

基于灰色关联度和偏最小二乘回归分析的苓苏胶囊抑菌谱效关系研究

黄广伟^{1, 2*}, 陈淮臣^{1, 2}, 刘渝^{1, 2}, 孙仁弟^{1, 2}, 杨素德^{1, 2}

1. 上海绿谷生命园医药有限公司, 上海 201707

2. 上海复方中药(绿谷)工程技术研究中心, 上海 201707

摘要: 目的 基于灰色关联度法和偏最小二乘法研究苓苏胶囊抑菌作用的谱效关系。方法 使用高效液相色谱(HPLC)法建立10批苓苏胶囊的指纹图谱, 采用管碟法测定苓苏胶囊(0.3 g·mL⁻¹)对5种常见致病菌(金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、肺炎链球菌)的抑菌活性, 使用灰色关联度分析法结合偏最小二乘法构建谱效关系。结果 10批样品指纹图谱中有37个共有峰, 苓苏胶囊对5种致病菌均具有一定的抑菌作用, 对金黄色葡萄球菌有较好的抑菌作用。6、10(迷迭香酸)、14、17(丹酚酸B)号峰为苓苏胶囊抑制金黄色葡萄球菌的主要成分; 10(迷迭香酸)、17(丹酚酸B)、35(苦参碱)、37(氧化苦参碱)号峰为抑制大肠埃希菌的主要成分; 6、7、8、9、10(迷迭香酸)、14、17(丹酚酸B)、27、31(丹参酮I)、37(氧化苦参碱)号峰为抑制铜绿假单胞菌的主要成分; 8、9、10(迷迭香酸)、14、17(丹酚酸B)、37(氧化苦参碱)为抑制肺炎克雷伯菌的主要成分; 5、23(汉黄芩素)、27、30、31(丹参酮I)、32、33(丹参酮II_A)、34(槐果碱)、36(氧化槐定碱)、37(氧化苦参碱)号峰为抑制肺炎链球菌的主要成分。结论 通过谱效关系研究明确了苓苏胶囊抑菌药效作用是多种成分共同作用的结果, 可为苓苏胶囊的药效物质基础研究与质量控制提供参考。

关键词: 苓苏胶囊; 抑菌活性; 指纹图谱; 谱效关系; 迷迭香酸; 丹酚酸B; 苦参碱; 氧化苦参碱; 汉黄芩素

中图分类号: 285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)06-1060-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.06.007

Research on spectrum-effect relationship of bacteriostasis in Qinsu Capsule based on grey correlation degree and partial least squares regression analysis

HUANG Guangwei^{1, 2}, CHEN Huaichen^{1, 2}, LIU Yu^{1, 2}, SUN Rendi^{1, 2}, YANG Sude^{1, 2}

1. Shanghai Green-Valley Shengmingyuan Pharmaceutical CO., LTD, Shanghai 201707, China

2. Shanghai Compound Traditional Chinese Medicine (Green-valley) Engineering Technology Research Center, Shanghai 201707, China

Abstract: Objective To study the spectral effect relationship of antibacterial activity in Qinsu capsule based on grey correlation degree method and partial least square method. **Methods** Using HPLC to establish 10 Qinsu capsule of fingerprint, tube plate method is used to determine Qinsu capsule on five kinds of pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*) bacteriostatic activity, using grey correlation analysis method combined with partial least squares method to construct spectrum efficiency relations. **Results** There were 37 common peaks in the fingerprints of 10 batches of samples. Qinsu capsule had certain bacteriostatic effect on five kinds of pathogenic bacteria, and had better bacteriostatic effect on *Staphylococcus aureus*. Peak 6, 10 (rosinic acid), peak 14, peak 17 (salvianolic acid B) were the main components of Qinsu capsule against *Staphylococcus aureus*. Peak 10 (rosinic acid), peak 17 (salvianolic acid B), peak 35 (matrine), peak 37 (oxymatrine) were the main components of Qinsu capsule against *Escherichia coli*. Peaks 6, 7, 8, 9, 10 (rosinic acid), 14, 17 (salvianolic acid B), 27, 31 (tanshinone I), 37 (oxymatrine) were the main components of Qinsu capsule against *Pseudomonas aeruginosa*. Peak 8, 9, 10 (rosinic acid), 14, 17 (salvianolic acid B), 37 (oxymatrine) were the main components of Qinsu capsule against *Klebsiella pneumoniae*. Peak 5, 23 (hanbaicalein), 27, 30, 31 (tanshinone I), 32, 33 (tanshinone II_A), 34 (sophorine), 36 (sophorine oxide), 37 (oxymatrine oxide) were the main components of Qinsu capsule against *Streptococcus*

收稿日期: 2021-10-08

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目(19401901700)

*通信作者: 黄广伟, 高级工程师, 研究方向为中药制剂研究。Tel: 13851276857 E-mail: hgw77@163.com

pneumoniae. **Conclusion** Through the study of spectrum effect relationship, it is clear that the antibacterial effect of Qinsu Capsule is the result of the joint action of multiple components, and this study can provide reference for the basic research and quality control of qinsu capsule.

Key words: Qinsu Capsule; antibacterial activity; fingerprint; spectrum relationship; rosinic acid; salvianolic acid B; matrine; oxymatrine; hanbaicalcin

上呼吸道感染作为临床上的常见疾病给日常生活带来诸多困扰,除病毒性感染外,致病细菌也是导致疾病发生的重要因素。随着抗生素滥用导致细菌变异产生的耐药菌株^[1],促使病情加重难以治愈,给医疗卫生事业带来巨大挑战。现在越来越多的研究侧重于天然广谱抑菌成分^[2-3],开发配合抗生素使用或者能够替代抗生素的天然药物。

芩苏胶囊源自中国工程院院士、中医内科王永炎院士的经验方芩苏散。由黄芩、紫苏子、紫苏梗、苦参、丹参五味药组成^[4],具有清肺活络、解毒化痰、降逆止咳等功效。前期研究发现,芩苏胶囊具有较好的抑菌作用^[5],已完成临床II期研究,正在开展临床III期研究,预期设计为一种能够治疗上呼吸道感染与感冒后咳嗽的抗菌抗病毒中成药。但是芩苏胶囊成分多而复杂,尚未明确其药效物质基础。基于此,本研究建立10个批次芩苏胶囊的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,采用牛津杯法(管碟法)^[6]研究芩苏胶囊对5种常见致病菌(金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、肺炎链球菌)的抑菌作用,采用灰色关联度分析法与偏最小二乘法对10批芩苏胶囊的HPLC图谱与抑菌作用的关联度进行分析,探究其抑菌作用的药效物质基础,为进一步提升芩苏胶囊的质量标准提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Agilent 1260 II型高效液相色谱仪、DAD型紫外-可见检测器(美国安捷伦公司);MSA125P-1CE-DU型电子分析天平(德国Satorius公司);SK250H型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);HWS-28型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);BSC-1604IIA2型生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司);LDZM-80KCS-II型高压蒸汽灭菌锅(上海永安医疗器械厂);SPX-250BSH-II型生化培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);WGZ-XT型细菌浊度仪(杭州齐威仪器有限公司)。

