单体江,唐祥佑,刘 易,等. 池杉叶片和球果挥发油化学成分分析及抗细菌活性[J]. 华南农业大学学报,2016,37(5):72-76.

池杉叶片和球果挥发油化学成分分析及 抗 细 菌 活 性

单体江,唐祥佑,刘 易,王 伟,陈 璇,段志豪,伍慧雄,王 军 (华南农业大学 林学与风景园林学院/广东省森林植物种质创新与利用重点实验室,广东 广州 510642)

摘要:【目的】分析和鉴定池杉 *Taxodium ascendens* 叶片和球果挥发油的化学组成,测定挥发油对 7 种供试细菌的抑制活性。【方法】采用水蒸气蒸馏法分别提取池杉叶片和球果中的挥发油,通过 GC-MS 对提取得到的挥发油进行化学成分分析,采用滤纸片扩散法测定挥发油对供试细菌的抑制活性。【结果】池杉叶片和球果中挥发油的得率分别为 0. 211% 和 0. 657%。从池杉叶片挥发油中鉴定出 21 种成分,占挥发性成分总量的 90. 410%,主要成分为 $(1R) - \alpha - \overline{x}$ 烯(70. 149%)、 $\alpha - \overline{x}$ 化油醇(7. 072%)、 $\alpha - \overline{x}$ 4 - 曹烯(2. 025%) 和 $\alpha - \overline{x}$ 6 - $\alpha - \overline{x}$ 7 - $\alpha - \overline{x}$ 8 - $\alpha - \overline{x}$ 9 - $\alpha - \overline{x}$ 8 - α

关键词:池杉;挥发油;化学成分;抗细菌活性

中图分类号: S791; S789.9

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2016)05-0072-05

Chemical compositions and antibacterial activities of volatile oils from Taxodium ascendens leaves and cones

SHAN Tijiang, TANG Xiangyou, LIU Yi, WANG Wei, CHEN Xuan, DUAN Zhihao, WU Huixiong, WANG Jun (College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University/Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, Guangzhou 510642, China)

Abstract: [Objective] To analyze and identify the chemical compositions of volatile oils extracted from *Taxodium ascendens* leaves and cones, and test the inhibition activities against seven different bacteria. [Method] The volatile oils were extracted by hydro-distillation from the leaves and cones of *Taxodium ascendens* and the chemical compositions of the essential oils were analyzed by GC-MS. The inhibitory activities against bacteria were tested using the filter paper diffusion method. [Result] The yield rates for the essential oils of fresh leaves and cones were 0.211% (w) and 0.657% (w), respectively. Totally 21 components were identified from the volatile oil of leaves, which accounted for 90.410% of the total volatile content. (1R)- α -pinene (70.149%), (-)- α -terpineol (7.072%), 4-carene (2.025%) and β -pinene(2.012%) were the major compounds in the volatile oil of leaves. Totally 13 components were identified from the volatile oil of cones, which accounted for 95.285% of the total volatile content. (1R)- α -pinene (78.609%), ferruginol (4.276%), 4-carene (3.355%), limonene (2.324%) and

收稿日期:2016-01-17 优先出版时间:2016-07-05

优先出版网址; http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20160705.1159.016.html

作者简介:单体江(1983—),男,讲师,博士, E-mail:tjshan@scau.edu.cn;通信作者:王 军(1962—),男,教授,博士, E-mail:wangjun@scau.edu.cn

基金项目:广东省林业科技创新项目(2015KJCH043);广东省普通高校青年创新人才项目(2014KQNCX034)

http://xuebao.scau.edu.cn

β-terpinene (2.179%) were the major compounds in the volatile oil of cones. There were only four common components in the volatile oils of both leaves and cones including (1R)-α-pinene, 4-carene, limonene and borneol. The volatile oil of cones showed the strongest inhibitory activity against *Agrobacterium tumefaciens* and the inhibition zone diameter was (34.5 ± 2.3) mm, while the volatile oil of leaves showed the strongest inhibitory activity against *Staphylococcus haemolyticus* and the inhibition zone diameter was (16.0 ± 1.2) mm. [Conclusion] The content of volatile oil in *T. ascendens* cones is higher than that in leaves, and (1R)-α-pinene is the main ingredient in both. The volatile oil of cones has higher antibacterial activity than that of leaves.

