

黄连抑菌活性的谱效关系研究

马欣欣, 刘吉华, 余伯阳*

中国药科大学 中药复方研究室, 江苏 南京 211198

摘要:目的 以黄连为对象探讨中药谱效关系研究新方法。方法 建立优化基于 ATP 生物发光的微量抑菌检测方法, 与微量稀释法抑菌结果进行相关性考察。以所建立的抑菌检测方法检测黄连抑菌活性, 整合黄连的化学与抑菌活性图谱, 探讨黄连化学组分与活性之间的关系。结果 所建立的基于 ATP 生物发光抑菌检测法与微量稀释法相关性良好, 分别检测大肠杆菌和金黄色葡萄球菌所得相关系数 r 值分别为 0.998 和 0.957。黄连谱效相关研究结果显示, 黄连中除主要有效成分黄连素外, 还可能含有微量高效抑菌成分。结论 基于 ATP 生物发光的抑菌活性检测方法适用于中药抑菌活性的谱效关系研究, 为中药质量控制和药效评价提供新的技术手段。

关键词: ATP 生物发光检测法; 抑菌活性; 微量稀释法; 谱效关系; HPLC

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2013)03-0171-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.03.003

Spectrum-effect relationship of antibacterial activities in *Coptidis Rhizoma*

MA Xin-xin, LIU Ji-hua, YU Bo-yang

Department of Complex Prescription of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract: Objective To explore the new methods for the research of spectrum-effect relationship of Chinese materia medica (CMM), taking *Coptidis Rhizoma* as an object. **Methods** The trace bacteriostatic detection method based on ATP bioluminescence was established and optimized, and the correlation of the results between ATP bioluminescence and microdilution method was investigated. The antibacterial activity of *Coptidis Rhizoma* was detected by the antibacterial detection method, and the chemical and activity profiles of *Coptidis Rhizoma* were integrated to discuss the relationship between the chemical composition and the activities. **Results** The results obtained by ATP bioluminescence assay correlated well with those by microdilution method, the r values of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were 0.998 and 0.957, respectively. The integration activity spectra showed that except berberine there may be other substances with the high antibacterial activity in *Coptidis Rhizoma*. **Conclusion** ATP bioluminescence could be used in the study on the spectrum-effect relationship of antibacterial activity in CMM, in order to provide a new method for the quality control and effect evaluation of CMM.

Key words: ATP bioluminescence assay; antibacterial activity; microdilution method; spectrum-effect relationship; HPLC

中药成分复杂多样, 治疗效果往往是多种成分作用于多靶点的整体结果, 目前中药的谱效关系研究已成为中药质量评价的重要手段。中药谱效关系研究是一种将化学特征鉴别与生物活性评价整合为一体的综合性评价模式^[1-3]。ATP 生物发光检测法作为一种快速灵敏的检测方法, 在医学、生物、环境、食品卫生及加工业等领域已得到较为广泛的应用^[4-9], 但用于抑菌活性的谱效关系研究尚未见报道。本实验建立基于 ATP 生物发光的抑菌活性微量

检测方法, 建立“谱效整合图谱”^[10]并考察黄连抑菌活性的谱效关系, 以期为中药的质量控制和药效评价研究提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 大肠杆菌 *Escherichia coli*. (ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*. (ATCC 29213)。

1.1.2 培养基 营养肉汤培养基: 蛋白胨 10 g, 牛

收稿日期: 2013-03-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173471); 江苏高校优势学科建设工程项目资助

作者简介: 马欣欣 (1987—), 女, 湖北人, 硕士, 主要从事中药整合指纹图谱方向的研究。Tel: 13401917986 E-mail: maxinxin2005@163.com

*通信作者 余伯阳 Tel: (025)86185157 E-mail: boyangyu59@163.com

肉浸膏 3 g, 氯化钠 5 g, 加到 1 000 mL 蒸馏水中, 加热溶解后, 调节 pH 值至 7.2, 115 °C 灭菌 30 min。

1.1.3 实验药物及试剂 黄连由中国药科大学中药复方研究室余伯阳教授鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎; 黄连素, 质量分数 98% (河南兴源化工产品有限公司)、荧光素/荧光素酶试剂 (美国 Promega)、三磷酸腺苷二钠 (美国 Amresco)、苯扎溴铵 (江苏海安制药厂)、乙腈 (美国 Tedia)、冰醋酸 (南京化学试剂有限公司)、乙酸铵 (国药集团化学试剂有限公司)。

