

黑玛咖不同提取物的抗疲劳作用与谱效关系研究

刘 淼¹, 黄莹莹¹, 林梦雅¹, 王春龙², 李 欣¹, 马宁宁¹, 张艳军¹, 宋丽丽^{1*}, 张密霞^{1*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 陶朱翁(天津)生物医药技术有限公司, 天津 300392

摘 要: **目的** 研究黑玛咖不同提取物的抗疲劳作用及其超高效液相色谱(UPLC)图谱与抗疲劳作用的谱效关系, 为明确黑玛咖的抗疲劳作用的物质基础提供依据。**方法** 通过小鼠力竭游泳实验、检测肝糖原和血清乳酸水平, 比较黑玛咖 8 种提取物的抗疲劳作用; 采用 UPLC-Q-TOF/MS 法建立黑玛咖 8 种提取物的指纹图谱; 以小鼠力竭游泳实验为抗疲劳作用的药效学指标, 采用偏最小二乘法回归(PLSR)分析建立其谱效关系。**结果** 黑玛咖 60%、80%、95%乙醇提取物(醇提物)均明显增加小鼠力竭游泳时间, 且以 95%醇提物增加作用更为显著; 黑玛咖 80%醇提物能显著增加因过度运动所致的降低的肝糖原水平; 黑玛咖 95%醇提物能明显减少小鼠负重游泳后产生的血清乳酸堆积。从黑玛咖不同提取物 UPLC 指纹图谱中提取出 23 个能够表征含量差异的特征峰。采用 PLSR 分析, 以力竭游泳时间为药效指标时, 发现黑玛咖提取物中 *N*-苄基十六酰胺、*N*-苄基-5-氧代-6*E*,8*E*-十八碳二烯酰胺、1,3-二苄基-2-苄基-4,5-二甲基咪唑和 *N*-十八烷酰胺与抗疲劳作用呈正相关, 且 VIP 值大于 1。**结论** 黑玛咖 95%及 80%醇提物具有显著的抗疲劳作用; 明确 *N*-苄基十六酰胺、*N*-苄基-5-氧代-6*E*,8*E*-十八碳二烯酰胺、1,3-二苄基-2-苄基-4,5-二甲基咪唑和 *N*-十八烷酰胺是黑玛咖抗疲劳作用的主要有效成分。为深入研究黑玛咖抗疲劳药效物质基础及建立全面可靠的质量控制方法提供思路。

关键词: 黑玛咖; 抗疲劳; 力竭游泳实验; 谱效关系; 偏最小二乘法回归分析; *N*-苄基十六酰胺; *N*-苄基-5-氧代-6*E*,8*E*-十八碳二烯酰胺; 1,3-二苄基-2-苄基-4,5-二甲基咪唑; *N*-十八烷酰胺

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)09-2090-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.09.017

Experimental studies on anti-fatigue effects and spectra-effect relationship of different extracts from black *Lepidium meyenii* (Maca)

LIU Miao¹, HUANG Ying-ying¹, LIN Meng-ya¹, WANG Chun-long², LI Xin¹, MA Ning-ning¹, ZHANG Yan-jun¹, Song Li-li¹, ZHANG Mi-xia¹

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Taozhu-weng Biomedical Technology Co., Ltd., Tianjin 300392, China

Abstract: Objective To investigate the anti-fatigue effects and the relationship between UPLC and anti-fatigue effects of different extracts of black Maca, and to provide a basis for clarifying the material basis of anti-fatigue effects of black Maca. **Methods** Anti-fatigue effects of eight different extracts of black Maca were evaluated through exhaustive swimming time, contents of liver glycogen, and lactic acid in serum; UPLC-Q-TOF/MS was applied to establish the fingerprints for black Maca from eight extracts; Using the anti-fatigue effects of exhaustive swimming experiment as pharmacodynamic indicators, spectra-effect relationship was analyzed by using PLSR. **Results** 60%, 80%, and 95% ethanol extracts of black Maca could significantly prolong the exhaustive swimming time of mice, with the effects of 95% ethanol extract of black Maca was the strongest; The treatment of 80% ethanol extract of black Maca significantly increased the level of depressed hepatic glycogen due to excessive exercise; Moreover, 95% ethanol extract of black Maca substantially decreased the serum lactic acid accumulation after loaded-swimming. A total of 23 characteristic peaks were characterized by HPLC fingerprints of eight different extracts of black Maca. *N*-benzylhexadecanamide, *N*-benzyl-5-oxo-6*E*,8*E*-octadecadienamide, 1,3-dibenzyl-2-phenyl-4,5-dimethylimidazilium, and *N*-octadecanamide were found to be positively related to the anti-fatigue effects with VIP > 1 in extracts of black Maca from PLSR analysis by using anti-fatigue effects of exhaustive swimming time as pharmacodynamic

收稿日期: 2017-12-26

作者简介: 刘 淼(1990—), 女, 助理实验师, 研究方向为中药药理学。Tel: 13702072916 E-mail: 1002864326@qq.com

