

基于灰色关联分析的芒果叶提取物抗炎作用的谱效关系

梁健钦^{1,2}, 王剑¹, 熊万娜^{3*}, 黄慧学^{1,2}, 郝二伟¹, 王志萍^{1,2}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530001; 2. 广西中医药大学中药制剂共性技术研发重点实验室, 南宁 530001; 3. 广西卫生职业技术学院, 南宁 530021)

[摘要] **目的:**探讨芒果叶提取物的高效液相色谱(HPLC)图谱中主要色谱峰与抗炎药效的相关性,为表征芒果叶抗炎作用物质基础提供依据。**方法:**采用 HPLC 法建立芒果叶不同极性提取物的指纹图谱。取昆明小鼠随机分别为模型组、地塞米松阳性对照组、芒果叶提取物 100 g·kg⁻¹组,模型组给生理盐水,其余各组给予相应药物,灌胃给药,连续 5 d,经二甲苯造模后,测定耳肿胀度。数据经统计分析后,采用灰色关联分析谱效关系。**结果:**芒果叶不同极性溶剂提取物的 HPLC 指纹图谱有明显差异,从 HPLC 指纹图谱中共提取 14 个能够表征药材特征的共有峰。不同极性提取物的抗炎作用存在显著差异。与模型组比较,地塞米松组具有显著抑制小鼠耳肿胀作用($P < 0.05$);与模型组比较,芒果叶(红象牙和台农一号)的三氯甲烷、乙酸乙酯提取物均无显著抗炎作用,其他溶剂提取物具有显著抗炎作用($P < 0.05$)。灰色关联分析明确了 X₁, X₃ 和芒果苷对抗炎作用贡献程度最大。**结论:**芒果叶提取物抗炎作用的部分物质基础是芒果苷及 X₁, X₃ 峰。灰色关联是研究中药谱效关系的有效手段。

[关键词] 芒果叶; 抗炎; 谱效关系; 灰色关联分析; 芒果苷; 指纹图谱

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0121-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015010121

Spectrum-effect Relationship of Leaf Extracts from *Mangifera indica* Based on Grey Relational Analysis

LIANG Jian-qin^{1,2}, WANG Jian¹, XIONG Wan-na^{3*}, HUANG Hui-xue^{1,2}, HAO Er-wei¹, WANG Zhi-ping^{1,2}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 2. Key Laboratory of Common Technology of Traditional Chinese Medicine Preparation, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 3. Guangxi Medical College, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the spectrum-effect relationship of leaf extracts from *Mangifera indica* (LEMI) based on grey relational analysis. **Method:** High performance liquid chromatography (HPLC) was applied to establish the fingerprint chromatography of the leaf extracts extracted with different polar solvent. The anti-inflammatory effects of the extracts were observed via mice auricular swelling model induced by dimethylbenzene. Kunming mice were randomly divided into model group, dexamethasone positive group and LEMI groups. Model group was administered orally physiological saline; other groups were given corresponding drug for 5 days. Then ear swelling was determined. Then the grey relational analysis was used to investigate its spectrum-effect relationship. **Result:** There were significantly differences in the HPLC fingerprints and anti-inflammatory activities obtained from varied extracts. Compared with the model group, dexamethasone group had significantly inhibited the ear edema in mice ($P < 0.05$). Chloroform extract and ethyl acetate LEMI from Red-ivory and Tainong-1 showed no significant anti-inflammatory effect, but other solvent LEMI had significant anti-inflammatory effect ($P < 0.05$). 14 common peaks were detected in HPLC chromatography, which were used for the identification of herb products. It was found that the main anti-inflammatory effect was mostly contributed to X₁, X₃ and mangiferin after grey relational analysis. **Conclusion:** The material basis of anti-inflammatory effect of LEMI

[收稿日期] 20140530(002)

[基金项目] 广西壮族自治区中医药管理局中医药科技专项课题(GZKZ09-10);广西自然科学基金项目(2013XNSFAA4019124);2014年广西高校科技创新能力提升工程项目[桂教科研(2014)14号]

[第一作者] 梁健钦,博士,副教授,从事药物改性与新药开发研究,Tel:13687723120,E-mail:liangjianqin@139.com

[通讯作者] *熊万娜,硕士,讲师,从事中药质量与成分分析研究,Tel:13036883598,E-mail:188848168@qq.com

were mangiferin, X_1 and X_3 . Grey relational analysis was an effective and useful method to evaluate spectrum-effect relationship of Chinese herbs.