1.1.4 仪器 Airtech 超净工作台 (苏净集团安泰公司)、智能生化培养箱 (宁波海曙赛福实验仪器厂)、LUMistar Optima 化学发光仪 (德国 BMG Labtech)、96 孔板 (美国 costar)、AL204 分析天平 (瑞典 Mettler Toledo)、LX—C35 型立式自动电热压力蒸汽灭菌器 (合肥华泰医疗设备有限公司)、BioTek Epoch 酶标仪 (美国 BioTek)、Agilent 1260 高效液相色谱仪; 二级管阵列检测器 (DAD); Agilent 1100 LC/MSD Trap XCT ESI (Agilent Technologies)。

1.2 方法

1.2.1 药材供试品制备 黄连素供试品溶液: 精密称取黄连素 1.02 mg, 无菌水定容至 1 mL, 配制成质量浓度为 1.02 mg/mL 的黄连素溶液, 经 0.22 μm 滤膜滤过除菌, 备用。

黄连供试品溶液: 取 1 g 药材粉末, 加入 100 mL 蒸馏水, 静置过夜, 超声提取 1 h, 滤过, 取上清液回收溶剂, 残渣用甲醇定容至 100 mL, 配制成质量浓度为 10 mg/mL 的储备液。HPLC 进样前经 0.45 μm 滤膜滤过。

1.2.2 微量稀释法 参考美国临床实验室标准化委员会 (NCCLS) 中 M07-A8 的方法^[11] 进行抑菌活性检测, 具体为在无菌的 96 孔板中加入黄连素溶液和菌液各 50 μL, 使大肠杆菌和金黄色葡萄球菌液终浓度分别为 1.5×10^5 、 1.5×10^7 cfu/mL, 黄连素终质量浓度为 128、64、32、16、8、4 μg/mL, 并设空白对照孔, 置 35 °C 培养箱孵育 24 h。用酶标仪在 600 nm 下测吸光度 (*A*) 值, 计算各浓度药物的抑制率。平行测量 3 次。

$$\text{抑制率} = 1 - A_{600} \text{ 样品} / A_{600} \text{ 空白}$$

1.2.3 ATP 标准曲线绘制 参考文献^[12], 对不同浓度的标准 ATP 试剂 ($5 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-16}$ mol/mL) 进行 ATP 生物发光法检测, 以生理盐水做空白对照, 平行测量 2 次。

1.2.4 基于 ATP 生物发光抑菌活性检测方法的建立和优化 在无菌的白色 96 孔板中, 依次加入菌液和药物, 黄连素浓度设置与微量稀释法相同。孵育后, 各孔中加入苯扎溴铵 50 μL, 混匀提取, 加入荧光素酶 10 μL, 立即测量发光强度, 并计算抑制率。平行测量 3 次。通过 $L_9(3^4)$ 正交试验, 考察菌液浓度、孵育时间、ATP 提取时间和 ATP 提取剂苯扎溴铵的浓度四个因素对 ATP 生物发光检测法的影响^[13] (表 1)。以抑制率为评价指标确定最优条件。按照正交试验结果进行抑菌活性检测。

$$\text{抑制率} = 1 - \text{样品 ATP 值} / \text{空白 ATP 值}$$

表 1 ATP 生物发光检测法因素水平表

Table 1 Factors and levels in ATP bioluminescence assay

| 水平 | 因素 | | | |
|----|------------|------------------|----------------------------------|------------|
| | 孵育时间/ h | ATP 提取 时间/min | 菌液浓度/ (cfu·mL ⁻¹) | 苯扎溴铵/ % |
| 1 | 2 | 1 | 1.5×10^8 | 0.05 |
| 2 | 4 | 3 | 1.5×10^7 | 0.1 |
| 3 | 6 | 5 | 1.5×10^5 | 0.2 |

1.2.5 黄连 HPLC 分析条件 色谱条件: 参照文献方法^[14], 略加改进。Hedera ODS-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温 30 °C; 体积流量 1 mL/min; 检测波长为 248 nm; 梯度洗脱, 流动相为 A 相水 (含 0.2% 醋酸和 20 mmol/L 醋酸铵), B 相乙腈, 流动相梯度为 0~10 min, B 相 15%~24%; 10~25 min, B 相 24%~30%; 25~30 min, B 相 30%~30%。

质谱条件: 正离子检测模式, ESI 喷雾电压为 3 500 V, 鞘气 (N₂) 体积流量 9.0 L/min, 毛细管温度 350 °C, 毛细管电压 40 V, 扫描范围 *m/z* 200~600。

