

忍冬叶总黄酮的测定及其体外抗菌活性

马艳妮，王志尧，郭展展，张海艳*，赵天增*
(河南省科学院 天然产物重点实验室，河南省生物技术开发中心，郑州 450002)

[摘要] 目的:研究忍冬叶总黄酮的分离工艺及其对 9 种常见病原菌的体外抗菌活性。方法:以河南封丘忍冬叶为研究对象,以总黄酮为主要考察指标,通过大孔树脂柱色谱分离得到忍冬叶总黄酮,并对其进行最小抑菌浓度 (MIC),最小杀菌浓度 (MBC),抑菌圈活性等体外抗菌评价。结果:建立了忍冬叶总黄酮简便、有效的分离工艺,证实了忍冬叶总黄酮对 9 种供试病原菌具有较好的广谱抑菌性 (MIC 为 1.95 ~ 62.5 g·L⁻¹,MBC 几乎均为 125 g·L⁻¹)。此外,当忍冬叶总黄酮部位同时含有较多绿原酸 (4.2%) 时,不仅得率高 (10.5%),活性也更强。结论:忍冬叶总黄酮具有较好的广谱抗菌性,可以将其开发抗畜禽病原菌药物或者饲料添加剂,这也为忍冬叶资源的合理开发利用奠定了坚实的基础。

[关键词] 忍冬叶; 总黄酮; 病原菌; 抗菌活性
[中图分类号] R282;Q949.9 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903 (2017)06-0055-05
[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017060055
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161207.1132.028.html>
[网络出版时间] 2016-12-07 11:32

Determination of Total Flavonoids of *Lonicera japonica* Leaves and Their *in Vitro* Antibacterial Activity

MA Yan-ni, WANG Zhi-yao, GUO Zhan-zhan, ZHANG Hai-yan*, ZHAO Tian-zeng*
(Key Laboratory of Natural Products, Henan Academy of Sciences, Biotechnology Developing Center of Henan Academy of Sciences, Zhengzhou 450002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the separation technology of total flavonoids from leaves of *Lonicera japonica* and investigate their antibacterial activity *in vitro* against nine common pathogenic bacteria. **Method:** The leaves of *L. japonica* from Henan Fengqiu were used, and the total flavonoids were obtained by macroporous resin column separation as the main investigation indexes. Then their antibacterial activity *in vitro* were evaluated by minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and inhibition zone. **Result:** A simple and convenient separation technology was established, proving the broad and better antibacterial activity against nine common pathogenic bacteria (MIC values were 1.95-62.5 g·L⁻¹, and MBC values were almost 125 g·L⁻¹). Meanwhile, when the total flavonoids fraction coexisted with plenty of chlorogenic acid (4.2%), its yields (10.5%) and activity were higher. **Conclusion:** The total flavonoids from the leaves of *L. japonica* could be developed as the antibacterial agent or feed supplement for livestock and poultry because of their broad and better antibacterial activity, and this study will lay the foundation for the rational development and utilization of the leaves of *L. japonica*.

[Key words] leaves of *Lonicera japonica*; total flavonoids; pathogenic bacteria; antibacterial activity

[收稿日期] 20160719(015)
[基金项目] 河南省重点科技攻关项目(152102210385)
[第一作者] 马艳妮,博士,助理研究员,从事天然产物化学研究,Tel:0371-55935563,E-mail: ni-2003@163.com
[通讯作者] * 张海艳,博士后,副研究员,从事天然产物化学研究,Tel:0371-55935563,E-mail: haiyanhai6828_cn@sina.com;
* 赵天增,研究员,博士生导师,从事核磁共振波谱解析与天然产物化学研究,Tel:0371-55935563,E-mail: tianzeng_zhao@163.com

