

紫花地丁抑菌活性成分的研究初报

张武岗^a, 李定刚^b, 宋毓民^b, 周 乐^a, 靳亚平^b

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

[摘 要] 采用活性跟踪法从紫花地丁的氯仿萃取物中分离得到1个抗菌活性成分(化合物1), 并以停乳链球菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、无乳链球菌、乳房链球菌和沙门氏菌为供试菌, 对紫花地丁的抑菌活性及其活性成分进行了初步研究。结果表明, 化合物1初步鉴定为黄酮类化合物; 紫花地丁的主要活性成分位于甲醇-水($V(\text{甲醇}) : V(\text{蒸馏水}) = 1 : 1$)萃取物和氯仿萃取物中; 化合物1对以上6种供试菌的最小抑菌浓度依次为0.039, 0.078, 0.156, 0.313, 0.625和1.25 mg/mL; 对金黄色葡萄球菌、无乳链球菌和乳房链球菌的最小杀菌浓度 ≤ 2.5 mg/mL, 对停乳链球菌、沙门氏菌和大肠杆菌的最小杀菌浓度 > 2.5 mg/mL。

[关键词] 紫花地丁; 抗菌活性; 抗菌成分; 抗菌活性跟踪; 分离纯化

[中图分类号] S567.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)11-0125-04

紫花地丁(*Viola yedoensis* Makino)系堇菜科多年生草本植物^[1], 以全草入药, 性苦、辛、寒, 具有清热、消肿、消炎和抗菌功能, 主治黄疸、痢疾、乳腺炎、目赤肿痛和咽炎, 外敷可治跌打损伤、肿痛、毒蛇咬伤等^[2-3]。关于紫花地丁化学成分的研究报道较多^[4-5], 但对其抗菌单体成分的研究目前尚属空白。刘湘新等^[6]曾对紫花地丁的抗菌活性进行了初步研究, 认为其有效成分为黄酮苷类和有机酸。本研究旨在了解紫花地丁的抑菌活性及其活性成分, 以为紫花地丁的临床应用和质量控制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

原料 紫花地丁全草, 购自西安药材市场。

仪器 ZF-C 型三用紫外分析仪(上海康禾光电仪器有限公司), 303 型电热恒温培养箱(北京科伟永鑫实验仪器设备厂)。

试剂 琼脂粉和牛肉膏均由北京奥博星生物技术责任有限公司生产, 蛋白胨由天津市英博生化试剂有限公司生产, 0.9 g/L 生理盐水自制, 其他化学试剂均为分析纯。

菌种 金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、无乳链球菌(*S. agalactiae*)、乳房链球菌(*S. uberis*)、停乳链球菌(*S. dysagalactiae*)、大肠杆菌(*E. coli*)和沙门氏菌

(*Salmonella*), 均由西北农林科技大学动物科技学院家畜生殖内分泌研究室从患有乳腺炎的奶牛乳腺中分离并保存, 用前将保存菌种接种于营养肉汤中, 于37℃条件下培养18~20 h后备用。

1.2 方 法

1.2.1 分离纯化方法 参考文献[4, 6-7]的方法进行。取1.8 kg 紫花地丁全草粉末, 用12.6 L 甲醇超声提取2次, 每次40 min, 合并2次提取液, 浓缩至浸膏(A)。用适量乙酸乙酯完全溶解浸膏A, 加等体积的水进行萃取。将乙酸乙酯相和水相分别浓缩后依次得浸膏B和C。再用适量甲醇-水($V(\text{甲醇}) : V(\text{蒸馏水}) = 1 : 1$)混合溶剂溶解浸膏B, 依次用石油醚和氯仿各连续萃取3次, 分别浓缩醇水萃取液、石油醚萃取液和氯仿萃取液, 依次得浸膏D、E和F。将浸膏F进行反复硅胶柱层析, 氯仿为洗脱剂, 收集具有天蓝色荧光(365 nm)的组分, 浓缩至干后得到化合物1(56 mg)。分离过程中活性部位的确定均由抑菌活性试验(纸片扩散法)来完成。

1.2.2 活性测定方法 (1)纸片扩散试验。培养基和药敏纸片的制备参考文献[8]的方法进行。将供试物配成50 mg/mL的供试液, 取制备好的纸片(直径为6 mm)放入供试液中浸泡2 h, 然后取出纸片置于40℃烘箱中烘干; 将菌液浓度为 10^6 /mL的大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、乳房链球菌、无乳链

