



马尾松叶低极性部位的GC-MS分析及协同氟康唑抗耐药白念珠菌活性研究

孔飞飞, 郑巍, 郭良君, 金永生

GC-MS analysis of low polarity extracts from *Pinus massoniana* Lamb. leaves and study on their synergetic activity of fluconazole against fluconazole-resistant *Candida albicans*

KONG Feifei, ZHENG Wei, GUO Liangjun, JIN Yongsheng

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202101011>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

红花五味子茎低极性化学成分的GC-MS分析

Analysis of low-polarity components from stems of *Schisandra rubriflora* (Franch). Rehd. et Wils by GC-MS.

药 学 实 践 杂 志. 2019, 37(6): 491-494 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.06.003

转录因子Cup2对白念珠菌铜离子代谢、氧化应激调控作用的初步研究

Regulation and control of transcription factor *Cup2* on Cu^{2+} metabolism and oxidative stress in *Candida albicans*

药 学 实 践 杂 志. 2017, 35(3): 224-228 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.03.008

基于D-SERS法表征两性霉素B对白色念珠菌抑制作用的研究

Research on the inhibitory effect of amphotericin B against *Candida albicans* by D-SERS

药 学 实 践 杂 志. 2019, 37(2): 156-161,169 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.02.011

吩嗪类衍生物的抗真菌活性研究

Study on the antifungal activity of phenazine derivatives

药 学 实 践 杂 志. 2021, 39(3): 249-254 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202103083

基于GC-MS技术的金钱草干预结晶肾损伤小鼠血清代谢组学研究

Metabolomics study of *Lysimachiae Herba* on mice with crystallization kidney injury by GC-MS

药 学 实 践 杂 志. 2019, 37(4): 332-336 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.04.009

表面增强拉曼光谱法快速鉴别失活白色念珠菌

Rapid identification of inactivated *C. albicans* by surface-enhanced Raman spectroscopy

药 学 实 践 杂 志. 2017, 35(5): 422-426 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.05.009



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

马尾松叶低极性部位的 GC-MS 分析及协同氟康唑抗耐药白念珠菌活性研究

孔飞飞¹, 郑巍¹, 郭良君¹, 金永生² (1. 陆军第七十二集团军医院药剂科, 浙江 湖州 313000; 2. 海军军医大学药学院有机化学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 研究马尾松叶低极性部位的主要化学成分, 以及其与氟康唑联用对氟康唑耐药白念珠菌的抗真菌活性。方法 马尾松叶经 80% 乙醇热提取后, 用石油醚萃取得到低极性部位, 运用 GC-MS 法检测其化学成分, 所测结果与标准谱库进行比对分析, 用峰面积归一法计算各个成分的相对含量。采用棋盘式微量稀释法测试低极性部位协同氟康唑对耐药白念珠菌的最小抑菌浓度(MIC₈₀)。结果 从低极性部位中检测出 30 种成分, 鉴定了 17 个化学成分; 马尾松叶 80% 乙醇提取物、低极性部位及石油醚提取物协同氟康唑对耐药白念珠菌的最小抑菌浓度(MIC₈₀)分别为 7.81 μg/ml、31.25 μg/ml、>250 μg/ml。结论 马尾松叶 80% 乙醇提取物及低极性部位具有协同氟康唑抗耐药白念珠菌活性; 马尾松叶低极性部位协同氟康唑抗耐药白念珠菌活性的有效成分可能是其中的二萜类化合物(53.99%)。

[关键词] 马尾松; 低极性部位; 气质联用; 耐药白念珠菌; 氟康唑

[中图分类号] R914 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2021)05-0399-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202101011

GC-MS analysis of low polarity extracts from *Pinus massoniana* Lamb. leaves and study on their synergetic activity of fluconazole against fluconazole-resistant *Candida albicans*

