

草豆蔻中黄酮和双苯庚酮的抑菌活性

黄文哲¹, 戴小军², 刘延庆², 张朝凤¹, 张勉¹, 王峥涛^{1,3}

(1. 中国药科大学, 江苏南京 210038; 2. 扬州大学, 江苏扬州 225009;

3. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203)

摘要: 以两倍稀释法测定了草豆蔻(*Alpinia katsumadai* Hayata)种子中4种黄酮和双苯庚酮类化合物的抑菌效果。结果表明,反,反-1,7-二苯基-4,6-庚二烯-3-酮和山姜素对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)的最低抑菌浓度(MIC)达到 $1.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,与阳性药相比对幽门螺杆菌具有较强的抑菌活性;豆蔻明和乔松素对幽门螺杆菌的MIC分别为2.56和0.32 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。反,反-1,7-二苯基-4,6-庚二烯-3-酮和豆蔻明对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* Rosenbach)、表皮葡萄球菌[*S. epidermidis* (Winslow et Winshlow) Evans]、大肠杆菌[*Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers]等菌株的MIC分别为0.208~1.667和0.122~1.955 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,与阳性药相比具有较强的抑菌活性。乔松素和山姜素对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠杆菌等菌株的MIC分别为1.275~2.550和1.925~3.850 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,也有一定的抑菌作用。豆蔻明、乔松素、反,反-1,7-二苯基-4,6-庚二烯-3-酮和山姜素是草豆蔻的抑菌活性成分。

关键词: 豆蔻明;乔松素;反,反-1,7-二苯基-4,6-庚二烯-3-酮;山姜素;幽门螺杆菌;抑菌活性

中图分类号: Q949.71+8.33; Q946.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2006)01-0037-04

Studies on antibacterial activity of flavonoids and diarylheptanoids from *Alpinia katsumadai*
HUANG Wen-zhe¹, DAI Xiao-jun², LIU Yan-qing², ZHANG Chao-feng¹, ZHANG Mian¹, WANG Zheng-tao^{1,3} (1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China; 2. Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 3. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2006, 15(1): 37-40

Abstract: The antibacterial activity of four compounds of flavonoids and diarylheptanoids from *Alpinia katsumadai* Hayata were studied by the tube double dilution method. The results indicated that the minimal inhibitory concentration (MIC) of trans,trans-1,7-diphenyl-4,6-heptadien-3-one and alpinetin against *Helicobacter pylori* reached to $1.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, which showed strong effects of antibacterial activity. MIC of cardamomin and pinocembrin against *H. pylori* were 2.56 and 0.32 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively. The MIC of trans,trans-1,7-diphenyl-4,6-heptadien-3-one and cardamomin against *Staphylococcus aureus* Rosenbach, *S. epidermidis* (Winslow et Winshlow) Evans, *Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers, etc. reached to 0.208-1.667 and 0.122-1.955 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively, which showed strong effects of antibacterial activity, and that of pinocembrin and alpinetin against *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, etc. reached to 1.275-2.550 and 1.925-3.850 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively. It is concluded that cardamomin, pinocembrin, trans,trans-1,7-diphenyl-4,6-heptadien-3-one and alpinetin were the antibacterial activity components of *Alpinia katsumadai* seeds.

Key words: cardamomin; pinocembrin; trans,trans-1,7-diphenyl-4,6-heptadien-3-one; alpinetin; *Helicobacter pylori*; antibacterial activity

草豆蔻(*Alpinia katsumadai* Hayata)是姜科(Zingiberaceae)山姜属(*Alpinia* Roxb.)植物,其干燥近成熟种子为较常用中药,主产于海南、广东、广西等地,资源丰富。传统中医药理论认为,草豆蔻主要用于寒湿内阻、脾胃虚弱、噎气呕逆、不思饮食等症。草豆蔻中主要含有黄酮、双苯庚烷、二苯乙烯及萜类