*通信作者 张密霞(1975—), 女, 高级实验师, 研究方向为中药药理学。Tel: 13132113407 E-mail: mimimixia@sina.com

宋丽丽(1982—), 女, 实验师, 研究方向为中药分析及代谢组学。Tel: 18622545966 E-mail: sl0204@163.com

indicators. **Conclusion** 95% and 80% ethanol extracts of black Maca showed the obvious anti-fatigue function. It is clear that four components *N*-benzylhexadecanamide, *N*-benzyl-5-oxo-6*E*,8*E*-octadecadienamide, 1,3-dibenzyl-2-phenyl-4,5-dimethylimidazilium, and *N*-octadecanamide are the principal anti-fatigue substances in black Maca. The study has the contribution to explore the material basis of anti-fatigue effects and provides new ideas for the omprehensive and reliable quality control of black Maca.

Key words: black Maca; anti-fatigue; exhaustive swimming test; spectra-effect relationship; partial least squares regression analysis; *N*-benzylhexadecanamide; *N*-benzyl-5-oxo-6*E*,8*E*-octadecadienamide; 1,3-dibenzyl-2-phenyl-4,5-dimethylimidazilium; *N*-octadecanamide

玛咖 (Maca) 是十字花科独行菜属植物玛卡特独行菜 *Lepidium meyenii* Walp. 的根茎, 原产于南美洲秘鲁的安第斯山脉。根据颜色不同, 分为黑、白、黄、红等 13 个类型。研究发现, 黑玛咖粉营养成分优于黄玛咖粉, 且玛咖提取物中的营养成分亦优于玛咖原粉^[1]。多年来研究表明, 玛咖具有增强体力、增强雄性性功能、调节女性内分泌、抗骨质疏松及抗肿瘤等多种功效^[2-6]。但不同提取方法对玛咖抗疲劳作用的影响尚未见文献报道。

目前, 中药谱效关系学已广泛用于中药的药效物质基础研究^[7-9], 但黑玛咖抗疲劳作用的物质基础研究相对较少。本研究通过小鼠力竭游泳实验、检测肝糖原和血清乳酸水平, 比较黑玛咖 8 种提取物的抗疲劳作用; 采用超高效液相色谱-飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF/MS) 法建立黑玛咖不同提取物的指纹图谱, 并用偏最小二乘回归法 (PLSR) 分析阐述指纹图谱特征峰与抗疲劳作用的关联度, 最终确定其主要药效成分, 为深入研究黑玛咖的抗疲劳作用及科学阐明其抗疲劳作用的药效物质基础提供依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

玛咖采集于秘鲁, 经天津药物研究院有限公司张铁军研究员鉴定为玛卡特独行菜 *Lepidium meyenii* Walp. 的根茎, 为黑玛咖。肝糖原试剂盒、乳酸试剂盒均购于南京建成生物科技有限公司。

1.2 动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠 270 只, 12 周龄, 体质量 (21±2) g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 动物合格证号 SCXK (京) 2014-0004。

1.3 仪器

Waters Acquity I Class UPLC 超高效液相色谱-质谱联用仪 (美国 Waters 公司); Waters Xevo G2 QTOF 质谱仪 (美国 Waters 公司); 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); FA2004N 电子分析天平 (万分之一, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司); 3K15 型离心机 (德国 Sigma 公司); 723 型可见分光光度计 (上海菁华

科技仪器有限公司); 电热恒温水浴锅 (天津市华北实验仪器有限公司)。

2 方法

2.1 黑玛咖提取物的制备

2.1.1 黑玛咖 20%、40%、60%、80%、95%乙醇提取物 (醇提物) 及水提取物 (水提物) 的制备 分别称取玛咖饮片 500 g 至 10 L 圆底烧瓶中, 分别依次加入 10 倍量 (5 L) 20%、40%、60%、80%、95% 乙醇和水, 回流提取 2 h, 热滤, 回收溶剂 (50~60 °C) 至一定体积, 水浴继续浓缩 (70~80 °C) 至稠膏, 收率分别为每克浸膏相当于生药 2.06、1.83、1.79、2.33、3.07、1.01 g, 备用。

2.1.2 黑玛咖水提物加挥发油样品及水蒸气蒸馏法药渣的醇提物的制备 称取黑玛咖饮片 500 g 至 10 L 圆底烧瓶中, 加入 10 倍量水 (5 L), 水蒸气蒸馏法提取, 提油 5 h, 热滤, 收取挥发油及水液, 回收水 (50~60 °C) 至一定体积, 水浴继续浓缩 (70~80 °C) 至稠膏, 将挥发油均匀加入稠膏中, 即得黑玛咖水提物加挥发油样品, 收率为每克浸膏相当于生药 1.61 g, 备用。取水蒸气蒸馏法提取后的药渣, 用 5 倍量白酒 (45 度古井贡酒岁月经典 5 年陈酿) 提取 2 h, 回收乙醇 (50~60 °C) 至无醇味, 水浴继续浓缩 (70~80 °C) 至稠膏, 即得水蒸气蒸馏法药渣的醇提物, 收率为每克浸膏相当于生药 6.92 g, 备用。

