

# 还贝止咳方不同极性部位止咳作用的谱效关系

张雯霞<sup>1,2</sup>, 苗雨露<sup>2</sup>, 冯敏<sup>1,2</sup>, 张文智<sup>2</sup>, 倪艳<sup>2\*</sup>

(1. 山西中医药大学, 太原 030619; 2. 山西省中医药研究院, 太原 030012)

**[摘要]** **目的:**研究还贝止咳方不同极性部位的指纹图谱与其止咳作用的关联性,明确对其药效作用贡献较大的色谱峰,并对色谱峰进行归属。**方法:**采用梯度洗脱法建立还贝止咳方不同极性部位的色谱峰,以水提物图谱为参照,经色谱工作站处理,得到各部位指纹图谱的共有峰和相应的峰面积。以小鼠咳嗽次数、咳嗽潜伏期及肺灌洗液中的白细胞介素(IL)-4,  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ ),免疫球蛋白(Ig)E, IL-5的含量为检测指标,对还贝止咳方不同极性部位的止咳作用进行考察。将咳嗽次数、咳嗽潜伏期与共有峰峰面积进行关联性分析,指出对药效作用贡献较大的峰,并根据单味药指纹图谱进行归属。**结果:**双变量相关分析得出7个对止咳作用贡献较大的色谱峰,分别为12,13,29,32,33,35,39号峰,这些峰所代表的化合物含量越高,止咳作用越强,其中32号峰与咳嗽潜伏期有极显著相关性,13,32号峰与咳嗽次数具有极显著相关性。对这些色谱峰进行归属,发现这些色谱峰分别属于黄芩、还阳参、枳壳、甘草等药味。**结论:**13号,32号等色谱峰对还贝止咳方的止咳作用发挥的贡献较大,还阳参、黄芩、枳壳对于全方具有显著意义。

**[关键词]** 还贝止咳方; 指纹图谱; 止咳作用; 谱效关系; 还阳参

**[中图分类号]** R284.1; R22; R2-03; R289; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)08-0120-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190516

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181120.1557.004.html>

**[网络出版时间]** 2018-11-21 16:48

## Spectrum-effect Relationship in Antitussive Effect of Different Polar Parts of Huabei Zhike Recipe

ZHANG Wen-xia<sup>1,2</sup>, MIAO Yu-lu<sup>2</sup>, FENG Min<sup>1,2</sup>, ZHANG Wen-zhi<sup>2</sup>, NI Yan<sup>2\*</sup>

(1. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Taiyuan 030619, China;

2. Shanxi Academy of TCM, Taiyuan 030012, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the correlation between the fingerprint of different polar parts of Huanbei Zhike recipe and its antitussive effect, identify the chromatographic peaks greatly contributing to its pharmacological effect, and ascribe the chromatographic peaks. **Method:** Gradient elution method was used to establish the chromatographic peaks of different polar parts of Huanbei Zhike recipe. The common peaks and corresponding peak areas of each part were obtained by referring to the water extract chromatogram and after being processed by chromatographic workstation. The cough frequency, the latent period of cough and the contents of interleukin (IL) -4, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), immunoglobulin (Ig) E and IL-5 in lung lavage fluid of mice were used as the detection indexes to investigate the antitussive effect of different polar parts of Huanbei Zhike recipe. The correlation analysis among cough frequency, cough latent period and common peak area was carried out, and the peaks greatly contributing to the effect of medicine were pointed out, which were assigned according to the fingerprint of single drug. **Result:** Bivariate correlation analysis showed that seven chromatographic peaks, i. e. No. 12, 13, 29, 32, 33, 35 and 39, contributed significantly to the antitussive effect. The higher the content

**[收稿日期]** 20180903(023)

**[基金项目]** 山西省重点研发项目(201603D321028)

**[第一作者]** 张雯霞,在读硕士,从事中药质量控制及活性成分分析研究, E-mail: zwx18234143026@163.com

**[通信作者]** \*倪艳,硕士生导师,主任药师,从事中药化学及药效物质基础研究, Tel: 0351-4668016, E-mail: niyan\_01@hotmail.com

of the compounds represented by these peaks, the stronger the antitussive effect. There was a significant correlation between No. 32 peak and the latent period of cough, while No. 13 and No. 32 peaks were significantly correlated with cough frequency. These chromatographic peaks were assigned and found to be present in *Scutellaria baicalensis*, *Crepis Herba*, *Aurantii Fructus*, *Glycyrrhiza uralensis*, etc. **Conclusion:** The chromatographic peaks of No. 13 and No. 32 peaks contribute greatly to the antitussive effect of Huanbei Zhike recipe, while *Crepis turczaniowii*, *S. baicalensis* and *Aurantii Fructus* are of significant significance for the whole recipe.

