

文章编号:1001-6880(2016)5-0754-07

大王马先蒿苯丙素类含量测定及有效部位抗疲劳活性研究

褚洪标*, 张志华, 陈冬, 王茜

井冈山大学医学院, 吉安 343009

摘要:建立了大王马先蒿中红景天苷、毛蕊花苷、异毛蕊花苷、米团花苷 A、紫地黄苷 D 和角胡麻苷等 6 种苯丙素类成分的测定方法,并利用大孔吸附树脂制备有效部位,评价有效部位的抗疲劳、耐缺氧活性。采用 ZORBAX-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱,以水(A)-甲醇(B)溶液为流动相,梯度洗脱(0~10 min, 63% A; 10~10.5 min, 63%→58% A; 10.5~40 min, 58% A),流速 1 mL/min,检测波长 0~4 min 为 275 nm, 4~40 min 为 330 nm, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL; 利用 D₁₀₁ 大孔吸附树脂梯度洗脱方法,制备苯丙素类成分有效部位,通过小鼠负重游泳、耐缺氧模型,观察不同剂量组小鼠力竭游泳时间及密闭缺氧存活时间。结果表明 6 种苯丙素类成分进样量分别在 2.10~8.40、13.60~54.40、0.93~3.72、0.53~2.12、1.50~6.00、0.37~1.28 范围内线性关系良好,平均加样回收率($n=6$)均在 98%~102% 范围内。有效部位制取率为 0.62%, 6 种苯丙素类成分总含量达到 65% 以上。高、中、低剂量组小鼠的力竭时间和缺氧存活时间明显高于空白对照组($P<0.01$)。本实验分析方法准确、简便、重复性好,可作为大王马先蒿中 6 种苯丙素类成分的含量测定方法。苯丙素有效部位能延长小鼠游泳时间,并明显延长小鼠在常压缺氧的存活时间,增强小鼠耐缺氧能力,提示大王马先蒿具有促进恢复和消除疲劳及提高运动能力的效用。

关键词:大王马先蒿; 苯丙素类; 高效液相色谱法; 有效部位; 抗疲劳; 耐缺氧

中图分类号:R917

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.5.021

Determination of Phenylpropanoids and Anti-fatigue Activity of Effective Fractions of *Pedicularis rex*

CHU Hong-biao*, ZHANG Zhi-hua, CHEN Dong, WANG Xi

The Medical School of Jinggangshan University, Ji'an 343009, China

Abstract: The aim of this study was to establish an HPLC method for simultaneous determination of salidroside, verbascoside, iso-verbascoside, leucoseptoside A, jionoside D and martynoside in *Pedicularis rex*, and to evaluate the anti-fatigue and anoxia endurance activities of *P. rex* extract. The chromatographic separation was carried out on a ZORBAX-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column, with mobile phases: H₂O (A) -MeOH (B) (0~10 min, 63% A; 10~10.5 min, 63%→58% A; 10.5~40 min, 58% A), at the flow rate of 1.0 mL/min and detection wavelength was set at 275 nm (0~4 min) and 330 nm (4~40 min). The column temperature was maintained at 35 °C. The injection volume was 10 μL. The effective fractions of phenylpropanoids were prepared by macroporous adsorption resin. The contents of salidroside, verbascoside, iso-verbascoside, leucoseptoside A, jionoside D and martynoside had good linear relationship with in the ranges of 2.10~8.40, 13.60~54.40, 0.93~3.72, 0.53~2.12, 1.50~6.00, 0.37~1.28, respectively, and the average recoveries of the 6 phenylpropanoids were all in the range of 98%~102%. The extraction yield of effective fractions was 0.62% with total contents of phenylpropanoids higher than 65%. The exhaustive swimming time and anoxia endurance time of three dosages groups were higher than those of the vehicle ($P<0.01$). The HPLC method was reliable, simple and accurate. It can be used for the quality control of *P. rex*. This experiment suggested that *P. rex* had the effect of promoting recovery, eliminating fatigue and improving exercise capacity.

