文章编号:1000-5404(2013)19-2077-04

论著

芳樟醇R-和S-对映异构单体的体外抗菌活性研究

胡小刚,陈剑鸿,夏培元,黄明春,冯 伟 (400038 重庆,第三军医大学西南医院药剂科)

[摘要] **目的** 研究芳樟醇R-和S-对映异构单体的体外抗菌活性。**方法** 采用琼脂稀释法和微量稀释法检测R-和S-芳樟醇的抗菌活性指标,包括MIC、MBC、B/I、抑菌曲线、半数抑制量(IC_{50})、杀菌曲线。**结果** R-和S-芳樟醇对金黄色葡萄球菌(ATCC29213、25923)、表皮葡萄球菌(ATCC12228、ATCC35984)、大肠杆菌(ATCC25922)均具有抗菌活性,敏感细菌的MIC值位于1.024 ~4.096 mg/mL,R-芳樟醇对部分细菌抗菌活性稍强于S-芳樟醇,两种构型芳樟醇B/I值均处于1 ~2范围内。而铜绿假单胞菌(ATCC27853)未检测出MIC值(MIC > 8.192 mg/mL)。R-芳樟醇对金黄色葡萄球菌(ATCC25923、ATCC29213)的IC_{50}小于S-芳樟醇($P < 0.05$)。两者的抗菌效应曲线均具有明显的时效和量效关系。**结论** R-和S-芳樟醇具有良好的抗菌活性,两者抗菌活性可能存在细微的差异。

[关键词] 芳樟醇;对应异构体;抗菌活性
[中图法分类号] R914.4; R965 [文献标志码] A

In vitro anti-bacterial activities of R- and S-linalool

Hu Xiaogang, Chen Jianhong, Xia Peiyuan, Huang Mingchun, Feng Wei (Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the *in vitro* antibacterial activities of R- and S-linalool. **Methods** The *in vitro* antibacterial activities were determined by agar-diffusion method and micro-dilution assay, including MIC, MBC, B/I, inhibition curves, IC_{50}, time-kill curves. **Results** R- and S-linalool inhibited the growth of bacteria, including strains of *S. aureus* (ATCC29213, ATCC25923), *S. epidermidis* (ATCC12228, ATCC35984), and *E. coli* (ATCC25922). All the MIC values of sensitive bacteria were between 1.024 and 4.096 mg/mL. The antibacterial activities of R-linalool were slightly better than those of S-linalool in terms of some bacteria. The ratio range of B/I was from 1 to 2. The MIC values of *P. aeruginosa* (ATCC27853) wasn't obtained (MIC >8.192 mg/mL). When linalool was used to inhibit *S. aureus* (ATCC29213, ATCC25923), the IC_{50} of R isomer was smaller than those of S isomer ($P < 0.05$). Effect curves of two isomers showed a dose- and time-dependent manner. **Conclusion** R- and S-linalool effectively inhibit the growth of bacteria. And the subtle difference may be present between them.

[**Key words**] R- and S-linalool; enantiomers; antibacterial activity

Supported by the Major Project of New Drugs Innovation of China (2011ZXJ09106-06B) and the National Natural Science Foundation of China (81273608, 30973493). Corresponding author: Chen Jianhong, Tel:86-23-68754463, E-mail: chenjh-110@263.net

芳樟醇属于链状含氧单萜衍生物的烯醇类物质,广泛分布于高等植物的腺体、油室和树脂道等分泌组织中,是植物挥发油的主要成分。工业上主要用于做香料或合成中间体,是医药、化妆品等行业的重要原料。

近年来研究表明,芳樟醇具有多种生物活性,包括消炎止痛作用[1-2]、肿瘤化疗增敏作用[3]、镇静抗焦虑作用[4]、驱避杀虫作用[5]等,具有重要的研究和应用价值。芳樟醇分子C3位上存在一个手性碳原子,使得其在构型上分为R-和S-两个对映异构体,菌不同的构型可能使化合物表现出不同的药理活性,目前的研究主要采用芳樟醇外消旋体进行,而关于其R-、S-单体抗菌作用的

