

乌天麻挥发性成分分析及抗菌活性研究^①

关 萍¹, 石建明¹, 高玉琼²

1. 贵州大学 生命科学学院, 贵阳 550025; 2. 贵州省生物技术研究开发基地, 贵阳 550002

摘要: 用水蒸汽蒸馏法提取乌天麻次生块茎(箭麻)的挥发性成分, 用气相色谱质谱法(GC-MS)对其挥发性化学成分进行分离鉴定, 并用面积归一化计算各成分相对含量. 结果显示: 乌天麻挥发性成分包含 36 种成份, 20 种成分已确定, 大约占总质量的 76.392%. 乌天麻中主要是 4-甲基-苯酚(20.409%)、苯乙烯(12.607%)、1-甲乙醚十六烷酸(8.842%)芳香醚(6.038%). 用乌天麻挥发性成分进行的抗菌试验表明: 乌天麻挥发性成分对包括米曲霉、黄曲霉、小麦纹枯病、茶轮斑病和青霉在内的部分植物病原真菌有一定的抑菌活性. 这将为天麻挥发油进一步开发利用提供了实验基础.

关键词: 乌天麻; 挥发性成分; GC-MS; 抗菌活性

中图分类号: Q946

文献标识码: A

天麻(*Gastrodia elata* Bl)为兰科(Orchidaceae)多年生共生寄生草本植物, 是我国名贵的中药材, 天麻化学成分主要有酚类、有机酸类、含氮类及植物中常见的甾醇类及多糖类化合物等^[1]. 前人对天麻的研究主要集中在天麻的生物学特性、化学成分分析、药理作用以及栽培等方面^[2,3], 目前, 未见天麻挥发油的研究报道. 挥发油是植物中一类具有芳香气味、在常温下能挥发的油状液体的总称, 在植物界分布很广, 许多挥发油具有多方面的作用. 鉴于此情况, 作者首次通过采用气相色谱质谱数据库(GC-MS-DS)联用技术, 对天麻挥发油的化学成分进行了分析, 并对天麻挥发性成分的体外抗真菌作用进行了初步研究, 该项工作的进行有利于天麻资源的进一步开发与利用.

1 材料、仪器与方法

1.1 试剂与材料

正己烷(重蒸馏)、无水硫酸钠均为国产分析纯试剂. 植物材料乌天麻(*Gastrodia elata* Bl f. *glauca* S. Chow)块茎于 2004 年 5 月采自贵州大方天麻栽培基地.

1.2 仪器

美国惠普公司(Hewlett Packard)HP-6890/HP5973 GC-MS 气质联用仪; RE52CS 型旋转蒸发器;

1.3 实验方法

1.3.1 挥发性成分的提取

取烘干粉碎成粉的天麻样品 100 g, 加 8 倍量的水及适量的正己烷, 采用《中国药典》挥发油提取方法提取挥发油^[4], 所获挥发性油无色透明, 出油率 0.23%(v/w). 待分析的挥发油样品用无水硫酸钠干燥, 用于抗菌实验的样品保存于密封的玻璃管中备用.

1.3.2 天麻挥发性成分定性定量分析

提天麻挥发油提取物 10 μ L, 进样, 用 GC/MS 仪器进行分离测定.

① 收稿日期: 2007-04-28

作者简介: 关 萍(1962-), 女, 安徽涡阳人, 副教授, 博士, 主要从事植物发育生物学与生物技术.

通讯作者: 石建明, 副教授.

1)气相色谱条件 色谱柱为 HP-5MS5% PhenylmethylSiloxane 30 m×0.25 mm, 0.25 μm 弹性石英毛细管;载气为氦气(Ψ1=99.999%),流速 1 mL/min;柱初温 60 °C(保持 2 min),程序升温 5 °C/min,终温 280 °C;柱前压 52.6 kPa;汽化室温 250 °C;进样量 1 μL;流速 11 mL/min;分流比 40:1;

2)质谱条件 离子源为 EI 源,离子源温度 230 °C,四极杆温度 150 °C,电子能量 70 eV,发射电流 34.6 μA;倍增器电压 1 388 V,接口温度 280 °C;质量范围 10~550 amu;溶剂延迟 5 min;

3)定性分析 通过 HPMSD 化学工作站检索 Nist98 标准质谱图库和 WILEY275 质谱图库确定化学结构,同时结合有关质谱图文献解析,确认天麻挥发性物质的化学成分。

