

黔产盾叶唐松草叶挥发油 GC-MS 分析及 生物活性研究

刘敏洁, 赵琦, 梁娜, 刘明川, 杨胜杰, 杨松*

(绿色农药与农业生物工程国家重点实验室培育基地, 教育部绿色农药与
农业生物工程重点实验室, 贵州大学精细化工研究开发中心, 贵阳 550025)

[摘要] 目的: 研究黔产盾叶唐松草 *Thalictrum ichangense* 叶挥发油的化学成分及其抗氧化和抗肿瘤的生物活性。方法: 采用超临界 CO₂ 萃取法提取盾叶唐松草叶的挥发油, 通过气相色谱-质谱联用技术 (GC-MS) 分析其化学成分, 用色谱峰面积归一法计算各组分相对百分含量, 并分别采用 DPPH·法和 MTT 法研究其抗氧化和抗肿瘤的生物活性。结果: 从超临界 CO₂ 萃取法提取得到的挥发油中鉴定了 21 个化学成分, 已鉴定出的组分占挥发油总量的 91.86%; 在 300 mg·L⁻¹ 时, 挥发油对 DPPH·清除率为 (61.2 ± 2.1)%, 对 MGC-803 胃癌细胞体外增殖抑制率为 (56.0 ± 6.8)%。结论: 盾叶唐松草叶挥发油中主要化学成分为正四十四烷 (Tetratetracontane, 25.82%)、3,5-二烯豆甾烷 (Stigmastan-3,5-diene, 16.39%)、二十八烷 (Octacosane, 14.96%) 等。盾叶唐松草叶挥发油具有较好的抗氧化活性和对 MGC-803 体外增殖的抑制作用。

[关键词] 盾叶唐松草; 超临界 CO₂ 萃取; 挥发油; 气相色谱-质谱联用技术; 抗氧化

[中图分类号] R284.1; R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)24-0135-04

[doi] 10.11653/syfyj2013240135

GC-MS Analysis and Biological Activity of Essential Oil from Leaves of *Thalictrum ichangense*

LIU Min-jie, ZHAO Qi, LIANG Na, LIU Ming-chuan, YANG Sheng-jie, YANG Song*

(State Key Laboratory Breeding Base of Green Pesticide and Agricultural Bioengineering,
Key Laboratory of Green Pesticide and Agricultural Bioengineering, Ministry of Education,
Center for R&D of Fine Chemicals, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

[Abstract] **Objective:** To study the chemical compositions of the essential oil from the leaves of *Thalictrum ichangense*. **Method:** The essential oil was extracted by supercritical carbon dioxide extraction assay, and the constituents were identified by gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS). The DPPH·method was used to study its antioxidant activity and MTT assay was used to study its anti-tumor activity. The relative content of each component was calculated by area normalization method. **Result:** Twenty one compounds were identified, representing 91.86% of the essential oil. The scavenging ratio for the DPPH·radicals reaches (61.2 ± 2.1)% when the concentration was 300 mg·L⁻¹ and the essential oil at 300 mg·L⁻¹ showed anti-tumor activities against MGC-803 *in vitro* with a inhibition rate of (56.0 ± 6.8)%. **Conclusion:** The principal chemical constituents of the essential oil were tetratetracontane (25.82%), stigmastan-3, 5-diene (16.39%), and octacosane (14.96%). The essential oil showed certain antioxidant activity and displayed good inhibition proliferation of MGC-803 *in vitro*. The analytic results can provide further exploitation and utilization of *T. ichangense*.