忍冬科植物忍冬是我国传统药用植物,含有挥发油、有机酸、环烯醚萜苷、黄酮等多类成分^[1-4],具有抗菌、抗炎、调节免疫、抗氧化等生物学活性^[5-11]。其花和藤皆可入药。李时珍虽云:“忍冬茎叶及花功用皆同”^[12],但是长期以来,忍冬叶作为忍冬的非药用部位,并没有得到充分的利用。研究表明,忍冬叶中含有较多的黄酮类成分,其含量明显高于花蕾和茎^[13-14],因此涌现了诸多对其黄酮类成分分离鉴定及对其总黄酮提取分离工艺的研究。与此同时,忍冬叶总黄酮的生物学活性研究也有了较快发展,例如抑菌作用^[15-17]、对肝损伤的保护作用^[4]、降血脂作用^[18]等。

为进一步加强忍冬叶资源的实际开发利用、促进我省畜牧业绿色健康发展,在前人研究基础之上,本研究以道地金银花产地——河南封丘地区的忍冬叶为原料,通过 60% 乙醇加热(60 ℃)提取、浓缩, D101 大孔吸附树脂柱分离,水或 10% 乙醇除杂,再用 50% 乙醇洗脱得到忍冬叶总黄酮,采用紫外分光光度法测定了所得总黄酮的质量分数,采用倍半稀释法和管碟法等考察了所得总黄酮对 9 种常见病原菌的体外抗菌活性。本研究所采用的提取分离工艺简单、有效,成本低,适易于推广应用,且抗菌活性检测范围较广,为忍冬叶资源在畜牧业中的应用提供了理论和实践基础。

1 材料

忍冬干燥叶,产自河南省封丘县,由新乡博凯生物技术有限公司提供。经河南中医药大学陈随清教授鉴定为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* 的叶子,标本存放于河南省科学院天然产物重点实验室,标本编号 150503。

对照品芦丁(批号 100080-200707,纯度 92.5%),绿原酸(批号 131201,纯度≥98%)均购自成都普菲德生物技术有限公司;阿莫西林(华北制药股份有限公司,批号 F5081206),亚硝酸钠,硝酸铝,氢氧化钠,氯化钠,95% 乙醇均为分析纯;银黄颗粒(成都神鹤药业有限责任公司,批号 160308),胰蛋白胨(英国 Oxoid 公司,批号 1205026),牛肉浸膏(北京双旋微生物培养基制品厂,批号 150606),琼脂(北京索莱宝科技有限公司,批号 402H039),医用乙醇(新乡市三伟消毒制剂有限公司,批号 20160305)。

标准菌株鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 13311(批号 14030301),肺炎链球菌 ATCC49619(批号 14040201),大肠埃希菌 ATCC 25922(批号

14030301),化脓性链球菌 ATCC19615(批号 14031401),金黄色葡萄球菌 ATCC 29213(批号 14030701),均购自南京便诊生物科技有限公司。

临床菌株鸡大肠埃希菌 CVCC 1555(批号 2009312),鸡金黄色葡萄球菌 CVCC 548(批号 2008426),鸡白痢沙门氏菌 CVCC 1887(批号 200721),牛无乳链球菌 CVCC 540(批号 2007710),均购自中国兽医药品监察所。

TU-1810 型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司),LC-20AT 型液相色谱仪(日本岛津公司),ME204 型分析天平(美国 Mettler 公司),wi93008 型麦氏比浊仪[东西仪(北京)科技有限公司],DHP-9082 型电热恒温培养箱(上海红华仪器有限公司)。

2 方法

2.1 提取与分离 称取忍冬叶 2 份,每份 250 g,分别用 60% 乙醇于 60 ℃ 加热提取 3 次,每次 1 h,料液比为 1:10/8/8,提取后趁热抽滤,合并滤液并浓缩至无醇味,加蒸馏水稀释至 1 750 mL,离心取上清液。

称取 D101 大孔树脂 2 份,每份 500 g,用 95% 乙醇浸泡过夜后分别装柱,先用 95% 乙醇冲至洗脱液与水 1:1 混合后无浑浊,再用蒸馏水冲至无醇味。将 2 份上清液分别加到柱子的顶端,其中 1 个树脂柱(A)用蒸馏水,50% 乙醇依次洗脱,另 1 个树脂柱(B)用 10% 乙醇,50% 乙醇依次洗脱,洗脱液分别收集并浓缩至干。A 柱 2 份洗脱物分别标记为 A1, A2;B 柱 2 份洗脱物分别标记为 B1, B2。将各洗脱物浓缩干燥,冷藏备用。

