

天山橐吾挥发油的提取及生物活性研究

尉梅

兰州交通大学化学与化工学院, 甘肃 兰州

收稿日期: 2024年3月12日; 录用日期: 2024年6月19日; 发布日期: 2024年6月29日

摘要

天山橐吾(*Ligularia narynensis*)系橐吾属(*Ligularia*)菊科(*Compositae*)千里光族(*Senecioneae* Cass)。用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)对天山橐吾的化学成分进行分析。从天山橐吾挥发油中鉴定出了22个化合物, 并对其进行抗菌活性检测, 抑菌实验结果显示其对金黄色葡萄球菌有微弱的抑菌活性。

关键词

天山橐吾, 挥发油, GC-MS

Study on the Extraction and Bioactivity of Volatile Components from *Ligularia narynensis*

Mei Wei

School of Chemistry and Chemical Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou Gansu

Received: Mar. 12th, 2024; accepted: Jun. 19th, 2024; published: Jun. 29th, 2024

Abstract

Ligularia narynensis belongs to *Ligularia* *Compositae* *Senecioneae* Cass. The chemical constituents of *Ligularia narynensis* were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Twenty-two compounds were identified from the volatile components of *Ligularia narynensis*, and their antibacterial activity was detected. The results of the antibacterial experiment showed that they had weak antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*.

Keywords

Ligularia narynensis, Volatile Components, GC-MS

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

天山橐吾(*Ligularia narynensis*)是菊科(Compositae)无鞘橐吾属(*Ligularia*)多年生草本植物,根细,肉质。根茎直立,高60 cm以上,分布于海拔800~3200 m的阴坡灌木丛、林荫高大的树下、山坡和高山草地等地区[1]。橐吾属植物中的化合物种类较多,主要为萜类、生物碱、黄酮、甾醇等类型的化合物,其中以倍半萜类化合物居多[2]。

挥发油是香料植物的花、叶、果实、种子等经水蒸气蒸馏法、溶剂萃取法、冷压榨法或脂吸法而得到的挥发性芳香物质的总称,大都含有香味,接触空气极易挥发,主要成分是萜类化合物、脂肪族化合物、芳香族化合物。芳香类中药是中药挥发油的主要来源,我国中草药应用历史悠久,种类丰富,结合现代科学的高速发展,中药挥发油在抗病毒、抗菌方面有极大的发展空间[3]。橐吾属植物的挥发油种类多样,不同种类的橐吾属植物所含挥发油成分不同,但主要是萜类化合物。近年来利用现代科技手段对橐吾属植物进行活性筛选,发现部分挥发油具有抗氧化、抗过敏、抗癌、抗菌、昆虫拒食等生物活性[4][5]。就目前为止,未见天山橐吾挥发油的化学成分及生物活性的相关报道。基于橐吾属植物丰富的挥发油成分及多样的生物活性与药用价值,故以天山橐吾全草为原料,用水蒸气蒸馏法提取挥发油成分,再用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)对其进行化学成分分析,采用滤纸片法对挥发油的抑菌活性进行研究。

2. 实验部分

2.1. 植物来源

本课题使用的植物为天山橐吾(*Ligularia narynensis*),于2020年7月采自于新疆,经青海师范大学确生教授鉴定为菊科橐吾属植物天山橐吾,植物标本存放于兰州交通大学六号实验楼517。

2.2. 实验仪器与材料

(1) 主要仪器

本实验中所用到的主要仪器及生产厂家见表1。

Table 1. The main instrument

表1. 主要实验仪器

仪器名称	型号	生产厂家
超净工作台	SW-CJ-2D	苏州净化设备有限公司
恒温培养箱	SPX-250-GB	上海琅玕实验设备有限公司
立式压力蒸汽灭菌锅	BXM-30R	上海博讯实业有限公司医疗设备厂
电子分析天平	FA1004	浙江力辰仪器有限公司
恒温摇床	TS 系列	上海习仁科学仪器有限公司

续表

超声波清洗器	KQ-250B	昆山市超声仪器有限公司
真空干燥箱	DZF-6010	巩义市予华仪器有限责任公司
循环水式真空泵	SHB-B95T	郑州长城科工贸有限公司
旋转蒸发器	N-1100	上海爱朗仪器有限公司

