

基于催眠药效筛选考察参苓颗粒的提取纯化工艺

程刚, 王丹, 胡奎, 苏梦, 李媛媛, 许汉林
(湖北中医药大学药学院, 武汉 430065)

[摘要] **目的:**通过主要催眠药效研究对参苓颗粒提取纯化工艺进行筛选,为确定该制剂的制备工艺提供实验依据。**方法:**自制单提油醇沉、单提油不醇沉、合提油醇沉及合提油不醇沉4组不同工艺路线的参苓颗粒浸膏,采用翻正反射睡眠试验考察各组浸膏对小鼠阈下、阈剂量戊巴比妥钠协同作用的影响;采用环磷酰胺、氯化可的松致阴血亏虚及水平台法剥夺睡眠48 h,建立阴血亏虚失眠证候大鼠复合模型,通过HPLC测定各组浸膏大鼠脑组织中氨基酸类神经递质谷氨酸(Glu),甘氨酸(Gly),牛磺酸(Tau)及 γ -氨基丁酸(GABA)的含量变化。**结果:**4组浸膏对小鼠阈下、阈剂量戊巴比妥钠均表现不同程度的协同作用,尤以单提油醇沉组显著缩短小鼠睡眠潜伏期、显著延长小鼠睡眠时间;与空白组比较,模型组大鼠脑组织Glu, Tau及GABA含量均明显升高, Glu/(Tau + GABA)比例增高,经各浸膏组干预后含量均不同程度下降,其中单提油醇沉组表现更为显著, Glu/(Tau + GABA)比例也在下调。**结论:**参苓颗粒的制备工艺优选单独提取挥发油合并醇沉的纯化工艺路线。

[关键词] 参苓颗粒; 戊巴比妥钠; 阴虚; 失眠; 氨基酸类神经递质

[中图分类号] R283.6; R285.5; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)12-0017-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016120017

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160426.1018.012.html>

[网络出版时间] 2016-04-26 10:18

Investigation of Extraction and Purification Process of Shenling Granules Based on Screening of Hypnotic Efficacy

CHENG Gang, WANG Dan, HU Kui, SU Meng, LI Yuan-yuan, XU Han-lin
(Pharmacy Faculty, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To provide experimental basis for guiding preparation process of Shenling granules by investigating hypnotic efficacy on extraction and purification process. **Method:** Four groups of extract with different process were prepared. Effects of each extract on synergistic action of pentobarbital sodium with sub-threshold dose and threshold dose on mice were investigated by righting reflex test. Multiple factors model were established with Yin and blood-deficiency induced by cyclophosphamide and hydrocortisone, and sleep deprivation 48 h induced by water platform method. Content levels of amino acid neurotransmitters in brain tissue of rats were determined by HPLC, glutamate (Glu), glycine (Gly), taurine (Tau) and γ -aminobutyric acid (GABA), to name a few. **Result:** Four groups of extract had different synergistic effect on pentobarbital sodium with sub-threshold dose and threshold dose on mice, especially the group of single volatile oil extraction and alcohol precipitation can significantly shorten sleep latency of mice and prolong sleeping time of mice. Compared with the blank group, contents of Glu, Tau, GABA and ratio of them in brain tissue of the insomnia model rats showed a considerable elevation. While contents of these indicators decreased in different degree after treatment of extract, among them the group of single volatile oil extraction and alcohol precipitation showed more significant, ratio of Glu/(Tau + GABA) was reduced simultaneously. **Conclusion:** Process route of single volatile oil extraction and

[收稿日期] 20151030(008)

[基金项目] 国家科技部科技基础专项(2014FY111100-2)

[第一作者] 程刚,在读硕士,从事中药新制剂与新剂型的研究, Tel:15271898630, E-mail:1245426867@qq.com

[通讯作者] *许汉林,博士生导师,教授,从事中药新制剂与新剂型的研究, Tel:027-68890239, E-mail:Xhl4201@sina.com

alcohol precipitation is the best preparation process of Shenling granules.

