

远志助眠功效成分提取及分析

Separation and identification of the hypnotic active ingredients of *Polygala tenuifolia* Willd

陈丽欢 徐德平 孔佳美 姚明华

CHEN Li-huan XU De-ping KONG Jia-mei YAO Ming-hua

张 东 古丽拜克热木 高静秋

ZHANG Dong GU Li-bai-ke-re-mu GAO Jing-qiu

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(Food Faculty of Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:通过直接观察睡眠法、高效液相色谱法(HPLC)测定小鼠海马区多巴胺(DA)含量,研究远志助眠的功效成分;通过理化检测、液质联用(HPLC-MS)、核磁共振(NMR)推断助眠有效成分的化学结构。结果表明:远志醇提取物乙酸乙酯萃取物 MCI 柱 70% 乙醇洗脱物是助眠的有效部分,该部分分离得化合物 A,检测得该化合物为 2 个互为同分异构体的皂苷类物质,该物质含有氮元素和 1 个由 3 个糖组成的糖链。

关键词:远志;助眠;提取;成分分析

Abstract: The effect of sedation was observed by sleeping method and the content of dopamine(DA) in hippocampal region of the experimental mice, which was measured by high performance liquid chromatography (HPLC). The structure of active ingredients was inferred by physical and chemical testing and HPLC-MS and NMR. The research showed that the active ingredient of hypnosis was the elution fraction of 70% ethanol in MCI, and it was Saponins, which were isomers of each other, with nitrogen(s) and a sugar chain consisting of three sugars.

Keywords: *Polygala tenuifolia* Willd; hypnosis; extract; component analysis

远志又名细叶远志,是可用于保健食品的中药^[1],具有安神、祛痰、消肿等多种功效^[2]。据报道^[3],远志主要成分为皂苷,此外还包括糖、甾山酮类、香豆素等多类化合物。有研

究^[4-8]表明,生远志高剂量能协同戊巴比妥钠呈现明显的催眠作用,同时也证明^[9]中枢系统中,单胺类递质如多巴胺、5-羟色胺等在睡眠调节中起着重要的作用。但未有关于远志起助眠作用的具体物质以及作用机制的研究。

本试验从远志药材的提取分离拟对远志醇提取物的不同萃取物助眠作用进行研究,并通过直接睡眠法和分析小鼠海马区多巴胺含量的变化得到远志助眠的功效物质;通过 HPLC-MS 和 NMR 对该物质进行结构鉴定,为远志进一步开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

远志:产地山西;

ICR 小鼠:18~22 g,南京模式动物研究所;

DA 标准品:美国 Sigma 公司;

硅胶板:GF₂₅₄,山东烟台芝罘化工厂;

Octadecylsilyl(ODS)填料:北京绿百草科技发展有限公司;

Middle Chromatogram Isolated Gel(MCI)填料:三菱化学控股集团;

丙酮、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

甲醇、磷酸氢二钠:色谱纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 试验仪器

萃取罐:RAT-100 型,上海锦赋实验仪器设备有限公司;

旋转蒸发器:XHRE-1002 型,广州予华仪器有限公司;

基金项目:江苏高校品牌专业建设工程资助项目(编号:PPZY2015A052);2015 级大学生创新训练计划项目资助(编号:2017182Y)

作者简介:陈丽欢,女,江南大学在读本科生。

通信作者:徐德平(1965—),男,江南大学副教授,博士。

E-mail: xdp1219@sina.com

收稿日期:2018-04-02

摄像头:LS-Q130W-1 型,广东东莞市盛鼎电子科技有限公司;

恒流泵:SYB106-100 型,天津市科器高新技术公司;
暗箱式紫外透射仪:ZF-90 型,上海顾村光电仪器厂;
可见分光光度计:V-5100B 型,上海元析仪器有限公司;
自动部分收集器:BS-160ABS-160A 型,上海金鹏分析仪器有限公司;

