

- and Technical Publishers, 1997.
- [2] Song J C, Yang H, Hu C Q, *et al.* Simultaneous determination of both ferulic acid and tetra methylpyrazine in serum by reverse phase HPLC [J]. *Herald Med* (医药导报), 2004, 23 (1): 45-46.
- [3] Yan F S, Liu X D, Song X Y, *et al.* Detection of ferulic acid in blood samples by using HPLC [J]. *J Capital Inst Med* (首都医学院学报), 1991, 12 (1): 27-30.
- [4] Shang G W, Jiang Y P, Huang X, *et al.* Determination of free ferulic acid in serum of healthy volunteers after administering compound Chuanxiong Decoctions by RP-HPLC [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1997, 32 (12): 761-764.
- [5] Wen A D, Huang X, Jiang Y P, *et al.* High-performance liquid chromatographic determination of free ferulic acid in serum of rabbits with blood stasis [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1995, 30 (10): 762-767.
- [6] Zhang Z, Yan Y F, Chen K J, *et al.* Study on the pharmacokinetics of ferulic acid in Canine serum after giving an intragastrical single dose of Xiongshao Capsules to a dog [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 2001, 24 (1): 25-28.
- [7] Chang M X, Xu L Y, Tao J S, *et al.* Studies on pharmacokinetics of ferulic acid in Chuanxiong in rabbits [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1996, 31 (1): 43-45.

肉桂醛和柠檬醛对烟曲霉细胞膜中麦角甾醇生物合成的影响

谢小梅, 龙 凯, 方建茹

(江西医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004)

摘要:目的 研究肉桂醛、柠檬醛对烟曲霉中麦角甾醇生物合成的影响。方法 将烟曲霉接种在含有不同质量浓度药物的蔡氏固体培养基中, 同时设不加药物为空白对照, 置 26.5 °C 恒温培养 5 d, 刮取平皿上菌苔, 称质量、皂化、提取烟曲霉菌中的难皂化脂, 高效液相色谱法测定其中的麦角甾醇。结果 柠檬醛质量浓度为 0.11 μg/mL、肉桂醛质量浓度为 0.16 μg/mL 作用于烟曲霉后, 麦角甾醇的质量分数显著降低。结论 肉桂醛和柠檬醛影响了烟曲霉中麦角甾醇的生物合成。

关键词:肉桂醛; 柠檬醛; 烟曲霉; 麦角甾醇; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)04-0530-03

Effects of cinnamaldehyde and citral on ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* cell membrane

XIE Xiao-mei, LONG Kai, FANG Jian-ru

(Key Laboratory of Modern Preparation Chinese Materia Medica of Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of the active ingredients, cinnamaldehyde and citral, on ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* cell membrane. **Methods** Saponification and extraction of the nonsaponifiable lipids (NSLs) of *A. fumigatus* were carried out after 26.5 °C for 5 d of incubation in Cai's solid medium with varied concentrations of cinnamaldehyde and citral compared with the control group without drugs. The contents of ergosterol in NSLs were determined by HPLC. **Results** After the treatment by cinnamaldehyde (0.16 μg/mL) and citral (0.11 μg/mL), the contents of ergosterol in *A. fumigatus* cell membrane was obviously decreased. **Conclusion** Cinnamaldehyde and citral influence the ergosterol biosynthesis in *A. fumigatus* cell membrane.

Key words: cinnamaldehyde; citral; *Aspergillus fumigatus* Fres.; ergosterol; HPLC

烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* Fres. 是深部真菌感染的常见病原菌。目前, 临床上常用的抗真菌感染药物如唑类化合物、烯丙胺类等, 无一例外是通过抑制真菌的麦角甾醇生物合成来达到抑菌目的的, 但由于这些药物的不良反应、耐药性及价格昂贵等原因, 在临床上应用受到限制。中药不良反应小, 来

源广, 价格低廉, 较少出现耐药等, 因此, 抗真菌中药的研究将成为 21 世纪的中医药研究热点内容之一。本研究室实验表明中药活性成分肉桂醛和柠檬醛有良好的抗烟曲霉作用, 并对其抗真菌作用机制做了初步探讨^[1~3]。本实验采用高效液相色谱法测定了肉桂醛和柠檬醛作用烟曲霉后真菌细胞膜中麦角甾

