

说明书

一种泽泻叶提取物及其制备方法

5 技术领域

本发明属于动物药物开发技术领域，具体地说，涉及一种泽泻叶提取物及其制备方法。

背景技术

- 10 东方泽泻（*Alisma orientale* (Sam.) Juzep.）和泽泻（*Alisma plantago-aquatica* Linn.）为泽泻科植物；其性寒，味甘、淡，入肾、膀胱经，具有利水渗湿、泄热化浊、降脂等功效，用于小便不利、水肿胀满、泄泻尿少、痰饮眩晕、热淋涩痛、高脂血症等病症。目前泽泻被列为卫生部颁布的“可用于保健品开发”的药用植物。然而现代关于泽泻的研究主要集中在泽泻的块茎上，对于泽泻叶的研究很少，仅见陈琪等人（陈琪. 生殖生长对川
- 15 泽泻产量和质量的影响研究[D].四川农业大学, 2013.）对泽泻叶中的化学成分进行测定。”据陆玑《诗疏》注解：“言采其蕒，蕒，今泽泻也。其叶如车前草大，其味亦相似。徐州、广陵人食之。”可见泽泻叶的应用历史悠久。课题组前期研究结果表明，泽泻生长茂盛期其地上部分和块茎的重量比大约
- 20 为 4:1，通过薄层色谱研究，泽泻叶、花苔和块茎含有非常相似的化学成分。

随着国家对畜牧养殖业无抗的要求和目前抗生素在动物体内的耐药性、对肠道健康的破坏以及对环境的影响等问题，将植物提取物开发成具有替代抗生素功能的饲料添加剂势必成为畜牧业发展的趋势。

- 25 目前无泽泻叶在动物饲养的应用相关文献报道，仅在产地有人用新鲜泽泻叶喂养动物，预防疾病。但如果大量采摘鲜叶，会影响泽泻块茎的生长，减少泽泻块茎产值；若在泽泻块茎采收的时候用叶直接喂养动物，因其纤维含量较高，难以消化，容易引起动物胀气，提取泽泻叶的活性部位再添加可避免上述情况，也可以利用生产废料。在人用产品中，泽泻叶都是加入到药

用或者食用配方中直接使用，如：王敬一等在外用减肥药中就添加了泽泻叶（王敬一. 一种外用减肥药[P]. CN101579460,2009-11-18.）；牧成林等在百香果辣鸡排调料中添加了少量的泽泻叶（牧成林. 一种百香果辣鸡排及其制备方法[P]. CN106666440A,2017-05-17.），暂且并没有关于泽泻叶中成分提取的研究报道。

发明内容

本申请的一个目的是提供一种泽泻叶提取物制备方法的新技术方案。

根据本申请的一个方面，提供一种泽泻叶提取物的制备方法，包括以下

10 步骤：

提供泽泻叶，对泽泻叶酶解；过滤得到酶解后的滤渣和酶解液；

将酶解后的滤渣用乙醇回流提取；过滤得到醇提后的滤渣和三萜类醇提液；

15 将醇提后的滤渣与蒸馏水混合，煮沸，过滤；将过滤得到的滤液与酶解液合并，浓缩后离心，取上清液为浓缩液；

对浓缩液使用 Sevage 法去除蛋白，离心取上清液为泽泻水提取液；

向泽泻水提取液中加入无水乙醇，静置后离心，去除上清液，过滤得到固体，将固体烘干得到泽泻粗多糖；

将三萜类醇提液浓缩，烘干得到泽泻三萜；

20 将泽泻粗多糖和泽泻三萜混合得到泽泻叶提取物。

可选地，所述泽泻叶酶解过程采用的酶为木瓜蛋白酶、纤维素酶、果胶酶中的一种，采用的酶的质量为泽泻叶质量的 0.8%-1.6%，酶解时间为 30 min-150min，酶解温度为 40℃-50℃，质量料液比为 1:5-1:35，pH 值为 4.0-7.0。

可选地，所述酶的活力为 5 万 U/g-10 万 U/g。

25 可选地，将酶解后的滤渣用 75%-95%的乙醇回流提取，回流提取时间为 0.5h-2.5h，提取温度为 50℃-70℃，酶解后的滤渣与乙醇的质量料液比为 1:5-1:25。

