

百合助眠活性组分的筛选和分析

胡超群, 徐德平*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 对百合助眠的活性组分进行筛选并对有效成分进行分析。用直接睡眠实验和延长戊巴比妥钠睡眠时间实验对百合助眠作用的有效成分进行研究; 用大孔树脂、MCI 等方法分离具有助眠作用的有效成分; 用核磁共振对有效成分进行结构鉴定。百合的正丁醇提取物能显著增加小鼠睡眠率、睡眠时间, 促进小鼠更快进入睡眠。经分离, 得到的主要物质结构为(25R)-3 β , 17 α -二羟基-5 α -螺甾烷-6-酮-3-O- α -L-鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄糖苷和(25R)-3 β -羟基-5 α -螺甾烷-6-酮-3-O- α -L-鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄糖苷。百合的正丁醇提取物具有显著助眠作用, 其中具有助眠作用的主要物质为甾体皂苷。

关键词: 百合; 助眠; 有效成分

中图分类号: R 284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)10-1096-05

Screening and Analyzing of the Hypnotic Active Ingredients of *Lilium lancifolium* Thunb

HU Chaoqun, XU Deping*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To screen and analyze the hypnotic active ingredients of *Lilium lancifolium* Thunb. Methods: Direct sleep experiment and prolonged pentobarbital sleeping time experiment are used to study the hypnotic active ingredients of *Lilium lancifolium* Thunb. The hypnotic active ingredients are separated by separation column like macroporous resin column and MCI column. Magnetic resonance imaging(MRI) is used to identify the structure of active ingredients. The n-butanol extract of *Lilium lancifolium* Thunb can increase the rate and time of sleep, accelerate the sleep of mice. By separating, the main structure of the active ingredients are (25R)-3 β , 17 α -dihydroxy-5 α -spirostan-6-one-3-O- α -L-Rhamnopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside and (25R)-3 β -hydroxy-5 α -spirostan-6-one-3-O- α -L-Rhamnopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside. The n-butanol extract of *Lilium lancifolium* Thunb has significant hypnotic effect and the structure of its main ingredients are saponins.

Keywords: *Lilium lancifolium* Thunb, hypnotize, active ingredients

收稿日期: 2015-09-30

* 通信作者: 徐德平(1965—), 男, 安徽宣城人, 工学博士, 副教授, 主要从事天然产物化学研究。E-mail: xdp1219@sina.com

引用本文: 胡超群, 徐德平. 百合助眠活性组分的筛选和分析[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(10): 1096-1100.

百合作为常用中草药,最早收录于《神农本草经》。在我国,百合的食用和药用历史非常悠久,早在唐朝就开始了百合的食用、药用和种植。近年来,国内有不少关于百合助眠作用的报道,特别是李卫民等^[1]、胡焕萍等^[2]通过百合对戊巴比妥钠小鼠睡眠时间影响的实验,证明了百合具有较好的镇静、催眠作用,但这些报道普遍缺乏对百合有效成分具体结构的研究。因此,作者拟对百合不同提取物的助眠作用进行研究,进一步明确百合助眠作用的有效成分,并对其进行结构鉴定,研究百合助眠作用的构效关系,为百合进一步开发提供实验依据。

1 实验材料

1.1 供试品

百合:宜兴市售产品。

1.2 实验试剂

戊巴比妥钠:上海将来实业股份有限公司产品。

1.3 实验仪器

核磁共振仪 (Brucker Avance 500): 德国 Brucker 公司产品。

1.4 实验动物

清洁级昆明小鼠:18~22 g^[3],上海斯莱克实验动物有限公司,动物许可证号:SCXK(沪)2012-0002。

2 实验方法

2.1 制备提取物

2.1.1 百合提取物的制备 将 8 kg 新鲜百合捣碎,放入提取罐,按料液质量体积比 1 g:5 mL 加入体积分数 70% 的乙醇,于 45 ℃ 下提取 5~6 h,过滤取清液,残渣按上述方法重复提取两次。合并 3 次提取的清液浓缩至无乙醇,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取并浓缩,得到百合的石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和萃取剩余相。用水提取剩余残渣,50 ℃ 提取 5~6 h,过滤取清液浓缩,得到百合的水提物,将上述不同提取物冷冻保存备用。

