

壮药三七姜乙酸乙酯提取物抗炎、镇痛作用的谱-效关系研究^Δ

梁洁^{1,2,3*}, 陈辉华¹, 杨川川¹, 曹玉嫔¹, 陈俊¹, 李耀华¹, 陈晓思¹, 柳贤福⁴(1.广西中医药大学药学院, 南宁 530200; 2.广西壮瑶药工程技术研究中心, 南宁 530200; 3.广西优势中成药与民族药开发工程技术研究中心, 南宁 530200; 4.广西中医药大学赛恩斯新医药学院, 南宁 530222)

中图分类号 R285;R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)14-1721-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.14.10

摘要 目的:考察不同产地壮药三七姜乙酸乙酯提取物抗炎、镇痛作用的谱-效关系。方法:以不同产地的10批三七姜为样品,分别以二甲苯致小鼠耳廓肿胀、乙酸致小鼠扭体反应实验考察其乙酸乙酯提取物的抗炎、镇痛活性。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》建立10批三七姜乙酸乙酯提取物的高效液相色谱指纹图谱并进行相似度评价,通过与对照品比对进行共有峰的指认。基于Pearson相关系数法(以小鼠耳肿胀度和15 min内扭体次数为药效指标)和灰色关联分析法(以耳肿胀抑制率和镇痛率为药效指标)分析三七姜乙酸乙酯提取物抗炎、镇痛的谱-效关系。结果:10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物均具有较好的抗炎、镇痛作用,其对小鼠的耳肿胀抑制率为46.43%~55.16%,对小鼠的镇痛率为45.56%~52.72%。10批样品共确定了18个共有峰,其与对照指纹图谱的相似度为0.994~0.997。通过与对照品比对,指认出了峰1、2、4分别为原儿茶酸、对羟基苯甲酸、对羟基苯甲醛。Pearson相关性分析结果显示,峰10、18与小鼠耳肿胀度和15 min内扭体次数均呈显著负相关(r 分别为-0.853、-0.738, P 分别为0.002、0.015);灰色关联分析结果显示,18个共有峰与耳肿胀抑制率和镇痛率的关联度均在0.65以上,其中峰14、1(原儿茶酸)、17、9、4(对羟基苯甲醛)、2(对羟基苯甲酸)、16、7、6与耳肿胀抑制率的关联度相对较高(关联度均高于0.7),峰1(原儿茶酸)、17、14、9、16、2(对羟基苯甲酸)、4(对羟基苯甲醛)与镇痛率的关联度相对较高(关联度均高于0.7)。结论:三七姜乙酸乙酯提取物具有较好的抗炎、镇痛作用,峰1(原儿茶酸)、2(对羟基苯甲酸)、10、14、17、18等可能是其主要活性成分。

关键词 三七姜;乙酸乙酯提取物;抗炎;镇痛;谱-效关系;Pearson相关性分析;灰色关联分析

Study on Spectrum-effect Relationship of Anti-inflammatory and Analgesic Effects of Ethyl Acetate Extract from Zhuang Medicine *Stahlianthus involucratus*

LIANG Jie^{1,2,3}, CHEN Huihua¹, YANG Chuanchuan¹, CAO Yupin¹, CHEN Jun¹, LI Yaohua¹, CHEN Xiaosi¹, LIU Xianfu⁴(1. School of Pharmacy, Guangxi University of TCM, Nanning 530200, China; 2. Guangxi Zhuang Yao Medicine Center of Engineering and Technology, Nanning 530200, China; 3. Guangxi Superior Chinese Patent Medicine and National Medicine Development Engineering Technology Center, Nanning 530200, China; 4. College of Pharmacy Science, Guangxi University of TCM, Nanning 530222, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the spectrum-effect relationship of analgesic and anti-inflammatory effects of ethyl acetate extract from Zhuang medicine *Stahlianthus involucratus* from different habitats. METHODS: Ten batches of *S. involucratus* from different habitats were used as samples to investigate the anti-inflammatory and analgesic activities of ethyl acetate extracts by xylene induced ear swelling test and acetic acid induced writhing test in mice. HPLC fingerprints of 10 batches of ethyl acetate extract from *S. involucratus* were established and their similarity was evaluated by using *Similarity Evaluation System of TCM Chromatogram Fingerprint* (2012 edition), and the common peaks were identified by comparison with the control. The spectrum-effect relationship of anti-inflammatory and analgesic effects of ethyl acetate extract from *S. involucratus* were analyzed on the basis of Pearson correlation coefficient (auricle swelling degree and writhing times in 15 min as pharmacodynamic indexes) and

^Δ 基金项目:广西自然科学基金资助项目(No.2020GXNS-FAA238026);广西壮瑶药重点实验室课题(No.GXZYZZ2020-05);广西高等学校中青年骨干教师培育计划(No.桂教人[2019]5号);广西一流学科建设名单(No.桂教科研[2018]12号);广西壮瑶药协同创新中心(No.桂教科研[2013]20号);广西壮瑶药重点实验室培育基地(No.桂科基字[2014]32号);广西第八批自治区特聘专家聘任人员名单(No.桂人才通字[2019]13号);广西高校高水平创新团队及卓越学者计划项目(No.桂教师范[2019]52号);广西科技基地和人才专项(No.桂科AD20238058)

