

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.05.024

李莉,殷中琼,贾仁勇,等. 四川宜宾七种中药提取物体外抗菌活性研究[J]. 广西植物,2014,34(5):714-718

Li L, Yin ZQ, Jia RY, et al. Antimicrobial activity *in vitro* of crude extracts from seven kinds of traditional Chinese medicine from Yibin in Sichuan[J]. *Guihaia*, 2014, 34(5):714-718

## 四川宜宾七种中药提取物体外抗菌活性研究

李莉<sup>1</sup>, 殷中琼<sup>1,2\*</sup>, 贾仁勇<sup>1,2</sup>, 代如意<sup>1</sup>, 李曼<sup>1</sup>, 蔡红<sup>1</sup>

(1. 四川农业大学 动物医学院, 四川 雅安 625014; 2. 四川农业大学 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 雅安 625014)

**摘要:** 用肉汤二倍稀释法和琼脂平板培养计数法, 研究四川宜宾七种中药的提取物对大肠杆菌、沙门氏菌和巴氏杆菌的体外抑制作用。结果表明: 黄柏提取物的抗菌活性最强, 最小抑菌浓度 (Minimum inhibitory concentration, MIC) 为 15.6~125 mg·mL<sup>-1</sup>, 最小杀菌浓度 (Minimum bactericidal concentration, MBC) 为 31.25~250 mg·mL<sup>-1</sup>; 栀子提取物抗菌活性次之, MIC 为 62.5~125 mg·mL<sup>-1</sup>, MBC 为 125~>250 mg·mL<sup>-1</sup>; 佛手提取物有较稳定的抗菌活性, MIC 均为 125 mg·mL<sup>-1</sup>, MBC 为 125 mg·mL<sup>-1</sup> 和 250 mg·mL<sup>-1</sup>; 姜黄、杜仲、何首乌、细毡毛忍冬的提取物抗菌活性相对较差, 大部分 MIC ≥ 250 mg·mL<sup>-1</sup>。说明四川宜宾的黄柏和栀子的提取物抗菌活性较强, 佛手提取物抗菌活性较稳定, 有进一步研究的价值。

**关键词:** 四川宜宾; 中药提取物; 抗菌活性; MIC; MBC

**中图分类号:** Q946; S853.73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)05-0714-05

## Antimicrobial activity *in vitro* of crude extracts from seven kinds of traditional Chinese medicine from Yibin in Sichuan

LI Li<sup>1</sup>, YIN Zhong-Qiong<sup>1,2\*</sup>, JIA Ren-Yong<sup>1,2</sup>, DAI Ru-Yi<sup>1</sup>, LI Man<sup>1</sup>, CAI Hong<sup>1</sup>

(1. College of Veterinary Medicine Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** The antimicrobial activities of crude extracts from seven kinds of traditional Chinese medicine from Yibin in Sichuan against *E.coli*, *Salmonella* and *Pasteurella in vitro* were investigated with serial two-fold broth dilution method and agar plate counting method. The results showed that the crude extract from *Phellodendron amurense* had the strongest antimicrobial activity, its Minimum inhibitory concentration (MIC) range was 15.6-125 mg·mL<sup>-1</sup>, its minimum bactericidal concentration (MBC) was 31.25-250 mg·mL<sup>-1</sup>. The antimicrobial activity of crude extract from *Gardenia jasminoides* was worse than *Phellodendron amurense*, its MIC was 62.5-250 mg·mL<sup>-1</sup>, and MBC was 125->250 mg·mL<sup>-1</sup>. The crude extract from *Citrus medica* var. *sarcodactylis* had stable antimicrobial activity, its MIC all was 125 mg·mL<sup>-1</sup>, MBC was 125 mg·mL<sup>-1</sup> and 250 mg·mL<sup>-1</sup>. The other four extracts from *Eucommia ulmoides*, *Fallopia multiflora*, *Curcuma longa*, *Lonicera similis* were proved that their antimicrobial activities were not as strong as other three extracts. Most of their MIC were ≥ 250 mg·mL<sup>-1</sup>. The results indicated that the extracts of *Phellodendron amurense* and *Gadenia jasminoides* had better bacteriostasis effect, and extract of *Citrus medica* var. *Sarcodactylis* was

