

引用:陈紫莹,黄姣丽,廖映红,等.复方铁苋工艺优化及抑菌成分研究[J].现代中医药,2024,44(4):100-108.

复方铁苋工艺优化及抑菌成分研究^{*}

陈紫莹 黄姣丽 廖映红 陈佳婷 孙旭高 陈星 肖遂^{**}

(华南农业大学林学与风景园林学院,广东 广州 510642)

摘要:目的 基于抑菌药效优化复方铁苋最佳配伍及提取工艺,并揭示该中药复方的抑菌物质。方法 以抗嗜水气单胞菌药效为考察指标筛选复方铁苋最佳配伍,以没食子酸的含量和抑菌活性为评价指标,通过单因素实验和响应面法优化复方铁苋的提取工艺;对不同提取工艺的复方铁苋建立化学指纹图谱并指认“共有峰”,通过分析建立指纹图谱与抑菌药效间的“谱效关系”,并采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术进行成分鉴定,找出抑制嗜水气单胞菌的关键成分。结果 复方铁苋以铁苋菜:五倍子:诃子=2:2:1 (w/w/w) 为最佳配伍,以料液比为 1:25,浸泡 22 min 后煎煮 60 min 为最佳提取工艺,该条件下复方铁苋提取物对嗜水气单胞菌具有最佳抑制效果;从复方铁苋指纹图谱中找出 4 个与抑菌活性呈高度正相关的物质:诃子酸>诃子鞣酸>没食子酸 4-O-(6-O-没食子酰)葡萄糖苷>没食子酸(相关系数在 0.499~0.846 之间)。结论 铁苋菜、五倍子、诃子在最佳配伍及工艺条件下具有明显抑制嗜水气单胞菌的活性,通过“谱效关系”快速找出该中药复方中潜在的抑菌物质,为复方铁苋进一步开发为防治嗜水气单胞菌的药物提供科学依据。

关键词:铁苋菜;五倍子;诃子;UPLC-Q-TOF-MS;嗜水气单胞菌;工艺优化;谱效关系

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:1672-0571(2024)04-0100-09

DOI:10.13424/j.cnki.mtcm.2024.04.019

Optimization of Fufang Tiexian Process and Study on Antibacterial Components

CHEN Ziying HUANG Jiaoli LIAO Yinghong CHEN Jiating
SUN Xugao CHEN Xing XIAO Sui

(School of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Objective To optimize the optimal combination and extraction process of Fufang Tiexian based on its antibacterial efficacy, and to reveal the antibacterial substances of this traditional Chinese medicine compound. **Methods** The optimal combination of Fufang Tiexian was selected based on the efficacy of anti *Pseudomonas aeruginosa* as the evaluation index, and the content of gallic acid and antibacterial activity were used as the evaluation index. The extraction process of Fufang Tiexian was optimized through single factor experiments and response surface methodology; Establish chemical fingerprints of Fufang Tiexian with different extraction processes and identify “common peaks”. Through correlation analysis, establish a “spectrum effect relationship” between the fingerprint and antibacterial efficacy, and use UPLC-Q-TOF-MS technology for component identification to identify the key components that inhibit *Aeromonas hydrophila*. **Results** The optimal combination of Fufang Tiexian was found to be *Acalypha australis* Linn. :gallnut :*Terminalia chebula* Retz. = 2 : 2 : 1 (w/w/w), with a solid-liquid ratio of 1 : 25. The optimal extraction process was to soak for 22 minutes and then boil for 60 minutes. Under these conditions, the extract of Fufang Tiexian had the best inhibitory effect on *Aeromonas hydrophila*; Four substances highly positively correlated with antibacterial activity were identified from the fingerprint of Fufang Tiexian : chebulic acid>chebulic acid>gallic acid 4-O-(6-O-gallic acid) glucoside>gallic acid (correlation coefficient between 0.499 and 0.846). **Conclusion** *Acalypha australis* Linn, Chinese gallnut, and *Terminalia* have significant inhibitory activity against *Pseudomonas aeruginosa* under the optimal combination and process conditions. Through the “spectrum effect re-

^{*} 基金项目:广东省自然科学基金面上项目(2021A1515012153)

^{**} 通讯作者:肖遂,副教授。E-mail:xiaosui@scau.edu.cn

lationship”, potential antibacterial substances in this traditional Chinese medicine compound can be quickly identified, providing scientific basis for the further development of Fufang Tiexian as a drug for the prevention and treatment of *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: *Acalypha australis* Linn.; gallnut; *Terminalia chebula* Retz.; UPLC-Q-TOF-MS; *Aeromonas hydrophila*; Process optimization; Spectral effect relationship

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)为弧菌科气单胞菌属的革兰氏阴性杆菌,普遍存在于淡水及海洋中^[1],是引起淡水鱼类败血症、稚鳖白点病、牛蛙腹水病等多种水产疾病的致病菌^[2],还可导致人类坏死性筋膜炎、内源性眼内炎、颅骨骨髓炎等,是一种常见的人-兽-鱼共患病原菌^[3-5]。目前,抗生素是防治嗜水气单胞菌的常用药物,然而抗生素的滥用,导致嗜水气单胞菌耐药性问题日趋严重,主要表现为耐药菌株耐药谱广和耐药率高,这给嗜水气单胞菌的防治带来了极大的挑战^[4-7],因此,研究开发具有显著抑菌作用且不易产生耐药性的新型抗菌药物刻不容缓。

