

双冬胶囊HPLC指纹图谱建立及其抗炎作用的谱效关系研究^Δ

刘星村^{1*}, 张米婵¹, 姚青青¹, 黄家宇¹, 汤磊¹, 吴军², 李莉^{1#} (1. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550025; 2. 贵州远程制药有限公司, 贵阳 550018)

中图分类号 R917; R965

文献标志码 A

文章编号 1001-0408(2024)09-1094-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.09.12



摘要 **目的** 建立双冬胶囊高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并研究其抗炎作用的谱效关系。**方法** 采用HPLC法建立15批双冬胶囊的指纹图谱,同时进行相似度评价。建立大鼠足肿胀模型考察双冬胶囊的抗炎活性,以大鼠足肿胀率及右后足组织中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、前列腺素E₂(PGE₂)、白细胞介素6(IL-6)、IL-8、IL-1 β 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平为抗炎药效指标,采用灰色关联度分析法构建双冬胶囊抗炎作用的谱效关系。**结果** 15批双冬胶囊确定了20个共有峰,相似度均大于0.97,指认了8个共有峰。经灰色关联度分析可知,15批双冬胶囊各共有峰峰面积与足肿胀率及MDA、SOD、PGE₂、IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 水平的关联度分别为0.621 1~0.783 5、0.564 3~0.827 9、0.581 0~0.845 3、0.564 9~0.855 0、0.583 1~0.856 4、0.576 5~0.863 5、0.564 1~0.838 0、0.572 5~0.851 3。其中,与抗炎药效指标关联性较强的有峰4(京尼平苷酸)、峰10(绿原酸)和峰2所代表的化学成分。**结论** 本研究成功建立15批双冬胶囊的HPLC指纹图谱,其中京尼平苷酸、绿原酸等可能是其抗炎药效成分。

关键词 双冬胶囊; 指纹图谱; 抗炎; 灰色关联度; 谱效关系

Establishment of HPLC fingerprint of Shuangdong capsules and the spectral effect relationship of its anti-inflammatory effect

LIU Xingcun¹, ZHANG Michan¹, YAO Qingqing¹, HUANG Jiayu¹, TANG Lei¹, WU Jun², LI Li¹ (1. School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Long-Range Pharmaceuticals LTD, Guiyang 550018, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish HPLC fingerprint of Shuangdong capsules, and to study the spectral effect relationship of its anti-inflammatory effect. **METHODS** The fingerprints of 15 batches of Shuangdong capsules were established by HPLC, and the similarity evaluation was carried out; the foot swelling model was established to investigate the anti-inflammatory activity of Shuangdong capsules. The gray correlation analysis method was used to construct the spectral effect relationship for the anti-inflammatory effect of Shuangdong capsules using the swelling rate of rat foot and the levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), prostaglandin E₂ (PGE₂), interleukin-6 (IL-6), IL-8, IL-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in right hindfoot tissues as the pharmacodynamic indexes of anti-inflammatory effects. **RESULTS** Overall 15 batches of Shuangdong capsules identified 20 common peaks, the similarities were all greater than 0.97, and a total of 8 chromatographic peaks were identified. According to the gray correlation analysis, the correlation degrees between the peak area and the foot swelling rate and the levels of MDA, SOD, PGE₂, IL-6, IL-8, IL-1 β and TNF- α in 15 batches of Shuangdong capsules were 0.621 1-0.783 5, 0.564 3-0.827 9, 0.581 0-0.845 3, 0.564 9-0.855 0, 0.583 1-0.856 4, 0.576 5-0.863 5, 0.564 1-0.838 0 and 0.572 5-0.851 3, respectively. Among them, the chemical components represented by peak 4 (geniposidic acid), peak 10 (chlorogenic acid) and the chemical composition represented by peak 2 were strongly correlated with anti-inflammatory efficacy indicators. **CONCLUSIONS** In this study, HPLC fingerprints of 15 batches of Shuangdong capsules were successfully established. Among them, geniposidic acid, chlorogenic acid may be its anti-inflammatory ingredients.

