

狐臭柴中精油 GC-MS 测定及其抑制肺癌细胞增殖的研究

李 爽^{1,2}, 向 东^{1,2}, 崔令军¹, 周大寨^{1*}, 朱玉昌^{1,2*}

1. 生物资源保护与利用湖北省重点实验室(湖北民族大学), 湖北 恩施 445000

2. 湖北民族大学生物科学与技术学院, 湖北 恩施 445000

摘 要: 目的 研究狐臭柴 *Premna puberula* 叶片精油的化学成分、含量、抗氧化、抑菌及抗肿瘤的能力, 为狐臭柴开发利用提供一定的研究基础。方法 采用气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)联用仪鉴定狐臭柴叶片精油的化学成分; 以对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)和 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)自由基的清除能力, 结合总还原力为指标评价精油的抗氧化活性; 以抑菌圈法探究其对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞杆菌、白色念珠菌的抑制作用; 采用细胞增殖/毒性检测试剂盒法(Cell Counting Kit-8, CCK-8)测定其对肺癌 A549 细胞的抑制作用。结果 狐臭柴叶片精油中共鉴定出 72 种化合物, 约占精油总成分的 99.36%, 其主要成分为左旋- β -蒎烯(15.27%)、1-辛烯-3-醇(14.46%)、蒎烯(14.29%)、1-石竹烯(6.26%)、 α -石竹烯(4.47%)和芳樟醇(3.12%)。抗氧化实验结果表明, 狐臭柴叶片精油具有较强的总还原力, 且对 DPPH 及 ABTS 自由基的半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)分别为 8.48、3.10 mg/mL。狐臭柴叶片精油对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞杆菌和大肠杆菌有较强的抑菌作用, 最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)分别为 30%、30%、30%、40%。狐臭柴叶片精油作用于肺癌 A549 细胞 3、4、5 h 下的 IC₅₀ 分别为 0.11%、0.10%、0.06%。结论 狐臭柴叶片精油中成分丰富, 具有较强的抗氧化、抗菌和抗肿瘤活性, 在食品、制药和化妆品行业具有潜在的应用前景。

关键词: 狐臭柴; 精油; 1-辛烯-3-醇; 蒎烯; 抗氧化; 抑菌; 抗肿瘤

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)06-1870-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.06.019

Determination of essential oil in *Premna puberula* by GC-MS and its inhibitory effect on proliferation of lung cancer cells

LI Shuang^{1,2}, XIANG Dong^{1,2}, CUI Ling-jun¹, ZHOU Da-zhai¹, ZHU Yu-chang^{1,2}

1. Hubei Key Laboratory of Biologic Resources Protection and Utilization (Hubei Minzu University), Enshi 445000, China

2. College of Biological Sciences and Technology, Hubei Minzu University, Enshi 445000, China

Abstract: Objective To study the chemical composition, content, antioxidant, antibacterial and anti-tumor abilities of the essential oils from the leaves of *Premna puberula*, so as to provide a certain research basis for the application and development of *P. puberula*. **Methods** The chemical constituents of the essential oil of *P. puberula* leaves were identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The antioxidant activity of essential oils was evaluated by DPPH and ABTS free radical scavenging capacity and total reducing capacity of essential oils. The inhibition zone method was used to explore the inhibitory effects of the essential oil on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. CCK-8 test was used to determine the inhibitory effect of essential oils on human lung cancer A549 cells. **Results** A total of 72 compounds were identified in the essential oil of *P. puberula* leaves, accounting for about 99.36% of the total composition. The main components of essential oils are L- β -pinene (15.27%), 1-octen-3-ol (14.46%), pinene (14.29%), 1-caryophyllene (6.26%), α -caryophyllene (4.47%) and linalool (3.12%). The results of antioxidant test showed that essential oils had strong total reducing power, and the IC₅₀ of DPPH and ABTS free radicals were 8.48 mg/mL and 3.10 mg/mL, respectively. The essential oil of *P. puberula* leaves had antibacterial effect on *C.*

收稿日期: 2022-08-09

基金项目: 湖北省教育厅项目(Q20131908); 恩施州科技计划项目(XYJ2020000022); 生物资源保护与利用湖北省重点实验室开放基金(PT012015)

作者简介: 李 爽(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为特色生物资源食品加工与开发。E-mail: 1820160341@qq.com

*通信作者: 周大寨(1976—), 男, 高级实验师, 研究方向为天然产物的研究与开发。E-mail: sws0048@163.com

朱玉昌(1980—), 女, 副教授, 研究方向为农产品质量与食品安全。E-mail: zycandy@163.com

albicans, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*, and the minimum inhibitory concentration (MIC) were 30%, 30%, 30% and 40%, respectively. The IC₅₀ of the essential oil of *P. puberula* leaves had acted on human lung cancer A549 cells at 3 h, 4 h and 5 h were 0.11%, 0.10% and 0.06%, respectively. **Conclusion** The essential oil of *P. puberula* leaves were rich in components and had strong antioxidant, antibacterial and antitumor activities, which will have potential application prospects in the food, pharmaceutical and cosmetic industries.

Key words: *Premna puberula* Pamp; essential oil; 1-octen-3-ol; pinene; antioxidant; antibacterial; antitumor

