

丁香油抑菌成分研究^{*}

楼兴隆¹, 李晓明², 张鞍灵¹, 董茹¹, 高锦明^{1*}

(1. 西北农林科技大学生命科学学院, 陕西杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学资源环境学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 利用滤纸片法和固体稀释法对丁香油进行了抑菌活性测定, 结果表明丁香油对 5 种植物病原菌有不同程度的抑制作用, 其抑菌成分为丁香酚。丁香油对白菜黑斑、小麦纹枯的最低抑菌浓度(MIC)为 0.625 mg/mL, 对玉米大斑、葡萄炭疽、番茄黑霉的最低抑菌浓度(MIC)为 0.3125 mg/mL。

关键词: 丁香油; 丁香酚; 抑菌活性

中图分类号: Q946.887 文献标识码: A 文章编号: 1004-1389(2006)03-0091-03

Study on Antimicrobial Components of the Clove Oil

LOU Xing-long¹, LI Xiao-ming², ZHANG An-ling¹,
DING Hong-ru¹ and GAO Jin-ming^{1*}

(1. College of Life Science, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China; 2. College of Resource & Environment, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: The antimicrobial activity of clove oil were determined by filter paper method and solid culture medium method. The results showed that clove oil could inhibit five phytopathogenic fungus at different levels, the antimicrobial component is eugenol, with the minimal inhibiting concentration (MIC) for *Alternaria brassicae* and *Rhizoctonia cereali* being 0.625 mg/mL, and minimal inhibiting concentration (MIC) for *Helminthosporium turcicum* Pass, gloesporium fructigenum and *Alternaria alternata* being 0.3125 mg/mL.

Key words: Clove oil; Eugenol; Antimicrobial activity

丁香为桃金娘科植物丁香(*Eugenia caryophyllata* Thumb)的干燥花蕾, 主要含有丁香酚(eugenol), 丁香酚乙酸酯(acetyl eugenol), 石竹烯(β -caryophyllene), 甲基正庚基甲酮(n-Heptyl methyl ketone)等挥发性成分及山柰酚、鼠李素、齐墩果酸等黄酮类成分^[1]。从中提取的丁香油为我国 GB2760-86 规定允许使用的食用香料。丁香油具有较好的防霉作用^[2], 并对食品中常见的腐败菌和产毒素菌的生长也有明显的抑制作用^[3]。

挥发油是植物中一类具有芳香气味、在常温下能挥发的油状液体的总称, 在植物界分布很

广, 特别是桃金娘科、菊科、芸香科、伞形科、唇形科、樟科、木兰科、姜科等植物中。许多挥发油都具有多方面的作用, 在医疗方面的应用也越来越普遍。具有抗肿瘤作用、抑菌作用、对中枢系统的作用及对呼吸系统的作用等等^[4]。因此选用丁香油作为研究对象, 此外由于生物农药的应用是 21 世纪可持续农业发展的一项重要措施, 本文着重进行抑菌活性研究, 并把植物病原菌作为丁香油的抑菌活性对象, 找出其抑菌的活性成分, 为进一步通过该活性成分的结构改造来寻找抑菌效果更佳的物质提供理论依据。

^{*} 收稿日期: 2005-11-23 修回日期: 2006-01-18
基金项目: 教育部重点项目(104174); 国家自然科学基金项目(30370019)。
作者简介: 楼兴隆(1981—), 男, 浙江东阳人, 在读硕士, 主要从事天然产物化学和有机合成研究。
^{*} 通讯作者, E-mail: jinming.gao@sohu.com。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 丁香, 于 2004 年购于西安中药材市场, 经本校植物学教研室齐兰兰老师鉴定为 *Eugenia caryophyllata* Thunb. 的干燥花蕾, 晾干备用。

1.1.2 试剂 无水乙醇、吐温-80、石油醚、丙酮均为 AR 级, 柱层析硅胶为青岛海洋化工厂生产。

1.1.3 仪器 培养皿, LS-B50L 型压力蒸汽灭菌器, YJ-875SA 医用净化设备台, LRH-250A 生化培养箱, HP 5973 GC-MS 等。

