

浙贝母精油化学成分 GC/MS 分析和抑菌活性检测

曹跃芬¹, 竺锡武¹, 谭琳^{1, 2}

(1. 浙江理工大学生物工程研究所, 杭州 310018; 2. 湖南农业大学, 长沙 410128)

摘要: 采用水蒸汽蒸馏法提取浙贝母精油, GC/MS 分析法结合保留指数分析法鉴定精油化学成分, 琼脂扩散法检测精油的抑菌活性。首次鉴定出浙贝母精油的 15 种化学成分, 占精油总离子流色谱峰面积的 97.48%, 主要成分为正十六酸(53.46%), (E,E)-9,12-十八烷二烯酸甲酯(26.96%)和油酸(9.34%)。浙贝母精油对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均无抑制效果, 对白色念珠菌有中等抑制作用。

关键词: 浙贝母; 精油; GC/MS; Kovats 保留指数; 抑菌活性

中图分类号: Q946.8 **文献标识码:** A

0 引言

中药浙贝母为百合科 (*Liliaceae*)、贝母属 (*Fritillaria*) 植物浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq. 的干燥鳞茎, 多产于浙江省内海拔 500 m 以下的地区, 在浙江省金华、宁波等市均有种植和加工, 是著名的中药材“浙八味”之一。国内外有关浙贝母已有多方面的研究, 主要集中在浸提物化学成分分析、质量检测方法、药理及临床治疗、培养及加工方法等方面^[1-3]。已发现的浙贝母主要化学成分为甾醇类生物碱, 含有浙贝甲素、浙贝乙素、浙贝宁、浙贝酮、贝母新碱、贝母芬碱、贝母定碱、贝母替定碱、贝母碱苷、胆碱、贝母醇、植物甾醇等。其中含量较高的浙贝母碱、去氢浙贝母碱、浙贝宁等成分属于异甾体生物碱^[4], 具有镇咳祛痰、平喘、镇静、镇痛、兴奋子宫肌、收缩肠肌、抑制心脏、降血压、升血糖等功效, 已应用于百日咳、前列腺肥大及咳嗽等疾病的治疗^[5]。

精油是天然产物中具有生物活性的一类重要组

分, 应用广泛^[6]。浙贝精油的化学成分和抑菌活性研究至今未见报道。本文开展浙贝精油化学成分的研究, 旨在为浙贝精油及其化学成分的利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

浙贝母干燥鳞茎于 2009 年 9 月份在浙江省金华市磐安浙贝种植基地购得。其干燥鳞茎经高速中药粉碎机(型号 DF-20, 2 840 r/min, 大德中药机械有限公司)粉碎成 20 目大小的颗粒。

1.2 精油提取

采用水蒸气蒸馏法提取精油。每次取材 120 g, 蒸馏水浸泡 12 h, 然后在挥发油测定仪(浙江海宁新华医疗器械厂)上蒸馏 10 h。油水分离得到精油, 用乙醚溶解, 加入无水 Na₂SO₄ 吸水干燥, 冷藏备用。

1.3 GC/MS 检测和保留指数法分析

1.3.1 GC/MS 仪器检测及分析

Agilent 6890N/Agilent 5973i 型气相色谱-质

谱联用仪(GC/MS,美国 Agilent 公司),色谱柱型:HP-5MS 石英毛细管(0.25 mm×30 m,0.25 μm),进样量 2 μL,升温程序:50℃保持 3 min,然后以 5℃/min升温至 280℃,保持 5 min,流量 0.8 mL/min,载气:氦气,接口温度 280℃,进样温度 250℃,四级杆温度 150℃,分流比 20:1,EI 电离源70 eV,离子源温度 230℃,灯丝发射电流 750 μA,倍增器电压 1 200 V;扫描周期 1.69 s,m/z 扫描范围为 50~500 amu。利用质谱库自动检索被分析组分的质谱,根据质谱图扫描识别色谱柱上不同保留值的一一对应关系,对精油中的成分进行确认。以面积归一化法计算各组分的相对含量。

