

# 锦灯笼 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 指纹图谱 及抗菌活性的谱效关系

张传洋,杨璐嘉,陈翠平,王 辉,赵元静,邓 放\*

成都中医药大学药学院 西南特色中药资源国家重点实验室,成都 611137

**摘要:**建立不同产地锦灯笼(*Physalis Calyx seu Fructus*, PCF)的指纹图谱,并进行抗菌活性的谱-效关系研究。采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Orbitrap HRMS)建立16批锦灯笼指纹图谱,对共有峰进行归属,并进行聚类热图和主成分分析;检测不同产地锦灯笼提取物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌活性,采用灰色关联度分析进行谱效关系的研究。建立的锦灯笼指纹图谱共标定38个共有峰,根据精确的分子离子峰质量数及二级碎片信息,查阅相关文献等发现其中包括了22个蔗糖脂肪酸酯类成分、4个酸浆苦素类成分以及木犀草苷、木犀草素等化学成分;聚类分析和主成分分析将16批锦灯笼均按照不同产地进行了分类。16批锦灯笼提取物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均具有较好的抑菌活性,灰色关联分析表明,峰27(关联度 $\geq 0.85$ )对金黄色葡萄球菌的抑菌活性贡献较大,峰37、29、30、19、33、35、31、17、32、20和28(关联度 $\geq 0.85$ )对大肠杆菌的抑菌活性贡献较大,且这些特征峰均为蔗糖脂肪酸酯类化合物,表明蔗糖脂肪酸酯类成分对于锦灯笼发挥抗菌活性具有很大的贡献。通过建立锦灯笼质谱指纹图谱及初步谱效关系,筛选出锦灯笼中对抑菌活性贡献较大的特征峰,为进一步研究锦灯笼的药效成分及药理作用提供参考。

**关键词:**锦灯笼;指纹图谱;抑菌活性;谱效关系;蔗糖脂肪酸酯

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)10-1699-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.10.005

## Spectrum-effect relationship between UPLC-Q-Orbitrap HRMS fingerprint and antibacterial activity of *Physalis Calyx seu Fructus*

ZHANG Chuan-yang, YANG Lu-jia, CHEN Cui-ping, WANG Hui, ZHAO Yuan-jing, DENG Fang\*

State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy,  
Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

**Abstract:** This study aimed to establish the fingerprint of *Physalis Calyx seu Fructus* (PCF) and to study the relationship between spectrum and antibacterial activity. The fingerprint of 16 batches of samples was constructed by an ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap HRMS), then the cluster heat map and principal component analysis (PCA) were performed. In vitro antibacterial activities of different batches of PCF against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were detected and then grey relational analysis was used to establish the spectrum-effect relationship. Thirty-eight common peaks were screened out from the fingerprint, including 22 sucrose fatty acid esters, four physalins, luteoloside, luteolin and other compounds based on the accurate mass and mass fragmentation patterns, and combined with literature information and related reference materials. The results of cluster heat map analysis showed that PCF from different sources were clustered into three categories, which agreed with the result of PCA. All samples had different degrees of antibacterial activities. Grey relational analysis indicated that peak 27 had great contribution to antibacterial activities against *S. aureus* and peak 37, 29, 30, 19, 33, 35, 31, 17, 32, 20 and 28 had great contribution to antibacterial activities against *E. coli*. Above all, all characteristic peaks were sucrose fatty acid esters, which indicated that sucrose fatty acid esters may be potential effective substances. The characteristic peaks which greatly contributed to

收稿日期:2023-02-16

接受日期:2023-06-25

基金项目:四川省科技厅重点研发项目(2022YFN0068)

\* 通信作者 Tel:86-013684090383; E-mail:dengf99@163.com

the pharmacodynamics of PCF were screened out by establishing its fingerprint and spectrum-effect relationship, which provided the theory basis for further study of the pharmacodynamics and pharmacology of PCF.

**Key words:** Physalis Calyx seu Fructus; fingerprint; antibacterial activity; spectrum-effect relationship; sucrose fatty acid esters

锦灯笼,又名酸浆、红姑娘,为茄科酸浆属植物酸浆 *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino 的干燥宿萼或带果实的宿萼。味酸苦,性寒,归肺脾二经。具有清热解毒、利咽化痰、利尿通淋之功效,临床用于治疗咽喉肿痛、肺热咳嗽、小便淋漓<sup>[1]</sup>。锦灯笼化学成分多样,主要包括酸浆苦素、黄酮、蔗糖酯、苯丙素、生物碱等类成分<sup>[2]</sup>。现代药理学研究表明,锦灯笼醇提取物及二氯甲烷提取物对于革兰阳性菌、革兰阴性菌及念珠杆菌均有较好的抑制活性<sup>[3]</sup>,部分酸浆苦素成分也被证实具有显著的抑菌作用<sup>[4]</sup>。目前国内外对于锦灯笼抗菌活性的研究较多,然而其物质基础尚不十分明确。

