

不同提取方式对连翘、荆芥、薄荷挥发油成分及抗菌活性的影响

朱梅芳¹, 唐宇¹, 郑琴^{1*}, 汤丹丰¹, 罗俊¹, 胡鹏翼¹, 郭园园¹, 吴海霞¹, 杨明^{1,2*}

1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 成都中医药大学, 四川 成都 610075

摘要: 目的 对连翘 *Forsythiae Fructus*、荆芥 *Schizonepetae Herba*、薄荷 *Menthae Haplocalycis Herba* 及其配伍挥发油进行化学成分及抑菌活性分析, 探讨挥发油不同提取方法与其成分及抑菌活性的关系。方法 采用气相色谱-质谱联用技术 (GC-MS), 对连翘、荆芥、薄荷挥发油成分及其配伍后成分的变化进行比较分析, 并采用纸片琼脂扩散法、微量稀释法分别测定抑菌圈直径及最低抑菌浓度 (MIC), 评价单味连翘、荆芥、薄荷挥发油和配伍提取挥发油及单提混合后的挥发油对常见的 4 种致病菌的抑菌活性。结果 连翘、荆芥与薄荷混合提取后, 所得到的挥发油主要成分及含量均发生了变化。连翘-荆芥混合提取的挥发油中, 缺失了连翘挥发油中含有的 7 种成分和荆芥挥发油中的 7 种成分, 而新增了 8 种成分。连翘-薄荷混合提取后, 缺失了连翘挥发油中的 6 种成分和薄荷挥发油中的 8 种成分, 并新增 8 种成分。荆芥-薄荷混合提取后, 缺失了荆芥挥发油中的 4 种成分和薄荷挥发油中的 7 种成分, 新增了 7 种成分。连翘-荆芥-薄荷混合提取后, 缺失了连翘挥发油中的 6 种成分、荆芥挥发油中的 4 种成分、薄荷挥发油中的 2 种成分, 连翘和薄荷共有成分缺失 1 种, 荆芥和薄荷共有成分缺失 2 种, 新增了 9 种成分。与单提混合挥发油相比, 3 种药材混合提取组中胡薄荷酮的相对含量明显下降。抑菌实验显示, 不同提取方式所得挥发油的抑菌效果不同, 单味挥发油及单提混合挥发油对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、白色念珠菌的抑菌效果均优于配伍提取挥发油组。结论 挥发油是解表中药的重要药效成分, 中药挥发油采用不同的提取方式对挥发油的得率、成分及药效有一定的影响, 最终影响其疗效, 应对此加以关注。

关键词: 连翘; 荆芥; 薄荷; 气相色谱-质谱联用技术; 抑菌; 挥发油; 致病菌; 胡薄荷酮

中图分类号: R284.2; R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)12-2845-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.12.017

Effects of different extraction methods on composition and antibacterial activity of volatile oil from *Forsythiae Fructus*, *Schizonepetae Herba*, and *Menthae Haplocalycis Herba*

ZHU Mei-fang¹, TANG Yu¹, ZHENG Qin¹, TANG Dan-feng¹, LUO Jun¹, HU Peng-yi¹, GUO Yuan-yuan¹, WU Hai-xia¹, YANG Ming^{1,2}

1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine under Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

Abstract: Objective To compare the chemical composition and antibacterial activity of the volatile oils from *Forsythiae Fructus* (FF), *Schizonepetae Herba* (SH), *Menthae Haplocalycis Herba* (MH), and their compatibility, and to explore the influence of different extraction methods on components and antibacterial activity of volatile oil. **Methods** GC-MS was employed to analyze the composition of the volatile oil from FF, SH, and MH extracted separately, and their mixture extracted, as well as physical mixing volatile oil of FF, SH, and MH extracted separately. The diameter of the inhibition zone and the minimum inhibitory concentration (MIC) were measured using the paper agar diffusion method and micro dilution method. The antibacterial activities of volatile oil on four common pathogens of respiratory tract were evaluated. **Results** When FF, SH, and MH were mixed and extracted, the main obtained components and contents of volatile oil changed. Compared to separately extracted volatile oil, eight new components emerged, seven components from FF and seven components from SH disappeared in FF and SH mixture extracted volatile oil. In FF

收稿日期: 2018-05-21

基金项目: 江西中医药大学校级科研课题 (2012FC004)

作者简介: 朱梅芳 (1991—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药新剂型和新技术。Tel: 18779172997 E-mail: 765637319@qq.com

*通信作者 郑琴, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新剂型和新技术。Tel: (0791)87118658 E-mail: zhengqin912006@163.com

杨明, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新剂型和新技术。Tel: (0791)87118658 E-mail: yangming16@126.com

and MH mixture extracted volatile oil, compared with separately extracted, six components from FF and eight components from MH disappeared, and eight new components emerged. As to SH and MH mixture extracted volatile oil, four components from SH and seven components from MH disappeared, and seven new components emerged. In the three herbs mixture extracted volatile oil, six components from FF, four components from SH, and two components from MH disappeared, one common component of FF and MH, two common components of SH and MH disappeared, however, nine new components emerged. The content of pulegone significantly decreased in the three herbs mixture extracted volatile oil compared with that in separately extracted. The antibacterial experiments showed that the antibacterial effects of the volatile oils obtained by different extraction methods were different. The antibacterial effects of volatile oil extracted separately and their physical mixing volatile oil on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans* were better than that from mixture extracted. **Conclusion** Volatile oil is an important effective component of Chinese patent medicines with relieving exterior syndrome function. Different extraction methods have a certain influence on the yield and composition of volatile oil, which ultimately affects the efficacy of drugs. Therefore, we should pay more attention to extraction method and process of volatile oil in these prescriptions.