2.2 黑玛咖不同提取物的抗疲劳作用

2.2.1 实验分组及给药 将 270 只雄性 ICR 小鼠随机分成 3 批, 每批 90 只。各批小鼠适应性喂养 1 周后, 均随机分为以下 9 组: 对照组、黑玛咖水提取物组 (水提物)、黑玛咖 20%乙醇提取物组 (20%醇提物)、黑玛咖 40%乙醇提取物组 (40%醇提物)、黑玛咖 60%乙醇提取物组 (60%醇提物)、黑玛咖 80%乙醇提取物组 (80%醇提物)、黑玛咖 95%乙醇提取物组 (95%醇提物)、黑玛咖水提物加挥发油样品组 (水提物加挥发油)、黑玛咖水蒸气蒸馏法药渣的醇提取物组 (药渣醇提物), 每组 10 只。将黑玛咖各提取物均按生药剂量 2.5 g/kg, 以蒸馏水配

成所需浓度,按 10 mL/kg ig 给药,对照组 ig 给予等量蒸馏水,每天 1 次,连续 14 d。

2.2.2 力竭游泳实验^[10] 末次给药 30 min 后,于小鼠尾根部负重体质量 8% 的铅皮,每只单独放入水深 50 cm、水温 (25±1) °C 的塑料圆柱体中,记录负重小鼠自开始游泳至头部沉入水中,10 s 仍不能返回水面的时间,即小鼠力竭游泳时间。

2.2.3 肝糖原测定^[10] 末次给药 30 min 后,将小鼠置于 (30±1) °C 水中不负重游泳 90 min,颈椎脱臼处死,取肝脏,生理盐水漂洗,称取肝脏并参照糖原检测试剂盒说明书检测肝糖原水平。

2.2.4 血清乳酸测定^[10] 末次给药 30 min 后,将小鼠置于 (30±1) °C 水中负重游泳 (体质量 6%) 10 min,分别于游泳后即刻、游泳后休息 30 min 自眼眶静脉丛取血。4 °C, 3 000 r/min 离心 15 min,取血清, -20 °C 保存。参照乳酸检测试剂盒说明书检测血清中乳酸水平。

2.3 黑玛咖不同提取物的 UPLC-Q-TOF/MS 分析^[11-14]

2.3.1 色谱条件 采用色谱柱 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 体积流量 0.3 mL/min; 进样量为 3 μL; 柱温为 35 °C; 进样时间为 35 min; 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-0.1% 甲酸的乙腈 (B) 溶液。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 UPLC-Q-TOF/MS 洗脱条件
Table 1 UPLC-Q-TOF/MS elution conditions

t/min	A/%	B/%
0.0	99	1
2.5	99	1
9.0	70	30
13.0	50	50
17.0	30	70
25.0	5	95
33.0	5	95
34.0	99	1
35.0	99	1

2.3.2 质谱条件 应用四极杆飞行时间串联质谱仪进行分析与鉴定。采用正、负离子模式,电喷雾离子源 ESI; 脱溶剂气体流量 700 L/h; 脱溶剂气温度 450 °C; 锥孔气体流量 50 L/h; 离子源温度 120 °C; 毛细管电压 3 000 V。相对分子质量扫描范围 m/z 50~1 500, 数据采集采用 MSE 模式。

2.3.3 样品溶液的处理 分别称取适量的黑玛咖 8

种提取物浸膏,采用 50% 乙醇配制成质量浓度为生药 1 g/L 的供试品溶液,过 0.22 μm 有机滤膜,备用。

2.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 方差齐时,多组间比较采用 LSD 法; 方差不齐时,采用 Tamhane's T_3 法。所有统计分析均使用 SPSS 17.0 软件进行处理。

3 结果

3.1 黑玛咖不同提取物抗疲劳作用比较

3.1.1 对小鼠力竭游泳时间的影响 与对照组比较,黑玛咖 40% 醇提取物组、20% 醇提取物组、水提取物组、水提取物加挥发油组、药渣醇提取物组小鼠力竭游泳时间均有延长趋势,但无统计学差异; 与对照组比较,黑玛咖 95% 醇提取物组、80% 醇提取物组、60% 醇提取物组小鼠力竭游泳时间均显著延长 ($P < 0.05$),其中以黑玛咖 95% 醇提取物的作用最为明显,结果见图 1。

