

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90097

香茅挥发油提取工艺优化及抗氧化、抑真菌活性研究

Optimization of the extraction process of citronella volatile oil and its antioxidant and antifungal activities

王佳丽 张晓南 熊婷婷

WANG Jia-li ZHANG Xiao-nan XIONG Ting-ting

牛亚倩 张英迪 徐 福

NIU Ya-qian ZHANG Ying-di XU Fu

(东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030)

(Northeast Agricultural University, Harbin, Helongjiang 150030, China)

摘要:目的: 优化香茅挥发油的微波辅助水蒸馏提取工艺, 评估香茅挥发油的抗氧化特性和抗真菌能力。方法: 利用 Box-Behnken 响应面法分析液料比、微波功率和微波时间对挥发油得率的影响; 并通过气相色谱—质谱 (GC-MS) 分析进行挥发油成分鉴定; 通过 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率以及 β -胡萝卜素漂白试验评估挥发油抗氧化能力; 采用打孔法和肉汤稀释法分析挥发油的抗真菌能力。结果: 微波提取最佳工艺参数为液料比 7.185 : 1.000 (mL/g), 功率 700 W, 时间 21.707 min, 挥发油得率为 15.965 mL/kg · DW, 香茅挥发油对 DPPH 自由基、ABTS 自由基以及亚油酸的氧化都显示出良好的抑制活性, 其半数抑制浓度 (IC_{50}) 值分别为 (0.546 ± 0.002), (1.694 ± 0.001), (0.145 ± 0.003) μ g/mL; 香茅挥发油对假尾孢菌有较为明显抑制作用, 其最小抑菌浓度 (MIC) 为 2.5 μ g/mL, 最小杀菌浓度 (MBC) 为 3 μ g/mL。结论: 与传统水蒸馏提取挥发油的方法相比, 微波辅助水蒸馏法更高效、提取的挥发油成分更丰富, 香茅挥发油具有良好的生物活性。

关键词: 香茅; 挥发油; 微波辅助; 水蒸馏; 抗氧化; 抗真菌

Abstract: Objective: This study aimed to optimize the microwave-assisted water distillation extraction process of citronella volatile oil, and to evaluate the antioxidant properties and antifungal abil-

ity of citronella volatile oil. **Methods:** The Box-Behnken response surface method was used to analyze the influence of liquid-to-material ratio, microwave power and microwave time on the yield of volatile oil. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis was used to identify the composition of the volatile oil. Thereafter, DPPH · and ABTS · scavenging methods and β -carotene bleaching experiment were utilized to evaluate the anti-oxidation ability of volatile oil. Perforation method and broth dilution method were used to analyze the anti-fungal ability of volatile oil. **Results:** The best process parameters of microwave extraction were liquid-to-material ratio 7.185 : 1.000 (mL/g), power 700 W, time 21.707 min, and the essential oil yield was 15.965 mL/kg · DW. The citronella volatile oil was found showing good inhibition activity, on the free radicals DPPH ·, ABTS · and β -carotene/linolenic oil produced by the acid system, and the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) values were (0.546 ± 0.002), (1.694 ± 0.001) and (0.145 ± 0.003) μ g/mL, respectively. Citronella volatile oil also showed a relatively obvious inhibitory effect on *Pseudocercosia*, and its minimum inhibitory concentration (MIC) was 2.5 μ g/mL, with the minimum bactericidal concentration (MBC) of 3 μ g/mL. **Conclusion:** Compared with the traditional water distillation method for extracting volatile oil, the microwave-assisted water distillation method is more efficient, and the extracted volatile oil components are more abundant. The excellent biological activity of citronella volatile oil also provides a theoretical basis for the development of antibacterial agents and antioxidants.

Keywords: citronella; volatile oil; microwave-assisted; water distillation; anti-oxidation; anti-fungal

基金项目: 黑龙江省教育厅创新人才项目 (编号: UNPYSCT-2018153)

作者简介: 王佳丽, 女, 东北农业大学在读硕士研究生。

通信作者: 张晓南 (1982—), 男, 东北农业大学副教授, 博士。

E-mail: xiaonanzhang@neau.edu.cn

收稿日期: 2021-11-25 **改回日期:** 2022-03-20

香茅草 [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf], 别名包

茅或柠檬草,是多年生禾本科香茅属草本植物^[1]。香茅草常被作为调味料出现在亚洲人的餐桌上^[2]。此外,香茅草也被广泛用于民间偏方,中国云南傣族人将香茅草烘干干茶饮,健胃消脂,治疗腹泻^[3];美国和巴西等国家利用香茅草驱蚊、治疗发热和焦虑症以及清热解毒等^[4]。现代研究证实,香茅草中具有多种大分子活性物质,其中挥发油在临床具有多种药理活性,含有丰富的活性成分,特别是橙花醛和香叶醛,它们具有很好的抗菌功效,对真菌的生长均有抑制作用^[5-6];一些烯炔类、酯类和醛类物质具有抗氧化效果^[7],可以作为天然抗氧化剂添加到食品中^[8];此外,从香茅挥发油中检测出了波旁烯和榄香烯两种活性成分,已证实该成分具有抗肿瘤的效果^[9-10]。

近年比较常见的天然植物挥发油提取方法包括水蒸气蒸馏法^[11]、超临界 CO₂ 萃取法^[12]、索氏提取法^[13]、微波辅助法^[14]等。但这些传统方法都有一定的缺陷:水蒸气蒸馏法使用设备简单,但提取率很低^[15];索氏提取法的提取率高,但要加入挥发性有毒试剂,具有污染性和潜在危害^[15];超临界 CO₂ 萃取法能保护有效成分,但需要高压设备,投资大^[16]。而微波辅助提取法可以利用微波在极短的时间内提高热能的传递性,缩减加热梯度,具有提取时间短、节能、操作简单等优点^[14]。近年来,已有学者^[17]将微波法用于辅助香茅草挥发油提取,但是由于单因素水平选取差异,使得试验条件和结果达不到预期效果,出现最佳微波时间和液料比过大的问题,造成了能源的浪费。

