

裸花紫珠抗菌作用的谱效学研究

李亚梅¹, 杨扬², 杨义芳^{2,3}, 李小锋⁴, 康兴东⁴, 肖军平⁴, 吴永忠⁴, 杨建琼^{5*}(1.赣南医学院, 江西 赣州 341000; 2.中国医药工业研究总院上海医药工业研究院, 上海 201203; 3.上海药辰生物科技有限公司, 上海 200060; 4.江西普正制药有限公司, 江西 吉安 343100; 5.赣南医学院第一附属医院临床医学研究中心, 江西 赣州 341000)

摘要: 目的 通过裸花紫珠色谱峰与其抗菌作用之间的相关性分析, 建立二者之间的谱效关系数学模型, 揭示裸花紫珠抗菌作用的可能物质基础。方法 HPLC 检测 10 批裸花紫珠药材及其不同提取物, 建立药材及 6 种裸花紫珠不同提取物的指纹图谱, 用相似度软件筛选提取物与裸花紫珠药材特征指纹图谱的共有峰, 选取匹配数>2 的峰进行谱效相关性分析。6 种不同的提取物分别进行体内和体外抗菌试验。通过 SPSS 统计软件进行共有峰与抗菌活性的相关性研究, 并通过线性回归建立数学模型。结果 共有 35 个共有峰其中有 21 个相关峰, 经 Pearson 相关分析相关峰与体内抗菌作用之间呈正相关关系, 与体外抗菌作用呈负相关关系。模型拟合精度较高, 除体外大肠杆菌外相关系数 $R^2 > 0.9$, 色谱峰 1(梓醇), 15(连翘脂苷 B), 23(异毛蕊花糖苷)和 27(2'-乙酰基毛蕊花糖苷)被引入谱效相关方程, 呈较强相关性。色谱峰 1(梓醇), 9(原儿茶酸), 10(原儿茶醛), 12, 14(咖啡酸), 16(阿魏酸), 18(毛蕊花糖苷), 19(木犀草素), 23(异毛蕊花糖苷), 25(2'-乙酰基金盏花糖苷), 27(2'-乙酰基毛蕊花糖苷), 28(木犀草素), 29(槲皮素), 30, 32(芹菜素), 34(异鼠李素), 35(5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮)与体内外抗菌作用呈显著相关。结论 建立的谱-效关系模型能较好地评价裸花紫珠提取物色谱峰与其药理作用之间的相关关系, 基本确定裸花紫珠发挥抗菌作用的成分主要为苯乙醇苷类化合物, 其次为黄酮类化合物, 为裸花紫珠物质基础研究奠定基础。

关键词: 裸花紫珠; 指纹图谱; 抗菌作用; 谱效关系

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)11-1294-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.11.003

引用本文: 李亚梅, 杨扬, 杨义芳, 等. 裸花紫珠抗菌作用的谱效学研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(11): 1294-1301.

Study on the Spectrum Effect of Antibacterial Activity of Callicarpae Nudiflorae Folium

LI Yamei¹, YANG Yang², YANG Yifang^{2,3}, LI Xiaofeng⁴, KANG Xingdong⁴, XIAO Junping⁴, WU Yongzhong⁴, YANG Jianqiong^{5*}(1.Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China; 2.China State Institute of Pharmaceutical Industry Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China; 3.Shanghai Yaochen Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 200060, China; 4.Jiangxi Puzheng Pharmaceutical Co., Ltd., Ji'an 343100, China; 5.The Clinical Medical Research Center, The First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To analyze the correlation between the chromatographic peaks of Callicarpae Nudiflorae Folium and its antibacterial effect, establish a mathematical model of the spectrum-effect relationship between them, and reveal the possible material basis of the antibacterial effect of Callicarpae Nudiflorae Folium. **METHODS** HPLC was used to detect 10 batches of medicinal herbs and different extracts of Callicarpae Nudiflorae Folium, and the fingerprints of medicinal herbs and 6 different extracts of Callicarpae Nudiflorae Folium were established. Similarity software was used to screen the fingerprints of extracts and medicinal herbs. The common peaks of the selected peaks with a matching number > 2 were used for spectral effect correlation analysis. Six different extracts were tested *in vivo* and *in vitro*. Used SPSS statistical software to study the correlation between common peak and antibacterial activity, and establish a mathematical model by linear regression. **RESULTS** There were a total of 35 common peaks, 21 of which were related peaks. Pearson correlation analysis showed a positive correlation between the correlation peak and the antibacterial effect *in vivo*, and a negative correlation between the antibacterial effect *in vitro*. The model fitting precision was high, the correlation coefficient R^2 was >0.9 except for *Escherichia coli*, and the chromatographic peaks 1(catalpol), 15(forsythiaside B), 23(isoacteoside) and 27(2'-acetylacteoside) were introduced into the spectrum. Effective correlation equations were strongly correlated. Chromatographic peaks 1(catalpol), 9(protocatechuic acid), 10(protocatechuic aldehyde), 12, 14(cafeic acid), 16(ferulic acid), 18(verbasic glycosides), 19(luteolin), 23(isoacteoside), 25(2'-acetyl fund staurosides), 27(2'-acetylacteoside), 28(luteolin), 29(querctin), 30, 32(apigenin), 34(isorhamnetin), 35(5,4'-dihydroxy-3,7,3'-trimethoxyflavone) were significantly related to antibacterial effects *in vivo* and *in vitro*. **CONCLUSION** The established spectrum-effect relationship model can better evaluate the correlation between the

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(81402824)

作者简介: 李亚梅, 女, 硕士生 Tel: (0797)8283981 E-mail: 2690984488@qq.com *通信作者: 杨建琼, 女, 硕士, 副教授 Tel: (0797)8283981 E-mail: yangjianqiong2010@163.com

· 1294 · Chin J Mod Appl Pharm, 2021 June, Vol.38 No.11

中国现代应用药学 2021 年 6 月第 38 卷第 11 期

chromatographic peaks of the extract of *Callicarpae Nudiflorae Folium* and its pharmacological effects. It is basically determined that the components of *Callicarpae Nudiflorae Folium* to play antibacterial effects are mainly phenylglycoside compounds, followed by flavonoids. This experiment laid the foundation for the material basic research of *Callicarpae Nudiflorae Folium*.

