

江西迷迭香精油的成分分析及抗氧化、抑菌活性研究

郭冬云¹, 万娜^{1,3*}, 吴意¹, 林瑞华¹, 唐欣¹, 曹岚⁴, 伍振峰^{1,2*}, 杨明^{1,2}¹江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室; ²江西中医药大学 创新药物与高效节能降耗制药设备国家重点实验室;³江西中医药大学 药学院; ⁴江西中医药大学 中药资源与民族药研究中心, 南昌 330004

摘要: 为了研究江西迷迭香精油的化学成分及抗氧化、抑菌活性, 采用水蒸气蒸馏法提取迷迭香精油, 利用气相色谱-质谱联用法 (GC-MS) 对迷迭香精油成分进行分析, 通过对 DPPH 自由基、羟基自由基的清除活性和还原力来研究迷迭香精油的体外抗氧化活性; 通过以枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为供试菌, 测定抑菌圈大小和最低抑菌浓度 (MIC) 来研究迷迭香精油的抑菌活性。实验结果表明, 从迷迭香精油中鉴定出 40 种化学成分, 占精油总量的 99.46%, 其主要化学成分有 α -蒎烯 (39.05%) 和 1,8-桉叶素 (16.86%), 其次是莰烯 (4.22%)、D-柠檬烯 (3.87%)、龙脑 (3.74%)、 β -石竹烯 (3.11%) 等, α -蒎烯的含量高于国内其他产地; 迷迭香精油对 DPPH、羟基自由基和还原力的半数清除率 IC_{50} 值分别为 76.42、51.40 和 49.15 $\mu\text{L}/\text{mL}$; 精油对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌圈大小分别为 14.40 ± 0.66 、 11.41 ± 0.19 、 11.70 ± 0.27 mm, 最低抑菌浓度 (MIC) 分别为 2.50、10.00、10.00 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 对枯草芽孢杆菌的抑制作用明显强于金黄色葡萄球菌和大肠杆菌。结果表明迷迭香精油具有较好的抗氧化、抑菌活性。

关键词: 迷迭香; 精油; GC-MS 分析; 化学成分; 抗氧化; 抑菌

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)2-0263-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.2.012

Study on chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Rosmarinus officinalis* L. in Jiangxi

GUO Dong-yun¹, WAN Na^{1,3*}, WU Yi¹, LIN Rui-hua¹, TANG Xin¹, CAO Lan⁴, WU Zhen-feng^{1,2*}, YANG Ming^{1,2}¹Key Laboratory of Modern Preparation of TCM Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine;²State Key Laboratory of Innovation Drug and Efficient Energy-Saving Pharmaceutical Equipment, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine; ³School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine;⁴Research Center for Traditional Chinese Medicine Resourcing and Ethnic Minority Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: To study the chemical compositions, antioxidant activity and antibacterial activity of essential oil of rosemary, the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) was extracted by steam distillation and the chemical compositions were analyzed by GC-MS. The antioxidant activity *in vitro* of essential oil was evaluated by DPPH free radical, hydroxyl free radical scavenging activity and reducing power. The antibacterial activity of rosemary essential oil was studied by measuring the size of the inhibition zone and the minimum inhibitory concentration (MIC) with *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* as test bacteria. The results showed that 40 chemical components were identified from the essential oil of rosemary, accounting for 99.46% of the total essential oil. The main chemical components were α -pinene (39.05%) and 1,8-cineole (16.86%), followed by camphene (4.22%), D-limonene (3.87%), borneol (3.74%), β -caryophyllene (3.11%), etc. The content of α -pinene was higher than other regions in China. The half of the clearance IC_{50} values of DPPH, hydroxyl free radical and reducing power of rosemary essential oil were 76.42, 51.40 and 49.15 $\mu\text{L}/\text{mL}$. The inhibitory zone sizes of essential oil against *B. subtilis*, *S. aureus* and *E. coli* were 14.40 ± 0.66 , 11.41 ± 0.19 and 11.70 ± 0.27 mm. The minimum

收稿日期: 2021-08-31 接受日期: 2021-12-23

基金项目: 国家自然科学基金 (82060720); 江西省重点研发计划 (20192BBG70072); 校级大学生创新创业计划 (202110412168); 江西中医药大学一流学科建设项目 (JXSYLXK-ZHYA0160)

* 通信作者 Tel: 86-791-87118658; E-mail: wanna988@163.com zfwu527@163.com

inhibitory concentration (MIC) of essential oil against *B. subtilis*, *S. aureus* and *E. coli* were 2.50, 10.00, 10.00 $\mu\text{L}/\text{mL}$. The inhibition of *B. subtilis* was stronger than that of *S. aureus* and *E. coli*. The results suggested that rosemary essential oil had strong antioxidant and antimicrobial activities.

