

河南省黄花蒿挥发油的组分分析及抑菌作用测定

智亚楠^{1,2},陈月华¹,马宇明¹,尹健^{1,2},陈利军^{1,2*}

(1. 信阳农林学院,河南 信阳 464000; 2. 豫南植物有害生物绿色防控院士工作站,河南 信阳 464000)

摘要: 为了明确河南省黄花蒿挥发油的成分和抑菌活性,采用水蒸气蒸馏法提取来自河南信阳的黄花蒿挥发油,利用气相色谱-质谱联用法(GC-MS)进行组分分析,并测定挥发油的熏蒸抑菌作用。结果表明:从黄花蒿挥发油中共分离到28个组分,鉴定出其中24个,占挥发油总量的95.324%,其主要组分为蒿酮(46.654%)、桉油精(13.422%)、樟脑(9.648%)等;挥发油对水稻纹枯病菌、番茄灰霉病菌、小麦赤霉病菌和油菜菌核病均有强烈的熏蒸抑制作用,有效中浓度(EC₅₀)分别为0.78 μL/皿、0.89 μL/皿、1.32 μL/皿和1.52 μL/皿。说明河南省黄花蒿挥发油可在农业上作为杀菌剂使用,具有一定的开发价值。
关键词: 黄花蒿;挥发油;气相色谱-质谱联用法;抑菌作用
中图分类号: S476 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2016)12-0105-05

The Chemical Constituents and Antifungal Activity of Essential Oil from *Artemisia annua* Linn in Henan Province

ZHI Ya'nan^{1,2}, CHEN Yuehua¹, MA Yuming¹, YIN Jian^{1,2}, CHEN Lijun^{1,2*}

(1. Xinyang College of Agriculture and Forestry, Xinyang 464000, China; 2. Academician Workstation of Pest Green Prevention and Control for Plants in Southern Henan, Xinyang 464000, China)

Abstract: In order to determine the chemical constituents and antifungal activity of essential oil from *Artemisia annua* Linn, essential oil from *A. annua* Linn in Xinyang city of Henan province was extracted by steam distillation, and their chemical constituents were analyzed by GC-MS. The antifungal activity of essential oil was also studied. The results showed that 28 ingredients were found, and 24 of them were identified, accounting for 95.324% of the total essential oil from *A. annua* Linn. The main chemical constituents were artemisia ketone (46.654%), eucalyptol (13.422%), camphor (9.648%), etc. The essential oil showed strong fumigation antifungal effect on *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum* and *Sclerotinia sclerotiorum*, and the EC₅₀ values were 0.78 μL/dish, 0.89 μL/dish, 1.32 μL/dish and 1.52 μL/dish, respectively. The essential oil can be used as a fungicide in agriculture and possesses a certain developing value.
Key words: *Artemisia annua* Linn; essential oil; GC-MS analysis; antifungal activity

黄花蒿(*Artemisia annua* Linn)又名黄蒿、臭蒿、苦蒿等,为菊科(Asteraceae)蒿属(*Artemisia*)1年生草本植物,是我国传统的中草药,全株具有浓烈的挥发性气味,其广泛分布于国内各省,在河南信阳也是一种常见的野生植物^[1]。黄花蒿的化学成分丰富,

可分为挥发性和非挥发性2类。非挥发性成分的代表是青蒿素^[2],该成分已在医学界引起高度关注,并被开发为多种药品,用于治疗疟疾、肿瘤、低热、结核病等^[3-5]。挥发性成分包括脂肪族化合物,芳香族化合物,萜类化合物中的单萜、倍半萜及其含氧衍

收稿日期:2016-05-28
基金项目:国家自然科学基金项目(31401798);河南省科技攻关项目(122102310257)
作者简介:智亚楠(1985-),女,河南漯河人,助教,硕士,主要从事植物病理学和农药学的教学和研究工作。
E-mail:zhiyanan000@126.com
* 通讯作者:陈利军(1980-),男,河南济源人,副教授,硕士,主要从事植物病理学和真菌学的教学和研究工作。
E-mail:chlijun1980@163.com
网络出版时间:2016-11-25 14:24:33
网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/41.1092.S.20161125.1424.021.html>

