

不同树龄侧柏木精油差异的研究

张俊浩^{1,2}, 杨继国^{1,3}, 杜高发^{1,2}, 张登辉³, 熊捷¹, 宁正祥¹, 郭新东²

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 广州质量监督检测研究院, 广东广州 511447)

(3. 华南协同创新研究院, 广东东莞 523808)

摘要: 本文采用超临界流体法提取三种不同树龄的侧柏木精油, 并研究了三种侧柏精油在提取率、感官性状、精油组成和抑菌功效等方面的差异。研究结果表明, 树龄越老的侧柏木的精油提取率越高, 最高可达到 9.98%, 精油的芳香气味也更浓郁醇正; 采用 GC-MS 法分析精油成分, 发现树龄越老的侧柏木的精油其主要成分罗汉柏烯、雪松醇、花侧柏烯等含量也越高; 采用最低抑菌浓度 (MIC) 法比较了三种精油的抑菌功能, 发现树龄越老的侧柏木精油其 MIC 也越低, 对四种细菌 (金黄色葡萄球菌、乳酸菌、大肠杆菌和沙门氏菌) 的 MIC 均可低至 0.05 mg/mL, 说明其具有高效的抑菌效果。本文研究结果表明, 侧柏木的陈化时间对其精油的风味、含量、组成和功能等方面均具有重要影响, 树龄越老的侧柏木精油利用价值越高。

关键词: 侧柏; 精油; 提取率; GC-MS 法; 最低抑菌浓度

文章编号: 1673-9078(2017)4-96-100

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.4.015

Differences in the Essential Oils from Different Ages of *Platycladus orientalis*

ZHANG Jun-hao^{1,2}, YANG Ji-guo^{1,3}, DU Gao-fa^{1,2}, ZHANG Deng-hui³, XIONG Jian¹, NING Zheng-xiang¹, GUO Xin-dong²

(1. College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511447, China) (3. South China Institute of Collaborative Innovation, Dongguan 523808, China)

Abstract: Essential oils were extracted from three *Platycladus orientalis* woods of different ages by supercritical fluid extraction, and the differences in the extraction rate, sensory characteristics, composition, and antimicrobial efficacy of the three essential oils were studied. The results indicated that an older *P. orientalis* could yield a higher extraction rate of platycladus orientalis (up to 9.98%), and the flavor of the essential oil was stronger and mellower. Gas chromatography-mass spectrometry was used to analyze the components of the essential oils, and the results showed that older *P. orientalis* had higher contents of the main active ingredients, including thujopsene, cedrol, and cuparene. The minimum inhibitory concentration (MIC) method was employed to compare the antimicrobial activities of the three essential oils. The result revealed that older *P. orientalis* had a lower MIC value, and the MIC values against four bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella*) all reached 0.05 mg/mL, showing a strong antimicrobial activity. This experimental result shows that the aging time of *P. orientalis* wood has an important influence on the favor, content, oil composition, and function of the essential oil, and the essential oil of older *P. orientalis* has a higher application value.

Key words: *Platycladus orientalis*; essential oil; extraction rate; gas chromatography-mass spectrometry; minimum inhibitory concentration

侧柏 (*Platycladus orientalis*(L.) Franco) 属于绿乔木, 柏科植物, 别名扁柏和片柏等, 是我国的特产^[1]。

收稿日期: 2016-04-22

基金项目: 十二五科技支撑计划项目子课题 (2012BAD33B11)

作者简介: 张俊浩 (1986-), 男, 硕士研究生, 中级质量工程师, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 杨继国 (1977-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品生物化学

侧柏寿命很长, 常有百年和数百年以上的古树。《本草纲目》将柏定义为“香木类上品”, 《史记》更将柏定为“百木之长”。

长在岩石或悬崖上的侧柏 (俗称崖柏), 由于营养贫瘠和环境恶劣, 生长极其缓慢, 上百年而常不盈尺, 民间亦有“千年松、万年柏”之说, 主要分布在太行山脉、秦岭山脉和大巴山脉等, 其树根、树干具有木质密度高和油性大的特点, 并有着醇厚的柏木香味。