* 教授,博士。研究方向:中药药效物质基础与质量控制。电话:0771-4953513。E-mail:liangjie1101@126.com

Grey relational analysis (inhibition rate of ear swelling and analgesic rate as pharmacodynamic indexes). RESULTS: Ten batches of ethyl acetate extract from *S. involucratus* had obvious anti-inflammatory and analgesic effects; inhibition rates of ear swelling in mice were 46.43% -55.16%, and the analgesic rates of mice were 45.56% -52.72%. A total of 18 common peaks were identified in 10 batches of samples, and the similarity between them and the control fingerprint was 0.994-0.997. Compared with substance control, the peaks 1, 2 and 4 were identified as protocatechuic acid, *p*-hydroxybenzoic acid and *p*-hydroxybenzaldehyde, respectively. Results

of Pearson correlation analysis showed that peak 10 and peak 18 were significantly negative correlated with auricle swelling degree and writhing times in 15 min (r were values -0.853 , -0.738 , P values were 0.002 , 0.015 , respectively). Results of Gray correlation degree analysis showed that the correlation degree of 18 common peaks with inhibition rate of ear swelling and analgesic rate were all greater than 0.65 ; among them, peaks 14, 1 (protocatechuic acid), 17, 9, 4 (p -hydroxybenzaldehyde), 2 (p -hydroxybenzoic acid), 16, 7 and 6 showed the relatively high correlation degree (correlation degree >0.7); peak 1 (protocatechuic acid), 17, 14, 9, 16, 2 (p -hydroxybenzoic acid) and 4 (p -hydroxybenzaldehyde) showed the relatively high correlation degree (correlation degree >0.7).

CONCLUSIONS: The ethyl acetate extract of *S. involucratu*s show good anti-inflammatory and analgesic effects. Peak 1 (protocatechuic acid), 2 (p -hydroxybenzoic acid), 10, 14, 17, 18 may be its main active ingredients.

KEYWORDS *Stahlianthus involucratu*s; Ethyl acetate extract; Anti-inflammatory; Analgesic; Spectrum-effect relationship; Pearson correlation analysis; Gray correlation analysis

三七姜为姜科 Zingiberaceae 姜七属植物土田七 *Stahlianthus involucratu*s (King ex Bak.) Craib. 的块根和根茎, 又称土田七、小田七、竹田七、毛七、姜三七、姜田七等, 其性温, 味辛, 具有散瘀、止痛、止血等功效, 主治跌打损伤、风湿骨痛等^[1]。三七姜为广西民间传统壮药, 现收载于《广西壮族自治区壮药质量标准(第二卷)》^[2], 主要分布于我国广西、云南、广东、福建等省区^[3]。现代研究表明, 三七姜中含有黄酮类、皂苷类、酚类、萜类、三萜类、糖类等多种化学成分^[4], 具有抗肿瘤、抗炎等药理作用^[5-6]。民间常将三七姜根茎作为野生草药使用, 并发现其对风湿性骨关节疼痛症状有一定疗效, 可用于治疗风湿骨痛、吐血衄血、月经过多等; 且还可炒炭研粉后撒于患处, 以散瘀消肿、活血止血、行气止痛, 用于治疗跌打损伤、虫咬蛇伤、外伤出血等^[1]。

本课题组前期对三七姜不同溶剂提取物的抗炎、镇痛作用进行了研究, 发现其乙酸乙酯提取物具有显著的抗炎、镇痛作用。目前, 谱效学已被学者广泛应用于中药的活性成分和药理作用关系的研究中, 其可通过数理统计方法, 快捷地筛选出中药的活性成分, 从而分析其药理活性的物质基础^[7]。基于此, 本研究分别以二甲苯致小鼠耳廓肿胀、乙酸致小鼠扭体反应作为炎症和疼痛模型, 考察三七姜乙酸乙酯提取物的抗炎、镇痛药效; 并建立不同产地三七姜乙酸乙酯提取物的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 然后通过 Pearson 相关系数法和灰色关联分析法将抗炎、镇痛药效与指纹图谱进行关联, 旨在初步探讨三七姜抗炎、镇痛作用的药效物质基础, 为进一步开发壮药三七姜提供科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 1100 型 HPLC 仪(美国 Agilent 公司)、CPA225D 型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]、KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司)、UPC-II-10T 型实验室超纯水器(四川优普超纯科技有限公司)、HH-S 型恒温水浴锅(江苏金坛市医疗仪器厂)、TGL-16G 型离心机(上海安亭科学仪器厂)等。

1.2 主要药品与试剂

10 批三七姜药材均由本课题组自行采摘, 所有药材经广西中医药大学滕建北教授鉴定均为姜科植物土田七 *S. involucratu*s (King ex Bak.) Craib. 的块根和根茎, 其具体来源信息见表 1。复方醋酸地塞米松乳膏(批号 1812012S, 规格 20 g: 15 mg) 购自华润三九医药股份有限公司; 双氯芬酸二乙胺乳胶剂[批号 VP2181, 规格 20 g: 0.2 g(以 $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ 计)] 购自北京诺华制药有限公司; 原儿茶酸对照品(批号 RP190605, 纯度 $\geq 98\%$)、对羟基苯甲酸对照品(批号 RP190609, 纯度 $\geq 98\%$)、对羟基苯甲醛对照品(批号 RP180913, 纯度 $\geq 98\%$) 均购自成都麦德生科技有限公司; 二甲苯(批号 20181022) 购自天津市富宇精细化工有限公司; 冰乙酸(批号 181227) 购自成都市科隆化学品有限公司; 甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