生物。多项研究表明,黄花蒿挥发油具有杀虫^[6-9]、杀螨^[10-11]、抑菌^[12-16]、抑制植物生长^[17-18]、果蔬保鲜等生物活性^[19]。不同地区的黄花蒿挥发油的化学组分、含量和生物活性有较大差异,已有学者对石家庄^[20]、湘西^[21]、陕北^[22]、山东^[23]等地区黄花蒿的挥发油成分进行了报道,而关于信阳地区黄花蒿挥发油的组分及活性研究尚未见报道。为了掌握河南信阳黄花蒿挥发油的含量、组分及抑菌活性,采用水蒸气蒸馏法提取黄花蒿的挥发油,测定其含油率,采用气相色谱-质谱联用法(GC-MS)分析挥发油的化学组分,并以番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)4种常见病原菌为目标菌,测定挥发油对病原菌菌丝生长的熏蒸抑制作用,以明确黄花蒿在农业上的开发利用价值。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 黄花蒿 供试黄花蒿全草于2015年8月下旬采自信阳市震雷山,选取健康、生长旺盛的植株,室内自然风干后,剪为不超过0.5 cm的小段。

1.1.2 培养基 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15 g、水1 000 mL。

1.1.3 植物病原真菌 番茄灰霉病菌、小麦赤霉病菌、油菜菌核病菌和水稻纹枯病菌菌株由信阳农林学院植物病理实验室分离保存。

1.1.4 主要仪器与设备 包括 Agilent 6850/5975 气质联用仪(美国安捷伦公司)、NIST05 谱库、HP-250S 生化培养箱(武汉瑞华仪器设备有限公司)、电子天平、KDM-2000 电热套(金坛市恒丰仪器制造有限公司)、铁架台、冷凝管、圆底烧瓶等。

1.2 黄花蒿挥发油的提取

准确称量植物材料,采用水蒸气蒸馏法连续提取2 h,得透明的淡黄色具浓郁气味的油状液体,即挥发油,将挥发油密封好,4℃冰箱保存备用。计算含油率,重复3次。含油率=挥发油体积/样品质量×100%。

1.3 挥发油熏蒸抑菌作用测定

挥发油对植物病原菌菌丝生长的熏蒸抑制作用采用参考文献[24]的生长速率法测定,根据挥发油的使用剂量设7个处理,每皿分别为0.5 μL、1.0 μL、1.5 μL、2.0 μL、2.5 μL、5.0 μL、10.0 μL,以仅放一滤纸片不滴加挥发油为对照,重复3次。48 h

后观察植物病原真菌的生长情况,并采用十字交叉法测量病原真菌菌落直径,取其平均值,计算抑制率。抑制率=(对照菌落生长直径-处理菌落生长直径)/对照菌落生长直径×100%。

利用 SPSS 17.0 统计分析软件绘制标准曲线,建立毒力回归方程,求得相关系数、有效中浓度(EC₅₀)及其置信区间,并根据 EC₅₀ 值比较挥发油对不同病原真菌的毒力。

1.4 挥发油 GC-MS 分析条件

色谱条件:色谱柱为 HP-5MS 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);程序升温,起始柱温60℃,保持1 min,以10℃/min升温速率升至230℃,保持20 min,进样口温度和接口温度分别为230℃和150℃;载气为高纯氦气,柱流速为1.0 mL/min,挥发油用乙醚稀释100倍,进样量1.0 μL,不分流。

质谱条件:EI 离子源,电子能量70 eV,扫描范围30~350 amu,四级杆温度和离子源温度分别为230℃和150℃,EM电压1 729 V。

2 结果与分析

2.1 黄花蒿中挥发油的含油率

经计算,采用水蒸气蒸馏法提取黄花蒿挥发油的含油率为0.46%。

2.2 黄花蒿挥发油组分 GC-MS 分析

对黄花蒿的挥发油组分进行 GC-MS 分析,总离子流图见图1。利用色谱峰面积归一法测得各组分的相对含量,所得质谱图经 NIST05 质谱数据库检索,与标准图谱核对,并结合化学物质登录号(CAS号)分析,从黄花蒿挥发油中共分离出28个组分,其中鉴定出了24个组分(表1),占总成分的95.324%。从表1可以看出,黄花蒿挥发油中相对含量最高的组分为蒿酮(46.654%),其次为桉油精(13.422%)和樟脑(9.648%),再次为3,3,6-三甲基-1,5-庚二烯-4-醇(4.076%)、石竹烯氧化物(2.636%)、石竹烯(2.515%)等。