1.1.4 供试菌种 玉米大斑病菌 (*Helminthosporium turcicum* Pass), 白菜黑斑病菌 (*Alternaria brassicae*), 葡萄炭疽病菌 (*Gloeosporium fructigenum*), 小麦纹枯病菌 (*Rhizoctonia cereali*), 番茄黑霉 (*Alternaria alternata*), 以上菌株为本实验室的保藏菌株。

1.1.5 培养基 采用马铃薯培养基 (PDA): 马铃薯 100 g, 琼脂 10 g, 葡萄糖 10 g, 蒸馏水加至 500 mL。将马铃薯去皮切碎, 加蒸馏水至 500 mL, 煮沸 10~20 min, 用纱布过滤, 再补加蒸馏水至 500 mL, 然后加葡萄糖和琼脂, 加热溶化, 分装, 高压灭菌 121℃, 20 min。

1.1.6 供试菌菌悬液的制备 将上述各种供试菌种用适宜斜面培养基活化, 以无菌生理盐水制成 102~103 cfu/mL 的菌悬液。

1.2 试验方法

1.2.1 香油的制备 用粉碎机将丁香研磨成细粉末。药品粉碎后, 按常规水蒸气蒸馏法提取丁香油, 将提取的丁香油每 2 mL 加 1 mL 吐温-80 增溶^[5], 备用。

1.2.2 香油最低抑菌浓度 (MIC) 的测定 将备用丁香油用无菌水进行连续倍半稀释法稀释, 其对应浓度为 (按中药量计算): 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.3125%, 0.15625%。然后将各稀释液 1 mL 分别注入无菌培养皿中与倒入的 9 mL 培养基混合均匀, 等其凝固后, 将菌悬液均匀涂抹于培养基表面。适温适时培养, 观察结果, 以完全没有菌生长的最低浓度为丁香油的最低抑菌浓度 (MIC)^[6]。同时用无菌水和 10% 吐温-80

作对照。

1.2.3 香油组分分离及各组分的抑菌试验

丁香油组分的分离和鉴定: 将提取所得的丁香油进行硅胶柱层析, 用石油醚、石油醚: 乙酸乙酯 (49:1), 丙酮依次进行梯度洗脱, 石油醚: 乙酸乙酯 (49:1) 洗脱得到组分 I, 用 GC-MS 分析确定纯度并鉴定其结构。合并石油醚洗脱部分及丙酮洗脱部分得到组分 II。两部分用吐温-80 增溶备用。

丁香油各组分的抑菌试验: 用常规滤纸制成直径为 6 mm 的小圆片, 干热 160℃ 灭菌 2 h, 并将小滤纸片浸渍在上述分离液中备用。

然后将菌悬液均匀涂抹于 PDA 培养基上, 把上述浸渍过的圆形滤纸片平放于培养基表面。以无菌水和 10% 吐温-80 做对照, 定温、定时培养后观察并测量抑菌圈大小^[7]。

2 结果与分析

2.1 丁香油的提取

利用常规水蒸气蒸馏法从丁香中提取丁香油, 经计算, 产率为 12.54%。

2.2 丁香油最低抑菌浓度 (MIC) 的测定

试验选用的 5 个供试菌种是植物中常见的病原菌, 以它们作为研究对象有一定的代表性。丁香油对供试菌种的最低抑菌浓度 (MIC) 见表 1。从表中可以看出, 丁香油对玉米大斑、葡萄炭疽、番茄黑霉、白菜黑斑和小麦纹枯等 5 种病原菌均有明显的抑制作用, 对玉米大斑、葡萄炭疽和番茄黑霉的最低抑制浓度为 0.3125 mg/mL, 对白菜黑斑、小麦纹枯的最低抑制浓度为 0.625 mg/mL。

2.3 丁香油分离组分的鉴定及其抑菌试验

对组分 I 进行了 GC-MS 分析, 并与丁香酚的标准谱图进行对照。分析结果见表 2。

由此可确定组分 I 为丁香酚, 含量达 97.29%。

将组分 I 和组分 II 以丁香油最低抑菌浓度的 2 倍分别对玉米大斑、葡萄炭疽、番茄黑霉、白菜黑斑、小麦纹枯进行抑菌试验, 结果见表 3。从表 3 可知, 只有丁香酚有明显的抑菌圈, 除去丁香酚后的其余组分和对照均无抑菌圈。故丁香酚是丁香油的有效抑菌成分。

