

中药现代化技术

# 黄连和乌梅水提液对肠道菌体外生长的影响

郑进保<sup>1,2</sup>, 何 宁<sup>1</sup>, 卢英华<sup>1,2</sup>, 林文爽<sup>1,2</sup>, 王远鹏<sup>1</sup>,  
孙道华<sup>1</sup>, 杨 坤<sup>1</sup>, 邵文尧<sup>1</sup>, 李清彪<sup>1,2\*</sup>

(1. 厦门大学 化学化工学院 化学工程与生物工程系, 福建 厦门 361005; 2 福建省化学生物学省重点实验室, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 通过滤纸片法初步测定了黄连和乌梅水提液的抗菌性能, 用比浊法进一步考察了它们对 5 种肠道菌体外生长的影响。结果表明, 0.001 g/mL 黄连和乌梅水提液均能够有效抑制产气荚膜梭菌和金黄色葡萄球菌的生长, 轻微促进干酪乳杆菌的生长, 但对嗜酸乳杆菌的生长只有微弱的抑制作用。0.01 g/mL 黄连水提液对大肠杆菌的生长影响不大。而 0.001 g/mL 乌梅水提液可促进大肠杆菌的生长, 但当质量浓度升高至 0.005 g/mL 时, 则对大肠杆菌的生长表现出抑制作用。因此, 黄连、乌梅水提液可能是潜在的益生元, 是功能性食品配料、绿色饲料添加剂的候选者。

**关键词:** 黄连; 乌梅; 肠道菌; 水提液; 天然抗菌剂; 中药现代化技术

中图分类号: R 282.71; R 378 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214(2008)08-0758-05

## Effects of Aqueous Extracts of *Coptis Chinensis* Franch and *Prunus Mume* on Intestinal Bacteria *in Vitro*

ZHENG Jin-bao<sup>1,2</sup>, HE Ning<sup>1</sup>, LU Ying-hua<sup>1,2</sup>, LIN Wen-shuang<sup>1,2</sup>, WANG Yuan-peng<sup>1</sup>, SUN Dao-hua<sup>1</sup>, YANG Kun<sup>1</sup>, SHAO Wen-yao<sup>1</sup>, LI Qing-biao<sup>1,2\*</sup>

(1 Department of Chemical and Biochemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China; 2 Key Lab for Chemical Biology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

**Abstract** The effects of aqueous extracts from *C. chinensis* Franch root (*Coptis* root)-derived and *P. mume* fruit-derived materials on the growth of intestinal bacteria were examined firstly by using impregnated paper disk method, and further by using spectrophotometric method. Both *Coptis* root and *P. mume* extracts exhibited potent inhibition against *Clostridium perfringens* and *Staphylococcus aureus* at mass concentration as low as 0.001 g/mL, whereas only weak inhibitory activity was detected against *Lactobacillus acidophilus*. Moreover, growth of *Lactobacillus casei* was slightly promoted by both extracts at the same mass concentration. No inhibition against *Escherichia coli* was observed from treatment with *Coptis* root extracts even at 0.01 g/mL. On the contrary, *P. mume* extracts showed slight stimulation effects on the growth of *E. coli* at 0.001 g/mL, but exhibited significant growth inhibition at 0.005 g/mL. These results indicated that *Coptis* extracts and *P. mume* extracts may be potential prebiotics and could be alternatives for functional food additives and green feed additives.

**Key words** *Coptis chinensis* Franch; *Prunus mume*; aqueous extracts; natural antibacterial agent; intestinal bacteria; modernization technology of traditional Chinese medicines

\*收稿日期: 2008-02-29 定用日期: 2008-04-16

作者简介: 郑进保 (1982-), 男, 福建漳州人, 厦门大学硕士研究生, 师从李清彪教授, 从事生物化工领域研究, E-mail: zjb@xmu2005@yahoo.com.cn