1.2 药物与主要试剂

芩苏胶囊,共10批S1~S10(批号分别为161101、161102、161103、161104、161105、180901、

190601、190901、190902、200101),由上海绿谷生命园医药有限公司生产提供。氯化钠(批号20200604,分析纯,国药集团化学试剂有限公司);对照品槐果碱(批号110781-201707,质量分数98.1%)、苦参碱(批号110805-201709,质量分数98.8%)、氧化苦参碱(110780-201508,质量分数92.5%)、迷迭香酸(批号111871-201706,质量分数90.5%)、丹酚酸B(批号111562-201716,质量分数94.1%)、汉黄芩苷(批号112002-201702,质量分数98.5%)、黄芩素(批号111595-201808,质量分数97.9%)、黄芩苷(批号110715-201821,质量分数95.4%)、汉黄芩素(批号111514-201706,质量分数未标识)、隐丹参酮(批号110852-201807,质量分数99.0%)、木犀草素(批号111520-201605,质量分数99.6%)、丹参酮II_A(批号110766-201721,质量分数99.5%),均购自中国食品药品检定研究院;三叶紫檀苷(批号3645,质量分数98.0%)、芹菜素(批号5729,质量分数98.0%)、千层纸素A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷(批号6805,质量分数98.0%)、丹酚酸A(批号4881,质量分数98.0%)、苦参酮(批号7374,质量分数98.0%)、氧化槐定碱(批号4892,质量分数98.0%)、丹参酮I(批号3998,质量分数98.0%)均购自上海诗丹德标准技术服务有限公司;实验室自制纯化水,乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯,购自上海安谱实验科技股份有限公司;磷酸为分析纯,购自江苏强盛功能化学股份有限公司;青霉素V钾胶囊(批号210105,四川制药制剂有限公司);硫酸庆大霉素碳酸铋胶囊(批号210401,山西同达药业有限公司)。

1.3 菌株

金黄色葡萄球菌CMCC(B)26003(批号26003-9a3-2)、大肠埃希菌CMCC(B)44102(批号44102-3a33-2)、铜绿假单胞菌CMCC(B)10104(批号10104-2a29-1)、肺炎克雷伯菌CMCC(B)46117(批号46117-5a1)、肺炎链球菌CMCC(B)31001(批号31001-9a1)均购自中国食品药品检定研究院。

1.4 培养基

胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA,批号201106)、

胰酪大豆胨液体培养基(TSB,批号210514)均购自上海盛思生化科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 芩苏胶囊指纹图谱研究

2.1.1 色谱条件 (1)色谱条件1: Waters Xbridge Shield RP₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈(A)-0.05%磷酸水(B); 梯度洗脱(0~3 min, 5%~18% A; 3~39 min, 18%~24% A; 39~58 min, 24%~25% A; 58~59 min, 25%~35% A; 59~68 min, 35% A; 68~92 min, 35%~52% A; 92~95 min, 52%~75% A; 95~100 min, 75%~85% A; 100~105 min, 85% A), 柱温 30 °C, 检测波长 270 nm, 体积流量为 0.8 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL。

(2)色谱条件2: Agilent ZORBAX NH₂(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈(A)-无水乙醇(B)-3%磷酸溶液(C), 等度洗脱(81% A-11% B-8% C) 35 min, 柱温 30 °C, 检测波长 210 nm, 体积流量 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 (1)混合对照品溶液1: 取迷迭香酸、黄芩苷、三叶豆紫檀苷、丹参酮I、千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、丹酚酸B、汉黄芩苷、丹酚酸A、木犀草素、黄芩素、汉黄芩素、苦参酮、隐丹参酮、丹参酮II_A对照品适量, 加75%甲醇溶解, 制成含上述各成分质量浓度均为0.1 mg·mL⁻¹的混合对照品溶液, 即得。

(2)混合对照品溶液2: 取苦参碱、槐果碱、氧化槐定碱、氧化苦参碱对照品适量, 用乙腈-无水乙醇(80:20)混合溶液制成质量浓度分别为0.10、0.75、0.63、0.03 mg·mL⁻¹的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 (1)供试品1: 取芩苏胶囊内容物, 研细, 精密称定50 mg, 置25 mL棕色量瓶中, 加75%甲醇20 mL, 超声处理10 min(功率250 kW、频率50 kHz), 冷却至室温, 加75%甲醇至刻度, 摇匀, 过0.45 μm微孔滤膜, 取续滤液, 即得。应用色谱条件1测定, 对照品应用混合对照品溶液1。

(2)供试品2: 取芩苏胶囊内容物, 研细, 精密称定100 mg, 置具塞锥形瓶中, 加浓氨试液0.5 mL, 精密加入二氯甲烷25 mL摇匀, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率250 W、频率50 kHz)10 min, 放冷, 再称定质量, 用二氯甲烷补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液10 mL, 滤液蒸干, 残渣加无水乙醇适量使溶解, 转移至10 mL量瓶中, 加无水乙醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。应用色谱条件2测

定, 对照品应用混合对照品溶液2。

2.1.4 方法学考察 (1)参照峰的选择: 指纹图谱1中11号峰(黄芩苷)的分离度及对称性良好, 故将其作为指纹图谱1的参照峰, 计算指纹图谱1中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。指纹图谱2中35号峰(苦参碱)峰面积较大, 故将其作为指纹图谱2的参照峰, 计算指纹图谱2中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

(2)精密度试验: ①日内精密度: 取同一批芩苏胶囊内容物, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.1.1”项下色谱条件连续进样6次, 各共有峰相对保留时间的RSD均<1.0%, 相对峰面积的RSD均<3.0%, 表明仪器日内精密度良好。

