

黄芪抗胃溃疡作用的谱效关系研究

刘小花, 梁 瑾, 梁建娣, 党子龙, 封士兰*

兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000

摘要: 目的 研究黄芪 95%乙醇提取物的高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱与抗胃溃疡药效的相关性, 初步揭示黄芪药效物质基础。方法 ig 给予胃溃疡模型小鼠黄芪乙醇提取物, 用灰色关联法和偏最小二乘法将 HPLC 指纹图谱各共有峰的峰面积与抗胃溃疡药效数据相关联, 研究谱效相关性, 确定黄芪抗胃溃疡作用的物质基础。结果 黄芪 95%乙醇回流提取物 (总提取物) 对无水乙醇所致小鼠胃溃疡有一定的抑制作用, 这与黄芪的敛疮生肌之功效相一致。用灰色关联的分析方法, 根据关联度大小确定黄芪乙醇提取物中各成分对抗胃溃疡作用的贡献度, 并应用偏最小二乘法拟合了药效和化合物峰面积的数理方程, 筛选出贡献值较大的化合物。两种统计学方法综合分析表明, 在 HPLC-DAD 指纹图谱中, 成分 P9 和 P12 (毛蕊异黄酮) 贡献较大; 在 HPLC-ELSD 指纹图谱中, 成分 P8 和 P9 作用较强。结论 黄芪 95%乙醇提取物较其不同极性提取部位具有较强的抗胃溃疡作用, 通过 HPLC 指纹图谱与药效相关性分析可知黄芪抗胃溃疡作用与其所含的多种成分有关。

关键词: 黄芪; 抗胃溃疡; 指纹图谱; 谱效关系; 灰色关联法; 药效物质基础

中图分类号: R284.2; R975.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)12-2448-05

Spectrum-effect relationship on anti-gastric ulcer effect of *Astragali Radix*

LIU Xiao-hua, LIANG Jin, LIANG Jian-di, DANG Zi-long, FENG Shi-lan

College of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between HPLC fingerprint of the 95% ethanol extract from *Astragali Radix* (EAR) and the anti-gastric ulcer efficacy and to reveal the material basis of *Astragali Radix*. **Methods** The gastric ulcer models of mice were established, and the mice were ig administered with the ethanol EAR. The peak areas of each common peak from HPLC fingerprint were correlated with the data of anti-gastric ulcer efficacy. The grey relation statistic and partial least squares (PLS) methods were used to study the spectrum-effect relationship and to find out the material basis of anti-gastric ulcer efficacy. **Results** The 95% ethanol EAR (total extract) had the inhibition on anhydrous ethanol-induced gastric ulcer in mice, which is consistent with the effect of myogenic sores of *Astragali Radix*. The contribution of various components in ethanol EAR with anti-gastric ulcer effect was determined according to the spectrum-effect relationship using grey relation analysis. The equations between the efficacy and common peak areas were fit by PLS method, and the compounds with greater contribution were screened. The two methods illustrated that, in HPLC-DAD fingerprint, components P9 and P12 (calycosin) had greater contribution, and in HPLC-ELSD fingerprint, P8 and P9 were the components with greater contribution. **Conclusion** The 95% ethanol EAR has better anti-gastric ulcer effect compared with other extracts, and the analysis on the spectrum-effect relationship indicates that the anti-gastric ulcer effect of *Astragali Radix* is related to the various components in *Astragali Radix*.

Key words: *Astragali Radix*; anti-gastric ulcer; fingerprint; spectrum-activity relationship; grey relation statistic; material basis of efficacy

实现中药的现代化、国际化, 必须重视中药质量的控制与疗效评价标准的研究。中药谱效关系学是近几年发展起来的将中药指纹图谱与中药药效结合起来考察中药内在质量及其成分与其活性间关系的新方法。研究表明, 黄芪对多种实验性动物胃溃

疡有抑制作用, 对 95%乙醇所致小鼠胃黏膜损伤及大鼠幽门结扎所致胃黏膜损伤具有显著的抑制作用, 可减少损伤面积, 降低损伤指数^[1]。本研究探讨了黄芪 95%乙醇提取物及其不同极性提取部位的抗胃溃疡作用, 并采用灰色关联法研究黄芪提取物