[**Key words**] Shenling granules; pentobarbital sodium; Yin deficiency; insomnia; amino acid neurotransmitters

失眠是一种影响健康的最常见疾病,随着现代社会经济的高速发展,生活节奏不断加快,失眠症日益成为困扰人们身心健康的隐患杀手。血亏阴虚型失眠是临床常见失眠证型之一,治宜养血安神、清热除烦。可用经典名方补心枣仁汤化裁^[1],由丹参、茯苓、石菖蒲等 9 味中药组成,诸药合用,具有滋阴清热、养血安神的功效。

中药颗粒剂既保持了汤剂吸收快、显效迅速等优点,又克服了汤剂服用前临时煎煮、费时耗能、久置易霉败变质等不足,同时利于中药用药的科学化、规范化、标准化^[2]。本课题组研制的参苓颗粒是按新药指导原则在补心枣仁汤剂基础上进行的剂型改良,基本工艺为丹参采用乙醇渗漉提取,石菖蒲提取挥发油,二者药渣与茯苓等剩余 7 味药材合并水煮回流,浓缩,纯化,最后加入适量辅料制成颗粒。戊巴比妥钠对中枢神经系统有抑制作用,因剂量不同而表现出镇静、催眠、抗惊厥等不同作用,其作用机制可能是由于阻断脑干网状结构上行激活系统使大脑皮层转入抑制,为中效催眠药^[3-4]。谷氨酸(Glu),天门冬氨酸(Asp),甘氨酸(Gly),牛磺酸(Tau)及 γ -氨基丁酸(GABA)是大脑海马结构中分布最广泛、研究最多的神经递质,研究表明前两者属于兴奋性递质,后三者则为抑制性递质^[5-7]。这些神经递质的含量变化与脑部生理功能和病理变化息息相关,是诊断神经系统疾病常用的生化指标。为探究颗粒制备工艺中不同提取纯化操作所得浸膏对动物催眠药效的优劣性,本实验通过考察各组浸膏对小鼠阈下剂量、阈剂量戊巴比妥钠协同作用的影响,以 Glu, Gly, Tau 及 GABA 的含量为指标,从神经毒性角度分析参苓颗粒对阴虚失眠证候模型大鼠的干预效果,为该制剂的制备工艺优选提供实验依据。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), CR21G-II 型高速冷冻离心机(日本日立公司), AD145S-P 型超细匀浆机(上海昂尼仪器仪表有限公司), BP211D 型 1/10 万电子分析天平(德国 Sartorius 公司), 雷磁 PHS-3C 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司);睡眠剥夺箱(自制,长 72 cm,宽 48 cm,高 30 cm),内置 6 个直径 8 cm,高 8 cm 的平台,平台间间隔 16 cm,平台与鼠箱箱体壁间隔 8

cm,在平台周边注满水,水面距平台面约 1 cm,大鼠在平台上可自行饮食饮水,并可在不同平台上自由活动,于箱体上放平行的不锈钢丝笼罩,上面放水和食物;环境对照箱(自制),与睡眠剥夺箱相似,但在距其底部 8 cm 处不放置平台,而是放置一面细密铁丝网,大鼠在网上可自由活动,其他条件均与睡眠剥夺组相同,以形成与睡眠剥夺组相似的环境。

谷氨酸(Glu),甘氨酸(Gly)和牛磺酸(Tau)对照品(中国食品药品检定研究院,批号依次为 140690-201203, 140689-201103, 111616-201304), γ -氨基丁酸(GABA)对照品(美国 Sigma 公司,批号 101467991),注射用环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 14082125),注射用氯化可的松琥珀酸钠(烟台北方制药有限公司,批号 201405061),艾司唑仑片(山东信谊制药有限公司,批号 140808),戊巴比妥钠(Solarbio 公司,批号 6900183),乙腈为色谱级,水为双重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

