

藏药二十五味驴血丸的指纹图谱建立、含量测定及化学模式识别分析^Δ

钟 镛^{1,2*}, 刘 川^{1,2}, 何青秀^{1,2}, 张 静^{1,2}, 张 艺^{1,2#} (1. 成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137; 2. 成都中医药大学民族医药学术传承创新研究中心, 成都 611137)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)04-0453-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.04.11

摘要 目的: 建立藏药二十五味驴血丸的指纹图谱, 测定其中5种成分的含量, 并进行化学模式识别分析。方法: 采用高效液相色谱法(HPLC)。以秦皮乙素为参照, 绘制10批藏药二十五味驴血丸的HPLC指纹图谱, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》进行相似度评价, 确定共有峰; 同时采用相同的HPLC法测定藏药二十五味驴血丸中5种成分的含量; 采用SPSS 19.0软件进行聚类分析和主成分分析。结果: 10批藏药二十五味驴血丸共有11个共有峰, 相似度均大于0.98; 共指认了秦皮乙素、苳草苷、异牡荆素、异金雀花素和鞣花酸等5个共有峰。秦皮乙素、苳草苷、异牡荆素、异金雀花素、鞣花酸检测质量浓度的线性范围分别为1.232~11.092 μg/mL($r=0.999\ 6$)、2.766~24.893 μg/mL($r=0.999\ 5$)、1.400~12.600 μg/mL($r=0.999\ 8$)、0.600~5.400 μg/mL($r=0.999\ 5$)、49.447~445.025 μg/mL($r=0.999\ 4$); 精密性、稳定性(24 h)、重复性试验的RSD均小于2%; 平均加样回收率分别为101.29% (RSD=2.33%, $n=3$)、91.39% (RSD=1.22%, $n=3$)、90.28% (RSD=1.88%, $n=3$)、98.76% (RSD=2.53%, $n=3$)、101.45% (RSD=2.84%, $n=3$)、100.44% (RSD=1.38%, $n=3$)、100.91% (RSD=1.73%, $n=3$)、97.78% (RSD=2.07%, $n=3$)、99.15% (RSD=1.28%, $n=3$)、100.27% (RSD=1.81%, $n=3$)、98.38% (RSD=1.89%, $n=3$)、101.92% (RSD=1.17%, $n=3$)、95.50% (RSD=0.67%, $n=3$)、99.89% (RSD=0.38%, $n=3$)、100.10% (RSD=0.65%, $n=3$)。含量分别为0.175~0.310、0.351~0.632、0.274~0.395、0.186~0.278、6.956~8.636 mg/g。聚类分析结果显示, 10批藏药二十五味驴血丸样品可聚为两类, 其中S1~S4为一类、S5~S10为一类。主成分分析结果显示, 两个主成分的累积方差贡献率为89.178%。结论: 所建指纹图谱稳定、可行, 含量测定方法简便、准确、重复性好, 结合化学模式识别分析可用于藏药二十五味驴血丸的质量控制。

关键词 藏药二十五味驴血丸; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 主成分分析; 聚类分析; 含量测定

Fingerprint Establishment, Content Determination and Chemical Pattern Recognition Analysis of Tibetan Medicine Ershiwuwei Luxue Pills