收稿日期: 2013-00-20 修回日期: 2013-11-25

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAD34B03); 四川省青年科技创新研究团队(2013TD0015)。

作者简介: 李莉(1987-), 女, 四川内江人, 在读硕士, 主要从事天然产物的研究, (E-mail)lilijc201109@163.com。

\*通讯作者: 殷中琼, 教授, 主要从事天然产物化学的研究, (E-mail)yinzhongq@163.com。

stable. They might be potential agents against bacterial disease, so they are worth of further study.

**Key words:** Yibin in Sichuan; extracts from traditional Chinese medicine; antimicrobial activity; MIC; MBC

随着集约化养殖业的发展,细菌性疾病已成为影响我国畜牧养殖业发展的主要原因之一。当前对细菌性疾病的防控主要采取疫苗预防和抗生素治疗。但是细菌自身血清型多、致病差异性大等造成疫苗保护不理想(田真等,2012)。使用抗生素是主要治疗措施,同时又由于抗生素的长期、广泛和不合理使用,使细菌耐药性、药物毒副作用、药物残留所致畜产品安全等问题日益突出(李振等,2009;黄春玲等,2011)。中药是兼有营养和药用双重作用的自然资源,具备直接杀灭或抑制细菌和增强免疫能力的功能,与抗生素相比,具有来源广、成本低、低毒副作用的“绿色”药物。因此,研究和开发出能替代抗生素的中药具有积极的现实意义。四川宜宾得天独厚的地理条件使其盛产丰富的药用植物,多年前宜宾的大宗药材金银花、佛手、桅子、姜黄等已在全国各地发挥了重要的医用价值(陈永昌,1986)。

本研究选用四川宜宾产的桅子、姜黄、黄柏、佛手、杜仲、何首乌、细毡毛忍冬七种中药作为试验药材,提取其有效成分,对大肠杆菌、沙门氏菌、巴氏杆菌进行体外抗菌活性研究,初步筛选出抗菌活性较强的中药,为四川宜宾中药材在畜牧业上的临床应用提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 主要试剂 营养琼脂、营养肉汤均购自北京奥博星生物技术有限公司;小牛血清购自兰州民海生物工程有限公司。

1.1.2 中药材 桅子(*Gardenia jasminoides*)、姜黄(*Curcuma longa*)、黄柏(*Phellodendron amurense*)、佛手(*Citrus medica* var. *sarcodactylis*)、杜仲(*Eucommia ulmoides*)、何首乌(*Fallopia multiflora*)、细毡毛忍冬(*Lonicera similis*)均采自四川宜宾,由四川农业大学药学系范巧佳副教授鉴定。

1.1.3 菌株 标准大肠杆菌 *E.coli* (ATCC 25922)、标准沙门氏菌 *Salmonella* (CMCC (B) 50041) 购于中国兽医药品监察所,临床大肠杆菌 *E.coli*、临床巴氏杆菌 *Pasteurella* 由本校兽医微生物实验室惠赠。

### 1.2 方 法

1.2.1 七种中药有效成分的提取 用乙醚和不同浓

度乙醇分别对佛手和其他 6 种中药有效成分进行提取。桅子粗粉用 5 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h(胡震等,2006);姜黄粗粉用 6 倍量 80% 乙醇浸提 3 次,每次 2 h(陈雁虹等,2008);黄柏粗粉用 7 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次,每次提取 2 h(邢俊波等,2003);杜仲粗粉用 12 倍量 60% 的乙醇回流提取 3 次,每次 2 h(刘辉琳等,2002);佛手粗粉用乙醚浸没水浴回流提取 2 次,每次 2 h(赵兴杰等,2007);何首乌粗粉 20 倍量 60% 乙醇超声提取 3 次,每次 15 min(徐燕等,2011);细毡毛忍冬粗粉分别用 10、8、6 倍 75% 乙醇回流提取 3 次,每次 0.5 h(王艳秋等,2009)。合并滤液,真空浓缩,干燥得中药提取物浸膏,计算浸膏得率。