联系人: 李清彪 (1963-), 男, 教授, 博士生导师, 电话: 0592-2189595 E-mail: kelq@xmu.edu.cn

肠道菌由有益菌(如双歧杆菌和乳酸菌)和有害菌(如产气荚膜梭菌等)构成, 它们影响宿主免疫能力、生理功能等。肠道菌群平衡的扰乱将引发腹泻等多种疾病, 而菌群失调常常是由于服用抗生素等药物引起<sup>[1]</sup>。益生菌因为可以改善肠道微生物的平衡来促进个体健康而倍受青睐。但由于外源益生菌在肠道内定植时存在拮抗效应, 而益生元可促进肠道内源有益细菌繁殖, 进而促进宿主健康, 故近来人们越来越关注益生元与个体健康的关系<sup>[2]</sup>。

研究已发现, 一些天然产物如风铃木(*Tabebuia impetiginosa*)<sup>[3]</sup>可作为益生元。黄连(*Coptis root*)系毛茛科植物黄连(*Coptis chinensis* Franch)的根茎, 是一种常用中药。它具有抗菌、抗糖尿病、抗肿瘤等功能, 其主要活性成分为生物碱, 其中小檗碱对一些革兰氏阳性菌如枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌等的最小抑菌质量浓度(MIC)为 50~400 mg/L<sup>[4]</sup>。Meksepralard C 等报道了黄连提取液对 7 种致病菌如克雷伯肺炎杆菌等的 MIC 为 3.25~6.5 mg/L<sup>[5]</sup>。乌梅(*Prunus mume*)为蔷薇科植物梅(*Prunus mume* (Sieb.) Sieb et Zucc)的近成熟果实熏制或烘制而成, 既是常用中药, 也是可口食品。它不仅具有敛肺、涩肠、生津、安蛔等功效, 而且具有抗肝炎、抗肿瘤等作用。沈红梅等研究了乌梅的采收期、加工方法以及植物基原等对其抗菌性能的影响, 它对痢疾杆菌、绿脓杆菌、伤寒杆菌、变形杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的 MIC 为 0.25~4.00 g/L<sup>[6]</sup>。

黄连、乌梅水提液对肠道菌群如乳杆菌、产气荚膜梭菌等生长的影响尚缺乏较为系统的研究。本研究比较了黄连、乌梅水提液对 5 种肠道菌体外生长的影响, 以期它们作为益生元的进一步研究及从中开发出功能性食品配料、绿色饲料添加剂提供参考。

## 1 实验部分

### 1.1 材料

黄连、乌梅(购于厦门九鼎药房)。

菌种: 产气荚膜梭菌 [*Cl. perfringens* CMCC (B) 64701] 购于中国医学细菌保藏中心; 金黄色葡萄球菌 [*Staph. aureus* CMCC (B) 26003]、大肠杆菌 [*E. coli* CMCC (B) 44103] 厦大生物系馈赠; 嗜酸乳杆菌 (*Lact. acidophilus* AS 1.1854)、干酪乳杆菌 (*Lact. casei* AS 1.2435), 购于中国微生物研究所。

培养基: 产气荚膜梭菌采用 RCM 培养基厌氧培养<sup>[7]</sup>; 金黄色葡萄球菌和大肠杆菌采用 LB 培养基好氧培养; 乳酸杆菌采用 MRS 培养基静置培养。

其他试剂均 AR, 由国药集团化学试剂有限公司提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 黄连、乌梅水提液的制备及分组

称取干燥的乌梅果肉或黄连根茎 50 g 加蒸馏水 300 mL 回流提取 1.5 h 离心过滤, 滤液浓缩至 100 mL (相当于每 mL 中含 0.5 g 原生药的可提物), 灭菌待用。将待用的 0.5 g/mL 水提液添加到相应基础培养基, 使其质量浓度达到 0.001、0.005、0.01 g/mL。以此培养基作为各实验组培养基, 不加水提液者为对照组培养基。