[基金项目] 国家重大新药创制项目(2011ZXJ09106-06B);国家自然科学基金面上项目(81273608,30973493)
[通信作者] 陈剑鸿,电话:(023)68754463, E-mail:chenjh-110@263.net
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130903.1520.003.html(2013-09-03)

研究尚少见相关报道。本研究选取4类引起常见临床感染细菌的标准菌株作为供试菌，包括表皮葡萄球菌（ATCC12228、ATCC35984）、金黄色葡萄球（ATCC25923、ATCC29213）、铜绿假单胞菌（ATCC27853）、大肠杆菌（ATCC25922），采用琼脂稀释法和微量稀释法测定其抗菌活性，并进一步考察抑菌作用的量效变化情况及杀菌作用的时效变化情况。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株 表皮葡萄球菌（ATCC12228、ATCC35984）、金黄色葡萄球菌（ATCC25923、ATCC29213）、铜绿假单胞菌（ATCC27853）、大肠杆菌（ATCC25922）菌株均来源于 典型培养物集存中心（ATCC），由第三军医大学西南医院药剂科 -70 ℃冷冻保存。

1.1.2 实验试剂及材料 R-芳樟醇购于美国Sigma公司，纯度为95%；S-芳樟醇购于吉安市林科天然冰片厂，纯度为94%。MHA和MHB培养基购于北京陆桥技术有限责任公司；哥伦比亚血平板和营养琼脂平板购于重庆庞通医疗器械有限公司；一次性使用平板购于扬州市创新医疗器械厂；COSTAR 96孔酶标板购于美国Coring公司。

1.1.3 实验仪器 日本Sakuma公司MIP-P型多点接种仪；上海昕瑞仪器仪表厂WGZ-2-XJ型麦氏比浊仪；广东省医疗器械厂LRH-150-B型生化培养箱；美国Thermo Scientific公司全波长酶标仪。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌培养 细菌接种于哥伦比亚血平板上，37 ℃ 5% CO_2条件下培养24 h，活化的细菌挑于比浊管中，比浊仪检测，配成0.5麦氏浊度的菌液，细菌量浓度约为10^8 CFU/mL[6]。

1.2.2 琼脂稀释法测定物质的抗菌活性 将芳樟醇R-、S-对映异构单体，按照初始浓度8.192 mg/mL进行1∶1倍比稀释，制备成共计11个浓度梯度的含药平板，然后通过多点接种仪将供试菌接种于平板上，每1个浓度设置3个重复，助溶剂丙酮（终浓度≤0.5%）作为溶剂对照组，氨苄西林和妥布霉素作为阳性药物对照组。接种细菌的平板置于37 ℃ 5% CO_2条件下培养24 h，观察细菌生长情况，以抑制细菌生长的最小药物浓度作为MIC值。

1.2.3 微量稀释法测定物质的抗菌活性 将前述菌液稀释100倍后，分别接种于96孔板中，每孔50 μL，然后分别给予终浓度为24.576、8.192、4.096、2.048、1.024、0.512 mg/mL共计6个浓度梯度的芳樟醇R、S对映异构单体进行处理，体系的终体积为100 μL，助溶剂丙酮（终浓度≤0.5%），然后置于37 ℃ 5% CO_2条件下培养24 h，裸眼观察以抑制细菌生长的最小药物浓度作为MIC值，然后接种环沾取菌液接种于营养琼脂平板上，继续培养24 h后，观察细菌的生长情况，以不见细菌生长的最小药物浓度作为MBC值。

1.2.4 化合物浓度变化对细菌生长的影响 细菌处理和加样方法同1.2.3步骤，药物浓度设置为4.096 mg/mL及以下的2倍倍比稀释共计9个浓度，同时设置溶剂对照组和正常对照组，在细菌培养24 h后，酶标仪检测波长为600 nm下，测定各孔的OD值，每个实验组设置6个复孔。

1.2.5 化合物对细菌杀灭能力的考察 细菌处理和加样方法同1.2.3步骤，以大肠杆菌ATCC25922作为研究菌株，分别以4MBC的药物浓度处理，于不同时间点取样，涂布菌液于营养平板中，培养24 h后，进行菌落计数，每组设3个重复。

