

## 基于谱效关系的醋延胡索炮制前后特征成分研究

杜伟锋<sup>1,2</sup>, 孙海英<sup>3</sup>, 洪浩<sup>1</sup>, 朱伟豪<sup>1</sup>, 洪智慧<sup>1</sup>, 葛卫红<sup>2\*</sup>, 李昌煜<sup>1,4\*</sup>, 张光霁<sup>5</sup>

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402
2. 浙江中医药大学中药炮制技术研究中心, 浙江 杭州 311401
3. 浙江省台州医院, 浙江 台州 317000
4. 浙江中医药大学中医药科学院, 浙江 杭州 310053
5. 浙江中医药大学基础医学院, 浙江 杭州 310053

**摘要:**目的 探讨醋延胡索炮制前后 HPLC 指纹图谱与镇痛药效的相关性, 筛选炮制特征成分。方法 建立生延胡索与醋延胡索 HPLC 指纹图谱, 对两者化学成分进行差异性分析, 以大鼠扭体反应为模型建立评价指标, 采用超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛、孕酮、雌二醇、前列腺素 E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>)、前列腺素 F<sub>2a</sub> (prostaglandin F<sub>2a</sub>, PGF<sub>2a</sub>) 等指标评价镇痛药效, 结合灰色关联度分析法与熵权法研究醋延胡索的谱-效关系, 指认醋延胡索炮制特征成分。结果 建立了不同批次生延胡索饮片、醋延胡索饮片的 HPLC 指纹图谱, 确定了 31 个共有峰。生延胡索饮片与醋延胡索饮片均有止痛效果, 以醋延胡索止痛效果最为显著。镇痛谱效关联度分析得到峰 9、18~21、25、26 醋炙后关联度得分有了显著的提升, 与醋炙后镇痛疗效呈显著正相关。结论 通过谱-效关系明确了醋延胡索炮制特征成分为原阿片碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、去氢紫堇碱、延胡索乙素、四氢小檗碱、延胡索甲素, 为醋延胡索炮制质量控制提供一定依据。

**关键词:** 醋延胡索; 指纹图谱; 谱效关系; 炮制特征成分; HPLC; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 孕酮; 雌二醇; 前列腺素 E<sub>2</sub>; 前列腺素 F<sub>2a</sub>; 原阿片碱; 盐酸巴马汀; 盐酸小檗碱; 去氢紫堇碱; 延胡索乙素; 四氢小檗碱; 延胡索甲素

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)20-6178-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.20.007

## Characteristic components in crude and vinegar-processed *Corydalis Rhizoma* based on relationship between spectrum and effect

DU Wei-feng<sup>1,2</sup>, SUN Hai-ying<sup>3</sup>, HONG Hao<sup>1</sup>, ZHU Wei-hao<sup>1</sup>, HONG Zhi-hui<sup>1</sup>, GE Wei-hong<sup>2</sup>, LI Chang-yu<sup>1,4</sup>, ZHANG Guang-ji<sup>5</sup>

1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China
2. Research Center of Traditional Chinese Medicine Processing Technology, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311401, China
3. Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Taizhou 317000, China
4. Academy of Chinese Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China
5. College of Basic Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

**Abstract: Objective** To explore the correlation between the HPLC fingerprint of crude and vinegar-processed Yanhusuo (*Corydalis Rhizoma*) and the analgesic efficacy, and to screen the characteristic components of the processing. **Methods** The crude and vinegar-processed *Corydalis Rhizoma* HPLC fingerprints were established, the differences of chemical composition between the two were analyzed. The evaluation index was established with body torsion reaction model. The analgesic efficacy was evaluated using the superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde, progesterone, estradiol, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaglandin F<sub>2a</sub> (PGF<sub>2a</sub>) as index,

收稿日期: 2021-05-08

基金项目: 国家重点研发计划—中药饮片质量识别关键技术研究 (2018YFC1707001); 中医药行业科研专项 (201507002); 宁波市“科技创新 2025”重大专项 (20201ZDYF020069); 中华中医药学会青年人才托举工程项目 (QNRC2-C12)

作者简介: 杜伟锋 (1984—), 男, 副研究员, 从事中药炮制及质量控制研究。Tel: (0571)87195895 E-mail: duweifeng\_200158@sohu.com

\*通信作者: 李昌煜 (1965—), 男, 教授, 从事中药药理及新药开发研究。Tel: (0571)86613537 E-mail: lcyzemu@sina.com

葛卫红 (1969—), 男, 教授, 从事中药药理与新药开发研究。Tel: (0571)87195888 E-mail: geweihong@hotmail.com

combined with the grey correlation analysis method and entropy weight method to study the refluxing spectrum-effect relationship, so as to identify the chemical composition characteristics of vinegar-processed *Corydalis Rhizoma*. **Results** HPLC fingerprints of different batches of crude and vinegar-processed *Corydalis Rhizoma* slices were established, and 31 common peaks were identified. Both crude and vinegar-processed *Corydalis Rhizoma* decoction pieces had analgesic effect, and vinegar-processed *Corydalis Rhizoma* decoction pieces had the most significant analgesic effect. The correlation degree analysis of analgesia spectrum effect showed that the correlation degree scores of peaks 9, 18—21, 25 and 26 were significantly improved after vinegar-processing, and showed a significant positive correlation with the analgesic efficacy after vinegar-processing. **Conclusion** The characteristic components in the processing of *Corydalis Rhizoma* were identified as protopine, palmatine hydrochloride, berberine hydrochloride, dehydrocorydaline, tetrahydropalmatine, tetrahydroberberine and corydaline, which provided a certain basis for the quality control of vinegar-processed *Corydalis Rhizoma*.

