

## 三黄泻心汤质量标志物抑菌生物效价测定

刘晶晶, 胡晓茹

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

**摘要** **目的:** 对三黄泻心汤质量标志物抑菌的生物效价进行测定。**方法:** 采用体外抑菌实验, 选取与三黄泻心汤及其质量标志物药理作用相关性强的细菌, 研究其抑制作用, 通过 MIC 和 MBC 值的测定及相应抑菌圈直径的测定, 计算生物效价。**结果:** 抑菌实验表明, 三黄泻心汤水煎剂与质量标志物组对金黄色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌抑制作用明显, 且质量标志物组抑菌效果明显优于复方水煎液, 三黄泻心汤质量标志物组相对于三黄泻心汤水煎剂的生物效价为 274.92, 即 1 g 质量标志物组所产生的生物效价相当 274.92 g 的复方药材。质量标志物组相对于亚胺培南的生物效价为 4.387 3, 即 1 g 质量标志物组所产生的生物效价相当于 0.438 7 mg 所产生的生物效价。**结论:** 基于三黄泻心汤主要用于治疗上呼吸道感染这一疾病, 针对三黄泻心汤及质量标志物的抗菌作用开展研究, 结果表明三黄泻心汤及质量标志物组有较强的抗菌作用。本工作作为新药研发提供一种新思路, 为中药质量控制提供了一种新的研究模式。

**关键词:** 三黄泻心汤; 质量标志物; 复方药材; 乙型溶血性链球菌; 抑菌; 生物效价

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)05-0852-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.05.12

## Determination of antibacterial biological titers of Q-Marker in Sanhuang Xiexin decoction

LIU Jing-jing, HU Xiao-ru

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**Abstract** **Objective:** To survey and evaluate the biological potency of Q-Maker in Sanhuang Xiexin decoction. **Methods:** *In vitro* antibacterial experiment was performed on Sanhuang Xiexin decoction and the Q-Maker using the most relevant bacteria inhibitory effect. The biological titers were calculated through surveying and evaluating the value of MIC, MBC and the diameter of bacteriostatic circle. **Results:** The bacteriostatic test showed that Sanhuang Xiexin decoction and Q-Maker group had sensitivity to staphylococcus aureus, beta hemolytic streptococcus etc., and the Q-Maker was much better than Sanhuang Xiexin decoction. 1 g of Q-Maker group was equivalent to 274.92 g of Sanhuang Xiexin decoction. Additionally, 1 g of Q-Maker group was equivalent to 0.438 7 mg of imipenem. **Conclusion:** Sanhuang Xiexin decoction is used mainly for the treatment of upper respiratory tract infection, both the Sanhuang Xiexin decoction and the Q-Maker group have strong antibacterial effect. The results of this research provides a new idea for the further research and development of Chinese medicine. This study

第一作者 Tel:(010)67095150; E-mail: 18911002859@126.com

provides the new research mode for the quality control of traditional Chinese medicine.

**Keywords:** Sanhuang Xiexin decoction; Q-Marker; Chinese herbal formul; beta hemolytic streptococcus; bacteriostasis; biological titers

三黄泻心汤为商朝伊尹所创,首载于东汉张仲景所撰之《金匱要略·惊悸吐衄下血胸满瘀血病脉证治第十六》,主治疗热盛吐衄证,包括大黄、黄连、黄芩 3 个药味<sup>[1]</sup>。依据刘昌孝院士提出的中药质量标志物(Q-Marker)控制中药产品质量的理论<sup>[2]</sup>,按经方的制剂方法制备样品,测得三黄泻心汤的生物碱类-黄酮类-蒽醌类质量标志物体系中 16 种质量标志物组合的含量:盐酸药根碱-盐酸表小檗碱-盐酸黄连碱-盐酸巴马汀-盐酸小檗碱-黄芩苷-汉黄芩苷-黄芩素-汉黄芩素-番泻苷 A-番泻苷 B-芦荟大黄素-大黄酸-大黄素-大黄酚-大黄素甲醚,其含量)依次为 1.800、5.400、7.700、4.500、18.800、47.800、9.400、3.600、1.100、0.423、3.540、0.069、0.112、0.365、0.111、0.033 mg·mL<sup>-1</sup><sup>[3]</sup>。质量标志物组合成分药理作用明确且与临床疗效相关<sup>[4-5]</sup>,采用生物检定方法验证三黄泻心汤与其质量标志物配比的等效性。