化合物^[1-7]。近年来,该属植物的化学和药理等方面的研究越来越多。日本学者研究表明^[1,2],草豆

收稿日期: 2005-08-09

作者简介: 黄文哲(1968-),女,江苏苏州人,硕士,副研究员,研究方向为生药的活性成分及质量标准研究。

蔻中的双苯庚酮类化合物为镇吐止呕的有效成分;现代药理学研究认为草豆蔻对治疗胃炎胃溃疡等症有较好的作用,而最近研究表明导致胃炎胃溃疡病症的罪魁祸首为幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*),它是人类慢性活动性胃炎及胃、十二指肠溃疡的重要病原菌。由于草豆蔻的水提物对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* Rosenbach)等具有显著的抑菌活性^[8-11],因此,为了确定草豆蔻治疗胃部疾患的活性成分,对草豆蔻中含量较高的黄酮及双苯庚酮类化合物,即豆蔻明、乔松素、反,反-1,7-二苯基-4,6-庚二烯-3-酮和山姜素对幽门螺杆菌的抑菌活性进行了研究,同时,就体外抑制金黄色葡萄球菌等 18 个菌株的活性也进行了探讨,以期为更深入细致的活性成分筛选提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

抑菌药物:豆蔻明、乔松素、反,反-1,7-二苯基-4,6-庚二烯-3-酮和山姜素为从草豆蔻中提取分离得到的单体,纯度均为 95% 以上。甲硝唑为抑制幽门螺杆菌实验的阳性对照品,大黄素为抑制金黄色葡萄球菌等的阳性对照品^[12]。

1.2 菌种

幽门螺杆菌标准菌株:NCTC11637 购于中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,NCTC11638、26695 由上海第二医科大学郭晓奎教授惠赠;幽门螺杆菌临床菌株:将江苏石油勘探局职工总医院胃镜室提供的慢性浅表性胃炎病人、胃溃疡病人、胃癌病人胃粘膜活检标本直接接种在脑心浸液血液琼脂平板上,经过微氧环境培养,分离出幽门螺杆菌菌落,经观察菌落及细菌形态和尿素酶、触酶、氧化酶试验,确定为幽门螺杆菌,依次编号为 L1、L2 和 L3,保存备用。

幽门螺杆菌质控菌株:用 NCTC11637 (甲硝唑的最低抑菌浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 作为标准的幽门螺杆菌质控菌株。

革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌临床分离株 18 株,3 株质控菌株;金黄色葡萄球菌 ATCC25923,大肠杆菌 ATCC25922,绿脓杆菌 ATCC27853 均由中国药科大学微生物教研室保存。

1.3 培养基及培养条件

幽门螺杆菌的培养条件及培养基:采用脑心浸液血液琼脂(含 8% ~ 10% 的脱纤维羊血、万古霉素、两性霉素、TMP、多粘菌素 B)培养基,pH 7.2。抽气换气法形成微氧环境(N_2 85%, CO_2 10%, O_2 5%),置 37℃ 恒温培养箱培养。脑心浸液血液琼脂培养基为美国 Becton Dickinson 产品。

金黄色葡萄球菌等的培养基:采用水解酪蛋白胨琼脂(MH)培养基。水解酪蛋白胨琼脂(MH 肉汤)为北京三药科技开发公司生产。

1.4 实验方法^[13]

1.4.1 样品平板的制备 精密称取各抑菌化合物和对照品适量,置无菌试管中,用适量 1% DMSO 溶解,无菌水混悬定容,按系列进行倍比稀释,使各受试化合物和对照品形成系列起始浓度。