KEYWORDS Shuangdong capsules; fingerprint; anti-inflammation; grey correlation; spectral effect relationship

^Δ **基金项目** 贵州省科技计划项目(No. 黔科中引地[2022]4017);

贵州省大学生创新创业训练计划项目(No. 202110660065)

* **第一作者** 硕士研究生。研究方向: 药品质量评价与控制。

E-mail: 1925395014@qq.com

通信作者 副教授, 硕士生导师, 硕士。研究方向: 药物分析。

E-mail: 1226072965@qq.com

双冬胶囊是一种由栀子、黄芪、麦冬、苦木、白花蛇舌草、冬葵果6味药材组成的中药制剂^[1], 临床上用于治疗单纯性下尿路感染以及下焦湿热兼气阴两虚证导致的尿频、尿急、尿道灼热刺痛、尿黄等症状^[2]。目前, 对于

双冬胶囊的国内外研究报道较少,主要是定性鉴别、单一成分的定量分析或药理作用研究等^[1-6],而双冬胶囊具体是哪些成分发挥抗炎作用目前尚不明确。中药谱效关系是在中药指纹图谱研究基础上,将中药指纹图谱中化学成分的变化与中药药效联系起来,进而筛选出与药效密切的成分^[7-8]。鉴于此,本研究采用高效液相色谱(HPLC)法建立双冬胶囊指纹图谱,并以抗炎作用为切入点,将大鼠足肿胀率及炎症因子水平作为药效指标,结合灰色关联度分析研究双冬胶囊指纹图谱与抗炎作用的谱效关系,以期从该药中筛选出与抗炎药效密切相关的化学成分,为探索其药效物质基础和质量控制提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有Ultimate 3000型HPLC仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)、MS105DU型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司)、H1-16KR型高速冷冻离心机(湖南可成仪器设备有限公司)、ReadMax-1500型光吸收全波长酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司)、T10 basic型组织分散机[艾卡(广州)仪器设备有限公司]。

1.2 实验动物

本研究所用动物为雄性SD大鼠,体重(190±10)g,购自长沙市天勤生物技术有限公司,实验动物生产许可证号为SCXK(湘)2022-0011。大鼠饲养于贵州医科大学药学院动物房内,温度为(24±2)℃,相对湿度为(55±2)%。所有动物实验操作均符合贵州医科大学动物实验福利伦理审查委员会标准,实验动物伦理号为2200394。

1.3 主要药品及试剂

双冬胶囊(批号分别为20210903、20211004、20211101、20211122、20211203、20211224、20220101、20220112、20220123、20220202、20220213、20220224、20220305、20221001、20221013,编号依次为S1~S15,规格均为0.3g/粒)购自贵州远程制药有限责任公司;京尼平苷酸、去乙酰车叶草苷酸甲酯、京尼平龙胆双糖苷、绿原酸、栀子苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、西红花苷、毛蕊异黄酮对照品(批号分别为wkq22041210、wkq20052505、wkq22060614、wkq20042702、wkq20011502、wkq20010904、wkq22042612、wkq21122903,纯度≥98%)购自四川维克奇生物科技有限公司;阿司匹林肠溶片(批号BJ70397,规格100mg/粒)购自拜耳医药保健有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号20220914)购自北京索莱宝科技有限公司;丙二醛(malondialdehyde,MDA)检测试剂盒、

总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性检测试剂盒(批号分别为081722221214、021423230302)购自上海碧云天生物技术有限公司;前列腺素E₂(prostaglandin E₂,PGE₂)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒、白细胞介素6(interleukin-6,IL-6)ELISA试剂盒、IL-8 ELISA试剂盒、IL-1β ELISA试剂盒、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)ELISA试剂盒(批号均为02/2023)均购自上海酶联生物科技有限公司;甲醇、乙腈为色谱纯;磷酸为分析纯;水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 双冬胶囊指纹图谱的建立

2.1.1 混合对照品溶液的制备

取京尼平苷酸、去乙酰车叶草苷酸甲酯、京尼平龙胆双糖苷、绿原酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、西红花苷、毛蕊异黄酮对照品适量,精密称定,分别加甲醇制成对照品储备液。精密量取上述各对照品储备液适量,精密称取栀子苷对照品适量,置于同一10mL量瓶中,加甲醇制得每1mL含30.6μg京尼平苷酸、133.3μg去乙酰车叶草苷酸甲酯、297.8μg京尼平龙胆双糖苷、34.5μg绿原酸、12.7μg毛蕊异黄酮葡萄糖苷、85.0μg西红花苷、3.5μg毛蕊异黄酮、1408.0μg栀子苷的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备

取双冬胶囊内容物约2g,精密称定,置于50mL具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇30mL,称定质量;超声(频率40kHz,功率250W)提取20min后取出,放冷,再次称定质量;用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,采用0.22μm微孔滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液。

2.1.3 色谱条件

本研究所用色谱柱为ACE C₁₈-AR(250mm×4.6mm,5μm),以乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B)为流动相,进行梯度洗脱(0~20min,4%A→25%A;20~25min,25%A→28%A;25~40min,28%A→38%A);检测波长为235nm(0~22min)、440nm(22~28min)、250nm(28~40min);柱温为30℃;流速为1mL/min;进样量为10μL。

