

# 余甘子醇提物不同萃取部位对人消化道常见菌的抑制作用研究<sup>△</sup>

罗 兰\*,余阿妹,林坤鑫(福建卫生职业技术学院药学院,福州 350101)

中图分类号 R285;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)07-0593-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.07.06

**摘要** 目的:研究余甘子醇提物4种不同萃取部位对人消化道常见菌的抑制作用。方法:采用管碟法进行余甘子醇提物及醇提物中石油醚、乙酸乙酯、三氯甲烷、水部位对大肠杆菌的抑菌试验,测量其抑菌圈直径以确定最佳抑菌部位,二倍稀释法测定最低抑菌浓度(MIC)。采用宏量肉汤稀释法(试管法)进行余甘子醇提物最佳抑菌部位对消化道菌群的抑菌试验,测定其MIC。结果:余甘子醇提物对大肠杆菌的MIC为0.625 mg/ml。余甘子醇提物乙酸乙酯部位为最佳抑菌部位,其对金黄色葡萄球菌、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均为2.5 mg/ml,对肺炎链球菌的MIC为0.625 mg/ml,对大肠杆菌和产气荚膜杆菌的MIC均为1.25 mg/ml,对破伤风杆菌的MIC为0.156 mg/ml。结论:余甘子醇提物乙酸乙酯部位对消化道常见菌群有较强的抑制作用。

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

## Study on Bacteriostatic Action of Different *Phyllanthus emblica* Ethanol Extracts on Common Gastrointestinal Flora

LUO Lan, YU A-mei, LIN Kun-xin (Dept. of Pharmacy, Fujian Health College, Fuzhou 350101, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the bacteriostatic action of 4 ethanol extracts of *Phyllanthus emblica* on common gastrointestinal flora. METHODS: The bacteriostatic action of Petroleum ether extract, ethyl acetate extract, chloroform extract, water extract from ethanol extracts of *P. emblica* was determined by cup plate method. The diameter of inhibition zone was measured to confirm optimal bacteriostatic site, and their MICs were measured by doubling dilution method. The bacteriostatic test of the active part to gastrointestinal flora was determined by macro broth dilution method, and their MICs were measured. RESULTS: MIC of ethanol extract of *P. emblica* to *Escherichia coli* were 0.625 mg/ml. MIC of acetic ether part of ethanol extract from *P. emblica* to *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Proteus*, *Salmonella* were 2.5 mg/ml; that to *Streptococcus pneumoniae* was 0.625 mg/ml; that to *E. coli* and *Clostridium perfringens* both were 1.25mg/ml; that to *Bacillus tetani* was 0.156 mg/ml. CONCLUSIONS: The best active part of ethanol extract from *P. emblica* is acetic ether portion.

**KEYWORDS** *Phyllanthus emblica*; Gastrointestinal flora; Ethanol extract; Ethyl acetate portion; Inhibition; MIC

余甘子是大戟科(Euphorbiaceae)叶下珠属(*Phyllanthus*)植物余甘子(*Phyllanthus emblica* L.)的干燥成熟果实。味甘、酸、涩,性凉,具有清热凉血、消食健胃、生津止渴的功效<sup>[1]</sup>。别名滇橄榄、橄榄、油甘子、望果,藏药称“久如拉”,傣药称“麻项帮”,古印度梵语称“庵摩勒”等<sup>[2]</sup>。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>[3]</sup>。该药主要具有抗菌、抗衰老、抗肿瘤、保肝、降血脂、降血糖、利咽、抗炎镇痛等药理作用<sup>[4-12]</sup>。

福建民间一直有用新鲜余甘子治疗腹泻的习俗,近年来出现了余甘子叶、余甘子精油、余甘子干果<sup>[4-6]</sup>抑菌作用的报道,但余甘子对消化道常见菌群的抑制作用尚未见报道。为进一步寻找其抑菌活性成分,笔者测试了余甘子醇提物不同萃取部位的抑菌作用,并测试抑菌部位的最低抑菌浓度(MIC)。以为余甘子制剂的应用提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

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)。

### 1.2 药材

新鲜余甘子,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真品。

### 1.3 试剂

细菌琼脂粉(批号:20110303)、布氏肉汤(批号:011210)、牛肉浸膏(批号:20100903)均购自北京陆桥技术有限公司;MH肉汤(批号:121132)、营养肉汤(批号:121227)均购自杭州天和微生物试剂有限公司;维生素K<sub>1</sub>(批号:20130223)、氯化血红素(批号:20130307)均购自成都格雷西亚化学技术有限公司;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);其余试剂均为分析纯。