醇的变化,以期探讨肉桂醛、柠檬醛是否通过抑制烟曲霉细胞膜中麦角甾醇的生物合成而起抗菌作用。

1 材料和方法

1.1 实验菌株:烟曲霉菌为标准株(CCCCMID A1),购自中国医学真菌中心(南京)。

1.2 仪器与试剂:Ykmm 高效液相色谱仪,美国 Gilching;肉桂醛购自上海双喜香料制剂厂,批号 20020401,质量分数 $>95\%$;柠檬醛为德国进口,批号 002489 S20085632,质量分数 $>98\%$;酮康唑 200 mg/片,批号 030418108,为西安杨森制药有限公司生产,临用前将酮康唑研成细粉并溶于二甲亚砜,使其质量浓度为 40 mg/mL;麦角甾醇对照品购自美国 Sigma 公司,用环己烷配成 1.0 mg/mL, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存;乙腈为色谱纯;皂化剂为新鲜配制的含 15% NaOH 的 90% 乙醇溶液;蔡氏培养液^[4];其他试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 菌液的制备:将试验菌株接种于蔡氏斜面, $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养至快速生长早期,活化 2 次,此时菌苔覆盖斜面,加入蔡氏液体,吸管吹打菌苔使孢子游离于培养液中,用 500 目无菌尼龙网滤过,滤液经血细胞计数板计数和紫外分光光度计测定,调整孢子浓度为 $1\times 10^6/\text{mL}$ 。

1.3.2 不同质量浓度药液的制备:参照文献报道^[1,2],于无菌、直径为 15 cm 的平皿内分别加入柠檬醛 4.55、6.11 μL ,肉桂醛 3.81、7.62 μL ,酮康唑 4.50 μL ,将冷却至 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右的蔡氏固体培养基 50 mL 迅速倒入上述平皿内,混匀(药物终质量浓度分别为:柠檬醛 0.08、0.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$;肉桂醛 0.08、0.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$;酮康唑 3.2、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$),待其凝固。

1.3.3 供试品制备:将制备的菌液接种在含有不同质量浓度药物的蔡氏固体培养基中(孢子终浓度为 $1\times 10^4/\text{mL}$),设不加药物为空白对照,置 $26.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 5 d,刮取平皿上的菌苔,称菌湿质量。各精密称取湿菌约 0.5 g,加 PBS 2.5 mL 和皂化剂 6 mL,混匀, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴皂化 60 min。加石油醚(沸程 $30\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$) 6 mL 提取 3 次,合并提取液,加水 6 mL 洗涤两次,醚层于 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴挥干,得未皂化脂(nonsaponifiable lipids, NSLs)^[5],加环己烷溶解使溶液体积为 1 mL/g 湿菌, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.4 高效液相色谱条件: C_{18} 色谱柱;流动相:乙腈-水(95:5);体积流量:1.0 mL/min;检测波长:283 nm,采用外标法按峰面积进行定量。

1.3.5 标准曲线绘制:精密称取 25 mg 麦角甾醇

对照品,用环己烷溶解制成 1.0 mg/mL 贮备液。用贮备液分别配制 0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.032 5、0.016 25 mg/mL 对照品溶液,进样 20 μL 。每个质量浓度进样 2 次。以峰面积均值为纵坐标,质量浓度为横坐标做标准曲线,进行回归处理。

1.3.6 样品测定:样品分别进样 20 μL ,每个样品进样 2 次,测定样品中麦角甾醇的质量分数。

1.3.7 统计学处理:组间差异用 t 检验。

2 结果

2.1 线性关系的确定:按本实验建立的色谱条件进样,麦角甾醇的出峰时间在 16~17 min。麦角甾醇在 0.5~0.016 25 mg/mL 线性关系良好,回归方程为 $Y=47.436\ 36\ X+0.507\ 256$, $r=0.999\ 4$ 。

2.2 肉桂醛和柠檬醛对烟曲霉细胞膜中麦角甾醇的影响,以酮康唑为阳性对照,测定了肉桂醛、柠檬醛作用烟曲霉后麦角甾醇的变化。结果见表 1。可见,柠檬醛较高质量浓度 0.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、肉桂醛较高质量浓度 0.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用于烟曲霉后,麦角甾醇质量分数较相应未用药组降低($P<0.01$)。

表 1 用药前后烟曲霉中麦角甾醇的比较 ($n=3$)

Table 1 Comparision of ergosterol content in *A. fumigatus* between pre- and post-administration of drugs ($n=3$)

药 物	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	麦角甾醇/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$
柠檬醛	对照	3.502 ± 0.17
	0.11	$1.51\pm 0.074^*$
	0.08	3.51 ± 0.64
肉桂醛	对照	3.10 ± 0.17
	0.16	$1.5\pm 0.03^*$
	0.08	3.17 ± 0.23
酮康唑	对照	10.74 ± 0.04
	40	$4.02\pm 0.01^*$

与相应对照组比较; * $P<0.01$

* $P<0.01$ vs control group

3 讨论

肉桂醛、柠檬醛是肉桂、山苍子的主要成分,两者已分别用于化工、食品、粮食防腐、医疗卫生。实验表明,两者有良好的广谱抗真菌作用^[6,7],特别是高效的抗烟曲霉作用,但对它们的抗烟曲霉作用机制研究极少。

