

基于成分敲除技术辨识灯心草抗焦虑的主要有效成分

李贵云, 王小红, 杨立华, 赵丹丹, 郭珍玉, 黄建梅*

北京中医药大学 中药学院, 北京 100102

摘要: **目的** 明确灯心草 *Juncus effusus* 抗焦虑作用的主要有效成分。 **方法** 利用硅胶柱色谱技术, 对灯心草干燥茎髓部 80%乙醇提取物的醋酸乙酯超声萃取粗提物中量较高的菲类成分去氢厄弗酚、厄弗酚、去氢灯心草酚、灯心草酚进行敲除, 制备相应的菲类目标成分、目标成分阴性样品, 将菲类目标成分、等比例的目标成分阴性样品和全成分分别进行小鼠高架十字迷宫试验。

结果 菲类目标成分与全成分能明显提高小鼠进入开放臂的时间和次数, 作用强度无差异, 而目标成分阴性样品未表现出抗焦虑活性。 **结论** 菲类成分为灯心草抗焦虑作用的主要有效成分, 灯心草中与菲类成分共存的其他成分对其抗焦虑作用基本无影响。

关键词: 灯心草; 菲类成分; 去氢厄弗酚; 抗焦虑; 药效物质基础

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)06-0825-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.06.016

Recognition of anxiolytic constituents from *Juncus effusus* based on constituents knock-out technique

LI Gui-yun, WANG Xiao-hong, YANG Li-hua, ZHAO Dan-dan, GUO Zhen-yu, HUANG Jian-mei

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: **Objective** To clarify the main anxiolytic components from *Juncus effusus*. **Methods** Silica gel column chromatography was used to extract the stem pith of *J. effusus* by 80% ethanol. The ethyl acetate extracts of *J. effusus* by ultrasonic extraction were separated to be phenanthrene constituents, such as dehydroeffusol, effusol, dehydrojuncusol, and juncusol. The phenanthrenes were knocked out and the target phenanthrene constituents and negative samples were prepared. The anxiolytic effects of the two separated fractions and the whole extract were evaluated by elevated plus-maze test in mice. **Results** In the elevated plus-maze test, phenanthrene constituents and the whole ethylacetate extract could significantly improve the time and number of times of mice into the open arms, without difference in the intensity of action, but no anxiolytic activity was shown in the negative sample. **Conclusion** Phenanthrene constituents are the main anxiolytic components in *J. effusus*. Other constituents in the ethylacetate extract of *J. effusus* do not influence the anxiolytic effect of phenanthrene constituents.

Key words: *Juncus effusus* L.; phenanthrene; dehydroeffusol; anxiolytic; material basis of drug efficacy

中药质量控制是攸关中药现代化发展的重大课题, 而中药药效物质辨识则是支撑中药质量控制的重要基石^[1-3]。为了探寻中药药效物质筛选与质量控制标准研究的新突破, 肖小河等^[4]首次提出“基于目标成分敲除/敲入的中药药效物质辨识与质量控制模式”的研究设想。前期研究发现灯心草 *Juncus effusus* L. 的醋酸乙酯提取物具有显著的抗焦虑作用^[5], 同时证实醋酸乙酯部位中菲类成分去氢厄弗酚(dehydroeffusol)具有明显抗焦虑作用且该化合物为灯心草的主要菲类成分^[6-8]。为了进一步明确灯

心草抗焦虑作用的主要有效成分为菲类成分, 同时阐明其他成分对灯心草抗焦虑作用的影响, 本研究应用肖小河等提出的敲除技术, 通过硅胶柱色谱技术对灯心草经乙醇回流提取, 醋酸乙酯超声萃取得到的粗提物进行进一步分离, 对分离得到的菲类目标成分和目标成分阴性样品进行抗焦虑作用评价, 从而明确灯心草的有效成分。

1 材料与仪器

1.1 药品与试剂

灯心草药材购自黑龙江齐齐哈尔药材市场, 经

收稿日期: 2013-09-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173541)

作者简介: 李贵云(1988—), 女, 安徽东至人, 硕士研究生, 研究方向为中药成分分析。Tel: (010)84738937 E-mail: lgy198806@163.com

*通信作者: 黄建梅(1970—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究领域为中药药物分析与体内过程分析。

Tel: (010)84738619 E-mail: huangjianmeiluck@sina.com

北京中医药大学中药学院生药系杨瑶珺副教授鉴定为灯心草 *Juncus effusus* L. 的干燥茎髓。地西洋(质量分数>97%, 批号 880801) 江西第四制药厂; 去氢厄弗酚对照品(质量分数 97.2%) 为自制, 经波谱分析确定结构。石油醚(60~90 ℃)、醋酸乙酯、甲醇等均为分析纯, 液相色谱用甲醇为色谱纯, 用于 HPLC 分析的水为娃哈哈纯净水, 其余用水均为去离子水。

