

四逆散镇静催眠作用的物质基础初步研究

李越峰^{1,2}, 苏云明², 李廷利³, 严兴科^{1*}

1. 甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000

2. 黑龙江中医药大学 博士后流动站, 黑龙江 哈尔滨 150040

3. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 初步确认四逆散镇静催眠作用的活性物质, 为揭示其镇静催眠作用的机制提供依据。**方法** 采用 HPLC 方法分析四逆散 ig 给药后大鼠血中及脑脊液中移行成分, 色谱条件为 Kromasil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 体积流量 0.8 mL/min, 柱温 28 ℃, 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为磷酸水 (pH 值为 3), 梯度洗脱 (10%~90% A), 分析时间为 140 min。**结果** 4 种成分辛弗林、芍药苷、柴胡皂苷 C、甘草次酸均可使脑脊液中内源性物质 5-羟色胺 (5-HT) 峰面积大于空白脑脊液中峰面积, 但作用不如四逆散冻干粉整方强, 且混合物组 (辛弗林-芍药苷-柴胡皂苷 C-甘草次酸) 脑脊液中 5-HT 峰面积是四逆散冻干粉组的 3.2 倍; 在延长戊巴比妥钠所致小鼠睡眠时间方面, 辛弗林、芍药苷、柴胡皂苷 C、甘草次酸及其混合物和四逆散冻干粉组作用强于对照组, 且混合物组优于四逆散冻干粉组。**结论** 通过四逆散冻干粉血和脑脊液中移行成分分析及四逆散冻干粉对戊巴比妥钠所致小鼠睡眠时间影响的药效研究, 初步确认了四逆散冻干粉的活性物质是血清中四逆散冻干粉的移行成分辛弗林、芍药苷、柴胡皂苷 C 及甘草次酸的混合物。

关键词: 四逆散; 镇静; 催眠; 物质基础; 辛弗林; 芍药苷; 柴胡皂苷 C; 甘草次酸

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)07-1361-05

Material basis of Sini Powder with sedative-hypnotic effect

LI Yue-feng^{1,2}, SU Yun-ming², LI Ting-li³, YAN Xing-ke¹

1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Postdoctoral Flow Station, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

3. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To confirm the active constituents in Sini Powder (freeze-dried powder) with the improving sedative-hypnotic function for the further studies on effective constituents and their mechanism. **Methods** By using HPLC method and gradient elution, chromatographic conditions were as follows: Kromasil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), flow rate 1.0 mL/min, column temperature 28 ℃; Mobile phase A was acetonitrile and mobile phase B was phosphoric acid water (pH = 3); mobile phase A gradient elution (10%—90% A), and the analysis time was 140 min. **Results** Synephrine, paeoniflorin, saikosaponin C, and glycyrrhetic acid could make the peak area of endogenous substance (5-hydroxytryptamine, 5-HT) in cerebrospinal fluid larger than that in blank cerebrospinal fluid. But all their effects were less than those of Sini Powder. The increasing peak area of 5-HT in cerebrospinal fluid by the mixture of synephrine-paeoniflorin-saikosaponin C-glycyrrhetic acid was 3.2 times as much as that of Sini Powder. The effects of synephrine, paeoniflorin, saikosaponin C, glycyrrhetic acid, their mixture, and Sini Powder on prolonging the sleeping time of mice induced by Pentobarbital sodium were significantly stronger than those in the control group, and the mixture group was better than the Sini Powder group. **Conclusion** Analysis on transitional composition of Sini Powder in blood and cerebrospinal fluid, and efficacy study on Sini Powder on sleeping time of mice induced by Pentobarbital sodium are carried out, which indicates that the active constituents (synephrine, paeoniflorin, saikosaponin C, and glycyrrhetic acid) in Sini Powder are confirmed and could improve the sedative function.