**[ Key words ]** Huabei Zhike recipe; fingerprint; antitussive effect; spectrum-effect relation; *Crepis turczaniowii*

还贝止咳方为山西省中医院临床经验方,由还阳参、平贝母、黄芩片、枳壳、地龙、僵蚕、苦杏仁、桃仁、紫苏子、乌梅、甘草片等药味组成,具有清肺止咳,解痉平喘之功效,可用咳嗽变异性哮喘、喘息性支气管炎等肺热咳嗽,临床上主要用于治疗小儿咳嗽变异性哮喘,发现其可以明显缓解小儿咳嗽等症状,疗效显著。方中,还阳参具有益气、止咳平喘、清热降火之功效,多年的实验研究提示<sup>[1-2]</sup>,还阳参止咳平喘作用显著,且无明显的毒副作用,清肺止咳、益气平喘的还阳参与润肺止咳、消痰下气的平贝母配伍,清润结合,止咳平喘,标本兼治;此外,方中苦杏仁、苏子一宣一降,调整已受邪之娇脏气机重归宣发肃降;黄芩片治肺中湿热,泻肺火上逆;乌梅敛肺止咳;桃仁活血润肺;僵蚕化痰散结、息风止痉;地龙清热平喘,通经活络;枳壳行气开胸,宽中除胀;甘草片调合诸药,全方共奏清热肃肺,止咳平喘之效。课题组前期经过系统的药效学实验证明,该方具有止咳、平喘、祛痰的作用,对于肺炎链球菌致大鼠肺热模型及咳嗽变异性哮喘豚鼠模型也具有显著的治疗作用<sup>[3-4]</sup>,但对于其发挥作用的药效物质基础尚不明确。因其主要用于治疗咳嗽变异性哮喘,一种以慢性咳嗽为主要或唯一临床症状的特殊类型的哮喘,因此本实验对该方止咳作用的药效物质基础进行初步的探索。

中药谱效关系研究是中药药效物质基础及其作用机制研究的一种有效方法,将“谱”与“效”通过统计软件与计算机技术联系起来,从整体研究其化学成分及药效作用之间的关系,不仅可以弥补传统中药研究模式中化学成分与药效作用隔离研究的弊端,还可以将指纹图谱与药效作用有效结合,为指纹图谱添加了药效学信息,从而达到了根据“谱”预测中药药效,增强“谱”“效”一致性的目的<sup>[5]</sup>。中药谱效关系的研究也为从整体上把控中药及其复方制剂的质量,鉴定中药真伪,评价中药质量一致性及稳定性提供研究思路<sup>[6]</sup>。本实验拟采用谱效相关性

分析,将还贝止咳方不同极性部位止咳作用的药理学实验数据及色谱峰数据进行相关性分析,明确方中对止咳作用发挥贡献较大的色谱峰,而后先通过单味药的 HPLC 图谱对色谱峰进行归属,初步对色谱峰为何种成分进行推测,再通过对照品进行有目标的指认,提高工作的准确度,减少工作量,缩短工作时间。实验对还贝止咳方的药效物质基础进行了初步研究,为日后该方的作用机制及处方优化等研究奠定基础。

双变量相关分析<sup>[7]</sup>是一种研究两个变量之间相互关系的统计学方法,用相关系数的大小及方向反应药效指标及色谱峰之间关系的密切程度及正负关系。本实验的谱效相关分析拟采用双变量相关分析法,通过相关系数明确还贝止咳方中发挥止咳作用的主要色谱峰,并对色谱峰进行归属,初步明确方中各单味药对全方的意义及其止咳作用的药效物质基础。

## 1 材料

**1.1 实验动物** SPF级KM幼年小鼠120只,体重10~12g,雌雄各半,购自中国辐射防护研究院,实验动物生产许可证号SCXK(京)2016-0006,动物实验的开展经过山西省中医药研究院伦理委员会审核。

**1.2 仪器** 402B型超声雾化器(上海鱼跃医疗器械有限公司);Thermo Scientific 移液枪(300 μL);PYX-DHS型数字显示隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂);Synergy H1型全功能微孔板检测仪(美国BioTek公司);1-14型高速离心机(德国SIGMA Laborzentrifugen Inc);UltiMate 3000型高效液相色谱仪(美国戴安公司,Chromeleon™色谱工作站);LC-300B型数控超声波清洗剂机(山东济宁鲁超超声设备有限公司);RE5298A型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

**1.3 药材及试剂** 方中还阳参药材采集于山西省朔州市山阴县,经检验符合《山西省中药材中药饮

片标准(第一册)》还阳参项下各项规定,平贝母、苦杏仁、黄芩、地龙、枳壳、紫苏子、僵蚕、桃仁、乌梅、甘草等药味均购于安徽省亳州市药材市场,由山西省中医院提供,经山西中医药研究院倪艳教授鉴定,分别为菊科植物还阳参 *Crepis crocea* 的干燥全草、百合科植物平贝母 *Fritillaria ussuriensis* 的干燥鳞茎、蔷薇科植物山杏 *Prunus armeniaca* var. *ansu* 的干燥成熟种子、唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* 的干燥根、钜蚓科动物环毛蚓 *Pheretima aspergillum* 的干燥体、芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* 及其栽培变种的干燥未成熟果实、唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* 的干燥成熟果实、蚕蛾科昆虫家蚕 *Bombyx mori* 4 ~ 5 龄的幼虫感染(或人工接种)白僵菌 *Beauveria bassiana* 而致死的干燥体、蔷薇科植物桃 *P. persica* 的干燥成熟种子、蔷薇科植物梅 *P. mume* 的干燥近成熟果实、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根和根茎,经检验均符合 2015 年版《中国药典》(一部)中各味药项下要求。

小鼠白细胞介素-4(IL-4),小鼠  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ ),小鼠免疫球蛋白 E(IgE),小鼠白细胞介素-5(IL-5)酶联免疫检测试剂盒(上海西唐生物科技有限公司,批号分别为 1802252, 1802152, 1803081, 1802171);氢氧化铵(国药集团化学试剂有限公司,批号 20140924);小儿肺热咳喘颗粒(南海葫芦娃制药有限公司,批号 160236);生理盐水(四川科伦药业股份有限公司,批号 N14111704-2);磷酸(北京试剂有限公司);乙酸、无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司);甲酸(天津市光复科技发展有限公司);甲醇、乙腈(西陇科学股份有限公司);超纯水(自制)。甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法

