

红芪提高免疫功能活性部位的谱效关系研究

崔方¹, 韩增护¹, 刘小花¹, 杨亚飞¹, 兰芝荟², 封士兰^{1*}

1. 兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000

2. 兰州市第一人民医院, 甘肃 兰州 730050

摘要: **目的** 研究红芪提高正常小鼠机体免疫功能活性部位与 HPLC 指纹图谱的相关性。**方法** 建立二硝基氟苯 (DNFB) 所致小鼠迟发型变态反应 (DTH) 模型, 以 1 批甘肃宕昌野生红芪的不同提取部位 ig 给药, 选择最优部位。HPLC 测定条件: 色谱柱为 Hypersil ODS C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈和 0.1% 甲酸, 梯度洗脱; 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温为 30 °C, 检测波长为 275 nm; 测定 12 批红芪药材水提部位的 HPLC 指纹图谱及其提高免疫功能的活性, 采用偏最小二乘 (PLS) 法将 HPLC 图谱的各组分峰面积与提高免疫功能药效指标相关联, 研究谱效相关性。**结果** 红芪水提部位提高免疫功能活性最强, 根据 PLS 法回归系数大小确定红芪药材水提部位中物质群对提高机体免疫功能的贡献程度, 常用于表征红芪质量的腺苷、芒柄花苷、金雀异黄酮、芒柄花素、美迪紫檀素等指标化合物均表现为负相关。**结论** 红芪药材水提部位具有明显的提高免疫功能活性, 不同来源的红芪药材提高免疫功能的活性不同, 谱效关系研究表明常用于表征红芪质量的腺苷、芒柄花苷、金雀异黄酮、芒柄花素、美迪紫檀素等指标化合物对红芪提供免疫功能活性未表现出积极作用。

关键词: 红芪; HPLC 指纹图谱; 免疫功能; 谱效关系; 偏最小二乘法; 腺苷; 芒柄花苷; 金雀异黄酮; 芒柄花素; 美迪紫檀素
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)01-0101-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.01.015

Spectrum-effect relationship of active fraction from *Hedysari Radix* on improving immunity

CUI Fang¹, HAN Zeng-hu¹, LIU Xiao-hua¹, YANG Ya-fei¹, LAN Zhi-hui², FENG Shi-lan¹

1. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

2. First People's Hospital of Lanzhou City, Lanzhou 730050, China

Abstract: Objective To study the correlation of HPLC fingerprint of *Hedysari Radix* and efficacy of improving immunity of normal mice, and provide the basis for finding bioactive components and selecting the index composition of quality control. **Methods** The mice delayed type hypersensitivity (DTH) model induced by dinitrofluorobenzene (DNFB) was used to study the effect and then to perform ig administration with different extracts of *Hedysari Radix* for selecting the best part. To study the correlation between fingerprint and efficacy and find out the effective substances foundation of improving immunity, the peak area of each common peak from HPLC fingerprint was associated with the date of improving immunity in the method of partial least square regression (PLS). **Results** In ear swelling experiment, water extract of *Hedysari Radix* was the most effective part which could improve the immunity function. PLS was used to evaluate the correlation of effect of improving immunity and components of the water extract including adenosine, ononin, genistein, formononeti, and medicarpin, the index of compounds to characterize the quality of *Hedysari Radix*, showed the negative correlation with the effectiveness. **Conclusion** A new method is established to evaluate the activity of enhancing immunity of *Hedysari Radix*. It is of practical significance as an effective approach for controlling quality and exploring the material basis for efficacy of traditional Chinese medicine compounds.

