

大巴山区汉中参叶挥发油化学成分和抗菌活性研究

赖普辉*, 田光辉, 季晓晖, 赵桦

(陕西理工学院化学学院, 陕西 汉中 723000)

[摘要] 从大巴山区的新鲜汉中参叶中利用水蒸气蒸馏法提取挥发油, 采用 GC/MS 联用技术首次对其挥发油组分进行分离和分析, 运用气相色谱面积归一化法确定各组分的相对含量。从汉中参叶挥发油中共检出了 75 种组分, 确定出 73 种化合物, 其主要组分是 α -蒎烯 (21.39%)、棕榈酸 (17.19%)、植醇 (5.50%)、菲 (5.05%)、降姥鲛-2-酮 (4.22%)、 α -亚麻酸 (octadecatrienoic acid, 3.35%) 等。对汉中参叶挥发油进行了抗菌试验, 结果表明汉中参叶挥发油对试验菌株均有明显的抑制和灭活作用, 特别是对金黄色葡萄球菌 CMCC26112 株和白色假丝酵母菌 CMCC850216 株的抗菌活性表现得更为显著。

[关键词] 汉中参叶; 挥发油; 气相色谱-质谱联用; 抗菌活性

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0007-05

Study on Volatile Components and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from the Leaf of *Panax japonicus* var. *major* in Daba Mountain

LAI Pu-hui, TIAN Guang-hui, JI Xiao-hui, ZHAO Hua

(School of Chemistry, Shanxi University of Technology, HanZhong 723000, China)

[Abstract] The essential oil from the fresh leaf of *Panax japonicus* var. *major* obtained from Daba mountain was extracted by steam distillation, and the components of the essential oil were separated and structurally identified by GC-MS for the first time, and the relative contents of the components by the peak-area normalization method was adopted in gas chromatography. Seventy-five peaks were separated from the essential oil of the fresh leaf, and 73 components were identified, the major components of the essential oil were α -cubebene (21.39%), hexadecanoic acid (17.19%), phytol (5.50%), phenanthrene (5.05%), nor-prist-2-one (4.22%), octadecatrienoic acid (3.35%), etc. The antimicrobial activities of the essential oil were also investigated. The results of the antimicrobial activities of the essential oil was found to inhibit the growth of testing bacteria and sterilized them especially against *Staphylococcus aureus* CMCC26112 and *Candida albicans* CMCC850216.

[Key words] *Panax japonicus*; the essential oil; gas chromatography-mass spectrometry; antimicrobial activity

汉中参叶为五加科人参属植物大叶三七 *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burkill) C. Y. Wu et K. M. Feng 的干燥带梗叶片^[1], 又称为钮子七、扣子七之叶等^[2]。以主产于陕西省汉中而得名, 具有生津止渴, 活血化瘀, 恢复疲劳的功效, 是港澳及东南

亚地区华人泡茶的习惯用品, 销售市场稳定。对钮子七根茎的化学成分研究报道较多^[3-5], 对汉中参叶的化学成分, 特别是汉中参叶挥发油的开发利用研究较少。事实上挥发油有许多独特的生理活性如杀菌、消炎、抗氧化、清热解毒等^[6-8], 一些已用于医疗、保健和食品工业, 开发汉中参叶挥发油有广阔的前景。这里对采自陕西镇巴县海拔 2 500 m 大巴山区汉中参叶的挥发油采用水蒸馏法进行了提取, 利用气相色谱-质谱联用技术对其挥发油进行分离和结构确定^[9-10], 在 NIST 谱库里计算机自动检索确定各

[收稿日期] 20100219(002)

[基金项目] 陕西省教育厅专项科研项目(04JK137)

[通讯作者] * 赖普辉, 教授, 硕士, 主要从事天然产物开发利用研究。Tel: 13992662905, E-mail: tgh398@yahoo.com.cn

