

基于灰色关联度分析法对半夏及其炮制品总有机酸止咳作用的谱-效关系研究

杨冰月^{1,2}, 李敏^{1*}, 任敏¹, 赵春艳¹, 魏恒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 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 研究半夏及其炮制品清半夏、姜半夏、法半夏和京半夏总有机酸 HPLC 指纹图谱与止咳作用的相关性, 建立半夏及其炮制品总有机酸与止咳作用的谱-效关系, 以阐明止咳作用的物质基础。方法 采用灰色关联度分析法, 对半夏及其炮制品总有机酸 HPLC 指纹图谱的各共有峰峰面积与止咳的 3 个评价指标 (咳嗽潜伏期、3 min 内咳嗽次数及抑咳率) 进行相关性分析, 建立半夏及其炮制品总有机酸止咳作用的谱-效关系。结果 半夏及其炮制品总有机酸对浓氨水致小鼠咳嗽有显著的抑制作用, 与半夏止咳功效一致。在半夏及其炮制品总有机酸 HPLC 指纹图谱中, 4、6 (琥珀酸)、12 号色谱峰所代表的化学成分与止咳作用具有较强的相关性, 对止咳作用贡献较大, 特别是 4 号色谱峰, 峰面积大、关联度强。结论 半夏及其炮制品总有机酸 HPLC 指纹图谱与其止咳作用具有相关性。通过谱-效关系研究, 阐明了半夏及其炮制品止咳作用的物质基础, 为其质量控制与评价提供了理论依据。

关键词: 半夏; 炮制品; 止咳作用; 总有机酸; 指纹图谱; 灰色关联度分析法; 谱-效关系

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)13-2301-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.13.016

Spectrum-effect relationship of antitussive effect by total organic acids in crude and four processed *Pinellia ternate* based on gray relative analysis method

YANG Bing-yue^{1,2}, LI Min¹, REN Min¹, ZHAO Chun-yan¹, WEI Heng¹, 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 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 investigate the HPLC fingerprint of the total organic acids in *Pinelliae Rhizoma* (the rhizomes of *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 the its relationship with antitussive effect, and to establish the spectrum-effect relationship of the total organic acids in crude and processed *P. ternate* and antitussive effect, so as to elucidate their material basis of antitussive effect. **Methods** The gray relative analysis method was used to make correspond analysis of the HPLC fingerprints of total organic acids in *Pinelliae Rhizoma* and processed products related with three antitussive indexes (the latent period, coughing times in 3 min, and inhibitory rate), establishing the spectrum-effect relationship between them. **Results** The total organic acids of crude *Pinelliae Rhizoma* and its processed products showed the antitussive activity against the ammonium hydroxide-induced mice cough, consist with arresting cough of *Pinelliae Rhizoma*. The HPLC data demonstrated that the chemical composition represented by peak 4, 6 (succinic acid), and 12 had strong relevancy with anti-tussive activity and made a great contribution to this activity, especially peak 4, which had bigger area and stronger relevancy. **Conclusion** This paper reveals that there

收稿日期: 2015-11-19

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); 四川省中医药管理局项目 (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

exists the correlations between the HPLC fingerprints of total organic acids and antitussive effect of crude and processed *Pinelliae Rhizoma*, elucidating the material basis of antitussive effects in crude and processed *P. ternate* by the spectrum-effect study, and could provide a theory basis for the quality control and analysis of *Pinelliae Rhizoma*.

Key words: *Pinelliae Rhizoma*; processed products; antitussive effect; total organic acids; fingerprints; gray relative analysis; spectrum-effect relationship

半夏来源于天南星科植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Berit. 的干燥块茎, 具有燥湿化痰、消痞散结的功效^[1]。因其有小毒, 炮制后方能入药, 临床上常用的炮制品有清半夏、姜半夏、法半夏、京半夏等。半夏成分复杂, 主要含生物碱、有机酸、核苷类、蛋白质、多糖、挥发油等, 其中与药效相关的成分主要有生物碱、有机酸、核苷类^[2-4]。现代药理研究表明, 有机酸具有止咳作用, 其作用机制主要是能够抑制咳嗽中枢, 降低呼吸道感受器敏感性^[5-7]。

