

白木香果皮提取物的抗菌活性

李浩华¹, 章卫民^{1*}, 高晓霞², 吴关庆³, 陈玉婵¹, 王磊¹

(1. 广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广州 510070; 2. 广东药学院, 广州 510006; 3. 信宜市珍稀沉香发展有限公司, 广东 信宜 525300)

[摘要] 目的: 为开发利用白木香果皮资源, 对其提取物进行抗菌活性评价。方法: 用三氯甲烷对白木香果皮进行提取, 提取物分别采用滤纸片法和生长速率法对不同细菌和真菌进行抗菌活性测定, 并采用连续稀释法测定其最低抑菌浓度。结果: 白木香果皮提取物对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌有显著抑制作用, 最小的抑菌浓度分别为 6.25, 625, 12.5 g·L⁻¹, 对大肠杆菌则没有抑制效果; 对绿色木霉、黑曲霉、黄曲霉也有明显的抑制作用, 最小的抑菌浓度分别为 6.25, 6.25, 12.5 g·L⁻¹。结论: 白木香果皮三氯甲烷提取物具有显著的抗菌活性, 值得开发利用。

[关键词] 白木香果皮; 提取物; 抗菌活性; 最低抑菌浓度

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0100-04

Study on Antimicrobial Activity of *Aquilaria sinensis* Peel Extract

LI Hao-hua¹, ZHANG Wei-min^{1*}, GAO Xiao-xia², WU Guan-qing³, CHEN Yu-chan¹, WANG Lei¹

(1. Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Provincial Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China; 2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006 China; 3. Xinyi Rare Agarwood Development, Co. Ltd., Xinyi 525300, China)

[Abstract] **Objective:** To study antimicrobial activity of *Aquilaria sinensis* peel extract. **Method:** The chloroform extract of *A. sinensis* peel was investigated for antimicrobial activity against the tested bacteria and fungi using filterpaper disc method and growth rate method respectively and their minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined using serial dilution method. **Result:** The extract displayed significant antibacterial and antifungal activities against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* with MIC values of 6.25, 6.25, 12.5 g·L⁻¹ and against *Trichoderma roseum*, *Aspergillus niger* and *A. flavus* with MIC values of 6.25, 6.25, 12.5 g·L⁻¹. **Conclusion:** The chloroform extract of *A. sinensis* peel exhibited antimicrobial activity which is worthy of exploitation.

[Key words] *Aquilaria sinensis* peel; extract; antimicrobial activity; minimum inhibitory concentration

[收稿日期] 20101115(007)

[基金项目] 广东省教育部产学研结合项目 (2008B090500085); 广东省自然科学基金项目 (7301571)

[第一作者] 李浩华, 工程师, 从事微生物抗菌活性研究, Tel: 020-87137599, E-mail: whq88163@21cn.com

[通讯作者] * 章卫民, 博士, 研究员, 从事微生物资源及其开发利用研究, Tel: 020-37656321, E-mail: wzhang58@yahoo.com.cn

全世界瑞香科 (Thymelaeaceae) 沉香属 *Aquilaria* 植物有 15 种以上, 大多数分布在印度、马来西亚、越南等地^[1]。我国沉香属植物只有一种, 即白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg, 是我国特有的珍稀濒危药用植物^[2], 主要分布于热带、亚热带地区, 其树脂习惯上称为国产沉香、土沉香或莞香。沉香用途广泛, 药用价值高, 具有行气止痛、温中止呕、纳气平喘之功效, 主治气逆喘息、呕吐、呃逆、心腹疼痛、大肠虚闭、腰膝虚冷等症。目前, 对白木香的利用主要

集中在以其茎、干生产沉香,但由于结香周期过长,且采香后对树木的损伤大,以致对白木香资源的利用率很低。因此,研究白木香其他组织的用途是提高该植物资源利用率和经济效益的有效途径。本研究对白木香果皮提取物进行抗菌活性研究,为综合开发利用白木香资源奠定基础。

1 材料

白木香果实采自广东省恩平市良西镇林场,经作者鉴定为正品,室内阴干,去除种子后,粉碎。

PYX-DHS 电热恒温培养箱(湖北省黄石医疗器械厂);YXQ.WY21-600 电热高压蒸气灭菌锅(广州市华南医疗器械有限公司);超净工作台(上海恒益科技有限公司);RE-2000 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。三氯甲烷(分析纯,广州化学试剂厂);硫酸卡那霉素(MBCHEM 公司);制霉菌素(MBCHEM 公司)。

