

· 中药研究 ·

# 紫花地丁 HPLC 指纹图谱及其抗炎作用研究

孙杭, 张振华, 黄莉莉\*

黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

**摘要** 目的:通过 HPLC 技术建立紫花地丁指纹图谱,结合聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)对 10 批紫花地丁进行质量评价,研究其抗炎机制。方法:采用 Waters Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相:乙腈-0.1%磷酸水溶液;流速:0.8 mL·min<sup>-1</sup>;进样量:10 μL;柱温:30℃;检测波长:353 nm。耳肿胀法观察抗炎作用,并检测血清中 PGE<sub>2</sub>、IL-6、TNF-α 的含量。结果:成功建立 10 批紫花地丁药材的 HPLC 指纹图谱,确认 10 个共有峰,相似度均高于 0.990,指认菊苣苷(2.44±1.11)mg·g<sup>-1</sup>和秦皮乙素(10.50±1.57)mg·g<sup>-1</sup>两个共有峰。通过化学模式识别方法将 10 批样品分为两大类。紫花地丁水煎液能抑制小鼠耳肿胀,降低血清 TNF-α、IL-6 及 PGE<sub>2</sub> 水平。结论:本研究成功建立 10 批紫花地丁的 HPLC 指纹图谱,发现其抗炎作用机制可能与抑制 TNF-α、IL-6 及 PGE<sub>2</sub> 的表达相关,为紫花地丁的质量控制和临床应用提供了科学依据和药效学支持。

**关键词** 紫花地丁;指纹图谱;化学模式识别;抗炎;质量评价

**中图分类号**:R284.1

**文献标识码**:A

**文章编号**:1002-2392(2026)04-0031-08

**DOI**:10.19664/j.cnki.1002-2392.260072

紫花地丁系堇菜科多年生草本植物紫花地丁 *Viola yedoensis* Makino 的带根全草,收录于《本草纲目》<sup>[1-2]</sup>。中医认为紫花地丁具有清热解毒、消痈散结之功效,现代药理研究发现其在解热、消炎、抗肿瘤、抗菌等方面具有重要作用<sup>[3-4]</sup>。

由于我国紫花地丁产地分布广泛,基源复杂,变种及近缘植物繁多,品种极易混淆。HPLC 作为一种高分辨率的分离和鉴定技术,不仅可以有效区分和鉴定紫花地丁中的主要化学成分,还能为其质量控制和药效评估提供可靠的分析手段<sup>[5-6]</sup>。目前对于紫花地丁的研究主要聚焦于化学成分的提取,有效成分及药理作用的研究较少<sup>[7-8]</sup>。尽管已有部分紫花地丁抗炎活性的研究报道<sup>[9-10]</sup>,但对具体化学成分在不同产地的变化及其与药效之间关系的系统研究仍相对匮乏。本研究旨在采用 HPLC 技术对紫花地丁化学成分进行深入分析,构建其指纹图谱,并辅以相似度分析、聚类分

析(HCA)及主成分分析(PCA)进行综合评价,对不同产地紫花地丁的相似性与差异性进行探讨,并以耳肿胀率及血清中炎症因子含量为指标,探讨紫花地丁的抗炎作用及其可能的作用机制,有助于深入理解紫花地丁的药理作用,也为开发新的抗炎药物提供依据。

## 1 材料

### 1.1 药物

本研究所用紫花地丁样品源于 2 个产地,每个产地包含 5 个批次(所有药材均由神威药业提供),其中 S1~S5 产自陕西商洛,批号为 1709061-1709065;S6~S10 产自河北行唐,批号为 ZHDD180321-ZHDD180325。所有样品均由黑龙江中医药大学郭盛磊教授鉴定,确认为堇菜科植物紫花地丁(*Viola yedoensis* Makino)的干燥全草。

### 1.2 主要试剂

对照品秦皮乙素(DST190526-050),购自成都德斯特生物科技有限公司;菊苣苷(wkq21071501),购自四川省维克奇生物科技有限公司;所有对照品纯度均不低于 98%。二甲苯(20220630),购自天津市富宇精细化工有限公司;小鼠 ELISA 试剂盒:TNF-α(MM-0190R1),IL-6(MM-0190R1),PGE<sub>2</sub>(MM-0068R1),购自江苏酶免实业有限公司。

### 1.3 主要仪器

Waters2695 型分析高效液相色谱仪(Waters);

收稿日期:2025-01-08 修回日期:2025-09-01

基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(LH2019H106);黑龙江省省属本科高校“优秀青年教师基础研究支持计划”(YQJH2023152)

作者简介:孙杭(2001-),女,硕士研究生,研究方向:中药及复方改善睡眠药效物质基础及其作用机制。

\*通信作者:黄莉莉(1978-),女,博士,教授,研究方向:中药及复方改善睡眠药效物质基础及其作用机制。

1810A 型纯水机(上海摩勒科学仪器有限公司);JC - FW - 100 多功能粉碎机(聚创集团有限公司);MS - 105 型分析天平(梅特勒 - 托利多国际贸易有限公司);SynergyMX 型酶标仪(美国 BIOTEK);CT15RE 型高速冷冻离心机(HITACHI)。

