

苦丁茶不同产地及采收部位抗菌活性成分研究* Antimicrobial Activity and Ingredients of *Ilex kudingcha* C. J. Tseng Collected from Different Localities and Parts

黄敏桃^{1,2}, 吴尤娇², 蔡 鹃³, 黄云峰⁴, 赖茂祥⁴, 黄庶识^{2**}, 刘华钢^{5**}

HUANG Mintao^{1,2}, WU Youjiao², CAI Juan³, HUANG Yunfeng⁴, LAI Maoxiang⁴, HUANG Shushi², LIU Huagang⁵

(1. 广西生态工程职业技术学院, 广西柳州 545004; 2. 广西科学院生物物理实验室, 广西南宁 530007; 3. 江西省赣州卫生学校, 江西赣州 341000; 4. 广西中医药研究院, 广西南宁 530022; 5. 广西医科大学, 广西南宁 530021)

(1. Guangxi Eco-engineering Vocational and Technical College, Liuzhou, Guangxi, 545004, China; 2. Lab of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 3. Health School of Ganzhou in Jiangxi Province, Ganzhou, Jiangxi, 341000, China; 4. Guangxi institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science, Nanning, Guangxi, 530022, China; 5. Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China)

摘要:【目的】研究不同产地及采收部位的苦丁茶抗菌活性及其与 5 种活性成分之间的相关性, 为苦丁茶商品化采摘提供参考。【方法】选用不同产地的、加工及未加工的苦丁茶叶子, 采用热水提取苦丁茶; 使用杯碟法测定苦丁茶水提物的抑菌活性; 经高效液相色谱法同时测定苦丁茶中槲皮素、山萘酚、熊果酸、齐墩果酸的含量, 苯酚-硫酸法测定其多糖含量; 采用 SPSS 统计软件将测得的 5 种活性成分的含量与抑菌活性进行双变量相关性研究。【结果】不同产地苦丁茶水提物的总体抗菌强弱为广西>广东>海南, 且对金黄色葡萄球菌的作用最强, 大肠杆菌最弱; 加工的>未加工的。除山萘酚外, 其余 4 种成分与 3 种细菌均呈显著性相关 ($R < 0.01$)。【结论】不同苦丁茶样品的抗菌活性与活性成分含量均有一定的差异; 苦丁茶水提物中槲皮素、多糖、熊果酸、齐墩果酸与抑菌活性有显著相关性。

关键词: 苦丁茶 抗菌活性 成分 相关性

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2016)01-0072-07

Abstract: 【Objective】The correlation between five elements and antimicrobial activity was studied in *Ilex kudingcha* C. J. Tseng collected from different localities and parts, in order to provide references for the commercialization of tea picking. 【Methods】Cylinder plate method was used to determine the effect of bacteriostasis from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng after extraction by hot water. The contents of quercetin, kaempferol, ursolic acid and oleanolic acid were simultaneously determined with HPLC method, and the content of polysaccharides was determined by means of phenylhydrate-sulfuric acid method. Then bivariate analysis was applied to the correlation between five elements and antimicrobial activity by SPSS. 【Results】The order of antibacterial activity from *Ilex kudingcha* C. J. Tseng was ranked as: Guangxi>Guangdong>

收稿日期: 2015-09-24

修回日期: 2015-11-17

作者简介: 黄敏桃(1987-), 女, 硕士研究生, 助教, 主要从事中药质量控制方面的研究。

* 国家科技支撑计划项目(2011BAI01B04)和广西科学研究与技术开发计划项目(0992003A-20, 桂科重 1298001-2-3, 14124002-3)资助。

** 通讯作者: 黄庶识(1964-), 男, 研究员, 硕士生导师, 主要从事中药质量控制研究, E-mail: hshushi@gxas.cn; 刘华钢(1956-), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药质量控制研究, E-mail: lhg@gxfda.gov.cn.

Hainan for the locality, *Staphylococcus aureus* > *Pseudomonas aeruginosa* > *Escherichia coli* for bacterial species, and processed goods > buds > mature leaves for the parts. Except for kaempferol, the rest 4 elements had a significant correlation with antimicrobial activity ($R < 0.01$). **【Conclusion】** Different tea samples have different antimicrobial activity and different content of active ingredients, among them quercetin, polysaccharides, ursolic acid and oleanolic acid possess a significant correlation with the antimicrobial activity.

