

豆腐柴叶挥发油化学成分及其抗氧化和抑菌作用研究

吴永祥, 杨庆, 李林, 卞国勇, 胡高峰, 毕淑峰*

黄山学院生命与环境科学学院, 黄山 245041

摘要: 采用水蒸气蒸馏法提取豆腐柴叶的挥发油, 通过气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 对挥发油进行化学成分分析, 并以还原能力、对 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 和 2, 2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS) 自由基清除能力及抑制微生物生长为评价指标, 研究其体外抗氧化和抑菌作用。结果表明, 从豆腐柴叶挥发油中共分离鉴定出化合物有 26 种, 占挥发油总量的 98.10%, 主要成分有丙酸乙酯 (33.70%)、2, 2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚) (9.38%)、叶绿醇 (7.91%)、 α -桉叶醇 (3.75%)、角鲨烯 (3.39%) 和棕榈酸 (3.34%) 等。豆腐柴叶挥发油具有较强的抗氧化活性, 其还原能力和对 DPPH、ABTS 自由基清除能力随其浓度的增加而增强; 对 DPPH、ABTS 自由基清除作用的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 3.396 mg/mL 和 0.761 mg/mL。豆腐柴叶挥发油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌均有显著抑制作用, 挥发油的质量浓度与对 4 种受试菌的抑制作用呈量效关系, 其最低抑制浓度 (MIC) 均为 1.125 mg/mL。故豆腐柴叶挥发油具有较好的抗氧化和抑菌特性, 为其在食品和药品方面的研究与应用提供了理论基础。

关键词: 豆腐柴叶; 挥发油; 化学成分; 抗氧化; 抑菌

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.1.008

Chemical Constituents, Antioxidant and Antimicrobial Effects of Volatile Oil from *Premna microphylla* Leaves

WU Yong-xiang, YANG Qing, LI Lin, BIAN Guo-yong, HU Gao-feng, BI Shu-feng*

College of Life and Environment Science, Huangshan University, Huangshan 245041, China

Abstract: The volatile oil from *Premna microphylla* leaves was extracted by water-steam distillation and analyzed by GC-MS. The antioxidant activity of volatile oil was examined using various antioxidant assays, such as reducing power, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate (ABTS) free radical scavenging assays. The volatile oil was also evaluated for antimicrobial activity by paper disc diffusion method. The results showed that twenty-six compounds representing 98.10% of the total constituents were identified. The major constituents of the volatile oil were propanoic acid ethyl ester (33.70%), 2, 2'-methylenebis(6-tert-butyl-4-methylphenol) (9.38%), phytol (7.91%), α -eudesmol (3.75%), squalene (3.39%), and palmitic acid (3.34%). The volatile oil exhibited strong antioxidant capacities such as reducing power, DPPH and ABTS free radical scavenging abilities. When the scavenging rate against DPPH and ABTS free radicals was 50%, the concentrations of volatile oil were 3.396 mg/mL and 0.761 mg/mL, respectively. The volatile oil also had the inhibition effects on *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* and *P. aeruginosa* in a dose-dependent manner. Its minimum inhibitory concentration (MIC) against four common bacterial strains was 1.125 mg/mL. In conclusion, the volatile oil from *P. microphylla* leaves showed remarkable antioxidant and antimicrobial activities, and this research provided theoretical basis for the further study and application of volatile oil in food and medicine products.

Key words: *Premna microphylla* leaves; volatile oil; chemical constituents; antioxidant; antimicrobial

收稿日期: 2017-09-15 接受日期: 2017-11-02

基金项目: 安徽省高校自然科学研究重点项目 (KJ2017A398); 安徽省留学回国人员创新项目择优资助计划重点项目 (2017srst1); 博士人才引进启动基金 (2016xkj q004); 安徽省大学生创新创业训练计划 (AH201610375055)

* 通信作者 E-mail: bsf@hsu.edu.cn

豆腐柴 (*Premna microphylla* Turcz) 又称腐婢、观音柴、凉粉叶等, 为马鞭科豆腐柴属的多年生落叶灌木, 广泛分布于我国长江流域以南的华东、华南、华中等地区, 蕴藏量丰富^[1]。豆腐柴叶安全无毒, 营养价值高, 富含果胶、纤维素、蛋白质、V_C、胡萝卜素、矿物质等成分, 必需氨基酸组分齐全, 是我国优