4)定量分析 通过 HPMSD 化学工作站数据处理系统,按峰面积归一化法进行计算求出各化学成分的峰面积相对百分含量。

1.3.3 体外抑菌实验

1.3.3.1 供试菌种的准备

实验用植物病原菌由贵州大学农学院植物病理实验室提供,这些微生物的敏感性对天然抗菌药物或防霉剂及植物农药的筛选有实际意义。将所有供测试的菌种转接于 PDA 斜面培养基上,每种菌接种两支,置于 28 °C 恒温箱内培养 72 h,备用。

1.3.3.2 平板的制备

配制好的 PDA 培养基经高压蒸汽消毒灭菌后,冷却至 50 °C 左右。将培养 72 h 后的供试真菌用 0.005% 的吐温无菌水洗下真菌孢子,按比浊法^[5]配成 10⁵ cfu/mL 菌液。菌液按 1:10 加入适合供试菌生长的培养基中混匀后到入培养皿内,每皿倒 15~20 mL,琼脂厚约 0.25 cm。

1.3.3.3 抗真菌活性实验

无菌条件下,取 7 支无菌试管,分别加入 1 mL 正己烷,吸乌天麻挥发油 1 mL 放入 1 号管中,混匀后,取 1 mL 加入 2 号管,依次操作,至 6 号管取 1 mL 弃去,使天麻挥发油稀释成 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 的不同浓度,第 7 号管为阴性对照。用杯碟法进行抑菌实验,硝酸咪康唑的圆纸片作真菌的阳性对照,含正己烷的纸片为空白对照。28 °C 条件下培养,实验重复 3 次,计算抑菌圈大小和抑菌浓度。

2 结果与分析

2.1 乌天麻的挥发性成分种类及含量

乌天麻挥发性化学成分组分见图 1,各化学成分的峰面积相对百分含量见表 1。

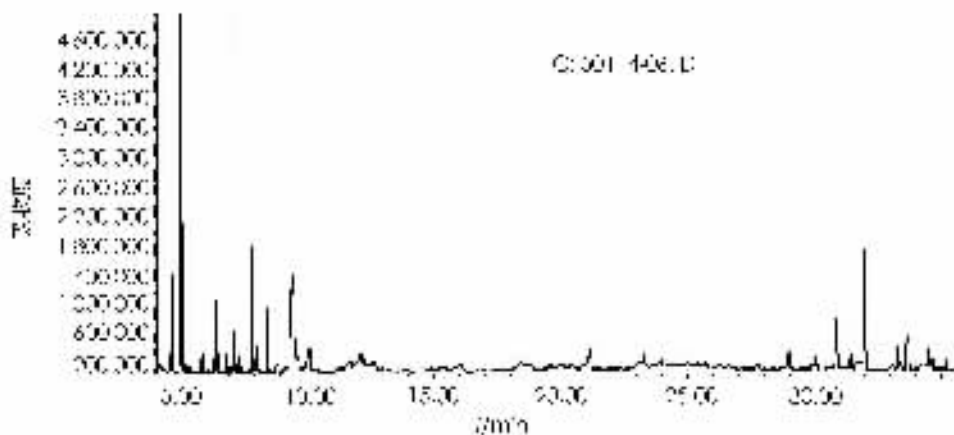


图 1 乌天麻的 GC/MS 图谱

乌天麻的挥发性成分中,共发现 36 种化学成分,其中 20 种是确定的成分,16 种是未知成分。已知成分含量占总质量的 76.392%。乌天麻挥发油中确定的成分含量较高的分别是 4-甲基-苯酚(20.409%)、苯乙烯(12.607%)、1-甲乙醚十六烷酸(8.842%)和芳香醚(6.038%),它们约占检出成分的 53.88%。含量在总质量 2%~5%之间的已知成分有:苯乙醛(5.379%)、对二甲苯(3.189%)、苯甲醛(3.118%)、2-戊基咪喃(2.264%)、α-雪松醇(2.016%)、棕榈酸乙酯(2.217%)。从大类上划分主要包含酯类、酚类、

萜类、芳烃类、醛类、醇类等 9 类物质. 未知的 16 种成分占总质量的 23.61%.

