

阳荷提取物体外抗菌作用研究

马建苹*, 胡志明, 张云丁, 赵虎彪

(兰州理工大学生命科学与工程学院, 兰州 730050)

[摘要] **目的:**研究姜科姜属植物阳荷根茎乙醇提取物的体外抗菌活性。**方法:**运用乙醇渗漉法提取得到阳荷总提取物,依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取,得到不同极性部位;用滤纸片法对乙醇提取物及各萃取物进行体外抗菌活性测定,有抑菌作用的萃取物进一步用微量肉汤稀释法测定其最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)。**结果:**阳荷根茎乙醇提取物、石油醚和氯仿萃取物具有抑制金黄色葡萄球菌等3种革兰阳性菌和大肠埃希菌等3种革兰阴性菌生长繁殖的活性, MIC 值在 $312.5 \sim 1\,250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。总提取物对地衣芽孢杆菌、无乳链球菌和大肠埃希菌的 MBC 均为 $1\,250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;石油醚和氯仿萃取物对6种测试菌株均有杀灭作用, MBC 值在 $625 \sim 1\,250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。**结论:**阳荷根茎乙醇提取物及石油醚和氯仿萃取物能显著抑制金黄色葡萄球菌、地衣芽孢杆菌、无乳链球菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌的生长繁殖,具有明显的灭活作用。

[关键词] 姜科; 阳荷; 根茎; 抗菌作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0206-04

Experimental Study on *in vitro* Antibacterial Effect of Extract from *Rhizoma Zingiber striolatum*

MA Jian-ping*, HU Zhi-ming, ZHANG Yun-ding, ZHAO Hu-biao

(College of Life Science and Technology, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] **Objective:** To study *in vitro* bacteriostasis of ethanol extract from the rhizomes of *Zingiber striolatum* Diels. **Method:** The rhizomes were percolated with ethanol and then the residue was sequentially extracted with petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and n-butanol after reduce-pressure distillation. The ethanol extract and various polar fractions were screened for *in vitro* antibacterial activities by disc-diffusion method. The minimum inhibition concentrations (MICs) and minimum bacteriocidal concentrations (MBCs) were further determined for active polar fractions by broth microdilution method. **Result:** The crude ethanol extract (CEE), petroleum ether-and chloroform soluble-parts (PE and CE, resp.) inhibited growth of Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus licheniformis* and *Streptococcus agalactiae*) and Gram-negative (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* and *Pseudomonas aeruginosa*) with MICs ranging from $312.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ to $1\,250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The MBCs of CEE against *B. licheniformis*, *S. agalactiae* and *E. coli* were $1\,250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, while those of PE and CE against all the test strains varied from $625 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ to $1\,250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion:** The CEE, PE and CE from the rhizomes of *Z. striolatum* possess antibacterial and bacteriocidal activities against *S. aureus*, *B. licheniformis*, *S. agalactiae*, *E. coli*, *K. pneumonia* and *P. aeruginosa*.

[Key words] Zingiberaceae; *Zingiber striolatum*; rhizoma; bacteriostasis

阳荷 (*Zingiber striolatum* Diels), 是姜科姜属多年生草本植物, 俗称野姜、猴姜、瓣姜、嘉草、芋渠、

山姜、野老姜、土里开花、莲花姜等, 是一种营养价值很高的药食同源的膳食纤维蔬菜, 富含蛋白质、

[收稿日期] 20120109 (018)

[基金项目] 甘肃省自然科学基金 (1107RJZA129); 兰州理工大学博士基金 (BS08201001)

[通讯作者] * 马建苹, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事天然药物资源的研究与开发, Tel: 0931-2976703, E-mail: majp@fudan.edu.cn

氨基酸、维生素、糖类、有机酸、矿物质元素等^[1]。目前,阳荷作为营养性蔬菜,在其食用价值和栽培技术方面多有研究报道。其实,作为姜科姜属植物家族中的一员,阳荷还具有很高的药用价值,常用于治疗咳嗽、小儿百日咳等疾病,具有活血调经、镇咳去痰、消肿解毒、消积健胃等功效^[2]。郝南明等^[3]从阳荷花苞的乙醇提取物中分离得到 β -谷甾醇、胡萝卜苷和蔗糖3个化合物,但关于阳荷根茎化学成分和药理活性的研究少有文献报道^[4-5]。为充分挖掘我国特有资源的价值,本实验以素有“阳荷之乡”的云南西畴生产的阳荷为试材,研究其根茎乙醇提取物的体外抗菌活性,并对其乙醇提取物进行萃取分离,筛选出抗菌活性部位后,进一步测定其最低抑菌浓度和最低杀菌浓度,为阳荷中抗菌活性成分的进一步分离及其综合利用奠定理论基础。

