

多指标综合评价黄芪免疫活性的谱效相关性

洪妍¹, 刘小花¹, 陈亚丽¹, 王波^{1,2}, 陈宇¹, 师志强¹,
薛志远¹, 封士兰^{1*}

(1. 兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃出入境检验检疫局综合技术中心, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 本文通过多指标研究测评黄芪小分子部位的指纹图谱与免疫活性的相关性, 揭示黄芪提高免疫功能的药效物质基础。采用 10 批黄芪药材小分子部位进行免疫抑制小鼠的免疫功能实验, 测定其吞噬指数、迟发型变态反应程度 (DTH)、脏器指数以及干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-4 (IL-4) 等药效值, 与 HPLC-DAD/HPLC-ELSD 指纹图谱的共有峰关联, 研究其谱效相关性。结果表明, 黄芪小分子部位中的多种成分对于增强免疫作用具有高度关联性。黄芪药材小分子部位提高小鼠免疫力是多种物质共同作用的结果。

关键词: 黄芪; 免疫活性; 谱效关系; 指纹图谱

中图分类号: R285.5; R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 05-0785-05

Multi-index integrated evaluation of spectrum-effect relationship on immunocompetence of Radix Astragali

HONG Yan¹, LIU Xiao-hua¹, CHEN Ya-li¹, WANG Bo^{1,2}, CHEN Yu¹, SHI Zhi-qiang¹,
XUE Zhi-yuan¹, FENG Shi-lan^{1*}

(1. College of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau Central Laboratory of Technical Center, Lanzhou 730000, China)

Abstract: The study was aimed to investigate the correlation between the immunocompetence and the fingerprints of supernatant extracts from Radix Astragali by multi-index integrated evaluation, and reveal the material basis of Radix Astragali improving the immunological function. After oral administration 10 batch of supernatant extracts from Radix Astragali on immunosuppressed mice, phagocytic index, delayed type hypersensitivity (DTH) degree, organs index and the level of cytokines IFN- γ , IL-4 (ELISAs) were measured, and each common peak from HPLC-DAD/HPLC-ELSD fingerprints were correlated with the above data. A number of components in supernatant extracts of Radix Astragali display a substantial correlation with the immunocompetence. Supernatant extracts of Radix Astragali can significantly enhance immunological function on mice, which is related to various components in Radix Astragali.

Key words: Radix Astragali; immunocompetence; spectrum-effect relationship; fingerprint

黄芪作为一味经典的补益药,《本草纲目》中称

其为“补者之长”,“可治一切气衰血虚之症”。由此可见,黄芪在免疫调节方面,有着非常悠久的用药历史。

黄芪中除含有多糖等免疫活性较强的大分子化合物外^[1],还含有一些黄酮及皂苷类成分,这些小分子物质也具有很强的免疫调节活性。其中,总黄酮可以提高免疫抑制小鼠的 CD4⁺ T 淋巴细胞水平,升高

收稿日期: 2016-12-15; 修回日期: 2017-02-03.

基金项目: 甘肃省中药质量与标准研究重点实验室培育基地开放基金项目 (ZYZL16-007); 兰州市科技计划项目 (2016-3-111); 城关区科技计划项目 (2016-1-5).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-931-8915685, E-mail: fengshl@lzu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1189

CD4⁺/CD8⁺比值以及血清中 IFN- γ 的水平^[2]。总皂苷能增强小鼠腹腔巨噬细胞的免疫作用,可能由于其引起 Ca²⁺浓度升高,从而激活巨噬细胞发挥免疫作用^[3]。

在中药研究和生产中,中药质量控制一直是开发和研究过程的热点和难点,也是实现中药现代化的基础和关键^[4];目前关于黄芪的质量控制,无论是药典中黄芪指标成分的含量测定^[5],还是指纹图谱的研究^[6,7],多为化学成分的研究,不能反映黄芪化学成分与药理作用之间的关系。

“中药谱效关系”将中药化学成分与药效学研究结合起来,采用统计学方法将二者进行关联分析,科学地阐述其化学成分与疗效的关系,近年来应用较为广泛^[8-10]。目前关于中药免疫活性的谱效关系研究测定的药效指标多为单一指标^[10,11],但是免疫活性体现在多个方面,用单一药效指标与化学成分进行谱效相关性分析不能够全面反映药材质量与药效的关系。本实验室前期进行了黄芪水部位化学成分指纹图谱与吞噬指数的谱效关系研究^[11],在此基础上,本实验以正常小鼠和免疫抑制小鼠为研究对象,对黄芪不同提取部位进行多药效指标测定分析,优选出小分子部位为黄芪提高免疫力的最佳部位,进行黄芪药材免疫活性多药效指标的谱效相关性综合评价分析。

