

枳壳挥发油化学成分及其抑菌活性分析

梁 卉, 刘绍华, 欧阳坚, 闻 婧, 刘昌福, 李运华* (萍乡市卫生学校, 江西萍乡 337000)

摘要 [目的]比较分析枳壳与麸炒枳壳挥发油成分及其抑菌活性差异。[方法]采用水蒸气蒸馏法提取枳壳、麸炒枳壳的挥发油,并通过GC-MS分析枳壳与麸炒枳壳挥发油的化学组成;采用滤纸片法研究枳壳与麸炒枳壳挥发油的抑菌活性。[结果]枳壳挥发油中主要化学成分相对含量高于麸炒枳壳;枳壳和麸炒枳壳挥发油对试验菌均具有抑制活性,但麸炒枳壳挥发油活性较优。[结论]枳壳与麸炒枳壳挥发油的抑菌活性可能与其主要化学成分含量差异有关。

关键词 枳壳;麸炒枳壳;挥发油;化学成分;抑菌活性
中图分类号 R285.5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)11-0111-03

Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oil from *Fructus aurantii*
LIANG Hui, LIU Shao-hua, OUYang Jian, LI Yun-hua* et al (Pingxiang Health School, Pingxiang, Jiangxi 337000)

Abstract [Objective] The research aimed to compare chemical composition and antibacterial activity of essential oil from *Fructus aurantii* and stir-baked *Fructus aurantii*. [Method] The essential oil of *Fructus aurantii* and stir-baked *Fructus aurantii* was extracted by steam distillation method, and the chemical composition of essential oil from *Fructus aurantii* and stir-baked *Fructus aurantii* was analyzed by GC-MS. The antibacterial activities of essential oil from *Fructus aurantii* and stir-baked *Fructus aurantii* were studied by filter paper method. [Result] The main chemical composition relative content in essential oil of *Fructus aurantii* was higher than that of stir-baked *Fructus aurantii*. The essential oil of *Fructus aurantii* and stir-baked *Fructus aurantii* were resistant to the tested bacteria, but the antibacterial activity of essential oil from stir-baked *Fructus aurantii* was better. [Conclusion] The antibacterial activity of *Fructus aurantii* and stir-baked *Fructus aurantii* may be related to the difference of its main chemical composition.

Key words *Fructus aurantii*; Stir-baked *Fructus aurantii*; Essential oil; Chemical composition; Antibacterial activity

枳壳为芸香科植物酸橙(*Citrus aurantium* L.)及其栽培变种的干燥未成熟果实。《中国药典》2015年版记载:枳壳味苦、辛、酸、性微寒、归脾、胃经,具有理气宽中、行滞消胀之功效,用于胸胁气滞、胀满疼痛、食积不化、痰饮内停、脏器下垂等症^[1]。枳壳的功效成分主要为挥发油和黄酮苷类成分。枳壳为常用的中药理气药之一,通常以枳壳或其炮制品麸炒枳壳入药,广泛应用于中医临床^[2],且麸炒枳壳的药性较枳壳的药性缓和。《日华子本草》记载枳壳治“健脾开胃,消痰……霍乱泻痢,破症结痃癖……利大小肠,皮肤痒……”。以往文献对枳壳挥发油的研究多集中在化学成分分析^[3-7],有关枳壳挥发油的抑菌活性研究较少,且对枳壳炮制品麸炒枳壳挥发油成分及其抑菌活性研究也不多。笔者拟通过比较分析枳壳与麸炒枳壳中挥发油的主要化学成分与抑菌活性差异,为深入研究江西省道地药材枳壳提供基础,同时也为解决细菌对抗生素的耐药性、寻求天然副作用较小的中药抗菌活性成分提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试药材。枳壳和麸炒枳壳于2016年秋季购买于江西省樟树中药材市场,为商州枳壳。由萍乡市中医院潘昌明副主任中药师鉴定为枳壳和麸炒枳壳,凭证标本保存于萍乡市卫生学校生物医学研究中心标本馆。

1.1.2 供试菌种。试验所需的大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidi*)和白

色念珠菌(*Candida albicans*)均购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.1.3 试剂。无水硫酸钠(分析纯,广州化学试剂厂),正己烷(色谱纯,上海安谱实验科技股份有限公司)。