KONG Feifei¹, ZHENG Wei¹, GUO Liangjun¹, JIN Yongsheng² (1. Department of Pharmacy, The 72nd Group Army Hospital of the PLA, Huzhou 313000, China; 2. Department of Organic Chemistry, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the main chemical constituents of the low polarity extracts from *pinus massoniana* Lamb. leaves and their synergetic activity with fluconazole against fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Methods** The *pinus massoniana* leaves were extracted with 80% ethanol, and then the extracts were extracted by petroleum ether to obtain the low polarity extracts. The chemical components were detected by GC-MS and elucidated by the comparison with the standard mass spectral data. The relative contents in percentage were calculated using the area normalization method. The minimal inhibitory concentrations (MIC₈₀) of fluconazole-resistant *Candida albicans* strains by the low polarity extracts in combination with fluconazole were determined by checkerboard microdilution assay. **Results** 30 components were detected from the low polarity extracts, and 17 components were identified. The minimum inhibitory concentration (MIC₈₀) of the 80% ethanol extracts, the low polarity extracts and the petroleum ether extracts from the *pinus massoniana* leaves combined with fluconazole against fluconazole-resistant *Candida albicans* were 7.81 μg/ml, 31.25 μg/ml and >250 μg/ml, respectively. **Conclusion** The 80% ethanol extracts of *pinus massoniana* leaves and its low polarity extracts have synergistic activity combined with fluconazole on fluconazole-resistant *Candida albicans*. The diterpenoids (53.99%) may be the effective components of the low polarity extracts.

[Key words] *Pinus massoniana* Lamb.; low polarity extracts; GC-MS; fluconazole-resistant *Candida albicans*; fluconazole

松科 (Pinaceae) 植物马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb.) 主要产于江苏、安徽、河南、陕西及长江中

下游各省区, 资源丰富^[1]。松叶“味苦, 温; 暖, 无毒”, 具有祛风燥湿、杀虫、止痒之功用。水煎、浸酒以外用或内服^[2]用于治风湿痿痹、跌打损伤、湿疮、疥癣、慢性气管炎等症以及预防感冒、流脑。文献报道马尾松叶中的主要化学成分为挥发油、黄酮、多糖、木脂素和树脂等, 现代药理研究表明马尾松叶提取物具有抗氧化、抗衰老、抑菌等多方面活性^[3-15]。

[基金项目] 浙江省湖州市公益性技术应用研究(No. 2018GY17)

[作者简介] 孔飞飞, 学士, 副主任中药师, 研究方向: 医院药学, Email: xslw2021@163.com

[通信作者] 郭良君, 硕士, 主任药师, 研究方向: 医院药学, Email: glj2021088@163.com; 金永生, 博士, 副教授, 研究方向: 药物化学, Email: ysjnsmmu@163.com

近年来由于抗生素的滥用、器官移植、免疫抑制剂以及 HIV 患者的增多,深部真菌感染发病率逐年上升,其中白念珠菌是最主要的致病菌。氮唑类药物氟康唑是临床上首选的抗白念珠菌(*Candida albicans*)感染药物。但是长期和重复给药导致白念珠菌对氟康唑耐药越来越强。目前联合用药是恢复耐药真菌对治疗药物的敏感度,提高耐药菌对氟康唑的敏感性,治疗深部耐药菌感染的一种有效的治疗途径。从天然活性成分中寻找与现有的抗真菌药物联合发挥协同作用的小分子化合物是近年来的研究方向之一^[16-20]。本文选用接近“传统水煎或浸酒法”的传统中药提取方法,用乙醇加热提取后,石油醚再萃取的方法得到马尾松叶低极性部位,通过测定马尾松叶低极性部位协同氟康唑抗耐药白念珠菌的 MIC₈₀ 值,同时,采用气相色谱-质谱的方法对低极性部位的化学成分进行分析鉴定,初步探究其联合氟康唑的体外抗真菌活性。

