

三尖杉种仁挥发油的化学成分及生物活性研究

解修超, 陈文强, 邓百万*, 彭浩, 张晓伟, 张曼
(陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000)

[摘要] 目的: 研究三尖杉种仁挥发油的化学成分及其生物活性。方法: 采用索氏回流法提取三尖杉种仁的挥发油, 利用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)分离和鉴定其化学成分, 并通过滤纸片扩散法和 MTT 法初步研究挥发油的抑菌及细胞毒性。结果: 从三尖杉种仁的挥发油中共鉴定出 23 种化学成分, 主要为油酸(34.53%)、棕榈酸(12.04%)、亚油酸丁酯(9.56%)、油酸乙酯(9.31%)等; 活性检测表明挥发油样品对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、大肠埃希菌 *Escherichia coli* 和沙门氏菌 *Salmonella typhl* 显示较强的抑制作用, 对慢性粒细胞白血病细胞株 K562 具有较高细胞毒活性, 并呈剂量-效应依赖关系, IC_{50} 16.14 $mg \cdot L^{-1}$ 。结论: 三尖杉种仁的挥发性成分主要为脂肪酸类、脂肪烷烃类及萜类, 有抗菌、抗肿瘤活性, 具有进一步开发利用的价值。

[关键词] 三尖杉; 种仁; 挥发油; 气相色谱-质谱联用; 生物活性

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0076-05

[doi] 10.11653/syjf2013100076

Chemical Components and Bioactivity of Volatiles from Kernels of *Cephalotaxus fortunei*

XIE Xiu-chao, CHEN Wen-qiang, DENG Bai-wan*, PENG Hao, ZHANG Xiao-wei, ZHANG Man
(School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of
TechShaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the chemical components and bioactivity of volatiles from the kernels of *Cephalotaxus fortunei*. **Method:** the essential oils were extracted with Soxhlet extraction method. The chemical composition were separated and identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Study the antibacterial and antitumor activity of fatty acids by filter paper diffusion and MTT method. **Result:** Twenty-three components were identified from the kernel of *C. fortunei*, the main components were oleic acid (34.53%), palmitic acid (12.04%), linnleic acid, butyl ester (9.56%), ethyl oleate (9.31%) and so on. The volatiles exhibited strong antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella*. In addition, the sample had cytotoxic activity against K562 tumor cell lines. **Conclusion:** The volatiles were composed of aliphatic acids, alkanes and terpenoids, exhibited antimicrobial and cytotoxic bioactivities.

[Key words] *Cephalotaxus fortunei*; kernel; volatiles; gas chromatography-mass spectrometry; bioactivity

[收稿日期] 20121110(010)

[基金项目] 陕西省教育厅专项科研计划基金项目(08JK247); 陕西理工学院人才引进科研启动项目(SLGQD0717)

[第一作者] 解修超, 讲师, 从事植物及其共生菌活性代谢产物研究, E-mail: xiexiuchao@126.com

[通讯作者] * 邓百万, 教授, 从事微生物资源保护与开发利用研究, E-mail: dengbw@yahoo.com.cn

三尖杉为三尖杉科三尖杉属植物, 分布于我国陕西南部、甘肃南部、华东、华南、西南地区, 散生于海拔 800~2 000 m 的山林边缘、路旁及山涧潮湿地带^[1-2]。该植物在陕西境内主要分布于秦岭南坡和巴山地区的镇巴、佛坪、留坝、略阳、勉县、旬阳、石泉、宁陕等县^[3]。从其根、树皮、种子等部位中提取的多种生物碱被临床证明是有效的抗癌药物, 特别是在白血病治疗方面具有较高的应用价值^[4-7]。由

于植株生长缓慢加之人类对天然药物需求量的逐年增加,导致三尖杉资源急剧减少。研究发现三尖杉种子具有润肺、止咳、消积、杀虫等功效^[3]。本研究以秦巴山区所产三尖杉种子为材料,通过气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术分析了其种仁挥发油的化学成分,并初步研究了挥发油的抗菌和细胞毒活性,以期三尖杉种子资源的开发与利用提供理论参考。

1 材料

1.1 种子材料 三尖杉种子样品采自陕西汉台褒河森林公园三尖杉野生植株,经陕西理工学院生物科学与工程学院杨培君教授鉴定为 *Cephalotaxus fortunei* Hook. f.,标本保存在陕西省生物资源重点实验室。

