

蓝翠雀花挥发油的提取及生物活性研究

梁雨晨

兰州交通大学化学与化工学院, 甘肃 兰州

收稿日期: 2024年3月20日; 录用日期: 2024年4月29日; 发布日期: 2024年5月6日

摘要

蓝翠雀花(*Delphinium caeruleum* Jacquem. ex Cambess.)是毛茛科(*Ranunculaceae* Juss.)翠雀属(*Delphinium* L.)多年生草本植物。用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)对蓝翠雀花的化学成分进行分析。从蓝翠雀花挥发油中鉴定出了35个化合物, 并对其进行抗菌活性检测, 抑菌实验结果显示其对枯草芽孢杆菌和大肠杆菌有抑菌活性。

关键词

蓝翠雀花, 挥发油, 抑菌活性

Extraction and Biological Activity of Volatile Oil from *Delphinium caeruleum*

Yuchen Liang

School of Chemistry and Chemical Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou Gansu

Received: Mar. 20th, 2024; accepted: Apr. 29th, 2024; published: May 6th, 2024

Abstract

Delphinium caeruleum is a perennial herb of *Delphinium* in the *Ranunculaceae* Juss family. The chemical composition of the flowers was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Thirty-five compounds were identified from the volatile oil of *Delphinium caeruleum* and their antibacterial activities were tested. The results of antibacterial experiments showed that they had antibacterial activities against *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*.

Keywords

Delphinium caeruleum, Volatile Components, Antibacterial Activity



1. 引言

蓝翠雀花(*Delphinium caeruleum Jacquem. ex Cambess.*)是毛茛科(*Ranunculaceae Juss.*)翠雀属(*Delphinium L.*)多年生草本植物[1]。主要分布于中国西藏、四川西部、青海、甘肃等地,生长于海拔2100~4000米山地草坡或多石砾山坡,在尼泊尔、印度、不丹也有分布[2] [3]。目前关于蓝翠雀花的化学成分研究鲜有报道,结合其他翠雀属植物的化学成分分析成果,初步判断其主要含有二萜生物碱、黄酮、甾醇、脂肪酸等类型的化合物[4] [5]。

挥发油是香料植物的花、叶、果实、种子等部位提取到的挥发性芳香物质的总称,其大多数都含有香味,极易挥发。其主要的提取方法主要为水蒸气蒸馏法、冷压榨法、溶剂萃取法和脂吸法[6]。中药挥发油主要来源于芳香类中药,而我国的中草药种类丰富多样,并有着悠久的历史。在现代科学高速发展的背景下,可以看出中药挥发油在抗病毒和抗菌领域具备巨大的发展潜力[7] [8]。在对该植物进行提取过程中发现其香气很浓,猜测该植物含有丰富的挥发油成分,但关于蓝翠雀花中化学成分的报道文献不是很多,其中关于挥发油及其活性方面的研究还未见文献报道。

故本文以蓝翠雀花为原料,用水蒸气蒸馏法提取挥发油成分,再用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)对其进行化学成分分析,采用滤纸片法对挥发油的抑菌活性进行研究。

2. 实验部分

2.1. 植物来源

本课题使用的植物为蓝翠雀花,于2021年9月采自于青海省青藏高原,经青海师范大学确生教授鉴定为毛茛科翠雀属植物蓝翠雀花,植物标本存放于兰州交通大学博学楼(六号实验楼)517。

2.2. 实验仪器与材料

(1) 主要仪器

本实验中所用到的主要仪器及生产厂家见表1。

Table 1. Main experimental instruments

表 1. 主要实验仪器

仪器名称	型号	生产厂家
超净工作台	SW-CJ-2D	苏州净化设备有限公司
恒温培养箱	SPX-250-GB	上海琅玕实验设备有限公司
立式压力蒸汽灭菌锅	BXM-30R	上海博讯实业有限公司医疗设备厂
电子分析天平	FA1004	浙江力辰仪器有限公司
恒温摇床	TS 系列	上海习仁科学仪器有限公司
超声波清洗器	KQ-250B	昆山市超声仪器有限公司
真空干燥箱	DZF-6010	巩义市予华仪器有限责任公司
循环水式真空泵	SHB-B95T	郑州长城科工贸有限公司
旋转蒸发器	N-1100	上海爱朗仪器有限公司

