

杜永华,敖光辉,魏 琴,等. 油樟叶总黄酮和总多糖的抑菌活性[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):408-410.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.128

油樟叶总黄酮和总多糖的抑菌活性

杜永华^{1,4},敖光辉²,魏 琴¹,张建敏³,龙国平³,朱 贤³

(1. 宜宾学院香料植物资源开发与利用四川省高校重点实验室,四川宜宾 644000;2. 内江师范学院,四川内江 641112;

3. 宜宾学院生命科学与食品工程学院,四川宜宾 644000;4. 宜宾学院食品科学与工程研究所,四川宜宾 644000)

摘要:采用纸片扩散法、二倍稀释法、平板菌落计数法测定了油樟叶总黄酮、总多糖对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌 3 种细菌的抑菌活性。结果表明,油樟叶总黄酮、总多糖对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌的抑制活性均表现出一定的浓度依赖性,其 MIC 分别为 16.000、8.000、16.000 mg/mL 和 16.000、16.000、32.000 mg/mL, MBC 分别为 16.000、16.000、32.000 mg/mL 和 16.000、32.000、64.000 mg/mL。油樟叶总黄酮和总多糖均明显干扰受试菌的正常生长过程。

关键词:油樟;黄酮;多糖;抑菌活性

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0408-03

油樟 [*Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao] 属樟科樟属植物,是我国特有树种,主产于四川省宜宾市,其枝叶均富含挥发油,是食品、香料、医药、日用、化工产品的重要原料来源^[1-2]。油樟与药用植物香樟 [*Cinnamomum camphora* (Linn.) Presl] 为同属植物,均具有多种药理活性。研究表明,油樟叶挥发油具有较强的抗微生物活性^[3-6],提取挥发油后的油樟叶残渣提取物具有抗微生物作用^[7-10]。目前关于油樟叶提取挥发油后残渣的化学成分及其生物活性研究较少,关于油樟叶中总黄酮的抗菌活性研究未见报道。本试验对油樟叶提取挥发油后残渣中的总黄酮进行抗菌活性研究,旨在为油樟资源的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

油樟叶采自宜宾市翠屏区邱场乡油樟种植基地;芸香苷标准品(含量≥92.5%,批号 100080—200707,中国药品生物制品检定所);D(+)-无水葡萄糖标准品(含量≥98%,贵州迪大科技有限责任公司);青霉素 G 钾盐(1 440 U/mg, Sigma 公司);硫酸链霉素(720 U/mg, Sigma 公司);其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 菌种与培养基

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)均由宜宾学院发酵资源与应用四川省高校重点实验室提供。营养琼脂(NA)液体培养基:0.5 g 牛肉膏,1 g 蛋白胨,0.5 g 氯化钠,加热搅拌溶

解于 100 mL 蒸馏水中,调节 pH 值至 7.3±0.1,121 ℃下高压灭菌 20 min,该培养基中加入 1.5 g 琼脂即为固体培养基。

1.3 主要仪器

AR2130 电子天平(赛多利斯公司);TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);LG-5A 真空冷冻干燥机(上海离心机机械研究所有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 油樟叶总黄酮的制备 将新鲜油樟叶自然晾干,用水蒸气蒸馏法除去挥发油,残渣(60±1)℃烘干,粉碎,取过 60~80 目筛油樟叶粉末 50 g,按料液比 1 g:21 mL 加入体积分数为 50%的乙醇溶液,室温浸泡 36 min,88 ℃水浴回流提取 105 min;过滤,滤液于 60 ℃减压浓缩至浸膏,加 100 mL 蒸馏水溶解,加入适量石油醚萃取至石油醚层无色,取水层浓缩至 50 mL,加入乙醇溶液调节乙醇终浓度至 80%,4 ℃醇沉过夜(除去多糖、蛋白、鞣质等杂质);过滤,滤液减压浓缩至膏稠状,真空冷冻干燥,得总黄酮粗品。采用 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 显色体系^[11]测定油樟叶总黄酮含量。将油樟总黄酮粗品用 10%乙醇溶液配制成浓度为 64.00 mg/mL 的储备液,用直径为 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后备用。

