

# 银杏叶类脂成分与聚戊烯醇的协同抑菌作用

陶冉<sup>1</sup>, 王成章<sup>1,2\*</sup>, 孔振武<sup>1,2</sup>

(1. 中国林业科学研究院林产化学工业研究所, 生物质化学利用国家工程实验室, 国家林业局林产化学工程重点开放性实验室, 江苏省生物质能源与材料重点实验室, 南京 210042;  
2. 中国林业科学研究院林业新技术研究所, 北京 100091)

**[摘要]** **目的:**考察银杏叶聚戊烯醇同系物以及其他 15 种类脂成分单体化合物对 5 种菌种(沙门菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌)的抑菌及协同作用。**方法:**正己烷作溶剂和空白对照,在样品质量浓度 500 mg·L<sup>-1</sup>下,利用滤纸片法测定样品抑菌圈值;样品用正己烷配制成质量浓度分别为 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9 mg·L<sup>-1</sup>溶液并分散在培养基中,记录无菌生长样品浓度,以确定最小抑菌浓度(MIC)、最小杀细菌浓度(MBC)和最小杀真菌浓度(MFC)和计算分级抑菌浓度指数(FIC)方法来比较各样品对菌种的抑制作用。**结果:**橙花叔醇对 4 种细菌(沙门菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌)的抑菌活性均为最强,抑菌圈范围为 17.4~20.9 mm, MIC 和 MBC 范围依次为 3.9~15.6, 31.3~62.5 mg·L<sup>-1</sup>; 芳樟醇对黑曲霉菌的抑菌活性最强,抑菌圈为 17.9 mm, MIC 和 MFC 依次为 7.8, 31.3 mg·L<sup>-1</sup>;  $\beta$ -石竹烯与银杏叶聚戊烯醇混合样品组对枯草芽孢杆菌的协同抑制作用最强;当  $\beta$ -石竹烯与银杏叶聚戊烯醇质量比为 43.42%:56.58% 时,其抗枯草芽孢杆菌协同作用最佳,此时测得实际值 FIC 指数为 0.16, 抑菌圈值为 19.8 mm。**结论:**银杏叶类脂成分具有一定抑菌作用,部分类脂成分与聚戊烯醇混合具有协同抑菌效应。

**[关键词]** 银杏; 类脂成分; 聚戊烯醇;  $\beta$ -石竹烯; 协同抑菌作用

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0203-08

**[doi]** 10.11653/syfy2013170203

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130625.1011.007.html>

**[网络出版时间]** 2013-06-25 10:11

## Antimicrobial Synergy between Polyprenols and other Lipids Isolated from Ginkgo Folium

TAO Ran<sup>1</sup>, WANG Cheng-zhang<sup>1,2\*</sup>, KONG Zhen-wu<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Chemical Industry of Forestry Products, Chinese Academy of Forestry (CAF),  
National Engineering Laboratory for Biomass Chemical Utilization, Key and Open Lab.  
on Forest Chemical Engineering, State Forestry Administration (SFA);  
Key Laboratory of Biomass Energy and Material, Jiangsu Province; Nanjing 210042, China;  
2. Institute New Technology of Forest, CAF, Beijing 100091, China)

**[Abstract]** **Objective:** Antibacterial/antifungal tests and synergistic interactions between polyprenols and other lipids (including fifteen known compounds) isolated from *Ginkgo biloba* leaves against five selected stains (*Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*) were carried out. **Method:** Antibacterial/antifungal actions and synergistic interactions were observed using a disc-diffusion

**[收稿日期]** 20130417(016)

**[基金项目]** 国家“十二五”林业科技支撑项目(2012BAD21B04);科技部农业科技成果转化资金(2012GB24320577);江苏省产学研前瞻性联合研究项目(BY2012042)

**[第一作者]** 陶冉, 博士生, 从事天然产物化学研究

**[通讯作者]** \*王成章, 研究员, 博士, 博士生导师, 从事天然产物研究与利用, E-mail: wangczhs@sina.com

method at  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  in n-hexane (blank) by measuring inhibition halos and comparing minimum inhibitory concentrations (MIC), minimal bactericidal concentration (MBC), minimal fungicidal concentration (MFC) values by recording the sample concentration (250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  in n-hexane) as no bacteria growing and figuring out fractional inhibitory concentration (FIC) Index. **Result:** Nerolidol showed the highest activity against the four tapes of bacteria (*S. enterica*, *S. aureus*, *E. coli* and *B. subtilis*) among all the tested samples, and inhibition halos were 17.4-20.9 mm, MIC and MBC values were the range of 3.9-15.6, 31.3-62.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . linalool showed the highest activity against *A. niger* among all the tested samples and the GBP with  $\beta$ -caryophyllene mixture group had the strongest synergistic effect against *B. subtilis* among all mixture groups against the five tested strains, and inhibition halos were 17.9 mm, MIC and MFC values were 7.8, 31.3  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . The proportion of  $\beta$ -caryophyllene and GBP was 43.42%:56.58% that was determined by Mixture Design as the optimal proportion of synergistic effect on GBP with isophytol against *B. subtilis*. In the meantime, the truth values of FIC index and inhibition halos were respectively 0.16, 19.8 mm. **Conclusion:** *G. biloba* leaves polyprenols and other lipids have antimicrobial effects and the parts of lipid compounds with polyprenols have synergistic effects against the tested strains.