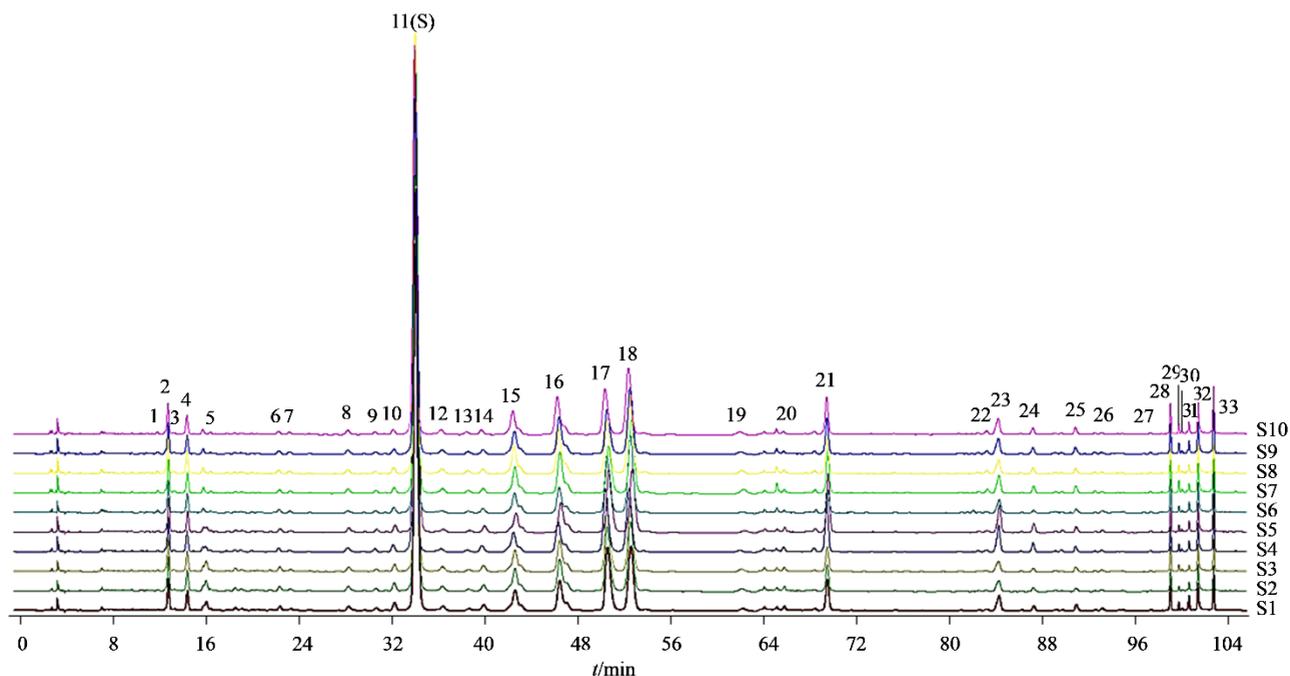
②日间精密度: 取同一批芩苏胶囊内容物, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.1.1”项下色谱条件连续3 d进样分析, 各共有峰相对保留时间的RSD均<1.0%, 相对峰面积的RSD均<3.0%, 表明仪器日间精密度良好。

(3)稳定性试验: 取同一供试品溶液, 同“2.1.1”项下色谱条件分别于0、2、4、6、12、24 h进行测定, 共有峰相对保留时间的RSD均<1.0%, 相对峰面积的RSD均<3.0%, 表明样品在24 h内稳定。

(4)重复性试验: 取同一批次芩苏胶囊内容物, 同“2.1.3”项下方法平行制备6份供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进行测定, 共有峰相对保留时间的RSD均<1.0%, 相对峰面积的RSD均<5.0%, 表明本方法重复性良好。

2.1.5 HPLC 指纹图谱的建立 (1)指纹图谱1: 取10批芩苏胶囊内容物按“2.1.3”项下供试品1方法制备样品溶液, 并按“2.1.1”项下色谱条件1依次进样测定, 记录色谱图。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”处理得到叠加图谱; 以S1为参照图谱, 设定时间窗宽度为0.1 min, 采用平均数法得出对照指纹图谱生成对照图谱, 确定33个共有峰, 并通过对照品比对指认其中14个共有峰, 见图1、2。对10批芩苏胶囊的指纹谱图1进行相似度计算, 各批样品的指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均>0.9。

(2)指纹图谱2: 取10批芩苏胶囊内容物按“2.1.3”项下供试品2方法制备样品溶液, 并按“2.1.1”项下色谱条件2依次进样测定, 记录色谱图。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”处理得到叠加图谱; 以S1为参照图谱, 设定时间窗宽度为0.1 min, 采用平均数法得出对照



10-迷迭香酸; 11-黄芩苷; 13-三叶豆紫檀苷; 16-千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷; 17-丹酚酸 B; 18-汉黄芩苷; 19-丹酚酸 A; 20-木犀草素; 21-黄芩素; 23-汉黄芩素; 25-苦参酮; 28-隐丹参酮; 31-丹参酮 I; 33-丹参酮 II_A (图 2 同)
 10-rosmarinic acid; 11-baicalin; 13-aloside; 16-melaleucine A-7-O-β-D-glucuronic acid; 17-salvianolic acid B; 18-baicalin; 19-salvianolic acid A; 20-luteolin; 21-baicalein; 23-hanbaicalein; 25-matrone; 28-cryptotanshinone; 31-tanshinone i; 33-tanshinone II_A (same as Fig. 2)

图 1 10 批芩苏胶囊的 HPLC 叠加指纹图谱 1

Fig. 1 Ten batches of Qinsu Capsules with HPLC fingerprints 1

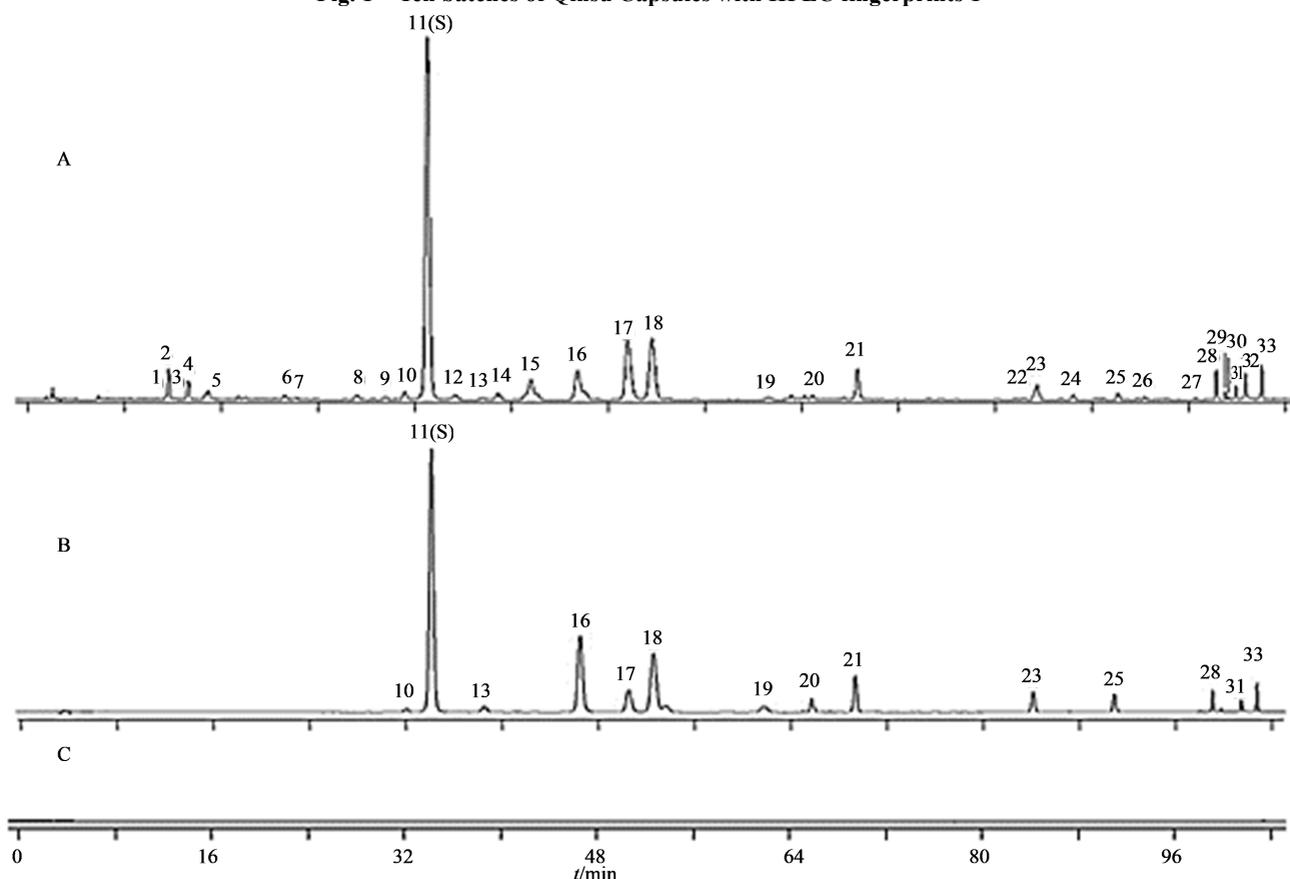
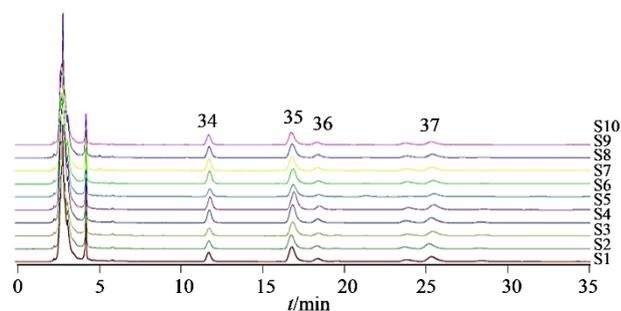