中药抗菌物质作为抗生素的替代品,具有天然低毒且不易产生耐药性的特点,有着其他药物不可比拟的优势^[8],为嗜水气单胞菌的防治研究提供了新的方向。铁苋菜 *Acalypha australis* Linn 是民间广泛应用的一味中药,隶属于大戟科铁苋菜属,含有广谱抑菌活性成分,对多种病原菌有抑制作用^[9]。五倍子 *Terminalia chebula* Retz. 中的鞣酸成分具有抑菌作用^[10];诃子 *Rhus chinensis* Mill. 被广泛应用于中药、印度药等传统医药中,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、嗜水气单胞菌等具有抑制作用^[11-12];五倍子和诃子组合能够协同产生抑菌效果^[13]。本研究以铁苋菜为主药,与五倍子、诃子进行配伍并优化其提取工艺,借助中药谱效关系研究方法将各工艺提取物的药效学信息与指纹图谱化学信息进行相关性研究,快速辨识出抑菌活性成分峰,最后运用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对复方铁苋中的化学成分进行精准定性,以期探究复方铁苋最佳工艺条件及其抑制嗜水气单胞菌的药效物质基础,为嗜水气单胞菌的防治及铁苋菜的开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 本研究所用的铁苋菜、五倍子和诃子(均购于安徽亳州中药饮片厂)经上海中医药大学中药研究所吴立宏副教授鉴定为铁苋菜(*Acalypha australis* Linn)、五倍子(*Terminalia chebula*

Retz)和诃子(*Rhus chinensis* Mill)。甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯(美国 Fisher 试剂公司),没食子酸标准品(上海源叶生物科技,NO4HB200116,纯度≥98%),盐酸小檗碱(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,纯度≥98%)、碘硝基四唑紫(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,纯度≥98%),嗜水气单胞菌(ATCC 35654,广东省微生物菌种保藏中心)。

1.2 仪器 ACQUITY UPLC I-Class(美国 Waters 公司);UPLC1290-6540-UHD Q-TOF system(美国 Agilent 公司);Milli-Q 超纯水制备装置(美国 millipore 公司);Mettler-Toledo XS105 型电子分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司);DHG 303-00 恒温培养箱(上虞市沪越仪器设备厂);R214 旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司)。

1.3 供试品溶液制备 供试品提取方法参考本课题组已发表论文^[14],供试药材按配比称量见表 2,煎煮水提,-80℃冷冻干燥处理后,得供试品冻干粉备用。准确称量各冻干粉并用超纯水溶解,过 0.22 μm 微孔滤膜,得供试液。抑菌实验的供试液浓度分别为:100、25 mg·mL⁻¹;UPLC-DAD 和 UPLC-Q-TOF/MS 检测分析供试液浓度为:5 mg·mL⁻¹。

1.4 抑菌实验

1.4.1 琼脂扩散法 嗜水气单胞菌接种于营养肉汤培养基,28℃恒温培养至对数生长期,将对数生长期的菌悬液稀释成 10⁷ CFU·mL⁻¹,取 1 mL 菌悬液于培养皿内,加入 20 mL 冷却至 40℃的固体培养基混匀,完全冷却后用直径 6 mm 打孔器打孔,每孔加入 100 μL 供试药液,28℃培养 24 h 后,测量各抑菌圈直径。供试复方铁苋冻干粉浓度为 100、25、5 mg·mL⁻¹,盐酸小檗碱为阳性对照,无菌水为阴性对照,每个处理设置 3 次重复。

1.4.2 微量二倍稀释法 将复方铁苋粗提物按照二倍稀释法制成系列浓度的供试药液,分别加入 96 孔板的第 2 孔至第 11 孔,每孔 100 μL,再将培养至对数生长期的菌悬液稀释成 10⁷ CFU·mL⁻¹,每孔加入 100 μL,28℃培养 24 h 后,每孔加入 40 μL 浓

度为 $0.2\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的碘硝基四唑紫指示剂,培养 30 min 后观察各孔细菌生长情况,以澄清透明的微孔对应终浓度为最小抑菌浓度值,即 MIC 值。系列浓度的盐酸小檗碱为阳性对照,无菌水为阴性对照,每个处理设置 3 次重复。

1.5 中药铁苋配比的筛选 按照六个配比称取样品 25 g/份,根据“1.3”的方法制备药液,用“1.4”的琼脂扩散法和微量二倍稀释法考察六个不同配伍比例对嗜水气单胞菌的抑制效果,以抑菌效果为指标,筛选最佳抑菌配比。

1.6 提取工艺优化 对筛选出的最佳配伍比例进行提取工艺优化,以没食子酸含量为考察指标,以浸泡时间(10、30、60 min)、煎煮时间(10、30、60 min)、料液比(1:10、1:12、1:15)为考察因素进行单因素实验。基于单因素实验结果确定响应面试验的因素水平,以抑菌圈直径为响应值,利用 Design-Expert 8.0.6 软件的 Box-Behnken 实验设计原理设计三因素三水平的响应面试验,分析模型得最优提取工艺。

1.7 UPLC-DAD 指纹图谱及谱效关系建立

1.7.1 UPLC-DAD 仪器条件 色谱柱:ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm×2.1 mm,1.8 μm)配有保护柱。流动相 0.2 % 甲酸溶液(A)-乙腈(B);洗脱梯度见表 1;流速: $0.2\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温: 40°C ,自动进样器温度: 20°C ,检测波长:254 nm,进样量:10 μL。

表 1 UPLC-DAD 梯度洗脱条件

时间(min)	流速($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	A 相(%)	B 相(%)
0	0.2	100.00	0.00
5	0.2	100.00	0.00
10	0.2	90.00	10.00
20	0.2	80.00	20.00
25	0.2	70.00	30.00
35	0.2	0.00	100.00

1.7.2 UPLC-DAD 方法学考察 精密度试验:取配比 5 按优化的提取方法和仪器条件连续进样 5 次,考察各个特征指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的一致性,结果用相对标准偏差(RSD)表示。

重复性试验:取配比 5 按优化的提取方法平行制备样品供试液 5 份,再按已优化的仪器条件分别进样,考察各个特征指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的一致性,结果用 RSD 表示。

稳定性试验:取配比 5 按优化的提取方法制备供试液,在已优化的分析条件下在 0、2、4、8、16、24

和 48 h 不同时间进样,考察各个特征指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的一致性,结果用 RSD 表示。