2.1.2 酸枣仁提取物的制备 按照文献[4]中所述方法制备酸枣仁提取物。

2.2 百合活性成分的粗分离

将实验确定的百合具有助眠作用的活性成分提取物用 AB-8 型大孔树脂柱进行分离,用体积分数为 50%、70% 和 95% 的乙醇洗脱,分别得到 50% 乙醇洗脱物(1)、70% 乙醇洗脱物(2)和 95% 乙醇洗

脱物(3)3 个部分,浓缩并冷冻保存备用。

2.3 百合活性成分的进一步分离

大孔树脂粗分离后经实验确定具有活性成分的主要部分用 MCI 柱(D 5 cm $\times$ 100 cm)、ODS 柱(D 4 cm $\times$ 100 cm)分离其中的单体物质。

2.4 百合助眠作用实验

2.4.1 直接睡眠实验 取小鼠 200 只,体质量 18~22 g,随机分成 10 组,每组 20 只,♀ ♂ 各半,分别灌胃给药。灌胃剂量分别为:百合石油醚萃取物(A 组)1 g/kg;百合乙酸乙酯萃取物(B 组)1 g/kg;百合正丁醇萃取物(C 组)1 g/kg;百合萃取剩余相(D 组)1 g/kg;百合水提物(E 组)1 g/kg;百合大孔树脂体积分数 50% 乙醇洗脱物(C1 组)1 g/kg;百合大孔树脂体积分数 70% 乙醇洗脱物(C2 组)1 g/kg;百合大孔树脂体积分数 95% 乙醇洗脱物(C3 组)1 g/kg;阳性对照组给酸枣仁提取物 1 g/kg;空白对照组给等量生理盐水。每天 1 次,连续给药 1 周。1 周后用监控摄像观察并记录;灌胃 30 min 后各组小鼠的睡眠率^[4];灌胃结束后 12 h 内各组小鼠的睡眠时间。

2.4.2 延长戊巴比妥钠睡眠时间实验 取小鼠 200 只,体质量 18~22 g,随机分成 10 组,每组 20 只,♀ ♂ 各半,分别灌胃给药,灌胃剂量、频率和时间同直接睡眠实验。最后一次灌胃结束 30 min 后,腹腔注射戊巴比妥钠 70 mg/kg,准确观察并记录给药时间和小鼠翻正反射消失时间^[2,9]。

2.4.3 数据处理及统计分析 数据用 SPSS23.0 软件进行方差分析,测定其显著差异性。

3 实验结果

3.1 百合不同提取物助眠作用

百合不同提取物对小鼠睡眠率影响见表 1,对小鼠睡眠时间和延长戊巴比妥钠睡眠时间影响见表 2。

由表 1 可得出:在百合不同提取物中,C 组的小鼠睡眠率最高,达到了 80%,最接近阳性对照组 90% 的睡眠率。表 2 结果表明:直接睡眠实验中,与空白对照组比较,B、C、D 和阳性对照组均具有极显著性差异;与阳性对照组比较,C 组无显著性差异;延长戊巴比妥钠小鼠睡眠实验中,与空白对照组比较,B、C、D 和阳性对照组均具有极显著性差异;与阳性对照组比较,只有 C 组无显著性差异。

综合表 1 表 2 的结果可以得出:B、C 和 D 组均

表 1 百合不同提取物对小鼠睡眠率的影响

Table 1 Effect of different Lily extracts on the sleep rate of mice

组别	小鼠数量/只	给药剂量/(g/kg)	给药途径	30 min 后睡眠小鼠数量/只	睡眠率/%
A	20	1	ig	11	55
B	20	1	ig	13	65
C	20	1	ig	16	80
D	20	1	ig	12	60
E	20	1	ig	9	45
空白对照	20	等量生理盐水	ig	10	50
阳性对照	20	1	ig	18	90

表 2 百合不同提取物对小鼠睡眠时间及延长戊巴比妥钠睡眠时间的的影响

Table 2 Effect of different Lily extracts on sleep time and prolonged pentobarbital sleep time of mice

