

- [6] SHEN S W, CAO H T, TIAN X F, et al. Experimental studies on effect of Weichang Shutai granule on promoting intestinal propulsion of mice, gastric juice content of rats and intestinal motion of rabbits [J]. Chin J Integr Tradit West Med(中国中西医结合消化杂志), 2003, 11(4): 203-205.
- [7] LUO J B, JU J. Research progress in pathogenesis of

functional dyspepsia [J]. Med Recap(医学综述), 2011, 17(22): 3431-3434.

- [8] LIU H J. Clinical research on acupoint sticking therapy for pediatric asthma in remission stage [J]. China J Chin Med(中医学报), 2011, 26(6): 761-762.

收稿日期: 2014-02-21

## 余甘子不同提取物对人消化道菌群抑菌作用的对比研究

罗兰<sup>1</sup>, 刘佳佳<sup>2</sup>, 朱宏阳<sup>1</sup>, 饶雪娥<sup>1</sup>, 林坤鑫<sup>1</sup>, 余阿妹<sup>1</sup>(1.福建卫生职业技术学院药系, 福州 350101; 2.中南大学化学化工学院, 长沙 410083)

**摘要:** 目的 通过余甘子醇提取物和盐提取物对消化道代表菌种大肠杆菌的抑菌试验, 确定余甘子对消化道菌群的最佳抑制提取物, 并确定最佳抑菌部位, 从而进行该部位对消化道菌群的抑制作用研究。方法 采用管碟法用余甘子醇提取物和盐水浸提物对消化道代表菌种大肠杆菌进行抑菌试验, 测量抑菌圈直径及菌落生长状况来确定最佳抑菌提取物及最佳抑菌部位。采用宏量肉汤稀释法(试管法)进行该部位对消化道菌群的抑菌试验, 测定最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)值。结果 抑菌试验显示余甘子醇提取物和盐提取物均有抑菌作用, 且盐提取物抑菌作用较强, 其最佳的抑菌部位为乙酸乙酯部位。余甘子醇提取物和盐提取物乙酸乙酯部位对各菌群的 MIC 值表明, 对消化道常见菌群均有抑菌效果, 且对厌氧菌的抑菌效果比需氧菌更好。结论 余甘子盐提取物的抑菌效果优于醇提取物, 乙酸乙酯部位对消化道菌群有较强抑菌作用。

**关键词:** 余甘子; 消化道菌群; 提取物; 乙酸乙酯部位; 抑菌作用; 最低抑菌浓度

中图分类号: R285.6

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)09-1045-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.09.003

### Bacteriostatic Comparison of Different Extracts of the Fruit of *Phyllanthus Emblica* L. on the Microflora of the Digestive Tract

LUO Lan<sup>1</sup>, LIU Jiajia<sup>2</sup>, ZHU Hongyang<sup>1</sup>, RAO Xue'e<sup>1</sup>, LIN Kunxin<sup>1</sup>, YU Amei<sup>1</sup>(1. Medicine Department, Fujian Health College, Fuzhou 350101, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the bacteriostatic action of ethanol extracts and salt extracts of the fruit of *Phyllanthus emblica* L. on the microflora of the digestive tract, and determine its best antimicrobial part, so as to carry out its bacteriostatic effect. **METHODS** The bacteriostatic action of ethanol extracts and salt extracts of the fruit of *Phyllanthus emblica* L. was determined by cup plate method, and their MICs were measured by doubling dilution method. The bacteriostatic test of the active part to the microflora on the digestive tract was determined by macro broth dilution method. And their MICs were measured. **RESULTS** The test by comparing the inhibition zone diameter and colony growth conditions indicated alcohol extracts and salt extracts of *Phyllanthus emblica* L. had strong inhibitory effect, the best site for the antibacterial was ethyl acetate portion. The salt extracts had the better bacteriostatic action. The MICs showed not only ethanol extracts but also salt extracts had inhibitory effect, and had better effect on the anaerobe. **CONCLUSION** Antibacterial effect of salt extracts was better than the alcohol extract, and ethyl acetate portion had better inhibitory action on gastrointestinal microflora.

