

蕈树叶芳香精油成分分析及其抗氧化活性研究

彭华贵¹, 钟瑞敏^{2*}

¹广东南岭自然保护区大顶山管理站, 韶关 512726 ²韶关学院英东生物工程学院, 韶关 512005

摘要: 为了解蕈树叶芳香精油化学组分及抗氧化活性, 采用气相色谱-质谱联用技术 (GC-MS) 结合 Kovats 保留指数 (KI) 比较的方法对其进行了成分分析, 并运用二种体外方法对其抗氧化活性进行了测定。结果表明蕈树叶精油以倍半萜烯类为主 (占 62.39%), 主要特征成分为双环大根香叶烯 (10.71%), (E)-丁香烯 (9.96%) 和 α -依兰油烯 (8.92%)。该精油具有中等程度的自由基清除活性和抗脂质过氧化活性。其抗氧化活性可能与精油中的酚类物质 5-羟基白菖蒲烯 (2.97%) 以及醇类物质 1-表橙胡椒醇 (3.12%) 和 (Z)-白檀油烯醇 (2.12%) 等化合物有关。

关键词: 蕈树; 芳香精油; GC-MS 分析; 抗氧化活性

中图分类号: Q946.85 TQ351.014

文献标识码: A

Composition Identification and Antioxidant Activity from Leaf Essential Oil of *Altingia chinensis* (Champ.)

PENG Hua-gui¹, ZHONG Rui-min^{2*}

¹Dadingshan Mountain Administration of Nanling National Nature Reserve, Shaoguang 512726, China;

²Yingdong College of Biotechnology, Shaoguang College, Shaoguang 512005, China

Abstract The composition and antioxidant activity of the leaf essential oil from *Altingia chinensis* (Champ.) were investigated. The GC-MS analyses as well as comparison of the Kovats retention indices (KI) of elution peaks with reported data were used in compound identification of the essential oil. Two *in vitro* methods were used in the preliminary evaluation of antioxidant activity for the essential oil. The essential oil is constituted mainly by sesquiterpenes (62.39%) and dominated with bicyclogermacrene (10.71%), (E)-caryophyllene (9.96%) and α -muurolene (8.92%). The essential oil has a moderate radical scavenging and anti-peroxidation effect in lipid system. The antioxidant activity of the essential oil is possibly associated with its sesquiterpene compounds, such as 5-hydroxycalamene (2.97%), cubenol (1-epi) (3.12%), (Z)- α -santalol (2.12%) and so on.

Key words *Altingia chinensis* (Champ.); essential oil; GC-MS analysis; antioxidant activity

蕈树 (*Altingia chinensis* (Champ.)) 是金缕梅科 (Hamamelidaceae) 植物, 又名阿丁枫、山荔枝, 华南地区有广泛分布。其树叶、树皮含有芳香精油, 可作香料和药材, 木材是培育食用菌的上佳原料。李玉媛等^[1]曾对同科植物高阿丁枫精油化学成分进行过研究, 然而, 国内外关于蕈树所含天然物质的研究非常缺乏。蕈树在华南地区一直处于野生状态, 我们对产自广东南岭自然保护区内的野生蕈树叶芳香精油进行了化学成分分析, 并采用二种体外方法对其精油的抗氧化活性进行了测定, 旨在为评价该

树种的经济价值及物种保护提供一定的科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

新鲜蕈树枝叶于 2005 年 4 月采自广东南岭自然保护区天顶山, 物种经与本保护区植物标本库内蕈树标本 (编号 T30070193) 进行对照鉴定。

主要试剂: DPPH· (美国 Sigma), 亚油酸 (德国 Alfar aesar), AA· (美国 Aldrich), 硫代巴比妥酸 (美国 Sigma), β -胡萝卜素 (美国 Sigma); C₈~C₂₀ 系列正烷烃 (气相色谱纯, 中国医药集团, 上海); 其它试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

