

不同方法提取青蒿挥发油成分分析及抗菌活性比较

张丽勇^{1*}, 林秀梅², 战月², 崔云虹², 郭子琦², 刘玲绯², 侯春妹²

(1. 白城医学高等专科学校, 吉林 白城 137000; 2. 东北师范大学, 长春 130024)

[摘要] 目的: 采用不同方法对青蒿挥发油进行提取, 研究提取过程的优化条件, 并对所得青蒿挥发油分别进行抗菌活性研究及 GC-MS 分析, 用于指导制药。方法: 采用索氏提取法和直接蒸馏法提取青蒿挥发油, 分别进行抗菌实验, 采用气相色谱-质谱分析法对两种方法得到的挥发油进行成分分析。结果: 索氏提取法提取青蒿挥发油的优化条件是: 料液比约为 1:7.8, 提取时间为 3 h。直接蒸馏法提取青蒿挥发油的优化条件是: 料液比为 1:7.4, 蒸馏时间为 5 h。索氏提取法所得青蒿挥发油为青蒿油-1, 直接蒸馏法所得青蒿挥发油为青蒿油-2。青蒿油-1 对黑曲霉的最低抑制浓度(MIC)为 1.25%, 菌刺孢属的最低抑制浓度(MIC)为 1.25%, 青霉的最低抑制浓度(MIC)为 5.0%, 马青霉的最低抑制浓度(MIC)为 1.25%。青蒿油-2 对 4 种细菌最低抑制浓度分别为北京棒状杆菌 0.023 5%, 枯草芽孢杆菌 0.023 5%, 四联球菌 0.005 9%, 普通变形杆菌 3.75%。进行 GC-MS 分析, 青蒿油-1 中分离出 55 个峰, 鉴定出 48 个化合物, 青蒿油-2 中分离出 48 个峰, 鉴定出 39 个化合物。结论: 青蒿油-1 抗真菌作用好于抗菌作用, 可能与青蒿油-1 中酮类、醚类、有机酸类具有较强的抗真菌作用(共占总量的 8.25%)有关; 烯类是挥发油中重要的抗菌成分, 青蒿油-2 的抗菌作用好于青蒿油-1, 可能与青蒿油-2 的烯类含量(烯类 65.42%)远远高于青蒿油-1(26.49%)有关。

[关键词] 青蒿; 挥发油; 提取方法; 抗菌活性; 气相色谱-质谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0060-04

Antimicrobial Activity and GC-MS Analysis of the Volatile Oil of *Artemisia annua*

ZHANG Li-yong^{1*}, LIU Xiu-mei², ZHAN Yue², CUI Yun-hong², GUO Zi-qi², LIU Ling-fei², HOU Chun-mei²

(1. Baicheng Medical Junior College, Baicheng 137000, China;

2. Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

[Abstract] **Objective:** To obtain the optimum condition for the extract of essential oil from *Artemisia annua* by different extract methods and analyze the chemical composition of the essential oil by GC-MS and evaluate the antimicrobial properties of the essential oil. **Method:** The fresh aerial part of *A. annua* was extracted by Soxhlet extraction and direct distillation to yield two essential oil samples designated as oil-1 and oil-2, respectively, which were both subjected to antimicrobial activity screening and GC-MS analysis. **Result:** The optimum condition for Soxhlet extraction was at a solid-liquid ratio 1:7.8 and extraction time of 3 h, while for direct distillation at a solid-liquid ratio 1:7.4 and extraction time of 5 h. Oil-1 displayed inhibitory activity against *Aspergillus niger*, *Mycocentrospora sp.*, *Penicillium sp.*, and *Penicillium marneffei* with MIC values of 1.25, 1.25, 5.0, and 1.25 mg·L⁻¹, respectively, while oil-2 showed antibacterial activity toward *Corynebacterium pekinense*, *Bacillus subtilis*, *tetracoccus*, and *Proteus vulgaris* with MIC values of 0.023 5, 0.023 5, 0.005 9, 3.75 mg·L⁻¹, respectively. According to the results from GC-MS analysis, 48 components from 55 peaks in the gas chromatogram of oil-1 and 39 components from 48 peaks in the gas chromatogram of oil-2 were identified. **Conclusion:** Comparatively, fungi were more sensitive to oil-1 in the antimicrobial test, which may be attributed to the antifungal components comprising 8.25% of the oil-1, including ketones, ethers, and organic acids. However, oil-2 showed stronger antibacterial activity than oil-1 due to the higher content of alkenes in oil-2 (65.42%) than that of in oil-1.