收稿日期: 2012-02-19

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划 (2011BAI05B02); 中央高校基本科研业务费专项资金 (Lzujbky-2011-137); 甘肃省科技重大专项项目 (1002FKDA048); 兰州市科技计划项目 (2011-1-133)

作者简介: 刘小花 (1976—), 女, 甘肃兰州人, 实验师, 博士在读, 主要研究方向为药物分析学。Tel: 15693070560 E-mail: liuxiaoh@Lzu.edu.cn

*通讯作者 封士兰 Tel: 13993162172 E-mail: fengshl@Lzu.edu.cn

指纹图谱与其抗胃溃疡作用的关系。

1 材料

1.1 药材与试剂

黄芪药材 (10 批), 自采或购买, 具体产地见表 1, 经兰州大学药学院生药学研究所马志刚教授鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。对照品毛蕊异黄酮、芒柄花素、毛蕊异黄酮苷、黄芪甲苷、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III 均购自中国食品药品检定研究院。雷尼替丁胶囊, 规格 0.15 g/粒, 陕西盘龙制药集团有限公司, 批号 20110203。乙腈, 色谱纯, 德国默克公司; 水为超纯水; 生理盐水。

表 1 黄芪药材来源

Table 1 Sources of *Astragali Radix*

样品编号	产地	样品编号	产地
1	野生	6	临洮
2	陇西	7	西和
3	岷县	8	内蒙
4	梅川	9	陕西
5	首阳	10	陇南

1.2 仪器

美国 Waters 2695 高效液相色谱仪, 2996 二极管阵列检测器, Millennium32 色谱管理站, 717 自动进样器, Alltech ELSD 2000 蒸发光散射检测器; Spursil™ C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 1.0 中药色谱指纹图谱计算机辅助相似性评价系统软件, 中南大学。

1.3 动物

昆明种小鼠, 雌雄兼用, 体质量 18~22 g, 兰州大学动物实验中心提供, 合格证号: SYXK (甘) 2011-0005。

2 方法与结果

2.1 黄芪提取物制备

称取黄芪药材 300 g, 用 6 倍量 95%乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h, 合并提取液, 减压浓缩至无醇味, 取 10 mL 作为总提取物 (提取率 11.14%)。剩余部分用石油醚萃取 3~5 次, 分出上层, 合并, 萃取液浓缩成浸膏, 得石油醚提取部位 (提取率 0.60%); 石油醚萃取物下层溶液用醋酸乙酯萃取 3~5 次, 分出上层, 合并, 萃取液浓缩成浸膏, 得醋酸乙酯提取部位 (提取率 0.85%); 醋酸乙酯萃取物下层溶液浓缩至干, 加乙醇超声溶解 10 min, 得乙醇提取部位 (提取率 0.77%); 乙醇不溶解部分加

水溶解, 得水提取部位 (提取率 8.52%); 10 批药材处理过程相同。称取各提取物浸膏, 加 0.3%聚山梨酯-80 制成混悬液。

2.2 对乙醇致小鼠胃溃疡的影响^[2-6]

70 只小鼠, 雌雄各半, 随机分为模型组、阳性对照组、5 个提取物组, 每组 10 只。5 个提取物组分别 ig 给予黄芪 (3 号样品) 总提取物、石油醚部位、醋酸乙酯部位、乙醇部位、水提取部位的混悬液 (生药剂量 4.0 g/kg^[7]), 模型组 ig 生理盐水, 阳性对照组 ig 雷尼替丁胶囊 0.06 g/kg, 给药体积为 0.01 mL/g, 每天给药 1 次, 连续给药 7 d。第 5 天给药后禁食不禁水 48 h。末次给药后 30 min, 小鼠 ig 无水乙醇 0.01 mL/g, 1 h 后处死, 结扎幽门和贲门, 取胃, 注入 1%甲醛 1 mL 固定 10 min, 沿胃大弯剪开, 平铺于玻璃板, 镜下测量点状和条索状溃疡面积。以各溃疡点总长度作为溃疡指数, 并计算溃疡抑制率。

溃疡抑制率 = (模型组平均溃疡指数 - 实验组平均溃疡指数) / 模型组平均溃疡指数

结果显示, 总提取物组、醋酸乙酯部位组和乙醇部位组对乙醇致小鼠胃溃疡均有一定的抑制作用, 其中总提取物的抑制作用最明显, 与模型组相比差异显著 ($P < 0.05$), 见表 2。因此, 对 10 批黄芪药材总提取物进行抗胃溃疡作用间的谱效关系研究。

