

基于谱效关联分析挖掘艾叶挥发油抑菌的质量标志物

刘昱¹, 胡琦¹, 贺亚男¹, 江燕², 吴佳颖¹, 杨昕³, 张定堃^{1*}, 杨明^{4*}

¹成都中医药大学药学院, 成都 611137; ²四川省药品检验研究院, 成都 610097;

³四川省天府香疗健康技术研究院, 彭州 611900; ⁴江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004

摘要: 基于谱效关联分析筛选艾叶挥发油抑菌活性的质量标志物(Q-markers)。采用水蒸气蒸馏法提取得到艾叶挥发油, 选择气相-质谱联用仪(GC-MS)构建15批艾叶挥发油样品的指纹图谱, 进行热图、聚类分析; 检测不同批次艾叶挥发油对白色念珠菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌活性; 并采用灰色关联分析及单体成分验证实验筛选艾叶挥发油质量标志物。GC-MS检测鉴定出49种化学成分, 主要为单萜类、倍半萜类及其氧化物。指纹图谱筛选出17个共有峰, 包括桉树脑、樟脑和龙脑等, 相似度在0.96~0.99。聚类分析结果可将不同产区艾叶分为两类。相对含量较高且热图显示差异较大的成分有桉树脑、樟脑、龙脑、松油醇。15批次艾叶挥发油对白色念珠菌抑菌圈在9.00~11.56 mm; 对大肠杆菌的抑菌圈在9.33~12.44 mm; 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈在9.33~12.89 mm。灰色关联分析结果表明艾叶挥发油抑菌活性的潜在质量标志物是桉树脑、樟脑和龙脑。单体抑菌实验结果表明除桉树脑外与灰色关联分析结果基本一致。因此筛选出艾叶挥发油抑菌活性的质量标志物为樟脑和龙脑。

关键词: 艾叶; 挥发油; 灰色关联分析; 抑菌; 质量标志物

中图分类号: R282.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)6-1017-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.6.011

Screening quality markers for antibacterial activity of *Artemisia argyi* leaves essential oil based on spectrum-effect relationships

LIU Yu¹, HU Qi¹, HE Ya-nan¹, JIANG Yan², WU Jia-ying¹, YANG Xin³, ZHANG Ding-kun^{1*}, YANG Ming^{4*}

¹School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

²Sichuan Institute of Drug Laboratory, Chengdu 610097, China;

³Sichuan Tianfu Health Technology Research Institute, Pengzhou 611900, China;

⁴Key Laboratory Modern Preparation Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: This study aims to screen for antimicrobial Q-markers of *Artemisia argyi* Levl. et Vant. essential oil based on spectrum-effect relationships. The *A. argyi* essential oil was extracted by steam distillation method. The fingerprint of 15 batches samples was constructed by gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS), and then the heat map and cluster analysis were performed. The antibacterial activities of different batches of *A. argyi* essential oil against *Candida albicans*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were detected. And then the Q-markers was screened by grey correlation analysis and monomer composition verification experiment. The results found that forty-nine chemical components were identified by GC-MS, and seventeen common peaks were screened out, including eucalyptol, (+)-2-bornanone, endo-borneol, etc, with the similarity between 0.96-0.99. The results of cluster analysis can be divided into two categories. The component with high abundance and greater differences in heat map display in the essential oil were selected as eucalyptol, (+)-2-bornanone, endo-borneol, and terpinen-4-ol. The inhibition zone of 15 batches of essential oil against *C. albicans*, *E. coli* and *S. aureus* was 9.00-11.56, 9.33-12.44 and 9.33-12.89 mm, respectively. The results of grey correlation analysis showed that eucalyptol, (+)-2-bornanone and endo-borneol were the potential Q-markers for the antibacterial activity of *A. argyi* essential oil. The verification test results also showed that the activity of other compounds was consistent with the results of grey correlation analysis except

收稿日期: 2022-10-25 接受日期: 2022-12-30

基金项目: 国家自然科学基金(82074026)

* 通信作者 E-mail: yangming16@126.com, zhangdingkun@cdutcm.edu.cn

for eucalyptol. In conclusion, (+)-2-bornanone and endo-borneol were the main Q-markers of *A. argyi* essential oil against bacteria.

Key words: *Artemisia argyi*; essential oil; grey relational analysis; antimicrobial activity; Q-markers

艾叶为菊科植物艾 (*Artemisia argyi* Levl. et Vant.) 的干燥叶, 具有温经止血, 散寒止痛; 外用祛湿止痒的功效。艾叶精油 (*A. argyi* essential oil) 作为艾叶的主要有效成分, 在国际上被誉为软黄金, 目前已鉴定出多种成分, 包括萜类 (如桉树脑)、酮醛类 (如侧柏酮)、醇酚类 (如松油醇)、酸酯类 (如乙酸龙脑酯)、烷烃类 (如石竹烯) 等化学成分^[1]。现代药理研究证明其具有抗菌、抗炎、镇痛、抗癌等多种药理作用^[2,3]。然而, 艾叶挥发油质量差异较大, 受艾叶产地、提取方式、采收时间、陈化等诸多因素影响^[4], 且无相关质量标准及评价指标研究, 难以评价艾叶挥发油的质量优劣, 因此亟需对其质量标志物进行筛选。