表 1 三七姜样品来源信息

Tab 1 Information of *S. involucratu*s sources

编号	产地	采集时间	编号	产地	采集时间
S1	广西南宁	2018年4月	S6	广西玉林	2018年5月
S2	广西桂林	2018年3月	S7	广西河池	2018年3月
S3	广西柳州	2018年5月	S8	广西来宾	2018年5月
S4	广西贺州	2018年4月	S9	广西崇左	2018年3月
S5	广西梧州	2018年3月	S10	广西百色	2018年4月

1.3 实验动物

实验所用动物为健康 SPF 级 KM 小鼠, 共 240 只, 雄性, 体质量为 18~22 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物生产许可证号为 SCXK(湘)2016-0002。所有小鼠购入后均饲养于广西中医药大学实验动物中心, 饲养期间均自由摄食、饮水。实验方案经广西中医药大学伦理委员会批准, 实验过程严格遵守《广西中医药大学实验动物管理条例》。所有小鼠均适应性喂养 7 d 后进行后续实验。

2 方法与结果

2.1 三七姜乙酸乙酯提取物的制备

称取不同产地三七姜粗粉适量, 加入 8 倍量(mL/mg) 的 80% 乙醇, 加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 分别滤过合并 3 次滤液, 减压浓缩至无醇味, 得到三七姜 80% 乙醇

总提物。将总提物用水分散后,依次用石油醚、乙酸乙酯各萃取3次,分别合并萃取液,回收乙酸乙酯部位萃取溶剂,蒸干,即得到不同产地三七姜药材的乙酸乙酯提取物(得率约为1.23%)。将所得提取物密封后置于4℃冰箱中保存,备用。

2.2 不同产地三七姜乙酸乙酯提取物的抗炎、镇痛作用

2.2.1 药液的制备 临用前,将“2.1”项下10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物分别用水配成质量浓度均为1.5 g/mL(按生药量计)的混悬液,备用。

2.2.2 三七姜乙酸乙酯提取物的抗炎作用研究 将120只小鼠随机分为空白对照组、复方醋酸地塞米松乳膏组(阳性对照,0.06 g/耳,剂量参考本课题组前期预实验结果设置)和10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物组(0.075 g/耳,以生药量计,剂量参考本课题组前期预实验结果设置),每组10只,均按组别分笼饲养。各给药组小鼠分别于右耳正反两面涂抹相应药液50 μL,空白对照组小鼠同法涂抹生理盐水50 μL,每10 min涂抹1次,连续涂药1 h,共涂药6次。末次涂药结束10 min后,用生理盐水擦净右耳后再用干药棉擦干。10 min后,除空白对照组外的其余各组小鼠均于右耳涂抹二甲苯20 μL致炎,分别于致炎后10 min和2 h,再次于右耳涂抹等量二甲苯1次。于再次涂抹二甲苯4 h后,处死小鼠(处死前用生理盐水擦净右耳并用干药棉擦干),剪下双耳,对齐,用6 mm打孔器取下圆形耳片,称定上述圆形耳片的质量。根据以下公式计算耳肿胀度和耳肿胀抑制率:耳肿胀度(mg)=致炎耳耳片质量(mg)-正常耳耳片质量(mg);耳肿胀抑制率(%)=(空白对照组平均耳肿胀度-给药组平均耳肿胀度)/空白对照组平均耳肿胀度×100%。采用SPSS 23.0软件对数据进行统计分析,符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。各组小鼠耳肿胀度和耳肿胀抑制率的测定结果见表2。

由表2可见,与空白对照组比较,复方醋酸地塞米松软膏组和10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物组小鼠的耳肿胀度均显著降低($P<0.01$)。10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物对小鼠的耳肿胀抑制率为46.43%~55.16%,说明各样品均有较好的抗炎作用。

2.2.3 三七姜乙酸乙酯提取物的镇痛作用研究 将120只小鼠随机分为空白对照组、双氯芬酸二乙胺乳胶剂组(阳性对照,0.3 g/只,剂量参考本课题组前期预实验结果设置)和10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物组(0.45 g/只,以生药量计,剂量参考本课题组前期预实验结果设置),每组10只,均按组别分笼饲养。于实验前24 h,剃除各组小鼠腹部被毛(面积约2 cm×2 cm)。各给药组小

表2 各组小鼠耳肿胀度和耳肿胀抑制率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Results of degree and inhibition rate of ear swelling in mice of each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	样品编号	耳肿胀度,mg	耳肿胀抑制率,%
空白对照组		4.75±1.05	
复方醋酸地塞米松软膏组		2.06±1.13**	56.63
三七姜乙酸乙酯提取物组	S1	2.46±1.32**	48.21
	S2	2.21±1.20**	53.47
	S3	2.13±1.49**	55.16
	S4	2.27±0.82**	52.21
	S5	2.35±1.36**	50.53
	S6	2.54±1.23**	46.43
	S7	2.37±1.53**	50.18
	S8	2.41±1.44**	49.24
	S9	2.20±1.55**	53.68
	S10	2.40±1.21**	49.47