1.1.4 培养基。细菌培养基为牛肉膏蛋白胨培养基,购自广东环凯微生物科技有限公司,配方为:牛肉膏 5 g、NaCl 5 g、蛋白胨 10 g、琼脂 20 g,以蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 7.2。真菌培养基为沙保氏培养基,购自广东环凯微生物科技有限公司。

1.1.5 仪器。挥发油提取装置,电子天平(ML203E,瑞士梅特勒托利多公司),7890A 气相色谱-5975C 质谱联用仪(美国安捷伦科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 枳壳挥发油提取。枳壳和麸炒枳壳药材粉碎过 26 目筛,取 50 g 粉末样品,置于 1 000 mL 的圆底烧瓶中,加入 500 mL 蒸馏水浸泡过夜;安装水蒸气蒸馏装置,通入冷凝水;加热至沸腾,保持沸腾 6 h 后,停止加热;冷凝后,收集挥发油;无水硫酸钠干燥,过滤;称重,计算枳壳和麸炒枳壳中挥发油含量(挥发油重量占粉末样品重量的百分比),得出枳壳和麸炒枳壳的挥发油含量分别为 8.0 和 4.5 mL/kg。枳壳挥发油颜色为深黄色,呈橙果肉香味;麸炒枳壳挥发油颜色较枳壳挥发油颜色浅,呈橙果肉香味且夹杂焦味。

1.2.2 GC-MS 分析。以色谱纯正己烷将枳壳和麸炒枳壳挥发油分别溶解后,采用石英毛细管气相色谱质谱联用仪分析。色谱条件:色谱柱为 HP-5MS 石英毛细管柱(5% Phenyl Methyl Silox, 30 m × 250 μm × 0.25 μm);进样口温度 280 ℃;柱温 45 ℃保持 3 min,以 2 ℃/min 升至 80 ℃并保持 1 min,然后以 5 ℃/min 升至 120 ℃并保持 1 min,最后以 15 ℃/min 升至 260 ℃;载气为氦气,流速为 1 mL/min,进样

基金项目 江西省卫生计生委科技计划项目(20177212)。
作者简介 梁卉(1985—),女,江西萍乡人,讲师,硕士,从事医学检验技术研究。*通讯作者,高级讲师,从事传染病防治技术研究。
收稿日期 2017-02-23

量 1 μL,分流比 10:1。质谱条件:EI-MS,离子阱温度 230 ℃,四级杆温度 150 ℃,接口温度 260 ℃,质量范围 50~400 amu。

1.2.3 枳壳挥发油抗菌活性测定。

1.2.3.1 菌体悬液及含菌平板的制备。供试菌制成 10¹¹~10¹² CFU/L 均匀的菌悬液,将融化的灭菌培养基倾入无菌培养皿中,待凝固后滴入 0.1 mL 菌悬液,用无菌涂布环将菌悬液涂布均匀即成含菌平板,待用。

1.2.3.2 抗菌活性的测定。采用滤纸片法^[8]:取吸水力较强而质地均匀的滤纸,用打孔器打成直径 6 mm 的圆形滤纸片,置洁净干燥的培养皿中,干热灭菌后备用。在每个含菌平皿呈正三角放入 3 张已灭菌的滤纸片,再吸取 2 种待测药品,按照 1、3、5、7、9 μL 浓度梯度垂直滴加到滤纸片上。细菌在 37 ℃恒温正置培养 1 h 后倒置培养 24 h,真菌在 37 ℃恒温正置培养 1 h 后倒置培养 48 h,观察抑菌情况,并测量抑

菌圈直径。以空白纸片做对照。

2 结果与分析

2.1 枳壳挥发油化学组成 经 GC-MS 分析后,通过 HP MSD 化学工作站结合 NIST11 质谱图库对枳壳和麸炒枳壳挥发油各组分质谱数据进行检索与定性,并按峰面积归一化法计算出各组分的相对含量,结果如表 1。

