

芸香挥发油 GC-MS 分析及其生物活性研究

唐祖年，杨月，杨扬，徐雅娟(桂林医学院，广西 桂林 541004)

摘要：目的 研究芸香挥发油的化学成分、抑菌活性和对 HepG2 细胞、NCI-H460 细胞增殖的抑制作用。方法 采用水蒸气蒸馏法(SD)提取挥发油，通过气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)分析芸香挥发油的化学成分，同时采用纸片法测定其抑菌活性和 MTT 法观察芸香挥发油对肝癌 HepG2 细胞和肺癌 NCI-H460 细胞增殖的抑制作用。结果 从芸香挥发油共鉴定出 21 种成分，主要为 2-十一酮(46.15%)，其次是 2-壬酮(27.01%)及 2-十三醇乙酸酯(12.73%)；抗菌实验显示，芸香挥发油对金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、乙型链球菌有较强的抑菌活性；对肝癌 HepG2 细胞和肺癌 NCI-H460 细胞的增殖也有抑制作用，48 h 的作用强于 24 h， IC_{50} 分别为 $23.21 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $21.87 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。
结论 芸香挥发油可作为一种潜在的天然抗菌和抗肿瘤药物的来源。

关键词：芸香；挥发油；气相色谱-质谱联用；抑菌活性；细胞增殖的抑制作用

中图分类号：R284.1；R285.5

文献标志码：A

文章编号：1007-7693(2011)09-0834-05

Chemical Composition and Biological Activity of the Essential Oil of *Ruta graveolens*

TANG Zunian, YANG Yue, YANG Yang, XU Yajuan(College of Pharmacy, Guilin Medical College, Guilin 541004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE The chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect to cell proliferation of the essential oil from *Ruta graveolens* were studied. **METHODS** The chemical composition of the essential oil obtained by hydrodistillation from *Ruta graveolens* was analysed by GC-MS. The antimicrobial activity of the oil was evaluated against 9 micro-organisms using agar disc diffusion method. The inhibitory effect of the oil to cell proliferation was evaluated on HepG2 and NCI-H460 cell lines by MTT assay. **RESULTS** Twenty-one components were identified in the oil, and main compounds of

作者简介：唐祖年，男，副教授

Tel: 13977373951

E-mail: tangzunian@yahoo.com.cn

the oil were 2-Undecanone (46.15%), 2-Nonanone (27.01%) and 2-Acetoxytridecane(12.73%). The oil presented a broad antimicrobial spectrum, and exerted strong bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* CCTCC 26001, *Staphylococcus albus* CCTCC 26101, *Staphylococcus epidermidis* CCTCC 26069 and β -hemolytic *streptococcus* CCTCC 32210. The data of MTT test indicated that the oil could exert an anti-tumor activity, especially more active for 48 h incubation than 24 h against two cancer cell lines. The IC₅₀ values of 23.21 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 21.87 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ were measured for HepG2 and NCI-H460 carcinoma cell lines, respectively. **CONCLUSION** Our study suggests that the essential oil of *Ruta graveolens* could be one of potential medicinal resources for antibacterial and antitumor agents.

KEY WORDS: *Ruta graveolens*; essential oil; GC-MS; antimicrobial activity; inhibitory effect to cell proliferation

芸香(*Ruta graveolens* Linn.), 别名臭草, 系芸香科多年生草本植物, 原产欧洲南部, 在我国分布于福建、广西、广东。全草供药用, 有祛风、退热、利尿、消肿等功效, 是常用中药^[1-2]。现代研究表明, 该植物含有喹啉生物碱、香豆素、黄酮和木脂素等化合物, 具有抗菌(真菌)、解痉、兴奋子宫和抗生育作用等多种药理学活性。以芸香为原料制成的复方芸香片醇提物对化脓性链球菌、藤黄八叠球菌、金黄色葡萄球菌和 B 群链球菌有较强的抗菌作用^[3]。芸香全草含挥发油, 其精油主要成分为 2-十一酮、2-壬酮和乙酸-2-壬醇酯。徐汉虹等^[4]报道用 0.1% 芸香精油处理小麦或全麦粉, 能完全抑制 4 种储粮害虫的繁殖。故芸香也可成为理想的生物农药。目前对芸香挥发油生物学活性的研究未见报道, 本文对桂林地区人工栽培的芸香采用蒸馏法提取挥发油, 然后通过气质联用(GC-MS)对所得的挥发油进行化学成分分析, 并采用纸片扩散法和 MTT 法检测了挥发油的抗菌活性和对 HepG2、NCI-H460 细胞增殖的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

