

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201603010

引文格式: 王勤, 肖喜泉, 董威, 等. 罗汉果祛痰作用谱效关系研究 [J]. 广西植物, 2017, 37(5):606-609

WANG Q, XIAO XQ, DONG W, et al. Spectrum-effect relationship on expectorant efficacy of *Siraitia grosvenorii* [J]. *Guihaia*, 2017, 37(5):606-609

罗汉果祛痰作用谱效关系研究

王勤¹, 肖喜泉¹, 董威^{1,4}, 唐慧勤¹, 卢凤来³,
李耀华¹, 李典鹏³, 王剑¹, 林吴^{1,2*}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530001; 2. 上海全顾医疗科技有限公司, 上海 200120; 3. 广西壮族自治区广西植物研究所, 中国科学院 广西 桂林 541006; 4. 嘉兴市第一医院药剂科, 浙江 嘉兴 314000)

摘要: 为了研究罗汉果祛痰作用与活性成分的相关性, 该研究首先测定了 19 批罗汉果提取物高效液相 (HPLC) 指纹图谱和小鼠气管酚红排泌量, 找出了指纹图谱共有峰, 采用灰色关联度法确定各共有峰对祛痰效果贡献度, 利用偏最小二乘法 (PLS) 得出了各共有峰的正负相关及贡献度。结果表明: 共有峰为 14 个, 其中关联度在 0.8 以上的有 12 个峰 (正相关峰为 3、11、12、13 号峰, 负相关峰为 1、2、4-10、14 号峰); 11、12 号峰分别为氧化罗汉果苷 V 和罗汉果苷 V。因此, 罗汉果祛痰作用不是单一成分起作用, 而是多种成分综合作用的结果。其中, 氧化罗汉果苷 V 和罗汉果苷 V 有祛痰作用, 贡献率较大。

关键词: 罗汉果, 祛痰作用, 谱效关系

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)05-0606-04

Spectrum-effect relationship on expectorant efficacy of *Siraitia grosvenorii*

WANG Qin¹, XIAO Xi-Quan¹, DONG Wei^{1,4}, TANG Hui-Qin¹, LU Feng-Lai³,
LI Yao-Hua¹, LI Dian-Peng³, WANG Jian¹, LIN Wu^{1,2*}

(1. *Guangxi University of Chinese Medicine*, Nanning 530000, China; 2. *Shanghai Comprehensive Healthcare Technology Co. Ltd.*, Shanghai 200120, China; 3. *Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences*, Guilin 541006, Guangxi, China; 4. *Department of Pharmacy, the First Hospital of Jiaxing*, Jiaxing 314000, Zhejiang, China)

Abstract: In order to investigate the relationship between expectorant efficacy and active components of *Siraitia grosvenorii*, the phenol red secretion of trachea in mice and the HPLC fingerprint of *S. grosvenorii* extract were determined. Grey relational analysis was applied to confirm the contribution degree of each common peak from HPLC fingerprints for expectoration efficacy, while partial least-squares regression (PLS) was utilized to confirm either positive or negative relationship, and to identify the contribution degree of *S. grosvenorii* extract. The results indicated that fourteen common peaks were chosen in HPLC fingerprints, including twelve peaks with relation rate higher than 0.8 (No.3, 11, 12, 13 peaks were positive correlation peaks, and No.1, 2, 4-10, 14 peaks were negative correlation peaks), No.11 and 12 peaks were Oxomogroside V and Mogroside V respectively. Therefore, expectorant efficacy of *S. grosvenorii* is contributed by a combined action of multi-components rather than one component. Oxomogroside V and Mogroside V have an expectorant efficacy and high contribution degree.

Key words: *Siraitia grosvenorii*, expectorant efficacy, spectrum-efficacy relationship

收稿日期: 2016-03-14 修回日期: 2016-06-16

基金项目: 国家自然科学基金(81160518) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (81160518)].

作者简介: 王勤(1957-), 男, 广西桂林人, 教授, 主要从事中药药理学研究与新产品开发, (E-mail) 175057354@qq.com.

*通信作者: 林吴, 硕士, 主要从事互联网远程医疗和医药数据管理, (E-mail) 442496053@qq.com.

