

深山含笑叶片的挥发油成分及其生物活性研究

操璟璟^{1,2}, 陈凤美², 龚玉霞^{1,2}, 李盼盼², 张小平^{1,①}

(1. 安徽师范大学国土资源与旅游学院, 安徽 芜湖 241000;

2. 徐州师范大学 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

摘要: 采用水蒸气蒸馏法及 GC-MS 联用技术提取并分析了深山含笑 (*Michelia maudiae* Dunn) 叶片的挥发油成分, 并用杯碟法和 Alamar blue 法检测了其抑菌和抗肿瘤生物活性。从深山含笑挥发油中共分离出 45 种化合物, 并鉴定出其中 37 种化合物, 占挥发油总相对含量的 97.8%; 挥发油主要成分有 莜烯 (16.575%)、 β -蒎烯 (15.857%)、D-柠檬烯 (12.653%)、丁香烯 (11.923%)、1R- α -蒎烯 (6.855%) 及橙花叔醇 (5.199%) 等。该挥发油对金黄色葡萄球菌 (*Staphalococcus aureus* Rosenbach) 和红酵母 (*Rhodotorula glutinis* Trans.) 有一定的抑制能力; 对人非小细胞肺癌细胞 (NCI-H460) 有较强的抑制作用, 浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 抑制率可达 98.89% 以上。

关键词: 深山含笑; 挥发油; 气相色谱-质谱联用; 生物活性

中图分类号: S685.99; R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2007)03-0027-04

Study on constituents and biological activity of volatile oil from leaves of *Michelia maudiae* CAO Jing-jing^{1,2}, CHEN Feng-mei², GONG Yu-xia^{1,2}, LI Pan-pan², ZHANG Xiao-ping^{1,①} (1. College of Territorial Resources and Tourism, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China; 2. Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plants of Jiangsu Province, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2007, 16(3): 27-30

Abstract: The volatile oil was extracted from leaves of *Michelia maudiae* Dunn by steam distillation and its chemical components were analyzed by GC-MS technique. The results showed that 45 compounds were separated and 37 compounds were identified, which represented 97.8% of the total relative content of the volatile oil. The main constituents were camphene (16.575%), β -pinene (15.857%), D-limonene (12.653%), caryophyllene (11.923%), 1R- α -pinene (6.855%) and nerolidol (5.199%). The biological activity of the volatile oil was screened with microbiological and Alamar blue methods. The experiment results indicated that the volatile oil possessed antibacterial activity to *Staphalococcus aureus* Rosenbach and *Rhodotorula glutinis* Trans., and it could also obviously inhibit the growth of cultured tumor cells (NCI-H460) with a inhibition rate reaching to 98.89% at volatile oil concentration of $100.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words: *Michelia maudiae* Dunn; volatile oil; GC-MS; biological activity

深山含笑 (*Michelia maudiae* Dunn) 又名光叶木兰、光叶白兰、莫夫人玉兰, 为木兰科含笑属 (*Michelia* L.) 常绿阔叶树种, 是中国特产树种之一, 主要分布在浙江、安徽、湖南南部、广东、福建北部、广西及贵州东部等地, 株高可达 20 余米^[1-3]。深山含笑为国家二级珍稀优良景观绿化树种, 是现代都市绿化及森林生态景观建设的良好树种。目前, 有关含笑属植物挥发油成分方面的报道很多^[4-8], 但有关深山含笑叶片挥发油成分及其生物活性方面的研究尚未见报道。

有研究发现, 含笑属植物挥发油中含有多种单萜和倍半萜类化合物及其含氧衍生物, 其中, 匙叶桉

叶油醇 (spathulenol) 和小白菊内酯 (parthenolide) 等成分具有抗真菌和杀虫活性^[9]。此外, 还有研究者提出, 含笑属植物的脂溶性提取物具有抗肿瘤活性^[10]。笔者利用气相色谱-质谱联用技术对深山含笑叶片挥发油成分进行了分析及鉴定, 并在此基础上, 初步探讨了该挥发油的抑菌作用及其抗肿瘤

收稿日期: 2006-12-25

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目 (050430501)、安徽省高等学校省级自然科学基金项目 (KJ2007A092) 和 2006 年博士学科点专项科研基金 (20060370001)

