

黄芪药材等级与化学成分和抗疲劳药效的相关性分析

张 瑞^{1,2,3,4}, 曹庆伟^{1,2,3,4}, 李 科^{1,3,4*}, 秦雪梅^{1,3,4*}

(山西大学 1. 中医药现代研究中心, 2. 化学化工学院, 3. 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 4. 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006)

摘要: 比较不同等级黄芪药材化学成分及抗疲劳药效差异, 为黄芪药材商品等级的建立提供依据。本研究收集不同等级的黄芪药材, 利用¹H NMR代谢组学对不同等级黄芪初级代谢物的成分及其含量进行分析, 同时采用HPLC-UV对5种黄酮类成分进行含量测定, 并对不同等级黄芪的抗疲劳药效进行比较。动物实验过程均符合山西大学科学研究伦理审查委员会的相关规定。结果表明二等黄芪浸出物含量最低; 浸出物¹H NMR图谱共指出21个化合物, 特等黄芪浸出物有3种成分较高, 末等黄芪浸出物含量较高的成分有7种, 二等黄芪中有7种成分含量较高。二等黄芪总黄酮含量最高, 其次是特等芪, 末等芪总黄酮成分最低。药效学结果表明黄芪可以明显提升大鼠力竭游泳时间, 改善血清和腓肠肌的生化指标, 其中二等黄芪组效果最好, 说明黄芪药材化学成分、抗疲劳药效与等级没有明显相关, 抗疲劳药效可能与几种成分的共同作用有关。本研究将化学成分和药效指标相结合来评价不同等级黄芪药材质量, 建立了基于化学和药效的黄芪药材质量评价技术, 为保护优质黄芪药材资源以及黄芪药材商品规格等级标准的制定提供科学依据, 为进一步构建黄芪药材质量等级标准奠定基础。

关键词: 黄芪药材; 等级; 初级代谢成分; 次级代谢成分; 抗疲劳

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)06-1092-09

Examination of the correlation between grades, chemical characteristics and anti-fatigue effect of Astragali Radix

ZHANG Rui^{1,2,3,4}, CAO Qing-wei^{1,2,3,4}, LI Ke^{1,3,4*}, QIN Xue-mei^{1,3,4*}

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering; 3. Key Laboratory of Effective Substances Research and Utilization in TCM of Shanxi Province; 4. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: To provide a basis for the establishment of the commodity grade of Astragali Radix (AR), we compared the chemical components and the anti-fatigue effect of different grades of AR. The components of primary metabolites were analyzed by ¹H NMR and the contents of five flavonoids were determined by HPLC-UV with different grades of AR. Fatigue efficacy of different grades of AR was compared. All the procedures were approved by the Laboratory Animal Ethics Committee of the Shanxi University. The results showed that the content of water soluble extracts (WSE) of the Grade II AR was the lowest, and 21 compounds were identified through ¹H NMR spectrum. There are 3 components showing a higher content in the Grade-top AR, and 7 components were higher in the Grade-IV, and 7 other components were higher in the Grade-II AR. Total flavonoid content was the highest in Grade-II but it was the lowest in the Grade-IV. Pharmacodynamic results showed that AR could significantly

收稿日期: 2018-02-11; 修回日期: 2019-03-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872962); 山西省优秀人才科技创新项目 (201605D211030, 201705D211020); 山西省重点研发计划重点项目 (201603D311101); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-JIN-34); 山西省科技攻关项目 (2014ZD0401).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-351-7018379, E-mail: qinxm@sxu.edu.cn;

Tel / Fax: 86-351-7019297, E-mail: like@sxu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0096

enhance the exhaustion time of rats and improve the biochemical indexes of serum and gastrocnemius muscle, and the best anti-fatigue effect was observed with Grade - II AR. Therefore, chemical composition and efficacy index were used to evaluate the quality of different grades of AR, and the quality evaluation approach was established based on chemical and pharmacological effects to provide a scientific basis for the development of AR. The study may provide useful information for construction of the quality grade standard of AR.

Key words: Astragali Radix; grade; primary metabolite; secondary metabolite; anti-fatigue

黄芪 (Astragali Radix, AR), 始载于《神农本草经》^[1], 2015 版《中国药典》规定其为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 或蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* Bge. Hsiao 的干燥根^[2]。蒙古黄芪作为主流商品, 依据其种植方式的不同分为以山西为主的仿野生芪和以甘肃为主的栽培芪。山西仿野生黄芪作为传统优质地道黄芪药材, 在国内外有很高的声誉^[3]。黄芪药材现行国家标准为《76 种药材商品规格标准》^[4], 然而, 随着市场需求的增长和黄芪种植模式的改变, 该标准已经很少被使用。各种种植基地分别制定黄芪药材等级分类标准, 且存在一定差异, 这就造成同一黄芪药材在不同标准下等级不一样, 优质不优价。因此, 建立一套科学、合理、可操作性强、实用性好的黄芪药材等级评价标准是非常必要的, 商品等级标准以形状特征为划分指标, 但要有一定的科学依据。Qin 等^[5]提出将传统经验的辨状论质与化学评价、生物效应相结合, 既能体现黄芪药材的整体特性, 还能提高评价的客观性和可操作性。

课题组前期对黄芪药材商品性状和化学特征与绝对生长年限的相关性进行研究, 发现特等黄芪主要是 5 年以上生长年限的根段, 一等主要是 4~5 年生的根段, 二等主要是 3~4 年生的根段, 三等主要是 2~3 年生的根段, 四等主要是 1~2 年生的根段。而且, 仿野生芪 5 种黄酮类成分含量明显高于移栽芪, 仿野生芪 (除特等外) 总黄酮含量与等级 (或直径, 年限) 呈正相关, 移栽芪与等级不相关。Gao 等^[6]对不同生年限仿野生芪的黄酮类和皂苷类成分研究发现, 3 年生皂苷类成分较高, 4 年生黄芪中黄酮类成分较高。但是仅依靠这两类化学成分的高低反映黄芪药材的质量存在一定的片面性, 还需结合黄芪药材的初级和次级代谢成

