

## 基于化学模式识别方法分析止得咳颗粒的抗炎谱效关系

周昱杉<sup>1</sup>, 梁洁<sup>1\*</sup>, 黄光强<sup>1</sup>, 黄冬芳<sup>1</sup>, 韦金玉<sup>1</sup>, 陈日兰<sup>2</sup>, 赵立春<sup>1\*</sup>

(1.广西中医药大学, 南宁 530200; 2.广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011)

**[摘要]** 目的:研究止得咳颗粒HPLC指纹图谱与抗炎作用的谱效关系,探索其抗炎药效物质基础。方法:采用HPLC建立10批止得咳颗粒的指纹图谱并进行色谱峰归属,流动相甲醇-0.2%磷酸水溶液梯度洗脱,检测波长254 nm。综合应用相似度评价,聚类分析(HCA),主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)评价止得咳颗粒批间质量差异。采用偏最小二乘法(PLS)将指纹图谱共有峰与二甲苯致小鼠耳肿胀和小鼠棉球肉芽肿的抑制率进行关联性分析,筛选出对抗炎药效作用贡献较大的色谱峰。结果:止得咳颗粒HPLC指纹图谱标定了31个共有峰,10批样品相似度均 $\geq 0.992$ 。HCA与PCA分析结果一致,均将样品分为3类;OPLS-DA结果发现15个成分是影响样品批间差异的主要标记物。不同批次止得咳颗粒样品均有不同程度的抗炎作用,PLS分析得出与抗炎作用呈正相关的色谱峰主要来自射干、黄芩,贡献较大的色谱峰为3,6,19,27~30号峰,其中28,30号峰依次为次野鸢尾黄素、汉黄芩素。结论:HPLC指纹图谱结合化学模式识别方法可为系统评价止得咳颗粒整体质量提供参考。止得咳颗粒对小鼠急、慢性炎症反应有一定的抑制作用,抗炎作用是多种成分共同作用的结果,射干、黄芩对该制剂发挥抗炎作用具有显著意义。

**[关键词]** 止得咳颗粒; 指纹图谱; 抗炎; 谱效关系; 高效液相色谱法(HPLC); 化学模式识别; 黄芩

**[中图分类号]** R22;R28;R364.5;O657.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)22-0156-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201646

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20200526.1052.001.html>

**[网络出版日期]** 2020-5-27 08:38

### Analysis on Spectrum-effect Relationship of Anti-inflammatory Effect of Zhideke Granules Based on Chemical Pattern Recognition

ZHOU Yu-shan<sup>1</sup>, LIANG Jie<sup>1\*</sup>, HUANG Guang-qiang<sup>1</sup>, HUANG Dong-fang<sup>1</sup>, WEI Jin-yu<sup>1</sup>,  
CHEN Ri-lan<sup>2</sup>, ZHAO Li-chun<sup>1\*</sup>

(1.Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China;

2.Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China)

**[Abstract]** **Objective:** The aim of this study was to research the relationship between HPLC fingerprint and anti-inflammatory effect of Zhideke granules, and the substance basis of its anti-inflammatory effect was preliminary explored. **Method:** The fingerprint of 10 batches of Zhideke granules were determined by HPLC, the mobile phase was consisted of methanol-0.2% phosphoric acid solution for gradient elution with a detection wavelength of 254 nm. Similarity analysis, hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were used to evaluate the quality difference between batches of Zhideke granules. The correlation analysis between the common peaks and the inhibition rates of Zhideke granules on ear swelling and cotton ball granuloma in mice was carried out by partial

**[收稿日期]** 20200314(018)

**[基金项目]** 广西创新驱动发展专项(桂科AA17202046);广西研究生教育创新计划项目(YCSY20190081);广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划项目(桂教人[2019]5号);广西高等学校高水平创新团队及卓越学者计划项目(2019-52)

**[第一作者]** 周昱杉,在读硕士,从事药品质量控制方法研究,Tel:0771-2279423,E-mail:769072235@qq.com

**[通信作者]** \*梁洁,博士,教授,从事中药药效物质基础与质量控制研究,Tel:0771-2279423,E-mail:liangjie1101@126.com;

\*赵立春,博士,研究员,从事中药民族药化学成分及药理活性研究,Tel:0771-2279423,E-mail:hyzlc@126.com

least squares (PLS), and the peaks greatly contributing to the anti-inflammatory effect were screened out. **Result:** There were 31 common peaks in the HPLC fingerprint of Zhideke granules. The similarities of 10 batches samples were  $\geq 0.992$ . The HCA and PCA analysis results were consistent, and the samples were divided into 3 categories. Combined with the OPLS-DA results, 15 components were the main markers affecting the differences of different batches of samples. Different batches of Zhideke granules differed in anti-inflammatory effect. The chromatographic peaks being positively correlated with the anti-inflammatory effect were mainly from *Belamcandae Rhizoma* and *Scutellariae Radix*, Chromatographic peaks 3, 6, 19, 27-30 had significant contribution to anti-inflammatory effect, of which peaks 28 and 30 were irisfloreantin and wogonin. **Conclusion:** HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition method can provide a reference for systematic evaluation of the overall quality of Zhideke granules. Zhideke granules has a certain inhibitory effect on acute and chronic inflammation in mice, and the anti-inflammatory effect is the result of the combined action of various ingredients, while *Belamcandae Rhizoma* and *Scutellariae Radix* have significant significance for the anti-inflammatory effect.