质的绿色天然健康食品^[2]。豆腐柴叶作为药食两用植物,具有很高的药用价值,有清热解毒、消毒止血等功效^[3,4]。豆腐柴叶还含有黄酮及其苷类、三萜类及其苷类、多糖、酚类等生物活性物质^[5-8],具有显著的抗氧化、抗炎和增强机体免疫等作用^[9-11]。目前国内外学者对豆腐柴叶的研究主要集中在其果胶的提取^[1,4,10]和黄酮的分离纯化^[5,9],对豆腐柴叶挥发油的提取与化学成分分析的研究仍然缺乏,比较全面的研究其抗氧化和抑菌性能尚未见报道。

本研究拟以豆腐柴叶为原料,采用水蒸气蒸馏法提取挥发油,通过 GC-MS 对挥发油进行化学成分分析,研究挥发油的还原能力、对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除能力及抑菌效果,为豆腐柴叶的综合利用与开发提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

Agilent HP7890-5975C 气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司);SpectraMax-190 型全波长酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);FA2004N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司);EV341 型旋转蒸发仪(北京莱伯泰科仪器有限公司);挥发油提取器(郑州中天实验仪器有限公司);BHC-1300IIB2 型生物安全柜(苏州安泰技术有限公司);SPT-P250A 型智能生化培养箱(安徽佳创医疗器械有限公司);YM50Z 型不锈钢立式电热蒸汽消毒器(上海三申医疗器械有限公司)。

丙酮、无水乙醚、三氯乙酸、三氯化铁、氯化钠、无水硫酸钠、铁氰化钾、无水乙醇等均为国产分析纯,购自于南京化学试剂有限公司;蛋白胨、牛肉膏、琼脂等生物试剂,购自于北京陆桥技术有限责任公司;DPPH、ABTS、维生素 C (Vc)、槲皮素(querce-tin)、对羟基苯甲酸丙酯(propylparaben, PP),购自于美国 Sigma 公司。

1.2 实验材料

豆腐柴叶于 2016 年 10 月采自安徽省黄山市,由黄山学院生命与环境科学学院潘健博士鉴定为豆腐柴(*Premna microphylla* Turcz.)叶。大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*),由武汉大学微生物保藏中心提供。

2 实验方法

2.1 挥发油的提取

称取新鲜豆腐柴叶 100.0 g 置于烧瓶中,加水 350 mL,用挥发油提取器按水蒸气蒸馏法提取 6 h,收集无水乙醚层,挥发无水乙醚溶剂,加入无水硫酸钠进行干燥,得到具有浓郁香味淡黄色透明油状物。共提取 5 组样品,得率为 1.159%。取适量挥发油用正己烷稀释,待 GC-MS 检测,同时部分挥发油 4 °C 密封保存,用于抗氧化和抑菌活性测试。

2.2 挥发油化学组分的 GC-MS 分析

色谱条件:选用 HP-5 MS 弹性石英毛细光柱(0.25 μm , 30 m \times 0.25 mm);载气为高纯氦气,载气流速为 1.0 mL/min;分流比为 40:1,进样量为 1.0 μL ;进样口温度为 280 °C;色谱柱初始温度为 60 °C,保持 3 min,以 5 °C/min 升至 280 °C,保持 10 min。

质谱条件:离子源温度 230 °C,电离方式为 EI,电子能量为 70 eV,四级杆温度为 150 °C;质量扫描范围为 35 ~ 450 u;溶剂延迟时间 3 min;采用 NIST08 标准谱库进行检索。

2.3 抗氧化活性的测定

2.3.1 还原能力的测定

参考文献^[12]略作改进:取 100 μL 不同浓度的豆腐柴叶挥发油(0.0、0.9、1.8、2.7、3.6、4.5 mg/mL),与 100 μL pH 6.6 磷酸缓冲溶液、100 μL 1% 铁氰化钾溶液混合,50 °C 水浴锅反应 20 min,冷却后加入 100 μL 10% 三氯乙酸,3,000 rpm 离心 15 min,取上澄清液 90 μL ,加入 100 μL 蒸馏水及 10 μL 0.1% 三氯化铁,静置 10 min 后于酶标仪 700 nm 波长处测定吸光值。同时将铁氰化钾溶液替换成 100 μL 蒸馏水作为空白对照组。以 V_c 为阳性对照,重复 3 次,取平均值。

