

紫花地丁抗菌活性成分研究

李定刚^a, 张武岗^b, 宋毓民^a, 李红飞^a, 武海军^a, 靳亚平^a, 周 乐^b

(西北农林科技大学 a 动物科技学院, b 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 采用超声波提取技术提取紫花地丁中的抗菌活性成分, 通过抑菌试验进行活性部分追踪, 运用化学方法进一步分离纯化其抗菌活性成分, 并用紫外光谱分析和高效液相色谱法(HPLC)测定其纯度, 最后用试管比浊法测定其抗菌活性。结果表明, 分离纯化所得的化合物为黄酮类, 纯度为97.50%; 该化合物对沙门氏菌和乳房炎病原菌包括金黄色葡萄球菌、乳房链球菌、停乳链球菌、无乳链球菌及大肠杆菌的最低抑菌浓度分别为312, 39, 156, 156, 312及39 $\mu\text{g/mL}$, 最低杀菌浓度分别为625, 312, 312, 312, 625及312 $\mu\text{g/mL}$ 。

[关键词] 紫花地丁; 抗菌活性; 分离纯化; 黄酮

[中图分类号] S481⁺. 9; O656.22

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)04-0087-04

紫花地丁(*Viola yedoensis* Makino), 别名箭头草、独行虎^[1], 系堇菜科多年生草本植物紫花地丁的带根全草^[2], 其味苦、辛, 性寒, 为清热解毒, 治疗疗疮肿毒之主药, 还有清肠止泻之功^[3]。临床上常用于治疗痢疾、乳房炎、黄疸、目赤肿痛、咽炎等, 外敷治跌打损伤、痈肿、毒蛇咬伤等^[2]。紫花地丁含黄酮、苷类、有机酸、酚性成分、糖类、氨基酸、多肽及蛋白质、植物甾醇、鞣质、酰胺类和挥发油等多种成分^[4-5]。研究^[4]表明, 其有机酸和黄酮苷类为抗菌有效成分, 但尚未见关于其抗菌单体成分的研究报道。本研究以5种奶牛乳房炎病原菌(金黄色葡萄球菌、乳房链球菌、停乳链球菌、无乳链球菌和大肠杆菌)和沙门氏菌为供试菌, 运用化学分离和活性成分追踪法, 分析了紫花地丁的抗菌活性成分, 以为紫花地丁在奶牛乳房炎治疗中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 药 材 紫花地丁干燥全草, 购于西安市中药材公司。

1.1.2 菌 种 金黄色葡萄球菌、乳房链球菌、无乳链球菌、停乳链球菌及大肠杆菌均由西北农林科技大学家畜生殖内分泌研究室提供, 沙门氏菌由西北农林科技大学兽医微生物实验室提供。

1.1.3 主要试剂 甲醇(色谱纯, 天津科密欧化学

试剂开发中心); 薄层层析硅胶GF₂₅₄(化学纯, 青岛海洋化工有限公司); 柱层析硅胶(分析纯, 0.074~0.147 mm, 青岛美品化工有限公司); 其他试剂均为分析纯。

1.1.4 主要仪器 HF-500B 超声循环提取机(北京弘祥隆生物技术开发有限公司); UV 757CRT 紫外可见分光光度计(上海精密科学有限公司); 紫外分光(JASCO)分析/半制备高效液相色谱仪UV-2075(日本JASCO公司); 隔水式303A s-1型电热培养箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 紫花地丁有效成分的提纯 取紫花地丁全草干粉600 g, 浸于4 700 mL 甲醇中超声波提取2次, 每次超声作用时间30 min, 提取温度40℃, 功率1 200 W, 过滤, 合并2次滤液, 浓缩得粗提物61.72 g(粗提率为10.28%)。粗提物用500 mL 乙酸乙酯溶解, 加等体积蒸馏水萃取, 下相(水相)继续用100 mL 乙酸乙酯连续萃取2次, 最后1次萃取所得水相浓缩得水相I, 合并3次上相(乙酸乙酯相)浓缩得乙酸乙酯相I。将乙酸乙酯相I溶于300 mL 体积分数56%乙醇溶液中, 用100 mL 石油醚连续萃取3次, 合并3次上相浓缩得石油醚相, 浓缩下相(水/乙醇相)得醇水相。醇水相再用300 mL 水溶解后加等体积乙酸乙酯萃取, 浓缩上相得乙酸乙酯相II共412 g, 浓缩下相得水相II。乙酸乙酯相II经硅胶柱层

