

姜黄与紫色姜提取物光照处理后的抗菌活性研究^{*}

黎晓菊¹, 度呈杰¹, 周明曦^{1,2}, 张科涛¹, 张冰¹, 黄之镨¹, 张晓梅^{1△}, 赵庆^{1△}

(1. 云南中医药大学, 云南 昆明 650500; 2. 成都中医药大学, 四川 成都 610072)

摘要: 目的 研究姜黄和紫色姜光照前后抗菌活性的变化。方法 采用纸片扩散法, 测试姜黄与紫色姜提取物在光照(LED 灯照射 2 h 或 4 h)前后, 对 20 种病原菌抗菌活性的变化。采用薄层色谱法检测姜黄和紫色姜提取液光照后生成的过氧化物与还原性物质, 以判断是否发生了光化学反应。结果 光照后姜黄与紫色姜提取物的抗菌活性都明显增强。姜黄与紫色姜提取液光照后均产生新的成分, 这表明发生了光化学反应。结论 在姜黄素类成分的催化下, 姜黄与紫色姜的化学成分在光照时发生光化学反应, 生成了抗菌活性更高的产物。

关键词: 姜黄; 紫色姜; 姜黄素类; 抗菌活性; 光化学反应

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2020)05-0006-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2020.05.002

Studies on Antimicrobial Activity of *Curcuma Longa* and *Zingiber Purpureum* Extracts after Illumination

LI Xiaojie¹, TUO Chengjie¹, ZHOU Mingxi^{1,2}, ZHANG Ketao¹, ZHANG Bing¹,

HUANG Zhipu¹, ZHANG Xiaomei¹, ZHAO Qing¹

(1. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

2. Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)

ABSTRACT: **Objective** The changes of antimicrobial activities of *Curcuma longa* and *Zingiber Purpureum* before and after illumination were studied. **Methods** Disk diffusion test was applied to detect the antimicrobial activity of *Curcuma longa* and *Zingiber Purpureum* extracts against 20 kinds of microbial pathogens before and after illumination. TLC was applied to detect peroxide products and reductive products in the extracts of *Curcuma longa* and *Zingiber Purpureum* after illumination, by which whether the photochemical reaction occurred were determined. **Results** The antimicrobial activities of the two extracts increased significantly after illumination. New products were detected in the two extracts after illumination, which indicated that the photochemical reaction had occurred. **Conclusion** Under the catalysis of curcuminoids, some components in *Curcuma longa* and *Zingiber Purpureum* underwent photochemical reaction under illumination. As a result, components with higher antimicrobial activity were generated.

KEY WORDS: *Curcuma longa*; *Zingiber purpureum*; curcuminoid; antimicrobial activity; photochemical reaction

姜黄为姜科姜黄属植物姜黄(*Curcuma longa* L.)的干燥根茎, 是著名中药, 形似姜而色黄故得名。姜黄广泛种植于云南、广西、台湾、福建等省区, 是多年生草本植物, 药食同源。姜黄味辛, 苦, 温, 归脾、肝经, 有破血行气、通经止痛之功效^[1-2]。《本草纲目》记载: “姜

黄、郁金、莪药三物, 形状功用皆相近, 但郁金入心治血, 而姜黄兼入脾, 兼治气, 莪药则入肝, 兼治气中之血, 为不同尔”。药理研究表明, 姜黄具有抗氧化、抗炎、治疗糖尿病、降血脂、神经保护、抗肿瘤、抗菌等药效^[3-5]。姜黄的主要化学成分为二苯基庚烷类、萜类,

收稿日期: 2020-09-03

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金项目(21662048、81460533、81060262), 云南省科技厅-云南中医学院应用基础研究联合专项[2017FF116(-011)]