中药本身成分复杂多样,在发挥药效时具有多靶点、整体调节等特点。中药谱效关系是建立在中药指纹图谱研究的基础上,将指纹图谱和药效作用联系起来,开展谱-效关系的研究,进一步明确发挥药效的物质基础<sup>[5,6]</sup>。目前,有关锦灯笼的指纹图谱研究及其谱效关系研究较少。因此,本研究拟从锦灯笼的谱效关系去挖掘其抑菌活性的物质基础。通过建立三个不同产地共计 16 批次锦灯笼的质谱指纹图谱,并测定其对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌活性,通过灰色关联分析,探讨特征峰与其抑菌活性的相关性,以阐明其抗菌活性的物质基础,旨在为锦灯笼的进一步开发利用和质量控制研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 药材

锦灯笼药材 16 批,其中安徽产地 6 批(S1 ~ S6),购于安徽亳州药材市场;吉林产地 4 批(S7 ~ S10),购于吉林长白山土特产商行;河北产地 6 批(S11 ~ S16),购于河北安国药材市场。经成都中医药大学学院龙飞副教授鉴定为酸浆 *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino 的干燥宿萼。所购买的宿萼均为橙红色,且无虫蛀和霉变。

#### 1.1.2 菌株

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC25923)和大肠埃希菌(*Escherichia coli*, ATCC25922)均购买于北京北纳创联生物技术研究院。

#### 1.1.3 仪器

Vanquish 超高效液相色谱联用 Q Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);KQ3200E 型超声波清洗器(频率 40 kHz,功率 650 W,昆山市超声仪器有限公司);PYX-DHS. 500-BY 型隔水式电热恒温培养箱(上海龙跃仪器设备有限公司);SW-CJ-2FD 型洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);DEN-1 型麦氏电子比浊仪(英国 Grant 仪器有限公司);Discovery DV215CD 十万分之一天平(美国 Ohaus 仪器有限公司);BS124S 万分之一分析天平(德国 Sartorius 科学仪器有限公司)。

#### 1.1.4 对照品与试剂

对照品绿原酸、芦丁、木犀草苷、木犀草素(批号分别为 DSTDL002101、DSTDL001701、DST201102-016、DST200910-032,纯度均大于 98%,成都德思特生物技术有限公司);M-H(A) 固体培养基(英国 Oxoid 公司);LB 固体培养基(杭州百思生物技术有限公司);色谱纯乙腈和甲酸(美国 Fisher 公司);甲醇、二甲亚砜(DMSO)(成都市科龙化工试剂厂);水为屈臣氏蒸馏水。

## 1.2 方法

### 1.2.1 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 样品及条件

#### 1.2.1.1 溶液的制备

对照品溶液的制备:分别精密称取各对照品绿原酸、芦丁、木犀草苷、木犀草素适量,加甲醇溶解,制成含上述各成分浓度均为 0.05 mg/mL 的混合对照品溶液,即得。

供试品溶液的制备:精密称取锦灯笼粉末(过 2 号筛)约 1 g,置 50 mL 锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇-水 25 mL,称定质量,超声(40 kHz,150 W)处理 30 min,再次称定质量,用 70% 甲醇-水补足碱失的重量,摇匀,过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,取续滤液,即得。

#### 1.2.1.2 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 条件

色谱条件:Thermo Scientific Accucore<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> 色谱柱(3 mm  $\times$  100 mm,2.6  $\mu\text{m}$ ),流动相为 0.1% 甲酸水(A)和 0.1% 甲酸乙腈(B),梯度洗脱(0 ~ 10 min,5%  $\rightarrow$  20% B;10 ~ 25 min,20%  $\rightarrow$  25% B;25 ~ 50 min,25%  $\rightarrow$  60% B;50 ~ 70 min,60%  $\rightarrow$  90% B;70 ~

75 min, 90% → 95% B), 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 30 °C, 进样量为 4 μL。

质谱条件: 采用电喷雾离子源 (ESI), 扫描模式为 Full MS / dd-MS<sup>2</sup> 下负离子进行扫描检测。喷雾电压 3.0 kV, 辅助气加热温度 350 °C, 鞘气流速 35 arb, 辅助气流速 10 arb, 离子传输管温度 320 °C。一级分辨率 35 000, 二级分辨率 17 500, 扫描范围  $m/z$  100 ~ 1 500, 碰撞能量梯度为 20、40、60 eV, Top N = 5。

### 1.2.2 抑菌活性

#### 1.2.2.1 菌悬液的制备

将在 4 °C 保存的大肠埃希菌标准株和金黄色葡萄球菌标准株划线接种于无菌 LB 琼脂培养基表面, 在 37 °C 孵箱中孵育 24 h。取生长良好的菌团混悬于生理盐水中并校正浓度至 0.5 麦氏浊度, 备用。

#### 1.2.2.2 供试品溶液制备

通过预实验, 发现锦灯笼在质量浓度为 0.05 g/mL 时抑菌活性良好。因此将供试品溶液进行浓缩, 再用 DMSO 溶液进行溶解, 使质量浓度达到 0.05 g/mL, 以 DMSO 溶液为空白对照, 在超净工作台上经微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 即为抑菌样品液。

#### 1.2.2.3 抑菌活性测定

将备用的细菌混悬液均匀涂抹于无菌 MH-A 平板表面。将牛津管分别置于 4 个涂板完成的 MH-A 平板上, 顺时针依次向各个牛津管中加入 S1 ~ S16 号样品。将培养基放置 37 °C 恒温培养箱中孵育 24 h, 测量抑菌圈直径。