芳香精油水蒸馏提取测定器 (广州芊荟)、气质

收稿日期: 2006-04-24 接受日期: 2006-06-19

基金项目: 广东省科技攻关地方引导项目 (20051140021)

* 通讯作者 Tel 86-013827990006; E-mail zhongm9898@163.com

联用仪 (Finggan, TRACE GC/DSQ, 美国热电), 紫外分光光度计 (916 GBC, 澳大利亚)。

1.3 芳香精油的提取

鲜叶等原料 (180 g) 切成碎片, 加水后用组织捣碎机打浆, 于精油测定器内沸蒸回流 3 h。从提取管刻度读取精油体积。每个品种测定至少 3 次, 精油得率取平均值。收集的精油用无水硫酸钠脱水, 过滤收集于精油瓶密封。精油样品使用前冰冻于 -20°C 。成分测定前取精油用正己烷溶解 $[1 \times 10^{-3} (\text{v/v})]$ 。

1.4 芳香精油成分分析方法

GC/MS 分析采用气质联用仪完成。GC 条件: 色谱柱为 DB-5 石英毛细管柱, $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$; 程序升温, 柱温 $40^{\circ}\text{C} (1 \text{ min}) - 10^{\circ}\text{C}/\text{min} - 200^{\circ}\text{C} (3 \text{ min})$; 进样口温度 220°C ; 离子源温度 200°C ; 电子能量 70 eV ; 载气为高纯氦 (99.999%); 柱流量 $1 \text{ mL}/\text{min}$ 不分流进样; 传输线温度 210°C ; 进样量 $1 \mu\text{L}$ 。MS 条件, 电离方式 EI, 发射电流 100 mA , 质量扫描范围 $50 \sim 350 \text{ m/z}$ 溶剂延迟 4 min 。

KI 测定: 系列正烷烃 ($\text{C}_8 \sim \text{C}_{20}$) 以 $1 \times 10^{-3} (\text{v/v})$ 浓度用正己烷混合溶解, 然后与芳香精油的正己烷液以 1:5 比例混合, 与上述 GC 条件一样进样分离, 记录 $\text{C}_8 \sim \text{C}_{20}$ 各正烷烃保留时间。用下面线性升温公式计算各成分的 KI^[2]:

$$KI = 100n + 100(t_k - t_n) / (t_{n+1} - t_n)$$

其中, t_k , t_n 和 t_{n+1} 分别为被分析的组分和碳原子数处于 n 和 $n+1$ 之间的正烷烃 ($t_n < t_k < t_{n+1}$) 的流出峰保留时间 (min)。

各组分峰相对含量的确定采用峰面积归一化法。对相对峰面积 $\geq 0.05\%$ 的组分进行鉴定。各组分峰用随机所带的美国 NIST Library (2002 版) 质谱库检索, 每个流出峰组分化学结构鉴定程序为: 选取质谱匹配度高的前 10 个可能物质, 分别检索其相应文献 KI 值^[3], 以质谱匹配度和 KI 值匹配度最高的化学结构为最佳鉴定结果; 无 KI 值匹配性的以质谱匹配度最高的化学结构为鉴定结果; 无文献 KI 值可参照且质谱匹配度低的定为未知物质, 只列出分子式。

1.5 DPH 自由基清除法

DPH $\cdot$ 是一种比较稳定的有机自由基, 在 517 nm 附近有强吸收 (显深紫色)。当自由基清除剂存在时, 其孤电子被配对, 吸收消失或减弱, 通过 517 nm 处测定吸收减弱的程度, 可评价自由基清除剂提