Key words: *Pedicularis rex*; phenylpropanoids; HPLC; effective fractions; anti-fatigue; anoxia endurance

马先蒿属 (*Pedicularis*. L.) 植物资源丰富, 药用种类繁多, 药用历史悠久, 在《神农本草经》、《晶珠本草》、《藏药经典》等本草著作中皆有该属植物药用的记载^[1,2]。马先蒿属植物普遍含有苯丙素或环

收稿日期:2015-12-25 接受日期:2016-04-06

基金项目:国家自然科学基金(31260084);江西省自然科学基金
(20142BAB205024)

* 通讯作者 E-mail:hongbiaochu@163.com

烯醚萜类化合物,其中苯丙素苷具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、清除自由基、延缓骨骼肌疲劳、DNA 碱基修复等多种显著的生理作用,引起人们广泛的兴趣和关注^[3,4]。马先蒿属植物的主要成分毛蕊花苷、角胡麻苷能提高机体的抗氧化能力,显示抗运动性贫血作用^[5]。

大王马先蒿(*Pedicularis rex*)是马先蒿属之一,全草性平、微苦辛、清热解毒,被广泛用于麻疹、慢性肝炎、风湿麻痹等疾病的治疗^[6]。本课题组前期曾从其全草乙醇提取物中分离到 16 种化学成分,主要包括苯丙素、环烯醚萜、黄酮等类型^[7]。目前针对红景天苷或毛蕊花苷成分分析的测定方法较多,而针对一系列苯丙素类似物的研究较少。作为其主要有效成分的苯丙素苷,有必要建立快速、准确、可靠的分析方法对其进行定性定量分析,使之成为有用的中药质量控制指标。由于提取方法对有效成分的提取效率影响很大,本实验采用超声、回流和闪式提取等 3 种方法,来探究大王马先蒿不同方法的提取率及含量。

越来越多的证据表明,由系列天然类似物构成的植物提取物由于具有相似的核心结构,能更有效的作用于靶点,其生物活性往往优于单一成分的药物^[8]。针对系列天然类似物进行有效部位的制备及活性测试,近年来成为中药、天然药物新药开发的重要方向之一。

鉴于苯丙素类成分在马先蒿属植物中分布广泛,含量较高,开发价值较大,本实验旨在建立高效液相色谱同时测定大王马先蒿中红景天苷、毛蕊花苷、异毛蕊花苷、米团花苷 A、紫地黄苷 D 和角胡麻苷等 6 种苯丙素类成分含量的分析方法,便于评价及控制该药用植物的品质。基于上述分析方法,采用大孔吸附树脂分离富集技术,筛选制备总苯丙素含量不低于 50% 的大王马先蒿有效部位,并对有效部位进行抗疲劳、耐缺氧活性评价,从而为该药用植物的综合利用和深入开发提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司, Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器); DV215CD 电子天平(美国奥豪斯); SL-250 型超声波清洗器(上海生析超声仪器有限公司); R210 旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI); DG-160 中药材粉碎机(浙

江瑞安飞达药材器械厂); ZHBE-50 闪式提取器(河南智晶生物科技发展有限公司); 沃特浦微量有机除热原型超纯水机(四川沃特尔水处理设备有限公司)。

1.2 试药与试剂

样品于 2013 年 8 月采集于云南省香格里拉,由井冈山大学医学院生药学教研室梁兆昌教授鉴定为大王马先蒿(*Pedicularis rex*)。对照品红景天苷、毛蕊花苷、异毛蕊花苷、米团花苷 A、紫地黄苷 D 和角胡麻苷均为实验室自制(高效液相色谱法测定峰面积,纯度 >98%)。D₁₀₁ 大孔吸附树脂(天津兴南允能高分子技术有限公司), 央科藏域红天胶囊(西藏央科生物科技有限公司), 钠石灰(上海纳辉干燥试剂厂), 甲醇为色谱纯, 娃哈哈纯净水, 其余试剂为分析纯。

1.3 实验动物

清洁级昆明种小鼠,平均体质量 20 g,雌雄各半,共 120 只(湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号[湘] 2011-0003)。

