

基于微量量热法的连花清瘟胶囊质量一致性评价方法的建立

沙孟晨^{1,2}, 张海珠^{1,2*}, 何 琴², 毕 丹³, 钱金楸¹, 王伽伯², 肖小河²

1. 大理大学药学与化学学院, 云南 大理 671000

2. 中国人民解放军第三〇二医院 全军中医药研究所, 北京 100039

3. 石家庄以岭药业股份有限公司, 河北 石家庄 050035

摘要: 目的 考察连花清瘟胶囊(LQC)对绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* 生长代谢的影响, 建立评价 LQC 质量一致性的新方法。方法 采用微量量热法测定不同质量浓度 LQC 对绿脓杆菌的生长代谢的影响, 得到热谱曲线及相应的热力学参数, 如生长峰达峰时间(T)、生长期发热量(Q)、生长期最大发热功率(P)、生长期生长速率常数(k)等。以 LQC 质量浓度(C)为横坐标, T 、 P 、 Q 、 k 为纵坐标进行回归分析, 根据相关系数优选最佳参数, 计算抑菌有效率(antibacterial effective rate, E)。以 E 作为评价 LQC 抗菌活性指标, 分别检测 11 个批次市售 LQC 以及经特殊处理后的 LQC 样品对绿脓杆菌生长代谢的影响。结果 LQC 质量浓度在 10.00~47.68 mg/mL 时对绿脓杆菌生长代谢具有明显的抑制作用, 且具有质量浓度依赖性。通过回归分析得出的 4 个热力学参数中, 相关性最好的参数为 T , $r=0.990$, 其变化可以直观评价 LQC 对绿脓杆菌生长代谢的影响, 且该参数稳定性较好, 故选择指数生长期的 T 计算 E 。结果表明不同批次 LQC 样品 E 无明显差异, 样品放于潮湿或高温环境中其 E 发生明显变化。结论 该方法具有灵敏度高、重现性好的特点, 可以区分不同质量 LQC 的抗菌生物活性, 为 LQC 质量的一致性评价提供了一种参考方法, 并为其他大复方中药制剂质量评价提供了参考依据和方法学借鉴。

关键词: 连花清瘟胶囊; 质量一致性; 微量量热法; 绿脓杆菌; 生物评价; 生长代谢热谱图; 热力学参数; 指数生长期; 生长峰; 达峰时间; 抑菌有效率; 抗菌生物活性; 最大发热功率; 生长速率常数

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)11-2202-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.11.008

Consistency evaluation method for Lianhua Qingwen Capsule based on microcalorimetry

SHA Meng-chen^{1,2}, ZHANG Hai-zhu^{1,2}, HE Qin², BI Dan³, QIAN Jin-fu¹, WANG Jia-bo², XIAO Xiao-he²

1. Department of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China

2. China Military Institute of Chinese Medicine, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China

3. Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China

Abstract: Objective To study the effect of Lianhua Qingwen Capsule (LQC) on the growth and metabolism of *Pseudomonas aeruginosa* and to establish a new method to evaluate the consistency of LQC. **Methods** The power-time curves and corresponding thermodynamic parameters such as appearance time (T), total heat output (Q), maximum power output (P), and growth rate constant (k) of *P. aeruginosa* were determined by microcalorimetry. The regression analysis was carried out with T , P , Q , and k as parameters, and the optimal parameters were selected according to the correlation coefficient to calculate the antibacterial effective rate. The effects of 11 batches of LQC and specially treated LQC samples on growth and metabolism of *P. aeruginosa* were determined by an index antibacterial effective rate to evaluate the antibacterial activity of LQC. **Results** LQC had obvious inhibitory effect on *P. aeruginosa* in the range of 10.00 to 47.68 mg/mL, and the bacteriostatic efficacy and dosage of LQC had good correlation. By regression analysis, it was found that T was the best parameter in the four thermodynamic parameters, $r = 0.990$. The change of this parameter could directly