[Key words] *Mangifera indica*; anti-inflammatory effect; spectrum-effect relationship; grey relational analysis; mangiferin; fingerprint chromatography

芒果叶为漆树科植物芒果的干燥叶,在广西民间亦作药用,有止咳的功效。我校对芒果叶进行了深入研究,主要包括芒果苷(芒果叶中主要酚类成分)的药理作用(抗炎、镇咳等)^[1]、芒果苷的提取工艺^[2]、不同产地不同品种芒果叶中芒果苷的含量及影响因素^[3-4]等方面,取得了多项研究成果,并成功研发以芒果叶提取物为主要成分的芒果止咳片。芒果叶中是否还有除芒果苷外的其他成分具有直接抗炎作用或协同作用未见有文献报道。

虽然参照化学药品以植物化学及药理研究为基础的质量标准模式在将来一段时间内仍然是主流,但是从长远看,一种综合的质量评价模式将是大势所趋,即从分解式的单一成分的“微观分析”向群体成分“宏观分析”的质量评价模式。中药指纹图谱的谱效学研究则是中药群体成分“宏观分析”的代表之一,可以使指纹图谱中化学成分体现出相应的药效,而且还能阐明指纹图谱特征与药效的相互关系,确定相应的药效物质基础。本文从研究芒果叶提取物的 HPLC 指纹图谱与抗炎药效的关系入手,以不同溶剂提取芒果叶而获得物质成分有显著差异的提取物及 HPLC 指纹图,同时对不同提取物的抗炎活性进行评价,最后采用灰色关联分析处理,以期初步探明与芒果叶抗炎作用关联度最高的化学成分群。

1 材料

1.1 仪器 岛津 LC-20A 高效液相色谱仪(LC-20AT 泵、SPD-20A 紫外检测器、自动进样器、柱温箱,日本岛津);Diamonsil C_{18} (2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m, DIKMA 公司);EL204 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);LG16-W 离心机(北京医用离心机厂);BKH-C 玻璃仪器快速烘干机(郑州长城科工贸有限公司);SB5200DT 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 药物与试剂 芒果叶(采自广西百色,品种为红象牙和台农一号。经广西卫生职业技术学院中药教研室鉴定,系漆树科植物芒果 *Mangifera indica* 的叶子)。醋酸地塞米松片(浙江仙琚制药股份有限公司,批号 140228);芒果苷对照品(纯度 > 98%,自制);乙腈(色谱纯, Fisher 公司);其他试剂均为分

析纯。

1.3 动物 昆明种小鼠, SPF 级,雌雄各半, 18 ~ 22 g,由广西中医药大学实验动物中心提供,许可证号 SYXK(桂)2009-0004。

2 方法与结果

2.1 芒果叶提取物(LEMI)的制备 取鲜芒果叶,洗净,阴干。取干芒果叶适量,粉碎成 12 ~ 24 目的粉末 8 份,每份 100 g,置锥形瓶中,分别加 900 mL 不同溶剂(乙酸乙酯、正丁醇、50% 甲醇、乙醇、50% 乙醇、水和三氯甲烷),超声处理(200 kHz) 1 h,滤过,滤液旋去溶剂,置冰箱保存。临用时加生理盐水和聚山梨酯 0.3%,制成芒果叶提取物(相当于原药材 5 g·mL⁻¹)。共制备得到 16 份样品(红象牙和台农一号各 8 份提取物)。