1.4 动物

选用 SPF 级 ICR 小鼠,雄性,体质量(20 ± 2)g,动物许可证编号为 SCXK(辽)2022 - 0001。小鼠饲养在独立通气笼中,保持压差≥10 Pa,通风频率20 ~ 50 次/h,噪音≤55 dB。使用自动光控系统调节明暗周期(7:00 开灯,19:00 关灯),相对湿度:45 ~ 65%,室内温度:17 ~ 23 ℃,光照强度:300 lx。本实验过程严格遵循黑龙江中医药大学《实验动物管理条例》的相关规定,并获得了黑龙江中医药大学动物伦理委员会的批准(伦理批号:2022123001)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Waters2695 型液相色谱仪,并搭载 Waters2998 二极管阵列检测器;使用 Waters Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈(A) - 0.1% 磷酸水(B)溶液;进样量为 10 μL,流速设定为0.8 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长设置为 353 nm,柱温控制在 30 ℃。梯度洗脱条件如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱表

| 时间/min | A/% | B/% |
|--------|-----|-----|
| 0      | 7   | 93  |
| 20     | 11  | 89  |
| 64     | 12  | 88  |
| 90     | 25  | 75  |

2.2 供试品溶液的制备

称量 0.5 g 供试品粉末(通过 3 号筛),放入50 mL 圆底烧瓶,加入 25 mL 甲醇回流提取 2 h。过滤所得液体通过 0.45 μm 微孔滤膜,制成供试液,4 ℃冷藏备用。

2.3 对照品溶液的制备

将适量秦皮乙素和菊苣苷置于容量瓶中,用甲醇稀释,配制成 1.260 mg·mL<sup>-1</sup>的秦皮乙素和 1.066 mg·mL<sup>-1</sup>的菊苣苷混合储备液,冷藏备用。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度考察

选取供试样品 S10,按“2.2”方法制备供试液,在“2.1”色谱条件下进样 6 次,记录数据。

2.4.2 稳定性考察

选取供试样品 S10,按“2.2”方法制备供试液,按照“2.1”色谱条件,于 0、2、4、8、12 及 24 h 分别检测,记录数据。

2.4.3 重复性考察

选取供试样品 S10,按“2.2”方法制备 6 份供试液,按“2.1”色谱条件分别进样,记录数据。

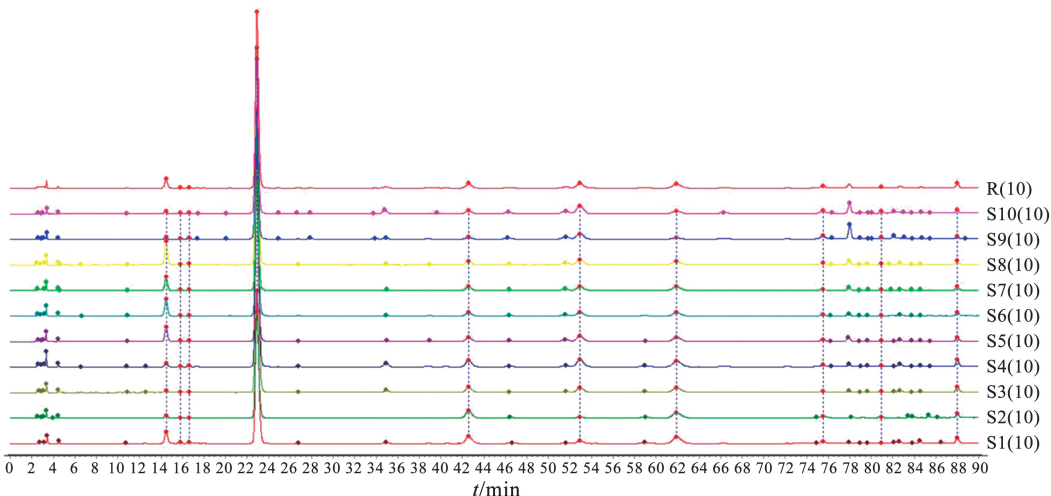
2.4.4 结果

选择秦皮乙素(4 号峰)为参考峰(S),测定 10 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,精密度、稳定性及重复性测试中,相对保留时间和峰面积的 RSD 值均低于 3%。这表明仪器性能良好,供试药液在 24 h 内稳定性较佳,指纹图谱检测方法具有可靠的重复性。

2.5 指纹图谱建立及相似度评价

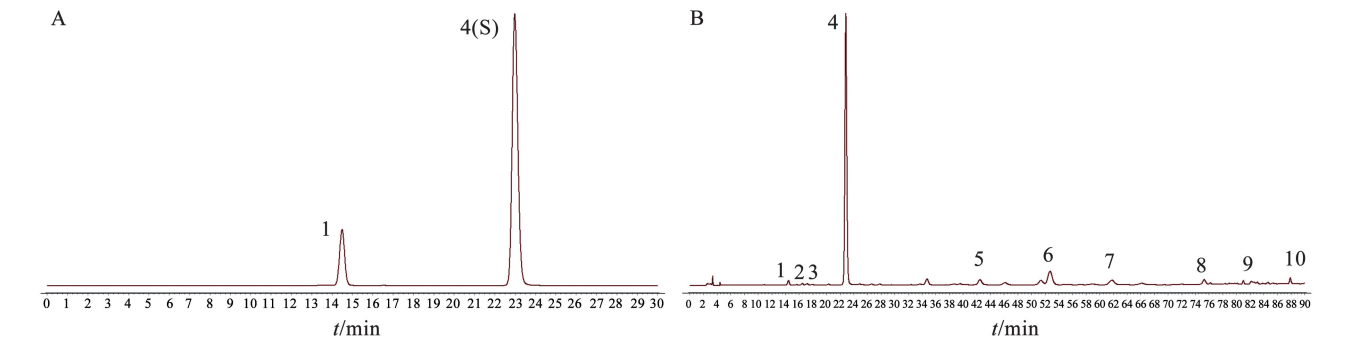
2.5.1 指纹图谱的建立

选用 S1 ~ S10 批次紫花地丁药材,各 0.5 g,依据“2.2”项的方法制备供试品溶液,按照“2.1”项的色谱条件进行测定,获取相应图谱,建立 10 批紫花地丁药材指纹图谱,详见图 1。HPLC 指纹图谱中共标定 10 个共有峰。通过比对对照品及供试品色谱图,以保留时间作为判定标准,指认了菊苣苷(1 号峰),秦皮乙素(4 号峰),详见图 2A,2B。



