

白芍改善睡眠作用的药效物质基础研究

李越峰, 张泽国, 徐福菊, 吴平安, 刘峰林, 王瑞琼, 严兴科*

(甘肃中医学院, 兰州 730000)

[摘要] 目的: 确认白芍改善睡眠作用的药效物质基础, 为揭示其改善睡眠作用的机制提供可靠依据。方法: Wistar 大鼠随机分为正常对照、芍药苷 $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 给药组 ig(灌胃) 给药, 每天 1 次, 连续 7 d, 于末次给药后 5 h 制备血清或抽取脑脊液, 用 HPLC 测定血清和脑脊液中四逆散移行成分; 或者连续 ig 给药 7 d 后, ip 给予戊巴比妥钠 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 用翻正反射法测定小鼠睡眠时间。采用 HPLC 方法, 梯度洗脱, 色谱条件为: Hypersil C_{18} 柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$), 流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 流动相 A 为乙腈; 流动相 B 为 (pH 3) 磷酸水, 流动相 A 梯度洗脱 (5% ~ 95% 乙腈), 分析时间为 140 min。结果: $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 芍药苷可以使脑脊液中内源性物质峰面积高于空白脑脊液峰面积, 从峰面积比值来看芍药苷能使脑脊液中内源性物质面积约是空白脑脊液峰面积的 10.2 倍。表明白芍主要化学成分芍药苷能明显促进脑脊液中内源性物质的分泌, 从而达到改善睡眠作用。结论: 通过白芍血中移行成分分析、脑脊液中移行成分分析及白芍对戊巴比妥钠所致小鼠睡眠时间影响的药效研究, 确认了白芍改善睡眠作用的药效物质基础是血清中白芍的移行成分芍药苷。

[关键词] 白芍; 脑脊液移行成分; 改善睡眠; 物质基础

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0127-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014150127

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140609.1531.002.html>

[网络出版时间] 2014-06-09 15:31

Study on Constituents of Paeoniae Radix Alba with Improving Sleep Function

LI Yue-feng, ZHANG Ze-guo, XU Fu-ju, WU Ping-an, LIU Feng-lin, WANG Rui-qiong, YAN Xing-ke*

(University of Traditional Chinese Medicine of Gansu, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To study active constituents of Paeoniae Radix Alba with improving sleep function. **Method:** Wistar rats were randomly divided into normal control, paeoniflorin $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, administered group (intra-gastric administration) ig administered once daily for 7 d, 5 h after the last administration of the preparation of serum or cerebrospinal fluid extraction, and serum by HPLC Sini San transitional cerebrospinal fluid composition; after ig administration or continuous 7 d, ip sodium pentobarbital $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, sleep time was measured using mouse righting reflex method. By using HPLC method, the gradient elution, and determine the transmigration ingredient of blood serum in Paeoniae Radix Alba. The chromatograph condition: Hypersil C_{18} column ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$), speed of flow $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, column warm $25 \text{ }^\circ\text{C}$, flowing A is acetonitrile; flowing B is (pH 3) phosphorus acid water, the flowing A gradient elution (5% - 95% acetonitrile), the analysis time is 140 min. **Result:** By the analysis of the compound in cerebrospinal fluid, we found that there was no other compound absorbed into blood except for the pentobarbitalum natricum. Moreover, the endogenous substance in cerebrospinal fluid was increased obviously. Increasing peak area of the endogenous substance in cerebrospinal fluid. Results of the pharmacological experiment indicated that Paeoniae Radix Alba

[收稿日期] 20140106(013)

[基金项目] 教育部科学技术研究重点项目(212186); 甘肃省财政厅高校基本科研业务费专项(2013-2); 国家自然科学基金项目(81073077); 2010 年度甘肃省自然科学基金项目(1010RJA212); 2010 甘肃中医学院引进人才科研启动基金项目(2010-3)

[第一作者] 李越峰, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事炮制对中药化学成分的影响研究, Tel: 09318765585, E-mail: lyfyxk@126.com

[通讯作者] * 严兴科, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药及复方有效成分及质量研究, Tel: 0931-8765585, E-mail: lyfyxk@126.com

significantly prolonged the sleep time of mice induced by pentobarbital sodium. **Conclusion:** Finally, defining active constituents of *Paeoniae Radix Alba* improving sedation function, confirmed the efficacy of the material basis of the *Paeoniae Radix Alba* is paeoniflorin in the serum.