### 2.1 还贝止咳方水提物及不同极性部位浸膏制备

分别按处方量(还阳参 10 g,平贝母 5 g,苦杏仁 8 g,紫苏子 8 g,黄芩片 8 g,地龙 8 g,僵蚕 8 g,桃仁 6 g,乌梅 6 g,枳壳 6 g,甘草片 3 g)称取各药味饮片,加 10 倍量的水,煎煮 3 次,每次 1.5 h,合并 3 次滤液,减压浓缩至所需浓度,取部分水煎液挥干溶剂后即得还贝止咳方水提物浸膏。各单味药、阴性药浸膏同法制备。剩余还贝止咳方水煎液加入等体积的乙酸乙酯,萃取 3 次,合并萃取液,挥干溶剂后即得乙酸乙酯部位浸膏;剩余药液加入等体积的水饱和正丁醇,萃取 3 次,合并萃取液,挥干溶剂后即得正丁醇部位浸膏,剩余药液挥干溶剂即得水层部位浸膏。

精密称取水提物浸膏 1 g,按照各浸膏出膏率及

各单味药在全方中的用量配比,称取适量的乙酸乙酯浸膏、正丁醇浸膏、水层浸膏、单味药浸膏、阴性药浸膏,加入甲醇 10 mL,密塞称定质量,超声处理 30 min,冷却至室温后补足失重,摇匀,滤过,取续滤液过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜备用。

**2.2 还贝止咳方不同极性部位止咳作用的药效学研究** 取昆明种幼年小鼠 120 只,逐个放入 5 L 的干燥器内,用超声波雾化器以 4 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup> 的容量向密闭的干燥器内通入雾化的 25% 氢氧化铵 20 s,迅速转移至倒扣的漏斗下,用带有钟型接头的听诊器在漏斗根部听小鼠的咳嗽潜伏期和 2 min 内的咳嗽次数,挑选潜伏期在 90 s 内的敏感小鼠 70 只。按体质量随机分为空白组、模型组、小儿肺热咳喘颗粒组、还贝止咳方水提物(全方)组、乙酸乙酯组、正丁醇组以及水层组,每组 10 只,雌雄各半。空白组和模型组小鼠每天灌服 1 次生理盐水 0.2 mL $\cdot$ (10 g)<sup>-1</sup>,小儿肺热咳喘颗粒组给予 13.85 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>,其余各组分别灌服止咳方全方、乙酸乙酯层、正丁醇层以及水层(21.92 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>,相当于正常人给药剂量 1.46 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> 的 15 倍)0.2 mL $\cdot$ 10 g<sup>-1</sup>,连续预防性给药 7 d。于末次给药后 1 h,将小鼠放入倒置的钟型玻璃罩内,以超声喷雾器喷入定量 25% 氢氧化铵引咳 20 s,观察并计数小鼠 2 min 内咳嗽次数以及小鼠的咳嗽潜伏期。

测定完咳嗽次数以及咳嗽潜伏期后,立即处死小鼠,于颈部正中切开暴露器官,插入磨圆的 5 mL 注射器针头,用生理盐水 2 mL 慢慢注入气管内,反复抽吸几次,将洗液抽出,回收洗液约 1.5 mL,置于 2 mL 离心管中。将洗液静置 1 h 后,3 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 15 min,收集上清液,即得肺灌洗液(BALF)。采用酶联免疫吸附测定法检测 BALF 中的 IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-5 及血清 IgE 的含量。

### 2.3 还贝止咳方指纹图谱的建立

**2.3.1 色谱条件** 岛津 Inertsil ODS-3 C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相甲醇(A)-0.2% 磷酸水(B)梯度洗脱(0 ~ 2 min, 5% ~ 10% A; 2 ~ 32 min, 10% ~ 25% A; 32 ~ 62 min, 25% ~ 39% A; 62 ~ 82 min, 39% ~ 42% A; 82 ~ 102 min, 42% ~ 48% A; 102 ~ 122 min, 48% ~ 58% A; 122 ~ 125 min, 58% ~ 60% A; 125 ~ 135 min, 60% ~ 65% A; 135 ~ 140 min, 65% ~ 90% A),进样量 10  $\mu\text{L}$ ,检测波长 280 nm,柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ ,流速 1.0 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>,信号采集时间 140 min,采集频率为 2.0 Hz $\cdot$ s<sup>-1</sup>。

**2.3.2 精密度试验** 取同一供试品,按 2.1 项下

方法制备和 2.3.1 项色谱条件下连续进样 6 次,结果显示各共有峰的相对峰面积 RSD 均 < 3%,相对保留时间 RSD 均 < 3%,表明仪器精密度良好。

**2.3.3 重复性试验** 取同一份供试品按照上述备样方法平行备样 6 份,在 2.3.1 项色谱条件下进样,结果显示各共有峰的相对峰面积 RSD 均 < 3%,相对保留时间 RSD 均 < 3%,表明该方法重复性良好。

**2.3.4 稳定性试验** 取同一供试品,按照上述备样方法和色谱条件,分别在 0, 2, 4, 8, 10, 24 h 进样,结果显示各共有峰的相对峰面积 RSD 均 < 3%,相对保留时间 RSD 均 < 3%,表明供试品在 24 h 内稳定。

