百合地黄汤多糖提取工艺优化及抗焦虑抑郁药效评价Δ

唐　林[1*]，赵洪庆[2]，杨　蕙[3]，刘　检[3]，何怡然[4]，李　莉[1]，张水寒[5#]（1.湖南中医药大学第一附属医院制剂中心，长沙　410007；2.湖南中医药大学科技创新中心，长沙　410208；3.湖南中医药大学第一附属医院医学创新实验中心，长沙　410007；4.湖南中医药大学第一附属医院药学部，长沙　410007；5.湖南省中医药研究院，长沙　410208）

中图分类号　R284.2；R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）08-0923-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.08.06

摘　要　目的　优化百合地黄汤多糖提取工艺并初步评价其抗焦虑抑郁药效。**方法**　在Plackett-Burman实验基础上，以多糖得率与多糖含量的综合评分为评价指标，提取时间、加水量、醇沉浓度为考察因素，结合Box-Behnken响应面法优化百合地黄汤多糖提取工艺并验证。将40只ICR小鼠分为对照组、文法拉辛组[阳性对照，13.5 mg/（kg·d）]和百合地黄汤多糖高、低剂量组[5.28、2.64 g/（kg·d），以生药量计]，每组10只（雌雄各半）。药物组小鼠灌胃相应药液，对照组小鼠灌胃水10 mL/kg，每天1次，连续7 d。采用高架十字迷宫实验、旷场实验、强迫游泳实验、悬尾实验评价最优工艺所制提取物对小鼠焦虑抑郁样行为的改善情况，并采用酶联免疫吸附测定法检测其对小鼠脑组织中神经递质水平的影响。**结果**　百合地黄汤多糖的最优提取工艺为加25倍量水，提取1.5 h，醇沉浓度70%。3次验证实验的多糖得率、多糖含量平均值分别为33.10%、0.62 mg/mg，与预测值（36.14%、0.65 mg/mg）的相对偏差分别为8.40%、4.62%（RSD＜2%，n＝3）。所得百合地黄汤多糖提取物能显著增加小鼠进入开放臂的次数比例及开放臂停留时间比例、自主活动总距离及中心区域活动距离，并显著缩短其强迫游泳实验、悬尾实验不动时间（P＜0.05或P＜0.01）；可显著升高小鼠脑组织中5-羟色胺、去甲肾上腺素（百合地黄汤多糖低剂量组除外）、γ氨基丁酸水平，并显著降低谷氨酸（百合地黄汤多糖低剂量组除外）水平（P＜0.05或P＜0.01）。**结论**　优化的百合地黄汤多糖提取工艺稳定、可行；所得多糖提取物具有明显的体内抗焦虑抑郁作用。

关键词　百合地黄汤；多糖；提取工艺；Plackett-Burman设计；Box-Behnken响应面法；抗抑郁；抗焦虑；小鼠

Optimization of extraction process of polysaccharide from Baihe dihuang decoction and study on its anti-anxiety and anti-depression efficacy

TANG Lin[1], ZHAO Hongqing[2], YANG Hui[3], LIU Jian[3], HE Yiran[4], LI Li[1], ZHANG Shuihan[5]（1. Hospital-made Preparations Center, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China; 2. Science & Technology Innovation Center, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 3. Medical Innovation Experiment Center, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China; 4. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China; 5. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410208, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To optimize the extraction process and to primarily evaluate the anti-anxiety and anti-depression efficacy of polysaccharide from Baihe dihuang decoction. **METHODS** Based on Plackett-Burman experimental design, using the comprehensive score of yield and content of polysaccharide as indicators, with extraction time, water amount, alcohol precipitation concentration as factors, Box-Behnken response surface methodology was used to optimize the extraction process of polysaccharide from Baihe dihuang decoction; and the validation test was conducted. Forty ICR mice were divided into control group, venlafaxine group [positive control, 13.5 mg/(kg·d)], Baihe dihuang polysaccharide high-dose and low-dose groups [5.28, 2.64 g/(kg·d), by raw material], with 10 mice in each group (half male and half female). Administration groups were given corresponding drug solution intragastrically, and control group was given water 10 mL/kg intragastrically, once a day, for 7 consecutive days. The elevated cross maze test, open field test, forced swimming test and tail suspension test were used

Δ**基金项目** 湖南省自然科学基金资助项目（No.2022JJ80093）；湖南省教育厅科学研究项目（No.22B0362）；湖南中医药大学中医学一流学科开放基金项目（No.2021ZYX27）；湖南省高新技术产业科技创新引领计划项目（No.2020SK2029）；湖南中医药大学校级科研基金项目（No.2019XJJJ055）