可选地，将醇提后的滤渣按质量固液比为 1:20 与蒸馏水混合，在 100℃ 下冷凝回流浸提 2 h，过滤得到滤液，重复两次，将两次得到的滤液合并。

可选地，将过滤得到的滤液与酶解液合并，浓缩至与所提供泽泻叶的质量比为 1:10。

- 5 可选地，对浓缩液使用 Sevage 法去除蛋白，离心取上清液为泽泻水提取液的具体方法为以氯仿和正丁醇为萃取剂与浓缩液混合，振摇 20min，3500 r/min 离心 5 min，取上清液。

可选地，萃取剂中氯仿和正丁醇的体积比为 4:1；萃取剂与浓缩液的体积比为 2:5。

- 10 可选地，向泽泻水提取液中加入 3 倍体积的无水乙醇，静置 20h-24h 后离心。

根据本申请的另一个方面，本申请还提供一种由上述制备方法制备得到的泽泻叶提取物。

与现有技术相比，本发明可以获得包括以下技术效果：

- 15 本发明提取泽泻叶的总三萜和总多糖，制备泽泻叶提取物，并研究其对菌群失调模型小鼠脏器指数、盲肠微生物、肠道 PH 等指标的影响。为泽泻叶的综合开发利用，变废为宝提供科学依据，也为寻找一种天然、安全，能替代抗生素，在动物饲养中起到促进生长发育，增强机体抗病能力，为开发预防腹泻的饲料添加剂奠定基础。

- 20 当然，实施本发明的任一产品并不一定需要同时达到以上所述的所有技术效果。

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例，提供以下附图。

- 25 图 1 为泽泻叶提取物的制备工艺流程图。

具体实施方式

以下将配合实施例来详细说明本发明的实施方式,藉此对本发明如何应用技术手段来解决技术问题并达成技术功效的实现过程能充分理解并据以实施。

5 根据本发明的一个方面,本发明提供一种泽泻叶提取物的制备方法,在一些实施例中,参考图 1,包括以下步骤:

提供泽泻叶。泽泻叶可以为烘干剪碎后的碎片状。

10 对所提供的泽泻叶酶解,采用的酶为木瓜蛋白酶、纤维素酶、果胶酶中的一种,酶的活力为 5 万 U/g -10 万 U/g,采用的酶的质量为泽泻叶质量的 0.8%-1.6%,酶解时间为 30 min -150min,酶解温度为 40℃-50℃,质量料液比为 1:5-1:35,PH 值为 4.0-7.0。过滤得到酶解后的滤渣和酶解液。

将酶解后的滤渣用乙醇回流提取,用 75%-95%的乙醇回流提取,回流提取时间为 0.5h-2.5h,提取温度为 50℃-70℃,酶解后的滤渣与乙醇的质量料液比为 1:5-1:25。过滤得到醇提后的滤渣和三萜类醇提液。

15 将醇提后的滤渣与蒸馏水混合,煮沸,过滤,具体的,可以是将醇提后的滤渣按质量固液比为 1:20 与蒸馏水混合,在 100℃下冷凝回流浸提 2 h,过滤得到滤液。进一步的,可以重复两次,将两次得到的滤液合并。将过滤得到的滤液与酶解液合并,浓缩至与所提供泽泻叶的质量比为 1:10,浓缩后离心,取上清液为浓缩液;

20 对浓缩液使用 Sevage 法去除蛋白,以氯仿和正丁醇为萃取剂与浓缩液混合,振摇 20min, 3500 r/min 离心 5 min,取上清液为泽泻水提取液。萃取剂中氯仿和正丁醇的体积比为 4:1;萃取剂与浓缩液的体积比为 2:5。

向泽泻水提取液中加入 3 倍体积的无水乙醇,静置 20h-24h 后离心,去除上清液,过滤得到固体,将固体烘干得到泽泻粗多糖;

将三萜类醇提液浓缩,烘干得到泽泻三萜;