1.3 统计学分析

实验结果采用IBM SPSS Statistics 21.0进行统计分析；计量资料以$\bar{x} \pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐性事后检验采用Dunnett检验，方差不齐事后检验采用Games-Howell检验。IC_{50}采用GraphPad Prism 5软件进行计算；统计表和图均由Excel 2013软件制作完成。

2 结果

2.1 含药琼脂平板法测定抗菌活性

为了考察芳樟醇R-、S-对映异构单体的抗菌活性，采用琼脂稀释法测定化合物的MIC值，结果见图1。除对铜绿假单胞菌（ATCC27853）未检测出明确的抗菌活性外（MIC >8.192 mg/mL），R-和S-芳樟醇对其余的测试菌株均具有抗菌活性，MIC值均位于1.024 ~ 4.096 mg/mL的浓度范围；对金黄色葡萄球菌（ATCC25923、ATCC29213）、表皮葡萄球菌（ATCC12228）和大肠杆菌（ATCC25922）作用效果比较，R-芳樟醇抗菌活性稍强于S-芳樟醇。见表1。

表1 R-和S-芳樟醇及阳性药物MIC值

菌株	R-芳樟醇 (mg/mL)	S-芳樟醇 (mg/mL)	氨苄西林 (μg/mL)	妥布霉素 (μg/mL)
ATCC29213	2.048	4.096	4	0.5
ATCC25923	2.048	4.096	>256	0.25
ATCC12228	2.048	4.096	4	0.125
ATCC27853	> 8.192	>8.192	>256	0.5
ATCC35984	4.096	4.096	16	16
ATCC25922	1.024	4.096	8	1

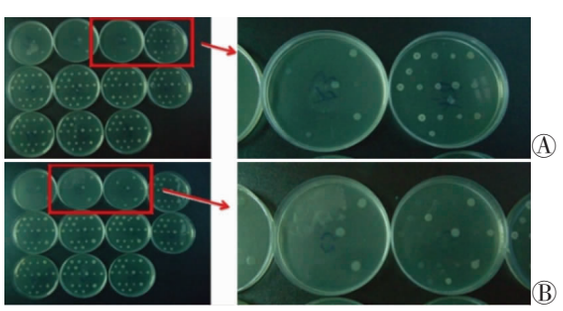


图1 R-(A)和S-芳樟醇(B)抗菌活性检测

2.2 微量稀释法测定抗菌活性

采用微量稀释法进一步验证R-和S-芳樟醇的抗菌活性，同时明确其杀菌能力。结果显示，此法中R-芳樟醇对大肠杆菌

的作用稍强于 S-芳樟醇;MIC 值均位于 1.024 ~ 4.096 mg/mL 的浓度范围内,此范围与前述琼脂平板法一致;所有的 MBC 数值≤8.192 mg/mL,B/I 值处于 1 ~ 2 的范围,提示化合物杀菌浓度和抑菌浓度相距较近。见表 2,图 2。

表 2 R-和 S-芳樟醇 MIC 和 MBC 值

菌株	R-芳樟醇			S-芳樟醇		
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	B/I	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	B/I
ATCC29213	4.096	8.192	2	4.096	8.192	2
ATCC25923	4.096	8.192	2	4.096	4.096	1
ATCC12228	4.096	8.192	2	4.096	4.096	1
ATCC35984	4.096	8.192	2	4.096	8.192	2
ATCC25922	1.024	2.048	2	2.048	2.048	1

