

铁皮石斛抗疲劳作用的谱效关系研究^{*}

谢唐贵^{1,2,*}, 陈敬民¹, 蓝保强^{1,2}, 蒋珍藕^{1,2}, 李燕婧^{1,2}

(1. 广西中医药研究院, 广西南宁 530022; 2. 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022)

摘要: 为了探讨铁皮石斛提取物高效液相色谱(HPLC)图谱峰面积与其抗疲劳作用的关联性, 为阐明其抗疲劳药效物质基础提供依据。本研究从4个不同产地采集铁皮石斛, 分别制取水提取物、醇提取物和制备其HPLC指纹图谱; 并开展小鼠负重游泳和游泳疲劳实验, 记录力竭游泳时间、检测血清乳酸含量和肝糖原含量, 分析抗疲劳作用; 最后采用偏最小二乘回归法, 研究各提取物指纹图谱共有峰面积与药效的关联性。结果如下: 分别制取了各产地铁皮石斛水提取物、醇提取物 HPLC 指纹图谱, 提取出30个特征峰; 铁皮石斛水提取物、醇提取物显著延长小鼠力竭游泳时间、降低游泳疲劳小鼠血清乳酸含量、提高游泳疲劳小鼠肝糖原含量; 与延长游泳时间相对应的色谱峰为第4, 8, 15, 23号, 与降低血清乳酸含量相对应的色谱峰为第1, 3, 5, 7, 9, 11, 20, 24, 25, 30号, 与增加肝糖原含量相对应的色谱峰为第27, 28号。实验结果初步证明铁皮石斛抗疲劳作用显著, 与延长小鼠力竭游泳时间、降低游泳疲劳小鼠血清乳酸含量或提高游泳疲劳小鼠肝糖原含量相关联的铁皮石斛提取物 HPLC 色谱峰各不相同。

关键词: 铁皮石斛 指纹图谱 谱效分析 抗疲劳 偏最小二乘法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2019)05-0569-08

0 引言

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)是我国传统名贵中药材, 具有益胃生津、滋阴去热的显著功效, 被2015年版《中华人民共和国药典》单列收载^[1]。抗疲劳是铁皮石斛主要药理作用之一^[2], 开展铁皮石斛抗疲劳药效物质基础研究, 有利于促进铁皮石斛相关功效的开发应用。

国内外现代研究表明, 铁皮石斛具有增强免疫

力、抗疲劳、降血糖、抗肿瘤等作用^[3-4]; 对阴虚所致肠胃疾病和糖尿病等具有明确疗效^[5-6], 特别是用于消除癌症放疗、化疗的副作用和恢复体能等方面, 效果十分明显^[7]。铁皮石斛化学成分主要有多糖、芪类、多酚、黄酮、生物碱等^[3-4, 8]。各地人工种植铁皮石斛指纹图谱及其品质有所差异^[9-10]。

随着铁皮石斛药理学研究的深入, 特别是铁皮石斛医疗保健价值的发现与确证, 铁皮石斛人工种植面积及产量均大幅增加, 导致铁皮石斛药材品质参差不齐。虽然铁皮石斛近年被批准为药食两用植物, 但其

* 广西重大科技专项(桂科重 14124002-6)和广西科技基地和人才专项(桂科 AD16380013)资助。

【作者简介】

谢唐贵(1966—), 男, 副研究员, 主要从事心血管药理学研究, E-mail: 505076561@qq.com。

【* * 通信作者】

【引用本文】

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20191024.011

谢唐贵, 陈敬民, 蓝保强, 等. 铁皮石斛抗疲劳作用的谱效关系研究[J]. 广西科学, 2019, 26(5): 569-576, 582.

XIE T G, CHEN J M, LAN B Q, et al. Spectrum-effect relationship between HPLC fingerprints and antifatigue function of *Dendrobium officinale* [J]. Guangxi Sciences, 2019, 26(5): 569-576, 582.

深加工产品比较有限。广西是铁皮石斛道地药材的主产区之一,要实现高质量发展,极其需要药效物质基础研究成果的有力支撑。目前关于铁皮石斛化学成分与药效学的关联性研究鲜有报道。

本研究以游泳时间、游泳疲劳后血清乳酸及肝糖原含量为抗疲劳药效指标,利用偏最小二乘回归法(PLSR)分析铁皮石斛指纹图谱与其抗疲劳作用的关联性,拟为阐明铁皮石斛的抗疲劳药效物质奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药材

铁皮石斛分别采自云南文山、广西凌云、广西桂林和广西容县,经广西中医药研究院中药研究所鉴定为 *Dendrobium officinale* Kinura et Migo。