1.3.2 保留指数法分析

通过线性升温公式(1)计算各成分 Kovats 保留指数(KI)^[7]。

$$KI=100n+100(t_x-t_n)/(t_{n+1}-t_n) \quad (1)$$

式中: t_x 为测定物质的保留时间; n 为相应的正构烷烃碳原子数; t_n 和 t_{n+1} 分别为碳原子数相差为 1 的正构烷烃的保留时间($t_n < t_x < t_{n+1}$)。以 GC/MS 仪器分析的各组分的保留时间计算得各组分实际 KI 值,与相应的化合物标准 KI 值^[8]对比,并参考文献数据一一加以确认精油中的成分。

最后综合 GC/MS 分析鉴定结果和保留指数法分析鉴定结果确认精油中的成分。

1.4 抑菌实验样品及实验菌种

抑菌样品制备:将 0.1 mL 浙贝精油溶解于 0.05 g卵磷脂,加 PBS 至 1.0 mL,混匀。卵磷脂(0.05 g卵磷脂加磷酸缓冲液至 1.0 mL)作为阴性对照,10%庆大霉素(Gentamicin)作为阳性对照。

实验菌种^[9]:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC6538)、白色念珠菌(*Canidia albicans*, ATCC10231)、大肠杆菌(*Escherichia coli*, ATCC 8099)。

1.5 抑菌活性检测

按《消毒技术规范》^[9]中琼脂扩散法检测精油的抑菌活性。将菌种接种于斜面,37℃培养 16 h,然后用无菌水冲洗斜面,得到菌体悬浮原液,通过与标准液(1×10^{10} CFU/mL)比浊将原液稀释成 1×10^6 CFU/mL。取 0.2 mL 稀释液均匀涂抹于固体培养基,然后将浸有抑菌实验样品的圆型滤纸片(直径 6 mm)置于固体培养基上,37℃培养 16 h,观察并测量抑菌圈的直径大小。试验设 3 次重复,并进行方

差分析。

抑菌活性判定标准按《消毒技术规范》标准,见表 1。

表 1 抑菌效果判定标准

抑菌圈直径大小/mm	敏感度
<7	不敏感
≥7~10	弱敏感
≥10~20	中度敏感
>20	高度敏感

2 结果与分析

2.1 精油化学成分分析

化学成分分析结果显示(表 2),共鉴定出浙贝母精油中化学成分 15 种,占精油离子流色谱峰总面积的 97.48%,其中醛类占 0.18%,烯酸、烷酸类占 67.17%,酯类占 29.01%,萜类占 1.13%。浙贝母精油中含量在 1%以上的主要成分为:十六烷酸含量最高,为 53.46%;(E,E)-9,12-十八烷二烯酸甲酯含量次之,为 26.96%;油酸为 9.34%;十四烷酸为 1.93%;9-十六碳烯酸为 1.87%;亚油酸乙酯为 1.17%。采用 GC/MS 分析和保留指数分析两种方法相结合鉴定精油的化学成分,可提高化合物鉴定的准确性^[10-11]。

十六烷酸是肥皂、香皂、洗涤剂、化妆品和织物柔软剂的原料,也是制造食品添加剂的原料^[12]。十四烷酸、不饱和脂肪酸和亚油酸等都具有一定程度的抗氧化和抗肿瘤作用^[13-15]。此外,萜类具有抗肿瘤、抗炎、抗真菌等多样的生物活性^[16]。如 δ-榄香烯具有良好的抗肿瘤活性^[17-18],而某些二萜类化合物也具有抗菌、抗炎、抗肿瘤作用^[19]。同时醛类化合物、酯类化合物以及有机酸也具有一定抑菌效果,尤其某些酯类对白色念珠菌具有极强的抑制作用,这在许多植物精油都有发现^[20-21]。

2.2 抑菌活性检测

抑菌活性检测结果见表 3。结果显示,浙贝母精油对金黄色葡萄球菌的平均抑菌直径为 6.03 mm,与阴性对照比较无显著差异(5%水平);对白色念珠菌有明显抑菌活性,平均抑菌直径为 10.87 mm,与阴性对照比较有极显著差异(1%水平);对大肠杆菌的平均抑菌直径为 6.03 mm,与阴性对照无显著差异。阳性对照庆大霉素对三种病菌的抑菌活性明显,平均抑菌直径与浙贝精油、阴性对照比较均有极显著差异。

