

中图分类号: R932; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)21-0047-04  
doi: 10.3969/j.issn.1006-4931.2023.21.011



## 基于镇痛作用的金骨莲胶囊生物活性测定方法研究\*

杨 帅<sup>1,2</sup>, 刘 慧<sup>1,2</sup>, 周家华<sup>1,2</sup>, 周祖英<sup>1,2</sup>, 朱 迪<sup>3</sup>, 巩仔鹏<sup>1</sup>, 李月婷<sup>1</sup>, 郑 林<sup>1</sup>, 黄 勇<sup>1△</sup>

(1. 贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室·国家苗药工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州中医药大学第一附属医院, 贵州 贵阳 550001)

**摘要:**目的 建立金骨莲胶囊的生物活性测定方法。方法 将50只昆明小鼠随机分为空白对照组[等量0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)], 阳性药对照组(阿司匹林36.40 mg/kg), 金骨莲胶囊低、中、高剂量组(113.75, 227.50, 455.00 mg/kg), 各10只。各组小鼠分别按每1 kg体质量灌胃10 mL相应药物, 连续7 d, 再腹腔注射1%醋酸溶液, 测定小鼠20 min内的扭体次数, 并测定10批金骨莲胶囊的生物活性。结果 与空白对照组比较, 金骨莲胶囊低、中、高剂量组小鼠20 min内的扭体次数均显著减少( $P < 0.01$ ); 重复性、中间精密度、方法适用性试验结果的RSD均小于8.0%。结论 10批金骨莲胶囊样品均显示出了较好的生物活性。建立的金骨莲胶囊生物活性测定方法准确、可靠, 可为建立该制剂更系统、全面的质量控制标准提供参考。

**关键词:** 金骨莲胶囊; 生物活性测定; 镇痛作用; 质量控制

### Bioactivity Assay Method for Jingulian Capsules Based on Analgesic Effect

YANG Shuai<sup>1,2</sup>, LIU Hui<sup>1,2</sup>, ZHOU Jiahua<sup>1,2</sup>, ZHOU Zuying<sup>1,2</sup>, ZHU Di<sup>3</sup>, GONG Zipeng<sup>1</sup>, LI Yueting<sup>1</sup>, ZHENG Lin<sup>1</sup>, HUANG Yong<sup>1</sup>  
(1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics · National Engineering Research Center of Miao's Medicines, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China 550004; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China 550004; 3. The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou, China 550001)

**Abstract: Objective** To establish a bioactivity assay method for Jingulian Capsules (JGLC). **Methods** Fifty Kunming mice were randomly divided into the blank control group [equal volume of 0.5% carboxymethyl cellulose sodium (CMC-Na)], the positive drug control group (36.40 mg/kg of aspirin), and the JGLC low-, medium-, and high-dose groups (113.75, 227.50, 455.00 mg/kg), with 10 mice in each group. Mice in each group were given 10 mL of corresponding drug per 1 kg of body mass by gavage for 7 d, followed by intraperitoneal injection of 1% acetic acid solution. The number of twisting times within 20 min was measured, and the bioactivity of 10 batches of Jingulian Capsules was measured. **Results** Compared with those in the blank control group, the twisting times within 20 min in the JGLC low-, medium-, and high-dose groups significantly reduced ( $P < 0.01$ ). The RSDs of the repeatability, intra-day precision, and method applicability test results were all lower than 8.0%. **Conclusion** All 10 batches of Jingulian Capsules showed good bioactivity. The established bioactivity assay for Jingulian Capsules is accurate and reliable, which can provide a reference for establishing a more systematic and comprehensive quality control standard for this preparation.

**Key words:** Jingulian Capsules; bioactivity assay; analgesic effect; quality control

金骨莲胶囊源于经典苗药组方, 该组方在《本草图经》《滇南本草》中均有记载<sup>[1]</sup>。其是以透骨香等5味中药材组方的复方中药制剂, 具有除湿、消肿、止痛、祛风等功效<sup>[2]</sup>, 临床主要用于镇痛、改善组织肿胀等<sup>[3-4]</sup>。目前, 已被收载于《国家中成药标准汇编: 脑系经络肢体》<sup>[5]</sup>和《国家基本医疗保险、工伤保险和生育保险药品目录(2022年)》<sup>[6]</sup>。现行质量标准中仅对大血藤、透骨香、金铁锁进行薄层色谱鉴别和对汉桃叶中富马酸进行含量限定(不低于0.01%)<sup>[7]</sup>, 难以全面控制该制剂的质量。课题组在前期研究中建立了同时测定金骨莲