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*、大肠埃希菌 *Escherichia coli*、绿色木霉 *Trichoderma roseum*、黑曲霉 *Aspergillus niger*、黄曲霉 *Aspergillus flavus*,均保存于广东省微生物研究所。

金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌采用 LB 培养基;绿色木霉、黑曲霉、黄曲霉采用 PDA 培养基。

2 方法

2.1 白木香果皮提取液的制备 称取已粉碎白木香果皮 3 g,用三氯甲烷冷浸 24 h,过滤,滤液于旋转蒸发器浓缩至干,称重,得提取物的质量为 83.0 mg,得率为 27.3 mg·g⁻¹。将提取物用二甲基亚砜(DMSO)溶解配 50 g·L⁻¹ 的浓度,并用无菌水稀释成 25,10,5,0.5,0.25 g·L⁻¹ 质量浓度,备用。

2.2 菌种活化及菌悬液制备 细菌活化及菌悬液制备:将细菌接种于 LB 液体培养基中,37 ℃ 培养 24 h,用无菌生理盐水稀释,配制成 1 × 10⁶ ~ 1 × 10⁷ CFU·mL⁻¹ 密度的菌液。

真菌活化:挑取真菌斜面菌种一小块接种于 PDA 平板中央,28 ℃ 恒温箱培养 72 h。

2.3 抗细菌活性的测定 抗细菌活性的测定采用滤纸片法^[3-4]。取制备好的细菌悬液 0.2 mL,加入已倒有 LB 固体培养基的平皿表面,用涂布棒均匀涂布。用无菌镊子夹取厚度为 1.5 mm、直径 6 mm 的滤纸片呈三角形置于含菌平板上,每个菌种设 3 皿

重复,同时在滤纸上滴不同浓度的提取液 10 μL,以 DMSO 代替样品作空白对照,以 20 mg·L⁻¹ 的硫酸卡那霉素作阳性对照,将平板置于 37 ℃ 恒温箱培养 24 h,测量抑菌圈直径的大小。

2.4 抗真菌活性的测定 抗真菌活性的测定采用生长速率法^[5]:分别取不同浓度提取液 0.1 mL 均匀涂布到含 PDA 固体培养基的培养皿中,在平皿中央分别接入直径为 4 mm 的绿色木霉、黑曲霉、黄曲霉的菌饼,每处理重复 3 皿,以 DMSO 代替提取液作空白对照,以 20 mg·L⁻¹ 的制霉菌素作阳性对照。置于 28 ℃ 恒温培养箱培养 48 h,记录菌饼生长直径,计算抑制率。

抑制率 = (空白对照平均纯生长量 - 处理平均纯生长量) / 空白对照平均纯生长量 × 100%,其中纯生长量(mm) = 菌饼生长直径 - 4。

2.5 最低抑菌浓度的测定 采用连续稀释法^[6]:取白木香果皮提取液按试管二倍稀释法,将细菌和真菌分别用 LB 液体培养基和 PDA 液体培养基按 1:2,1:4,1:8,1:16,1:32,1:64 比例稀释,提取物质量浓度分别为 25,12.5,6.25,3.125,1.5625,0.78125 g·L⁻¹。吸取不同浓度提取液 100 μL 于试管中,再分别加入 100 μL 菌液,使细菌的含菌量达 1 × 10⁶ ~ 1 × 10⁷ CFU·mL⁻¹、真菌含孢子数 1 × 10⁶ ~ 1 × 10⁷ 个/mL,以无菌水代替提取液为空白对照组。细菌置于 37 ℃ 恒温箱培养 24 h,真菌置于 28 ℃ 恒温箱培养 72 h,然后于平皿上划线培养,细菌再培养 24 h,真菌培养 72 h,观察生长情况。以试管澄清,划线培养不长菌的最低浓度为最低抑菌浓度(MIC)。

3 结果与分析

3.1 提取物对细菌的抗菌作用 不同浓度的提取物对 3 种供试细菌的生长均表现出抑制作用,但抑制效果存在差异(表 1 和图 1)。其中提取物对金黄色葡萄球菌有明显的抑制作用,抑菌圈明显;枯草芽孢杆菌次之,抑菌圈较为明显;对铜绿假单胞菌也有一定的抑制作用,但抑菌圈较为模糊;随着提取物的浓度降低,抑制作用明显下降,提取物对大肠埃希菌则没有抑制作用。