指纹图谱技术是中药研究的一个热点, 它既能较全面地反映中药中化学成分的种类与数量, 又能从整体上评价中药质量, 是一种可行的质量控制方法^[8]。中药指纹图谱所反映的化学成分是否与药效物质基础一致, 与药效相关, 这些问题尚不明确。因此, 本实验通过 HPLC 法建立了半夏及其炮制品总有机酸指纹图谱, 以浓氨水刺激小鼠黏膜引咳为模型进行了药效学研究, 采用灰色关联度分析法对半夏炮制前后总有机酸指纹图谱与止咳作用之间的相关性进行分析, 建立谱-效关系, 阐明半夏及其炮制品止咳作用的物质基础, 为其质量控制与评价提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

Agilent technologies 1200 高效液相色谱仪; 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); Allegra X-22R 离心机(美国贝克曼公司); Heidolph-Laborota 4000 旋转蒸发仪(德国海道夫公司)。

1.2 试剂

琥珀酸(中国食品药品检定研究院, 批号 896-200001, 质量分数 99.6%); 磷酸可待因(青海制药厂有限公司, 批号 20100110); 氨水(成都市科龙化工试剂厂, 批号 20110617); 羧甲基纤维素钠(CMC-Na, 成都市科龙化工试剂厂, 批号 20100302); 乙腈为色谱纯; 水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

半夏采自全国 5 个省份, 共 10 批; 半夏炮制品

各 8 批, 5 批购自于药厂, 3 批为自制炮制品, 共计 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。

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^[9], 京半夏炮制方法参考文献报道^[10]。

2.2 半夏及其炮制品总有机酸的提取制备

取各批半夏及半夏炮制品适量, 粉碎, 过 4 号筛, 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, 得总有机酸提取物。

2.3 半夏及其炮制品总有机酸的止咳作用研究

2.3.1 受试药物配制 将各批半夏及半夏炮制品总有机酸提取物, 按实验动物(小鼠)与成人服用剂量计算公式进行换算, 称取各提取物, 加含 2 滴 1%聚山梨酯-80 的 0.5% CMC-Na 制成混悬液, 给药体积 0.01 mL/g。

2.3.2 浓氨水引咳实验 采用浓氨水引咳实验分别对 10 批半夏及 32 批炮制品的总有机酸提取物进行药效学评价。实验按照半夏、清半夏、姜半夏、法半夏和京半夏分 5 批进行, 每批随行设置对照组和阳性药物组。每 1 个样品均设高、低剂量(以各样品提取物中总有机酸的量设置总有机酸 0.06、

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(栽培)	四川	jbx-4	姜半夏	成都康美药业有限公司
bx-2	半夏(野生)	四川	jbx-5	姜半夏	四川省中药饮片有限责任公司
bx-3	半夏(野生)	四川	jbx-6	姜半夏	自制(四川,栽培)
bx-4	半夏(栽培)	甘肃	jbx-7	姜半夏	自制(四川,栽培)
bx-5	半夏(栽培)	甘肃	jbx-8	姜半夏	自制(四川,栽培)
bx-6	半夏(栽培)	山东	fbx-1	法半夏	四川新荷花中药饮片股份有限公司
bx-7	半夏(栽培)	江西	fbx-2	法半夏	成都康美药业有限公司
bx-8	半夏(栽培)	江西	fbx-3	法半夏	成都康美药业有限公司
bx-9	半夏(栽培)	贵州	fbx-4	法半夏	四川省中药饮片有限责任公司
bx-10	半夏(栽培)	贵州	fbx-5	法半夏	四川省中药饮片有限责任公司
qbx-1	清半夏	四川新荷花中药饮片股份有限公司	fbx-6	法半夏	自制(四川,栽培)
qbx-2	清半夏	四川新荷花中药饮片股份有限公司	fbx-7	法半夏	自制(四川,栽培)
qbx-3	清半夏	河北光明饮片有限公司汉草饮片厂	fbx-8	法半夏	自制(四川,栽培)
qbx-4	清半夏	河北光明饮片有限公司汉草饮片厂	jjbx-1	京半夏	四川新荷花中药饮片股份有限公司
qbx-5	清半夏	河北康派中药材有限公司	jjbx-2	京半夏	四川新荷花中药饮片股份有限公司
qbx-6	清半夏	自制(四川,栽培)	jjbx-3	京半夏	成都康美药业有限公司
qbx-7	清半夏	自制(四川,栽培)	jjbx-4	京半夏	四川省中药饮片有限责任公司
qbx-8	清半夏	自制(四川,栽培)	jjbx-5	京半夏	四川省中药饮片有限责任公司
jbx-1	姜半夏	四川新荷花中药饮片股份有限公司	jjbx-6	京半夏	自制(四川,栽培)
jbx-2	姜半夏	四川新荷花中药饮片股份有限公司	jjbx-7	京半夏	自制(四川,栽培)
jbx-3	姜半夏	成都康美药业有限公司	jjbx-8	京半夏	自制(四川,栽培)