[**Key words**] *Ginkgo biloba*; lipids; polyprenols;  $\beta$ -caryophyllene; antimicrobial synergy

银杏(*Ginkgo biloba* L.)树原产于中国,也是世界上最古老的树种之一<sup>[1]</sup>。银杏叶是临床上常用的药材之一,传统医学认为其具有益心敛肺、化湿止泻的功效<sup>[2]</sup>。银杏叶聚戊烯醇(GBP)是继银杏黄酮、萜内酯之后新发现的一类重要天然活性物质,它是由 14~24 个异戊烯基单元及终端异戊烯醇组成的线性长链化合物<sup>[3]</sup>,对提高免疫功能、肝细胞再生、抑制癌细胞转移和辅助放疗等具有明显作用<sup>[4]</sup>。银杏叶类脂成分主要包括烃类、聚戊烯醇类、萜烯醇类、甾醇类等化合物,笔者最近发现其中某些成分具有一定的抑菌作用<sup>[3]</sup>。银杏叶提取物的抑菌活性已有报道<sup>[5]</sup>,主要是以银杏黄酮及内酯成分为主的醇-水提取物;Choi, J. G. 等人<sup>[6]</sup>从银杏叶中分离出一种新的烷基酚酸类化合物,其对抗万古霉素肠球菌(VRE)具有良好的抑制作用。而对于银杏叶类脂成分特别是聚戊烯醇的抑菌作用,报道相对较少。为了进一步研究银杏叶类脂成分的抑菌作用,筛选出与银杏叶聚戊烯醇协同抑菌作用更强的类脂化合物;为了进一步开发银杏叶新的药用化学部位以及新的药效功能,提供更多理论基础,本研究对银杏叶聚戊烯醇同系物以及其他 15 种类脂成分单体化合物对 5 种菌种(沙门菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌)的抑菌活性考察,同时对它们之间的抑菌协同作用进行了比较,从而筛选出抑菌协同作用较强的化合物,进而确定其最佳抑菌比例。

## 1 材料

1.1 供试菌种 沙门菌 ATCC 14028、金黄色葡萄

球菌 ATCC 25923、黑曲霉菌 ATCC 16404、大肠杆菌 NCTC 12923 和枯草芽孢杆菌 NCTC 10400(中国典型培养物保藏中心)。

1.2 供试样品 银杏叶类脂总不皂化物,类脂结晶物,分子蒸馏类脂轻馏分和重馏分以及银杏叶类脂成分中提取分离得到的银杏叶聚戊烯醇同系物( $C_{70} \sim C_{120}$ )和 15 个单体化合物,依次为  $\beta$ -谷甾醇乙酯(HPLC, 98.11%),棕榈酸乙酯(GC, 99.37%),  $\beta$ -谷甾醇(HPLC, 99.08%),豆甾醇(HPLC, 94.81%),麦角甾醇(HPLC, 94.68%),棕榈酸酰胺(TLC, >95%),三棕榈酸甘油酯(GC, 98.40%),胡萝卜苷(TLC, >95%),正十一烷(GC, 96.05%), $\beta$ -石竹烯(GC, 98.63%),异植物醇(GC, 95.88%),橙花叔醇(GC, 96.62%),芳樟醇(GC, 95.21%),松油醇(GC, 97.05%) and  $\beta$ -胡萝卜素(HPLC, 96.20%)(银杏叶产地为江苏邳州,为 3~5 年生苗叶,2010 年 10 月初采收)。

1.3 仪器与试剂 华南理工大学 MDS-80 型刮膜式分子蒸馏装置;LDZX-50KBS 高压灭菌锅(上海申安医疗器械厂);SPX-250 生化培养箱(上海跃进医疗器械厂);SW-CJ-1G 净化工作台(苏州净化设备有限公司);硝酸咪康唑(Sigma SM351201, 1 g),硫酸庆大霉素(Sigma G3632, 100 mg);牛肉膏,鱼粉蛋白胨,卵磷脂,琼脂条均为 BR 级(国药集团化学试剂公司),其他试剂均为分析纯(南京化学试剂有限公司)。

## 2 方法

2.1 测试样品的制备<sup>[7]</sup> 取干燥粉碎银杏叶粉

20 kg,加 20 kg 石油醚(60~90)℃,65℃加热回流提取,时间 5 h,重复 3 次提取,合并提取液,50℃下减压回收尽溶剂,得石油醚软膏抽提物 950 g,加 8 L 5% NaOH-EtOH 溶液,采用 65℃热回流搅拌,搅拌速度为  $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,时间 100 min,石油醚软膏与皂化剂 1:5(g:mL),制备类脂成分(不皂化物)约 370 g;然后用丙酮 1 L 充分溶解,放于 -20℃下冷冻结晶 2 h,迅速抽滤,得到低温结晶物约 28 g;滤液回收溶剂后称约 340 g,分次加入 MDS-80 型刮膜式分子蒸馏装置,刮膜转速  $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,蒸馏温度 180℃,在高真空条件下(真空度  $1.0 \times 10^5$ ),轻馏分以气体状态径直飞向中间冷凝器并凝结成液体,进入轻馏分收集器,得到轻馏分 87 g;重馏分沿筒体内壁进入重馏分收集器,得到重馏分 228 g;将低温结晶物、轻馏分和重馏分利用不同的色谱分离以及重结晶方法分别得到银杏叶聚戊烯醇同系物( $C_{70} \sim C_{120}$ )和 15 个单体化合物。

**2.2 培养基制备** 取鱼粉蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,牛肉膏 3 g,琼脂 15~20 g,水 1 000 mL;调节 pH 7.0~7.2,121℃灭菌 20 min,制成蛋白胨牛肉膏培养基(细菌用);取  $\text{NaNO}_3$  2 g,KCl 0.5 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g, $\text{FeSO}_4$  0.01 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,蔗糖 30 g,琼脂 15~20 g,水 1 000 mL;121℃灭菌 20 min 制成查氏(Czapek)培养基(霉菌用)。

**2.3 菌落浓度的确定**<sup>[8]</sup> 将溶化的固体培养基倒入 20 mL 左右于培养皿中,置于净化操作台上,自流平冷却。取 7 支试管,依次稀释活化好的菌悬液,1 号试管为原液经生理盐水稀释 10 倍后的菌悬液,2 号试管为稀释 100 倍的菌悬液,依次稀释后,第 7 号试管为稀释  $10^7$  倍的菌悬液。移取  $100 \mu\text{L}$  1~7 号试管中的菌悬液涂布固体培养基,静置使其渗透于培养基中,后倒置培养皿,分别于生化培养箱中 37℃(细菌),28℃(霉菌)培养 24 h。根据菌落计算法则:菌落形成单位 CFU  $\times$  稀释倍数 = 菌落数,计数可数菌落平皿,推算每皿菌落数,选择菌落涂布浓度为  $10^5$  CFU/mL。

