

物质基础-功效-生物活性多元化的半夏质量评价模式的建立

杨冰月^{1,2}, 李敏^{1*}, 敬勇¹, 赖月月¹, 刘佳灵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** 研究半夏总有机酸量与止咳作用、总有机酸 HPLC 指纹图谱与止咳作用、总有机酸量与止咳效价的相关性, 建立物质基础-功效-生物活性多元化的半夏质量评价模式。 **方法** 通过电位滴定法测定半夏总有机酸含量, 采用 HPLC 建立总有机酸指纹图谱; 以浓氨水引咳模型研究止咳作用, 并利用灰色关联度分析法建立总有机酸与止咳作用的谱-效关系; 基于小鼠浓氨水引咳模型, 建立半夏止咳效价的测定方法; 通过 SPSS 18.0 软件分析总有机酸和止咳作用、止咳效价 3 者之间的相关性。 **结果** 半夏总有机酸对浓氨水致小鼠咳嗽有显著的抑制作用, 结合总有机酸含量, 随其含量的增加, 止咳作用增强。在总有机酸 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。10 批半夏的止咳平均效价值为 (753.72 ± 58.18) U/g, 结合总有机酸定量分析, 二者呈显著的正相关, 表现为总有机酸的量增加, 止咳效价值增大。 **结论** 总有机酸为半夏止咳作用的物质基础之一; 总有机酸、止咳作用、生物活性 3 者之间呈相关性, 构建了物质基础-功效-生物活性多元化的半夏质量评价模式。

关键词: 半夏; 总有机酸; 止咳; 生物效价; 相关性分析; 质量控制方法

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)19-4575-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.19.016

Establishment of quality evaluation model of material foundation-efficacy-bioactivity of *Pinelliae Rhizoma*

YANG Bing-yue^{1,2}, LI Min¹, JING Yong¹, LAI Yue-yue¹, LIU Jia-ling¹, PENG Liang²

1. Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine; 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 establish the quality evaluation model of material foundation-efficacy-bioactivity of *Pinelliae Rhizoma* by investigating the relationships between the total organic acids of *Pinelliae Rhizoma* and the antitussive effect, the HPLC fingerprint of total organic acid and the antitussive effect, the total organic acids and the antitussive potency, respectively. **Methods** The content of total organic acids in *Pinelliae Rhizoma* was determined by potentiometric titration. The total organic acid fingerprints were established by HPLC. The cough relieving effect was studied by the concentrated ammonia water cough model, and the spectral-effect relationship between total organic acids and antitussive effect was established by the grey correlation analysis. Based on the mice concentrated ammonia water cough model, the determination method of the cough potency of *Pinelliae Rhizoma* was established. The correlation among the total organic acids, the antitussive effect and the antitussive potency was analyzed by SPSS 18.0 Software. **Results** The total organic acids of *Pinelliae Rhizoma* had a significant inhibitory effect on mice cough induced by concentrated ammonia. The antitussive effect was enhanced with the increase of the content of total organic acids. In the HPLC chromatogram, the chemical

收稿日期: 2018-05-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173492); 国家中药标准行动计划项目“川贝母、半夏等 7 种中药饮片标准化建设”(ZYBZH-Y-SC-40); 四川省科技厅科技成果转化项目“半夏优质高产栽培及绿色加工技术成果转化”(2017CC0084); 半夏优质高产栽培技术集成及产业化示范 (2050205); “川蓬 1 号”“川半夏 1 号”新品种成果转化 (17CZ0013); 金川县、丹巴县中药材科技扶贫示范基地建设 (2017NFP0001); 川产地药材半夏新品种“川半夏 1 号”推广与示范 (2016NFP0076)

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

***通信作者** 李敏 (1962—), 教授, 研究方向为中药品种、质量及资源研究。E-mail: 028limin@163.com

components represented by chromatographic peaks of 4, 6 (succinic acid), and 12 showed a strong correlation with the antitussive effect. The cough efficacy mean value of ten batches of *Pinelliae Rhizoma* was (753.72 ± 58.18) U/g. Combined with the quantitative analysis of total organic acids, there was a significant positive correlation between them, showing an increase in the antitussive efficacy with an increase of the content of total organic acids. **Conclusion** This study not only revealed the material foundation of the anti-tussive effect of *Pinelliae Rhizoma*, but also clarified the correlation among total organic acids, antitussive effect and bioactivity. Finally, it can improve the quality standards of *Pinelliae Rhizoma* and provide a scientific basis for the construction of a new model for quality control of *Pinelliae Rhizoma*.