0.12 g/kg 2 个剂量,换算成各样品的生药剂量)组,每个剂量组均为 10 只小鼠,雌雄各半。昆明种小鼠适应 3 d,实验前小鼠禁食不禁水 12 h。对照组 ig 含 2 滴 1%聚山梨酯-80 的 0.5% CMC-Na,阳性药物组 ig 磷酸可待因 30 mg/kg,给药组分别 ig 给予各批次药材制得的总有机酸提取物,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 注入棉球上,迅速倒置容器(以防气体泄漏),秒表记录时间,观察记录小鼠的咳嗽潜伏期(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,张大口同时并伴有咳嗽声为准),计算抑咳率。

抑咳率=(给药前小鼠的咳嗽次数-给药后小鼠的咳嗽次数)/给药前小鼠的咳嗽次数

结果表明同种半夏或半夏炮制品不同批次间观察的药效指标数据差异不大,故将同一种样品的不同批次的药效指标进行合并,求算平均值,比较半夏及不同半夏炮制品不同剂量下的药效。数据均

以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析。结果见表 2。与对照组比较,磷酸可待因组、半夏及半夏炮制品总有机酸各组均能延长小鼠咳嗽潜伏期,减少小鼠 3 min 内咳嗽次数 ($P < 0.05$ 、 0.01);半夏及半夏炮制品总有机酸高剂量组的止咳作用均强于低剂量组,其中京半夏作用最强,抑咳率为 63.51%。

2.4 半夏及其炮制品总有机酸 HPLC 指纹图谱研究^[11]

2.4.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);以 10% Na₂HPO₄-HAc 缓冲液(pH 2.7)-乙腈为流动相进行梯度洗脱,程序见表 3;检测波长 256 nm;体积流量 1.0 mL/min;柱温 35 ℃;进样量 10 μL。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取琥珀酸对照品适量,置于 10 mL 量瓶中,甲醇溶解,定容,摇匀,配成 0.2 mg/mL 的对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备 精密称取半夏及半夏炮制品各批总有机酸提取物 0.1 g,加甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

表 2 半夏及半夏炮制品总有机酸止咳作用比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Results of antitussive effect of total organic acids in crude and processed *Pinelliae Rhizoma* ($\bar{x} \pm s$)

组别	生药剂量/(g·kg ⁻¹)	咳嗽潜伏期/s	3 min 咳嗽次数	抑咳率/%
对照	—	34.22±3.88	14.47±0.97	—
磷酸可待因	30 mg·kg ⁻¹	105.13±3.87**	4.25±0.42**	70.36
半夏 (n=100)	0.41	46.58±3.27	7.81±0.79**	46.03
	0.82	96.93±4.58**	5.90±0.52**	59.22
清半夏 (n=80)	0.40	47.78±5.91*	8.65±0.67**	40.22
	0.80	68.55±5.64**	5.37±0.61**	62.89
姜半夏 (n=80)	0.42	47.29±5.52	8.58±0.75**	40.70
	0.84	79.15±5.21**	5.38±0.63**	60.82
法半夏 (n=80)	0.46	45.43±4.85	8.19±0.78**	43.40
	0.92	62.13±4.66*	5.33±0.69**	63.17
京半夏 (n=80)	0.54	55.23±4.78*	8.07±0.87**	44.23
	1.08	83.37±5.91**	5.28±0.56**	63.51

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs control group

表 3 流动相梯度洗脱程序

Table 3 Elution program of gradient

t/min	乙腈/%	10% Na ₂ HPO ₄ -HAc 缓冲液 (pH 2.7)/%
0	2	98
10	2	98
15	15	85
35	40	60
40	40	60
40.1	2	98
45	2	98

