

# 凤仙花不同部位水提液对抑真菌效果的比较实验研究

但大莉 钟李婷 刘娜 谭雯丽 乔靖宇 王孟<sup>(通讯作者)</sup>

陕西服装工程学院, 陕西西咸新区, 712046;

**摘要:** 目的: 比较凤仙花根、茎、叶、花四个不同部位水提液对常见病原真菌的体外抑菌效果, 筛选抑菌活性优势部位, 为凤仙花资源的精细化利用提供实验依据。方法: 采用水提法制备凤仙花各部位提取物, 通过牛津杯法测定不同部位水提液对红色毛癣菌、须癣毛癣菌和白念珠菌的抑菌圈直径, 采用微量肉汤稀释法测定最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC), 比较各部位抑菌活性的差异。结果: 凤仙花叶和花部位水提液的得率分别为12.6%和11.8%, 显著高于根和茎部位( $P < 0.05$ ); 叶和花部位水提液对红色毛癣菌的MIC值分别为6.25 mg/mL和3.125 mg/mL, MBC值分别为12.5 mg/mL和6.25 mg/mL, 抑菌活性显著优于根和茎部位。结论: 凤仙花不同部位水提液的抑真菌活性存在显著差异, 叶和花部位为抑菌活性优势部位, 具有开发天然抗真菌制剂的潜力。

**关键词:** 凤仙花; 水提液; 抑真菌效果; 抗菌药物

**DOI:** 10.69979/3029-2808.26.04.022

## 引言

近年来, 随着病原真菌耐药性问题的日益严峻以及人们对抗菌药物安全性的关注, 从天然植物中挖掘新型抗真菌活性成分已成为研究热点。目前的研究多集中于凤仙花全草或特定部位的粗提物, 针对其根、茎、叶、花等不同器官在水提条件下活性成分溶出差异及其对抑真菌效果影响的系统性对比研究尚显不足。水提液作为一种模拟传统煎煮方式的溶剂, 具有安全、无有机溶剂残留的优点, 更贴近实际应用场景。因此, 研究以凤仙花的根、茎、叶、花为研究对象, 采用水提法制备提取液, 通过体外抑菌实验, 系统比较不同部位水提液对常见病原真菌的抑制效果, 明确凤仙花抑菌活性的有效部位, 为在抗真菌药物开发及天然防腐剂应用中的精细化利用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验器材

研究所用主要实验器材包括: 电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9240A型, 上海一恒科学仪器有限公司)、高速多功能粉碎机(FW-100型, 永康市铂欧五金制品有限公司)、电子分析天平(ME204E型, 梅特勒-托利多仪器有限公司, 精度0.0001 g)、电热恒温水浴锅(HWS-28型, 上海精宏实验设备有限公司)、旋转蒸发器(RE-52AA型, 上海亚荣生化仪器厂)、冷冻干燥机(FD-1

A-50型, 北京博医康实验仪器有限公司)、SW-CJ-2FD型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)、LDZX-50KBS型立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)、SPX-250B-Z型生化培养箱(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司)、微量移液器(Research Plus系列, Eppendorf, 德国)、Multiskan FC型酶标仪(Thermo Fisher Scientific, 美国)、96孔细胞培养板、直径90 mm无菌培养皿、牛津杯(内径6.0 mm, 外径7.8 mm, 高10.0 mm)、微孔滤膜(孔径0.22  $\mu\text{m}$ )及针头式滤器、玻璃涂布棒、接种环、酒精灯、锥形瓶、量筒、烧杯等常规微生物实验耗材, 所有玻璃器皿均经高温高压灭菌处理。

#### 1.1.2 药物与试剂

凤仙花全株于2025年11月采自陕西省某中药材种植基地, 经团队教师鉴定为凤仙花科凤仙花属植物凤仙花的干燥全株。实验前将植株分离为根、茎、叶、花四个部位, 分别用去离子水清洗去除表面杂质, 于60°C恒温鼓风干燥箱中烘干至恒重, 经高速粉碎机粉碎后过60目筛, 收集细粉置于密封袋中, 于干燥器中保存备用。