胶囊中9种成分含量的高效液相色谱(HPLC)法及指纹图谱法<sup>[7-8]</sup>, 但单一的化学分析方法无法全面控制金骨莲胶囊的质量, 无法保障其临床安全性与有效性<sup>[9]</sup>。目前, 生物活性测定已成为中药质量控制发展的重要方向<sup>[10-11]</sup>, 2020年版《中国药典(四部)》中已增加9015中药生物活性测定指导原则(以下简称指导原则)<sup>[12]</sup>。为进一步完善金骨莲胶囊的质量控制方法, 有必要开展生物活性检测研究。优选和建立与药效相关且符合药品检定要求的中药生物活性测定方法是实现中药质量生物控制的前提和关键<sup>[13]</sup>。参考指导原则, 本研究中

\* 基金项目: 国家自然科学基金[81960763]; 贵州省科技计划项目[黔科合平台人才[2019]5407, 黔科合中引地[2023]006]; 贵州省高层次创新型人才[黔科合平台人才-GCC[2022]031-1]。

第一作者: 杨帅, 男, 硕士研究生在读, 研究方向为中药药代动力学与药物新剂型开发, (电子信箱)1186520624@qq.com。

△通信作者: 黄勇, 男, 博士研究生, 教授, 研究方向为中药药效物质基础与质量控制, (电话)0851-86908468 (电子信箱)HUANGY2020@126.com。

基于镇痛功效<sup>[2-3]</sup>建立了金骨莲胶囊的生物活性测定方法。现报道如下。

### 1 仪器、试药与动物

仪器: 1 mL一次性注射器; EL-240型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司, 精度为0.1 mg); KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 功率为500 W, 频率为40 kHz); WP-UP-IV-20型超纯水机(四川沃特尔科技发展有限公司); 12号灌胃针。

试药: 阿司匹林肠溶片(神威药业集团有限公司, 批号为2010281, 规格为每片25 mg); 金骨莲胶囊(贵州益佰制药股份有限公司, 批号分别为190816, 191001, 191010, 191102, 191108, 200607, 200711, 201021, 201101, 201205, 规格为每粒0.25 g); 冰醋酸(重庆川东化工<集团>有限公司, 批号为20191001); 生理盐水(贵州科伦药业有限公司, 批号为E121051506); 羧甲基纤维素钠(CMC-Na, 大连美仑生物科技有限公司, 批号为J0826A)。

动物: SPF级昆明小鼠50只, 雌雄兼用, 体质量18~22 g, 购于长沙市天勤生物技术有限公司, 动物许可证号为SCXK(湘)2019-0014。动物进入实验室后, 雌雄分开饲养, 每笼20只, 光照充足, 通风和空调设备良好, 室温20~24℃, 相对湿度50%~70%。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液制备

取阿司匹林肠溶片和金骨莲胶囊内容物各适量, 分别置容量瓶中, 精密称定, 加0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液定容, 摇匀, 即得。

### 2.2 分组、给药与建模

将50只昆明小鼠随机分为空白对照组(等量0.5%CMC-Na), 金骨莲胶囊低、中、高剂量组(113.75, 227.50, 455.00 mg/kg), 阳性药对照组(阿司匹林36.40 mg/kg), 各10只。分别按每1 kg体质量灌胃10 mL药物, 每日1次, 连续给药7 d。末次给药前12 h, 禁食、自由饮水。末次给药1 h后, 按每1 kg体质量小鼠腹腔注射10 mL 1%醋酸溶液, 以诱导扭体反应。

### 2.3 评价指标与统计学处理

记录腹腔注射醋酸后20 min内各组小鼠扭体反应的次数, 评价指标为小鼠的腹部是否内凹、臀部是否抬高、后肢是否伸展。根据扭体次数计算各给药组的镇痛率<sup>[14]</sup>, 镇痛率(%) = (扭体次数<sub>空白组</sub> - 扭体次数<sub>给药组</sub>) / 扭体次数<sub>空白组</sub> × 100%。

采用SPSS 22.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐时用LSD-t法进行比较, 方差不齐时用Dunnett T<sub>3</sub>法进行比

较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 2.4 限值剂量确定

由表1可知, 与空白对照组比较, 阳性药对照组及金骨莲胶囊低、中、高剂量组小鼠20 min内的扭体次数均显著减少( $P < 0.01$ ); 与金骨莲胶囊低剂量组比较, 金骨莲胶囊高剂量组小鼠20 min内的扭体次数显著减少( $P < 0.05$ )。为增加实验的可靠性与重复性, 选择455.00 mg/kg(相当于临床等效剂量的2倍)作为限值剂量。

表1 不同剂量金骨莲胶囊对小鼠镇痛率的影响( $n = 10$ )