(2) 主要试剂

本实验中所用到的所用试剂均为分析纯、色谱纯，具体试剂材料及生产厂家见表 2。

Table 2. The main reagents**表 2.** 主要实验试剂

试剂	纯度	生产厂家
蛋白胨	生化试剂	天津市大茂化学试剂有限公司
酵母提取物	生化试剂	北京奥博星生物科技有限责任公司
氯化钠	分析纯	天津市大茂化学试剂有限公司
琼脂	生化试剂	上海广瑞生物科技有限公司
二甲基亚砜	分析纯	天津市富宇精细化工有限公司

培养基的配制:

① LB 液体培养基: 牛肉膏蛋白胨液体培养基: 氯化钠 10 g, 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 蒸馏水 1000 mL, 调节 pH 至 7.4, 高压灭菌锅 121℃ 灭菌 30 min, 4℃ 冰箱保存待用;

② LB 固体培养基: 向配置好的液体培养基中, 再添 20 g 琼脂, 121℃ 灭菌 30 min, 即得到固体培养基;

③ PDA 培养基: 去皮马铃薯 200 g, 加热煮沸 30 min, 用八层纱布过滤除去不溶物, 加入 20 g 葡萄糖, 20 g 琼脂, 即得到 PDA 培养基。

(3) 实验菌株

本实验所使用的供试病原菌菌株均由兰州交通大学天然药物研究所提供, 具体实验菌株见表 3。

Table 3. Main experimental strains**表 3.** 主要实验菌株

菌种	拉丁名
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>
大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>
枯草芽孢杆菌	<i>Bacillus subtilis</i>
尖孢镰刀菌	<i>Fusarium oxysporum</i>
番茄链格孢菌	<i>Alternaria solani</i>
灰葡萄孢菌	<i>Botrytis cinerea</i>
茄腐镰刀菌	<i>Fusarium solani</i>
层出镰刀菌	<i>Fusarium proliferatum</i>
胶孢炭疽菌	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>

菌悬液的制备:

用接种环将待测菌种接种到液体培养基中, 在摇床上培养至对数期, 将细菌配制成菌液浓度为 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL, 真菌配制成 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL 的孢子悬浮液。

2.3. 挥发油的提取、鉴定

(1) 提取方法

提取挥发油的方法很多, 传统方法如水蒸气蒸馏法、溶剂萃取法、冷压法等, 现代方法如 CO_2 超临界流体萃取、酶提取法、微波辐射法、超声波辅助提取等。水蒸气蒸馏法是提取植物性天然香料最经典的一种方法。根据橐吾属植物挥发油提取的相关文献, 本实验采用水蒸气蒸馏法。称取天山橐吾全草粉末 100 g, 装入 1000 ml 的圆底烧瓶, 加入 400 ml 蒸馏水浸泡 12 h [6]。参照 2010 年版《中华人民共和国药典》, 水蒸气蒸馏法提取 8 h, 然后冷却至室温, 用乙醚萃取馏出液的水相 3 次, 分别处理馏出液油状物与萃取液, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 环己烷清洗, 旋转蒸发器将其减压浓缩后, 转移至西林瓶中避光保存, 做好标记。天山橐吾挥发油是具有特殊气味的淡黄色油状液体。

(2) 气相色谱 - 质谱分析条件

气相色谱 - 质谱联用技术(GC-MS)同时具有气相色谱的强分离能力和质谱对未知化合物的高鉴定能力, 是医药卫生、食品、环境等各领域分离和检测复杂挥发性成分的重要工具[7] [8]。

气相色谱条件: GC-MS 接口温度为 230°C , 柱温程序为 60°C 保持 1 分钟, 并以 $2.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速率升高至 210°C , 保持 5 分钟, 然后以 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 速率升至 280°C 并保持 1 分钟。以氢气作为载气的流速为 $1.2 \text{ mL}/\text{min}$, 进样量 $0.2 \mu\text{L}$ 。

