

• 药剂与工艺 •

基于指纹图谱、化学计量学、网络药理学的半夏汤洗前后质量评价

张梦晨, 谢辉*, 陆兔林*, 何畅, 毛春芹, 冯飞, 蒋孝峰

南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046

摘要: 目的 建立半夏汤洗前后 HPLC 指纹图谱及化学模式识别方法, 并利用网络药理学方法分析半夏药理作用的潜在靶点和作用机制。方法 采用 Waters C₁₈ Xselect (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 260 nm, 用相似度评价、主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)对汤洗前后半夏质量进行分析。结合网络药理学分析, 利用 Swiss Target Prediction 和 David 等数据库分析半夏成分的对应靶点和通路, 并在 Cytoscape 3.6.0 软件中绘制出“成分-靶点-通路”网络图。结果 半夏药材指纹图谱中标定了 20 个共有峰, 通过与对照品比对, 指认了其中 7 个色谱峰, 分别为次黄嘌呤(7 号峰)、黄嘌呤(8 号峰)、尿苷(9 号峰)、腺嘌呤(10 号峰)、胸苷(13 号峰)、腺苷(14 号峰)和琥珀酸(20 号峰), 13 批半夏药材相似度均大于 0.95, PCA 显示 S6 批样品(甘肃陇南)综合质量较好。PCA 和 OPLS-DA 结果表明半夏汤洗前后在化学成分组成和含量上有差异, 且可明显区分, 并揭示了贡献最大的 4 个潜在标志性色谱峰, 分别为 11、10(腺苷)、18、20(琥珀酸)号峰, 其为导致差异的主要标志物。指认出的色谱峰具有广泛的靶点和网络通路, 与半夏的主要药理作用密切相关。结论 所建立的指纹图谱方法准确、可靠, 可以有效地区分半夏和汤洗半夏, 并为半夏功效关联物质的研究及作用机制的阐释奠定基础。

关键词: 半夏; 指纹图谱; 化学计量学; 网络药理学; 汤洗; 质量评价; 主成分分析; 正交偏最小二乘法-判别分析; 次黄嘌呤; 黄嘌呤; 尿苷; 腺嘌呤; 胸苷; 腺苷; 琥珀酸

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)10-2897-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.10.006

Quality evaluation of *Pinelliae Rhizoma* before and after hot water washing based on HPLC fingerprint, chemometrics and network pharmacology

ZHANG Meng-chen, XIE Hui, LU Tu-lin, HE Chang, MAO Chun-qin, FENG Fei, JIANG Xiao-feng

College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of Banxia (*Pinelliae Rhizoma*, PR) before and after hot water washing (wPR), and analyze the potential target and mechanism of PR by network pharmacology. **Methods** Waters C₁₈ Xselect (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used with acetonitrile-water as mobile phase for gradient elution with flow rate of 1.0 mL/min, column temperature of 30 °C, detection wavelength of 260 nm. Similarity evaluation, principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used for quality analysis of PR and wPR. Combined with network pharmacology analysis, Swiss target prediction and David database were used to analyze the corresponding target and pathway of components, and the “component-target-pathway” diagram was drawn in Cytoscape 3.6.0 software. **Results** A total of 20 common peaks were demarcated in the fingerprint of PR. Seven of them were identified as hypoxanthine (peak 7), xanthine (peak 8), uridine (peak 9), adenine (peak 10), thymidine (peak 13), adenosine (peak 14) and succinic acid (peak 20). The similarity of 13 batches of PR were greater than 0.95. PCA showed that the comprehensive quality of S6 batches of samples (Longnan, Gansu) was better. The results of PCA and OPLS-DA showed that there were differences in chemical composition and

收稿日期: 2020-11-09

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1707000); 南京市栖霞区产学研合作及科技成果转化项目

作者简介: 张梦晨(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂技术及中药饮片质量研究。Tel: 15261838473 E-mail: meng242694@163.com

*通信作者: 谢辉, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药制剂技术及中药饮片质量研究。Tel: (025)85811517 E-mail: njxh66@163.com

陆兔林, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制及中药饮片质量标准研究。Tel: (025)85811524 E-mail: lutuling2005@126.com

content between PR and wPR. Four potential chromatographic peaks, 11, 10 (adenosine), 18, 20 (succinic acid), which were the main markers leading to the difference, were revealed. The identified chromatographic peaks had a wide range of targets and network pathways, which were closely related to the main pharmacological effects of PR. **Conclusion** The fingerprints were accurate and reliable, which could effectively distinguish PR and wPR, and lay a foundation for the study of related substances of PR and the interpretation of its mechanism of action.

Key words: *Pinelliae Rhizoma*; fingerprint; chemometrics; network pharmacology; hot water washing; quality evaluation; principal component analysis; orthogonal partial least squares discriminant analysis; hypoxanthine; xanthine; uridine; adenine; thymidine; adenosine; succinic acid

半夏系天南星科半夏属植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit.的干燥块茎, 辛温, 归肺、脾、胃经; 可燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结。临床用于湿痰寒痰、咳嗽痰多、痰饮眩悸、风痰眩晕、痰厥头痛、呕吐反胃、胸脘痞闷、梅核气等病证的治疗^[1]。半夏是临床常用有毒中药, 《神农本草经》将其列为下品, 内服时均以炮制品入药。吴皓^[2]研究并分析了汉代至宋代半夏的炮制方法沿革, 结果表明汤洗、姜制是半夏的基本炮制方法, 也是其他诸多半夏炮制工艺演变的基础。

《伤寒杂病论》中含有半夏的42首方剂中, 半夏下方标注“洗”字共18首^[3], 占含半夏方剂数的42%, 可见汤洗半夏的使用频率之高。2018年4月国家中医药管理局发布了《古代经典名方目录(第一批)》, 其中含半夏的9首汉代仲景方中5首明确标注半夏的炮制方法为“洗”。张仲景在《金匮玉函经·方药炮制》中给出“洗”的解释: “凡半夏不咀, 以汤洗十数度, 令水清滑尽。洗不熟有毒也。”关于“汤”的界定, 《说文解字》曰: “汤, 热水也”。半夏汤洗即将半夏药材置于新沸的热水中反复泡洗至洗后的水清澈、半夏表面无涎滑物质。有研究表明, 半夏经过“汤洗”后对黏膜的刺激性降低^[4]。

项目组在前期对半夏泻心汤、旋覆代赭汤、黄连汤^[5-6]等经典名方开展的研究工作中发现, 由于制剂成分复杂, 半夏在制剂中尚缺乏有效的质量评价手段, 因此完善半夏药材及汤洗饮片的质量评价方法, 控制药材及饮片质量, 配合制剂过程管理, 有助于建立含有半夏饮片的复方制剂质量控制体系。

指纹图谱技术常用于表征中药化学成分的整体性、复杂性和成分变化的差异性, 本研究采用HPLC法构建指纹图谱, 结合主成分分析(principal component analysis, PCA), 对国内主要产区半夏进行分析与评价; 同时, 采用模式识别方法对汤洗前后半夏进行判别分析, 探寻半夏汤洗前后化学成分变化, 以期发现和明确区分半夏及汤洗半夏的质量