Key words: *Pinelliae Rhizoma*; total organic acids; cough relieving; biological value; correlation analysis; quality control

半夏为常用大宗药材,来源于天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit 的干燥块茎,具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结之功,临床多用于治疗咳嗽痰多、痰饮眩悸、呕吐反胃等症^[1]。半夏成分复杂,主要含有机酸、生物碱、核苷类、蛋白质、多糖等^[2-4]。其中有机酸具有止咳、祛痰、止呕等作用,为半夏的主要药效物质基础^[5-7]。目前,《中国药典》2015 年版主要从薄层定性和总有机酸定量来控制半夏的质量^[8],仅以此远不能全面、有效地控制其质量,反映临床功效。如何建立一种既符合中药特点,又能被国际所认可的质量控制模式,是当前亟待解决的难题^[9]。

随着中药现代化研究的不断发展,中药的质量控制从传统的通过形色气味的感官评价,发展到以化学药品质量控制方法为参照的化学评价,再到生物评价^[10]。中药有别于化学药和生物制品,单一的感官评价、化学评价或生物评价均无法全面反映中药的整体质量和临床功效^[11]。多元化的交叉综合评价模式势必会成为中药独特的质量评价方法^[12]。因此,本实验以半夏为研究对象,从药效物质基础、药效学及生物活性 3 个方面对半夏的质量控制进行系统研究。通过电位滴定法测定半夏总有机酸含量,采用 HPLC 梯度洗脱建立半夏总有机酸的指纹图谱;以浓氨水刺激小鼠黏膜引咳为模型进行止咳作用研究,并利用灰色关联度分析法建立半夏总有机酸指纹图谱与止咳作用的谱-效关系;基于小鼠浓氨水引咳模型,建立半夏止咳效价的测定方法。最后,将半夏的总有机酸含量分别与止咳作用、止咳效价进行相关性分析,阐明三者之间的相关性,探索构建物质基础-功效-生物活性多元化的半夏质量控制模式,为完善半夏质量标准,建立全方位、多元化的中药质量控制新模式奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

Agilent technologies 1200 高效液相色谱仪 (Agilent 公司); 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); 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

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

1.3 药材

半夏药材采自全国 5 个省份,共 10 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 ternata* (Thunb.) Breit 的干燥块茎。样品来源信息见表 1。

表 1 半夏样品来源及有机酸含量

Table 1 Origins of and total organic acids in *Pinelliae Rhizoma* samples

编号	样品	来源	总有机酸/%
bx-1	生半夏 (栽培)	四川	0.36
bx-2	生半夏 (野生)	四川	0.52
bx-3	生半夏 (野生)	四川	0.47
bx-4	生半夏 (栽培)	甘肃	0.42
bx-5	生半夏 (栽培)	甘肃	0.37
bx-6	生半夏 (栽培)	山东	0.32
bx-7	生半夏 (栽培)	江西	0.32
bx-8	生半夏 (栽培)	江西	0.39
bx-9	生半夏 (栽培)	贵州	0.38
bx-10	生半夏 (栽培)	贵州	0.45

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 电位滴定法测定半夏中总有机酸的含量^[8]

2.1.1 滴定液的配制与标定 按《中国药典》2015

年版四部通则 8006“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。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称定半夏粉末（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，加新沸过的冷水至刻度，摇匀，即得。

2.1.3 测定方法 精密吸取供试品溶液 25 mL，按《中国药典》2015 年版四部通则 0701“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。

2.1.4 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

半夏的总有机酸含量测定结果见表 1。按照《中国药典》2015 年版一部“含量测定”项下规定，半夏按干燥品计算，含总有机酸以琥珀酸（ $C_4H_6O_4$ ）计，不得少于 0.25%。由表 1 可知，半夏各批样品总有机酸的含量均符合药典规定，其均值为 0.40%。

2.2 半夏总有机酸 HPLC 指纹图谱的建立^[13]

2.2.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μ m）；以 10% Na_2HPO_4 -HAc 缓冲

液（pH 2.7，A）-乙腈（B）为流动相进行梯度洗脱，洗脱程序见表 2；检测波长 265 nm；体积流量 1.0 mL/min；柱温 35 $^{\circ}C$ ；进样量 10 μ L。

2.2.2 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 对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 参考文献方法^[14]，取半夏适量，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%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。精密称取各批半夏总有机酸提取物 0.1 g，加甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶，经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过，即得。