#### 1.2.2 抑菌圈的测定

分别培养乳酸菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌至对数期, 各自接种 100  $\mu$ L 菌悬液 (大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 OD<sub>600</sub> = 0.1, 乳酸菌的 OD<sub>600</sub> = 0.5) 到相应的琼脂平板, 涂布均匀。无菌操作将 6 mm 滤纸片贴至相应的区域, 每片含水提液 10  $\mu$ L, 另取无菌水滤纸片作阴性对照, 以四环素滤纸片作阳性对照, 37  $^{\circ}$ C 培养箱培养 18~24 h 观察结果。用游标卡尺测量抑菌圈的直径, 实验重复 3 次取算术平均值。

#### 1.2.3 对乳酸杆菌生长的影响

各实验组和对照组以体积分数 5% (种子液相对于培养基的体积分数) 的比例分别加入乳酸杆菌菌悬液, 其中, 100 mL 的血清瓶装培养基 40 mL, 37  $^{\circ}$ C 厌氧培养箱中静置培养, 每隔 2~3 h 取菌悬液, 以空白培养基作为空白对照测其 OD<sub>600</sub> 值<sup>[8]</sup> (以 OD 值代表其生长量)。考察不同培养时间和不同质量浓度的水提液对菌体生长的影响。

#### 1.2.4 对产气荚膜梭菌生长的影响

各实验组和对照组以体积分数 5% 的比例分别加入产气荚膜梭菌菌悬液, 其中, 100 mL 的血清瓶装培养基 40 mL, 通入氩气, 保持培养基处于厌氧状态, 37  $^{\circ}$ C 培养, 每隔一定时间取菌悬液, 以空白培养基作为对照测其 OD<sub>600</sub> 值。

#### 1.2.5 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌生长的影响

各实验组和对照组以体积分数 3% 分别加入大肠杆菌或金黄色葡萄球菌菌悬液, 其中, 250 mL 的摇瓶装培养基 30 mL, 将摇瓶置于摇床振荡培养 (37  $^{\circ}$ C, 150 r/min), 每隔一定时间取菌悬液, 以空白培养基作为对照测其 OD<sub>600</sub> 值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 黄连、乌梅水提液抗菌活性的初步分析

黄连、乌梅水提液抗菌性能初步分析的结果见表 1 和图 1。从表 1 可看出, 0.1 g/mL 黄连水提液抑制金黄色葡萄球菌的生长, 对干酪乳杆菌和大肠杆菌的生长没有抑制作用; 0.1 g/mL 乌梅水提液抑制金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的生长, 而不抑制干酪乳杆菌的生长。表 1 亦说明了四环素对有益菌的抑制作用强于对有害菌的抑制作用, 而黄连、乌梅水

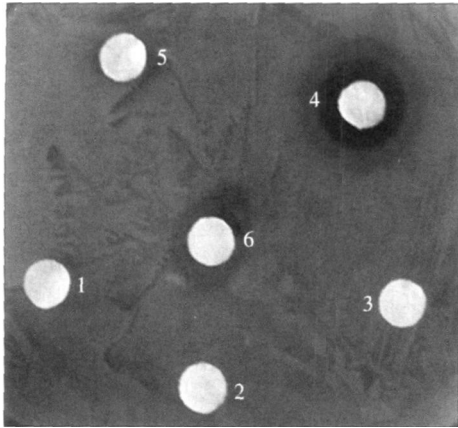
提液则更强烈抑制有害菌的生长。因此,作者采用比浊法进一步考察了不同浓度的两种水提液分别对 5 种肠道菌生长的影响。

表 1 黄连、乌梅水提液的抗菌实验结果(抑菌圈, mm)

Table 1 Antibacterial effects of aqueous extracts from *Coptis* root and *P. mume* ( diameter of inhibiting ring mm).