**Key words:** vinegar-processed *Corydalis Rhizoma*; fingerprint; spectral effect relationship; processing characteristic components; HPLC; superoxide dismutase; malondialdehyde; progesterone; estradiol; prostaglandin E<sub>2</sub>; prostaglandin F<sub>2a</sub>; protopine; palmatine hydrochloride; berberine hydrochloride; dehydrocorydaline; tetrahydropalmatine; tetrahydroberberine; corydaline

延胡索为罂粟科紫堇属植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎, 具有活血、行气、止痛功效。临床常用于治疗脘腹疼痛、胸痹心痛、经闭痛经、产后瘀阻等症<sup>[1]</sup>。现代研究表明, 延胡索止痛作用与体内前列腺素、雌二醇等激素分泌水平有关<sup>[2-3]</sup>, 其主要有效成分为季胺类和叔胺类生物碱, 包括延胡索乙素、去氢紫堇碱、紫堇碱、巴马汀、小檗碱等<sup>[4-8]</sup>。生延胡索经醋炙后, 醋酸与生物碱形成可溶性醋酸盐, 有利于煎煮时溶出, 疗效增强。目前《中国药典》2020年版规定只有延胡索乙素单一成分含量测定, 且延胡索生品和醋延胡索的限度要求一致, 难以体现出炮制特色, 难以完全满足延胡索饮片的质量控制和评价<sup>[9]</sup>。因此, 开展醋延胡索化学成分与镇痛谱效关系研究, 寻找炮制特征成分, 建立炮制特色质量标准尤为关键<sup>[10-11]</sup>。

本实验采用 HPLC 建立不同批次生延胡索与醋延胡索饮片指纹图谱, 确定生醋延胡索共有峰模式; 通过建立大鼠扭体法疼痛模型, 来源于同一批药材的生延胡索与醋延胡索药液, 探讨生延胡索与醋延胡索饮片药效; 在数据分析的基础上, 结合灰色关联度分析法与熵权法研究醋延胡索炮制前后谱效关系<sup>[12-13]</sup>, 确定炮制特征成分, 为醋延胡索炮制质量控制提供一定依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

U3000 高效液相色谱仪, 配置包括四元梯度泵、在线真空脱气机、自动进样器、柱温箱、变色龙谱数据工作站, 美国 Thermo Fisher 公司; BIOBASE-EL10A 博科酶标仪, 济南鑫贝西生物技术有限公司; NT-xs105 电子分析天平, 0.01 mg, 瑞士 Mettler Toledo 公司; 华兴 HX-T 电子秤, 杭州三里亭电子

秤行; DFD-700 电热恒温水浴锅, 天津市泰斯特仪器有限公司; TG16-WS 台式高速离心机, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; MIL-SYN 型超纯水仪, 美国 Milipore 公司。

### 1.2 材料

己烯雌酚 (批号 100033-201308, 质量分数 99.5%)、缩宫素 (批号 150529-200902, 质量分数 21 IU/支)、戊巴比妥 (批号 20190517, 质量分数 3%)、大鼠雌二醇试剂盒、大鼠孕酮试剂盒、大鼠前列腺素 F<sub>2a</sub> (prostaglandin F<sub>2a</sub>, PGF<sub>2a</sub>) 试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒、大鼠前列腺素 E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) 试剂盒、大鼠丙二醛试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司; 罗通定片 (批号 190501) 购自广西河丰药业有限公司。对照品原阿片碱 (质量分数 99.6%, 批号 110853-201805)、盐酸巴马汀 (质量分数 85.7%, 批号 110732-201913)、盐酸小檗碱 (质量分数 86.7%, 批号 110713-201814)、延胡索乙素 (质量分数 99.9%, 批号 110726-201819) 均购自中国食品药品检定研究院; 对照品四氢小檗碱, 质量分数 98%, 批号 190144-201907, 购自上海鸿永生物科技有限公司; 对照品延胡索甲素 (质量分数 95%, 批号 518-69-4)、去氢紫堇碱 (质量分数 95%, 批号 30045-16-0) 购自上海标准科技有限公司。

生延胡索、醋延胡索均购自中药饮片公司, 经浙江中医药大学葛卫红教授鉴定, 分别为罂粟科紫堇属植物延胡索 *C. yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎的生品和炮制加工后的醋制品。具体编号及来源见表 1。

### 1.3 动物

清洁级 SD 大鼠, 雌性, 70 只, 体质量 (200±

表1 延胡索样品来源信息

Table 1 Information of origin of *Corydalis Rhizoma* samples

编号	收集地点	生延胡 索批号	醋延胡 索批号
1	安徽鹤年堂中药饮片有限公司	S1	C1
2	山东百味堂中药饮片有限公司	S2	C2
3	江西樟树成方中药饮片有限公司	S3	C3
4	河北春开制药股份有限公司	S4	C4
5	衢州南孔中药有限公司饮片厂	S5	C5

20) g, 来源于浙江中医药大学动物实验研究中心, 动物许可证号 SYXK(浙) 2018-0012。饲养环境: 湿度 40%~60%、温度 20~25 °C, 12 h 光亮与 12 h 黑暗交替。所有动物实验遵循浙江中医药大学动物实验研究中心有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则。

## 2 方法与结果

### 2.1 醋延胡索饮片的制备

生延胡索饮片, 淋入米醋(100 kg 饮片用米醋 20 kg) 搅拌均匀, 按醋炙法炒制(温度 180 °C, 25 kg 为 1 锅, 炒 15 min), 取出晾凉, 即得醋延胡索饮片, 批号见表 1。

### 2.2 色谱条件

色谱柱为安捷伦 Zorbax-Extend-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.6% 乙酸水溶液(三乙胺调 pH 值至 5.0)-乙腈, 梯度洗脱: 0~22 min, 17%~22% 乙腈; 22~30 min, 22%~30% 乙腈; 30~50 min, 30%~50% 乙腈; 50~75 min, 50%~80% 乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 280 nm。

### 2.3 溶液的制备

**2.3.1 对照品储备液** 取原阿片碱、盐酸小檗碱、四氢小檗碱、延胡索乙素、盐酸巴马汀、延胡索甲素、去氢紫堇碱对照品适量, 精密称定, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇配置成质量浓度分别为 1.049、1.179、1.240、1.076、1.158、1.172、1.091 mg/mL 的对照品母液, 备用。

**2.3.2 供试品溶液** 取生延胡索、醋延胡索粉末(过三号筛) 约 0.5 g, 精密称定, 置平底烧瓶中, 精密加入浓氨试液-甲醇(1:20) 混合溶液 50 mL, 称定质量, 冷浸 1 h 后加热回流 1 h, 放冷, 再称定质量, 用浓氨试液-甲醇(1:20) 混合溶液补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 25 mL, 蒸

干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度试验** 取生延胡索供试品溶液, 连续进样 6 次测定, 各色谱峰相对保留时间及相对峰面积 RSD ≤ 2%, 指纹图谱相似度大于 0.998, 表明仪器精密度良好, 符合实验要求。