注:S1 ~ S10 为 10 批紫花地丁样品,R 为对照指纹图谱。

图 1 10 批紫花地丁 HPLC 指纹图谱



注:A. 混合对照品色谱图;B. 紫花地丁样品色谱图;峰 1. 菊苣苷;峰 4. 秦皮乙素。

图 2 混合对照品、紫花地丁样品 HPLC 色谱图

2.5.2 相似度评价

利用 2012 版《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件,对 10 批次紫花地丁药材的图谱数据进行分析,生成对照图谱并进行相似度计算。结果表明,两个

产地 10 批紫花地丁药材指纹图谱的相似度均在 0.996 ~ 1.000,表明两个产地共 10 批紫花地丁药材差异较小,详见表 2。

表 2 10 批两个产地紫花地丁指纹图谱相似度评价

|     | S1    | S2    | S3    | S4    | S5    | S6    | S7    | S8    | S9    | S10   | R     |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| S1  | 1     | 1     | 0.998 | 1     | 1     | 0.999 | 0.998 | 1     | 0.999 | 0.999 | 1     |
| S2  | 1     | 1     | 0.999 | 0.999 | 1     | 0.998 | 0.999 | 0.999 | 0.999 | 0.997 | 1     |
| S3  | 0.998 | 0.999 | 1     | 0.998 | 0.999 | 0.997 | 1     | 0.998 | 1     | 0.996 | 0.999 |
| S4  | 1     | 0.999 | 0.998 | 1     | 0.999 | 1     | 0.998 | 1     | 0.999 | 0.999 | 1     |
| S5  | 1     | 1     | 0.999 | 0.999 | 1     | 0.999 | 0.999 | 0.999 | 0.999 | 0.997 | 1     |
| S6  | 0.999 | 0.998 | 0.997 | 1     | 0.999 | 1     | 0.997 | 1     | 0.998 | 1     | 0.999 |
| S7  | 0.998 | 0.999 | 1     | 0.998 | 0.999 | 0.997 | 1     | 0.998 | 0.999 | 0.996 | 0.999 |
| S8  | 1     | 0.999 | 0.998 | 1     | 0.999 | 1     | 0.998 | 1     | 0.999 | 0.999 | 1     |
| S9  | 0.999 | 0.999 | 1     | 0.999 | 0.999 | 0.998 | 0.999 | 0.999 | 1     | 0.998 | 1     |
| S10 | 0.999 | 0.997 | 0.996 | 0.999 | 0.997 | 1     | 0.996 | 0.999 | 0.998 | 1     | 0.999 |
| R   | 1     | 1     | 0.999 | 1     | 1     | 0.999 | 0.999 | 1     | 1     | 0.999 | 1     |

注:S1 ~ S10 为 10 批紫花地丁样品,R 为对照指纹图谱。

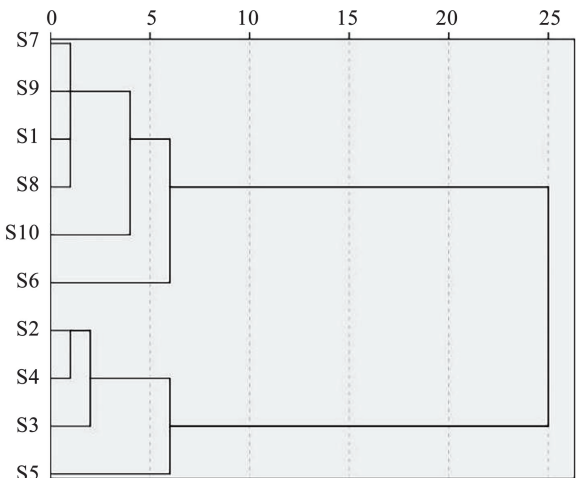
2.6 指纹图谱的分析

2.6.1 聚类分析(Hierarchicalclusteranalysis, HCA)

利用 SPSS 26.0 软件对 10 个共有峰的峰面积数据进行分析,采用欧式平方距离作为测量标准,并通过组件连接法进行聚类分析,具体结果见图 3。当距离为 5 时,样品可聚为 2 类,其中陕西商洛产地 S2 ~ S5 聚为一类,陕西商洛产地 S1 和河北行唐 S6 ~ S10 聚为一类,聚类结果与样品产地有较大相关性。

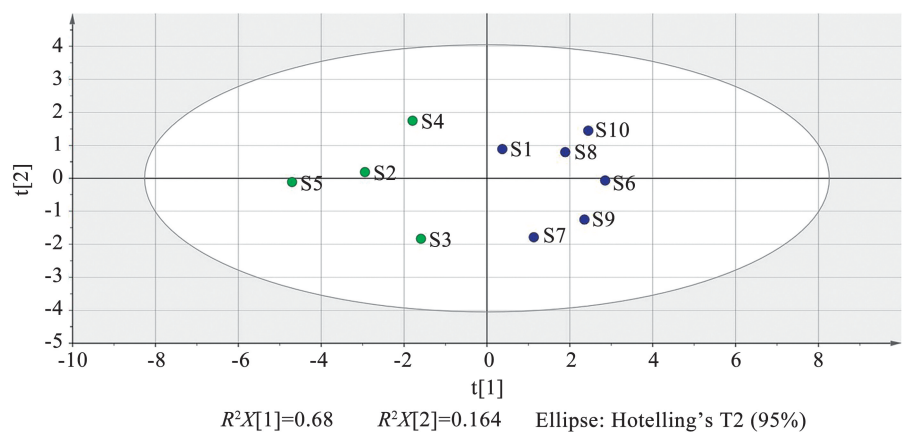
2.6.2 主成分分析(Principalcomponentanalysis, PCA)