1 材料

1.1 试剂与设备

Thermo Trace GC Ultra 气相色谱、Thermo DSQ II 质谱、Xcalibur 工作站(美国赛默飞世尔公司);马尾松叶(浙江东阳市,经海军军医大学黄宝康教授鉴定为马尾松 *Pinus massoniana* Lamb.);所有试剂均为分析纯;水为重蒸水;载气为高纯氦气。

氟康唑注射液(上海信谊金朱药业有限公司);黄芩素(上海历鼎生物技术有限公司);二甲基亚砜(DMSO,中国医药集团上海化学试剂公司);白念珠菌 103(*Candida albicans* 103,海军军医大学长海医院真菌室提供)。

1.2 马尾松叶低极性部位的制备

取干燥马尾松叶,粉碎,称取二份,每份 50.0 g,分别用 150 ml 石油醚和 80% 乙醇加热回流提取 1h,滤过;滤渣再分别用 150 ml 石油醚和 80% 乙醇加热回流提取 1 h,滤过。分别合并两次滤液,滤液用旋转蒸发仪减压浓缩,回收溶剂,得石油醚提取物(简称醚提取物)2.5 g 和 80% 乙醇提取物(简称醇提取物)8.0 g。取干燥后的醇提取物 5.0 g,加入水 100 ml 混溶,获得混悬液。混悬液用 50 ml 石油醚萃取 3 次,合并浓缩石油醚萃取液,获得石油醚浸膏(简称醚浸膏)即马尾松叶低极性部位 0.8 g。取 125 mg 醚浸膏,置于 100 ml 量瓶中,加入 80% 甲醇,超声、加热使其几近完全溶解,放置、冷却;再加入 80% 甲醇定容,摇匀、放置;吸取 1 ml 定容后的浸膏液,微孔滤膜过滤后待测。

1.3 色谱-质谱条件

色谱柱 TR-35MS 石英毛细管(30 m×0.25 mm, 0.25 μm),程序升温,起始温度 40 °C,保持 2 min 后以 10 °C/min 的速度升至 300 °C 并保持 5 min;汽化温度 250 °C,进样量 1 μl;分流比 10:1。载气为高纯氦气,流速 1.0 ml/min。离子源:EI 源;离子源温度为 250 °C;电子能量:70 eV;扫描范围:50~650 m/z。

2 方法

2.1 抑菌实验方法

菌株选用临床分离耐药菌株白念珠菌 103(氟康唑的 MIC₈₀>128.0 μg/ml)。采用美国临床和实验室标准协会(CLSI)提出的 RPMI1640 培养基微量稀释法,取无菌 96 孔板,于每排 1 号孔加 RPMI1640 液体培养基 100 μl 作空白对照;3~12 号孔各加新鲜配制的菌液 100 μl,菌液浓度范围为(1~5)×10³cfu/ml;2 号孔分别加菌液 160 μl 和受试药物溶液 40 μl;12 号孔不含药物,只加菌液 100 μl 作阳性生长对照。2~11 号孔进行倍比稀释,使各孔的最终药物(醚提取物、醇提取物和醚浸膏)浓度分别为 250.0、125.0、62.5、31.25、15.63、7.81、3.91、1.95、0.98 和 0.49 μg/ml,对照品黄芩素浓度分别为 128.0、64.0、32.0、16.0、8.0、4.0、2.0、1.0、0.5 和 0.25 μg/ml,各孔中 DMSO 含量均低于 1%,氟康唑溶液的终浓度为 8.0 μg/ml。96 孔板于 30 °C 恒温培养箱培养 24 h 后取出,读取受试药物与氟康唑(8.0 μg/ml)联用时的 MIC₈₀ 值。微量稀释法测试结果见表 1。

表 1 马尾松叶 3 种提取物与氟康唑联用对体外白念珠菌 103 活性(MIC₈₀)试验结果

化合物	MIC ₈₀		联合抑菌浓度 分数指数 (FICI)	联合作用
	单用 (μg/ml)	与氟康唑联用 (μg/ml)*		
醚提取物	>250.0	>250.0	1.031	无关
醇提取物	>250.0	7.81	0.047	协同
醚浸膏	>250.0	31.25	0.094	协同
黄芩素	16.0	4.0	0.281	协同
氟康唑	>128.0	-	-	-

