

# 线叶菊抗耐药性细菌感染有效部位的抗菌活性谱效关系

吕邵娃<sup>1</sup>, 杨阳<sup>1</sup>, 赵爽<sup>1</sup>, 孙爽<sup>1</sup>, 郭玉岩<sup>1</sup>, 杨大宇<sup>1</sup>,  
李国玉<sup>2</sup>, 王秋红<sup>3</sup>, 刘玉婕<sup>1</sup>, 匡海学<sup>1\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学 北药基础与应用研究教育部重点实验室, 黑龙江省中药天然药物药效物质  
基础研究重点实验室, 哈尔滨 150040; 2. 哈尔滨商业大学 药学院, 哈尔滨 150076;  
3. 广东药科大学 药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:建立线叶菊指纹图谱,阐明共有峰所代表的化学成分对抗菌药效贡献的大小,揭示其药效物质基础。方法:采用 HPLC 建立线叶菊的指纹图谱,流动相乙腈-PBS(0.1 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钠与 2% 冰乙酸 1:1 混合)梯度洗脱,检测波长 360 nm。通过线叶菊不同批次样品对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、白色葡萄球菌、副乙型伤寒杆菌和耐药金黄色葡萄球菌的抑制作用来反映其抗菌活性,利用多元线性回归与灰色关联分析方法建立谱效关系。结果:多元线性回归法可知对耐药性金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌和副乙型伤寒杆菌有作用的峰共有 9 个。灰关联度分析得出异鼠李素 3-O-芸香糖苷、异荭草素、异杜荆苷与耐药金黄色葡萄球菌相关;异鼠李素 3-O-β-D-葡萄糖苷、东莨菪内酯、杨梅素、木犀草苷、圣次草苷、异槲皮苷与大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌相关;木犀草素和槲皮素 3-O-芸香糖基-7-O-葡萄糖苷与白色葡萄球菌相关;圣次草苷、芒果苷、杨梅素、芦丁、东莨菪内酯、异鼠李素 3-O-β-D-葡萄糖苷与副乙型伤寒杆菌相关,上述抑菌关联度均达到了 0.8 以上。结论:所建立的 HPLC 指纹图谱方法简便、重复性良好。

[关键词] 线叶菊; 细菌耐药性; 指纹图谱; 抗菌; 谱效关系

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)24-0084-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017240084

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170912.1450.064.html>

[网络出版时间] 2017-09-12 14:50

## Spectrum-effect Relationships of Antibacterial Activity for Effective Parts from *Filifolium sibiricum*

LYU Shao-wa<sup>1</sup>, YANG Yang<sup>1</sup>, ZHAO Shuang<sup>1</sup>, SUN Shuang<sup>1</sup>, GUO Yu-yan<sup>1</sup>, YANG Da-yu<sup>1</sup>,  
LI Guo-yu<sup>2</sup>, WANG Qiu-hong<sup>3</sup>, LIU Yu-jie<sup>1</sup>, KUANG Hai-xue<sup>1\*</sup>

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Chinese Materia Medica (Ministry of Education), Heilongjiang Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmacodynamic Material Bases, Harbin 150040, China; 2. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 3. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC fingerprints and spectrum-effect relationships of different batches of *Filifolium sibiricum*, clarify the contribution of the chemical constituents represented by the common peaks to the antimicrobial efficacy, and reveal the pharmacological basis. **Method:** Fingerprint was established by

[收稿日期] 20170705(006)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81373929);国家“重大新药创制”科技重大专项(2009x09103-358);黑龙江中医药大学创新人才基金项目(2012);省自然科学基金项目(H2016060)

[第一作者] 吕邵娃,博士,教授,从事中药药效物质基础及新药开发,Tel:0451-87266916,E-mail:lswa5599@hotmail.com

[通讯作者] \*匡海学,教授,博士生导师,从事中药及天然药物药效物质基础及中药药性理论研究工作,Tel:0451-82110803,E-mail:hxkuang56@163.com