ZHONG Lu^{1,2}, LIU Chuan^{1,2}, HE Qingxiu^{1,2}, ZHANG Jing^{1,2}, ZHANG Yi^{1,2} (1. School of Ethnic Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2. Academic Inheritance and Innovation Research Center of Ethnic Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish fingerprint of Tibetan medicine Ershiwuwei luxue pills, and determine the contents of 5 components, and to conduct chemical pattern recognition. METHODS: HPLC method was adopted. Using aesculetin as reference, HPLC fingerprint of 10 batches of Tibetan medicine Ershiwuwei luxue pills were drawn. The similarity evaluation was conducted by using *Evaluation System of TCM Chromatogram Fingerprint Similarity* (2012 edition), and the common peaks were determined. Same HPLC method was adopted to determine the contents of 5 components in Tibetan medicine Ershiwuwei luxue pills. The cluster analysis and principle component analysis were performed by using SPSS 19.0 software. RESULTS: Totally 11 common peaks were calibrated, and the similarity was higher than 0.98. Five common peaks were identified, as aesculetin, orientin, isovitexin, isoscoparin and ellagic acid. The linear range of aesculetin, orientin, isovitexin, isoscoparin and ellagic acid were 1.232-11.092 μg/mL($r=0.999\ 6$), 2.766-24.893 μg/mL($r=0.999\ 5$), 1.400-12.600 μg/mL($r=0.999\ 8$), 0.600-5.400 μg/mL($r=0.999\ 5$), 49.447-445.025 μg/mL($r=0.999\ 4$), respectively. RSDs of precision, stability (24 h) and reproducibility tests were all lower than 2%. The average recoveries were 101.29% (RSD=2.33%, $n=3$), 91.39% (RSD=1.22%, $n=3$), 90.28% (RSD=1.88%, $n=3$), 98.76% (RSD=2.53%, $n=3$), 101.45% (RSD=2.84%, $n=3$), 100.44% (RSD=1.38%, $n=3$), 100.91% (RSD=1.73%, $n=3$), 97.78% (RSD=2.07%, $n=3$), 99.15% (RSD=1.28%, $n=3$), 100.27% (RSD=1.81%, $n=3$), 98.38% (RSD=1.89%, $n=3$), 101.92% (RSD=1.17%, $n=3$), 95.50% (RSD=0.67%, $n=3$), 99.89% (RSD=0.38%, $n=3$), 100.10% (RSD=0.65%, $n=3$), respectively. Their contents were 0.175-0.310, 0.351-0.632, 0.274-0.395, 0.186-0.278, 6.956-8.636 mg/g, respectively. Cluster analysis showed that 10 batches of Tibetan medicine Ershiwuwei luxue pills were clustered into two category, with S1-S4 as one category and

Δ 基金项目: 国家重点研发计划项目(No.2017YFC1703900)

* 硕士研究生。研究方向: 民族药药效物质基础。电话: 028-61932600。E-mail: 1984899716@qq.com

通信作者: 研究员, 博士。研究方向: 民族药药效物质基础及信息化。电话: 028-61932600。E-mail: zhangyi@cdutcm.edu.cn

min, 35% A), 检测波长为 350 nm, 流速为 1 mL/min, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。

2.1.4 精密度试验 取“2.1.1”项下供试品溶液(编号 S1)适量, 按“2.1.3”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 以秦皮乙素为参照, 记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, 11 个共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.0% ($n=6$), 相对峰面积的 RSD 均小于 2.0% ($n=6$), 表明方法精密度良好。

2.1.5 重复性试验 取藏药二十五味驴血丸(编号 S1) 0.5 g, 共 6 份, 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 以秦皮乙素为参照, 记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, 11 个共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.0% ($n=6$), 相对峰面积的 RSD 均小于 2.0% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 取“2.1.1”项下供试品溶液(编号 S1)适量, 分别于室温下放置 0、2、4、6、8、10、12、24 h 时, 按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 以秦皮乙素为参照, 记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, 11 个共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.0% ($n=8$), 相对峰面积的 RSD 均小于 2.0% ($n=8$), 表明供试品溶液于室温下放置 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 指纹图谱的建立 取 10 批藏药二十五味驴血丸, 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。将所得色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》, 生成指纹图谱的共有模式, 并以此作为对照指纹图谱(R), 同时生成叠加指纹图谱, 详见图 1、图 2。

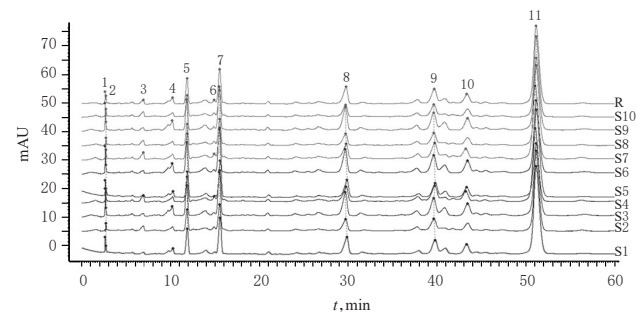


图 1 10 批藏药二十五味驴血丸样品的 HPLC 叠加指纹图谱

Fig1 HPLC superimposed fingerprint of 10 batches of Tibetan medicine Ershiwuwei luxue pills

2.1.8 相似度评价 将 10 批藏药二十五味驴血丸样品的色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》进行相似度评价。结果, 10 批藏药二十五味驴血丸样品的相似度分别为 0.999、0.995、0.994、0.998、0.999、0.997、0.994、0.984、0.988、0.983, 均大于 0.98。这提示, 10 批藏药二十五味驴血丸样品的图谱与对照指纹图谱具有较高的相似度, 即各批样品的化学成分一致性较好。

