

# 南美蟛蜞菊挥发油 GC-MS 分析及抗菌活性研究

沈卓豪, 刘磊, 韩姣姣, 惠阳\*, 陈光英, 陈文豪\*

(热带药用植物化学教育部重点实验室, 海南师范大学, 海口 571127)

**[摘要]** **目的:**分析新鲜南美蟛蜞菊挥发油中的化学成分,进行抑菌活性测试。**方法:**采用水蒸气蒸馏法提取南美蟛蜞菊挥发油,运用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)对其成分进行分析;微量稀释法测试所得挥发油对6种菌株(大肠菌、蜡状芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、四联球菌、藤黄八叠球菌、白色葡萄球菌)的抑菌活性。**结果:**南美蟛蜞菊挥发油提取收率为0.72%,检测到61个化合物,鉴定出57个,含量占总挥发油的92.92%;该挥发油对枯草芽孢杆菌、藤黄八叠球菌具有良好的抑制活性,最小抑菌浓度分别为0.39, 0.78 mg·L<sup>-1</sup>。**结论:**从南美蟛蜞菊中提取挥发油并鉴定化学成分,发现其富含结构多样的倍半萜类化合物,为南美蟛蜞菊的开发利用提供实验依据。

**[关键词]** 南美蟛蜞菊;挥发油;成分分析;抗菌活性

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0054-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014070054

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000024.html>

**[网络出版时间]** 2014-01-21 9:27

## GC-MS Analysis and Antibacterial Activity of Essential Oil from the Flowers of *Wedelia trilobata*

SHEN Zhuo-hao, LIU Lei, HAN Jiao-jiao, HUI Yang\*, CHEN Guang-ying, CHEN Wen-hao\*

(Key Laboratory of Tropical Medicinal Plant Chemistry of Ministry of Education, Hainan Normal University, Haikou 571127, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the chemical constituents and antibacterial activity of essential oil from the flowers of *Wedelia trilobata*. **Method:** The essential oil from the flowers of *W. trilobata* was extracted by steam distillation. The components of the essential oil were separated and identified by gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS). Its antibacterial activity against six species of strains (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pediococcus*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus*) was evaluated by microdilution method. **Result:** 61 chromatographic peaks were detected and 57 components were identified and accounted for 92.92% of all the peak area. The essential oil showed well inhibitory activities against *B. subtilis* and *S. lutea*, with minimum inhibitory concentration (MIC) values of 0.39 and 0.78 mg·L<sup>-1</sup>, respectively. **Conclusion:** The essential oil was extracted and the chemical constituents were identified for the first time, and found that is rich in diversity of sesquiterpenes. This study provides experimental evidence for the further research and exploitation of *W. trilobata*.

**[Key words]** *Wedelia trilobata*; essential oil; GC-MS analysis; antibacterial activity

**[收稿日期]** 20130828(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(21202030);海南省自然科学基金项目(213022);大学生创新创业训练计划项目(2013116580)

**[第一作者]** 沈卓豪,在读学士,从事色谱分析研究, Tel:15607680087, E-mail:814003940@qq.com

**[通讯作者]** \* 惠阳,博士,副教授,从事色谱分析研究, Tel:0898-65889422, E-mail:327834270@qq.com;

\* 陈文豪,博士,副教授,从事天然药物化学研究, Tel:0898-65889422, E-mail:chenwh04@163.com

菊科螞蟥菊属植物多具有保肝利胆、抗病毒、抗炎等功效,在多国民间作为传统药材使用。目前,已对该属多种植物进行化学成分及药理活性研究,从中分离得到黄酮<sup>[1-2]</sup>、倍半萜<sup>[3-4]</sup>、二萜<sup>[5]</sup>、三萜<sup>[2]</sup>等结构类型化合物,其中部分化合物表现出良好的保肝、抗炎镇痛、杀虫及抑菌活性。