*与 8 μg/ml 氟康唑联合使用

协同药效的判定采用联合抑菌浓度分数指数(FICI),即联用抑菌时每种药物所需最低抑菌浓度(MIC)与单用这种药物抑菌时所需 MIC 的比值的和。当 FICI≤0.5 时,两种药物的相互作用效果被

定义为具有协同作用;当 FICI>0.5 时,认为两种药物无相互作用。

2.2 色谱-质谱分析方法

按“1.3”项下实验条件对马尾松叶低极性部位进行分析,25 min 得到马尾松叶低极性化学成分的总离子流图(图 1)。共检测出 30 个峰,通过检索 NIST08 光谱数据库,按 60% 以上匹配率(SI 和 RSI 均大于 600,最大值 1 000),并结合质谱裂解规律确定其化学成分。运用峰面积归一法通过 Xcalibur 化学工作站数据处理系统,测得各个化学成分在石油醚部位中的质量百分数。

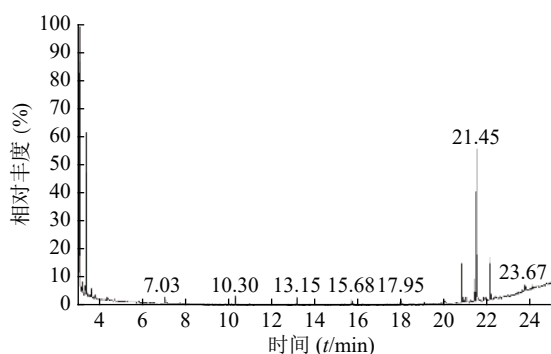


图 1 马尾松叶低极性化学成分总离子流图

3 结果与分析

由表 1 可见,各受试药物单用时,对照品黄芩

素的 MIC₈₀ 为 16.0 μg/ml,提示了其具有一定的抗菌活性,其他的化合物的 MIC₈₀ 均大于 250 μg/ml。各受试药物与氟康唑(8.0 μg/ml)联用后,对照品黄芩素、醇提取物及醚浸膏的 MIC₈₀ 降至 4.0~31.25 μg/ml,相应的 FICI 值均小于 0.5,显示黄芩素、醇提取物、醚浸膏分别与氟康唑联用对耐药白念珠菌均具有协同活性,但醇提取物和醚浸膏的协同活性不及对照品黄芩素,醚浸膏协同活性小于醇提取物。醚提取物单用及与氟康唑联用的 MIC₈₀ 均大于 250 μg/ml, FICI 大于 0.5,显示其单用及与氟康唑联用均没有协同氟康唑抗耐药白念珠菌活性。

如表 2 所示,本次 GC-MS 检测出 30 种成分,鉴定出 17 个化合物。统计出本次所测马尾松叶的低极性化学成分中含有烷烃 4 个(6.1%),甾烷类 5 个(4%),脂肪酸 1 个(0.75%),二萜 5 个(53.99%),其他峰均提示为聚硅氧烷(35.16%),其中含量较高的化学成分是:玛瑙酸(8.38%,见图 2)、脱氢枞酸甲酯(8.41%,见图 3)。

4 讨论

近年来研究发现马尾松叶提取物具有抗真菌活性:马尾松叶石油醚、氯仿等溶剂的提取物以及不同比例的乙醇水提取物可以抑制曲霉、青霉、啤酒酵母的生长;马尾松叶乙醇提取物对枯萎病、灰