**2.4.2 重复性试验** 取生延胡索粉末, 按“2.3.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 精密吸取 10 μL, 注入液相色谱仪, 各色谱峰相对保留时间及相对峰面积 RSD ≤ 2%, 相似度 ≥ 0.996, 重复性良好, 符合实验要求。

**2.4.3 稳定性试验** 取生延胡索供试品溶液, 按“2.2”项色谱条件, 分别于制备后 0、5、10、15、20、25 h 进样测定, 各色谱峰相对保留时间及相对峰面积 RSD ≤ 2%, 相似度 ≥ 0.997, 表明供试品溶液在 25 h 内稳定, 符合实验要求。

### 2.5 醋延胡索炮制前后比较研究

**2.5.1 HPLC 指纹图谱的建立** 将制备的生延胡索及醋延胡索样品各 5 批, 按“2.3.2”项下方法制备供试品, 进液相色谱仪检测, 将得到的色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”分析<sup>[14]</sup>, 以 S1 为参照图谱, 时间窗宽度 0.1 min, 中位数法进行匹配, 记录共有峰色谱峰面积, 结果见图 1。由图 1 可知, 确定了 31 个共有峰; 结合指纹图相似度评价可知, 5 批生延胡索 HPLC 指纹图谱相似度 > 0.95, 5 批醋延胡索 HPLC 指纹图谱相似度 > 0.96, 同时得到了 10 批样品中 31 个共有峰的峰面积, 见表 2。结果表明, 生延胡索与醋延胡索总体差异不大, 但在常见成分含量上存在差异, 通过比较生延胡索与醋延胡索的指纹图谱特征峰, 可以有效地比较两者的化学成分变化, 控制生延胡索与醋延胡索的质量。

**2.5.2 分层聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)** 对 10 批样品进行 HCA, HCA 结果如图 2 所示。生延胡索样品 S1~S5 明确划分为一个聚类, 醋延胡索样品 C1~C5 明确划分为另一个聚类, 证明了 HCA 是一种快速、简单、准确划分生延胡索与醋延胡索样品的方法, 在接下来的药效学实验中, 选择的样品来自于生延胡索(S1~S5) 与醋延胡索样品(C1~C5)。

**2.5.3 主成分分析(principal component analysis,**

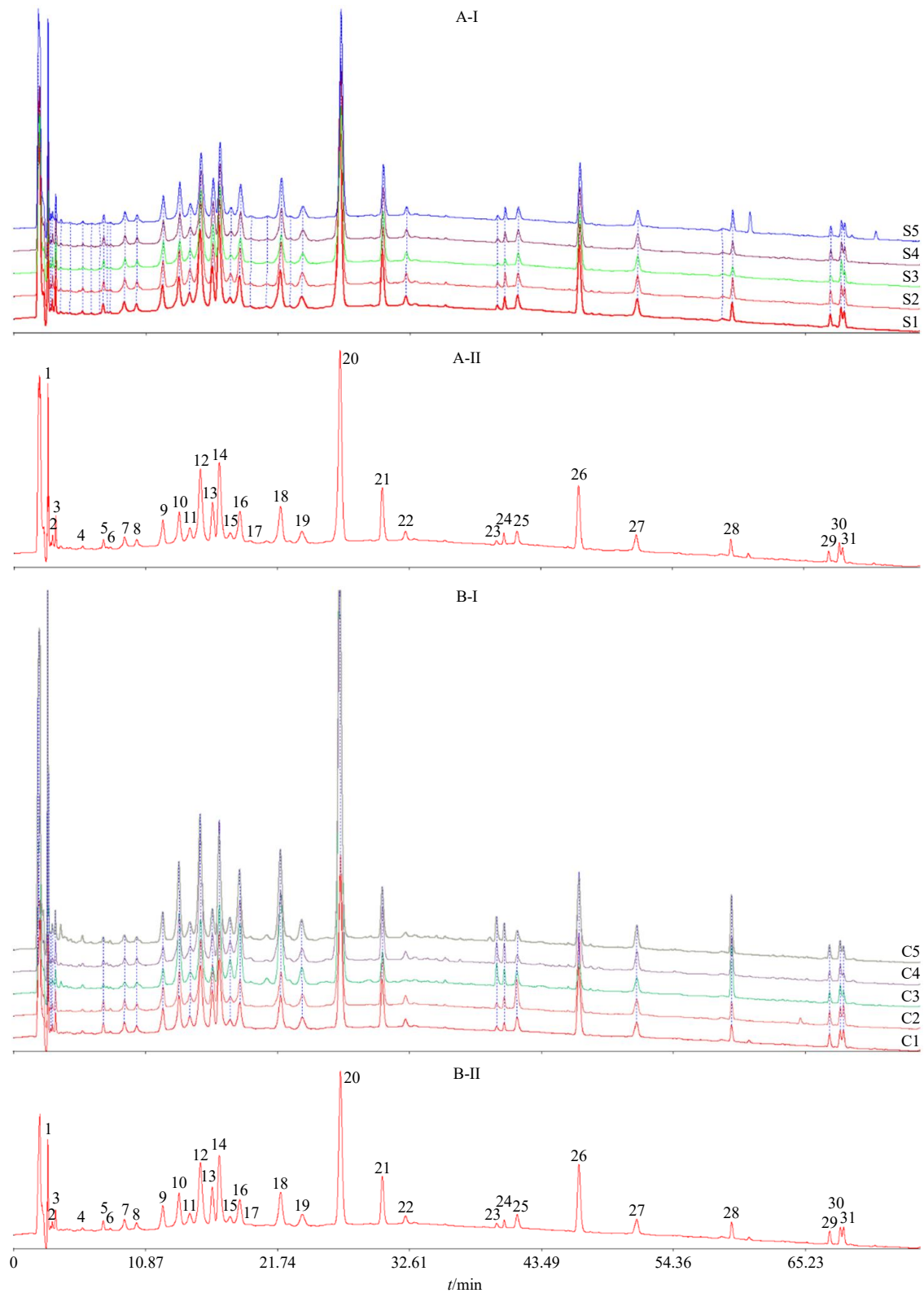


图1 生延胡索 (A)、醋延胡索 (B) HPLC 共有指纹图谱 (I) 及其对照指纹图谱 (II)