Key words: Taxodium ascendens; volatile oil; chemical constituent; antibacterial activity

池杉 Taxodium ascendens,又名池柏、落雨柏,杉 科 Taxodiaceae 落羽杉属 Taxodium 乔木,原产于美国 东南部,1930年引入我国[1-2]。池杉同落羽杉 T. distichum 一样, 耐水性、抗逆性强, 木材质量好, 易移 植,树姿雄伟优美,为长江中下游及珠江三角洲地区 农田林网和湖网的重要造林绿化树种和观赏树 种[3-5]。池杉枝叶及木材含有特殊的挥发油,耐腐力 强,无论置于水中、土壤或空气中都极耐腐,池杉能 够产生去甲基柳杉树脂酚、6-hydroxysalvinolone、 hydroxyferruginol 和桧醇等一系列抗菌活性化合物, 引种以来,尚未见大面积严重病虫害发生[4,67]。植 物挥发油是一种存在于植物体内,由相对分子质量 较小的简单化合物组成,具有挥发性和特殊芳香性, 可随水蒸气蒸馏而得到的油状液体,按其化学结构 可分为脂肪族、芳香族和萜类3大类化合物及含氧 衍生物,属于植物次生代谢产物[89]。植物挥发油大 多具有广谱的抗微生物活性,能够抑杀细菌、真菌和 病毒[10]。近年来不少学者对池杉叶片、枝条和木材中 的挥发油化学成分进行了研究[34],然而对于池杉球 果挥发油化学成分及抗细菌活性的研究鲜见报道。

本研究采用水蒸气蒸馏法提取池杉叶片和球果中的挥发油,并通过滤纸片扩散法测定其抗细菌活性,以确定池杉不同部位挥发油的化学成分及相对含量,并探索其抑菌活性,从而为保健及园林绿化树种选择,为房屋建筑、家用器具木材选择以及医药工业和食品工业的原料选择提供科学依据,进一步提高森林的多功能利用价值,为池杉资源的合理开发和综合利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

池杉的叶片和球果于2014年7月15日采自华南农业大学昭阳湖,标本由华南农业大学林学与风

景园林学院郑明轩老师鉴定。

1.2 仪器与试剂

水蒸气蒸馏装置(北京永光明医疗仪器厂); 6890N-5975C 气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)(美国 安捷伦科技有限公司);硫酸链霉素(美国 Sigma 公 司,质量分数为 99%); C₈-C₄₀系列正构烷烃(美国 Sigma 公司); NaCl、无水乙醚、无水硫酸钠、二氯甲烷 等均为国产分析纯(北京化学试剂公司)。

1.3 挥发油的提取

参照 Lou 等[11]的方法,2014 年 7 月 15 日分别 采集池杉的叶片(985 g)和球果(1 123 g),称质量后 将其装入水蒸气蒸馏装置内,加入适量蒸馏水,待温度升至 100 ℃后连续蒸馏 6 h,收集蒸出的挥发油,加入一定量的 NaCl,用无水乙醚萃取 3 次,萃取液合并,加入无水硫酸钠进行干燥,浓缩萃取液或让无水乙醚自然挥发,4 ℃条件下密封保存,备用。

1.4 池杉叶片和球果挥发油抗细菌活性的测定

供试菌株:桉树青枯病菌 Ralstonia solanacearum (G⁻)、根癌农杆菌 Agrobacterium tumefaciens (G⁻)、番茄疮痂病菌 Xanthomonas vesicatoria (G⁻)、黄瓜角斑病菌 Pseudomonas lachrymans (G⁻)、溶血葡萄球菌 Staphylococcus haemolyticus (G⁺)、大肠埃希菌 Escherichia coli (G⁻)和枯草芽孢杆菌 Bacillus subtilis (G⁺),均由华南农业大学林学与风景园林学院森林保护教研室提供。