表 2 浙贝母 *F. thunbergii* Miq. 精油化学成分

序号	化学名称	分子式	分子量	<i>K_t</i>	<i>KI</i>	相对含量/%
1	δ-榄香烯 δ-elemene	C ₁₅ H ₂₄	204	1 292. 6	1 338	0. 26
2	δ-桉叶烯 delta-Selinene	C ₁₅ H ₂₄	204	1 483. 3	1 493	0. 14
3	十四烷酸 Tetradecanoic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228	1 758. 8	1 770	1. 93
4	十五烷酸 Pentadecanoic acid	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242	1 829. 1	1 866	0. 48
5	十六酸甲酯 Hexadecanoic acid, methyl ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	1 924. 2	1 927	0. 60
6	9-十六碳烯酸 9-Hexadecenoic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254	1 938. 5	1 938	1. 87
7	十六烷酸 n-Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	1 970. 2	1 972	53. 46
8	15-贝壳杉烯 Kaur-15-ene	C ₂₀ H ₃₂	272	2 000. 3	1 998	0. 62
9	十七碳一烯酸 Heptadecanoic acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	2 018. 0	2 022	0. 1
10	贝壳杉烯 Kaurene	C ₂₀ H ₃₂	272	2 028. 9	2 043	0. 11
11	亚油酸甲酯 9,12-Octadecadienoic acid(Z,Z)-, methyl ester	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294	2 052. 8	—	0. 28
12	(Z)-9-十四碳烯醛 9-Tetradecenal, (Z)-	C ₁₄ H ₂₆ O	210	2 057. 7	—	0. 18
13	(E,E)-9,12-十八烷二烯酸甲酯 9,12-Octadecadienoic acid,methyl ester, (E,E)-	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294	2 077. 9	—	26. 96
14	油酸 Oleic Acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	2 080. 4	2 082	9. 34
15	亚油酸乙酯 Linoleic acid ethyl ester	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308	2 090. 9	—	1. 17

注: *KI* Adams 标准 Kovats 保留指数(非极性 DB-5 柱); *K_t* 测定的各组分的 Kovats 保留指数(非极性 HP-5MS 柱); “—” 数据不确定 Unknown data.

表 3 浙贝母精油抑菌活性(抑菌直径/mm)

样品	金黄色葡萄球菌	白色念珠菌	大肠杆菌
阴性对照	6. 07 ^{b B}	6. 07 ^{c C}	6. 00 ^{b B}
浙贝精油	6. 03 ^{b B}	10. 87 ^{b B}	6. 03 ^{b B}
庆大霉素	37. 67 ^{a A}	37. 50 ^{a A}	29. 37 ^{a A}

注: ^{a b c} 表示三种样品同一个菌种的 5% 水平差异比较; ^{A B C} 表示三种样品同一个菌种的 1% 水平差异比较。

根据《卫生消毒规范》^[9] 抑菌效果判定标准(见表 1), 浙贝母精油对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌抑菌圈平均直径分别为 6. 0 mm 和 6. 03 mm<7 mm, 而对白色念珠菌抑菌圈平均直径为 10. 87 mm>10 mm, 因此判定: 浙贝母精油对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌不敏感, 对白色念珠菌中度敏感。

3 结 论

a) 本研究第一次报道了浙贝母精油的化学组成成分, 共鉴定出浙贝母精油 15 种成分, 主要成分为十六烷酸(53. 46%)、(E, E)-9, 12-十八烷二烯酸甲酯(26. 96%) 和油酸(9. 34%), 此外还含有少量的萜类、醛类化合物, 如 δ-榄香烯和 (Z)-9-十四碳烯醛。

b) 浙贝母精油对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均无抑菌效果, 对白色念珠菌具有中等抑菌活性。

参考文献:

[1] 林明宝, 周志愉, 万丽玲. 浙贝母对甲状腺功能亢进模型鼠的保护作用研究[J]. 中国药房, 2010, 21(15): 1362-1363.

[2] 王忠华, 史姗姗, 陈 雨, 等. 浙贝母生物碱提取工艺研究[J]. 中药材, 2010, 33(1): 128-132.