Key words: *Rosmarinus officinalis* L.; essential oil; GC-MS; chemical composition; antioxidants; antimicrobials

迷迭香(*Rosmarinus officinalis* L.)为唇形科迷迭香属亚灌木,原产于地中海地区,现在世界各地均有种植,含有丰富的芳香油成分^[1]。迷迭香香气浓郁,常用于烹饪香料、食品工业的天然防腐剂,以及观赏和药用植物^[2]。研究发现,在广泛的草药和香料中,迷迭香等具有较好的抗氧化活性^[3]。

精油是植物新陈代谢过程中形成的次生产物,是一种具有高浓度芳香和挥发性的物质,存在于植物体内某些特殊器官,发挥各种生态功能^[4,5]。由于精油具有多种生物活性,因而在食品工业、化妆品工业、植物疗法、医学等许多领域的应用不断增长^[6]。虽然合成的抗氧化剂和防腐剂已在食品工业中等领域被广泛使用,但其长期使用会对人体健康造成一定危害。因此,近期许多研究都在寻找天然活性成分^[7]。植物精油作为一种天然提取物,被提出作为合成抗氧化剂的潜在替代品。迷迭香精油是从其茎、叶、花等中经提取所得的是一种无色或淡黄色液体,具有植物特有的气味,主要含有 α -蒎烯、1,8-桉叶素、蒎烯、樟脑、龙脑、石竹烯等萜类成分^[8]。迷迭香精油具有抗氧化、抑菌及防腐等作用,在医药、食品工业和芳香疗法等方面具有广泛的使用价值^[9-11]。本研究用水蒸气蒸馏法提取江西产迷迭香叶精油,采用气相色谱-质谱联用法(GC-MS)对迷迭香精油成分进行分析,并对精油的抗氧化、抑菌活性进行研究,为综合开发利用迷迭香精油资源提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

迷迭香(*Rosmarinus officinalis* L.)新鲜叶植物材料于2020年6月采自江西迭香果农业发展有限公司,经江西中医药大学杨明教授鉴定为唇形科植物迷迭香*Rosmarinus officinalis* L.的新鲜叶。标本(20200615)现存于江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室。

1,1-二苯基-2-苦肼基(DPPH)(上海源叶生物科技有限公司);铁粉、30%过氧化氢、硫酸亚铁、水杨酸、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁、无水乙醇、无水硫酸钠等均为分析纯;实验用水为蒸馏水(广州

屈臣氏食品饮料有限公司);硫酸庆大霉素(美伦生物科技有限公司);刃天青(北京梦怡美生物科技有限公司)。

菌种:金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、大肠杆菌(ATCC 25922)、枯草芽孢杆菌(ATCC 6633)均购自美国典型微生物菌种保存中心(American Type Culture Collection, ATCC)。

岛津UV-2550紫外-可见光分光光度计(日本岛津公司);挥发油提取器(四川蜀牛玻璃仪器有限公司);BT25S型电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司);H2050R型大容量高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室开发有限公司);HH-S恒温水浴锅(江苏省金坛市医疗仪器厂);7890A/5975C型气相色谱-质谱联用仪(安捷伦科技有限公司);LDZM-80KCS立式蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂);SPX-150F型生化培养箱(上海龙跃仪器设备有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 迷迭香精油的提取

采用水蒸气蒸馏法提取精油,准确称取100 g迷迭香鲜叶,置于5 000 mL圆底烧瓶中,加入2 000 mL双蒸水,振荡混合后,浸泡30 min,置于电热套中加热并保持微沸状态,加热回流提取2 h,静置分层后读取精油的体积并收集精油。100 g迷迭香样品提取得到精油的得率为1.12%。所得精油,加入无水硫酸钠干燥后置于棕色玻璃瓶中,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱密封保存备用。

1.2.2 GC-MS分析条件

采用气相色谱-质谱联用法对迷迭香精油进行定性定量分析。气相色谱条件:HP-5MS石英毛细管(30 m \times 320 μm \times 1.8 μm)色谱柱;采用程序升温:起始温度45 $^{\circ}\text{C}$,保持4 min,后运行70 $^{\circ}\text{C}$,再以4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至150 $^{\circ}\text{C}$,保持1 min,再以6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至250 $^{\circ}\text{C}$,于250 $^{\circ}\text{C}$ 保持4 min。载气为高纯氮气,流量1.0 mL/min;进样口温度280 $^{\circ}\text{C}$;分流比80:1;溶剂延迟4 min;进样量为1.0 μL 。

质谱条件:四极杆温度150 $^{\circ}\text{C}$;电离源为标准EI源,离子源温度230 $^{\circ}\text{C}$;电子倍增管电压2 447.06 V;质量扫描范围 m/z 为29~650。