我国自古就有在端午节将艾叶悬挂门口作为驱邪避秽的习俗, 用以消灭空气中的细菌, 其主要活性成分为艾叶挥发油。文献报道艾叶挥发油可通过改变细菌细胞壁及细胞膜通透性, 破坏细胞结构对细菌的生长发挥抑制作用^[5,6], 且对真菌也具有较好抑制作用^[7,8]。因此, 本研究选择抑菌活性作为艾叶挥发油的质量检测标准, 基于已有文献报道, 选择金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和白色念珠菌检测艾叶挥发油的抑菌活性^[9]。目前, 谱效关联是筛选出中药的质量标志物的重要方法之一, 常用的分析方法有灰色关联分析 (grey relational analysis)^[10,11]。灰色关联分析是一种多因素统计分析的方法, 可在系统发展过程中, 探索各种变量和因素间的复杂相关性。本研究通过 GC-MS 建立 15 批次艾叶挥发油的指纹图谱, 采用热图寻找不同批次艾叶挥发油的差异性成分, 同时通过灰色关联分析, 将艾叶挥发油成分与抑菌活性相关联, 筛选并验证艾叶挥发油抑菌活性的质量标志物, 为艾叶挥发油未来的开发与利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药材

采购不同产地艾叶共 15 个批次艾叶 (S1 ~ S15), 经成都中医药大学药学院许润春副教授鉴定均为菊科植物艾 (*Artemisia argyi* Levl. et Vant.) 的干燥叶。

1.1.2 菌株

大肠杆菌 (*Escherichia coli*, BNCC336902)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, BNCC337946)、白色念珠菌 (*Candida albicans*, BNCC352028) 均购于商城北纳创联生物科技有限公司。

1.1.3 仪器

Agilent/5975C 型气相-质谱-计算机联用仪 (美国 Agilent 公司); NIST 系列标准谱库; Milli-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); ZQLY-180V 振荡培养箱 (上海知楚科技有限公司); HR30-IIA2 生物安全柜 (青岛海尔生物医疗股份有限公司); BD-169C 低温冰箱 (合肥美菱股份有限公司); BSA224S 型万分之一分析天平 and BT25S 型十万分之一分析天平 (德国 Sartorius 公司); 移液枪 (赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司)。

1.1.4 药品与试剂

无水乙醚 (批号: 2111117)、琼脂粉 (批号: 2020120401)、脑心浸液肉汤 (批号: 20210618)、无水硫酸钠 (批号: 2020091401)、无水乙醇 (批号: 2021033102)、桉树脑 (批号: RH288870, 纯度 > 99.5%)、氨苄西林 (批号: R002445) 购自上海易恩化学技术有限公司; 侧柏酮 (批号: DRK-2383-970310, 纯度 > 98%)、樟脑 (批号: DRK-0543-970424, 纯度 > 98%)、松油醇 (批号: DRK-2382-961125, 纯度 > 98%)、石竹烯 (批号: DRK-2345-960323, 纯度 > 98%) 购自成都德锐可生物科技有限公司; 龙脑 (批号: 2203231301, 纯度 > 98%) 购自四川恒诚致远生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 艾叶挥发油的制备

采用水蒸气蒸馏法提取, 称取艾叶 400 g, 加入 12 倍水, 浸泡 0.5 h, 在电热套加热至沸腾后保持微沸, 回流提取 3 h 后, 计算得率, 将提取所得的艾叶挥发油加无水硫酸钠干燥, 于 4 °C 避光保存备用。

1.2.2 GC-MS

1.2.2.1 样品制备

配制时吸取 20 μ L 艾叶挥发油, 加无水乙醚定容至 10 mL, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 即得。

1.2.2.2 GC-MS 条件

气相色谱条件: 色谱柱采用 HP-5MS 毛细石英

管柱;载气 He;载气为恒流模式,柱流速 1.0 mL/min;进样量 1.0 μ L;进样口为分流模式,分流比 100:1;进样口温度 250 $^{\circ}$ C。程序升温:60 $^{\circ}$ C 用于 2 min;然后 5 $^{\circ}$ C/min 到 240 $^{\circ}$ C 用于 0 min;然后 10 $^{\circ}$ C/min 到 260 $^{\circ}$ C 用于 3 min;运行时间:43 min。

质谱条件:电离源为 EI,离子源温度 230 $^{\circ}$ C,四极杆温度为 150 $^{\circ}$ C,质量扫描范围 m/z :15 ~ 550。

1.2.3 抑菌活性

1.2.3.1 菌悬液的制备

取适量白色念珠菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌分别接种于肉汤培养基,于 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,配成 1×10^6 CFU/mL 的菌液,备用。

1.2.3.2 供试品溶液制备

艾叶挥发油样品制备:查阅文献后,精密量取艾叶挥发油 1 mL,用无水乙醇定容至 10 mL,配置成浓度为 100 μ L/mL 的药液^[9]。

单体成分样品制备:根据“1.2.2 GC-MS”结果,选择 S12 为代表,通过峰面积归一化法计算出单体成分含量:桉树脑为 0.50 μ L/mL、侧柏酮为 0.011 μ L/mL、樟脑为 0.069 μ L/mL、龙脑为 0.18 μ L/mL、松油醇为 0.10 μ L/mL、石竹烯为 0.090 μ L/mL。