Key words: *Hedysari Radix*; HPLC fingerprint; immune function; relationship of fingerprint and efficacy; partial least squares regression; adenosine; ononin; genistein; formononeti; medicarpin

红芪为豆科植物多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand. -Mazz. 的干燥根^[1], 是甘肃的道地药材。具有补气固表、利尿排毒、敛疮生肌等功效^[2]。现代药理研究表明, 红芪具有提高免疫功能的

收稿日期: 2015-05-16

基金项目: 兰州大学“中央高校基本科研业务费专项资金”自由探索-小额探索项目 (lzujbky-2014-218); 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室开放课题项目 (ZDSYS-KJ-2013-004)

作者简介: 崔方 (1983—), 女, 河北怀来人, 实验师, 硕士, 研究方向为中草药及中药制剂分离分析。E-mail: cuif@lzu.edu.cn

*通信作者 封士兰 (1957—), 女, 甘肃嘉峪关人, 教授, 博士生导师, 主要从事中药质量控制及中药新药研究。

作用^[3]。《中国药典》2010 年版关于红芪的质量控制只有常规的鉴别和浸出物的检查,中药指纹图谱能表征中药所含的物质成分,符合中医理论的整体性和中药作用机制的模糊性,本课题组前期曾进行红芪指纹图谱的研究^[4]。然而,中药作为一个多组分、多靶点综合作用的复杂整体,其药效的体现与指纹图谱中化学指标成分的体现并不是完全一致的,因此仅仅研究药材的化学指纹图谱是远远不够的。只有将中药指纹图谱中化学成分的变化跟中药药效结果联系起来建立起有实际意义的中药谱-效关系,才能为中药的质量控制和药效评价标准提供规律性的科学依据^[5-7]。偏最小二乘回归 (partial least-squares regression, PLS) 是一种由数据样本进行建模的统计回归方法,集多元线性回归、主成分分析和典型相关分析的基本功能为一体,可以较好地解决自变量之间多重相关性、样本点容量少于变量个数等一般回归分析方法无法解决的问题^[8]。

本课题组在探讨红芪药材(甘肃宕昌野生)中不同极性部位提高机体免疫功能作用的同时,发现红芪水提部位作用最显著,进而研究了另外 12 批不同产地、不同生长年限红芪药材水提部位的指纹图谱和提高机体免疫功能的作用,通过 PLS 法研究其谱效关系,为全面评价红芪药材的质量提供技术支持,也为进一步指导临床合理用药奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

SPF 级昆明小鼠,体质量 18~22 g,由兰州大学动物实验中心提供,许可证号 SYXK(甘)2014-0005。

1.2 药物与试剂

红芪药材为甘肃各地采集或购买的种植或野生红芪,共 13 批,经兰州大学药学院周印锁教授鉴定均为红芪 *Hedysarum polybotrys* Hand. -Mazz. 正品;对照品腺苷(购自中国食品药品检定研究院,批号 110819-200202)、芒柄花苷(购自上海顺勃生物工程有限公司,批号 201206)、金雀异黄酮(购自上海源叶生物科技有限公司,批号 20130412)、芒柄花素(购自中药国体制剂制造技术国家工程中心,批号 1054-090402)、美迪紫檀素(购于上海一林生物科技有限公司,批号 130120),质量分数均大于 98%;乙腈为色谱纯(德国默克公司);水为超纯水;二硝基氟苯(DNFB,西亚反应研究中心);硫化钠(天津市恒兴化学试剂有限公司)。

1.3 仪器

2695 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司(包括 717 自动进样器、2996 二极管阵列检测器、Millennium32 色谱管理站);数据处理软件:SIMCA13.0 软件(Umetrics 公司)。

2 方法与结果

2.1 红芪不同提取部位对小鼠机体免疫功能的影响

2.1.1 样品制备 称取红芪药材(甘肃宕昌野生) 300 g,用 6 倍量的 95%乙醇回流提取,共提取 3 次,每次 1 h,合并提取液,将提取液减压浓缩至无醇味,取出 50 mL 作为总提取物(出膏率 6.110%);其余用石油醚萃取,重复 3~5 次,分出上层,合并,萃取液浓缩成浸膏,得到石油醚部位(出膏率 0.775%);下层溶液用醋酸乙酯萃取,重复 3~5 次,分出上层,合并,萃取液浓缩成浸膏,得到醋酸乙酯部位(出膏率 0.204%);下层溶液浓缩至干,加乙醇超声溶解 10 min,得到乙醇部位(出膏率 0.649%);乙醇不溶解部分加水溶解,得水提部位(出膏率 3.433%);其余 12 批药材样品处理过程相同。根据各提取部位出膏率,按原生药 20 g/kg 给药,称取浸膏,加聚山梨酯 80 (0.3%) 制成混悬液。

