

三种山苍子精油化学成分及抑菌效果差异分析

王雪,梁晓洁,高暝,吴立文,汪阳东,陈益存*

中国林业科学研究院亚热带林业研究所,杭州 311400

摘要:为探究山苍子不同种之间化学成分及抑菌效果的差异,本研究通过生长速率法和抑菌圈法测定三种山苍子精油对尖孢镰刀菌、大肠杆菌和李斯特菌的抑菌活性,同时对三种山苍子精油进行 GC-MS 挥发性成分鉴定,进一步对精油主要化学成分与抑菌率进行相关性分析。结果表明,山鸡椒果实精油含量最高且对尖孢镰刀菌、大肠杆菌和李斯特菌的抑菌效果优于毛叶木姜子和毛山鸡椒;三种山苍子精油抑菌效率均与柠檬醛、芳樟醇的含量分别呈现显著正相关,提示主要成分柠檬醛含量适合作为山苍子优良精油筛选的可靠指标。研究结果为山苍子精油抗菌物质的开发利用提供了理论依据。

关键词:山苍子;精油;抑菌活性;精油成分鉴定;相关性分析

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)11-1847-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.11.001

Analysis of chemical constituents and antimicrobial activity of essential oils in three species from May Chang tree

WANG Xue, LIANG Xiao-jie, GAO Ming, WU Li-wen, WANG Yang-dong, CHEN Yi-cun *

Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Hangzhou 311400, China

Abstract: May Chang tree contains several species, including *Litsea cubeba* (Lour.) Pers., *Litsea mollis* Hemsl. and *Litsea cubeba* var. *formosana*, in Lauraceae. As important aromatic tree species, they have wide application value in traditional Chinese medicine, natural spices and commodity products. In order to explore the inhibitory effects of different species of May Chang trees, five families of *L. cubeba*, *L. mollis* and *L. cubeba* var. *formosana*, respectively, were selected as biological replicates for analysis. The inhibition rate of essential oil against *Fusarium oxysporum* f. sp. *fordii* 1 was determined by growth rate method, and the antibacterial activities of essential oils against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* was valued using the agar disc diffusion method. Meanwhile, the gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) was used to detect the chemical components of essential oils. Moreover, the significant difference analysis among the chemical components and its correlation with inhibition rate were conducted by data processing system (DPS). The results showed that the average content of essential oil in *L. cubeba* was 6.13%, which was significantly higher than those of *L. mollis* and *L. cubeba* var. *formosana*. The average EC₅₀ value of *L. cubeba* essential oil (74.176 μL/L) was significantly lower than that in *L. cubeba* var. *formosana* and the MIC value (459.315 μL/L) was significantly lower than that in *L. mollis*. In addition, a significant positive correlation between the citral content and the essential oil content was found; the content of citral and linalool were shown a significant positive correlation with the inhibition rate, respectively. In summary, the relative content of citral in essential oil can be used as a reliable index for screening high-quality antimicrobial essential oil of May Chang trees. The data here provided a basis information for the development of botanical antimicrobial substances of May Chang trees.

Key words: May Chang tree; essential oil; antimicrobial activity; chemical component; correlation analysis

山苍子是樟科(Lauraceae)木姜子属(*Litsea*)多

种植物的统称,中国近 50 种,其中作为“芳香油料树”被管理及广泛栽培的主要有 3 种,即毛叶木姜子(*Litsea mollis*)(俗称大木姜)、山鸡椒 *Litsea cubeba* (Lour.) Pers. (俗称小木姜)及其变种毛山鸡椒(*Litsea cubeba* var. *formosana*)^[1]。山苍子主要分布

收稿日期:2019-03-07

接受日期:2019-10-22

基金项目:“十三五”国家重点研发计划“林业资源培育及高效利用技术创新”重点专项(2017YFD0600704)

* 通信作者 E-mail:chenyc@caf.ac.cn

在亚洲东部,中国、马来西亚等,大洋洲和太平洋诸岛^[2],中国主要分布在长江以南的各省份,居于海拔 500~3 200 米的疏林或林中路旁,通常是森林植被破坏后的先锋树种。作为我国重要的经济香料树种之一,山苍子果实可入药(萆澄茄),用于治疗肠胃不适和呼吸道等疾病,亦可作为食品中的添加剂以及化妆品的抗氧化和增香剂。山苍子精油主要从果实中提取,淡黄色、不溶于水、高度挥发,具强烈的芳香气味,已被国家食品药品监督管理局批准用于食品中(GB 2760-86),并被广泛用作化妆品的香料增香剂^[3]。

近年来,随着人们环保意识的增强,天然抑菌产品需求增大,也激起了国内外科学家对植物精油抗菌特性的兴趣^[4]。早在 1999 年,植物精油就被认为是合成食品添加剂和作物保护物质的安全替代品^[5]。此外,部分植物精油具有抗虫、抑制植物病原体的作用^[6]。

迄今为止,大量文献报道了山苍子精油的抗菌特性。在食品防腐方面,山苍子精油对副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)和植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)具有显著的抑菌活性^[4]。在药用和农产品保护方面,山苍子精油对黄曲霉(*Aspergillus avus*)有很强的抗菌活性,能够抑制菌丝生长和改变其超微结构,被认为是一种安全的天然植物保护剂。基于实验室小鼠和大鼠的遗传毒性试验,山苍子精油对人

