

烟台柴胡挥发油的 GC-MS 分析及抑菌活性研究

刘泽坤¹, 陈海霞², 李兵兵¹, 孙佳欣¹, 张伶俐¹

(1. 山东大学威海分校海洋学院, 山东 威海 264209; 2. 山东大学齐鲁医院药学部, 济南 250012)

[摘要] 目的: 研究烟台柴胡地上部分的挥发油成分及其抑菌活性。方法: 水蒸气蒸馏法提取烟台柴胡地上部分挥发油, 采用气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 技术, 分析、鉴定挥发油的化学成分。采用滤纸片固相扩散法进行抗菌活性试验并采用平板连续稀释法测定其最小抑菌浓度 (MIC)。结果: 首次提取了烟台柴胡地上部分挥发油, 成功鉴定出 30 种化合物, 并对其抑菌作用进行了研究, 发现其具有广谱抗菌性。结论: 烟台柴胡地上部分挥发油主要成分为萜类化合物和低分子脂肪烃类化合物, 其对供试菌的抑菌强度由大到小为金黄葡萄球菌 > 桔青霉 > 大肠埃希菌 > 白色葡萄球菌 > 枯草芽孢杆菌 > 黑曲霉 > 黄曲霉。

[关键词] 烟台柴胡地上部分; 挥发油; GC-MS; 抑菌活性

[中图分类号] R284.1, R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0123-04

GC-MS Analysis and Antimicrobial Activities of Essential Oil from *Bupleurum chinense*

LIU Ze-kun¹, CHEN Hai-xia², LI Bing-bing¹, SUN Jia-xin¹, ZHANG Ling-li¹

(1. Marine College of Shandong University at Weihai, Weihai 264209, China;

2. Department of Pharmacy of Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

[Abstract] **Objective:** In order to make clear the components of the essential oil from the aerial part of *Bupleurum chinense* DC. f. *vanheurckii* (Muell. -Arg.) Shan et Y. Li and the antimicrobial activities. **Method:** Distillation in water vapor was applied to extract the essential oil from *B. chinense* and meanwhile GC-MS was used to analyze the components of this plant. Its antimicrobial activities were investigated by plate diffuse and the minimum

[收稿日期] 20110415(008)

[基金项目] 山东大学威海分校学生科研立项 (SRTP) 专项资金项目 (SRTPA20101183)

[第一作者] 刘泽坤, 本科, 研究方向: 植物活性成分提取分离及鉴定, Tel: 15163128337, E-mail: lwj65@126.com

代-9H-环异长叶烯 (6.80%) 和对甲氧基桂皮酸乙酯 (2.92%)。而用水蒸气蒸馏法提取的紫玉盘茎挥发油化学成分以萜类和脂肪族化合物为主, 主要成分是十六烷酸、 α -桉叶醇和 2-羟基苯甲酸苄酯、(-)-匙叶桉油烯醇^[6]。由于提取原理不同, 这 2 种提取方法所得挥发油化学成分种类和含量都有很大的差别, 因此在实际应用时应根据提取目的选择合适的提取方法, 以得到满意的效果。

[参考文献]

[1] 《中华本草》编委会. 中华本草: 第 3 册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 11.

[2] 中国药材公司. 中国中药资源志要 [M]. 北京: 科学出版社, 1994: 275.

[3] 潘英. 复方感冒颗粒剂的制备及临床观察 [J]. 医学文选, 1999, 18(3): 399.

[4] 刘安, 徐雨珍, 邹忠梅, 等. 紫玉盘属植物的化学成分 [J]. 国外医学·中医中药分册, 2001, 23(4): 195.

[5] 卢汝梅, 苏醒, 周媛媛, 等. 紫玉盘的化学成分研究 [J]. 中药材, 2009, 32(7): 1056.

[6] 卢汝梅, 朱小勇, 李兵, 等. 紫玉盘茎挥发油化学成分的气相色谱-质谱联用分析 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(3): 557.

[责任编辑 邹晓翠]

inhibitory concentration (MIC) was investigated by plate spread. **Result:** The essential oil was extracted successfully and 30 compounds were identified. Meanwhile the antimicrobial activities were tested and a broad-spectrum antimicrobial activity of the essential oil was found. **Conclusion:** Main components of the essential oil from *B. chinense* are terpenes and low molecular aliphatic hydrocarbon compounds. And the antimicrobial intensity to the tested strains is: *Staphylococcus aureus* > *Penicillium citrinum* > *Escherichia coli* > *Staphylococcus albus* > *Bacillus subtilis* > *Aspergillus niger* > *Aspergillus flavus*.