## 2 结果

### 2.1 锦灯笼指纹图谱的研究

#### 2.1.1 精密度试验

取同一供试品溶液 (S1) 按“1.2.1.2”项下条件连续进样 6 次, 记录色谱图。选择 20 号峰为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的相对标准偏差 (RSD), 分别为 < 0.2% 和 < 4.5%, 表明仪器精密度良好。

#### 2.1.2 稳定性试验

取同一供试品溶液 (S1), 分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 按“1.2.1.2”项下色谱条件测定, 记录色谱图。以 20 号峰为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 分别为 < 1.2% 和 < 4.7%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

#### 2.1.3 重复性试验

取样品 S1 粉末适量, 精密称定 6 份, 按“1.2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 按“1.2.1.2”项下色谱条件测定, 记录色谱图。以 20 号峰为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 分别为 < 0.3% 和 < 5.1%, 表明该方法的重复性良好。

#### 2.1.4 锦灯笼指纹图谱的建立及相似度评价

利用 Xcalibur 软件对 16 批锦灯笼的质谱数据进行处理, 提取并积分总离子流图, 导出色谱峰峰面积、峰高和保留时间等信息, 建立相似度评价软件可识别的 .txt 格式数据文件, 再导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)。选择样品 S1 的谱图作为参照谱图, 时间窗宽度设为 0.1 min, 选取多个特征峰进行多点校正, 自动峰匹配, 共标定了 38 个共有峰。分别生成 16 批锦灯笼的 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 指纹图谱和对照指纹图谱 (见图 1 和 2)。

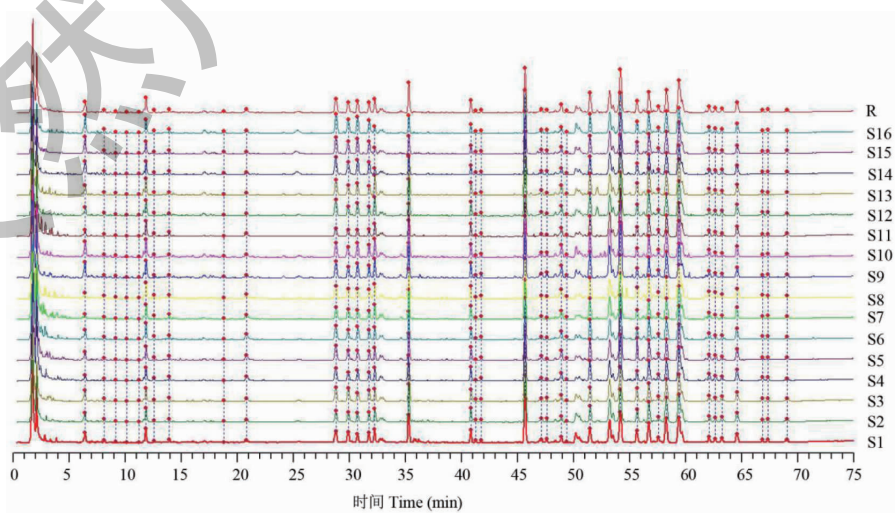


图 1 16 批锦灯笼的指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint of 16 batches of Physalis Calyx seu Fructus

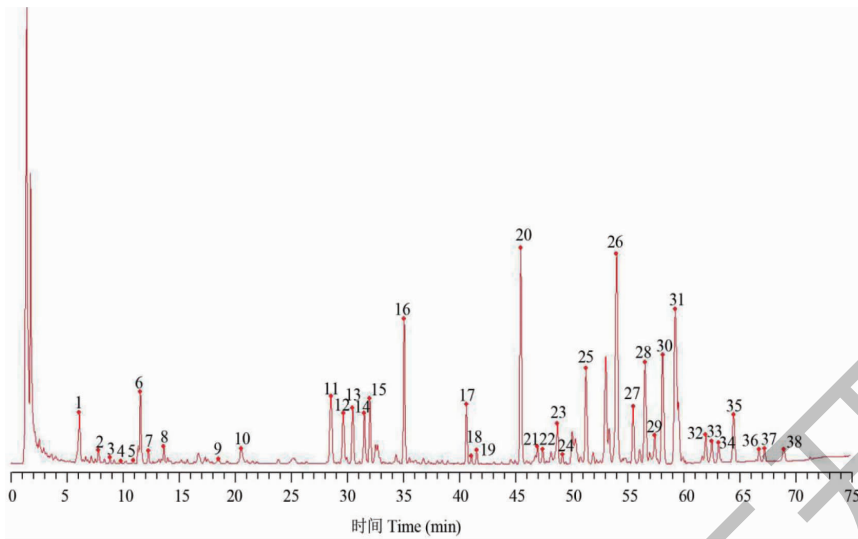


图2 锦灯笼的对照指纹图谱

Fig. 2 Reference fingerprint of *Physalis Calyx seu Fructus*

16批锦灯笼药材色谱图和对照谱图进行相似度评价, S1 ~ S16 相似度均大于 0.95, 表明 16 批次锦灯笼的相似度较好, 结果见表 1。

表 1 锦灯笼样品指纹图谱相似度评价

Table 1 Similarity evaluation of fingerprint of *Physalis Calyx seu Fructus*

编号 No.	相似度 Similarity	编号 No.	相似度 Similarity
S1	0.975	S9	0.982
S2	0.975	S10	0.981
S3	0.977	S11	0.981
S4	0.986	S12	0.984
S5	0.984	S13	0.983
S6	0.987	S14	0.980
S7	0.983	S15	0.978
S8	0.986	S16	0.972