2.2.4 半夏总有机酸 HPLC 指纹图谱的建立 精密吸取供试品溶液 10 μ L 注入高效液相色谱仪，记录色谱图。通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”建立半夏总有机酸 HPLC 指纹图谱。琥珀酸对照品图谱及半夏总有机酸指纹图谱见图 1，各共有峰峰面积见表 3。

表 2 流动相梯度洗脱程序

Table 2 Gradient elution program

t/min	A/%	B/%	t/min	A/%	B/%
0	98	2	40	60	40
10	98	2	40.1	98	2
15	85	15	45	98	2
35	60	40			

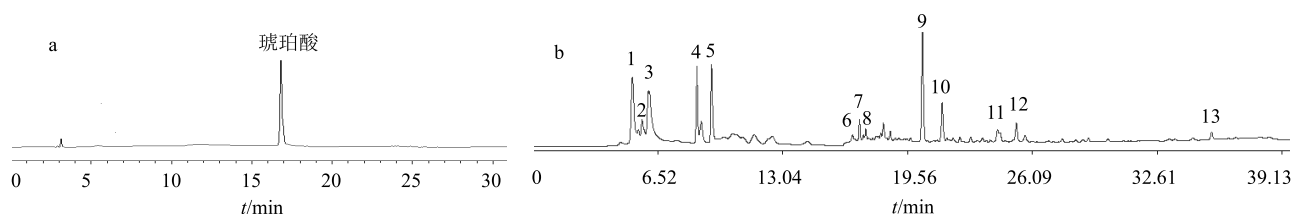


图 1 琥珀酸对照品 (a) 和半夏总有机酸指纹图谱 (b)

Fig. 1 HPLC chromatogram of succinic acid (a) and HPLC fingerprints of total organic acids in *Pinelliae Rhizoma* (b)

由图 1 可知，半夏总有机酸指纹图谱的共有峰共 13 个，其中 6 号峰为琥珀酸。

2.3 半夏总有机酸的止咳作用研究^[13]

2.3.1 受试药物配制 将“2.2.3”项制备的半夏总有机酸提取物，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 浓氨水刺激小鼠黏膜引咳实验 采用浓氨水刺激小鼠黏膜引咳实验分别对 10 批半夏的总有

表3 半夏总有机酸 HPLC 指纹图谱各共有峰的峰面积
Table 3 HPLC peak areas of common peaks of total organic acids in *Pinelliae Rhizoma*

峰号	t_R/min	峰面积	峰号	t_R/min	峰面积
1	5.190	340.1	8	17.314	76.7
2	5.723	106.3	9	20.345	327.6
3	6.021	253.9	10	21.302	178.2
4	8.565	283.5	11	24.420	89.7
5	9.310	238.8	12	25.685	118.5
6	16.686	81.1	13	35.491	75.9
7	17.059	119.9			

机酸进行药效学评价。实验随行设置对照组和阳性药物组。每1批样品均设高、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、0.12 g/kg 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。昆明种小鼠适应性饲养 3 d，实验前小鼠禁食不禁水 12 h。对照组小鼠 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，给药组小鼠分别 ig 给予各批半夏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，张口同时并伴有咳嗽声为准），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

结果表明，半夏不同批次的药效指标数据差异不大，故进行合并，求算平均值，比较半夏不同剂量下的药效。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 4。与对照组比较，磷酸可待因、半夏总有机酸高、低剂量均能延长小鼠咳嗽潜伏期，

减少小鼠 3 min 内咳嗽次数 ($P < 0.01$)；半夏总有机酸高剂量的止咳作用强于低剂量，抑咳率为 59.22%。

2.4 半夏总有机酸止咳作用的谱-效关系研究

采用灰色关联度分析法，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，按公式^[13]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。

由表 5 可知，各共有峰与止咳作用的关联度存在差异。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 $9 > 6 > 12 > 10 > 4 > 2 > 8 > 7 > 5 > 13 > 3 > 1 > 11$ ； γ_{0i} 大于 0.95 的色谱峰有 2、4、5、6、12 号峰； ρ_{0i} 大于 0.85 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} 大小排列顺序为 $13 > 6 > 9 > 12 > 10 > 4 > 2 > 8 > 7 > 5 > 3 > 1 > 11$ ； γ_{0i} 大于 0.95 的色谱峰有 4、6、12 号峰； ρ_{0i} 大于 0.75 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。

