

基于止咳效价评价半夏及其炮制品品质的方法研究

杨冰月^{1,2}, 李敏^{1*}, 吴发明¹, 夏琴¹, 周海玉¹, 彭亮²

1. 成都中医药大学 中药材标准化教育部重点实验室 中药资源系统研究与开发利用国家重点实验室, 四川 成都 611137

2. 陕西中医药大学 中药资源产业化协调创新中心 陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心, 陕西 西安 712046

摘要: **目的** 建立半夏及其炮制品清半夏、姜半夏、法半夏和京半夏止咳效价测定的模型与方法, 为初步探索生物效价测定法用于评价半夏及其炮制品的质量提供科学依据。**方法** 基于小鼠浓氨水引咳模型, 采用量反应平行线(2,2)法建立半夏及其炮制品止咳效价的测定方法, 测定其效价值, 并结合总有机酸定量测定结果, 分析总有机酸的量与生物效价二者的相关性。**结果** 半夏炮制后, 止咳效价值均升高; 京半夏的止咳效价值最大, 为2105.59 U/g; 其后依次为法半夏、清半夏、姜半夏; 半夏止咳效价值最小, 为京半夏的1/3。结合总有机酸定量分析, 半夏及其炮制品的止咳效价与总有机酸的量相关, 其 R^2 为0.6920~0.9178, 表现为总有机酸的量增加, 止咳效价值增大, 二者呈显著的正相关。**结论** 该方法重复性、精密度良好, 适用于半夏及其炮制品止咳效价的测定, 可作为评价其质量的方法, 为完善其质量标准, 构建中药质控新模式提供了科学依据。

关键词: 半夏; 炮制品; 止咳; 生物效价; 总有机酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)17-2586-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.17.014

Methodological study on quality evaluation of crude and processed *Pinelliae Rhizoma* based on antitussive bioassay

YANG Bing-yue^{1,2}, LI Min¹, WU Fa-ming¹, XIA Qin¹, ZHOU Hai-yu¹, PENG Liang²

1. Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine Ministry of Education; State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization; Shaanxi Qinling Application Development and Engineering Center of Chinese Herbal Medicine, College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

Abstract: Objective To establish a method for determining the antitussive effects of *Pinelliae Rhizoma* (*Pinelliae ternate*), *Pinelliae Rhizoma Praeparatum cum Alumine*, *Pinelliae Rhizoma Praeparatum cum Zingibere et Alumine*, *Pinelliae Rhizoma Praeparatum* and *Pinelliae Rhizoma Praeparatum cum Glycyrrhizae et Alumine*, and provide a scientific basis for constructing a new quality evaluation pattern of crude and processed *P. ternate*. **Methods** Antitussive bioassay for crude and processed *Pinelliae Rhizoma* was established by taking parallel line quantitative analysis method, based on mouse cough model induced by strong aqua ammoniac. Correlation analysis was used to determine the relationships among the levels of different total organic acids and antitussive bioassay. **Results** The results showed that antitussive bioassay increased after prepared. *Pinelliae Rhizoma Praeparatum cum Glycyrrhizae et Alumine* had the highest antitussive bioassay (2105.59 U/g), followed by *Pinelliae Rhizoma Praeparatum*, *Pinelliae Rhizoma Praeparatum cum Alumine* and *Pinelliae Rhizoma Praeparatum cum Zingibere et Alumine*; *Pinelliae Rhizoma* demonstrated the lowest antitussive bioassay which was only 1/3 of *Pinelliae Rhizoma Praeparatum cum Glycyrrhizae et Alumine*. The antitussive bioassay increased when the content of total organic acids was growing, presenting a significant positive correlation, R^2 among them ranged from 0.6920 to 0.9178. **Conclusion** The method is stable, precise, and good for determining the antitussive bioassay of crude and processed *Pinelliae Rhizoma*. It can be used in quality evaluation and quality standard and provide a scientific basis for the quality control of Chinese materia medica.