1.1.2 实验动物

KM 小鼠,雌雄各半,体质量为 18~22 g,SPF 级,购于广西医科大学实验动物中心,生产许可证号:SCXK 桂 2014-0002。

1.1.3 主要试剂

乳酸测试盒和肝糖原测试盒(购自南京建成生物工程研究所);甲醇(色谱纯,购自天津市四友精细化学品有限公司),95%乙醇(食用酒精,购自南宁广耀实验装备有限责任公司),乙腈(色谱纯,购自德国默克公司)。

1.1.4 主要仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪(购自岛津公司),Shim-pack VP-ODS 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm,购自岛津公司);TDL-5-A 低速离心机(上海安亭科学仪器厂生产);B11500-BS 电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械有限公司生产);1510 酶标仪(购自 Thermo Fisher Scientific Oy)。

1.2 方法

1.2.1 样本制备

1.2.1.1 提取物制备

取铁皮石斛干品,粉碎,过药典检验二号筛(24 目)。(1)取铁皮石斛细粉 250 g,加水浸泡 1 h,煎煮提取 3 次,每次 1 h;合并提取液,滤过,浓缩滤液成稠膏,经干燥,即得到水提取物。(2)另取铁皮石斛细粉 250 g,加 95%乙醇浸泡 1 h,加热回流提取 3 次,每次 1 h;合并提取液,滤过,浓缩滤液成稠膏,经干燥,即得到醇提取物。

1.2.1.2 供试品制备

(1)取铁皮石斛水提取物粉末约 1.0 g,精密称定,置锥形瓶中,加 50%甲醇 25 mL,精确称量,加热回流 30 min,放冷至常温;用 50%甲醇补足减失的质量,摇匀;经 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液滤过,得到水提取物供试品溶液。(2)取铁皮石斛醇提取物粉末约 0.2 g,精密称定,置锥形瓶中,加 100%甲醇 25 mL,精确称量,超声处理(240 W,40 kHz,40℃)30 min,放冷;用 100%甲醇补足减失的质量,摇匀;过滤,滤液即为醇提取物供试品溶液。

1.2.1.3 药效实验样品制备

按小鼠每公斤体质量灌胃 40 mL 体积给予生药 1.633 g(即 1.633 g/kg)的要求,称取相当于 4.899 g 生药的水提取物或醇提取物,加适量蒸馏水溶解,配成 120 mL 药液。

1.2.2 指纹图谱^[1]

1.2.2.1 色谱条件

体积流量 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

(1)水提取物

流动相:甲醇(A)—水(B);时间梯度 0 min→10 min→30 min→0 min,甲醇(A)对应的浓度梯度 5%→12%→23%→5%;检测波长为 254 nm;柱温 25℃。

(2)醇提取物

流动相:乙腈(A)—水(B);梯度洗脱:时间梯度 0 min→10 min→38 min→50 min→65 min,乙腈(A)对应的浓度梯度 8%→15%→28%→20%→8%;检测波长为 310 nm;柱温 30℃。

1.2.2.2 方法学考察

对实验方法进行稳定性、重复性、精密度考察,以指纹图谱相似度 RSD 在 4.2%以内,各色谱峰相对保留时间 RSD 在 2.2%以内,为符合分析要求。

1.2.2.3 HPLC 指纹图谱

按 1.2.2.1 项的色谱条件分别记录色谱图。色谱峰经《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 年版)》软件(选择时间窗 0.4,生成色谱的方法:平均值)予以多点校正,自动匹配,分别生成水提取物、醇提取物的对照 HPLC 指纹图谱。

1.2.3 药效实验

各取小鼠 50 只,随机分为正常组、铁皮石斛提取物组。各提取物组分别按 1.633 g/kg(生药/体质量)灌胃给予铁皮石斛提取物,正常组灌胃给予等量蒸馏水,每天 1 次,连续 10 d。

1.2.3.1 负重游泳小鼠游泳时间的测定^[12]

末次给药后 1 h, 使小鼠鼠尾负重 5% 体质量的铅块, 于 (25 ± 1.0) °C 水中进行负重力竭游泳实验, 记录游泳时间。

1.2.3.2 游泳疲劳小鼠血清乳酸及肝糖原的测定^[13]

末次给药后 1 h, 使小鼠不重于 30 °C 水中游泳 90 min, 分别于游泳前 0 min、游泳结束后 0 min、20 min, 经眼球取血测定血清乳酸含量, 游泳结束后 20 min 取肝脏测定肝糖原。

1.2.3.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件分析数据, 实验数据以“均数 ± 标准差” ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析作组间比较。

1.2.4 谱效相关性分析^[14]

1.2.4.1 统计学方法

采用 Simca-p 13.0 软件的偏最小二乘法 (PLSR) 及交叉验证方差分析 (Analysis of variance testing of cross-validated predictive residuals, CV-ANOVA) 开展谱效相关性分析研究, 其中 PLSR 用于建立色谱峰与药效的谱效模型, CV-ANOVA 用于检验 PLSR 分析模型的可靠性。正交信号校正法 (Orthogonal Signal Correction, OSC) 用于色谱峰面积数据处理。

