

杜仲雄花水溶性生物碱的镇静催眠作用

李欣, 刘严, 朱文学, 郭菡, 刘少阳

(河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003)

摘要:目的: 研究不同剂量杜仲雄花水溶性生物碱的镇静催眠作用。方法: 采用酸水提取法提取杜仲雄花中水溶性生物碱。观察不同剂量杜仲雄花水溶性生物碱对小鼠自主活动的影响以及直接镇静催眠作用、与戊巴比妥钠的协同作用和抗惊厥作用。结果: 杜仲雄花水溶性生物碱能有效减少小鼠的自主活动次数; 与戊巴比妥钠有良好的协同作用, 能显著增加阈下剂量的小鼠睡眠率, 延长阈下剂量及阈上剂量的睡眠时间, 并缩短睡眠潜伏期; 杜仲雄花水溶性生物碱还能有效降低尼可刹米所致的小鼠惊厥率, 延长惊厥潜伏期。结论: 杜仲雄花水溶性生物碱具有良好的镇静催眠作用。

关键词: 杜仲雄花; 水溶性生物碱; 镇静; 催眠

Sedative and Hypnotic Effects of Water-soluble Alkaloids from Male Flowers of *Eucommia*

LI Xin, LIU Yan, ZHU Wen-xue, GUO Han, LIU Shao-yang

(College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: Objective: To explore the sedative and hypnotic effects of different doses of water-soluble alkaloids from male flowers of *Eucommia*. Methods: Water-soluble alkaloids were extracted from *Eucommia* male flowers by an acidic water extraction method, their effect on spontaneous activities of mice, hypnotic function with and without the presence of pentobarbital sodium and anticonvulsant effects were investigated at different doses. Results: Water-soluble alkaloids from *Eucommia* male flowers could decrease the frequency of spontaneous activities, significantly increase sleeping ratio below the threshold dose, prolong the sleeping time and shorten the sleeping latency. Meanwhile, these alkaloids also could effectively reduce the eclamptic ratio of the mice and significantly prolong the convulsion latency. Conclusion: Water-soluble alkaloids of *Eucommia* male flowers have obviously sedative and hypnotic effects in mice and there is a synergistic effect between them and pentobarbital sodium.

Key words: *Eucommia* male flowers; water-soluble alkaloids; sedation; hypnosis

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)11-0296-04

杜仲是我国名贵的滋补中药材, 现代医学证明杜仲具有调节血压、降低血糖、调节血脂、抗菌消炎、抑制肿瘤细胞生长、滋阴补肾、强壮筋骨、延缓衰老等多种功效^[1]。近年来, 已有研究表明杜仲皮及其籽、叶、花都有镇静催眠作用^[2-4], 但杜仲中镇静催眠的具体活性成分和作用机理还不清楚。

生物碱是一类含有氮杂环的天然有机化合物, 大多具有碱性和显著的生理活性, 广泛分布于植物体内, 是许多中草药及药用植物的有效成分, 其药物作用主要表现为抗肿瘤作用和抗菌作用, 同时生物碱还可以作用于神经系统和心血管系统^[5]。研究发现酸枣仁等许多中药材中生物碱的镇静催眠效果明显^[6-7]。但杜仲雄花中的水溶性生物碱是否具有镇静催眠作用, 目前还未见有相关

报道。本实验将初步研究杜仲雄花中水溶性生物碱的镇静催眠作用, 为以后深入研究杜仲雄花的镇静催眠功能成分及其作用机理提供参考, 并为开发临床安全可靠的镇静催眠药物提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明种小白鼠, 普通级, 20~30g(雄性), 河南科技大学动物实验中心提供。

1.2 材料、试剂与仪器

杜仲雄花: 洛阳市汝阳县王坪乡杜仲种植基地, 在不同花期不同方向采摘, 并混合均匀。

生物碱检验试剂(碘化铋钾试剂、碘-碘化钾试剂、

收稿日期: 2010-10-11

基金项目: 河南省教育厅自然科学基金项目(2006550001); 河南科技大学科研创新能力培育基金项目(2009CZ0015)

作者简介: 李欣(1979—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为天然产物功能性。E-mail: lixinpxy@hotmail.com