抗细菌活性的测定参照龚佑文^[12]的方法,略有改进。供试细菌由于长期保存在 - 20 ℃条件下,在活性测定前,先用 LB 平板进行活化培养(28 ℃,暗)48 h,然后挑取单菌落,在 LB 液体培养基中摇床培养(28 ℃,暗,150 r·min⁻¹)24 h,将菌液稀释到10⁸ cfu·mL⁻¹,备用。倒好平板后,用移液枪分别吸取50 μL 菌液,玻璃棒涂板。夹取无菌滤纸片放于培养皿中央,分别在滤纸片上加入5 μL 的挥发油,在黑

http://xuebao.scau.edu.cn

暗条件下培养 24 h,用尺子测量抑菌圈大小,阳性对 照为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的硫酸链霉素 $5 \mu \text{L}$,每皿放 $3 \uparrow \text{k}$ 滤纸片,每处理重复 $3 \uparrow \text{K}$ 次。

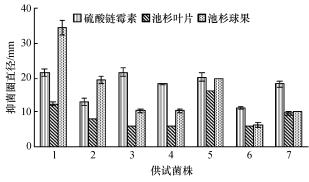
1.5 挥发油化学组分的 GC-MS 分析

池杉叶片和球果挥发油化学组分的鉴定在 6890N-5975C GC-MS 上进行,毛细管色谱柱为 DB-5 (30 m × 250 μ m × 0.25 μ m),无分流进样,进样口温度 230 \mathbb{C} ,进样量 1 μ L。升温程序:起始温度 70 \mathbb{C} ,保持 1 \min ,然后 8 \mathbb{C} · \min 1 上升到 120 \mathbb{C} ,保持 1 \min ,然后 30 \mathbb{C} · \min 1 上升到 150 \mathbb{C} ,保持 1 \min ,然后 5 \mathbb{C} · \min 1 上升到 175 \mathbb{C} ,保持 0 \min ,然后 1 \mathbb{C} · \min 1 上升到 180 \mathbb{C} ,保持 0 \min ,然后 5 \mathbb{C} · \min 1 上升到 240 \mathbb{C} ,保持 0 \min 。离子源温度 230 \mathbb{C} ,电离方式为 EI,电离能量 70 eV,载气为 He,流速 1 \min 1 \min 1,全扫描采集,质谱检测器(MSD)检测。通过与 NIST (2011)中标准化合物的保留时间和质谱图作对比,确定待测成分。

2 结果与分析

2.1 池杉叶片和球果挥发油抗菌活性检测

池杉叶片和球果挥发油对 7 种供试细菌的抑制活性如图 1 所示,从图 1 中可以看出,池杉叶片和球果挥发油对不同供试细菌的抑制活性差异较大,总体来看,池杉球果挥发油对供试细菌的抑制活性要明显强于池杉叶片;与阳性对照相比,池杉叶片挥发油的抑菌活性均弱于阳性对照硫酸链霉素,而球果挥发油对根癌农杆菌(G^-)和桉树青枯病菌(G^-)的抑制活性明显强于阳性对照,对溶血葡萄球菌(G^+)的抑制活性与阳性对照相当,对其他供试细菌的抑



1:根癌农杆菌 Agrobacterium tumefaciens(G⁻);2:桉树青枯病菌 Ralstonia solanacearum(G⁻);3:番茄疮痂病菌 Xanthomonas vesicatoria(G⁻);4:枯草芽孢杆菌 Bacillus subtilis(G⁺);5:溶血葡萄球菌 Staphylococcus haemolyticus(G⁺);6:大肠埃希菌 Escherichia coli(G⁻);7:黄瓜角斑病菌 Pseudomonas lachrymans(G⁻)。

图 1 池杉叶片和球果挥发油的抗细菌活性

Fig. 1 Antibacterial activities of the volatile oils from the leaves and cones of *Taxodium ascendens*

http://xuebao.scau.edu.cn

制活性明显弱于阳性对照,但仍强于池杉叶片挥发油对供试细菌的抑制活性。池杉叶片挥发油对番茄疮痂病菌(G^-)、枯草芽孢杆菌(G^+)和大肠埃希菌(G^-)几乎无抑制活性。池杉球果挥发油对根癌农杆菌(G^-)的抑制活性最强,抑菌圈直径为(34.5 ± 2.3) mm,而池杉叶片挥发油对溶血葡萄球菌(G^+)的抑制活性最强,抑菌圈直径为(16.0 ± 1.2) mm。池杉叶片和球果挥发油对革兰阳性菌和阴性菌的抑制活性无明显规律性。