分, 并通过药效实验综合评价。因此, 本研究选取特等、末等以及含量相对较高的二等黄芪, 采用 ¹H NMR 图谱对不同等级黄芪中初级代谢产物的成分及含量进行分析, 采用已建立的 HPLC-UV 方法同时比较不同等级黄芪药材的黄酮类次生代谢产物的差异, 阐明黄芪药材等级与化学成分之间的关系。

传统中医认为黄芪是补气良药, 现代药理研究表明, 黄芪具有抗疲劳、抗心衰、抗炎、提高免疫等多种生物活性^[7-9]。Yan 等^[10]对浑源仿野生、武川栽培、土默特右旗栽培及野生黄芪的抗疲劳作用研究发现 4 种不同产地的蒙古黄芪均可显著延长小鼠力竭游泳时间。课题组前期对黄芪抗疲劳的最佳剂量进行了筛选^[7], 但是, 对不同等级黄芪药材抗疲劳的作用还没有研究。因此, 本研究对不同等级黄芪药材性状、化学成分分析及传统药效学比较, 为黄芪商品等级标准建立和中药材“辨状论质”科学内涵阐释提供依据。

材料与方法

材料 从山西浑源收集不同等级黄芪药材, 经山西大学秦雪梅教授鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge) Hsiao 的干燥根, 且均为仿野生芪。药材样品留存于山西大学中医药现代研究中心样品库, 黄芪药材信息见表 1。根据课题组前期研究, 鉴定不同等级黄芪药材的实际生长年限。

仪器 Bruker 600-MHz Avance III NMR Spectrometer (瑞士布鲁克公司), TGL 高速冷冻离心机 (湖南湘仪离心机仪器有限公司), UP-250 细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司), 自动生化分析仪 (Thermo Scientific; 型号: Prime30)。

试剂 磷酸二氢钠、磷酸氢二钠 (天津市化学试

Table 1 Sample of Astragali Radix

No.	Origin	Grade	Collected time	Planting patterns	Diameter of 3.5 cm under head chopping/cm	Diameter of terminatio/cm	Length/cm	Absolute growth years
S1	Shanxi	Top	2017	Wild	1.9 ± 0.19	1.4 ± 0.13	44.6 ± 5.89	5-, 6-years
S2	Hunyuan	II	2017	Wild	1.4 ± 0.14	1.0 ± 0.15	58.5 ± 7.10	3, 4-years
S3		IV	2017	Wild	1.0 ± 0.12	0.7 ± 0.11	44.5 ± 11.18	2-years

剂六厂,分析纯),甲醇(天津市大茂化学试剂厂,分析纯),重水(D₂O, Norell, 美国),氘代氢氧化钠(Armar, 瑞士),3-(三甲基硅基)氘代丙酸钠(TSP, Cambridge Isotope Laboratories Inc., 美国)。

黄芪浸出物含量测定 参照2015版《中国药典》四部^[11],水溶性浸出物测定法(通则2201)项下的冷浸法测定。

黄芪浸出物成分测定与分析 参照课题组前期建立方法对黄芪浸出物成分进行备样^[12]。样品在25℃下于Bruker 600 MHz AVANCE III NMR仪上测定,测定频率为600.13 MHz,扫描次数为64,谱宽12 345.7 Hz,延迟时间为1.0 s,脉冲宽度(PW) 14.0 μs,傅里叶变换(LB) 0.3 Hz。内标为TSP,采用noesyppr1d脉冲序列压制水峰。NMR数据导入软件MestReNova中(version 8.0.1, Mestrelab Research, Santiagode Compostella, Spain)进行分段积分预处理。以δ 0.04积分段对化学位移区间δ 0.52~10.0进行分段积分,核磁图谱中δ 4.70~5.02(残余水峰)不进行积分。积分后的数据进行归一化处理。

色谱条件与系统适用性 Venuil MP C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); Ultimate C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 柱温30℃; 流速为1 mL·min⁻¹; 检测波长230 nm; 进样量20 μL; 流动相A为乙腈, B为水; 梯度洗脱程序: 0~8 min, 20% A; 8~15 min, 30% A; 15~30 min, 43% A; 30~40 min, 60% A; 40~50 min, 100% A; 50~60 min, 100% A; 以毛蕊异黄酮葡萄糖苷(色谱峰1)计算理论塔板数不低于7 000。

混合对照品溶液的制备 取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、紫檀烷苷、异黄酮苷、异黄酮对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为1.870、1.360、1.362、0.601和1.046 mg·mL⁻¹的储备液。取对照品储备液适量,加甲醇制成质量浓度分别为56.5、81.3、75.5、86.8和83.79 μg·mL⁻¹的混合对照品溶液。

供试品溶液的制备 取本品粉末(过四号筛)约1 g,精密称定,置150 mL圆底烧瓶中,精密加入甲醇

50 mL,称定重量,加热回流4 h,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液25 mL,回收溶剂至干,残渣加甲醇溶解,转移至5 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

方法学考察 线性关系:精密量取“混合对照品溶液的制备”项下混合对照品溶液;精密密度:取S1号样本连续进样6次;重复性:取S1号样品6份进样;稳定性:取S1号样品,分别于供试品制备后0、3、6、12、24和48 h进样;加样回收率:精密称取含量已知的样品(S1样品)6份,每份约20 mg加入适量对照品溶液,按照上述方法备样、测定。结果表明线性关系、精密密度、稳定性、重复性和加样回收率良好,具体见表2。