供质子的能力。

实验方法: 精油样品用甲醇配制成 $0.16 \sim 0.64 \sim 0.96 \sim 1.28 \sim 2.00 \text{ g/L}$ 。分别取 $200 \mu\text{L}$ 与 4 mL 浓度为 $6 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ DPH 甲醇液混合, 于 517 nm 处测定吸光度, 不加精油样品的 DPH 甲醇液为空白样。平行样为 3 个, 取平均值。自由基清除率按下式计算^[74]:

$$\text{自由基清除率}(\%) = (A_{C(0)} - A_{A(t)}) / A_{C(0)} \times 100$$

其中, $A_{C(0)}$ 为 $t = 0$ 时的空白样吸光度值; $A_{A(t)}$ 为 $t = 1 \text{ h}$ 时样品吸光度值。

1.6 β -胡萝卜素漂白法

活性氧分子与亚油酸形成初级产物 ROOH (氢过氧化物), 氢过氧化物会破坏 β -胡萝卜素的共轭生色团 (最大吸收 470 nm), 从而对其有漂白作用, 通过测定反应体系 470 nm 处的吸度值就可衡量受试物的抗氧化活性。

实验方法: 将 β -胡萝卜素 (0.1 mg) 用氯仿 (10 mL) 于梨形瓶中溶解, 加入亚油酸 (20 mg) 和吐温 40 (100 mg), 然后于 50°C 旋转真空干燥。加入 50 mL 含饱和氧蒸馏水 (在蒸馏水中以 $100 \text{ mL}/\text{min}$ 的速度通氧 30 min), 于超声波中形成乳化液 A。取 $200 \mu\text{L}$ 质量浓度分别为 $4 \sim 8 \sim 12 \sim 16$ 和 20 g/L 的样品乙醇液与 5 mL 乳化 A 液于试管中混合, 不加精油样品的用等量乙醇代替与 A 液混合作为空白样。在 50°C 保温, 于 470 nm 测定吸光度。平行样为 3 个, 取平均值。抗氧化率用下式计算^[4]:

$$\beta\text{-胡萝卜素漂白抑制率}(\%) = [(A_{A(120)} - A_{C(120)}) / (A_{C(0)} - A_{C(120)})] \times 100$$

其中, $A_{A(120)}$ 为 $t = 120 \text{ min}$ 时的样品吸光度, $A_{C(120)}$ 为 $t = 120 \text{ min}$ 时空白样吸光度值, $A_{C(0)}$ 为 $t = 0$ 时的空白样吸光度值。

2 结果与讨论

2.1 薑树叶芳香精油的 GC/MS 分析

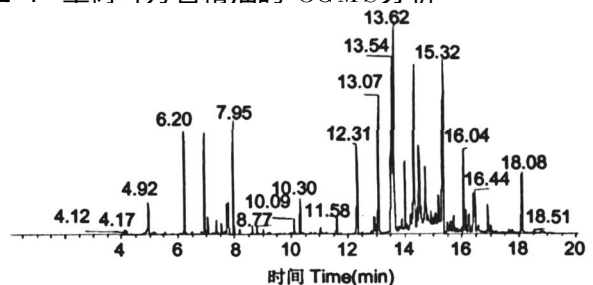


图 1 薑树叶芳香精油的 GC-MS 图

Fig. 1 GC-MS of essential oil from *Altingi chinensis*

蕈树鲜叶芳香精油含量为 0.18%~0.05%, 柠檬黄色, 具有弱刺激性。采用 GC-MS 技术, 同时计算各流出峰的 Kovats 保留指数并与标准值匹配性比较的方法, 对该精油进行了化学成分分析。气相色谱离子流图如图 1 所示, 我们对相对含量 $\geq 0.10\%$ 的组分进行了化学定性, 分析结果以分离物质保留时间的先后列于表 1。

经鉴定的化合物含量占总相对含量的 93.63%。蕈树叶芳香精油化学组分以倍半萜烯类为主(占 62.39%)。单萜类和含氧倍半萜类化合物含量均较小, 这是该精油不具备强刺激性的主要原因。分析结果表明其特征组分为双环大根香叶烯(10.71%)、(E)-丁香烯(9.96%)和 α -依兰油烯(8.92%)。含量相对较多的还有愈创烷-1(5), 11-二烯(6.36%)、桉叶油-4(14), 7(11)-二烯(4.04%)、反式罗勒烯(3.92%)、 δ -榄香烯