25 将泽泻粗多糖和泽泻三萜混合得到泽泻叶提取物。

实施例 1

提供泽泻叶,将泽泻叶烘干后剪碎。

对所提供的泽泻叶采用木瓜蛋白酶酶解,酶的活力为 10 万 U/g,酶的

质量为泽泻叶质量的 1.2%，酶解时间为 90min，酶解温度为 50℃，质量料液比为 1:25，pH 值为 7.0。酶解后过滤，得到酶解后的滤渣和酶解液。

将酶解后的滤渣用乙醇回流提取，用 85% 的乙醇回流提取，回流提取时间为 1.5h，提取温度为 60℃，酶解后的滤渣与乙醇的质量料液比为 1:15。

5 醇提后过滤，得到醇提后的滤渣和三萜类醇提液。

将醇提后的滤渣按质量固液比为 1:20 与蒸馏水混合，在 100℃ 下冷凝回流浸提 2 h，过滤得到滤液。重复两次，将两次得到的滤液合并。将过滤得到的滤液与酶解液合并，升温蒸发，浓缩至混合液与所提供泽泻叶的质量比为 1:10，对浓缩后的混合液 3500 r/min 离心 5 min 处理，取上清液为浓缩液；

10 对浓缩液使用 Sevage 法去除蛋白，以体积比为 4:1 的氯仿和正丁醇为萃取剂，按萃取剂与浓缩液的体积比为 2:5 混合，振摇 20min，3500 r/min 离心 5 min，取上清液为泽泻水提取液。

向泽泻水提取液中加入 3 倍体积的无水乙醇（含醇量为 75 %），静置 22h 后离心，去除上清液，过滤得到固体，将固体烘干得到泽泻粗多糖；

15 将三萜类醇提液浓缩，烘干得到泽泻三萜；

将泽泻粗多糖和泽泻三萜混合得到泽泻叶提取物。

实施例 2

提供泽泻叶，将泽泻叶烘干后剪碎。

20 对所提供的泽泻叶采用纤维素酶酶解，酶的活力为 10 万 U/g，酶的质量为泽泻叶质量的 0.8%，酶解时间为 30min，酶解温度为 40℃，质量料液比为 1:5，pH 值为 5.0。酶解后过滤，得到酶解后的滤渣和酶解液。

将酶解后的滤渣用乙醇回流提取，用 75% 的乙醇回流提取，回流提取时间为 0.5h，提取温度为 50℃，酶解后的滤渣与乙醇的质量料液比为 1:5。醇提后过滤，得到醇提后的滤渣和三萜类醇提液。

25 将醇提后的滤渣按质量固液比为 1:20 与蒸馏水混合，在 100℃ 下冷凝回流浸提 2 h，过滤得到滤液。重复两次，将两次得到的滤液合并。将过滤得到的滤液与酶解液合并，升温蒸发，浓缩至混合液与所提供泽泻叶的质量比为 1:10，对浓缩后的混合液 3500 r/min 离心 5 min 处理，取上清液为浓缩液；

对浓缩液使用 Sevage 法去除蛋白,以体积比为 4:1 的氯仿和正丁醇为萃取剂,按萃取剂与浓缩液的体积比为 2:5 混合,振摇 20min,3500 r/min 离心 5 min,取上清液为泽泻水提取液。

5 向泽泻水提取液中加入 3 倍体积的无水乙醇(含醇量为 75 %),静置 20h 后离心,去除上清液,过滤得到固体,将固体烘干得到泽泻粗多糖;

将三萜类醇提液浓缩,烘干得到泽泻三萜;

将泽泻粗多糖和泽泻三萜混合得到泽泻叶提取物。

实施例 3

提供泽泻叶,将泽泻叶烘干后剪碎。

10 对所提供的泽泻叶采用果胶酶酶解,酶的活力为 5 万 U/g,酶的质量为泽泻叶质量的 1.6%,酶解时间为 150min,酶解温度为 50℃,质量料液比为 1:35, pH 值为 4.0。酶解后过滤,得到酶解后的滤渣和酶解液。