2.1.4 精密度试验

取“2.1.2”项下供试品溶液(样品编号S10),按“2.1.3”项下色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图。选取峰9(京尼平龙胆双糖苷)作为参照峰,以此计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD。结果显示,各共有峰相对保留时间的RSD为0.14%~0.67%(n=6),相对峰面积的RSD为0.44%~2.92%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.1.5 重复性试验

取双冬胶囊(样品编号S10)内容物适量,共6份,按“2.1.2”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。选取峰9(京尼平龙胆双糖苷)作为参照峰,以此计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD。结果显示,各共有峰相对保留时间的RSD为0.04%~0.57%($n=6$),相对峰面积的RSD为0.41%~2.92%($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验

取“2.1.2”项下供试品溶液(样品编号S10),于室温放置0、2、4、8、12、24 h后,按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。选取峰9(京尼平龙胆双糖苷)作为参照峰,以此计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD。结果显示,各共有峰相对保留时间的RSD为0.06%~1.71%($n=6$),相对峰面积的RSD为0.96%~3.39%($n=6$),表明供试品溶液在室温放置24 h内稳定性良好。

2.1.7 指纹图谱的生成和共有峰的指认

取15批双冬胶囊供试品溶液及混合对照品溶液适量,按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,将15批供试品溶液的色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》进行分析。将色谱峰峰形较明显、信号强度较好的样品S11的图谱作为参照图谱,时间窗宽度设置为0.1,并经过多点校正后进行全谱峰匹配,生成包含15批供试品溶液色谱图的叠加指纹图谱;同时,采用中位数法生成对照指纹图谱R。通过对比供试品溶液(样品编号S11)与混合对照品溶液的色谱图,进行色谱峰的识别与指认。结果显示,共标定出20个共有峰,并指认出其中8个共有峰:峰4为京尼平苷酸、峰5为去乙酰车叶草苷酸甲酯、峰9为京尼平龙胆双糖苷、峰10为绿原酸、峰11为栀子苷、峰13为毛蕊异黄酮葡萄糖苷、峰16为西红花苷、峰20为毛蕊异黄酮。结果见图1、图2。

2.1.8 相似度评价

将对照指纹图谱R作为参照,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》进行15批双冬胶囊的相似度评价。结果显示,15批样品与对照指纹图谱R的相似度分别为0.985、0.989、0.972、0.989、0.988、0.979、0.996、0.998、0.995、0.991、0.992、0.990、0.996、0.994、0.990,表明15批样品化学成分组成一致性良好。

2.2 双冬胶囊抗炎作用考察

2.2.1 药液的制备

临用前,将阿司匹林肠溶片、15批双冬胶囊内容物加入适量生理盐水超声(频率40 kHz,功率250 W)分散,分别配制成适当浓度的混悬液。

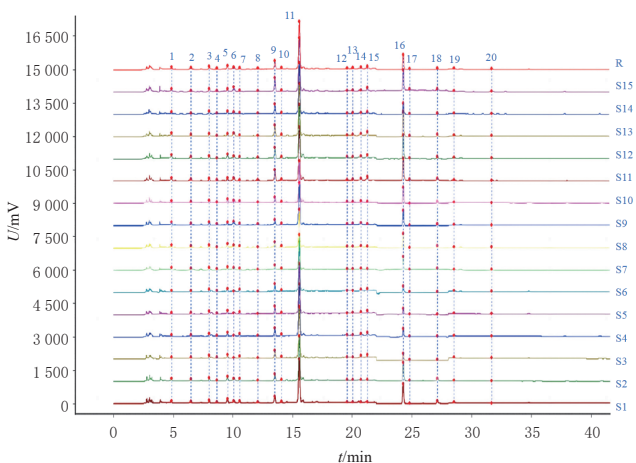
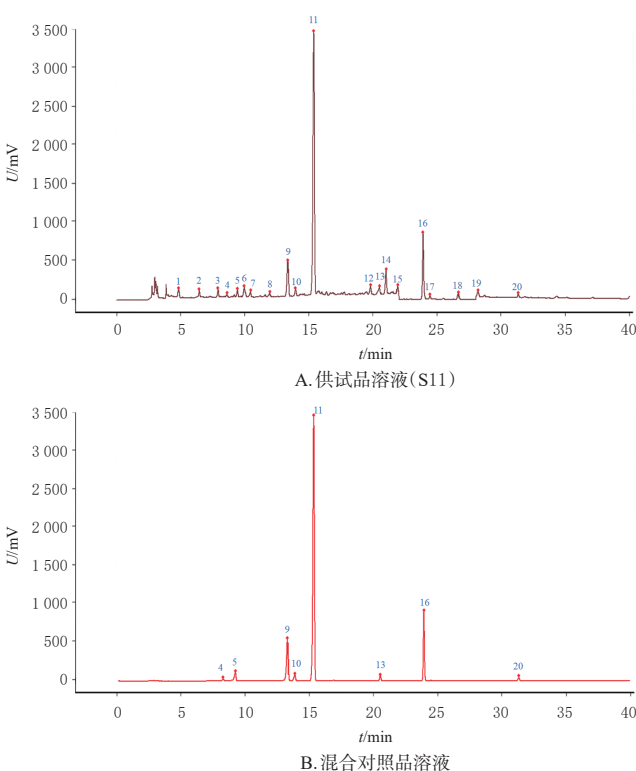