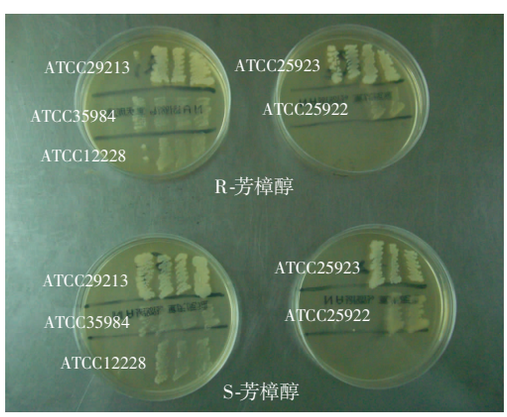


图 2 R-和 S-芳樟醇 MBC 测定结果

2.3 药物浓度对抑菌能力的影响

考察 R-和 S-芳樟醇抑菌能力随着浓度变化的情况,结果显示 MIC 浓度下的抑菌能力与 2.2 中的 MIC 测定结果相印证;随着药物浓度的降低,除 R-芳樟醇处理 ATCC25923 组外,其余各组中,1/2 MIC 及其以下浓度的剂量对细菌的抑制能力明显低于 MIC 组($P < 0.05$),呈现显著下降的量效趋势。见表 3。进一步计算半数抑制量(IC_{50}),结果显示 R-芳樟醇对金黄色葡萄球菌(ATCC25923、ATCC29213)的 IC_{50} 明显低于 S-芳樟醇处理组,提示两个对应异构体对这两种细菌抑制作用的下降趋势具有显著差异($P<0.05$)。见图 3。

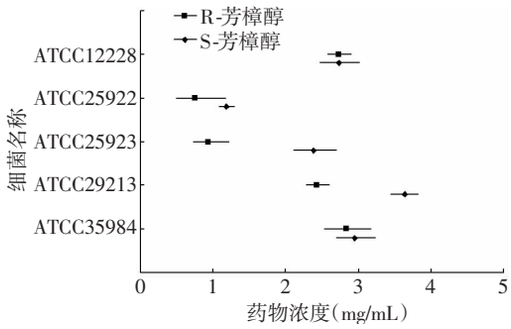


图 3 R-和 S-芳樟醇对各菌株的半数抑制量及 95%置信区间($n=6$)

2.4 杀菌效率测试

以大肠杆菌(ATCC25922)为考察菌株,分别以 4 倍 MBC 浓度的 R-和 S-芳樟醇处理细菌,结果显示 R-和 S-芳樟醇均能在 2 min 内对细菌进行有效杀灭,呈明显的时效关系。见图 4。

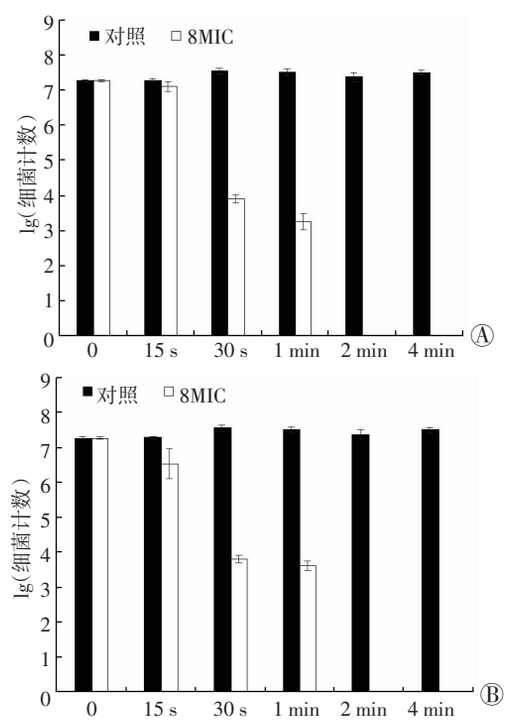


图 4 R-(A)和 S-芳樟醇(B)杀菌曲线($n=3$)

表 3 不同浓度的 R-和 S-芳樟醇对各细菌生长的抑制作用($n=6$,%,$\bar{x} \pm s$)