收稿日期: 2017-01-16

基金项目: 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-HEB-12); 京津冀中药大复方国际注册技术合作平台建设与应用; 北京市科委科技计划十病十药专项(Z161100001816022); 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地开放研究基金; 全军医学科技“十二五”科研项目(BWS11J049); 全军医学科技青年培育项目(16QN151)

作者简介: 沙孟晨(1993—), 女, 满族, 在读硕士, 从事中药质量评价。Tel: (010)66933325 E-mail: smc5251@126.com

***通信作者** 张海珠, 副教授, 从事中药质量评价研究 Tel: (872)2257417 E-mail: hzningjing@163.com

evaluate the effect of LQC on the growth and metabolism of *P. aeruginosa*, with good stability. The appearance time was selected as a parameter to calculate its antibacterial effective rate (E). The results showed that there was no significant difference in E of different batches of LQC samples. And the E value was significantly changed when the sample was placed in a humid/high temperature environment. **Conclusion** The microcalorimetric method can be used to evaluate the antibacterial activity and the quality consistency of LQC capsule, which has the high precision and good accuracy. The study has provided a new method to evaluate the quality consistency of TCM.

Key words: Lianhua Qingwen Capsule; quality consistency; microcalorimetry; *Pseudomonas aeruginosa*; biological evaluation; growth metabolic thermogram; thermokinetic parameters; exponential growth phase; growth peak; peak time; antibacterial efficiency; antibacterial bioactivity; maximum heat power; growth rate constant

连花清瘟胶囊 (Lianhua Qingwen Capsule, LQC) 源自麻杏石甘汤、藿香正气散和银翘散等经典古方, 由连翘、金银花、麻黄 (炙)、苦杏仁 (炒)、石膏、板蓝根、绵马贯众、鱼腥草、广藿香、大黄、红景天、薄荷脑、甘草 13 味中药组成^[1], 是石家庄以岭药业股份有限公司独家产品, 具有清瘟解毒、宣肺泄热的功能, 广泛应用于多种流感病毒感染所引起的呼吸系统疾病^[2-6]。绿脓杆菌是一种常见的条件致病菌, 虽致病力较低但抗药性强, 其所导致的绿脓杆菌性肺炎病死率高达 50%。现有研究发现 LQC 可突破细菌生物膜, 显著抑制膜内活菌数量, 对金黄色葡萄球菌有明显的抑制作用^[7], 但其对绿脓杆菌的作用未见报道。

微量量热法主要研究生命体系的热动力学过程, 广泛应用于化工、环保、生物医药等领域^[8-10], 其原理是在生物体生长、繁殖、衰亡的过程中均会伴随着热量代谢与释放, 通过记录热量变化所得到的热谱图以及相关参数便可对生物体整个生长代谢过程进行定性、定量分析, 具有较强的专属性、灵敏度以及重现性。当细菌的生长代谢过程受到影响干预时, 微量量热仪可监测并记录其代谢热发生的动态变化。因此可以获取药物样品与细菌之间相互作用的信息, 从而评价药物的疗效及质量^[10-11]。

目前, LQC 的质量评价仅通过测定连翘苷的量来考察^[12], 但其作为一种中药大复方制剂, 成分复杂, 仅测定单一指标性成分的量无法有效控制其质量^[1], 也无法表征其清瘟解毒、抑菌的作用。因此本研究尝试利用微量量热法考察 LQC 对绿脓杆菌生长代谢过程的影响, 并应用该方法评价其抗菌生物活性, 以期建立 LQC 抑菌这一临床功效为目的的质量一致性评价提供一种参考方法。

1 仪器和材料

TAM Air 毫瓦级热导式等温微量热仪, 瑞典 Thermometric 公司, 配有 8 个独立通道, 可同时测

量 8 个样品; 检测限为 4 μW ; 精密度 $\pm 20 \mu\text{W}$; 误差 $< \pm 23 \mu\text{W}$; 系统控温于 37 $^{\circ}\text{C}$ 。AL 204 电子分析天平, 梅特勒-托利上海有限公司; 高压蒸汽灭菌锅, 日本 Yamato 公司。

绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 由中国人民解放军第三〇二医院临床检查中心提供; LB 肉汤粉, 北京奥博星生物技术有限责任公司; LQC, 由石家庄以岭药业有限公司提供, 批号 A1510032、A1508118、A1508123、A1509084、A1510024、A1510051、A1511012、A1601012、A1601060、A1601061、A1601063、A1601065。

2 方法和结果

2.1 培养基的配制

准确称取 20 g LB 肉汤粉, 置于锥形瓶中, 加入 1 000 mL 开水, 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 30 min。放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。每次使用时应无菌操作。

2.2 经特殊处理供试品的制备

将 LQC (A1508118) 内容物分别放置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱、相对湿度 90 % 环境 20 d, 作为经特殊处理供试品, 备用。

2.3 供试品溶液的制备

称取不同批次的 LQC 内容物和经特殊处理供试品内容物分别置于离心管中, 加入“2.1”项下所配制培养基溶解, 配制成所需质量浓度后超声 10 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用。

2.4 绿脓杆菌生长热功率输出曲线的采集

采用安瓿法检测^[13]。每个培养瓶中准确加入 10 mL 培养基, 接种浓度为 1×10^7 CFU/mL 的绿脓杆菌 10 μL , 加盖, 密封。整个过程应无菌操作。置于微量量热仪中记录在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下细菌生长的热谱曲线, 并获得相关参数: 生长峰达峰时间 (appearance time, T)、生长期发热量 (the total heat output, Q)、生长期最大发热功率 (the maximum power output, P)、生长期生长速率常数 (growth rate

constant, k)。当曲线重新返回基线时实验结束。

37 °C 下, 安瓿法测定的绿脓杆菌的生长代谢曲线如图 1 所示, 因密闭安瓿内所供给的营养成分以及氧气有限, 细菌的生长可分为 4 个阶段, 如图 1 中曲线 a 所示: I 第 1 指数生长期; II 稳定期; III 第 2 指数生长期; IV 衰亡期。曲线 b 为 $\ln P$ - t 曲线。细菌指数生长周期内, P - t 曲线上产热功率与培养时间应符合公式 1: 线性拟合求得 k 值^[14]。

$$P_t = P_0 \exp(k_t) \quad (1)$$

P_t 为 t 时刻的产热功率, P_0 为初始热功率, k_t 为 t 时刻的生长速率常数

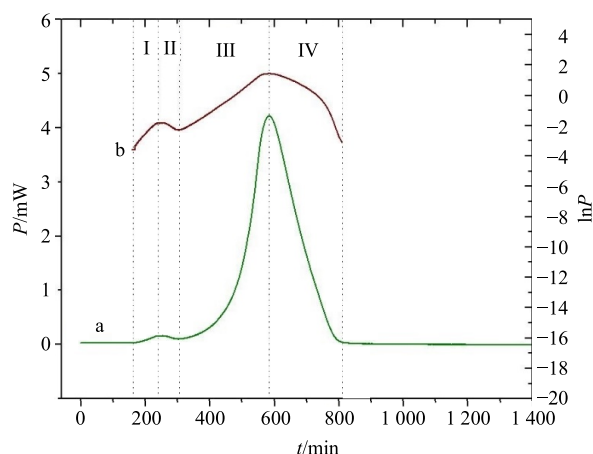


图 1 绿脓杆菌生长代谢的热谱曲线 (37 °C)

Fig. 1 Power-time curves for growth of *P. aeruginosa* at 37 °C

2.5 重复性考察

在相同的实验条件下测定绿脓杆菌生长热谱曲线 6 次, 计算 Q 、 T 、 P 、 k 的 RSD 值。结果分别为 1.04%、4.28%、0.76%、0.74%, 说明该方法具有良好的重复性。