＊**第一作者** 助理研究员，硕士。研究方向：中药制剂、质量标准及新药开发。E-mail：492150309@qq.com

＃**通信作者** 研究员，博士。研究方向：中药资源及综合开发利用。E-mail：zhangshuihan0220@126.com

to evaluate the effects of the extract prepared by the optimal process on the anxiety-like and depression-like behavior of mice; enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the effects of the extract on the levels of neurotransmitter in cerebral tissue of mice. **RESULTS** The optimal extraction process of Baihe dihuang decoction was: the water amount of 25 times, extract time of 1.5 hours, and alcohol precipitation concentration of 70%. In 3 times of validation test, the average yield and content of polysaccharide were 33.10% and 0.62 mg/mg, the relative deviations of which from the predicted values (36.14% and 0.65 mg/mg) were 8.40% and 4.62% respectively (RSD＜2%, n=3). The polysaccharide extract of Baihe dihuang decoction could effectively increase the percentages of open-arms entry, the percentages of open-arms time, the total distance of voluntary activities and the activity distance in central area, and significantly shortened the immobility time of forced swimming test and tail suspension test (P＜0.05 or P＜0.01). The polysaccharide extract could significantly increase the levels of 5-hydroxytryptamine, norepinephrine (except for the Baihe dihuang polysaccharide low-dose group) and gamma-aminobutyric acid in cerebral tissue of mice, while significantly decrease the levels of glutamic acid (except for the Baihe dihuang polysaccharide low-dose group) (P＜0.05 or P＜0.01). **CONCLUSIONS** The optimized extraction process of polysaccharide from Baihe dihuang decoction is stable and feasible, and the obtained polysaccharide extract has obvious anti-anxiety and anti-depression effect *in vivo*.

KEYWORDS Baihe dihuang decoction; polysaccharide; extraction process; Plackett-Burman design; Box-Behnken response surface methodology; anti-depression; anti-anxiety; mice

百合地黄汤始载于东汉张仲景的《金匮要略》，由百合、生地黄组成，用于百合病之心肺阴虚内热证[1]。研究指出，百合病病证与现代神经系统疾病及心理障碍疾病的临床表现有相似之处，均表现为情绪低落、兴趣下降、紧张不安、急躁易怒、精神恍惚等[2]。百合地黄汤是国家中医药管理局《古代经典名方目录》收载的首批方剂，具有较高的开发价值，可用于临床治疗抑郁症、焦虑症、失眠等，可有效改善患者的焦虑抑郁症状且副作用小[2－4]。研究表明，百合多糖或地黄多糖均具有增强免疫、抗氧化、抗衰老、抗骨质疏松、改善学习记忆等作用[5－8]。近年来，中药复方多糖类物质的生物功能多样性已逐渐受到学者关注，其调节免疫、抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、调节血脂血糖、抗辐射、保护神经系统等作用逐步得到验证，同时具有安全性高、不良反应较少等优点[9－10]。多糖作为百合地黄汤的主要成分，含量较高且较易获得，因此百合地黄汤多糖类成分具有较大的开发应用前景。基于此，本研究对百合地黄汤中多糖类成分的提取工艺进行优化，并对百合地黄汤多糖类成分抗焦虑抑郁的效果进行评价，旨在为该方的作用机制研究及进一步开发利用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括UV-1800型紫外-可见分光光度计（日本Shimadzu公司）、PM-200型大鼠高架十字迷宫（成都泰盟软件有限公司）、SMART 3.0型动物行为学视频记录与分析系统（西班牙Panlab公司）、RT-6100型酶标仪（深圳雷杜生命科学股份有限公司）等。

1.2 主要药品与试剂

百合饮片（产自湖南龙山，批号20200801）、生地黄饮片（产自河南焦作，批号20200901）均购自湖南省南国药都中药饮片有限公司，经湖南中医药大学第一附属医院制剂中心张裕民教授鉴定分别为百合科植物卷丹 *Lilium lancifolium* Thunb.的干燥肉质鳞叶、玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch.的干燥块根，符合2020年版《中国药典》（一部）的相关规定。

D-无水葡萄糖对照品（批号110833-201908，纯度99.8%）购自中国食品药品检定研究院；盐酸文拉法辛缓释胶囊[批号CN3193D，规格150 mg（以文法拉辛计）]购自Pfizer Ireland Pharmaceuticals公司；γ氨基丁酸（gamma-aminobutyric acid，GABA）、谷氨酸（glutamic acid，Glu）、5-羟色胺（5-hydroxytryptamine，5-HT）、去甲肾上腺素（norepinephrine，NE）酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（批号分别为2205M03、2205M09、2205M11、2205M16）均购自江苏菲亚生物科技有限公司；乙醇、苯酚、浓硫酸均为分析纯，水为蒸馏水。