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P<0.01$

鼠每天于脱毛处涂抹相应药液2次(9:00和17:00),每次涂抹0.3 mL(以均匀涂抹于脱毛部位为准),共涂抹4天;空白对照组小鼠同法涂抹生理盐水0.3 mL。于末次涂药1 h后,各组小鼠均腹腔注射0.6%乙酸溶液(0.2 mL/只),观察其注射乙酸溶液后15 min内的扭体次数和扭体潜伏期(即第1次扭体反应出现的时间),并计算各给药组小鼠的镇痛率:镇痛率(%)=(空白对照组平均扭体次数-给药组平均扭体次数)/空白对照组平均扭体次数×100%。按“2.2.2”项下方法对数据进行统计分析。各组小鼠扭体潜伏期、15 min内扭体次数和镇痛率的测定结果见表3。

表3 各组小鼠扭体潜伏期、15 min内扭体次数和镇痛率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Results of writhing latency, writhing times in 15 minutes and analgesic rate of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	样品编号	扭体潜伏期,min	15 min内的扭体次数	镇痛率,%
空白对照组		3.60±1.17	34.90±3.41	
双氯芬酸二乙胺乳胶剂组		7.40±1.58**	15.80±5.27**	54.73
三七姜乙酸乙酯提取物组	S1	4.60±1.71	18.60±7.11**	46.70
	S2	5.50±2.27	16.70±5.33**	52.15
	S3	5.30±1.77	17.20±6.30**	50.72
	S4	5.09±1.97	17.91±5.66**	48.68
	S5	4.70±1.89	18.10±7.40**	48.14
	S6	4.60±1.51	18.70±6.82**	46.42
	S7	4.60±1.90	18.30±7.33**	47.56
	S8	4.60±2.07	19.00±6.25**	45.56
	S9	5.50±1.72	16.50±5.64**	52.72
	S10	4.90±1.79	18.00±6.06**	48.42

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P<0.01$

由表3可知,与空白对照组比较,双氯芬酸二乙胺乳胶剂组小鼠的扭体潜伏期显著延长($P<0.01$),10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物组小鼠的扭体潜伏期虽

也有所延长,但差异均无统计学意义($P>0.05$);双氯芬酸二乙胺乳胶剂组和10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物组小鼠15 min内扭体次数均显著减少($P<0.01$)。10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物组小鼠的镇痛率为45.56%~52.72%,说明各样品均有较好的镇痛作用。

2.3 10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物的HPLC指纹图谱

2.3.1 溶液制备 (1)对照品溶液:称取对羟基苯甲酸、原儿茶酸、对羟基苯甲醛对照品各适量,加甲醇溶解制成上述成分质量浓度分别为0.212、0.236、0.149 mg/mL的混合对照品溶液。(2)三七姜供试品溶液:分别称取不同产地三七姜乙酸乙酯提取物0.1 g,精密称定,用5 mL甲醇超声(功率250 W,频率50 kHz)提取5 min,用甲醇定容到10 mL量瓶中,混匀,过滤,滤液以13 000 r/min离心10 min,取上清液,过0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液作为供试品溶液。

2.3.2 色谱条件 以Phenomenex Kinetex XB C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,以0.1%磷酸溶液(A)-乙腈(B)为流动相进行洗脱梯度(0~20 min, 60%B; 20~50 min, 60%B \rightarrow 80%B; 50~75 min, 80%B \rightarrow 100%B);流速为0.8 mL/min;检测波长为260 nm;柱温为30 $^{\circ}\text{C}$;进样量为10 μL 。

2.3.3 精密度试验 称取三七姜乙酸乙酯提取物(编号S9)0.1 g,按“2.3.1(2)”项下方法制备供试品溶液,然后按“2.3.2”项下色谱条件连续测定6次,记录色谱图。结果,以2号峰(对羟基苯甲酸,该峰含量相对较高、分离度良好且出峰稳定)为参照峰(S),计算得各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.18% ($n=6$)、相对峰面积的RSD均小于1.80% ($n=6$),表明方法精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取三七姜乙酸乙酯提取物(编号S9)0.1 g,按“2.3.1(2)”项下方法制备供试品溶液,于室温下放置0、2、4、8、16、24 h时分别按“2.3.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,以2号峰为参照峰,计算得各共有色谱峰相对保留时间的RSD均小于0.34% ($n=6$)、相对峰面积的RSD均小于2.12% ($n=6$),表明该供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 称取三七姜乙酸乙酯提取物(编号S9)0.1 g,精密称定6份,分别按“2.3.1(2)”项下方法制备供试品溶液,然后按“2.3.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,以2号峰为参照峰,计算得各共有色谱峰相对保留时间的RSD均小于0.34% ($n=6$)、相对峰面积的RSD均小于1.77% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.3.6 HPLC指纹图谱的生成 分别取10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物各0.1 g,按“2.3.1(2)”项下方法制备供试品溶液,然后按“2.3.2”项下色谱条件进样测