芸香地上部分于 2010 年 6 月采自桂林市郊花卉种植基地, 由中科院广西植物研究所植物分类研究员韦发南鉴定为芸香 *Ruta graveolens* Linn.。

1.2 仪器与试剂

GC-MS/QP 5050A 气相色谱质谱联用仪(日本岛津公司); 色谱柱为 DB-1 弹性石英毛细管柱 (30.0 m×0.25 mm, 0.25 μm); 隔水式电热培养箱 GNP-9270(上海精宏实验设备有限公司); 蒸气高压灭菌锅 MLS-3020(日本日立); 水解酪蛋白琼脂(杭州天和微生物试剂有限公司); 胰酶(Amresco 公司分装); 新生牛血清(GIBCO 公司, 批号: LOT71703680); 培养基 DMEM(HIGH GLUCOSE, Hyclone 公司, 批号: NVE0272); PBS(福州迈新生物技术开发有限公司, 批号: 10032901); MTT(Amresco 公司分装); HepG2 细胞株和

NCI-H460 细胞株来源于武汉大学中国典型培养物保藏中心, 并由本教研室自行传代培养。

1.3 样品处理

鲜芸香茎叶 4 kg 剪碎, 用水蒸气蒸馏 6 h, 蒸馏出的挥发油加适量无水硫酸钠脱水, 置-20 ℃冰箱保存。

1.4 GC-MS 分析

色谱和质谱条件: 柱前压为 47 kPa; 进样口温度为 270 ℃; 程序升温: 柱起始温度 60 ℃, 保留 5 min, 以 3 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 135 ℃, 然后以 2 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 145 ℃, 以 6 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 220 ℃, 最后以 20 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 260 ℃, 保持 10 min; 载气为高纯度氦气(99.99%), 流量为 1.0 mL·min⁻¹; 进样量为 0.2 μl (乙醚溶液), 分流比为 70 : 1; 离子源为 EI 源, 离子源温度为 230 ℃; 电子能量为 70 eV; 倍增器电压为 800 V; 接口温度为 250 ℃; 质量扫描范围为 33~800 amu。采用美国 NIST'05 数据库对其进行定性定量分析, 挥发油成分相对含量的确定采用面积归一法。

1.5 菌株与培养基

供试菌株: 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* CCTCC 26001)、白色葡萄球菌(*Staphylococcus albus* CCTCC 26101)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis* CCTCC 26069)、甲型链球菌(α -hemolytic *Streptococcus* CCTCC 32209)、乙型链球菌(β -hemolytic *Streptococcus* CCTCC 32210)、肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae* CCTCC 31002)、大肠埃希菌(*Escherichia coli* CCTCC 44104)、变形杆菌(*Proteusbacillus vulgaris* CCTCC 49027) 和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* CCTCC 10104)由桂林医学院微生物教研室提供。培养基为血清肉汤琼脂培养基和普通肉汤琼脂培养基, 购自中国药品生物制品检定所。

1.6 挥发油稀释

芸香挥发油用 95% 乙醇稀释, 配成 10%(1 : 10)、5%(1 : 20)、2.5%(1 : 40)、1.25%(1 : 80)系列浓度备用。

1.7 芸香挥发油抑菌活性测定

抑菌试验(滤纸片法)^[5-6]: 将供试菌种在血清肉汤培养基和普通肉汤培养基上活化后, 分别用灭菌生理盐水配成 $3 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌液悬液, 振荡均匀。用无菌棉签吸取菌液约 1 mL, 分别涂布于血清肉汤琼脂培养基和普通肉汤琼脂培养基上, 制成均匀的含菌平板, 备用。将厚度 1.5 mm 的滤纸用打孔机制成直径为 6 mm 的小圆纸片, 干热灭菌后, 将滤纸片浸于上述 10%、5%、2.5%、1.25% 不同浓度的各种药液中浸泡 2 h。用 95% 的乙醇溶液和无菌生理水作对照。用无菌镊子将浸泡后的含药滤纸片贴在已准备好的含菌平板上, 每个平皿等距放 2 片, 每个浓度各供试菌平行做 3 次, 然后将培养皿置培养箱中培养 18~24 h, 测定各供试菌抑菌圈的直径大小, 结果取平均值。

