

金泽排石颗粒指纹图谱的建立及对环氧合酶-2 的抑制作用

向采芹¹, 侯丰爵¹, 冯建安², 黄 嫣², 黄玉普², 李 希^{1,2*}

1. 成都中医药大学, 四川 成都 610072

2. 四川省中医药科学院中医研究所, 四川 成都 610031

摘要:目的 建立10个不同批次金泽排石颗粒的HPLC指纹图谱,并初步建立其抗炎生物活性效价检测方法,构建环氧合酶-2(COX-2)与金泽排石颗粒的量效关系,科学评价并有效控制颗粒的质量。方法 采用HPLC法分析10个不同批次金泽排石颗粒共有峰的相似性,并将19个共有峰归属到药材,将相似性结合SPSS统计软件聚类分析以及主成分分析结果评价10批次颗粒;用酶免疫法测定金泽排石颗粒对COX-2的半数抑制浓度(IC₅₀)。结果 10个批次金泽排石颗粒的HPLC指纹图谱的相似性均≥0.955,聚类分析和主成分分析结果与相似性结果具有一致性。金泽排石颗粒对COX-2有明显的抑制作用,IC₅₀为10.272 mg/mL,具有明显的量效关系。结论 采用化学指纹图谱与生物活性检测多元质控体系,具有高效、快速、准确、灵敏、重现性好等特点,可以有效地评价金泽排石颗粒的抗炎生物活性,更加科学合理地控制其质量,也为其他中药制剂建立更加科学的质量控制标准提供了参考。

关键词: 金泽排石颗粒; 指纹图谱; 环氧合酶-2; 生物活性评价; 酶免疫测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)12-2937-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.12.031

Establishment of Jinzepaishi Granules fingerprint and evaluation of its anti-inflammatory activity for cyclooxygenase-2

XIANG Cai-qin¹, HOU Feng-jue¹, FENG Jian-an², HUANG Yan², HUANG Yu-pu², LI Xi^{1,2}

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China

2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Sichuan Academy of Chinese Medical Sciences, Chengdu 610031, China

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprints of Jinzepaishi Granules from ten different batches and a preliminary method for its anti-inflammatory biological activity titer detection, and construct a dose-effect relationship between cyclooxygenase-2 (COX-2) and Jinzepaishi Granules for scientific evaluation and effective control of granules quality. **Methods** The HPLC method was used to analyze the similarity of common peaks in different batches of granules and assigned 19 common peaks to herbs. The fingerprints were further analyzed by the chemometric method of hierarchical clustering analysis and principal component analysis (PCA). The EIA method was used to determine the half-inhibitory concentration (IC₅₀) of Jinzepaishi Granules. **Results** The similarity of HPLC fingerprints of all the ten batches was ≥ 0.955, which were consistent with the results of cluster analysis and PCA. Jinzepaishi Granules had a significant inhibitory effects on COX-2 with a IC₅₀ of 10.272 mg/mL, which demonstrated a significant dose-effect relationship. **Conclusion** The multiple quality control system of chemical fingerprinting and biological activity detection has the characteristics of high efficiency, rapidness, accuracy, sensitivity, and good reproducibility. It can effectively evaluate the anti-inflammatory biological activity of Jinzepaishi Granules and achieve more scientific and reasonable control of its quality. It also provides a reference for the establishment of more scientific quality control for other Chinese materia medica preparations.

Key words: Jinzepaishi Granules; fingerprint; COX-2; biological activity evaluation; EIA; HPLC

金泽排石颗粒由金钱草、泽泻、海金沙、甘草、
栀子、蒲公英6味药组成,具有清热利湿、排石通
淋之功效,并具有一定的抗炎作用,主要用于湿热

下注所致的胆道结石、尿路结石、尿路感染等。本
研究拟在金泽排石颗粒定性鉴别与含量测定的基础
上,通过HPLC指纹图谱与生物活性检测^[1-2],采用

收稿日期: 2018-05-20

作者简介: 向采芹(1992—),女,四川广元人,在读硕士研究生,研究方向为中药新剂型、新技术、新工艺。E-mail: 742426178@qq.com

*通信作者 李 希(1969—),女,四川成都人,硕士,教授,研究方向为中药新剂型、新技术、新工艺。E-mail: 1836820767@qq.com

多元质控体系对金泽排石颗粒进行质量控制,以期
为其他中药制剂的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 药品与试剂