1 材料

1.1 药物 本实验所用材料采集于云南省文山州西畴县,经复旦大学药学院康云博士鉴定为阳荷(*Zingiber striolatum* Diels),洗净,60℃干燥,粉碎,过60目筛备用。

1.2 试剂 牛肉膏、蛋白胨、琼脂(Br,均为北京奥博星生物技术有限责任公司),NaCl、NaOH、乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和二甲基亚砜(DMSO)均为分析纯(天津市百世化工有限公司);精密pH试纸(上海试剂三厂)。

1.3 仪器 恒温振荡培养箱(HZQ-F160A,上海民仪电子有限公司),实验型高压灭菌器(SY36DW,上海顺仪实验设备有限公司),麦氏比浊管(81M294477,上海申源科技有限公司),旋转蒸发器(RE-5299,上海亚荣仪器有限公司),电子天平(AE100 S/0.1 mg,梅特勒托利多上海仪器有限公司),超净工作台(VS-1300U,上海合恒仪器设备有限公司)。

1.4 菌株 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC25923)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis* GSICC30205)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae* 5132)、大肠埃希菌(*Escherichia coli* ATCC25922)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae* 219)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* 109)由兰州理工大学实验中心提供保存。

2 方法

2.1 阳荷根茎乙醇提取物及不同极性萃取物的制备 粉碎的阳荷根茎(1.3 kg)用乙醇渗漉提取,减压回收溶剂得到乙醇提取物(144.0 g),该提取物经

水混悬,依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取,有机相减压回收溶剂,水相冷冻干燥,分别得到石油醚(29.2 g)、氯仿(11.1 g)、乙酸乙酯(5.6 g)、正丁醇(6.9 g)和水萃取物(29.2 g)。

2.2 药物原液的配制

2.2.1 抗菌作用初筛样品 分别精密称取阳荷根茎乙醇提取物及各萃取物100.0 mg和50.0 mg,用DMSO溶解药物,配制成浓度为100,50 g·L⁻¹的高、低质量浓度药物原液,备用。

2.2.2 测定MIC样品 分别精密称取具有抗菌作用的样品10.0 mg,加入800 μ L DMSO,加1~2滴聚氧乙烯山梨糖醇酐单油磷酸酯(吐温-80),药物完全溶解后,加入1 200 μ L MH液体培养基,得到初始质量浓度为5 g·L⁻¹的药物原液,备用。

2.3 培养基的制备

2.3.1 滤纸片法^[6-7] 量取1 000 mL蒸馏水,加入牛肉膏3.0 g,蛋白胨10.0 g,NaCl 5.0 g,琼脂15 g,加热溶解后,用精密pH试纸测定pH,再用0.1 mol·L⁻¹ NaOH溶液调节pH为7.2~7.4,煮沸10 min,过滤分装,103.43 kPa和121℃高温高压灭菌20 min,4℃冷藏,备用。

2.3.2 微量稀释法^[8-9] 培养基配方中不含琼脂,其余与滤纸片法相同。

2.4 菌种活化与菌悬液制备 取测试菌株接种于已灭菌的MH液体培养基中,37℃培养4~5 h后,用MH液体培养基制备菌悬液,将含菌培养基与麦氏比浊管比较,使菌液密度为 1.5×10^8 CFU·mL⁻¹,备用。

2.5 抗菌活性测定(滤纸片法) 将滤纸片(直径6 mm)分别在药物原液、阳性对照溶液(链霉素)和空白对照溶液中浸渍后取出,每张纸片含待测药物或链霉素(SM)分别为1 mg(低浓度组为0.5 mg)和10 μ g,空白对照为DMSO。取0.1 mL菌液,均匀涂布整块MH琼脂培养基表面,室温放置3~5 min后,贴加含药纸片,置入37℃恒温恒湿箱培养18~24 h,测定其纸片周围抑菌圈直径的大小,每个样品重复测定3次。

