

文章编号:1673-1689(2011)06-0827-05

薄荷属植物精油和多酚类的抑菌性及抗氧化性研究

吕爽^{1,2}, 田呈瑞^{*1}, 韩莎莎¹

(1. 陕西师范大学 食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710062; 2. 西安市农业技术推广中心, 陕西 西安 710065)

摘要: 研究了椒样薄荷(*Mentha piperita* L.)与苏格兰留兰香(*Mentha cardiaca* G.)精油的抑菌活性,测定了精油的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)。同时对两种薄荷叶片以及精油提取后残渣的多酚含量和抗氧化性进行研究,以期对两种薄荷的多角度开发利用提供理论依据。结果表明:2种薄荷精油对于大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌和李斯特菌均有抑制作用,而对于肠炎沙门氏菌及黑曲霉没有抑制作用,椒样薄荷精油的抑菌效果比苏格兰留兰香精油强。另外,椒样薄荷多酚含量在提取精油后显著性减少,而苏格兰留兰香未显著性降低。两种薄荷精油提取后残渣具有较强的DPPH自由基清除能力,而FRAP抗氧化能力却显著性降低。

关键词: 薄荷属植物; 抑菌性; 抗氧化性

中图分类号: Q 505

文献标识码: A

Study on Antimicrobial and Antioxidant Activity of Essential Oils and Polyphenol in *Mentha* Plants

LV Shuang^{1,2}, TIAN Cheng-rui^{*1}, HAN Sha-sha¹

(1. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China;
2. Xi'an Agricultural Technology Extension Centre, Xi'an 710065)

Abstract: The antimicrobial activity, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of essential oil in *Mentha piperita* and *Mentha cardiaca* were determined in this study. Furthermore, the polyphenol content and antioxidant activity of solid residues in two mints were also investigated. The results demonstrated that the two essential oils exhibited inhibition effect on *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*, however, without inhibitory effect was observed in the case of *Salmonella enteritidis* and *Aspergillus niger*. The antimicrobial ability of peppermint essential oil was stronger than Scotch spearmint essential oils. Besides, the polyphenol content in residues of peppermint was significantly decreased, but that in Scotch spearmint had no significant

收稿日期:2010-10-24

基金项目:国家星火计划项目(2007EA851010)。

作者简介:吕爽(1979—),女,陕西省宝鸡市人,讲师,博士研究生,主要从事植物资源开发与利用。

Email: gracelv79@163.com

*通信作者:田呈瑞(1956—),男,陕西省周至县人,教授,博士研究生导师,主要从事植物资源开发利用研究。

Email: gracelv79@hotmail.com

reduction. The residues of two mints had stronger ability of scavenging DPPH after water distillation, but the antioxidant ability in FRAP assay reduced significantly.

Key words: *Mentha* plant, antimicrobial activity, antioxidant activity

椒样薄荷(*Mentha piperita* L.)与苏格兰留兰香(*Mentha cardica* G.)均属于唇形科薄荷属芳香植物,目前是世界薄荷精油生产的主要品种。芳香植物具有抑菌、抗氧化等多种作用,成为天然食品防腐剂以及抗氧化剂的重要来源,研究芳香植物抑菌性以及抗氧化性具有广阔的应用前景。

本文主要对椒样薄荷与苏格兰留兰香水蒸气蒸馏提取的精油抑菌性进行了研究,同时研究了两种植物醇提物以及精油提取后固体残渣醇提物多酚含量以及抗氧化性。以期为椒样薄荷与苏格兰留兰香的多角度开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

材料:椒样薄荷与苏格兰留兰香叶片均于2009年7月采摘于西安市农科所三桥科技示范园,叶片自然风干备用。

菌种:大肠杆菌,金黄色葡萄球菌,李斯特菌,肠炎沙门氏菌,鼠伤寒沙门氏菌,黑曲霉菌均为本校食品学院微生物实验室保存。

试剂:甲醇,无水碳酸钠;福林酚试剂:购自上海荔达生物科技有限公司;没食子酸,DPPH,TPTZ:购自SIGMA公司。

1.2 主要设备

S·SW-CJ-1F净化工作台:上海跃进医疗器械厂产品;PHS-3C精密pH计:上海精密仪器仪表有限公司产品;722型可见分光光度计:上海光谱仪器有限公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 精油的抑菌性