1.4.2 油樟叶总多糖的制备 取过 60~80 目筛除去挥发油的油樟叶干燥粉末 50 g,按料液比 1 g:20 mL 加入水,100 ℃水浴回流提取 3 h,过滤,滤液浓缩至 1/5 体积,加入乙醇溶液调节乙醇终浓度至 80%,4 ℃醇沉过夜,12 000 r/min 冷冻离心 5 min,取沉淀真空冷冻干燥,得总多糖粗品。采用苯酚-硫酸法测定油樟叶总多糖含量。将油樟总多糖粗品用无菌水配制成浓度为 64.00 mg/mL 的储备液,用直径为 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌后备用。

1.4.3 菌株活化及菌悬液制备 无菌条件下将保藏菌种接入 NA 平板培养基,37 ℃恒温培养 18~24 h;挑取单个特征菌落接种于 5 mL 灭菌 NA 液体培养基中,37 ℃恒温培养 18~24 h;取 0.5 mL 菌悬液加入 4.5 mL NA 液体培养基中,用血细胞计数板计数,用 NA 液体培养基稀释菌悬液使其浓度为 10⁵~10⁶ CFU/mL^[7],备用。

收稿日期:2014-11-24

基金项目:四川省基础研究项目(编号:2011JY0050);四川省青年科技创新研究团队培育计划(编号:2011JTD0035);四川省省属高校科研创新团队建设计划(编号:14TD0031)。

作者简介:杜永华(1978—),男,四川遂宁人,硕士,讲师,主要从事天然产物及其生物活性研究。E-mail: yonghuad@163.com。

通信作者:魏 琴,博士,教授,主要从事植物资源开发利用研究。E-mail: weiqin2011-67@163.com。

1.4.4 抑菌效果的测定 采用纸片琼脂扩散法^[12]测定测试物的抑菌效果。将定性滤纸制成直径为 6 mm 的圆纸片,置于洁净干燥的试管内,121 ℃ 湿热灭菌 20 min 后烘干。测定 100 片滤纸片吸水量,根据吸水量在无菌条件下滴加不同浓度的药液,使油樟总黄酮粗品、总多糖粗品的纸片含药量均分别为 512.00、256.00、170.67 μg/片,阳性对照纸片含药量为青霉素 G 钾盐 10 U/片、硫酸链霉素 10 μg/片,37 ℃ 干燥后密闭低温保存备用。取 0.5 mL 各菌悬液分别涂布于 NA 平板培养基上,每个平皿放 4 张含药滤纸,分别为油樟叶总黄酮、总多糖的 3 个浓度梯度及 1 个阳性对照,每个浓度 3 个平行。以放溶剂纸片的加菌培养基为溶剂对照,不加菌培养基为无菌对照。37 ℃ 恒温培养箱培养 24 h,观察是否有抑菌圈,若有,则用游标卡尺测量抑菌圈直径。

1.4.5 最小抑菌浓度(MIC)的测定 采用二倍稀释法^[7]将油樟叶总黄酮粗品、总多糖粗品用相应无菌溶剂稀释成 64.000、32.000、16.000、8.000、4.000、2.000、1.000、0.500、0.250、0.125 mg/mL 的系列溶液,分别取 0.5 mL 总黄酮、总多糖溶液至 4 mL NA 液体培养基中,加入 0.5 mL 菌悬液,充分摇匀,37 ℃、115 r/min 摇床培养 24 h,每个浓度重复 3 次,同时设无菌对照组(不含菌的 NA 液体培养基)、溶剂对照组(加相应溶剂的含菌 NA 液体培养基)。用肉眼观察法观察每支试管中细菌的生长情况,以完全不长菌的浓度为最小抑菌浓度(MIC)。

1.4.6 最小杀菌浓度(MBC)的测定 在 MIC 基础上,从未见细菌生长的试管中取出 0.5 mL 培养物加入装有 4.5 mL NA 液体培养基中,37 ℃ 培养 24 h,取 0.1 mL 培养液用涂布平板法计数,以菌落数少于 5 个的最低浓度为油樟叶总黄酮、总多糖对该菌的最小杀菌浓度(MBC)^[7]。