类的安全性得到证实^[4]。大量研究表明,山苍子精油具有广谱抑菌性^[7],是一种不可缺少的天然抗菌材料,具有巨大的应用潜力和推广价值。但大部分研究未对山苍子进行具体物种鉴定,所研究和推广的山苍子精油是山鸡椒、毛叶木姜子和毛山鸡椒果实精油的混合产物,亟待对这三种山苍子精油品质进行评价。

为鉴定三种山苍子抑菌效果差异,我们选择了十大植物病原真菌代表种尖孢镰刀菌^[8],以及食源性疾病的常见致病菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)和李斯特菌^[9]。作为抑菌实验对象,分别检测山鸡椒、毛叶木姜子和毛山鸡椒三个物种的精油抑菌活性,同时精油化学成分检测和抑菌活性相关性分析,最终对三种山苍子精油进行评价,为山苍子遗传育种和开发利用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 植物材料

三种山苍子分别从贵州、福建、安徽、重庆、江西和浙江收集到的优良单株,经丁炳杨教授鉴定分别为山鸡椒、毛叶木姜子和毛山鸡椒。收集的优良单株的种子种植在贵州黎平的实验基地。于 2017 年 8~9 月从试验基地采集每种山苍子树龄 3 年的 5 个家系的果实作为生物学重复,通过水蒸馏法获得山苍子精油,三种山苍子信息以及果实精油含量如表 1 所示。

表 1 三种山苍子各样本果实精油信息统计表

Table 1 The information statistics list of fruit essential oil in samples of May Chang tree

样本名称 Sample name	精油含量 Essential oil content(%)	种名称 Species name	拉丁名 Latin name	采集日期 Harvest time
G3	4.48	山鸡椒	<i>L. cubeba</i>	2017.8.21
G4	6.56	山鸡椒	<i>L. cubeba</i>	2017.8.21
L6	12.05	山鸡椒	<i>L. cubeba</i>	2017.8.17
F7	2.46	山鸡椒	<i>L. cubeba</i>	2017.8.16
L29	5.09	山鸡椒	<i>L. cubeba</i>	2017.8.17
F15	3.50	毛叶木姜子	<i>L. mollis</i>	2017.8.26
C5	2.88	毛叶木姜子	<i>L. mollis</i>	2017.9.3
C3	3.78	毛叶木姜子	<i>L. mollis</i>	2017.9.3
C14	2.62	毛叶木姜子	<i>L. mollis</i>	2017.9.3
F14	1.50	毛叶木姜子	<i>L. mollis</i>	2017.8.26
F12	2.98	毛山鸡椒	<i>L. cubeba</i> var. <i>formosana</i>	2017.8.16
F9	3.09	毛山鸡椒	<i>L. cubeba</i> var. <i>formosana</i>	2017.8.16

续表 1 (Continued Tab. 1)

样本名称 Sample name	精油含量 Essential oil content (%)	种名称 Species name	拉丁名 Latin name	采集日期 Harvest time
F8	1.82	毛山鸡椒	<i>L. cubeba</i> var. <i>formosana</i>	2017.8.16
F10	1.83	毛山鸡椒	<i>L. cubeba</i> var. <i>formosana</i>	2017.8.17
F11	1.85	毛山鸡椒	<i>L. cubeba</i> var. <i>formosana</i>	2017.8.17

1.1.2 供试病原菌

枯萎病病原菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *fordii* 1) 取自油桐枯萎病病发区, 病原菌经分离、纯化后, 形态和分子鉴定^[10]。大肠杆菌和李斯特菌由浙江科技大学宋大峰博士赠送。

1.1.3 仪器与设备

设备: Agilent-5975B 气质联用仪

仪器: 精油提取装置、压力蒸汽灭菌锅、干热灭菌器、电热恒温培养箱、旋涡混合器、微波炉、超净工作台、移液器、单反相机等。

1.2 实验方法

1.2.1 山苍子果实精油提取

取新鲜山苍子果实, 通过水蒸气蒸馏法分离得到芳香精油。经无水硫酸钠 (Na_2SO_4) 干燥后于 4 °C 保存备用。各样本单独提取。

1.2.2 三种山苍子各样本精油挥发性成分测定

利用气相色谱-质谱联用仪 (gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS), 分别对上述山苍子各样本精油进行挥发性成分检测。吸取 50 μL 精油, 溶解在 5 mL 无水乙醇溶液中, 经过无水硫酸钠脱水处理后, 上机测定。

GC-MS 条件: 色谱柱: DB-5MS (60 m \times 0.25 mm ID \times 0.25 μm 膜厚)。程序升温参数: 初始温度 50 °C, 保持 2 min, 以 3 °C/min 升温至 870 °C 保持 2 min, 以 5 °C/min 升温至 180 °C 保持 1 min, 以 10 °C/min 升温至 230 °C 保持 5 min, 最后以 20 °C/min 升温至 250 °C 保持 3 min。进样口温度: 220 °C, 分流比 1:10, 进样量 1 μL , 载气为高纯氮气 (99.999%), 柱流速: 1.5 mL/min。色谱-质谱接口温度: 250 °C。离子源温度: 230 °C。离子化方式: EI。电子能量: 70 eV。扫描质量范围 m/z 50 ~ 500。

