

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.01.003

枫香脂挥发油抑菌性试验

覃晓¹, 李炎^{1△}, 王玲¹, 饶伟文¹, 向梵瑄²

(1. 广西壮族自治区桂林市食品药品检验所, 广西 桂林 541012; 2. 广西中医药大学, 广西 南宁 530000)

摘要:目的 探讨枫香脂中挥发油的抑菌作用及抑菌范围。方法 以纸片法测定抑菌圈大小,以试管等比稀释法测定最低抑菌浓度。结果 枫香脂中挥发油对所用菌株均有不同程度抑制,抑菌强度革兰阳性菌>革兰阴性菌,真菌类>细菌类;100%及50%的枫香重油和枫香精油对芽孢类杆菌和霉菌最低抑制浓度可达1.25%,对酵母菌最低抑制浓度为0.625%,且两种样品抑菌效力差异不大。结论 枫香脂中挥发油具有较强和较广泛的抑菌作用,值得进一步研究开发利用。

关键词:枫香脂;挥发油;贴片法;抑菌性;最低抑菌浓度

中图分类号:R932;R285.5

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)01-0007-04

Test of Volatile Oil in *Liquidambar Formosana*

QIN Xiao¹, LI Yan¹, WANG Ling¹, RAO Weiwen¹, XIANG Fangxuan²

(1. Guangxi Guilin Food and Drug Inspection Institute, Guilin, Guangxi, China 541012; 2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China 530000)

Abstract: Objective To investigate the bacteriostatic effect and range of volatile oil in *Liquidambar formosana*. **Methods** Antibiotic reference sticker method was used to determine the size of bacteriostasis circle, and the lowest bacteriostasis concentration was determined by the isotopic dilution method in test tube. **Results** The volatile oil of *Liquidambar formosana* inhibited all the strains in varying degrees. The sequence of bacteriostasis intensity was gram-positive bacteria > gram-negative bacteria; fungi > bacteria. The minimum inhibitory concentration of the 100% and 50% samples to bacillus and fungi could reach 1.25% and yeast could reach 0.625%; but the bacteriostasis efficacy of the two samples had little difference. **Conclusion** The volatile oil of *Liquidambar formosana* belongs to a strong and broad antimicrobial activity, which is worthy of further research, development and utilization.

Key words: *Liquidambar formosana*; volatile oil; antibiotic reference sticker method; antibacterial activity; minimum inhibitory concentration

枫香脂为金缕梅科枫香属植物枫香树 *Liquidambar formosana* Hance 的干燥树脂,作为传统中药,收载于2015年版《中国药典(一部)》^[1],有活血止痛、解毒生肌功效,用于治疗跌打损伤、痈疽肿痛、内外出血等。枫香

脂含有树脂和挥发油两大类成分,其中树脂部分含五环三萜类酸及酯类化合物,如齐墩果酮酸、羽扇豆酮酸、齐墩果酮醇、肉桂酸肉桂酯、肉桂酸肉桂醇等;挥发油部分含石竹烯、蒎烯、苾烯、松油烯、乙酸龙脑酯等数10种化

第一作者:覃晓,女,土家族,大学本科,主管药师,主要从事食品药品检验工作,(电子信箱)351978114@qq.com。

△通信作者:李炎,女,大学本科,工程师,主要从事食品药品检验工作,(电子信箱)1278542894@qq.com。

- [9] CHEN J, VEMURI C, PALEKAR RU, et al. Antithrombin nanoparticles improve kidney reperfusion and protect kidney function after ischemia-reperfusion injury[J]. American Journal of Physiology Renal Physiology, 2015, 308: F765-F773.
- [10] OGATA M, IWAMOTO T, TAZAWA N, et al. A novel and selective Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor, SEA0400, improves ischemia/reperfusion-induced renal injury[J]. European Journal of Pharmacology, 2003, 478: 187-198.
- [11] NLANDU-KHODO S, DISSARD R, HASLER U, et al. NADPH oxidase 4 deficiency increases tubular cell death during acute ischemic reperfusion injury[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 38598.
- [12] LIU D, SHANG H, LIU Y. Stanniocalcin-1 Protects a Mouse Model from Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Affecting ROS-Mediated Multiple Signaling Pathways[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17: 1051.

