抑菌方法(纸片抑菌法和微孔扩散法)研究蒲公英叶脂溶性成分对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌的抑菌能力发现(表 2),在 4 株实验菌平板上,对照组 DMSO 纸片和微孔周围均无抑菌环,表明二甲基亚砜对细菌和真菌生长无抑制作用。阳性对照组纸片和 0.5% 碘伏溶液微孔周围抑菌环均 > 1.5 cm,表明实验方法可行且无误。本实验利用二倍连续梯度稀释法测

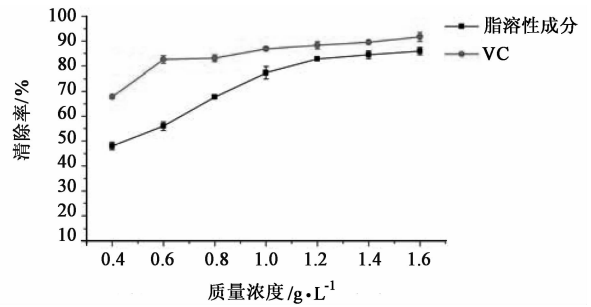


图 5 脂溶性成分和 VC 对 ·OH 的清除作用
Fig. 5 Hydroxyl radical scavenging of liposoluble constituents and VC

定最小抑菌浓度(MIC),同时采用平板转种法测定最小杀菌浓度(MBC)。结果表明,蒲公英叶脂溶性成分对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌均有明显的抑菌作用且最小抑菌浓度分别为 0.5, 1.72, 2.46, 3.58 g·L⁻¹, 最小杀菌浓度分别为 0.84, 1.88, 3.62, 4.74 g·L⁻¹, 表明蒲公英叶脂溶性成分对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌均具有良好的抑菌作用,尤其对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最好。

表 2 蒲公英叶脂溶性成分的抑菌活性
Table 2 Study on antimicrobial activity of liposoluble constituents of dandelion leaves

菌种	最小抑菌浓度	最小杀菌浓度
金黄色葡萄球菌	0.50	0.84
大肠埃希菌	1.72	1.88
枯草芽孢杆菌	2.46	3.62
白色念珠菌	3.58	4.74

注:阳性对照组纸片和 0.5% 碘伏溶液抑菌环直径 > 1.5 cm,阴性对照 DMSO 无抑菌环。

4 讨论

药品对人类健康是非常重要的,抗菌防腐或延长保质期对食品保鲜贮藏也起着至关重要的作用,天然抗氧化物质和抑菌物质具有安全、高效、无毒、无害等优点,不会给药品和食品安全带来安全隐患,因此,近年来受到了国内外的广泛关注^[20-21]。

蒲公英根脂溶性成分对羟基自由基、超氧阴离子的清除能力均有随浓度的增大而提高,总抗氧化活性也随浓度的增加而提高,表明其具有一定的抗氧化活性,并对金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、枯草芽孢杆菌和白假丝酵母菌具有较好的抑菌和杀菌能力。以上研究表明,脂溶性成分具有良好的抗氧化活性和抑菌活性,为了寻找更多天然抗氧化物质

和抑菌物质,本研究利用索氏提取法提取蒲公英叶中脂溶性成分,GC-MS 对脂溶性成分组成进行分析鉴定,并对蒲公英叶脂溶性成分进行抗氧化活性和抑菌活性的测定。

研究发现,蒲公英叶脂溶性成分有一定的抗氧化活性和良好的抑菌效果,可为新药、新型抗氧化保鲜方法和天然抗菌防腐材料的开发提供新思路。但蒲公英叶脂溶性成分的组成较为复杂,本文仅仅是对总脂溶性成分的分析鉴定,单体的分离还需进一步研究。

GC-MS 结果表明,以该法提取的蒲公英叶脂溶性成分组成约有 36 种,有烷类、烷酸类、烯酸类、醇类等,含量较高的成分依次为(*Z,Z,Z*)-9,12,15-十八烷三烯酸(27.69%),(*Z,Z*)-9,12-十八烷二烯酸(19.99%),十六酸(15.54%),3,7,11,15-四甲基-2-十六烷烯-1-醇(9.72%),菜油甾醇(6.20%)和十八酸(3.99%),6 种物质相对含量的总和占脂溶性成分的 73.42%。