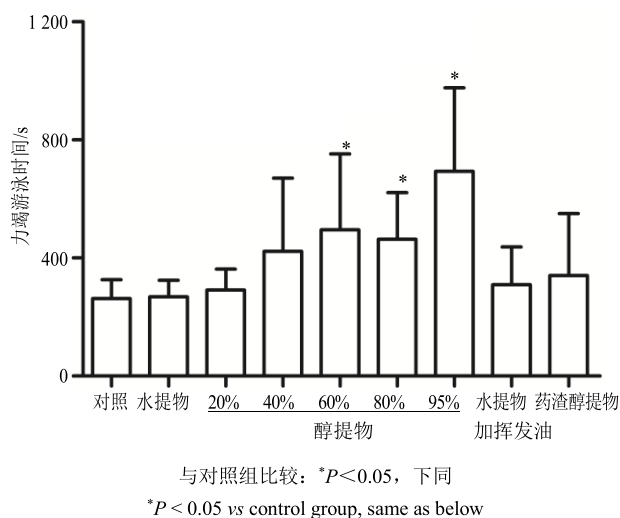


图 1 黑玛咖不同提取物对小鼠力竭游泳时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effects of different extracts of black Maca on exhaustive swimming time in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.1.2 对小鼠肝糖原水平的影响 与对照组比较,黑玛咖 80% 醇提取物能显著抑制因过度运动所致的肝糖原水平降低 ($P < 0.05$),而 60% 醇提取物虽有增加游泳后肝糖原水平的趋势,但差异无显著性,结果见图 2。说明黑玛咖 80% 醇提取物能够减少运动所致肝糖原的消耗。

3.1.3 对小鼠血清乳酸水平的影响 图 3 结果显示,游泳后休息 30 min 时,黑玛咖 95% 醇提取物组与对照组相比小鼠血清乳酸水平显著降低 ($P < 0.05$); 而黑玛咖 20%、40%、80% 醇提取物组、水提取物组、

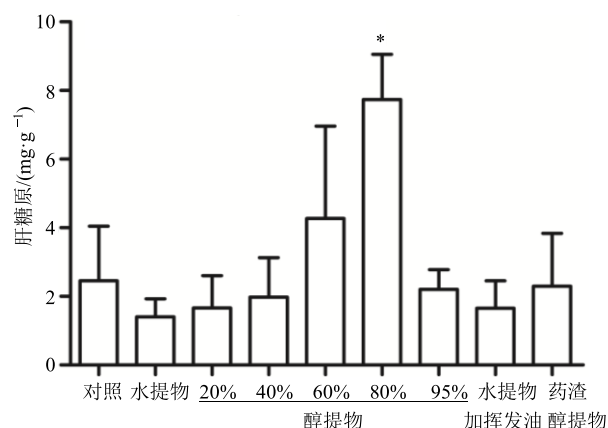


图 2 黑玛咖不同提取物对小鼠肝糖原水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effects of different extracts of black Maca on contents of hepatic glycogen in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

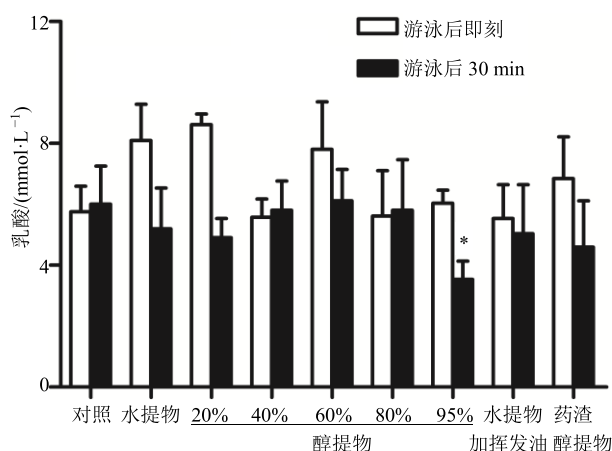


图 3 黑玛咖不同提取物对小鼠血清乳酸水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effects of different extracts of black Maca on contents of serum lactic acid in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

水提取物加挥发油组和药渣醇提取物组小鼠血清乳酸水平均有降低的趋势，但与对照组相比无统计学意义。说明黑玛咖 95%醇提取物能够显著降低小鼠游泳后血清乳酸水平，促进乳酸消除。