- [13] HUANG Q, WANG Q, ZHANG S, et al. Increased hydrogen peroxide impairs angiotensin II contractions of afferent arterioles in mice after renal ischaemia-reperfusion injury[J]. Acta Physiologica, 2016, 218: 136-145.
- [14] STANLEY KS, MEYER DJ, GATTO C, et al. Intracellular Requirements for Passive Proton Transport through the Na⁺, K⁺-ATPase[J]. Biophysical Journal, 2016, 111: 2430-2439.
- [15] MARTINEZ-AZORIN F. Cyclopiazonic acid reduces the coupling factor of the Ca²⁺-ATPase acting on Ca²⁺ binding[J]. FEBS letters, 2004, 576: 73-76.
- [16] JAIN AK, MEHRA NK, SWARNAKAR NK. Role of Antioxidants for the Treatment of Cardiovascular Diseases: Challenges and Opportunities[J]. Current Pharmaceutical Design, 2015, 21: 4441-4455.

(收稿日期:2019-06-17)

合物^[2-6]。动物实验表明,枫香脂中挥发油有提高心肌耐缺氧能力、降低小鼠室颤发生率、提高冠脉流量、舒张血管、抑制血栓形成等^[7-10],以及抗肿瘤等作用^[11-14]。此外,从枫香叶提取的挥发油还有明显的抑菌作用,用于枇杷、砂糖橘、圣女果的防腐保鲜也有较好的效果^[15-17]。枫香树在我国分布广泛,资源丰富。枫香脂中的挥发油常温放置分层为两部分:上层液体部分为枫香精油,下层半固体部分为枫香重油。为了进一步开发枫香树的利用价值,本研究中将这两部分分别进行抑菌性试验。现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

BD240 型微生物培养箱,KB240 型生化培养箱,均购自德国 Binder 公司;AC2-4S1 型生物安全柜(新加坡 Esco 公司);Sup G6R 型菌落计数/筛选/抑菌圈测量联用仪(杭州迅数科技有限公司)。

1.2 试剂

挥发油样品(以液态枫香树脂通过蒸馏法提取得到,收率为 16%),原植物经检验所饶伟文主任药师鉴定为正品。庆大霉素标准品(批号为 130326-201716,含量每 1 mg 相当于 637 U),环吡酮胺对照品(批号为 100232-201402,含量 99.8%),均购自中国食品药品检定研究院。胰酪胨大豆蛋白琼脂培养基(TSA,批号为 180820),胰酪胨大豆蛋白液体培养基(TSB,批号为 170722),沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA,批号为 181127),沙氏葡萄糖液体培养基(SDB,批号为 180411),均购于北京陆桥技术有限责任公司。丙酮为分析纯,95%乙醇、聚山梨酯 80 为化学纯。

1.3 菌株

大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104]、短小芽孢杆菌[CMCC(B)63202]、黑曲霉菌[CMCC(F)98003],均购自中国食品药品检定研究院;白色念珠菌[CMCC(F)98001,购自原南宁食品药品检验所];表皮葡萄球菌[CMCC(B)29069],福氏志贺氏菌(ATCC12022),均购自桂林朝仪商贸有限公司;蜡样芽孢杆菌[CMCC(B)63303]、产气肠杆菌(ATCC13048)、鼠伤寒沙门氏菌(ATCC14028)、酿酒酵母(ATCC9763),均购自原广东省食品微生物安全工程技术研究开发中心;黄曲霉菌(CICC2219)购自原中国工业微生物菌种管理中心。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 溶液制备

菌悬液:取大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢

杆菌、铜绿假单胞菌、短小芽孢杆菌、表皮葡萄球菌、福氏志贺氏菌、蜡样芽孢杆菌、产气肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌甘油冷冻管,接种在 TSB 培养基中,36℃条件下培养 24 h,采用平板计数法,将菌液制成浓度为 $10^7 \sim 10^8$ 的菌悬液,冰箱中保存,备用。取白色念珠菌、酿酒酵母菌甘油冷冻管,接种到 SDB 液体培养基,28℃条件下培养 48 h,同细菌计数法制成浓度为 $10^7 \sim 10^8$ 的菌悬液,冰箱中保存,备用。取黑曲霉、黄曲霉的新鲜培养物,接种至 SDA 斜面培养基,25℃条件下培养 7~8 d,加入 5 mL 含 0.05% 聚山梨酯 80 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,将孢子洗脱,用无菌吸管吸出孢子液。可根据用量多制备几个斜面。同上述方法制备成浓度为 $10^5 \sim 10^6$ 的菌悬液,冰箱中保存,备用。

供试品溶液:取样品(半固体约 50℃融化)原液,作 100% 供试品溶液;取样品(半固体约 50℃融化)50 mL,加丙酮至 100 mL,摇匀,作 50% 供试品溶液。