表 2 马尾松叶低极性化学成分分析结果

序号	保留时间(min)	相似度SI值	相似度RSI值	化合物	含量(%)
1	10.30	821	850	正十五烷	1.52
2	13.15	797	840	2,6,11,15-四甲基-十六烷	2.23
3	15.68	781	822	2,6,10-三甲基-十四烷	1.37
4	17.95	709	727	3-乙基-5-(2-乙基丁基)-十八烷	0.98
5	19.03	661	770	泪柏醚	0.68
6	19.96	641	684	1-单烯丙基甘油三甲基硅醚	0.75
7	20.00	639	670	3,3-亚乙基二氧基-5β-胆甾烷	1.00
8	20.78	688	700	玛瑙酸/贝壳杉萜甲酸	8.38
9	20.88	621	690	N-[24-氧代-3α-(三甲基硅氧基)-5β-胆安-24-基]甘氨酸甲酯	0.51
10	20.96	636	739	24, 25-二羟基维生素D3 / 24R, 25-二羟基胆钙化醇	1.11
11	21.16	609	633	17-乙酰氧基-4,4,10,13-四甲基-7-氧代-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氢-1H-环戊烷(a)菲-3-基,乙酸	0.61
12	21.38	777	915	隐青霉酸甲酯 / 山萆苣碱酸甲酯 / 海松酸甲酯	4.62
13	21.45	626	636	3-羟基-2,5,5,8a-四甲基-1,4,4a,5,6,7,8,8a-八氢萘-1-羧酸, 2-三甲基硅乙基酯	31.90
14	21.79	645	662	3,11,18-三乙酰氧基-3,19:14,15-二环氧孕烷-20-酮	0.77
15	21.87	625	765	1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-十六甲基八硅氧烷	1.50
16	22.09	841	889	脱氢枞酸甲酯	8.41
17	22.29	676	788	1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-十四甲基七硅氧烷	1.30