1.2.2 七种中药提取物的溶液制备 根据各中药浸膏率称取适量浸膏,用少量二甲亚砜 DMSO 溶解,再加蒸馏水定容,配成生药浓度为  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的原液,流通蒸汽灭菌后,置  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。临用前用灭菌营养肉汤稀释至  $500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.3 菌悬液制备 将保种的菌液划线接种于营养琼脂培养基中, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后,取单个典型菌落接种于营养肉汤培养基中, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温水浴振荡培养 24 h 后备用(巴氏杆菌培养基中加入 5% 血清)。取 8 个灭菌试管,每试管中加入 4.5 mL 生理盐水,自第 1 管加入 0.5 mL 活化菌液开始依次 10 倍稀释至第 8 管。用微量移液器取  $10^5 \sim 10^7$  稀释梯度的稀释液于琼脂平板上,用 L 棒均匀涂布,每个稀释度涂 3 个平板, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温培养 24 h 后,对细菌数在 30~300 个的平板计数,求平均值,以  $\text{cFu} \cdot \text{mL}^{-1}$  为单位。最后将其稀释至  $10^6 \text{ cFu} \cdot \text{mL}^{-1}$  细菌数。

1.2.4 最小抑菌浓度(MIC)的测定 采用试管二倍稀释法,无菌操作取 16 支加塞试管,分为 2 组,每组 8 支,一组为实验组,一组为对照组。每支试管内分别加入 1 mL 肉汤培养基,每组第 1 管再加入 1 mL 中药提取液,混合均匀后取 1 mL 到第 2 管,同理依次混合稀释直至第 7 管(药物浓度依次为 250、125、62.5、31.25、15.63、7.81、3.95  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),实验组每支试管分别加入 100  $\mu\text{L}$  细菌稀释液。实验组和对照组第 8 管分别为加菌不加药的阳性对照和不加药不加菌的空白对照。 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后取出,观察细菌生长情况。重复 3 次实验,取平均值。在实验

表 1 七种中药提取物对 4 株细菌的 MIC 和 MBC 值 (单位:  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

Table 1 MIC and MBC of crude extracts from seven kinds of traditional Chinese medicine against four bacteria

提取物 Extract	标准沙门氏菌 <i>Salmonella</i>		标准大肠杆菌 <i>E. coli</i>		临床大肠杆菌 <i>E. coli</i>		临床巴氏杆菌 <i>Pasteurella</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
黄柏 <i>Phellodendron amurense</i>	125	250	15.6	31.25	31.25	31.25	31.25	62.5
杜仲 <i>Eucommia ulmoides</i>	62.5	125	125	125	>250	>250	250	250
佛手 <i>Citrus medica</i> var. <i>sarcodactylis</i>	125	250	125	125	125	250	125	250
栀子 <i>Gardenia jasminoides</i>	125	250	125	>250	125	>250	62.5	125
姜黄 <i>Curcuma longa</i>	125	>250	125	250	>250	>250	250	>250
何首乌 <i>Fallopia multiflora</i>	62.5	62.5	125	250	>250	>250	62.5	125
细毡毛忍冬 <i>Lonicera similis</i>	250	>250	250	>250	62.5	62.5	250	>250

组中 8 号试管溶液浑浊,对照组 8 号试管溶液澄清的情况下,与对照组比较,实验组眼观溶液澄清、颜色未发生变化的最低药物浓度作为该药的 MIC。

1.2.5 最小杀菌浓度(MBC)的测定 将上述实验组眼观溶液澄清的各管中液体接种涂布于琼脂平板,经 37 °C 培养 24 h 后观察结果。以肉眼观察菌落不生长视为 100% 被杀灭,此最低药物浓度值为其 MBC 值。