Key words: Sini Powder; sedation; hypnosis; material basis; synephrine; paeoniflorin; saikosaponin C; glycyrrhetic acid

收稿日期: 2011-06-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81073077); 教育部科学技术研究重点项目 (212186); 甘肃省自然科学基金资助项目 (1010RJZA212)

作者简介: 李越峰, 女, 副教授, 博士, 硕士生导师, 研究方向为中药及复方活性物质及机制研究。Tel: (0931)8765585 E-mail: lyfyxk@126.com

*通讯作者 严兴科 Tel: (0931)8765585 E-mail: lyfyxk@126.com

中药指纹图谱技术是一种综合的、可量化的化学分析鉴定手段,为全析中药复方化学成分提供了技术手段,因此中药复方指纹图谱反映的不仅是药物本身的信息,也反映了复方整体的天然化学成分集合^[1-3]。四逆散由柴胡、白芍、枳实、甘草4味药组成,始载于东汉张仲景的《伤寒论》,为和解少阳、调和肝脾的基础方剂,具有解郁透热、疏肝理脾、宣散气血郁滞之功效。前期实验对四逆散冻干粉的化学成分变化以及镇静催眠的药效学研究发现,该复方在镇静催眠、提高睡眠质量方面具有独特的疗效^[4-5]。本实验采用 RP-HPLC 法^[6]建立四逆散冻干粉指纹图谱,并进行了拆方对比分析,通过四逆散冻干粉血和脑脊液中移行成分分析及四逆散冻干粉对戊巴比妥钠所致小鼠睡眠时间影响的研究,初步确认四逆散冻干粉镇静催眠作用的活性物质,为揭示其镇静催眠的作用机制提供科学依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

柴胡为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根,购于河北省安国市康信义药材行;白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根,枳实(炙)为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥幼果,甘草(炙)为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根,均购自哈尔滨市世一堂中药饮片厂;以上药材均经黑龙江中医药大学药理学教研室都晓伟教授鉴定。戊巴比妥钠,中国医药集团上海化学试剂公司;甘草酸单铵盐(质量分数>98%,批号 0900-200602)、柴胡皂苷 C 和辛弗林(质量分数>98%),成都思科华生物技术有限公司;甘草次酸、芍药苷、柚皮苷、橙皮苷(质量分数>98%),中国药品生物制品检定所;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 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。

1.3 仪器

Shimad-ZU2010—A 高效液相色谱仪;色谱柱 Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 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。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备

精密称取芍药苷 0.521 4 g、柚皮苷 1.481 1 g、柴胡皂苷 A 0.754 4 g、甘草次酸 0.772 3 g 对照品,分别置 5 mL 量瓶中,甲醇溶解并定容至刻度,备用。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),检测波长 210、240 nm,体积流量 0.8 mL/min,柱温 28 ℃,流动相为乙腈(A)-磷酸水(pH 3),梯度洗脱,0~10 min, 10% A; 10~30 min, 10%~15% A; 30~35 min, 15%~18% A; 35~40 min, 18% A; 40~42 min, 18%~20% A; 42~62 min, 20%~28% A; 62~70 min, 28% A; 70~75 min, 28%~30% A; 75~80 min, 30%~33% A; 80~90 min, 33% A; 90~100 min, 33%~50% A; 100~115 min, 50% A; 115~120 min, 50%~60% A; 120~130 min, 60%~70% A; 130~140 min, 70%~90% A。

2.3 四逆散冻干粉的制备

精密称取四逆散各味药材适量,加入 10 倍体积水煎煮 2 次,每次 1 h,滤过,合并 2 次滤液,减压浓缩至稠膏状,于 70 ℃水浴浓缩至生药 0.8 kg/L。四逆散冻干粉制备:提取物-40 ℃制冷,-20 ℃保冻 2 h,-10 ℃保冻 16 h,20 ℃干燥 5 h,35 ℃两次干燥 2 h。在此工艺条件下,获得的四逆散冻干粉冻型饱满,复水性好,呈淡黄色,网状疏松,水分小于 1%。HPLC 法测定其中芍药苷质量分数≥2.74%,柴胡皂苷 C 质量分数≥2.32%,柚皮苷质量分数≥3.31%,甘草次酸质量分数≥2.70%。

2.4 大鼠血清样品的制备

称取冻干粉 20 g,加水溶解配成 0.5 g/mL 溶液。取大鼠 20 只,ig 给予 4.952 5 g/kg 的四逆散药液,每天 1 次,连续 7 d。于末次给药后 5 h 大鼠 ip 1% 戊巴比妥钠溶液 4 mL/kg 麻醉,5 min 后肝门静脉取血,每只 5 mL,4 000 r/min 离心 10 min,每只大鼠取血清 2.0 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 离心 10 min,取上清液,在 40 ℃恒温条件下减压回收至干,残渣以甲醇 1 mL 溶解,0.45 μm 滤膜滤过,进样 10 μL 进行移行成分分析。结果见图 1。