[**Key words**] the aerial part of *Bupleurum chinense* DC. f. *vanheurckii* (Muell. -Arg.) Shan et Y. Li; the essential oil; GC-MS; antimicrobial activities

柴胡具有解表、退热、疏肝解郁、升举阳气的功效,临床上主治寒热往来、胸满胁痛、口苦耳聋、头痛目眩、疟疾等症。我国有柴胡属植物 40 种,17 个变种,主产于辽宁、甘肃、河北、河南、山东、湖北、江苏、四川、安徽等地^[1]。柴胡的主要有效成分为柴胡皂苷和挥发油,柴胡皂苷主要存在于柴胡根中,而地上部分则含较多的挥发油^[2]。柴胡的挥发油是其发汗作用的物质基础,具有良好的解表退热作用。烟台柴胡作为北柴胡的 1 个变种,产于吉林、辽宁、山东、山西等省,生于海拔 200~950 m 的山坡草地。烟台等地民间常以其作为正品柴胡入药,但未得到科学论证。烟台柴胡仅在黄酮类成分方面有人研究,在挥发油成分方面未见报道。本文采用水蒸气蒸馏法提取了烟台柴胡地上部分的挥发油,并用 GC-MS 联用技术分析,鉴定其成分,同时对其抑菌活性进行了研究。

1 材料

1.1 药材 烟台柴胡采自烟台市昆崙山,时间为 2010 年 8 月 25 日,经山东省中医药高等专科学校药理学系主任张钦德教授鉴定为伞形科植物烟台柴胡 *Bupleurum chinense* DC. f. *vanheurckii* (Muell. -Arg.) Shan et Y. Li。

1.2 仪器 7890-5975 型气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦科技公司),ZSD-1090 型全自动新型生化培养箱(北京东南仪诚实验室设备有限公司),AVC-6A1 型垂直流超净工作台(广州坤灵净化设备科技有限公司),SKY-200B 型恒温培养振荡器(南京菲奇工贸有限公司),VX 型立式全自动高压蒸汽灭菌锅(广州倍立思仪器有限公司)。

1.3 试剂及培养基 无水乙醚、无水硫酸钠均为分析纯,培养霉菌用 PDA 培养基(去皮马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水定容至 1 000 mL),培养细菌用牛肉膏蛋白胨培养基(牛肉膏 5 g,NaCl 5

g,蛋白胨 10 g,琼脂 20 g,蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 7.2)。

1.4 菌种 大肠埃希菌 *Escherichia coli*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、白色葡萄球菌 *Staphylococcus albus*、黑曲霉 *Aspergillus niger*、黄曲霉 *Aspergillus flavus*、桔青霉 *Penicillium citrinum*,由山东大学威海分校海洋学院微生物实验室提供。

2 方法

2.1 挥发油的提取 挥发油提取采用《中国药典》附录 U 方法^[3]中水蒸汽蒸馏法提取挥发油。取烟台柴胡地上部分鲜品 100 g,粉碎,过筛(40 目),放入水蒸气蒸馏容器中,加热回流 8 h,收集蒸馏液,加 NaCl 搅拌至饱和,用分析纯乙醚萃取 3 次,乙醚萃取物中加入无水硫酸钠脱水干燥,用旋转蒸发器除去乙醚^[4]后得到挥发油。将挥发油密封,置于冰箱中保存。样品送至山东省药品检验所进行 GC-MS 分析。

2.2 GC-MS 分析 色谱条件:HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane(0.25 μm \times 0.25 mm \times 30 m)弹性石英毛细管柱,程序升温初温 60 $^{\circ}\text{C}$,保持 2 min,以 15 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升至 180 $^{\circ}\text{C}$,保持 5 min,再以 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 250 $^{\circ}\text{C}$,保持 3 min,进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$,载气氦气,柱前压 72 kPa,进样量 1 μL (正己烷溶液),流速 1.2 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ 。质谱条件:离子源 EI,离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$,电子能量 70 eV,接口温度 270 $^{\circ}\text{C}$,溶剂延迟时间 3 min,扫描质量 m/z 60~600。检索普库为 NIST 质谱数据库。用面积归一法确定各组分的相对百分含量。

2.3 菌悬液及含菌平板的制备 将供试菌制成 10^{11} ~ 10^{12} cfu $\cdot\text{L}^{-1}$ 均匀的菌(孢子)悬液,将融化的灭菌培养基倾入无菌培养皿中待凝固后滴入 0.1 mL 菌(孢子)悬液,用无菌涂布棒将菌(孢子)悬液涂布均匀即成含菌平板,正置在培养箱 1 h(细菌 37