第一作者简介: 黎晓菊(1996-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 天然药物化学。

△通信作者: 赵庆, E-mail: qingzhaokm2008@126.com; 张晓梅, E-mail: meimeizhang.net@163.com

其次还有少量生物碱和甾醇类。其中萜类成分主要为多骨架类型的倍半萜,其次为单萜和二萜^[6]。姜黄素类成分属于二苯基庚烷结构类型,具有广谱抗癌作用^[7],引起众多学者的关注。姜黄素还可以通过免疫调节,预防新冠病毒(COVID-19)感染^[8]。此外,姜黄素作为色素和调味品广泛应用于食品工业中,姜黄挥发油则有抗菌、抗真菌、抗肿瘤等作用^[6,9-11]。

紫色姜(*Zingiber purpureum* Rosc)为姜科姜属多年生草本植物,分布在云南南部及东南部的热带雨林中。紫色姜是云南傣族传统常用药,具有健胃消食、散寒和止痛等功效,是傣族成药双姜胃痛丸的主药材之一^[12-13]。紫色姜中含有姜黄素类成分,而其挥发油中含有具抗菌活性的化学成分^[12]。

姜黄素类成分除了具有多种药理活性外,还具有光敏作用,在光照条件下可激发氧分子生成单线态氧,单线态氧具有很强的氧化性。姜黄素不仅自身具有抗肿瘤活性,还可以在光动力学疗法中通过光敏氧化反应,杀灭肿瘤细胞^[14-15]。

课题组在研究姜科过氧化物时偶然发现,姜黄、紫色姜提取液在光照时会产生多个过氧化物,未经光照,则检测不到过氧化物。由此推测,姜黄素类成分可能催化姜黄、紫色姜的化学成分发生光化学反应,而化学成分的变化,很有可能导致其药理活性发生变化。为了验证上述推测,本研究对光照前后的姜黄、紫色姜提取液进行了抗菌活性测试。

1 材料与方法

1.1 药材与试剂 姜黄购买于一心堂药店,紫色姜购买于西双版纳州傣医医院。2种药材均由云南中医药大学中药学院马伟光教授鉴定。培养基配料等常用试剂均购自雅云生物科技有限公司。有机溶剂:丙酮、乙酸乙酯、石油醚等均为分析纯。

1.2 仪器 打粉机、研钵、超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);FA2004 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);OSB-2100 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);ES-315 高压蒸汽灭菌锅(TO-MY 公司);恒温培养箱、电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);SW-CJ-2FD 洁净工作台(AIRTECH 公司);LED 灯(功率 100 W,口径 8.5 cm,波长 410~780 nm)。

1.3 指示菌 革兰氏阳性菌:金黄色葡萄球菌

(*Staphylococcus aureus*, ATCC 29213)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, ATCC 6633)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, ATCC 29212)、耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*, 1037)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA-1450、1505、2024、1957、28299、1591)。革兰氏阴性菌:大肠杆菌(*Escherichia coli*, ATCC 25922)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, ATCC 19606)、克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*, ATCC 13883)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*, ATCC 49247)。真菌:白色念珠球菌(*Candida albicans*, ATCC 10231),白色念珠球菌耐药菌(Drug-resistant *Candida albicans*, 23[#]、1730[#]、1725[#]、1732[#]),以上供试菌株均由课题组前期研究保存。

1.4 培养基 病原细菌培养基 LB:胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,氯化钠 10 g,琼脂 15 g,水 1 L,pH 7.2~7.6。真菌培养基、沙保氏培养基:蛋白胨 10 g,葡萄糖 40 g,琼脂 15 g,水 1 L,pH 6.0。

1.5 实验方法

1.5.1 姜黄、紫色姜的提取与光照处理 分别取粉碎后的姜黄、紫色姜药材 10 g,置于棕色瓶中,加入 60 mL 丙酮浸泡 1 h,超声提取 30 min,过滤。滤渣再加 60 mL 丙酮,超声再提取 10 min,过滤,合并 2 次所得滤液。将所得姜黄滤液分为 2 等份,1 份减压浓缩后避光保存(编号为 CL1);另外 1 份置于 150 mL 无色透明的具塞锥形瓶中,用 LED 灯照射 2 h,减压浓缩后保存(编号为 CL2)。将所得紫色姜滤液分为 2 等份,1 份减压浓缩后避光保存(编号为 ZP1);另外 1 份置于 150 mL 无色透明的具塞锥形瓶中,用 LED 灯照射 4 h,减压浓缩后保存(编号为 ZP2)。