**[Key words]** Zhideke granules; fingerprint; anti-inflammatory; spectrum-effect relationship; high performance liquid chromatography (HPLC); chemical pattern recognition; *Scutellariae Radix*

止得咳颗粒为临床经验方,由龙脷叶、射干、桔梗、白前、黄芩、青天葵、枇杷叶、薄荷、荆芥、柴胡10味药材科学配伍组成的中药复方制剂,主治病证为外感咳嗽,具有宣肺、止咳、化痰、利咽的功效,用于上呼吸道感染,急、慢性支气管炎。方中龙脷叶性平,味甘、淡,入肺经,具清热化痰、止咳平喘之功;射干味苦,性寒,具有清热解毒、消痰、利咽之功效,亦归肺经;二者共为君药。桔梗辛散苦泄,归肺经,善于开宣肺气、祛痰利气,白前味辛、苦,性微寒,长于降气化痰,二者协同,一宣一降,以复肺气之宣降,增强君药宣肺止咳之力;黄芩清肺泻火,三者共为臣药。青天葵清肺止咳,散瘀消肿;枇杷叶清肺止咳,还能祛痰、平喘;荆芥、薄荷疏风解表,以祛在表之邪,还能利咽;柴胡和解表里,退热,五者均为佐使之用。诸药合用,使上焦风热得以疏散,肺气得以宣降则咳嗽止,临床试验中验证该方疗效显著、副作用少且毒性低、安全稳定<sup>[1]</sup>。

李戎等<sup>[2]</sup>在国内提出创建中药谱效学,将指纹图谱作为研究基础,与药效评价相结合,通过数理统计方法,探索指纹图谱体现的中药成分信息与中药药效之间的关系。中药谱效关系研究的推广与应用为深入研究中药材和中成药的药效物质基础提供了新方法、新思路,有助于提高产品的质量标准和整体质量水平<sup>[3-4]</sup>。偏最小二乘回归分析是一种建立在主成分分析、典型相关分析和多元线性回归分析3种方法基础上的多元统计分析方法<sup>[5]</sup>。在中药谱效关系研究中应用该方法时,自变量为指纹图谱中各共有峰的峰面积,因变量为药效指标数

据,采用SIMCA-P, MATLAB等软件进行偏最小二乘回归模型拟合,可初步反映各色谱峰所代表的成分对药效作用的贡献程度,筛选出与药效相关的特征峰<sup>[6]</sup>。主要参数包括标准化回归系数和变量重要性投影(VIP)值。标准化回归系数的正负表示自变量与因变量的相关性,即正相关或负相关,其绝对值的大小可体现自变量对因变量的贡献大小。VIP值可反映自变量对因变量的重要程度, VIP值越大,自变量解释因变量的能力就越强。通常认为VIP值 $>1$ 且误差线不超过原点的自变量是有意义的自变量,其在解释因变量时的重要性显著,即对药效具有显著性贡献<sup>[7-8]</sup>。

止得咳颗粒现行的质控方法仅用简单的薄层定性鉴别以及黄芩苷、次野鸢尾黄素2个指标成分定量分析表征该制剂的质量<sup>[9]</sup>,目前尚无指纹图谱及药效学相关方面的研究报道。基于此,本研究采用HPLC建立10批止得咳颗粒的指纹图谱并进行色谱峰归属,对止得咳颗粒的抗炎药效进行实验研究和初步疗效评价。在此基础上,从HPLC指纹图谱与抗炎药效的相关性入手,通过偏最小二乘回归分析法研究该制剂的谱效关系,初步探讨其抗炎药效物质基础,为全面阐释止得咳颗粒的药效物质基础提供实验依据,并为其质量标准改进提供参考。

## 1 材料

1100系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司), AFZ-1001-U型超纯水系统(重庆颐洋企业发展有限公司), TGL-16G型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂), XS104型电子分析天平(瑞士梅特勒-

托利多仪器有限公司), YXQ-LS-50S11型立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂), DHG-9240A型电热恒温鼓风干燥箱(上海焯南仪器有限公司)。

10批止得咳颗粒由广西中医药大学附属瑞康医院提供, 编号S1~S10, 批号依次为20181201, 20181202, 20181203, 20181204, 20190101, 20190102, 20190103, 20190701, 20190702, 20190703; 黄芩苷, 柴胡皂苷d, 汉黄芩素, 次野鸢尾黄素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为110715-201720, 110778-201711, 111514-201706, 111557-201703, 纯度依次为93.5%, 95.8%, >98%, 99.9%); 醋酸氢化可的松片(上海上药信谊药厂有限公司, 批号019180401), 生理盐水(回音必集团江西东亚制药有限公司, 批号2019061716), 水为超纯水, 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

SPF级雄性昆明种小鼠, 体质量18~22 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号SCXK(湘)2016-0002。饲养温度20~25℃, 相对湿度50%~60%, 日光照与黑暗时间各12 h, 并按3R原则给予人道关怀。本文涉及的动物实验经广西中医药大学伦理委员会批准, 批准号DW2019115-33。