**2.4 测试样品的配制** 用正己烷分别将样品配制成  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  溶液,正己烷作空白对照,硝酸咪康唑( $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )和硫酸庆大霉素( $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )作为阳性对照;将经过灭菌的滤纸片浸于样品溶液中,半小时后测定其抑菌活性。

**2.5 滤纸片法测定供试样品的抑菌活性**<sup>[9]</sup> 用移液器移取  $100 \mu\text{L}$  菌悬液涂布于液体培养基,放置一段时间后待菌液渗透于培养基后,以浸有待测样品

的滤纸片(直径 6 mm)轻轻贴服于皿中,将其陷于固体培养基中,3 片滤纸片等距均匀,以两皿对照平行试验,37℃(细菌),28℃(霉菌)下倒置于生化培养箱中培养 24 h,测量各样品对沙门菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径。统计方法:SPSS 13.0 软件中 Tukey 检验( $P=0.05$ 水平)。

**2.6 最小抑菌浓度(MIC)、最小杀细菌浓度(MBC)和最小杀真菌浓度(MFC)值的确定**<sup>[10]</sup> 将样品用正己烷配制成质量浓度分别为 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液。将混合了不同浓度样品的培养基倒入平皿,至流平冷却凝固,将待测菌种涂布于平板上,放置一段时间待菌悬液渗入后,37℃(细菌),28℃(霉菌)下倒置于生化培养箱中培养 24 h。观察无菌生长的最低浓度平皿,记为此浓度为样品对于该菌种的 MIC 值;100% 无菌生长的最高浓度即为 MBC(细菌)或 MFC(霉菌)。

**2.7 FIC(分级抑菌浓度)指数的计算**<sup>[11]</sup> FIC 指数为抗菌药药效学参数之一,是 2 种抗菌药的联合药敏(2 种抗菌药同时使用时,可出现协同、拮抗、无关和耐药 4 种情况)指标。FIC 指数 = MIC 甲药联用/MIC 甲药单用 + MIC 乙药联用/MIC 乙药单用。当  $0 < \text{FIC 指数} \leq 0.5$  定义为协同作用, $0.5 < \text{FIC 指数} \leq 1$  定义为加和作用或部分协同作用, $1 < \text{FIC 指数} \leq 4$  定义为无关作用,FIC 指数  $> 4$  定义为拮抗作用<sup>[12-13]</sup>。设计方法:Design Expert 7.1.3 软件中 Mixture Design(D-optimal 模式,两组分,两因素)。

### 3 结果

**3.1 银杏叶类脂成分的抑菌作用** 本实验对银杏叶类脂总不皂化物,类脂结晶物,分子蒸馏类脂轻馏分和重馏分以及银杏叶类脂成分中提取分离得到的银杏叶聚戊烯醇同系物( $C_{70} \sim C_{120}$ )和 15 个单体化合物进行 5 种菌种(沙门菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌)的抑菌实验考察;通过对各样品组的抑菌圈大小(见表 1)以及 MIC, MBC 和 MFC 值(见表 2)比较,并利用 Tukey 检验的方差分析( $P=0.05$  水平)对各组数据差异显著性分析,结果显示:银杏叶类脂总不皂化物,分子蒸馏类脂轻馏分和重馏分,聚戊烯醇以及棕榈酸乙酯、 $\beta$ -石竹烯、异植物醇、橙花叔醇、芳樟醇、松油醇和  $\beta$ -胡萝卜素对 5 种菌种均有不同程度的抑制作用;其中橙花叔醇对 4 种细菌的抑菌活性均为最强,抑菌圈范围为 17.4~20.9 mm, MIC 和 MBC 值范围依次

为 3.9 ~ 15.6, 31.3 ~ 62.5 mg·L<sup>-1</sup>; 芳樟醇对黑曲霉菌的抑菌活性最强, 抑菌圈为 17.9 mm, MIC 和 MFC 值依次为 7.8 mg·L<sup>-1</sup>, 31.3 mg·L<sup>-1</sup>; 银杏叶聚戊烯醇对 5 种菌种均有抑制作用, 抑菌圈范围为 12.4 ~ 14.8 mm, MIC, MBC 和 MFC 值范围依次为 31.3 ~ 62.5, 125, 125 mg·L<sup>-1</sup>; 类脂结晶物以及 β-谷甾醇乙酯、β-谷甾醇、棕榈酸酰胺和胡萝卜苷对 4 种细菌(沙门菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌)也有不同程度的抑制作用, 但对黑曲霉菌无效; 豆甾醇和麦角甾醇对沙门菌、金黄色葡萄球

菌、大肠杆菌有抑制作用, 对黑曲霉菌和枯草芽孢杆菌无效; 而正十一烷对 5 种菌种均无抑制作用。银杏叶聚戊烯醇是一种重要的银杏叶类脂成分(S1, 含量 > 40%), 主要存在于类脂成分分子蒸馏的重馏分中(S4, 含量 > 80%)<sup>[14]</sup>, 从表 1 可以看出, 银杏叶类脂成分(S1)和重馏分(S4)对本实验的 5 种菌种抑菌圈值均大于银杏叶聚戊烯醇, 而聚戊烯醇具有良好的抑菌效果; 由此推断, 银杏叶聚戊烯醇可能与其他类脂成分具有协同抑菌作用。

表 1 银杏叶类脂成分与聚戊烯醇 500 mg·L<sup>-1</sup> 总浓度下不同样品抑菌圈值的比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