定性与定量分析: 各组分分别与 NIST08 标准谱库进行检索匹配, 并结合文献报道、各成分相对保留时间等进行定性分析。定量分析按峰面积归一化法计算各峰面积的相对含量。

1.2.3 山苍子精油抑制真菌活性测定

1.2.3.1 精油使用液的配制

用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解待测精油, 每种待测精油用量设置 5 个浓度梯度, 分别为 6.25、12.5、25、50 和 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。

1.2.3.2 抑菌率的测定

采用生长速率法测定山苍子精油对尖孢镰刀菌的抑菌活性。将配制好的 PDA 培养基分装到组培瓶中, 每瓶倒入 60 mL, 待冷却至 55 °C 左右时, 各加入 600 μL 的精油使用液, 立刻摇匀。混匀后倒入到 5 个 90 mm 规格的培养皿中, 制成含不同浓度精油的平板。用灭菌的 9 mm 打孔器在培养好的尖孢镰刀菌平板上打取菌饼, 用镊子将菌饼倒贴于上述平板上, 28 °C 培养, 分别在 72、96、120、144 和 168 h 按十字交叉法测量菌落直径。

菌丝生长抑制率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 菌饼直径) \times 100%

1.2.4 山苍子精油抑制细菌活性测定

采用抑菌圈法测定山苍子精油对大肠杆菌和李斯特菌的抑菌活性。将大肠杆菌培养过夜培养, 制备 1×10^7 CFU/mL 的菌悬液。吸取 100 μL 菌悬液与 5 mL 半固体 LB 培养基 (胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 琼脂 7.5 g, 蒸馏水 1 000 mL) 混匀后倒入 9 mm 培养皿中, 冷却后形成半固体培养基。将含有 20 μL 精油使用液的圆形滤纸 (直径为 5 mm) 放入培养基中, 每个培养基中均匀放置 3 个精油滤纸。于 37 °C 培养 24 h 后, 测量抑菌圈直径。李斯特菌需在脑心浸液肉汤培养基 (BHI) 中培养, 其余实验方法同上。

1.2.5 数据分析

所有试验均保留 3 ~ 5 个重复, 利用 Excel 计算各精油不同浓度不同培养时间下的抑菌率, 绘制毒力方程并计算出半最大效应浓度 (EC_{50}) 和最低抑菌浓度 (MIC) 数值。通过 DPS (Data Processing System) 软件, 对三种山苍子精油抑菌效果进行显著性分析, 对各化学成分与抑菌效果进行相关性分析。采用最小显著性差异检验 (LSD)^[11] 进行方差分析 (ANOVA)。利用 SPSS 软件进行相关性分析, 通过

R 语言 (<https://www.r-project.org/>) corrplot 包中的“corrplot()”函数进行相关矩阵分析和可视化作图。

2 结果与分析

2.1 山苍子物种鉴定

对采集到的山苍子进行性状描述并记录,与《中国植物志修订版》(<http://foc.eflora.cn/>)和中

国植物图像库 (PPBC <http://www.plantphoto.cn/>) 进行对比,确定其为山鸡椒、毛叶木姜子和毛山鸡椒。还有一未鉴定种,推测其为山鸡椒和红叶木姜子杂交种或变种,在本实验中不做具体研究。以下列出了这些山苍子的植物检索表(表2)。

表2 几种重要山苍子物种检索表

Table 2 The plant key of several important May Chang tree species

山苍子植物检索表 The plant key of May Chang tree species	
1 小枝无毛;叶片披针形,无毛,先端渐尖;花梗和果梗无毛。	
2 小枝绿色,叶片绿色。·····	山鸡椒
2 小枝黄绿色或红色,叶片偏红色。·····	未鉴定种
1 小枝、叶下面具白色柔毛,嫩枝的毛不脱落。	
3 叶片披针形,较小,长4~11 cm,宽1.1~2.5 cm。·····	毛山鸡椒
3 叶片长圆形或卵状椭圆形,较宽大,长4~14 cm,宽2~4.8 cm。·····	毛叶木姜子

2.2 山苍子精油对真菌的抑菌性评估

采用交叉法测定了山苍子精油不同浓度下从第3天到第7天的菌落直径,再根据菌落直径数据计算出各个样本的菌丝生长抑制率。总的来说,山苍子精油具有较好的抑菌效果,在浓度为1 000 $\mu\text{L/L}$ 时,除了F15、C14和F11,其余样本抑菌率都达到了100%。大部分样本精油在浓度为500 $\mu\text{L/L}$ 时,抑菌率在90%以上。表3展示了不同样本精油

的毒力,其中毒力方程是根据浓度对数和抑菌率的相关性,做出的回归方程。根据毒力方程,当y值为1时,x所对应的浓度就是最低抑菌浓度(MIC);当y值为0.5时,x所对应的浓度就是半最大效应浓度(EC_{50})。其中,样本G4、G3和L29精油的 EC_{50} 最低,分别为0.47、63.32和91.06 $\mu\text{L/L}$;样本G3、F7和F9精油的MIC最低,分别为265.53、243.13和321.07 $\mu\text{L/L}$ 。

表3 三种山苍子各样本精油对尖孢镰刀菌的抑菌活性分析

Table 3 The inhibitory activities of essential oil from three kinds of May Chang trees against *Fof-1*