控制指标。进一步结合网络药理学分析相应成分所涉及的靶点与通路, 为半夏的质量控制及后续开发研究提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪, 含 2998 DAD 检测器, 全自动进样器, Empower 液相色谱工作站, 上海沃特世科技有限公司; TGL-16C 高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; CAV64C 电子天平, 上海奥豪斯仪器有限公司; KQ-500B 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试剂

乙腈、甲醇, 色谱纯, 美国天地有限公司; 水为超纯水。对照品次黄嘌呤(批号 140661-201704, 质量分数 100.0%)、黄嘌呤(批号 140662-200802, 质量分数 98.0%)、尿苷(批号 110887-201803, 质量分数 99.5%)、腺嘌呤(批号 110886-201102, 质量分数 99.4%)、琥珀酸(批号 110896-201602, 质量分数 98.0%)、肌苷(批号 140669-201606, 质量分数 98.0%)、鸟苷(批号 111977-201501, 质量分数 93.6%)、腺苷(批号 110879-201703, 质量分数 99.7%)均购自中国食品药品检定研究院; 对照品胸苷(批号 18042703, 质量分数 98.0%)购自南京金益柏生物科技有限公司。

13 批半夏药材经南京中医药大学陈建伟教授鉴定, 均为天南星科半夏属植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit.的干燥块茎, 信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters C₁₈ Xselect(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱: 0~7 min, 0~0.5% 乙腈; 7~20 min, 0.5%~1.0% 乙腈; 20~25 min, 1.0%~1.5% 乙腈; 25~40 min, 1.5%~5.5% 乙腈; 40~45 min, 5.5%~10.0% 乙腈; 45~50 min, 10.0%~15.0% 乙腈; 50~60 min, 15.0%~26.0% 乙

表1 不同产地半夏药材信息

Table 1 Sample information of *Pinelliae Rhizoma* (PR) from different producing areas

编号	产地	批号	编号	产地	批号
S1	贵州	1904191	S8	甘肃陇南	20190141
S2	贵州	1903191	S9	甘肃天水	1902191
S3	贵州	1903195	S10	甘肃天水	1902192
S4	甘肃陇南	200801	S11	甘肃天水	1902193
S5	甘肃陇南	201001	S12	江苏泰州	20180111
S6	甘肃陇南	20190121	S13	江苏泰州	1903194
S7	甘肃陇南	20190131			

睛; 60~65 min, 26.0%~60.0%乙腈; 65~85 min, 60.0%~100.0%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 260 nm; 柱温 30 °C; 进样体积 10 μL。

2.2 供试品溶液的制备

取本品细粉, 约 2 g, 精密称定, 置 50 mL 锥形瓶中, 精密加入 20 mL 超纯水, 称定质量, 超声 45 min, 放冷, 超纯水补足减失的质量, 滤过, 离心, 取上清液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、腺嘌呤、肌苷、胸苷、腺苷、琥珀酸对照品适量, 加入适量超纯水, 配制成质量浓度分别为 113.2、46.6、77.8、109.4、45.2、27.5、191.0、195.5 μg/mL 的混合对照品溶液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 连续进样 6 次, 以 9 号峰 (尿苷) 为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间与相对峰面积。结果显示各项 RSD 值均小于 3%, 表明该仪器具有良好的精密度。

2.4.2 重复性试验 按“2.2”项下方法制备供试品溶液 (S1) 6 份, 按照“2.1”项下色谱条件进样测定, 进行 6 次平行测定, 以 9 号峰 (尿苷) 为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间与相对峰面积。结果显示各项 RSD 值均小于 3%, 表明该方法具有良好的重复性。

2.4.3 稳定性试验 精密称取样品 (S1), 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别在制备后 0、2、4、8、16、24 h 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以 9 号峰 (尿苷) 为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间与相对峰面积。结果显示各项 RSD 值均小于

3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 半夏药材指纹图谱研究

2.5.1 指纹图谱的建立及主要色谱峰的指认 取 13 批半夏样品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 将 260 nm 处色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价软件” (2012 版), 设定 S1 样品色谱图为参照图谱, 采用平均数法, 进行多点校正和色谱峰匹配, 经全峰匹配后得到半夏的共有模式图和指纹图谱叠加图, 见图 1-A、B, S1~S13 相似度计算结果分别为 0.990、

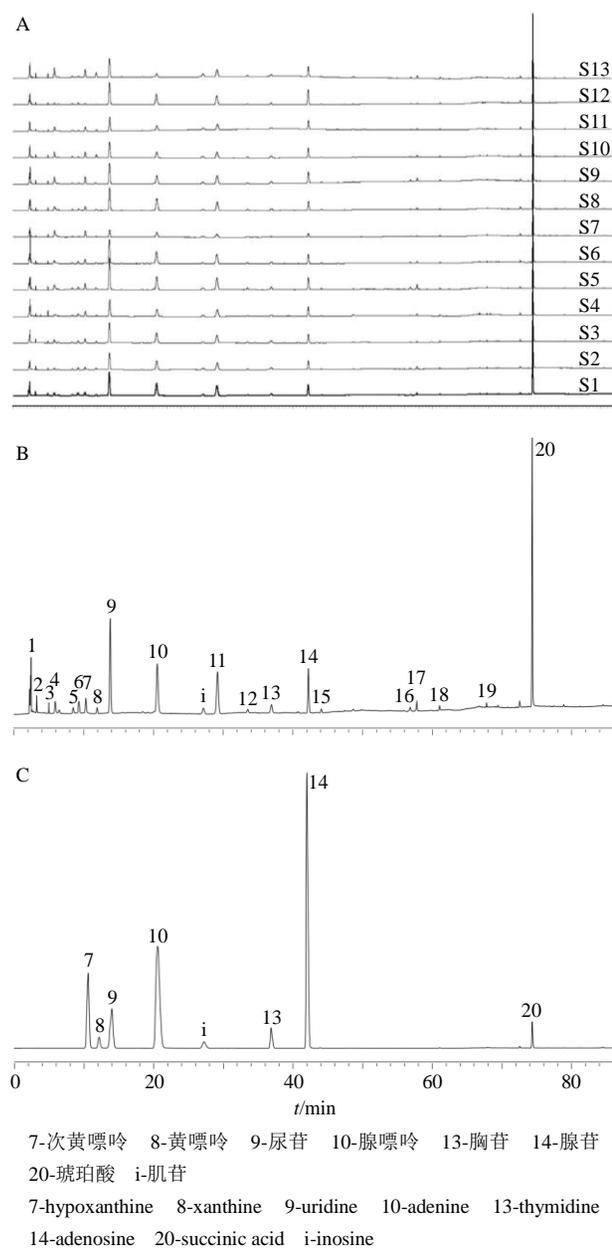


图1 13批半夏药材的 HPLC 指纹图谱 (A)、共有模式图 (B) 和混合对照品 HPLC 图 (C)

Fig. 1 HPLC fingerprint (A) and common pattern (B) of 13 batches of PR and HPLC of mixed reference substances (C)

0.991、0.996、0.988、0.975、0.984、0.951、0.980、0.981、0.988、0.974、0.983、0.969，相似度为0.951~0.996。取“2.3”项下的对照品溶液按“2.1”项下色谱条件进样测定，得到对照品溶液液相色谱图，见图1-C。

本研究建立了半夏药材的指纹图谱，共标记20个共有峰，经对照品保留时间及紫外吸收图谱指认，确定7~10、13、14、20号色谱峰分别为次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、腺嘌呤、胸苷、腺苷和琥珀酸。尿苷的色谱峰（9号峰）保留时间适中，峰形对称，分离度较好，故以其作为参照峰，计算得到各共有