材料与amp;方法

仪器 2695 高效液相色谱仪和 2996 二极管阵列检测器 (美国 Waters 公司); ELSD 2000 蒸发光散射检测器 (美国 Alltech 公司); 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)。

药物与试剂 10 批黄芪药材,为 2015 年产自全国各地的种植或野生黄芪,经兰州大学药学院马志刚教授鉴定均为蒙古黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao], 1~10 号黄芪药材依次产自山西大同、甘肃莲峰、甘肃首阳、甘肃文峰、甘肃双泉、甘肃贾河、内蒙古银号、内蒙古下湿壕、内蒙古鄂伦春旗和陕西渭南;注射用环磷酰胺 (安道生,德国百特公司,批号: 5K084A); 乙腈 (色谱纯,德国 Merck 公司); 超纯水 (哇哈哈集团有限公司); 对照品毛蕊异黄酮、芒柄花素、毛蕊异黄酮-7-*O*- β -D-葡萄糖苷、黄芪皂苷 II、黄芪甲苷均购自中国食品药品检定研究院; 芒柄花苷、黄芪皂苷 III 均购自上海顺勃技术有限公司; 3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷、芒柄花素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷-6"-*O*-丙二酸酯、2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷-7-*O*- β -D-葡萄糖苷、

毛蕊异黄酮-3-*O*- β -D-葡萄糖苷均为实验室自制,纯度大于 98% (HPLC); 小鼠 IFN- γ 、IL-4 ELISA 试剂盒 (欣博盛生物科技公司,批号均为 160729)。

实验动物 SPF 级雄性昆明种小鼠,体质量 (20 \pm 2) g,由兰州大学动物实验中心提供,合格证号 SCXK (甘) 2013-0002,实验研究过程遵从实验动物饲养管理和使用指南。

样品制备 称取 10 批不同产地的黄芪药材 1 kg,依次用 10 倍量水煎煮 2 h、8 倍量水 1.5 h、6 倍量水 1 h,合并水煎液,过滤,浓缩后加乙醇沉淀,使其浓度为 70%。静置沉淀过夜后离心,上清液浓缩至干,得到小分子部位。根据出膏率换算小鼠的给药剂量。

10 批黄芪药材小分子部位的 HPLC 指纹图谱

色谱条件^[12] SpursilTM C18 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 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), 流速 1 mL \cdot min⁻¹, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 进样量 40 μ L。DAD 检测波长为 254 nm, ELSD 温度 112.8 $^{\circ}$ C, 载气流速为 3.2 L \cdot min⁻¹, 增益值为 8。

供试品溶液的配制 取 10 批黄芪药材小分子部位的干燥品各 0.5 g,精密称定,加甲醇溶解后,定容至 10 mL,混匀得到供试品溶液,经微孔滤膜 (0.45 μ m) 过滤后备用。

对照品溶液的配制 精密称取对照品毛蕊异黄酮、芒柄花素、毛蕊异黄酮-7-*O*- β -D-葡萄糖苷、芒柄花苷、3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷、芒柄花素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷-6"-*O*-丙二酸酯、2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷-7-*O*- β -D-葡萄糖苷、毛蕊异黄酮-3-*O*- β -D-葡萄糖苷、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷适量,加甲醇制成适宜浓度的对照品溶液。

10 批黄芪药材小分子部位对免疫抑制小鼠免疫功能的作用 前期实验通过探讨黄芪不同提取部位对正常和免疫抑制小鼠免疫功能的影响,发现黄芪提高小鼠免疫力的最佳部位为黄芪小分子部位高剂量组。因此本研究采用此部位进行 10 批黄芪药材的 HPLC 指纹图谱与免疫学药效指标的谱效关系研究。

将 360 只小鼠随机分成免疫 I 组、II 组和 III 组: I 组进行碳廓清实验; II 组进行迟发型变态实验及胸腺、脾脏指数测定; III 组测定细胞因子 IFN- γ 、IL-4 水平。每大组下设 12 个小组,分别为空白对照组、模型对照组和 10 批黄芪小分子高剂量组。空白组和模型组均给予生理盐水,给药组按原生药 10.0 g \cdot kg⁻¹ 的剂量换算后给予黄芪小分子部位药物。灌胃 4 周,在第 3 周后,除空白组外,其余各组小鼠连续两天腹

