

荷叶提取物的镇静催眠作用

闫明珠^{1,2}, 钟雨^{1,2}, 刘新民², 张泽生¹, 叶林虎², 曹方瑞², 肖冰心², 冯利², 常琪^{2,*}

(1.天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457;

2.中国医学科学院&北京协和医学院, 药用植物研究所, 北京 100193)

摘要:目的: 研究荷叶提取物(乙醇提取物、生物碱、总黄酮和小分子水溶物)对小鼠的镇静催眠作用, 筛选其活性组分。方法: 利用空场实验、戊巴比妥钠阈下催眠剂量实验和延长戊巴比妥钠睡眠时间实验, 给予小鼠灌胃荷叶50%乙醇提取物(150、450 mg/kg)和不同分离组分(30、90 mg/kg)后, 观察其对小鼠的镇静催眠作用。结果: 高剂量荷叶乙醇提取物和低、高剂量荷叶生物碱均能显著抑制小鼠的自主活动, 增加阈下剂量戊巴比妥钠引起的小鼠入睡率, 缩短戊巴比妥钠阈上剂量的小鼠入睡潜伏期, 延长睡眠时间。结论: 荷叶乙醇提取物具有显著的镇静催眠作用, 生物碱是其活性成分。

关键词: 荷叶; 镇静; 催眠; 生物碱

Sedative and Hypnotic Effects of the Extracts from *Nelumbo nucifera* Leaves

YAN Mingzhu^{1,2}, ZHONG Yu^{1,2}, LIU Xinmin², ZHANG Zesheng¹, YE Linhu², CAO Fangrui², XIAO Bingxin², FENG Li², CHANG Qi^{2,*}

(1. School of Food Engineering and Biological Technology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract: Objective: The present study aimed to determine the sedative and hypnotic effects of 50% ethanol extract and its different fractions prepared from *Nelumbo nucifera* leaves. Methods: Locomotion activity and pentobarbital-induced sleeping tests were used to evaluate the sedative and hypnotic activities of 50% ethanol extract (150 and 450 mg/kg) and different fractions (30 and 90 mg/kg) through gavage administration. Results: Ethanol extract (450 mg/kg) and alkaloid fraction (30 and 90 mg/kg) significantly inhibited the locomotion activity of mice, increased the percentage of sleeping and decreased the sleep latency and prolonged the sleeping time of mice. Conclusion: *Nelumbo nucifera* leaves possess sedative and hypnotic effects and its alkaloids are the bioactive components for these activities.

Key words: *Nelumbo nucifera* leaves; sedative; hypnotic; alkaloids

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2015)05-0168-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201505032

荷叶为睡莲科多年生水生草本植物莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)的叶片。在2002年3月中国卫生部卫法监发[2002]第51号文件中, 荷叶被列入“既是食品又是药品”的名单中^[1]。传统医学认为荷叶性苦性平, 具有清暑利湿、升发清阳、清心去热、止血利水的功效^[2]。现代研究表明荷叶具有降脂减肥、抑菌抗病毒、抗炎抗过敏、抗氧化、抗衰老等多种生理活性^[3]。荷叶中含有生物碱、黄酮、挥发油、鞣质等多种次生代谢产物, 其中生物碱和黄酮两类化合物是荷叶中最重要的生物活性和生理功能成分^[3]。

黄酮类化合物是荷叶活性物质中含量比较多的一类

成分, 主要以苷类形式存在, 苷元多为槲皮素、山奈酚和杨梅素^[4]。荷叶中生物碱类化合物种类繁多, 根据母核结构的不同可将其分为3类: 阿朴啡类(荷叶碱、*N*-去甲荷叶碱、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡等)^[5-6]、单苄基异喹啉类^[7]和去氢阿朴啡类^[8]。

本研究利用阳离子交换树脂柱和大孔吸附树脂柱将荷叶乙醇提取物中的生物碱、总黄酮和小分子水溶物3种组分分离^[9-13], 采用空场实验^[14]、戊巴比妥钠阈下催眠剂量实验和延长戊巴比妥钠睡眠时间实验^[15]比较醇提物和各组分的镇静催眠活性, 从而初步明确其活性组分, 为进一步探讨荷叶镇静催眠作用机制提供实验依据。