狐臭柴 *Premna puberula* Pamp 别名豆腐柴、臭黄荆、臭树、水白腊等, 属马鞭草科豆腐柴属植物, 一般生长于山坡林下或林缘, 在我国广泛分布于华东、中南、华南及西南等地, 是一种药食兼用植物^[1-2], 贵州地区将其根与叶入药, 清湿热、解毒, 治月经不调, 四川地区用其皮煮水治牙痛; 湖北、湖南等地用其叶制作凉粉食用, 名曰“神仙豆腐”。目前, 狐臭柴在我国部分地区已区域化、规范化种植^[3], 如颜跃跃等^[4]研究不同扦插材料来源、扦插时期、不同植物生长调节物质及其浓度对狐臭柴扦插成活率的影响, 不断优化其扦插繁殖技术。另外, 狐臭柴叶片中果胶、蛋白质、多酚及黄酮类化合物含量丰富, 李祥栋等^[5]通过柠檬酸法提取狐臭柴叶片果胶, 响应面法得到果胶粗产率、半乳糖醛酸含量和果胶有效提取率分别为 36.72%、32.09%和 11.78%; 陈晔等^[6]研究发现狐臭柴叶片果胶可作为热稳定性增稠剂应用于热食型吞障食品中。陶阿丽等^[7]通过优化狐臭柴叶片蛋白的闪式提取工艺, 其平均提取率达到叶片蛋白含量的 63.06%; 杨宁线等^[8]测定发现狐臭柴叶中总酚及总黄酮质量分数分别为 30.05 mg/g 和 6.54 mg/g, 通过自由基清除实验发现狐臭柴叶片提取物具有良好的抗氧化活性; 黄思雨^[9]研究发现狐臭柴叶片细粉可以改善小鼠溃疡性结肠炎症, 具有肠道益生性。狐臭柴叶片是一种集营养、保健和药用一体的野生资源, 作为功能食品开发或者医药原材料开发, 均有广阔的发展前景。

植物精油是一种潜在的新型药物化合物及食品添加剂的来源^[10]。因化学和结构组成的不同, 使得其具有多种生理功能, 包括抗氧化^[11]、抗菌^[12-13]、抗炎^[14]、抗肿瘤和驱虫^[15]等, 徐小青等^[16]发现狐臭柴精油中大多成分都具有抑菌作用或抑制害虫作用; Riabov 等^[17]发现塞尔维亚月桂精油对所有受试微生物显示出更大的抑菌活性, 而俄罗斯月桂精油对受试细菌和酵母都有效, 对其他受试真菌没有任何抑制作用; 席祖卫等^[18]发现维吉尼亚雪松精油可显著提高巨噬细胞相关炎症因子的表达量, 且呈剂量相关性抑制人结肠癌 HT-29 细胞株的增殖。而狐

臭柴叶片功能性成分的研究主要集中在果胶、蛋白质、多酚及黄酮类化合物的提取与抗氧化活性研究, 对狐臭柴叶片精油抗氧化、抗菌及抗肿瘤活性的研究鲜有报道。

本实验以狐臭柴叶片为原料, 采用水蒸气蒸馏法采集油品, 通过气相色谱-质谱 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 联用仪分析鉴定其化学成分, 同时对其精油的抗氧化、抑菌和抗肿瘤能力进行了研究, 以期对狐臭柴资源的开发利用提供一定的研究基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

HP7890A/5975C 型 GC-MS 联用仪, Cary300 型紫外分光光度计 (Agilent Technologies 公司); BSA6202S-CW 型精密分析天平 (赛多利斯科学仪器有限公司, 万分之一); 酶标仪 (上海光谱仪器有限公司); SJ-CJ-2FDQ 型超净台 (苏洁净化); SPX-1505H-II 型生化培养箱 (上海新苗医疗器械制造有限公司); JC80D 型立式压力蒸汽灭菌锅 (德强净化科技有限公司); BB15 型 CO₂ 细胞培养箱 (赛默飞世尔科技有限公司); 热泵干燥机 (威而信实业有限公司)。

1.2 材料

狐臭柴鲜叶于 2021 年 9 月采摘于湖北省利川市湖北雄展农业开发有限公司的种植基地, 经湖北民族大学林学院园艺学院易咏梅教授鉴定为狐臭柴 *P. puberula* Pamp。鲜叶洗净后于 57 °C 烘干揉碎, 于 4 °C 遮光密封保存。

平板计数琼脂培养基、马铃薯琼脂培养基、胰酪大豆胨液体培养基 (杭州百思生物技术有限公司); 大肠杆菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、铜绿假单胞杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*、白色念珠菌 *Candida albicans* (广东环凯微生物科技有限公司); 人肺癌 A549 细胞 (中国医学科学院细胞研究所); 细胞增殖/毒性检测试剂盒 (Cell Counting Kit-8, CCK-8)、RPMI 1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶 EDTA 消化液 (生工

生物股份有限公司); 抗坏血酸 (vitamin C, Vc)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、2,2'-联氮双 (3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐 [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS]、二甲基亚砜 (DMSO, 国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法

2.1 精油提取

将 1.0 kg 的狐臭柴干叶按照 1:15 的料液比装入水蒸馏及冷凝回收装置中, 加热沸腾后开始计时, 5 h 后停止加热。待提取器静置分层, 收集上层油状物质, 下层水层用 10 mL 的乙醚萃取 3 次, 合并 3 次滤液, 室温下挥发多余乙醚, 得精油得率为 0.29%。取适量精油用无水乙醚溶解, 并加入适量无水硫酸钠干燥, 待 GC-MS 检测; 剩余精油保存在棕色玻璃瓶中, 置于 4 °C 冰箱中保存。

2.2 精油 GC-MS 测定

2.2.1 色谱条件 DB-5MS 石英毛细管色谱柱 (30 m×320 μm×0.25 μm); 载气为高纯氦气, 载气体积流量 1.0 mL/min; 分流比 60:1, 进样量 1.0 μL; 进样口温度 250 °C; 程序升温: 初始温度 60 °C, 保持 3 min; 8 °C/min 升温至 100 °C; 再以 2 °C/min 升温至 150 °C; 10 °C/min 升温至 180 °C, 保持 2 min; 4 °C/min 升温至 190 °C; 8 °C/min 升温至 280 °C, 保持 5 min。

2.2.2 质谱条件 溶剂延迟时间为 2 min; 电离方式为 EI, 电离能量 70 eV, 离子源温度为 230 °C, 四极杆温度为 150 °C; 质量扫描范围为 m/z 35~550; 采用 NIST2014 标准谱库进行检索。