金泽排石颗粒 10 批(批号分别为 20180227、
20180228、20180229、20180308、20180309、20180310、
20180319、20180320、20180321、20180322, 编号 S1~
S10)。金钱草对照药材(批号 121187-201403)、泽
泻对照药材(批号 12081-201406)、海金沙对照药
材(批号 121607-201202)、栀子对照药材(批号
120986-201610)、蒲公英对照药材(批号
121195-201503)、甘草对照药材(批号 120904-
201620),均购于中国食品药品检定研究院。金钱草

药材饮片、盐泽泻饮片、蒲公英药材饮片、甘草药
材饮片、栀子药材饮片、海金沙饮片各 10 批均购自
四川省中药饮片公司。制备成 10 批次金泽排石颗粒
所对应的药材批次见表 1。以上药材均由四川省中医
药科学院中医研究所谢守德主任中药师鉴定,分别为
报春花科植物过路黄 *Lysimachia christinae* Hance 的干
燥全草、泻科植物泽泻 *Alisma orientale* (Sam.) Juzep.
的干燥块茎、菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum*
Hand. -Mazz. 的干燥全草、茜草科植物栀子 *Gardenia*
jasminoides Ellis 的干燥成熟果实、豆科植物甘草
Glycyrrhiza uralensis Fisch. 的干燥根茎、海金沙科植
物海金沙 *Lygodium japonicum* (Thunb.) Sw. 的干燥
成熟孢子。

表 1 10 批金泽排石颗粒对应的药材饮片批号

Table 1 10 batches Jinze paishi Granules corresponding to number of herbs

批次	对应药材批号					
	金钱草	泽泻	海金沙	栀子	甘草	蒲公英
S1	160330	170911	171207	170106	180115	170307
S2	180205	171110	171016	180113	171215	171216
S3	171213	170919	170421	160219	171025	171102
S4	180116	170705	170728	160127	170721	171010
S5	171028	170512	170203	160411	170306	170920
S6	170804	170119	160217	161226	170105	161116
S7	170608	170108	150805	170325	170106	170803
S8	170520	161108	150313	170805	161018	170617
S9	161206	160905	170919	170916	171009	170213
S10	170902	160803	160616	151029	160817	170203

环氧合酶-2 (COX-2) 抑制剂筛选检测试剂盒
(碧云天生物技术公司); 甲醇(分析纯)、甲醇(色
谱纯)、磷酸(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 水为超
纯水(实验室自制)。

1.2 仪器

Agilent-1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦科
技有限公司); KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆
山市超声仪器有限公司); BT-125D 型电子天平(赛
多利斯科学仪器北京有限公司); 电热恒温水浴锅
(北京市永光明医疗仪器有限公司); VARIOSKAN
FLASH 酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司); 基因型
1810A 纯水机(重庆摩尔水处理有限公司);
VORTEX 5 涡旋混合仪(海门市其林贝尔仪器制造
有限公司); TG-16S 台式微量高速离心机(四川蜀

科仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 金泽排石颗粒的制备

根据金泽排石颗粒拟定的制备及成型工艺(实
验室自拟),将方中金钱草经乙醇回流提取,其余药
味加水提取,将醇提液经过减压浓缩、水沉纯化。
水提液经减压浓缩离心后,浓缩至适宜密度,合并
醇提水提浓缩液,加入辅料,再经过干燥和成型工
艺制备成金泽排石颗粒。

2.2 金泽排石颗粒指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件^[3-6] Agilent 1260 型高效液相色谱
仪, DAD 二极管阵列检测器, 色谱柱 SHIMADZU
VP-ODS C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相
为乙腈(A)-0.2%磷酸溶液(B), 梯度洗脱, 洗脱