(2) 主要试剂

本实验中所用到的所用试剂均为分析纯、色谱纯，具体试剂材料及生产厂家见表 2。

Table 2. Main experimental reagents**表 2.** 主要实验试剂

试剂	纯度	生产厂家
蛋白胨	生化试剂	天津市大茂化学试剂有限公司
酵母提取物	生化试剂	北京奥博星生物科技有限责任公司
氯化钠	分析纯	天津市大茂化学试剂有限公司
琼脂	生化试剂	上海广瑞生物科技有限责任公司
二甲基亚砜	分析纯	天津市富宇精细化工有限公司

培养基的配制:

① LB 液体培养基: 牛肉膏蛋白胨液体培养基: 氯化钠 10 g, 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 蒸馏水 1000 mL, 调节 pH 至 7.4, 高压灭菌锅 121°C 灭菌 30 min, 4°C 冰箱保存待用;

② LB 固体培养基: 向配置好的液体培养基中, 再添加 20 g 琼脂, 121°C 灭菌 30 min, 即得到固体培养基;

③ PDA 培养基: 去皮马铃薯 200 g, 加热煮沸 30 min, 用八层纱布过滤除去不溶物, 加入 20 g 葡萄糖, 20 g 琼脂, 即得到 PDA 培养基。

(3) 实验菌株

本实验所使用的供试病原菌菌株均由兰州交通大学天然药物研究所提供, 具体实验菌株见表 3。

Table 3. Main experimental strains**表 3.** 主要实验菌株

菌种	拉丁名
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>
大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>
枯草芽孢杆菌	<i>Bacillus subtilis</i>

菌悬液的制备:

用接种环将待测菌种接种到液体培养基中, 在摇床上培养至对数期, 将细菌配制成菌液浓度为 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL, 真菌配制成 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL 的孢子悬浮液。

2.3. 挥发油的提取、鉴定

(1) 提取方法

水蒸气蒸馏法是提取植物性天然香料最经典的一种方法, 本实验采用水蒸气蒸馏法对蓝翠雀花的挥发油进行提取[9]。称取蓝翠雀花全草粉末 100 g, 装入 1000 ml 的圆底烧瓶, 加入 400 ml 蒸馏水浸泡 12 h。参照 2010 年版《中华人民共和国药典》, 水蒸气蒸馏法提取 8 h, 然后冷却至室温, 用乙醚萃取馏出水相 3 次, 分别处理馏出液油状物与萃取液, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 环己烷清洗, 旋转蒸发仪将其减压浓缩后, 转移至西林瓶中避光保存, 做好标记, 重复以上实验三次。蓝翠雀花挥发油是具有特殊气味的淡黄色油状液体。

(2) 气相色谱 - 质谱分析条件

气相色谱 - 质谱联用技术(GC-MS)同时具有气相色谱的强分离能力和质谱对未知化合物的高鉴定能力, 是医药卫生、食品、环境等各领域分离和检测复杂挥发性成分的重要工具[7] [8]。

气相色谱条件: GC-MS 接口温度为 230°C, 柱温程序为 60°C 保持 1 分钟, 并以 2.5°C/min 的速率升高至 210°C, 保持 5 分钟, 然后以 10°C/min 速率升至 280°C 并保持 1 分钟。以氦气作为载气的流速为 1.2 mL/min, 进样量 0.2 μ L。

质谱条件: EI 离子源, 离子源温度为 230°C, 电离电压是 70 eV。

(3) 挥发油 GC-MS 成分分析结果

采取水蒸气蒸馏法提取蓝翠雀花的挥发油, 得到具有特殊气味的淡黄色液 0.462 g, 出油率是 0.154%。经 GC-MS 分析, 共得到了 35 个化合物。将 GC-MS 分析后的质谱图通过 NIST 谱图库并核对相关文献确定其化学组成, 绘制成表 4。

