

含笑花精油的抑菌活性及其化学成分分析

杨波华^a, 马英姿^{a*}, 杨蕾^b, 张慧^a, 宋荣^a

(中南林业科技大学 a.生命科学与技术学院; b.林学院, 湖南 长沙 410004)

摘 要: 运用水蒸气蒸馏法提取含笑花精油, 分别采用平板菌落法和滤纸片法检测精油对细菌和真菌的抑菌活性, 并运用 GC/MS 法分析精油的化学成分。结果表明: 含笑花精油对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和总状毛霉抑制效果较佳, 抑菌率分别达 70.36%、60.24%和 65.52%; 对金黄色葡萄球菌、黄曲霉具有一定的抑制作用, 对米根霉无抑制效果; 从含笑花精油中分离鉴定出 30 种化合物, 其中脂肪族化合物 14 种、萜烯类化合物 16 种。

关 键 词: 含笑花; 精油; 抑菌活性; 化学成分

中图分类号: Q949.747.1; Q946.85 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)03-0337-05

Study on antimicrobial activity and chemical constituents of essential oil from the flowers of *Michelia figo* Spreng

YANG Bo-hua^a, MA Ying-zi^{a*}, YANG Lei^b, ZHANG Hui^a, SONG Rong^a

(a.College of Life Science and Technology; b.College of Forestry, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

Abstract: Essential oil from the flowers of *Michelia figo* was extracted by steam distillation and the antimicrobial activities of the essential oil on bacteria and fungi were tested by plate counts and filter paper methods. Then the chemical constituents of the essential oil were analyzed by GC/MS. The results showed that: the antimicrobial effect of the essential oil from the flowers of *M. figo* on *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Mucor racemosus* were good and their inhibitory rates were up to 70.36%, 60.24% and 65.52%. There were certain antimicrobial effect of the essential oil on *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus flavus*, but no antimicrobial effect on *Rhizopus oryzae*. Thirty compounds were separated and identified from the essential oil including 14 aliphatic compounds and 16 terpenoid compounds.

Key words: flowers of *Michelia figo* Spreng; essential oil; antimicrobial activity; chemical constituents

含笑 (*Michelia figo*) 又名香蕉花或寒霄, 为木兰科 (Magnoliaceae) 含笑属亚热带常绿灌木, 原产中国广东、福建一带, 花期在 3—5 月和 10—12 月, 是重要的园林绿化树种^[1-2]。含笑花具有浓烈的水果香味, 有祛淤生新、活血止痛之功效, 临床用于治疗月经不调、痛经和胸肋间作痛等症^[3]。含笑挥发油化学成分的研究始于 1986 年, 至今已对含笑属植物峨眉含笑、乐昌含笑、金叶含笑等的精油化学成分^[4-13]

进行了分析。笔者研究了含笑花精油对几种细菌和真菌的室内抑菌活性, 通过 GC/MS 法分析了精油的化学成分, 以期对含笑的综合利用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

含笑花采自中南林业科技大学校园, 于晴朗天

收稿日期: 2010-12-28

基金项目: 湖南省发展改革委员会项目(湘发改高技[2007]896)

作者简介: 杨波华(1986—), 男, 江西抚州人, 硕士研究生, ybhizs@sina.com; *通信作者, ma_yingzi@163.com

气花朵微张时采摘。1.5 kg 含笑花用水蒸气蒸馏法提取精油,得油率约为 0.17%,精油香气浓郁,用无水硫酸钠干燥后保存在棕色瓶中,4℃冷藏,备用。

供试菌种为大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、总状毛霉(*Mucor racemosus*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和米根霉(*Rhizopus oryzae*),均由中南林业科技大学微生物实验室提供。细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基培养,真菌采用 PDA 培养基培养。