## 2 结果与分析

表 1 结果显示,七种中药提取物对标准沙门氏菌、标准大肠杆菌、临床大肠杆菌、临床巴氏杆菌呈不同抑菌效果。七种中药提取物对标准沙门氏菌的 MIC 由小到大依次为杜仲=何首乌<黄柏=佛手=栀子=姜黄<细毡毛忍冬;对标准大肠杆菌的 MIC 由小到大依次为黄柏<杜仲=佛手=栀子=姜黄=何首乌<细毡毛忍冬;对临床大肠杆菌的 MIC 由小到大依次为黄柏<细毡毛忍冬<佛手=栀子<杜仲=姜黄;对临床巴氏杆菌的 MIC 由小到大依次为黄柏<栀子=何首乌<佛手<杜仲=姜黄=细毡毛忍冬。各中药提取物的 MBC 基本为 2MIC。

总体而言,七种中药提取物对临床巴氏杆菌的抑菌效果更好,且七种中药中黄柏的抑菌效果最好。

## 3 讨论与结论

中药提取的传统方法包括煎煮法、浸渍法、渗漉法、热回流法等,其中煎煮法是最常用的方法,但煎煮法使有效成分损失较多,尤其是水不溶成分,提取液浓缩处理困难,容易变质失效,同时长时间高温操作会引起热敏性有效成分大量分解等缺点。因此,

选择适当的提取方法是保证中药药效的重要前提。本研究主要粗提中药中的主要活性成分:黄柏中的小檗碱、栀子中的栀子苷、姜黄中的姜黄素、佛手中的挥发油、何首乌中的二苯乙烯苷、杜仲和细毡毛忍冬中的绿原酸抗菌活性研究。故参考相关文献的优化工艺,用乙醇热回流法和超声法进行提取各中药有效成分。采用真空减压浓缩,有效避免了有效成分的破坏。

常用中药抗菌实验法有纸片法、打孔法、管碟法、稀释法等。纸片法虽操作简单,但纸片所吸附的药量不易确定,吸附到纸片上的药液又不易扩散;打孔法因中药药液黏稠度大,滴在孔内的药液难以扩散,故这两种方法均有一定局限性(林炳炎,1989)。管碟法取量精确,试验结果较准确,但只能作为定性测定。稀释法分为琼脂稀释法和肉汤稀释法,稀释法操作较其他方法更繁琐,但能进行定量测定。琼脂稀释法能避免中药色泽及浑浊度影响,但对中药浓度的提高有所限制,不适用于测定 MIC 值较高的中药,且受细菌接种量的影响较大;而肉汤稀释法是药物与细菌直接接触作用,与机体内药物作用模式较为接近,结果更能反映临床应用(马驰,2011)。故本实验选择肉汤稀释法进行抗菌实验研究,同时设置颜色对照排除药液颜色干扰,并结合 MBC 的测定,能最大可能减少误差,起到定量的测定效果。

目前中药抑菌作用研究缺乏统一的评判标准,参考刘忠义等(1996);当  $\text{MIC} > 250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  为不敏感, MIC 介于  $7.81 \sim 250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  为中敏,  $\text{MIC} \leq 7.81 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  为高敏。本实验结果表明,不同中药提取物的抗菌作用存在明显差异。除临床大肠杆菌对杜仲提取物、姜黄提取物和何首乌提取物表现不敏感,其  $\text{MIC} > 250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,其余细菌对各中药提取物都有中度敏感性, MIC 介于  $15.6 \sim 250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,但 MIC 差异较大。黄柏提取物抗菌效

果最强, 栀子和佛手次之, 且抗菌活性差异不大。

同种药物对同属但来源不同的细菌表现出不同程度的抗菌活性。对于大肠杆菌, 中药提取物对标准菌株的抗菌效果普遍强于临床菌株, 这可能与临床菌株适应性和致病性强有关。梁莹(2005)报道黄柏对大肠杆菌抑菌效果不明显, 李广京等(2007)也表明黄柏对大肠杆菌、巴氏杆菌、肠炎沙门氏菌无抑菌效果, 与本试验结果差异较大。黄青萍(2008)报道的栀子提取液对大肠杆菌的 MIC 为  $500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 高于本试验结果。究其原因, 可能与提取方法和细菌来源有关, 不同地区中药有效成分含量也可能存在一定差异。文献采用水提有效成分, 损失了某些水不溶性成分, 而本试验采用的乙醇回流提取, 表明醇提抗菌效果可能优于水提。