## 2 方法与结果

### 2.1 HPLC指纹图谱的建立

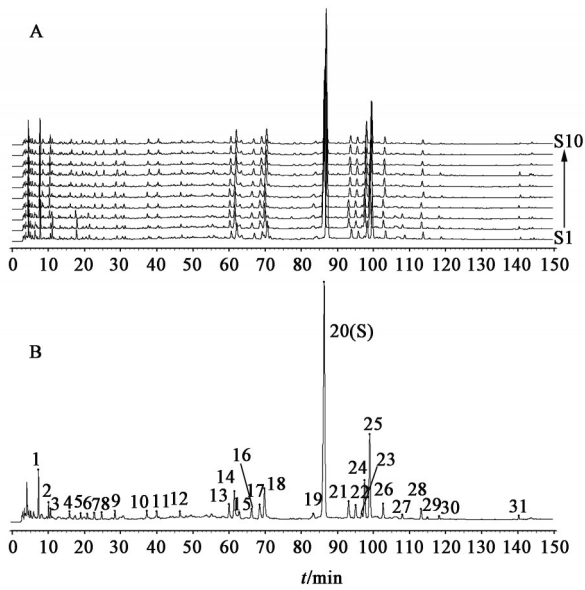
**2.1.1 溶液的制备** 取止得咳颗粒2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇10 mL, 称质量, 超声提取30 min(功率250 W, 频率50 kHz), 放冷, 用甲醇补足减失量, 于13 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min(离心半径6 cm), 取上清液作为供试品溶液。按止得咳颗粒处方配比(龙脷叶22.2 g, 射干22.2 g, 桔梗22.2 g, 白前22.2 g, 黄芩14.8 g, 青天葵14.8 g, 枇杷叶22.2 g, 薄荷14.8 g, 荆芥14.8 g, 柴胡22.2 g)分别称取缺龙脷叶、缺射干、缺黄芩等各药味的10份复方, 加12倍量水煎煮3次, 每次1 h, 合并3次滤液, 减压浓缩至所需生药质量浓度的浸膏, 按浸膏-蔗糖-糊精(1:1:2)的比例与辅料混合, 以适量75%乙醇作为润湿剂, 进行湿法制粒, 60℃干燥1 h, 整粒, 得到各阴性颗粒, 按供试品溶液的制备方法制得阴性供试品溶液。按止得咳颗粒处方配比称取龙脷叶、射干、黄芩等10味药材, 各味药按上述工艺提取后制备单味药浸膏, 按供试品溶液的制备方法制得各单味药溶液。分别称取次野鸢尾黄素、黄芩苷、汉黄芩素、柴胡皂苷d适量, 精密称定, 加甲醇制成混合对照品溶液, 即得。

**2.1.2 HPLC 色谱条件** 采用Agilent ZORBAX Eclipse Plus-C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相选择甲醇(A)-0.2%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~30 min, 5%~20%A; 30~50 min, 20%~35%A; 50~75 min, 35%~40%A; 75~110 min, 40%~60%A; 110~150 min, 60%~90%A), 流速设定0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温30℃, 检测波长254 nm, 进样量10 μL。

**2.1.3 方法学考察** 取样品S1, 按2.1.1项下方法制备供试品溶液, 按2.1.2项下色谱条件连续进样6次, 计算各共有峰相对保留时间的RSD均<1.0%, 相对峰面积的RSD均<5.0%, 表明仪器精密良好。取样品S1的供试品溶液适量, 分别在制备后0, 4, 8, 12, 24, 48 h按2.1.2项下色谱条件进样分析, 计算各共有峰相对保留时间的RSD均<1.0%, 相对峰面积的RSD均<5.0%, 表明供试品溶液在48 h内稳定性良好。取6份样品S1, 按2.1.1项下方法制备供试品溶液, 按2.1.2项下色谱条件进样分析, 计算各共有峰相对保留时间的RSD均<1.0%, 相对峰面积的RSD均<5.0%, 表明该方法重复性良好。

**2.1.4 指纹图谱的建立及化学成分的指认** 取样品S1~S10, 按2.1.1项下方法制备供试品溶液, 按2.1.2项下色谱条件进样分析, 记录10批样品的色谱图。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”(2012.1版本)软件中, 将样品S1的色谱图设为参照图谱, 采用中位数法经多点校正进行谱峰匹配, 生成共有模式对照图, 确定了31个共有峰, 见图1。将混合对照品溶液进样分析对各色谱峰进行指认, 确定20号峰为黄芩苷, 28号峰为次野鸢尾黄素, 30号峰为汉黄芩素, 31号峰为柴胡皂苷d, 见图2。其中黄芩苷的含量高、峰面积大、出峰时间适宜且稳定, 故选用20号峰(黄芩苷)作为参照峰(S)。

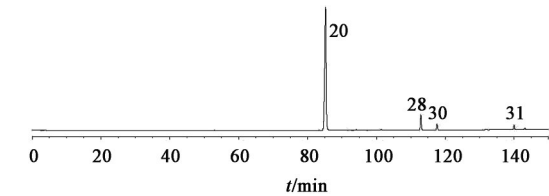
**2.1.5 共有峰的归属** 取2.1.1项下各单味药溶液、供试品溶液、阴性供试品溶液适量, 按2.1.2项下色谱条件测定, 将各单味药、阴性颗粒、止得咳颗粒的指纹图谱进行重叠比较, 对复方指纹图谱的共有峰进行归属分析。结果发现成品指纹图谱31个共有峰中有26个特征峰可以在原料药材中找到明确归属, 2个色谱峰为多药材共有峰。其中, 4, 5, 7, 9号峰来源于龙脷叶; 6, 11号峰来源于枇杷叶; 12, 14, 15, 17, 18, 26, 28号峰来源于射干; 13, 16, 20~25, 27, 29, 30号峰来源于黄芩; 19号峰来源于青天葵; 31号峰来源于柴胡; 8号峰同时归属于龙脷叶、枇杷叶2味原料药材, 10号峰同时归属于青天葵、枇杷叶



A. 叠加指纹图谱; B. 对照指纹图谱

图1 止得咳颗粒的HPLC指纹谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of Zhideke granules