Key words: *Pinelliae Rhizoma*; processed products; cough relieving; biological value; total organic acids

收稿日期: 2015-01-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173492); 四川省科技厅“十二五”农作物育种攻关(2011NZ0098-12); 国家基础科学人才培养基金项目(J1310034-04); 川产道地药材麦冬、半夏的品种和质量评价研究项目(2014F038)

作者简介: 杨冰月(1983—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为中药品种、质量及资源开发研究。Tel: 18064331298 E-mail: 304951774@qq.com

*通信作者 李敏(1962—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药品种、质量及资源开发研究。Tel: 13980038316 E-mail: 028limin@163.com

目前中药内在质量的优劣主要是通过运用各种分析检测手段测定某种指标性成分或某些活性成分的量来评价。中药成分多而复杂,大部分中药的化学成分尚不完全明确,仅以单个或几个有效成分作为定性、定量的指标远不能完全代表中药的整体质量,更不能完全反映其临床疗效。随着中药质量控制与评价模式研究的发展,生物活性检定逐渐应用于中药领域。它适用于结构复杂,理化方法不能定量测定或者理化测定不能反映其临床生物活性的药物^[1],在中药质量控制和评价中具有独到的优势,如《中国药典》2010年版一部中的水蛭就采用了此法控制其质量^[2]。此外,在洋地黄叶、板蓝根、益母草、大黄等中药中,生物活性检定法也得到了广泛的应用^[3-7]。

半夏为常用中药,具有祛痰、止咳、止呕等功效,尤其止咳作用显著,被认为是半夏的主要药理活性^[8-9]。半夏成分复杂,《中国药典》2010年版主要以薄层定性,琥珀酸定量来控制其质量,但以此作为评价指标远不能完全代表半夏的整体质量,更不能完全反映其临床疗效。因此,本实验以半夏及其炮制品清半夏、姜半夏、法半夏和京半夏为研究对象,基于小鼠浓氨水引咳模型,建立半夏及其炮制品止咳效价

测定方法,探索构建以生物活性为手段的中药质量控制与评价的新方法,补充和完善当前质控模式的不足。

1 材料

1.1 仪器

BP121S 十万分之一电子天平(德国赛多利斯公司);KQ-500DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);RE-5203 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);PHS-3E pH 计(上海精密科学仪器有限公司);磁力搅拌器(大地自动化仪器厂)。

1.2 试剂

磷酸可待因(青海制药厂有限公司,批号20100110);琥珀酸(中国食品药品检定研究院);氨水、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、氢氧化钠、95%乙醇均购买于成都市科龙化工试剂厂;盐酸(四川西陇化工有限公司);其余试剂均为分析纯。

1.3 样品

半夏采自全国3个省份,共6批;半夏炮制品各8批,其中5批购自于药厂,3批为自制炮制品,共32批。样品经成都中医药大学中药鉴定教研室李敏教授鉴定为天南星科植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Berit. 的干燥块茎及其炮制品清半夏、姜半夏、法半夏和京半夏。样品来源信息见表1。

