

滋肾宁神方提取工艺安神药效筛选研究

林荣锋¹, 陈剑平¹, 卢小凤¹, 何耀慧¹, 李一圣¹, 黄晓其¹, 施旭光¹, 张惜强², 苏子仁^{*1}
(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 广东宏兴集团股份有限公司, 广东潮州 521011)

[摘要] 目的: 筛选滋肾宁神方的提取工艺。方法: 通过小鼠自主活动实验及睡眠实验, 对水提、醇提、水提醇沉、部分水提部分醇提等 4 种不同提取工艺进行筛选。结果: 水提醇沉工艺提取物可显著减少小鼠自主活动, 明显延长阈下剂量戊巴比妥钠致小鼠入睡; 水提工艺提取物可明显延长阈剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠时间。4 种工艺提取物均可提高小鼠入睡率, 其中水提醇沉工艺提取物对小鼠入睡率的提高最显著。结论: 选择水提醇沉工艺为滋肾宁神方的提取工艺。

[关键词] 滋肾宁神方; 提取工艺筛选; 水提醇沉; 药效实验

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)06-0220-03

Selecting of Extraction Techniques for Zishen Ningshen Decoction Based on Tranquilizing Effect

LIN Rong-feng¹, CHEN Jian-ping¹, LU Xiao-feng¹, HE Yao-hui¹, LI Yi-sheng¹,
HUANG Xiao-qi¹, SHI Xu-guang¹, ZHANG Xi-qiang², SU Zi-ren¹

(1. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
2. GuangDong HongXing Group Co., Ltd., Chaozhou 521011, China)

[Abstract] **Objective:** To select the extraction techniques for Zishen Ningshen decoction. **Method:** By the experiment of locomotor activity and sleep in mice, four extraction techniques, i. e. water-extraction, alcohol-extraction, water-extraction with alcohol-precipitation, water-extraction and partial alcohol-extraction, were evaluated. **Result:** The extracts of water-extraction and alcohol-precipitation and water-extraction could significantly decrease the locomotor activity, significantly prolong the sleeping time induced by the under-threshold doses pentobarbital sodium, and the extract of partial water-extraction with partial alcohol-extraction could significantly prolong the sleeping time induced by the threshold doses pentobarbital sodium; and the four extracts all could improve the sleeping rate of the mice, among which water-extraction with alcohol-precipitation extract performed best. **Conclusion:** The water-extraction alcohol-precipitation was selected as the extraction technique for Zishen Ningshen decoction.

[Key words] Zishen Ningshen decoction; selection of the extraction techniques; the water-extraction with alcohol-precipitation; pharmacodynamic experiment

滋肾宁神方由熟地黄、白芍(炒)、菟丝子、首乌

藤、丹参、珍珠母、山药等 16 味中药组成; 用于治疗头晕耳鸣、失眠多梦、怔忡健忘、腰酸遗泄等症。滋肾宁神丸是由该方制得的浓缩水蜜丸, 是收载于国家卫生部药品标准的中药保护品种^[1]。但其制剂工艺落后, 方中 16 味中药中有 10 味中药以生药粉入药, 使该制剂因服用量大、服用不便等突出问题而无法满足现时消费者需求。本文以安神药效为导向对滋肾宁神方提取工艺进行筛选研究, 为滋肾宁神方

[收稿日期] 2009-07-20

[基金项目] 广东省科技计划项目(2007B031408006)

[第一作者] 林荣锋, 实习研究员, 从事中药新药开发与研究, Tel: 13760853038, E-mail: linrof@ qq. com

[通讯作者] * 苏子仁, 研究员, 博士生导师, 从事中药新药开发与研究, Tel: 020-39358517, E-mail: suziren@gzhtcm. edu. cn

新剂型的开发奠定基础。

1 材料

1.1 药品与仪器 滋肾宁神丸(批号 070505)与熟地黄、炒白芍等 16 味药材均由广东省潮州市宏兴制药厂提供;地西洋片(广东三才医药集团有限公司,批号 20080404);戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司,批号 WS20051129)。ZZ-6 小鼠自主活动测试仪(成都泰盟科技有限公司)。

1.2 动物 NIH 小白鼠,体重 18 ~ 22 g,由广州中医药大学实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(粤)2003-0001。

2 方法与结果

2.1 滋肾宁神方的不同提取工艺

2.1.1 全方水提 取全方药物 680 g,加 8 倍量水浸泡 0.5 h,加热煎煮 2 次,每次 1.5 h,滤过,合并滤液,滤液浓缩至 340 mL(含生药 2 g·mL⁻¹)备用。