Table 4. Chemical components of the volatile oil of *Delphinium caeruleum*

表 4. 蓝翠雀花挥发油的化学成分

序号	保留时间 t/min	化合物名称	分子式
1	21.1	2,4-Di-tert-butylphend	C ₁₄ H ₂₂ O
2	21.46	1,3-Benzodioxole, 4-methoxy-6-(2-propenyl)-	C ₁₁ H ₁₂ O ₃
3	28.53	Methyl tetradecanoate	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
4	30.77	(Z)-Ethyl pentadec-9-enoate	C ₁₇ H ₃₂ O ₂
5	31.9	cis-10-Pentadecenoic acid, butyl ester	C ₁₉ H ₃₆ O ₂
6	31.44	Pentadecanoic acid, methyl ester	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
7	33.18	7,10-Hexadecadienoic acid, methyl ester	C ₁₇ H ₃₀ O ₂
8	33.34	7,10,13-Hexadecatrienoic acid, methyl ester	C ₁₇ H ₂₈ O ₂
9	33.46	Methyl hexadec-9-enoate	C ₁₇ H ₃₂ O ₂
10	33.69	9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	C ₁₇ H ₃₂ O ₂
11	33.95	Hexadecanoic acid, methyl ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
12	35.17	Butyl myristate	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
13	35.23	Hexadecanoic acid, ethyl ester	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
14	35.46	Cyclopropanebutanoic acid,2-[[2-[[2-[(2pentylcyclopropyl)methyl]cyclopropyl]methyl]cyclopropyl]methyl]-, methyl ester	C ₂₅ H ₄₂ O ₂
15	35.97	Heptadecanoic acid, methyl ester	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
16	37.52	9,12-Octadecadienoic acid(Z,Z)-, methyl ester	C ₁₉ H ₃₄ O ₂
17	37.56	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)	C ₁₉ H ₃₂ O ₂
18	37.87	Methyl stearate	C ₁₉ H ₃₈ O ₂
19	38.39	9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester, (Z,Z,Z)	C ₂₀ H ₃₄ O ₂
20	38.43	Linoleic acid ethyl ester	C ₂₀ H ₃₆ O ₂
21	38.66	cis-9-Hexadecenoic acid, heptyl ester	C ₂₃ H ₄₄ O ₂
22	38.83	Hexadecanoic acid, butyl ester	C ₂₀ H ₄₀ O ₂
23	40.72	7,10,13-Eicosatrienoic acid, methyl ester	C ₂₁ H ₃₆ O ₂