2.5 半夏总有机酸剂量与止咳作用的相关性分析

受试药物配制按“2.3.1”项，实验设计按“2.3.2”项下方法。结果见表 6。结果显示，半夏总有机酸不同剂量均能减少小鼠 3 min 内咳嗽次数，抑咳率

表4 半夏总有机酸止咳作用比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of antitussive effect of total organic acids in *Pinelliae Rhizoma* ($\bar{x} \pm s$)

组别	生药剂量/(g·kg ⁻¹)	n	咳嗽潜伏期/s	3 min 内咳嗽次数	抑咳率/%
对照	—	10	34.22 ± 3.88	14.47 ± 0.97	—
磷酸可待因	0.030	10	105.13 ± 3.87**	4.25 ± 0.42**	70.36
半夏	0.41	100	46.58 ± 3.27**	7.81 ± 0.79**	46.03
	0.82	100	96.93 ± 4.58**	5.90 ± 0.52**	59.22

与对照组比较：** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

表 5 半夏总有机酸 HPLC 指纹图谱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 *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	0.725 0	0.882 8	0.841 2	0.518 8	0.873 0	0.742 0	0.506 9	0.940 6	0.729 4
2	0.780 8	0.977 5	0.831 8	0.520 7	0.877 7	0.699 2	0.507 8	0.905 1	0.707 4
3	0.731 1	0.920 1	0.840 5	0.519 3	0.909 3	0.740 6	0.507 1	0.879 4	0.744 8
4	0.782 6	0.953 6	0.868 1	0.523 4	0.965 2	0.768 2	0.508 7	0.993 3	0.750 5
5	0.743 9	0.968 5	0.836 2	0.519 8	0.905 8	0.712 3	0.507 3	0.944 2	0.730 3
6	0.834 0	0.950 0	0.877 0	0.527 8	0.961 9	0.750 6	0.510 6	0.981 9	0.752 8
7	0.744 2	0.947 8	0.841 0	0.520 3	0.879 2	0.718 5	0.507 5	0.909 7	0.709 3
8	0.747 9	0.887 7	0.817 8	0.520 4	0.949 9	0.745 1	0.507 7	0.845 8	0.677 3
9	0.933 3	0.898 0	0.815 7	0.525 6	0.937 0	0.731 3	0.509 7	0.876 2	0.695 0
10	0.795 6	0.889 2	0.842 4	0.523 5	0.942 0	0.732 8	0.508 9	0.931 3	0.719 2
11	0.702 5	0.948 5	0.849 8	0.516 9	0.939 9	0.701 9	0.506 4	0.850 2	0.679 0
12	0.807 7	0.997 2	0.878 1	0.524 6	0.980 9	0.753 4	0.509 3	0.998 2	0.761 7
13	0.735 0	0.916 5	0.820 8	0.548 1	0.908 5	0.758 3	0.518 2	0.851 5	0.760 4

表 6 半夏总有机酸剂量与止咳作用相关性分析结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 6 Correlation analysis of total organic acids and antitussive effect of *Pinelliae Rhizoma* ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	生药剂量/(g·kg ⁻¹)	3 min 内咳嗽次数	抑咳率/%
对照	—	14.47±0.97	—
半夏	0.23	9.06±0.48	37.08
	0.41	8.58±0.82	40.33
	0.82	7.81±0.79	46.03
	1.16	6.48±0.52	55.22
	1.32	5.10±0.48	64.58

在 37.08%~64.58%，具有止咳作用。以半夏总有机酸不同给药剂量为横坐标 (X)，抑咳率为纵坐标 (Y)，通过 SPSS 18.0 软件进行相关性分析，得回归方程 $Y=23.013 X+30.514$ ， $r^2=0.970 3$ ， $P<0.01$ ，总有机酸与止咳作用存在着密切联系，且止咳作用随着给药剂量的增加而增强，二者呈显著的正相关，总有机酸为止咳作用的有效成分。

2.6 半夏止咳效价的测定^[8]

2.6.1 供试品溶液的制备 将“2.2.3”项下提取得到的半夏总有机酸提取物在给药前加含 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。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。半夏的剂量（生药剂量）为 410、820 mg/kg。

2.6.2 磷酸可待因阳性对照溶液的制备 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。

2.6.3 止咳效价的实验设计 基于“2.3.3”项下方法，选择量反应平行线（2.2）法，将阳性对照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 只小鼠，其中 2 组作为阳性对照组，分别 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。

2.6.4 止咳效价的计算 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”计算半夏止咳效价值。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（阳性对照）的最大剂量及剂距等进行分析，得到 10 批半夏平均效价值（753.72±58.18）U/g。结果见表 7。