[**Key words**] *Paeoniae Radix Alba*; constituents absorbed into cerebrospinal fluid; improving sleeping; active constituents

白芍味苦、酸、甘,性微寒。归肝、脾经,具有养血调经,柔肝止痛,敛阴止汗之功^[2]。经药学研究发现,白芍主要含有芍药苷(paeoniflorin)、芍药内酯苷(albiflorin)、氧化芍药苷(oxypaeoniflorin)、苯甲酰芍药苷(benzoylpaeoniflorin)、芍药花苷、牡丹酚成分,此外尚含挥发油、脂肪油、树脂、鞣质、糖、淀粉、黏液质、 β -谷甾醇等^[3]。现代药理研究结果表明,芍药苷具有镇静、镇痛作用,能延长环己巴比妥钠对小鼠的睡眠时间,对五甲烯四氮唑所致的惊厥有拮抗作用。中药复方是中医临床用药的主要形式,化学成分是中药复方发挥药效作用的物质基础。中药指纹图谱技术是一种综合的、量化的化学分析鉴定手段,它的出现为分析中药复方化学成分提供了技术手段,因此建立复方指纹图谱反映的不仅是所含药物本身的信息,也反映了复方整体的天然组合化学库。近年来,经过对中药白芍的镇静催眠作用药效学研究发现,其在改善睡眠、提高睡眠质量方面具有独特的疗效^[4-6],但白芍的镇静催眠作用药效物质基础尚未明确,所以本实验采用 RP-HPLC 法构建白芍指纹图谱^[7],通过白芍血中移行成分分析、脑脊液中移行成分分析及白芍对戊巴比妥钠所致小鼠睡眠时间影响的药效研究,初步确认白芍改善睡眠作用的药效物质基础,为揭示其改善睡眠作用的机制提供可靠依据。

1 材料

1.1 药品与试剂 白芍购自哈尔滨市世一堂中药饮片厂,药材均经黑龙江中医药大学药学教研室都晓伟教授鉴定为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根。戊巴比妥钠(中国医药集团上海化学试剂公司),芍药苷(质量分数 > 98%,中国食品药品检定研究院),白芍冻干粉和五味子冻干粉(自制),胰蛋白酶(上海伯奥生物科技有限公司),三羟甲基氨基甲烷(Tris)、高氯酸均为分析纯,甲醇和乙腈均为 HPLC 级。

1.2 仪器 Shimad-ZU2010-A 高效液相色谱仪, Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m)和 C₁₈ 保护柱(大连依利特分析仪器有限公司), KDC-40 低速离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司),

B3200S-T 超声震荡仪(必能信超声上海有限公司)。
1.3 动物 Wistar 大鼠,雄性,体质量 200 ~ 220 g,昆明种小鼠,雄性,体质量 18 ~ 22 g,均由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,许可证号黑动字第 P00101006。

2 方法

2.1 白芍和五味子冻干粉的制备 精密称取白芍药材适量,加入 10 倍体积水,煎煮 2 次,每次 1 h,过滤,合并滤液,减压浓缩至稠膏状,并于 70 $^{\circ}$ C 水浴浓缩至(生药)0.6 kg·L⁻¹,采用先煎煮后冷冻干燥的工艺制备白芍冻干粉。工艺如下: -40 $^{\circ}$ C 制冷, -20 $^{\circ}$ C 保冻 2 h, -10 $^{\circ}$ C 保冻 16 h, 20 $^{\circ}$ C 干燥 5 h, 35 $^{\circ}$ C 二次干燥 2 h。此工艺条件下,获得的白芍冻干粉冻型饱满,复水性好,呈淡黄色,网状疏松,水分 < 1%。采用 HPLC 测定其中芍药苷 \geq 2.74%。五味子冻干粉的制备方法同白芍冻干粉的制备。