图 2 10 批芩苏胶囊对照指纹图谱 1(A) 和混合对照品 1(B)、空白溶剂(C) HPLC 色谱图

Fig. 2 Ten batches of Qinsu Capsules control fingerprint 1 (A), and HPLC chromatographic of mixed reference 1 (B) and blank solvent (C)

指纹图谱生成对照图谱确定4个共有峰,并通过对照品比对指认这4个共有峰,见图3、4。对10批芩苏胶囊的指纹谱图2进行相似度计算,各批样品的指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均>0.9。各批次共有峰峰面积见表1。



34-槐果碱;35-苦参碱;36-氧化槐定碱;37-氧化苦参碱(图4同)
34-sophorine; 35-matrine; 36-sophoridine oxide; 37-oxymatrine (same as Fig. 4)

图3 10批芩苏胶囊的HPLC叠加指纹图谱2

Fig. 3 Ten HPLC overlay fingerprint 2 of Qinsu Capsules

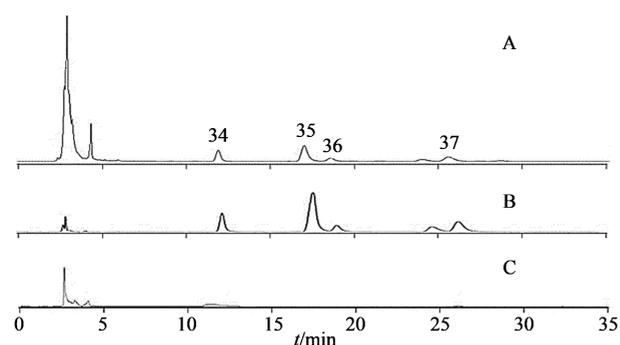


图4 10批芩苏胶囊对照指纹图谱2(A)、混合对照品2(B)和空白溶剂(C)的HPLC色谱图

Fig. 4 Ten control fingerprint of Qinsu Capsules 2 (A), and HPLC chromatogram of mixed control substance 2 (B) and blank solvent (C)

2.2 芩苏胶囊体外抑菌作用研究

2.2.1 菌悬液的制备 选取金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、肺炎链球菌单个菌落于TSB培养基37℃培养24h,加0.9%无菌氯化钠用细菌浊度仪校正菌悬液至0.5麦氏比浊单位,含菌量 1.0×10^8 CFU·mL⁻¹,备用。

2.2.2 体外抑菌活性测定 取直径90mm培养皿,加入灭菌融化的TSA培养基15mL,均匀摊布,凝固后,作为底层。另取灭菌融化的TSA冷却至50℃,置于50℃恒温水浴锅保温,加入“2.2.1”项下菌悬液,使含菌量为 1.0×10^6 CFU·mL⁻¹,摇匀后加5mL至培养皿中,在底层上均匀摊布,作为菌层。待冷却凝固后,在菌层上等距离放置牛津杯[内径(6.0±

0.1)mm、外径(7.8±0.1)mm、高(10.0±0.1)mm]^[7]。根据已有研究进行预试验^[8],确定芩苏胶囊与青霉素V钾胶囊、硫酸庆大霉素碳酸铋胶囊的给药剂量。取10批芩苏胶囊内容物加灭菌后放至室温的TSB培养基涡旋配制成0.3g·mL⁻¹的药物混悬液,向每个牛津杯加入100μL药物混悬液,各药物混悬液单独重复操作6次,培养皿置于生化培养箱37℃下培养24h,使用游标卡尺采用交叉法测量抑菌圈直径。取青霉素V钾胶囊与硫酸庆大霉素碳酸铋胶囊内容物按同样的方法分别配制成0.236g·mL⁻¹与0.64g·mL⁻¹的阳性药物混悬液,设置阳性对照组(阳性对照1为青霉素V钾胶囊,应用于革兰阳性菌:金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌;阳性对照2为硫酸庆大霉素碳酸铋胶囊,应用于革兰阴性菌:大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌),设阴性对照组,向牛津杯中加入100μL灭菌后放至室温的TSB。分别测量各组抑菌圈直径,根据抑菌圈直径的大小判断各组对细菌的抑菌效果,抑菌圈直径越大说明抑菌活性越强,见表2。芩苏胶囊对5种致病菌均具有一定的抑制作用,对金黄色葡萄球菌有较强的抑菌作用。

2.3 谱效关系研究

2.3.1 灰色关联度分析 分别以10批芩苏胶囊对5种致病菌的抑菌圈直径(表2)作为参考序列,取对应批次芩苏胶囊的HPLC指纹图谱中37个共有峰峰面积(表1)数据作为比较序列,运用灰色关联度分析法建立谱效相关性数理统计模型,计算各共有峰对药效指标的关联度,运算步骤如下:

(1)无量纲化处理:以均值法分别对参考序列和比较序列进行无量纲化处理,先分别求出各个序列数据的平均值,然后用序列中的各个原始数据除以对应平均值,所得到的商为新的数据列,即均值化数列。