清热解毒药药理作用广泛,主要的药理作用为抗菌、抗炎等<sup>[6]</sup>。三黄泻心汤为经典清热解毒方剂,具有明显的抑菌作用,其质量标志物均具有明确的生物活性<sup>[7-9]</sup>。目前生物活性评价方法已逐渐受到国内外学者的关注,尤其是 FDA 发布的《植物药研发行业指南》对植物药及制剂的质量评控明确提出<sup>[10]</sup>:在只靠化学检验不足以确保质量和疗效一致性的情况下,应在质量标准和稳定性方案中纳入生物检定。肖小河等<sup>[11]</sup>指出生物活性检测方法联合多组分化学表征将是中药及中药相关产品质量评控的重要发展方向。生物检定在合理的供试品溶液制备的情况下,选择体外的试验方法较为适宜,如体外抑菌。所以本实验选取了体外抑菌<sup>[12-13]</sup>作为生物效价评价指标,测定了三黄泻心汤质量标志物抑菌生物效价。

## 1 材料

**1.1 药物 药材饮片:**饮片黄芩(批号 120101)、黄连(批号 120101)、大黄(批号 120101)购自安国市路路通饮片厂,经北京中医药大学张贵君教授鉴定依次为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干

燥根茎,蓼科植物大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根。

**对照品:**盐酸药根碱(批号 201011)、盐酸表小檗碱(批号 110426)、盐酸黄连碱(批号 107917)、盐酸巴马汀(批号 110732)、盐酸小檗碱(批号 110713)、黄芩苷(批号 110329)、汉黄芩苷(批号 110702)、黄芩素(批号 100810)、汉黄芩素(批号 110404)、芦荟大黄素(批号 100729)、大黄酸(批号 111201)、大黄素(批号 111106)、大黄酚(批号 110802)、大黄素甲醚(批号 100328)、番泻苷 A(批号 110714)、番泻苷 B(批号 110908),纯度均 $\geq 98\%$ ,购自四川省维克奇生物科技有限公司。

**阳性对照物:**亚胺培南(批号 810121,规格 4 万 U),购自重庆赛普那斯科技有限公司。

**1.2 试验菌** 金黄色葡萄球菌(批号 260143)、乙型链球菌(批号 321304)、大肠杆菌(批号 14153)、痢疾杆菌(批号 513502)、伤寒杆菌(批号 50071-8)、白色念珠菌(批号 CMCC(F)98001),均购自中国食品药品检定研究院,由本室传代保存。

**1.3 培养基** 胎牛血清(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所,批号 0607);营养肉汤(北京奥博星生物技术有限责任公司生产,规格为 250 g,批号 20120316);营养琼脂(北京奥博星生物技术有限责任公司生产,规格为 250 g,批号 20130105);沙氏培养基(自制,蛋白胨 10 g,葡萄糖 40 g,蒸馏水 1 000 mL 配成液体培养基)。

**1.4 仪器** 电热鼓风箱:DFG801 型,湖北省黄石市医疗器械厂;电热恒温培养箱:DNP-9162 型,上海精密实验设备有限公司;高压蒸汽灭菌器:AstellScientific,AMA440N,英国;冰箱:Electrolux,BCD-211E,伊莱克斯电器有限公司(中国)。

## 2 方法

**2.1 复方水煎液和质量标志物组的制备** 取三黄泻心汤(黄芩 5 g,黄连 5 g,大黄 10 g),加水煎煮 2 次。第 1 次加 10 倍水,常温浸泡 30 min,煎煮,水沸后回流提取 30 min,4 层纱布趁热滤过,药渣再加 10 倍水,煎煮 20 min,同法过滤,合并 2 次滤液,浓缩,冷至常温后,调节浓度至每毫升提取液含药量 1 g。

三黄泻心汤质量标志物组: 盐酸药根碱 - 盐酸表小檗碱 - 盐酸黄连碱 - 盐酸巴马汀 - 盐酸小檗碱 - 黄芩苷 - 汉黄芩苷 - 黄芩素 - 汉黄芩素 - 番泻苷 A - 番泻苷 B - 芦荟大黄素 - 大黄酸 - 大黄素 - 大黄酚 - 大黄素甲醚, 其含量依次为 1.800、5.400、7.700、4.500、18.800、47.800、9.400、3.600、1.100、0.423、3.540、0.069、0.112、0.365、0.111、0.033  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 三黄泻心汤泻火解毒质量标志物组的含量为 104.153  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。按照 16 种质量标志物比例 56:163:232:136:571:1 448:283:110:32:107:13:2:3:11:3:1 混合均匀, 得到三黄泻心汤质量标志物组。按照盐酸药根碱 - 盐酸表小檗碱 - 盐酸黄连碱 - 盐酸巴马汀 - 盐酸小檗碱比例 (1:3:4.28:2.5:10.44) 混合均匀得到黄连质量标志物组, 按照黄芩苷 - 汉黄芩苷 - 黄芩素 - 汉黄芩素比例 (43.45:8.55:3.27:1) 混合均匀得到黄芩质量标志物组, 按照番泻苷 A - 番泻苷 B - 芦荟大黄素 - 大黄酸 - 大黄素 - 大黄酚 - 大黄素甲醚比例 (12.82:107.27:2.09:3.39:11.06:3.36:1) 混合均匀得到大黄质量标志物组。用无菌 0.9% 氯化钠溶