2 实验方法

2.1 大王马先蒿苯丙素类成分含量的测定

2.1.1 混合对照品储备液的配制

分别称取 6 种苯丙素类成分对照品适量,以甲醇为溶剂,配制成含红景天苷 2.10 mg/mL、毛蕊花苷 13.60 mg/mL、异毛蕊花苷 1.00 mg/mL、米团花苷 A 0.60 mg/mL、紫地黄苷 D 1.50 mg/mL、角胡麻苷 0.40 mg/mL 的母液。各取母液适量,配制成含红景天苷 420 μg/mL、毛蕊花苷 2720 μg/mL、异毛蕊花苷 186 μg/mL、米团花苷 A 106 μg/mL、紫地黄苷 D 300 μg/mL、角胡麻苷 74 μg/mL 的混合溶液,储存于 4 ℃ 的冰箱中,备用。

2.1.2 供试品溶液的制备

2.1.2.1 超声提取法供试品溶液制备

将干燥的大王马先蒿全草样品粉碎,过 80 目筛,干燥条件下保存备用。准确称量粉末 50 g,加甲醇 500 mL,用 1000 mL 锥形瓶在超声波清洗器中超声提取 30 min,再将药渣重复上述步骤超声提取一次,过滤,滤液浓缩至 100 mL,经 0.45 μm 有机滤膜过滤后供高效液相分析。

2.1.2.2 回流提取法供试品溶液制备

准确称量上述粉末 50 g,加甲醇 500 mL,用 1000 mL 圆底烧瓶回流提取 1 h,再将药渣重复上述

步骤一次,过滤,滤液浓缩至 100 mL,经 0.45 μm 有机滤膜过滤后供高效液相分析。

2.1.2.3 闪式提取法供试品溶液制备

准确称量大王马先蒿粉末 50 g,加甲醇 500 mL,利用闪式提取器提取 6 min,再将药渣重复上述步骤一次,过滤,滤液浓缩至 100 mL,经 0.45 μm 有机滤膜过滤后供高效液相分析。

2.1.3 色谱条件

采用 ZORBAX-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱,以水(A)-甲醇(B)溶液为流动相,梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 63% A; 10 ~ 10.5 min, 63% → 58% A; 10.5 ~ 40 min, 58% A),流速 1 mL/min,检测波长 0 ~ 4 min 为 275 nm, 4 ~ 40 min 为 330 nm,柱温 35 °C,进样量 10 μL 。

2.1.4 方法学考察

2.1.4.1 线性关系考察

取“2.1.1”项下混合对照品溶液,分别进样 5、7.5、10、15、17.5、20 μL ,按“2.1.3”项下色谱条件测定。以对照品进样量 X(μg)为横坐标,相应的峰面积 Y 为纵坐标,绘制标准曲线,得到线性回归方程。

2.1.4.2 精密度试验

取对照品溶液连续进样 6 次,每次 10 μL ,按“2.1.3”项下色谱条件测定峰面积,计算峰面积的相对标准偏差 RSD。

2.1.4.3 重复性试验

取大王马先蒿同一样品 5 份,按“2.1.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.3”项下色谱条件测定峰面积,计算峰面积的相对标准偏差 RSD。

2.1.4.4 稳定性试验

取同一供试品溶液,分别于 0、2、4、8、10、12 h 进样 10 μL ,按“2.1.3”项下色谱条件测定峰面积,计算峰面积的相对标准偏差 RSD。

2.1.4.5 加样回收率试验

精密称取 6 份已测含量的大王马先蒿粉末适量,精密加入适量的红景天苷、毛蕊花苷、异毛蕊花苷、米团花苷 A、紫地黄苷 D 和角胡麻苷,按“2.1.2.3”项下方法制备所需溶液,按“2.1.3”项下色谱条件测定,计算加样回收率。

2.2 大王马先蒿苯丙素有效部位的制备

2.2.1 大孔吸附树脂的预处理

取 D₁₀₁ 大孔树脂适量 300 g,置于 1000 mL 烧杯中,加入 600 mL 无水乙醇淹没树脂,浸泡 10 h 左

右。将 500 mL 树脂(体积)缓慢加入柱子中(树脂柱的径高比为 1:7),再用去离子水冲洗柱子至无乙醇味,最后用去离子水淹没树脂保存备用。

2.2.2 有效部位的制备

取大王马先蒿粉末 300 g,按“2.1.2”项下方法加入 3000 mL 甲醇,设置闪式提取器工作电压为 50 V,提取时间 6 min,过滤,收集滤液;再将药渣重复上述步骤提取一次,过滤,合并收集两次滤液,浓缩蒸干用纯水定容至 1000 mL。溶液缓慢流经树脂柱,流速为 5 mL/min,弃去流出液,用 2000 mL 蒸馏水洗涤柱体,弃去洗涤液,接着用 20% 甲醇 2000 mL 洗脱,待充分洗脱完毕,弃去流出液,继续用 30%、50% 甲醇洗脱,收集洗脱液,减压浓缩。