药材均购置于安徽省普信医药销售有限公司,经湖北中医药大学药教研室潘宏林教授鉴定,均符合 2015 年版《中国药典》的相关项下要求。浸膏一号(丹参采用乙醇渗漉提取,得 A,石菖蒲回流提取挥发油 B,二者药渣与茯苓等剩余药材加水回流煎煮,滤液浓缩醇沉纯化,得 C,合并 A, B 和 C),浸膏二号(同一号 A 和 B 制备方法得 D 和 E,照 C 步骤滤液浓缩不纯化得 F,合并 D, E 和 F),浸膏三号(同一号 A 制备方法得 G,渗漉药渣与全方剩余所有药材一并水煎煮提取挥发油 H,滤过药液浓缩醇沉纯化得 I,合并 G, H 和 I),浸膏四号(同一号 A 制备方法得 J,渗漉药渣与全方剩余所有药材一并水煎煮提取挥发油 K,滤过药液浓缩不纯化得 L,合并 J, K 和 L)。

健康雌雄各半的 Wistar 大鼠共 88 只,SPF 级,体重(200 ± 20.0) g;健康雄性 KM 系小鼠 100 只,SPF 级,体重(20 ± 2.0) g;均由湖北省实验动物中心提供,合格证号分别为 SCXK(鄂)2008-0005, SCXK(鄂)2015-0018。

2 方法与结果

2.1 参苓浸膏对戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠协同考察^[8-10]

2.1.1 对阈下剂量戊巴比妥钠的协同作用 健康

雄性 KM 系小鼠 100 只,随机分为空白组、安定阳性组及浸膏一号、二号、三号、四号组,其中浸膏组中每组细分大、小剂量组,共计 10 组,每组 10 只。按人体与小鼠等效剂量折算,阳性组和浸膏组大、小剂量组给药剂量分别为 1.3×10^{-4} , $18, 6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 给药体积 $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, 对照组灌服等量生理盐水。各组小鼠每天灌胃给药 1 次,连续 6 d,于最后 1 次给药 1 h 后(禁食不禁水 12 h),每鼠腹腔注射阈下剂量的戊巴比妥钠液 $28 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。记录 30 min 内小鼠翻正反射消失的只数(即睡眠小鼠数),计算小鼠入睡率(小鼠入睡率 = 入睡小鼠个数/每组小鼠总数 $\times 100\%$)。计数资料则采用 χ^2 检验,结果见表 1。

表 1 参苓颗粒浸膏对阈下剂量和阈剂量戊巴比妥钠的协同作用 ($n = 10$)

Table 1 Synergistic effect of Shenling granules extract on pentobarbital sodium with sub-threshold dose and threshold dose ($n = 10$)

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	入睡 动物数 $/\text{只}$	睡眠率 $/\%$	入睡潜伏期 ($\bar{x} \pm s$) $/\text{min}$	睡眠维持时间 ($\bar{x} \pm s$) $/\text{min}$
空白	-	1	10	6.27 ± 1.08	24.59 ± 1.66
安定阳性	1.3×10^{-4}	8	80 ¹⁾	$3.56 \pm 0.65^{1)}$	$49.53 \pm 1.52^{1)}$
浸膏一号	6	5	50	$5.06 \pm 0.95^{2)}$	$41.76 \pm 2.02^{1)}$
	18	7	70 ²⁾	$4.38 \pm 0.81^{1)}$	$46.77 \pm 2.53^{1)}$
浸膏二号	6	4	40	5.75 ± 0.88	$32.37 \pm 1.37^{1)}$
	18	5	50	$5.25 \pm 0.82^{2)}$	$39.05 \pm 2.39^{1)}$
浸膏三号	6	5	50	5.39 ± 0.82	$40.99 \pm 1.44^{1)}$
	18	6	60 ²⁾	$4.49 \pm 0.75^{1)}$	$44.18 \pm 1.95^{1)}$
浸膏四号	6	3	30	5.79 ± 0.89	$30.98 \pm 1.48^{1)}$
	18	4	40	5.45 ± 1.10	$37.01 \pm 2.32^{1)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