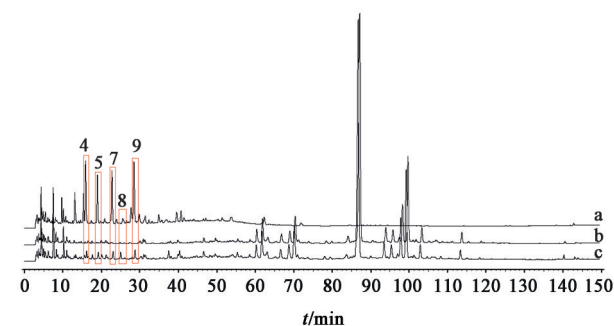


20. 黄芩苷; 28. 次野鸢尾黄素; 30. 汉黄芩素; 31. 柴胡皂苷d

图2 混合对照品的HPLC

Fig. 2 HPLC chromatogram of mixed reference substance

2味原料药材。另外,1~3号峰未归属到原料药材,可能为多化学成分相互作用的产物,也可能是生产过程中的其他因素产生的,有待于进一步研究。较为显著的单味药、阴性颗粒、止得咳颗粒对照图谱见图3~8。



a. 单味药材; b. 阴性颗粒; c. 止得咳颗粒(图4~8同)

图3 龙胆叶、阴性颗粒及止得咳颗粒的HPLC比较

Fig. 3 Comparison of HPLC chromatograms of Sauropi Folium, negative granules and Zhideke granules

**2.1.6 相似度评价** 在止得咳颗粒经HPLC检测得到的色谱图中,黄芩苷色谱峰峰面积较大且峰高过

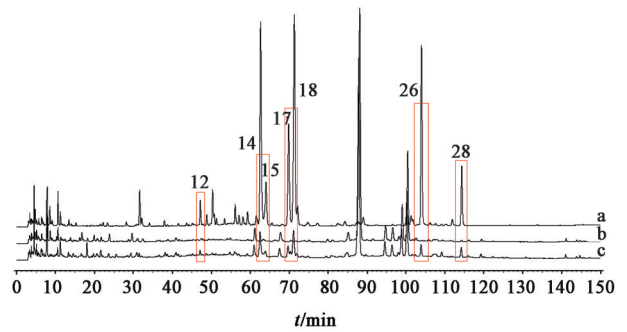


图4 射干、阴性颗粒及止得咳颗粒的HPLC比较

Fig. 4 Comparison of HPLC chromatograms of Belamcandae Rhizoma, negative granules and Zhideke granules

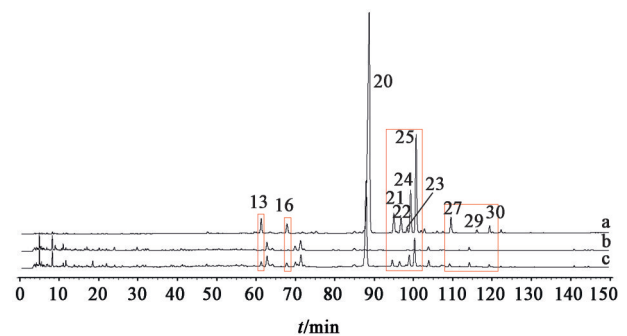


图5 黄芩、阴性颗粒及止得咳颗粒的HPLC比较

Fig. 5 Comparison of HPLC chromatograms of Scutellariae Radix, negative granules and Zhideke granules

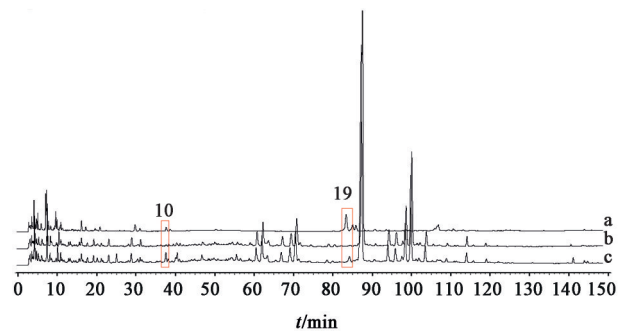


图6 青天葵、阴性颗粒及止得咳颗粒的HPLC比较

Fig. 6 Comparison of HPLC chromatograms of Nervilia fordii leaves, negative granules and Zhideke granules

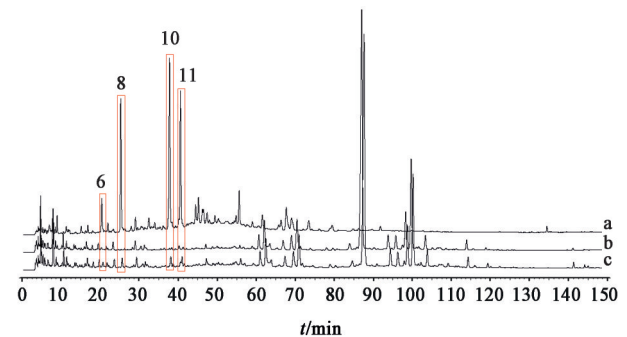


图7 枇杷叶、阴性颗粒及止得咳颗粒的HPLC比较

Fig. 7 Comparison of HPLC chromatograms of Eriobotryae Folium, negative granules and Zhideke granules

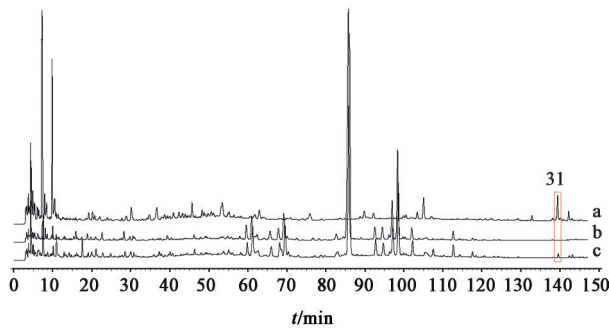


图8 柴胡、阴性颗粒及止得咳颗粒的HPLC比较  
Fig. 8 Comparison of HPLC chromatograms of Bupleuri Radix, negative granules and Zhideke granules

