

广藿香不同药用部位挥发油物质基础差异与抗白色念珠菌的相关性研究

王振强^{1,2}, 赵思蕾³, 余佳丽^{1,2}, 林美斯¹, 唐晓章¹, 曹科², 林大胜^{1,2*}

¹成都中医药大学药学院, 中药资源系统研究与开发利用省部级共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137;

²成都泰合健康科技股份有限公司, 成都 611731; ³四川工商职业技术学院酒类与食品工程系, 都江堰 611830

摘要: 为了阐明广藿香叶挥发油、地上部分挥发油及带根全株挥发油的物质基础差异与其抗白色念珠菌活性差异的相关性。采用 GC-MS 法建立指纹图谱, 对三组共有成分进行检识和聚类分析, 比较指纹图谱相似度, 分析物质基础差异; 用倍比稀释法测定其抗白色念珠菌活性, 用灰色关联分析法研究其谱效关系。结果表明, 除叶组外, 地上组与全株组聚类分析结果一致, 且指纹图谱相似度较好; 全株组除广藿香酮相对百分含量增幅较大以外, 其它成分种类及含量与地上组基本一致, 而叶组几乎不含广藿香酮; 抗白色念珠菌活性: 全株组 > 地上组 > 叶组; 广藿香酮与抗白色念珠菌活性相关度最高。由此可见, 如果将带根全株取代地上部分作为广藿香的药用部位, 不仅未改变原挥发油物质群, 而且提高了广藿香酮含量, 增加了抗白色念珠菌的效果。

关键词: 广藿香油; 不同药用部位; GC-MS; 广藿香酮; 抗白色念珠菌

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.5.009

Composition Differences of Volatile Oil from Different Parts of *Pogostemon cablin* and Its Correlation with Anti-fungus Activity Against *Candida Albicans*

WANG Zhen-qiang^{1,2}, ZHAO Si-lei³, YU Jia-li^{1,2}, LIN Mei-si¹, TANG Xiao-zhang¹, CAO Ke², LIN Da-sheng^{1,2*}

¹Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, The State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China; ²Chengdu Taihe Health Technology Group Inc., Ltd, Chengdu 611731, China; ³Wine and Food Engineering, Sichuan Technology and Business College, Dujiangyan 611830, China

Abstract: To elucidate the differences of material base of volatile oils from the leaves, aerial parts and whole part of *Pogostemonis* herba and its correlation with anti-*Candida albicans* activity. The fingerprints of volatile oils were established by GC-MS. The common peaks of the three oils were relatively recognized and cluster analyzed by SPSS software to compare the fingerprint similarity and analyze of material differences. The anti-*C. albicans* activity was detected by double dilution method and the correlation with fingerprint was identified by grey relational analysis. The cluster analysis of the other two oils was found to be divided into the same categories and the similarities were perfectly correlated, except for the oil of leaves. Comparing with the aerial part, the whole plants had almost no change in the types and contents of the components except the drastically enhancing of patchoulone. The oil of leaves contained no patchoulone. The efficacy order of anti-*C. albicans* was as follows: the oil of whole part > the oil of aerial parts > the oil of leaves, and patchoulone had the highest correlation with anti-*C. albicans* activity. In conclusion, the use of the whole plant instead of the aerial parts of *P. cablin* did not change the original components of the volatile oil, but increased the patchoulone content. Furthermore, it also improved the effect of anti-*C. albicans* effect.

Key words: patchouli oil; different medicinal parts; GC-MS; patchoulone; anti-*Candida albicans*

广藿香是唇形科植物 *Pogostemon cablin* (Blan-

co) Benth. 的干燥地上部分, 为临床常用的芳香化湿药^[1], 原产于东南亚地区, 现我国广东、广西、海南与福建等地均有栽培。广藿香油为广藿香药材干燥地上部分经水蒸气蒸馏提取的挥发油^[1]。现代研究表明, 广藿香油具有多种药理作用, 包括抗

收稿日期: 2016-12-29 接受日期: 2017-03-22

基金项目: 四川省重大产业技术创新项目 (2015PT024); 四川省科技支撑计划 (2011SZ0318)

* 通信作者 E-mail: hoistlds@vip.sina.com

菌^[2,3]、驱虫^[4]、抗氧化^[5]、免疫调节^[6]等。广藿香油的应用比较广泛,除了入药“藿香正气水(软胶囊、丸)”等品种外。广藿香油还作为医药工业和轻化工业的生产原料被广泛运用于化妆品、杀虫剂等日常生活用品^[7,8]。结合课题组前期研究及现有文献研究表明,广藿香油中百秋李醇(广藿香醇)和广藿香酮为其主要抗菌药效成分^[9]。此外,广藿香酮还具明显的抗真菌活性,其中对于白色念珠菌的效果较优^[10]。在对广藿香质量评价的传统经验中,广藿香药材质量与广藿香酮含量密切相关,即广藿香酮含量高者其质量更优^[11]。广藿香酮主要分布于广藿香药材的茎及地下部分^[12,13](以根与根茎中含量最高),但是,历版《中国药典》均未将地下部分作为广藿香油提取的药用部位,而且在采收过程中需人工切除根茎。因此,为了扩大广藿香药材的药用部位,提高资源利用度,提升广藿香油内在质量,本文通过比较分析 14 批广藿香叶挥发油(叶组)、地上部分挥发油(地上组)与 14 批带根全株挥发油(全株组)GC-MS 指纹图谱,拟从整体角度表征广藿香不同药用部位挥发油的物质基础差异;同时采用倍比稀释法对广藿香不同药用部位挥发油抗白色念珠菌作用进行研究,采用灰色关联度统计分析方法进行“谱-效关系”研究^[14],探讨广藿香油共有峰代