麦角甾醇是真菌细胞质膜的重要组成成分,它是一种准平面体分子,通过与磷脂结合稳定磷脂相,从而增加膜的稳定性。麦角甾醇的缺乏,必将引起真菌细胞膜功能异常,甚至发生细胞破裂。目前临床最常用的抗真菌药物主要有两性霉素 B、氟康唑、酮康唑、伊曲康唑和特比萘芬^[8],它们都是针对真菌细胞膜上的特有脂质麦角甾醇来发挥其抗真菌作用的。其中,

除了两性霉素 B 是通过与麦角甾醇特异性结合,破坏真菌细胞膜结构,从而起到抗真菌作用外,其余都是麦角甾醇的生物合成抑制剂。这类药物虽然作用于麦角甾醇生物合成过程中的不同环节,但最终都能使真菌中的麦角甾醇的质量分数下降。

用于检测细胞膜中麦角甾醇的方法有薄层色谱法、高效液相色谱法等^[9]。反相高效液相色谱分析法具有分析速度快、分离效能高、自动化程度好的特点而被广泛使用。本实验以酮康唑为阳性对照,采用反相液相色谱法测定了肉桂醛、柠檬醛作用烟曲霉后细胞膜中麦角甾醇的变化。实验中发现,一定浓度的药物作用后烟曲霉细胞膜中麦角甾醇较阴性对照组减少,随着药物浓度的增加,麦角甾醇也随之减少。表明药物影响了细胞膜中麦角甾醇的生物合成,从而抑制了烟曲霉的生长繁殖。至于药物抑制了麦角甾醇生物合成的哪一个环节或多个环节,还有待进一步研究。通过测定真菌中麦角甾醇,有助于探讨抗真菌药物的作用机制,为中药活性成分的体外抗真菌作用研究提供了新方法。

References:

- [1] Xie X M, Xu Y, Fu Y Y. *In vitro* anti-*Aspergilli* activity study of active ingredients of Chinese herbs by broth micro-

dilution testing [J]. *Microbiology* (微生物学通报), 2003, (6): 112-115.

- [2] Xie X M, Xu Y, Fang J R. Effects of cinnamaldehyde and citral on DNA and RNA in *Aspergillus flavus* and *A. fumigatus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36 (4): 558-560.
- [3] Xie X M, Zhang W P, Fu Y Y, et al. Study on antifungal mechanism of cinnamaldehyde and citral in *Aspergilli* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35 (4): 430-432.
- [4] Chen S P. *Fungal Infection* (真菌感染学) [M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press, 2000.
- [5] Liu H T, Gao P H, Cao Y B, et al. Inhibitory effect of fluconazole on sterol biosynthesis in *Candida albicans* studied by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2002, 16 (5): 368-371.
- [6] Zhang W J. Study on effect of cinnamaldehyde against opportunistic fungi [J]. *J Clin Dermatol* (临床皮肤科杂志), 1995 (4): 219-220.
- [7] Zhou Y, Tao J D, Zhang J J. Study on antifungal role by *Litsea Cubeba* and its primary component—the citral [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1984, 4 (9): 558-559.
- [8] Ji H, Zhang W, Zhou Y, et al. A three dimensional model of lanosterol 14 α demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals [J]. *J Med Chem*, 2000, 43 (13): 2493-2505.
- [9] Cao Y B, Jiang Y Y, Yin M, et al. Effect of fluconazole on ergosterol biosynthesis in fungi by TLC [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 1999, 20 (5): 312-315.

正交试验法优选酸枣仁中白桦脂酸的提取工艺

赖 玲, 杨 昕, 杨 光, 吴孔弦

(华中科技大学同济医学院药学院 分析测试中心, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 优化酸枣仁中白桦脂酸的提取工艺。方法 以白桦脂酸和干浸膏得率为检测指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,考察乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间和提取次数 4 个影响因素,采用高效液相色谱法进行白桦脂酸测定。结果 乙醇体积分数对提取物中白桦脂酸有显著影响,其他因素影响不显著,最佳提取工艺条件为 3 倍量 95% 乙醇热回流 3 次,每次 2 h。结论 优选得到的工艺稳定、方法可行。

关键词:酸枣仁;白桦脂酸;正交试验;高效液相色谱

中图分类号:R284.2; R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2006)04-0532-03

Orthogonal test for optimizing extraction technique of betulinic acid in *Semen Ziziphi Spinosae*

LAI Ling, YANG Xin, YANG Guang, WU Kong-xian

(Tongji Pharmaceutical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Key words: *Semen Ziziphi Spinosae*; betulinic acid; orthogonal test; HPLC

收稿日期:2005-06-29

基金项目:华中科技大学同济医学院科学研究基金资助(01514709)

作者简介:赖 玲(1980—),女,广西桂林,在读硕士,主研方向为中药新剂型。

Tel: (027) 8365817 E-mail: victoryD773@yahoo.com.cn