KEYWORDS: *Callicarpae Nudiflorae Folium*; fingerprint; antibacterial effect; spectrum-effect relationship

中药谱效关系在中医理论指导下,将中药指纹图谱和药效学通过化学计量学模型进行关联,建立以化学分析与生物活性评价相结合的综合评价体系,有助于揭示中药药效的物质基础,成为中药有效成分预测和质量评价的方法之一。中药指纹图谱能够揭示中药的化学成分,在整体上评价中药的质量,具有特征性、专属性、稳定性和完整性等特点。但指纹图谱的研究与建立只是对中药化学成分的稳定性和可控性实现改进,而没有与中药的药效建立直接的内在联系。谱效关系的研究建立在指纹图谱的基础上,指纹图谱提供了复杂体系的化学成分信息,药理学研究提供了其活性信息,谱效关系的研究使二者有效结合,更可靠地揭示中药药效的物质基础。目前谱效关系的研究方法有相关性分析、回归分析、主成分分析、灰色关联度分析、聚类分析和典型相关分析等^[1-6]。

裸花紫珠(*Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn.)为马鞭草科紫珠属植物,主要生长于长江流域以南,分布在江西、福建、广东、广西、海南等地区。其别名为贼子叶,黎药名补阔,是一种海南大宗地道药材,是海南黎族医师常用药材之一^[7]。以其干燥叶^[8]或带嫩枝的叶^[9]为药用,化学成分主要包括黄酮类、苯乙醇苷类、萜类、挥发油和酚类等^[10],具有抗菌消肿^[11]、止血凝血^[12]、消炎解毒^[13]、收敛^[14]等作用。

目前,对于裸花紫珠的指纹图谱^[15-18]和抗菌作用^[19-21]均有文献报道,但对于裸花紫珠发挥抗菌作用的具体物质基础研究还不深入。故本研究首先建立裸花紫珠药材指纹图谱,然后取其中的药材分别采用不同极性溶媒提取,并将其中中极性提取部分进行分离,得到不同提取物,对裸花紫珠不同提取物的 HPLC 指纹图谱与其抗菌作用之间的谱效关系进行研究,通过 SPSS 统计软件进行指纹图谱与抗菌活性的相关性研究,并建立数学模型,以期能够表征裸花紫珠抗菌活性成分。

1 材料

1.1 仪器与试剂

1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent); SPSS

22.0 统计分析软件; FA1004 电子天平(上海精科天平厂); HGPB-32 隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂); YXQ-2S-50S II 立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); BSC-1500 II A2-X 生物安全柜(济南鑫贝亚生物技术有限公司); M-IT-P 多点接种器(日本 SAKUMA); SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台(苏州净化)。

裸花紫珠药材由江西普正制药有限公司提供,经江西普正制药有限公司吴永忠研究员鉴定为马鞭草科裸花紫珠,药材信息见表 1。裸花紫珠颗粒(江西普正制药有限公司,批号:150512;规格:每袋 3 g,含干浸膏 0.8 g 相当于含裸花紫珠生药 2.89 g);阿莫西林胶囊(澳美制药厂,批号:150110;规格:每粒含阿莫西林 0.5 g);氯化钠(南京化学试剂有限公司,批号:140709);甲硝唑片(上海信谊万象药业股份有限公司,批号:03150202;规格:每片含甲硝唑 0.2 g);营养琼脂(上海盛思生化科技有限公司,批号:141125);营养肉汤(上海盛思生化科技有限公司,批号:140523);绵羊红细胞(江宁防疫站,批号:20150710);胃膜素(重庆市江峡生化制药有限公司,批号:140322);毛蕊花糖苷对照品(批号:M-001-170315;纯度 $\geq 98\%$);鞣质苷 B 对照品(批号:L-013-170421;纯度 $\geq 98\%$)均购自成都瑞芬思生物科技有限公司;木犀草苷对照品(成都普瑞法科技开发有限公司,批号:PRF8030242;纯度 $\geq 98\%$);异毛蕊花糖苷(上海医药工业研究院中药研究部实验室自制,纯度 $\geq 98\%$)。

乙腈、磷酸均为色谱纯,购自美国 ACS 公司;乙醇、甲醇均为分析纯,购自上海泰坦科技股份有限公司;水为自制重蒸水。

表 1 裸花紫珠药材信息

Tab. 1 Medicine information of *Callicarpae Nudiflorae Folium*

海南五指山产		海南白沙产	
实验批号	采收时间	实验批号	采收时间
W1	7月15日	B1	7月15日
W2	7月30日	B2	7月30日
W3	8月15日	B3	8月15日
W4	8月30日	B4	8月30日
W5	9月15日	B5	9月15日