作者简介: 操璟璟 (1982-), 女, 安徽安庆人, 硕士研究生, 主要从事环境生态方面的研究工作。

① 通讯作者 E-mail: pinghengxu@sina.com.cn

活性,以期对深山含笑叶片挥发油的深入开发和利用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试鲜叶于2006年春季采自江苏省林业科学研究院,经鉴定为深山含笑(*Michelia maudiae* Dunn);供试的金黄色葡萄球菌(*Staphalococcus aureus* Rosenbach)、大肠杆菌[*Escherichia coli* (Migula) Castellani]和红酵母(*Rhodotorula glutinis* Trans.)均由江苏省药用植物生物技术重点实验室提供;实验用人非小细胞肺癌肿瘤细胞株(NCI-H460)购自美国ATCC公司。

1.2 方法

1.2.1 挥发油提取 取深山含笑新鲜叶片200 g,剪碎后置于挥发油提取器中,水蒸气常压蒸馏8 h。馏出物移至分液漏斗中,无水乙醚萃取,乙醚层用无水 Na_2SO_4 干燥后,过滤,常压浓缩,得到具有特殊浓烈香味的淡黄色油状物,即为深山含笑叶片挥发油。

1.2.2 GC-MS分析 气相色谱条件:采用6890型气相色谱仪(美国Agilent公司)。HP-5MS弹性石英毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)。载气为高纯氮气,柱流量60 mL · min⁻¹;气化室温度280 ℃,采用程序升温,70 ℃保持2 min,然后以10 ℃ · min⁻¹的速度升至255 ℃,保持25 min,再以10 ℃ · min⁻¹的速度升至270 ℃,保持5 min。

质谱条件:采用5973N型质谱仪(美国Agilent公司)。EI离子源(电子轰击源),电离电压70 eV,离子源温度230 ℃,相对分子质量扫描范围30~550 amu,进样量1.0 μL,分流比50:1,扫描周期1 s。

采用峰面积归一化法计算挥发油中各成分的相对含量,相应的质谱图经计算机检索并结合文献资料^[11]进行成分鉴定。

1.2.3 抗菌活性测定 采用杯碟法^[12-14]检测深山含笑叶片挥发油对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及红酵母的抑制作用,每组重复3次,以丙二醇为对照。将供试菌株分别接种到牛肉膏蛋白胨培养基斜面上进行活化,37 ℃培养24 h后移入液体培养基中。于37 ℃、250 r · min⁻¹振荡培养12 h后,将菌液梯度稀释成适宜浓度的菌悬液(细胞密度10⁶ mL⁻¹)备

用。分别用无菌吸管吸取0.2 mL菌悬液,涂在琼脂培养基平板上,每皿3个无菌牛津杯,小心吸取挥发油及丙二醇溶液各0.2 mL于相应标记的牛津杯中,37 ℃恒温培养48 h后,观察并测量抑菌圈直径。每处理至少测定3次,结果取平均值。

1.2.4 抗肿瘤活性测定 采用Alamar blue法检测深山含笑叶片挥发油的抗肿瘤活性,具体实验方法参见文献^[15]和^[16]。Alamar blue贮存液用培养基以1:10(体积比)比例稀释,每孔200 μL,Alamar blue的体积分数为10%,4 h后,用SpectroMax M2荧光检测仪检测。将培养板分别置于570 nm激发光波长和590 nm吸收光波长下,以不含细胞培养液的孔为空白,以加细胞培养液但不加待测样品的孔为对照,以细胞培养孔的荧光值减去空白值为样品荧光值,活细胞数量越多,荧光值越大。细胞抑制率计算公式为:抑制率=[(对照荧光值-样品荧光值)/对照荧光值]×100%。

2 结果和讨论

2.1 深山含笑叶片挥发油的成分及其相对含量

深山含笑叶片挥发油的提取得率为1.65%,通过GC-MS分析得到的气相色谱图共有45个峰,经计算机检索并结合文献调研^[11],共鉴定出其中37个化合物,占挥发油总相对含量的97.8%,详细结果见表1。由表1可以看出,深山含笑叶片挥发油的主要成分有莰烯、β-蒎烯、D-柠檬烯、丁香烯、1R-α-蒎烯和橙花叔醇,相对含量分别为16.575%、15.857%、12.653%、11.923%、6.855%和5.199%。挥发油中绝大部分成分为烯类化合物,其具体成分及含量与以往报道有很大差异^[17],这可能与样品的产地和取样时间不同有关。