定,记录色谱图。将10批样品的色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》中,以S1样品的色谱图为参照图谱(因S1样品图谱的色谱峰信号相对较强且峰形较好),设置时间窗宽度为0.1 s,采用多点校正法进行色谱峰匹配生成叠加指纹图谱,并采用中位数法生成对照指纹图谱(R)。结果,共确定了18个共有峰。10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物的HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱见图1。

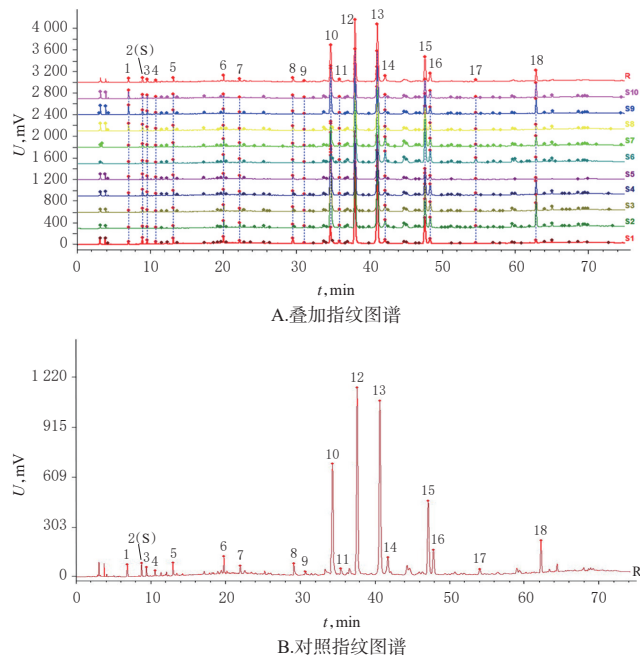
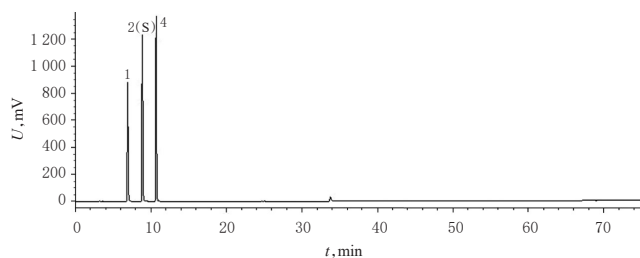


图1 10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物的叠加指纹图谱和对照指纹图谱

Fig 1 HPLC superimposed fingerprint and control fingerprint of ethyl acetate extracts of *S. involucratus* from 10 different habitats

2.3.7 共有峰的指认 取“2.3.1(1)”项下混合对照品溶液适量,按“2.3.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。通过对比该混合对照品图谱与对照指纹图谱(图1B)中各成分峰的保留时间,指认出峰1为原儿茶酸、峰2为对羟基苯甲酸、峰4为对羟基苯甲醛。混合对照品的HPLC图见图2。



注:1.原儿茶酸;2.对羟基苯甲酸;4.对羟基苯甲醛

Note: 1. protocatechuic acid; 2. *p*-hydroxybenzoic acid; 4. *p*-hydroxybenzaldehyde

图2 混合对照品的HPLC图

Fig 2 HPLC chromatogram of mixed control

2.3.8 相似度评价 将10批三七姜乙酸乙酯提取物的HPLC指纹图谱导入《中药色谱指纹图谱相似性评价系统(2012版)》中进行相似度评价。结果,10批样品的色谱图与对照指纹图谱的相似度为0.944~0.997,均大于0.900,说明各批样品化学成分的一致性较好。10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物的相似度评价结果见表4。

表4 10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物的相似度评价结果

Tab 4 Similarity evaluation results of ethyl acetate extracts of 10 batches of *S. involucratus* from different habitats

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.821	0.895	0.856	0.939	0.994	0.991	0.996	0.897	0.958	0.963
S2	0.821	1.000	0.989	0.996	0.952	0.792	0.877	0.785	0.986	0.941	0.944
S3	0.895	0.989	1.000	0.996	0.982	0.871	0.936	0.866	0.998	0.978	0.982
S4	0.856	0.996	0.996	1.000	0.971	0.829	0.904	0.823	0.993	0.959	0.963
S5	0.939	0.952	0.982	0.971	1.000	0.914	0.958	0.912	0.981	0.982	0.989
S6	0.994	0.792	0.871	0.829	0.914	1.000	0.986	0.997	0.872	0.943	0.948
S7	0.991	0.877	0.936	0.904	0.958	0.986	1.000	0.984	0.937	0.981	0.985
S8	0.996	0.785	0.866	0.823	0.912	0.997	0.984	1.000	0.871	0.944	0.945
S9	0.897	0.986	0.998	0.993	0.981	0.872	0.937	0.871	1.000	0.983	0.982
S10	0.958	0.941	0.978	0.959	0.982	0.943	0.981	0.944	0.983	1.000	0.997
R	0.963	0.944	0.982	0.963	0.989	0.948	0.985	0.945	0.982	0.997	1.000

