

大高良姜地下根茎挥发油化学成分及体外药理活性研究

陆廷亚¹, 陈琪², 赵晓歌¹, 韦凤¹, 洪怡², 支青¹, 田民义^{1,2*}

¹贵州大学酿酒与食品工程学院 贵州省药食同源植物资源开发工程技术研究中心; ²贵州大学生命科学学院, 贵阳 550025

摘要: 采用水蒸气蒸馏法提取大高良姜地下根茎挥发油, 通过气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 分析其化学成分, 分别采用 DPPH、ABTS、抑菌圈、肉汤稀释及 MTT 等方法评价其体外药理活性。结果表明, 挥发油主要成分为 1,8-桉叶油素 (25.41%)、 β -没药烯 (6.24%) 和 β -倍半水芹烯 (9.08%)。挥发油对 ABTS 自由基有一定的清除活性, 其抗坏血酸当量为 4.83 mg AEs/g oil, 对 DPPH 自由基显示出较差的清除活性。挥发油对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和变形杆菌表现出较好的抗菌活性, 其抑菌圈大小为 9.81 ~ 14.95 mm, MIC 值为 312.5 ~ 625 μ g/mL, MBC 值为 625 ~ 1250 μ g/mL。挥发油具有较强的抗肿瘤活性, 其对 A549、K562 和 PC-3 肿瘤细胞的 IC₅₀ 值分别为: 26.57、58.01 和 35.56 μ g/mL, 与正常细胞相比具有显著性差异 ($P < 0.05$)。挥发油对酪氨酸酶、 α -葡萄糖苷酶、乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶表现出一定的酶抑制活性, 其阳性当量值分别为 71.88 \pm 2.33 mg AREs/g oil, 0.25 \pm 0.002 mmol ACEs/g oil, 0.77 \pm 0.02 mg GALAEs/g oil 和 0.52 \pm 0.01 mg GALAEs/g oil。因此, 大高良姜地下根茎挥发油具有一定抗氧化活性、抗菌活性、酶抑制活性和较强的抗肿瘤活性。研究结果可为大高良姜地下根茎挥发油的进一步开发利用提供一定的数据参考。

关键词: 大高良姜; 挥发油; 化学成分; 体外药理活性

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)11-1866-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.11.009

Chemical constituents and *in vitro* pharmacological activities of essential oil from rhizome of *Alpinia galanga* (L.) Willd.

LU Ting-ya¹, CHEN Qi², ZHAO Xiao-ge¹, WEI Feng¹, HONG Yi², ZHI Qing¹, TIAN Min-yi^{1,2*}

¹Guizhou Medicine Edible Plant Resources Research and Development Center, School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University;

²College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: The essential oil from the rhizome of *Alpinia galanga* (L.) Willd. was extracted by hydrodistillation, and the chemical components were analyzed by GC-MS. The *in vitro* pharmacological activities of essential oil were evaluated by DPPH, ABTS, the inhibition zone, the broth microdilution and MTT methods, and so on. The results showed that the predominant components of the essential oil were 1,8-cineole (25.41%), β -bisabolene (6.24%), and β -sesquiphellandrene (9.08%). The essential oil revealed a certain ABTS radical-scavenging activity with the equivalents of ascorbic acid was 4.83 mg ACEs/g oil, and revealed a weak DPPH radical-scavenging activity. The essential oil exhibited a significant antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, and *Proteus vulgaris* with the inhibition zones (9.81-14.95 mm), MIC (312.5-625 μ g/mL), and MBC (625-1250 μ g/mL). The essential oil showed significant cytotoxicity against human leukemic (K562), lung cancer (A549), and prostatic carcinoma (PC-3) cell lines with the IC₅₀ values of 26.57, 58.01 and 35.56 μ g/mL, respectively. Compared with normal cells, there was a significant difference ($P < 0.05$). The essential oil showed a certain enzyme inhibitory activity against tyrosinase, α -glucosidase, acetylcholinesterase, and butyrylcholinesterase with the equivalents of positive drugs were 71.88 \pm 2.33 mg AREs/g oil, 0.25 \pm 0.002 mmol ACEs/g oil, 0.77 \pm 0.02 mg GALAEs/g oil, and 0.52 \pm 0.01 mg GALAEs/g oil, respectively. Therefore, the essential oil from rhizome of *A. galanga* has certain antioxidant activity, antibacterial activity, enzyme inhibition activity, and strong antitumor activity. The results can provide some

收日期: 2020-06-22 接受日期: 2020-09-11

基金项目: 贵州省科技计划(黔科合支撑[2020]1Y133号; 黔科合支撑[2017]2850); 贵州大学引进人才科研项目(贵大人基合字(2019)29号); 贵州省中药、民族药材质量标准研究课题任务书(DB52/YC121-2013)

* 通信作者 Tel: 86-018286039699; E-mail: mytian@gzu.edu.cn

data references for the further development and utilization of the essential oil from the rhizome of *A. galanga*.