组别	小鼠数量/只	给药剂量/(g/kg)	给药途径	睡眠时间/min	入睡时间/min
A	20	1	ig	166.90±16.637 [△]	6.437±1.533 [△]
B	20	1	ig	196.70±16.190 ^{*△}	5.015±0.937 ^{*△}
C	20	1	ig	256.15±19.140 [*]	3.524±0.6351 [*]
D	20	1	ig	192.45±19.516 ^{*△}	4.607±0.8682 ^{*△}
E	20	1	ig	162.20±16.214 [△]	6.473±1.2068 [△]
空白对照	20	等量生理盐水	ig	170.70±13.271 [△]	6.973±1.5659 [△]
阳性对照	20	1	ig	271.00±32.260 [*]	3.692±0.9975 [*]

注: $P < 0.01$, * 表示与空白对照组比较, Δ 表示与阳性对照组比较。

具有一定助眠作用, 但 C 组助眠效果远好于 B、D 组, 分析认为 B、D 组与 C 组的成分有交叉, 因此百合具有助眠作用的有效成分主要在 C 组, 即正丁醇提取物中。

3.2 大孔树脂不同分离部分的助眠作用

大孔树脂的不同分离部分对小鼠睡眠率的影响见表 3, 对小鼠睡眠时间和延长戊巴比妥钠睡眠时间的的影响见表 4。

表 3 大孔树脂不同分离部分对小鼠睡眠率的影响

Table 3 Effect of different macroporous resin separation section on the sleep rate of mice

组别	小鼠数量/只	给药剂量/(g/kg)	给药途径	30 min 后睡眠小鼠数量/只	睡眠率/%
C1	20	1	ig	15	75
C2	20	1	ig	19	95
C3	20	1	ig	10	50
空白对照	20	等量生理盐水	ig	11	55
阳性对照	20	1	ig	18	90

表 4 大孔树脂不同分离部分对小鼠睡眠时间及延长戊巴比妥钠睡眠时间的的影响

Table 4 Effect of different macroporous resin separation section on sleep time and prolonged pentobarbital sleep time of mice

组别	小鼠数量/只	给药剂量/(g/kg)	给药途径	睡眠时间/min	入睡时间/min
C1	20	1	ig	189.35±22.295 ^{*△}	4.865±1.0628 ^{*△}
C2	20	1	ig	273.30±40.042 [*]	4.178±1.0989 [*]
C3	20	1	ig	179.15±13.628 [△]	4.857±0.6754 ^{*△}
空白对照	20	等量生理盐水	ig	170.70±13.271 [△]	6.973±1.5659 ^{*△}
阳性对照	20	1	ig	271.00±32.260 [*]	3.692±0.9975 ^{*△}

注: $P < 0.05$, * 表示与空白对照组比较, Δ 表示与阳性对照组比较。

由表 3 可得出: 百合的不同分离部分中, C2 组的小鼠睡眠率最高, 为 95%。表 4 结果表明: 直接睡眠时间实验中, 与空白对照组比较, C1、C2 和阳性对照组有显著差异; 与阳性对照组比较, C2 组无显

著差异。延长戊巴比妥钠小鼠睡眠时间实验中, 与空白对照组比较, C1、C2、C3 和阳性对照组均有显著性差异; 与阳性对照组比较, 只有 C2 组无显著性差异。

综合表 3 表 4 结果可知:C2 组助眠效果最好。因此百合具有助眠作用的主要活性成分在 C2 组即正丁醇提取物经大孔树脂用 70%乙醇洗脱分离部分。

3.3 C2 组功效成分的分析

从 C2 组分中分离得到 A、B、C 3 个单体成分。

3.3.1 A 物质分析 化合物 A 为白色无定形粉末,易溶于甲醇、乙醇等溶剂,体积分数 10%浓硫酸乙醇溶液显紫红色,Liebermann-Burchard 反应则显墨绿色,Molish 反应成阳性。表明该化合物为甾体皂苷类化合物,其 $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz)见表 5。