将酶解后的滤渣用乙醇回流提取,用 95%的乙醇回流提取,回流提取时间为 2.5h,提取温度为 70℃,酶解后的滤渣与乙醇的质量料液比为 1:25。

15 醇提后过滤,得到醇提后的滤渣和三萜类醇提液。

将醇提后的滤渣按质量固液比为 1:20 与蒸馏水混合,在 100℃下冷凝回流浸提 2 h,过滤得到滤液。重复两次,将两次得到的滤液合并。将过滤得到的滤液与酶解液合并,升温蒸发,浓缩至混合液与所提供泽泻叶的质量比为 1:10,对浓缩后的混合液 3500 r/min 离心 5 min 处理,取上清液为浓缩液;

20 对浓缩液使用 Sevage 法去除蛋白,以体积比为 4:1 的氯仿和正丁醇为萃取剂,按萃取剂与浓缩液的体积比为 2:5 混合,振摇 20min,3500 r/min 离心 5 min,取上清液为泽泻水提取液。

向泽泻水提取液中加入 3 倍体积的无水乙醇(含醇量为 75 %),静置 24h 后离心,去除上清液,过滤得到固体,将固体烘干得到泽泻粗多糖;

25 将三萜类醇提液浓缩,烘干得到泽泻三萜;

将泽泻粗多糖和泽泻三萜混合得到泽泻叶提取物。

下面结合具体的实验数据来本发明的技术效果:

一、本发明泽泻叶提取物制备方法的可行性验证:

1、多糖提取率的计算方法:

1.1 粗多糖得率的计算

粗多糖得率 (%) = (粗多糖质量/泽泻叶质量) × 100%

5 1.2 多糖含量测定

(1) 对照品溶液的制备

精密称量干燥至无水的葡萄糖对照品 250 mg, 然后放置于 250 mL 容量瓶中, 加入蒸馏水使之溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得到 1 mg/mL 的葡萄糖对照品溶液, 备用。

10 (2) 标准曲线的制备

精密移取对照品溶液 0.00 mL、0.10 mL、0.20 mL、0.30 mL、0.40 mL、0.50 mL、0.60 mL、0.70 mL, 分别置于 1 mL 容量瓶中, 加入蒸馏水并稀释至刻度, 摇匀, 即得不同浓度的标准溶液。然后从各容量瓶中分别移取 0.2 mL 标准溶液置于试管中, 加入 6% 的苯酚溶液 0.2 mL, 摇匀后快速加入浓硫酸 1 mL, 于 40℃ 水浴中显色 40 min, 冷却至室温后以第一瓶溶液为参比溶液。用酶标仪测定葡萄糖溶液在 490 nm 处的吸光度。以吸光度为纵坐标, 葡萄糖浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 并计算回归方程。

(3) 供试品溶液的制备

20 取所得的泽泻多糖粗品 0.250 g 置于 250 mL 的容量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

(4) 硫酸·苯酚法测定多糖含量

25 精密移取供试品溶液 0.2 mL, 置于试管中, 加入 6 % 的苯酚溶液 0.2 mL, 摇匀后快速加入浓硫酸 1 mL, 于 40 ℃ 水浴中显色 40 min, 冷却至室温后, 测定其吸光度。平行测定三次, 根据线性回归方程计算泽泻叶多糖粗品中多糖的浓度。粗多糖中多糖含量 (%) = (多糖质量/粗多糖质量) × 100%。

1.3 多糖提取率的计算

多糖提取率(%)=(粗多糖得率×粗多糖中多糖含量)×100%

2 总三萜含量测定方法

(1) 标准曲线的建立

- 5 精密称取 23-乙酰泽泻醇 B 对照品 1.26 mg，于 25 mL 容量瓶中，加乙醇适量溶解，摇匀，定容，得到浓度为 0.050 4 mg/mL 的 23-乙酰泽泻醇 B 对照品溶液。精密吸取对照品溶液 0.2，0.4，0.6，0.8，1.0，1.2，1.4 mL 于 10 mL 的试管中，在 60℃ 水中把溶剂挥干，挥干后于试管中加入 0.2 mL 的 5% 香草醛冰乙酸溶液，0.8 mL 高氯酸，60℃ 水浴 15 min，冷却 5 min，加冰醋酸 5.0 mL，摇匀。于 555 nm 波长处测定。收集数据，绘制标准曲线，并计算回归方程。