样品	抑菌圈值(mm) ± 标准误, n=3				
	沙门菌	金黄色葡萄球菌	黑曲霉菌	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌
S1	15.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	16.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	14.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	15.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	16.4 ± 0.1 <sup>a</sup>
S2	12.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	12.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.0	12.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	12.2 ± 0.1 <sup>b</sup>
S3	14.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	14.8 ± 0.1 <sup>c</sup>	12.9 ± 0.1 <sup>b</sup>	13.9 ± 0.1 <sup>c</sup>	12.9 ± 0.1 <sup>c</sup>
S4	16.0 ± 0.1 <sup>c</sup>	16.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	15.0 ± 0.1 <sup>c</sup>	16.0 ± 0.1 <sup>d</sup>	14.1 ± 0.1 <sup>d</sup>
GBP	13.5 ± 0.1 <sup>d</sup>	13.8 ± 0.1 <sup>d</sup>	13.4 ± 0.1 <sup>d</sup>	13.2 ± 0.1 <sup>e</sup>	12.4 ± 0.1 <sup>b</sup>
C1	10.9 ± 0.1 <sup>e</sup>	11.7 ± 0.1 <sup>e</sup>	0.0	10.1 ± 0.1 <sup>f</sup>	11.3 ± 0.1 <sup>e</sup>
C2	9.2 ± 0.1 <sup>f</sup>	9.5 ± 0.1 <sup>f</sup>	11.2 ± 0.1 <sup>e</sup>	10.2 ± 0.1 <sup>f</sup>	10.4 ± 0.1 <sup>f</sup>
C3	12.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	14.1 ± 0.1 <sup>g</sup>	0.0	12.8 ± 0.1 <sup>g</sup>	9.9 ± 0.1 <sup>g</sup>
C4	7.7 ± 0.1 <sup>g</sup>	9.2 ± 0.1 <sup>f</sup>	0.0	9.6 ± 0.1 <sup>h</sup>	0.0
C5	8.1 ± 0.1 <sup>g</sup>	10.0 ± 0.1 <sup>h</sup>	0.0	8.8 ± 0.1 <sup>i</sup>	0.0
C6	11.7 ± 0.1 <sup>h</sup>	13.2 ± 0.1 <sup>i</sup>	0.0	13.0 ± 0.1 <sup>e</sup>	11.1 ± 0.1 <sup>e</sup>
C7	0.0	0.0	0.0	0.0	9.5 ± 0.1 <sup>h</sup>
C8	11.1 ± 0.1 <sup>e</sup>	12.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.0	12.6 ± 0.1 <sup>g</sup>	10.4 ± 0.1 <sup>f</sup>
C9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C10	15.4 ± 0.1 <sup>i</sup>	14.1 ± 0.1 <sup>g</sup>	12.2 ± 0.1 <sup>f</sup>	14.5 ± 0.1 <sup>j</sup>	15.8 ± 0.1 <sup>i</sup>
C11	9.9 ± 0.1 <sup>j</sup>	13.4 ± 0.1 <sup>i</sup>	10.3 ± 0.1 <sup>g</sup>	10.1 ± 0.1 <sup>f</sup>	12.9 ± 0.1 <sup>e</sup>
C12	17.4 ± 0.1 <sup>k</sup>	20.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	16.2 ± 0.1 <sup>h</sup>	18.1 ± 0.1 <sup>k</sup>	20.9 ± 0.1 <sup>j</sup>
C13	16.1 ± 0.1 <sup>e</sup>	14.9 ± 0.1 <sup>e</sup>	17.9 ± 0.1 <sup>i</sup>	17.9 ± 0.1 <sup>k</sup>	16.8 ± 0.1 <sup>k</sup>
C14	16.6 ± 0.1 <sup>l</sup>	17.3 ± 0.1 <sup>j</sup>	15.8 ± 0.1 <sup>j</sup>	16.2 ± 0.1 <sup>d</sup>	17.9 ± 0.1 <sup>l</sup>
C15	14.0 ± 0.1 <sup>m</sup>	13.8 ± 0.1 <sup>d</sup>	12.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	15.1 ± 0.1 <sup>l</sup>	13.9 ± 0.1 <sup>d</sup>
MN	0.0	20.4 ± 0.1	20.9 ± 0.4	0.0	19.8 ± 0.4
GS	20.2 ± 0.3	20.1 ± 0.5	0.0	21.1 ± 0.3	20.5 ± 0.3

注: S1: 银杏叶类脂; S2: 结晶物; S3: 轻馏分; S4: 重馏分; C1 ~ C15: 化合物 1 ~ 15; GBP: 银杏叶聚戊烯醇; MN: 硝酸咪康唑(阳性对照 1); GS: 硫酸庆大霉素(阳性对照 2)。在同一竖栏中相同小写字母表示没有统计学差异(Tukey 检验, P > 0.05)。

表 2 银杏叶类脂成分与聚戊烯醇样品的 MIC, MBC 和 MFC

样品	沙门菌		金黄色葡萄球菌		黑曲霉菌		大肠杆菌		枯草芽孢杆菌	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
S1	15.6	62.5	15.6	62.5	31.3	125	15.6	62.5	15.6	62.5
S2	62.5	125	62.5	125	-	-	62.5	125	62.5	125
S3	31.3	125	31.3	125	31.3	125	62.5	125	62.5	250
S4	31.3	62.5	15.6	62.5	31.3	62.5	31.3	125	31.3	125
GBP	31.3	125	31.3	125	31.3	125	31.3	125	62.5	125

续表 2

样品	沙门菌		金黄色葡萄球菌		黑曲霉菌		大肠杆菌		枯草芽孢杆菌	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
C1	62.5	250	62.5	250	-	-	62.5	250	62.5	250
C2	62.5	250	62.5	250	62.5	125	62.5	250	62.5	250
C3	31.3	125	31.3	125	-	-	62.5	125	62.5	250
C4	125	>250	125	>250	-	-	62.5	250	-	-
C5	125	>250	62.5	>250	-	-	62.5	250	-	-
C6	62.5	125	62.5	125	-	-	62.5	125	62.5	250
C7	-	-	-	-	-	-	-	-	62.5	250
C8	62.5	250	62.5	125	-	-	62.5	250	62.5	250
C9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10	15.6	62.5	15.6	125	31.3	125	15.6	62.5	15.6	62.5
C11	31.3	125	31.3	62.5	31.3	125	31.3	125	31.3	62.5
C12	15.6	62.5	3.9	31.3	15.6	62.5	7.8	62.5	3.9	31.3
C13	15.6	62.5	31.3	62.5	7.8	31.3	7.8	31.3	7.8	62.5
C14	15.6	62.5	7.8	31.3	31.3	62.5	31.3	62.5*	7.8	31.3
C15	31.3	125	31.3	125	31.3	125	31.3	62.5	31.3	62.5

