

三桠乌药叶片中挥发油成分及抑菌活性研究

刘泽坤^{1*}, 陈海霞²

(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, 济南 250012)

摘要 目的: 研究三桠乌药叶片中所含挥发油成分及抑菌活性。方法: 采用水蒸气蒸馏法提取三桠乌药叶片中所含挥发油, 并用气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术, 分析挥发油的化学成分。用滤纸片固相扩散法和平板连续稀释法进行挥发油抗菌活性试验和最小抑菌浓度(MIC)研究。结果: 首次提取了三桠乌药叶片中所含挥发油, 成功鉴定出 46 种化合物, 并对其抑菌活性进行了研究, 发现其具有广谱抗菌性。结论: 三桠乌药叶片中所含挥发油主要成分为醇类化合物、萜类化合物和少量氧化物、酯类化合物及其他物质。其对供试菌的抑菌强度由大到小为金黄葡萄球菌 > 表皮葡萄球菌 > 粪肠球菌 > 大肠埃希菌 > 桔青霉 > 白色葡萄球菌 > 枯草芽孢杆菌 > 白色念珠菌 > 黑曲霉 > 绿脓杆菌。

关键词 三桠乌药叶片; 挥发油成分; 抑菌活性

中图分类号 R284.1 **文献标识码** A **文章编号** 1005-9903(2011)22-0164-04

DOI CNKI: 11-3495/R. 20110920. 1430. 005 **网络出版时间** 2011-09-20 14:30

网络出版地址 <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110920.1430.005.html>

GC-MS Analysis of Essential Oils from Leaves of *Lindera obtusiloba*

LIU Ze-kun^{1*}, CHEN Hai-xia²

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

2. Department of Pharmacy of Qilu Hospital of Shandong University, Ji'nan 250012, China)

[Abstract] **Objective:** To study the components of the essential oil from the leaves of *Lindera obtusiloba* and the antimicrobial intensity. **Method:** Distillation in water vapor was applied to extract the essential oil from the leaves of *L. obtusiloba* and meanwhile gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to analyze the components of this plant. Meanwhile, paper disc diffusion method and plate serial dilution method were used respectively to study the anti-bacterial activity and the minimum inhibitory concentration (MIC). **Result:** The essential oil was extracted successfully and 46 compounds were identified. Also broad-spectrum antimicrobial activity was found. **Conclusion:** Main components of the essential oil from the leaves of *L. obtusiloba* are alcohol, sesquiterpenes, and a minority of esters, oxygenated components as well as some other compounds. And the antimicrobial intensity to the tested strains is: *Staphylococcus aureus* > *Staphylococcus epidermidis* > *Enterococcus faecium* > *Escherichia coli* > *Penicillium citrinum* > *Staphylococcus albus* > *Bacillus subtilis* > *Candida albicans* > *Aspergillus niger* > *Pseudomonas aeruginosa*.

[Key words] leaves of *Lindera obtusiloba*; essential oil; chemical constituents; antimicrobial activities

三桠乌药 *Lindera obtusiloba* Bl. 为樟科山胡椒属

植物, 民间俗称“三桠钓樟”、“三钻风”、“山胡椒”、“甘姜”, 生长在海拔约 3 000 m 以下山谷或灌丛中, 分布于辽宁、山东、安徽、江苏、河南、陕西、甘肃、浙江、江西、福建、湖南、湖北、四川、西藏、云南等省, 朝鲜、日本也有分布^[1]。民间常将树叶或树皮适量捣烂敷患处, 有活血、舒筋、散瘀消肿、理气等功效, 用

收稿日期 20110531(008)

基金项目 山东大学威海分校学生科研立项专项(A10022)

通讯作者 * 刘泽坤, Tel: 13791120656, E-mail: wenjun1965@163.com

于治疗跌打损伤、瘀血肿痛、疮毒、风湿性关节炎、扭伤、胃脘冷痛等^[2]。三桠乌药所含有效成分及其活性未见报道。本文采用水蒸气蒸馏法提取了三桠乌药叶片中的挥发油,用气相色谱-质谱联用方法对其成分进行分析,并进行了抑菌试验。