Key words: *Forsythiae Fructus*; *Schizonepetae Herba*; *Menthae Haplocalycis Herba*; GC-MS; antibacterial activity; volatile oil; pathogens; pulegone

解表中药具有发汗解热、增加体表血液循环、抗菌、抗病毒等药理作用,其中大多含有挥发油。现代药理研究表明,挥发油具有解热、抗菌、抗病毒、抗炎等作用,对中药解表功效的发挥具有重要影响^[1]。连翘 *Forsythiae Fructus* 为木犀科连翘属植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实,具有清热、解毒、散结、消肿的功效。荆芥 *Schizonepetae Herba* 是唇形科植物荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* Briq. 的干燥地上部分,具有祛风、解表、透疹、止血的功效。薄荷 *Menthae Haplocalycis Herba* 为唇形科薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 的干燥地上部分,为辛凉发汗解热药。连翘、荆芥、薄荷三者常同时出现在治疗感冒的中成药中,如《中国药典》2015 年版记载的银翘类方(银翘解毒片、银翘解毒颗粒、银翘解毒丸等)、感冒舒颗粒、芎菊上清丸等皆有其配伍应用^[2]。

课题组前期研究发现,挥发性成分对银翘类方抑菌活性有重要影响,但《中国药典》2015 年版并未对其中挥发性成分做出明确的质量规定。在分析不同中成药中挥发油的提取方式,发现不同品种、剂型的中成药中连翘、荆芥、薄荷的挥发油提取方式不尽相同。如感冒舒颗粒、银翘解毒颗粒、芎菊上清丸将三者合并提取挥发油,银翘解毒片及银翘解毒丸、银翘解毒胶囊只对薄荷、荆芥提取挥发油,维 C 银翘片则取连翘、荆芥与山银花提取挥发油,再将所得挥发油与薄荷素油混合。鉴于此,本实验对连翘、荆芥、薄荷单独提取及混合提取后的挥发油进行成分比较,以及它们对 4 种常见的致病菌金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、大肠埃希菌、白色念珠

菌的抑菌效果进行研究,探讨挥发油不同提取方式对成分及抗菌效果的影响,旨在为挥发油的不同“制”法对“质”和“效”的影响提供一些思考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

BHC-1300IIA/B2 型生物洁净安全柜(苏州净化设备有限公司);XH-B 型漩涡混合器(江苏康健医疗用品有限公司);恒温生化培养箱(上海光都仪器设备有限公司);BSA124 电子分析天平(万分之一,德国 Sartorius 公司);轻油挥发油提取器(四川蜀牛玻璃仪器有限公司);水蒸气蒸馏装置(2 L,四川蜀牛玻璃仪器有限公司);KDM 型控温电热套(郾城华鲁电热仪器有限公司);TB-214 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);Agilent 7890 A/5975C 型 GC-MS 仪器(美国安捷伦公司)。

1.2 药材

连翘(产地山西,批号 20151215)、荆芥(产地河北,批号 20150923)、薄荷(产地湖南,20151009)均购于江西江中中药饮片有限公司,经江西中医药大学刘荣华教授鉴定,分别为木犀科连翘属植物连翘 *F. suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实、唇形科植物荆芥 *S. tenuifolia* Briq. 的干燥地上部分、唇形科植物薄荷 *M. haplocalyx* Briq. 的干燥地上部分。

1.3 试剂及培养基

营养肉汤(批号 HB0108, pH 7.3±0.1)、玫瑰红钠琼脂培养基(批号 HR0908, pH 6.0±0.2)均购自青岛高科园海博生物技术有限公司,琼脂粉(批号 829Q031, 型号 100)购自 Solarbio 公司;刃天青,购自北京梦怡美生物科技有限公司;聚山梨酯-80(药

用级,批号 20160708)购自四川金山制药有限公司;无水硫酸钠(分析纯,质量分数 $\geq 99.0\%$,批号 160129)购自西陇化工有限公司。

1.4 菌种

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC6538、大肠埃希菌 *Escherichia coli* ATCC8739、绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027、白色念珠菌 *Candida albicans* ATCC10231 由江西中医药大学基础医学院舒青龙教授惠赠。

2 方法

2.1 挥发油的提取

2.1.1 样品分组 参照银翘系列方中连翘、荆芥、薄荷提取挥发油的方法,分为连翘、荆芥、薄荷分别单提组;连翘-荆芥、连翘-薄荷、荆芥-薄荷、连翘-荆芥-薄荷混合提取组。

2.1.2 挥发油提取样品的配制 称取连翘、荆芥、薄荷各 100 g,分别单独提取挥发油。参照《中国药典》2015 年版一部中银翘系列方各药材比例,即连翘-荆芥 5:2、连翘-薄荷 5:3、荆芥-薄荷 2:3、连翘-荆芥-薄荷 5:2:3,称取总量为 100 g,分别提取挥发油。将药材置于 2 L 烧瓶中,加 12 倍水量,参照《中国药典》2015 年版中水蒸气蒸馏法提取,至提取器中的挥发油量不再增加,停止加热,收集挥发油,计算得率。用无水硫酸钠脱水处理挥发油,制得挥发油样品。取挥发油 20 μL 于 10 mL 量瓶中,用醋酸乙酯定容,超声混匀,经 0.22 μm 的微孔滤膜滤过,制得供 GC-MS 分析用挥发油样品。

2.2 GC-MS 法分析挥发油成分

取上述 GC-MS 分析用挥发油样品,进行 GC-MS 分析,通过 7890A-5975C 质谱数据库、NIST014.L 计算机检索、人工图谱解析,鉴定出其中的特征成分,以面积归一化法计算挥发油各组分的相对含量。

2.2.1 气相色谱条件 安捷伦 HP-5 MS 柱(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μm);进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$;程序升温:柱初始温度 60 $^{\circ}\text{C}$,保持 5 min,以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 125 $^{\circ}\text{C}$,保持 1 min,再以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 150 $^{\circ}\text{C}$,保持 2 min,最后以 50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 230 $^{\circ}\text{C}$,保持 3 min。载气为高纯氦气;体积流量 1 mL/min;进样量 1 μL ;分流比为 10:1。

2.2.2 质谱条件 离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$;单极杆温度 150 $^{\circ}\text{C}$;色谱-质谱接口温度 280 $^{\circ}\text{C}$;电离源(EI);电子能量 70 eV;传输线温度 250 $^{\circ}\text{C}$;扫描质量范