1.2.4.2 谱效相关性分析方法

药效指标游泳时间、肝糖原含量的实验数据预处

理: $Y_n = (\text{各试样组} - \text{正常对照组}) / \text{正常对照组} \times 100\%$ 。

药效指标乳酸含量的实验数据预处理: $Y_n = (\text{正常对照组} - \text{各试样组}) / \text{正常对照组} \times 100\%$ 。

色谱峰面积数据的 OSC 预处理^[15]: 将经预处理的药效数据设为因变量 Y , 各提取物色谱共有峰面积数据设为自变量 X , 采用 Simca-p 13.0 软件建立 PLSR 分析模型, 以 CV-ANOVA 检验该模型有无统计学意义。如所建模型无统计学意义 ($P > 0.05$), 则采用上述软件 OSC 对色谱峰面积数据进行过滤, 分解 X 数据为两部分, 与 Y 垂直、对药效 Y 无贡献的部分舍去, 与药效 Y 密切相关的部分记为 X_o 。以 X_o 为自变量, 采用上述软件建立 PLSR 分析模型, 以 CV-ANOVA 检验模型的统计学意义。

2 结果与分析

2.1 指纹图谱特征峰

按 1.2.2.3 节的操作, 分别获得铁皮石斛水提取物和醇提取物的对照指纹图谱。分别查看各提取物色谱图峰的响应值, 把具有 3 个以上共有峰和(或)具有 2 个较大响应值的共有峰列为研究对象, 分别将各提取物进样量换算为毫克生药, 以校正相应提取物共有峰面积数据, 对应不出峰的峰面积作为 0 处理, 得到 30 个特征相对明显的共有峰。4 个产地铁皮石斛提取物的指纹色谱峰数据见表 1。

表 1 各样本色谱峰对应的校正峰面积

Table 1 Corrected peak area corresponding to chromatographic peak of samples

色谱峰 Chromatographic peak	保留时间 Retention time (min)	醇提取物 OD OD of ethanolic extract				水提取物 OD OD of water extract			
		文山 Wenshan	桂林 Guilin	凌云 Lingyun	容县 Rongxian	文山 Wenshan	桂林 Guilin	凌云 Lingyu	容县 Rongxian
X_1	2.698	92 714	143 500	154 857	172 547	0	0	0	0
X_2	3.158	11 731	20 493	27 595	26 524	28 059	59 469	12 562	40 019
X_3	3.260	64 887	145 839	143 434	158 492	0	0	0	0
X_4	3.385	0	0	0	0	78 505	55 398	41 365	67 652
X_5	4.231	34 638	45 914	46 554	50 721	0	0	0	0
X_6	4.913	0	0	0	0	13 771	35 417	44 493	8 950
X_7	5.140	32 536	19 639	10 926	12 602	0	0	0	0
X_8	5.729	0	0	0	0	98 252	61 684	40 168	81 442
X_9	6.220	91 846	134 849	175 525	158 696	0	0	0	0
X_{10}	7.039	0	0	0	0	12 087	19 543	36 681	19 989
X_{11}	7.940	57 003	903 169	966 541	1 283 091	280 781	175 150	113 923	224 463
X_{12}	9.790	13 131	0	0	0	0	11 866	20 469	0
X_{13}	11.235	4 051	6 484	0	8 646	105 380	88 659	48 836	60 019

续表 1

Continued table 1

色谱峰 Chromatographic peak	保留时间 Retention time (min)	醇提取物 OD OD of ethanolic extract				水提取物 OD OD of water extract			
		文山 Wenshan	桂林 Guilin	凌云 Lingyun	容县 Rongxian	文山 Wenshan	桂林 Guilin	凌云 Lingyu	容县 Rongxian
X ₁₄	11.926	0	0	0	0	72 081	90 288	31 482	33 639
X ₁₅	13.049	0	0	0	0	152 366	36 394	63 608	115 213
X ₁₆	14.565	0	0	0	25 111	5 731	34 617	7 154	13 899
X ₁₇	15.121	0	0	0	0	45 814	27 945	19 518	0
X ₁₈	16.528	0	0	0	0	59 892	37 039	15 864	33 612
X ₁₉	16.677	0	0	0	0	0	7 720	8 347	8 298
X ₂₀	18.109	30 720	63 351	43 770	65 512	0	0	0	0
X ₂₁	19.051	0	12 321	0	0	41 628	29 803	19 397	21 260
X ₂₂	20.085	22 626	59 311	24 143	15 323	0	0	0	0
X ₂₃	20.810	0	0	0	0	338 184	179 221	135 753	290 501
X ₂₄	21.683	12 836	24 527	25 129	65 888	22 460	0	19 442	15 441
X ₂₅	22.545	8 669	35 319	29 832	58 559	0	0	0	0
X ₂₆	23.039	16 483	58 553	28 732	0	0	0	0	0
X ₂₇	23.640	0	0	0	0	16 169	11 601	51 390	47 365
X ₂₈	24.060	0	0	0	0	0	8 807	32 004	23 516
X ₂₉	24.511	0	50 055	40 496	0	0	0	0	0
X ₃₀	25.236	58 880	55 695	75 621	147 678	0	0	0	0