高,与其他色谱峰相比差异太大,以致于其在相似度评价中占据了主导作用,使指纹图谱相似度结果均 $>0.999$ ,故考虑将黄芩苷色谱峰去除后重新计算相似度,以保证相似度的准确性<sup>[10-11]</sup>。结果样品S1~S10的指纹图谱与对照指纹图谱的相似度分别为0.992, 0.993, 0.993, 0.998, 0.994, 0.998, 0.999, 0.999, 0.995, 0.997。

**2.1.7 聚类分析(HCA)** 运用HCA对止得咳颗粒样品的指纹图谱进行分析,将10批样品的共有峰峰面积作为变量导入SPSS 23.0软,选择离差平方和法(Ward's Method),以欧氏距离(Euclidean distance)作为样品的度量标准,见图9。结果发现当类间距离介于10~15时,10批止得咳颗粒可分为三大类,其中样品S4和S6~S10聚为第一类,样品S3和S5聚为第二类,样品S1和S2聚为第三类。第一类又可继续分为更小的类别,说明在同一类别里样品S9与S4, S6~S8, S10相差较大。提示在制备工艺相同的条件下,不同批次样品间也有一定差异,且差异与去除黄芩苷色谱峰后的相似度结果较为一致。

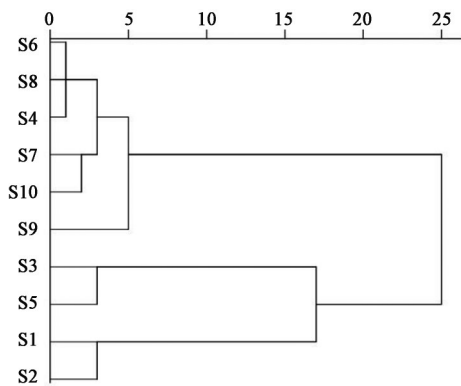


图9 10批止得咳颗粒的聚类分析  
Fig. 9 Hierarchical cluster analysis of 10 batches of Zhideke granules

**2.1.8 主成分分析(PCA)** 将样品S1~S10的共有峰峰面积导入SIMCA 14.1进行PCA,从31个变量中共提取5个主成分,累积方差贡献率达93.3%,能比较全面地反映样品的信息。其中第一、第二主成分的累积贡献率72.5%,表明前2个主成分能够比较充分地体现出止得咳颗粒的基本特征和主要信息。因此,以前2个主成分为坐标轴构建主成分二维平面,在缺少部分信息的条件下,将样本的多元变量以降维的方式投影在二维平面上,观察样品的自然聚集,见图10。结果发现样品S4, S6~S10出现较为明显的分类,样品S1和S2可分为一类,样品S3和S5均出现离群现象但彼此距离较近可分为另一类。其结果与聚类分析结果一致,又与去除黄芩苷色谱峰后所得样品相似度结果相符。综上分析,说明黄芩苷主导峰峰面积过大及峰高过高,确实会对相似度评价结果的准确性造成影响,将其去除后再进行相似度评价,结果更准确且更接近实际情况。

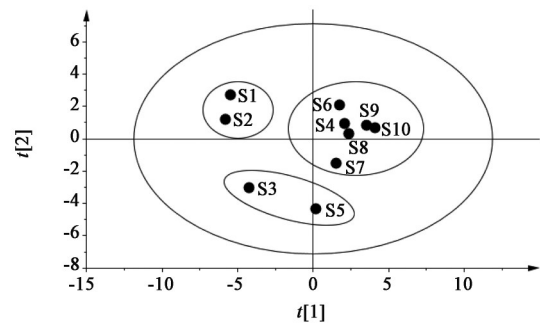


图10 10批止得咳颗粒的PCA得分  
Fig. 10 PCA score scatter plot of 10 batches of Zhideke granules

载荷图中每个点代表1个色谱峰,表示每个色谱峰对主成分综合作用的贡献,其变量的权重值可最大程度地反映化学成分与样品质量的相关性,距离载荷图原点越远的变量权重越大<sup>[12-13]</sup>。通过比较权重值大小,对第1主成分影响较大的有1, 11, 13, 16, 22, 26, 31号色谱峰,对第2主成分影响较大的有3, 6, 27, 28, 30号色谱峰,说明这些色谱峰可能对止得咳颗粒的质量具有较大影响,见图11。

**2.1.9 正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)** 为了研究样品间产生差异的化学成分,根据HCA和PCA所得分类结果,使用SIMCA 14.1软件进行监督模式识别方法OPLS-DA建模分析。OPLS-DA模型验证的3个关键参数可用于评价模型的质量, $R^2X$ 可概括X矩阵结实率, $R^2Y$ 反映模型的稳定性, $Q^2$ 反映模型的预测性,三者的数值越接近1说明模型的拟合程度和预测能力越好<sup>[14]</sup>。结果 $R^2X=$

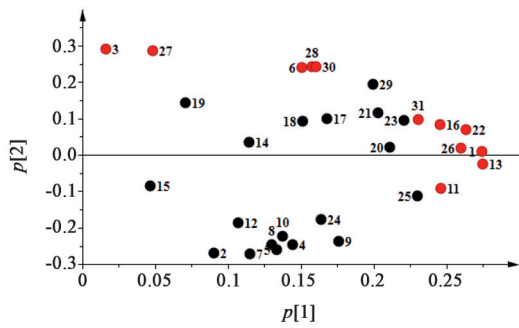


图11 10批止得咳颗粒的PCA载荷  
Fig. 11 PCA loading scatter plot of 10 batches of Zhideke granules