HPLC method with acetonitrile-PBS ( $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  sodium dihydrogen phosphate and 2% acetic acid mixed 1:1) as the mobile phase for gradient elution and the detection wavelength was 360 nm. The inhibitory effects of different samples of *F. sibiricum* on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, methicillin resistant *S. aureus*, *Bacillus paratyphoid* and *S. albus* were studied to reflect their antibacterial activity. Spectrum-effect relationship was revealed by multivariate linear regression and grey relational analysis method. **Result:** The result of multiple linear regression analysis showed that five antibacterial group experiments (*S. aureus*, *E. coli*, methicillin resistant *S. aureus*, *B. paratyphoid* and *S. albus*) were developed respectively and nine peaks per group were correlated with antibacterial activities. The results of gray correlation analysis indicated that isorhamnetin-3-*O*-rutinoside, isoorientin and isovitexin were correlated with methicillin resistant *S. aureus*; *E. coli* and *S. aureus* were correlated with isorhamnetin-3-*O*- $\beta$ -*D*-glucoside, scopoletin, myricetin, galuteolin, eriocitrin and isoquercitrin; *S. albus* was correlated with luteolin and quercetin 3-*O*-rutinoside-7-*O*-glucoside; and *B. paratyphoid* was correlated with eriocitrin, mangiferin, myricetin, rutin, scopoletin and isorhamnetin-3-*O*- $\beta$ -*D*-glucoside. The above inhibitory correlation degrees were all more than 0.8. **Conclusion:** The established HPLC fingerprint method was simple and reproducible.

[**Key words**] *Filifolium sibiricum*; bacterial drug resistance; fingerprint; antibacterial activity; spectrum-effect relationship

线叶菊是欧亚草原区东缘山地丘陵特有的草原药用植物,为草原的重要建群种,主要分布在我国大兴安岭东西两麓低山丘陵地带、呼伦贝尔草原和锡林郭勒草原东部以及松嫩平原北部。其具有清热解毒、抗菌消炎、安神镇惊、调经止血的功能<sup>[1]</sup>,大孔树脂提纯物具有抗耐药性细菌感染的作用,可用于治疗慢性支气管炎和肾盂肾炎<sup>[2]</sup>等疾病,研究表明线叶菊有效部位对耐药金黄色葡萄球菌、耐药绿脓杆菌、耐药大肠埃希菌、耐药肺炎克雷伯氏菌等具有较强的抑菌和杀菌作用<sup>[3]</sup>,总黄酮(如异荛草素、圣草次苷、牡荆苷等)含量占有效部位的 50% 以上<sup>[4]</sup>,此外还含有香豆素和酚酸类等成分<sup>[5]</sup>。研究结果显示线叶菊化学成分多样性的特点也正是其抗细菌耐药性的优势所在。尽管前期进行了大量的化学成分和抗菌活性研究,但是化学成分与抗菌活性的关联度还不够明确。因此,选择适宜的研究方法来探讨化学成分与药效之间的关联程度是十分必要的。谱效关系研究可以通过合适的数据处理方法,在药理活性与指纹图谱色谱峰面积之间建立关联度,并可有效地推测出主要活性成分及其药效贡献率<sup>[6]</sup>,近年来,在抗菌中药如黄连<sup>[7]</sup>、铁苋菜<sup>[8]</sup>、板蓝根<sup>[9]</sup>等研究中都取得了一定成果。本文为了进一步阐明线叶菊抗耐药性细菌感染有效部位的抗菌活性药效的物质基础,建立了线叶菊有效部位 HPLC 指纹图谱,比较不同批次的线叶菊药材的抗菌活性,同时应用多元线性回归和灰色关联分析方法计算指纹图谱共有峰与抗菌活性的相关

