

头花蓼提取物中具抗淋球菌作用的有效部位研究

张丽艳¹, 刘昌孝^{2*}, 唐靖雯⁴, 许海玉³, 周英¹, 罗君¹, 周雯¹

1. 贵阳中医学院药学院, 贵州 贵阳 550002

2. 天津药物研究院 新药评价中心 现代中药研究中心, 天津 300193

3. 中国中医科学院 中药资源中心 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700

4. 贵州威门药业股份有限公司, 贵州 贵阳 550004

摘要: **目的** 分析头花蓼提取物中具有抗淋球菌活性有效部位的成分。**方法** 采用药敏纸片法检测头花蓼提取物的不同部位对淋球菌的抑菌活性。并采用 UPLC-TOF-MS 对头花蓼提取物中具有抗淋球菌作用的有效部位进行鉴别。**结果** 头花蓼提取物经特定的大孔树脂洗脱所获得的洗脱物中, 35%甲醇洗脱物(部位 F3)中含有可水解鞣质(三没食子酰葡萄糖), 该部位具有良好的抗淋球菌作用。F2、F4~6 有微弱的抑菌作用, 而其他部位无抑菌作用。**结论** 头花蓼提取物的 35%甲醇洗脱物具有良好的抗淋球菌作用, 其主要成分为三没食子酰葡萄糖, 可能为头花蓼抗淋球菌物质基础。

关键词: 头花蓼; 提取物; 有效部位; 淋球菌; 超高效液相色谱-飞行时间质谱

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)02-0436-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.02.024

Study on effective sites of anti-gonococcus in *Polygonum capitatum* extract

ZHANG Li-yan¹, LIU Chang-xiao^{2*}, TANG Jing-wen⁴, XU Hai-yu³, ZHOU Ying¹, LUO Jun¹, ZHOU Wen¹

1. School of Pharmacy, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China

2. Modern Chinese Medicine Research Center, New Drug Evaluation Center, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

4. Guizhou Weimen Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550004, China

Abstract: Objective To analyze the components of active anti-gonococcal fractions in the extracts of *Polygonum capitatum*.

Methods Drug sensitive paper method and *Neisseria gonorrhoeae* culture method were used to detect the antibacterial activity of different parts of the flower bud extract against *Neisseria gonorrhoeae*. UPLC-TOF-MS was used to identify the effective parts of the flower bud extract with anti-gonococcal effect. **Results** As a result, in the eluate obtained by extracting with a specific macroporous resin, the hydrolysable tannin was contained in the methanol (35%) eluate (fraction F3), such as trigalloyl glucose. This fraction had a good anti-gonococcal effect. The fractions of F2 and F4—6 had a weak antibacterial effect, while other fractions have no antibacterial effect. **Conclusion** This study provides a basis for the use of trigalloyl glucose in the preparation of anti-gonococcal drugs, and lays a foundation for the development of a clinical drug of *P. capitatum* extracts against *Neisseria gonorrhoeae*.

Key words: *Polygonum capitatum* Buch.-Ham. ex D. Don Prodr; extracts; effective fractions; *Neisseria gonorrhoeae*; ultra performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry

头花蓼为蓼科植物头花蓼 *Polygonum capitatum* Buch.-Ham. ex D. Don Prodr 的干燥全草或地上部分, 具有清热利湿、解毒止痛、活血散瘀以及利尿通淋之功效, 主治泌尿系统感染、血尿、湿疹、肾

收稿日期: 2018-07-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81260640); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2014ZX09301307-017); 贵州省国内一流建设学科(中药学)(GNYL[2017]008号)

作者简介: 张丽艳, 教授, 硕士生导师, 从事中药质量控制与新药研究。Tel: 13984870641 E-mail: zly1964@163.com

*通信作者 刘昌孝, 中国工程院院士, 研究方向药动学及质量标志物。E-mail: liuchangxiao@163.com

孟肾炎等症^[1], 收载于《贵州省中药材、民族药材质量标准》2003 年版, 是贵州常用苗药。长期临床应用表明, 头花蓼在治疗泌尿系统感染方面具有显著疗效。近年来对头花蓼的研究多为化学成分^[2-4]、不同采收期^[5-6]、药材品质^[7-8]等方面, 据报道头花蓼提取物可用于抗菌^[9]、抗炎^[10-12]、镇痛^[13]、利尿、治疗泌尿系统结石、治疗肾孟肾炎以及前列腺炎^[14]。淋球菌(淋病奈瑟菌)属于人体病原菌, 只感染人类, 常因非正常接触(主要是性接触)而引起泌尿生殖系统化脓性感染。尽管目前有诸多关于制备头花蓼提取物的报道, 然而在抗淋球菌作用方面研究较少。该研究通过头花蓼不同部位提取物对淋球菌的抗菌实验, 为临床治疗淋球菌感染的泌尿生殖系统化脓性感染提供依据和指导。