研究拟采用微波辅助水蒸气蒸馏法提取香茅挥发油,利用 GC-MS 对香茅挥发油富含的化学成分进行分析,并对香茅挥发油的抗氧化及抑制假尾孢真菌活性进行探究,以期对挥发油产业的开发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

香茅草:采购于广西壮族自治区的玉林山农户;
去离子水:东北农业大学;
正己烷:色谱纯,天津市光复科技发展有限公司;
无水硫酸钠:纯度≥99%,天津市福晨化学试剂厂;
假尾孢菌:东北农业大学张晓南老师团队于水果表皮中分离鉴定;
电子天平:JA2003 型;上海浦春计量仪器有限公司;
酶标仪:SpectraMax i3x 型,东北农业大学;
气相色谱质谱联用仪:Agilent 7890A-5975C 型,安捷伦科技有限公司;
精密量具游标卡尺:GREENER 型,烟台市绿林工具有限公司;
循环水多用真空泵:SHB-D-Ⅲ型,河南省泰斯特仪器有限公司;
电热恒温鼓风干燥箱:DHG-9240A 型,上海一恒科

技有限公司;
旋转蒸发仪:RE52CS 型,上海亚荣生化仪器厂;
微波炉:M1-L213B 型(180~700 W),广东美的厨房电器制造有限公司;
恒温水浴锅:B-220 型,上海亚荣生化仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 香茅挥发油的制备 将 50 g 的干香茅条和一定量的去离子水混合于装置中加热,初始温度为 25 ℃,大约 30 min 后产生挥发油。每隔一定时间记录一次挥发油读数,测定挥发油含量,使用无水硫酸钠干燥挥发油,4 ℃ 保存备用,采用 GC-MS 测定并统计挥发油的化学成分。
1.2.2 挥发油提取工艺优化 根据前期预试验结果,以液料比、微波功率和提取时间为自变量,以挥发油得率为响应值,采用 Design-Expert 8.0 软件对挥发油提取工艺条件进行优化。因子编码及水平见表 1。

表 1 响应面试验设计因素和水平

Table 1 Factor and levels in response surface analysis			
水平	X ₁ 液料比(mL/g)	X ₂ 微波功率/W	X ₃ 提取时间/min
-1	4 : 1	385	15
0	6 : 1	540	20
1	8 : 1	700	25

1.2.3 香茅挥发油成分分析 采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)法^[18]。检测前,挥发油用正己烷稀释 50 倍。采用 Agilent 7890A 气相色谱 Agilent MSD5975C 质谱检测器,使用 HP-5MS 色谱柱(30 m×0.25 mm,0.25 μm),样品注入量 1 μL,喷射器温度 250 ℃,电子电离能 70 eV,质量范围 40~400(*m/z*)。从 60 ℃ 以 3 ℃/min 的速度升温到 250 ℃,持续 10 min。采用色谱结合火焰离子化检测器(GC-FID),载气为氮气(恒定流量 1 mL/min,纯度 99.999%),进样器和检测器温度均为 250 ℃,采用单个峰面积除以所有峰总面积计算相对比例,不考虑响应因子;只包括超过 0.1% 的化合物。小于 0.1% 的峰值未计算在内。

1.2.4 抗氧化活性研究

(1) DPPH 自由基清除能力:配制 0.05 mg/mL 的紫色 DPPH 无水乙醇溶液,根据紫色褪色程度判定挥发油中氢原子或电子得失能力,测定挥发油对 DPPH 自由基的影响。每个浓度样品溶液与 DPPH 乙醇溶液 1 : 1 混合均匀,室温避光静置 30 min,在 517 nm 处测定吸光度,上述试验重复 3 次取均值;将样品溶液替换为等量乙醇溶液作为空白对照;以与样品溶液同浓度梯度 V_C 溶液作为阳性对照^[19]。按式(1)计算 DPPH 自由基清除率。

$$C = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

C ——DPPH 自由基清除率, %;

A_0 ——DPPH 与乙醇混合溶液吸光度值;

A_1 ——DPPH 与样品混合溶液吸光度值;

A_2 ——乙醇与样品混合溶液吸光度。

(2) ABTS 自由基清除能力: ABTS 无水乙醇溶液呈天蓝色, 其褪色程度可判断挥发油的抗氧化能力, 抗氧化能力越强则最大吸收波长 734 nm 处测得的吸光度值越小。将溶液与 ABTS 溶液以 1 : 9 混合避光静置 10 min 进行测定 A_1 ; 将溶液替换为乙醇作为空白对照 A_0 ; 以与样品溶液同浓度梯度 V_C 溶液为阳性对照。按式(2)计算 ABTS 自由基清除率。

$$C = \left(1 - \frac{A_1 - A_0}{A_2}\right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

C ——ABTS 自由基清除率, %;

A_0 ——乙醇与样品混合溶液吸光度值;

A_1 ——ABTS 与样品混合溶液吸光度值;

A_2 ——ABTS 与乙醇混合溶液吸光度值。

(3) β -胡萝卜素漂白试验: 将 0.2 mg 的 β -胡萝卜素、20 μ L 亚油酸和 200 μ L 吐温-20 依次溶解于 200 μ L 氯仿溶液中并混合均匀, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发去除氯仿, 再加入 50 mL 无水乙醇溶解即得到 β -胡萝卜素-亚油酸体系; 样品与 β -胡萝卜素-亚油酸溶液按 1 : 4 混合均匀, 水浴一定时间, 在 470 nm 处测定抗氧化活性; 以同浓度梯度的 BHT 溶液代替样品溶液测得阳性对照结果^[20]。按式(3)计算自由基清除率。

$$C = \left(1 - \frac{A_{\text{样品},0} - A_{\text{对照组},0}}{A_{\text{样品},2\text{h}} - A_{\text{对照组},2\text{h}}}\right) \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

C ——亚油酸氧化抑制率, %;

$A_{\text{样品},0}$ 、 $A_{\text{对照组},0}$ —— $t=0$ 时样品溶液和对照组的吸光度值;