2.3.2 清除 DPPH 自由基能力的测定

参考文献^[13,14]修改如下:取 100 μL 不同浓度的豆腐柴叶挥发油(0.0、0.9、1.8、2.7、3.6、4.5 mg/mL),分别加入 50 μL 0.2 mmol/L DPPH-乙醇溶液,混匀,避光反应 10 min,于 517 nm 处测定样品组吸光(A_s)。样品对照组为挥发油与 99.9% 乙醇混合测定的吸光值(A_{SB}),空白组为丙酮与 DPPH 溶液混合测定吸光值(A_C),空白对照组为丙酮与 99.9% 乙醇混合测定吸光值(A_{CB})。以 Vc 为阳性对照,每样重复 3 次,取平均值,并按下列公式计算 DPPH 自由

基清除率:

$$I\% = \left(1 - \frac{A_S - A_{SB}}{A_C - A_{CB}}\right) \times 100$$

式中: I —DPPH 自由基清除率,%; A_S —样品组吸光值; A_{SB} —样品对照组吸光值; A_C —空白组吸光值; A_{CB} —空白对照组吸光值。

2.3.3 清除 ABTS 自由基能力的测定

参考文献^[15,16]的方法,配置 ABTS 混合溶液,由 7 mmol/L 的 ABTS 溶液和 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液避光反应 16 h。取 50 μ L 不同浓度的豆腐柴叶挥发油(0.0、0.9、1.8、2.7、3.6、4.5 mg/mL),分别加入 100 μ L ABTS 混合溶液,混匀,避光反应 5 min,于 734 nm 处测定样品组吸光值(A_S)。样品对照组为挥发油与 99.9% 乙醇混合测定的吸光值(A_{SB}),空白组为丙酮与 ABTS 溶液混合测定的吸光值(A_C),空白对照组为丙酮与 99.9% 的乙醇混合测定的吸光值(A_{CB})。以槲皮素为阳性对照,每样重复 3 次,取平均值,并按下列公式计算 ABTS 自由基清除率:

$$I\% = \left(1 - \frac{A_S - A_{SB}}{A_C - A_{CB}}\right) \times 100$$

式中: I —ABTS 自由基清除率,%; A_S —样品组吸光值; A_{SB} —样品对照组吸光值; A_C —空白组吸光值; A_{CB} —空白对照组吸光值。

2.4 抑菌活性的测定

2.4.1 菌种活化及菌悬液制备

将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌接种到试管培养基斜面进行活化,于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 24 h。长出菌落后,在无菌操作台中各挑取已活化好的菌种接种到无菌生理盐水中,配置各菌悬液浓度约为 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL^[17,18]。

2.4.2 抑菌圈法测定抑菌活性

在无菌操作台中将熔化并灭菌的培养基倒入已灭菌的培养皿中,冷却凝固后,加入菌悬液 100 μ L,用涂布棒涂布均匀。用移液枪于无菌直径 6 mm 的滤纸片中央加入 10 μ L 挥发油,以丙酮为空白对照,以对羟基苯甲酸丙酯(propylparaben, PP)为阳性对照,37 $^{\circ}$ C 倒置培养 24 h 后测量抑菌圈直径,结果重复 3 次,取平均值。

2.4.3 最低抑菌浓度的测定

采用二倍稀释法将豆腐柴叶挥发油配置成系列梯度浓度为:1.125、2.25、4.5 mg/mL 的溶液。然后参考文献^[19]的方法,观察各平板抑菌圈的有无,首次出现抑菌圈所对应的豆腐柴叶挥发油浓度即为最

低抑菌浓度。

2.5 统计学处理

所得数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,运用 SPSS 18.0 软件对实验结果进行统计分析(One-way ANOVA),利用邓肯式多重比较对差异显著性进行比较分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

3 结果与分析

3.1 豆腐柴叶挥发油的化学成分分析

豆腐柴叶挥发油化学成分 GC-MS 分析的总离子流图见图 1。通过 GC-MS 分析,各组分峰用 NIST08 质谱库进行检索,从豆腐柴叶挥发油中共鉴定出 26 个成分,占挥发油总量的 98.10%。鉴定匹配度高于 80% 的化学成分,采用 GC 峰面积归一化法定量分析,计算出各成分的相对含量,如表 1 所示。挥发油含有酯、醇、酚、酮、烯炔、酸类等,以酯、醇、酚、酮为主,其中含有 4 种酯类化合物(37.58%)、6 种醇类化合物(19.53%)、3 种酚类化合物(13.95%)及 6 种酮类化合物(13.83%)。挥发油中含量较高成分有丙酸乙酯(33.70%)、2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚)(9.38%)、叶绿醇(7.91%)、 α -桉叶醇(3.75%)、角鲨烯(3.39%)、棕榈酸(3.34%)等。