性<sup>[10]</sup>,根据关联度系数来确定各成分对抗菌活性的贡献,从而明确其主要药效成分,为线叶菊质量控制和新药研究提供参考。

## 1 材料

12 批线叶菊药材均采集于黑龙江省大庆市林甸县,经黑龙江中医药大学药学院王振月教授鉴定为菊科植物线叶菊 *Filifolium sibiricum* 的全草。NB 营养肉汤(批号 20080326),NA 营养琼脂(批号 20070822)购自北京奥博星生物技术有限责任公司。红四氮唑(批号 140303)购自上海蓝季科技发展有限公司。氯化钠(批号 20070521)购自成都市科龙化工试剂厂。

东莨菪苷(批号 111809-201102),芒果苷(批号 111607-200301),东莨菪内酯(批号 111809-201102),槲皮素 3-*O*-芸香糖基-7-*O*-葡萄糖苷(批号 0773-9910),芦丁(批号 100080-200707)购自中国食品药品检定研究院。异槲皮苷(批号 21637-25-2),槲皮素(批号 111809-201102),杨梅素(批号 529-44-2),异鼠李素 3-*O*-芸香糖苷(批号 604-80-8),异鼠李素 3-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷(批号 5041-82-7),圣草次苷(批号 13463-28-0),异荛草素(批号 4261-42-1),木犀草素(批号 491-70-3),木犀草苷(批号 5373-11-5),异牡荆苷(批号 13463-28-0)购自北京亿诺辉科技发展有限公司。所有对照品纯度均 >98%。

甲醇、乙腈和冰乙酸为色谱纯,95% 乙醇、磷酸二氢钠为分析级,实验用水为娃哈哈纯净水。

金黄色葡萄球菌(批号 25923),大肠埃希菌(批

号 25922) 购自黑龙江省微生物检疫所菌种保藏中心; 白色葡萄球菌 (批号 26104-6) 购自中国食品药品检定研究院。副乙型伤寒杆菌、耐药金黄色葡萄球菌, 由黑龙江中医药大学附属第一医院检验科分离并鉴定。

2489 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), KQ2400 KDE 型数控超声仪 (昆山市超声仪器有限公司), Buchi 型旋转蒸发仪 (瑞士步琪有限公司), 中药指纹图谱相似度评价软件为 (国家药典委员会, 2004A 版)。

## 2 方法与结果

**2.1 供试品和对照品溶液的制备** 将采集的不同批次线叶菊全草阴干, 碎段, 分别精密称取 20 g, 用 20 倍的 50% 乙醇加热回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 合并提取液, 浓缩, 醇沉去除叶绿素, 过滤, 滤液回收溶剂定容至 10 mL, 上 AB-8 型大孔吸附树脂柱, 收集 30% 乙醇洗脱液, 减压回收溶剂, 干燥, 得线叶菊抗感染有效部位, 用 40% 乙腈将其溶解并定容至 2 mL, 作为供试品溶液。分别精密称定各对照品约 1 mg, 加乙腈使成为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品溶液, 备用。

### 2.2 线叶菊不同批次指纹图谱的建立

**2.2.1 色谱条件** 采用 VenusilxBP  $\text{C}_{18}$  色谱柱 ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$ ), 以 PBS ( $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钠与 2% 冰乙酸 1:1 混合) 为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱 (0 ~ 32 min, 90% ~ 89% A, 32 ~ 45 min, 89% ~ 88.5% A, 45 ~ 48 min, 88.5% ~ 88% A, 48 ~ 50 min, 88% ~ 87% A, 50 ~ 100 min, 87% ~ 82% A), 检测波长 360 nm, 流速  $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , 进样量  $10 \mu\text{L}$ 。

表 1 12 批线叶菊 HPLC 指纹谱量化指纹峰数据

Table 1 *Filifolium sibiricum* moratorium HPLC fingerprint are quantitative fingerprint data