精油编号 Essential oil number	毒力方程 Virulence equation	相关系数 R^2	最低抑菌浓度 MIC ($\mu\text{L/L}$)	半最大效应浓度 EC_{50} ($\mu\text{L/L}$)
G4	$y = 0.156x + 0.708$	0.962	737.448	0.471
G3	$y = 0.803x - 0.144$	0.988	265.525	63.316
L29	$y = 0.636x - 0.111$	0.976	555.120	91.061
L6	$y = 0.723x - 0.226$	0.999	495.350	100.863
F7	$y = 1.541x - 1.135$	0.983	243.130	115.168
F14	$y = 0.939x - 0.669$	0.963	599.059	175.833
C5	$y = 0.545x - 0.059$	0.968	881.266	106.456
C3	$y = 0.561x - 0.099$	0.996	910.664	116.974
F15	$y = 0.566x - 0.242$	0.975	1 567.704	204.982
C14	$y = 0.209x + 0.494$	0.995	2 645.379	107.187
F12	$y = 0.949x - 0.678$	0.975	586.486	174.313
F9	$y = 0.780x - 0.176$	0.999	321.070	73.421
F8	$y = 0.449x + 0.129$	0.988	865.161	166.948
F10	$y = 0.914x - 0.704$	0.961	729.933	207.213
F11	$y = 0.876x - 0.847$	0.942	1 283.953	345.015

2.3 三种山苍子精油抑制真菌活性评价

尖孢镰刀菌在培养到第7天后记录菌落形态,发现山鸡椒精油培养基中的菌落直径最小,其次是毛叶木姜子和毛山鸡椒。为进一步确定三种山苍子精油对尖孢镰刀菌的抑菌差异性,本研究对每个物种选择3个家系的精油作为生物学重复进行精油含量、MIC和EC₅₀分析。结果如表4所示,山鸡椒精油含量为7.70%,显著高于毛叶木姜子(3.09%)和毛

山鸡椒(2.14%)。山鸡椒MIC和EC₅₀浓度分别为499.44和54.88 μL/L,毛叶木姜子MIC和EC₅₀分别为1479.10和110.21 μL/L,毛山鸡椒MIC和EC₅₀分别是638.72和149.19 μL/L,结果表明,山鸡椒MIC显著低于毛叶木姜子,EC₅₀显著低于毛山鸡椒,证明山鸡椒果实精油含量以及精油抑制真菌效果都显著优于其他两个物种。

表4 山鸡椒、毛叶木姜子和毛山鸡椒精油对尖孢镰刀菌抑菌效果的显著性分析

Table 4 The significant analysis on inhibitory effect of *L. cubeba*, *L. mollis* and *L. cubeba* var. *formosana* essential oil against *Fof-1*

种名称 Species name	精油含量 Essential oil content (%)	最低抑菌浓度 MIC (μL/L)	半最大效应浓度 EC ₅₀ (μL/L)
山鸡椒 <i>L. cubeba</i>	7.70% ± 1.37% ^{a*}	499.44 ± 235 ^b	54.88 ± 51 ^b
毛叶木姜子 <i>L. mollis</i>	3.09% ± 0.61% ^b	1 479.10 ± 101 ^a	110.21 ± 6 ^{ab}
毛山鸡椒 <i>L. cubeba</i> var. <i>formosana</i>	2.14% ± 0.63% ^b	638.72 ± 283 ^{ab}	149.19 ± 68 ^a

注: *用小写字母表示5%显著性。如果一个处理为“a”,那么所有包含“a”的处理之间没有显著差异,而不包含“a”的处理之间存在显著差异。
Note: * The lowercase letters are used for 5% significance. If one dispose is treated as “a”, there are no significant difference among all the treatments containing “a”, and there are significant differences among all treatments that do not include “a”.

2.4 三种山苍子精油抑制细菌活性评价

为了进一步探究三种山苍子对细菌的抑菌活性,本研究分别选择3个家系精油作为生物学重复进行抑制大肠杆菌和李斯特菌效果的分析。三种山苍子精油抑菌圈直径如表5所示,结果显示三种山苍子精油对大肠杆菌和李斯特菌都表现出抑菌活性,特别是对大肠杆菌的抑菌活性优于李斯特菌。根据抑菌圈试验判定标准:抑菌圈直径大于20 mm,极敏;16~20 mm,高敏;11~15 mm,中敏;8~10 mm,低敏;小于8 mm,不敏感^[12]。当浓度为100 μL/mL时,大肠杆菌对山鸡椒、毛叶木姜子和毛山

鸡椒都表现出对极敏感性;当精油浓度为50 μL/mL时,对山鸡椒和毛叶木姜子表现出极敏感性,毛山鸡椒为高敏;浓度在25 μL/mL或以下时,大肠杆菌对三种山苍子精油都表现出中敏或低敏感性。而李斯特菌在精油浓度为100 μL/mL时,对山鸡椒表现出极敏感性,对毛叶木姜子和毛山鸡椒表现出高敏和中敏感性;当浓度为12.5 μL/mL时,对毛叶木姜子和毛山鸡椒表现出低敏感性。整体上看,三种山苍子精油对大肠杆菌的抑菌效果相近;山鸡椒对李斯特菌的抑菌效果要优于毛叶木姜子和毛山鸡椒。