1.2 靶标菌株和细胞系 大肠埃希菌 *Escherichia coli*、沙门氏菌 *Salmonella typhi*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、白色念珠菌 *Monilia albican*,购自美国菌种保藏中心,由陕西省食药菌工程技术研究中心提供,慢性粒细胞白血病细胞系 K562 细胞购自海南伯杰科技有限公司。

1.3 仪器与试剂 气相色谱-质谱联用仪(GS6890N/MSD5973N型,美国安捷伦科技有限公司)、高级研究显微镜(E600型,日本Nikon公司)、二氧化碳培养箱(Thermo3110型,美国Thermo公司)、酶标分析仪(RT-2100C型,深圳雷杜公司)、数显恒温培养箱(LRH-250-GS型,广东省医疗器械厂),胎牛血清与四甲基偶氮唑盐购自Sigma公司、试验用分析纯试剂(乙醚、二甲基亚砜等)购自天津科密欧公司、培养基原料购自北京陆桥公司。

2 方法

2.1 挥发油成分提取 取适量三尖杉种子置于50℃烘箱中恒温干燥24h后剥离种壳,收集种仁,充分研磨后精密称取47.75g,滤纸包装,置于索氏提取器中,加入乙醚,加热至40℃,回流提取12h,同温回收乙醚得油状物,称质量、计算得率。采用氢氧化钾-甲醇酯化法对样品做酯化处理,得GC-MS检测用样品^[8-9]。

2.2 GC-MS 美国J&W. HP-5(0.25mm×30m,0.25μm)弹性石英毛细管柱,程序升温(以5℃·min⁻¹的升温速率由50℃程序升温至290℃,恒温保持20min),GC气化室温度250℃,载气99.999%高纯度氦,流速2.0mL·min⁻¹。质谱条件:离子源为EI源,电子轰击能量70eV,离子源温

度230℃。倍增电压1.28kVz,质量扫描范围m/z 10~550,扫描速度3.8次/s。

2.3 活性检测 采用滤纸片扩散法^[10]测定样品对大肠埃希菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌的抑制作用。取适量挥发油原液,分别配制成质量浓度为1000.0,100.0,10.0,1.0g·L⁻¹的样品溶液,各加入适量过氧化氢酶,用于消除可能带来的活性影响。将直径为8.0mm的无菌滤纸片置于各浓度样品的上清液中浸湿,待溶剂挥干后贴在涂有100.0μL靶标菌悬液(菌液密度为0.8~1.2×10⁶CFU/mL)的培养基平板上,重复3次,细菌选用NA培养基,37℃恒温培养24h;真菌采用YPD培养基,28℃恒温培养48h,分别测量各质量浓度样品在不同靶标菌平板上的抑菌圈直径。以含有过氧化氢酶的乙醚溶液作为空白对照,操作步骤与试验组相同。

采用MTT法^[11]测定样品的细胞毒活性。取对数期的慢性粒细胞白血病细胞株K562细胞(约5000个/孔)接入96孔板,37℃培养24h后各加入含质量浓度挥发油的培养液200.0μL,5孔重复,样品挥发油设8个倍比质量浓度梯度,分别为2.0,4.0,8.0,16.0,32.0,64.0,128.0,256.0mg·L⁻¹,空白对照除以无菌水代替样品外,其余均与试验组相同。37℃继续培养,分别在24,48h后置于显微镜下观察K562细胞的生长情况。64h后去除上清液,向每孔加入0.5%的MTT培养液20.0μL,继续同温培养4h后加入150.0μL二甲基亚砜,低速振荡10min以促进沉淀充分溶解,用酶标分析仪在492nm处测量各孔的吸光度(A)。按公式计算各浓度挥发油对肿瘤细胞生长的抑制率,采用SPSS13.0软件进行相关分析和曲线拟合,最终得半数抑制率所需挥发油质量浓度IC₅₀。

$$\text{肿瘤细胞生长抑制率} = (1 - A_{\text{试验组}} / A_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$$

3 结果与分析

3.1 三尖杉种仁挥发油的提取 以乙醚作为溶剂,采用索氏提取法经12h回流提取,得到淡黄色透明油状挥发油29.20g,其具有特殊香味,密度小于水,经计算得率为61.15%。

