

砂仁提取物的抗菌及抗氧化效应研究

唐建阳¹, 刘凤娇², 苏明星¹, 黄素芳¹, 陈菁瑛¹, 陈清西^{2*}

(1. 福建省农业科学研究院农业生物资源研究所, 福建 福州 350003;

2. 厦门大学 生命科学学院, 滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 以阳春砂仁(*Amomum villosum*)为原料, 经过研磨过筛, 超声浸提, 分级萃取, 得到砂仁粗提取物. 研究提取物的抑菌性和抗氧化性, 结果表明, 砂仁提取物对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)有不同程度的抑制作用. 1, 1-二苯基苦基苯肼(DPPH)实验显示, 砂仁提取物具有较强的抗氧化作用, 以乙酸乙酯层提取物的抗氧化效果最好, 质量浓度达到 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 导致 0.1 mmol/L DPPH 自由基下降到 13.99%, 其清除率为 86.01%.

关键词: 砂仁; 提取物; 抑菌; 抗氧化

中图分类号: Q 356.1

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2012)04-0789-04

砂仁(*Amomum villosum* Lour.)是姜科植物, 其花、果、根、茎、叶均可入药^[1]. 以广东省阳春县产的阳春砂仁最著名, 称为地道南药砂仁^[2]. 砂仁为历代常用中药, 因其药效可靠而著称. 《本草经疏》记载了有关的中医施治机理: “盖以风寒湿之邪, 多由脾胃而入, 脾主肌肉, 为邪所侵, 则腠理闭塞, 而寒热诸痹所从来矣, 辛温走散开发, 故能使风寒湿之邪从腠理而出”. 现代临床应用则更为广泛, 在治疗消化系统疾病、妇产科疾病、抗肿瘤等方面具有确切的医疗价值^[3-7]. 彭伟文^[8]观察了 8 味常见的姜科和豆科中药对亚油酸自动空气氧化的抑制作用结果, 研究表明中药砂仁醇提取物显示出较好的抗氧化性能. 陈永培等^[9]对集中导致腹泻的不同肠道杆菌作了体外抑菌和杀菌实验, 证明砂仁能抑制结肠类耶尔森菌和摩根变形杆菌的生长繁殖, 对福氏痢疾杆菌和肠毒型大肠杆菌无抑制作用. 我们在天然植物的酪氨酸酶抑制剂筛选中, 发现砂仁提取物除了对酪氨酸酶有显著抑制作用, 也对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)及肺

炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)有明显的抑制作用, 并且具有较强的抗氧化作用. 本文报道砂仁果实提取物的抗菌活性及抗氧化活性, 该研究对砂仁的药效及其开发应用提供理论依据, 具有重要的应用前景.

1 材料与方法

1.1 材料

砂仁果实样品取自福建长泰山重砂仁生产基地; 1, 1-二苯基苦基苯肼(DPPH)购自 SIGMA 化学公司. 其他试剂为国产分析纯试剂, 使用的蒸馏水为去离子重蒸水. 各菌株来自福建农业科学院研究院.

1.2 方法

1.2.1 样品制备

将砂仁样品研磨至粉末, 过 100 目大小的筛, 取 10 g 的样品加入 100 mL 80% (体积分数)乙醇, 超声 2 次, 每次 30 min, 待溶液冷却后过滤, 其余残渣加入不同比例乙醇溶液继续超声, 过滤后合并滤液, 在 50~60 $^{\circ}\text{C}$ 减压回收溶剂, 最后得到膏状提取物, 加入双蒸水使其全部溶解. 根据极性大小, 依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取浓缩后的乙醇提取物, 减压回收溶剂, 得到膏状提取物, 用少量的双蒸水溶解, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥, 得到粉末状固体, 称取收集, 备用.

1.2.2 砂仁提取物抑菌效果的测定

根据《分子克隆实验指南》配制培养基, 高压下蒸

收稿日期: 2011-11-16

基金项目: 福建省发改委项目(闽发改高技(2009)608号); 福建省科技公益专项(2009R10037-2, 2009R10037-3); 福建省科技平台项目(2008Y2003)

* 通信作者: chenqx@xmu.edu.cn

汽灭菌 20 min. 挑菌株划平板接种, 置于 37 °C 恒温箱中培养. 观察平板上的菌落, 挑取 1~2 个单菌落接种于 25 mL 液体培养基中, 于 37 °C 下 200 r/min 摇床培养, 待用. 在培养皿中倒入质量分数为 1.5% 琼脂的 LB 培养基, 打开盖子, 紫外光下照 10~15 min. 而后加入质量分数为 0.7% 琼脂的 LB 培养基, 同时混有 100 μL 菌液. 打孔后取 40 μL 效应物加入孔内, 在孔的上方滴入, 置 37 °C 恒温箱中培养, 隔夜观察结果, 实验重复 3 次.