Tab. 1 Effect of different doses of Jingulian Capsules on the analgesic rate of mice ( $n = 10$ )

组别	剂量(mg/kg)	20 min内扭体次数( $\bar{x} \pm s$ , 次)	镇痛率(%)
空白对照组		32.20 ± 7.86	
阳性药对照组	36.40	16.00 ± 4.36 <sup>*</sup>	50.31
金骨莲胶囊低剂量组	113.75	22.10 ± 4.95 <sup>*</sup>	31.37
金骨莲胶囊中剂量组	227.50	18.10 ± 5.09 <sup>*</sup>	43.79
金骨莲胶囊高剂量组	455.00	16.30 ± 6.57 <sup>*#</sup>	49.38

注: 与空白对照组比较,  $*P < 0.01$ ; 与金骨莲胶囊低剂量组比较,  $#P < 0.05$ 。表2至表4同。

Note: Compared with those in the blank control group,  $*P < 0.01$ ; Compared with those in the JGLC low-dose group,  $#P < 0.05$  (for Tab. 1-4).

### 2.5 方法学考察

重复性试验: 取同一批样品(批号为191001, 剂量为455.00 mg/kg)进行6次平行试验, 考察方法重复性。结果6次试验均能显著减少小鼠的20 min内扭体次数( $P < 0.01$ ), 平均镇痛率(47.43 ± 2.30)%,  $RSD$ 为4.85%( $n = 6$ ), 表明方法重复性良好。详见表2。

表2 重复性试验结果( $n = 10$ )

Tab. 2 Results of the repeatability test ( $n = 10$ )

组别	剂量(mg/kg)	20 min内扭体次数( $\bar{x} \pm s$ , 次)	镇痛率(%)
空白对照组		29.20 ± 7.87	
金骨莲胶囊高剂量组	455.00	15.10 ± 5.26 <sup>*</sup>	48.29
	455.00	15.40 ± 6.26 <sup>*</sup>	47.26
	455.00	16.60 ± 4.48 <sup>*</sup>	43.15
	455.00	15.10 ± 5.17 <sup>*</sup>	48.29
	455.00	15.30 ± 4.99 <sup>*</sup>	47.60
	455.00	14.60 ± 4.38 <sup>*</sup>	50.00

日间精密度试验: 由同实验室不同人员采用455.00 mg/kg的金骨莲胶囊连续灌胃给药7 d后, 测得各组小鼠的平均镇痛率为(46.63 ± 2.51)%,  $RSD$ 为5.39%( $n = 3$ ), 与正常对照组比较, 各给药组小鼠的扭体次数均显著减少( $P < 0.01$ ), 表明仪器日间精密度良好。详见表3。

表3 日间精密度试验结果( $n = 10$ )

Tab. 3 Results of the intra-day precision test ( $n = 10$ )

组别	剂量(mg/kg)	20 min内扭体次数( $\bar{X} \pm s$ , 次)	镇痛率(%)
空白对照组		25.50 ± 7.65	
		26.30 ± 6.77	
		26.70 ± 7.70	
金骨莲胶囊高剂量组	455.00	13.80 ± 5.07*	45.88
	455.00	13.30 ± 3.16*	49.43
	455.00	14.80 ± 5.47*	44.57

方法适用性试验:测定10批金骨莲胶囊,通过与空白对照组和金骨莲胶囊高剂量组间比较,考察方法适用性。结果10批给药后小鼠的镇痛率均大于40.00%,平均镇痛率为(47.44 ± 3.61)%,RSD为7.61%( $n = 10$ );与空白对照组比较,金骨莲胶囊高剂量组小鼠20 min内的扭体次数均显著减少( $P < 0.01$ ),表明方法适用性良好,不同批次金骨莲胶囊质量均一。详见表4。

表4 方法适用性试验结果( $n = 10$ )

Tab. 4 Results of the method applicability test ( $n = 10$ )

组别	批号	20 min内扭体次数( $\bar{X} \pm s$ , 次)	镇痛率(%)
空白对照组		27.00 ± 5.40	
金骨莲胶囊高剂量组	190816	14.70 ± 3.77*	45.56
	191001	13.80 ± 5.85*	48.89
	191010	13.30 ± 4.99*	50.74
	191102	12.90 ± 4.58*	52.22
	191108	15.10 ± 4.46*	44.07
	200607	15.70 ± 4.22*	41.85
	200711	13.60 ± 3.75*	49.63
	201021	15.30 ± 5.62*	43.33
	201101	14.30 ± 4.99*	47.04
	201205	13.20 ± 6.00*	51.11