表 7 半夏止咳效价测定结果

Table 7 Results of antitussive potency of *Pinelliae Rhizoma*

样品	效价/(U·g ⁻¹)	可信限率 (FL)/%
bx-1	711.82	13.61
bx-2	825.22	6.81
bx-3	836.64	8.64
bx-4	785.29	9.06
bx-5	732.50	10.99
bx-6	710.47	11.72
bx-7	707.80	12.03
bx-8	755.13	9.22
bx-9	663.10	7.35
bx-10	809.25	6.17

2.7 半夏总有机酸含量与止咳效价的相关性分析

以半夏总有机酸的含量为横坐标(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,得到回归方程 $Y=764.13X+448.07$, r^2 为0.728 2, $P<0.01$,总有机酸含量与止咳效价存在相关性。因此,总有机酸与止咳效价值存在着密切联系,表现为总有机酸含量增加,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

中药的真伪优劣是临床用药安全性和有效性的根本保证,其质量控制和评价是中药发展的关键科学问题^[15]。长期以来,中药质量的控制方法、评价指标及标准与中药的有效性关联不强,缺少能够反映中药有效性的质量控制体系。依此现状,本研究对半夏总有机酸的含量和HPLC指纹图谱、止咳作用、止咳效价进行了研究,并分别分析了总有机酸的含量和HPLC指纹图谱、总有机酸的含量和止咳作用的谱-效及相关性;同时,采用生物检定法,建立了半夏总有机酸止咳效价的测定方法,测定其效价值,并结合总有机酸含量,分析总有机酸含量与止咳效价的相关性。实验结果显示,收集的10批半夏样品中总有机酸含量均符合药典规定,总有机酸对浓氨水致小鼠咳嗽有显著的抑制作用,且随着含量的增加,止咳作用增强;在总有机酸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,可作为琥珀酸外另一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的研究;基于前期实验基础,利用浓氨水刺激小鼠黏膜引咳模型评价半夏总有机酸止咳效价测定方法的重复性、精密度良好,半夏的止咳效价值为 (753.72 ± 58.18) U/g,结合总有机酸定量分析,二者呈显著的正相关,表现为总有机酸的量增加,止咳效价值增大,建议将总有机酸止咳效价测定法作为评价半夏及其炮制品质量的方法之一。

本实验通过半夏的药效物质基础、功效及生物活性3个方面研究完善其质量标准,阐明了中药的药效物质基础是临床功效的重要保证;临床功效是药效物质基础的重要表达;生物效价测定主要反映了药物的生物活性信息,与临床功效相一致,3者之间的辩证统一关系^[16]。从中药的安全性、有效性出发,共同把握半夏的质量控制与评价,构建半夏

多元化交叉的综合质量控制新模式,为其更好地服务于临床提供科学依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 胡文斌,王 翰,张少飞,等. 半夏的化学成分及其药性、毒性研究 [J]. 中国资源综合利用, 2016, 10(34): 57-59.
- [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] 龚道峰,王甫成,纪东汉,等. 中药半夏化学成分及其药理、毒理活性研究进展 [J]. 长江大学学报: 自然版, 2015, 18(12): 77-79.
- [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(5): 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] 杨冰月,李 敏,吴发明,等. 基于止咳效价评价半夏及其炮制品品质的方法研究 [J]. 中草药, 2015, 46(17): 2586-2592.
- [9] 赵 超,李会军,陈 君,等. 中药复杂成分解析与质量评价的研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2012, 43(3): 283-288.
- [10] 笪航芳,戴忠华,朱 华. 中药品质评价研究现状及发展趋势 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(6): 1485-1488.
- [11] 江振作,王跃飞. 基于“药材基原-物质基础-质量标志物-质控方法”层级递进的中药质量标准模式研究 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4127-4133.
- [12] 刘昌孝,陈士林,肖小河,等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [13] 杨冰月,李 敏,任 敏,等. 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 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2301-2307.
- [14] 吴 皓,王 媚,许凤清,等. 正交试验法优化半夏有效部位的提取工艺 [J]. 中药材, 2004, 27(7): 524-525.
- [15] 季 申,王 柯,胡 青,等. 基于有效性和安全性相关的中药质量控制方法的建立 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(3): 502-505.
- [16] 李寒冰,吴宿慧,王伽伯,等. 中药品质生物评价的历史与发展 [J]. 中草药, 2017, 48(14): 2809-2816.