液配制成一定浓度的药液, 煮沸灭菌于 4℃ 保存备用。试验时, 用培养液将药物对倍稀释, 制成不同浓度梯度。

**2.2 试验菌液和培养基的配制** 金黄色葡萄球菌、痢疾杆菌、伤寒杆菌、大肠埃希菌接种于 MH 肉汤, 置普通培养箱 37℃、24 h 培养; 白色念珠菌接种于沙保弱氏肉汤, 置普通培养箱 37℃、48 h 培养; 乙型链球菌接种于 5% 小牛血清肉汤, 5%  $\text{CO}_2$  培养箱 37℃、48 h 培养。比浊法进行细菌计数, 转种于平板测定菌液中活菌数, 即菌落形成单位 ( $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。用稀释液调配成  $1.5 \times 10^8 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  菌液备用。沙保弱氏培养基、5% 小牛血清肉汤、MH 培养基、MH 肉汤均按《现代微生物培养基和试剂手册》制备。

**2.3 最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 和最小杀菌浓度 (minimal bactericidal concentration, MBC) 测定方法** 参照《卫生部药政局新药临床前研究指导原则》中“抗菌药体外抗菌试验原则”和《微生物学检验技术》, 采用二倍稀释法测定 MIC, 平板转染法测定 MBC (表 1、2)。

表 1 各药物体外抑菌 MIC 结果 ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )Tab. 1 The MIC results of each group *in vitro*

药物 (medicine)	金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	大肠埃希菌 ( <i>Escherichia coli</i> )	痢疾杆菌 ( <i>Bacillus dysenteriae</i> )	伤寒杆菌 ( <i>Typhoid bacillus</i> )	乙型溶血性链球菌 ( <i>Streptococcus hemolysin B</i> )	白色念珠菌 ( <i>Candida albicans</i> )
黄芩质量标志物组 ( <i>Scutellaria baicalensis</i> Q-Marker group)	1.785	>3.571	>3.571	>3.571	1.785	1.785
黄连质量标志物组 ( <i>Coptis chinensis</i> Q-Marker group)	0.112	1.785	0.223	>3.571	0.028	0.112
大黄质量标志物组 ( <i>Rheum palmatum</i> Q-Marker group)	0.446	>3.571	>3.571	>3.571	0.893	>3.571
三黄泻心汤质量标志物组 (Sanhuang Xiexin decoction Q-Marker group)	0.446	>3.571	>3.571	>3.571	0.112	0.893
三黄泻心汤水煎液 (Sanhuang Xiexin decoction)	125	>500	250	250	62.5	>500
亚胺培南 (imipenem)	0.5	0.5	2	1	0.25	1

表 2 各药物体外抑菌 MBC 结果

Tab. 2 The MBC results of each group *in vitro*

药物 (medicine)	金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	大肠埃希菌 ( <i>Escherichia coli</i> )	痢疾杆菌 ( <i>Bacillus dysenteriae</i> )	伤寒杆菌 ( <i>Typhoid bacillus</i> )	乙型溶血性链球菌 ( <i>Streptococcus hemolysin B</i> )	白色念珠菌 ( <i>Candida albicans</i> )
黄芩质量标志物组 ( <i>Scutellaria baicalensis</i> Q-Marker group)	0.893	>3.571	3.571	>3.571	1.785	1.785
黄连质量标志物组 ( <i>Coptis chinensis</i> Q-Marker group)	0.112	1.785	0.223	3.571	0.028	0.223
大黄质量标志物组 ( <i>Rheum palmatum</i> Q-Marker group)	0.446	>3.571	>3.571	>3.571	0.893	>3.571
三黄泻心汤质量标志物组 (Sanhuang Xiexin decoction Q-Marker group)	0.223	>3.571	1.785	>3.571	0.112	0.223
三黄泻心汤水煎液 (Sanhuang Xiexin decoction)	62.5	>500	250	125	31.75	>500
亚胺培南 (imipenem)	0.5	0.5	2	2	0.25	1

**2.4 测定菌株的选择** 根据以上结果选择金黄色葡萄球菌和乙型链球菌 2 种标准菌株(中国食品药品检定研究院提供)。分别选择对金黄色葡萄球菌和乙型链球菌 MIC 的 2、4、8 倍作为试验浓度,按照《中华人民共和国药典》2010 年版二部附录 XI 规定的培养基和培养条件进行抑菌试验,测定抑菌圈直径(表 3)。

表 3 对 2 种标准菌株的平均抑菌圈直径 (mm)

Tab. 3 Average bacteriostasis diameter of two standard strains

MIC 倍数 (MIC multiple)	三黄泻心汤水煎液 (Sanhuang Xiexin decoction)		亚胺培南 (imipenem)	
	金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	乙型溶血性链球菌 ( <i>Streptococcus hemolysin B</i> )	金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	乙型溶血性链球菌 ( <i>Streptococcus hemolysin B</i> )
	2	10.07	16.11	11.39
4	12.15	18.85	12.76	18.38
8	14.53	20.86	15.59	20.45