超声波清洗器:FRQ-1002T 型,杭州法兰特超声波有限公司;

高效液相色谱仪(紫外+荧光检测器)(反相):1525 型,美国沃特世公司;

液质联用仪:MALDI SYNAPT MS 型,美国沃特世公司;

核磁共振仪:Avance 500 MHz 型,美国 Bruker 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 原料预处理 将 20 kg 远志粉碎,过 30 目筛后,放入体积为 100 L 的提取罐中,按料液比 1:10 (g/mL)加入 75%的乙醇,60 ℃搅拌提取 3 h,取上清液后,渣重复提取 2 次。将 3 次所得上清液浓缩后得远志乙醇提取物。将乙醇提取物和去离子水 1:1 (g/mL)混合后,依次用相同体积的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取、浓缩后得石油醚萃取物(I)、乙酸乙酯萃取物(II)、正丁醇萃取物(III)以及萃余物(IV),于-18 ℃保存备用。

1.2.2 远志醇提物不同溶剂萃取物的助眠作用 取 50 只 ICR 小鼠,10 只/组,共 5 组,分别进行灌胃。I、II、III、IV 4 组试验小鼠的灌胃剂量均为 1 g/kg·BW,对照组给等量生理盐水,1 次/d。1 周后,观察灌胃 30 min 内小鼠的睡眠率、灌胃结束后 12 h 内小鼠的睡眠时间。

1.2.3 乙酸乙酯萃取物的分离 将远志醇提物的乙酸乙酯萃取物上 MCI(5 cm×100 cm)柱,依次用不同体积分数的乙醇溶液(30%,50%,70%,95%)洗脱,通过薄层色谱法(TLC)检测洗脱液中的成分,根据 TLC 检测结果合并相同成分的洗脱液,分成 A(30%洗脱)、B(50%洗脱)、C(70%洗脱)、D(95%洗脱)4 个部分。将其分别减压浓缩,于-18 ℃保存备用。

1.2.4 乙酸乙酯萃取物不同分离组分的助眠效果 取 50 只 ICR 小鼠,10 只/组,共 5 组,分别给药灌胃。A、B、C、D 4 组小鼠的剂量为 500 mg/kg·BW,对照组(CK)小鼠给等量生理盐水,1 次/d。1 周后,观察灌胃 30 min 内小鼠的睡眠率、灌胃结束后 12 h 内小鼠的睡眠时间。

1.2.5 测定脑组织多巴胺含量

(1)制备匀浆:使用异弗烷麻醉小鼠后进行经心灌注。将小鼠断头处死,迅速剥取全脑,置冰盘中,分离出小鼠左、右海马区,-80 ℃冰冻保存备用^[9]。

称取海马区 0.2 g,加入 0.1 mol/L 的高氯酸 300 μL 后置于冰盘上碾碎 1 min。以 15 000 r/min 离心 5 min,取上清液过 0.22 μm 滤膜后,进样分析^[10]。

(2)色谱条件:根据文献[11]修改如下,pH 3.0;流速 1.0 mL/min;检测波长 280~320 nm;柱温 10 ℃;进样量 15 μL。

1.2.6 远志助眠活性部位的成分分离 将 1.2.4 中助眠效果好的组分减压浓缩后上样到 MCI 柱(5 cm×100 cm),依次用不同体积分数的乙醇洗脱,薄层色谱层析法检测洗脱液中的成分,并根据结果将相同成分合并,浓缩后重复过 MCI (5 cm×100 cm)柱,得到主要成分的较纯化合物 A。

1.2.7 远志助眠活性部位的成分检测

(1)发泡性试验:皂苷能降低水溶液表面张力,产生的泡沫不因加热而消失^[12]。取 0.5 g 化合物 A,加水 5 mL 溶解,煮沸 10 min 后滤出水溶液。