[收稿日期] 20110620(005)

[通讯作者] * 张丽勇, 硕士, 讲师, 从事生物化学, E-mail: lihonggang1112@163.com

(26.49%), since alkenes were the major antibacterial components of the essential oil.

[Key words] *Artemisia annua*; volatile oil; extraction method; antimicrobial activity; GC-MS analysis

青蒿学名黄花蒿 *Artemisia annua* L., 属菊科春黄菊族蒿属, 是我国传统中药, 具有很高的药用价值。性味苦、辛, 微寒, 归肝, 有特殊香气。具有抗疟、抗病毒、抗肿瘤、抗心律失常、清热解暑等活性。青蒿挥发油是一种淡黄色透明液体, 有浓郁芳香气味^[2], 具有抗菌、平喘、解热、止咳等药理作用^[1]。临床上可用于治疗皮肤真菌病、慢性支气管炎、上呼吸道感染等^[3-4]。有报道对于野生青蒿及栽培青蒿的挥发油成分进行分析, 分别分离出 23 个和 28 个成分^[5]。有青蒿挥发油抗植物病原真菌^[6]及大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等 4 种菌种^[2]的报道。本研究比较索氏提取法和直接蒸馏法 2 种方法提取的青蒿挥发油, 进行气相色谱-质谱(GC-MS)分析, 鉴定其成分及各组分的相对含量并对 2 种方法得到的青蒿挥发油进行抗菌活性方面的比较。

1 材料

5975/6890N 气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司), 实验菌种由东北师范大学生命科学学院微生物实验室提供。

新鲜青蒿地上部分于 2010 年 9 月采自吉林省白城市郊区, 经东北师范大学生命科学学院植物学教授肖洪兴老师鉴定为黄花蒿 *A. annua*。

2 方法

2.1 挥发油的提取 青蒿剪成 1~2 cm 的碎段备用。以乙醚为溶剂, 采用索氏提取法, 料液比 1:7.8, 蒸馏时间 3 h, 得到青蒿挥发油 1 号; 直接蒸馏法, 料液比 1:7.4, 蒸馏时间 5 h, 得到青蒿挥发油 2 号。

2.2 青蒿挥发油抗菌活性分析 以青蒿挥发油 1 号、2 号分别进行抗菌实验, 比较其抑菌作用的差异, 通过成分分析, 推断其抑菌作用主要成分, 为青蒿挥发油的制药提供依据。

2.2.1 试验菌种抑菌试验 真菌用马铃薯培养基(简称 PDA) 28℃培养 72 h。细菌用牛肉膏蛋白胨培养基 37℃培养 24 h。

2.2.2 结果 青蒿油 1 号对黑曲霉的最低抑制浓度为 1.25%, 菌刺孢属的最低抑制浓度为 1.25%, 青霉的最低抑制浓度为 5%, 马青霉的最低抑制浓度为 1.25%。青蒿油 1 号对北京棒状杆菌的最低抑制浓度为 2.5%, 枯草芽孢杆菌的最低抑制浓度为 1.25%, 四联球菌的最低抑制浓度为 2.5%, 普通变

形杆菌的最低抑制浓度为 5%。对枯草芽孢杆菌的抑制效果最好。

在 4 种真菌中, 只有青霉的最低抑菌浓度较高, 与 4 种细菌中的普通变形杆菌一致。而其他 3 种真菌的最低抑菌浓度相同, 只与枯草芽孢杆菌一致, 而明显小于其他 3 种细菌。所以青蒿油 1 抗真菌效果超过抗细菌效果。