阳性药制备:精密称取 5 mg 氨苄西林,用无菌水定容至 50 mL,制得 100 μ g/mL 的母液,再取 5

mL 稀释至 10 mL 制得 50 μ g/mL 的阳性药样品。

1.2.3.3 抑菌活性测定

在超净工作台将灭菌好的培养皿用记号笔画“+”分为四个区域,做好四个浓度标记,用涂布棒沾取适量配置好的供试菌悬液呈 Z 字型接种培养皿,涂布三次,每次涂布将培养基旋转 60 $^{\circ}$,最后沿培养基内缘涂一次,涂布均匀,放置三到五分钟等细菌完全吸收后,用镊子将滤纸轻轻贴在培养基中,恒温培养 24 h 后,测量抑菌圈的直径,判断抑菌强弱。

1.2.4 数据分析方法

将 GC-MS 数据在工作站积分后导出整理为 txt 文本,导入国家药典委员会研发的“中药指纹图谱相似度评价系统计算软件”(2012 版)做指纹图谱相似度分析。

2 结果

2.1 不同产地艾叶挥发油提取

提取来自湖北、河南、四川、安徽、广东、山西、陕西 7 个产地共 15 批艾叶。实验发现湖北、广东、陕西的艾叶所得挥发油得率较高,大于 0.4%;安徽、山西、四川的艾叶所得挥发油得率较低;从挥发油得率来看河南的艾叶存在良莠不齐情况,说明不同产地艾叶挥发油的含量存在地域差异性,同时也提示挥发油得率可能还存在其他因素的交叉影响(见表 1)。

表 1 不同产地艾叶挥发油得率

Table 1 Yields of *A. argyri* essential oil from different producing areas

样本 Sample	产地 Place of origin	得率 Yield(%)	样本 Sample	产地 Place of origin	得率 Yield(%)
S1	安徽	0.38	S9	湖北	0.72
S2	安徽	0.26	S10	湖北	0.52
S3	广东	0.66	S11	山西	0.46
S4	河南	0.36	S12	陕西	0.90
S5	河南	0.62	S13	四川	0.30
S6	湖北	0.52	S14	四川	0.46
S7	湖北	0.43	S15	四川	0.24
S8	湖北	0.50			

2.2 不同产地艾叶挥发油化学成分分析

通过 GC-MS 对艾叶挥发油的化学成分进行检测分析,通过 NIST 系列标准谱库及相关文献分析各成分的名称、分子量、化学式及结构式等信息。同时,选择峰面积归一化法对艾叶挥发油中各成分的相对含量进行计算,结果如表 2 所示,共鉴定出 49

种成分,主要为单萜类,如蒎烯,莰烯,桉树脑,侧柏酮,樟脑,龙脑等;倍半萜类,如石竹烯及其氧化物石竹烯氧化物等。其中单萜类的桉树脑丰度最高,相对含量一般在 20% 以上,是艾叶挥发油中的主要活性成分。

表2 艾叶挥发油的化学成分

Table 2 Chemical constituents of *A. argyi* essential oil

编号 No.	成分 Component	分子式 Molecular formula	CAS
1	α -蒎烯 α -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	000080-56-8
2	(1S)-2,6,6-三甲基双环[3.1.1]庚-2-烯 (1S)-2,6,6-Trimethyl bicyclo [3.1.1] hept-2-Ene	C ₁₀ H ₁₆	007785-26-4
3	莰烯 Camphene	C ₁₀ H ₁₆	000079-92-5
4	3,6-庚二烯-2-开环,2,5,5-三甲基-, (3E)-3,6-Heptadien-2-ol,2,5,5-trimethyl-, (3E)-	C ₁₀ H ₁₈ O	026127-98-0
5	异松油烯 Terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	000586-62-9
6	桉烯 Sabenene	C ₁₀ H ₁₆	003387-41-5
7	β -蒎烯 β -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	000127-91-3
8	3-辛醇 3-Octenol	C ₈ H ₁₆ O	003391-86-4
9	2,3-脱氢-1,8-桉树脑 2,3-Dehydro-1,8-cineole	C ₁₀ H ₁₆ O	092760-25-3
10	α -萜品烯 α -Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	000099-86-5
11	<i>g</i> -萜品烯 <i>g</i> -Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	000099-85-4
12	1,5-庚二烯-4-酮,3,3,6-三甲基-1,5-Heptadien-4-one,3,3,6-trimethyl-	C ₁₀ H ₁₆ O	000546-49-6
13	<i>o</i> -伞花烃 <i>o</i> -Cymene	C ₁₀ H ₁₄	000527-84-4
14	氧化石竹烯 Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	001139-30-6
15	<i>D</i> -柠檬烯 <i>D</i> -Limonene	C ₁₀ H ₁₆	005989-27-5
16	桉树脑 Eucalyptol	C ₁₀ H ₁₈ O	000470-82-6
17	γ -萜品烯 γ -Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	000099-85-4
18	环己醇,1-甲基-4-(1-异丙烯基)-,顺式-Cyclohexanol,1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, <i>cis</i> -	C ₁₀ H ₁₈ O	007299-41-4
19	蒿属酮 Artemisia ketone	C ₁₀ H ₁₆ O	000546-49-6
20	反式-4-侧柏醇 <i>trans</i> -4-Thujanol	C ₁₀ H ₁₈ O	017699-16-0
21	2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚) 2,2'-Methylenebis(6-tert-butyl-4-methylphenol)	C ₂₃ H ₃₂ O ₂	000119-47-1
22	1,5-庚二烯-4-环,3,3,6-三甲基-1,5-Heptadien-4-ol,3,3,6-trimethyl-	C ₁₀ H ₁₈ O	027644-04-8
23	(+)-4-萹烯 (+)-4-Carene	C ₁₀ H ₁₆	029050-33-7
24	反式-桉烯水合物 <i>trans</i> -Sabinene hydrate	C ₁₀ H ₁₈ O	017699-16-0
25	崖柏酮 3-Thujanone	C ₁₀ H ₁₆ O	001125-12-8
26	侧柏酮 Thujone	C ₁₀ H ₁₆ O	000546-80-5
27	2-环己烯-1-开环,1-甲基-4-(1-甲基乙基)-, (1R,4S)-Rel-2-Cyclohexen-1-ol,1-methyl-4-(1-methylethyl)-, (1R,4S)-rel-	C ₁₀ H ₁₈ O	029803-81-4
28	2-环己烯-1-开环,1-甲基-4-(1-甲基乙基)-, (1R,4R)-Rel-2-Cyclohexen-1-ol,1-methyl-4-(1-methylethyl)-, (1R,4R)-rel-	C ₁₀ H ₁₈ O	029803-82-5
29	樟脑 (+)-2-Bornanone	C ₁₀ H ₁₆ O	000464-49-3
30	二环[3.1.1]庚烷-3-酮,6,6-二甲基-2-亚甲基-Bicyclo[3.1.1]heptan-3-one,6,6-dimethyl-2-methylene-	C ₁₀ H ₁₄ O	030460-92-5
31	异龙脑 <i>DL</i> -Isoborneol	C ₁₀ H ₁₈ O	000124-76-5
32	冰片 Endo-borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	000507-70-0
33	3-松莰酮(8CI) 3-Pinanone(8CI)	C ₁₀ H ₁₆ O	015358-88-0
34	(-)-4-萜品醇 (-)-4-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	020126-76-5
35	4-萜烯醇 Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	000562-74-3
36	α -松油醇 α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	000098-55-5
37	4,6,6-三甲基二环[3.1.1]庚-3-烯-2-酮 4,6,6-Trimethyl-bicyclo [3.1.1] hept-3-en-2-one	C ₁₀ H ₁₄ O	001196-01-6