**KEY WORDS:** *Phyllanthus emblica* L.; gastrointestinal flora; extract; ethyl acetate portion; inhibition; minimal inhibitory concentration

余甘子(*Phyllanthi Fructus*)是大戟科(Euphorbiaceae)叶下珠属(*Phyllanthus*)植物余甘子(*Phyllanthus*

*emblica* L.)的成熟果实。余甘子味甘、酸、涩, 性凉, 具有清热凉血, 消食健胃, 生津止渴的功效,

基金项目: 福建卫生职业技术学院生物医药工程中心开放基金项目(2014-KFJJ-PT-3)

作者简介: 罗兰, 女, 硕士, 讲师 Tel: 18960868933 E-mail: fjluolan@qq.com

可用于治疗血热血瘀、消化不良、腹胀、咳嗽、喉痛、口干等<sup>[1]</sup>。余甘子是一味卫生部颁布的药食兼用的重要传统民族药物,自1977年起的历版中国药典中均有收载。全世界约有17个国家在传统药物中使用余甘子,而我国约有16个民族使用该药<sup>[2]</sup>。

近年来,关于余甘子抗菌、抗炎作用已有报道,现代药理研究证实<sup>[3-6]</sup>,余甘子具有广泛的抗菌能力,对常见的枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌以及沙门氏菌有很好的抑制作用,对革兰氏阳性菌的抑制活性大于革兰氏阴性菌。福建盛产余甘子,常见于酒泡和盐腌治疗腹泻和健胃消食。本研究对福建常见余甘子处理方法所得提取物采用管碟法<sup>[7]</sup>和宏量肉汤稀释法<sup>[8]</sup>,比较盐提物和醇提物对消化道菌群的抑菌作用。

## 1 材料

余甘子采购于福建省惠安县紫山镇,由福建卫生职业技术学院中药教研室朱扶蓉副教授鉴定为大戟科余甘子 *Phyllanthus emblica* L.的果实。

SPX-280 型生化培养箱(宁波市科技园区新江南仪器有限公司);TS-100C 型恒温摇床(上海天呈试验仪器制造有限公司);SW-CJ-2FD 型洁净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);FD-1C-50 型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);SY-2002 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司);DW-86L388 型超低温保存箱(青岛海尔特种电器有限公司);RE-52A 型旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限责任公司)。

细菌琼脂粉(北京陆桥技术有限公司,批号:20110303);牛肉浸膏(北京陆桥技术有限公司,批号:20100903);营养肉汤(杭州天和微生物试剂有限公司,批号:121227);维生素 K<sub>1</sub>(成都格雷西亚化学技术有限公司,批号:20130223,CAS号:84-80-0);氯化血红素(成都格雷西亚化学技术有限公司,批号:20130307,CAS号:16009-13-5);布氏肉汤(北京陆桥商检新技术公司,批号:011210);MH 肉汤(杭州天和微生物试剂有限公司,批号:121122);MGC AnaeroPack 系列厌氧产气袋(日本三菱瓦斯化学株式会社,批号:2297LJ-4),其他试剂均为分析纯。

大肠杆菌(ATCC 25922)、奇异变形杆菌(ATCC 35659)、金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、表皮葡萄球菌(ATCC 12228)、肠道沙门氏菌(ATCC 14028)、白色念珠菌(ATCC 90029)、枯草芽孢杆菌(ATCC

6538)、肺炎链球菌(ATCC 49619)、产气荚膜杆菌(ATCC 13124)、破伤风杆菌(ATCC 19404)由福建卫生职业技术学院医学技术系微生物教研室提供。

## 2 方法与结果

### 2.1 提取物的制备

**2.1.1 余甘子醇提物的制备** 取新鲜余甘子,用蒸馏水洗净晾干,用80%乙醇常温浸提30d,过滤。取适量减压回收溶剂得流浸膏,将其溶解分散于蒸馏水中,冻干成粉末,保存于4℃冰箱中,临用前用蒸馏水配制成所需浓度。

**2.1.2 余甘子盐提物的制备** 取新鲜余甘子,用蒸馏水洗净晾干,用80%氯化钠水溶液常温浸提30d,过滤。取适量减压回收溶剂得流浸膏,将其溶解分散于蒸馏水中,冻干成粉末,保存于4℃冰箱中,临用前用蒸馏水配制成所需浓度。

**2.1.3 不同极性萃取物的制备** 取适量余甘子醇提物和盐提物,分别用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇各萃取3次,分别得石油醚部、三氯甲烷部、乙酸乙酯部和正丁醇部和水余部,将5个部位的提取物减压回收溶剂得流浸膏,冻干成粉末,保存于4℃冰箱中,临用前配制成所需浓度。