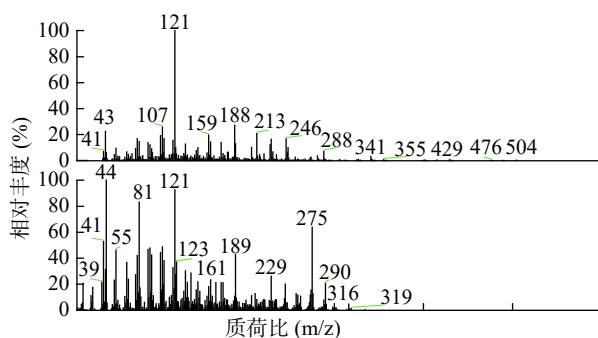


图2 玛瑙酸/贝壳杉萜甲酸

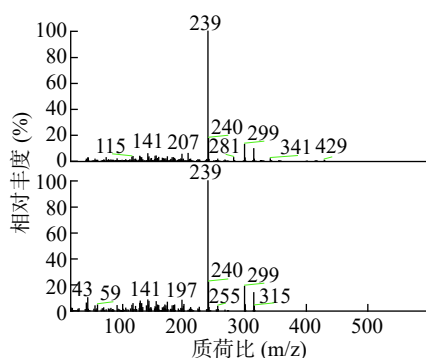


图3 脱氢枞酸甲酯

霉菌有显著的抑菌活性;马尾松叶水提取物对白色念珠菌有较弱抑菌性^[21-25]。但马尾松叶提取物对氟康唑耐药白念珠菌的协同抗菌活性未见报道。

本研究发现,马尾松叶的醇提取物和醚浸膏单独使用时均不及黄芩素,没有抗耐药白念珠菌活性,但联用氟康唑(8 μg/ml)后,醇提取物和醚浸膏均表现出协同活性,醇提取物的活性更好,而醚提取物无论是单独使用还是联用氟康唑都没有抗耐药白念珠菌活性。醚浸膏与醚提取物相比,提取方法的改变,导致了提取物抑菌效果的有无。醚浸膏的活性应该源于乙醇加热提取获得的更丰富、含量更高的化学成分,尽管醚浸膏的主要成分也是低极性成分,但与醚提取物相比无论在含量和组成上均应不同。醚提取物含有更丰富的挥发油等低极性成分,但是可能缺少了一些重要的活性抗真菌成分,导致其没有协同抗耐药真菌作用。我们进一步对活性部位醚浸膏进行了GC-MS化学成分分析,结果表明,其化学成分与文献报道的采用水蒸气和超临界CO₂提取法获得的马尾松叶挥发油成分相比差异大。活性部位醚浸膏中化合物结构类型和数量比文献报道的直接提取的挥发油少,且没有以萜烯、蒽烯为主的单萜和以石竹烯等为主的倍半萜,仅有烷烃类少量化合物重合^[26-31]。活性部位醚浸膏采用了乙醇加热提取后,再经石油醚萃取得到,加热提取可能导致了萜烯、蒽烯、石竹烯等低

沸点萜类化合物的丢失,但分子量更大的二萜类化学成分含量升高(53.99%)。二萜类化学成分中脱氢枞酸甲酯、海松酸甲酯是主要化学成分,两者也是松香酸的主要成分。有文献报道松香酸具有抗赤霉菌、灰霉菌等多种抗真菌活性^[32-35]。因此,醚浸膏中的二萜类化合物可能是其协同氟康唑抗耐药白念珠菌作用的重要活性成分,值得进一步研究。此外,Zuzana 研究发现云杉提取物中的β-谷甾醇抑制微生物生长,同时低浓度的脱氢枞酸甲酯破坏细胞壁,两者相互协同可能是云杉提取物对青霉菌、链格孢菌、米根霉的抑菌活性的关键^[36]。本研究获得的醚浸膏中也含有丰富的树脂酸(13.03%)和甾烷(4%)。树脂酸和甾烷的协同可能也是醚浸膏具有协同氟康唑抗耐药白念珠菌活性的原因,这一点也值得进一步研究。

综上所述,本文首次报道了马尾松叶乙醇提取物以及马尾松叶低极性部位具有协同氟康唑抗耐药白念珠菌作用,并首次对马尾松叶低极性部位进行了GC-MS分析,鉴别的化合物除了烷烃、脂肪酸、脱氢枞酸甲酯外其它11种成分都是首次从该植物中发现,丰富了马尾松叶的化学成分。

【参考文献】

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第七卷[M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995.
- [3] 刘东彦, 石晓峰. 药用松针的研究进展[J]. 中药材, 2012, 35(10): 1701-1705.
- [4] MITSUYOSHI YATAGAI, YONG HONG. Chemical composition of the essential oil of *Pinus massoniana* Lamb[J]. JE OR, 1997, 9(4): 485-487.
- [5] SHEN Z B, THEANDER O. Flavonoid glycosides from needles of *Pinus massoniana* [J]. *Phytochemistry*, 1985, 24(1): 155-158.
- [6] 肖靖萍, 任宇红. 松针抑菌作用的研究[J]. 食品科学, 1994, 15(2): 52.
- [7] 杨天明, 夏德超, 朱景申. 松针的研究进展[J]. *中国药师*, 2002, 5(12): 748-749.
- [8] 张万里, 乔润香, 尹飞, 等. 13种植物提取物对5种果蔬病原真菌的抑菌活性[J]. *华南农业大学学报*, 2009, 30(2): 40-43.
- [9] 赵桂芝, 寿旦, 俞忠明, 等. 松针提取物的药理学研究进展[J]. *现代医院*, 2010, 10(10): 14-16.
- [10] 周文美, 程兰香, 赵辰路, 等. 马尾松松针中莽草酸的提取工艺研究[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(11): 314-316.
- [11] 王晓梅, 张忠山, 吴酬飞, 等. 马尾松松针多酚的提取及其抗氧化活性[J]. *湖州师范学院学报*, 2018, 40(4): 30-34.
- [12] 高治平, 刘刚, 刘玉玲, 等. 马尾松松针儿茶素提取工艺研究[J]. *应用化工*, 2011, 40(3): 420-421, 424.