

朱桔叶挥发油化学成分及抑菌活性研究

冯自立^{1*}, 李志刚², 教义俊³, 吴三桥⁴

- (1. 陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001;
2. 城固县质量技术监督检验所, 陕西 城固 723003;
3. 城固县果业局, 陕西 城固 723003; 4. 陕西省油脂深加工工程技术研究中心, 陕西 汉中 723001)

〔摘要〕 目的:研究朱桔叶挥发油化学成分,初步研究其抑菌活性。方法:采用水蒸气蒸馏法提取朱桔叶中的挥发油,气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)和峰面积归一化法分析其化学成分和相对含量;采用微量二倍连续梯度稀释法确定挥发油杀菌效果。结果:通过 GC-MS 从朱桔叶挥发油中分离 41 种化合物,鉴定 36 种。柑橘叶挥发油的主要成分为:r-榄香烯(30.691%)、 β -石竹烯(18.895%)、水芹烯(10.814%)、2-异丙基-甲苯(7.977%)、 α -石竹烯(5.260%)、 α -金合欢烯(4.805%)等;初步的抑菌试验结果显示朱桔叶挥发油对大肠埃希菌的抑制效果[最小抑菌浓度(MIC) 3.9 g·L⁻¹,最小杀菌浓度(MBC) 5.6 g·L⁻¹]最为显著,其次依次为金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和假丝酵母。次为金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和假丝酵母。结论:通过 GC-MS 测定和鉴别了朱桔叶挥发油化学成分,抗菌实验表明其挥发油具有一定的抗菌活性,为朱桔叶挥发油的开发利用提供实验依据。

〔关键词〕 朱桔; 挥发油; 气相色谱-质谱联用(GC-MS); 抑菌

〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2014)05-0102-04

〔doi〕 10.11653/syjf2014050102

Chemical Composition of Olatile Oil from Leaf of *Citrus erythrosa* and Study on Antibacterial Activity

FENG Zi-li^{1*}, LI Zhi-gang², AO Yi-jun³, WU San-qiao⁴

- (1. Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China;
2. Chenggu Quality and Technology Supervision Test Institute, Chenggu 723003, China;
3. Chenggu County Bureau of Fruit Industry, Chenggu 723003, China;
4. Shaanxi Province Engineering and Research Center of Oil, Hanzhong 723001, China)

〔Abstract〕 **Objective:** Steam distillation extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) combined with quantification by peak area normalization method was used to analyze volatile compounds from leaf of *Citrus erythrosa* Tanaka. **Method:** Analysised bactericidal concentration of olatile compounds with the agar dilution method. **Result:** Showed that 36 compounds were identified with gc-ms, which the predominant compounds were r-elemene (30.691%), β -caryophyllene (18.895%), phellandrene (10.814%), benzene-1-methyl-2- (1-meth-ylethy) (7.977%), α -caryophyllene (5.260%) and α -farnesene (4.805%) et al. Results of experiments on antimicrobial activities showed that volatile component had antibacterial effects. Results Bacteriostatic test *in vitro* express that olatile oil to escherichia coli inhibitory effect in the most significant (MIC 3.9 g·L⁻¹, MBC 5.6 g·L⁻¹), and followed by staphylococcus aureus, bacillus subtilis and candida. **Conclusion:** GC-MS could be used to identify and determine content of volatile components of leaf of *C. erythrosa*, and have a little of antimicrobial activity. This study could provide experimental basis for development and

〔收稿日期〕 20130426(014)

〔基金项目〕 陕西省重点实验室资助项目(12JS027);陕西省油脂深加工工程技术研究中心项目(2009ZDGC-03-05)

〔通讯作者〕 * 冯自立,讲师,在读博士,从事天然产物纯化及衍生物合成、构效关系研究,E-mail:fengzili2008@163.com

utilization of leaf of *C. erythroa* .

[**Key words**] *Citrus erythroa* ; volatile oil ; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ; antibacterial activity