Fig. 1 HPLC common fingerprint (I) and its contrast fingerprint (II) of crude *Corydalis Rhizoma* (A) and vinegar-processed *Corydalis Rhizoma* (B)

PCA) PCA 结果如图 3 所示, 其中正方形为生延胡索样品, 三角形为醋延胡索样品, 将 31 个共有峰

的峰面积标准化导入 SIMCA14.1 进行 PCA, 模型参数  $R^2_X$  (模型主成分对  $X$  变量的解释程度) 为

表 2 延胡索样品共有峰相对峰面积

Table 2 Peak area of common peaks of *Corydalis Rhizoma* samples

样品	共有峰相对峰面积															
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13	峰 14	峰 15	峰 16
S1	0.745	1.345	2.293	1.848	1.825	0.184	1.306	0.907	4.881	5.399	1.073	12.530	4.266	11.004	0.484	4.437
S2	0.536	1.349	2.313	1.988	1.573	0.395	1.733	1.102	4.064	6.177	1.955	15.712	4.112	10.346	0.594	5.059
S3	0.684	1.083	2.457	1.555	1.126	0.426	2.058	1.154	4.816	5.067	2.006	12.567	4.246	9.965	0.667	4.791
S4	0.923	1.209	2.029	1.331	1.424	0.273	1.143	0.857	4.535	5.272	2.327	13.197	4.725	8.993	0.410	4.670
S5	0.554	1.643	2.668	1.296	2.005	0.435	1.940	1.027	4.248	7.675	1.582	15.781	4.595	11.047	0.582	5.660
C1	0.826	1.682	2.958	2.428	1.910	0.162	2.932	1.654	4.549	5.881	1.414	14.622	5.525	11.194	0.977	6.465
C2	0.720	1.384	2.341	1.814	1.818	0.781	2.711	1.257	4.590	6.145	2.504	17.082	5.199	10.395	0.415	5.217
C3	0.525	1.145	2.672	1.569	1.455	0.250	2.235	1.924	4.473	5.228	2.286	13.647	3.628	9.795	0.577	4.581
C4	0.892	1.362	2.318	1.384	1.808	0.177	2.042	1.724	5.228	5.260	2.306	12.812	3.776	9.148	0.402	4.076
C5	0.871	1.688	2.817	1.373	2.543	0.586	2.092	1.877	4.502	5.166	2.594	15.809	4.095	10.278	0.413	5.507

样品	共有峰相对峰面积															
	峰 17	峰 18	峰 19	峰 20	峰 21	峰 22	峰 23	峰 24	峰 25	峰 26	峰 27	峰 28	峰 29	峰 30	峰 31	
S1	5.204	1.906	22.896	4.969	10.057	0.309	0.719	0.719	1.225	6.692	2.037	3.347	0.845	1.313	1.065	
S2	4.859	1.808	18.751	4.438	10.015	0.187	0.561	0.461	1.092	5.843	1.768	3.060	0.435	1.467	1.217	
S3	5.294	1.832	20.949	4.458	10.839	0.278	0.651	0.651	1.087	5.986	1.844	3.563	0.582	1.056	1.119	
S4	4.577	1.710	19.079	4.007	10.731	0.304	0.660	0.660	1.122	5.209	1.839	3.074	0.766	1.173	0.968	
S5	5.429	2.004	20.038	4.473	9.795	0.245	0.451	0.451	1.143	6.049	1.856	3.704	0.535	1.264	1.088	
C1	6.484	2.280	23.935	5.117	11.097	0.332	0.753	0.753	1.172	7.671	2.076	3.570	0.905	1.586	1.121	
C2	5.779	1.827	20.454	4.484	11.156	0.269	0.587	0.587	1.093	5.917	1.886	3.613	0.676	1.574	1.245	
C3	4.683	1.731	21.081	4.601	10.702	0.256	0.468	0.468	1.307	5.903	1.990	3.391	0.593	1.361	1.156	
C4	5.612	1.681	19.163	4.543	10.819	0.267	0.533	0.533	1.160	5.845	2.095	3.097	0.515	1.223	0.963	
C5	4.878	1.948	20.377	4.692	10.722	0.284	0.583	0.583	1.201	6.839	2.224	3.819	0.839	1.334	1.094	

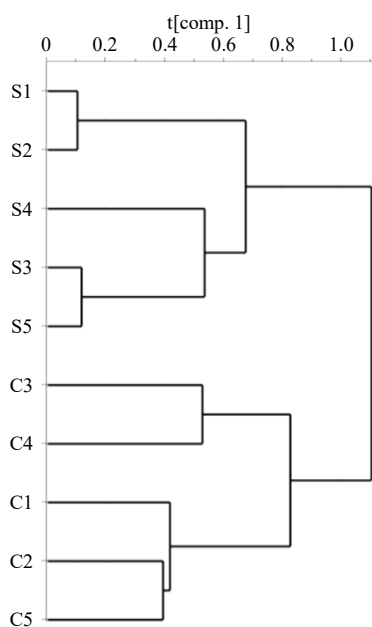


图 2 10 批样品 HCA

Fig. 2 HCA of 10 batches of samples

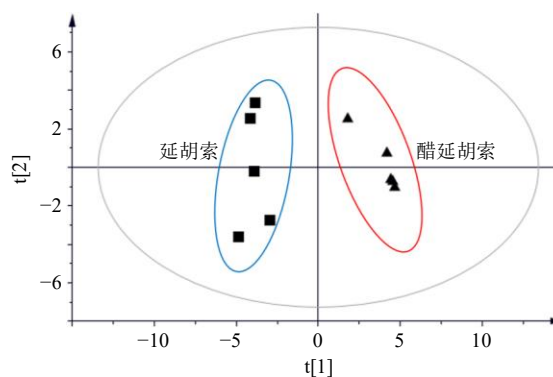


图 3 10 批样品 PCA 图

Fig. 3 PCA diagram of 10 batches of samples

0.982, 模型预测率 ( $Q^2$ ) 为 0.863。在无监督 PCA 识别模式下, 将延胡索样本自动分为 2 类。第 1 类 (S1~S5) 为生延胡索, 分布在 I、IV 象限; 第 2 类 (C1~C5) 为醋延胡索, 分布在 II、III 象限。