2.1.9 共有峰的指认 10 批藏药二十五味驴血丸样品

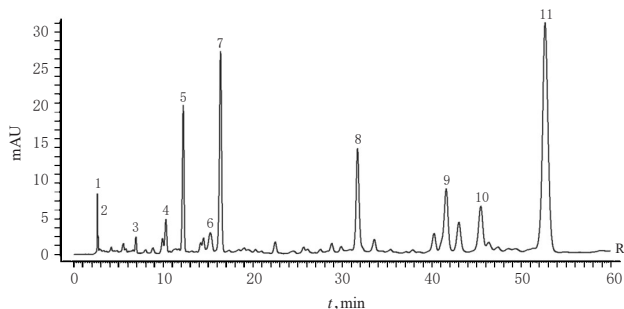
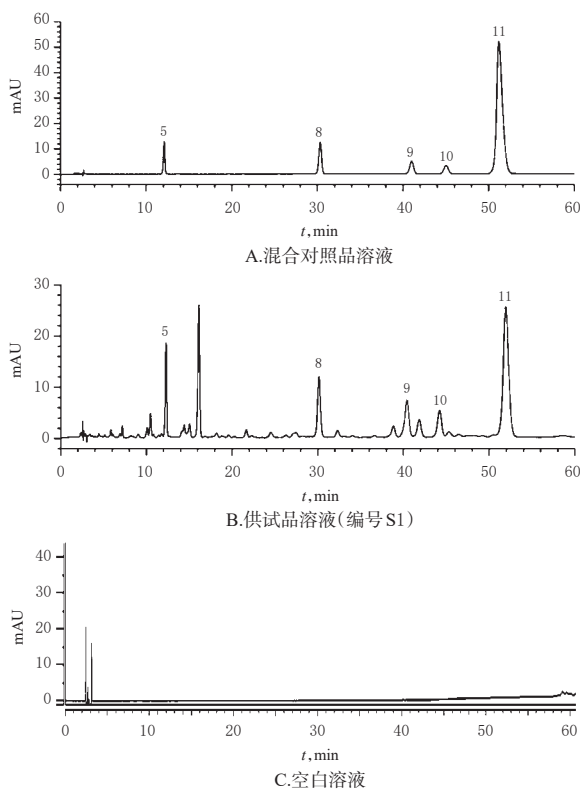


图 2 藏药二十五味驴血丸的对照指纹图谱

Fig 2 Control fingerprint of Tibetan medicine Ershiwuwei luxue pills

共有 11 个共有峰, 通过与混合对照品溶液的保留时间(按相同色谱条件分析所得, 见图 3A)进行对比, 共指认出其中 5 个共有峰, 分别为秦皮乙素(5 号峰)、苈草苷(8 号峰)、异牡荆素(9 号峰)、异金雀花素(10 号峰)、鞣花酸(11 号峰)。由于秦皮乙素含量相对较高、分离度较好, 且出峰稳定, 故以其为参照计算其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, 10 批藏药二十五味驴血丸样品相对保留时间的 RSD 为 0~0.84%, 相对峰面积的 RSD 为 0~67.19%, 详见表 2、表 3。



注: 5. 秦皮乙素; 8. 苈草苷; 9. 异牡荆素; 10. 异金雀花素; 11. 鞣花酸
Note: 5. aesculetin; 7. orientin; 8. isovitexin; 10. isoscoparin; 11. ellagic acid

图 3 藏药二十五味驴血丸样品以及 5 种成分混合对照品溶液、空白溶液的高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of Tibetan medicine Ershiwuwei luxue pills, five components mixed reference and blank control

表2 10批藏药二十五味驴血丸样品HPLC指纹图谱共有峰的相对保留时间

Tab 2 Relative retention time of common peaks in HPLC fingerprint of 10 batches of Tibetan medicine Ershiwuwei luxue pills

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD, %
1	0.189	0.188	0.189	0.189	0.189	0.187	0.191	0.188	0.191	0.189	0.38
2	0.195	0.195	0.195	0.194	0.195	0.196	0.196	0.194	0.197	0.194	0.39
3	0.496	0.496	0.495	0.495	0.495	0.493	0.495	0.496	0.496	0.497	0.25
4	0.855	0.855	0.852	0.850	0.857	0.855	0.856	0.856	0.857	0.853	0.12
5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
6	1.073	1.073	1.074	1.073	1.076	1.072	1.072	1.071	1.076	1.073	0.51
7	1.124	1.124	1.126	1.123	1.125	1.125	1.124	1.124	1.127	1.125	0.84
8	2.137	2.137	2.137	2.137	2.136	2.134	2.134	2.137	2.138	2.135	0.16
9	2.849	2.848	2.848	2.845	2.846	2.843	2.843	2.845	2.849	2.849	0.23
10	3.122	3.122	3.123	3.122	3.121	3.121	3.125	3.124	3.121	3.122	0.43
11	3.677	3.678	3.678	3.678	3.676	3.676	3.673	3.672	3.672	3.677	0.54