收稿日期: 2014-04-28

基金项目: 科技部对欧盟科技合作专项(1108); 科技部国际科技合作项目(2011DFA32730)

作者简介: 闫明珠(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为保健食品功能评价。E-mail: yanmingzhu906@126.com

*通信作者: 常琪(1962—), 女, 研究员, 博士, 研究方向为中药药物代谢动力学。E-mail: qchang@implad.ac.cn

1 材料与方法

1.1 动物

雄性健康ICR小鼠, SPF级, 体质量18~20 g, 由北京市维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证号SCXK(京)2012-0001。动物饲养在恒温(25±2)℃、恒湿(70%)、12 h明暗交替的SPF级动物房中, 自由摄取标准饲料和清洁饮用水。实验前, 动物分笼饲养, 至少适应实验环境48 h。所有动物均使用一次。

1.2 材料与试剂

荷叶: 2012年6月采自湖南, 经中国医学科学院药用植物研究所张本刚教授鉴定为睡莲科植物莲*Nelumbo nucifera* Gaertn.的叶。

地西洋(diazepam, DZP) 中国食品药品检定研究院; 戊巴比妥钠 美国Sigma公司; 氯化钠注射液四川科伦药业股份有限公司。

1.3 仪器与设备

RE-52型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; 动物空场实验计算机在线检测系统, 由中国医学科学院药用植物研究所和中国航天员中心联合研制。

1.4 方法

1.4.1 荷叶提取物的制备

干燥荷叶300 g剪碎成直径大约为3 cm的碎片, 加入9 L的50%乙醇室温浸泡提取3次, 每次24 h。浸泡期间不时搅拌。提取液过滤后合并, 于65℃减压浓缩至无醇味。将所得浓缩液加入5倍量的0.1% HCl, 搅拌溶解后过滤, 滤液经D001阳离子交换树脂柱(200 g)分离, 先用不少于1倍树脂量的纯水洗去非生物碱部分后, 再以含1%氨的95%乙醇溶液洗脱, 将碱性醇洗脱液浓缩蒸干, 得生物碱粉末^[16]。D001树脂柱的上样流出液和水洗液合并后上样至AB-8大孔吸附树脂柱(300 g), 水洗至中性后用70%乙醇洗脱, 将乙醇洗脱液浓缩蒸干, 得总黄酮粉末^[17]。AB-8大孔树脂柱的上样流出液和水洗液浓缩后蒸干, 得小分子水溶物部分。各提取物称质量, 计算得率。生物碱组分和总黄酮组分分别采用碘化铋钾和三氯化铁试剂进行显色定性鉴别^[18]。所有提取物均放置于干燥器中保存。

取适量荷叶乙醇提取物2份, 分别加入0.5%的羧甲基纤维素钠(carboxymethyl cellulose sodium, CMC-Na)溶液配成质量浓度分别为15、45 mg/mL的溶液; 荷叶总黄酮、荷叶生物碱和荷叶小分子水溶物均使用0.5%的CMC-Na溶液配制成质量浓度分别为3、9 mg/mL的溶液, 以用于不同剂量组的动物实验。

1.4.2 荷叶提取物对小鼠自主活动的影响

120只小鼠适应性喂养48 h后, 随机分为10组, 每组12只, 分别为空白对照组(0.5% CMC-Na溶液), 荷叶乙醇提取物低、高剂量组(150、450 mg/kg), 荷叶总黄酮组、荷叶生物碱组及荷叶小分子水溶物

的低、高剂量组(30、90 mg/kg)和DZP阳性对照组(5 mg/kg)。小鼠按0.01 mL/g灌胃给药一次, 于给药后30 min, 将小鼠放入圆形自主活动测试仪(直径30 cm, 高40 cm)中适应环境5 min, 然后开始记录其在10 min内的活动总路程、运动路程、运动时间、平均速率等指标。

1.4.3 荷叶提取物对戊巴比妥钠催眠作用的影响

1.4.3.1 戊巴比妥钠催眠阈剂量的选择^[19]