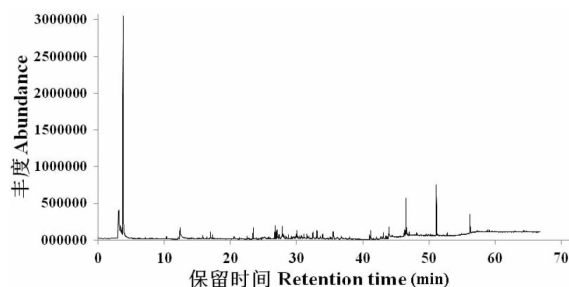


图 1 豆腐柴叶挥发油的 GC-MS 总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of the volatile oil from *P. microphylla* leaves

3.2 豆腐柴叶挥发油的抗氧化作用

3.2.1 豆腐柴叶挥发油的还原能力

由表 2 可知,豆腐柴叶挥发油具有较好的还原能力,在 0.9 ~ 4.5 mg/mL 内,随着挥发油浓度的增加,其还原能力不断增强,且呈明显的剂量依赖关系。当挥发油浓度为 4.5 mg/mL 时,还原能力吸光值为 0.35 ± 0.02 ,但还原能力低于 0.05 mg/mL 的 Vc,其吸光值为 0.54 ± 0.01 。

表1 豆腐柴叶挥发油的化学成分及其相对含量

Table 1 Chemical constituents and relative contents of volatile oil from *P. microphylla* leaves

| 序号 No. | 保留时间 Retention time (min) | 化合物 Compounds | 分子式 Formula | 分子量 Molecule mass | 相对含量 Relative contents (%) |
|-----------|---------------------------------|---|--|-------------------------|----------------------------------|
| 1 | 3.3722 | (3-甲基环氧乙基-2-基) 甲醇 (3-Methyloxiran-2-yl) methanol | C ₄ H ₈ O ₂ | 88.11 | 1.12 |
| 2 | 3.7458 | 丙酸乙酯 (Propanoic acid ethyl ester) | C ₅ H ₁₀ O ₂ | 102.13 | 33.70 |
| 3 | 12.3693 | 1-辛烯-3-醇 (1-Octen-3-ol) | C ₈ H ₁₆ O | 128.21 | 3.22 |
| 4 | 16.9716 | 芳樟醇 (Linalool) | C ₁₀ H ₁₈ O | 154.25 | 1.86 |
| 5 | 23.4315 | α-紫罗酮 (α-Ionone) | C ₁₃ H ₂₀ O | 192.30 | 2.37 |
| 6 | 26.6381 | α-萜澄茄烯 (α-Cubebene) | C ₁₅ H ₂₄ | 204.35 | 1.49 |
| 7 | 26.7885 | β-大马烯酮 (β-Damascenone) | C ₁₃ H ₁₈ O | 190.28 | 2.96 |
| 8 | 27.0376 | 2,3-二氢-3,4,7-三甲基-1H-茛酮 (1H-Inden-1-one, 2,3-dihydro-3,4,7-trimethyl-) | C ₁₂ H ₁₄ O | 174.00 | 2.86 |
| 9 | 27.3645 | 丙泊酚 (Propofol) | C ₁₂ H ₁₈ O | 178.27 | 1.78 |
| 10 | 27.8159 | 3-乙基邻二甲苯 (Benzene, 1-ethyl-2,3-dimethyl-) | C ₁₀ H ₁₄ | 134.22 | 2.80 |
| 11 | 29.9536 | β-紫罗酮 (β-Ionone) | C ₁₃ H ₂₀ O | 192.30 | 1.27 |
| 12 | 30.0729 | 4-[2,2,6-三甲基-7-氧杂二环[4.1.0]庚-1-基]-3-丁烯-2-酮 (4-[2,2,6-Trimethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-1-yl]-3-Buten-2-one) | C ₁₃ H ₂₀ O ₂ | 208.30 | 2.12 |
| 13 | 31.1366 | (-)-β-萜澄茄烯 ((-)-β-Cadinene) | C ₁₅ H ₂₄ | 204.35 | 0.86 |
| 14 | 31.5621 | 二氢猕猴桃内酯 (Dihydroactinidiolide) | C ₁₁ H ₁₆ O ₂ | 180.24 | 1.38 |
| 15 | 32.4597 | 反式-橙花叔醇 (Nerolidol) | C ₁₅ H ₂₆ O | 222.37 | 1.67 |
| 16 | 33.0823 | 氧化石竹烯 (Caryophyllene oxide) | C ₁₅ H ₂₄ O | 220.35 | 1.73 |
| 17 | 33.9489 | 环氧化蛇麻烯 II (Humulene epoxide II) | C ₁₅ H ₂₄ O | 220.35 | 1.41 |
| 18 | 35.5418 | α-桉叶醇 (α-Eudesmol) | C ₁₅ H ₂₆ O | 222.37 | 3.75 |
| 19 | 41.0417 | 蒎烷 (cis-Pinane) | C ₁₀ H ₁₈ | 138.25 | 0.99 |
| 20 | 41.2026 | 6,10,14-三甲基-2-十五烷酮 (2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-) | C ₁₈ H ₃₆ O | 268.48 | 2.25 |
| 21 | 43.112 | 棕榈酸甲酯 (Methyl hexadecanoate) | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | 270.45 | 1.37 |
| 22 | 43.9577 | 棕榈酸 (Palmitic acid) | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 256.42 | 3.34 |
| 23 | 46.3756 | 亚麻酸甲酯 (Methyl linolenate) | C ₁₉ H ₃₂ O ₂ | 292.46 | 1.13 |
| 24 | 46.5417 | 叶绿醇 (Phytol) | C ₂₀ H ₄₀ O | 296.53 | 7.91 |
| 25 | 51.1544 | 2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚) (2,2'-Methylenebis (6-tert-butyl-4-methylphenol)) | C ₂₃ H ₃₂ O ₂ | 340.50 | 9.38 |
| 26 | 56.2444 | 角鲨烯 (Squalene) | C ₃₀ H ₅₀ | 410.72 | 3.39 |