表1 样品来源

Table 1 Origins of samples

编号	名称	来源	编号	名称	来源
bx-1	半夏(野生)	四川南充	jbx-6	姜半夏	自制(由bx-3炮制)
bx-2	半夏(野生)	四川遂宁	jbx-7	姜半夏	自制(由bx-3炮制)
bx-3	半夏(栽培)	四川遂宁	jbx-8	姜半夏	自制(由bx-3炮制)
bx-4	半夏(栽培)	甘肃西河	fbx-1	法半夏	四川新荷花中药饮片股份有限公司
bx-5	半夏(栽培)	甘肃清水	fbx-2	法半夏	成都康美药业有限公司
bx-6	半夏(栽培)	贵州赫章	fbx-3	法半夏	成都康美药业有限公司
qbx-1	清半夏	四川新荷花中药饮片股份有限公司	fbx-4	法半夏	四川省中药饮片有限责任公司
qbx-2	清半夏	四川新荷花中药饮片股份有限公司	fbx-5	法半夏	四川省中药饮片有限责任公司
qbx-3	清半夏	河北光明饮片有限公司汉草饮片厂	fbx-6	法半夏	自制(由bx-3炮制)
qbx-4	清半夏	河北光明饮片有限公司汉草饮片厂	fbx-7	法半夏	自制(由bx-3炮制)
qbx-5	清半夏	河北康派中药材有限公司	fbx-8	法半夏	自制(由bx-3炮制)
qbx-6	清半夏	自制(由bx-3炮制)	jjbx-1	京半夏	四川新荷花中药饮片股份有限公司
qbx-7	清半夏	自制(由bx-3炮制)	jjbx-2	京半夏	四川新荷花中药饮片股份有限公司
qbx-8	清半夏	自制(由bx-3炮制)	jjbx-3	京半夏	成都康美药业有限公司
jbx-1	姜半夏	四川新荷花中药饮片股份有限公司	jjbx-4	京半夏	四川省中药饮片有限责任公司
jbx-2	姜半夏	四川新荷花中药饮片股份有限公司	jjbx-5	京半夏	四川省中药饮片有限责任公司
jbx-3	姜半夏	成都康美药业有限公司	jjbx-6	京半夏	自制(由bx-3炮制)
jbx-4	姜半夏	成都康美药业有限公司	jjbx-7	京半夏	自制(由bx-3炮制)
jbx-5	姜半夏	四川省中药饮片有限责任公司	jjbx-8	京半夏	自制(由bx-3炮制)

1.4 实验动物

昆明种小鼠，雌雄各半，体质量 (20 ± 2) g，由成都达硕生物科技有限公司提供，合格证号SOXK(111)2008-24。

2 方法与结果

2.1 半夏的炮制

自制清半夏、姜半夏、法半夏按照《中国药典》2010年版的炮制方法进行炮制^[2]，京半夏炮制方法参考文献方法^[10]。

2.2 半夏及其炮制品供试品溶液的制备

取半夏及其炮制品粉末适量，分别加入10倍量75%乙醇，加热回流提取2次，每次1 h，合并提取液，滤过，回收乙醇，浓缩成浸膏，加5%无水碳酸钠溶液调pH值至12；然后用醋酸乙酯反复萃取至萃取液无色，收集碱水液，以盐酸酸化至pH值为2；再用醋酸乙酯反复萃取，至无有机酸反应（0.1%溴酚蓝乙醇溶液作为薄层色谱显色剂，喷洒后，呈黄色斑点），合并醋酸乙酯萃取液，回收溶剂，蒸干后溶解，滤过，滤液浓缩至干，即得半夏或其炮制品的总有机酸提取物。给药前加含2滴1%聚山梨酯80的0.5% CMC-Na使其溶解，按

1:0.5倍剂距等比稀释成一定质量浓度的供试品溶液。

2.3 小鼠浓氨水引咳模型的制备

2.3.1 氨水体积分数的筛选 本实验设置了氨水3个体积分数梯度，分别为20%、25%、30%。在倒置的500 mL容器中，放含30%氨水的棉球时，不足1 min，小鼠死亡。降低氨水体积分数，用25%的氨水进行实验，小鼠不会出现死亡，且0.5 min后出现强烈的咳嗽。使用最低体积分数20%的氨水进行实验，小鼠几乎不咳嗽。通过3次重复实验，结果显示一致，最终确定实验氨水体积分数为25%。

2.3.2 氨水使用量 通过3次重复实验，结果显示当500 mL容器中置入吸取25%氨水0.3 mL的棉球时，氨水致小鼠咳嗽效果最佳，易于体现出受试药物的药效，并对小鼠病理伤害小，不出现死亡现象。

2.3.3 观察时间 本实验分别设置了4个观察时间即1、2、3、4 min，对小鼠进行实验。结果见表2。结果显示，3 min内小鼠咳嗽次数与4 min内咳嗽次数之间无显著差异，故实验最终选择观察时间为3 min。