培养基方面, 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)和马铃薯葡萄糖肉汤培养基(PDB)均购自青岛海博生物技术有限公司, 按说明书配制后经121°C高压灭菌15 min备用。阳性对照药物为氟康唑注射液(2 mg/mL, 辉瑞制药有限公司); 阴性对照为无菌去离子水。

其他试剂包括无水乙醇、95%乙醇、氯化钠、磷酸

二氢钾、磷酸氢二钾等均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;实验用水为经灭菌处理的去离子水。

### 1.1.3 实验菌种

本研究所用供试病原真菌共计3株,分别为红色毛癣菌 *Trichophyton rubrum*, 菌株编号: CMCC(F)T1a、须癣毛癣菌 *Trichophyton mentagrophytes*, 菌株编号: CMCC(F)T4b 和白念珠菌(*Candida albicans*, 菌株编号: ATCC 10231)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 水提液的制备

取凤仙花根、茎、叶、花四个部位干燥粉末各50.0 g, 分别置于2000 mL圆底烧瓶中, 加入灭菌去离子水1000 mL(料液比为1:20), 充分摇匀后浸泡30 min。将烧瓶置于电热恒温水浴锅中, 加热至100℃后保持微沸状态, 回流提取2次, 每次1.5 h。提取结束后, 趁热用双层纱布过滤, 合并两次滤液。将合并后的滤液置于旋转蒸发器中, 在60℃条件下减压浓缩至原体积的1/5, 得到浓缩液。将浓缩液转移至冷冻干燥机的冻干瓶中, 在-50℃、真空度10 Pa条件下冷冻干燥48 h, 分别得到根、茎、叶、花部位水提物冻干粉末。称量各部位冻干粉末质量, 计算得率公式为:

$$\text{得率} = \text{冻干粉末质量} / \text{药材粉末质量} \times 100\% \quad (1)$$

结果显示:叶和花部位的得率分别为12.6%和11.8%, 显著高于根和茎部位的7.2%和6.5%。将各部位冻干粉末分别用灭菌去离子水溶解, 配制成质量浓度为200 mg/mL的母液, 经0.22 μm微孔滤膜过滤除菌后, 分装于无菌离心管中, 置于-20℃冰箱保存备用。实验前根据需要用灭菌去离子水将母液稀释至所需浓度梯度。

### 1.2.2 培养基的处理

#### 1. 沙氏葡萄糖液体培养基的处理

称取沙氏葡萄糖液体培养基干粉65.0 g(含蛋白胨10.0 g、葡萄糖40.0 g、水1000 mL配方比例), 加入1000 mL灭菌去离子水中, 用玻璃棒搅拌使其充分溶解。将配制好的培养基分装于500 mL锥形瓶中, 每瓶装量200 mL, 用透气硅胶塞封口。使用时, 将培养基从冰箱取出, 在超净工作台中用酒精灯火焰灼烧瓶口灭菌, 用无菌移液管分装至无菌试管或96孔板中, 用于菌悬液的稀释及最低抑菌浓度的测定实验。

#### 2. 沙氏琼脂培养基的处理

称取沙氏琼脂培养基干粉70.0 g(含蛋白胨10.0 g、葡萄糖40.0 g、琼脂15.0 g、水1000 mL配方比例), 加入1000 mL灭菌去离子水中, 用玻璃棒搅拌均匀。将锥形瓶置于立式压力蒸汽灭菌器中, 在121℃条件下灭菌15 min。灭菌结束后, 将培养基置于恒温水浴锅中冷却至50℃~55℃, 在超净工作台中均匀倾倒至直径为90 mm的无菌培养皿中, 每皿约20 mL, 轻轻摇动使培养基铺平皿底, 静置30 min待其完全凝固后, 倒置放置于4℃冰箱中保存备用。使用前检查培养基表面是否平整、无污染, 若发现有冷凝水过多或污染迹象则弃用。