Key words: *Alpinia galanga*; essential oil; chemical constituents; *in vitro* pharmacological activity

大高良姜 *Alpinia galanga* (L.) Willd. 是姜科山姜属多年生草本植物,果实入药称为红豆蔻,收载于2015版《中国药典》。其味辛,性温,有散寒燥湿、醒脾消食之功效^[1]。大高良姜地下根茎在印度、菲律宾及马来西亚等地区可用作香料和调味品,既可食用又可药用,用于治疗糖尿病、风湿病、哮喘、炎症及胃痛等疾病^[2-5]。大高良姜地下根茎富含挥发油,且已经用于香水、化妆品和药品中^[5-7]。现代药理研究表明,大高良姜地下根茎具有抗氧化、抗菌、抗肿瘤、抗溃疡及抗过敏等药理活性^[8-13]。目前国内关于大高良姜的研究主要集中在其果实部位,对其地下根茎挥发油的化学成分及体外药理活性报道较少。所以,本实验主要通过分析大高良姜地下根茎挥发油的化学成分,并对其体外药理活性进行筛选,以期为国内大高良姜地下根茎的进一步开发利用提供理论基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

HP6890/5975C GC/MS 联用仪(美国安捷伦公司);多功能酶标仪、细胞培养箱、超低温冰箱(Thermo 公司);冷冻离心机(上海力伸科学仪器公司);FA1104 电子分析天平(上海郎平仪器仪表有限公司);HWS-150 恒温恒湿培养箱(北京科伟永兴仪器有限公司);SW-CJ-1FD 超净工作台(苏州净化设备有限公司);LDZX-30KBS 高压灭菌锅(上海中安医疗器械厂);RE-3000 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);UV-5200 紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司)。

RP-MI-1640 培养基(GIBCO 公司);二甲基亚砜(DMSO)(鼎国生物制剂有限公司);DPPH、ABTS、 α -葡萄糖苷酶、L-酪氨酸酶、乙酰胆碱酯酶、丁酰胆碱酯酶(美国 Sigma 公司);营养肉汤、营养琼脂(上海博微生物科技有限公司);沙氏葡萄糖琼脂培养基、沙氏葡萄糖培养基(杭州百思生物技术有限公司);刃天青(大连美伦生物技术有限公司);抗生素药敏纸片(杭州微生物试剂有限公司);实验所用水均为蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

1.2 实验材料

实验用大高良姜 2018 年 12 月采购于广西省玉林市,由贵州大学胡国雄教授鉴定为姜科山姜属大高良姜 *Alpinia galanga* (L.) Willd., 标本保存于贵

州省药食同源植物资源开发工程技术研究中心。菌株:大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC 25922);白色念珠菌(*Candida albicans* BNCC 186335);金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538P);铜绿假单胞杆菌(*Pseudomonas aeruginosa* CMCC (B) 49027);枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* CMCC (B) 63501);变形杆菌(*Proteus vulgaris* CMCC (B) 49027)。人肺癌细胞株 A549、人白血病细胞株 K562、人前列腺癌细胞株 PC-3 和小鼠成纤维细胞株 L929 均购于中国昆明细胞库。

2 实验方法

2.1 挥发油的制备

取新鲜大高良姜地下根茎,洗净、切片、晒干、粉碎,称取药粉约 300 g,置于 5 L 圆底烧瓶中,加入 3 L 蒸馏水,浸泡过夜,水蒸汽蒸馏 5 h,收集馏出液,无水硫酸钠除水,得到淡黄色有香气的大高良姜根茎挥发油,提取率为 0.43%,密封保存于 4 °C 冰箱备用。

2.2 挥发油化学成分的 GC-MS 分析

GC 参数设置:色谱柱选用 HP-5MS (60 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m) 弹性石英毛细管柱,初始温度为 70 °C,保持 2 min,然后以 2 °C/min 升温至 180 °C,再以 10 °C/min 升温至 310 °C,保持 6 min,最终运行时间为 76 min;进样体积为 1 μ L;汽化室温度为 250 °C;载气为氦气(纯度为 99.999%);柱前压为 18.47 psi,载气流量为 1 mL/min,分流比为 10:1,溶剂延迟时间为 6 min。

MS 参数设置:离子源为 EI 源;离子源温度为 230 °C;四极杆温度为 150 °C;电子能量为 70 eV;发射电流为 34.6 μ A;倍增器电压为 1 847 V;接口温度为 280 °C;质量范围为 29 ~ 450 amu。

2.3 挥发油的抗氧化活性测定

2.3.1 清除 DPPH 自由基能力测定

参考文献^[14],称取 19.7 mg DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)加无水乙醇配制成浓度为 1 mmol/L 的溶液,避光保存备用。使用时将其稀释为 0.08 mmol/L 的 DPPH 溶液。取大高良姜地下根茎挥发油加无水乙醇溶解并配制成一定浓度的供试品溶液。取 2 mL 供试品溶液与 2 mL DPPH 溶液置于具塞试管中,混匀后室温避光放置 30 min,在酶标仪

517 nm 处测定吸光度 A_S ; 同时测定 2 mL 供试品溶液与 2 mL 无水乙醇的吸光度 A_R , 2 mL 无水乙醇与 2 mL DPPH 溶液的吸光度 A_0 。以 Ascorbic acid 和 BHT 作为阳性对照药, 结果重复三次, 取平均值。按公式计算清除率: DPPH 自由基清除率 = $[1 - (A_S - A_R)/A_0] \times 100\%$ 。

2.3.2 清除 ABTS 自由基能力测定

参考文献^[14], 将 50 mL 0.7 mmol/L ABTS(2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐)溶液与 50 mL 2.4 mmol/L 过硫酸钾($K_2S_2O_8$)溶液混合, 室温避光放置 12 ~ 18 h, 制得 ABTS 储备液。使用前将其用无水乙醇稀释成工作液, 使其在 734 nm 波长下的吸光度为 0.70 ± 0.02 。取大高良姜地下根茎挥发油加无水乙醇溶解并配制成一定浓度的供试品溶液。取 0.4 mL 供试品溶液与 4 mL ABTS 溶液置于具塞试管中, 混匀后室温避光放置 10 min, 在酶标仪 734 nm 处测定吸光度 A_S ; 同时测定 0.4 mL 供试品溶液与 4 mL 无水乙醇的吸光度 A_R , 0.4 mL 无水乙醇与 4 mL ABTS 溶液的吸光度 A_0 。以抗坏血酸和 BHT 作为阳性对照药, 结果重复三次, 取平均值。按公式计算清除率: ABTS 自由基清除率 = $[1 - (A_S - A_R)/A_0] \times 100\%$ 。