0.832,  $R^2Y=0.915$ ,  $Q^2=0.669$ 。提取 OPLS-DA 模型中 31 个变量的 VIP 值研究共有峰对差异产生的影响, 见图 12, 以 VIP 值 > 1.0 且误差线不超过原点为选取原则, 筛选得到了 15 个影响较大的色谱峰, 从大到小排序依次为峰 14 > 峰 15 > 峰 18 > 峰 5 > 峰 27 > 峰 7 > 峰 3 > 峰 8 > 峰 2 > 峰 9 > 峰 10 > 峰 30 (汉黄芩素) > 峰 28 (次野鸢尾黄素) > 峰 4 > 峰 6。载荷图分析结果见图 13, 结果显示上述 15 种成分均离原点距离较远, 与图 12 结果一致。提示这 15 个色谱峰的差异对样品分类的影响较大, 这些成分可能是导致样品批间差异的主要标志性成分。

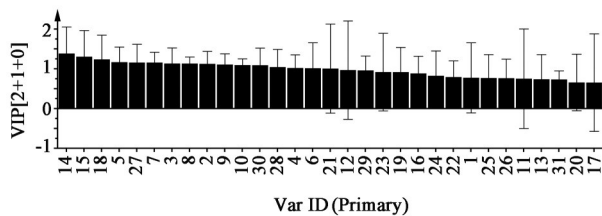


图12 10批止得咳颗粒 OPLS-DA 模型的 VIP 值  
Fig. 12 VIP values of OPLS-DA model of 10 batches of Zhideke granules

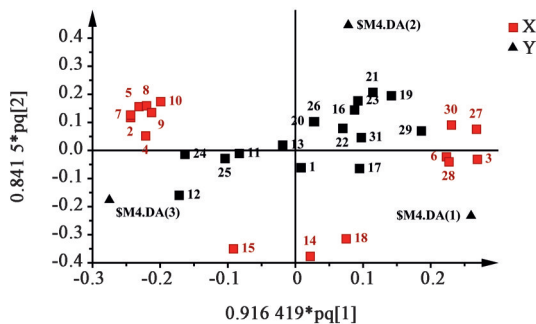


图13 10批止得咳颗粒 OPLS-DA 模型的载荷散点  
Fig. 13 OPLS-DA loading scatter plot of 10 batches of Zhideke granules

## 2.2 抗炎作用

### 2.2.1 二甲苯致小鼠耳肿胀试验 取小鼠 120 只,

随机分为 12 组, 每组 10 只, 灌胃给药, 每天 1 次, 给药体积均为  $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ , 连续 7 d。模型组给予等体积水, 阳性药组给予醋酸氢化可的松片 (给药剂量  $0.003 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 试验组给予止得咳颗粒 (给药剂量  $4.550 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。末次给药 1 h 后各小鼠右耳廓滴二甲苯溶液  $0.02 \text{ mL}$  致炎。致炎 2 h 后脱颈椎处死小鼠, 沿耳根部剪下两耳, 用 8 mm 打孔器在两耳同部位等面积打下耳片, 电子天平称质量, 以右耳减去左耳的差值作为肿胀度, 计算肿胀抑制率。二者计算公式分别为肿胀度 = 致炎耳耳片重 - 正常耳耳片重, 抑制率 = [(模型组平均肿胀度 - 给药组平均肿胀度) / 模型组平均肿胀度]  $\times 100\%$ 。采用 SPSS 23.0 软件分析实验数据, 正态计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义, 见表 1。结果与模型组比较, 10 批止得咳颗粒样品对小鼠耳肿胀均有明显抑制作用 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 且作用不等, 原因可能是各批次原料药的来源等因素有所不同, 使得制剂中各药效成分的含量不同, 从而抗炎药效存在一定差异。

### 2.2.2 小鼠棉球肉芽肿试验

取小鼠 120 只, 用 5% 水合氯醛麻醉 ( $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 在每只小鼠的左、右腋下用碘酒消毒, 75% 乙醇棉球脱碘后, 切口, 用眼科镊子将 2 个 10 mg 灭菌棉球从切口处植入皮下, 随即缝合皮肤。术后第 1 天将小鼠随机分组, 分组、给药方法同 2.2.1 项。第 8 天脱颈椎处死小鼠打开原切口, 将棉球连同周围结缔组织一起取出, 剔除脂肪组织, 置烘箱中  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  烘 12 h, 称质量, 计算各组肉芽肿干重和抑制率。计算公式分别为肉芽肿干重 = 烘干后的棉球质量 - 原始棉球质量 (10 mg), 抑制率 = [(模型组平均肉芽肿干重 - 给药组平均肉芽肿干重) / 模型组平均肉芽肿干重]  $\times 100\%$ 。实验数据统计方法同 2.2.1 项, 见表 1。结果发现与模型组比较, 10 批止得咳颗粒对小鼠棉球肉芽肿均有明显抑制作用 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 与耳肿胀试验结果一致, 说明各批次止得咳颗粒抗炎药效作用相对稳定。

## 2.3 HPLC 指纹图谱与抗炎作用的相关性分析

以 HPLC 指纹图谱 31 个共有峰的峰面积作为自变量, 不同批次止得咳颗粒对二甲苯致小鼠耳肿胀、棉球植入致小鼠炎症的抑制率作为因变量, 导入 SIMCA 14.1 作 PLS 模型拟合, 偏回归系数和 VIP 值见图 14, 15。结果表明止得咳颗粒 HPLC 指纹图谱中的 3, 6, 8, 13, 16, 19, 20, 22, 24~30 号峰与小鼠耳肿胀的抑制作用呈正相关, 3, 6, 13, 16, 19~23, 26~31 号峰与小鼠棉球肉芽肿抑制作用呈正相关,