南美螞蟥菊又称三裂叶螞蟥菊、地锦花、穿地龙等,原产美洲。20世纪70年代作为绿化地被植物引进我国,广泛分布于我国南方各地。由于其极强的入侵性,对本地植物多样性表现出显著负影响,目前已成为华南地区危害性严重的杂草。在我国民间,该植物全草可用于清热解毒、凉血止血、利咽止咳、消炎退肿等<sup>[6]</sup>。截止目前,国内外学者对其植株全草或地上部位进行化学成分研究,发现主要含有萜类化合物,其中尤以桉烷型倍半萜以及贝壳杉烷型二萜为主<sup>[7-10]</sup>,但未见南美螞蟥菊花相关研究报道。为进一步开发利用该药用资源,本实验采用水蒸汽蒸馏法提取南美螞蟥菊花的挥发油,GC-MS法分析其挥发油的化学成分并进行抗菌活性研究,为南美螞蟥菊的综合开发利用提供科学依据。

## 1 材料

南美螞蟥菊花于2013年5月采自海南省海口市,经海南师范大学生命科学学院钟琼芯教授鉴定为南美螞蟥菊 *Wedelia trilobata*。其标本保存于海南师范大学热带药用植物化学省部共建教育部重点实验室。

7890A/5975C-GC/MSD 气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦公司),Elx800 型酶标仪(美国宝特公司 BioTek),MCO-15AC 型二氧化碳恒温培养箱(日本 SANYO 公司),LGJ-10D 型冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂),BP310S 型电子天平(德国赛多利斯公司),RPMI1640 培养液(Gibco 公司),其他试剂均购自天津市化学试剂二厂。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、四联球菌 (*Pediococcus*)、藤黄八叠球菌 (*Sarcina lutea*)、白色葡萄球菌 (*Staphylococcus*) 均购自中国科学院微生物研究所。

## 2 方法与结果

**2.1 挥发油的提取** 新鲜南美螞蟥菊花 200 g,剪碎,按 2010 年版《中国药典》一部附录 XD 挥发油测定法(不加二甲苯),采用水蒸气蒸馏法提取 8 h,无水乙醚萃取 3 次,合并萃取液并加无水硫酸钠干燥,

真空浓缩回收乙醚,得淡黄色澄清油状物,计算提取率。

**2.2 GC-MS 分析条件**<sup>[11]</sup> GC 条件:石英毛细管柱 HP-FFAP (0.25 mm × 30 m, 0.25 μm) 程序升温,起始温度 50 °C,保持 1 min,以 5 °C · min<sup>-1</sup> 升温速率,升温到 230 °C 保持 5 min,再以 8 °C · min<sup>-1</sup> 升温速率,升温到 280 °C,然后保持至完成分析,载气为 He (99.99%),柱流量 1.0 mL · min<sup>-1</sup>,压力 28.8 kPa,进样口温度 250 °C,分流比 50:1。

MS 条件<sup>[12]</sup>:EI 源,电子能量为 70 eV,接口温度为 280 °C,离子源温度为 230 °C,四级杆温度为 180 °C,溶剂延迟为 2.5 min,全扫描 (Scan) 采集模式,质量扫描范围  $m/z$  50 ~ 550,扫描间隔 0.50 s,倍增器电压 1 200 V。

**2.3 微量稀释法体外抗菌试验**<sup>[13]</sup> 应用微量稀释法测定微生物的最小抑菌浓度 (MIC)。应用营养肉汤培养,样品的初始浓度为 100 mg · L<sup>-1</sup>,将药液在 96 孔微量稀释板作 2 倍递减浓度稀释,分装于微量稀释板孔内或用微量加液器直接在稀释板孔内作 2 倍稀释,然后接种稀释菌液,其中留一列孔作为药液对照,另一孔仅加培养基和菌液作为空白对照,试验完毕后,用微量搅拌器震荡混匀后,置 37 °C 生化培养箱中培养 22 h,酶标仪 630 nm 测吸光度。能抑制试验菌生长的最低浓度,即为该菌株的 MIC。