1.2 试验菌株

体内抗菌试验菌株：临床分离大肠杆菌、金黄色葡萄球菌，由江苏省人民医院微生物鉴定室提供。

体外抗菌试验菌株：耐药性金黄色葡萄球菌(耐甲氧西林)、大肠杆菌、摩尔根变形杆菌，3株标准菌株由上海医药工业研究院菌株保藏室提供。

1.3 动物

ICR 小鼠 400 只，体质量 18~22 g，♀♂各半，由南通大学实验动物中心提供，生产许可证号：SCXK(苏)2014-0010，用全价营养颗粒饲料(江苏协同医药技术有限责任公司)饲养，自由饮水，室温(22±2)℃，湿度 55%~65%。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱 Welch Material C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)；流动相：0.5%磷酸(A)-乙腈(B)，梯度洗脱，0~10 min, 82%→80%A, 10~20 min, 80%→76%A, 20~25 min, 76%A, 25~30 min, 76%→82%A；流速 1 mL·min⁻¹；柱温 35℃；UV-DAD 检测器；检测波长 330 nm；进样量 10 μL；总时间 30 min。

2.1.2 供试品溶液的制备 供试品溶液 1：取裸花紫珠药材烘干，粉碎过 4 号筛，备用。提取物 1、提取物 2 和提取物 3：取裸花紫珠粉末各 2 kg，分别加 10 倍量水、60%乙醇、95%乙醇提取回流提取 2 h，合并滤液减压回收至干，即得提取物 1(每克浸膏粉含 3.62 g 生药)、提取物 2(每克浸膏粉含 2.82 g 生药)和提取物 3(每克浸膏粉含 3.85 g 生药)。提取物 4、提取物 5 和提取物 6：取部分提取物 2 加适量水溶解，过 AB-8 大孔吸附树脂柱，用水洗脱至洗脱液澄清，合并洗脱液，减压回收至干，即得提取物 4(每克浸膏粉含 7.19 g 生药)；再改以 40%乙醇继续洗脱至洗脱液澄清，合并洗脱液减压回收至干，得提取物 5(每克浸膏粉含 7.07 g 生药)；再改以 60%乙醇继续洗脱至洗脱液澄清，合并洗脱液减压回收至干得提取物 6(每克浸膏粉含 55.56 g 生药)。取相当于生药量 1 g 的各提取物浸膏粉，精密加入 50%甲醇 50 mL，充分溶解，滤过，取续滤液，即得。

供试品溶液 2：取裸花紫珠药材 60℃真空干燥，粉碎过 4 号筛，粉末约 1 g，精密称定，置具塞茄形瓶中，精密加入 50%甲醇 50 mL，称定质量，

加热回流 1 h，放冷，再称定质量，用 50%甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.1.3 裸花紫珠药材指纹图谱 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液 1，按“2.1.1”项下色谱条件进样，得代表性的裸花紫珠药材的指纹图谱，以中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)筛选出 35 个共有指纹峰，其中连翘酯苷 B 的色谱峰(15 号峰)分离度良好、峰面积适中，故被确定为内参比峰。

2.1.4 方法学考察 仪器精密度考察：精密称取样品(B4)粉末 1 份(1.0 g)，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液 2，按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次，测得各指纹峰的相对保留时间 RSD<0.2%，相对峰面积 RSD<1.8%，该方法的精密度良好；重复性考察：精密称取样品(B4)粉末 6 份，每份 1.0 g，分别按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液 2，按“2.1.1”项下色谱条件下依次进样，测得各指纹峰的相对保留时间 RSD<0.2%，相对峰面积 RSD<2.3%，该方法的重复性良好；稳定性考察：精密称取样品(B4)粉末 1 份(1.0 g)，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液 2，按“2.1.1”项下色谱条件分别在 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 分别进样，测得各指纹峰的相对保留时间 RSD<0.2%，相对峰面积 RSD<2.7%，供试品溶液在 24 h 内稳定；相似度评价：所有裸花紫珠药材的色谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 版)，进行相似度计算。10 批裸花紫珠药材的 HPLC 指纹图谱相似度在 0.913~0.997；白沙产 7~9 月 5 批样品图谱相似度在 0.982~0.999；五指山产 7~9 月 5 批样品图谱相似度 0.975~0.991；说明各批裸花紫珠药材质量稳定。

2.1.5 提取物指纹图谱 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液 1，按“2.1.1”项下色谱条件下进样，得 6 个不同提取物的 HPLC 指纹图谱。以裸花紫珠药材的指纹图谱作为对照指纹图谱与 6 个提取物 HPLC 色谱图进行比较。共有 35 个共有峰从中筛选匹配数>2 的色谱峰进行谱效相关性分析，共从 6 种不同提取物色谱峰筛选出 21 个相关峰。结果见图 1。

2.2 统计学分析

体内抗菌试验与体外抗菌试验均采用 *t* 检验比较组间差异，采用 SPSS 19.0 进行分析。*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

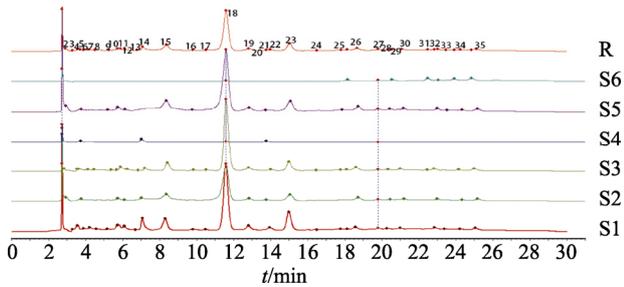


图1 裸花紫珠药材与提取物指纹图谱叠图

Fig. 1 Overlay of fingerprints of the medicinal herbs and extract of *Callicarpae Nudiflorae Folium*