(2)氯仿-硫酸反应:取 0.5 g 样品溶于氯仿,加入浓硫酸后分层,氯仿层呈红色,硫酸层显绿色荧光。通过上述现象则可判断为皂苷。

(3)Lieberman-Burchard 反应:将试样溶于氯仿,加入浓硫酸-乙醚(1:20)数滴,呈黄→红→蓝→紫→绿色的变化后,观察最后的成色。

(4)结构检测:使用液质联用仪(HPLC-MS)推断样品的结构成分。

HPLC-MS 检测条件:检测波长 200~400 nm;分析柱为 BEHC₁₈ 柱(2.1 mm×150 mm,1.7 μm);流动相:0.1%甲酸洗脱 40 min→乙腈和 0.1%甲酸混合液(体积比 3:7)洗脱 45 min→乙腈和 0.1%甲酸混合液(体积比 8:2)洗脱 50 min→100%乙腈洗脱 55 min→0.1%甲酸洗脱 35 min;柱温 45 ℃;流速 0.3 mL/min;进样量 5 μL。

(5)核磁共振分析:以二甲基亚砷-d₆(DMS-d₆)为溶剂,四甲基硅烷(TMS)为内标物,将得到的化合物经氢谱和碳谱等光谱数据分析,确定其结构。

1.2.8 统计学方法 采用 SPSS 22.0 进行分析。组间差异比较采用单因素方差分析,P<0.05 为有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 远志醇提物的不同溶剂萃取物的助眠作用

由表 1 可知,在不同溶液的萃取物中,远志乙酸乙酯萃取物的试验小鼠睡眠率、睡眠时间均为最佳,助眠效果最显著,且与空白小鼠存在显著性差异(P<0.01);远志正丁醇萃取物试验小鼠的睡眠时间与空白小鼠也有显著性差异(P<0.05),但明显低于乙酸乙酯萃取物的小鼠睡眠时间。

试验中远志醇提物不同溶剂萃取物明显延长各组小鼠睡眠时间和睡眠率的现象,与北五味子多糖^[13]能够显著延长小鼠睡眠时间的现象一致,由此推断远志醇提物有助眠作用,且有效成分为远志醇提物乙酸乙酯萃取物。

2.2 乙酸乙酯萃取物不同组分对小鼠的助眠作用

由表 2 可知,远志醇提物乙酸乙酯萃取物 MCI 柱 70%乙醇洗脱物的试验小鼠的睡眠率最高,为 80%,同时平均睡眠时间最长,为 509.6 min,且明显高于其他各组的,同时具有显著性差异(P<0.05)。

表 1 不同萃取物对小鼠睡眠率和时间的影响[†]

Table 1 Influence of extracts on sleep rate and time of mice

组别	数量/只	剂量/(g·kg ⁻¹ ·BW)	30 min 后入睡数量/只	睡眠率/%	平均睡眠时间/min	延长率/%
CK	10	等量生理盐水	2	20	365.4±9.8	0.0
I	10	1	4	40	379.7±19.5	3.9
II	10	1	8	80	477.8±11.2 ^b	30.8
III	10	1	3	30	402.0±5.4 ^a	10.0
IV	10	1	3	30	386.4±13.0	5.7

† a. 与对照组相比在 P<0.05 水平差异显著;b. 与对照组相比在 P<0.01 水平差异显著。

表 2 MCI 洗脱物对小鼠睡眠率和时间的影响[†]

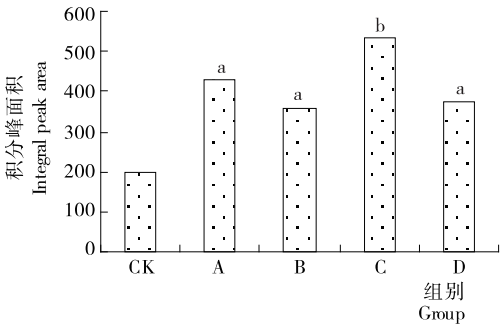
Table 2 Influence ofeluent of MCI resin on sleep rate and time of mice