对照溶液:取庆大霉素标准品 10 mg,精密称定,根据对菌株的抑菌效力强弱加灭菌水制成 10,20,100 U/mL 3 种浓度的细菌对照溶液。取环吡酮胺对照品 10 mg,精密称定,加乙醇制成质量浓度为 0.4 mg/mL 的真菌对照溶液。

空白溶液:以 100% 丙酮作为空白溶液。

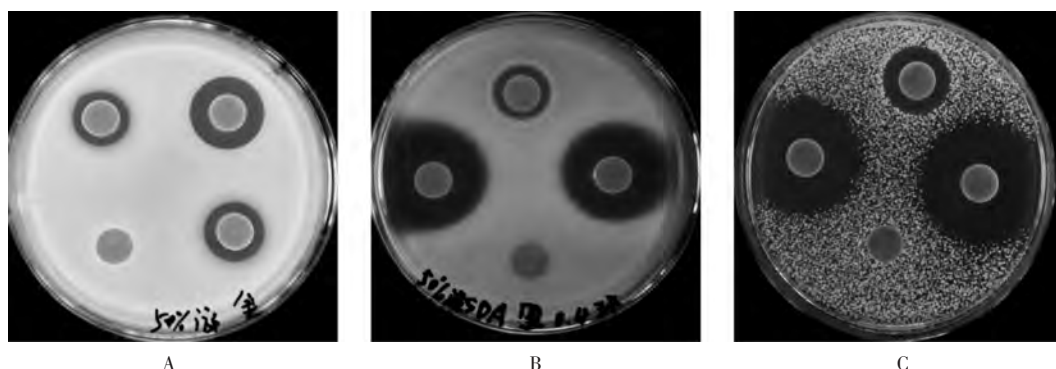
2.1.2 样品抑菌性测定

采用纸片法^[16]。在安全柜里将完成灭菌的培养基倾注 15 mL 于平皿中(细菌用 TSA 培养基,霉菌用 SDA 培养基),待其凝固,在上面平铺含 5% 细菌的 TSA 培养基(或含 4% 霉菌、5% 酵母菌的 SDA 培养基)5 mL,制成带菌平板;贴上浸泡约 10 min 供试品溶液的纸片,同时用浸泡庆大霉素标准品溶液的纸片作细菌抑菌性对照,用浸泡环吡酮胺对照溶液的纸片作霉菌、酵母菌抑菌性对照,用浸泡丙酮溶液的纸片作空白对照。每个板贴 4 片,其中样品成对角贴 2 片,对照与空白成对角各 1 片,平行 3 份。细菌置 36℃条件下培养 24 h,真菌置 28℃条件下培养 48 h,测量抑菌圈直径,重复 2 次,结果取平均值,详见表 1。抑菌效果见图 1。样品的抑菌活性与对照溶液抑菌活性进行比较,又形成倍比关系,详见表 2。

2.1.3 最低抑菌浓度测定

称取样品,加灭菌的 10% 聚山梨酯 80,混匀,用灭菌好的 TSB 培养基(真

本栏目由
重庆赢英康医疗器械有限公司
协办



A. 细菌 B. 霉菌 C. 酵母菌

图 1 样品抑菌效果图

表 1 各溶液抑菌性比较(抑菌圈直径,mm)

菌种	供试品溶液		对照溶液		空白溶液
	枫香重油(100%/50%)	枫香精油(100%/50%)	细菌对照	真菌对照	丙酮
I	16.905/16.034	21.962/15.497	20.496 ^a		0
II	16.432/15.061	18.127/14.685	15.403 ^b		0
III	17.688/14.688	19.028/16.998	14.750 ^a		0
IV	13.624/12.012	14.889/12.824	17.270 ^c		0
V	26.105/25.082	30.965/27.907	22.525 ^b		0
VI	17.028/16.376	18.899/16.097	22.544 ^a		0
VII	14.548/13.792	16.685/15.792	15.506 ^b		0
VIII	13.483/12.182	14.784/12.901	18.845 ^b		0
IX	16.426/15.941	18.457/16.652	13.523 ^c		0
X	14.301/13.248	16.837/14.196	16.549 ^b		0
XI	23.316/20.824	33.888/28.361		17.492	0
XII	32.530/29.940	35.233/33.399		22.242	0
XIII	30.926/28.341	36.860/33.171		19.870	0
XIV	/17.185	/18.465		15.910	0