峰保留时间的RSD<0.76%，表明各色谱峰出峰稳定。分别为将各个共有峰的峰面积相对于参照峰的峰面积进行量化，得到20×13阶数据矩阵，见表2。由于不同批次的半夏中肌苷含量差异较大且峰面积较小，色谱图中肌苷对应的色谱峰（i号峰）未被指认作为半夏指纹图谱的共有峰。

2.5.2 PCA PCA将多个变量转化为少数几个综合变量（即主成分），是一种有效的降维统计方法，该方法消除了评价指标间的相关影响，有助于更客观地描述样品的相对地位，这对于半夏药材质量的综合评价具有重要意义。采用SPSS21.0统计软件，将

表2 13批半夏药材共有峰相对峰面积
Table 2 Relative peak area of 13 batches of PR

编号	相对峰面积									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S1	0.007 6	0.059 3	0.021 0	0.115 3	0.048 5	0.121 5	0.132 9	0.051 2	1.000 0	0.758 7
S2	0.007 3	0.067 2	0.018 4	0.090 7	0.050 1	0.117 4	0.121 1	0.065 1	1.000 0	0.768 2
S3	0.006 1	0.056 7	0.019 2	0.141 1	0.046 6	0.091 7	0.174 7	0.056 9	1.000 0	0.731 4
S4	0.018 4	0.040 5	0.022 1	0.216 2	0.044 6	0.058 9	0.169 4	0.055 7	1.000 0	0.610 6
S5	0.011 7	0.037 8	0.022 6	0.164 4	0.045 5	0.071 8	0.149 1	0.032 6	1.000 0	0.743 7
S6	0.062 7	0.065 4	0.063 5	0.985 3	0.087 9	0.090 0	0.730 6	0.088 1	1.000 0	0.884 3
S7	0.014 6	0.032 3	0.021 9	0.221 0	0.042 6	0.047 9	0.139 8	0.042 5	1.000 0	0.767 9
S8	0.032 8	0.061 7	0.026 0	0.347 6	0.054 4	0.045 0	0.281 5	0.059 5	1.000 0	0.578 1
S9	0.031 2	0.061 6	0.027 1	0.339 7	0.056 8	0.055 5	0.302 9	0.164 6	1.000 0	0.541 1
S10	0.022 3	0.040 9	0.021 3	0.265 4	0.041 3	0.046 0	0.249 4	0.091 5	1.000 0	0.479 8
S11	0.006 2	0.030 6	0.016 7	0.062 0	0.042 0	0.061 1	0.041 6	0.011 7	1.000 0	0.725 4
S12	0.039 5	0.091 8	0.040 1	0.513 4	0.049 9	0.067 3	0.352 4	0.221 7	1.000 0	0.265 2
S13	0.023 5	0.045 2	0.065 4	0.044 3	0.038 1	0.122 3	0.262 7	0.069 0	1.000 0	0.600 2

编号	相对峰面积									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
S1	0.689 9	0.039 7	0.122 7	0.431 9	0.035 7	0.036 5	0.068 8	0.030 8	0.014 0	1.577 3
S2	0.682 0	0.051 1	0.176 7	0.469 2	0.044 8	0.058 1	0.096 1	0.043 7	0.019 5	2.253 0
S3	0.614 5	0.037 8	0.139 3	0.399 1	0.024 1	0.023 6	0.025 0	0.036 0	0.015 8	1.853 4
S4	0.598 3	0.065 0	0.114 2	0.357 7	0.046 8	0.059 3	0.090 4	0.022 7	0.010 6	1.118 9
S5	0.621 1	0.049 9	0.105 3	0.362 8	0.032 3	0.029 6	0.050 3	0.030 6	0.013 3	1.546 6
S6	0.651 2	0.043 9	0.138 5	0.453 0	0.041 3	0.020 3	0.042 8	0.095 0	0.044 4	4.811 7
S7	0.607 2	0.050 7	0.092 9	0.360 2	0.030 7	0.026 0	0.047 8	0.030 2	0.014 0	1.477 0
S8	0.639 5	0.058 7	0.136 3	0.483 8	0.034 7	0.057 8	0.088 3	0.032 4	0.015 1	1.587 7
S9	0.592 7	0.060 3	0.167 6	0.576 0	0.034 4	0.040 5	0.074 8	0.046 3	0.021 9	2.244 4
S10	0.600 2	0.036 2	0.107 0	0.575 2	0.021 0	0.025 0	0.053 1	0.051 7	0.023 2	2.467 1
S11	0.655 5	0.039 8	0.104 0	0.650 3	0.035 6	0.022 3	0.031 5	0.035 4	0.013 6	1.598 1
S12	0.641 1	0.070 5	0.162 0	0.504 9	0.030 6	0.051 1	0.095 2	0.039 8	0.018 0	1.911 1
S13	0.677 2	0.047 8	0.115 8	0.512 6	0.033 9	0.048 3	0.074 9	0.040 3	0.018 0	1.964 2

13批样品中20个成分的相对峰面积组成矩阵,数据经标准化处理后进行PCA。PCA中特征值及贡献率见表3。由表3可见,前5个主成分的特征值均大于1,表明前5个主成分在半夏药材质量评价中起主导作用,5个主成分的累积贡献率达90.928%(>90%),能较客观地反映不同产地半夏药材的综

表3 旋转后的主成分特征值及贡献率

Table 3 Rotated eigenvalue of principal component and contribution rate

主成分	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%
1	7.004	36.864	36.864
2	3.863	20.329	57.193
3	2.503	13.176	70.369
4	1.961	10.322	80.691
5	1.945	10.237	90.928

合质量,故选取前5个主成分进行分析。

每个主成分包含的各因子其载荷系数综合反映了所测成分对各主成分的影响。由表4可知,1、4、7(次黄嘌呤)、18、19、20(琥珀酸)号峰对主成分1有明显的正负荷;12、16、17号峰是主成分2的主要决定因子,此外,10(腺嘌呤)号峰对主成分2有较强的逆负荷;6、11号峰的载荷因子在主成分3中较大;8(黄嘌呤)号峰是对主成分4影响较大的特征向量,此外,10(腺嘌呤)、15号峰对主成分2有较强对逆负荷;2、13号峰的载荷因子在第5主成分中较大,说明上述化合物对半夏药材的品质影响较大,其余色谱峰对半夏药材的品质影响较小。

不同产地半夏样品的主成分各因子总得分见表5,可根据各主要因子的权重系数计算得出各样品的

表4 主成分荷载

Table 4 Load matrix of principal component

峰号	载荷					峰号	载荷					峰号	载荷				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
1	0.928	0.284	-0.159	0.129	0.022	8	0.359	0.467	-0.232	0.523	0.489	15	0.164	0.467	0.347	-0.647	0.019
2	0.367	0.421	0.159	0.199	0.729	9	0.421	0.201	-0.106	0.394	0.201	16	-0.220	0.900	0.179	-0.092	0.166
3	0.755	0.246	0.362	0.211	-0.303	10	0.106	-0.564	0.336	-0.715	-0.129	17	-0.077	0.912	0.146	0.005	0.230
4	0.930	0.067	-0.239	-0.065	0.166	11	0.025	0.057	0.933	0.001	0.052	18	0.919	-0.272	0.142	0.061	0.139
5	0.879	-0.066	0.019	-0.298	0.302	12	0.040	0.893	-0.332	-0.067	0.166	19	0.937	-0.225	0.113	0.031	0.151
6	0.012	-0.044	0.911	-0.113	0.147	13	0.222	0.344	0.186	0.076	0.856	20	0.916	-0.270	0.165	0.006	0.164
7	0.980	0.091	-0.039	0.046	0.077	14	0.079	-0.112	0.132	0.725	0.083						