$A_{\text{样品},2\text{h}}$ 、 $A_{\text{对照组},2\text{h}}$ —— $t=2\text{ h}$ 时样品溶液和对照组的吸光度值。

1.2.5 假尾孢菌菌株分离及培养 操作过程在超净工作台中进行, 使用超净工作台前需用 75% 酒精棉擦拭工作台, 并用紫外灯照射 30 min, 准备酒精灯并将试验用具灭菌放入超净工作台内。将冷冻的番石榴上的腐烂部位切割成块状(10 mm $\times$ 10 mm)研磨, 加入到生理盐水中震荡 30 s, 梯度稀释至 $10^5 \sim 10^7$ CFU/mL, 取样品 100 μ L 均匀涂抹到固体培养基中, 密封置于 26 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 48 h, 显微镜下观测真菌形态。

1.2.6 MIC 和 MBC 的测定 根据文献[21], 修改如下: 将不同浓度的挥发油溶液加入到含培养基的平板中, 使得培养基中所含挥发油最终质量浓度分别为 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 混匀注入培养皿中, 待培养基凝

固后, 使用打孔器将培养好的菌饼切割成直径为 4 mm 的圆饼, 放置在培养基中心位置, 26 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 1~5 d, 观察菌体生长情况。对挥发油的每一浓度梯度做 3 组平行试验, 从无菌生长的培养基中找到挥发油浓度最小的培养基, 即为该挥发油的最低抑菌浓度, 以 0.1% 的吐温-80 水溶液作为对照。参考最低抑菌浓度试验结果, 制备浓度大于 MIC 的挥发油加入到液体培养基中, 26 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d, 对澄清和较为澄清的试管进行涂板, 26 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2~5 d, 以无菌落生长的挥发油浓度为最低杀菌浓度。

2 结果与分析

2.1 挥发油提取工艺优化

根据因素水平设计 $L_9(3^4)$ 试验见表 2。利用 Box-Behnken 设计原理并采用 Design-Expert 8.0 软件对表 2 试验数据进行多元回归拟合, 得到各因子对响应值的二次多项回归模型:

$$Y = 14.72 + 0.13X_1 + 1.18X_2 + 1.00X_3 + 0.005X_1X_2 + 0.93X_1X_3 - 0.45X_2X_3 - 0.38X_1^2 - 0.061X_2^2 - 1.61X_3^2. \quad (4)$$

由表 3 可知, 模型的 P 值 < 0.0001 , 极显著; 失拟项不显著($P = 0.1101 > 0.05$), 表明未知因素对试验结果干扰较小, 试验误差小可以忽略; 模型的 $R^2 = 0.9988$, $R_{\text{Adj}}^2 = 0.9973$, 表明模型拟合程度良好, 能够准确地反映各个因素对挥发油提取率的影响。

表 2 响应面法试验设计及结果

Table 2 Response surface methodology tests and results

试验号	X_1	X_2	X_3	Y 挥发油得率/ (mL $\cdot$ kg $^{-1}$ $\cdot$ DW)
1	1	0	1	14.74
2	0	0	0	14.70
3	-1	0	-1	12.58
4	0	1	-1	13.60
5	1	-1	0	13.18
6	0	1	1	14.80
7	0	0	0	14.78
8	-1	1	0	15.36
9	1	0	-1	11.00
10	0	-1	1	13.40
11	0	0	0	14.72
12	0	-1	-1	10.40
13	1	1	0	15.60
14	0	0	0	14.74
15	-1	0	1	12.60
16	0	0	0	14.64
17	-1	-1	0	12.96

表 3 响应面试验各因素方差分析[†]
Table 3 Analysis of variance for each factor

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	35.30	9	3.92	650.33	<0.000 1	* *
X ₁	0.13	1	0.13	21.56	0.002 4	* *
X ₂	11.09	1	11.09	1 839.04	<0.000 1	* *
X ₃	7.92	1	7.92	1 313.15	<0.000 1	* *
X ₁ ²	0.61	1	0.61	101.07	<0.000 1	* *
X ₂ ²	1.50×10 ⁻²	1	1.50×10 ⁻²	2.56	0.154 0	
X ₃ ²	10.85	1	10.85	1 799.44	<0.000 1	* *
X ₁ X ₂	1.00×10 ⁻⁴	1	1.00×10 ⁻⁴	0.02	0.901 2	
X ₁ X ₃	3.46	1	3.46	573.60	<0.000 1	* *
X ₂ X ₃	0.81	1	0.81	134.30	<0.000 1	* *
残差	4.20×10 ⁻²	7	6.00×10 ⁻³			
失拟项	3.20×10 ⁻²	3	1.10×10 ⁻²	3.92	0.110 1	不显著
纯误差	1.10×10 ⁻²	4	3.00×10 ⁻³			
总离差	35.34	16				

[†] * * 表示极显著($P<0.01$);相关系数(R^2)为 0.998 8;校正决定系数(R_{adj}^2)为 0.997 3。

一次项、二次项的 X_1^2 、 X_3^2 和交互项的 X_2X_3 、 X_1X_3 对挥发油提取率的影响极显著($P<0.01$),二次项的 X_2^2 和交互项的 X_1X_2 对挥发油提取率的影响不显著($P>0.05$)。按照 F 值大小对影响挥发油提取率的各个因素进行排序:液料比(X_1)>微波功率(X_2)和微波时间(X_3),说明液料比对挥发油提取率的影响较大,微波时间和功率对挥发油的得率影响相差不大。

由图 1(a)可以看出,随着液料比从 6:1 (mL/g)增加到 10:1 (mL/g),微波功率从 385 W 增加到 700 W,

挥发油得率也相应地增加,较高的液料比有利于得到更多的提取物,较高的微波功率可以快速破坏植物细胞壁结构,微波处理越强烈,越有利于挥发成分的流出。当液料比和微波功率同时增高时,挥发油得率也增大。图 1(b)显示挥发油得率随液料比的增大而升高,当液料比为 7:1 (mL/g)、微波时间为 22 min 时,挥发油的得率趋于平缓,可能是由于当水溶液体积过大,挥发油溶解在水中不容易挥发出来,再延长提取时间并不能增加得率。图 1(c)中,香茅挥发油的得率也是随着微波功率、微波时