2.5 大鼠脑脊液样品的制备

称取四逆散冻干粉适量,加水溶解配制成 0.5

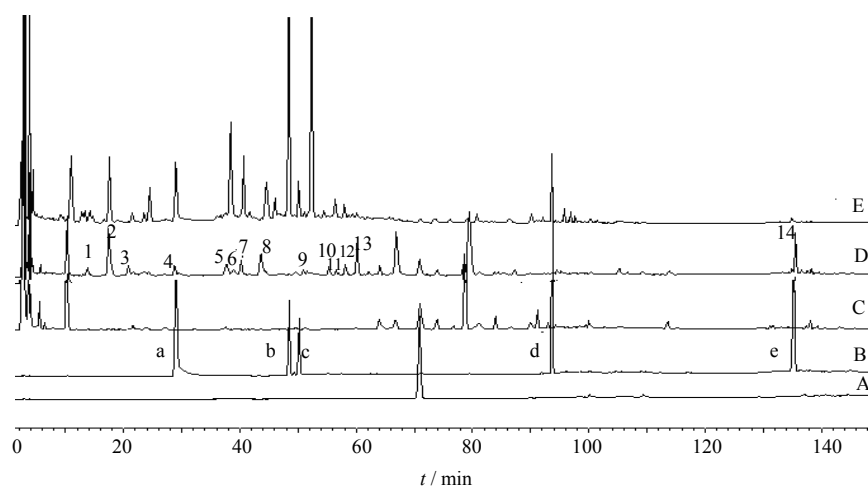
g/mL 溶液。Wistar 大鼠 20 只分为给药组和对照组。给药组 ig 给予四逆散冻干粉 4.952 5 g/kg, 连续给药 7 d; 对照组给予同体积蒸馏水。于末次给药后 5 h、取样前 5 min, 大鼠 ip 1%戊巴比妥钠溶液 4.0 mL/kg 麻醉, 用 1 mL 注射器于枕骨大孔抽取脑脊液, 并将 10 只大鼠脑脊液合并, 加入甲醇 5 mL 快速混匀, 密闭超声提取 10 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 在 40 °C 恒温条件下减压回收至干, 残渣以甲醇 1 mL 溶解, 0.45 μm 滤膜滤过, 10 μL

进样进行 HPLC 分析。结果见图 2。

2.6 大鼠血清样品和脑脊液样品中四逆散冻干粉移行成分分析

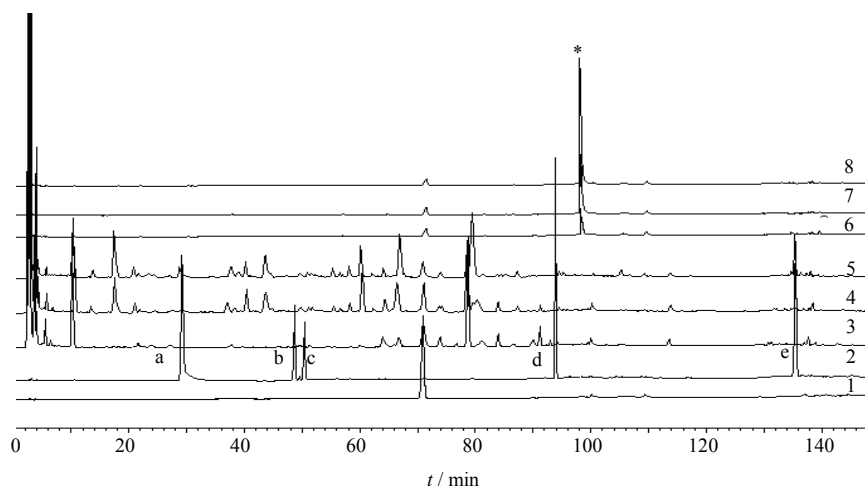
从图 1 可以看出, 血中有 14 种移行成分, 对其部分成分进行了鉴定, 其中 2 号为辛弗林, 4 号为芍药苷, 12 号为柴胡皂苷 C, 14 号峰为甘草次酸, 而其他成分多数是体内代谢转化物, 有待进一步鉴定分析。

从图 2 可以看出, 大鼠脑脊液样品色谱图中出



a-芍药苷 b-柚皮苷 c-橙皮苷 d-甘草次酸单铵盐 e-甘草次酸 图 2 同
a-paeoniflorin b-naringin c-hesperidin d-monopotassium glycyrrhizinate e-glycyrrhetic acid same as Fig. 2