表 5 化合物 A、B 的 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据

Table 5 $^{13}\text{C-NMR}$ data of compound A and B

碳位	$\delta/\times 10^{-6}$		碳位	$\delta/\times 10^{-6}$	
	A	B		A	B
C-1	36.23	36.58	C-21	9.35	14.54
C-2	28.38	29.74	C-22	108.87	108.38
C-3	74.48	76.59	C-23	31.21	30.86
C-4	25.28	25.12	C-24	28.14	28.22
C-5	56.17	55.51	C-25	29.75	28.42
C-6	210.01	209.56	C-26	65.97	67.90
C-7	46.03	45.88	C-27	17.82	17.01
C-8	37.34	39.01	Glc-1	97.47	97.27
C-9	55.22	55.11	Glc-2	76.57	76.47
C-10	40.51	40.02	Glc-3	77.66	77.55
C-11	20.52	20.75	Glc-4	70.40	70.26
C-12	31.42	29.74	Glc-5	76.85	74.25
C-13	45.07	40.38	Glc-6	61.08	60.93
C-14	52.54	52.50	Rha-1	100.40	100.23
C-15	30.50	31.13	Rha-2	70.54	70.64
C-16	88.90	79.95	Rha-3	70.80	70.42
C-17	88.19	61.72	Rha-4	72.02	71.87
C-18	17.16	16.04	Rha-5	68.05	65.90
C-19	12.82	17.72	Rha-6	18.57	17.72
C-20	43.75	41.04			

结合其理化性质和 $^{13}\text{C-NMR}$ 解析,并参考文献^[5,11]中的报道,化合物 A 为:(25R)-3 β ,17 α -二羟基-5 α -螺甾烷-6-酮-3-O- α -L-鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄糖苷,其结构见图 1。

3.3.2 B 物质分析 化合物 B 为白色无定形粉末,易溶于甲醇、乙醇等溶剂,体积分数 10%浓硫酸乙醇溶液显紫红色,Liebermann-Burchard 反应则显墨绿色,Molish 反应成阳性,表明该化合物为甾体皂苷类化合物,其 $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz)见表 5。

结合其理化性质和 $^{13}\text{C-NMR}$ 解析,参照文献^[5,11]中的报道,化合物 B 为:(25R)-3 β -羟基-5 α -螺甾烷-6-酮-3-O- α -L-鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄糖苷,其结构见图 1。

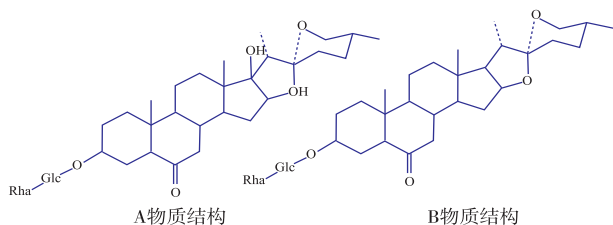


图 1 化合物 A、B 的结构

Fig. 1 Structure of compound A and B

3.3.3 C 物质分析 化合物 C 为油状液体,易溶于甲醇、乙醇等溶剂,不溶于水,通过分析其理化性质和核磁共振碳谱,化合物 C 为:亚麻酸甘油二酯。

4 结 语

百合既有食用价值又有药用价值,在清心安神、改善睡眠方面有其独到作用。我国作为百合属植物的原产大国,拥有极其丰富的种质资源,但对于百合的开发尚不完全,因此百合具有巨大的开发潜力。

研究表明,百合的正丁醇提取物具有较好的助眠作用,经过进一步分离得到 3 个化合物,其中两个为甾体皂苷,一个为甘油二酯,其中甘油二酯不具有活性。通过王旭峰等^[6]、陈百泉等^[7]、马进杰等^[8]的研究,表明酸枣仁中具有助眠作用的物质为四环三萜类皂苷,通过 Wang T 等^[10]的研究,表明百合中具有助眠作用的物质也为皂苷,因此可以确定:百合中具有助眠作用的物质为皂苷类化合物且这类皂苷为甾体皂苷。

参考文献:

- [1] LI Weimin, MENG Xianshu, YU Tengfei, et al. Pharmacological research of *Lilium lancifolium* Thunb [J]. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, 1990(6):31-35. (in Chinese)
- [2] HU Huanping, ZHANG Jian, GAN Yinhuang, et al. Pharmacological experiments of cough sedative and hypnotic effects of fresh *Lilium lancifolium* Thunb[J]. **Li Shizhen Medicine and Materia Research**, 2006(9):1704-1705. (in Chinese)
- [3] PENG Yunru, QIAN Dawei, DING Yongfang, et al. Study on pharmacological effects of extracts different position from *Lilium lancifolium*[J]. **Research and Practice of Chinese Medicines**, 2006(1):31-32. (in Chinese)
- [4] CUI Sijiao, JIA Ying, LUO Jie, et al. Screening of sedative-hypnotic active fraction of *Ziziphus jujube* [J]. **China Pharmacy**, 2013, 23:2128-2129. (in Chinese)
- [5] ZHOU Zhongliu, SHI Renbing, LIU Bin, et al. Chemical constituents of Juandan (*Lilium lancifolium* Thunb)[J]. **Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine**, 2010(1):57-61. (in Chinese)
- [6] WANG Xufeng, HE Jiguo, CHEN Ynag, et al. Method of ultrasonic extraction of total jujuboside from *Ziziphus jujube* mill in mice test[J]. **Food Science**, 2006(4):226-229. (in Chinese)
- [7] CHEN Baiquan, DU Gangjun, XU Qitai. Sedative and hypnotic effects of jujuboside [J]. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, 2002(6):429-430. (in Chinese)
- [8] MA Jinjie, LIU Ping, MA Baiping. The chemical constituents of semen zizyphi spinosae and pharmacologic mechanism of its sedative and hypnotic effects:research advances [J]. **International Journal of Clinical Pharmacology Research**, 2011(3):206-211. (in Chinese)
- [9] FANG X, HAO J F, ZHOU H Y, et al. Pharmacological studies on the sedative-hypnotic effect of Semen Zizyphi spinosae (Suanzaoren) and Radix et Rhizoma Salviae miltiorrhizae (Danshen) extracts and the synergistic effect of their combinations[J]. **Phytomedicine:International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, 2010, 17(1):75-80.
- [10] WANG T, HUANG H, ZHANG Y, et al. Role of effective composition on antioxidant, anti-inflammatory, sedative-hypnotic capacities of 6 common edible lilium varieties[J]. **Journal of Food Science**, 2015, 80(4):H857-68.
- [11] HONG X X, LUO J G, GUO C, et al. New steroidal saponins from the bulbs of *Lilium brownii* var. *viridulum* [J]. **Carbohydrate Research**, 2012, 361:19-26.

会 议 消 息

会议名称(中文):第二十次全国环境微生物学学术研讨会

所属学科:动植物微生物学,细胞生物学,环境科学

开始日期:2017-11-10

结束日期:2017-11-13

所在城市:浙江省 杭州市

具体地点:之江饭店

主办单位:中国微生物学会环境微生物学专业委员会

承办单位:浙江工业大学、国家海洋局第二海洋研究所、浙江大学

主题:环境微生物学创新与应用

联系人:李骏:18258120722;霍颖异:13819128939;孙凯凯:15967157911

E-MAIL:em20hangzhou@163.com

会议网站:<http://csm.im.ac.cn/templates/team/introduction.aspx?nodeid=9&page=ContentPage&contentid=4841>

会议背景介绍:由中国微生物学会环境微生物学专业委员会主办,浙江工业大学、国家海洋局第二海洋研究所、浙江大学承办的“第二十次全国环境微生物学学术研讨会”定于2017年11月10日-13日在杭州召开。热忱欢迎全国从事环境微生物学研究、教学和技术开发的专家、学者到风景秀丽开放创新的杭州相聚,本次会议将为与会代表提供一个学术交流、成果展示以及项目合作的良好平台。大会将邀请国内外环境微生物学领域著名专家、学者报告当今环境微生物学研究的最新科研成果与发展趋势。同时,大会也热忱欢迎从事环境微生物学研发相关企业参会并展示相关的技术和产品。