样品名称	菌种		
	<i>Lact casei</i>	<i>E. coli</i>	<i>Staph. aureus</i>
0.01 g/mL 黄连水提液	—	—	—
0.1 g/mL 黄连水提液	—	—	9.55
1.0 g/mL 黄连水提液	14.40	13.26	23.06
0.01 g/mL 乌梅水提液	—	—	—
0.1 g/mL 乌梅水提液	—	9.65	7.15
1.0 g/mL 乌梅水提液	14.13	17.66	16.40
0.125 mg/L 四环素	19.50	8.86	10.57
去离子水	—	—	—

“—”,代表菌体正常生长。



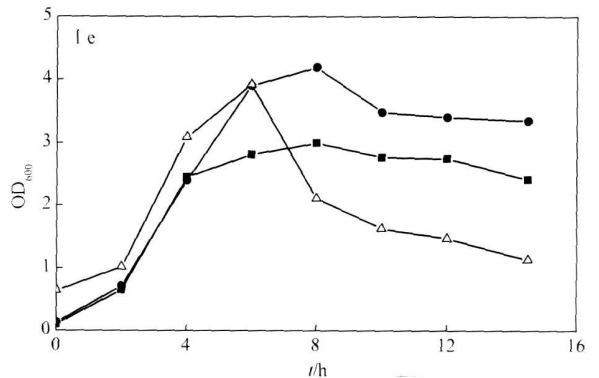
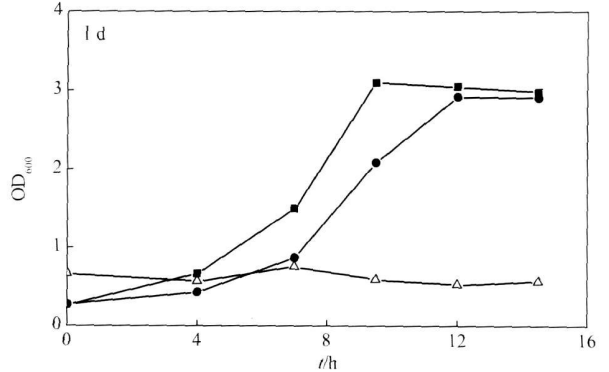
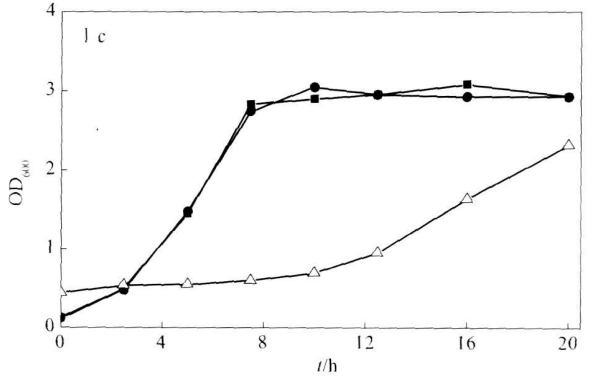
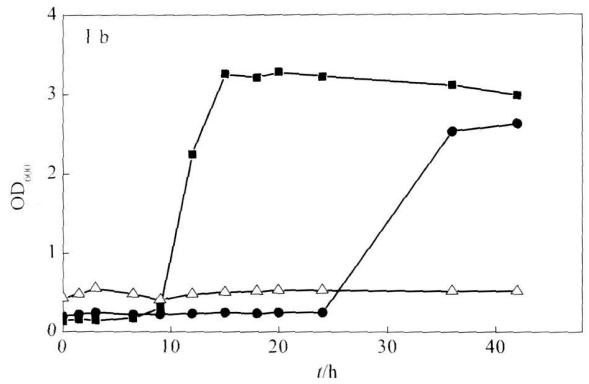
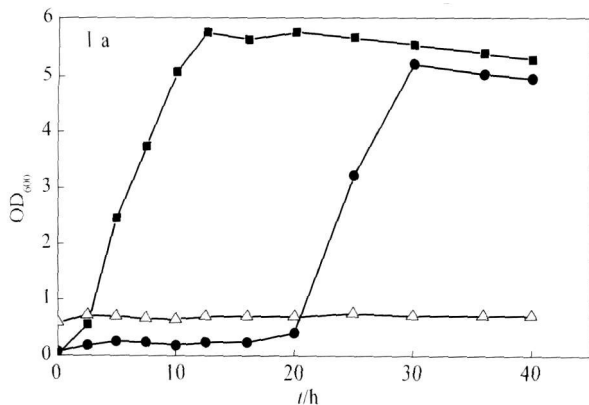
1—0.001 g/mL 乌梅水提液; 2—0.01 g/mL 乌梅水提液; 3—0.1 g/mL 乌梅水提液; 4—1.0 g/mL 乌梅水提液; 5—去离子水; 6—0.125 mg/L 四环素