腔注射 $55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 新鲜配制的环磷酰胺。造模后第 5 天, 测定各项指标。

灰色关联度分析

参考数列和比较数列的设定 将 10 批黄芪药材小分子组提高免疫功能的药效值作为参考数列, 黄芪药材小分子部位的指纹图谱共有峰设为比较数列。

无量纲化处理 为便于科学地将物理意义不同的数据进行比较, 需要将数据统一进行无量纲化处理。本研究采用均值化法^[13]作原始数据的变换。变换后的参考数列记作 $\{X_0(k)\}$, 比较数列记作 $\{X_i(k)\}$ ($1 \leq i \leq N, 1 \leq k \leq 10, N$ 为指纹图谱的共有峰数)。

计算关联系数 按下式计算 $\{X_0(k)\}$ 与 $\{X_i(k)\}$ 之间的关联系数。式中, $\Delta_{0i}(k)$ 为 $\{X_0(k)\}$ 与 $\{X_i(k)\}$ 之间差值的绝对值。 Δ_{\min} 和 Δ_{\max} 分别为绝对差值中的最小值和最大值。 ρ 为分辨系数, 通常取作 0.5。

$$\zeta_{0i}(k) = \frac{\Delta_{\min} + \rho \Delta_{\max}}{\Delta_{0i}(k) + \rho \Delta_{\max}}$$

关联度及其排序 关联度的计算公式如下。将所得关联度降序排列, 可以反映出指纹图谱中各共有峰对免疫作用的贡献程度。关联度数值越大, 说明二者的变化趋于一致; 数值越小, 则二者变化趋势相反。

$$\gamma_{0i} = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \zeta_{0i}(k)$$

结果

1 HPLC 指纹图谱峰的归属

10 批黄芪药材小分子部位的指纹图谱如图 1A、1B 所示, 其中图 1A 为 HPLC-DAD (254 nm) 的指纹图谱, 图 1B 为 HPLC-ELSD 的指纹图谱。

综合两个指纹图谱, 共确定了 19 个共有峰。HPLC-ELSD 指纹图谱中, 有 6 个化合物与 HPLC-DAD 指纹图谱中的相同, 分别为 E1 和 D8、E2 和 D11、E3 和 D12、E4 和 D13、E5 和 D14、E6 和 D15。通过与对照品的保留时间、紫外吸收以及本实验室前期在黄芪总提取物中鉴别出的化合物^[12]进行对比分析, 共鉴别出 11 个化合物。

在 HPLC-DAD 指纹图谱中, 共鉴别了 8 个化合物, 其中 D2 为芒柄花素-7-*O*- β -D-葡萄糖苷-6"-*O*-丙二酸酯、D8 为毛蕊异黄酮-7-*O*- β -D-葡萄糖苷、D9 为 2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮-7-*O*- β -D-葡萄糖苷、D10 为毛蕊异黄酮-3-*O*- β -D-葡萄糖苷、D11 为芒柄花苷、D12 为 3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷、D14 为毛蕊异黄酮、D16 为芒柄花素。

在 HPLC-ELSD 指纹图谱中, 共鉴别了 7 个化

物。其中 E1、E2、E3、E5 分别与 HPLC-DAD 指纹图谱中的 D8、D11、D12、D14 4 个化合物相同。E7 为黄芪甲苷、E8 为黄芪皂苷 III、E9 为黄芪皂苷 II。