本研究通过对头花蓼提取物用水及 10%~100%甲醇进行梯度洗脱, 采用药敏纸片法^[15]对其有效部位进行抗淋球菌实验, 并采用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间高分辨质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)对头花蓼具有抗淋球菌作用的有效部位进行分析鉴定, 以探索头花蓼抑菌作用的药效物质基础, 并为开发临床有效产品提供参考。

1 材料

1.1 仪器

超高效液相色谱-飞行时间质谱联用仪[美国 Waters 公司 Acquity 超高效液相色谱系统、高压二元梯度泵、恒温自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、电喷雾接口、四极杆飞行时间质谱仪(Q-TOF-MS, Bruker 公司)、Hystar 工作站; 美国 Agilent 公司 1290 Infinity 液相色谱系统、6550 iFunnel 四极杆飞行时间质谱仪、MassHunter 工作站]; 大孔树脂 MCI(日本三菱公司生产的 MCIGEL 系列); TGL-16G 离心机(上海安亭科学仪器厂); 100 Hz 超声处理器(北京创新德超电子研究所)。

1.2 药材与试剂

头花蓼药材由贵州威门药业股份有限公司贵州施秉头花蓼 GAP 种植基地提供, 由贵阳中医学院魏升华教授鉴定为蓼科植物头花蓼 *Polygonum capitatum* Buch.-Ham. ex D. Don Prodr 的干燥全草; 甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯(ACS 公司); MilliQ 水由 Millipak-20 Filter Unit 处理; 其他试剂均为分析纯; 药敏纸片(北京天坛生物制品所); 四环素片(Tet, 批号 150504, 广东华南药业集团有限公司); 医用生理盐水和巧克力平板均为自制。

1.3 菌株

淋球菌株 *Neisseria gonorrhoeae* 由广东省皮肤性病防治中心性病实验室提供。

2 方法

2.1 头花蓼提取物及有效部位的制备

2.1.1 头花蓼提取物的制备 将头花蓼地上部分鲜品或干品加 5~15 倍量的 50%~90%乙醇回流提取 1~3 次, 滤过, 滤液浓缩、干燥, 得醇浸膏, 取醇浸膏混悬于甲醇中, 超声处理 0.5~5 h, 离心, 将上清液加载到 MCI 大孔树脂柱上; 分别用水及 10%~100%甲醇依次进行梯度洗脱, 收集各部分洗脱液, 回收溶剂, 由不同溶剂洗脱获得的部位干燥, 得到的甲醇洗脱物混合物, 即为头花蓼提取物。

2.1.2 头花蓼有效部位的制备 “2.1.1”项下头花蓼提取物用水及 10%~100%甲醇依次进行梯度洗脱所收集各部分洗脱液, 经回收溶剂处理后得到的不同溶剂洗脱获得的部位, 干燥。其中 10%~20%甲醇洗脱物为部位 F1; 30%甲醇洗脱物为部位 F2; 35%甲醇洗脱物为部位 F3; 40%甲醇洗脱物为部位 F4; 45%甲醇洗脱物为部位 F5; 50%甲醇洗脱物为部位 F6; 55%甲醇洗脱物为部位 F7; 60%~75%甲醇洗脱物为部位 F8; 80%~100%甲醇洗脱物为部位 F9。其中 F1~F5 用去离子水(DW)溶解, F6~F9 用 50%乙醇溶解, 质量浓度均为 40 mg/mL。