Key words: *Ilex kudingcha* C. J. Tseng, antimicrobial activity, elements, correlation

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20160315.004

0 引言

【研究意义】近年来,由于具有极佳的药用功效和较高的饮用价值,苦丁茶成为仅次于茶叶在我国广泛应用的代茶饮品。《中华本草》上记载,苦丁茶冬青(*Ilex kudingcha* C. J. Tseng)属于正品苦丁茶的一种。**【前人研究进展】**苦丁茶因含有多糖类、三萜类、黄酮类、皂苷类等多种成分而被广泛应用^[1]。研究表明^[2-8],苦丁茶水提液能够促进脑循环、调整脑血管功能,具有降血压、降血脂以及抗炎抗菌等作用,并在临床上得到验证。**【本研究切入点】**以不同产地及加工与未加工的苦丁茶叶子为研究对象,对其进行体外抑菌试验,并与所含主要活性成分黄酮类、三萜类等含量相比较,建立相关性模型。**【拟解决的关键问题】**优选出最佳采摘时期与采摘部位,为苦丁茶商品工业化采摘提供参考。

表1 不同产地的苦丁茶样品

Table 1 *Ilex kudingcha* C. J. Tseng samples from different localities

No.	产地 Locality	采集时间 Time	备注 Remarks	No.	产地 Locality	采集时间 Time	备注 Remarks
1	广西天等县都康乡 Dukang village, Tiandeng country, Guangxi prov- ince	2011-07-12	栽培,成熟叶 Cultivation, old leaves	9	广西上林县寨鹿村 Zailu village, Shanglin country, Guangxi prov- ince	2011-12-24	栽培,成熟叶 Cultivation, old leaves
2	广西天等天茗茶厂 Tea factory of Tiandeng country, Guangxi prov- ince	2011-07-13	栽培,嫩芽 Cultivation, burgeon	10	广西大新苦丁村 1 Kuding village, Daxin country, Guangxi prov- ince	2011-07-13	栽培,嫩芽 Cultivation, burgeon
3	广西天等县仕民村 Shimin village, Tiandeng country, Guangxi prov- ince	2012-03-28	栽培,嫩芽 Cultivation, burgeon	11	广西大新苦丁村 2 Kuding village, Daxin country, Guangxi prov- ince	2011-07-13	栽培,成熟叶 Cultivation, old leaves
4	广西武鸣罗波镇 1 Luobo village, Wuming country, Guangxi prov- ince	2012-03-29	栽培,成熟叶 Cultivation, old leaves	12	广西大新苦丁村 3 Kuding village, Daxin country, Guangxi prov- ince	2012-03-29	栽培,成熟叶 Cultivation, old leaves
5	广西武鸣罗波镇 2 Luobo village, Wuming country, Guangxi prov- ince	2011-12-21	野生,成熟叶 Wild, old leaves	13	广西大新苦丁村 4 Kuding village, Daxin country, Guangxi prov- ince	2011-12-21	栽培,成熟叶 Cultivation, old leaves
6	广西武鸣罗波镇 3 Luobo village, Wuming country, Guangxi prov- ince	2011-12-21	野生,成熟叶 Wild, old leaves	14	广西马山古零镇 1 Guling village, Mashan country, Guangxi prov- ince	2011-12-22	野生,成熟叶 Wild, old leaves
7	广西上林县北梁村 Beiliang village, Shanglin country, Guangxi prov- ince	2011-12-22	野生,成熟叶 Wild, old leaves	15	广西马山古零镇 2 Guling village, Mashan country, Guangxi prov- ince	2011-12-22	栽培,成熟叶 Cultivation, old leaves
8	广西上林县排岙村 Paiyi village, Shanglin country, Guangxi prov- ince	2011-12-22	野生,成熟叶 Wild, old leaves	16	广西马山古零镇 Guling village, Mashan country, Guangxi prov- ince	2011-12-22	商品,嫩芽 Merchandise, bur- geon

1 材料与方法

1.1 样品

槲皮素(批号:100081-200406),山奈素(批号:110861-200405),熊果酸(批号:110742-200518),齐墩果酸(批号:110709-200505)均购于中国药品生物制品检定所。

大肠杆菌(ATCC44102),金黄色葡萄球菌(ATCC26003),绿脓杆菌(ATCC27583)购自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection)。

不同产地样品:2011年7月至2012年8月采摘自不同产地的各种栽培及野生苦丁茶见表1,经鉴定为冬青科冬青属苦丁茶冬青(*Ilex kudingcha* C. J. Tseng),采回后晾干,粉碎,备用。