2.3 体内抗菌试验

2.3.1 试剂配制 裸花紫珠颗粒:取10袋颗粒剂,加100 mL蒸馏水溶解;阿莫西林胶囊:取10粒胶囊加67 mL蒸馏水溶解(现配现用);罗红霉素胶囊:取4粒胶囊加80 mL蒸馏水溶解;提取物1:精密称取10 g浸膏粉加120 mL蒸馏水溶解;提取物2:精密称取12 g浸膏粉加112 mL蒸馏水溶解;提取物3:精密称取10 g浸膏粉加128 mL蒸馏水溶解;提取物4:精密称取12 g浸膏粉加142 mL蒸馏水溶解;提取物5:精密称取6 g浸膏粉加140 mL蒸馏水溶解;提取物6:精密称取1 g浸膏粉加185 mL蒸馏水溶解,均按 $0.2 \text{ mL} \cdot (10 \text{ g})^{-1}$ 灌胃给药。

2.3.2 试验菌株培养 取临床分离金黄色葡萄球菌菌株(肺炎双球菌菌株)接种于肉汤培养基中,37 °C培养18 h,取出划线于10%羊血琼脂平板上,置37 °C培养20 h,取5%胃膜素溶液(pH 7.2)4 mL,洗脱菌落,并用4 mL生理盐水洗净,合并后吹打,使菌落分散,金黄色葡萄球菌稀释到浓度为 $0.20 \sim 0.25 \text{ mL} \cdot \text{mL}^{-1}$,肺炎双球菌稀释到浓度为 $0.20 \sim 0.25 \text{ mL} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3.3 抗金黄色葡萄球菌作用 ICR小鼠随机分10组,每组20只,分别为正常组、模型组、阿莫西林组、裸花紫珠颗粒组及裸花提取物1组、2组、3组、4组、5组、6组。以上各组小鼠适应性饲养3 d后均灌胃给药,给药量为 $0.2 \text{ mL} \cdot (10 \text{ g})^{-1}$,每天1次,连续7 d,第5天给药后1 h,各组小鼠(除正常组外)均腹腔注射金黄色葡萄球菌菌液每只0.5 mL(经预实验得到金黄色葡萄球菌菌液浓度在 $0.20 \sim 0.25 \text{ mL} \cdot \text{mL}^{-1}$ 较为适宜,该浓度下小鼠死亡率在80%~90%),正常组给予等量生理盐水。继续给药2 d,观察各组注入金黄色葡萄球菌菌液后7 d内小鼠死亡情况,比较组间差异,计算存活天数、存活率。6种不同提取物均能对感染金黄色葡萄球

菌小鼠的存活天数产生延长作用,其中裸花提取物1,2和3组作用较为明显。结果见表2。

表2 裸花紫珠提取物对感染金黄色葡萄球菌小鼠死亡情况的影响($n=20$)

Tab. 2 Effect of *Callicarpae Nudiflorae Folium* extract on the death of *S. aureus* infected mice($n=20$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	死亡数/只	存活率/%	存活天数/d
正常组	等量生理盐水	0	100	7.00±0.00
模型组	等量生理盐水	19	5	1.60±1.35 ¹⁾
阿莫西林组	0.75	9	55 ³⁾	4.55±2.82 ³⁾
裸花紫珠颗粒组	6.0	15	25	3.10±2.40 ²⁾
裸花提取物1组	6.0	13	35 ²⁾	3.60±2.62 ³⁾
裸花提取物2组	6.0	15	25	3.00±2.42 ²⁾
裸花提取物3组	6.0	14	30 ²⁾	3.25±2.57 ³⁾
裸花提取物4组	6.0	16	20	2.55±2.35
裸花提取物5组	6.0	15	25	2.70±2.58
裸花提取物6组	6.0	16	20	2.45±2.37

注:与正常组比较,¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较,²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

2.3.4 抗肺炎双球菌作用 ICR小鼠随机分10组,每组20只,分别为正常组、模型组、阿莫西林组、裸花紫珠颗粒组及裸花提取物1组、2组、3组、4组、5组、6组。各组小鼠适应性饲养3 d后均灌胃给药,给药量为 $0.2 \text{ mL} \cdot (10 \text{ g})^{-1}$,每天1次,连续7 d,第5天给药后1 h,各组小鼠(除正常组外)均腹腔注射肺炎双球菌菌液每只0.5 mL(经预试验得到肺炎双球菌菌液浓度在 $0.20 \sim 0.25 \text{ mL} \cdot \text{mL}^{-1}$ 较为适宜,该浓度下小鼠死亡率为80%~90%),正常组给予等量生理盐水。连续给药2 d,观察各组注入肺炎双球菌菌液后7 d内小鼠死亡情况,比较组间差异,计算存活天数、存活率。6种不同提取物均能延长小鼠的存活天数,其中提取物1,2,3,4,5均对延长小鼠存活天数有明显作用,提取物1和2具有显著作用。结果见表3。