表2 豆腐柴叶挥发油的还原能力

Table 2 Reducing power of the volatile oil from *P. microphylla* leaves

| 样品 Samples | 浓度 Concentration (mg/mL) | 吸光值 Absorbance (700nm) |
|------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 挥发油 Volatile oil | 0.9 | 0.15 ± 0.01 ^e |
| | 1.8 | 0.22 ± 0.02 ^d |
| | 2.7 | 0.27 ± 0.01 ^e |

续表 2(Continued Tab. 2)

| 样品 Samples | 浓度 Concentration (mg/mL) | 吸光值 Absorbance (700nm) |
|---------------|-----------------------------|---------------------------|
| Vc | 3.6 | 0.33 ± 0.03 ^b |
| | 4.5 | 0.35 ± 0.02 ^b |
| | 0.05 | 0.54 ± 0.01 ^a |

注:同列不同字母表示在统计学上具有显著差异($P < 0.05$)。

Note: Different letters in the same column indicated significant difference ($P < 0.05$).

3.2.2 豆腐柴叶挥发油对 DPPH 自由基的清除作用

由表 3 可知,豆腐柴叶挥发油对 DPPH 自由基清除能力表现出明显的剂量效应,即随着挥发油浓度的增加,DPPH 自由基清除能力随之增强,且差异显著($P < 0.05$)。当挥发油浓度为 4.5 mg/mL 时,对 DPPH 自由基清除率为 65.63%。挥发油质量浓

度(X)与清除率(Y)间的回归方程为: $Y = 14.951X - 0.7722$ ($R^2 = 0.9969$);Vc 质量浓度(X)与清除率(Y)间的回归方程为: $Y = 1229.2X - 0.2571$ ($R^2 = 0.9997$)。挥发油和 Vc 对 DPPH 自由基清除作用的 IC_{50} 值分别为 3.396 mg/mL 和 0.041 mg/mL。

表 3 豆腐柴叶挥发油对 DPPH 自由基的清除作用

Table 3 DPPH radical scavenging ability of the volatile oil from *P. microphylla* leaves

| 样品 Samples | 浓度 Concentration (mg/mL) | 清除率 Scavenging ability (%) | 线性回归方程 Linear regression equation | IC_{50} (mg/mL) |
|------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| 挥发油 Volatile oil | 0.9 | 10.43 ± 1.90 ^e | $Y = 14.951X - 0.7722$ | 3.396 |
| | 1.8 | 26.68 ± 0.86 ^d | | |
| | 2.7 | 41.31 ± 1.30 ^c | | |
| | 3.6 | 53.15 ± 0.09 ^b | | |
| | 4.5 | 65.63 ± 0.12 ^a | | |
| Vc | - | - | $Y = 1229.2X - 0.2571$ | 0.041 |

注:同列不同字母表示在统计学上具有显著差异($P < 0.05$)。

Note: Different letters in the same column indicated significant difference ($P < 0.05$).