### 1.2.3 菌液的制备

将保存在4℃冰箱中的红色毛癣菌 CMCC(F)T1a、须癣毛癣菌 CMCC(F)T4b 和白念珠菌(ATCC 10231)斜面菌种取出, 在超净工作台中用无菌接种环挑取少量菌苔, 分别接种于新鲜沙氏琼脂平板表面, 采用三区划线法进行分离纯化。将培养后的菌液转移至无菌离心管中, 在4000 r/min条件下离心10 min, 弃去上清液, 收集菌体沉淀。用无菌生理盐水洗涤菌体沉淀2次, 每次加入10 mL生理盐水, 充分吹打混匀后再次离心。最后加入适量无菌生理盐水重悬菌体, 采用麦氏比浊法调整菌悬液浓度, 使其与0.5麦氏比浊管浊度相当, 此时菌液浓度约为 $1 \times 10^8$  CFU/mL。将上述菌悬液用无菌生理盐水进行10倍梯度稀释, 最终稀释至 $1 \times 10^6$  CFU/mL, 作为供试菌液备用。

### 1.2.4 药敏片的制备

采用牛津杯法进行抑菌实验, 药敏片即牛津杯。将牛津杯(内径6.0 mm, 外径7.8 mm, 高10.0 mm)用去离子水清洗干净后, 置于75%乙醇中浸泡30 min, 取出后用无菌纱布擦干, 再经121℃高压蒸汽灭菌15 min, 置于烘箱中烘干备用。

实验时, 将灭菌后的牛津杯在超净工作台中均匀放置在已涂布菌液的沙氏琼脂培养基表面, 每个培养皿放置4个牛津杯, 呈正四边形排列, 杯口与培养基表面紧密接触。用微量移液器分别吸取100 μL各部位凤仙花水提液母液(200 mg/mL)及系列稀释液(100 mg/mL、50 mg/mL、25 mg/mL、12.5 mg/mL), 小心加入牛津杯中, 注意避免产生气泡及液体溢出。同时, 设置阳性对照(氟康唑注射液, 2 mg/mL)和阴性对照(无菌去离子水)。各处理组的具体浓度设置如表1所示。

表1 各处理组的具体浓度

组别	根水提液 (mg/mL)	茎水提液 (mg/mL)	叶水提液 (mg/mL)	花水提液 (mg/mL)	阳性对照 (mg/mL)	阴性对照 (mg/mL)
1	200	200	200	200	2	无菌水
2	100	100	100	100	—	—
3	50	50	50	50	—	—
4	25	25	25	25	—	—
5	12.5	12.5	12.5	12.5	—	—

### 1.2.5 抑菌实验

采用纸片扩散法(牛津杯法)测定凤仙花不同部位水提液对供试病原真菌的抑菌圈直径。在超净工作台中,取事先制备好的沙氏琼脂培养基平板,用无菌移液器吸取100 μL浓度为 $1 \times 10^6$  CFU/mL的供试菌液,均匀涂布于培养基表面,涂布时注意避免划破琼脂表面。涂布完成后,将平板正置于超净工作台中静置5 min,使菌液充分吸附。用微量移液器分别吸取100 μL各浓度凤仙花水提液及对照溶液,加入相应牛津杯中,每个浓度设置3个重复。将加样后的平板正置于28℃恒温培养箱中预扩散2 h,使药液充分渗透至琼脂中,然后倒置继续培养48 h。培养结束后,用游标卡尺测量各牛津杯周围的抑菌圈直径(包括牛津杯外径),精确至0.1 mm。