2.3 大王马先蒿苯丙素类成分活性评价

2.3.1 抗疲劳小鼠负重游泳试验

参照文献^[9],用有机玻璃自制成控温循环流水游泳池(45 cm × 60 cm × 50 cm),水深 25 cm,水温 25 ± 1 °C,小鼠 60 只,雌雄兼有,按实验要求随机分成空白对照组(10 mL/kg, Vehicle)、阳性药红景天胶囊组(0.180 g/kg, Control)、大王马先蒿有效部位高剂量组(0.080 g/kg, High)、中剂量组(0.040 g/kg, Medium)、低剂量组(0.020 g/kg, Low),每组 12 只。小鼠均灌胃给药,给药量均为 10 mL/kg,每天一次,连续 7 d。末次给药 30 min 后,小鼠尾根部负荷 5% 体质量的铅丝,置于水中游泳。每次每组各下水 1 只小鼠,小鼠游泳力竭指标以小鼠第 2 次下沉于水面的时间大于 4 s 为准。记录游泳时间,以各组游泳时间的均值进行比较。

2.3.2 小鼠耐缺氧试验^[9]

小鼠 60 只,雌雄兼有,按实验要求随机分成空白对照组、阳性药红景天胶囊组(0.180 g/kg)、高剂量组(0.080 g/kg)、中剂量组(0.040 g/kg)、低剂量组(0.020 g/kg),每组 12 只。小鼠均灌胃给药,给药量均为 10 mL/kg,每天一次,连续 7 d。末次给药 30 min 后,将小鼠各放于盛有 7.5 g 钠石灰的 125 mL 广口瓶中,密封,记录每只小鼠的存活时间。

2.3.3 数据统计分析

采用 SPSS 11.0 统计学软件进行处理,实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析和 t 检验。

3 实验结果

3.1 色谱方法学考察

3.1.1 HPLC 色谱图

红景天苷、毛蕊花苷、异毛蕊花苷、米团花苷 A、紫地黄苷 D 和角胡麻苷样品的 HPLC 色谱图见图

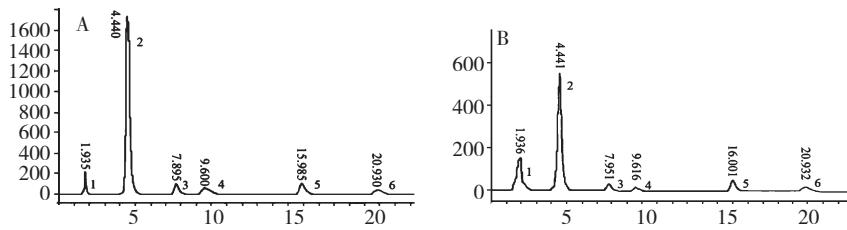


图 1 混合对照品(A)与大王马先蒿药材供试品(B)高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed standards(A) and *P. rex* sample(B)

1 - 红景天苷;2 - 毛蕊花苷;3 - 异毛蕊花苷;4 - 米团花苷 A;5 - 紫地黄苷 D;6 - 角胡麻苷

1 - salidroside;2 - verbascoside;3 - iso-verbascoside;4 - leucoseptoside A;5 - jionoside D;6 - martynoside