2.2 白芍冻干粉给药后大鼠血清样品的制备 取 Wistar 大鼠 80 只。称取冻干粉 20 g,加水溶解配成 0.5 kg·L⁻¹溶液,给大鼠灌胃,剂量为 4.95 g·kg⁻¹(约含芍药苷 43 mg),每天 1 次,连续 7 d。于末次给药后 5 h 给大鼠 ip 4 mL·kg⁻¹ 1% 戊巴比妥钠溶液麻醉,5 min 后肝门静脉取血,每只 5 mL,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,每只取血清 2 mL。随机将 2 只大鼠血清合并,加入甲醇 10 mL 快速混匀,密闭超声提取 10 min,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液在 40 $^{\circ}$ C 恒温条件下减压回收至干,残渣以甲醇 1 mL 溶解,0.45 μ m 滤膜过滤,10 μ L 进样进行移行成分分析。

2.3 白芍冻干粉及其主要成分芍药苷给药后大鼠脑脊液样品的制备 取 Wistar 大鼠 30 只,平均分为 3 组,分别为正常对照组、白芍冻干粉组、芍药苷组。称取冻干粉 20 g,加水溶解配成 0.5 kg·L⁻¹溶液,灌胃给药,正常对照组给予等体积蒸馏水。每天 1 次,连续 7 d。于末次给药后 5 h 给大鼠 ip 4 mL·kg⁻¹ 1% 戊巴比妥钠溶液麻醉,5 min 后用 1 mL 注射器于枕骨大孔抽取脑脊液,并将 10 只大鼠脑脊液合并,加入甲醇 5 mL 快速混匀,密闭超声提取 10 min,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液在 40 $^{\circ}$ C 恒温条件下减压回收至干,残渣以甲醇 1 mL 溶

解,0.45 μm 滤膜过滤,取 10 μL 进样进行移行成分分析。

2.4 大鼠血清和脑脊液中移行成分分析 HPLC。

表 1 不同时间最佳梯度洗脱

溶剂	0 min	15 min	30 min	40 min	42 min	60 min	72 min	75 min	82 min	85 min	90 min	100 min	120 min	135 min	140 min
乙腈/%	5	10	12	15	18	25	25	28	30	30	35	50	50	75	95
pH 3 磷酸水/%	95	90	88	85	82	75	75	72	70	70	65	50	50	25	5

2.5 戊巴比妥钠致小鼠睡眠时间的测定 小鼠 80 只,置实验室适应环境 1 周,随机分 4 组,分别为正常对照组、白芍冻干粉组、芍药苷组、五味子冻干粉组,每组 20 只。各药物组均灌胃给药,剂量均为 12 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (参照预实验结果),正常对照组给予等体积的蒸馏水。每天 1 次,连续 7 d。于末次给药前 8 h 禁食,给药 60 min 后,ip 戊巴比妥钠 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,室内温度保持在 20 $^{\circ}\text{C}$,湿度 40%。用翻正反射测定仪测定小鼠睡眠时间,以翻正反射消失达 1 min 以上者即为入睡,观察并记录翻正反射消失和恢复时间。

3 结果

3.1 大鼠血清中白芍冻干粉移行成分 HPLC 测定结果(图 1)表明,白芍冻干粉一次给药 7 d 后血清样品中有 15 种移行成分,经来源认定研究认为,其中 2 号成分为芍药苷。

Kromasil C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),流动相乙腈-磷酸水(pH 3)溶液,梯度见表 1,检测波长 240 nm,流速 0.8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

血清中白芍的移行成分芍药苷给药后脑脊液中该内源性物质峰面积亦高于正常脑脊液峰面积。

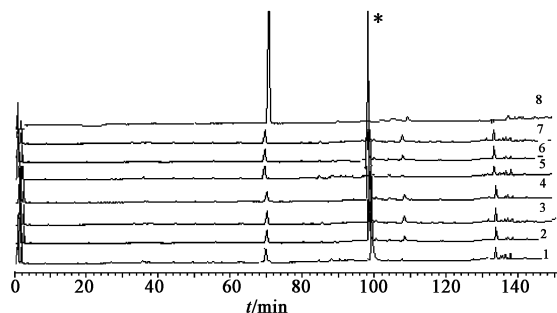
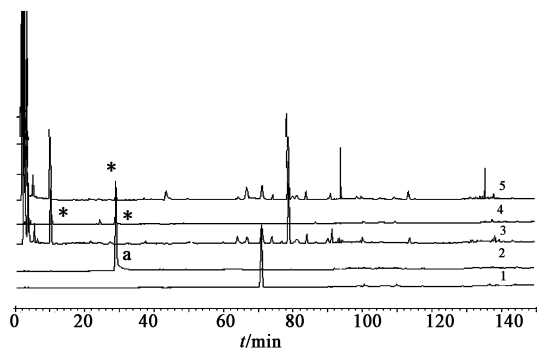