### 1.4 菌种

大肠杆菌(ATCC 25922)、变形杆菌(ATCC 35659)、金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、表皮葡萄球菌(ATCC 12228)、肠

△基金项目:福建省教育厅B类科技项目(No.JB12312)

\*讲师。研究方向:中药药效物质基础与质量控制。E-mail:

fjluluan@qq.com

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)均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

### 2.1 提取物的制备

取新鲜余甘子适量,用蒸馏水洗净晾干,95%乙醇浸提,滤过。减压回收溶剂得余甘子醇提物流浸膏,将其溶解分散于蒸馏水中,冻干成粉末,4℃贮藏,临用前用蒸馏水制备成所需质量浓度。另取适量余甘子醇提物冻干粉,蒸馏水溶解,分别用石油醚、乙酸乙酯、三氯甲烷各萃取3次,分别得余甘子醇提物石油醚部位、乙酸乙酯部位、三氯甲烷部位和水部位,将4个部位的提取物减压回收溶剂得流浸膏,将其分别溶解分散于蒸馏水中,冻干成粉末,4℃贮藏,临用前制备成所需质量浓度。

### 2.2 菌液的制备

分别对各菌种接种、常规培养至3代,备用。取培养后的细菌原液,采用10倍稀释法稀释,依次标记为 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ ... $10^{-8}$ ,各质量浓度分别做2个平行试验。

### 2.3 抑菌试验

采用管碟法<sup>[13]</sup>,取菌种接种于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。将冻干粉制备成一定质量浓度的溶液,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加入相同质量浓度的余甘子提取物溶液(40、20、10、5、2.5 mg/ml),相邻区域加入不同质量浓度的余甘子提取物溶液,每个质量浓度设定2个平行组,空白对照为无菌水,阳性对照为0.02 mg/ml庆大霉素溶液。于35℃恒温培养20 h后观察结果。采用二倍稀释法<sup>[14]</sup>,用培养基将药物稀释成不同质量浓度的供试品溶液,分别加入0.1 ml菌液(0.5麦氏比浊度,100倍稀释),将其置于培养箱中,37℃培养18 h后接种于MH平板培养过夜,观察结果。未见细菌生长最低质量浓度的为MIC,每个样品设2个平行组,结果以平均值计。

### 2.4 MIC试验

2.4.1 需氧菌种MIC试验 按照宏量肉汤稀释法<sup>[15]</sup>操作,取不同菌种置于MH琼脂平板,35℃培养过夜,用无菌生理盐水制作菌悬液,并调整菌浓度至0.5麦氏浊度相当。将余甘子乙酸乙酯部位冻干粉以蒸馏水制备成一定质量浓度溶液,灭菌,贮藏于-60℃以下。取无菌试管10支,第1管加3.8 ml MH肉汤液体培养基,2~10管各加2 ml液体培养基。以无菌操作吸取已稀释至一定质量浓度并灭菌好的余甘子醇提物乙酸乙酯部位溶液200 μl,混匀后吸取2 ml加入第2管中,依次倍比稀释至第9管,混匀后自第9管弃去2 ml,第10管不加余甘子醇提物乙酸乙酯部位溶液作为空白对照管。用微量加样器取已校正质量浓度的各菌种0.05 ml,依次由低质量浓度向高质量浓度加到各管中。混匀后于35℃恒温培养18~24 h。

2.4.2 厌氧菌种MIC试验 取产气荚膜杆菌和破伤风杆菌接种于血琼脂平板,35℃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,并调整菌浓度至0.5麦氏浊度相当。将余甘子醇提物乙酸乙酯部位冻干粉以蒸馏水制备成一定质量浓度溶液,灭菌,贮藏于-60℃以下。取无菌

试管10支,第1管加3.8 ml已加入适量维生素K<sub>1</sub>和氯化血红素的布氏肉汤液体培养基,2~10管各加2 ml液体培养基。以无菌操作吸取已稀释至一定质量浓度并灭菌好的余甘子醇提物乙酸乙酯部位溶液200 μl,混匀后吸取2 ml加入第2管中,依次倍比稀释至第9管,混匀后自第9管弃去2 ml,第10管不加余甘子醇提物乙酸乙酯部位溶液作为空白对照管。用微量加样器取已校正质量浓度的各菌种0.01 ml,依次由低质量浓度向高质量浓度加到各管中。混匀后于37℃恒温厌氧培养18~24 h。