罗汉果(*Siraitia grosvenorii*)是广西道地中药材,具有止咳、祛痰、通便、解痉、保肝(王勤等,1999;张宏等,2011)、抗病毒、抗肿瘤、抗疲劳(夏星等,2012;何超文等,2012b)等广泛的药理活性。而与药理作用相关的活性成分大多指向罗汉果甜苷V(王霆等,1999;刘婷等,2007),其他化学成分对药理作用是否有贡献,尚不明确。

2015年版《中华人民共和国药典》中罗汉果的评价标准有定性鉴别及规定罗汉果皂苷V的含量测定不得少于0.50%(国家药典委员会,2015)。现行的罗汉果质量标准对保障罗汉果的基本质量起了肯定的作用,但它忽略了中药的药效是多成分的协同作用,难以对其质量进行较全面的评价。而中药谱效关系是将中药的药效与指纹图谱很好地结合起来评价中药内在质量及其成分与其活性间关系的新方法(国家中医药管理局中华本草编委会,1999)。本研究通过建立罗汉果指纹图谱获得化学数据,同时采用小鼠酚红排泌法获得祛痰药效数据,运用灰度关联法与最小偏二乘法将化学数据与药效数据相关联,建立罗汉果祛痰的谱效关系模型。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 药材与试剂 罗汉果药材19批,均为青皮果,经广西中医药大学药物鉴定教研室田慧教授鉴定为罗汉果(*Momordica grosvenori*)的果实。药材编号及产地:永福龙江(S1-11,育苗方式、采摘时间、果形大小等有差异,下同)、湖南衡阳(S12-13)、南宁坛洛(S14-15)、永福堡里(S16-17)、永福百寿(S18-19)。对照品罗汉果苷V为本实验小组自制,远志购自柳州市神农中药饮片厂,批号20130305。酚红,国药集团化学试剂有限公司,批号20130725。碳酸氢钠,成都市科龙化工试剂厂,批号:20130409。氢氧化钠,成都市科龙化工试剂厂,批号:2013102101。分析纯甲醇、乙醇、磷酸,广东汕头市西陇化工厂。色谱纯乙腈,美国TEDIA公司。水为重蒸蒸馏水,自制。

1.1.2 仪器 1100分析型高效液相色谱仪(包括二极管阵列多波长DVD检测器、四元梯度泵、在线真空脱气机、7725i手动进样器、HP化学工作站),美国Agilent公司;B3500S-MT超声波清洗器,必能信超声(上海)有限公司;双光束紫外可见光光度计TU-1901,北京普析通用仪器有限公司;L600台式低

速自动平衡离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;MATLAB R2013数学软件,美国MathWorks公司。

1.1.3 动物 昆明种小鼠,雌雄各半,体重18~24 g,广西医科大学实验动物中心提供。合格证号:SCXK桂2009-0002。

1.2 方 法

1.2.1 罗汉果提取物制备 称取罗汉果药材1 000 g,先后用10倍量、8倍量、5倍量的水提取,时间分别为1.5、1、1 h,合并滤液,加热浓缩至1 000 mL,加入1倍量的95%乙醇,混匀,封口,-4℃静置48 h,抽滤,得滤液回收乙醇浓缩成浸膏备用。

1.2.2 小鼠气管酚红法 420只小鼠,雌雄各半,随机分为19个罗汉果组、空白组与阳性远志组,每组20只。I_g分别给予罗汉果提取物每公斤40 g生药量(每公斤体重给罗汉果药材量),纯净水与远志提取物20 g·kg⁻¹(每公斤体重给远志药材量),给药体积为0.2 mL·10 g⁻¹,每天给药1次,连续给药3 d。第2天给药后禁食不禁水10 h。末次给药45 min后腹腔注射0.5%酚红溶液0.5 mL,15 min后闷死,用5% NaHCO₃溶液1 mL灌洗呼吸道,重复3次,合并洗出液,离心,取上清液用紫外分光光度计(波长546 nm)比色。通过酚红溶液浓度标准曲线,计算酚红排泌量以及祛痰率。