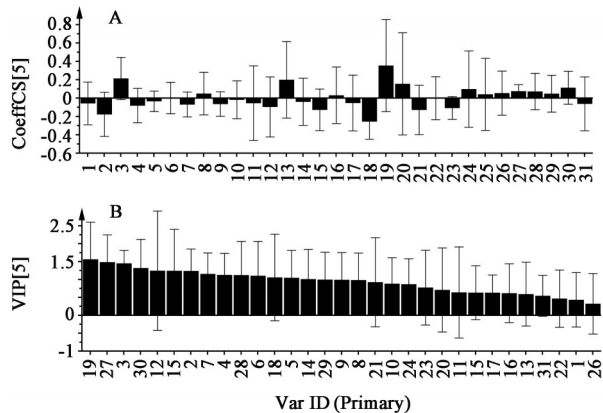
表1 10批止咳颗粒的抗炎作用考察(n=10)

Table 1 Anti-inflammatory effect of 10 batches of Zhideke granules(n=10)

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	耳肿胀试验		棉球肉芽肿试验	
		肿胀度( $\bar{x}\pm s$ )/mg	抑制率/%	肉芽肿干重( $\bar{x}\pm s$ )/mg	抑制率/%
模型	-	9.67±2.27	-	35.49±7.32	-
醋酸氢化可的松	0.003	3.06±1.19 <sup>2)</sup>	68.36	25.91±5.42 <sup>2)</sup>	26.99
S1	4.550	4.42±2.37 <sup>2)</sup>	54.29	24.37±5.19 <sup>2)</sup>	31.33
S2	4.550	4.32±1.65 <sup>2)</sup>	55.33	24.00±7.15 <sup>2)</sup>	32.38
S3	4.550	3.75±1.51 <sup>2)</sup>	61.22	22.49±4.17 <sup>2)</sup>	36.63
S4	4.550	5.69±2.62 <sup>2)</sup>	41.16	27.49±5.12 <sup>2)</sup>	22.54
S5	4.550	4.98±1.80 <sup>2)</sup>	48.50	24.97±9.11 <sup>2)</sup>	29.64
S6	4.550	7.59±2.65 <sup>1)</sup>	21.51	29.48±2.74 <sup>1)</sup>	16.93
S7	4.550	6.91±2.83 <sup>2)</sup>	28.54	28.56±5.13 <sup>2)</sup>	19.53
S8	4.550	7.28±1.99 <sup>1)</sup>	24.72	28.81±5.04 <sup>1)</sup>	18.82
S9	4.550	6.04±1.17 <sup>2)</sup>	37.54	28.06±5.67 <sup>2)</sup>	20.94
S10	4.550	6.60±1.94 <sup>2)</sup>	31.75	28.15±5.37 <sup>2)</sup>	20.68

注:与模型组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01。

即这些色谱峰相对质量分数增加,抑制作用增强。在与小鼠耳肿胀、棉球肉芽肿抑制作用呈正相关的色谱峰中,3,6,19,27~30号色谱峰的VIP值均>1,说明这7个色谱峰对抗炎作用影响较显著。



A. 偏回归系数;B.VIP值(图15同)

图14 止咳颗粒共有峰峰面积与其对小鼠耳肿胀抑制率的相关性分析

Fig. 14 Correlation analysis between peak areas of common peaks and inhibition rates of ear swelling in mice of Zhideke granules

综上所述,止咳颗粒HPLC指纹图谱共有峰与二甲苯致小鼠耳肿胀,棉球植入致小鼠炎症抑制作用的相关性PLS分析结果较为一致,3,6,19,27~30号色谱峰均为止咳颗粒与抗炎作用关联性较大的正相关峰。此外,还有一些色谱峰与小鼠耳肿胀、棉球肉芽肿的抑制作用呈正相关性,其也有可能对止咳颗粒的抗炎作用发挥有一定贡献。结

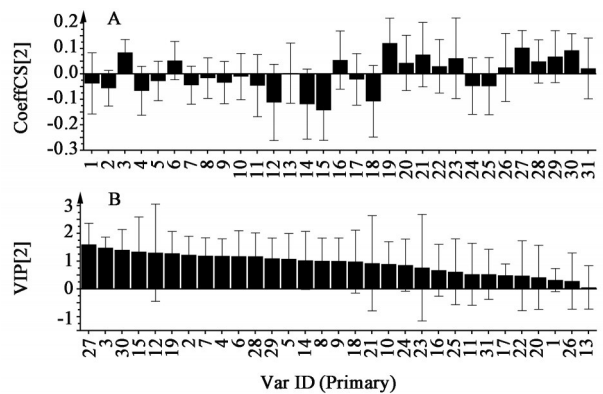


图15 止咳颗粒共有峰峰面积与其对小鼠棉球肉芽肿抑制率的相关性分析

Fig. 15 Correlation analysis between peak areas of common peaks and inhibition rates of cotton ball granuloma in mice of Zhideke granules

合止咳颗粒HPLC指纹图谱共有峰的归属,与抗炎作用呈正相关的色谱峰主要来自黄芩、射干,提示二者对止咳颗粒发挥抗炎作用具有显著意义。

### 3 讨论

本实验建立的10批止咳颗粒HPLC指纹图谱的相似度均 $\geq 0.992$ ,表明该颗粒的稳定性良好、主要化学成分较一致,但31个共有峰的含量具有一定差异,可能是由于样品生产的时间不同,其原料药产地、采摘时间等也有所不同。在相似度分析的基础上,结合多种化学模式识别方法,采用HCA和PCA对10批样品共有峰的数据信息进行分类研究,明确样品之间的聚类情况,结果10批样品均被分为