1.8 MTT 法检测芸香挥发油对 HepG2 细胞和 NCI-H460 细胞增殖的抑制作用^[7]

将对数生长期的 HepG2 细胞和 NCI-H460 细胞接种于培养瓶, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养, 待细胞融合约 80% 时, 进行传代培养。将对数生长期细胞稀释为 $5 \times 10^4 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$, 接种于 96 孔板, 每孔 180 μL 及药液 20 μL。待测样品用

DMSO 溶解(DMSO 终体积分数≤0.1%), 芸香挥发油终浓度分别为 12.5, 25, 50, 100 和 200 μg · mL⁻¹, 每个浓度平行 5 孔, 同时设生理盐水对照组和 5-氟尿嘧啶(5-FU, 终浓度为 12.5, 25, 50, 100 和 200 μg · mL⁻¹)阳性对照组^[8], 分别培养 24 和 48 h 后, 每孔加入 MTT(5 mg · mL⁻¹)20 μL, 37 °C 培养 4 h。培养结束后, 去上清液, 每孔加入 DMSO 150 μL, 在振动器上摇匀 15 min, 于酶标仪 490 nm 测定吸光度值, 实验重复 3 次, 结果取平均值, 并计算细胞生长抑制率, 细胞生长抑制率(%)=(1-OD 实验孔/OD 对照孔)×100%。采用 Origin 9.0 软件进行数据的统计分析, 并计算 IC₅₀。

2 结果

2.1 芸香挥发油的化学成分分析

芸香经过水蒸气蒸馏得到淡黄色透明的挥发油, 具有特殊气味, 其得率为 0.09%。通过 GC-MS 对芸香挥发油的化学成分进行了分析, 并利用色谱峰面积归一法测得各组分的相对含量, 所得质谱图经 NIST'05 质谱数据库检索, 并与标准图谱核对, 鉴定出其中的 21 个组分, 占挥发油总量的 67.86%, 含量最高的为 2-十一酮(46.15%)、其次是 2-壬酮(27.01%)及 2-十三醇乙酸酯(12.73%)。结果见表 1。

表 1 芸香挥发油化学成分与相对含量

Tab 1 Chemical composition and relative content of the essential oil of *Ruta Graveolens*

序号	化学成分	分子式	分子量	相对含量/%
1	2-Nonanone 2-壬酮	C ₉ H ₁₈ O	142	27.01
2	2-Nonanol 2-壬醇	C ₉ H ₂₀ O	144	0.75
3	3-Methyl-3,4-divinyl-1-cyclohexene 3-甲基-3,4-二乙烯基环己烯	C ₁₁ H ₁₆	148	0.12
4	1,5-Cyclooctadiene, 3-(1-methyl-2-propenyl) 3-(3-1 甲基-2-丙烯基)-1,5-环辛二烯	C ₁₂ H ₁₈	162	1.33
5	2-(1-Hydroxybut-2-enylidene)cyclohexanone 2-(1-羟基-2-亚丁烯基)环己酮	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	166	0.03
6	2-Dodecanone 2-十二(烷)酮	C ₁₂ H ₂₄ O	184	0.02
7	1-Methyl-5,6-divinyl-1-cyclohexene 1-甲基-5,6-二乙烯基环己烯	C ₁₁ H ₁₆	148	0.01
8	2-Decanone 2-癸酮	C ₁₀ H ₂₀ O	156	0.81
9	3-Methylheptyl acetate 3-甲基庚醇乙酸酯	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172	0.03
10	2-Acetoxytridecane 2-十三醇乙酸酯	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242	12.73
11	2-Undecanone 2-十一酮	C ₁₁ H ₂₂ O	170	46.15
12	2-Undecanol 2-十一醇	C ₁₁ H ₂₄ O	172	0.31
13	Acetic acid, nonyl ester 乙酸正壬酯	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	186	0.21
14	2-Dodecanone 2-十二(烷)酮	C ₁₂ H ₂₄ O	184	1.59
15	2-Acetoxytetradecane 2-十四醇乙酸酯	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	1.76
16	2-Tridecanone 2-十三酮	C ₁₃ H ₂₆ O	198	0.84
17	Butylated Hydroxytoluene 二丁基羟基甲苯	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.22
18	Elemol 檬香醇(脑)	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.29
19	8-Phenyl-1-octanol 8-苯基-1-辛醇	C ₁₄ H ₂₂ O	206	0.17
20	n-Hexadecanoic acid 十六酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	0.16
21	Phytol 3,7,11,15-四甲基-2-十六烯-1-醇	C ₂₀ H ₄₀ O	296	1.31