续表 1
Continue table 1

No.	产地 Locality	采集时间 Time	备注 Remarks	No.	产地 Locality	采集时间 Time	备注 Remarks
17	广西马山里民村 Limin village, Mashan country, Guangxi province	2011-12-23	野生,成熟叶 Wild,old leaves	33	广东梅州大麻镇 5 Dama village, Meizhou country,Guangdong province	2012-02-10	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves
18	广西崇左龙州县 1 Longzhou village,Chongzuo country,Guangxi province	2012-03-13	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves	34	广东梅州大麻镇 Dama village, Meizhou country,Guangdong province	2012-02-10	商品,嫩芽 Merchandise, burgeon
19	广西崇左龙州县 2 Longzhou village,Chongzuo country,Guangxi province	2012-03-13	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves	35	广东梅州市银江镇 Yinjiang village,Meizhou country,Guangdong province	2012-02-10	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves
20	广西崇左龙州县 3 Longzhou village,Chongzuo country,Guangxi province	2012-03-13	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves	36	广东清远市石潭镇 1 Shitan village, Qingyuan country,Guangdong province	2012-02-11	野生,成熟叶 Wild,old leaves
21	广西崇左龙州县 4 Longzhou village,Chongzuo country,Guangxi province	2012-03-13	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves	37	广东清远市石潭镇 2 Shitan village, Qingyuan country,Guangdong province	2012-02-11	野生,成熟叶 Wild,old leaves
22	广西宾阳县平安村 Ping'an village, Binyang country, Guangxi province	2011-12-23	野生,成熟叶 Wild,old leaves	38	广东清远市石潭镇 Shitan village, Qingyuan country,Guangdong province	2012-02-11	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves
23	广西宾阳县贵龙村 Guilong village, Binyang country, Guangxi province	2011-12-24	野生,成熟叶 Wild,old leaves	39	海南五指山水满乡 Shuiman village, Wuzhishan country, Hainan province	2012-08-26	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves
24	广西宾阳县贵龙村 2 Guilong village, Binyang country, Guangxi province	2011-12-24	野生,成熟叶 Wild,old leaves	40	海南五指山畅好乡 1 Changhao village, Wuzhishan country, Hainan province	2012-08-26	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves
25	广东英德市新联村 1 Xinlian village, Yingde country,Guangdong province	2012-02-12	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves	41	海南五指山畅好乡 2 Changhao village, Wuzhishan country, Hainan province	2012-08-26	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves
26	广东英德市新联村 2 Xinlian village, Yingde country,Guangdong province	2012-02-12	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves	42	海南保亭茶厂医院 Tea factory hospital, Baoting country, Hainan province	2012-08-25	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves
27	广东英德市新联村 3 Xinlian village, Yingde country,Guangdong province	2012-02-12	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves	43	海南保亭县番奋村 1 Fanyu village, Baoting country, Hainan province	2012-08-25	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves
28	广东英德市新联村 4 Xinlian village, Yingde country,Guangdong province	2012-02-12	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves	44	海南保亭县番奋村 2 Fanyu village, Baoting country, Hainan province	2012-08-25	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves
29	广东梅州大麻镇 1 Dama village, Meizhou country,Guangdong province	2012-02-10	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves	45	海南海口阜龙乡 Bulong village, Haikou country, Hainan province	2012-08-27	野生,成熟叶 Wild,old leaves
30	广东梅州大麻镇 2 Dama village, Meizhou country,Guangdong province	2012-02-10	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves	46	海南海口打安乡 Da'an village, Haikou country, Hainan province	2012-08-27	野生,成熟叶 Wild,old leaves
31	广东梅州大麻镇 3 Dama village, Meizhou country,Guangdong province	2012-02-10	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves	47	海南海口青松乡 1 Qingshong village, Haikou country, Hainan province	2012-08-27	野生,成熟叶 Wild,old leaves
32	广东梅州大麻镇 4 Dama village, Meizhou country,Guangdong province	2012-02-10	栽培,成熟叶 Cultivation,old leaves	48	海南海口青松乡 2 Qingshong village, Haikou country, Hainan province	2012-08-27	野生,成熟叶 Wild,old leaves
				49	海南海口青松乡 3 Qingshong village, Haikou country, Hainan province	2012-08-27	野生,成熟叶 Wild,old leaves

注:嫩芽为新长出的叶子,成熟叶为嫩叶之外的叶子
Note: Bud's new leaf, old leaves are all leaves except for the bud

1.2 试剂

浓硫酸(廉江市爱廉化试剂有限公司),分析纯;苯酚(天津市凯通化学试剂有限公司),分析纯;葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司),分析纯;超纯水(本实验室自制);甲醇(Fisher公司),色谱纯;乙腈(Fisher公司),色谱纯;MH琼脂培养基(广东环凯公司);MH肉汤(广东环凯公司);营养肉汤(广东环凯公司);磷酸(天津科密欧化学试剂),色谱纯。

1.3 仪器

BS224S型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);戴安U3000高效液相色谱仪(包括四元泵、自动进样器、紫外可见检测器、柱温箱、变色龙工作站);Agilent HC-C18(5 μm , 4.6 mm \times 250 mm)柱;HH-8型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);TU-1901型双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);OKP-S010型实验室超纯水仪(上海涑科实业发展有限公司);RE-52AA型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHB-B型循环水式真空泵(郑州长城科工贸有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 苦丁茶水提物的提取