三类,验证了相似度分析结果;通过 OPLS-DA 探索影响批次间分组的差异性成分,筛选出对分组影响较大的 15 个色谱峰。所建立的 HPLC 指纹图谱可用于止得咳颗粒的质量控制,有利于保证产品的稳定性、均一性,可为全面控制止得咳颗粒的质量提供参考。

参照止得咳颗粒成品指纹图谱的建立方法,对原药材与成品色谱峰的相关性进行了初步研究,止得咳颗粒 HPLC 指纹图谱中 31 个色谱峰主要来源于黄芩、射干、龙脷叶、枇杷叶、青天葵、柴胡 6 味药材,对指纹图谱贡献最大的是黄芩,其次是君药射干和龙脷叶。处方中薄荷<sup>[15]</sup>和荆芥<sup>[16]</sup>主要含有挥发油类化合物,桔梗<sup>[17]</sup>、柴胡<sup>[18]</sup>等药材所含的皂苷类成分处于紫外吸收末端,故而在本实验条件下未检出相应色谱峰,而白前<sup>[19]</sup>药效成分暂不明确,这些药材所含成分的色谱峰均未能在成品特征图谱中有所体现,有待于深入研究进行探索。

在药效实验研究中,小鼠给药剂量根据止得咳颗粒的临床用量按体质量换算为小鼠等效剂量。结果表明 10 批止得咳颗粒均有一定的抗炎作用。PLS 分析结果显示,在止得咳颗粒 HPLC 指纹图谱的 31 个共有峰中,与小鼠耳肿胀、棉球肉芽肿抑制作用呈正相关的色谱峰均有 15 个,说明止得咳颗粒是通过有效组分群共同发挥抗炎作用,确定 3, 6, 19, 27~30 号色谱峰可能是其发挥抗炎作用贡献较大的药效物质。

由于实验条件有限,未对止得咳颗粒的全谱化学成分进行结构鉴定,仅通过对照品指认了 4 个成分,对药效作用贡献度较高的化学成分还有待深入研究。本实验仅采用单个波长建立止得咳颗粒的指纹图谱,并研究其与抗炎作用的谱效关系,存在一定局限性,且止得咳颗粒所含物质极性范围较广,HPLC 梯度洗脱时间也较长。下一步考虑采用 UPLC 结合蒸发光散射检测器(ELSD)建立多波长指纹图谱,结合多个药效指标更加全面地研究止得咳颗粒的药效物质基础。此外,本研究建立的止得咳颗粒指纹图谱是单纯的化学指纹图谱,后续将根据该制剂的药效建立血清指纹图谱,并对其入血成分的谱效关系进行研究,以明确其药效物质基础。

#### [参考文献]

[1] 辛静,李丽丽,凌爱思.止得咳冲剂治疗支气管哮喘急性发作期的临床观察[J].广西中医药大学学报,2013,16(1):35-36.

[2] 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.

[3] 秦昆明,郑礼娟,沈保家,等.谱效关系在中药研究中的应用及相关思考[J].中国中药杂志,2013,38(1):26-31.

[4] 张小艺,刘久石,高石曼,等.中药谱效关系的研究方法及应用进展[J].中国中药杂志,2019,44(20):4405-4411.

[5] 白关亚.基于谱效关联研究青翘与老翘的药效物质基础[D].太原:山西省中医药研究院,2017.

[6] 潘杰,刘德胜,颜贵明.数据分析应用于中药谱效关系中的研究进展[J].中医药学报,2018,46(4):119-122.

[7] 李姣姣,于猛,高源,等.基于谱效关系的中药虎杖抗炎活性成分探讨[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(12):208-213.

[8] 孙亮亮,吴剑,张叶,等.基于偏最小二乘回归分析法怀牛膝药材抗炎镇痛谱效关系[J].中成药,2018,40(12):2786-2792.

[9] 黄敏,黄国东,韦瑀龙,等.止得咳颗粒质量标准的研究[J].中国医药导报,2018,15(30):106-110,182.

[10] 孙如煜,李鹏跃,杜守颖,等.基于中药指纹图谱结合模式识别的清开灵硬胶囊批次间稳定性控制研究[J].中华中医药杂志,2017,32(10):4629-4633.

[11] 滕会会,杜守颖,白洁,等.基于中药指纹图谱结合化学模式识别的清开灵软/硬胶囊的成分分析[J].环球中医药,2016,9(6):671-677.

[12] 杨光.基于物质基础表征与新型化学模式识别方法的辛夷质量控制与药动力学研究[D].上海:第二军医大学,2017.

[13] 姜建萍,王美琪,马雯芳,等.基于多种分析模式构建壮药滇桂艾纳香 HPLC 指纹图谱[J].中药材,2018,41(1):124-128.

[14] 李潮,于欢,温柔,等.江西不同产区车前子药材的 HPLC 指纹图谱及其多成分化学模式识别分析[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(15):161-167.

[15] 沈梅芳,李小萌,单琪媛.薄荷化学成分与药理作用研究新进展[J].中华中医药学刊,2012,30(7):1484-1487.

[16] 泽仁拉姆,普珍,卓玛东智,等.荆芥的化学成分和药理作用[J].现代医药卫生,2014,30(2):215-217.

[17] 孙强,蒙艳丽,吴秉纯,等.桔梗化学成分及药理作用的研究概况[J].黑龙江中医药,2017,46(4):64-65.

[18] 颜美玲,杨柳,侯阿娇,等.柴胡化学成分及药理作用研究进展[J].中医药信息,2018,35(5):103-109.

[19] 刘洋,王四旺,唐志书.白前的现代研究与开发应用前景[J].西北药学杂志,2015,30(6):768-770.

[责任编辑 刘德文]