小鼠64只, 随机分为8组, 每组8只。分别腹腔注射不同剂量的戊巴比妥钠(20、25、30、35、40、45、50、55 mg/kg), 注射体积为0.01 mL/g(下同), 以给药后小鼠翻正反射消失达30 s以上为入睡判断标准(下同), 观察30 min内小鼠入睡只数。戊巴比妥钠的阈下催眠剂量是指90%以上小鼠不入睡的最大剂量, 而阈上催眠剂量则是指100%小鼠全部入睡的最小剂量。

1.4.3.2 对戊巴比妥钠所致的入睡率的影响

小鼠120只, 随机分为10组, 每组12只, 分别为空白对照组(0.5% CMC-Na)、DZP阳性对照组(2 mg/kg)、荷叶乙醇提取物低、高剂量组(150、450 mg/kg)和荷叶总黄酮、荷叶生物碱及荷叶小分子水溶物的低、高剂量组(30、90 mg/kg)。小鼠按0.2 mL/20 g灌胃给药一次, 于给药后30 min腹腔注射戊巴比妥钠催眠阈下剂量25 mg/kg。记录注射后30 min内小鼠入睡只数。

1.4.3.3 对戊巴比妥钠所致的入睡潜伏期和睡眠时间的的影响

小鼠120只, 按1.4.2节方法分组和给药, 各组动物给药后30 min, 腹腔注射戊巴比妥钠睡眠阈上剂量50 mg/kg, 记录注射戊巴比妥钠后小鼠入睡和觉醒(翻正反射恢复)的时间。从注射戊巴比妥钠到翻正反射消失的时间为入睡潜伏期, 从入睡到觉醒的时间为睡眠时间。

1.5 数据分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用统计学软件SPSS 19.0进行统计学分析, 给药组与对照组的差异显著性采用单因素方差分析(One-Way ANOVA) Dunnett's方法进行多重比较分析; 戊巴比妥钠阈下剂量实验采用Fisher精确检验分析。