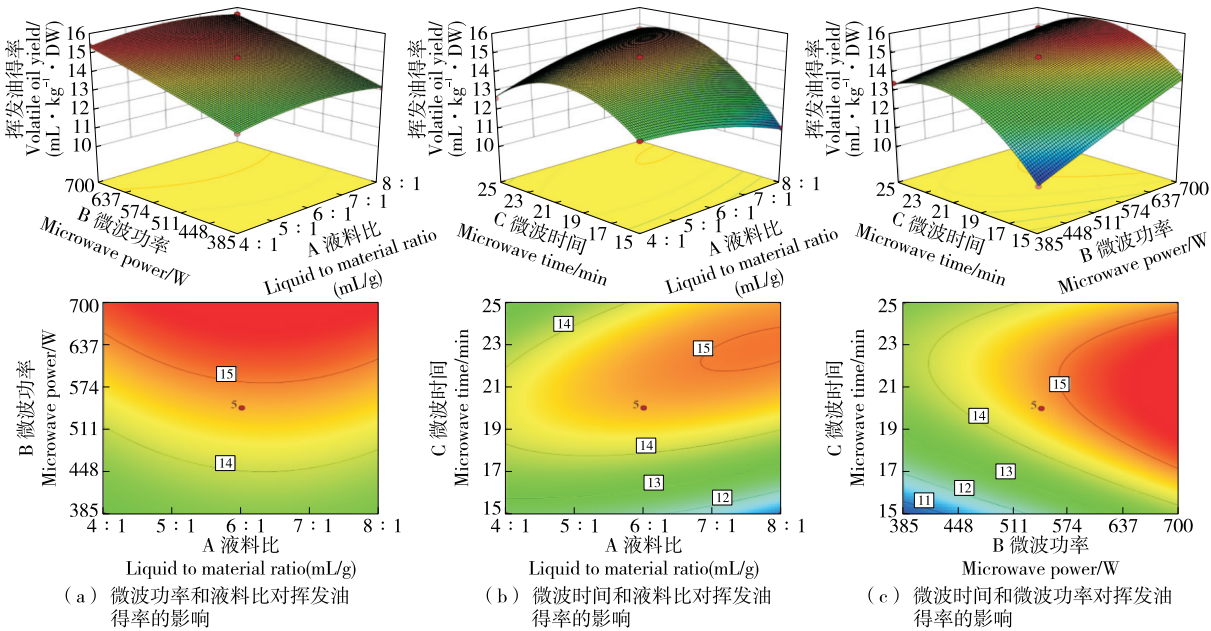


图 1 各因素对挥发油得率影响的响应面图

Figure 1 Response surface diagram of the influence of various factors on the yield of essential oil

间的增加而增加,但过长的时间并不能增加挥发油得率,当功率达到 600 W 左右,挥发油得率趋于平缓,过大的功率会导致能耗增加。经响应面分析得出微波提取最佳条件为料液比7.185 : 1 (mL/g),功率 700 W,时间 21.707 min,此时挥发油得率为 15.965 mL/kg · DW。在最佳提取条件下再次进行挥发油的提取验证实验,重复 3 次,挥发油得率平均值为 16.000 mL/kg · DW,此挥发油得率大于响应面实验中的数值,说明上述组合条件为挥发油提取最佳条件。

2.2 挥发油成分分析

微波辅助提取法和加热套提取法所得香茅挥发油的离子流色谱图分别见图 2 和图 3,微波辅助提取法中共得到 46 个峰,共检出 39 种成分,占所提挥发油总量的

98.63%;加热套提取法中共得到 57 个峰,共检出 43 种成分,占所提挥发油总量的 96.74%。各成分及其相对含量见表 4。总体而言,这两种方法提取的挥发油中的主要成分均为香茅醛和香茅醇,但相对含量存在差异,加热套提取法的相对含量明显小于微波辅助提取法的,微波辅助提取法所得到的挥发油中功能成分含量普遍高于加热套提取的挥发油,两种工艺都有各自的特点,提取成分种类的不同主要与提取工艺密切相关,挥发油成分含量也存在一定差异。微波加热会使食品内部分子振动摩擦并迅速产热,引起食品温度升高,从而达到快速加热的目的。与传统加热方法相比,微波加热不仅具有加热速度快、加热均匀、对产品的机械损伤小、提取效率高,耗能低等优点,也更是一种符合绿色发展观念的挥发油提取法。

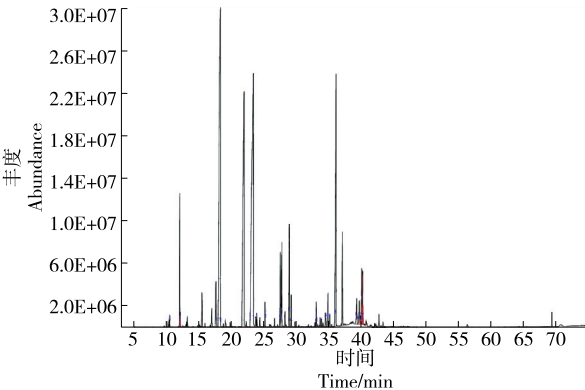


图 2 微波辅助提取法所得香茅挥发油总离子流图
Figure 2 Total ion flow diagram of citronella volatile oil obtained by microwave-assisted extraction method

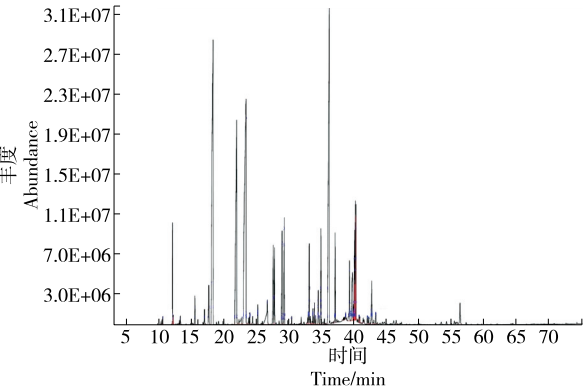


图 3 加热套提取法所得香茅挥发油总离子流图
Figure 3 Total ion flow diagram of citronella volatile oil obtained by heating mantle extraction method