朱桔别名朱红桔、红桔,其果皮呈朱红色,味甘甜,有核,为传统柑桔品种之一,分布于各柑桔主产省份。朱桔叶叶形较小,气味芳香,含有丰富柑桔挥发性成分,可制备高附加值的柑桔精油。柑桔精油主要由萜烯烃、倍半萜烯烃等纯碳氢烯烃和高级醇类、醛类、酮类、酯类组成的含氧化合物组成。具有令人愉悦的独特芳香^[1],能使人体中枢神经镇静和减轻应激性,具有消炎抗菌、祛痰、止咳、促进肠胃蠕动、促进消化液分泌等作用^[2-3]。柑桔精油生产原料主要是柑桔果皮,从其他部位提取的研究较少,可通过水蒸气蒸馏、有机溶剂浸提^[4]、冷磨^[5]及超临界萃取^[6]等工艺来制备。席萍等^[7]对采用水蒸气蒸馏法提取山桔叶挥发油并通过 GC-MS 技术检出 33 个化学成分,鉴定了其中 12 个成分;周葆华等^[8]采用水蒸气蒸馏提取四季桔叶挥发油,采用 GC-MS 技术鉴定出 23 种化合物,并发现其挥发油具有抑菌、抗病毒及抗肿瘤活性。因此本研究以朱桔修剪管理过程中产生的废叶为原料,着重研究其化学成分及初步的抑菌活性,为进一步的资源利用提供实验数据参考。

1 材料与方法

1.1 药材、试剂与菌种 朱桔叶于 2012 年 5 月份采自陕西省城固县桔园镇,经陕西理工学院生物学院王勇博士鉴定为芸香科朱桔 *Citrus erythroa* Tanaka. 的叶片;叶片阴干粉碎,过 40 目筛,冰箱保存备用;石油醚、氯化钠、无水硫酸钠均为市售分析纯;实验室自制纯水。大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢和假丝酵母,均购自中国科学院微生物研究所菌种中心。

1.2 仪器与设备 GC6890N/MSD5973N 型气相色谱/质谱联用仪(美国安捷伦科技公司),DJ-04 型粉碎机(东星机械工贸有限公司),TB-214 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),水蒸气蒸馏装置(2 000 mL,四川蜀牛玻璃仪器有限公司),恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂)。

1.3 挥发油水蒸气蒸馏提取 准确称取适量朱桔叶粉末,按液料比加入 8 倍量蒸馏水,浸泡 1 h 后进行水蒸气蒸馏 4 h,完成后向油水混合的馏出液中加入一定量的 NaCl,然后用石油醚进行萃取,减压浓缩萃取液,无水硫酸钠脱水后得浅黄色的挥发油,出

油率为 1.25%。

1.4 气相色谱-质谱联用分析条件

气相色谱条件 汽化室温度 260 ℃;载气 99.999% 高纯氮,载气流速 1.2 mL·min⁻¹,线速度 40 cm·s⁻¹;弹性石英毛细柱 AT-SE54(0.25 μm×0.25 mm×30 m);程序升温,初始温度 80 ℃,以 4 ℃·min⁻¹升至 290 ℃,恒温 30 min。

质谱条件 EI 离子源温度 >230 ℃;四极杆温度 150 ℃;离子源电离能:70 eV,接口温度:280 ℃;溶剂延迟 4 min,质量范围 *m/z* 220~550,谱库:美国 NIST02L。

1.5 抗菌实验 参照文献[9-11]采用微量二倍连续梯度稀释法确定最小抑菌浓度(MIC),平板转种法确定最小杀菌浓度(MBC)。每实验组中接种菌悬液 0.1 mL,培养条件为 37 ℃培养 24 h,若培养瓶中出现浑浊,则确定为微生物生长,将无菌生长的样品最低质量浓度确定为最小抑制浓度 MIC。取未见供试菌生长的实验组中培养物分别移种到牛肉膏蛋白胨培养基平板上培养过夜,若平板上仍无菌生长的样品最低质量浓度即为最小杀菌浓度 MBC。实验重复 3 次测定,结果取平均值。

2 结果与分析

2.1 气相色谱-质谱联用分析 取挥发油适量按上述气相色谱-质谱联用分析条件,通过气质联用仪对朱桔叶挥发油化学成分进行分析,各分离组分利用计算机谱库(NIST 02L)进行检索和有关文献进行人工谱图解析,采用色谱峰面积归一化法进行相对定量。朱桔叶挥发油 GC-MS 总离子流图如图 1 所示,解析结果见表 1。

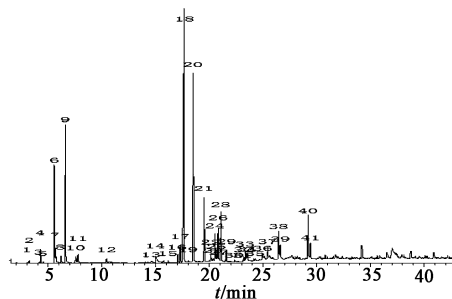


图 1 柑桔叶挥发油的气相色谱-质谱联用分析总离子流

由表 1 知,从水蒸气蒸馏法提取的朱桔叶鲜品挥发油中,经色谱分离共得到 41 个峰,通过谱图库检索及人工解析,鉴定了其中的 36 种成分,已鉴定

成分的相对含量占挥发油总含量的 87.8%。其主要成分为 *r*-榄香烯 (30.691%)、 β -石竹烯 (18.895%)、水芹烯 (10.814%)、2-异丙基-甲苯 (7.977%)、 α -石竹烯 (5.260%)、 α -金合欢烯 (4.805%)、桉叶油二烯内酯 (2.777%)、桉叶油二烯 (2.154%) 等。与采用石油醚浸泡 4 h, 超声 60 次得到的普通柑橘叶挥发油主要成分相比较差异较大, 相同的化合物为 β -石竹烯^[12]。与采用水蒸气蒸馏法获