2.1.2 全方醇提 取全方药物 680 g,加 5 倍量 70% 乙醇,加热回流提取 2 次,每次 1.5 h,滤过,合并滤液,回收乙醇,浓缩至约 340 mL(含生药 2 g·mL⁻¹),备用。

2.1.3 全方水提醇沉 取全方药物 680 g,加 8 倍量水煎煮 2 次,每次 1.5 h,滤过,合并滤液,浓缩至 800 mL,放冷后加适量乙醇调整至乙醇浓度约为 80%,静置过夜,滤过,滤液回收乙醇,浓缩至 340 mL(含生药 2 g·mL⁻¹),备用。

2.1.4 部分水提部分醇提(以下简称水醇结合) 取全方药物 680 g,其中首乌藤、女贞子、丹参、何首乌(制)、五味子和五指毛桃等 6 味,加 5 倍量 70% 乙醇,加热回流 2 次,每次 1.5 h,滤过,合并滤液,回收至无醇味,即得醇提浓缩液;其余 10 味加 8 倍量水煎煮 2 次,每次 1 h,滤过,合并滤液,浓缩至 450 mL,即得水提浓缩液;混合水提及醇提浓缩液,摇匀,加热浓缩至 340 mL(含生药 2 g·mL⁻¹),备用。

2.2 小鼠自主活动实验^[2] NIH 小鼠 132 只,18 ~ 22 g,雌雄各半,随机分为 11 组,每组 12 只,分别为空白组、阳性组、水提高剂量组、水提低剂量组、醇提高剂量组、醇提低剂量组、水提醇沉高剂量组、水提醇沉低剂量组、水醇结合高剂量组、水醇结合低剂量组、原剂型组。按体表面积折算等效剂量,各提取物高、低剂量为 19.93,4.98 g·kg⁻¹(相当于人用量的 40,10 倍),阳性对照组给予地西洋,剂量为 19 mg·kg⁻¹,空白组给予等体积蒸馏水,ig. 1 次/d,连续 6

d。于末次药后 1 h,将小鼠置于小鼠自主活动记录仪中适应 5 min,再记录 5 min 内动物的活动次数和站立次数。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,考察各组样本均数间的差异用 *t* 检验。见表 1。

表 1 不同工艺滋肾宁神方对小鼠自主活动的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	活动次数	站立次数
空白	-	13.89 ± 3.35	55.22 ± 14.09
地西洋	0.019	6.40 ± 4.52 ²⁾	25.40 ± 11.35 ²⁾
水提	19.93	9.58 ± 7.18	46.50 ± 15.77
	4.98	10.50 ± 6.70	45.70 ± 12.22
醇提	19.93	11.08 ± 9.95	48.55 ± 19.44
	4.98	13.18 ± 9.22	45.80 ± 16.39
水提醇沉	19.93	8.50 ± 6.33 ¹⁾	38.50 ± 15.65 ¹⁾
	4.98	7.33 ± 6.11 ²⁾	43.82 ± 11.61
水醇结合	19.93	11.18 ± 7.79	48.50 ± 20.57
	4.98	10.44 ± 3.89	45.91 ± 16.46
原剂型	19.93	7.91 ± 7.01 ¹⁾	40.22 ± 13.08 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ *P* < 0.05,²⁾ *P* < 0.01(表 2 ~ 3 同)。

结果表明,滋肾宁神丸原剂型组、滋肾宁神方水提醇沉高、低剂量组与空白组比较,可显著减少小鼠活动次数(*P* < 0.01 或 *P* < 0.05);原剂型组、水提醇沉高剂量组均能显著减少站立次数(*P* < 0.05)。提示滋肾宁神方采用水提醇沉工艺能显著减少小鼠自主活动,说明滋肾宁神方采用水提醇沉工艺具有明显镇静作用。

2.3 睡眠实验

2.3.1 阈下剂量戊巴比妥钠睡眠实验^[3] 小鼠分组和给药同 2.2。于末次给药 1 h 后,每鼠 ip 戊巴比妥钠 36 mg·kg⁻¹。以注射后 15 min 内小鼠翻正反射消失达 1 min 为入睡指标,记录各组入睡小鼠的只数,即睡眠数,计算入睡率。考察各组样本率间的差异用 χ^2 检验。见表 2。