采用峰面积归一化法确定组分的相对含量;通过检索 NIST11 化学工作站标准质谱图库,参阅有关文献,鉴定组分的化学结构。

1.3 迷迭香精油抗氧化活性的测定

1.3.1 DPPH 自由基清除能力的测定

DPPH 自由基清除能力的测定参考 Liu 等^[12]的方法,并稍做修改。用无水乙醇配置 1 mmol/L 的 DPPH 溶液,避光保存。将精油样品稀释至不同浓度。取 2 mL 不同浓度的样品与 4 mL 的 DPPH 溶液置于试管中,充分混匀,室温暗处静置 30 min 后,在 517 nm 处测定不同浓度样品溶液的吸光度(A_1),同时测定 2 mL 样品溶液与 4 mL 无水乙醇混合后的吸光度(A_2),以及 4 mL DPPH 溶液与 2 mL 无水乙醇混合后的吸光度(A_0)。实验平行测定 3 次,取平均值, DPPH 自由基清除能力按公式(1)进行计算。

$$\text{DPPH 自由基清除能力} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\% \quad (1)$$

1.3.2 羟基自由基清除能力的测定

羟基自由基清除能力的测定采用水杨酸法。取 1 mL 不同浓度的样品,依次加入 1 mL 10 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液和 1 mL 10 mmol/L 的 FeSO_4 ,最后加入 1 mL 8.8 mmol/L 的 H_2O_2 启动反应,37 °C 下水浴 30 min,用蒸馏水调零,于 510 nm 波长下测吸光度(A_1)。以蒸馏水代替样品作为空白组测吸光度(A_0);以蒸馏水代替 H_2O_2 作为对照组测吸光度(A_2)。实验平行测定 3 次,取平均值,羟基自由基清除能力按公式(2)进行计算。

$$\text{羟基自由基清除能力} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\% \quad (2)$$

1.3.3 还原能力的测定

还原能力的测定采用普鲁士蓝还原法。取 1 mL 不同浓度的样品,加 pH 6.6 的磷酸缓冲液 2.5 mL 和 1% 铁氰化钾溶液 2.5 mL,混匀于 50 °C 反应 20 min,冷却至室温后加入 10% 三氯乙酸 2.5 mL,混匀后以 4 000 rpm 的速度离心 10 min,取上清液 2.5 mL 与蒸馏水 2.5 mL、0.1% 三氯化铁溶液 0.5 mL 混匀,静置室温下反应 10 min,于 700 nm 波长下测定吸光度(A)。实验重复 3 次,取平均值。

1.4 迷迭香精油抑菌试验

1.4.1 菌种的活化和菌悬液配制

将菌粉用自带的复溶培养基制备成混合液体,用接种环蘸取混合液体,在营养琼脂板上划线,37 °C 恒温培养箱培养 24 h,待长出菌落,进行菌悬液制备。用接种环挑取单菌落于营养肉汤培养基中在

37 °C 培养 24 h,上述培养物用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成 1.5×10^8 CFU/mL 的菌悬液,4 °C 保存备用。

1.4.2 抑菌活性的测定

采用滤纸片法,通过测定抑菌圈直径的大小来判断迷迭香精油的抑菌效果。在超净工作台用移液枪吸取 200 μL 各种菌悬液,将其均匀地涂布于平板培养基表面,制成含菌平板。用无菌镊子夹取 6 mm 的圆形滤纸片,用移液枪吸取 10 μL 精油滴加到滤纸片上,滴入的一面朝下贴于平板,三片一个板,正置 20 min,以无菌水作为阴性对照,庆大霉素药敏纸片(10 μg /片)作为阳性对照。将所有平板倒置于 37 °C 的恒温培养箱内培养 24 h。采用十字交叉法测定抑菌圈的直径,实验平行 3 次取平均值。

1.4.3 最低抑菌浓度(MIC)的测定

采用微量稀释法与刃天青显色法^[13]测定迷迭香精油的最低抑菌浓度(MIC)。在 96 孔无菌平板中,用 2% 吐温-80 的液体培养基将精油进行连续双倍稀释后,加入 100 μL 菌悬液混匀,最后加入 20 μL 0.01% 的刃天青溶液,置于 37 °C 培养箱培养 24 h,观察显色结果,颜色从蓝色变为粉色即预示细菌生长。以保持蓝色的最低浓度为 MIC。第一行每孔加含 2% 吐温-80 的无菌营养肉汤 200 μL 作为培养基对照;第二行每孔加 2% 吐温-80 的无菌营养肉汤 100 μL 和菌悬液 100 μL 作为含菌阴性对照,每孔中菌数为 5×10^4 个;样品行中每孔加入含 2% 吐温-80 的无菌营养肉汤 100 μL ,分别往第三行到第五行的 1 号孔加入 100 μL 的精油肉汤溶液(320 μL /mL),第六行的 1 号孔加入 100 μL 的硫酸庆大霉素母液(1 mg/mL),依次对第三行到第六行的 1~12 孔进行梯度稀释后,在每孔中加入 100 μL 的菌悬液,在 1~12 孔的精油样品最终浓度为 160、80.0、40.0、20.0、10.0、5.00、2.50、1.25、0.625、0.312、0.156、0.078 0 μL /mL。