2.6 测定样品对绿脓杆菌生长代谢的影响

分为模型组和给药组, 模型组加入 10 mL LB 培养基, 接种 1×10^7 CFU/mL 的绿脓杆菌 10 μ L, 加盖, 密封; 给药组根据实验设计, 按“2.3”项方法将不同样品配制成一定质量浓度后, 取 10 mL 置于安瓿瓶中, 接种 1×10^7 CFU/mL 的绿脓杆菌 10 μ L, 加盖, 密封。整个过程应无菌操作。放入微量热仪中记录在 37 °C 细菌生长的热谱曲线 (P - t 曲线), 记录相关参数。当曲线重新返回基线时实验结束。

2.6.1 同一批号不同剂量样品对绿脓杆菌生长代谢的影响 考察同一批号 (A1510032), 8 个质量浓度梯度 (10.00、12.50、15.63、19.53、24.41、30.51、

38.13、47.68 mg/mL) 的 LQC 对绿脓杆菌生长代谢的影响, 供试品对细菌抑制率 (inhibition rate, I) 按照公式 2 计算, 不同质量浓度供试品抑菌曲线见图 2, 热力学参数和计算结果见表 1。(由于第 1 指数生长峰被抑制, 所以以下参数均为第 2 指数生长长期参数)。

$$I = (k_0 - k_v) / k_v \quad (2)$$

式中 k_0 为未加药时细菌的生长速率常数、 k_v 为加药后细菌生长速率常数

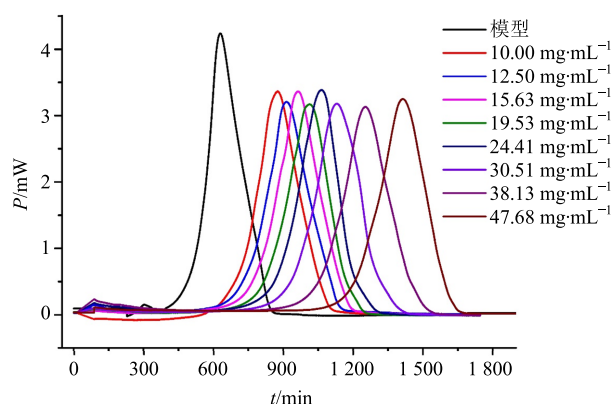


图 2 不同质量浓度 LQC 作用下的绿脓杆菌生长代谢产热曲线 (37 °C)

Fig. 2 Power-time curves for growth of *P. aeruginosa* affected by various concentration of LQC at 37 °C

表 1 LQC 作用于绿脓杆菌生长代谢的热力学参数

Table 1 Growth parameters of *P. aeruginosa* affected by various concentration of LQC

$C/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	Q/mJ	T/min	P/mW	k/min^{-1}	$I/\%$
0.00	724.95	632.83	4.17	9.02×10^{-4}	—
10.00	740.09	875.67	3.37	4.80×10^{-4}	46.78
12.50	782.79	914.67	3.21	4.54×10^{-4}	49.67
15.63	778.70	964.17	3.36	4.45×10^{-4}	50.67
19.53	723.30	1 013.67	3.17	3.53×10^{-4}	60.97
24.41	796.30	1 064.17	3.39	3.95×10^{-4}	56.26
30.51	818.71	1 130.00	3.18	3.90×10^{-4}	56.76
38.13	855.13	1 252.50	3.13	3.59×10^{-4}	60.20
47.68	853.84	1 413.50	3.25	3.75×10^{-4}	58.43

由图 2 及表 1 参数分析可知, 在一定范围内, 随药物质量浓度的上升, 绿脓杆菌指数生长期 k 、 P 呈减小趋势; 而生长峰 T 、药物对细菌 I 、生长期 Q 相应增大。