1.2.3 测定提取物对 DPPH 自由基清除作用

在 1.87 mL 无水乙醇中加入 0.03 mL 不同浓度的效应物及 1 mL 醋酸缓冲液 (pH=5.5), 加入 0.1 mL 3 mmol/L DPPH, 立即混匀, 室温反应 30 min, 测 OD₅₁₇. 清除率 = (A_{加样} - A_{空白}) / A_{空白} × 100%.

2 结果

2.1 砂仁提取物抑菌研究

砂仁果实经过初步分离提取, 得到石油醚层、三氯甲烷层、乙酸乙酯层、正丁醇层和水层 5 个不同极性层的提取物. 结果表明, 砂仁各层的提取物均具有一定的抑菌效应, 抑菌效果因菌种不同而有所差异, 不同层提取物的抑菌效应也各不相同 (图 1). 其中, 石油醚层提取物质量浓度达 1.5 mg/mL 时对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和沙门氏菌有抑菌作用; 三氯甲烷层提取物质量浓度为 0.24 mg/mL 和水层提取物质量浓度为 1.50 mg/mL 均对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、沙门氏菌、铜绿假单胞菌和葡萄球菌有不同程度抑制作用; 乙

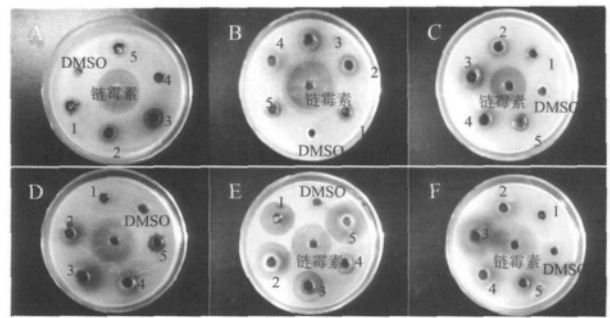


图 1 砂仁提取物对各菌株的抑制效果
A. 枯草芽孢杆菌; B. 大肠杆菌; C. 沙门氏菌; D. 铜绿假单胞菌; E. 葡萄球菌; F. 肺炎克雷伯菌. 标记: 1. 石油醚层提取物; 2. 三氯甲烷层提取物; 3. 乙酸乙酯层提取物; 4. 正丁醇层提取物; 5. 水层提取物.

图 1 砂仁提取物对各菌株的抑制效果

Fig. 1 Inhibition of different microorganism strains by the extract of *A. villosum*

酸乙酯层提取物质量浓度为 0.27 mg/mL 对各菌株都有一定程度的抑制作用; 正丁醇层提取物质量浓度为 0.075 mg/mL 对大肠杆菌和葡萄球菌有抑菌作用. 阴性对照二甲亚砷 (DMSO) 对试验菌没有抑制作用, 阳性对照链霉素对各菌株都有抑菌效果, 具体抑菌圈大小见表 1. 其中, 砂仁水层提取物对葡萄球菌的抑制效应 (抑菌圈直径为 3.2 cm) 尤为显著, 效果好于链霉素 (抑菌圈直径为 2.4 cm); 其他提取物的抑菌圈直径在 1.0~1.6 cm 之间.

2.2 砂仁提取物的抗氧化性

采用 DPPH 法测定砂仁各层提取物清除 DPPH 自由基的能力, 以 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚 (BHT)、特丁基对苯二酚 (TBHQ) 与维生素 C (Vc) 作为阳性对照, 质量浓度均为 50 μg/mL. 结果显示, 当砂仁石油

表 1 砂仁提取物对菌株的抑菌圈直径

Tab. 1 *A. villosum* extract on diameter of inhibition zone of strains

砂仁提取物	质量浓度/ (mg · mL ⁻¹)	抑制圈直径/cm					
		枯草芽孢杆菌	大肠杆菌	沙门氏菌	铜绿假单胞菌	葡萄球菌	肺炎克雷伯菌
DMSO	—	—	—	—	—	—	—
石油醚层提取物	1.50	—	1.0	1.0	—	1.6	—
三氯甲烷层提取物	0.24	1.2	1.2	1.4	1.0	2.4	—
乙酸乙酯层提取物	0.27	1.4	1.6	1.6	1.2	2.2	1.4
正丁醇层提取物	0.075	—	1.0	—	—	1.4	—
砂仁水层提取物	1.50	—	1.0	1.0	1.2	3.2	—
链霉素	0.001	2.8	3.2	2.8	2.2	2.4	2.0