(2)求灰色关联系数:对于参考数列有若干个比较数列,各比较数列与参考数列的灰色关联系数 $[\zeta_i(k)]$ 可由下列公式算出:

$$\zeta_i(k) = \frac{\min \Delta i(k) + \rho \max \Delta i(k)}{\Delta i(k) + \rho \max \Delta i(k)}$$

ρ 为分辨系数,一般在0~1,通常取0.5; $\Delta i(k)$ 表示比较数列与参考数列的绝对差; $\min \Delta i(k)$ 和 $\max \Delta i(k)$ 分别表示比较序列中差值绝对值的最小值与最大值

(3)关联度的计算:分别求各个数列的关联系数的平均值即得关联度,关联度(r_i)公式如下:

$$r_i = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n \zeta_i(k), k = 1, 2, 3 \dots n$$

表1 共有峰峰面积
Table 1 Common peak area

峰号	t_R/min	峰面积/ $(\mu\text{V}\cdot\text{s}^{-1})$									
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	12.28	26.8	27.0	26.5	30.2	30.2	48.2	49.7	50.1	45.2	45.9
2	13.15	606.1	637.7	642.0	571.7	631.9	606.4	642.0	686.8	584.2	592.1
3	13.60	44.4	46.6	45.6	40.4	41.6	42.4	60.7	58.0	49.3	50.5
4	14.75	407.3	432.4	419.0	387.4	427.1	406.2	436.9	454.9	391.1	398.4
5	16.75	35.5	37.7	37.1	37.8	38.7	43.0	51.8	48.5	41.2	45.9
6	22.60	126.2	136.2	131.5	104.7	113.0	101.5	108.6	116.0	100.2	100.1
7	23.47	81.4	66.2	62.7	73.9	78.8	48.1	73.7	75.5	69.6	67.8
8	28.45	187.9	210.8	199.6	171.0	186.7	88.8	169.6	161.9	159.4	159.8
9	30.80	100.9	106.6	101.0	103.7	111.9	67.8	99.8	100.8	85.5	87.2
10	32.35	278.3	287.4	245.8	228.1	250.1	184.1	195.5	209.9	163.2	164.3
11	34.15	13 661.1	15 017.0	14 543.5	11 468.8	12 739.7	15 093.6	15 257.2	15 952.9	13 399.2	13 559.3
12	36.40	262.7	283.8	289.0	195.9	214.3	120.2	285.1	270.9	241.3	249.1
13	38.64	105.5	110.5	109.2	97.3	104.8	91.3	139.6	133.8	113.1	113.6
14	39.89	263.5	271.9	271.1	249.4	273.8	182.1	213.4	197.7	178.2	180.1
15	42.60	1 240.5	1 335.9	1 298.5	895.0	991.1	922.8	1 429.5	1 460.2	1 075.4	1 089.3
16	46.30	1 417.0	1 498.7	1 448.4	1 513.6	1 678.4	1 174.0	2 272.7	2 411.6	2 027.3	2 050.8
17	50.50	3 180.2	3 235.3	3 247.0	2 837.5	3 149.4	2 817.6	2 396.4	2 683.5	2 256.1	2 273.1
18	52.52	3 286.0	3 511.3	3 346.5	2 891.0	3 208.8	3 940.7	3 746.5	3 916.7	3 309.1	3 345.7
19	61.90	164.1	166.7	165.1	117.9	127.7	82.9	244.9	196.4	159.9	176.9
20	65.60	171.2	179.9	167.6	126.1	136.8	76.9	157.7	143.9	84.8	81.5
21	69.30	996.9	820.3	759.0	1 522.1	1 687.9	666.3	1297.5	1 066.6	1 051.2	1 080.3
22	82.90	66.1	42.5	45.5	66.1	70.1	42.1	125.9	94.0	103.9	107.6
23	83.85	577.7	425.8	421.4	783.7	867.4	494.3	646.8	502.1	576.4	584.6
24	86.86	145.5	112.8	105.9	225.4	247.2	80.0	208.1	156.3	178.0	180.2
25	90.42	173.8	98.2	142.6	140.3	152.6	111.6	219.6	145.8	188.1	191.1
26	92.66	95.9	79.8	88.6	70.6	75.1	85.9	86.1	61.5	60.6	64.1
27	96.80	32.7	21.9	24.7	32.8	33.1	36.2	40.3	31.4	41.1	42.3
28	98.50	416.5	288.9	335.4	277.6	305.1	445.4	454.7	342.7	426.2	437.3
29	99.22	95.8	55.9	78.1	67.1	71.2	94.3	143.5	99.2	128.7	130.7
30	99.48	48.4	30.8	41.6	53.8	56.4	43.0	70.0	55.2	69.7	71.3
31	100.10	202.8	114.4	118.5	173.2	189.1	192.8	172.5	165.2	216.8	222.4
32	100.87	455.3	455.4	467.7	451.6	498.4	527.9	525.9	559.8	559.6	564.3
33	102.18	479.5	374.2	406.4	475.7	525.2	542.8	575.3	392.6	572.8	643.2
34	13.10	548.7	441.0	448.1	683.9	756.6	483.3	684.7	627.6	626.1	587.8
35	18.30	1 217.4	1 096.0	1 131.4	1 282.3	1 421.5	1 065.3	1 132.9	1 064.6	1 082.6	1 037.5
36	20.30	223.4	203.5	236.3	237.4	260.4	199.5	248.6	272.1	277.5	224.2
37	27.50	508.5	498.4	443.3	489.3	540.4	327.0	310.3	416.9	455.7	369.0

34~37号峰为色谱条件2的色谱峰

Peaks 34 to 37 were chromatographic peaks of chromatographic condition 2

依据关联系数的大小,确定各成分对5种致病
菌抑菌药效的贡献程度,结果见表3。

2.3.2 偏最小二乘(PLS)分析 采用SIMCA 14.1

软件进行PLS回归分析,建立芩苏胶囊对试验菌的
谱效关系模型。

(1)PLS回归方程的建立:以各共有峰峰面积作

表2 芩苏胶囊抑菌圈直径测定结果($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Measurement results of antibacterial diameter of Qinsu Capsule ($\bar{x}\pm s, n=6$)