注:菌种编号 I~XIV 分别对应金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、短小芽孢杆菌、表皮葡萄球菌、福氏志贺氏菌、产气肠杆菌、蜡样芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、黑曲霉菌、白色念珠菌、酿酒酵母菌、黄曲霉菌,下表同;a,b,c 对应的庆大霉素浓度分别为 10,20,100 U/mL。

菌用 SDB 培养基)稀释成 20% 的供试品溶液。采用等比稀释法进一步稀释成 20%,10%,5%,2.5%,1.25%,0.625%,0.312%,0.156% 系列体积分数。分别吸取 10mL 分装试管,分别加 1 种菌悬液各 50 μ L,摇匀。同时取相同稀释剂,加适量聚山梨酯 80,摇匀,分别作阴性和阳性(阳性管加菌悬液 50 μ L)对照。细菌 36 $^{\circ}$ C 条件下培养 24 h,真菌置 28 $^{\circ}$ C 条件下培养 48 h。吸取 1 mL 培养好的样品溶液注皿(每皿 0.5 mL),倾注培养基摇匀待其凝固;同时从样品溶液中取一环划平板做同步试验,细菌用 TSA 培养基、真菌用 SDA 培养基,细菌 36 $^{\circ}$ C 条件下培养 24 h,真菌 28 $^{\circ}$ C 条件下培养 48 h。重复 3 次。观察平板,找出未长菌的最低浓度,即为最低抑菌浓度。详见表 3。

表 2 50% 供试品溶液抑菌活性倍数与对照溶液浓度比较

菌种	抑菌活性倍数		庆大霉素浓度	环吡酮胺质量
	枫香重油	枫香精油	(U/mL)	浓度(mg/mL)
I	0.78	0.76	10	
II	0.98	0.95	20	
III	1.00	1.15	10	
IV	0.70	0.74	100	
V	1.16	1.24	20	
VI	0.73	0.71	10	
VII	0.89	1.02	20	
VIII	0.65	0.68	20	
IX	0.97	1.02	100	
X	0.80	0.86	20	
XI	1.19	1.62		0.4
XII	1.35	1.50		0.4
XIII	1.43	1.67		0.4
XIV	1.08	1.16		0.4

表 3 样品对各菌株的最低抑菌浓度(枫香重油/精油)

菌种	供试品溶液浓度(%)							阳性	阴性
	10	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156		
I	-/-	-/-	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
II	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
III	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
IV	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
V	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
VI	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
VII	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
VIII	-/-	-/-	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
IX	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
X	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
XI	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
XII	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
XIII	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+	-/-
XIV	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-

注:“+”表示有菌生长,“-”表示无菌生长。

2.2 结果与分析

通过贴纸片法和最低抑菌浓度试验,枫香重油、枫香精油两个供试品溶液对受试的14种菌株均有不同程度抑制,两者试验结果一致。从表1及表3可知抑菌强度:革兰阳性菌>革兰阴性菌,真菌类>细菌类,芽孢类杆菌>其他细菌,供试品溶液浓度与其抑菌活性呈量比关系,但不明显,可能与油和有机溶剂的扩散性有关。表2中通过比较供试品溶液与对照品溶液抑菌活性,可直观看出供试品溶液对每个菌株的抑菌活性强度。

3 讨论

通过两样品不同菌株的抑菌试验证明,枫香脂中挥发油室温下分层的两部分对试验菌株的抑制作用差异不大,两者对细菌类最低抑制浓度可达5%,对芽孢类杆菌甚至可达1.25%,对霉菌最低抑制浓度可达1.25%,对酵母类最低抑制浓度可达0.625%。

从以往的文献资料中可知,枫香脂精油对心血管及抗肿瘤方面都有较好的生物活性^[7-14]。本研究结果表明,枫香脂精油对金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、大肠埃希菌、产气肠杆菌、白色念珠菌、黄曲霉菌、酿酒酵母等14个菌株均有较强的抑制作用,其作用强度优于枫香叶挥发油^[15-18]。枫香树在我国资源丰富,新鲜枫香树脂中挥发油含量高达15%~20%,目前主要用作香精的原料,应用范围相对较窄。因此,继续深入研究枫香脂挥发油在医疗、化工、食品行业上的应用前景广阔。