围 m/z 40~600。

2.3 挥发油抑菌活性研究

于超净工作台将金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、绿脓杆菌分别接种于营养琼脂培养基上,将白色念珠菌接种到玫瑰红钠营养琼脂培养基平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 24 h 后,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷藏备用。用接种环从固体培养基上挑取一个菌落置于 10 mL 灭菌液体培养基中,于培养箱中培养 24 h 作为种子液,然后用灭菌双蒸水洗脱,配制成含菌数约为 0.5 麦氏浊度(1×10^8 个/mL)的菌悬液,备用。将灭菌后的培养基倒入无菌培养皿中,待凝固后加入 0.20 mL 菌悬液,用灭菌的涂布棒均匀涂布,制成含菌平板。取“2.1.2”项下制备得到的挥发油各 6 μL 滴于 6 mm 无菌滤纸片上,充分吸收后,贴入含菌平板中,每个平皿放 3 片不同的挥发油,每个平皿重复 3 次。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 24 h 后,采用十字交叉法量取抑菌圈直径(mm),实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。通过测定抑菌圈直径大小评价抑菌效果,直径越大,表示抑菌效果越好。

2.4 挥发油最小抑菌浓度(MIC)的测定^[3]

利用微量肉汤稀释法测定不同方法提取的各挥发油对 4 种细菌的 MIC。将挥发油分别溶于含 1% 聚山梨酯-80 营养肉汤中,采用等量稀释法对其进行稀释。第 1 列加入 180 μL 营养肉汤,2~11 列加入 100 μL 营养肉汤;往第 1 列中加入 20 μL 挥发油,混匀,取其混悬液 100 μL 加入到第 2 孔,混匀后取第 2 列孔混悬液 100 μL 加入第 3 列孔,按此法依次稀释到第 11 列,第 11 列吸去混悬液 100 μL ,即得体积分数为 100.00、50.00、25.00、12.50、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39、0.20、0.10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的培养液。将菌悬液 100 μL 加入到第 1~11 列孔,其中第 4 行加营养肉汤 100 μL 作为空白对照,第 12 列加菌悬液 200 μL 作为阴性对照组。37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 24 h,向所有孔内加入 0.2 g/L 的刃天青溶液 20 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 4 h,显色后观察结果。

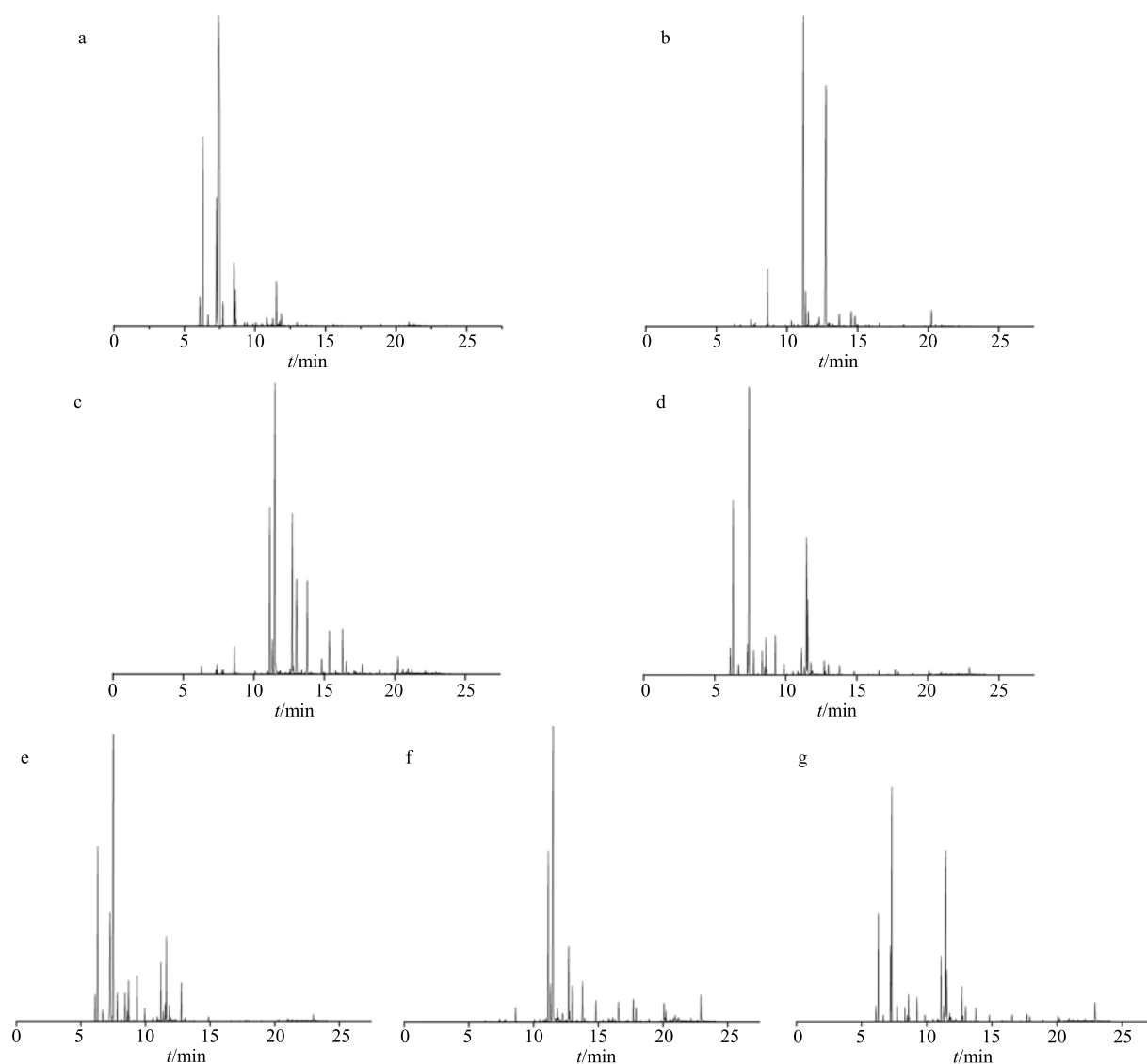
3 结果

3.1 挥发油的提取率

经水蒸气蒸馏法提取,连翘、荆芥、薄荷挥发油得率分别为 0.4%、0.2%、0.5%。连翘-荆芥、连翘-薄荷、荆芥-薄荷、连翘-荆芥-薄荷混合提取挥发油得率分别为 0.3%、0.4%、0.4%、0.3%。