1.7.3 指纹图谱及共有峰获取 复方铁苋标准指纹图谱及 12 个共有峰均由中国药典委员会开发的中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2004A 版)计算获得。

1.7.4 谱效关系建立 为考察指纹图谱中每个共有峰与抑菌指标间的密切程度、相关性大小及变化方向,本研究将复方铁苋 UPLC/DAD 指纹图谱中的 12 个特征峰看成变量,同时把对嗜水气单胞菌的抑制效果也看成变量,通过两组变量之间的相关分析,找出潜在抑菌物质。采用 SPSS 统计软件(SPSS for Windows 18.0, SPSS Inc., USA)进行相关性分析获得。

1.8 UPLC-Q-TOF/MS 仪器条件 色谱条件:同“1.7.1 UPLC-DAD 仪器条件”。质谱条件:电喷雾离子源;扫描方式:正、负离子模式下分别采集;50~1000 Da 全扫描(full scan mode);毛细管电压:3.5 kV;锥孔电压:30 V;碰撞能量:15~40 eV;离子源温度: 100°C ;脱溶剂气温度: 300°C ;锥孔气流量: $30\text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$;脱溶剂气流量: $500\text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$;数据处理:安捷伦 MASSHUNTER 工作站进行数据采集,通过精确分子量和二级谱图信息,再结合数据库和文献报道裂解规律确定化合物结构式。

2 结果与分析

2.1 复方铁苋配伍比例的筛选 本研究在中医理论的指导下,按照君臣佐使原则配伍,组成了六个配比并进行了体外抑菌试验(表 2),以期筛选最优配伍比例。

表 2 复方铁苋组方筛选及抑菌效果

组方	铁苋菜 (g)	五倍子 (g)	诃子 (g)	高浓度抑菌 圈(mm)	低浓度抑菌 圈(mm)	MIC ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
配比 1	25	0	0	13.16	8.91	25.00
配比 2	15	10	0	17.02	9.24	0.391
配比 3	15	0	10	12.97	9.76	25.00
配比 4	15	5	5	14.03	10.07	3.125
配比 5	10	10	5	17.03	10.89	0.391
配比 6	10	5	10	16.47	12.64	0.781

抑菌试验结果显示配比 5 在高浓度和低浓度下抑菌圈直径分别为 17.03 mm 和 10.89 mm, MIC 值为 $0.391\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 抑菌活性在六个配比中表现最优,即铁苋菜:五倍子:诃子=2:2:1($w/w/w$)配伍为

抑制嗜水气单胞菌的最优配伍比例。铁苋菜与五倍子、诃子配伍后抑菌效果显著增强,这与彭金菊等^[15]发现五倍子、诃子与清热解毒药物组成的复方抑菌效果显著提高的研究结果相同,表明五倍子、诃子与铁苋菜之间可能存在协同作用。

2.2 复方铁苋提取工艺的优化

2.2.1 单因素优化工艺参数 复方铁苋中含有丰富的抑菌活性成分没食子酸^[16],因此,选择没食子酸的提取率作为单因素工艺优化实验的主要考察指标。由图 1 可知,当浸泡时间为 30 min 时,没食子

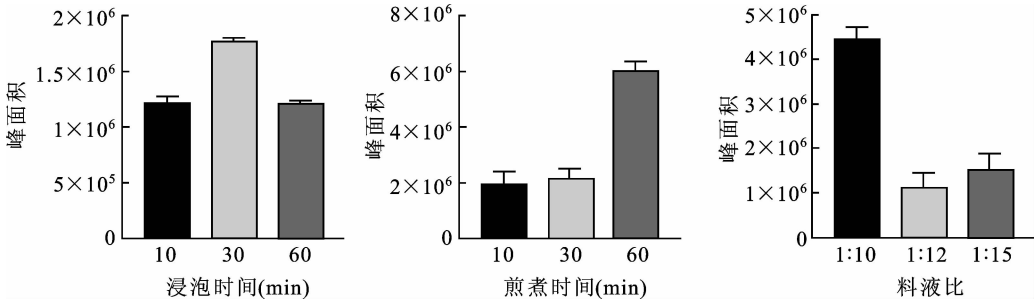


图 1 单因素试验结果

2.2.2 响应面法优化提取工艺 在单因素实验基础上以浸泡时间(A)、煎煮时间(B)、料液比(C)为自变量,抑菌圈直径为响应值(Y),进行 3 因素 3 水平的响应面试验,Box-Behnken 试验设计与结果见表 3。

表 3 Box-Behnken RSM 优化试验设计与结果

试验	Factor1 (A) 浸泡时间 (min)	Factor2 (B) 煎煮时间 (min)	Factor3 (C) 料液比	R1 (Y) 抑菌圈直径 (mm)
1	15	45	25	10.07
2	30	30	25	10.55
3	30	45	20	9.68
4	30	45	20	9.79
5	30	45	20	9.95
6	15	60	20	9.84
7	30	45	20	9.49
8	30	30	15	10.22
9	15	45	15	9.14
10	30	45	20	9.52
11	30	60	25	10.60
12	30	60	15	8.82
13	45	30	20	9.61
14	15	30	20	8.79
15	45	60	20	9.08
16	45	45	25	9.69
17	45	45	15	8.90

酸提取率达到最大,故选取浸泡时间 15、30、45 min 这三个水平进行响应面实验。此外,研究发现随着煎煮时间延长,水提物中没食子酸含量显著升高,两者呈正相关。但煎煮时间超过 60 min 会由于水分蒸发过多而导致药材糊化。为避免此现象以及综合考虑提取率和工艺成本,本研究将煎煮时间控制在 60 min 内,料液比在 1:15 的基础上适当提高。通过以上实验的探索,选择不同浸泡时间(15、30、45 min)、煎煮时间(30、45、60 min)和料液比(1:15、1:20、1:25),进行响应面实验进一步优化提取工艺。