1.3 实验动物

SPF级ICR小鼠40只，雌雄各半，体质量18～20 g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物使用许可证号为SYXK（湘）2019-0009。本实验方案经湖南中医药大学动物伦理委员会审核，批准编号为LLBH-202104270001。

2 方法与结果

2.1 百合地黄汤粗多糖粉末制备

称取百合、生地黄饮片各50.0 g，加入10倍量水，提取1 h×2次，滤过；滤液浓缩至100 mL，加入无水乙醇使浓缩液醇浓度达80%，于4 ℃下静置24 h后滤过；收集沉淀，于50 ℃下真空干燥，粉碎，即得粗多糖粉末。按下式计算多糖得率（%）：多糖得率＝M/m×100%（式中，M为粗多糖粉末质量，m为饮片质量）。

2.2 多糖含量测定

采用苯酚-硫酸法进行测定。

2.2.1 对照品溶液及供试品溶液的制备 分别称取D-无水葡萄糖对照品13 mg、百合地黄汤粗多糖粉末8 mg，置于100 mL容量瓶中，用水溶解并定容，摇匀，得质量

浓度分别为0.13 mg/mL的葡萄糖对照品溶液和0.08 mg/mL的多糖供试品溶液。

2.2.2 葡萄糖标准曲线的绘制及供试品溶液多糖含量的测定 精密量取“2.2.1”项下葡萄糖对照品溶液1、2、4、6、8、10 mL，分别置于10 mL容量瓶中，用水稀释并定容，得葡萄糖对照品待测溶液。精密移取上述各质量浓度的葡萄糖对照品待测溶液和供试品溶液1.0 mL，置于10 mL具塞试管中，分别加入5%苯酚试剂1.0 mL，摇匀，迅速滴加浓硫酸5.0 mL，摇匀，于沸水浴中加热30 min后再于冰浴中静置15 min，采用紫外-可见分光光度计于486 nm波长下测定吸光度。以吸光度为纵坐标（A）、葡萄糖对照品质量浓度为横坐标（C）绘制标准曲线，得其标准曲线为$A=0.008\ 1C+0.088\ 1$（$R^2=0.999\ 5$）。以标准曲线法计算供试品溶液中多糖的质量浓度，方法学考察符合2020年版《中国药典》（四部）的相关要求。按下式计算多糖含量：多糖含量（mg/mg）$=\frac{C\times V\times N}{M\times 1\ 000}$[式中，$C$为供试品溶液中多糖的质量浓度（mg/mL）；$V$为定容体积（mL）；$N$为稀释倍数；$M$为粗多糖粉末质量（mg）]。

2.3 百合地黄汤粗多糖提取工艺优化

2.3.1 考察因素初筛 运用Design-Expert 13.0软件，采用Plackett-Burman实验设计，以提取时间（A）、加水量（B）、醇沉浓度（C）、醇沉时间（D）、浸泡时间（E）为考察因素，每个因素设置2个水平，以多糖得率及多糖含量为考察指标[7,11]，初步筛选影响百合地黄汤多糖提取的显著因素。Plackett-Burman实验因素与水平、设计与结果分别见表1、表2。

表1 Plackett-Burman实验因素与水平

水平	A/h	B/倍	C/%	D/h	E/h
−1	0.5	10	65	20	0.5
1	1.5	20	85	30	1.5

表2 Plackett-Burman实验设计与结果

序号	A/h	B/倍	C/%	D/h	E/h	多糖得率/%	多糖含量/(mg/mg)
1	1.5	20	65	30	1.5	24.6	0.57
2	1.5	20	85	20	0.5	24.1	0.61
3	1.5	10	65	20	1.5	22.0	0.57
4	0.5	10	85	20	1.5	10.0	0.61
5	1.5	10	85	30	0.5	21.1	0.64
6	0.5	10	65	30	0.5	16.8	0.55
7	0.5	20	65	30	1.5	19.5	0.64
8	0.5	10	65	20	0.5	13.1	0.57
9	1.5	20	65	20	0.5	25.5	0.59
10	0.5	20	85	30	0.5	12.9	0.66
11	1.5	10	85	30	1.5	20.2	0.68
12	0.5	20	85	20	1.5	11.9	0.64

运用Design Expert 13.0软件对实验数据进行方差分析，结果见表3。由表3可见，以多糖得率为评价指标，提取时间、加水量、醇沉浓度对其有显著影响（$P<0.05$）；以多糖含量为评价指标，醇沉浓度对其有显著影响（$P<0.05$）。醇沉时间、浸泡时间对多糖得率和多糖含量的影响均不显著（$P>0.05$），因此选择提取时间、加水量、醇沉浓度作为后续工艺优化的考察因素。

