

泰山野生白苏叶挥发油成分 GC-MS 分析与抑菌活性研究

姜红霞¹, 聂永心², 冀海伟¹, 张显忠¹, 王德才¹, 赵雪梅^{1*}

1. 泰山医学院, 山东 泰安 271016

2. 山东农业大学生命科学学院, 山东 泰安 271018

摘要: 目的 研究泰山野生白苏 *Perilla frutescens* 叶挥发油组成及抑菌活性。方法 水蒸气蒸馏法提取白苏叶挥发油, 采用 GC-MS 法对挥发油成分进行分析; 以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌和红色毛癣菌为供试菌种, 平板打孔法初步测定挥发油抑菌活性, 试管稀释法测定挥发油最低抑菌浓度和最低杀菌浓度。结果 白苏叶挥发油已鉴定成分占总量的 98.45%, 其主要成分有 2, 6-二甲基-6-(4-甲基-3-戊烯基)-双环 [3.1.1] 庚-2-烯 (18.23%)、紫苏酮 (18.16%)、戊基苯酚 (17.3%)、石竹烯 (14.79%)、芳樟醇 (7.69%); 白苏叶挥发油对 4 种供试菌的最低抑菌浓度分别为 2.500、2.500、0.625、0.100 $\mu\text{L/mL}$, 最低杀菌浓度分别为 5.000、2.500、1.250、0.200 $\mu\text{L/mL}$ 。结论 白苏叶挥发油对细菌和真菌都有抑制和杀灭作用, 尤其对红色毛癣菌有较强的杀灭作用。

关键词: 白苏; 挥发油; 气相色谱-质谱分析; 抑菌活性; 红色毛癣菌

中图分类号: R284.14

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2011)10-1952-04

GC-MS analysis and antimicrobial activity study of essential oil from *Perilla frutescens* leaves

JIANG Hong-xia¹, NIE Yong-xin², JI Hai-wei¹, ZHANG Xian-zhong¹, WANG De-cai¹, ZHAO Xue-mei¹

1. Taishan Medical College, Taian 271016, China

2. Life Science Department, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

Key words: *Perilla frutescens* (L.) Britton; essential oil; GC-MS analysis; antimicrobial activity; *Trichophyton rubrum* Sabouraud

白苏 *Perilla frutescens* (L.) Britton 是唇形科紫苏属一年生草本植物, 其性味辛温, 能散寒解表、理气宽中, 用于风寒感冒、头痛、咳嗽、胸腹胀满等症, 在全国很多地方都有野生及栽培^[1]。《中国植物志》将白苏与紫苏 *P. frutescens* var. *arguta* (Benth.) Hand. -Mazz. 合并为一种, 称为紫苏^[2]。白苏全草香气浓厚, 含有丰富的挥发油^[3], 挥发油是中药中一类常见的重要成分, 多具有祛痰、止咳、平喘、驱风、健胃、解热、镇痛、抗菌消炎作用^[4-5]。由于季节性、受环境条件和提取方法差异的影响, 不同产地、不同来源的白苏活性成分及其量差别很大^[3]。本实验以采自泰山山麓的野生白苏为实验材料, 水蒸气蒸馏法提取挥发油, GC-MS 测定挥发油成分; 以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌和红色毛癣菌为代表菌种, 研究了白苏叶挥发油的抑菌活

性。研究证明, 白苏叶挥发油对 4 种菌均有抑制活性, 对红色毛癣菌的抑制活性最高, 为进一步开发白苏的药用价值提供参考。

1 材料与仪器

1.1 药材

野生白苏于 2009 年 9 月采自泰山山麓, 经泰山医学院李同德鉴定为白苏 *Perilla frutescens* (L.) Britton, 采摘叶片后阴干备用。

1.2 供试菌种

大肠杆菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 由本实验室保存, 白色念珠菌 *Candida albicans* ATCC90028 由第二军医大学皮肤科提供, 红色毛癣菌标准菌株 *Trichophyton rubrum* Sabouraud 由中国医学科学院医学真菌菌种保藏中心提供。

收稿日期: 2010-12-18

作者简介: 姜红霞 (1977—), 女, 山东泰安人, 泰山医学院讲师, 硕士, 主要从事中药生物技术、中药有效成分提取等研究工作。

E-mail: lx100000y@163.com

*通讯作者 赵雪梅 E-mail: zhaoxm@tsmc.edu.cn

1.3 主要仪器与试剂

QP2010 气相色谱-质谱联用仪, 日本岛津公司; RTx-1MS 色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.5 μm), Restek 公司; SW-CJ-2F 型超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; GNP-9050 型隔水式恒温培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; DHZ-300L 台式冷冻恒温振荡器, 宁波新芝生物科技有限公司。