2.1.2 不同提取部位对 DNFB 诱发小鼠迟发型变态反应(DTH)的影响 取小鼠 60 只,雌雄各半,随机分为 6 组:对照组,红芪总提取物、石油醚部位、醋酸乙酯部位、乙醇部位、水提部位组,每组 10 只。对照组 ig 给予生理盐水,红芪各提取部位(均来自甘肃宕昌野生红芪)组分别 ig 给予相应部位浸膏混悬液 20 g/kg(生药剂量),每天 1 次,连续给药 15 d。给药第 10 天,小鼠腹部皮肤用硫化钡脱毛,范围 3 cm×3 cm,用 1% DNFB 溶液 50 μL 均匀涂抹致敏,5 d 后,用 DNFB 溶液 10 μL 均匀涂抹于小鼠右耳(两面)进行攻击。攻击后 24 h 颈椎脱臼处死小鼠,剪下左右耳壳,用打孔器取下直径 6 mm 的耳片,称质量。用左右耳片质量差值表示 DTH 的程度^[9]。结果见表 1。水提部位组左右耳片质量差值最大,表明其提高免疫功能作用最强,与对照组比较,差异显著($P<0.05$)。故后续实验研究另 12 批红芪药材水提部位的谱效关系。

2.1.3 12 批红芪药材水提部位对 DNFB 诱发小鼠 DTH 的影响 取小鼠 130 只,雌雄各半,随机分为对照组和 12 批红芪药材水提部位给药组,每组 10 只,给药组分别给予 12 批不同产地红芪药材水提部位的混悬液,其余操作与“2.1.2”项下方法相同。

12 批不同产地红芪药材水提部位组左右耳片质量差值不同,表明红芪药材提高免疫功能的能力也不尽相同,结果见表 2。其中来自甘肃武都 1、武都米仓山和陇西县首阳镇红芪药材的水提部位组耳片质量差值与对照组比较明显增加 ($P < 0.05$)。

表 1 红芪不同提取部位对 DNFB 诱发小鼠 DTH 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of different extract fractions from *Hedysari Radix* on DTH of mice induced by DNFB ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	耳片质量差值/mg
对照	—	1.35±1.37
总提取物	1.222 0	1.83±1.72
石油醚提取部位	0.155 0	1.99±1.12
醋酸乙酯部位	0.040 8	3.24±2.10*
乙醇部位	0.129 8	2.24±1.42
水提部位	0.686 6	3.89±3.04*

与对照组比较: * $P < 0.05$, 表 2 同

* $P < 0.05$ vs control group, Table 2 is same

表 2 12 批红芪药材水提部位对 DNFB 诱发小鼠 DTH 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of aqueous extract from 12 batches of *Hedysari Radix* on DTH of mice induced by DNFB ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

样品编号	样品来源	耳片质量差值
对照	—	0.83±0.56
S1	甘肃武都 1 (野生)	2.17±1.12*
S2	甘肃武都 5 年 (野生)	1.47±1.08
S3	甘肃陇南西河 3 年 (野生)	1.45±0.72
S4	甘肃武都米仓山 (种植)	1.43±0.52*
S5	甘肃宕昌哈达铺镇 (种植)	1.27±0.79
S6	甘肃陇西县菜子乡 (种植)	1.30±0.53
S7	甘肃岷县 (野生)	1.49±0.80
S8	甘肃宕昌官亭 (种植)	0.82±0.44
S9	甘肃宕昌 (野生)	1.30±0.27
S10	甘肃宕昌将台 (种植)	0.51±0.56
S11	甘肃陇西县首阳镇 (野生)	2.17±1.24*
S12	甘肃武都 2 (种植)	1.09±0.69