### 2.2 余甘子醇提物和盐提物不同部位对大肠杆菌的抑菌作用

取大肠杆菌接种于MH琼脂平板,35℃培养过夜,用MH液体培养基制作菌悬液,并稀释至 $10^{-2}$ ,取适量与MH琼脂培养基混匀制作双层MH琼脂平板(管碟法)。将余甘子醇提物及盐提物的石油醚部、乙酸乙酯部、三氯甲烷部、正丁醇部、水余部的干粉配制成一定浓度,灭菌,备用。将平板均分为4个区域,在每块区域的培养基表面放置牛津杯,每区域1只,在对角区域的牛津杯内分别加入相同浓度的不同部位的余甘子提取溶液,相邻区域分别加入不同浓度的不同部位的余甘子溶液,每个浓度设定3个平行组,空白对照组为无菌水,阳性对照组为 $0.02 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 庆大霉素溶液。每只牛津杯加入不同部位的余甘子醇提物和盐提物( $10, 5, 2, 1, 0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )溶液 $100 \mu\text{L}$ ,空白对照组加入 $100 \mu\text{L}$ 无菌水。置35℃恒温培养20h后观察,通过比较抑菌圈大小来显示不同部位的余甘子醇提物和盐提物的抑菌作用。结果显示,与庆大霉素对大肠杆菌产生极敏效果做比较,余甘子醇提物和盐提物5个部位均对大肠杆菌具有抑制作用,随浓度降低,抑菌作用明显降低,

乙酸乙酯部的抑菌效果最佳，石油醚次之。由此可知，乙酸乙酯部是余甘子醇提物和盐提物中最佳抑菌部位，且盐提物的抑菌效果明显高于醇提物。结果见表 1。

**表 1** 余甘子不同部位提取物对大肠杆菌的抑菌作用( $n=3$ )  
**Tab. 1** Bacteriostatic action of different extracts of the fruit of *Phyllanthus emblica* L.( $n=3$ )

组别	浓度/ mg·mL <sup>-1</sup>	抑菌环直径/cm				
		石油 醚部	乙酸 乙酯部	三氯 甲烷部	正丁 醇部	水余部
醇提物	10	2.45	2.86	0.80	1.20	0.64
	5	2.19	2.20	0	0.40	0
	2	1.54	1.81	0	0	0
	1	0.80	1.15	0	0	0
	0.5	0	0.80	0	0	0
盐提物	10	1.57	3.57	0.50	1.00	0.64
	5	1.40	2.80	0.10	0.56	0
	2	1.00	1.62	0	0.17	0
	1	0.60	1.15	0	0	0
	0.5	0	0.80	0	0	0
空白对照组	0	0	0	0	0	0
庆大霉素组	0.02	2.56	2.56	2.56	2.56	2.56

注：抑菌圈 $\geq 2.00$  cm 为极敏； $1.50 < 2.00$  cm 为高敏； $> 1.00 < 1.50$  cm 为中敏； $> 0 < 1.00$  cm 低敏；0 为不敏。

Note: inhibition zone  $\geq 2.00$  cm, extremely sensitive;  $1.50 < 2.00$  cm, highly sensitive;  $> 1.00 < 1.50$  cm, middle sensitive;  $> 0 < 1.00$  cm, low sensitivity; 0, not sensitive.