组别	数量/只	剂量/(g·kg ⁻¹ ·BW)	30 min 后入睡数量/只	睡眠率/%	平均睡眠时间/min	延长率/%
CK	10	等量生理盐水	4	40	382.5±8.5	0.0
A	10	0.5	4	40	411.2±9.1 ^a	7.5
B	10	0.5	3	30	383.0±14.3	0.1
C	10	0.5	8	80	509.6±6.5 ^b	33.2
D	10	0.5	5	50	398.2±11.1 ^a	4.1

† a. 与对照组相比在 P<0.05 水平差异显著;b. 与对照组相比在 P<0.01 水平差异显著。

分析图 1,组别为远志醇提物乙酸乙酯萃取物 MCI 柱 70%乙醇洗脱物的小鼠海马区 DA 含量最高,与空白组相比效果最明显(P<0.01)。组别为远志醇提物乙酸乙酯萃取物 MCI 柱 20%乙醇洗脱物、50%乙醇洗脱物、95%乙醇洗脱物的小鼠海马区 DA 含量与空白组相比差异显著(P<0.05),明显低于远志醇提物乙酸乙酯萃取物 MCI 柱 70%乙醇洗脱物的试验组小鼠海马区 DA 含量,同时具有显著性差异(P<0.05)。

睡眠是中枢神经系统发生的一个主动过程,与脑内神经递质,尤其是单胺类递质,如多巴胺、五羟色胺的动态变化有着极大的关联,DA 作为中枢神经递质中最重要的组成部分,在睡眠—觉醒过程中起着极其重要的作用^[9, 14—16]。因此,组别为远志醇提物乙酸乙酯萃取物 MCI 柱 70%乙醇洗脱物的小鼠海马区 DA 含量的显著提高有利于该组小鼠睡眠率的提高、睡眠时间的延长,故推断该部分为远志助眠的功效部位。



a. 与空白对照组比较在 P<0.05 水平差异显著;b. 与空白对照组比较在 P<0.01 水平差异显著

图 1 不同组别小鼠海马区中多巴胺(DA)的积分峰面积
Figure 1 The peak areas of dopamine in different groups of mouse hippocampus region

综合表 2 和图 1 可知,远志醇提物乙酸乙酯萃取物中具有助眠作用的功效成分主要集中在 MCI 柱 70%乙醇洗脱物中。

2.3 乙酸乙酯萃取物 MCI 柱 70%乙醇洗脱部分成分纯化及分析

2.3.1 远志助眠活性成分的理化分析 70%乙醇洗脱部分具有很好的助眠作用,分离后得一个单体化合物 A,其理化检测结果见表 3。

从表 3 可知,单体化合物 A 的各项理化检测均呈现皂苷具有的性质,故推断该化合物为皂苷类物质。

表 3 各项检测结果及其分析

Table 3 Results and inferences of different physical tests and chemical analysis

试验	结果	结果分析
发泡性试验	振荡后产生持泡沫,15 min 内几乎无减少,加热不消失	呈现皂苷具有的性质
氯仿-硫酸反应	硫酸层呈红色,氯仿层有绿色荧光	呈现皂苷具有的性质
Lieberman-Burchard 反应	溶液显红色	呈阳性,初步判断为三萜皂苷

2.3.2 HPLC-MS 检测 图 2 为 HPLC 图谱,图 3~5 为主要化合物的质谱图。

图 2 中主要有 3 个峰,即该部分主要有 3 种化合物组成,含量最多的化合物保留时间为 6.99 min(图 5),其与保留时间为 6.93 min(图 4)的化合物为同分异构体,对应的分子量均为 1 573,由于分子量为奇数,可以推断化合物含有氮。