2.5.4 正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal least

squares-discriminant analysis, OPLS-DA) OPLS-DA 结果如图 4 所示, 将 31 个共有峰的峰面积标准化导入 SIMCA 14.1 进行 OPLS-DA, 模型预测能力参数  $Q^2$  为 0.988、累积解释能力参数 ( $R^2_X$ 、 $R^2_Y$ ) 分别为 0.878、0.935, 且 3 者的数值越接近于 1, 则表示模型拟合效果越好。以变量投影重要性 (variable importance projection, VIP) 值  $\geq 1$  为筛选指标, 得到峰 9、18~21、25、26 共 7 个峰对差异贡献度最为显著, 因此认为峰 9、18~21、25、26 为差异贡献量。

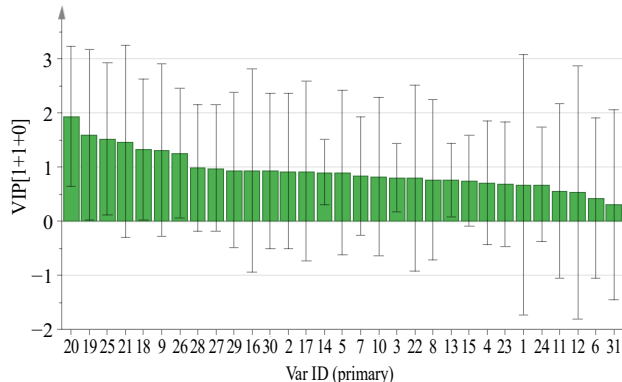


图 4 10 批样品 OPLS-DA 模型中共有成分的 VIP 值  
Fig. 4 VIP values of components of OPLS-DA model of 10 batches of samples

## 2.6 醋延胡索炮制前后镇痛药效比较

**2.6.1 药液制备** 取己烯雌酚适量, 加纯净水溶解, 制成 0.5 mg/mL 的己烯雌酚溶液, 备用。

将罗通定片适量, 粉碎后用纯净水溶解, 制成 3 mg/mL 的罗通定片溶液, 作为阳性药, 备用。

称取醋延胡索与生延胡索饮片各 600 g, 各加入 10 倍量纯净水浸泡 30 min 后, 煎煮 1 h 滤过, 滤渣再煎煮 1 h, 合并过滤煎煮液, 浓缩至 300 mL, 得到 2 g/mL 的延胡索水煎液, 备用。

**2.6.2 造模、分组及给药** 取 65 只健康雌性 SD 大鼠按照体重随机分为 5 组, 即空白组 (5 只)、模型组 (5 只)、阳性药组 (5 只)、生延胡索组 (25 只) 和醋延胡索组 (25 只)。除空白组外, 剩余 4 组大鼠每日 ig 己烯雌酚 2.00 mg/kg 1 次, 连续 12 d; 在造模第 6 天, 生延胡索组和醋延胡索组 ig 相应药液 10 g/kg; 阳性药组大鼠 ig 罗通定混悬液 30 mg/kg; 空白组与模型组 ig 等体积生理盐水; 在造模第 12 天, 末次给药 1 h 后, 给药组大鼠 ip 缩宫素 40 U/kg, 空白组 ip 等体积生理盐水, 记录注射缩宫素后 30 min 内各组大鼠发生扭体反应的数量及扭体次数<sup>[15]</sup>, 结果见表 3, 空白组大鼠未出现扭体反应, 模型组大

表 3 醋延胡索炮制前后对痛经大鼠扭体反应的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effects of crude and vinegar-processed *Corydalis Rhizoma* on writhing response of dysmenorrhea rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n/只	给药剂量/ (g·kg <sup>-1</sup> )	扭体发 生率/%	30 min 扭体次数
空白	5	/	0	0
模型	5	/	90	5.11 ± 1.67
阳性药	5	0.03	50	2.01 ± 0.71*
生延胡索	25	6	60	2.91 ± 1.21
醋延胡索	25	6	50	2.20 ± 0.86*

与模型组比较: \* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs model group

鼠在 ip 缩宫素后 30 min 内的扭体发生率为 90%, 提示动物模型成功建立。与模型组相比, 给药组大鼠扭体反应发生率都有所降低, 扭体次数减少; 其中醋延胡索组与阳性药组扭体次数显著减少; 醋延胡索组扭体次数少于生延胡索组, 无显著差异。

**2.6.3 指标检测** 缩宫素注射 1 h 后, 各组大鼠 ip 戊巴比妥麻醉, 使用肝素抗凝管采集腹主动脉血后, 在低温离心机中 4 °C、3000 r/min 离心 5 min, 取上清液备用。采用酶联免疫 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法测定大鼠血浆中雌二醇、孕酮、丙二醛水平及 SOD 活性。

在腹主动脉取血完成后, 取出子宫组织, 加入生理盐水, 于冰浴下制成 0.10 g/mL 的组织匀浆, 在低温离心机中设置 4 °C、3000 r/min 离心 5 min, 取上清液备用。采用 ELISA 法测定大鼠子宫组织匀浆中 PGF<sub>2a</sub>、PGE<sub>2</sub> 水平。

**2.6.4 药效结果比较** 将 6 种药效指标数据导入 SPSS 统计软件进行分析, 组间差异比较用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。结果见表 4, 与空白组大鼠相比, 缩宫素诱导的痛经大鼠 SOD 活性及孕酮、PGE<sub>2</sub> 水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01), 丙二醛、雌二醇、PGF<sub>2a</sub> 含量显著升高 ( $P < 0.01$ ), 给药后 6 种指标均有回调, 其中醋延胡索组回调效果优于生延胡索组。

## 2.7 基于灰色关联度法的谱效关系分析

**2.7.1 原始数据的无量纲化处理** 采用均值法对原始数据进行变换。变换的母序列记为  $\{Y_m(k)\}$ , 子序列记为  $\{Y_z(k)\}$ 。将生、醋延胡索的药效指标作为母序列, 生、醋延胡索的共有峰峰面积作为子序列。