1 材料

1.1 药材 三桠乌药于2011年4月16日采自烟台市昆嵛山,经山东省中医药高等专科学校药理学主任张钦德教授鉴定为樟科植物 *L. obtusiloba* Bl. 的叶片,将三桠乌药叶片切成1 cm 饮片晒干备用。

1.2 仪器 挥发油提取器,7890/5975 型气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦科技公司) ZSD-4090 型全自动新型生化培养箱,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 型立式高压蒸气灭菌锅(广州倍立思仪器有限公司)。

1.3 试剂及培养基 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,自然 pH),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)。无水乙醚、无水硫酸钠均为分析纯。

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*,白色念珠菌 *Candida albicans*,粪肠球菌 *Enterococcus faecium*,表皮葡萄球菌 *Staphylococcus epidermidis*,绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*,黑曲霉 *Aspergillus niger*,桔青霉 *Penicillium citrinum* 均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 方法中水蒸气蒸馏法提取挥发油^[3]。取三桠乌药鲜品叶片 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后得挥发油^[4]。将挥发油密封置冰箱中保存。样品送至威海市药品检验所进行 GC-MS 分析。

2.2 GC-MS 分析 色谱条件: HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane(0.25 μ m $\times$ 0.25 mm $\times$ 30 m) 弹性石英毛细管柱,程序升温初温为 60 $^{\circ}$ C,保持 2 min,以

15 $^{\circ}$ C $\cdot$ min⁻¹ 的速率升至 180 $^{\circ}$ C,保持 5 min,再以 5 $^{\circ}$ C $\cdot$ min⁻¹ 升温至 250 $^{\circ}$ C,保持 3 min,进样口温度为 250 $^{\circ}$ C,载气为氦气,柱前压 72 kPa,进样量 1 μ L (正己烷溶液),流速 1.2 mL $\cdot$ min⁻¹。质谱条件: 离子源为 EI,离子源温度 230 $^{\circ}$ C,电子能量 70 eV,接口温度 270 $^{\circ}$ C,溶剂延迟时间 3 min,扫描质量范围 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 $1 \times 10^{11} \sim 10^{12}$ CFU $\cdot$ 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,放置在培养箱 1 h(细菌 37 $^{\circ}$ C,真菌 28 $^{\circ}$ C)待用。

2.4 抑菌活性的测定 采用滤纸片法^[5],用 1% 的聚氧乙烯脱水山梨酸单油酸酯(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,高温蒸气杀菌后烘干。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,以贴只浸有 1% 的聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯(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 $^{\circ}$ C 培养 24 h,真菌在 28 $^{\circ}$ C 培养 48 ~ 72 h^[6] 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%,0.125%)的三桠乌药叶片挥发油稀释液,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 $^{\circ}$ C 下培养 24 h,真菌在 28 $^{\circ}$ C 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

根据上述条件进行测定,将所得图谱进行分析检索,结果发现三桠乌药叶片挥发油中主要为低分子脂肪烃类化合物、萜类化合物、醇类化合物,还含

有少量酯类化合物。通过面积归一化法计算,其中相对质量分数最高的 7 种成分(大于 5%)依次是 α -杜松醇 α -cadinol (11.735%)、四甲基环癸二烯甲醇 hedycaryol (9.739%)、 α -桉叶醇 α -eudesmol (9.698%)、石竹烯 caryophyllene (6.247%)、 γ -杜松醇 γ -cadinol (6.163%)、异松油烯 terpinolen (6.874%)、 γ -桉叶醇 γ -eudesmol (5.351%)。见表 1。

表 1 三桉乌药叶片挥发油成分 GC-MS 分析($\bar{x} \pm s, n = 12$)