· [收稿日期] 2005-11-28

[基金项目] 杨凌科研基金项目(2003JB03-1)

[作者简介] 李定刚(1980-), 男, 重庆铜梁人, 在读硕士, 主要从事兽医产科病理研究。E-mail: lukeldg@163.com

[通讯作者] 靳亚平(1966-), 男, 陕西宝鸡人, 教授, 主要从事产科病理与家畜生殖内分泌研究。E-mail: yapingjin@163.com

析,收集主要含蓝色大荧光点($\lambda_{365\text{ nm}}$)的流份,浓缩干后用甲醇于40~50℃水浴溶解,趁热加体积4倍量的蒸馏水,室温静置24 h即可产生大量淡黄色针状晶体,再经重结晶而纯化。

1.2.2 抗菌活性成分追踪 在以上分离过程中,采用平皿打孔法^[6]判定以上各步所得产物的抑菌效果(药液浓度均为50 mg/mL),逐步追踪、分离抗菌活性成分。

1.2.3 晶体紫外光谱分析 取结晶粉末配制成10 $\mu\text{g/mL}$ 的甲醇溶液,用全自动UV 757CRT紫外可见分光光度计测定UV谱图。

1.2.4 晶体纯度的检测 (1)薄层层析色谱(TLC)法 以V(氯仿) V(丙酮) V(醋酸)=8 2 1和V(环己烷) V(乙酸乙酯) V(醋酸)=2 3 1的混合液作为展开剂,分别进行薄层层析。(2)高效液相色谱(HPLC)定量。根据晶体紫外光谱分析结果选择检测波长进行HPLC,HPLC条件为:流动相V(甲醇) V(水)=70 30,流速1.2 mL/min,进样量20 μL 。用峰面积归一法进行纯度定量分析。

1.2.5 晶体定性试验 采用圆形滤纸层析法、试管预试法^[4]进行晶体定性。

1.2.6 晶体抗菌活性检测 (1)最低抑菌浓度(MIC)的测定。采用试管比浊法^[7],将10支带棉塞的灭菌试管编号,1号管加肉汤培养液1.5 mL,其余各管加1 mL。取10 mg/mL晶体溶液(溶剂为V(甲醇) V(水)=1 1的混合液)0.5 mL加入1

号管中混匀,再从1号管中取1 mL加入2号管,如此连续稀释至8号管,8号管弃去1 mL含药液肉汤。吸取50 μL 含菌量相当于麦氏比浊管第1管1/2的细菌悬液(细菌浓度1.5亿/mL)到1~9号管,10号管补加50 μL 肉汤。置37℃培养12~15 h后取出观察混浊度。9号管为混浊阳性对照管,10号管为混浊阴性对照管。比9号管清亮而其后各管与9号管混浊度一致的试管,其药物含量即为最低抑菌浓度。

(2)最低杀菌浓度(MBC)的测定。取琼脂厚度为4 mm的灭菌琼脂平皿2个,每个平分为4区,共8区,编为1~8号。再将以上试验后的1~8号管内容物用灭菌脱脂棉蘸取菌液均匀涂布于琼脂对应各区表面。同法,另取一琼脂平皿分两区编为9号和10号,对应涂布9号和10号试管内容物。将上述平皿置37℃培养12 h,取出观察,最后一个无菌生长区(即该区及编号较其小的各区不长菌,编号较其大的各区长菌)对应试管的药物含量即为最低杀菌浓度。