**2.7.2 关联系数的计算** 当  $t=k$  时 ( $k$  为批次编

表4 醋延胡索炮制前后镇痛实验结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 4 Analgesic experiment of crude and vinegar-processed *Corydalis Rhizoma* ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	雌二醇/(pmol·L <sup>-1</sup> )	孕酮/(ng·mL <sup>-1</sup> )	丙二醛/(nmol·mL <sup>-1</sup> )	SOD/(U·mL <sup>-1</sup> )	PGF <sub>2α</sub> /(pg·mL <sup>-1</sup> )	PGE <sub>2</sub> /(pg·mL <sup>-1</sup> )
空白	7.96±0.82	1.96±0.17	0.31±0.02	7.38±0.51	33.5±2.3	201.0±16.1
模型	15.49±1.52**	1.26±0.13**	0.72±0.01**	6.30±0.41*	49.0±3.7**	171.6±11.1*
阳性	10.70±1.09##	1.57±0.15#	0.37±0.02##	6.76±0.43#	38.6±2.7##	192.0±7.4#
生品	9.38±0.77##	1.54±0.12	0.39±0.02##	6.52±0.36#	41.5±2.8	191.4±11.7#
醋品	8.49±0.98##	1.73±0.19##	0.36±0.02##	7.01±0.51#	36.7±2.9##	198.2±9.1#

与空白组比较: \*P<0.05 \*\*P<0.01; 与模型组比较: #P<0.05 ##P<0.01  
\*P<0.05 \*\*P<0.01 vs blank group; #P<0.05 ##P<0.01 vs model group

号), 母序列记为{Y<sub>m</sub>(k)}, 子序列记为{Y<sub>z</sub>(k)}。按下  
列公式, 计算在 t=k 时母序列与子序列的关联系数  
p(k)。

$$p(k) = [\min\min |Y_m(k) - Y_z(k)| + \rho \cdot \max\max |Y_m(k) - Y_z(k)|] / [ |Y_m(k) - Y_z(k)| + \rho \cdot \max\max |Y_m(k) - Y_z(k)| ]$$

Y<sub>m</sub>(k)为生、醋延胡索止痛药效指标, Y<sub>z</sub>(k)为生、醋延胡索的  
共有峰峰面积归一化后的数值; z 为峰号, k 为不同批次的  
编号; ρ 为分辨系数, 取值范围为 0<ρ<1, 关系系数之间的  
差异及区分能力随着ρ的减小而上升, 即ρ的取值越小,  
关系系数之间的差异越大, 区分能力越强, 通常情况下ρ取  
0.5; |Y<sub>m</sub>(k) - Y<sub>z</sub>(k)|为母序列与子序列差的绝对值,  
minmin |Y<sub>m</sub>(k) - Y<sub>z</sub>(k)|为第2级最小差, 记为 Δ<sub>min</sub>;

maxmax |Y<sub>m</sub>(k) - Y<sub>z</sub>(k)|为第2级最大差, 记为 Δ<sub>max</sub>

2.7.3 关联度(R)的计算 R实质上是对时间序列  
几何关系的比较, 是母序列与子序列各个时刻的关  
联系数的平均值。

$$R = 1/n \sum_{k=1}^n p(k)$$

n 为子序列的数据个数 (即批次)

以指纹图谱中 31 个共有峰峰面积为子序列, 痛  
经大鼠雌二醇、孕酮、丙二醛、SOD、PGF<sub>2α</sub>、PGE<sub>2</sub>  
含量为母序列, 按照“2.7.2”项下的方法进行灰色  
关联度计算, 得到生、醋延胡索各成分与 7 种药效  
指标灰色关联度, 结果见表 5、6。

表5 生延胡索成分 (峰号) 与各药效指标灰色关联度

Table 5 Grey correlation degree between components (peak numbers) of crude *Corydalis Rhizoma* and pharmacodynamic indexes

峰号	灰色关联度						峰号	灰色关联度					
	雌二醇	孕酮	丙二醛	SOD	PGF <sub>2α</sub>	PGE <sub>2</sub>		雌二醇	孕酮	丙二醛	SOD	PGF <sub>2α</sub>	PGE <sub>2</sub>
1	0.651	0.621	0.667	0.659	0.656	0.669	17	0.752	0.718	0.797	0.779	0.734	0.815
2	0.599	0.664	0.645	0.673	0.644	0.652	18	0.811	0.78	0.772	0.788	0.822	0.761
3	0.644	0.639	0.683	0.68	0.638	0.696	19	0.877	0.856	0.860	0.827	0.862	0.859
4	0.812	0.779	0.773	0.772	0.812	0.764	20	0.685	0.708	0.673	0.680	0.700	0.664
5	0.875	0.859	0.837	0.860	0.900	0.825	21	0.714	0.653	0.745	0.741	0.698	0.756
6	0.861	0.931	0.863	0.863	0.885	0.852	22	0.792	0.785	0.800	0.761	0.741	0.805
7	0.621	0.542	0.608	0.603	0.604	0.610	23	0.662	0.631	0.656	0.671	0.670	0.650
8	0.875	0.937	0.912	0.925	0.943	0.908	24	0.936	0.864	0.872	0.876	0.901	0.858
9	0.848	0.887	0.867	0.882	0.931	0.853	25	0.828	0.835	0.880	0.843	0.810	0.885
10	0.891	0.952	0.915	0.918	0.944	0.901	26	0.823	0.811	0.874	0.839	0.803	0.874
11	0.893	0.902	0.929	0.919	0.877	0.925	27	0.905	0.943	0.924	0.927	0.903	0.909
12	0.883	0.869	0.865	0.859	0.891	0.854	28	0.523	0.528	0.503	0.507	0.514	0.498
13	0.902	0.944	0.929	0.936	0.92	0.913	29	0.633	0.613	0.604	0.611	0.626	0.597
14	0.893	0.956	0.910	0.919	0.917	0.895	30	0.498	0.488	0.489	0.497	0.502	0.486
15	0.915	0.953	0.922	0.932	0.904	0.907	31	0.673	0.645	0.648	0.664	0.680	0.641
16	0.752	0.718	0.797	0.779	0.734	0.815							

表 6 醋延胡索成分 (峰号) 与各药效指标灰色关联度

Table 6 Grey correlation degree between components (peak numbers) of vinegar-processed *Corydalis Rhizoma* and pharmacodynamic indexes