1.4.7 抑菌曲线的测定 参考陶翠等的方法^[4],用 NA 液体培养基将油樟叶总黄酮粗品、总多糖粗品配制成 MIC 浓度,分别接种 3 种细菌,使其终浓度为 10⁵ CFU/mL,充分混匀后于 37 ℃ 培养,分别于 0、2、4、8、12、24、36、48 h 吸取 1.0 mL 菌液,按 10 倍比例稀释,加入 19 mL NA 培养基混匀后制成平板,37 ℃ 培养 24 h 后计算菌落,根据稀释浓度计算 1 mL 活菌数,以菌落数的对数为因变量,以培养时间为自变量在直角坐标系中作图,即得油樟叶总黄酮或总多糖对细菌的时间抑菌曲线,同时设含相应菌的培养基空白对照。

2 结果与分析

2.1 油樟叶总黄酮、总多糖含量测定

50 g 提取挥发油后的油樟叶渣经醇提法提取总黄酮,冷冻干燥获得油樟叶总黄酮粗品 4.60 g,经比色法测得油樟叶总黄酮粗品中总黄酮含量为 381.83 mg/g,油樟叶总黄酮提取率为 3.51%;获得油樟叶总多糖粗品 2.65 g,经苯酚-硫酸法测定总多糖粗品中总多糖含量为 371.22 mg/g,总多糖提取率为 1.97%。

2.2 油樟叶总黄酮、总多糖的抑菌效果

由表 1 可知,油樟叶总黄酮、总多糖粗品对 3 株细菌均具有一定的抑菌作用,其抑菌圈直径随着纸片含药量的增加而增加,表现出一定的剂量依耐性,但均低于阳性对照组。油樟总黄酮粗品对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌的抑菌圈基本上大于

油樟总多糖粗品,但油樟总多糖粗品对金黄色葡萄球菌的抑菌圈大于油樟总黄酮粗品。阳性药物组对相应细菌的抑菌圈均达到美国抗微生物药物敏感性试验执行标准(CLSI)的敏感水平,溶剂对照组、无菌对照组均无异常现象。512.0 μg/片油樟总黄酮粗品对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径是 10 U/片青霉素 G 钾盐的 30.3%,对枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径是青霉素 G 钾盐的 50.0%。

表 1 油樟叶总黄酮、总多糖对 3 株细菌的抑菌作用

供试物	抑菌圈直径(mm)		
	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	大肠杆菌
512.00 μg/片油樟总黄酮粗品	10.0	14.0	12.0
256.00 μg/片油樟总黄酮粗品	8.2	11.0	9.0
170.67 μg/片油樟总黄酮粗品	6.0	7.5	8.2
512.00 μg/片油樟总多糖粗品	10.0	9.5	8.6
256.00 μg/片油樟总多糖粗品	9.0	9.0	8.0
170.67 μg/片油樟总多糖粗品	8.5	8.0	7.3
10 U/片青霉素 G 钾盐	33.0	28.0	—
10 μg/片硫酸链霉素	—	—	26.0
溶剂对照	0	0	0
无菌对照	0	0	0

注:“—”表示未测试该项目。

2.3 油樟叶总黄酮、总多糖的最小抑菌浓度

由表 2 可知,无菌对照组无菌生长,溶剂对照组有菌生长。油樟叶总黄酮和总多糖对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌的最小抑菌浓度分别为 16.000、8.000、16.000 mg/mL 和 16.000、16.000、32.000 mg/mL。

表 2 油樟总黄酮对 3 株细菌的最小抑菌浓度(MIC)