据科学研究测试,侧柏木所提取出挥发性的精油,在工业上广泛用于木香型辛香型等的香精和其他产品的增香剂,且具有排毒解毒、宁神舒筋和镇痛抗菌等作用。据研究,侧柏精油主要成分柏木脑(雪松醇)有活化作用,可作为血小板的活化因子(PAF)受体的拮抗剂,在炎症反应中,人类的呼吸系统和心血管疾病等中发挥重要作用;其次,其还有镇静作用和解痉活性,和调节心血管系统的作用^[2]。最新研究还发现,雪松醇还有抗肿瘤活性抗癌的作用^[3]。此外,侧柏精油还具有较强的抗蚁抗虫作用^[4]。由于侧柏精油中还含有少量的没药醇,其具有多种生物活性,并且可以跟其它抗生素产生协同抗炎消炎作用。

精油的传统生产工艺,一般采用的是加压(压榨)提取法或溶剂提取法^[5]。但这些方法提取精油都需要花费较长的提取时间,且精油提取率不高、纯度低,不符合现在工业生产的要求。超临界流体萃取法(SCFE)是近30多年出现的一种新型的萃取分离技术,是以超临界流体为溶剂,从固体或液体中萃取可溶组分的分离操作技术。其中,超临界流体具有良好选择性,其低粘度、高扩散系数等优点,可以有效提高物质交换效率,超临界萃取技术也是符合绿色化学原则的新型萃取技术^[6]。其中,CO₂作为一种理想的超临界流体(无毒性、不可燃性和经济性),已经广泛用于超临界流体萃取植物精油的研究和生产中^[7,8]。

前期研究主要集中于侧柏不同部位(树叶、树皮和树干等)精油的对比和分析,但不同树龄侧柏木材精油的对比研究鲜有报道,本文立足于此,采用超临界CO₂萃取法提取不同树龄的侧柏木精油,并对精油的性质、成分和功能功效的差异进行分析研究,为进一步地推动侧柏精油提取工业的发展和其医药保健功能的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器



图1 三种树龄侧柏木材实物图

Fig.1 Three *Platycladus orientalis* wood samples of different ages

选取3种物理性状和树龄差异较大的长在岩石或悬崖上的侧柏木材为原材料(由广东阿妈生物科技有

限公司提供),分别记作A、B和C,实物拍摄图如图1所示。

侧柏木A的心材呈红褐色,年轮紧密(年轮间隔小于1 mm)其年轮线较粗,木材表面光滑,轻揉可泛油光,可闻到浓郁的芳香味;侧柏木B的边材呈黄色,心材呈红棕色,年轮较紧密(年轮间隔基本小于2 mm),木材表面光滑较油亮,可闻到浓郁的芳香味;侧柏木C的边材呈浅黄色,心材呈浅棕色,年轮较紧密(年轮间隔小于3 mm),年轮线较细,木材表面光滑无油光,可闻到芳香味。由图可判断,侧柏木A的树龄最老,陈化时间最长,从年轮可估计其树龄在200年以上;而侧柏木C的树龄最小,估计为100年左右;侧柏木B树龄在A与C之间,可估计为150年左右。

超临界萃取仪:5L-SFE,广州美晨高新分离技术有限公司;气相色谱-质谱联用仪:7890A-5975C,美国Agilent公司。

1.2 试验方法

1.2.1 侧柏精油的制备

侧柏精油的主要成分是萜烯类化合物,并且选择超临界CO₂萃取法提取精油。所以,首先将三种侧柏木材料分别粉碎成0.1~0.5 mm的刨花,并将木屑进行初步干燥处理后,阴凉处保存。

采用单因素变量试验,试验分析所得,影响超临界流体萃取侧柏精油提取率的主要因素有萃取压力、萃取时间和萃取温度。在其基础上,进行正交试验,并综合节能低耗的经济效益考虑,进一步得到侧柏精油提取的最佳工艺条件。

1.2.2 侧柏精油成分分析(GC-MS法)

1.2.2.1 分析条件

使用分析仪器:Agilent 7890A-5975C气相色谱-质谱联用仪;色谱柱:Agilent DB-WAX,色谱柱参数:30.0 m×0.32 mm×0.25 μm。

色谱条件:设定初始温度为110 °C,2 °C/min程序升温,至200 °C,保留5 min;进样口温度设定为250 °C;载气为氦气,载气流速为1.0 mL/min,分流比为40:1;进样量为1.0 μL。

质谱条件:传输线温度:250 °C,电子轰击离子源:EI,电子能量:70 eV,离子源温度:220 °C;四级杆温度:150 °C。进入质谱仪进行全程扫描分析,扫描范围:40~500 U,并采用峰面积归一化法初步定量。