菌株	R-芳樟醇(mg/mL)								
	4.096	2.048	1.024	0.512	0.256	0.128	0.064	0.032	0.016
ATCC29213	92.05 ± 2.54	30.82 ± 9.43[a]	−0.09 ± 7.76[a]	1.07 ± 7.02[a]	1.84 ± 9.09[a]	1.58 ± 7.93[a]	3.67 ± 7.50[a]	4.55 ± 5.95[a]	7.92 ± 4.32[a]
ATCC25923	96.39 ± 5.73	76.36 ± 18.42	41.26 ± 9.31[a]	17.17 ± 2.98[a]	23.46 ± 5.95[a]	21.55 ± 6.29[a]	21.10 ± 5.55[a]	18.85 ± 4.41[a]	11.71 ± 6.12[a]
ATCC12228	81.38 ± 2.88	25.54 ± 4.97[a]	6.75 ± 3.78[a]	−2.92 ± 6.58[a]	−3.29 ± 7.12[a]	−4.29 ± 4.78[a]	−1.52 ± 5.40[a]	−1.93 ± 3.93[a]	−0.14 ± 10.71[a]
ATCC35984	75.65 ± 6.82	25.64 ± 9.30[a]	10.54 ± 7.99[a]	15.99 ± 4.26[a]	20.98 ± 7.10[a]	19.40 ± 6.92[a]	15.40 ± 6.12[a]	10.93 ± 4.44[a]	7.54 ± 6.16[a]
ATCC25922	98.98 ± 1.20	97.82 ± 0.80	98.69 ± 0.69	0.49 ± 8.13[b]	−0.48 ± 9.76[b]	1.87 ± 7.32[b]	6.15 ± 5.54[b]	8.80 ± 7.32[b]	5.23 ± 8.73[b]
菌株	S-芳樟醇(mg/mL)								
	4.096	2.048	1.024	0.512	0.256	0.128	0.064	0.032	0.016
ATCC29213	56.99 ± 4.46	20.61 ± 2.43[a]	0.52 ± 2.00[a]	−0.94 ± 1.78[a]	0.40 ± 1.25[a]	3.18 ± 1.08[a]	5.67 ± 2.66[a]	4.54 ± 2.40[a]	6.94 ± 2.36[a]
ATCC25923	79.96 ± 4.07	39.69 ± 7.15[a]	12.17 ± 3.70[a]	0.57 ± 5.25[a]	8.77 ± 8.85[a]	11.51 ± 7.73[a]	18.66 ± 6.05[a]	10.79 ± 5.77[a]	8.86 ± 9.42[a]
ATCC12228	87.90 ± 1.58	19.62 ± 6.07[a]	6.12 ± 7.11[a]	0.49 ± 6.40[a]	2.80 ± 7.92[a]	7.29 ± 6.81[a]	13.11 ± 6.31[a]	15.39 ± 7.52[a]	16.15 ± 6.73[a]
ATCC35984	72.80 ± 2.80	22.22 ± 8.72[a]	14.42 ± 4.98[a]	8.90 ± 4.22[a]	3.35 ± 7.62[a]	−4.16 ± 4.06[a]	2.11 ± 3.16[a]	−5.42 ± 7.82[a]	−8.93 ± 7.63[a]
ATCC25922	100.08 ± 1.62	95.50 ± 1.98	30.88 ± 6.30[c]	20.97 ± 4.17[c]	8.07 ± 4.73[c]	3.54 ± 4.88[c]	7.50 ± 7.44[c]	7.19 ± 5.92[c]	10.56 ± 7.03[c]

a:$P<0.05$,与 4.096 mg/mL 比较;b:$P<0.05$,与 1.024 mg/mL 比较;c:$P<0.05$,与 2.048 mg/mL 比较

3 讨论

单萜类化合物芳樟醇又名沉香醇,通常为植物来源性挥发油的重要组成部分,有的植物挥发油中芳樟醇的含量甚至高达90%以上[7]。许多单萜类化合物或挥发油成分均被认为具有抗菌活性[8],芳樟醇亦被报道对口腔龋齿相关细菌具有较好的抗菌活性[9]。本课题组前期研究亦发现含芳樟醇的挥发油对革兰阳性菌及革兰阴性菌均具有明显的抗菌活性[10]。本研究以芳樟醇的R-和S-构型单体化合物作为研究对象,选取多种标准菌株作为研究模型,评价芳樟醇R-和S-构型单体的抗菌能力。

琼脂平板法表明除铜绿假单胞标准菌外,其余标准菌株均能被R-和S-构型的芳樟醇有效抑制。在琼脂平板法中R-芳樟醇对金黄色葡萄球菌(ATCC25923、ATCC29213)、表皮葡萄球菌(ATCC12228)和大肠杆菌(ATCC25922)的抑制能力稍好于S-芳樟醇,而在微量稀释法中只有大肠杆菌(ATCC25922)表现出了这种趋势,这种改变可能和检测方法不同有关。同时,R-芳樟醇对金黄色葡萄球菌(ATCC25923、ATCC29213)半数抑制能力亦稍好于S-芳樟醇,以上所有证据提示抗菌活性差异可能有物质结构的影响,这种影响已有类似报道[11],但此处的推测尚需进一步核实。在对所有敏感细菌的考察中,随着两种构型芳樟醇浓度的降低,细菌生长抑制效果也迅速降低,呈现良好的量效关系。杀菌曲线显示,两种构型的芳樟醇在4MBC浓度下,均能在2 min内将大肠杆菌(ATCC25922)有效杀灭,并呈现良好的时效关系,提示药物高效的杀菌能力。