2.4 挥发油的抗菌活性测定

2.4.1 菌悬液的制备

将金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、变形杆菌分别接种于营养琼脂平板上, 白色念珠菌接种于沙氏琼脂平板上, 于 37 °C 恒温恒湿培养箱中培养 18 ~ 20 h 活化, 备用。使用时, 挑取平板上形态相同的菌落, 放入已灭菌的液体培养基中, 在恒温培养振荡器中震荡 24 h, 然后取一定量菌悬液逐倍稀释后涂布到平板上, 培养后统计菌落数, 按照稀释的倍数与接种量计算含菌量。使用时, 将菌悬液稀释至所需浓度。

2.4.2 抑菌圈的测定

参考文献^[15], 采用滤纸片扩散法, 滤纸片大小为 6 mm。先将含 20 μ L 挥发油样品和含 20 μ L (100 μ g/mL) 链霉素滤纸片轻轻放置于已均匀涂布 100 μ L (1×10^6 CFU/mL) 菌液的固体培养基上。在 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后观察菌的生长情况, 测量抑菌圈的直径, 结果重复三次, 取平均值。

2.4.3 最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 和最小杀菌浓度 (minimal bactericidal concentration, MBC) 的测定

参考文献^[15], 在 96 孔培养板中, 首先每孔加入

100 μ L 的半倍稀释的样品和对照品溶液, 然后每孔加入 100 μ L 菌液 (1×10^6 CFU/mL)。在 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后, 每孔加入 20 μ L (0.1 mg/mL) 刃天青显色剂, 继续放入恒温培养箱中培养 2 h 后, 观察结果, 记录数据。以微孔中颜色变化指示菌株抑制情况, 以蓝色孔的最小样品浓度为 MIC。从蓝色孔浓度样品取出 100 μ L, 均匀涂布在固体培养基上, 在 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后, 未出现菌落的最小样品浓度即为 MBC 值, 结果重复三次, 取平均值。试验所有操作均在无菌条件下进行。

2.5 挥发油的抗肿瘤活性测定

参考文献^[15], 选用对数期的贴壁细胞, 胰酶消化后, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基配制细胞悬液, 80 μ L 接种于 96 孔板, 密度为 5×10^4 个/mL, 培养 24 h。将待测样品和阳性对照用 DMSO 溶解后, 用培养基稀释成 5 个浓度梯度。每孔加入 20 μ L 样品溶液, 阴性对照组为等体积的培养基, 每组设 5 个平行孔, 培养 72 h 后, 加 10 μ L MTT (5 mg/mL), 37 °C 5% CO_2 培养 4 h。取出 96 孔板, 吸掉培养基上清液。加入 DMSO 150 μ L, 振荡 10 min, 使 DMSO 完全溶解 MTT 反应的产物。用酶标仪读取 490 nm 波长下的 OD 值, 结果重复三次, 取平均值。抑制率的计算公式如下: 细胞株抑制率 = $[1 - (\text{样品组 OD 值} - \text{调零孔 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{调零孔 OD 值})] \times 100\%$ 。

2.6 挥发油的酶抑制活性测定

2.6.1 酪氨酸酶抑制活性测定

参考文献^[15], 以 L-酪氨酸为底物测定酪氨酸酶的活性, 以熊果苷 (arbutin) 为阳性对照, 在 96 孔板上进行活性检测。反应体系为: 先加入 70 μ L 样品溶液, 再加入 100 μ L 酪氨酸酶 (100 U/mL), 37 °C 恒温孵育 5 min, 然后加入 80 μ L 底物 (5.5 mmol/L), 37 °C 恒温孵育 30 min, 在 492 nm 波长下测定吸光度值 (A 值)。样品组 A_1 、样品空白组 A_2 、阴性组 A_3 、空白组 A_4 、结果重复三次, 取平均值。抑制率的计算公式如下: 酪氨酸酶抑制率 = $[1 - (A_1 - A_2) / (A_3 - A_4)] \times 100\%$ 。

2.6.2 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定

参考文献^[15], 以 4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷为底物测定 α -葡萄糖苷酶的活性, 以阿卡波糖 (acarbose) 为阳性对照, 在 96 孔板上进行活性检测。反应体系为: 60 μ L 缓冲液 (pH = 6.8) 中加入 30 μ L 一定浓度的样品溶液, 加入 10 μ L α -葡萄糖苷酶

(0.8 U/mL), 37 °C 恒温孵育 15 min, 然后加入 10 μ L 底物(1 mmol/L), 37 °C 恒温孵育 15 min, 再加入 80 μ L 碳酸钠溶液(0.2 mol/L)终止反应, 在 405 nm 波长下测定吸光度值(A 值)。样品组 A_1 、样品空白组 A_2 、阴性组 A_3 、空白组 A_4 , 结果重复三次, 取平均值。抑制率的计算公式如下: α -葡萄糖苷酶抑制率 = $[1 - (A_1 - A_2)/(A_3 - A_4)] \times 100\%$ 。

2.6.3 乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶抑制活性测定

参照文献^[15], 以碘代乙酰胆碱为底物测定乙酰胆碱酯酶的活性, 以硫代丁酰胆碱为底物测定丁酰胆碱酯酶的活性, 以加兰它敏(galanthamine)为阳性对照, 在 96 孔板上进行活性检测。反应体系为: 先加入 50 μ L 一定浓度的样品溶液, 再加入 10 μ L 乙酰胆碱酯酶或丁酰胆碱酯酶(0.5 U/mL), 4 °C 恒温孵育 10 min, 然后加入 20 μ L 底物(2 mmol/L)和 20 μ L 显色剂二硫代双硝基苯甲酸(2 mmol/L), 37 °C