用幽门螺杆菌培养基和 MH 培养基分别将上述各样液进行倍比稀释为一定的终浓度,制备成含不同浓度供试化合物的琼脂平皿。同时以不含供试化合物的培养基作为对照。

1.4.2 幽门螺杆菌的抑菌实验 将菌株在幽门螺杆菌培养基平板上传种 3 次以保证其纯度及活力。将 72 h 菌龄的菌株用生理盐水洗下,稀释成 $10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 菌液,取 $1 \mu\text{L}$ 菌液涂布于已制备好的平皿上,每一菌株重复 3 块平皿。其中,含甲硝唑琼脂的平皿只涂布 NCTC11637 菌株。于 37℃ 微需氧环境下培养 3 d。观察细菌生长情况,以不出现菌落的平皿上的最低化合物浓度为最低抑菌浓度(MIC)。

1.4.3 金黄色葡萄球菌等的抑菌实验 将各菌接种到 MH 培养基上,37℃ 培养过夜,用 MH 培养液进行适当稀释,菌液浓度为 $10^7 \sim 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ (用麦氏比浊管控制菌量)。用多点接种仪将各菌液点种于已制备好的平板上,每点最终接种菌量 $10^4 \sim 10^5 \text{ cfu}$ 。37℃ 培养 16 ~ 18 h,观察并记录各菌的 MIC 值。

2 结果和分析

2.1 黄酮和双苯庚酮类化合物对幽门螺杆菌的抑菌作用

黄酮和双苯庚酮类化合物对不同幽门螺杆菌菌株的抑菌作用结果见表 1。甲硝唑对 NCTC11637 菌

株的MIC为 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，空白对照组6种菌株均生长良好。与阳性对照品甲硝唑相比，草豆蔻中的4个化合物对所测试的幽门螺杆菌均有不同程度的抑菌活性，其中的双苯庚酮类化合物反，反-1,7-二苯基-4,6-庚二烯-3-酮和二氢黄酮类化合物山姜素的MIC达到了 $1.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，其抑菌效果与阳性对照品相当，较豆蔻明和乔松素的抑菌效果为好。豆蔻明和乔松素对幽门螺杆菌的MIC分别为 2.56 和 $0.32 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，也具有一定程度的抑菌作用。

2.2 黄酮和双苯庚酮类化合物对金黄色葡萄球菌等的抑菌作用

黄酮和双苯庚酮类化合物对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌[*Staphylococcus epidermidis* (Winslow et Winshlow) Evans]、大肠杆菌[*Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers]等菌株的抑菌活性见表2。金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌为革兰氏阳性菌，其余均为革兰氏阴性菌。筛选结果表明，与阳性对照物大黄素相比，草豆蔻中的4个化合物在所测试的浓度范围内对各菌株均有较好的抑菌活性。其中反，反-1,7-二苯基-4,6-庚二烯-3-酮对18个菌株的抑菌效果较其他3个化合物为好，抑菌浓度在 $0.208 \sim 1.667 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间，对洋葱

假单胞菌(*Pseudomonas cepacia* Burkholder)的抑菌活性最强。豆蔻明的抑菌效果也比较好，抑菌浓度在 $0.122 \sim 1.955 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间。这2个化合物对菌株的抑菌活性均强于阳性对照品大黄素。二氢黄酮类化合物乔松素和山姜素的抑菌活性则相对较弱，抑菌浓度分别在 $1.275 \sim 2.550 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1.925 \sim 3.850 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间，其中乔松素的抑菌活性与阳性对照品大黄素相当。

表1 草豆蔻中黄酮和双苯庚酮类化合物对幽门螺杆菌的最低抑菌浓度(MIC)¹⁾
Table 1 The minimal inhibitory concentrations (MIC) of flavonoids and diarylheptanoids from *Alpinia katumadai* Hayata against *Helicobacter pylori*¹⁾

供试菌株 Strain	最低抑菌浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MIC				
	M	C	P	T	A
NCTC11637	1.00	2 560	640	1.25	2.50
NCTC11638		2 560	320	1.25	1.25
26695		2 560	320	2.50	2.50
L1		2 560	320	1.25	2.50
L2		>2 560	320	2.50	2.50
L3		2 560	320	2.50	2.50