2.2 芸香挥发油抑菌测定结果

以纸片扩散法测定芸香挥发油的抑菌活性，结果表明对所试 9 种细菌中的 8 种有不同程度的抑菌活性，其中对金黄色葡萄球菌、白色葡萄球

菌、表皮葡萄球菌、乙型链球菌和铜绿假单胞菌的抑菌活性较强，对甲型链球菌、肺炎链球菌和大肠埃希菌作用弱，而对变形杆菌无效。结果见表 2。

表 2 芸香发油的抗菌作用(样品浓度为 V/V, 单位为 mm, n=3, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Antimicrobial activity of the essential oil of *Ruta Graveolens* (Tested at a concentration of volume to volume; Values given as mm, n=3, $\bar{x} \pm s$)

细菌种类	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	NS	95%乙醇
金黄色葡萄球菌	12.3±0.58	10.0±1.00	8.3±0.58	0	0	0
白色葡萄球菌	10.0±1.00	9.3±0.58	8.0±1.00	7.3±0.58	0	0
表皮葡萄球菌	11.3±0.58	9.3±0.58	7.7±0.58	6.7±0.58	0	0
甲型链球菌	6.7±0.58	0	0	0	0	0
乙型链球菌	12.3±0.58	10.0±1.00	9.3±0.58	8.0±1.00	0	0
肺炎链球菌	8.3±0.58	7.0±1.00	0	0	0	0
大肠埃希菌	0	8.3±0.58	8.0±1.00	0	0	0
变形杆菌	0	0	0	0	0	0
铜绿假单胞菌	10.3±0.58	9.3±0.58	7.0±1.00	6.7±0.58	0	0

2.3 芸香挥发油对 HepG2 细胞和 NCI-H460 细胞增殖的抑制作用

采用 MTT 法检测了芸香挥发油对 HepG2 细胞和 NCI-H460 细胞增殖的抑制作用，结果见表 3 和表 4。结果表明芸香挥发油对 HepG2 细胞和

NCI-H460 细胞体外增殖均有明显的抑制作用，并呈浓度依赖性；从 IC₅₀ 值来看芸香挥发油对 HepG2 细胞 48 h 的增殖抑制作用优于 24 h，并且其对 NCI-H460 细胞增殖的抑制作用强于 HepG2 细胞。

表 3 芸香挥发油对人肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用(n=5, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The inhibitory effect of the essential oil from *Ruta Graveolens* on HepG2 cell line(n=5, $\bar{x} \pm s$)

剂量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	24 h			48 h		
	OD 值	抑制百分率/%	IC ₅₀ / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	OD 值	抑制百分率/%	IC ₅₀ / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
NS	0.999±0.052	—	—	1.801±0.062	—	—
芸香挥发油						
200	0.294±0.144	70.60	144.85	0.399±0.164	77.86	23.21
100	0.670±0.080	32.90	—	0.698±0.126	61.24	—
50	0.771±0.021	28.85	—	0.747±0.036	58.49	—
25	0.901±0.058	9.81	—	0.782±0.015	56.60	—
12.5	0.883±0.109	11.61	—	1.074±0.208	40.35	—
5-FU						
200	0.357±0.199	64.19	127.24	0.469±0.030	70.96	13.88
100	0.563±0.169	43.67	—	0.539±0.033	70.05	—
50	0.701±0.081	29.79	—	0.569±0.196	68.37	—
25	0.715±0.100	28.39	—	0.633±0.192	64.83	—
12.5	0.810±0.066	18.88	—	0.793±0.027	45.97	—

表4 芸香挥发油对人肺癌 NCI-H460 细胞增殖的抑制作用($n=5$, $\bar{x} \pm s$)Tab 4 The inhibitory effect of the essential oil from *Ruta Graveolens* on NCI-H460 cell line($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