葡萄糖、琼脂粉、蛋白胨、氯化钠、酵母提取物、无水乙醇等试剂均为国产分析纯。

1.4 培养基

LB 培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 加蒸馏水至 1 000 mL, 固体培养基加琼脂粉 18 g, 121 °C 灭菌 20 min。

沙氏培养基: 蛋白胨 10 g, 葡萄糖 40 g, 固体培养基加琼脂粉 18 g, 115 °C 灭菌 15 min。

2 方法

2.1 挥发油的提取

将白苏叶阴干粉碎, 按《中国药典》2010 年版一部附录 XD 挥发油测定法提取挥发油。白苏叶挥发油呈亮黄色, 密度小于水, 得率 1.4%~1.6%, 用无水硫酸钠干燥后置棕色瓶中, 4 °C 保存备用。

2.2 GC-MS 分析

色谱条件: 进样口温度 280 °C, 柱箱温度: 初温 40 °C, 保持 3 min, 以 10 °C/min 的速率上升至 120 °C, 再以 5 °C/min 的速率上升至 230 °C, 保持 3 min; 载气为氦气, 柱流量为 1.0 mL/min, 进样量 1 μL, 分流比 50:1。

质谱条件: 离子源为 EI, 离子源温度 200 °C, 接口温度 250 °C, 检测电压 0.8 kV, 质量扫描范围 30~400 amu, 溶剂切除时间 2 min。

2.3 挥发油抑菌活性检测

2.3.1 菌悬液的制备 将培养至对数生长期的菌种计数(红色毛癣菌须先研磨), 用无菌生理盐水稀释, 细菌调至 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cfu/mL; 真菌调至 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ cfu/mL。

2.3.2 挥发油体外抑菌活性 取 100 μL 各菌悬液在直径 9 cm 的琼脂平板上均匀涂布, 用直径 3 mm 的打孔器在平板中央打孔, 孔内加入 5 μL 挥发油, 对照板加 5 μL 蒸馏水, 置于恒温培养箱培养。大肠杆菌、金黄色葡萄球菌 37 °C 培养 20 h, 白色念珠菌 35 °C 培养 36 h, 红色毛癣菌 28 °C 培养 14 d。培养结束测量抑菌圈直径。

2.3.3 最小抑菌浓度(MIC)的测定 大肠杆菌、

金黄色葡萄球菌和白色念珠菌 MIC 值测定采用液体培养基二倍稀释法^[6], 在试管中加入一定量的液体培养基、菌悬液和挥发油, 使挥发油体积分数分别为 5.000、2.500、1.250、0.625、0.312、0.156 μL/mL, 同时以不加挥发油的空白管为对照(CK)。每个浓度接种 3 管, 重复 3 次。37 °C 摇床培养, 培养结束肉眼观察试管的浑浊程度。溶液澄清无菌生长的最大稀释度为最小抑菌浓度。

红色毛癣菌采用试管内药基法^[7]。沙氏培养基灭菌后趁热加入挥发油, 使体积分数分别为 0.400 0、0.200 0、0.1000、0.050 0、0.025 0、0.012 5 μL/mL, 漩涡混合器震荡混匀, 置斜面。取小于 1 mm³ 的菌块接种, 同时以不加挥发油的试管为空白对照(CK)。每个浓度接种 3 管, 重复 3 次。28 °C 恒温培养 14 d 观察菌落生长情况。最大稀释度无菌落生长为最小抑菌浓度。

2.3.4 最低杀菌浓度(MBC/MFC)的测定^[6-7] 取上述肉眼观察无菌生长的培养液或菌块移种于未加挥发油的培养基中, 按上述条件再培养, 仍无生长的为最低杀菌浓度。

3 结果

3.1 挥发油成分分析

采用 GC-MS 方法, 从白苏叶挥发油样品中获得 50 个峰, 通过数据库 NIST05 自动检索、人工解析和核对有关文献资料, 从中鉴定了 40 个化合物, 以面积归一化法进行定量分析, 结果见表 1。可见已鉴定化合物占白苏叶挥发油总量的 98.45%, 主要成分有 2, 6-二甲基-6-(4-甲基-3-戊烯基)-双环[3.1.1]庚-2-烯(18.23%)、紫苏酮(18.16%)、戊基苯酚(17.3%)、石竹烯(14.79%)、芳樟醇(7.69%)等, 白苏叶的挥发油成分组成与文献报道相近, 但各组分质量分数有较大差异^[3,8]。