2.2 对负重游泳小鼠游泳时间的影响

与对照组比较,各产地铁皮石斛提取物组小鼠游泳时间分别延长 38.8%~115.2%,差异极其显著 ($P<0.01$),详见表 2。

2.3 对游泳疲劳小鼠血乳酸及肝糖原的影响

与对照组比较,各产地铁皮石斛提取物组小鼠血液中乳酸含量分别降低 3.0%~8.3%,肝糖含量分别增加 38.5%~119.0%,其差异有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$)。

2.4 谱效分析

将色谱峰面积作为自变量 X ,经中心化 (Zero-centered) 处理;药效指标作为因变量 Y ,经 Unit Variance Scaling (UV) 处理。

2.4.1 指纹图谱与游泳时间的谱效分析

因以游泳时间为因变量 Y ,以色谱共有峰面积为自变量 X ,以 Simca-p 13.0 软件建立的 PLSR 分析模型无统计学意义,就以 OSC 滤过色谱共有峰面积数据得到自变量 X_0 ,再以 Y 与 X_0 建立 PLSR 分析模型。经 CV-ANOVA 检验有统计学意义 ($P<0.05$), R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 累计值分别为 0.575, 0.996 和 0.936,说明该模型对药效 Y 有较强的解释能力和预测能力。在 X_0 相对于 Y 有统计学意义的 10 个回归系数中,正回归系数有 4 个,分别对应色谱峰 X_4 、 X_8 、 X_{15} 、 X_{23} ;负回归系数有 6 个,分别对应色谱峰

X_1 、 X_3 、 X_9 、 X_{11} 、 X_{24} 、 X_{25} 。实验结果分析表明,各色谱共有峰与力竭游泳小鼠的游泳时间之间有着明显的相关性,见图 1、表 4。

表 2 铁皮石斛提取物对负重游泳小鼠游泳时间的影响 ($x \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of *Dendrobium officinale* extract on swimming time of weight-bearing swimming mice ($x \pm s, n=10$)

组别 Group	来源 Source	剂量 Dose (g/kg)	游泳时间 Swimming time (s)
对照组 Control	—	—	459.0±68.8
水提取物 Water extract	文山 Wenshan	1.633	822.8±323.6 ^a
	桂林 Guilin	1.633	988.0±485.1 ^a
	凌云 Lingyun	1.633	637.0±153.4 ^a
	容县 Rongxian	1.633	964.8±485.6 ^a
	醇提取物 Ethanolic extract	文山 Wenshan	1.633
桂林 Guilin		1.633	985.5±490.1 ^a
凌云 Lingyun		1.633	690.5±208.8 ^a
容县 Rongxian		1.633	741.5±254.2 ^a

注:剂量为小鼠每 kg 体重质量给予生药的 g 数;与对照组比较,^a 表示 $P<0.01$

Note: The dose is the g number of raw drugs given to per kg body weight of mice; compared with control group, ^a indicates $P<0.01$

表 3 铁皮石斛提取物对游泳疲劳小鼠血乳酸及肝糖原的影响 ($x \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of *Dendrobium officinale* extract on blood lactic acid levels and liver glycogen levels in swimming fatigue mice ($x \pm s, n = 10$)

组别 Group	来源 Source	剂量 Dose (g/kg)	乳酸 Lactic acid (mmol/L)	肝糖原 Hepatic glycogen (mg/g)
对照组 Control group	—	—	435.7 ± 11.9	4.31 ± 1.36
水提取物 Water extract	文山 Wenshan	1.633	418.1 ± 18.1 ^a	7.19 ± 2.46 ^b
	桂林 Guilin	1.633	417.7 ± 8.7 ^b	5.97 ± 1.86 ^a
	凌云 Lingyun	1.633	421.0 ± 16.0 ^a	9.34 ± 2.03 ^c
	容县 Rongxian	1.633	422.5 ± 9.5 ^a	9.29 ± 1.46 ^c
醇提取物 Ethanol extract	文山 Wenshan	1.633	399.6 ± 18.7 ^c	9.44 ± 2.38 ^c
	桂林 Guilin	1.633	412.9 ± 18.9 ^b	7.65 ± 2.26 ^b
	凌云 Lingyun	1.633	408.6 ± 6.3 ^c	8.41 ± 1.29 ^c
	容县 Rongxian	1.633	406.0 ± 13.9 ^c	7.75 ± 3.26 ^b