表 2 黄芪提取物对乙醇致小鼠胃溃疡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of EAR on ethanol-induced gastric ulcer in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	溃疡指数	溃疡抑制率 / %
模型	—	8.40±2.58	—
总提取物	1.4	2.33±2.55*	72.26
石油醚部位	1.4	11.67±4.03	—
醋酸乙酯部位	1.4	5.50±2.50	34.52
乙醇部位	1.4	5.60±2.58	33.33
水部位	1.4	9.67±2.49	—
雷尼替丁	0.06	8.00±3.74	40.76

与模型组比较: * $P < 0.05$, 表 3 同

* $P < 0.05$ vs model group, Table 3 is same

2.3 不同产地黄芪总提取物抗胃溃疡作用比较

取小鼠 120 只, 雌雄各半, 随机分为模型组、阳性对照组、10 批黄芪总提取物组, 每组 10 只。各组给药方式、样本处理过程同“2.2”项。结果见表 3。

表 3 不同产地黄芪总提取物对乙醇致小鼠胃溃疡的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of total EAR from different sources on ethanol-induced gastric ulcer in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	溃疡指数	溃疡抑制率 / %
模型	—	7.24 ± 4.88	—
样品 1	1.4	6.18 ± 3.36	14.64
样品 2	1.4	7.21 ± 3.67	0.41
样品 3	1.4	3.76 ± 1.52	48.07
样品 4	1.4	3.83 ± 1.57	47.10
样品 5	1.4	6.37 ± 4.29	12.02
样品 6	1.4	2.33 ± 1.56*	67.82
样品 7	1.4	7.11 ± 4.84	1.80
样品 8	1.4	5.98 ± 3.33	17.40
样品 9	1.4	5.39 ± 2.46	25.55
样品 10	1.4	6.24 ± 3.45	13.81
雷尼替丁	0.06	4.55 ± 3.64	37.15

2.4 不同产地黄芪总提取物的 HPLC 指纹图谱^[8-9]

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 SpursilTM C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A)-水 (B), 梯度洗脱 (0~30 min, 5%~40% A; 30~60 min, 40%~60% A; 65~90 min, 60%~95% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 254 nm, 进样量 20 μL。蒸发光散射检测器温度 112.8 °C; 载气体积流量 3.2 L/min。

2.4.2 对照品溶液制备 分别称取毛蕊异黄酮、芒柄花素、毛蕊异黄酮苷、黄芪甲苷、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III 适量, 用甲醇配制成质量浓度分别为 0.425、0.437、0.412、0.385、0.281、0.348 mg/mL 的对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液制备 将各批黄芪药材总提取物的浸膏干燥, 分别取 0.5 g, 精密称定, 加甲醇溶解并移至 10 mL 量瓶中, 定容至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过后备用。

2.4.4 HPLC 图谱峰的归属 分别精密吸取毛蕊异黄酮、芒柄花素、毛蕊异黄酮苷、黄芪甲苷、黄芪皂苷 III、黄芪皂苷 II 对照品溶液以及 10 批黄芪药材供试品溶液进样, 按“2.4.1”项下色谱条件测定。结果见图 1。10 批黄芪药材总提取物的 HPLC-DAD 指纹图谱 (图 1) 共确定 14 个共有峰, 其中 12 和 14 号峰分别与对照品毛蕊异黄酮和芒柄花素的保留时间和紫外光谱图相同, 鉴定为毛蕊异黄酮和芒柄花素; 10 批黄芪药材总提取物的 HPLC-ELSD 指

纹图谱 (图 2) 共确定 9 个共有峰, 通过与对照品保留时间的比较, 确定 1 号峰为毛蕊异黄酮苷, 5 号峰为黄芪甲苷 (黄芪皂苷 IV), 6 号峰为黄芪皂苷 III, 7 号峰为黄芪皂苷 II。

2.4.5 峰面积与关联度 取“2.4.3”项制备的供试品溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件测定。各共有峰峰面积见表 4、5。将原始数据进行标准化转换后, 根据灰色关联度的分析方法计算关联度^[10], 并分别