黄芪水提液的制备 黄芪药材适量,加10倍量水浸泡1 h,回流提取3 h,用纱布过滤,药渣再加8倍量水回流提取2 h,用纱布过滤,合并滤液,减压浓缩,至生药量6 g·kg⁻¹。

动物实验及样本收集 SPF级雄性SD大鼠180~200 g若干只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号SCXK(京)2016-0011。饲养室环境:温度(25±2)℃、湿度(50±10)%、12 h明暗交替光照。实验过程均符合山西大学科学研究伦理审查委员会的相关规定。

适应1周后,首先进行游泳能力筛选,剔除不会游泳的和游泳能力特别强的,筛选出50只SD大鼠,开始实验,分为空白组(Normal, NS)、模型组(Model, MS)、特等黄芪组(AR of grade top, Top)、末等黄芪(AR of grade IV, IV)和二等黄芪组(AR of grade II, II)每组10只。所有大鼠每天按0.1 mL·kg⁻¹体重灌胃一次,连续3周,给药组灌胃黄芪水提物(给药量为生药量6 g·kg⁻¹),空白组和模型组给予等体积的水。

每天给药1 h后,除空白组外,所有大鼠进行负重游泳,自由饮水,模型组和各给药组给予空白组一半的饲料量,持续21天,期间每隔2天称一次体重,最后一天灌胃1 h后,称重,并负铅块,置于水温(25±1)℃的圆形水槽中进行游泳,开始计时,直至大鼠沉入水底且5 s内不再浮出水面为止,记录得到大鼠负重游泳力竭

Table 2 Method validation

Constituent	Regression equation	<i>r</i>	Linearity and range/μg	Precision /%	Repeatability /%	Stability /%	Recovery /%
Calycosin-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside	$Y = 508.32 X + 1 497$	1	0.298-18.7	1.9	1.3	0.6	101.4
Ononin	$Y = 2 542 X + 236.1$	0.999 9	0.212-6.8	1.0	2.2	1.1	100.6
(6 <i>aR</i> ,11 <i>aR</i>)-9,10-Dimethoxypterocarpan-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranoside	$Y = 1 951 X + 156.9$	0.999 9	0.213-6.81	2.0	1.3	0.9	103.5
8,2'-Dihydroxy-3,4-dimethoxyisoflavan-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranoside	$Y = 1 621.1 X + 227.6$	0.999 1	0.094-6.01	1.9	3.6	1.5	100.1
8,2'-Dihydroxy-3,4-dimethoxyisoflavan	$Y = 2 950.3 X + 28.7$	0.999 9	0.33-10.46	1.9	2.2	1.3	101.1

时间。从游泳缸里取出大鼠,腹腔注射 20% 乌拉坦 (0.75 mL·100 g⁻¹) 麻醉,迅速股动脉取血,离心后-80 °C 保存、备用。分别剥离所有大鼠的肌肉(腓肠肌)组织,一部分固定于中性福尔马林中用于组织病理学切片,另一部分于液氮中速冻,-80 °C 保存,备用。

生化指标的检测 血清中的葡萄糖 (glucose, GLU)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 以及肌酸激酶 (creatinine kinase, CK)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 均使用市售试剂盒,通过全自动生化分析仪 (Thermo Scientific; 型号: Prime 30) 获得。腓肠肌中的肌糖元 (muscle glycogen)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、硒依赖性谷胱甘肽 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 使用试剂盒测定,试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

数据处理 采用 SIMCA 14.0 软件对归一化的核磁数据进行多元统计分析。主成分分析 (principal component analysis, PCA) 能够反映样本内部固有的差异性和相似性,显示样本的原始分类状态。采用 GraphPad Prism 6.0 软件对所有的浸出物成分进行 one-way ANOVA 分析,以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

结果

1 不同等级黄芪初级代谢产物的比较

1.1 黄芪浸出物含量比较 从表 3 中可以看出,不同等级仿野生芪浸出物含量有明显差异,二等芪浸出物含量最低,其次是末等芪,特等芪浸出物含量最高。

1.2 黄芪浸出物核磁图谱分析 结合文献^[12-14]和 BMRB 数据库 (<http://www.bmrb.wisc.edu/>) 中的标准物质,共指认出 21 个化合物 (图 1),主要为有机酸、氨基酸、碳水化合物等初级代谢成分。各类化合物指认核磁数据见表 4。从 ¹H NMR 图谱中可以看出碳水化合物信号最强,黄芪水溶性浸出物中可能含有大量糖类化合物,且主要是蔗糖。

1.3 多元统计分析 借助多元统计方法对数据进行深入分析以准确揭示黄芪各等级间的初级代谢成分间的差异。首先对不同规格等级黄芪浸出物进行 PCA 分析 (图 2),各个等级黄芪浸出物 (特等、二等、末等) 有明显分离趋势,存在组间差异。

1.4 初级代谢物相对含量分析 对黄芪浸出物中共 21 种化学成分的核磁图谱峰面积积分,进行单变量分析,结果如图 3 所示。亮氨酸、异亮氨酸、琥珀酸 3 种成分在不同等级仿野生芪中没有明显差异。仿野生特等黄芪浸出物含量较高的成分包括缬氨酸、苏氨酸、蔗糖

Table 3 The contents of WSE of different grade AR. AR: Astragali Radix; WSE: Water soluble extracts. $n = 6, \bar{x} \pm s$

Grade No.	WSE/%	Grade No.	WSE/%	Grade No.	WSE/%
Top-1	31.79	II-1	25.54	IV-1	29.39
Top-2	32.64	II-2	26.04	IV-2	29.98
Top-3	29.99	II-3	23.76	IV-3	26.48
Top-4	29.25	II-4	23.93	IV-4	26.72
Top-5	30.92	II-5	24.75	IV-5	27.89
Top-6	31.08	II-6	24.98	IV-6	28.14