预试验中比较了乳化溶液贴纸片法、生物检定(管碟)法^[18-19]、表层涂布菌液培养基打孔法^[20]、表层菌液涂布贴纸片法^[21],结果均有不稳定性因素影响抑菌圈的圆整性、均匀性,甚至无法产生抑菌圈,表明供试品溶液制备和试验方法对抑菌性试验结果影响较大。经综合考虑各种影响因素,采用试剂溶解、加厚菌层、对照比对贴纸片法。每次的试液量相对恒定,菌层生长均匀,容易得到大小均一、圆整透明的抑菌圈;四角对贴又可与对照、空白比较,一目了然。但要注意,抑菌圈直径的大小受菌液浓度影响,菌悬液的浓度在使用过程中就是一个量变过程,所以菌液浓度应控制在 10^7 左右,每次试验菌层浓度应相同,且重复性试验尽量短时连续做。

最低抑菌浓度检测直接将样品加乳化剂制成乳液,采用试管等比稀释,并用培养基稀释法测定。此方法操作简单,无有机溶液干扰,且重复性好。

综上所述,该方法操作简便,较稳定。枫香脂中挥发油具有较强和较广泛的抑菌作用,值得进一步研究开发利用。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 206.
- [2] 刘 驰, 徐全富, 何其敏, 等. 枫香树脂化学成分[J]. 有机化学研究简报, 1991, 11(5): 508.
- [3] 李 蓓, 郭济贤. 枫香树属二种香树脂类生药—苏合香与枫香脂的研究概况[J]. 天然产物研究与开发, 1995, 7(3): 54-57.
- [4] 刘 虹, 沈美英, 何正洪. 枫香树脂化学成分研究[J]. 林产化学与工业, 1995, 15(3): 61-66.
- [5] 宋 晓, 曾 韬. 枫脂精油的化学组成[J]. 林产化学与工业, 2010, 30(5): 40-44.
- [6] 刘志林, 倪士峰, 刘 惠, 等. 枫香成分及其生物学活性研究进展[J]. 西北药学杂志, 2009, 24(6): 513-515.
- [7] 李 蓓, 邵以德, 郭济贤, 等. 枫香脂和苏合香的心血管药理学研究[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 11(5): 72-79.
- [8] 李建明, 王 政, 陈 川, 等. 枫香脂挥发油对大鼠离体胸主动脉的舒张作用[J]. 中成药, 2015, 37(8): 1659-1663.
- [9] 程再兴, 陈卫琳, 陈锡铨, 等. 枫香脂挥发油及乙酸乙酯部位对小鼠血管活性因子的影响[J]. 中国医药导报, 2011, 8(34): 37-39.
- [10] 朱 亮, 冷红文, 谭力伟, 等. 枫香脂及其挥发油抗血栓作用[J]. 中草药, 1990, 22(9): 404.
- [11] 曾臣红, 陈 冲, 陈久林, 等. 陈皮、枫香脂、没药、木香挥发油对人高转移卵巢癌细 HO-8910PM 体外增殖影响的研究[J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(3): 84-87.
- [12] 付守智, 钟朝辉, 杨 桑, 等. 枫香脂联合左旋甲状腺素片对分化型甲状腺癌患者术后促甲状腺素抑制治疗的疗效观察[J]. 中华普通外科杂志, 2014, 29(10): 787-790.
- [13] 王立青, 江荣高. 枫香树中对激活的 T-细胞核因子 κ B 抑制活性的齐墩果烷型三萜类化合物[J]. 国外医药: 植物药分册, 2005(3): 119.
- [14] 福田优子. 从胶皮枫香树球果中分离得到新的三萜化合物的结构及其抑癌作用[J]. 怡悦, 摘译. 国外医学: 中医中药分册, 2005(6): 370.
- [15] 尚艳双, 刘玉民, 刘亚敏, 等. 枫香叶精油对枇杷低温储藏的防腐保鲜效果[J]. 食品科学, 2014, 35(2): 266-268.
- [16] 刘玉民, 刘亚敏, 李鹏霞. 枫香叶精油抑菌活性及抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(11): 134-137.
- [17] 徐娜婷. 枫香叶挥发油化学成分、抑菌活性及其对枇杷的保鲜作用[D]. 重庆: 西南大学, 2013.
- [18] 高 琳, 傅 强, 黄 萍, 等. 黄芩抑菌效力生物检定法的研究[J]. 陕西中医, 2016, 37(12): 1676-1678.
- [19] 谢 梅, 徐春红, 胡正波, 等. 管碟法比较盐酸小檗碱和黄连药材对金黄色葡萄球菌的抑菌效力[J]. 中国药业, 2012, 21(19): 9-11.
- [20] 刘宏丁, 刘亚敏, 刘玉民, 等. 枫香叶丁醇提取物抑菌效果及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2015, 12(36): 87-90.

(收稿日期: 2019-05-09; 修回日期: 2019-07-13)