3.2 挥发油化学成分的比较分析

3.2.1 各挥发油成分分析 GC-MS 鉴定出特征成分的总离子流图见图 1。连翘检出 14 个色谱峰,鉴



a-连翘挥发油 b-荆芥挥发油 c-薄荷挥发油 d-连翘-荆芥挥发油 e-连翘-薄荷挥发油 f-荆芥-薄荷挥发油 g-连翘-荆芥-薄荷挥发油

a-volatile oil of *Forsythiae Fructus* b-volatile oil of *Schizonepetae Herba* c-volatile oil of *Menthae Haplocalycis Herba* d-volatile oil of *Forsythiae Fructus* and *Schizonepetae Herba* e-volatile oil of *Forsythiae Fructus* and *Menthae Haplocalycis Herba* f-volatile oil of *Schizonepetae Herba* and *Menthae Haplocalycis Herba* g-volatile oil of *Forsythiae Fructus*, *Schizonepetae Herba*, and *Menthae Haplocalycis Herba*

图 1 不同提取方式的连翘、荆芥、薄荷挥发油总离子流图

Fig. 1 Total ion flow diagram of volatile oil from *Forsythiae Fructus*, *Schizonepetae Herba*, and *Menthae Haplocalycis Herba* extracted by different extraction methods

定出挥发性成分 14 种, 占色谱峰数 100%, 占挥发油总量 100%, 其中有 9 种挥发性成分相对含量超过 1% (表 1), 主要为 β -蒎烯 (43.30%)、蒎烯 (19.58%)、2-*p*-薄荷二烯 (17.37%)。荆芥检出色谱峰 12 个, 鉴定出挥发性成分 9 种, 占色谱峰数 75.0%, 占挥发油总量 96.41%, 其中 7 种挥发性成分相对含量超过 1% (表 1), 主要为异薄荷酮 (43.58%) 和胡薄荷酮 (40.02%)。薄荷检出 23 个

色谱峰, 鉴定出挥发性成分 15 种, 占色谱峰数挥发油总量 65.2%, 挥发油总量 79.29%, 其中 8 种挥发性成分相对含量超过 1% (表 2), 主要为薄荷醇 (34.28%)、胡薄荷酮 (14.52%)、呋喃 (11.90%)。

连翘-荆芥混合提取挥发油检出 18 个色谱峰, 鉴定出挥发性成分 17 种, 占色谱峰数 94.4%, 挥发油总量 97.06%, 其中 12 种挥发性成分相对含量超过 1%, 主要为 β -蒎烯 (38.72%)、左旋- α -蒎烯

表 1 连翘-荆芥配伍前、后挥发油成分变化分析

Table 1 Analysis on volatile oil of *Forsythiae Fructus* and *Schizonepetae Herba* before and after compatibility

序号	化学成分	CAS	分子式	相对含量/%		
				连翘	荆芥	连翘-荆芥配伍
1	β-蒎烯崖柏烯	028634-89-1	C ₁₀ H ₁₆	2.79	—	—
2	3-蒎烯崖柏烯	002867-05-2	C ₁₀ H ₁₆	—	—	2.40
3	蒎烯	007785-70-8	C ₁₀ H ₁₆	19.58	—	—
4	左旋-α-蒎烯	007785-26-4	C ₁₀ H ₁₆	—	—	16.40
5	茨烯	000079-92-5	C ₁₀ H ₁₆	1.10	—	1.00
6	2- <i>p</i> -薄荷二烯	000555-10-2	C ₁₀ H ₁₆	17.37	—	13.16
7	β-蒎烯	000127-91-3	C ₁₀ H ₁₆	43.30	—	38.72
8	1-辛烯-3-醇	003391-86-4	C ₈ H ₁₆ O	—	0.73	—
9	月桂烯	000123-35-3	C ₁₀ H ₁₆	1.85	—	1.96
10	2-萹烯	000554-61-0	C ₁₀ H ₁₆	—	—	2.00
11	<i>o</i> -伞花烃	000527-84-4	C ₁₀ H ₁₄	4.82	—	0.72
12	右旋萜二烯	005989-27-5	C ₁₀ H ₁₆	—	5.00	—
13	双戊烯	000138-86-3	C ₁₀ H ₁₆	3.05	—	—
14	桉叶油醇	000470-82-6	C ₁₀ H ₁₈ O	0.46	—	—
15	萜品烯	000099-85-4	C ₁₀ H ₁₆	—	—	3.12
16	萜品油烯	000586-62-9	C ₁₀ H ₁₆	—	—	0.89
17	1-辛烯-3-醇乙酸酯	002442-10-6	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	—	0.44	—
18	反式松香芹醇	000547-61-5	C ₁₀ H ₁₆ O	0.69	—	—
19	异薄荷酮	000491-07-6	C ₁₀ H ₁₈ O	—	43.58	—
20	松香芹酮	030460-92-5	C ₁₀ H ₁₄ O	0.56	—	—
21	<i>L</i> -薄荷酮	014073-97-3	C ₁₀ H ₁₈ O	—	—	0.93
22	哒嗪	000089-80-5	C ₁₀ H ₁₈ O	—	2.71	3.92
23	薄荷脑	001490-04-6	C ₁₀ H ₂₀ O	—	—	1.36
24	反式-异胡薄荷酮	029606-79-9	C ₁₀ H ₁₆ O	—	1.43	—
25	(-)-4-萜品醇	020126-76-5	C ₁₀ H ₁₈ O	3.10	—	5.90
26	α-松油醇	000098-55-5	C ₁₀ H ₁₈ O	0.38	—	0.99
27	胡薄荷酮	000089-82-7	C ₁₀ H ₁₆ O	—	40.02	3.07
28	薄荷烯酮	000491-09-8	C ₁₀ H ₁₄ O	—	1.12	—
29	氧化石竹烯	001139-30-6	C ₁₅ H ₂₄ O	—	1.38	—
30	棕榈酸	000057-10-3	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	—	—	0.52
31	α-thujenal	1000139-63-3	C ₁₀ H ₁₄ O	0.95	—	—