2.2 池杉叶片和球果挥发油化学成分分析

通过水蒸汽蒸馏法,池杉叶片挥发油的得率为 0.211%(以鲜质量为基础),球果挥发油的得率为 0.657%(以鲜质量为基础),说明池杉球果中挥发油 的含量远高于其叶片。通过 GC-MS 分析发现,池杉 叶片和球果挥发油在化学组成和相对含量上都存在 差异。从池杉叶片中共鉴定出21种成分,占总相对 含量的 90.410%, 主要成分是 $(1R) - \alpha - 蒎烯$ (70.149%)、 α - 松油醇(7.072%)、4 - 蒈烯 (2.025%)和β-蒎烯(2.012%),其相对含量之和 为81.258%,其他成分相对含量均小于2%;在球果 中,共鉴定出13种成分,占总相对含量的95.283%, 其中主要成分是 $(1R) - \alpha - 蒎烯(78.609\%)$ 、铁锈 罗汉柏醇(4.276%)、4 - 蒈烯(3.355%)、柠檬烯 (2.324%)和 β -萜品烯(2.179%),其相对含量之 和为90.743%,其他成分相对含量均小于2%。池 杉叶片和球果挥发油成分及其相对含量见表1。

从表1可以看出,池杉叶片和球果挥发油以烯 醇类成分为主,二者的主要成分均为(1R) - α - 蒎 烯,其相对含量分别为 70.149% 和 78.609%。除 (1R) - α - 蒎烯外, 池杉叶片和球果挥发油中相同 的成分还有3种,分别是4-蒈烯、柠檬烯和冰片, 4-蒈烯和柠檬烯在球果挥发油中的相对含量均高 于叶片挥发油。α-松油醇在叶片挥发油中的相对 含量高达 7.072%, β - 蒎烯(2.012%)、莰烯 (1.045%), (3aS, 3bR, 4S, 7R, 7aR)-7-methyl-3methylidene-4-(propan-2-yl) octahydro-1H-cyclopenta [1,3] cyclopropa [1,2] benzene (1.471%) 和 β-杜松 烯(1.104%) 在叶片挥发油中的相对含量均大于 1%,但是在球果中并未发现;而铁锈罗汉柏醇在球 果挥发油中的相对含量为4.276%, 桧烯为1.585%, 但在叶片中均未检测到。通过以上分析可知,池杉 叶片和球果中都含有一定量的挥发油,虽然其主要 成分相同,但不同部位的化学组成存在一定的差异, 因此在池杉挥发油的生产过程中,要根据不同的需 求,采集不同的部位进行提取。

表 1 池杉叶片和球果挥发油成分及含量测定结果

Tab. 1 Test results of the constituents and contents of volatile oils from the leaves and cones of Taxodium ascendens