2 结果与分析

2.1 紫花地丁抑菌活性成分的分离纯化及其抑菌活性追踪

对紫花地丁粗提物进行连续萃取,得到具有抑菌活性的晶体,该晶体溶于甲醇和热水,溶解度低,易于结晶析出。分离各步所得提取物的抑菌活性见表1。

表1 紫花地丁抑菌活性追踪结果

Table 1 Tracing result of bacteriostatic activity of *Viola yedoensis*

菌种 Bacterium genus	粗提物 The thick extract	乙酸乙酯相 I Ethyl acetate phase I	水相 I Water phase I	醇水相 Methanol and water phase	石油醚相 Petroleum ether phase	乙酸乙酯相 II Ethyl acetate phase II	水相 II Water phase II
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureas</i>	+++ (20.1±0.5)	++ (13.6±0.6)	-	+++ (25.0±0.1)	+	++ (15.9±0.8)	-
乳房链球菌 <i>S. uberis</i>	+++ (27.5±0.2)	++ (17.4±0.4)	-	+++ (32.9±0.8)	-	++ (12.1±0.4)	-
停乳链球菌 <i>S. dysgalactiae</i>	++ (15.3±0.8)	-	-	++ (16.1±0.9)	-	++ (11.3±0.5)	-
无乳链球菌 <i>S. agalactiae</i>	+++ (24.8±0.3)	+	-	+++ (25.4±0.7)	++ (13.4±0.3)	+	-
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	++ (19.2±0.5)	+	-	++ (19.3±0.1)	+	+++ (21.3±0.5)	-
沙门氏菌 <i>Samonellal</i>	++ (13.6±0.8)	++ (19.9±0.2)	-	++ (15.6±0.8)	-	++ (18.1±0.3)	-

注:-表示无明显抑菌环,判定为无抑菌作用;+表示抑菌环直径小于10 mm;++表示抑菌环直径为10~20 mm;+++表示抑菌环直径大于20 mm;括号内标注的是抑菌环直径(mm)。

Note:-no obvious antiblastic collar and no bacteriostatic action +. the diameter of antiblastic collar is smaller than 10 mm. ++. the diameter of antiblastic collar is 10~20 mm. +++ the diameter of antiblastic collar is larger than 20 mm. What mark in signs of aggregation are the diameter data of antiblastic collar (mm).

2.2 紫花地丁提纯物的紫外光谱分析

对紫花地丁提纯物的紫外光谱分析结果表明,

有4个紫外光最大吸收峰,在229,255,299和352 nm处的百分消光系数分别为2.022,903,809和

1 717。在229 nm 处紫外吸收易受溶剂干扰, 不宜选作检测波长, 故选取其余3 处中百分消光系数最大的352 nm 作为HPLC 紫外检测波长。

2 3 紫花地丁提纯物纯度的检测

2 3 1 TLC 检测 以V (氯仿) V (丙酮) V (醋酸)= 8 2 1 为展开剂的 R_f 为0.56, 以V (环己烷) V (乙酸乙酯) V (醋酸)= 2 3 1 为展开剂的 R_f 为0.60。在 λ_{365} nm 下均呈单一蓝色斑点, 碘缸显色均为单一黄色斑点。

2 3 2 HPLC 定量分析 由紫花地丁提纯物的HPLC 图(图1)可知, 共有2 个峰, 峰面积比为2.5: 97.5, 晶体纯度为97.50%, 表明所得晶体基本为单一化合物。