2.6.2 LQC 作用下绿脓杆菌生长代谢的量-效关系 LQC 在 10.00~47.68 mg/mL, 以质量浓度 (C) 为

横坐标, 热力学参数 T 、 P 、 Q 、 k 为纵坐标进行回归分析, 结果 $T=15.042 C+697.44$, $r=0.990$; $P=-0.013 6 C+3.658 2$, $r=0.633$; $Q=2.998 8 C+719.88$, $r=0.881$; $k=-8 \times 10^{-6} C+0.000 6$, $r=0.695$ 。可得出 4 个热力学参数中, 相关性最好的参数为 T , 参数 T 的变化可以直观评价 LQC 对绿脓杆菌的影响, 且该参数稳定性较好, 因此本研究选择以生长峰达峰时间 T 进行抑菌有效率 (antibacterial effective rate, E) 的计算, 并以 E 作为评价 LQC 抗菌活性指标, E 的计算见公式 3。

$$E=(T_i-T_0)/T_0 \quad (3)$$

T_0 为未加药时细菌的生长峰达峰时间、 T_i 为加药后细菌生长峰达峰时间

2.6.3 不同批次 LQC 样品及经特殊处理供试品抗绿脓杆菌作用 将 11 个批次 LQC 样品和制备所得的经特殊处理供试品, 依照“2.3”项方法配制成质量浓度为 12.50 mg/mL 的样品溶液, 考察样品对绿脓杆菌生长代谢的作用。结果表明, 不同批次 LQC 的 E 在 42.04%~47.92%, 批次间 E 的 RSD 为 4.60%, 表明不同批次间 E 差异较小, 即以抑菌生物活性这一角度来看, 不同批次间 LQC 的质量一致性较好。

实验室自制所得经特殊处理供试品与 LQC 样品之间 E 差异明显, 放于高湿环境中的供试品 E 仅为 2.18%, 与 LQC 样品的 E 平均值相差 20.56 倍; 放于高温环境中的供试品 E 为 31.47%, 与 LQC 样品的 E 平均值相差 1.42 倍。测定结果表明以 E 作为评价指标能够区分 LQC 样品与经特殊处理供试品。结果见表 3。

表 3 不同供试品的 LQC 对绿脓杆菌的 E

Table 3 Antibacterial effective rate of different batches of LQC on bacteriostasis of *P. aeruginosa*

供试品编号	$E/\%$	供试品编号	$E/\%$
A1508118	46.99	A1601060	45.74
A1508123	42.77	A1601061	42.98
A1509084	45.38	A1601063	46.80
A1510024	43.64	A1601065	46.04
A1510051	42.04	高湿	2.18
A1511012	42.64	高温	31.47
A1601012	47.92		

3 讨论

微量量热法可以实时、在线、灵敏地监测生物体生命活动中热量代谢的变化, 与传统的管碟法、

比浊法等评价药物抑菌活性的方法相比, 可反映微生物整个生长过程中动态的整体信息^[15-17]。LQC 作为一种具有代表性的中药大复方, 成分十分复杂, 《中国药典》2015 年版仅通过测定连翘苷 1 种指标性成分的量来评控其质量, 与其相应的临床疗效关联较小。而应用微量量热法可避免这一缺点的同时, 还可提供药物对微生物产生作用时各种热力学参数具体的变化, 有利于协助解决中药质量控制和药效评价等复杂性难题, 理论上比现行的中药指标性成分定性定量分析具有较明显的优越性^[18-20]。

本研究首次通过微量量热法研究了 LQC 对绿脓杆菌生长代谢的影响, 研究结果表明 LQC 对绿脓杆菌具有明显的抑菌作用, 在 10.00~47.68 mg/mL 对绿脓杆菌的生长代谢影响呈剂量依赖关系。筛选得出影响绿脓杆菌生长代谢的主要参数为生长峰 T 。以 T 计算得出的 E 为指标, 评价 11 批次市售产品以及 3 种经特殊处理供试品, 发现 11 批次供试品之间的 E 差异较小, 而 LQC 样品与经特殊处理供试品之间 E 存在明显差异。说明该方法可以区分开不同质量 LQC 的抗菌作用, 体现了该方法用于其质量评价的灵敏性和可行性, 可为 LQC 的质量一致性评价提供一种技术和方法参考。