参照文献[9],称取苦丁茶粉末各5 g,加入300 mL超纯水,在98 $^{\circ}\text{C}$ 下回流提取2.15 h,重复提取3次,趁热过滤,合并滤液浓缩,水定容至10 mL容量瓶中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

1.4.2 体外抑菌试验

参照文献[10],采用杯碟法测定苦丁茶水提物对大肠杆菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 及绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* 的抑菌活性,每份平行3个牛津杯,得到其抑菌圈,结果取平均值。

1.4.3 5种活性成分的测定

1.4.3.1 HPLC法测定槲皮素和山萘酚含量

进样前处理:将甲醇-苦丁茶水提物(0.6:0.4, V:V)超声萃取1 h,离心除去沉淀;加入0.25 mL 25% HCl(V:V)溶液后80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴酸化1 h,离心除去沉淀,0.22 μm 微孔滤膜过滤,备用。含量测定采用Agilent HC-C18,以甲醇-0.03%磷酸溶液(70:30, V:V)为流动相,检测波长370 nm,流速0.6 mL/min,柱温35 $^{\circ}\text{C}$,进样量10 μL 。

1.4.3.2 HPLC法测定熊果酸和齐墩果酸含量

进样前处理:将甲醇-苦丁茶水提物(0.7:0.3, V:V)超声萃取1 h,离心除去沉淀,0.22 μm 微孔滤膜过滤,备用。含量测定采用Agilent HC-C18柱,以甲醇-0.03%磷酸溶液(90:10, V:V)为流动相,检

测波长220 nm,流速0.5 mL/min,柱温35 $^{\circ}\text{C}$,进样量10 μL 。

1.4.3.3 苯酚-硫酸法测定多糖含量

采用文献[11]的方法,将苦丁茶水提物稀释至一定的倍数,利用水提物中的多糖与硫酸、苯酚的显色反应,采用双光束紫外可见分光光度计检测其吸光度,代入葡萄糖标准曲线中,换算出多糖含量。

1.4.4 线性考察

1.4.4.1 槲皮素和山萘酚的线性考察

精密称取槲皮素3.25 mg,甲醇定容至100 mL容量瓶中;山萘酚4.7 mg,甲醇定容至10 mL容量瓶中;然后分别吸取适量溶液,甲醇定容至10 mL,得到浓度依次为0.401 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.204 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3.611 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10.833 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、32.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (槲皮素);0.02937 mg/mL、0.05875 mg/mL、0.1175 mg/mL、0.235 mg/mL、0.47 mg/mL(山萘酚)的样品。0.22 μm 滤膜过滤后进样,得到相应的标准曲线,根据标准曲线算出样品中槲皮素和山萘酚的浓度。

1.4.4.2 熊果酸和齐墩果酸的线性考察

精密称取熊果酸3.69 mg、齐墩果酸4.5 mg,甲醇分别定容至100 mL容量瓶中;然后分别吸取适量溶液,甲醇定容至10 mL,得到浓度依次为0.452 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.367 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、12.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、36.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (熊果酸);0.557 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (齐墩果酸)的样品。0.22 μm 滤膜过滤后进样,得到相应的标准曲线,根据标准曲线算出样品中熊果酸和齐墩果酸的浓度。

1.4.4.3 多糖的线性考察

精密称取无水葡萄糖20.03 mg,蒸馏水定容至100 mL,再精密吸取10.00 mL定容至50 mL容量瓶中,得到40.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的葡萄糖标准溶液。吸取0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL、1.4 mL、1.6 mL、1.8 mL于试管中,并用水补足至2.0 mL,分别加入1 mL 6%苯酚溶液及5.0 mL浓硫酸,待各管加完后摇匀,室温静置30 min,482 nm测吸光度,再精密吸取2.0 mL蒸馏水,同法操作,作空白对照。以吸光度为纵坐标(y),葡萄糖浓度为横坐标(x),绘制标准曲线,根据标准曲线换算出样品中多糖的浓度。

1.4.5 活性成分的含量计算

浓度换算公式如下:

$$C = \frac{C_1 \times N}{C_2}$$

式中, C :样品中各成分的含量, $\mu\text{g}/\text{g}$; C_1 :已稀释样品中各成分浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$; N :样品稀释倍数; C_2 :样

品生药浓度, g/mL。

2 结果与分析

2.1 苦丁茶水提物体外抑菌效果

如表 2 所示,不同产地总体抗菌强弱为广西>广东>海南;所研究地区的苦丁茶对金黄色葡萄球菌作用最强,大肠杆菌最弱;广西产地中属大新县样品抗菌效果最好,其次为马山、崇左;广东产地中,清远市样品比其他采集点抗菌活性相对较强;海南产地抗菌活性均很弱。可能原因是海南气温相对较高,活性成分消耗过多,而广西、广东气候温和,适宜苦丁茶合成有效成分。加工品与未加工品抗菌活性比较中,同一来源的 14 号、15 号、16 号进行对比,16 号的加工品

