

文章编号:1001-6880(2018)Suppl-0104-05

凤仙花不同极性部位中1,4-萘醌类成分与其抗真菌活性的相关性研究

王芳,王宝华*,丁磊,周广义,董洁洁,王志荣,黎志立

北京中医药大学中药学院,北京 102488

摘要:测定凤仙花醇提取物不同极性部位中1,4-萘醌类成分指甲花醌(HNQ)、指甲花甲醚(MeONQ)的含量及其抑菌活性,探究不同萃取部位中1,4-萘醌类成分含量与其抑菌活性的关系,明确凤仙花抗真菌的主要活性成分。利用HPLC法测定凤仙花不同极性部位中HNQ、MeONQ的含量及转移率;采用滤纸片扩散法比较不同萃取部位对红色毛癣菌的抑菌活性。结果表明,不同极性部位1,4-萘醌类成分含量:石油醚相>二氯甲烷相>乙酸乙酯相>正丁醇、水相;石油醚部位中HNQ和MeONQ的含量、转移率最高,含量分别为4.20%、39.46%,转移率分别为53.46%和92.52%;其次是二氯甲烷部位,HNQ和MeONQ的含量分别为2.44%、0.38%,转移率分别为17.85%和0.49%;乙酸乙酯、正丁醇和水相基本不含以上两种成分。滤纸片扩散法药敏实验结果显示,抑菌圈直径大小:石油醚相>二氯甲烷相>乙酸乙酯、正丁醇、水相,凤仙花石油醚部位的抑菌圈直径最大,即抑菌活性最强;其次是二氯甲烷部位;而乙酸乙酯、正丁醇和水相均无抑菌活性。实验结果证明,凤仙花粗提物的不同极性部位中HNQ和MeONQ含量与其体外抑菌活性呈显著的正相关性,石油醚部位为凤仙花具有抗真菌活性的有效部位,HNQ和MeONQ是凤仙花体外抗红色毛癣菌的主要活性成分。

关键词:凤仙花;溶剂萃取;红色毛癣菌;抑菌活性;指甲花醌;指甲花甲醚

中图分类号:R284

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.014

Study on Relationship between 1,4-naphthoquinones and Antifungal Activities of Different Polar Parts of *Impatiens balsamina* L.

WANG Fang, WANG Bao-hua*, DING Lei, ZHOU Guang-yi, DONG Jie-jie, WANG Zhi-rong, LI Zhi-li

College of Traditional Chinese Pharmacy, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: To determine the content of lawsone (HNQ) and 2-methoxy-1,4-naphthoquinone (MeONQ) and antifungal activities of five polar fractions of ethanol extracts of *Impatiens balsamina* L. and analyze relationship between content and antifungal activities, in order to define antifungal active constituents of *Impatiens balsamina* L. The content and transfer rate of HNQ and MeONQ in different extraction parts was simultaneously determined by using HPLC method. The fungicidal activities of extracts of five fractions against *Trichophyton rubrum* were studied by filter paper diffusion method. The results showed that the petroleum ether extract showed the highest amount of HNQ and MeONQ, their content were 4.20% and 39.46%, and transfer rate were 53.46% and 92.52%, respectively. Secondly, the dichloromethane extraction, their content of HNQ and MeONQ were 2.44% and 0.38%, and transfer rate were 17.85% and 0.49%, respectively. However, ethyl acetate, n-butanol and water solvent fractions all were hard to detect HNQ and MeONQ. The results of filter paper diffusion method showed that petroleum ether extract was the best, dichloromethane extraction was low antifungal activities, and the other three phases exhibited no antifungal activities. The results showed that antifungal activities were positively correlated to content of HNQ and MeONQ in different polar parts of *Impatiens balsamina* L. The content of HNQ and MeONQ the petroleum ether extract was the main antifungal active fractions, HNQ and MeONQ were the main active constituent.