℃,真菌 28 ℃)待用。

2.4 抑菌活性的测定 采用滤纸片法^[5],用 1% 的聚山梨醇酯(吐温-80)水溶液作稀释剂制成 20% 稀释液待用。将滤纸打成直径为 6 mm 的小圆片,高温蒸汽杀菌后烘干。之后浸泡在浓度为挥发油稀释液中约 30 min,沥干贴于含菌平板上,每板呈“品”字形贴 3 片,以贴有只浸有 1% 的吐温 80 水溶液滤纸片的组为空白对照。之后将所有组置于恒温培养箱中,细菌在 37 ℃ 下培养 24 h,真菌在 28 ℃ 下培养 48 ~ 72 h^[6-7] 观察并记录形成的抑菌圈直径。每组实验重复 3 次,实验结果取 $\bar{x} \pm s$ 。

2.5 最小抑菌浓度(MIC)的测定 采用平板连续稀释法,用 1% 的吐温 80 水溶液作稀释剂制成不同体积比(20%,15%,10%,6%,4%,2%,1%,0.5%,

0.25%,0.12%)的烟台柴胡挥发油稀释液,0.1% 的菌悬液加入至各浓度挥发油的稀释液中,摇匀成混合液。移取 0.2 mL 挥发油稀释液与菌悬液的混合液于平板中,用涂布棒涂布均匀,倒置于恒温培养箱中,细菌在 37 ℃ 下培养 24 h,真菌在 28 ℃ 下培养 48 ~ 72 h。观察菌体生长情况,生长菌体为阳性(+),不生长菌体为阴性(-),以不生长菌体的挥发油的最低浓度为挥发油的最低抑菌浓度(MIC)。以稀释剂 1% 的吐温 80 水溶液作对照,重复 3 次。

3 结果与讨论

根据上述条件进行测定,将图谱进行分析检索,结果如表 1。

表 1 烟台柴胡挥发油成分 GC-MS 分析

No.	化合物	保留时间	质量分数/%
1	甘香烯 elixene	9.439	0.598
2	α -榄香烯 α -elemen	9.964	0.607
3	7 双环[4.1.0]庚-7-亚基-双环[4.1.0]庚烷 bicyclo[4.1.0]heptane,7-bicyclo[4.1.0]hept-7-ylidene-	10.166	1.088
4	α -葑烯 α -cubebene	10.281	4.881
5	石竹烯 caryophyllene	10.314	1.262
6	环苜蓿烯 cyclosativene	10.535	0.802
7	τ -杜松烯 τ -cadinene	10.613	0.824
8	τ -衣兰油烯 τ -muurolene	10.810	1.844
9	大根香叶烯 D germacrene D	10.927	14.843
10	法尼烯 farnesene	10.983	0.910
11	τ -榄香烯 τ -elemene	11.065	1.937
14	ϵ -杜松烯 ϵ -cadinene	11.252	2.622
15	异香橙烯环氧化物 isoaromadendrene epoxide	11.937	0.757
16	匙叶桉油烯醇 ent-spathulenol	12.072	3.451
17	石竹烯氧化物 caryophyllene oxide	12.580	2.681
18	金合欢醇 farneso	12.777	1.305
19	τ -紫穗槐醇 τ -muurolo	13.009	5.264
20	α -毕橙茄醇 α -cadinol	13.217	5.609
21	4-(2,2-二甲基-6-甲基己酮)-3-甲基丁烷-2-酮 4-(2,2-Dimethyl-6-methylenecyclohexylidene)-3-methylbutan-2-one	13.351	2.734
22	(3E)-4-(1-过氧化氢-2,2-二甲基-6-甲基环己基)-3-戊烯-2-酮 (3E)-4-(1-Hydroperoxy-2,2-dimethyl-6-methylenecyclohexyl)-3-penten-2-one	13.753	1.519
23	香橙烯氧化物-(1) aromadendrene oxide-(1)	15.115	2.093
24	murolan-3,9(11)二烯-10-过氧 murolan-3,9(11)-diene-10-peroxy	15.576	3.618
25	1-甲基-4-异丙基-7,8-二羟基-螺[三环[4.4.0.0(5,9)]癸-10,2'-环氧乙烷] spiro[tricyclo[4.4.0.0(5,9)]decane-10,2'-oxirane],1-methyl-4-isopropyl-7,8-dihydroxy-	16.953	1.566