3.2.3 豆腐柴叶挥发油对 ABTS 自由基的清除作用

豆腐柴叶挥发油和阳性对照槲皮素清除 ABTS 自由基能力如表 4 所示。挥发油具有显著的 ABTS 自由基清除能力,在 0.9 ~ 4.5 mg/mL 内,挥发油对 ABTS 自由基清除率分别为 55.78%、68.85%、78.62%、90.39%、91.61%。挥发油对 ABTS 自由基清除率随着挥发油质量浓度的增加,清除作用随之增强。挥发油和槲皮素对 ABTS 自由基的清除能力与质量浓度呈显著正相关:挥发油质量浓度(X)与清除率(Y)间的回归方程为, $Y = 63.147X + 1.949$ ($R^2 = 0.9916$);槲皮素质量浓度(X)与清除率(Y)间的回归方程为, $Y = 4681.7X + 0.507$ ($R^2 = 0.9949$)。挥发油和槲皮素对 ABTS 自由基清除作用的 IC_{50} 值分别为 0.761 mg/mL 和 0.011 mg/mL。

3.3 豆腐柴叶挥发油的抑菌作用

由表 5 可知,豆腐柴叶挥发油对大肠杆菌、金黄

色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌均有显著的抑制效果。当挥发油质量浓度为 4.5 mg/mL 时,对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌的最大抑菌圈直径分别为(10.75 ± 0.25)、(11.50 ± 0.50)、(12.00 ± 1.00)、(13.50 ± 0.50) mm;阳性对照 PP(1 mg/mL)浓度为 1.0 mg/mL 时,最大抑菌圈直径分别为(12.00 ± 1.00)、(12.25 ± 0.25)、(11.75 ± 0.25)、(13.50 ± 0.50) mm。表明豆腐柴叶挥发油和对羟基苯甲酸丙酯对 4 种供试的革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌都有明显的抑制作用。

为了定量研究挥发油对食品种常用菌的抑制活性,本实验进一步测定了其最小抑菌浓度(MIC)。由表 5 可知,挥发油在一定质量浓度范围内对 4 种菌的抑制效果呈浓度依赖性增大。豆腐柴叶挥发油对 4 种菌的最低抑制浓度均为 1.125 mg/mL,其中抑制强度依次为:绿脓杆菌 > 枯草芽孢杆菌 > 金黄色葡萄球菌 > 大肠杆菌。

表4 豆腐柴叶挥发油对 ABTS 自由基的清除作用

Table 4 ABTS radical scavenging ability of the volatile oil from *P. microphylla* leaves

| 样品 Samples | 浓度 Concentration (mg/mL) | 清除率 Scavenging ability (%) | 线性回归方程 Linear regression equation | IC ₅₀ (mg/mL) |
|------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| 挥发油 Volatile oil | 0.9 | 55.78 ± 2.48d | Y = 63.147X + 1.949 | 0.761 |
| | 1.8 | 68.85 ± 1.13c | | |
| | 2.7 | 78.62 ± 0.02b | | |
| | 3.6 | 90.39 ± 2.27a | | |
| | 4.5 | 91.61 ± 1.79a | | |
| 槲皮素 Quercetin | - | - | Y = 4681.7X + 0.507 | 0.011 |

注: 同列不同字母表示在统计学上具有显著差异 ($P < 0.05$)。

Note: Different letters in the same column indicated significant difference ($P < 0.05$).

