

脱油油樟叶提取物的体外抑菌活性研究

张超¹, 魏琴¹, 杜永华^{1*}, 周黎军¹, 蒋勤久², 殷中琼³

(1. 宜宾学院 生命科学与食品工程学院 发酵资源与应用四川省高校重点实验室, 四川 宜宾 644000; 2. 宜宾县生产力促进中心, 四川 宜宾 644000; 3. 四川农业大学 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 雅安 625014)

摘要: 探讨了油樟叶提取挥发油后的残渣的乙醇浸膏和乙醇浸膏的石油醚萃取相、乙酸乙酯萃取相、正丁醇萃取相和水萃取相对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌等三种常见致病菌的最低抑菌浓度(MIC)、最低杀菌浓度(MBC)以及抑菌曲线。结果显示,各提取物对大肠杆菌的抑菌活性为正丁醇萃取相(MIC、MBC: 7.813、15.625 mg/mL) > 乙酸乙酯萃取相(MIC、MBC: 15.625、31.125) > 乙醇浸膏和水萃取相(MIC、MBC: 31.25、62.5) > 石油醚萃取相(MIC和MBC都高于500);对金黄色葡萄球菌的抑菌活性为石油醚萃取相和乙酸乙酯萃取相(MIC、MBC: 7.813、15.625) > 正丁醇萃取相(MIC、MBC: 15.625、31.125) > 乙醇浸膏和水萃取相(MIC、MBC: 31.25、62.5);对沙门氏菌的抑菌活性为乙酸乙酯萃取相(MIC、MBC: 3.9063、7.813) > 正丁醇萃取相(MIC、MBC: 15.625、31.125) > 乙醇浸膏和水萃取相(MIC、MBC: 31.25、62.5) > 石油醚萃取相(MIC、MBC: 31.25、125)。由此可见,油樟叶提取物中存在抗菌活性物,其活性成分主要集中在乙酸乙酯萃取相和正丁醇萃取相。曲线结果表明,脱油后的油樟叶提取物对三种细菌的作用均属于浓度依赖型。

关键词: 油樟叶; 提取物; 抑菌活性

中图分类号: S644.6, Q935 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2011)05-0690-05

The antibacterial study on extracts from de-oiled leaves of *Cinnamomum longepaniculatum* against three of the pathogenic bacteria

ZHANG Chao¹, WEI Qin¹, DU Yong-Hua^{1*}, ZHOU Li-Jun¹,
JIANG Qin-Jiu², YIN Zhong-Qiong³

(1. College of Life Science and Food Engineering Key Lab of Fermentation Resource and Application of Institutes of Higher Learning in Sichuan, Yibin 644000, China; 2. Yibin County Productivity Promotion Center, Yibin 644000, China; 3. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: The antimicrobial activity of ethanol extracts from the de-oiled leaves of *Cinnamomum longepaniculatum* and system solvent extraction by petroleum, ethyl acetate and N-butanol against the *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*. Minimum inhibition concentration(MIC), minimal bacteriocidal concentration(MBC) and time-kill curves of extracts were studied. And the activities against the three strains of bacterial were compared. The results showed that, for *E. coli*, the N-butanol extracts(MIC, MBC: 7.813, 15.625 mg/mL) > ethyl acetate extracts(MIC, MBC: 15.625, 31.125) > the ethanol extracts and water extracts(MIC, MBC: 31.25, 62.5) > petroleum extracts(MIC and MBC > 500). For *S. aureus*, petroleum extracts and ethyl acetate extracts(MIC, MBC: 7.813,

收稿日期: 2010-12-06 修回日期: 2011-03-17

基金项目: 四川省科技支撑项目(2009FZ0090); 宜宾市科技项目(200903019) [Supported by the Science and Technology Project of Sichuan Province (2009FZ0090); the Science and Technology Project of Yibin City (200903019)]

作者简介: 张超(1966-), 男, 重庆开县人, 副教授, 主要从事生物工程与食品生物技术领域研究, (E-mail)chzh1966@126.com.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: yonghuad@163.com)

15. 625) > N-butanol extracts (MIC, MBC: 15. 625, 31. 125) > ethanol extracts and water extracts (MIC, MBC: 31. 25, 62. 5). For *Salmonella*, ethyl acetate extracts (MIC, MBC: 3. 9063, 7. 813) > N-butanol extracts (MIC, MBC: 15. 625, 31. 125) > water extracts (MIC, MBC: 31. 25, 62. 5) > petroleum extracts (MIC, MBC: 31. 25, 125). *C. longepaniculatum* had some antibacterial active compounds and the main active constituents existed in ethyl acetate extracts and N-butanol extracts. The extracts of de-oiled leaves of *C. longepaniculatum* displayed concentration-dependent relationship with all the three pathogenic bacteria.