图 1 乌梅水提液对金黄色葡萄球菌的抑制效果

Fig 1 Inhibitory effect of *P. mume* extracts on *Staph. aureus*

## 2.2 黄连水提液的抗菌活性

添加不同量的黄连水提液时,金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌、干酪乳杆菌、嗜酸乳杆菌和大肠杆菌 5 种菌体的生长曲线分别如图 2(I a~ I e)所示。



水提液的质量浓度为: ■—0 g/mL; ●—0.001 g/mL; △—0.01 g/mL

图 2 黄连水提液对金黄色葡萄球菌(I a)、产气荚膜梭菌(I b)、干酪乳杆菌(I c)、嗜酸乳杆菌(I d)以及大肠杆菌(I e)生长的影响

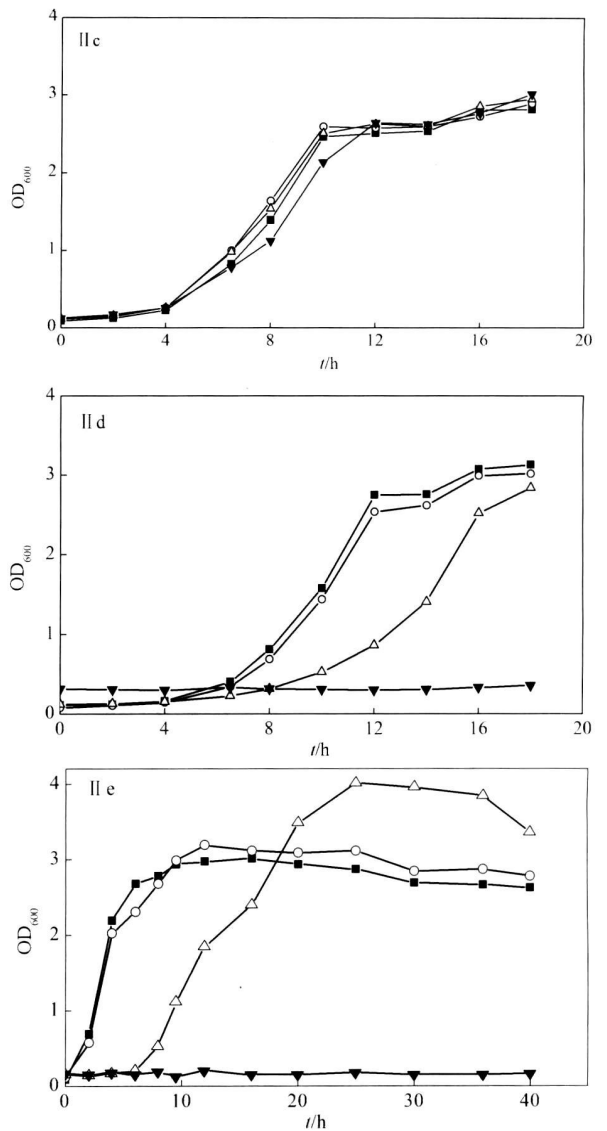
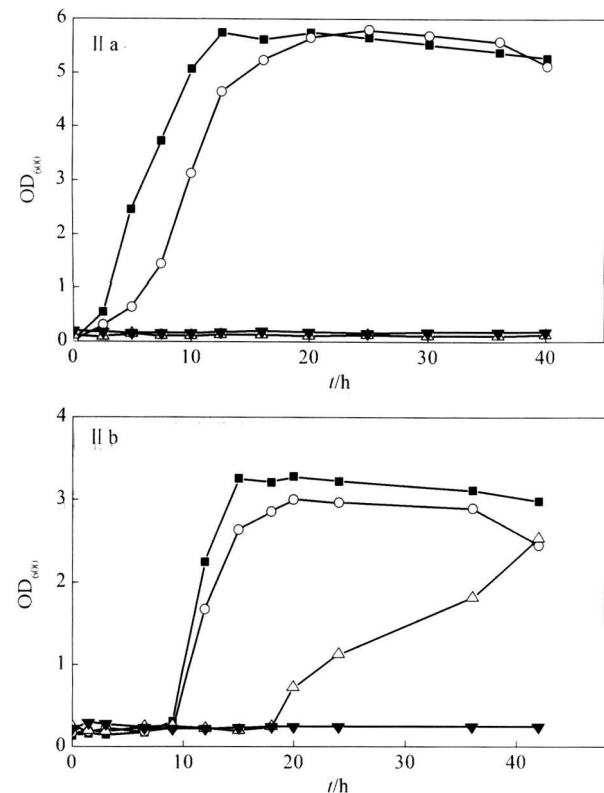
Fig 2 Effects of *Coptis* root extracts on the growth of *Staph. aureus* (I a), *CL perfringens* (I b), *Lact casei* (I c), *Lact acidophilus* (I d) and *E. coli* (I e)