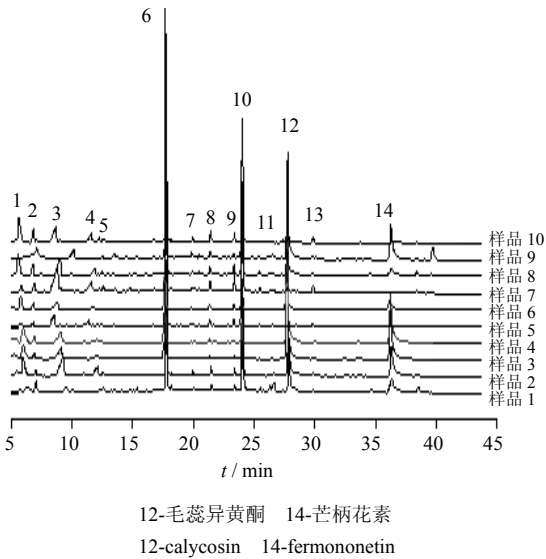


图 1 不同产地黄芪总提取物 HPLC-DAD 指纹图谱
Fig. 1 HPLC-DAD fingerprints of total EAR from different sources

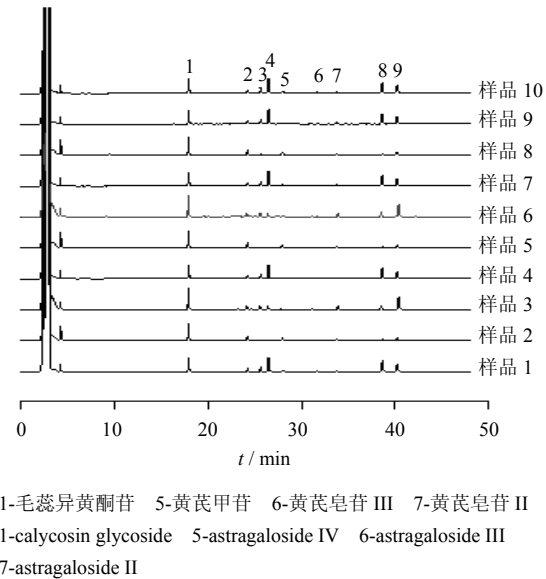


图 2 不同产地黄芪总提取物 HPLC-ELSD 指纹图谱
Fig. 2 HPLC-ELSD fingerprints of total EAR from different sources

计算 10 批黄芪药材总提取物溃疡指数与模型组溃疡指数的差值 (R)。

2.5 谱效关系的关联度和关联序分析

指纹图谱中各个色谱峰所代表的化学成分与抗胃溃疡作用具有一定关联 (关联度 >0.60), 表明黄芪总提取物的抗胃溃疡作用是其化学成分群共同作用的结果。在黄芪总提取物 HPLC-DAD 指纹图谱中, 1~9 号峰和 12~14 号峰所代表的化学成分与抗胃溃疡作用具有高度关联 (关联度 >0.80)。依据

关联度的大小, 确定各成分 (P) 对抗胃溃疡作用贡献的大小顺序为 $P_9 > P_{12} > P_6 > P_8 > P_1 > P_7 > P_5 > P_{13} > P_3 > P_4 > P_2 > P_{14} > P_{10} > P_{11}$ 。其中 12 号峰为毛蕊异黄酮, 14 号峰为芒柄花素。在黄芪总提取物的 HPLC-ELSD 指纹图谱中, 依据关联度的大小, 确定各成分对抗胃溃疡作用贡献的大小顺序为 $P_8 > P_9 > P_7 > P_5 > P_1 > P_4 > P_6 > P_3 > P_2$, 其中 1 号峰为毛蕊异黄酮苷, 5 号峰为黄芪甲苷, 6 号峰为黄芪皂苷 III, 7 号峰为黄芪皂苷 II。

表 4 不同产地黄芪总提取物 HPLC-DAD 的共有峰、药效值 R 与关联度

Table 4 Common peaks, efficacy R , and relationship of total EAR from different sources in HPLC-DAD