表 1 大王马先蒿中 6 种苯丙素类成分的标准曲线

Table 1 Standard curves of six phenylpropanoids in *P. rex*

分析物 Analytes	线性方程 Regression equation	相关系数 <i>r</i>	线性范围 Linear range(μg/mL)
Salidroside	$Y = 1276.6X + 30.898$	0.9999	2.10 ~ 8.40
Verbascoside	$Y = 5014.0X - 860.99$	0.9995	13.60 ~ 54.40
Iso-verbascoside	$Y = 5938.7X - 68.141$	0.9999	0.93 ~ 3.72
Leucoseptoside A	$Y = 7768.8X - 58.265$	0.9999	0.53 ~ 2.12
Jionoside D	$Y = 2206.8X + 21.985$	0.9996	1.50 ~ 6.00
Martynoside	$Y = 15352X - 51.197$	0.9999	0.37 ~ 1.28

3.1.2 线性关系考察

回归分析得到 6 种苯丙素类成分的线性回归方程,见表 1。结果表明 6 种苯丙素类成分在线性范围内线性关系良好。

3.1.3 精密度试验

测得 6 种苯丙素类成分的峰面积的 RSD 值分别为 0.52%、0.60%、0.72%、0.79%、1.24%、0.08%,结果表明仪器精密度良好。

3.1.4 重复性试验

红景天苷、毛蕊花苷、异毛蕊花苷、米团花苷 A、紫地黄苷 D 和角胡麻苷平均值含量分别为 0.317、0.626、0.042、0.010、0.121、0.021 mg/g, RSD 值分别为 2.7%、2.4%、3.1%、3.2%、2.5%, 表明方法的重复性良好。

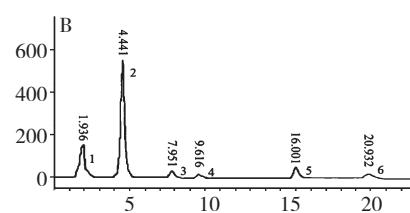
3.1.5 稳定性试验

6 种苯丙素类成分峰面积的 RSD 分别为 3.3%、2.8%、3.4%、2.7%、2.2%、1.0%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

3.1.6 加样回收率试验

按“2.1.3”项下色谱条件测定,计算加样回收

1。如图 1 所示,在本法的色谱条件下,6 种成分分离度好,出峰完全且峰形较好,无基线漂移。



率,结果见表 2。如表 2 所示,回收率与相对标准差均符合要求,表明本方法具有良好的检测性能。

3.2 大王马先蒿苯丙素类成分含量测定结果

取大王马先蒿粉末样品,按“2.1.2”项下方法制备超声、回流、闪式提取供试品溶液,按“2.1.3”项下色谱条件测定,样品平行测定 3 次,取平均值,根据线性方程计算 6 种苯丙素类成分的含量,见表 3。实验结果表明,超声、回流、闪式提取供试品中总苯丙素的含量分别为 0.763%、0.964% 和 1.148%,闪式提取方法的提取率较高。

3.3 大王马先蒿苯丙素有效部位的制备

以甲醇作为提取溶剂,大王马先蒿粉末样品经闪式提取器提取之后,减压浓缩蒸干,用纯水溶解。溶液缓慢流经 D_{101} 大孔吸附树脂柱,水和甲醇梯度洗脱,合并 30%、50% 甲醇洗脱液。减压浓缩,得到固体 1.85 g,有效部位制取率为 0.62%,按“2.1.3”项下色谱条件有效部位进行含量分析,结果显示 6 种苯丙素类成分含量达到 65% 以上。

3.4 大王马先蒿苯丙素类成分活性评价

利用抗疲劳小鼠负重游泳试验对大王马先蒿苯

表 2 大王马先蒿中 6 种苯丙素类成分加样回收率实验结果
Table 2 Results of recovery test of six phenylpropanoids in *P. rex*

分析物 Analytes	样品浓度 Sample content (mg)	加样浓度 Addition content (mg)	测量浓度 Measure content (mg)	回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
Salidroside	0.3349	0.2000	0.5336	99.7	2.4
Verbascoside	0.6693	0.2800	0.9500	100.1	1.3
Iso-verbascoside	0.0381	0.0620	0.1015	101.5	1.8
Leucoseptoside A	0.0096	0.0100	0.0200	102.0	0.9
Jionoside D	0.0678	0.0800	0.1460	98.8	2.1
Martynoside	0.0276	0.0110	0.0385	99.7	2.2