2.2 总黄酮质量分数测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥芦丁对照品 0.011 2 g,用 30% 乙醇溶解并定容至 50 mL,得质量浓度为 207 mg·L⁻¹的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取各待测样品适量,用 30% 乙醇溶解并定容至 50 mL,摇匀,备用。

2.2.3 标准曲线的绘制 精确吸取对照品溶液 0.0,2.0,4.0,6.0,8.0,10.0 mL 分别至 25 mL 量瓶中,各加入 5% NaNO₂ 溶液 1.0 mL,放置 6 min;加入 10% Al(NO₃)₃ 溶液 1.0 mL,放置 6 min;再加入 4% NaOH 溶液 10.0 mL,用 30% 乙醇定容,放置 15 min,在波长 510 nm 处测定各个溶液的吸光度 A。以 A 为纵坐标、质量浓度 C(mg·L⁻¹)为横坐标,建立标准曲线。

2.2.4 总黄酮质量分数测定 分别量取各供试品

溶液 5.0 mL 并转移至相应的 25 mL 量瓶中,参照 2.2.3 项方法对各待测液进行显色,在波长 510 nm 处测定 A,每个样品平行测定 3 次,取平均值代入下式计算各待测样品总黄酮的质量分数。

总黄酮质量分数 = $\frac{C(\text{g}\cdot\text{L}^{-1}) \times 25(\text{mL}) \times 50}{\text{取样量}(\text{g}) \times 10^6 \times 5} \times 100\%$

2.3 绿原酸质量分数测定 绿原酸质量分数测定依照《中国药典》一部(2015 版)中金银花项下绿原酸含量测定方法执行^[19]。

2.4 体外抗菌活性的测定

2.4.1 菌株的复苏 将 9 种供试菌先进行斜面复苏,复苏后接种于固体培养基上,37 ℃ 培养 12 ~ 24 h。

2.4.2 菌悬液的制备 从固体平板上挑取单个菌落接种到液体培养基中,制成浓度为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌悬液,备用。

2.4.3 最小抑菌浓度的测定 采用倍半稀释法^[20-22]测定各样品的最小抑菌浓度(MIC)。首先将各样品与阳性药物银黄颗粒制成初始质量浓度为 $500 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水溶液,再用液体培养基依次倍半稀释,总共稀释 7 个浓度,即各样品的实际检测质量浓度依次为 250,125,62.5,31.25,15.63,7.81,3.91,1.95 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

将上述各溶液按质量浓度大小依次加入 96 孔板中,每孔 100 μL ;再分别加入各供试菌液 100 μL 。每种菌液分别设置阴性组(加入菌液 100 μL 和液体培养基 100 μL)和空白组(只加液体培养基 100 μL)。将制备好的 96 孔板于 37 ℃ 恒温培养 16 ~ 18 h,观察结果。没有细菌生长的各孔均呈澄清状,而无细菌生长的孔所对应的最小检测质量浓度即为其 MIC。

2.4.4 最小杀菌浓度的测定^[23-24] MIC 实验结束后,分别从没有细菌生长的各孔中取少量样液涂布于固体培养基上,37 ℃ 培养 24 h 后观察结果。完全没有细菌生长的各平板所对应的最小检测质量浓度即为其最小杀菌浓度(MBC)。

2.4.5 抑菌圈的测定 利用管碟法^[25-26]测定各样品的抑菌圈活性。其中,各待测样品的质量浓度为 $500 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,阳性药物阿莫西林的质量浓度为 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,银黄颗粒的质量浓度为 $500 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。每个平板涂布的菌液量为 25 μL ,每个牛津杯中添加的溶液量为 200 μL 。之后将各平板于 37 ℃ 培养 24 h,观察并测量抑菌结果。

3 结果与分析

3.1 芦丁标准曲线 芦丁对照品的线性回归方程

为 $A = 0.008\ 42C + 0.023\ 98$, $r = 0.999\ 3$ 。结果表明,芦丁在 82.8 ~ 207 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