表5 不同产地半夏药材的主成分因子及品质综合评价

Table 5 Principal component factors and comprehensive quality evaluation of PR from different producing areas

编号	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F	排序
S1	-0.280 0	-0.084 2	0.198 8	-0.038 9	0.043 5	-0.160 8	7
S2	-0.232 5	0.079 9	0.220 6	-0.101 4	0.182 6	0.149 2	5
S3	-0.250 6	-0.334 9	-0.038 6	-0.008 9	0.117 5	-0.515 4	12
S4	-0.187 2	0.335 5	-0.122 1	-0.167 4	-0.093 6	-0.234 8	9
S5	-0.191 6	-0.084 3	-0.070 4	-0.089 9	-0.064 3	-0.500 6	10
S6	1.246 0	-0.158 4	0.053 7	-0.100 6	-0.006 1	1.034 5	1
S7	-0.156 0	-0.093 7	-0.155 7	-0.086 2	-0.106 4	-0.598 0	13
S8	0.000 9	0.219 2	-0.066 3	-0.020 5	-0.003 1	0.130 2	6
S9	0.117 0	0.068 5	-0.137 6	0.064 2	0.133 1	0.245 1	4
S10	0.025 0	-0.223 6	-0.126 4	0.184 1	-0.042 9	-0.183 8	8
S11	-0.296 4	-0.251 4	0.047 3	0.063 0	-0.077 3	-0.514 8	11
S12	0.154 6	0.351 9	-0.066 7	0.172 5	0.116 5	0.728 8	2
S13	0.050 8	0.175 5	0.263 3	0.130 0	-0.199 3	0.420 4	3

综合得分。权重系数依据其方差贡献的大小计算,即各主成分的贡献率与5个主成分的总贡献率之比,主成分1的权重为 $36.864\%/90.928\%=0.4054$,同理可得主成分2、3、4、5的权重分别为0.2236、0.1449、0.1136、0.1126。各主成分因子得分与其权重乘积之和相加,得出各半夏样品的总因子得分(F),其表达式为 $F=0.4054F_1+0.2236F_2+0.1446F_3+0.1136F_4+0.1126F_5$,其值越高,综合质量越好。结果显示,S6批样品(甘肃陇南)综合质量最好,S12(江苏泰州)综合质量次之。

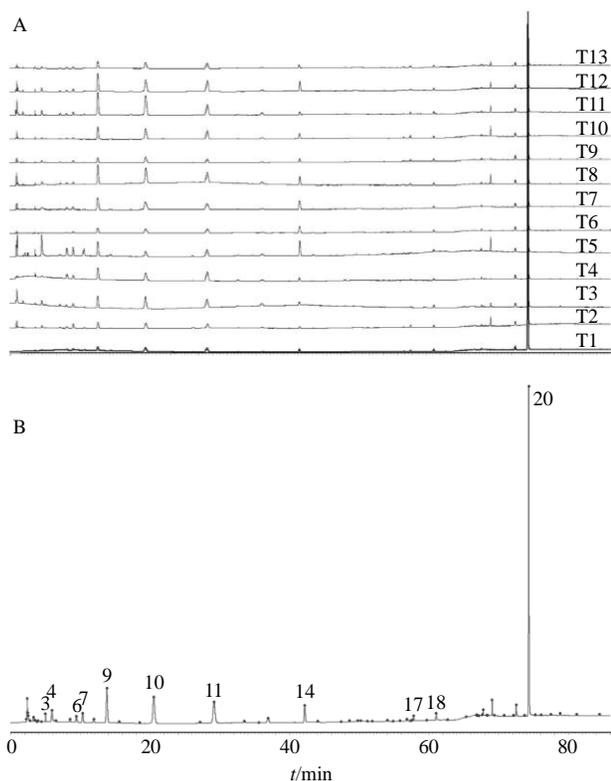
2.6 汤洗半夏指纹图谱研究

2.6.1 汤洗半夏的制备 取净半夏药材,加水浸泡至内无干心后弃去全部水液,加入5倍量新沸的热水,浸泡搅拌10 min,弃去水液及漂浮物,如此反复拌洗7次,取出,干燥,即得。13批半夏药材S1~S13汤洗后对应饮片编号为T1~T13。

2.6.2 汤洗半夏指纹图谱的建立 取13批汤洗半夏饮片,以“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,将260 nm处色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”(2012版),设定S1样品色谱图为参照图谱,采用平均数法,进行多点校正和色谱峰匹配,经全峰匹配后得到汤洗半夏饮片的指纹图谱叠加图和共有模式图,见图2,图2中共有峰的编号系根据半夏药材指纹图谱中对应共有峰号编制。汤洗半夏饮片T1~T13相似度计算结果分别为0.978、0.977、0.993、0.993、0.940、0.988、0.995、0.984、0.983、0.997、0.961、0.989、0.991,相似度介于0.940~0.997。

与半夏药材相比,经汤洗处理后,指纹图谱中某些共有色谱峰峰面积减小甚至消失,仅余11个共有峰,分别对应半夏药材指纹图谱共有峰中的3、4、6、7、9~11、14、17、18、20号峰。经对照品保留时间及紫外吸收图谱指认,确定7、9、10、20号色谱峰分别对应为次黄嘌呤、尿苷、腺嘌呤和琥珀酸。分别为将各个共有峰的峰面积相对于参照峰(9号峰)的峰面积进行量化,得到 11×26 阶数据矩阵,比较半夏及汤洗半夏共有峰的相对峰面积,结果见表6。

2.6.3 PCA 将13批半夏、汤洗半夏共有峰的相对峰面积导入SIMCA-P14.1软件,以10个共有峰的相对峰面积为变量,PCA得分图见图3。半夏与汤洗半夏在主成分空间分布上均有特定区域,说明半夏与汤洗半夏化学成分存在显著差异,能够实现半



7-次黄嘌呤 9-尿苷 10-腺嘌呤 14-腺苷 20-琥珀酸
7-hypoxanthine 9-uridine 10-adenine 14-adenosine 20-succinic acid

图2 13批汤洗半夏的HPLC指纹图谱叠加图(A)和共有模式(B)

Fig. 2 HPLC fingerprint (A) and common pattern (B) of 13 batches of wPR

夏与汤洗半夏的区分。

2.6.4 正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)与差异性成分分析 在PCA的基础上选择有监督模式的OPLS-DA,模型主成分回归系数: $R^2_X=0.683$, $R^2_Y=0.724$, $Q^2=0.64>0.5$,说明预测模型有效,半夏与汤洗半夏可以得到有效区分,如图4。模型得到变量重要性投影(variable importance projection, VIP)值,见图5。VIP值越大,即变量离X轴越远,表明该色谱峰对于半夏与汤洗半夏的分类贡献越大,也是导致半夏与汤洗半夏相区分的差异成分。其中VIP>1的有4个色谱峰,依次为11、10、18、20号,其为导致差异的主要标志物。其中10号峰为腺嘌呤,20号峰为琥珀酸。其余色谱峰均<1,对于区分半夏和汤洗半夏意义不大。