2.3 黄花蒿挥发油对病原真菌的熏蒸抑制作用

黄花蒿挥发油对4种植物病原真菌菌丝生长的熏蒸抑制作用测定结果见图2—3、表2。从表2可以看出,黄花蒿挥发油对供试菌种菌丝生长均有一定的熏蒸抑制作用,抑制作用随剂量增加而增强。在2.0 μL/皿的较低剂量下,挥发油对4种病原菌的抑制率均在50%以上,其中对水稻纹枯病菌的抑制率最高,达到70.67%。10.0 μL/皿的剂量对番茄灰霉病菌的抑制率达到99.13%,对其他3种病原菌的抑制率也在90%以上,抑菌效果较好。

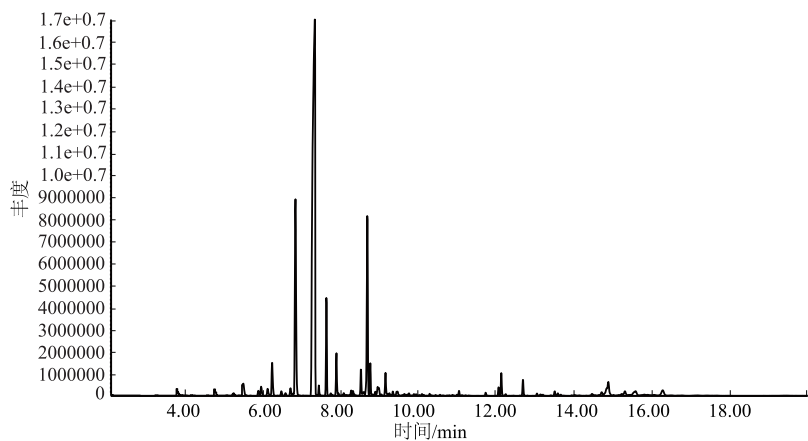
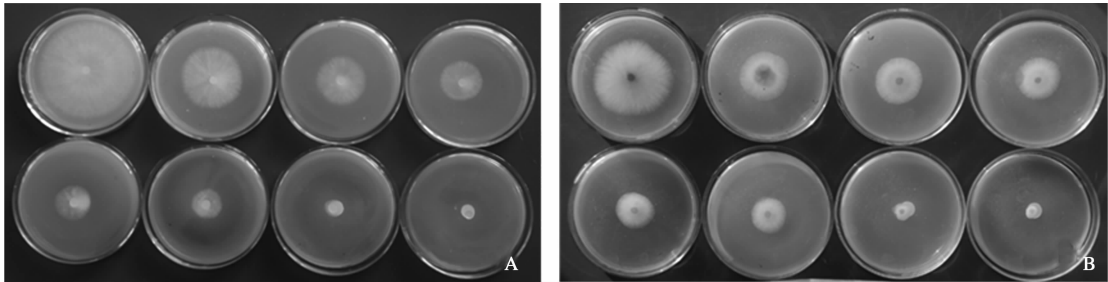