1) 精油的提取 采用水蒸气蒸馏法对椒样薄荷以及苏格兰留兰香叶片中的精油进行提取。

2) 培养基的制备 分别配制牛肉膏蛋白胨培养基、马铃薯蔗糖琼脂培养基、LB培养基待用^[1]。

3) 抑菌剂的制备 取精油40 μ L于5mL棕色容量瓶中,加二甲基亚砷定容后备用。最终抑菌剂质量浓度为4 000 μ g/mL。

4) 菌悬液的制备 制作斜面培养基,接种待测菌,活化,细菌在37 $^{\circ}$ C培养箱中培养24 h。霉菌在25 $^{\circ}$ C培养箱中培养4~5 d,刮两环已活化的待测菌

于100 mL无菌水中,充分混合,备用。

5) 抑菌圈的测定 采用滤纸片法。在无菌操作台,用移液枪移取0.1 mL菌悬液至已经倒好的平板上,涂布均匀,将6 mm的圆滤纸片贴在固体平板上,每皿贴两片,给滤纸片上加配制好的抑菌剂10 μ L,放入培养箱中培养,细菌37 $^{\circ}$ C下培养24 h,霉菌25 $^{\circ}$ C下培养2~3 d,记录抑菌圈的直径,做2个平行样,结果取平均值,二甲基亚砷作为阴性对照。

6) 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)的测定 参考王磊等人的方法^[2],测定最小抑菌浓度和最小杀菌浓度。配制LB培养基,将抑菌剂,液体培养基和菌悬液按一定比例加入试管中,使试管中抑菌剂质量浓度分别为20、40、80、160、320、640、1 280 μ g/mL。

将添加好的试管,细菌在37 $^{\circ}$ C培养箱内培养24 h,霉菌在25 $^{\circ}$ C培养箱内培养4 d。在培养结束后,记录液体培养基不出现浑浊的最小抑菌剂浓度,即为最小抑菌浓度。MIC测定结束后,继续培养24 h,然后记录液体培养基不出现浑浊的最小抑菌剂浓度,即为最小杀菌浓度。

1.3.2 醇提物多酚含量测定及抗氧化性

1) 醇提物的制备 将2种植物精油提取后残渣在50 $^{\circ}$ C烘箱中烘干,椒样薄荷、苏格兰留兰香叶片以及精油提取后残渣粉碎后过60目筛,各取样品5 g,采用甲醇300 mL分3次超声波提取,每次30 min,超声初始温度30 $^{\circ}$ C。将提取液过滤,滤液旋转蒸发至5 mL左右放入培养皿中自然挥干溶剂。将粗提物用甲醇定容到10 mL,作为待测液。

2) 多酚含量测定 多酚含量用福林法测定^[3]。吸取0.2 mL稀释到一定浓度的待测液到测试管中,再加入去离子水使总体积达到4.6 mL,加入0.1 mL福林试剂(使用前用去离子水稀释两倍)和0.3 mL 2% Na_2CO_3 溶液,振摇试管,25 $^{\circ}$ C下保温2 h,760 nm下测定吸光度。多酚含量通过没食子酸标准曲线进行换算,标准曲线质量浓度范围为4 μ g/mL到10 μ g/mL。多酚含量被表示为mg没食子酸/g干物质量。做两个平行样,结果取平均值。

计算公式:样品中多酚含量(mg/g)=(测定液中多酚浓度(μ g/mL) $\times$ 测定液体积(mL) $\times$ 待测液

稀释倍数 $\times$ 待测液定容体积(mL))/(测定时取待测液体积(μ L) $\times$ 称样量(g))

3) 清除 DPPH 自由基抗氧化评价方法 按照 Williams 等人的方法^[4], 0.1 mL 不同粗提物浓度的待测液加入到 4.9 mL 的 60 μ mol/L DPPH 甲醇溶液中, 混合液剧烈振摇后在 25 $^{\circ}$ C 下避光稳定 30 min, 在 517 nm 下测定吸光度, 甲醇为参比液。对照溶液为将 0.1 mL 甲醇加入到 4.9 mL 的 60 μ mol/L DPPH 溶液中的溶液, 在 517 nm 下测定对照溶液的吸光度。DPPH 自由基清除率(%) = $(1 - A_{\text{样品}}/A_{\text{对照}}) \times 100$ 。做两个平行样, 结果取平均值。