3.2 三尖杉种仁挥发油的化学成分与含量 通过对三尖杉种仁的挥发油成分进行气相色谱-质谱检测,得到GC-MS分析总离子流图。检索美国NIST02L和WILEY275标准质谱图库确认其成分,运用峰面积归一化法,借助G170LBA化学工作站数据处理系统,求得各挥发油成分的相对含量,结果见表1。

表 1 三尖杉种仁挥发油的化学成分与含量

No.	化合物名称	分子式	相对分子质量	相对含量/%
1	α -terpinene α -松油烯	C ₁₀ H ₁₆	136	3.06
2	(R)-(+) -3-methylcyclohexanone 甲基环己酮	C ₇ H ₁₂ O	112	0.35
3	cyclobutanecarboxylic acid 环丁基甲酸	C ₆ H ₁₀ O ₂	114	3.28
4	decanedioic acid 癸二酸	C ₁₁ H ₂₀ O ₄	216	0.48
5	dodecanoic acid 正十二烷酸	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	214	0.29
6	1,11-dodecadiene 1,11-十二碳二烯	C ₁₂ H ₂₂	166	0.17
7	ethyl cis-4-octenoate 顺式-4-辛烯酸乙酯	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	0.29
8	ethyl dodecanoate 月桂酸乙酯	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228	2.74
9	oleic-1-13C acid 油酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	34.53
10	cyclopentadecanone 环十五烷酮	C ₁₅ H ₂₈ O	224	0.22
11	palmitic acid 棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	12.04
12	squalene 角鲨烯	C ₃₀ H ₅₀	410	0.87
13	(S)-(+) -1-cyclohexylethyl isocyanate 环己乙基异氰酸酯	C ₉ H ₁₅ NO	153	0.21
14	L(+)-arginine L-精氨酸	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174	0.36
15	2,4-diaminopyrimidine 2,4-二氨基嘧啶	C ₄ H ₆ N ₄	110	0.15
16	nonanoic acid, methylester 壬酸	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172	5.23
17	thujopsene 罗汉柏烯	C ₁₅ H ₂₄	204	2.10
18	4-butylcyclohexanone 4-正丁基环己酮	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.18
19	linoleic acid, butyl ester 亚油酸丁酯	C ₂₂ H ₄₀ O ₂	336	9.56
20	lauric acid 月桂酸	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	184	1.55
21	9,12-octadecadienoic acid 亚油酸	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294	4.97
22	stearic acid 硬脂酸	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	5.29
23	ethyl oleate 油酸乙酯	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310	9.31

表 1 结果所示,从样品中共检出 26 种成分,经多重比对鉴定了其中的 23 种化学成分,占总油量的 97.23%,主要成分为油酸含量最高(34.53%)、棕榈酸(12.04%)、亚油酸丁酯(9.56%)、油酸乙酯(9.31%)、壬酸(5.29%)、硬脂酸(5.23%)、亚油酸(4.97%)、环丁基甲酸(3.28%)、 α -松油烯(3.06%)、月桂酸乙酯(2.74%)、罗汉柏烯

(2.10%)等。

3.3 三尖杉种仁脂肪酸化学成分的生物活性

3.3.1 三尖杉种仁挥发油的抑菌活性 以 4 种细菌和 1 种病原真菌作为靶标菌株,采用滤纸片扩散法对挥发油进行抑菌活性研究。试验表明,各质量浓度挥发油均表现出了不同程度的抗菌活性,结果见表 2。

表 2 三尖杉种仁挥发油对靶标菌的抑制作用

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	大肠埃希菌	沙门氏菌	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	白色念珠菌
三尖杉种仁挥发油	1 000.0	+++	++	+	+++	+
	100.0	+++	+	-	++	-
	10.0	++	+	-	+	-
	1.0	+	-	-	+	1
空白对照	-	-	-	-	-	-

注: + 示抑菌直径为 8.00 ~ 13.00 mm; ++ 示抑菌直径为 13.00 ~ 18.00 mm; +++ 示抑菌直径为 18.00 ~ 23.00 mm; - 为无抑菌活性。

表2结果所示,三尖杉种仁挥发油对大肠埃希菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌3种靶标细菌有较强的抑制活性,不同质量浓度的抑制效果具有明显差异。其中挥发油质量浓度为 $1\ 000.0\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌抑菌圈直径分别达23.0,21.5 mm,在质量浓度降低至 $1.0\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,依然存在抑制活性。挥发油对沙门氏菌也显示抑制活性;高浓度挥发油对枯草芽孢杆菌和白色念珠菌表现较弱的活性。