编号	t _{保留} / min	化合物名称	化学式	相对分子	相对含量1)/%	
				质量	叶片	球果
1	4. 253	3 - 蒈烯	$C_{10}H_{16}$	136	0.395	
2	4. 253	3,6,6-Trimethyl-2-norpinene	$C_{10}H_{16}$	136		0.279
3	4.461	(1R) - α - 蒎烯	$C_{10}H_{16}$	136	70.149	78.609
4	4.734	莰烯	$C_{10}H_{16}$	136	1.045	•••
5	4.734	L - 莰烯	$C_{10}H_{16}$	136		0.689
6	5.253	桧烯	$C_{10}H_{16}$	136		1.585
7	5.376	β-蒎烯	$C_{10}H_{16}$	136	2.012	
8	5.376	<i>β</i> – 萜品烯	$C_{10}H_{16}$	136		2.179
9	6.018	α-紫罗兰酮	$\mathrm{C_{13}H_{20}O}$	192	0.149	
10	6.173	1,2,3,4 - 四甲基苯	$C_{10}H_{14}$	134		0.146
11	6. 291	柠檬烯	$C_{10}H_{16}$	136	1.725	2.324
12	6.339	β-水芹烯	$C_{10}H_{16}$	136	0.240	•••
13	6.344	2 – 莰烯	$C_{10}H_{16}$	136		0.190
14	6.933	2 – 蒈烯	$C_{10}H_{16}$	136	0.236	
15	7.590	4 – 蒈烯	$C_{10}H_{16}$	136	2.025	3.355
16	7.590	萜品油烯	$C_{10}H_{16}$	136		0.587
17	8.457	(1S-exo)-1, 3, 3-Trimethylbicyclo	$C_{10}H_{18}O$	154	0.254	
		[2. 2. 1] heptan-2-ol				
18	9.821	冰片	$\mathrm{C_{10}H_{18}O}$	154	0.262	0.200
19	10.420	α-松油醇 (-) - α - Terpineol	$C_{10}H_{18}O$	154	7.072	
20	10.516	γ – Pyronene γ – pyronene	$C_{10}H_{16}$	136	0.087	•••
21	12.736	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol,1,7,7-tri-	$C_{12}H_{20}O_2$	196	•••	0.864
		methyl-, 2-acetate				
22	12.741	乙酸冰片酯	$\mathrm{C_{12}H_{20}O_2}$	196	0.590	•••
23	16. 282	γ - 丁香烯	$C_{15}H_{24}$	204	0.668	•••
24	17. 175	α-石竹烯	$C_{15}H_{24}$	204	0.158	•••
25	17.641	1,2,4a,5,6,8a-Hexahydro-4,7-dime-	$C_{15}H_{24}$	204	0.272	•••
26	45.020	thyl-1-(1-methylethyl)-naphthalene	C II	20.4	4 454	
26	17.838	(3aS, 3bR, 4S, 7R, 7aR)-7-Methyl-3- methylidene-4- $($ propan-2-yl $)$ octa-	$C_{15}H_{24}$	204	1.471	•••
		hydro-1H-cyclopenta [1,3] cyclopropa				
		[1,2] benzene				
27	18.689	α-蒎烯	$C_{15}H_{24}$	204	0.247	•••
28	18.807	β-杜松烯	$C_{15}H_{24}$	204	1.104	
29	21.556	1-Isopropyl-7-methyl-4-methylene-1,	$C_{15}H_{24}$	204	0.249	
		2,3,4,4a,5,6,8a-octahydronaphtha-				
		lene				
30	31.948	铁锈罗汉柏醇	$\mathrm{C}_{20}\mathrm{H}_{30}\mathrm{O}$	286	•••	4.276

^{1) …} 表示未检测到。

3 讨论与结论

殷倩等[3]采用动态顶空气体循环采集法和热脱 附气质联用技术(TDS-GC-MS)从池杉中鉴定出37 种成分, 主要为 β - 蒎烯(40.18%)、水芹烯 (12.01%)、柠檬烯(8.10%)、石竹烯(5.77%)和 顺-3-己烯醇(5.30%);吴敏[4]通过对池杉叶片和 木材精气的化学成分及其相对含量分析发现, α - 蒎 烯为叶片主要成分,其相对含量高达 94.43%,在木 材中为71.69%;柠檬烯在木材中相对含量高达 6.82%,但在叶片中未检测到。本研究通过水蒸汽 蒸馏法和 GC-MS 分析发现池杉叶片和球果挥发油 的主要成分均为(1R) - α - 蒎烯,其相对含量分别 为70.149%和78.609%,柠檬烯在叶片和球果中均 存在,其相对含量分别为 1.725% 和 2.324%。本研 究的结果与文献相比,化合物的组成基本一致,但 各组分的含量差别较大,可能与采集方法、采集时 间、样品产地、采集部位以及提取和分析的方法不同 有关。