1.2.2.2 质谱分析

侧柏精油经过GC-MS后,得到质谱分析图,再利用其的谱图库自动检索,得到每一碎片的初步匹配

结果。找出匹配度高的碎片信息，再结合侧柏精油的相关认识，进行人工筛选，鉴定出其主要成分。

1.2.3 侧柏精油抑菌试验(最低抑菌浓度的测定)

很多研究证实，植物精油大多具有抗菌抑菌作用^[9]。试验采用固体平板培养基稀释法，测定三种侧柏精油的最低抑菌浓度。将三种侧柏精油溶于乙醇，后注入牛肉膏蛋白胨培养基中，配制成最终精油浓度为 0.30 mg/mL、0.20 mg/mL、0.18 mg/mL、0.15 mg/mL、0.12 mg/mL、0.10 mg/mL、0.08 mg/mL、0.06 mg/mL、0.05 mg/mL、0.04 mg/mL、0.03 mg/mL、0.02 mg/mL 和 0.01 mg/mL 的固体培养基。取含菌量约为 2×10^9 CFU/mL 的菌悬液，用无菌生理盐水稀释 10^5 倍以后，吸取 0.10 mL 稀释菌液，分别涂布到各种浓度侧柏精油的平板中，制成含菌平板，以不含侧柏精油的普通培养基平板作空白对照，在 37 °C 下培养 24 h，后观察菌落形成的情况，以无菌落形成的最低精油浓度为各精油的最低抑菌浓度 (MIC)。

2 结果与讨论

2.1 精油提取结果

表 1 精油提取结果表
Table 1 Extraction results

侧柏木	精油提取率/% (20 MPa、50 °C、65 min)
A	9.98±0.03
B	7.67±0.05
C	6.10±0.04

前期的试验结果表明，侧柏精油超临界 CO₂ 萃取法提取的最佳工艺条件为压力 20 MPa、温度 50 °C 下萃取 65 min。三种侧柏木精油在此条件下，各重复 3 次提取试验，取平均值，分别表示为提取率平均值±标准偏差。由表 1 结果可知，三种侧柏木材 (A、B 和 C) 的精油提取率均可达到最高值，但其提取率最高值并不相同，平均提取率分别为 9.98±0.03%、7.67±0.05% 和 6.10±0.04%。从提取数据可看出，三种侧柏木材提取试验都有良好的重现性，试验精密度也高。同时，也可以很直观地看出，在相同条件下，侧柏木 A 的出油率最高，B 次之，C 最低。

2.2 精油性状的差异分析

在最佳工艺条件下，侧柏木材 A、B 和 C 提取出的精油分别记作精油 a、b 和 c。试验所得三种侧柏精油的感官和物理性状也各不相同，表 2 位侧柏精油 a、b 和 c 的感官评价结果。

表 2 感官评价表

Table 2 Sensory evaluation

侧柏精油	感官评价
a	深红棕色粘稠液体，无刺激性头香，木香浓郁醇厚，留香持久
b	棕色粘稠液体，头香稍有刺激性，木香纯正，留香久
c	澄清棕色液体，有刺激性头香，木香但有杂味，留香较久

通过三种侧柏精油的感官比较，树龄越老越陈年的侧柏木精油颜色越深，并且具有更持久的醇厚浓郁的木香气味，而且没有刺激性头香和杂味，尤其是在去除精油中的树脂后得到的澄清淡黄色侧柏精油，木香更为纯正浓郁，肤感也更佳；而树龄小的侧柏木精油呈颜色越浅，虽有芳香味，但并不持久，甚至还存在其它杂味。为了进一步了解分析精油 a、b 和 c 性状明显差异的原因，使用 GC-MS 法对精油的主要成分进行定性定量分析。