由表 1 可知,与空白组比较,阳性组、各浸膏组均能增加阈下剂量戊巴比妥钠致小鼠入睡率;其中阳性组能极显著提高小鼠入睡率,4 组浸膏对小鼠阈下戊巴比妥钠均表现了不同程度的协同作用,尤以浸膏一号与三号的大剂量组能显著提高小鼠入睡率;各浸膏组大剂量比小剂量组对小鼠入睡率有提高的趋势。

2.1.2 对阈剂量戊巴比妥钠的协同作用

健康雄性 KM 系小鼠 100 只,分组、灌胃体积和给药剂量同 2.1.1 项。每天给药 1 次,连续给药 7 d。于最后一次给药后 1 h(禁食不禁水 12 h),每鼠腹腔注射戊巴比妥钠 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,记录小鼠入睡的潜伏期(从注射戊巴比妥钠到翻正反射消失为睡眠潜伏期)和

睡眠时间(以翻正反射消失 1 min 以上者为入睡,以翻正反射消失到翻正反射恢复为睡眠时间)。见表 1。结果显示与空白组比较,阳性组、各浸膏组均能缩短阈剂量戊巴比妥钠致小鼠入睡潜伏期,显著延长小鼠睡眠时间;4 组浸膏对小鼠阈剂量戊巴比妥钠均表现不同程度的协同作用,尤以浸膏一号显著缩短小鼠睡眠潜伏期、显著延长小鼠睡眠时间;各浸膏组大剂量比小剂量组对小鼠睡眠维持时间显著增加。

2.2 参苓浸膏对阴虚失眠证候模型大鼠干预效果考察

2.2.1 血亏阴虚失眠证候大鼠模型制作^[11-13] 将氢化可的松注射液按 $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的剂量腹腔注射 5 d 以制作阴虚模型,同时将环磷酰胺注射液按 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腹腔注射 5 d 以制作血虚模型,放入自制睡眠剥夺箱进行睡眠剥夺 2 d。造模 1 周后,环境对照组大鼠神态矫健,行动灵活,眼睛粉红明亮,鼻唇洁净潮润,尾巴粗、圆、色粉红,背腰平直,被毛光泽而密。失眠模型组大鼠面色无华,经常低头,精神萎靡不振,毛蓬竖少光泽,口唇或黏膜淡白失泽,耳、尾苍白,眼裂变窄(闭目),嗜睡,食欲明显下降,体型消瘦,团缩弓腰,行动摇晃,呼吸急促等血亏阴虚体表特征。

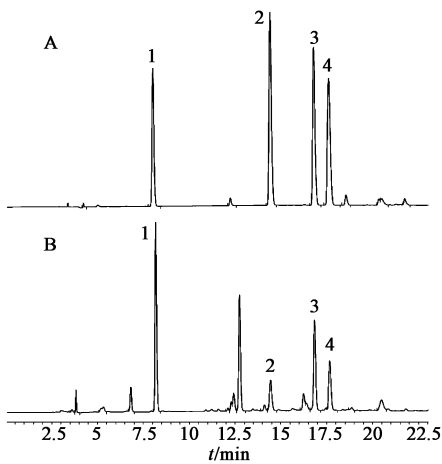
2.2.2 动物分组及给药 将大鼠 88 只随机分为空白组、失眠模型组、安定阳性组和浸膏一号、二号、三号、四号组,各浸膏组分别划分大、小剂量组。共计 11 组,每组 8 只。安定阳性组大鼠在造模后按 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 连续灌胃 10 d,各浸膏组大、小剂量分别为 $15, 7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,连续灌胃 10 d,空白组和失眠模型组大鼠则分别给予等量生理盐水。