图1 15批双冬胶囊的HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱R



4:京尼平苷酸;5:去乙酰车叶草苷酸甲酯;9:京尼平龙胆双糖苷;10:绿原酸;11:栀子苷;13:毛蕊异黄酮葡萄糖苷;16:西红花苷;20:毛蕊异黄酮。

图2 混合对照品溶液和供试品溶液的HPLC图

2.2.2 双冬胶囊对角叉菜胶致大鼠足趾肿胀的影响

将SD大鼠适应性饲养7 d后随机分为18组,分别为对照组、模型组、阿司匹林肠溶片组(阳性对照,0.18 g/kg,根据临床等效剂量设置)、双冬胶囊S1~S15组(1.96 g/kg,以药物内容物计,根据临床等效剂量设置),每组6只。各给药组大鼠每天灌胃给药1次,连续7 d,对照组与模型组大鼠灌胃等体积生理盐水。末次给药后1 h,模型组和各给药组大鼠右后足趾皮下注射0.1 mL 1%角叉菜胶溶液以致炎,对照组注射等剂量生理盐

水。3 h后测定每只大鼠右后足趾的脚板厚度,并计算足肿胀率[足肿胀率=(致炎足趾的脚板厚度-正常足趾的脚板厚度)/正常足趾的脚板厚度×100%]^[9-10]。采用SPSS 25.0软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。结果(表1)显示,与对照组比较,模型组大鼠足肿胀率显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠足肿胀率显著降低($P<0.01$),表明这15批双冬胶囊均具有较好的抗炎作用。

表1 各组大鼠足肿胀率的检测结果($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

组别	足肿胀率	组别	足肿胀率
对照组	3.00±0.25	双冬胶囊S7组	14.55±1.46 ^b
模型组	64.14±15.45 ^a	双冬胶囊S8组	25.64±5.77 ^b
阿司匹林肠溶片组	16.13±5.06 ^b	双冬胶囊S9组	18.59±2.65 ^b
双冬胶囊S1组	20.94±2.30 ^b	双冬胶囊S10组	15.51±4.41 ^b
双冬胶囊S2组	20.18±2.40 ^b	双冬胶囊S11组	17.81±2.84 ^b
双冬胶囊S3组	13.11±3.26 ^b	双冬胶囊S12组	20.94±1.78 ^b
双冬胶囊S4组	31.29±7.16 ^b	双冬胶囊S13组	19.41±1.44 ^b
双冬胶囊S5组	28.13±5.98 ^b	双冬胶囊S14组	22.27±4.00 ^b
双冬胶囊S6组	19.76±5.94 ^b	双冬胶囊S15组	16.24±1.46 ^b

a: 与对照组比较, $P<0.01$; b: 与模型组比较, $P<0.01$ 。

2.2.3 双冬胶囊对大鼠右后足组织中炎症因子的影响

脱颈处死各组大鼠,并剪下炎症右后足,称定质量,以预冷的0.9% NaCl溶液为匀浆介质,制备成10%组织匀浆,再于4℃下以3 000 r/min离心15 min;取上清液适量,按试剂盒说明书方法检测炎症组织中MDA、SOD、PGE₂、IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 水平。结果(表2)显示,与对照组比较,模型组大鼠右后足组织中MDA、PGE₂、IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 水平均显著升高,SOD水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠右后足组织中上述指标水平均显著逆转($P<0.01$)。