个成分^[11],通过数据处理系统检索谱图库,确定出 73 种化合物,并对汉中参叶挥发油进行了体外抗菌试验,为开发汉中参叶这一野生资源寻求科学的理论依据。

1 材料

汉中参叶于 2009 年 7 月下旬采集于陕西镇巴县海拔 2 500 m 的大巴山区,由陕西理工学院生物学院赵桦教授鉴定,确认是大叶三七 *P. japonicus* C. A. Mey. var. major (Burkill) C. Y. Wu et K. M. Feng 的叶子,又称为汉中参叶。

氯化钠、无水硫酸钠、乙醚等试剂(均为分析纯,西安化学试剂厂),水为蒸馏水。MH 肉汤,肉汤培养基,普通琼脂平板培养基。活性试验用的标准菌株冻干品购自中国预防医学科学院北京药品生物制品检定所中国医学细菌保藏中心。

Finnigan-Trace DSQ 型 GC/MS 仪(美国热电公司),96 孔培养板,普通培养箱,水蒸气蒸馏装置,打浆机。

2 方法

2.1 挥发油的提取 称取汉中参叶的鲜叶 100.0 g 用打浆机打碎成泥浆状,用水蒸气蒸馏法提取挥发油 8 h^[12]。馏出液经 NaCl 饱和后用乙醚萃取 3 次,萃取液用无水硫酸钠干燥过夜,蒸馏回收乙醚得淡黄色挥发油 0.18 g,得油率 0.18%,0℃ 下密封保存备用。

2.2 挥发油的 GC/MS 分析条件 GC6890N/MSD5973N 联用仪(美国 J&W),色谱柱:HP-5(0.25 mm × 30 m, 0.25 μm)弹性石英毛细管柱,气相色谱条件:载气 99.999% 高纯氦气,衡流模式流量 1.0 mL·min⁻¹,进样量 5 μL,分流比 10:1,GC 气化温度 250℃,柱温 80℃ 保持 5 min 后,再以 2℃·min⁻¹ 的升温至 100℃,保持 5 min。质谱条件:MSD 离子源为 EI 源,电子能量 70 eV,电离源温度 230℃,倍增器电压 976 V,扫描范围 *m/z* 40~600,扫描模式:全扫描。定量定性方法:各色谱峰对应的质谱图经联用仪的计算机谱库检索进行定性,使用美国 NIST02 谱库,相似度(SI)均在 85% 以上;各组分的相对含量根据总离子流图由计算机采用峰面积归一化法计算。

2.3 抗菌试验方法 试验菌液的配置是将细菌接种于 MH 肉汤,在普通培养箱 37℃ 培养 24 h,比浊法计数,用培养液调配成 10⁶ CFU·mL⁻¹。培养基用

肉汤培养基和普通琼脂平板培养基,采用微量 2 倍连续梯度稀释法测定最小抑菌浓度(MIC),平板转种法测定最小杀菌浓度(MBC)^[13]。试验菌株为金黄色葡萄球菌 CMCC26112 株,大肠埃希菌 CMCC44113 株,乙型溶血性链球菌 CMCC32210 株,伤寒沙门菌 CMCC50127 株,福氏志贺氏菌 CMCC51573 株和白色假丝酵母菌 CMCC850216 株,5 个细菌和 1 个酵母菌。

3 结果与讨论

3.1 挥发油组分 汉中参叶的挥发油经 GC/MS 分离分析各峰经质谱扫描后将所得的质谱图用计算机谱库检索,结合人工谱图解析,按各峰的质谱碎片与文献核对,查阅有关质谱资料,对基峰、质核比和相对丰度等方面进行比较,分别对各峰加以确认,从汉中参叶挥发油中共检出了 75 种组分,确定出 73 种化合物,确定出的化合物相对含量占到全油的 98.80%,各组分鉴定结果列于表 1。汉中参叶挥发油中的组分是复杂多样的,以芳香烃类、醇类、烯炔类和杂环类化合物居多,其中芳香烃类有 16 种之多,醇类 12 种,烯类 12 种,杂环类 8 种,烷烃 7 种,酸类 5 种,酮类 5 种,酚类 4 种,醛类 4 种。

