

# 嘉南藥理學院專題研究計畫成果報告

## 檳榔，荖花及荖葉抑菌作用之探討

計畫編號：CNFH-88-04

執行期間：87年9月1日至88年6月30日

計畫類別：個別型

主持人：馮惠萍

協同研究：郭玫君

### 摘要

本試驗針對檳榔嚼塊之主要組成植物：檳榔子，荖花及荖葉，以水，甲醇和正己烷三種溶劑萃取，所得之抽出物對正常存在人體口腔及消化道的八種微生物 *Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus sanguis*、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Pseudomonas aeruginosa* 及 *Candida albicans* 進行抑菌性之檢測。結果顯示檳榔，荖花及荖葉之甲醇抽出物對八種微生物之抑制較顯著，尤以荖花及荖葉之甲醇抽出物效果最佳；而檳榔，荖花及荖葉之水及正己烷抽出物，則無明顯之抑制圈出現。另外檢測檳榔，荖花及荖葉之甲醇抽出物對於八種微生物之最小抑菌濃度（MIC）及最小殺菌濃度（MBC），所得結果顯示荖花及荖葉之甲醇抽出物在 1500ppm 下對八種菌株皆造成抑菌效果；而在抽出物濃度達 2500ppm 時已可殺滅所有菌株；尤對其中四株革蘭氏陽性菌 *Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Streptococcus mutans* 及 *Streptococcus sanguis* 較陰性菌為佳。至於檳榔甲醇抽出物抑菌效果則不若荖花及荖葉顯著，在 2500ppm 濃度下，只對五株菌 *Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Streptococcus mutans*、*Escherichia coli* 及 *Pseudomonas aeruginosa* 抑菌效果，更對 *Candida albicans* 有促進其生長之功效。

關鍵字：檳榔，荖花，荖葉，抑菌作用，最小抑菌濃度（MIC）及最小殺菌濃度（MBC）

### 前言

國人嚼食檳榔由來已久，尤其是中下勞工階層，長期以嚼食檳榔提神，禦寒及應酬之用。近年來許多研究顯示，口腔癌與嚼食檳榔嚼塊關係密切。檳榔嚼塊的主要組成包括：檳榔子（*Areca catechu*），荖藤（*Piper betle* L.），紅灰及白灰等；檳榔子中之生物鹼（arecaidine），檳榔素（areoline）及多酚類成分皆被發現可引起微生物細胞和哺乳類動物細胞之致突變性以及潛在誘導動物腫瘤之發生[20]。而嚼食含有荖花或荖葉之檳榔嚼塊致癌性更高，因為荖花中含有黃樟素（safrole），丁香油（eugenol）等成分，易造成口腔表皮層萎縮變薄[6]。而荖葉之角色尚未確定，目前少數研究顯示，其成分會造成染色體異常；但另一方面荖葉中也含有抗癌及抗氧化之成分[22]。至於紅灰及白灰則會使口腔環境偏鹼性，造成黏膜組織直接傷害，同時促使檳榔嚼塊中之多酚類自動氧化，而釋出活性氧或含氧自由基，其造成 DNA 突變，甚至細胞死亡[23]。如何有效制止嚼食檳榔導致口腔癌之產生，全面宣導民眾禁止嚼食檳榔實是政府相關單位之重要課題。但目前行政機關常遭受許多不必要之阻力，其一包括栽種檳榔之農民，據農委會在 1993 年估計，全台種植檳榔之面積已達四萬四千公頃，目前已成為台灣的第二大農作物。因此如何改變大量檳榔作物

之用途，使栽種檳榔之農民不至於血本無歸，以及改善國人因嚼食檳榔導致口腔癌產生，實是當務之急。

近年來許多學者致力於開發蔬果類植物之抑菌功能，除了可添加於食品中或食品包裝上，增加其保存期限[21]，另外檳榔在中藥上本為驅蟲之用，應可開發為食用米之防蟲包。本試驗試圖開發檳榔，荖花及荖葉之其他利用價值，並探討嚼食檳榔是否會影響口腔及消化道菌群之消長

## 材料與方法

### 一、實驗材料

本試驗所使用之菌種共八株，包括 *Staphylococcus aureus*，*Staphylococcus epidermidis*，*Streptococcus mutans*，*Streptococcus sanguis*，*Escherichia coli*，*Klebsiella pneumoniae*，*Pseudomonas aeruginosa* 及 *Candida albicans*。這八株菌皆為正常存在於人體消化道之微生物。各菌株 活化。其來源皆來自食品工業研究所。