### 2.1.5 共有峰的指认

将采集得到的原始数据导入 Compound Discoverer 3.2 质谱数据处理软件中, 建立未知化合物鉴定的工作流程, 设置一级及二级质量偏差  $< 5$  ppm, 进行峰提取、峰对齐等。根据分子离子峰的精确质量数和精确的二级碎片离子信息, 结合前期对锦灯笼化学成分的分析结果<sup>[7]</sup>, 以及参照相关文献<sup>[8,9]</sup>及与对照品比对, 对共有峰进行鉴定和归属。分析结果表明, 38 个共有峰中有 22 个峰为蔗糖脂肪酸酯类 (sucrose fatty acid ester, SFAE) 成分, 由于其同分异构体众多, 通过质谱分析并不能得到其准确的

结构, 另外从 16 个共有峰中共鉴定出 9 个成分, 结果见表 2。

### 2.1.6 聚类热图分析

将 16 批锦灯笼指纹图谱的 38 个共有峰的峰面积导入分析网站 (<https://hiplot-academic.com/>) 做聚类热图分析, 结果见图 3。聚类分析将这 16 批锦灯笼分为两大类: 安徽产地聚为一类, 吉林和河北产地聚为一类, 这可能是和药材产地地理位置的远近相关。另外, 在第二大类中吉林和河北产地的药材分别各自聚为一类, 进一步说明产地对于药材的影响。

表 2 锦灯笼的 38 个共有峰

Table 2 Thirty eight common peaks of Physalis Calyx seu Fructus

序号 No.	保留时间 $t_R$ (min)	离子模式 Ion mode	实测值 Measured value ( $m/z$ )	分子式 Molecular formula	误差 Deviation ( $\times 10^{-6}$ )	碎片离子 Fragment ion	化合物名称 Compound name
1	6.09	[M-H] <sup>-</sup>	353.087 5	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	-0.79	191.055 0, 179.034 2, 173.008 4, 161.023 7	绿原酸 Chlorogenic acid*
2	7.81	[M-H] <sup>-</sup>	431.192 0	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub>	-0.51	385.186 7, 179.055 3, 119.034 0	未知 Unknow
3	8.82	[M-H] <sup>-</sup>	609.145 8	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	-0.57	447.092 7, 285.040 1	芦丁 Rutinum*
4	9.80	[M-H] <sup>-</sup>	787.266 5	C <sub>35</sub> H <sub>48</sub> O <sub>20</sub>	-0.09	579.207 3, 417.155 0, 181.049 7	未知 Unknow
5	10.90	[M-H] <sup>-</sup>	609.146 1	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	0.03	300.027 2, 271.024 5, 255.029 5	未知 Unknow
6	11.55	[M-H] <sup>-</sup>	447.092 5	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	-1.81	447.092 7, 285.040 1	木犀草苷 Luteoloside*
7	12.26	[M-H] <sup>-</sup>	561.197 1	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>12</sub>	-1.18	543.186 7, 437.159 4, 149.059 9, 121.064 9	未知 Unknow
8	13.65	[M-H] <sup>-</sup>	675.228 9	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>15</sub>	-0.74	585.198 5, 401.108 6, 311.077 4	未知 Unknow
9	18.51	[M-H] <sup>-</sup>	342.134 3	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>5</sub>	-1.02	327.111 1, 190.050 2, 178.050 2, 148.052 0, 135.044 2	<i>N</i> -反式-阿魏酰- 3-甲氧基酪胺 <i>N-trans</i> -Feruloyl- 3-methoxytyramine <sup>[8]</sup>
10	20.56	[M-H] <sup>-</sup>	285.040 2	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	-1.05	151.002 8, 133.028 5, 107.012 8	木犀草素 Luteolin*
11	28.58	[M-H] <sup>-</sup>	525.175 9	C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>	-1.37	507.166 4, 479.170 5, 289.107 8, 193.086 3, 149.059 9, 121.064 9	酸浆苦素 A Physalin A <sup>[9]</sup>
12	29.69	[M-H] <sup>-</sup>	525.175 7	C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>	-1.83	507.165 7, 479.170 8, 289.108 2, 193.086 6, 149.059 9, 121.064 9	7β-羟基酸浆苦素 A 7β-Hydroxyphysalin A <sup>[9]</sup>
13	30.53	[M-H] <sup>-</sup>	527.191 6	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub>	-1.29	509.181 4, 447.180 7, 403.192 0, 323.129 1, 149.059 9, 121.064 9	7β-羟基酸浆苦素 L 7β-Hydroxyphysalin L <sup>[9]</sup>
14	31.57	[M-H] <sup>-</sup>	527.191 6	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub>	-1.29	509.180 9, 447.180 9, 403.191 2, 323.128 6, 149.059 8, 121.064 9	酸浆苦素 L Physalin L <sup>[9]</sup>
15	32.07	[M-H] <sup>-</sup>	327.217 3	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	-1.13	201.112 6, 171.101 9, 137.092 7	未知 Unknow
16	35.12	[M-H] <sup>-</sup>	329.232 9	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	-1.40	201.112 6, 171.101 9, 127.111 8	未知 Unknow
17	40.69	[M + COOH] <sup>-</sup>	611.291 1	C <sub>26</sub> H <sub>46</sub> O <sub>13</sub>	-1.57	467.213 1, 439.181 2, 341.108 3, 323.098 1, 143.106 8, 115.0753	SFAE <sup>[7]</sup>
18	41.14	[M + COOH] <sup>-</sup>	611.291 9	C <sub>26</sub> H <sub>46</sub> O <sub>13</sub>	-0.28	467.212 3, 439.181 7, 341.108 6, 323.098 1, 143.106 8, 115.075 4	SFAE <sup>[7]</sup>
19	41.61	[M + COOH] <sup>-</sup>	611.291 6	C <sub>26</sub> H <sub>46</sub> O <sub>13</sub>	-0.67	467.213 0, 439.181 7, 341.108 6, 323.098 1, 143.106 8, 115.075 4 467.213 0, 341.108 6, 323.098 2,	SFAE <sup>[7]</sup>
20	45.55	[M + COOH] <sup>-</sup>	639.322 6	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> O <sub>13</sub>	-1.11	143.106 8, 113.023 3, 89.023 4	SFAE <sup>[7]</sup>
21	47.05	[M + COOH] <sup>-</sup>	667.317 9	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>14</sub>	-0.48	495.208 1, 425.166 5, 407.155 2, 143.106 8, 101.059 8, 87.044 1 509.219 9, 439.181 5, 425.169 0,	SFAE <sup>[7]</sup>
22	47.50	[M + COOH] <sup>-</sup>	681.333 4	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>14</sub>	-0.78	143.106 9, 115.075 5, 87.044 0	SFAE <sup>[7]</sup>
23	48.82	[M + COOH] <sup>-</sup>	681.333 0	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>14</sub>	-1.31	537.255 1, 509.222 6, 411.150 6, 323.097 4, 143.106 8, 115.075 5, 87.044 1	SFAE <sup>[7]</sup>
24	49.27	[M + COOH] <sup>-</sup>	681.333 4	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>14</sub>	-0.78	509.223 5, 439.181 3, 425.166 2, 143.106 8, 115.075 4, 101.059 7	SFAE <sup>[7]</sup>