· [收稿日期] 2005-11-14

[基金项目] 陕西杨凌科研发基金项目(2003JB03-1)

[作者简介] 张武岗(1979-), 男, 陕西宝鸡人, 在读硕士, 主要从事天然产物化学研究。

[通讯作者] 周 乐(1965-), 男, 陕西蒲城人, 教授, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: betterzl@163.com; zhoule863@sina.com

球菌和停乳链球菌分别均匀涂抹在普通琼脂培养基上。最后,再将制备好的药敏片均匀贴于培养基的3个位点,然后置于37℃恒温培养箱中培养18 h,分别测定各自的抑菌圈直径。取3个重复的平均值作为最终结果。

(2)肉汤倍比稀释法。参考文献[9-10]的方法进行。取25 mg 化合物1置于试管中,先加入0.5 mL 丙酮溶解样品,再加入4.5 mL 肉汤培养液配成10 mg/mL 的供试液;另取0.5 mL 丙酮、4.5 mL 肉汤培养液混匀配成丙酮肉汤培养液。取13支灭菌的试管,向1~12号管各加肉汤培养液0.5 mL,再向1号试管加1 mL 供试液,然后由1号管到10号管依次进行倍比稀释,1号管到10号管的供试液浓度依次为2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156, 0.078, 0.039, 0.020, 0.010和0.005 mg/mL。然后向1~11号试管每管加浓度为 10^6 /mL 的菌液0.05 mL,其中11号管作为阴性对照;12号管加入0.05 mL 供试液代替菌液作为阳性对照;13号管加入0.5 mL 丙酮肉汤培养液和0.05 mL 菌液作为溶剂对照。将13支试管置于37℃恒温培养箱中培养18~24 h,然后对各管进行比浊,以确定最低抑菌浓度(MIC)。供试管的混浊度小于阴性对照管表明有抑菌活性,混浊度与阴性对

照管相同表示无抑菌活性,混浊度越大表明抑菌活性越小,将未见细菌生长的管内肉汤转接到普通琼脂培养基平皿上,再于37℃条件下培养18~24 h。将琼脂平皿上未见细菌生长的药物浓度作为最低杀菌浓度(MBC)。

2 结果与分析

2.1 化合物1初步鉴定结果

化合物1为淡黄色粉末状,易溶于乙酸乙酯、氯仿,溶于甲醇、乙醇、丙酮,难溶于水,熔点为188~192℃。在氯仿-丙酮($V(\text{氯仿}) : V(\text{丙酮}) = 4 : 1$)和氯仿-乙酸乙酯($V(\text{氯仿}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 1 : 1$)展开剂中, R_f 值分别为0.65和0.56,紫外光下和碘缸中均呈单一斑点。TLC上在 $\lambda_{365\text{ nm}}$ 下可见天蓝色荧光。通过盐酸镁粉反应、氨气熏蒸定性试验,结果均为正反应,UV-vis (CH_3OH) λ_{max} : 206, 229, 254, 299, 346 nm,据此可初步认定化合物1为黄酮类化合物^[11],具体结构还有待红外光谱、质谱和核磁共振等进一步确证。

2.2 分离过程中的抑菌活性跟踪结果

采用纸片扩散法对分离过程中的7种供试物进行了抑菌活性试验,结果见表1。

表1 紫花地丁不同萃取相的抑菌活性

Table 1 Antibacterial activity of the different extractions of *Viola yedoensis* Makino

供试样 Sample tested	抑菌圈直径/mm The diameter of antibacterial zone					
	沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	乳房链球菌 <i>S. uberis</i>	无乳链球菌 <i>S. agalactiae</i>	停乳链球菌 <i>S. dysgalactiae</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>
A	13.6±0.8	19.2±0.5	27.5±0.2	24.8±0.3	15.5±0.8	20.1±0.5
B	19.9±0.2	8.9±0.3	17.4±0.4	9.3±0.4	-	13.6±0.6
C	-	-	-	-	-	-
D	15.6±0.8	19.3±0.1	32.9±0.8	25.4±0.3	16.1±0.9	25.0±0.1
E	-	7.6±0.6	-	13.4±0.3	-	9.1±0.2
F	8.0±1.2	16.6±0.4	10.9±0.9	14.0±2.2	26.8±0.7	19±1.1

注:表中抑菌圈直径为3次试验的平均值;“-”表示无抑菌圈。

Note: The diameter of inhibition zone is the average of three experiments. “-” means no inhibition.