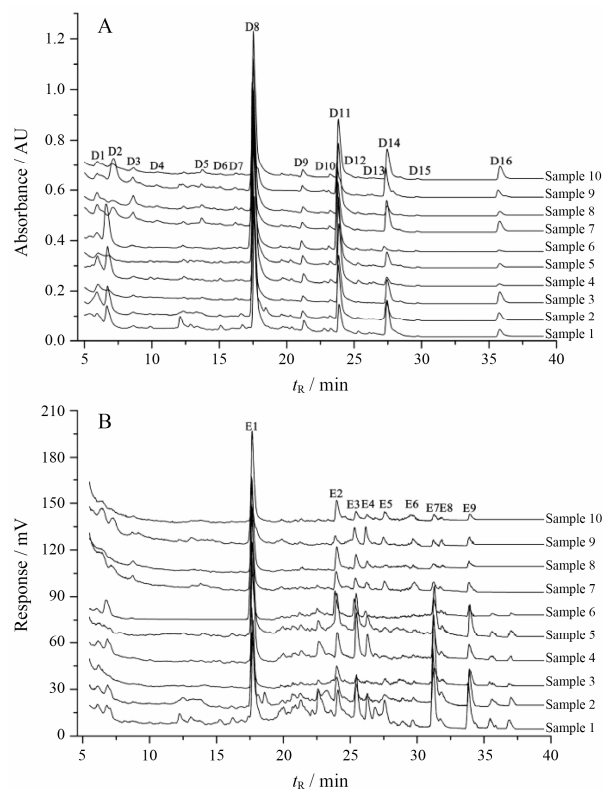


Figure 1 HPLC-DAD (A, 254 nm) and HPLC-ELSD (B) fingerprints of the supernatant extracts of Radix Astragali from 10 samples. D2: Formononetin-7-*O*- β -D-glucoside-6"-*O*-malonate; D8/E1: Calycosin-7-*O*- β -D-glucoside; D9: 2'-Hydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan-7-*O*- β -D-glucoside; D10: Calycosin-3-*O*- β -D-glucoside; D11/E2: Ononin; D12/E3: 3-Hydroxy-9,10-dimethoxypterocarpan; D14/E5: Calycosin; D16: Formononetin; E7: Astragaloside IV; E8: Astragaloside III; E9: Astragaloside II. Other common peaks are unknown

2 黄芪药材小分子部位免疫活性谱效关系分析

如方法中所述, 将 10 批黄芪药材小分子部位 HPLC-DAD 指纹图谱共有峰的峰面积和 HPLC-ELSD 指纹图谱共有峰的含量分别与免疫学药效数据进行关联。黄芪药材小分子部位的免疫学药效值见表 1。表 2 中列出了 HPLC-ELSD 指纹图谱中 3 个黄芪皂苷的含量。经均值化法处理后, 按上述公式计算其关联度。表 3 和表 4 分别为 HPLC-DAD 和 HPLC-ELSD 指纹图谱与各免疫活性指标的关联度。

表 3 为 HPLC-DAD 指纹图谱的 16 个共有峰峰面积与免疫学药效指标的关联度, 排序依次如下: $D8 > D10 > D11 > D15 > D9 > D1 > D7 > D6 > D13 > D3 > D12 > D14 > D16 > D5 > D4 > D2$ (DTH 程度); $D8 > D10 > D11 > D9 > D15 > D1 > D6 > D7 > D13 > D16 > D3 > D14 > D12 >$

Table 1 Immunological medicinal value of the supernatant extracts of Radix Astragali from 10 samples. DTH: Delayed type hypersensitivity

Sample	DTH degree/g	Phagocytic index α	IFN- γ /ng·mL ⁻¹	IL-4/ng·mL ⁻¹	Thymus index/mg·g ⁻¹	Spleen index/mg·g ⁻¹
1	0.014 3 ± 0.003 4	4.72 ± 0.66	0.270 ± 0.068	0.080 4 ± 0.021 8	1.11 ± 0.13	1.58 ± 0.21
2	0.016 1 ± 0.004 3	4.38 ± 0.44	0.269 ± 0.093	0.055 4 ± 0.014 0	0.83 ± 0.14	1.62 ± 0.18
3	0.017 5 ± 0.003 2	4.41 ± 0.70	0.240 ± 0.066	0.035 1 ± 0.009 6	1.03 ± 0.26	1.45 ± 0.14
4	0.021 0 ± 0.002 1	4.70 ± 1.24	0.501 ± 0.081	0.042 0 ± 0.008 0	1.05 ± 0.12	1.50 ± 0.14
5	0.021 9 ± 0.004 7	4.68 ± 0.83	0.332 ± 0.080	0.062 5 ± 0.019 2	0.99 ± 0.29	2.12 ± 0.31
6	0.017 6 ± 0.003 4	4.17 ± 0.63	0.167 ± 0.086	0.031 7 ± 0.008 4	1.20 ± 0.17	1.48 ± 0.15
7	0.019 1 ± 0.003 0	4.83 ± 0.53	0.221 ± 0.084	0.033 6 ± 0.007 4	1.07 ± 0.12	1.62 ± 0.26
8	0.018 1 ± 0.003 4	5.04 ± 1.10	0.298 ± 0.052	0.038 1 ± 0.010 6	1.07 ± 0.13	1.84 ± 0.32
9	0.019 8 ± 0.003 5	4.54 ± 0.58	0.203 ± 0.041	0.040 2 ± 0.009 6	0.97 ± 0.13	1.36 ± 0.23
10	0.020 5 ± 0.003 6	5.13 ± 1.02	0.372 ± 0.105	0.054 5 ± 0.010 9	0.68 ± 0.11	1.37 ± 0.10