续表 2(Continued Tab. 2)

编号 No.	成分 Component	分子式 Molecular formula	CAS
38	2-环己烯-1-开环,2-甲基-5-(1-异丙烯基)-, (1 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-Rel-2-Cyclohexen-1-ol,2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, (1 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-rel-	C ₁₀ H ₁₆ O	001197-06-4
39	2-环己烯-1-开环,1-甲基-4-(1-异丙烯基)-, (1 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-Rel-2-Cyclohexen-1-ol,1-methyl-4-(1-methylethyl)-, (1 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-rel-	C ₁₀ H ₁₈ O	029803-81-4
40	2-环己烯-1-开环,3-甲基-6-(1-异丙烯基)-, (1 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-Rel-2-Cyclohexen-1-ol,3-methyl-6-(1-methylethyl)-, (1 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-rel-	C ₁₀ H ₁₈ O	016721-38-3
41	3-甲基-6-(1-甲基乙基)-2-环己烯-1-酮 3-Methyl-6-(1-methylethyl)-2-cyclohexen-1-one	C ₁₀ H ₁₆ O	000089-81-6
42	甲基丁香酚 Methyl eugenol	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	000093-15-2
43	乙酸冰片酯 Bornyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	000076-49-3
44	1-石竹烯 1-Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	000087-44-5
45	α -石竹烯 α -Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	006753-98-6
46	1,6-环癸二烯,1-甲基-5-亚甲基-8-(1-亚甲基)-, (1 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,8 <i>S</i>)-1,6-Cyclodecadiene,1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)-, (1 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,8 <i>S</i>)-	C ₁₅ H ₂₄	023986-74-5
47	二环[8.1.0]十一-2,6-二烯,3,7,11,11-四甲基-, (1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,10 <i>R</i>)-Bicyclo[8.1.0]undeca-2,6-diene,3,7,11,11-tetramethyl-, (1 <i>S</i> ,2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,10 <i>R</i>)-	C ₁₅ H ₂₄	024703-35-3
48	(+)- β -芹子烯 (+)- β -Selinene	C ₁₅ H ₂₄	017066-67-0
49	2,6-二叔丁基对甲酚 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol	C ₁₅ H ₂₄ O	000128-37-0

2.3 艾叶挥发油的指纹图谱与相似性

将提取所得的 15 批艾叶挥发油样品处理后做 GC-MS 检测,将实验数据处理为 txt 格式后,导入国家药典委员会研发的“中药指纹图谱相似度评价系统计算软件”。由于不同批次艾叶挥发油峰面积太高,导入软件后出现分不开的情况,将所有产地峰面

积进行统一处理后再导入软件绘制指纹图谱。以 S1 的色谱图为对照图谱,将时间宽度设为 0.1 min,生成对照图谱后进行色谱法匹配,得到叠加图谱,见图 1。共标定了 17 个共有峰(见表 3)。如图 1 所示,15 批次艾叶挥发油的相似度均大于 0.96,说明不同产区艾叶挥发油成分组成具有较高的相似性。