2.2 深山含笑叶片挥发油的抑菌活性

深山含笑叶片挥发油对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及红酵母的抑制结果见表2。由表2可见,深山含笑叶片挥发油对金黄色葡萄球菌和红酵母均有一定的抑制作用,对大肠杆菌无抑菌活性。初步推测深山含笑叶片挥发油具有对革兰氏阳性菌和真核微生物的抗菌谱,其抗菌性可能与挥发油中含有的多种有效生物活性成分或具有协同作用的成分有关。有报道指出,α-蒎烯(α-pinene)和桉叶醇(eudesmol)有较强的解热、抗炎、祛痰和抗菌作

表1 深山含笑叶片挥发油的化学成分及其相对含量

Table 1 Chemical constituents and relative content of volatile oil from leaves of *Michelia maudiae* Dunn

峰号 No. of peak	保留时间/min Retention time	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	相对含量/% Relative content
1	3.192	1R- α -蒎烯 1R- α -pinene	C ₁₀ H ₁₆	6.855
2	3.322	莰烯 camphene	C ₁₀ H ₁₆	16.575
3	3.488	β -水芹烯 β -phellandrene	C ₁₀ H ₁₆	1.603
4	3.548	β -蒎烯 β -pinene	C ₁₀ H ₁₆	15.857
5	3.844	(+)-4-萜烯 (+)-4-carene	C ₁₀ H ₁₆	0.109
6	3.957	D-柠檬烯 D-limonene	C ₁₀ H ₁₆	12.653
7	3.992	桉油精 eucalyptole	C ₁₀ H ₁₈ O	2.433
8	4.063	3-萜烯 3-carene	C ₁₀ H ₁₆	0.167
9	4.206	γ -萜品烯 γ -terpinene	C ₁₀ H ₁₆	0.368
10	4.484	异松油烯 terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	2.563
11	4.538	沉香醇 linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	2.159
12	5.071	樟脑油 camphor oil	C ₁₀ H ₁₆ O	1.369
13	5.261	冰片 borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	1.276
14	5.344	L-4-松油醇 L-4-terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.862
15	5.463	α -松油醇 α -terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.881
16	6.328	1,7,7-三甲基二环[2.2.1]-二乙酰酯 1,7,7-trimethylbicycol[2.2.1]hept-2-yl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0.503
17	6.809	杜松烯 elixene	C ₁₅ H ₂₄	0.369
18	7.182	玷吧烯 copaene	C ₁₅ H ₂₄	0.141
19	7.295	β -榄香烯 β -elemene	C ₁₅ H ₂₄	1.374
20	7.479	异丁香烯 isocaryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	0.156
21	7.603	丁香烯 caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	11.923
22	7.763	香木兰烯 aromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	0.239
23	7.852	α -古芸烯 α -gurjunene	C ₁₅ H ₂₄	0.155
24	7.894	律草烯 humulene	C ₁₅ H ₂₄	1.393
25	7.959	别香橙烯 alloaromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	0.816
26	8.042	γ -木罗烯 γ -muurolene	C ₁₅ H ₂₄	0.385
27	8.113	β -库毕烯 β -cubebene	C ₁₅ H ₂₄	1.088
28	8.178	异丁香烯 isocaryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	0.271
29	8.243	1-乙烯基-1-甲基-2-(1-甲基乙烯基)-4-(1-异丙烯基)环己烷 cyclohexane,1-ethenyl-1-methyl-2-(1-methylethenyl)-4-(1-methylethylidene)-	C ₁₅ H ₂₄	1.598
30	8.368	γ -杜松萜烯 γ -cadinene	C ₁₅ H ₂₄	0.165
31	8.409	β -杜松烯 β -cadinene	C ₁₅ H ₂₄	0.923
32	8.652	橙花叔醇 nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O	5.199
33	8.925	斯巴醇 spathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	0.957
34	8.984	氧化石竹烯 caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	1.301
35	9.145	喇叭茶醇 ledol	C ₁₅ H ₂₆ O	0.254
36	9.382	β -桉叶醇 β -eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	0.754
37	9.506	香榧醇 terreyol	C ₁₅ H ₂₆ O	2.172

用^[18];松油醇(terpineol)和沉香醇(linalool)等萜类及酚类化合物均为良好的天然活性抑菌成分^[19]。通过本研究发现,深山含笑叶片挥发油中也含有类似的活性成分,为深山含笑成为优良生态保健树种和药源研究对象提供了科学依据。