2.2 高效液相指纹图谱

2.2.1 色谱条件 岛津 LC-20A 高效液相色谱仪;SPD-20A 紫外检测器;Diamonsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m);柱温 30 $^{\circ}$ C;检测波长 258 nm;流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液;梯度洗脱(表 1)。

表 1 梯度洗脱

Table 1 Table of HPLC gradient elution

时间/min	乙腈/%	0.1% 磷酸溶液/%
0	12	88
15	20	80
20	25	75
30	55	45
40	12	88
45	12	88

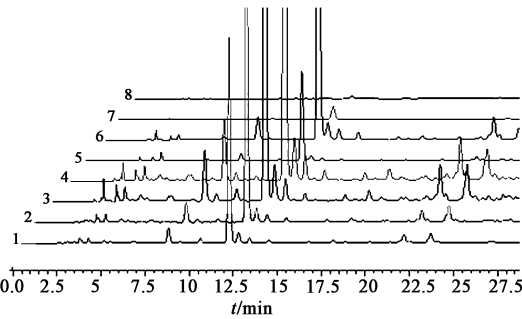
2.2.2 供试品溶液的制备 取 2.1 芒果叶提取物的制备项下样品,加流动相适量,稀释不同的倍数(乙醇、水、甲醇的提取物稀释 1 倍,50% 乙醇、50% 甲醇的提取物稀释 10 倍),离心 12 000 r·min⁻¹, 10 min,取上清液,即得。

2.2.3 芒果苷对照品溶液的制备 精密称取芒果苷 5.0 mg,置 25 mL 量瓶中,加色谱甲醇使溶解至刻度,制得质量浓度为 200 mg·L⁻¹的溶液。

2.2.4 测定法 分别精密吸取芒果苷对照品溶液、乙酸乙酯样品溶液 20 μ L、三氯甲烷样品溶液 15 μ L

和其他 6 种溶剂的样品溶液 10 μL , 注入色谱仪, 记录峰面积。

2.2.5 HPLC 图谱峰的归属 在该色谱条件下, 测定得到芒果叶提取物与芒果苷的 HPLC 图谱(图 1)。从 16 份提取物 HPLC 图谱中, 确定 14 个明显的共有峰(见图 2), 保留时间分别约为 X_1 (3.039 min), X_2 (4.319 min), X_3 (8.826 min), X_4 (9.489 min), X_5 (10.622 min), X_6 (12.236 min), X_7 (12.792 min), X_8 (13.417 min), X_9 (14.517 min), X_{10} (16.797 min), X_{11} (18.164 min), X_{12} (22.206 min), X_{13} (23.614 min), X_{14} (29.547 min)。6 号峰与芒果苷对照品的保留时间相同, 因此鉴定其为芒果苷; 9 号峰与文献[5]报道的一致, 因此 9 号峰为高芒果苷(homomangiferin)。见图 3。



1~8. 提取物溶剂分别为 50% 甲醇, 50% 乙醇, 甲醇, 乙醇, 水, 正丁醇, 乙酸乙酯和三氯甲烷

图 1 红象牙芒果叶不同溶剂提取物 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of varied extracts from Red-ivory

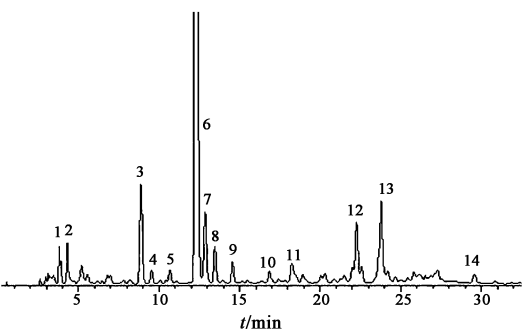
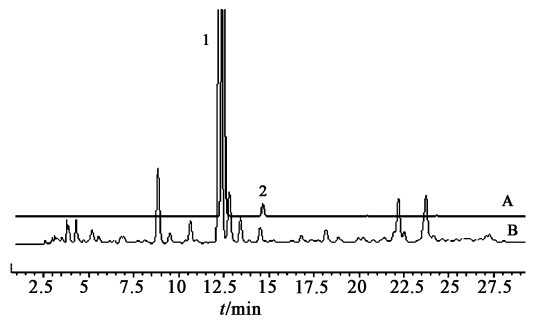