表2 各组大鼠右后足组织中炎症因子水平的检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	MDA/(μ mol/mg)	SOD/(U/mL)	PGE ₂ /(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	IL-8/(pg/mL)	IL-1 β /(pg/mL)	TNF- α /(pg/mL)
对照组	2.40±0.54	208.12±25.06	81.93±5.91	16.27±1.13	34.31±2.79	15.01±3.31	260.53±21.73
模型组	12.50±2.22 ^a	153.72±14.83 ^a	105.39±17.19 ^a	21.48±1.92 ^a	44.07±2.12 ^a	24.54±6.83 ^a	357.01±41.83 ^a
阿司匹林肠溶片组	3.11±0.81 ^b	202.95±18.47 ^b	86.68±8.25 ^b	17.69±2.69 ^b	36.95±1.20 ^b	16.03±5.18 ^b	313.42±18.58 ^b
双冬胶囊S1组	3.80±0.80 ^b	190.77±28.18 ^b	88.56±12.98 ^b	17.88±1.73 ^b	36.70±1.70 ^b	18.72±3.51 ^b	322.75±23.04 ^b
双冬胶囊S2组	5.41±0.61 ^b	176.42±10.73 ^b	86.20±11.15 ^b	19.68±0.67 ^b	37.25±2.01 ^b	17.88±2.44 ^b	313.75±20.35 ^b
双冬胶囊S3组	5.28±2.05 ^b	202.65±23.86 ^b	87.82±10.33 ^b	18.31±2.74 ^b	38.74±3.95 ^b	18.12±4.77 ^b	315.31±18.79 ^b
双冬胶囊S4组	3.79±2.30 ^b	205.84±12.47 ^b	86.60±20.01 ^b	18.76±5.07 ^b	37.86±8.00 ^b	19.46±7.90 ^b	319.43±19.74 ^b
双冬胶囊S5组	4.90±1.47 ^b	183.17±10.70 ^b	86.12±19.25 ^b	18.32±3.04 ^b	37.65±4.80 ^b	19.73±7.62 ^b	317.28±27.70 ^b
双冬胶囊S6组	5.52±1.10 ^b	187.07±15.02 ^b	91.53±22.12 ^b	18.23±2.66 ^b	37.12±3.54 ^b	18.81±7.71 ^b	322.88±27.70 ^b
双冬胶囊S7组	4.24±1.91 ^b	205.91±12.47 ^b	88.36±23.17 ^b	18.10±2.24 ^b	36.26±2.49 ^b	18.58±9.44 ^b	322.11±23.23 ^b
双冬胶囊S8组	4.67±1.14 ^b	198.18±13.60 ^b	85.80±27.37 ^b	19.33±1.72 ^b	36.50±2.22 ^b	18.09±9.81 ^b	322.44±39.35 ^b
双冬胶囊S9组	4.41±2.68 ^b	184.05±12.24 ^b	90.13±19.08 ^b	19.37±1.86 ^b	37.48±3.20 ^b	17.82±2.61 ^b	312.37±42.73 ^b
双冬胶囊S10组	5.40±2.06 ^b	183.47±37.30 ^b	91.11±26.01 ^b	19.36±2.05 ^b	36.92±3.07 ^b	18.45±7.25 ^b	313.08±16.61 ^b
双冬胶囊S11组	3.79±1.91 ^b	184.05±12.18 ^b	87.18±18.90 ^b	19.12±1.01 ^b	37.27±1.08 ^b	17.41±4.24 ^b	316.62±17.74 ^b
双冬胶囊S12组	5.09±2.63 ^b	167.20±19.24 ^b	89.55±21.23 ^b	17.82±8.01 ^b	37.42±2.63 ^b	18.94±3.26 ^b	317.03±21.65 ^b
双冬胶囊S13组	4.08±1.88 ^b	199.84±10.93 ^b	85.30±18.35 ^b	18.29±2.03 ^b	36.90±6.02 ^b	17.65±5.01 ^b	320.96±11.09 ^b
双冬胶囊S14组	3.40±1.03 ^b	186.95±15.15 ^b	86.88±20.60 ^b	19.95±5.62 ^b	38.59±1.27 ^b	20.19±1.60 ^b	318.41±27.74 ^b
双冬胶囊S15组	4.33±1.40 ^b	203.59±15.79 ^b	91.47±24.14 ^b	19.01±5.33 ^b	37.01±3.40 ^b	19.79±7.15 ^b	317.48±11.11 ^b

a: 与对照组比较, $P<0.01$; b: 与模型组比较, $P<0.01$ 。

2.3 双冬胶囊指纹图谱与炎症因子的灰色关联度分析

2.3.1 原始数据无量纲化处理

由于数据的物理意义不同,所以数据的量纲也不一定相同,不便于比较,或在比较时难以得到正确的结论,因此在进行灰色关联度分析时,需要将数据统一进行无量纲化处理^[10-11]。本研究以大鼠足肿胀率及炎症因子水平作为参考序列,记为 $Y(k), k=1, 2, 3, \dots, m$ 。以指纹图谱共有峰峰面积作为比较序列,记为 $X_i(k), i=1, 2, 3, \dots, n; k=1, 2, 3, \dots, m$ 。采用均值化法进行无量纲化处理。