图 1 黄花蒿挥发油的 GC-MS 总离子流图

表 1 黄花蒿挥发油的化学组分

峰号	保留时间/min	化合物	分子式	相对含量/%
1	3.787	未鉴定	-	0.486
2	5.488	(1S)-2,2-二甲基-3-亚甲基-双环[2.2.1]庚烷	C ₁₀ H ₁₆	1.057
3	5.877	β-水芹烯	C ₁₀ H ₁₆	0.669
4	5.949	β-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	0.834
5	6.115	β-月桂烯	C ₁₀ H ₁₆	0.671
6	6.230	3,3,6-三甲基-1,4-庚二烯-6-醇	C ₁₀ H ₁₈ O	1.707
7	6.828	桉油精	C ₁₀ H ₁₈ O	13.422
8	7.318	蒿酮	C ₁₀ H ₁₆ O	46.654
9	7.426	(1α,2β,5α)-2-甲基-5-(1-甲基乙基)-双环[3.1.0]正己烷-2-醇	C ₁₀ H ₁₈ O	0.530
10	7.621	3,3,6-三甲基-1,5-庚二烯-4-醇	C ₁₀ H ₁₈ O	4.076
11	7.880	未鉴定	-	1.926
12	8.514	2-甲基-6-亚甲基-1,7-辛二烯-3-酮	C ₁₀ H ₁₄ O	0.843
13	8.680	樟脑	C ₁₀ H ₁₆ O	9.648
14	8.752	2,6-二甲基-1,5,7-辛三烯-3-醇	C ₁₀ H ₁₆ O	1.262
15	8.947	6,6-二甲基-2-亚甲基-双环[2.2.1]庚烷-3-酮	C ₁₀ H ₁₄ O	0.515
16	8.976	未鉴定	-	0.518
17	9.148	4-萜烯醇	C ₁₀ H ₁₈ O	1.302
18	9.429	6,6-二甲基-双环[3.1.1]庚-2-烯-2-甲醇	C ₁₀ H ₁₆ O	0.633
19	12.052	α-葑烯茄油烯	C ₁₅ H ₂₄	1.346
20	12.124	2-甲基丁酸苯甲酯	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	0.992
21	12.686	石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	2.515
22	13.047	金合欢烯	C ₁₅ H ₂₄	0.544
23	13.501	大根香叶烯 D	C ₁₅ H ₂₄	1.102
24	13.580	[4aR-(4α,7α,8αβ)]-十氢-4a-甲基-1-亚甲基-7-(1-甲基乙烯基)-萘	C ₁₅ H ₂₄	0.499
25	14.877	石竹烯氧化物	C ₁₅ H ₂₄ O	2.636
26	15.309	雪松醇	C ₁₅ H ₂₆ O	0.656
27	15.583	2,4-二甲基-苯甲醇	C ₉ H ₁₂ O	1.211
28	16.289	未鉴定	-	1.746



对于每种病菌,第 1 排从左至右挥发油剂量依次为 0(对照)、0.5、1.0、1.5 μL/皿,第 2 排从左至右剂量依次为 2.0、2.5、5.0、10.0 μL/皿,下同

图 2 黄花蒿挥发油对番茄灰霉病菌(A)和小麦赤霉病菌(B)的熏蒸抑制作用

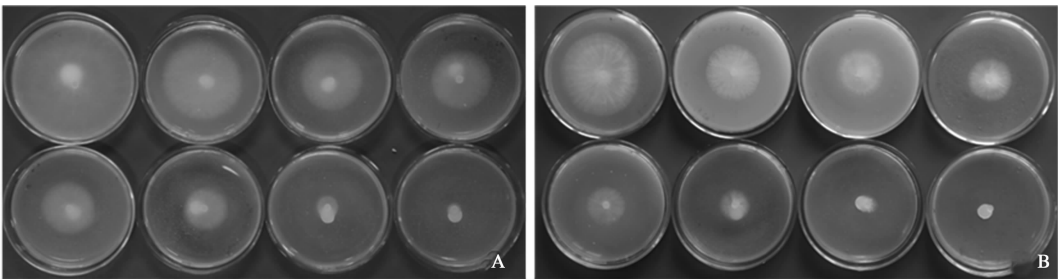


图 3 黄花蒿挥发油对油菜菌核病菌 (A) 和水稻纹枯病菌 (B) 的熏蒸抑制作用

表 2 黄花蒿挥发油对植物病原真菌菌丝生长的熏蒸抑制作用

挥发油剂量/ ($\mu\text{L}/\text{皿}$)	抑制率/%			
	番茄灰霉病菌	小麦赤霉病菌	油菜菌核病菌	水稻纹枯病菌
0.5	40.60	36.21	28.87	44.52
1.0	52.71	40.93	42.02	54.06
1.5	58.48	44.91	47.18	61.48
2.0	69.43	56.23	50.23	70.67
2.5	76.07	62.63	56.10	78.80
5.0	93.66	85.05	79.58	88.34
10.0	99.13	91.46	93.66	97.17

