

酸枣仁皂苷的提取及改善睡眠功效的研究

王旭峰, 何计国*, 陈 阳, 李 欣, 李智欣
(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: 本文通过对酸枣仁皂苷不同提取方法的比较, 得出超声波提取方法是较为理想的方法之一, 并通过正交试验确定了超声波提取的最佳工艺。用酸枣仁皂苷的提取液按不同剂量给药并测定给药后小鼠的入睡率、睡眠潜伏期和睡眠时间, 验证了酸枣仁改善睡眠的功能并得到了最低给药量。

关键词: 酸枣仁皂苷; 超声波提取; 改善睡眠

Method of Ultrasonic Extraction of Total Jujuboside from *Ziziphus jujuba Mill* in Mice Test

WANG Xu-feng, HE Ji-guo*, CHEN Yang, LI Xin, LI Zhi-Xin
(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: In this paper, it was studied that the ultrasonic extraction method was one of ideal methods by comparing different methods of extracting the total Jujuboside from *Ziziphus jujuba Mill* and the optimum conditions were obtained by orthogonal test. The *Ziziphus jujuba Mill* extracted solution was given to the mice according to different doses and, to induce sleep afterwards. The sleeping latency time and sleeping time were assayed. The results proved that the Jujuboside from *Ziziphus jujuba Mill* product significantly improves the sleep quality of mice and the optimal low dose is obtained.

Key words jujuboside; ultrasonic extraction; dormancy improving

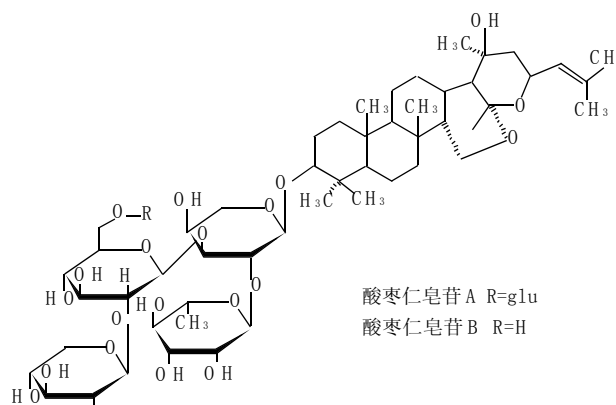
中图分类号: R284.2 R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)04-0226-04

酸枣仁为鼠李科植物酸枣(*Ziziphus jujube Mill*)的干燥成熟种子, 主产于河北、陕西、辽宁、河南等地, 内蒙古、山东、山西、甘肃、安徽等地亦产。酸枣仁是中医安神之要药, 用于虚烦、失眠、心悸、体虚多汗诸症有显著疗效, 而且具有补肝、宁心、敛汗、生津的作用, 《神农本草经》将其列为上品, 《本草纲目》将其列为本部类, 《中药学》列为养心安神类药。现代医学研究也表明, 酸枣仁有镇静催眠作用^[1]。

酸枣仁皂苷是酸枣仁的主要有效成分, 其中主要含有酸枣仁皂苷 A、B。酸枣仁皂苷属于四环三萜类皂苷。其结构式为:



收稿日期 2005-12-14

*通讯作者

作者简介: 王旭峰(1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品营养与安全。

[12] Morton L W, Abu-Amsha Caccetta R, Puddey I B. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease[J]. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2004, 27: 152-159.

[13] Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of

hydrogen peroxide produced by cells in culture[J]. Immunological Methods, 2004, 381: 161-170.

[14] Werns S W, Lucchesia B R. Myocardial ischemia and reperfusion: the role of oxygen radicals in tissue injury[J]. Cardiovascular Drugs and Therapy, 2005, 23: 269-761.

酸枣仁皂苷是酸枣仁镇静催眠作用的主要成分之一,对睡眠的改善有很好的效果^[2]。酸枣仁皂苷的提取方法和它的改善睡眠的效果一直是人们所关注的问题,本文采用正交试验,研究了不同提取条件下酸枣仁皂苷提取的最佳工艺,并且通过酸枣仁皂苷对小鼠睡眠的动物实验,对酸枣仁皂苷的改善睡眠作用进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 材料

酸枣仁炒品 北京金象大药房;
酸枣仁皂苷 A 标准品(纯度为 98%) 成都思科华生物技术有限公司。

1.1.2 主要仪器及试剂

高效液相色谱仪 (SHIMADZU LC-10A) 日本岛津
高效液相色谱 超声波药品处理机 (JBT/C-YCL400/3P) 济宁金百特电子有限责任公司;离心机 (TDL-5-A) 上海安亭科学仪器厂。