祛痰率=(实验组平均酚红排泌量-空白组酚红排泌量)/空白组酚红排泌量

表1结果显示,远志组和19个罗汉果组对小鼠均有一定的祛痰作用。因此,对19批罗汉果提取物进行小鼠祛痰作用的谱效关系研究。

表1 罗汉果提取物对小鼠的祛痰作用
Table 1 Expectorant efficacy of the extracts from *Siraitia grosvenorii* in mice

样品编号 Sample number	祛痰率 Rate of phlegm eliminating (%)	样品编号 Sample number	祛痰率 Rate of phlegm eliminating (%)	样品编号 Sample number	祛痰率 Rate of phlegm eliminating (%)
1	14.60	8	14.89	15	11.00
2	14.80	9	9.00	16	12.62
3	16.03	10	6.61	17	26.47
4	23.49	11	21.09	18	14.08
5	17.27	12	8.74	19	4.36
6	12.21	13	21.43	远志 <i>Polygala tenuifolia</i>	56.44
7	11.86	14	2.31		

1.2.3 罗汉果提取物的 HPLC 指纹图谱

1.2.3.1 色谱条件 色谱柱: ZORBAXSB-C₁₈ 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 柱温: 20 ℃; 流动相: 0.05% 磷酸(A)-乙腈(B)(梯度洗脱: 0~8 min, 3%~13.5% B; 8~35 min, 13.5%~35% B; 35~45 min: 35% B); 检测时间: 45 min; 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 检测波长: 203 nm; 进样量: 10 μL(卢风来等, 2010)。

1.2.3.2 对照品溶液制备 称取罗汉果苷 V、氧化罗汉果苷 V 适量, 用甲醇溶解到 5 mL 的容量瓶中, 超声使其充分溶解, 并用甲醇定容至刻度, 以 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 滤液作为对照品溶液。

1.2.3.3 供试品溶液制备 取罗汉果浸膏 2 g, 精密称量, 置 25 mL 容量瓶中, 加入纯净水定容至刻度, 溶解, 摇匀, 以 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 滤液作为供试品溶液。

1.2.3.4 HPLC 图谱峰的归属 精密吸取罗汉果苷 V 及氧化罗汉果苷 V 对照品溶液以及 19 批罗汉果供试药品溶液进样, 按“2.3.1”项下色谱条件测定。19 批罗汉果共确定有 14 个共有峰, 其中 11 号和 12 号峰分别与对照品氧化罗汉果苷 V 和罗汉果苷 V 的保留时间与紫外光谱图相同, 鉴定为氧化罗汉果苷 V 和罗汉果苷 V(图 1)。