2.3.2 灰色关联度分析

分别计算每个比较序列和参考序列所对应元素的关联系数 $A_i(k)$,具体公式为 $A_i(k) = \frac{\Delta_{\min} + \rho \Delta_{\max}}{\Delta_i(k) + \rho \Delta_{\max}}$ 。其中 $i=1, 2, 3, \dots, n; k=1, 2, 3, \dots, m; \rho$ 为分辨系数,一般取0.5; $\Delta_i(k)$ 是参考序列与比较序列的绝对差值; $\Delta_{\min}$ 是两极最小差值; $\Delta_{\max}$ 是两极最大差值。然后再根据公式计算关联度 r_i ,具体公式为 $r_i = \frac{1}{m} \sum_{k=1}^m A_i(k)$ 。其中 $i=1, 2, 3, \dots, n; k=1, 2, 3, \dots, m$ 。结果(表3)显示,15批双冬胶囊各共有峰峰面积与足肿胀率和MDA、SOD、PGE₂、IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 水平的关联度分别为0.621 1~0.783 5、0.564 3~0.827 9、0.581 0~0.845 3、0.564 9~0.855 0、0.583 1~0.856 4、0.576 5~0.863 5、0.564 1~0.838 0、0.572 5~0.851 3。由此可知,各共有峰对足肿胀率与炎症因子水平的贡献大小不一,提示双冬胶囊的抗炎作用是化学成分群共同作用的结果。当关联度大于0.6时,表示色谱峰代表的化学成分与药效指标有关联性;当关联度大于0.8时,表示色谱峰代表的

化学成分与药效指标有较强的关联性^[12]。综合可以发现,峰4(京尼平苷酸)、峰10(绿原酸)和峰2所代表的化学成分与抗炎药效指标的关联性较强,可能是双冬胶囊发挥药效的主要成分。

表3 各共有峰峰面积与足肿胀率和炎症因子水平的关联度

峰号	足肿胀率	MDA	SOD	PGE ₂	IL-6	IL-8	IL-1β	TNF-α
1	0.728 9	0.706 1	0.774 0	0.766 2	0.769 9	0.756 6	0.741 4	0.769 0
2	0.781 9	0.795 0	0.809 7	0.805 2	0.801 7	0.820 2	0.801 4	0.817 2
3	0.755 6	0.774 6	0.797 7	0.813 1	0.794 4	0.782 7	0.776 9	0.802 4
4	0.782 9	0.827 9	0.845 3	0.855 0	0.856 4	0.863 5	0.838 0	0.851 3
5	0.760 1	0.762 8	0.796 3	0.780 8	0.824 3	0.802 4	0.801 5	0.783 0
6	0.687 3	0.620 0	0.678 7	0.662 6	0.668 8	0.656 5	0.647 0	0.664 0
7	0.781 7	0.804 0	0.771 2	0.766 8	0.769 0	0.767 3	0.770 5	0.768 9
8	0.696 1	0.692 0	0.716 6	0.714 3	0.730 0	0.703 7	0.690 9	0.709 1
9	0.697 0	0.635 2	0.705 2	0.691 9	0.708 7	0.693 2	0.693 5	0.693 8
10	0.760 5	0.742 8	0.835 8	0.842 4	0.844 7	0.853 6	0.821 1	0.839 6
11	0.783 5	0.747 8	0.817 2	0.789 4	0.790 0	0.803 1	0.808 2	0.793 4
12	0.621 1	0.564 3	0.581 0	0.564 9	0.585 3	0.576 5	0.564 1	0.572 5
13	0.685 0	0.641 1	0.681 1	0.678 2	0.687 0	0.682 6	0.660 9	0.681 9
14	0.651 5	0.600 6	0.593 7	0.578 9	0.583 1	0.586 7	0.584 2	0.582 9
15	0.626 2	0.620 6	0.654 7	0.625 4	0.620 0	0.629 0	0.621 9	0.626 6
16	0.640 6	0.627 1	0.652 2	0.646 5	0.664 5	0.640 0	0.624 8	0.642 7
17	0.654 2	0.585 1	0.676 6	0.641 7	0.662 3	0.652 6	0.652 3	0.6474
18	0.631 0	0.615 0	0.638 9	0.627 8	0.638 4	0.617 3	0.610 0	0.626 8
19	0.717 2	0.697 4	0.754 6	0.744 8	0.735 5	0.737 2	0.736 7	0.745 7
20	0.740 2	0.682 5	0.763 2	0.758 3	0.772 4	0.763 3	0.759 2	0.760 4