本試驗使用之檳榔子，荖花及荖葉購自南投縣農家；所使用之培養基購自德國之 MerckKGaA Darmstadt，其餘藥品均採用試藥級。

檳榔，荖花及荖葉之水萃取液之製備：取新鮮檳榔，荖花或荖葉 100g，加入 100ml 之去離子水均質，置於冷房中震盪 16-18 小時（37°C 萃取液置於 37°C 水浴鍋震盪；100°C 萃取液則加熱沸騰 30 分鐘，其餘皆同）。第二天樣品再度均質，然後過濾掉殘渣，再利用真空凍結乾燥，磨粉並吹氮氣冷凍備用。正己烷萃取液之製備大致與水萃取之方法相同，只是在過濾殘渣之後，需先利用無水硫酸鹽過濾去水，再於 50°C 真空濃縮，備用。至於檳榔，荖花及荖葉之甲醇萃取液之製備，取 100g 之樣品均質後，再以真空凍結機乾燥，並磨成粉狀後加入 100ml 之甲醇，置於冷房中萃取 16-18 小時，隔日再度均質，並以 watman paper 抽氣過濾，然後在 45°C 下真空濃縮，秤重備用。所有抽出物皆於使用前再以溶劑定量為 250mg/ml。

抑制圈之測定試驗(Disk diffusion susceptibility test)是將待試驗菌株於試驗前一天，採用適當之溫度及培養基(如表一所示)，活化 18 至 24 小時。隔日利用分光光度計，波長 600nm，將活化之菌液稀釋至 0.1A，並取 0.1ml 之稀釋菌液置於 Mueller-Hinton Agar (*Streptococcus sanguis* 及 *Candida albicans* 分別需改用 Blood Agar 及 Yeast Malt extract Agar) 平板上，塗抹均勻備用。另外將檳榔，荖花及荖葉之各式萃取液以 6mg/per disk 之濃度滴在紙錠(直徑 8mm)上，並置其於無菌無塵操作台上，待其溶劑揮發後，將紙錠置於塗有菌液之固體培養基，靜至 15 分鐘，再放入培養箱中倒置培養 18 至 24 小時(*Candida albicans* 需培養 4 天)，觀察有無抑制圈並測量其直徑。空白組則以相同體積之溶劑滴入紙錠觀察比較之[17]。

最小抑菌濃度(the minimum inhibitory concentration, MIC)及最小殺菌濃度 (the minimum bactericidal concentration, MBC)的測試，則是利用試管稀釋法(Broth microdilution MIC test)。先將待測菌株活化 18 至 24 小時。再利用分光光度計，以波長 600nm，測定活化之菌液之吸光值，並將其稀釋至 0.1A 備用。取 0.1ml 之稀釋菌液加入含 0ppm，500ppm，1000ppm，2000ppm 及 2500ppm 檳榔，荖花及荖葉甲醇萃取液之 Mueller-Hinton Broth，培養 18 至 24 小時。隔日再以連續十倍稀釋，Plate Count Agar 傾注平板，培養 18 至 24 小時(*Candida albicans* 需培養 4 天)，計算總生菌數[18]。所得之生菌數如小於 0ppm 之生菌數，其含甲醇萃取液之濃度則為最小抑菌濃度(MIC)；另外所得之生菌數如小於前一日所加入之生菌數，則為最小殺菌濃度(MBC)。