通过 PCA 拟合得到紫花地丁得分图(图 4),其模型参数为  $R^2X=0.844$ 、 $Q^2=0.590$ ,均高于 0.5,表明模型具有良好的稳定性和预测能力。在得分图中,10 批紫花地丁样品的 S2 ~ S5 聚为一组,S1、S6 ~ S10 聚为另一组,与聚类分析结果相符。



注:S1 ~ S10 为 10 批紫花地丁样品。

图 3 10 批紫花地丁聚类分析图



注:S1 ~ S10 为 10 批紫花地丁样品。  
图 4 10 批紫花地丁的得分图

2.7 主要成分含量测定

2.7.1 色谱条件及供试品制备方法

色谱条件参照“2.1”项,供试品溶液的制备步骤按照“2.2”项执行。

2.7.2 线性关系考察

取“2.3”项下混合对照品逐级稀释成 2、4、8、16、32 倍浓度梯度溶液。按照“2.1”项色谱条件测定峰面积,并以对照品浓度( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线。结果见表 3,表明两种成分在相应质量范围内呈现良好线性关系。

表 3 标准曲线回归方程

| 化学成分 | 回归方程                                        | $R^2$   | 线性范围/<br>( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) |
|------|---------------------------------------------|---------|-----------------------------------------------|
| 菊苣苷  | $y = 1.60 \times 10^4 x - 1.21 \times 10^4$ | 0.999 9 | 7.88 ~ 252                                    |
| 秦皮乙素 | $y = 4.60 \times 10^4 x - 2.09 \times 10^4$ | 0.999 9 | 15.06 ~ 482                                   |

2.7.3 精密度试验

取“2.3”项下混合对照品溶液,按照“2.1”项下色谱条件进行液相分析,连续进样 6 次,记录菊苣苷、秦皮乙素的峰面积,得出  $RSD$  值为 0.41%、0.35%。结果表明实验仪器精密性良好。

使用“2.3”项制备的混合对照品溶液,于“2.1”项

色谱条件下进样 6 次,测定菊苣苷和秦皮乙素的峰面积, $RSD$  值分别为 0.41% 和 0.35%。结果证明仪器具备良好的精密性。

2.7.4 稳定性试验

选用供试药材 S10,按“2.2”方法制备供试品溶液,并在“2.1”项色谱条件下,于 0、2、4、8、12、24 h 分别进样检测,记录菊苣苷和秦皮乙素的峰面积,计算得到  $RSD$  值分别为 0.86%、0.50%。结果表明,供试品溶液在 24 h 内保持了良好的稳定性。

2.7.5 重复性试验

选择供试药材 S10,依据“2.2”项制备供试品溶液,并按照“2.1”项色谱条件连续进样 6 次,记录菊苣苷、秦皮乙素的峰面积,得出  $RSD$  值为 1.23%、0.88%。结果表明实验所建立的方法重复性良好。

2.7.6 加样回收试验

选择供试药材 S10 精密称量 6 份,每份 0.25 g。根据各成分已知含量分别加入对应量的对照品,依据“2.2”项制备供试品溶液,并在“2.1”项条件下进行检测。通过计算,得出菊苣苷、秦皮乙素的平均回收率及对应的  $RSD$  值(表 4)。结果表明本实验建立的含量测定方法准确性良好。

表 4 加样回收率考察结果( $n = 6$ )

| 化学成分 | 样品质量/g   | 样品含量/mg | 加入量/mg | 测得量/mg | 回收率/% | 平均回收率/% | $RSD$ /% |
|------|----------|---------|--------|--------|-------|---------|----------|
| 菊苣苷  | 0.250 24 | 0.96    | 0.91   | 1.84   | 96.96 | 95.81   | 2.55     |
|      | 0.253 80 | 0.97    | 0.91   | 1.81   | 92.76 |         |          |
|      | 0.250 21 | 0.96    | 0.91   | 1.85   | 97.98 |         |          |
|      | 0.250 36 | 0.96    | 0.91   | 1.83   | 95.45 |         |          |
|      | 0.250 74 | 0.96    | 0.91   | 1.85   | 98.52 |         |          |
|      | 0.250 17 | 0.96    | 0.91   | 1.80   | 93.17 |         |          |

续表 4

| 化学成分 | 样品质量/g   | 样品含量/mg | 加入量/mg | 测得量/mg | 回收率/%  | 平均回收率/% | RSD/% |
|------|----------|---------|--------|--------|--------|---------|-------|
| 秦皮乙素 | 0.250 61 | 2.67    | 2.66   | 5.27   | 97.81  | 98.62   | 1.79  |
|      | 0.250 94 | 2.67    | 2.66   | 5.31   | 99.11  |         |       |
|      | 0.250 42 | 2.67    | 2.66   | 5.33   | 99.88  |         |       |
|      | 0.250 77 | 2.67    | 2.66   | 5.36   | 101.22 |         |       |
|      | 0.250 19 | 2.67    | 2.66   | 5.24   | 96.76  |         |       |
|      | 0.250 43 | 2.67    | 2.66   | 5.25   | 96.92  |         |       |

2.7.7 含量测定

取自不同产地的 10 批供试品粉末,按“2.2”规定条件制备溶液,采用“2.1”中的色谱条件进行检测,测定其中秦皮乙素与菊苣苷的含量,详见表 5。实验结果表明,紫花地丁药材中菊苣苷的含量限度为 $(2.44 \pm 1.11) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,秦皮乙素的含量限度为 $(10.50 \pm 1.57) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