2 结果与分析

2.1 迷迭香精油的化学成分分析

按上述 GC-MS 条件对迷迭香精油的化学成分进行分析,得到迷迭香精油的总离子流色谱图(见图 1)。

经 GC-MS 计算机数据处理系统进行自动检索,通过与标准质谱图经 NIST11 质谱库检索及人工辅助分析,鉴定确认了 40 种化学成分,用面积归一化法计算出其相对含量。由表 1 可见,已鉴定成分的

相对含量占精油总量的 99.46%。其中含量较高的为 α -蒎烯(39.05%) 和 1 β -桉叶素(16.86%) 其次是 蒎烯(4.22%)、*D*-柠檬烯(3.87%)、龙脑(3.74%)、 β -石竹烯(3.11%)、香叶醇(2.92%)、 β -蒎烯(2.23%)、樟脑(2.16%)、乙酸龙脑酯(2.01%)、芳樟醇(1.81%)、 γ -松油烯(1.74%) 等, 为迷迭香精油的主要成分, 相对含量高于 1% 的成分占 91.41%。根据 ISO 国际标准分类^[14], 迷迭香精油可分为突尼斯/摩洛哥型(Tunisian and Moroccan type) 和西班牙型(Spanish type) 两大类, 其中 α -蒎烯的含量超过国际标准规定的最高含量 β -蒎烯、1 β -桉叶素、*D*-柠檬烯、龙脑的含量均符合西班牙型标准, 樟脑含量低于标准规定的最低含量, 因此从

GC-MS 分析结果, 江西迷迭香精油属于西班牙型。

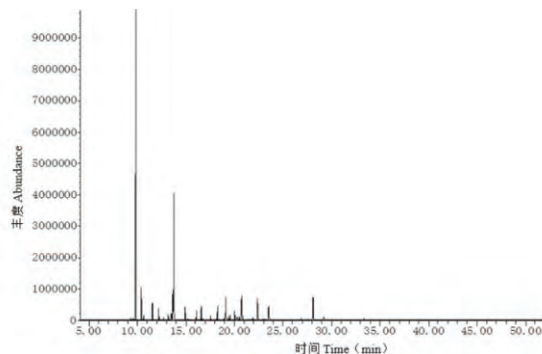


图1 迷迭香精油的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of the essential oil from *R. officinalis*

表1 迷迭香精油化学成分

Table 1 The chemical composition of the essential oil from *R. officinalis*

序号 No.	化合物 Compound	保留时间 t_R (min)	分子式 Molecular formula	相对含量 Relative content(%)
1	3-蒎烯 3-Carene	9.35	C ₁₀ H ₁₆	0.19
2	α -侧柏烯 α -Thujene	9.60	C ₁₀ H ₁₆	0.19
3	α -蒎烯 α -Pinene	9.83	C ₁₀ H ₁₆	39.05
4	蒎烯 Camphene	10.40	C ₁₀ H ₁₆	4.22
5	双环[3.1.0]己-3-烯-2-醇 Bicyclo[3.1.0]hex-3-en-2-ol	10.65	C ₆ H ₈ O	0.66
6	桉烯 Sabinene	11.45	C ₁₀ H ₁₆	0.05
7	β -蒎烯 β -Pinene	11.54	C ₁₀ H ₁₆	2.23
8	月桂烯 Myrcene	12.22	C ₁₀ H ₁₆	1.49
9	α -水芹烯 α -Phellandrene	12.69	C ₁₀ H ₁₆	0.31
10	α -松油烯 α -Terpinene	13.20	C ₁₀ H ₁₆	0.73
11	邻-伞花烃 <i>o</i> -Cymene	13.52	C ₁₀ H ₁₄	0.86
12	<i>D</i> -柠檬烯 <i>D</i> -Limonene	13.68	C ₁₀ H ₁₆	3.87
13	1 β -桉叶素 1 β -Cineole	13.77	C ₁₀ H ₁₈ O	16.86
14	γ -松油烯 γ -Terpinene	14.92	C ₁₀ H ₁₆	1.74
15	4-紫杉醇 4-Thujanol	15.26	C ₁₀ H ₁₈ O	0.17
16	异松油烯 Terpinolene	16.10	C ₁₀ H ₁₆	1.28
17	γ -松油烯 γ -Terpinene	16.49	C ₁₀ H ₁₆	0.13
18	芳樟醇 Linalool	16.58	C ₁₀ H ₁₈ O	1.81
19	双环[2.2.2]辛-5-烯-2-酮 Bicyclo[2.2.2]oct-5-en-2-one	16.72	C ₈ H ₁₀ O	0.12
20	3,3-二甲基-6-亚甲基-环己烯 Cyclohexene 3,3-dimethyl-6-methylene-	17.55	C ₉ H ₁₄	0.62
21	(<i>S</i>)-顺式-马鞭草烯醇 (<i>S</i>)- <i>cis</i> -Verbenol	18.16	C ₁₀ H ₁₆ O	0.15
22	樟脑 Camphor	18.27	C ₁₀ H ₁₆ O	2.16