样品	相对峰面积																		相似度
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	$X_8$	$X_9$	$X_{10}$	$X_{11}$	$X_{12}$	$X_{13}$	$X_{14}$	$X_{15}$	$X_{16}$	$X_{17}$	$X_{18}$	
1	1.00	0.72	1.25	2.85	13.35	3.78	24.32	1.59	0.57	8.83	10.93	12.06	5.11	4.39	13.33	2.28	13.4	3.15	92.8
2	1.00	0.69	1.21	2.80	13.30	3.69	24.28	1.57	0.48	8.76	10.66	12.01	5.01	4.34	13.3	2.20	13.29	3.05	92.8
3	1.00	0.82	1.32	2.66	13.23	3.65	24.30	1.68	0.58	8.55	10.89	12.12	5.05	4.96	13.38	2.25	13.18	3.22	92.9
4	1.00	0.81	1.44	2.60	12.99	4.28	23.08	1.52	0.49	8.24	10.34	12.00	6.84	4.80	13.58	2.77	14.56	4.08	95.4
5	1.00	0.70	1.28	3.09	12.80	3.98	24.12	1.54	0.59	7.69	10.66	12.14	5.82	4.97	13.95	2.81	15.55	3.75	93.2
6	1.00	0.76	1.19	2.65	13.80	3.96	23.45	1.59	0.53	8.47	10.31	12.97	6.71	5.11	14.05	3.09	15.08	3.48	95.5
7	1.00	0.69	1.33	3.20	13.56	4.19	24.54	1.58	0.46	7.92	9.12	13.76	5.98	4.93	15.95	2.55	15.07	3.64	94.3
8	1.00	0.72	1.40	3.05	14.08	4.01	23.89	1.66	0.55	8.76	11.09	13.97	6.04	5.12	15.31	2.69	14.56	3.79	95.5
9	1.00	0.68	1.41	2.86	13.09	3.67	24.13	1.56	0.59	7.90	11.13	12.88	5.82	4.91	14.3	2.75	14.99	3.33	95.0
10	1.00	0.71	1.32	2.79	14.33	4.05	23.89	1.85	0.51	8.34	11.4	12.24	5.84	4.94	15.3	2.66	15.55	3.75	94.2
11	1.00	0.78	0.41	2.31	15.60	4.16	23.43	1.86	0.69	7.99	10.89	13.05	5.80	4.60	15.39	2.64	14.67	3.61	95.6
12	1.00	0.84	0.37	3.14	14.69	4.12	23.12	1.79	0.54	8.54	11.56	12.28	5.79	5.08	15.78	2.76	15.22	3.64	96.5

**2.2.2 精密度试验** 精密吸取供试品溶液  $10 \mu\text{L}$ , 按 2.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 结果各色谱峰相对保留时间和峰面积的 RSD 均  $< 3.0\%$ , 表明该仪器的精密度良好。

**2.2.3 重复性试验** 精密称取同一供试品 6 份, 制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 结果各色谱峰的相对保留时间和峰面积的 RSD 均  $< 3.0\%$ , 表明该方法的重复性良好。

**2.2.4 稳定性试验** 精密量取供试品溶液适量, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按 2.2.1 项下色谱条件检测, 计算各色谱峰相对保留时间和峰面积的 RSD 均  $< 3.0\%$ , 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.2.5 指纹图谱的建立** 按 2.2.1 项下色谱条件建立 HPLC 色谱, 将色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”, 建立不同批次线叶菊融合指纹图谱, 对 12 批线叶菊有效部位的指纹图谱的相关参数进行多点校正方法全谱峰匹配, 设定时间窗宽度为 0.1, 以中位数法生成对照图谱, 确定了 12 批线叶菊有效部位的 HPLC 指纹图谱共有模式及叠加, 见图 1, 以峰 1 为内标物得到量化指纹峰数据和指纹图谱的相似度样本数据, 见表 1。线叶菊 HPLC 图谱特征峰数目为 18 个, 并对指纹图谱的共有峰进行了指认, 见图 2。