表 5 各产地紫花地丁药材含量测定结果( $\bar{x} \pm s, n = 2, \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )

| 批次  | 菊苣苷          | 秦皮乙素          |
|-----|--------------|---------------|
| S1  | 2.90 ± 0.003 | 11.86 ± 0.001 |
| S2  | 1.53 ± 0.001 | 9.16 ± 0.001  |
| S3  | 1.07 ± 0.001 | 9.59 ± 0.001  |
| S4  | 2.60 ± 0.003 | 8.82 ± 0.001  |
| S5  | 1.44 ± 0.000 | 7.78 ± 0.001  |
| S6  | 4.21 ± 0.001 | 12.58 ± 0.001 |
| S7  | 1.31 ± 0.003 | 11.55 ± 0.001 |
| S8  | 3.30 ± 0.008 | 11.50 ± 0.013 |
| S9  | 2.20 ± 0.003 | 11.54 ± 0.001 |
| S10 | 3.82 ± 0.003 | 10.66 ± 0.002 |

2.8 紫花地丁抗炎作用研究

2.8.1 药物制备

2.8.1.1 样品的制备

分别称取适量的紫花地丁(产地:河北行唐 ZHDD180321、陕西商洛 1709065)进行粉碎,分别精确称取粉末 20 g,置于容器中,加入 8 倍量蒸馏水,浸泡 20 min 后煎煮 20 min,趁热过滤;药渣加 6 倍量蒸馏水煎煮 30 min,再过滤。将滤液浓缩至紫花地丁水煎液(按生药量计浓度为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),冷却后置于 4 ℃冰箱中保存备用。

2.8.1.2 阳性药物的制备

取阿司匹林肠溶片(2862206207,石药集团欧意药业有限公司),置于研钵中,用研杵将其碾碎,精密称定阿司匹林粉末 10 mg,将其转入 20 mL 容量瓶,用蒸馏水定容至刻度,充分混匀,制备成浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的阿司匹林溶液。

2.8.2 分组及给药

将实验动物于实验室适应 7 d 后,将其随机分为空白组、模型组、阿司匹林组、紫花地丁 S5 组(陕西商洛 1709065)和紫花地丁 S6 组(河北行唐 ZHDD180321),每组 10 只。随后每日灌胃给药,阳性对照组给予阿司匹林溶液 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,给药组分别给予紫花地丁水煎液 S5 和 S6( $9.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}, 1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,生药量),空白组和模型组给予等体积蒸馏水,连续给药 7 d。

2.8.3 统计学处理

数据分析使用 SPSS 26.0 软件进行。实验数据采用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,显著性检验通过单因素方差分析完成, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.8.4 不同产地紫花地丁水煎液对小鼠耳肿胀的影响

末次给药后 1 h,对空白组以外的小鼠右耳涂抹 10 μL 二甲苯,左耳作为对照不处理。1 h 后,处死小鼠,剪取耳廓,用直径 9 mm 的打孔器取耳片称重。

$$\text{肿胀度}(\text{mg}) = m_{\text{右耳片}} - m_{\text{左耳片}}$$

结果显示,模型组小鼠的耳部肿胀明显高于空白组( $P < 0.001$ )。与模型组相比,阿司匹林组以及紫花地丁 S5、S6 组小鼠的耳肿胀度均显著降低( $P < 0.01, P < 0.001$ )。此外,与阿司匹林组相比,紫花地丁 S5 和 S6 组小鼠的肿胀度无明显差异( $P > 0.05$ )。紫花地丁 S5 组与 S6 组比较,小鼠耳肿胀度差异同样无统计学意义( $P > 0.05$ ),详见图 5A。

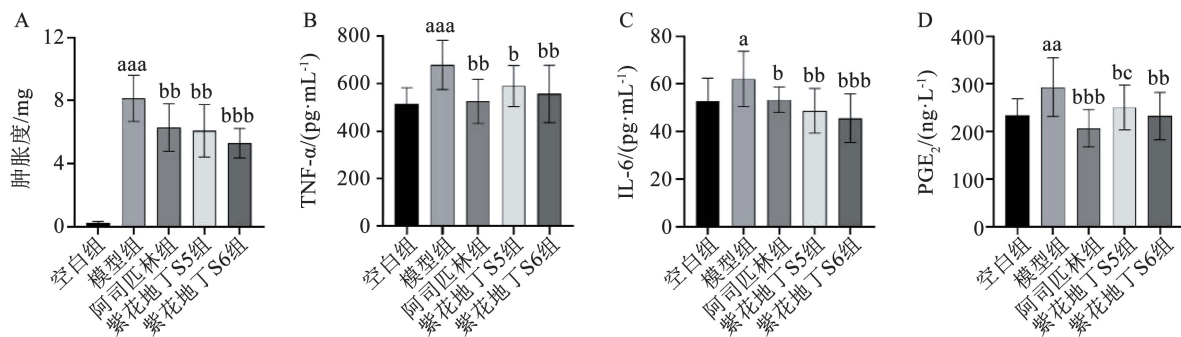
2.8.5 不同产地紫花地丁水煎液对小鼠血清中 TNF-α、IL-6、PGE<sub>2</sub>含量影响

通过眼球采血获取实验动物血样,在 4 ℃以 $3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心分离血清,依据试剂盒说明测定血清中 TNF-α、IL-6 及 PGE<sub>2</sub>的含量。

实验结果表明,模型组小鼠的 TNF-α、IL-6 和 PGE<sub>2</sub>含量相比空白组显著升高( $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$ )。而阿司匹林组及紫花地丁 S5、S6 组以上指标均明显下降,与模型组相比差异具有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$ )。与阿司匹林组相比,紫花地丁 S5 和 S6 组 TNF-α 和 IL-6 无明显变化