注:S1:银杏叶类脂;S2:结晶物;S3:轻馏分;S4:重馏分;C1~C15:化合物1~15;GBP:银杏叶聚戊烯醇。

**3.2 银杏叶类脂成分与聚戊烯醇的协同抑菌作用** 银杏叶类脂成分与聚戊烯醇的协同抑菌作用是通过对各混合样品组(化合物1~15分别用正己烷溶解后与银杏叶聚戊烯醇以质量比1:1等量混合)的抑菌圈实际测定值与理论加和值差异显著性分析(见表3)以及FIC指数的大小(见表5)分析。而FIC指数是由混合样品组的MIC值(见表4)与其各自单一样品组的MIC(见表2)按2.7方法计算得到,结果显示:异植物醇与银杏叶聚戊烯醇混合样品组对上述5种被测菌种均有不同程度的协同抑制作用,抑菌圈实际测定值范围为14.1~17.1 mm, MIC范围为7.8~15.6 mg·L<sup>-1</sup>, FIC指数范围为0.25~0.5;β-谷甾醇和β-石竹烯与银杏叶聚戊烯醇混合样品组对上述5种被测菌种有不同程度的协同或部分协同抑制作用(加和作用),β-谷甾醇与银杏叶聚戊烯醇混合样品组抑菌圈实际测定值范围为10.4~16.3 mm, MIC为15.6~31.3 mg·L<sup>-1</sup>, FIC指数为0.5~0.75;β-石竹烯与银杏叶聚戊烯醇混合样品组抑菌圈实际测定值为14.3~19.9 mm, MIC为3.9~15.6 mg·L<sup>-1</sup>, FIC指数为0.16~0.75;其中,β-石竹烯与银杏叶聚戊烯醇混合样品组对枯草芽孢杆菌的协同抑制作用较其他组强,抑菌圈实际测定值(19.9 mm)与其理论加和值(14.1 mm)有显著性差异( $P < 0.001$ ), MIC值为3.9 mg·L<sup>-1</sup>, FIC指数达

到了0.16;异植物醇与银杏叶聚戊烯醇混合样品组对沙门菌的协同抑制作用较其他组最强,抑菌圈实际测定值(16.3 mm)与其理论加和值(11.7 mm)有显著性差异( $P < 0.001$ ), MIC为7.8 mg·L<sup>-1</sup>, FIC指数为0.25;而正十一烷与银杏叶聚戊烯醇混合样品组对上述5种被测菌种均无协同作用(无关作用)。

**3.3 银杏叶聚戊烯醇与β-石竹烯抗枯草芽孢杆菌最优比例的考察** 银杏叶聚戊烯醇与β-石竹烯抗枯草芽孢杆菌最优比例的确定是利用Design Expert 7.1.3软件中Mixture Design(D-optimal模式,两组分,两因素)进行实验设计(见表6),所得响应值1和2的数据根据三次曲线方程模式作曲线(见图1,2),从而软件计算出(接近响应值1最低点和接近响应值2最高点)此时两组分的最优浓度比例。三次曲线方程分别为 $R_1 = 1.09921 \times A + 1.26471 \times B - 3.87814 \times A \times B + 1.73909 \times A \times B \times (A - B)$ ,其中 $R_1 = FIC$ 指数, $A = \beta$ -石竹烯, $B = GBP$ , $F = 238.14$ , $P < 0.0001$ ; $R_2 = 15.58246 \times A + 10.56445 \times B + 27.04452 \times A \times B - 15.31961 \times A \times B \times (A - B)$ ,其中 $R_2 =$ 抑菌圈值, $A = \beta$ -石竹烯, $B = GBP$ , $F = 2165.99$ , $P < 0.0001$ 。按此拟合曲线的结果显示:当β-石竹烯与银杏叶聚戊烯醇质量比为43.42%:56.58%时,其抗枯草芽孢杆菌协同作用最

佳,此时 FIC 指数为 0.183 9, 抑菌圈值为 19.88 mm;在此比例下所测得的实际值为 FIC 指数 0.16, 抑菌圈值 19.8 mm;拟合值和实际测量值相对标准

偏差分别为 6.95% (FIC 指数)和 0.21% (抑菌圈值),说明用该拟合方法确定银杏叶聚戊烯醇与  $\beta$ -石竹烯抗枯草芽孢杆菌最优比例是可靠的。

表 3 银杏叶类酯成分与聚戊烯醇在 500 mg·L<sup>-1</sup>总浓度下质量比为 1:1 混合样品抑菌圈的实际测定值与理论加和值( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