本研究仅针对以绿脓杆菌为工具菌评价 LQC 抗菌活性方法的建立进行了初步探讨, 而相关参数变化与哪些成分变化直接/间接相关, 在何种程度上影响药物内在质量, 正在进一步研究。

参考文献

- [1] 陈静娴, 张敏敏, 崔 莉, 等. 分散固相萃取-HPLC 法测定金银花及其成药连花清瘟胶囊中的环烯醚萜苷类成分 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2850-2856.
- [2] 王以炳, 张天民, 杨玉梅, 等. 连花清瘟胶囊治疗病毒性感冒的有效性 & 安全性观察 [J]. 临床肺科杂志, 2008, 13(9): 1118-1119.
- [3] 王新功, 崔学军, 刘新生, 等. 连花清瘟胶囊治疗流行性感冒的临床疗效观察 [J]. 中国药房, 2008, 19(27): 2146-2148.
- [4] 魏 华. 连花清瘟胶囊联合特布他林和布地奈德治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(7): 973-977.
- [5] 刘春援, 李晓强, 蔡绍乾. 连花清瘟胶囊的药理与临床研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2010, 26(6): 84-85.
- [6] 李宝法, 张长青, 付 敏, 等. 连花清瘟胶囊治疗甲型 H1N1 流感临床研究 [J]. 医药论坛杂志, 2009, 30(23): 91-92.
- [7] 雷洪涛, 刘敏彦, 欧阳竞锋, 等. 连花清瘟胶囊抗金黄

- 色葡萄球菌生物膜研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 161-164.
- [8] 李俊贤, 王嘉毅, 张乐乐, 等. 微量热法研究中药黄连 6 种生物碱之间相互作用关系 [J]. 药学学报, 2013, 48(12): 1807-1811.
- [9] 任永申, 张 萍, 吕宏宇, 等. 基于微量热法的无菌制剂快速无菌检查方法研究 [J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(20): 2047-2052.
- [10] 章从恩, 王嘉毅, 郝俊杰, 等. 微量热法体外表征拉米夫定对肠道特征菌群的影响 [J]. 药学学报, 2013, 48(10): 1590-1594.
- [11] 罗 云, 金 城, 周 健, 等. 基于微量热法和化学计量学的人工麝香抗金黄色葡萄球菌作用研究 [J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(17): 1312-1316.
- [12] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [13] 余惠旻, 肖小河, 刘塔斯, 等. 中药四性的生物热动力学研究 (II) 参叶和参花药性的微量热学比较 [J]. 中草药, 2001, 22(10): 49-52.
- [14] 肖小河, 余惠旻. 中药四性的生物热动力学研究 I 生晒参与红参药性的微量热学比较[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(5): 393-396.
- [15] Zhao Y I, Wang J B, Sun X, *et al.* Microcalorimetry coupled with chemometric techniques for toxicity evaluation of *Radix Aconiti Lateralis Preparata* (Fuzi) and its processed products on *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(1): 437-444.
- [16] Kong W J, Zhao Y L, Xiao X H, *et al.* Investigation of the anti-fungal activity of coptisine on *Candida albicans* growth by microcalorimetry combined with principal component analysis [J]. *J Appl Microbiol*, 2009, 107(4): 1072-1080.
- [17] 张甜甜, 张媛媛, 陈红鸽, 等. 基于微量热法的金银花抗菌活性部位初筛 [J]. 解放军药学报, 2011, 27(3): 205-207.
- [18] Kong W J, Zhao Y L, Shan L M, *et al.* Investigation on the spectrum-effect relationships of EtOAc extract from *Radix Isatidis* based on HPLC fingerprints and microcalorimetry [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 871(1): 109-114.
- [19] Yan D, Jin C, Xiao X H, *et al.* Antimicrobial properties of berberines alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by microcalorimetry [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2008, 70(6): 845-849.
- [20] 金 城, 武彦舒, 张 倩, 等. 微量热法研究清开灵对金葡菌生长代谢的影响 [J]. 药学学报, 2011, 46(2): 193-197.