续表

24	40.94	9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester, (Z,Z,Z)-	C ₂₀ H ₃₄ O ₂
25	41.48	Butyl 9,12-octadecadienoate	C ₂₂ H ₄₀ O ₂
26	41.62	Butyl 9,12,15octadecatrienoate	C ₂₂ H ₃₈ O ₂
27	42.44	Phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-	C ₂₃ H ₃₂ O ₂
28	42.6	1H-2,8a-Methanocyclopenta[a]cyclopropano[e]cyclodecen-11-one, 1a,2,5,5a,6,9,10,10a,10b,11,11a,11b,11c,12,12a,12b,12c,12d,12e,12f,12g,12h,12i,12j,12k,12l,12m,12n,12o,12p,12q,12r,12s,12t,12u,12v,12w,12x,12y,12z,13,13a,13b,13c,13d,13e,13f,13g,13h,13i,13j,13k,13l,13m,13n,13o,13p,13q,13r,13s,13t,13u,13v,13w,13x,13y,13z,14,14a,14b,14c,14d,14e,14f,14g,14h,14i,14j,14k,14l,14m,14n,14o,14p,14q,14r,14s,14t,14u,14v,14w,14x,14y,14z,15,15a,15b,15c,15d,15e,15f,15g,15h,15i,15j,15k,15l,15m,15n,15o,15p,15q,15r,15s,15t,15u,15v,15w,15x,15y,15z,16,16a,16b,16c,16d,16e,16f,16g,16h,16i,16j,16k,16l,16m,16n,16o,16p,16q,16r,16s,16t,16u,16v,16w,16x,16y,16z,17,17a,17b,17c,17d,17e,17f,17g,17h,17i,17j,17k,17l,17m,17n,17o,17p,17q,17r,17s,17t,17u,17v,17w,17x,17y,17z,18,18a,18b,18c,18d,18e,18f,18g,18h,18i,18j,18k,18l,18m,18n,18o,18p,18q,18r,18s,18t,18u,18v,18w,18x,18y,18z,19,19a,19b,19c,19d,19e,19f,19g,19h,19i,19j,19k,19l,19m,19n,19o,19p,19q,19r,19s,19t,19u,19v,19w,19x,19y,19z,20,20a,20b,20c,20d,20e,20f,20g,20h,20i,20j,20k,20l,20m,20n,20o,20p,20q,20r,20s,20t,20u,20v,20w,20x,20y,20z,21,21a,21b,21c,21d,21e,21f,21g,21h,21i,21j,21k,21l,21m,21n,21o,21p,21q,21r,21s,21t,21u,21v,21w,21x,21y,21z,22,22a,22b,22c,22d,22e,22f,22g,22h,22i,22j,22k,22l,22m,22n,22o,22p,22q,22r,22s,22t,22u,22v,22w,22x,22y,22z,23,23a,23b,23c,23d,23e,23f,23g,23h,23i,23j,23k,23l,23m,23n,23o,23p,23q,23r,23s,23t,23u,23v,23w,23x,23y,23z,24,24a,24b,24c,24d,24e,24f,24g,24h,24i,24j,24k,24l,24m,24n,24o,24p,24q,24r,24s,24t,24u,24v,24w,24x,24y,24z,25,25a,25b,25c,25d,25e,25f,25g,25h,25i,25j,25k,25l,25m,25n,25o,25p,25q,25r,25s,25t,25u,25v,25w,25x,25y,25z,26,26a,26b,26c,26d,26e,26f,26g,26h,26i,26j,26k,26l,26m,26n,26o,26p,26q,26r,26s,26t,26u,26v,26w,26x,26y,26z,27,27a,27b,27c,27d,27e,27f,27g,27h,27i,27j,27k,27l,27m,27n,27o,27p,27q,27r,27s,27t,27u,27v,27w,27x,27y,27z,28,28a,28b,28c,28d,28e,28f,28g,28h,28i,28j,28k,28l,28m,28n,28o,28p,28q,28r,28s,28t,28u,28v,28w,28x,28y,28z,29,29a,29b,29c,29d,29e,29f,29g,29h,29i,29j,29k,29l,29m,29n,29o,29p,29q,29r,29s,29t,29u,29v,29w,29x,29y,29z,30,30a,30b,30c,30d,30e,30f,30g,30h,30i,30j,30k,30l,30m,30n,30o,30p,30q,30r,30s,30t,30u,30v,30w,30x,30y,30z,31,31a,31b,31c,31d,31e,31f,31g,31h,31i,31j,31k,31l,31m,31n,31o,31p,31q,31r,31s,31t,31u,31v,31w,31x,31y,31z,32,32a,32b,32c,32d,32e,32f,32g,32h,32i,32j,32k,32l,32m,32n,32o,32p,32q,32r,32s,32t,32u,32v,32w,32x,32y,32z,33,33a,33b,33c,33d,33e,33f,33g,33h,33i,33j,33k,33l,33m,33n,33o,33p,33q,33r,33s,33t,33u,33v,33w,33x,33y,33z,34,34a,34b,34c,34d,34e,34f,34g,34h,34i,34j,34k,34l,34m,34n,34o,34p,34q,34r,34s,34t,34u,34v,34w,34x,34y,34z,35,35a,35b,35c,35d,35e,35f,35g,35h,35i,35j,35k,35l,35m,35n,35o,35p,35q,35r,35s,35t,35u,35v,35w,35x,35y,35z	C ₂₀ H ₂₈ O ₆
29	45.68	1b,4a-Epoxy-2Hcyclopenta[3,4]cyclopropano[8,9]cycloundec[1,2-b]oxiren-5(6H)-one, 7-(acetyloxy)decahydro-2,9,10trihydroxy-3,6,8,8,10apentamethyl-	C ₂₂ H ₃₂ O ₈
30	47.38	Butyl 9,12,15octadecatrienoate	C ₂₂ H ₃₈ O ₂
31	47.47	E,E,Z-1,3,12-Nonadecatriene-5,14-diol	C ₁₉ H ₃₄ O ₂
32	47.75	Hexadecanoic acid, decyl ester	C ₂₆ H ₅₂ O ₂
33	49.51	4H-Cyclopropano[5,6]benz[1',2':7,8]azuleno[5,6-b]oxiren-4one, 8-(acetyloxy)-1,1a,1b,1c,2a,3,3a,6a,6b,7,8, 8a-dodecahydro-3a,6b,8atrihydroxy-2a-(hydroxymethyl)-1,1,5,7tetramethyl-, [1ar-(1a.alpha.,1b.beta.,1c.alpha.,2a.alpha.,3a.beta., 6a.alpha.,6b.alpha.,7.alpha.,8.beta.,8a.alpha.)]-	C ₂₂ H ₃₀ O ₈
34	51.86	Butyl 9,12-octadecadienoate	C ₂₂ H ₄₀ O ₂
35	52.23	Butyl 9,12,15octadecatrienoate	C ₂₂ H ₃₈ O ₂