表 1 乌天麻挥发油的化学成分

峰序号	保留时间/min	化合物	分子式	分子量	含量/%
1	4.622	未知	未知	未知	0.278
2	4.702	对二甲苯	C ₈ H ₁₀	106	3.189
3	5.003	庚醛	C ₇ H ₁₄ O	114	0.435
4	5.071	苯乙烯	C ₈ H ₈	104	12.607
5	5.200	未知	未知	未知	0.584
6	5.887	α-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.693
7	6.324	未知	未知	未知	0.694
8	6.453	苯甲醛	C ₇ H ₆ O	106	3.118
9	6.833	1-辛烯-3-醇	C ₈ H ₁₆ O	128	1.135
10	7.128	2-戊基呋喃	C ₉ H ₁₄ O	138	2.264
11	7.392	未知	未知	未知	0.664
12	7.859	芳香醚	C ₈ H ₁₀ O	122	6.038
13	7.964	对伞花烃	C ₁₀ H ₁₄	134	0.650
14	8.068	柠檬烯	C ₁₀ H ₁₆	136	1.976
15	8.479	苯乙醛	C ₈ H ₈ O	120	5.379
16	8.848	未知	未知	未知	1.070
17	9.474	4-甲基-苯酚	C ₇ H ₈ O	108	20.409
18	10.058	未知	未知	未知	2.094
19	10.144	未知	未知	未知	2.094
20	11.698	未知	未知	未知	1.341
21	12.146	未知	未知	未知	2.324
22	12.269	萜品烯-4-醇	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.883
23	18.503	未知	未知	未知	1.037
24	21.151	未知	未知	未知	2.507
25	23.331	α-雪松醇	C ₁₅ H ₂₆ O	222	2.016
26	23.958	未知	未知	未知	1.173
27	28.963	未知	未知	未知	1.451
28	29.977	未知	未知	未知	1.298
29	30.063	棕榈酸甲酯	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	1.016
30	31.390	棕榈酸乙酯	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	2.217
31	31.666	未知	未知	未知	1.608
32	31.979	1-甲乙醚十六烷酸	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298	8.842
33	33.281	亚油酸甲酯	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294	1.962
34	34.510	未知	未知	未知	3.392
35	35.155	正二十二烷	C ₂₂ H ₄₆	310	0.792
36	36.893	正二十三烷	C ₂₃ H ₄₈	324	0.771
		已知成分总含量/%			76.392
		未知成分总含量/%			23.61

2.2 乌天麻挥发性油的抑菌作用

挥发性成分的初步抑菌结果见表 2. 结果显示, 乌天麻挥发油对部分真菌有较明显的抑菌作用, 如对米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、小麦纹枯病(*Rhizoctonia cerealis*)、茶轮斑病(*Pestalotiopsis theae*)的生长都有明显的抑制作用. 当挥发性油被稀释 1/2 和 1/4 倍时, 抑菌效果最好, 稀释倍数为 1/8 时, 抑菌活性有所下降, 稀释倍数小于 1/16 对任何真菌都无抑菌作用. 几种真菌的最佳抑菌作用相比较, 对米曲霉、黄曲霉的抑菌作用最明显, 抑菌圈直径为 8 mm, 和 2~5 mm. 对小麦纹枯病和茶轮斑病均有一定的抑制生长作用, 抑菌圈在 1~2 mm.

表 2 乌天麻挥发性成分抑菌效果

供试菌	稀释倍数						阳性对照
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
米曲霉	+++	+++	++	-	-	-	++++
黄曲霉	++	++	++	-	-	-	++++
小麦纹枯病	+	+	-	-	-	-	++++
茶轮斑病	+	+	+	-	-	-	+++
青霉	+	+	+	-	-	-	++++

注:++++: D(抑菌圈直径) ≥ 10 mm; +++: D=5~10 mm; ++: D=2~5 mm; +: D=1~2 mm; -: 无抑菌作用。

3 讨 论

3.1 乌天麻的挥发性成分分析

挥发油是植物中一类具有芳香气味的油状液体的总称,在植物界分布很广,如菊科、芸香科、伞形科的植物.乌天麻的挥发性成分组成与前人报道的植物挥发性成分相比,有明显的不同.即使与同一种不同变型的红天麻和绿天麻挥发性成分相比较(另文待发表),三种天麻挥发性成分中仅有 6 种共有成分.由于挥发性成分属于植物次生代谢产物,植物种类、生长环境、生理发育状况等都对次生代谢产物的种类、含量有显著的影响,因此,植物挥发性成分从组成种类上和含量上都有很大差异^[6].

