

清香木叶挥发油成分及其抑菌作用

周葆华

(安庆师范学院资源环境学院 安庆 246011)

摘 要 采用水蒸汽蒸馏法(SD)提取清香木叶挥发油,采用 GC-MS 联用技术分析了挥发油的化学成分,采用杯碟法和 Almar blue 法检测了其抑菌和抗肿瘤活性。结果表明,从清香木叶挥发油中分离鉴定出 29 种化合物,占挥发油总质量的 99.54%。清香木叶挥发油中的活性物质对大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、红酵母(*R. glutinis*)均有较强的抑制活性;对体外人非小细胞肺癌(NCH460)细胞核有显著的抑制作用,且其抑制作用与浓度呈正相关,当质量浓度达到 0.1 g/L 时,抑制率达 92.56%。

关键词 清香木,挥发油,GC-MS 生物活性

中图分类号:O629.6

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2008)03-0305-04

清香木(*Pistacia weinmannifolia*)漆树科黄连木属常绿灌木或小乔木,别名香叶树、紫柚木、青香树,性喜温暖、耐干热,野生于我国云南中部、北部及四川南部等海拔 1 300~2 300 m 的干热河谷地带。树形美观,叶清香,果呈红色;皮、叶可提取芳香油,叶及树皮供药用,有消炎解毒、收敛止泻功效^[1]。茎干制作生活用品,园林中常用作盆景植物和观果植物,民间用作香料,具有多种食用、药用、材用功能。有报道^[2]清香木散发出来的味道有驱逐苍蝇、蚊子作用,但关于清香木叶挥发油化学成分及其生物活性的研究尚未见报道。本文采用水蒸汽蒸馏法提取了购自安庆市盆栽清香木叶挥发油,采用 GC-MS 联用技术对其化学成分进行了分析和鉴定。采用杯碟法和 Almar blue 法探讨了提取挥发油的抑菌作用和抗肿瘤活性。

1 实验部分

1.1 材料、试剂和仪器

清香木鲜叶(安徽省安庆市花卉市场盆栽),金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、大肠杆菌(*E. coli*)和红酵母(*R. glutinis*) (上海工程技术有限公司),肺癌细胞 NCH460 (美国 ATCC),乙醚、无水硫酸钠、丙酮等均为分析纯试剂;6890 型气相色谱仪(美国 Agilent 公司);5973N 型质谱仪(美国 Agilent 公司);Spectro Max M2 型荧光检测仪(德国斯派克公司);RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 挥发油提取 取新鲜阴干清香木叶 150 g 剪碎后置于挥发油提取器中,水蒸气常压蒸馏 8 h 蒸馏出的液体用乙醚萃取 3 次,萃取液浓缩后,再用无水硫酸钠干燥,过滤后除去溶剂,得浅黄色透明挥发油,具有很浓的香味,提取率(油/样品干质量)为 0.52%。

1.2.2 挥发油化学成分分析 (1)气相色谱采用 HP-5MS 弹性石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm),气化室温度 280 °C,柱温采取程序升温方式从 70 °C 开始(恒温 2 min),以 10 °C/min 的速率升至 255 °C(恒温 25 min),再以 10 °C/min 的速率升至 270 °C(恒温 5 min),载气(He 气)流量 60 mL/min (2)质谱采用载气为 He 气,进样量 1.0 μL,分流比 50:1,离子源温度为 230 °C, E 离子源(电子轰击源),电离电压为 70 eV 相对分子质量扫描范围 30~550 AMU,扫描周期 1 s。

各成分经质谱扫描后得到质谱图 1,经计算机质谱数据库检索,按各色谱峰的质谱裂片图并结合有

关文献^[3]对基峰质荷比和相对丰度等进行直观比较,同时还对一些主要组分采用标准物质对照,分别对各色谱峰代表物质加以确认,用面积归一化法测得各组分的含量。

1.2.3 抗菌活性测试 采用杯碟法^[4~9],将清香木叶挥发油用丙酮稀释至 1×10^{-2} g/mL,以丙酮溶液作对比。以 2 mL 的琼胶培养基放入陪替氏培养皿内做成平面,然后分 3 组,每组为 5 个进行处理,上面分别加上预先培养的大肠杆菌、红酵母、金黄色葡萄球菌,使之凝固,然后上面再放上一个外径 8 mm 的不锈钢圆筒,筒内倒满挥发油稀释液(质量浓度为 1×10^{-2} g/mL)之后,在 35~37℃培养 12~16 h。由于圆筒周围产生浓度梯度,大肠杆菌、红酵母、金黄色葡萄球菌的繁殖被阻止于有效浓度范围之内而形成圆形的透明带。

