

# 黄金香柳挥发油化学成分分析及其抗菌活性

冯皓, 祝一鸣, 王伟, 刘易, 贺佳, 王军, 单体江\*

(华南农业大学林学与风景园林学院, 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广州 510642)

**摘要** 采用水蒸气蒸馏法提取黄金香柳枝叶中的挥发油, 得率为 0.972% (以鲜重为基础)。通过 GC-MS 分析, 从黄金香柳枝叶中共鉴定出 18 种成分, 占总相对含量的 99.056%, 其中主要成分是甲基丁香酚(92.185%)和肉桂酸甲酯(3.795%)。黄金香柳枝叶挥发油对 6 种供试细菌表现出一定的抑菌作用, 其中对黄瓜角斑病菌和根癌农杆菌的抑菌活性最好, 抑菌圈直径分别为  $(9.0 \pm 0.0)$  mm 和  $(8.5 \pm 0.1)$  mm, 但仍弱于阳性对照硫酸链霉素对黄瓜角斑病菌  $(18.0 \pm 1.0)$  mm 和根癌农杆菌  $(21.7 \pm 1.0)$  mm 的活性。

**关键词** 黄金香柳; 挥发油; 化学成分分析; 抗菌活性

**中图分类号:** S 482.292, TQ 455 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.01.035

## Chemical composition and antibacterial activity of the volatile oils from *Melaleuca bracteata*

Feng Hao, Zhu Yiming, Wang Wei, Liu Yi, He Jia, Wang Jun, Shan Tijiang

(Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasms, College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract** Using hydro-distillation method, the volatile oil was extracted with a yield of 0.972% from fresh branches and leaves of *Melaleuca bracteata*. The chemical composition of the volatile oil was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Totally eighteen components were identified from the volatile oil, which accounted for 99.056% of total volatile substances. Methyl eugenol (92.185%) and methyl cinnamate (3.795%) were the major compounds of the volatile oil. The essential oil showed a certain antibacterial activity on all six tested bacteria, and had better inhibition to *Pseudomonas lachrymans* and *Agrobacterium tumefaciens*, with the diameters of inhibition zone of  $(9.0 \pm 0.0)$  mm and  $(8.5 \pm 0.1)$  mm, respectively, which was weaker than that of streptomycin sulfate. The diameters of inhibition zone treated with streptomycin sulfate was  $(18.0 \pm 1.0)$  mm and  $(21.7 \pm 1.0)$  mm, respectively.

**Key words** *Melaleuca bracteata*; volatile oil; chemical constituent analysis; antibacterial activity

黄金香柳 *Melaleuca bracteata*, 又名千层金、黄金宝树、黄金串钱柳, 属于桃金娘科白千层属常绿小乔木或灌木<sup>[1-2]</sup>。原产于新西兰、澳大利亚, 20 世纪 90 年代首次作为彩叶树种从澳洲引种到我国<sup>[3]</sup>。黄金香柳树体金黄, 株形通直, 适生范围广, 不仅生长快, 耐修剪, 更具有强大的抗病虫、抗旱、耐涝及抗风特性, 是现今世界上最流行、最具观赏价值的色叶乔木新树种之一。黄金香柳不仅能用于庭园景观绿化, 亦可用于林相改造<sup>[2]</sup>, 其大面积的推广和种植对于丰富华南地区城市绿化树种和提高城市景观多样

性具有重要意义。

黄金香柳枝叶芳香宜人, 目前关于其研究多集中于黄金香柳挥发油化学成分及其提取方法等方面<sup>[2, 4]</sup>, 黄金香柳芳香油是目前世界上珍贵的化妆品香料之一, 且具有很强的杀螨活性和驱虫性<sup>[5]</sup>, 然而对于其挥发油抗菌活性以及在农林业上的应用却鲜有报道。本研究采用水蒸气蒸馏法提取黄金香柳的挥发油, 通过 GC-MS 分析鉴定其主要成分, 并通过滤纸片扩散法测定了黄金香柳挥发油对 6 种供试细菌的抑菌活性, 以期黄金香柳推广