取粉碎后的姜黄药材 1 g,置于 50 mL 无色透明的具塞锥形瓶,在日光下照射 8 h。加入 10 mL 丙酮浸泡 1 h,超声 30 min,过滤、减压浓缩后保存(编号为 CL3)。

1.5.2 抗菌活性测试 病原细菌接种至液体 LB 培养基,37 ℃、200 r/min 黑暗培养 12 h,白色念珠菌接种至液体沙保氏培养基,28 ℃、200 r/min 黑暗培养 24 h,用液体培养基将各菌液分别稀释至 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cfu/mL 备用。

采用纸片扩散法^[16],对未经光照与经过光照的姜黄提取物(CL1、CL2),紫色姜提取物(ZP1、ZP2)进行

抗菌活性测试。将稀释后的指示菌菌液均匀涂布在固体培养基上。分别精密称取 90 mg 提取物 CL1、CL2、ZP1、ZP2, 加入 900 μL 丙酮溶解提取物至质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 分别取 10 μL 上述溶液于 5 mm 的滤纸片上, 滤纸片将溶液完全吸收后, 挥干溶剂, 贴于接种好指示菌的固体培养基上。每份提取液做 3 组平行实验, 以 10 μL 丙酮作为空白对照, 以抗生素作为阳性对照 (革兰氏阳性菌以苄基青霉素为阳性对照, 革兰氏阴性菌以卡那霉素为阳性对照, 真菌以氟康唑为阳性对照; 每个滤纸片上的抗生素质量为 50 μg)。真菌在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养, 其余病原细菌于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 恒温培养 12 h 后测量抑菌圈直径。

1.5.3 薄层色谱法检测姜黄、紫色姜提取物光照前后的化学成分变化 采用薄层色谱法检测姜黄、紫色姜的丙酮提取液光照前后的成分变化, 以及姜黄粉末光照 8 h 后的变化。各取 2 mg CL1、CL2、CL3、ZP1、ZP2, 溶于 0.5 mL 丙酮, 用毛细管分别吸取上述溶液各 5 μL , 在硅胶 GF254 板上点样, 以石油醚: 乙酸乙酯 (5:1) 展开, 分别以过氧化物显色剂^[17]和三氯化铁-铁氰化钾试剂显色, 拍照记录薄层色谱图。

2 结果

2.1 光照前后的姜黄提取物抗菌活性结果 采用纸片扩散法, 对未经光照与经过光照的姜黄提取物 (CL1、CL2) 进行 20 种病原菌的抗菌活性测试。结果发现, 未经光照的样品 CL1, 对 20 种病原菌均未产生抑菌圈; 经过光照的样品 CL2, 对 15 种病原菌产生抑菌圈, 对 5 种病原菌未产生抑菌圈。其中, CL2 对病原菌 MRSA-2024、MRSA-1957、MRSA-1591 的抑菌圈都超过了 10 mm。由此可见, 姜黄样品经过光照后, 对大多数病原菌的抗菌活性有显著提高, 见表 1、图 1A、1B。

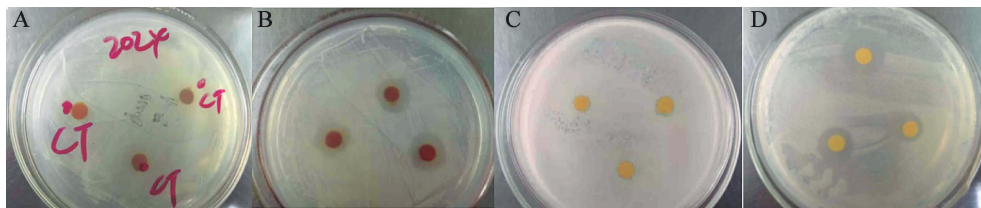
2.2 光照前后的紫色姜提取物抗菌活性结果 采用纸片扩散法, 对未经光照与经过光照的紫色姜提取物