表5 三种山苍子精油不同浓度下对大肠杆菌和李斯特菌的抑菌活性分析

Table 5 The antibacterial activity of three kinds May Chang tree essential oil against *E. coli* and *L. monocytogenes* at different concentrations

精油浓度 Essential oils concentration (μL/mL)	对大肠杆菌的抑菌圈直径 Inhibitory zone diameters against <i>E. coli</i> (mm)					对李斯特菌的抑菌圈直径 Inhibitory zone diameters against <i>L. monocytogenes</i> (mm)				
	6.25	12.5	25	50	100	6.25	12.5	25	50	100
山鸡椒 <i>L. cubeba</i>	10.35 ± 1.0	12.07 ± 1.3	12.76 ± 0.8	22.07 ± 1.9	28.66 ± 2.1	10.91 ± 0.8	11.53 ± 1.2	12.33 ± 0.6	13.78 ± 2.0	23.83 ± 2.1
毛叶木姜子 <i>L. mollis</i>	10.23 ± 0.9	11.38 ± 0.2	12.37 ± 0.7	20.76 ± 1.1	24.65 ± 1.0	7.68 ± 0.5	9.20 ± 0.7	11.24 ± 1.0	12.56 ± 1.3	17.41 ± 1.1
毛山鸡椒 <i>L. cubeba</i> var. <i>formosana</i>	10.24 ± 0.5	11.21 ± 0.7	12.42 ± 0.6	17.89 ± 1.2	27.76 ± 1.1	8.67 ± 0.1	10.56 ± 0.3	10.32 ± 0.4	12.17 ± 0.3	15.69 ± 1.0

2.5 山苍子精油化学成分分析

本研究对三种山苍子各样本精油进行了GC-

MS检测,每个样本鉴定得到的成分占总成分的97%以上。由于各样本精油化学成分含量差异性较

大,只对各物种的代表样本进行展示。三种山苍子精油成分的化学式和成分含量如表6所示,橙花醛和香叶醛是山鸡椒、毛山鸡椒和毛叶木姜子的最主

要成分,其中山鸡椒橙花醛和香叶醛的含量最高,分别占39.97%和50.00%。

表6 三种山苍子精油化学成分及百分含量分析

Table 6 The analysis of chemical compositions and percentage contents in three kinds May Chang tree essential oil

化学成分 Chemical composition	中文名称 Chinese name	化学式 Chemical formula	含量 Content(%)		
			山鸡椒 <i>L. cubeba</i>	毛山鸡椒 <i>L. cubeba</i> var. <i>formosana</i>	毛叶木姜子 <i>L. mollis</i>
Limonene	柠檬烯	C ₁₀ H ₁₄	0.19	0.08	1.36
(+)-4-Carene	4-萜烯	C ₁₀ H ₁₆			0.02
α-Pinene	α-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆			0.03
β-Pinene	β-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆			0.22
Camphene	莰烯	C ₁₀ H ₁₆			0.01
4,7-Methano-1H-indene, octahydro-	四氢二聚环戊二烯	C ₁₀ H ₁₆			0.09
Terpinene	松油烯	C ₁₀ H ₁₆		0.01	0.05
β-Phellandrene	β-水芹烯	C ₁₀ H ₁₆			0.01
Linalool	芳樟醇	C ₁₀ H ₁₆ O	1.36	1.50	0.94
Nerol	橙花醇	C ₁₀ H ₁₆ O	0.29	1.06	
Neral	橙花醛	C ₁₀ H ₁₆ O	39.97	37.35	40.58
Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol,4,6,6-trimethyl-	馬鞭烯醇	C ₁₀ H ₁₆ O		0.74	
(S)-cis-Verbenol	顺式-马鞭草烯醇	C ₁₀ H ₁₆ O	0.62	0.05	0.08
α-Terpineol	松油醇	C ₁₀ H ₁₆ O	0.40	2.01	0.09
Citronellal	香茅醛	C ₁₀ H ₁₆ O	1.04	0.57	0.79
Geraniol	香叶醇	C ₁₀ H ₁₆ O	0.29	2.75	
Geranial	香叶醛	C ₁₀ H ₁₆ O	50.00	46.47	46.77
Limonene epoxide	氧化柠檬烯	C ₁₀ H ₁₆ O		0.04	1.66
β-Myrcene	月桂烯	C ₁₀ H ₁₄ O ₂			0.39
Acetaldehyde, (3,3-dimethylcyclohexylid-ene)-, (Z)-	3,3-二甲基-环己糖烯乙醛	C ₁₀ H ₁₆ O			0.31
2-Isopropenyl-5-methylhex-4-enal	2-异丙烯基-5-甲基-4-烯醛	C ₁₀ H ₁₆ O			0.32
5,7-Octadien-2-ol,2,6-dimethyl-	2,6-二甲基-5,7-辛二烯-2-醇	C ₁₀ H ₁₆ O		0.12	
Carveol	香芹醇	C ₁₀ H ₁₆ O		0.11	
2,6-Octadien-1-ol,3,7-dimethyl-, (Z)-(Z)-	顺,顺-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇	C ₁₀ H ₁₆ O			0.03
Cyclohexanone,5-methyl-2-(1-methylethenyl)-,trans-	反-5-甲基-2-(1-甲基乙烯基)-环己酮	C ₁₀ H ₁₆ O ₂		1.11	
Terpineol, cis-. beta. -	顺-β-萜品醇	C ₁₀ H ₁₆ O ₂		0.05	
3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-	4-萜烯醇	C ₁₀ H ₁₈ O		1.01	
3-Oxatricyclo[4.1.1.0(2,4)]octane,2,7,7-trimethyl-	环氧蒎烷	C ₁₀ H ₁₈ O		0.02	
Eucalyptol	桉叶油素	C ₁₀ H ₁₈ O	0.03	0.14	
Borneol	茨醇	C ₁₀ H ₁₈ O		0.12	
Borneo camphor	右旋龙脑	C ₁₀ H ₁₈ O	0.04		
Pulegone	长叶薄荷酮	C ₁₀ H ₁₈ O	1.19	0.12	
Oxiranecarboxaldehyde,3-methyl-3-(4-methyl-3-pentenyl)-	3-甲基-3-(4-甲基-3-戊烯基)-环氧乙烷甲醛	C ₁₀ H ₁₈ O		0.11	
3-Cyclohexen-1-one,2-isopropyl-5-methyl-	2-异丙烯基-5-甲基-3-环己烯-1-酮	C ₁₀ H ₁₈ O	0.24		