2.4 体外抗菌试验

2.4.1 体外抗菌试剂配制 提取物1~5:分别精密称取4 g,加入50%无水乙醇至8 mL;提取物6:精密称取3.5 g,加入50%无水乙醇至7 mL;裸花紫珠颗粒2袋、甲硝唑片10片分别用研钵研成粉末后,裸花紫珠颗粒加入50%无水乙醇至12.8 mL,甲硝唑片至8 mL;用灭菌水稀释,采用倍比稀释法,配成500,250,125,62.5,31.25,15.6,7.8,3.9,1.95,0.98 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的不同浓度,使用前加温混匀,量取所需体积的灭菌水作为空白对照。

表 3 裸花紫珠提取物对感染肺炎双球菌小鼠死亡的保护作用(n=20)

Tab. 3 Protective effect of the extract of *Callicarpae Nudiflorae* Folium on the death of mice infected with *Pneumococcus*(n=20)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	死亡数/只	存活率/%	存活天数/d
正常组	等量生理盐水	0	100	7.00±0.00
模型组	等量生理盐水	17	15	2.65±2.01 ¹⁾
阿莫西林组	0.75	6	60 ³⁾	5.50±2.40 ³⁾
裸花紫珠颗粒组	6.0	10	50 ²⁾	4.50±2.63 ³⁾
裸花提取物 1 组	6.0	9	55 ³⁾	4.80±2.53 ³⁾
裸花提取物 2 组	6.0	9	55 ³⁾	4.85±2.50 ³⁾
裸花提取物 3 组	6.0	12	40	4.15±2.43 ²⁾
裸花提取物 4 组	6.0	11	45 ²⁾	4.30±2.54 ²⁾
裸花提取物 5 组	6.0	11	45 ²⁾	4.40±2.46 ²⁾
裸花提取物 6 组	6.0	11	45 ²⁾	4.20±2.65

注：与正常组比较，¹⁾P<0.01；与模型组比较，²⁾P<0.05，³⁾P<0.01。
 Note: Compared with the normal group, ¹⁾P<0.01; compared with the model group, ²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01.

2.4.2 菌株培养与接种 采用琼脂稀释法，取“2.3.1”项下各稀释液 1 mL，分别加到无菌平皿内，倾注 9 mL M.H 琼脂培养基，另外设 2 个不含药的培养基，作为空白对照组和菌对照组，用多点接种仪定量接种，每点接种 10⁵ CFU，于 37 °C 恒温培倒置培养 22 h 后，观察并记录结果。分别对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、摩尔根变形杆菌进行了体外抗菌试验，试验结果以药物抑制细菌生长的最低浓度为最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。结果显示提取物 2, 3, 5 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和摩尔根变形杆菌的体外抑菌效果比裸花紫珠颗粒和甲硝唑片好。结果见表 4。

表 4 8 个样品抗菌活性 MIC 结果
 Tab. 4 MIC results of antibacterial activity of 8 samples

菌种	提取物 1	提取物 2	提取物 3	提取物 4	提取物 5	提取物 6	裸花紫珠颗粒	甲硝唑片
金黄色葡萄球菌	0.39	0.19	0.78	6.25	0.09	6.25	6.25	12.50
大肠杆菌	12.50	1.56	3.13	25.00	0.78	>25.00	6.25	0.78
摩尔根变形杆菌	0.78	0.78	1.56	6.25	0.19	6.25	6.25	12.50

2.5 谱效相关性分析

2.5.1 色谱峰面积与对裸花紫珠体内抗菌作用的相关性分析 将数据导入 SPSS 19.0 软件分析裸花紫珠不同提取物色谱指纹峰与其药效作用之间

的关系，相关分析结果见表 5。Pearson 相关分析结果显示色谱峰 9, 12, 14, 16, 18(毛蕊花糖苷), 19(木犀草苷), 23(异毛蕊花糖苷), 25, 27, 28, 29, 32, 34 与感染金黄色葡萄球菌小鼠的保护作用呈显著相关，其中色谱峰 12, 19(木犀草苷), 23(异毛蕊花糖苷)和 29 呈极显著相关；色谱峰 1 和 10 与感染肺炎双球菌小鼠的保护作用呈显著相关，其中色谱峰 1 呈极显著相关，且均为正相关关系。结合前期裸花紫珠化学成分分析^[22]，指认色谱峰 1, 9, 10, 14, 16, 25, 27, 28, 29, 32, 34 分别为梓醇、原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、阿魏酸、2'-乙酰基金石蚕苷、2'-乙酰基毛蕊花糖苷、木犀草素、槲皮素、芹菜素、异鼠李素。可认为裸花紫珠发挥体内抗菌作用是黄酮类化合物与苯乙醇苷类化合物起主要作用，酚酸类小分子化合物与环烯醚萜类化合物起协同作用。

2.5.2 裸花紫珠体外抗菌作用的相关性分析 将数据导入 SPSS 19.0 软件分析裸花紫珠不同提取物色谱指纹峰与其体外抗菌药效作用之间的关系，相关分析结果见表 6。Pearson 相关性分析结果显示色谱峰 15(连翘脂苷 B), 18(毛蕊花糖苷), 19(木犀草苷), 27, 28, 29, 30, 32, 34, 35 与抗金黄色葡萄球菌 MIC 呈现显著相关，其中色谱峰 15, 18 和 35 呈现极显著相关；色谱峰 15, 18, 27, 30, 35 与抗大肠杆菌 MIC 呈显著相关；色谱峰 15, 18, 19, 27, 28, 29, 30, 32, 35 与抗摩尔根变形杆菌 MIC 呈显著相关，其中色谱峰 15 呈极显著相关，且均为负相关关系。结合前期实验对裸花紫珠化学成分分析^[22]，指认色谱峰 27, 28, 29, 32, 34, 35 分别为 2'-乙酰基毛蕊花糖苷、木犀草素、槲皮素、芹菜素、异鼠李素、5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮。可认为裸花紫珠发挥体外抗菌作用主要是黄酮类化合物与苯乙醇苷类化合物共同作用。