2.2.3 试液配制^[14] 最后 1 次给药结束 40 min 后将各组大鼠断头处死后取出双侧脑组织,在冰台上迅速分离双侧前脑皮质、下丘脑和海马组织,以冰生理盐水冲洗后除去残血,吸干后称重,加入适量无水乙醇,在冰浴下用高速匀浆机制成脑匀浆液,匀浆条件为每次 10 s,间隔 15 s,共计 4 次。将匀浆液于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $15\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 25 min,分离上清液,得供试品溶液,于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存待测。精密称定 Glu, Gly, Tau 及 GABA 对照品 10.01, 10.03, 10.02, 10.01 mg,置于同一 10 mL 量瓶中,用 50% 甲醇溶解并定容至刻度,得质量浓度均为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品储备液,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中储存,备用。将邻苯二甲醛(OPA) 5 mg 溶于 100 μL 甲醇中,加入 β -巯基乙醇 5 μL ,用 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂-氢氧化钠缓冲液(pH

9.5) 稀释至 5 mL, 配成 OPA 衍生化溶液, 密封后低温避光保存, 24 h 后使用。

2.2.4 样品柱前衍生化^[15] 取对照品溶液或处理后脑组织样品 30 μL , 加入 2 倍量 OPA 溶液在室温下反应, 精确记时在微型混合器上混匀 30 s, 静置 1 min 后立即注入高效液相色谱仪进行分析。

2.2.5 色谱条件^[16] 月旭 Ultimate[®] LP-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 200 mm, 5 μm), 流动相 0.05 mol \cdot L⁻¹ 乙酸钠缓冲液(A, pH 6.5)-50% 乙腈(B) 梯度洗脱(0~10 min, 16%~45% B; 10~25 min, 45%~85% B), 流速 1 mL \cdot min⁻¹, 检测波长 360 nm, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 20 μL , 采用外标法定量。结果 4 种氨基酸得到了有效分离, 相互之间无干扰且峰形良好, 理论塔板数按 GABA 计 > 2000 。见图 1。



1. Glu; 2. Gly; 3. Tau; 4. GABA

图 1 氨基酸对照品(A)和大鼠脑组织(B)的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of standard substances of amino acid (A) and rat brain tissue (B)

2.3 方法学验证

2.3.1 线性关系考察 精密量取 2.2.3 项下氨基酸混合对照储备液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 4.0 mL, 用 50% 甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 照 2.2.4 项下方法柱前衍生后进样, 按 2.2.5 项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 得 Glu, Gly, Tau 和 GABA 的回归方程分别为 $Y = 3\,997.1X + 13.065$ ($r = 0.999\,8$), $Y = 8\,473.3X - 43.835$ ($r = 0.999\,5$), $Y = 5\,844.5X - 3.527$ ($r = 0.999\,9$), $Y = 6\,420.1X - 19.271$ ($r = 0.999\,7$), 线性范围依次为 0.200 2 ~ 8.008, 0.200 6 ~ 8.024, 0.200 4 ~ 8.016, 0.200 2 ~ 8.008 μg 。

2.3.2 精密度试验 取同一份脑组织样品, 照 2.2.4 项下方法预处理, 同日内或连续 3 d 按 2.2.5

项下色谱条件重复测定 6 次, 计算 Glu, Gly, Tau 和 GABA 峰面积的日内 RSD 依次为 6.4%, 1.6%, 1.5%, 2.7%, 日间 RSD 依次为 7.3%, 3.3%, 3.4%, 4.9%, 表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 取同一份脑组织样品, 照 2.2.4 项下方法重复预处理 5 次, 将处理后的 5 批样品按 2.2.5 项下色谱条件测定, 结果 Glu, Gly, Tau 和 GABA 峰面积的 RSD 依次为 3.5%, 4.1%, 3.0%, 4.5%, 表明该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一份脑组织样品, 照 2.2.4 项下方法预处理, 分别于 0, 2, 4, 8, 12 h 按 2.2.5 项下色谱条件测定, 结果 Glu, Gly, Tau 和 GABA 峰面积的 RSD 依次为 1.8%, 5.6%, 4.7%, 4.8%, 表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.3.5 加样回收率试验 取一组空白大鼠脑组织样品, 共均分成 8 份, 其中 4 份加入等体积 0.02 g \cdot L⁻¹ 氨基酸混合对照品溶液, 另 4 份则加入等体积 50% 甲醇, 同时准备 4 份 0.02 g \cdot L⁻¹ 混合对照品溶液, 将此 12 份样品分别按 2.2.4 项下方法预处理, 利用增量法^[15] 计算回收率。结果 Glu, Gly, Tau 和 GABA 的平均回收率分别为 88.37%, 97.29%, 98.49%, 102.58%, RSD 依次为 3.2%, 4.0%, 3.9%, 4.8%, 表明该方法稳定可行。