Key words: *Impatiens balsamina* L.; solvent extracts; trichophyton rubrum; antibacterial activity; lawsone; 2-methoxy-1,4-naphthoquinone

收稿日期:2018-04-27

接受日期:2018-06-08

基金项目:北京中医药大学校级科研项目(2020072220009)

*通信作者 TE-mail:Wbaohua1@163.com

甲癣等皮肤癣菌病是皮肤科的常见病、多发病^[1],红色毛癣菌、须癣毛癣菌等皮肤真菌是其主

要致病菌^[2]。对于此类皮肤癣菌病,临幊上主要使用内服、外敷的抗真菌药物治疗,但用药时间长、剂量大且毒副作用大^[3]。日常生活中人们发现凤仙花捣碎敷患处的方法对治疗灰指甲具有显著疗效,同时,国内外许多文献也相继报道,凤仙花对红色毛癣菌、石膏样毛癣菌、须癣毛癣菌等皮肤真菌具有抑菌作用,其抑菌活性成分主要为1,4-萘醌类成分^[4]指甲花醌(HNQ)和指甲花甲醚(MeONQ)。因此,本研究利用不同极性溶剂萃取,得到凤仙花中的1,4-萘醌类成分;通过测定不同溶剂部位中HNQ和MeONQ的含量,比较凤仙花不同极性部位的抑菌活性,探究不同极性部位中HNQ和MeONQ的含量与其抑菌活性的关系;筛选凤仙花体外抗真菌有效部位并进行抑菌活性分析,从而为抑菌活性成分的分离纯化、药理药效等进一步研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 仪器

LC-20AT高效液相色谱仪(日本岛津公司,紫外检测器、四元泵、在线脱气机);CX-250DE型超声波清洗器(北京医疗设备二厂);HH-1型水浴锅(北京健力园医疗器械有限公司);RE-2000A型旋转蒸发器、SHZ-Ⅲ循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂);FA1104型电子天平(上海越平科学仪器有限公司);YX-280D型压力蒸汽灭菌器(合肥华泰医疗设备有限公司);SW-VS-870型净化工作台(苏州净化工程设备有限公司)SHP-80型生化培养箱(上海森德实验仪器有限公司)。

1.1.2 试药

凤仙花购买于河南省南阳市,经北京中医药大学石晋丽教授鉴定为凤仙花科凤仙花属凤仙花的花。硝酸咪康唑(批号:100213-201406,国家食品药品检定研究院);沙氏葡萄糖琼脂培养基(批号:20170328,北京奥博星生物技术有限公司);二甲基亚砜(批号:20160427,北京奥博星生物技术有限公司);无菌生理盐水。

1.1.3 菌种

红色毛癣菌(GIM3.600),购于广东省微生物菌种保藏中心。

1.2 方法

1.2.1 凤仙花醇提液的制备

精密称定凤仙花粉末0.5 g(过40目筛),加入

40%乙醇水溶液25 mL,超声功率180 W,超声温度40 °C,超声提取30 min,过滤,得凤仙花原药材醇提液,待测。

1.2.2 凤仙花醇提液不同极性部位的制备

精密称定凤仙花粉末100 g(过40目筛),加入40%乙醇水溶液5 000 mL,超声功率180 W,超声温度40 °C,超声提取30 min,过滤,即得凤仙花粗提液。粗提液在50 °C下减压浓缩,浓缩液以4 000 rpm转速,离心20 min,除杂。将上述所得浓缩液,分别经石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇多次萃取至萃取液接近无色,合并萃取液。将不同溶剂萃取液减压浓缩,水浴蒸干,最后真空干燥至恒重并计算各极性部位的出膏率。精密称定不同极性部位干燥物10.0 mg,定溶于5 mL容量瓶,待测。

1.2.3 指甲花醌和指甲花甲醚的含量测定

按照参考文献的色谱条件以及方法学考察进样分析,根据绘制的标准曲线,计算凤仙花原药材、不同极性部位中HNQ和MeONQ的含量和转移率^[5]。

$$\text{含量}(\%) = \frac{m_1}{m_2} \times 100$$

$$\text{转移率}(\%) = \frac{m_1}{m_3} \times 100$$

m_1 —各极性部位中HNQ和MeONQ的质量,mg;

m_2 —各极性部位干燥物料的质量,mg;

m_3 —原药材中HNQ和MeONQ的质量,mg;

1.2.4 抑菌液的制备

精密称定HNQ标准品50.0 mg,MeONQ标准品12.5 mg,二甲基亚砜分别溶解定容至5 mL容量瓶,制备HNQ标准品溶液浓度为10 mg/mL和MeONQ标准品溶液浓度为2.5 mg/mL。