2.3 精油抗氧化活性的测定

2.3.1 总还原能力的测定 参考卢彩会等^[19]的方法, 用无水乙醇稀释精油得到质量浓度分别为 1、2、3、4、5 mg/mL 的精油-乙醇溶液。取 0.4 mL 样品液和 4.0 mL 磷钼试剂 (0.6 mol/L 硫酸、28 mmol/L 磷酸钠、4 mmol/L 钼酸铵) 于干净试管, 摇匀后在 95 °C 恒温加热 90 min, 冷却至室温后, 于紫外分光光度计 695 nm 波长处测定吸光度 (A)。用 0.4 mL 无水乙醇代替样品液作空白, Vc 作为阳性对照, 平行操作重复 3 次。

2.3.2 清除 DPPH 自由基能力的测定 参考刘梦洁等^[20]的方法, 并据实验稍加修改。取 19.716 mg DPPH 于 500 mL 量瓶中, 加无水乙醇定容, 得到 0.1 mmol/L DPPH 乙醇溶液。1.0 mL 不同质量浓度

(1、2、3、4、5 mg/mL) 的精油-乙醇溶液与 2.0 mL DPPH 溶液混合后, 避光反应 30 min, 517 nm 下测定吸光值 (A_1); 2.0 mL 无水乙醇代替 DPPH 溶液测得吸光值 (A_2); 1.0 mL 乙醇代替样品液测得吸光值 (A_0)。Vc 作为阳性对照, 操作同上。平行操作重复 3 次。DPPH 自由基清除率按公式 (1) 计算。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = 1 - (A_1 - A_2) / A_0 \quad (1)$$

2.3.3 清除 ABTS 自由基能力的测定 参考刘梦洁等^[20]的方法, 并据实验稍加修改。取 7 mmol/L ABTS 溶液与 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液各 5.0 mL 混合, 在室温避光条件下静置过夜, 将混合液用磷酸缓冲液 (pH 值为 7.4) 稀释至波长在 734 nm 处吸光度值为 (0.70±0.02), 即为 ABTS 测定液。取 0.2 mL 不同质量浓度 (1、2、3、4、5 mg/mL) 的精油-乙醇溶液与 2.0 mL 上述 ABTS 测定液混合后暗处反应 30 min, 734 nm 处测定吸光值 (B_1); 2.0 mL 无水乙醇代替 ABTS 溶液测得吸光值 (B_2); 1.0 mL 乙醇代替样品液测得吸光值 (B_0)。Vc 作为阳性对照, 操作同上。平行操作重复 3 次。ABTS 自由基清除率按公式 (2) 计算。

$$\text{ABTS 自由基清除率} = 1 - (B_1 - B_2) / B_0 \quad (2)$$

2.4 精油抑菌活性的测定

2.4.1 菌种活化及菌悬液制备 参考《中国药典》2020 年版^[21], 将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞杆菌、白色念珠菌分别接种到胰酪大豆胨液体培养基中进行活化, 于 37 °C 恒温培养箱中振荡培养 24 h, 得到一代菌悬液。在无菌操作台内吸取 100 μL 已活化好的菌种接种到上述培养基中, 操作同上, 得到二代菌悬液, 供实验使用。

2.4.2 抑菌圈法测定抑菌活性 参考张玉龙等^[22]的方法, 并据实验稍加修改。在无菌操作台中将融化并灭菌的培养基倒入已灭菌的培养皿中, 冷却凝固后, 加入菌悬液 100 μL, 用滚珠涂布均匀。将直径为 9 mm 的无菌滤纸片放于培养基上, 将狐臭柴精油用 DMSO 分别配成含精油添加量 10%、20%、30%、40% 和 50% 的溶液, 用移液枪吸取 40 μL 溶液, 缓慢滴加在滤纸片上, 令其完全浸润且不外溢, 以空白平板为阴性对照, 以 DMSO 为阳性对照, 37 °C 正置培养 24 h 后测量抑菌圈直径, 首次出现抑菌圈所对应的狐臭柴叶片精油浓度即为最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC), 平行重复 3 次, 取平均值。

2.5 精油对 A549 细胞的抑制作用

2.5.1 细胞培养 复苏 A549 细胞, 在超净工作台上将其接种于 25 mL 培养瓶中, 加入含体积分数为 10% 的胎牛血清及青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL 的 RPMI 1640 培养液 5 mL, 用枪头小心反复吹打, 使细胞分散均匀。将培养瓶置于培养箱 (温度为 37 ℃、饱和湿度为 95%、CO₂ 体积分数为 5%) 中培养, 每 2~3 d 换液传代培养。

2.5.2 CCK-8 法测定狐臭柴叶片精油对 A549 肺癌细胞的抑制率 参考刘岸等^[23]的方法, 并据实验稍加修改。收集对数期细胞, 吸弃培养液, 用 PBS 液清洗悬浮死细胞并弃去, 加 0.25% 的胰酶消化 2 min, 加 RPMI 1640 培养液 1.0 mL 中止消化, 小心反复吹打, 制成单层细胞悬液, 调整细胞浓度至 1×10^4 个/mL。将细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔的体积为 100 μ L, 并设置仅加入 RPMI 1640 培养液的孔作为阴性对照组 (C₀), 置于 CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 吸弃孔中液体, 分别加入不同浓度的用 RPMI 1640 培养液混匀的精油混悬液 (精油的体积比浓度分别为 0.05%、0.10%、0.20%、0.30% 和 0.40%), 作为实验组 (C₁)。在加入细胞悬液的孔中加 RPMI 1640 培养液 100 μ L, 作为阳

性对照组 (C₂)。在所有组别的周围孔中加入 RPMI 1640 培养液 100 μ L, 减少蒸发对实验的影响。每个浓度分别设 6 个平行孔, 置于 CO₂ 培养箱中分别培养 3、4、5 h。加入 10% 体积浓度的 CCK-8 溶液, 震荡 2 min, 继续培养 1 h, 在 450 nm 波长下, 利用酶标仪测定 96 孔培养板上各孔的吸光度值 (A), 记录实验结果。抑制率按公式 (3) 计算。

$$\text{抑制率} = [(A_{C_2} - A_{C_0}) - (A_{C_1} - A_{C_0})] / (A_{C_2} - A_{C_0}) \quad (3)$$