2.3.3 核磁共振分析 化合物 A 的¹³C-NMR 和 135dept 图谱见图 6。从图 6 中可以看出化合物 A 不纯,结合 HPLC-

MS 检测可以看出该组分含有 2 个同分异构体,使用常规的色谱方法难以将其分离。但图6(a)中可以看出在化学位移

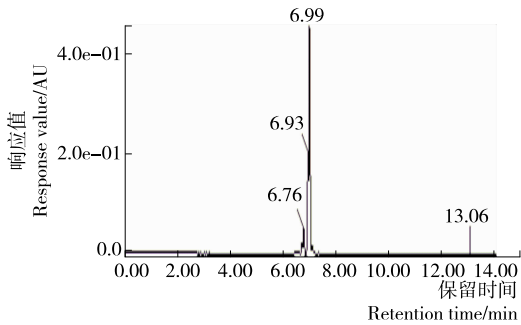


图 2 MCI 柱 70%乙醇洗脱物液相色谱图

Figure 2 The chromatography of elution fraction of 70% ethanol in MCI in HPLC

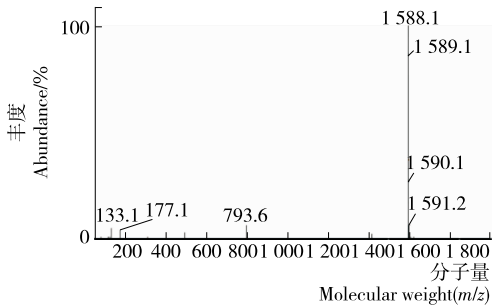


图 3 保留时间为 6.76 min 化合物的质谱图

Figure 3 Mass spectrogram of the compound with the retention of 6.76 min

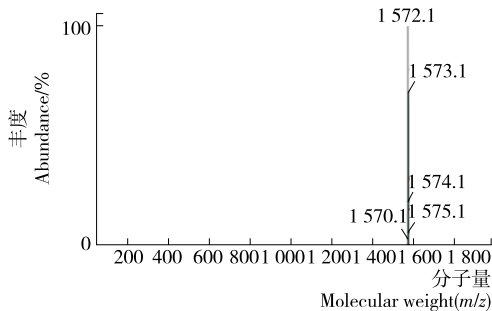


图 4 保留时间为 6.93 min 化合物的质谱图

Figure 4 Mass spectrogram of the compound with the retention of 6.93 min

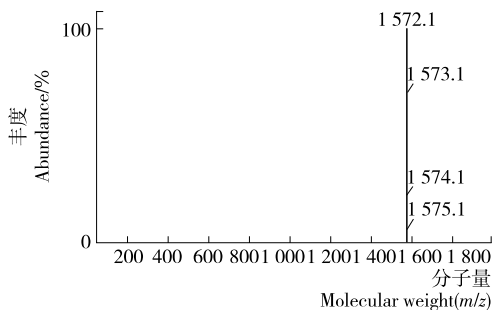
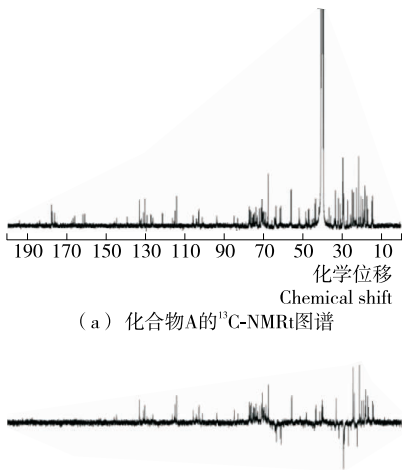
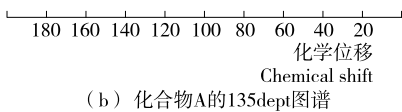


图 5 保留时间为 6.99 min 化合物的质谱图

Figure 5 Mass spectrogram of the compound with the retention of 6.99 min



(a) 化合物A的¹³C-NMRt图谱



(b) 化合物A的135dept图谱

图 6 化合物 A 的¹³C-NMR 和 135dept 图谱

Figure 6 ¹³C-NMR spectrum and 135dept spectrum of A

为 20~60 时,有明显的皂苷信号,但为何种皂苷无法确定,同时也可看出在化学位移为 60~105 时有 3 个糖残基,说明化合物含有 1 个由 3 个糖组成的糖链,其详细结构还在继续研究中。