表3 10批二十五味驴血丸样品HPLC指纹图谱共有峰的相对峰面积

Tab 3 Relative peak areas of common peaks in HPLC fingerprint of 10 batches of Tibetan medicine Ershiwuwei luxue pills

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD, %
1	0.252	0.452	0.478	0.521	0.269	0.365	0.562	0.662	0.365	0.426	33.44
2	0.124	0.325	0.365	0.254	0.254	0.189	0.165	0.452	0.365	0.372	21.89
3	0.319	0.563	0.396	0.452	0.425	0.612	0.574	0.385	0.345	0.482	22.18
4	0.285	0.425	0.365	0.214	0.254	0.325	0.369	0.482	0.412	0.258	15.36
5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
6	0.124	0.186	0.165	0.251	0.412	0.452	0.226	0.365	0.174	0.326	13.68
7	2.189	2.956	3.125	2.156	2.865	3.568	3.217	4.569	3.275	2.842	20.98
8	1.636	1.097	1.058	1.135	1.792	1.426	0.915	1.430	1.513	1.571	44.11
9	1.058	1.304	1.147	1.217	1.497	1.073	1.162	1.038	1.189	1.121	35.56
10	0.761	0.847	0.880	0.739	1.198	0.774	0.723	0.747	0.821	0.791	51.63
11	12.537	9.370	8.667	9.433	14.857	8.394	8.942	7.512	7.645	7.411	67.19

2.2 5种有效成分的含量测定

2.2.1 溶液的制备 供试品溶液的制备同“2.1.1”项,混合对照品溶液的制备同“2.1.2”项。

2.2.2 色谱条件 色谱条件同“2.1.3”项。

2.2.3 系统适用性试验 取上述混合对照品溶液、供试品溶液(编号S1)和空白溶液(甲醇)适量,按“2.2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,各待测成分的色谱峰分离度均大于1.5,理论板数均大于5000,拖尾因子为0.9~1.1,空白溶液对5种成分的测定无干扰,详见图3。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,加80%甲醇制成秦皮乙素质量浓度分别为1.232、2.464、3.697、6.162、8.627、11.092 μg/mL,苈草苷分别为2.766、5.532、8.298、13.829、19.361、24.893 μg/mL,异牡荆素分别为1.400、2.800、4.200、7.000、9.800、12.600 μg/mL,异金雀花素分别为0.600、1.200、1.800、3.000、4.200、5.400 μg/mL,鞣花酸分别为49.447、98.894、148.342、247.236、346.131、445.025 μg/mL的混

合系列线性工作溶液,按“2.2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以待测成分质量浓度($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,结果见表4。

表4 秦皮乙素等5种有效成分的回归方程与线性范围
Tab 4 Regression equation and linear range of five effective components including aesculetin

成分	回归方程	r	线性范围, μg/mL
秦皮乙素	$Y=40.873X-24.702$	0.999 6	1.232~11.092
苈草苷	$Y=31.696X-40.752$	0.999 5	2.766~24.893
异牡荆素	$Y=35.658X-25.417$	0.999 8	1.400~12.600
异金雀花素	$Y=31.897X-0.105$	0.999 5	0.600~5.400
鞣花酸	$Y=15.732X-639.204$	0.999 4	49.447~445.025

2.2.5 精密度试验 取“2.2.4”项下混合系列线性工作溶液(秦皮乙素、苈草苷、异牡荆素、异金雀花素和鞣花酸的质量浓度分别为2.464、5.532、2.800、1.200、98.894 μg/mL)适量,按“2.2.2”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,秦皮乙素、苈草苷、异牡荆素、异金雀花素、鞣花酸峰面积的RSD分别为0.58%、1.67%、1.86%、1.06%、1.28% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取藏药二十五味驴血丸样品(编号S1)0.5 g,共6份,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量。结果,秦皮乙素、苈草苷、异牡荆素、异金雀花素、鞣花酸含量的RSD分别为1.91%、1.93%、1.76%、1.16%、0.84% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取“2.2.1”项下供试品溶液(编号S1)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、10、12、24 h时,按“2.2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,秦皮乙素、苈草苷、异牡荆素、异金雀花素、鞣花酸峰面积的RSD分别为1.83%、1.61%、1.73%、1.52%、1.38% ($n=8$),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取已知含量的藏药二十五味驴血丸样品(编号S1)约0.25 g,共9份,分别按已知含量的80%、100%、120%加入“2.2.1”项下混合对照品溶液,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表5。