表 2 不同产地苦丁茶水提物对 3 种菌株的抑菌圈直径

No.	抑菌圈直径 Diameter(mm)			No.	抑菌圈直径 Diameter(mm)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	13.23±1.12	32.15±1.70	11.41±1.63	25	11.02±1.80	28.99±1.76	14.29±1.22
2	12.62±2.34	25.22±2.35	7.20±1.75	26	14.23±1.66	31.16±1.44	15.20±2.54
3	19.30±2.47	45.28±1.75	31.03±2.69	27	22.90±2.10	38.21±1.72	23.68±1.46
4	14.69±3.29	39.71±1.01	23.71±1.20	28	10.00±1.78	21.12±2.14	6.00±1.49
5	14.46±2.06	36.50±1.19	22.32±2.86	29	10.36±3.72	29.41±0.86	14.39±1.24
6	13.85±1.46	33.21±2.08	19.91±0.43	30	12.44±2.23	30.46±0.21	13.22±2.30
7	12.32±1.28	26.75±3.04	7.38±1.99	31	19.41±2.75	32.71±1.31	11.10±2.47
8	13.70±1.03	25.29±1.14	13.73±2.38	32	15.19±1.35	32.50±1.01	16.28±1.80
9	17.22±1.40	30.27±1.26	11.40±1.66	33	16.86±2.03	27.87±1.58	7.18±1.46
10	23.80±1.87	29.88±2.97	16.73±2.61	34	28.07±2.07	45.90±0.99	26.17±1.55
11	22.62±2.30	23.72±1.46	12.95±4.54	35	21.70±3.68	33.79±2.31	20.02±1.72
12	24.27±1.13	43.86±1.41	25.95±1.17	36	27.86±1.41	42.50±2.34	21.85±2.62
13	8.01±1.79	22.75±2.16	0.00±0.00	37	14.26±2.83	34.53±2.89	15.51±1.77
14	13.23±1.59	27.76±1.37	16.02±1.28	38	17.47±2.10	36.12±2.33	16.55±1.43
15	17.06±2.17	33.05±0.52	16.67±3.25	39	10.40±1.80	32.62±2.51	18.92±1.35
16	25.16±1.66	41.07±2.04	24.81±2.11	40	16.23±1.87	34.80±1.96	20.67±1.30
17	22.24±1.99	31.22±2.83	11.76±1.48	41	15.48±1.75	28.57±1.61	23.54±1.88
18	11.58±1.47	22.79±2.00	8.01±1.62	42	7.80±2.44	32.39±3.25	17.90±1.49
19	17.06±2.11	34.99±1.17	17.55±1.90	43	11.50±2.14	39.25±1.76	17.31±1.41
20	13.39±2.26	30.68±3.55	13.60±1.12	44	12.82±2.72	31.04±2.78	21.41±1.91
21	20.08±1.35	36.64±3.03	24.65±1.62	45	9.36±2.25	16.87±2.43	0.00±0.00
22	14.06±2.47	27.09±2.26	15.82±2.09	46	0.00±0.00	33.68±2.36	23.09±1.76
23	17.10±2.62	33.85±1.31	14.70±1.25	47	16.08±2.26	32.13±2.16	16.08±1.47
24	11.31±1.48	25.06±2.42	14.31±3.79	48	14.41±1.20	32.23±0.67	16.56±1.38
				49	14.19±1.61	22.12±2.74	6.00±0.00

注:表中产地与表 1 产地相对应

Note: The localities correspond to table 1

表 3 不同产地苦丁茶水提物的 5 种活性成分含量

Table 3 The content of five active ingredients in different localities

No.	槲皮素 Quercetin($\mu\text{g/g}$)	山萘酚 Kaempferol($\mu\text{g/g}$)	熊果酸 Ursolic acid($\mu\text{g/g}$)	齐墩果酸 Oleanolic acid($\mu\text{g/g}$)	多糖 Polysaccharides(mg/g)
1	456.56±5.27	1637.19±11.6	173.67±5.21	1.50±0.11	50.94±6.78
2	191.88±1.54	982.18±9.89	188.33±6.52	8.33±0.69	61.33±9.52
3	282.19±0.52	563.75±7.66	17.33±2.54	0.081±0.00	93.62±3.41
4	528.44±1.08	2117.18±22.70	184.33±8.92	2.43±0.17	47.93±5.23

抗菌活性明显比未加工的药材高出一倍;来自广东梅州的 34 号商品与 29,30 号未加工品比较,加工品抗菌活性较强。商品是采摘嫩芽并经过一定的工艺加工而成的,抗菌结果表明,传统加工商品茶叶抗菌活性最强,具有一定的传承意义。