硅钨酸试剂)-石油醚、氯仿、氢氧化钠、正丁醇(以上均为分析纯)、尼克刹米、0.9%氯化钠溶液、地西洋上海试一化学试剂有限公司;戊巴比妥钠 美国 Sigma 公司上海分装产品。

GJ-1 型光电计数器 天津医疗器械修配厂。

1.3 方法

1.3.1 杜仲雄花水溶性生物碱的制备^[8-11]

将杜仲雄花粉碎,石油醚处理后真空干燥。取 1.5kg 用 5 倍体积的 1.5% 盐酸水溶液(pH 2~3)多次浸泡,首次浸泡 2d,依次 1d、12、6h,酸水溶液用氯仿萃取除去脂类,回收酸水溶液用氢氧化钠调 pH 值至 10~11,碱水溶液用氯仿多次萃取,弃去氯仿层,将碱水溶液 pH 值调至 6.5~7,用正丁醇浸泡碱水溶液 24h,然后萃取,重复 3 次,减压蒸馏浓缩得到水溶性生物碱。

1.3.2 对小鼠自主活动的影响^[12]

动物分组:实验前将小鼠放入 GJ-1 型光电计数器的活动箱内,开动记录仪记录 5min 内活动次数,选择自主活动数 150 次左右的正常小鼠。然后根据自主活动次数将小鼠随机分配到各实验组,实验前各组小鼠的自主活动数无显著性差异。

实验分组:昆明种小鼠 50 只,分为 5 组,每组 10 只:1)阴性对照组;2)水溶性生物碱高剂量组;3)水溶性生物碱中剂量组;4)水溶性生物碱低剂量组;5)阳性对照地西洋组。各组小鼠分别放入 GJ-1 型光电计数器的活动箱内,然后开动记录仪记录 5min 内活动次数。阴性对照组根据小鼠体质量灌胃给予 10mL/kg 生理盐水,阳性对照组按照 5mg/kg 的剂量灌胃给予 0.30% 地西洋^[13-14]。水溶性生物碱高、中、低剂量组灌胃量分别为 2.5、1.25、0.625g/kg,根据小鼠体质量灌胃给予,每日 2 次,连续 3d,于末次给药 30min 后,测定小鼠自主活动次数。同时对小鼠状态进行观察,记录小鼠镇静率、30min 内的入睡百分率。其中以小鼠静卧 15s 以上为药物有镇静效果,以翻正反射消失 1min 以上者为入睡。

$$\text{入睡率}/\% = \frac{\text{小鼠入睡只数}}{\text{小鼠总只数}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{镇静率}/\% = \frac{\text{静卧 15s 以上的小鼠只数}}{\text{实验小鼠总只数}} \times 100 \quad (2)$$

1.3.3 对阈下剂量戊巴比妥钠镇静作用的影响

戊巴比妥钠阈剂量实验:取 50 只小鼠,随机分 5 组,每组 10 只分别腹腔注射戊巴比妥钠,剂量分别为:20、25、30、35、37mg/kg,记录小鼠 30min 内的入睡率^[15]。

阈下剂量实验:取 50 只小鼠,随机均分为 5 组,分别为杜仲雄花水溶性生物碱高、中、低剂量组和阳

性对照组、阴性对照组(根据小鼠体质量阳性对照组按照 5mg/kg 的剂量灌胃给予 0.30% 地西洋;阴性对照组灌胃给予 10mL/kg 生理盐水)。杜仲雄花水溶性生物碱各组灌胃量分别为 2.5、1.25g/kg 和 0.625g/kg。每天两次,给药 3d。各组均于末次给药 60min 后按照小鼠体质量注射阈下剂量戊巴比妥钠(20mg/kg),记录 30min 内的入睡百分率、睡眠潜伏期(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 1min 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)。