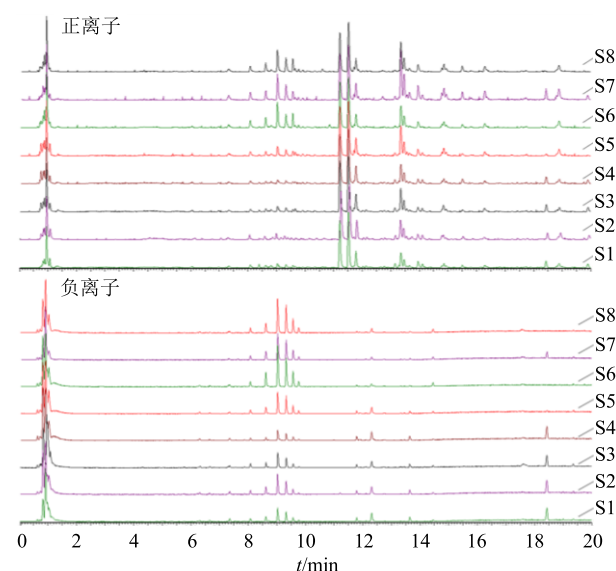
3.2 黑玛咖不同提取物的 UPLC-Q-TOF/MS 分析

在上述色谱条件下检测，采用正、负离子模式分别采集黑玛咖不同提取物的质谱信息，比较在正、负离子扫描方式下黑玛咖不同提取物中各个化学特征峰的信号强度，表明黑玛咖不同提取物大多数成分在正离子模式下的信号强度大于在负离子模式下的信号强度，且各特征峰分离良好，因此确

定扫描方式为正离子模式，总离子流图见图 4。结合文献信息，对 UPLC 分离出的 23 个主要特征峰进行分析并标记 (图 5)，明确了 20 个特征色谱峰所代表的化学成分 (表 2)。

3.3 黑玛咖提取物 UPLC 图谱与抗疲劳作用的 PLSR 分析

通过指纹图谱筛选出 23 个特征峰，这些特征峰与药效之间的关系可看作一个多元线性回归分析问题。多元线性回归分析是研究在线性相关的条件下，多个自变量 (如指纹图谱中的色谱峰) 对因



S1-95%醇提取物 S2-80%醇提取物 S3-60%醇提取物 S4-40%醇提取物
S5-20%醇提取物 S6-水提取物 S7-药渣醇提取物 S8-水提取物加挥发油
S1-95% ethanol extract S2-80% ethanol extract S3-60% ethanol
extract S4-40% ethanol extract S5-20% ethanol extract
S6-water extract S7-dregs ethanol extract S8-water extract added
with volatile oil

图 4 黑玛咖不同提取物在正、负离子模式下的总离子流图
Fig. 4 Total ion flow chart of each extract of black Maca in positive and negative ion mode

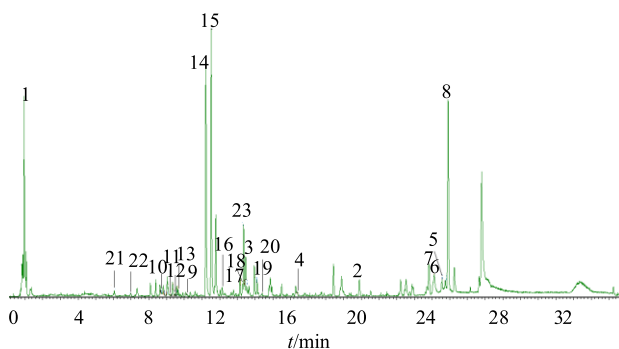


图 5 黑玛咖提取物的特征峰图谱
Fig. 5 Characteristic peaks of black Maca extracts

表 2 黑玛咖提取物 UPLC-Q-TOF/MS 图谱特征峰的指认结果
Table 2 UPLC-Q-TOF/MS map of characteristic peaks of black Maca extracts