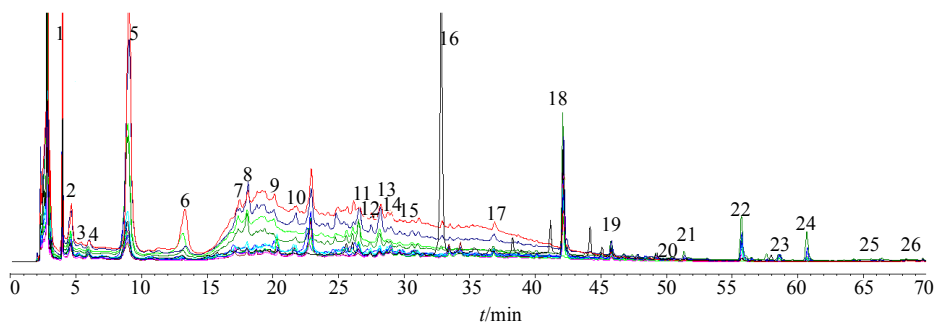
2.2 HPLC 指纹图谱测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil ODS C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈和 0.1% 甲酸, 梯度洗脱: 0~10 min, 4%~10%乙腈; 10~30 min, 10%~40%乙腈; 30~65 min, 40%~60%乙腈; 65~66 min, 60%~100%乙腈; 66~70 min, 100%乙腈; 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温为 30 °C, 检测波长为 275 nm。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取腺苷、芒柄花苷、金雀异黄酮、芒柄花素、美迪紫檀素对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释制成一定质量浓度的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备及测定 将提取所得的各批红芪水提部位浸膏干燥, 分别取 2.0 g, 精密称定, 加甲醇超声溶解转移至 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。按“2.2.1”项下色谱条件进样 20 μL, 得 HPLC 图 (图 1)。

2.2.4 HPLC 图谱峰的归属 按“2.2.1”项下色谱条件, 所得 12 批药材水提部位指纹图谱, 根据国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 年 A 版进行相似度评价。以 12 批红芪药材的相对峰面积的均值作为对照模板, 由中药色谱图分析和数据管理软件自动进行峰匹配, 确定 26 个共有峰 (表 3)。其中 4、18、21、22、24 号峰分别与对照品腺苷、芒柄花苷、金雀异黄酮、芒柄花素、美迪紫檀素的保留时间和紫外光谱图一致。利用夹角余弦法计算指纹图谱的相似度, 结果见表 4。可知, 12 批红芪药材的相似度在 0.8 以上, 相似度较高。以腺苷对应的 4 号峰为参照峰 (相对保留时间为 1.00), 计算色谱图中各共有峰的相对保留时间, 结果见表 5。



4-腺苷 18-芒柄花苷 21-金雀异黄酮 22-芒柄花素 24-美迪紫檀素
4-adenosine 18-ononin 21-genistein 22-formononetin 24-medicago

图 1 12 批红芪水提部位 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of aqueous extract from 12 batches of *Hedysari Radix*

表 3 共有峰峰面积
Table 3 Peak areas of common peaks

样品	共有峰峰面积												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
S1	2 766 318	1 467 744	43 828	156 896	12 026 524	2 682 946	359 324	375 651	303 376	1 409 736	99 091	146 402	639 877
S2	954 314	537 865	58 213	85 923	1 244 800	78 220	33 415	94 433	170 182	1 480 250	312 051	97 005	218 075
S3	1 039 184	779 417	60 867	101 972	1 425 937	49 653	92 824	176 954	454 676	527 514	370 160	122 837	168 160
S4	1 063 269	716 711	59 368	188 893	2 436 358	122 886	70 437	124 753	455 752	451 130	268 926	147 830	258 477
S5	865 301	692 251	68 844	261 083	2 770 823	55 135	229 631	230 062	228 663	1 165 567	391 443	295 854	258 430
S6	558 744	412 178	35 752	128 639	1 687 676	57 975	105 487	56 694	440 891	1 246 456	94 616	126 296	119 098
S7	2 241 759	1 706 353	70 654	245 693	12 058 180	464 225	107 657	915 947	166 299	1 253 381	750 885	185 564	1 093 355
S8	1 540 769	936 077	42 475	196 154	7 477 300	699 345	21 803	707 820	6 771	819 030	814 805	119 041	605 511
S9	954 302	536 163	38 608	171 989	7 665 860	186 332	75 230	109 408	29 200	59 276	135 343	43 122	94 206
S10	1 084 179	682 741	72 891	107 683	2 102 510	146 236	181 220	96 515	223 976	868 223	233 630	85 461	109 064
S11	1 818 422	792 084	41 854	60 776	7 027 934	1 511 735	80 815	397 011	92 319	282 720	336 519	362	445 353
S12	983 019	784 200	54 937	196 743	1 848 157	77 346	40 054	148 762	264 569	1 188 210	359 542	138 686	253 822

