

黄花蒿残渣挥发油化学成分及其抑菌活性分析

张晓蓉^{1,2}, 彭光花³, 陈功锡^{1,2*}, 徐定华², 常大成²

1. 吉首大学 植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室, 湖南 吉首 416000

2. 吉首大学生物资源与环境科学学院, 湖南 吉首 416000

3. 华立(吉首)青蒿素制药有限公司, 湖南 吉首 416000

摘要: 目的 对提取青蒿素后的黄花蒿残渣中挥发油进行综合利用。方法 采用水蒸气提取法对黄花蒿残渣挥发油进行提取, 通过薄层色谱及 GC-MS 对提取的挥发油组分进行分析鉴定; 并对黄花蒿残渣挥发油进行抑菌活性测试。结果 水蒸气提取法提取的黄花蒿残渣挥发油, 每 100 g 干植物得油量为 0.43 mL, 提取总量约为黄花蒿挥发油总量的 69%; 薄层色谱分析黄花蒿残渣挥发油存在 5 个组分。GC-MS 鉴定黄花蒿残渣挥发油共 40 个成分, 占挥发油成分 84%。抑菌活性测试表明黄花蒿残渣挥发油对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有抑制作用。结论 黄花蒿残渣挥发油仍然保留与原植物相同的部分化学成分, 并有一定的抑菌活性, 具有医药、化工等方面的开发利用价值。

关键词: 黄花蒿; 挥发油; 水蒸气蒸馏; GC-MS 分析; 抑菌活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)12-2418-04

Chemical constituents of volatile oil from *Artemisia annua* residue and their antibacterial activity

ZHANG Xiao-rong^{1,2}, PENG Guang-hua³, CHEN Gong-xi^{1,2}, XU Ding-hua², CHANG Da-cheng²

1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Utilization in Hunan Province, Jishou University, Jishou 416000, China

2. College of Bio-resources and Environment Science, Jishou University, Jishou 416000, China

3. Holley (Jishou) Artemisinin Pharmaceutical Co., Ltd., Jishou 416000, China

Key words: *Artemisia annua* L.; volatile oil; water steam distillation; GC-MS analysis; antibacterial activity

黄花蒿 *Artemisia annua* L. 为重要的药用植物, 富含多种挥发性和非挥发性的活性成分^[1-3]。挥发性成分主要为挥发油, 在植物体内的量约为 0.2%~0.5%。但其量及成分因地区分布不同而差异很大^[4-5]。如湖南雪峰山地区野生黄花蒿挥发油收油率为 0.5%, 鉴定出 45 个化学成分^[6]; 甘肃地区野生黄花蒿挥发油超临界 CO₂ 萃取提取得率为 1.2%, 鉴定出 86 种化合物^[7]; 从山东地区黄花蒿挥发油中共鉴定出 59 个化学成分^[8]。药理活性研究表明, 黄花蒿挥发油具有广谱抑菌活性, 对病毒、真菌及细菌等多种微生物有抑制作用^[9]。对蚊虫、鳞翅目、鞘翅目、膜翅目等农业害虫均具有杀灭作用^[10-12]。

湖南武陵山地区黄花蒿资源丰富, 全国大部分青蒿素生产厂家分布于此, 但提取青蒿素后的黄花

蒿残渣仍含有重要药用成分挥发油, 被大量废弃。基于对黄花蒿残渣挥发油资源的综合利用, 本实验对提取青蒿素后的黄花蒿残渣进行了挥发油再提取, 对其化学组分进行薄层色谱与 GC-MS 分析及鉴定, 对其抑菌活性进行测试, 以期黄花蒿残渣工业利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

黄花蒿 *Artemisia annua* L. 于 2010 年 8 月采集自湖南湘西地区, 由吉首大学陈功锡教授鉴定为正品, 黄花蒿残渣为提取青蒿素后的黄花蒿, 由华立(吉首)青蒿素制药有限公司提供。大肠杆菌 *Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* Rosenbach, 保存于吉首大学生物工程微生物实验室。