2.2.9 样品含量测定 取10批藏药二十五味驴血丸样品粉末,每份约0.5 g,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量。每样品平行操作3次,取平均值,结果见表6。

2.3 聚类分析

以10批藏药二十五味驴血丸指纹图谱中测定的5个已指认的共有峰(下同)的峰面积为变量,采用SPSS 19.0软件进行分析,以Pearson相关性为测度,采用组间联接法绘制聚类分析图,结果见图4。由图4可知,10批

表5 秦皮乙素等5种有效成分的加样回收率试验结果 (n=9)

Tab 5 Results of sample recovery tests of five effective components including aesculetin (n=9)

待测成分	已知含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
秦皮乙素	55.31	44.15	98.89	98.71	101.29	2.33
	55.42	43.56	99.78	101.84		
	56.15	44.34	101.97	103.34		
	55.74	55.11	105.56	90.40	91.39	1.22
	55.42	55.42	106.74	92.60		
	56.36	54.38	105.94	91.17		
	55.44	66.19	114.25	88.85	90.28	1.88
	55.65	65.94	116.42	92.16		
	55.16	66.45	114.86	89.84		
	55.16	66.45	114.86	89.84		
苣荬昔	123.93	99.23	223.96	100.81	98.76	2.53
	123.65	100.56	220.16	95.97		
	123.47	99.98	222.95	99.50		
	124.21	124.12	247.35	99.21	101.45	2.84
	123.45	123.96	247.95	100.44		
	122.95	124.51	253.32	104.71		
	124.35	148.83	271.65	98.97	100.44	1.38
	122.62	148.56	272.12	100.63		
	123.41	149.35	275.32	101.71		
	123.41	149.35	275.32	101.71		
异牡荆素	62.23	50.66	112.79	99.80	100.91	1.73
	62.35	51.21	113.56	100.00		
	62.25	50.12	113.83	102.91		
	62.31	62.31	124.62	100.00	97.78	2.07
	63.12	62.52	123.95	97.30		
	62.54	64.12	124.12	96.04		
	62.14	75.21	137.52	100.23	99.15	1.28
	62.35	76.32	136.95	97.75		
	62.47	75.54	137.62	99.48		
	62.47	75.54	137.62	99.48		
异金雀花素	36.93	29.65	67.28	102.36	100.27	1.81
	37.12	30.12	66.98	99.14		
	36.35	29.98	66.12	99.30		
	36.24	36.25	71.25	96.58	98.38	1.89
	36.56	36.98	73.65	100.30		
	37.15	37.12	73.62	98.25		
	37.28	43.98	82.36	102.50	101.92	1.17
	36.15	44.56	81.92	102.72		
	36.95	44.12	81.31	100.54		
	36.95	44.12	81.31	100.54		
鞣花酸	2 213.19	1 770.56	3 965.83	98.99	99.50	0.67
	2 214.21	1 770.98	3 989.63	100.25		
	2 213.35	1 771.35	3 971.48	99.25		
	2 213.56	2 213.65	4 415.62	99.48	99.89	0.38
	2 213.24	2 213.82	4 432.45	100.24		
	2 213.54	2 214.21	4 426.95	99.96		
	2 212.86	2 655.62	4 886.35	100.67	100.10	0.65
	2 213.42	2 656.12	4 853.21	99.39		
2 213.96	2 655.43	4 875.74	100.24			

藏药二十五味驴血丸样品可聚为2类,其中S1~S4为一类、S5~S10为一类。

2.4 主成分分析

主成分分析能够将原有多个指标数据转化成一组若干个新的互不相关的综合变量,可用于全面反映多个原始数据的信息^[17]。以10批藏药二十五味驴血丸指纹图谱中的5个共有峰的峰面积为变量,采用SPSS 19.0软件进行主成分分析,以特征值>1的成分为主成

表6 10批藏药二十五味驴血丸样品中秦皮乙素等5种有效成分的含量测定结果(n=3,mg/g)

Tab 6 Results of content determination of 10 batches of Tibetan medicine Ershiwuwei luxue pills of five effective components including aesculetin (n=3,mg/g)