样品	实测抑菌圈(理论加和值)/mm									
	沙门菌		金黄色葡萄球菌		黑曲霉菌		大肠杆菌		枯草芽孢杆菌	
C1: GBP (1:1)	12.4 ± 0.1	(12.2)	13.1 ± 0.1	(12.8)	7.1 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(6.7)	11.7 ± 0.1	(11.6)	12.3 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(11.8)
C2: GBP (1:1)	11.2 ± 0.1	(11.4)	11.8 ± 0.1	(11.6)	11.3 ± 0.1	(12.3)	10.3 ± 0.1	(11.7)	12.2 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(11.4)
C3: GBP (1:1)	14.8 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(12.8)	16.3 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(13.0)	10.4 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(6.7)	14.5 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(13.0)	15.0 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(11.2)
C4: GBP(1:1)	10.2 ± 0.1	(10.6)	10.2 ± 0.1	(11.5)	6.7 ± 0.1	(6.7)	9.9 ± 0.1	(11.4)	7.8 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(6.2)
C5: GBP(1:1)	10.1 ± 0.1	(10.8)	10.2 ± 0.1	(11.9)	6.6 ± 0.1	(6.7)	10.0 ± 0.1	(11.0)	8.1 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(6.2)
C6: GBP(1:1)	12.5 ± 0.1	(12.6)	13.2 ± 0.1	(13.5)	7.3 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(6.7)	12.8 ± 0.1	(13.1)	13.1 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(11.8)
C7: GBP(1:1)	6.8 ± 0.1	(6.8)	7.0 ± 0.1	(6.9)	6.5 ± 0.1	(6.7)	8.0 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(6.6)	8.9 ± 0.1	(11.0)
C8: GBP(1:1)	10.0 ± 0.1	(12.3)	11.1 ± 0.1	(13.2)	6.8 ± 0.1	(6.7)	10.7 ± 0.1	(12.9)	10.5 ± 0.1	(11.4)
C9: GBP(1:1)	6.8 ± 0.1	(6.8)	7.1 ± 0.1	(6.9)	6.5 ± 0.1	(6.7)	6.6 ± 0.1	(6.6)	6.3 ± 0.1	(6.2)
C10: GBP(1:1)	15.7 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(14.4)	15.9 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(14.0)	14.3 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(12.8)	15.9 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(13.8)	19.9 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(14.1)
C11: GBP(1:1)	16.3 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(11.7)	17.1 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(13.6)	14.1 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(11.8)	14.6 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(11.6)	16.0 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(12.6)
C12: GBP(1:1)	16.2 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(15.4)	18.3 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(17.0)	15.3 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(14.8)	17.4 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(15.6)	16.9 ± 0.1	(16.6)
C13: GBP(1:1)	15.1 ± 0.1	(14.8)	15.2 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(14.4)	15.0 ± 0.1	(15.6)	15.8 ± 0.1	(15.6)	14.3 ± 0.1	(14.6)
C14: GBP(1:1)	16.0 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(15.0)	15.5 ± 0.1	(15.6)	14.8 ± 0.1	(14.6)	14.6 ± 0.1	(14.7)	14.8 ± 0.1	(15.2)
C15: GBP(1:1)	13.9 ± 0.1	(13.8)	14.0 ± 0.1	(13.8)	13.2 ± 0.1	(13.0)	15.7 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(14.2)	13.8 ± 0.1 <sup>1)</sup>	(13.2)

注:C1~C15. 化合物 1~15;GBP. 银杏叶聚戊烯醇;化合物 1~15 分别与聚戊烯醇按质量比 1:1 理论加和平均值;大于且与对应理论加和值相比有统计学差异,Tukey 检验<sup>1)</sup>P < 0.05。

表 4 银杏叶类酯成分与聚戊烯醇质量比为 1:1 混合样品的 MIC

样品	MIC/mg·L <sup>-1</sup>				
	沙门菌	金黄色葡萄球菌	黑曲霉菌	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌
C1: GBP(1:1)	31.3	31.3	62.5	31.3	31.3
C2: GBP(1:1)	62.5	31.3	62.5	62.5	31.3
C3: GBP(1:1)	15.6	15.6	31.3	31.3	31.3
C4: GBP(1:1)	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
C5: GBP(1:1)	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
C6: GBP(1:1)	62.5	62.5	62.5	62.5	31.3
C7: GBP(1:1)	62.5	62.5	62.5	31.3	62.5
C8: GBP(1:1)	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
C9: GBP(1:1)	125	125	125	125	250
C10: GBP(1:1)	15.6	15.6	15.6	15.6	3.9
C11: GBP(1:1)	7.8	15.6	15.6	15.6	15.6
C12: GBP(1:1)	15.6	3.9	15.6	7.8	7.8
C13: GBP(1:1)	15.6	31.3	15.6	15.6	31.3
C14: GBP(1:1)	15.6	15.6	31.3	31.3	31.3
C15: GBP(1:1)	31.3	31.3	31.3	15.6	31.3

注:C1~C15. 化合物 1~15;GBP. 银杏叶聚戊烯醇;MIC 值为混合样品的总浓度。

表 5 FIC 指数确定联合用药效应

样品	FIC 指数				
	沙门菌	金黄色葡萄球菌	黑曲霉菌	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌
C1: GBP(1:1)	0.75 <sup>2)</sup>	0.75 <sup>2)</sup>	1 <sup>2)</sup>	0.75 <sup>2)</sup>	0.5 <sup>1)</sup>
C2: GBP(1:1)	1.5 <sup>2)</sup>	0.75 <sup>2)</sup>	1.5 <sup>3)</sup>	1.5 <sup>3)</sup>	0.5 <sup>1)</sup>
C3: GBP(1:1)	0.5 <sup>1)</sup>	0.5 <sup>1)</sup>	0.5 <sup>1)</sup>	0.75 <sup>2)</sup>	0.5 <sup>1)</sup>
C4: GBP(1:1)	1.25 <sup>3)</sup>	1.25 <sup>3)</sup>	1 <sup>2)</sup>	1.5 <sup>3)</sup>	0.5 <sup>1)</sup>
C5: GBP(1:1)	1.25 <sup>3)</sup>	1.5 <sup>3)</sup>	1 <sup>2)</sup>	1.5 <sup>3)</sup>	0.5 <sup>1)</sup>
C6: GBP(1:1)	1.5 <sup>3)</sup>	1.5 <sup>3)</sup>	1 <sup>2)</sup>	1.5 <sup>3)</sup>	0.5 <sup>1)</sup>
C7: GBP(1:1)	1 <sup>2)</sup>	1 <sup>2)</sup>	1 <sup>2)</sup>	0.5 <sup>1)</sup>	1 <sup>2)</sup>
C8: GBP(1:1)	1.5 <sup>3)</sup>	1.5 <sup>3)</sup>	1 <sup>2)</sup>	1.5 <sup>3)</sup>	1 <sup>2)</sup>
C9: GBP(1:1)	2 <sup>3)</sup>	2 <sup>3)</sup>	2 <sup>3)</sup>	2 <sup>3)</sup>	2 <sup>3)</sup>
C10: GBP(1:1)	0.75 <sup>2)</sup>	0.75 <sup>2)</sup>	0.5 <sup>1)</sup>	0.75 <sup>2)</sup>	0.16 <sup>1)</sup>
C11: GBP(1:1)	0.25 <sup>1)</sup>	0.5 <sup>1)</sup>	0.5 <sup>1)</sup>	0.5 <sup>1)</sup>	0.37 <sup>1)</sup>
C12: GBP(1:1)	0.75 <sup>2)</sup>	0.56 <sup>2)</sup>	0.75 <sup>2)</sup>	0.62 <sup>2)</sup>	1.06 <sup>3)</sup>
C13: GBP(1:1)	0.75 <sup>2)</sup>	1 <sup>2)</sup>	1.25 <sup>3)</sup>	1.25 <sup>3)</sup>	2.25 <sup>3)</sup>
C14: GBP(1:1)	0.75 <sup>2)</sup>	1.25 <sup>2)</sup>	1 <sup>2)</sup>	1 <sup>2)</sup>	2.25 <sup>3)</sup>
C15: GBP(1:1)	1 <sup>2)</sup>	1 <sup>2)</sup>	1 <sup>2)</sup>	0.5 <sup>1)</sup>	0.75 <sup>2)</sup>