3 讨论

3.1 双冬胶囊内容物提取方法及色谱条件的选择

实验前期本课题组分别考察了不同提取方式(回流、超声)、不同提取溶剂(甲醇、乙醇、50%甲醇、50%乙醇、70%甲醇、70%乙醇)、不同提取时间(20、30、40 min)对双冬胶囊内容物提取的影响,结果显示,采用50%甲醇超声提取20 min的效果最好。同时,实验前期本课题组还考察了不同流动相系统(水-乙腈、0.1%磷酸溶液-乙腈、0.1%甲酸溶液-乙腈)和不同柱温(20、25、30、35、40℃)对样品洗脱能力及色谱峰分离效果的影响,结果显示,采用0.1%磷酸溶液-乙腈为流动相、选择柱温30℃对样品洗脱和色谱峰分离效果最好。此外,实验前期本课题组对双冬胶囊内容物样品进行了全波长扫描,最终确定应用波长转化法进行检测并筛选了最佳的洗脱程序。

3.2 双冬胶囊抗炎作用炎症指标选择

足肿胀模型是常用于评价药物抗炎作用的经典急性炎症模型。给大鼠足趾注射角叉菜胶后,可使局部组织毛细血管扩张、水肿等,足肿胀率的变化则反映了足部肿胀的程度^[13]。机体在炎症反应发生时,TNF-α是最早分泌的一种强促炎因子,其在参与炎症反应的同时能诱导并调节IL-6、IL-8、IL-1β等,从而增强组织对TNF-α的敏感性^[14]。在炎症反应的过程中,PGE₂也是一种重要

的炎症介质,其在促进血管扩张的同时,还能增加炎症水肿,促进大量氧自由基生成,导致机体氧化产物增多、抗氧化能力降低,从而使机体损伤^[15]。MDA是自由基损伤的代谢产物,其在组织中的水平能间接地反映机体氧化应激损伤的程度;SOD能催化还原氧自由基生成过氧化氢,从而达到保护机体免受损伤的目的^[16]。因此,本研究选择足肿胀率和MDA、SOD、PGE₂、IL-6、IL-8、IL-1β、TNF-α水平作为药效评价指标。

3.3 双冬胶囊的谱效关系分析

本研究对15批双冬胶囊进行了HPLC分析,并建立了指纹图谱,筛选了20个共有峰,指认了8个共有峰。采用灰色关联度分析法将双冬胶囊HPLC指纹图谱与抗炎药效指标进行了关联分析,结果显示,与双冬胶囊抗炎作用具有较强关联性的是峰4(京尼平苷酸)、峰10(绿原酸)和峰2所代表的化学成分。由此可知,这些成分起着相互协同的作用,正符合中药复方“多成分、多靶点”综合作用的特点。

综上所述,本研究成功建立15批双冬胶囊的HPLC指纹图谱,其中京尼平苷酸、绿原酸等可能是其抗炎药效成分。

参考文献

[1] 刘青,罗天军,薛静,等. HPLC法测定双冬胶囊中栀子苷的含量[J]. 中国处方药,2015,13(8):23-24.
LIU Q, LUO T J, XUE J, et al. Determination of geniposide in Shuangdong capsules by HPLC[J]. J China Prescr Drug, 2015, 13(8):23-24.

[2] 薛静,黄刚,吴再猛,等. 双冬胶囊鉴别方法研究[J]. 亚太传统医药,2015,11(17):30-31.
XUE J, HUANG G, WU Z M, et al. Study on identification method of Shuangdong capsules[J]. Asia Pac Tradit Med, 2015, 11(17):30-31.

[3] 李莉,刘青,罗天军,等. 双冬胶囊对免疫功能的影响观察[J]. 亚太传统医药,2016,12(13):9-11.
LI L, LIU Q, LUO T J, et al. Effect of Shuangdong capsules on immune function[J]. Asia Pac Tradit Med, 2016, 12(13):9-11.

