

水杉种子挥发物质的鉴定及其抗菌活性测定*

杨俊杰 陈利军 杨海霞 石庆锋

(信阳农业高等专科学校 信阳 464000)

摘要 采用气质联用仪(GC-MS)测定水杉种子挥发油的化学组成,并采用生长速率法测定水杉种子挥发油对梨黑斑病菌(*Alternaria kikuchiana*)、苹果霉心病菌(*A. alternata*)、大蒜叶枯病菌(*Stemphylium botryosum*)、莴苣灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、茶轮斑病菌(*Pestalotiopsis theae*)、构骨炭疽病菌(*Colletotrichum* sp.)和大葱紫斑病菌(*A. porri*)8种植物病原真菌生长的影响。结果表明:水杉种子挥发油的主要成分为 1R- α -蒎烯(46.355%)、柠檬烯(13.663%)、(1S-内型)-1,7,7-三甲基-二环[2.2.1]庚-2-醇乙酸酯(6.941%)、石竹烯氧化物(6.924%)、 β -蒎烯(4.902%)、(1S)-6,6-二甲基-2-亚甲基-二环[3.1.1]庚烷(4.807%)等。水杉种子挥发油对8种植物病原真菌均有一定的抑制作用,其中100 $\mu\text{L} \cdot \text{培养皿}^{-1}$ 剂量对大蒜叶枯病菌、小麦赤霉病菌、茶轮斑病菌的抑菌率在60%以上。本研究表明,水杉种子挥发物质中含有多种活性成分,在医药化工等方面有着广阔的应用前景,在农业上有一定的开发价值。

关键词 水杉种子 挥发油 抗菌作用 气相色谱-质谱法

中图分类号: Q946.85+1; S482.292; R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-3990(2010)05-1018-04

Identification and fungi toxicity of volatiles in *Metasequoia glyptostroboides* seeds

YANG Jun-Jie, CHEN Li-Jun, YANG Hai-Xia, SHI Qing-Feng

(Xinyang Agricultural College, Xinyang 464000, China)

Abstract GC-MS analysis was used to identify the volatile chemical constituents of *M. glyptostroboides* seeds, and their toxicity to 8 plant pathogens (*Alternaria kikuchiana*, *A. alternata*, *Stemphylium botryosum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Pestalotiopsis theae*, *Colletotrichum* sp. and *A. porri*) was measured by mycelium growth inhibition method. The main components of *M. glyptostroboides* seed volatiles are 1R- α -Pinene (46.355%), Limonene (13.663%), Bicyclo [2.2.1] heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl-acetate (1S-endo) (6.941%), Caryophyllene oxide (6.924%), β -Pinene (4.902%), Bicyclo [3.1.1] heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene (1S) (4.807%), etc. The volatiles evidently inhibit mycelium growth of 8 plant pathogenic fungi. At 100 $\mu\text{L} \cdot \text{dish}^{-1}$ dose, the inhibitory rates are higher than 60% to *S. botryosum*, *F. graminearum* and *P. theae*. The results indicate that volatiles of *M. glyptostroboides* seeds have various active components. They have copious application prospects in medicine, chemical industry and the development of pesticides of agriculture.

Key words *Metasequoia glyptostroboides* seed, Volatile oil, Antibiotic effect, GC-MS analysis

(Received Oct. 21, 2009; accepted Jan. 26, 2010)

水杉为世界珍稀孑遗物种。据《中国中药资源志要》记载,水杉叶、种子有清热解毒、消炎止痛之功效,用于痈疮肿痛、癣疮等症;《名医别录》将其列为中品,谓煮汤洗,可治臃疮;《本草纲目拾遗》载杉木油治一切顽癣^[1]。水杉的抗真菌作用不仅应用在医药上,在农业上也有着广阔的应用前景^[2]。樊兵等^[3]以烟草花叶病为防治对象,其中水杉的抑制率

为21.01%。吴光旭等^[4]发现水杉茎叶提取物在浓度为0.01 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,对荔枝霜疫霉菌菌丝生长的抑制率和对孢子囊萌发的抑制率均超过50%,对香蕉炭疽病菌也有一定的抑制作用。但上述研究都集中在对水杉茎叶方面,而对含挥发性物质比较集中的水杉种子方面的研究尚少见报道。本试验采用气质联用仪(GC-MS),分析了水杉种子挥发油的化学成