2.6 MIC测定 在96孔板每孔加入100 μ L MH液体培养基,将50 μ L药物(5 g·L⁻¹)按二倍稀释法稀释成系列浓度,然后加入50 μ L菌液,混匀,在37℃孵箱培养18~24 h,加入40 μ L 0.2 g·L⁻¹的碘硝基四唑紫(*p*-iodonitrotetrazolium violet, INT),以微孔中是否出现紫色来检查有无细菌生长,以不显示紫色微孔的终浓度为最低抑菌浓度^[10],每个

样品重复测定 3 次。空白、阳性对照分别为含有 10% DMSO 的 MH 液体培养基和 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的链霉素水溶液。

3 结果与分析

3.1 总提取物和各萃取物的抗菌作用 本实验选择 2 种革兰阳性菌(金黄色葡萄球菌、地衣芽孢杆菌)和 3 种革兰阴性菌(大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌),对阳荷根茎的乙醇提取物(CEE)及石油醚(PE)、氯仿(CE)、乙酸乙酯(EE)、正丁醇(BE)和水萃取物(WE)进行体外抗菌作用的实验研究,抗菌结果见表 1。空白对照不产生抑菌圈,阳荷根茎总提取物及石油醚和氯仿萃取物能显著抑制 5 种测试菌株的生长繁殖,形成抑菌圈;浓度越大抑菌圈直径越大。乙酸乙酯萃取物只对肺炎克雷伯菌有较弱的抗菌效果(高、低浓度对应的

抑菌圈直径分别为 8.3 mm 和 7.7 mm),正丁醇和水萃取物没有抗菌作用。

3.2 MIC 的测定 乙醇提取物及石油醚和氯仿萃取物对 6 种菌株的最低抑菌浓度见表 2,乙醇提取物及石油醚和氯仿萃取物对金黄色葡萄球菌、地衣芽孢杆菌、无乳链球菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌都有显著的抑制作用。其中乙醇提取物对 6 种测试菌株的 MIC 分别为 1 250, 312.5, 625, 625, 1 250, 312.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,石油醚和氯仿萃取物对 6 种测试菌株的 MIC 均为 625 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。虽然肺炎克雷伯菌对乙酸乙酯萃取物在滤纸片法中表现出一定的敏感性,利用微量稀释法测定时,在测定浓度范围内(39.1 ~ 1 250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),乙酸乙酯萃取物对 6 种测试菌株没有抑制活性。

表 1 阳荷根茎乙醇提取物及各萃取物的抑菌圈直径($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	加药量/mg	金黄色葡萄球菌	地衣芽孢杆菌	大肠埃希菌	肺炎克雷伯菌	铜绿假单胞菌
CEE	1	14.2 ± 0.3 ¹⁾	12.0 ± 0.5 ¹⁾	14.3 ± 0.3 ¹⁾	15.7 ± 0.3 ¹⁾	12.2 ± 0.3 ¹⁾
	0.5	11.7 ± 0.3 ¹⁾	10.3 ± 0.3 ¹⁾	11.7 ± 0.8 ¹⁾	14.2 ± 0.3 ¹⁾	8.2 ± 0.3 ¹⁾
PE	1	32.2 ± 0.3 ¹⁾	30.2 ± 0.3 ¹⁾	41.7 ± 0.3 ¹⁾	32.3 ± 0.3 ¹⁾	28.3 ± 0.3 ¹⁾
	0.5	30.0 ± 0.5 ¹⁾	28.2 ± 0.3 ¹⁾	39.7 ± 0.3 ¹⁾	27.7 ± 0.3 ¹⁾	26.3 ± 0.3 ¹⁾
CE	1	26.3 ± 0.3 ¹⁾	20.2 ± 0.3 ¹⁾	28.3 ± 0.3 ¹⁾	16.3 ± 0.3 ¹⁾	17.7 ± 0.7 ¹⁾
	0.5	24.3 ± 0.3 ¹⁾	17.7 ± 0.3 ¹⁾	26.2 ± 0.3 ¹⁾	14.2 ± 0.3 ¹⁾	16.3 ± 0.3 ¹⁾
EE	1	-	-	-	8.3 ± 0.3 ¹⁾	-
	0.5	-	-	-	7.7 ± 0.3 ¹⁾	-

注: - 无抑菌作用;与空白对照组滤纸片直径 6 mm 比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 阳荷根茎乙醇提取物及各萃取物的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)