( $P > 0.05$ ), 但紫花地丁 S5 组  $\text{PGE}_2$  含量显著降低 ( $P < 0.05$ )。紫花地丁 S6 组与 S5 组间的  $\text{TNF} - \alpha$ 、

IL-6 及  $\text{PGE}_2$  含量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 具体见图 5B ~ 5D。



注: A. 二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀变化; B. 对血清  $\text{TNF} - \alpha$  水平的影响; C. 对血清 IL-6 水平的影响; D. 对血清  $\text{PGE}_2$  水平的影响; 与空白组相比,  $^a P < 0.05$ ,  $^{aa} P < 0.01$ ,  $^{aaa} P < 0.001$ ; 与模型组相比,  $^b P < 0.05$ ,  $^{bb} P < 0.01$ ,  $^{bbb} P < 0.001$ ; 与阿司匹林组相比,  $^c P < 0.05$ 。

图 5 两个产地紫花地丁水煎液对小鼠抗炎效果的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

### 3 讨论

本研究对供试品溶液的制备方法 & 色谱条件进行了系统考察, 成功建立紫花地丁的指纹图谱, 确定 10 个共有峰, 并指出菊苣苷和秦皮乙素。进一步研究表明, 经指纹图谱鉴定, 符合要求的紫花地丁水煎液可显著抑制小鼠耳肿胀, 并降低血清  $\text{TNF} - \alpha$ 、IL-6 及  $\text{PGE}_2$  水平, 显示出明显的抗炎作用, 其中秦皮乙素的含量与抗炎活性呈显著相关性。

本研究对提取方式 (超声、回流)、提取时间 (30 min、1 h、2 h、3 h)、提取溶剂 (甲醇、90% 甲醇、80% 甲醇、70% 甲醇)、料液比 (1: 5、1: 10、1: 50、1: 100、1: 150) 进行了系统优化。以主要色谱峰的峰面积和分离度为标准, 最终确定采用甲醇为溶剂, 料液比 1: 50, 加热回流提取 2 h 作为供试品溶液的最佳制备方法。在色谱条件优化中, 考察了流动相 (乙腈-0.05% 磷酸水溶液、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.2% 磷酸水溶液、乙腈-0.1% 甲酸水溶液)、柱温 (25 ℃、30 ℃、35 ℃)、进样量 (5  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ )、流速 (0.6  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、0.8  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、1.0  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 和检测波长 (237 nm、254 nm、300 nm、330 nm、353 nm)。结果表明, 使用乙腈-0.1% 磷酸水溶液作为流动相时, 色谱峰分离良好, 无拖尾现象, 基线平稳。当柱温为 30 ℃、流速为 0.8  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、进样量为 10  $\mu\text{L}$ 、检测波长为 353 nm 时, 供试品溶液的色谱峰形和分离效果最佳。基于上述考察条件, 本研究成功建立了紫花地丁的指纹图谱。

HPLC 指纹图谱技术因具有技术成熟、操作简便、结果准确及经济便捷等特点, 广泛应用于中药材质量评价, 共有峰越多其指纹图谱就越能更全面控制中药的质量<sup>[11]</sup>。在过往的研究中, 王笑等<sup>[12]</sup>指出 6 个共

有峰, 东莨菪内酯、秦皮乙素、木犀草素 3 个色谱峰。郭晓霞等<sup>[13]</sup>确立了 9 个特征峰, 秦皮甲素、秦皮乙素 2 个色谱峰。而本研究指纹图谱显示, 紫花地丁药材中存在 10 个共有峰, 其中成功指出菊苣苷和秦皮乙素两个主要成分。菊苣苷的平均含量为  $(2.44 \pm 1.11) \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 而秦皮乙素的平均含量为  $(10.50 \pm 1.57) \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 表明不同产地紫花地药材有效成分及含量不同, 导致在建立指纹图谱过程中共有峰的不同及指认成分的不同, 实验结果为紫花地丁的质量控制提供了参考。

基于以往对紫花地丁指纹图谱的 HCA、PCA 分析可知, 不同产地的紫花地丁药材具有一定区别<sup>[8, 12-13]</sup>。本研究聚类分析结果显示 10 批紫花地丁可聚类为两类, 且聚类结果与产地相关性较高, 通过后续含量测定可知, S1、S6 ~ S10 批次的紫花地丁中秦皮乙素含量普遍高于 S2 ~ S5 批次, 表明陕西商洛和河北行唐两个产地紫花地丁药材化学成分含量存在一定的差异。温度、光照、土壤水分、土壤盐分和土壤肥力等不同因素对中药的生理和生化反应以及次生代谢过程产生了显著影响<sup>[14]</sup>。秦皮乙素作为一种次生代谢产物, 河北行唐的含量相对更高可能是由于其环境条件更适合秦皮乙素的合成, 该产地的环境条件可为后续紫花地丁的种植提供依据。本研究通过建立科学的分析方法, 为陕西商洛和河北行唐两地紫花地丁药材质量标准研究提供技术支持和数据基础。

炎症是机体对刺激的保护性反应, 炎症过程中, 受损组织和血液释放细胞因子、炎性介质等化学物质, 从而导致局部红肿、发热和疼痛等症状<sup>[15]</sup>。本研究发现, 来自不同产地的紫花地丁水煎液对二甲苯引起的小鼠耳肿胀有不同程度的抑制作用, 并能降低小鼠血清中  $\text{TNF} - \alpha$ 、IL-6 和  $\text{PGE}_2$  的水平。二甲苯致耳肿