Key words: *Cinnamomum longepaniculatum* leaves; extracts; antibacterial activity

油樟 (*Cinnamomum longepaniculatum*) 是樟科 (Lauraceae) 樟属 (*Cinnamomum*) 植物, 为中国特有树种, 已被列为国家 II 级重点保护野生植物。油樟主产四川省宜宾市。据调查, 宜宾的油樟资源占全国的 70%, 而目前对四川宜宾油樟的开发与利用主要以油樟挥发油粗产品为主, 对叶产品的深加工及其它有用产物的开发较少; 在提取油樟叶挥发油时, 将油樟叶通过水蒸气蒸馏获得叶挥发油后, 剩下大量的残渣副产物。每年有近 100 000 t 的干废叶残渣被抛弃, 不仅浪费资源, 还污染环境, 这些问题导致了油樟有价值的产品少、附加值低等不良后果, 也增加了企业处理废料的成本, 严重限制了油樟的综合利用与开发。

油樟叶挥发油据报道具有抗菌活性 (魏琴等, 2006, 2009), 提取过挥发油的油樟叶残渣可用于食用菌的种植, 但出菇周期延长, 目前没能在生产上得到应用 (周洪昌等, 1991)。叶残渣是否具有抗菌活性, 国内外未见报道。大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌 (*Salmonella*) 是三种空气中常见致病菌, 为了充分利用与合理开发油樟资源, 寻找油樟产品的新价值, 促进油樟产业的可持续发展, 本课题拟以提取过挥发油的油樟叶为研究对象, 研究油樟叶残渣提取物的抗菌活性, 以期为综合利用油樟资源奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌种与培养基

金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923)、埃希氏大肠杆菌 (CMCC (B) 44102)、沙门氏菌 (ATCC 50041) 的菌种均由四川农业大学食品科学学院微生物实验室提供; MH 肉汤培养基、营养琼脂培养基、麦康凯培养基、Baird. Parker 琼脂基础培养基、SS 琼脂培养基, 均购自北京奥博星生物技术有限公司。

1.2 油樟叶提取物药液的制备

将提过挥发油的油樟叶残渣在 45 °C 的烘箱中

烘干或者自然条件下风干, 再粉碎过 20 目筛。加入 10 倍量的 95% 乙醇, 在 85 °C 下索氏提取 8~10 h, 将提取液趁热过滤后旋转蒸发并挥发干溶剂得 95% 乙醇浸膏。称取适量的 95% 乙醇浸膏, 用水分散均匀, 用等体积的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇依次进行萃取分离。将各萃取层真空旋转浓缩至干, 得石油醚萃取相、乙酸乙酯萃取相、正丁醇萃取相和水萃取相。95% 乙醇浸膏和各组萃取相用二甲基亚砜-水溶解配成母液, 临用前用 MH 肉汤稀释。

1.3 菌悬液的制备

将大肠杆菌接种到麦康凯培养基的平板上; 沙门氏菌接种到 SS 琼脂培养基; 金黄色葡萄球菌接种到 Baird. Parker 琼脂基础培养基上进行纯化, 恒温 37 °C 培养 18~24 h, 用接种环分别挑取单个特征菌落分别接种于 5 mL 灭菌 MH 肉汤培养基中, 置 37 °C 恒温箱中培养 18~24 h。培养后取 0.5 mL 已制备好的菌悬液加入到 4.5 mL 的 MH 培养基 (或灭菌生理盐水) 中依次进行 10 倍比稀释, 选取适当的浓度涂板, 每个浓度 3 个平行, 选取菌落数在 30~300 之间进行计数, 用 MH 肉汤 (或灭菌生理盐水) 稀释菌悬液浓度至含菌体 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL 后备用。