从表 1 可看出,枳壳炮制前后挥发油中共鉴定出了 13 种主要成分。该 13 种化合物分别占枳壳和麸炒枳壳挥发油化学成分相对含量的 99.42% 和 99.30%,其中枳壳挥发油中含量较高的为柠檬烯、γ-松油烯和邻异丙基甲苯,其相对含量分别占挥发油化学成分的 84.258 4%、5.119 1% 和 4.460 1%;麸炒枳壳挥发油中含量较高的为柠檬烯、γ-松油烯和邻异丙基甲苯,其相对含量分别占挥发油化学成分的 81.536 7%、3.997 8% 和 8.278 7%。

表 1 枳壳挥发油化学成分及其相对百分含量

Table 1 Chemical constituents and relative percentage content of essential oil from <i>Fructus aurantii</i>					
序号 No.	保留时间 Retention time//min	化合物名称 Compound name	分子量 Molecular weight	相对百分含量 Relative percentage content//%	
				枳壳 <i>Fructus aurantii</i>	麸炒枳壳 Stir-baked <i>Fructus aurantii</i>
1	9.021 3	α-蒎烯(α-Pinene)	136	0.878 4	0.670 2
2	11.125 3	β-蒎烯(β-Pinene)	136	0.611 9	0.455 2
3	12.185 2	β-月桂烯(β-Myrcene)	136	1.164 3	0.736 1
4	13.957 0	邻异丙基甲苯(o-Cymene)	134	4.460 1	8.278 7
5	14.233 8	柠檬烯(Limonene)	136	84.258 4	81.536 7
6	16.076 8	γ-松油烯(γ-Terpinene)	136	5.119 1	3.997 8
7	24.397 8	α-松油醇(α-Terpineol)	154	0.644 0	1.290 1
8	32.782 0	β-榄香烯(β-Elemene)	204	0.294 5	0.304 8
9	33.114 3	γ-衣兰油烯(γ-Murolene)	204	0.215 7	0.240 5
10	33.549 3	β-澄茄油烯(β-Cubebene)	204	0.854 3	0.461 7
11	34.158 3	β-杜松烯(β-Cadinene)	204	0.224 6	0.465 6
12	35.313 2	α-杜松醇(α-Cadinol)	222	0.291 1	0.243 1
13	35.392 3	桉油烯醇(Spathulenol)	220	0.405 1	0.623 0

2.2 枳壳挥发油的抑菌活性 由表 2 可知,枳壳与麸炒枳壳挥发油对试验细菌和真菌均有抑制效果,但抑菌强度有一定差异;二者对同一细菌和真菌的抑菌作用存在差异,且麸炒枳壳挥发油的抑菌活性强于枳壳挥发油的抑菌活性。其

中,枳壳挥发油和麸炒枳壳挥发油对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑菌活性较强,对大肠杆菌和表皮葡萄菌的抑菌活性次之,对白色念珠菌的抑菌活性较弱。

表 2 枳壳和麸炒枳壳挥发油抑菌圈测量结果

Table 2 Results of inhibition zone of essential oil from <i>Fructus aurantii</i> and stir-baked <i>Fructus aurantii</i>											mm
菌液量 Bacteria volume//μL	枳壳 <i>Fructus aurantii</i>					麸炒枳壳 Stir-baked <i>Fructus aurantii</i>					
	Sa	Se	Bs	Ec	Ca	Sa	Se	Bs	Ec	Ca	
1	7.3	6.0	6.0	6.0	6.0	8.0	6.2	6.0	6.0	6.0	
3	8.1	6.3	6.3	6.2	6.5	9.3	6.7	6.5	6.3	7.6	
5	9.0	7.4	7.5	6.5	8.0	9.8	7.9	8.2	6.7	8.7	
7	9.5	7.8	8.3	7.0	9.0	10.5	8.2	9.3	7.3	9.4	
9	10.3	8.4	9.8	7.2	9.9	11.5	9.1	11.0	7.5	10.8	
CK	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	

注:Sa 为金黄色葡萄球菌,Se 为表皮葡萄球菌,Bs 为枯草芽孢杆菌,Ec 为大肠杆菌,Ca 为白色念珠菌
Note:Sa is *Staphylococcus aureus*;Se is *Staphylococcus epidermidi*;Bs is *Bacillus subtilis*;Ec is *Escherichia coli*;Ca is *Candida albicans*