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	化合物 Compound	保留时间 t_R (min)	分子式 Molecular formula	相对含量 Relative content (%)
23	2 β β -三甲基-(1 α 2 α 5 α)-双环[3.1.1]庚-3-酮 Bicyclo[3.1.1]heptan-3-one 2 β β -trimethyl-(1 α 2 α 5 α)-	18.90	C ₁₀ H ₁₆ O	0.12
24	6 β -甲基-2-亚甲基-双环[3.1.1]庚-3-酮 Bicyclo[3.1.1]heptan-3-one 6 β -dimethyl-2-methylene-	18.99	C ₁₀ H ₁₄ O	0.21
25	龙脑 Endo-borneol	19.09	C ₁₀ H ₁₈ O	3.74
26	2 β β -三甲基-(1 α 2 β 5 α)-双环[3.1.1]庚-3-酮 Bicyclo[3.1.1]heptan-3-one 2 β β -trimethyl-(1 α 2 β 5 α)-	19.42	C ₁₀ H ₁₆ O	0.65
27	4-萜烯醇 Terpinen-4-ol	19.54	C ₁₀ H ₁₈ O	0.71
28	α -松油醇 α -Terpineol	20.05	C ₁₀ H ₁₈ O	1.39
29	桃金娘烯醇 Myrtenol	20.27	C ₁₀ H ₁₆ O	0.40
30	反式-1,4-环己烷二甲醇 <i>trans</i> -1,4-Cyclohexanedimethanol	20.52	C ₈ H ₁₆ O ₂	0.46
31	4 β β -三甲基二环[3.1.1]庚-3-烯-2-酮 4 β β -Trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one	20.75	C ₁₀ H ₁₄ O	3.54
32	香茅醇 Citronellol	21.45	C ₁₀ H ₂₀ O	0.12
33	香叶醇 Geraniol	22.40	C ₁₀ H ₁₈ O	2.92
34	柠檬醛 Citral	22.99	C ₁₀ H ₁₆ O	0.16
35	乙酸龙脑酯 Bornyl acetate	23.54	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	2.01
36	(-)- β -蒎烯 (-)- β -Pinene	26.87	C ₁₀ H ₁₆	0.25
37	甲基丁香酚 Methyl eugenol	27.56	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	0.16
38	β -石竹烯 β -Caryophyllene	28.10	C ₁₅ H ₂₄	3.11
39	α -石竹烯 α -Caryophyllene	29.20	C ₁₅ H ₂₄	0.41
40	氧化石竹烯 Caryophyllene oxide	33.35	C ₁₅ H ₂₄ O	0.21

将江西迷迭香与国内其他产地迷迭香精油的化学成分进行比较^[15-48] 结果见表 2。

表 2 不同产地迷迭香精油主要成分相对含量的比较

Table 2 Comparison of chemical composition of the essential oil from different regions of *R. officinalis*

化学成分 Chemical composition	相对百分含量 Relative content (%)				
	江西 Jiangxi	河南 Henan	贵州 Guizhou	山东 Shandong	广西 Guangxi
α -蒎烯 α -Pinene	39.05	37.15	25.44	14.90	28.78
蒎烯 Camphene	4.22	18.05	7.10	5.65	5.67
β -蒎烯 β -Pinene	2.23	1.76	1.91	1.77	2.55
1- β -桉叶素 1- β -Cineole	16.86	12.28	20.27	35.12	30.68
芳樟醇 Linalool	1.81	0.12	0.57	0.91	0.71
樟脑 Camphor	2.16	7.30	7.67	15.32	5.76
龙脑 Borneol	3.74	2.27	3.30	6.45	2.62
乙酸龙脑酯 Bornyl acetate	2.01	1.63	2.31	0.16	2.77
β -石竹烯 β -Caryophyllene	3.11	1.10	3.23	1.50	0.80

从表 2 可以看出,不同产地的迷迭香精油的相对含量存在较大差异,江西、河南、贵州、山东、广西

产地的迷迭香精油中均有 α -蒎烯、蒎烯、 β -蒎烯、1,8-桉叶素、芳樟醇和樟脑等物质。其中江西产迷迭

香油中的 α -蒎烯和芳樟醇的相对含量高于国内其他产地, $1,8$ -桉叶素、 β -蒎烯、乙酸龙脑酯和 β -石竹烯的相对含量较高; 河南产迷迭香油中蒎烯的相对含量最高, 贵州产迷迭香油中 β -石竹烯含量最高, 山东产迷迭香油中 $1,8$ -桉叶素、樟脑、龙脑含量最高, 广西产迷迭香油中 β -蒎烯、乙酸龙脑酯含量最高。Verma 等^[19] 采用 GC-FID 和 GC-MS 技术分析印度北部亚热带地区不同生长阶段的迷迭香油, 发现不同生长阶段其主要成分相同, 均为樟脑(23.9% ~ 33.2%)、桉叶油素(20.4% ~ 23.9%)、 α -蒎烯(8.5% ~ 14.4%), 但其相对含量存在明显差异。研究表明, 精油成分受植物生长地、土壤、提取方法、植物品种等诸多因素的影响^[20]。