## 結果與討論

本試驗探討檳榔子，荖花及荖葉之水，甲醇和正己烷抽出物對於存在人體消化道的八種菌株之抑菌活性。由抑制圈的實驗發現，檳榔，荖花及荖葉之水及正己烷抽出物並無明顯之抑菌效果，只有甲醇萃取物，出現明顯之抑制圈，所得結果如表二，表三及表四所示；其中又以荖花及荖葉之甲醇抽出物對八株試驗菌皆具有抗菌作用（表三及表四）。而添加水，甲醇和正己烷為對照之紙錠皆無抑制圈出現，顯示抑菌效果確為抽出物所造成，非溶劑所為。此與楊鎮南[14]所指出荖花水抽出物對其試驗菌株並未無抑菌活性，荖花乙醇抽出物則出現明顯之抗菌作用相吻合。因而進一步探討三種甲醇萃取物對八株試驗菌抑菌效果之差異，故以試管稀釋法進行 MIC 及 MBC 之測定。另外檳榔子之水抽出物並無明顯抑菌效果，這與 Miranda 之研究相符合，Miranda 之研究顯示檳榔咀嚼五分鐘並無法抑制口腔中之菌群，可見單嚼食檳榔子並無防止蛀牙之功效。可行之處，應是確認並萃取出甲醇萃取物荖花或荖葉之有效抑菌成分，添加於牙膏或漱口藥水中。目前已有研究顯示，茶葉中之 sunphenon 可有效抑制蛀牙致病菌 *Streptococcus mutans* 及 *Streptococcus sobrinus* 的生長，且進一步將 sunphenon 添加於馬之飼料及飲水中，可有效降低齲齒之罹患率 30% [4]。

試管稀釋法測定結果如表五所示，以荖花之甲醇抽出物在 1000 ppm 以下即對八株試驗菌皆具抑制作用，在 2000ppm 以下便可將大部分之試驗菌株殺滅效果最好，其中 *Staphylococcus aureus*，*Staphylococcus epidermidis*，*Streptococcus mutans* 及 *Klebsiella pneumoniae* 之 MIC 及 MBC 皆僅為 500ppm；至於荖葉之甲醇抽出物亦有良好之抑菌功效，其在 1500ppm 以下即可抑制所有菌株，如將抽出液之濃度提高至 2500ppm 則可將八株菌株殺滅；而檳榔甲醇抽出物抑菌效果則不若荖花及荖葉顯著，在 2500ppm 濃度下，只對五株菌 *Staphylococcus aureus*，*Staphylococcus epidermidis*，*Streptococcus mutans*，*Escherichia coli* 及 *Pseudomonas aeruginosa* 具抑菌效果，更對 *Candida albicans* 有促進其生長之功效；另外在 MBC 之試驗當中，2500ppm 試驗濃度內，只能殺滅 *Streptococcus* 屬之兩株菌，對於其餘 6 株菌皆無抑制效果。張，游和周[9]曾比較多種香辛植物之抗菌性，結果發現在鼠尾草、辣椒、茴芹、薄荷、風藤、薑黃及紫蘇之抑菌功效皆不若荖藤之抽出物，而荖藤無論葉子（荖葉）或果實（荖花）對所有試驗菌株皆表現出抑制效果；且對同一種菌株而言，荖藤之果實比葉子表現較大之抑菌能力；這與此次研究結果荖花抽出物在三種抽出物中抑菌效果最佳相符。楊震南[14]曾指出荖花及荖葉之乙醇萃取物對 *Escherichia coli* 等之試驗菌株具有抑菌作用，雖未分離鑑定出抑菌物質，但可能為荖藤植物中之酚類化合物，尤其是醇溶性之酚類化合物。另外，在所有試驗菌株當中，*Staphylococcus aureus* 及 *Staphylococcus epidermidis* 對於三種抽出物敏感性最高，其 MIC 及 MBC 皆為 500ppm（表五）；目前許多蔬果抑菌性之研究顯示，包括大蒜、韭黃[12]、薑黃根及鼠尾草[9]之抽出物皆可抑制 *Staphylococcus* 屬之菌株，這是否意味上述植物抽出物皆含有相同抑制 *Staphylococcus* 屬之物質，有待進一步之研究探討。抑制圈與試管稀釋法之實驗結果大致相符，但是對於同一種菌株而言，荖葉甲醇抽出物之抑制圈似乎皆大於荖花甲醇抽出物，而實際測試 MIC 及 MBC 卻發現荖花抽出物之抑菌性優於荖葉抽出物，這可能是抑制圈試驗之抑菌性需牽涉到待測物質在培養基中之擴散性，如擴散能力不足，雖抑菌能力強，仍無法顯現較大之透明圈[17]。

整體而言，無論檳榔，荖花及荖葉之甲醇抽出物對於革蘭氏陽性菌 *Staphylococcus aureus*，*Staphylococcus epidermidis*，*Streptococcus mutans* 及 *Streptococcus sanguis* 之抑制效果皆優於陰性菌（表五），至於唯一的真菌 *Candida albicans*，只有荖花及荖