2.7 网络药理学研究

2.7.1 候选化合物靶点预测 核苷类成分和有机酸是半夏中主要的2类成分,已有许多研究报道证实

表 6 半夏-汤洗半夏指纹图谱共有峰的相对峰面积
Table 6 Relative common peak area of PR and wPR

编号	相对峰面积										
	3	4	6	7	9	10	11	14	17	18	20
S1	0.021 0	0.115 3	0.121 5	0.132 9	1.000 0	0.758 7	0.689 9	0.431 9	0.068 8	0.030 8	1.577 3
S2	0.018 4	0.090 7	0.117 4	0.121 1	1.000 0	0.768 2	0.682 0	0.469 2	0.096 1	0.043 7	2.253 0
S3	0.019 2	0.141 1	0.091 7	0.174 7	1.000 0	0.731 4	0.614 5	0.399 1	0.025 0	0.036 0	1.853 4
S4	0.022 1	0.216 2	0.058 9	0.169 4	1.000 0	0.610 6	0.598 3	0.357 7	0.090 4	0.022 7	1.118 9
S5	0.022 6	0.164 4	0.071 8	0.149 1	1.000 0	0.743 7	0.621 1	0.362 8	0.050 3	0.030 6	1.546 6
S6	0.063 5	0.985 3	0.090 0	0.730 6	1.000 0	0.884 3	0.651 2	0.453 0	0.042 8	0.095 0	4.811 7
S7	0.021 9	0.221 0	0.047 9	0.139 8	1.000 0	0.767 9	0.607 2	0.360 2	0.047 8	0.030 2	1.477 0
S8	0.026 0	0.347 6	0.045 0	0.281 5	1.000 0	0.578 1	0.639 5	0.483 8	0.088 3	0.032 4	1.587 7
S9	0.027 1	0.339 7	0.055 5	0.302 9	1.000 0	0.541 1	0.592 7	0.576 0	0.074 8	0.046 3	2.244 4
S10	0.021 3	0.265 4	0.046 0	0.249 4	1.000 0	0.479 8	0.600 2	0.575 2	0.053 1	0.051 7	2.467 1
S11	0.016 7	0.062 0	0.061 1	0.041 6	1.000 0	0.725 4	0.655 5	0.650 3	0.031 5	0.035 4	1.598 1
S12	0.040 1	0.513 4	0.067 3	0.352 4	1.000 0	0.265 2	0.641 1	0.504 9	0.095 2	0.039 8	1.911 1
S13	0.065 4	0.044 3	0.122 3	0.262 7	1.000 0	0.600 2	0.677 2	0.512 6	0.074 9	0.040 3	1.964 2
T1	0.068 1	0.098 5	0.285 0	0.305 5	1.000 0	1.429 5	1.434 0	0.689 7	0.194 0	0.346 5	14.625 3
T2	0.034 5	0.281 1	0.245 1	0.599 2	1.000 0	1.213 8	1.018 2	0.280 4	0.292 2	0.239 4	9.773 9
T3	0.035 6	0.315 4	0.111 4	0.239 7	1.000 0	1.465 5	1.083 8	0.253 7	0.043 4	0.137 2	4.989 5
T4	0.093 8	1.371 5	0.422 8	0.516 3	1.000 0	0.481 8	0.796 0	0.956 2	0.059 7	0.097 0	4.286 5
T5	0.036 5	0.087 4	0.151 1	0.245 3	1.000 0	1.221 0	1.312 9	1.193 6	0.097 4	0.241 7	9.849 4
T6	0.033 0	0.205 7	0.139 0	0.202 1	1.000 0	0.956 5	0.789 1	0.660 4	0.028 7	0.096 3	3.834 7
T7	0.048 3	0.133 1	0.059 8	0.098 4	1.000 0	1.107 2	0.8342	0.389 8	0.053 0	0.078 3	3.132 3
T8	0.118 8	0.332 1	0.087 3	0.322 3	1.000 0	1.677 2	1.241 1	0.713 0	0.299 2	0.328 9	13.544 9
T9	0.031 5	0.087 8	0.079 0	0.109 2	1.000 0	1.255 1	1.126 6	0.385 8	0.160 0	0.101 9	4.865 9
T10	0.037 7	0.190 3	0.059 9	0.112 7	1.000 0	1.266 7	0.710 2	0.114 3	0.039 7	0.055 7	2.579 2
T11	0.027 8	0.177 2	0.079 0	0.144 7	1.000 0	0.948 0	0.939 8	0.496 0	0.037 9	0.069 7	3.271 5
T12	0.060 3	0.199 9	0.145 7	0.245 8	1.000 0	1.323 0	1.307 0	0.426 4	0.195 9	0.187 0	9.029 7
T13	0.051 3	0.063 5	0.292 8	0.241 9	1.000 0	0.880 2	1.221 2	0.248 8	0.057 4	0.111 1	4.668 4

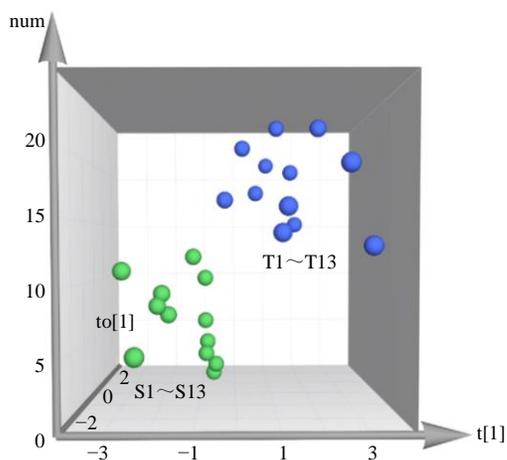


图 3 半夏与汤洗半夏 PCA 得分图
Fig. 3 PCA score chart of PR and wPR

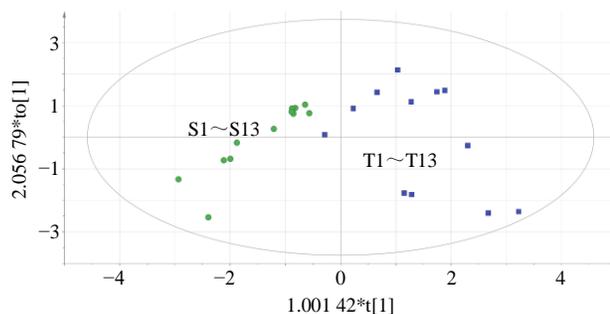


图 4 半夏与汤洗半夏 OPLS-DA 得分散点图
Fig. 4 OPLS-DA scatter plot of PR and wPR

这些成分是半夏的功效关联物质^[7-8]。检索中药系统药理数据库(TCMSP, <http://tcmsp.w.com/tcmsp.php>)、PubChem Compound 数据库 (<https://www.ncbi.nlm>.)

nih.gov/pubmed/)、Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 中次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、腺嘌呤、肌苷、胸苷、腺苷和琥珀