### 3 讨论

中药材因其来源广泛、制备工艺烦杂,难以控制其质量,且中药多成分,多活性,药理作用较多,单一成分难以控制其质量和反映中药的疗效<sup>[15]</sup>。为更好地保证中药的安全性和有效性,有必要将质量控制和疗效评价标准相结合,以更好地保证每批药品用于临床的安全性和有效性<sup>[16]</sup>。生物活性测定方法可作为常规理化测定方法的补充,可进一步完善金骨莲胶囊的质量控制标准。

目前,对于镇痛药物药效的筛选,常用的经典模型有物理致痛模型(如热、电及机械刺激)和化学致痛模型(如甲醛、冰醋酸等)<sup>[14,17]</sup>。本研究中采用化学致痛模型,向小鼠腹部注入一定量冰醋酸,刺激脏层和壁层腹膜,引起腹部较大面积、较长时间的炎性疼痛,导致小鼠在一段时间后出现扭体反应(表现为腹部内凹、伸展后肢、抬高臀部、蠕行等)<sup>[18]</sup>,此模型能直观地通过小鼠的扭体情况来反映小鼠的内脏疼痛,其疼痛程度可通过

扭体次数和扭体潜伏期时长等观察指标进行量化,简单易行,对药物的镇痛作用较敏感,重复性好,是目前公认的筛选镇痛药物的经典模型之一<sup>[17]</sup>。通过预实验发现,热板实验所得数据重复性较差,结果不稳定。考虑到实验的重复性及稳定性,本研究中选用化学致痛冰醋酸诱导小鼠的疼痛反应作为实验模型进行研究。

本实验在课题组前期研究的基础上,结合本品功能主治镇痛药效成分,选择经典的小鼠醋酸扭体模型,以建立其镇痛生物活性检测方法,以具有镇痛功效的阿司匹林作为阳性对照药。由表1可知,与空白对照组比较,金骨莲胶囊低、中、高剂量组小鼠20 min内的扭体次数均显著减少( $P < 0.01$ );与金骨莲胶囊低剂量组比较,金骨莲胶囊高剂量组小鼠20 min内的扭体次数均显著减少( $P < 0.05$ )。为增加实验的可靠性和重复性,选择高剂量(455.00 mg/kg)进行方法学验证,结果表明,该方法的重复性、精密度及方法适用性均良好,且操作简单,经验证可用于揭示金骨莲胶囊的生物活性信息,以及全面评价药品品质。另外,建议采用该方法时,第1次结果若有统计学意义,则可判定为合格;第1次结果若无统计学意义,则可增加样本量进行1次复试,复试时应增设阳性药对照组,复试结果若有统计学意义,则判定为合格,否则为不合格。

### 参考文献

- [1] 李思翰,练东银,张广平,等. 基于PI3K/Akt信号通路探讨金骨莲提取物抑制脂多糖诱导RAW264.7细胞炎症反应的作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(14):29-35.
- [2] 彭旭,杨继滨,尤奇,等. 金骨莲灌胃对兔骨关节炎模型软骨细胞凋亡相关蛋白表达的影响[J]. 中国组织工程研究,2020,24(8):1188-1194.
- [3] 龚春燕,教华蓉,吴金刚,等. 金骨莲胶囊治疗急性软组织损伤的临床观察[J]. 中国处方药,2018,16(4):87-88.
- [4] 李伟. 金骨莲胶囊治疗骨性关节炎的临床观察[J]. 中医临床研究,2019,11(1):75-77.
- [5] WS-10093(ZD-0093)-2002,国家中成药标准汇编:脑系经络肢体[S].
- [6] 国家医疗保障局,人力资源社会保障部. 国家医保局人力资源社会保障部关于印发《国家基本医疗保险、工伤保险和生育保险药品目录(2022年)》的通知[A/OL]. (2023-01-04)[2023-07-04]. [http://www.nhsa.gov.cn/art/2023/1/18/art\\_104\\_10078.html](http://www.nhsa.gov.cn/art/2023/1/18/art_104_10078.html).
- [7] 刘慧,肖金超,张庆捷,等. 金骨莲胶囊HPLC指纹图谱及化学模式识别研究[J]. 中草药,2021,52(14):4185-4192.
- [8] 肖金超,刘慧,蒲健,等. HPLC法同时测定金骨莲胶囊中9个成分的含量[J]. 中药材,2021,44(12):2871-2876.
- [9] 马湘炜,蒋淑敏,赵筱萍. 基于多指标抗炎活性检测的注射用鼻塞通生物评价方法研究[J]. 浙江中医药大学学报,2019,43(5):399-406.
- [10] 王平,钱忠直. 《中国药典》2010年版编制大纲解读[J].