[收稿日期] 20130307(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(21172048); 贵州省社会发展攻关计划项目(20103052)

[第一作者] 刘敏洁, 硕士, 从事天然有机化学研究, Tel:0851-8292171, E-mail:liuminjie26@126.com

[通讯作者] * 杨松, 博士, 教授, 从事农药学及生物新能源利用研究, Tel:0851-8292171, E-mail:jhzx.msm@gmail.com

[Key words] *Thalictrum ichangense*; supercritical carbon dioxide extraction; essential oil; GC-MS; antioxidant activity

盾叶唐松草为毛茛科唐松草属植物,别名为龙眼草、岩扫把、连钱草、羊耳、小淫羊藿等。盾叶唐松草在我国主要分布于云南东部、四川、贵州、湖北西部、陕西南部、浙江等地。其根可治小儿抽风、小儿白口疮;全草药用,有散寒除风湿、去目雾、消浮肿等作用^[1],是我国民间草药“马尾连”的主要植物资源,在民间用于治疗痢疾、肠炎等消化系统疾病^[2]。该属植物含有丰富的生物碱类化合物,因此具有降压、抗菌、止痛、利尿、抗肿瘤等多种药理作用^[3-4]。近代研究表明,唐松草属植物还具有杀虫^[5-7]、氧化的作用^[8]。目前,有关盾叶唐松草叶挥发性成分的研究未见报道。本文采用超临界 CO₂ 流体萃取^[9-13]提取盾叶唐松草叶的挥发性成分,应用气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术分析其化学成分,使用面积归一法确定各成分的相对含量^[14-17],生物活性测试结果表明其对 DPPH· 具有较好的清除能力,并对胃癌细胞 MGC-803 的体外增殖具有较好抑制作用。

1 材料

超临界 CO₂ 流体萃取仪(TA231-50-031 型,江苏省南通市华安超临界 CO₂ 萃取仪有限公司),气相色谱,质谱联用仪(6890/5973 型,美国 Agilent 公司),96 孔板酶标仪(BIO-RAD680 型,美国 BIO-RAD 公司),CO₂ 培养箱(日本 SANYO 公司),DPPH·(美国 Sigma 公司),BIO-RAD680 胎牛血清(天津市灏阳生物制品科技有限公司),胰蛋白酶(trypsin,美国 Sigma 公司),MTT(Sigma 分装,北京鼎国生物技术有限公司),RPMI 1640 培养基(美国 GIBICO 公司),细胞培养用 96 孔板(美国 Corning Incorporated 公司),SDS(北京鼎国生物技术有限公司),PBS 缓冲液,无水乙醇(AR),DMSO(AR)。盾叶唐松草叶采自贵州省龙里县,由贵阳医学院药学院药用植物与生药学教研室主任龙庆德教授鉴定为毛茛科唐松草属植物盾叶唐松草 *Thalictrum ichangense* 的叶。

2 方法

2.1 挥发油的提取 称取黔产盾叶唐松草干燥叶 250 g,采用超临界 CO₂ 流体萃取的方法提取其挥发性成分,萃取条件为:萃取压力 35 MPa,温度 40 °C,萃取时间 90 min,流量 30 L·h⁻¹。得到其具有特殊气味的黄色油状液体,萃取率为 2.0%。

2.2 气相色谱-质谱条件

2.2.1 气相色谱条件 色谱柱为 HP-5 MS 5% Phenyl Methyl Siloxane (0.25 μm × 0.25 mm × 30 m),弹性石英毛细管柱,柱温 50 °C(保留 2 min),以 5 °C·min⁻¹ 升温至 290 °C,保持 2 min;汽化室温度 250 °C,载气为高纯 He(99.999%),柱前压 7.60 psi,载气流量 1.0 mL·min⁻¹,进样量 1 μL(用正己烷将样品稀释的溶液),分流比 20:1。

2.2.2 质谱条件 离子源为 EI 源,离子源温度 230 °C,电子能量 70 eV,接口温度 280 °C,溶剂延迟 3 min,质量范围 *m/z* 10~550。