编号	秦皮乙素	苣荬昔	异牡荆素	异金雀花素	鞣花酸
S1	0.227	0.479	0.274	0.186	8.636
S2	0.236	0.360	0.341	0.217	7.301
S3	0.249	0.368	0.323	0.241	7.239
S4	0.270	0.420	0.369	0.222	8.175
S5	0.175	0.398	0.281	0.213	7.796
S6	0.243	0.458	0.297	0.206	6.956
S7	0.269	0.351	0.352	0.215	7.834
S8	0.268	0.504	0.318	0.222	6.958
S9	0.291	0.575	0.391	0.269	7.507
S10	0.310	0.632	0.395	0.278	7.711
RSD, %	14.77	20.83	12.88	12.40	7.01

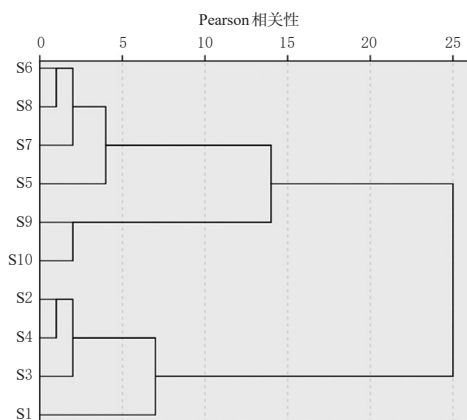


图4 10批藏药二十五味驴血丸样品的聚类分析图

Fig 4 Cluster analysis of 10 batches of Tibetan medicine Ershiwuwei luxue pills

分^[18-19]。结果,共提取到2个主成分,累积方差贡献率为89.178%,表明这2个主成分包含了藏药二十五味驴血丸的主要信息,达到了降维的目的,其本质是一种矩阵变换过程^[19],详见表7。

表7 10批藏药二十五味驴血丸样品中2个主成分的特征值与方差贡献率

Tab 7 Eigen value and variance contribution rate of 10 batches of Tibetan medicine Ershiwuwei luxue pills of two principle component

主成分	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差贡献率, %	累积方差贡献率, %	合计	方差贡献率, %	累积方差贡献率, %
1	3.454	69.082	69.082	3.454	69.082	69.082
2	1.005	20.096	89.178	1.005	20.096	89.178

以10批藏药二十五味驴血丸指纹图谱中的5个共有峰的峰面积为变量,采用SIMCA-P 11.5软件绘制主成分得分图。结果,10批藏药二十五味驴血丸样品可以被分为2类,其中S1~S4为一类、S5~S10为一类,与“2.3”项下聚类分析结果一致,详见图5。

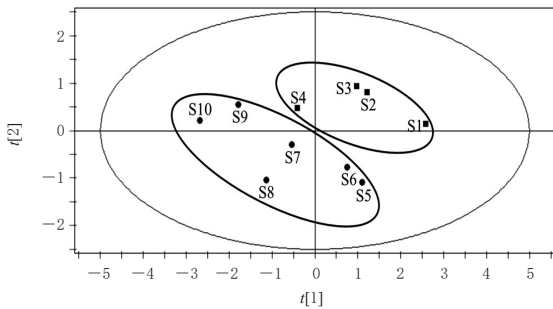


图5 10批藏药二十五味驴血丸样品的主成分分析得分图

Fig 5 Principle component analysis score chart of 10 batches of Tibetan medicine Ershiwuwei luxue pills

3 讨论

本课题组前期分别对不同提取溶剂(甲醇、乙醇、80%甲醇、80%乙醇、60%甲醇和60%乙醇)、提取时间(20、30、40、50 min)、提取方式(超声、回流)、提取溶剂用量(20、30、40、50 mL)的提取效果进行了考察。结果,以80%乙醇30 mL超声30 min所得提取物的色谱峰数量较多且分离效果较好,故选择这种方式制备供试品溶液。同时,本课题组还考察了不同流动相(甲醇-0.1%磷酸水溶液、甲醇-0.2%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液、甲醇-水)、检测波长(330、350、370 nm)、色谱柱(Chromsil C₁₈、Kromasil 100-5-C₁₈、Zorbax Eclipse XDB-C₁₈)、柱温(25、30、35 ℃)、流速(0.8、1.0、1.2 mL/min)、分析时间(45、60、75 min)等的分离效果。结果,以“2.1.3”项下色谱条件的分离效果较好,且色谱峰数量较多。

10批藏药二十五味驴血丸的HPLC图谱与对照指纹图谱的相似度均大于0.98,表明不同厂家生产的藏药二十五味驴血丸的化学成分相似,一致性较好。含量测定结果显示,秦皮乙素、苈草苷、异牡荆素、异金雀花素和鞣花酸等5种成分含量的RSD分别为14.77%、20.83%、12.88%、12.40%、7.01%,表明不同厂家的藏药二十五味驴血丸质量存在一定差异,这可能与原药材基原的多样性和复杂性有关,包括土壤、气候等自然条件^[20-21]。