拟合得回归方程:

$$Y=9.69-0.07A-0.1B+0.48C-0.4AB-0.035AC+0.36BC-0.48A^2+0.12B^2+0.24C^2 \quad (1)$$

对该回归方程进行方差分析及显著性检验,结果见表 4。由表 4 可知模型 $F=5.08, P<0.05$,说明该回归模型中各自变量与响应值之间的线性关系显著,模型可信度高;失拟项大于 0.05,表明随机误差为实验的主要误差,实验结果受其他因素影响较小,该模型可靠度较高; $r^2=0.8673$,说明该模型拟合度较好,可靠度较高,可用该模型进行分析预测。由方差分析结果可知,料液比的一次项,浸泡时间与煎煮时间的交互项对结果影响极显著($P<0.01$),浸泡时间的二次项对结果影响显著($P<0.05$)。

浸泡时间、煎煮时间和料液比交互作用对嗜水气单胞菌体外抑菌效果影响的响应面曲线及等高线曲线见图 2。由图 2(a)可知:响应曲面并非开口向下的凸形曲面,说明在此实验条件范围内不存在响应面最大值,浸泡时间与煎煮时间之间交互作用对响应值影响不显著;由图 b、c 可知:等高线形状呈近椭圆形,可知料液比与浸泡时间、煎煮时间之间交互作用对响应值影响显著。

根据 Design-Expert 8.0.6 软件优化得到最佳提取参数:浸泡时间 22.11 min,煎煮时间 60 min,料液比 1:25,在此工艺条件下所得粗提物在低浓度下

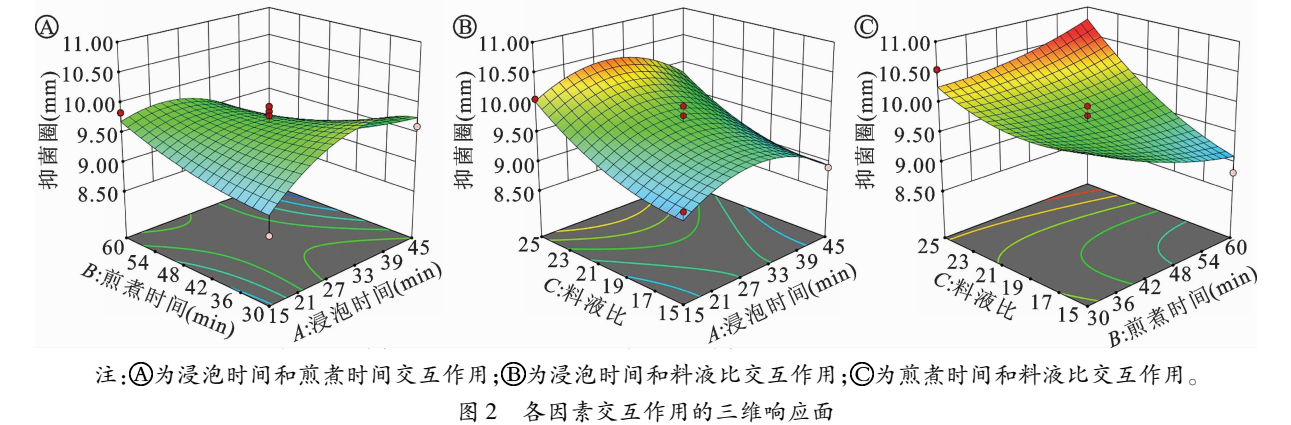
的抑菌圈直径预测值为 10.914 mm。为便于实际操作,本研究将最优提取工艺参数确定为浸泡时间 22 min,煎煮时间 60 min,料液比 1:25。在此条件下

进行验证试验,复方铁苋抑制嗜水气单胞菌的低浓度平均抑菌圈直径为 10.9 mm,RSD 为 0.28 %,与预测值较为吻合,说明了实验方法与数学模型的可靠性。

表 4 响应面回归模型方差分析结果

方差源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	4.320	9	0.480	5.080	0.02170	*
A 浸泡时间	0.039	1	0.039	0.420	0.53970	ns
B 煎煮时间	0.086	1	0.086	0.910	0.37120	ns
C 料液比	1.830	1	1.830	19.43	0.00310	**
AB	0.620	1	0.620	6.610	0.00369	**
AC	4.900E-003	1	4.900E-003	0.052	0.82620	ns
BC	0.520	1	0.530	5.570	0.05030	ns
A ²	0.960	1	0.960	10.14	0.01540	*
B ²	0.061	1	0.061	0.650	0.44640	ns
C ²	0.240	1	0.240	2.590	0.15180	ns
残差	0.660	7	0.094			ns
失拟项	0.510	3	0.170	4.680	0.08510	ns
误差项	0.150	4	0.037			ns
总和	4.980	16				ns