注: 剂量为小鼠每 kg 体质量给予生药的 g 数。与对照组比较, ^a 表示 $P < 0.05$; ^b 表示 $P < 0.01$; ^c 表示 $P < 0.001$

Note: The dose is the g number of raw drugs given to per kg body weight of mice; compared with control group, ^a indicates $P < 0.05$; ^b indicates $P < 0.01$; ^c indicates $P < 0.001$

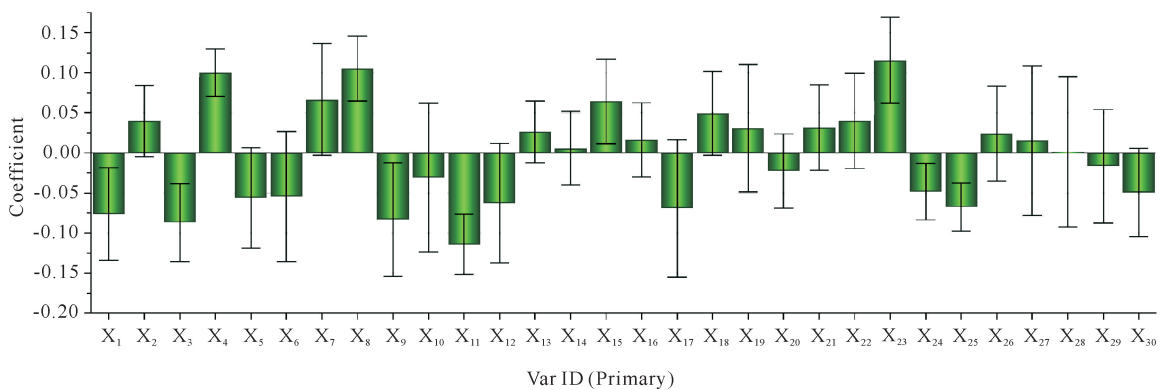


图 1 经 OSC 处理的色谱峰面积对游泳时间的回归系数

Fig. 1 Regression coefficient of peak area for swimming time treated by OSC

表 4 OSC 处理前后 PLSR 建模的相关参数

Table 4 Relevant parameters of PLSR modeling before or after OSC processing

药效指标 Pharmacodynamic indicators	分析模型 Analysis model	OSC 成分数 OSC component number	PLSR 成分数 PLSR component number	模型 P 值 P value of model	累计 $R^2 X$ Sum of square of X explained by the extracted components	累计 $R^2 Y$ Sum of square of Y explained by the extracted components	累计 Q^2 Cumulative cross validated Q^2
乳酸含量 Lactic acid content	PLS	0	2	0.346 7	0.698	0.993	0.537
肝糖原含量 Hepatic glycogen content	PLS	0	0	—	—	—	—

续表 4

Continued table 4

药效指标 Pharmacodynamic indicators	分析模型 Analysis model	OSC 成分数 OSC component number	PLSR 成分数 PLSR component number	模型 P 值 P value of model	累计 $R^2 X$ Sum of square of X explained by the extracted components	累计 $R^2 Y$ Sum of square of Y explained by the extracted components	累计 Q^2 Cumulative cross validated Q^2
游泳时间 Swimming time	PLS	0	0	—	—	—	—
乳酸含量 Lactic acid content	OSC+PLSR	2	2	0.001 4	0.828	0.996	0.980
肝糖原含量 Hepatic glycogen content	OSC+PLSR	2	1	0.016 9	0.338	0.995	0.804
游泳时间 Swimming time	OSC+PLSR	3	2	0.029 1	0.574	0.997	0.936

2.4.2 指纹图谱与乳酸含量的谱效分析

按照 1.2.4.1 项的操作,应用 Simca-p 13.0 软件对乳酸含量因变量 Y 及指纹图谱色谱峰进行谱效分析,获得 X₀ 相对于 Y 有统计学意义的 19 个回归系数,其中,正回归系数 10 个,分别对应色谱峰 X₁、

X₃、X₅、X₇、X₉、X₁₁、X₂₀、X₂₄、X₂₅、X₃₀,负回归系数 9 个,分别对应色谱峰 X₄、X₈、X₁₀、X₁₃、X₁₅、X₁₈、X₂₁、X₂₃、X₂₇。这表明各色谱共有峰与游泳小鼠的乳酸含量之间有着明显的相关性,见表 4、图 2。