3 结论

本试验结果表明,远志助眠功效部位为远志醇提物乙酸乙酯萃取物 MCI 柱 70%乙醇洗脱物;经分离纯化后所得的较纯化合物 A 为 2 个互为同分异构体的皂苷类物质,该物质分子量为 1 573,且含有氮元素和 1 个由 3 个糖组成的糖链。本研究为远志功能成分的开发提供了依据。但化合物 A 的具体结构仍需进一步研究。

参考文献

[1] 刘大伟, 康利平, 马百平. 远志化学及药理作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2012, 39(1): 32-36.

[2] QU Wei-hong, ZHAO Jian-guo, LIU Ke-yue. Callus induction of polygala tenuifolia willd[J]. Medicinal Plant, 2011, 2(10): 32-34.

[3] 张陶珍, 荣巍巍, 李清, 等. 远志的研究进展[J]. 中草药, 2016, 47(13): 2 381-2 389.

[4] GUO Chang-run, SHEN Jin-yang, MENG Zhao-qing, et al. Neuroprotective effects of polygalacic acid on scopolamine-induced memory deficits in mice[J]. Phytomedicine, 2016, 23 (2): 149-155.

[5] 杨波, 朱盼, 王艳, 等. 远志复方不同萃取部位抗氧化及安神作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(12): 2 872-2 873.

[6] MONTI J M, MONTI D. The involvement of dopamine in the modulation of sleep and waking[J]. Sleep Med Rev, 2007, 11 (2): 113.

(下转第 182 页)

of pulsed light on the organoleptic properties and shelf-life extension of pork and salmon[J]. Food Control, 2014, 44: 138-145.

[24] HEINRICH V, ZUNABOVIC M, BERGMAIR J, et al. Post-packaging application of pulsed light for microbial decontamination of solid foods: A review[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2015, 30: 145-156.

[25] TURTOI M, NICOLAU A. Intense light pulse treatment as alternative method for mould spores destruction on paper-polyethylene packaging material[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 83(1): 47-53.

[26] HAUGHTON P N, LYG J G, MORGAN D J, et al. Efficacy of high-intensity pulsed light for the microbiological decontamination of chicken, associated packaging, and contact surfaces[J]. Foodborne Pathogens & Disease, 2011, 8(1): 109.

[27] MONTGOMERY N L, BANERJEE P. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in biofilms by pulsed ultraviolet light [J]. Bmc Research Notes, 2015, 8 (1): 235.

[28] GÓMEZ-LÓPEZ V M. Pulsed Light and Packaging [M]// SMITHERS G W. Reference Module in Food Science. Murcia: [s.n.], 2016: 463-470.

[29] WANG Bei, MAHONEY N E, PAN Zhong-li, et al. Effectiveness of pulsed light treatment for degradation and detoxification of aflatoxin B₁ and B₂ in rough rice and rice bran[J]. Food Control, 2016, 59: 461-467.

[30] CHUNG S Y, YANG W, KRISHNAMURTHY K. Effects of pulsed UV-light on peanut allergens in extracts and liquid peanut butter[J]. Journal of Food Science, 2008, 73(5): C400-C404.

[31] YANG W, CHUNG S-Y, AJAYI O, et al. Use of pulsed ultraviolet light to reduce the allergenic potency of soybean extracts[J]. International Journal of Food Engineering, 2010, 6(3): 61-64.

[32] YANG W, MWAKATAGE N R, GOODRICH-SCHNEIDER R, et al. Mitigation of major peanut allergens by pulsed ultraviolet light[J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 5(7): 2 728-2 738.