1.2 方法

1.2.1 含笑花精油化学成分的测定

参照文献[14]的方法,采用美国安捷伦 Agilent 6890/5973 气质联用仪(GC/MS)分析供试精油化学成分。气相色谱条件:RTX-5 石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);柱温 80℃,升温程序为 80℃保持 1 min,升温 5 min,130℃保持 6 min,升温 10 min,150℃保持 2 min,升温 5 min,200℃保持 2 min;汽化室温度 280℃;高纯氦气;载气流量 1.78 mL/min;分流比 30:1;进样量 0.5 μL。质谱条件:质谱的电离方式为 EI,灯丝电流为 0.6 mA;电子能量为 70 eV,倍增器电压 1.0 kV,离子源温度 200℃,扫描周期 0.5 s,溶剂延迟 2 min。

数据处理与质谱检索采用 NIST02 质谱库,自动检索分析组分的质谱数据,并对全部检索结果参考有关标准图谱进行核对和补充检索,经色谱峰面积归一法,计算各组分的相对含量。

1.2.2 菌种制备

将供试菌种用培养基活化后,制成含菌量约为 $10^6 \sim 10^7$ cfu/mL 的菌悬液。真菌接入 PDA 培养基中,在生化培养箱中 28℃培养 4 d。

1.2.3 含笑花精油对细菌的抑菌活性测定

采用平板菌落法^[15]测定含笑花精油对细菌的

抑菌活性。分别往 96 孔细胞培养板孔中精确加入精油和含菌量约为 $10^6 \sim 10^7$ cfu/mL 的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌菌悬液,使精油在菌悬液中的含量分别为 0.078 125、0.156 25、0.312 5、0.625、1.25、2.5、5、10、20、30、40 μL/mL,以加无菌水为对照,3 次重复。于 37℃生化培养箱中培养 12 h,移取 50 μL 不同体积分数精油混合液用涂布器涂在牛肉膏蛋白胨固体培养基上,并将培养皿放入生化培养箱中,37℃培养 18 h 后,计算平均抑菌率。

1.2.4 含笑花精油对真菌的抑菌活性测定

采用滤纸片法^[16]测定含笑花精油对真菌的抑菌活性。将灭菌后直径为 6 mm 的滤纸片分别浸入体积分数为 1、50%、40%、30%、20%、10%、5% 的精油中 10 min(溶剂为丙酮)。用接种针挑取总状毛霉、黄曲霉、米根霉接入培养皿(直径 9 cm)中心,在离中心 1.5 cm 呈 120°贴入 3 个滤纸片,以只接菌种的培养为对照,3 次重复。在生化培养箱中 28℃培养 4 d,测量抑菌圈直径,计算平均抑菌率。

使用 SPSS17.0 软件,对含笑花精油的抑菌活性结果进行统计分析,得到回归方程,并进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 含笑花精油的化学成分

用气相色谱-质谱(GC/MS)联用技术分析含笑花精油的化学成分,从中分离并鉴定出 30 种化合物,占总成分的 96.47%。主要化合物类别为:脂肪族化合物 14 种,占总成分的 35.94%;萜烯类化合物 16 种,占总成分的 60.53%。在脂肪族化合物中,酯类化合物含量较高,主要为 2-甲基-乙酸丙酯、2-甲基-丙酸乙酯;萜烯类化合物主要为 α-松油烯、马兜铃烯、石竹烯(表 1)。

表 1 含笑花精油主要化学成分

Table 1 The chemical constituents of the essential oil from the flowers of *M. figo*