收稿日期: 2016-01-06

修订日期: 2016-02-21

基金项目: 广东省林业科技创新项目(2015KJCH043); 广东省普通高校青年创新人才项目(2014KQNCX034)。

\* 通信作者 E-mail: tjshan@scau.edu.cn

和种植以及挥发油在农林病害生物防治上的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

黄金香柳枝叶于 2015 年 7 月 23 日采自华南农业大学校园,标本由华南农业大学林学与风景园林学院郑明轩老师鉴定。

### 1.2 仪器与试剂

主要仪器:水蒸气蒸馏装置(北京永光明医疗仪器厂);6890A-5975C 气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)(Agilent Technologies, USA);主要试剂:正构烷烃  $C_8 \sim C_{40}$ (美国 Sigma 公司);硫酸链霉素(美国 Sigma 公司);氯化钠、无水乙醚、无水硫酸钠均为国产分析纯(北京化学试剂公司)。

### 1.3 黄金香柳挥发油的提取

参照 Lou 等<sup>[6]</sup>的方法。采集黄金香柳枝叶,称重后将其装入水蒸气蒸馏装置内,加入适量蒸馏水,待温度升至  $100^\circ\text{C}$ ,有液滴滴下时开始计时,连续蒸馏 6 h,收集蒸出的挥发油,加入一定量的 NaCl,用无水乙醚连续萃取 3 次,合并萃取液,加入无水硫酸钠进行干燥,浓缩萃取液或让无水乙醚自然挥发,待挥发干后计算得率, $4^\circ\text{C}$ 密封保存,备用。

### 1.4 黄金香柳挥发油化学组分的 GC-MS 分析

黄金香柳挥发油化学组分的鉴定在 6890N-5975C GC-MS 上进行,色谱柱为 DB-5 ( $30\text{ m} \times 250\ \mu\text{m} \times 0.25\ \mu\text{m}$ ),无分流进样,进样量  $1\ \mu\text{L}$ 。升温程序:进样口温度  $230^\circ\text{C}$ ,起始温度  $70^\circ\text{C}$ ,保持 1 min,以  $8^\circ\text{C}/\text{min}$  上升到  $120^\circ\text{C}$ ,保持 1 min,以  $30^\circ\text{C}/\text{min}$  上升到  $150^\circ\text{C}$ ,保持 1 min,以  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  上升到  $175^\circ\text{C}$ ,保持 0 min,再以  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  上升到  $180^\circ\text{C}$ ,保持 0 min,最后以  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  上升到  $240^\circ\text{C}$ ,保持 0 min。离子源温度  $230^\circ\text{C}$ ,电离方式为 EI,电离能量 70 eV,载气为 He,流速  $1\ \text{mL}/\text{min}$ ,全扫描采集,质谱检测器(MSD)检测。通过与标准化化合物的保留时间和质谱图作对比,确定待测成分。

保留系数(retention index,  $RI$ )的测定<sup>[7-8]</sup>:系列正构烷烃  $C_8 \sim C_{40}$ 用氯仿稀释 50 倍,然后与上述 GC 条件一样进行分离,记录  $C_8 \sim C_{40}$ 各正构烷烃的保留时间。用线性升温公式计算各成分的  $RI$ : $RI = 100n + 100(\lg t_x - \lg t_n) / (\lg t_{n+1} - \lg t_n)$ ,其中  $t_x$ 、 $t_n$  和  $t_{n+1}$

分别为被分析的组分和碳原子数处于  $n$  和  $n+1$  之间的正烷烃( $t_n < t_x < t_{n+1}$ )的流出峰保留时间。

### 1.5 黄金香柳挥发油抗菌活性的测定

供试细菌:均为革兰氏阴性菌,包括枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*、桉树青枯菌 *Ralstonia solanacearum*、番茄疮痂病菌 *Xanthomonas vesicatoria*、黄瓜角斑病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*、大肠杆菌 *Escherichia coli* 和根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens*,以上菌株由华南农业大学林学与风景园林学院森保教研室提供。