从表 1 和图 1 可以看出当处理浓度高于 10 g·L⁻¹ 时,对 3 种供试细菌的生长均表现出强的抑制作用,对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌的最大抑菌圈直径分别 18.25,14.92,11.47 mm;当处理浓度为 5 g·L⁻¹ 时,对枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌有较强抑制作用,抑菌圈直径分别为 8.86,

8.42 mm;而当处理质量浓度为 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,仅对铜绿假单胞菌有抑制作用,抑菌圈直径为 7.81 mm;当处理质量浓度低于 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对 3 种供试细菌均无抑制作用。

3.2 提取物对真菌的抗菌作用 不同浓度的提取物对真菌的抗菌效果见表 2。随着白木香果皮提取物处理浓度的降低,对 3 种供试真菌的抑制率明显降低。在处理质量浓度大于 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对绿色木

霉、黑曲霉、黄曲霉均有抑制作用,最高抑制率分别为 83.33% ,53.85% ,31.82%。在处理质量浓度小于 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,除对黑曲霉有微弱的抑制作用外,对其他 2 种供试真菌均无抑制效果。此外,不同浓度处理对同种真菌的抑制效果存在差异。对于绿色木霉,各浓度处理间差异均极为明显;而对于黑曲霉,25,10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 2 个质量浓度处理间无差异,抑制率均为 28.21%。

表 1 白木香不同浓度提取物对细菌的抑菌圈直径 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

样品	剂量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	抑菌圈直径/mm			
		金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	铜绿假单胞菌	大肠埃希菌
空白对照	-	6 ± 0.15	6 ± 0.26	6 ± 0.33	6 ± 0.21
硫酸卡那霉素	-	12.38 ± 0.16	16.62 ± 0.15	7.96 ± 0.62	12.06 ± 0.22
白木香提取物	50	18.25 ± 0.23	14.92 ± 0.36	11.47 ± 0.56	6 ± 0.15
	25	12.33 ± 0.11	12.44 ± 0.81	10.82 ± 0.82	6 ± 0.43
	10	10.62 ± 0.62	11.55 ± 0.72	9.46 ± 0.66	6 ± 0.31
	5	6 ± 0.12	8.86 ± 0.21	8.42 ± 0.42	6 ± 0.76
	0.5	6 ± 0.79	6 ± 0.23	7.81 ± 0.19	6 ± 0.22
	0.25	6 ± 0.52	6 ± 0.14	6 ± 0.31	6 ± 0.62
	0				

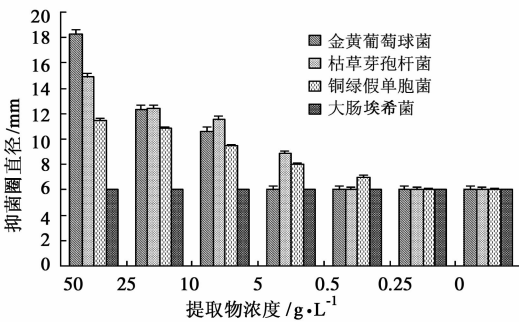


图 1 不同质量浓度提取物对细菌的抑制效果

3.3 最低抑菌浓度测定 白木香果皮提取物对供试菌株的最低抑菌浓度分别见表 3,4。白木香果皮提取物对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、绿色木霉、黑曲霉、黄曲霉都有显著的抑制作用,最低抑菌质量浓度分别为 6.25, 6.25, 12.5,

6.25, 6.25, 12.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。当提取物溶液浓度为 12.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,所有供试菌株均不能生长。

表 2 白木香不同提取物浓度对真菌的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	剂量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	抑菌率/%		
		绿色木霉	黑曲霉	黄曲霉
制霉菌素	-	46.70 ± 0.62	46.15 ± 0.36	18.28 ± 0.11
提取物	50	83.33 ± 0.29	53.85 ± 0.56	31.82 ± 0.62
	25	50.0 ± 0.33	28.21 ± 0.82	18.18 ± 0.76
	10	18.18 ± 0.23	28.21 ± 0.29	4.54 ± 0.21
	5	3.04 ± 0.72	12.82 ± 0.41	4.54 ± 0.51
	0.5	0	2.56 ± 0.83	0
	0.25	0	2.56 ± 0.75	0
	0			

表 3 白木香提取物对细菌的最低抑菌浓度 (MICs)