峰号	灰色关联度						峰号	灰色关联度					
	雌二醇	孕酮	丙二醛	SOD	PGF <sub>2α</sub>	PGE <sub>2</sub>		雌二醇	孕酮	丙二醛	SOD	PGF <sub>2α</sub>	PGE <sub>2</sub>
1	0.868	0.845	0.892	0.897	0.884	0.869	17	0.915	0.905	0.915	0.878	0.892	0.886
2	0.782	0.758	0.752	0.720	0.742	0.744	18	0.627	0.626	0.622	0.622	0.620	0.621
3	0.892	0.894	0.894	0.914	0.859	0.890	19	0.821	0.807	0.845	0.857	0.895	0.867
4	0.895	0.868	0.861	0.824	0.858	0.856	20	0.634	0.635	0.634	0.638	0.636	0.636
5	0.912	0.899	0.912	0.878	0.901	0.890	21	0.619	0.606	0.593	0.573	0.583	0.590
6	0.936	0.925	0.932	0.895	0.924	0.918	22	0.885	0.862	0.887	0.863	0.850	0.837
7	0.900	0.904	0.927	0.948	0.977	0.960	23	0.860	0.887	0.865	0.887	0.888	0.900
8	0.945	0.929	0.973	0.932	0.941	0.938	24	0.961	0.944	0.952	0.915	0.922	0.914
9	0.876	0.849	0.880	0.868	0.841	0.826	25	0.841	0.835	0.840	0.835	0.852	0.844
10	0.922	0.903	0.937	0.909	0.912	0.896	26	0.700	0.699	0.701	0.705	0.704	0.702
11	0.921	0.905	0.949	0.918	0.938	0.925	27	0.924	0.890	0.958	0.929	0.914	0.898
12	0.918	0.925	0.915	0.900	0.912	0.906	28	0.743	0.738	0.739	0.736	0.743	0.739
13	0.928	0.907	0.961	0.924	0.929	0.917	29	0.865	0.852	0.872	0.845	0.879	0.872
14	0.928	0.911	0.960	0.919	0.927	0.920	30	0.930	0.914	0.960	0.916	0.935	0.930
15	0.922	0.914	0.931	0.918	0.926	0.908	31	0.902	0.886	0.919	0.899	0.913	0.897
16	0.915	0.905	0.915	0.878	0.892	0.886							

2.8 熵权法计算关联度综合得分

2.8.1 采用极差法按下列公式对关联度数据进行标准化处理。其中正向指标为与药效成正相关的药效指标，负向指标为与药效成负相关的药效指标。*i* 为各色谱峰峰号，*j* 为各药效评价指标的数值。 $\min\{X_j\}$ 与 $\max\{X_j\}$ 分别为所有色谱峰中第*j*项药效指标的最小值和最大值。

2.8.2 计算药效关联度综合得分 首先按下列公式对标准化后的数据计算各色谱峰的各药效指标值的比重 ( $T_{ij}$ )。

$$T_{ij} = X_{ij} / \sum_{i=1}^m X_{ij}$$

随后计算各指标的信息熵 ( $e_j$ )。

$$e_j = -k \sum_{i=1}^m T_{ij} \times \ln T_{ij}$$

再计算信息熵冗余度 ( $a_j$ )。

$$a_j = 1 - e_j$$

其次计算各指标权重 ( $W_i$ )。

$$W_i = a_j / \sum_{j=1}^n a_j$$

最后得到药效关联度综合得分 ( $F_{ij}$ )。

$$F_{ij} = W_i \times X_{ij}$$

*m* 为色谱峰数量，*n* 为药效指标数量

以表 5、6 灰色关联度为基础，按照熵权法<sup>[16]</sup>计算，得到各色谱峰与药效指标的关联度得分，并进行排序，结果见表 7。结果显示，醋制后，峰 9 排名上升 11 位，关联度得分排名第 11；峰 18 排名上升 14 位、关联度得分排名第 2；峰 19 排名上升 12 位，关联度得分排 8；峰 20 排名上升 7 位，关联度排名第 3；峰 21 排名上升 10 位，关联度排名第 1；峰 25 排名上升 11 位，关联度得分排第 7；峰 26 排名上升 13 位，关联度得分排第 4。表明醋炙后，该 7 种成分对醋延胡索药效提升有较大影响，故确定这 7 种峰为炮制特征成分。经对照品确认，峰 9、18~21、25、26 分别为原阿片碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、去氢紫堇碱、延胡索乙素、四氢小檗碱、延胡索甲素。

3 讨论

延胡索止痛效果显著，中医常常将其作为治疗妇女经闭痛经的首选药物，故动物实验选择痛经模型大鼠作为实验对象开展谱效研究。经文献调研发现动物的痛经模型主要是通过注射缩宫素，刺激子宫平滑肌收缩，以达到模拟原发性痛经的效果<sup>[17]</sup>，因此，在本研究中，通过 ig 己烯雌酚改善大鼠子宫



表7 生延胡索与醋延胡索特征成分与药效指标灰色关联度综合得分

Table 7 Comprehensive score of grey correlation degree between characteristic components and pharmacodynamic indexes of crude and vinegar-processed *Corydalis Rhizoma*

峰号	生品关联度得分	排名	醋品关联度得分	排名	排名变化	峰号	生品关联度得分	排名	醋品关联度得分	排名	排名变化
1	0.562 0	7	0.364 4	15	8 ↓	17	0.466 0	12	0.318 6	16	4 ↓
2	0.616 0	3	0.544 3	6	3 ↓	18	0.411 6	16	0.763 9	2	14 ↑
3	0.578 5	6	0.375 7	12	6 ↓	19	0.348 1	20	0.416 7	8	12 ↑
4	0.412 9	15	0.371 6	13	2 ↑	20	0.541 2	10	0.748 0	3	7 ↑
5	0.343 9	21	0.317 9	18	3 ↑	21	0.501 9	11	0.793 8	1	10 ↑
6	0.364 3	19	0.285 1	24	5 ↓	22	0.450 6	14	0.365 0	14	0
7	0.600 1	4	0.301 6	21	17 ↓	23	0.557 0	8	0.404 0	9	1 ↓
8	0.321 2	28	0.247 6	31	3 ↓	24	0.303 3	31	0.257 7	30	1 ↑
9	0.337 8	22	0.378 2	11	11 ↑	25	0.390 4	18	0.426 1	7	11 ↑
10	0.311 7	30	0.291 8	23	7 ↑	26	0.391 9	17	0.645 5	4	13 ↑
11	0.331 5	24	0.276 7	25	1 ↓	27	0.322 6	26	0.273 3	26	0
12	0.335 1	23	0.317 8	19	4 ↑	28	0.715 5	2	0.582 1	5	3 ↓
13	0.314 8	29	0.266 5	28	1 ↑	29	0.600 0	5	0.378 4	10	5 ↓
14	0.328 1	25	0.269 0	27	2 ↓	30	0.729 2	1	0.265 2	29	28 ↓
15	0.321 4	27	0.295 5	22	5 ↑	31	0.551 4	9	0.315 8	20	11 ↓
16	0.466 0	12	0.318 6	16	4 ↓						