黄金香柳挥发油抗细菌活性的测定参照赵文越<sup>[9]</sup>和龚佑文<sup>[7]</sup>的方法,略有改进。供试细菌由于长期保存在  $-20^\circ\text{C}$ 下,在活性测定前,先用 LB 平板进行活化培养( $28^\circ\text{C}$ ,暗)48 h,然后挑取单菌落,在 LB 液体培养基中摇培( $28^\circ\text{C}$ ,暗,  $150\ \text{r}/\text{min}$ )24 h,将菌液浓度稀释到  $10^8\ \text{cfu}/\text{mL}$ 备用。倒好平板后,用移液枪分别吸取  $50\ \mu\text{L}$  菌液,用玻璃棒涂板。用镊子夹取直径 6 mm 的无菌滤纸片放在带菌平板上,每皿放置 3 片,在滤纸片滴加  $8\ \mu\text{L}$  的黄金香柳挥发油,每个菌种平行测定 3 次。阳性对照为  $8\ \mu\text{L}$  的 0.2% 硫酸链霉素。然后将平板放在  $28^\circ\text{C}$ ,黑暗条件下培养,24 h 后测量抑菌圈直径。采用 SAS 8.2 软件对数据进行分析,显著性水平为 0.05。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄金香柳挥发油化学成分分析

采用水蒸气蒸馏法提取黄金香柳枝叶中的挥发油,得率为 0.972% (以鲜重为基础)。黄金香柳挥发油总离子流色谱图如图 1 所示。通过 GC-MS 分析,各组分峰用 NIST Library(2011 版)质谱库进行检索,从黄金香柳枝叶中共鉴定出 18 个成分,占总相对含量的 99.056%,采用 GC 峰面积归一法定量分析,计算出各成分的相对含量,黄金香柳枝叶挥发油组成成分及其相对含量见表 1。从表中可以看出,黄金香柳挥发油主要是萜类化合物及其含氧衍生物,其中主要成分是甲基丁香酚,其相对含量高达 92.185%;此外,肉桂酸甲酯的相对含量为 3.795%,其余成分的相对含量均在 0.4% 以下。以上结果表明,黄金香柳枝叶中含有大量的挥发性成分,而挥发性油的成分主要是甲基丁香酚和肉桂酸甲酯,可作为观赏树种种植。

表 1 黄金香柳挥发油成分及其含量测定结果

Table 1 Test results of the constituents and contents of volatile oils from *Melaleuca bracteata*

编号 No.	保留时间 /min Retention time	保留系数 Retention index	化合物 Compound	化学式 Molecular formula	分子量 Molecular weight	相对含量/% Relative content
1	6.173	1 029	4-乙基邻二甲苯 4-Ethyl-o-xylene	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	134	0.122
2	7.585	1 085	D2-萹烯 D2-Carene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	0.165
3	7.890	1 096	$\alpha$ -萹烯 $\alpha$ -Fenchene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	0.315
4	10.447	1 201	茴香脑 <i>cis</i> -Anethol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	148	0.261
5	11.147	1 230	香茅烯(-)-Citronellene	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub>	138	0.152
6	13.190	1 306	反式-肉桂酸甲酯( <i>E</i> )-3-Phenylacrylic acid methyl ester	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	162	0.123
7	14.497	1 358	5-丁子香酸 5-Allylguaiacol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	164	0.178
8	15.341	1 389	肉桂酸甲酯 Methyl cinnamate	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	162	3.795
9	15.875	1 410	甲基丁香酚 Methyl eugenol	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	178	92.185
10	16.303	1 428	( <i>Z</i> )-石竹烯( <i>Z</i> )-Caryophyllene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.157
11	17.849	1 490	1-isopropyl-7-methyl-4-methylene-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydronaphthalene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.168
12	18.806	1 529	$\delta$ -杜松烯 $\delta$ -Cadinene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.276
13	18.903	1 533	l-卡拉烯 l-Calamenene	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	202	0.260
14	19.432	1 554	橐香素 Elemicin	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	208	0.264
15	20.422	1 592	$\delta$ -芹子烯 $\delta$ -Selinene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.157
16	21.593	1 668	1,2,4a,5,6,8a-Hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)naphthalene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.196
17	22.807	1 736	3,4,5-三甲氧基苯甲酸甲酯 3,4,5-Trimethoxybenzoic acid methyl ester	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	226	0.122
18	29.354	2 072	叶绿醇 Phytol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	296	0.160