浓度 (mg/mL)	金黄色葡萄球菌		枯草芽孢杆菌		大肠杆菌		无菌 对照	溶剂 对照
	黄酮	多糖	黄酮	多糖	黄酮	多糖		
64.000	—	—	—	—	—	—	—	+
32.000	—	—	—	—	—	—	—	+
16.000	—	—	—	—	—	+	—	+
8.000	+	+	—	+	+	+	—	+
4.000	+	+	+	+	+	+	—	+
2.000	+	+	+	+	+	+	—	+
1.000	+	+	+	+	+	+	—	+
0.500	+	+	+	+	+	+	—	+
0.250	+	+	+	+	+	+	—	+
0.125	+	+	+	+	+	+	—	+

注:“—”表示无菌生长,“+”表示有菌生长。下表同。

2.4 油樟叶总黄酮、总多糖的最小杀菌浓度

由表 3 可知,无菌对照组无菌生长,溶剂对照组有菌生长。油樟叶总黄酮、总多糖对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌作用 24 h 后的最小杀菌浓度分别为 16.000、16.000、32.000 mg/mL 和 16.000、32.000、64.000 mg/mL。

2.5 油樟叶总黄酮、总多糖抑菌曲线

由图 1 至图 3 可知,3 种细菌在溶剂对照中均能正常生长,有较明显的调整期、对数期、稳定期、衰亡期。油樟叶总黄酮、总多糖在 1 倍 MIC 下,金黄色葡萄球菌均直接进入了衰亡期,表现出明显的杀菌作用;1 倍 MIC 总黄酮使枯草芽孢杆菌、大肠杆菌的调整期延长,无明显对数期、稳定期,24 h 内缓慢生长,但活菌数量较溶剂对照组低,随即进入衰亡期;

表 3 油樟总黄酮对 3 株细菌的最小杀菌浓度

浓度 (mg/mL)	金黄色葡萄球菌		枯草芽孢杆菌		大肠杆菌		无菌 对照	溶剂 对照
	黄酮	多糖	黄酮	多糖	黄酮	多糖		
64.000	-	-	-	-	-	-	-	+
32.000	-	-	-	-	-	+	-	+
16.000	-	-	-	+	+	+	-	+
8.000	+	+	+	+	+	+	-	+

1 倍 MIC 总多糖使枯草芽孢杆菌、大肠杆菌无明显对数生长期,生长缓慢,12 h 进入稳定期,但稳定期较溶剂对照组长,细菌量较对照组少。48 h 内,1 倍 MIC 下油樟叶总黄酮、总多糖均未将 3 种菌全部杀死。在油樟总黄酮 1 倍 MIC 下,3 种细菌生长过程中活菌数低于油樟总多糖。

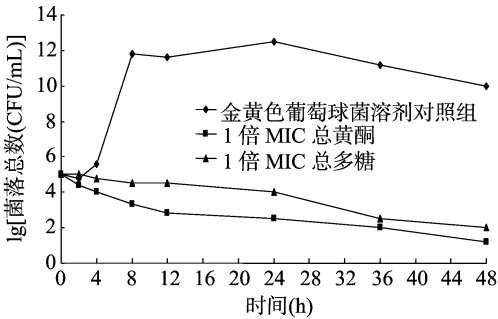


图 1 油樟总黄酮、总多糖对金黄色葡萄球菌的抑菌曲线

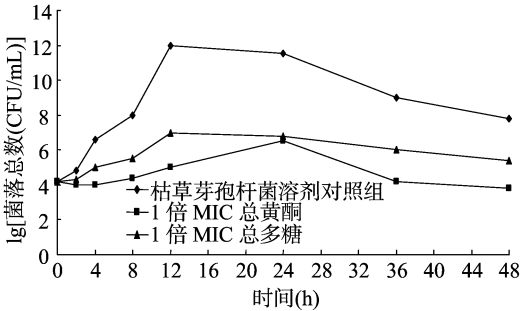


图 2 油樟总黄酮、总多糖对枯草芽孢杆菌的抑菌曲线

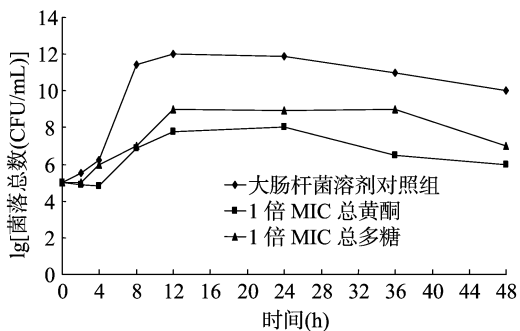


图 3 油樟总黄酮、总多糖对大肠杆菌的抑菌曲线

3 结论与讨论

本试验结果表明,油樟叶总黄酮、总多糖对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌均具有一定的抑菌活性,其抑菌效果随着总黄酮、总多糖浓度的增加而增强。油樟总黄酮对金黄色葡萄球菌的 MIC、MBC 与总多糖相同,说明总黄酮、总