可见,复方水煎液对乙型链球菌 2 倍 MIC(浓度为  $125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的抑菌圈大小较合适,故选择乙型链球菌为测定菌株,确定生药  $125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  中心浓度。亚胺培南对乙型链球菌 4 倍 MIC(浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的抑菌圈大小较合适,故选择乙型链球菌为测定菌株,确定  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  为中心浓度。

**2.5 生物效应标准曲线的确定** 以生药  $0.125 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  为中心浓度,1:0.8 为剂距,用蒸馏水配制一组不同浓度的三黄泻心汤水煎液与亚胺培南标准液,在规定的培养基和培养条件下培养 16 h,取出,用游标卡尺测量抑菌圈直径,以对数浓度 ( $\lg C_k$ )  $Y$  为纵坐标,抑菌圈直径  $X$  (mm) 为横坐标,应用 Excel 软件得到三黄泻心汤及亚胺培南的直线方程式。

**2.6 标准曲线回归数据及  $\beta$  的可信限率测定** 精密移取对照(三黄泻心汤、亚胺培南)溶液,用蒸馏水稀释成各浓度  $C_k$  (k1-k8);同时配制对照溶液的中心浓度溶液。取备妥的双碟 24 只,分为 8 组,每组 3 只。每组各碟内间隔的 3 只牛津杯内分别滴满对照溶液  $C_k$  (k1-k8),即  $0.40 \sim 2.50 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  溶液;另 3 只牛津杯内均滴满对照溶液的中心浓度溶液。在规定的培养基和培养条件下培养 16 h 后,逐一测量每个抑菌圈直径。根据测得值,应用 Excel 软件计算出标准曲线的回归数据及  $\beta$  的可信限率。

**2.7 抑菌生物效价的测定** 按照《中华人民共和国药典》2005 年版二部附录 XI 规定的培养基和培养条件进行抑菌试验,测定药效组分抑菌圈直径。代入计算公式  $\lg R = (y_i - \bar{y}_s) / b$ , 求出  $R$  值,即为相应生物效价。

**2.8 试验结果** 三黄泻心汤对金黄色葡萄球菌、乙

型链球菌、伤寒杆菌、痢疾杆菌敏感,其药效组分对金黄色葡萄球菌、乙型链球菌、痢疾杆菌、白色念珠菌敏感,且质量标志物配比的抑菌效果明显优于三黄泻心汤水煎液。因此选择金黄色葡萄球菌和乙型溶血性链球菌进行抑菌效价计算,质量标志物组抑菌效果明显优于复方水煎液,见表 1。

据上述抑菌结果,选取金黄色葡萄球菌和乙型链球菌 2 种标准菌株(中国食品药品检定研究院提供)。采用二倍稀释法测定三黄泻心汤水煎液及亚胺培南对 2 种标准菌株的 MIC,结果三黄泻心汤水煎液对上述 2 种标准菌株的 MIC 依次为  $125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $62.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。亚胺培南对上述 4 种标准菌株的 MIC 依次为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (表 4、5)。

表 4 不同浓度三黄泻心汤和亚胺培南对乙型链球菌的抑菌圈直径 (mm)

Tab. 4 Diameter of bacteriostasis of different concentrations of Sanhuang Xiexin decoction

三黄泻心汤水煎液 (Sanhuang Xiexin decoction)		亚胺培南 (imipenem)	
生药浓度 (TCM concentration) / ( $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	抑菌圈直径 (bacteriostasis diameter) / mm	浓度 (concentration) / ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	抑菌圈直径 (bacteriostasis diameter) / mm
0.051	13.72	0.41	14.5
0.064	14.46	0.51	14.89
0.080	15.02	0.64	15.26
0.100	15.67	0.80	15.87
0.125	16.33	1.00	16.46
0.156	17.15	1.25	17.09
0.195	17.94	1.56	17.71
0.244	18.85	1.95	18.42
0.305	20.08	2.44	19.27

表 5 质量标志物组供试品测定记录表

Tab. 5 Record table for test products of Q-marker group

药物 (medicine)	复方中心浓度抑菌圈直径 (bacteriostatic ring diameter) (ys)	$\bar{y}_s$	各剂量 [(C <sub>k</sub> (k1~k8))] 抑菌圈直径 (the diameter of bacteriostasis of [(C <sub>k</sub> (k1~k8))](yt)	$\bar{y}_t$	fk $\bar{y}_t - \bar{y}_s$
三黄泻心汤水煎液 (Sanhuang Xiexin decoction)	16.21, 16.13, 16.20 16.09, 16.11, 16.15 16.10, 16.12	16.14	27.12, 27.93, 28.56 29.04, 30.77, 31.69, 32.93, 34.15	30.27	14.13
亚胺培南 (imipenem)	16.29, 16.28, 16.29 16.41, 16.24, 16.40 16.23, 16.25	16.30	18.24, 18.73, 19.45 19.94, 20.37, 20.89, 21.63, 22.12	20.17	3.87