样品	共有峰峰面积												
	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
S1	254 564	215 661	77 208	224 093	674 731	98 913	32 432	3 836	58 675	12 424	9 849	42 753	3 195
S2	141 775	128 060	142 455	123 662	1 130 915	186 770	115 554	32 756	688 747	134 126	234 713	37 667	50 207
S3	103 767	169 419	79 879	92 821	777 404	242 901	119 122	30 670	575 832	61 767	100 992	30 468	18 050
S4	132 765	257 670	103 303	141 951	1 238 276	224 380	62 853	44 106	301 046	83 461	71 695	44 744	20 706
S5	157 322	637 686	329 103	246 244	2 692 366	104 626	38 957	160 298	388 434	26 155	48 717	51 172	31 622
S6	103 657	314 697	280 628	126 692	1 455 124	136 448	26 451	62 555	257 020	62 337	118 003	40 669	50 208
S7	179 115	236 471	63 306	199 872	2 072 554	359 835	34 848	46 956	528 090	175 035	68 680	47 935	29 787
S8	63 778	54 434	42 390	116 609	3 147 080	360 264	21 110	69 754	887 007	225 306	569 391	52 647	76 263
S9	13 271	34 189	7 045 589	76 254	2 157 638	0	10 494	177 987	68 890	0	5 093	70 928	47 539
S10	22 859	183 940	229 118	133 695	1 474 237	233 605	42 491	46 552	500 144	203 219	328 474	71 014	80 980
S11	15 262	17 762	51 883	24 039	7 042	65 480	22 773	542	2 545	1 806	27 260	51 805	1 539
S12	162 380	181 434	146 170	135 286	1 147 693	157 931	18 579	35 669	429 545	73 152	46 112	68 354	66 323

表 4 12 批红芪水提部位指纹图谱相似度

Table 4 Fingerprint similarity of aqueous extract from 12 batches of *Hedysari Radix*

样品	相似度	样品	相似度	样品	相似度
S1	0.96	S5	0.88	S9	0.80
S2	0.80	S6	0.82	S10	0.93
S3	0.89	S7	0.97	S11	0.94
S4	0.96	S8	0.97	S12	0.91

2.3 谱效相关研究

以指纹图谱中代表化学成分各峰的峰面积为自变量 (X), 以表 2 中耳片质量差值的均数作为因变量 (Y), 采用 PLD 法, 进行谱效相关性分析。结果得到 X 关于 Y 的回归方程: $Y=0.078 1 X_1+0.027 7 X_2-0.102 5 X_3-0.060 0 X_4+0.071 1 X_5+0.100 5 X_6-0.033 3 X_7+0.046 5 X_8-0.025 8 X_9-0.020 7 X_{10}-0.019 8 X_{11}-0.038 2 X_{12}+0.074 2 X_{13}+0.060 1 X_{14}-0.030 8 X_{15}-0.002 7 X_{16}-0.056 5 X_{17}-0.116 1 X_{18}-0.097 9 X_{19}+0.073 3 X_{20}-0.049 3 X_{21}-0.099 6 X_{22}-0.165 0 X_{23}-0.138 7 X_{24}-0.176 5 X_{25}-0.231 9 X_{26}$ 。