**2.3.5 指纹图相似度评价** 分别精密称取 8 批不同批次的还贝止咳方浸膏按照 2.3.1 项下色谱条件进行测定,采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件 2.0 版对 8 批样品的特征图谱进行相似度评价并生成对照指纹图谱。

**2.4 不同极性部位、单味药、阴性药指纹图谱的建立** 按照 2.3.1 项下色谱条件分别测定还贝止咳方不同极性部位和方中各单味药及其阴性药。以还贝

止咳方水提物图谱为参照,经色谱工作站处理,得到各部位指纹图谱的共有峰和相应的峰面积。采用 SPSS 22.0 中的双变量相关分析方法,计算各部位共有峰峰面积与咳嗽次数、咳嗽潜伏期的 Pearson 相关系数,指出方中对其止咳作用贡献较大的色谱峰,分别将全方、单味药、阴性药的特征图谱进行比较,对这些色谱峰进行归属,初步了解方中各味药物对全方的贡献。

### 3 结果

**3.1 药效学试验** 实验结果显示,与空白组相比,模型组 BALF 中的 IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-5 及 IgE 的含量均显著升高 ( $P < 0.05$ ),说明造模成功。与模型组相比,全方组、乙酸乙酯组、正丁醇组、水层组对于小鼠咳嗽次数,及 BALF 中的 IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-5 及 IgE 的含量均有下调趋势,且均可以延长小鼠的咳嗽潜伏期,除水层组延长咳嗽潜伏期及下调 IFN- $\gamma$  水平外,均具有统计学意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),提示还贝止咳方全方、乙酸乙酯层、正丁醇层、水层对于小鼠氨水引咳模型均具有一定的治疗作用,结果见表 1。

表 1 小鼠咳嗽的潜伏期, 2 min 内咳嗽的次数及炎症因子检测 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 Detection of cough latency, cough frequency in 2 min and inflammatory factors in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

分组	咳嗽潜伏期/s	咳嗽次数/次	IL-5/ng·L <sup>-1</sup>	IL-4/ng·L <sup>-1</sup>	IgE/ng·L <sup>-1</sup>	IFN- $\gamma$ /ng·L <sup>-1</sup>
空白	-	-	14.58 ± 4.38	4.10 ± 1.41	7.66 ± 7.75	26.38 ± 7.75
模型	14.00 ± 3.63	44.25 ± 14.96	22.70 ± 4.23 <sup>2)</sup>	8.91 ± 1.14 <sup>2)</sup>	14.9 ± 2.17 <sup>2)</sup>	38.5 ± 17.18 <sup>1)</sup>
小儿肺热咳喘颗粒	32.43 ± 9.52 <sup>4)</sup>	25.88 ± 14.97 <sup>4)</sup>	8.65 ± 2.30 <sup>4)</sup>	5.32 ± 1.92 <sup>4)</sup>	5.36 ± 3.36 <sup>4)</sup>	12.4 ± 4.92 <sup>4)</sup>
全方	23.83 ± 7.99 <sup>3)</sup>	23.88 ± 7.57 <sup>4)</sup>	14.30 ± 3.59 <sup>4)</sup>	4.94 ± 1.61 <sup>4)</sup>	6.70 ± 4.21 <sup>4)</sup>	25.69 ± 7.92 <sup>3)</sup>
乙酸乙酯	22.14 ± 7.53 <sup>3)</sup>	27.00 ± 7.15 <sup>4)</sup>	15.79 ± 4.79 <sup>4)</sup>	5.32 ± 1.35 <sup>4)</sup>	9.28 ± 5.31 <sup>3)</sup>	25.45 ± 7.63 <sup>3)</sup>
正丁醇	24.63 ± 8.68 <sup>4)</sup>	24.13 ± 5.54 <sup>4)</sup>	9.52 ± 4.06 <sup>4)</sup>	4.72 ± 2.04 <sup>4)</sup>	5.59 ± 5.23 <sup>4)</sup>	20.36 ± 6.22 <sup>4)</sup>
水层	17.13 ± 3.72	31.38 ± 6.14 <sup>3)</sup>	17.36 ± 5.18 <sup>3)</sup>	6.74 ± 1.33 <sup>3)</sup>	10.68 ± 3.32 <sup>3)</sup>	28.58 ± 4.70

注:与空白组相比,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组相比,<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

还贝止咳方不同极性部位中,正丁醇组小鼠的咳嗽次数、咳嗽潜伏期及 BALF 中 IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , IgE 的含量与全方及阳性药各组比较均无统计学差异;乙酸乙酯层延长咳嗽潜伏期及降低 IFN- $\gamma$ , IL-5 水平不如小儿肺热咳喘颗粒组,降低 IL-5 的能力显著低于正丁醇组 ( $P < 0.05$ );水层组在延长咳嗽潜伏期,降低 IL-5, IFN- $\gamma$ , IgE 方面不如小儿肺热咳喘颗粒组 ( $P < 0.05$ ),且降低 IL-5, IgE 水平与正丁醇组相比也存显著差异,低于正丁醇组 ( $P < 0.05$ )。还贝止咳方不同极性部位对于小鼠氨水引咳模型的治疗作用具有一定差异,其中,正丁醇组疗效最好,乙酸乙酯层疗效次之,水层疗效最差。