2.4. 挥发油的抗菌活性研究

挥发油的抗菌实验通常采用琼脂扩散法-滤纸片法及 MTT 法。滤纸片法是通过抑菌圈的直径大小来直接衡量挥发油的抗菌活性，此法操作简便、结果直观。MTT 法是间接的反映药物对细胞的抑制作用，再根据颜色深浅通过酶标仪测定吸光度值，即二甲亚砜(DMSO)溶解活细胞中由琥珀酸脱氢酶将淡黄色的 MTT 还原成水不溶性的蓝紫色结晶甲臜。MTT 法还经常被用于微生物的抑菌率测定。本实验采用了易于观察、便于操作的滤纸片法来测定蓝翠雀花挥发油的抑菌活性。

(1) 实验方法

从灭菌锅中取出 PDA 固体培养基的锥形瓶，降温至 50℃左右，在超净台中倒入直径为 9 cm 的培养皿，每个培养皿约 20 ml，待凝固后，用移液枪取 200 μL 稀释后的菌液，用涂布棒涂布均匀。将活化好的植物病原真菌菌株用打孔器制成直径为 6 mm 的菌饼，并用无菌接种针倒扣放置在 PDA 平板的中心。用无菌镊子夹取已灭菌的直径 6 mm 的无菌滤纸片，每块平板上对称放置 2 张滤纸片，使用移液枪吸取 20 μL 的蓝翠雀花挥发油(1 mg/ml)滴加至滤纸片上，另一个滤纸片加 20 μL 的二甲基亚砜做空白对照，每个样品设置 3 个平行实验。将培养皿置于 37℃培养箱中培养 18~24 h，根据抑菌圈的大小评估抑菌活性的强弱。每个样品设置 3 个平行实验。

(2) 实验结果

在药物浓度为 1 mg/ml 时，蓝翠雀花挥发油对枯草芽孢杆菌和大肠杆菌有抑菌作用，对于其他植物病原真菌，均无明显抑菌活性。

3. 结果与讨论

采用水蒸气蒸馏法提取了蓝翠雀花的挥发油，运用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术分析其挥发油

