

# 锦绣杜鹃花抗菌、抗炎活性及其有效部位研究<sup>①</sup>

徐宝贵 李松慧 宋明霞 邓先清

(井冈山大学 医学部,江西 吉安 343009)

**摘要** 为了研究锦绣杜鹃花的抗菌及抗炎活性,并比较不同提取方法对其抗菌活性物质的提取效率.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花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.基于其较好的体外抗菌活性,还采用 RAW264.7 细胞炎症模型评价了粗提物对炎症因子 TNF- $\alpha$  的影响,并测定了各萃取物的总黄酮含量.此外,为了获取锦绣杜鹃花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.甲醇冷浸法获得的粗提物的抗菌活性最佳;各萃取组分中,乙酸乙酯萃取组分的抗菌效果最好,其对金黄色葡萄球菌 26003 的 MIC 值达到 0.512 mg/mL;提取物能明显抑制 LPS 诱导的炎症因子 TNF- $\alpha$  的增加.本研究证实了锦绣杜鹃花具有较好的抗菌抗炎活性,其抗菌作用的有效部位为乙酸乙酯萃取部位,为锦绣杜鹃花在抗菌、抗炎药物和产品研究开发方面提供了实验依据.

**关键词** 锦绣杜鹃花;微波萃取;抗菌活性;耐药菌;抗炎

**中图分类号** R285.5

**文献标识码** A

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.),别名满山红,又名映山红、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、补虚的功效,可治疗内伤咳嗽,肾虚耳聋,月经不调,风湿等疾病<sup>[1]</sup>.因花冠鲜红色,为著名的花卉植物,具有较高的观赏价值<sup>[1]</sup>,近年来还发现其活性成分具有良好的抗菌消炎、杀虫、止咳平喘作用.

陈国联<sup>[2]</sup>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<sup>[2]</sup>.任茜<sup>[3]</sup>等人研究发现如秀丽杜鹃和汶川杜鹃的抗菌作用强于或相当于黄连<sup>[4,5]</sup>.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<sup>[6]</sup>,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,有镇痛、抗炎抑菌、抗氧化等多方面的药理活性<sup>[7]</sup>.黄酮类物质系近年来与越来越多的治疗活性和保健功能相联系,如抗血栓形成、抗糖尿病、降血糖、抗病毒和抗肿瘤等<sup>[8]</sup>.

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<sup>[9]</sup>,其主要成分为黄酮类物质<sup>[9]</sup>,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花为原料,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,从而为锦绣杜鹃的抗菌活性成分的分离和临床应用提供依据.此外,鉴于大部分中草药中抗菌活性常常伴随着消炎作用,我们对锦绣杜鹃的甲醇冷浸提取物的乙酸乙酯萃取部分还进行了体外抗炎活性研究,从而进一步拓展它的临床应用.

① 收稿日期:2018-06-20

基金项目:国家自然科学基金项目(81560561)资助

通讯作者:邓先清,男,汉族,博士,副教授,研究方向:抗菌先导物的发现与修饰,E-mail:dengxianqing1121@126.com.

## 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 型单人单面净化工作台(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

锦绣杜鹃花(采自江西吉安,经井冈山大学药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);金葡萄菌 CMCC(B) 26003、金葡萄菌 CMCC 25923、枯草芽孢杆菌 CMCC 63501、粪肠球菌 CMCC 29212、变异链球菌 BNCC 336931、大肠杆菌 CMCC 44568、大肠杆菌 CMCC 25922、铜绿假单胞菌 CMCC 10104、铜绿假单胞菌 CMCC 27853、金葡萄菌 ATCC 33591、金葡萄菌 ATCC 43300、铜绿假单胞菌 ATCC BAA-2111、大肠杆菌 ATCC BAA-196,以上菌株购自中国科学院微生物研究所与北纳生物科技有限公司,小鼠肿瘤坏死因子  $\alpha$  酶联试剂盒(Biolegend, USA)。

## 2 方法

### 2.1 锦绣杜鹃花提取前处理

花朵采摘后阴凉通风处自然风干,粉碎成 40 目筛粉末备用。

### 2.2 锦绣杜鹃花不同溶剂提取物的制备

2.2.1 甲醇冷浸法。取 50 g 锦绣杜鹃花干燥粉末用 95% 的甲醇按料液比 1:10(m/v),室温避光浸 48 h,每 24 h 振荡一次,滤渣依次再用 1:10 的 95% 甲醇溶液浸提,连续三次,合并三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<sup>[10-13]</sup>。