2.4.4 半夏及半夏炮制品总有机酸指纹图谱的建立 精密吸取各供试品溶液各 10 μL 注入高效液相色谱仪, 进行测定, 记录色谱图。半夏及半夏炮制品各批样品色谱图经过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”处理得到药材对照指纹图谱。对照品溶液见图 1-A, 半夏及各半夏炮制品对照指纹图谱见图 1-B, 各共有峰的峰面积见表 4。

由图 1 可知, 半夏及其炮制品清半夏、姜半夏、法半夏和京半夏总有机酸指纹图谱的共有峰分别为 13、14、16、16、18 个, 其中 6 号峰为琥珀酸。

2.5 半夏及其炮制品总有机酸止咳作用的谱-效关系研究

采用灰色关联度分析方法, 分别以止咳评价指标咳嗽潜伏期、3 min 内咳嗽次数及抑咳率为母序列, 半夏及其炮制品清半夏、姜半夏、法半夏和京半夏总有机酸指纹图谱的各共有峰峰面积为子序列, 将原始数据设为参考数据序列 $X_0(k) = \{X_0(1), X_0(2), \dots, X_0(n)\}$; m 个比较数据系列: $X_i(k) =$

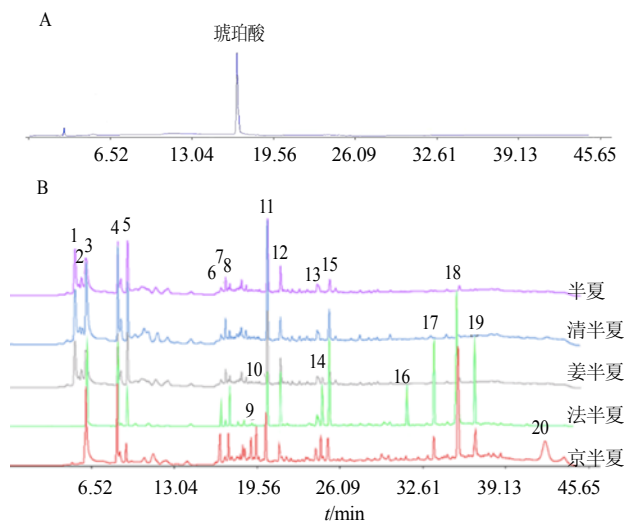


图 1 琥珀酸对照品色谱图 (A) 和半夏及其炮制品总有机酸对照指纹图谱 (B)

Fig. 1 HPLC of succinic acid (A) and HPLC fingerprints of total organic acids in crude and processed *Pinelliae Rhizoma* (B)

$\{X_i(1), X_i(2), \dots, X_i(n)\}$, 其中 $i=1, 2, \dots, m$; X_0 表示各共有峰峰面积; $X_0(k)$ 中的 k 表示各共有峰编号 1~n; X_i 表示各剂组止咳药效; $X_i(k)$ 中的 k 表示各剂组组的编号 1~n; $m=2$ 。

按公式计算共有峰与止咳作用之间的相对关联度 (γ_{0i})、绝对关联度 (ε_{0i}) 以及综合关联度 (ρ_{0i}), 评价二者的相关性, 确定各色谱峰对药效贡献的大小, 结果见表 5。

ε_{0i} 计算过程如下:

表 4 半夏及其炮制品总有机酸 HPLC 各共有峰的峰面积

Table 4 HPLC peak areas of common peaks of total organic acids in crude and processed *Pinelliae Rhizoma*

峰号	t_R/min	共有峰峰面积				
		半夏	清半夏	姜半夏	法半夏	京半夏
1	5.190	340.1	283.5	121.0	0	0
2	5.723	106.3	72.8	127.3	0	0
3	6.021	253.9	496.5	130.8	782.2	450.5
4	8.565	283.5	251.0	74.9	576.9	479.8
5	9.310	238.8	212.1	89.8	179.6	62.4
6	16.686	81.1	103.5	47.2	106.6	185.6
7	17.059	119.9	74.4	71.3	35.0	25.2
8	17.314	76.7	43.3	57.6	275.6	192.2
9	19.303	0	0	0	54.5	82.4
10	19.473	0	0	15.3	0	248.0
11	20.345	327.6	394.7	260.6	1 959.5	387.8
12	21.302	178.2	98.2	155.6	224.0	58.7
13	24.420	89.7	46.6	69.7	105.1	157.2
14	25.271	0	0	18.6	245.5	219.6
15	25.685	118.5	117.8	43.7	618.5	272.1
16	30.032	0	0	0	296.1	77.1
17	33.551	0	26.3	13.5	680.6	218.7
18	35.491	75.9	15.3	64.9	3 762.8	1 064.2
19	36.621	0	0	0	296.8	93.5
20	42.242	0	0	0	0	464.1

