

文章编号: 1674-8085(2019)02-0025-06

锦绣杜鹃叶抗菌活性及其有效部位研究

刘 兵, 唐佳慧, 李松慧, 徐宝贵, *宋明霞

(井冈山大学医学部, 江西, 吉安 343009)

摘 要: 为了研究锦绣杜鹃叶的抗菌活性, 本实验采用了甲醇冷浸法、乙醇回流法和微波萃取法分别对锦绣杜鹃叶的有效成分进行提取, 并采用微孔板稀释法测试提取物对多种阳性菌、阴性菌和耐药菌的抑制活性, 通过紫外分光光度法测定了各萃取物的总黄酮含量。此外, 为了获取锦绣杜鹃叶抗菌作用的有效部位, 本实验将提取物分别用石油醚、乙酸乙酯和水萃取得到不同极性的萃取物组分, 比较其抑菌活性。结果显示: 乙醇回流法获得的粗提物的抗菌活性最佳, 对铜绿假单胞 27853 的 MIC 值达到了 0.512 mg/mL; 各萃取组分中, 水萃取组分和乙酸乙酯萃取组分的抗菌效果最好, 三种提取方法得到的水萃取组分对金黄色葡萄球菌 26003 均达到 1.024 mg/mL, 微波萃取法得到的乙酸乙酯萃取组分对铜绿假单胞菌 27853 的 MIC 值达到了 0.512 mg/mL。本研究证实了锦绣杜鹃叶具有较好的抗菌活性, 其抗菌作用的有效部位为水层提取部位, 为锦绣杜鹃叶在抗菌药物和相关产品研究开发方面提供了实验依据。

关键词: 锦绣杜鹃叶; 微波萃取; 抗菌活性; 耐药菌

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2019.02.006

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF *RHODODENDRON PULCHRUM* LEAVES AND ITS ACTIVE FRACTION

LIU Bing, TANG Jia-hui, LI Song-hui, XU Bao-gui, *SONG Ming-xia

(Health Science Center, Jinggangshan University, Ji'an, Jiangxi 343009, China)

Abstract: To investigate the antibacterial activities of the extraction of *Rhododendron pulchrum* leaves and its different extraction methods for antibacterial active substances. Extraction methods including methanol soaking, ethanol refluxing and microwave extracting were carried out. The antibacterial activities of the extracted components were evaluated by microporous plate dilution test using various positive bacteria, negative bacteria and antibiotic resistant bacteria as the tested bacteria. The total flavonoid content of different extractions were determined by ultraviolet spectroscopy. Additionally, the crude extract was extracted with petroleum ether, ethyl acetate and water respectively to get three different polar components, which were also subjected to the antibacterial test. The results indicated that The ethanol refluxing method was superior to the other extract methods in the aspect of antibacterial activity. Furthermore, the water phase and the ethyl acetate phase had better antibacterial effects than the petroleum ether phase, the water phases in three methods all had antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* 26003 with a MIC value of 1.024 mg/ML. The ethyl acetate phase from microwave extracting expressed antibacterial activities against *Pseudomonas aureus* 27853 with a MIC value of

收稿日期: 2018-12-12; 修改日期: 2019-01-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(81560561)

作者简介: 刘 兵(1966-), 女, 江西吉安人, 实验师, 主要从事药用植物的提取分离(E-mail: 1277544374@qq.com);

唐佳慧(1983-), 女, 江西吉安人, 实验师, 主要从事药用植物的提取分离(E-mail: 643556068@qq.com);

李松慧(1997-), 女, 安徽安庆人, 井冈山大学医学部药学专业 2015 级本科生(E-mail: 1762277817@qq.com);

徐宝贵(1996-), 女, 云南曲靖人, 井冈山大学医学部药学专业 2015 级本科生(E-mail: 1871133084@qq.com);

*宋明霞(1983-), 女, 山西介休人, 副教授, 博士, 主要从事抗菌先导物的发现与结构修饰(E-mail: freexiaoxiao83@aliyun.com).