3 小结与讨论

(1) 枳壳与麸炒枳壳挥发油中均含有 13 种主要成分,但

各化学成分含量有差异,其中柠檬烯、γ-松油烯和邻异丙基甲苯是枳壳与麸炒枳壳中含量较高的成分,柠檬烯有镇咳、

祛痰、抗菌的作用^[2,9]。枳壳挥发油中的柠檬烯、 γ -松油烯相对含量高于麸炒枳壳挥发油中的柠檬烯、 γ -松油烯的相对含量,这可能与枳壳和麸炒枳壳药性强弱有关。但麸炒枳壳挥发油中的邻异丙基甲苯相对含量高于枳壳挥发油中邻异丙基甲苯的相对含量,由于邻异丙基甲苯具有芳香气味,可能是引起枳壳炮制前后气味变化的成分之一。

(2) 枳壳挥发油和麸炒枳壳挥发油均为深黄色,但枳壳挥发油的颜色较麸炒枳壳挥发油颜色深,且枳壳挥发油的提取率远高于麸炒枳壳。结合挥发油成分的 GC-MS 分析结果,麸炒枳壳挥发油中一部分化合物的相对含量低于枳壳,另一部分化合物的相对含量高于枳壳。其原因可能是枳壳经过高温炮制过程中易挥发的化合物有所损失,从而导致其相对含量减少;而高温炮制过程中可能促进另一部分成分发生结构变化,这也可能是引起枳壳挥发油与麸炒枳壳挥发油颜色差异的原因。

(3) 根据试验结果,可推测枳壳挥发油和麸炒枳壳挥发油对革兰氏阳性菌的抑制活性强于其对革兰氏阴性菌的抑制活性,对细菌的抑制活性强于其对真菌的抑制活性;枳壳挥发油和麸炒枳壳挥发油中均含有对试验菌有抑制作用的

化学成分,但炮制后的麸炒枳壳挥发油的抑菌活性高于枳壳挥发油的活性,其原因是否与枳壳在炮制过程中高温导致挥发油化学成分结构发生变化有关,还需进一步深入研究^[10]。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 陈振鹤,吴国泰,任远. 枳壳的化学成分·药理作用及临床应用[J]. 安徽农业科学,2016,44(26):95-97.
- [3] 廖凤霞,辛龙涛,陈华,等. 中药枳实与枳壳挥发油成分对比分析[J]. 重庆大学学报,2004,27(5):38-40.
- [4] 龚千锋,钟凌云,曹君,等. 不同产地枳壳饮片炮制前后挥发油 GC-MS 分析[J]. 中成药,2007,29(11):1639-1644.
- [5] 曹君,王少军,龚千锋,等. 不同产地枳壳饮片炮制前后挥发油成分的 GC-MS 分析[J]. 中草药,2005,36(2):172-177.
- [6] 蒋以号,杨先玉,张庆华,等. 枳壳樟帮法炮制前后挥发油的 GC-MS 分析[J]. 中药材,2010,33(8):1233-1236.
- [7] 彭金年,程庚金生,张付远,等. 炮制后安徽枳壳挥发性成分的 GC-MS 分析[J]. 安徽农业科学,2014,42(34):12071-12072.
- [8] 金振国,冀玉良,姚焕英,等. 白花曼陀罗挥发油主要化学成分和抑菌活性测定[J]. 安徽农业科学,2011,39(28):17244-17245,17270.
- [9] 孙文基,绳金房. 天然活性成分简明手册[M]. 北京:中国医药科技出版社,1998.
- [10] 施学骄,张杰红,樊丹青,等. 枳实、枳壳挥发油化学成分及抑菌活性的比较研究[J]. 中药与临床,2012,3(2):25-27,31.
- [21] 孙世利,苗爱清,凌彩金,等. 茶黄素体外抗氧化作用研究[C]//中国科学技术协会学会. 经济发展方式转变与自主创新——第十二届中国科学技术协会年会:第二卷. 福州:福建省人民政府,2010.
- [22] BABICH H, PINSKY S M, MUSKIN E T, et al. In vitro cytotoxicity of a theaflavin mixture from black tea to malignant, immortalized, and normal cells from the human oral cavity[J]. Toxicology in vitro, 2006, 20(5):677-688.
- [23] KALRA N, SETH K, PRASAD S, et al. Theaflavins induced apoptosis of LNCaP cells is mediated through induction of p53, down-regulation of NF- κ B and mitogen-activated protein kinases pathways[J]. Life sciences, 2007, 80(23):2137-2146.
- [24] 张建勇,江和源,王岩,等. 茶黄素提取物及茶黄素片的急性毒性[J]. 中国农学通报,2014,30(21):285-288.
- [25] LIN Y L, TSAI S H, LIN-SHIAU S Y, et al. Theaflavin-3,3'-digallate from black tea blocks the nitric oxide synthase by down-regulating the activation of NF- κ B in macrophages[J]. European journal of pharmacology, 1999, 367(2/3):379-388.
- [26] PAN M H, LAI C S, WANG H, et al. Black tea in chemo-prevention of cancer and other human diseases[J]. Food science and human wellness, 2013, 2(1):12-21.
- [27] 金恩惠,吴媛媛,屠幼英. 茶黄素抑菌作用的研究[J]. 中国食品学报, 2011, 11(6):108-112.
- [28] LIN C L, HUANG H C, LIN J K. Theaflavins attenuate hepatic lipid accumulation through activating AMPK in human HepG2 cells[J]. J Lipid Res, 2007, 48(11):2334-2343.
- [29] MARON D J, LU G P, CAI N S, et al. Cholesterol-lowering effect of a theaflavin-enriched green tea extract: A randomized controlled trial[J]. Archives of internal medicine, 2003, 163(12):1448-1453.