3.2 忍冬叶提取分离结果与分析 忍冬叶醇提后用 D101 大孔吸附树脂进行分离,各个洗脱物的得率与质量分数结果见表 1。

表 1 忍冬叶各洗脱物的得率与总黄酮、绿原酸的质量分数
Table 1 Yields and mass fractions of various elutions of leaves of *Lonicera japonica* %

洗脱物	得率 ¹⁾	总黄酮质量分数	绿原酸质量分数
A1	23.8	25.6	6.6
A2	10.5	72.8	4.2
B1	25.0	22.6	7.7
B2	7.1	81.0	0.4

注:1) 为以原材料为基数的得率。

从表 1 可以看出,忍冬叶醇提物经水和 10% 乙醇洗脱后,所得的洗脱物(A1, B1)占原材料的比重较大,得率达 23% 以上;但是它们的总黄酮质量分数较小, <26%。50% 乙醇洗脱物(A2, B2)占原材料的比重较小,得率 <11%;但是它们的总黄酮质量分数很大,达 72% 以上。此外,通过对 4 个样品绿原酸质量分数的考察可以发现,A1 和 B1 中含有大量绿原酸(>6%),A2 相对 B2 而言也含有较多的绿原酸(4.2%)。

3.3 体外抑菌活性

3.3.1 MIC 检测结果 4 种待测样品(A1, A2, B1, B2)对 9 种供试菌的 MIC 检测结果见表 2。从中可以看出,4 种待测样品中,A2 和 B2 对 9 种供试菌的抑制效果普遍比 A1 和 B1 好(MIC 值小),而且普遍比阳性药物银黄颗粒的抑制效果好。对 A2 和 B2 而言,除 B2 对鼠伤寒沙门氏菌、肺炎链球菌的抑制效果稍差外(MIC 值大),对于其他供试菌的抑制作用则相同(对同种供试菌的 MIC 值相等)。其中,A2 和 B2 对鸡大肠埃希菌的抑制效果最好(MIC 值最小),MIC 为 $1.95 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;对鸡金黄色葡萄球菌的抑制效果次之,MIC 为 $3.91 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。说明忍冬叶总黄酮对禽畜病原菌具有很强的抑制作用。

3.3.2 MBC 检测结果与分析 4 种待测样品对 9 种供试菌的 MBC 检测结果见表 3。由表可知,4 种待测样品中,A2 和 B2 对 9 种供试菌的杀菌效果也比 A1 和 B1 好(MBC 值小),同时也比阳性药物银黄颗粒好。对 A2 和 B2 而言,除 B2 对金黄色葡萄球菌的抑制效果稍差外(MBC 值最大,为 $250 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),对于其他菌的杀菌效果较好,且 MBC 值均相等。

表 2 各待测样品对 9 种供试菌的 MIC

Table 2 MIC results of samples against 9 tested bacteria										g·L ⁻¹	
组别	标准菌					临床菌					
	鼠伤寒沙门氏菌	肺炎链球菌	大肠埃希菌	化脓性链球菌	金黄色葡萄球菌	鸡大肠埃希菌	鸡白痢沙门氏菌	鸡金黄色葡萄球菌	牛无乳链球菌		
A1	250	250	>250	250	>250	125	125	31.25	250		
A2	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	1.95	15.63	3.91	15.63		
B1	250	250	250	250	250	15.63	125	15.63	125		
B2	62.5	62.5	31.25	31.25	31.25	1.95	15.63	3.91	15.63		
银黄颗粒	125	62.5	125	31.25	62.5	125	62.5	62.5	125		

表 3 各待测样品对 9 种供试菌的 MBC

Table 3 MBC results of samples against 9 tested bacteria										g·L ⁻¹	
组别	标准菌					临床菌					
	鼠伤寒沙门氏菌	肺炎链球菌	大肠埃希菌	化脓性链球菌	金黄色葡萄球菌	鸡大肠埃希菌	鸡白痢沙门氏菌	鸡金黄色葡萄球菌	牛无乳链球菌		
A1	>250	>250	—	>250	—	>250	>250	>250	>250		
A2	125	125	125	125	125	125	125	125	125		
B1	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250		
B2	125	125	125	125	250	125	125	125	125		
银黄颗粒	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250		