(2) 样品总三萜的含量测定

- 15 样品提取液浓缩定容至 250 mL，精密量取待测液 0.2 mL，用相应体积分数的乙醇稀释至 1 mL，摇匀，即得样品溶液。取样品溶液 0.2 mL 在 60℃ 水中把溶剂挥干，挥干后于试管中加入 0.2 mL 的 5% 香草醛冰乙酸溶液，0.8 mL 高氯酸，60℃ 水浴 15 min，冷却 5 min，加冰醋酸 5.0 mL，摇匀。随行乙醇空白。在 555 nm 处测定吸光度，记录数据得出回归方程。根据回归方程换算为总三萜类组分的含量。

总三萜类成分提取率计算

- 20 $C=m_1/m_2 \times 100\%$

m1 为提取液中总三萜组分总量(g);

m2 为原料质量(g);

C 为泽泻总三萜总组分的提取率(%)。

3 泽泻叶粗多糖的含量分析

- 25 3.1 总多酚含量测定

称取没食子酸 1.7 mg，定容至 25 mL。配制饱和碳酸钠，将福林酚稀释至 10 倍体积备用。取 10 支 10 mL 试管，编号 1-10，精密量取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mL 没食子酸溶液于试管中，再分别取 1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 mL 蒸馏水于对应试管中，5 每根试管中均加入 1 mL 福林酚和 2 mL 饱和碳酸钠，在加入福林酚时必须严格避光。混匀后室温放置 2 min，然后避光放置 1 h 后，转移至 96 孔板，于 750 nm 波长处测定吸光度。将样品同蒸馏水配成 10 mg/mL 的浓度，按照如上方法进行测定。

3.2 蛋白质含量测定

10 考马斯亮蓝 G-250 100 mg 溶于 50 mL 95% 乙醇，加入 100 mL 85% H₃PO₄，转移至 1000 mL 量瓶，蒸馏水定容。称取纯牛血清白蛋白，根据其纯度同蒸馏水配成 100 µg/mL 蛋白标液。取 10 支 10 mL 试管，编号 1-10，分别取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mL 蛋白标液，再分别取 1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 mL 蒸馏水于 15 试管中，每管均加入考马斯亮蓝 G-250 试剂 5 mL，涡旋振荡器混匀。静置 1 h 后转移至 96 孔板，于 595 nm 波长处测定吸光度。将样品同蒸馏水配成 10 mg/mL 的浓度，按照上述方法进行测定。

4、结果分析:

4.1、木瓜蛋白酶、纤维素酶和果胶酶单因素实验对比时，泽泻叶多糖 20 提取率为 3.76%、3.56%和 2.14%。因为木瓜蛋白酶对泽泻叶中的蛋白质具有水解作用，使泽泻叶结构变得松散；同时还会使糖蛋白和白聚糖中游离的蛋白质水解，降低了它们与原料的结合力，有利于多糖的浸出。

4.2、当酶添加量小于 1.2%时，多糖提取率随着酶添加量的增加而逐渐增加，在木瓜蛋白酶添加量为 1.2%时，多糖提取率为 4.76%；当添加量超过 25 1.2%时，随着酶添加量的增加，提取率反而降低。因为酶用量增加到一定程度时，酶分子达到饱和，一部分酶分子没有机会与底物结合，底物被酶解的速率降低，同时酶解产物过多的积累，抑制酶解过程，使得酶解效果下降导致多糖的溶出率下降，而且酶的增加还会引入更多的蛋白质，对后续的

纯化不利，所以一定的底物浓度存在一个最佳的酶用量，并非酶用量越大越好。

4.3、随着酶解时间的增加，多糖提取率逐渐增加，当酶解时间达到 90min 以后，多糖提取率呈下降趋势。因此，木瓜蛋白酶的最佳酶解时间为 90min。

5 4.4、当料液比小于 1: 25 时，多糖提取率随着料液比的增加而逐渐增加，并于 1: 25 时，有最大值。1: 25 作为最佳料液比。

4.5、按照实施例 1 给出的制备工艺提取泽泻叶粗多糖 3 次，其多糖提取率分别为 4.02%、3.59%、3.86%，RSD 值为 4.67%。

10 按照实施例 1 给出的制备工艺提取泽泻叶总三萜 3 次，总三萜提取率分别为 0.449%、0.435%、0.445%，RSD 值为 1.6%。

4.6、总多酚含量测定结果

以没食子酸浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标，得到总多酚含量回归方程 $y = 0.0458x + 0.0045$ ， $R^2 = 0.9989$ 。