表的有效成分对其抗白色念珠菌作用的贡献大小,为广藿香油的质量控制提供一定的理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

气相色谱-质谱联用仪(Agilent 7890A/5975C);Mettler Toledo 分析电子天平(Mettler Toledo 分析仪器有限公司);电热套(ZOHW 型,北京中兴伟业仪器有限公司);挥发油提取器(成都亚荣有限公司)。上海申安立式自动电热压力蒸汽灭菌器(LDZX-40SBI);4℃冰箱(美菱 BCD-225CH);优普系列超纯水器(成都超纯科技有限公司);节能净化工作台(成都新光非兰特净化工程有限公司)。

1.2 材料

正己烷(分析纯,成都市科龙化工试剂厂);无水硫酸钠(分析纯,成都市科龙化工试剂厂);二甲亚砜(Sigma);沙氏琼脂培养基(广东环凯微生物科技);RPMI-1640 液体培养基(Gbico BRL);96 孔细胞培养板(Nest Biotech);14 批广藿香药材采收时间、地点及批号见表 1。经成都中医药大学药学院蒋桂华副教授鉴定为唇形科植物 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 广藿香的全株。白色念珠菌(*Candida albicans*)4 株。

表 1 广藿香药材来源
Table 1 Sources of *P. cablin*

编号 No.	产地 Place of origin	采收时间 Harvesting Time	批号 Batch
1	广东韶关 始兴县 沈所镇 新屋场村	2015 年 9 月	20150901
2	江西赣州 全南县 龙源坝镇 寨下村	2015 年 9 月	20150902
3	广东阳春 潭水镇 高尧村(印尼种)	2015 年 9 月	20150903
4	广东阳春 潭水镇 高尧村	2015 年 9 月	20150904
5	广东阳春 潭水镇 尧垌村	2015 年 8 月	20150905
6	广东阳春 潭水镇 三塘村	2015 年 9 月	20150906
7	广东阳春 潭水镇 场南村	2015 年 9 月	20150907
8	广东阳春 潭水镇 荆山村	2015 年 9 月	20150908
9	广东阳春 马水镇 马兰村	2015 年 9 月	20150910
10	广东阳春 三甲镇 庞洞古山村	2015 年 9 月	20150911
11	广东阳春 三甲镇 中寮村	2015 年 9 月	20150912
12	广东阳春 三甲镇 罗村	2015 年 9 月	20150913
13	广东阳春 山坪镇 京冲村	2015 年 9 月	20150914
14	广东湛江 覃斗镇 凌新村	2015 年 9 月	20150915

2 方法与结果

2.1 挥发油样品提取

2.1.1 广藿香药材叶挥发油

参照 2015 年版《中国药典》四部挥发油测定方法甲法,提取各组广藿香挥发油。14 批广藿香叶充分干燥后,称取各批次净药材 200 g,置于 20000 mL 圆底烧瓶中,加入 12 倍量水,浸泡 3 h 后,加热并保持微沸状态 6 h,提取挥发油,提取物为淡黄色有特殊气味的油状液体,加入适量无水硫酸钠除去多余水分,即得各组挥发油样品,冷藏备用。

2.1.2 广藿香药材地上部分挥发油

按“2.1.1”项下方法,14 批广藿香药材地上部分充分干燥后,切粗段,按比例(叶/茎 = 3:5)分别称取各批次净药材 200 g,同法提取挥发油,提取物为淡黄色有特殊气味的油状液体,加入适量无水硫酸钠除去多余水分,即得各组挥发油样品,冷藏备用。

2.1.3 广藿香药材带根全株挥发油

按“2.1.1”项下方法,14 批广藿香带根全株药材充分干燥后,切粗段,按比例(叶/茎/根 = 3:5:1)分别称取各批次净药材 200 g,同法提取挥发油,提取物为淡黄色有特殊气味的油状液体,加入适量无水硫酸钠除去多余水分,即得各组挥发油样品,冷藏备用。

2.2 供试品溶液的配制

取挥发油样品约 0.1 g,精密称定,置 25 mL 量瓶中,用正己烷溶解并稀释至刻度,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 GC-MS 条件