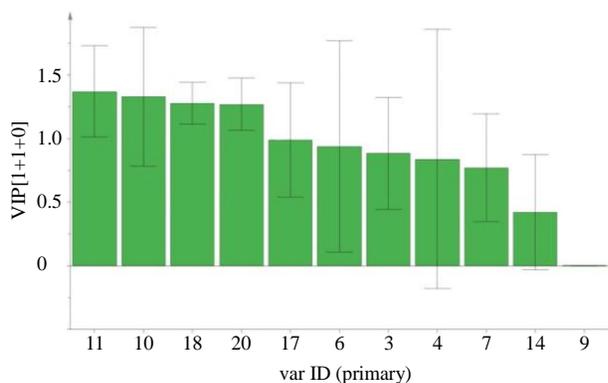


图 5 半夏、汤洗半夏指纹图谱共有峰 VIP 值

Fig. 5 VIP values of fingerprint common peaks of PR and wPR

酸 8 个化合物, 候选化合物作用的靶点; 并通过 Uniprot 数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 将预测出的靶点蛋白名转换为对应的基因名。将各数据库筛选出的靶点蛋白合并, 除去重复靶点, 最终得到与 8 个化合物相关的 229 个靶点蛋白。

2.7.2 靶点蛋白与蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络分析 将获得的 229 个靶点蛋白以 gene symbol 形式导入在线 String 11.0 软件 (<https://string-db.org/cgi/input.pl>), 物种选择为人 (homo sapiens), 最高置信度蛋白交互参数评分值 > 0.9, 其他参数设置不变, 将得到的相互作用参数导入 Cytoscape 3.6.0 软件构建 PPI 网络图, 去掉网络中的单一节点, 见图 6。

对 PPI 进行拓扑特征分析, 选取在度中心性 (degree)、中介中心性 (betweenness)、接近中心性

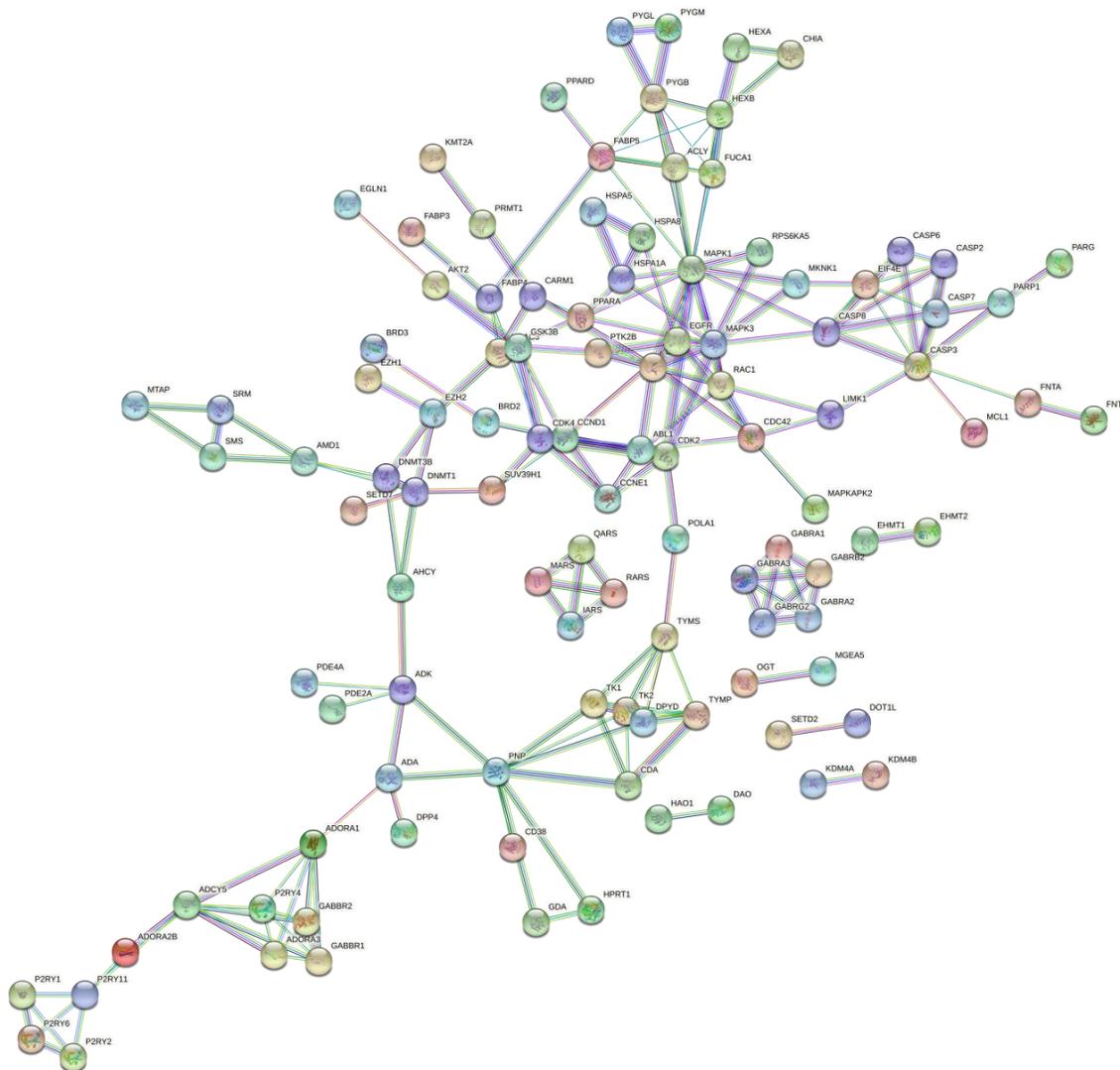


图 6 PPI 网络

Fig. 6 PPI network

(closeness) 3 个参数均大于中位数且 degree ≥ 9 的点作为核心靶点, 经筛选后共得到 9 个重要核心靶点, 具体包括 MAPK1 (degree 15)、RAC1 (degree 10)、CASP3 (degree 10)、MAPK3 (degree 10)、CCND1 (degree 9)、CDK2 (degree 9)、SRC (degree 9)、PNP (degree 9)、EGFR (degree 9), 且发现这 9 个靶点主要与腺苷、腺嘌呤、肌苷、尿苷、次黄嘌呤有关。

2.7.3 功能富集分析与通路分析 利用 David 6.8 数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>) 对 9 个潜在的核心靶点蛋白进行交集靶点进行基因本体论 (gene ontology, GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。GO 功能分析主要用于描述基因靶点的功能, 包括细胞功能、分子功能和生物功能。KEGG 富集分析可以得到潜在靶点所富集的信号通路。GO 分析以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。在 GO 富集分析中, 共获取 19 个 GO 条目, 其中生物过程 (biological process, BP) 占 10 个, 分子功能 (molecular function, MF) 占 1 个, 细胞组成 (cellular component, CC) 占 8 个, 选择 P 值 < 0.05 的条目进行展示, GO 分析结果提示 BP 显著富集在长波紫外光 (long wave ultraviolet ray, UV-A) 反应、乳腺上皮细胞增殖、底物黏附依赖性细胞扩散和 G₁/S 过渡有丝分裂细胞周期等过程; MF 主要富集