**3.2 特征图谱相似度评价** 将 8 批还贝止咳方样品的特征图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价软件 2.0 版,通过软件中的多点校正和全谱峰匹配,其中 33 号峰峰面积稳定且分离度良好,故选 33 号峰为参照峰(S),对 8 批样品进行相似度评价,结果见表 2,图 1,各批次样品相似度均 > 0.9,表明各批次之间差异较小。通过中药指纹图谱相似度评价软件得出还贝止咳方 HPLC 图谱对照指纹图谱,见图 2。

**3.3 还贝止咳方不同极性部位指纹图谱** 以还贝止咳方水提物图谱为参照,经色谱工作站处理,得到各部位指纹图谱的共有峰和相应的峰面积。相同保留时间下的峰标记为同一峰号,若某部位在该保留

表 2 不同批次还贝止咳方指纹图谱相似度评价

Table 2 Similarity evaluation of fingerprints of Huanbei Zhike recipe in different batches

编号	相似度
S1	0.966
S2	0.984
S3	0.985
S4	0.989
S5	0.989
S6	0.993
S7	0.956
S8	0.980

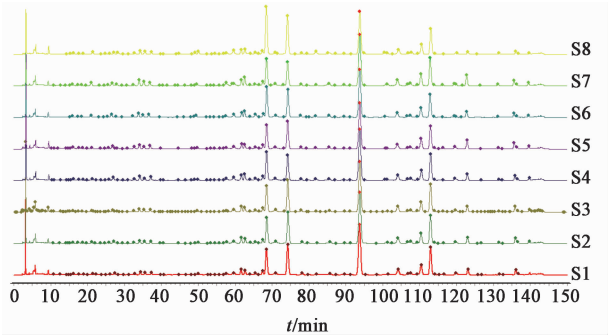
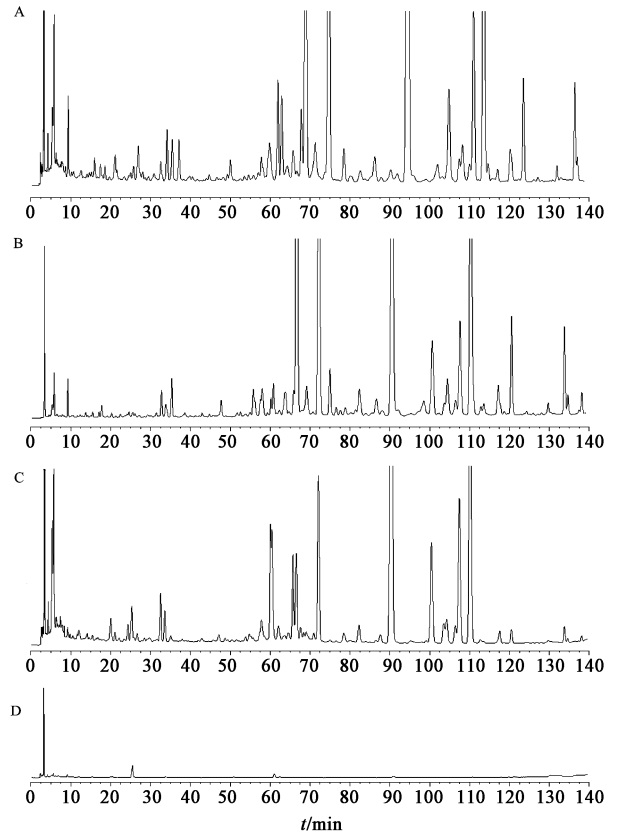


图 1 不同批次还贝止咳方特征谱叠加

Fig.1 Matching of characteristic graphs of different batches



A. 还贝止咳方水提取物; B. 还贝止咳方乙酸乙酯部位; C. 还贝止咳方正丁醇部位; D. 还贝止咳方水层部位

图 3 还贝止咳方不同极性部位指纹谱

Fig.3 Fingerprints of different polar parts of Huabei Zhike recipe

10, 18, 19, 20, 21, 23, 36, 38, 40, 41 这些峰与药效学实验结果相关性也较强,但不具有显著性差异,表示这些成分也有可能对该方的止咳作用发挥一定的贡献。

**3.5 色谱峰的归属** 将还贝止咳方的对照指纹图谱和方中各单味药及其阴性药的指纹图谱进行对照,发现黄芩对全方的贡献最大,对 19 个共有峰有贡献,且对 33, 35, 39, 40, 43, 44 和 46 号峰贡献极为显著;其次为枳壳,对 9 个共有峰有贡献,且对 18, 22, 24, 25, 26 和 34 号峰贡献极为显著;还阳参和乌梅对全方也有显著贡献,还阳参对 9 个共有峰有贡献,且对 20 号峰贡献显著,乌梅对 7 个共有峰有贡献;甘草对 5 个共有峰有贡献,且对 17 号峰贡献极为显著;紫苏子对 3 个共有峰有贡献,且对 27 号峰贡献极为显著;苦杏仁对 3 个共有峰有贡献;桃仁对 2 个共有峰有贡献,地龙和僵蚕均对 1 个共有峰有贡献,而平贝母对共有峰没有贡献,对全方贡献较小。较为显著的全方、单味药、阴性药对照图见图 4~9,相关分析结果见表 5。