(3.52%)、1-表橙椒醇(3.12%)、 β -蒎烯(3.07%)、 α -蒎烯(2.99%)和 5-羟基白菖烯(2.97%)。

2.2 蕈树叶芳香精油的抗氧化活性

2.2.1 DPPH 自由基清除活性

DPPH 自由基法可适用于亲水相和亲脂相两种体系, 它可快速检测水溶性和醇溶性抗氧化剂提供质子的能力。本研究选用 BHT、PG 和抗坏血酸作为参照, 测定了蕈树芳香精油的 DPPH 自由基清除效果, 如图 2 所示。醇溶性的 BHT、半醇溶性的 PG 和水溶性的抗坏血酸的自由基清除率比较接近, 均表现出强抗氧化活性, 在本试验条件下, 它们的自由基半清除浓度 IC_{50} 值约为 0.041 g/L。蕈树叶芳香精油的 DPPH 自由基清除活性与这些强抗氧化剂相比差异较大, 其 IC_{50} 值为 0.25 g/L。然而, 蕈树精油随着受试浓度的增大, 其 DPPH 自由基清除活性也有显著增长, 表现出中等程度的自由基清除活性。

表 1 蕈树叶精油鉴定的成分及其相对含量

Table 1 Chemical constituents identified of the *A. chinensis* essential oil

序号 No	化合物 Compound	K _I ^{lit. a}	K _I ^{cal. b}	相对含量 Relative content(%)	鉴定方法 Identifying method
1	2-己醛	854	846	1.35	GC-MS/MS
2	α -蒎烯	939	930	2.99	GC-MS/MS
3	β -蒎烯	979	975	3.07	GC-MS/MS
4	月桂烯	991	982	0.51	GC-MS/MS
5	顺式罗勒烯	1037	1029	2.04	GC-MS/MS
6	反式罗勒烯	1050	1043	3.92	GC-MS/MS
7	对薄荷烷-1, 5-二烯-8-醇	-	1180	0.62	GC-MS
8	对-薄荷-1-烯-4-醇	-	1193	1.59	GC-MS
9	乙酸龙脑酯	1289	1288	0.65	GC-MS/MS
10	δ -榄香烯	1338	1342	3.52	GC-MS/MS
11	α -依兰烯	1375	1379	0.10	GC-MS/MS
12	β -橙椒烯	1388	1385	0.60	GC-MS/MS
13	β -榄香烯	1391	1389	0.27	GC-MS/MS
14	愈创烷-1(5), 11-二烯	-	1402	6.36	GC-MS
15	(E)-丁香烯	1419	1434	9.96	GC-MS/MS
16	异丁香烯	1438	1440	11.42	GC-MS/MS
17	(E)-9-表丁香烯	1466	1468	2.09	GC-MS/MS
18	γ -依兰油烯	1480	1484	0.85	GC-MS/MS
19	α -依兰油烯	1500	1494	8.92	GC-MS/MS
20	大根香叶烯	1509	1502	0.51	GC-MS/MS
21	桉叶油-4(14), 7(11)-二烯	-	1508	4.04	GC-MS
22	反式杜松萜烷-1(2), 4-二烯	1535	1524	2.43	GC-MS/MS
23	桉叶油-3, 7(11)-二烯	-	1549	0.47	GC-MS
24	(E)-橙花叔醇	1563	1557	0.76	GC-MS/MS
25	双环大根香叶烯	-	1568	10.71	GC-MS