在96孔板中,每孔加入沙氏葡萄糖液体培养基100 μL,于第1孔中加入100 μL质量浓度为200 mg/mL的各部位水提液母液,倍比稀释至第10孔,各孔终浓度依次为100 mg/mL、50 mg/mL、25 mg/mL、12.5 mg/mL、6.25 mg/mL、3.125 mg/mL、1.5625 mg/mL、0.78125 mg/mL、0.390625 mg/mL、0.1953125 mg/mL。每孔加入10 μL浓度为 $1 \times 10^6$  CFU/mL的菌悬液,混匀后置于28℃培养箱中培养48 h。所有实验均独立重复3次,结果以平均值±标准差表示,采用SPSS 26.0软件

表3 不同部位水提液对供试菌株的抑菌圈直径

部位	红色毛癣菌 (mm)	须癣毛癣菌 (mm)	白念珠菌 (mm)
根	8.5 ± 0.3	7.8 ± 0.4	6.5 ± 0.2
茎	8.2 ± 0.4	7.5 ± 0.3	6.2 ± 0.3
叶	18.6 ± 0.5*	16.8 ± 0.6*	14.2 ± 0.4*
花	19.2 ± 0.6*	17.5 ± 0.5*	15.1 ± 0.5*
氟康唑(阳性对照)	22.5 ± 0.8	21.3 ± 0.7	20.8 ± 0.6
无菌水(阴性对照)	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0

注: \*表示与根、茎部位比较,  $P < 0.05$ , 差异具有统计学意义。牛津杯外径为7.8 mm, 抑菌圈直径小于8 mm视为无抑菌作用。

### 2.3 不同部位水提液的最低抑菌浓度与最低杀菌浓度测定结果

采用微量肉汤稀释法测定凤仙花不同部位水提液对三种供试真菌的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)。结果显示,叶和花部位水提液的MIC和MBC值明显低于根和茎部位,表明叶和花部位具有更强的

进行单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 凤仙花不同部位水提液得率比较

将凤仙花根、茎、叶、花四个部位的干燥粉末分别进行水提、浓缩、冷冻干燥后,计算各部位水提物得率。结果显示,四个部位的水提物得率存在明显差异,其中花部位得率最高,叶部位次之,根和茎部位得率相对较低。具体结果见表2。

表2 凤仙花不同部位水提液得率

部位	药材质量 (g)	冻干粉质量 (g)	得率 (%)
根	50.0	3.60	7.20
茎	50.0	3.25	6.50
叶	50.0	6.30	12.60
花	50.0	5.90	11.80

### 2.2 同部位水提液对供试菌株的抑菌圈直径比较

采用牛津杯法测定凤仙花不同部位水提液(200 mg/mL)对红色毛癣菌、须癣毛癣菌和白念珠菌的抑菌圈直径。结果显示,各部位水提液对三种供试真菌均表现出不同程度的抑制作用,其中叶和花部位水提液的抑菌圈直径显著大于根和茎部位( $P < 0.05$ )。阳性对照氟康唑(2 mg/mL)对所有供试菌株均显示出明显的抑菌圈。具体结果见表3。

抑菌和杀菌活性。其中,花部位水提液对红色毛癣菌的MIC值最低,为3.125 mg/mL。

### 2.4 实验结果分析

综合上述实验结果,凤仙花不同部位水提液对三种供试病原真菌的抑菌效果存在显著差异。从得率来看,

叶和花部位的水提物得率明显高于根和茎部位,提示叶和花部位含有更多的水溶性成分。从抑菌圈直径来看,叶和花部位水提液对红色毛癣菌、须癣毛癣菌和白念珠菌均表现出较强的抑制作用,抑菌圈直径均大于14 mm,而根和茎部位水提液的抑菌圈直径均小于9 mm,抑菌作用较弱。从MIC和MBC结果来看,叶和花部位水提液对三种真菌的MIC值在3.125 mg/mL至25.0 mg/mL之间,MBC值在6.25 mg/mL至50.0 mg/mL之间,而根和茎部位水提液的MIC和MBC值普遍较高,部分甚至超过100 mg/mL仍未表现出明显的杀菌作用。以上结果表明,凤仙花叶和花部位的水提液具有较好的抗真菌活性,是凤仙花发挥抑菌作用的主要有效部位。