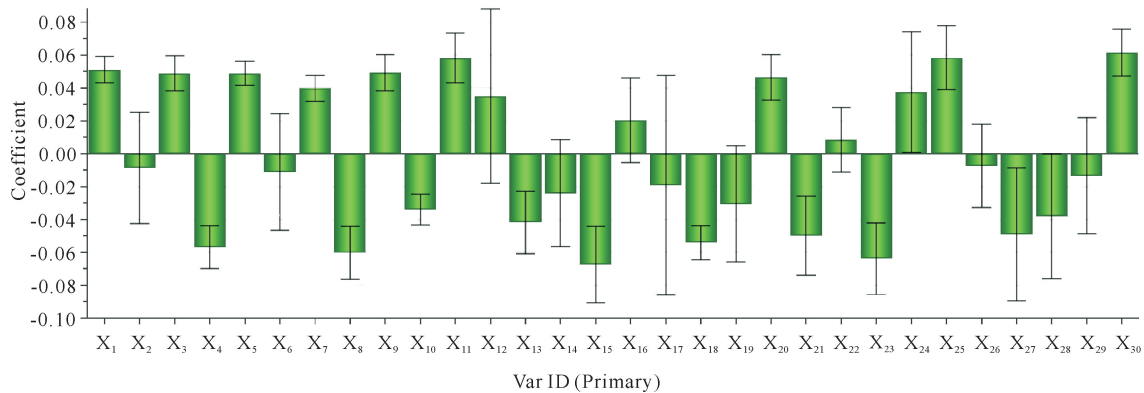


图 2 经 OSC 处理的色谱峰面积对血清乳酸含量的回归系数

Fig. 2 Regression coefficient of Serum lactic acid content by spectrum peak area treated by OSC

2.4.3 指纹图谱与肝糖原含量的谱效分析

按照 1.2.4.1 项的操作,应用 Simca-p 13.0 软件对肝糖原含量因变量 Y 及指纹图谱色谱峰进行谱效分析,获得 X₀ 相对于 Y 有统计学意义的 12 个回归系数,其中,正回归系数 2 个,分别对应色谱峰

X₂₇、X₂₈,负回归系数 10 个,对应色谱峰 X₄、X₈、X₁₁、X₁₃、X₁₄、X₁₇、X₁₈、X₂₁、X₂₃、X₂₅。这表明各色谱共有峰与游泳小鼠的肝糖原含量之间有着明显的相关性,见表 4、图 3。

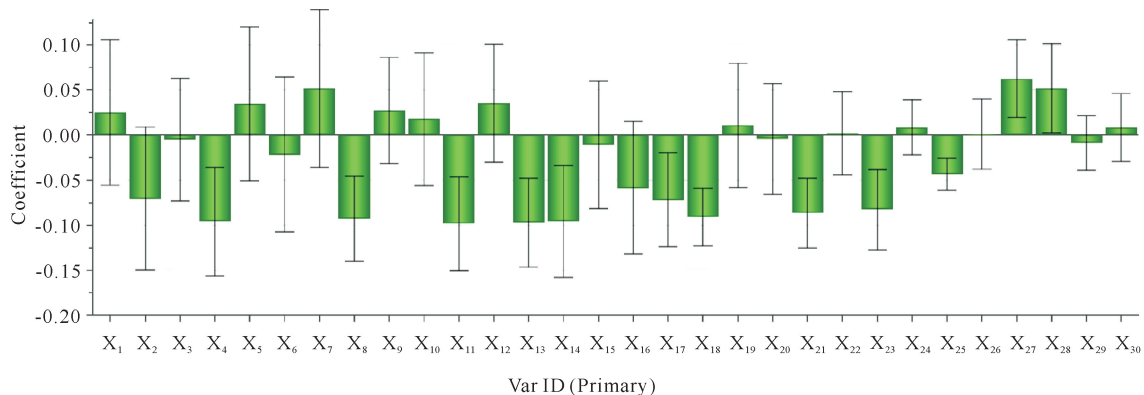


图3 经 OSC 处理的色谱峰面积对肝糖原含量的回归系数

Fig. 3 Regression coefficient of chromatographic peak area to liver glycogen content treated by OSC

3 讨论

铁皮石斛在不同品种石斛中占有着重要的地位,但目前市场上铁皮石斛质量参差不齐^[16]。质量控制是提高药材质量的重要手段,而指纹图谱技术是实现药材质控及药材国际化的关键技术^[17]。本实验以指纹图谱各色谱峰峰面积作为各成分的含量指标,监控不同产地铁皮石斛提取物的内在质量。从指纹图谱结果可知,铁皮石斛不同产地之间总体上色谱峰均相同,但不同产地之间保留时间基本一致的色谱峰面积有一定差别;铁皮石斛不同溶剂提取物之间色谱峰面积有较大差异,这从技术层面说明不同产地药材药效有强弱区别、不同溶剂提取对药效有较大影响。