0.512 mg/mL. *R. pulchrum* leaves exhibited antibacterial activities, and the water extract was the effective antibacterial ingredients. It provides experimental evidences for the research and development of *R. pulchrum* leaf as antibacterial agents or related products.

Key words: *Rhododendron pulchrum* leaf; microwave-assisted extraction; antibacterial activity; drug-resistance bacteria

0 引言

近年来随着对抗菌药物研究的不断深入,人们逐渐意识到化学药物的过度使用带来了诸多问题,抗生素长期使用及不合理使用导致细菌的耐药性问题日益加剧,药物残留问题和食品安全问题也受到越来越多的关注。因此有必要开发和利用纯天然中药来解决这一问题。杜鹃花(学名: *Rhododendron simsii* Planch.), 又名满山红、映山红、山石榴,为常绿或平常绿灌木。该物种全株供药用,有行气活血、补虚,可治疗内伤咳嗽、肾虚耳聋、月经不调、风湿等疾病^[1]。因花冠鲜红色,为著名的花卉植物,具有较高的观赏价值^[1],近年来还发现其活性成分具有良好的抗菌消炎、杀虫、止咳平喘等作用。

陈国联等人的研究发现多种杜鹃对多种常见致病菌有不同程度的杀菌作用,所测试的 10 种杜鹃皆为广谱抗菌药物^[2]。任茜等人研究发现秀丽杜鹃和汶川杜鹃的抗菌作用强于或相当于黄连^[3-5]。文献报道杜鹃植物中含有黄酮、二萜类、三萜类等多种活性成分^[6],其黄酮主要化学成分为金丝桃苷、槲皮素及映山红素等黄酮化合物,具有镇痛、抗炎抑菌、抗氧化等多方面的药理活性^[7]。

锦绣杜鹃(*Rhododendron pulchrum* Sweet.), 也称毛杜鹃,在我国江苏、福建、江西等地分布广泛,常用于园林和屋前舍后的绿化美观^[8],其主要成分为黄酮类物质^[8],具有较好的祛痰、止咳作用。鉴于锦绣杜鹃分布广泛,易于成活以及其同样富含黄酮类成分等特点,本实验拟研究其抗菌活性,对其抗菌活性部位进行追踪,初步获得其有效部位,并比较不同提取方法对抗菌活性成分的提取优劣。具体以江西省井冈山大学校园景观植物锦绣杜鹃的叶为原料,采用甲醇冷浸法、乙醇回流法、微波萃取法三种不同方法提取,并使用石油醚、乙酸乙酯和水进行萃取,测试三种提取方法获得的石油醚萃

取物、乙酸乙酯萃取物和水萃取物的体外抗菌活性,从而为锦绣杜鹃叶的抗菌活性成分的提取分离和临床应用提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

SSW-420-2S 型电热恒温水槽(上海博讯有限公司), WT30001B 电子天平(常州万泰天平仪器有限公司), ZNHW 型电热套(上海羌强仪器设备有限公司), MAS-II 微波提取器(上海新仪微波化学科技有限公司), 旋转蒸发器 RE-3000(上海亚荣生化仪器厂), DHG-9075A 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司), iMark 酶标仪(美国伯乐公司), ST2100 实验室 PH 计(奥豪斯仪器(常州)有限公司), SW-CJ-2D 型双人单面净化工作台(普通型,苏州净化设备有限公司), HZQ-F100 全温振荡培养箱(江苏太仓市华美生化仪器厂), GRP-9080 隔水式恒温培养箱(上海森信实验仪器有限公司), KXQ-LS 高压灭菌仪(上海博讯有限公司), Tu-1901 紫外可见分光光度计(北京普析通用公司), DV215CD 电子天平(美国奥豪斯公司)。