[33] YANG W, SHRIVER S K, CHUNG S-y, et al. In vitro gastric and intestinal digestions of pulsed light-treated shrimp extracts[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 166(6): 1 409-1 422.

[34] SHRIVER S, YANG W, CHUNG S-Y, et al. Pulsed ultraviolet light reduces immunoglobulin E binding to atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) extract[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2011, 8 (7): 2 569.

[35] LI Ying-qiu, CHEN Zheng-xing, MO Hai-zhen. Effects of pulsed electric fields on physicochemical properties of soybean protein isolates[J]. LWT-Food Science and Technology, 2007, 40(7): 1 167-1 175.

[36] WIHODO M, MORARU C I. Effect of Pulsed Light treatment on the functional properties of casein films[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 64(2): 837-844.

[37] MANZOCCO L. Photo-induced modification of food protein structure and functionality [J]. Food Engineering Reviews, 2015, 7(3): 346-356.

[38] PANOZZO A, MANZOCCO L, LIPPE G, et al. Effect of pulsed light on structure and immunoreactivity of gluten[J]. Food Chemistry, 2016, 194: 366-372.

[39] CHARLES F, VIDAL V, OLIVE F, et al. Pulsed light treatment as new method to maintain physical and nutritional quality of fresh-cut mangoes[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2013, 18: 190-195.

[40] JANVE B A, YANG W, MARSHALL M R, et al. Nonthermal inactivation of soy (*Glycine max* Sp.) lipoxygenase by pulsed ultraviolet light[J]. Journal of Food Science, 2014, 79 (1): C8-C18.

[41] CHOI M-S, CHEIGH C-I, JEONG E-A, et al. Nonthermal sterilization of *Listeria monocytogenes* in infant foods by intense pulsed-light treatment[J]. Journal of Food Engineering, 2010, 97(4): 504-509.

[42] GREEN S, BASARAN N, SWANSON B G. High-intensity light [M]// Food Preservation Techniques. Washington: Woodhead Publishing, 2003: 284-302.

[43] IZQUIER A, G MEZ-L PEZ V M. Modeling the pulsed light inactivation of microorganisms naturally occurring on vegetable substrates[J]. Food Microbiology, 2011, 28(6): 1 170-1 174.

(上接第 122 页)

[7] VOLKOW N D, WANG G J, TELANG F. Increased dopaminergic function in the thalamus is associated with excessive daytime sleepiness[J]. Sleep Medicine, 2018, 43(3): 25-30.

[8] FORSTER C H. Sleep in insects[J]. Annual Review of Entomology, 2018, 63(1): 69-86.

[9] 董晖, 刘雨秋, 时红娟, 等. 尿毒症脑病大鼠脑组织多巴胺、5-羟色胺含量变化及发病机制的探讨[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(1): 42-45.

[10] 陈娟, 王一超, 崔蓉, 等. 小鼠脑组织中多巴胺和 5-羟色胺检测方法的优化试验研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(14): 1 996-1 999.

[11] 张梓毓, 徐德平. 五味子助眠成分的分离鉴定[J]. 食品与机械, 2018, 34(3): 162-165

[12] 王静. 荷青花中皂苷类化合物的研究 I [D]. 吉林: 吉林大学, 2015: 25.

[13] 王春梅, 李贺, 孙靖辉, 等. 北五味子多糖抗焦虑和镇静催眠作用[J]. 食品科学, 2015, 36(13): 239-242.

[14] MONTI J M, MONTI D. The involvement of dopamine in the modulation of sleep and waking[J]. Sleep Med Rev, 2007, 11 (2): 113-133.

[15] VOLKOW N D, WANG G J, TELANG F. Increased dopaminergic function in the thalamus is associated with excessive daytime sleepiness[J]. Sleep Medicine, 2018, 43(3): 25-30.

[16] Charlotte Helfrich-Förster. Sleep in Insects[J]. Annual Review of Entomology, 2018, 63(1): 69-86.