由图 2(I a)可见, 0.001 g/mL, 0.01 g/mL 黄连

水提液能够有效抑制金黄色葡萄球菌的生长, 而且抑制时间超过 18 h。同样, 0.001、0.01 g/mL 黄连水提液亦明显抑制产气荚膜梭菌的生长, 而且抑制时间均长达 20 h 以上 (图 2I b)。黄连水提液对以上两种菌生长的抑制作用可能是由黄连中的生物碱引起的。Yu H H 曾报道小檗碱对金黄色葡萄球菌的 MIC 为  $3.2 \times 10^{-5} \sim 12.8 \times 10^{-5}$  g/mL<sup>[9]</sup>。由图 2I c 可见, 0.001 g/mL 黄连水提液促进干酪乳杆菌的生长, 而当其质量浓度升高至 0.01 g/mL 时, 则对干酪乳杆菌的生长表现出轻微的抑制作用。图 2I d 表明, 0.001 g/mL 黄连水提液轻微抑制嗜酸乳杆菌的生长, 但在其质量浓度为 0.01 g/mL 时表现出明显的抑制作用。上述说明黄连可能是一种潜在的益生元, 也说明了使用时需要注意剂量问题。由图 2I e 可见, 大肠杆菌的生长在加入黄连水提液后受到了扰乱, 6 或 8 h 生长达到最优, 之后衰退。但是从表 1 可看出, 1.0 g/mL 黄连水提液则对大肠杆菌有较强的抑制作用, 说明水提液中的某种成分有抑制大肠杆菌的性能, 但含量偏少。这也说明在采用黄连治疗大肠杆菌引起的肠道疾病时, 可适当与其他中药复配, 从而使低剂量的黄连药物能起到修复肠道菌群平衡的作用。

### 2.3 乌梅水提液的抗菌活性

添加不同量的水提液时, 金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌、干酪乳杆菌、嗜酸乳杆菌和大肠杆菌 5 种菌体的生长曲线分别如图 3 (II a~ II e) 所示。



水提液的质量浓度为: ■—0 g/mL; ○—0.001 g/mL; △—0.005 g/mL; —0.01 g/mL

图 3 乌梅水提液对金黄色葡萄球菌 (II a)、产气荚膜梭菌 (II b)、干酪乳杆菌 (II c)、嗜酸乳杆菌 (II d) 以及大肠杆菌 (II e) 生长的影响

Fig 3 Effects of *P. mume* extracts on the growth of *Staph aureus* (II a), *Cl perfringens* (II b), *Lact casei* (II c), *Lact acidophilus* (II d) and *E. coli* (II e).