1.2 试剂与材料

锦绣杜鹃叶(采自江西吉安,经井冈山大学药理学系梁兆昌教授鉴定), G116212 甘油(阿拉丁试剂公司, 500 mL), CM1135 BRAIN HEART INFUSION(BHI)(英国 OXOID 公司, 500 g makes 13.5 litres), CM1168 NUTRIENT BROTH(英国 OXOID 公司, 500 g makes 38.4 litres), TRYPTONE SOYA BROTH(TSB)(英国 OXOID 公司), 二甲亚砜(国药集团化学试剂有限公司, 分析纯 AR 500 mL), 无水乙醇(成都市科隆化学品有限公司, 分析纯 AR500 mL), 芦丁(阿拉丁工业公司); 菌种购自中国科学院微生物研究所与北纳生物科技有限公司。

2 方法

2.1 锦绣杜鹃叶提取前处理

叶采摘后阴凉通风处自然风干, 粉碎成 40 目筛粉末备用。

2.2 锦绣杜鹃叶不同溶剂提取物的制备

2.2.1 甲醇冷浸法

取 50 g 锦绣杜鹃叶干燥粉末用 95% 的甲醇按料液比 1:10 (m/v), 室温避光浸 48 h, 每 24 h 振荡 1 次, 滤渣依次再用 1:10 的 95% 甲醇溶液浸提, 连续 3 次, 合并 3 次提取液减压浓缩得浸膏。称取 0.1 g 甲醇冷浸所得浸膏于离心管中留用, 将剩余浸膏按 1:20 (m/v) 溶于水中, 分别用等体积的石油醚、乙酸乙酯萃取三次, 获得石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、水萃取物, 浓缩溶剂后得到各自的浸膏^[9-12]。

2.2.2 乙醇回流提取法

取 50 g 锦绣杜鹃叶干燥粉末用 75% 的乙醇按料液比 1:10 (m/v), 120 °C 电热套加热回流, 每次 1 h。过滤得滤液, 滤渣依次再用 1:10 的 75% 乙醇溶液加热回流 1.0 h, 连续 3 次, 合并 3 次提取液减压浓缩得浸膏。称取 0.1 g 乙醇回流所得浸膏于离心管中留用, 将剩余浸膏按 1:20 (m/v) 溶于水中, 分别用等体积的石油醚、乙酸乙酯萃取 3 次, 获得石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、水萃取物, 浓缩溶剂后得到各自的浸膏^[13-17]。

2.2.3 微波萃取法

取 50 g 锦绣杜鹃叶干燥粉末用 75% 的乙醇按料液比 1:10 (m/v), 微波功率 400 W, 70 °C 条件萃取 30 min, 稍冷, 过滤, 滤渣依次再用 1:10 的 75% 乙醇溶液进行微波萃取, 连续 3 次, 合并 3 次提取液减压浓缩得浸膏。称取 0.1 g 微波萃取浸膏于离心管中留用, 将剩余浸膏按 1:20 (m/v) 溶于水中, 分别用等体积的石油醚、乙酸乙酯萃取 3 次, 获得石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、水萃取物, 浓缩溶剂后得到各自的浸膏^[18-19]。

2.3 抗菌实验

2.3.1 待测物的处理

将以上三种提取方法得到的粗浸膏以及其石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、水萃取物浓缩后的浸膏共 12 种浸膏作为抗菌实验对象, 用 DMSO 配

制为初始测试浓度 2.048 mg/mL 的待测药液, 4 °C 保存备用。

2.3.2 菌液制备

将金黄色葡萄球菌 26003、金黄色葡萄球菌 25923、枯草芽孢杆菌 63501、粪肠球菌 29212、变异链球菌 336931(1:50 接种, 静置培养), 大肠杆菌 44568、大肠杆菌 25922、铜绿假单胞菌 10104、铜绿假单胞菌 27853 以及金黄色葡萄球菌 33591、金黄色葡萄球菌 43300、铜绿假单胞菌 BAA-2111、大肠杆菌 BAA-196 按 1:1000 接种于 Mueller-Hinton broth (MHB) 或者 Tryptone Soya Broth (TSB) 或者 Brain Heart Infusion(BHI) 培养液中 37 °C 条件下摇瓶培养 24 h, 取菌落用培养液稀释成 10^5 CFU/mL。