质谱条件: EI 离子源, 离子源温度为 230°C , 电离电压是 70 eV 。

(3) 挥发油 GC-MS 成分分析结果

采取水蒸气蒸馏法提取天山橐吾的挥发油, 得到具有特殊气味的淡黄色液 0.198 g , 出油率是 0.198% 。天山橐吾的挥发油经 GC-MS 分析, 共得到了 22 个化合物, 其中大多为倍半萜类成分。以上分析结果与橐吾属植物中主要成分是倍半萜类化合物这一规律相吻合。将 GC-MS 分析后的质谱图通过 NIST 谱图库并核对相关文献确定其化学组成, 绘制成表 4。

Table 4. Chemical composition of volatile oil of *Ligularia narynensis*

表 4. 天山橐吾挥发油的化学成分

序号	保留时间 t/min	化合物名称	分子式
1	17.12	Thymol	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$
2	20.76	Dimethyl phthalate	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$
3	21.6	2-Propenal, 3-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}$
4	22.85	Cyclopropa[d]naphthalen-3-one, octahydro-2,4a,8,8-tetramethyl-, oxime	$\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{NO}$
5	23	(1R,7S,E)-7-Isopropyl-4,10-dimethylenecyclodec-5-enol	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$
6	23.4	Isospathulenol	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$
7	23.48	1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol,decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1ar-(1a.alpha.,4a.alpha.,7b.beta.,7a.beta.,7b.alpha.)]-	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$
8	24.66	2-((2R,4aR,8aS)-4a-Methyl-8-methylenedecahydronaphthalen-2-yl)prop-2-en-1-ol	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$
9	25.04	6-(p-Tolyl)-2-methyl-2-heptenol, trans-	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$
10	25.13	.gamma.-HIMACHALENE	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$

续表

11	25.26	Cedren-13-ol, 8-	C ₁₅ H ₂₄ O
12	26.03	10,10-Dimethyl-2,6-dimethylenebicyclo[7.2.0]undecan-5.beta.-ol	C ₁₅ H ₂₄ O
13	26.75	2-((2R,4aR,8aS)-4a-Methyl-8-methylenedecahydronaphthalen-2-yl)prop-2-en-1-ol	C ₁₅ H ₂₄ O
14	27.99	5-Benzofuranacetic acid, 6-ethenyl-2,4,5,6,7,7a-hexahydro-3,6-dimethyl-.alpha.-methylene-2-oxo-, methyl ester	C ₁₆ H ₂₀ O ₄
15	29.15	Acetic acid, 3-hydroxy-7-isopropenyl-1,4a-dimethyl-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahydronaphthalen-2-yl ester	C ₁₇ H ₂₆ O ₃
16	29.46	3-Oxo-10(14)-epoxyguai-11(13)-en-6,12-olide	C ₁₅ H ₁₈ O ₄
17	29.84	Spiro[tricyclo[4.4.0(5,9)]decane-10,2'-oxirane], 1-methyl-4-isopropyl-7,8-dihydroxy-, (8S)-	C ₁₅ H ₂₄ O ₃
18	30.34	Propanoic acid, 2-methyl-, (dodecahydro-6a-hydroxy-9a-methyl-3-methylene-2,9-dioxoazuleno[4,5-b]furan-6-yl)methyl ester, [3aS-(3a.alpha.,6.beta.,6a.alpha.,9a.beta.,9b.alpha.)]-	C ₁₉ H ₂₆ O ₆
19	33.97	1-Heptatriacotanol	C ₃₇ H ₇₆ O
20	37.95	2-[4-methyl-6-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)hexa-1,3,5-trienyl]cyclohex-1-en-1-carboxaldehyde	C ₂₃ H ₃₂ O
21	40.81	Phthalic acid, di(2-propylpentyl) ester	C ₂₄ H ₃₈ O ₄
22	44.13	1,3-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	C ₂₄ H ₃₈ O ₄

2.4. 挥发油的抗菌活性研究

挥发油的抗菌实验一般采用琼脂扩散法-滤纸片法及MTT法。滤纸片法是通过抑菌圈的直径大小来直接衡量挥发油的抗菌活性，此法操作简便、结果直观。MTT法是间接的反映药物对细胞的抑制作用，再根据颜色深浅通过酶标仪测定吸光度值，即二甲亚砜(DMSO)溶解活细胞中由琥珀酸脱氢酶将淡黄色的MTT还原成水不溶性的蓝紫色结晶甲臜。MTT法还经常被用于微生物的抑菌率测定。本实验采用更简单、便于观察的滤纸片法来测定天山橐吾挥发油的抑菌活性。