26	兰桉醇	1585	1588	0.63	GC-MS KI
27	表桉醇	-	1597	0.56	GC-MS
28	愈创木醇	1601	1607	0.20	GC-MS KI
29	橙烯	1619	1622	0.14	GC-MS KI
30	1-表橙烯醇	1630	1630	3.12	GC-MS KI
31	γ-桉叶油醇	1632	1637	0.64	GC-MS KI
32	α-萜醇	1646	1648	0.93	GC-MS KI
33	白檀油烯醇	1675	1664	2.12	GC-MS KI
34	桉叶油-7(11)-烯-4-醇	-	1670	1.11	GC-MS
35	未知倍半烯 C ₁₅ H ₂₄	-	1682	0.37	GC-MS
36	芹子烷-6-烯-4-醇	-	1710	0.91	GC-MS
37	5-羟基白菖蒲烯	-	1826	2.97	GC-MS
38	未知含氧二萜	-	1906	0.18	GC-MS
被鉴定化合物合计				93.63	
单萜烯				12.53	
含氧单萜				2.86	
倍半萜烯				62.39	
含氧倍半萜				14.32	
其它				1.53	

^aK_I^{ad} = Adams 标准 Kovats 保留指数 (DB-5 柱) (K_I^{lit} = Retention indices published by Adams (DB-5 column));
^bK_I^{rel} = 以 C₈ ~ C₂₀ 系列正烷烃内标测定的各组分的 Kovats 保留指数 (DB-5 柱) (K_I^{rel} = Retention index relative to C₈ - C₂₀ alkanes on DB-5 column).

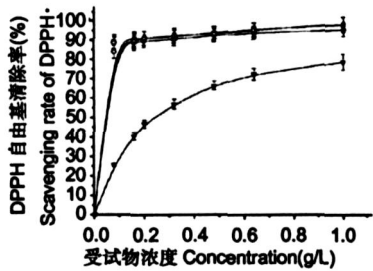


图 2 葶树叶芳香精油清除 DPPH 自由基活性
Fig 2 DPPH radical scavenging activity of the *A. chinensis* leaf essential oil

▼ - 葶树叶精油; ■ - BHT; ◇ - PG; ○ - 抗坏血酸
▼ - *A. chinensis* leaf essential oil ■ - BHT; ◇ - PG; ○ - Ascorbic acid

2.2.2 β-胡萝卜素漂白抑制活性

β-胡萝卜素漂白抑制法采用的是脂质体系,它适用于检测醇溶性抗氧化剂抑制脂质前期反应(生成氢过氧化产物)的能力。图 3 为采用 β-胡萝卜素漂白试验法测定的葶树精油与抗氧化剂 BHT、PG 和抗坏血酸的抗氧化效果对比。在脂质体系中醇溶性的 BHT 是公认的强抗氧化剂,在本试验条件下, BHT 再现出极强的抗氧化性,其 β-胡萝卜素漂白半抑制浓度 IC₅₀ 约为 0.083 g/L。葶树精油的半抑制浓度 IC₅₀ 值为 0.31 g/L。这表明其抗脂质氢过氧化活性比 BHT 要低得多,但随着受试浓度的增大,活

性也相应显著提高,表现出一定的抗脂质过氧化活性。

值得一提的是作为强抗氧化剂的水溶性抗坏血酸几乎不显现其抗氧化活性,而且与浓度无相关性,弱水溶性的 PG 也未能测出其 IC₅₀ 值,活性甚至弱于葶树精油。这是由于水溶性极性物质在乳化脂质体系中主要集中在水相,而脂相中的浓度极低。这种现象称为脂质体系中的“极性反常”(Polar paradox),已被许多研究者所证实^[5]。

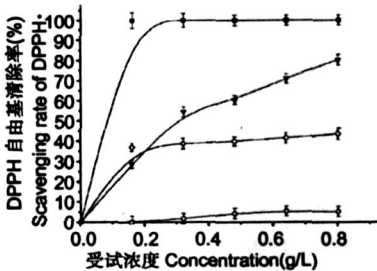


图 3 葶树叶芳香精油的 β-胡萝卜素漂白抑制活性
Fig 3 Antioxidant activity of *A. chinensis* leaf essential oil with β-carotene bleaching method