[4] 黄刚,罗天军,薛静,等. 双冬胶囊对膀胱收缩的影响[J]. 亚太传统医药,2016,12(13):16-17.
HUANG G, LUO T J, XUE J, et al. Effect of Shuangdong capsules on bladder contraction[J]. Asia Pac Tradit Med, 2016, 12(13):16-17.

[5] 杜秋莹,黄家宇,王彬宇,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS技术快速鉴定双冬胶囊的化学成分[J]. 中药材,2022,45(1):115-122.
DU Q Y, HUANG J Y, WANG B Y, et al. Rapid identification of chemical constituents of Shuangdong capsules

- based on UPLC-Q-TOF-MS technology[J]. J Chin Med Mater, 2022, 45(1):115-122.
- [6] 王坤,潘园园,刘怡清,等. 双冬胶囊联合氟喹诺酮类抗生素治疗社区获得性下尿路感染的临床研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2022, 21(15):1615-1618.
- WANG K, PAN Y Y, LIU Y Q, et al. Effect of Shuang-dong capsules combined with quinolones antibiotics in the treatment of community-acquired lower urinary tract infection[J]. J Clin Exp Med, 2022, 21(15):1615-1618.
- [7] LI S, HUANG X, LI Y, et al. Spectrum-effect relationship in Chinese herbal medicine: current status and future perspectives[J]. Crit Rev Anal Chem, 2023;1-22.
- [8] 王琳琳,牛晨冬,卢宜然,等. 中药材谱效关系研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2022, 43(4):379-383.
- WANG L L, NIU C D, LU Y R, et al. Research progress on the spectrum-effect relationships of traditional Chinese medicine[J]. J Qiqihar Med Univ, 2022, 43(4):379-383.
- [9] 邓东方,王鑫,姜帆,等. 乳痛软坚片抗炎镇痛及调节免疫药效作用的实验研究[J]. 中医药导报, 2024, 30(2):20-25.
- DENG D F, WANG X, JIANG F, et al. Experimental study on the anti-inflammatory, analgesic and immunoregulatory effects of Rutong ruanjian tablets[J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2024, 30(2):20-25.
- [10] 黄潇,刘婧,吴建华,等. 基于灰色关联法分析栀子提取物抗炎作用谱效关系[J]. 中成药, 2020, 42(1):233-237.
- HUANG X, LIU J, WU J H, et al. Analysis of spectral-effect relationship of anti-inflammatory effects of *Gardenia jasminoides* Ellis extract based on grey correlation method[J]. Chin Tradit Pat Med, 2020, 42(1):233-237.
- [11] 张强,杨宇婷. 中药谱效关系研究现状概述[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(3):680-683.
- ZHANG Q, YANG Y T. Overview of the research status of the relationship between spectrum and effect of traditional Chinese medicine[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2022, 33(3):680-683.
- [12] 孙琪,赵迪,刘悦,等. 正骨紫金丸HPLC指纹图谱及活血化瘀作用谱效关系研究[J]. 中药药理与临床, 2023, 39(11):18-24.
- SUN Q, ZHAO D, LIU Y, et al. Zhenggu zijin pills: HPLC fingerprint and its relationship with Huoxuehuayu effect[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2023, 39(11):18-24.
- [13] 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.
- MIAO Y Y, XU B H, XU J, et al. Establishment of HPLC fingerprint of *Lonicera japonica* and study on its anti-inflammatory spectrum-effect relationship[J]. China Pharm, 2020, 31(20):2497-2502.
- [14] 周昱杉. 止得咳颗粒抗炎谱效关系及质量分析研究[D]. 南宁:广西中医药大学, 2020.
- ZHOU Y S. Study on anti-inflammatory spectrum-effect and quality analysis of Zhideke granules[D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine, 2020.
- [15] 黄莉,王兴,罗黎霞,等. 银黄解毒消肿胶囊对急性咽炎模型鼠的抗炎止痛作用[J]. 中国药业, 2022, 31(2):32-35.
- HUANG L, WANG X, LUO L X, et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of Yinhuang jiedu xiaozhong capsules on acute pharyngitis in rats[J]. China Pharm, 2022, 31(2):32-35.
- [16] 何利,付志丽,熊燕,等. 芍药甘草汤抗胃溃疡作用的谱效关系[J]. 中国药房, 2022, 33(6):693-698.
- HE L, FU Z L, XIONG Y, et al. Spectrum-effect relationship of anti-gastric ulcer effect of Shaoyao gancao decoction[J]. China Pharm, 2022, 33(6):693-698.

(收稿日期:2023-10-18 修回日期:2024-03-11)
(编辑:唐晓莲)