[3] 韦 敏. 不同炮制方法对浙贝母中贝母素含量影响的研究[J]. 中药材, 2008, 31(8): 1129-1130.

[4] 薛 燕, 王 峰. 不同产地浙贝母药材中 3 种活性成分的分析研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(16): 1628-1630.

[5] 程远方, 辜转荣, 马海平. 五类贝母药材性状、化学成份、现代药理及应用比较[J]. 中华临床医学研究杂志, 2005, 11(14): 2038-2039.

[6] 刘成梅, 游 海. 天然产物有效成分的分离与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 506-539.

[7] Isidorov V, Krajewska U, Vinogorova V. Gas chromatographic analysis of essential oil from buds of different birch species with preliminary partition of components [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2004, 32 (1): 1-13.

[8] Adams R. Identification of essential oil components by gas chromatography/ouadrupole mass spectroscopy [M]. Carol Stream, Illinois. USA: Allured Publishing Corporation, 2001.

[9] 卫生部法规司. 卫生消毒规范[M]. 北京: 中华人民共和国

- 和国卫生部, 2002.
- [10] 徐 朋, 竺锡武, 陈集双. 长裂苦苣菜挥发油成分的 GC/MS 分析[J]. 科技通报, 2010, 26(3): 374-379.
- [11] 苏 越, 王呈仲, 郭寅龙. 基于准确质量测定和保留指数的 GC-MS 分析薄荷挥发性成分[J]. 化学学报, 2009(6): 546-554.
- [12] 王慎敏. 日用化学品[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [13] Yang Z, Liu S, Chen X. Induction of apoptotic cell death and invivo growth inhibition of human cancer cells by a saturated branched-chain fatty acid 13-methyltetradecanoic acid [J]. Cancer Res., 2000, 60(3): 505-509.
- [14] 秦 薇. 多不饱和脂肪酸摄入量与肿瘤的相关分析[J]. 护士进修杂志, 2010, 25(12): 1063-1066.
- [15] 韦 娜, 糜漫天. ω -6/ ω -3 多不饱和脂肪酸不同比例对乳腺癌细胞脂代谢调控基因的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(7): 652-655.
- [16] 郭启雷, 杨峻山. 旋覆花属植物中倍半萜类成分及药理活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(6): 804-809.
- [17] 李大景, 邵金良, 张忠录. 榄香烯的药理研究及临床应用[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(12): 1123-1124.
- [18] 王茜莎, 杨 威, 李 明, 等. δ -榄香烯体外抗肿瘤活性研究[J]. 中华医药杂志, 2006, 6(8): 841-843.
- [19] 梁念慈, 何太平, 覃燕梅, 等. 抗癌草药半边旗有效成分对卵巢癌细胞基因表达的影响[J]. 中国药理通讯, 2007, 24(3): 4.
- [20] 吴传万, 杜小凤, 王伟中, 等. 植物源抑菌活性成分研究进展[J]. 淮阴工学院学报, 2004, 13(3): 28-34.
- [21] 竺锡武, 谭济才, 曹跃芬, 等. 植物精油的研究进展[J]. 湖南农业科学, 2009(8): 86-89, 92.

Analysis of Chemical Composition by GC/MS and Antimicrobial Activities of Essential Oil from *Fritillaria thunbergii* Miq.

CAO Yue-fen¹, ZHU Xi-wu¹, TAN Lin^{1, 2}

(1. Institute of Bioengineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: The essential oil from dried bulbs of *Fritillaria thunbergii* Miq. obtained by hydrodistillation is analyzed by GC-MS together with Kovats retention index. The results show that major constituents of this oil are n-Hexadecanoic acid (53.46%), (E, E)-9, 12-Octadecadienoic acid (26.96%) and Oleic Acid (9.34%) and 15 chemical components are identified which represents 97.5% of the total peak. The result tested by agar diffusion method shows that the oil has a moderate antifungal activity against *Candida albicans* and no antimicrobial activity to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Key words: *Fritillaria thunbergii* Miq.; essential oil; GC/MS; Kovats retention index; antimicrobial activity

(责任编辑: 许惠儿)