精密称定凤仙花不同溶剂部位(石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和水部位)干膏40.0 mg,DMSO定容至5 mL容量瓶,得到浓度为8.0 mg/mL的溶液。

1.2.5 红色毛癣菌菌悬液的制备

将菌种于冷藏条件下取出,在无菌超净台内,挑取适量菌种于灭菌的研磨器内,加入适量的生理盐水,研磨至肉眼观察呈现毛玻璃状的混悬液,血细胞板计数,浓度范围大致为10⁶~10⁷ CFU/mL,备用^[6]。

1.2.6 滤纸片扩散法测定药敏活性

精密吸取100 μL菌悬液加入平板培养基制备

染菌板。在平板背面用 Mark 笔将染菌板平均分成四部分,其中三部分平行贴相同浓度的滤纸药片,剩余一部分贴含 DMSO 滤纸片,作为空白对照组。将染菌板倒置,28 ℃下恒温恒湿培养5~7 d,观察抑菌圈直径大小,以上实验均重复3次。

1.2.7 石油醚部位的抑菌活性测定

精密称定凤仙花石油醚萃取物40.0 mg,加DMSO溶解制得8.0 mg/mL的母液,采用二倍稀释法稀释得到1.0、2.0、4.0、8.0 mg/mL浓度系列。硝酸咪康唑(达克宁主成分)作为阳性对照药,精密称4.0 mg,加5 mL的DMSO溶解定容,制得浓度为0.8 mg/mL的母液,采用二倍稀释法制得0.1、0.2、

0.4、0.8 mg/mL的浓度系列。滤纸片扩散法测定石油醚部位的抑菌圈直径大小,方法详见“1.2.6”项。

2 结果与分析

2.1 不同极性部位中 HNQ 和 MeONQ 的含量和转移率

凤仙花原药材中 HNQ 含量为 0.063%, RSD 为 1.14% ($n = 3$); MeONQ 的含量为 0.34%, RSD 为 0.35% ($n = 3$)。凤仙花醇提液经过不同极性溶剂萃取,得到石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和水部位的出膏率分别为 0.81%、0.46%、2.01%、8.73%、19.24%。

表 1 不同极性部位中指甲花醌和指甲花甲醚的含量及转移率

Table 1 The content and transfer rate of HNQ and MeONQ from different polar parts

萃取部位 Parts	指甲花醌 HNQ				指甲花甲醚 MeHNQ			
	含量 Content (%)	转移率 Transfer rate (%)	平均转移率 Mean transfer rate (%)	RSD (%)	含量 Content (%)	转移率 Transfer rate (%)	平均转移率 Mean transfer rate (%)	RSD (%)
石油醚 Petroleum ether	4.20	53.47	53.46	0.31	39.49	92.58	92.52	0.36
	4.21	53.61			39.58	92.81		
	4.19	53.28			39.30	92.15		
二氯甲烷 Dichloromethane	2.44	17.83	17.85	0.61	0.38	0.52	0.49	4.34
	2.46	17.97			0.36	0.48		
	2.43	17.75			0.39	0.53		
乙酸乙酯 Ethyl acetate	0.29	9.25	9.46	3.90				
	0.31	9.89						
	0.29	9.25						
正丁醇 Butyl alcohol	-	-						
水 Water	-	-						

2.2 滤纸片扩散法测定抑菌圈直径

表 2 滤纸片扩散法测定抑菌圈直径

Table 2 Determination of diameter of inhibition zone by filter paper diffusion method

RSD(%)	标准品 Standard	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)			平均直径 Mean diameter (mm)	
		指甲花醌 HNQ	指甲花甲醚 MeHNQ	石油醚 Petroleum ether	二氯甲烷 Dichloromethane	乙酸乙酯 Ethyl acetate
		16.2	15.8	14.7	15.6	4.99
		24.6	23.5	23.9	24.0	2.32
	不同极性部位 Parts	56.4	56.1	55.9	56.1	4.48
		11.3	10.8	11.6	11.2	3.60
		-	-	-	-	
		-	-	-	-	
		-	-	-	-	

由表1、表2可知,两种1,4-萘醌类成分HNQ和MeONQ标准品均对红色毛癣菌具有较强的抑菌作用。凤仙花粗提物不同极性部位中HNQ和MeONQ含量存在显著差异,其抑菌活性也明显不同。石油醚相含量最高,对红色毛癣菌的抑制活性最强;二氯甲烷相中含量较低,其抑菌活性较弱;乙酸乙酯、正丁醇和水相则无抑菌作用,因此,不同极性部位中1,4-萘醌类成分含量与其抑菌活性呈现明显的量效关系^[7]。