1.3.4 对阈上剂量戊巴比妥钠镇静作用的影响

方法同 1.3.3 节,末次给药 60min 后,各组小鼠腹腔注射阈上剂量的戊巴比妥钠(37mg/kg),记录睡眠潜伏期和睡眠时间。

1.3.5 抗惊厥作用

方法同 1.3.3 节,末次给药 60min 后,按照小鼠体质量注射,各组小鼠均腹腔注射 1.25% 尼可刹米 0.1mL/10g;阳性对照组灌胃给予地西洋,剂量 5mg/kg,60min 后腹腔注射 1.25% 尼可刹米溶液 0.1mL/10g;阴性对照组,灌胃给予生理盐水,60min 后腹腔注射 1.25% 尼可刹米 0.1mL/10g;给药后观察 2h,记录小鼠惊厥潜伏期和惊厥小鼠的数量(以小鼠出现全身强直性惊厥为指标)。

1.3.6 统计学分析

采用统计学软件 SPSS 11.0 进行数据的统计学分析,杜仲雄花水溶性生物碱不同剂量组灌胃处理后引起的小鼠镇静作用采用单因素方差分析。药物组与对照组的差异显著性分析采用成对样本 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 杜仲雄花水溶性生物碱的检识实验结果

在酸水溶液环境下,向杜仲雄花水溶性生物碱提取物中加入 3 种检测试剂:碘化铋钾试剂、碘-碘化钾试剂、硅钨酸试剂后,均有沉淀产生。表明杜仲雄花中含有一定量的水溶性生物碱,且本实验的提取方法切实可行。

2.2 杜仲雄花水溶性生物碱对小鼠自主活动的影响

表 1 杜仲雄花水溶性生物碱对小鼠自主活动的影响(*n*=10)
Table 1 Effect of water-soluble alkaloids from *Eucommia* male flowers on spontaneous activity of mice (*n*=10)

组别	活动次数/(次/5min)	镇静率/%
高剂量	42 ± 16** △△	100**
中剂量	54 ± 13** △△	100**
低剂量	63 ± 18** △△	100**
阴性对照组	157 ± 34	0
阳性对照组	89 ± 26*	100

注:*.与阴性对照组比较,有显著性差异($P < 0.05$);**.与阴性对照组比较,有极显著性差异($P < 0.01$);△.与阳性对照组比较,有显著性差异($P < 0.05$);△△.与阳性对照组比较,有极显著性差异($P < 0.01$)。下同。

如表 1 所示, 杜仲雄花水溶性生物碱具有显著的镇静作用。与阴性对照组相比, 水溶性生物碱高、中、低不同剂量药物组可极显著减少小鼠的自主活动($P < 0.01$), 镇静催眠效果优于市售安定类药物地西洋。统计学分析结果显示, 杜仲雄花水溶性生物碱对小鼠自主活动的影响具有极显著的剂量相关性($P < 0.01$), 随剂量的增加, 镇静催眠作用增强。

2.3 杜仲雄花水溶性生物碱对阈下剂量戊巴比妥钠镇静作用的影响

戊巴比妥钠阈剂量确定实验中, 注射不同剂量戊巴比妥钠 20、25、30、35、37mg/kg, 小鼠 30min 内的入睡率分别为 10%、30%、50%、80%、100%, 根据实验结果, 确定戊巴比妥钠阈下剂量为 20mg/kg, 阈上剂量为 37mg/kg。

表 2 杜仲雄花水溶性生物碱对阈下剂量戊巴比妥钠镇静作用的影响($n=10$)

Table 2 Effect of water-soluble alkaloids from *Eucommia* male flowers on sedative function of pentobarbital sodium with a subthreshold dose in mice ($n=10$)

组别	入睡率/%	睡眠潜伏期/min	睡眠时间/min
高剂量	100	6.49 ± 0.55*	43.44 ± 5.45** [△]
药物组 中剂量	50	7.59 ± 0.52	31.14 ± 1.58**
低剂量	30	7.49 ± 0.55	22.37 ± 1.48*
阴性对照组	10	7.41	15.20
阳性对照组	100	13.42 ± 4.25	20.18 ± 10.35

如表 2 所示, 灌胃给予杜仲雄花水溶性生物碱的药物组表现出与阈下剂量戊巴比妥钠良好的协同作用, 且对小鼠睡眠潜伏期和睡眠时间的影响具有极显著的剂量相关性(P 值分别为 0.00068、0.00061), 高、中、低剂量组均能增加小鼠的入睡率。与阴性对照组相比, 高剂量药物组显著缩短了小鼠的睡眠潜伏期($P < 0.05$); 各剂量组均能明显延长睡眠时间(高、中剂量组 $P < 0.01$, 低剂量组 $P < 0.05$)。与阳性对照地西洋相比, 高剂量组的药效显著增强($P < 0.05$), 中、低剂量组与地西洋的药效相近。且各药物组小鼠的睡眠潜伏期及睡眠时间的标准偏差显著低于地西洋组, 因此小鼠的个体差异对药效的影响较弱, 药效稳定性高。