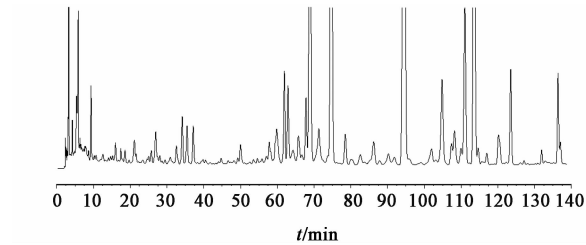


图 2 还贝止咳方 HPLC 对照指纹谱

Fig.2 HPLC fingerprint of Huabei Zhike recipe

时间下无峰,则将其峰面积记为 0,共有峰结果见图 3,共有峰峰面积结果见表 3。其中,水提物共有 46 个共有峰,乙酸乙酯部位有 45 个共有峰,正丁醇部位有 43 个共有峰,水层部位有 3 个共有峰。

**3.4 不同极性部位止咳作用的谱效分析** 各共有峰峰面积与咳嗽次数、咳嗽潜伏期的 Pearson 相关系数见表 4。实验数据显示,12, 13, 29, 32, 33, 35, 39 号峰的含量变化与咳嗽潜伏期呈显著正相关性,其中 32 号峰具有极显著性意义;12, 13, 32, 33 号峰的含量变化与咳嗽次数呈显著负相关性,其中 13, 32 号峰具有极显著性意义,即表示这些峰对于还贝止咳方止咳作用发挥的贡献较大。此外,1, 5, 6, 8, 9,

表 3 还贝止咳方不同极性部位指纹图谱共有峰峰面积

Table 3 Common peak area of fingerprints of different polar parts of Huabei Zhike recipe

部位	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
水提物	1.625 1	3.923 5	1.829 4	2.601 2	7.698 3	2.737 6	9.617 7	1.224 1	0.89	2.757 3	5.168 4	12.138
乙酸乙酯部位	0.678 6	1.791 2	1.312 1	3.444 3	1.236 7	1.405 7	1.781 7	1.120 8	1.027 7	0.533 1	1.038 4	8.096 5
正丁醇部位	3.481 7	1.215 7	0.521 6	0.829 2	9.051 8	5.749 7	13.851 9	3.310 7	0.861	2.144 7	1.372 3	15.551 5
水层部位	0	0	0	0	0	0	3.739 5	0	0	0	0	0
部位	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
水提物	10.376 4	9.400 7	1.510 5	5.602 2	6.949 9	16.593 5	24.294 8	25.155 8	4.064 9	12.017	14.099 2	153.379 6
乙酸乙酯部位	5.496 8	12.065 3	0	5.216 1	13.936 4	16.313 3	5.109 7	10.514 3	1.445 1	14.745 8	7.695 7	212.175 4
正丁醇部位	10.126 4	2.427 9	0.526	2.568	5.180 5	13.811 9	38.090 3	40.410 3	6.602 8	3.298 7	30.037 8	37.876 2
水层部位	0	0	0	0	0	0	0	1.314 9	0	0	0	0
部位	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
水提物	18.009 4	180.746 9	10.564 8	3.215 4	4.011 3	12.063 1	6.132 8	4.279 6	337.233 3	11.512 8	38.628 1	7.844 7
乙酸乙酯部位	19.582 7	237.857 1	19.440 3	3.068 9	3.747 5	16.852 4	8.094 3	2.603	228.601 4	16.393	43.594 9	1.373 5
正丁醇部位	0	68.786 5	1.250 2	0.586 4	5.287 6	9.032 2	1.322 5	4.5	284.858 8	0	55.128 6	10.105 4
水层部位	0	0	0	0	0	0	0	0	0.683	0	0	0
部位	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46		
水提物	14.201 2	5.855 1	58.347 5	157.611 5	4.949 8	3.217 1	13.784	28.368 8	3.554 5	27.539 9		
乙酸乙酯部位	24.749 4	4.942 6	51.362 9	204.004 9	3.543 7	5.395 7	16.569 7	40.375	5.730 9	33.418 8		
正丁醇部位	13.278 6	4.261	79.3609	180.587 5	2.271 5	0	6.030 9	5.553 6	1.536 5	5.759		
水层部位	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

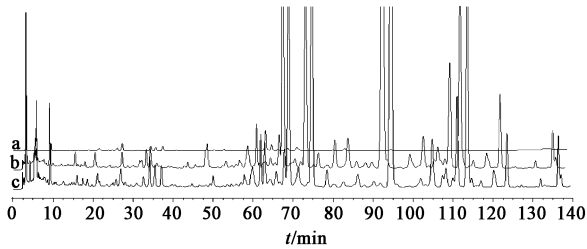


图 4 还阳参单味药 (a), 阴性药 (b) 及全方 (c) HPLC 比较  
Fig. 4 Comparison of atlas of single drug (a), negative drug (b) and whole recipe of Crepidis Herba (c)

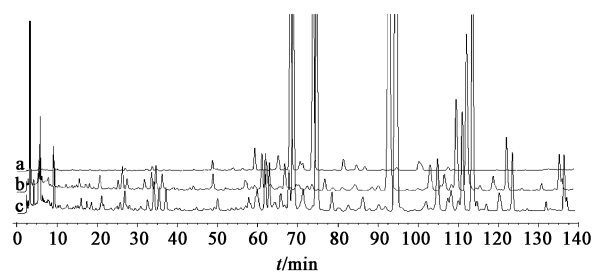


图 6 枳壳单味药 (a), 阴性药 (b) 及全方 (c) HPLC 比较  
Fig. 6 Comparison of single drug (a), negative drug (b) and whole recipe of Aurantii Fructus (c)