2.3.3 抗菌活性 MIC 值的测定

于含 4 μ L 药液(浓度为 2.048 mg/mL)和 96 μ L 无菌培养液的 96 孔板中, 加入 100 μ L 菌液。在微型振荡器上震荡数秒后, 用酶标仪在 620 nm 波长下测定培养前的吸光度值。将微孔板置于 37 °C 恒温箱中培养 18~24 h 后, 再用酶标仪测定培养后的吸光度值, 综合两次数据, 根据式(1)计算药液对各菌的抑制率。以计算结果抑制率超过 80% 的定为具有抑菌活性, 继续用连续稀释法测定其 MIC 值(抑制率超过 80% 的最小浓度为最低抑菌浓度, 即 MIC 值)^[20-21]。

$$\text{抑制率} = 1 - \frac{\Delta\lambda}{\Delta\lambda_{\text{空白}}} \quad (1)$$

注: $\Delta\lambda$ = 培养后每组数据的平均值 - 培养前每组数据的平均值; $\Delta\lambda_{\text{空白}}$ = 培养后空白组的平均值 - 培养前空白组的平均值

2.4 提取物黄酮含量的测定

2.4.1 标准曲线的建立^[22-28]

精密称取 20 mg 芦丁置于 100 mL 容量瓶中, 加 70% 的乙醇溶液完全溶解并定容至刻度, 配置 0.2 mg/mL 芦丁标准溶液。精密量取 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 标准液, 分别放入 25 mL 容量瓶中, 加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL, 10% 三氯化铝溶液 0.3 mL, 用 70% 乙醇溶液定容, 摇匀, 依照紫外分光光度法, 在 410 nm 波长处测定吸光度($A_{\text{吸光度}}$), 所测结果见表 1。以标准溶液浓度 ($\rho_{\text{mg/ml}}$) 为横坐标, 吸光度 ($A_{\text{吸光度}}$) 为纵坐标, 绘制标准曲线; 计算标准曲线回归方程 $C = 0.03268A + 0.00026$, $r = 0.9979$, 并作出标准曲线图 1。

表 1 标准曲线表
Table 1 Standard curve table

芦丁标准浓度 (mg/mL)	0	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02
吸光度	0.001	0.100	0.231	0.385	0.482	0.592

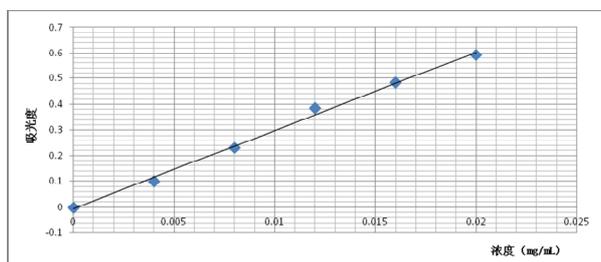


图 1 标准曲线图
Fig. 1 Standard curve

2.4.2 直接比色法含量测定

取 2.2 中三种提取方法得到的石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、水萃取物浓缩后的浸膏共 9 种浸膏为测定对象,称取每种浸膏 100 mg 放入 25 mL 量瓶中,分别加入 5%亚硝酸钠溶液 0.3 mL, 10%三氯化铝溶液 0.3 mL,加 70%乙醇至刻度,测定 410 nm 波长吸收值,将吸收值代入标准曲线方程,计算各浸膏中黄酮含量。

3 结果与讨论

3.1 三种提取方法提取率的比较

三种提取方法中,微波萃取法提取率最高,甲醇冷浸法和乙醇回流法的提取率相差不大(结果见表 2),说明微波萃取法确实是一种良好的中药材有效成分提取方法。微波萃取时,高频电磁波可以穿透萃取介质,到达被萃取物料的内部,使得细胞内部的温度快速升高,当细胞内部的压力达到某一临界点时,细胞就会破裂,有效成分流出并溶解于萃取介质。三种粗提物溶于水分别用石油醚、乙酸乙酯萃取得到石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、水萃取物。它们分别的提取率如表 2 所示,甲醇冷浸法得到的石油醚萃取物含量最多,乙醇回流和微波萃取法均是水萃取物更多。