序号	化合物	保留时间/min	相对含量/%
1	1-Butanol, 2-methyl-(2-甲基-1-丁醇)	2.115	0.17
2	Propanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester (2-甲基-丙酸乙酯)	2.195	3.20
3	Acetic acid, 2-methylpropyl ester (2-甲基-乙酸丙酯)	2.264	18.19
4	Butanoic acid, ethyl ester(丁酸乙酯)	2.413	0.69
5	Butanoic acid, 2-methylpropyl ester (2-甲基-丁酸丙酯)	3.723	0.21
6	Camphene(莜烯)	3.792	0.88
7	Hexanoic acid, ethyl ester(己酸乙酯)	4.227	0.13
8	β -Myrcene (β -月桂烯)	5.606	1.30
9	Hexanoic acid, 2-methylpropyl ester (2-甲基-己酸丙酯)	6.298	0.27
10	α -Cubebene (α -葑澄茄油烯)	10.561	0.67
11	α -Terpinene (α -松油烯)	12.506	30.59
12	Caryophyllene(石竹烯)	13.697	7.65
13	γ -Elemene (γ -榄香烯)	14.137	2.26
14	α -Caryophyllene (α -石竹烯)	15.110	1.35
15	β -Betulene (β -香桉烯)	16.306	2.20
16	α -Cadinene (α -葑澄茄烯)	16.912	0.37
17	α -Selinene (α -芹子烯)	17.004	1.25
18	8-Isopropenyl-1,5-dimethyl-cyclodeca-1,5-diene(8-丙烯-1,5-二甲基-环癸-1,5-二烯)	17.416	3.53
19	Germacrene (大牻牛儿烯)	17.851	0.55
20	Helminthogermacrene(长蠕孢吉码烯)	18.188	0.72
21	δ -Cadinene (δ -杜松烯)	19.419	2.02
22	Aristolene (马兜铃烯)	19.865	8.48
23	Elemol(榄香醇)	21.141	2.07
24	Isolongifolene, 9,10-dehydro- (9,10-去氢异长叶烯)	23.441	0.62
25	Caryophyllene oxide (丁香烯环氧化物)	24.814	1.32
26	1,4,8-Dodecatriene, (E,E,E)- ((E,E,E)-1,4,8-十二碳三烯)	25.358	0.65
27	4-Methylquinolinic acid (4-甲基喹啉酸)	25.524	0.18
28	9, 12, 15-Octadecatrien-1-ol (9, 12, 15-十八碳三烯-1-醇)	26.897	0.28
29	3,5-Heptadien-2-ol, 2,6-dimethyl- (2,6-二甲基-3,5-庚二烯基-2-醇)	27.109	0.57
30	3-Heptadecen-5-yne, (Z)- ((Z)3-十七碳烯-5-炔)	30.811	5.00

2.2 含笑花精油对细菌的抑菌活性

含笑花精油对枯草芽孢杆菌抑菌活性最强,对金黄色葡萄球菌的抑菌活性最弱;精油对 3 种细菌的抑菌率随着精油含量的增大而增大,但当精油含量大于 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 后,对大肠杆菌的抑菌活性变化较小,精油含量高于 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 后,对枯草芽孢杆菌的抑菌效果变化较小(表 2)。

2.3 含笑花精油对真菌的抑菌活性

含笑花精油对总状毛霉的抑菌率最高,对米根霉没有抑菌效果;对总状毛霉、黄曲霉的抑菌率随着精油体积分数的增大而增大,但当精油体积分数高于 20% 时,对总状毛霉的抑菌率变化不大,当精

表 2 含笑花精油对 3 种细菌的抑菌活性

Table 2 Antimicrobial activity of different volume fractions of essential oil from the flowers of *M. figo* on three bacteria

精油含量/ ($\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑菌率/%		
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌
0.078 125	0	0	0.56
0.156 25	1.28	0	4.28
0.312 5	9.85	0.96	12.81
0.625	20.74	2.41	18.22
1.25	29.88	8.56	35.36
2.5	38.69	14.11	40.58
5	46.58	28.21	52.02
10	57.38	29.66	53.00
20	58.26	30.28	69.07
30	60.02	35.64	69.75
40	60.24	50.01	70.36

油体积分数高于 40%时对黄曲霉的抑菌率变化小(表 3)。

表 3 含笑花精油对 3 种真菌的抑菌活性

Table 3 Antimicrobial activity of different volume fractions of essential oil from the flowers of *M. figo* on three fungi

精油体积分数	抑菌率		
	总状毛霉	米根霉	黄曲霉
5	40.15	0	4.12
10	45.52	0	6.33
20	58.41	0	16.33
30	61.72	0	18.67
40	63.79	0	27.65
50	64.90	0	27.89
100	65.52	0	29.17