2.4 三七姜乙酸乙酯提取物抗炎、镇痛的谱-效关系

2.4.1 基于Pearson相关系数的谱-效关系分析 将10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物的18个共有峰的峰面积与小鼠耳肿胀度(记为 β_1)、15 min内小鼠扭体次数(记为 β_2)分别导入SPSS 23.0软件中,以10批样品的18个共有峰峰面积为自变量、药效指标(β_1 、 β_2)为因变量进行Pearson相关性分析^[8]。结果显示,峰10、18与 β_1 呈显著负相关(r 分别为-0.853、-0.738, P 分别为0.002、0.015),且峰10、18同时与 β_2 呈显著负相关(r 分别为-0.821、-0.809, P 分别为0.004、0.005)。以上结果提示,峰10、18与三七姜乙酸乙酯提取物的抗炎、镇痛作用具有显著相关性。18个共有峰与 β_1 、 β_2 的Pearson相关性分析结果分别见表5、表6。

2.4.2 基于灰色关联度的谱-效关系分析 由于10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物的共有峰峰面积与小鼠药效指标(镇痛率、耳肿胀抑制率)的量纲不一致,不便于比较,因此在进行灰色关联度分析时,需先对数据进行无量纲化处理^[9-10]。本研究以10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物的共有峰峰面积为子序列、小鼠药效指标为母序列,采用初值化变换法对数据进行无量纲化处理^[9-10]。

将无量纲化处理后的子序列和母序列数值代入灰色关联度公式: $\Delta i(k) = |\lambda_0(k) - \lambda_i(k)|$ 。式中, $\lambda_i(k)$ 表示不同产地三七姜乙酸乙酯提取物的共有峰峰面积, i

表5 18个共有峰与 β_1 的Pearson相关性分析结果

Tab 5 Pearson correlation analysis results of 18 common peaks and β_1

峰号	相关系数 r	P	峰号	相关系数 r	P
1	0.046	0.900	10	-0.853**	0.002
2	0.171	0.637	11	0.462	0.178
3	0.286	0.423	12	0.366	0.298
4	0.260	0.469	13	0.367	0.297
5	0.336	0.342	14	0.274	0.444
6	0.171	0.637	15	0.156	0.667
7	-0.070	0.848	16	-0.072	0.843
8	0.138	0.704	17	0.306	0.390
9	-0.312	0.380	18	-0.738*	0.015

注:“*”表示在0.05水平(双侧)上显著相关;“**”表示在0.01水平(双侧)上显著相关

Note: “*” means significant correlation at 0.05 level (bilateral); “**” means significant correlation at 0.01 level (bilateral)

表6 18个共有峰与 β_2 的Pearson相关性分析结果

Tab 6 Pearson correlation analysis results of 18 common peaks and β_2

峰号	相关系数 r	P	峰号	相关系数 r	P
1	-0.053	0.884	10	-0.821**	0.004
2	0.415	0.233	11	0.437	0.206
3	0.452	0.189	12	0.360	0.307
4	0.458	0.184	13	0.332	0.349
5	0.594	0.070	14	0.157	0.664
6	0.123	0.735	15	0.148	0.683
7	-0.119	0.744	16	-0.081	0.824
8	0.378	0.281	17	0.127	0.727
9	-0.304	0.393	18	-0.809**	0.005

注:“**”表示在0.01水平(双侧)上显著相关

Note: “**” means significant correlation at 0.01 level (bilateral)

表示各共有峰的峰号(1~18), k 表示样品编号; $\lambda_0(k)$ 表示不同产地三七姜乙酸乙酯提取物的抗炎、镇痛指标, k 表示各产地样品提取物抗炎、镇痛指标的编号(1~10)。求出两个药效指标绝对差的最大值和最小值,分别记为 Δ_{\max} 、 Δ_{\min} 。结果, $\Delta_{\text{耳肿胀抑制率}\max} = 1.7436$ 、 $\Delta_{\text{耳肿胀抑制率}\min} = 0.0053$ 、 $\Delta_{\text{镇痛率}\max} = 1.7837$ 、 $\Delta_{\text{镇痛率}\min} = 0.0052$ 。将上述最大值和最小值代入灰色关联系数计算公式^[9],计算18个共有峰与抗炎、镇痛药效指标的关联系数。式中, ρ 为分辨系数,在0~1内取值,取值越小,表示关联度系数差异越大^[11-12]。当 ρ 取0.6时^[13],得到10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物指纹图谱中18个共有峰与抗炎、镇痛药效指标之间的关联系数。利用所得的关联系数计算关联度(关联度实质上是序列几何关系的比较,是母序列与子序列各个时刻的关联系数的平均值^[14]),并对其排序组成关联序,结果见表7。

由表7可知,10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物的18个共有峰与二甲苯致小鼠耳肿胀的抑制率以及与乙酸致小鼠扭体的镇痛率的关联度均在0.65以上,各成分对抗炎作用贡献的大小顺序依次为峰14>峰1>峰

表7 10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物中18个共有峰与抗炎、镇痛作用的关联度和关联序