醚层提取物质量浓度达到 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,导致 $0.1 \text{ mmol}/\text{L}$ DPPH 自由基下降到 11.25% 。砂仁三氯甲烷层提取物同样具有清除 DPPH 自由基的能力,当质量浓度达到 $60 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其清除 DPPH 自由基的能力与 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BHT 一样,总体比阳性对照略差;砂仁乙酸乙酯层提取物具有很强的清除 DPPH 自由基的能力,当质量浓度达到 $18 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,导致 $0.1 \text{ mmol}/\text{L}$ DPPH 自由基下降到 13.99% ,其清除率为 86.01% ,高于 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BHT、TBHQ 和 Vc 的清除能力(清除率分别为 69.95% , 73.53% , 82.28%);砂仁正丁醇提取物在 $0\sim 18 \mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内清除 DPPH 自由基的能力随着浓度的升高而增强,当质量浓度达到 $18 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对 DPPH 自由基的清除率为 75.29% 。砂仁水层提取物也具有一定的清除 DPPH 自由基的能力,当质量浓度达到 $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其清除 DPPH 自由基下降到 17.26% ,但单位质量浓度的清除率远低于砂仁其他层提取物,结果如图 2 所示。

从以上结果可以看出,砂仁各提取物都具有清除 DPPH 自由基的活性,促使 DPPH 自由基下降。砂仁各提取物清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 分别为:砂仁石油醚层提取物为 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$,砂仁三氯甲烷层提取物为 $41.5 \mu\text{g}/\text{mL}$,砂仁乙酸乙酯层提取物为 $7.5 \mu\text{g}/\text{mL}$,砂仁正丁醇层提取物为 $12.3 \mu\text{g}/\text{mL}$,砂仁水层提取物为 $290 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3 讨论

砂仁在中医药治疗胃肠道疾病中应用非常普遍,常用于湿阻中焦、脾胃气滞、脾胃虚寒和胎动不安^[6]。目前,尚未查到砂仁提取物的其他功效,前文我们报道了砂仁提取物对酪氨酸酶有很强的抑制作用^[10],阐明其抑制作用机理。本文进一步探讨此砂仁提取物的抑菌和抗氧化活性,这为砂仁的新功效的研究奠定了基础,具有重要的应用价值和理论意义。本研究砂仁提取物的抗菌结果显示,乙酸乙酯层对多种菌(枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、沙门氏菌、铜绿假单胞菌、葡萄球菌、肺炎克雷伯菌)的抑制作用最强,三氯甲烷层除了对肺炎克雷伯菌没有显著的抗菌作用外,对其他几种菌都有很好的抗菌效果。而石油醚层只对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、沙门氏菌有较强的抗菌作用,正丁醇层提取物的抗菌种类最少,只对大肠杆菌和葡萄球菌有一定的抗菌效果。总体而言,砂仁提取物对革兰氏阳性菌抑制效果与革兰氏阴性菌相当。

DPPH 是一种很稳定的氮中心的自由基^[11],本文采用 DPPH 法研究了砂仁各提取物清除 DPPH 自由基的活性。研究结果显示,砂仁各提取物都具有清除 DPPH 自由基的活性,各提取物对 DPPH 自由基的清除能力依次为:乙酸乙酯层提取物 > 正丁醇层提取物