恒温孵育 30 min, 再加入 20 μ L 独扁豆碱溶液(0.018 mmol/L)终止反应, 在 405 nm 波长下测定吸光度值(A 值)。样品组 A_1 、样品空白组 A_2 、阴性组 A_3 、空白组 A_4 , 结果重复三次, 取平均值。抑制率的计算公式如下:乙(丁)酰胆碱酯酶抑制率 = $[1 - (A_1 - A_2)/(A_3 - A_4)] \times 100\%$ 。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析, 所有数据均以“均数 \pm 标准差”($\bar{x} \pm s$)表示。

3 结果与分析

3.1 大高良姜地下根茎挥发油的化学成分分析

大高良姜地下根茎挥发油的总离子流图见图 1, 对总离子流图中的各峰经质谱计算机数据系统检索及核对 Nist 2017 和 Wiley 275 标准质谱图, 确定了 116 种挥发性化学成分, 占挥发油总量的 94.12%, 用峰面积归一化进行定量分析, 计算出各个化学成分的相对质量分数, 结果见如表 1。

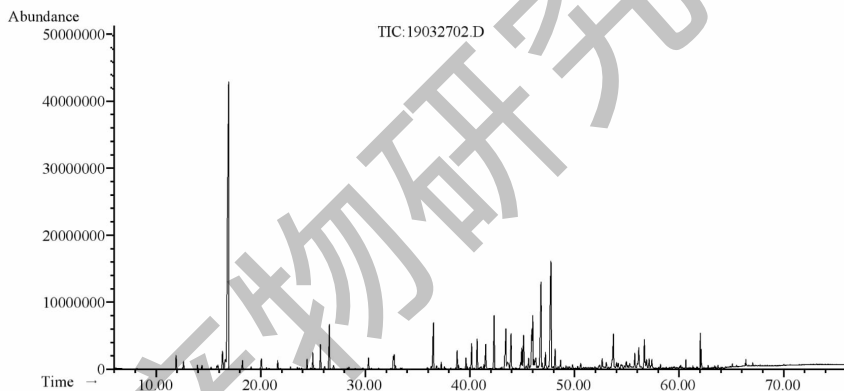


图 1 大高良姜地下根茎挥发油 GC-MS 总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of the essential oil from the rhizome of *A. galanga*

表 1 大高良姜地下根茎挥发油化学成分及相对含量

Table 1 Chemical compositions and relative contents of the essential oil from the rhizome of *A. galanga*

序号 No.	保留时间 Retention time (min)	化合物 Compound	分子式 Formula	分子量 Molecule mass	相对含量 Relative content(%)
1	11.91	α -蒎烯 α -Pipene	$C_{10}H_{16}$	136	0.54
2	12.528	α -葑烯 α -Fenchene	$C_{10}H_{16}$	136	0.05
3	12.627	茨烯 Camphene	$C_{10}H_{16}$	136	0.32
4	13.95	β -蒎烯 β -Pinene	$C_{10}H_{16}$	136	0.17
5	14.379	β -月桂烯 β -Myrcene	$C_{10}H_{16}$	136	0.15
6	15.26	α -水芹烯 α -Phellandrene	$C_{10}H_{16}$	136	0.09
7	15.801	对-薄荷烷 <i>p</i> -Menthane	$C_{10}H_{18}O$	154	0.14
8	15.902	α -松油烯 α -Terpinene	$C_{10}H_{16}$	136	0.20

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	保留时间 Retention time (min)	化合物 Compound	分子式 Formula	分子量 Molecule mass	相对含量 Relative content(%)
9	16.349	对-伞花烃 <i>p</i> -Cymene	C ₁₀ H ₁₄	134	1.16
10	16.632	外消旋-柠檬烯 <i>dl</i> -Limonene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.82
11	16.926	1,8-桉叶油素 1,8-Cineole	C ₁₀ H ₁₈ O	154	25.41
12	17.495	(<i>Z</i>)- β -罗勒烯 (<i>Z</i>)- β -Ocimene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.01
13	18.254	γ -松油烯 γ -Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.33
14	20.06	α -异松油烯 α -Terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.59
15	20.549	芳樟醇 Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.06
16	20.802	壬醛 Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	142	0.03
17	21.339	异葑醇 Isofenchol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.01
18	21.482	1,3,8-对-薄荷三稀 1,3,8- <i>p</i> -Menthatriene	C ₁₀ H ₁₄	134	0.01
19	21.631	葑醇 Fenchol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.37
20	22.853	1-松油醇 1-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.10
21	23.506	β -松油醇 β -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.07
22	23.688	(+)-2-樟脑 (+)-2-Bornanone	C ₁₀ H ₁₆ O	152	0.03
23	23.912	水合蒎烯 Camphene hydrate	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.04
24	24.429	异龙脑 Isoborneol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.43
25	24.986	<i>endo</i> -龙脑 <i>endo</i> -Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.77
26	25.717	4-萜烯醇 Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1.14
27	26.112	4'-甲基苯乙酮 4'-Methylacetophenone	C ₉ H ₁₀ O	134	0.13
28	26.566	α -松油醇 α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	2.35
29	26.964	γ -松油醇 γ -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.19
30	28.281	反式-香芹醇 <i>trans</i> -Carveol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	0.03
31	28.442	α -葑基乙酸酯 α -Fenchyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	0.09
32	29.052	顺式-香芹醇 <i>cis</i> -Carveol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	0.02
33	29.752	枯茗醛 Cumicinaldehyde	C ₁₀ H ₁₂ O	148	0.05
34	29.998	(+)-香芹酮 (+)-Carvone	C ₁₀ H ₁₄ O	150	0.01
35	30.307	对烯丙基苯酚 Chavicol	C ₉ H ₁₀ O	134	0.51
36	30.57	对-丙基苯酚 <i>p</i> -Propylphenol	C ₉ H ₁₂ O	136	0.02
37	32.679	反式-茴香脑 <i>trans</i> -Anethole	C ₁₀ H ₁₂ O	148	0.62
38	32.755	1-乙酸龙脑酯 1-Bornyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	0.61
39	32.876	乙酸异龙脑酯 Isobornyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	0.14
40	35.934	香芹醇乙酯 Carveol acetate	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	194	0.08
41	36.298	羟基桉油脑乙酸酯 hydroxycineyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₃	212	0.14
42	36.509	4-烯丙基苯乙酸酯 4-Allylphenyl acetate	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	176	2.54
43	36.818	乙酸香茅基酯 Citronellyl acetate	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	198	0.16
44	37.26	丁香酚 Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164	0.31
45	37.569	顺式-乙酸香芹酯 <i>cis</i> -Carvyl acetate	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	194	0.13
46	38.117	香芹基乙酸 Carvacryl acetate	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	192	0.03
47	38.651	α -可巴烯 α -Copaene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.04