**2.4 挥发油化学成分分析** 采用水蒸气蒸馏法提取南美螞蟥菊花挥发油,得到具有浓郁特殊香气的浅黄色油状物 0.144 g,得油率为 0.72%。采用 GC-MS 联用仪分析其化学成分,经化学工作站数据处理系统和用面积归一化法从其总离子流图中计算各组分百分含量,按各峰的质谱图经计算机质谱数据库检索,结合有关质谱碎片峰与文献资料核对<sup>[14]</sup>,确定了其中的 57 个成分(表 1),占挥发油总质量的 92.92%。其中相对质量分数较高的成分有邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯(14.48%)、大根香叶烯 B (9.32%)、(3aS, 3bR, 4S, 7R, 7aR)-7-甲基-3-亚甲基-4-(丙-2-基)八氢-1H-环戊二烯并[1,3]环丙并[1,2]苯(8.84%)、石竹烯(6.08%)等。

**2.5 体外抗菌试验** 采用微量稀释法对挥发油进行最小抑菌浓度测试,发现其对枯草芽孢杆菌、藤黄八叠球菌具有较好的抑制活性, MIC 值分别为 0.39, 0.78 mg · L<sup>-1</sup>; 而对大肠杆菌、蜡状芽孢杆菌、四联球菌、白色葡萄球菌等 4 种菌株显示无重要抑制活性, MIC 值均 > 25 mg · L<sup>-1</sup>。

表 1 南美螞蚱菊花挥发油的化学成分

No.	$t_R$ /min	化合物名称	相对分子质量	相对百分含量/%
1	3.52	2,2'-氧代二乙醇	106	2.12
2	4.74	环己醇	100	0.54
3	5.73	(1 <i>R</i> )-(+) - $\alpha$ -蒎烯	136	0.70
4	7.41	$\alpha$ -水芹烯	136	2.44
5	7.93	邻异丙基甲苯	134	0.21
6	8.03	<i>D</i> -蒎二烯(柑橘柠檬烯)	136	3.56
7	8.25	3,7-二甲基-1,3,6-十八烷三烯	136	0.15
8	9.97	芳樟醇	154	0.11
9	11.36	4-(5-甲基-2-呋喃基)-2-丁酮	152	0.39
10	12.13	4-蒎烯醇	154	0.23
11	12.52	$\alpha$ , $\alpha$ ,4-三甲基-3-环己烯-1-甲醇	154	0.16
12	12.61	十二烷	170	0.28
13	14.17	(1 $\alpha$ ,2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ )-2,5-二甲基-2-硝基-1,3-环己二乙酸酯	273	0.45
14	15.05	1,7,7-三甲基-6-双环[2.2.1]庚烷基-乙酸甲酯	196	0.34
15	16.39	1,5,5-三甲基-6-亚甲基-1-环己烯	136	0.58
16	17.40	$\alpha$ -蒎烯	204	0.36
17	17.77	(3 <i>aS</i> ,3 <i>bR</i> ,4 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,7 <i>aR</i> )-7-甲基-3-亚甲基-4-(丙-2-基)八氢-1 <i>H</i> -环戊二烯并[1,3]环丙并[1,2]苯	204	0.22
18	17.81	$\beta$ -榄香烯	204	0.37
19	18.54	石竹烯	204	6.08
20	19.39	$\alpha$ -石竹烯	204	4.81
21	19.92	$\gamma$ -芹子烯	204	0.8
22	20.08	(3 <i>aS</i> ,3 <i>bR</i> ,4 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,7 <i>aR</i> )-7-甲基-3-亚甲基-4-(丙-2-基)八氢-1 <i>H</i> -环戊二烯并[1,3]环丙并[1,2]苯	204	8.84
23	20.16	未鉴定	220	0.22
24	20.20	$\alpha$ -芹子烯	204	0.34
25	20.35	(+)-表-双环倍半水芹烯	204	0.41
26	20.45	大根香叶烯 B	204	9.32
27	20.64	( <i>Z</i> , <i>E</i> )- $\alpha$ -合金欢烯	204	0.70
28	20.93	$\gamma$ -杜松烯	204	1.79
29	21.07	<i>d</i> -杜松烯	204	2.47
30	21.15	蛇麻烷-1,6-二烯-3-醇	222	0.44
31	21.98	<i>S</i> -( <i>Z</i> )-3,7,11-三甲基-1,6,10-十二烷三烯-3-醇	222	0.41
32	22.17	白菖烯	204	0.27
33	22.35	1-羟基-1,7-二甲基-4-异丙基-2,7-环癸二烯	222	1.20
34	22.42	espatulenol	220	2.10
35	22.55	4,5-环氧-4,11,11-三甲基-8-亚甲基双环[7.2.0]十一烷	220	0.65
36	22.67	(+)-表-双环倍半水芹烯	204	0.36
37	22.85	愈创木醇	222	0.75
38	23.06	$\alpha$ -榄香烯	204	0.36
39	23.36	2,4-二甲基-3-亚甲基环戊酸甲酯	168	4.79