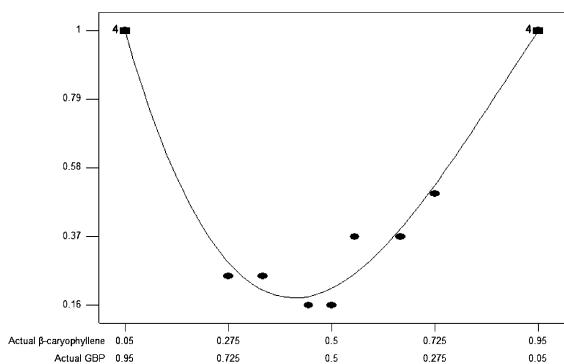
注:C1~C15. 化合物 1~15;GBP. 银杏叶聚戊烯醇;<sup>1)</sup>协同作用(0 < FIC 指数 ≤ 0.5);<sup>2)</sup>加和作用(0.5 < FIC 指数 ≤ 1)和<sup>3)</sup>无关作用(1 < FIC 指数 ≤ 4)。

表 6 银杏叶聚戊烯醇与  $\beta$ -石竹烯抗枯草

芽孢杆菌最优比例的实验设计\*

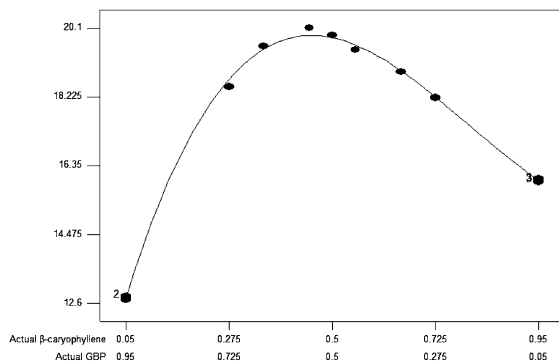
标准 <sup>△</sup>	运行	组分 A		响应值 1	响应值 2
		$\beta$ -石竹烯 /%	组分 B GBP/% <sup>▲</sup>		
10	1	5.00	95.00	1	12.8
5	2	95.00	5.00	1	16
7	3	72.50	27.50	0.5	18.2
9	4	95.00	5.00	1	16
12	5	50.00	50.00	0.16	19.9
6	6	27.50	72.50	0.25	18.5
8	7	35.00	65.00	0.25	19.6
2	8	55.00	45.00	0.37	19.5
1	9	5.00	95.00	1	12.8
3	10	65.00	35.00	0.37	18.9
11	11	95.00	5.00	1	15.9
13	12	45.00	55.00	0.16	20.1
4	13	5.00	95.00	1	12.7

注: \* 使用 Design Expert 7.1.3 软件中 Mixture Design (D-optimal 模式, 两组分, 两因素) 进行实验设计, 并在总质量浓度为 500 mg·L<sup>-1</sup> 下测定响应值 1 和 2。<sup>△</sup> 随机产生。<sup>▲</sup> 限度: 5% ~ 95%。

图 1 不同比例银杏叶聚戊烯醇与  $\beta$ -石竹烯抗枯草芽孢杆菌 FIC 指数的曲线拟合图

#### 4 讨论

橙花叔醇在银杏叶类脂轻馏分中 GC 含量约为 0.21%<sup>[7]</sup>, 相比本实验其他化合物, 其对本实验的 4 种细菌的抑菌活性均为最强; 有文献显示, 橙花叔醇对脓癣病原体须癣毛癣菌具有一定抑制作用, 这种作用可能是由于不可逆的菌体细胞破坏而导致<sup>[15]</sup>。橙花叔醇还能增强抗生素如环丙沙星, 克林霉素, 红霉素, 四环素, 庆大霉素, 万古霉素对金黄色葡萄球菌的敏感性, 也能增强多黏菌素 B 对大肠杆菌的敏感性<sup>[16]</sup>。本实验中, 橙花叔醇与银杏叶聚戊烯醇混合样品组对 5 种被测菌种的 FIC 值区间为 0.56 ~