表 2 三种提取方法的提取率比较

Table 2 The extraction rate of three extraction methods

萃取部位	甲醇冷浸法	乙醇回流法	微波萃取法
粗提取物	12.83	13.29	16.36
石油醚萃取物	4.04	3.66	3.57
乙酸乙酯萃取物	2.27	3.85	4.06
水萃取物	3.42	4.03	6.37

^a 提取率 = 浸膏质量/提取所用药材粉末质量*100%

3.2 三种粗提物抑菌活性的比较

本实验选取了 13 种细菌包括阴性菌、阳性菌和耐药菌用于杜鹃花提取物体外抗菌活性的评价。如表 3 所示,三种提取方法获得的粗提物中,甲醇冷浸法和微波萃取法所得浸膏在 2.048 mg/mL 剂量下几乎没有显示出抗菌活性;而乙醇回流法所得浸膏对大多数所选细菌包括两个耐药菌株,均显示出较好的抗菌活性,对部分菌株的 MIC 值达到 0.512 mg/mL。

表 3 甲醇冷浸法、乙醇回流法和微波萃取法粗提物抑菌活性比较 (MIC 值, mg/mL)

Table 3 Comparison of antibacterial activity of crude extract obtained by methanol soaking, ethanol refluxing and microwave extracting

菌株	甲醇冷浸法	乙醇回流法	微波萃取法
金葡菌 CMCC(B)26003	> 2.048	1.024	> 2.048
金葡菌 CMCC 25923	> 2.048	2.048	2.048
枯草芽孢杆菌 CMCC 63501	2.048	2.048	> 2.048
粪肠球菌 CMCC 29212	> 2.048	> 2.048	> 2.048
变异链球菌 BNCC 336931	> 2.048	2.048	> 2.048
大肠杆菌 CMCC 44568	> 2.048	2.048	> 2.048
大肠杆菌 CMCC 25922	> 2.048	2.048	2.048
铜绿假单胞菌 CMCC 10104	> 2.048	2.048	> 2.048
铜绿假单胞菌 CMCC 27853	> 2.048	0.512	> 2.048
金葡菌 ATCC 33591	> 2.048	> 2.048	> 2.048
金葡菌 ATCC 43300	> 2.048	2.048	> 2.048
铜绿假单胞 ATCCBAA-2111	> 2.048	1.024	> 2.048
大肠杆菌 ATCC BAA-196	> 2.048	2.048	> 2.048

3.3 粗提物萃取组分的抑菌活性比较

为了寻找锦绣杜鹃叶抗菌作用的有效部位,更好地为后续活性物质追踪提供依据,本实验将三种提取法所得粗提物依次进行石油醚和乙酸乙酯萃取,分别将获得的石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物和水萃取物进行抗菌活性筛选。对 5 种阳性菌的抑菌活性见表 4。总的来说,锦绣杜鹃叶提取物对金葡菌显示出较好的抑菌活性,对枯草芽孢杆菌、粪肠球菌和变异链球菌在 2.048 mg/mL 浓度下也显示一定活性。比较三种萃取物的抗菌活性,可以看出水萃取物的活性最好,其次是乙酸乙酯萃取物,最后是石油醚萃取物。三种粗提方法得到的水萃取组分对金葡菌 26003 的抗菌活性 MIC 值均达到 1.024 mg/mL。

表 4 各萃取物对革兰氏阳性菌的抗菌活性 MIC 值 (mg/ml)
Table 4 Antibacterial activity of different solvent extracts against gram-positive bacteria