巴比妥钠、乙腈等其他试剂均为分析。

1.1.3 实验动物 昆明种健康小鼠(体重 18~22g, SPF 级, 雄性), 由北京军事科学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK-(军)2002-001。

1.2 提取方法

1.2.1 酸枣仁皂苷提取方法

酸枣仁→粉碎→过筛→超声波提取→加等量水饱和的正丁醇萃取→粗皂苷提取液→HPLC 法测定样品中酸枣仁皂苷 A 的含量^[3]

1.2.2 酸枣仁皂苷检测方法及条件

以酸枣仁皂苷 A 作为酸枣仁皂苷的检测指标,酸枣仁皂苷 A 的含量的检测采用用高效液相色谱对不同条件提取的样品进行酸枣仁皂苷 A 含量的测定。

色谱柱: Venusil MP-C18 (5 μm, 100A, 6 × 250mm);

流动相: 乙腈:水(30:70); 流速: 0.5ml/min; 柱温: 常温; 检测波长: 203 nm。

1.2.3 超声波快速提取酸枣仁皂苷各因素的确定

以超声波提取仪的频率(A)、提取时间(B)、溶剂(C)、提取温度(D)为因素,确定四因素三水平正交表(见表1)。

表1 超声波提取酸枣仁皂苷正交试验设计因素水平
Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A 频率 (kHz)	B 提取时间 (min)	C 溶剂	D 提取温度 (℃)
1	27.0	20	甲醇	30
2	47.0	30	95% 乙醇	50
3	70.0	40	75% 乙醇	70

1.2.4 不同提取方法提取效率的比较

比较超声波提取方法、回流提取方法与索氏提取方法在不同提取时间时的提取效率,用高效液相检测各种方法的提取率。以时间为横坐标,提取率为纵坐标作图,结果即图1。

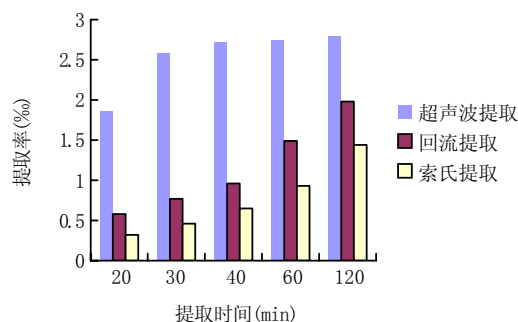


图1 不同提取方法不同时间提取效率的比较
Fig.1 Comparison of different extraction method

1.2.5 最佳提取方法的确定

由图1可以看出,与索氏提取、回流提取相比,超声波提取方法是比较理想的酸枣仁皂苷提取方法。

1.3 酸枣仁皂苷对小鼠睡眠的影响

1.3.1 实验分组、给药方法、灌胃剂量及灌胃时间

小鼠适应性喂养 48h 之后,应用随机数字表进行完全随机化分组,分为四组,每组 12 只。空白对照组(蒸馏水);酸枣仁皂苷低剂量(20mg/kg·d);酸枣仁皂苷中剂量(40mg/kg·d);酸枣仁皂苷高剂量(80mg/kg·d)。通过灌胃方式给药,每天灌胃一次,灌胃时间选择在每天晚上 8 点钟,各剂量组连续灌胃给药 15 d。

1.3.2 阈值催眠剂量巴比妥钠小鼠入睡率试验

观察受试物与巴比妥钠的协同作用。由于巴比妥钠通过肝酶代谢,而对该酶有抑制作用的药物,也能延长巴比妥钠睡眠时间,所以为了排除这种影响,应进行阈值剂量实验。

各剂量组给药后,对照组给予等体积蒸馏水,30min 后,各组均按 150mg/kgbw 腹腔注射巴比妥钠,以翻正反射消失 30s 以上作为入睡判断标准,观察受试物对注射阈下巴比妥钠的小鼠入睡率的影响。

1.3.3 巴比妥钠睡眠潜伏期试验

在巴比妥钠催眠的基础上,观察受试物是否能够缩短动物入睡潜伏期,若潜伏期缩短,则说明受试物与巴比妥钠有协同作用。

各剂量组给药后,对照组给予等体积蒸馏水,30min 后,各组均按 300mg/kgbw 腹腔注射巴比妥钠,以翻正反射消失 30s 以上作为入睡判断标准,从注射巴比妥钠到动物入睡即为睡眠潜伏期,观察受试物对巴比妥