3.2 挥发油体外抑菌活性

平板打孔法测定结果显示, 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌加入挥发油的平板形成抑菌圈, 抑菌圈直径见表 2; 红色毛癣菌加入挥发油的平板没有菌落生长, 但对照板长满了红色毛癣菌。由此可见, 白苏叶挥发油对 4 种供试菌都有一定的抑制活性, 对红色毛癣菌抑制活性最显著, 其次是白色念珠菌和金黄色葡萄球菌, 对大肠杆菌的抑制活性最小。

3.3 MIC

大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌培养结束后菌液的浑浊程度见表 3。可知, 白苏叶挥发

表 1 白苏叶挥发油成分

Table 1 Components of essential oil from *P. frutescens* leaves

序号	化合物	质量分数/%	序号	化合物	质量分数/%
1	己-2-烯醛	0.08	23	2, 4-二异丙烯基环己烷	0.38
2	反-3-己烯-1-醇	0.04	24	石竹烯	14.79
3	顺-3-己烯-1-醇	0.27	25	异喇叭烯	0.09
4	反-2-己烯-1-醇	0.10	26	葎草烯	2.03
5	甲酸己酯	0.09	27	β -紫罗兰酮	0.05
6	安息香醛	0.33	28	长叶环烯	0.10
7	6-甲基-5-庚烯-2-酮	0.04	29	大牛儿烯 D	3.22
8	1-辛烯-3-醇	2.44	30	2, 6-二甲基-6-(4-甲基-3-戊烯基)-双环 [3.1.1] 庚-2-烯	18.23
9	月桂烯	0.05	31	α -法尼烯	1.37
10	3-辛醇	0.56	32	异丁子香烯	0.11
11	苯乙醛	0.08	33	杜松二烯	0.41
12	芳樟醇	7.69	34	3, 7, 11-三甲基-1, 6, 10-十二烷三烯-3-醇	1.45
13	α -松油醇	0.09	35	石竹烯氧化物	0.48
14	2, 2, 5-三甲基-3-己酮	1.36	36	反式-3, 6-二甲基-3, 6-二乙基-三环 [3.1.0.0 (2, 4)] 己烷	0.74
15	紫苏酮	18.16	37	芹菜脑	0.34
16	1, 1-二甲基-2-戊烯基-1-丙烷	1.10	38	3, 7, 11-三甲基-1, 6, 10-十二烷三烯-3-醇乙酸酯	0.12
17	2-(1-丁烯基-3-基-双环[2, 2, 1] 庚烷)	2.33	39	τ -杜松醇	0.23
18	戊基苯酚	17.30	40	α -萜茄醇	0.12
19	牻牛儿酸甲酯	0.28	合计		98.45
20	丁香酚	1.40			
21	可巴烯	0.31			
22	十氢-3 α -甲-6-亚甲基-1-(1-甲基乙基)环丁基 [1,2,3,4] 二环戊烯	0.09			

表 2 白苏叶挥发油对菌种的抑菌圈直径

Table 2 Antimicrobial cycle diameter of essential oil from *P. frutescens* on stains

菌种	抑菌圈平均直径/mm
大肠杆菌	10.5
金黄色葡萄球菌	12.5
白色念珠菌	25.3
红色毛癣菌	>90
空白对照	6

油对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 值均为 2.5 $\mu\text{L/mL}$, 白色念珠菌的 MIC 值为 0.625 $\mu\text{L/mL}$ 。红色毛癣菌的 MIC 值测定结果显示, 对照试管中菌落生长旺盛, 菌丝呈白色绒毛状; 0.012 5、0.025 $\mu\text{L/mL}$ 的试管菌落比对照依次变小, 菌丝仍呈白色绒毛状。0.05 $\mu\text{L/mL}$ 的试管菌落更小, 菌丝呈灰黄色, 粉末状; 0.1、0.2、0.4 $\mu\text{L/mL}$ 的试管均无菌落生长。由此判定白苏叶挥发油对红色毛癣菌的 MIC 值为 0.1 $\mu\text{L/mL}$ 。

3.4 MBC/MFC

平板培养的结果表明, 挥发油对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MBC 分别为 5 和 2.5 $\mu\text{L/mL}$, 对白色念珠菌和红色毛癣菌的 MFC 分别为 1.25 和 0.2 $\mu\text{L/mL}$, 证明白苏叶挥发油对红色毛癣菌有较强的杀灭作用。

4 讨论

本实验用水蒸气蒸馏法提取泰山野生白苏叶挥发油, 并通过 GC-MS 分析其化学组成, 主要成分有 2, 6-二甲基-6-(4-甲基-3-戊烯基)-双环[3.1.1]庚-2-烯 (18.23%)、紫苏酮 (18.16%)、戊基苯酚 (17.3%)、石竹烯 (14.79%)、芳樟醇 (7.69%) 等, 这几种成分在紫苏属植物挥发油中均有报道, 但质量分数差异较大^[3,8]。这不仅取决于白苏自身的遗传因素, 还可能与植物的生长环境、采收季节、提取方法等相关。