收稿日期: 2011-06-05

基金项目: 湖南省科技计划项目(2009FJ3011); 湖南省大学生研究性学习及创新性实验计划项目(2009-199); 湖南省高校产学研合作示范基地开放项目(2010JSJK003); 湖南省生态学重点学科建设项目(JDS04)

作者简介: 张晓蓉(1969—), 女(土家族), 副教授, 硕士生导师, 研究方向为生物分析化学。Tel: (0743)8564416 E-mail: xrzhang0743@163.com

*通讯作者 陈功锡 Tel: (0743)8233309 E-mail: chengx@jssu.edu.cn

1.2 仪器与试剂

超临界 CO₂ 流体萃取装置 (HA121-50-1) 为江苏南通华安超临界流体萃取有限公司生产, 气相色谱-质谱电脑联用分析仪 (GCMS-QP2010) 为日本 Shimadzu 公司生产, 薄层色谱硅胶板为青岛海洋化工公司生产, 挥发油提取器为亚华生化仪器厂生产。实验所用水为去离子水, 试剂均为分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 挥发油提取 水蒸气提取法^[6]: 称量粉碎的黄花蒿及黄花蒿残渣粉末 250 g, 分别于 2 000 mL 圆底烧瓶中, 加入去离子水 1 800 mL 浸泡 12 h, 加热蒸馏提取 6 h。蒸馏完毕后, 以少量乙醚冲洗冷凝管, 待充分分层后, 收集乙醚层, 挥干乙醚得黄色油状物即为挥发油, 精密定量, 4 °C 冰箱保存备用。

1.3.2 薄层色谱分析 薄层色谱分析水蒸气法提取的黄花蒿及其残渣挥发油组分差异, 以石油醚-丙酮-冰醋酸-三氯甲烷 (7:2:0.1:1) 为展开剂, 含 2% 香草醛的 20% 硫酸乙醇溶液为显色剂。

1.3.3 GC-MS 化学组分鉴定 气相色谱条件: 进样口温度 250 °C, 载气为高纯氦气, 总流量为 30 mL/min, 气相色谱柱为 HP-5MS 弹性石英毛细管柱 (25 m×0.25 mm, 0.25 μm), 柱体积流量为 1 mL/min, 柱前压为 80 kPa, 进样量为 0.1 μL, 分流比为 30:1。程序升温: 柱起始温度 60 °C, 保持 1 min, 以 10 °C/min 升至 160 °C, 保持 4 min, 再以 5 °C/min 升至 260 °C, 保持 5 min。然后以 5 °C/min 升至 280 °C, 保持 10 min。MS 条件: 用电子轰击 (EI) 源分析, 电子能量为 70 eV, 离子源温度为 220 °C, 接口温度为 280 °C, 选取全扫描模式, 质量扫描范围为 28~600 amu。

1.3.4 抑菌活性测定 采用滤纸片法测定水蒸气法提取的黄花蒿残渣挥发油抑菌活性^[7], 将直径为 7 mm 的无菌滤纸片浸入乙醇溶解的黄花蒿残渣挥发油, 经 2 h 充分浸泡后, 挥干溶剂, 备用。将活化的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌悬液 0.1 mL 于无菌平板, 涂布均匀, 加入浸有挥发油滤纸片, 37 °C 培养 24 h。实验重复 3 次, 以市售碘酊为阳性对照。

2 结果与分析

2.1 薄层色谱分析

为探究黄花蒿残渣挥发油组分的变化, 采用 TLC 法对水蒸气法提取的黄花蒿残渣及黄花蒿挥发油组分进行了比较分析。结果表明, 黄花蒿残渣挥发油显示有 5 个组分, 黄花蒿挥发油显示有 7 个