2.3 深山含笑叶片挥发油的抗肿瘤活性

深山含笑叶片挥发油的抗肿瘤活性测定结果见

表3。结果表明,深山含笑叶片挥发油对人非小细胞肺癌细胞(NCI-H460)有显著的抗肿瘤活性。当浓度为12.50 mg·L⁻¹时,对NCI-H460肺癌细胞株的抑制率为3.49%;随着浓度的升高,抑制作用显著增强;当浓度达到100.00 mg·L⁻¹时,抑制率可达98.89%。表明深山含笑叶片挥发油中含有抗肿瘤活性成分或挥发油中各成分之间具有协同抗肿瘤的

表2 深山含笑叶片挥发油的抑菌活性

Table 2 The antibacterial activity of volatile oil from leaves of *Michelia maudiae* Dunn

菌株 Strain	抑菌圈直径/mm Diameter of antimicrobial circle	
	处理组 Treatment group	对照组 Control group
	金黄色葡萄球菌 <i>Staphalococcus aureus</i>	11.35 ± 0.10
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	0	9.00 ± 0.15
红酵母 <i>Rhodotorula glutinis</i>	12.15 ± 0.25	0

表3 深山含笑叶片挥发油对人非小细胞肺癌(NCI-H460)细胞的抑制活性¹⁾Table 3 Antitumor activity of volatile oil from leaves of *Michelia maudiae* Dunn against human lung cancer cell line (NCI-H460)¹⁾

挥发油浓度/mg · L ⁻¹ Concentration	抑制率/% Inhibition rate
6.25	1.79 ± 0.13
12.50	3.49 ± 0.13 *
25.00	15.19 ± 0.14 *
50.00	47.45 ± 0.23 * *
100.00	98.89 ± 0.16 * *

¹⁾ * : $P < 0.05$; * * : $P < 0.01$.

作用。

目前,笔者只在单细胞水平上进行了深山含笑叶片挥发油成分的体外抗肿瘤实验,动物体内实验及药理作用的机制还有待进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] 孙可群,张应麟. 花卉及观赏树木栽培手册[M]. 北京:中国林业出版社,1985.
- [2] 祁承经. 树木学[M]. 北京:中国林业出版社,1994.
- [3] 安徽植物志编委会. 安徽植物志(第二卷)[M]. 北京:中国展望出版社,1986. 260-261.
- [4] 钟瑞敏. 华南五种木兰科植物精油成分和抗氧化活性[J]. 云南植物研究,2006,28(2):208-214.

- [5] 汪洪武,刘艳清,鲁湘鄂,等. 不同季节含笑挥发油成分的GC-MS分析[J]. 肇庆学院学报,2006,27(5):30-32.
- [6] 孙凌峰. 大叶含笑叶精油化学成分研究[J]. 林产化学与工业,1993,13(3):18-22.
- [7] 熊江,戴好富,易元芬,等. 多花含笑叶的挥发油成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2001,13(5):13-14.
- [8] 钟瑞敏,张振明,曾庆孝,等. 金叶含笑中芳香精油成分的气相色谱-质谱分析[J]. 植物生理学通讯,2005,41(4):505-508.
- [9] 赵利琴. 木兰科含笑属萜类成分及其生物活性研究进展[J]. 时珍国医国药,2005,16(8):722-725.
- [10] 程永现,雷茂林,周俊. 壮丽含笑中的新倍半萜成分及其化学分类学意义[J]. 云南植物研究,2002,24(1):129-132.
- [11] 丛蒲珠. 质谱在天然有机化学中的应用[M]. 北京:科学出版社,1987. 230-232.
- [12] 钱存柔,黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京:北京大学出版社,2000.
- [13] 马绪荣,苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京:科学出版社,2000.
- [14] 刘冬梅,李理,杨晓泉,等. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. 食品研究与开发,2006,27(3):110-111.
- [15] Pagé B, Pagé M, Noël C. A new fluorimetric assay for cytotoxicity measurements *in vitro* [J]. International Journal of Oncology, 1993, 3: 473-476.
- [16] Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi I, et al. Comparison of Alamar blue and Mtt assays for high through-put screening [J]. Toxicology *in vitro*, 2004, 88: 703-710.
- [17] 孙凌峰. 江西芳香植物资源[J]. 香料香精化妆品,1990(1):22-28.
- [18] Lorente I, Ocete M A, Zarzuelo A. Bioactivity of the essential oil of *Bupleurm frutescens* [J]. J Nat Prod, 1989, 52(2): 267-272.
- [19] 孙文基,绳金房. 天然活性成分简明手册[M]. 北京:中国医药科技出版社,1998. 226, 429.