续表 1

No.	$t_R$ /min	化合物名称	相对分子质量	相对百分含量/%
40	23.50	(+)-白菖油萜	204	1.53
41	23.64	表-桉叶醇	222	0.37
42	23.80	依兰烯	204	0.53
43	23.87	依兰油醇	222	1.09
44	23.96	古巴烯	204	0.67
45	24.08	$\beta$ -桉叶醇	222	0.3
46	24.16	$\alpha$ -毕澄茄醇	222	1.97
47	24.26	柠檬酸三乙酯	276	1.16
48	24.42	布藜醇	222	0.17
49	24.99	未鉴定	-	5.84
50	27.53	反式-Z- $\alpha$ -环氧化红没药烯	220	0.91
51	30.42	邻苯二甲酸二丁酯	278	2.23
52	30.98	未鉴定	-	0.79
53	33.16	叶绿醇	296	0.25
54	35.94	1,11-十六二炔	218	0.61
55	36.30	十八烷	254	1.02
56	37.93	二十四烷	338	0.31
57	38.41	2,2'-亚甲基双[6-(1,1-二甲基乙基)-4-甲基]苯酚	340	0.45
58	38.84	未鉴定	-	0.23
59	40.36	邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯	278	14.48
60	41.08	二十烷	282	0.81
61	42.48	二十烷	282	3.81

### 3 讨论

本研究从采自海南海口的南美蟛蜞菊挥发油中分离鉴定出 57 个化学成分, 占总挥发油的 92.92%, 其中主要含有结构多样的倍半萜类化合物。实验结果与广东潮州的南美蟛蜞菊叶挥发油<sup>[15]</sup>, 揭阳的三裂叶蟛蜞菊地上部分挥发油<sup>[16]</sup>以及福建福州的南美蟛蜞菊地上部分挥发油<sup>[17]</sup>无论在化合物组成和含量上存在明显差异。究其原因, 不同的分析结果与植株不同分析部位、样品产地、GC-MS 分析方法等因素有关。抗菌实验表明, 南美蟛蜞菊挥发油对枯草芽孢杆菌、藤黄八叠球菌具有较好的抑制活性, 最小抑菌浓度分别为 0.39, 0.78 mg·L<sup>-1</sup>。

#### [参考文献]

- [1] Calanatan C A, MacLeod J K. A diterpenoid sulphate and flavonoids from *Wedelia asperrima* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 47(6):1093.
- [2] Sartori M R K, Pretto J B, Cruz A B, et al. Antifungal

activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae) [J]. *Pharmazie*, 2003, 58(8):567.

- [3] Filho V C, Block L C, Yunes R A, et al. Paludolactone: a new eudesmanolide lactone from *Wedelia paludosa* DC. (*Acmela brasiliensis*) [J]. *Nat Prod Res*, 2004, 18(5):447.
- [4] Ragasa C Y, Padolina W G, Bowden B F, et al. New Eudesmanolide Sesquiterpenes from a Philippines Collection of *Wedelia prostate* [J]. *J Nat Prod*, 1993, 56(3):386.
- [5] Chowdhury R, Mottakin, A K M, Sohrab M H, et al. Kauren diterpenes from *Wedelia calendulacea* [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2003, 31(5):539.
- [6] 吴修仁. 潮汕生物资源植物志略[M]. 广州:中山大学出版社, 1997:281.
- [7] Bohlmann F, Zsiesche J, Robert M K, et al. Eudesmanolides and diterpenes from *Wedelia trilobata* and an ent-kaurenic acid derivative from *Aspilia parvifolia* [J]. *Phytochemistry*, 1981, 20(4):751.