样品	共有峰峰面积														R
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1	1 655 162	1 735 248	751 003	431 301	571 649	12 060 369	793 784	903 366	4 565 011	4 565 011	12 589 333	3 886 036	436 730	660 161	1.06
2	3 058 901	708 025	574 917	228 374	72 250	11 960 112	753 694	615 707	5 620 622	108 322	336 482	6 091 091	27 656	240 120	0.03
3	2 981 547	861 235	239 213	182 285	116 044	4 268 744	304 806	339 263	1 404 952	24 299	113 413	12 877 707	41 191	68 257	3.48
4	93 455	863 538	309 935	305 277	212 958	12 543 337	437 741	332 418	10 045 251	439 172	558 806	462 793	114 918	87 940	3.41
5	405 559	36 805	256 931	138 406	141 709	6 966 760	550 858	521 260	3 485 088	182 172	186 444	234 925	8 721	107 014	0.87
6	575 274	148 771	129 459	47 706	56 993	6 136 168	331 949	362 138	2 274 274	105 315	85 708	2 753 939	26 326	108 373	0.91
7	197 397	238 375	794 950	730 444	415 057	17 133 925	1 486 320	1 567 536	6 997 098	461 525	508 288	808 252	27 090	173 277	0.13
8	103 764	226 494	609 656	305 570	377 468	13 115 454	1 126 837	991 706	5 287 555	334 518	340 636	2 808 578	308 847	435 418	1.26
9	346 318	3 236 458	486 868	213 679	597 902	12 228 675	912 684	912 041	5 313 741	336 232	938 531	9 626 652	183 560	189 827	1.85
10	571 731	537 408	662 250	527 381	333 924	12 298 587	1 075 966	918 096	7 660 396	317 336	299 348	975 536	142 531	99 033	1.00
t/min	6.34	7.04	12.56	14.75	15.37	17.76	21.47	23.41	24.05	25.49	26.61	27.82	34.64	38.47	
关联度	0.832 3	0.813 0	0.816 6	0.814 4	0.823 3	0.853 1	0.830 0	0.834 1	0.867 1	0.793 3	0.776 5	0.856 9	0.821 4	0.802 2	

表 5 不同产地黄芪总提取物 HPLC-ELSD 的共有峰、药效值 R 与关联度

Table 5 Common peaks, efficacy R , and relationship of total EAR from different sources in HPLC-ELSD

样品	共有峰峰面积									R
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1	337 333	67 939	113 067	7 636	8 111	14 192	49 742	313 446	281 167	1.06
2	421 936	122 732	27 105	3 298	33 280	7 194	40 130	44 343	110 081	0.03
3	60 377	8 783	2 864	4 808	7 919	10 720	41 511	7 377	165 096	3.48
4	310 039	292 113	188 658	6 890	6 689	10 032	28 291	12 859	173 157	3.41
5	148 010	72 530	61 998	9 161	12 405	11 926	91 467	19 154	513 639	0.87
6	129 214	36 331	30 937	3 683	6 704	5 918	27 347	3 140	171 552	0.91
7	730 291	177 011	169 650	9 407	5 572	6 936	47 270	39 964	239 523	0.13
8	498 350	121 120	117 803	10 023	30 811	24 807	107 464	155 774	499 646	1.26
9	424 310	107 659	49 207	19 377	13 853	19 017	37 138	7 180	5 689	1.85
10	453 737	271 863	83 861	13 835	25 237	19 405	88 968	17 287	395 204	1.00
t/min	17.93	24.22	25.65	29.61	31.10	31.70	33.80	38.64	40.24	
关联度	0.755 7	0.793 8	0.792 8	0.773 0	0.741 5	0.785 2	0.735 2	0.661 5	0.719 1	

2.6 谱效关系的偏最小二乘相关分析^[11]