## 3 结果

### 3.1 余甘子醇提物对大肠杆菌的抑制作用

与无菌水、庆大霉素比较抑菌圈大小(抑菌圈直径单位均为cm),余甘子醇提物对大肠杆菌有明显的抑制作用,且随着余甘子醇提物质量浓度的升高而抑制作用明显增强,在质量浓度为0.312 5 mg/ml时开始有菌落生长,余甘子醇提物对大肠杆菌的MIC为0.625 mg/ml。余甘子醇提物对大肠杆菌的抑制作用见表1;对大肠杆菌的MIC见表2。

表1 余甘子醇提物对大肠杆菌的抑制作用(cm, n=2)

药物	质量浓度,mg/ml				
	40	20	10	5	2.5
余甘子醇提物	2.11	1.95	1.68	1.4	1.08
无菌水	0	0	0	0	0
庆大霉素	2.56	2.56	2.56	2.56	2.56

表2 余甘子醇提物对大肠杆菌的MIC(n=2)

Tab 2 MIC of ethanol extracts of *P. emblica* on *E. coli*(n=2)

菌种	质量浓度,mg/ml				
	2.5	1.25	0.625	0.312 5	0.156 25
大肠杆菌	-	-	-	+	+

注:“-”代表无菌落生长,“+”代表有菌落生长

note:“-”means no flora,“+”mean flora was found

### 3.2 余甘子醇提物不同萃取部位对大肠杆菌的抑制作用

余甘子醇提物4个萃取部位均对大肠杆菌有抑制作用,且随着质量浓度的升高抑菌效果增强,其中乙酸乙酯部位的抑菌效果最佳,石油醚部位次之,而三氯甲烷部位和水部位几乎不具有抑菌作用。余甘子醇提物不同萃取部位对大肠杆菌的抑制作用见表3。

表3 余甘子醇提物不同萃取部位对大肠杆菌的抑制作用(cm, n=2)

Tab 3 Bacteriostatic action of ethanol extracts from different parts of *P. emblica* on *E. coli*(cm, n=2)

药物	质量浓度,mg/ml				
	10	5	2	1	0.5
石油醚部位	2.45	2.19	1.54	0.80	0
乙酸乙酯部位	2.86	2.20	1.81	1.15	0.80
三氯甲烷部位	0.80	0	0	0	0
水部位	0.64	0	0	0	0
无菌水	0	0	0	0	0
庆大霉素(0.02 mg/ml)	2.56	2.56	2.56	2.56	2.56

### 3.3 余甘子醇提物乙酸乙酯部位对消化道各菌种的抑制作用和MIC

#### 3.3.1 余甘子醇提物乙酸乙酯部位对消化道各需氧菌种的抑

制作用和MIC 按照宏量肉汤稀释法<sup>[15]</sup>,余甘子醇提物乙酸乙酯部位对消化道各需氧菌种的抑制作用较为明显,且随质量浓度的升高抑菌效果增强;余甘子醇提物乙酸乙酯部位对金黄色葡萄球菌、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均为2.5 mg/ml,对肺炎链球菌的MIC为0.625 mg/ml,对大肠杆菌则MIC为1.25 mg/ml。余甘子醇提物乙酸乙酯部位对消化道各需氧菌种的抑制作用见表4。

表4 余甘子醇提物乙酸乙酯部位对消化道各需氧菌种的抑制作用(n=2)

Tab 4 Inhibition effect of acetic ether part of ethanol extract from *P. emblica* on gastrointestinal aerobe(n=2)

菌种	质量浓度,mg/ml									
	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.0785	0.039	0.019	0
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:“-”means no flora,“+”mean flora was found

3.3.2 余甘子醇提物乙酸乙酯部位对消化道各厌氧菌种的抑制作用和MIC 按照宏量肉汤稀释法<sup>[15]</sup>,余甘子醇提物乙酸乙酯部位对消化道各厌氧菌种有较强抑制效果;对破伤风杆菌的MIC值为0.156 mg/ml,对产气荚膜杆菌的MIC值为1.25 mg/ml。余甘子醇提物乙酸乙酯部位对消化道各厌氧菌种的抑制作用见表5。

表5 余甘子醇提物乙酸乙酯部位对消化道各厌氧菌种的抑制作用(n=2)

Tab 5 Inhibition effect of acetic ether part of ethanol extract from *P. emblica* on gastrointestinal anaerobia(n=2)