2.2 苦丁茶水提物的活性成分含量

槲皮素和山萘酚的回归方程分别为 $Y = 0.4776X + 1.410, R^2 = 0.9996$; $Y = 0.9249X + 851.9, R^2 = 0.9992$;熊果酸和齐墩果酸的回归方程分别为 $Y = 0.0167X + 0.071, R^2 = 0.9994$; $Y = 0.0926X + 0.0585, R^2 = 0.9995$;多糖回归方程为 $Y = 0.01363X + 0.01398, R^2 = 0.9979$,将所测得的含量换算成质量分数,结果如表 3。

续表 3

Continue table 3

No.	槲皮素 Quertetin($\mu\text{g/g}$)	山萘酚 Kaempferol($\mu\text{g/g}$)	熊果酸 Ursolic acid($\mu\text{g/g}$)	齐墩果酸 Oleanolic acid($\mu\text{g/g}$)	多糖 Polysaccharides(mg/g)
5	51.25±3.47	400.00±20.63	84.67±5.53	0.069±0.00	61.55±4.99
6	15.00±1.08	162.81±14.23	80.33±7.39	0.050±0.00	47.01±5.53
7	65.31±4.78	462.19±15.62	163.00±14.04	0.212±0.01	45.02±8.92
8	91.56±2.73	248.13±7.78	162.67±10.18	0.18±0.03	60.28±7.78
9	37.81±4.50	283.75±1.92	386.00±10.16	78.00±8.49	54.61±8.05
10	325.31±5.12	520.63±14.85	297.33±9.82	57.67±7.17	86.49±1.84
11	115.00±4.37	311.88±4.47	468.00±13.11	78.33±5.96	99.60±2.75
12	956.25±10.30	2285.00±10.89	287.00±17.49	28.33±1.41	79.22±10.11
13	16.88±2.68	169.69±4.00	272.33±9.75	27.67±2.34	63.79±8.45
14	35.31±1.35	72.81±4.32	139.00±8.86	71.33±4.55	53.65±12.11
15	91.88±0.49	361.25±6.27	174.00±13.35	0.27±0.06	57.66±4.98
16	1366.25±5.17	250.63±6.08	291.67±11.74	58.00±9.36	132.80±2.94
17	54.69±0.90	174.69±10.24	213.33±21.42	18.33±1.98	53.70±4.54
18	25.94±2.57	328.13±5.56	150.00±6.03	5.00±0.37	53.94±10.01
19	13.75±1.73	177.50±4.24	35.67±5.19	0.061±0.00	45.67±5.68
20	6.56±0.19	75.31±1.39	201.00±18.19	4.33±0.19	49.46±3.95
21	8.75±2.01	253.13±5.17	53.00±8.24	0.12±0.00	54.27±4.49
22	30.00±3.00	113.75±5.96	111.67±11.89	0.16±0.001	68.13±8.64
23	18.44±1.18	183.13±2.12	125.00±7.93	0.18±0.003	51.58±9.42
24	37.19±3.23	268.44±1.80	451.67±12.73	74.67±7.88	75.81±6.23
25	408.44±5.15	1683.44±12.40	105.33±13.73	0.112±0.001	55.44±7.13
26	134.38±2.27	745.31±1.71	215.33±16.78	2.53±0.09	39.23±6.10
27	1103.75±4.06	3931.87±7.11	178.67±12.52	0.23±0.02	63.12±5.22
28	78.75±7.39	206.88±5.65	121.67±6.45	0.26±0.06	55.78±10.64
29	164.69±4.19	709.69±5.42	606.33±20.16	92.33±10.03	59.73±8.93
30	70.94±2.60	258.44±10.95	606.00±18.82	113.67±9.52	38.35±2.78
31	28.44±1.54	705.94±8.66	396.33±16.31	42.67±4.50	48.67±5.66
32	126.88±13.07	713.75±21.67	263.33±3.99	13.33±2.76	61.62±10.34
33	130.93±4.01	780.63±11.98	457.67±10.95	55.67±6.66	22.30±11.04
34	959.06±4.33	313.13±7.14	1363.67±15.64	444.33±13.21	110.91±3.22
35	483.13±6.59	1276.56±5.34	246.33±9.37	23.67±2.24	44.99±8.43
36	575.94±13.89	3200.63±15.80	420.00±14.22	36.33±3.42	68.49±8.53
37	2.50±0.11	84.69±1.55	112.33±5.74	0.15±0.01	50.53±4.69
38	48.13±1.02	294.06±2.04	226.00±10.04	8.67±1.09	52.27±13.04
39	94.06±1.12	490.00±9.90	191.33±6.39	5.67±0.75	45.26±8.05
40	31.56±2.52	143.44±9.32	334.67±10.29	27.00±2.67	49.36±6.94
41	6.56±0.55	93.43±7.37	328.00±14.23	32.33±6.87	44.78±8.85
42	83.75±1.64	348.12±12.35	365.00±9.84	35.00±1.05	66.17±9.51
43	28.75±0.61	108.13±3.88	474.00±13.36	100.00±11.51	46.62±10.65
44	20.00±1.21	170.00±2.08	521.33±15.71	92.33±7.42	60.52±12.07
45	0.281±0.08	158.75±2.73	86.00±8.17	0.67±0.05	28.64±9.07
46	0.281±0.08	11.25±0.21	62.33±7.39	0.119±0.02	25.87±4.52
47	15.31±2.91	57.81±0.75	445.33±13.55	62.00±5.83	53.94±8.63
48	5.94±3.12	36.56±1.10	87.33±7.68	0.132±0.001	51.51±6.99
49	5.63±1.19	88.75±1.63	199.00±8.59	0.247±0.01	21.29±5.75