续表 6 (Continued Tab. 6)

化学成分 Chemical composition	中文名称 Chinese name	化学式 Chemical formula	含量 Content (%)		
			山鸡椒 <i>L. cubeba</i>	毛山鸡椒 <i>L. cubeba</i> var. <i>formosana</i>	毛叶木姜子 <i>L. mollis</i>
6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-, (<i>R</i>)-	(<i>R</i>)-3,7-二甲基-6-辛烯醇	C ₁₀ H ₂₀ O	0.10		
Cyclohexanemethanol, 4-hydroxy-, .alpha., .alpha., 4-trimethyl-	对薄荷烷-1,8-二醇	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	0.10		
Caryophyllene	石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	0.48	1.43	0.61
Caryophyllene oxide	石竹烯氧化物	C ₁₅ H ₂₄		0.04	0.01
(-)- β -Elemene	β -榄香烯	C ₁₅ H ₂₆ O			0.63
(<i>E</i>)- β -Farnesene (<i>E</i>)-	法呢烯	C ₁₅ H ₂₆ O			0.05
Naphthalene, decahydro-1,5-dimethyl-	1,5-二甲基-十氢萘	C ₁₁ H ₁₈	0.04		
4-terpene alcohols	4-萜烯醇	C ₁₁ H ₂₀ O	0.05		
2-Cyclohexen-1-one, 4-(2-oxopropyl)-	4-(2-氧代丙基)-2-环己烯-1-酮	C ₁₇ H ₂₈ O ₂			0.97
3-Cyclopentene-1-acetaldehyde, 2-oxo-	2-氧代-3-环戊烯-1-乙醛	C ₁₈ H ₂₄ O ₂			0.25
5-Hepten-2-one	甲基庚烯酮	C ₆ H ₁₀ N ₂	0.15	0.05	0.39
Cyclohexane, (1-methylethyl)-	异丙基环己烷	C ₉ H ₁₈		0.13	

注:“/”表示未检测到。

Note:“/” indicates not detected.

2.6 山苍子精油差异成分与抑菌效果相关性分析

为了进一步探究山苍子精油化学成分与抑菌效果的关系,本研究对各样本山苍子精油差异成分与 MIC 进行了初步的相关性分析。结果如表 7 所示,香叶醛与 MIC 呈显著负相关关系,橙花醛与 MIC 呈

极显著负相关关系,石竹烯与 MIC 呈极显著正相关关系,其余各成分与 MIC 的相关性较低。相关性分析结果表明,山苍子精油中香叶醛和橙花醛含量与抑菌效果呈现显著正相关关系,石竹烯含量与抑菌效果存在负相关关系。

表 7 山苍子精油差异成分与最低抑菌浓度的相关性分析

Table 7 The correlation analysis between the chemical components of essential oil and MIC

中文名称 Chinese name	英文名称 English name	最低抑菌浓度 MIC		个案数 Number of case
		皮尔逊相关性 Pearson correlation	显著系数 Significance coefficient	
柠檬烯	D-Limonene	0.077	0.843	15
月桂烯	β -Myrcene	0.88	0.316	7
香叶醛	Geranial	-0.699 *	0.036	15
橙花醛	Neral	-0.842 * *	0.004	15
氧化柠檬烯	Limonene epoxide	-0.044	0.925	12
香茅醛	Citronellal	-0.25	0.517	15
芳樟醇	Linalool	-0.056	0.887	15
松油醇	α -Terpineol	0.062	0.874	15
橙花醇	Nerol	-0.072	0.878	12
顺式-马鞭草烯醇	(<i>S</i>)- <i>cis</i> -Verbenol	-0.367	0.331	15
香叶醇	Geraniol	-0.21	0.587	15
马鞭草烯醇	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol, 4,6,6-trimethyl-	-0.218	0.678	10
顺-香芹醇	<i>cis</i> -Carveol	0.655	0.23	9
反-5-甲基-2-(1-甲基乙烯基)-环己酮	Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethenyl)-, trans-	-0.202	0.744	9

续表 7 (Continued Tab. 7)

