

苍术不同部位中挥发油的资源评价研究

王兴源, 张 杰, 赵建华, 罗思凡, 王 欣, 王飞娟*

(陕西国际商贸学院医药学院, 陕西 西安 712046)

摘 要 苍术为临床大宗常用中药, 其挥发油具有抗菌、调节胃肠运动、抗胃溃疡及保护肝脏等药理作用。目的: 分别分析苍术叶片与根茎中挥发油成分, 并分别对其挥发油进行抑菌及抗菌活性研究。方法: 采用水蒸气蒸馏法提取挥发油, 利用 GC-MS 技术辅助人工检索分别分析比较苍术叶片与根茎挥发油的化学成分组成的差异, 使用大肠埃希氏杆菌、枯草芽孢杆菌及金黄色葡萄球菌等菌株分别对苍术叶与根茎的挥发油进行抑菌实验。结果: 苍术不同部位的挥发油中主要成分均为 4-联苯甲醛、八氢四甲基萘甲醇、桉叶烯和苍术醇等, 且其会明显抑制大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等常见细菌的生长。结论: 北苍术的叶片亦有潜在利用价值, 可考虑进一步开发利用苍术整株资源。

关键词 苍术; 挥发油; GC-MS; 抗菌活性

中图分类号: R282

文献标识码: A

文章编号: 1007-0745(2023)01-0064-03

苍术为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 或北苍术 *Atractylodes chinensis* (DC.) Koidz. 的干燥根茎, 临床上可用于脘腹胀满、风湿痹痛及风寒感冒等^[1]。苍术熏蒸空气能够解郁避秽, 在病房、产房及手术室等均取得了满意效果, 而其挥发油为杀菌的主要活性成分^[2-3]。气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 技术常用于中药挥发油的研究^[4-5], 对于苍术挥发油的提取多使用根茎部位, 而其地上部分资源的利用缺乏, 有待深入研究。本研究通过提取北苍术叶片和根茎中的挥发油, 并对挥发油进行 GC-MS 分析以及实验室抑菌实验, 为实现苍术地上部分的综合利用提供实验依据。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

日本岛津 GC8040 型气相色谱-质谱联用仪; BSA 323S 型电子天平为赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司生产; MH-1000 电热套于北京科伟永兴仪器有限公司购买; QE-100 型高速粉碎机购买于浙江屹立工贸有限公司; XSE105DU 型电子天平 (METTLER TOLEDO); RE2000B 型压力蒸汽灭菌锅生产于河南巩义市予华仪器有限公司; 96 孔微量板; 普通培养箱。

无水硫酸钠、乙醚、葡萄糖、氯化钠、氢氧化钠、碘硝基四唑紫 (均为分析纯), 蒸馏水。PB 及 PDA 培

养基。抗菌活性实验所用标准菌株冻干品由陕西国际商贸学院医药学院微生物学实验室提供。

实验用苍术经陕西国际商贸学院医药学院赖普辉教授鉴定为菊科苍术属植物北苍术的干燥根茎和叶片。

1.2 苍术挥发油的提取

将苍术叶置于装有 95% 乙醇中加热约 30min 后干燥, 以去除叶中的叶绿素。将苍术根茎 430g (粉碎至 20 目) 及苍术叶 200g 放于 3000ml 的圆底烧瓶中, 加入蒸馏水 1000ml、重蒸乙醚 200ml 蒸馏萃取 4 小时, 用无水 Na_2SO_4 去除萃取液中的水分并减压回收乙醚, 即得淡黄色苍术挥发油, 冷却后为淡黄色固体, 分别放入 4℃ 冰箱保存待用。