本研究的供试菌种分别属于革兰阴性、阳性细

表 3 白苏叶挥发油作用后菌种的浑浊程度

Table 3 Turbidity of strains after treated with essential oil from *P. frutescens* leaves

组别	体积分数/($\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$)	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	白色念珠菌
CK	—	+++	+++	+++
挥发油	5.000	—	—	—
	2.500	—	—	—
	1.250	+	+	—
	0.625	++	+	—
	0.312	++	+	+
	0.156	++	++	++

“—”代表溶液澄清，无菌生长；“+”代表菌液浑浊的程度

“—” means clear solution without microbial growth; “+” means the amount of microbial in medium

菌、酵母样真菌和丝状真菌，实验证明，白苏叶挥发油对细菌和真菌都有一定抑制活性，但对真菌的抑制活性强于细菌，对丝状真菌的抑制活性强于酵母样真菌，对革兰阳性细菌强于阴性细菌。这可能与细菌、真菌的细胞壁成分有关^[9]，但抑制机制有待进一步研究。

红色毛癣菌是常见的皮肤癣菌，常引起皮肤浅部真菌病，如手癣、足癣、头癣等，从天然药物中筛选抗真菌药物已受到国内外学者的广泛重视。李治建等^[10]研究了地锦草对皮肤癣菌的抑制作用，地锦草提取物对红色毛癣菌的平均 MIC 为 446 $\mu\text{g/mL}$ ；张宏桂等^[7]研究了野生东北刺人参茎挥发油对红色毛癣菌等 7 种皮肤癣菌抗菌活性，MIC 为 0.063%~0.125%，MFC 为 0.125%~0.25%；杨得坡等^[11]研究了中国广藿香挥发油对皮肤癣菌的抑制作用，MIC 在 0.05~0.40 $\mu\text{L/mL}$ 。本研究证明泰山野生白苏叶挥发油对红色毛癣菌的 MIC 为 0.1 $\mu\text{L/mL}$ ，MFC 为 0.2 $\mu\text{L/mL}$ ，与同类研究相比，其抑菌与杀菌活性均较强。

据文献报道，紫苏醛和柠檬烯对皮肤丝状真菌生长有协同抑制作用^[12]，但本研究 GC-MS 分析结果表明，泰山野生白苏叶挥发油中不含紫苏醛和柠檬烯，对红色毛癣菌仍有强烈的抑制和杀灭作用，其中的抑菌活性成分尚需进一步实验确定。

参考文献

- [1] 蒋翔, 曹恒, 刘湘博, 等. 野生白苏子中挥发油的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11): 56-60.
- [2] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志 [M]. 北

京: 科学出版社, 1977.

- [3] 邱琴, 凌建亚, 张莉, 等. 不同方法提取的白苏叶挥发油的气质联用成分分析 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26(1): 114-119.
- [4] 吴玉兰, 丁安伟, 冯有龙. 荆芥及其相关药材挥发油的成分研究 [J]. 中草药, 2000, 31(12): 894-896.
- [5] 李昌勤, 姬志强, 康文艺. 藿香挥发油的 HS-SPME-GC-MS 分析 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1443-1444.
- [6] 刘晓蓉, 邓毛程, 张媛媛. 广藿香挥发油的提取及抑菌活性成分稳定性的研究 [J]. 中国酿造, 2009, 8: 87-90.
- [7] 张宏桂, 刘松艳, 付爱华. 野生东北刺人参茎挥发油成分及其抗皮肤癣菌作用 [J]. 中国药理学杂志, 1999, 34(6): 369-371.
- [8] 胡彦, 丁友芳, 温春秀, 等. 吹扫捕集 GC-MS 法测定紫苏不同变种叶片中的挥发性成分 [J]. 食品科学, 2010, 31(12): 159-164.
- [9] 沈灵犀, 扎西次, 耿宇鹏, 等. 西藏蒿属六种植物精油化学成分分析及抑菌效果 [J]. 复旦学报, 2010, 49(1): 73-80.
- [10] 李治建, 古力娜·达吾提, 肖威, 等. 地锦草提取物抗真菌作用及对皮肤真菌超微结构的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 758-762.
- [11] 杨得坡, Chaumont J P, Millet J Å. 藿香和广藿香挥发油对皮肤癣菌和条件致病真菌的抑制作用 [J]. 中国药理学杂志, 2000, 35(1): 9-11.
- [12] McGeady P, Wansley D, Logan D A. Carvone and perillaldehyde interfere with the serum-induced formation of filamentous structures in *Candida albicans* at substantially lower concentrations than those causing significant inhibition of growth [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(7): 953-955.