在此回归模型中, 26 个自变量 X 对 Y 的回归系数有正也有负, 即存在正相关和负相关性。其中 1、2、5、6、8、13、14、20 号峰所对应的化合物对红芪水提部位提高免疫功能有贡献, 而 4、18、21、22、24 号峰所分别对应的腺苷、芒柄花苷、金雀异黄酮、芒柄花素、美迪紫檀素均表现为负相关, 其他自变量对应的化合物结构有待确定。

3 讨论

比较红芪各提取部位提高正常小鼠机体免疫功能作用, 发现水提部位组提高免疫功能的能力最强, 这也与文献报道相一致^[10]。进而对 12 批不同产地或不同生长年限的红芪水提部位进行药效学考察和 HPLC 分析, 对提取方法、流动相及洗脱梯度、检测波长等色谱条件进行了优化, 构建了红芪药材水提部位 HPLC 指纹图谱, 并指认了腺苷、芒柄花苷、金雀异黄酮、芒柄花素、美迪紫檀素指纹峰的位置。不同来源红芪水提部位提高免疫功能的能力不尽相同, 其中只有甘肃武都 1 批、武都米仓山和陇西县首

表5 各共有峰相对保留时间
Table 5 Relative retention time of each common peaks

样品	相对保留时间												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
S1	0.66	0.77	0.90	1.00	1.51	2.22	2.91	3.02	3.36	3.82	4.44	4.59	4.70
S2	0.67	0.77	0.89	1.00	1.50	2.20	2.87	3.02	3.41	3.83	4.43	4.59	4.70
S3	0.67	0.77	0.89	1.00	1.51	2.21	2.89	3.04	3.43	3.87	4.48	4.63	4.75
S4	0.67	0.77	0.89	1.00	1.51	2.21	2.88	3.04	3.42	3.86	4.47	4.62	4.74
S5	0.66	0.77	0.88	1.00	1.49	2.19	2.84	2.99	3.39	3.80	4.40	4.54	4.66
S6	0.67	0.77	0.89	1.00	1.51	2.31	2.89	3.04	3.43	3.86	4.48	4.63	4.75
S7	0.67	0.78	0.89	1.00	1.52	2.24	2.90	3.05	3.39	3.86	4.48	4.63	4.75
S8	0.67	0.78	0.89	1.00	1.51	2.22	2.90	3.06	3.46	3.88	4.50	4.65	4.77
S9	0.67	0.77	0.89	1.00	1.51	2.21	2.83	2.94	3.34	3.45	4.48	4.63	4.74
S10	0.66	0.77	0.87	1.00	1.46	2.13	2.84	3.12	3.37	3.79	4.4	4.56	4.66
S11	0.67	0.75	0.89	1.00	1.50	2.20	2.80	3.03	3.37	3.80	4.46	4.63	4.72
S12	0.67	0.77	0.88	1.00	1.50	2.20	2.88	3.03	3.42	3.85	4.46	4.61	4.73
平均值	0.67	0.77	0.89	1.00	1.50	2.21	2.87	3.03	3.40	3.80	4.46	4.61	4.72
RSD/%	0.78	1.08	0.71	0	1.00	1.73	1.16	1.37	1.06	3.07	0.75	0.73	0.74