从表 3 中看出,不同的采摘时间,其成分含量均不相同,以广西天等为例,3 月份样品中多糖和槲皮素的含量较高,而 7 月份样品中熊果酸与齐墩果酸的含量较高。从整体地域来分类,广西样品的多糖含量大于广东产地与海南产地;其他成分含量则是广东样品较高。同一产地的不同采集点也不相同,在广西产

地中,大新采集点的多糖、槲皮素、熊果酸和齐墩果酸的含量均比其他采集点高。不同部位中,商品的多糖、槲皮素、熊果酸的含量远远大于未加工的嫩叶及成熟叶,说明加工后的嫩芽商品具有更高的药用价值。

2.3 抗菌活性与有效成分的相关性分析

采用 SPSS17.0 软件将不同产地苦丁茶样品对 3 种细菌的抗菌活性与多糖、槲皮素、山萘酚、熊果酸及齐墩果酸进行双变量相关分析,结果见表 4。

表 4 不同产地苦丁茶活性成分含量与其抑菌作用的相关性
Table 4 The correlation between the content of five active ingredients and bacteriostatic effect in different localities

活性成分 Active ingredient	抑菌圈直径 Diameter(mm)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
多糖 (Polysaccharides)	0.857 ⁺⁺	0.688 ⁺⁺	0.847 ⁺⁺
槲皮素 (Quertetin)	0.653 ⁺⁺	0.897 ⁺⁺	0.633 ⁺⁺
山萘酚 (Kaempferol)	0.089	0.324	0.075
熊果酸 (Ursolic acid)	0.899 ⁺⁺	0.967 ⁺⁺	0.858 ⁺⁺
齐墩果酸 (Oleanolic acid)	0.664 ⁺⁺	0.922 ⁺⁺	0.629 ⁺⁺

注: ++, 在 0.01 水平上显著相关

Note: ++, Significant at the 0.01 level

结果显示,多糖、槲皮素、熊果酸和齐墩果酸对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌均呈显著性相关,山萘酚抗菌活性不显著。其中,对大肠杆菌的抑菌活性强弱顺序为熊果酸>多糖>齐墩果酸>槲皮素;对金黄色葡萄球菌抑菌强弱为熊果酸>齐墩果酸>槲皮素>多糖>山萘酚;对绿脓杆菌抑菌强弱为熊果酸>多糖>槲皮素>齐墩果酸。槲皮素、多糖、熊果酸和齐墩果酸是苦丁茶的活性成分,并对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌具有一定的抑菌作用

3 结论

由于气候、地域、采摘部位、是否加工等原因,不同苦丁茶样品的抗菌药效与活性成分含量均有一定的差异。槲皮素、多糖、熊果酸和齐墩果酸是苦丁茶的活性成分,并对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌具有一定的抑菌作用,与文献[12-14]中单个成分抑菌结果相一致。

参考文献:

[1] LI L, LI J X, GUI Z M, et al. The large-leaved Kudingcha (*Ilex latifolia* Thunb and *Ilex kudingcha* C. J. Tseng): A traditional Chinese tea with plentiful secondary metabolites and potential biological activities[J]. J Nat Med, 2013, 67(3): 425-437.

[2] 朱莉芬, 李美珠, 罗集鹏, 等. 苦丁茶的心血管药理作用研究[J]. 中药材, 1995, 17(3): 37-40.

ZHU L F, LI M Z, LUO J P, et al. Study on cardiovascular pharmacological effects of Kuding tea[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 1995, 17(3): 37-40.

[3] 陈一, 李双开, 谢唐贵. 苦丁茶冬青叶的降压作用研究[J]. 中草药, 1995, 26(5): 250-252.

CHEN Y, LI S K, XIE T G. Study on the antihypertensive effect of *Ilex Tseng*[J]. Chinese Herbal Medicines, 1995, 26(5): 250-252.

[4] 黄镇才. 苦丁茶治疗高血压病 35 例观察[J]. 中国中医药信息杂志, 1997, 4(4): 25.