由图 3II a 可见, 0.005 g/mL、0.01 g/mL 的乌梅水提液可有效抑制金黄色葡萄球菌的生长, 且抑制时间均长达 36 h 以上, 即使 0.001 g/mL 时也微弱抑制此菌体的生长。同样地, 0.005 g/mL、0.01 g/mL 的乌梅水提液明显抑制产气荚膜梭菌的生长, 且抑制时间分别达 18、36 h 以上 (图 3II b)。但是, 由图 3II c 可看出, 0.001、0.005 g/mL 的乌梅水提液则轻微促进干酪乳杆菌的生长, 即使此水提液质量浓度上升至 0.01 g/mL 时亦不影响此菌体的生长。图 3II d 表明, 0.001 g/mL 乌梅水提液不影响嗜酸乳杆菌的生长, 但质量浓度升高后则对该菌体的生长表现出轻微的抑制作用。 (下转第 765 页)

(3)本生产工艺符合环保要求,产品质量高,社会效益和经济效益并重,具有良好的应用前景。据初步测算,生产 1 t 无氯苯甲醛约需苯甲酸 1.5 t。若考虑到主要副产物的回收(苯甲醇的价格比苯甲醛高,而甲苯的价格也比苯甲酸高),生产 1 t 无氯苯甲醛的毛利约为人民币 5000~6000 元,如能将该工艺用于对苯二甲酸的精制,则经济效益将更加显著。

### 参考文献:

- [1] Dmitri A, Bulsher L, Iubov K, W. Minister Valainir IZ, *et al*. Formation of active sites for selective toluene oxidation during catalyst synthesis via solid state reaction of  $V_2O_5$  with  $TiO_2$ . [J]. *Journal of Catalysis* 2000, 193(1): 145-153
- [2] Kuang Wenxing, Fan Yining, Chen Kai long *et al*. Partial oxidation of toluene over ultrafine mixed Mo-based oxide particles [J]. *Journal of Catalysis* 1999, 186(2): 310-317
- [3] Susana Lamondó, Andrés Barba, Beatriz Irigoyen, *et al*. Oxidation of toluene to benzaldehyde over  $V_{0.8}Sb_{0.8}Ti_{0.2}O_4$  - effect of the operating conditions [J]. *Catalysis Today*, 2001, 64: 179-187.
- [4] Koutstaal C A, Ponec V. New aspects of the selective reduction of aromatic carboxylic acids to the aldehydes [J]. *Science and Technology in Catalysis* 1994: 105-110
- [5] Sakata Y, Van To K, Koutstaal C A, Ponec V. Selectivity problems in the catalytic deoxygenation of benzoic acid [J]. *Journal of*

- Catalysis* 1997, 169: 13-21
- [6] Hollerich W F, Tjo J D. Direct hydrogenation of aromatic carboxylic acids to their corresponding aldehydes with zinc oxide catalysts [J]. *Applied Catalysis A: General* 1999, 184: 257-264
- [7] Chen Amin, Xu Hualong, Yue Yinghong *et al*. Methyl Hydroxylate-like compounds as precursors for methyl benzoate hydrogenation catalysts [J]. *Industrial Engineering Chemical Research* 2004, 43: 6409-6415.
- [8] De Lange M W, Van Ommen J G, Lefferts L. Deoxygenation of benzoic acid on metal oxides 1. The selective pathway to benzaldehyde [J]. *Applied Catalysis A: General* 2001, 220: 41-49
- [9] De Lange M W, Van Ommen J G, Lefferts L. Deoxygenation of benzoic acid on metal oxides 2. Formation of byproducts [J]. *Applied Catalysis A: General* 2002, 231: 17-26.
- [10] Doomkanp C, Ponec V. The universal character of the Mars and Van Krevelen mechanism [J]. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 2000, 162: 19-32
- [11] Maki Takeo. Catalytic process of producing aromatic aldehyde [P]. EP. 0 150 961, 1985-01-17.
- [12] Maki Takeo, Yokoyama Toshiharu. Process for producing aromatic aldehydes [P]. US 4 613 700, 1986-09-23.
- [13] 陈良坦, 黄泰山, 赖桂勇, 等. 用于制备芳香醛或脂肪醛的催化剂及其制备方法 [P]. CN. 1 608 729A, 2005.
- [14] 陈良坦, 邓卫平, 张来英. 一种无氯苯甲醛的纳米催化剂的合成及性能 [J]. *精细化工*, 2006, 23(5): 443-448