2.2 抗淋球菌实验

淋球菌用生理盐水配成 0.5 麦氏浊度(A_{625} 值在 0.08~0.10)的菌悬液, 无菌棉签浸取菌悬液均匀涂布巧克力平板, 用无菌镊子将直径约 6 mm 的药敏纸片贴于平板表面, 每个纸片上分别加入 F1~F9 各样品、DW、50%乙醇、Tet (10 mg/mL)。第 1 次抑菌实验点样量分为 10、3、1 μ L。第 2 次与第 3 次抑菌实验只重复点样量 10、3 μ L, 然后平皿置 37 $^{\circ}$ C, 5%~10%二氧化碳培养箱中孵育 18~24 h, 量取抑菌环直径^[15], 3 次实验结果求平均值。

2.3 头花蓼抗淋球菌有效部位 UPLC-TOF-MS 分析

2.3.1 供试液配制 称取适量“2.1.2”项下制备的头花蓼 F3 部位粉末, 加入 70%甲醇制成 5 mg/mL 的混悬液, 超声溶解, 混悬液稀释 10 倍, 滤过, 即得。

2.3.2 色谱条件 色谱柱为 Acquity BEH C_{18} 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m), 以 0.1%甲酸水溶液为流动相 A, 0.1%甲酸乙腈溶液为流动相 B, 梯度洗脱: 0~0.5 min, 5% B; 0.5~20 min, 5%~18.5% B; 20~28 min, 18.5~100% B; 28~30 min, 100%

B; 30~30.1 min, 100%~5% B; 30.1~32 min, 5% B; 柱温 40 °C; 体积流量 0.35 mL/min; 进样量 2 μ L。

2.3.3 质谱条件 利用 Bruker Q-TOF 采集一级质谱数据, ESI 离子源, 离子源温度 180 °C, 毛细管电压 4 500 eV; 负离子检测模式; 喷雾压力 250 kPa (2.5 bar); 干燥氮气体积流量 8.0 L/min; 扫描范围 m/z 100~2 000。利用 Agilent Q-TOF 采集二级质谱数据, ESI 离子源, 离子源温度 250 °C, 干燥氮气体积流量 13 L/min, 鞘气(氮气)温度 300 °C, 鞘气体积流量 11 L/min; 负离子检测模式; 扫描范围 m/z 100~2 000, 碰撞能量 10~40 eV。

2.3.4 有效部位的成分确认 通过检索数据库

Dictionary of Natural Products 中头花蓼的化学成分以及关于头花蓼化学成分研究的相关报道^[16-18], 再根据一级质谱所提供的精确相对分子质量、同位素丰度和同位素间距等信息与数据库中的化学成分进行匹配, 并进一步利用二级质谱数据, 根据所得的碎片信息来对各色谱峰进行鉴定。