表2 氨水刺激不同时间致小鼠咳嗽效果的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Comparative effect of stimulus time by NH_4OH to mouse cough ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

性别	咳嗽潜伏期/s	咳嗽次数/次			
		1 min	2 min	3 min	4 min
雄性小鼠	41.12±4.57	3.18±1.58	6.42±2.06	12.69±1.02	14.66±3.50
雌性小鼠	39.92±4.08	4.06±1.65	7.07±1.98	15.02±2.43	16.83±1.74

2.3.4 阳性药验证结果 以磷酸可待因(30 mg/kg)为阳性对照，观察氨水引咳效果，结果对照组小鼠咳嗽潜伏期为 (40.13 ± 4.02) s ($n=10$)，3 min内咳嗽次数为 (15.74 ± 1.36) 次 ($n=10$)；阳性对照组咳嗽潜伏期为 (112.59 ± 3.72) s ($n=10$)，3 min内咳嗽次数为 (4.06 ± 1.19) 次 ($n=10$)，两组间比较差异非常显著($P<0.01$)，阳性药磷酸可待因能够明显延长小鼠咳嗽潜伏期，减少3 min内咳嗽次数。

2.3.5 半夏止咳作用 取小鼠40只，雌雄各半，随机分成4组，分别为对照组、阳性对照组及半夏高、低剂量组，每组10只，实验前小鼠禁食不禁水12 h。对照组小鼠给予0.5% CMC-Na(含2滴1%聚山梨酯80)，阳性对照组给予磷酸可待因30 mg/kg，半夏组给予半夏总有机酸提取物，高、低剂量分别为820、410 mg/kg(生药剂量)，各组

均ig给药，每天1次，连续7 d。末次给药1 h后，分别将小鼠按照分组顺序放置于倒置的500 mL容器中，内放一棉球，用1 mL注射器吸取25%氨水0.3 mL注入棉球中，迅速倒置容器(以防气体泄漏)，秒表记录时间，观察小鼠的咳嗽潜伏期(从记录时间起到小鼠第1次咳嗽的时间)，3 min内咳嗽次数(以小鼠腹肌收缩，张大口同时伴有咳嗽声为准)，计算抑咳率[抑咳率=(对照组小鼠的咳嗽次数-给药组小鼠的咳嗽次数)/对照组小鼠的咳嗽次数]。采用SPSS 18.0软件的单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行数据处理，结果见表3。与对照组比较，磷酸可待因及高、低剂量半夏均能明显延长小鼠咳嗽潜伏期，减少小鼠3 min内咳嗽次数，差异显著($P<0.01$)，结果表明半夏具有止咳作用。

表3 半夏对小鼠的止咳作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Antitussive effect of *Pinelliae Rhizoma* in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	咳嗽潜伏 期/s	3 min 咳嗽 次数/次	抑咳 率/%
对照	—	34.22±3.88	14.47±0.97	
磷酸可待因	30	105.13±3.87**	4.25±0.42**	70.36
半夏	410	46.58±3.27**	7.81±0.79**	46.03
	820	96.93±4.58**	6.48±0.52**	55.22

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

2.4 方法学考察

2.4.1 重复性考察 同一样品, 制备成3批供试品溶液, 按“2.3.5”项下方法进行小鼠浓氨水引咳实验的重复性考察。结果咳嗽潜伏期和咳嗽次数的RSD均小于3%, 表明方法重复性良好。

2.4.2 精密度考察 制备同一供试品溶液, 按“2.3.5”项下方法平行进行小鼠浓氨水引咳实验6次, 结果咳嗽潜伏期和咳嗽次数的RSD均小于3%, 表明方法精密度良好。

2.5 基于浓氨水引咳法的半夏及其炮制品止咳效价测定

2.5.1 供试品给药剂量 给药剂量根据人与小鼠

每千克体质量剂量折算系数和提取物的提取率进行计算。具体剂量(生药剂量)为半夏410、820 mg/kg, 清半夏400、800 mg/kg, 姜半夏420、840 mg/kg, 法半夏460、920 mg/kg, 京半夏540、1 080 mg/kg。