2.2.2 乙醇回流提取法。取 50 g 锦绣杜鹃花干燥粉末用 75% 的乙醇按料液比 1:10(m/v),120℃ 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 h,连续三次,合并三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<sup>[14-18]</sup>。

2.2.3 微波萃取法。取 50 g 锦绣杜鹃花干燥粉末用 75% 的乙醇按料液比 1:10(m/v),微波功率 400 W,温度 70℃ 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,连续三次,合并三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<sup>[19,20]</sup>。

### 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℃ 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,37℃下静置培养),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 1:100 0 接种于 Mueller-Hinton broth (MHB) 或者 Tryptone Soya Broth (TSB) 或者 Brain Heart Infusion(BHI)培养液中 37℃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  $4 \mu\text{L}$  药液(浓度为  $2.048 \text{ mg/mL}$ )和  $96 \mu\text{L}$  无菌培养液的 96 孔板中,加入  $100 \mu\text{L}$  菌液.在微型振荡器上震荡数秒后,用酶标仪在  $620 \text{ nm}$  波长下测定培养前的吸光度值.再将微孔板置于  $37^\circ\text{C}$  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)<sup>[21,22]</sup>

$$MI=1-\Delta\lambda/\Delta\lambda_{\text{空白}}, \quad (1)$$

其中  $\Delta\lambda$  = 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 抗炎实验

2.4.1 细胞培养.小鼠巨噬细胞购买于中科院上海细胞库,37℃、5%  $\text{CO}_2$  用含 10% 胎牛血清、青霉素、链霉素的 RPMI-1640 完全高糖培养基培养,传代、生长至对数期待用.

2.4.2 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症模型<sup>[23]</sup>.将处于对数期的 RAW 264.7 细胞转至 24 孔板中,每孔中细胞密度约为  $10^4$  个/L,每孔添加培养基定容至 1 mL,置于细胞培养箱中培养 24 h.将细胞分成 5 个组:正常组,不加 LPS 和药液;LPS 对照组(终浓度为  $1 \mu\text{g/mL}$ ),和三个不同浓度的药物组( $0.2 \text{ mg/mL}$ ,  $0.5 \text{ mg/mL}$ ,  $1 \text{ mg/mL}$ ,乙酸乙酯萃取物配置),每组三个复孔.给药处理 6 h 后,加入 LPS 进行刺激,细胞培养箱中培养 24 h 后,取上清液按照 ELISA 试剂盒说明书操作进行炎症因子  $\text{TNF-}\alpha$  的含量测定.结果采用 Prism 5.0 软件进行处理,ANOVA 统计分析,  $p < 0.05$  视为具有统计学差异.

## 2.5 提取物黄酮含量的测定

2.5.1 标准曲线的建立<sup>[24-29]</sup>.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  $0.2 \text{ mg/mL}$  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  $410 \text{ nm}$  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( $\rho_{\text{mg/mL}}$ )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

芦丁标准浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	0	0.004	0.008	0.012	0.016	0.020
吸光度	-0.001	0.100	0.231	0.385	0.482	0.592

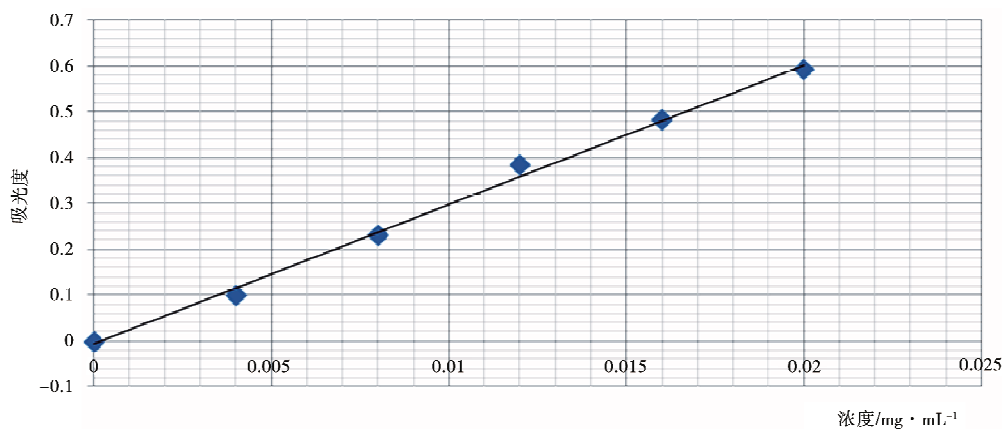


图 1 标准曲线图

2.5.2 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  $410 \text{ nm}$  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(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一零界点时,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.