2.6 建立谱效关系模型

2.6.1 主成分分析 通过 SPSS 19.0 主成分分析对裸花紫珠的 6 种不同提取物的 21 个相关峰进行主成分分析，从而寻找出相关峰对 6 种提取物组分间差异有较大影响且较大累计贡献率的指标，使谱效关系评价更准确。保留主成分个数累计贡献率>80%、特征值>1、经过 KMO(越接近 1 越适合主成分分析)和 Bartlett 检验(P<0.01)的成分。

表 5 相关峰峰面积与体内抗菌作用的 Pearson 相关分析结果

Tab. 5 Pearson correlation analysis results of correlation peak areas and antibacterial effect *in vivo*

峰号	Pearson 相关性		峰面积					
	感染金黄色葡萄球菌的保护作用	感染肺炎双球菌的保护作用	提取物 1	提取物 2	提取物 3	提取物 4	提取物 5	提取物 6
P1	0.629	0.971 ²⁾	342.127	314.187	26.074	30.737	169.322	3.066
P2	-0.008	0.503	0.000	50.996	8.646	0.000	31.063	0.000
P5	-0.071	0.545	0.000	28.093	3.143	6.102	11.159	0.000
P9	0.852 ¹⁾	0.258	6.899	0.000	3.923	0.000	2.676	0.000
P10	0.741	0.890 ¹⁾	74.968	41.304	3.886	0.000	26.246	0.000
P12	0.941 ²⁾	0.609	43.353	12.099	15.888	0.000	7.564	0.000
P14	0.862 ¹⁾	0.731	132.282	51.115	28.810	19.992	0.000	0.000
P15	0.667	0.639	196.656	167.860	118.067	0.000	202.571	0.000
P16	0.860 ¹⁾	0.385	18.271	0.000	6.751	0.000	4.004	0.000
P18	0.874 ¹⁾	0.518	1 085.883	1 029.069	1 136.899	6.616	662.935	1.340
P19	0.947 ²⁾	0.629	74.698	54.589	55.704	0.000	32.285	0.000
P23	0.962 ²⁾	0.682	318.200	162.745	158.693	0.000	104.078	0.000
P25	0.896 ¹⁾	0.185	20.079	0.000	14.579	0.000	3.989	0.000
P27	0.820 ¹⁾	0.456	45.767	52.260	58.142	2.686	30.596	1.869
P28	0.875 ¹⁾	0.801	20.476	16.766	10.538	0.000	9.576	0.000
P29	0.926 ²⁾	0.558	12.654	9.907	11.056	0.000	6.469	0.859
P30	0.797	0.646	19.095	24.241	18.867	0.000	10.900	1.186
P32	0.859 ¹⁾	0.522	19.175	19.777	20.672	0.000	10.995	2.057
P33	0.583	0.495	3.990	0.000	0.000	0.000	2.005	0.248
P34	0.862 ¹⁾	0.523	9.663	10.209	10.477	0.000	4.537	1.570
P35	0.806	0.639	32.473	38.848	31.316	0.000	20.288	2.404

注: ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01。

Note: ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01.

表 6 裸花紫珠体外抗菌 Pearson 相关分析结果

Tab. 6 Results of *in vitro* antibacterial Pearson correlation analysis of *Callicarpae Nudiflorae Folium*

峰号	抗金黄色葡萄球菌 MIC	抗大肠杆菌 MIC	抗摩尔根变形杆菌 MIC
P1	-0.699	-0.486	-0.714
P2	-0.589	-0.739	-0.596
P5	-0.404	-0.550	-0.402
P9	-0.591	-0.326	-0.590
P10	-0.655	-0.367	-0.672
P12	-0.616	-0.302	-0.607
P14	-0.437	-0.108	-0.425
P15	-0.965 ²⁾	-0.849 ¹⁾	-0.981 ²⁾
P16	-0.503	-0.187	-0.504
P18	-0.929 ²⁾	-0.827 ¹⁾	-0.897 ¹⁾
P19	-0.885 ¹⁾	-0.701	-0.860 ¹⁾
P23	-0.790	-0.531	-0.777
P25	-0.528	-0.277	-0.506
P27	-0.904 ¹⁾	-0.848 ¹⁾	-0.865 ¹⁾
P28	-0.881 ¹⁾	-0.682	-0.870 ¹⁾
P29	-0.903 ¹⁾	-0.750	-0.875 ¹⁾
P30	-0.895 ¹⁾	-0.814 ¹⁾	-0.861 ¹⁾
P32	-0.903 ¹⁾	-0.809	-0.866 ¹⁾
P33	-0.448	-0.140	-0.490
P34	-0.853 ¹⁾	-0.755	-0.810
P35	-0.921 ²⁾	-0.834 ¹⁾	-0.891 ¹⁾

注: ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01。

Note: ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01.