$$|s_0| = \left| \sum_{k=2}^{n-1} x_0^0(k) + \frac{1}{2} x_0^0(n) \right|, |s_i| = \left| \sum_{k=2}^{n-1} x_i^0(k) + \frac{1}{2} x_i^0(n) \right|$$

$$|s_i - s_0| = \left| \sum_{k=2}^{n-1} (x_i^0(k) - x_0^0(k)) + \frac{1}{2} (x_i^0(n) - x_0^0(n)) \right|$$

$$\varepsilon_{0i} = \frac{1 + |s_0| + |s_i|}{1 + |s_0| + |s_i| + |s_i - s_0|}$$

γ_{0i} 计算过程如下:

$$|s'_0| = \left| \sum_{k=2}^{n-1} x_0^{0'}(k) + \frac{1}{2} x_0^{0'}(n) \right|, |s'_i| = \left| \sum_{k=2}^{n-1} x_i^{0'}(k) + \frac{1}{2} x_i^{0'}(n) \right|$$

$$|s'_i - s'_0| = \left| \sum_{k=2}^{n-1} (x_i^{0'}(k) - x_0^{0'}(k)) + \frac{1}{2} (x_i^{0'}(n) - x_0^{0'}(n)) \right|$$

$$\gamma_{0i} = \frac{1 + |s'_0| + |s'_i|}{1 + |s'_0| + |s'_i| + |s'_i - s'_0|}$$

其中 s'_i 表示序列差 $x_i^{0'}(k)$ 的残差值; $x_0^{0'}$ 、 $x_i^{0'}$ 分别表示各共有峰峰面积和各剂量组止咳药效归一化后的值; 其余符号意义同上

ρ_{0i} 计算过程如下:

$$\rho_{0i} = \theta \varepsilon_{0i} + (1 - \theta) \gamma_{0i}, \theta \in [0, 1]$$

由表 5 可知, 各共有峰与止咳作用的关联度存在较大差异。以止咳评价指标咳嗽潜伏期为母序列, 各共有峰峰面积与止咳作用之间的 ε_{0i} 大小排列顺序为 $9 > 6 > 12 > 10 > 4 > 2 > 8 > 7 > 20 > 5 > 16 > 19 > 14 > 15 > 13 > 3 > 1 > 17 > 11 > 18$, γ_{0i} 大于 0.8 的色谱峰有 2、4、5、6、12 号峰, ρ_{0i} 大于 0.8 的色

谱峰有 4、6、12 号峰。

以止咳评价指标 3 min 内咳嗽次数为母序列, 各共有峰峰面积与止咳作用之间的 ε_{0i} 度大小排列顺序为 $13 > 6 > 9 > 12 > 10 > 4 > 2 > 8 > 7 > 20 > 5 > 16 > 19 > 14 > 15 > 3 > 1 > 17 > 11 > 18$, γ_{0i} 大于 0.9 的色谱峰有 4、6、12 号峰, ρ_{0i} 大于 0.7 的色谱峰有 4、6、12、13 号峰。

以止咳评价指标抑咳率为母序列, 各共有峰峰面积与止咳作用之间的关联度大小排列顺序同 3 min 内咳嗽次数。

综合 3 个评价指标咳嗽潜伏期、3 min 内咳嗽次数及抑咳率与各共有峰峰面积关联度的分析, 结果表明 4、6、12 号色谱峰所代表的化学成分与止咳作用具有较强的相关性, 对止咳作用贡献较大, 其中 6 号色谱峰为琥珀酸。