表 1 未光照与光照的姜黄提取物抑菌圈直径

微生物菌株	抑菌圈直径/mm		
	阳性对照	CL1(未光照)	CL2(光照)
金黄色葡萄球菌	46.5	—	10.4
枯草芽孢杆菌	26.8	—	—
肺炎链球菌	13.1	—	7.2
肺肠球菌	17.3	—	7.7
MRSA-1450	14.6	—	—
MRSA-1505	11.2	—	8.6
MRSA-2024	15.1	—	14.3
MRSA-1957	11.0	—	11.5
MRSA-1591	39.6	—	13.3
MRSA-28299	13.5	—	—
耻垢分枝杆菌	7.2	—	—
大肠杆菌	19.8	—	7.6
鲍曼不动杆菌	20.0	—	8.1
克雷伯氏菌	17.9	—	7.8
流感嗜血杆菌	15.2	—	7.4
白色念珠菌	29.7	—	—
23 [#]	11.2	—	9.3
1730 [#]	7.2	—	8.8
1725 [#]	20.5	—	8.1
1732 [#]	20.3	—	8.4

注: 表中抑菌圈直径为 3 次实验的平均值; “—”表示无抑菌圈。革兰氏阳性菌以苄基青霉素为阳性对照, 革兰氏阴性菌以卡那霉素为阳性对照, 真菌以氟康唑为阳性对照。

(ZP1、ZP2) 进行 20 种病原菌的抗菌活性测试。结果发现, 未经光照的样品 ZP1 对 6 种病原菌有抗菌活性, 经过光照处理的样品 ZP2 对 14 种病原菌有抗菌



注: A. CL1 对 MRSA-2024 的抑菌活性; B. CL2 对 MRSA-2024 的抑菌活性; C. ZP1 对草芽孢杆菌的抑菌活性; D. ZP2 对草芽孢杆菌的抑菌活性。

图 1 光照前后的姜黄、紫色姜提取物对部分菌株的抑菌圈对比

活性,其中 ZP2 对枯草芽孢杆菌、MRSA-1957、MRSA-28299、MRSA-1591 的抑菌圈都超过了 10 mm,且对耻垢分枝杆菌-1037 和白色念珠球菌耐药菌-1730[#] 的抑菌圈直径超过了阳性对照。ZP2 对 11 种病原菌的抑制活性都明显高于未经光照的 ZP1,仅对 MRSA-1450、白色念珠菌耐药菌 1732[#] 的抑制活性低于 ZP1。这些结果说明,紫色姜在经过光照后,对大多数病原菌的抗菌活性有显著提高,结果见表 2、图 1C、1D。

2.3 薄层色谱检测姜黄、紫色姜光照前后的化学成分变化 采用薄层色谱法,以过氧化物显色剂对姜黄提取物 CL1、CL2,紫色姜提取物 ZP1、ZP2 进行检测。结果表明,未经光照的提取物(CL1、ZP1)中检测不到过氧化产物,而经过光照的提取物(CL2、ZP2)中都检测到了多个过氧化物。姜黄粉末光照后再用丙酮提取得到的样品 CL3 中也能检测到过氧化物。这些结果说明,无论是姜黄、紫色姜的丙酮提取液还是姜黄粉末,其中的姜黄素类成分均能够催化其它共存的化学成分发生光化学反应,产生新的化学成分。此外,用三氯化铁-铁氰化钾试剂显色时,可观察到 CL2 产生了至少 5 个新生成的还原性成分,见图 2,而 ZP2 无新还原产物生成。