胀模型被广泛用于药物抗炎作用的初步评价<sup>[16-18]</sup>。其主要机制为释放组胺和缓激肽等炎症介质,导致血管扩张、毛细血管通透性增加及炎症细胞浸润,从而引发耳部急性炎症性水肿<sup>[19]</sup>。颜宏等<sup>[4]</sup>研究发现紫花地丁辐照前、后对二甲苯致小鼠耳肿胀均具有显著的改善作用。张静等<sup>[20]</sup>研究表明,紫花地丁乙酸乙酯提取物可显著抑制小鼠耳肿胀,并抑制了炎症组织中PGE<sub>2</sub>的生成量和NO释放量,其抗炎作用可能与降低PGE<sub>2</sub>、NO表达有关。其作用机制可能与抑制TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及PGE<sub>2</sub>的表达有关<sup>[8,21]</sup>。此外,李慧等<sup>[21]</sup>认为紫花地丁超声波提取物乳膏剂能够有效改善小鼠耳肿胀,抗炎效果明显,其研究结果与本实验相一致。促炎因子作为炎症反应的关键驱动因素,能够通过激活和调控免疫系统,促进炎症的发生、发展和维持<sup>[22]</sup>。TNF- $\alpha$ 在调控促炎介质分泌中发挥重要作用,其功能失调与自身免疫性疾病和炎症性疾病等多种病理状况密切相关<sup>[23-24]</sup>。近年来有研究<sup>[25]</sup>进一步揭示,TNF- $\alpha$ 不仅通过诱导炎症基因表达直接驱动炎症反应,还可通过诱导细胞死亡和刺激炎症免疫反应等途径,间接推动炎症扩展及疾病进程。IL-6作为一种促炎细胞因子,在多种慢性炎症性疾病中高度表达,是炎症性疾病的治疗靶点<sup>[26-28]</sup>。PGE<sub>2</sub>是体内花生四烯酸的代谢产物,是急性和慢性感染期间炎症和免疫反应中的重要脂质介质,可调节多种免疫细胞的活化、成熟、迁移和细胞因子分泌,其大量分泌与炎症有关<sup>[29-31]</sup>。Fan等<sup>[32]</sup>研究发现紫花地丁乙醇提取物可降低特应性皮炎小鼠血清中IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 等炎症因子的表达,起到抗炎作用。此外,其提取物对炎症组织中的PGE<sub>2</sub>含量也有显著的降低作用<sup>[20]</sup>。Zeng等<sup>[33]</sup>认为紫花地丁能够通过降低促炎因子的水平发挥抗炎作用,梁小瑞等<sup>[34]</sup>的研究也能证实这一观点。

综上,本研究成功建立了10批次紫花地丁药材的指纹图谱,全面表征了紫花地丁的关键化学质量属性,为紫花地丁及相关制剂的质量标准建立提供了科学依据。本研究结果表明,紫花地丁水煎液具有显著的抗炎作用,并可明显降低促炎因子的水平,为在感染性疾病等炎症相关疾病的治疗提供了药效学基础。

## 参考文献:

[1] 陈志良,刘聪,廖自文,等. 紫花地丁总黄酮的提取工艺及抗炎作用研究[J]. 中国畜牧兽医,2024,51(11):5051-5063.  
[2] 丘跃济,李美娣,吉艺宽. 紫花地丁活性成分、药理作用及其在畜禽生产方面的应用前景[J]. 中国兽药杂志,2024,58(5):89-94.  
[3] 段建荣,李春梅,高晓莉,等. 内部沸腾法提取紫花地丁抗肿瘤成分总黄酮的工艺优化研究[J]. 广东化工,2024,51(2):42-44,22.

[4] 颜宏,柴琇璞,赵道强,等. 紫花地丁辐照前、后镇痛、抗炎及抗菌活性对比研究[J]. 云南中医中药杂志,2023,44(9):78-82.  
[5] 谢翡翠,卢晓莹,叶聪,等. 佩兰的HPLC特征图谱建立及化学成分鉴定[J]. 分析测试学报,2024,43(6):826-836.  
[6] 王婕,王书航,周绍岩,等. 连朴饮基准样品高效液相色谱指纹图谱建立及化学成分鉴定[J]. 应用化学,2024,41(6):813-829.  
[7] 李媛媛,毛妍,梁曾恩妮,等. 紫花地丁药理作用研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2023,50(7):2998-3006.  
[8] 金阳,吕涵,葛金环,等. 紫花地丁物质基础研究进展[J]. 中华中医药学刊,2022,40(7):21-26.  
[9] 张静,邵永斌,谷新利,等. 紫花地丁总黄酮体外抗炎活性研究[J]. 中国畜牧兽医,2020,47(4):1258-1266.  
[10] 薛观宏,罗燕,梁小瑞,等. 紫花地丁-白头翁配伍对小鼠溃疡性结肠炎的抗炎作用[J]. 中国畜牧杂志,2019,55(10):126-130.  
[11] 周绮诗,朱敏洁,范胜贤,等. 不同产地降香檀叶HPLC指纹图谱建立及2个异黄酮类成分的含量测定[J]. 江西中医药,2024,55(12):57-61.  
[12] 王笑,李圆圆,孙志强,等. 不同产地紫花地丁中秦皮乙素的含量测定及特征图谱研究[J]. 山东科学,2019,32(4):24-31.  
[13] 郭晓霞,李冬华,张明童,等. 紫花地丁HPLC特征图谱结合多组分含量测定方法研究[J]. 中华中医药杂志,2021,36(7):4238-4242.  
[14] PANT P, PANDEY S, DALL'ACQUA S. The influence of environmental conditions on secondary metabolites in medicinal plants: a literature review[J]. Chem Biodivers, 2021, 18(11): e2100345.  
[15] YAN Y Y, LV Q, ZHOU F L, et al. Discovery of an effective anti-inflammatory agent for inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2023, 38(1): 2225135.  
[16] 盘涌,柳贤福,李本杰,等. 壮药白苞蒿抗炎活性部位筛选[J]. 中药药理与临床,2025,41(5):82-86.  
[17] 陈永柱,周希志,郭亚明,等. 鹿筋的常温浸提工艺与化学成分分析及提取物抗炎镇痛活性研究[J]. 中草药,2024,55(18):6186-6195.  
[18] 范佳琪,杨思琦,张红强,等. 复方苦参膏对湿疹小鼠模型的治疗作用研究[J]. 世界中医药,2024,19(18):2755-2761.  
[19] 赵淑锐,王耀楠,吴英婷,等. 基于代谢组学探讨阿司匹林对小鼠急性炎症的干预作用[J]. 分析仪器,2024(1):44-48.  
[20] 张静,罗燕,乔彦杰,等. 紫花地丁不同提取物化学成分检识及抗炎活性研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2019,37(1):121-126.  
[21] 李慧,李丽,张立强,等. 紫花地丁超声波提取物乳膏剂的抗炎作用及临床疗效观察[J]. 黑龙江畜牧兽医,2019(11):132-133,136.  
[22] 李祥梁,刘学伍. 炎性细胞因子在癫痫发生发展中的作用[J]. 癫痫杂志,2023,9(2):119-123.  
[23] JANG D I, LEE A H, SHIN H Y, et al. The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) in autoimmune disease and current TNF- $\alpha$  inhibitors in therapeutics[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2719.  
[24] WANG Y, YE R W, FAN L M, et al. A TNF- $\alpha$  blocking peptide that reduces NF- $\kappa$ B and MAPK activity for attenuating inflammation[J]. Bioorg Med Chem, 2023, 92: 117420.  
[25] VAN LOO G, BERTRAND M J M. Death by TNF: a road to inflamma-