峰号	<i>t_R</i> /min	[M+H] ⁺	分子式	二级碎片离子 (<i>m/z</i>)	成分指认
1	0.81	234.10	—	207, 156, 127, 109, 91	未知
2	19.89	384.29	C ₂₅ H ₃₇ NO ₂	366, 306, 300, 288, 277, 260	<i>N</i> -苄基-5-氧代-6 <i>E</i> ,8 <i>E</i> -十八碳二烯酰胺/ <i>N</i> -苄基-13-氧代-9 <i>E</i> ,11 <i>E</i> -十八碳二烯酰胺/ <i>N</i> -苄基-9-氧代-12 <i>E</i> ,15 <i>Z</i> -十八碳二烯酰胺/ <i>N</i> -苄基-9-氧代-12 <i>E</i> ,15 <i>E</i> -十八碳二烯酰胺
3	13.47	318.30	—	240, 211, 193, 123, 91	未知
4	16.36	374.36	—	357, 266, 248, 138, 121	未知
5	24.75	284.29	C ₁₈ H ₃₇ NO	256, 158, 144, 130, 116	<i>N</i> -十八烷酰胺
6	24.56	310.31	C ₂₀ H ₃₉ NO	265, 254, 247, 95	<i>N</i> -ethyl-(2 <i>E</i> ,16 <i>E</i>)-octadecadienamide
7	24.13	406.33	C ₂₅ H ₄₃ NO ₃	391, 375, 305, 91	<i>N</i> -(3,4-dimethoxybenzyl)-hexadecanamide
8	24.9	346.31	C ₂₃ H ₃₉ NO	268, 239, 221, 137, 109	<i>N</i> -苄基十六酰胺
9	10.15	218.12	C ₁₃ H ₁₅ NO ₂	200, 159, 126, 112, 91	3-benzyl-1,2-dihydro- <i>N</i> -hydroxypyridine-4-methoxy
10	8.53	201.14	C ₁₃ H ₁₆ N ₂	160, 121, 109, 91	1-dibenzyl-trimethylimidazilium
11	9.08	225.14	C ₁₅ H ₁₆ N ₂	208, 181, 130, 91	1-dibenzyl-2-propyne-4,5-dimethylimidazilium
12	9.18	229.17	C ₁₅ H ₂₀ N ₂	188, 137, 121, 91	1-dibenzyl-2-propane-4,5-dimethylimidazilium/1-dibenzyl-2-isopropane-4,5-dimethylimidazilium
13	9.81	239.16	C ₁₆ H ₁₈ N ₂	198, 181, 158, 91	1-dibenzyl-2-(1,3-butadiene)-4,5-dimethylimidazilium
14	11.21	277.17	C ₁₉ H ₂₀ N ₂	262, 199, 185, 109, 91	1,3-dibenzyl-4,5-dimethylimidazolium
15	11.52	291.19	C ₂₀ H ₂₂ N ₂	250, 199, 158, 117, 91	1,3-dibenzyl-2,4,5-trimethylimidazilium
16	12.14	305.20	C ₂₁ H ₂₄ N ₂	250, 213, 185, 123, 91	1,3-dibenzyl-2 (<i>R</i>)-ethyl-4,5-dimethylimidazilium
17	13.15	353.20	C ₂₅ H ₂₄ N ₂	275, 185, 171, 158, 121, 91	1,3-二苄基-2-苯基-4,5-二甲基咪唑
18	13.29	333.23	C ₂₃ H ₂₈ N ₂	277, 250, 241, 200, 185, 158, 91	1,3-dibenzyl-2-butyl-4,5-dimethylimidazilium/1,3-dibenzyl-2-isobutyl-4,5-dimethylimidazilium
19	14.11	347.25	C ₂₄ H ₃₀ N ₂	277, 255, 227, 200, 158, 91	1,3-dibenzyl-2-pentyl-4,5-dimethylimidazilium
20	14.39	316.29	C ₂₁ H ₃₅ N ₂	298, 280, 262, 109, 91	1-(3,5-cyclohexadiene)-cyclohexyl-2-hexyl-4,5-dimethylhydridelimidazilium/1-dibenzyl-3-cyclohexyl-2-isopropenyl-4,5-dimethylimidazilium/1-(1,3-cyclohexadiene)-3-cyclohexyl-2-hexyl-4,5-dimethylhydridelimidazilium/1-dibenzyl-3-cyclohexyl-2-propenyl-4,5-dimethylimidazilium
21	6.05	233.13	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂	215, 116, 91, 70	(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-1-methyltetrahydro-β-5,6-hydridecarboline-3-carboxylic acid
22	6.97	233.13	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂	215, 187, 142, 116, 91	(1 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1-methyltetrahydro-β-5,6-hydridecarboline-3-carboxylic acid
23	13.35	274.28	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂	256, 212, 136, 93	<i>N</i> -ethyl-tetradecene ester

变量（如药效指标）的数量变化关系^[15]。采用 SIMCA-P 12.0 软件对 23 个化合物的相对含量（*X* 变量）与抗疲劳作用（*Y* 变量）进行 PLSR 分析。

黑玛咖提取物 UPLC 指纹图谱中的 15、17、10、5、8、13、20、12、2 号峰与抗疲劳作用呈正相关性，即相对含量增加，抗疲劳作用增强；剩下的 14 个峰与抗疲劳作用呈负相关性，见图 6-A。自变量

在解释对因变量贡献程度的大小时可通过 VIP 的数值大小来决定，一般认为 VIP>1 时，对模型有显著贡献^[16]。以力竭游泳时间为抗疲劳的药效指标时，通过 SIMCA 软件处理得到黑玛咖提取物中 1、8、3、2、7、6、23、17 和 5 号峰的 VIP 值均大于 1，说明其对小鼠抗疲劳作用发挥重要作用，见图 6-B。综合上述黑玛咖提取物与抗疲劳作用的 PLSR

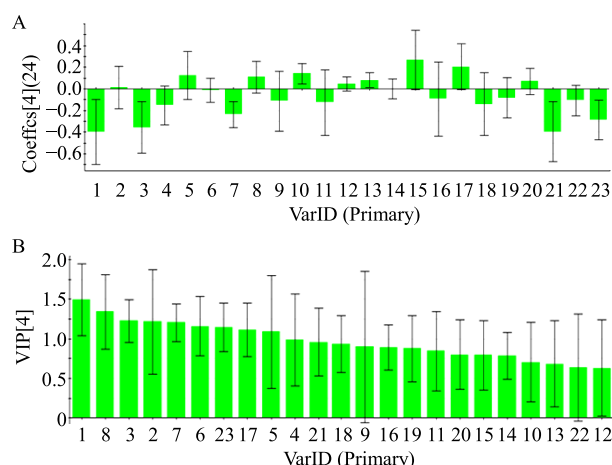


图 6 PLSR 标准化回归系数 (A) 及药效 VIP 贡献 (B)
Fig. 6 PLSR standardization regression coefficients (A) and efficacy VIP contribution plot (B)