表3 Plackett-Burman实验的方差分析结果

评价指标	方差来源	平方和	自由度	均值	F	P
多糖得率	模型	302.417 5	5	60.483 5	21.019 4	0.000 9
	A	236.740 8	1	236.740 8	82.273 1	0.000 1
	B	19.507 5	1	19.507 5	6.779 3	0.040 5
	C	37.807 5	1	37.807 5	13.139 0	0.011 0
	D	6.020 8	1	6.020 8	2.092 3	0.198 2
	E	2.340 8	1	2.340 8	0.813 5	0.401 8
	残差	17.265 0	6	2.877 5		
	总差	319.682 5	11			
多糖含量	模型	0.012 6	5	0.002 5	2.742 1	0.125 8
	A	$3.745\ 8\times10^{-6}$	1	$3.745\ 8\times10^{-6}$	0.004 1	0.951 2
	B	0.000 7	1	0.000 7	0.727 8	0.426 3
	C	0.009 8	1	0.009 8	10.582 0	0.017 4
	D	0.001 5	1	0.001 5	1.588 6	0.254 3
	E	0.000 7	1	0.000 7	0.807 8	0.403 4
	残差	0.005 5	6	0.000 9		
	总差	0.018 2	11			

2.3.2 提取工艺优化及验证 根据Plackett-Burman实验结果，运用Design-Expert 13.0软件，采用Box-Behnken响应面法进行实验设计，以提取时间（A）、加水量（B）、醇沉浓度（C）为考察因素，每个因素设计3个水平，在固定浸泡时间1 h、醇沉时间24 h的基础上，以多糖得率和多糖含量的综合评分为评价指标，进行工艺优化。综合评分（Y）$=\frac{\text{多糖得率}_i}{\text{多糖得率}_{max}}\times50+\frac{\text{多糖含量}_i}{\text{多糖含量}_{max}}\times50$（式中，多糖得率$_i$、多糖含量$_i$分别为第$i$次实验所得结果，多糖得率$_{max}$、多糖含量$_{max}$分别为该指标最大值）[11]。Box-Behnken实验因素与水平、设计与结果分别见表4、表5。

表4 Box-Behnken实验因素与水平

水平	A/h	B/倍	C/%
−1	1	15	60
0	1.5	20	70
1	2	25	80

表5 Box-Behnken实验设计与结果

序号	A/h	B/倍	C/%	多糖得率/%	多糖含量/(mg/mg)	综合评分/分
1	1.5	20	70	32.8	0.62	89.25
2	1	20	60	21.6	0.63	74.84
3	2	15	70	33.1	0.64	91.11
4	2	20	60	31.0	0.68	91.17
5	1.5	20	70	33.3	0.62	89.93
6	1.5	20	70	30.8	0.61	85.82
7	1	20	80	25.8	0.58	76.89
8	1.5	25	80	37.0	0.67	98.55
9	1.5	15	60	23.3	0.67	80.04
10	1	15	70	25.0	0.60	77.26
11	2	25	70	33.5	0.64	91.65
12	1.5	20	70	33.1	0.62	89.66
13	2	20	80	30.5	0.66	89.04
14	1	25	70	29.2	0.65	86.56
15	1.5	15	80	30.6	0.64	87.73
16	1.5	20	70	33.0	0.63	90.25
17	1.5	25	60	34.1	0.69	96.08

应用Design-Expert 13.0软件对实验数据进行拟合并建立多项式方程，得综合评分（Y）=−93.289 3+103.692 2A−0.161 7B+2.389 7C−0.875 8AB−0.208 9AC−0.026 1BC−19.901 1A^2+0.105 5B^2−0.010 2C^2。对其进行方差分析，结果见表6。由表6可见，二次多元回归模型的P<0.05，可用于设计范围内综合评分的预测；由各因素的P值可知，对综合评分有显著影响的因素包括A、B、A^2（P<0.05），且模型失拟度不显著（P>0.05），提示模型拟合程度较高，可用于分析和预测百合地黄汤多糖的提取工艺。