中文名称 Chinese name	英文名称 English name	最低抑菌浓度 MIC		个案数 Number of case
		皮尔逊相关性 Pearson correlation	显著系数 Significance coefficient	
桉叶油素	Eucalyptol	0.461	0.25	14
胡椒酮	Piperitone	0.805	0.1	9
4-萜烯醇	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-	-0.024	0.969	9
茨醇	Borneol	-0.241	0.696	9
环氧蒎烷	3-Oxatricyclo [4.1.1.0(2,4)] octane, 2,7,7-trimethyl-	0.001	0.998	9
石竹烯	Caryophyllene	0.800 * *	0.01	15
石竹烯氧化物	Caryophyllene oxide	0.746	0.088	10
柠檬二乙缩醛	Citral diethyl acetal	0.875	0.052	9

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

根据对山苍子精油差异成分与 MIC 的相关性分析,本研究进一步筛选出山苍子精油中的几种主要成分进行各成分、抑菌率以及精油含量之间的相关性分析。山苍子精油主要的化学成分为柠檬醛(橙花醛+香叶醛)、柠檬烯、石竹烯、香茅醛、芳樟醇和松油醇(表 6),将这 6 种主要成分与菌丝生长抑制率和精油含量进行相关性分析。如图 1 所示,

柠檬醛和芳樟醇含量与抑菌率呈现显著(显著性水平 $\alpha = 0.05$)正相关性,相关系数分别为 0.342 和 0.333;柠檬醛含量与精油含量呈现显著正相关关系,相关系数为 0.391;柠檬烯和石竹烯含量与柠檬醛的含量呈现极显著(显著性水平 $\alpha = 0.01$)负相关关系,相关系数分别为-0.496 和-0.664。

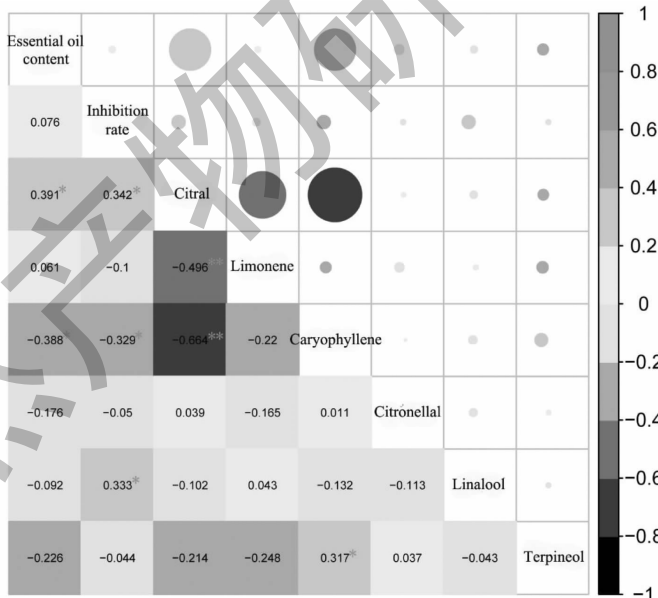


图 1 山苍子精油主要化学成分、精油抑制率和精油含量之间的相关性分析

Fig. 1 The correlation analysis among the main chemical components of essential oil, inhibition rate and essential oil content.

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。 Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

3 结论

3.1 山鸡椒、毛叶木姜子和毛山鸡椒精油抑菌性效果评价

本研究中山苍子精油具有广谱的抑菌性,与文

献报道^[7]一致,特别是山鸡椒精油抑制真菌的效果最好,其 EC_{50} 为 $54.88 \mu\text{L/L}$ 。毛叶木姜子和毛山鸡椒精油的 EC_{50} 均低于先前报道^[13] ($EC_{50} = 379.4 \text{ mg/L}$)。山鸡椒和毛山鸡椒精油的 MIC 分别为

499.44 和 638.72 $\mu\text{L/L}$, 均低于先前报道^[14]的山苍子精油抑制真菌的 MIC(1 000 $\mu\text{L/L}$)。此外,山鸡椒精油在浓度为 125 $\mu\text{L/L}$ 时,对尖孢镰刀菌的抑菌率大于 50%,异樟叶(异—橙花叔醇)精油报道浓度在 166 $\mu\text{L/L}$ 时抑菌率为 42.64%,山鸡椒精油抑制尖孢镰刀菌的效果要优于异樟叶抑菌效果^[15]。如表 5 所示,山苍子精油对革兰氏阴性菌(大肠杆菌)的抑制效果优于对革兰氏阳性菌(李斯特菌),这与 Mayaud 等^[16]先前的结论不同,但与 Kumar-saikia 等^[17]报道的结论一致。三种山苍子精油对大肠杆菌表现出相近且较好的抑菌效果,而山鸡椒精油对李斯特菌的抑制效果要优于毛叶木姜子和毛山鸡椒。总体来说,山鸡椒精油含量和抑菌效果都优于毛叶木姜子和毛山鸡椒,证明山鸡椒可作为山苍子品质油提取和生产的优良物种,亦可作为抗菌和防腐产品研发的原材料。