样品	抑菌圈直径/mm				
	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	铜绿假单胞菌	肺炎克雷伯菌	肺炎链球菌
S1	22.226±1.125	9.781±0.269	11.813±1.000	12.383±1.113	10.475±0.646
S2	23.316±2.631	9.723±0.497	12.014±1.043	11.844±0.800	10.331±1.039
S3	21.834±2.624	9.162±0.391	10.366±0.397	12.627±0.954	10.753±1.084
S4	23.858±0.797	9.826±0.288	11.014±1.274	12.632±1.293	11.030±1.085
S5	20.183±0.655	9.908±0.418	11.587±1.123	11.942±0.491	11.345±0.572
S6	21.035±1.111	9.821±0.445	10.790±1.422	11.620±0.707	10.948±0.889
S7	20.398±1.662	9.490±0.246	11.050±1.388	11.869±1.247	11.028±0.663
S8	20.796±1.542	9.520±0.613	11.133±1.333	11.966±1.415	11.107±0.469
S9	19.081±1.455	9.193±0.522	11.046±0.647	11.986±1.297	10.853±0.689
S10	19.338±1.329	8.998±0.382	11.105±0.603	11.938±0.834	11.130±0.763
阳性对照1	59.459±1.924	—	—	—	28.168±3.394
阳性对照2	—	23.687±1.199	46.733±1.677	27.033±1.773	—
阴性对照	7.800±0.000	7.800±0.000	7.800±0.000	7.800±0.000	7.800±0.000

各阴性对照组各平行样在牛津杯外圈均未产生透明圈;牛津杯本身外径为7.8 mm

All parallel samples in negative control group had no transparent circle around Oxford Cup; Oxford Cup itself has an outer diameter of 7.8 mm

表3 共有峰峰面积与抑菌圈直径灰色关联度分析结果

Table 3 Grey correlation degree analysis results of common peak area and bacteriostatic diameter

峰号	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	铜绿假单胞菌	肺炎克雷伯菌	肺炎链球菌	峰号	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	铜绿假单胞菌	肺炎克雷伯菌	肺炎链球菌
1	0.544	0.547	0.555	0.554	0.574	20	0.631	0.620	0.638	0.614	0.620
2	0.861	0.878	0.864	0.874	0.881	21	0.654	0.660	0.663	0.669	0.674
3	0.714	0.736	0.751	0.761	0.790	22	0.528	0.515	0.530	0.532	0.544
4	0.857	0.882	0.876	0.864	0.888	23	0.678	0.684	0.702	0.706	0.709
5	0.725	0.754	0.760	0.752	0.799	24	0.587	0.582	0.593	0.600	0.618
6	0.860	0.788	0.811	0.808	0.769	25	0.663	0.658	0.697	0.675	0.665
7	0.756	0.803	0.811	0.810	0.827	26	0.760	0.731	0.718	0.726	0.701
8	0.796	0.798	0.793	0.778	0.765	27	0.686	0.704	0.708	0.707	0.730
9	0.878	0.812	0.803	0.813	0.786	28	0.663	0.664	0.683	0.664	0.671
10	0.745	0.704	0.704	0.716	0.682	29	0.619	0.614	0.631	0.626	0.641
11	0.830	0.816	0.801	0.809	0.813	30	0.628	0.667	0.685	0.659	0.711
12	0.716	0.681	0.723	0.716	0.706	31	0.694	0.721	0.739	0.707	0.723
13	0.744	0.760	0.770	0.790	0.817	32	0.746	0.788	0.791	0.785	0.839
14	0.771	0.695	0.701	0.706	0.665	33	0.663	0.711	0.714	0.689	0.749
15	0.780	0.709	0.722	0.718	0.678	34	0.696	0.696	0.713	0.717	0.744
16	0.612	0.614	0.635	0.636	0.655	35	0.878	0.847	0.833	0.850	0.834
17	0.823	0.774	0.776	0.762	0.756	36	0.752	0.795	0.782	0.784	0.839
18	0.795	0.832	0.798	0.800	0.828	37	0.797	0.722	0.731	0.734	0.704
19	0.691	0.681	0.688	0.710	0.688						

为自变量,抑菌直径作为因变量,将二者进行PLS相关性分析,SIMCA 14.1软件自动拟合得到回归方程: $Y_{JP} = a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_{37}X_{37}$; $Y_{DC} = b_1X_1 + b_2X_2 + \dots$

$b_{37}X_{37}$; $Y_{TL} = c_1X_1 + c_2X_2 + \dots + c_{37}X_{37}$; $Y_{FK} = d_1X_1 + d_2X_2 + \dots + d_{37}X_{37}$; $Y_{FL} = e_1X_1 + e_2X_2 + \dots + e_{37}X_{37}$ 。

回归方程中 Y_{JP} 、 Y_{DC} 、 Y_{TL} 、 Y_{FK} 、 Y_{FL} 分别对应芩苏

胶囊对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、肺炎链球菌的抑菌圈直径, $X_1 \sim X_{37}$ 分别对应1~37号共有峰的峰面积, $a_1 \sim a_{37}$ 、 $b_1 \sim b_{37}$ 、 $c_1 \sim c_{37}$ 、 $d_1 \sim d_{37}$ 、 $e_1 \sim e_{37}$ 为1~37号共有峰与金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、肺炎链球菌抑菌药效的回归系数, 回归系数为正值说明其与药效呈正相关, 负数则表示与药效呈负相关。结果见图5。

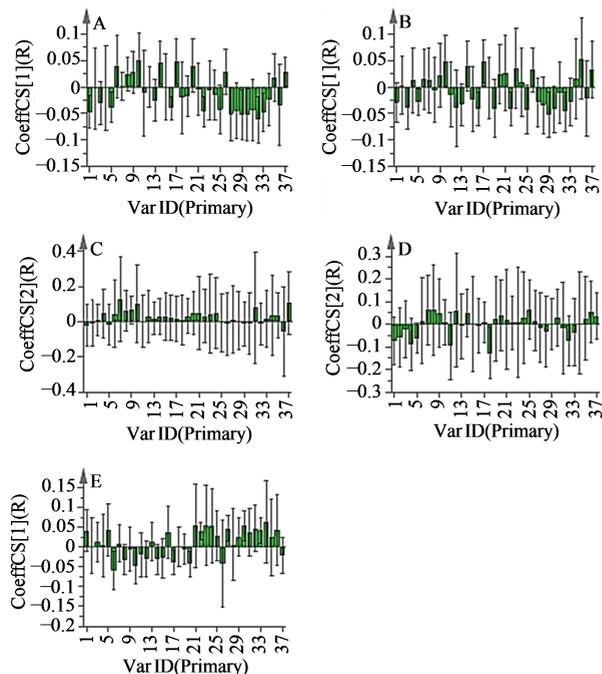


图5 共有峰与金黄色葡萄球菌(A)、大肠埃希菌(B)、铜绿假单胞菌(C)、肺炎克雷伯菌(D)、肺炎链球菌(E)抑菌药效的回归系数

Fig. 5 Regression coefficients of common peaks with *Staphylococcus aureus* (A), *Escherichia coli* (B), *Pseudomonas aeruginosa* (C), *Klebsiella pneumoniae* (D), *Streptococcus pneumoniae* (E)

(2) 变量投影重要性(variable importance in projection, VIP)分析: VIP是反映自变量对因变量解释能力的重要指标, 其值越大说明该自变量对因变量的解释能力越强。一般认为当VIP>1时, 自变量在解释因变量时具有显著重要性。将自变量X(各共有峰峰面积)与因变量Y(抑菌圈直径)导入SIMCA 14.1软件进行变量投影重要性分析, 生成VIP, 见图6。