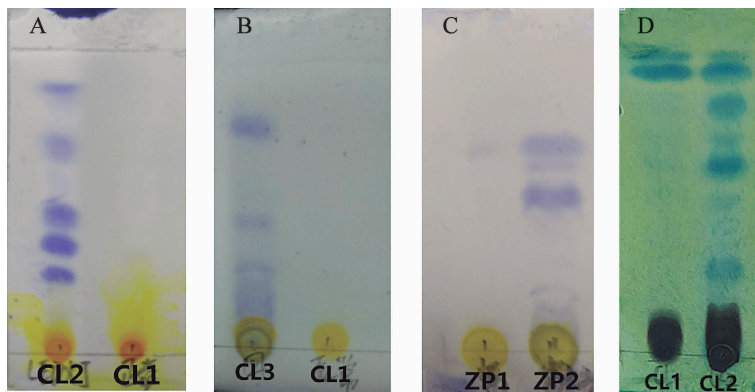
3 讨论

姜黄、紫色姜提取液在 LED 光源照射后,抗菌活性发生了显著变化,光照之后,试样对多数菌株的抗菌活性显著增强,仅对个别菌株的抗菌活性降低。由此可见,姜黄与紫色姜化学成分经过光照后,产生了抗菌活性更高的产物。初步推测,在姜黄素类成分的催化下,姜黄与紫色姜的一些化学成分发生光化学反

表 2 未光照与光照的紫色姜提取物抑菌圈直径

微生物菌株	抑菌圈直径/mm		
	阳性对照	ZP1(未光照)	ZP2(光照)
金黄色葡萄球菌	46.5	8.0	8.9
枯草芽孢杆菌	26.8	—	15.3
肺炎链球菌	13.1	—	—
肺肠球菌	17.3	—	7.3
MRSA-1450	14.6	8.5	7.5
MRSA-1505	11.2	—	—
MRSA-2024	15.1	8.3	9.9
MRSA-1957	11.0	—	11.2
MRSA-1591	39.6	8.6	10.4
MRSA-28299	13.5	—	11.1
耻垢分枝杆菌	7.2	8.3	8.5
大肠杆菌	19.8	—	—
鲍曼不动杆菌	20.0	—	7.2
克雷伯氏菌	17.9	—	7.4
流感嗜血杆菌	15.2	—	7.1
白色念珠菌	29.7	—	8.4
23 [#]	11.2	—	—
1730 [#]	7.2	—	7.8
1725 [#]	20.5	—	—
1732 [#]	20.3	11.6	—

注:表中抑菌圈直径为 3 次试验的平均值;“—”表示无抑菌圈。革兰氏阳性菌以苋基青霉素为阳性对照,革兰氏阴性菌以卡那霉素为阳性对照,真菌以氟康唑为阳性对照。



注:A. CL1、CL2 过氧化物显色剂显色; B. CL1、CL3 过氧化物显色剂显色; C. ZP1、ZP2 过氧化物显色剂显色; D. CL1、CL2 三氯化铁-铁氰化钾试剂显色。

图 2 姜黄、紫色姜提取物光照前后的薄层色谱图

应,产生抗菌活性更高的产物。

单线态氧与天然产物反应时,多数情况下会生成过氧化产物或中间体。因此可以采用薄层色谱法检测光照之后的姜黄或紫色姜提取物是否有过氧化物产生,以此判断是否发生光化学反应。考虑到光化学反应的产物可能不仅有过氧化物,因此还采用了三氯化铁-铁氰化钾试剂检测还原性产物。薄层色谱分析表明,姜黄、紫色姜提取液经光照之后,产生了大量的过氧化产物,经过光照的姜黄提取液还检出新生成的还原性物质,这表明光照时发生了光化学反应。此外,姜黄粉末在光照后也有过氧化物生成。基于上述结果,推测在光照条件下,姜黄素可催化氧分子转化为单线态氧。单线态氧是一种强氧化剂,它与姜黄、紫色姜中的其它共存的化学成分发生光化学反应,生成一系列新的化合物。姜黄提取液光照后抗菌活性的提高,可能归因于一些新生成的化合物。