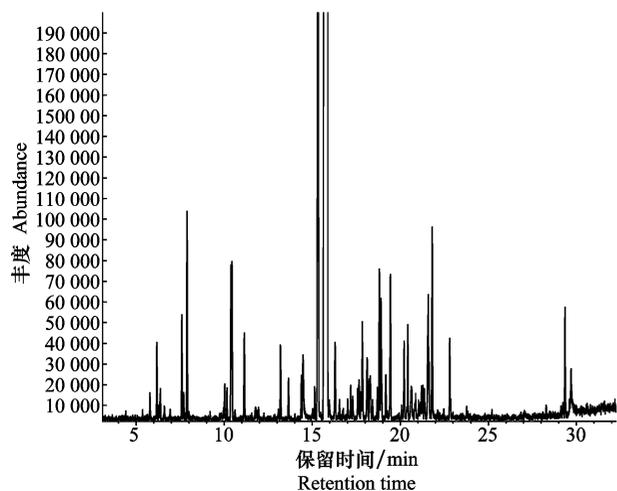


图 1 黄金香柳挥发油总离子流色谱图

Fig. 1 TLC of volatile oils from *Melaleuca bracteata*

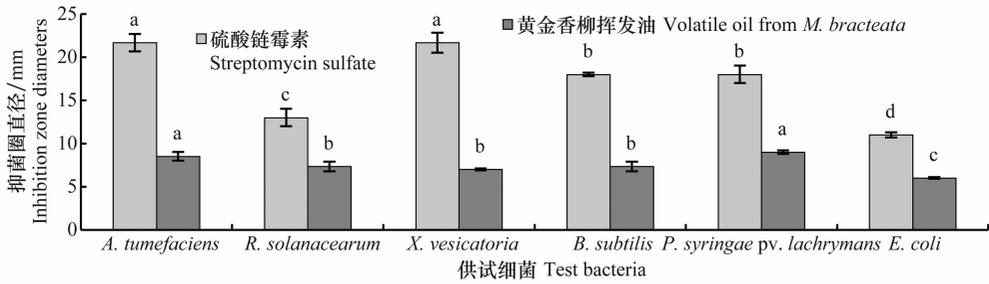
## 2.2 黄金香柳挥发油的抗细菌活性

黄金香柳挥发油对 6 种细菌的抑制活性如图 2 所示,从图中看出,黄金香柳挥发油对 6 种供试细菌虽然表现出一定的抑菌作用,但抑菌效果不明显;与阳性对照相比,黄金香柳挥发油对 6 种细菌的抑制活性均弱于硫酸链霉素。黄金香柳挥发油对不同细菌的抑制活性也略有不同,通过 SAS 分

析发现,对黄瓜角斑病菌和根癌农杆菌的抑菌活性最好,抑菌圈直径分别为(9.0±0.0)mm 和(8.5±0.1)mm;而对大肠杆菌的抑菌效果最差,几乎无抑制作用;对梭树青枯病菌、番茄疮痂病菌和枯草芽胞杆菌的抑制活性无显著性差异,抑菌圈直径在 7.0~7.3 mm 之间。

## 3 讨论

黄金香柳作为园林景观和绿化树种,在我国南方尤其是华南地区种植广泛。钟昌勇等<sup>[4]</sup>采用水蒸气蒸馏法测得黄金香柳挥发油的得率为 1.13%,其中甲基丁香酚的相对含量达到 95.45%;叶征美等<sup>[2]</sup>测得黄金香柳挥发油甲基丁香酚的相对含量为 83.55%;秦荣秀等<sup>[10]</sup>研究发现黄金香柳芳香水和黄金香柳挥发油的主要化学成分基本一致,黄金香柳挥发油的主要成分为甲基丁香酚,含量达 90%。本研究的结果表明,黄金香柳挥发油的得率为 0.972%,其主要成分甲基丁香酚的相对含量为 92.185%,这与前人的研究基本一致,但在化合物的数量以及相对含量上有所差异。一方面与黄金香柳的品种和生长地点等有关,另一方面也与采集时间和提取方式有关。



相同处理不同小写字母表示在0.05水平差异显著  
Bar with different small letters in the same treatment indicate significant difference at 0.05 level