条件为 0~10 min, 0~8% A; 10~26 min, 8%~15% A; 26~35 min, 15%~20% A; 35~50 min, 20%~40% A; 50~60 min, 40%~0 A; 体积流量为 1 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μ L; 紫外检测波长 230 nm。

2.2.2 供试品溶液的制备 称取 10 个批次的金泽排石颗粒约 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 80% 甲醇补足缺失的质量, 摇匀滤过, 取续滤液即得。

2.2.3 6 味药材溶液的制备 精密称取金钱草、泽泻、海金沙、栀子、甘草、蒲公英药材各 1 g, 按“2.2.2”项下方法, 分别制成各药材的提取液。

2.2.4 方法学考察

(1) 精密度考察: 取同一批次(批号 20180310)供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 其 RSD 值均小于 3%, 表明仪器精密度良好。

(2) 稳定性考察: 取同一批次(批号 20180310)供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件, 分别于 0、2、4、8、10、24 h 进样, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果其 RSD 值均小于 3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

(3) 重复性考察: 取同一个批次(批号 20180310)供试品 6 份, 按照“2.2.2”项下方法处理和“2.2.1”项下色谱条件进样, 计算 6 份供试品的相对保留时间和相对峰面积, 结果两者 RSD 值均小于 3%, 表明方法重复性良好。

2.2.5 样品测定 分别依次精密吸取 10 批供试品溶液 10 μ L, 注入高效液相色谱仪, 按照“2.2.1”项下色谱条件测定, 得 10 个样品 HPLC 图谱。再分别依次精密吸取组方的 6 味药材供试品溶液各 10 μ L, 注入高效液相色谱仪, 按照“2.2.1”项下色谱条件测定, 得 6 味药材 HPLC 色谱图。

2.2.6 指纹图谱检测与分析 根据 S1~S10 10 个批次供试品的 HPLC 图谱, 由色谱图中的保留时间和峰面积确定共有峰的数量, 要求共有峰的峰面积大于总峰面积的 90%, 选取其中的 19 个共有峰为特征指纹峰, 记录 10 批次金泽排石颗粒的保留时间、峰面积, 并计算其相对保留时间、相对峰面积以及 RSD 值。选择特征指纹峰中分离度好、时间适中、峰面积相对较大的目标成分作为参照峰(S), 对照指纹图谱见图 1, 10 批次供试品叠加图谱见图 2。6 味组方药材供试品溶液分别按“2.2.5”项下方法测定, HPLC 色谱图见图 3, 并将供试品的共有峰归属到各药材(表 2)。

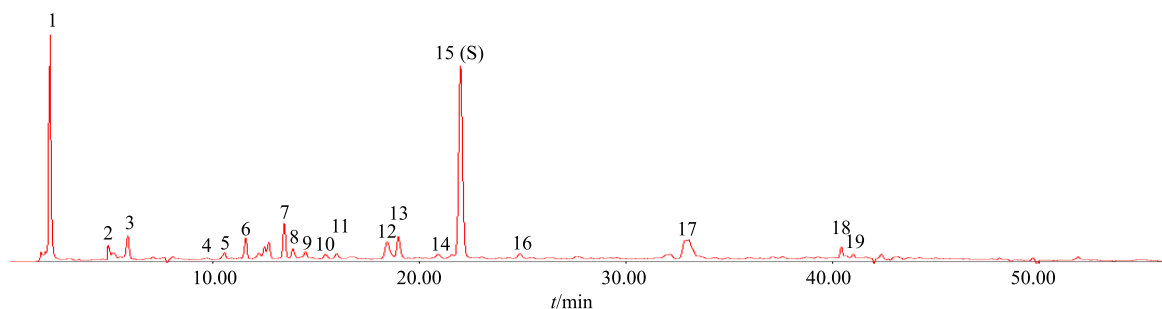


图 1 对照指纹图谱

Fig. 1 Reference fingerprints

2.2.7 相似度分析 将所得 10 批次金泽排石颗粒的 HPLC 图以 AIA 格式文件导出, 并将数据导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)”进行计算, 以其中 1 个样品(S1)的色谱图为参照图谱, 通过多点校正, 自动匹配, 以中位数法, 生成对照图谱(R), 并规定相似度范围, 根据“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)”计算得出的 10 批次金泽排石颗粒相似度分别为 0.955、0.989、0.972、0.967、0.957、0.956、0.989、0.975、0.983、0.987。