1.2.6 黄连抑菌活性整合图谱建立 按以上 HPLC 条件进样分析, 每次进样体积 20 μL; 以 1 min 为单位收集 HPLC 洗脱流分作为一个检测样品。用 ATP 生物发光检测法检测每个样品的抑菌活性, 计算各样品抑菌活性相对于总抑菌活性的贡献率, 作各组分抑菌贡献率的折线图。

2 结果

2.1 ATP 标准曲线

以 ATP 浓度对数值为横坐标, 发光强度对数值为纵坐标, 绘制 ATP 标准曲线。结果表明 ATP 浓度在 $5 \times 10^{-9} \sim 5 \times 10^{-13}$ mol/mL 时, ATP 浓度的对数值与生物发光值的对数值之间具有较好的线性关

系, 回归方程为 $Y=0.058X+1.642$, $r=0.991$ 。

2.2 ATP 生物发光检测法的优化

根据 $L_9(3^4)$ 正交试验结果得出 ATP 生物发光检测法检测大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最适条件。对于大肠杆菌, 4 个因素的影响大小依次为孵育时间 > 菌液浓度 > ATP 提取时间 > 苯扎溴铵体积分数。最佳的实验条件为: 菌液浓度 1.5×10^5 cfu/mL, 孵育时间 6 h, 苯扎溴铵体积分数 0.05%, ATP 提取时间 3 min。对于金黄色葡萄球菌, 4 个因素的影响大小依次为孵育时间 > ATP 提取时间 > 苯扎溴铵体积分数 > 菌液浓度。最佳的实验条件为: 菌液浓度 1.5×10^7 cfu/mL, 孵育时间 4 h, 苯扎溴铵体积分数 0.05%, ATP 提取时间 1 min。

2.3 抑菌活性检测方法的比较

以微量稀释法和 ATP 生物发光检测法检测黄连素抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性, 结果见表 2。

表 2 两种抑菌检测方法检测黄连素的抑菌活性
Table 2 Antimicrobial activity of berberine detected by two antibacterial detection methods

| 质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 对大肠杆菌抑制率/% | | 对金葡菌抑制率/% | |
|---|------------|--------|-----------|--------|
| | 微量 | ATP 生物 | 微量 | ATP 生物 |
| | 稀释法 | 发光检测法 | 稀释法 | 发光检测法 |
| 4 | 8.76 | 16.57 | 5.73 | 26.16 |
| 8 | 23.82 | 30.37 | 13.65 | 39.66 |
| 16 | 45.01 | 52.54 | 24.33 | 59.86 |
| 32 | 89.75 | 93.95 | 48.48 | 83.84 |
| 64 | 90.29 | 99.11 | 73.91 | 96.56 |
| 128 | 90.49 | 99.53 | 90.13 | 99.04 |

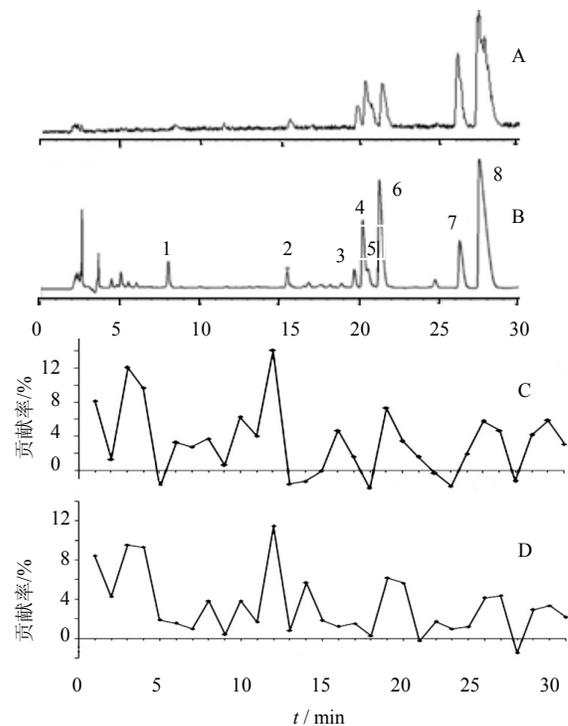
对两种结果进行相关性分析, 结果表明, 微量稀释法和 ATP 生物发光检测法分别测得黄连素对大肠杆菌的抑制率线性关系良好, 回归方程为 $Y=1.000X+7.285$, $r=0.998$ 。微量稀释法和 ATP 生物发光法分别测得黄连素对金黄色葡萄球菌的抑制率线性关系良好, 回归方程为 $Y=0.857X+30.92$, $r=0.957$ 。