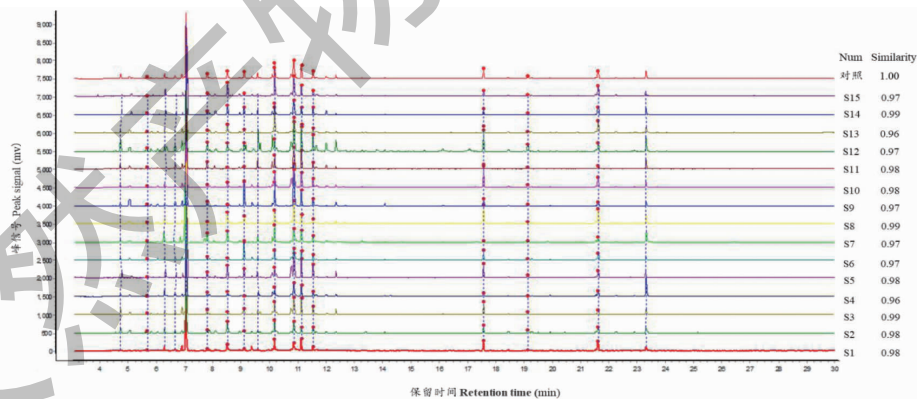


图 1 15 个批次艾叶挥发油 GC-MS 的指纹图谱

Fig. 1 GC-MS fingerprints of 15 batches of *A. argyi* essential oil

表 3 艾叶挥发油的 17 个共有峰

Table 3 Seventeen common peaks of *A. argyi* essential oil

编号 No.	成分 Component	编号 No.	成分 Component
P1	α -蒎烯	P10	樟脑
P2	β -蒎烯	P11	龙脑
P3	未知物 1	P12	松油醇

续表 3 (Continued Tab. 3)

编号 No.	成分 Component	编号 No.	成分 Component
P4	2-萜烯	P13	α -萜品醇
P5	桉树脑	P14	石竹烯
P6	γ -萜品烯	P15	右旋大根香叶烯
P7	未知物 2	P16	石竹烯氧化物
P8	侧柏酮	P17	未知物 3
P9	2-环己烯-1-醇,1-甲基-4-(1-甲基乙基)-,(1R,4S)-rel-		

2.4 不同产地艾叶挥发油热图及聚类分析

将指纹图谱所得共有峰数据导入分析网站 (<https://hiplot-academic.com/>) 做热图及聚类分析,得到结果见图 2。通过热图可知 15 批次艾叶挥发油的差异性成分主要为: P5 (桉树脑)、P10 (樟脑)、P11 (龙脑)、P12 (松油醇), 说明这 4 种成分在各个

批次的相对含量较高, 尤其以 Eucalyptol 丰度最高。聚类分析可以将不同产区艾叶分为两类: 广东, 山西, 陕西的艾叶聚为一类; 四川, 安徽的艾叶挥发油聚为一类, 而湖北、河南的艾叶在两类之间均有分布, 推测这与该产地为艾叶的道地产区之一, 市场流通广泛有关。

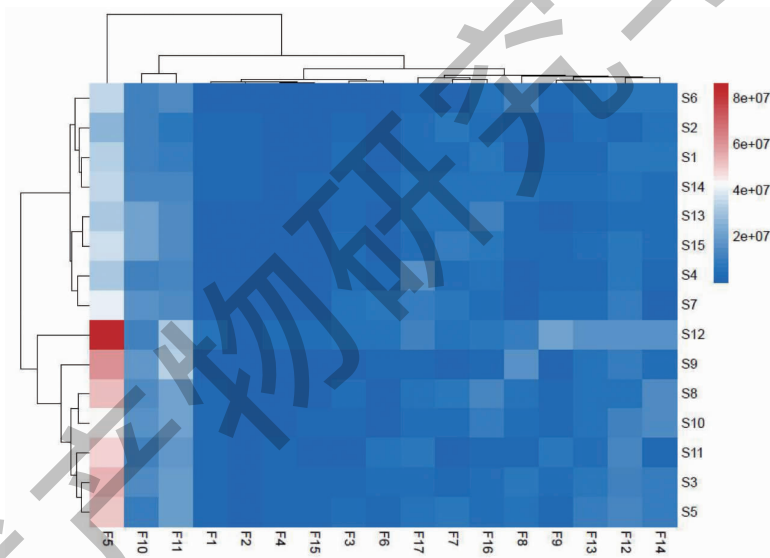


图 2 15 批次艾叶挥发油的热图及聚类分析

Fig. 2 Heat map and cluster analysis of 15 batches of *A. argyi* essential oil

2.5 艾叶挥发油主成分分析

在指纹图谱的基础上, 以 17 个共有峰的峰面积为变量, 选择 SPSS 25.0 软件对 15 批艾叶挥发油进行主成分分析, 计算主成分特征值及类及方差贡献率, 见表 4 和表 5。其中特征值 > 1 的主成分有 4 个, 累计方差贡献率为 83.976%。PC1 的特征值达到 7.099, 方差贡献率为 41.758%, 负载量较高的峰主要为 P1、P4、P5、P9、P12、P13、P15, 说明这 7 个峰反映了 PC1 的大部分信息; PC2 的特征值达到 2.910, 方差贡献率为 17.117%, 负载量较高的峰主要为 P3、P7、P8; PC3 的特征值为 2.421, 方差贡献率

为 14.240%, 负载量较高的为 P6、P14、P16、P17; PC4 的特征值为 1.846, 方差贡献率为 10.861%, 负载量较高的为 P2、P10、P11。以每个主成分的方差贡献率的比例作为权重计算综合得分, 公式为 $F = 0.4973 \times F1 + 0.2038 \times F2 + 0.1696 \times F3 + 0.1293 \times F4$, 由综合得分得知不同产地艾叶挥发油的主成分分析排序是: S12 (4.579 4) > S5 (0.832 8) > S8 (0.558 9) > S10 (0.393 9) > S3 (0.377 9) > S7 (-0.235 6) > S11 (-0.236 5) > S14 (-0.425 1) > S15 (-0.565 7) > S1 (-0.732 9) > S9 (-0.774 2) > S13 (-0.780 1) > S4 (-0.834 4) > S2 (-0.998 0) > S6 (-1.161 2)。