(16.40%) 和 2-*p*-薄荷二烯 (13.16%), 结果见表 1。连翘-薄荷混合提取挥发油共检出色谱峰 21 个, 鉴定出挥发性成分 19 种, 占色谱峰数 90.4%, 挥发油总量 96.90%, 其中 11 种挥发性成分相对含量超过 1%, 主要为 β-蒎烯 (35.46%)、蒎烯 (16.00%)、β-蒎烯崖柏烯 (11.78%), 结果见表 2。荆芥-薄荷混合提取挥发油检出 19 个色谱峰, 鉴定出挥发性成分

16 种, 占色谱峰数 84.2%, 挥发油总量 95.36%, 挥发性成分 16 种, 占挥发油总量 84.2%, 其中 12 种挥发性成分相对含量超过 1%, 主要为薄荷酮 (47.90%)、哒嗪 (14.93%)、胡薄荷酮 (7.01%), 结果见表 3。连翘-荆芥-薄荷混合提取挥发油检出色谱峰 26 个, 鉴定出挥发性成分 24 种, 占色谱峰数 92.3%, 挥发油总量 98.75%, 其中 16 种挥发性成分

表 2 连翘-薄荷挥发油配伍前、后成分变化分析

Table 2 Analysis on volatile oil of *Forsythiae Fructus* and *Menthae Haplocalycis Herba* before and after compatibility

序号	化学成分	CAS	分子式	相对含量/%		
				连翘	薄荷	连翘-薄荷
1	β -蒎烯崖柏烯	028634-89-1	C ₁₀ H ₁₆	2.79	0.31	11.78
2	3-蒎烯崖柏烯	002867-05-2	C ₁₀ H ₁₆	—	—	2.33
3	蒎烯	007785-70-8	C ₁₀ H ₁₆	19.58	0.70	16.00
4	莰烯	000079-92-5	C ₁₀ H ₁₆	1.10	—	0.89
5	2- <i>p</i> -薄荷二烯	000555-10-2	C ₁₀ H ₁₆	17.37	—	—
6	β -蒎烯	000127-91-3	C ₁₀ H ₁₆	43.30	0.75	35.46
7	月桂烯	000123-35-3	C ₁₀ H ₁₆	1.85	0.32	1.71
8	萜品油烯	000586-62-9	C ₁₀ H ₁₆	—	—	1.68
9	α -伞花烃	000527-84-4	C ₁₀ H ₁₄	4.82	—	0.59
10	右旋萜二烯	005989-27-5	C ₁₀ H ₁₆	—	1.80	—
11	双戊烯	000138-86-3	C ₁₀ H ₁₆	3.05	—	—
12	桉叶油醇	000470-82-6	C ₁₀ H ₁₈ O	0.46	—	—
13	萜品烯	000099-85-4	C ₁₀ H ₁₆	—	—	2.63
14	(+)-4-萜烯	029050-33-7	C ₁₀ H ₁₆	—	—	0.73
15	反式松香芹醇	000547-61-5	C ₁₀ H ₁₆ O	0.69	—	—
16	呋喃	000089-80-5	C ₁₀ H ₁₈ O	—	11.90	1.75
17	松香芹酮	030460-92-5	C ₁₀ H ₁₄ O	0.56	—	—
18	<i>L</i> -薄荷酮	014073-97-3	C ₁₀ H ₁₈ O	—	2.92	0.81
19	<i>L</i> -薄荷醇	002216-51-5	C ₁₀ H ₂₀ O	—	—	11.38
20	薄荷醇	015356-70-4	C ₁₀ H ₂₀ O	—	34.28	—
21	(-)-4-萜品醇	020126-76-5	C ₁₀ H ₁₈ O	3.10	—	5.06
22	α -松油醇	000098-55-5	C ₁₀ H ₁₈ O	0.38	—	0.81
23	正戊酸顺式-3-己烯酯	035852-46-1	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	—	0.37	—
24	胡薄荷酮	000089-82-7	C ₁₀ H ₁₆ O	—	14.52	1.00
25	右旋香芹酮	002244-16-8	C ₁₀ H ₁₄ O	—	0.63	—
26	胡椒酮	000089-81-6	C ₁₀ H ₁₆ O	—	—	0.85
27	乙酸薄荷酯	000089-48-5	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	—	—	0.83
28	<i>DL</i> -乙酸薄荷酯	016409-45-3	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	—	7.93	—
29	1-石竹烯	000087-44-5	C ₁₅ H ₂₄	—	1.16	—
30	氧化石竹烯	001139-30-6	C ₁₅ H ₂₄ O	—	1.31	—
31	α -毕橙茄醇	000481-34-5	C ₁₅ H ₂₆ O	—	0.39	—
32	棕榈酸	000057-10-3	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	—	—	0.61
33	α -thujenal	1000139-63-3	C ₁₀ H ₁₄ O	0.95	—	—

相对含量超过 1%，主要为 β -蒎烯（27.66%）、薄荷醇（19.18%）、左旋- α -蒎烯（11.09%），结果见表 4。

连翘、薄荷、荆芥、连翘-荆芥、荆芥-薄荷、连翘-薄荷和连翘-荆芥-薄荷样品挥发油化学成分与文献报道^[4-6]没有显著区别，但在相对含量上有一定差别，可能与原材料的品种来源、样品的采集分析

条件的差异及储藏等具有密切关系。

3.2.2 单味药和混合提取挥发油成分比较 由表 1 可知，连翘-荆芥混合提取后，连翘缺失松香芹酮、双戊烯等 7 种成分。荆芥缺失氧化石竹烯、异薄荷酮、反式-异胡薄荷酮等 7 种成分。胡薄荷酮相对含量明显降低。新增 8 种成分：3-蒎烯崖柏烯、左旋- α -

表 3 荆芥-薄荷挥发油配伍前、后成分变化分析

Table 3 Analysis on volatile oil of *Schizonepetae Herba* and *Menthae Haplocalycis Herba* before and after compatibility