1.2.4 肿瘤抑制率测试 抗肿瘤采用 Alamar blue 法^[7,8],Alamar blue 贮存液用培养基以体积比为

1:10 比例稀释,每孔 2 mL,4 h 后用荧光检测仪检测。由于活细胞的氧化还原酶能将 Alamar blue 还原成红色荧光物质,在酶标仪下能测定其荧光值,活细胞数量越多,荧光值越大。样品对细胞的抑制率为:

抑制率 (%) =

对照荧光值 - 样品荧光值

对照荧光值

× 100%

2 结果与讨论

2.1 清香木叶挥发油的化学成分

挥发油的 GC-MS 联用分析结果表明,清香木叶含挥发油 0.52%,其化学成分比较复杂,共鉴定出 29 种化合物,占总质量的 99.54%,化合物名称及相对含量见表 1。化学成分有萜烯类、酮、酯、烷烃和醛类化合物。绝大部分为萜烯类化合物(16 种),占挥发油中已鉴定化合物的 55.17%,相对含量占总质量的 86.80%。其中反式肉桂酸甲酯(相对含量 80.53%)、环十二酮(6.296%)、1-甲基-4-异丙基-2-环己烯-1-醇(1.311%)、桉叶油(1.301%)、戊二酸二丁酯(1.095%)、为清香木叶挥发油的主要成分。大量萜烯类化合物的存在,不但使挥发油具有浓郁的芳香气味,而且具有杀菌消毒的功效^[9]。

表 1 清香木叶挥发油的化学成分

Table 1 The chemical components of volatile oil in the leaves of *Pistacia weinmannifolia*

No. of peak	Compound	Retention time/min	Molecular formula	Relative content/%
1	β-caryophyllene	4.087	C ₁₅ H ₂₄	0.154
2	(+)-Sylvestrene	4.603	C ₁₅ H ₂₄	0.903
3	β-caryophyllene	4.627	C ₁₅ H ₂₄	0.549
4	Eucalyptol	4.650	C ₁₅ H ₂₆ O	1.301
5	Undecane	5.397	C ₁₁ H ₂₄	0.110
6	Alloocimene	5.439	C ₁₅ H ₂₆ O	0.953
7	1,4-Isopropyl-1-methyl-2-cyclohexen-1-ol	5.807	C ₁₅ H ₂₆ O	1.311
8	Rhodinal	6.145	C ₁₅ H ₂₆ O	0.110
9	(-)-4-Terpinol	6.565	C ₁₅ H ₂₆ O	0.172
10	(Z)-7-Hexadecenal	6.726	C ₁₆ H ₃₀ O	0.811
11	6-Isopropyl-3-methyl-2-cyclohexen-1-ol	6.957	C ₁₅ H ₂₆ O	0.334
12	3,7-dimethyl-2-octen-1-ol	7.141	C ₁₅ H ₂₆ O	0.323
13	Tridecane	8.065	C ₁₃ H ₂₈	0.256
14	Exo-2-Hydroxy-2-pentyl acetate	8.724	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	0.134
15	Terpinyl acetate	8.818	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	0.504

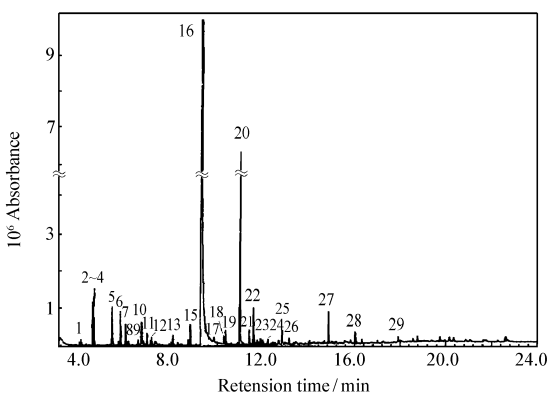


图 1 清香木叶挥发油总离子流图

Fig. 1 Total current chromatogram of the components of volatile oil in the leaves of *Pistacia weinmannifolia*