HUANG Z C. Observation of 35 cases of hypertension treatment of Kudingcha[J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 1997, 4(4): 25.

[5] 刘彬, 许宏大. 苦丁茶降血脂的实验及临床研究[J]. 护理研究, 2005, 19(1): 21-22.

LIU B, XU H D. Experiment and clinical study on broadleaf holly leaf to lower down blood lipids level[J]. Chinese Nursing Research, 2005, 19(1): 21-22.

[6] 方召云, 宫艳飞, 卫方方. 苦丁茶液预防口腔感染 79 例[J]. 中国民间疗法, 2006, 14(7): 37.

FANG Z Y, GONG Y F, WEI F F. 79 cases of oral liquid for prevention of Kudingcha infection[J]. China's Naturopathy, 2006, 14(7): 37.

[7] 邬悦心. 应用苦丁茶治疗皮肤感染的护理[J]. 上海护理, 2003, 3(2): 8.

WU Y X. Application of nursing for treatment of skin infection Kudingcha[J]. Shanghai Nursing, 2003, 3(2): 8.

[8] 王如伟, 徐向东, 李颂华, 等. 苦丁茶袋泡剂的研制及临床疗效观察[J]. 浙江中西医结合杂志, 1999, 9(4): 230-231.

WANG R W, XU X D, LI S H, et al. Observation of Kuding tea bag preparation and clinical efficacy of agents[J]. Zhejiang Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 1999, 9(4): 230-231.

[9] 蔡鹃, 黄敏桃, 黄云峰, 等. 响应面法优化苦丁茶抑菌活性成分提取工艺[J]. 食品科技, 2013, 38(11): 197-202.

CAI J, HUANG M T, HUANG Y F, et al. Optimization of the antimicrobial activity of Guangxi leaf of Chinese holly by using respond surface method[J]. Food Science and Technology, 2013, 38(11): 197-202.

[10] 薛晓晶, 李玲, 金涌, 等. 杯碟法检测乳中的 β -内酰胺酶[J]. 食品科学, 2011, 32(4): 216-219.

XUE X J, LI L, JIN Y, et al. Detection of β -lactamase in milk based on cylinder plate method[J]. Food Science, 2011, 32(4): 216-219.

[11] 杨勇杰, 姜瑞芝, 陈英红, 等. 苯酚硫酸法测定杂多糖含量的研究[J]. 中成药, 2005, 27(6): 706-708.

YANG Y J, JIANG R Z, CHEN Y H, et al. Determination of sugars in heteropolysaccharide by phenol-sulfuric acid method[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2005, 27(6): 706-708.

(下转第 85 页 Continue on page 85)

- Aiptasia mutabilis* (Anthozoa) nematocysts[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A Mol Integr Physiol, 2009, 152(3): 418-422.
- [13] KUDO I, MURAKAMI M. Phospholipase A2 enzymes [J]. Prostaglandins & Other Lipid Mediators, 2002, 68/69: 3-58.
- [14] BLOOM D A, BURNEET J W, ALDERSLADE P. Partial purification of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) nematocysts venom isolated at the beachside[J]. Toxicon, 1998, 36: 1075-1085.
- [15] 傅献彩. 物理化学[M]. 5版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 249.
- FU X C. Physical Chemistry [M]. 5th ed. Beijing: Higher Education Press, 2006: 249.
- [16] 张焱, 闭静秀, 周卫斌, 等. PEG 沉淀结合层析分离重组乙肝病毒表面抗原[J]. 过程工程学报, 2006, 6(1): 100-103.
- ZHANG Y, BI J X, ZHOU W B, et al. Purification of recombinant hepatitis B virus surface antigen with PEG precipitation and chromatography [J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2006, 6(1): 100-103.

(责任编辑: 陆雁)

(上接第 78 页 Continue from page 78)

- [12] 林雄平, 陈晓清, 苏育才, 等. 金银花和苦丁茶多糖提取物抗菌活性研究[J]. 亚热带植物科学, 2008, 37(1): 51-53.
- LIN X P, CHEN X Q, SU Y C, et al. Antimicrobial activities of polysaccharide extracts from *Flos ionicerae* and *Ilex kudingcha* [J]. Subtropical Plant Science, 2008, 37(1): 51-53.
- [13] 黄国霞, 李军生, 阎柳娟. 几种中药提取物的抑菌作用及机理研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2): 425-426.
- HUANG G X, LI J S, YAN L J. Study on antibacterial activity and mechanism of several Chinese herbal medicine extracts[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2011, 22(2): 425-426.
- [14] 解军波, 李萍. 冬青属植物化学成份及药理活性研究进展[J]. 中草药, 2002, 33(1): 85-88.
- XIE J B, LI P. Advances in research of chemistry and pharmacology of *Ilex* L. [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2002, 33(1): 85-88.

(责任编辑: 米慧芝)