得的四季桔叶挥发油主要成分相比较存在较多的共同成分, 特别是榄香烯类化合物^[8]。说明柑桔属内不同种的植物叶片挥发油的化学成分存在差异, 不同的挥发油提取方法亦可能造成较大成分构成差异。朱桔叶挥发油中其中相对质量分数达到 30.691% 的 γ -榄香烯与现在临床上用于广泛治疗肺癌、消化道肿瘤、乳腺癌^[13-15] 等癌症药物 β -榄香烯为双键位置异构体, 同属倍半萜烯类有效活性成分^[16-17]。

表 1 桔叶挥发油化学成分

No.	<i>t_R</i> /min	化合物名称	分子式	相对 分子质量	含量/%
1	3.034	香桉烯 sabinene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.075
2	3.222	α -蒎烯 . alpha. -pinene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.211
3	4.155	双环倍半萜烯 bicyclo[3.1.0] hexane, 2-methylene-5-(1-methylethyl)-	C ₁₀ H ₁₆	136	0.090
4	4.287	α -蒎烯 . alpha. -pinene	C ₁₀ H ₁₆	136	1.034
5	4.517	β -香叶烯(月桂烯) . beta. -myrcene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.114
6	5.555	2-异丙基-甲苯 benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)	C ₁₀ H ₁₄	134	7.977
7	5.687	<i>D</i> -柠檬烯 <i>D</i> -limonene	C ₁₀ H ₁₆	136	1.351
8	6.181	罗勒烯 ocinene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.628
9	6.592	水芹烯 phellandrene	C ₁₀ H ₁₆	136	10.814
10	7.553	4-异丙烯基-甲苯 benzene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)	C ₁₀ H ₁₂	132	0.779
11	7.769	芳樟醇 linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.701
12	10.422	α -松油醇 α -terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.414
13	14.607	香芹酚 carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	150	0.345
14	15.011	2-甲氧基-4-乙烯基苯酚 2-methoxy-4-vinylphenol	C ₉ H ₁₀ O ₂	150	1.503
15	16.16	α -蒎蒎澄烯 . alpha. -cubebene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.159
16	17.052	古巴烯 copaene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.687
17	17.302	异-榄香烯 iso-elemene	C ₁₅ H ₂₄	204	1.528
18	17.637	<i>r</i> -榄香烯 <i>r</i> -elemene	C ₁₅ H ₂₄	204	30.691
19	18.04	异-石竹烯 iso-caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.123
20	18.514	β -石竹烯 β -caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	204	18.895
21	19.524	α -石竹烯 α -caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	204	5.260
22	20.15	桉叶油二烯 eudesmdiene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.631
23	20.366	八氢-四甲基-环丙[a]萘(三环倍半萜烯) <i>H</i> -cyclopropa[a] naphthalene, octahydro-tetramethyl-	C ₁₅ H ₂₄	204	0.273
24	20.547	桉叶油二烯 eudesmdiene	C ₁₅ H ₂₄	204	2.154
25	20.652	α -香柠檬西 α -bergamotene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.578
26	20.819	桉叶油二烯内酯 eudesmdiene	C ₁₅ H ₂₄	204	2.777
27	20.93	无译名(桥环二萜类化合物) cycloisoativene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.138
28	21.077	α -法呢烯(α -金合欢烯) . alpha. -farnesene	C ₁₅ H ₂₄	204	4.805
29	21.592	杜松二烯 cadindiene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.897
30	22.351	榄香烯醇 elemenol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.159
31	23.138	法呢烯醇 farnesenol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.118
32	23.221	斯巴醇 (-)-spathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.394
33	23.375	氧化- β -石竹烯 caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.730
34	23.5	未鉴定	C ₁₆ H ₃₄	226	0.979
35	24.266	球脞醇 globulol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.217
36	24.94	降姥鲛烷 norpristine	C ₁₈ H ₃₈	254	0.519
37	25.45	异-球脞醇 iso-globulol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	1.259