将数据导入 SIMCA 14.1 做主成分分析得到不同产区艾叶挥发油的主成分得分矩阵图及共有峰综合得分图(见图 3)。结果显示不同产区艾叶挥发油

大致可分为两类,和聚类结果基本一致。其中以 P12 (松油醇)和 P13 (α -萜品醇)综合得分最高,表明二者可能是艾叶挥发油质量差异的潜在成分。

表 4 主成分特征值和方差贡献率

Table 4 Principal component eigenvalue and variance contribution rate

主成分 Principal component	特征值 Eigenvalue	方差贡献率 Variance contribution rate	累积方差贡献率 Cumulative variance contribution rate(%)
1	7.099	41.758	41.758
2	2.910	17.117	58.875
3	2.421	14.240	73.115
4	1.846	10.861	83.976

表 5 不同批次艾叶油主成分得分

Table 5 Principal component score of 15 batches of *A. argyi* essential oil

样品 Sample	主成分得分 Principal component score			
	1	2	3	4
S1	-1.670	0.932	0.606	-1.510
S2	-2.017	1.125	0.530	-2.429
S3	1.332	-1.226	-0.019	-0.232
S4	-1.267	1.018	-2.737	0.404
S5	1.590	0.234	-0.177	0.188
S6	-1.344	-2.296	0.446	-0.777
S7	-0.602	1.816	-2.844	1.361
S8	-0.468	1.054	2.232	1.532
S9	0.049	-4.583	-0.079	1.155
S10	0.148	-0.328	1.942	0.448
S11	1.275	-1.325	-2.579	-1.259
S12	8.437	1.314	0.656	0.037
S13	-2.454	0.732	0.964	0.982
S14	-0.856	0.655	0.752	-2.014
S15	-2.153	0.878	0.311	2.114

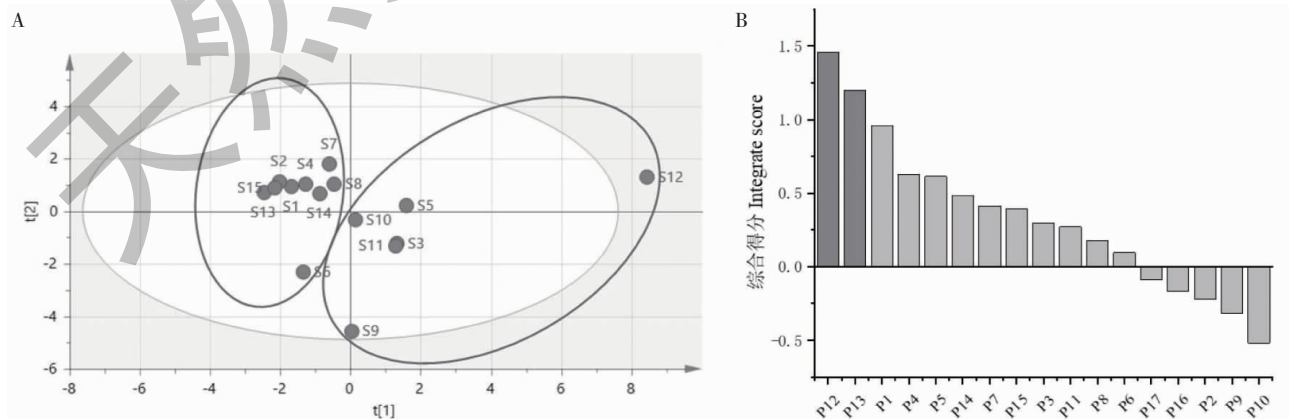


图 3 不同产地艾叶挥发油样品主成分分析

Fig. 3 Principal component analysis of *A. argyi* essential oil of different habitats

注:A. 主成分得分矩阵图;B. 共有峰综合得分图。Note: A. Principal component score matrix; B. Composite score chart of common peaks.

2.6 艾叶挥发油抑菌活性

如表 6 所示,不同批次艾叶挥发油白色念珠菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有较好抑制作用,其中白色念珠菌抑菌圈在 9.00 ~ 11.56 mm;大肠杆菌的抑菌圈在 9.33 ~ 12.44 mm;金黄色葡萄球菌的抑菌圈在 9.33 ~ 12.89 mm。

不同批次艾叶挥发油对白色念珠菌的抑菌作用: S5 > S1 > S11 > S4 > S8 > S3 > S6 > S9 > S10 > S2 > S7 > S15 > S12 > S13 > S14; 对大肠杆菌的抑制效

果排序: S12 > S8 > S9 > S1 > S7 > S10 > S4 > S14 > S13 > S5 > S6 > S15 > S2 > S11 > S3; 金黄色葡萄球菌的抑菌效果排序: S9 > S7 > S10 > S12 > S15 > S8 > S6 > S1 > S11 > S13 > S5 > S2 > S4 > S14 > S3。综合比较下发现各产区对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制效果大于白色念珠菌,同时 S3 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制效果均最弱, S14 对白色念珠菌抑制效果最弱。