供试品中总多酚平均吸光度为 0.020，平均多酚含量为 0.83%。

15 4.7、蛋白质含量测定结果

根据考马斯亮蓝法，以蛋白质浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，得到蛋白质含量的回归方程 $y = 0.3867x + 0.3923$ ， $R^2 = 0.9957$ 。

检测结果显示，泽泻叶粗多糖中不含蛋白质。

20 根据本发明的另一个方面，本发明还提供一种由上述制备方法制备得到的泽泻叶提取物，在动物饲料添加中有着广泛的应用前景。

二、本发明泽泻叶提取物对菌群失调小鼠肠道微环境的影响

1、试药的配置

1.1 丽珠肠乐的配制

25 取丽珠肠乐双歧杆菌活菌胶囊，打开后将粉末置于无菌试管中，按 4×10^7 CFU/mL 配置成菌悬液。

1.2 泽泻叶提取物溶液的配制

按《中国药典》规定，泽泻成人服用量为6-10 g/d(成人体重按60 kg计)，该试验将实施例制备得到的泽泻叶提取物按成人服用量的40倍、20倍、10倍分别设置为泽泻叶提取物高(750 mg/mL)、中(400 mg/mL)、低(200 mg/mL)剂量组；每日灌胃1次。以蒸馏水为溶剂，采用等倍稀释法，分别制得高、中、低剂量组溶液。

2 动物模型的构建

选取6周龄清洁级昆明小鼠50只，体重18-22 g，雌雄各半。灌服氨苄西林68.75 mg/kg.只。每天灌胃1次，0.2 mL/只，连续7 d。以模型组小鼠出现行动迟缓、畏寒挤缩、饮食下降、被毛糙乱、粪便湿润样等现象造模成功的标准。

3 试验动物及分组

随机选取未造模小鼠10只作为空白对照组。在造模成功的小鼠中，随机选取50只，分为5组，10只/组，分别为自然恢复组、阳性对照组(丽珠肠乐)、泽泻叶提取物高、中、低剂量组。自然恢复组灌胃生理盐水，阳性对照组灌服丽珠肠乐水溶液(4×10^7 CFU/mL, 0.3 mL/只)，剂量组分别灌服药液浓度为高(750 mg/mL)、中(400 mg/mL)、低(200 mg/mL)的泽泻叶提取物水溶液，每天灌胃1次，灌胃体积均为0.2 mL/只。

4 指标的测定

4.1 对免疫器官及肾脏脏器指数的影响

于末次给药后禁食不禁水。脱颈椎处死后，解剖取脾脏、胸腺和肾脏用滤纸吸干血迹后称其湿质量，分别计算脾脏、胸腺和肾脏指数。

脾脏指数(mg/g) = 脾脏质量(mg) / 体质量(g)

胸腺指数(mg/g) = 胸腺质量(mg) / 体质量(g)

肾脏指数(mg/g) = 肾脏质量(mg) / 体质量(g)

4.2 肠道菌群菌落数的影响

采盲肠内容物于灭菌后的EP内，倒插于冰盒中，之后收集存放于-20℃

冰箱，称取10 mg盲肠内容物，用0.09 mL生理盐水稀释并转入灭菌的EP管，用微型震荡器震荡1 min后，吸取50 μ L转入另一EP管内，加入450 μ L生理盐水继续震荡1 min，按体积倍比稀释到 10^{-6} 。将适度稀释样品用移液器吸取10 μ L涂布到选择性培养基，每个稀释度做3个平行样。根据表2中各种微生物的生长要求，在37℃条件下好氧或厌氧培养24~48h，培养结束后进行计数(每克粪便标本的活菌数)，取其平均值。计算结果取常用对数值lgCFU/g表示(CFU/g=3个平皿菌落总数/3 \times 10 \times 稀释度)。