2.6 数据处理

运用 SPSS23.0 软件对实验结果进行统计分析 (One-way ANOVA), 利用邓肯氏多重比较对差异显著性进行比较分析, $P < 0.05$ 表示差异显著; 运用 Origin2021b 进行作图分析。

3 结果与分析

3.1 精油 GC-MS 成分分析

使用 GC-MS 技术对狐臭柴叶片精油成分进行分析, 色谱峰信息依据 NIST14 标准谱库检索和文献报道的保留指数进行比对定性, 保留匹配度高于 80% 的化学成分, 采用峰面积归一化法计算各组分的相对含量, 定性结果及相对含量见表 1, 总离子流图见图 1。

表 1 狐臭柴叶片精油的化学成分与相对含量

Table 1 Chemical constituents and relative contents of volatile oil from *P. puberula* leaves

序号	tr/min	化合物	分子式	相对质量分数/%
1	3.54	糠醛	C ₅ H ₄ O ₂	0.10
2	3.84	5-(1,1-二甲基乙基)-1,3-环戊二烯	C ₉ H ₁₄	0.09
3	4.18	反式-2-己烯醛	C ₆ H ₁₀ O	2.26
4	4.25	反式-3-己烯-1-醇	C ₆ H ₁₂ O	0.43
5	4.61	正己醇	C ₆ H ₁₄ O	0.33
6	5.23	(Z)-4-庚烯醛	C ₇ H ₁₂ O	0.07
7	6.06	蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	14.29
8	6.32	樟脑萜	C ₁₀ H ₁₆	0.12
9	6.60	5-甲基呋喃醛	C ₆ H ₆ O ₂	0.23
10	7.09	左旋- β -蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	15.27
11	7.22	1-辛烯-3-醇/蘑菇醇	C ₈ H ₁₆ O	15.50
12	7.60	顺-2-(2-戊烯基)呋喃	C ₉ H ₁₂ O	0.23
13	7.65	3-辛醇	C ₈ H ₁₈ O	0.08
14	7.70	α -水芹烯	C ₁₀ H ₁₆	0.25
15	7.86	反式-2,4-庚二烯醛	C ₇ H ₁₀ O	0.28
16	8.08	邻异丙基甲苯	C ₁₀ H ₁₄	0.20
17	8.19	右旋萜二烯	C ₁₀ H ₁₆	1.33
18	8.40	反式- β -罗勒烯	C ₁₀ H ₁₆	0.21
19	8.46	苯乙醛	C ₈ H ₈ O	0.11
20	8.60	罗勒烯	C ₁₀ H ₁₆	0.24
21	8.79	萜品烯	C ₁₀ H ₁₆	0.12
22	9.07	反式-3,5-辛二烯-2-酮	C ₈ H ₁₂ O	0.32
23	9.35	萜品油烯	C ₁₀ H ₁₆	0.19

续表 1

序号	<i>t_R</i> /min	化合物	分子式	相对质量分数/%
24	9.65	3-(4-甲基-3-戊烯-1-基)-呋喃	C ₁₀ H ₁₄ O	0.08
25	9.79	芳樟醇	C ₁₀ H ₁₈ O	3.12
26	10.45	1-松香酚	C ₁₀ H ₁₆ O	0.23
27	10.85	匹诺香芹酮	C ₁₀ H ₁₄ O	0.25
28	11.41	水杨酸甲酯	C ₈ H ₈ O ₃	0.24
29	11.48	桃金娘烯醛	C ₁₀ H ₁₄ O	0.16
30	11.56	1-甲基-3-(1-甲基乙烯基)环己烯	C ₁₀ H ₁₇	0.91
31	11.80	1,1,4,5-四甲基茛满	C ₁₃ H ₁₈	0.09
32	11.99	β-环柠檬醛	C ₁₀ H ₁₆ O	0.36
33	12.19	橙花醇	C ₁₀ H ₁₈ O	0.16
34	12.82	香叶醇	C ₁₀ H ₁₈ O	0.46
35	13.59	乙酸冰片酯	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0.16
36	14.27	4-乙烯基-2-甲氧基苯酚	C ₉ H ₁₀ O ₂	0.53
37	15.40	α-萜荜茄油烯	C ₁₅ H ₂₄	0.19
38	15.53	丁香酚	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	0.26
39	16.34	α-可巴烯	C ₁₅ H ₂₄	3.20
40	16.44	大马士酮	C ₁₃ H ₁₈ O	0.62
41	16.73	萜荜茄油烯	C ₁₅ H ₂₄	0.75
42	16.82	β-榄香烯	C ₁₅ H ₂₄	0.52
43	17.87	1-石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	6.26
44	17.99	α-紫罗兰酮	C ₁₃ H ₂₀ O	0.36
45	18.47	[1S-(1α,4α,7α)]-1,2,3,4,5,6,7,8-八氢化-1,4-二甲基-7-(1-甲基乙烯基)奥	C ₁₅ H ₂₄	0.98
46	19.18	α-石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	4.47
47	19.35	(+)-香橙烯	C ₁₅ H ₂₄	1.77
48	20.03	1-异丙基-7-甲基-4-亚甲基-1,2,3,4,4a,5,6,8a-八氢茱	C ₁₅ H ₂₄	1.51
49	20.19	β-紫罗兰酮	C ₁₃ H ₂₀ O	2.13
50	20.76	双环烯	C ₁₅ H ₂₄	0.87
51	21.12	(1S,7R,8aS)-1,2,3,5,6,7,8,8a-八氢-1,4-二甲基-7-(1-甲基乙烯基)-天竺葵	C ₁₅ H ₂₄	1.68
52	21.87	d-卡丁烯	C ₁₅ H ₂₄	1.93
53	22.65	α-卡拉柯烯	C ₁₅ H ₂₀	0.28
54	23.08	反式倍半萜	C ₁₅ H ₂₆ O	0.44
55	24.17	反式-橙花叔醇	C ₁₅ H ₂₆ O	2.02
56	24.34	芥菜酚	C ₁₅ H ₂₄ O	1.88
57	24.43	氧化石竹烯	C ₁₅ H ₂₄ O	1.34
58	25.63	葎草烯	C ₁₅ H ₂₄ O	1.12
59	26.54	1,2,3,4,4a,7-六氢-1,6-二甲基-4-(1-甲基乙基)-萘	C ₁₅ H ₂₄	0.18
60	27.52	α-蒎烯	C ₁₅ H ₂₄	0.33
61	27.87	g-古朱烯	C ₁₅ H ₂₄	0.31
62	28.88	b-红没药醇	C ₁₅ H ₂₆ O	0.35
63	31.25	3,7,11-三甲基-2,6,10-十二烷三烯-1-醇	C ₁₅ H ₂₆ O	0.21
64	38.97	金合欢基丙酮	C ₁₈ H ₃₀ O	0.16
65	39.46	棕榈酸甲酯	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	0.21
66	39.80	邻苯二甲酸二丁酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	0.15
67	40.73	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1.66
68	43.41	8,11-十八碳二烯酸甲酯	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	0.14
69	43.54	亚麻酸甲酯	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	0.48
70	43.87	叶绿醇	C ₂₀ H ₄₀ O	0.62
71	44.62	亚麻酸	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	0.72
72	49.17	三苯基氧化膦	C ₁₈ H ₁₅ OP	0.13