* 河南省科技攻关计划项目(102102110119)资助

杨俊杰(1979-),男,硕士,讲师,主要研究方向为天然药物化学成分的研究与开发。E-mail: nanyangjj@163.com

收稿日期: 2009-10-21 接受日期: 2010-01-26

分组成,并采用生长速率法测定了不同浓度水杉种子挥发油对8种植物病原真菌的体外抑制活性。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试水杉(*Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng)种子于2008年11月采自信阳农业高等专科学校校园内,为杉科水杉属水杉的成熟种子。

供试菌种包括梨黑斑病菌(*Alternaria kikuchiana*)、苹果霉心病菌(*A. alternata*)、大蒜叶枯病菌(*Stemphylium botryosum*)、莴苣灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、茶轮斑病菌(*Pestalotiopsis theae*)、构骨炭疽病菌(*Colletotrichum* sp.)和大葱紫斑病菌(*A. porri*)。8种植物病原真菌菌种均由信阳农业高等专科学校植物病理实验室分离保存。

1.2 试验方法

1.2.1 挥发油的提取

采集水杉成熟种子,粉碎,用水蒸气蒸馏法提取2 h,分离水油混合物,无水硫酸钠干燥,得到浅黄色有浓郁香气的挥发油。将挥发油密封,冰箱保存,备用。

1.2.2 挥发油化学成分测定仪器及条件

采用气质联用仪(GC-MS)测定。Agilent6850/5975 GC/MSD; NIST05 谱库。色谱条件: HP-5MS 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm),程序升温,柱初温60℃,保持2 min,以10℃·min⁻¹升至230℃,运行6 min;载气为高纯氮气,流量1.0 mL·min⁻¹,进样量1.0 μL,分流比20:1。质谱条件: EI 离子源,电子能量70 eV,扫描范围29~350 amu,四极杆温度150℃,离子源温度230℃,EM电压1400 V。

1.2.3 抑菌试验

抑菌试验采用生长速率法^[5],在直径90 mm的培养皿中加入10 μL、50 μL、100 μL水杉种子挥发油,加入10 mL 40℃左右融化的PDA培养基,摇匀制成厚薄均匀平板,每个平板上接种3块直径为5 mm的植物病原真菌菌饼,每皿3个菌饼等距离呈等边三角形排放于培养皿中央,菌丝面朝下,25℃培养,48 h后测量菌落直径,十字交叉取两次数据的平均值。

抑菌率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100%

2 结果与分析

2.1 水杉种子挥发油成分

用气相色谱质谱联用技术对水杉种子挥发油的化学成分进行分析,共分离到43个组分,质谱总离

子流图见图1。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NIST05 质谱数据库检索,并与标准图谱核对,从而鉴定了水杉种子挥发油中的30个组分(表1)。

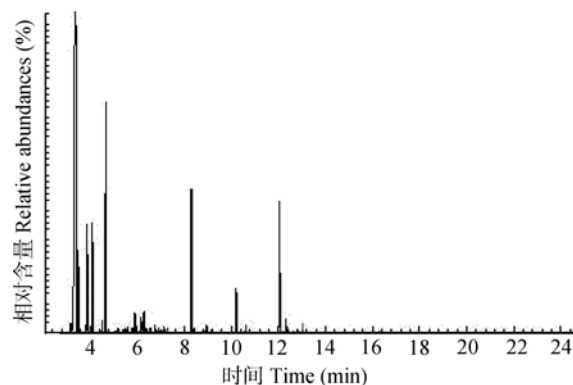


图1 水杉种子中挥发油总离子流图

Fig. 1 General ion flow of volatile oil of *M. glyptostroboides* seeds

由表1可知,水杉种子挥发油主要化学成分为:1R- α -蒎烯(46.355%)、柠檬烯(13.663%)、(1S-内型)-1,7,7-三甲基-二环[2.2.1]庚-2-醇乙酸酯(左旋乙酸龙脑酯)(6.941%)、石竹烯氧化物(6.924%)、 β -蒎烯(4.902%)、(1S)-6,6-二甲基-2-亚甲基-二环[3.1.1]庚烷(4.807%)等。鉴定率为83.59%,占挥发油总量的94.97%。其中,萜类成分及其衍生物含量占88.28%,单萜成分及其衍生物含量占78.01%,倍半萜及其衍生物含量占10.15%,二萜含量占0.12%,其他成分含量占7.34%。

2.2 水杉种子中挥发油的抑菌作用

对不同剂量水杉种子挥发油对8种植物病原真菌抑制作用的测定结果(表2)表明,水杉种子挥发油对供试菌种均有不同程度的抑制作用,且随挥发油剂量增加而增强。与对照相比,10 μL·培养皿⁻¹剂量对试验菌种抑菌不明显,50 μL·培养皿⁻¹剂量茶轮斑病菌和莴苣灰霉病菌抑菌明显,100 μL·培养皿⁻¹剂量对8种植物病原真菌的抑制率均显著,对大蒜叶枯病菌、小麦赤霉病菌、茶轮斑病菌的抑菌率在60%以上。