Tab 7 Correlation degree and order between common peaks and analgesic and anti-inflammatory effects of ethyl acetate extracts of 10 batches of *S. involucratus* from different habitats

色谱峰号	抗炎关联度结果		镇痛关联度结果	
	关联度	关联序	关联度	关联序
1	0.732 7	2	0.732 2	1
2	0.707 4	6	0.704 4	6
3	0.695 9	14	0.692 9	13
4	0.708 7	5	0.703 0	7
5	0.699 7	10	0.694 7	10
6	0.700 7	9	0.695 0	9
7	0.704 9	8	0.699 8	8
8	0.693 7	15	0.689 1	18
9	0.715 1	4	0.708 9	4
10	0.687 9	18	0.689 3	17
11	0.698 3	11	0.692 8	14
12	0.697 3	12	0.691 9	15
13	0.696 8	13	0.691 3	16
14	0.734 1	1	0.726 2	3
15	0.694 7	16	0.693 0	12
16	0.706 4	7	0.704 5	5
17	0.730 5	3	0.728 4	2
18	0.691 9	17	0.693 6	11

17>峰9>峰4>峰2>峰16>峰7>峰6>峰5>峰11>峰12>峰13>峰3>峰8>峰15>峰18>峰10,各成分对镇痛作用贡献的大小顺序依次为峰1>峰17>峰14>峰9>峰16>峰2>峰4>峰7>峰6>峰5>峰18>峰15>峰3>峰11>峰12>峰13>峰10>峰8。同时,峰14、1(原儿茶酸)、17、9、4(对羟基苯甲醛)、2(对羟基苯甲酸)、16、7、6与三七姜乙酸乙酯提取物抗炎药效的关联度相对较高(关联度均高于0.7),峰1(原儿茶酸)、17、14、9、16、2(对羟基苯甲酸)、4(对羟基苯甲醛)与三七姜乙酸乙酯提取物镇痛药效的关联度相对较高(关联度均高于0.7)。该结果表明,这些关联度较高的峰(其中包括已知成分原儿茶酸、对羟基苯甲酸、对羟基苯甲醛等)可能是三七姜乙酸乙酯提取物发挥药效的主要成分。

3 讨论

3.1 色谱条件的筛选

本课题组前期考察了多种色谱柱(COSMOSIL 5C₁₈-PAQ、Hypersil ODS2 和 Phenomennex Kinetex XB C₁₈等)的分离效果,结果发现色谱柱 Phenomenex Kinetex XB C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)对各成分的分离效果明显优于其他色谱柱。此外,本课题组前期还考察了不同检测波长(220、260、280、300、320 nm)、不同流动相(甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%冰乙酸溶液、乙腈-0.1%甲酸溶液)、

不同流速(0.8、1、1.2 mL/min)对各成分的分离效果。结果发现,当检测波长为260 nm、流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液、流速为0.8 mL/min时,各色谱峰的分离效果和峰形均最好,且基线较平稳、各峰保留时间适当,故最终确定了“2.3.2”项下色谱条件。

3.2 三七姜乙酸乙酯提取物抗炎、镇痛的谱-效关系分析

本研究主要是想探讨三七姜外用的抗炎、镇痛作用,因此选择了外敷药物复方醋酸地塞米松软膏和双氯芬酸二乙胺乳胶剂作为阳性对照药物。其中,复方醋酸地塞米松软膏为糖皮质激素外用制剂,临床上常用于炎症性疾病的治疗,且效果显著^[15];双氯芬酸二乙胺乳胶剂为前列腺素合成抑制剂,其不仅能抑制前列腺素的合成,具有抗炎、镇痛作用,还能提高痛阈值,从而减轻疼痛及肿胀,最终达到治疗效果^[16]。

本研究采用HPLC法对10批不同产地三七姜乙酸乙酯提取物进行了指纹图谱分析,共标定出了18个共有峰,并指出了其中3个特征峰。接着,本研究分别采用Pearson相关系数法和灰色关联分析法对这18个共有色谱峰与三七姜乙酸乙酯提取物的抗炎、镇痛作用进行了相关性分析。Pearson相关性分析结果表明,与三七姜乙酸乙酯提取物抗炎、镇痛作用具有显著相关的是峰10、18;基于灰色关联度分析表明,对三七姜乙酸乙酯提取物抗炎作用贡献较大的是峰14、1(原儿茶酸)、17、9、4(对羟基苯甲醛)、2(对羟基苯甲酸)、16、7、6,对其镇痛作用贡献较大的是峰1(原儿茶酸)、17、14、9、16、2(对羟基苯甲酸)、4(对羟基苯甲醛)。以上各特征峰与三七姜乙酸乙酯提取物对应药效的关联度虽存在差异,但关联度均高于0.7,可能为三七姜乙酸乙酯提取物发挥抗炎、镇痛效果的主要活性成分^[17]。