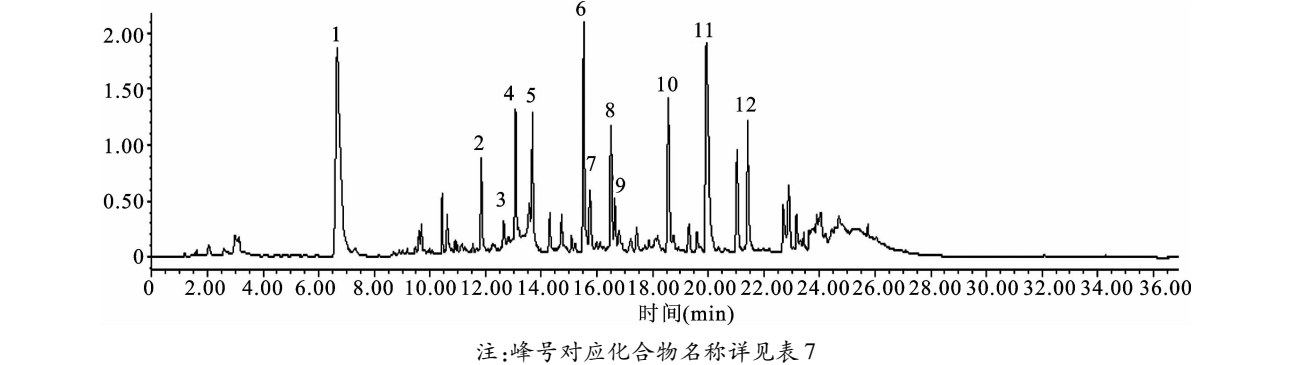
$r^2=0.8673, r^2_{Adj}=0.6967$



2.3 UPLC-DAD 分析方法的建立

2.3.1 条件优化 为获得最佳分离效果,本研究选用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱,并对流动相组成进行了优化,检测了水(A相)-甲醇(B相)、0.1%甲酸-甲醇、0.2%甲酸-甲醇、水-乙腈、0.1%甲酸-乙腈、0.2%甲酸-乙腈 6 种流动相体系的分离效果,结果表明 0.2% 甲酸-乙腈对各成分的保留能力、峰

形、分离度和洗脱效果均较为理想。为了使样品中性质差异较大的组分实现分离,故采用梯度洗脱方式,最佳洗脱梯度如表 1 所示。此外,对比了不同波长条件下各组分的吸收响应情况,发现在波长 254 nm下绝大多数成分的响应值最大,故选择 254 nm为紫外检测波长。优化上述相关参数后,各主要色谱峰实现了较好分离,且峰形良好(图 3)。



2.3.2 方法学考察 为验证复方铁苋 UPLC-DAD 指纹图谱分析方法的科学合理性,对已建立的指纹图谱分析方法进行精密度、重复性和稳定性考察,结果显示 12 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积

的 RSD 值均在可控范围内(表 5),表明该分析仪器的精密度、分析方法的重复性以及供试品的稳定性均为良好。

表 5 UPLC-DAD 方法学验证

峰号	精密度(RSD%)		重复性(RSD%)		稳定性(RSD%)	
	相对保留时间	相对峰面积	相对保留时间	相对峰面积	相对保留时间	相对峰面积
1	0.35	1.08	0.07	1.05	0.07	4.63
2	0.06	3.63	0.06	4.49	0.36	3.25
3	0.04	1.82	0.38	1.90	0.52	4.40
4	0.02	1.26	0.06	4.24	0.06	4.45
5	0.04	0.16	0.07	0.23	0.46	1.03
6	0.02	0.45	0.06	0.45	0.06	1.81
7	0.03	0.84	0.06	0.58	0.05	3.48
8	0.02	0.21	0.06	0.42	0.05	1.80
9	0.02	0.82	0.07	0.67	0.04	3.08
10	0.02	1.57	0.06	3.92	0.05	2.10
11	0.01	0.09	0.06	0.47	0.06	3.21
12	0.03	0.57	0.06	0.60	0.03	3.66

2.4 UPLC 指纹图谱建立与抑菌活性的相关分析
2.4.1 复方铁苋不同工艺指纹图谱的建立与共有峰指认 采用“1.7.1”项下的仪器条件对响应面试验制备的 17 组样品进行 UPLC-DAD 进样测定,建立其 UPLC 指纹图谱,采用中药色谱指纹图谱相似

度评价系统对 17 组样品进行色谱峰匹配,设置时间窗口为 0.1,进行多点校正,中位数法计算生成铁苋复方的叠加指纹图谱与标准指纹图谱(R),共指认出 12 个共有峰(图 4)。

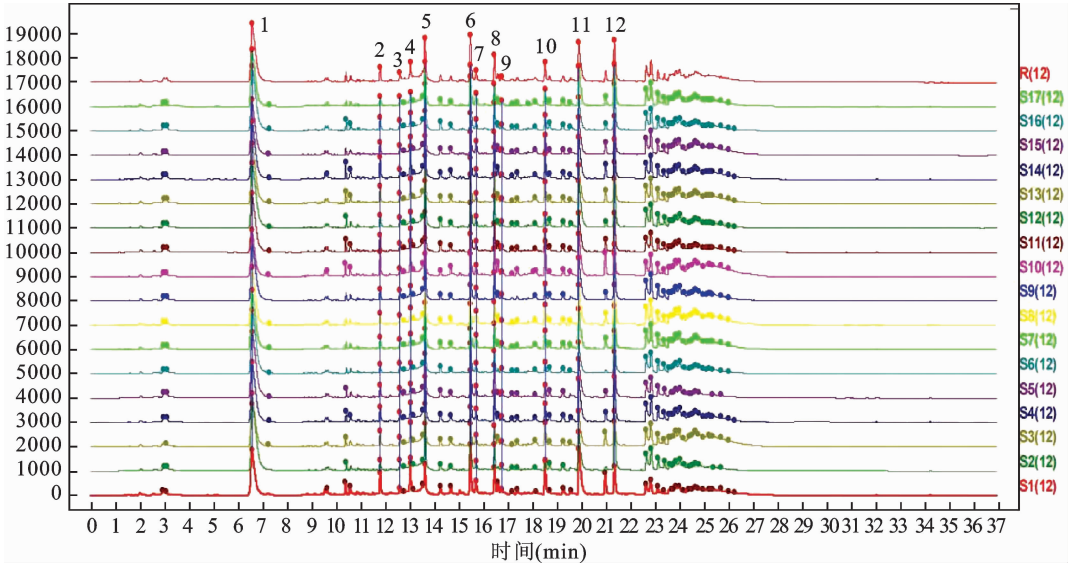


图 4 17 组样品 UPLC 叠加指纹图谱

2.4.2 指纹图谱与抑菌活性的相关性分析^[17] 对 17 组样品的 12 个 UPLC 指纹图谱共有峰峰面积(表 6)与抑菌活性进行相关性分析,获得了指纹图谱各特征峰所代表的化学成分对抗嗜水气单胞菌的贡献度大小顺序。由表 7 可知各共有峰与高浓度抑