青蒿油 2 号对 4 种细菌最低抑制浓度分别为北京棒状杆菌 0.023%, 枯草芽孢杆菌 0.023%, 四联球菌 0.005 9%, 普通变形杆菌 3.75%。最低抑制浓度实验结果显示青蒿油 2 号对四联球菌的抑菌效果最好。

北京棒状杆菌、枯草芽孢杆菌、四联球菌的最低抑菌浓度青蒿油 1 号均明显大于青蒿油 2 号, 普通变形杆菌的最低抑菌浓度青蒿油 1 与青蒿油 2 号虽然差别不大, 但也是青蒿油 1 大于青蒿油 2 号。由此可得, 青蒿油 2 号对 4 种细菌的抑菌效果大于青蒿油 1 号。

由以上抑菌实验可以看出, 青蒿油 1 号对 4 种细菌和 4 种真菌均有较好的抑菌效果, 而且对真菌效果超过细菌。青蒿油 2 号对同样 4 种细菌抑菌效果更佳, 远远超过青蒿油 1 号。

2.3 青蒿挥发油成分分析 为进一步探究 2 种方法得到的挥发油具体成分和含量, 对索氏提取法得到的青蒿油 1 号 and 直接蒸馏法得到的青蒿油 2 号分别进行 GC-MS 分析。

2.3.1 色谱条件 HP-5 柱(0.25 μm × 250 μm × 30 m), 程序升温: 起始温度 60℃, 进样口温度 280℃, 载气为氦气。

2.3.2 质谱条件 电子 EI 源, 能量 70 eV, 离子源温度 230℃, 倍增电压 1.988 kV, 扫描质量范围 m/z 20~800。

2.3.3 成分分析 经 GC-MS 分析, 得到如下青蒿油 1 号和青蒿油 2 号的色谱图, 见图 1 2。经计算机标准质谱库检索, 确定出组分, 青蒿油 1 号分离出 55 个成分(表 1), 青蒿油 2 号分离出 48 个成分(表 2)。

2.3.4 结果 从表 2 可知, 青蒿油 1 号的主要成分有烯类占 26.49%, 烷类占 22.36%, 吡喃和呋喃占 28.05%, 酚类 1.09%, 桉油精 0.44%, 酮类 1.42%, 醚类 4.94%, 有机酸类 1.89%, 噻嗪类 1.79%, 未鉴定成分占 11.31%。其中酮类、醚类、有机酸类具有

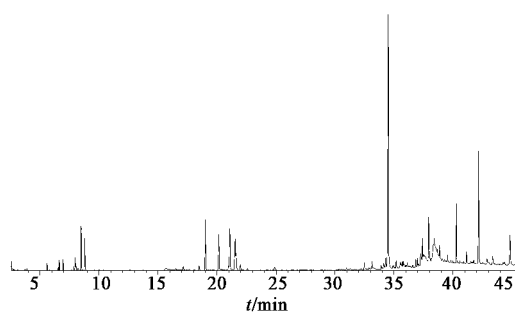


图 1 青蒿挥发油 1 号总离子流

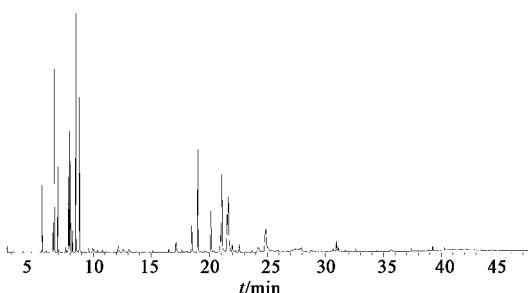


图 2 青蒿挥发油 2 号总离子流

较强的抗真菌作用,共占总量的 8.25%,可能与青蒿油 1 号抗真菌作用好于抗细菌作用有关。

由表 2 可知,青蒿油 2 号的主要成分有烯类 65.42%, 桉油精 1.73%, 酚类 1.66%, 烷类 7.38%, 酮类 0.14%, 有机酸类 0.17%, 烃类 0.97%, 醇类 0.95%, 环戊并 6.93%, 醛类 0.49%, 酯类 5.58% 未鉴定成分占 8.58%。烯类是挥发油中重要的抗菌成分,青蒿油 2 号的抗菌作用好于青蒿油 1 号,可能与青蒿油 2 号的烯类含量远远高于青蒿油 1 号有关。青蒿挥发油具有良好的抑菌活性,具有开发价值。