由表1可以看出,粗提物(A)对所有供试菌均表现出较好的抑菌活性,尤其是对乳房链球菌和无乳链球菌的抑菌效果较好。经过乙酸乙酯萃取后,水相(C)已基本不含抑菌成分,活性成分主要集中在乙酸乙酯相(B)中,这说明抑菌活性成分应该是非极性或中等极性而不是水溶性的化合物。B再经石油醚和氯仿萃取后,虽然D、E、F都有不同程度的活性,但三者的抑菌活性强弱明显不同,依次为D>F>E,且D、F的抗菌谱远宽于E,这说明紫花地丁中含有不止一个抑菌成分,而且活性较强或含量较多的成分应该是中等极性的化合物(D、F)。

2.3 化合物1对6种细菌的最低抑菌浓度(MIC)

表2显示,化合物1对6种供试菌的抑菌活性大小顺序为:停乳链球菌>金黄色葡萄球菌>大肠杆菌>无乳链球菌>乳房链球菌>沙门氏菌,其对6种菌的最低抑菌浓度(MIC)依次为0.039, 0.078, 0.156, 0.313, 0.625和1.25 mg/mL。说明化合物1对停乳链球菌、金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性菌具有明显的抑菌活性;在对革兰氏阴性菌的抑菌活性方面,化合物1对大肠杆菌的抑菌活性明显优于沙门氏菌。

表 2 化合物 1 的最低抑菌浓度(MIC)

Table 2 Minimal inhibitory concentration of the compound 1

菌种 Bacterium genus	浓度/(mg·mL ⁻¹) Concentration										溶剂对照 Solvent contrast	阴性对照 N egative contrast	阳性对照 Positive contrast
	2 5	1 25	0 625	0 313	0 156	0 078	0 039	0 020	0 010	0 005			
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	+++	+++	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+++
乳房链球菌 <i>S. uberis</i>	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
无乳链球菌 <i>S. agalactiae</i>	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
停乳链球菌 <i>S. dysgalactiae</i>	+++	+++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	+++

注:“+++”表示清澈;“++”表示较清澈;“+”表示较混浊;“-”表示混浊
Note:“+++”means limpidity;“++”means more limpidity;“+”means more muddiness;“-”means muddiness

2.4 化合物 1 对 6 种细菌的最低杀菌浓度(MBC)

从表 3 可以看出,化合物 1 对 6 种供试菌都具有一定的杀菌活性,其中对革兰氏阳性菌的杀菌活性明显强于革兰氏阴性菌。但对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的不同菌种而言,其最低杀菌浓度(MBC)

存在差异,其中化合物 1 对金黄色葡萄球菌、无乳链球菌和乳房链球菌 3 种革兰氏阳性菌的MBC≤2.5 mg/mL,但同样是对革兰氏阳性菌的停乳链球菌,其MBC>2.5 mg/mL;对属于革兰氏阴性菌的沙门氏菌和大肠杆菌也表现出MBC>2.5 mg/mL。

表 3 化合物 1 的最低杀菌浓度(MBC)

Table 3 Minimal bactericidal concentration of the compound 1

菌种 Bacterium genus	浓度/(mg·mL ⁻¹) Concentration										溶剂对照 Solvent contrast	阴性对照 N egative contrast	阳性对照 Positive contrast
	2 5	1 25	0 625	0 313	0 156	0 078	0 039	0 020	0 010	0 005			
沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	-	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
乳房链球菌 <i>S. uberis</i>	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
无乳链球菌 <i>S. agalactiae</i>	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
停乳链球菌 <i>S. dysgalactiae</i>	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

注:“+”表示有少量的细菌;“++”表示细菌生长较茂盛;“+++”表示细菌生长茂盛;“-”表示杀菌
Note:“+”means a few bacteria;“++”means more bacteria;“+++”means a good many bacteria;“-”means absent of bacteria

3 讨 论

在中医临床方面,紫花地丁一直是效果良好的抗菌消炎药物,本试验的研究结果在一定程度上为这一传统中药的抑菌活性提供了理论依据。从本研究结果可知,紫花地丁中的抑菌活性成分除了氯仿