菌效果的关联序为:9>10>4>1>2>7>3>11>8>6>12>5,与低浓度抑菌效果的关联序为:10>4>9>1>2>3>12>11>8>6>7>5,其中 1、4、9、10 号峰对抑菌活性贡献较大,这提示 1、4、9、10 号峰对应的化学成分可能是复方铁苋抑菌作用的关键物质基础。

2.5 UPLC-Q-TOF 抑菌成分分析 为进一步探究复方铁苋抑菌作用的药效物质基础,采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术,按照“1.8”项下仪器方法进行进样分析,根据各化合物的保留时间、精确质荷比、二级裂解特征性碎片离子并结合数据库及相关文献报道对复方铁苋化学成分进行定性分析,共指认出 18 个化合物,结果如表 8 所示。

表 6 17 批复方铁苋 UPLC 指纹图谱共有峰保留时间和峰面积

样品	1 号峰 (6.6 min)	2 号峰 (11.82 min)	3 号峰 (12.64 min)	4 号峰 (13.06 min)	5 号峰 (13.66 min)	6 号峰 (15.51 min)	7 号峰 (15.74 min)	8 号峰 (16.5 min)	9 号峰 (16.79 min)	10 号峰 (18.56 min)	11 号峰 (19.94 min)	12 号峰 (21.39 min)	有效物质 之和
S1	31212376	1946507	2095882	3717594	15072351	7179434	2868879	4198502	1575772	3009362	11599671	9180880	39515104
S2	22019327	4433101	1846423	4752741	6358941	9128956	3030520	5287726	1457451	2890102	14387251	5692989	31119621
S3	43523015	2036855	2208621	3563105	16177663	8096322	2074062	4899321	1580316	1851064	11249079	11185123	50517500
S4	27977375	2910235	2121358	6684366	9149162	6899746	2308146	3814231	1553300	4178511	9858509	7360110	40393552
S5	39886040	3062009	2216001	5734267	9659986	9108134	2659926	5646691	1759067	3245467	13141609	10194519	50624841
S6	31861030	2399318	2170347	3699423	9583837	9707648	2469234	6246934	1659571	2211171	11172537	10173906	39431195
S7	38713139	1841975	2162070	3121530	15436854	7849641	2186685	4288459	1583646	1884382	8306558	9388138	45302697
S8	32825224	2336259	2215829	4933568	9911142	7913716	3064401	4759689	1673949	4224840	11980283	1749539	43657581
S9	31480186	2372807	2168735	5299104	9784517	6942329	3207929	4301684	1817629	4422038	11819446	8524078	43018957
S10	34922633	2090456	2202048	3824169	16034613	8078937	2670995	5063050	1561306	2769901	12952187	10376169	43078009
S11	43240067	4622429	2027486	8570154	7917718	7544876	2334295	5034440	2429170	6256172	12513265	6604704	60495563
S12	28144253	3500985	2063208	3215286	8600242	8760284	2212818	5238919	1211819	3787036	11277931	8386629	36358394
S13	39882433	2505841	2227488	4051516	10007677	9433329	2363177	5875120	1801629	2334350	14872036	11037150	48069928
S14	31221730	3448255	2291158	4680558	10259321	8116597	2137340	5406734	1573380	3742229	11109086	8937947	41217897
S15	32110232	4370184	2205474	8400390	9355618	8538406	2033037	5900621	1599040	4485511	12496323	8467869	46595173
S16	39445246	2465006	2136763	5305875	9426743	7312066	2912056	4286163	1581855	3499757	10755225	10755225	49832733
S17	39257751	2675347	2279823	7306002	10010680	9604434	2218360	5294393	1906941	4547034	9143832	10418235	53017728

表 7 17 批复方铁苋共有峰与抑菌活性的关联性

共有峰	成分	r(高浓度)	r(低浓度)
1	没食子酸	0.4990	0.4592
2	鹿蹄草素	0.1772	0.2331
3	对-二没食子酸	0.0558	0.2080
4	没食子酸-4-O-(6-O-没食子酰)葡萄糖苷	0.6982	0.6651
5	1,3,6-O-三没食子酰葡萄糖	-0.2697	-0.2721
6	柯里拉京	-0.1813	-0.0356
7	槲皮素-3-葡萄糖醛酸甙	0.1741	-0.0601
8	4-羟基苯基丙酮酸	-0.1207	0.0006
9	诃子酸	0.8456	0.5291
10	诃子鞣酸	0.7088	0.6837
11	鞣花酸	0.0050	0.0331
12	金丝桃苷	-0.1840	0.0493
有效成分之和		0.7470	0.6892