2.3 清除 DPPH·能力的测定^[18] 使用乙醇溶解样品,准确称取 9 mg DPPH·用少量无水乙醇溶解后定容于 100 mL 量瓶(2.3 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹),放置于 4 °C 冰箱备用。将 100 μL 不同浓度的样品和 100 μL DPPH·溶液加入到 96 孔板中,每个样品作 6 个平行,无水乙醇作阴性对照,相同浓度下的 Vc 溶液作阳性对照。将 96 孔板置于酶标仪中混匀 60 s 后于 37 °C 恒温箱中避光保存 30 min,在 515 nm 下测吸光度(A)。计算公式:

$$\text{清除率} = 1 - (A_i - A_j) / A_0 \times 100\%$$

2.4 MTT 法^[19]对 MGC-803 体外增殖抑制活性的测定 用 DMSO 溶解样品,取对数生长期细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化后,重悬于含 10% FBS 的 RPMI 1640 的培养基中,以 2 × 10⁴ 个/mL 的终浓度接种于 96 孔培养板上,每孔 100 μL,置于 37 °C、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养。24 h 后吸掉培养基,加入含不同浓度药物的有血清培养基,每孔 200 μL。放入培养箱培养 72 h 后吸掉含药培养基,加入质量浓度为 0.5 g·L⁻¹ 的 MTT,每孔 100 μL,培养 4 h 后每孔再补加 100 μL 10% 的 SDS,放入培养箱 10 h,使结晶充分溶解后取出,冷却至室温,在 595 nm 波长下测 A,计算抑制率。实验中同时设空白对照组、阴性对照组和阳性对照组。空白对照组不加细胞只加有血清 RPMI 1640 培养基,阴性对照组加入与药物同体积的 DMSO,阳性对照组加入与被测药物同浓度的 ADM。

实验结果以 SPSS 13.0 软件进行方差分析,*P* < 0.05 时为差异显著,*P* < 0.01 时为差异极显著。细胞增殖的抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照组}} - A_{\text{试验组}}) / A_{\text{对照组}} \times 100\%$$

3 结果与讨论

3.1 挥发油成分和相对含量 挥发油样品用正己烷稀释后进样,按上述实验条件进行 GC-MS 分析鉴定,通过 HPMSD 化学工作站,结合 Nist 5 标准质谱图库,对挥发油中的化学成分进行鉴定,并使用面积归一法确定了各成分的质量分数,得到挥发油总离子流图,见图 1。并按峰面积归一化法进行计算求得各化学成分在挥发油中的相对含量,结果见表 1。

3.2 挥发油清除 DPPH· 的能力 盾叶唐松草叶挥发油清除 DPPH· 能力的结果见表 2。由表 2 可知,挥发油对 DPPH· 有较好的清除能力,在 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对 DPPH· 清除能力达 $(61.2 \pm 2.1)\%$,且清除能力呈浓度依赖性。