根据偏最小二乘法相关分析, 拟合出上述指纹图谱中各峰峰面积与药效间的数理方程。在 10 批黄芪药材总提取物的 HPLC-DAD 指纹图谱中, $Y = -0.11 \times 10^{-5} X_1 - 0.97 \times 10^{-6} X_2 - 0.22 \times 10^{-6} X_3 + 0.33 \times 10^{-7} X_4 + 0.51 \times 10^{-7} X_5 - 0.28 \times 10^{-6} X_6 - 0.16 \times 10^{-6} X_7 - 0.56 \times 10^{-7} X_8 + 0.72 \times 10^{-6} X_9 + 0.29 \times 10^{-6} X_{10} + 0.99 \times 10^{-7} X_{11} + 0.59 \times 10^{-6} X_{12} + 0.12 \times 10^{-6} X_{13} + 0.36 \times 10^{-7} X_{14}$ ($X_1 \sim X_{14}$ 为共有峰)。对抗胃溃疡作用的贡献大小依次为 $X_9 > X_{12} > X_{10} > X_{13} > X_{11} > X_5 > X_{14} > X_4 > X_8 > X_7 > X_3 > X_6 > X_2 > X_1$, 其中 X_9 、 X_{12} 、 X_{10} 、 X_{13} 、 X_{11} 、 X_5 、 X_{14} 、 X_4 对该药效呈正相关, X_8 、 X_7 、 X_3 、 X_6 、 X_2 、 X_1 对该药效呈负相关。在黄芪总提取物 HPLC-ELSD 指纹图谱中, $Y = -1.61 X_1 + 2.56 X_2 - 2.29 X_3 - 0.05 X_4 - 2.27 X_5 + 7.11 X_6 - 3.53 X_7 + 0.19 X_8 + 0.89 X_9$ ($X_1 \sim X_9$ 为共有峰), 对抗胃溃疡的贡献大小依次为 $X_6 > X_2 > X_9 > X_8 > X_4 > X_1 > X_5 > X_3 > X_7$, 其中 X_6 、 X_2 、 X_9 和 X_8 对该药效呈正相关, X_4 、 X_1 、 X_5 、 X_3 和 X_7 对该药效呈负相关。

3 讨论

本实验以无水乙醇所致小鼠胃溃疡模型为研究对象, 比较不同产地黄芪提取物的抗胃溃疡作用, 结果黄芪总提取物药效明显, 这与其敛疮生肌功效相符。同时建立了黄芪总提取物 HPLC-DAD/ELSD 指纹图谱, 鉴定了其中 6 个指纹峰, 用灰关联度分析谱效关系, 结果表明在 HPLC-DAD 指纹图谱中, P9、P12、P6、P8、P1 与抗胃溃疡作用的关联度较大, 其中 P12 为毛蕊异黄酮。偏最小二乘法的谱效关系分析显示, P9、P12、P10、P13、P11 与抗胃溃疡作用呈正相关且贡献较大, P1 和 P6 则呈负相关。

在 HPLC-ELSD 指纹图谱中, 灰色关联度分析结果表明, P8、P9、P7 与抗胃溃疡作用关联度较大; 偏最小二乘法分析显示, P6、P2、P9、P8 与抗胃溃疡作用呈正相关。综上所述, 黄芪总提取物抗胃溃疡作用是多种成分共同作用的结果。由于仅鉴定出了部分抗胃溃疡作用成分的结构, 因此黄芪抗胃溃疡作用的谱效关系有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] 赵维中, 王宇翎, 章家胜. 黄芪精对胃粘膜保护作用的研究 [J]. 基层中药杂志, 1999, 13(2): 14-16.
- [2] Jalsrai A, Grecksch G, Becker A. Evaluation of the effects of *Astragalus mongholicus* Bunge saponin extract on central nervous system functions [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(3): 544-549.
- [3] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [4] 蒋毅萍, 吴航宇, 朱汉. 胃可宁对实验性胃溃疡的影响 [J]. 中药药理与临床, 2003, 19(5): 37-39.
- [5] 赵明宏, 郭涛, 刘玉兰, 等. 安胃微丸抗胃溃疡作用 [J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19(2): 118-121.
- [6] 康毅. 禁食与实验性胃溃疡形成的关系 [J]. 中国病理生理杂志, 1990, 6(1): 56-58.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [8] 胡芳弟, 封士兰, 赵健雄, 等. 黄芪的高效液相色谱指纹图谱及主成分含量测定 [J]. 中药材, 2004, 27(11): 831-834.
- [9] 黄际薇, 李瑞珍, 刘杰, 等. 黄芪药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中成药, 2005, 27(11): 1244-1246.
- [10] 吴忠. 质量计量学——中药色谱指纹图谱的解析与特征表达 [J]. 中药材, 2003, 26(8): 598-600.
- [11] 叶莺, 陈崇桐, 林熙. 偏最小二乘回归的原理及应用 [J]. 海峡预防医学杂志, 2005, 11(3): 3-6.