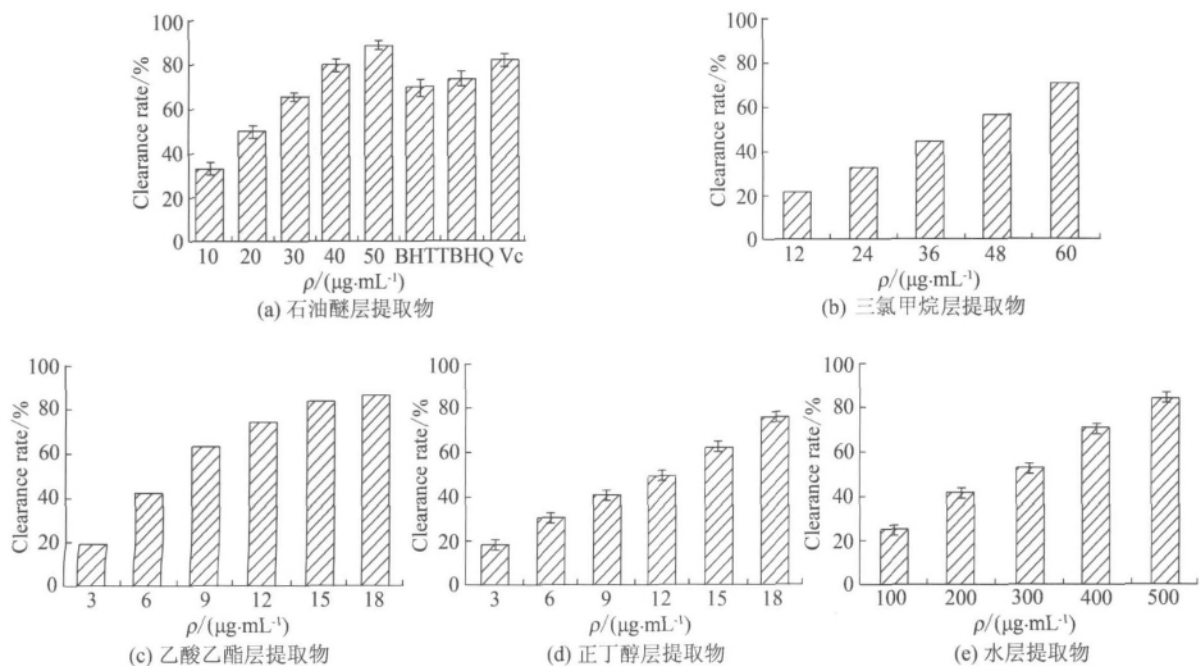


图 2 砂仁提取物对 DPPH 自由基的清除作用

Fig. 2 Scavenging effects of the extract of *A. villosum* on DPPH

>石油醚层提取物>三氯甲烷层提取物>水层提取物。本文研究结果显示,砂仁提取物具有广谱的抑菌效应和较强的抗氧化活性,说明砂仁中药用于治疗胃肠道疾病,可能与其具有广谱的抑菌作用有关。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京:化学工业出版社,2005:177.
- [2] 张丽霞,彭建,明马洁,等. 砂仁种质资源研究概况[J]. 时珍国医国药,2009,20(4):788-789.
- [3] 陈红,程再兴. 中药砂仁化学成分与质量标准研究概况[J]. 河南中医学院学报,2009,24(2):96-98.
- [4] 刘波,刘红斌,王京昆,等. 阳春砂仁药材质量标准研究[J]. 云南大学学报:自然科学版,2008,30(3):286-290.
- [5] 曾亚军,陈训,彭惠蓉. 砂仁及其常见混淆品分类鉴别[J]. 贵州科学,2005,23(3):60-64.
- [6] 陈彩英,詹若挺,王小平. 砂仁的药用文献研究与开发利用[J]. 新中医,2009(9):110-111.
- [7] Jafri M A, Farah, Javed K, et al. Evaluation of the gastric antiulcerogenic effect of large cardamom (fruits of *Amomum subulatum* Roxb)[J]. J Ethnopharmacol, 2001, 75:89-94.
- [8] 彭伟文,洪晖菁. 几种姜科和豆科类中药抗氧化性能的研究[J]. 时珍国药研究,1998,9(2):146.
- [9] 陈永培,黄哲元,金琪漾,等. 山姜与长泰砂仁的抑菌试验[J]. 福建中医药,1990,21(5):25-26.
- [10] 唐建阳,苏明星,刘凤娇,等. 砂仁提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制效应[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2012,51(2):258-262.
- [11] Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method [J]. LWT-Food Science and Technology, 1997,30(6):609-615.

Study on Antioxidant and Antimicrobial Effects of extract from *Amomum villosum*

TANG Jian-yang¹, LIU Feng-jiao², SU Ming-xing¹, HUANG Su-fang¹,
CHEN Jing-ying¹, CHEN Qing-xi^{2*}

(1. Agricultural Bioresource Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China ;
2. Key Laboratory of the Ministry of Education for Coastal and Wetland Ecosystems,
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The antimicrobial and antioxidant effects of extract from *Amomum villosum* Lour have been studied using the methods of sift through the grinding, ultrasonic extraction, hierarchical extraction to get villosum extract. The results showed that extract of *A. villosum* have different degrees of inhibition on *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. DPPH test showed that the extract had strong antioxidant. Extract of *A. villosum* ethyl acetate layer had the best antioxidant effects, and decreased the amount of DPPH (0.1 mmol/L) free radical to 13.99% when its concentration was 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$, clearance rate was 86.01%.

Key words: *Amomum villosum*; extract; antibacterial; antioxidant