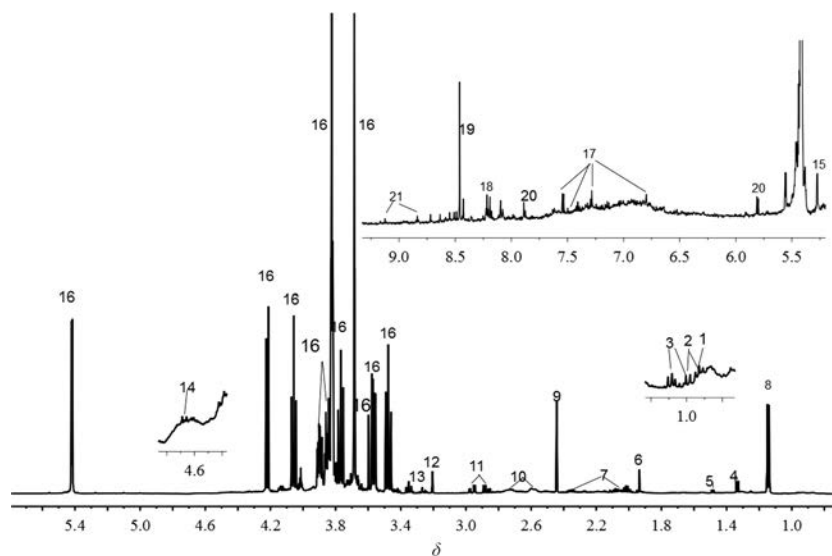
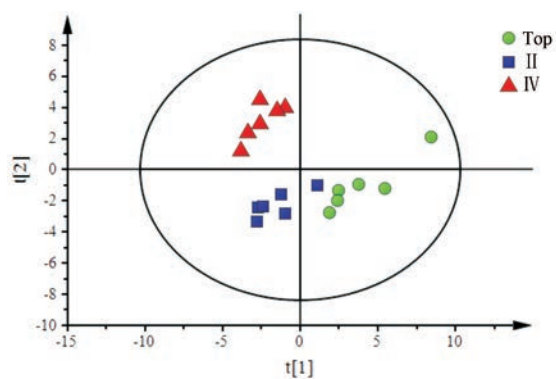


Figure 1 ¹H NMR spectra of WSE of AR. The metabolites labeled with numbers are listed in Table 4

Table 4 ^1H NMR assignments of major metabolites from WSE of AR

No.	Metabolite	δ_{H}
1	Leucine	0.96 (d, $J = 6.0$ Hz)
2	Isoleucine	0.97 (t, $J = 7.8$ Hz), 1.02 (d, $J = 7.2$ Hz)
3	Valine	1.01 (d, $J = 7.2$ Hz), 1.06 (d, $J = 7.2$ Hz)
4	Threonine	1.33 (d, $J = 6.6$ Hz)
5	Alanine	1.48 (d, $J = 7.2$ Hz)
6	Acetic acid	1.93 (s)
7	Glutamate	2.08 (m), 2.34 (m)
8	Unknown	1.14 (d, $J = 6.6$ Hz)
9	Succinic acid	2.45 (s)
10	Citric acid	2.65 (d, $J = 16.8$ Hz), 2.78 (d, $J = 15.6$ Hz)
11	Aspartate	2.83 (dd, $J = 7.8, 16.8$ Hz), 2.96 (dd, $J = 3.6, 16.8$ Hz)
12	Choline	3.21 (s)
13	Taurine	3.27 (t, $J = 1.8$ Hz), 3.35 (t, $J = 1.4$ Hz)
14	β -Glucose	4.62 (d, $J = 8.4$ Hz)
15	α -Glucose	5.26 (d, $J = 3.6$ Hz)
16	Sucrose	3.46 (t, $J = 9.6$ Hz), 3.54 (dd, $J = 2.4, 2.8$ Hz), 3.66 (s), 3.75 (t, $J = 3.6$ Hz), 3.81 (t, $J = 10.0$ Hz), 4.06 (t, $J = 8.4$ Hz), 4.21 (d, $J = 8.4$ Hz), 5.41 (d, $J = 4.2$ Hz)
17	Ferulic acid	6.80 (s), 7.28 (s), 7.48 (s), 7.53 (d, $J = 15.6$ Hz)
18	Adenine	8.18 (s), 8.23 (s)
19	Formic acid	8.46 (s)
20	Uridine	5.89 (dd, $J = 4.2, 7.2$ Hz), 7.87 (d, $J = 7.8$ Hz)
21	Fenugreek	8.86 (t, $J = 7.8$ Hz), 9.13 (s)

**Figure 2** PCA score plot of primary metabolites of different grades of AR. Top: AR of grade Top; II: AR of grade II; IV: AR of grade IV

和一种未知成分。仿野生末等黄芪浸出物含量较高的成分有 β -葡萄糖、 α -葡萄糖、阿魏酸、腺嘌呤、甲酸、尿苷、葫芦巴碱。仿野生二等黄芪中丙氨酸、乙酸、谷氨酸、柠檬酸、天冬氨酸、胆碱、牛磺酸7种成分含量较高。

2 五种黄酮类成分定量研究

黄酮类成分是黄芪次级代谢产物的主要活性成分,测定不同等级仿野生芪中的5种黄酮类成分含量(图4),发现不同等级仿野生芪黄酮类含量有一定差异,其中二等芪总黄酮含量最高,其次是特等芪,末等

芪总黄酮含量最低。

3 不同等级黄芪抗疲劳的药效学分析

3.1 黄芪对大鼠体重的影响 随着造模时间和给药时间的增加,除空白组外,其余4组大鼠的体重呈现逐渐下降趋势,从第7天开始,给药组和模型组体重与空白组相比均显著性降低;第21天时,与空白组相比,其余各组大鼠体重仍呈现显著性下降,但与模型组相比,各给药组大鼠体重有显著性升高(图5),且二等>末等>特等黄芪组。