续表 1

No. of peak	Compound	Retention time/min	Molecular formula	Relative content/%
16	(E)-Methyl cinnamate	9.316	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	80.534
17	Methyl cinnamate	9.643	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	0.051
18	Humulene	10.289	C ₁₅ H ₂₄	0.206
19	Succinic acid diisobutyl ester	10.983	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	0.405
20	Cyclodecanone	11.398	C ₁₂ H ₂₂ O	6.296
21	2-(4,8-Dimethyl-3,7-cyclodecadien-1-yl)-2-propanol	11.587	C ₁₅ H ₂₆ O	0.400
22	Diethyl glutarate	11.890	C ₁₃ H ₂₄ O ₄	1.095
23	beta-Carophyllene oxide	12.198	C ₁₅ H ₂₄ O	0.143
24	1,5,5,8-Tetramethyl-12-oxabicyclo[9.1.0]deca-3,7-diene	12.198	C ₁₅ H ₂₄ O	0.153
25	Adipic acid bis(2-methylpropyl) ester	12.826	C ₁₄ H ₂₆ O ₄	0.435
26	3-Butyl-4-hexylbicyclo[4.3.0]nonane	13.141	C ₁₉ H ₃₆	0.176
27	DiBP	14.854	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	0.830
28	Ethyl palmitate	16.022	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	0.563
29	Heptacosane	17.902	C ₂₇ H ₅₆	0.324

2.2 清香木叶挥发油的抗菌活性

抗菌试验表明,清香木叶挥发油具有较强的抗菌活性,其中对金黄色葡萄球菌的抑制效果最好。挥发油质量浓度为 1×10^{-2} g/mL对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、大肠杆菌(*E. coli*)和红酵母(*R. glutinis*)的抑菌圈直径分别为 5.0、3.9和 3.7 cm(表 2)。

表 2 清香木叶挥发油的抗菌活性
Table 2 Antibacterial activity of volatile oil in the leaves of *P. weinmannifolia*

Strain	Diameter of antimicrobial circle/mm	
	Treatment group	Control group
<i>Staphylococcus aureus</i>	50.05±0.10**	6.03±0.15
<i>Escherichia coli</i>	39.15±0.25*	6.01±0.02
<i>Rhodotorula glutinis</i>	37.02±0.2*	0

* * shows extremely significant difference (P<0.01); * shows significant difference (P<0.05).

实验结果表明,清香木叶挥发油中具有多种抗革兰氏阳性菌、阴性菌和真核微生物的生物活性成分或协同作用成分。已报道^[10-11]的β水芹烯、石竹萜烯等都有较强的解热、抗炎、祛痰、抗菌作用,萜烯类化合物和大环类化合物均为很好的抑菌成分,说明清香木叶挥发油有开发为天然抗菌药物和空气清新剂及应用于香料工业和农业病虫害防治的潜力^[12]。

2.3 清香木叶挥发油的抗肿瘤活性

抗肿瘤试验结果表明,清香木叶挥发油对体外人非小细胞肺癌(NCH460)株细胞有很强的杀灭作用(图 2),并具有明显的浓度正相关性(表 3)。当挥发油质量浓度为 0.1 g/L时,抑制率为 92.56%。

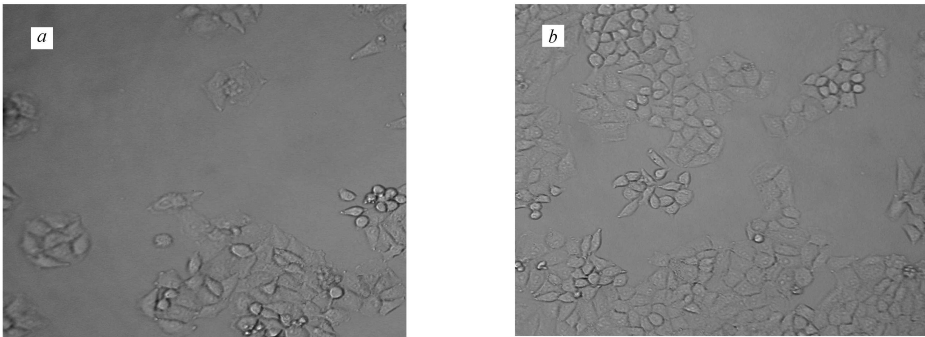


图 2 清香木叶挥发油抗肿瘤效果图
Fig 2 Anti-tumor effect of volatile oil in the leaves of *Pisacia weinmannifolia*
a: Treatment group(0.1 g/L); b: Control group