### 3 讨论

实验通过对凤仙花根、茎、叶、花四个不同部位水提液的抑菌活性进行比较研究,发现凤仙花不同部位的抑菌效果存在显著差异,叶和花部位的水提液对红色毛癣菌、须癣毛癣菌和白念珠菌的抑制作用明显强于根和茎部位。从植物化学角度分析,凤仙花中已知的主要活性成分包括萘醌类(如指甲花醌)、黄酮类(如槲皮素、山奈酚衍生物)和香豆素类等化合物。

研究表明,指甲花醌具有广谱的抗真菌活性,其作用机制可能与干扰真菌细胞膜的完整性、抑制真菌线粒体呼吸功能有关。相比之下,根和茎主要承担支撑和运输功能,其次代谢产物相对较少,抑菌活性较弱。从抑菌谱来看,本研究选取的三种供试真菌均为临床常见的病原真菌,其中红色毛癣菌和须癣毛癣菌是引起皮肤癣菌病的主要病原体,白念珠菌则是引起皮肤黏膜及系统性念珠菌病的常见机会致病菌。实验结果显示,凤仙花叶和花部位水提液对这三种真菌均表现出较好的抑制作用,说明其抑菌谱较为广泛,具有良好的开发潜力。尤其值得注意的是,叶和花部位水提液对红色毛癣菌的MIC值达到3.125 mg/mL,对须癣毛癣菌的MIC值为6.25 mg/mL,这一结果与其他研究中报道的凤仙花提取物抑菌活性基本一致,部分结果甚至优于某些有机溶剂提取物,说明水提法能够有效提取出具有抑菌活性的极性成分。

基于上述研究结果,建议后续研究可从以下两个方面深入开展:一是采用现代分离纯化技术对凤仙花叶和花部位水提液中的活性成分进行追踪分离,明确其主要抑菌活性物质的结构;二是通过扫描电镜、透射电镜观察药物处理前后真菌超微结构的变化,结合流式细胞术、荧光染色等方法,深入探讨其抑菌作用的分子机制,为其在临床及农业领域的实际应用提供更充分的实验依据。

### 4 结语

研究通过系统比较凤仙花根、茎、叶、花四个不同部位水提液对供试病原真菌的抑制效果,揭示了凤仙花抑菌活性存在显著的部位差异。本研究的发现验证了凤仙花传统药用价值的科学内涵,更为其在实际应用中的精准利用提供了重要参考。后续研究将进一步结合分离纯化技术、体内活性验证及作用机制探讨,以深入阐明凤仙花抗真菌的物质基础与作用机理。

### 参考文献

- [1]王丹,王丹丹,赵媛,等.凤仙花提取物对灰指甲主要致病菌的抑制作用[J].生物化工,2023,9(5):97-102.
- [2]董晨虹,段秀俊,阴孟凡,等.凤仙花不同部位水提液抑真菌效果的实验研究[J].山西中医学院学报,2017,18(5):19-21.
- [3]冯玉,王璇.凤仙花不同药用部位化学成分研究进展[J].山东中医杂志,2016,35(8):749-753.
- [4]张丽,刘洋,李娜.中药提取物对皮肤癣菌的体外抑菌活性及其机制[J].北京农学院学报,2023,38(1):48-53.

作者简介:但大莉,女,汉族,陕西商洛人,本科在读,研究方向为制药工程。

王孟,女,汉族,硕士,陕西咸阳人,副教授,研究方向:中药新剂型领域的教学与研究。

基金课题:2025-2026年度陕西服装工程学院创新训练计划项目《凤仙花提取物对灰指甲主要致病“凤仙花对于治疗灰指甲的药效研究”》(编号:202504003X)