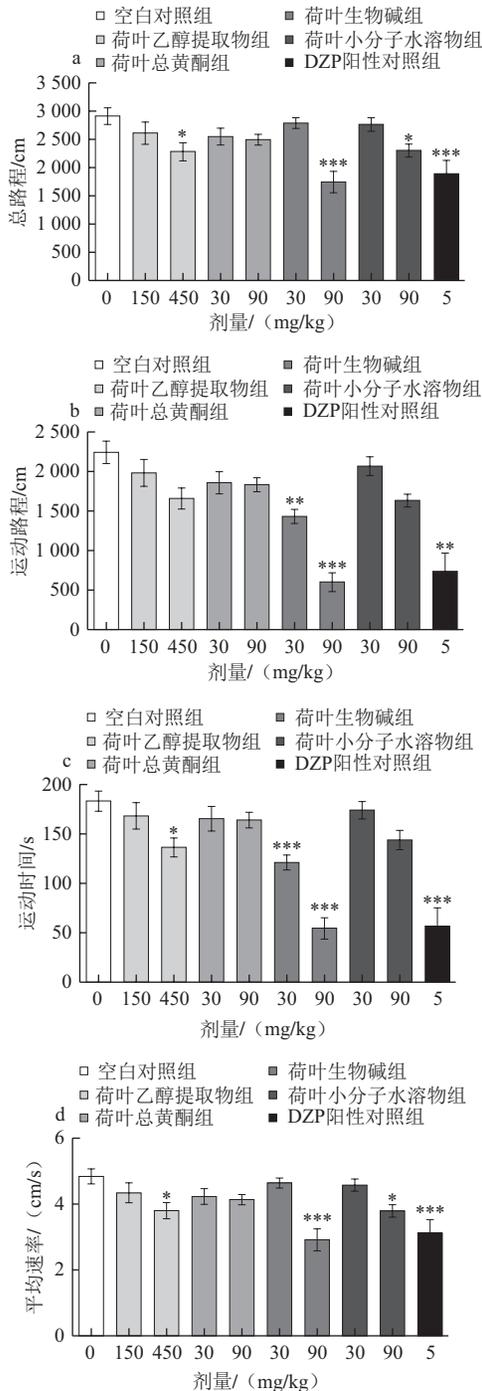
2 结果与分析

2.1 荷叶提取物的制备

本实验成功利用D001型阳离子交换树脂将荷叶中的生物碱富集, 而与黄酮类化合物分离, 然后用AB-8性大孔树脂将黄酮类化合物富集, 与小分子水溶性成分如氨基酸、维生素、盐类等分离开来。所得生物碱部分与碘化铋钾试剂反应呈阳性, 与三氯化铁试剂反应呈阴性; 而黄酮部分则相反, 与碘化铋钾试剂呈阴性反应, 与三氯化铁试剂呈阳性反应, 小分子水溶性物部分既无生物碱反应, 也无黄酮反应。说明荷叶中的生物碱和黄酮通

过两种树脂柱可以得到很好的富集和分离，并均与小分子水溶性成分分离。3次实验结果的平均值显示，荷叶乙醇提取物、总黄酮、生物碱和小分子水溶物的得率分别为24.86%、3.05%、1.34%和21.42%（以干荷叶计）。

2.2 荷叶提取物对小鼠自主活动的影响



*. 与空白对照组相比, $P < 0.05$; **. 与空白对照组相比, $P < 0.01$; ***. 与空白对照组相比, $P < 0.001$ 。

图1 荷叶提取物对小鼠自主活动的影响 ($n=12$)

Fig.1 Effect of *Nelumbo nucifera* leaf extracts on locomotion activity in mice ($n = 12$)

如图1所示，荷叶乙醇提取物、荷叶总黄酮、荷叶生物碱和小分子水溶物均不同程度地降低小鼠的自主活动，且随着剂量的增加，活动减少的程度增大。但是，只有荷叶乙醇提取物组（450 mg/kg）和荷叶生物碱组（90 mg/kg）能显著降低小鼠的总路程、运动时间和平均速率（ $P < 0.05$ 或 $P < 0.001$ ）。与空白对照组相比，荷叶乙醇提取物组（450 mg/kg）小鼠的总路程、运动路程、运动时间和平均速率降低了21.15%、26.10%、25.49%和21.49%；荷叶生物碱组（90 mg/kg）分别降低了39.50%、73.41%、69.91%和39.46%。

2.3 荷叶提取物对戊巴比妥钠催眠作用的影响

2.3.1 戊巴比妥钠催眠剂量的选择

腹腔注射戊巴比妥钠剂量为20、25 mg/kg时，在30 min内没有小鼠入睡；当注射剂量增加为30、35、40、45、50、55 mg/kg时，小鼠的入睡率分别为25%、38%、75%、88%、100%、100%。因此，ICR小鼠的戊巴比妥钠的阈下睡眠剂量定为25 mg/kg，而ICR小鼠的戊巴比妥钠阈上催眠剂量选择50 mg/kg。

2.3.2 荷叶提取物对戊巴比妥钠所致入睡率的影响

表1 荷叶提取物对戊巴比妥钠所致小鼠入睡率的影响 ($n=12$)
Table 1 Effect of *Nelumbo nucifera* leaf extracts on the sleeping rate of mice induced by sodium pentobarbital ($n = 12$)

组别	剂量/ (mg/kg)	入睡只数	入睡率/%
空白对照组	0	0	0
荷叶乙醇提取物组	150	1	8
	450	7	58**
荷叶总黄酮组	30	3	25
	90	4	33
荷叶生物碱组	30	9	75***
	90	12	100***
荷叶小分子水溶物组	30	0	0
	90	2	17
DZP阳性对照组	2	12	100***