根据不同粗提物浓度的 DPPH 自由基清除率计算样品的 IC_{50} 值。 IC_{50} : 当 DPPH 自由基清除率达到 50% 时样品粗提物的浓度。

4) FRAP 抗氧化评价方法 按照 Netzel 等人的方法^[5], 进行 FRAP 抗氧化性测定。FRAP 反应液配置方法: 300 mmol/L 乙酸钠缓冲液(pH = 3.6), 10 mmol/L TPTZ 溶液(40 mmol/L HCl 为溶剂)以及 20 mmol/L $FeCl_3$ 溶液, 三者体积比为 10:1:1。FRAP 每天都要现配, 在使用前放置在 37 $^{\circ}$ C 的水浴中保温。0.03 mL 稀释到一定浓度的待测液与 1.8 mL 的 FRAP 试剂以及 3.1 mL 的超纯水混合。在 37 $^{\circ}$ C 下保温 30 min 后在 593 nm 下测定吸光度, 以 0.03 mL 甲醇与 FRAP、超纯水混合溶液作为参比液。FRAP 值使用 $FeSO_4$ 标准曲线(浓度为 0.2 mmol/L 到 1 mmol/L)进行换算, 被表示为 mmol $Fe(II)$ / g 干物质量。做两个平行样,

结果取平均值。

2 结果与分析

2.1 精油的抑菌活性

分别用椒样薄荷与苏格兰留兰香精油配制的抑菌剂对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、李斯特菌和黑曲霉进行抑菌活性测定, 结果见表 1。

从表 1 可以看出, 椒样薄荷及苏格兰留兰香精油对于大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌以及李斯特菌四种受试菌种均有不同程度的抑制作用, 对于肠炎沙门氏菌以及黑曲霉没有明显的抑制作用。另外, 椒样薄荷与苏格兰留兰香对大肠杆菌的抑制效果均显著性强于金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌以及李斯特菌。

2.2 最小抑菌浓度和最小杀菌浓度的测定

对椒样薄荷与苏格兰留兰香精油进行最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)研究。根据抑菌圈试验结果, 该试验只针对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌以及李斯特菌 4 种对于薄荷精油敏感的菌种进行研究。结果见表 2、3。

从表 2 和表 3 可以看出, 椒样薄荷精油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌性最强, 其最小抑菌浓度和最小杀菌浓度分别为 20 μ g/mL 和 80 μ g/mL。而苏格兰留兰香精油对大肠杆菌的抑菌性最强, 其最小抑菌浓度和最小杀菌浓度分别为 80 μ g/mL 和 160 μ g/mL。

表 1 精油抑菌圈直径

Tab. 1 Inhibition zone diameter of essential oil

精油	直径/mm					
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	肠炎沙门氏菌	鼠伤寒沙门氏菌	李斯特菌	黑曲霉菌
椒样薄荷	12.25 $\pm$ 1.06 ^a	13.50 $\pm$ 0.71 ^b	—	10.50 $\pm$ 0.99 ^b	17.00 $\pm$ 1.41 ^b	—
苏格兰留兰香	11.00 $\pm$ 1.41 ^a	10.50 $\pm$ 0.71 ^b	—	9.05 $\pm$ 0.64 ^b	16.50 $\pm$ 2.12 ^b	—
二甲基亚砷	—	—	—	—	—	—

注: “—”表示无抑菌效果。精油抑菌圈直径表示为平均值 $\pm$ 标准差, 上标具有相同字母表示不具有显著性差异($p > 0.05$)。

表 2 精油的最小抑菌浓度

Tab. 2 Minimum inhibitory concentration of essential oil

精油	抑菌质量浓度/(μ g/mL)			
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	李斯特菌	鼠伤寒沙门氏菌
椒样薄荷	20	20	40	80
苏格兰留兰香	80	160	160	320

表 3 精油的最小杀菌质量浓度

Tab. 3 Minimum bactericidal concentration of essential oil

精油	杀菌质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)			
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	李斯特菌	鼠伤寒沙门氏菌
椒样薄荷	80	80	80	160
苏格兰留兰香	160	320	320	640

另外,椒样薄荷精油对于大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌以及李斯特菌的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度均小于苏格兰留兰香精油,这说明椒样薄荷精油对这 4 种受试菌的抑菌效果均比苏格兰留兰香精油强。

2.3 醇提物的多酚含量

样品中的多酚含量由没食子酸标准曲线($y = 0.0837x - 0.0894$, $R^2 = 0.9926$)换算得到,表示为 $\text{mg 没食子酸} / \text{g 干物质量}$ 。对椒样薄荷与苏格兰留兰香叶片以及两种植物精油提取后残渣的醇提物测定多酚含量,结果见表 4。