其中与复方铁苋指纹图谱中抑菌效果相关性较强的 1、4、9、10 号峰分别为:没食子酸、没食子酸-4-O-(6-O-没食子酰)葡萄糖苷、诃子酸、诃子鞣酸。

此外,槲皮素-3-葡萄糖醛酸甙、鹿蹄草素、对-二没食子酸、鞣花酸、金丝桃苷对抑菌效果也有一定贡献。

表 8 复方铁苋 UPLC-Q-TOF 化学成分鉴定

编号	模式	Rt (min)	测定值 (m/z)	理论值 (m/z)	偏差 (ppm)	分子式	主要二级碎片离子	化合物
1	-	1.7	191.0563	192.0636	-0.92	C ₇ H ₁₂ O ₆	173	奎宁酸 ^[18]
2	-	2.25	347.0985	174.0529	-0.38	C ₇ H ₁₀ O ₅	155.0357 137.0250;111.0452; 93.0350	莽草酸 ^[18]
3	-	2.25	137.0244	138.0317	0.34	C ₇ H ₆ O ₃	93.0331	水杨酸 ^[19]
4	+	2.95	124.0393	123.032	0.06	C ₆ H ₅ NO ₂	136.0616,132.9038,119.0346,78.0338,70.0649	尼古丁酸 ^[14]
5	+	3.81	303.1549	302.1476	0.69	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	153.0184	槲皮素 ^[20]
6	-	4.42	117.0194	118.0266	-0.24	C ₄ H ₆ O ₄	117.0194	琥珀酸 ^[21]
7	-	7.22	169.0143	170.0216	-0.42	C ₇ H ₆ O ₅	169,125,107,97	没食子酸 ^[22]
8	-	12.79	123.0452	124.0524	-0.09	C ₇ H ₈ O ₂	123.0452	鹿蹄草素
9	-	13.36	321.0255	322.0325	-0.07	C ₁₄ H ₁₀ O ₉	321.0255,125.0244	对-二没食子酸 ^[23]
10	-	13.86	483.0778	484.0851	0.47	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	483.0772,169.0142,125.0242	没食子酸-4- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -没食子酰) 葡萄糖苷 ^[24]
11	-	14.52	635.0888	636.0961	0.55	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	483.0766,465.0681,313.0573,169.0144	1,3,6- <i>O</i> -三没食子酰葡萄糖 ^[23]
12	-	16.31	633.0733	634.0805	0.1	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	633.0719,300.9998,169.0140	柯里拉京 ^[25]
13	-	16.49	477.0672	478.0745	0.58	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	477.0688,300.9984,169.0143,125.0244	槲皮素-3-葡萄糖醛酸武 ^[26]
14	-	17.46	973.1164	974.1236	0.1	C ₄₁ H ₃₄ O ₂₈	635.0899,486.0552,169.0135	诃子酸 ^[23]
15	-	19.43	953.0901	954.0973	0.15	C ₄₁ H ₃₀ O ₂₇	953.0912,300.9995,	诃子鞣酸 ^[23]
16	-	20.63	787.0996	788.1067	0.71	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	635.0887,465.0687,169.0139	四没食子酰基葡萄糖苷 ^[25]
17	-	20.89	300.9993	302.0065	-0.87	C ₁₄ H ₆ O ₈	300.9991,145.0300	鞣花酸 ^[25]
18	-	21.58	463.0878	464.0951	0.78	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	169.0144,300.0274,271.0245	金丝桃苷 ^[27]

注:水杨酸、槲皮素、没食子酸为对照品验证得到

3 讨论

3.1 基于药效筛选复方及优化工艺 中药复方成分复杂,其药效发挥并非单个药效物质生物效应的简单叠加,而是多组分间协同、相加、拮抗等综合作用的结果,单一成分难以代表中药的整体性和系统性,单一成分的线性考察模式无法对中药质量进行全面评价^[28-29],故中药质量评价不能仅以某些成分的含量为指标,还需对整体进行相关性分析,相关性分析结果也表明复方铁苋提取物是通过多成分整合作用发挥抑菌活性,因此基于药效指标的整体思维筛选复方及优化提取工艺,为在整体水平上表征复方铁苋的抑菌成分提供了保障,避免了以单一成分评价药物整体的局限性。

3.2 基于指纹图谱与药效相关分析揭示活性物质 指纹图谱既能从整体上把握中药发挥药效的化学概貌,又能结合数理统计和高精仪器分析技术辨识有效成分,充分体现了中药整体性与模糊性的特点。本研究在获得复方铁苋 17 组响应面工艺优化实验的指纹图谱与药效学量化数据的基础上,对复方铁苋进行谱效关系的初步研究,从 12 个共有峰中快速辨识出抑制嗜水气单胞菌的关键色谱峰 1、4、9、10,结合 UPLC-Q-TOF 检测分析技术明确了各共有峰所

代表的化学成分,初步揭示了复方铁苋抑菌活性物质基础。

经 UPLC-Q-TOF 检测分析及对照品验证,共鉴定出 18 种化学成分,其中指纹图谱中的色谱峰 1 为没食子酸、峰 4 为没食子酸-4-*O*-(6-*O*-没食子酰)葡萄糖苷、峰 9 为诃子酸、峰 10 为诃子鞣酸。众多研究发现细菌细胞膜是植物活性成分作用的主要靶点,没食子酸可通过改变膜疏水性、减少表面负电荷,导致膜特性(电荷、渗透性以及物理化学特性)发生不可逆的变化,起到直接杀菌作用^[30]。诃子鞣酸是一类结构复杂的多元酚,对蛋白质具有沉淀或凝集作用,可抑制生物被膜的形成,最终通过非凋亡途径致使菌体死亡^[31]。没食子酸-4-*O*-(6-*O*-没食子酰)葡萄糖苷属于结构复杂的酚类化合物,广泛存在于中药五倍子、没食子、石榴果皮中,具有收敛、止血、抗菌等功效^[32]。诃子酸抑菌谱广抑菌活性强,对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均具有较好的抑制效果,是诃子抑菌作用的主要活性成分^[12]。

复方铁苋由不同母核结构的活性成分群构成,这种复杂性特征为多层面、多途径、多靶点发挥协同抑菌作用提供物质基础^[31],相较抗生素和单味中药而言更具抑菌杀菌优势,且细菌难以同时对多种抑

菌成分产生多重突变,这对于抑菌增效和降低耐药性有着重要意义,为中药在水产养殖上的应用与发展提供了一些有益尝试^[33-35]。但当前研究还存在一些局限性,有待通过进一步的药效学及药理学方法研究各特征峰所代表化学成分之间的协同作用关系,此外,还需要在分子水平上明确复方铁苋的抑菌作用机制。

参考文献

[1] DOUKAS, ATHANASSOPOULOU, KARAGOUNI, et al. Short communication *Aeromonas hydrophila* infection in cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., and *Puntazzo puntazzo* Cuvier from the Aegean Sea[J]. *Journal of Fish Diseases*, 1998, 21(4): 317-320.