本研究中药提取物的化学成分抗菌研究有相关报道, 如黄柏中的小檗碱能显著抑制空肠弯曲菌生长, MIC 为  $62.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (邝耀陶等, 1993); 王少虎等(2001)对变形链球菌和茸毛链球菌的 MIC 和 MBC 均为  $625 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 对黏性放线菌的 MIC 和 MBC 均为  $1\ 250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Pepljnjak *et al.* (1992)报道小檗碱还能抑制金黄色葡萄球菌、解凝沙雷菌、摩氏变形菌等。而小檗碱产生抑菌作用的方式则是通过抑制细菌内糖代谢过程中的丙酮酸氧化, 使细菌对维生素  $B_6$  和烟酰胺等的利用受到限制; 抑制细菌体内 DNA、RNA、蛋白质和类脂的合成, 从而干扰细菌的繁殖等(张茜等, 2010)。绿原酸, 同样被发现具有显著的抗菌活性, 如对金黄色葡萄球菌、停乳链球菌、无乳链球菌、大肠杆菌的 MIC 分别为  $1.25$ 、 $2.5$ 、 $2.5$ 、 $3.75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 其抗菌机制与非竞争性抑制细菌体内的芳基胺乙酰转移酶等有关(吴卫华, 2006; 张涛等, 2009)。钟英英等(2010)的研究发现姜黄素对枯草杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 为  $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 对沙门氏菌和大肠杆菌的 MIC 分别为  $200$  和  $>200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。佛手果挥发油对枯草芽孢杆菌和大肠杆菌 MIC 为  $1.25\%$ , 金黄色葡萄球菌 MIC 为  $2.5\%$ , 具有良好的抑菌活性(郭卫东等, 2009)。而栀子苷和二苯乙烯苷尚未见有相关的抗菌研究报告。

综上所述, 不同提取方法对中药抑菌效果有一定影响, 适当的提取方法能更大限度的发挥中药的抑菌作用。粗提物成分较复杂, 与纯提物在抑菌效果上具有一定差异, 四川宜宾的黄柏和栀子抑菌谱广、抗菌活性较强, 佛手抗菌活性较好且稳定, 可进