1.4 最低抑菌浓度的测定

参考戴自英 (1985) 的描述采用试管二倍稀释法, 以含不同浓度油樟叶提取物的含菌 MH 肉汤为试验组, 同时设 3 个对照组, 即以含菌液的 MH 肉汤为菌液对照、不含菌液的 MH 肉汤为 MH 肉汤培养基对照、加有二甲亚砜的含菌 MH 肉汤为二甲亚砜溶剂对照。37 °C 温箱中培育 18~24 h 后, 观察结果。当菌液对照和二甲亚砜溶剂对照混浊, 而 MH 肉汤培养基澄清时, 以无细菌生长的油樟叶提取物浓度为最小抑菌浓度 (MIC), 各油樟叶提取物设置 10 个浓度梯度, 其最高浓度为 250 mg/mL, 每个浓度梯度做 3 个重复。

1.5 最低杀菌浓度的测定

观察药物 MIC 以上未见细菌生长的各管培养

物,分别取 0.1 mL 移种至不含药的营养琼脂平皿上,轻轻推开药液,置 37℃ 培养过夜,观察有无细菌生长。按一般规定,平皿培养基中,计数少于 5 个菌落者作为该药的最低杀菌浓度(MBC)。

1.6 抑菌曲线的测定

参考 Zhang 等(2010)的方法,选取最佳抑菌提取物,分别做其在 0.5MIC、1MIC、2MIC 浓度下对三种细菌的抑菌曲线,以时间为横坐标,以细菌数目

的对数为纵坐标作图,得抑菌曲线。取对数生长期的细菌接种到 Muller Hinton 培养基中,使该液体培养基中含菌量为 10^5 cfu/mL,加入 3 种细菌的各自最佳抑菌提取物,使其终浓度为 0.5MIC、1MIC、2MIC,分别于 0、1、2、4、8、12、24、36 h 取出菌液 100 μ L 按 10 倍顺序稀释,选取适当浓度的菌液 100 μ L 接种于琼脂平板上,轻轻推开菌液,置 37℃ 培养 18 h,挑选平板上生长 30~300 个的菌落计数。求两个

表 1 油樟叶提取物对三株细菌的 MIC 值 (mg/mL)

Table 1 The MICs of 3 strains bacteria of extracts from *C. longepaniculatum*

菌种 Bacteria	乙醇浸膏 Ethanol extracts		石油醚萃取相 Petroleum extracts		乙酸乙酯萃取相 Ethyl acetate extracts		正丁醇萃取相 N-butanol extracts		水萃取相 Water extracts	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	31.25	62.5	>500	>500	15.625	31.125	7.813	15.625	31.25	62.5
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	31.25	62.5	7.813	15.625	7.813	15.625	15.625	31.25	31.25	62.5
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	31.25	62.5	31.25	125	3.9063	7.813	15.625	31.25	31.25	62.5

平板平均菌数,根据稀释浓度算出每 1 mL 的活菌数,将每个菌落计数的对数与培养时间在直角坐标系中绘出油樟提取物对细菌的时间抑菌曲线。

2 结果

2.1 油樟叶残渣提取物的抑菌效果

从表 1 可知,各提取物对大肠杆菌的抑菌活性为正丁醇萃取相(MIC、MBC: 7.813、15.625 mg/mL) > 乙酸乙酯萃取相(MIC、MBC: 15.625、31.125) > 乙醇浸膏和水萃取相(MIC、MBC: 31.25、62.5) > 石油醚萃取相(MIC 和 MBC 都高于 500);对金黄色葡萄球菌的抑菌活性为石油醚萃取相和乙酸乙酯萃取相(MIC、MBC: 7.813、15.625) > 正丁醇萃取相(MIC、MBC: 15.625、31.125) > 乙醇浸膏和水萃取相(MIC、MBC: 31.25、62.5);对沙门氏菌的抑菌活性为乙酸乙酯萃取相(MIC、MBC: 3.9063、7.813) > 正丁醇萃取相(MIC、MBC: 15.625、31.125) > 水萃取相(MIC、MBC: 31.25、62.5) > 石油醚萃取相(MIC、MBC: 31.25、125)。乙醇浸膏和水萃取相对三种细菌的抗菌活性相当,其他萃取相对三种细菌有不同程度的抑制作用,石油醚萃取相对金黄色葡萄球菌的活性最强,对其他两株细菌没有明显活性;乙酸乙酯萃取相对沙门氏菌的活性最强,其次分别是金黄色葡萄球菌和大肠杆菌;正丁醇萃取相对大肠杆菌效果最好,对金黄色葡