复方水煎液对乙型链球菌 2 倍 MIC (浓度为 125 mg · mL<sup>-1</sup>) 的抑菌圈大小较合适。故选择乙型链球菌为测定菌株, 确定生药 125 mg · mL<sup>-1</sup> 中心浓度。亚胺培南对乙型链球菌 4 倍 MIC (浓度为 1 mg · mL<sup>-1</sup>) 的抑菌圈大小较合适。故选择乙型链球菌为测定菌株, 确定 1 mg · mL<sup>-1</sup> 为中心浓度。

以对数浓度 Y (lgC<sub>k</sub>) 为纵坐标, 抑菌圈直径 X (mm) 为横坐标, 得出三黄泻心汤和亚胺培南的直线方程式分别为

$$Y = 0.1252X - 2.9789 \quad R^2 = 0.9882$$

$$Y = 0.1606X - 2.6672 \quad R^2 = 0.9886$$

表明复方水煎液生药在 0.051~0.305 g · mL<sup>-1</sup> 时, 对数浓度与抑菌圈直径线性关系良好, 因此, 选定生药 0.125 g · mL<sup>-1</sup> 作为中心浓度; 亚胺培南在 0.41~2.44 mg · mL<sup>-1</sup> 时, 对数浓度与抑菌圈直径线性关系良好, 因此, 选定 1.00 mg · mL<sup>-1</sup> 作为中心浓度 (图 1)。

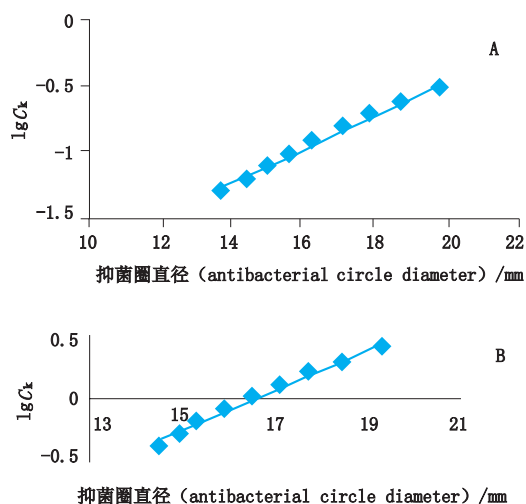


图 1 三黄泻心汤水煎液 (A) 和亚胺培南 (B) 对乙型链球菌抑菌生物效应曲线

Fig. 1 Biological effect curves of Sanhuang Xiexin decoction (A) and imipenem (B) to *Streptococcus B*

复方水煎液 - 乙型链球菌  $\beta = b \pm t_{0.05} \times S_b = 7.704 \pm 2.45 \times 0.8003 = 5.7433 \sim 9.6647$ , 可信限率 (FL) =  $(9.6647 - 5.7433) / (7.704 \times 2) \times 100\% = 25.45\%$ 。亚胺培南 - 乙型链球菌  $\beta = b \pm t_{0.05} \times S_b = 6.0266 \pm 2.45 \times 0.6093 = 7.5195 \sim 4.5337$ , 可信限率 (FL) =  $(7.5195 - 4.5337) / (6.0266 \times 2) \times 100\% = 24.77\%$  (表 5)。

质量标志物配比相对三黄泻心汤的效价为  $\lg R = (\bar{y}_t - \bar{y}_s) / b = 14.13 / 7.704 = 1.8346$ ,  $R = PT/PS = 74.92$ ; 即 1 g 质量标志物配比所产生的生物效价相当于 74.92 g 的复方药材。

质量标志物组相对亚胺培南的效价为  $\lg R = (\bar{y}_t - \bar{y}_s) / b = 3.87 / 6.0266 = 0.6422$ ,  $R = PT/PS = 4.3873$ ; 即 1 mg 质量标志物组所产生的生物效应相当于 4.3873  $\mu$ g 的亚胺培南。

### 3 结论与讨论

**3.1 质量标志物的选择** 三黄泻心汤为临床常用经典方剂, 其抑菌作用已被广泛证实<sup>[7-8, 14-15]</sup>。其处方组成为黄连、黄芩、大黄三味药。其中黄连、黄芩、大黄均为临床常用药材, 其化学成分及活性研究较为深入。从文献报道来看, 黄连抗菌活性主要由盐酸药根碱、盐酸表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱等生物碱类成分提供; 黄芩抗菌活性主要由黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素等黄酮类成分提供; 大黄抗菌活性主要由番泻苷 A、番泻苷 B、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚等蒽醌类成分提供<sup>[16-20]</sup>。上述成分也是这些药材活性及质量控制研究的重点关注成分。因此在三黄泻心汤的研究中, 也选择上述 16 个成分作为其质量标志物。从实验结果来看, 这 16 个成分的混合物已能代表甚至超过原汤剂的抑菌活性, 表明上述标志物的选择具有一定合理性。