3 结果

3.1 抗淋球菌实验结果

3.1.1 第1次实验结果 如图1所示, 部位 F3 的抑菌圈直径明显大于其他样品或空白溶剂(DW 或 50%乙醇溶液)的抑菌圈直径。第2次抑菌实验结果见图2。

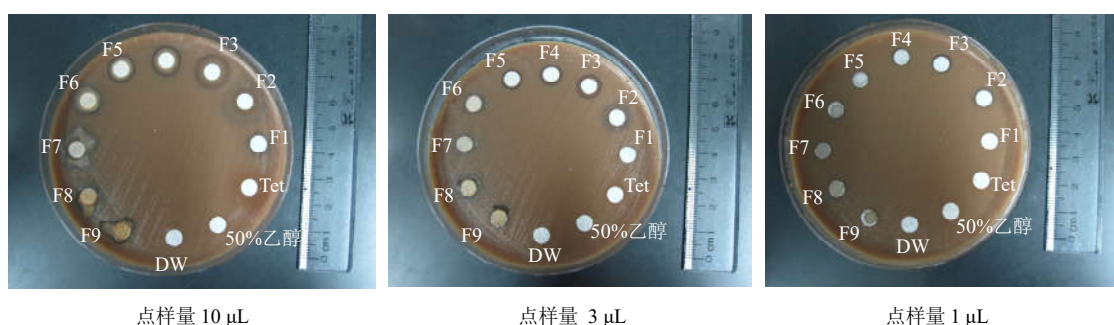


图1 第1次抑菌实验结果

Fig. 1 Results of first bacteriostatic experiment

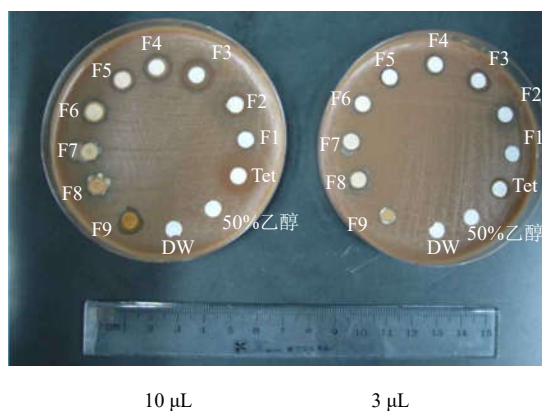


图2 第2次抑菌实验结果

Fig. 2 Results of second bacteriostatic experiment

3.1.2 抑菌圈直径结果 抑菌圈直径 6 mm 即为与纸片直径相同, 无抑菌作用; 抑菌圈直径越大, 抑菌作用越强。在加样量为 10 μ L 时, F3 (400 μ g) 有良好的抑菌作用, F2、F4~F6 有微弱的抑菌作用, 而其他部位无抑菌作用。在上样量 3 μ L 时, F3 (120 μ g) 有一定的抑菌作用, 其他部位无抑菌作用。见表1。

3.2 头花蓼抗淋球菌有效部位 UPLC-TOF-MS 分析结果

结果显示在保留时间约 3.9 min 处和保留时间约 5.3 min 处显示可水解鞣质(三没食子酰葡萄糖)的色谱峰, 见图3和表2。

4 讨论

头花蓼醇提取物经大孔树脂洗脱所获得的洗脱物中, 35%甲醇洗脱物(部位 F3)具有与四环素相当的抑菌效果。该有效部位具有良好抗淋球菌作用, 其他各部位的抑菌效果弱。甚至抑菌(淋球菌)作用阴性, 例如部位 F1、F7、F8、F9。通过进一步的 UPLC-TOF-MS 分析, 可知该部位有效成分主要为可水解鞣质(三没食子酰葡萄糖), 可水解鞣质(三没食子酰葡萄糖)是头花蓼中抗淋球菌作用的主要活性物质。

据报道, 淋球菌的唯一宿主是人类。因为社会的因素, 淋病在人与人之间近年来的传播与流行呈上升趋势, 导致很难控制, 若治疗不够彻底, 就会扩散到人的生殖系统。胎儿也会经患该病母亲的产道感染进而造成新生儿的淋病性急性结膜炎。人类

表 1 不同部位 (F2~F6) 抑菌圈直径结果

Table 1 Results of diameter of bacteriostasis circle in different parts (F2—F6)

样品	第 1 次实验抑菌圈直径/mm			第 2 次实验抑菌圈直径/mm		第 3 次实验抑菌圈直径/mm	
	10 μ L	3 μ L	1 μ L	10 μ L	3 μ L	10 μ L	3 μ L
F2	9	6	6	9	6	9	6
F3	13	9	6	13	10	13	10
F4	10	7	6	10	7	10	7
F5	10	7	6	9	6	10	6
F6	10	6	6	6	6	6	6
50%乙醇	7	6	6	6	6	6	6
Tet	14	8	6	14	8	14	8

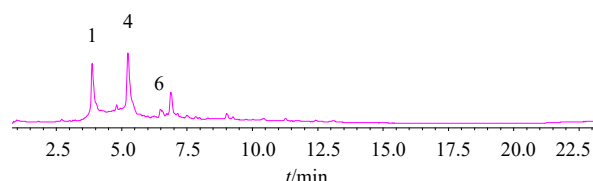


图 3 F3 部位 UPLC-TOF-MS 图谱

Fig. 3 UPLC-TOF-MS map of part F3

相对淋球菌是没有自然免疫力的, 比较容易感染, 染病后免疫力较弱, 很容易再感染^[19]。本研究通过对头花蓼醇提取物不同洗脱部位进行体外抗菌活性研究, 筛选出头花蓼提取物中 35% 甲醇洗脱物 (部位 F3) 在抗淋球菌方面具有良好的效果, 并通过 UPLC-TOF-MS 进行分析, 可水解鞣质 (三没食子酰葡萄糖) 是头花蓼中抗淋球菌作用的主要活性