从上述主成分分析能够确定 2 个主要成分, 其中第一主成分贡献率为 64.9%, 第二主成分贡献率为 22.0%, 2 个主成分的累计贡献率为 86.9%, 符合要求。另外, 利用 SPSS 19.0 主成分分析实现 6 种提取物的主成分分析荷载成分图分析, 结果见图 2。从图中可以看到提取物 4, 6 在同一区域, 提取物 1, 3, 5 和 2 在同一区域, 同时可明显看到提取物 4, 6 对主成分 2 有显著影响, 提取物 1, 2, 3 和 5 对主成分 1 有显著影响。结合各提取物的 21 个相关峰峰面积推测成分 1 为苯乙醇苷类化合物的贡献度, 成分 2 为黄酮类化合物的贡献度。提取物 4, 6 中含有较多黄酮类成分, 提取物 1, 2, 3 及 5 中含有较多苯乙醇苷类成分。

2.6.2 聚类分析 通过 SPSS 19.0 软件中的 Ward 法聚类分析法对主成分分析进行验证, 分析结果见图 3。提取物 4 和 6 聚为一类, 提取物 1, 2, 3, 5 聚成一类, 结合体内体外抗菌药理试验, 具有明显体内体外抗菌作用的提取物 1, 2, 3, 5 聚为一类, 与主成分分析结果基本一致。结合成分贡献率分析, 推测成分 1 和 2 可能为苯乙醇苷类化合物和黄酮类化合物。

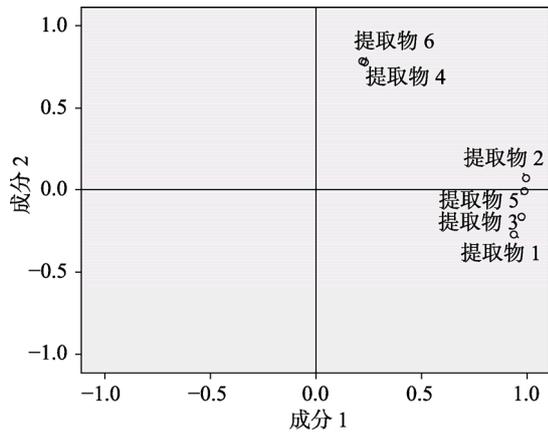


图2 6种不同提取物的主成分分析荷载成分图
Fig. 2 Principal component analysis load composition of 6 different extracts

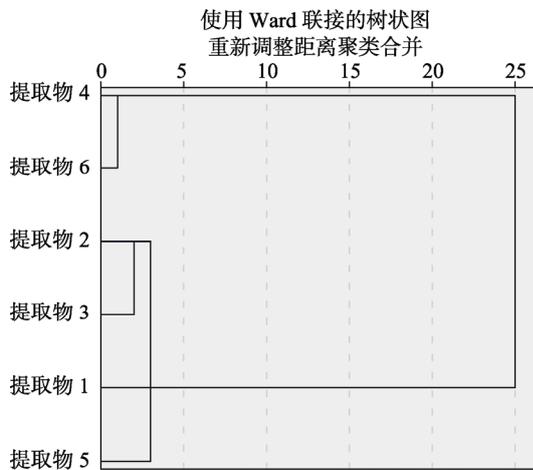


图3 6种不同提取物聚类分析
Fig. 3 Cluster analysis results of 6 different extracts

2.6.3 多元线性回归法拟合裸花紫珠体内体外抗菌作用的数学模型 利用 SPSS 19.0 对数据进行线性回归分析, 采用逐步引入法进行模型拟合。拟合结果见表 7。可以发现色谱峰 1(梓醇)、15(连翘脂苷 B)、23(异毛蕊花糖苷)和 27(2'-乙酰毛蕊花糖苷)分别以不同程度被引入谱效方程, 且建立的所有谱效方程 P 值均 <0.05 , 说明模型具有统计学意义。裸花紫珠不同提取物色谱峰的峰面积与其体内抗菌作用、体外抗菌作用的模型拟合后的相关系数除体外大肠杆菌外均 >0.9 , 说明自变量的差异基本可以解释全部的裸花紫珠体内抗菌和体外抗菌作用的药理活性。可认为模型能较好地评价裸花紫珠色谱峰与药理活性之间的关系。

3 结论

指纹图谱的建立提供了裸花紫珠的化学成分信息, 体内体外抗菌试验提供了裸花紫珠的药理信息, 通过相关性分析及建立相关的谱效关系模

表 7 裸花紫珠抗菌作用的谱效方程

Tab. 7 Spectrum effect equation of antibacterial action of *Callicarpae Nudiflorae Folium*

菌种	谱效方程	R^2	F 值	P 值
体内金黄色葡萄球菌	$Y=2.483+0.004 2X_{23}$	0.925	49.100	0.002
体内肺炎双球菌	$Y=4.164+0.002 2X_1$	0.943	66.561	0.001
体外耐药性金黄色葡萄球菌	$Y=6.323-0.0222X_{15}-0.048 2X_{27}$	0.990	152.988	0.001
体外大肠杆菌	$Y=23.155-0.104 2X_{15}$	0.720	10.297	0.033
体外摩尔根变形杆菌	$Y=6.036-0.030 2X_{15}$	0.963	104.715	0.001

型, 将色谱信息与药理信息联系在一起。建立的数学模型在统计学上有意义, 相关系数较高, 能较好地揭示色谱峰与药理活性之间的关系。主成分分析和聚类分析推测提取物 1, 2, 3, 5 中可能含有大量苯乙醇苷类化合物和黄酮类化合物。通过谱效关系相关性分析以及谱效方程的建立, 基本能够确定裸花紫珠发挥抗菌作用的主要成分为苯乙醇苷类化合物和黄酮类化合物, 酚酸类小分子化合物与环烯醚萜类化合物梓醇发挥协同作用。