2.4 各组大鼠脑组织中氨基酸的含量测定 取各组大鼠脑组织样品, 照 2.2.4 项下方法柱前衍生后, 按 2.2.5 项下色谱条件测定, 采用 SPSS 21.0 软件包进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 见表 2。结果显示与空白组比较, 失眠模型组大鼠脑组织 Glu, Tau 及 GABA 含量均明显升高, 经各浸膏组干预后含量均有不同程度下降, 其中浸膏一号下降更为显著, Glu/(Tau + GABA) 比例也在下调。而 Gly 含量在各组大鼠脑组织中变化均不大, 尚未发现 Gly 与失眠的关联性, 与文献[14]报道相符。

2.5 参苓颗粒制备工艺路线确定 通过对阈下剂量、阈剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠协同影响和对阴虚失眠证候大鼠脑内氨基酸类神经递质含量影响 2 项初步药效评价, 参苓颗粒制备工艺中的不同提取纯化操作所得浸膏对动物促眠效果影响不尽相同。浸膏一号、二号由于对石菖蒲单独提取挥发油比全方水提效率更高, 药效表现总体上好于浸膏三号、四号; 而浸膏一号、三号由于对水提药液进行了醇沉纯化处理, 相较未经醇沉纯化处理的浸膏二号、四号在动物促眠效果上更显著。最终确立浸膏一号的工艺路线, 即石菖蒲单独提取挥发油, 丹参渗漉提取, 获

表 2 大鼠脑组织中氨基酸类神经递质的质量分数测定 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	Glu	Gly	Tau	GABA
空白	-	0.438 9 \pm 0.106 1	0.105 5 \pm 0.009 0	0.201 9 \pm 0.051 1	0.132 0 \pm 0.032 5
失眠模型	-	0.928 1 \pm 0.193 9 ¹⁾	0.110 1 \pm 0.017 3	0.355 0 \pm 0.021 6 ¹⁾	0.255 1 \pm 0.041 9 ¹⁾
安定阳性	2×10^{-3}	0.679 5 \pm 0.047 0 ³⁾	0.100 5 \pm 0.010 0	0.298 4 \pm 0.033 2 ³⁾	0.190 1 \pm 0.017 1 ³⁾
浸膏一号	7.5	0.660 5 \pm 0.039 1 ³⁾	0.110 9 \pm 0.013 6	0.299 0 \pm 0.034 0 ³⁾	0.178 2 \pm 0.013 9 ³⁾
	15	0.618 0 \pm 0.056 6 ³⁾	0.107 3 \pm 0.007 3	0.284 8 \pm 0.039 3 ³⁾	0.179 9 \pm 0.013 9 ³⁾
浸膏二号	7.5	0.709 0 \pm 0.016 3 ⁴⁾	0.103 2 \pm 0.010 2	0.299 8 \pm 0.028 1 ³⁾	0.212 3 \pm 0.016 4 ⁴⁾
	15	0.702 5 \pm 0.014 4 ⁴⁾	0.096 3 \pm 0.011 6	0.292 7 \pm 0.019 1 ³⁾	0.206 6 \pm 0.011 8 ⁴⁾
浸膏三号	7.5	0.697 7 \pm 0.022 7 ⁴⁾	0.108 8 \pm 0.017 1	0.305 8 \pm 0.006 2 ⁴⁾	0.214 0 \pm 0.010 9 ⁴⁾
	15	0.692 1 \pm 0.073 7 ³⁾	0.110 1 \pm 0.017 7	0.296 2 \pm 0.028 8 ³⁾	0.211 7 \pm 0.015 1 ⁴⁾
浸膏四号	7.5	0.694 7 \pm 0.040 6 ⁴⁾	0.114 1 \pm 0.009 1	0.308 5 \pm 0.066 4	0.244 6 \pm 0.011 1
	15	0.707 5 \pm 0.014 6 ⁴⁾	0.107 2 \pm 0.043 8	0.303 7 \pm 0.017 2 ⁴⁾	0.231 5 \pm 0.009 9