3.2 黄芪对大鼠负重力竭游泳时间的影响 由图6可见,与模型组相比,给药组大鼠游泳时间均显著延长;二等黄芪组游泳时间明显高于特等组和末等组($P < 0.001$);末等组游泳时间大于特等组,但没有显著性差异($P > 0.05$)。

3.3 组织病理学分析 组织病理学结果显示(图7),空白组骨骼肌纤维排列整齐,染色均匀,组织间隙无肿胀;模型组骨骼肌纤维肿胀,排列紊乱,出现不完全断裂,毛细血管扩张;给药组均有不同程度的肌纤维肥大,与模型组相比,细胞肿胀明显减轻,以二等黄芪组改善最为明显,骨骼肌组织基本正常。

3.4 血清生化指标分析 检测血清中生化指标以评估运动后疲劳程度。与空白组相比,模型组CK和BUN显著性升高,给药黄芪后两者显著降低,其中特等组回调作用最好。与空白组相比,模型组GLU、LDH水平显著降低,给药组均有回调作用,二等组和末等组对GLU、LDH水平有显著性升高(图8)。

3.5 肌肉生化指标分析 肌肉作为力竭游泳运动的靶器官,其生化指标的检测至关重要。有研究表明,疲劳的发生与氧化应激有关^[19],对肌肉中氧化应激相关指标测试后发现(图9),与空白组相比,模型组中MDA水平升高,SOD和GSH-Px水平降低($P < 0.05$);与模型组相比,给药组的MDA水平不同程度降低,二等组回调效果最好。SOD和GSH-Px水平不同程度升高。与空白组相比,模型组肌糖元水平降低,给药黄芪后,肌糖元水平有所升高,但各给药组都没有显著性差异($P > 0.05$)。

讨论

本研究是基于绝对生长年限对不同等级仿野生芪化学成分(初级代谢物和次级代谢物)和抗疲劳药效的差异性比较。首先采用 ^1H NMR对不同等级黄芪初级成分进行分析,共指出21个化合物;PCA结果显示3个等级初级代谢成分有明显分离趋势,说明不同等级黄芪的初级代谢产物存在一定差异。对21个代谢物相对含量进行方差分析,结果表明不同等级黄芪

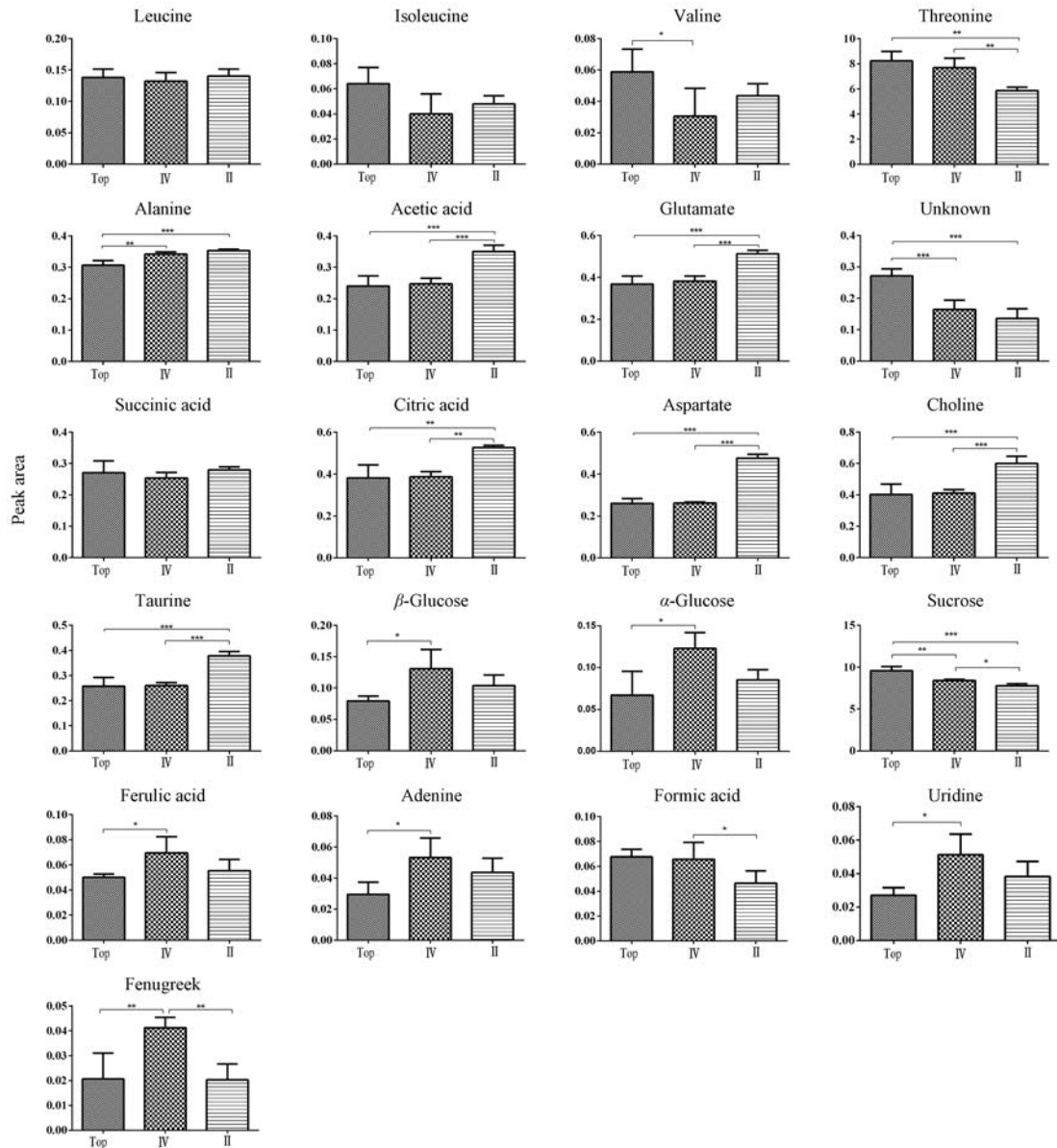


Figure 3 Results of quantification of metabolites identified from AR. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