2.4 含笑花精油对 6 种菌抑菌活性的回归分析

根据回归方程计算半抑菌浓度(LC_{50}), 得到精油对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、总状毛霉的 LC_{50} 值为 9.3、5.8、11.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$; 精油对金黄色葡萄球菌、黄曲霉的抑菌活性较差, 抑菌率均未达到 50%。除了对米根霉没有抑菌效果外, 含笑花精油对 5 种供试菌的抑菌活性都随着精油含量变化而差异极显著(表 4)。

表 4 含笑花精油对抑菌活性的回归分析

Table 4 Antimicrobial activity of essential oil from the flowers of *M. figo* on six strains

菌种	回归方程	R^2	LC_{50}
大肠杆菌	$y=10.864\ln x+25.825$	0.976	9.3
金黄色葡萄球菌	$y=7.616\ln x+11.868$	0.904	—
枯草芽孢杆菌	$y=12.133\ln x+28.693$	0.985	5.8
总状毛霉	$y=9.561\ln x+26.393$	0.903	11.8
米根霉	—	—	—
黄曲霉	$y=9.846\ln x-13.073$	0.922	—

3 讨论

刘芳等^[17]曾对峨眉含笑精油抑菌作用进行过研究。本研究结果证明, 含笑花精油对常见细菌和真菌, 如枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和总状毛霉的抑菌活性较佳。通过分析含笑花精油的化学成分, 得知精油中单萜、倍半萜类化合物含量较高, 石竹烯含量高达 7.65%。大量研究^[18-22]表明, 很多萜烯类化

合物具有抑菌效果; 因此, 可以认为单萜、倍半萜类化合物可能是含笑花精油中的主要抑菌成分之一, 但精油中其他的抑菌成分还有待于进一步研究。

本研究所得含笑花精油化学成分与典灵辉等^[3]对广东产含笑的化学成分分析的结果有较大差异, 仅有 γ -榄香烯、 α -石竹烯、 α -萜澄茄油烯、榄香醇 4 种化合物相同, 并且 4 种化合物的含量也不同, 这说明不同地域含笑精油的化学成分存在较大差异。新分离出的 6 种酯类化合物, 2-甲基-乙酸丙酯含量最高, 占 18.19%; 丁酸乙酯、2-甲基-1-乙酸丁酯、2-甲基-丙酸丁酯、2-甲基-丁酸丙酯、己酸乙酯都具有浓郁的果蔬香气, 可能是含笑花盛开时香气香型的主要成分。

参考文献:

- [1] 熊雄, 陈爱霞, 赖永新, 等. 含笑花中木脂素成分研究[J]. 中国科技论文在线, 2008, 3(9): 663-665.
- [2] 马英姿, 谭琴, 李恒熠, 等. 樟树叶及天竺桂叶的精油抑菌活性研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2009, 29(1): 36-40.
- [3] 典灵辉, 龚先玲, 蔡春, 等. 含笑化学成分分析[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 36(10): 1250-1251.
- [4] Tat suka K, Sumitani H, Suekane S, et al. Study on the volatile components of *Michelia figo* Spreng with gas chromatography-mass spectrum [J]. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 1986, 60 (6): 457.
- [5] 蒋继宏, 李晓储, 陈凤美, 等. 芳香型植物挥发油抑菌活性的研究[J]. 江苏林业科技, 2004, 31(3): 6-12.
- [6] 黄素青, 梁炳泉, 苏兆雄, 等. 植物精油的生物活性及其在有害生物控制上的应用[J]. 农药, 2010, 49(6): 397-402.
- [7] 刘玉民, 刘亚敏, 李鹏霞. 枫香叶精油抑菌活性及抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(11): 135-137.
- [8] 方小平, 胡光平. 不同提取方法对深山含笑花挥发性成分的影响[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(5): 81-84.
- [9] 刘芳, 张小青, 吴三林. 峨眉含笑精油对冬枣保鲜的研究[J]. 长春师范学院学报:自然科学版, 2008, 27(3): 65-69.
- [10] 刘艳清, 汪洪武. 乐昌含笑叶挥发油超声波提取工艺优化及化学成分分析[J]. 精细化工, 2008, 25(7): 644-646.