表 1 丁香油的最低抑菌浓度

Table 1 The minimal inhibiting concentration of the clove oil

丁香油浓度/ % Concentration	供试菌种 Pathogenic fungi				
	玉米大斑菌 <i>Helminthosporium turcicum pass</i>	葡萄炭疽菌 <i>Gloeosporium fructigenum</i>	番茄黑霉菌 <i>Alternaria alternate</i>	白菜黑斑菌 <i>Alternaria brassicae</i>	小麦纹枯菌 <i>Rhizoctonia cereali</i>
2.5	—	—	—	—	—
1.25	—	—	—	—	—
0.625	—	—	—	—	—
0.3125	—	—	—	+	+
0.15625	+	+	+	++	++
无菌水 Sterile water	+++	+++	+++	+++	+++
10%吐温-80 10% Polysorbate-80	+++	+++	+++	+++	+++

注: 以上数据均为 3 次试验重复。— 表示无菌生长, + 表示菌体生长弱, ++ 表示菌体生长较强, +++ 表示生长很强。
Note: All values are means of three replicates. The sign of "—" shows that the phytopathogenic fungus do not grow, the signs of "+", "++" and "+++" show respectively they grow lower, strong and stonger.

表 2 组分 I 和丁香酚的质谱数据

Table 2 The mass spectral data of component I and eugenol

样品 Samples	m/ z / %					
I	164(M+)	149(40)	131(22)	103(22)	77(23)	55(18)
丁香酚 Eugenol	164(M+)	149(50)	131(40)	103(30)	77(25)	55(14)

表 3 丁香油各组分的抑菌效果

Table 3 Inhibitory effect of different components of clove oil

丁香油浓度/ % Concentration	供试菌种 Pathogenic fungi				
	玉米大斑菌 <i>Helminthosporium turcicum pass</i>	葡萄炭疽菌 <i>Gloeosporium fructigenum</i>	番茄黑霉菌 <i>Alternaria alternate</i>	白菜黑斑菌 <i>Alternaria brassicae</i>	小麦纹枯菌 <i>Rhizoctonia cereali</i>
I	15.2	15.0	15.6	14.5	14.0
II	—	—	—	—	—
III	—	—	—	—	—
IV	—	—	—	—	—

注: I 为丁香酚, II 为除丁香酚后的其余组分, III为无菌水, IV为 10%吐温-80。表中数值表示抑菌圈的直径(单位: mm), W 表示无抑菌效果。
Note: I, II, III and IV is respectively the eugenol, the rest except for eugenol, the sterile water and 10% Polyorbate-80. The value in table 3 shows the diameter of the antimicrobial circle(units; mm), the sign of "—" shows these samples have no effect on the phytopathogenic fungus.

3 讨论

3.1 丁香油对植物中常见的病原菌的最低抑制浓度(MIC)达到了 0.5 mg/mL 左右,说明丁香油具有作为生物农药的应用前景。

3.2 经气质分析得知丁香油的主要成分为丁香酚。

3.3 对丁香油中的不同组分进行了抑菌研究,结果表明丁香油的有效抑菌活性成分为丁香酚。

3.4 丁香油原料丰富,且富含丁香酚,为丁香酚结构改造寻求更佳抑菌活性成分提供了物质基础,这方面的研究工作正在进行之中。

参考文献:

[1] 李锦绣. 丁香现代药理研究进展[J]. 实用中医药杂志, 2002, 18(6): 54.

[2] 谢小梅, 陈资文, 陈和利, 等. 花椒肉豆蔻防霉作用实验研究[J]. 时珍国医国药, 2001, (2): 100.

[3] 周建新, 许 华, 金 浩. 丁香油抑菌效果与抑菌成分的研究[J]. 中国食品添加剂, 2000, (3): 24.

[4] 靖 会, 佐建锋. 挥发油的药理研究进展[J]. 西北药学杂志, 2005, 20(2): 50.

[5] 李先保, 时维静, 柯六四. 三种中草药抑菌效果的观察[J]. 开发研究, 2002, (6): 27.

[6] 吴传茂, 吴周和, 何霞辉. 迷迭香提取物的抑菌作用研究[J]. 广州食品工业科技, 2000, (3): 5.

[7] 徐叔云. 药理实验方法学(第 2 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 1340.