注:与失眠模型组比较³⁾ $P < 0.01$,⁴⁾ $P < 0.05$ 。

苓等剩余药材合并药渣一起水提醇沉处理,所得浸膏即可用于后续颗粒剂制备。

3 讨论

在中医学中,失眠通常被称为“不寐”,《黄帝内经》称之为“不得卧”、“不得眠”、“目不瞑”等,是指因外感或内伤等因素导致脏腑机能紊乱、阴阳失调所引起的神不守舍睡眠障碍性疾病^[17]。中医认为正常的睡眠依赖于人体的阴平阳秘、脏腑调和、气血充足、心神安定。因此,患者的先天禀赋、生理状态及外邪内扰等方面引起的阴阳失调、脏腑失和、气血亏虚均能导致失眠症的发生。对于失眠症的治疗,与西药相比,中药以其药源广泛、副作用和依赖性小等优势,日益受到人们关注。本课题拟研制的参苓颗粒复方组成来自补心枣仁汤,由丹参、茯苓、石菖蒲等 9 味中药组成。全方滋阴养血、补益心肝,用于虚证之失眠,甚为相宜。

石菖蒲在全方中具有醒脑开窍、行气活血的功效,对脑组织和神经细胞有很好的保护作用^[18]。挥发油是石菖蒲镇静、催眠、抗惊厥作用的主要有效部位^[19]。因此,对于全方一起水煎和石菖蒲单独回流提取挥发油在得率上的差异势必会对浸膏药效表现上产生一定影响。水提醇沉法被广泛用于中药水提液的纯化,醇沉操作对中药固体制剂疗效、服用剂量、制剂成型及产品稳定性有重要影响^[20]。通过醇沉除杂后虽能保留提取液中生物碱类、苷类、氨基酸类、有机酸类等化合物,但纯化除杂也必然会影响到中药复方的整体性、复杂性和综合性等,不可盲目选择^[21]。较以往研究中多以某一化学成分的转移率

和含量等分析手段来考察药物的质量,本研究侧重于从动物药效方面上来佐证工艺路线的合理性,为确立参苓颗粒最佳制备工艺提供了依据。

阈下剂量和阈剂量戊巴比妥钠致小鼠协同作用中的入睡率与睡眠时间是被广泛采用的镇静催眠药理实验的基础指标。失眠与中枢神经系统兴奋性氨基酸与抑制性氨基酸神经递质的平衡失调密切相关,因而,Glu,Tau 和 GABA 代谢比例的改变对维持神经细胞抑制与兴奋功能的稳态具有极重要的作用^[14,22]。结果显示浸膏一号组显著缩短小鼠睡眠潜伏期、显著延长小鼠睡眠时间,且呈现一定的剂量依赖性,同时明显降低失眠大鼠模型脑皮层及下丘脑 Glu,Tau 和 GABA 的含量,且 Glu 下调更为显著。发生这些变化的原因可能是其对复合造模引起的亢进或紧张紊乱状态下的皮质细胞获得调节,从而使兴奋与抑制过程恢复平衡。因此,结合 2 项初步催眠药效实验确立了以浸膏一号为主的工艺路线。而关于参苓颗粒制备工艺参数的优化和制剂的进一步药效学研究正在开展相关的后续工作。

[参考文献]

[1] 蒋俊.失眠的证治规律研究[D].长沙:湖南中医药大学,2009.