2.2 迷迭香油抗氧化活性的测定结果

2.2.1 DPPH 自由基清除能力的测定

DPPH 自由基有个单电子, 其乙醇溶液呈深紫色, 在 517 nm 处有强吸收。抗氧化剂的存在可以使得 DPPH 溶液的颜色从深紫色变为淡黄色, 从而具有清除 DPPH 自由基的能力^[21]; 褪色越明显表明抗氧化能力越强。

如图 2 所示, 不同浓度的迷迭香油对 DPPH 自由基清除能力呈现明显的量效应关系, 随着样品浓度的增大, 对 DPPH 自由基的清除效果增强; 迷迭香油对 DPPH 自由基的 IC_{50} 值为 76.42 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 表明迷迭香油对 DPPH 自由基有较好的清除活性。

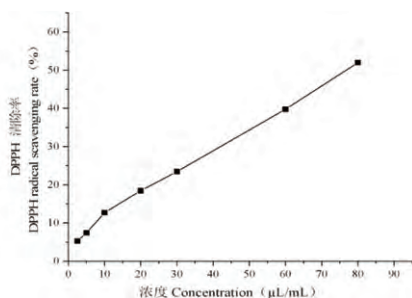


图 2 迷迭香精油的 DPPH 自由基清除能力

Fig. 2 DPPH radical scavenging rate of the essential oil from *R. officinalis*

2.2.2 羟基自由基清除能力的测定

Fe^{2+} 和 H_2O_2 混合后反应产生高活性的羟基自由基, 然后由体系中的水杨酸-乙醇捕捉羟基自由基产生有色物质且在 510 nm 处有吸收。如果在反应体系中加入有清除羟基自由基能力的物质, 与水杨酸竞争羟基自由基, 会使有色物质生成量减少并降低吸

光值。

如图 3, 不同浓度的迷迭香油对羟基自由基清除能力呈现较好的量效应关系, 随着样品浓度的增大, 对羟基自由基的清除效果增强; 迷迭香油对羟基自由基的 IC_{50} 值为 51.40 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 表明对羟基自由基有较好的清除效果。

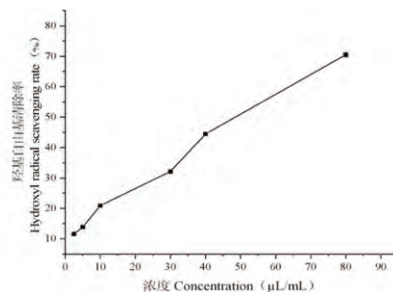


图 3 迷迭香精油的羟基自由基清除能力

Fig. 3 Hydroxyl radical scavenging rate of the essential oil from *R. officinalis*

2.2.3 还原能力的测定

多数情况下, 多数非酶类抗氧化剂的活性都是通过还原反应终止氧化链式反应的, 化合物的还原能力是显示其是否具有抗氧化潜能的一个至关重要的因素。吸光值越大, 物质的还原力越强, 其抗氧化活性也越高。

如图 4, 还原力与质量浓度具有一定的量效关系, 随着样品浓度的增大, 还原力增强; 迷迭香油具有较强的还原力, IC_{50} 值为 49.15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。

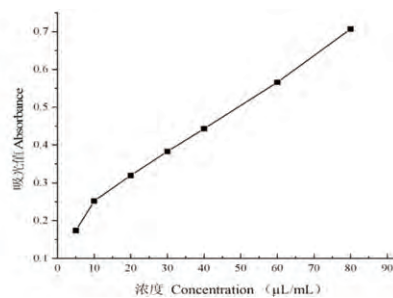


图 4 迷迭香精油的还原力

Fig. 4 The reducing power of the essential oil from *R. officinalis*

2.3 迷迭香油抑菌试验结果

2.3.1 抑菌活性的测定

采用滤纸片法测定了迷迭香精油的抑菌圈直径, 结果如表 3 所示, 迷迭香油对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均具有良好的抑制作用, 其中对枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径为 $14.40 \pm$

0.66 mm 抑制作用最强,对大肠杆菌的抑菌圈直径为 11.70 ± 0.27 mm,对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为 11.41 ± 0.19 mm,抑菌作用稍弱。

2.3.2 最低抑菌浓度(MIC)的测定

采用微量稀释法与刃天青显色法测定了迷迭香挥发油的 MIC, MIC 值是测定抗菌物质抗菌活性大

小的一个指标。结果如表 4 所示,迷迭香精油对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的最低抑菌浓度(MIC)分别为 2.50、10.00、10.00 μL/mL。从实验结果可知,迷迭香精油对枯草芽孢杆菌的抑制效果最强,明显优于金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌效果。这一点与抑菌圈直径的实验结果一致。