3 结论与讨论

水杉作为我国最常用的绿化树种,有着很大的种植规模,每年产生大量种子,大多作为垃圾处理,相关方面的综合利用尚少见报道。

本试验对水杉种子中挥发油的化学成分进行分析,结果表明水杉种子挥发油中含有多种生物活性成分,其中 α -蒎烯、 β -蒎烯是羌活、益母草、连翘、五味子、藿香、牡荆等中药材主要挥发性成分,是

表 1 水杉种子中挥发油的化学成分和气相色谱-质谱分析结果

Tab. 1 Results of GC-MS analysis and the constituents of volatile oil of *M. glyptostroboides* seeds

峰号 Serial number	保留时间 Reservation time (min)	化学成分名称 Name of chemical constituents	相对百分含量 Relative amount (%)	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight
1	3.168	(1S)-3,7,7-三甲基-二环[4.1.0]庚-3-烯 Bicyclo[4.1.0]hept-3-ene, 3,7,7-trimethyl-, (1S)-	0.928	C ₁₀ H ₁₆	136
2	3.377	1R- α -蒎烯 1R- α -Pinene	46.355	C ₁₀ H ₁₆	136
3	3.485	蒎烯 Camphene	2.927	C ₁₀ H ₁₆	136
4	3.535	未鉴定 Undetermined	0.138		
5	3.809	4-甲基-1-(1-甲基乙基)-二环[3.1.0]己-2-烯 Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-	0.361	C ₁₀ H ₁₆	136
6	3.867	(1S)-6,6-二甲基-2-亚甲基-二环[3.1.1]庚烷 Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)-	4.807	C ₁₀ H ₁₆	136
7	4.090	β -蒎烯 β -Pinene	4.902	C ₁₀ H ₁₆	136
8	4.501	1-甲基-2-(1-甲基乙基)-苯 Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-	0.574	C ₁₀ H ₁₄	134
9	4.659	柠檬烯 Limonene	13.663	C ₁₀ H ₁₆	136
10	4.760	未鉴定 Undetermined	0.136		
11	5.070	1-甲基-4-(1-甲基乙基)-1,4-环己二烯 1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	0.116	C ₁₀ H ₁₆	136
12	5.142	顺- α -松油醇 Terpineol, cis- β -	0.209	C ₁₀ H ₁₈ O	154
13	5.373	未鉴定 Undetermined	0.146		
14	5.430	1-甲基-4-(1-甲基乙基)-1-苯 1-Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-	0.123	C ₁₀ H ₁₂	132
15	5.502	未鉴定 Undetermined	0.247		
16	5.589	(1 α ,2 β ,5 α)-2-甲基-5-(1-甲基乙基)-二环[3.1.0]己-2-醇 Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1 α .,2 β .,5 α .)-	0.265	C ₁₀ H ₁₈ O	154
17	5.791	未鉴定 Undetermined	0.326		
18	5.884	2,2,3-三甲基-3-环戊烯-1-乙醛 3-Cyclopentene-1-acetaldehyde, 2,2,3-trimethyl-	0.891	C ₁₀ H ₁₆ O	152
19	5.949	反-1-甲基-4-(1-甲基乙基)-2-环己烯-1-醇 2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, trans-	0.126	C ₁₀ H ₁₈ O	154
20	6.158	未鉴定 Undetermined	0.717		
21	6.201	未鉴定 Undetermined	0.251		
22	6.281	未鉴定 Undetermined	1.473		
23	6.367	2,6,6-三甲基-二环[3.1.1]庚-3-酮 Bicyclo[3.1.1]heptan-3-one, 2,6,6-trimethyl-	0.214	C ₁₀ H ₁₆ O	152
24	6.547	(1S-内)-1,7,7-三甲基-二环[2.2.1]庚-2-醇 Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl-, (1S-endo)-	0.271	C ₁₀ H ₁₈ O	154
25	6.749	4-甲基-1-(1-甲基乙基)-3-环己烯-1-醇 3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-	0.322	C ₁₀ H ₁₈ O	154
26	6.915	α , α ,4-三甲基-3-环己烯-1-甲醇 3-Cyclohexene-1-methanol, α ., α .,4-trimethyl-	0.165	C ₁₀ H ₁₈ O	154
27	7.001	6,6-二甲基-二环[3.1.1]庚-2-烯-2-甲醇 Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene-2-methanol, 6,6-dimethyl-	0.189	C ₁₀ H ₁₆ O	152
28	7.030	(1S)-4,6,6-三甲基-二环[3.1.1]庚-3-烯-2-酮 Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethyl-, (1S)-	0.139	C ₁₀ H ₁₄ O	150
29	7.116	异龙脑 Isoborneol	0.244	C ₁₀ H ₁₈ O	154
30	7.289	顺-2-甲基-5-(1-甲基乙基)-2-环己烯-1-醇 2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, cis-	0.221	C ₁₀ H ₁₆ O	152
31	8.291	(1S-内型)-1,7,7-三甲基-二环[2.2.1]庚-2-醇乙酸酯 Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl-, acetate, (1S-endo)-	6.941	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196
32	8.435	未鉴定 Undetermined	0.217		
33	8.939	顺-2-甲基-5-(1-甲基乙基)-2-环己烯-1-醇乙酸酯 2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, acetate, cis-	0.398	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	194
34	9.148	(+)-4-蒎烯 (+)-Carene	0.134	C ₁₀ H ₁₆	136
35	10.193	石竹烯 Caryophyllene	1.933	C ₁₅ H ₂₄	204
36	10.597	Z,Z,Z-1,5,9,9-四甲基-1,4,7-环十一碳三烯 Cycloundecatriene 1,4,7-, Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-, Z,Z,Z-	0.399	C ₁₅ H ₂₄	204
37	12.045	石竹烯氧化物 Caryophyllene oxide	6.924	C ₁₅ H ₂₄ O	220
38	12.319	未鉴定 Undetermined	0.656	C ₁₅ H ₂₄ O	220
39	12.622	10,10-二甲基-2,6-二亚甲基-二环[7.2.0]十一碳-5 β -醇 10,10-Dimethyl-2,6-dimethylenebicyclo[7.2.0]undecan-5 β -ol	0.102	C ₁₅ H ₂₄ O	220
40	13.011	未鉴定 Undetermined	0.466		
41	16.282	未鉴定 Undetermined	0.127		
42	17.161	(4aS-反)-1,2,3,4,4a,9,10,10a-八氢-1,4a-三甲基-7-(1-甲基乙基)-菲 Phenanthrene, 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydro-1,1,4a-trimethyl-7-(1-methylethyl)-, (4aS-trans)-	0.124	C ₂₀ H ₃₀	270
43	20.944	未鉴定 Undetermined	0.134		