2.5.2 磷酸可待因阳性对照溶液的配制 参照文献方法^[11-13], 以30、15 mg/kg(剂距1:0.5)的磷酸可待因分别为阳性对照高、低剂量组。给药前加入含2滴1%聚山梨酯80的0.5% CMC-Na溶解。

2.5.3 试验设计 选择量反应平行线(2.2)法, 将对照品溶液和供试品溶液以剂距(1:0.5)按高、低剂量随机分组, 每组10只, 其中2组作为阳性对照组, ig高、低剂量阳性对照溶液, 其余给药组分别ig高、低剂量供试品溶液。采用国家药典委员会编制的“中国药典生物检定统计程序BS2000”进行半夏及其炮制品止咳效价值的计算。

2.5.4 止咳效价的计算 运用“中国药典生物检定统计程序BS2000”软件, 以采自四川遂宁市(野生)半夏(编号bx-2)为例示范止咳效价的计算。

进入“BS2000 工作站”, 选择量反应平行线(2.2)法, 输入样品的估计效价、样品的最大剂量、对照品的最大剂量及剂距等进行分析, 通过对数转换得到可靠性测验结果, 见表4。

表4 半夏止咳效价检测的方差分析和可靠性测验结果

Table 4 Results of variance analysis and reliability test of antitussive valence of *Pinelliae Rhizoma*

变异来源	自由度	方差和	方差	F 值	P 值
试品间	1	0.388 06	0.388 06	1.982	>0.05
回归	1	0.060 533	0.060 533	30.916	<0.01
偏离平行	1	0.000 541 26	0.000 541 26	<1	>0.05
剂间	3	0.449 14	0.149 71	76.463	<0.01
区组间	9	0.024 667	0.002 740 8	1.399 8	>0.05
误差	26	0.050 907	0.001 958		
总量	39				

(1) 可靠性检验: 由表4可知, 试品间(供试品和阳性对照) $P > 0.05$, 说明试品间无显著性差异, 总效价无差异; 回归 $P < 0.01$, 具有极显著性差异, 说明随着剂量的增加, 3 min内咳嗽次数有规律的减少; 偏离平行 $P > 0.05$, 说明供试品与阳性对照作用规律相近, 呈平行直线关系, 可用(2.2)法测定供试品的效价; 剂间 $P < 0.01$, 具有极显著性差异, 说明实验剂量比例和实验安排合理。

(2) 效价计算和实验误差估计: 根据公式计算, 半夏的效价及可信限的结果为 $sm = 0.169 13$, 测得效价(PT) = 836.64 U/g, 测得效价的可信限率(FL) = 8.640 4%。

2.5.5 半夏及其炮制品止咳效价的测定结果 本实验基于浓氨水引咳法对半夏及其炮制品清半夏、姜半夏、法半夏和京半夏的止咳效价进行了测定, 结果见表5。

表 5 半夏及其炮制品止咳效价测定结果

Table 5 Results of antitussive valence of crude and processed *Pinelliae Rhizoma*

样品编号	PT/(U·g ⁻¹)	FL/%	平均 PT/(U·g ⁻¹)	样品编号	PT/(U·g ⁻¹)	FL/%	平均 PT/(U·g ⁻¹)
bx-1	825.22	6.81	759.10±68.16	jbx-6	699.85	4.94	
bx-2	836.64	8.64		jbx-7	1 438.69	9.46	
bx-3	711.82	13.61		jbx-8	872.02	6.49	
bx-4	785.29	9.06		fbx-1	2 073.91	3.23	2 017.98±537.35
bx-5	732.50	10.99		fbx-2	2 009.35	9.20	
bx-6	663.10	7.35		fbx-3	1 865.10	4.84	
qbx-1	1 500.11	5.42	1 832.36±387.58	fbx-4	3 007.10	8.44	
qbx-2	1 811.13	4.24		fbx-5	2 541.94	4.03	
qbx-3	2 171.80	4.04		fbx-6	1 718.30	3.45	
qbx-4	1 889.25	6.40		fbx-7	1 325.65	8.05	
qbx-5	2 569.93	4.03		fbx-8	1 602.47	5.63	
qbx-6	1 437.44	4.95		jjbx-1	2 362.87	4.77	2 105.59±243.32
qbx-7	1 794.48	9.19		jjbx-2	2 563.80	6.27	
qbx-8	1 484.73	3.23		jjbx-3	2 052.18	7.59	
jbx-1	883.86	7.95	1 146.63±317.80	jjbx-4	1 947.52	6.86	
jbx-2	984.85	9.45		jjbx-5	2 165.19	6.28	
jbx-3	1 437.44	5.46		jjbx-6	1 940.19	9.63	
jbx-4	1 363.61	5.54		jjbx-7	1 895.22	6.36	
jbx-5	1 492.72	3.71		jjbx-8	1 917.73	9.20	