续表 2 (Continued Tab. 2)

序号 No.	保留时间 $t_R$ (min)	离子模式 Ion mode	实测值 Measured value ( $m/z$ )	分子式 Molecular formula	误差 Deviation ( $\times 10^{-6}$ )	碎片离子 Fragment ion	化合物名称 Compound name
25	51.38	[M + COOH] <sup>-</sup>	695.348 5	C <sub>31</sub> H <sub>54</sub> O <sub>14</sub>	-1.58	467.213 4, 439.182 1, 425.166 3, 143.106 8, 115.075 4, 101.059 8, 467.212 5, 439.181 5, 411.149 9, 143.106 8, 115.075 5, 87.044 1	SFAE <sup>[7]</sup>
26	54.11	[M + COOH] <sup>-</sup>	709.363 9	C <sub>32</sub> H <sub>56</sub> O <sub>14</sub>	-1.76	551.270 6, 425.165 9, 143.106 8, 101.059 8	SFAE <sup>[7]</sup>
27	55.59	[M + COOH] <sup>-</sup>	723.379 8	C <sub>33</sub> H <sub>58</sub> O <sub>14</sub>	-1.51	551.270 1, 467.212 7, 425.166 1, 143.106 8, 101.059 7	SFAE <sup>[7]</sup>
28	56.66	[M + COOH] <sup>-</sup>	723.380 3	C <sub>33</sub> H <sub>58</sub> O <sub>14</sub>	-0.75	481.191 8, 143.106 7, 87.043 9	SFAE <sup>[7]</sup>
29	57.53	[M + COOH] <sup>-</sup>	751.374 9	C <sub>34</sub> H <sub>58</sub> O <sub>15</sub>	-1.18	439.181 7, 341.107 7, 323.097 6, 143.106 8, 115.075 4	SFAE <sup>[7]</sup>
30	58.22	[M + COOH] <sup>-</sup>	737.395 9	C <sub>34</sub> H <sub>60</sub> O <sub>14</sub>	-0.85	467.212 9, 439.181 5, 341.108 2, 323.097 8, 143.106 8, 115.075 3	SFAE <sup>[7]</sup>
31	59.36	[M + COOH] <sup>-</sup>	737.395 9	C <sub>34</sub> H <sub>60</sub> O <sub>14</sub>	-0.85	523.243 8, 509.223 6, 425.166 2, 143.106 8, 101.059 7, 87.007 6, 509.222 9, 481.192 2, 411.150 6, 143.106 8, 115.075 5, 87.044 0	SFAE <sup>[7]</sup>
32	62.08	[M + COOH] <sup>-</sup>	779.406 1	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>15</sub>	-1.21	593.317 9, 467.212 9, 449.203 7, 143.106 8, 87.007 7, 621.311 1, 495.207 4, 425.165 5, 143.106 7, 101.059 7, 87.044 0	SFAE <sup>[7]</sup>
33	62.63	[M + COOH] <sup>-</sup>	779.406 3	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>15</sub>	-0.98	551.271 1, 509.223 1, 425.165 6, 407.156 4, 143.106 8, 101.059 7, 537.254 5, 509.228 3, 449.200 8, 143.106 8, 115.075 4, 87.043 9	SFAE <sup>[7]</sup>
34	63.22	[M + COOH] <sup>-</sup>	765.427 1	C <sub>36</sub> H <sub>64</sub> O <sub>14</sub>	-0.89	551.270 1, 523.239 3, 425.166 0, 143.106 78, 115.075 4, 101.059 7	SFAE <sup>[7]</sup>
35	64.56	[M + COOH] <sup>-</sup>	793.421 8	C <sub>37</sub> H <sub>64</sub> O <sub>15</sub>	-1.15		SFAE <sup>[7]</sup>
36	66.84	[M + COOH] <sup>-</sup>	807.437 6	C <sub>38</sub> H <sub>66</sub> O <sub>15</sub>	-0.93		SFAE <sup>[7]</sup>
37	67.33	[M + COOH] <sup>-</sup>	807.437 7	C <sub>38</sub> H <sub>66</sub> O <sub>15</sub>	-0.85		SFAE <sup>[7]</sup>
38	69.05	[M + COOH] <sup>-</sup>	821.453 2	C <sub>39</sub> H <sub>68</sub> O <sub>15</sub>	-1.01		SFAE <sup>[7]</sup>