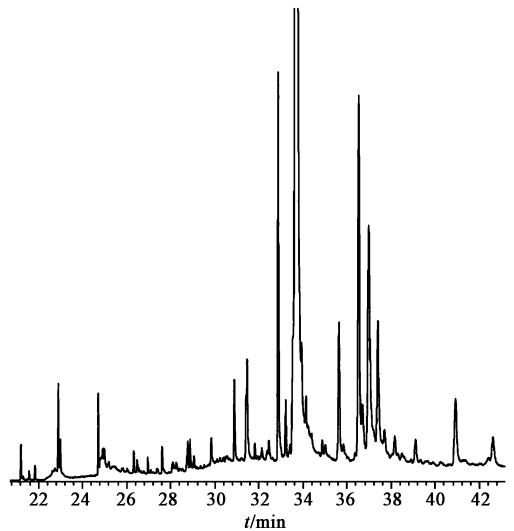


图 1 盾叶唐松草叶挥发油总离子流

表 1 盾叶唐松草叶挥发油成分

No.	t_R/min	化合物	相对分子质量	分子式	相对含量/%
1	21.21	1 α ,2 β ,5 α -2,6,6-三甲基二环[3.1.1]庚烷 bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl, (1. alpha., 2. beta., 5. alpha.)	138.23	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}$	0.19
2	22.91	棕榈酸 <i>n</i> -hexadecanoic acid	256.42	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	0.52
3	23.00	邻苯二甲酸二丁酯 dibutyl phthalate	278.35	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$	1.20
4	24.72	叶绿醇 phytol	296.53	$\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}$	1.34
5	27.61	十一烷酸 undecanoic acid	186.29	$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2$	0.21
6	28.78	1,10-十九烷醇 10-nonadecanol	284.52	$\text{C}_{19}\text{H}_{40}\text{O}$	0.26
7	29.88	辣椒素 capsaicin	305.42	$\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{O}_3$	0.21
8	30.89	1,16-十六烷二醇 1,16-hexadecanediol	258.44	$\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{O}_2$	2.34
9	31.47	3-二十烯 3-eicosene	280.53	$\text{C}_{20}\text{H}_{40}$	4.43
10	32.88	十六烷基环氧乙烷 oxirane, heptadecyl-	282.50	$\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}$	3.51
11	33.22	邻羟基苯乙酮 1-(2-hydroxyphenyl) ethanone	136.15	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$	4.53
12	33.93	3,5-二烯甾萜 stigmastan-3,5-diene	396.69	$\text{C}_{29}\text{H}_{48}$	16.39
13	34.14	1,19-二十碳烯 1,19-eicosadiene	278.52	$\text{C}_{20}\text{H}_{38}$	0.34
14	34.51	十四烷基环氧乙烷 oxirane, tetradecyl-	240.42	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}$	2.31
15	35.53	二十八烷 octacosane	394.77	$\text{C}_{28}\text{H}_{58}$	14.96
16	35.63	十八醛 octadecanal	268.48	$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}$	1.50
17	36.70	二十烷 eicosane	282.55	$\text{C}_{20}\text{H}_{42}$	2.96
18	36.98	顺式-4a-甲基萘烷 cis-4a-methyl-decahydronaphthalene	152.28	$\text{C}_{11}\text{H}_{20}$	7.06
19	37.40	正四十四烷 tetratetracontane	619.19	$\text{C}_{44}\text{H}_{90}$	25.82
20	40.93	十八烷 octadecane	254.49	$\text{C}_{18}\text{H}_{38}$	1.38
21	42.62	10-十九醇 10-nonadecanol	284.52	$\text{C}_{19}\text{H}_{40}\text{O}$	0.86

3.3 挥发油对 MGC-803 体外增殖的抑制活性 盾叶唐松草叶挥发油对 MGC-803 体外增殖抑制作用的结果见表 2。由表 2 可知,挥发油对 MGC-803 体外增殖有较好的抑制活性,在 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对

MGC-803 体外增殖的抑制率达 $(56.0 \pm 6.8)\%$ 。

从盾叶唐松草叶中共分离出 28 个峰,鉴定出 21 种化合物,其主要成分为正四十四烷 (tetratetracontane, 25.82%)、3,5-二烯甾萜

表 2 盾叶唐松草叶挥发油对 DPPH·的清除能力及对 MG(-803 体外增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

挥发油 /mg·L ⁻¹	对 DPPH·的 清除能力/%	对 MGC-803 体外 增殖抑制率/%
50	19.8 ± 0.3	12.4 ± 9.6
100	23.6 ± 3.2	15.0 ± 4.7
200	40.3 ± 4.5	39.2 ± 6.2
300	61.2 ± 2.1	56.0 ± 6.8

(stigmastan-3, 5-diene, 16.39%)、二十八烷(octacosane, 14.96%)等。由表 2 可知,挥发油对 DPPH·有较好的抗氧化活性,在浓度为 300 mg·L⁻¹时对 DPPH·清除能力达(61.2 ± 2.1)%,这可能与挥发油中含有醇、醛、酮类等化合物的存在有关,且清除能力呈浓度依赖性。由表 3 可知,挥发油对胃癌细胞 MGC-803 体外增殖具有较好的抑制活性,在 300 mg·L⁻¹时抑制率为(56.0 ± 6.8)%,可能与挥发油中的辣椒素、叶绿醇等化合物的存在有关^[20-21]。