在上述关联度较高的色谱峰中,笔者指出了原儿茶酸、对羟基苯甲酸、对羟基苯甲醛这3种成分。占龙等^[18]通过研究原儿茶酸在体外对白细胞介素1β诱导炎症软骨细胞的生物学影响,证实了其能促进软骨细胞生长以及下调炎症相关基因MMP-13的表达。姜鸿等^[19]在火绒草抗急性炎症的药效物质基础研究中发现,该药发挥抗急性炎症的作用与其所含成分原儿茶酸有关。Dikmen等^[20]研究发现,原儿茶酸通过内源性大麻素系统来抑制疼痛反应。Arslan等^[21]通过小鼠热板实验(脊柱上综合反应)和尾巴浸入实验(脊髓反射)发现,原儿茶酸具有镇痛作用。和蕾等^[22]研究发现,对羟基苯甲酸具有抗炎活性。刘珊珊等^[23]研究表明,天麻中的对羟基苯甲醛具有抗炎作用。可见,原儿茶酸、对羟基苯甲酸、对羟基苯甲醛可能为三七姜药材抗炎、镇痛的活性成分之一。

综上所述,三七姜乙酸乙酯提取物具有一定的抗炎、镇痛作用。其中,峰1(原儿茶酸)、2(对羟基苯甲酸)、4(对羟基苯甲醛)、14、17、10、18等可能是其抗炎、镇痛作用的主要活性成分。但本研究仅指出了部分对抗炎、镇痛作用贡献较大的化学成分,对其他关联度较高的有效成分仍需结合超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱技术进行深入的挖掘与鉴定。

参考文献

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草:第8册[M].上海:上海科技出版社,1999:623.

[2] 广西壮族自治区食品药品监督管理局.广西壮族自治区壮药质量标准:第二卷[S].南宁:广西科学技术出版社,2011:12.

[3] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:第十六卷[M].北京:科学出版社,1981:44.

[4] 谢珍珍,杨颖欣,梁洁,等.壮药姜叶三七的化学成分鉴别研究[J].广西中医药大学学报,2015,18(3):49-51.

[5] 胡稀,谢珍珍,梁洁.壮药姜叶三七醇提取物抗炎作用的研究[J].大众科技,2017,19(1):37-38.

[6] 曾立威,唐春燕,徐勤.三七姜挥发油成分的GC-MS分析与体外抗肿瘤活性研究[J].华夏医学,2017,30(4):33-38.

[7] 李戎,闫智勇,李文军,等.创建中药谱效关系学[J].中医教育,2002,21(2):62.

[8] 王宏志.大数据分析原理与实践[M].北京:机械工业出版社,2017:15.

[9] 刘雯,刘云,刘进宝,等.基于灰色关联分析的藤茶不同极性部位在小鼠体内抗炎作用的谱-效关系研究[J].中国药房,2020,31(19):2382-2386.

[10] 林梦雅,张玉萍,李雅,等.基于灰色关联度分析的丹参提取物抗炎作用谱效关系研究[J].中草药,2017,48(16):3447-3452.

[11] 刘婧,黄潇,付小梅,等.基于主成分因子加权和灰色关联分析法的栀子利胆作用谱效关系分析[J].中国实验方剂

学杂志,2020,26(14):135-142.

[12] 杨冰月,李敏,任敏,等.基于灰色关联度分析法对半夏及其炮制品总有机酸止咳作用的谱-效关系研究[J].中草药,2016,47(13):2301-2307.

[13] 王莹,吴红杰,管庆霞,等.基于灰色关联分析法探索芍药甘草汤对癫痫小鼠脑保护作用的谱效关系[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(16):56-62.

[14] 卿勇军,刘文,杜平,等.基于灰色关联度分析戊己丸对胃蛋白酶抑制作用的谱效关系[J].中草药,2017,48(16):3390-3395.

[15] 庄明军,雍磊.复方氟米松软膏治疗斑块型银屑病疗效观察[J].中华全科医学,2011,9(3):408-409.

[16] 张建涛.冷敷后三七粉口服及双氯芬酸二乙胺乳胶剂外涂在官兵训练急性踝关节扭伤中的应用[J].中国现代药物应用,2020,14(16):212-214.

[17] 缪艳燕,徐帮会,徐剑,等.金银花的HPLC指纹图谱建立及其抗炎作用谱-效关系研究[J].中国药房,2020,31(20):2497-2502.

[18] 占龙,孟农钦,农桔安,等.原儿茶酸可减轻退变软骨细胞的损伤[J].中国组织工程研究,2020,24(8):1149-1154.

[19] 姜鸿,侯政,邸子真,等.火绒草抗急性炎症药效物质基础初步研究[J].中成药,2010,32(6):1048-1050.

[20] DIKMEN D Y, OKCAY Y, ARSLAN R, et al. Cannabinoid system involves in the analgesic effect of protocatechuic acid[J]. Daru, 2019, 27(2):605-612.

[21] ARSLAN R, AYDIN S, SAMUR D N, et al. The possible mechanisms of protocatechuic acid-induced central analgesia[J]. Saudi Pharm J, 2018, 26(4):541-545.

[22] 和蕾,史琪荣,柳润辉,等.芫花条中抗炎活性成分[J].第二军医大学学报,2008,29(10):1221-1226.

[23] 刘珊珊,向彬,郭营营,等.天麻成分对羟基苯甲醛抗炎作用及机制研究[J].中国民族民间医药,2016,25(9):16-17,19.

(收稿日期:2021-01-22 修回日期:2021-03-28)

(编辑:林静)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