表 3 结果显示,黄花蒿挥发油对植物病原真菌菌丝生长均有强烈的熏蒸抑制作用。从 EC_{50} 分析,挥发油对水稻纹枯病菌的抑制作用最强, EC_{50} 仅为 $0.78\ \mu\text{L}/\text{皿}$,其次是番茄灰霉病菌, EC_{50} 为 $0.89\ \mu\text{L}/\text{皿}$,挥发油对小麦赤霉病菌和油菜菌核病菌的抑制作用相对较弱, EC_{50} 分别为 $1.32\ \mu\text{L}/\text{皿}$ 和 $1.52\ \mu\text{L}/\text{皿}$ 。

表 3 黄花蒿挥发油对植物病原真菌菌丝生长的毒力测定结果

植物病原真菌	毒力回归方程	相关系数	$\text{EC}_{50}/(\mu\text{L}/\text{皿})$	95% 置信限/ $(\mu\text{L}/\text{皿})$
番茄灰霉病菌	$Y=0.090+1.763X$	0.946	0.89	0.61~1.15
小麦赤霉病菌	$Y=-0.170+1.424X$	0.932	1.32	0.89~1.78
油菜菌核病菌	$Y=-0.272+1.496X$	0.941	1.52	1.12~1.97
水稻纹枯病菌	$Y=0.163+1.485X$	0.967	0.78	0.60~0.95

3 结论与讨论

多项研究显示,不同地区的黄花蒿挥发油组分和含量存在差异^[20-23],本试验通过 GC-MS 从信阳产的黄花蒿挥发油中分离到 28 个组分,鉴定出了其中的 24 个组分,主要为蒿酮、桉油精、樟脑等。据报道,石家庄野生黄花蒿挥发油的主要化学成分为蒿酮、右旋樟脑和石竹烯^[20],湘西黄花蒿挥发油的主要组分为杜松醇、脱氧青蒿素、1H-环丙烷萜、1,3-二氧杂环己烷-4,6-二酮、 α -愈创木烯等^[21],陕北产黄花蒿挥发油的主要组分为(-)-斯巴醇、石竹烯氧化物和视黄醛^[22]。本研究结果显示,信阳产黄花蒿挥发油主要组分与石家庄产黄花蒿挥发油主要组分较为接近,与湘西、陕北产黄花蒿挥发油差异较大。蒿酮、桉油精、樟脑、石竹烯等化合物在生活中常被用于食品工业、医药工业、化妆品生产中,在农用上开发利用较少^[25-28]。

本试验发现,信阳地区的黄花蒿挥发油对供试的 4 种植物病原真菌均有强烈的熏蒸抑制作用,其中对水稻纹枯病菌和番茄灰霉病菌的抑制作用较强, EC_{50} 仅为 $0.78\ \mu\text{L}/\text{皿}$ 和 $0.89\ \mu\text{L}/\text{皿}$ 。有学者^[14]采用抑菌圈法和孢子萌发法测定了黄花蒿不同溶剂提取物对青霉、绵霉和黑曲霉的抑菌活性,结

果显示,黄花蒿不同溶剂提取物对 3 种病原菌都有一定的抑制作用。可见,黄花蒿挥发油中含有某些抑菌活性物质,这些活性物质能抑制病原菌菌丝的生长或者孢子的萌发。

黄花蒿挥发油对植物病原真菌的抑制作用可能是多种成分协同作用的结果,单体组分在抑菌活性中发挥的作用,有待进一步研究,进而可找到抑菌活性高的化合物。从植物提取物中寻找有生物活性的物质是开发、研制新型农药的有效途径之一,可以对挥发油中活性物质进行分离、筛选,直接作为植物源农药;也可以以活性物质为先导化合物,通过结构改造,合成新的化学农药。黄花蒿在全国极为常见,且易于人工栽培,是一种理想的植物源农药来源,以其为原料进行植物源抗菌剂的开发,将具有广阔的前景和深远的意义。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志第 76 卷第 2 分册[M]. 北京: 科学出版社,1991:62-63.
[2] 王轶. 青蒿素最佳提取工艺研究[J]. 河南农业科学, 2007(7):84-86.
[3] 薛丹,程慧芳,毋海兰,等. 用 SYBR green I 法和流式细胞术体外评价 3 种青蒿素类药物的抗疟活性[J].