表 4 椒样薄荷与苏格兰留兰香的多酚含量

Tab. 4 Content of polyphenol in peppermint and scotch spearmint

供试材料	材料类型	多酚含量($\text{mg 没食子酸} / \text{g 干物质量}$)
椒样薄荷	叶片	12.26 ± 0.08^a
	精油提取后残渣	5.06 ± 0.08^c
苏格兰留兰香	叶片	10.20 ± 0.08^b
	精油提取后残渣	9.99 ± 0.15^b

注:多酚与总黄酮含量表示为平均值 $\pm$ 标准差,上标具有相同字母表示不具有显著性差异($p > 0.05$)。

从表 4 可以看出,椒样薄荷残渣相对未提取精油的椒样薄荷叶片,其多酚含量有显著性减少,残渣中多酚含量为 $5.06 \pm 0.08 \text{ mg 没食子酸} / \text{g 干物质量}$ 。而苏格兰留兰香残渣相对未提取精油的苏格兰留兰香叶片,其多酚含量没有显著性降低,为 $9.99 \pm 0.15 \text{ mg 没食子酸} / \text{g 干物质量}$ 。同时,椒样薄荷叶片中的多酚含量显著性大于苏格兰留兰香中的多酚含量。

2.4 醇提物的抗氧化性

DPPH 是一种早期合成的有机自由基,常用来评估抗氧化物的供氢能力,它在有机溶剂中非常稳定,呈紫色,517 nm 处有一个特征吸收峰,当遇到自由基清除剂时,DPPH 的孤对电子被配对而使其褪色,也就是在最大吸收波长处的吸光值变小。因此,可通过测定吸光值的变化来评价样品对 DPPH

自由基的清除效果,从而反映样品的抗氧化性强弱。本文用 IC_{50} 值表示样品抗氧化性的强弱。 IC_{50} 值越小,表明样品清除 DPPH 自由基能力越强,即 DPPH 抗氧化性越强。

FRAP 法通常用于研究植物材料的抗氧化能力。植物提取物的抗氧化能力,取决于在这些提取物中的抗氧化剂能够减少 FRAP 分析试剂中三价铁的量,在 FRAP 试剂中,提取物中的抗氧化剂还原三价铁离子成为二价铁离子,这种二价铁离子可与 FRAP 试剂中的 TPTZ 形成一种蓝色混合物,这种蓝色混合物可在波长 593 nm 下测定吸光度,如果吸光度越大,表明形成的二价铁离子越多。因此,FRAP 值越大,表明样品还原的三价铁离子越多,即 FRAP 抗氧化性越强。FRAP 值通过 FeSO_4 的标准曲线($y = 0.415x - 0.004$, $R^2 = 0.9986$)进行换算,被表示为 $\text{mmol Fe(II)} / \text{g 干物质量}$ 。

利用 DPPH 抗氧化评价体系,比较椒样薄荷、苏格兰留兰香叶片及精油提取后残渣对于 DPPH 自由基的抑制率,结果如图 1 和表 5 所示。

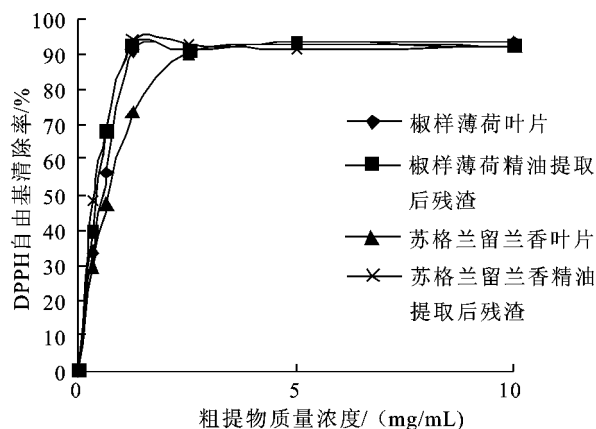


图 1 椒样薄荷与苏格兰留兰香对 DPPH 自由基清除率(%)

Fig. 1 Scavenging rate of free radical DPPH (%) by peppermint and scotch spearmint

从图 1 可以看出,随着样品粗提物浓度的逐渐提高,DPPH 自由基清除率也逐渐提高,当样品粗提物达到一定浓度以后,DPPH 自由基清除率基本不再变化,达到一个恒定值。苏格兰留兰香精油提取后残渣的 DPPH 自由基清除效果较强,其粗提物