抗氧化实验表明,蒲公英叶脂溶性成分有一定的抗氧化活性,总抗氧化活性及其对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)和羟基自由基($\cdot OH$)的清除率均随样品浓度的增加而增大,但总抗氧化活性、对 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 的清除作用均低于 VC。

抑菌实验表明,蒲公英叶脂溶性成分对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌具有较好的抑菌和杀菌作用,其最小抑菌浓度和最小杀菌浓度分别为 0.5,1.72,2.46,3.58 $g \cdot L^{-1}$ 和 0.84,1.88,3.62,4.74 $g \cdot L^{-1}$ 。表明蒲公英叶脂溶性成分对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌均具有良好的抑菌作用,尤其对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最好。

[参考文献]

[1] 李喜凤,郝哲,杜云锋. 蒲公英的生物活性研究进展[J]. 中药材,2009,32(5):823-826.
[2] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:352.
[3] 钟振声,赵蓓蓓,孙昂. 蒲公英抑菌物质的提取工艺研究[J]. 现代食品科技,2009,25(1):58-61.
[4] HE W, HAN H, WANG A W, et al. Anti-influenza virus effect of aqueous extracts from Dandelion [J]. Virol J, 2011,8(1):538-548.
[5] 王剑,刘德丽,李峰. 近 5 年蒲公英抑菌抗氧化活性研究进展 [J]. 山东中医杂志,2015,34(3):233-235.

[6] Kim J J, Park C M, Kim M J, et al. Hypolipidemic effect of dandelion (*Taraxacum officinale*) extracts via fecal lipid excretion in C57BL/6 mice fed an atherogenic diet [J]. Food Sci Biotech, 2014, 23(3):841-847.
[7] HU C, Kitts D D. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells [J]. Mol Cell Biochem,2004,265(1/2):107-113.
[8] 杜军英,姜东伯,狄柯坪,等. 蒲公英抑菌抗炎作用的研究进展 [J]. 白求恩医学院学报,2012,10(2):128-131.
[9] 孟静思,袁进罡,马辉. 中草药蒲公英的体外抑菌实验[J]. 河北化工,2013,36(3):29-31.
[10] 隋洪玉,王毅,梁海艳,等. 蒲公英总黄酮提取液对衰老模型小鼠脑组织的抗氧化作用[J]. 中成药,2009,31(8):1289-1290.
[11] 梁引库. 巨大型蒲公英绿原酸的分离纯化及其抑菌实验研究 [J]. 食品科技,2013,38(6):227-230.
[12] 贾琳斐,杨颖,李清宇,等. 蒲公英糖蛋白体内外抗氧化作用研究 [J]. 西北植物学报,2012,32(12):2486-2491.
[13] 段红波,梁引库. 蒲公英多酚的提取及其活性研究 [J]. 中国食品添加剂,2017,27(3):80-86.
[14] 梁引库. 巨大型蒲公英根脂溶性成分的抗氧化活性及抑菌实验研究[J]. 食品工业科技,2013,34(12):153-156.
[15] 梁引库,王琦,李新生. 黑米花青苷胶囊体外清除自由基及抗氧化作用的研究 [J]. 食品科技,2012,37(8):243-246.
[16] 韩少华,朱靖博,王妍妍. 邻苯三酚自氧化法测定抗氧化活性的方法研究 [J]. 中国酿造,2009,28(6):155-157.
[17] 范勇,李宝宝,毛苇,等. 巨大型蒲公英小分子量糖蛋白的制备及抗氧化活性分析 [J]. 南方农业学报,2015,46(3):486-491.
[18] 杨新星,程春梅,王炯,等. 千里光多酚提取物的体外抗氧化研究 [J]. 云南民族大学学报:自然科学版,2009,18(2):143-145.
[19] 龚晓武,李炳奇,刘丹丹,等. 红景天黄酮提取及其抗氧化活性研究 [J]. 西北林学院学报,2011,26(3):136-138.
[20] 王玉荣,邢韶芳,李钟洙,等. 囊荷提取物抗氧化能力及抑菌作用 [J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(24):59-63.
[21] 蓝蔚青,车旭,谢晶,等. 复合生物保鲜剂对荧光假单胞菌的抑菌活性及作用机理 [J]. 中国食品学报,2016,16(8):159-165.

[责任编辑 顾雪竹]