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	保留时间 Retention time (min)	化合物 Compound	分子式 Formula	分子量 Molecule mass	相对含量 Relative content(%)
48	38.78	乙酸香叶基酯 Geranyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	0.80
49	38.907	肉桂酸甲酯 Methyl cinnamate	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	162	0.18
50	39.622	β -榄香烯 β -Elemene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.51
51	39.755	十四烷 Tetradecane	C ₁₄ H ₃₀	198	0.10
52	39.981	3aS,4R,7S,7aR)-3-Isopropyl-3a,7a-dimethyl-3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-1H-4,7-methanoindene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.08
53	40.169	甲基丁香酚 Methyl eugenol	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	178	1.23
54	40.697	异石竹烯 Isocaryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	204	1.47
55	41.078	α -柏木烯 Cedr-8-ene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.17
56	41.346	α -檀香烯 α -Santalene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.24
57	41.506	反式-石竹烯 <i>trans</i> -Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	204	1.30
58	42.321	反式- α -香柠檬烯 <i>trans</i> - α -Bergamotene	C ₁₅ H ₂₄	204	2.84
59	42.542	α -愈疮木烯 α -Guaiene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.01
60	42.692	别香树烯 Alloaromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.02
61	43.062	β -檀香烯 β -Santalene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.08
62	43.435	反式- β -法呢烯 <i>trans</i> - β -Farnesene	C ₁₅ H ₂₄	204	2.63
63	43.594	α -葎草烯 α -Humulene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.84
64	43.938	紫穗槐二烯 Amorphadiene	C ₁₅ H ₂₄	204	2.18
65	44.837	菖蒲二烯 Acoradiene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.33
66	44.961	δ -没药烯 δ -Bisabolene	C ₁₅ H ₂₄	204	1.07
67	45.132	α -姜黄烯 α -Curcumene	C ₁₅ H ₂₄	204	2.27
68	45.391	4a,8-Dimethyl-2-(prop-1-en-2-yl)-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydronaphthalene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.24
69	45.614	β -芹子烯 β -Selinene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.57
70	45.914	α -姜烯 α -Zingiberene	C ₁₅ H ₂₄	204	2.08
71	46.012	十五烷 Pentadecane	C ₁₅ H ₃₂	212	2.70
72	46.13	α -芹子烯 α -Selinene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.46
73	46.309	顺式- α -没药烯 <i>cis</i> - α -Bisabolene	C ₁₅ H ₃₂	212	0.91
74	46.484	α -花柏烯 α -Chamigrene	C ₁₅ H ₃₂	212	0.18
75	46.797	β -没药烯 β -Bisabolene	C ₁₅ H ₂₄	204	6.24
76	46.915	(-)- β -姜黄烯 (-)- β -Curcumene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.27
77	47.213	(Z)- γ -没药烯 (Z)- γ -Bisabolene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.96
78	47.51	7-epi- α -芹子烯 7-epi- α -Selinene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.13
79	47.75	β -倍半水芹烯 β -Sesquiphellandrene	C ₁₅ H ₂₄	204	9.08
80	48.15	(E)- γ -没药烯 (E)- γ -Bisabolene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.96
81	48.677	反式- α -没药烯 <i>trans</i> - α -Bisabolene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.52
82	48.926	α -白昌考烯 α -Calacorene	C ₁₅ H ₂₀	200	0.07
83	49.196	榄香醇 Elemol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.15
84	49.815	反式-橙花叔醇 <i>trans</i> -Nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.18
85	50.309	绿花白千层醇 Viridiflorol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.14
86	50.595	石竹烯醇 Caryophyllenyl alcohol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.31