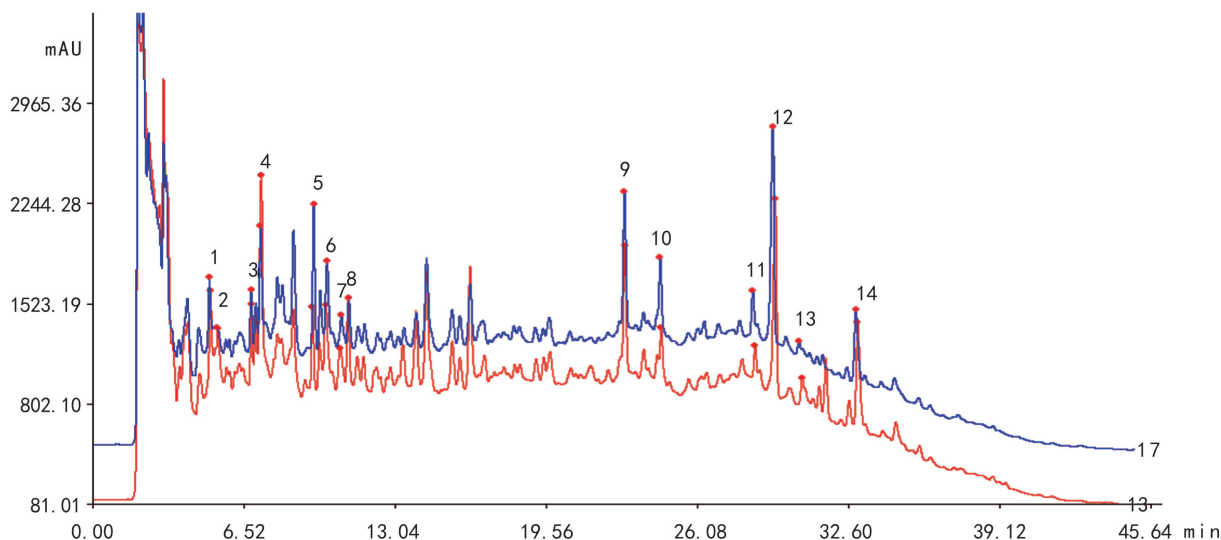


图 1 不同批次罗汉果提取物 HPLC 指纹图谱
Fig. 1 HPLC fingerprint of extract from different batches

2 结果与分析

2.1 谱效关系的灰色关联度和关联顺序分析

将各共有峰原始数据进行标准化转换(即首先分别求出各个序列数据的平均值,再用平均值去除以对应序列中的各个原始数据,所得到的商为新的数据列,即均值化数列,又叫规格化数据)。根据灰色关联度分析法计算关联度,结果见表 2。

从表 2 可以看出,各个共有峰所代表的化学成分与祛痰作用均具有一定的关联(关联度>0.60),表明罗汉果提取物的祛痰作用是其多个化学成分共同作用的结果。在罗汉果提取物 HPLC 指纹图谱中,1-4 号峰、6 号峰以及 8-14 号峰所代表的化学

成分与祛痰作用具有高度关联(关联度>0.80)。依据关联度的大小,确定各成分(P)对祛痰作用贡献大小顺序为 P11>P12>P1>P14>P8>P3>P13>P9>P6>P2>P4>P10>P7>P5。其中 11 号峰为氧化罗汉果苷 V,12 号峰为罗汉果苷 V。

2.2 谱效关系的偏最小二乘法分析

使用 MATLAB R2013 软件,依据偏最小二乘法分析,计算出上述指纹图谱中各个共有峰的峰面积与祛痰药效间的数理关系。表 2 结果表明,根据 19 批罗汉果提取物的图谱数据,得出各峰(P)对祛痰作用的贡献大小依次为 P12>P11>P13>P3>P4>P10>P8>P7>P1>P2>P9>P14>P5>P6,其中 P12、P11、P13、P3 与祛痰效果呈正相关,P4、P10、P8、P7、P1、P2、P9、P14、P5、P6 与祛痰效果呈负相关。

表 2 罗汉果提取物 HPLC 的共有峰的灰色
关联分析和偏最小二乘分析

Table 2 Grey correlation analysis and partial least-squares
regression of common peaks of *Siraitia*
grosvenorii extract in HPLC

峰号 Peak number	保留时间 Retention time (min)	灰色关联度 Grey correlation analysis degree	偏最小 二乘系数 Partial least squares	化学成分 Chemical composition
1	4.794	0.858	-0.259 9	
2	5.135	0.832	-0.369 0	
3	6.494	0.846	0.283 0	
4	6.955	0.823	-0.107 8	
5	9.697	0.667	-0.632 8	
6	10.060	0.836	-0.704 2	
7	10.655	0.791	-0.227 9	
8	11.123	0.855	-0.203 1	
9	23.870	0.842	-0.396 3	
10	25.513	0.814	-0.179 4	
11	29.944	0.873	0.874 0	氧化罗汉果苷 V Oxomogroside V
12	30.920	0.868	1.704 7	罗汉果苷 V Mogroside V
13	32.480	0.843	0.444 7	
14	34.262	0.857	-0.602 1	

3 讨论与结论

本研究使用经典的酚红排泌法来测定不同产地、不同采收期、不同加工方法的罗汉果共 19 批次的祛痰作用,结果罗汉果的祛痰作用明显。同时使用 HPLC 建立了罗汉果提取物的指纹图谱,发现了其中 14 个共有特征峰,并确定了其中 2 个指纹峰,分别为罗汉果苷 V 与氧化罗汉果苷 V。用灰色关联度法进行谱效关系分析,结果表明在 HPLC 指纹图谱中,P11、P12、P1、P14、P8 与祛痰作用的关联度较大,其中 P11 为氧化罗汉果苷 V, P12 为罗汉果苷 V。王霆等(1999)报道罗汉果甜苷有祛痰作用,刘婷等(2007)也报道罗汉果皂苷 V 有祛痰作用。本研究使用偏最小二乘法分析谱效关系,结果表明 P12、P11、P13 与祛痰作用呈正相关且贡献较大, P1、P14、P8 则呈负相关,提示罗汉果提取物的祛痰作用可能是多种成分共同作用的结果,这与我们的