序号	化学成分	CAS	分子式	相对含量/%		
				荆芥	薄荷	荆芥-薄荷
1	蒎烯	007785-70-8	C ₁₀ H ₁₆	—	0.70	—
2	β-蒎烯崖柏烯	028634-89-1	C ₁₀ H ₁₆	—	0.31	—
3	β-蒎烯	000127-91-3	C ₁₀ H ₁₆	—	0.75	—
4	1-辛烯-3-醇	003391-86-4	C ₈ H ₁₆ O	0.73	—	—
5	月桂烯	000123-35-3	C ₁₀ H ₁₆	—	0.32	—
6	右旋萜二烯	005989-27-5	C ₁₀ H ₁₆	5.00	1.80	1.14
7	1-辛烯-3-醇乙酸酯	002442-10-6	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	0.44	—	—
8	异薄荷酮	000491-07-6	C ₁₀ H ₁₈ O	43.58	—	—
9	薄荷酮	010458-14-7	C ₁₀ H ₁₈ O	—	—	3.74
10	呋喃	000089-80-5	C ₁₀ H ₁₈ O	2.71	11.90	14.93
11	L-薄荷酮	014073-97-3	C ₁₀ H ₁₈ O	—	2.92	—
12	薄荷醇	015356-70-4	C ₁₀ H ₂₀ O	—	34.28	47.90
13	反式-异胡薄荷酮	029606-79-9	C ₁₀ H ₁₆ O	1.43	—	—
14	二氢香芹醇	000619-01-2	C ₁₀ H ₁₈ O	—	—	0.81
15	间异丙基乙苯	004920-99-4	C ₁₁ H ₁₆	—	—	1.33
16	正戊酸顺式-3-己烯酯	035852-46-1	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	—	0.37	—
17	胡薄荷酮	000089-82-7	C ₁₀ H ₁₆ O	40.02	14.52	7.01
18	右旋香芹酮	002244-16-8	C ₁₀ H ₁₄ O	—	0.63	0.90
19	胡椒酮	000089-81-6	C ₁₀ H ₁₆ O	—	—	3.49
20	乙酸薄荷酯	000089-48-5	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	—	—	4.36
21	DL-乙酸薄荷酯	016409-45-3	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	—	7.93	—
22	薄荷烯酮	000491-09-8	C ₁₀ H ₁₄ O	1.12	1.32	2.20
23	1-石竹烯	000087-44-5	C ₁₅ H ₂₄	—	1.16	2.19
24	大根香叶烯	023986-74-5	C ₁₅ H ₂₄	—	—	1.69
25	氧化石竹烯	001139-30-6	C ₁₅ H ₂₄ O	1.38	1.31	0.82
26	α-毕橙茄醇	000481-34-5	C ₁₅ H ₂₆ O	—	0.39	0.59
27	棕榈酸	000057-10-3	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	—	—	2.26

蒎烯、2-萜烯、萜品烯、萜品油烯、L-薄荷酮、薄荷脑、棕榈酸。其中 3 中由立体异构化而来：连翘中 β-蒎烯崖柏烯转化为 3-蒎烯崖柏烯，蒎烯转化为左旋-α-蒎烯，荆芥中异薄荷酮转化为 L-薄荷酮。

由表 2 可知，连翘-薄荷混合提取后，连翘缺失松香芹酮、2-*p*-薄荷二烯等 6 种成分。薄荷缺失氧化石竹烯、薄荷醇等 8 种成分。胡薄荷酮相对含量明显下降。新增 8 种成分：3-蒎烯崖柏烯、萜品烯、萜品油烯、(+)-4-萜烯、L-薄荷醇、胡椒酮、乙酸薄荷酯、棕榈酸。其中 2 种成分由立体异构转化而来：薄荷中的薄荷醇转化为 L-薄荷醇、DL-乙酸薄荷酯转化为乙酸薄荷酯。

由表 3 可知，荆芥-薄荷混合提取后，荆芥缺失异薄荷酮等 4 种成分，薄荷缺失蒎烯等 7 种成分。胡薄荷酮相对含量明显下降。新增 7 种成分：乙酸薄荷酯、L-薄荷醇二氢香芹酮、间异丙基乙苯、胡椒酮、大根香叶烯、棕榈酸。其中 2 种成分由立体异构转化而来：荆芥中的异薄荷酮和薄荷中的 L-薄荷酮转化为薄荷酮，薄荷中 DL-乙酸薄荷酯转化为乙酸薄荷酯。

由表 4 可知，连翘-荆芥-薄荷混合提取后，连翘缺失蒎烯、松香芹酮等 6 种成分，荆芥缺失异薄荷酮等 6 种成分，薄荷缺失 α-毕橙茄醇等 2 种成分，连翘和薄荷共有成分缺失蒎烯 1 种，荆芥和薄

表 4 连翘-荆芥-薄荷混合提取配伍成分变化

Table 4 Analysis on volatile oil of *Forsythiae Fructus*, *Schizonepetae Herba*, and *Menthae Haplocalycis Herba* before and after compatibility