“↑”表示排名上升，“↓”表示排名下降

“↑” indicates rising, “↓” indicates falling

敏感性后，注射缩宫素诱发子宫痉挛性收缩，结果发现造模成功，与空白组大鼠相比，模型组大鼠出现扭体反应明显，反应发生率达90%。

而在给药后，大鼠扭体反应次数则显著下降，表明延胡索水提液镇痛效果显著，能极大地缓解大鼠疼痛，醋延胡索组扭体次数低于生延胡索组，提示醋延胡索镇痛作用优于生延胡索。并以SOD、丙二醛、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、雌二醇、孕酮为药效学评价指标<sup>[18-20]</sup>，与空白组大鼠相比，缩宫素诱导的痛经大鼠SOD活性、孕酮水平、PGE<sub>2</sub>显著降低，丙二醛、雌二醇、PGF<sub>2α</sub>含量显著升高，给药后6种指标均有显著回调，其中醋延胡索组回调效果优于生延胡索组。从药效指标上可以看出，醋延胡索水煎液止痛效果强于生延胡索，表明醋炙后，某些止痛成分的含量发生了变化，导致药效出现提升。为了更好地探明成分含量变化与药效变化之间的联系，本实验选择谱效关系作为研究方法，结合灰色关联分析手段展开研究。建立了10批延胡索的HPLC指纹图谱，共确定31个共有峰，相似度>0.9，表明各批次饮片质量基本稳定。

通过灰色关联度法对7种药效数据和生、醋延

胡索指纹图谱共有峰进行分析，得到各色谱峰关联度，随后采用熵权法计算得到各色谱峰关联度得分，并比较生延胡索与醋延胡索共有峰关联度得分变化情况。结果表明，峰9、18~21、25、26醋炙后关联度得分有了显著的提升，与醋炙后镇痛疗效增加呈正相关。结合对照品比对结果，得出结论：原阿片碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、去氢紫堇碱、延胡索乙素、四氢小檗碱、延胡索甲素为醋延胡索炮制特征成分，这为醋延胡索炮制质量控制提供一定依据。

综上所述，本实验通过谱效关系，探究了醋延胡索炮制前后化学成分变化规律，初步明确了7种炮制特征成分，为醋延胡索炮制机制及饮片品质评价标准研究提供参考。

**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: 145.  
 [2] 张恺, 李娜娜, 李嵩, 等. 元胡止痛口服液对原发性痛经的镇痛作用及机制研究 [J]. 天津中医药, 2019, 36(10): 1006-1011.  
 [3] 韩彦琪, 孟凡翠, 许浚, 等. 基于网络药理学方法的元

- 胡止痛滴丸治疗原发性痛经的配伍合理性研究 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 526-532.
- [4] 冯自立, 赵正栋, 刘建欣. 延胡索化学成分及药理活性研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(11): 2000-2008.
- [5] 何晓凤, 张晶, 张梅. 延胡索化学成分、药理活性及毒副作用研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(11): 97-100.
- [6] 骆晶, 孟雪, 胡卫涛, 等. 亲和萃取法筛选延胡索水提液中的活性成分 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2020, 22(10): 3768-3774.
- [7] 高振华, 王超然, 郭秀洁, 等. 延胡索中叔胺碱和季铵碱类组分的高效分离及镇痛活性鉴定 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(3): 507-514.
- [8] 陈昆南, 傅红燕, 王长军. 基于 UPLC/Q-TOF MS 技术对延胡索醋法炮制前后化学成分的研究 [J]. 化学研究与应用, 2019, 31(9): 1618-1622.
- [9] 廖建萍, 刘红宇, 刘绍贵. 药材与饮片质量问题及其成因与监管建议 [J]. 中医药导报, 2010, 16(2): 69-70.
- [10] 贾红梅, 庾延和, 于猛, 等. 基于化学计量学的酒萸肉特征性成分识别及定量测定 [J]. 中草药, 2020, 51(5): 1294-1301.
- [11] 赵楠, 张晓哲, 胡昌江, 等. 运用代谢组学技术研究发现炮制引起大黄多成分变化 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(9): 1607-1613.
- [12] 杨超, 朱晓钗, 万浩婷, 等. 基于灰色关联分析方法研究炒酸枣仁镇静催眠作用谱效关系 [J]. 中草药, 2021, 52(17): 5267-5274.
- [13] 刘谊民, 许婷, 张黄琴, 等. 基于谱效关系和网络药理学的淫羊藿抗骨质疏松物质基础及作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(16): 177-184.
- [14] 孙萍萍, 郭正红, 杨武德, 等. 生/醋延胡索饮片及配方颗粒的指纹图谱研究及 5 种生物碱的含量测定 [J]. 中国药房, 2020, 31(20): 2462-2468.
- [15] 孙兰, 李家春, 刘莉娜, 等. 散结镇痛胶囊对缩宫素诱导小鼠痛经的作用机制 [J]. 中成药, 2021, 43(8): 2030-2035.
- [16] 杨龙飞, 高燕, 赵瀚年. 丹红注射液指纹图谱的灰色关联度分析及谱效相关数学模型研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 878-881.
- [17] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 痛经动物模型制备规范(草案) [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(19): 20-24.
- [18] Dikensoy E, Balat O, Pene S, *et al.* Malondialdehyde, nitric oxide and adrenomedullin levels in patients with primary dysmenorrhea [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2008, 34(6): 1049-1053.
- [19] Bernardi M, Lazzeri L, Perelli F, *et al.* Dysmenorrhea and related disorders [J]. *F1000Research*, 2017, 6: 1645.
- [20] Huang X, Su S, Duan J A, *et al.* Effects and mechanisms of Shaofu-Zhuyu decoction and its major bioactive component for cold-stagnation and blood-stasis primary dysmenorrhea rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 186: 234-243.

[责任编辑 郑礼胜]