注: \* 经与对照品比对确认。

Note: \* Identified by comparison with the reference substance.

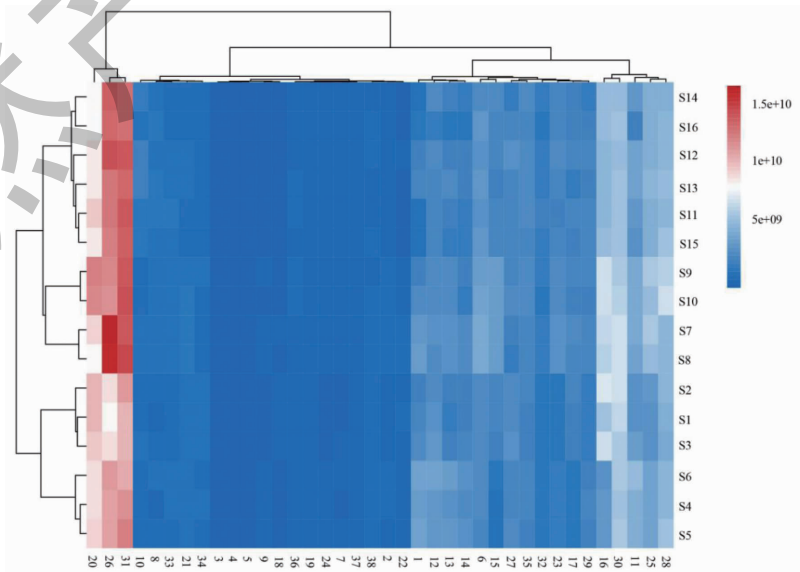


图 3 16 批锦灯笼的聚类热图

Fig. 3 Cluster heat map of 16 batches of Physalis Calyx seu Fructus



### 2.1.7 主成分分析

将 16 批锦灯笼指纹图谱的 38 个共有峰的峰面积组成  $38 \times 16$  阶矩阵, 导入到 SIMCA14.1 软件进行主成分分析(PCA 分析)。模型提取的 4 个主成分累积方差贡献率  $R^2X$  达到 0.842 (显著大于 0.5), 预测能力参数  $Q^2$  为 0.544 (大于 0.5), 表明提取的主成分可以解释 84.2% 的原始变量, 模型预

测能力为 54.4%, 模型拟合程度和稳定性较好。从得分散点图可知(见图 4), PCA-X 模型中所有数据点均在 95% 置信区间内, 聚类良好, 区分明显, 可分为三类, 说明不同产地的锦灯笼样品在化学成分及含量上存在一定差异, 同一产地的样品相似度高, 具有趋势性。