国外有研究者考虑将芳樟醇制备为眼用清洗剂[12]和抗菌牙膏或者漱口水[9],这些研究均提示具有香味和抗菌作用的芳樟醇潜在的商业和研究应用价值。而对于芳樟醇抗菌作用方面的研究,目前主要有生物转化、制剂开发以及挥发油活性成分的研究等,其具体抗菌机制的研究却少见报道。而类似的萜类挥发油抗菌机制的研究主要从影响菌膜渗透性、膜电位等方面进行考察[13]。所以芳樟醇对映异构单体的抗菌作用机制的探讨尚待进一步研究。

综上所述,R-和S-芳樟醇均具有良好的抗菌活性,但抗菌活性方面可能存在细微的差异,本研究为芳樟醇单体化合物在相关领域的应用奠定了基础。然而其具体的抗菌作用机制以及手性中心的存在对抗菌机制是否产生影响等问题,却有待后续研究。

参考文献:

[1] Huo M, Cui X, Xue J, *et al*. Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model[J]. J Surg Res, 2013, 180(1): e47-e54.

[2] Batista P A, Werner M F, Oliveira E C, *et al*. Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)-linalool in mice[J]. Neurosci Lett, 2008, 440(3): 299-303.

[3] Miyashita M, Sadzuka Y. Effect of linalool as a component of Humulus lupulus on doxorubicin-induced antitumor activity[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 53: 174-179.

[4] Linck V M, da-Silva A L, Figueiro M, *et al*. Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice[J]. Phytomedicine, 2010, 17(8/9): 679-683.

[5] de-Oliveira-Souza-Senra T, Zeringota V, de-Oliveira-Monteiro C M, *et al*. Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (E)-cinnamaldehyde, trans-anethole, and linalool on larvae of Rhipicephalus microplus and Dermacentor nitens (Acari: Ixodidae)[J]. Parasitol Res, 2013, 112(4): 1461-1416.

[6] Fratianni F, Coppola R, Nazzaro F. Phenolic composition and antimicrobial and antiquorum sensing activity of an ethanolic extract of peels from the apple cultivar Annurca[J]. J Med Food, 2011, 14(9): 957-963.

[7] Queiroga C L, Duarte M C, Ribeiro B B, *et al*. Linalool production from the leaves of Bursera aloexylon and its antimicrobial activity[J]. Fitoterapia, 2007, 78(4): 327-328.

[8] Sokovic M, Glamoclija J, Marin P D, *et al*. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model[J]. Molecules, 2010, 15(11): 7532-7546.

[9] Park S N, Lim Y K, Freire M O, *et al*. Antimicrobial effect of linalool and alpha-terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria[J]. Anaerobe, 2012, 18(3): 369-372.

[10] Cai Y, Hu X, Huang M, *et al*. Characterization of the antibacterial activity and the chemical components of the volatile oil of the leaves of Rubus parvifolius L[J]. Molecules, 2012, 17(7): 7758-7768.

[11] de-Sousa D P, Nobrega F F, Santos C C, *et al*. Anticonvulsant activity of the linalool enantiomers and racemate: investigation of chiral influence[J]. Nat Prod Commun, 2010, 5(12): 1847-1851.

[12] Gilbard J P, Douyon Y, Huson R B. Time-kill assay results for a linalool-hinokitiol-based eyelid cleanser for lid hygiene[J]. Cornea, 2010, 29(5): 559-563.

[13] Xu J, Zhou F, Ji B P, *et al*. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against Escherichia coli[J]. Lett Appl Microbiol, 2008, 47(3): 174-179.

(**收稿**:2013-04-15;**修回**:2013-07-15)

(编辑 邓强庭)