2.2 抑菌实验结果 朱桔叶水蒸气蒸馏法获得的挥发油对4个供试菌株抗菌结果见表2。朱桔叶挥发油对大部分供试菌株都表现出一定的抑菌作用,对大肠埃希菌的抑制效果最为显著, MIC 3.9 g·L⁻¹, MBC 5.6 g·L⁻¹,其次依次为金黄色葡萄球菌、枯草芽孢和假丝酵母。朱桔叶精油中榄香烯、石竹烯成分的存在可能与其抗菌活性有密切的关系。

表2 朱桔叶挥发油抑菌试验 g·L⁻¹

菌株	MIC	MBC
大肠埃希菌 (<i>E. coli</i>)	3.9	5.6
金黄色葡萄球菌 (<i>S. aureus</i>)	6.4	9.7
假丝酵母 (<i>Candidasp.</i>)	18.7	24.3
枯草芽孢 (<i>B. subtilis</i>)	9.6	14.8

3 结论

本文对陕西汉中传统柑桔品种——朱桔的叶片挥发油进行研究,通过GC-MS解析,共分离出41个峰,鉴定出36种化合物,其主要成分为γ-榄香烯(30.691%)、β-石竹烯(18.895%)、水芹烯(10.814%)、2-异丙基-甲苯(7.977%)、α-石竹烯(5.260%)、α-金合欢烯(4.805%)、桉叶油二烯内酯(2.777%)、桉叶油二烯(2.154%)等。初步研究了朱桔叶挥发油的抗菌活性,结果显示朱桔叶挥发油具有一定的抗菌活性,对大肠埃希菌的抑制效果最为显著,其次依次为金黄色葡萄球菌、枯草芽孢和假丝酵母,有关朱桔叶挥发油活性机制,还有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Fisher K, Phillips C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food; is citrus the answer[J]. Trends in Food Science & Technology, 2008, 19 (3):156.

[2] Lesueur D, De-Rocca-Serra D, Bighelli A, et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Acronychia pedunculata* (L.) Miq from Vietnam[J]. Nat Prod Res, 2008, 22(5):393.

[3] 李巧巧,雷激,唐洁,等. 柑橘精油的抑菌性及D-柠檬烯在面包的初步应用研究[J]. 食品工业, 2012, 33

(1):21.

[4] 赵文红,白卫东,白思韵. 柑桔类精油提取技术的研究进展[J]. 农产品加工学刊, 2009(5):17.

[5] 赵文红,蔡培钿,白卫东,等. 冷磨法提取柑橘精油工艺研究[J]. 广东农业科学, 2010(8):149.

[6] 张建立,李延升. 超临界CO₂萃取柑橘精油的工艺研究[J]. 广州化工, 2011, 39 (10):85.

[7] 席萍,曾惠芳,詹若挺,等. 山桔叶挥发油化学成分分析[J]. 中药材, 2000, 23(6):335.

[8] 周葆华,操璟璟. 植物资源的环境效应——四季桔叶挥发油抑菌效果实验[J]. 自然资源学报, 2008, 23 (4):737.

[9] 梁恒兴,宝福凯,董晓萍,等. 鹅不食草中具有抗菌活性的三萜类成分[J]. 云南植物研究, 2007, 29:479.

[10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard-seventh edition [R]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.

[11] 刘易鑫,颜日明,鲁顺保,等. 突托蜡梅叶中挥发油成分及其抑菌活性研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36 (22):3149.

[12] 郭辉,钱俊青,许雅颖. 正交设计优选超声辅助提取柑桔叶精油工艺研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2010, 32(1):24.

[13] 王艳芝,郑甲信,王海玲,等. β-榄香烯固体脂质纳米粒 Zeta 电位影响因素检测[J]. 郑州大学学报:医学版, 2010, 45 (1):137.

[14] 王艳芝,周婕,郑甲信,等. 叶酸受体靶向β-榄香烯固体脂质纳米粒的制备及其大鼠体内分布[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(12):920.

[15] Zeng Z, Zhou G, Wang X, et al. Preparation, characterization and relative bioavailability of oral elemene o/w micro emulsion[J]. Int J Nanomedicine, 2010, 5:567.

[16] 董金华,胡国宝,胡皆汉. 温莪术挥发油中榄香烯的分离鉴定及抗癌活性[J]. 中草药, 1997, 28(1):13.

[17] 刘晓宇,陈旭冰,陈光勇. β-石竹烯及其衍生物的生物活性与合成研究进展[J]. 林产化学与工业, 2012, 32 (1):105.

[责任编辑 邹晓翠]