气相色谱仪为 Agilent 7890A,色谱柱为 HP-5 石英毛细管色谱柱(30 m \times 320 mm \times 0.25 μm),柱温为程序升温:初始温度 100 $^{\circ}\text{C}$,以每分钟 1 $^{\circ}\text{C}$ 的速度升温至 125 $^{\circ}\text{C}$,保持 15 min,以每分钟 6 $^{\circ}\text{C}$ 的速度升温至 140 $^{\circ}\text{C}$,保持 15 min,再以每分钟 20 $^{\circ}\text{C}$ 的速度升温至 280 $^{\circ}\text{C}$;进样口温度为 280 $^{\circ}\text{C}$;流速 1.2 mL/min;分流比 100:1;进样量 1 μL ;载气为高纯度氦气。EI 电离源,离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$,电子能量 70 eV;扫描质量范围 m/z 50 ~ 500;质谱检索标准库: NIST MS search 2.0。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度的试验

取同一批广藿香带根全株药材约 200 g,按

“2.1”项下方法提取挥发油,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下方法测定,连续进样 6 次,选择 14 个主要色谱峰进行比较,结果各主色谱峰相对保留时间 RSD < 1.17%,相对峰面积 RSD < 2.43%,说明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验

取同一批广藿香带根全株药材约 200 g,按“2.1”项下方法提取挥发油,按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.3”项下方法测定,结果各主色谱峰相对保留时间 RSD < 1.94%,相对峰面积 RSD < 2.87%,说明该实验方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验

取同一份供试品溶液,分别于 0、3、6、9、12、24 h,按“2.3”项下方法测定,结果各主色谱峰相对保留时间 RSD < 1.84%,相对峰面积 RSD < 2.88%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 指纹图谱分析

2.5.1 指纹峰的指认

14 批广藿香叶挥发油样品、14 批广藿香地上部分挥发油样品与 14 批广藿香带根全株挥发油样品。按“2.2”项下方法分别配制成供试品溶液,并按“2.3”项下色谱条件,进行 GC-MS 检测分析,重复进样两次。将广藿香叶组、地上组与全株组挥发油所得的谱图参数进行对比分析,三组供试品共有峰数分别为 35、36、35 个。三组谱图数据经 NIST MS Search 2.0 数据库自动检索,结合标准图谱对照,人工谱图解析,以及与相关文献对比,对其基峰、质荷比、相对丰度等谱图数据进行直观比较与分析,并鉴定各化合物,采用面积归一化法,确定 42 份广藿香油样品中各共有组分的相对百分含量,并分别计算叶组、地上组与全株组中各共有成分的平均相对百分含量,结果见表 2。

由表 2 数据可见,从广藿香叶组、广藿香地上组与全株组挥发油中共分离鉴定出 22 种化合物,其中平均相对百分含量达到 5% 以上的共有成分为 α -愈创木烯(叶组 6.40%,地上组 7.12%,全株组 5.60%)、 α -布黎烯(叶组 6.06%,地上组 6.67%,全株组 5.04%)、百秋李醇(叶组 60.90%,地上组 57.13%,全株组 54.96%)、广藿香酮(叶组 0.00%,地上组 5.15%,全株组 7.15%)。平均相对百分含量为 1% ~ 5% 的共有成分主要有 β -广藿香烯(叶组 1.32%,地上组 1.28%,全株组 1.64%)、 β -石竹烯(叶组 1.12%,地上组 1.33%,全株组 1.00%)、 α -

广藿香烯(叶组 2.13%,地上组 2.33%,全株组 1.36%)、25号(叶组 1.73%,地上组 1.79%)以及16号(叶组 1.73%,地上组 2.55%,全株组 1.53%)、26号(叶组 1.27%,地上组 2.37%)、20号(叶组 1.24%,地上组 1.33%,全株组 1.06%)、全株组 1.18%)。

表2 广藿香叶组、地上组与全株组挥发油共有成分及平均相对百分含量

Table 2 Common constitutions and their relative contents in volatile oil from the leaves, aerial parts and whole plant of *P. cablin*