表 4 香茅挥发油化学成分的气相色谱—质谱分析结果

Table 4 Gas chromatography-mass spectrometry results for the chemical compositions of citronella essential oil

成分	保留指数	CAS 号	相对含量/%	
			微波辅助提取法	普通加热提取法
月桂烯	990	000123-35-3	0.11	—
6-甲基-5-庚烯-2-醇	996	001569-60-4	0.21	0.12
双戊烯	1 079	005989-27-5	2.56	1.69
2,6-二甲基-5-庚烯醛	1 090	000106-72-9	0.19	0.14
芳樟醇	1 098	000078-70-6	0.80	0.56
异薄荷醇	1 143	000089-79-2	1.48	1.03
香茅醛	1 150	000106-23-0	21.64	16.80
.alpha.-Terpin	1 190	000098-55-5	0.10	—
香茅醇	1 226	000106-22-9	14.71	10.52
(Z)-3,7-dimethylocta-2,6-dienal	1 237	000106-26-3	0.15	0.11
香叶醇	1 249	000106-24-1	25.19	18.60
(E)-3,7-二甲基-2,6-辛二烯醛	1 250	000141-27-5	0.25	0.15
甲酸香草酯	1 289	000105-85-1	0.26	0.20
茴香烯	1 305	000104-46-1	0.22	0.21

续表 4

成分	保留指数	CAS 号	相对含量/%	
			微波辅助提取法	普通加热提取法
2-(1-Hydroxy-1-methylethyl)-5-methylcyclohexanol	1 352	138663-70-4	0.20	—
香茅醇乙酸酯	1 360	000150-84-5	2.18	—
丁香酚	1 379	000097-53-0	2.21	1.93
异丁香酚	1 380	000097-54-1	0.33	—
乙酸香叶酯	1 382	000105-87-3	2.58	2.22
β -榄香烯	1 392	000515-13-9	0.72	2.28
甲基丁香酚	1 411	000093-15-2	0.11	0.08
germacreneD, 1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)-1,6-cyclodecadiene	1 416	023986-74-5	0.55	1.73
白菖烯	1 419	017334-55-3	0.22	0.33
.gamma.-Muurolene	1 449	030021-74-0	0.13	0.23
.alpha.-Muurolene	1 452	031983-22-9	0.18	0.46
1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-Naphthalene	1 477	000483-75-0	0.50	0.90
3,7-二甲基-1,6-辛二烯-3-醇甲酸酯	1 497	000115-99-1	0.53	0.37
Δ -杜松烯	1 522	000483-76-1	0.90	2.19
乙酸异丁香酚酯	1 529	000093-29-8	0.41	—
4-ethenyl-a, a, 4-trimethyl-3-(1-methylethenyl)-, (1R, 3S, 4S)-Cyclohexanemethanol	1 542	000639-99-6	10.09	14.49
1,7-dimethyl-4-(1-methylethyl)-2,7-Cyclodecadien-1-ol	1 554	072120-50-4	2.42	2.12
1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-a, a, 4a, 8-tetramethyl-, (2R, 4aR)-2-Naphthalenemethanol	1 592	001209-71-8	0.80	1.61
(-)- <i>T</i> -Muurolol	1 636	019912-62-0	1.00	2.05
4-烯丙基邻苯二酚二乙酸盐	1 640	013620-82-1	0.33	—
β -桉叶醇	1 643	000473-15-4	1.45	2.51
A-毕橙茄醇	1 650	000481-34-5	0.99	2.04
α -Eudesmol	1 652	000473-16-5	1.26	2.70
(2Z, 6E)-3,7,11-三甲基十二碳-2,6,10-三烯-1-醇	1 664	003790-71-4	0.38	0.15
2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚)	1 688	000119-47-1	0.29	—
玫瑰醚	1 699	016409-43-1	—	0.09
3,7-二甲基-6-辛酸	1 710	000502-47-6	—	1.63
2,6-dimethylocta-2,6-diene	1 731	002792-39-4	—	2.05
(+)-香橙烯	1 744	000489-39-4	—	0.06
α -律草烯	1 746	000087-44-5	—	0.16
Humulene	1 754	006753-98-6	—	0.15
1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-4a, 8-dimethyl-2-(1-methylethenyl)-Naphthalene	1 758	000473-13-2	—	0.17
1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis (1-methylethenyl)-Cyclohexane	1 762	110823-68-2	—	0.19
A-杜松烯	1 790	024406-05-1	—	0.12
A-毕橙茄醇	1 857	133645-25-7	—	0.38
法尼醇	1 831	004602-84-0	—	1.14
A-布藜烯	1 872	003691-11-0	—	0.24

2.3 抗氧化活性

香茅挥发油对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的 IC_{50} 值分别为 0.546, 1.694 mg/mL, 均高于 BHT (0.017, 0.081 mg/mL), 表明香茅挥发油具有很好的自由基清除能力 (表 5)。根据表 5 中数据显示, 香茅挥发油对 DPPH 自由基、ABTS 自由基的清除效率均低于 V_c 与 BHT, 而抗氧化能力的大小取决于抗氧化剂的浓度及其供氢能力, 香茅挥发油是天然抗氧化活性物质, 由多种化合物构成; 在 β -胡萝卜素漂白试验中, 香茅挥发油抗氧化 IC_{50} 值为 0.145 mg/mL, 低于 BHT 的抗氧化能力 0.02 mg/mL, 与 DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除试验结果一致。以上结论表明香茅挥发油属于天然抗氧化物, 具有安全性、无毒副作用的特点, 可用于各类抗氧化产品开发之中, 保护生物体免受自由基氧化, 因此具有良好的应用前景。

表 5 香茅挥发油的抗氧化能力

Table 5 Antioxidant capacity of the essential oil from the leaves of citronella mg/mL