表 3 迷迭香精油抑菌圈直径($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 The antimicrobial diameter of the essential oil from *R. officinalis*($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品 Sample	革兰阳性菌 Gram-positive bacteria(mm)		革兰阴性菌 Gram-negative bacteria(mm)
	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>
精油 Essential oil	14.40 ± 0.66	11.41 ± 0.19	11.70 ± 0.27
阳性对照 Positive control	20.92 ± 0.42	21.35 ± 0.22	23.00 ± 0.87
阴性对照 Negative control	-	-	-

注“-”表示无抑制效果。
Noté“-”means no inhibition effect.

表 4 迷迭香精油的最低抑菌浓度

Table 4 MIC of the essential oil from *R. officinalis*

菌种 Strain	样品 Sample	孔号 No.												MIC
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	A	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	2.50
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	3.91
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	A	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	10.00
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	0.98
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	A	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	10.00
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	3.91
阴性对照 Negative control		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0

注“-”表示无细菌生长,“+”表示有少量细菌生长,“++”表示有中等细菌生长,“+++”表示有大量细菌生长; A-迷迭香精油(μL/mL)、B-硫酸庆大霉素(mg/mL)。
Noté“-”means no bacterial growth,“+”means a small amount of bacterial growth,“++”means medium bacterial growth,“+++”means a lot of bacterial growth; A-Essential oil from *R. officinalis*(μL/mL), B-Gentamicin sulfate(mg/mL).

3 讨论与结论

采用水蒸气蒸馏法结合气相色谱-质谱联用法(GC-MS)鉴定了迷迭香精油的化学成分,迷迭香精油中含量较高的成分为α-蒎烯(39.05%)和1,8-桉叶素(16.86%),其次是茨烯(4.22%)、D-柠檬烯(3.87%)、龙脑(3.74%)、β-石竹烯(3.11%)、香叶醇(2.92%)、β-蒎烯(2.23%)、樟脑(2.16%)等。根据 ISO 国际标准,江西迷迭香精油属于西班牙型。迷迭香是西餐中经常使用的香料,其特征是具有龙脑、龙脑酯、樟脑等成分的混合香气^[22],同时具有清甜带松木香的气味和风味,香味浓郁^[23]。推测这可能与迷迭香中的 4 种主要成分 α-蒎烯、1,8-桉叶素、

龙脑、樟脑有关,这 4 种成分的相对含量占总成分含量的 61.80%。其中樟脑具有浓郁的辛香,1,8-桉叶素与茨烯具有类似樟脑香气,龙脑味辛苦、微寒;有樟脑和松木香气,α-蒎烯有松木、针叶及树脂样的气息,因此迷迭香呈现出浓郁的松木香气味。

通过迷迭香精油对 DPPH 自由基、羟基自由基的清除以及总还原力的测定,来分析其抗氧化活性。迷迭香精油的 DPPH 自由基、羟基自由基清除能力和还原力的 IC₅₀ 值分别为 76.42、51.40 和 49.15 μL/mL,由此可知,迷迭香精油具有良好的抗氧化活性,对自由基有较好的清除效果。Rašković 等^[24]研究表明迷迭香精油具有较好的抗氧化活性,不同产

地迷迭香精油成分含量差异较大,导致其 IC_{50} 值有所不同。通过迷迭香精油对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌圈大小 14.40 ± 0.66 、 11.41 ± 0.19 、 11.70 ± 0.27 mm 以及最低抑菌浓度 (MIC) 2.50 、 10.00 、 10.00 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 可以看出,迷迭香精油对这 3 种供试菌均具有较好的抑菌性,具有广谱抑菌性。精油对枯草芽孢杆菌的抑制作用明显强于金黄色葡萄球菌和大肠杆菌。Jiang 等^[25] 报道,迷迭香精油的抗菌活性优于 α -蒎烯和 1- β -桉叶素,推断出迷迭香精油的抗菌活性是其化学成分的协同作用。根据上述 GC-MS 结果, α -蒎烯和芳樟醇的含量高于国内其他产地,1- β -桉叶素在迷迭香精油中具有较高的含量,这几种成分的含量是迷迭香精油具有良好的抗氧化、抗菌活性的主要原因^[26-28]。通过本实验可知,迷迭香精油具有较好的抗氧化、抑菌活性,作为天然抗氧化、抑菌剂具有巨大的开发价值。