萄球菌和沙门氏菌的活性萃取相当。总体来说,油樟叶残渣的抗菌活性主要集中在乙酸乙酯萃取相和正丁醇萃取相。

2.2 油樟叶残渣提取物对三种细菌的抑菌曲线

正丁醇萃取相对大肠杆菌、乙酸乙酯萃取相对沙门氏菌和石油醚萃取相对金黄色葡萄球菌的生长曲线的影响见图 1~3。三种细菌在溶剂对照试验中能持续生长,并完成了生长过程需要经历的调整期、对数期和稳定期,最后逐步进入衰亡期。在 0.5 \times MIC 值提取物浓度下,三种细菌的生长情况基本同溶剂对照组,其中金黄色葡萄球菌和沙门氏菌在作用后,12 h 内与大肠杆菌萃取相比较,其生长速度较缓慢;在 MIC 值提取物浓度下,大肠杆菌和沙门氏菌的增长速度缓慢,活菌数目一直维持在一个较低的水平;金黄色葡萄球菌直接进入衰亡期,表现为明显的杀菌活性。在 2 \times MIC 值提取物浓度下,三种细菌的生长均直接进入衰亡期,没有调整期、对数期和稳定期的变化。乙酸乙酯萃取相、正丁醇萃取相和石油醚萃取相杀死所有的大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌所需要的时间分别为 24、36 和 36 h。

3 讨论

本实验中的油樟叶脱油后的乙醇提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌均具有一定抑制

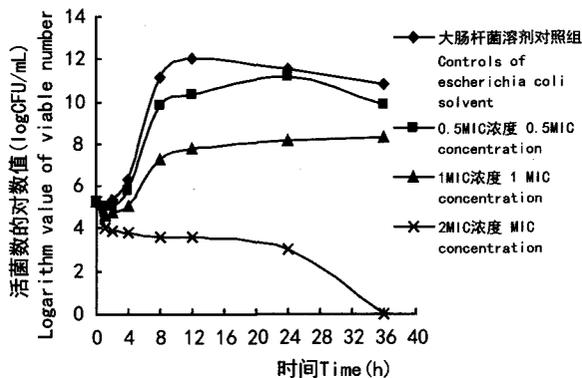


图 1 不同浓度的正丁醇萃取相对大肠杆菌的抑菌曲线
Fig. 1 Time-kill cure of N-butanol extracts from *C. longepaniculatum* leaves against *Staphylococcus aureus*

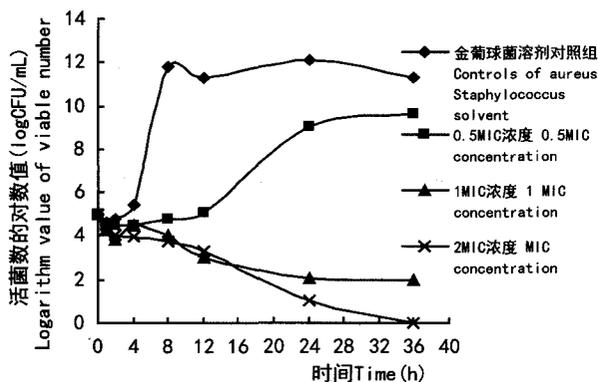


图 2 不同浓度的石油醚萃取相对金黄色葡萄球菌的抑菌曲线
Fig. 2 Time-kill cure of petroleum ether extracts from *C. longepaniculatum* leaves against *S. aureus*

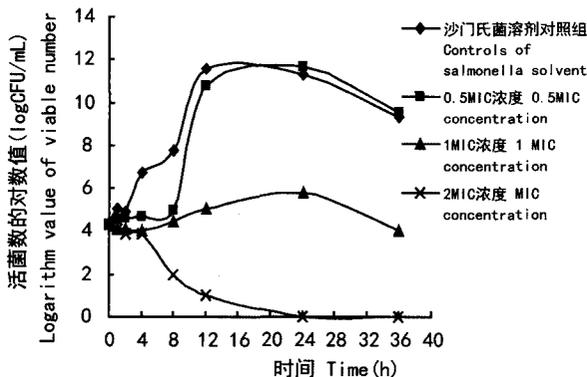


图 3 不同浓度的乙酸乙酯萃取相对沙门氏菌的抑菌曲线

Fig. 3 The time-kill cure of ethyl acetate extracts from *C. longepaniculatum* leaves against *Salmonella*