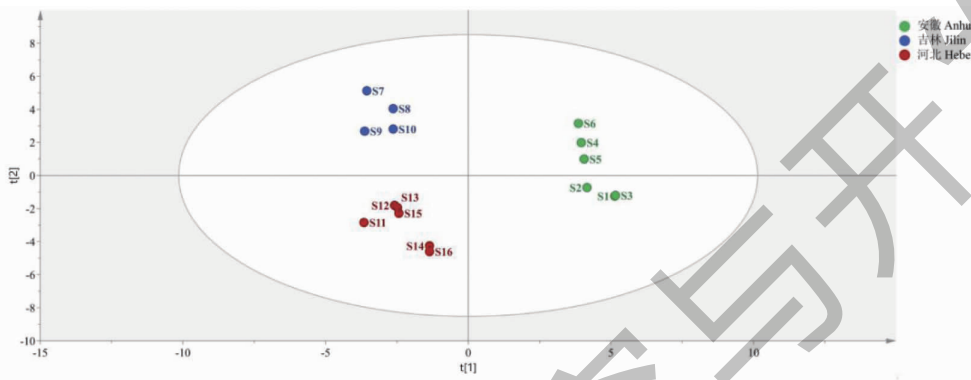


图 4 16 批锦灯笼的主成分得分图

Fig. 4 PCA score plot of 16 batches of Physalis Calyx seu Fructus

### 2.2 锦灯笼抑菌活性

如表 3 所示, 不同批次的锦灯笼提取物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均具有较好的抑制活性, 其中金黄色葡萄球菌的抑菌圈范围为 0.9 ~ 1.2 cm,

大肠杆菌的抑菌圈范围为 1.3 ~ 1.9 cm, 由此可见, 锦灯笼对大肠杆菌的抑制活性优于对金黄色葡萄球菌的抑菌活性。

表 3 16 批次锦灯笼药材抑菌圈直径

Table 3 Inhibition zone diameter of 16 batches of Physalis Calyx seu Fructus

样品 Sample	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter(cm)		样品 Sample	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter(cm)	
	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>		金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>
S1	1.2	1.8	S10	1.1	1.7
S2	0.9	1.5	S11	0.9	1.8
S3	0.9	1.4	S12	1.2	1.7
S4	1.0	1.3	S13	0.9	1.6
S5	1.1	1.5	S14	1.2	1.4
S6	1.1	1.6	S15	1.0	1.4
S7	0.9	1.9	S16	1.0	1.4
S8	0.9	1.8	空白组 Control	0.8	0.8
S9	0.9	1.8			

### 2.3 锦灯笼谱效关系研究

通过灰色关联分析 16 批次锦灯笼的化学成分与抑菌活性之间的谱效关系。以锦灯笼指纹图谱中

38 个共有峰为参考序列, 以锦灯笼药材对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌圈直径大小作为比较序列, 将数据导入数据处理网站 (<https://www.>

spsspro.com/)进行灰色关联度分析。将数据统一进行无量纲化处理,采用均值化处理法计算关联度系数,结果见表4和5。

通过分析结果可知,峰27对于抑制金黄色葡萄

球菌的生长具有较大贡献(关联度 $\geq 0.85$ );峰37、29、30、19、33、35、31、17、32、20和28(关联度 $\geq 0.85$ )对大肠杆菌的抑菌活性具有较大贡献。值得注意的是,这些化合物均为蔗糖脂肪酸酯类成分。

表4 16批次锦灯笼共有峰与抗金黄色葡萄球菌活性的关联度

Table 4 Correlation degree between common peak and antibacterial activity against *S. aureus* of 16 batches of *Physalis Calyx seu Fructus*

峰号 Peak	关联度 Correlation	峰号 Peak	关联度 Correlation	峰号 Peak	关联度 Correlation	峰号 Peak	关联度 Correlation
27	0.849	34	0.783	6	0.744	5	0.705
35	0.829	26	0.783	4	0.742	15	0.700
28	0.828	19	0.781	8	0.738	10	0.682
38	0.818	12	0.776	23	0.733	3	0.679
30	0.811	17	0.775	2	0.733	18	0.659
20	0.802	24	0.770	14	0.726	1	0.651
31	0.801	32	0.768	7	0.726	22	0.643
33	0.800	21	0.758	36	0.721	9	0.532
37	0.793	11	0.750	13	0.714		
29	0.792	25	0.748	16	0.713		

表5 16批次锦灯笼共有峰与抗大肠杆菌活性的关联度

Table 5 Correlation degree between common peak and antibacterial activity against *E. coli* of 16 batches of *Physalis Calyx seu Fructus*

峰号 Peak	关联度 Correlation	峰号 Peak	关联度 Correlation	峰号 Peak	关联度 Correlation	峰号 Peak	关联度 Correlation
37	0.894	28	0.846	24	0.804	15	0.739
29	0.884	21	0.837	16	0.784	3	0.720
30	0.881	6	0.827	13	0.783	5	0.697
19	0.881	25	0.826	23	0.782	1	0.671
33	0.872	38	0.825	12	0.776	10	0.666
35	0.869	34	0.815	7	0.776	18	0.664
31	0.868	27	0.813	14	0.772	22	0.643
17	0.858	2	0.812	8	0.766	9	0.583
32	0.857	11	0.812	36	0.757		
20	0.849	26	0.812	4	0.755		

### 3 讨论与结论

本实验前期考察了不同浓度甲醇(50%、70%、100%)对锦灯笼药材提取效果的影响,发现70%甲醇-水提取时出峰最多。同时,在进行质谱条件的考察时发现,负离子模式下的总离子流图更加稳定,峰形也更加好看,故选择在负离子扫描模式下进行实验。

本研究建立了16批锦灯笼药材指纹图谱,提取

出了38个共有峰,相似度均在0.95以上,说明不同产地的锦灯笼药材质量相对比较稳定;聚类分析和PCA分析结果均可将样品按照不同产地进行聚类,说明药材的生长环境是造成质量差异的较大因素。