续表 1

No.	化合物	保留时间	质量分数/%
26	维生素 A 醋酸酯 retinol, acetate	17.375	7.330
27	(全 Z)-4,7,10,13,16,19-十二碳六烯酸甲酯 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid, methyl ester, (all-Z)	19.1	17.508
28	8,9-去氢-9-甲酰基-环异长叶烯 cycloisolongifolene, 8,9-dehydro-9-formyl	18.118	6.913
29	镰叶芹醇 falcarinol	19.520	0.856
30	2,2'-亚甲基双(4-甲基-6-叔丁基)-苯酚 phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-	28.251	3.181

结果表明,烟台柴胡挥发油中主要成分为萜类化合物、低分子脂肪烃类化合物,还含有少量醇类。通过面积归一化法计算,其中相对质量分数最高的 6 种成分分别依次是顺-4,7,10,13,16,19-十二碳六烯酸甲酯(19.1%)、大根香叶烯 D(14.843%)、维生素 A 醋酸酯(7.330%)、8,9-去氢-9-甲酰基-环异长叶烯(6.913%)、 α -毕橙茄醇(5.609%)、 τ -紫穗槐醇(5.264%)。同时挥发油对所测 8 种供试菌均有

抑菌活性,其活性的定性分析结果以抑菌圈直径大小(mm)表示为:金黄葡萄球菌 24 ± 1.8 、大肠埃希菌 18 ± 1.3 、枯草芽孢杆菌 12 ± 0.9 、白色葡萄球菌 17 ± 0.2 、黑曲霉 11 ± 2.9 、黄曲霉 8 ± 1.4 、桔青霉 19 ± 0.7 ,对照组无明显抑菌现象。由此可见烟台柴胡挥发油对金黄葡萄球菌造成的抑菌圈最大,对黄曲霉造成的抑菌圈最小。

表 2 烟台柴胡挥发油对供试菌的 MIC

菌种	体积分数/%										MIC	
	15	10	6	4	2	1	0.5	0.25	0.125	对照组		
金黄葡萄球菌	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	5.00
大肠埃希菌	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	10.00
枯草芽孢杆菌	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	100.00
白色葡萄球菌	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	10.00
黑曲霉	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	20.00
黄曲霉	-	-	-	-	+	++	++	+++	+++	+++	+++	40.00
桔青霉	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	10.00

由表 2 结果也知,烟台柴胡挥发油对金黄葡萄球菌的最小抑制浓度最低。经分析发现表 2 与抑菌圈大小分析结果基本吻合,烟台柴胡对这 8 种菌的抑制强度从大到小依次为:金黄葡萄球菌 > 桔青霉 > 大肠埃希菌 > 白色葡萄球菌 > 枯草芽孢杆菌 > 黑曲霉 > 黄曲霉。有报道称 α -紫穗槐烯、石竹烯、香橙烯、乙酸香茅酯、榄香烯、大根香叶烯、愈创木烯和榄香醇这 8 种化合物与抑制金黄色葡萄球菌显著或极显著相关,其中榄香醇为负相关^[8],其中大根香叶烯、紫穗槐醇、榄香烯、石竹烯均在烟台柴胡挥发油中发现且总含量不低于 20%,很好地解释了烟台柴胡挥发油对金黄葡萄球菌的最大抑制活性,但其他物质对于供试菌株的抑制活性还有待于进一步研究。结果表明烟台柴胡的挥发油对细菌和真菌都具有抑菌效果,具有广谱抗菌性。

[参考文献]

[1] 孙云,朱燕. 柴胡古今应用概述[J]. 山东中医学院学报,1994,18(6):421.
 [2] 范秦鹤,王俊芳,陈会平. 柴胡及其炮制品有效成分比较[J]. 中成药,1994,16(2):20.
 [3] 中国药典. 一部[S]. 2000:232.
 [4] 宫海明,赵桦. 不同产地吴茱萸果实挥发油成分的 GC-MS 分析及与小花吴茱萸的比较[J]. 西北植物学报,2008,28(3):595.
 [5] 钱存柔,黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 北京:北京大学出版社,1999:7.
 [6] 梁盛年,段志芳,王志娟,等. 香蕉皮中有机酸的提取及抑菌作用的研究[J]. 食品工业科技,2007,28(8):73.
 [7] 李建慧,马会勤,陈尚武. 多酚抑菌效果的研究[J]. 中国食品学报,2008,8(4):100.
 [8] 陈新,刘晓静,吴娇,等. 益智果实挥发油化学成分及抑菌活性研究[J]. 中国农学通报,2010,26(22):366.

[责任编辑 邹晓翠]