样品	相对保留时间												
	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
S1	4.79	4.83	5.58	6.15	7.02	7.63	8.12	8.21	9.29	9.76	10.12	11.66	12.26
S2	4.80	4.85	5.59	6.16	7.05	7.66	8.09	8.23	9.32	9.80	10.15	11.70	12.30
S3	4.85	4.90	5.65	6.23	7.12	7.74	8.17	8.32	9.42	9.90	10.26	11.75	12.43
S4	4.84	4.89	5.64	6.21	7.10	7.71	8.15	8.29	9.39	9.87	10.23	11.79	12.40
S5	4.75	4.81	5.54	6.10	6.98	7.58	8.01	8.15	9.23	9.70	10.05	11.58	12.18
S6	4.84	4.90	5.65	6.22	7.11	7.73	8.17	8.31	9.41	9.89	10.25	11.81	12.42
S7	4.85	4.89	5.65	6.22	7.11	7.72	8.23	8.31	9.40	9.88	10.24	11.80	12.41
S8	4.87	4.91	5.67	6.24	7.14	7.76	8.29	8.35	9.45	9.93	10.29	11.86	12.47
S9	4.83	4.89	5.55	6.17	7.11	0	8.17	8.31	9.41	0	10.25	11.81	12.42
S10	4.76	4.85	5.59	6.17	7.06	7.68	8.11	8.25	9.34	9.82	10.18	11.72	12.33
S11	4.82	4.86	5.55	6.05	7.04	7.68	8.18	8.26	9.35	9.82	10.06	11.74	12.32
S12	4.83	4.87	5.62	6.19	7.08	7.69	8.13	8.27	9.37	9.85	10.20	11.76	12.36
平均值	4.82	4.87	5.61	6.17	7.08	7.05	8.15	8.27	9.36	9.02	10.19	11.75	12.36
RSD/%	0.74	0.62	0.81	0.92	0.68	2.51	0.85	0.66	0.67	0.69	0.78	0.66	0.69

阳镇药材与对照组比较具显著性差异。中药药效的不稳定性与其有效成分，乃至有效部位的量是息息相关的，这也更加说明了谱效关联作为寻找评价中药药效有效成分或部位的有效手段是很有必要的。

采用 PLS 法对红芪水提部位化学组成与提高免疫功能作用进行相关分析，结果表明 HPLC 图中 1、2、5、6、8、13、14、20 号峰所对应的化学成分为对提高免疫功能药效有贡献的药效成分组，应通过进一步的实验对这些成分进行确认。而常用于表征红芪质量的腺苷、芒柄花苷、金雀异黄酮、芒柄花素、美迪紫檀素等指标化合物均表现为负相关，即这些指标化合物的量越高提高免疫功能药效可能越低，这也对应用于提高免疫功能药效时，以上述成分控制红芪药材的质量提出了质疑和参考。PLS 法分析既可以得到红芪水提部位对提高免疫功能起主要作用的色谱峰，又可以获得各色谱峰之间相互作用的信息，为研究药物组分间相互关系提供可能，同时为中药药效物质快速筛选，合理选择质量控制指标及谱效关系研究提供了参考。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[2] 李广民, 王维宁, 胡妙申. 中药红芪生药学研究 [J]. 中药通报, 1987, 12(8): 453-456.

[3] 张李峰, 卫东锋, 赵春燕, 等. 红芪替代复芪止汗颗粒中的黄芪对免疫抑制小鼠细胞免疫作用的差异研究 [J]. 中成药, 2012, 34(8): 1415-1420.

[4] 封士兰, 胡芳弟, 赵健雄, 等. 高效液相色谱法研究红芪指纹图谱 [J]. 分析化学, 2004, 32(6): 710-714.

[5] 肖云芝, 于超, 刘朝勇, 等. 鳖甲药材指纹图谱与其抗肝纤维化作用的谱效关系研究 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2506-2510.

[6] 耿媛媛, 胡昌江, 潘新, 等. 二神丸不同提取部位温脾止泻的谱效关系研究 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2658-2663.

[7] Sun X J, Liu T T, Zhao Y L, et al. Toxicity of five herbs in *Aconitum* L. on *tetrahymena thermophila* based on spectrum-effect relationship [J]. *Chin Herb Med*, 2014, 6(1): 29-35.

[8] 唐启义, 唐洁. 偏最小二乘回归分析在均匀设计试验建模分析中的应用 [J]. 数理统计与管理, 2005, 25(5): 45-49.

[9] 增强免疫力功能评价方法 (征求意见稿) [S]. 2012.

[10] 胡燕, 程卫东, 刘欣, 等. 红芪和黄芪水提物对小鼠免疫功能影响的差异 [J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(9): 623-625.