相(F)中的化合物 1 外,应该还有其他的活性成分,其中活性最强的成分位于醇水相(D)中,另外在石油醚相还含有非极性的活性成分(E)。因此,本研究仅是对紫花地丁抑菌活性成分的初步研究,关于其他活性成分的分离鉴定工作,还有待于后续研究。

[参考文献]

[1] 瞿自明,徐方舟. 兽医中草药大全[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996: 160
[2] 任仁安. 中药鉴定学[M]. 上海: 上海科技出版社, 1986: 466
[3] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编: 上册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 553-554
[4] 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): 532-535
[5] Chen Xie, Nigel C Veitch, Peter J H, et al. Flavone C-glycosides from *Viola yedoensis* Makino[J]. Chem Pharm Bull, 2003, 51(10): 1204-1207.
[6] 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, 16(3): 16-18
[7] 姚新生. 天然药物化学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 184-186
[8] 李健强,李六金. 兽医微生物学实验实习指导[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1998

- [9] 吴国娟, 张中文, 李焕荣, 等. 中草药对奶牛乳房炎6种致病菌的抑菌效果观察[J]. 北京农学院学报, 2003, 18(3): 195-198
- [10] 童延清, 李 晖. 紫花地丁、蒲公英体外抗菌作用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003, 23(9): 669
- [11] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海: 上海科学出版社, 1997: 289-290

Antibacterial constituent of *Viola yedoensis* Makino

ZHANG Wu-gang^a, LI Ding-gang^b, SONG Yu-ming^b, ZHOU Le^a, JIN Ya-ping^b

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

Abstract: Antibacterial activity of *Viola yedoensis* Makino and its antibacterial constituents were studied in this paper against *S. aureas*, *S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. dysagalactiae*, *E. coli* and *Salmonella* *in vitro*. One antibacterial constituent (compound 1) from the chloroform extract was obtained with tracing-antibacterial activity method. The results showed that compound 1 was preliminarily identified as flavone; that main antibacterial constituents in *V. yedoensis* Makino existed in chloroform phase and ethanol-water (1:1) phase, that minimal inhibitory concentrations (MIC) of compound 1 were 0.039, 0.078, 0.156, 0.313, 0.625 and 1.25 mg/mL respectively against *S. dysagalactiae*, *S. aureas*, *E. coli*, *S. agalactiae*, *S. uberis* and *Salmonella*, and minimal bactericidal concentrations (MBC) were ≤ 2.5 mg/mL against *S. aureas*, *S. agalactiae* and *S. uberis*, and > 2.5 mg/mL against *S. dysagalactiae*, *E. coli* and *Salmonella*.

Key words: *Viola yedoensis* Makino; antibacterial activity; antibacterial constituent; tracing-antibacterial activity; isolation and purification

(上接第124页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)11-0121-CA

Antifungal activity of ethanol extracts from *Peganum harmala* L.

ZHANG Yi-yang^a, WANG Jun-ru^a, GONG Yue-hua^b, ZHANG Feng^a, ZHANG Han-wen^b

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

Abstract: The hypha growth-inhibiting method and the virulence determination method were used to investigate the inhibition effects of the petroleum ether fraction, chloroform fraction, ethyl acetate fraction, n-butanol fraction and water fraction in the alcoholic extracts from the aboveground of *Peganum harmala* L. on the five types of popular plant pathogenic fungi, *Alternaria solani*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium bulbigenum*, *Fusarium oxysporum f. niveum* and *Valsa mali*. The results showed that chloroform fraction, n-butanol fraction, and ethylacetate fraction can inhibit the growth of five types of popular plant pathogenic fungi. The inhibition effect of chloroform fraction was the most potent, with the inhibition rate about more than 83% to 5 plant pathogenic fungi under the concentration of 15 mg/mL. Under the concentration of 15 mg/mL, the ethyl acetate fraction and n-butanol fraction thoroughly inhibited the growth of *Alternaria solani* and *Valsa mali*, with the inhibition rate up to 100%. The n-butanol fraction showed the highest potent virulence, with EC_{50} to *Alternaria solani* and *Valsa mali* about 0.09 and 0.279 mg/mL respectively.

Key words: *Peganum harmala* L.; polar fraction; plant pathogenic fungi; antifungal activity