2.2.8 聚类分析 将 10 批金泽排石颗粒样品 19 个共有峰的相对峰面积数据输入 SPSS 21.0 软件, 采用离差平方和法, 以欧式平方距离为分类依据, 对 10 批次金泽排石颗粒样品进行聚类分析(图 4)。可见, 10 批金泽排石颗粒可以聚为 2 类, 第 1 类为样品 S2、S3、S4、S7、S8、S9、S10, 与对照图谱相似度较高; 第 2 类为样品 S1、S5、S6, 相似度相对较低。聚类分析结果与相似度结果高度吻合, 说明金泽排石颗粒的指纹图谱的建立方法稳定可行。

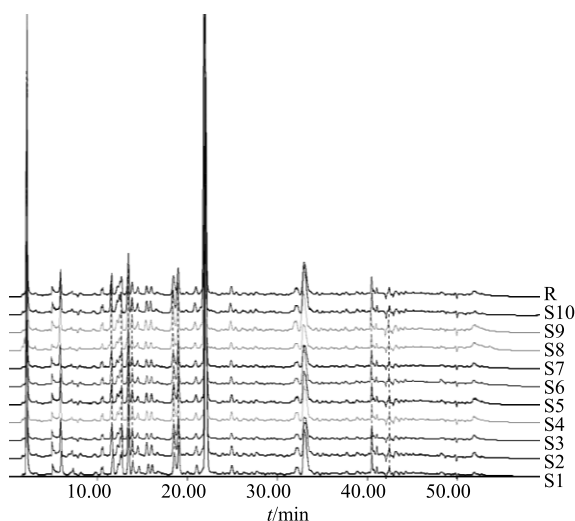


图 2 10 批次金泽排石颗粒指纹叠加图

Fig. 2 Common peaks fingerprint chromatograms of 10 batches Jinze paishi Granules

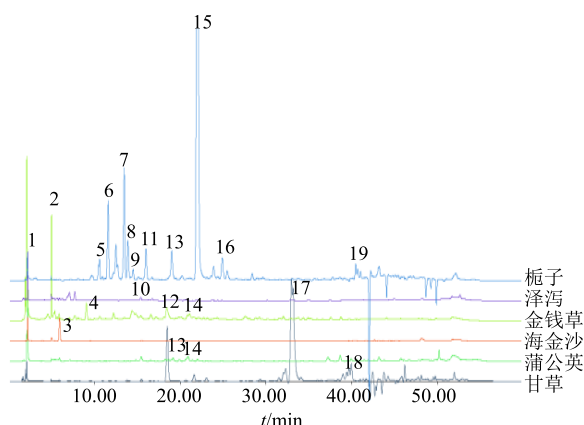


图 3 6 味药材 HPLC 图

Fig. 3 HPLC chromatograms of six herbal pieces

表 2 共有峰药材归属

Table 2 Common peak herbs belonging

共有峰峰号	归属药材
1、2、4、12、14	金钱草
5~9、11、13、15、16、19	栀子
3	海金沙
10	泽泻
17、18	甘草
1、13、14	蒲公英

2.2.9 主成分分析 将 10 批金泽排石颗粒 19 个共有峰的相对峰面积数据导入 SPSS 21.0 软件, 进行降维主因子分析, 按主成分提取方法提取出 1 个主成分 $t[1]$, 其贡献值 $>95\%$, 再将共有峰的相对峰面积数据导入 SIMCA-P (version 11.5.0) 软件中, 进行主成分分析, 得出主成分分析图 (图 5), 解释