1.3 GC-MS 工作条件

GC8040 型 GC-MS 仪, 色谱柱型号: Thermo TR - 5 - MS 毛细管质谱柱 (30m × 0.25mm × 0.33 μm); 流动相为氦气, 流量为 1.0ml/min, 进样口温度 150℃; 柱温 60℃, 以 5℃/min 升至 80℃, 保持 1min, 以 10℃/min 升至 180℃, 保持 3min, 再以 15℃/min 升至 250℃, 保持 5min; 扫描模式: 采用全扫描, 选择质量 30~350amu, EI 方式电离, 电子能量 70eV, 离子源温度 200℃, 传输线温度 250℃。分析方法: 通过与计算机 NIST 谱库对比各色谱峰对应的质谱图定性, 根据总

★基金项目: 2021 年陕西省大学生创新创业训练计划项目 (S202113123002)。

*本文通讯作者, E-mail: 276183726@qq.com。

离子流图采用面积归一法计算其相对含量。

1.4 培养基的制备

细菌培养基的制备 (PB 培养基): 准确称取 3g 牛肉膏、10g 蛋白胨、5g NaCl 后加适量蒸馏水, 用电炉加热搅拌至其充分溶解, 再加入 15g 琼脂粉使其融化后加水定容至 1000mL。溶液冷却至室温后, 用 1mol/L 的氢氧化钠调节溶液的 PH 值至 7.3, 再将其装入不同的锥形瓶中牛皮纸封好瓶口, 用高压蒸汽灭菌锅 (121℃, 20min) 灭菌后备用。

真菌培养基的制备 (PDA 培养基): 将去皮的马铃薯切成块状并称取 200g, 用适量蒸馏水煮沸 (20~30min) 后用双层纱布过滤除去杂质, 再加葡萄糖 20g, 琼脂 15g, 加水定容至 1000mL。待溶液冷却至室温后, 用 1mol/L 的氢氧化钠调节至溶液的 PH 值为 5.6, 再将其倾倒入不同的锥形瓶中用牛皮纸封好瓶口, 用高压蒸汽灭菌锅 (115℃, 20min) 灭菌即得。

1.5 抑菌活性的测定

选择滤纸片法对挥发油的抑菌活性进行检测^[6-7]。以无水乙醇作为溶剂, 分别将苍术根茎和叶片挥发油配制成 50mg/mL 的溶液。在无菌环境下, 滴加试菌液 0.1mL 于培养皿的平板表面上涂匀, 并将灭菌的滤纸片 (d=6mm) 分别在样品溶液中浸润 30min, 待滤纸片充分吸收试液后取出沥干贴于平板表面中央, 每个培养皿贴两个滤纸片, 其中两个小纸片分别为空白对照组 (无水乙醇) 和挥发油溶液组。用大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌各做三组平行, 放置平整后轻压使滤纸片紧贴于平板表面, 盖上平皿盖静置 30min 后置于恒温培养箱中进行培养。37℃ 下培养细菌 24h, 28℃ 下培养真菌 48h。最后通过肉眼观察结果并测量各组苍术挥发油对 4 种供试菌种的抑菌圈直径。

1.6 抗菌实验

最低抑菌浓度 (MIC) 的测定: 本实验在参考文献^[8]的基础上稍作改动, 采用微量稀释法对苍术根茎和叶片中挥发油的最低抑菌浓度进行考察。在 96 孔板中, 供试样品孔为第 1 列至 8 列, 空白对照孔为第 9 列。每孔中加入 100μL 液体培养基后, 利用倍比稀释法将其分为不同稀释浓度, 即浓度梯度依次为 25%、12.5%、6.25%、3.13%、1.57%、0.78%、0.39%、0.20% (V/V)。将 50μL 不同浓度的挥发油药液依次加入 96 孔板中, 其中空白对照组加入 50μL 无水乙醇, 并按顺序向每孔中滴加 50μL 菌液, 每个浓度设置 3 个

复孔作为平行。37℃ 下培养细菌 24h, 28℃ 下培养真菌 48h。每孔加入 0.2g/L 的碘硝基四唑紫溶液 50μL, 若出现紫色则表明有活菌, 首次出现紫色的溶液浓度则为苍术挥发油的最低抑菌浓度。