编号 No.	<i>t</i> (min)	化合物 Compound	分子式 Molecular Formula	相对 分子量 MW	平均相对百分含量 Average relative percentage(%)		
					叶组 Leaf	地上组 Aerial parts	全株组 Whole plant
1	14.073	β -广藿香烯 β -Patchoulene	C ₁₅ H ₂₄	204.35	1.32	1.28	1.64
2	14.715	β -榄香烯 β -Elemene	C ₁₅ H ₂₄	204.35	0.70	0.86	0.61
3	15.651	α -石竹烯 α -Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	204.35	0.21	0.23	0.20
4	16.319	β -石竹烯 β -Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	204.35	1.12	1.33	1.00
5	17.640	α -愈创木烯 α -Guaiene	C ₁₅ H ₂₄	204.35	6.40	7.12	5.60
6	18.566	α -广藿香烯 α -Patchoulene	C ₁₅ H ₂₄	204.35	2.13	2.33	1.79
7	18.823	(+)-环蒜头烯 (+)-Cyclosativene	C ₁₅ H ₂₄	204.35	0.99	1.06	0.88
8	19.502	[1R-(1R*,4Z,9S*)]-4,11,11-trimethyl-8-methylene-Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene,	C ₁₅ H ₂₄	204.35	0.13	0.19	0.12
9	20.219	1a,2,3,5,6,7,7a,7b-octahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1aR-(1a α ,7 α ,7a β ,7b α)]-1H-Cycloprop[e]azulene	C ₁₅ H ₂₄	204.35	0.19	0.23	0.17
10	21.058	γ -广藿香烯 γ -Patchoulene	C ₁₅ H ₂₄	204.35	0.28	0.24	0.19
11	21.288	δ -蛇床烯 δ -Selinene	C ₁₅ H ₂₄	204.35	0.14	0.17	0.13
12	21.855	石竹烯-(II) Caryophyllene-(II)	C ₁₅ H ₂₄	204.35	1.21	1.22	0.85
13	22.417	α -布黎烯 α -Bulnesene	C ₁₅ H ₂₄	204.35	6.06	6.67	5.04
14	23.085	Selina-3,7(11)-diene	C ₁₅ H ₂₄	204.35	0.16	0.17	0.14
15	24.524	脱氢香橙烯 dehydro-aromadendrene	C ₁₅ H ₂₂	202.17	0.48	0.26	0.33
16	25.760	未鉴定	-	-	1.73	2.55	2.37
17	27.359	未鉴定	-	-	0.17	0.16	0.18
18	27.915	未鉴定	-	-	0.70	0.43	0.67
19	28.429	氧化石竹烯 oxide Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄ O	220.18	0.89	0.65	0.90
20	29.156	未鉴定	-	-	1.24	1.33	1.36
21	30.632	未鉴定	-	-	0.29	0.45	0.40
22	31.044	未鉴定	-	-	0.30	0.22	0.28
23	31.911	未鉴定	-	-	0.90	0.79	0.78
24	32.413	未鉴定	-	-	0.81	0.76	0.72
25	33.237	未鉴定	-	-	1.73	1.53	1.58
26	34.157	decahydro-4a-methyl-1-naphthalene	C ₁₅ H ₂₄	204.35	1.27	1.06	1.18
27	36.906	百秋李醇 Patchouli alcohol	C ₁₅ H ₂₆ O	222.37	60.90	57.13	54.96
28	40.821	未鉴定	-	-	0.50	0.41	0.50
29	41.105	未鉴定	-	-	0.22	0.22	-
30	42.629	未鉴定	-	-	0.19	0.15	0.18
31	43.383	未鉴定	-	-	0.61	0.43	0.55
32	44.656	广藿香酮 Pogostone	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	224.25		5.15	7.15
33	45.582	法呢醇 Farnesol	C ₁₅ H ₂₆ O	222.37	0.86	0.86	0.69
34	47.507	3,7,11-trimethyl-2,6,10-Dodecatrienal	C ₁₅ H ₂₄ O	220.35	0.25	0.24	0.19
35	48.860	未鉴定	-	-	0.51	0.31	0.42
36	50.214	未鉴定	-	-	0.40	0.23	0.36

注:“-”未知或其量为0。

Note:“-” unknown or no content.

2.5.2 系统聚类分析

运用“SPSS”软件,将广藿香叶组、地上组与全株组挥发油指纹图谱的共有峰峰面积作为变量导入,进行系统聚类分析(Hierarchical Cluster),采用组间联接法(Between-group link-age),以夹角余弦

(Cosine)作为样品测度,其聚类分析谱系图见图1,分类结果见表3。地上组与全株组聚类分析结果一致,分别将样品分为3类:I类,3号样品(印尼种);II类,9号样品;III类,其它样品。叶组样品可分为三类:I类,3号样品;II类,1、2、8号样品;III类,其它样品。

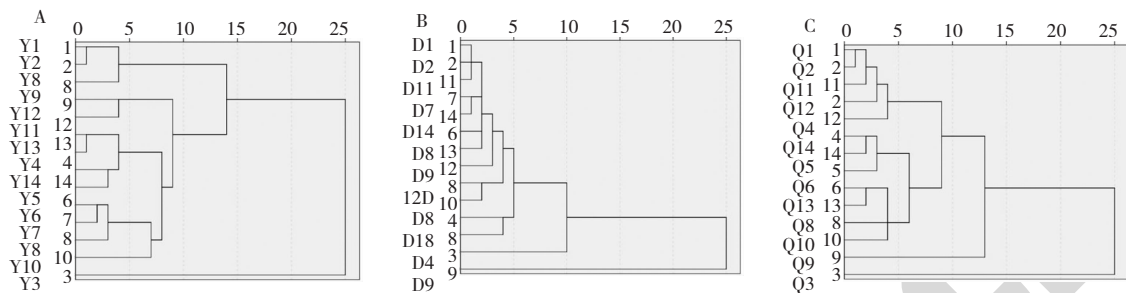


图1 广藿香叶组(A)、地上组(B)、全株组(C)指纹图谱聚类分析谱系图

Fig. 1 Cluster analysis dendritic diagram of fingerprint of Leaf Group(A), Aerial Parts Group(B) and Whole Plant Group(C) of *P. cablin*