藏药二十五味驴血丸的HPLC指纹图谱共有11个共有峰,经与混合对照品比对,指认了其中5个成分,分别为秦皮乙素、苈草苷、异牡荆素、异金雀花素和鞣花酸。聚类分析分析结果显示,10批藏药二十五味驴血丸样品可聚为2类,其中西藏厂家产样品聚为一类(S1~S4)、青海厂家产样品聚为另一类(S5~S10)。主成分分析结果显示,2个主成分的累积方差贡献率为89.178%,同样聚为两类,与聚类分析结果一致。这提示,不同厂家产藏药二十五味驴血丸含量差异较大,同一地区厂家

的藏药二十五味驴血丸成分含量相似,这可能与不同厂家所用原药材的质量和储存方式、时间等有关^[20-21]。除异金雀花素外,秦皮乙素、苈草苷、异牡荆素、鞣花酸均具有抗炎的生物活性,而藏药二十五味驴血丸具有抗风湿性关节炎的功效,提示这4个成分可能是该药抗炎作用的有效成分之一,可为下一步的药理机制研究提供参考。鉴于此,本研究后期将借用DNA条形码鉴定技术及核磁共振、红外光谱等现代化学鉴定技术进一步探讨。

综上所述,所建指纹图谱稳定、可行,含量测定方法简便、准确、重复性好,结合化学模式识别分析可用于藏药二十五味驴血丸的质量控制。

参考文献

- [1] 宇妥·云丹贡布.四部医典[M].马世林,罗达尚,译.10版.上海:上海科学技术出版社,1987:164.
- [2] 卫生部药典委员会,中华人民共和国卫生部药品标准:藏药:第1册[M].北京:化学工业出版社,1998:151.
- [3] 晋仁云.藏药二十五味驴血丸治疗类风湿关节炎100例临床观察[J].心理月刊,2020,15(7):176.
- [4] LIANG CY, JU WH, PEI SM, et al. Pharmacological activities and synthesis of esculetin and its derivatives: a mini-review[J]. *Molecules*, 2017. DOI: 10.3390/molecules22030387.
- [5] RZODKIEWICZ P, GAŚIŃSKA E, GAJEWSKI M, et al. Esculetin reduces leukotriene B4 level in plasma of rats with adjuvant-induced arthritis[J]. *Reumatologia*, 2016, 54(4):161-164.
- [6] LI CM, CAI CC, ZHENG XJ, et al. Orientin suppresses oxidized low-density lipoproteins induced inflammation and oxidative stress of macrophages in atherosclerosis[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84(4):774-779.
- [7] 张良,张玉奎,戴荣继,等.射干叶中黄酮碳苷类化合物的药理作用研究进展[J].天然产物研究与开发,2010,22(4):728-730.
- [8] HE M, MIN JW, KONG WL, et al. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin[J]. *Fitoterapia*, 2016. DOI:10.1016/j.fitote.2016.09.011.
- [9] 孙静.藏药线叶龙胆化学成分及生物活性的研究[D].兰州:兰州理工大学,2012.
- [10] RÍOS JL, GINER RM, MARÍN M, et al. A pharmacological update of ellagic acid[J]. *Planta Med*, 2018, 84(15):1068-1093.
- [11] 武嘉庚,杨凤梅.二十五味驴血丸质量标准研究[J].中医药导报,2020,26(15):79-82,86.
- [12] 金小朵. HPLC法测定二十五味驴血丸中没食子酸的含量[J].中国中医药科技,2013,20(2):168-169.
- [13] 夏宇江,杨蒲,王曙.二十五味驴血丸的鉴别及没食子酸

愈疡胶囊对细菌感染皮炎模型大鼠的抗炎作用及对TLR/NF- κ B通路的影响^Δ

罗伦才^{1*}, 童妍^{2#}, 张兴国², 陈礴¹, 钟振东³(1.凉山彝族自治州第二人民医院制剂室, 四川西昌 615000; 2.西南交通大学生命科学与工程学院药理学系, 成都 610031; 3.四川省医学科学院/四川省人民医院实验动物研究所, 成都 610072)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)04-0459-08
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.04.12