最小杀菌浓度 (MBC) 的测定: 采用平板转种法测定 MBC^[9]。依次用无菌生理盐水稀释平板未生长孔的培养物 ($\geq$ MIC) 20 倍后, 取 0.05mL 接种在琼脂平板上, 并在培养箱 (37℃, 24h) 条件培养。此时, 细菌未生长区域的最小药物浓度可认为是该挥发油的最小杀菌浓度。

2 结果

2.1 苍术挥发油成分分析

在上述气相色谱试验条件下, 北苍术的根茎和叶片挥发油中分离出的峰数量分别为 54 个、50 个。通过 NIST 谱库定性及文献资料^[10] 直观比较苍术挥发油成分的基峰及相对丰度等, 分别鉴定出化合物 50 个、47 个。通过分析面积归一法测得上述化合物在根茎和叶片挥发油总组分中的含量分别为 98.4% 和 95.2%。

结果显示, 苍术根茎和叶片中挥发油成分含量较高的均为 4-联苯甲醛, 八氢四甲基萘甲醇、桉叶烯和茅术醇等, 但并未检出苍术酮和苍术素。研究显示, 提取方法及所选溶剂的不同是影响苍术挥发油抽提成分不同的重要因素。贾春晓等^[11] 采用蒸馏萃取法和索氏提取法分别鉴定出苍术挥发油化合物 49 种、22 种, 同时以二氯甲烷、无水乙醚和正己烷为溶剂进行抽提所得成分也各不相同。本研究使用水蒸气蒸馏法提取出苍术挥发油的有效成分主要为 C15 等倍半萜类成分, 这可能与该实验所采用的挥发油提取方式及 MS 的分离条件有关。

2.2 抑菌活性分析

苍术不同部位对 4 种菌种的抑制作用结果显示, 苍术根茎和叶片挥发油均有一定的抑菌效果, 而抑菌活性却有差别。根茎挥发油和叶片挥发油对 4 种菌种的抑菌效果一致, 无显著差异。其中两部位所提取的挥发油对大肠杆菌及枯草芽孢杆菌的抑制作用较金黄色葡萄球菌、白色念珠菌次之。

2.3 抗菌活性结果分析

为进一步验证不同部位的苍术挥发油抑制作用, 本实验采用倍比稀释法研究其对不同试验菌种的 MIC 和 MBC。

由此可知, 两部位提取的苍术挥发油对不同菌株的 MIC 结果一致, 且其对 G+ (金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌) 及真菌 (白色念珠菌) 的抑制作用较强, 对 G-

(大肠杆菌)的作用较弱。

苍术不同部位挥发油对供试菌株的 MIC 范围在 0.79%~1.58% (V/V)。其中两部位提取的挥发油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的 MIC 值均为 0.79% (V/V), 对枯草芽孢杆菌的 MIC 值为 1.58% (V/V); 而其对不同菌株的 MBC 结果有差异, 范围在 1.58%~12.5% (V/V)。

3 讨论

本研究通过分析水蒸气蒸馏法提取的北苍术根茎和叶片中挥发油的成分及含量, 并对其挥发油的生物活性进行初步验证。

结果表明, 苍术不同部位挥发油化学成分复杂多样且以萜类成分为主, 其中含量较高的均为 4- 联苯甲醛, 八氢四甲基萜甲醇、桉叶烯和苍术醇等, 这与李迎春等的研究中挥发油中的主要成分相一致^[12], 说明植物与其所含化学成分有一定的相关性。而北苍术叶片中所含的挥发油成分与习用部位 (根茎) 的化学成分相一致且其相对含量的差异亦并不明显, 提示北苍术的叶片也有潜在利用价值, 为苍术药用资源的综合利用及开发奠定了一定的理论依据。

抑菌活性分析结果显示, 北苍术根茎与叶片中的挥发油对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌及白色念珠菌均有抑制作用, 且苍术不同部位提取的挥发油对同一供试菌种的抑制效果无明显差异。抑菌圈的大小能够反映病菌对药物的敏感度, 即抑菌圈直径越大该病菌对药物越敏感。