图 1 戊巴比妥钠+空白血清 (A)、混合对照品+空白血清 (B)、空白血清 (C)、血清样品 (D)、四逆散 (E) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC chromatograms of Pentobarbital sodium + blank serum (A), mixed reference substances + blank serum (B), blank serum (C), serum sample (D), and Sini Powder (E)



1-戊巴比妥钠+空白脑脊液 2-混合对照品 3-空白血清 4、5-血清样品 6-对照组脑脊液 7、8-给药组脑脊液样品 * 内源性物质 5-HT
1-Pentobarbital sodium + blank cerebrospinal fluid 2-mixed reference substances 3-blank serum 4 and 5-serum sample 6-reference cerebrospinal fluid in control group 7 and 8-cerebrospinal fluid administrated with Sini Powder * endogenous substance 5-HT

图 2 血清与脑脊液中成分对比分析

Fig. 2 Contrast analysis on constituents in serum and cerebrospinal fluid

现了一个血清样品色谱图中没有的色谱峰,经鉴定为内源性物质 5-羟色胺 (5-HT)。为了考察四逆散的作用是否与 5-HT 有关以及初步确认四逆散的镇静催眠药效物质基础,进一步以鉴定的 4 种血中移行成分为目标成分,进行镇静催眠活性考察。

2.7 四逆散冻干粉与辛弗林、芍药苷、柴胡皂苷 C、甘草次酸及其混合物镇静催眠作用比较

取小鼠 140 只,实验室放置 1 周,使之适应环境。将小鼠随机分成 7 组,每组 20 只,分别为对照组、四逆散冻干粉组、芍药苷组、甘草次酸组、辛弗林组、柴胡皂苷 C 组及辛弗林、芍药苷、柴胡皂苷 C、甘草次酸混合物组 (混合物组)。四逆散冻干粉组 ig 给予四逆散冻干粉 12 g/kg (相当于芍药苷 87 mg/kg、柴胡皂苷 C 42 mg/kg、辛弗林 38 mg/kg、甘草次酸 39 mg/kg),各单体成分组按复方中所占比例 ig 给药,混合物组 ig 给予混合物 206 mg/kg,对照组给予同体积的蒸馏水,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 mg/kg,室内温度保持在 20 ℃、湿度 40%。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、恢复时间。翻正反射消失至恢复时间为睡眠时间,结果见表 1 (数据采用 SPSS 13.0 软件处理)。可知,与对照组比较,四逆散冻干粉组、芍药苷组、甘草次酸组、辛弗林组、柴胡皂苷 C 组、混合物组连续 ig 给药 7 d,均可明显延长阈剂量戊巴比妥钠

表 1 四逆散冻干粉对戊巴比妥钠所致小鼠睡眠时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 1 Effects of Sini Powder on sleeping time of mice induced by Pentobarbital sodium ($\bar{x} \pm s, n = 20$)		
组 别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	睡眠时间 / min
对照	—	100.07 ± 26.18
四逆散冻干粉	12	216.06 ± 95.02**
芍药苷	0.087	146.89 ± 93.19
甘草次酸	0.039	108.74 ± 49.08
辛弗林	0.038	130.33 ± 32.39
柴胡皂苷 C	0.042	134.95 ± 72.98
混合物	0.206	235.00 ± 136.84**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

所致小鼠睡眠时间,其中四逆散冻干粉组、混合物组与对照组比较具有显著差异 ($P < 0.01$),且混合物组的效果优于四逆散冻干粉组。

2.8 四逆散冻干粉与辛弗林、芍药苷、柴胡皂苷 C、甘草次酸及其混合物对大鼠脑脊液中 5-HT 的影响

按“2.5”项方法分组、给药,制备脑脊液样品,进行分析,结果见图 3。四逆散冻干粉、芍药苷、辛弗林、柴胡皂苷 C、甘草次酸及混合物均可使脑脊液中 5-HT 增加,推测四逆散镇静催眠作用与改变 5-HT 水平有关。