表5 豆腐柴叶挥发油对4种菌的抑菌圈直径

Table 5 Diameter of inhibitory zone of the volatile oil from *P. microphylla* leaves against four common bacterial strains

| 样品 Samples (mg/mL) | 抑菌圈直径 Inhibition zone diameters (mm) | | | |
|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | 大肠杆菌 <i>E. coli</i> | 金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> | 枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> | 绿脓杆菌 <i>P. aeruginosa</i> |
| CK | - | - | - | - |
| 挥发油 Volatile oil | 1.125 | 7.50 ± 0.50 ^b | 8.75 ± 0.75 ^b | 9.25 ± 0.25 ^c |
| | 2.25 | 10.50 ± 0.50 ^a | 10.00 ± 1.00 ^{ab} | 11.50 ± 0.50 ^b |
| | 4.5 | 10.75 ± 0.25 ^a | 11.50 ± 0.50 ^a | 12.00 ± 1.00 ^a |
| PP | 1.0 | 12.00 ± 1.00 ^a | 12.25 ± 0.25 ^a | 11.75 ± 0.25 ^{ab} |

注: 同列不同字母表示在统计学上具有显著差异 ($P < 0.05$)。

Note: Different letters in the same column indicated significant difference ($P < 0.05$).

4 讨论与结论

采用水蒸气蒸馏法提取豆腐柴叶的挥发油, 通过 GC-MS 对挥发油化学成分进行分离鉴定, 共检测出 28 个色谱峰, 初步鉴定了 26 个化合物, 被鉴定化合物相对含量占挥发油总量的 98.10%。豆腐柴叶挥发油化合物种类较少, 以酯、醇、酚、酮、烯炔为主。豆腐柴叶挥发油中含量较高成分有丙酸乙酯 (33.70%)、2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚) (9.38%)、叶绿醇 (7.91%)、 α -桉叶醇 (3.75%)、角鲨烯 (3.39%)、棕榈酸 (3.34%) 等。Zhang 等^[11] 分析了豆腐柴地上部分挥发油的化学成分, 鉴定出 56 个化合物, 以布卢门醇 C、 β -柏木烯、柠檬烯、 α -愈创木烯等化合物为主。可见豆腐柴叶挥发油化学成分与茎、花挥发油存在较大差异。豆腐柴叶挥发油中含有多种具有应用价值的化学成分, 如丙酸乙酯是豆腐柴叶挥发油独特香味的主要成分, 可用作香料或食品添加剂^[20]; 叶绿醇是合成维生素 K 及维生素 E 的前体物质, 叶绿醇在体内的氧化代谢不仅能为

组织提供能量, 还可以作为信号分子参与糖脂代谢和脂肪细胞分化的调控^[21]; 角鲨烯是由 6 个异戊二烯连接而成的不饱和三萜类化合物, 具有调控胆固醇的代谢、抗氧化、抗肿瘤、解毒、抗辐射和抑制微生物生长等生物活性^[22]; 棕榈酸是一种饱和高级脂肪酸, 在人体血液中含有较高, 对人体具有重要的平衡调节作用^[23]。因此, 本研究结果可为豆腐柴叶的质量标准制定提供科学依据, 便于后续对该植物资源的综合开发利用。

豆腐柴叶挥发油具有较强的还原能力和显著的 DPPH、ABTS 自由基清除能力, 抗氧化能力与挥发油质量浓度呈正相关。挥发油对 DPPH、ABTS 自由基清除作用的 IC₅₀ 值分别为 3.396 mg/mL 和 0.761 mg/mL。抑菌实验结果显示, 豆腐柴叶挥发油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌均具有显著的抑菌效果, 其中抑制强度依次为: 绿脓杆菌 > 枯草芽孢杆菌 > 金黄色葡萄球菌 > 大肠杆菌。挥发油在一定质量浓度范围内对 4 种菌的抑制效果呈浓度依赖性增大, 对 4 种菌的最低抑制浓度

均为 1.125 mg/mL。挥发油中含量较高的 2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚)和角鲨烯等酚类、烯炔类成分,能够有效的清除自由基和显著的抑制微生物生长^[22,24]。豆腐柴叶挥发油较好的抗氧化和抑菌活性与酚类、烯炔化合物以及成分间的相互作用相关,但未知的是哪种或哪几种成分发挥主要作用,需进一步分离纯化,以筛选出更加明确有效的活性成分。

综上所述,豆腐柴叶挥发油具有良好的抗氧化和抑菌活性,高含量的酚类、烯炔类等活性成分是挥发油具有抗氧化和抑菌作用的内在原因。本研究表明豆腐柴叶挥发油有一定的药学研究价值和作为食品天然防腐剂和抗菌剂的潜能。