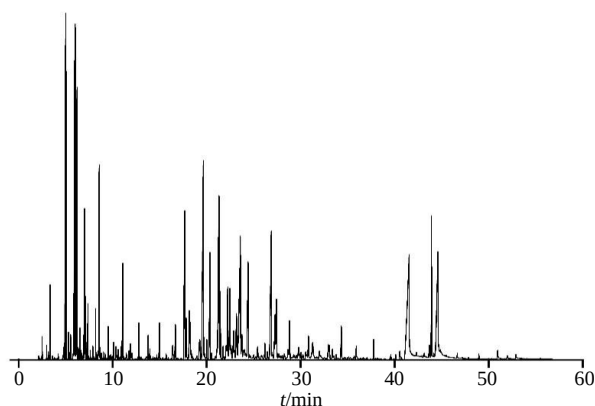
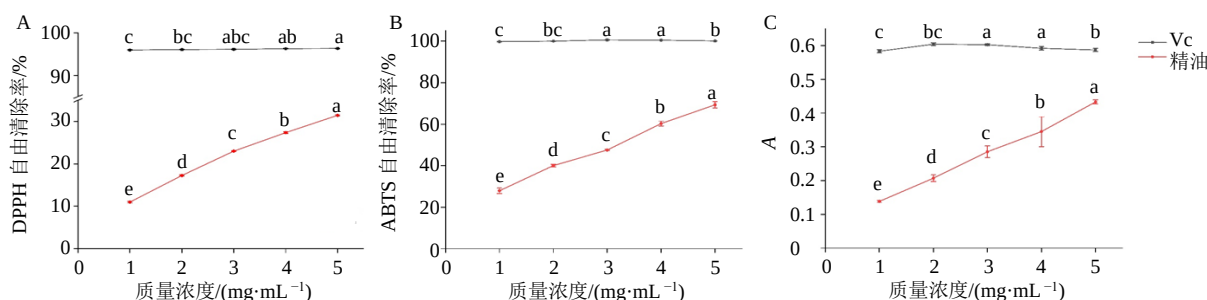


图 1 狐臭柴叶片精油成分的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of volatile oil from *P. puberula* leaves



不同小写字母表示具有显著性差异 ($P < 0.05$), 下同 A、B、C-总还原能力

Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$), same as below A, B, C-total reduction capacity

图 2 狐臭柴叶片精油的抗氧化作用

Fig. 2 Anti-oxidize effect of volatile oil from *P. puberula* leaves

由图 2-B 可知, 精油具有显著的 ABTS 自由基清除能力。在 1~5 mg/mL, 精油对 ABTS 自由基清除率从 27.90% 上升至 69.31%, 表现出明显的剂量效应。精油质量浓度 (X) 与清除率 (Y) 间的回归方程为 $Y = 10.305X + 18.104$, $R^2 = 0.9951$, 精油对 ABTS 自由基清除作用的 IC_{50} 值为 3.10 mg/mL。

由图 2-C 可知, 狐臭柴叶片精油具有较好的总还原能力, 在 1~5 mg/mL 内, 随着精油浓度的增加, 其还原能力不断增强, 呈明显的剂量相关性, 且差异显著。当精油质量浓度为 5 mg/mL 时, 还原能力 A 值为 0.43, 但还原能力低于同质量浓度的 Vc (其 A 为 0.59)。

3.3 精油的抑菌作用

表 2 及图 3 为狐臭柴叶片精油在不同体积百分比浓度下作用于 4 种供试菌种 24 h 后出现的抑菌圈的直径大小。在同一浓度下, 精油对白色念珠菌的抑制性最强, 对大肠杆菌的抑制性较弱, 不同菌的

由表 1 和图 1 可知, 从狐臭柴叶片精油中共鉴定出 72 个成分, 占精油总量的 99.36%。精油含有烯烃、醇、酮、醛、酸、酯类等, 以萜类化合物为主, 精油中含量较高成分有左旋- β -蒎烯 (15.27%)、蒎烯 (14.29%)、1-辛烯-3-醇 (13.83%)、石竹烯 (10.73%)、芳樟醇 (3.12%) 和亚麻酸 (0.72%) 等。

3.2 精油的抗氧化作用

由图 2-A 可知, 狐臭柴叶片精油具有显著的 DPPH 自由基清除能力。在 1~5 mg/mL 内, 精油对 DPPH 自由基清除率从 10.98% 上升至 31.45%, 表现出明显的剂量效应。精油质量浓度 (X) 与清除率 (Y) 间的回归方程为 $Y = 5.1051X + 6.6938$, $R^2 = 0.9908$, 精油对 DPPH 自由基清除作用的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50}) 为 8.48 mg/mL。