表 3 大王马先蒿中 6 种苯丙素类成分的含量
Table 3 Content determination results of six phenylpropanoids in *P. rex*

分析物 Analytes	超声提取率 Ultrasonic extraction (%)	回流提取率 Reflux extraction (%)	闪式提取率 Flash extraction (%)
Salidroside	0.249	0.299	0.318
Verbascoside	0.356	0.472	0.632
Iso-verbascoside	0.030	0.042	0.041
Leucoseptoside A	0.002	0.002	0.011
Jionoside D	0.125	0.158	0.123
Martynoside	0.001	0.001	0.023
总和 Total	0.763	0.974	1.148

丙素有效部位进行活性测试, 实验结果显示, 有效部位的高、中、低剂量组游泳时间均高于空白组, 且具有剂量相关性, 即剂量越大, 游泳时间越长, 见表 4。利用小鼠耐缺氧试验对大王马先蒿苯丙素有效部位进行活性测试, 实验结果表明, 有效部位的高、中、低剂量组缺氧存活时间均高于空白组, 且具有剂量相关性, 即剂量越大, 缺氧存活时间越长, 但中剂量组的缺氧存活时间小于低剂量组, 见表 4。

综合本次实验结果, 阳性对照组小鼠的力竭时间和缺氧存活时间明显高于空白对照组 ($P < 0.01$), 而高、中、低剂量组小鼠的力竭时间和缺氧

存活时间明显高于空白对照组 ($P < 0.01$), 高、中、低剂量组小鼠的抗疲劳负重游泳时间高于阳性药物组。活性实验表明大王马先蒿苯丙素类成分有效部位具有显著的抗疲劳、耐缺氧活性, 与红景天苷、毛蕊花苷等单体的活性一致。

4 讨论

4.1 提取方法的选择

由于苯丙素苷的极性较大, 在提取溶剂的选择上, 主要采用水、甲醇、乙醇等溶剂。提取方法中, 根据现有文献^[10]可知, 超声提取、回流提取和浸取应

表 4 有效部位对小鼠负重游泳及耐缺氧时间的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 4 Effect of effective fractions on loaded swimming and anoxia endurance time of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别 Groups	剂量 Dose (g/kg)	游泳时间 Swimming time (s)	缺氧存活时间 Anoxia endurance time (s)
空白对照组 Vehicle	-	146.08 ± 28.92	598.42 ± 49.59
阳性对照组 Control	0.180	195.17 ± 31.06 * *	816.42 ± 158.89 * *
高剂量组 High	0.080	352.58 ± 52.32 * * #	1000.75 ± 277.87 * *
中剂量组 Medium	0.040	232.92 ± 51.87 * * \$ \$	776.42 ± 155.82 * *
低剂量组 Low	0.020	211.33 ± 67.79 * *	791.33 ± 83.56 * *

* * $P < 0.01$ vs vehicle group; # # $P < 0.01$ vs control group; \$ \$ $P < 0.05$ vs control group.

用广泛,并且对提取工艺进行了大量探索。近年闪式提取法由于具有快速、完全、高效等特点,得到了快速发展和广泛应用。其原理是依靠闪式提取器的高速机械剪切力和超动力分子渗滤技术,在室温及溶剂存在下数秒内使有效成分达到组织内外平衡,对溶解性较好的成分,一般在几十秒到几分钟即可提取完全^[11]。因此,本实验采用超声、回流和闪式提取3种方法,探究大王马先蒿不同方法的提取率及含量。从大王马先蒿有效成分的提取方法来看,超声提取与回流提取比较,6种苯丙素类成分的总含量无显著性差异,闪式提取法较超声、回流方法提取率高,且提取时间短。鉴于此,本实验利用闪式提取方法对大王马先蒿进行甲醇提取,并利用HPLC对其中6种苯丙素类成分进行了含量测定。