质量浓度为 1.25 mg/mL 时抑制率就达到 93.5%,之后变化极少。

对椒样薄荷与苏格兰留兰香叶片以及两种植物精油提取后残渣的醇提物 DPPH 及 FRAP 抗氧化性研究结果如表 5 所示。

试验结果表明,椒样薄荷与苏格兰留兰香在精油提取后,其残渣还具有较强的 DPPH 自由基清除能力,其 IC₅₀ 值分别达到了(0.55±0.00) mg/mL 和 (0.52±0.02) mg/mL。但对于 FRAP 抗氧化能力而言,精油提取后残渣的抗氧化性则显著性降低。

表 5 椒样薄荷与苏格兰留兰香的抗氧化性
Tab. 5 Antioxidant activity of peppermint and scotch spearmint

供试材料	材料类型	DPPH 抗氧化性	FRAP 值(mmol Fe(II) /g
		评价体系 IC ₅₀ 值/(mg/mL)	干物质量)
椒样薄荷	叶片	0.62±0.01 ^b	28.97±0.09 ^a
	精油提取后残渣	0.55±0.00 ^c	4.26±0.01 ^c
苏格兰留兰香	叶片	1.00±0.01 ^a	28.33±0.27 ^b
	精油提取后残渣	0.52±0.02 ^d	3.23±0.01 ^d

注:IC₅₀ 值与 FRAP 值表示为平均值±标准差,上标具有相同字母表示不具有显著性差异($p>0.05$)。

从表 5 可以看出,对于 DPPH 抗氧化评价体系,椒样薄荷与苏格兰留兰香精油提取后残渣的醇提物清除 DPPH 自由基能力均显著性大于未提取精油前的叶片,这说明残渣醇提物中具有对清除 DPPH 自由基起主要作用的多酚类组分,这种组分没有随精油提取过程而降低。而对于 FRAP 抗氧化评价体系,残渣醇提物的 FRAP 抗氧化性均显著性低于未提取精油前的叶片,这表明对还原三价铁离子起主要作用的多酚组分随着精油提取过程而减少。这些试验结果也充分说明了 DPPH 和 FRAP 两种抗氧化评价体系抗氧化机理完全不同,在评价样品抗氧化性时,应该使用两种评价体系进行全面评价。

3 结 语

1) 椒样薄荷和苏格兰留兰香精油均对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌以及李斯特

菌 4 个受试菌种有不同程度的抑制作用,而对于肠炎沙门氏菌以及黑曲霉没有明显的抑制作用。

2) 椒样薄荷精油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌性最强,其最小抑菌质量浓度和最小杀菌质量浓度分别为 20 μg/mL 和 80 μg/mL。而苏格兰留兰香精油对大肠杆菌的抑菌性最强,其最小抑菌质量浓度和最小杀菌质量浓度分别为 80 μg/mL 和 160 μg/mL。另外,椒样薄荷精油对以上 4 种受试菌的抑菌效果均比苏格兰留兰香精油强。

3) 椒样薄荷多酚含量在精油提取后的残渣中含量显著性减少,而苏格兰留兰香在精油提取后,其残渣中多酚含量未显著性降低。椒样薄荷与苏格兰留兰香在精油提取后,其残渣还具有较强的 DPPH 自由基清除能力,而 FRAP 抗氧化能力,即还原三价铁离子为二价铁离子的能力却显著性降低,这为椒样薄荷与苏格兰留兰香精油提取后残渣的开发利用提供了一定的理论依据。

参考文献(References):

- [1] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,1999:154.
- [2] 王磊,邱芳萍,王志兵,等. 粪鬼伞菌丝体提取液的抗菌活性[J]. 食品与生物技术学报,2009(2):272—275.
WANG Lei, QIU Fang-ping, WANG Zhibing, et al. Study on the antibacterial activity of extracts from the mycelium of submerged-cultured coprinus sterquilinus Fr. [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2009 (2): 272—275. (in Chinese)
- [3] Slinkard K, Singleton V L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods[J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1977(28): 49—55.
- [4] Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. *Food Science and Technology Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 1995(28): 25—30.
- [5] Netzel M, Netzel G, Tian Q, et al. Sources of antioxidant activity in Australian native fruits. identification and quantification of anthocyanins[J]. *Agric Food Chem*, 2006(54):9820—9826.