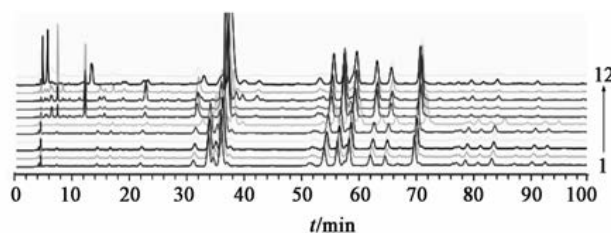
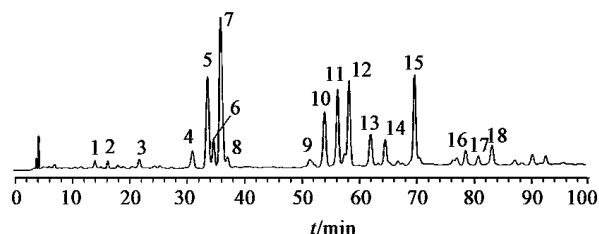


图 1 12 批线叶菊 HPLC 指纹谱叠加

Fig. 1 HPLC fingerprint of *Filifolium sibiricum*



1. 东莨菪苷; 2. 芒果苷; 3. 圣次草苷; 4. 东莨菪内酯; 7. 异荜草素; 9. 芦丁; 10. 槲皮素-3-O-芸香糖基-7-O-glc 苷; 11. 木犀草素; 12. 异杜荆苷; 13. 异槲皮苷; 14. 木犀草苷; 15. 槲皮素; 16. 杨梅素; 17. 异鼠李素-3-O-芸香糖苷; 18. 异鼠李素-3-O-β-D-葡萄糖苷

图 2 指纹图谱中各色谱峰的指认

Fig. 2 Fingerprints in peaks of identification

根据 Bootstap 算法得到计算相似度阈值方法<sup>[11]</sup>, 选  $B = 10\ 000$ ,  $\alpha = 0.05$ , 计算 12 批线叶菊有效部位

的色谱指纹图相似度阈值为 0.938 8。结果显示 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 批次整体相似度良好, 1, 2, 3, 5 批次有所差距。

**2.3 不同批次线叶菊的抑菌实验** 将培养基以无菌操作倾倒在 90 mm 无菌培养皿中, 制成培养基平板。每个平板分别加入浓度为  $1 \times 10^8$  CFU · mL<sup>-1</sup> 的细菌的悬液 0.1 mL, 无菌棉棒均匀涂布。用打孔器 (直径为 6 mm) 在涂菌的平板上打孔, 并向孔中分别加入药液 100 μL, 同时以无菌水制备空白对照。37 °C 培养箱中培养 24 h, 观察细菌生长情况。用打孔法测量不同批次线叶菊对 5 种细菌的抑菌圈直径, 测量结果见表 2。

表 2 线叶菊提取物对 5 种菌的抑菌圈直径的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of extract of *Filifolium sibiricum* extracts on diameter of inhibitory ring of 5 kinds of bacteria ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) mm

样品	耐药金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	白色葡萄球菌	副乙型伤寒杆菌
1	2.33 ± 0.58	0.27 ± 0.25	0.13 ± 0.15	0.10 ± 0.10	0.13 ± 0.15
2	2.50 ± 0.00	0.30 ± 0.26	0.17 ± 0.06	9.50 ± 0.50	0.17 ± 0.06
3	5.83 ± 0.29	1.23 ± 0.25	0.23 ± 0.21	1.06 ± 0.21	0.10 ± 0.10
4	6.17 ± 0.29	1.37 ± 0.15	0.20 ± 0.20	1.10 ± 0.10	0.00 ± 0.00
5	2.33 ± 0.58	0.27 ± 0.31	1.07 ± 0.06	2.03 ± 0.06	0.90 ± 0.10
6	5.33 ± 0.58	0.20 ± 0.17	1.10 ± 0.10	2.07 ± 0.12	2.03 ± 0.06
7	6.83 ± 0.29	1.17 ± 0.15	1.17 ± 0.12	3.13 ± 0.15	0.00 ± 0.00
8	8.03 ± 0.41	1.30 ± 0.26	2.10 ± 0.17	3.23 ± 0.23	0.13 ± 0.06
9	8.17 ± 0.29	1.17 ± 0.21	2.00 ± 0.10	3.87 ± 0.15	0.30 ± 0.20
10	9.23 ± 0.25	1.19 ± 0.15	3.13 ± 0.12	4.07 ± 0.06	0.37 ± 0.15
11	3.17 ± 0.29	0.23 ± 0.25	1.20 ± 0.20	2.07 ± 0.12	0.00 ± 0.00
12	4.93 ± 0.12	0.24 ± 0.26	1.27 ± 0.15	3.13 ± 0.06	1.10 ± 0.10