# 一测多评法测定银杏叶提取物中总黄酮醇苷的含量

王丹<sup>1,2</sup>, 张晶<sup>1\*</sup>, 赵晓宏<sup>2\*</sup>

(1. 吉林农业大学, 吉林 130118; 2. 北京协和医学院 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193)

**[摘要]** 目的: 建立银杏叶提取物中总黄酮醇苷含量测定的一测多评法。方法: 采用药典含量测定操作方法, 以槲皮素为内标, 通过测定山柰素、异鼠李素与槲皮素在固定配比和正交设计的不同配比下的响应因子, 计算相对校正因子, 进而考察相关影响因素并确立相对校正因子; 样品测定中以槲皮素含量按相对校正因子直接计算出山柰素和异鼠李素的含量, 三者相加计算总黄酮醇苷的含量, 从而建立起仅以槲皮素为对照品的一测多评法, 并通过与外标法实测值比较验证。结果: 相对校正因子分别为  $f_{\text{山柰素/槲皮素}} = 1.020$ ,  $f_{\text{异鼠李素/槲皮素}} = 1.033$ , RSD 分别为 1.23%, 1.03%, 重复性良好; 8 份样品的一测多评法计算值与外标法实测值之间没有显著性差异。结论: 实验测得的相对校正因子及建立的银杏叶提取物中总黄酮醇苷含量测定的“一测多评法”准确可靠, 为实际工作中银杏叶提取物中总黄酮醇苷的常规化、多批次含量测定带来了方便, 具有较好的实用价值。

**[关键词]** 一测多评法; 相对校正因子; 高效液相色谱; 银杏叶提取物; 黄酮醇苷

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0058-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014070058

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000008.html>

**[网络出版时间]** 2014-01-20 16:04

## Content Determination of Total Falconoid Glycosides in Ginkgo Biloba Extract by QAMS

WANG Dan<sup>1,2</sup>, ZHANG Jing<sup>1\*</sup>, ZHAO Xiao-hong<sup>2\*</sup>

**[收稿日期]** 20131014(011)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZXJ09106-03C)

**[第一作者]** 王丹, 硕士研究生, 从事中药新药质量研究, Tel:15043098132, E-mail:925317599@qq.com

**[通讯作者]** \* 张晶, 教授, 从事中药学, Tel:0431-84532803, E-mail:zhjing0701@sina.com;

\* 赵晓宏, 副研究员, 从事天然药物研究开发, Tel:010-57833282, E-mail:xhzhao86@126.com

- [ 8 ] Huang X S, Huang R C. Studies on enriched yield of wedeliatrilolactone A and B in *Wedelia trilobata* by macroporous resin [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2003, 34(8):701.
- [ 9 ] 武美兰. 三裂叶蟛蜞菊的化学成分研究[D]. 广州: 广东药学院, 2010.
- [ 10 ] Li Y T, Hao X J, Li S F, et al. Eudesmanolides from *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. as potential inducers of plant systemic acquired resistance [J]. J Agri Food Chem, 2013, 61(16):3884.
- [ 11 ] 刘雪梅, 杨秀芬, 刘耀泉, 等. 超临界 CO<sub>2</sub> 提取桂郁金挥发油的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19):114.
- [ 12 ] 王燕, 陈文豪, 陈光英, 等. 鹰爪花挥发油 GC-MS 分析及抗肿瘤活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17):313.
- [ 13 ] Ebrahimabadi A H, Ebrahimabadi E H, Djafari-Bidgoli Z, et al. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran [J]. Food Chem, 2009, 119(2):452.
- [ 14 ] 丛浦珠, 李笋玉. 天然有机质谱学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002:783.
- [ 15 ] 杨东娟, 郭守军, 陈远平, 等. 南美蟛蜞菊叶挥发油化学成分分析[J]. 西北林学院学报, 2010, 25(1):131.
- [ 16 ] 江贵波, 陈实, 曾任森. 入侵物种三裂叶蟛蜞菊挥发物质的鉴定及其抗菌活性[J]. 中国生态农业学报, 2008, 16(4):905.
- [ 17 ] 林碧芬, 黄志坚. 南美蟛蜞菊挥发油的抑菌活性及成分分析[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(11):69.

[责任编辑 蔡仲德]