葉之甲醇抽出物對其有抑制生長之功效，檳榔甲醇抽出物則會促進其生長。這與周隆武，王淑珍和杜平德[2]研究中認為，牛蒡之甲醇抽出物對於陽性菌及陰性菌皆有抑菌作用，但對於陽性菌之抑制效果較佳相近；另外原征彥和上日[4]的研究亦顯示，茶葉的乙醇抽出物對革蘭氏陽性及陰性細菌皆有抑制作用，但對酵母菌及真菌皆無抑制功效。此結果是否顯示荖花及荖葉之甲醇抽出物含有較多抑制陽性菌之成分，仍待進一步的探討。

由整體結果得知，荖藤之甲醇抽出物對多數試驗菌株皆有抑制甚至殺滅之功效，尤以革蘭氏陽性菌更佳，所以荖藤甲醇抽出物中之抑菌成分之純化，分析及再利用實為未來之重要研究課題。

### 參考文獻

1. 李季眉，苦瓜抑菌成份的抽取，食品科學，第 9 卷，第 3 期，pp138，1981
2. 周隆武，王淑珍和杜平德，牛蒡之抑菌作用，食品科學，第 24 卷，第 2 期，pp195-202，1997
3. 范晉嘉，陳佳慧，青蔥乙醇抽出物之抗菌活性，中國農業化學會誌，第 36 卷，第 1 期，pp12，1998
4. 原征彥等，上正，日食工誌，第 36 卷，pp996，1989
5. 殷梅津，張淑君，蘇國雄，若干香辛植物萃取液抑制黑麴菌及白色念珠菌生長之研究，食品科學，第 34 卷，第 3 期，pp384，1997
6. 孫璐西，和許明仁，荖藤花揮發性香氣成份之研究，食品科學，第 17 卷，第 4 期，pp298，1990
7. 張如華，茶之抗菌作用，農藥世界，第 125 卷，pp73，1994
8. 張湘文，香辛料及蔬菜之抑菌作用，食品工業，第 27 卷，第 9 期，pp53，1985
9. 張圓笙，游若萩，周正俊，香辛植物水浸出液抗菌性之初步探討，食品科學，第 8 卷，第 2 期，pp.185-191，1982
10. 郭建民，吳鴻程，黃慶華和葉東柏，海藻脂氧合酶催化產物之抗菌性，嘉南學報，第 22 期，pp.163-170，1996
11. 游若萩，周正俊，荖藤中不同溶劑抽出物之抗菌性，科學發展月刊，第十一卷，第五期，pp.385-394，1983
12. 陳光華，鄧德豐，蔬菜中抑制微生物生長之物質，食品科學，第 4 卷，第 2 期，pp.33-44，1977
13. 楊振昌，檳榔的毒性，臨床醫學，第 43 卷，第 3 期，pp.168，1999
14. 楊震南，檳榔嚼塊抽出物之抗菌性與誘突變性，碩士論文，國立台灣大學，台北，1991
15. Batt, C., Solberg, M. and Ceponis, M., Inhibition of Aflatoxin Production by Carrot Root Extract, J. Food Sci. Vol. 45, pp. 1210, 1980
16. De Miranda, C. M. Van Wyk, C. W., Van der Bijl K. P. and Basson N. J., The Effect of Areca Nut on Salivary and Selected Oral Microorganisms, International Dental J., Vol. 46, pp. 350-356, 1996.
17. Isenberg, H. D., Clinical Microbiology Procedures Handbook, American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp.5.1.1-5.1.30, 1992.
18. Isenberg, H. D., Clinical Microbiology Procedures Handbook, American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp.5.2.1-5.2.28, 1992.
19. Kyung, K. H. and Fleming, H. P., Antibacterial Activity of Cabbage Juice Against Lactic Acid Bacteria, J. Food Sci., Vol. 59, pp. 125, 1994.
20. Rao. A. R., Sinha, A. and Selvan, R. S., Inhibitory Action of *Piper betle* on the