图 2 空白脑脊液(1)白芍脑脊液样品(2~7)及戊巴比妥钠(8)HPLC(240 nm)

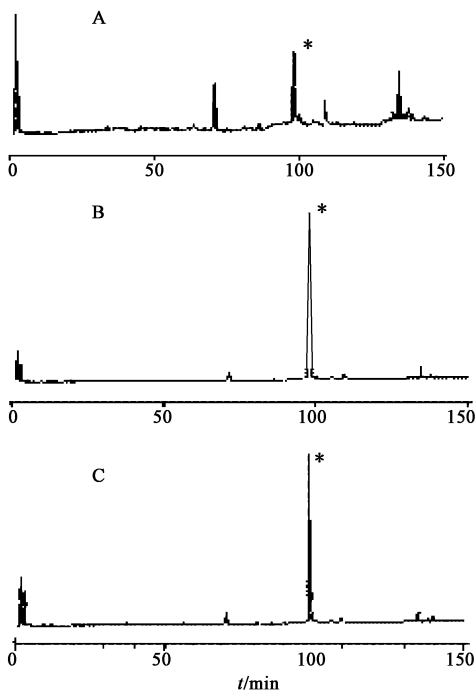


a. 芍药苷;*. 脑脊液中内源性物质(图 2,3 同)

1. 戊巴比妥钠;2. 混合对照;3. 空白血清;

4. 白芍冻干粉;5. 白芍血清样品

图 1 白芍冻干粉血中移行成分 HPLC(240 nm)



A. 脑脊液空白组; B. 白芍冻干粉组; C. 芍药苷 12 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组

图 3 白芍冻干粉给药后大鼠脑脊液中成分 HPLC(240 nm)

3.2 大鼠脑脊液中白芍冻干粉移行成分 经过综合分析,脑脊液中除戊巴比妥钠成分外,并无白芍冻干粉血清移行成分。如图 2 所示,正常脑脊液及给药组脑脊液中的 * 号成分保留时间及紫外吸收光谱一致为同一物质,表明是内源性物质。分析各峰面积比值(图 3),给予白芍冻干粉后脑脊液中内源性物质峰面积约是正常脑脊液峰面积的 10.2 倍。

3.3 白芍冻干粉改善睡眠的作用 从表 2 中可知,与空白组比较,白芍冻干粉组连续灌胃 7 d,均可明显延长阈剂量戊巴比妥钠所致小鼠睡眠时间,具有极显著性差异($P < 0.01$)。

表 2 芍药苷对戊巴比妥钠所致小鼠睡眠时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	睡眠时间/min
空白	-	108.32 ± 25.33
芍药苷	12	216.06 ± 105.03 ¹⁾
白芍冻干粉	12	218.64 ± 143.79 ¹⁾
五味子冻干粉	12	121.18 ± 98.25

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

通过白芍冻干粉血清中移行成分分析,白芍冻干粉连续给药 7 d 后血清样品中有 15 种移行成分,经来源认定研究认为,其中 2 号成分为芍药苷。

经过综合分析,脑脊液中除戊巴比妥钠成分外,并无血中移行成分的进入,空白脑脊液及给药组脑脊液中的 * 号成分保留时间及紫外吸收光谱一致为同一物质,说明是内源性物质,从峰面积比值来看给予白芍冻干粉后脑脊液中内源性物质峰面积约是空白脑脊液峰面积的 10.2 倍。血清中白芍冻干粉的移行成分芍药苷可以使脑脊液中该内源性物质峰面积高于空白脑脊液峰面积,与白芍冻干粉作用相近,根据上述结果,笔者认为血清移行成分芍药苷可能就是白芍冻干粉改善睡眠作用的药效物质基础。