2.3 凤仙花石油醚部位对红色毛癣菌的抑菌活性

表3 药物敏感实验判定标准表^[8]

Table 3 The criteria table of drug sensitivity experiment

Inhibition zone diameter(mm)	Sensitiveness
>20	极敏 Extremely
15~20	高敏 High
10~14	中敏 Medium
6~10	低敏 Low
<6	不敏感 Insensitivity

表4 硝酸咪康唑的滤纸片扩散法药敏实验

Table 4 Drug sensitivity test of miconazole nitrate by filter paper diffusion method

Miconazole nitrate ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	平均直径 (mm)	敏感度 Sensitiveness
0.1	19.2	高敏 High
0.2	22.3	极敏 Extremely
0.4	27.5	极敏 Extremely
0.8	28.8	极敏 Extremely

表5 石油醚部位的滤纸片扩散法药敏实验

Table 5 Drug sensitivity test of petroleum ether by filter paper diffusion method

Petroleum ether (mg/mL)	平均直径 (mm)	敏感度 Sensitiveness
1	19.0	高敏 High
2	26.4	极敏 Extremely
4	44.7	极敏 Extremely
8	56.5	极敏 Extremely

HPLC法测定结果表明,石油醚部位的1,4-萘醌类成分含量最高,除HNQ和MeONQ两种成分外,基本无其他杂质成分。不同极性部位体外抑菌

实验表明,石油醚相为凤仙花体外抗红色毛癣菌的有效部位。当石油醚部位抑菌液浓度为1.0~8.0 mg/mL,抑菌圈直径是19.0~56.5 mm;参照阳性对照药硝酸咪康唑的抑菌活性,凤仙花有效部位石油醚相对红色毛癣菌具有极强的抑制作用。

3 结论

本研究实验结果表明,HNQ和MeONQ标准品对红色毛癣菌具有较强的体外抑制作用。凤仙花粗提物的不同极性部位中HNQ和MeONQ含量与其体外抑菌活性呈显著的正相关性^[9],石油醚部位为凤仙花具有抗真菌活性的有效部位,HNQ和MeONQ是凤仙花体外抗红色毛癣菌的主要活性成分。参照阳性对照药硝酸咪康唑的抑菌活性,发现凤仙花中的萘醌类成分对红色毛癣菌抑菌作用很强,此外,凤仙花中的萘醌类成分含量较高,说明凤仙花具备良好的研究、开发潜能以及应用前景。

因此,本实验为进一步研究凤仙花抗真菌活性成分的分离纯化、药理药效以及新药研发奠定基础。但是,凤仙花对皮肤真菌病的治疗作用是否还与其他抑菌成分有关则需要作进一步研究、探讨^[10]。

参考文献

- Zhu HM (朱红梅), Liao WQ (廖万清). Trichophyton rubrum: relationship between susceptibilities to antifungal agents and species specificities [J]. Acad J Sec Mil Med Univ (第二军医大学学报), 2006, 27:136-139.
- Wei WG (卫凤莲), Wen H (温海), Gu JH (顾菊红), et al. Establishment of a model to compare nail plate penetration time of Trichophyton rubrum and Scopulariopsis brevicaulis [J]. Chin J Mycol (中国真菌学杂志), 2008, 3(1):8-10.
- Chen C (陈超), Sun LF (孙莲芬), Peng Y (彭艳). Experimental study of Huanglian Pikang tincture for anti-cutaneous-fungal action [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学与治疗学), 2002, 7:141-142.
- Su BL (苏卜利), Zeng R (曾容), Huang CG (黄长干), et al. Advances at the research on chemical constituents and biological activities of Impatiens balsamina L. [J]. Sci Tech of Food Ind (食品工业科技), 2012, 33:418-422.
- Yun CY (云成悦), Li XB (李潇彬), Zheng KL (郑奎玲), et al. Antioxidant activities of different polar solvent extracts from polyphenol of polygonum capitatum [J]. Sci Tech of Food Ind (食品工业科技), 2018, 39(3):61-64.

(下转第146页)