**3.2 生物效价测定方法** 在实验菌种选择中, 依据

上呼吸道感染的常见参考细菌包括金黄色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌、伤寒杆菌、白色念珠菌、大肠杆菌、痢疾杆菌<sup>[21-25]</sup>,故选择上述6种菌对原汤剂和标志物进行等效性试验。前期预试验中对亚胺培南、庆大霉素作为对照药物进行比较,结果表明亚胺培南抑菌更广谱且敏感,选为阳性对照物。

生物效价测定试验与化学分析相比,重复性较差。为此,在正式试验前,专门进行了预试验,在预试验中所得抑菌圈直径线性方程与正式试验结果稍有差异,但试验最终结论基本一致,表明本试验结果重复性较好。

三黄泻心汤的原汤剂与其标志物组的抑菌实验数据显示,乙型溶血性链球菌的抑菌圈直径更适宜,表现出更佳的敏感度,与报道溶血性链球菌最常见<sup>[26]</sup>相符,因此选为计算效价的菌种。三黄泻心汤的原汤剂与其标志物组均有较强的抗菌作用,且标志物组效果明显优于复方水煎液。另发现单味药标志物组抑菌效果:黄连>黄芩>大黄,此方中黄连抑菌效果最佳且更广谱。3个单味药均有抑菌作用的是金黄色葡萄球菌和乙型溶血性链球菌。三黄泻心汤水煎剂及标志物组对金黄色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌抑制作用明显,这与单味药的抑菌结论相符。

**3.3 标志物生物效价评价的意义** 本实验选择与三黄泻心汤泻火解毒作用密切相关的抑菌生物效应指标来反映原方及标志物组的作用效果<sup>[27-31]</sup>。首次采用抑菌生物效应评价方法,在已初步确定疗效的标志物组研究的基础上,对三黄泻心汤原方及标志物组的生物效价进行测定。选择性较高,作用较强,灵敏度较好,从抑菌角度评价三黄泻心汤的标志物组的药效作用,得出1g标志物组所产生的生物效价相当于74.92g的复方药材,1mg标志物组所产生的生物效应相当于4.3873μg的亚胺培南。标志物组药效明显优于原汤剂,为中药制剂新品的研发提供了探讨的方向,方法简便,可操作性强。

中药的质量控制和评价一直以来都是中药新药研发的难点,尤其是在中药国际化研究中,更是极大的挑战。三黄泻心汤标志物组是中药新药研发的一种新思路,本实验将抗生素与标志物进行效价换算,确定三黄泻心汤标志物组及其生物效价分析方法为中药质量控制提供了一种新的研究模式,通过对标志物及生物效价的深入研究和实施,将药

品质评价和质量控制有机地结合,探索出一条用于中药产品质量一致性评价和质量控制的可行性模式。

#### 参考文献

- [1] 范永升. 金匮要略[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003  
FAN YS. Synopsis of Golden Chamber [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Publishing House, 2003
- [2] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443  
LIU CX, CHEN SL, XIAO XH, et al. New concept on quality marker of Chinese materia medica: quality control for Chinese medicinal products [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(9): 1443
- [3] 刘晶晶, 张贵君, 彭慧, 等. 三黄泻心汤药效组分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 103  
LIU JJ, ZHANG GJ, PENG H, et al. Analysis of active components alignments of classic recipe of Chinese medicine Sanhuang Xiexin Tang [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2013, 19(18): 103
- [4] 李颜, 郭澄. 三黄泻心汤的现代药理研究进展[J]. 中国药房, 2010, 11(12): 1045  
LI Y, GUO C. The modern pharmacological research progress of Sanhuang Xiexin decoction [J]. China Pharm, 2010, 11(12): 1045
- [5] 赖先荣, 张艺, 郑海杰, 等. 三黄方及其单味药药效物质基础的血清药物化学研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2012, 19(5): 520  
LAI XR, ZHANG Y, ZHENG HJ, et al. Three serum pharmacology of Sanhuangfang and its single medicinal ingredients [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med, 2012, 19(5): 520
- [6] 李瑞奇, 白明, 苗明三. 清热药的特点及现代研究[J]. 中医学报, 2013, 1(7): 1003  
LI RQ, BAI M, MIAO MS. Modern research and relationship of heat-clearing traditional Chinese medicine [J]. Acta Chin Med, 2013, 1(7): 1003
- [7] 魏晓芬, 李静华, 郭玉成. 三黄泻心汤不同剂型的体外抑菌作用观察[J]. 承德医学院学报, 2006, 23(1): 14  
WEI XF, LI JH, GUO YC. The bacteriostatic effects of Sanhuang Xiexin Decoction of different dosage forms of the observation [J]. J Chengde Med Coll, 2006, 23(1): 14
- [8] 谭波, 于丽华, 韩志芬, 等. 泻心汤的抗菌作用研究[J]. 上海中医药大学学报, 2007, 21(2): 48  
TAN B, YU LH, HAN ZF, et al. Antibacterial effect of Xiexin decoction [J]. J Shanghai Univ Tradit Chin Med, 2007, 21(2): 48
- [9] US. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Botanical Drug Development Guidance for Industry (Draft Guidance) [S]. 2015
- [10] 秦亚东, 席先蓉, 梁光义, 等. 高效液相色谱法测定泻心汤不同煎液中黄芩苷的含量及体外抗菌作用比较[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(12): 2387  
QIN YD, XI XR, LIANG GY, et al. Determination of baicalin in different decoctions of Xiexin Tang by HPLC and comparison of the antibacterial effects *in vitro* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2006, 17(12): 2387