ATP 生物发光检测法测得的抑制率结果普遍高于微量稀释法, t 检验结果表明差异有显著性 ($P < 0.05$), 与文献相似^[15]。经检测可知, 能检测到吸光度的最小菌液浓度为 1.5×10^7 cfu/mL, 能检测到发光强度值所需的最小菌液浓度为 1.5×10^6 cfu/mL, ATP 生物发光检测法的灵敏度高于微量稀释法。且

ATP 生物发光检测法测量所需时间短, 可快速获得结果, 故可将此法用于微量中药体外抑菌活性的检测。

2.4 黄连抑菌活性谱效整合图谱的建立

以时间为横坐标, 抑菌活性贡献率为纵坐标, 作黄连 HPLC-抑菌活性整合图谱(图 1)。结果显示, 黄连 HPLC 图谱上主要特征峰 1、3、4、6—8 对应的样品对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用相似, 主要特征峰 2 对应的样品对大肠杆菌的抑制作用高于对金黄色葡萄球菌, 主要特征峰 8 存在托尾现象被分入两组样品中。同时未见明显色谱峰的洗脱样品对整体抑菌活性具有较高贡献率, 提示在实验条件下该样品中可能存在微量高效抑菌活性物质, 或说明不同物质相互作用效果比单一成分要好很多。对于该样品中的微量高效抑菌活性物质的进一步分离提纯鉴定工作正在进行中。



A-黄连供试品总离子流图; B-黄连供试品 HPLC 图谱; C-黄连各组分对大肠杆菌的抑菌活性图谱; D-黄连各组分对金黄色葡萄球菌的抑菌活性图谱

A-TIC chromatogram of *Coptidis Rhizoma* sample; B-HPLC chromatograms of *Coptidis Rhizoma* sample; C-inhibition fingerprint of each component (ts of *Coptidis Rhizoma* on *Escherichia coli*; D-inhibition fingerprint of each component in *Coptidis Rhizoma* on *Staphylococcus aureus*

图 1 黄连抑菌谱效整合图谱

Fig. 1 Spectrum-effect integrated fingerprint of antibacterial activity in *Coptidis Rhizoma*

通过 LC-MS 技术,对黄连供试品 HPLC 图谱中各特征峰进行鉴定。根据黄连样品的总离子流色谱图给出的碎片信息与相关文献^[14,16]对照,对指纹图谱中的特征峰进行归属指认,结果见表 3。研究

表明谱效结合的研究方法,可直观显示中药的化学和活性相关信息,对中药中微量高效活性成分发现及药效物质基础研究具有一定的指导意义,也为中药抑菌活性谱效关系研究提供了方法。

表 3 HPLC-DAD-MS 指纹图谱特征峰归属

Table 3 Attachment of fingerprint characteristic peaks by HPLC-DAD-MS

| 峰号 | 保留时间/min | [M + H] ⁺ | MS ² 碎片离子 | 化合物名称 |
|----|----------|----------------------|----------------------|--------|
| 1 | 7.94 | 342 | 297, 265, 237, 219 | 木兰花碱 |
| 2 | 15.39 | 322 | 307, 279 | 格陵兰黄连碱 |
| 3 | 19.51 | 338 | 323, 322, 294, 279 | 药根碱 |
| 4 | 19.98 | 336 | 320, 292 | 表小檗碱 |
| 5 | 20.38 | 338 | 323, 322, 294 | 非洲防己碱 |
| 6 | 20.98 | 320 | 292, 262 | 黄连碱 |
| 7 | 25.93 | 352 | 336, 308, 294 | 巴马汀 |
| 8 | 27.07 | 336 | 320, 292, 278 | 小檗碱 |

3 讨论

ATP 是细胞内重要的能源物质,ATP 生物发光是利用 ATP 与荧光素-荧光素酶发生反应,产生光子,用化学发光仪检测并转换成发光值,从而表征 ATP 的数量^[17]。当细胞死后体内的 ATP 会快速分解,不会对活体微生物检测产生影响^[18-19]。与常用的体外抑菌活性实验方法扩散法、稀释法和比色法等相比^[20],ATP 生物发光检测法灵敏度高,操作方便、可自动化,在短时间内能够得到活性测量结果。将 ATP 生物发光抑菌检测与 HPLC 分析相结合,建立中药抑菌活性与化学指纹整合图谱,可直观显示药材中不同成分或组分对总体抑菌活性的贡献率。在对黄连抑菌活性整合图谱研究中,发现 HPLC 分析的 11~12 min 洗脱样品对样品整体抑菌活性具有较大的贡献率,但在检测条件下未见明显色谱峰,提示黄连中可能存在微量抑菌活性成分。