表 1 微生物培养条件

菌种	稀释度	培养基	培养条件
大肠杆菌	10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5}	伊红美蓝培养基	普通、37℃、24h
肠杆菌	10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5}	BDS 培养基	普通、37℃、24h
肠球菌	10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6}	肠球菌培养基	普通、37℃、48h
乳酸杆菌	10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8}	LBS 培养基	厌氧、37℃、48h
双歧杆菌	10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5}	BS 双歧杆菌培养基	厌氧、37℃、24h

4.3 盲肠内容物 pH 值的影响

取盲肠内容物于洁净离心管内，称重，用蒸馏水以 1:9 稀释样品，涡旋，超声混匀，3000 r/min 离心 5 min，取上清液使用 pH 计测定 pH 值，每个样品重复测 3 次，计算平均值。

4.4 统计学分析

各分组所得计量数据采用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm\Delta s$) 表示，用 IBM SPSS 22.0 软件进行统计学分析，采用 Duncan's multiple range test 进行组间差异性分析， $P<0.05$ 为差异显著， $P<0.01$ 为差异极显著。

5、实验结果

5.1 泽泻叶提取物对小鼠脏器指数的影响

由表 2 可知，与自然恢复组及空白组相比，阳性对照组、泽泻叶提取物高、中、低剂量组脾脏及胸腺指数均有显著降低 ($P<0.05$)；各处理组间脾脏与胸腺指数无显著性差异。与自然恢复组相比，泽泻叶提取物高、中剂量

组肾脏指数显著降低 ($P<0.05$)，且随着泽泻叶提取物的含量增多，肾脏指数呈下降趋势。

脏器指数是反映器官相对生长的指标，一定程度上可说明其功能强弱，一般来说，免疫器官的脏器指数升高证明机体细胞免疫机能增强，肾脏指数升高有肾肿大的可能。泽泻作为利水渗湿类药物，入肾、膀胱经，具有利尿等功效。本试验中，泽泻叶提取物高、中剂量组显著降低了肾脏指数，一定程度反映了其肾功能的增强，与泽泻药材本身表现相同的药理作用。

表 2 泽泻叶提取物对小鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$, mg/g)

组别	脾脏指数	胸腺指数	肾脏指数
空白组	4.867 ± 0.698^c	1.936 ± 0.930^c	17.333 ± 0.903^{bc}
自然恢复组	5.261 ± 0.522^c	1.525 ± 0.743^c	17.832 ± 1.937^c
阳性对照组	3.940 ± 0.546^{ab}	1.145 ± 0.529^{ab}	16.818 ± 1.282^{abc}
高剂量组	4.173 ± 0.853^{ab}	0.631 ± 0.385^a	15.428 ± 1.042^{ab}
中剂量组	3.674 ± 0.571^a	0.706 ± 0.478^a	15.524 ± 1.290^{ab}
低剂量组	4.075 ± 1.777^{ab}	0.892 ± 0.743^{ab}	16.805 ± 2.343^{abc}

注：同一列不同字母表示显著性差异 ($P<0.05$)

5.2 泽泻叶提取物对小鼠肠道菌群菌落数的影响

由表 3 可知与空白组菌落数相比，其余 5 组大肠杆菌菌落数均有显著性下降 ($P<0.05$)，且随着泽泻提取物含量的增高，大肠杆菌菌落数呈下降趋势。与自然恢复组菌落数相比，阳性对照组、泽泻叶提取物高、中剂量组的肠杆菌菌落数有显著性下降 ($P<0.05$)。

与空白组或自然恢复组菌落数相比，高剂量组的有益菌乳酸杆菌和双歧杆菌均有显著性升高 ($P<0.05$)；肠球菌菌落数除阳性对照组外无明显差异。

表 3 泽泻叶提取物对菌群失调小鼠肠道微生物数量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$, lgCFU/g)