在 ATP 结合; CC 主要富集在胞质、周期蛋白依赖的蛋白激酶全酶复合、早期内体膜等过程。具体信息见表 7。

KEGG 富集分析得到 73 条通路, 结果见表 8。选择关联基因数大于等于 5 的的条目进行展示, 富集到 16 条通路主要涉及癌症中的病毒致癌 (viral carcinogenesis)、蛋白聚糖作用癌症 (proteoglycans in cancer)、癌症通路 (pathways in cancer)、乙型肝炎 (hepatitis B)、黏着斑 (focal adhesion)、磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 信号通路等, 结果表明这 9 个核心靶点可能主要通过调控这些通路达到干预疾病的目的。

2.7.4 成分-靶点-通路网络构建 根据上述成分-靶点、靶点-通路的对应关系, 利用 Cytoscape3.6.0 软件绘制出成分-靶点-通路网络图, 并通过网络图进行可视化展示, 见图 7。由网络图可知, 半夏是通过多靶点、多途径发挥协同作用的。根据 Cytoscape3.6.0 软件分析结果, 以化合物、靶点蛋白、信号通路的连接度 (degree) 为参考, 发现化合物腺苷 (degree 73)、肌苷 (degree 38) 的连接度较高, 提示这 2 个化合物可能是半夏的活性成分, MAPK1 (degree 16)、CCND1 (degree 13)、ADORA1 (degree 6)、ADORA2A (degree 6)、ADORA3 (degree 5)、PNP (degree 5) 的连接度高于其他靶点, 表明这 6

表 7 基因生物学过程

Table 7 Genetic biological process

类别	基因功能	基因数	P 值
生物过程	UV-A 反应 (response to UV-A)	2	2.27×10^{-3}
生物过程	乳腺上皮细胞增殖 (mammary gland epithelial cell proliferation)	2	3.40×10^{-3}
生物过程	底物黏附依赖性细胞扩散 (substrate adhesion-dependent cell spreading)	2	0.018 0
生物过程	G ₁ /S 过渡有丝分裂细胞周期 (G ₁ /S transition of mitotic cell cycle)	2	0.022 5
生物过程	蛋白质磷酸化的正调控 (positive regulation of protein phosphorylation)	2	0.028 0
生物过程	蛋白激酶 B 信号转导的正调控 (positive regulation of protein kinase B signaling)	2	0.033 6
生物过程	药物反应 (response to drug)	2	0.039 6
生物过程	细胞对 DNA 损伤刺激的反应 (cellular response to DNA damage stimulus)	2	0.046 8
分子功能	ATP 结合 (ATP binding)	4	0.024 7
细胞组成	胞质 (cytosol)	4	7.79×10^{-3}
细胞组成	周期蛋白依赖的蛋白激酶全酶复合 (cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex)	2	8.52×10^{-3}
细胞组成	早期内体膜 (early endosome membrane)	2	0.014 0
细胞组成	细胞核 (nucleus)	5	0.018 9
细胞组成	莱夫膜 (ruffle membrane)	2	0.019 9
细胞组成	肌动蛋白丝 (actin filament)	2	0.022 4

表 8 主要作用靶点的通路富集分析
Table 8 Enrichment analysis of main target pathways

ID 编号	KEGG 信号通路	基因数	P 值
cfa05203	病毒致癌 (viral carcinogenesis)	7	1.31×10^{-8}
cfa05205	蛋白聚糖作用癌症 (proteoglycans in cancer)	7	1.44×10^{-8}
cfa05200	癌症通路 (pathways in cancer)	7	9.09×10^{-7}
cfa05161	乙型肝炎 (hepatitis B)	6	2.04×10^{-7}
cfa04510	黏着斑 (focal adhesion)	6	1.34×10^{-6}
cfa04151	PI3K/Akt 信号通路 (PI3K/Akt signaling pathway)	6	1.49×10^{-5}
cfa05219	膀胱癌 (bladder cancer)	5	8.06×10^{-8}
cfa05210	结肠直肠癌 (colorectal cancer)	5	4.11×10^{-7}
cfa05212	胰腺癌 (pancreatic cancer)	5	5.00×10^{-7}
cfa04520	黏着连接 (adherens junction)	5	7.62×10^{-7}
cfa05215	前列腺癌 (prostate cancer)	5	1.73×10^{-6}
cfa04068	FoxO 信号通路 (FoxO signaling pathway)	5	8.93×10^{-6}
cfa04921	催产素信号通路 (oxytocin signaling pathway)	5	1.41×10^{-5}
cfa04015	Rap1 信号通路 (Rap1 signaling pathway)	5	5.46×10^{-5}
cfa04810	肌动蛋白细胞骨架调节 (regulation of actin cytoskeleton)	5	5.67×10^{-5}
cfa04010	MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)	5	1.11×10^{-5}

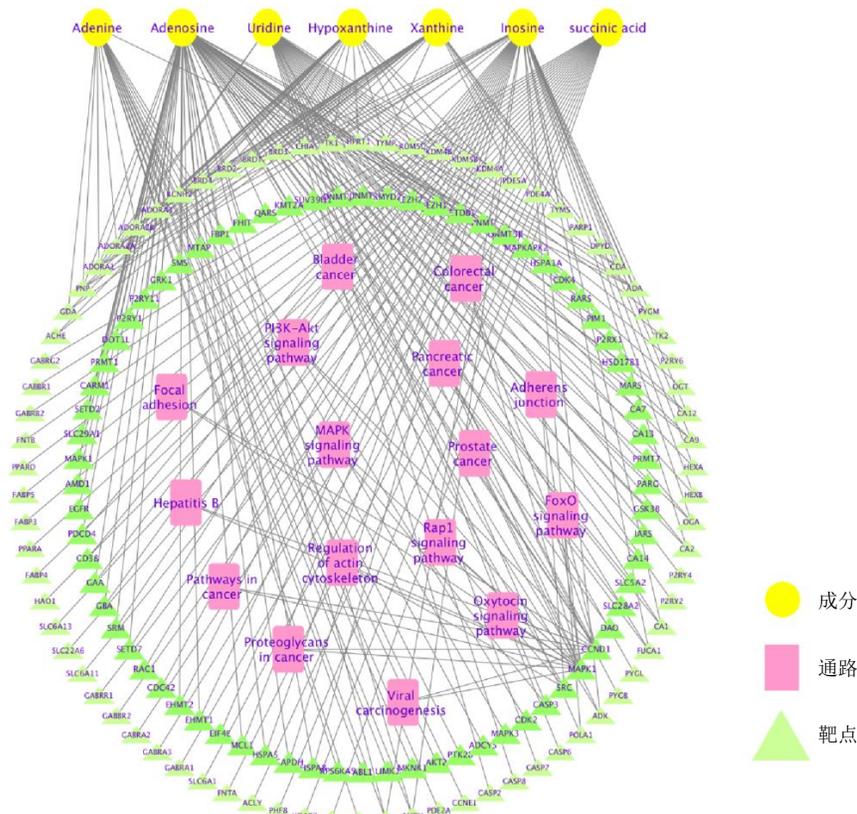


图 7 半夏成分-靶点-通路网络

Fig. 7 Component-target-pathway network of PR

个靶点发挥的作用可能更为关键, 蛋白聚糖作用癌症 (degree 7)、癌症通路 (degree 7)、病毒致癌 (degree

7)、PI3K-Akt 信号通路 (degree 6)、乙型肝炎 (degree 6)、黏着斑 (degree 6) 连接度高于其他通路, 表明

半夏的7个关键成分主要对上述6条信号通路发挥重要作用。

2.8 整合分析

半夏中含有生物碱类、有机酸类、核苷类、植物甾醇类、芳香酸类及半夏蛋白等多种成分,其中有机酸类和核苷类成分是半夏主要的活性成分之一,具有多种药理作用^[9]。1987年从半夏中分离出鸟苷^[10],1997年分离出胸苷^[11];2003年分离出次黄嘌呤核苷^[12]。有研究表明,半夏经炮制成清半夏、姜半夏、法半夏饮片后,肌苷、鸟苷、腺苷、琥珀酸含量明显降低^[13],这与本研究中识别出的差异性成分相吻合。