表 3 清香木叶挥发油的抗肿瘤活性
Table 3 Antitumor activity of volatile oil in the leaves of Pistacia weinmannifolia

α volatile oil/(mg L ⁻¹)	Inhibition rate/%	Relative standard deviation
6.25	22.29	0.30
12.5	32.85	0.18
25	45.56	0.23
50	65.26	0.06
100	92.56	0.28

参 考 文 献

1 Chinese Academy of Sciences The Editorial Committee of Flora Republicae Popularis Sinicae(中国科学院中国植物志编辑委员会). Flora Republicae Popularis Sinicae(中国植物志)[M]. Beijing(北京): Science Publishing House(科学出版社), 2005: 95

2 LIHuifan(李慧燕). Pistacia weinmannifolia is Outright Sale for Its Antimosquito Function(清香木据称防蚊卖断市). http://www.dayoo.com/gb/content/2003-05/24/content_1079874.htm, 2004: 5-24

3 CONG Pu-Zhu(丛蒲珠). The Application of GS in Natural Organic Chemistry(质谱在天然有机化学中的应用)[M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 1987: 230

4 QIAN Cun-Rou(钱存柔), HUANG Yi-Xin(黄仪秀). The Course of Microbiological Experiment(微生物学实验教程)[M]. Beijing(北京): Peking University Press(北京大学出版社), 2000

5 MA Xu-Rong(马绪荣), SU De-Mo(苏德模). The Handbook of Microbiological Inspection of Drugs(药品微生物学检验手册)[M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2000

6 LIU Dong-Mei(刘冬梅), LI Li(李理), YANG Xiao-Quan(杨晓泉), LIANG Shi-Zhong(梁世中). Food Res and Dev(食品研究与开发)[J], 2006: 27(3): 110

7 PAGE B PAGE M NELC. International J Oncology [J], 1993: 3: 473

8 Hamid R Roshayn Y Rabadil, Parikh R Bullock P. Toxicology in vitro [J], 2004: 18(5): 703

9 JIANG Ji-Wu(江纪武), XIAO Qing-Xiang(肖庆祥). The Effective Constituents of Herbal Drug(植物药有效成分手册)[M]. Beijing(北京): Light Industrial Press(轻工业出版社), 1989

10 SUN Ling-Feng(孙凌峰). Flavors Fragrance Cosmetics(香料香精化妆品)[J], 1990: (1): 22

11 SUN Wen-Ji(孙文基), SHENG Jin-Fang(绳金房). The Handbook of Natural Active Constituents(天然活性成分简明手册)[M]. Beijing(北京): Chinese Medical Publishing House(中国医药科技出版社), 1998: 226

12 XU Han-Hong(徐汉虹), ZHAO Shan-Huan(赵善欢). J South China Agricultural Univ(华南农业大学学报)[J], 1993: 14(4): 145

Volatile Oil in the Leaves of Pistacia weinmannifolia
and Their Antibacterial Effects

ZHOU BaoHua
(Colleges of Resources and Environment Anqing University Anqing 246011)

Abstract The volatile oil from Pistacia weinmannifolia's leaves was obtained by steam distillation and its chemical constituents were analyzed by GC-MS. Its biological activity was screened with microbiological method and AlamarBlue method. Analysis of the constituents of the volatile oil shows that 29 compounds were identified, accounting for 99.54% of its total content. The tested Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Rhodotorula glutinis showed great sensitivity to the volatile oil, and the volatile oil could also obviously inhibit the growth of cultured tumor cells (NCIH460). The inhibitory effects on the cell viability are dose dependent with a inhibition rate of 92.56% at a volatile oil concentration of 0.1 g/L.

Keywords Pistacia weinmannifolia, Volatile oil, GC-MS, biological activity