(上接第 87 页)

- [8] CRISPIN D J. The separation of theaflavins on sephadex LH-20[J]. J Chromatogr, 1971(54):133-135.
- [9] COLLIER P D, BRYCE T, MALLOWS R, et al. The theaflavins of black tea[J]. Tetrahedron, 1973, 29(1):125-142.
- [10] 竹尾忠一. 茶黄素的分离与定量[J]. 茶叶技术研究, 1973(45):46.
- [11] BAJAI K L, ANAN T, TSUSHIDA T, et al. The defects of (-)-EC on the oxidation of TF by PPO from tea leaves[J]. Agric Biol Chem, 1987, 51(7):1767-1772.
- [12] 吴雪源,李纯. 茶黄素组分的薄层凝胶色谱分析[J]. 茶业通报, 1988(2):11-19.
- [13] 谢练武,郭亚平,方继前,等. 二醇基键合硅胶制备色谱分离纯化茶黄素类及其稳定性[J]. 食品科学, 2012(21):96-99.
- [14] 丁阳平,刘仲华,黄建安. 聚酰胺分离纯化茶黄素类物质研究[J]. 食品科学, 2007, 28(12):55-57.
- [15] 王坤波,刘仲华,黄建安,等. 高速逆流色谱法分离茶黄素条件的优化[J]. 食品科学, 2009, 30(6):191-195.
- [16] 江和源,程启坤,杜琪珍. 高速逆流色谱法分离纯化茶黄素[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(4):30-35.
- [17] 杨子银,屠幼英,赵勤,等. 高速逆流色谱分离茶黄素单体的初步研究[J]. 食品科学, 2005, 26(10):87-90.
- [18] 张正竹. 茶叶生物化学实验教程[M]. 北京:中国农业出版社,2009.
- [19] 李大祥,杨荣俊,方世辉,等. Roberts 法和 RP-HPLC 法测定茶黄素的比较研究[J]. 安徽农业大学学报, 2006, 33(1):87-89.
- [20] YANG Z Y, JIE G L, DONG F, et al. Radical-scavenging abilities and antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters in H_2O_2 -mediated oxidative damage system in the HPF-I cells[J]. Toxicology in vitro, 2008, 22(5):1250-1256.

科技论文写作规范——讨论

着重于研究中新的发现和重要方面,以及从中得出的结论。不必重复在结果中已评述过的资料,也不要模棱两可的语言,或随意扩大范围,讨论与文中无多大关联的内容。