由表 5 可知,半夏及其不同炮制品效价值存在差异,效价值在 759.10~2 105.59 U/g,高低相差近 3 倍。半夏炮制后,止咳效价值均升高。京半夏的止咳效价值最大,为 2 105.59 U/g;其后依次为法半夏、清半夏、姜半夏;半夏止咳效价值最小,为 759.10 U/g。

2.6 电位滴定法测定半夏及其炮制品中总有机酸

2.6.1 滴定液的配制与标定 按《中国药典》2010 年版一部附录 XV F “滴定液”项下氢氧化钠滴定液、盐酸滴定液的制备方法配制 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液和 0.1 mol/L 盐酸溶液,并进行标定。

2.6.2 供试品溶液的制备 精密称定半夏及其炮制品清半夏、姜半夏、法半夏和京半夏粉末(过 4 号筛) 5 g,置锥形瓶中,加乙醇 50 mL,加热回流 1 h,同上操作,重复提取 2 次,放冷,滤过,合并滤液,蒸干,残渣精密加入 0.1 mol/L 氢氧化钠滴定液 10 mL,在功率 500 W,频率 40 kHz 的条件下超声处理 30 min,转移至 50 mL 量瓶中,加新煮沸的冷水至刻度,摇匀,即得。

2.6.3 测定方法 精密吸取供试品溶液 25 mL,按《中国药典》2010 年版一部附录 VIII A “电位

滴定法”测定供试品溶液中的总有机酸的量。每毫升 0.1 mol/L 氢氧化钠滴定液相当于 5.904 mg 的琥珀酸。

2.6.4 测定结果 根据实验得到的电位 (E) 值和滴定体积 (V) 值计算一级微商 $\Delta E/\Delta V$ 和二级微商 $\Delta^2 E/\Delta V^2$; $\Delta E/\Delta V$ 和 $\Delta^2 E/\Delta V^2$ 等于零时对应的体积即为滴定终点。滴定终点体积计算公式如下。

$$V_0 = V + a/(a+b) \times \Delta V$$

V_0 表示滴定终点体积; V 表示 a 点对应的滴定液体积; a、b 分别表示过零前、后的二级微商绝对值; ΔV 表示由 a 到 b 点滴加的滴定液体积

半夏及其炮制品清半夏、姜半夏、法半夏和京半夏的总有机酸的量测定结果见表 6。按照《中国药典》2010 年版一部“含量测定”项下规定,半夏、清半夏按干燥品计算,含总有机酸以琥珀酸 (C₄H₆O₄) 计,分别不得少于 0.25%、0.30%。由表 6 可知,半夏、清半夏各批样品总有机酸的量均达到药典标准,其平均值分别为 0.42%、0.46%;姜半夏为 0.40%;法半夏为 0.48%;京半夏为 0.50%。结果表明,半夏炮制后总有机酸的量不同程度的增加,姜半夏变化最小。

表6 半夏及其炮制品总有机酸定量测定结果 (n = 2)
Table 6 Determination of total organic acids in crude and processed *Pinelliae Rhizoma* (n = 2)