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	保留时间 Retention time (min)	化合物 Compound	分子式 Formula	分子量 Molecule mass	相对含量 Relative content(%)
87	51.646	大果柏醇 Macrocarpol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.09
88	51.964	韦得醇 Widdrol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.11
89	52.414	八氢四甲基萘甲醇 Rosifoliol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.20
90	54.027	γ -桉叶油醇 γ -Eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.39
91	54.195	Gossonorol	C ₁₅ H ₂₂ O	218	0.32
92	54.957	(S)-1-(4-乙酰氧基苯基)乙酸丙基 (S)-1-(4-Acetoxyphenyl) propyl acetate	C ₁₃ H ₁₆ O ₄	236	0.43
93	55.284	α -杜松醇 α -Cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.21
94	56.005	β -没药醇 β -Bisabolol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.22
95	56.15	8-十七碳烯 8-Heptadecene	C ₁₇ H ₃₄	238	1.23
96	56.685	顺式-3-十七碳烯 cis-3-Heptadecene	C ₁₇ H ₃₄	238	1.74
97	56.896	α -没药醇 α -Bisabolol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.47
98	57.132	4-(1,5-二甲基-4-己烯)环己烯-2-酮 4-(1,5-Dimethylhex-4-enyl) cyclohex-2-enone	C ₁₄ H ₂₂ O	206	0.47
99	57.303	十七烷 Heptadecane	C ₁₇ H ₃₆	240	0.11
100	57.394	α -反式-香柠檬烯醇 α -trans-Bergamotenol	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.47
101	58.219	Cuparenal	C ₁₅ H ₂₀ O	216	0.19
102	60.16	Cyperen-8-one	C ₁₅ H ₂₂ O	218	0.11
103	61.311	Ambrial	C ₁₆ H ₂₆ O	234	0.08
104	61.378	十六醛 Hexadecanal	C ₁₆ H ₃₂ O	240	0.05
105	61.767	(+)-epi- β -乙酸檀香酯 (+)-epi- β -Santalyl acetate	C ₁₇ H ₂₆ O ₂	262	0.04
106	62.031	金合欢醇乙酸酯 Farnesyl acetate	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	264	0.81
107	62.988	9-十九烯 9-Nonadecene	C ₁₉ H ₃₈	266	0.03
108	63.282	2-十七烷酮 2-Heptadecanone	C ₁₇ H ₃₄ O	254	0.04
109	63.714	十六酸 Hexadecanoic acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	0.10
110	64.46	邻苯二甲酸二丁酯 Dibutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278	0.05
111	65.088	(E)-15,16-Dinorlabda-8(17),11-dien-13-one	C ₁₈ H ₂₈ O	260	0.12
112	65.488	香叶基芳樟醇 Geranyl linallol	C ₂₀ H ₃₄ O	290	0.04
113	66.323	亚油酸甲酯 Methyl linoleate	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294	0.05
114	66.388	油酸甲酯 Oleic acid, methyl ester	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296	0.16
115	66.676	硬脂酸甲酯 Methyl stearate	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298	0.01
116	67.053	二羟丙茶碱 E Coronarin E	C ₂₀ H ₂₈ O	284	0.06
总计 Total					94.12

3.2 大高良姜地下根茎挥发油的抗氧化活性

由表 2 可知,大高良姜地下根茎挥发油对 DP-PH 自由基显示出较差的抗氧化活性,其 IC₅₀ 值为 6 886.01 ± 88.64 μ g/mL,抗坏血酸当量为 0.09 ± 0.02 mg AEs/g oil。对 ABTS 自由基有一定的抗氧化活性,其 IC₅₀ 值为 222.8 ± 7.04 μ g/mL,抗坏血酸当量为 4.83 ± 0.31 mg AEs/g oil。

3.3 大高良姜地下根茎挥发油的抗菌活性

由表 3、4 可知,大高良姜地下根茎挥发油对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和变形杆菌表现出较好的抗菌活性,其抑菌圈大小在 9.81 ~ 14.95 mm 之间, MIC 值在 312.50 ~ 625.00 μ g/mL 之间, MBC 值在 625.00 ~ 1 250.00 μ g/mL 之间。挥发油对大肠杆菌、铜绿假单胞菌和白色念珠菌的活性较差。

表2 大高良姜地下根茎挥发油的抗氧化活性

Table 2 Antioxidant activity of the essential oil from the rhizomes of *A. galanga*

样品 Sample	DPPH		ABTS	
	IC ₅₀ (μg/mL)	mg AEs/g oil	IC ₅₀ (μg/mL)	mg AEs/g oil
挥发油 Essential oil	6 886.01 ± 88.64	0.09 ± 0.02	222.87 ± 7.04	4.83 ± 0.31
BHT	13.65 ± 0.75	-	2.06 ± 0.09	-
抗坏血酸 Ascorbic acid	0.63 ± 0.11	-	1.08 ± 0.48	-

注:阳性对照:BHT 和抗坏血酸;“mg AEs/g oil”表示抗坏血酸当量。

Note:BHT and ascorbic acid as positive control;“mg AEs/g oil” means equivalents of ascorbic acid.

表3 大高良姜地下根茎挥发油的抑菌圈直径

Table 3 Diameter of the inhibition zones of the essential oil from the rhizomes of *A. galanga*

菌株 Microorganism	抑菌圈直径 Diameter of the inhibition zones (mm)	
	挥发油 Essential oil	链霉素 Streptomycin
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	9.81 ± 0.49	17.56 ± 0.68
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	14.95 ± 2.39	18.65 ± 2.10
铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>	9.78 ± 1.30	12.54 ± 3.43
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	9.87 ± 1.55	16.40 ± 0.71
变形杆菌 <i>P. vulgaris</i>	10.52 ± 1.41	16.72 ± 0.77
白色念珠菌 <i>C. albicans</i>	8.49 ± 1.64	Na

注:“Na”表示无活性;链霉素为阳性对照。

Note:“Na” means no activity;Streptomycin is positive control.