2.3 精油主要成分及差异分析

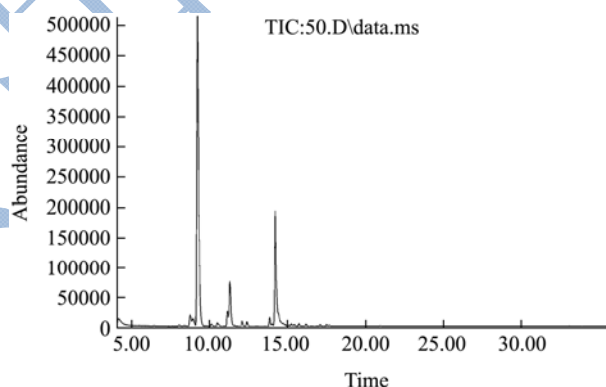


图 2 侧柏精油 a GC-MS 谱图

Fig.2 GC-MS spectra of *Platycladus orientalis* essential oil

侧柏精油经过 GC-MS 后，以侧柏精油 a 为例，得到质谱图(见图 2)，并进一步匹配筛选，得到侧柏精油 a 的主要成分以及成分的相对质量分数(见表 3)。

由表 3 结果可知，超临界 CO₂ 萃取所得的侧柏精油主要以萜烯类化合物为主，其中侧柏精油 a 的主要成分有罗汉柏烯 (53.01%)、雪松醇 (22.63%) 和花侧柏烯 (7.47%)。其中罗汉柏烯和雪松醇的质谱电离配图如下(侧柏精油 a)。

同时，经过 GC-MS 分析，侧柏精油 b 的主要成分含量为：罗汉柏烯 (27.63%)、雪松醇 (18.54%)、花侧柏烯 (5.04%) 和花侧柏烯 (4.16%)；侧柏精油 c 主要成分的含量为：罗汉柏烯 (19.60%)、雪松醇 (15.13%) 和花侧柏烯 (3.70%)。

表3 侧柏精油 a GC-MS 成分分析表

Table 3 Component analysis of *Platycladus orientalis* essential oil

序号	化合物名称	分子式	保留时间/min	相对质量分数/%
1	α -柏木烯	C ₁₅ H ₂₄	8.517	1.59
2	柏木烯	C ₁₅ H ₂₄	8.954	1.02
3	罗汉柏烯	C ₁₅ H ₂₄	9.229	53.01
4	长叶烯	C ₁₅ H ₂₄	9.705	1.00
5	β -愈创烯	C ₁₅ H ₂₄	10.002	0.36
6	花柏烯	C ₁₅ H ₂₄	10.101	0.67
7	长叶蒎烯	C ₁₅ H ₂₄	10.492	1.19
8	α -反式佛手柑醇	C ₁₅ H ₂₄ O	11.055	0.56
9	雪松烯	C ₁₅ H ₂₄	11.151	1.41
10	花侧柏烯	C ₁₅ H ₂₂	11.303	7.47
11	9-甲氧基白菖烯	C ₁₆ H ₂₄ O	11.023	1.20
12	苯并噻唑	C ₇ H ₅ NS	12.392	1.21
13	1-环氧化二表柏木烯	C ₁₅ H ₂₄ O	13.847	1.94
14	雪松醇	C ₁₅ H ₂₆ O	14.212	22.63
15	长松香芹醇	C ₁₅ H ₂₂ O	15.220	0.48
16	1H-苯酰三甲基庚醇	C ₁₅ H ₂₆ O	15.391	0.58
17	库毕醇	C ₁₅ H ₂₆ O	15.744	0.57
18	喇叭茶醇	C ₁₅ H ₂₆ O	16.131	0.44
19	桔利酮	C ₁₅ H ₂₂ O	16.902	0.12
20	没药醇	C ₁₅ H ₂₆ O	17.024	0.40
21	柏木烯醇	C ₁₅ H ₂₄ O	17.481	0.36
22	反式长松香芹醇	C ₁₅ H ₂₄ O	17.663	0.36
23	喇叭烯醇	C ₁₅ H ₂₄ O	20.980	0.17
共计				98.74

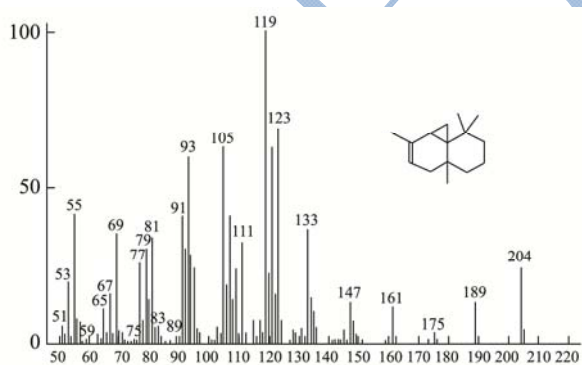


图3 罗汉柏烯质谱电离图

Fig.3 Ionization mass spectrum of thujopsene

试验结果表明，三种侧柏精油都以萜烯类化合物为主，其主要成分也大致相同，为罗汉柏烯、雪松醇和花侧柏烯，其中，雪松醇（又名柏木脑）具有温和杉木芳香，其正是侧柏精油芳香气味的主要来源，这与文献^[10]报导的崖柏精油类似。但三种精油主要成分的相对质量分数并不相同，且呈现 a>b>c 的趋势。精