3 讨论

3.1 色谱条件的考察

半夏成分复杂, 若使用单一的流动相较难得到理想的指纹图谱, 在 HPLC 测定过程中, 常选用多种溶剂进行梯度洗脱。本实验分别对 10% NaH_2PO_4 -HAc 缓冲液 (pH 2.5) -乙腈、10% Na_2HPO_4 -HAc 缓冲液 (pH 2.5) -乙腈、10% KH_2PO_4 -HAc 缓冲液 (pH 2.5) -乙腈、10% K_2HPO_4 -HAc 缓冲液 (pH

表 5 半夏及半夏炮制品总有机酸 HPLC 各共有峰峰面积与止咳作用关联度分析结果

Table 5 Grey correlation degree analysis for peak areas of HPLC common peaks and anti-tussive effect of total organic acids in crude and processed *Pinelliae Rhizoma*

峰号	咳嗽潜伏期			3 min 内咳嗽次数			抑咳率		
	ε_{0i}	γ_{0i}	ρ_{0i}	ε_{0i}	γ_{0i}	ρ_{0i}	ε_{0i}	γ_{0i}	ρ_{0i}
1	0.556 1	0.750 0	0.653 0	0.502 9	0.698 9	0.600 9	0.502 9	0.698 9	0.600 9
2	0.755 7	0.831 7	0.793 7	0.513 1	0.763 9	0.638 5	0.513 1	0.763 9	0.638 5
3	0.559 1	0.704 3	0.631 7	0.503 0	0.662 6	0.582 8	0.503 0	0.662 6	0.582 8
4	0.792 4	0.866 7	0.829 5	0.514 9	0.960 9	0.737 9	0.514 9	0.960 9	0.737 9
5	0.636 4	0.879 2	0.757 8	0.507 0	0.801 8	0.654 4	0.507 0	0.801 8	0.654 4
6	0.878 1	0.968 4	0.923 2	0.533 8	0.924 7	0.729 2	0.533 8	0.924 7	0.729 2
7	0.694 5	0.794 2	0.744 4	0.509 9	0.734 1	0.622 0	0.509 9	0.734 1	0.622 0
8	0.715 4	0.722 1	0.718 8	0.511 0	0.676 7	0.593 9	0.511 0	0.676 7	0.593 9
9	0.975 9	0.507 6	0.741 8	0.524 3	0.506 0	0.515 2	0.524 3	0.506 0	0.515 2
10	0.823 7	0.505 2	0.664 4	0.516 5	0.504 1	0.510 3	0.516 5	0.504 1	0.510 3
11	0.526 5	0.626 1	0.576 3	0.501 4	0.600 3	0.550 8	0.501 4	0.600 3	0.550 8
12	0.876 9	0.910 6	0.893 8	0.519 2	0.984 5	0.751 9	0.519 2	0.984 5	0.751 9
13	0.581 9	0.733 3	0.657 6	0.655 9	0.793 1	0.724 5	0.655 9	0.793 1	0.724 5
14	0.619 0	0.501 9	0.560 4	0.506 1	0.501 5	0.503 8	0.506 1	0.501 5	0.503 8
15	0.587 9	0.648 5	0.618 2	0.504 5	0.618 2	0.561 3	0.504 5	0.618 2	0.561 3
16	0.633 0	0.502 1	0.567 6	0.506 8	0.501 7	0.504 2	0.506 8	0.501 7	0.504 2
17	0.553 4	0.500 8	0.527 1	0.502 7	0.500 7	0.501 7	0.502 7	0.500 7	0.501 7
18	0.510 7	0.512 9	0.511 8	0.500 5	0.510 2	0.505 4	0.500 5	0.510 2	0.505 4
19	0.629 6	0.502 1	0.565 8	0.506 6	0.501 6	0.504 1	0.506 6	0.501 6	0.504 1
20	0.692 6	0.503 1	0.597 8	0.509 8	0.502 4	0.506 1	0.509 8	0.502 4	0.506 1

2.5) -乙腈及 10% $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-HAc}$ 缓冲液 (pH 2.7) -乙腈 5 种流动相进行了考察, 结果表明以 10% $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-HAc}$ 缓冲液 (pH 2.7) -乙腈为流动相的梯度洗脱, 得到的色谱峰较多且分离效果较好; 通过比较不同波长下的 HPLC 指纹图谱, 发现在 265 nm 下色谱峰数目多, 且分离度好。