- [ 11 ] 肖小河, 王伽伯, 鄢丹. 生物评价在中药质量标准化中的研究与应用 [ J ]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2014, 16 ( 3 ): 514  
XIAO XH, WANG JB, YAN D. Studies and application of biological evaluation in the quality standardization of Chinese medicines [ J ]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med, 2014, 16 ( 3 ): 514
- [ 12 ] 孙婷婷, 马晓慧, 李欣欣, 等. 中药生物效价研究现状及开发思路探讨 [ J ]. 中草药, 2017, 48 ( 9 ): 1906  
SUN TT, MA XH, LI XX, *et al.* Discussion on research status and development ideas of biopotency for Chinese materia medica [ J ]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48 ( 9 ): 1906
- [ 13 ] 徐蓓蕾, 文春先, 张贵君, 等. 葛根芩连汤效组分抑菌生物效价测定 [ J ]. 中华中医药杂志, 2013, 28 ( 1 ): 230  
XU BL, WEN CX, ZHANG GJ, *et al.* Determination of biological titers of active components alignments in Gegen Qinlian decoction on bacteriostasis [ J ]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2013, 28 ( 1 ): 230
- [ 14 ] 白羽, 徐广宇. 三黄泻心汤合煎和分煎样品的抑菌活性研究 [ J ]. 健康之路, 2016, 15 ( 3 ): 203  
BAI Y, XU GY. Study on antimicrobial activity of Sanhuang Xiexin decoction and Fenjian decoction samples [ J ]. Health Way, 2016, 15 ( 3 ): 203
- [ 15 ] 孙涛, 张洪峰, 刘璐. 三黄泻心汤不同提取溶媒抑菌活性研究 [ J ]. 中国医院用药评价与分析, 2015, 15 ( 6 ): 711  
SUN T, ZHANG HF, LIU L. Antibacterial activity of different extracts from Sanhuang Xiexin decoction [ J ]. Eval Anal Drug Use Hosp China, 2015, 15 ( 6 ): 711
- [ 16 ] 王育红, 张志清, 李仲兴, 等. 8 种中药水煎剂与免煎颗粒剂对临床菌株的体外抑菌作用研究 [ J ]. 时珍国医国药, 2005, 23 ( 8 ): 734  
WANG YH, ZHANG ZQ, LI ZX, *et al.* 8 kinds of Chinese herbal medicine decoction and free decoction on clinical strains of the bacteriostatic action [ J ]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2005, 23 ( 8 ): 734
- [ 17 ] 毛理纳, 罗予, 孟林敏, 等. 黄连合用头孢菌素类抗生素的抑菌作用研究 [ J ]. 中医药学刊, 2004, 22 ( 11 ): 2033  
MAO LN, LUO Y, MENG LM, *et al.* Antibacterial effect of *Coptis chinensis* cephalosporins [ J ]. J Tradit Chin Med, 2004, 22 ( 11 ): 2033
- [ 18 ] 唐金凤, 李莉, 左国营. 51 种常见中草药抗菌活性筛选 [ J ]. 时珍国医国药, 2016, 27 ( 4 ): 788  
TANG JF, LI L, ZUO GY. 51 kinds of common herbal medicine antibacterial activity in screening [ J ]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2016, 27 ( 4 ): 788
- [ 19 ] 罗海燕, 邴枣园, 黄雅丽, 等. 黄芩颗粒和黄芩煎剂体外抗菌试验的比较 [ J ]. 临床合理用药杂志, 2011, 4 ( 1 ): 69  
LUO HY, KUANG ZY, HUANG YL, *et al.* Comparison of *in vitro* antibacterial test between *Scutellaria baicalensis* granules and *Scutellaria baicalensis* [ J ]. J Clin Rat Drug Use, 2011, 4 ( 1 ): 69
- [ 20 ] 宋丽琴. 大黄不同炮制品的体外抑菌作用 [ J ]. 海峡药学, 2011, 23 ( 5 ): 55  
SONG LQ. *In vitro* bacteriostasis of different artillery products of rhubarb [ J ]. Strait Pharm J, 2011, 23 ( 5 ): 55
- [ 21 ] 张晓艳, 易绍琼, 陈薇. 金黄色葡萄球菌疫苗的研究进展 [ J ]. 微生物学免疫学进展, 2009, 37 ( 2 ): 74  
ZHANG XY, YI SQ, CHEN W. Advances in the research of *Staphylococcus aureus* vaccine [ J ]. Prog Microbiol Immunol, 2009, 37 ( 2 ): 74