图 2 芒果叶提取物 HPLC 共有峰

Fig. 2 HPLC common peaks of LEMI

2.2.6 精密度和重复性考察 精密度: 取 2.2.2 供试品溶液的制备项下红象牙芒果叶甲醇提取物供试品溶液 1 份, 进样 5 次, 每次 10 μL , 记录峰面积。结果显示 14 个共有峰峰面积 RSD < 3% ($n = 5$)。

重复性: 取 2.1 芒果叶提取物的制备项下红象



1. 芒果苷峰; 2. 高芒果苷峰

图 3 芒果苷对照品(A)和芒果叶 50% 甲醇提取物(B)的 HPLC 对比

Fig. 3 HPLC chromatograms of mangiferin reference substance (A) and mango leaves extract obtained with 50% methanol (B)

牙芒果叶甲醇提取物适量, 5 份, 照 2.2.2 供试品溶液的制备处理, 制备得到 5 份甲醇提取物供试品溶液, 精密吸取 10 μL , 注入色谱仪, 记录峰面积。结果显示 14 个共有峰峰面积的 RSD 均 < 3% ($n = 5$)。

2.3 二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验^[6]

2.3.1 分组及给药方法 取小鼠 180 只, 雌雄各半, 随机分为 18 组, 每组 10 只, 分别为模型组、阳性药组(地塞米松 4.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、芒果叶提取物 100 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组(台农一号 8 组、红象牙 8 组, 质量浓度相当于原药材 5 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。除模型组给生理盐水外, 其余各组均给予相应的药物, 每天 *ig* 给药 1 次, 给药容量 20 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, 连续 5 d。

2.3.2 观察指标 末次给药 45 min 后, 将二甲苯 0.02 mL 滴于右耳两面, 30 min 后颈椎脱臼处死动物, 沿耳廓基线剪下两侧耳片, 用 6 mm 直径打孔器分别在左、右耳同一部位打下耳片, 精密称重。计算各组肿胀度和肿胀抑制率。

$$\text{肿胀度} = \text{右耳片质量} - \text{左耳片质量}$$

$$\text{肿胀抑制率} = (\text{模型组耳片肿胀度} - \text{给药组耳片肿胀度}) / \text{模型组耳片肿胀度} \times 100\%$$

2.3.3 统计学处理 采用 Microsoft Office Excel 2003 对数据进行处理, 计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2.3.4 二甲苯致小鼠耳廓肿胀抑制率的影响 表 2 中, 红象牙组与台农一号组的给药剂量折合成生药均为 100 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。与模型组比较, 地塞米松阳性组具有显著抑制小鼠耳肿胀作用 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 芒果叶(红象牙和台农一号)的三氯甲烷、乙酸乙酯提取物均无显著抗炎作用; 与地塞米松组对比, 红象牙组中三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和甲醇提取物的抗小鼠耳肿胀作用不如阳性组 ($P < 0.05$), 台农一

号组中三氯甲烷、乙酸乙酯、水和正丁醇提取物的抗炎小鼠耳肿胀作用明显低于地塞米松组 ($P < 0.05$), 乙

醇、50% 乙醇和 50% 甲醇提取物的抗炎效果低于地塞米松组。

表 2 芒果叶提取物 $100 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Anti-inflammatory effects of mango leaves extract on mouse ear edema model induced by xylene ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