2.3.3 综合分析 基于灰色关联度分析与PLS分析的数据, 结合谱效关系研究方面文献报道^[9-11], 以灰色关联度>0.7, PLS分析回归系数为正数(正相关)且VIP值>1为标准, 筛选芩苏胶囊产生抑菌作用的关键成分。结果显示, 6、10(迷迭香酸)、14、

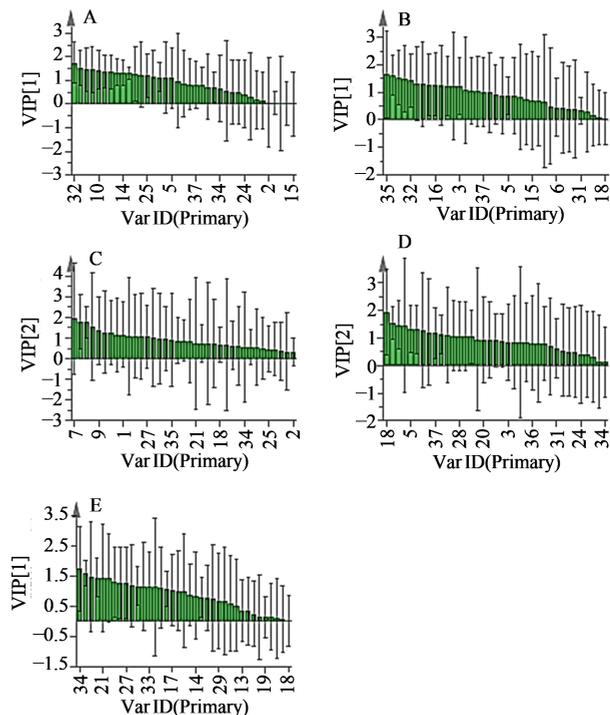


图6 共有峰与金黄色葡萄球菌(A)、大肠埃希菌(B)、铜绿假单胞菌(C)、肺炎克雷伯菌(D)、肺炎链球菌(E)抑菌药效的VIP值

Fig. 6 VIP values of common peaks and antimicrobial efficacy of *Staphylococcus aureus* (A), *Escherichia coli* (B), *Pseudomonas aeruginosa* (C), *Klebsiella pneumoniae* (D) and *Streptococcus pneumoniae* (E)

17(丹酚酸B)号峰为芩苏胶囊抑制金黄色葡萄球菌的主要成分; 10(迷迭香酸)、17(丹酚酸B)、35(苦参碱)、37(氧化苦参碱)号峰为芩苏胶囊抑制大肠埃希菌的主要成分; 6、7、8、9、10(迷迭香酸)、14、17(丹酚酸B)、27、31(丹参酮I)、37(氧化苦参碱)号峰为芩苏胶囊抑制铜绿假单胞菌的主要成分; 8、9、10(迷迭香酸)、14、17(丹酚酸B)、37(氧化苦参碱)为芩苏胶囊抑制肺炎克雷伯菌的主要成分; 5、23(汉黄芩素)、27、30、31(丹参酮I)、32、33(丹参酮IIA)、34(槐果碱)、36(氧化槐定碱)、37(氧化苦参碱)号峰为芩苏胶囊抑制肺炎链球菌的主要成分。

3 讨论

金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌致病菌为革兰阳性菌, 大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌为革兰阴性菌, 其细胞结构具有一定的差异, 课题组在前期通过预试验确定了革兰阳性菌试验采用青霉素V钾胶囊作为阳性药, 而革兰阴性菌试验采用硫酸庆大霉素碳酸铋胶囊作为阳性药。试验结果表明, 芩苏胶囊对革兰阳性菌与革兰阴性菌都有抑制作用, 本研究所用的5种致病菌中有4种与上呼吸

道感染密切相关^[12],可以推测芩苏胶囊对上呼吸道感染具有潜在的治疗作用,是一种很有研究价值的广谱抑菌中成药。

谱效关系是中药药效物质基础的重要手段,本研究结合了灰色关联度与PLS两种谱效关系分析方法,筛选出5、6、7、8、9、10(迷迭香酸)、14、17(丹酚酸B)、23(汉黄芩素)、27、30、31(丹参酮I)、32、33(丹参酮IIA)、34(槐果碱)、35(苦参碱)、36(氧化槐定碱)、37(氧化苦参碱)号峰对一个或多个上呼吸道感染致病菌具有较强的抑制作用,表明芩苏胶囊抑菌药效作用是多种成分共同作用的结果。王音^[13]经实验发现,迷迭香酸对金黄色葡萄球菌等几种有害菌均有不同程度的抑制作用,具有广谱抗菌活性,其抑菌机制主要为增加细菌生物膜通透性,并影响蛋白质的活性;Yim等^[14]研究并分析了黄芩苷与汉黄芩苷在水解过程中对细菌的影响,发现汉黄芩素是黄芩发挥抑菌作用的重要药效物质;总丹参酮中的多种成分对细菌具有较强的抑制作用,研究表明丹参酮I与丹参酮II_A具有一定的抑菌药效^[15-16];孙磊等^[17]通过药敏实验发现槐果碱、苦参碱、氧化苦参碱对革兰阳性菌和阴性菌均具有抑菌作用;权晓燕等^[18]采用纸片扩散法研究苦豆子中生物碱的抑菌作用,发现氧化槐定碱也具有一定的抑菌活性。这些研究对本实验起到了重要的支撑作用。而丹酚酸B的抑菌药效方面研究较少^[19],考虑到芩苏胶囊具有独特的配伍机制,其中丹参作为佐使药起到协同增效的作用,故推测丹酚酸B能够协同芩苏胶囊中的抗菌成分产生抑菌作用,所以经谱效关系分析后对抑菌药效具有较大的贡献。本研究所建立的指纹图谱中仍有部分具有抑菌药效的色谱峰未指认,后续将对芩苏胶囊的化学成分进行更深入的研究。此外体外抑菌药效试验存在一定的局限性,课题组后期将开展体内药效试验继续探寻芩苏胶囊的药效成分。