表3 聚类分析样品分类表

Table 3 Samples classification after clustering

组别 Group	类别 Category		
	I	II	III
叶组 Leaf Group	3号样品(印尼种) No. 3	1、2、8号样品 No. 1、2、8	其它 Others
地上组 Aerial Parts Group	3号样品(印尼种) No. 3	9号样品 No. 9	其它 Others
全株组 Whole Plant Group	3号样品(印尼种) No. 3	9号样品 No. 9	其它 Others

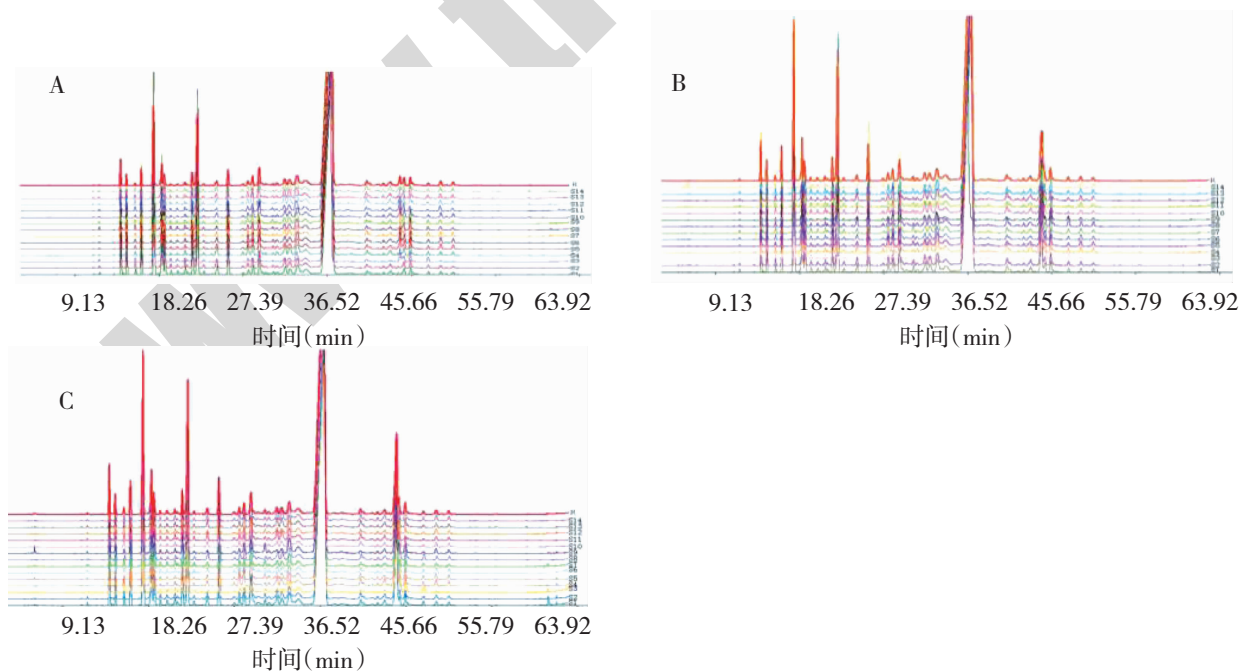


图2 广藿香叶组(A)、地上组(B)、全株组(C)的挥发油GC-MS指纹图谱及各自对照图谱(R)

Fig. 2 GC-MS fingerprint of volatile oil from Leaf Group(A), Aerial Parts Group(B) and Whole Plant Group(C) of *P. cablin* and each reference fingerprint(R)

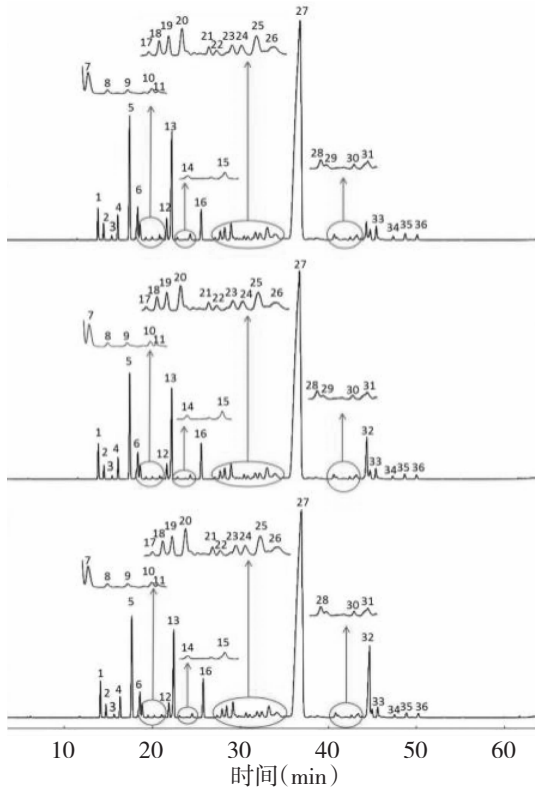


图3 广藿香叶挥发油(A)、广藿香地上部分挥发油(B)与广藿香带根全株挥发油(C)的GC-MS指纹图谱(共有峰编号参照表2)

Fig. 3 GC-MS fingerprint of volatile oil from Leaf Group (A), Aerial Parts Group (B) and Whole Plant Group (C) of *P. cablin* (serial numbers of common peaks refer to Table 2)