表6　多元回归模型及方差分析结果

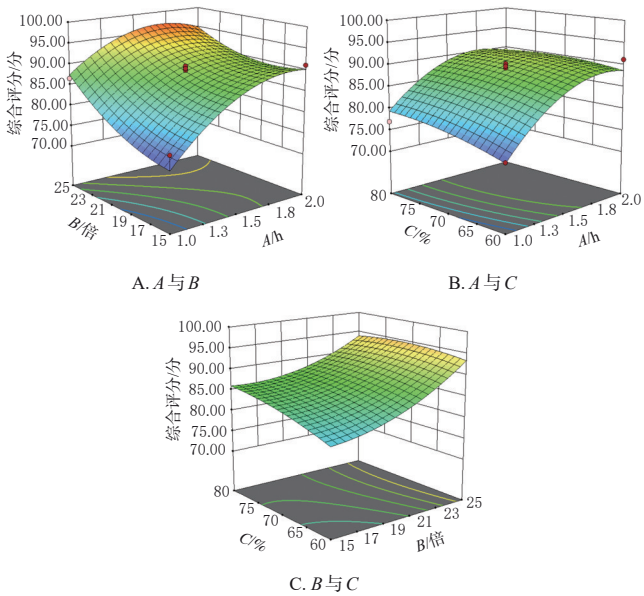
方差来源	平方和	自由度	均值	F	P
模型	626.056 9	9	69.561 9	6.606 3	0.010 5
A	280.904 4	1	280.904 4	26.677 8	0.001 3
B	168.414 8	1	168.414 8	15.994 5	0.005 2
C	12.721 3	1	12.721 3	1.208 1	0.308 1
AB	19.177 1	1	19.177 0	1.821 3	0.219 2
AC	4.362 7	1	4.362 7	0.414 3	0.540 3
BC	6.815 5	1	6.815 5	0.647 3	0.447 5
A^2	104.224 6	1	104.224 6	9.898 3	0.016 2
B^2	29.297 4	1	29.297 4	2.782 4	0.139 2
C^2	4.381 7	1	4.381 7	0.416 1	0.539 4
残差	73.706 7	7	10.529 5		
失拟值	60.714 6	3	20.238 2	6.230 9	0.054 7
纯误差	12.992 1	4	3.248 0		
总差	699.763 7	16			

为进一步评价各因素交互作用对综合评分的影响，本研究运用Design-Expert 13.0软件绘制响应面图，结果见图1。由图1可知，提取时间和加水量对综合评分的影响较为明显，而醇沉浓度的影响则不大；随着提取时间的延长，综合评分呈现先升高后降低的趋势；随着加水量的增加，综合评分明显升高，这可能是由于多糖属于水溶性成分，足量的水可更加充分地溶解药物中多糖类成分，进而提高提取率[7]。通过Design-Expert 13.0软件对多项式方程求解，得百合地黄汤多糖最优提取工艺为加24.8倍量水，提取1.7 h，醇沉浓度72%。

考虑实验操作和生产实际，本研究将提取工艺进一步优化为加25倍量水，提取1.5 h，醇沉浓度70%。在此条件下，百合地黄汤多糖得率及多糖含量的预测值分别为36.14%、0.65 mg/mg。3次验证实验结果显示，百合地黄汤多糖得率的平均值为33.10%（RSD=1.62%，n=3），与预测值的相对偏差为8.40%；多糖含量的平均值为0.62 mg/mg（RSD=0.83%，n=3），与预测值的相对偏差为4.62%，提示该工艺稳定、可行。同时，本研究比较了提取2次和提取3次的效果，第3次提取的多糖得率约为2.4%，提示经2次提取后，方中多糖成分基本被提取完全。