2 4 紫花地丁提纯物的定性

由表2 可知, 由紫花地丁提纯所得晶体的性质与黄酮类化合物相符, 结合紫外光谱分析结果推断其为黄酮类化合物。

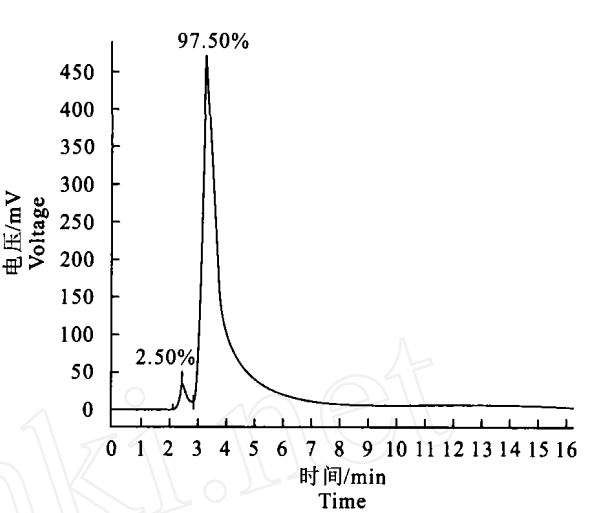


图1 紫花地丁提纯物的高效液相色谱(HPLC)图
Fig 1 HPLC analysis result of purified extract from *Viola yedoensis*

表2 紫花地丁提纯物的定性试验结果

Table 2 Trial result of purified extract from *Viola yedoensis*

鉴定方法 Identification methods	试验项目 Test items	结果 Results
圆形滤纸层析法 Round filter paper chromatography	喷3%三氯化铁乙醇液Asperse with 3%chloride ferric in alcohol	显兰绿色(+) Orchid green color
	浓氨水熏蒸Fumigate with ammonia water stronger	显黄色(+) Yellow
	紫外光照射显色,再喷三氯化铝Ultraviolet radiation, then asperse with AlCl ₃	显黄色荧光,喷三氯化铝后荧光加强(+) Yellow fluorescence, then strengthens with AlCl ₃
试管预试法 Cuvette test method	盐酸-镁粉反应Acidum hydrochloricum-Mg reaction	加热2~3min后显黄红色(+) Become yellow after heating 2~3min
	醋酸铅沉淀反应Lead acetate precipitation	黄色沉淀(+) Yellow mercury oxide

注: +. 表示与黄酮类化合物性质相符。
Note: +. means that it is coincident with the properties of flavonoids

2 5 紫花地丁提纯物抗菌活性的检测

由表3 可知, 紫花地丁提纯物对4 种革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌、乳房链球菌、无乳链球菌、停乳链球菌)和2 种革兰氏阴性菌(大肠杆菌、沙门氏菌)都有明显的抗菌作用, 对沙门氏菌和乳房炎病原菌包括金黄色葡萄球菌、乳房链球菌、停乳链球菌、无

乳链球菌及大肠杆菌的最低抑菌浓度分别为312, 39, 156, 156, 312 和39 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 最低杀菌浓度分别为625, 312, 312, 312, 625 和312 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。由此可见, 该化合物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抗菌作用最佳, 最低抑菌浓度为39 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 最低杀菌浓度为312 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表3 紫花地丁提纯物的最低抑菌浓度(MIC)及最低杀菌浓度(MBC)

Table 3 MIC and MBC of the crystalloid from *Viola yedoensis*

试验项目 Test item	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureas</i>	乳房链球菌 <i>S. uberis</i>	停乳链球菌 <i>S. dysgalactiae</i>	无乳链球菌 <i>S. agalactiae</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	沙门氏菌 <i>Salmonella</i>
最低抑菌浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Minimal inhibitory concentration	39	156	156	312	39	312
最低杀菌浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Minimal bacteriostatic concentration	312	312	312	625	312	625

3 讨 论

奶牛乳房炎是奶牛最常见的疾病之一,在其治疗过程中,抗生素的长期滥用使病原体对药物产生抗药性,降低了药物疗效,且使牛奶中抗生素的残留增加。而中草药作为纯天然药物,具有无残留、无致畸、无毒副作用的优点。因此,研究利用中草药治疗奶牛乳房炎已备受关注。本试验结果表明,紫花地丁提纯物对5种奶牛乳房炎病原菌均有良好的抗菌作用,提示该提纯物是治疗奶牛乳房炎的有效成分。