2.5.3 指纹图谱的生成

将广藿香叶组、地上组与全株组挥发油的GC-MS谱图数据,导入“中药色谱指纹图谱相似度评价

系统2004A版”软件,分别生成广藿香叶组挥发油指纹图谱(图2A)、广藿香地上组挥发油指纹图谱(图2B)与广藿香全株组挥发油指纹图谱(图2C),其对应共有峰见图3。

2.5.4 指纹图谱相似度评价

采用中位数法,分别计算三组供试品的指纹图谱相似度,结果见表4,其相似度均在90%~100%之间,均未发现离群样本,符合国家药品监督管理局对中药指纹图谱相似度评价的要求。

2.5.5 指纹图谱比较分析

广藿香叶组挥发油S1~S14的指纹图谱(图2-A)共含35个共有峰(图3-A),占总峰面积的94.33%~97.13%;广藿香地上组挥发油S1~S14的指纹图谱(图2-B),共含36个共有峰(图3-B),占总峰面积的96.45%~98.82%;广藿香全株组S1~S14挥发油的指纹图谱(图2-C),共含35个共有峰(图3-C),占总峰面积的93.82%~96.53%。与地上组挥发油物质基础相比较,叶组有35个重合的共有峰,缺失32号共有峰(广藿香酮);全株组挥发油有35个重合共有峰,仅缺失含量较小的29号共有峰。

此外,与地上组相比,全株组物质群中,百秋李醇的平均相对百分含量减少1.75%,广藿香酮的平均相对百分含量提高38.83%。各批次供试品中百秋李醇、广藿香酮相对百分含量数据见表5。

2.6 体外药敏试验

2.6.1 受试菌茵悬液制备

实验前,用接种圈从4℃保存的沙氏琼脂固体培养基上,挑取上述菌株少量至RPMI-1640培养液中,30℃培养48h,使真菌处于指数生长期。采用

表4 广藿香叶、地上部分和带根全株挥发油GC-MS指纹图谱相似度

Table 4 Similarity of volatile oil from Leaf Group, Aerial Parts Group and Whole Plant Group of *P. cablin* by GC-MS fingerprint

编号 No.	相似度 Similarity			编号 No.	相似度 Similarity		
	叶组 Leaf Group	地上组 Aerial Parts Group	全株组 Whole Plant Group		叶组 Leaf Group	地上组 Aerial Parts Group	全株组 Whole Plant Group
1	0.993	0.999	0.989	8	0.989	0.988	0.988
2	0.990	0.998	0.993	9	0.999	0.999	0.997
3	0.985	0.975	0.972	10	0.995	0.999	0.984
4	0.999	0.999	0.994	11	0.999	0.990	0.996
5	0.999	0.998	0.993	12	0.986	0.998	0.993
6	0.997	0.991	0.989	13	0.999	0.999	0.994
7	0.999	0.998	0.990	14	0.999	0.999	0.997

表5 广藿香叶组、地上组和全株组挥发油中百秋李醇与广藿香酮平均相对百分含量

Table 5 The average relative percentage of patchouli alcohol and patchoulenone in volatile oil from the Leaf Group, Aerial Parts Group and Whole Plant Group of *P. cablin*

叶组 Leaf Group	相对百分含量 Relative content(%)		地上组 Aerial Parts Group	相对百分含量 Relative content(%)		全株组 Whole Plant Group	相对百分含量 Relative content(%)	
	百秋李醇 Patchouli alcohol	广藿香酮 Pogostone		百秋李醇 Patchouli alcohol	广藿香酮 Pogostone		百秋李醇 Patchouli alcohol	广藿香酮 Pogostone
1	58.30	-	1	56.12	3.34	1	50.91	7.13
2	56.79	-	2	55.08	4.02	2	54.82	6.62
3	60.81	-	3	53.75	12.32	3	53.06	13.73
4	61.75	-	4	58.18	4.03	4	56.17	6.34
5	61.95	-	5	62.21	3.40	5	58.80	6.64
6	62.89	-	6	55.90	7.39	6	57.38	7.49
7	60.31	-	7	56.70	4.42	7	49.88	4.97
8	58.53	-	8	53.21	8.21	8	52.79	8.19
9	63.53	-	9	60.16	3.69	9	55.69	7.72
10	66.58	-	10	64.23	4.78	10	53.97	9.93
11	59.16	-	11	56.89	2.44	11	54.41	4.58
12	62.36	-	12	54.20	7.16	12	57.24	6.67
13	59.49	-	13	56.10	4.84	13	55.61	5.94
14	60.15	-	14	57.08	2.12	14	58.64	4.09
平均值 Average	60.90	-	平均值 Average	57.13	5.15	平均值 Average	54.96	7.15