[2] KOZIŃSKA A, PEKALA A. Characteristics of disease spectrum in relation to species, serogroups, and adhesion ability of motile aeromonads in fish [J]. *The Scientific World Journal*, 2012, 2012: 949358.

[3] SHARPLESS M, SHARMA R. *Aeromonas hydrophila* endogenous endophthalmitis in a patient with underlying adenocarcinoma of the colon[J]. *BMJ Case Reports*, 2021, 14(4): e241317.

[4] KHALIL W, GANTOIS C, Lemnos L, et al. *Aeromonas hydrophila* is a deceptive pathogen requiring reconsideration of antibiotic prophylaxis [J]. *Surgical Infections*, 2021, 22(9): 987-988.

[5] 江丽莉, 朱延姝, 余璟璐, 等. 2 例外伤感染嗜水气单胞菌致坏死性筋膜炎的病例特点及临床转归[J]. *浙江医学教育*, 2018, 17(5): 55-57.

[6] NHINH DT, LE DV, VAN VAN K, et al. Prevalence, virulence gene distribution and alarming the multidrug resistance of *Aeromonas hydrophila* associated with disease outbreaks in freshwater aquaculture [J]. *Antibiotics*, 2021, 10(5): 532.

[7] HOSSAIN S, DE SILVA BCJ, DAHANAYAKE PS, et al. Characterization of virulence properties and multi - drug resistance profiles in motile *Aeromonas* spp. isolated from zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2018, 67(6): 598-605.

[8] 刘华钢, 申庆荣, 刘丽敏. 中药抗菌研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(2): 463-465.

[9] 梁曾恩妮. 铁苋菜主要功能成分及其体外抑菌研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2008.

[10] 杨香玉, 李思迪, 麻成全, 等. 五倍子及其复方对痤疮致病细菌的抑制作用和配伍配比研究[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(1): 467-472.

[11] 王涛, 陈家顺, 姚康, 等. 诃子及其提取物研究进展及畜牧业应用潜力展望[J]. *饲料工业*, 2023, 44(22): 29-33.

[12] 孟祥锋. 广谱抑菌中草药诃子的抑菌活性分析及有效组分的初步分离检测[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2009.

[13] 王帅兵, 张雅城. 5 种中药提取物及其组合对嗜水气单胞菌的体外抑制作用[J]. *饲料研究*, 2023, 46(22): 80-85.

[14] 肖遂. 基于谱效关系的中药铁苋菜抑菌物质辨识方法研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.

[15] 彭金菊, 马驿, 梁淑黎, 等. 抗菌中药及复方对嗜水气单胞菌的体外抑制效果[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(28): 3623-3625.

[16] 夏国文, 杜小东, 胡庆丰. 没食子酸对嗜水气单胞菌及温和气单胞菌的体外抑菌作用研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2015, 42(5): 1127-1129.

[17] 张晓莉, 刘宇灵, 樊丽蛟, 等. 基于体外抗氧化活性的参芪通脉益智方提取工艺评价及其谱效关系的初步研究[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(9): 1635-1639.

[18] 刘丁丽. 胡颓子多酚的提取鉴定及抗氧化活性研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2021.

[19] 崔小敏, 万兆新, 任慧, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术的白毛银露梅化学成分研究[J]. *中药材*, 2020, 43(8): 1901-1906.

[20] 阙玉红, 谢笔钧, 孙智达. 胭脂红番石榴叶黄酮提取物的抑菌活性及其机理[J]. *中国调味品*, 2021, 46(12): 159-166, 188.

[21] 樊晓荃, 付娟, 胡军华, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速分析六味地黄苷糖片化学成分[J]. *中草药*, 2021, 52(21): 6473-6484.

[22] 孙国东, 霍金海, 王改丽, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的核桃楸皮成分分析[J]. *中草药*, 2017, 48(4): 657-667.

[23] 韩贤威. 不同产地西青果与诃子成分含量的比较及抗细菌毒力物质研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2019.

[24] 李文兰, 孙志, 程斌, 等. 金匱肾气丸的紫外光谱-质谱/质谱研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, 28(8): 1914-1918.

[25] 林启凰, 鲍红娟, 张岗. UPLC-MS/MS 法分析通奶草乙酸乙酯部位成分及其体外抗菌活性[J]. *中成药*, 2020, 42(7): 1931-1935.

[26] 唐明敏, 田恒康, 杨文宁, 等. 桑叶水提物及其含药血清化学成分分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(9): 25-29.

[27] 程鼎. 翻白草多酚的分离鉴定及生物活性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2021.

[28] 姜廷良, 霍海如. 重视中药多组分整合作用的研究[J]. *世界科学技术*, 2003, 5(2): 1-4, 75.

[29] 肖佳妹, 杨岩, 周晋, 等. 基于总量统计矩理论的中药质量标志物研究策略[J]. *中草药*, 2019, 50(19): 4589-4594.

[30] BORGES A, FERREIRA C, SAAVEDRA MJ, et al. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and Gallic acids against pathogenic bacteria [J]. *Microbial Drug Resistance*, 2013, 19(4): 256-265.

[31] 向丽, 周铁军, 叶迎春, 等. 诃子鞣质对白色念珠菌及其生物被膜的影响[J]. *重庆医学*, 2013, 42(2): 134-137.

[32] 周梦宇, 周本宏, 郭成希. 石榴皮鞣质作为天然抑菌剂的研究进展[J]. *中国药师*, 2018, 21(11): 2037-2040, 2044.

[33] 彭齐, 谢丽玲, 谢俊. 中药抑菌机制的研究方法[J]. *生物技术进展*, 2015, 5(1): 66-69.

[34] 余苏云, 陆茵. 中药起效作用机制探讨[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2018, 32(5): 347-354.

[35] 李娟, 张学顺, 傅春升. 中药抗菌作用的研究进展[J]. *中国药业*, 2014, 23(2): 90-93.