在研究过程中也发现,虽然 HPLC 分析每分钟洗脱样品即可进行基于 ATP 生物发光抑菌活性检测,但确保在无菌状态下快速获得样品存在困难,在本文研究中采用了目前谱效相关研究常用的多次 HPLC 分析富集、除菌并稀释制备抑菌检测样品的方法^[21],今后如能制备与 HPLC 分析配套使用的洗脱组分无菌收集及挥干溶剂装置,对中药谱效相关研究将会有积极的推动作用。

参考文献

[1] 张丽杰,刘丽娟,赵学玲,等. 中药谱效关系研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(11): 971-975.

[2] 吴雷,余伯阳,朱丹妮. 高效液相色谱-DAD-化学发光法在线检测麦冬清除超氧阴离子活性 [J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(2): 141-145.

[3] 孔维军,赵艳玲,山丽梅,等. 左金丸及类方 HPLC 指纹图谱与生物热活性的“谱-效”关系研究 [J]. 化学学报, 2008, 66(22): 2533-2538.

[4] 唐倩倩,叶尊忠,王剑平,等. ATP 生物发光法在微生物检验中的应用 [J]. 食品科学, 2008, 29(6): 460-465.

[5] Devera G, Stewart L J, Pitt A R, et al. Phospholipid chlorohydrins cause ATP depletion and toxicity in human myeloid cells [J]. *FEBS Lett*, 2003, 540(1/3): 245-250.

[6] Hawronskyj J M, Holah J. ATP: A universal hygiene monitor [J]. *Trends Food Sci Tech*, 1997, 8(3): 79-84.

[7] Kapoor R, Yadav J S. Development of a rapid ATP bioluminescence assay for biocidal susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(10): 3725-3728.

[8] Loo W T Y, Jin L J, Cheung M N B, et al. Evaluation of ellagic acid on the activities of oral bacteria with the use of adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence assay [J]. *Afr J Biotech*, 2010, 9(25): 3938-3943.

[9] 陈历排,周旻,李志阳,等. 用微量板 ATP 生物发光法检测肿瘤细胞对化疗药物的敏感性 [J]. 肿瘤, 2000, 20(2): 103-105.

[10] 戚进,余伯阳. 中药质量评价新模式-“谱效整合指纹谱”研究进展 [J]. 中国天然药物, 2010, 8(3): 171-176.

[11] National committee for clinical laboratory standards. *Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement: approved standard M100-S20* [S]. 2010.

[12] 湛学军,谢大泽,徐燕萍,等. 三磷酸腺苷生物发光法

- 分析莪术油等中药抑制肝、胃癌细胞增殖活性的研究 [J]. *江西医药*, 2005, 40(11): 706-708.
- [13] 叶 菁, 王周平, 乐国伟, 等. 微生物 ATP 提取方法及其在微波灭菌效果快速评价中的应用研究 [J]. *食品与生物技术学报*, 2010, 29(02): 172-176.
- [14] 霍 达. 黄连黄柏指纹图谱与成分研究 [D]. 北京: 首都师范大学, 2009.
- [15] 韩国荣, 唐引荣, 张 林, 等. ATP 生物发光法与 MTT 法检测卵巢癌体外化疗敏感性的比较 [J]. *铁道医学*, 1999, 27(4): 224-226.
- [16] 郭锦明, 王跃飞, 胡丽萍, 等. 黄连生物碱的 HPLC-MS 分析 [J]. *中成药*, 2011, 33(1): 110-113.
- [17] Zhang Q Z, Mao Y D, Yang J, *et al.* Fast examination of total bacteria count in liwa creek by ATP bioluminescence method [J]. *Envir Sci Tech*, 2011, 34(7): 152-155.
- [18] Chen F, Cushion M T. Use of an ATP bioluminescent assay to evaluate viability of pneumocystis carinii from rats [J]. *J Clin Microbiol*, 1994, 32(11): 2791-2800.
- [19] Holm-Hansen O, Booth C R. The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance [J]. *Limnol Oceanogr*, 1966, 11(4): 510-519.
- [20] 马建凤, 刘华钢, 朱 丹. 中药体外抑菌研究的方法学进展 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(1): 42-45.
- [21] 刘荣华, 陈兰英, 余伯阳, 等. 山楂叶抗超氧阴离子活性与化学特征相关指纹的探索研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(7): 1173-1178.