4.2 测定成分的选择

苯丙素类成分是一类重要的化学结构,该类化合物具有广泛的生理活性,其中抗疲劳是其生理活性之一,已成为开发天然抗疲劳药物的重要来源之一,该类化合物日益受到植物化学家、药物学家的重视。红景天苷、毛蕊花苷、异毛蕊花苷、米团花苷A、紫地黄苷D和角胡麻苷是苯丙素类具有代表性的成分,是马先蒿、红景天、肉苁蓉、地黄、玄参、连翘、女贞等中药材的有效成分,也是某些成药的质量控制指标,特别是红景天苷、毛蕊花苷的抗疲劳活性及其机制已开展了大量研究^[12],因此本实验以上述6种成分为测定指标,研究大王马先蒿中苯丙素类成分的含量,为该药用植物的开发与应用提供实验依据。资料显示^[13],针对红景天苷、毛蕊花苷成分分析的测定方法较多,而针对一系列苯丙素类似物的研究较少,本实验的分析方法对于富含该类成分的天然药物的成分分析、品质评价也具有借鉴作用。

4.3 色谱条件的选择

关于天然药物中苯丙素类成分含量测定的色谱条件不一^[14,15],本实验在借鉴红景天、肉苁蓉中该类成分含量测定色谱条件基础上,建立了“2.1.3”项下色谱条件。实验结果表明在此条件下峰形对称性较高,无拖尾现象,且其与其他成分分离度、重现性好。本实验在进行色谱条件优化时,尝试了乙腈、缓冲液等色谱条件,分析效果改善不大,考虑到实验成本、环境、仪器损耗等,采用了上述的色谱条件,重要的是6种苯丙素类成分在同时测定时均取得了较好的效果。

4.4 有效部位的制备及活性评价

中药有效部位是指从中药中提取的一类或几类化学成分的混合体,其含量达到总提取物的50%以上,而且这一类或几类已知化学成分要被认为是有有效成分。中药有效部位新药由于既能体现中药多成分、多靶点、多途径发挥药效的特点,又能使药物有效成分更加富集,药理作用和临床疗效增强,以及利于质量控制水平提高等优势,近年来成为中药、天然药物新药开发的重要方向之一^[16]。

大孔吸附树脂具有吸附快、解吸快、吸附容量大、易于再生、使用寿命长等优点,现已广泛应用于天然产物的分离和富集^[17],加之大王马先蒿中的苯丙素类成分具有一定的极性和水溶性,使得选用大孔吸附树脂对其进行分离成为可能。 D_{101} 是一种对大王马先蒿苯丙素苷吸附解吸附性能优良的吸附剂,本实验以6种苯丙素类成分为测定对象,通过梯度洗脱方法,得到其有效部位,制取率0.62%,有效部位中6种苯丙素类成分的总含量大于65%。利用小鼠负重游泳、耐缺氧模型,对有效部位进行了活性评价。本实验使用央科藏域牌红天胶囊作为阳性对照组,该胶囊以红景天、沙棘、西洋参、枸杞子、葛根、刺五加为主要原料制成的,经动物功能实验证明,具有提高缺氧耐受力、增强免疫力功能,每100 g含红景天苷400 mg,总皂苷430 mg。本研究的实验结果也证实了在两种动物模型上阳性对照组明显高于空白组。

5 结论

本研究以高效液相色谱法同时测定大王马先蒿中红景天苷、毛蕊花苷、异毛蕊花苷、米团花苷A、紫地黄苷D和角胡麻苷等6种苯丙素类成分的含量,建立了含量测定方法,且分析方法准确、简便、重复性好,可作为大王马先蒿6种苯丙素类成分的检测方法。大王马先蒿苯丙素有效部位能延长小鼠游泳时间,并明显延长小鼠在常压缺氧的存活时间,增强小鼠耐缺氧能力,提示大王马先蒿具有促进恢复和消除疲劳及提高运动能力的功用,实验结果为该药用植物的综合利用和深入开发提供了参考依据。

参考文献

- Qian CS, Chen HY. Flora Republicae Popularis Sinicae (中国植物志). Beijing: Science Press, 1963. 68:2-3.
- Feng HY(冯虎元), An LZ(安黎哲), Wang XL(王勋陵).