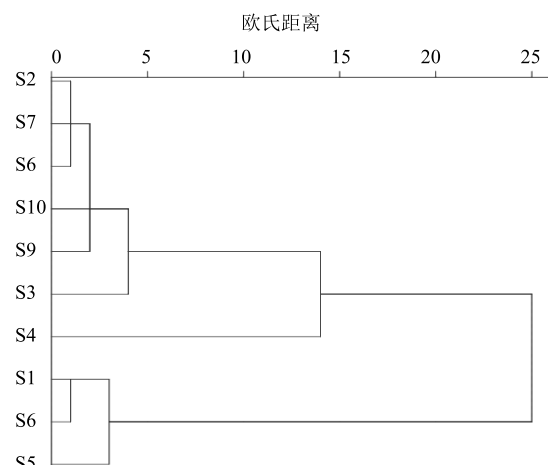


图 4 10 批金泽排石颗粒聚类分析树状图

Fig. 4 Dendrogram of 10 batches Jinze paishi Granules by cluster analysis

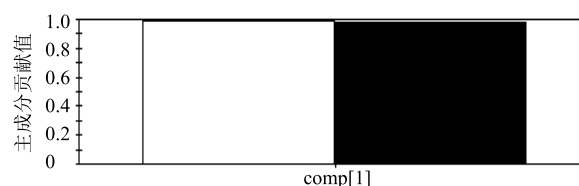


图 5 19 个共有峰主成分分析

Fig. 5 Principal components analysis of 19 common peaks

了提取出的 1 个主成分, 且其贡献值大于 95%。结果表明 2 种不同的分析统计软件分析的结果一致, 证明指纹图谱的方法建立具有稳定性。进一步对 10 批次金泽排石颗粒中 19 个共有峰的相对峰面积差异性进行分析, 得出其 19 个共有峰主成分的载荷分析图 (图 6), 表明共有峰的相对峰面积差异性整体相差不大, 但 S1、S5、S6 与其余批次有明显差异, 这也与相似度结果保持一致, 证明金泽排石颗粒 10 个批次质量相差不大, 建立的指纹图谱方法稳定可行, 可以作为金泽排石颗粒的质量控制的方法。

2.3 金泽排石颗粒生物活性评价

参考罗云等^[7]的方法, 检测金泽排石颗粒对 COX-2 的半数抑制浓度 (IC_{50}), 评价其抗炎生物活

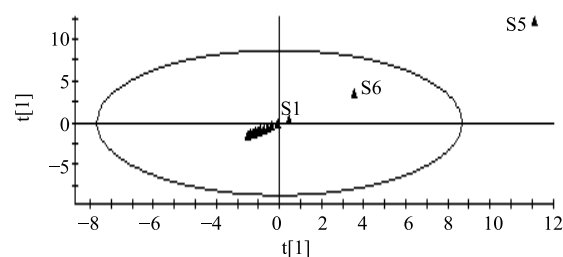


图 6 共有峰载荷分析

Fig. 6 Load analysis of common peaks

性^[8-9]。取金泽排石颗粒(批号 20180309)适量,采用试剂盒中的 COX-2 Assay Buffer 作为溶剂进行超声溶解,滤过,稀释成质量浓度分别为 8.672、9.544、10.624、11.944、13.648、15.928 mg/mL 的供试品溶液,每个质量浓度设 3 个复孔。按照试剂盒说明书操作,分别设置空白对照组、100%酶活性对照组、Celecoxib(阳性对照)组及金泽排石颗粒样品组,在酶标仪下进行荧光检测,激发波长为 560 nm,发射波长为 590 nm。检测各孔平均荧光值(RFU),按照公式计算酶抑制率。

$$\text{抑制率} = (\text{RFU}_{100\% \text{酶活性}} - \text{RFU}_{\text{药物}}) / (\text{RFU}_{100\% \text{酶活性}} - \text{RFU}_{\text{空白}})$$

以金泽排石颗粒供试品的 COX-2 抑制率(Y)对金泽排石颗粒供试品的质量浓度(X)作图,得到其量效曲线,得到的拟合方程为 $Y = -1.7219X^2 + 52.543X - 307.99$, 计算得到金泽排石颗粒 IC₅₀ 为 10.272 mg/mL。