Table 2 Content of common peaks and retention times in HPLC-ELSD fingerprints of the supernatant extracts of Radix Astragali from 10 samples

Common peak	t/min	Content/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
E7	31.23	201.15	238.27	95.58	146.60	131.53	91.11	58.48	52.32	47.47	50.18
E8	31.84	18.80	55.80	36.00	27.76	25.34	28.38	19.32	11.30	35.07	25.69
E9	33.90	204.11	203.10	130.42	128.45	139.52	129.58	85.72	74.72	54.86	101.76

Table 3 The grey correlation degree between HPLC-DAD fingerprints and the immunocompetence of Radix Astragali

Common peak	DTH degree	Phagocytic index α	IFN- γ	IL-4	Thymus index	Spleen index
D1	0.794 0	0.779 8	0.754 2	0.739 6	0.765 0	0.766 2
D2	0.589 0	0.601 9	0.638 5	0.647 4	0.620 0	0.602 2
D3	0.702 8	0.683 4	0.636 8	0.650 6	0.698 0	0.693 1
D4	0.603 5	0.607 7	0.621 9	0.618 5	0.571 7	0.584 7
D5	0.611 5	0.611 0	0.617 6	0.604 6	0.583 4	0.596 4
D6	0.705 0	0.711 2	0.757 9	0.753 9	0.716 4	0.682 5
D7	0.710 9	0.706 7	0.684 3	0.687 2	0.662 9	0.675 5
D8	0.859 4	0.853 8	0.861 0	0.821 4	0.848 1	0.882 4
D9	0.807 1	0.826 0	0.812 7	0.874 0	0.835 9	0.840 7
D10	0.856 8	0.848 0	0.867 2	0.788 3	0.798 5	0.830 6
D11	0.847 2	0.837 6	0.818 8	0.792 5	0.812 0	0.844 0
D12	0.687 1	0.668 2	0.732 8	0.759 0	0.684 6	0.702 7
D13	0.703 5	0.692 1	0.773 3	0.769 8	0.702 1	0.678 8
D14	0.671 1	0.673 1	0.666 9	0.696 9	0.665 5	0.632 9
D15	0.842 2	0.802 2	0.807 6	0.815 6	0.767 3	0.831 8
D16	0.649 9	0.684 1	0.680 6	0.716 9	0.670 9	0.671 9

Table 4 The grey correlation degree between HPLC-ELSD fingerprints and the immunocompetence of Radix Astragali

Common peak	DTH degree	Phagocytic index α	IFN- γ	IL-4	Thymus index	Spleen index
E7	0.635 1	0.616 7	0.653 9	0.673 0	0.619 0	0.643 1
E8	0.707 7	0.704 2	0.609 0	0.627 7	0.693 0	0.701 7
E9	0.690 9	0.703 7	0.659 2	0.730 7	0.731 8	0.728 9

D5>D4>D2 (吞噬指数); D10>D8>D11>D9>D15>D13>D6>D1>D12>D7>D16>D14>D2>D3>D4>D5 (IFN- γ); D9>D8>D15>D11>D10>D13>D12>

D6>D1>D16>D14>D7>D3>D2>D4>D5 (IL-4); D8>D9>D11>D10>D15>D1>D6>D13>D3>D12>D16>D14>D7>D2>D5>D4 (胸腺指数); D8>D11>D9>D15>D10>D1>D12>D3>D6>D13>D7>D16>D14>D2>D5>D4 (脾脏指数)。

综合所有免疫活性指标来看, D1、D8、D9、D10、D11 和 D15 对免疫活性药效均有较大贡献。其中, D8 为毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷、D9 为 2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷、D10 为毛蕊异黄酮-3-O- β -D-葡萄糖苷、D11 为芒柄花苷, 与所有免疫学药效值的关联度均在 0.7~0.9 之间。D2、D4、D5 对增强免疫功能的贡献较小, 其中 D2 为芒柄花素-7-O- β -D-葡萄糖苷-6"-O-丙二酸酯。