3 讨论

对索氏提取和直接提取进行了不同料液比,不同时间的比较。结果证明,索氏提取法提取青蒿挥发油的最佳条件是料液比 1:7.8,蒸馏时间为 3 h,此条件为提取青蒿挥发油较理想的优化条件,见表 3。直接蒸馏法最佳提取条件是料液比 1:7.4,蒸馏时间 5 h。见表 5。

提取青蒿挥发油的最佳条件分别是:索氏提取法料液比为 1:7.8,蒸馏时间为 3 h;直接蒸馏法料液比在 1:7.4,蒸馏时间为 5 h。青蒿油号 1 对 4 种细菌和 4 种真菌均有较好的抑菌效果,而且对真菌效果超过细菌。青蒿油 2 号对同样 4 种细菌抑菌效果更佳,远远超过青蒿油号 1。通过 GC-MS 分析,得出青蒿油 1 号中酮类、醚类、有机酸类共占总量的

表 1 青蒿油-1 的化学组分及其相对含量

No.	t/min	相对含量 /%	化合物
1	5.591	0.39	α -蒎烯
2	6.541	0.17	环己烯
3	6.636	0.61	β -蒎烯
4	6.959	0.63	β -月桂烯
5	7.873	0.23	-
6	7.977	0.79	柠檬烯
7	8.038	0.44	桉油精
8	8.491	2.67	辛三烯
9	8.796	1.93	环己二烯
10	15.667	0.50	对苯二酚
11	17.139	0.43	丁香酚
12	18.489	0.41	-
13	19.011	4.54	石竹烯
14	20.152	3.45	十二碳三烯
15	20.971	0.47	三环十一碳-9-烯
16	21.075	4.32	环庚二烯
17	21.537	3.99	1,3-环己二烯
18	21.615	1.81	环己烷
19	21.981	0.64	α -金合欢烯
20	22.582	0.18	-
21	24.881	0.43	庚烷
22	30.960	0.16	2-甲氧基-6-丙烯基-苯酚
23	32.475	0.41	二环庚烷
24	33.137	0.77	甲基苯乙烯
25	33.912	0.25	氮杂环十三烯
26	34.121	0.74	苯并吡喃
27	34.278	0.89	十六酸
28	34.513	26.82	苯并吡喃
29	34.896	0.22	十五碳二醇
30	34.983	0.25	蔡乙酸
31	35.175	0.74	羟基苯甲醚
32	35.532	0.96	环戊酮
33	35.680	0.35	二十一烷
34	35.767	0.57	三氟基乙烯
35	35.845	0.33	丁酸
36	35.984	0.21	吩噻嗪
37	36.115	0.49	苯并咪唑
38	36.577	0.21	十八烷
39	36.820	0.33	二十碳二烯
40	36.969	0.46	喹啉酮
41	37.073	0.17	-
42	37.247	1.17	-
43	37.395	1.13	二十三烷
44	37.491	0.42	氨基甲酸
45	37.926	4.20	对氨基苯甲醚
46	38.388	7.74	-
47	38.658	1.38	-
48	38.858	0.81	二十烷
49	39.538	0.40	十八烷
50	40.287	3.12	十八烷
51	41.140	0.82	十八烷
52	42.159	8.44	二十九烷
53	43.352	0.81	二十烷
54	44.824	3.62	十八烷
55	46.008	1.58	噻嗪