#### 3.2 三种提取方法所得粗提物抑菌活性比较

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,乙醇回流法和微波萃取法所得浸膏在2.048 mg/mL剂量下没有显示出抗菌活性;而甲醇冷浸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1.024 mg/mL.

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

菌株	甲醇冷浸法	乙醇回流法	微波萃取法
金葡菌 CMCC(B)26003	1.024	>2.048	>2.048
金葡菌 CMCC 25923	2.048	>2.048	>2.048
枯草芽孢杆菌 CMCC 63501	1.024	>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	1.024	>2.048	>2.048
铜绿假单胞菌 CMCC 10104	1.024	>2.048	>2.048
铜绿假单胞菌 CMCC 27853	>2.048	>2.048	>2.048
金葡菌 ATCC 33591	>2.048	>2.048	>2.048
金葡菌 ATCC 43300	1.024	>2.048	>2.048
铜绿假单胞菌 ATCCBAA-2111	>2.048	>2.048	>2.048
大肠杆菌 ATCC BAA-196	2.048	>2.048	>2.048

#### 3.3 三种粗提物不同溶剂萃取物抑菌活性比较

为了寻找锦绣杜鹃花抗菌作用的有效部位,更好的为后续的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,锦绣杜鹃花提取物对金葡菌和枯草芽孢杆菌显示出较好的抑菌活性,而对粪肠球菌和变异链球菌在2.048 mg/mL浓度下均没有显示出活性.比较三种萃取物的抗菌活性,可以看出乙酸乙酯萃取物的活性最好,其次是石油醚萃取物,最后是水萃取物.甲醇冷浸法得到的乙酸乙酯萃取物的抗菌活性MIC值达到0.512 mg/mL.

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,三种提取方法获得的萃取物中,乙酸乙酯萃取物均显示出抗菌活性,其他萃取组分对大肠杆菌和铜绿假单胞菌在2.048 mg/mL浓度下没有显示出活性.

表2 三种提取方法的提取率比较(%)<sup>a</sup>

萃取部位	甲醇冷浸法	乙醇回	微波萃取法
粗提取物	12.74	12.64	16.36
石油醚萃取物	4.16	3.92	3.88
乙酸乙酯萃取物	2.02	2.62	2.60
水萃取物	3.10	4.38	5.10

注:a 提取率=浸膏质量/提取所用药材粉末质量\*100%.

表 4 三种粗提物不同溶剂萃取物对革兰氏阳性菌的抗菌活性 MIC 值 (mg/mL)

提取方法	萃取物	金葡菌 26003	金葡菌 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	0.512	2.048	1.024	>2.048	>2.048
	水萃取物	>2.048	>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	1.024	1.024	>2.048	>2.048	>2.048
	水萃取物	>2.048	>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	1.024	1.024	1.024	>2.048	>2.048
	水萃取物	>2.048	>2.048	>2.048	>2.048	>2.048

表 5 三种粗提物不同溶剂萃取物对革兰氏阴性菌的抗菌活性 MIC 值 (mg/mL)

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	1.024	1.024	2.048	1.024
	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	1.024	1.024	2.048	0.512
	水萃取物	>2.048	>2.048	>2.048	>2.048

三种粗提物不同溶剂萃取物对耐药菌的抗菌活性见表 6. 结果显示甲醇冷浸法和微波萃取法提取物的乙酸乙酯萃取层对两种耐甲氧西林金葡菌(33591 和 43300) 显示出较好的抑菌活性,乙醇回流法提取物的乙酸乙酯萃取层对多药耐药大肠杆菌 BAA-196 显示出较好的抑制活性, MIC 值达到 1.024 mg/mL; 甲醇冷浸法提取物的石油醚萃取层对两种耐甲氧西林金葡菌也显示出一定抑制活性, MIC 值为 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	1.024	1.024	>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	1.024
	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	1.024	1.024	>2.048	>2.048
	水萃取物	>2.048	>2.048	>2.048	>2.048

总的来说,锦绣杜鹃花不同溶剂萃取物对细菌的抑制活性强弱有别,活性顺序为:乙酸乙酯萃取物>石油醚萃取物>水萃取物. 从不同菌种类型来看,锦绣杜鹃花对革兰氏阳性菌的抑制活性要强于革兰氏阴性菌.