品种	提取物种类	耳肿胀度/mg	肿胀抑制率/%	品种	提取物种类	耳肿胀度/mg	肿胀抑制率/%
红象牙芒果叶	三氯甲烷	$4.52 \pm 1.31^{2)}$	1.78	台农一号	三氯甲烷	$4.48 \pm 1.06^{2)}$	2.64
	乙酸乙酯	$4.57 \pm 1.19^{2)}$	0.64		乙酸乙酯	$4.51 \pm 1.18^{2)}$	2.01
	水	$2.59 \pm 1.50^{1)}$	43.77		水	$2.98 \pm 1.59^{1,2)}$	35.18
	正丁醇	$3.13 \pm 1.12^{1,2)}$	31.91		正丁醇	$3.31 \pm 1.50^{2)}$	28.03
	甲醇	$2.94 \pm 1.76^{1,2)}$	36.00		甲醇	$2.56 \pm 1.43^{1)}$	41.32
	乙醇	$2.46 \pm 1.18^{1)}$	46.52		乙醇	$2.70 \pm 1.28^{1)}$	44.31
	50% 甲醇	$2.58 \pm 1.12^{1)}$	44.01		50% 甲醇	$2.22 \pm 1.20^{1)}$	51.74
	50% 乙醇	$2.37 \pm 1.04^{1)}$	48.51		50% 乙醇	$2.42 \pm 1.54^{1)}$	47.40
	模型		4.60 ± 1.46		-	地塞米松	

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$;与地塞米松组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

2.4 芒果叶提取物指纹图谱与抗炎作用的灰色关联分析^[7-8]

2.4.1 确定反映系统行为特征的参考数列和影响系统行为的比较数列

反映系统行为特征的数据序列,称为参考数列。影响系统行为的因素组成的数据序列,称比较数列。本文以芒果叶不同极性提取物的抗炎作用作为参考序列,以芒果叶不同极性提取物 HPLC 图谱特征峰峰面积数据为比较序列。

2.4.2 对参考数列和比较数列进行无量纲化处理

由于系统中各因素的物理意义不同,导致数据的量纲也不一定相同,不便于比较,或在比较时难以得到正确的结论。因此在进行灰色关联度分析时,一般都要进行无量纲化的数据处理。本文采用的无量纲化方法是初值化法(见公式 1,式中 $i = 0, 1, \dots, n; k = 1, 2, \dots, m$)。

$$x_i(k) = \frac{x'_i(k)}{x'_i(1)} \quad (\text{公式 1})$$

2.4.3 求参考数列与比较数列的灰色关联系数

按(公式 2)分别计算每个比较序列与参考序列对应元素的关联系数。式中 ρ 为分辨系数,在 $(0, 1)$ 内取值,若 ρ 越小,关联系数间差异越大,区分能力越强,通常 ρ 取 0.5。

$$\zeta_i(k) = \min_i \min_k |x_0(k) - x_i(k)| + \rho \cdot \max_i \max_k |x_0(k) - x_i(k)| / |x_0(k) - x_i(k)| + \rho \cdot \max_i \max_k |x_0(k) - x_i(k)| \quad (\text{公式 2})$$

2.4.4 计算关联序

按(公式 3)对各评价对象(比较序列)分别计算其个指标与参考序列对应元素的关联系数的均值,以反映各评价对象与参考序列的

关联关系,并称其为关联序。

$$r_{0i} = \frac{1}{m} \sum_{k=1}^m \zeta_i(k) \quad (\text{公式 3})$$

2.4.5 排关联序

将 m 个比较数列对同一参考数列按照关联度大小的顺序排列起来,组成关联序,可直接反应各个比较数列对参考数列贡献的大小,即确定各色谱峰对“抗炎作用”贡献的大小顺序(见表 3)。关联结果表明,关联度大于 0.6 的色谱峰有 $X_1, X_2, X_3, X_5, X_6, X_7, X_8, X_9, X_{11}, X_{12}$ 和 X_{13} ,说明芒果叶提取物的抗炎作用是“化学成分群”共同作用的结果;对芒果叶提取物的抗炎作用来说,关联度大于 0.9 的物质为 X_1, X_3, X_6 (芒果苷),可见芒果苷与芒果叶提取物的抗炎作用关联度最大,同时与 X_1, X_3 的作用密切相关。

表 3 各色谱峰对“抗炎作用”贡献关联度

Table 3 Grey correlation degree between common peaks and anti-inflammatory effects