- 国际医学寄生虫病杂志,2014,41(4):218-222.
- [4] 曹慧,李国庆. 青蒿素类药物的生物学活性应用研究进展[J]. 微生物学免疫学进展,2016,44(2):84-88.
- [5] Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, *et al.* The anti-malarial artesunate is also active against cancer[J]. International Journal of Oncology, 2001, 18(4):767-773.
- [6] 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.
- [7] 王振吉,杨申明,沈慧,等. 黄花蒿提取物对菜蚜的杀虫活性研究[J]. 西部林业科学,2014,43(4):136-139.
- [8] Juteau F, Masotti V, Bessiere J M, *et al.* Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil[J]. Fitoterapia, 2002, 73:532-535.
- [9] 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.
- [10] 张永强,丁伟,赵志模,等. 不同生长时期黄花蒿提取物对朱砂叶螨的生物活性[J]. 生态学杂志,2007,26(12):1969-1973.
- [11] 尚德斌,骆星丹,李春华,等. 黄花蒿杀螨活性物质的提取分离及活性评价[J]. 中国农学通报,2007,23(2):360-363.
- [12] 武月红. 六种蒿属植物提取物抑菌效果的比较研究[J]. 北方园艺,2014(19):121-125.
- [13] 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):713-715,718.
- [14] 葛水莲,叶嘉,陈建中,等. 黄花蒿提取物离体抑菌活性研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(3):291-292.
- [15] Soylu E M, Yigitbas H, Tok F M, *et al.* Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Artemisia annua* L. against foliar and soil-borne fungal pathogens [J]. Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 2005, 112(3):229-239.
- [16] Désirée C K R, René F K P, Jonas K, *et al.* Antibacterial and antifungal activity of the essential oil extracted by hydro-distillation from *Artemisia annua* grown in West-Cameroon [J]. British Journal of Pharmacology and Toxicology, 2013, 4(3):89-94.
- [17] Bagechi G D, Jain D C, Kumar S, *et al.* Arteether: A potent plant growth inhibitor from *Artemisia annua* [J]. Phytochemistry, 1997, 45(6):1131-1133.
- [18] 孙娜娜,谭永钦,马洪菊,等. 黄花蒿对紫茎泽兰竞争效应的影响[J]. 华中农业大学学报,2015,34(1):34-44.
- [19] 陈建中,葛水莲,焦云红,等. 黄花蒿提取物在黄瓜保鲜中的应用研究[J]. 北方园艺,2013(1):169-171.
- [20] 张书锋,于新蕊,秦葵,等. 石家庄野生黄花蒿挥发油的化学成分分析[J]. 湖南中医杂志,2012,28(3):131-132.
- [21] 张凤杰,陈功锡,刘祝祥. 湘西产黄花蒿挥发性成分分析[J]. 中药材,2010,33(11):1743-1748.
- [22] 杨华,李龚,田锐,等. 陕北野生黄花蒿挥发油化学成分分析[J]. 广东农业科学,2009,20(1):71-72.
- [23] 张秀玲. 山东产中药黄花蒿挥发油成分研究[J]. 黄冈师范学院学报,2005,25(3):44-47.
- [24] 陈利军,智亚楠,王国君,等. 土荆芥花序和叶挥发油的抑菌作用及组分分析[J]. 植物保护,2014,40(5):40-43.
- [25] 马兴苗,周静,范玲,等. 桉油精对补骨脂素体外抗肿瘤活性的增效作用研究[J]. 中成药,2013,35(5):903-908.
- [26] 盖静,王俊丽,安宝文,等. HPLC - DAD 法测定复方樟脑搽剂中樟脑和苯酚的含量[J]. 西北国防医学杂志,2015,36(2):87-89.
- [27] 何兵,田吉,刘艳,等. HPLC 测定 11 种中药挥发油中桉油精的含量[J]. 药物分析杂志,2012,32(5):769-771.
- [28] Bandna, Jaitak V, Kaul V K, *et al.* Synthesis of novel acetates of β -caryophyllene under solvent-free Lewis acid catalysis[J]. Natural Product Research, 2009, 23(15):1445-1450.