表 1 结果可以看出从汉中参叶挥发油中确定出的 73 种有 9 种倍半萜化合物,相对含量占全油的 27.80%,主要成分是 -萜茄澄烯(-cubebene, 21.39%)、双环大根香叶烯(bicyclogermacrene, 0.861%)、-石竹烯(-caryophyllene, 0.53%)、-石竹烯(-caryophyllene, 0.979%)、异榄香烯(acetophenone, 1.99%)、氧化-石竹烯(caryophyllene oxide, 0.478%)等。确定出有 4 种酚类,相对含量占全油的 0.921%。不饱和脂肪酸的相对含量占全油的 6.37%,其中亚麻酸和亚油酸都是人体必需的脂肪酸之一,属于多烯不饱和脂肪酸,均具有特殊的生理功能。还有斯巴醇[(-)-spathulenol, 1.117%]和 -环氧化-红没药烯(-bisabolene epoxide, 2.701%)等。汉中参叶挥发油中有多种生物活性成分,其中 2,6-叔丁基-4-甲基-苯酚是 1 种抗氧化剂,2-羟基-4-甲氧基-苯乙酮具有祛风、镇痛的功效^[14],斯巴醇具有抗细菌、抗真菌和抗病毒的作用^[15]。斯巴醇可作为人参属植物中扣子七与其他植物的主要鉴别成分,扣子七中往往含有大量的斯巴醇。汉中参叶挥发油化学组分的复杂多样性预示着该挥发油可能具有一定的药理活性,此挥发油具有良好的应用开发价值。

表 1 汉中参叶挥发油的成分

峰号	RT /min	分子式	相对分子质量	化合物名称	质量分数 /%	准确度 /%
1	3.69	C ₈ H ₁₀	106	ethylbenzene 乙基苯	0.24	93
2	3.94	C ₈ H ₁₀	106	<i>p</i> -xylene 对甲基苯	0.85	97
3	4.73	C ₈ H ₁₀	106	<i>o</i> -xylene 邻甲基苯	0.06	94
4	7.05	C ₇ H ₁₂ O	112	(<i>E</i>)-2-heptenal (<i>E</i>)-2-庚烯醛	0.12	83
5	7.96	C ₈ H ₁₆ O	128	1-octen-3-ol 1-辛烯-3-醇	0.27	88
6	8.62	C ₇ H ₁₀ O	110	(<i>E, E</i>)-2,4-heptadienal 2-4-庚二烯醛(<i>E, E</i>)	0.10	90
7	9.95	C ₈ H ₁₈ O	130	2-ethyl-1-hexanol 2-乙基-己醇-1	0.05	86
8	10.42	C ₈ H ₈ O	120	benzeneacetaldehyde 苯乙醛	0.06	91
9	11.09	C ₁₂ H ₂₆	170	2,6-dimethyldecane 异-十二烷	0.25	86
10	11.30	C ₁₂ H ₂₆	170	dodecane 正十二烷	0.08	89
11	11.47	C ₈ H ₁₆ O	128	2-octen-1-ol 2-辛烯-1-醇	0.04	87
12	11.57	C ₈ H ₁₈ O	130	1-octanol 辛-1-醇	0.29	87
13	11.70	C ₈ H ₁₈ O	108	4-methyl-phenol 4-甲基苯酚	0.03	87