天麻是名贵的中药材,具有较高的药用价值.而挥发油中的成分柠檬烯具有显著的镇咳和良好祛痰作用,同时对肺炎双球菌、甲型链球菌、卡他双球菌、金黄色葡萄球菌有很强的抑制作用^[7].通过对天麻挥发性成分的分析,将为中药制剂、药理、创制中成药新品种提供一定的依据.

3.2 乌天麻挥发性成分的抗菌活性

挥发油的抑菌和杀菌作用前人已有研究报道^[8,9].植物挥发性物质的许多组分具有抗菌活性,在抵御病原菌侵入和扩展的防卫策略中有潜在的生理功能.很多芳香性植物的挥发油对细菌和真菌生长都有抑制作用^[10].广藿香精油对新型隐球菌、球毛壳霉和短柄帚霉的生长有明显的抑制作用^[9].我们的抑菌实验结果也显示,乌天麻挥发油对米曲霉、黄曲霉、小麦纹枯病和茶轮斑病四种真菌有一定的抑制作用.有研究表明,挥发油中的萜类化合物是重要的抑菌成分之一^[11].在天麻的挥发油中也含有萜类物质,故其挥发油具有一定的抑菌作用,但由于萜类在天麻挥发性成分中相对含量不高,故抑菌的活性很有限.当然,植物挥发油中的其它成分如醛类、酮类和酚类等也参与了植物的抗菌作用,因此,有关天麻挥发性成分中的有效抗菌功效的成分还需作进一步的深入研究.

参考文献:

- [1] 冯孝章,陈玉武,杨峻山.天麻化学成分的研究[J].化学学报,1979,37(3):175-182.
- [2] 周 铨.天麻生活史[J].云南植物研究,1981,3(2):197-202.
- [3] 刘玉亭.天麻栽培技术[M].成都:四川人民出版社,1981.
- [4] 中国药典委员会.中国药典一部[S].北京:化学工业出版社,2000:151.
- [5] 周邦靖.常用中药的抗菌作用及其测定方法[M].重庆:科学技术文献出版社重庆社,1987:1-36.
- [6] 陈晓亚,叶和春.植物次生代谢及其调控.植物科学进展.第1卷[M].北京:高等教育出版社,1998:293-304.
- [7] 曾 明,李守汉,张 继,等.兰州油松皮挥发性成分分析[J].西北植物学报,2005,25(3):583-586.
- [8] Manenzhe N J, Potgieter N, Ree T V. Composition and antimicrobial activities of volatile components of *Lippia javanic* [J]. *Phytochemistry*, 2004: 2333-2336.
- [9] 苏镜娱,张广文,李 核,等.广藿香精油化学成分分析与抗菌活性研究(I)[J].中草药,2001,32(3):204-205.
- [10] 何培青,柳春燕,郝林华,等.植物挥发性物质与植物抗病防御反应[J].植物生理学通讯,2005,41(1):105-110.
- [11] 孙凌峰,陈 新.植物精油及萜类成分的生物活性[J].香料香精化妆品,1999,59(4):11-14.

Study on the Volatile Components from *Gastrodia elata* B1. f. *glauca* S. Chow and the Antibiotic Activities

GUAN Ping¹, SHI Jian-ming¹, GAO Yu-qiong²

1. School of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025;

2. Guizhou Institute of Biotechnology Research and Development, Guiyang 550002

Abstract: For the first time, the volatile constituents from the secondary protocorm of *Gastrodia elata* B1. f. *glauca* S. Chow were obtained by the steam distillation. The compounds were determined, and their relative quantities were calculated by GC-MS. According to their mass spectra and GC peak areas the constituents and the relative percentage of the volatile were identified and calculated, thirty-six volatile constituents were detected from *Gastrodia elata* B1. f. *glauca* S. Chow, 20 of which, accounting for approximately 76.392% of the oils, were identified, 4-methyl-phenol was found to be the most abundant component (20.409%). Other major chemical components were styrene (12.607%), 1-methylethyl ester-hexadecanoic acid (8.842%), P-methylanisole (6.038%). The test to inhibit bacterium with the volatile oil indicates that the volatile components of *Gastrodia elata* B1. f. *glauca* S. Chow shows an activity to inhibit *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia cerealis*, *Pestalotiopsis theae* and *Penicillium* sp. This study establishes a primary foundation to make more use of *Gastrodia elata* B1.

Key words: *Gastrodia elata* B1. f. *glauca* S. Chow; volatile constituent; GC-MS; antibiotic activities

责任编辑 胡 杨