盾叶唐松草叶挥发油化学成分复杂,涵盖了有机酸、脂、芳香环、醇、醛和烯等。其中部分成分还具有较大的药用价值,如在已鉴定出的化学成分中,叶绿醇在抗病毒、抑菌、抗炎、抗肿瘤及清除自由基等方面有显著的活性^[22-23],因此,对其挥发油的生物活性有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 国家自然科学基金委,中国科学院和国家科技部. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1979.

[2] 张永红. 抗癌植物唐松草研究概况[J]. 西北民族大学学报:自然科学版,1996,17(1):85.

[3] Schiff P L, Doskotch R W. Thalictrum alkaloids[J]. Lloydia, 1970, 33(4):403.

[4] 李谄光,罗永明,陈杰. 唐松草属植物的化学与药理研究概况[J]. 江西中医学院学报,2001,13(2):93.

[5] 张宏利,冯俊涛,陈安良,等. 秦岭山区 204 种植物对粘虫生物活性测定[J]. 西北林学院学报,2004,19(3):92.

[6] 张兴,王兴林,王胜宝,等. 西北地区杀虫植物资源初步调查[J]. 甘肃农业大学学报,1993,28(1):93.

[7] 牛树君,胡冠芳,刘敏艳,等. 贝加尔唐松草提取物对粘虫的杀虫活性及其作用机理研究[J]. 甘肃农业大学学报,2009,44(5):106.

[8] 敖恩宝力格,邵丽华,胡日都胡. 瓣蕊唐松草根茎中抗氧化性物质的提取研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(4):872.

[9] 葛发欢,李莹,谢健鸣,等. 超临界 CO₂ 从柴胡中萃取挥发油及其皂苷的研究[J]. 中国中药杂志,2000,25(3):149.

[10] 葛发欢,李菁,王海波,等. 超临界 CO₂ 流体萃取技术在天然产物提取及药物分析中的最新研究进展和前景[J]. 中药材,1995,18(6):316.

[11] 陈青,钟宏波. 黔产青皮挥发油化学成分及抑菌活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(9):118.

[12] 刘宁,林铁,李正芬. 矮杨梅叶挥发油的 GC-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2004,10(6):14.

[13] 朱小勇,潘立卫,卢汝梅,等. 超临界 CO₂ 萃取紫玉盘茎挥发油化学成分的分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):121.

[14] 张丽勇,林秀梅,战月,等. 不同方法提取青蒿挥发油成分分析及抗菌活性比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):60.

[15] 唐冰,王成芳,费超,等. GC-MS 法分析黄皮叶挥发油的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):94.

[16] 朱小勇,赵红艳,黄贵庆,等. 超临界 CO₂ 提取天茄子挥发油化学成分的分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):139.

[17] 郝俊杰,王祥培,李雨生,等. 桃枝挥发油化学成分 GC-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):45.

[18] 刘平怀,汪春牛,陈德力,等. DPPH 法测定青皮加速溶剂萃取物的抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(16):69.

[19] 徐礼英,张小平,蒋继宏. 栝楼子挥发油的成分分析及其生物活性的初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(8):38.

[20] 宋家玲,杨永建,李强,等. 多甲氧基黄酮类化合物研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(17):308.

[21] 李韶菁,张迎春,苏培瑜,等. 阿魏酸松柏酯的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):229.

[22] 胡东南,蒋才武,黄健军. 黄杞叶挥发油化学成分 GC-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):49.

[23] 华静,戚进,余伯阳. 玄参属植物中的环烯醚萜类化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):233.

[责任编辑 邹晓翠]