3.3.2 三尖杉种仁挥发油的细胞毒活性 将加入试验样品后的肿瘤细胞培养液置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、 5.0% CO_2 培养箱,分别在24,48 h时显微观察肿瘤细胞的生长状况。结果显示,试验组在培养24 h时肿瘤细胞数量与同期空白对照中相比明显减少,形态相对皱缩,部分细胞出现裂解,48 h时相对数量继续减少,大部分细胞出现裂解;空白对照组中肿瘤细胞在48 h内数量持续增加,形态近椭圆状,贴壁生长,易聚集成群。试验组与空白对照组的5孔平行重复经显微观察同一时期未见明显差异。

通过MTT法测定了不同浓度挥发油对慢性粒细胞白血病细胞株K562的细胞毒活性,借助酶标分析仪在492 nm处测量每个样品浓度的A。试验表明,慢性粒细胞白血病细胞株K562细胞生长抑制率与样品浓度之间呈现剂量-效应依赖关系,空白对照组的A为1.290,试验组测定结果见图1。

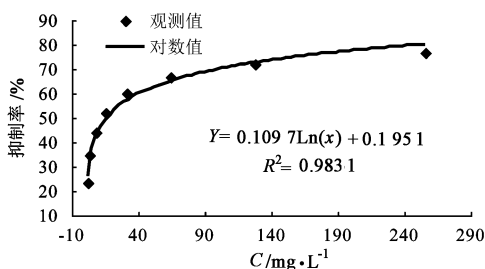


图1 三尖杉种仁挥发油对慢性粒细胞白血病细胞株K562的量效关系曲线

图1结果所示,三尖杉种仁挥发油可明显抑制慢性粒细胞白血病细胞株K562细胞的生长,并随样品浓度的倍比增加,对肿瘤细胞的生长抑制效应呈升高趋势,最高抑制率达76.94%。其中样品浓度处于前4种较低水平时,随添加量倍比增高抑制效应响应强度明显上升,较高浓度时抑制率增长则逐渐趋于缓和。由挥发油浓度与慢性粒细胞白血病细胞K562肿瘤细胞抑制率之间的量效关系生成了对

数拟合曲线,计算得 $\text{IC}_{50} = 16.14\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

4 讨论

以GC-MS联用技术分析并鉴定了存在于三尖杉种仁挥发油的23种化学成分,结果显示主要为脂肪烷烃和萜类,其中油酸含量最高,达总油量的34.53%,含量超过2.0%的化学成分有11种,占全部鉴定成分的92.11%。大部分挥发油成分在其他裸子植物组织中也有发现^[12]。另外, α -松油烯、角鲨烯和L-精氨酸在三尖杉植物中属首次报道。

本文对分布于秦巴山区三尖杉野生植株的种仁脂肪酸进行了初步的抗菌、细胞毒活性研究。试验表明,挥发油样品对供测试的金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和沙门氏菌表现较强的抑制作用,特别是在样品质量浓度为 $1.00\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时仍对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌有抑制活性。目前关于脂肪酸的抑菌机制主要有以细胞膜为靶位点而起作用的膜机制;以引起细胞内酸化从而使正常代谢受阻的酸化机理;影响电子传递体系机制及信号干扰机制等多个方面。Kelsey等^[13]研究发现从植物组织中提取到的棕榈酸、肉豆蔻酸、亚油酸等多种脂肪酸可对存在于肉制品中的金黄色葡萄球菌显示出较高的抑制作用;有研究证明月桂酸蔗糖酯对蜡样芽孢杆菌具有强烈抑制活性,其中最低抑制质量浓度为 $9.375\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[14]。有关本研究的抑菌有效成分、最低拮抗浓度及抑菌机制还有待进一步研究。在细胞毒活性检测中,脂肪酸样品对慢性粒细胞白血病细胞株K562细胞显示较高的细胞毒活性。通过细胞形态跟踪观察发现,48 h内对肿瘤细胞生长的抑制作用表现稳定并持续增加;另外,随着样品浓度的倍比增加,肿瘤细胞生长抑制率与样品浓度之间呈现剂量-效应依赖关系, $\text{IC}_{50}\ 16.14\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,具有较大开发利用潜力,然而对于具体的抗肿瘤成分有待进一步研究确认。

[参考文献]

- [1] 郑万钧,傅立国. 中国植物志. 第7卷[M]. 北京:北京科学出版社,1978:426.
- [2] 傅立国. 三尖杉属的研究[J]. 植物分类学报,1984,22(4):277.
- [3] 李因刚,周志春,金国庆. 三尖杉种源遗传多样性[J]. 林业科学,2008,44(2):64.
- [4] Wang Jianmin, Lü Shuqing, Yang Jianmin, et al. A homoharringtonine-based induction regimen for the treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia: a single center experience from China [J]. J Hematol Oncol, 2009, 2(1): 32.