(上接第 761 页)

由图 3II e 可见, 0.005 g/mL、0.01 g/mL 的乌梅水提液有效抑制大肠杆菌的生长, 且抑制时间分别达 8 & 36 h 以上, 但 0.001 g/mL 时却微弱促进此菌体的生长。上述说明乌梅亦可能是一种益生元, 也说明使用时仍需要注意剂量问题, 而且从乌梅水提液对有害菌的抑制效果来看, 建议少量多次服用。其中, 乌梅中含有丰富的有机酸<sup>[6]</sup>和多酚<sup>[10]</sup>, 它们可能是抗菌的主要成分。

### 3 结论

基于中草药独特的抗菌性能, 考察了黄连、乌梅水提液对 5 种肠道有益菌和有害菌生长的影响。

0.001 g/mL 的黄连水提物对肠道有害菌产气荚膜梭菌、金黄色葡萄球菌有强烈的抑制作用, 但对有益菌干酪乳杆菌的生长影响较小, 对嗜酸乳杆菌则有轻微的抑制。

0.001~0.005 g/mL 的乌梅水提液对肠道有害菌产气荚膜梭菌、金黄色葡萄球菌有明显的抑制作用, 但对有益菌干酪乳杆菌的生长有轻微的促进, 对嗜酸乳杆菌的生长影响较小。

因此, 黄连和乌梅可能是潜在的益生元, 本工作为进一步开发它们作为功能性食品配料、绿色饲料添加剂提供了参考。

### 参考文献:

- [1] Nord C E, Edlund G, Sullivan A. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora [J]. *Lancet Infect Dis*,

2001, 1: 101-114.

- [2] Lin M Y, Jeon J H, Jeong E Y, *et al*. Antimicrobial activity of 5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone isolated from *Caesalpinia sappan* toward intestinal bacteria [J]. *Food Chem*, 2007, 100: 1254-1258.
- [3] Park B S, Kim J R, Lee S E, *et al*. Selective growth-inhibiting effects of compounds identified in *Tabebuia impetiginosa* inner bark on human intestinal bacteria [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(4): 1152-1157.
- [4] Kim S H, Shin D S, Oh M N, *et al*. Inhibition of the bacterial surface protein anchoring transpeptidase sortase by isoquinoline alkaloids [J]. *BioSci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(2): 421-424.
- [5] Mekseepalard C, Poonpon P, Kamkaen N. Antibacterial activities of *Coptis chinensis* and *Glycyrrhiza glabra* against seven bacteria associated with human gastrointestinal infections [J]. *Planta Med* 2007, 73(09): 140-140.
- [6] 沈红梅, 乔传卓, 苏中武, 等. 采收、加工、植物基原对乌梅抑菌作用的影响 [J]. *中药材*, 1994, 17(8): 24-27
- [7] 祖若夫, 胡宝龙, 周德庆. *微生物学实验* [M]. 上海: 复旦大学出版社, 1993: 168-172
- [8] Holt S M, Miller-Fomone C M, Côté G L. Growth of various intestinal bacteria on a lentsucrose-derived oligosaccharides [J]. *Lett Appl Microbiol* 2005, 40: 385-390
- [9] Yu H H, Kim K J, Cha J D, *et al*. Antimicrobial activity of berberine alone and in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *J Med Food* 2005, 8(4): 454-461
- [10] Jeong J T, Moon J H, Park K H, *et al*. Isolation and characterization of a new compound from *Prunus mume* fruit that inhibits cancer cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(6): 2123-2128.