成分。从中共鉴定出 35 个化合物。对蓝翠雀花挥发油成分运用滤纸片法进行抗菌活性测定,如图 1 所示,在培养皿中均匀涂满枯草芽孢杆菌和大肠杆菌的菌液,蓝雀翠花挥发油呈现出较强的抑菌活性,在培养皿右侧含有蓝雀翠花挥发油的无菌滤纸片周围出现抑菌圈,其对枯草芽孢杆菌和大肠杆菌有抑菌活性,但对于金黄色葡萄球菌没有出现抑菌活性。并进行平行实验测量抑菌圈的直径见表 5。



Figure 1. Antibacterial activity of *Bacillus subtilis* (left) and *E. coli* (right)
图 1. 枯草芽孢杆菌(左)以及大肠杆菌(右)的抑菌活性

Table 5. Inhibition results of volatile oils against three plant pathogenic fungi
表 5. 挥发油对三种植物病原真菌的抑制结果

病原真菌	抑菌圈平均值
枯草芽孢杆菌	11.2 mm
大肠杆菌	15.3 mm
金黄色葡萄球菌	-

4. 总结

本实验的目的是对蓝翠雀花的挥发油成分及其生物活性进行全面研究。通过分析蓝翠雀花中的挥发油成分,我们可以更加深入地理解其化学组成和特征,为进一步探索其潜在药用价值或为其他应用领域提供基础数据。首先,通过鉴定主要化合物对蓝翠雀花中挥发油成分进行详细分析。此外,在评估这些挥发油的生物活性方面,我们可以初步判断蓝翠雀花挥发油在医药领域或其他应用领域中是否具有潜在价值。总之,本次实验旨在全面了解蓝翠雀花挥发油成分及其生物活性,并为进一步开展相关应用和深入探究提供科学依据。希望通过这项工作能够为该植物资源有效利用和新产品开发提供参考,并促进相关领域的科学交流与合作。

参考文献

- [1] 潘远江, 王锐, 陈绍农, 等. 藏药蓝翠雀花中的新二萜生物碱[J]. 高等学校化学学报, 1992, 13(11): 2.
- [2] Chen, S., Meng, L., El-Demerdash, F.M., *et al.* (2020) Review of Compounds and Pharmacological Effects of Delphinium. *Journal of Chemistry*, 2020, Article ID: 9375619. <https://doi.org/10.1155/2020/9375619>
- [3] 刘世军, 廖志新, 唐志书, 等. 蓝翠雀花的化学成分研究[J]. 中药材, 2016(2): 4.
- [4] Wada, K., Asakawa, E., Toshio, Y., *et al.* (2016) Four New Diterpenoid Alkaloids from *Delphinium elatum*. *Phytochemistry Letters*, 17, 190-193. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.06.009>
- [5] He, Y.Q., Ma, Z.Y., Wei, X.M., *et al.* (2010) Chemical Constituents from *Delphinium chrysotrichum* and Their Bio-

-
- logical Activity. *Fitoterapia*, **81**, 929-931. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.06.008>
- [6] Yin, T., Cai, L. and Ding, Z.J.R.A. (2020) An Overview of the Chemical Constituents from the Genus *Delphinium* Reported in the Last Four Decades. *RSC Advances*, **10**, 13669-13686. <https://doi.org/10.1039/D0RA00813C>
- [7] Díaz, J.G., Marapara, J.L., Valdés, F., *et al.* (2005) Dianthramide Glucosides from Tissue Cell Cultures of *Delphinium staphisagria* L. *Phytochemistry*, **66**, 733-739. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.10.021>
- [8] Wang, F.P. and Yan, L.P. (2007) Campylopin from *Delphinium campylocentrum*, the First Hetidane C₂₀-Diterpene, Suggests a New Alkaloid Biogenetic Pathway. *Tetrahedron*, **63**, 1417-1420. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.11.078>
- [9] Yan, Y., Jiang, H., Yang, X., *et al.* (2022) Grandiflolines A-F, New Anti-Inflammatory Diterpenoid Alkaloids Isolated from *Delphinium grandiflorum*. *Frontiers in Chemistry*, **10**. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.1012874>