组分。可见, 黄花蒿经过提取青蒿素后, 残渣挥发油不仅量减少, 并且有部分组分的损失。

2.2 挥发油 GC-MS 鉴定

采用 GC-MS 对挥发油组分进行鉴定, 并通过面积归一化法定量挥发油组分相对质量分数, 结果见表 1。黄花蒿及其残渣挥发油分别鉴定出 44 和 40 个组分, 占挥发性成分 89.41% 及 84.96%。其中, 两者挥发油存在 27 个相同组分, 30 个差异组分。但 27 个相同组分的相对质量分数有明显差异, 黄花蒿挥发油残渣较黄花蒿相对质量分数总和少 0.55%。两者不同组分分析发现, 黄花蒿挥发油检出 17 个不同组分, 而黄花蒿残渣检出 13 个不同组分。

27 个相同组分中有 10 个相对质量分数在 2% 以上的组分, 在黄花蒿及其残渣中的挥发油质量分数分别为: 左旋樟脑 (14.76%, 12.42%)、合成右旋龙脑 (10.41%, 11.94%)、丁子香烯 (7.87%, 7.31%)、β-法呢烯 (3.12%, 2.76%)、2-异丙烯基-24α, 82-二甲基-21, 2, 3, 4, 4α, 5, 6, 72-八氢化萘 (2.18%, 2.13%)、大牛儿烯 D (3.51%, 3.07%)、斯巴醇 (3.5%, 3.96%)、石竹素 (5.58%, 7.3%)、雪松烯 (5.25%, 6.49%)、β-人参烯 (2.23%, 2.16%)。相对质量分数变化 0.01%~2.34%, 这可能与青蒿素提取工艺有关。

黄花蒿挥发油 17 个差异组分中, 有两个相对质量分数在 2% 以上的组分, 分别为长叶醛 (3.54%) 和 9-异丙基-1-甲基-2-亚甲基-5-一氧杂三环 [5.4.0.0 (3, 8)]十一烷 (2.15%)。黄花蒿残渣挥发油 13 个差异组分中仅 1 个相对质量分数在 2% 以上组分, 为 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 7-八氢-1, 4a-二甲基-7-(2-羟基-1-甲基乙基)-2-萘酚 (4.2%)。残渣新出现的组分可能为青蒿素提取过程挥发油的分解产物。

2.3 黄花蒿残渣挥发油抑菌活性检测

为探究黄花蒿残渣挥发油的生物活性, 采用滤纸片法对其抑菌活性进行检测。黄花蒿残渣挥发油的滤纸片周围均有透明圈, 对大肠杆菌的抑菌圈直径为 10 mm (碘酊的抑菌圈直径为 21 mm), 对金黄色葡萄球菌抑菌圈直径为 20 mm (碘酊的抑菌圈直径为 9 mm)。黄花蒿残渣挥发油对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有一定的抑菌活性, 对金黄色葡萄球菌的抑制作用强于大肠杆菌。