样品	IC_{50} 值		
	DPPH 自由基	ABTS 自由基	亚油酸氧化
挥发油	0.546±0.002	1.694±0.001	0.145±0.003
V_c	0.019±0.002	0.032±0.002	—
BHT	0.017±0.004	0.081±0.006	0.020±0.001

2.4 抑真菌试验

假尾孢真菌包括有上千个品种, 从腐败番石榴中分离的假尾孢真菌是座囊菌纲、球腔菌科下的微生物, 广泛存在于番石榴属果实表面^[22], 为了验证香茅挥发油对真菌的抑制性, 从冷冻的番石榴变质部位进行假尾孢菌分离。假尾孢真菌于 26 °C 恒温培养箱中培养 48 h 后, 经革兰氏染色, 采用电子显微镜观测表面结构如图 4 所示, 其呈现出丝状缠绕的状态, 无序排列, 未经染色的假尾孢真菌头部呈黑褐色, 尾孢呈乳白色, 在生长过程中占空间较大, 当假尾孢真菌繁殖到一定数量时, 肉眼可见黑褐色头部覆盖住尾孢, 最终呈片状分布在培养皿中。

采用琼脂打孔法^[23]测定香茅挥发油的抗真菌能力。

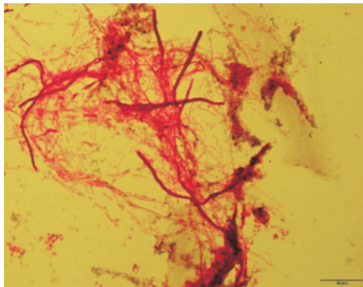


图 4 经革兰氏染色的显微镜下 200 倍的假尾孢菌

Figure 4 Pseudotail bacteria 200 times under the microscope after gram staining

假尾孢菌是无性型真菌属, 生长速度缓慢, 因此菌株生长情况观察总时长为 120 h。在 24 h 时, 各培养皿中菌株均无明显生长, 随时间推移, 陆续出现菌落, 随挥发油抑菌液浓度的增大菌落数越少。当挥发油抑菌液的质量浓度为 2.0 μ g/mL 时, 对假尾孢真菌的抑制作用不明显, 菌落呈放射状生长, 但当挥发油抑菌液质量浓度为 2.5 ~ 3.0 μ g/mL 时, 对假尾孢真菌具有较好的抑制效果, 但假尾孢真菌在 2.5 μ g/mL 的抑菌液中持续 120 h 后仍然有一点生长; 因此可以得出: 在相同时间条件下, 随着香茅挥发油浓度的不断增大, 菌落生长直径越来越小; 该结果表明在单位时间恒定的情况下, 挥发油对假尾孢菌的抑制强度与挥发油浓度呈正比例关系, 且判断 MIC 为 2.5 μ g/mL, MBC 为 3.0 μ g/mL, 由图 5 可知, 菌株在 72 h 时的观察效果已经很明显, 在挥发油质量浓度为 2.5 μ g/mL 的培养皿中, 并未观察到菌株生长, 但是随时间推移, 直到 120 h 时琼脂块周围出现白色菌落状物, 推测是因为时间的增加使培养皿中挥发油量逐渐减少, 抑制作用逐渐消失, 可能再延长培养时间, 菌落数会越来越多, 因此在培养前期就可以确定其 MIC 值, 随时间推移反而会影响试验结果的准确性, 挥发油浓度的增大抑菌效果也显著增加。童周^[24]研究表明 α -松油醇、香茅醇和香茅醛等活性成分具有良好的抑真菌效果, 由于香茅挥发

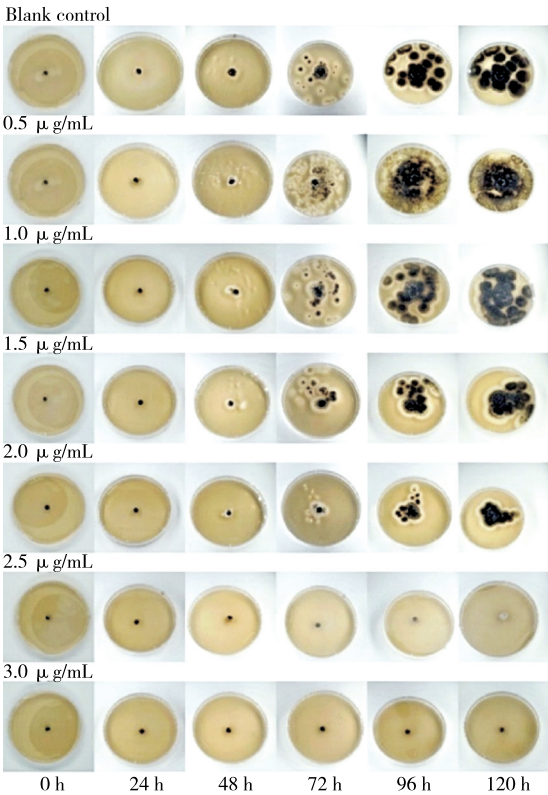


图 5 不同质量浓度香茅挥发油对假尾孢真菌的抑制情况
Figure 5 Inhibitory effects of citronella essential oil at different mass concentrations on *pseudosporomyces*

油中也富含这几种成分,因此推测对抑制假尾孢真菌起到了很大作用。这也有利于挥发油抑制真菌以及香茅挥发油对其他真菌方面的研究。

3 结论

微波辅助提取香茅挥发油的最佳工艺参数为微波功率 700 W、微波时间 21.707 min、液料比 7.185 : 1 (mL/g),挥发油得率为 15.965 mL/kg · DW。GC-MS 分析鉴定出 39 种化合物成分,主要成分为烯类、倍半萜烯类及其含氧衍生物等,这些药用成分的百分含量比加热套提取法所得挥发油多。通过 DPPH 自由基、ABTS 自由基以及亚油酸氧化的抑制率评估香茅挥发油的抗氧化性能,分别为 92.49%,92.46%,82.23%,且香茅挥发油抑菌液对假尾孢菌的抑制 MIC 值为 2.5 $\mu\text{g/mL}$,MBC 值为 3.0 $\mu\text{g/mL}$ 。但是微生物种类繁多,香茅挥发油对更多菌种的抑制作用还有待研究。