图 2 同比例银杏叶聚戊烯醇与  $\beta$ -石竹烯抗枯草芽孢杆菌抑菌圈值的曲线拟合图

1.06, 表现出了一定的协同抑菌能力。芳樟醇在银杏叶类脂轻馏分中 GC 含量约为 0.06%<sup>[7]</sup>, 相比本实验其他化合物, 其对黑曲霉菌的抑菌活性最强; 有报道, 芳樟醇含量为 58.2% 的芫荽挥发油对犬小孢子菌和假丝酵母 (真菌) 具有良好的抑制性, 且表现出对小鼠的低毒性<sup>[17]</sup>。 $\beta$ -石竹烯在银杏叶类脂轻馏分中 GC 含量达到 2.28%<sup>[7]</sup>, 本实验显示,  $\beta$ -石竹烯与银杏叶聚戊烯醇混合样品组对枯草芽孢杆菌的协同抑制作用最强, FIC 指数达到 0.16;  $\beta$ -石竹烯对革兰阳性菌有广谱的抑制作用<sup>[18]</sup>, 对革兰阴性菌抑制作用文献报道有一定的争议, 特别是对大肠杆菌的 MIC (0.625 ~ 12.8 g·L<sup>-1</sup>) 报道有明显的不同<sup>[19-21]</sup>。本实验的结果显示,  $\beta$ -石竹烯对大肠杆菌的 MIC 为 0.156 g·L<sup>-1</sup>, 与各文献有一定差别, 可能与被测样品的纯度有关; 本实验中  $\beta$ -石竹烯是经纯化后样品, GC 测得纯度达 98.63%, 其他文献中的  $\beta$ -石竹烯样品均为混合物。

本研究利用滤纸片法测定样品抑菌圈值, 以及确定 MIC, MBC, MFC 值和 FIC 值等方法指标来考察银杏叶聚戊烯醇同系物以及其他 15 种类脂成分单体化合物对 5 种不同菌种的抑菌作用。结果显示: 橙花叔醇对 4 种细菌 (沙门菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌) 的抑菌活性均为最强, 芳樟醇对黑曲霉菌的抑菌活性最强,  $\beta$ -石竹烯与银杏叶聚戊烯醇混合样品组对枯草芽孢杆菌的协同抑制作用最强; 当  $\beta$ -石竹烯与银杏叶聚戊烯醇质量比为 43.42% : 56.58% 时, 其抗枯草芽孢杆菌协同作用最佳, 此时测得实际值 FIC 指数为 0.16, 抑菌圈值为 19.8 mm。由此可见, 银杏叶类脂成分具有一定抑菌作用, 部分类脂成分与聚戊烯醇混合具有协同抑菌效应。

#### [参考文献]

[1] 李春斌, 孙磊, 李黎, 等. 银杏叶聚戊烯醇分离分析方

- 法的研究进展 [J]. 大连民族学院学报, 2007, (1):41.
- [ 2 ] 孙磊,李春斌,范圣第. 银杏叶聚戊烯醇类化合物的制备与分析[J]. 时珍国医国药,2006,17(12):2528.
- [ 3 ] Ran Tao, Chengzhang Wang, Zhenwu Kong. Antibacterial/antifungal activity and synergistic interactions between polyprenols and other lipids Isolated from *Ginkgo biloba* L. leaves[J]. Molecules, 2013, 18(2):2166.
- [ 4 ] 王成章,沈兆邦,谭卫红,等. 银杏叶聚戊烯醇的化学、纯化和药效研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2001,13(2):43.
- [ 5 ] Bombardelli E, Cristoni A, Morazzoni P. Cosmetical uses of *Ginkgo extracts* and constituents[M]. In *Ginkgo biloba*, 2nd ed.; van Beek, T A, Ed.; Harwood Academic Publishers:City, Singapore, 2000:475.
- [ 6 ] Choi J G, Jeong S I, Ku C S, et al. Antibacterial activity of hydroxyalkenyl salicylic acids from sarcotesta of *Ginkgo biloba* against vancomycin-resistant *Enterococcus*[J]. Fitoterapia, 2009, 80(1):18.
- [ 7 ] 陶冉,王成章,孔振武. 银杏叶脂溶性不皂化物轻馏分 Py-GC-MS 分析 [J]. 林产化学与工业,2012,32(3):66.
- [ 8 ] Orth D S. Linear regression method for rapid determination of adequacy of cosmetic preservative efficacy[J]. J Soc Cosmet Chem, 1979, 30(6):321.
- [ 9 ] Bauer, A W, Kirby, W M, Sherris, J C, et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method[J]. A J Clini Pathol, 1966, 45(4):493.
- [10] Sati S C, Joshi S. Antibacterial activities of *Ginkgo biloba* L. leaf extracts [J]. Sci World, 2011(11):2237.
- [11] Hall M J, Middleton R F, Westmacott D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy [J]. J Antimicrob Chemother, 1983, 11(5):427.
- [12] Bassolé, I H N, Lamien-meda A, Bayala, B, et al. Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination [J]. Molecules, 2010, 15(11):7825.
- [13] Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components[J]. Food Microbiol, 2009, 26(2):142.
- [14] 王成章,王婉苓,叶建中,等. 分子短程蒸馏分离银杏叶聚戊烯醇的研究 [J]. 林产化学与工业,2008,28(3):23.
- [15] Park M J, Gwak K S, Yang I, et al. Effect of citral, eugenol, nerolidol and  $\alpha$ -terpineol on the ultrastructural changes of trichophyton mentagrophytes [J]. Fitoterapia, 2009, 80(5):290.
- [16] Brehm-Stecher B F, Johnson E A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, *Farnesol*, *Bisabolol*, and apritone[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(10):3357.
- [17] Bruna V Soares, Selene M Morais, Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle, et al. Antifungal activity, toxicity and chemical composition of the essential oil of *Coriandrum sativum* L. fruits[J]. Molecules, 2012, 17(7):8439.
- [18] Liang Xiong, Cheng Peng, Qin-Mei Zhou, et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from different parts of *leonurus japonicus* Houtt. [J]. Molecules, 2013, 18(1):963.
- [19] Rasoarivelo S T R, Grougnet R, Vérité, P, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Anthospermum emirnense* and *Anthospermum perrieri* (Rubiaceae) [J]. Chemistry & Biodiversity, 2011, 8(1):145.
- [20] Skaltsa H D, Demetzos, C, Lazari, D, et al. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece [J]. Phytochemistry, 2003, 64(3):743.
- [21] Cha J D, Jeong M R, Choi H J, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia lavandulaefolia*[J]. Planta Medica, 2005, 71(6):575.

[责任编辑 聂淑琴]