2.4　百合地黄汤多糖体内抗焦虑抑郁作用评价

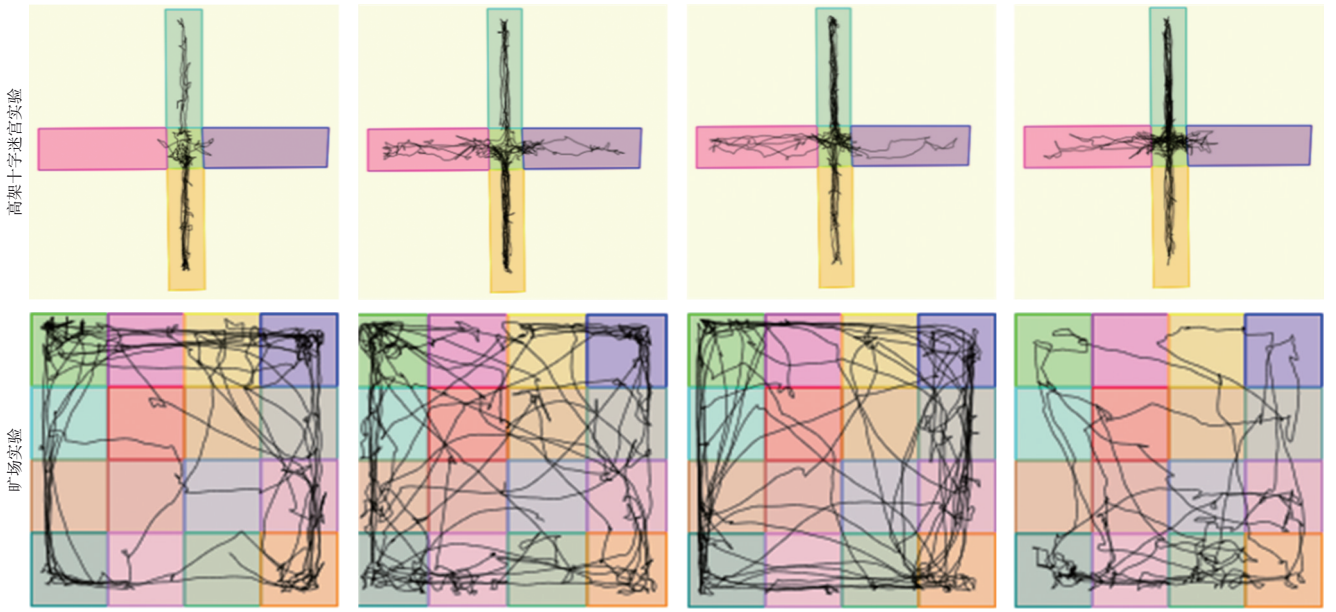
2.4.1　分组与给药　将40只小鼠随机分为4组，即对照组、文法拉辛组（阳性对照）和百合地黄汤多糖高、低剂量组，每组10只（雌雄各半）。文法拉辛组小鼠灌胃文拉法辛13.5 mg/（kg·d）（以水为溶剂，剂量相当于临床等效剂量的2倍），百合地黄汤多糖高、低剂量组小鼠分别灌胃按“2.3”项下最优提取工艺所制多糖提取物5.28、2.64 g/（kg·d）（以水为溶剂，剂量以生药量计，分别相当于百合地黄汤临床等效剂量的3、1.5倍），对照组小鼠灌胃水10 mL/kg，每天1次，连续7 d，并于末次给药1 h后检测各组小鼠的相关指标。



A. A与B　B. A与C　C. B与C

图1　各因素交互作用对综合评分影响的响应面图

2.4.2　行为学指标检测　（1）高架十字迷宫实验：分别记录各组小鼠5 min内进入高架十字迷宫开放臂、封闭臂的次数及在开放臂的停留时间，计算进入开放臂的次数比例（open-arms entry percentages，OE）及开放臂停留时间比例（open-arms time percentages，OT）。（2）旷场实验：将各组小鼠放入旷场箱中自由活动30 s后，记录其5 min内自主活动总距离及中心区域活动距离。（3）强迫游泳实验：将各组小鼠放入专用强迫游泳筒（水深约25 cm）中，记录其5 min内不动（以两前爪不动、身体呈漂浮状态视为不动）时间。（4）悬尾实验：将各组小鼠尾部用胶布固定于同一高度，记录其5 min内不动（以身体垂直倒立、四爪紧缩视为不动）时间。采用SPSS 20.0软件对数据进行统计分析。数据均以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA），组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准α=0.05。结果见图2、表7。结果表明，与对照组比较，各药物组小鼠的OE、OT值均显著升高（P<0.01），旷场实验自主活动总距离及中心区域活动距离均显著增加（P<0.05或P<0.01），提示百合地黄汤能改善小鼠焦虑样行为。与对照组比较，各药物组小鼠强迫游泳、悬尾实验不动时间均显著缩短（P<0.01），表明百合地黄汤能改善小鼠抑郁样行为。



A. 对照组　B. 文法拉辛组　C. 百合地黄汤多糖高剂量组　D. 百合地黄汤多糖低剂量组

图2　各组小鼠行为轨迹图

表7　百合地黄汤对小鼠行为学指标的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	高架十字迷宫实验		旷场实验		强迫游泳实验不动时间/s	悬尾实验不动时间/s
	OE/%	OT/%	自主活动总距离/cm	中心区域活动距离/cm		
对照组	55.36±5.90	30.53±5.68	1 744.17±167.28	249.45±61.17	104.70±20.22	83.70±19.88
文拉法辛组	60.58±3.75[a]	42.10±6.18[a]	2 044.52±209.25[b]	421.25±115.40[a]	62.90±11.22[a]	61.20±17.92[a]
百合地黄汤多糖高剂量组	62.18±5.44[a]	40.48±7.29[a]	2 246.35±175.10[a]	375.41±93.60[b]	54.30±15.66[a]	46.00±18.68[a]
百合地黄汤多糖低剂量组	63.93±4.26[a]	37.26±6.62[a]	2 001.83±214.73[b]	335.17±76.14[b]	65.00±18.59[a]	64.22±14.99[a]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与对照组比较，$P<0.05$