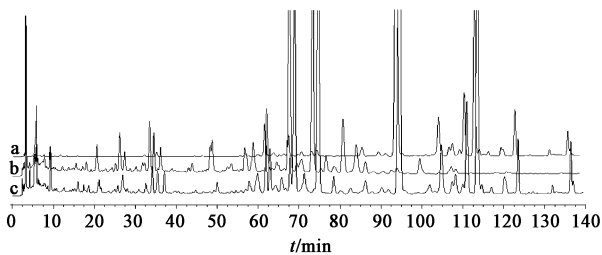


图 5 黄芩单味药 (a), 阴性药 (b) 及全方 (c) HPLC 比较  
Fig. 5 Comparison of single drug (a), negative drug (b) and whole recipe of Scutellariae Radix (c)

#### 4 讨论

药效学实验数据表明, 还贝止咳方不同极性部

位间的止咳作用存在一定差异, 其中, 正丁醇组疗效最好, 乙酸乙酯层疗效次之, 水层疗效最差。经双变量相关分析可知, 12, 13, 29, 32, 33, 35, 39 号峰与该方止咳作用有显著相关性, 这些峰在正丁醇部位的含量最高, 其次为乙酸乙酯部位, 水层含量最低, 这与各部位止咳作用的药效学实验结果相吻合, 初步确认这些成分为还贝止咳方中发挥止咳作用的药效物质基础。

经对还贝止咳方中单味药材、各单味药的阴性复方及全方的特征图谱进行对比, 所建立指纹图谱中的色谱峰主要来自于还阳参、黄芩片、紫苏子、

表 4 各部位指纹图谱与其药效学实验结果的双变量相关分析

Table 4 Bivariate correlation analysis between fingerprints of different parts and their pharmacodynamic experiment results

峰号	咳嗽潜伏期	咳嗽次数	峰号	咳嗽潜伏期	咳嗽次数
1	0.827	-0.805	24	0.438	-0.411
2	0.670	-0.754	25	0.348	-0.361
3	0.627	-0.673	26	0.533	-0.503
4	0.494	-0.467	27	0.300	-0.252
5	0.857	-0.900	28	0.495	-0.514
6	0.847	-0.820	29	0.986 <sup>1)</sup>	-0.942
7	0.682	-0.722	30	0.708	-0.650
8	0.824	-0.764	31	0.435	-0.414
9	0.892	-0.842	32	0.991 <sup>2)</sup>	-0.997 <sup>2)</sup>
10	0.845	-0.921	33	0.970 <sup>1)</sup>	-0.982 <sup>1)</sup>
11	0.602	-0.720	34	0.301	-0.284
12	0.986 <sup>1)</sup>	-0.972 <sup>1)</sup>	35	0.957 <sup>1)</sup>	-0.893
13	0.977 <sup>1)</sup>	-0.998 <sup>2)</sup>	36	0.857	-0.890
14	0.468	-0.448	37	0.663	-0.578
15	0.596	-0.725	38	0.902	-0.900
16	0.708	-0.713	39	0.986 <sup>1)</sup>	-0.947
17	0.517	-0.432	40	0.889	-0.819
18	0.906	-0.880	41	0.766	-0.802
19	0.844	-0.858	42	0.271	-0.238
20	0.882	-0.879	43	0.603	-0.580
21	0.877	-0.876	44	0.402	-0.374
22	0.492	-0.476	45	0.481	-0.428
23	0.849	-0.819	46	0.454	-0.444

注: <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

枳壳、乌梅、甘草片、苦杏仁、桃仁 8 味药材,其中黄芩对色谱峰的贡献最大,共 19 个色谱峰有贡献,且对其中 7 个贡献极为显著;还阳参作为君药,对 9 个色谱峰有贡献,且对 20 号峰的贡献极为显著。

此外,建立的特征图谱还存在一些不足之处,方中地龙、僵蚕两味动物药图谱较为薄弱,而平贝母作为另一味君药,在此次建立的特征图谱中没有与共有峰相对应的特征峰。分析原因,可能是因为动物药中含有的主要成分为氨基酸、蛋白质等,指纹图谱需要采用特定的色谱柱或在特定的高效液相色谱条件下进行<sup>[8-9]</sup>;而平贝母中含有的主要成分为贝母甲素、贝母乙素等生物碱类<sup>[10-11]</sup>,这类成分在制备供试品溶液时,需要在碱性条件下进行提取,指纹图谱需以二乙胺水溶液为流动相,并采用蒸发光散射检测器<sup>[12]</sup>。这些都与当前色谱条件相差较大,故很

表 5 色谱峰的归属

Table 5 Attribution of chromatographic peaks

峰号	归属	峰号	归属
1	乌梅	24	枳壳、苏子
2	杏仁、乌梅	25	还阳参、枳壳、苏子
3	甘草	26	枳壳
4	乌梅	27	苏子
5	还阳参、地龙、僵蚕、乌梅	28	甘草
6	还阳参	29	枳壳
7	还阳参	30	黄芩、甘草
8	乌梅	31	黄芩
9	杏仁、桃仁	32	黄芩
10	乌梅	33	黄芩
11	杏仁、桃仁	34	枳壳
12	还阳参、枳壳	35	黄芩
13	还阳参、黄芩	36	黄芩
14	还阳参	37	黄芩
15	枳壳	38	黄芩
16	乌梅	39	黄芩
17	甘草	40	黄芩
18	枳壳	41	黄芩
19	黄芩、甘草	42	黄芩
20	还阳参	43	黄芩
21	还阳参	44	黄芩
22	枳壳	45	黄芩
23	黄芩	46	黄芩