表2 青蒿油2号的化学组分及其相对含量

No.	t/min	相对含量/%	化合物
1	5.591	3.06	α -蒎烯
2	6.541	0.98	β -水芹烯
3	6.636	9.16	β -蒎烯
4	6.959	4.05	β -月桂烯
5	7.647	0.27	1,3-环己二烯
6	7.837	3.88	—
7	7.986	6.26	柠檬烯
8	8.039	1.73	桉油精
9	8.204	1.11	辛三烯
10	8.509	13.01	辛三烯
11	8.805	7.85	1,4-环己二烯
12	9.615	0.28	萹烯
13	9.954	0.30	辛二烯醇
14	10.033	0.31	壬醛
15	10.381	0.14	薰衣草醇
16	10.799	0.16	辛四烯
17	12.158	0.67	环己烯
18	12.576	0.51	甲醇
19	13.072	0.54	—
20	16.512	0.22	庚三烯
21	17.130	1.01	丁香酚
22	17.635	0.21	油烯
23	18.489	1.96	—
24	19.020	7.89	石竹烯
25	19.299	0.16	环戊并
26	19.717	0.14	—
27	20.144	3.65	—
28	20.353	0.29	甘菊环烃
29	20.971	1.49	雪松烯
30	21.084	6.77	环戊并
31	21.546	3.89	环己二烯
32	21.641	6.50	萹
33	21.981	0.78	金合欢烯
34	22.242	0.17	—
35	22.573	0.74	—
36	23.679	0.25	—
37	24.202	1.08	十二碳烯
38	24.541	0.20	辛烯酯
39	24.872	5.38	斯巴酯
40	25.491	0.68	甘菊环烃
41	25.891	0.47	庚烷
42	30.672	0.18	萘醛
43	30.960	0.65	苯酚
44	31.099	0.28	—
45	32.579	0.14	十五烷酮
46	35.671	0.23	三十四烷
47	37.395	0.18	十八烷
48	39.250	0.17	间苯二甲酸

表3 不同料液比对青蒿挥发油得率的影响

No.	乙醚/mL	青蒿/g	蒸馏时间/h	挥发油得率/%
1	1 250	150	3	0.31
2	1 250	160	3	0.94
3	1 250	170	3	0.76
4	1 250	180	3	0.67
5	1 250	190	3	0.58

表4 不同提取时间对青蒿挥发油得率的影响

No.	乙醚/mL	青蒿/g	蒸馏时间/h	挥发油得率/%
1	1 250	160	2	0.68
2	1 250	160	3	0.94
3	1 250	160	4	0.95
4	1 250	160	5	0.97
5	1 250	160	6	0.99

表5 不同料液比对青蒿挥发油得率的影响

No.	青蒿/g	水/mL	蒸馏时间/h	挥发油得率/%
1	50	350	5	0.36
2	50	360	5	0.45
3	50	370	5	0.54
4	50	380	5	0.54
5	50	390	5	0.54

表6 不同蒸馏时间对青蒿挥发油得率的影响

No.	青蒿/g	水/mL	蒸馏时间/h	挥发油得率/%
1	50	370	3	0.18
2	50	370	4	0.27
3	50	370	5	0.54
4	50	370	6	0.54
5	50	370	7	0.54

8.25%,具有较强的抗真菌作用,可能与青蒿油1号抗真菌作用好于抗细菌作用有关。青蒿油2号中,烯类含量远远高于青蒿油1号,烯类是挥发油中重要的抗菌成分,青蒿油2号的抗菌作用好于青蒿油1号,可能与青蒿油2号的烯类含量远远高于青蒿油1号有关。

[参考文献]

- [1] 冯文宇,田吉.青蒿挥发油含量检测及提取工艺研究[J].泸州医学院学报,2001,24(5):455.
- [2] 谢英辉.青蒿挥发油抗菌活性研究[D].长春:东北师范大学,2007:5.
- [3] 冯文宇,叶荣岗,赵映武,等.青蒿挥发性部分的研究[J].河北药学,1984,2:78.
- [4] 林伯香,郑义信.青蒿油丸[J].医院药学杂志,1982,5:35.
- [5] 张东,杨岚,杨立新,等.野生及栽培青蒿挥发油成分的气相色谱-质谱分析[J].中国实验方剂学,2009,15(8):33.
- [6] 刘芳.青蒿挥发油抗植物病原真菌活动的研究[J].白城师范学院学报,2009,23(6):26.

[责任编辑 蔡仲德]