抗菌活性相当。从最低抑菌浓度来看,油樟叶残渣乙醇浸膏对大肠杆菌和沙门氏菌(MIC 均为 31.25 mg/mL)的抑制活性高于芦笋皮乙醇提取液对大肠杆菌和沙门氏菌(MIC 均为 50 mg/mL)的作用,对金黄色葡萄球菌的抑制活性(MIC 为 31.25 mg/mL)略低于芦笋皮乙醇提取液(MIC 为 10 mg/mL)(冯翠萍等,2010),作为废物利用资源,油樟废叶的抗菌活性具有进一步研究的价值。

油樟叶脱油后的乙醇提取物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌活性与戴群等(2008)报道的油樟同属植物香樟(*C. camphora*)叶脱脂后的乙醇提取物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均具有抑制作用相似。吴传茂等(2000)报道香樟叶未脱去挥发油的乙醇提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌等多种微生物具有抑制作用,其抑制作用可能与香樟油的抑菌作用相关(李爱民等,2006)。研究表明油樟油同样具有较强的抑菌作用(魏琴等,2006,2009)。孙崇鲁等(2006)研究表明,香樟叶脱脂后的乙醇提取物主要成分是黄酮类化合物,而据文献报道,黄酮类化合物有强烈抑菌作用(曲中堂等,2010;韦英亮等,2010),戴群等(2008),得到的具有抑菌作用的乙醇提取物被检测出黄酮成分。尽管油樟与香樟为同属植物,但其抑菌成分是否为黄酮类化合物还有待于进一步研究。

乙醇浸膏的不同极性溶剂相对三种菌生长具有不同抑制作用。乙酸乙酯萃取相对金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的 MIC 和 MBC 最低,正丁醇萃取相对大肠杆菌 MIC 和 MBC 最低,且高于乙醇浸膏的 MIC 和 MBC(表 1),说明油樟叶抗菌活性成分主要集中在油樟叶乙醇浸膏的乙酸乙酯萃取相和正丁醇萃取相。由于乙酸乙酯和正丁醇都是极性较低的溶剂,此结果符合甘聘等(2003)的研究结果:樟树叶片(同属的香樟)提取物得出的脂溶性提取物的抑菌活性高于水溶性提取物的抑菌活性的规律,这说明可能在活性成分上有相似性,为活性成分的追踪奠定了基础。

抑菌曲线(图 1~3)结果表明,金黄色葡萄球菌在 MIC 值提取物浓度下时直接进入衰亡期,大肠杆菌和沙门氏菌在 $2 \times$ MIC 值提取物浓度下衰亡期,36 h 内杀死细菌,这充分证明了提取物杀菌的高效性。抑菌曲线还表明,抑菌活性均随着浓度的增大而加强,即抑菌活性与抗菌药物的浓度呈一定的正相关,其作用类型为浓度依赖型。这为进一步试验

作用,其 MIC 和 MBC 相当(表 1),说明对三种菌的

时用量设计提供试验数据。

参考文献:

- 戴自英. 1985. 临床抗菌药理学[M]. 北京:人民卫生出版社:6-24
- Dai Q(戴群), Zhu XX(朱晓新), Weng DB(翁德宝). 2008. Studies on extraction and antibacterial activity of flavanoid from *Cinnamomum camphora* (香樟叶黄酮类化合物的提取及抑菌作用的研究)[J]. *J Jiangsu Institute Edu; Nat Sci Edi* (江苏教育学院学报·自然科学版), **25**(3):30-34
- Feng CP(冯翠萍), Zhang PY(张培宜), Zhang S(张帅), et al. 2010. Anti-microbial activity of ethanol extract from *Asparagus officinalis* peel (芦笋皮乙醇提取物的抑菌活性研究)[J]. *Food Sci* (食品科学), **31**(15):73-75
- Gan D(甘聃), Chen GY(陈功雨), Xiong J(熊建), et al. 2003. Study on effective inhibitory of extracting compounds from camphortree leaves (樟树叶片提取物抑菌作用研究)[J]. *Chem Indus Times* (化工时刊), **17**(1):51-52
- Li AM(李爱民), Tang YQ(唐永勤), Qing YB(卿玉波). 2006. Camphor oil extracgction from *Cinnamomum camphora* and its antibacterial activity (樟油的提取及其抑菌性研究)[J]. *J Fujian Fore Sci Tech* (福建林业科技), **33**(4):121-123
- Qu ZT(曲中堂), Xiang ZB(项昭保), Zhao ZQ(赵志强). 2010. Antimicrobial activity of total flavones in *Canarium album* (橄榄总黄酮抑菌作用研究)[J]. *China Brew* (中国酿造), (4):62-64
- Sun CL(孙崇鲁), Huang KY(黄克瀛), Chen CJ(陈丛瑾), et al. 2006. Extraction of flavonoids from *Cinnamomum camphora* leaves (香樟叶中黄酮类化合物的提取)[J]. *Appli Chem Indus* (应用化工), **35**(2):142-143
- Wei Q(魏琴), Li Q(李群), Luo Y(罗扬), et al. 2006. Antifungal activity of leaf essential oil from *Cinnamomum longepaniculatum* (油樟油对植物病原真菌活性的抑制作用)[J]. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), **28**(1):63-66
- Wei Q(魏琴), Zhou YK(周宇科), Zhou LJ(周黎军), et al. 2009. Inhibitive activity of *Cinnamomum longepaniculatum* oil against bacteria (油樟油抑制细菌生长的活性试验)[J]. *Chin J Trop Agric* (热带农业科学), **29**(1):1-3
- Wei YL(韦英亮), Liu ZP(刘志平), Ma JQ(马建强), et al. 2010. Antibacterial activity study of flavonoids from jasmine sambac slag (茉莉花渣黄酮抑菌活性研究)[J]. *Tech Develop Chem Indus* (化工技术与开发), **39**(4):8-9
- Wu CM(吴传茂), Wu ZH(吴周和), Wu YS(伍业松). 2000. Study on antibacterial activity of ethanol extract of *Cinamomum camphora* (樟叶乙醇提取液的抑菌作用)[J]. *Amino Acids Biotic Res* (氨基酸和生物资源), **22**(2):41-42
- Zhang YQ(张玉群), Xu J(徐娇), Yin ZQ(殷中琼), et al. 2010. Isolation and identification of the antibacterial active compound from petroleum ether extract of neem oil [J]. *Fitoterapia*, **81**(7):747-750
- Zhou HC(周洪昌) Guo CH(郭朝辉), Ye YW(叶应文), et al. 1991. Cultivating pleurotus ostreatus with de-oiled leaves of *Cinnamomum longepaniculatum* (用提取樟油后的樟叶栽培平菇)[J]. *Fore Sci Tech* (林业科技通讯)(10):3
- change[J]. *Ecol Letters*, **8**:1 138-1 146
- Woodward FI. 1987. Climate and plant distribution[M]. Cambridge, United Kingdom:Cambridge University Press:62-63
- Xiang QP(向巧萍). 2001. A preliminary survey on the distribution of rare and endangered plants of *Abies* in China (中国几种珍稀濒危冷杉属植物及其地理分布成因的探讨)[J]. *Guihaia* (广西植物), **21**(2):113-117
- Xie CP(谢春平). 2006. A review of research advances in rare and endangered plant *Tapiscia sinensis* (濒危植物瘿椒树研究进展(综述))[J]. *Subtrop Plant Sci* (热带植物科学), **35**(4):71-74
- Xiong W(熊伟), Xu YL(许吟隆), Lin ED(林而达), et al. 2005. Regional simulation of rice yield change under two emission scenarios of greenhouse gases (两种温室气体排放方案下我国水稻产量变化模拟)[J]. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), **16**(1):65-68
- Xu YL(许吟隆), Xue F(薛峰), Lin YH(林一骅). 2002. Changes of surface air temperature and precipitation in China during the 21st century simulated by HadCM2 under different greenhouse gas emission scenarios (不同温室气体排放情景下中国21世纪地面气温和降水变化模拟分析)[J]. *Climatic Environ Res* (气候与环境研究), **8**(2):207-217
- Xu YL(许吟隆). 2005. Analyses on scenario simulations of the 21st century climate change in China (中国21世纪气候变化的情景模拟分析)[J]. *J Nanjing Inst Meteorol* (南京气象学院学报), **28**(3):323-329

(上接第607页 Continue from page 607)