参考文献

- 1 Wang YL (王媛莉), Li MQ (李梅青), Dong M (董明), et al. Ultrasonic-aided ammonium oxalate extraction of pectin from *Premna microphylla* Turcz leaves[J]. *Food Sci* (食品科学), 2011, 32:88-91.
- 2 Luo DS (罗东升), Yu P (余萍), Kan JQ (阚建全). Optimization of processing conditions for improved quality of *Premna microphylla* Turcz leaf tofu[J]. *Food Sci* (食品科学), 2013, 34:313-317.
- 3 Huo YR (霍艳荣), Gao QX (高前欣). Forming factors of leaf gel in *Premna microphylla* Turcz[J]. *Food Sci Technol* (食品科技), 2011, 36:92-94.
- 4 Ning HF (宁海凤), Tong QY (童群义). Study on extraction of pectin from leaves of *Premna microphylla* Turcz in the presence of mixed acids[J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2011, 32:222-228.
- 5 Lin YH (林颖华), Wu XL (吴晓玲), Peng RZ (彭荣珍), et al. Ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from *Premna microphylla* Turcz. by response surface methodology[J]. *China Med Her* (中国医药导报), 2013, 10:116-118.
- 6 Zhong CG, Wang DY. Four new isoflavones from *Premna microphylla*[J]. *Indian J Heterocyc Chem*, 2002, 12:143-148.
- 7 Zong SH (宗沈虹). Preliminary chemical analysis of *Premna microphylla* from the mountain areas in southern Anhui[J]. *Chin Wild Plant Res* (中国野生植物资源), 2013, 32:42-44.
- 8 Hu ZX (胡正喜), Xue YB (薛永波), Yao GM (姚广民), et al. Chemical constituents from the leaves of *Premna microphylla* Turcz[J]. *J Chin Pharm Sci* (中国药学), 2013, 22:431-434.
- 9 Hu Y (胡予), Li XS (李旭升), Ma N (马楠), et al. Extraction, purification and antioxidant activity of total fla-

- vonoids from *Premna microphylla* Turcz leaves[J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2016, 37:1-10.
- 10 Tao AL (陶阿丽), Feng XH (冯学花), Yin W (尹伟), et al. Optimization of microwave-assisted extraction of pectin from *Premna Microphylla* by response surface method and its antioxidant activity[J]. *J Shantou Univ* (汕头大学学报-自科版), 2014, 29:53-60.
- 11 Zhang HY, Gao Y, Lai PX. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of essential oil from *Premna microphylla* Turczaninow[J]. *Molecules*, 2017, 22:381-391.
- 12 Zeng LB, Zhang ZR, Luo ZH, et al. Antioxidant activity and chemical constituents of essential oil and extracts of *Rhizoma Homalomenae*[J]. *Food Chem*, 2011, 125:456-463.
- 13 Zhang YB (张元波), Zhang M (张敏), Cheng QB (程启斌), et al. Relationship between HPLC fingerprint chromatogram and antioxidant activity of forsythia suspense leaves[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29:629-634.
- 14 Zhang QL (张庆琳), Gao HQ (高慧琴), Ling LJ (凌丽君), et al. Crude polysaccharides extracted from three characteristic plants in Qinghai province and their activities[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29:34-39.
- 15 Zhao XL (赵秀玲), Liu YJ (刘永杰). Chemical constituents antioxidant activities *in vitro* of volatile oil from *Nostoc commune*[J]. *J Yunnan Univ* (云南大学学报-自然科学版), 2017, 39:454-462.
- 16 Zhu Y (朱玉), Wen FL (文飞龙), Qi YC (齐应才), et al. Chemical constituents of volatile oil of *Ligustrum quihoui* fruits and their antioxidant activity[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:553-557.
- 17 Zhang TT (张婷婷), Guo XL (郭夏丽), Huang XY (黄学勇), et al. GC-MS analysis and antioxidant and antimicrobial properties of volatile oil from *Flos Magnoliae*[J]. *Food Sci* (食品科学), 2016, 37:144-150.
- 18 Wilkinson JM, Hipwell M, Ryan T, et al. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: antibacterial and antifungal activity[J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51:76-81.
- 19 Wang TY (王桃云), Jiang WN (蒋伟娜), Hu CY (胡翠英), et al. Research on extraction, chemical composition and bacterial inhibition activity of volatile oils from *Brassica Chinensis*[J]. *J Chin Cereals Oils Assoc* (中国粮油学报), 2017, 32:81-87.
- 20 Sun CL (孙崇鲁), Tang XL (汤小蕾), Chen L (陈磊). Analysis of chemical constituents of volatile oil from *Zelkova schneideriana* leaves by GC-MS[J]. *Chin J Exp Med* (中国实验方剂学杂志), 2015, 21:53-56.