综上所述,在姜黄素类成分的催化下,姜黄与紫色姜的一些化学成分发生光化学反应,生成了抗菌活性更高的产物。至于光化学反应是如何进行的,光化学反应的产物是什么,产率是多少,光照时间与抗菌活性的关系如何,这些都还需要在后续的研究工作中采用其它方法(例如对样品进行指纹图谱相对定量分析,HPLC-MS 分析,等等)进行深入探讨。此外,姜黄和紫色姜的加工、炮制、储存过程中,姜黄素类成分能够催化其它共存化学成分发生光化学反应,这有可能会引起药物的药效变化。因此,这两种药材在加工、储存过程中,化学成分的光化学反应是一个不可忽视的因素。本实验仅初步测试了抗菌活性的变化,其它药理活性的变化,亦值得进一步探讨。例如姜科萜类成分 α -桉醇、coronaridin E 经光化学反应,可得到具有细胞毒或抗肿瘤活性的产物^[18-19]。因此,探讨姜黄、紫色姜在光化学反应后抗肿瘤等活性的变化,也有重要意义。本研究工作可为姜科植物的开发与利用提供科学依据和线索。

参考文献:

- [1] 付兴会,林连美. 中药姜黄主要有效成分药理学研究进展[J]. 湖北中医药大学学报,2015,17(4):109-110.
- [2] 王琰,王慕邹. 姜黄属常用中药的研究进展[J]. 中国药理学杂志,2001,36(2):8-12.
- [3] 孙林林,乔利,田振华,等. 姜黄化学成分及药理作用研究进展[J]. 山东中医药大学学报,2019,43(2):207-212.
- [4] ADAMCZAK A, OŻAROWSKI M, KARPIŃSKI T M. Curcumin, a natural antimicrobial agent with strain-specific activity[J]. Pharmaceuticals, 2020, 13(7):153.
- [5] ROTH G N, CHANDRA A, NAIR M G. Novel bioactivities of Curcuma longa constituents [J]. J Nat Prod, 1998, 61(4):542-545.
- [6] 肖长坤. 姜黄属植物的化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(21):339-347.
- [7] IMRAN M, ULLAH A, SAEED F, et al. Curcumin, anti-cancer, & antitumor perspectives: A comprehensive review [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2018, 58(8):1271-1293.
- [8] GARG S, JOSHI H, KAUR H, et al. Curcumin - a immunomodulators against COVID-19[J]. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research, 2020, 18(2):417-426.
- [9] 卢彩会,赵明明,牟德华. 姜黄油的抑菌活性及抑菌机理[J]. 食品工业科技,2018,39(21):108-113.
- [10] 曹煜,茅颖,向俊才,等. 中药姜黄有效成分抗真菌研究及临床应用研究 [J]. 中华皮肤科杂志,1994,27(6):354-356.
- [11] 齐莉莉,王进波. 姜黄提取物的抗氧化及抗菌活性研究[J]. 中国调味品,2008(2):72-73.
- [12] 魏启亮,唐玲. 傣药紫色姜的研究概况[J]. 中国民族民间医药,2018,27(17):53-55.
- [13] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志 [M]. 北京:科学出版社 1997:536.
- [14] 郭慧,李晓燕,李东波,等. 姜黄素光动力疗法下调人喉癌细胞中 STAT3 信号传导通路相关调控蛋白水平[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2018,27(1):43-46.
- [15] 朱文婷,许桐瑛,谢蕊,等. 姜黄素在光动力与声动力治疗恶性肿瘤中的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学,2015,23(22):3367-3370.
- [16] 钟楚楚,赵晋彤,范宇,等. 超声提取夏枯草总黄酮及抗菌活性研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2019,35(6):651-653.
- [17] RUECKER G, NEUGEBAUER M, KIEFER A. TLC analysis of plant peroxides with modifications of the Huber and Frohke reagent [J]. Pharmazie, 1995, 50(9):601-603.
- [18] 赵映梅,张滢,邹澄,等. α 桉醇光敏氧化及抗肿瘤活性研究[J]. 云南中医学院学报,2015,38(2):18-20.
- [19] 冯彦,赵一纯,陈其润,等. 光敏氧化制备抗癌及保肝二萜衍生物[J]. 云南中医学院学报,2015,38(3):13-15.