分析结果, 结合质谱数据与对照品信息比对, 对 8、2、17 和 5 号峰进行指认, 对应的化合物分别为 *N*-苄基十六酰胺、*N*-苄基-5-氧代-6*E*,8*E*-十八碳二烯、1,3-二苄基-2-苄基-4,5-二甲基咪唑和 *N*-十八烷酰胺。

4 讨论

抗疲劳能力增强最客观和最直接的表现是运动耐力的提高, 测定机体持续运动至力竭的时间可以反映机体的耐力。金指标负重游泳时间能直观地反映出小鼠运动耐力的大小, 因此本实验采用负重游泳的方法衡量运动疲劳的程度^[17-18]。ICR 小鼠是国际公认的小鼠品种, 繁殖力好, 对疾病的抵抗力强, 主要用于安全评价、药理学、毒理学、感染及免疫学等实验研究, 已成为全世界最广泛使用的实验动物之一。在疲劳实验研究中, 多以 ICR 雄性小鼠为研究对象, 故本实验亦选用雄性 ICR 小鼠进行抗疲劳及谱效关系研究^[19]。实验结果显示, 黑玛咖 95%、80%、60%醇提物均能显著延长小鼠力竭游泳时间, 提高运动耐力, 具有一定的抗疲劳作用。常用的体力疲劳的评价方法除了运动耐力实验外, 还包括生化指标的检测。糖原是机体能源的贮存方式, 机体剧烈运动会消耗大量糖原, 因此糖原储备量可以反映运动耐力的强弱, 继而反映机体疲劳程度^[20]。本实验中, 黑玛咖 80%、60%醇提物能够减少运动时肝糖原的消耗, 其中以 80%醇提物更为明显。无氧条件下, 肌肉中的糖原被分解产生大量乳酸, 体内乳酸的量增加, 会引起肌肉运动能力的下降, 因此减少体内乳酸堆积, 可以缓解机体的疲劳状态。本

实验证实, 黑玛咖 95%醇提物能够降低小鼠负重游泳 30 min 后血清乳酸水平, 促进乳酸的消除^[21]。通过比较不同提取方法得到的黑玛咖提取物在抗疲劳方面的功效, 认为黑玛咖 95%、80%醇提物表现出显著的抗疲劳作用。

中药药效物质基础是阐明中药作用的关键, 是中药质量评价的基础与核心, 谱效关系是建立在中药材指纹图谱的研究基础上, 建立其化学成分与药效之间的关联性^[22]。PLSR 分析方法集多元线性回归分析、典型相关分析和主成分分析的基本功能于一体, 在一个算法下, 同时实现回归建模(多元线性回归分析)、数据结构简化(主成分分析)及两组变量间的相关分析(典型相关分析), 能够最大限度利用数据信息, 具有预测精度较高及模型易于解释等特点^[23-24]。本研究采用 PLSR 分析黑玛咖不同提取物色谱峰面积与抗疲劳作用之间的关系, 确定了指纹图谱特征峰所代表的 4 个化学成分, 即 *N*-苄基十六酰胺、*N*-苄基-5-氧代-6*E*,8*E*-十八碳二烯酰胺、1,3-二苄基-2-苄基-4,5-二甲基咪唑和 *N*-十八烷酰胺与抗疲劳评价的金指标力竭游泳时间呈正相关性, 且对模型有显著贡献, 推测其为黑玛咖抗疲劳作用的潜在的药效物质。

玛咖酰胺和玛咖烯的主要化学成分被推测是玛咖抗疲劳的主要活性物质。据文献报道, 这两类物质包含的化学成分能显著延长小鼠力竭游泳时间, 降低长时间游泳后小鼠血乳酸、血乳酸脱氢酶的含量, 增加游离脂肪酸水平及糖原储备量, 显著提高抗氧化酶超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活力^[25-26]。这与本实验发现黑玛咖提取物中的化合物 *N*-苄基十六酰胺、*N*-十八烷酰胺、*N*-苄基-5-氧代-6*E*,8*E*-十八碳二烯与抗疲劳药效呈相关性的结果一致。下一步研究重点将对这 4 种药效成分进行定量分析及药效评价, 为深入研究黑玛咖药效物质基础及建立全面可靠的质量控制方法提供思路。

参考文献

- [1] 田万平, 王 霄, 张良明, 等. 不同品种玛咖粉和不同提取方式提取物营养成分分析 [J]. 食品科技, 2016, 41(5): 229-233.
- [2] Cicero A F, Bandieri E, Arletti R. *Lepidium meyenii* Walp. improves sexual behaviour in male rats independently from its action on spontaneous locomotor activity [J]. *J Ethnopharmacol*, 2001, 75(2/3): 225-229.