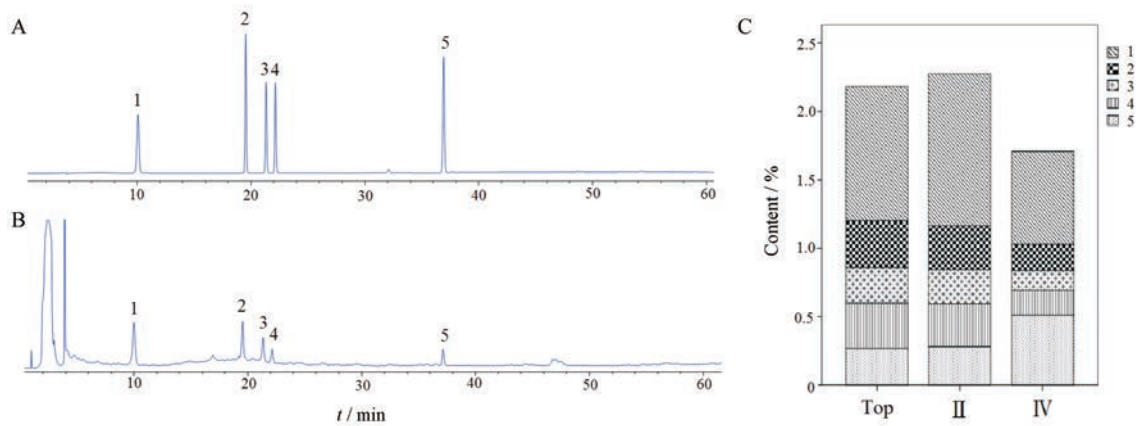


Figure 4 HPLC-UV specific chromatogram of reference compound (A) and typical sample (B), and content of flavonoids in different grade of AR (C). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. 1: Calycosin-7-*O*- β -D-glucoside; 2: Ononin; 3: (6*aR*,11*aR*)-9,10-Dimethoxytercarpan-3-*O*- β -D-glucopyranoside; 4: 8,2'-Dihydroxy-3,4-dimethoxyisoflavan-7-*O*- β -D-glucopyranoside; 5: 8,2'-Dihydroxy-3,4-dimethoxyisoflavan

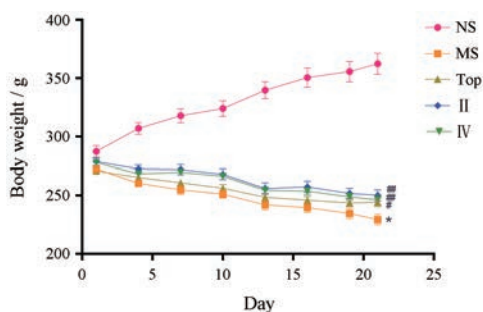


Figure 5 Effects of Astragali Radix on the body weight of rats. NS: Normal; MS: Model; Top: AR of grade Top; II: AR of grade II; IV: AR of grade IV. $n = 10, \bar{x} \pm s. *P < 0.05$ vs NS; $^{\#}P < 0.05, ^{\#\#}P < 0.01$ vs MS

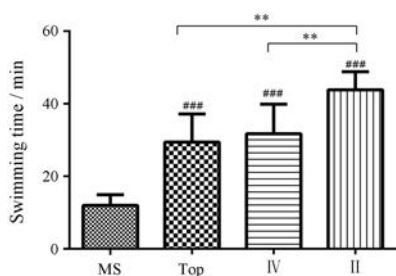


Figure 6 Effects of AR on exhaustive swimming time of rats. $n = 10, \bar{x} \pm s. ^{\#\#\#}P < 0.001$ vs MS; $^{**}P < 0.01$ vs II

中初级代谢产物成分含量不同, 没有明显规律。

黄酮和皂苷类成分是黄芪主要的次级代谢成分, 很多研究表明^[15,16], 皂苷类成分与黄芪直径呈反比, 直径越小含量越高, 也就是等级越低含量越高。本研究采用 HPLC-UV 法, 对不同等级黄芪中 5 种黄酮类成分进行含量测定, 发现二等黄芪总黄酮含量最高, 其次是特等, 末等黄芪总黄酮含量最低, 这与课题组前期研究结果一致, 黄芪总黄酮 (除特等) 含量与等级呈正相关, 即总黄酮与年限呈正相关 (除 6 年生以上), 可能与特等黄芪中空心部分占比大有一定关系。

负重力竭游泳是评价各种生物活性化合物抗疲劳作用的经典有效的模型^[17], 力竭游泳时间的延长是黄芪抗疲劳作用的最有利表现。二等黄芪组大鼠游泳时间最长, 说明二等黄芪 (3~4 年生) 抗疲劳效果最明显, 其次是末等, 特等黄芪组相对时间最短, 但是特等和末等组之间无显著性差异。高强度运动会导致大鼠