给药后脑脊液中的成分含量明显高于空白脑脊液中成分含量,说明在连续给药后,大鼠脑脊液中的内源性物质分泌增多,至于该成分为何种物质有待进一步研究。通过对脑脊液成分分析的研究发现,白芍冻干粉在体内发挥改善睡眠作用时,表现出了一种内部调控作用,这在某种程度上解释了白芍冻干粉在改善睡眠作用方面所具有的独特的药理作用,这一点与化学合成药物存在较大的差别^[9]。依据上述实验结果,笔者以脑脊液中内源性活性物质为观察指标,研究表明:芍药苷、白芍冻干粉均能使脑脊液中内源性物质峰面积增高,血清移行成分芍药苷作用最强,所以以血清移行成分芍药苷作为目标成分,结合药效学研究,确认白芍冻干粉改善睡眠作用的主要药效物质基础,为白芍冻干粉改善睡眠作用机制研究奠定了基础。

至今为止,有关白芍冻干粉的改善睡眠作用的研究还仅局限于临床观察阶段。为此,本研究应用中枢神经系统药理研究方法,通过白芍冻干粉对戊巴比妥钠所致小鼠睡眠时间的影响来阐明其改善睡眠的药理作用。药物能否延长戊巴比妥钠所致小鼠的睡眠时间是中枢神经系统药理实验研究中观察药

物是否有镇静催眠作用的常用的实验方法^[10]。本实验观察了白芍冻干粉对戊巴比妥钠所致小鼠睡眠时间的影响。实验结果表明,给予小鼠白芍冻干粉 $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续灌胃 7 d,可明显延长戊巴比妥钠所致小鼠睡眠时间,与空白组比较,具有极显著性差异($P < 0.01$)。

白芍冻干粉改善睡眠作用药效物质基础的确认:①血清中白芍冻干粉的移行成分芍药苷峰面积较大,含量较高,所以药理活性较强,故以该成分为目标成分来确认药效物质基础;②该成分可以使脑脊液中内源性物质峰面积高于空白脑脊液峰面积,并与白芍冻干粉作用相近;③在延长戊巴比妥钠所致小鼠睡眠时间方面,芍药苷和白芍冻干粉组作用强于空白组。

因此,通过白芍冻干粉血中移行成分分析、脑脊液中移行成分分析及白芍冻干粉对戊巴比妥钠所致小鼠睡眠时间影响的药效研究,初步确认了白芍冻干粉的主要药效物质基础可能是血清中白芍冻干粉的移行成分芍药苷。

[参考文献]

- [1] 石志红,何建涛,常文保. 中药指纹图谱技术[J]. 大学化学,2004,19(1):33.
- [2] 蒋晔,郝晓花,刘红菊. 中药指纹图谱的构建与解析[J]. 中成药,2004,26(4):262.
- [3] 扬桂芳,王鹏. 中药指纹图谱的建立方法和作用[J]. 时珍国医国药,2004,15(1):21.
- [4] 罗燕,林明美. 柴胡皂甙薄层扫描定量法[J]. 药物分析杂志,1987,6(2):104.
- [5] 宋坤,毛颐晴. 指纹图谱在中药复方研究中的应用[J]. 时珍国医国药,2002,13(11):699.
- [6] 李越峰,李廷利. 四逆散中有效成分芍药苷对睡眠影响的实验研究[J]. 中成药,2011,33(4):690.
- [7] 李廷利,朱维莉,齐凤琴,等. 四逆散催眠作用的实验研究[J]. 中医药信息,2004,21(1):封三.
- [8] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究技术要求(暂行)[S]. 2000:25.
- [9] Dugovic C. Role of serotonin in sleep mechanisms[J]. Rev Neurol, 2001,16(3):157.
- [10] Zhao X, Cui X Y, Chen B Q, et al. Tetrandrine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid from Chinese herb Radix, augmented the hypnotic effect of pentobarbital through serotonergic system [J]. Eur J Pharmacol, 2004, 506:101.

[责任编辑 聂淑琴]