红细胞计数板计数,以 RPMI-1640 培养液调整菌悬液浓度至 5×10^3 CFU/mL。

2.6.2 最小抑菌浓度(MIC)测定

取无菌 96 孔板,于每排 1 号孔加入 RPMI 1640 培养基 100 μ L 作空白对照;2 号孔分别加菌悬液和受试药物,菌悬液和受试药物的总体积为 200 μ L;3 ~ 12 号孔各加新鲜配置的菌悬液 100 μ L。2 ~ 11 号孔逐级倍比稀释,12 号孔只加菌悬液 100 μ L,不含药物,作为阳性对照。取混合液 100 μ L 分别加入 96 孔板中。使得各孔的药物(广藿叶油、广藿香地上部分油或广藿香全株油)最终浓度依次为 500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.813、3.906、1.953 μ g/mL。将各药板置于 35 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h 后,与对照组比较,观察药物对受试菌的生长抑制情况,肉眼观察无浑浊者,每个样品重复 3 次,取平均值,即为受试菌的最小抑菌浓度(MIC)。

2.6.3 结果判定

广藿香不同药用部位挥发油的抗白色念珠菌 MIC 值见表 6。结果显示,各部位的抗白念珠菌活性大小:带根全株 > 地上部分 > 叶,广藿香带根全株

挥发油抗白色念珠菌效果最强,传统药用部位地上部分挥发油抗白色念珠菌效果略低,而叶油抗白色念珠菌效果不明显。

2.7 广藿香不同药用部位挥发油物质群差异与其抗白色念珠菌活性的灰色关联度分析

2.7.1 关联度计算

2.7.1.1 绝对差序列计算

将原始数据采用均值变换法处理。以 MIC 值作为母序列 $X_0(k)$,选择了含量大于 1% 的 8 个峰百分含量作为子序列 $X_i(k)$ 。然后求绝对差序列 $\Delta_{oi}(k) = |X_0(k) - X_i(k)|$ 。

2.7.1.2 求关联系数

关联系数反映 2 个被比较序列的靠近程度。母序列 $\{X_0(k)\}$ 与子序列 $\{X_i(k)\}$ 的关联系数 $Loi(k)$ 由以下公式计算可得。其中 $\min \min \Delta_{oi}(k)$ 为二级最小差; $\max \max \Delta_{oi}(k)$ 为二级最大差; ρ 为分辨系数。

$$Loi(k) = \frac{\min \min \Delta_{oi}(k) + \rho \max \max \Delta_{oi}(k)}{(\Delta_{oi}(k) + \rho \max \max \Delta_{oi}(k))}$$

表6 广藿香叶、地上部分和带根全株挥发油抗白色念珠菌的 MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)Table 6 The anti-*C. albicans* MIC value of volatile oil from the Leaf Group, Aerial Parts Group and Whole Plant Group of *P. cablin*($\mu\text{g}/\text{mL}$)

组别 Group	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	CMCC98001	B1	B2	B4
叶组 Leaf Group	500	500	500	500
地上组 Aerial Parts Group	62.50	125	125	125
全株组 Whole Plant Group	31.25	62.5	62.5	62.5

2.7.1.3 求关联度

各类关联系数的平均值。

2.7.1.4 关联序

将各子序列对同一母序列的关联度按大小顺序。

2.7.2 结果

广藿香不同药用部位挥发油物质基础差异与其

抗白色念珠菌活性的 MIC 值关联序见表 7。实验结果表明:广藿香酮与抗白色念珠菌活性效果贡献最相关;而百秋李醇与抗白色念珠菌活性效果关联度较低。主要物质群抗白色念珠菌活性效果关联程度(以峰号表示该峰代表的化学物质)为 $32 > 1 > 16 > 27 > 5 > 4 > 6 > 13$ 。

表7 广藿香叶、地上部分和带根全株挥发油指纹特征与 MIC 值的关联序

Table 7 Relational order of volatile oil from the Leaf Group, Aerial Parts Group and Whole Plant Group of *P. cablin* components fingerprint with the MIC value

关联序 Relational order	峰号 Peak No.	名称 Compound	关联度 Correlation
1	32	广藿香酮 Pogostone	0.765714882
2	1	β -广藿香烯 β -Patchoulene	0.67808886
3	16	-	0.669880299
4	27	百秋李醇 Patchouli alcohol	0.630561446
5	5	α -愈创木烯 α -Guaiene	0.617952637
6	4	β -石竹烯 β -Caryophyllene	0.617897442
7	6	α -广藿香烯 α -Patchoulene	0.613655162
8	13	α -布黎烯 α -Bulnesene	0.612139868

3 讨论与结论

本实验收集了 14 批不同产地的广藿香药材,分别建立了广藿香叶挥发油、地上部分挥发油及带根全株挥发油的 GC-MS 指纹图谱,为广藿香油的质量控制提供了一定的依据。通过调查发现,目前市售广藿香油一般采用广藿香叶提取。由指纹图谱结果分析可知:与地上组相比,叶组挥发油中缺失主要有效成分广藿香酮,而百秋李醇和广藿香酮均为广藿香油的主要抗菌药效成分,这说明市售挥发油的品质较次。但是,在广藿香油的测定项目中,2015 版《中国药典》仅规定百秋李醇含量不低于 26% 即可,无广藿香酮含量测定。如果采用药典广藿香油标准对于市售广藿香油进行质量评价,会忽略广藿香叶