14	12.67	C ₁₀ H ₁₈ O	154	linalool 芳樟醇	0.09	85
15	12.83	C ₉ H ₁₈ O	142	nonanal 壬醛	0.45	87
16	12.95	C ₈ H ₁₆ O	128	2,6-dimethyl-cyclohexanol 2,6-二甲基环己醇	0.04	86
17	13.17	C ₈ H ₁₀ O	122	phenylethyl alcohol 苯乙醇	0.03	86
18	15.02	-	-	结构未确定	0.19	
19	15.71	C ₁₀ H ₈	128	naphthalene 萘	0.09	94
20	17.03	C ₈ H ₈ O	120	2,3-dihydro-benzofuran 2,3-二氢-苯并呋	0.26	86
21	17.20	C ₉ H ₅ NS	135	benzothiazole 苯并 噻	0.42	94
22	19.04	C ₉ H ₁₈ O ₂	158	nonanoic acid 壬酸	0.18	93
23	19.64	C ₈ H ₇ N	117	indole 吲哚	1.22	95
24	20.39	C ₉ H ₁₀ O ₂	150	2-methoxy-4-vinylphenol 2-甲氧基-4-乙烯基苯酚	0.45	85
25	21.29	C ₉ H ₁₀ O	134	4-(2-propenyl)-phenol 4-丙稀基苯酚	0.28	93
26	21.65	C ₈ H ₁₀ O ₃	154	2,6-dimethoxy-phenol 2,6-二甲氧基苯酚	0.16	86
27	22.59	C ₁₅ H ₂₄	204	-cubebene -葎茄澄烯	0.38	93
28	22.94	-	-	结构未确定	0.10	
29	23.12	C ₁₅ H ₂₄	204	<i>iso</i> -elemene 异榄香烯	1.99	95
30	23.33	C ₁₂ H ₁₂	156	1,7-dimethyl-naphthalene 1,7-二甲基萘	0.28	93
31	23.81	C ₁₂ H ₁₂	156	2,6-dimethyl-naphthalene 2,6-二甲基萘	0.30	90
32	24.00	C ₁₅ H ₂₄	204	-caryophyllene -石竹烯	0.98	95
33	24.21	C ₁₃ H ₂₀ O	192	-ionone -紫罗兰酮	0.21	87
34	24.31	C ₁₅ H ₂₄	204	cadindiene 杜松二烯	0.55	90
35	24.55	C ₉ H ₁₀ O ₃	166	1-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-ethanone 2-羟基-4-甲氧基苯乙酮	0.35	90
36	24.73	C ₁₂ H ₈	152	biphenylene 亚联苯	0.09	88
37	24.79	C ₁₅ H ₂₄	204	cadindiene 杜松二烯	0.22	89
38	25.09	C ₁₅ H ₂₄	204	-caryophyllene -石竹烯	0.53	89
39	25.30	C ₂₀ H ₄₂	282	phytane 植烷	0.59	87