紫花地丁为常用中草药,临床上常与蒲公英配伍治疗乳房炎、腮腺炎、咽炎等。研究^[4]表明,紫花地丁的抗菌有效成分为有机酸和黄酮类。本试验通过对紫花地丁抗菌活性成分的追踪分离,纯化得到具有抗菌活性的单体,经定性试验和紫外光谱分析证实为黄酮类化合物,每1 000 g紫花地丁干粉通过此

法可纯化得到黄酮晶体1.71 g,提取量较高。

超声波提取技术能够更有效地提高黄酮类的提取率^[8],提高药物溶出速度,缩短提取时间,并且不改变提取物的生物活性^[8-9]。本试验能获得如此高的黄酮晶体提取率,与研究过程中采用的超声波提取技术是密不可分的;同时,也与研究过程中较为简单的分离纯化工艺有关。

有效单体成分的研究作为中草药研究开发的基础,具有重要的科研价值。尽管有关紫花地丁抗菌混合物^[4]及其单体成分^[5-10]的研究已有不少报道,但对其抗菌单体成分的研究仍未见报道。本研究提纯得到了紫花地丁的一个抗菌活性单体,为阐述紫花地丁的治病机制提供了新的理论依据,同时也为紫花地丁药用价值的进一步开发利用提供了新的参考资料。

[参考文献]

- [1] 瞿自明,徐方舟. 兽医中草药大全[M]. 北京:中国农业出版社,1996:160
- [2] 江西中医学院. 中药大词典:下册[M]. 上海:上海科技出版社,2001:2178
- [3] 任仁安. 中药鉴定学[M]. 上海:上海科技出版社,1986:466
- [4] 刘湘新,刘进辉,刘自远,等. 紫花地丁的有效成分分析及抗菌作用研究[J]. 中兽医杂志,2004(3):16-18
- [5] 肖永庆,毕俊英,刘晓宏,等. 地丁化学成分的研究[J]. 植物学报,1987,29(5):352-356
- [6] 林炜明. 奶牛隐性乳房炎病原菌检测及药敏试验新方法——MTT法的建立[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2004
- [7] 李健强,李六金. 兽医微生物学试验实习指导[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1999:29-30
- [8] 沙 宏. 有效成分提取分离方法研究进展[J]. 黑龙江医药,2004,17(5):375-377
- [9] 安建忠,许志惠. 新技术新方法在中草药提取方面的应用[J]. 时珍国医国药,2001,12(5):465-467
- [10] Chen Xie, Nigel C Veitch, Peter J Houghton, et al. Flavone C-Glycosides from *Viola yedoensis* Makino [J]. Chem Pharm Bull, 2003, 51(10):1204-1207

Studies on antibacterial constituents in *Viola yedoensis*

L ID ing-gang^a, ZHANG W u-gang^b, SONG Y u-m in^a,

L I Hong-fei^a, W U Ha i-jun^a, J I N Ya-p ing^a, Z H O U L e^b

(^a College of Animal Science and Technology, ^b College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi, 712100, China)

Abstract: The antibacterial constituents from *Viola yedoensis* is extracted by ultrasonic extraction technique. Then antibacterial test is conducted to trace the active section, and an antibacterial compound is separated and purified through chemical methods. According to ultraviolet spectrum data, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) assayed its fineness. Eventually, turbid degree comparison method with cuvettes is used to measure its antibacterial activity. It is concluded that the compound is flavonoids, and its content is 97.50%. To *Salmonella* and pathogenic bacteria of dairy cow including *S. aureas*, *S. uberis*, *S. dysagalactiae*, *S. agalactiae* and *E. coli*, its minimal inhibitory concentration (MIC, $\mu\text{g}/\text{mL}$) is 312, 39, 156, 156, 312, 39 and minimal bacteriostatic concentration (MBC, $\mu\text{g}/\text{mL}$) is 625, 312, 312, 312, 625, 312.

Key words: *Viola yedoensis*; antibacterial activity; isolation and purification; flavonoids