相关性分析结果表明色谱峰 1, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 23, 25, 27, 28, 29, 32, 34 与体内抗金黄色葡萄球菌和肺炎双球菌呈现显著相关, 其中色谱峰 1, 12, 19, 23, 29 呈极显著相关; 色谱峰 15, 18, 19, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 35 与体外抗耐药性金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和摩尔根变形杆菌呈现显著相关, 其中色谱峰 15, 18, 35 呈极显著相关。故可认为色谱峰 1(梓醇), 9(原儿茶酸), 10(原儿茶醛), 12, 14(咖啡酸), 16(阿魏酸), 18(毛蕊花糖苷), 19(木犀草苷), 23(异毛蕊花糖苷), 25(2'-乙酰基金石蚕苷), 27(2'-乙酰基毛蕊花糖苷), 28(木犀草素), 29(槲皮素), 30, 32(芹菜素), 34(异鼠李素), 35(5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲氧基黄酮)可能是裸花紫珠发挥体内体外抗菌作用的物质基础。

同时建立的谱-效关系模型能较好地评价裸花紫珠提取物色谱峰与其药理作用之间的相关关系, 实现了裸花紫珠指纹图谱与药效作用的关联, 研究结果将为裸花紫珠新药的研究开发奠定物质基础, 有助于完善和构建裸花紫珠药材及其成药制剂质量评价体系, 具有实际应用价值。

REFERENCES

- [1] 杨义芳, 杨扬震, 萧伟. 中药药效物质[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 231-241.
- [2] WEI Q, LIU K M. Research progress on spectrum-effect relationship of traditional Chinese medicine[J]. Tradit Chin

- Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2019, 30(5): 634-638.
- [3] ZHANG X Y, LIU J S, GAO S M, et al. Research methods and applications progress on spectrum-effect relationships in study of traditional Chinese medicine[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44(20): 4405-4411.
- [4] ZHU C S, NIE A Z, WANG X, et al. Research progress on dose-effect relationship of Chinese materia medica[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50(7): 1708-1712.
- [5] XU P C, SHOU D, WU R J, et al. Study on the spectrum-effect relationship between GC-MS fingerprint and antioxidant activity of volatile oil from *Atractylodes macrocephalae* rhizoma[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(11): 1322-1327.
- [6] WANG Y, WANG H X. Progress in the study of profile-effect of traditional Chinese medicine[J]. Chin J Ethnomedicine Ethnopharmacy(中国民族民间医药), 2018, 27(4): 50-52.
- [7] 刘明生. 黎药学概论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 165-197.
- [8] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1982.
- [9] 杜同仿, 黄兆胜. 中国中草药图典(下册)[M]. 广州: 广东科技出版社, 2011.
- [10] FENG S X, ZHANG M, YI B, et al. Research progress on chemical constituents in *Callicarpa nudiflora* and their pharmacological activities[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48(5): 1015-1026.
- [11] XIE Y C, GU S X, ZHU L, et al. Synergistic antibacterial effect of association of *Callicarpa nudiflora* and Vancomycin Hydrochloride towards rat model of MRSA pneumonia[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47(17): 3070-3073.
- [12] CHEN L, XIA Y Y, LIN Z Z, et al. Effects of Luohuazizhu on hemorheological parameters and clotting time in blood-stasis rats[J]. Pharm Today(今日药理学), 2016, 26(2): 73-76.
- [13] 杨子明, 谷陟欣, 颜小捷, 等. 裸花紫珠抗炎活性研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(11): 2620-2622.
- [14] ZHANG X G, LI X M, ZHOU X X, et al. The wound healing effect of *Callicarpa nudiflora* in scalded rats[J]. Evid-Based Complement Altern Med, 2019(2019): 1-8.
- [15] ZHENG D K, CHEN W K, MA S C, et al. Study on HPLC fingerprint of *Callicarpa nudiflora* and determination of ten components[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40(9): 1776-1782.
- [16] MA S Y. The research about HPLC Fingerprint of *Callicarpa nudiflora* in Hainan province[D]. Guangzhou University of Chinese Medicine, 2014.
- [17] MA S Y, SHENG L, GUAN W W, et al. HPLC fingerprint of *Callicarpa nudiflora*[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2014, 37(3): 404-408.
- [18] 邓杰仁, 杨义芳, 李小锋, 等. 裸花紫珠 UPLC 指纹图谱的建立[J]. 中成药, 2020, 42(7): 1926-1930.
- [19] YANG F, DENG H M, NI P L, et al. Study on Co-administration of *Chromolaena odorata* L. and *Callicarpa nudiflora* hook. for hemostasis and Anti-inflammation treatment[J]. Guangzhou Chem Ind(广州化工), 2017, 45(5): 44-46,57.
- [20] GAO X Q, LI C C, ZHOU X. Studies on the pharmacodynamics of the combination of Luohuazizhu and Danmu[J]. Chin J Ethnomedicine Ethnopharmacy(中国民族民间医药), 2017, 26(6): 34-38.
- [21] LUO C X. Hemostatic effects study of *Callicarpa nudiflora*[D]. Nanchang University(南昌大学), 2016.
- [22] LI Y M, YANG Y, YANG Y F, et al. Analysis of different extraction process components of *Callicarpa nudiflora* based on UPLC-QTOF MS/MS technology[J/OL]. Chin Med Mater, 2020(11): 2707-2712.

收稿日期: 2020-04-29
(本文责编: 沈倩)