- Investigation on resources of medicinal plants *Pedicularis* L. in Gansu Province. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2001, 32:449-451.
- 3 Zhu MJ(朱梅菊), Cai CF(蔡彩凤), Tan NH(谭宁华), et al. Anti-fatigue effects of extracts from *Pedicularis densispica* Franch on exercise mice. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24:1545-1548.
- 4 Cai RL, Yang MH, Shi Y, et al. Antifatigue activity of phenylethanoid-rich extract from *Cistanche deserticola*. *Phytother Res*, 2010, 24:313-315.
- 5 Zhu MJ, Tan NH, Zhu HZ, et al. Anti-sports anaemia effects of verbascoside and martynoside in mice. *Int J Sports Med*, 2010, 31:537-541.
- 6 Jiangsu New Medical College(江苏新医学院). Chinese Medicine Dictionary (中药大词典). Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1977. 1108.
- 7 Chu HB, Tan NH, Zhang YM. The chemical constituents of *Pedicularis rex* C. B. Clarke. *Z. Naturforsch*, 2007, 62B: 1465-1470.
- 8 Liu ZJ. Preparation of botanical samples for biomedical research. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2008, 8: 112-121.
- 9 Wang YX(王永新), Zhan H(詹皓), Wei RB(魏日胞), et al. Anti-hypoxia effect of compound *Rhodiola rosea* L. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2010, 16: 152-153.
- 10 Huang LT(黄莉婷), Sun SP(孙少平), Zheng Y(郑颖). Simultaneous determination and optimization of extraction process of catalpol and acteoside from *Rehmanniae Radix*. *J Chin Med Mat*(中药材), 2012, 35:1318-1322.
- 11 Huang YY(黄越燕), Tan RD(谭荣德). Research progress of flash extraction of active ingredients from Chinese herbal medicine. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2015, 35:83-87.
- 12 Zhu MJ(朱梅菊), Tan NH(谭宁华), Zhu HZ(朱洪竹), et al. Effects of verbascoside and martynoside on anti-sports fatigue and free radical metabolism. *Chin J Sports Med* (中国运动医学杂志), 2009, 28:310-312.
- 13 Yang TX(杨太新), Du YH(杜艳华), Liu JN(刘金娜), et al. Determination on active ingredient content of *Cistanche tubulosa* in different growth period and different parts. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2014, 25:1191-1193.
- 14 Ding LX(丁立新), Li H(李焕), Fan BJ(范宝俭), et al. Determination of salidroside and verbascoside in *Osmanthus fragrans* from different producing areas by HPLC. *J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2013, 33:894-897.
- 15 Ye C(叶超), Liu F(刘芳), Chen BL(陈宝龙), et al. HPLC determination of verbascoside in *Pogostemon cablin*. *Cent South Pharm* (中南药学), 2014, 12:1248-1250.
- 16 Yang YF(杨义芳), Yang BC(杨必成), Jin LL(金丽丽). Retrospection, stratagem, and practice on innovative drug research and development of Chinese materia medica. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2009, 40:1513-1519.
- 17 Wang YJ(王毓杰). Extraction of phenylethanoid glycoside from *Cistanche tubulosa* and purification technology by macroporous resin. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2014, 45:2344-2348.

(上接第 695 页)

- 12 Ishizuka T, Yaoita Y, Kikuchi M. Sterol constituents from the fruit bodies of *Grifola frondosa* (FR.) S. F. Gray. *Chem Pharm Bull*, 1997, 45:1756-1760.
- 13 Noboru S, Hideyuki T, Kazuo V, et al. Sterol analysis of DMI-resistant and sensitive strains of *Venturia inaequalis*. *Phytochemistry*, 1996, 41:1301-1308.
- 14 Gao H(高红), Shi DF(史德芳), Yang D(杨德), et al. Antitumor activity of ergosterol from *Agaricus blazei* murrill and its mechanism. *Edible Fungi China*(中国食用菌), 2011, 30:35-39.
- 15 Marrogi AJ, Travis WD, Welsh JA, et al. Nitric oxide syn-
- thase, cyclooxygenase 2, and vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2000, 6:4739-4744.
- 16 Zhang YJ, Mills GL, Nair MG. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the mycelia of the edible mushroom *Grifola frondosa*. *J Agric Food Chem*, 2002, 50:7581-7585.
- 17 Zhang YJ, Mills GL, Nair MG. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the fruiting body of an edible mushroom, *Agrocybe aegerita*. *Phytomedicine*, 2003, 20: 386-390.