3.2 药理活性部位的筛选

本实验前期对半夏及半夏炮制品 95%乙醇、总有机酸、总生物碱 3 种提取物进行了止咳作用的比较, 通过药理实验筛选出总有机酸提取物能够延长小鼠咳嗽潜伏期, 减少小鼠 3 min 内咳嗽次数, 增强止咳抑制率, 具有较强的止咳作用, 与文献报道一致^[5]。

3.3 谱-效关系研究

目前, 研究谱-效关系的方法主要有灰色关联度分析、回归分析、聚类分析、相关分析等方法^[12]。灰色关联度分析法是一种多因素统计分析方法, 根据各因素的样本数据通过灰色关联度描述因素间

关系的大小、强弱及次序, 若样本数据反映出两因素变化趋势基本一致, 则二者间关联度较大, 反之, 关联度较小。灰色关联度分析法包括灰色绝对关联度、灰色相对关联度和灰色综合关联度, 在前者的基础上拓展出后者。绝对关联度是从绝对量的关系着眼考虑; 相对关联度是从各时刻观测数据相对始点的变化率着眼考虑; 灰色综合关联度克服了关联度的绝对性和相对性, 得到更接近现实问题的结论, 大量实例表明, 灰色相对关联度和综合关联度已在科学研究和现代化工过程优化中得到广泛应用, 特别是阐明中药的谱-效关系^[13]。因此, 本实验采用灰色关联度分析法, 对半夏及其炮制品总有机酸 HPLC 指纹图谱的各共有峰峰面积与止咳的 3 个评价指标 (咳嗽潜伏期、3 min 内咳嗽次数及抑咳率) 进行相关性分析, 首次建立了半夏及其炮制品总有机酸止咳作用的谱-效关系。半夏及其炮制品总有机酸 HPLC 指纹图谱中, 4、6、12 号色谱峰所代表的化学成分与止咳作用具有较强的关联

度,对止咳作用贡献较大,其中 6 号色谱峰为琥珀酸,与文献报道的琥珀酸具有止咳、平喘的作用相一致^[14-15],进一步证实了琥珀酸的止咳作用。

此外,通过谱-效关系分析,发现 4 号色谱峰,峰面积大、关联度强,可作为除琥珀酸外另一个评价半夏及其炮制品质量的新指标,但其反映的化学成分还需进一步研究。

综上所述,本实验建立的总有机酸止咳作用的谱-效关系,可阐明半夏及其炮制品止咳作用的物质基础,同时为其质量控制与评价提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] 白 权,李 敏,贾敏如,等. 四川南充半夏祛痰镇咳作用研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(3): 50-52.
- [2] 周 倩,吴 皓,许风清,等. 半夏中生物碱的研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 1(13): 102-103.
- [3] Luo Q Y, Xiao Y W, Wang K C, *et al.* Analysis on the genetic control of heterosis for guanosine and organic acid contents in tuber of *Pinellia ternata* by using of random amplified polymorphic DNA (RAPD) makers [J]. *J Med Plants Res*, 2013, 7(14): 857-862.
- [4] 周 欣,汤洪波,龚小见,等. 半夏药材水溶性成分的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(12): 1635-1637.
- [5] 张科卫,吴 皓,沈绣红,等. 半夏中总游离有机酸的作用研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2001, 17(3): 159-161.
- [6] Yu P, Cheng S, Xiang J, *et al.* Expectorant, antitussive, anti-inflammatory activities and compositional analysis of *Aster tataricus* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 164: 328-333.
- [7] Li Z Y, Zhi H J, Zhang F S, *et al.* Metabolomic profiling of the antitussive and expectorant plant *Tussilago farfara* L. by nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 75(5): 158-164.
- [8] 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.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [10] 王贵英. 京半夏的传统炮制法 [J]. 湖南中医药导报, 2002, 8(1): 40-41.
- [11] 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]. 四川: 成都中医药大学, 2014.
- [12] 陈 峰. 医用多元统计分析方法 [M]. 北京: 中国统计出版社, 2006.
- [13] 周长芹,许宏伟,何 霞. 灰色绝对关联度模型的改进 [J]. 郑州师范教育, 2014, 3(4): 25-27.
- [14] 金 园,岳 旺. 琥珀酸的药理研究进展 [J]. 药学通报, 1983, 18(2): 36-38.
- [15] 利红宇,李 钟,黄艳玲,等. 不同炮制的广地龙平喘化痰止咳药效比较 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1464-1465.