骨骼肌损伤, 骨骼肌组织病理学结果显示各给药组大鼠肌肉纤维轻度肥大, 与模型组相比有明显改善, 说明黄芪可以明显减轻骨骼肌损伤。

CK 和 LDH 被认为是评价肌肉损伤程度的两个重要指标^[18], 当肌肉损伤时, 肌肉细胞中 CK 进入血液, 血液中 CK 含量增加, 暗示肌肉损伤发生。本实验中模型组的 CK 含量明显高于空白组, 给予黄芪后, CK 含量明显降低, 且二等黄芪组的效果最好。LDH 是参与糖酵解与糖异生的重要酶^[19], 高强度运动产生大量乳酸对机体产生危害, 快速清除大量的乳酸可以缓解疲劳。给予黄芪后, 大鼠血清 LDH 活性增高, 乳酸积累减少, 因而力竭游泳时间延长, 疲劳延缓, 且二等黄芪组效果最好。BUN 主要用于评价机体遭遇负荷刺激时的承受能力, 运动强度越大时, BUN 升高的越显著^[20]。模型组中 BUN 含量明显高于空白组, 给予不同等级黄芪均可以显著清除体内积累的 BUN, 二等黄芪组回调相对较小, 可能与该组大鼠游泳时间最长, 运动强度最大有关。GLU 是机体必要的能源物质, 运动之后, GLU 水平会立刻降低, 给予黄芪可以使血液中葡萄糖含量升高, 提高运动能力, 末等黄芪组回调效果最好, 可能与末等黄芪中浸出物糖类含量较高有关。

在剧烈运动的过程中, 肌肉糖原被迅速消耗, 黄芪给药后能够通过增加大鼠机体糖原含量, 使血糖维持在正常水平^[21]。高强度运动后, 容易引起氧化应激发生^[22]。力竭性运动可能引起大鼠骨骼肌中过氧化作用加强, 抗氧化能力减弱, 表现为大鼠骨骼肌中脂质过氧化产物 MDA 含量增加。体内的抗氧化物质超氧化物歧化酶 SOD、硒依赖性谷胱甘肽过氧化酶 GSH-Px 能有效地清除氧化磷酸化过程中产生的自由基, 避免疲劳的发生^[23]。骨骼肌生化指标结果表明, 黄芪可以有效的降低 MDA 的含量, 增加 SOD 和 GSH-Px 的含量和活性, 其中二等组干预效果最佳。

综上, 二等黄芪抗疲劳效果最好, 其次是末等, 特等效果最低; 而浸出物含量与之相反, 每个等级浸出物成分的含量高低不一致, 二等黄芪浸出物中丙氨酸、乙酸、谷氨酸、柠檬酸、天冬氨酸、胆碱、牛磺酸 7 种成分含量相对较高, 它们主要参与了糖酵解过程, 说明黄芪抗疲劳可能与糖代谢有关。二等黄芪总黄酮类含量最

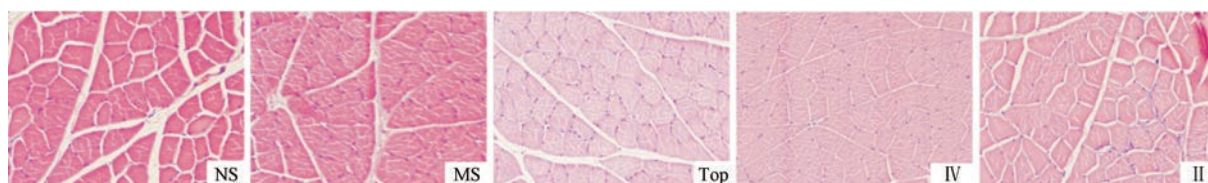


Figure 7 The effects of AR on the histopathology of skeletal muscle of rats in different groups. Thick sections of 5 μm were stained with hematoxylin-eosin staining (H&E). Magnification, $\times 200$

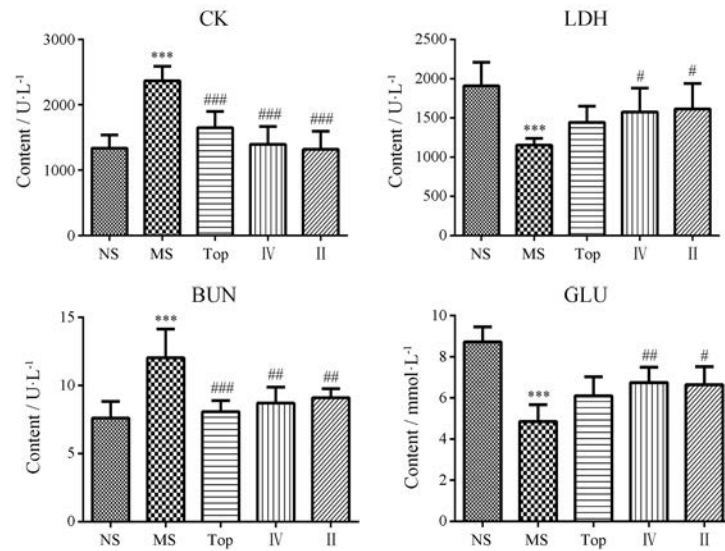


Figure 8 Effects of AR on serum biochemical parameters of rats. GLU: Glucose; BUN: Blood urea nitrogen; CK: Creatinine kinase; LDH: Lactate dehydrogenase. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs NS; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs MS

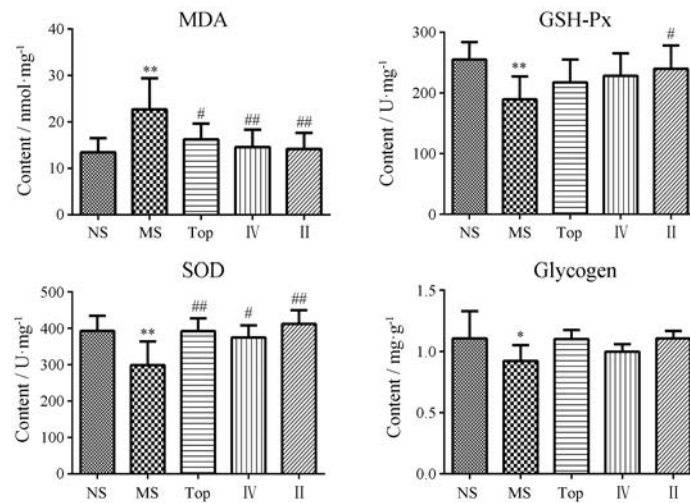


Figure 9 Effects of AR on gastrocnemius muscle biochemical parameters of rats. MDA: Malondialdehyde; SOD: Superoxide dismutase; GSH-Px: Glutathione peroxidase. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NS; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs MS