表 2 头花蓼有效部位 F3 质谱分析

Table 2 Analysis of effective part F3 of *P. capitatum* by mass spectrometry

峰号	t_R /min	分子式	m/z ($[M-H]^-$)		化合物	MS/MS 碎片
			实测值	理论值		
1	3.95	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635.087 4	635.089 0	1,3,6-三没食子酸酰葡萄糖	483.077 2, 465.066 5, 313.056 3, 169.014 5
4	5.05	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635.088 2	635.089 0	1,3,6-三没食子酸酰葡萄糖	483.079 8, 313.061 4, 169.014 6, 125.025 6

物质。头花蓼抑菌作用已有大量报道^[20-21], 然而头花蓼药材提取物中其他洗脱分离部位的生物活性及其抑菌机制有待深入研究。后续将进行该有效部位的抑菌机制研究, 为头花蓼药材更好地应用于临床治疗淋病提供研究基础。

参考文献

[1] 贵州省中药材、民族药材质量标准 [S]. 2003.
 [2] 杨 阳, 蔡 飞, 杨 琦, 等. 头花蓼化学成分的研究 (I) [J]. 第二军医大学学报, 2009, 30(8): 937-940.
 [3] 李咏梅, 龚 元. 头花蓼的化学成分及药理研究进展 [J]. 贵州大学学报: 自然科学版, 2007, 24(2): 205-207.
 [4] 王洪平, 曹 芳, 杨秀伟. 头花蓼地上部分的化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 24-30.
 [5] 王祥培, 吴红梅, 王祥森, 等. 不同采收期头花蓼药材指纹图谱相似度评价 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 2980-2981.

[6] 余欣洋, 张丽艳, 谢 宇, 等. 主成分分析确定头花蓼最佳采收时间及初加工方法 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21): 90-92.
 [7] 谢 宇, 张丽丽, 徐 亮, 等. HPLC 特征图谱对 GAP 基地产头花蓼药材品质控制研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(8): 70-72.
 [8] 谢 宇, 潘雯婷, 徐 亮, 等. 头花蓼及热淋清颗粒薄层色谱特征图谱的建立 [J]. 贵州农业科学, 2014, 42(7): 31-35.
 [9] 姚元贵, 张丽艳, 谢立敏, 等. 头花蓼不同极性部位抑菌作用的谱效学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(1): 20-25.
 [10] 徐 丹. 基于中药血清药理学与血清药物化学方法的头花蓼抗炎药效物质及作用机制研究 [D]. 贵阳: 贵州医科大学, 2016.
 [11] 钱海兵, 王祥培, 孙宜春, 等. 贵州野生与栽培头花蓼的主要药效质量评价研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(7): 1597-1598.

- [12] 薛鑫宇, 刘昌孝, 周 英, 等. 基于 UPLC-MS 联用技术的头花蓼抗炎谱效关系初探 [J]. 中草药, 2018, 49(21): 5134-5141.
- [13] 刘 明, 罗春丽, 张永萍, 等. 头花蓼、飞龙掌血的镇痛抗炎及利尿作用研究 [J]. 贵州医药, 2007, 31(4): 370-371.
- [14] 颜俊青, 邢 俊, 王丹丹. 五种检测淋球菌方法的比较 [J]. 海南医学, 2012, 23(18): 84-85.
- [15] 彭碧华, 黄海花, 梁佩婵, 等. 纸片扩散法常规检测淋球菌药敏试验可靠性研究 [J]. 实用预防医学, 2011, 18(7): 1353-1355.
- [16] 陈旭冰, 刘晓宇, 陈光勇, 等. 头花蓼化学成分研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(23): 14025-14026.
- [17] 赵焕新, 白 虹, 李 巍, 等. 头花蓼化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(2): 262-266.
- [18] 李勇军, 骆宏丰, 王永林, 等. 头花蓼黄酮类化学成分的研究 [J]. 中国药学杂志, 2000, 35(5): 300-302.
- [19] 杨丙莲. 不同方法检测淋球菌的临床应用探讨 [J]. 中外医疗, 2013, 32(36): 172-173.
- [20] 胡 露, 张 锦, 蔺良才, 等. 基于谱效关系的头花蓼抑菌作用物质基础研究 [J]. 中药材, 2016, 39(9): 2037-2040.
- [21] 张 姝, 罗昭逊, 莫 非, 等. 头花蓼对幽门螺杆菌抗菌作用分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(2): 113-118.