提取方法	萃取物	金葡萄菌 26003	金葡萄菌 25923	枯草芽孢杆菌 63501	粪肠球菌 29212	变异链球菌 336931
甲醇冷浸法	石油醚萃取物	> 2.048	> 2.048	2.048	> 2.048	> 2.048
	乙酸乙酯萃取物	> 2.048	2.048	2.048	2.048	> 2.048
	水萃取物	1.024	> 2.048	2.048	> 2.048	2.048
乙醇回流法	石油醚萃取物	> 2.048	> 2.048	2.048	2.048	> 2.048
	乙酸乙酯萃取物	> 2.048	2.048	> 2.048	2.048	> 2.048
	水萃取物	1.024	> 2.048	2.048	> 2.048	> 2.048
微波萃取法	石油醚萃取物	> 2.048	> 2.048	2.048	> 2.048	> 2.048
	乙酸乙酯萃取物	2.048	2.048	2.048	> 2.048	2.048
	水萃取物	1.024	2.048	2.048	> 2.048	2.048

各种萃取物对 4 种常见阴性菌的抑菌活性结果见表 5。从表中可以看出,不同萃取物中,石油醚萃取物在 2.048 mg/mL 浓度下几乎没有显示出抗菌活性,而微波萃取组的乙酸乙酯萃取物和水萃取物对铜绿假单胞菌抗菌活性较好,分别达到了 0.512、2.048 mg/mL。

表 5 各萃取物对革兰氏阴性菌的抗菌活性 MIC 值 (mg/mL)
Table 5 Antibacterial activity MIC of different solvent extracts against gram-negative bacteria

提取方法	萃取物	大肠杆菌 44568	大肠杆菌 25922	铜绿假单胞菌 10104	铜绿假单胞菌 27853
甲醇冷浸法	石油醚萃取物	2.048	> 2.048	> 2.048	> 2.048
	乙酸乙酯萃取物	> 2.048	> 2.048	> 2.048	> 2.048
	水萃取物	> 2.048	> 2.048	> 2.048	> 2.048
乙醇回流法	石油醚萃取物	> 2.048	> 2.048	> 2.048	> 2.048
	乙酸乙酯萃取物	> 2.048	2.048	> 2.048	> 2.048
	水萃取物	2.048	> 2.048	> 2.048	> 2.048
微波萃取法	石油醚萃取物	> 2.048	> 2.048	> 2.048	> 2.048
	乙酸乙酯萃取物	2.048	> 2.048	2.048	0.512
	水萃取物	2.048	2.048	2.048	2.048

各萃取物对耐药菌的抗菌活性见表 6。结果显示各萃取组分对四种耐药菌的抗菌活性均较弱,对金黄色葡萄球菌 33591 在 2.048 mg/mL 浓度条件下均没有显示出抗菌活性,对其他三种耐药菌抗菌活性区别不大;甲醇冷浸法和乙醇回流法得到的萃取物对四种耐药菌在 2.048 mg/mL 浓度条件下几乎没有抗菌活性,微波萃取组的乙酸乙酯层和水层对金

葡菌 43300、铜绿假单胞 BAA-2111、大肠杆菌 BAA-196 的 MIC 值均达到了 2.048 mg/mL。

表 6 三种粗提物不同溶剂萃取物对耐药菌的抗菌活性 MIC 值 (mg/mL)

提取方法	萃取物	金黄色葡萄球菌 33591	金黄色葡萄球菌 43300	铜绿假单胞菌 BAA-2111	大肠杆菌 BAA-196
甲醇冷浸法	石油醚萃取物	> 2.048	2.048	> 2.048	> 2.048
	乙酸乙酯萃取物	> 2.048	> 2.048	2.048	> 2.048
	水萃取物	> 2.048	> 2.048	> 2.048	> 2.048
乙醇回流法	石油醚萃取物	> 2.048	> 2.048	> 2.048	> 2.048
	乙酸乙酯萃取物	> 2.048	> 2.048	> 2.048	2.048
	水萃取物	> 2.048	> 2.048	> 2.048	2.048
微波萃取法	石油醚萃取物	> 2.048	> 2.048	> 2.048	> 2.048
	乙酸乙酯萃取物	> 2.048	2.048	2.048	2.048
	水萃取物	> 2.048	2.048	2.048	2.048