多糖对金黄色葡萄球菌的抑制作用相当。总黄酮对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌的 MIC、MBC 均低于总多糖,表明总黄酮对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌的抑制作用强于总多糖。这一现象与光石韦总黄酮和多糖对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌的作用趋势相似^[12]。油樟叶总黄酮对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的抑菌活性(MIC 均为 16.000 mg/mL)强于油樟叶乙醇提取物(MIC 均为 31.25 mg/mL)^[7]。与油樟同属植物香樟叶在除去挥发油后的乙醇提取物主要成分为黄酮类化合物,其黄酮类化合物提取物对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌均有较强抗菌活性^[13-14]。由此可知,油樟叶总黄酮可能是油樟叶乙醇提取物中主要的抑菌成分。油樟叶总多糖对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌活性(MIC 分别为 16.000、32.000 mg/mL)弱于香樟叶水提取物(MIC 均为 15.63 mg/mL)^[15]。孙崇鲁研究表明,香樟叶水提取物含有较多的多糖成分^[16]。但油樟叶总多糖的抑菌活性是否弱于香樟叶总多糖还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 吴征镒,孙航,周浙昆,等. 中国植物区系中的特有性及其起源和分化[J]. 云南植物研究,2005,27(6):577-604.
[2] 罗中杰,李维一,魏琴,等. 宜宾油樟的现状 & 未来[J]. 四川师范大学学报:自然科学版,2001,24(3):317-319.
[3] 魏琴,周宇科,周黎军,等. 油樟油抑制细菌生长的活性试验[J]. 热带农业科学,2009,29(1):5-7.
[4] 陶翠,魏琴,殷中琼,等. 油樟叶挥发油对三种真菌的抗菌效果[J]. 中国兽医科学,2011,41(1):89-93.
[5] 黄彤,游玲,杜永华,等. 油樟油副产物对细菌性皮肤致病菌的抑制作用[J]. 四川农业大学学报,2014,32(1):53-58.
[6] 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.
[7] 张超,魏琴,杜永华,等. 脱油油樟叶提取物的体外抑菌活性研究[J]. 广西植物,2011,31(5):690-694.
[8] 曹玫,陶翠,房俊,等. 油樟叶油枯提取物抗病原真菌活性研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(11):2792-2793.
[9] 魏琴,殷中琼,杜永华,等. 油樟叶乙醇提取物抗炎活性的研究[J]. 中国兽医科学,2011,41(8):859-864.
[10] 魏琴,殷中琼,杜永华,等. 油樟叶乙酸乙酯萃取物镇痛抗炎作用的研究[J]. 中国兽医杂志,2013,49(5):76-78.
[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社,2005:333.
[12] 钟霞军,蓝芳,朱丹青,等. 光石韦抑菌活性的研究[J]. 时珍国医国药,2014,25(3):574-575.
[13] 孙崇鲁,黄克瀛,陈丛瑾,等. 香樟叶中黄酮类化合物的提取[J]. 应用化工,2006,35(2):142-143.
[14] 戴群,朱晓新,翁德宝. 香樟叶黄酮类化合物的提取及抑菌作用的研究[J]. 江苏教育学院学报:自然科学版,2008,25(3):30-34.
[15] 邓海英,于志君,张垚,等. 樟树叶提取物对几种消化道感染细菌的抑制作用研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(7):1781-1782.
[16] 孙崇鲁. 香樟叶中多糖的提取及含量测定[J]. 应用化工,2011,40(8):1434-1436.