取 3 批(批号 20180228、20180309、20180322)金泽排石颗粒样品,按照上述方法进行测定,得 3 批金泽排石颗粒的 IC₅₀ 分别为 10.35、10.28、10.22 mg/mL。根据测定结果,暂定金泽排石颗粒的 IC₅₀ 不超过 12.0 mg/mL。

3 讨论

本实验对 10 个批次的金泽排石颗粒进行指纹图谱研究,标示出 19 个共有峰,并将各共有峰归属到药材,体现药材与金泽排石颗粒剂的相关性。10 批次颗粒的共有峰的相似度均大于 95%,符合规定,共有峰的总面积占有峰面积的 90%以上。将 10 批次金泽排石颗粒的相对峰面积数据输入 SPSS 21.0 软件,对样品进行系统聚类,其聚类结果与相似度结果保持一致,同时对 19 个共有峰进行主成分分析,其分析结果与 SIMCA-P 软件主成分分析结果一致,2 种不同统计软件分析结果均与相似度结果契合,可用于指纹图谱相似度的验证,解决仅用相似度这一指标评价的单一性,使数据处理结果更加可靠。指纹图谱相似度分析结合统计分析为金泽排石颗粒的质量评价提供了一种有效的手段,有利于其质量标准的研究。在指纹图谱的方法研究时,考察了金泽排石颗粒的提取溶剂、溶剂浓度、流动相、流动相比比例等一系列条件,选取最佳条件。此方法项下的指纹图谱特征峰可以用于金泽排石颗粒的质量检查。本实验检测了金泽排石颗粒剂对

COX-2 的抗炎活性,结果表明,金泽排石颗粒表现出明显的抗炎活性,且与剂量呈正相关,IC₅₀ 为 10.272 mg/mL,通过对 3 批次金泽排石颗粒重复测定,暂定其 IC₅₀ 不超过 12.0 mg/mL。

由于中药成分复杂,中药颗粒剂的指纹图谱可全面反映其所含化学成分的种类与数量,宏观、综合地反映和表征其内在质量。生物活性检测是利用生物模型评估药物生物活性的一种方法,本实验通过药物对 COX-2 的抑制作用来评价药物的抗炎活性,该方法快速、简便、灵敏、特异性好,可以作为金泽排石颗粒的抗炎活性检测方法。指纹图谱与抗炎活性评价方法可为金泽排石颗粒提供多元质控手段,保证制剂稳定,方法可行且高效。在本研究基础上,后续会进一步对制剂工艺的提取、纯化等各个环节的药液和浓缩液做相关指纹图谱研究,并对抗炎活性评价方法进行深入研究和完善,以期更加精准地监控金泽排石颗粒的质量。

参考文献

- [1] 于姗姗,李敏,张秋红. 中药配方颗粒的指纹图谱研究进展 [J]. 中国执业药师, 2016, 13(1): 38-40.
- [2] 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): 3095-3104.
- [3] 黄萌萌,唐颂豪,陈彦,等. 排石颗粒 HPLC 指纹图谱及化学模式识别分析 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(6): 2768-2772.
- [4] 牛小花,陈洪源. 清咳利咽颗粒的 UPLC 指纹图谱建立及主成分分析 [J]. 中国药房, 2017, 28(6): 826-830.
- [5] 薛乾鑫,王晖,武拉斌,等. 法半夏配方颗粒的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中南药学, 2016, 14(2): 170-174.
- [6] 高颖,张云天,徐以亮,等. 炒麦芽配方颗粒的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(20): 115-118.
- [7] 罗云,金城,周健,等. 基于环氧合酶抑制作用的人工麝香质量评价方法研究 [J]. 药学学报, 2011, 46(4): 438-442.
- [8] Jin S E, Son Y K, Min B S, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of constituents isolated from *Pueraria lobata* roots [J]. Arch Pharm Res Vol, 2012, 35(5): 823-837.
- [9] 毛近隆,李晓宇,孙蓉. 环氧合酶 (COX-2) 抑制剂提高心血管安全性的抗炎机制探讨 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(20): 4054-4059.