图2 黄金香柳挥发油的抗细菌活性

Fig. 2 Antibacterial activity of the volatile oils from *Melaleuca bracteata*

黄金香柳挥发油对6种供试细菌的生长表现出一定的抑制活性,但抑菌效果不明显,可能与黄金香柳挥发油的主要成分有关,甲基丁香酚广泛存在于多种植物挥发油中,如细辛、肉豆蔻、辣椒、柠檬草、龙蒿、罗勒、八角茴香和茴香等<sup>[2]</sup>,目前尚未见关于甲基丁香酚抑菌作用的研究。但甲基丁香酚作为橘小实蝇的引诱剂对性成熟的雄虫具有强烈的引诱作用,引诱效果明显且持效期长<sup>[2, 11-13]</sup>,在生物防治上具有潜在的利用价值。肉桂酸甲酯又称β-苯基丙烯酸甲酯,具有果香膏香,可作为制造香水香精、皂用香精的定香剂,也可作为食用香精。从黄金香柳枝叶中提取到的肉桂酸甲酯已被广泛应用于香料和防晒护肤品中<sup>[14]</sup>,在食品、日用化妆品、制皂等方面有着广泛的用途<sup>[15-16]</sup>。黄金香柳作为高产甲基丁香酚和肉桂酸甲酯挥发油的树种具有潜在的研究前景和应用价值,其本身能否作为生防树种应用于园林病虫害的防治还有待于更深入的研究。

参考文献

[1] 余雪芳,曹莉莉,李永裕,等. 千层金叶片化学成分初步研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(6): 203-205.  
 [2] 叶征美,刘鑫,沈明娟,等. 千层金挥发油有机溶剂提取工艺的优化及成分分析[J]. 热带作物学报, 2014, 35(5): 992-998.  
 [3] 龚峥,周丽华,张卫华,等. 黄金香柳组织培养与快速繁殖[J]. 广东林业科技, 2009, 25(5): 50-53.  
 [4] 钟昌勇,黄祖强,梁忠云,等. 黄金香柳枝叶挥发性挥发油提取与分析[J]. 香料香精化妆品, 2009, 12(6): 8-10.  
 [5] Yatagai M, Ohira T, Nakashima K. Composition, miticidal activity and growth regulation effect on radish seeds of extracts

from *Melaleuca* species [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 1998, 26(7): 713-722.  
 [6] Lou Jingfeng, Mao Ziling, Shan Tijiang, et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant properties of the essential oils from the roots and cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2014, 17(3): 380-384.  
 [7] 龚佑文. 芸香科植物花椒和川黄柏果实精油化学组成及其抗真菌活性[D]. 北京: 中国农业大学, 2007.  
 [8] Van den Dool H, Kratz P D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography [J]. Journal of Chromatography, 1963, 11: 463-471.  
 [9] 赵文越,王雪青,邵明辉,等. 水蒸气蒸馏法制备板栗花精油及其抑菌活性[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(13): 38-43.  
 [10] 秦荣秀,李桂珍,梁忠云. 千层金油芳香水的化学成分分析[J]. 广西林业科学, 2014, 43(3): 325-328.  
 [11] Brennan R J, Kandikonda S, Khimian A P, et al. Saturated and monofluoro analogs of the oriental fruit fly attractant methyl eugenol show reduced genotoxic activities in yeast [J]. Mutation Research, 1996, 369(3/4): 175-181.  
 [12] 李周文婷,曾玲,梁广文,等. 不同温度和光照强度甲基丁香酚对桔小实蝇雄虫的诱捕率[J]. 环境昆虫学报, 2010, 32(3): 363-368.  
 [13] 孙阳,张淑颖. 甲基丁香酚挥发物对桔小实蝇成虫的引诱作用[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(20): 8685-8687.  
 [14] Bhatia S P, Wellington G A, Cocchiara J, et al. Fragrance material review on methyl cinnamate [J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45(1): S113-S119.  
 [15] 黎海妮,黄锁义. 合成肉桂酸甲酯催化剂研究进展[J]. 化工生产与技术, 2006, 13(6): 58-60.  
 [16] 许戈文,李布青. 合成香料产品技术手册[M]. 北京: 中国商业出版社, 1996: 365-366.

(责任编辑: 杨明丽)