油 a 的主要成分的含量最高，说明精油的纯度最高，所以精油 a 的芳香风味最浓郁。而精油 c 的含量最低，且含有较多其它的萜烯类杂质，这也是其存在着杂质的主要原因。分析说明了树龄越老越陈年的侧柏木材所提取的精油由于有效成分的浓度越高，纯度也越高，所以精油的物理性状越好，芳香气味越醇厚浓郁，价值也越高。

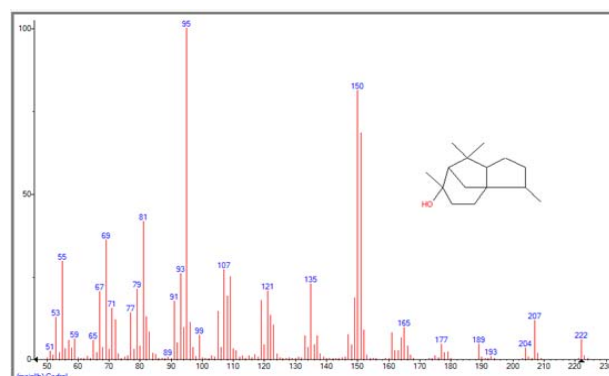


图4 雪松醇质谱电离图

Fig.4 Ionization mass spectrum of thujopsene cedrol

2.4 侧柏精油抑菌性能的研究

分别对侧柏精油 a、b 和 c 进行最低抑菌浓度 MIC 的测定, 结果如表 4 所示。

表 4 侧柏精油对细菌的最低抑菌浓度(MIC)结果

侧柏精油	最低抑菌浓度(MIC)/(mg/mL)			
	<i>S. aureus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. sp.</i>
侧柏精油a	0.05	0.05	0.05	0.05
侧柏精油b	0.12	0.10	0.10	0.12
侧柏精油c	0.18	0.15	0.15	0.18

注: *S.aureus*-金黄色葡萄球菌; *Lactobacillus*-乳酸菌; *E. coli*-大肠杆菌; *S. Sp.*-沙门氏菌。

通过对比(表 4)可知, 侧柏精油对常见的四种细菌都有抑制作用, 且抑菌性能都很强, 其中, 侧柏精油 a 的抑菌效果最佳最高效, 最低抑菌浓度(MIC)可达到 0.05 mg/mL 的水平, 对四种细菌都有显著的抑制作用。而侧柏精油 b 和侧柏精油 c 的 MIC 基本为 0.10 mg/mL 以上, 其中 c 的抑菌效果相对最低, 对四种细菌的 MIC 值也最高, 达到了 0.18 mg/mL。

相比其它植物性精油, 如硬毛地笋精油的 MIC 值最低到达 6.25 mg/mL(金黄色葡萄球菌)^[11], 又如我们较熟悉的油樟木精油, 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的 MIC 最低达到 1 μ L/mL(以精油密度换算为 0.8~1.0 mg/mL)^[12], 侧柏木精油都显示出更强的抑菌性能, 更具应用价值。

3 结论

3.1 本文采用超临界 CO₂ 萃取法提取侧柏精油, 提取条件为温度 50 $^{\circ}$ C、压力 20 MPa、提取时间 65 min, 在此条件下, 不同树龄或陈化时间的侧柏, 其精油的提取率也不相同, 树龄越老的侧柏木的精油提取率越高, 最高可达到 9.98%; 树龄越老陈化时间越长的侧柏木的精油, 颜色越深, 具有更持久的醇厚浓郁的木香气味, 而且无刺激性头香和杂味, 尤其是在去除精油中的树脂后得到的澄清淡黄色侧柏精油, 木香更为纯正浓郁, 肤感也更佳; 经过 GC-MS 分析, 侧柏精油的主要成分有罗汉柏烯、雪松醇和花侧柏烯等, 而且树龄越老的侧柏木的精油其主要成分罗汉柏烯、雪松醇和花侧柏烯等含量也越高(罗汉柏烯含量可达 53.01%, 雪松醇可达 22.63%)。采用最低抑菌浓度(MIC)法比较了三种精油的抑菌功能, 发现树龄越老的侧柏木精油其 MIC 也越低, 对四种细菌(金黄色葡萄球菌、乳酸菌、大肠杆菌和沙门氏菌)的 MIC 均可低至 0.05 mg/mL, 说明其具有高效的抑菌效果。