2.4 杜仲雄花水溶性生物碱对阈上剂量戊巴比妥钠镇静作用的影响

如表 3 所示, 杜仲雄花水溶性生物碱和阈上剂量戊巴比妥钠表现出良好的协同作用, 能在一定程度上缩短小鼠睡眠潜伏期, 高、中剂量组药效极显著($P < 0.01$), 低剂量组药效显著($P < 0.05$); 高、中剂量药物组均能够极显著延长小鼠睡眠时间($P < 0.01$)。统计学分析结果显示, 杜仲雄花水溶性生物碱与阈上剂量戊巴比妥钠协同作用后对小鼠睡眠潜伏期($P = 0.00993$)及睡眠时间

($P = 0.00438$)的影响均具有极显著的剂量正相关性。与阳性对照地西洋相比, 高剂量药物组显著缩短小鼠睡眠潜伏期($P < 0.05$); 从睡眠时间来看, 高剂量药物显著延长小鼠睡眠时间($P < 0.05$), 药效显著优于地西洋, 中、低剂量组药物能够达到与地西洋相近的药效。

表 3 杜仲雄花水溶性生物碱对阈上剂量戊巴比妥钠镇静作用的影响($n=10$)

Table 3 Effect of water-soluble alkaloids from *Eucommia* male flowers on sedative function of pentobarbital sodium with a superthreshold dose in mice ($n=10$)

组别	入睡率/%	睡眠潜伏期/min	睡眠时间/min
高剂量	100	4.20 ± 1.23** [△]	68.37 ± 12.20** [△]
药物组 中剂量	100	5.04 ± 1.17**	62.35 ± 13.27**
低剂量	100	6.45 ± 2.10*	55.16 ± 24.59
阴性对照组	100	8.52 ± 1.29	48.59 ± 7.28
阳性对照组	100	5.67 ± 2.08*	66.40 ± 1.61**

2.5 杜仲雄花水溶性生物碱的抗惊厥作用

表 4 杜仲雄花水溶性生物碱的抗惊厥作用($n=10$)

Table 4 Effect of water-soluble alkaloids from *Eucommia* male flowers on convulsion latency of mice ($n=10$)

组别	惊厥率/%	惊厥潜伏期/min
高剂量	60*	13.35 ± 2.09**
药物组 中剂量	80*	7.37 ± 2.12*
低剂量	90	5.51 ± 2.47
阴性对照组	100	4.49 ± 2.12
阳性对照组	60*	13.35 ± 4.62*

如表 4 所示, 杜仲雄花水溶性生物碱高($P < 0.01$)、中($P < 0.05$)剂量组能明显延长小鼠的惊厥潜伏期, 降低小鼠的惊厥率($P < 0.05$); 低剂量组效果不显著, 但根据统计学分析显示, 杜仲雄花水溶性生物碱对小鼠惊厥潜伏期的影响具有极显著的剂量正相关性($P = 0.00766$), 随着剂量的增大, 能够显著推迟小鼠惊厥症状的出现。与阳性对照地西洋相比, 高剂量组药效与地西洋相当。

3 结 论

通过杜仲雄花水溶性生物碱的直接镇静催眠作用实验、对阈下剂量和阈上剂量戊巴比妥钠镇静催眠作用的影响以及抗惊厥实验, 结果表明: 杜仲雄花水溶性生物碱具有显著的直接镇静催眠作用, 其作用效果优于市售安定地西洋, 且其镇静催眠作用与剂量显著正相关。与阈下剂量和阈上剂量戊巴比妥钠均有良好的协同作用; 高剂量组的药效显著强于地西洋, 中、低剂量组与地西洋的药效相近, 且对小鼠睡眠潜伏期和睡眠时间的影