续表 1

峰号	RT /min	分子式	相对分子质量	化合物名称	质量分数 /%	准确度 /%
40	25.83	C ₁₂ H ₁₀	154	acenaphthene 茚	0.46	86
41	25.98	C ₁₅ H ₂₄	204	-cubebene -葑茄澄烯	21.39	94
42	26.43	C ₁₅ H ₂₄	204	bicyclgermacrene 双环大根香叶烯	0.86	91
43	26.72	C ₁₅ H ₂₄	204	-farnesene -法泥烯	0.40	90
44	26.79	C ₁₂ H ₈ O	168	dibenzofuran 氧芴(二苯并呋)	1.47	86
45	27.21	C ₁₅ H ₂₄	204	cadindiene 杜松二烯	0.51	98
46	27.31	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	180	trimethyl-tetrahydro-2(4H)-benzofuranone 三甲基-四氢苯并呋酮	2.68	95
47	28.38	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200	dodecanoic acid 十二烷酸(月桂酸)	1.50	99
48	28.76	C ₁₃ H ₁₀	166	fluorene 芴	1.49	95
49	28.82	C ₁₅ H ₂₄ O	220	(-)-spathulenol 斯巴醇	1.12	90
50	28.99	C ₁₅ H ₂₄ O	220	caryophyllene oxide 氧化-石竹烯	0.48	90
51	29.53	C ₁₅ H ₂₆ O	222	cedrol 柏木醇	1.36	98
52	30.27	C ₁₃ H ₁₀ O	182	4-methyl-dibenzofuran 4-甲基-氧芴	0.31	93
53	30.98	C ₁₅ H ₂₄ O	220	8-hydroxy-endo-cycloisolongifolene 环化-异构长叶松醇	0.59	85
54	31.89	C ₁₅ H ₂₄ O	220	cis-Z-. .-bisabolene epoxide cis-Z-. .-环氧化-红没药烯	2.70	86
55	32.20	C ₁₇ H ₃₆	240	heptadecane 正十七烷	0.86	93
56	32.39	C ₁₉ H ₄₀	268	pristane 姥鲛烷	0.39	87
57	33.05	C ₁₃ H ₈ O	180	9H-fluoren-9-one 芴-9-酮	0.41	88
58	33.46	C ₁₂ H ₈ S	184	dibenzothiophene 二苯并吩(硫芴)	0.69	97
59	34.18	C ₁₄ H ₁₀	178	phenanthrene 菲	5.05	96
60	34.43	C ₁₄ H ₁₀	178	anthracene 蒽	0.58	93
61	34.86	C ₁₈ H ₃₈	254	octadecane 正十八烷	0.44	93
62	36.02	C ₁₈ H ₃₆ O	268	nor-prist-2-one 降姥鲛-2-酮	4.22	99
63	37.13	C ₁₅ H ₁₂	192	3-methyl-phenanthrene 3-甲基-菲	0.47	89
64	37.26	C ₁₅ H ₁₂	192	2-methyl-phenanthrene 2-甲基-菲	0.412	93
65	37.40	C ₁₉ H ₄₀	268	nonadecane 正十九烷	0.42	93
66	37.66	C ₁₅ H ₁₀	190	4H-cyclopenta[def]phenanthrene 4H-环戊[def]菲	0.41	97
67	37.76	C ₁₅ H ₁₂	192	9-methyl-phenanthrene 9-甲基-菲	0.36	86
68	37.87	C ₁₅ H ₁₂	192	1-methyl-phenanthrene 1-甲基-菲	0.56	87
69	38.58	C ₂₀ H ₄₀ O	296	isophytol 异-植(烯)醇	1.15	87
70	39.04	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	n-hexadecanoic acid 十六烷酸(棕榈酸)	17.19	98
71	41.08	C ₁₆ H ₁₀	202	fluoranthene 荧蒽	1.59	96
72	42.24	C ₁₆ H ₁₀	202	pyrene 芘	1.57	91
73	42.44	C ₂₀ H ₄₀ O	296	phytol 植醇	5.50	91
74	42.90	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280	(Z,Z)-9,12-octadecadienoic acid 亚油酸	3.02	99
75	43.03	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278	(Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoic acid -亚麻酸	3.35	98

3.2 抗菌活性结果分析 汉中参叶挥发油对 6 个标准菌株的 MIC 和 MBC 如表 2, 从表中结果可以看出汉中参叶挥发油对试验所选用的 6 个标准菌株均有较为明显的抑制作用和灭活作用, 能有效地抵抗这些致病菌的感染。汉中参叶挥发油对金黄色葡萄

球菌的 MIC 是 1.72 g·L⁻¹, 表明汉中参叶挥发油对此细菌有显著的抑制作用; 汉中参叶挥发油对白色假丝酵母菌的 MIC 为 2.12 g·L⁻¹, 表明汉中参叶挥发油对这个细菌也有显著的抑制作用。汉中参叶挥发油对其他细菌的 MIC 最大为 11.18 g·L⁻¹, 相对较

大一些,但也表现出明显的抑菌活性,汉中参叶挥发油对试验的 6 个菌株均有抑制作用。

表 2 汉中参叶挥发油对标准菌株的 MIC 和 MBC $g \cdot L^{-1}$

试验菌株	MIC	MBC
金黄色葡萄球菌 CMCC26112 株	1.72	2.62
大肠埃希菌 CMCC44113 株	8.86	12.26
乙型溶血性链球菌 CMCC32210 株	10.14	8.64
伤寒沙门菌 CMCC50127 株	9.92	12.12
福氏志贺氏菌 CMCC51573 株	11.18	14.58
白色假丝酵母菌 CMCC850216 株	2.12	3.16