**2.4 线叶菊指纹图谱与抑菌作用的谱效关系**

**2.4.1 谱效多元回归分析** 利用 SPSS 中多元线性回归分析进行处理 (保留  $P < 0.05$  的各因素), 以量化指纹峰  $X_1 \sim X_{18}$  为自变量 ( $X$ ), 每种细菌的抑菌圈

为因变量 ( $Y$ ), 以多元线型回归-逐步回归法建立方程筛选出的对药效有显著贡献的峰<sup>[12]</sup>, 建立抑菌谱效关系。所建立的方程见表 3。

模型拟合后初步可知, 对耐药性金黄色葡萄球

表 3 线叶菊抑菌作用的谱效方程

Table 3 Spectral equations of *Filifolium sibiricum* antibacterial effect

细菌	谱效方程	R <sup>2</sup>
耐药金黄色葡萄球菌	$Y = -16.403 - 10.345X_2 + 15.786X_3 - 8.210X_4 + 1.028X_6 + 15.340X_8 - 3.487X_9 - 2.183X_{10} + 2.218X_{12} - 1.242X_{18}$	0.928
大肠埃希菌	$Y = -7.08 - 0.405X_2 + 5.768X_3 - 0.452X_4 + 0.543X_5 - 0.307X_{10} - 0.156X_{11} - 0.03X_{14} - 0.282X_{16} + X_{18}$	0.914
金黄色葡萄球菌	$Y = -2.55 - 13.888X_2 + 0.503X_3 - 2.468X_4 + 0.964X_5 - 0.878X_{10} + 0.428X_{11} + 2.746X_{14} - 1.959X_{16} + 0.558X_{18}$	0.902
白葡萄球菌	$Y = -13.949 - 37.001X_2 + 12.316X_3 + 1.465X_4 + 2.697X_5 - 0.284X_{10} - 0.341X_{11} - 8.354X_{14} + 10.503X_{16} + 1.366X_{18}$	0.852
副乙型伤寒杆菌	$Y = 5.247 - 0.189X_2 - 5.766X_3 - 0.95X_4 - 0.381X_5 + 0.155X_{10} + 0.048X_{11} + 1.779X_{14} + 0.547X_{16} - 0.291X_{18}$	0.922

菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌和副乙型伤寒杆菌有作用的峰 ( $X$ ) 分别有 9 个, 且其总贡献率分别为 92.8%, 91.4%, 85.2%, 90.2%,

92.2%。表明回归性显著, 可信, 具有统计学意义。

**2.4.2 灰关联度分析** 利用两序列曲线几何形状的相似程度来判断联系的紧密性, 曲线越接近, 则相

应序列之间的关联性就越大,关联性的大小用关联度来表示。关联度大小的顺序用来判别因素对指标的影响大小。利用 DPS 数据处理系统将反应线叶菊抑菌活性的药效指标抑菌圈为母序列,线叶菊各

部位共有峰的量化指纹峰峰面积作为子序列。将子序列对同一母序列的关联度按大小排序,得关联序<sup>[12]</sup>。关联序为各共有峰关联度的排序,反映了其对抑菌药效贡献大小的相对顺序,结果见表 4。

表 4 线叶菊不同批次指纹图谱与其抑菌作用的灰色关联分析

Table 4 Gray correlation analyses of fingerprints of different batches of *Filifolium sibiricum* and its bacteriostasis