运动耐力降低是疲劳的最直观表现,而负重游泳力竭实验和游泳疲劳实验是经典的抗疲劳药效实验^[18]。力竭游泳时间是反映运动耐力的重要指标^[19]。在本实验中,4个产地铁皮石斛提取物组负重小鼠力竭游泳时间均显著延长,表明铁皮石斛提取物具有较强的提高运动耐力、延缓运动疲劳的作用。在生化层面上,机体内血中乳酸含量与机体疲劳程度呈正相关,肝糖原含量与机体供能呈正相关,在本实验中,4个产地铁皮石斛提取物组疲劳小鼠乳酸含量各有下降、肝糖原含量均明显增加,表明铁皮石斛提取物具有较强的抗疲劳作用。对于游泳时间、乳酸含量及肝糖原含量指标的影响,各产地或不同溶剂提取的提取物之间有较大差别,反映出药材质量的差异性。

利用中药指纹图谱技术与统计学分析方法,考察化学成分变化与中药药效强弱的关联性,研究两者的“谱-效”关系^[20-21],有助于阐明药效物质基础和提高了药材质量控制水平。本实验选择 PLSR 方法分析铁

皮石斛指纹图谱与其抗疲劳作用之间的关联性,各色谱共有峰面积数据分别经 OSC 方法过滤,得到与药效密切相关的数据 X_0 作为自变量。经 PLSR 建模分析, X_0 相对于游泳时间的正回归系数有 4 个,其色谱峰均来自水提取物,这表明延长游泳时间的铁皮石斛化学成分主要在水提取物中,分别对应第 4, 8, 15, 23 号色谱峰; X_0 相对于乳酸含量的正回归系数有 10 个,其中 8 个为醇提取物色谱峰,2 个为醇提取物和水提取物共有色谱峰,但醇提取物色谱峰面积分别为水提取物的 4.0 和 2.2 倍,这表明降低机体乳酸含量的铁皮石斛化学成分主要在醇提取物中,分别对应第 1, 3, 5, 7, 9, 11, 20, 24, 25, 30 号色谱峰; X_0 与肝糖原含量的正回归系数仅 2 个,均来自水提取物色谱峰,这表明提高肝糖原含量的铁皮石斛化学成分主要在水提取物中,分别对应 27, 28 号色谱峰。

4 结论

不同产地铁皮石斛水提取物和醇提取物均有抗疲劳作用, PLSR 能较好地表征铁皮石斛液相色谱与其药效之间的相关性,延长游泳时间、降低机体乳酸含量或提高肝糖原含量等药效的铁皮石斛主要化学成分各不相同,为进一步阐明铁皮石斛抗疲劳药效物质基础和促进铁皮石斛相关产品开发提供了科学依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 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, 2015:282-283.
- [2] 吕圭源, 颜美秋, 陈素红. 铁皮石斛功效相关药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(4):489-493.

- [3] 孙恒,胡强,金航,等. 铁皮石斛化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 225-234.
- [4] FAN Y, LUO A. Evaluation of anti-tumor activity of water-soluble polysaccharides from *Dendrobium denneanum* [J]. African Journal of Pharmacy Pharmacology, 2011, 5(3): 415-420.
- [5] 张崇霞, 巩金. 铁皮枫斗晶临床疗效观察[J]. 浙江中医杂志, 1996(1): 43.
- [6] 吴人照, 陈军贤, 夏亮, 等. 铁皮枫斗颗粒(胶囊)治疗慢性萎缩性胃炎气阴两虚证临床研究[J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(10): 28-29.
- [7] 陈晓萍, 张沂平, 朱娴如, 等. 铁皮枫斗颗粒(胶囊)治疗肺癌放化疗患者气阴两虚证的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(5): 394-397.
- [8] XING X, CUI S W, NIE S, et al. Study on *Dendrobium officinale* O-acetyl-glucomannan (Dendronan); Part 1. Extraction, purification, and partial structural characterization [J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2014, 4(1): 74-83.
- [9] 龚庆芳, 周浩, 王新桂, 等. 不同产地铁皮石斛的品质比较研究[J]. 北方园艺, 2013(8): 162-165.
- [10] 何铁光, 卢声仙, 王爱勤, 等. 广西铁皮石斛 HPLC 指纹图谱研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(3): 353-358, 320.
- [11] 刘会民, 刘腾飞, 刘蓬蓬. 六神曲不同产地的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中医药导报, 2015, 21(12): 24-26.
- [12] 鹿伟, 陈玉满, 徐彩菊, 等. 铁皮石斛抗疲劳作用研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(10): 2488-2490.
- [13] 肖云峰, 王玉华, 丛丽华, 等. 羊外肾胶囊抗疲劳作用机制研究[J]. 中医药导报, 2015, 21(13): 46-48.
- [14] 邓书鸿, 宋丽, 段小菊, 等. 黄芪提取物 HPLC 指纹图谱与抗疲劳作用的相关分析[J]. 中药材, 2013, 26(2): 260-264.
- [15] ZHENG Q, ZHAO Y, WANG J, et al. Spectrum-effect relationships between UPLC fingerprints and bioactivities of crude secondary roots of *Aconitum carmichaelii* Debeaux (Fuzi) and its three processed products on mitochondrial growth coupled with canonical correlation analysis [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2014, 153(3): 615-623.
- [16] 魏鑫鑫, 孙志蓉, 刘文兰, 等. 安国药材市场中石斛质量现状的调查研究[J]. 中医药导报, 2015, 21(9): 46-48.
- [17] 张信青, 蒋孟良, 崔淑芬, 等. 浅谈指纹图谱在中药饮片质量控制中应用的可行性[J]. 中医药导报, 2005, 11(3): 55-58.
- [18] 常柄权, 黄山, 李斌, 等. 复方玛咖黑蒜颗粒抗疲劳与耐缺氧作用研究[J]. 中医药导报, 2017, 23(13): 18-21.
- [19] 俞浩, 张成孜, 毛斌斌. 滁菊多糖抗疲劳耐缺氧作用效果观察[J]. 食品工业科技, 2014, 35(12): 365-367, 372.
- [20] 吕邵娃, 董书羽, 郭玉岩, 等. 数据分析技术在中药谱效关系中的应用进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(15): 226-230.
- [21] 邓书鸿, 聂磊. 中药谱效关系的分析方法及数据处理技术研究进展[J]. 中药材, 2010, 33(11): 1819-1823.