序号	成分	CAS	化学式	相对含量/%			
				连翘	荆芥	薄荷	连翘-荆芥-薄荷
1	3-苧烯崖柏烯	002867-05-2	C ₁₀ H ₁₆	—	—	—	1.54
2	左旋- α -蒎烯	007785-26-4	C ₁₀ H ₁₆	—	—	—	11.09
3	蒎烯	007785-70-8	C ₁₀ H ₁₆	19.58	—	0.70	—
4	苈烯	000079-92-5	C ₁₀ H ₁₆	1.10	—	—	—
5	L-樟脑烯	005794-04-7	C ₁₀ H ₁₆	—	—	—	0.65
6	2- <i>p</i> -薄荷二烯	000555-10-2	C ₁₀ H ₁₆	17.37	—	—	—
7	β -蒎烯	000127-91-3	C ₁₀ H ₁₆	43.30	—	0.75	27.66
8	1-辛烯-3-醇	003391-86-4	C ₈ H ₁₆ O	—	0.73	—	—
9	月桂烯	000123-35-3	C ₁₀ H ₁₆	1.85	—	0.32	1.33
10	2-萜烯	000554-61-0	C ₁₀ H ₁₆	—	—	—	1.21
11	<i>o</i> -伞花烃	000099-87-6	C ₁₀ H ₁₄	4.82	—	—	0.51
12	右旋萜二烯	005989-27-5	C ₁₀ H ₁₆	—	5.00	1.80	—
13	双戊烯	000138-86-3	C ₁₀ H ₁₆	3.05	—	—	2.26
14	桉叶油醇	000470-82-6	C ₁₀ H ₁₈ O	0.46	—	—	—
15	萜品烯	000099-85-4	C ₁₀ H ₁₆	—	—	—	1.92
16	萜品油烯	000586-62-9	C ₁₀ H ₁₆	—	—	—	0.54
17	1-辛烯-3-醇乙酸酯	002442-10-6	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	—	0.44	—	—
18	反式松香芹醇	000547-61-5	C ₁₀ H ₁₆ O	0.69	—	—	—
19	异薄荷酮	000491-07-6	C ₁₀ H ₁₈ O	—	43.58	—	—
20	松香芹酮	030460-92-5	C ₁₀ H ₁₄ O	0.56	—	—	—
21	吡嗪	000089-80-5	C ₁₀ H ₁₈ O	—	2.71	11.90	5.16
22	L-薄荷酮	014073-97-3	C ₁₀ H ₁₈ O	—	—	2.92	1.52
23	薄荷醇	015356-70-4	C ₁₀ H ₂₀ O	—	—	34.28	19.18
24	反式-异胡薄荷酮	029606-79-9	C ₁₀ H ₁₆ O	—	1.43	—	—
25	(-)-4-萜品醇	20126-76-5	C ₁₀ H ₁₈ O	3.10	—	—	4.19
26	α -松油醇	000098-55-5	C ₁₀ H ₁₈ O	0.38	—	—	0.61
27	正戊酸顺式-3-己烯酯	035852-46-1	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	—	—	0.37	—
28	胡薄荷酮	000089-82-7	C ₁₀ H ₁₆ O	—	40.02	14.52	3.22
29	右旋香芹酮	002244-16-8	C ₁₀ H ₁₄ O	—	—	0.63	0.51
30	胡椒酮	000089-81-6	C ₁₀ H ₁₆ O	—	—	—	1.44
31	DL-乙酸薄荷酯	016409-45-3	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	—	—	7.93	1.45
32	薄荷烯酮	000491-09-8	C ₁₀ H ₁₄ O	—	1.12	1.32	0.68
33	1-石竹烯	000087-44-5	C ₁₅ H ₂₄	—	—	1.16	0.73
34	大根香叶烯	023986-74-5	C ₁₅ H ₂₄	—	—	—	0.58
35	氧化石竹烯	001139-30-6	C ₁₅ H ₂₄ O	—	1.38	1.31	—
36	α -毕澄茄醇	000481-34-5	C ₁₅ H ₂₆ O	—	—	0.39	—
37	棕榈酸	000057-10-3	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	—	—	—	1.57
38	β -苧烯崖柏烯	028634-89-1	C ₁₀ H ₁₆	2.79	—	0.31	9.20
39	α -thujenal	1000139-63-3	C ₁₀ H ₁₄ O	0.95	—	—	—

荷共有成分缺失氧化石竹烯等 2 种。胡薄荷酮相对含量明显下降。新增 9 种成分：3-苧烯崖柏烯、左旋- α -蒎烯、L-樟脑烯、2-萜烯、萜品烯、萜品油烯、胡椒酮、大根香叶烯、棕榈酸。其中 1 种成分由立体异构转化而来：连翘和薄荷中的蒎烯转化为左旋- α -蒎烯。

3.3 抑菌活性测定

由表 5 可知，单提混合对 4 种菌株的抑菌效果普遍优于混合提取。连翘-薄荷混合提取挥发油对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、绿脓杆菌无抑制作用，其余各挥发油对 4 种菌均有不同程度的抑制作用。其中对于金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌，连翘单提挥

表 5 各挥发油的抑菌活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 5 Antibacterial activity of each volatile oil ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	抑菌圈直径/mm			
	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	白色念珠菌	绿脓杆菌
连翘单提 (A)	18.67±0.65	11.67±0.58	13.33±0.58	15.00±0.23
荆芥单提 (B)	11.33±0.31	11.00±0.50	12.67±0.58	13.67±0.21
薄荷单提 (C)	12.33±0.58	9.67±0.58	12.00±0.50	12.67±0.25
连翘-荆芥混提 (D)	9.00±0.50 ^{△△△}	10.00±0.50 ^{△△}	9.00±0.50 ^{△△△}	10.23±0.26 ^{△△△}
连翘-薄荷混提 (E)	—	—	10.67±0.53 ^{△△}	—
荆芥-薄荷混提 (F)	10.33±0.58 ^{△△}	11.00±0.87 [△]	12.67±0.58	9.98±0.32 ^{△△△}
连翘-荆芥-薄荷混提 (G)	8.67±0.58 ^{△△△△}	9.67±0.58 ^{△△}	12.33±0.58	10.67±0.29 ^{△△△△}
连翘、荆芥单提混合 (H)	12.00±0.80 ^{**}	11.67±0.58 ^{**}	15.00±0.87 ^{**}	8.90±0.13 ^{**}
连翘、薄荷单提混合 (I)	11.67±0.49	11.67±0.58	14.33±0.58 ^{**}	10.78±0.21
荆芥、薄荷单提混合 (J)	11.33±0.65 [*]	11.67±0.58	13.33±0.58	11.34±0.24 ^{**}
连翘、荆芥、薄荷单提混合 (K)	11.67±0.58 ^{**}	12.00±0.30 ^{**}	12.67±0.58	10.23±0.19 [*]

与 A 组比较: ^{△△} $P < 0.01$; 与 B 组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$; 与 C 组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$; 与各自混合提取挥发油比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; “—” 无抑菌作用

^{△△} $P < 0.01$ vs A group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs B group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs C group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs corresponding mixture extraction group; “—” indicate no bacteriostasis