抑菌圈直径呈现出显著性差异。对于同一种菌, 随着精油浓度的增大, 抑菌圈直径增大, 表明抑菌作用增强。白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞杆菌及大肠杆菌的 MIC 分别为 30%、30%、30% 和 40%。

3.4 精油对 A549 细胞的抑制作用

通过 CCK-8 法测定在不同作用浓度和不同作用时间下的狐臭柴叶片精油对人肺癌 A549 细胞增殖的影响, 结果如表 3 与图 4 所示。由表 3 及图 4 可知, 相同作用时间下, 随着狐臭柴叶片精油浓度的加大, 对癌细胞的抑制率逐渐上升, 具有显著的药物浓度相关性; 相同作用浓度下, 不同作用时间的癌细胞抑制率为 5 h > 4 h > 3 h, 说明其抑制效果具有时间相关性; 当狐臭柴叶片精油浓度达到 0.3% 将药物浓度的对数与抑制率进行曲线拟合, 通过回归方程计算, 不同浓度狐臭柴叶片精油分别作用于人肺癌 A549 细胞 3、4、5 h 的 IC_{50} 值分别为 0.11%、

表 2 狐臭柴叶片精油对细菌和真菌的抑菌活性及其 MIC 值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 2 Antibacterial activity and MIC of volatile oil of *P. puberula* leaves against bacteria and fungal strains ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

菌种	不同浓度下的抑菌圈直径/mm			MIC/%
	30%	40%	50%	
金黄色葡萄球菌	9.92 ± 0.46 ^c	11.36 ± 0.45 ^c	17.44 ± 1.04 ^b	30
大肠杆菌	—	10.83 ± 0.65 ^d	12.50 ± 0.63 ^d	40
铜绿假单胞杆菌	11.36 ± 1.04 ^b	12.87 ± 1.22 ^b	15.48 ± 0.96 ^c	30
白色念珠菌	12.91 ± 0.82 ^a	15.30 ± 1.44 ^a	18.64 ± 1.36 ^a	30

—表示无抑菌圈；小写字母表示同一浓度下不同菌种的抑菌圈直径具有显著性差异 ($P < 0.05$)

—means no bacteriostatic effect; Lowercase letters indicate that the diameter of the inhibition zone of different strains at the same concentration is significantly different ($P < 0.05$)

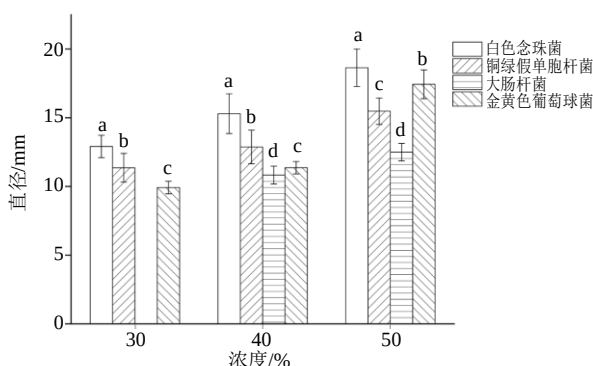


图 3 狐臭柴叶片精油对不同菌种的抑菌效果

Fig. 3 Antibacterial effect of essential oil from *P. puberula* leaves on different bacterial species表 3 狐臭柴叶片精油对肺癌 A549 细胞的抑制率及其 IC₅₀ 值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 IC₅₀ and inhibitory effect of volatile oil of *P. puberula* leaves on lung cancer A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

精油浓度/%	不同时间的平均抑制率/%		
	3 h	4 h	5 h
0.05	22.33 ± 4.43 ^d	28.66 ± 3.34 ^d	37.04 ± 4.98 ^d
0.10	42.36 ± 3.27 ^c	50.14 ± 2.25 ^c	71.00 ± 4.28 ^c
0.20	62.89 ± 4.85 ^b	63.90 ± 3.20 ^b	88.02 ± 1.35 ^b
0.30	96.96 ± 0.24 ^a	98.15 ± 0.50 ^a	98.35 ± 0.18 ^a
0.40	99.67 ± 0.68 ^a	99.37 ± 0.28 ^a	97.96 ± 0.11 ^a
IC ₅₀	0.11	0.10	0.06

0.10%和 0.06%；随着狐臭柴叶片精油作用于 A549 细胞的时间延长，IC₅₀ 也随之降低。

4 讨论

本实验采用 GC-MS 分析了狐臭柴叶片精油的化学成分，主要成分有蒎烯、1-辛烯-3-醇、石竹烯、芳樟醇等，这与吴永祥等^[24]研究的安徽省黄山市豆腐柴叶片精油主要成分差异较大，而与范超敏等^[25]研究的四川大竹县臭黄荆叶精油主要成分类似，是

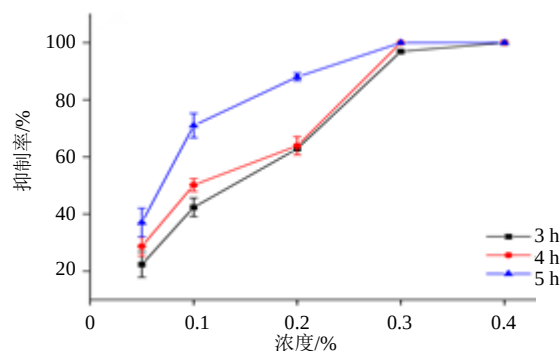


图 4 狐臭柴叶片精油对 A549 细胞的抑制作用

Fig. 4 Inhibitory effect of essential oil from *P. puberula* leaves on human lung cancer A549 cells

由药材产地和品种之间的差异大小导致的。已有的文献显示这些化学成分具有良好的药理活性。其中，蒎烯是天然单萜化合物，研究发现它具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗炎、抗过敏及改善溃疡等作用，食品行业常通过蒎烯来合成紫苏糖甜味剂^[26]，医药方面可应用于小儿感冒颗粒^[27]、桉柠蒎肠溶软胶囊^[28]等。 β -石竹烯，一种双环倍半萜型的天然产物，存在于许多具有抗炎、抑菌、抑制哮喘功能的植物提取物中^[29]。芳樟醇属于链状萜烯醇类，具有抗菌、抗龋齿作用，可以用于合成香料、除臭杀虫等^[30]。Rehman 等^[31]的综述表明，植物精油具有良好的生物功能，除了单独组分的作用，更多的是不同组分协同作用的结果。