**表 2** 余甘子醇提物及盐提物乙酸乙酯部位对消化道各需氧菌种的抑菌作用和 MIC( $n=3$ )

**Tab. 2** The MICs of aerobe of ethyl acetate extracted from the fruit of *Phyllanthus emblica* L.( $n=3$ )

组别	菌株	浓度/mg·mL <sup>-1</sup>									
		5.000	2.500	1.250	0.625	0.312	0.156	0.078	0.039	0.019	空白
醇提物乙酸乙酯部位	金黄色葡萄球菌	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	表皮葡萄球菌	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	枯草芽孢杆菌	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	肺炎链球菌	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	白色念珠菌	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	大肠杆菌	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	变形杆菌	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	沙门氏菌	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
盐提物乙酸乙酯部位	金黄色葡萄球菌	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	表皮葡萄球菌	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	枯草芽孢杆菌	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	肺炎链球菌	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	白色念珠菌	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	大肠杆菌	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	变形杆菌	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	沙门氏菌	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

注：“-”代表无菌落生长，“+”代表有菌落生长。

Note: “-”No bacterium growing; “+” bacterium growing.

**2.3** 余甘子醇提物和盐提物乙酸乙酯部位对消化道各菌种的抑菌作用和最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)

**2.3.1** 对消化道各需氧菌种的抑菌作用和 MIC 取大肠杆菌、变形杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、沙门氏菌、白色念珠菌、枯草芽孢杆菌、肺炎链球菌接种于 MH 琼脂平板上，35 °C 培养过夜，用无菌生理盐水制作菌悬液，并调整菌液浓度至 0.5 麦氏比浊相当。将余甘子醇提物及盐提物乙酸乙酯部干粉配制成一定浓度，灭菌，保存于 -60 °C 以下。按宏量肉汤稀释法进行操作，混匀后，置于 35 °C 恒温培养 18~24 h 后，得 MIC。

余甘子醇提物乙酸乙酯部对消化道各需氧菌种的抑菌作用随着余甘子醇提物乙酸乙酯部浓度的降低而抑制作用明显降低，乙酸乙酯部对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、变形杆菌、沙门氏菌的 MIC 值均为 2.500 mg·mL<sup>-1</sup>，对肺炎链球菌的 MIC 值为 0.625 mg·mL<sup>-1</sup>，对大肠杆菌 MIC 值为 1.250 mg·mL<sup>-1</sup>；盐提物的乙酸乙酯部对表皮葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、变形杆菌、沙门氏菌的 MIC 值均为 2.500 mg·mL<sup>-1</sup>，对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌的 MIC 值均为 1.250 mg·mL<sup>-1</sup>。结果见表 2。

**2.3.2** 对消化道各厌氧菌种的抑菌作用和 MIC 取产气荚膜杆菌和破伤风杆菌接种于血琼脂平板, 35 °C 厌氧培养过夜, 用已加入适量维生素 K<sub>1</sub> 和氯化血红素的布氏肉汤制作菌悬液, 并调整菌液浓度至 0.5 麦氏比浊相当。将余甘子醇提取物及盐提取物乙酸乙酯部干粉配制成一定浓度, 灭菌, 保存于-60 °C 以下。按宏量肉汤稀释法进行操作, 混合后置于 37 °C 恒温厌氧培养 18~24 h, 观察抑菌

作用。结果显示, 余甘子醇提取物对消化道各需氧菌种的抑菌作用随着余甘子醇提取物乙酸乙酯部浓度的降低而抑制作用明显降低, 余甘子醇提取物的乙酸乙酯部对破伤风杆菌的 MIC 值为 0.156 mg·mL<sup>-1</sup>, 对产气荚膜杆菌的 MIC 值为 1.250 mg·mL<sup>-1</sup>。余甘子盐提取物的乙酸乙酯部对破伤风杆菌的 MIC 值为 0.312 mg·mL<sup>-1</sup>, 对产气荚膜杆菌的 MIC 值为 0.625 mg·mL<sup>-1</sup>。结果见表 3。

**表 3** 余甘子醇提取物及盐提取物乙酸乙酯部位对消化道各厌氧菌种的抑菌作用和 MIC(n=3)

**Tab. 3** The MICs of anaerobe of ethyl acetate part extracted from the fruit of *Phyllanthus emblica* L.(n=3)

组别	菌株	浓度/mg·mL <sup>-1</sup>									
		5.000	2.500	1.250	0.625	0.312	0.156	0.078	0.039	0.019	空白
醇提取物乙酸乙酯部位	破伤风杆菌	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	产气荚膜杆菌	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
盐提取物乙酸乙酯部位	破伤风杆菌	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	产气荚膜杆菌	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