响具有极显著的剂量相关性。同时杜仲雄花水溶性生物碱还表现出显著的抗惊厥作用,能有效的降低尼可刹米所致小鼠惊厥率,延长小鼠惊厥潜伏期。

实验表明杜仲雄花水溶性生物碱具有镇静催眠的作用,进一步证明了前期实验结果显示的杜仲雄花总生物碱具有镇静催眠作用的结论(前期实验结果尚未发表)。但是杜仲雄花水溶性生物碱的镇静催眠作用是由何种生物碱产生或者是否存在多种生物碱的相互作用,其最终的活性成分,以及产生镇静催眠效果的机理等都不清楚,都有待于今后更深入的研究。

在与戊巴比妥钠的协同作用实验中,地西洋阳性对照组小鼠完全苏醒后,其自主活动恢复到正常状态一般需要15min左右,同时,小鼠在药物催眠后,出现多次反复入睡的现象,药物残留作用明显,此外,实验后存在食量减小问题,副作用较大;而杜仲雄花水溶性生物碱高剂量组小鼠入睡后,能够持续深度睡眠,并且苏醒后自主活动恢复到正常状态只需要6min左右,实验后未发现异常。此实验结果显示,与对照组小鼠相比,杜仲雄花水溶性生物碱高剂量组小鼠能较快的恢复,且恢复状态明显优于对照组小鼠。这显示杜仲雄花水溶性生物碱具有较小副作用,更好的安全性。能有效克服目前大量使用的镇静催眠类药物在治疗失眠的同时产生一定的依赖性和副作用的缺点,因此,杜仲雄花镇静催眠活性的进一步研究开发必将具有更为广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 刘宁,刘春山. 杜仲国内外研究进展[J]. 西南国防医药, 2002, 12(5): 450-451.
- [2] 程光丽. 杜仲有效成分分析及药理学研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(5): 723-725.
- [3] 廉小梅,朱文学,白喜婷. 杜仲雄花茶中活性成分的测定及催眠作用的药理研究[J]. 食品科技, 2007(3): 203-205.
- [4] 管淑玉,苏薇薇. 杜仲化学成分与药理研究进展[J]. 中药材, 2003, 26(2): 126-129.
- [5] 周贤春,何春霞. 生物碱的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(3): 476-479.
- [6] 耿敬章,徐福星. 生物碱的生理功能及其提取分离研究进展[J]. 综述与述评, 2007, 10(10): 1-4.
- [7] 符敬伟,乔卫,陈朝晖. 酸枣仁总生物碱镇静催眠作用的实验研究[J]. 天津医科大学学报, 2005, 11(1): 52-54.
- [8] 喻朝阳,王晓琳. 生物碱提取与纯化技术应用进展[J]. 化工进展, 2006, 25(3): 259-264.
- [9] 李立坤,夏建军,施荣富,等. 天然植物中生物碱的提取及树脂法在其纯化中的应用[J]. 离子交换与吸附, 2007, 23(5): 475-480.
- [10] JOSEPH P M. Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids[J]. Natural Products Report, 2007, 24: 223-246.
- [11] TALATY N, TAKATS Z, COOKS R G. Rapid in situ detection of alkaloids in plant tissue under ambient conditions using desorption electrospray ionization[J]. The Analyst, 2005, 130(1): 1624-1633.
- [12] WATZMAN N, BARRY III H, KINNARD J W, et al. Comparison of different photobeam arrangements for measuring spontaneous activity of mice[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006, 55(9): 907-909.
- [13] JONKMAN J H G, BIANCHETTI G, GRASMEIJER G, et al. Clinical pharmacokinetics and tolerability of alpidem in healthy subjects given increasing single doses[J]. European Journal of Clinical Pharmacology, 1991, 41(4): 369-371.
- [14] KUDO Y, KAWAKITA Y, SAITO M, et al. Clinical efficacy and safety of zolpidem on insomnia: a double - blind comparative study with zopidem and nitrazepam[J]. Rinsho Iyaku, 1993, 9(1): 79-82.
- [15] ZHANG Guiliang, MIAO Mingsan, SHI Jingjing, et al. Synergistic action on hypnosis: yinao capsules with pentobarbital sodium of threshold and sub-threshold doses[J]. Neural Regeneration Research, 2007, 2(2): 91-94.