剂量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	24 h			48 h		
	OD 值	抑制百分率/%	$\text{IC}_{50}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	OD 值	抑制百分率/%	$\text{IC}_{50}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
NS	1.298 \pm 0.359	—	—	1.509 \pm 0.083	—	—
芸香挥发油						
200	0.440 \pm 0.067	66.05	21.80	0.293 \pm 0.073	80.56	21.87
100	0.512 \pm 0.027	60.55	—	0.430 \pm 0.014	71.50	—
50	0.524 \pm 0.066	59.65	—	0.506 \pm 0.094	66.46	—
25	0.591 \pm 0.127	54.46	—	0.682 \pm 0.066	54.82	—
12.5	1.069 \pm 0.035	17.62	—	1.063 \pm 0.034	32.63	—
5-FU						
200	0.405 \pm 0.038	68.77	26.59	0.220 \pm 0.021	85.40	13.43
100	0.482 \pm 0.014	62.84	—	0.244 \pm 0.013	83.80	—
50	0.561 \pm 0.011	56.78	—	0.257 \pm 0.015	82.99	—
25	0.648 \pm 0.046	50.08	—	0.304 \pm 0.012	79.83	—
12.5	0.722 \pm 0.173	40.50	—	0.526 \pm 0.077	45.13	—

3 讨论

研究结果表明, 芸香挥发油主要成分为 2-十一酮(46.16%)、2-壬酮(27.01%)和 2-十三醇乙酸酯(12.73%), 相对含量在 1%以上的成分有: 3-(3-1 甲基-2-丙烯基)-1, 5-环辛二烯(1.33%)、2-十四醇乙酸酯(1.76%)和 3, 7, 11, 15-四甲基-2-十六烯-1-醇(1.31%), 与徐汉虹等^[4]报道的其主要成分为 2-十一酮(36.82%)、2-壬酮(24.12%)和乙酸-2-壬醇酯(16.71%), 相对含量在 1%以上的成分有: 2-癸酮(1.31%)、异-2-十二酮(结构未定, 1.28%)和乙酸-2-十一醇酯(3.04%)的结果在含量上差异较大, 这可能与样品来源和地域等因素有关。抗菌结果表明芸香挥发油对金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、乙型链球菌有较强的抑菌作用, 可能与挥发油中含烯类化合物有关^[9]。此外芸香挥发油对 HepG2 细胞和 NCI-H460 细胞体外增殖有明显的抑制作用, 为芸香的开发利用提供了实验依据。

REFERENCES

- [1] XIE G Q, WANG L L, XU N, et al. New highly cold-resistant economic plant- *Ruta Graveolens* Linn.[J]. The Border

Economy and Culture(边疆经济与文化), 2008, 5(8): 75-76.

- [2] GU G Y, JIANG Y. The chemical constituents and pharmacological activities of *Ruta Graveolens* Linn.[J]. World Notes Plant Med(国外医药 植物药分册), 2003, 18(2): 47-49.
- [3] LI F. Study on the Bacteriostasis *in vitro* of compound *Ruta graveolens* L. Tablets [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2001, 12(11): 971-972.
- [4] XU H H, ZHAO S H. Preliminary studies on insecticidal activity of the rue oil and analysis of its components [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 1994, 6(1): 56-61.
- [5] YU H, ZHANG X P, DENG M Q, et al. Study on constituents and biological activity of volatile oil from tubers of *Polygonatum cyrtonema* Hua [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2008, 14(5): 4-6.
- [6] ZHAO Y, ZHANG Y, WANG Z Z. Chemical composition and biological activities of essential oil from flower of *Chimonanthus praecox* (L.) Link [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2010, 21(3): 622-625.
- [7] TANG Z N, GONG S J, DAI Z K, et al. Preliminary study on acute toxicity and effects of different extracts of *Pachyrrhizus erosus* Urban seed on KB cell [J]. Food Sci (食品科学), 2008, 29(7): 435-437.
- [8] CHEN ZH H, GONG X L, LIU Y. Effect of steroidal saponins from *P polyphylla* on proliferation and cell cycle of A549 cells [J]. J Pract Med(实用医学杂志), 2010, 26(15): 2685-2687.
- [9] WEI D W, FANG J, JIANG H M, et al. The review of antibacterial activity of essential oils and their main chemical components [J]. Modern Agricultural Sciences and Technology (现代农业科技), 2008, (23): 357-358.

收稿日期: 2010-12-21