参考文献

- [1] KAUR H, BHARDWAJ U, KAUR R. *Cymbopogon nardus* essential oil: A comprehensive review on its chemistry and bioactivity[J]. Journal of Essential Oil Research, 2021, 33(3): 205-220.
- [2] KAKRAPARTHI P S, SRINIVAS K V N S, KUMAR J K, et al. Variation in the essential oil content and composition of citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.) in relation to time of harvest and weather conditions[J]. Industrial Crops and Products, 2014, 61: 240-248.
- [3] FRANCIKOWSKI J, BARAN B, CUP M, et al. Commercially available essential oil formulas as repellents against the stored-product pest *Alphitobius diaperinus*[J]. Insects, 2019, 10(4): 96.
- [4] 张赞彬, 郭媛. 香辛料精油抑菌机理研究进展及其在食品保藏中的应用[J]. 中国调味品, 2011, 36(7): 4-10.
ZHANG Y B, GUO Y. Research progress on antibacterial mechanism of spice essential oil and its application in food preservation[J]. China Seasoning, 2011, 36(7): 4-10.
- [5] 刘耀华, 马新耀, 程作慧, 等. 香茅挥发油对番茄早疫病菌的抑菌作用及抑菌机制[J]. 应用生态学报, 2017, 28(9): 3 016-3 022.
LIU Y H, MA X Y, CHENG Z H, et al. Antibacterial effect and antibacterial mechanism of citronella volatile oil on early blight of tomato[J]. The Journal of Applied Ecology, 2017, 28(9): 3 016-3 022.
- [6] 林霜霜, 邱珊莲, 郑开斌, 等. 柠檬香茅挥发油的成分分析及抑菌作用研究[J]. 中国农业科技导报, 2017, 19(10): 89-95.
LIN S S, QIU S L, ZHENG K B, et al. Composition analysis and antibacterial effect of lemongrass volatile oil[J]. China Agricultural Science and Technology Review, 2017, 19(10): 89-95.
- [7] 赵琳静, 王斌, 乔妍, 等. 香茅叶挥发油的化学成分及其体外抗氧化活性[J]. 中成药, 2016, 38(4): 841-845.
ZHAO L J, WANG B, QIAO Y, et al. The chemical constituents of volatile oil from citronella leaves and its in vitro antioxidant activity[J]. Chinese Patent Medicine, 2016, 38(4): 841-845.
- [8] 侯滨滨, 李悦. 柑橘类精油对食用油脂的抗氧化研究[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(11): 234-236.
- [9] HOU B B, LI Y. Study on the antioxidant effect of citrus essential oils on edible fats[J]. Food Research and Development, 2010, 31(11): 234-236.
- [9] MEMARZADEH S M, GHOLAMI A, PIRBALOUTI A G, et al. Bakhtiari savory (*Satureja bachtiarica* Bunge.) essential oil and its chemical profile, antioxidant activities, and leaf micromorphology under green and conventional extraction techniques[J]. Industrial Crops and Products, 2020, 154: 112719.
- [10] ABDELWAHAB S I, PANCHOLI S S, MOHAN S S, et al. Antinociceptive activity of the essential oil formulation from the roots of *Saussaura lappa* clarks[J]. Curr Top Nutr R, 2021, 19(2): 127-132.
- [11] 朱海东, 曾茂茂, 何志勇, 等. 不同产地香榧假种皮精油组分分析[J]. 食品与机械, 2021, 37(6): 62-68.
ZHU H D, ZENG M M, HE Z Y, et al. Analysis of essential oil components of *Torreya serrata* aril from different producing areas[J]. Food & Machinery, 2021, 37(6): 62-68.
- [12] 田媛, 孙宇峰, 张正海, 等. 响应面法优化超临界 CO₂ 萃取汉麻叶精油工艺[J]. 食品工业科技, 2021, 42(8): 158-163.
TIAN Y, SUN Y F, ZHANG Z H, et al. Optimization of supercritical CO₂ extraction process of hemp leaf essential oil by response surface method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(8): 158-163.
- [13] 耿天佑, 罗理勇, 曾亮, 等. 不同提取方法对沉香精油制备的影响[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2020, 45(2): 59-67.
GENG T Y, LUO L Y, ZENG L, et al. The influence of different extraction methods on the preparation of agarwood essential oil[J]. Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition), 2020, 45(2): 59-67.
- [14] 邵明辉, 王雪青, 宋文军, 等. 响应面法优化微波辅助水蒸气蒸馏提取板栗花精油工艺[J]. 食品工业科技, 2015, 36(10): 233-236, 240.
SHAO M H, WANG X Q, SONG W J, et al. Optimization of microwave-assisted steam distillation process for extracting essential oil from chestnut flower by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(10): 233-236, 240.
- [15] 吕凤. 植物精油七大提取方法对比[N]. 中国医药报, 2021-04-20(7).
LU F. Comparison of seven extraction methods of plant essential oils[N]. China Medical News, 2021-04-20(7).
- [16] 王一彤, 赵新玲, 姚佳彤, 等. 香根草精油微胶囊的制备及其体外抗炎作用[J]. 精细化工, 2020, 37(7): 1 447-1 453.
WANG Y T, ZHAO X L, YAO J T, et al. Preparation of microcapsules of vetiver essential oil and its anti-inflammatory effects in vitro[J]. Fine Chemical Industry, 2020, 37(7): 1 447-1 453.
- [17] 张洪军, 曹亚斌, 刘伟, 等. 响应面法优化香茅精油提取工艺及其成分分析[J]. 中国调味品, 2017, 42(8): 15-20.
ZHANG H J, CAO Y B, LIU W, et al. Response surface methodology to optimize the extraction process of citronella essential oil and its component analysis[J]. China Seasoning, 2017, 42(8): 15-20.