MAPK信号转导通路在细胞生长、分化、凋亡等进程中发挥关键作用^[14]。细胞周期蛋白D1(cyclin D1, CD1)经研究表明可促进细胞增殖,但其过度表达可致细胞增殖失控,促进恶性肿瘤细胞的侵袭和转移^[15]。过表达的CD1与肝细胞癌相关。综上,推测半夏差异性成分可通过作用这些核心靶点发挥潜在的治疗机制。与半夏中核苷类成分相关度较高的通路主要为蛋白聚糖作用癌症、癌症通路、病毒致癌、PI3K-Akt信号通路、乙型肝炎、黏着斑等。通过查阅相关文献可知,半夏中总蛋白、多糖等成分对卵巢癌细胞、小鼠肉瘤瘤株S₁₈₀、小鼠肝癌细胞H₂₂、小鼠艾氏腹水癌细胞EAC等具有显著的抑制作用^[16-19]。半夏中的核苷类成分是否具有抑癌协同增效作用有待进一步研究证实。

3 讨论

本实验分别建立了半夏药材和汤洗半夏饮片的HPLC指纹图谱,并指认了其中7个共有峰,半夏药材和汤洗半夏饮片的均具有较好的相似度,说明该方法简便快捷,可以稳定可靠地应用于半夏的质量控制过程中。各主成分的载荷值综合得分表明不同产地半夏药材的综合化学质量存在差异,且无明显的地域性规律,这进一步说明由于受环境、生长年限等多因素的影响,造成了半夏化学质量的差异。经汤洗处理后其中11个共有峰的色谱数据经PCA和OPLS-DA筛选后得到4种差异性成分。采用网络药理学分析相关成分,结果表明它们具有广泛的靶点和网络通路,与半夏的主要药理作用密切相关,为进一步实验验证、潜在药理学机制及临床拓展应用提供参考依据。

在文献研究基础上,指纹图谱方法建立过程中对水、20%甲醇、50%甲醇3种提取溶剂进行比较,

研究发现用水超声提取45 min得到的供试液分离效果好且色谱峰数量较多;以水为提取溶剂,分离出来的成分极性较大,例如多糖类成分、核苷类成分。且超声提取一次操作简单,避免多重操作处理有助于降低精密度。

经文献查阅^[20-22],同时进行190~410 nm波长下全波长扫描,发现在260 nm处各成分均有较强吸收,色谱峰相对较多,故选择260 nm波长下进行指纹图谱分析;对Waters C₁₈ Xselect (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters C₁₈ XTerra (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、汉邦Hedera ODS-2 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)等色谱柱进行了比较,结果表明Waters C₁₈ Xselect (250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱对于极性成分分离效果最佳,可以最大限度地反映半夏化学成分组成的全貌。研究中还对比柱温、流动相流速、梯度洗脱程序进行了考察,最终确定了色谱条件。

来源不确定、各地炮制规范不统一、贮藏运输不当使得中药饮片的质量控制问题频出^[23],本研究采用指纹图谱技术对多个产地的半夏药材开展质量研究,初步分析了汤洗前后半夏中的差异性成分,通过网络药理学初步筛选其潜在的作用靶点和网络通路,有助于更快速地找到效应相关的质量标志物。未来还需借助适宜的化学分析技术、药效学与毒理学技术和“谱-效-毒”关联性分析研究,进一步阐明汤洗影响半夏临床使用的有效性与安全性的科学内涵。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 123.
- [2] 吴皓. 汉至宋代半夏炮制的沿革研究 [J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版, 2001, 17(1): 45-47.
- [3] 孙静, 万强, 张伟. 从量效关系探讨《伤寒杂病论》半夏用药规律 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(5): 688-691.
- [4] 李东影, 崔凯茜, 孟贺, 等. 半夏古法“汤洗”炮制的科学性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(7): 127-133.
- [5] 许金国, 黄紫炎, 沈钱能, 等. 经典名方竹茹汤的指纹图谱及功效关联物质预测分析 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(23): 5599-5606.
- [6] 洪婷婷, 张钰明, 杨琳洁, 等. 经典名方半夏泻心汤水煎液的HPLC指纹图谱及黄芩、黄连量值传递研究 [J]. 中草药, 2020, 51(20): 5166-5176.
- [7] 曾颂. 基于灰色关联分析法的半夏质效评价研究 [D].

- 广州: 广东药学院, 2013.
- [8] 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.
- [9] 罗强, 梁晓宇, 刘鑫, 等. 半夏化学成分及药理作用研究进展 [J]. 特产研究, 2020, 42(5): 54-60.
- [10] 鹿野美弘, 有元良帆子, 赵昌代. 小半夏加茯苓汤における[半夏]の指标物质[J]. 生药学杂志, 1987, 41(1): 282-288.
- [11] 丸野正雄. Active principles of Pinelliae tube and new preparation of crude drug [J]. *Trat Med* 1997, 14(2):81.
- [12] 吴皓, 李伟, 张科卫, 等. 半夏药材鉴别成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(9): 836-839.
- [13] 杨冰月, 李敏, 敬勇, 等. 半夏及其炮制品化学成分及功效的差异研究 [J]. 中草药, 2018, 49(18): 4349-4355.
- [14] Cargnello M, Roux P P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, 75(1): 50-83.
- [15] Zhou J, Li L, Fang L, et al. Quercetin reduces cyclin D1 activity and induces G1 phase arrest in HepG2 cells [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(1): 516-522.
- [16] 何萍, 李帅, 王素娟, 等. 半夏化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(9): 671-674.
- [17] 付芸, 黄必胜, 李娟, 等. 半夏蛋白抗肿瘤活性组分的提取分离 [J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(1): 45-47.
- [18] 朱铭伟, 周抗美, 丁声颂. 掌叶半夏总蛋白对卵巢癌细胞株及人脐血造血细胞的作用 [J]. 上海医科大学学报, 1999, 26(6): 455-456,458.
- [19] 赵永娟, 王蕾, 侯琳, 等. 半夏多糖抗肿瘤作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(3): 368-371.
- [20] 周恒, 曹依敏, 苗水, 等. HPLC法测定沪地龙中7个核苷类成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(1): 97-103.
- [21] 潘慧. Box-Behnken 设计-效应面法优化益安宁丸中尿苷和腺苷的提取工艺 [J]. 中国药师, 2019, 22(12): 2229-2232.
- [22] 何丹, 杨林, 秦少容, 等. UPLC 法测定半夏提取物中尿苷、鸟苷和腺苷的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17): 87-89.
- [23] 彭任, 陆兔林, 胡立宏, 等. 中药饮片质量标志物(Q-marker)研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2603-2610.

[责任编辑 郑礼胜]