- [11] 黄京华, 黎华寿, 杨军, 等. 香根草挥发物化学成分的分析[J]. 应用生态学报, 2004, 15(1): 170-172.
- [12] 熊江, 戴好富, 易元芬, 等. 多花含笑叶的挥发油成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(5): 13-14.
- [13] 钟瑞敏, 张振明. 金叶含笑中芳香精油成分的气相色谱-质谱分析[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(4): 505-508.
- [14] 汪洪武, 刘艳清, 鲁湘鄂, 等. 含笑花挥发油的超临界二氧化碳萃取及气相色谱-质谱分析[J]. 理化检验: 化学分册, 2007, 43(7): 537-539.
- [15] 陈燕飞. 两种细菌学检查方法的比较[J]. 中国农学通报, 2010, 26(17): 129-131.
- [16] 方羽生, 杨卫华. 放线菌 4 种病原真菌的拮抗作用初探[J]. 广东农业科学, 2001(5): 39-41.
- [17] 刘芳, 曾郑祥. 峨眉含笑精油抑菌作用研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(10): 4074-4075.
- [18] 夏忠弟, 毛学政, 罗映辉. α -蒎烯抗真菌机制的研究[J]. 湖南医科大学学报, 1999, 24(6): 507-509.
- [19] 王伟江. 天然活性单萜——柠檬烯的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2005(1): 33-37.
- [20] 吴新安, 花日茂, 岳永德, 等. 植物源抗菌、杀菌活性物质研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(3): 245-249.
- [21] 陈丽艳, 崔志恒. 植物精油抗菌活性的研究进展[J]. 黑龙江医药, 2006, 19(3): 197-198.
- [22] Leopolo J, Gerhard B, Albera S, et al. Composition quality control and antimicrobial activity of the essential oil of long time dill seeds from Bulgaria[J]. Chem Nat Compounds, 2003, 51(2): 3854-3857.

责任编辑: 罗慧敏

(上接第336页)

- [6] Kauffman R G, Eikelenboom G, vander Wal PG, et al. The use of filter paper to estimate drip loss of porcine musculature[J]. Meat Science, 1986, 18(3): 191-200.
- [7] Karl O Honikel. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat[J]. Meat Science, 1998, 49(4): 447-457.
- [8] Zhang M, Mittal G S, Barbut S, et al. Effects of test conditions on the water holding capacity of meat by a centrifugal method[J]. LWT-Food Science and Technology, 1995, 28(1): 50-55.
- [9] 张伟力. 转谷氨酰胺酶改善 PSE 猪肉西式香肠质构特性的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(3): 44-48.
- [10] 汪学荣, 龚韵, 郭晓光. 亲水胶体对肉糜凝胶强度和持水性能的影响[J]. 肉类研究, 2005(8): 37-39.
- [11] 张国丛, 李美桃, 刘欢, 等. 亲水胶体及其复配胶在肉制品中应用的研究进展[J]. 肉类研究, 2008(4): 7-9.
- [12] 朱峰, 吴厚玖. 食品胶在肉制品加工中的应用[J]. 肉类研究, 2007(11): 12-14.
- [13] 杨书珍, 史欣峰, 潘思轶, 等. 魔芋-卡拉胶复配凝胶质构特性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(B11): 404-407.
- [14] 郭瑞, 丁恩勇. 黄原胶的结构、性能与应用[J]. 日用化学工业, 2006, 36(1): 42-45.
- [15] Garcia-Ocho F, Santos V E, Casas J A, et al. Xanthan gum: Production, recovery, and properties [J]. Biotechnology Advances, 2000, 18(7): 549-579.
- [16] Dirk Verbeke, Nico sNeirinck, Paul Van der Meeren, et al. Influence of κ -carrageenan on the thermal gelation of salt-soluble meat proteins[J]. Meat Science, 2005, 70: 161-166.
- [17] 尚一平. 卡拉胶的性能及其在肉类工业中的应用[J]. 肉类工业, 2006(12): 31-32.
- [18] 张英华. 肉的品质及其相关质量指标[J]. 食品研究与开发, 2005(2): 39-42.

责任编辑: 王赛群