钠睡眠潜伏期的影响。

1.3.4 延长巴比妥钠诱导的小鼠睡眠时间试验

在巴比妥钠催眠的基础上, 观察受试物能否延长睡眠时间, 若睡眠时间延长, 则说明受试物与巴比妥钠有协同作用。

各剂量组小鼠分别给药后, 对照组给予等体积蒸馏水, 30min后, 各组均按300mg/kgbw腹腔注射巴比妥钠, 以翻正反射消失30s以上作为入睡判断标准, 翻正反射恢复即为动物觉醒, 翻正反射消失至恢复这段时间为动物睡眠时间, 观察受试物对巴比妥钠睡眠时间的延长作用。

2 结果与分析

2.1 酸枣仁皂苷超声波提取正交试验结果与讨论

2.1.1 正交试验结果

正交试验中, 综合提取过程中提取频率、温度、时间、溶剂四个因素的共同作用, 考虑它们对提取效果的影响, 本试验以酸枣仁皂苷A的得率为检测指标, 设计了四因素三水平共9个试验点的正交分析试验(见表2), 找到四个因素间的相互影响, 并得出因素间的最佳组合。

表2 超声波提取酸枣仁皂苷的正交分析试验数据

Table 2 Experiment designs and results

序号	A	B	C	D	酸枣仁皂苷A的得率(%)
1	1	1	1	1	0.83
2	1	2	2	2	1.40
3	1	3	3	3	2.72
4	2	1	2	3	1.68
5	2	2	3	1	1.79
6	2	3	1	2	0.34
7	3	1	3	2	1.85
8	3	2	1	3	1.71
9	3	3	2	1	0.41
K ₁	4.95	4.36	2.88	3.03	
K ₂	3.81	4.90	3.49	2.59	
K ₃	3.97	3.47	6.36	6.11	
R	0.38	0.48	1.16	1.73	

2.1.2 数据分析及最优工艺

比较本试验中A、B、C、D四个因素中R值得大小, 可以看出D因素, 即提取温度为最重要因素, 其次为C因素即溶剂, 四个因素的主次关系为D > C > B > A。正交实验L₉(3⁴)根据分析结果选择各因素中均数最高的水平, 分别是A₁、B₂、C₃、D₃。因此最佳的因素组合是: 频率为27.0kHz、提取时间为30min、溶剂为75%乙醇、提取温度为70℃。

2.2 酸枣仁皂苷对小鼠睡眠的影响

2.2.1 酸枣仁皂苷对阈下催眠剂量巴比妥钠小鼠入睡率的影响

表3 酸枣仁皂苷对各组小鼠药后睡眠率的影响(n=12)

Table 3 Proportion of sleeping mouse

组别	睡(只)	未睡(只)	有效率(%)
空白	1	11	8.33
低剂量组	1	11	8.33
中剂量组	4	8	33.33
高剂量组	3	9	25.00

如表3结果显示, 酸枣仁皂苷对注射了阈下剂量巴比妥钠的小鼠入睡率的影响, 以中剂量组效果最好, 其次为高剂量组, 而低剂量组与空白组无差异。

2.2.2 酸枣仁皂苷对巴比妥钠睡眠潜伏期的影响

表4 酸枣仁皂苷对各组小鼠给药后潜伏期及睡眠时间的影响

Table 4 Delitescence and sleeping time

组别	潜伏期(min)	睡眠时间(min)
空白	30.00±2.98	209.27±32.51
低剂量组	26.45±10.61	235.45±49.97*
中剂量组	24.17±4.18**	263.42±86.45**
高剂量组	22.70±6.54**	288.70±93.47**

注: 与空白组比较, *p < 0.05, **p < 0.01。

如表4结果显示, 低剂量的酸枣仁皂苷对小鼠睡眠潜伏期的改善作用与空白组无差异, 中剂量组和高剂量组与空白组比较均有极显著差异, 可以看出, 随着剂量的增大, 小鼠睡眠潜伏期缩短。

2.2.3 酸枣仁皂苷对延长巴比妥钠诱导小鼠睡眠时间的影响

如表4结果显示, 酸枣仁皂苷对于巴比妥钠诱导的睡眠小鼠睡眠时间的延长, 以高剂量组最为明显, 其次为中剂量组, 与空白组比较均有极显著差异, 低剂量组与空白组比较有显著性差异。

3 结论

3.1 通过L₉(3⁴)正交试验结果表明, 影响酸枣仁皂苷提取最主要的因素是温度, 其次是提取溶剂的种类, 用超声波提取方法提取酸枣仁皂苷时的最佳工艺为: 超声波频率27.0kHz, 提取时间30min, 提取溶剂75%乙醇, 提取温度70℃。对超声波提取方法与索氏提取法以及传统回流方法进行比较, 可以看出超声波提取方法是酸枣仁皂苷提取比较理的方法。