表 6 15 批次艾叶挥发油抑菌圈直径($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 6 Inhibitor zone diameter of 15 batches of *A. argyi* essential oil($\bar{x} \pm s, n=9$)

样品 Sample	抑菌圈直径 Inhibitor zone diameter(mm)		
	白色念珠菌 <i>C. albicans</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>
S1	10.89 ± 1.20	11.33 ± 1.41	10.11 ± 1.29
S2	10.11 ± 0.57	10.44 ± 0.68	9.78 ± 0.92
S3	10.33 ± 1.83	9.33 ± 0.47	9.33 ± 0.67
S4	10.67 ± 1.56	11.22 ± 1.31	9.78 ± 1.47
S5	11.56 ± 1.50	10.78 ± 0.79	9.89 ± 1.10
S6	10.33 ± 0.82	10.78 ± 0.63	10.44 ± 0.83
S7	9.89 ± 0.57	11.33 ± 0.94	11.56 ± 1.57
S8	10.67 ± 1.05	12.11 ± 0.99	10.56 ± 0.83
S9	10.33 ± 1.25	12.00 ± 0.94	12.89 ± 1.29
S10	10.22 ± 0.79	11.33 ± 1.56	11.11 ± 0.87
S11	10.78 ± 2.35	10.00 ± 0.67	10.00 ± 0.82
S12	9.44 ± 1.64	12.44 ± 1.64	11.00 ± 0.82
S13	9.33 ± 0.82	11.00 ± 1.33	10.00 ± 0.82
S14	9.00 ± 1.05	11.11 ± 1.10	9.44 ± 1.26
S15	9.89 ± 0.74	10.78 ± 0.79	11.00 ± 1.49
阳性组 Positive group	11.56 ± 1.07	9.44 ± 0.96	9.56 ± 1.42
溶剂组 Solvent group	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00

2.7 艾叶挥发油的质量标志物确定

通过灰色关联分析 15 批次艾叶挥发油的化学成分与抑菌活性之间的谱效关系,从而确定艾叶挥发油抑菌活性的质量标志物。将 15 批次艾叶挥发油的抑菌圈直径作为参考数列,指纹图谱所得共有峰峰面积为比较数列,做灰色关联分析,结果见表 7。通过实验结果可知各共有峰的关联度均大于

0.775,其中 P10 与抑制白色念珠菌和大肠杆菌的关联度较强,P10(樟脑)、P5(桉树脑)和 P11(龙脑)与抑制金黄色葡萄球菌的关联度较强,同时这 3 个成分也是热图显示丰度较高的共有峰。因此综合热图及灰色关联分析结果表明 P10(樟脑)、P5(桉树脑)和 P11(龙脑)是艾叶挥发油发挥抑菌活性的潜在质量标志物。

表 7 15 批次艾叶挥发油共有峰与抗菌活性的关联度

Table 7 Correlation degree between common peak and antibacterial activity of 15 batches of *A. argyi* essential oil

共有峰 Common peak	灰色关联结果 Grey correlation result		
	白色念珠菌 <i>C. albicans</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>
P10	0.879	0.889	0.889
P5	0.861	0.869	0.884
P11	0.852	0.858	0.874
P12	0.850	0.854	0.866
P1	0.840	0.846	0.850
P17	0.839	0.844	0.847
P16	0.837	0.835	0.846
P4	0.836	0.835	0.846
P13	0.831	0.828	0.840
P7	0.826	0.824	0.835
P3	0.822	0.823	0.810
P15	0.810	0.822	0.805
P2	0.796	0.803	0.799
P6	0.795	0.795	0.798
P9	0.794	0.791	0.794
P14	0.785	0.790	0.783
P8	0.775	0.776	0.778

2.8 单体抑菌活性验证

为进一步验证灰色关联分析得到结果,选择 S12 样本作为代表,通过峰面积归一化法得到各单体成分相对含量,验证灰色关联分析相关度大于 0.85 的 P10(樟脑)、P5(桉树脑)、P11(龙脑)和 P12(松油醇)以及相关性最低的 P10(樟脑)、P5(桉树脑)、P11(龙脑)和 P12(松油醇),一共 6 种单体成

分的抑菌活性(见表 8)。灰色关联分析结果显示抑菌效果:P10(樟脑) > P5(桉树脑) > P11(龙脑) > P12(松油醇);而单体抑菌活性验证实验的结果却显示 P10(樟脑) > P11(龙脑) > P12(松油醇) > P5(桉树脑),其中 P5(桉树脑)在灰色关联分析结果排名第二,但在单体活性验证实验中却排名第四,而另外三个成分两个实验的结果是一致的。因此

表 8 单体成分抑菌圈直径($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 8 Inhibitor zone diameter of monomer composition($\bar{x} \pm s, n=9$)

单体成分 Monomer composition	抑菌圈直径 Inhibitor zone diameter(mm)		
	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	白色念珠菌 <i>C. albicans</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>
樟脑	8.00 ± 0.07	9.30 ± 0.29	9.40 ± 0.13
龙脑	7.09 ± 0.09	8.30 ± 0.15	8.00 ± 0.08
松油醇	7.70 ± 0.12	7.00 ± 0.07	7.70 ± 0.13
桉树脑	7.30 ± 0.05	7.30 ± 0.05	7.30 ± 0.05
石竹烯	6.30 ± 0.05	6.20 ± 0.04	6.30 ± 0.05
侧柏酮	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00