(下转第 582 页 Continued on page 582)

The Extracts from Leaf of *Ambroma augustum* Inhibit the Activity of Alpha-glucosidase and the Chemical Constitution Study

HU Ying¹, CHEN Lu¹, JIANG Caihua¹, LING Lanxin², SU Jian²

(1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530200, China; 2. Guangxi Scientific Research Center of Traditional Chinese Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530200, China)

Abstract: To study the inhibition of extracts from leaf of *Ambroma augustum* to alpha-glucosidase and the chemical constitution of the extract, systematic solvent extracts from leaf of *Ambroma augustum* were prepared to test the inhibition to alpha-glucosidase. A GC-MS method was used to analyze the chemical constitution. The results showed that the extraction sites of n-hexane, chloroform and methanol had strong inhibitory effects on α -glucosidase, and the inhibition curves of different extraction sites were also different. The results of GC-MS detected 23 compounds with high correlation. It indicated that extracts from the leaf of *Ambroma augustum* inhibit the activity of glucosidase, and 23 chemical components from the leaf were detected by GC-MS, whose active components were to be further confirmed.

Key words: *Ambroma augustum*, alpha-glucosidase, chemical components, GC-MS, diabetes

责任编辑:米慧芝

(上接第 576 页 Continue from page 576)

Spectrum-effect Relationship between HPLC Fingerprints and Antifatigue Function of *Dendrobium officinale*

XIE Tanggui^{1,2}, CHEN Jingmin¹, LAN Baoqiang^{1,2}, JIANG Zhenou^{1,2}, LI Yanjing^{1,2}

(1. Guangxi Institute of Traditional Medicine and Pharmaceutical Science, Nanning, Guangxi, 530022, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning, Guangxi, 530022, China)

Abstract: The correlation between the HPLC fingerprints of *Dendrobium officinale* (DO) extracts and its anti-fatigue effects were explored to provide an evidence for clarifying the substances foundation of its anti-fatigue efficacy. In this study, *Dendrobium officinale* was collected from four different producing areas, and the water extracts, ethanol extract and HPLC fingerprints chromatography were prepared. The mice were tested for loaded swimming and swimming fatigue, and the exhaustive swimming time was recorded, the serum lactic acid content and liver glycogen content were detected to analyze the anti-fatigue effect. Finally, the partial least squares regression method was used to study the correlation between the common peak area and the efficacy of fingerprints of each extract. The results were as follows: The water extracts of DO from various producing areas and the HPLC fingerprints chromatography of ethanol extract were obtained, and 30 characteristic peaks were extracted. The water extract and ethanol extract of DO significantly prolonged the exhaustive swimming time of mice, reduced the serum lactic acid content in mice with swimming fatigue, and increased the liver glycogen content of mice with swimming fatigue. Peaks of No. 4, 8, 15, 23 were related with the effect of DO on prolonging swimming time, peaks of No. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 20, 24, 25, 30 were related with the effect of DO on decreasing lactic acid, peaks of No. 27, 28 were related with the effect of DO on increasing the content of liver glycogen. The experimental results preliminarily proved that the anti-fatigue effect of DO was significant, and the HPLC peaks of DO extracts associated with prolonged swimming exhaustion time, decreased serum lactic acid content in swimming fatigue mice, or increased liver glycogen content in swimming fatigue mice were different.

Key words: *Dendrobium officinale*, fingerprint, spectrum-effect analysis, anti-fatigue, partial least squares regression analysis

责任编辑:陆雁