结果表明,滋肾宁神方采用不同提取工艺对注射阈下剂量戊巴比妥钠的小鼠入睡率均有一定的影响,以水提醇沉低剂量组入睡率最高,且明显高于原剂型组 *P* < 0.05。提示滋肾宁神方水提醇沉物阈下剂量戊巴比妥钠具有较强的协同作用。说明其对中枢神经有较强的抑制作用。

2.3.2 阈剂量戊巴比妥钠睡眠实验^[4] 小鼠分组和给药同 2.2。于末次给药 1 h 后,每鼠 ip 戊巴比妥钠 45 mg·kg⁻¹,以注射后 15 min 翻正反射消失达 30 s

表 2 不同工艺滋肾宁神方对注射阈下剂量戊巴比妥钠的小鼠入睡率的影响

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	睡眠只数	入睡率 /%
空白	-	12	1	8.33
地西洋	0.019	12	12	100.00 ²⁾
水提	19.93	12	5	41.67
	4.98	12	6	50.00
醇提	19.93	11	4	36.36
	4.98	12	3	25.00
水提醇沉	19.93	12	5	41.67
	4.98	12	9	75.00 ^{2,3)}
水醇结合	19.93	11	2	18.18
	4.98	12	3	25.00
原剂型	19.93	10	4	40.00

注:与原剂型比较³⁾P<0.05。

以上为进入睡眠,以其翻正反射恢复为小鼠的苏醒,其间为睡眠时间,记录各组小鼠的睡眠持续时间。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,考察各组样本均数间的差异用 t 检验。结果见表 3。

表 3 不同工艺滋肾宁神丸对注射阈剂量戊巴比妥钠的小鼠睡眠时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	睡眠持续时间 /min
空白	-	14.64 ± 3.09
地西洋	0.019	24.45 ± 4.05 ²⁾
水提	19.93	17.55 ± 5.74
	4.98	20.71 ± 7.00 ¹⁾
醇提	19.93	15.12 ± 3.57
	4.98	17.30 ± 4.62
水提醇沉	19.93	18.95 ± 4.60 ¹⁾
	4.98	23.58 ± 8.75 ²⁾
水醇结合	19.93	15.85 ± 2.11
	4.98	18.18 ± 4.47
原剂型	19.93	19.15 ± 4.11 ²⁾

结果表明,滋肾宁神方原剂型组、滋肾宁神方水提低剂量组,水提醇沉高、低剂量组均能延长小鼠的持续睡眠时间,与空白组比较,差异显著 (P < 0.01 或 P < 0.05),且水提醇沉组相对优于其余各组。提

示滋肾宁神方水提醇沉物对小鼠中枢镇静催眠具有较好的作用。

3 讨论

失眠是临床常见而又难治的病症,长时间的失眠严重损害患者身心健康。目前大量使用的苯二氮类等镇静催眠药物在治疗失眠的同时也产生一定的依赖性,而中药制剂的镇静催眠作用具有在起效的同时不产生药物依赖性优点^[5]。滋肾宁神丸对失眠多梦等症具有独特功效。

在中药制剂工艺筛选研究中,多只运用某种或某些指标成分作为质量控制指标,而这些化学成分含量往往难于评价药效,这使最终得到的制剂产品难以获得最好的临床疗效^[6]。滋肾宁神方药味众多、化学成分复杂,有效成分/部位及其作用机制尚不明确,因此在提取工艺筛选研究中采用某种或某些成分作为指标进行工艺筛选比较困难,本研究以药效为导向对滋肾宁神方提取工艺进行筛选。实验结果显示,滋肾宁神方采用水提醇沉工艺对小鼠中枢神经系统有明显的镇静和催眠作用,能明显抑制小鼠的自主活动,能明显延长戊巴比妥钠对小鼠的催眠时间,增加阈下剂量戊巴比妥钠所致睡眠动物数,对戊巴比妥钠催眠有协同作用。且水提醇沉组作用效果优于其他给药组,滋肾宁神方采用水提醇沉工艺其镇静催眠效果明显优于滋肾宁神丸,并且可大大减少服用量,从以上两方面考虑,选择水提醇沉工艺为滋肾宁神方的提取工艺。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂第十八册)[S]. 北京:人民卫生出版社,1992:339.
- [2] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:657.
- [3] 陈奇. 中药药理实验方法[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:107.
- [4] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 2版. 上海:上海科学技术出版社,2006:333.
- [5] 黄泰康. 常用中药成分与药理手册[M]. 北京:中国医药科技出版社,1999:1750.
- [6] 谭晓斌,贾晓斌,沈明勤,等. 结合药效的刺五加纯化工艺优选[J]. 中国药房,2007,18(12):902.

[责任编辑 何伟]