1.2 动物

SPF 级昆明小鼠, 雄性, 体质量(20±2) g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号 SCXK(京) 2012-0001。

1.3 实验仪器

岛津 LC-20A 型高效液相色谱仪, SPD-20A 检测器; SHB-III 循环水多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); KQ300DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 电子天平 Sartorius AGBS110S(北京赛多利斯仪器系统有限公司); 硅胶 G 薄层板、柱色谱用硅胶(青岛海洋化工厂); 色谱用玻璃柱(北京汇海科仪科技有限公司); CBS-B 程控多功能全自动部分收集器(上海沪西分析仪器有限公司); 数显恒温水浴锅 HH-4(金坛市华锋仪器有限公司); ZF-90 型多功能暗箱式紫外透射仪(上海顾村电光仪器厂); YOKO-XR 显色加热器(武汉药科新技术开发公司)。

小鼠高架十字迷宫: 由 2 个开放臂(30 cm×5 cm×20 cm)、2 个闭合臂(30 cm×5 cm×20 cm) 以及 1 个连接 4 个臂的中央平台(10 cm×10 cm) 组成 1 个类似“十”字形的迷宫(即开放臂-中央平台-开放臂或闭合臂-中央平台-闭合臂, 二者互相垂直形成“十”字形)。本迷宫聚丙烯材料制成, 4 个臂及中央平台底部均为黑色, 闭合臂四周为黑色, 整体固定于一个铝制的“十”字形支架上, 使迷宫高于实验室地面 50 cm。

2 方法

2.1 灯心草抗焦虑菲类目标成分与目标成分阴性样品的制备及 HPLC 检测

2.1.1 灯心草抗焦虑菲类目标成分与目标成分阴性样品的制备 取 1.5 kg 灯心草干燥茎髓部, 以 80%乙醇回流提取 2 次, 第 1 次以 25 倍量 80%乙醇回流提取 1.5 h, 第 2 次以 15 倍量 80%乙醇回流提取 1 h, 合并提取液, 浓缩, 真空干燥, 得到 80%乙醇提取物 90.6 g。乙醇提取物经硅胶拌样, 醋酸乙酯超

声萃取 2 次, 每次各 30 min, 合并提取液, 浓缩, 真空干燥, 得到干燥醋酸乙酯粗提物 17.6 g, 备用。

取干燥醋酸乙酯粗提物 0.402 0 g, 溶于甲醇, 经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-醋酸乙酯(5:0.8) 洗脱, 以去氢厄弗酚为对照品进行 TLC 鉴别, 含有去氢厄弗酚等菲类成分的样品合并作为菲类目标成分, 收集敲除该目标成分后的剩余提取物, 即目标成分阴性样品。

2.1.2 菲类目标成分中去氢厄弗酚的定量测定^[9] 色谱条件: 色谱柱 Agilent HC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 23 ℃; 进样量 10 μL, 流动相为甲醇-水(65:35); 体积流量 1 mL/min, PAD 检测器, 检测波长 270 nm。

2.2 灯心草菲类目标成分与目标成分阴性样品的生物等效性实验

灯心草菲类目标成分 13.1 mg/kg、等比例目标成分阴性样品 18.7 mg/kg 以及全成分 33.1 mg/kg 给药(各给药组的剂量以其在醋酸乙酯提取物中的比例, 按去氢厄弗酚的剂量为 5 mg/kg 折算), 进行高架十字迷宫试验, 对比考察菲类目标成分、目标成分阴性样品与全成分的抗焦虑作用及其差异。

2.2.1 动物分组 小鼠随机分为对照组(0.5% CMC-Na)、阳性对照组(地西洋 1 mg/kg)、菲类目标成分组、等比例目标成分阴性样品组、全成分(醋酸乙酯粗提物)组, 每组 10 只。

2.2.2 给药方式及剂量 菲类目标成分、等比例目标成分阴性样品、全成分(醋酸乙酯粗提物)、地西洋用 0.5% CMC-Na 溶液配制成相应浓度, ig 给药, 给药体积为 0.1 mL/10 g, 于给药 30 min 后进行小鼠高架十字迷宫测试。

2.2.3 小鼠高架十字迷宫实验 小鼠于给药 30 min 后进行小鼠高架十字迷宫实验, 将小鼠头朝向开放臂放入高架十字迷宫的中央平台中, 同时点击仪器开始按钮, 开始记录小鼠 6 min 内在高架十字迷宫上的行为。

2.2.4 测试指标 ①进入开放臂次数(open arm entry, OE): 进入到任一开放臂的次数, 以小鼠前后足均进入到臂内为准, 中途任一前足或后足从该臂中完全退出则为该次进入活动完成; ②开放臂停留时间(open arm time, OT): 小鼠进入开放臂的时间。