采用不同的体外抗氧化试验得到的植物精油抗氧化活性的机制不尽相同^[32]。研究发现，植物精油的抗氧化活性归因于精油中酚类和萜类化合物的含量^[33]，萜类化合物的抗氧化活性是通过活性氧的清除机制和内源抗氧化系统的修饰能力表现出来的^[34]。通过 GC-MS 分析，狐臭柴叶片精油中蒎烯、石竹烯等萜类化合物的相对质量分数约占 50.05%，另外还含有酚、醇及酮类化合物，所以狐

臭柴叶片精油在自由基清除率还原能力方面均具有显著作用。其中 ABTS 自由基的清除率显著高于 DPPH 自由基清除率,可能是精油在溶剂水与醇的溶解性不同引起的^[35]。

由于植物精油具有一定的疏水性,植物精油抗菌活性机制的研究主要集中在对细胞膜结构和功能的破坏方面^[36]。狐臭柴叶片精油对白色念珠菌的抑制活性显著高于其他菌,这可能是由于其萜类化合物能改变细胞表面的特性,抑制了孢子萌发,改变了病原菌的正常菌丝形态进而破坏其正常的生命活性^[37-38]。而精油对于革兰氏阳性菌及阴性菌的生长繁殖影响不同,原因是其中的活性抗菌化合物通过疏水键和氢键与膜蛋白结合,从而改变膜的通透性^[39]。

现代药理研究证明,萜类化合物对乳腺癌、胃癌、肺癌、肝癌等有明显的预防与治疗作用^[40-41];亚麻酸等不饱和脂肪酸能改变肿瘤细胞膜生物特性,影响膜表面活性、受体表达,干扰或阻滞肿瘤细胞内 DNA 代谢、信号传导,从而诱导肿瘤细胞凋亡^[42],而狐臭柴叶片精油中含有丰富的萜类化合物及少量的亚麻酸等不饱和脂肪酸,所以可能是萜类化合物及少量不饱和脂肪酸作用于肺癌 A549 细胞,从而抑制癌细胞增殖,体现出狐臭柴叶片精油良好的抗肿瘤活性。

狐臭柴叶片精油中含有丰富的化学成分,并表现出良好的体外抗氧化、抗菌和抗肿瘤能力。此外,狐臭柴叶片精油中的萜类、醇类、酮类等化合物可能具有调节免疫功能,减少脂肪的累积,进而保护心血管系统^[43],以及减少细菌性胃肠炎的感染和减轻缺血性脑卒中时的神经炎症和细胞凋亡^[44-45],鉴于这些有效成分广泛的生物活性及药理作用,可应用于食品保鲜、药品研制及美容保健的开发中;但这些有效成分的具体作用机制仍需进一步探明,这也指明了狐臭柴叶片精油在未来的研究方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈磊,周忠雨,王晓琼,等.豆腐柴中功能性成分提取及产品开发生态研究进展[J].食品研究与开发,2021,42(7):209-214.
- [2] 罗东升,余萍,阚建全.豆腐柴鲜叶豆腐的工艺条件优化[J].食品科学,2013,34(24):313-317.
- [3] 刘庭付,周大云,缪叶旻子,等.浙西南山区野生豆腐柴驯化栽培技术[J].长江蔬菜,2022(2):62-64.
- [4] 颜跃跃,张明生,王汪中,等.影响狐臭柴扦插繁殖成活率的主要因素研究[J].中药材,2017,40(6):1270-1273.
- [5] 李祥栋,张明生,刘诗雅.狐臭柴叶片中果胶提取条件的初步研究[J].中南林业科技大学学报,2014,34(10):127-131.
- [6] 陈晔,李静雯,李晓,等.豆腐柴叶果胶凝胶流变特性及其在咽喉障碍食品中的应用研究[J].食品科技,2021,46(11):252-258.
- [7] 陶阿丽,冯学花,曹殿洁,等.豆腐柴叶蛋白闪式提取工艺优化及其体外抗氧化活性研究[J].长江大学学报:自科版,2018,15(10):50-56.
- [8] 杨宁线,阳娇,王艳秋,等.贵州狐臭柴不同部位提取物及其抗氧化活性[J].食品与机械,2021,37(8):180-184.
- [9] 黄思雨.绿茶、桑叶和臭黄荆叶细粉抗氧化、抗炎及肠道益生性探究[D].重庆:西南大学,2020.
- [10] Nartey D, Accorley E D, Opoku R, et al. Essential oils from *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae): Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and anti-biofilm potential[J]. *Chem Afr*, 2021, 4(4): 741-752.
- [11] Moein M, Sarabi N, Zomorodian K, et al. *Mentha mozaaffarianii* jamzad: Assessment of the volatile constituents, antioxidant and antifungal activities[J]. *Iran J Sci Technol Trans Sci*, 2022, 46(1): 61-71.
- [12] 张浩宽,郭盛,尚尔鑫,等.山茱萸药材加工过程废弃物制备木醋液的化学成分分析及抑菌活性评价[J].中草药,2022,53(5):1372-1381.
- [13] Khanjani R, Dehghan H, Sarrafi Y. Antifungal edible tomato coatings containing ajwain, neroli, and rosemary essential oils[J]. *Food Measure*, 2021, 15(6): 5139-5148.
- [14] Gao T H, Jiang M Y, Deng B, et al. *Aurantii Fructus*: A systematic review of ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology[J]. *Phytochem Rev*, 2021, 20(5): 909-944.
- [15] Sanei-Dehkordi A, Moemenbellah-Fard M D, Sereshti H, et al. Chitosan nanoparticles containing *Elettaria cardamomum* and *Cinnamomum zeylanicum* essential oils; repellent and larvicidal effects against a malaria mosquito vector, and cytotoxic effects on a human skin normal cell line[J]. *Chem Pap*, 2021, 75(12): 6545-6556.
- [16] 徐小青,吴雨,范超敏,等.2种臭黄荆叶主要挥发性成分及驱虫作用研究[J].中国粮油学报,2013,28(10):74-79.
- [17] Riabov P A, Micić D, Božović R B, et al. The chemical, biological and thermal characteristics and gastronomical perspectives of *Laurus nobilis* essential oil from different geographical origin[J]. *Ind Crops Prod*, 2020, 151:

- 112498.
- [18] 席祖卫, 王雨佳, 陈金虎, 等. 维吉尼亚雪松精油的 GC-MS 分析及体外药理活性研究 [J]. 药物分析杂志, 2022, 42(2): 335-341.
- [19] 卢彩会, 牟德华. 姜黄油的抗炎镇痛及体外抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2018, 39(1): 243-249.
- [20] 刘梦洁, 林丽静, 姜永超. 高良姜精油和纯露的体外抗氧化活性及酪氨酸酶抑制活性研究 [J]. 食品研究与开发, 2021, 42(7): 56-61.
- [21] 中国药典: [S]. 三部. 2020: 529.
- [22] 张玉龙, 张伟, 敬思群, 等. 油茶树嫩枝精油抗氧化性及抑菌性研究 [J]. 食品工业, 2021, 42(10): 197-201.
- [23] 刘岸, 邓姿峰, 胡金喜, 等. 大黄素对人胰腺癌 Panc-1 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 756-759.
- [24] 吴永祥, 杨庆, 李林, 等. 豆腐柴叶挥发油化学成分及其抗氧化和抑菌作用研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(1): 45-51.
- [25] 范超敏, 卢秀彬, 钟耕, 等. 臭黄荆叶理化组成及挥发油成分分析 [J]. 食品科学, 2011, 32(8): 248-251.
- [26] 马腾飞. 微生物合成萜烯的研究进展 [J]. 中国酿造, 2022, 41(4): 20-26.
- [27] 张小龙, 孙晓, 马新飞, 等. 气相色谱法同时测定小儿感冒颗粒中百秋李醇、薄荷脑、 α -萜烯、 β -萜烯的含量 [J]. 首都医药, 2014, 21(22): 110-112.
- [28] 李慧, 张翠欣, 张少芳, 等. HPLC-DAD 法同时测定桉柠蒎肠溶软胶囊中桉油精、柠檬烯和 α -萜烯的含量 [J]. 中国药房, 2015, 26(3): 411-413.
- [29] 舒慧珍, 唐志凌, 韩薇, 等. 石竹烯对热杀索丝菌的抑菌机理 [J]. 食品科学, 2020, 41(15): 31-38.
- [30] 郭俸钰, 陈文学, 陈海明, 等. 芳樟醇对大肠杆菌的抑菌作用机制 [J]. 现代食品科技, 2020, 36(4): 113-118.
- [31] Rehman A, Jafari S M, Aadil R M, *et al.* Development of active food packaging via incorporation of biopolymeric nanocarriers containing essential oils [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2020, 101: 106-121.
- [32] Tavares C S, Gameiro J A, Roseiro L B, *et al.* Hydrolates: A review on their volatiles composition, biological properties and potential uses [J]. *Phytochem Rev*, 2022, 21(5): 1661-1737.
- [33] 唐欣, 吴一峰, 郭冬云, 等. 基于系统压力调控的水蒸气蒸馏法提取柏木阴沉木精油的化学成分分析及抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2022, 53(6): 1709-1718.
- [34] Ramana K V, Srivastava S, Singhal S S. Lipid peroxidation products in human health and disease [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013: 583438.
- [35] Roy S, Kim H J, Rhim J W. Synthesis of carboxymethyl cellulose and agar-based multifunctional films reinforced with cellulose nanocrystals and shikonin [J]. *ACS Appl Polym Mater*, 2021, 3(2): 1060-1069.
- [36] 李亚茹, 周林燕, 李淑荣, 等. 植物精油对果蔬中微生物的抑菌效果及作用机理研究进展 [J]. 食品科学, 2014, 35(11): 325-329.
- [37] 翟浩, 王金政, 王丹, 等. 免套袋栽培苹果采后真菌病害鉴定及精油抑菌研究 [J]. 果树学报, 2021, 38(4): 549-559.
- [38] Liang C, Huang S H, Geng Y, *et al.* A study on the antibacterial mechanism of thymol against *Aeromonas hydrophila* *in vitro* [J]. *Aquacult Int*, 2022, 30(1): 115-129.
- [39] Esmaeili Y, Paidari S, Baghbaderani S A, *et al.* Essential oils as natural antimicrobial agents in postharvest treatments of fruits and vegetables: A review [J]. *Food Measure*, 2022, 16(1): 507-522.
- [40] Gyrdymova Y V, Rubtsova S A. Caryophyllene and caryophyllene oxide: A variety of chemical transformations and biological activities [J]. *Chem Pap*, 2022, 76(1): 1-39.
- [41] Ma Y, Bian J M, Zhang F. Inhibition of perillyl alcohol on cell invasion and migration depends on the Notch signaling pathway in hepatoma cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 411(1): 307-315.
- [42] 张彬, 张蕾, 范文进, 等. 不同产地奇异南星挥发油 GC-MS 分析及抗肿瘤活性 [J]. 精细化工, 2021, 38(9): 1830-1833.
- [43] Huang W, Wang J Q, Song H Y, *et al.* Chemical analysis and *in vitro* antimicrobial effects and mechanism of action of *Trachyspermum copticum* essential oil against *Escherichia coli* [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2017, 10(7): 663-669.
- [44] Kolaj I, Imindu Liyanage S, Weaver D F. Phenylpropanoids and Alzheimer's disease: A potential therapeutic platform [J]. *Neurochem Int*, 2018, 120: 99-111.
- [45] 刘昭, 李利, 汤杨黔南, 等. 山香圆叶挥发油化学成分及抗氧化和抗炎活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(5): 723-738.

[责任编辑 时圣明]