(1) 实验方法

从灭菌锅中取出PDA固体培养基的锥形瓶，降温至50℃左右，在超净台中倒入直径为9 cm的培养皿，每个培养皿约20 ml，待凝固后，用移液枪取200 μl稀释后的菌液，用涂布棒涂布均匀。将活化好的植物病原真菌菌株用打孔器制成直径为6 mm的菌饼，并用无菌接种针倒扣放置在PDA平板的中心。用无菌镊子夹取已灭菌的直径6 mm的无菌滤纸片，每块平板上对称放置2张滤纸片，使用移液枪吸取20 μL的天山橐吾挥发油(1 mg/ml)滴加至滤纸片上，另一个滤纸片加20 μL的二甲基亚砜做空白对照，每个样品设置3个平行实验。将培养皿置于37℃培养箱中培养18~24 h，根据抑菌圈的大小评估抑菌活性的强弱。每个样品设置3个平行实验。

(2) 实验结果

Table 5. Results of volatile oil antibacterial test

表 5. 挥发油抑菌实验结果

测试样品	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	大肠杆菌
天山橐吾挥发油	+	-	-
DMSO	-	-	-

注：表中，抑菌圈直径：<10 mm (-)，10~12 mm (+)，13~15 mm (++)，16~20 mm (+++)。

在药物浓度为 1 mg/ml 时, 天山橐吾挥发油仅对金黄色葡萄球菌有微弱的抑菌作用, 对于枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和其他植物病原真菌, 均无明显抑菌活性, 实验结果见表 5。

3. 结果与讨论

本实验采用水蒸气蒸馏法提取了天山橐吾全草的挥发油, 运用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术分析其挥发油成分。从中共鉴定出 22 个化合物。对天山橐吾挥发油成分运用滤纸片法进行抗菌活性测定, 实验结果显示, 其对金黄色葡萄球菌有微弱的抑菌活性。

综上, 橐吾属植物资源丰富, 挥发性成分亦有研究价值, 但国内对橐吾属的研究, 尤其是橐吾属植物的挥发油部分, 相对较少。本实验首次对天山橐吾的挥发油成分及生物活性进行了研究, 为天山橐吾的开发利用提供了科学依据。后期有望将其应用于天然药物的潜在分子。

参考文献

- [1] 刘尚武, 邓德山, 刘建全. 橐吾属的起源、演化与地理分布[J]. 植物分类学报, 1994(6): 514-524.
- [2] SHAO, Y., SUN, Y., LI, D., *et al.* (2020) *Chrysanthemum indicum* L.: A Comprehensive Review of Its Botany, Phytochemistry and Pharmacology. *The American Journal of Chinese Medicine*, **48**, 871-897. <https://doi.org/10.1142/S0192415X20500421>
- [3] 易国辉, 陈锦萍, 王丽丽, 等. 植物挥发油成分分析及抗假丝酵母菌活性的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(22): 215-227.
- [4] 周群, 富国文, 王绍卿, 等. 橐吾属植物的药理作用研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2019, 38(3): 84-87.
- [5] Wu, H., Liu, T., Deng, W., *et al.* (2019) A New Eremophilane Sesquiterpene with Nematocidal Activity from *Ligularia veitchiana*. *Chemistry of Natural Compounds*, **55**, 671-673. <https://doi.org/10.1007/s10600-019-02775-8>
- [6] 刘霞妹, 陈晗, 董琼娟, 等. 水蒸气蒸馏和超临界 CO₂ 萃取法提取欧洲刺柏果精油及其在卷烟加香中的应用[J]. 香料香精化妆品, 2024(1): 74-79.
- [7] 席祖卫, 王雨佳, 陈金虎, 等. 维吉尼亚雪松精油的 GC-MS 分析及体外药理活性研究[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(2): 335-341.
- [8] 袁源, 刘洋洋, 张利, 等. 气相色谱-质谱联用与主成分分析研究不同年份宜昌花椒挥发油成分[J]. 分析试验室, 2021, 40(11): 1309-1313.