本研究结果显示, 苍术挥发油对大肠杆菌及枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径较金黄色葡萄球菌、白色念珠菌小, 提示苍术根茎与叶片中的挥发油对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌的抑制作用较强, 对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌的抑制作用较弱。

抗菌活性的实验结果表明, 不同部位的苍术挥发油对不同菌株的最小抑菌浓度结果一致, 对实验所选用的 4 种菌株均有明显的抑制和灭活作用。其中, 以 G+ 及真菌的抑制作用较强, 这也与金诗凤等、施绮云等利用苍术作为空气消毒剂的研究结果相同^[13-14]。由于北苍术挥发油化学成分的复杂多样性^[15], 本实验仅验证了其部分抗菌的生物活性, 抗菌杀菌实验有待进一步研究。

综上, 提取的苍术根茎及叶片挥发油的化学成分相一致, 且苍术叶片亦具有抑菌抗菌活性, 为苍术全珠资源的开发利用奠定了理论基础。而本研究仅采用

水蒸气蒸馏法提取了不同部位苍术挥发油, 后续亦可通过不同提取方法及溶剂萃取分离出不同的苍术挥发油成分, 并选用不同的菌种进行相应的活性研究, 以期对苍术的综合利用及资源开发提供参考。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] 陈小青, 李慧灵, 曾松芳, 等. 苍术新剂型燃烧法空气消毒的效果观察 [J]. 护理学杂志, 2002(02):111.
- [3] 毛又玲, 陈学芹. 四种室内空气消毒方法的效果观察 [J]. 护士进修杂志, 1997(06):8.
- [4] 赵旭, 马晓鹏. GC-MS-AMDIS 结合保留指数技术用于缬草挥发性成分指纹图谱的研究 [J]. 中医药信息, 2015,32(03):29-31.
- [5] 邢娜, 舒尊鹏, 徐炳清, 等. 不同产地枳壳挥发油成分的气相色谱-质谱分析及抗肿瘤活性研究 [J]. 中医药信息, 2015,32(05):1-6.
- [6] 高洁, 董文宾, 王勇, 等. 山皂荚多糖的提取工艺及抑菌活性 [J]. 食品与机械, 2017,33(03):145-149.
- [7] 孙义玄, 包怡红. 艾蒿多糖抑菌活性及稳定性 [J]. 食品与生物技术学报, 2017,36(09):990-995.
- [8] Chao Peng, Su-Qing Zhao, Jun Zhang, et al. Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of Mustard (*Sinapis alba*) seed essential oil by complex coacervation [J]. Food Chem, 2014(165):560-568.
- [9] 徐小平, 李卓成, 肖建德, 等. 苍术消毒剂杀菌性能的实验观察 [J]. 中华医院感染学杂志, 2003(09):47-48.
- [10] 周家驹, 谢桂荣, 严新建. 中药原植物化学成分手册 [M]. 北京: 化学工业出版社, 化学与应用化学出版社, 2004.
- [11] 贾春晓, 毛多斌, 张文叶, 等. 大别山野生苍术挥发油化学成分研究 [J]. 中药材, 2004(08):571-574.
- [12] 李迎春, 曾健青, 刘莉玫, 等. 北苍术超临界 CO₂ 萃取产物的成分 [J]. 分析测试学报, 2001(01):46-48.
- [13] 金诗凤, 王汝清, 周光镶. 苍术烟熏对空气消毒效果的观察 [J]. 中国消毒学杂志, 2003(03):44-45.
- [14] 施绮云, 薛广波, 胡世杰. 苍术复方消毒剂对空气中微生物杀灭效果的检测 [J]. 中国消毒学杂志, 1995(02):114-115.
- [15] 郭金鹏, 王萍, 孙如宝, 等. 苍术挥发油化学成分及其抗菌活性的研究 [J]. 时珍国医国药, 2011,22(03):566-568.