2.4.3　神经递质检测　上述实验完成后，处死各组小鼠，取其脑组织适量，加生理盐水匀浆，以3 000 r/min离心10 min，取上清液，采用ELISA法以酶标仪测定脑组织中5-HT、NE、GABA、Glu水平。严格按照试剂盒说明书操作，结果见表8。由表8可见，与对照组比较，各药物组小鼠脑组织中5-HT、NE（百合地黄汤多糖低剂量组除外）、GABA水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），Glu水平（百合地黄汤多糖低剂量组除外）均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。

表8　百合地黄汤多糖对小鼠脑组织中神经递质的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	5-HT/(ng/mL)	NE/(pg/mL)	GABA/(μmol/mL)	Glu/(mg/mL)
对照组	277.83±77.03	979.82±180.46	5.55±0.96	37.28±10.38
文拉法辛组	389.23±92.94[a]	1 198.61±213.97[b]	6.88±1.41[b]	25.71±8.21[a]
百合地黄汤多糖高剂量组	458.87±128.46[a]	1 210.54±201.29[b]	7.90±1.87[a]	27.84±6.56[b]
百合地黄汤多糖低剂量组	417.60±111.67[b]	1 166.89±289.29	7.25±1.59[b]	31.15±6.43

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与对照组比较，$P<0.05$

3　讨论

苯酚-硫酸法在中药多糖含量测定中应用广泛，但易受测定条件影响，因此本课题组前期对苯酚-硫酸法的测定条件进行了系统的方法研究，分别对苯酚浓度、苯酚用量、硫酸用量、水浴时间、加热温度等因素进行了单因素考察，最终获得了“2.2”项下实验条件；同时，本课题组对测定方法进行了方法学验证，其结果均符合2020年版《中国药典》（四部）相关要求，为百合地黄汤中多糖的定量分析提供了方法依据。

本研究以水提醇沉法来提取百合地黄汤多糖，首先采用Plackett-Burman实验设计，考察提取时间、加水量、醇沉浓度、醇沉时间、浸泡时间对百合地黄汤多糖得率、多糖含量的影响。Plackett-Burman设计可通过比较各因素水平与整体之间的差异性，进而从较多的因素中筛选出关键影响因素，可避免在后期优化时由于部分因素影响不显著而浪费实验成本，大幅减少实验次数，明显提高实验效率和准确度[12]。Plackett-Burman设计共筛选出影响百合地黄汤多糖提取的3个显著因素：提取时间、加水量、醇沉浓度。随后，本研究采用Box-Behnken设计-响应面法，采用3因素3水平设计，结合实验操作和实际生产，最终筛得百合地黄汤多糖最优提取工艺为加25倍量水，提取1.5 h，醇沉浓度70%。验证实验结果提示，上述工艺稳定、可行，可作为一种有效提取百合地黄汤多糖的方法。

高架十字迷宫实验、旷场实验、强迫游泳实验、悬尾实验均是经典的行为学实验方法，是利用动物对新异环境的探究特性与对高悬敞开环境的恐惧所形成的矛盾冲突状态，从而建立的一种急性应激性焦虑抑郁模型，具有操作简单快捷、实验动物敏感的优点，常用于抗焦虑抑郁药物的初筛及动物焦虑抑郁样行为的评价[13-15]。

本研究结果显示，百合地黄汤多糖可显著提高小鼠的OE、OT值，增加其自主活动总距离及中心区域活动距离，并可显著缩短其强迫游泳、悬尾实验不动时间，具有改善小鼠焦虑抑郁样行为的作用。

神经递质假说是焦虑抑郁症发病机制的经典假说，5-HT、NE、GABA、Glu等神经递质与焦虑抑郁的发生发展密切相关：5-HT是抑制性神经递质和血管活性物质，在大脑皮层和神经突触中呈高表达，在调节情绪状态、学习记忆、活动节律等方面发挥重要作用，其水平在抑郁症患者中枢神经系统中有所降低[16－17]。NE可在神经末梢突触间发挥作用，具有影响神经可塑性，调节机体认知、情绪、疼痛等生理功能，其水平在抑郁症患者脑内有所降低，从而造成NE系统功能障碍，导致患者记忆认知功能受损，产生抑郁、焦虑情绪[16－17]。GABA是中枢神经系统重要的抑制性神经递质，其水平降低与焦虑、不安等情绪的产生密切相关[18]。Glu是中枢神经系统内含量最高的兴奋性神经递质，其水平降低能够减少兴奋性神经毒性，从而发挥镇静、催眠、缓解焦虑的作用[19]。本研究结果显示，百合地黄汤多糖可显著提高小鼠脑组织中5-HT、NE（低剂量组除外）、GABA水平，显著降低Glu（低剂量组除外）水平，提示该多糖类成分对小鼠神经递质的分泌具有调节作用。

综上所述，本研究优化的百合地黄汤多糖提取工艺稳定、可行，且所得多糖提取物具有明显的体内抗焦虑抑郁作用。百合地黄汤是治疗焦虑性抑郁症的经典名方，其药效物质基础受到研究者的广泛关注[20]，但目前相关研究多集中于网络药理学预测的小分子化合物[21－22]。本研究结果表明，百合地黄汤中的多糖得率超过33%，且提取工艺操作简单，加之初步证实其具有抗焦虑抑郁活性，提示百合地黄汤多糖有一定的开发潜力。本课题组下一步拟结合多组学方法进一步验证挖掘其结构特征、功效作用及潜在靶点。

参考文献

[1] 张仲景. 金匮要略方论[M]. 北京：人民卫生出版社，2012：42.