摘要 目的:研究愈疡胶囊对细菌感染皮炎模型大鼠的抗炎作用及对Toll样受体/核因子 κ B(TLR/NF- κ B)通路的影响。方法:采用肉汤稀释法测定愈疡胶囊对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)。将50只大鼠随机分为模型组、阳性对照组(阿莫西林克拉维酸钾,以阿莫西林计120 mg/kg)和愈疡胶囊高、中、低剂量组(根据MIC设定),每组10只。以金黄色葡萄球菌感染大鼠烧伤皮肤构建细菌感染皮炎模型。造模成功24 h后,各药物组大鼠灌胃相应药物,模型组大鼠灌胃等体积生理盐水,每日1次,连续7 d。计算给药第1、3、5、7天各组大鼠皮肤愈合率并记录创面结痂、脱痂、愈合情况;使用酶联免疫吸附试验法检测皮肤组织中白细胞介素 1β (IL- 1β)、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、羟脯氨酸(HYP)、胶原蛋白 I (Col I)、Col III的含量;使用苏木精-伊红染色法观察皮肤组织形态学变化,并使用透射电子显微镜观察超微结构;采用Western blotting法检测皮肤组织中Toll样受体2(TLR2)、TLR4与磷酸化-NF- κ B-p65(p-NF- κ B p65)蛋白表达水平。结果:愈疡胶囊的MIC与MBC分别为25 mg/mL和50 mg/mL,愈疡胶囊高、中、低剂量组分别设为600、300、150 mg/kg。与模型组比较,愈疡胶囊高、中剂量组大鼠给药3 d后伤处皮肤出现结痂,给药5~7 d后部分大鼠伤处出现脱痂;阳性对照组和愈疡胶囊高、中剂量组大鼠各时间点的皮肤愈合率均显著升高,IL- 1β 、IL-6、IL-10、TNF- α 含量和病理评分以及TLR2、TLR4、p-NF- κ B p65蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),皮肤组织炎细胞浸润等病理改变好转;阳性对照组和愈疡胶囊高剂量组大鼠的HYP、Col I、Col III含量均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。而阳性对照组和愈疡胶囊高、中剂量组上述指标差异大多无统计学意义($P > 0.05$)。结论:愈疡胶囊可促进细菌感染皮炎模型大鼠皮肤愈合,具有一定的抗炎作用,其机制可能与抑制TLR/NF- κ B信号通路、减少炎症反应有关。

关键词 愈疡胶囊;细菌感染;感染性皮炎;Toll样受体/核因子 κ B信号通路;抑菌抗炎;大鼠

Anti-inflammatory Effects of Yuyang Capsule on Bacterial Dermatitis Model Rats and Its Effect on TLR/NF- κ B Signaling Pathway

LUO Luncai¹, TONG Yan², ZHANG Xingguo², CHEN Bo¹, ZHONG Zhendong³ (1. Dept. of Pharmaceutical Preparation, the Second People's Hospital of Liangshan Yi Autonomous Prefecture, Sichuan Xichang 615000, China; 2. Dept. of Pharmacy, School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China; 3. Institute of Laboratory Animals, Sichuan Academy of Medical Science/Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China)

- 的含量测定[J].华西药学杂志,2003,18(1):53-54.
- [14] 李强,杜思邈,张忠亮,等.中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望[J].中草药,2013,44(22):3095.
- [15] 谷瑞敏.指纹图谱等同系数的理论、方法及应用[D].天津:天津大学,2008.
- [16] 孙立丽,王萌,任晓亮.化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展[J].中草药,2017,48(20):4339-4345.
- [17] 邱俊娜,张榆,张双,等.基于HPLC指纹图谱结合化学模式识别及定量测定的夏枯草质量控制研究[J].中草药,2020,51(10):2842-2850.
- [18] 阿基业,何骏,孙润彬.代谢组学数据处理:主成分分析10个要点问题[J].药学学报,2018,53(6):929-937.
- [19] 张文彤.SPSS统计分析高级教程[M].2版.北京:高等教育出版社,2013:214.
- [20] 范刚,贾敏如,刘悦,等.藏药鉴定及质量控制研究现状[J].中国中药杂志,2016,41(4):559-561.
- [21] 曹炯.浅谈影响藏药制剂质量因素有关问题分析[J].甘肃医药,2012,31(9):702-703.

^Δ 基金项目:四川省转移支付项目(No.2017SZYZF0012)

* 主任中药师。研究方向:民族药物制剂研发与应用。E-mail: luoluncai@126.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:中药药效与机制、中药资源学。E-mail: tongyanmail@126.com

(收稿日期:2020-09-18 修回日期:2020-12-29)

(编辑:陈宏)