供试细菌	空白对照	提取物质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$							MIC $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
		25	12.5	6.25	3.125	1.562	0.781	0.390	
金黄色葡萄球菌	+	-	-	-	+	+	+	+	6.25
枯草芽孢杆菌	+	-	-	-	+	+	+	+	6.25
铜绿假单胞菌	+	-	-	+	+	+	+	+	12.5

注：“+”表示有菌生长，“-”表示无菌生长。

表4 提取物对真菌的最低抑菌浓度(MICs)

供试菌种	空白对照	提取物浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$							MIC $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
		25	12.5	6.25	3.125	1.562	0.781	0.390	
绿色木霉	+	-	-	-	+	+	+	+	6.25
黑曲霉	+	-	-	-	+	+	+	+	6.25
黄曲霉	+	-	-	+	+	+	+	+	12.5

注:“+”表示有菌生长,“-”表示无菌生长。

4 讨论

白木香果皮的三氯甲烷提取物不但对革兰阳性菌金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌有显著的抑制效果,对革兰阴性菌铜绿假单胞菌也有明显的抑制效果,而且该提取物对3种供试真菌绿色木霉、黑曲霉、黄曲霉也表现出良好的抗菌活性,说明白木香果皮提取物具有广谱的抗菌活性。因此,白木香果皮的活性成分值得深入研究,以期开发出植物来源的天然抗菌活性物质。

随着耐药菌株的不断出现,对人类的健康构成了潜在威胁,因此,开发利用药用植物资源,寻找新型的抗菌活性物质具有重要意义。近年来,人们不但重视沉香的药用价值,而且也开始关注白木香的花、果、茎、叶的开发利用。梅文莉等^[7-8]报道了白木香花和果实挥发油成分及果实乙醇提取物具有抗肿瘤活性;路晶晶等^[9]研究发现从白木香叶子中提取的黄酮类成分具有抗氧化活性;余伯阳等^[10]发现白木香水提物具有镇痛活性,醇提物具有镇痛、抗炎、泻下、止血、抗脑缺氧、降血糖、抗肿瘤活性;张应烙等^[11]对沉香茎的丙酮提取物进行抑菌试验研究,发现该提取物对小麦纹枯病菌等产生抑菌作用;作者在对白木香果皮提取物的化学成分进行分析时发现其果皮中含有大量沉香特征性成分,而且该提取物对人乳腺癌细胞MCF-7具有抑制活性^[12]。本研究首次对白木香果皮三氯甲烷的提取物进行抗菌活性的研究,发现该提取物具有广谱的抗菌活性,提示白木香果皮具有很好的开发利用价值。

[参考文献]

[1] 冯凤钜. 沉香木和沉香[J]. 中国木材, 2005, 6: 13.

- [2] 裘树平,刘仲荃. 中国保护植物[M]. 上海:上海科技出版社,1994:26.
- [3] 杨联松,檀根甲,徐美清. 茶多酚抑菌作用和防腐效果初探[J]. 安徽农业科学,1996,24(4): 373.
- [4] 董金甫,李瑶青,洪绍梅. 茶多酚对8种致病菌最低抑制浓度的研究[J]. 食品科学,1995,16(1): 6.
- [5] 张兴,王兴林. 植物化学保护实验指导[M]. 西安:西北农林科技大学出版社,2000:66.
- [6] 张红英,崔保安,夏平安,等. 7种中草药提取物对猪链球菌的体外抑菌试验[J]. 河南农业科学,2006(8):113.
- [7] 梅文莉,林峰,戴好富. 白木香花和果实挥发油成分的GC-MS分析[J]. 热带亚热带植物学报,2009,17(3):305.
- [8] 梅文莉,戴好富,吴娇,等. 白木香果实及其提取物在制备抗肿瘤药物中的新用途,中国:200810186904.2[P]. 2008-12-05.
- [9] 路晶晶,威进,朱丹妮,等. 白木香叶中黄酮类成分结构与抗氧化功能的相关性研究[J]. 中国天然药物,2008,6(6):456.
- [10] 余伯阳,寇俊萍,周敏华,等. 一种沉香叶提取物及其医药和保健用途,中国:200710019969.3[P]. 2007-02-05.
- [11] 张应烙,尹彩萍. 15种中药提取物对几种植物病原菌抑菌活性的初步研究[J]. 西北农业科技大学,2005(33):175.
- [12] 徐维娜,高晓霞,郭晓玲,等. 白木香果皮挥发性成分及抗肿瘤活性的研究[J]. 中药材,2010,33(11):1736.

[责任编辑 邹晓翠]