色谱峰	关联系数	色谱峰	关联系数
X_1	0.901 6	X_8	0.745 6
X_2	0.879 1	X_9	0.829 8
X_3	0.955 8	X_{10}	0.520 1
X_4	0.558 9	X_{11}	0.798 6
X_5	0.877 2	X_{12}	0.643 1
X_6	0.938 5	X_{13}	0.846 5
X_7	0.865 0	X_{14}	0.497 4

3 讨论

3.1 流动相选择 参考文献[9],本文选用乙腈-0.1%磷酸溶液作为流动相,采用梯度洗脱方式,所得的HPLC色谱图基线平稳,各主要峰分离度较好。

3.2 检测波长的选择 芒果苷在芒果叶中的含量较高^[2-3],芒果苷是芒果叶中发挥止咳、抗炎作用的主要有效成分。因此,为了能获得与抗炎作用密切相关的HPLC指纹图谱,本文有针对性地建立258 nm下提取物的HPLC。

3.3 提取物的制备 一般认为,药效作用会因为物质基础不同而变化。为获得物质基础明显不同的提取物,本文采用极性差别较大的溶剂提取芒果叶。在本实验中,不同溶剂提取得到的芒果叶提取物中物质成分显著不同,尤其是芒果苷含量差别非常大,同时不同提取物的体内抗炎作用变化非常大。这种研究方法,有利于提高统计分析结果的准确度。

3.4 体内抗炎试验给药剂量的确定 在体内抗炎实验中,发现芒果叶水提物的抗炎效果显著。因此在确定水提物组的单次给药剂量的基础上,确定其他提取物组的给药剂量并按生药折算。

3.5 谱效关系分析 灰色关联度分析法(Grey relational analysis)是灰色系统分析方法的一种,是根据因素之间发展趋势的相似或相异程度(亦即“灰色关联度”),作为衡量因素间关联程度的一种方法,它强调因素间相关程度的顺序。本研究旨在采用灰色关联度分析法,能快速分辨出提取物中HPLC图谱共有峰与抗炎药效的相关性,以便于确认芒果叶的抗炎药效物质基础。从本文谱效分析结果可见,芒果叶提取物中极性较大的成分(即HPLC

图中保留时间较短的成分)以及芒果苷与抗炎活性密切相关,亦即 X_1 , X_3 和芒果苷色谱峰对抗炎作用贡献程度最大,也提示下一步工作重点将是包括 X_1 , X_3 在内的芒果叶极性成分的分离、结构鉴定、药效评价等研究。

[参考文献]

- [1] 邓家刚,郑作文,曾春晖. 芒果苷的药效学实验研究[J]. 中医药学刊,2002,20(6):802-803.
- [2] 邓家刚,李学坚. 提取高纯度芒果苷的工艺研究[J]. 中国中医药科技,2008,15(1):50-51.
- [3] 邓家刚,冯旭,王勤,等. 不同产地及不同品种芒果叶中芒果苷的含量对比研究[J]. 中药材,2006,28(12):1755-1756.
- [4] 李学坚,邓家刚,覃振林. 影响芒果叶中芒果苷含量的生长因素研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(1):7-8.
- [5] J Qin, J Deng, X Feng, et al. Quantitative RP-LC analysis of mangiferin and homomangiferin in *Mangifera indica* L. leaves and in *Mangifera persiciforma* C. Y. Wu et T. L. Ming Leaves[J]. Chromatographia, 2008, 68(11/12):955-960.
- [6] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2002.
- [7] 孟庆刚,王微,李强,等. 黄芩解热作用的谱效关系研究[J]. 北京中医药大学学报,2011,34(6):379-383.
- [8] 刘小花,蔺兴遥,梁瑾,等. 黄芪药材利尿作用的谱效关系研究[J]. 中国现代应用药学,2013,30(5):491-495.
- [9] 冯旭,王胜波,邓家刚,等. 高效液相色谱法同时测定芒果叶中芒果苷与高芒果苷的含量[J]. 中药材,2008,30(10):1054-1056.

[责任编辑 聂淑琴]