注：“—”表示因相应 MIC 检测结果已经大于最大检测质量浓度 250 g·L⁻¹，所以未做 MBC 检测。

3.3.3 抑菌圈检测结果与分析 根据 MIC 和 MBC 检测结果,选出活性较好的待测样品(即 A2 和 B2)对 9 种供试菌进行抑菌圈活性检测,结果见表 4。由表可知,待测样品 A2 和 B2 对 9 种供试菌表现出不同程度的敏感性,它们的抑菌圈均比阿

莫西林小,但比银黄颗粒大。说明待测样品 A2 和 B2 具有较强的广谱抗菌性,虽然它们的抑菌效果不及阿莫西林,但比银黄颗粒强。而且,待测样品 A2 的抑菌圈普遍比 B2 大,说明 A2 的抑菌效果比 B2 好。

表 4 A2 和 B2 对 9 种供试菌的抑菌圈检测

Table 4 Inhibition zone results of A2 and B2 against 9 tested bacteria										cm	
组别	标准菌					临床菌					
	鼠伤寒沙门氏菌	肺炎链球菌	大肠埃希菌	化脓性链球菌	金黄色葡萄球菌	鸡大肠埃希菌	鸡白痢沙门氏菌	鸡金黄色葡萄球菌	牛无乳链球菌		
A2	1.5	1.4	1.0	1.1	1.2	1.3	1.2	1.2	1.4		
B2	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	1.2	1.0		
阿莫西林	1.6	1.8	2.0	2.0	1.6	2.9	3.3	2.1	2.0		
银黄颗粒	—	—	—	—	—	—	—	—	—		

注：“—”表示无抑菌效果或抑菌效果很不明显。

4 讨论

本实验主要针对道地金银花产地——封丘地区的忍冬叶进行了研究,在用 1 g·L⁻¹忍冬叶粗提物进行抑菌圈活性检测预实验时,并没有发现明显的抑菌圈。但是经过大孔树脂柱分离后,50%乙醇洗脱部位的抑菌效果明显,而且该分离工艺简便、有效,适用于工业化生产。在提取分离过程中,作者不仅

主要考虑了忍冬叶中的总黄酮,同时也考虑了忍冬叶中的另一种活性成分——绿原酸——忍冬药用部位(金银花和忍冬藤)的主成分之一。而且经检测,忍冬叶中绿原酸质量分数(2.4%)比忍冬藤中质量分数(0.13%)高,与金银花中绿原酸质量分数(2.5%)接近。为避免绿原酸的破坏,作者采用了低温加热(60℃)提取。在柱分离时,根据绿原酸的

性质,A 柱在用水洗脱后,柱内仍有较多绿原酸存在,故用 50% 乙醇洗脱后,洗脱液中不仅含有总黄酮(质量分数 72.8%),同时也含有较多绿原酸(质量分数 4.2%)。而 B 柱经 10% 乙醇洗脱后,绝大部分绿原酸已被洗脱下来,50% 乙醇洗脱部位则主要含总黄酮(质量分数 81.0%),绿原酸量极少(0.4%)。通过对比洗脱物 A1,A2,B1,B2 的抑菌活性可以发现,总黄酮质量分数大的样品其抑菌效果好、广谱性强,而且,总黄酮质量分数大、同时含有较多绿原酸的样品活性更好,且该部分样品的得率也高。

综上所述,采用 60% 乙醇加热(60 ℃)提取、浓缩,D101 大孔吸附树脂柱分离,水除杂后用 50% 乙醇洗脱得到忍冬叶总黄酮的这一分离工艺简便、有效,适用于工业化生产,而且所得忍冬叶总黄酮广谱抗菌性强,可以开发成为抗畜禽病原菌的药物或者饲料添加剂,这也为忍冬叶资源的合理开发利用奠定了坚实的基础。

[参考文献]

[1] 于生兰,张龙,孙玲. 金银花的研究进展[J]. 时珍国医国药,2002,13(8):498-500.