油品质较低这一事实。所以,在对广藿香油进行质量控制时,应考虑增加广藿香酮的含量测定项目,建立对广藿香油两个主要药效成分进行测定的方法和标准,从而达到全面控制广藿香油品质的目的。

广藿香不同药用部位挥发油抗白色念珠菌实验结果和灰色关联度的分析结果可知:广藿香油抗白色念珠菌活性与其提取所用药用部位密切相关,且广藿香酮的含量决定了广藿香油抗白色念珠菌活性效果。结合地上部分和全株挥发油的指纹图谱对比结果可知:广藿香地下部分药材的加入,对于提取广藿香油而言,益大于弊。因此,可以考虑将“带根全株”作为广藿香药材提取挥发油的药用部位,这样不仅没有改变原有挥发油物质群的整体特征,还扩大了广藿香药材的药用部位,提高了广藿香油中广

藿香酮药效成分的含量,增强了抗白念珠菌的效果。同时增加了广藿香药材的资源利用度,降低了采收过程去根的人工成本。具有较好的科学性与合理性。课题组后续将对广藿香的地下部分挥发油做详细的化学与药理探究。通过和现行常用药如藿香正气水的相关药理进行研究。以期发现其成分以及相应的药理活性的差异。为扩大药用部位提供更多理论和数据支撑。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 45:397.
- 2 Wan F(万峰), Peng C(彭成), Cao XY(曹小玉), et al. Antibacterial activity and mechanism of essential oil from *Pogostemon cablin* against *Staphylococcus aureus*. *Chin Tradit Patent Med*(中成药), 2014, 36:1376-1381.
- 3 Dai M, Peng C, Wan F, et al. Antibacterial activity and mechanism of *Pogostemon cablin* against bacteria from milk of dairy cows suffering with mastitis. *J Anim Vet Adv*, 2012, 11:3289-3297.
- 4 Gokulakrishnan J, Kuppasamy E, Shanmugam D, et al. Pupicidal and repellent activities of *Pogostemon cablin* essential oil chemical compounds against medically important human vector mosquitoes. *Asian Pac J Trop Med*, 2013, 3:26-31.
- 5 Hussin N, Mondello L, Costa R, et al. Quantitative and physical evaluation of patchouli essential oils obtained from different sources of *Pogostemon cablin*. *Nat Prod Commun*, 2012, 7:927.
- 6 Qi SS(齐珊珊), Hu LP(胡丽萍), Chen WN(陈文娜), et al. Immunological regulation effects of essential oil in leaves

of *cablin patchouli herb* on mice. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2009, 27:774.

- 7 Paul A, Thapa G, Basu A, et al. Rapid plant regeneration, analysis of genetic fidelity and essential aromatic oil content of micropropagated plants of Patchouli, *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. An industrially important aromatic plant. *Ind Crops Prod*, 2010, 32:366-374.
- 8 Jia XL(贾旭玲), Xu S(徐三), Shi F(施芬), et al. Research progress of *Pogostemon cablin*. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2010, 28:2442-2444.
- 9 Zhao SL(赵思蕾), Xiong L(熊亮), Wang ZQ(王振强), et al. Analysis of main antibacterial components in patchouli oil based on constituent knock-out/knock-in. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28:707-712.
- 10 Li Y, Liang H, Chen H, et al. Anti-*Candida Albicans* activity and pharmacokinetics of pogostone isolated from *Pogostemonis Herba*. *Phytomedicine*, 2012, 20:77-83.
- 11 Luo JP(罗集鹏), Feng YF(冯毅凡), He B(何冰), et al. 广藿香的道地性研究. *Chin Med Mat*(中药材), 2005, 28:1121-1125.
- 12 Chen XH(陈秀华), Liu Q(刘强), Chen XX(陈兴兴), et al. Analysis and comparison of the volatile oil from different parts of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth by GC-MS. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med* (辽宁中医药大学学报), 2008, 10:127-128.
- 13 Luo JP(罗集鹏), Feng YF(冯毅凡), Guo XL(郭晓玲). Studies on volatile oil of root and Rhizome of Herba *Pogostemonis*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 12:66-70.
- 14 Zhu ST(朱诗塔), Lei P(雷鹏), Li X(李新), et al. Grey relational analysis fingerprint and hemostatic function of *Rheum palmatum* L. *Central South Pharm* (中南药学), 2009, 7:55-58.

(上接第 740 页)

- 25 Qi YX, Liu YB, Rong WH. RNA-Seq and its applications: a new technology for transcriptomics. *Hereditas (Beijing)*, 2011, 33:1191-1202.
- 26 Baucher M, Monties B, Boerjan W, et al. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit Rev Plant Sci*, 1998, 12:125-197.

- 27 Chen YZ(陈永忠), Tan XF(谭晓风), David C. Lignin biosynthesis and genetic regulation. *Jiangxi Acta Agri Univ*, 2003, 25:613-617.
- 28 Li L, Popko JL, Umezawa T, et al. 5-Hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringylmonolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in angiosperms. *J Biol Chem*, 2000, 275:6537-6545.