- tion[J]. Nat Rev Immunol, 2023, 23(5): 289–303.
- [26] KAUR S, BANSAL Y, KUMAR R, et al. A panoramic review of IL-6: structure, pathophysiological roles and inhibitors[J]. Bioorg Med Chem, 2020, 28(5): 115327.
- [27] ZHU X Q, SHEN J Y, FENG S Y, et al. *Akkermansia muciniphila*, which is enriched in the gut microbiota by metformin, improves cognitive function in aged mice by reducing the proinflammatory cytokine interleukin-6[J]. Microbiome, 2023, 11(1): 120.
- [28] NISHI K, YOSHIMOTO S, NISHI S, et al. Epipharyngeal abrasive therapy (EAT) reduces the mRNA expression of major proinflammatory cytokine IL-6 in chronic epipharyngitis[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(16): 9205.
- [29] HUANG J H, XIE M X, HE L, et al. Chlorogenic acid: a review on its mechanisms of anti-inflammation, disease treatment, and related delivery systems[J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1218015.
- [30] 韦晶玥, 罗诗雯, 冯龄燃, 等. 金银花与山银花活性成分抗炎作用及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(11): 273–281.
- [31] 阎政荣, 张立石, 高煥, 等. 两种不同取血部位制备桂枝汤含药血清对其抗炎作用影响差异的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2024, 30(5): 828–835.
- [32] FAN P L, YANG Y L, LIU T, et al. Anti-atopic effect of *Viola yedoensis* ethanol extract against 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin dysfunction[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 280: 114474.
- [33] ZENG H R, ZHAO B, ZHANG D, et al. *Viola yedoensis* Makino formula alleviates DNCB-induced atopic dermatitis by activating JAK2/STAT3 signaling pathway and promoting M2 macrophages polarization[J]. Phyto-medicine, 2022, 103: 154228.
- [34] 梁小瑞, 薛观宏, 裴文刚, 等. 紫花地丁-白头翁配伍对小鼠血清细胞因子含量的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(11): 136–139.

## Study on HPLC Fingerprint and Anti-inflammatory Effects of *Viola yedoensis*

SUN Hang, ZHANG Zhenhua, HUANG Lili

*Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China*

**Abstract** Objective: To establish an HPLC fingerprint of *Viola yedoensis* using HPLC technology, evaluate the quality of 10 batches of *Viola yedoensis* combined with cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA), and study its anti-inflammatory mechanism. Methods: A Waters Symmetry C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with a mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution; flow rate: 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; injection volume: 10 μL; column temperature: 30 °C; detection wavelength: 353 nm. The anti-inflammatory effect was observed using the ear swelling method, and the levels of PGE<sub>2</sub>, IL-6, and TNF-α in serum were detected. Results: The HPLC fingerprint of 10 batches of *Viola yedoensis* was successfully established, with 10 common peaks identified. The similarities were all higher than 0.990. Two common peaks were identified as cichoriin (2.44 ± 1.11) mg·g<sup>-1</sup> and esculetin (10.50 ± 1.57) mg·g<sup>-1</sup>. The 10 batches of samples were classified into two categories by chemical pattern recognition methods. The aqueous decoction of *Viola yedoensis* could inhibit ear swelling in mice and reduce the levels of TNF-α, IL-6, and PGE<sub>2</sub> in serum. Conclusion: This study successfully established the HPLC fingerprint of 10 batches of *Viola yedoensis* and found that its anti-inflammatory mechanism may be related to the inhibition of TNF-α, IL-6, and PGE<sub>2</sub> expression, providing a scientific basis and pharmacodynamic support for the quality control and clinical application of *Viola yedoensis*.

**Key words** *Viola yedoensis*; Fingerprint; Chemical pattern recognition; Anti-inflammatory; Quality evaluation