一步深入研究其药效物质和抗菌机理等, 为其应用于临床奠定基础。

## 参考文献:

- Chen YC(陈永昌). 1986. Herbal plant resources of Yibin area in Sichuan(四川宜宾地区中草药植物资源)[J]. *Guihaia*(广西植物), **6**(3):217-219
- Chen YH(陈雁虹), Qin B(秦波), Zhang YY(张媛媛), *et al.* 2008. Comparative study on the process for extraction of curcumin from *Curcuma Longa L.* with different methods(姜黄素不同提取方法比较研究)[J]. *Chin J Inf TCM*(中国中医药信息杂志), **15**(7):55-56
- Guo WD(郭卫东), Zheng SJ(郑建树), Deng G(邓刚), *et al.* 2009. Antibacterial effects of essential oil from *Fingered Citrons*(佛手挥发油抑菌活性的研究)[J]. *J Chin Cer Oils Assoc*(中国粮油学报), **24**(8):103-107
- Hu Z(胡震), Yang GD(杨广德), Luo GA(罗国安), *et al.* 2006. Extraction technology of Geniposide in *Gardenia* and HPLC analysis(栀子中栀子苷提取工艺及 HPLC 分析)[J]. *Chin Tradit Patent Med*(中成药), **28**(3):336-338
- Huang CL(黄春玲), Huang RH(黄瑞华). 2011. Influence of antibiotic on growth of animal and animal product quality(抗生素对动物生长与动物产品质量的影响)[J]. *Feed China*(饲料广角), (3):36-38
- Huang QP(黄青萍). 2008. Investigation of bacteriostasis effect of extract from *Gadenia jasminoides*(栀子提取液抑菌效果考察)[J]. *Chin Pharm*(中国药师), **11**(11):1 341-1 342
- Kuang YT(邝耀陶), Liao ZH(廖筑华), Deng ZA(邓志爱), *et al.* 1993. Adhesion inhibition observation of ten kinds of Chinese herbal medicine against jejunum distort bacteria(10 种中草药对空肠歪曲菌粘附抑制作用的观察)[J]. *Chin J Zoon*(中国人兽共患病杂志), **9**(4):323
- Liu HL(刘辉琳), Tang ML(唐明林), An LY(安莲英), *et al.* 2002. Study on the extraction method of the effective components of *eucommia ulmoides* Oliv(杜仲药用有效成分提取方法研究)[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), **14**(6):47-50
- Liu ZY(刘忠义), Zhang GW(张国威), He YZ(何云志). 1996. Observation of antibacterial activity of Chinese medicinal herbs against ureaplasma urealyticum *in vitro*(解脲支原体中药药敏试验)[J]. *Chin J Dermatol*(中华皮肤科杂志), **29**(5):349-351
- Li Z(李振), Wang YJ(王云建). 2009. The current situation, problems and countermeasures of antibiotic usage in livestock and poultry breeding(畜禽养殖中抗生素使用的现状、问题及对策)[J]. *Chin Anim Health*(中国动物保健), **7**:55-57
- Li GJ(李广京), Lin HY(林红英), Liang XX(梁肖霞), *et al.* 2007. Bacteriostatic test *in vitro* of creepingoxalis and other ten kinds of Chinese herbal medicine(酢浆草等 11 种中草药的体外抑菌试验)[J]. *Guangxi J Anim Husb Vet Med*(广西畜牧兽医), **23**(5):201-202,230
- Lin BY(林炳炎). 1989. Study on antibacterial test method of Chinese herb medicine(中草药抑菌试验方法研讨)[J]. *Mil Med J South Chin*(华南国防医学杂志), (3):51-53.
- Liang Y(梁莹). 2005. Study on bacteriostasis effect of *Cortex Phellodendr Chinensis*(黄柏抑菌效果的实验研究)[J]. *Mod Med Health*(现代医药卫生), **21**(20):2 746-2 747
- Ma(马驰). 2011. Study on R-plasmid curing effect of different tra-

- ditional Chinese medicine to three kinds of bacteria(不同中药对3种细菌耐药质粒的消除作用研究)[D]. Ya'an(雅安): Sichuan Agricultural University(四川农业大学)
- Pepeljnjak S, Petricic J. The antimicrobial effect of berberine and tinctura berberidis[J]. *Pharmazie*, 1992, **47**(H4): 307.
- Tian Z(田真), Zheng K(郑凯), Tian JH(田京汉). 2012. Analysis of the causes of vaccination failure in animal(浅析动物疫苗免疫失败原因)[J]. *Today Anim Husb Vet Med*(今日畜牧兽医), **10**: 64-65
- Wang SH(王少虎), Fan MW(樊明文), Bian Z(边专). 2001. Experimental study of Chinese herbs against cariogenic bacteria(中草药抗致龋菌的实验研究)[J]. *Chin J Oral Med*(中华口腔医学杂志), **36**(5): 385
- Wang YQ(王艳秋), He M(何淼). 2009. Study on extraction technology of chlorogenic acid in *Flos Lonicerae japonicae*(金银花中绿原酸提取方法的研究)[J]. *Special Wild Econ Anim Plant Res*(特产研究), **31**(2): 54-56
- Wu WH(吴卫华), Kang Z(康桢), Ouyang DS(欧阳冬生), et al. 2006. Progresses in the pharmacology of chlorogenic acid(绿原酸的药理学研究进展)[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), **18**: 691-694
- Xing JB(邢俊波), Liu Y(刘云). 2003. Study on extract technology of berberine in *Cortex Phellodendri* by orthogonal design(正交设计优选黄柏中小檗碱的提取工艺)[J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*(时珍国医国药), **14**(3): 129-131
- Xu Y(徐燕), Dian LH(典灵辉), Lu JY(陆江赢), et al. 2011. Study on extraction technology of 2,3,5,4'-tetrahydroxytilbene-2- $\alpha$ -D-glucoside in *Fallopia multiflora* From Deqing city(德庆首乌二苯乙炔苷提取的研究)[J]. *Liaoning Chem Ind*(辽宁化工), **40**(1): 4-6
- Zhang X(张茜), Piao XS(朴香淑). 2010. Advance in antimicrobial activities of berberine(小檗碱抑菌作用研究进展)[J]. *Chin J Anim sci*(中国畜牧杂志), **46**(3): 59-61
- Zhang T(张涛), Zhang S(张爽), Hu G(胡格), et al. 2009. *In vitro* antibacterial effects of berberine, chlorogenic acid and Bicalin against *Escherichia coli*(盐酸小檗碱、绿原酸和黄芩苷对大肠杆菌的体外抑菌作用)[J]. *Chin J Vet Med*(中国兽医杂志), **45**(1): 42-43
- Zhao XJ(赵兴杰), Ji BP(籍保平), Zhao L(赵磊), et al. 2007. Comparison of extraction methods for volatile oil from *Citrus medica* var. *Sarcodactylis*(佛手挥发油不同提取方法的比较研究)[J]. *Food Sci*(食品科学), **28**(4): 167-170
- Zhong YY(钟英英), Huang XC(黄晓畅), Chen SY(陈世益). 2010. Study on antibacterial activity of curcum in *in vitro*(姜黄素的体外抑菌活性研究)[J]. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), **38**(34): 19 369-19 370, 19 377