(下转第 201 页)

- drink by lactic acid fermentation[D]. Xianyang: Northwest A & F University, 2016: 7-18.
- [9] 卞春, 季澜洋. 黑米发酵乳饮料配方的响应面法优化[J]. 粮食与油脂, 2016, 29(5): 47-50.
- BIAN C, JI L Y. Optimization of formula of black rice fermented milk beverages by response surface methodology[J]. Cereals & Oils, 2016, 29(5): 47-50.
- [10] 陈娟, 冉军舰. 复配益生菌发酵谷物饮料工艺优化[J]. 现代食品, 2021(8): 81-86.
- CHEN J, RAN J J. Optimization of the process of fermented grain beverage with compound probiotics[J]. Modern Food, 2021(8): 81-86.
- [11] 隋春光, 李大鹏. 富含 L-乳酸黑米发酵饮料的研制及发酵工艺的优化[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2008(3): 77-81.
- SUI C G, LI D P. Research on enriched L-lactic acid fermented black rice beverage and its fermentation process[J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2008(3): 77-81.
- [12] ZOU Y P, CHANG S K C, GU Y, et al. Antioxidant activity and phenolic compositions of lentil (*Lens culinaris* var. Morton) extract and its fractions[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59: 2 268-2 276.
- [13] BENZIE I F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay[J]. Anal Biochem, 1996, 239(1): 70-76.
- [14] 李项辉. 紫苏叶提取物的降血糖活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017: 24-25.
- LI X H. Hypoglycemic activity of perilla leaf extract [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017: 24-25.
- [15] MIRA N V M D, MASSARETTO I L, PASCUAL C D S C I, et al. Comparative study of phenolic compounds in different Brazilian rice (*Oryza sativa* L.) genotypes[J]. Journal of Food Composition & Analysis, 2009, 22(5): 405-409.
- [16] 满朝坤. 五种颜色糙米多酚类物质抗氧化活性及体外消化特性研究[D]. 沈阳: 沈阳师范大学, 2020: 29-38.
- MAN C K. Study on antioxidant activity and in vitro digestion characteristics of phenols in five colors of brown rice [D]. Shenyang: Shenyang Normal University, 2020: 29-38.
- [17] 杨汝德, 陈琼, 陈惠音. 乳酸菌发酵制品研究的现状与发展[J]. 广州食品工业科技, 2003(S1): 79-83.
- YANG R D, CHEN Q, CHEN H Y. Progress in fermented goods of lactobacillus[J]. Modern Food Science and Technology, 2003(S1): 79-83.
- [18] 李志芳, 佐兆杭, 王颖, 等. 芸豆/大豆复合发酵液代谢组分及功能性研究[J]. 食品与机械, 2021, 37(11): 38-43.
- LI Z F, ZUO Z H, WANG Y, et al. Studies on metabolites and functions of soy-based plant fermentation broth[J]. Food & Machinery, 2021, 37(11): 38-43.
- [19] 张珍, 李波清. 乳酸菌主要代谢产物及其作用研究进展[J]. 滨州医学院学报, 2012, 35(4): 274-276.
- ZHANG Z, LI B T. Research progress on main metabolites of lactic acid bacteria and their effects[J]. BMU Journal, 2012, 35(4): 274-276.
- [20] 龚二生. 糙米多酚组分及其抗氧化活性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2018: 25-43.
- GONG E S. Identification and antioxidant activity of phenolic compounds in brown rice [D]. Nanchang: Nanchang University, 2018: 25-43.
- [21] 李俊, 卢扬, 赵刚, 等. 苦荞芽苗茶饮料发酵前后营养、风味及抗氧化活性的变化[J]. 食品与机械, 2019, 35(7): 187-192.
- LI J, LU Y, ZHAO G, et al. Variation of nutrition, flavor and antioxidant activity in tea beverage of tartary buckwheat sprout after fermentation[J]. Food & Machinery, 2019, 35(7): 187-192.
- [22] WIESLAW W, DOROTA S N, JOANNA T, et al. Changes in the content and composition of anthocyanins in red cabbage and its antioxidant capacity during fermentation, storage and stewing[J]. Food Chemistry, 2015, 167: 115-123.
- (上接第 173 页)
- [18] 张圆圆, 孟永斌, 张琳, 等. 响应面法优化微波辅助水蒸气蒸馏法提取油樟精油工艺[J]. 化工进展, 2020, 39(S2): 291-299.
- ZHANG Y Y, MENG Y B, ZHANG L, et al. Optimization of microwave-assisted steam distillation for extracting essential oil from *Cinnamomum camphora* by response surface methodology[J]. Progress in Chemical Industry, 2020, 39(S2): 291-299.
- [19] 李勇慧, 耿惠敏, 李双双. 四种柑橘类果皮精油成分分析[J]. 现代食品科技, 2019, 35(4): 264-272.
- LI Y H, GENG H M, LI S S. Analysis of essential oils in four citrus peels[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(4): 264-272.
- [20] HE F, WANG W, WU M C, et al. Antioxidant and antibacterial activities of essential oil from *Atractylodes lancea* rhizomes[J]. Industrial Crops and Products, 2020, 153: 112552.
- [21] BLAEKOVI B, YANG W F, WANG Y, et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Lavandula* × *intermedia* 'Budrovka' and *L. angustifolia* cultivated in Croatia[J]. Industrial Crops and Products, 2018, 123: 173-182.
- [22] 郭英兰. 假尾孢属一新种[J]. 菌物学报, 2011, 30(5): 671-673.
- GUO Y L. A new species of *Pseudocercospora* [J]. Acta Mycologica Sinica, 2011, 30(5): 671-673.
- [23] TIMUN R, BARIK C R, PUROHIT S, et al. Composition and antibacterial activity analysis of citronella oil obtained by hydrodistillation: Process optimization study [J]. Industrial Crops and Products, 2016, 94(30): 178-188.
- [24] 童周. 浙江玫瑰精油成分、抑菌抗氧化能力及稳定性研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2017: 39-45.
- TONG Z. Study on the composition, antibacterial, antioxidant capacity and stability of Zhejiang rose essential oil[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2017: 39-45.