### 3 讨论

通过余甘子醇提取物中 5 个部位(石油醚部、乙酸乙酯部、三氯甲烷部、正丁醇部、水余部)对大肠杆菌的抑菌作用, 测量抑菌圈的直径和比较菌落生长状况, 可得出余甘子醇提取物和盐提取物的 5 个部位对大肠杆菌均具有抑制作用, 且随浓度的降低, 抑菌效果明显降低, 其中乙酸乙酯部的抑菌效果最强, 石油醚次之。即乙酸乙酯部位抑菌活性最强, 是余甘子的主要抑菌活性部位, 且盐提取物的乙酸乙酯部位抑菌效果较醇提取物的乙酸乙酯部位更好。

通过对余甘子醇提取物和盐提取物乙酸乙酯部位的消化道菌群抑菌实验, 余甘子醇提取物和盐提取物中乙酸乙酯部位对需氧菌和厌氧菌的 MIC 数据对比, 可得出余甘子醇提取物和盐提取物的乙酸乙酯部位对厌氧菌的抑菌效果比对需氧菌的抑菌效果好。

余甘子主要成分有黄酮类、多糖、蛋白质、生物碱、香豆素、有机酸、微量元素及挥发油等<sup>[9-11]</sup>。盐水中主要为多糖、蛋白质、生物碱、有机酸类成分。因此, 初步可推测余甘子抑菌的化学成分为多糖和有机酸类成分。

近年来, 有关耐药菌株的报道越来越多, 而大量研究发现, 中药在预防和治疗细菌性感染疾病上具有积极作用。而且由于中药化学成分组成复杂, 对细菌具有广谱抑菌性和低耐药性等优点。本研究发现, 余甘子对消化道菌群具有较广谱的抑制作用, 为中药抗菌作用的研究和开发提供了实验数据和理论依据。

### REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 167.
- [2] XIA Q, XIAO P E, WANG L E. Ethnopharmacology of *Phyllanthus emblica* L. [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 1997, 22(9): 515-518.
- [3] ZHAO M M, LIU X L, CUI C, et al. Composition and antimicrobial activity of essential oil from *Phyllanthus emblica* L. by supercritical CO<sub>2</sub> extraction [J]. J South China Univ Technol(Nat Sci Edit)(华南理工大学学报: 自然科学版), 2007, 35(12): 116-120.
- [4] DENG C B, XIE Q J, QU Z T. Bacteriostatic action of 4 ethanol extracts of the fruit of *Phyllanthus emblica* L. [J]. J China Pharm (中国药房), 2010, 21(3): 209-211.
- [5] TANG C H, CHEN G, CHEN D M, et al. Study on antimicrobial activity of crude extract from *Phyllanthus emblica* L. [J]. Food Sci(食品科学), 2009, 30(7): 106-108.
- [6] XI X R. Research progress of antibacterial effect of *Phyllanthus emblica* L. [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm(中国民族民间医药), 2010 19(3): 46-50.
- [7] CHANG C, DONG C, YANG H T, et al. *In vivo* and *in vitro* antibacterial action study on Oinghou Buccal tablets [J]. J China Pharm(中国药房), 2006, 17(5): 336-338.
- [8] CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-ninth edition [J]. Chin J Lab Med(中华检验医学杂志), 2012, 39(2): 1-63.
- [9] LIU X L, ZHAO M M, YANG B, et al. Antioxidant activities and functional composition content of *Phyllanthus emblica* L. fruits [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2007, 19(2): 188-192.
- [10] XU Y X. Study on the chemical composition of *Phyllanthus emblica* L. and extraction technology of total phenolics [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2009.
- [11] LIU X L, ZHAO M M, CUI C, et al. A study of the composition of essential oils from *Emblca (Phyllanthus emblica) L.* Fruit by supercritical fluid extraction and their antioxidant activity [J]. J Southwest Univ(Nat Sci Edit)(西南大学学报: 自然科学版), 2007, 29(5): 122-127.

收稿日期: 2013-11-12