发油的抑菌效果最为明显, 抑菌圈 >15 mm, 各单提混合挥发油抑菌圈基本 >10 mm, 其抑菌效果明显优于混合提取挥发油的效果 ($P < 0.05, 0.01$)。对于大肠埃希菌, 除荆芥、薄荷单提混合与混合提取无明显差异, 其他单提混合挥发油抑菌效果均优于混合提取挥发油 ($P < 0.01$)。对于白色念珠菌, 连翘、荆芥和连翘、薄荷单提混合油抑菌效果优于混合提取 ($P < 0.01$)。混提挥发油与相应的单提挥发油相比, 抑菌效果更差 ($P < 0.05, 0.01$), 连翘-薄荷混提后, 除对白色念珠菌有抑菌效果外, 对其他 3 种菌株无抑菌效果。

3.4 刃天青显色法测定各挥发油的 MIC

从表 6 可知, 对于 4 种细菌, 挥发油单提混合

的 MIC 普遍小于混合提取, 抑菌效果更强。连翘单提挥发油对金黄色葡萄球菌抑菌效果最好, MIC 为 $0.78 \mu\text{L/mL}$, 单提混合挥发油对金黄色葡萄球菌的抑菌效果较好, 优于各混合提取挥发油。单味挥发油与单提混合挥发油对大肠杆菌的抑菌作用相差不大, 优于混合提取挥发油。单味挥发油和单提混合挥发油对白色念珠菌抑菌效果相差不大, 优于混合提取挥发油。各挥发油对绿脓杆菌的抑菌效果为连翘、薄荷单味挥发油及荆芥-薄荷混合提取挥发油效果最好, MIC 均为 $6.25 \mu\text{L/mL}$ 。除绿脓杆菌外, MIC 测定结果与各挥发油抑菌圈测定结果基本一致。

表 6 各挥发油的 MIC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 6 MIC of each volatile oil ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

各类挥发油	MIC/($\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$)			
	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	白色念珠菌	绿脓杆菌
连翘单提	0.78	6.25	1.56	6.25
荆芥单提	12.50	12.50	3.13	12.50
薄荷单提	3.13	3.13	3.13	6.25
荆芥-薄荷混提	25.00	12.50	6.25	6.25
连翘-荆芥混提	50.00	12.50	12.50	25.00
连翘-薄荷混提	50.00	50.00	50.00	12.50
荆芥-薄荷-连翘混提	50.00	25.00	25.00	12.50
荆芥、薄荷单提混合	12.50	3.13	3.13	12.50
连翘、荆芥单提混合	6.25	6.25	1.56	50.00
连翘、薄荷单提混合	3.13	3.13	1.56	12.50
荆芥、薄荷、连翘单提混合挥发油	25.00	6.25	3.13	12.50

4 讨论

连翘-荆芥、连翘-薄荷、连翘-荆芥-薄荷混合提取的挥发油对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、白色念珠菌、绿脓杆菌的抑菌活性弱于其单提混合提挥发油，可能与混合提取后松香芹酮、氧化石竹烯等成分的缺失以及胡薄荷酮相对含量显著下降有关。松香芹酮又名香芹酮，杨倩^[7]研究发现，香芹酮、胡薄荷酮型薄荷挥发油对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、绿脓杆菌、表皮葡萄球菌以及肺炎杆菌均有一定的抑菌作用。孙广仁等^[8]研究发现山核桃青果皮挥发油中的氧化石竹烯对白色念珠菌、绿脓杆菌和大肠埃希菌有抑制作用。符继红等^[9]研究发现，薰衣草精油中氧化石竹烯对抑制金黄色葡萄球菌有较大贡献。解宇环等^[10]研究发现，胡薄荷酮对急性炎症模型有抑制作用，是荆芥挥发油发挥抗炎作用的物质基础之一。荆芥-薄荷混合提取挥发油抗菌效果较单提混合差，可能与混合提取后蒎烯、 β -蒎烯等成分的缺失及胡薄荷酮含量显著下降有关。据报道^[4]， β -蒎烯具有抗大肠杆菌的作用， α -蒎烯具有抑制白色念珠菌作用。

本实验采用 GC-MS 对单味连翘、荆芥、薄荷的水提挥发油成分及其配伍后成分的变化进行分析比较。单味挥发油及配伍后提取的挥发油化学成分及含量均发生了变化，这在一定程度上影响了挥发油对常见的 4 种致病菌的抑菌效果。银翘系列方中挥发油的提取方式为 2 种或 3 种药材混合提取，不同的提取方式可造成药效的差异。本研究发现挥发油混合提取的抗菌活性较单提混合效果差，而抗菌活性与解表类中药疗效有密切相关性，解表类中药又多含挥发油，这

为含挥发油的解表类中药中挥发油的提取提供了一定的参考，在实际应用中可考虑单独提取后混合。因此，中成药中采用不同的“制”法对挥发油的化学成分、抑菌活性有一定的影响，是影响中成药质量和疗效的重要环节，应对此加以关注。

参考文献

- [1] 郑琴, 喻进, 薛鑫, 等. 药物制法对中成药解表功效的影响分析 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2427-2430.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 张小飞, 冯玲玲, 伍振峰, 等. 四川产肉桂挥发油化学成分分析及药效学研究 [J]. 中国医药工业杂志, 2016, 47(9): 1183-1187.
- [4] 魏珊, 吴婷, 李敏, 等. 不同产地连翘挥发油主要成分分析及抗菌活性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(4): 69-74.
- [5] 迟玉广, 李中阳, 黄爱华, 等. 不同产地薄荷饮片中挥发性成分的比较分析 [J]. 安徽医药, 2016, 20(9): 1661-1664.
- [6] 杜成智, 覃洁萍, 陈玉萍, 等. 不同产地荆芥挥发油化学成分的 GC-MS 分析 [J]. 湖北农业科学, 2014, 53(1): 188-190.
- [7] 杨倩. 薄荷挥发油的化学型分析及抑菌、抗炎活性研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2017.
- [8] 孙广仁, 姚大地, 由士江. 山核桃青果皮对几种人类致病细菌的抑制作用 [J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(1): 92-93.
- [9] 符继红, 唐军, 廖享, 等. 基于抑菌活性成分的薰衣草精油组效关系研究 [J]. 质谱学报, 2015, 36(5): 403-410.
- [10] 解宇环, 郭沛鑫, 缪飞, 等. 胡薄荷酮对急性炎症动物模型影响的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(6): 1344-1346.