近年来,植物挥发性有机化合物在生态系统及 医疗保健中的作用日益受到重视。 α - 蒎烯、 β - 蒎 烯和柠檬烯等萜烯类化合物可增强空气的清新感, 同时可以调节人体的神经系统,对人体具有保健作 用[3,13-14]; 蒎烯及莰烯等成分是天然的强驱虫杀虫成 分,柠檬烯、石竹烯等成分具有一定的抗菌、抗炎作 用[15]。精油通常是协同增强剂,即单独使用精油时, 可能不会产生任何显著抑菌作用,但是当它们与标 准药物联合用药时,其产生的联合效应强于个体效 应,并产生增强的抗菌活性[16]。在本研究中池杉球 果挥发油对部分供试细菌抑制作用显著,在生物防 治上具有重要意义,可有效降低抗生素的使用量,防 止细菌耐药性的产生;叶片挥发油对部分供试细菌 的抑制活性不强甚至无抑菌活性,可能与叶片挥发 油中各组分的相对含量有关,但能否作为协同增强 剂还有待于进一步的研究。此外,本文仅对固定时 间叶片和球果的挥发油进行分析,随着球果的成熟, 其成分以及相对含量发生如何变化还有待于深入探 索。本文的研究结果将为池杉叶片及球果精油的开 发利用奠定基础,为在城市公园、园林绿化以及森林 浴场、森林保健中心等的建设提供重要的理论依据。

- lignan from $Taxodium\ ascendens[J]$. Fitoterapia, 2009, 80(6); 361-363.
- [2] 朱恒忠,徐麟寿. 池杉引种考察报告[J]. 江苏林业科技,1987(1):12-13.
- [3] 殷倩, 俞益武, 高岩, 等. 3 种杉科植物挥发性有机化合物成分[J]. 东北林业大学学报, 2013, 41(6); 23-26.
- [4] 吴敏. 5 种杉科植物不同部位的精气成分[J]. 中南林 学院学报, 2006, 26(3): 82-86.
- [5] 周毅, 甘先华, 黎元伟. 池杉林网凋落物特征的研究 [J]. 华南农业大学学报, 2003, 24(2): 19-21.
- [6] STARKS C M, NORMAN V L, WILLIAMS R B, et al. Antibacterial activity of *Taxodium ascendens* diterpenes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Nat prod commun, 2014, 9(8): 1129-1130.
- [7] 曾慧卿,薛建辉. 江苏池杉人工林培育研究综述[J]. 江苏林业科技, 1999, 26(3):53-56.
- [8] OLMEDO R, NEPOTE V, GROSSO N R. Antioxidant activity of fractions from oregano essential oils obtained by molecular distillation [J]. Food chem, 2014, 156 (26): 212-219.
- [9] 赵文越,王雪青,邵明辉,等. 水蒸气蒸馏法制备板栗 花精油及其抑菌活性[J]. 食品研究与开发,2014,35 (13):38-43.
- [10] 李文茹,施庆珊,莫翠云,等. 几种典型植物精油的化学成分与其抗菌活性[J]. 微生物学通报,2013,40 (11):2128-2137.
- [11] LOU J, MAO Z, SHAN T, et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant properties of the essential oils from the roots and cultures of Salvia miltiorrhiza[J]. J Essent Oil Bear Plant, 2014, 17(3): 380-384.
- [12] 龚佑文. 芸香科植物花椒和川黄柏球果精油化学组成及其抗真菌活性[D]. 北京:中国农业大学, 2007.
- [13] 高翔, 姚雷. 特定芳香植物组合对降压保健功能的初步研究[J]. 中国园林, 2011(4): 37-38.
- [14] MARIA R P, MARK J P, WENDY S G, et al. The impacts of reactive terpene emissions from plants on air quality in Las Vegas Nevada [J]. Atmos Environ, 2009, 43 (27): 4109-4123.
- [15] 曾春晖,杨柯,韦建华,等.广西山油柑不同部位挥发油成分及抗菌作用的研究[J].中成药,2012,34(4):747-750.
- [16] 王锐,穆青.精油:抗细菌耐药性的新视野[J]. 国外 医药(抗生素分册),2015,36(3):103-107.

【责任编辑 李晓卉】

参考文献:

[1] ZHANG Y M, TAN N H, ZENG G Z, et al. A new nor-