排序	耐药金黄色葡萄球菌		大肠埃希菌		金黄色葡萄球菌		白色葡萄球菌		副乙型伤寒杆菌	
	峰号	关联度	峰号	关联度	峰号	关联度	峰号	关联度	峰号	关联度
1	17	0.836 0	6	0.898 6	18	0.843 4	11	0.807 3	3	0.913 0
2	5	0.819 8	18	0.895 7	6	0.840 1	10	0.805 6	8	0.910 2
3	7	0.818 6	4	0.870 0	16	0.836 3	13	0.798 4	2	0.872 7
4	12	0.813 6	16	0.866 9	4	0.831 4	14	0.780 1	16	0.862 5
5	11	0.780 1	14	0.860 5	8	0.819 9	6	0.761 3	9	0.848 6
6	10	0.763 8	8	0.855 5	14	0.819 9	12	0.760 6	4	0.839 7
7	13	0.695 3	3	0.827 6	3	0.811 1	18	0.749 7	18	0.806 2
8	14	0.657 1	13	0.804 0	13	0.801 6	5	0.747 3	6	0.786 2
9	6	0.621 0	2	0.771 4	2	0.756 3	17	0.723 5	14	0.749 5
10	18	0.603 7	9	0.753 3	10	0.737 5	4	0.713 6	13	0.721 9
11	4	0.578 6	10	0.703 0	9	0.737 4	16	0.709 6	10	0.640 7
12	16	0.566 9	11	0.644 8	11	0.679 1	8	0.662 7	11	0.591 8
13	8	0.527 7	12	0.608 8	12	0.639 2	3	0.652 9	12	0.561 3
14	3	0.515 6	5	0.596 4	5	0.624 9	7	0.647 4	5	0.550 4
15	2	0.497 3	17	0.582 7	17	0.608 5	2	0.617 8	17	0.538 0
16	9	0.494 1	7	0.507 8	7	0.527 9	9	0.605 4	7	0.473 9
17	15	0.367 7	15	0.036 8	15	0.036 8	15	0.036 3	15	0.037 0

由表 4 可知,线叶菊抑菌作用是其多个化学成分共同作用的结果,其中 4 个峰(17,5,7,12)与耐药金黄色葡萄球菌;8 个峰(6,18,4,16,14,8,3,13)与大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌;2 个峰(11,10)与白色葡萄球菌;7 个峰(3,8,2,16,9,4,18)与副乙型伤寒杆菌的关联度均 >0.8。表明鼠李素 3-O-芸香糖苷、异荭草素、异牡荆苷、圣次草苷、杨梅素、东莨菪内酯、异鼠李素 3-O-β-D-葡萄糖苷和槲皮素-3-O-芸香糖基-7-O-葡萄糖苷等成分是线叶菊发挥抑菌作用的主要物质基础。

### 3 讨论

在谱效关系的研究中有 3 个重要的要素,首先,必须获得药效相近且具有一定差异性的样本,并采用适宜的方法对主要活性进行评价;其次,还需要建立起能够反映药物主要活性成分的指纹图谱;第三,选择适宜的统计学方法,在药效和指纹图谱之间建立联系,从而达到阐明药效物质及探讨有效成分贡献率等研究目的。线叶菊药材为全草入药,生长周期和开花率对药材质量影响较大,因此,本文选用

6~8 月份开花率有显著性差异的线叶菊药材,进行提取分离获得具有差异性的药效部位,并且选择多元线性回归分析法(MLR)来建立化学成分与药效之间的线性关系,初步判断各种化学成分与药效的相关性;同时选择灰色关联度分析法(GAR)进一步分析系统中各因素关联度的差异性,两种分析方法综合运用以达到全面的分析效果<sup>[12]</sup>。