组别	金黄色葡萄球菌		地衣芽孢杆菌		无乳链球菌		大肠埃希菌		肺炎克雷伯菌		铜绿假单胞菌	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
CEE	1 250	-	312.5	1 250	625	1 250	625	1 250	1 250	-	312.5	-
PE	625	625	625	1 250	625	1 250	625	1 250	625	1 250	625	625
CE	625	625	625	1 250	625	1 250	625	625	625	1 250	625	1 250
EE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SM	6.25	6.25	6.25	6.25	25	25	0.78	0.78	25	50	3.13	6.25

注: SM 为链霉素; - : 测试浓度范围内没有抗菌和杀菌作用。

3.3 MBC 的测定 乙醇提取物及石油醚和氯仿萃取物对 6 种菌株的最低杀菌浓度见表 2。总提取物对地衣芽孢杆菌、无乳链球菌和大肠埃希菌的 MBC 均为 1 250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;石油醚萃取物对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的 MBC 均为 625 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,对其余 4 种测试菌株的 MBC 均为 1 250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;氯仿萃取物金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的 MBC 均为 625 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,对其余 4 种测试菌株的 MBC 均为

1 250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

4 讨论

本实验首次对阳荷根茎的乙醇提取物及石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水萃取物进行体外抗菌活性研究。实验结果表明阳荷根茎乙醇提取物具有抑制金黄色葡萄球菌、地衣芽孢杆菌、无乳链球菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌生长繁殖的作用,抗菌活性部位主要为石油醚和氯仿萃取物,

MIC 值介于 $312.5 \sim 1\ 250\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 提示其抗菌有效成分主要为脂溶性组分。总提取物及石油醚和氯仿萃取物不但对革兰阳性菌有显著的抑制作用,对革兰阴性菌也有明显的抑制效果,说明阳荷根茎乙醇提取物及石油醚和氯仿萃取物具有广谱的抗菌活性,因此,有必要深入研究其抗菌活性成分,以期开发出天然的植物源抗菌剂。

随着临床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,寻找新型的天然抗菌剂具有重要意义。近年来,人们不但重视阳荷的食用价值,而且也开始关注其不同部位的药用价值和进一步的开发利用。陈仕学等^[10]对梵净山野生阳荷果实中的红色素提取工艺进行了优化,同时研究了光照、温度、pH、糖类、防腐剂、氧化剂、还原剂以及金属离子对色素稳定性的影响。罗兴武等^[11]对产自湖北恩施的阳荷果实中蛋白质的提取工艺进行了优化,同时对阳荷中锌赋存状态进行研究。王丽娜等^[12]考察了阳荷根茎的安全性,为临床安全用药提供依据。本研究首次对阳荷根茎的乙醇提取物进行体外抗菌活性的研究,发现该提取物及石油醚和氯仿萃取物具有广谱的抗菌活性,提示阳荷根茎具有很好的开发利用价值。

[参考文献]

[1] 《云南植物志》编辑委员会. 云南植物志 [M]. 昆明:云南省科技出版社, 1997, 8:540.
[2] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1977.

[3] 郝南明, 赵保发, 胡国海, 等. 阳荷的化学成分的研究 [J]. 文山师范高等专科学校学报, 2004, 17 (4):379.
[4] 陆宇惠, 赵景云, 马克坚, 等. 阳荷根药材的生药学研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2009, 30 (11):51.
[5] 朱玉昌, 周大寨, 彭辉. 阳荷红色素的提取及稳定性研究 [J]. 食品科学, 2008, 29 (8):293.
[6] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 14th Informational Supplement M100-S14 [J]. Pennsylvania: Wayne, 2004.
[7] 李浩华, 章卫民, 高晓霞, 等. 白木香果皮提取物的抗菌活性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (7):100.
[8] Eloff J N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria [J]. Planta Medica, 1998, 64:711.
[9] 王秋红, 刘玉婕, 吕邵娃, 等. 线叶菊抗菌作用研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (22):134.
[10] 陈仕学, 郁建平. 梵净山野生阳荷红色素的提取及理化性质研究 [J]. 山地农业生物学报, 2010, 29 (5):432.
[11] 罗兴武, 周大寨, 朱玉昌, 等. 阳荷蛋白质提取工艺优化及锌赋存状态研究 [J]. 食品科学, 2010, 31 (2):98.
[12] 王丽娜, 郭世民, 高敏. 植物药阳荷根的急性毒性研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2010, 31 (12):64.

[责任编辑 聂淑琴]