表4 大高良姜地下根茎挥发油的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度

Table 4 MIC and MBC values of the essential oil from the rhizomes of *A. galanga*

菌株 Microorganism	最小抑菌浓度和最小杀菌浓度 MIC and MBC values (μg/mL)			
	挥发油 Essential oil		链霉素 Streptomycin	
	MIC	MBC	MIC	MBC
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	312.50	625.00	0.08	0.17
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	625.00	1 250.00	0.08	0.17
铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>	1 250.00	Na	1.56	3.13
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	Na	Na	0.04	0.08
变形杆菌 <i>P. vulgaris</i>	312.50	625.00	0.04	0.08
白色念珠菌 <i>C. albicans</i>	625.00	Na	Na	Na

注:“Na”表示无活性(≤ 2 500 μg/mL);链霉素为阳性对照。

Note:“Na” means not activity (≤ 2 500 μg/mL);Streptomycin is positive control.

3.4 大高良姜地下根茎挥发油的抗肿瘤活性

由表5可知,大高良姜地下根茎挥发油具有较

强的抗肿瘤活性,其对 A549、K562 和 PC-3 肿瘤细胞的 IC₅₀值(IC₅₀值分别为:26.57 ± 0.76、58.01 ±

0.94 和 $35.56 \pm 0.57 \mu\text{g/mL}$ 与正常细胞 ($\text{IC}_{50} = 0.05$), 选择性指数 (正常细胞 IC_{50} 值与肿瘤细胞的 $76.25 \pm 1.04 \mu\text{g/mL}$) 相比具有显著性差异 ($P < \text{IC}_{50}$ 值的比值) 分别为 2.87、1.31 和 2.14。

表5 大高良姜地下根茎挥发油的抗肿瘤活性

Table 5 Anticancer activity of the essential oil from the rhizomes of *A. galanga*

细胞株 Cell line	挥发油 Essential oil		顺铂 Cisplatin
	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	选择性指数 Selectivity index	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
A549	$26.57 \pm 0.76^*$	2.87	8.65 ± 0.95
K562	$58.01 \pm 0.94^*$	1.31	4.41 ± 0.03
PC-3	$35.56 \pm 0.57^*$	2.14	28.08 ± 1.03
L929	76.25 ± 1.04	-	0.84 ± 0.73

注: * 与正常细胞株 (L929) 相比, 具有显著性差异 ($P < 0.05$); 顺铂为阳性对照。

Note: * Compared with normal cell line (L929), there is a significant difference ($P < 0.05$); Cisplatin is positive control.

3.5 大高良姜地下根茎挥发油的酶抑制活性

酪氨酸酶是催化黑素生成的关键酶, 因此, 酪氨酸酶抑制剂具有皮肤美白效果; α -葡萄糖苷酶抑制剂通过延缓碳水化合物在小肠的吸收, 从而降低餐后血糖和胰岛素水平, 用于治疗 2 型糖尿病; 胆碱酯酶抑制剂通过抑制乙酰胆碱的分解, 增强胆碱能神经传递, 已成为阿尔茨海默病最有效的治疗策略^[15]。由表 6 可知, 大高良姜地下根茎挥发油对酪

氨酸酶、 α -葡萄糖苷酶、乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶表现出一定的酶抑制活性, 其 IC_{50} 分别为 2479.15 ± 73.58 、 933.71 ± 0.46 、 380.47 ± 0.55 和 $9157.26 \pm 26.29 \mu\text{g/mL}$, 阳性当量值分别为 $71.88 \pm 2.33 \text{ mg AREs/g oil}$ 、 $0.25 \pm 0.002 \text{ mmol ACEs/g oil}$ 、 $0.77 \pm 0.02 \text{ mg GALAEs/g oil}$ 和 $0.52 \pm 0.01 \text{ mg GALAEs/g oil}$ 。

表6 大高良姜地下根茎挥发油的酶抑制活性

Table 6 Enzyme inhibitory activity of the essential oil from the rhizomes of *A. galanga*

酶 Enzyme	挥发油 Essential oil	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			阳性当量 Equivalents of positive control
		熊果昔 Arbutin	阿卡波糖 Acarbose	加兰它敏 Galanthamine	
酪氨酸酶 Tyrosinase	2479.15 ± 73.58	178.09 ± 0.55	-	-	$71.88 \pm 2.33 \text{ mg AREs/g oil}$
α -葡萄糖苷酶 α -Glucosidase	933.71 ± 0.46	-	151.64 ± 1.38	-	$0.25 \pm 0.002 \text{ mmol ACEs/g oil}$
乙酰胆碱酯酶 Acetylcholinesterase	380.47 ± 0.55	-	-	0.29 ± 0.01	$0.77 \pm 0.02 \text{ mg GALAEs/g oil}$
丁酰胆碱酯酶 Butyrylcholinesterase	9157.26 ± 26.29	-	-	4.74 ± 0.09	$0.52 \pm 0.01 \text{ mg GALAEs/g oil}$

注: 熊果昔、阿卡波糖、加兰它敏分别为酪氨酸酶、 α -葡萄糖苷酶、乙(丁)酰胆碱酯酶抑制活性的阳性对照; “mg AREs/g oil” 表示熊果昔当量; “mmol ACEs/g oil” 表示阿卡波糖当量; “mg GALAEs/g oil” 表示加兰它敏当量。

Note: Arbutin, acarbose, and galanthamine were the positive control drugs of the inhibitory effects on tyrosinase, α -glucosidase, and cholinesterase, respectively; “mg AREs/g oil” means equivalents of arbutin. “mmol ACEs/g oil” means equivalents of acarbose. “mg GALAEs/g oil” means equivalents of galanthamine.