菌种	质量浓度,mg/ml									
	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.078	0.039	0.019	0
破伤风杆菌	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
产气荚膜杆菌	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

注:“-”代表无菌落生长,“+”代表有菌落生长

note:“-”means no flora,“+”mean flora was found

#### 4 讨论

通过测量抑菌圈的直径和比较菌落生长状况可知,余甘子醇提物4个萃取部位(石油醚部位、乙酸乙酯部位、三氯甲烷部位和水部位)对大肠杆菌具有抑制作用,且随着质量浓度的增加,抑菌效果也明显增强。其中,乙酸乙酯部位的抑菌效果最强,石油醚部位次之,而三氯甲烷部位和水部位几乎不具有抑菌作用。表明乙酸乙酯部位是余甘子醇提物的主要抑菌活性部位。

通过余甘子醇提物中乙酸乙酯部位对于消化道菌群的抑菌试验可知,余甘子醇提物乙酸乙酯部位对大肠杆菌的MIC值为1.25 mg/ml,对变形杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、沙门氏菌、白色念珠菌、枯草芽孢杆菌的MIC均为2.5 mg/ml,对肺炎链球菌的MIC为0.625 mg/ml;对破伤风杆菌的MIC为0.156 mg/ml,对产气荚膜杆菌的MIC为1.25 mg/ml。其中,

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、肺炎链球菌都属于需氧菌,而破伤风杆菌和产气荚膜杆菌属于厌氧菌。结果表明,余甘子醇提物中乙酸乙酯部位对厌氧菌的抑制效果较对需氧菌的抑制效果好。

近年来,有关耐药菌株的报道越来越多,而我国是抗生素使用最多的国家之一。研究人员渐渐将研究目标转向了我国丰富的中药资源。大量的研究发现,中药在预防和治疗细菌性感染疾病上具有积极的作用,且其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,这可为中药抗菌作用的研究和开发提供参考。

#### 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:167.
- [2] 王文光,孔楠,袁唯.余甘子的功能成分及其综合利用[J].中国食物与营养,2007(12):20.
- [3] 夏泉,肖培根,王立力.传统药物余甘子的民族药学研究[J].中国中药杂志,1997,22(9):515.
- [4] 赵谋明,刘晓丽,崔春,等.超临界CO<sub>2</sub>萃取余甘子精油成分及精油抑菌活性[J].华南理工大学学报:自然科学版,2007,35(12):116.
- [5] Liu XL, Zhao MM, Yang B, et al. Antioxidant activities and functional composition content of *Phyllanthus emblica* L. fruits[J]. *Nat Prod Res*, 2007, 19(2):188.
- [6] 罗春丽.余甘子对肿瘤细胞抑制作用及免疫调节的研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(13):155.
- [7] 吉守祥,鞠怀强,向阳飞.余甘子等28种藏药提取物体外抗乙型肝炎病毒的实验研究[J].中药材,2011,34(3):438.
- [8] 朱英环,孟宪生,包永睿.余甘子总酚酸和总黄酮配伍抑制肝癌细胞增殖及对免疫功能的调节作用[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(3):132.
- [9] 童丽,吴萍,张广梅,等.二十五味余甘子丸对血隆病大鼠肝肾功能及血脂的影响[J].甘肃中医,2008,21(12):9.
- [10] 席晓蓉,邢海晶,赵文娟,等.复方余甘子含片对人口咽部甲型链球菌及唾液SIgA的影响[J].中医药导报,2010,16(12):85.
- [11] 高鹰,李存仁.余甘子的抗炎作用与毒性的实验研究[J].云南中医中药杂志,1996,17(2):50.
- [12] 董坤,李昌炜,曲卉,等.余甘子对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌PKB表达和GLUT4mRNA表达的影响[J].第四军医大学学报,2009,30(21):2352.
- [13] 李婧,杜娟,陈征.抗生素微生物检定二剂量管碟法常用菌种培养的研究[J].首都医药,2011,24(14):23.
- [14] 常翠,董淳,杨宏图,等.清喉口含片动物体内外抑菌实验研究[J].中国药房,2006,17(5):336.
- [15] 中华检验医学杂志CLSI临床检验标准编译小组.需氧菌的稀释法抗菌药物敏感性试验批准标准:第9版[J].中华检验医学杂志,2012,12(1):1.

(收稿日期:2013-07-15 修回日期:2013-09-05)