3 讨论

对黄花蒿残渣进行挥发油提取, 可采用水蒸气提取法、乙醇有机溶剂法及超临界 CO₂ 萃取法 3 种提取方法。后两种方法得到的提取物的光谱分析表

表1 挥发油 GC-MS 鉴定
Table 1 Identification of volatile oil by GC-MS

序号	化合物名称	保留时间/min	相对质量分数/%		变化率/%
			黄花蒿残渣	黄花蒿	
1	茨烯	7.529	0.28	0.81	-0.53
2	蘑菇醇	8.681	—	0.31	
3	邻-伞花素	10.098	—	0.65	
4	1, 1-二甲基-2-(3-甲基-1, 3-丁二烯炔)-环丙烷	10.233	—	0.35	
5	桉树脑	10.329	0.66	1.25	-0.59
6	海茴香烯	11.300	—	0.30	
7	2, 2, 4-三甲基-3-环己烯-1-甲醛	14.101	—	0.32	
8	1S-(1 α , 3 α , 5 α)-6, 6-二甲基-2-亚甲基-二环[3.1.1]-3-庚醇	14.258	0.29	—	
9	左旋樟脑	14.407	12.42	14.76	-2.34
10	合成右旋龙脑	15.280	11.94	10.41	+1.53
11	4-萜烯醇	15.644	0.94	0.90	+0.04
12	桃金娘烯醇	16.378	0.26	—	
13	3-(10)-萜烯-2-醇	16.901	0.47	—	
14	异兰烯	22.312	0.79	0.94	-0.15
15	β -榄香烯	22.855	0.43	0.48	-0.05
16	丁子香烯	23.741	7.31	7.87	-0.56
17	(Z)- β -法呢烯	24.860	2.76	3.12	-0.36
18	[1S-(1 α , 4 β , 5 α)]-螺环[4, 5]-7-癸烯-1, 8-二甲基-4-异丙烯基	25.020	0.28	0.36	-0.08
19	2-异丙烯基-4 α , 8-二甲基-1, 2, 3, 4, 4 α , 5, 6, 7-八氢化萘	25.491	2.13	2.18	-0.05
20	大牛儿烯D	25.686	3.07	3.51	-0.44
21	B-瑟林烯	25.862	1.48	1.44	+0.05
22	大牛儿烯B	26.164	—	1.11	
23	β -榄烯	26.163	1.00	—	
24	γ -木罗烯	26.708	0.26	—	
25	2-甲基-4-(2, 6, 6-三甲基-1-环己烯-1-基)-2-丁烯醛	26.851	0.60	0.73	-0.13
26	杜松烯	26.961	—	0.63	
27	1, 2, 4 α , 5, 8, 8 α -六氢-4, 7-二甲基-1-异丙基苯	26.965	0.56	—	
28	3, 7, 11-三甲基-1, 6, 10-十二烷三烯-3-醇乙酸酯	28.181	0.27	0.23	+0.04
29	2-甲基-4-(2, 6, 6-三甲基-2-环己烯-1-基)-3-丁醛	28.346	0.61	0.56	+0.05
30	2-亚甲基-5-(1-甲乙烯)-8-甲基-[5.3.0]双环庚烯癸烷	28.514	1.19	1.10	+0.09
31	斯巴醇	28.713	3.96	3.50	+0.46
32	石竹素	28.811	7.30	5.58	+1.72
33	4-氰基苯酯	28.983	0.33	0.28	+0.05
34	2-(1, 4, 4-三甲基环己-2-烯基)乙醇	29.122	0.46	0.62	-0.16
35	三甲基-2-戊烯酸-1, 7, 7-三甲基双环[2.2.1]庚-2-基酯	29.544	0.95	—	
36	[S-(E, Z, E, E)]-3, 7, 11-三甲基-14-异丙基-1, 3, 6, 10-环十四碳四烯	29.839	0.99	—	
37	长叶醛	30.047	—	3.54	
38	2, 3, 4, 4 α , 5, 6, 7-八氢-1, 4 α -二甲基-7-(2-羟基-1-甲基乙基)-2-萘酚	30.046	4.20	—	
39	雪松烯	30.227	6.49	5.25	+1.24
40	[1R-(1 α , 4 β , 4 α , β , 8 α , β)]-1, 2, 3, 4, 4 α , 7, 8, 8 α -八氢-1, 6-二甲基-4-异丙基-1-萘酚	30.302	—	1.78	
41	β -雪松烯-9- α -醇	30.418	1.04	1.20	-0.16
42	N, N-双(2, 6-二甲基-6-亚硝基)-2-烯-4-酮	30.525	0.87	—	
43	蒿酮	30.528	—	0.65	
44	桉烷-7(11)-烯-4-醇	30.933	1.67	1.54	+0.13
45	蓝桉醇	31.015	—	1.45	
46	2, 3, 3-三甲基-2-(3-甲基-1, 3-二烯醇)-6-亚甲基环己酮	31.161	—	0.62	
47	4-亚甲基-1-甲基-2-(2-甲基-1-丙烯基-1)-1-乙烯基环庚烷	31.401	—	1.50	
48	1, 6-二烯-3-醇石竹烯	31.676	1.35	—	
49	α -比萨波稀醇	31.679	—	1.32	
50	六氢法呢基丙酮	31.812	1.91	—	