No.	化合物	保留时间/min	分子式	质量分数/%
1	莰烯 camphene	5.324	C ₁₀ H ₁₆	0.671
2	异松油烯 terpinolen	6.234	C ₁₀ H ₁₆	6.874
3	(4 <i>E</i> ,6 <i>Z</i>)-2,6-二甲基-2,4,6-辛三烯 (4 <i>E</i> ,6 <i>Z</i>)-2,6-dimethyl-2,4,6-octatriene	7.304	C ₁₀ H ₁₆	0.801
4	樟脑 (-)-camphor	7.630	C ₁₀ H ₁₆ O	0.647
5	冰片 linderol	7.888	C ₁₀ H ₁₈ O	0.593
6	α -松油醇 α -terpineol	8.088	C ₁₀ H ₁₈ O	0.319
7	内型-2-甲基双环 [3.3.1] 壬烷 endo-2-methylbicyclo [3.3.1]nonane	8.328	C ₁₀ H ₁₈	0.417
8	乙酸龙脑酯 bornyl acetate	8.980	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	2.811
9	甘香烯 elixene	9.347	C ₁₅ H ₂₄	2.017
10	香茅醇酯 citronellyl butyrate	9.484	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	0.163
11	α -萜荜烯 α -cubebene	9.576	C ₁₅ H ₂₄	0.787
12	异喇叭烯 isodene	9.822	C ₁₅ H ₂₄	0.315
13	胡椒烯 copaene	9.873	C ₁₅ H ₂₄	0.658
14	α -榄香烯 α -elemene	9.982	C ₁₅ H ₂₄	4.803
15	6-甲基十环-5-烯醇 6-methyl-cyclodec-5-enol	10.028	C ₁₁ H ₂₀ O	1.193
16	三硝基吡啶-2-硫代乙酸 3-nitropyrid-2-ylthioacetic acid	10.073	C ₇ H ₆ N ₂ O ₄ S	0.223
17	α -古芸烯 α -gurjunene	10.182	C ₁₅ H ₂₄	0.593
18	石竹烯 caryophyllene	10.342	C ₁₅ H ₂₄	6.247
19	α -石竹烯 α -caryophyllene	10.674	C ₁₅ H ₂₄	0.566
20	香树烯 alloaromadendrene	10.714	C ₁₅ H ₂₄	0.230
21	τ -衣兰油烯 τ -muurolene	10.806	C ₁₅ H ₂₄	0.931
22	(+)-喇叭烯 (+)-ledene	11.022	C ₁₅ H ₂₄	1.790
23	τ -榄香烯 τ -elemene	11.086	C ₁₅ H ₂₄	3.991
24	τ -杜松烯 τ -cadinene	11.264	C ₁₅ H ₂₄	4.274
25	菖蒲烯 calamenene	11.326	C ₁₅ H ₂₂	0.985
26	α -雪松烯 α -himachalene	11.447	C ₁₅ H ₂₄	0.715
27	四甲基环癸二烯甲醇 hedycaryol	11.681	C ₁₅ H ₂₆ O	9.739
28	9-甲基菖蒲烯 9-methoxycalamenene	11.853	C ₁₆ H ₂₄ O	0.279
29	白菖油萜环氧化物 calarene epoxide	11.927	C ₁₅ H ₂₄ O	0.421
30	长叶松醇 palustrol	12.025	C ₁₅ H ₂₆ O	0.513
31	匙叶桉油烯醇 ent-spathulenol	12.110	C ₁₅ H ₂₄ O	3.615
32	蓝桉醇 globulol	12.213	C ₁₅ H ₂₆ O	2.357
33	绿花白千层醇 viridiflorol	12.356	C ₁₅ H ₂₆ O	0.896
34	喇叭茶醇 ledol	12.505	C ₁₅ H ₂₆ O	0.760
35	萜荜油烯醇 cubenol	12.597	C ₁₅ H ₂₆ O	1.679
36	τ -桉叶醇 τ -eudesmol	12.889	C ₁₅ H ₂₆ O	5.351
37	α -愈创木烯 α -guaiene	12.934	C ₁₅ H ₂₄	0.577
38	τ -杜松醇 τ -cadinol	13.020	C ₁₅ H ₂₆ O	6.163
39	异香橙烯环氧化物 isoaromadendrene epoxide	13.169	C ₁₅ H ₂₄ O	0.418
40	α -杜松醇 α -cadinol	13.341	C ₁₅ H ₂₆ O	11.735
41	α -桉叶醇 α -eudesmol	13.398	C ₁₅ H ₂₆ O	9.698
42	α -甜没药萜醇 α -bisabolol	13.655	C ₁₅ H ₂₆ O	0.554
43	异香橙烯环氧化物 isoaromadendrene epoxide	14.519	C ₁₅ H ₂₄ O	0.234
44	cedrane-8,13-diol	16.734	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	0.179
45	甲氧普林 methoprene	18.622	C ₁₉ H ₃₄ O ₃	0.295
46	2,2'-亚甲基双 [6-1,1(二甲基乙基)]-4-甲基苯酚 phenol, 2,2'-methylenebis [6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl	28.245	C ₂₃ H ₃₂ O ₂	0.247