组别	大肠杆菌	肠杆菌	乳酸杆菌	双歧杆菌	肠球菌
	lgCFU/g	lgCFU/g	lgCFU/g	lgCFU/g	lgCFU/g

空白组	9.458±0.657 ^b	8.622±0.069 ^{ab}	8.539±0.437 ^c	7.987±0.667 ^a	5.142±0.111 ^b
自然恢复组	8.700±0.183 ^a	9.057±0.239 ^b	8.038±0.295 ^c	8.366±0.607 ^a	5.265±0.026 ^b
阳性对照组	8.597±0.304 ^a	7.927±0.527 ^a	6.573±0.114 ^{c b}	8.427±0.525 ^{ab}	4.499±0.456 ^a
高剂量组	8.296±0.291 ^a	8.148±0.498 ^a	8.774±0.113 ^{a b}	8.976±0.263 ^b	4.872±0.563 ^{ab}
中剂量组	8.457±0.332 ^a	8.188±0.355 ^a	7.482±0.282 ^{c b}	8.671±0.222 ^{ab}	5.112±0.165 ^{ab}
低剂量组	8.595±0.115 ^a	8.463±0.541 ^{ab}	7.281±0.316 ^{c b}	8.497±0.479 ^{ab}	4.995±0.252 ^{ab}

注：同一列不同字母表示显著性差异（ $P<0.05$ ）

5.2.1 对有害菌的影响

5 试验中其余 5 组与空白组相比较，盲肠内容物中的大肠杆菌数量均显著降低；阳性对照组、泽泻叶提取物高、中、低剂量组与自然恢复组相比较，大肠杆菌数量也有显著降低。且随着泽泻提取物组中提取物含量的增高，大肠杆菌及肠杆菌菌落数呈下降趋势。表明泽泻叶提取物可有效降低肠道内有害菌大肠杆菌及肠杆菌的数量，且抑制效果与含量成正比。泽泻叶提取物对大肠杆菌的抑制效果优于阳性对照组，但无显著差异。其中对肠道菌群的作用机制还有待进一步研究。

10 5.2.2 对有益菌的影响

与空白组或自然恢复组菌落数相比，高剂量组的有益菌乳酸杆菌和双歧杆菌均有显著性升高，表明泽泻叶提取物能促进双歧杆菌与乳酸杆菌的生长，促进效果可能与提取物在饲料中添加的含量有关，仅较高剂量组能展现出显著促进作用。对肠球菌无显著影响。

15 多糖能促进肠道中有益菌的增殖，对乳酸菌的作用尤其明显，而大肠杆菌等有害菌则不能利用植物多糖，且有益菌乳酸杆菌的数量增加也能有效抑制有害菌的繁殖，而泽泻叶提取物中多糖为主要成分之一，因此可能是由于其中多糖起到了主要作用，但其中具体影响因素，还需要进一步试验去证明。

5.3 泽泻叶提取物对盲肠内容物 pH 值的影响

20 由表 4 可知，与自然恢复组相比，阳性对照组、泽泻叶提取物高、中、低剂量组的盲肠内容物 pH 值均有显著性降低（ $P<0.05$ ），其中泽泻叶提取

物高剂量组的盲肠内容物 pH 值与空白组相比也有显著性降低 ($P<0.05$)。试验结果表明, 在饲料中添加泽泻叶提取物能降低盲肠内容物 pH 值, 且效果优于阳性对照组丽珠肠乐, 但无显著差异。

表 4 泽泻叶提取物对小鼠盲肠内容物
pH 的 ($n=10 \bar{x} \pm s$)

组别	pH 值
空白组	7.00 ± 0.50^{bc}
自然恢复组	7.30 ± 0.57^c
阳性对照组	6.60 ± 0.42^{ab}
高剂量组	6.30 ± 0.27^a
中剂量组	6.50 ± 0.45^{ab}
低剂量组	6.40 ± 0.42^{ab}

注: 同一列不同字母表示显著性差异
($P<0.05$)

- 上述说明示出并描述了发明的若干优选实施例, 但如前所述, 应当理解
- 5 发明并非局限于本文所披露的形式, 不应看作是对其他实施例的排除, 而可用于各种其他组合、修改和环境, 并能够在本文所述发明构想范围内, 通过上述教导或相关领域的技术或知识进行改动。而本领域人员所进行的改动和变化不脱离发明的精神和范围, 则都应在发明所附权利要求的保护范围内。