▼ - 葶树叶精油; ■ - BHT; ◇ - PG; ○ - 抗坏血酸
▼ - *A. chinensis* leaf essential oil ■ - BHT; ◇ - PG; ○ - Ascorbic acid

总体上,葶树精油具有中等程度的抗氧化活性。这种性质应该与其所含的化学成分特性有关。一些

研究者通过对萜烯类以及含氧萜烯衍生物中的酚类、醇类和醛类等单体化合物抗氧化特性测定表明,含氧萜烯衍生物的抗氧化活性一般酚类最好,其次为醇类和醛类,而萜烯化合物一般是单萜烯的抗氧化活性比倍半萜烯的强^[6]。结合前面 GC-MS 成分分析结果,葶树精油的抗氧化活性可能与精油中的酚类物质 5-羟基白菖蒲烯 (2.97%)、醇类物质 1-表橙烯醇 (3.12%) 和白檀油烯醇 (2.12%), 以及 α -蒎烯 (2.99%)、 β -蒎烯 (3.07%)、顺式罗勒烯 (2.04%)、反式罗勒烯 (3.92%) 等单萜烯物质有关。

葶树叶芳香精油的主要成分为双环大根香叶烯 (10.71%)、(E)-丁香烯 (9.96%) 和 α -依兰油烯 (8.92%), 这些成分也是许多天然香料和中草药挥发油的有效成分^[7-8]。通过适当的分离技术进行组分分离, 这些成分可以加以利用。

参考文献

- 1 Li YY (李玉媛), Wang DM (王达明), Mao YL (毛云玲), *et al* The chemical components of essential oil from fresh leaves of *Altingia excelsa*. *Yunnan Academy of Forestry* (云南

林业科技), 1995, 4: 70-73.

- 2 Kovats EH. *Chim Acta*, 1958, 41: 1915-1929.
- 3 Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Carol Stream, Illinois USA: Allured Publishing Corporation, 2001, 1-40.
- 4 Kulisić TA, Radonić V, Katalinić MM. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 2004, 85: 633-640.
- 5 Frankel EN, Huang SW, Kanner J *et al*. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils versus emulsions. *J Agric Food Chem*, 1994, 42: 1054-1059.
- 6 Ruberto G, Baratta MT. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 2000, 69: 167-174.
- 7 Shao JJ (邵俊杰), Lin N (林金云). Practical Handbook of Perfumes. Shanghai: Shanghai Literature Press of Science and Technology, 1991. 1-49.
- 8 Kong CH (孔垂华), Xu T (徐涛), Hu F (胡飞). Study on interactions among allelochemicals of *Ageratum conyzoides*. *Acta Phytocologica Sinica* (植物生态学报), 1998, 22: 360-366.

(上接第 677 页)

- 2 Fuhman B, Volkova N, Kaplan M, *et al*. Antithrombotic effects of licorice extract supplementation on hypercholesterolemic patients: increased resistance of LDL to atherogenic modifications, reduced plasma lipid levels and decreased systolic blood pressure. *Nutrition*, 2002, 18: 268-73.
- 3 Tian QL (田庆来), Guan YP (官月平), Zhang B (张波), *et al*. Research advances on pharmacological activities of components in licorice. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 2: 343-345.
- 4 Vaya J, Belinky PA, Aviram M. Antioxidant constituents from

licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. *Free Radic Biol Med*, 1997, 23: 302-13.

- 5 Ekström G, Ingelman-Sundberg M. Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450IE1). *Biochem Pharmacol*, 1989, 38: 1313-1319.
- 6 Ablisi M, Leininger-Müller B, Dalwong C, *et al*. Synthesis and *in vitro* antioxidant activity of glycyrrhetic acid derivatives tested with the cytochrome P450/NADPH system. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52: 1436-1439.