通过抑菌实验发现,三桠乌药挥发油对所测 10 种供试菌均有抑菌作用,强度从大到小依次为:金黄色葡萄球菌>表皮葡萄球菌>粪肠球菌>大肠埃希菌>桔青霉>白色葡萄球菌>枯草芽孢杆菌>白色念球菌>黑曲霉>绿脓杆菌。由表 2 看出,三桠乌药叶片挥发油对金黄色葡萄球菌造成的抑菌圈最大,对绿脓杆菌造成的抑菌圈最小。由表 3 看出,三桠乌药叶片挥发油对金黄色葡萄球菌的最小抑制浓度最低。表 2,3 结果基本吻合。

表 2 三桠乌药叶片挥发油对供试菌的抑菌圈直径($\bar{x} \pm s$)

菌种	直径/mm	菌种	直径/mm
金黄色葡萄球菌	28 ± 1.8	粪肠球菌	23 ± 0.9
大肠埃希菌	22 ± 1.3	表皮葡萄球菌	23 ± 1.7
枯草芽孢杆菌	16 ± 0.9	绿脓杆菌	7 ± 3.3
白色葡萄球菌	17 ± 0.2	黑曲霉	12 ± 1.4
白色念球菌	15 ± 2.9	桔青霉	19 ± 0.7

表 3 三桠乌药叶片挥发油对供试菌的 MIC

菌种	药物体积分数										MIC /g·L ⁻¹
	15%	10%	6%	4%	2%	1%	0.5%	0.25%	0.125%	对照组	
金黄色葡萄球菌	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	5.00
大肠埃希菌	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	10.00
枯草芽孢杆菌	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	60.00
白色葡萄球菌	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	20.00
白色念球菌	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	60.00
粪肠球菌	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	20.00
表皮葡萄球菌	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	10.00
绿脓杆菌	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	100.00
黑曲霉	-	-	-	-	+	++	++	+++	+++	+++	40.00
桔青霉	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	20.00

4 讨论

三桠乌药叶片挥发油中榄香烯、石竹烯、愈疮木烯总含量超过 10%,有报道称,石竹烯、 α -紫穗槐烯、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 种化合物对金黄色葡萄球菌有显著抑制作用^[7],很好地解释了三桠乌药挥发油对金黄色葡萄球菌的最大抑制活性。挥发油中 τ -杜松醇含量达到 6.163%, α -杜松醇含量达到 11.735%,杜松醇具有强烈的杀螨作用^[8]。因此,三桠乌药散瘀消肿作用可能与此成分有关。另外桉叶醇含量达到 14.78%, β -桉叶醇已被证实具有促进胃肠运动的作用^[9],因此三桠乌药理气作用可能与此成分有关。这些有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典: 上册 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1988: 64.
- [2] 罗献瑞. 实用中草药彩色图集: 第 5 册 [M]. 广州: 广东科学技术出版社, 2000: 322.
- [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] 李建慧, 马会勤, 陈尚武. 葡萄多酚抑菌效果的研究 [J]. 中国食品学报, 2008, 8(2): 100.
- [7] 陈新, 刘晓静. 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.
- [8] 龚玉霞, 张文慧, 姜自见, 等. 台湾杉叶挥发油的成分及其生物活性 [J]. 江苏农业科学, 2008, 5: 235.
- [9] 王金华, 薛宝云, 梁爱华, 等. 苍术有效成分 β -桉叶醇对小鼠小肠推进功能的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(4): 266.

责任编辑 邹晓翠