编号	总有机酸平均值/%	编号	总有机酸平均值/%
bx-1	0.47	jbx-6	0.36
bx-2	0.52	jbx-7	0.42
bx-3	0.36	jbx-8	0.39
bx-4	0.42	fbx-1	0.46
bx-5	0.37	fbx-2	0.49
bx-6	0.38	fbx-3	0.44
qbx-1	0.45	fbx-4	0.60
qbx-2	0.46	fbx-5	0.56
qbx-3	0.44	fbx-6	0.44
qbx-4	0.41	fbx-7	0.44
qbx-5	0.36	fbx-8	0.41
qbx-6	0.52	jjbx-1	0.58
qbx-7	0.50	jjbx-2	0.61
qbx-8	0.53	jjbx-3	0.50
jbx-1	0.37	jjbx-4	0.50
jbx-2	0.40	jjbx-5	0.51
jbx-3	0.42	jjbx-6	0.45
jbx-4	0.40	jjbx-7	0.43
jbx-5	0.45	jjbx-8	0.46

2.7 半夏炮制前后止咳效价与总有机酸量的相关性分析

以半夏及其炮制品清半夏、姜半夏、法半夏和京半夏中总有机酸的量为横坐标 (x), 止咳效价值为纵坐标 (y), 通过 SPSS 18.0 软件进行相关性分析, 为客观阐明半夏炮制前后生物效价与化学成分之间的内在联系提供理论依据。相关性分析结果见表 7。结果表明, 半夏及其炮制品总有机酸量与止

表7 半夏及其不同炮制品止咳效价与总有机酸量相关性分析结果

Table 7 Correlation analysis of total organic acids and antitussive valence of crude and processed *Pinelliae Rhizoma*

样品	回归方程	R ²	P 值
半夏	y=943.9x+362.66	0.774 8	<0.05
清半夏	y=-5 614x+4 407.8	0.692 0	<0.05
姜半夏	y=9 760.1x-2 769.6	0.793 3	<0.05
法半夏	y=7 557.7x-1 609.7	0.876 0	<0.01
京半夏	y=3 726x+223.97	0.917 8	<0.01

咳效价的 R² 在 0.692 0~0.917 8, P<0.05 或 0.01, 总有机酸的量与止咳效价存在相关性, 京半夏、法半夏总有机酸的量最高, 止咳效价值最大; 清半夏、姜半夏总有机酸的量低于前二者, 其止咳效价值亦较小; 半夏的总有机酸的量最低, 止咳效价值最小。因此, 总有机酸与止咳效价值存在着密切联系, 表现为总有机酸的量增加, 止咳效价值增大, 二者变化趋势一致, 呈显著的正相关。

3 讨论

3.1 小鼠浓氨水引咳模型的选择依据

目前研究止咳活性的药理方法主要是使用化学药物或电刺激引起动物咳嗽的模型, 观察药物的止咳活性。咳嗽多是由刺激呼吸道黏膜引起, 用电刺激喉部延髓咳嗽中枢或神经, 可以分析止咳作用是作用于中枢或是外周, 但操作复杂, 选用的实验动物为大型动物如猫、狗等, 筛选药物时, 耗费大, 难以进行大量研究, 应用较少; 用化学药物 (氨水、辣椒素、枸橼酸) 刺激呼吸道感受器引起咳嗽, 操作简便, 选用的实验动物为小型啮齿动物如小鼠、豚鼠等, 实验成本低, 宜于大批量筛选药物, 实验中应用较多。豚鼠枸橼酸引咳法和豚鼠辣椒素引咳法选用的动物是豚鼠, 豚鼠对化学刺激物敏感度高, 引起的咳嗽反射与人类十分相似, 有利于咳嗽症状的准确评估, 但实验成本高, 多用于确定药物的止咳效果后, 再作进一步研究^[14]。浓氨水引咳法适用于小鼠, 方法快速、简便, 耗药量少, 易于掌握, 适合于止咳药研究的筛选^[15], 有大量研究报道表明该法成功应用于中药的止咳作用研究^[11,13,16-17], 因此本实验采用小鼠浓氨水引咳法建立模型, 进行半夏及其炮制品的止咳效价测定。