- [3] Lee M S, Lee H W, You S, *et al.* The use of maca (*Lepidium meyenii*) to improve semen quality: A systematic review [J]. *Maturitas*, 2016, 92: 64-69.
- [4] Ruiz-Luna A C, Salazar S, Aspajo N J, *et al.* *Lepidium meyenii* (maca) increases litter size in normal adult female mice [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005(3): 16.
- [5] Zhang Y, Yu L, Ao M, *et al.* Effect of ethanol extract of *Lepidium meyenii* Walp. on osteoporosis in ovariectomized rat [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 105(1/2): 274-279.
- [6] Gonzales G F, Valerio L G J. Medicinal plants from Peru: A review of plants as potential agents against cancer [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2006, 6(5): 429-444.
- [7] 池 婕, 林 兵, 刘志宏, 等. 基于最小二乘回归分析法的雷公藤多苷片免疫抑制作用谱效关系研究 [J]. 中草药, 2015, 46(18): 2755-2758.
- [8] 薛丹平, 张美敬, 余 越, 等. 雷公藤不同乙醇提取物指纹图谱及与大鼠肾小球系膜细胞的谱效关系研究 [J]. 中国药师, 2017, 20(4): 617-620.
- [9] 林梦雅, 张玉萍, 李 雅, 等. 基于灰色关联度分析的丹参提取物抗炎作用谱效关系研究 [J]. 中草药, 2017, 48(16): 3447-3452.
- [10] 何来英, 严卫星, 楼密密, 等. 保健食品抗疲劳作用试验方法研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 1997, 4(9): 1-6.
- [11] 郭谦亮, 张天华, 王 宁, 等. 玛咖不同提取部位对磷酸二酯酶 5 抑制作用的谱-效关系研究 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 728-736.
- [12] 陈 菲, 张奉苏, 刘训红, 等. 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱同时测定樟芝菌粉中 6 个核苷类化合物及其指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(12): 2097-2103.
- [13] Chen S X, Li K K, Pubu D, *et al.* Optimization of ultrasound-assisted extraction, HPLC and UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS analysis of main macamides and macaenes from Maca (cultivars of *Lepidium meyenii* Walp.) [J]. *Molecules*, 2017, doi: 10.3390/molecules22122196.
- [14] 陈 菲, 张奉苏, 刘训红, 等. 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱同时测定樟芝菌粉中 6 个核苷类化合物及其指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(12): 2097-2103.
- [15] Wold S, Sjostrom M, Eriksson L. PLS-regression: A basic tool of chemometrics [J]. *Chemometr Intell Lab Syst LabInf Manage*, 2001, 58(2): 109-130.
- [16] 吴环宇, 许妍妍, 卢志强, 等. 黑顺片血浆指纹图谱与抗心衰作用的谱效关系研究 [J]. 中草药, 2015, 46(6): 861-865.
- [17] 石鹤坤, 邱韵玲, 陈开杰, 等. 公石松抗疲劳活性部位筛选研究 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(B11): 129-130.
- [18] Kang D Z, Hong H D, Kim K I, *et al.* Anti-fatigue effects of fermented *Rhodiola rosea* extract in mice [J]. *Prev Nutr Food Sci*, 2015, 20(1): 38-42.
- [19] 张 静, 李 慧, 周 雯, 等. 玛咖粉对小鼠的抗疲劳作用及其机制研究 [J]. 卫生研究, 2013, 42(6): 1046-1049.
- [20] Suwanmala J, Lu S, Tang Q, *et al.* Comparison of antifatigue activity of five sea cucumber species in a mouse model of intense exercise [J]. *J Food Nutr Res*, 2016, 4(1): 12-19.
- [21] Kang D Z, Hong H D, Kim K I, *et al.* Anti-fatigue effects of fermented *Rhodiola rosea* extract in mice [J]. *Prevent Nutr Food Sci*, 2015, 20(1): 38-42.
- [22] 冯 看, 刘华钢, 雷欣潮, 等. 中药谱效学研究现状 [J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(6): 103-105.
- [23] 王园园, 陈景武. 偏最小二乘回归分析在医学中的正确应用 [J]. 中国卫生统计, 2010, 27(2): 208-209.
- [24] Al-Shidhani S, Rehman N U, Mabood F, *et al.* Quantification of incensole in three *Boswellia* species by NIR spectroscopy coupled with PLSR and cross-validation by HPLC [J]. *Phytochem Anal*, 2018, 29(3): 300-307.
- [25] 刘跃金, 王钰楠, 冯鸿雁, 等. *N*-苄基十六碳酰胺与玛咖醇提物小鼠抗疲劳作用 [J]. 中国公共卫生, 2015, 31(1): 92-93.
- [26] Yang Q, Jin W, Lv X, *et al.* Effects of macamides on endurance capacity and anti-fatigue property in prolonged swimming mice [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(5): 827-834.