同时,本研究测定了16批锦灯笼提取物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌活性,首次将指纹图谱和药效结果相结合,采用灰色关联分析研究锦灯笼的谱效关系。结果显示,锦灯笼的抑菌活性可能



是多成分共同作用的结果。其中,对抗菌活性贡献较大(关联度 $\geq 0.85$ )的特征峰均为蔗糖脂肪酸酯类成分,说明该类成分对于锦灯笼发挥抗菌活性具有较大的贡献。

以往,学者对于锦灯笼的研究大多集中于化学结构复杂、生物活性显著的酸浆苦素类成分,而忽视了对蔗糖脂肪酸酯的研究。蔗糖脂肪酸酯类成分其结构特征是以蔗糖为母核,通过酯键连有一个或多个脂肪酸链片段。现代药理学研究表明,该类化合物具有显著的抗菌<sup>[10]</sup>、抗炎<sup>[11]</sup>、降血糖<sup>[12]</sup>、抗肿瘤<sup>[13]</sup>、杀虫<sup>[14]</sup>等活性。同时,蔗糖脂肪酸酯具有良好的生物降解性能和毒理学性质<sup>[15-16]</sup>,因此该类成分的应用前景广阔,值得我们重视。

综上,本研究成功建立了锦灯笼提取物的指纹谱图,并首次对其谱效关系进行研究,结果发现蔗糖脂肪酸酯类成分与锦灯笼的抗菌活性相关性极大。然而,由于其结构的特殊性,在本次实验中未能通过质谱手段对其结构进行深入解析。后续,将对锦灯笼中的该类成分进行分离纯化,对其抗菌活性进行验证,并在此基础上总结其构效关系,为进一步研究锦灯笼的抗菌活性及其作用机制提供参考。

#### 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 376.
- 2 Wu S, Li L, Zhang YJ, et al. Research progress of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino in recent ten years[J]. J Chin Med Mater (中药材), 2019, 42: 2462-2467.
- 3 Helvacı S, Kokdil G, Kawai M, et al. Antimicrobial activity of the extracts and physalin D from *Physalis alkekengi* and evaluation of antioxidant potential of physalin D[J]. Pharm Biol, 2010, 48: 142-150.
- 4 Zhang R, Li QC, Zhang CL, et al. Study on preparation and antibacterial activities of chemical constituents separated from *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino [J]. J Anhui TCM Coll (安徽中医学院学报) 2013, 32: 69-71.
- 5 Zhang Q, Yang YT. Overview of the research status of the relationship between spectrum and effect of traditional Chinese

- 6 medicine[J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2022, 33: 680-683.
- 6 Wang ZY, Mu WC, Li YR, et al. Study on fingerprint and activity relationship of hawthorn leaf standard decoction [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2020, 32: 557-566.
- 7 Zhang CY, Zheng ZX, Wang D, et al. Analysis of chemical constituents from calyxes of *Physalis alkekengi* var. *franchetii* by UPLC-Q-Orbitrap HRMS [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2021, 44: 2590-2598.
- 8 Cao YM, Gu CC, Zhao FL, et al. Therapeutic effects of *Cyathula officinalis* Kuan and its active fraction on acute blood stasis rat model and identification constituents by HPLC-QT-OF/MS/MS [J] Pharmacogn Mag, 2017, 13: 693-701.
- 9 Huang C, Xu QM, Chen C, et al. The rapid discovery and identification of physalins in the calyx of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight tandem mass spectrometry together with a novel three-step data mining strategy [J]. J Chromatogr A, 2014, 1361: 139-152.
- 10 Zhao L, Zhang HY, Hao TY, et al. *In vitro* antibacterial activities and mechanism of sugar fatty acid esters against five food-related bacteria [J]. Food Chem, 2015, 187: 370-377.
- 11 Li W, Sun YN, Yan XT, et al. NF- $\kappa$ B inhibitory activity of sucrose fatty acid esters and related constituents from *Astragalus membranaceus* [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61: 7081-7088.
- 12 Bernal CA, Castellanos L, Aragon DM, et al. Peruvioses A to F, sucrose esters from the exudate of *Physalis peruviana* fruit as  $\alpha$ -amylase inhibitors [J]. Carbohydr Res, 2018, 461: 4-10.
- 13 Lin H, Zhang C, Zhang H, et al. Physalogen G induces apoptosis via EGFR/mTOR signaling and inhibits autophagic flux in human osteosarcoma cells [J]. Phytomedicine, 2018, 42: 190-198.
- 14 Buta JG, Lusby WR, Neal JW, et al. Sucrose esters from *Nicotiana glauca* active against the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* [J]. Phytochemistry, 1991, 32: 859-864.
- 15 Farrab A, Cai C, Sandoval M, et al. Green solvents in carbohydrate chemistry: from raw materials to fine chemicals [J]. Chem Rev, 2015, 115: 6811-6853.
- 16 Soutani S, Ognier S, Engasser JM, et al. Comparative study of some surface active properties of fructose esters and commercial sucrose esters [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects, 2003, 227: 35-44.