3.2 山苍子精油成分与抑菌效果相关性分析

本研究中山苍子挥发油化学成分中柠檬醛、柠檬烯、石竹烯、香茅醛、芳樟醇和松油醇为其最主要的化学成分,特别是柠檬醛含量(70%~90%),这与先前报道具有一致性^[18]。在山苍子精油差异成分与 MIC 的显著性分析中,结果显示只有柠檬醛与 MIC 呈显著负相关,即与抑菌性成显著正相关;但通过与菌丝生长抑制率进行相关性分析发现柠檬醛和芳樟醇与抑菌性有显著正相关关系。推测芳樟醇与抑菌性存在较高的正相关关系,但由于山苍子精油中柠檬醛含量占据主导地位,导致不同指标下其相关关系的显著性存在一定差异。据报道,单萜柠檬醛和香茅醛已被证明能够抑制真菌的生长,尤其是柠檬醛^[19];芳樟醇 R-和 S-对映异构单体都具有较好的体外抗菌活性^[20]。实验结果支持柠檬醛和芳樟醇含量可作为山苍子挥发油抗真菌活性样本筛选的可靠指标,其中柠檬醛含量为主导。本研究中石竹烯含量与抑菌率表现出显著负相关,但 Kim 等^[21]探究了石竹烯异构体的抗菌活性,证明它们可以抑制金黄色链球菌(*Streptococcus aureus*)和副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)。石竹烯在山苍子精油中与柠檬醛含量显著负相关,推测其可能与柠檬醛合成存在直接或间接地竞争关系。

参考文献

1 Yue JL, Xu WB, Luo YC. Preliminary study on varieties (types) and selection of fine varieties of May Chang Tree in

Guizhou Province [J]. Nonwood For Res (经济林研究), 1997, 3:9-11.

2 Zhao MQ, Su CT, Ji XM, et al. Research advance of integrated utilization of *Litsea cubeba* oil [J]. J Anhui Agr Sci (安徽农业科学), 2007, 35:7866-7868.

3 Ma YP, Zhang HX, Du ZZ. Application of essential oils from aromatic plants of Yunnan plateau in cosmetics [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 30:146-154.

4 Liu TT, Yang TS. Antimicrobial impact of the components of essential oil of *Litsea cubeba* from Taiwan and antimicrobial activity of the oil in food systems [J]. Int J Food Microbiol, 2012, 156:68-75.

5 Song JS, Ryu SN, Kim KS, et al. Analytical technique and agricultural application of essential oil in plant [J]. J Korean Soc Int Agr, 2001, 11:107-125.

6 Wang L, Jin J, Liu X, et al. Effect of cinnamaldehyde on morphological alterations of *Aspergillus ochraceus* and expression of key genes involved in ochratoxin A biosynthesis [J]. Toxins, 2018, 10:340.

7 Gu RY, Liu YY. Study on the anti-oxidation and bacteriostasis of *Litsea cubeba* extraction oil [J]. Food Sci (食品科学), 2006, 27(11):86-89.

8 Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA, et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology [J]. Mol Plant Pathol, 2012, 13:414-430.

9 Goñi P, López P, Sánchez C, et al. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils [J]. Food Ferment Ind, 2010, 116:982-989.

10 Yang SS, Gao M, Zhu HP, et al. Physiological response of *Vernicia fordii* and *V. montana* upon inoculation with *Fusarium oxysporum* [J]. For Res (林业科学研究), 2014, 27:752-757.

11 Fisher RA. The design of experiments [J]. Soc Serv Rev, 1949, 57:183-189.

12 Lin SH, Wang W, Zhang JH, et al. The initial screening of ten plant essential oils *in vitro* antibacterial activity of blueberry pathogens [J]. Hunan Agr Sci (湖南农业科学), 2018(2):73-75.

13 Wang HN. Studies on the fungicidal activities of some essential oils [D]. Yangling: Northwest A&F University (西北农林科技大学), 2007.

14 He HY, Zhu YQ, Wang ZP, et al. Inhibitory effects of ten plant essential oils on three pathogens of cherry tomatoes [J]. Sci-Tech Food Ind (食品工业科技), 2016, 37:153-157.

15 Hu WJ, Li GX, Cao YS, et al. Study on antimicrobial activity and chemical constituents of the essential oil from the leaves

- of *Cinnamum camphora* isonerolidol type [J]. For Sci-Tech (林业工程学报), 2014, 28(6): 69-71.
- 16 Mayaud L, Carricajo A, Zhiri A, et al. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics [J]. Lett Appl Microbiol, 2008, 47: 167-173.
- 17 Kumarsaikia A, Dipak C, Manuela D' A, et al. Screening of fruit and leaf essential oils of *Litsea cubeba* Pers. from north-east India-chemical composition and antimicrobial activity [J]. J Essent Oil Res, 2013, 25(4): 9.
- 18 Chen XH. Commented on utilization status ang industrialization prospects of natural resources from *Litsea cubeba* in China [J]. Sci Silv Sin (林业科学), 2003, 39: 134-139.
- 19 Garcia R, Alves ESS, Santos MP, et al. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives [J]. Brazilian J Microbiol, 2008, 39: 163-168.
- 20 Hu XG, Chen JH, Xia PY, et al. *In vitro* anti-bacterial activities of *R*- and *S*-linalool [J]. J Third Mil Med Univ (第三军医大学学报), 2013, 35: 2077-2080.
- 21 Kim YS, Park SJ, Lee EJ, et al. Antibacterial compounds from rose Bengal-sensitized photooxidation of beta-caryophyllene [J]. J Food Sci, 2010, 73: 540-545.