- Initiation of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced Mammary Carcinogenesis in Rats, Cancer Letter, Vol. 26, pp207, 1985.
21. Shelef, L. A., Naglik, O. A. and Bogen, D. W. , Sensitivity of Some Common Food-borne Bacteria to the Spices Sage, Rosemary and Allispice, J Sci., Vol. 45, pp. 1042, 1980
  22. Shinohara, K., Kuroki, M.,Kong, Z., L., and Hosoda, H., Antimutagenicity of Dialyzates of Vegetables and Fruits, Agric. Biol. Chem. Vol. 52, pp. 1369, 1988.
  23. Stich, H. F. and Stich, W., Chromosome-damaging Activity of Saliva of Betel Nut and Tobacco Chewers, Cancer Letters, Vol. 15, pp193, 1982.
  24. Zaika, L. L. and Kissinger, Inhibitory and Stimulatory effects of oregano on *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus cerevisiae*, J. Food Sci. Vol. 46, pp. 1215, 1981

表一，試驗菌株分類，培養溫度及培養基

試驗菌株	分類	培養溫度°C	培養基
<i>Staphylococcus aureus</i>	G(+)	37	Tryptic Soy Agar
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G(+)	37	Nutrient Agar
<i>Streptococcus mutans</i>	G(+)	37	Brain Heart Infusion
<i>Streptococcus sanguis</i>	G(+)	37	Blood Agar
<i>Escherichia coli</i>	G(-)	37	Nutrient Agar
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G(-)	37	Nutrient Agar
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G(-)	37	Nutrient Agar
<i>Candida albicans</i>	真菌	24	Yeast Malt extract Agar

表二，檳榔水，甲醇及正己烷抽出物對不同菌株之抑菌效果

菌株	抑制圈 (mm)				
	水(室溫)	水(37°C)	水(100°C)	甲醇	正己烷
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	10	9	12	—
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	11	10	17	—
<i>Streptococcus mutans</i>	— <sup>a</sup>	—	—	17	—
<i>Streptococcus sanguis</i>	—	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i>	—	—	—	—	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	—	—	—	11	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—	—	—	—
<i>Candida albicans</i>	—	—	—	—	—

<sup>a</sup>—：沒有抑制圈

<sup>b</sup>：抽出物添加於紙錠之濃度為 6mg/disk

<sup>c</sup>：紙錠大小為 8mm

表三，萵花水，甲醇及正己烷抽出物對不同菌株之抑菌效果

菌株	抑制圈 (mm)				
	水(室溫)	水(37°C)	水(100°C)	甲醇	正己烷
<i>Staphylococcus aureus</i>	— <sup>a</sup>	—	—	31	—
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	—	—	—	37	—
<i>Streptococcus mutans</i>	—	—	—	37	—
<i>Streptococcus sanguis</i>	—	—	—	37	—
<i>Escherichia coli</i>	—	—	—	14	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	—	—	—	12	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—	—	12	—
<i>Candida albicans</i>	—	—	—	19	—

a—：沒有抑制圈

b：抽出物添加於紙錠之濃度為 6mg/disk

c：紙錠大小為 8mm

表四，萵葉水，甲醇及正己烷抽出物對不同菌株之抑菌效果

菌株	抑制圈 (mm)				
	水(室溫)	水(37°C)	水(100°C)	甲醇	正己烷
<i>Staphylococcus aureus</i>	— <sup>a</sup>	—	—	35	—
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	—	—	—	37	—
<i>Streptococcus mutans</i>	—	—	—	46	—
<i>Streptococcus sanguis</i>	—	—	—	37	—
<i>Escherichia coli</i>	—	—	—	18	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	—	—	—	33	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—	—	18	—
<i>Candida albicans</i>	—	—	—	40	—

a—：沒有抑制圈

b：抽出物添加於紙錠之濃度為 6mg/disk

c：紙錠大小為 8mm

表五，檳榔、荖花、荖葉對 8 種菌之最小抑菌濃度 (MIC) 及最小殺菌濃度 (MBC) 之比較

試驗菌株	檳榔		荖花		荖葉 (ppm)	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Staphylococcus aureus</i>	500	500	500	500	500	500
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	500	500	500	500	500	500
<i>Streptococcus mutans</i>	1000	—	500	500	1500	1500
<i>Streptococcus sanguis</i>	— <sub>a</sub>	—	500	1000	500	2500
<i>Escherichia coli</i>	2000	—	500	1500	500	2000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	*— <sub>b</sub>	*—	500	500	500	500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2500	—	1000	—	1500	2000
<i>Candida albicans</i>	*—	*—	1000	2000	1000	1000

a—：表示在 2500ppm 以下，無殺菌或抑菌之效果

b\*—：表示在 2500ppm 以下，有促進生長之效果