### 3.4 甲醇冷浸粗提物的体外抗炎活性

TNF- $\alpha$  即肿瘤坏死因子,它可以促进 T 细胞产生各种炎症因子,进而促进炎症反应的发生. TNF- $\alpha$  还可介导其他细胞因子和炎症因子的表达. 适量的 TNF- $\alpha$  可调节机体的免疫及代谢功能,对维持机体内部稳定及抵制各种疾病因子具有重要意义,但其

在体内的大量产生和释放则会破坏机体的免疫平衡,与其它炎症因子一起产生多种病理损伤.因此TNF- $\alpha$ 作为一种重要的炎症因子,用于衡量细胞与机体的炎症反应程度已被大家所接受.本实验中,我们采用RAW264.7细胞构建炎症细胞模型,通过测定提取物对RAW264.7细胞TNF- $\alpha$ 分泌的影响,来评价提取物的抗炎活性.如图2所示,RAW264.7细胞用LPS处理后,与空白组相比TNF- $\alpha$ 浓度显著升高(\* \* \*  $p < 0.001$ ),三个药物组明显抑制了LPS诱导的炎症因子的增加,药物组与模型组相比均具有显著性差异(#  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ ),并且该抑制作用具有一定的剂量依赖性.

### 3.5 萃取物抗菌活性与其总黄酮含量关系

由3.3讨论可知,甲醇冷浸法、乙醇回流法和微波萃取法三种提取方法获得的萃取物中,乙酸乙酯萃取物均显示出较好的抗菌活性.为了探究黄酮类物质是否为锦绣杜鹃花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,各种提取方法获得的乙酸乙酯萃取物中黄酮含量均较高,这一点与其较高的抗菌活性相吻合,说明锦绣杜鹃花抑菌活性与总黄酮含量确实存在着较强的相关性,可初步断定黄酮类是锦绣杜鹃花的主要抑菌成分.由3.3部分可知水萃取物的抑菌活性较低,但其黄酮含量测定结果却显示出比石油醚萃取物更高的吸光度,其原因可能是挥发水溶液时温度较高引起多糖、氨基酸、鞣酸、蛋白质等物质的糊化,从而导致吸光度升高.

## 4 结论

杜鹃花科植物分布广、品种多、活性高、用途广,具有广阔的开发前景,其中的锦绣杜鹃江西分布较多,属于传统的中草药.通过对其提取物的抗菌、抗炎活性和其抗菌活性有效部位的研究,可以为其在抗菌、抗炎药物和产品研究开发方面提供实验依据.本文采用甲醇冷浸法、乙醇回流法、微波萃取法三种方法对锦绣杜鹃花中的有效成分进行提取,评价了粗提物对十三种菌株的抑制活性;采用酶联免疫法评价了粗提物对细胞炎症因子的抑制活性,并利用紫外分光光度法测定了萃取物的总黄酮含量.结果表明:锦绣杜鹃花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;可以明显抑制由LPS诱导的RAW264.7细胞TNF- $\alpha$ 的分泌,表现出较好的抗炎活性;且表现出较好抑菌活性的萃取物中总黄酮含量较高,锦绣杜鹃花粗提物的抑菌活性与其黄酮含量有关.在提取方法研究中,甲醇冷浸法和微波萃取法获得的的萃取物抗菌活性要优于乙醇回流法,建议在进行抗菌有效物质提取时,优先选择甲醇冷浸法和微波萃取法.不同萃取层之间抗菌活性依次为:乙酸乙酯萃取物 > 石油醚萃取物 > 水萃取物,说明锦绣杜鹃花中的抗菌有效部位是乙酸乙酯层,这对于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(5):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(4):36-38.