高,特等次之,末等最低,与药效没有明显相关,然而皂苷类成分与等级呈负相关,末等含量最高,这说明黄芪抗疲劳可能与某类成分没有明显相关,可能与黄酮、皂苷类成分的共同作用有关。

本研究是基于化学成分和药效指标评价不同等级黄芪药材质量,利用代谢组学技术、HPLC-UV方法和传统药理指标比较不同等级仿野生芪药效强度。明确各类黄芪的药效优势,进行化学型与药效的关联分析,阐释不同等级黄芪药材药效差异的化学基础。建立基于化学和药效的黄芪药材质量评价技术,为保护优质黄芪药材资源以及黄芪药材商品规格等级标准的制定提供科学依据,为进一步构建黄芪药材质量等级标准奠定基础。然而,本研究药效实验采用黄芪水提液,接

下来应进一步对黄芪水提液中的化学成分进行评价,探讨其与药效之间的关系。

References

- [1] Chu C, Qi LW, Liu EH, et al. Radix Astragali (Astragalus): latest advancements and trends in chemistry, analysis, pharmacology and pharmacokinetics [J]. *Curr Org Chem*, 2010, 14: 1792-1807.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part 1. 2015 ed Beijing: China Medical Science Press, 2015: 302-303.
- [3] Niu QY, Wan YQ, Li ZY, et al. Evaluation of different goods quality grade Astragalus [J]. *Chin Med Mat (中药材)*, 2015, 38: 1186-1190.
- [4] Wan YQ, Li ZY, Qin XM. Verification of specification grading

- for Astragali Radix goods and consideration about the quality of Astragali Radix [J]. Chin Med J Res Pract (现代中药研究与实践), 2016, 30: 61-64.
- [5] Qin XM, Kong ZK, Zhang LZ, et al. Interpretation of "assessing quality by distinguishing TCMM features" and research ideas about commodity specifications [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2012, 43: 2093-2098.
- [6] Gao SY, Li K, Xiong YF, et al. Identification of growth years of Hengshan imitative wild culture Astragali Radix and investigation into the accumulation rules of flavonoids and saponins [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 147-154.
- [7] Zhang R, Li K, Li AP, et al. ¹H-NMR-based metabolomics analysis of the anti-fatigue effects of Astragali Radix based on muscle tissue [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 782-790.
- [8] Liu YT, Xu WQ, Xiong YF, et al. Evaluations of the effect of HuangQi against heart failure based on comprehensive echocardiography index and metabonomics [J]. Phytomedicine, 2018, 50: 205-212.
- [9] Ryu M, Kim EH, Chun M, et al. Astragali Radix elicits anti-inflammation *via* activation of MKP-1, concomitant with attenuation of p38 and Erk [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 115: 184-193.
- [10] Yan T, Ren K, Bai XR, et al. Anti-fatigue effects of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Beg. var. *mongholicus* (Beg.) Hsiao from different genuine habitats on mice [J]. Mod Chin Med, 2017, 19: 924-928.
- [11] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part IV. 2015 ed Beijing: China Medical Science Press, 2015: 2201.
- [12] Tian D, Li ZY, Fan SC, et al. NMR-based analysis of water soluble extracts of different Astragali Radix [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2014, 49: 89-94.
- [13] Fan ML, Xing J, Li ZY, et al. Comparison on chemical constituents between *Paeoniae Alba Radix* and *Paeoniae Rubra Radix* using NMR based metabolomic approach [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2014, 45: 3230-3237.
- [14] Li J, Wei YH, Qin XM, et al. Chemical comparison on different parts of *Angelica sinensis* Radix based on NMR metabolomics [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 1409-1415.
- [15] Niu QY, Wan YQ, Li ZY, et al. Evaluation of different goods quality grade Astragalus [J]. Chin Med Mater (中药材), 2015, 38: 1186-1190.
- [16] Xin B, Ma SJ, Wang WQ, et al. Influence of different growing years on accumulation of flavonoids and saponins in Astragali Radix [J]. Chin Med Mater (中药材), 2015, 38: 1366-1369.
- [17] Tanaka M, Nakamura F, Mizokawa S, et al. Establishment and assessment of a rat model of fatigue [J]. Neurosci Lett, 2003, 352: 159-162.
- [18] You LJ, Zhao MM, Regenstein JM, et al. *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* anti-fatigue effect of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion [J]. Food Chem, 2011, 124: 188-194.
- [19] Brancaccio P, Maffulli N, Limongelli FM. Creatine kinase monitoring in sport medicine [J]. Br Med Bull, 2007, 209: 81-82.
- [20] Wang MY, An LG. Effects of *Plantago major* L. seeds extract on endurance exercise capacity in mice [J]. J Med Plants Res, 2011, 5: 1659-1663.
- [21] Xu X, Ding Y, Yang Y, et al. β -Glucan salectan improves exercise performance and displays anti-fatigue effects through regulating energy metabolism and oxidative stress in mice [J]. Nutrients, 2018, 10: 858-870.
- [22] Wang X, Qu Y, Zhang Y, et al. Antifatigue potential activity of *Sarcodon imbricatus* acute excise-treated and chronic fatigue syndrome in mice *via* regulation of Nrf2-mediated oxidative stress [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018. DOI: 10.1155/2018/9140896.
- [23] Li D, Ren J, Zhang T, et al. Anti-fatigue effects of small-molecule oligopeptides isolated from *Panax quinquefolium* L. in mice [J]. Food Funct, 2018, 9: 4266-4273.