表 4 为 HPLC-ELSD 指纹图谱的 3 个共有峰含量与免疫学药效指标的关联度, 排序依次如下: E8>E9>E7 (DTH 程度); E8>E9>E7 (吞噬指数); E9>E7>E8 (IFN- γ); E9>E7>E8 (IL-4); E9>E8>E7 (胸腺指数); E9>E8>E7 (脾脏指数)。

综合所有药效可知, E7、E8 和 E9 对提高机体免疫力均有一定贡献。其中 E7 为黄芪甲苷、E8 为黄芪皂苷 III、E9 为黄芪皂苷 II。

讨论

本实验建立了 10 批不同产地黄芪药材小分子部位 HPLC-DAD/HPLC-ELSD 的指纹图谱, 共确定了 19 个共有峰, 鉴定出其中 11 个化合物。将 2 个指纹

图谱与 6 个免疫学药效指标进行谱效相关性综合分析, 发现其中多种物质对提高免疫功能有较大贡献。

在进行谱效相关性分析时, 由于 2 个指纹图谱中有 6 对共有峰相重合, DAD 检测器灵敏度要优于 ELSD, 因而将这些共有峰归于 HPLC-DAD 指纹图谱中计算更为准确合理。HPLC-DAD 指纹图谱共确定出 16 个共有峰, 但由于其中部分成分尚不能确定, 故用其峰面积与免疫活性指标相关联。而 HPLC-ELSD 指纹图谱中, E7、E8、E9 为已知的皂苷类物质, 采用其含量与提高免疫作用的药效相关联, 结果更为科学可靠。

综上所述, 黄芪药材小分子部位提高免疫功能作用的主要成分为毛蕊异黄酮-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、毛蕊异黄酮-3-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、芒柄花苷、黄芪甲苷、黄芪皂苷 II 和黄芪皂苷 III。黄芪药材小分子部位提高免疫功能的作用是多种物质共同作用的结果。通过对黄芪药材谱效关系的研究, 能更加科学有效地评价其药理活性, 为全面阐述黄芪提高免疫作用的药效物质奠定了基础。

References

- [1] Wang TX, Wang TX, Wu GC. Effect of *Astragalus* polysaccharide on immunological function in mice [J]. *Shizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药)*, 2009, 20: 1763-1764.
- [2] Yan PY, Yu XH, Zhang DS, et al. TAF to the hyp immunity mice on effect of T cell polarization [J]. *J Zhejiang Coll Tradit Chin Med (浙江中医药大学学报)*, 2008, 32: 163-164.
- [3] Yang XM, Xu XW, Lu HL, et al. Study on activation of mouse peritoneal macrophage by *Astragalus* saponin [J]. *Chin J Immunol (中国免疫学杂志)*, 2008, 24: 804-807.
- [4] Xiao XH, Jin C, Yan D, et al. Proposition and practice on "integrative quality" in quality control for Chinese materia medica [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2010, 41: 505-508.
- [5] Chinese Pharmacopoeia Committee. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典)* [M]. Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 302-303.
- [6] Liang J, Liu XH, Ren Y, et al. Study on chromatography fingerprint of Radix Astragali with hyphenated technique of HPLC-DAD-ELSD [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formula (中国实验方剂学杂志)*, 2012, 18: 70-74.
- [7] Su X, Wu LJ, Tu PF. RRLC-UV-MS fingerprint of Radix Astragali [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2010, 35: 732-735.
- [8] Wang BL, Hu JP, Sheng L, et al. Chemical-pharmacokinetic-pharmacodynamic fingerprints of *Schisandra chinensis* alcoholic extract [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 734-740.
- [9] Xu JJ, Lu JQ, Li XS, et al. Study on spectrum-effect relationship between fingerprints of essential oil from Shennong Xiangju and the *in vitro* antioxidant activities [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2016, 36: 1823-1830.
- [10] Cui F, Han ZH, Liu XH, et al. Spectrum-effect relationship of active fraction from Hedysari Radix on improving immunity [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2016, 47: 101-105.
- [11] Liu XH, Liang J, Ren Y, et al. Spectrum-effect relationship in effect of improving immunity of Astragali Radix [J]. *Chin Med Mat (中药材)*, 2012, 35: 1978-1981.
- [12] Liu XH. Study on Spectrum-effect Relationship and Metabolism of Anti-gastric Ulcer Effects in Radix Astragali (基于抗胃溃疡作用的黄芪谱效关系和相关成分的体内代谢研究) [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2015.
- [13] Liu SF, Dang YG, Fang ZG. *Gray System Theory and Its Application (灰色系统理论及其应用)* [M]. Beijing: Science Press, 2004.