同一植株不同生长期橘皮中 辛弗林含量动态变化规律研究

韦正¹, 陈鸿平¹, 杨丽¹, 樊丹青¹, 王坚^{1,2}, 刘友平^{1*}

(1. 成都中医药大学药学院, 教育部中药材标准化重点实验室, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137; 2. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 400016)

[摘要] **目的:**比较研究定产地、定植株橘皮在不同生长期橘皮中辛弗林的动态变化差异,探索橘皮因采收期不同而成为(陈皮和青皮)2味功效存在差异的中药其内在物质基础有何不同,以及采收期与有效成分的动态累积的关系,为两药质量控制标准的完善提供依据。**方法:**采用 HPLC 测定四川蒲江、眉山、夹江及重庆市璧山 4 个不同产地、不同采收期共 45 批橘皮中的辛弗林含量。**结果:**同一植株不同生长期橘皮中辛弗林含量随着果实成熟度增加而降低,11 月之后采集的样品辛弗林的含量变化趋于稳定;同一植株不同年份相同生长期的橘皮药材中辛弗林含量亦无显著差异。**结论:**同一植株不同的采收期对陈皮、青皮辛弗林成分的影响较大,橘皮未成熟的果实中辛弗林的含量最高,不同生长期橘皮辛弗林含量呈随着果实成熟度增加而降低。

[关键词] 橘皮; 高效液相色谱; 含量测定; 辛弗林

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0080-05

[doi] 10.11653/syfy2013100080

[收稿日期] 20120925(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072991);四川省教育厅自然科学重点项目(09ZA033)

[第一作者] 韦正,在读硕士研究生,从事中药化学成分与质量标准化研究, Tel: 15208278394, E-mail: weizheng2006@163.com

[通讯作者] *刘友平,研究员,博士生导师,从事中药质量标准化及药效物质基础研究, Tel: 028-61800158, E-mail: lyp@cdutcm.edu.cn

- [5] Gu L F, Zhang W G, Wang F X, et al. Low dose of homoharringtonine and cytarabine combined with granulocyte colony-stimulating factor priming on the outcome of relapsed or refractory acute myeloid leukemia [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(6): 997.
- [6] Tang J Y, Liu Y, Chen J, et al. Homoharringtonine as a backbone drug for the treatment of newly diagnosed pediatric acute myeloid leukemia: a report from a single institution in China [J]. *Inter J Hematol*, 2011, 93(5): 610.
- [7] 刘同祥,张艳平,徐羽,等. 紫杉醇联合三尖杉宁碱诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(8): 115.
- [8] 王慧娜,赵桦. 开口箭脂肪酸成分气相色谱-质谱分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(8): 86.
- [9] 张辰露,吴三桥,秦文娟,等. GC-MS 法分析中药索骨丹中脂肪酸成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(3): 100.
- [10] 刘俊,梅文莉,崔海滨,等. 白木香种子挥发油的化学成分及抗菌活性研究[J]. *中药材*, 2008, 31(3): 340.
- [11] 司高. 核桃仁醇提取物抑制癌细胞生长的实验研究[J]. *中医研究*, 2011, 24(1): 19.
- [12] Zhang Y M, Chen Y G, Huang Z X. Chemical composition of the essential oil of *Cephalotaxus lanceolata* fresh leaves [J]. *Chem Nat Comp*, 2012, 48(1): 147.
- [13] 张靖,杨柳,高文远. 天然抗肿瘤药物研究进展[J]. *中草药*, 2010, 41(6): 182.
- [14] Kelsey J A, Bayles K W, Shafii B, et al. Fatty acids and monoacylglycerols inhibit growth of *Staphylococcus aureus* [J]. *Lipids*, 2006, 41(10): 951.
- [15] Habulin M, Sabeder S, Knez Z. Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in organic solvent and in supercritical carbon dioxide and their antimicrobial activity [J]. *J Supercritical Fluids*, 2008, 45(3): 338.

[责任编辑 邹晓翠]