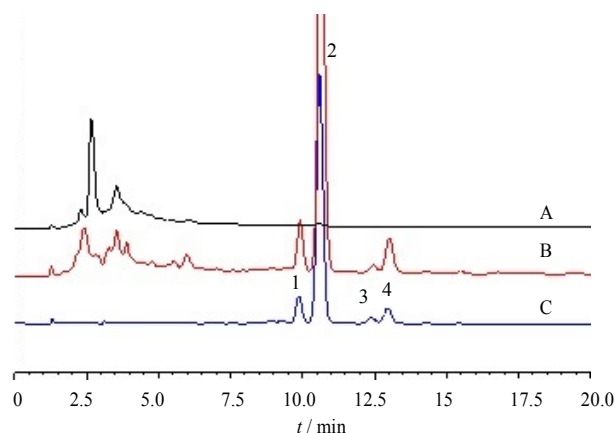
2.2.5 数据处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 统计方法采用

单因素方差分析。

3 结果

3.1 灯心草抗焦虑菲类目标成分的敲除与目标成分阴性样品的确认

干燥醋酸乙酯粗提物经硅胶柱色谱分离, 分别得到菲类目标成分 158 mg、目标成分阴性样品 225 mg。采用 HPLC 法得到 2 个样品和全成分的液相色谱图 (图 1), 并测得菲类目标成分中去氢厄弗酚的质量分数为 38.4%。



1-厄弗酚 2-去氢厄弗酚 3-灯心草酚 4-去氢灯心草酚
1-effusol 2-dehydroeffusol 3-juncusol 4-dehydrojuncusol

图1 灯心草抗焦虑菲类目标成分阴性样品 (A)、全成分 (B)、菲类目标成分 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of negative constituents (A), whole extract (B) and phenanthrene target constituents (C)

3.2 灯心草抗焦虑菲类目标成分、目标成分阴性样品、全成分对小鼠高架十字迷宫行为的影响

小鼠高架十字迷宫实验结果显示: 菲类目标成分组、全成分组与对照组比较, 小鼠的 OT 均显著升高 ($P<0.01$); 小鼠 OE 也显著增加 ($P<0.05$)。单次给药后, 全成分、菲类目标成分具有明显的抗焦虑作用, 且作用强度相似; 而目标成分阴性样品与对照组比较无明显抗焦虑作用。结果见表 1。

4 讨论

本研究借助肖小河等^[4]提出的“敲入/敲除”模式, 通过小鼠高架十字迷宫试验发现, 菲类目标成分与全成分的抗焦虑作用相似, 而目标成分阴性样品无效, 说明菲类目标成分与抗焦虑作用之间存在直接关系或必然相关, 粗提取物中的其他成分没有抗焦虑作用, 明确了菲类目标成分为灯心草抗焦虑作用的有效成分。研究结果为灯心草药材和制剂的

表1 灯心草抗焦虑菲类目标成分、目标成分阴性样品、全成分对小鼠高架十字迷宫行为的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Anxiolytic effects of phenanthrene target constituents, negative samples, and whole extract of *J. effusus* in mice elevated plus-maze test ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	OE	OT / s
对照	—	3.50±0.64	35.18± 7.62
地西洋	1.0	6.80±0.65**	65.72± 8.86*
菲类目标成分	13.1	6.70±0.97*	71.75±10.55**
全成分	33.1	7.90±0.83*	74.51±10.06**
目标成分阴性样品	18.7	4.70±1.33	37.44± 8.23

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

质量标准的制定提供科学的依据, 为灯心草的进一步开发奠定基础。

基于成分敲出/敲入的中药药效物质辨识和质量控制的模式, 能“快且准”地锁定中药有效成分, 同时该模式始终把方药作为一个整体或系统来考量, 目标组分的药效作用始终与方药整体进行等效性比较, 能较好地体现中医药的整体观、系统观。

参考文献

- [1] 张铁军. 中药质量认识与质量评价 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 1-9.
- [2] 肖小河, 金城, 鄢丹, 等. 中药大质量观及实践 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 505-508.
- [3] 肖小河. 论中药质量控制与评价模式的创新与发展 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14): 1377-1381.
- [4] 肖小河, 鄢丹, 袁海龙, 等. 基于成分敲除/敲入的中药药效组分辨识与质量控制模式的商建 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1345-1348.
- [5] 王衍龙, 黄建梅, 张硕峰, 等. 灯心草镇静作用活性部位的研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2006, 29(3): 181-183.
- [6] Liao Y J, Zhai H F, Huang J M, et al. Anxiolytic and sedative effects of dehydroeffusol from *Juncus effusus* in mice [J]. *Planta Med*, 2011, 77: 416-420.
- [7] 赵丹丹, 黄建梅, 王杨, 等. 灯心草及野灯心草中菲类成分的 LC-ESI-MS 快速识别及鉴定 [J]. 中草药, 2013, 44(12): 1539-1545.
- [8] 简伟杰, 段琼, 段天璇, 等. 灯心草药材 RP-HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 60-63.
- [9] 段琼, 王杨, 林婷婷, 等. HPLC 测定灯心草中去氢厄弗酚含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 92-94.