参考文献

- 1 Wang JX, Zhong PH. Principle and Application of Spices(香料原理与应用) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 27.
- 2 Oliveira JRD, Camargo SEA, Oliveira LDD. *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent [J]. J Biomed Sci 2019 26(1) : 1-22.
- 3 Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage(*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils [J]. J Agr Food Chem 2007 55: 7879-7885.
- 4 Teixeira B, Marques A, Ramos C, et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils [J]. Ind Crops Prod 2013 43: 587-595.
- 5 Zhu TP, Liu L, Zhu M. Plant Resources of China(中国资源植物) [M]. Beijing: Science Press 2007: 523.
- 6 Miljanović A, Bielen A, Grbin D, et al. Effect of enzymatic, ultrasound and reflux extraction pretreatments on the chemical composition of essential oils [J]. Molecules, 2020, 25(20) : 4818.
- 7 Fan ZL, Zhang YD, Zhang H, et al. Antioxidant and antibacterial activity of essential oil from *Pinus koraiensis* needles [J]. J Beijing For Univ(北京林业大学学报), 2017, 39(8) : 98-103.
- 8 Wang ZC, Zhang HY, Deng JS, et al. Chemical constituents and pharmacological activities of *Rosmarini officinalis* herba [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2019, 25(24) : 8.
- 9 Kadri A, Zarai Z, Chobba IB, et al. Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from the South-Western of Tunisia [J]. J Med Plants Res 2011 5: 6502-6508.
- 10 Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils [J]. BMC Complem Altern M 2006 6: 39.
- 11 Ojeda-Sana AM, Baren CM, Elechosa MA, et al. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components [J]. Food Control 2013, 31: 189-195.
- 12 Liu J, Luo J, Ye H, et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 [J]. Carbohydr Polymers, 2010 82: 1278-1283.
- 13 Chen J, Chen LF, Rao YY, et al. Rapid determination of MICs of fluoroquinolones for *Mycobacterium tuberculosis* by resazurin colorimetric assay [J]. J Clin Hematol(临床血液学杂志) 2011 24(4) : 198-200.
- 14 International Standard Organization. ISO 1342-2012(E) Essential oil of rosemary(*Rosmarinus officinalis* L) [S]. Geneva: ISO 2012.
- 15 Li LH, Li XF, Xie KW, et al. Analysis of the chemical compositions of the volatile oil from *Rosmarinus officinalis* L. planted in Yuzhou, Henan by GC-MS [J]. J Northwest A & F Univ: Nat Sci(西北农林科技大学学报: 自科版), 2012, 40: 227-230.
- 16 Liu XK, Yu JP, Lian B, et al. Analysis of chemical constituents of the volatile oil from the *Rosmarinus officinalis* L. in Guizhou province of China [J]. J Guizhou Univ: Agr Biol Sci (贵州大学学报: 农业与生物科学版) 2002 21: 186-190.
- 17 Dong Y, Qi W, Zhou LW. Analysis of chemical constituents of volatile oils from rosemary and their antimicrobial activity [J]. Chem Res Appl(化学研究与应用), 2015 27: 1805-1810.
- 18 Zhou YH, Ji LX. Components of essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. in Guangxi [J]. Biomass Chem Eng(林产化工通讯) 2004 38(6) : 24-36.
- 19 Verma RS, Padalia RC, Chauhan A, et al. Productivity and essential oil composition of rosemary(*Rosmarinus officinalis* L.) harvested at different growth stages under the subtropical region of north India [J]. J Essent Oil Res, 2019, 32: 144-149.
- 20 Borges RS, Ortiz BLS, Pereira ACM, et al. *Rosmarinus officinalis* essential oil: a review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity and mechanisms of action involved [J]. J Eth-

- nopharmacol 2019 229: 29-45.
- 21 Lu L ,Yao Q ,Shu CJ ,et al. Composition ,antibacterial and antioxidant activities of essential oil and alcohol extract from *Artemisia argyi* in Shangluo ,Shaanxi Province [J]. Nat Prod Re Dev(天然产物研究与开发) 2020 ,32: 1852-1859.
- 22 Liu SM ,Tian YH ,Huang CJ ,et al. Studies on the chemical components and antimicrobial activities of volatile oil from *Rosmarinus officinalis* L. [J]. J Anhui Agr Sci(安徽农业科学) 2009 ,37: 654-656.
- 23 Wang YD ,Yao XL ,Xiao QL ,et al. Study on the chemical components and antioxidant activities of rosemary essential oils and marjoram essential oils [J]. China Condiment(中国调味品) 2021 ,46(1) : 135-141.
- 24 Rašković A ,Milanović I ,Pavlović N ,et al. Antioxidant activity of rosemary(*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential [J]. BMC Complem Altern M , 2014 ,14: 225.
- 25 Jiang Y ,Wu N ,Fu YJ ,et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of rosemary [J]. Environ Toxicol Pharmacol 2011 ,32(1) : 63-68.
- 26 Salehi B ,Upadhyay S ,Orhan IE ,et al. Therapeutic potential of α - and β -pinene: a miracle gift of nature [J]. Biomolecules 2019 ,9(11) : 738.
- 27 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.
- 28 Seol GH ,Kim KY. Eucalyptol and its role in chronic diseases [J]. Adv Exp Med Biol 2016: 389-398.