3.2 研究结果表明酸枣仁皂苷对于小鼠睡眠有较好的调节作用, 对阈下巴比妥钠小鼠的入睡率的影响, 中高剂量组的酸枣仁皂苷对小鼠的入睡率有增加, 低剂量组与空白组无差异; 对小鼠睡眠潜伏期的影响, 低剂量组与空白组比较无差异, 中、高剂量组与空白对照组小鼠睡眠潜伏期存在极显著差异, 可以显著缩短小鼠睡眠潜伏期, 并呈现一定的量效关系; 对巴比妥钠诱导小鼠睡眠时间的的影响, 各剂量组对巴比妥钠诱导小鼠睡眠时

间均有延长作用,低剂量组与空白对照组在小鼠的睡眠时间上存在显著性差异,中、高剂量组与空白对照组比较存在极显著差异,并且呈现一定的量效关系。

参考文献:

- [1] 任风芝,栾新慧,赵毅民.酸枣仁药理作用及其化学成分的研究进展[J].基层中药杂志,2001,15(1):46-47.
- [2] 史琪荣,周耘,周萍,等.中药酸枣仁的研究概况[J].天然药物化学,2004,22(2):94-98.
- [3] 张永军,唐玉海,刘宏浪,等.酸枣仁总苷的提取工艺研究[J].西北药学杂志,2001,16(1):18.
- [4] 许汉英,梁春,商明磊.人參中总皂苷的超声波快速提取方法研究[J].理化检验—化学分册,2002,12:625-627.
- [5] 黄保民.中药提取分离工艺中高新技术应用的进展[J].中医研究,1998,11(5):56-58.
- [6] 曾里,夏之宁.超声波和微波对中药提取的促进和影响[J].化学研究与应用,2002,14(3):245-249.
- [7] 杜志敏,陈兴兴.不同来源酸枣仁有效成分的对照分析[J].广东药学院学报,1999,15(2):127-128.
- [8] 郭维图.中药提取新老工艺技术浅谈[J].医药工程设计杂志,2005,26(1):41-47.
- [9] 朱玲.正交试验优选酸枣仁中酸枣皂苷A提取工艺[J].郑州大学学报(医学版),2003,38(1):111-112.
- [10] 王菊荣,袁锦华.正交设计法研究酸枣仁口服液的提取工艺[J].药实践杂志,1996,14(2):95-95.
- [11] 王健,林晓.酸枣仁中酸枣仁皂苷A和B的含量测定[J].中草药,1996,27(3):154-155.
- [12] 王健,林晓生.炒酸枣仁中酸枣仁皂苷A和B的含量比较[J].中成药,1994,16(10):24-59.
- [13] 李会军.正交试验法优化酸枣仁汤制备工艺[J].时珍国医国药,2001,12(7):600-601.
- [14] 郭胜民.酸枣仁总皂苷中枢抑制作用研究[J].西北药学杂志,1996,8(11):166-168.
- [15] 李玉娟,刘雯.酸枣仁汤的镇静催眠作用[J].沈阳药科大学学报,2002,19(2):115-117.
- [16] 黄胜英.酸枣仁皂苷的镇静作用研究,大连大学学报[J].2002,23(4):90-92.
- [17] 陈韩英,李炳奇.黄芪皂苷提取工艺的研究[J].石河子大学学报,2004,22(2):170-172.
- [18] 龚盛昭,曾海宇.微波场协同提取远志皂苷的研究[J].广州食品工业科技,2004,20(1):36-38.
- [19] 彭智聪.酸枣仁化学成分及药理作用研究进展[J].时珍国医国药,2001,12(1):86-87.
- [20] Feng Zhou-yan, Zheng Xiao-xiang. Effect of Jujubo-side A on the evoked field potentials of granule cells in dentate gyrus[J]. Journal of Zhejiang University (Science), inpress.
- [21] 黎海彬,李琳,郭杞远,等.药用植物有效成分提取技术[J].现代化工,2002,22(5):59-62.
- [22] 梁立娟,彭靖茹,甘志勇.微波提取测定罗汉果中皂苷[J].广州热带农业,2003,(2):6-8.
- [23] 高山林,汪红.罗汉果皂苷的含量测定[J].天然产物研究与开发,2001,13(2):36-39.
- [24] Jinyu Hao, Wei Han, Shunde Huang. Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L.[J]. Separation and Purification Technology[J]. 2002, 28: 191-196.
- [25] K Ganzler, A Salgo, K Valko. Microwave extraction—a novel sample preparation method for chromatography[J]. Journal of Chromatography, 1986, 371: 299-306.
- [26] LOU Shong-nian, FENG Bao-ling, XIA Li-ying. Comparison of the sedative and hypnotic effects between raw and fried seeds of *Ziziphus spinosa*[J]. Chinese Medicine Research, 1987, (2): 18-20. (in Chinese)