注: **. 与空白对照组相比, $P < 0.01$; ***. 与空白对照组相比, $P < 0.001$ 。下同。

荷叶各提取物组对戊巴比妥钠阈下剂量（25 mg/kg）下小鼠入睡率的影响如表1所示，DZP阳性对照组显示出很强的催眠作用，给药剂量为2 mg/kg即可使戊巴比妥钠诱导的小鼠入睡率达100%。荷叶提取物各组 and 空白对照组相比，小鼠的入睡率均有不同程度增加，且有一定的量效关系。但是只有荷叶乙醇提取物组（450 mg/kg）和荷叶生物碱组（30、90 mg/kg）能显著增加小鼠的入睡率（ $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$ ）。与空白对照组的0%相比，荷叶乙醇提取物组（450 mg/kg）和荷叶生物碱组（30、90 mg/kg）的小鼠入睡率分别增加至58%、75%和100%。尤其是荷叶生物碱组（90 mg/kg）的小鼠入睡率能达到100%，和DZP阳性对照组相同。

2.3.3 荷叶提取物对戊巴比妥钠所致的入睡潜伏期和睡眠时间的影

表 2 荷叶提取物对戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠潜伏期及睡眠时间的影

Table 2 Effects of *Nelumbo nucifera* leaf extracts on sleep latency and sleep duration of mice induced by sodium pentobarbital (n = 12)

组别	剂量/(mg/kg)	入睡潜伏期/min	睡眠时间/min
空白对照组	0	4.28±0.33	41.44±4.11
荷叶乙醇提取物组	150	3.67±0.20	57.54±6.26
	450	3.05±0.16	65.35±3.97*
荷叶总黄酮组	30	3.74±0.22	52.95±3.61
	90	4.56±0.77	53.89±7.84
荷叶生物碱组	30	3.05±0.25	65.03±3.19*
	90	2.70±0.10*	160.80±9.42***
荷叶小分子水溶物组	30	4.62±0.20	55.24±6.07
	90	4.93±0.32	58.90±3.34
DZP阳性对照组	2	2.60±0.12*	142.90±8.82***

注：*、与空白对照组相比，P < 0.05。

如表2所示，与空白对照组相比，荷叶生物碱组（90 mg/kg）和DZP阳性对照组小鼠的入睡潜伏期均显著缩短，分别缩短了36.85%、39.26%（P < 0.05）。同时荷叶提取物各组均能不同程度地延长小鼠的睡眠时间，但是只有荷叶乙醇提取物组（450 mg/kg）、荷叶生物碱组（30、90 mg/kg）和DZP阳性对照组能显著延长小鼠睡眠时间（P < 0.05或P < 0.001）。

3 讨论

空场实验、戊巴比妥钠阈下催眠剂量实验和延长戊巴比妥钠睡眠时间实验均显示荷叶各提取物能不同程度地抑制小鼠的自主活动，提高小鼠入睡率，缩短入睡潜伏期，延长睡眠时间，具有镇静催眠的活性。荷叶化学成分的研究表明荷叶黄酮中主要含有槲皮素糖苷类化合物^[16]，荷叶生物碱中主要含有2-羟基-1-甲氧基阿朴啡、N-去甲荷叶碱和荷叶碱等阿朴啡类生物碱^[17]。有研究显示槲皮素具有镇静、镇痛和抗焦虑的神经活性^[20-21]，荷叶中的荷叶碱能诱导僵直症，抑制自发性运动、条件躲避反应等，具有中枢神经抑制活性^[22-24]。由此可见，荷叶中的黄酮和生物碱为其镇静催眠活性提供了物质基础。水溶物中主要含有小分子的氨基酸和糖类，在减压浓缩的过程中，不断升高的pH值和较高的温度为美拉德反应提供了合适的条件，生成还原酮等活性物质^[25]，推测这些活性物质使得浓缩的小分子水溶物也具有微弱的镇静催眠神经活性。但是，与空白对照组相比，只有荷叶乙醇提取物和荷叶生物碱部分具有显著的镇静催眠作用。