本研究初步探讨了芩苏胶囊发挥抑菌作用的主要有效成分,可为芩苏胶囊的药效研究提供参考,且建立了芩苏胶囊的指纹图谱并指认了多个药效成分,结合前期研究与生产实际确定芩苏胶囊中迷迭香酸、丹酚酸B、丹参酮I、丹参酮II_A、槐果碱、苦参碱、氧化槐定碱、氧化苦参碱的含量可作为其质量控制的指标,有助于芩苏胶囊的质量标准提升。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李炜,向俊,易晶,等.基于CNKI的2000—2018年我国抗生素滥用的文献计量学分析[J].中国社会医学杂志,2021,38(3):344-346.
Li W, Xiang J, Yi J, et al. Bibliometric analysis of antibiotic abuse in China from 2000 to 2018 based on CNKI database [J]. Chin J Soc Med, 2021, 38(3): 344-346.
- [2] 曹珍,薛璇玑,张新新,等.临床常见耐药细菌及其天然抗生素增效剂的研究进展[J].中草药,2020,51(22):5868-5876.
Cao Z, Xue X J, Zhang X X, et al. Research progress on common clinical resistant bacteria and their natural synergist for antibiotics [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(22): 5868-5876.
- [3] 张智敏,阚雨村,江豪杰,等.枳壳挥发油抑菌活性的谱效关系[J].中成药,2020,42(12):3269-3275.
Zhang Z M, Kan Y C, Jiang H J, et al. Spectral effect relationship of antibacterial activity of volatile oil from *Fructus aurantii* [J]. Chin Tradit Pat Med, 2020, 42(12): 3269-3275.
- [4] 黄广伟,陈凤晨,刘渝,等.基于网络药理学和分子对接技术芩苏胶囊干预新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的潜在药效物质预测分析[J].上海中医药杂志,2020,54(10):1-11.
Huang G W, Chen F C, Liu Y, et al. Predictive analysis of active compounds in Qinsu Capsule for prevention of COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2020, 54(10): 1-11.
- [5] 安琪,唐雪阳,卢广英,等.紫苏方药物制备物的质量表征及其关联分析[J].北京中医药大学学报,2014,37(6):414-419.
An Q, Tang X Y, Lu G Y, et al. Quality characteristics and correlation analysis of medicinal preparations from Zisu Fang [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2014, 37(6): 414-419.
- [6] Zhang H, Huang F P, Wang X, et al. *Leuconostoc mesenteroides* antibacterial activity of lactic acid producing QZ1178 against pathogenic [J]. Front Vet Sci, 2021, 8: 630294.
- [7] 卞振华,胡敏敏,袁晓航,等.基于偏最小二乘回归法分析五味子抑菌活性部位谱效关系[J].中成药,2019,41(11):2788-2791.
Bian Z H, Hu M M, Yuan X H, et al. Partial least squares regression method was used to analyze the spectral effect relationship of antibacterial active parts of *Schisandrae chinensis* [J]. Chin Tradit Pat Med, 2019, 41(11): 2788-2791.

- [8] 吕伟伟, 朱童娜, 邱欢, 等. 疏风解毒胶囊抗病毒及抗菌的体外药效学实验研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(3): 234-238.
Lv W W, Zhu T N, Qiu H, et al. Pharmacodynamic study on antiviral and antibacterial effects of Shufeng Jiedu Capsules *in vitro* [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2013, 24(3): 234-238.
- [9] 陈淮臣, 刘文, 何利, 等. 经典名方桃核承气汤抗炎作用的谱效关系研究 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(1): 1-5.
Chen H C, Liu W, He L, et al. Research on spectrum-effect relationship of anti-inflammatory action in Taohe Chengqi Decoction [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 32(1): 1-5.
- [10] 丘琴, 卢显兴, 阮必高, 等. 基于灰色关联度和偏最小二乘回归分析的扁担藤抗炎谱效关系研究 [J]. 中药材, 2021(2): 370-374.
Qiu Q, Lu X X, Ruan B G, et al. Study on the anti-inflammatory spectrum-effect relationship of *Tetrastigma planicaule* rattan based on grey relational degree and partial least squares regression analysis [J]. J Chin Med Mater, 2021(2): 370-374.
- [11] 帖晓燕, 戴海蓉, 辛国雄, 等. 基于灰色关联分析研究甘草汁蒸制前后高乌头石油醚部位行气作用谱效关系 [J]. 中草药, 2021, 52(5): 1303-1311.
Tie X Y, Dai H R, Xin G X, et al. Spectrum-effect relationship of petroleum ether fraction of *Aconitum sinomontanum* for promoting qi before and after steaming with licorice juice based on grey correlation analysis [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(5): 1303-1311.
- [12] 王宇星. 上呼吸道感染患儿咽后壁分泌物细菌培养及化脓性链球菌药敏试验结果分析 [J]. 河南医学研究, 2020, 29(18): 3404-3406.
Wang Y X. Analysis of bacterial culture and drug sensitivity test of streptococcus pyogenes in secretion of posterior pharyngeal wall in children with upper respiratory tract infection [J]. Henan Med Res, 2020, 29(18): 3404-3406.
- [13] 王音. 迷迭香酸对三种常见细菌抑菌活性的研究 [J]. 太原师范学院学报: 自然科学版, 2020, 19(2): 71-74.
Wang Y. Antibacterial activity of rosmarinic acid against three common bacteria [J]. J Taiyuan Norm Univ Nat Sci Ed, 2020, 19(2): 71-74.
- [14] Yim J S, Kim Y S, Moon S K, et al. Metabolic activities of ginsenoside Rb1, baicalin, glycyrrhizin and geniposide to their bioactive compounds by human intestinal microflora [J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27(10): 1580-1583.
- [15] 强喆, 李晓明, 郭文柱, 等. 丹参酮包合物体外抑菌活性研究 [J]. 西北农业学报, 2013, 22(5): 196-203.
Qiang Z, Li X M, Guo W Z, et al. The antimicrobial activity of total tanshinones- β -cyclodextrin *in vitro* [J]. Acta Agric Boreali Occidentalis Sin, 2013, 22(5): 196-203.
- [16] 汪泽坤, 孙冬冬, 郭峰, 等. 丹参中丹参酮提取工艺优化及活性研究 [J]. 安徽农业大学学报, 2019, 46(1): 90-97.
Wang Z K, Sun D D, Guo F, et al. Study on extraction process optimization and activity of tanshinone from *Salvia miltiorrhiza* [J]. J Anhui Agric Univ, 2019, 46(1): 90-97.
- [17] 孙磊, 郭江玉, 闫彦, 等. 苦参化学成分及其生物碱抑菌活性研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(11): 49-53.
Sun L, Guo J Y, Yan Y, et al. Study on the chemical constituents and antibacterial activity of *Radix Sophora flavescens* [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2017, 19(11): 49-53.
- [18] 权晓燕, 梁芳军, 马蓉, 等. 槐定碱、氧化槐定碱对常见泌尿生殖道感染细菌的抑菌作用 [J]. 宁夏医科大学学报, 2016, 38(4): 463-465.
Quan X Y, Liang F J, Ma R, et al. The bacteriostatic effect of sophoridine and sophoridine oxide on common urogenital tract infection bacteria [J]. J Ningxia Med Univ, 2016, 38(4): 463-465.
- [19] 朱彩莲, 李鸣宇. 17种中药提取物对6种牙周可疑致病菌的体外抑菌实验 [J]. 上海口腔医学, 2006, 15(4): 434-436.
Zhu C L, Li M Y. Inhibition of extracts from 17 Chinese herbs on periodontal pathogenic microbes [J]. Shanghai J Stomatol, 2006, 15(4): 434-436.

[责任编辑 兰新新]