总的来说,锦绣杜鹃叶的粗提物用不同溶剂萃取后,对细菌的抑制活性强弱有别,活性顺序为:水萃取物 > 乙酸乙酯萃取物 > 石油醚萃取物。从不同菌种类型来看,锦绣杜鹃叶对革兰氏阳性菌的抑制活性要强于革兰氏阴性菌。

3.4 萃取物抗菌活性与其总黄酮含量的关系

由 3.3 讨论可知,在石油醚、乙酸乙酯和水的三个萃取组分中,水萃取物显示出更好的抗菌活性。为了探究黄酮类物质是否为锦绣杜鹃叶的主要抗菌活性成分,对各萃取组分进行了黄酮含量测定。黄酮含量结果见表 7。从表中可以看出,三种粗提物的乙酸乙酯萃取组分中黄酮含量均较高,这一点与其较高的抗菌活性相吻合,说明锦绣杜鹃叶抑菌活性与总黄酮含量确实存在着一定的相关性,可初步断定黄酮类是锦绣杜鹃叶的抑菌活性成分之一。在三种提取方法中,水萃取物中黄酮含量都最低,这与黄酮类物质的本身性质相关,但由 3.3 部分可知水萃取物的抑菌活性较高,据此推测杜鹃叶的抗菌活性还来自于黄酮以外的其他成分。根据进一步查阅文献,石天松^[29]、赵玺^[10]、赵宝琴等^[7]在中药满山红中分离出黄酮类、香豆素类、有机酸类、挥发油类等数十种重要化学成分,据此猜测杜鹃叶中有效抗菌活性很有可能来自于有机酸类、香豆素类以及挥发油类或者其他化学成分。

表 7 各萃取物总黄酮含量
Table 7 Total flavone content of each extract

提取方法	萃取物	吸光度	含量 (%)
乙醇回流法	石油醚萃取物	0.5000	4.150
	乙酸乙酯萃取物	0.5122	4.250
	水萃取物	0.1817	1.550
甲醇冷浸法	石油醚萃取物	0.4969	4.125
	乙酸乙酯萃取物	0.5030	4.175
	水萃取物	0.2001	1.700
微波萃取法	石油醚萃取物	0.5122	4.250
	乙酸乙酯萃取物	0.5122	4.250
	水萃取物	0.1603	1.375

4 小结

本研究证实了锦绣杜鹃叶中含有广谱抗菌的有效成分,对常见的革兰氏阳性菌和阴性菌以及耐药菌均表现出抑制活性。其抑菌活性可能与黄酮及其他成分如香豆素类、有机酸类或者挥发油类成分有关。在提取方法研究中,微波萃取法和乙醇回流法在提取抗菌活性物质方面要优于甲醇冷浸法,且提取率较高。粗提物用不同溶剂萃取后,不同萃取层之间抗菌活性依次为:水萃取物 > 乙酸乙酯萃取物 > 石油醚萃取物,说明锦绣杜鹃叶中的抗菌有效部位是水层和乙酸乙酯层,这为后续的抗菌有效成分的分离提供了指导。

参考文献:

- [1] 张梅,潘大仁. 杜鹃属植物黄酮类化合物的研究进展[J]. 海峡科学,2012,65(5):3-14.
- [2] 陈国联,张德山,王桂山,等. 秦岭 10 种药用杜鹃的抗菌作用的实验研究[J]. 中医药学报,1990,23(05):51-52.
- [3] 任茜,李强,李万波,等. 十种秦岭杜鹃的抗菌作用研究[J]. 陕西林业科技,1990,17(3):31-32.
- [4] 张德山,王桂山,李凌夫,等. 汶川杜鹃的抗菌实验及镇咳作用的临床观察[J]. 中医药学报,1998,22(04):36-38.
- [5] 任茜,陈国联,李万波. 30 种杜鹃属植物抗菌作用的试验研究[J]. 中国园艺文摘,2012,28(3):3-4.
- [6] 李少泓,孙欣. 杜鹃属植物的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中华中医药学刊,2010,28(11):2435-2437.
- [7] 赵宝琴,高陆. 满山红化学成分和药理学研究进展[J]. 人参研究,2015,14(1):42-44.
- [8] 张梅,潘大仁. HPLC 同时测定锦绣杜鹃四种黄酮类化合物的含量[J]. 西北林学院学报,2013,28(1):119-122.
- [9] 吴丹慧. 锦绣杜鹃提取物制备工艺及质量标准研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2011.
- [10] 赵玺,车文实. 满山红的化学成分和提取方法研究进展[J]. 安徽医科大学学报,2013,48(5):580-582.
- [11] 蔡秋华. 千层金总黄酮的提取研究[J]. 中国农业信息,2015,34(19):159-160.
- [12] 黎璐,吕昱,汤洪敏. 长裙竹荪 3 部分石油醚提取物的对比[J]. 食品科学,2013,35(6):73-77.
- [13] 仇燕,王明珠,赵紫华. 莱芙蓉总黄酮提取物抑菌作用及其稳定性研究[J]. 北方园艺,2016,41(8):150-153.
- [14] 傅力明,李华峰,姚杰,等. 中药蒲公英花提取物的抑菌性能研究[J]. 山西医药杂志,2015,44(8):947-949.
- [15] 张朝坤,安晔,张振秋. 大孔吸附树脂纯化满山红总黄酮工艺研究[J]. 中国药师,2010,13(7):969-97.
- [16] 徐炳祥,韩公羽,刘明珠. 映山红有效成份的研究——Ⅲ、乌索酸的分离和鉴定[J]. 第二军医大学学报,1982,08(4):298-299.
- [17] 沈腾滨,张梅,唐旭艳,等. 基于均匀设计的锦绣杜鹃花色苷提取工艺优选[J]. 井冈山大学学报:自然科学版,2016,37(5):21-24.
- [18] 张彩霞,戎敢,张志刚. 罗汉果花中黄酮的提取及结构表征[J]. 光谱实验室,2013,30(3):1389-1394.
- [19] 孟辉,邹向宇,刘国良,等. 两种微波辅助萃取法萃取满山红叶中总黄酮[J]. 湖南农业大学学报:自然科学报,2006,32(2):210-213.
- [20] 彭姣阳,林梦婷,谭雨琪,等. 含 3-芳基吡唑的绕丹宁衍生物的合成及抗菌活性评价[J]. 井冈山大学学报:自然科学版,2017,38(5):96-103.
- [21] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard M7-A6, [M]. Wayne, PA, USA, 2003.
- [22] 曹婷婷. 丹参对原代 246.7 细胞炎性因子作用机制的研究[D]. 武汉:华中科技大学,2005.
- [23] 陈滴,陈星,刘昕. 分光光度法测定玉米须总黄酮含量研究[J]. 玉米科学,2007,15(2):147-152.
- [24] 梁军. 银杏叶黄酮类化合物提取工艺的优化研究[J]. 辽宁中医杂志,2011,38(4):706-709.
- [25] 徐璐,夏国华,徐黎明,等. 水芹中总黄酮类化合物提取工艺的优化及其含量测定[J]. 抗感染药学,2017,14(9):1654-1657.
- [26] 谢天艳,何开泽,赵海,等. 4 种浮萍提取物的抗菌活性和黄酮含量[J]. 应用与环境生物学报,2014,20(2):238-244.
- [27] 黄晓冬. 4 种龙眼核提取物的总黄酮含量、体外抗菌活性与抗氧化活性[J]. 食品科学,2011,32(11):43-47.
- [28] 黄晓冬. 赤楠叶醇提物抗菌活性及成分总黄酮的研究[J]. 泉州师范学院学报,2007(4):98-102.
- [29] 石天松. 中药满山红化学成分和分析方法的研究进展[J]. 华夏医学,2012,25(1):119-123.