¹⁾ NCTC11637, NCTC11638 和 26695 是幽门螺杆菌标准菌株 NCTC11637, NCTC11638 and 26695 represent standard strains of *Helicobacter pylori*; L1, L2 和 L3 是幽门螺杆菌临床菌株 L1, L2 and L3 represent clinical strains of *Helicobacter pylori*. M: Metronidazole; C: Cardamomin; P: Pinocebrin; T: Trans, trans-1,7-diphenyl-4,6-heptadien-3-one; A: Alpinetin.

表2 草豆蔻中黄酮和双苯庚酮类化合物的最低抑菌浓度(MIC)
Table 2 The minimal inhibitory concentrations (MIC) of flavonoids and diarylheptanoids from *Alpinia katumadai* Hayata

供试菌株 Strain	最低抑菌浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MIC				
	Emodin	Cardamomin	Pinocebrin	Trans, trans-1,7-diphenyl-4,6-heptadien-3-one	Alpinetin
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	>2.500	0.975	>2.550	0.417	>3.850
表皮葡萄球菌1 <i>Staphylococcus epidermidis</i> 1	>2.500	1.950	2.550	0.417	>3.850
表皮葡萄球菌2 <i>Staphylococcus epidermidis</i> 2	>2.500	0.975	>2.550	0.417	>3.850
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	>2.500	>1.950	>2.550	1.667	>3.850
伤寒杆菌1 <i>Salmonella typhi</i> 1	2.500	1.950	2.550	0.833	3.850
伤寒杆菌2 <i>Salmonella typhi</i> 2	>2.500	1.955	2.550	0.833	3.850
肺炎克雷伯氏菌1 <i>Klebsiella penumoniae</i> 1	>2.500	1.950	2.550	1.667	3.850
肺炎克雷伯氏菌2 <i>Klebsiella penumoniae</i> 2	2.500	1.950	2.550	1.667	3.850
绿脓杆菌1 <i>Pseudomonas pyocyanea</i> 1	2.500	1.950	2.550	1.667	3.850
绿脓杆菌2 <i>Pseudomonas pyocyanea</i> 2	2.500	0.975	1.275	1.667	3.850
产气杆菌1 <i>Enterobacter aerogenes</i> 1	2.500	1.950	2.550	1.667	3.850
产气杆菌2 <i>Enterobacter aerogenes</i> 2	2.500	1.950	2.550	1.667	3.850
嗜麦芽假单胞菌1 <i>Pseudomonas maltophilia</i> 1	2.500	1.950	1.275	0.833	3.850
嗜麦芽假单胞菌2 <i>Pseudomonas maltophilia</i> 2	2.500	1.950	1.275	0.833	3.850
枸橼酸杆菌1 <i>Citrobacter diversus</i> 1	2.500	1.950	2.550	1.667	3.850
枸橼酸杆菌2 <i>Citrobacter diversus</i> 2	2.500	1.950	2.550	1.667	3.850
洋葱假单胞菌1 <i>Pseudomonas cepacia</i> 1	2.500	1.950	1.275	0.208	3.850
洋葱假单胞菌2 <i>Pseudomonas cepacia</i> 2	2.500	0.122	1.275	0.208	1.925

由表2还可看出,反,反-1,7-二苯基-4,6-庚二烯-3-酮对革兰氏阳性菌的抑菌活性强于对革兰氏阴性菌的抑菌活性,而山姜素对革兰氏阳性菌的抑菌活性弱于对革兰氏阴性菌的抑菌活性。这4个化合物的抑菌活性程度由强到弱的顺序为双苯庚酮类化合物、查尔酮类化合物和二氢黄酮类化合物。