本实验建立 12 个不同批次线叶菊有效部位的 HPLC 指纹图谱,并进行了谱效关系分析,系统地比较了其抑菌作用的差异性,筛选出黄酮类成分为抑制耐药金黄色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌等细菌的主要有效成分。在建立中药谱-效相关关系方面,采用了灰色关联度及多元线性回归分析,结果显示线叶菊中主要有 16 种化学成分与其抑菌活性之间存在着明显的关联性,可能为主要作用物质基础,根据灰色关联度可知对抑菌作用的贡献大小顺序为  $X_{14} > X_{13} > X_6 > X_{18} > X_{10} > X_4 > X_{16} > X_{11} > X_8 > X_3 > X_{12} > X_2 > X_9 > X_5 > X_{17} > X_7 > X_{15}$ ,并指出 15 个峰。灰色关联度分析可以进一

步考察每个峰与药效之间的关联度,更直接地显示其有效成分,结果显示共有 9 个峰包括峰 17(鼠李素 3-O-芸香糖苷),峰 7(异荳草素),峰 12(异杜荆苷),峰 3(圣次草苷),峰 16(杨梅素),峰 4(东莨菪内酯),峰 18(异鼠李素 3-O-β-D-葡萄糖苷)和峰 10(槲皮素-3-O-芸香糖基-7-O-葡萄糖苷)与线叶菊发挥抑菌作用之间存在密切的关联性。线叶菊的有效部位对不同细菌的抑菌能力也有所不同,从小到大的顺序为耐药金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、副乙型伤寒杆菌。此外,属于共有峰之外的和未指认的峰是否与线叶菊抑菌作用有关,尚需进一步研究。

随着世界范围内细菌耐药性的不断增长,从中药及天然药物中发现新的药效物质已成为创新药物研究的主要趋势。本文为中药抗耐药性细菌感染有效成分地发现提供了新思路,并为中药抗细菌耐药性的物质基础的研究工作提供参考,对中药复杂体系抗耐药性药效物质基础的研究与活性物质的发现具有重要意义。

[参考文献]

[1] 王秋红,刘玉婕,吕邵娃,等. 线叶菊抗菌作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):142-145.  
[2] 匡海学,吕邵娃,刘玉婕,等. 线叶菊抗感染有效部位对大鼠肾盂肾炎的疗效[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,20(17):141-147.  
[3] 王秋红,吕邵娃,匡海学,等. 线叶菊抗耐药性细菌活性部分的筛选[J]. 中草药,2011,34(11):1757-1759.  
[4] 王秋红,刘玉婕,苏阳,等. 线叶菊抗感染有效部位化学成分的研究(I)[J]. 中草药,2012,43(1):43-46.

[5] 刘玉婕,王秋红,于晓龙,等. 线叶菊抗感染有效部位化学成分的研究(II)[J]. 中医药学报,2011,39(4):67-69.  
[6] 邓书鸿,聂磊. 中药谱效关系的分析方法及数据处理技术研究进展[J]. 中药材,2010,33(11):1819-1823.  
[7] KONG W J, ZHAO Y L, XIAO X H, et al. Spectrum-effect relationships between ultra performance liquid chromatography fingerprints and anti-bacterial activities of Rhizoma Coptidis[J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 634(2):279-285.  
[8] XIAO S, ZHANG L F, ZHANG X, et al. Tracing antibacterial compounds from *Acalypha australis* Linn by spectrum-effect relationships and semi-preparative HPLC[J]. J Sep Sci, 2013, 36(9/10):1667-1676.  
[9] 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.  
[10] 李少泓,夏鹏飞,马肖,等. 基于灰色关联分析方法评价当归药材质量[J]. 中药材,2012,35(11):1742-1746.  
[11] 颜肃容,詹雪艳,王耕. 基于 Bootstrap 区间估计的中药指纹图谱相似度闭值确定方法研究[J]. 计算机与应用化学,2013,30(7):767-769.  
[12] 吕邵娃,董书羽,郭玉岩,等. 数据分析技术在中药谱效关系中的应用进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(15):226-230.

[责任编辑 顾雪竹]