3.2 半夏及其炮制品止咳效价与总有机酸量的相关性研究

生物效价反映了药物的药理活性信息, 有效成分是其药理活性的基础。本实验对半夏及其炮制品的止咳效价与有效成分总有机酸进行了相关性分析, 阐明了二者的关系, 表现为总有机酸的量增高, 止咳效价值增大。

前期实验对半夏及其炮制品的药效学进行了研究, 结果表明半夏及其炮制品的总有机酸具有止咳作用^[18]。结合总有机酸定量测定结果, 显示总有机酸的量与止咳作用存在着密切联系, 总有机酸的量越高, 止咳作用越强。

综上所述, 半夏及其炮制品的总有机酸量、止

咳作用、止咳效价,三者存在一定的相关性,总有机酸的量增加,止咳作用增强,止咳效价值增大,三者变化趋势一致,呈显著的正相关。且止咳效价测定结果与临床功效相一致,止咳效价测定法可作为评价半夏及其炮制品质量的方法,为其更好地服务于临床,保证中药用药的安全性、有效性具有重要意义。在半夏质量控制与评价体系中引入生物活性测定,结合有效成分定量,构建更全面的中药质量控制与评价的新方法,既可辅助鉴定药材的真伪优劣,同时为定性、定量的评价中药的内在质量提供一定的科学依据。

参考文献

- [1] 王伽伯,李会芳,肖小河,等. 生物检定方法控制中药质量的思考 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2007, 6(9): 36-39.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 中国药典 [S]. 二部. 2010.
- [4] 魏丽,李远,肖小河,等. 基于抗菌效价检测的板蓝根药材品质评价方法的研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2008, 10(2): 33-36.
- [5] 孙琴,李寒冰,鄢丹,等. 基于抗菌效价检测的板蓝根颗粒制备过程质量变化评价 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 259-264.
- [6] 杨明华,王溶溶. 益母草药材生物检定方法的研究(III) [J]. 中国现代应用药学杂志, 2004, 21(2): 124-126.
- [7] 李会芳,王伽伯,曲毅,等. 致泻效价检测用于大黄品质评价的方法研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(11): 1309-1312.
- [8] 张科卫,吴皓,沈绣红. 半夏中总游离有机酸的作用 [J]. 南京中医药大学学报, 2001, 17(3): 159.
- [9] 王志强,李炳超. 半夏药理作用研究进展 [J]. 山西医药杂志, 2009, 38(1): 65-67.
- [10] 王贵英. 京半夏的传统炮制法 [J]. 湖南中医药导报, 2002, 8(1): 40.
- [11] Wang D D, Wang S, Chen X, *et al.* Antitussive, expectorant and anti-inflammatory activities of four alkaloids isolated from Bulbus of *Fritillaria wabuensis* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(1): 189-193.
- [12] Shang J H, Cai X H, Zhao Y L, *et al.* Pharmacological evaluation of *Alstonia scholaris*: Anti-tussive, anti-asthmatic and expectorant activities [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 129(2): 293-298.
- [13] Wang D D, Zhu J Y, Wang S, *et al.* Antitussive, expectorant and anti-inflammatory alkaloids from *Bulbus Fritillaria Cirrhosae* [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(8): 1290-1294.
- [14] 石艳,任立群,李才. 咳嗽动物模型 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [15] 张清玲. 咳嗽动物模型 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [16] Han N, Chang C L, Wang Y C, *et al.* The *in vivo* expectorant and antitussive activity of extract and fractions from *Reineckia carnea* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(1): 220-223.
- [17] Yu P, Cheng S, Xiang J, *et al.* Expectorant, antitussive, anti-inflammatory activities and compositional analysis of *Aster tataricus* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 164(22): 328-333.
- [18] 杨冰月. 基于物质基础和生物活性对半夏及其炮制品功效的相关性研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.