3 结 论

双苯庚酮类化合物反,反-1,7-二苯基-4,6-庚二烯-3-酮、二氢黄酮类化合物乔松素和山姜素及查尔酮类化合物豆蔻明是草豆蔻抑制幽门螺杆菌的活性成分,而草豆蔻具有对幽门螺杆菌的抑菌活性也是其治疗胃部疾病的主要原因之一。这4个化合物也是草豆蔻抑制金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠杆菌等细菌的活性成分。目前,临床上治疗幽门螺杆菌感染主要采用抗生素联合用药,而抗生素类药物的副作用及耐药性一直是困扰人们的难题之一。对草豆蔻中黄酮和双苯庚酮类化合物抑制幽门螺杆菌的实验作进一步深入研究,有潜在的实际应用价值。

4个化合物中,只有双苯庚酮类化合物反,反-1,7-二苯基-4,6-庚二烯-3-酮对幽门螺杆菌和金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠杆菌等都表现出了较强抑菌活性。据文献报道^[1,2],双苯庚酮类化合物是草豆蔻镇吐止呕的有效成分,这类化合物是主要分布在姜科植物中结构特殊的一大类成分,目前为止对其生理活性研究较少,已报道的活性主要有抗氧化、活血、抗肝毒和杀虫消炎等^[14,15],利用各种方法对这类具有开发前景的天然产物进行更深入细致的活性筛选,是一项具有社会意义的研究工作。

参考文献:

- [1] Yang Y, Kinoshita K, Koyama K, *et al.* Study on anti-emetic constituents of *Alpinia katsumadai* [J]. *Nat Prod Sci*, 1999, 5 (1): 20-24.
- [2] Yang Y, Kinoshita K, Koyama K, *et al.* Two novel anti-emetic principles of *Alpinia katsumadai* [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(12): 1672-1674.
- [3] Ngo K S, Brown G D. Stilbenes, monoterpenes, diarylheptanoids, labdanes and chalcones from *Alpinia katsumadai* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 47(6): 1117-1123.
- [4] Kuroyanagi M, Noro T, Fukushima S, *et al.* Study on the constituents of *Alpinia katsumadai* Hayata [J]. *Chem Pharm Bull*, 1983, 31(5): 1544-1550.
- [5] Yushiro K, Shuhichi T, Ikuo Y. Studies on the constituents of *Alpinia*. XII. on the constituents of the seeds of *Alpinia katsumadai* Hayata. I. the structure of cardamomin [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1968, 88(2): 239-241.
- [6] Saiki Y, Ishikawa Y, Uchida M, *et al.* Essential oil from Chinese drug 'caodoukou', the seeds of *Alpinia katsumadai* [J]. *Phytochemistry*, 1978, 17(5): 808-809.
- [7] 丁杏苞, 仲英, 王晓静, 等. 草豆蔻化学成分的研究 (I) [J]. *中草药*, 1997, 28(6): 333.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2000 版(一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 191.
- [9] 中国医学科学院药物研究所. 中药志(第三册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984. 15.
- [10] 乔春峰, 徐璐珊, 王峥涛, 等. 山姜素和豆蔻明的研究概况 [J]. *中国野生植物资源*, 2000, 20(6): 11-12.
- [11] 刘吉华, 高山林, 朱丹妮, 等. 蛇葡萄素的抑菌作用研究 [J]. *中国药科大学学报*, 2002, 33(5): 439-441.
- [12] 戚欢阳, 张朝凤, 张勉, 等. 毛脉蓼化学成分及抑菌活性的研究 [J]. *中国药学杂志*, 2005, 40(11): 819-822.
- [13] 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2002. 309.
- [14] 卜宪章, 张敏, 马林, 等. 天然二芳基庚烷类化合物的化学修饰及生理活性研究 [J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2000, 39(2): 41-45.
- [15] Masuda T, Jitoe A, Nakatani N, *et al.* Anti-oxidative and anti-inflammatory curcumin-related phenolics from rhizomes of *Curcuma domestica* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 32(6): 1557.