(上接第 634 页 Continue from page 634)

- Onoda Y, Hikosaka K, Hirosem T. 2004. Allocation of nitrogen to cell walls decreases photosynthetic nitrogen-use efficiency[J]. *Funct Ecol*, **18**: 419-425
- Orgeas J, Ourcival JM, Bonin G. 2002. Seasonal and spatial patterns of foliar nutrients in cork oak (*Quercus suber* L.) growing on siliceous soils in Provence (France)[J]. *Plant Ecol*, **164**(2): 201-211
- Takashima T, Hikosaka K, Hirose T. 2004. Photosynthesis or persistence: nitrogen allocation in leaves of evergreen and deciduous *Quercus* species[J]. *Plant, Cell & Environ*, **27**: 1 047-1 054
- Wang QJ(王启基), Zhou XM(周兴民), Zhang YQ(张堰青), et al. 1991. Structure characteristics and biomass of *Potentilla fruticosa* shrub in Qinghai-Xizang Plateau(青藏高原金露梅灌丛的结构特征及其生物量)[J]. *Acta Bot Bor-Occ Sin*(西北植物学报), **11**(4): 333-340
- Warren CR, Adams MA. 2004. Evergreen trees do not maximize instantaneous photosynthesis[J]. *Trend in Plant Sci*, **9**: 270-274
- Wright IJ, Reich PB, Westoby M, et al. 2004. The world-wide leaf economics spectrum[J]. *Nature*, **428**: 821-827
- Xin XJ(辛晓娟). 2011. Effects of N, P addition on above/below-ground biomass allocation and plant community composition in a sub-alpine meadow(氮、磷添加对亚高山草甸地上/地下生物量分配及植物群落组成的影响)[D]. Lanzhou(兰州): Lanzhou University(兰州大学): 14-19
- Zhao P, Kriebitzsch W, Zhang ZQ. 1999. Gas exchange, chlorophyll and nitrogen contents in leaves of three common trees in middle Europe under two contrasting light regimes[J]. *J Trop & Subtrop Bot*, **7**(2): 133-139
- Zheng SX(郑淑霞), Shangguan ZP(上官周平). 2007. Photosynthetic characteristics and their relationships with leaf nitrogen content and leaf mass per area in different plant functional types(不同功能型植物光合特性及其与叶氮含量、比叶重的关系)[J]. *Acta Ecol Sin*(生态学报)[J], **27**(1): 171-181
- Chapin III FS, Matson PA, Mooney HA. 2002. Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology[M]. New York: Springer-Verlag: 83-144
- Field DC, Mooney HA. 1986. The photosynthesis-nitrogen relationship between the wild plants[C]//Givnish TJ. On the economy of plant form and function. Cambridge: Cambridge University Press: 25-53