单体验证结果发现除 P5(桉树脑)抑菌活性与灰色关联分析结果略有出入外,其余成分抑菌活性与灰色关联分析结果基本一致。值得注意的是单体成分的抑菌圈直径小于艾叶挥发油的抑菌圈直径,推测艾叶挥发油发挥抑菌活性是一个协同过程。

综合指纹图谱、热图、灰色关联分析及单体验证结果,筛选同时满足:(1)艾叶挥发油共有成分;(2)丰度较高成分;(3)具有抑菌活性三个条件的质量标志物。P10(樟脑)、P11(龙脑)在艾叶挥发油中丰度较高,且抑菌活性较好,与灰色关联分析结果一致,因此认定 P10(樟脑)、P11(龙脑)为艾叶挥发油抑菌活性的质量标志物;P5(桉树脑)、P12(松油醇)虽丰度及灰色关联分析相关度均较高,但单体验证的抑菌活性较低,因此不认定 P5(桉树脑)、P12(松油醇)为质量标志物。因此综合热图、灰色关联分析及单体验证实验,筛选出艾叶挥发油抑菌活性的质量标志物为 P10(樟脑)、P11(龙脑)。

3 讨论与结论

艾叶挥发油作为艾叶的主要活性成分,具有较好的抑菌活性,然而艾叶生长的环境、采收时间、陈化过程均会影响其成分组成^[12,13]。抑菌实验发现,河南、湖北产区的艾叶挥发油对 3 种菌的抑制效果最好,这与艾叶道地性相吻合。GC-MS 数据也发现湖北、河南产区艾叶挥发油中的 P10(樟脑)和 P11(龙脑)的相对含量占比在 15 批次中相对较高,这与灰色关联分析结果基本一致。其中,湖北艾叶挥发油对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制效果最好,河南艾叶挥发油对白色念珠菌的抑制效果最好。通过单体验证实验发现 P12(松油醇)对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有较好抑制作用而对白色念珠菌抑制稍弱,其中主成分分析结果也证明 P12(松油醇)和 P13(α -萜品醇)对不同产区艾叶挥发油差异性的贡献较大,因此推测二者可能为湖北产区和河南产区对不同菌抑制效果出现差异的原因。然而灰色关联分析和单体抑菌实验结果证明二者贡献相对不大,因此推测 P12(松油醇)和 P13(α -萜品醇)在抑菌过程发挥协同作用而非主要作用。

灰色关联分析和单体抑菌实验结果证明樟脑和龙脑为艾叶挥发油抑菌活性的质量标志物,现代研究也证实二者确有较好抑菌活性,董杰的研究证明 100%樟脑精油对大肠杆菌的抑菌圈直径为 0.2 ~ 1.1 cm,通过影响大肠杆菌蛋白合成及调控其基因表达发挥抑菌作用^[14]。肖姗姗的研究表明右旋龙

脑可通过形成孔洞破坏菌体细胞膜,使内容物外泄发挥抑菌作用^[15]。王远辉的研究证明左旋龙脑抑制金黄色葡萄球菌和大肠杆菌时,并未破坏其细胞膜完整性,通过改变膜电位,细胞去极化,影响离子通道,从而致其灭亡^[16]。

综上所述,本研究发现艾叶挥发油多种成分均具有抑菌活性,其中贡献较大的为樟脑和龙脑,可作为艾叶挥发油抑菌活性的质量标志物,为艾叶挥发油的质量控制以及后续研究提供参考。

参考文献

- Huang HC, Wang HF, Yih KH, et al. Dual bioactivities of essential oil extracted from the leaves of *Artemisia argyi* as an antimelanogenic versus antioxidant agent and chemical composition analysis by GC/MS [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13: 14679-14697.
- Xiang F, Bai J, Tan X, et al. Antimicrobial activities and mechanism of the essential oil from *Artemisia argyi* Levl. et Van. var. *argyi* cv. Qiai [J]. *Ind Crop Prod*, 2018, 125: 582-587.
- Chen LL, Zhang HJ, Chao J, et al. Essential oil of *Artemisia argyi* suppresses inflammatory responses by inhibiting JAK/STATs activation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 204: 107-117.
- Liu Y, He YN, Wang F, et al. From longevity grass to contemporary soft gold: explore the chemical constituents, pharmacology, and toxicology of *Artemisia argyi* H. Lev. & Vaniot essential oil [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114404.
- Yang WT, Huang SX, Weng DH, et al. Antibacterial effect and mechanism of essential oils from *Artemisia argyi* *in vitro* [J]. *North Hort*(北方园艺), 2017, 23: 22-28.
- Ge DP, Li S, Huang K, et al. Antimicrobial Activities of *Artemisia argyi* essential oils extracted by simultaneous distillation using different solvent systems [J]. *J Food Sci Biotechnol*(食品与生物技术学报), 2020, 39: 41-48.
- Shi GX, Wang TM, Wu SB, et al. Activity of essential oil extracted from *Artemisia argyi* in inducing apoptosis of *Candida albicans* [J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2017, 42: 3572-3577.
- Wu SB, Cao J, Wang TM, et al. Experimental study on antifungal and antiherpes zoster virus of essential oil from *Artemisia argyi* [J]. *J Anhui Univ Tradit Med*(安徽中医药大学学报), 2015, 34(6): 70-71.
- Zheng JJ, Yin L, Wang Q. Study on the antioxidant and antibacterial effects of *Artemisia argyi* leaves pure dew and volatile oil [J]. *Guangdong Chem Ind*(广东化工), 2020, 47: 47-49.