续表 1

序号	化合物名称	保留时间/min	相对质量分数/%		变化率/%
			黄花蒿残渣	黄花蒿	
51	9-异丙基-1-甲基-2-亚甲基-5-一氧杂三环 [5.4.0.0 (3, 8)]十一烷	31.813	—	2.15	
52	6-异丙烯基-4, 8a-二甲基-1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 8a-八氢萘-2-酚	32.815	—	0.31	
53	3a, 7a-二甲基亚甲基-2-苯并呋喃-4-醇	35.296	0.32	—	
54	植酮	35.778	0.34	0.33	+0.01
55	β-人参烯	38.003	2.16	2.23	-0.07
56	半蒎类-1, 6-二酮	39.287	—	0.65	
57	叶绿醇	2.248	0.62	0.91	-0.29
合 计			84.96	89.41	0.55

“+”为黄花蒿残渣高于黄花蒿挥发油的相对质量分数; “—”为黄花蒿残渣低于黄花蒿挥发油的相对质量分数

“+” indicates that volatile oil contents are higher in *A. annua* residue than those in *A. annua*

“—” indicates that volatile oil contents are lower in *A. annua* residue than those in *A. annua*

明植物中某些脂溶性物质已被提取出来, 需纯化才能得到较纯的挥发油, 故本实验采用水蒸气提取法制备样品。结果表明, 每 100 g 干黄花蒿残渣挥发油得油量为 0.43 mL, 黄花蒿残渣含有的挥发性成分质量分数约为黄花蒿的 69%。薄层色谱分析表明, 黄花蒿残渣挥发油有部分损失, 仅存在 5 个大组分。进一步采用 GC-MS 法进行分析鉴定, 结果揭示残渣挥发油共鉴定 40 个组分, 占挥发性成分 84.96%, 其中 27 个组分与黄花蒿挥发油相同, 其相对质量分数总和较黄花蒿少 0.55%, 有两个相对质量分数在 2% 以上的组分已丢失。此外, 还发现残渣挥发油存在 13 个新组分, 这可能与青蒿素提取过程有关。

抑菌活性检测表明, 黄花蒿残渣挥发油对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌均具有抑菌生物活性。可见, 黄花蒿残渣挥发油的抑菌活性成分尚未破坏, 具有再利用价值。

参考文献

- [1] 傅立国, 洪 涛. 中国高等植物 [M]. 青岛: 青岛出版社, 2000.
- [2] 范振涛, 马小军, 张明庆. 青蒿素产量影响因素的研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(2): 313-316.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科技出

版社, 2000.

- [4] 张凤杰, 陈功锡, 刘祝祥. 湘西黄花蒿挥发油研究 [J]. 中药材, 2010, 33(12): 74-78.
- [5] 彭 洪, 郭振德, 张镜澄, 等. 黄花蒿挥发油的成分研究 [J]. 中药材, 1996, 19(9): 458.
- [6] 廖化为. 湖南雪峰山地区野生黄花蒿挥发油化学成分的研究 [J]. 西北药学杂志, 2006, 19(9): 458.
- [7] 姚 健, 赵保堂, 王俊龙, 等. 甘肃黄花蒿超临界 CO₂ 萃取产物化学成分的差异性分析 [J]. 草业科学, 2010, 3: 57-63.
- [8] 赵 进, 孙 晔, 田丽娟. 不同产地黄花蒿挥发油成分的 GC/MS 研究 [J]. 陕西中医学院学报, 2009, 32(5): 72-75.
- [9] 吴 静, 丁 伟, 张永强, 等. 黄花蒿 (*Artemisia annua* L.) 提取物对两种病原真菌的生物活性 [J]. 农药, 2007, 46(10): 713-718.
- [10] Juteau F, Masotti V, Bessiere J M, *et al.* Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. [J]. *Fitoterapia*, 2002, 73: 532-535.
- [11] Kordalis S, Aslan I, Calmasur O, *et al.* Toxicity of essential oils isolated from three *Artemisia* species and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). [J]. *Indust Crops Produc*, 2006, 23: 162-170.
- [12] 李云寿, 唐绍宗, 邹华英, 等. 黄花蒿提取物的杀虫活性 [J]. 农药, 2000, 39(10): 25-26.