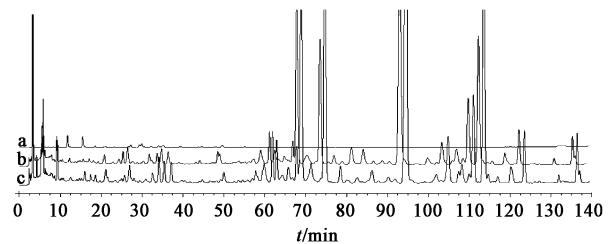


图 7 乌梅单味药(a), 阴性药(b)及全方(c) HPLC 比较  
Fig. 7 Comparison of chromatogram of single drug (a), negative drug (b) and whole recipe of Mume Fructus (c)

难在当前特征图谱中出峰。

中药复方成分复杂,单纯采用甲醇或乙腈等常规试剂为流动相可以反映大部分的化学成分信息,但很难分离出所有成分,尤其是一些特殊成分,本研究仅采用了甲醇为流动相,对于更全面地反映该方成分信息的条件尚需进一步研究,以期更加全面地反映该方作用与药效的有效成分及组方机制。

实验通过对照品对照,确认 9 号峰为苦杏仁苷,

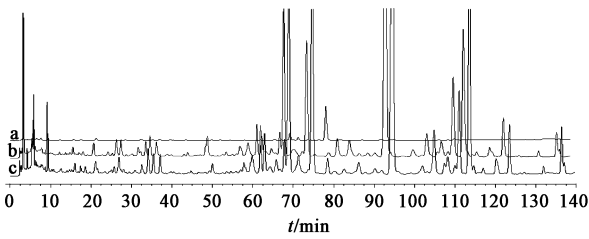


图 8 紫苏子单味药 (a), 阴性药 (b) 及全方 (c) HPLC 比较  
Fig. 8 Comparison of atlas of single drug (a), negative drug (b) and whole recipe of Ferillae Fructus (c)

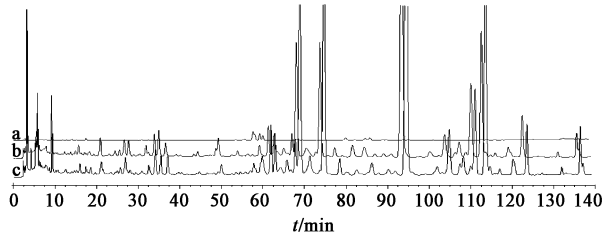


图 9 甘草单味药 (a), 阴性药 (b) 及全方 (c) HPLC 比较  
Fig. 9 Comparison of single drug (a), negative drug (b) and whole recipe of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (c)

12 号峰为绿原酸, 17 号峰为甘草苷, 27 号峰为迷迭香酸, 33 号峰为黄芩苷, 本实验通过对色谱峰的归属及部分色谱峰的指认, 只能初步对其药效物质基础进行探讨, 后续将通过对照品对更多有效峰进行指认, 且谱效关联只能初步确定方中对止咳作用贡献较大的色谱峰, 至于这些成分是否为入血成分, 在体内的作用机制, 需用后续通过血清药物化学及采用液质联用等技术手段进行进一步探索。

[参考文献]

[1] 彭照琪. 还阳参乙酸乙酯部位化学成分及 HD2 部位谱效关联研究[D]. 太原: 山西省中医药研究院, 2014.

[2] 彭照琪, 岳永花, 李小贝, 等. 还阳参醇提物止咳祛痰平喘及抗炎作用的实验研究[J]. 药物评价研究, 2012, 35(6): 423-426.

[3] 李媛, 张雯霞, 何盼, 等. 基于  $^1\text{H-NMR}$  代谢组学的还贝止咳方对咳嗽变异性哮喘豚鼠的干预作用[J]. 中草药, 2018, 49(10): 2230-2239.

[4] 李媛, 张雯霞, 刘聪, 等. 还贝止咳方对肺炎链球菌致大鼠肺热的治疗作用[J]. 药物评价研究, 2018, 41(5): 788-793.

[5] 蔡靓, 张倩, 杨丰庆. 中药谱效学的应用进展[J]. 中草药, 2017, 48(23): 5005-5011.

[6] 刘英, 徐永莉, 李力. 中药谱效关系研究思路与应用概况[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(3): 677-680.

[7] 曾令军, 林兵, 宋洪涛. 中药谱效关系研究进展及关键问题探讨[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(8): 1425-1432.

[8] 赵清, 徐月清, 冯天铸, 等. 不同炮制方法对僵蚕指标性成分的含量影响研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3): 657-660.

[9] 石召华, 黄文芳, 陈立军, 等. 不同干燥方式对地龙提取物中 17 种氨基酸的影响[J]. 中成药, 2015, 37(5): 1135-1138.

[10] 佟晓琳, 聂颖兰, 马琰岩, 等. 平贝母水煎液化学成分的 LC-MS<sup>n</sup> 分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(21): 45-49.

[11] 程斌, 徐文伟, 俞松林, 等. 浙贝母化痰效应成分指数的建立与应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(20): 71-76.

[12] 彭锐, 谭均, 马鹏, 等. 太白贝母生物碱的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(1): 152-155.

[责任编辑 顾雪竹]