表 2 水杉种子挥发油对植物病原真菌菌落生长的影响
Tab. 2 Effects of volatile oil of *M. glyptostroboides* seeds on mycelia growth of plant pathogenic fungi

受体菌种 Tested pathogen	挥发油剂量 Volatile dose ($\mu\text{L} \cdot \text{dish}^{-1}$)	菌落直径 Colony diameter (mm)	抑菌率 Inhibitory percent (%)
茶轮斑病菌 <i>P. theae</i>	100	10.00±3.16a	60.00
	50	19.33±1.63b	22.67
	10	21.50±1.38bc	14.00
	CK	25.00±4.10c	—
大葱紫斑病菌 <i>A. porri</i>	100	8.67±0.82a	26.74
	50	10.75±0.97b	9.13
	10	11.00±1.41b	7.02
	CK	11.83±0.75b	—
小麦赤霉病菌 <i>F. graminearum</i>	100	4.00±0.63a	64.44
	50	9.50±2.59b	15.56
	10	11.33±2.34b	/
	CK	11.25±1.60b	—
大蒜叶枯病菌 <i>S. botryosum</i>	100	2.83±1.72a	63.44
	50	5.50±1.05b	29.03
	10	6.33±1.03b	18.28
	CK	7.75±1.47b	—
莴苣灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	100	8.17±2.48a	39.51
	50	10.25±0.97a	24.07
	10	13.67±1.97b	/
	CK	13.50±1.00b	—
苹果霉心病菌 <i>A. alternate</i>	100	11.17±2.93a	30.21
	50	13.33±2.50ab	16.67
	10	15.17±2.14b	5.21
	CK	16.00±2.10b	—
构骨炭疽病菌 <i>Colletotrichum</i> sp.	100	7.75±2.04a	26.19
	50	9.83±2.14ab	6.35
	10	10.56±0.84b	/
	CK	10.50±0.55b	—
梨黑斑病菌 <i>A. kikuchiana</i>	100	5.33±0.82a	44.80
	50	8.00±1.33b	17.26
	10	8.50±2.86b	12.01
	CK	9.67±2.32b	—

同一病菌不同处理数据后不同字母表示差异显著($\alpha=0.05$)。“/”表示“0”或负值。Different letters following data of one pathogens mean significant difference ($\alpha=0.05$)。“/” denotes “0” or negative.