4 讨论

从大高良姜地下根茎挥发油中共分析鉴定出 116 种化合物, 占挥发油总量的 94.12%, 主要成分有 1,8-桉叶油素 (25.41%)、 β -没药烯 (6.24%) 和 β -倍半水芹烯 (9.08%)。文献回顾表明^[3-5,7], 印度产大高良姜地下根茎挥发油富含 1,8-桉叶油素 (28.4 ~ 63.4%), 马来西亚产大高良姜地下根茎挥发油富含 1,8-桉叶油素 (40.5%)、 β -没药烯 (8.4%),

对比说明产地对其化学成分的含量有一定影响。挥发油对 ABTS 自由基有一定的清除活性, 对 DPPH 自由基显示出较差的清除活性。挥发油对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和变形杆菌表现出较好的抗菌活性。挥发油具有较强的抗肿瘤活性, 与正常细胞相比具有显著性差异 ($P < 0.05$), 选择性指数分别为 2.87、1.31 和 2.14。挥发油对酪氨酸酶、 α -葡萄糖苷酶、乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶均表现出

一定的酶抑制活性。1,8-桉叶油素已被证明具有抗氧化、抗菌、抗肿瘤、抗炎、镇痛活性和乙酰胆碱酯酶抑制作用^[16-18]。 β -没药烯具有抗菌和抗肿瘤活性^[19,20]。故挥发油的抗氧化、抗菌、抗肿瘤和酶抑制活性可能是这些主要的化学成分,或主要成分和少量成分的协同作用。研究结果可为大高良姜地下根茎挥发油的进一步开发利用提供一定的数据参考。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:153.
- 2 De Pooter HL, Omar MN, Coolsaet BA, et al. The essential oil of greater galangal (*Alpinia galanga*) from Malaysia [J]. Phytochemistry, 1985, 24(1):93-96.
- 3 Jirovetz L, Buchbauer G, Shafi MP, et al. Analysis of the essential oils of the leaves, stems, rhizomes and roots of the medicinal plant *Alpinia galanga* from southern India [J]. Acta Pharm, 2003, 53:73-81.
- 4 Jantan IB, Ahmad FB, Ahmad AS. Constituents of the rhizome and seed oils of greater galangal *Alpinia galanga* (L.) Willd. from Malaysia [J]. J Essent Oil Res, 2004, 16(3):174-176.
- 5 Raina AP, Verma SK, Abraham Z. Volatile constituents of essential oils isolated from *Alpinia galanga* Willd. (L.) and *A. officinarum* Hance rhizomes from North East India [J]. J Essent Oil Res, 2014, 26(1):24-28.
- 6 Jaju S, Indurwade N, Sakarkar D, et al. Isolation of galangolloside from rhizomes of *Alpinia galangal* [J]. Int J Green Pharm, 2009, 3:144-147.
- 7 Mallavarapu GR, Rao L, Ramesh S, et al. Composition of the volatile oils of *Alpinia galanga* rhizomes and leaves from India [J]. J Essent Oil Res, 2002, 14:397-399.
- 8 Juntachote T, Berghofer E. Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal [J]. Food Chem, 2005, 92:193-202.
- 9 Mahae N, Siree C. Antioxidant activities and antioxidative components in extracts of *Alpinia galanga* (L.) Sw [J]. Ka-setsart J(Nat Sci), 2009, 43:358-369.
- 10 Janssen AM, Scheffer JJC. Acetoxychavicol acetate, an anti-fungal component of *Alpinia galanga* [J]. Planta Med, 1985, 6:507-511.
- 11 Khattak S, Rehman S, Shah HU, et al. Biological effects of indigenous medicinal plants *Curcuma longa* and *Alpinia galangal* [J]. Fitoterapia, 2005, 76:254-257.
- 12 Yang X, Eilerman RG. Pungent principle of *Alpinia galangal* (L.) Swartz and its applications [J]. J Agr Food Chem, 1999, 47:1657-1662.
- 13 Matsuda H, Morikawa T, Managi H, et al. Antiallergic principles from *Alpinia galanga*: structural requirements of phenylpropanoids for inhibition of degranulation and release of TNF- α and IL-4 in RBL-2H3 cells [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2003, 13:3197-3202.
- 14 Zhai DC, Yao JL, Wang WJ, et al. Chemical constituents of the volatile oil from *Ormosia hosiei* leaves and its antioxidant and antimicrobial activity [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31:814-849.
- 15 Baloglu MC, Llorent-Martínez EJ, Aumeeruddy MZ, et al. Multidirectional insights on *Chrysophyllum perpulchrum* leaves and stem bark extracts: HPLC-ESI-MSⁿ profiles, antioxidant, enzyme inhibitory, antimicrobial and cytotoxic properties [J]. Ind Crops Prod, 2019, 134:33-42.
- 16 Rodenak-Kladniew B, Castro A, Stärkel P, et al. 1,8-Cineole promotes G0/G1 cell cycle arrest and oxidative stress-induced senescence in HepG2 cells and sensitizes cells to anti-senescence drugs [J]. Life Sci, 2020, 243:117271.
- 17 Zheng X, Zhang Y, Li Q, et al. Effects of 1,8-cineole on neuropathic pain mediated by P2X2 receptor in the spinal cord dorsal horn [J]. Sci Rep-UK, 2019, 99:7909.
- 18 Petrachaiyanan T, Chaiyasirisuwan S, Athikomkulchai S, et al. Screening of acetylcholinesterase inhibitory activity in essential oil from Myrtaceae [J]. Thai J Pharm Sci, 2019, 43(1):63-68.
- 19 Nascimento AMA, Brandao MGL, Oliveira GB, et al. Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or β -bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus* [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2007, 92(1):95-100.
- 20 Yeo SK, Ali AY, Hayward OA, et al. β -Bisabolene, a sesquiterpene from the essential oil extract of opoponax (*Commiphora guidottii*), exhibits cytotoxicity in breast cancer cell lines [J]. Phytother Res, 2016, 30:418-425.