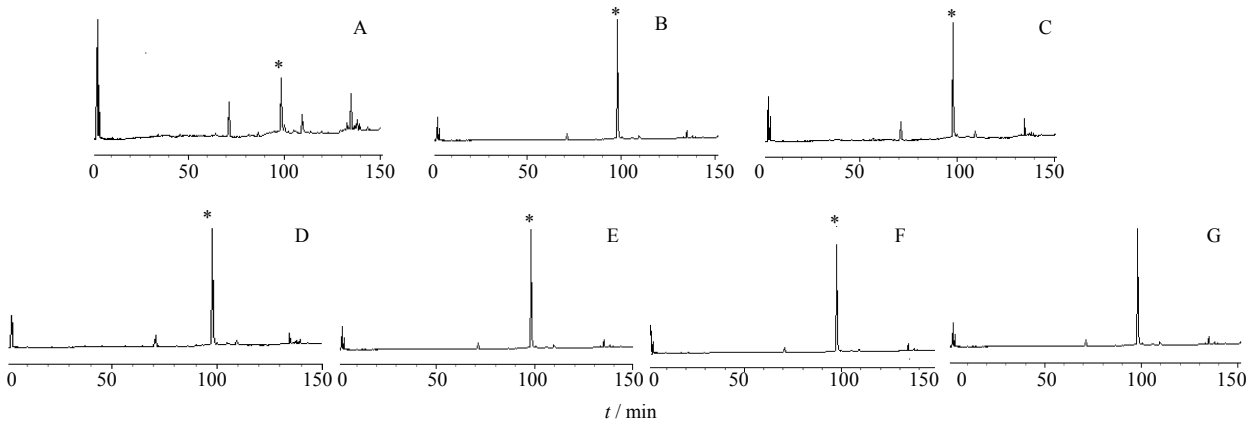


图 3 对照组 (A)、四逆散冻干粉组 (B)、芍药苷组 (C)、辛弗林组 (D)、柴胡皂苷 C 组 (E)、甘草次酸组 (F) 和混合物组 (G) 脑脊液样品的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC chromatograms of cerebrospinal fluid in control (A), Sini Powder (B), peoniflorin (C), synephrine (D), saikosaponin C (E), glycyrrhetic acid (F), and mixture (G) groups

3 讨论

经过综合分析,脑脊液中除戊巴比妥钠外,并无血中移行成分的进入。从峰面积比值看,给予四

逆散冻干粉后大鼠脑脊液中 5-HT 峰面积约是空白脑脊液 5-HT 峰面积的 12.5 倍。血清中四逆散冻干粉的移行成分辛弗林、芍药苷、柴胡皂苷 C、甘草

次酸均可使脑脊液中 5-HT 峰面积高于空白脑脊液中 5-HT 的峰面积,但不如四逆散冻干粉整方的作用强,且混合物(辛弗林-芍药苷-柴胡皂苷 C-甘草次酸)组增大的脑脊液中 5-HT 峰面积是四逆散冻干粉组的 3.2 倍。这些结果表明,混合物可能就是四逆散冻干粉镇静催眠作用的活性物质,为四逆散镇静催眠作用机制研究奠定了基础。

连续给药后大鼠脑脊液中成分的量明显高于空白脑脊液,表明脑脊液中的 5-HT 分泌增多。通过对脑脊液成分分析发现,四逆散冻干粉在体内发挥镇静催眠作用时,并不一定是药效成分直接起作用,而表现出一种调控作用,这在某种程度上解释了四逆散冻干粉在镇静催眠作用方面所具有的独特药理作用,这一点与化学合成药物存在较大的差别。

给药组大鼠血清中四逆散冻干粉的 4 种移行成分辛弗林、芍药苷、柴胡皂苷 C、甘草次酸峰面积较大,量较高,药理活性较强。

总之,通过四逆散冻干粉血中移行成分分析、脑脊液中移行成分分析及四逆散冻干粉对戊巴比妥

钠所致小鼠睡眠时间影响的药效研究,初步确认四逆散冻干粉的活性物质是血清中四逆散冻干粉镇静催眠的移行成分辛弗林、芍药苷、柴胡皂苷 C 及甘草次酸的混合物,且作用机制与调节内源性物质有关,但具体的更多的物质基础及作用机制正在进一步研究中。

参考文献

- [1] 张 萍,孔维军,鄢 丹,等.基于淫羊藿苷测定及 HPLC 指纹图谱分析的淫羊藿药材质量差异评价 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1901-1904.
- [2] 邵建强. 中药指纹图谱的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 994-008.
- [3] 韦 辉,刘素香,刘 毅,等. 丹参药材的综合质量评价研究 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(5): 343-347.
- [4] 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 3.
- [5] 李越峰,严兴科,李廷利,等. 四逆散冻干粉化学成分变化的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 854-859.
- [6] 中药注射剂指纹图谱研究技术要求 (暂行) [S]. 2000.