合成抗糖尿病药物那格列奈^[6]，具有高附加价值、高甜度、低热量、无毒的优质甜味剂和防腐作用的紫苏萆^[7]，具有广泛用途的化工原料蒽酮酸，名贵香料和化工原料异松油烯^[8]，具有解痉、镇静止痛、兴奋中枢神经作用和杀病毒活性的蒽酮酰胺^[9]等多种医药化工的原料。柠檬烯是花椒、陈皮、薄荷、核桃、荆芥等中药材的主要有效成分，具有镇痛作用和促进神经中枢维持觉醒^[10]、杀虫^[11]等生物活性。乙酸龙脑酯是砂仁、五味子、牡荆等中药材的主要挥发性成分，有显著的抑制番泻叶所致小鼠腹泻、

冰醋酸所致腹泻、鼠疼痛和离体家兔小肠平滑肌运动等方面的作用^[12]。石竹烯是青蒿等中药材的主要有效成分，具有抗炎、抑菌、抑制哮喘、消除自由基等作用^[13]。由此可以看出，水杉种子中挥发油在医药化工等方面有着广阔的应用前景。

水杉种子挥发油对所试 8 种植物病原真菌均有一定的抑制作用，对大蒜叶枯病菌、小麦赤霉病菌和茶轮斑病菌的抑制效果较好。因此水杉种子和其挥发油在防治植物病害方面也有一定的开发价值。从植物病害的生态调控方面可以考虑以水杉树木作为一些作物或林木的趋避隔离带，通过挥发性物质的化感作用避免植物病害的蔓延；也可以水杉种子制成绿肥在相关作物中使用，近距离的发挥挥发物质对植物病害的化感抑制作用；更直接的方式是将水杉挥发油活性物质开发成生物农药。水杉种子挥发油对植物病原菌和植物病害的抑制作用以及其在农业上的应用有待进一步深入研究。

参考文献

[1] 姜明凯, 厉建燕, 孟昭礼, 等. 水杉叶甲醇提取物的农用抑菌活性研究[J]. 现代农业科技, 2007(10): 55-56

[2] 卫春, 陈建群, 张鹏飞, 等. 复合农林系统中水杉他感作用的生物测定[J]. 南京林业大学学报, 1999, 23(4): 86-89

[3] 樊兵, 吴云锋, 袁耀锋. 植物源抗病毒活性物质的初步筛选[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(Z1): 175-178

[4] 吴光旭, 杨小玲, 刘爱媛, 等. 64 种植物提取物的离体抗菌活性评价[J]. 长江大学学报: 自然科学版, 2005, 2(2): 77-82

[5] 江贵波, 陈实, 曾任森. 入侵物种三裂叶蟛蜞菊挥发物质的鉴定及其抗菌活性[J]. 中国生态农业学报, 2008, 16(4): 905-908

[6] 马世营, 沈敏敏, 哈成勇, 等. β -蒽烯合成抗糖尿病药物那格列奈[J]. 林产化学与工业, 2007, 27(4): 92-93

[7] 钟莉, 王亚明, 杨利敏. α -蒽烯制备紫苏萆的研究进展[J]. 应用化工, 2005, 34(7): 397-399

[8] 胡宏成, 曾韬, 陈华成. α -蒽烯合成异松油烯的研究[J]. 生物质化学工程, 2007, 41(1): 19-21

[9] 梁宏艳, 赵文浩, 陈海燕, 等. α -蒽烯合成蒽酮酰胺的研究[J]. 化工技术与开发, 2007, 36(4): 1-3

[10] 王梅兰, 林建交, 陈雅容. 柠檬烯对小白鼠中枢神经系统的影响[J]. 海峡药学, 2005, 17(4): 30-32

[11] 李泰荣, 付喜凤. 桔皮杀虫有效成分的研究初报[J]. 河南职技师学院学报, 1995, 23(1): 67-68

[12] 李晓光, 叶富强, 徐鸿华. 乙酸龙脑酯药理作用的实验研究[J]. 浙江中医学院学报, 2001, 25(3): 49-50

[13] 周成林, 钱之玉. β -石竹烯醇抑制哮喘豚鼠气道炎症及清除氧自由基作用[J]. 药物生物技术, 2006, 13(5): 63-66