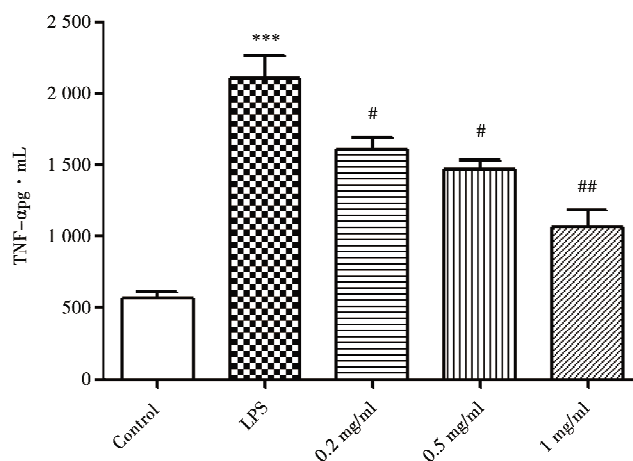


图2 锦绣杜鹃花不同浓度萃取物对LPS诱导的RAW264.7细胞TNF- $\alpha$ 分泌的影响

表7 各萃取物总黄酮含量

提取方法	萃取物	吸光度	含量/%
乙醇回流法	石油醚萃取物	0.160 3	1.375
	乙酸乙酯萃取物	0.500 0	4.150
	水萃取物	0.396 0	3.300
甲醇冷浸法	石油醚萃取物	0.261 3	2.200
	乙酸乙酯萃取物	0.493 9	4.100
	水萃取物	0.432 6	3.711
微波萃取法	石油醚萃取物	0.190 9	1.625
	乙酸乙酯萃取物	0.496 9	4.125
	水萃取物	0.506 1	4.200

- [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] 李雪萍,高亚曼,孔令米,等. 蜂蜜的药用价值:对人类健康特别是对血糖调节影响[J]. 聊城大学学报(自然科学版),2016,29(4):31-38.
- [9] 张梅,潘大仁. HPLC同时测定锦绣杜鹃四种黄酮类成分的含量[J]. 西北林学院学报,2013,28(1):119-122.
- [10] 吴丹慧. 锦绣杜鹃提取物制备工艺及质量标准研究[D]. 湖北中医药大学,2011.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 黎璐,吕星,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.
- [14] 仇燕,王明珠,赵紫华. 莱菔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.
- [15] 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.
- [16] 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):969-973.
- [17] 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,1982,8(4):298-299.
- [18] 马微微,王军,穆立蕾. 紫椴花提取物体外抗菌活性[J]. 东北林业大学学报,2013,41(9):127-132.
- [19] 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.
- [20] 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(自然科学版),2006,32(2):210-213.
- [21] 彭蛟阳,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,2017,38(5):96-103.
- [22] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard M7-A6[S]. Wayne, PA, USA, 2003.
- [23] 曹婷婷. 丹参对原代246.7细胞炎性因子作用机制的研究[D]. 华中科技大学,2005.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 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.

## Study on Antibacterial and Anti-inflammatory Activity of *Rhododendron Pulchrum* and Its Active Fraction

XU Bao-gui LI Song-hui SONG Ming-xia DENG Xian-qing

(Medical School, Jinggangshan University, Ji'an 343009, China)

**Abstract** In this study, the antibacterial activity of the extract of *Rhododendron pulchrum* flower and its different extraction methods for antibacterial active substances were investigated. 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. Based on its potent antibacterial activity, the effect of the extract on the inflammatory factor TNF- $\alpha$  in the RAW264.7 macrophage was also investigated. Additionally, the extractions with petroleum ether and ethyl acetate from the water suspension of crude extract were also carried out to get three different polar components, which were also subjected to the antibacterial test to obtain the effective part of the antibacterial activity of *Rhododendron pulchrum* flower. The results indicated that the methanol soaking was superior to the other extract methods in the aspect of antibacterial activity. Furthermore, the ethyl acetate phase, holding the greatest antibacterial effects, was the optimal active fraction of *Rhododendron pulchrum* flower. It displayed outstanding antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* 1.2155 with MIC value of 0.512 mg/mL. The extract could significantly inhibit the increase of the TNF- $\alpha$  induced by LPS. It can be concluded that *Rhododendron pulchrum* flower exhibited antibacterial and anti-inflammatory activities, and the ethyl acetate extracting after a methanol soaking of the medicinal plant was a proper method to obtain its antibacterial active ingredients.

**Key words** *Rhododendron pulchrum* flower; microwave extraction; antibacterial activity; drug-resistance bacteria; anti-inflammatory