预期相符。而罗汉果苷 V 是罗汉果甜苷主要组成成分之一,本研究结果提示罗汉果苷 V 对祛痰作用的贡献率较大,与王霆等(1999)和刘婷等(2007)的研究结果相吻合。

本研究中,由于通过质谱技术和对照品等因素,除了 P11 和 P12 外,其他峰是何化学成分还无法鉴定。而将这些化合物分离出来,采用波谱技术进行鉴定,并测定其药理活性,将是本课题今后的研究方向之一。

参考文献:

- Chinese Pharmacopoeia Commission, 2015. Pharmacopoeia of China; Vol. I [M]. 2015 ed. Beijing: China Medical Science Press;197. [国家药典委员会. 2015. 中华人民共和国药典:一部 [M]. 2015 年版. 北京:中国医药科技出版社;197.]
- Editorial Committee of Chinese Materia Medica of State Administration of Traditional Chinese Medicine, 1999. Chinese materia medica; Book II [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publisher;4645-4647. [国家中医药管理局中华本草编委会, 1999. 中华本草第二册 [M]. 上海:上海科学技术出版社;4645-4647.]
- LU FL, LIU JL, HUANG YL, et al, 2010. HPLC fingerprints of *Siraitia grosvenorii* at different growth states [J]. Food Sci, 31 (18):283-284. [卢凤来,刘金磊,黄永林,等,2010. 不同生长期罗汉果高效液相指纹图谱研究 [J]. 食品科学,31(18):283-284.]
- HE CW, XIA X, ZHU XY, et al, 2012. The anti-fatigue activity of fresh tissue culture seedling *Grosvenor momordica* fruit [J]. Food Sci Technol, 37 (8): 75-78. [何超文,夏星,朱晓韵,等, 2012. 组培苗鲜罗汉果抗疲劳活性研究 [J]. 食品科技;37(8):75-78.]
- LIU T, WANG XH, LI C, et al, 2007. Study on the antitussive, expectorant and antispasmodic effects of mogrosides V [J]. Chin J Pharm Sci,42(20):1534-1536. [刘婷,王旭华,李春,等, 2007. 罗汉果皂苷 V 的镇咳、祛痰及解痉作用研究 [J]. 中国药学杂志,42(20):1534-1536.]
- WANG T, HUANG ZJ, JIANG YM, et al, 1999. Study on the biological activity of mogrosides [J]. Chin Herb Med, 30(2):914-916. [王霆,黄志江,蒋毅珉,等,1999. 罗汉果甜苷的生物活性研究 [J]. 中草药,30(2):914-916.]
- WANG Q, LI AY, LI XP, et al, 1999. Pharmacologic action of *Siraitia grosvenorii* [J]. Chin J Chin Mat Med, 4(7):425-428. [王勤,李爱媛,李献萍,等,1999. 罗汉果的药理作用研究 [J]. 中国中药杂志,24(7):25-428.]
- XIA X, ZHONG ZG, LIN CY, et al, 2012. Anti-fatigue and hypoxia tolerance effect of mogrosides in mice [J]. Chin J Experim Trad Med Form, 18(17):198-201. [夏星,钟振国,林彩云,等,2012. 罗汉果皂苷抗疲劳及耐缺氧作用 [J]. 中国实验方剂学杂志,18(17):198-201.]
- ZHANG H, LI XH, 2011. Research advance of pharmacological effects and toxicity of *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey [J]. Chin Agric Sci Bull, 27(5):430-433. [张宏,李啸红, 2011. 罗汉果的药理作用和毒性研究进展 [J]. 中国农学通报,7(5):430-433.]