汉中参叶挥发油对金黄色葡萄球菌的 MBC 是 $2.62 g \cdot L^{-1}$,表明汉中参叶挥发油对此细菌有显著的杀灭作用;汉中参叶挥发油对白色假丝酵母菌的 MBC 是 $3.16 g \cdot L^{-1}$,表明汉中参叶挥发油对这个细菌也有显著的杀灭作用。汉中参叶挥发油对其他细菌的 MBC 最大为 $14.58 g \cdot L^{-1}$,表明该挥发油对试验的 6 个菌株均有杀灭作用。汉中参叶挥发油对金黄色葡萄球菌和白色假丝酵母菌的抑制作用和灭活作用更为显著一些。

4 结论

用水蒸气蒸馏法提取挥发油简单方便,设备廉价易得,易形成大规模生产,用水蒸气蒸馏法提取汉中参叶的挥发油,确定其挥发油组分,对汉中参叶挥发油进行抗菌试验尚属首例。汉中参叶挥发油中的成分种类复杂多样,以芳香烃类、醇类、烯炔类和杂环类化合物居多,汉中参叶挥发油中有 9 种倍半萜化合物,相对含量占全油的 27.80%,其中 -萜茄澄烯占到 21.39%,含量较高的化合物其分子结构中存在着不饱和双键,含有不饱和双键的化合物往往会表现出一系列的生理活性,这些含量较高化合物的结构特征预示着汉中参叶挥发油可能具有一定的生理活性。体外抗菌试验结果表明汉中参叶挥发油对试验所选用的 6 个试验菌株均有明显的抑制和灭活作用,对金黄色葡萄球菌和白色假丝酵母菌的抑制和灭活作用表现得更为显著,这里也仅对其挥发油的抗菌活性做了初步试验,由于汉中参叶挥发油化学成分种类的复杂性,其他生物活性的试验还有研究的价值和意义。

[参考文献]

- [1] 徐虹,姜祎,许海燕,等. 汉中参叶总皂苷提取工艺研究[J]. 现代中医药, 2007(3): 78.
- [2] 李世全. 秦岭巴山药物志[M]. 西安: 陕西科技出版社, 1987: 353.
- [3] 刘朝霞,邹坤. 鄂产人参属药用植物的研究概况[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(9): 571.
- [4] 刘朝霞,潘家荣,邹坤,等. 扣子七挥发油成分的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(2): 301.
- [5] 赖普辉,田光辉,高艳丽,等. 钮子茎中石油醚提取物成分的 GC-MS 分析[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(2): 10026.
- [6] Alberto A, Andrea B, Elisabetta C, et al. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *rosmarinus officinalis* L[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(12): 3530.
- [7] Leopold J, Gerhard B, Albena S, et al. Composition quality control and antimicrobial activity of the essential oil of long-time Dill seeds from Bulgaria[J]. Chem Nat Com, 2003, 51(7): 3854.
- [8] 田光辉,刘存芳. 野生糙苏籽挥发油化学成分的分析[J]. 食品科学, 2009, 30(3): 39.
- [9] Kovats E. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system[J]. Adv Chromatogr, 1965, 1(3): 229.
- [10] Van Den Dool H, Kratz P D. A generalization of retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography[J]. J Chromatogr, 1963, 11(8): 463.
- [11] The nist mass spectral search program for the NIST/EPA/NIM mass spectral [R]. Library version 2.0, build 10/05/2002.
- [12] 田光辉;刘存芳;王晓. 四川杜鹃花中挥发性成分的研究[J]. 陕西理工学院学报, 2007(2): 49.
- [13] 刘存芳,田光辉. 抱茎蓼挥发油成分及其抗菌活性的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(3): 447.
- [14] 许海琴. 常用天然提取物质量标准参考手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 132.
- [15] 梁振益,陈祎平,吴辉,等. 雪香兰挥发油化学成分的研究[J]. 化学分析计量, 2008, 17(6): 35.

[责任编辑 仝燕]