综上所述，荷叶乙醇提取物具有镇静催眠的活性，生物碱类成分是其活性成分。本实验为荷叶在镇静催眠方面的应用奠定了理论基础，但是其作用机制还有待进一步研究。

参考文献：

- [1] 范继善, 韩锡光. 食用食品添加剂[M]. 天津: 科学技术出版社, 2003: 10.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 522.
- [3] 孔文琦, 李严巍. 荷叶活性成分及药理活性研究进展[J]. 中药信息与研究, 2005, 7(6): 22-24.
- [4] 郭晓鸥, 熊英. 荷叶质量标准研究[J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(4): 27-29.
- [5] 富田真雄, 渡边真男, 富田真次, 等. 莲的生物碱(第1报)[J]. 药学杂志(日), 1961, 81(4): 469-473.
- [6] YANG Tsanghsiung, CHEN Chiming, LU Changsha, et al. Studies on the alkaloids of lotus receptacle[J]. Journal of the Chinese Chemical Society(Taipei), 1972, 19(3): 143-147.
- [7] KUNITOMO J, YOSHIKAWA Y, TANAKA S, et al. Alkaloids of *Nelumbo nucifera*[J]. Phytochemistry, 1973, 12(3): 699-701.
- [8] 国友顺一. 莲的研究VI: 古莲的生物碱[J]. 药学杂志(日), 1964, 84(11): 1141-1142.
- [9] 肖娟, 孙智达, 谢笔钧, 等. 荷叶生物碱提取工艺响应曲面优化研究[J]. 食品科学, 2009, 30(22): 157-161.
- [10] 李宇亮, 吴雅睿. 荷叶总生物碱的提取与纯化研究[J]. 应用化工, 2007, 36(1): 4-6.
- [11] 赵骏, 李小年. 利用大孔吸附树脂纯化荷叶生物碱[J]. 中药材, 2003, 26(9): 669-670.
- [12] 封聚强, 时书杰, 赵骏. 大孔吸附树脂分离纯化荷叶中的荷叶碱[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(4): 877-879.
- [13] ELEGAMI A A, BATES C, GRAY A I, et al. Two very unusual macrocyclic flavonoids from the water lily *Nymphaea lotus*[J]. Phytochemistry, 2003, 63(6): 727-731.
- [14] WU Xiangyang, ZHAO Jiangli, ZHANG Min, et al. Sedative, hypnotic and an ticonvulsant activities of the ethanol fraction from *Rhizoma Pinelliae* Praeparatum[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 135(2): 325-329.
- [15] NASIARA K, JOHN C, NAVNATH G, et al. 2'-Methoxy-6-methylflavone: a novel anxiolytic and sedative with subtype selective activating and modulating actions at GABA_A receptors[J]. British Journal of Pharmacology, 2011, 165(4): 880-896.
- [16] YE Linhu, HE Xiaoxi, KONG Lingti, et al. Identification and characterization of potent CYP2D6 inhibitors in lotus leaves[J]. Journal Ethnopharmacology, 2014, 153(1): 190-196.
- [17] YE Linhu, HE Xiaoxi, YAN Mingzhu, et al. Identification of *in vivo* components in rats after oral administration of lotus leaf flavonoids using ultra fast liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. Analytical Methods, 2014, 6: 6088-6094.
- [18] 吴立军, 吴继洲. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 181.
- [19] 张蕾. 酸枣果肉化学成分及镇静催眠活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2010.
- [20] 龚珊, 张玉英, 俞光第, 等. 槲皮素镇痛作用的观察[J]. 中草药, 1996, 27(10): 612-613.
- [21] AGUIRRE-HERNÁNDEZ E, GONZÁLEZ-TRUJANO M E, MARTÍNEZ A L, et al. HPLC/MS analysis and anxiolytic-like effect of quercetin and kaempferol flavonoids from *Tilia americana* var. *mexicana*[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 127(1): 91-97.
- [22] BHATTACHARYA S K, BOSE R, GOSH P, et al. Psychopharmacological studies on (-)-nuciferine and its Hofmann degradation product atherosperminine[J]. Psychopharmacology, 1978, 59(1): 29-33.
- [23] MELENNAN H, WHEAL H V. The specificity of action of three possible antagonists of amino acid-induced neuronal excitations[J]. Neuropharmacology, 1976, 15(11): 709-712.
- [24] DOMINIK F, URSULA F. Dimethoxyaporphine as an antagonist of chemical excitation in the pigeon optic tectum[J]. Neuroscience Letters, 1977, 4(6): 347-350.
- [25] 曹治云, 陈旭征, 杜建. 美拉德产物的生物学效应研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(7): 1491-1495.