[2] 张静，杨振宁. 中医药治疗百合病的现代研究进展[J]. 山东中医杂志，2022，41(11)：1244-1249.

[3] 魏娅男. 百合地黄汤治疗阴虚内热型失眠合并轻中度抑郁的临床疗效研究[D]. 济南：山东中医药大学，2021.

[4] 诸葛叶婷. 加味百合地黄汤对干燥综合征焦虑抑郁状态患者$P2X_7R$炎性通路干预作用研究[D]. 北京：北京中医药大学，2018.

[5] 马媛媛，姚晓英，谈卓臣，等. 地黄多糖对东莨菪碱诱导小鼠学习记忆能力障碍的改善作用及其机制[J]. 中成药，2021，43(6)：1462-1466.

[6] 宋硕. 兰州百合多糖的结构鉴定及其抗氧化活性研究[J]. 现代食品，2020(16)：176-179.

[7] 周加林，张涵，岳义民，等. 响应面法优化地黄多糖的提取工艺及抗氧化活性分析[J]. 广东药科大学学报，2022，38(4)：64-71.

[8] 刘思美，赵鹏，张婷婷，等. 地黄硒多糖的合成、表征及免疫活性分析[J]. 中国中药杂志，2022，47(11)：2938-2946.

[9] 景永帅，张钰炜，吴兰芳，等. 中药复方多糖的提取方法和药理活性研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学，2021，26(4)：462-468.

[10] 黄梓. 铁皮石斛当归复方多糖胶囊制备工艺、质量标准、降糖降脂功效以及体内安全性研究[D]. 武汉：华中科技大学，2020.

[11] 张子东，何燕珊，白浩东，等. 基于深度神经网络与Box-Behnken响应面法的海马多糖提取工艺优化研究[J]. 中国中药杂志，2021，46(10)：2501-2508.

[12] 马秉智，李丽，赫军，等. Plackett-Burman设计结合响应面法优化苦豆子效应成分的提取工艺[J]. 中国药学杂志，2019，54(12)：953-959.

[13] 于文潇，赵德，邓君. 核黄素四丁酸酯抗焦虑作用的药效学研究[J]. 中国药理学通报，2012，28(4)：577-580.

[14] 韦震，宋洪波，安凤平，等. 黄精多糖对急性抑郁小鼠模型的改善作用及机制[J]. 食品工业科技，2022，43(6)：351-357.

[15] 王孟迪，姚勤伟，薛涛，等. 3种抗抑郁中药方作用比较研究[J]. 湖南中医药大学学报，2021，41(9)：1327-1333.

[16] 赵迪克，牛君，杜志欣，等. 基于cAMP/PKA-CREB-BDNF信号通路探讨柴胡加龙骨牡蛎汤抗抑郁的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29(3)：17-25.

[17] 马瑞，李爽，王祯，等. 雪菊抗抑郁有效部位的筛选及其作用机制研究[J]. 中国药房，2022，33(10)：1177-1182.

[18] 胡晓炜，罗广彬，范琼尹，等. 柴牡安神颗粒抗焦虑作用及其活性机制[J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25(13)：41-48.

[19] 程红，陈湛，胡立娜，等. 中枢谷氨酸增多可能是抑郁与吸烟成瘾伴发的原因[J]. 中国健康心理学杂志，2019，27(7)：1115-1120.

[20] 赵洪庆，刘检，孟盼，等. 百合地黄汤对焦虑性抑郁症模型大鼠海马突触可塑性的影响[J]. 中国中药杂志，2021，46(5)：1205-1210.

[21] 何燕，张紫菱，招彦彤，等. 基于网络药理学和分子对接技术的百合地黄汤抗肝癌作用机制研究[J]. 广东工业大学学报，2022，39(4)：98-106.

[22] 丁腾，孙宇宏，杜霞，等. 经典名方百合地黄汤的化学成分与网络药理学研究[J]. 中草药，2019，50(8)：1848-1856.

（收稿日期：2022-08-25　修回日期：2023-02-02）

（编辑：张元媛）