[2] 何龙,姚尧.中药颗粒剂的研究现状及应用前景分析[J].中国当代医药,2010,17(9):82-83.

[3] 刘琼丽,易继涛,李玉山,等.夜交藤提取物对小鼠中枢神经系统作用的实验研究[J].临床和实验医学杂志,2014,13(17):1404-1406.

[4] 许葆芳.酸枣仁汤治疗甲亢失眠的临床疗效研究

- [D]. 广州:广州中医药大学,2009.
- [5] Palma-Cerda F, Auger C, Crawford D J, et al. New caged neurotransmitter analogs selective for glutamate receptor subtypes based on methoxynitroindoline and nitrophenyl ethoxycarbonyl caging groups [J]. *Neuropharmacology*, 2012, 63 (4) :624-634.
- [6] Zinellu A, Sotgia S, Deiana L, et al. Analysis of neurotransmitter amino acids by CE-LIF detection in biological fluids [J]. *Methods Mol Bio*, 2013, 919: 35-42.
- [7] Xiong G, Zhang L, Mojsilovic-Petrovic J, et al. γ -GABA and glutamate are not colocalized in mossy fiber terminals of developing rodent hippocampus [J]. *Brain Res*, 2012, 1474:40-49.
- [8] 魏伟, 吴希美, 李元健. 药理实验方法学 [M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2010:639-642.
- [9] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1993:659-671.
- [10] 王希东, 郝少君, 张正臣. 抗眩颗粒对阈下和阈剂量戊巴比妥钠小鼠协同作用的影响 [J]. *中医学报*, 2013, 28 (8) :1168-1169.
- [11] 黄攀攀, 王平, 李贵海, 等. 老年阴虚失眠动物模型的建立与评价 [J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28 (8) : 1719-1723.
- [12] 游秋云. 老年血亏阴虚失眠证候大鼠模型的建立及酸枣仁汤干预作用研究 [D]. 武汉:湖北中医学院, 2008.
- [13] 游秋云, 王平, 吴丽丽, 等. 两种老年失眠证候大鼠模型的建立和评价 [J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26 (1) : 123-126.
- [14] 涂星, 郜红利, 卢映, 等. 荧光高效液相色谱法测定三种失眠模型大鼠脑组织氨基酸类神经递质的含量 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21 (5) :74-77.
- [15] 王晓菲, 罗晓星, 周四元, 等. RP-HPLC 法检测海马脑片灌流液中氨基酸类神经递质 [J]. *第四军医大学学报*, 2002, 23 (5) :426-428.
- [16] 周卿, 代广会, 左巨波, 等. RP-HPLC 法测定大鼠脑组织及脑脊液中四种氨基酸类神经递质的含量 [J]. *遵义医学院学报*, 2006, 29 (4) :395-397.
- [17] 啜阿丹. 失眠症患者相关因素、证候与汉密尔顿焦虑量表的相关研究 [D]. 北京:北京中医药大学, 2014.
- [18] 王睿, 费洪新, 李晓明, 等. 石菖蒲的化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31 (7) : 1606-1610.
- [19] 胡锦涛, 顾健, 王志旺. 石菖蒲及其有效成分对中枢神经系统作用的实验研究 [J]. *中药药理与临床*, 1999, 15 (3) :19-21.
- [20] 何雁, 辛洪亮, 黄恺, 等. 水提醇沉法中醇沉浓度对板蓝根泡腾片制备过程的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35 (3) :288-292.
- [21] 夏伯候, 刘菊妍, 李春, 等. 夏枯草水提液及水提醇沉上清液降血压药效评价 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20 (2) :113-116.
- [22] 游秋云, 王平, 孔明望, 等. 酸枣仁汤对老年血亏阴虚失眠证候模型大鼠脑组织谷氨酸、 γ -氨基丁酸及 γ -氨基丁酸 A 受体表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16 (14) :119-123.

[责任编辑 刘德文]