3.2 侧柏精油拥有独特的芳香味, 并具有抗菌消炎、舒筋宁神和镇静阵痛等功效作用, 可广泛利用于各类香精香料、保健食品以及功效化妆品的研究开发中。本文研究结果表明, 侧柏木的陈化时间对其精油的风味、含量、组成和功能等方面均具有重要影响, 树龄越老陈化时间越长的侧柏木提取出的侧柏精油得率更高、木香更纯正浓郁、有效成分含量和功效也越高, 可开发和利用的价值也越高, 应是我们今后研究和开发的重点。

参考文献

- [1] 回瑞华, 侯冬岩, 刘晓媛, 等. 不同方法提取侧柏叶中挥发性成分的气相色谱-质谱分析[J]. 质谱学报, 2006, 27(4): 226-231
HUI Rui-hua, HOU Dong-yan, LIU Xiao-yuan, et al. Analysis of volatile components from leaf twigs in biota orientalis with different extraction methods by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2006, 27(4): 226-231
- [2] 张岩, 曲凡志, 赵余庆. 柏木醇的药理作用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(7): 584-588
ZHANG Yan, QU Fan-zhi, ZHAO Yu-qing. Development of pharmacological effects of cedrol [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2014, 31(7): 584-588
- [3] 蒋继宏, 李晓储, 高雪芹, 等. 侧柏挥发油成分及抗肿瘤活性的研究[J]. 林业科学研究, 2006, 19(3): 311-315
JIANG Ji-hong, LI Xiao-chu, GAO Xue-qin, et al. Volatile constituents from platycladus orientalis and their antitumor activities [J]. Forest Research, 2006, 19(3): 311-315
- [4] 黄洛华, 龙玲, 陆熙娴, 等. 侧柏枝叶精油的化学组成与抗蚁性[J]. 林业科学研究, 2001, 14(4): 416-420
HUANG Luo-hua, LONG Ling, LU Xi-xian, et al. Chemical composition of the leaf essential oil of platycladus orientalis and its resistance to termite [J]. Forest Research, 2001, 14(4): 416-420
- [5] Kátia Andressa Santosa, Reinaldo Aparecido Bariccatti, Lúcio Cardozo-Filho, et al. Extraction of crambe seed oil using subcritical propane: Kinetics, characterization and modeling [J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2015, 104: 54-61
- [6] S M García-Abarrio, L Martín, J Burillo, et al. Supercritical fluid extraction of volatile oil from *Lippia alba* (Mill.) cultivated in Aragón (Spain) [J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2014, 94: 206-211
- [7] Edgar Uquiche, Natalia Cirano, Sonia Millao. Supercritical

- fluid extraction of essential oil from *Leptocarpha rivularis* using CO₂ [J]. *Industrial Crops and Products*, 2015, 77: 307-314
- [8] E Arranz, L Jaime, M C López de las Hazas, et al. Supercritical fluid extraction as an alternative process to obtain essential oils with anti-inflammatory properties from marjoram and sweet basil [J]. *Industrial Crops and Products*, 2015, 67: 121-129
- [9] Fatima Reyes-Jurado, Avelina Franco-Vega, Nelly Ramírez-Corona, et al. Essential oils: antimicrobial activities, extraction methods, and their modeling [J]. *Food Eng. Rev.*, 2015, 7(3): 275-297
- [10] 王亚琦,陈奕洪,黄卫文,等.超临界 CO₂ 萃取崖柏精油的研究[J]. *食品与机械*,2015,3:175-178
WANG Ya-qi, CHEN Yi-hong, HUANG Wei-wen, et al. Research on supercritical CO₂ extraction of thuja sutchuenensis essential oil [J]. *Food and Machinery*, 2015, 3: 175-178
- [11] Jian-qing Yu, Jia-chuan Lei, Xiu-qiao Zhang, et al. Anticancer, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Lycopus lucidus* turcz. var. *hirtus* Regel [J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(4): 1593-1598
- [12] 张萍,王平,石超峰,等.油樟油主成分对几种常见病原菌的抑菌活性研究[J]. *四川农业大学学报*,2013,31(4):393-397
ZHANG Ping, WANG Ping, SHI Chao-feng, et al. Antibacterial activity of essential components of *Cinnamomum longepaniculatum* oil on several typical pathogenic bacteria [J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2013, 31(4): 393-397