[2] 陈玲,张海艳,李晓,等. 忍冬的化学成分研究进展[J]. 现代药物与临床,2015,30(1):108-114.

[3] 王芳,蒋跃平,王晓良,等. 金银花的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(9):1378-1385.

[4] 马俊利,尚克勇,周艳红. 叶总黄酮对四氯化碳致急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(24):304-307.

[5] 王亚丹,杨建波,戴忠,等. 中药金银花的研究进展[J]. 药物分析杂志,2014,34(11):1928-1935.

[6] 胡远艳,张吉贞,田建平. 忍冬属植物药理毒力作用研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(15):8455-8465.

[7] 毛理纳,罗予,宋建兵,等. 忍冬叶与忍冬花体外抗菌作用研究[J]. 中医药学刊,2004,22(12):2203.

[8] 李玉洁,陈海蛟,崔真爱,等. 金银花叶对鸡免疫功能影响的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2011,10(19):120-121.

[9] 郑必胜,李会娜. 金银花叶有效成分的抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技,2013,29(12):2870-2876.

[10] Tzeng T F, Liou S S, CHANG C J, et al. The ethanol extract of *Lonicera japonica* (Japanese Honeysuckle) attenuates diabetic nephropathy by inhibiting p-38 MAPK activity in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Planta Med*, 2014, 80(2/3): 121-129.

[11] GAN Y, LIANG Y, CHEN H, et al. Prediction and screening of biologically active compounds in honeysuckle (*Lonicera japonica*) by biopartitioning

micellar chromatography [J]. *Asian J Chem*, 2014, 26(10): 3109-3115.

[12] 林国通. 中药学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985:64.

[13] 武雪芬,李玉贤,魏炜,等. 金银花越冬老叶有效成分测定[J]. 中药材,1997,20(1):6-7.

[14] 景小琦,武雪芬,雷敬卫. 金银花枝叶中粗黄酮、无机元素和蛋白质含量测定[J]. 河南中医,2001,21(4): 66-67.

[15] 武雪芬,景小琦,李国茹. 金银花叶药用成分的提取及抑菌试验[J]. 天然产物研究与开发,2001,21(3): 66-67.

[16] 朱英,徐之路. 红腺忍冬叶抑菌作用及其与总黄酮、绿原酸含量的相关性研究[J]. 中国中医药科技, 2014,21(1):39-41.

[17] 原增艳,宋小锋,郭庆合,等. 金银花叶总黄酮抑菌作用研究[J]. 科技视界,2015,(30):56,150.

[18] 姜红芳,石宝俊,赵伯涛,等. 忍冬叶黄酮-磷脂复合物的降血脂作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18):165-168.

[19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:221.

[20] 黄传奇,张林碧,章习哲,等. 北美圆柏与侧柏挥发性成分体外抑菌活性的比较[J]. 湖北中医药大学学报,2013,15(2):42-44.

[21] 王俊丽,张要齐,孙雪峰,等. 18 种中药对猪大肠埃希菌的体外抑菌活性的测定方法比较[J]. 安徽农业科学,2012,40(26):12947-12948.

[22] Adetutu A, Morgan W A, Corcoran O. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation activity of crude extracts of *Bridelia ferruginea* leaf, a wound-healing plant of Nigeria [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133(1): 116-119.

[23] 王伟,魏磊,王学方,等. 14 种中草药对常见畜禽病原菌的体外抗菌研究[J]. 河南科学,2015,33(7): 1130-1134.

[24] HOU L X, SHI Y H, ZHAI P, et al. Antibacterial activity and in vitro anti-tumor activity of the extract of the larvae of the housefly (*Musca domestica*) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 111(2): 227-231.

[25] 李思聪,曾富强,聂健,等. 七种中药提取物对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的体外抑菌实验[J]. 四川畜牧兽医,2013,(2):29-31.

[26] 何晓峰,曹晋桂,刘芳,等. 管碟法在检测金黄色葡萄球菌对苯扎溴铵抗性中的应用[J]. 中华医院感染学杂志,2014,24(20):5198-5200.

[责任编辑 邹晓翠]