- [ 22 ] 王倩, 褚云卓, 邓宇欣. 连续 5 年监测乙型溶血性链球菌的临床分布及耐药性分析 [ J ]. 中国现代医学杂志, 2004, 14 ( 20 ): 67  
WANG Q, CHU YZ, DENG YX. Analysis of clinical distribution and drug resistance of *Streptococcus hemolytic* streptococci for 5 consecutive years [ J ]. Chin J Mod Med, 2004, 14 ( 20 ): 67
- [ 23 ] 尹秀玲, 牛发良. 大肠杆菌耐药机制的研究进展 [ J ]. 河北北方学院学报, 2007, 23 ( 2 ): 49  
YIN XL, NIU FL. Research progress in the mechanism of drug resistance of *Escherichia coli* [ J ]. J Hebei North Univ, 2007, 23 ( 2 ): 49
- [ 24 ] 王亚霞, 魏琴, 刘亚新. 医院内白色念珠菌感染原因探讨及预防 [ J ]. 中华医院感染学杂志, 2003, 13 ( 9 ): 885  
WANG YX, WEI Q, LIU YX. Study on the causes of *Candida albicans* infection in hospital and prevention [ J ]. Chin J Nosocomiol, 2003, 13 ( 9 ): 885
- [ 25 ] 张麦利. 痢疾杆菌菌型分布及其耐药性分析 [ J ]. 医技与临床, 2009, 11 ( 13 ): 1022  
ZHANG ML. *Shigella serotype* distribution and drug resistance analysis [ J ]. Clin Med Technol, 2009, 11 ( 13 ): 1022
- [ 26 ] 陈哲杰, 李文, 何瑶, 等. 三黄泻心汤研究现状及其关键技术与核心问题分析 [ J ]. 中草药, 2016, 39 ( 11 ): 4111  
CHEN ZJ, LI W, HE Y, *et al.* Research status of Sanhuang Xiexin decoction and analyses of key technologies and core issues [ J ]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 39 ( 11 ): 4111
- [ 27 ] 刘晶晶, 张贵君, 彭慧, 等. 与大黄功能对应的 7 种药效组分分析 [ J ]. 天津中医药, 2014, 31 ( 1 ): 202  
LIU JJ, ZHANG GJ, PENG H, *et al.* Analysis of active components alignments in rhubarb on the basis of functions of purging fire of detoxification eliminating stagnant and treating jaundice [ J ]. Tianjin Tradit Chin Med, 2014, 31 ( 1 ): 202
- [ 28 ] 刘晶晶, 张贵君, 彭慧, 等. 黄芩清热燥湿和泻火解毒药效组分分析 [ J ]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15 ( 11 ): 89  
LIU JJ, ZHANG GJ, PENG H, *et al.* Analysis of active components alignments in *Scutellaria* on the basis of functions of clearing away heat and eliminating dampness purging fire and toxic material [ J ]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2013, 15 ( 11 ): 89
- [ 29 ] 刘晶晶, 张贵君, 彭慧, 等. 与黄连功能对应的 5 种药效组分分析 [ J ]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15 ( 10 ): 56  
LIU JJ, ZHANG GJ, PENG H, *et al.* Analysis of the five active component alignment corresponding to the function of Rhizoma *Coptidis* [ J ]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2013, 15 ( 10 ): 56
- [ 30 ] 谭正怀, 唐大轩, 李杭翼. 泻心汤配伍理论实验研究 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16 ( 4 ): 99  
TAN ZH, TANG DX, LI HY. Study on interactions among drugs in Xiexin decoction [ J ]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2010, 16 ( 4 ): 99
- [ 31 ] 耿慧春, 辛颖, 艾凤伟, 等. 三黄泻心汤 HPLC 指纹图谱研究 [ J ]. 中草药, 2008, 39 ( 4 ): 524  
GENG HC, XIN Y, AI FW, *et al.* Fingerprint research of Sanhuang Xiexin decoction by HPLC [ J ]. Chin Tradit Herb Drugs, 2008, 39 ( 4 ): 524

( 本文于 2017 年 12 月 15 日收到 )