

盐炙益智仁石油醚部位缩尿成分分离与药效学分析

龚晓猛, 李梦琪, 吴珊珊, 胡麟, 胡昌江*

(成都中医药大学药学院, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室, 中药材标准化教育部重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] 目的:探讨盐炙益智仁石油醚部位缩尿的有效成分,并进行药效学验证,拟阐明盐炙益智仁的缩尿药效物质基础以及作用机制。**方法:**采用硅胶和 HPLC 等色谱手段进行化学成分的分纯化,根据理化性质和¹H-NMR,¹³C-NMR 波谱数据鉴定化合物结构;通过 BL-420S 型生物机能实验系统测定膀胱逼尿肌张力的变化,采用分别加 4 种兴奋剂 BaCl₂, 磷酸组胺、多巴胺、乙酰胆碱累计加药物的方法,观察化合物对豚鼠膀胱逼尿肌肌条的收缩张力活动影响。**结果:**盐炙益智仁石油醚部位成分分离并鉴定出 9 个化合物[圆柚酮, 11-hydroxy-valenc-1(10)-en-2-one, 香科酮(teucrenone), 7-表-香科酮(7-epi-teucrenone B), 12-羟基圆柚酮(12-hydroxynootkatone), 杨芽黄素, β-谷甾醇, 胡萝卜苷, 棕榈酸], 通过药效学验证 7-epi-teucrenone B 与温肾缩尿密切相关。**结论:**7-epi-teucrenone B 可能是通过拮抗磷酸组胺的 H1 受体释放从而抑制豚鼠膀胱逼尿肌收缩张力。推测盐炙益智仁石油醚部位中的 7-epi-teucrenone B 可能为盐炙益智仁缩尿主要有效成分。

[关键词] 益智; 盐炙品; 药效成分; 膀胱逼尿肌; 7-表-香科酮; 缩尿; 化学分离

[中图分类号] R283.1; R284.2; R285.5; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)06-0013-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017060013

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161228.1129.026.html>

[网络出版时间] 2016-12-28 11:29

Separation and Pharmacodynamics of Urine-reducing Components in Petroleum Ether Part of Salt-processed Alpiniae Oxyphyllae Fructus

GONG Xiao-meng, LI Meng-qi, WU Shan-shan, HU Lin, HU Chang-jiang*

(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province, Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate urine-reducing components in petroleum ether part of salt-processed Alpiniae Oxyphyllae Fructus and verify their pharmacodynamics for clarifying its material basis and mechanism of urine-reducing. **Method:** HPLC and other chromatographic means were employed to separate and purify medicinal compositions, the structures of these compounds were identified by physicochemical properties and ¹H-NMR, ¹³C-NMR spectral data. Guinea pig bladder detrusor was prepared by isolated tracheal thermostatic perfusion experimental method and isolated in the Kerbs solution. The tension of 7-epi-teucrenone B on the isolated guinea pig bladder detrusor and the effect of 7-epi-teucrenone B on guinea pig bladder detrusor contraction incubation by four antispasmodic agents including acetylcholine, histamine phosphate, BaCl₂ and dopamine were measured by

[收稿日期] 20160721(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473353,30973941)

[第一作者] 龚晓猛,在读硕士,从事中药炮制学研究, Tel:13880687572, E-mail:gongjin20080621@126.com

[通讯作者] * 胡昌江,教授,博士生导师,从事中药炮制原理与质量标准研究, Tel:13980980796, E-mail:hhcejj@hotmail.com

BL-420S biological function experiment system. **Result:** Nine compounds were isolated and identified from petroleum ether part of salt-processed *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*, such as nootkatone, 11-hydroxy-valenc-1(10)-en-2-one, teucrenone, 7-epi-teucrenone B, 12-hydroxynootkatone and so on. By confirmation of pharmacodynamics, 7-epi-teucrenone B was closely related to urine-reducing. **Conclusion:** 7-Epi-teucrenone B inhibited contractile tension of isolated bladder detrusor may be through the antagonizing release of H1 receptor of histamine phosphate, it may be the urine-reducing component in petroleum ether part of salt-processed *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* fruits.

[**Key words**] *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*; salt-processed product; medicinal composition; bladder detrusor; 7-epi-teucrenone B; urine-reducing; chemical separation

益智仁生品辛温而燥,主归脾经,以温脾、摄唾为主,盐炙后辛燥之性减弱,主归肾经,专行下焦,以固精缩尿为主^[1-2]。前期研究表明益智仁经盐炙后缩尿作用明显增强^[3-4],并建立了盐炙益智仁石油醚部位缩尿作用谱效关系。但关于盐炙益智仁缩尿成分的研究目前尚未见报道。相关文献报道,益智仁的缩尿作用药效部位主要是在挥发油或石油醚部位中^[3],也有报道称是倍半萜类化合物^[2]。本实验以药效作用为导向^[5],对盐炙益智仁石油醚部位进行药效成分分离并鉴定出了多个化合物。通过药效试验验证 7-表-香科酮(7-epi-teucrenone B)对豚鼠膀胱逼尿肌肌条收缩的平均张力和抑制率有显著影响,揭示盐炙益智仁中 7-epi-teucrenone B 可能是其温肾缩尿的药效物质基础。

1 材料

BL-420S 型生物机能实验系统, JH-2 型肌张力传感器和 HV-4 型离体组织器官恒温灌流系统(成都泰盟软件有限公司), Avance III 600 MHz 型核磁共振仪(瑞士 Burker 公司), 1200 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), YP30002 型电子天平(德国 Sartorius 公司), AE240 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

益智仁药材均购自海南澄迈县,经成都中医药大学卢先明教授鉴定为姜科植物益智 *Alpinia oxyphylla* 的干燥成熟果实;聚山梨酯-80(tween-80)和 K-R 营养液均购自成都市科龙化工试剂厂,磷酸组胺、乙酰胆碱(上海伯奥生物科技有限公司),胡萝卜苷和 β -谷甾醇(成都煜泉绿健科技有限公司,批号分别为 H-002-150729, G-002-150421),水为去离子水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF 级豚鼠,体重 370 ~ 400 g,由成都达硕生物科技有限公司提供,合格证号 SCXK(川)2015-030。经成都中医药大学实验动物伦理委员会批准。

2 方法与结果

2.1 成分分离与结构鉴定^[5] 取石油醚部位 269.69 g,过 200 ~ 300 目硅胶柱色谱,用石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱(1:0 ~ 0:1),合并组分共得到 A ~ H(8 个组分)。A 组分经过硅胶柱色谱,石油醚-乙酸乙酯(6:5)梯度洗脱,得流分 Fr1 ~ Fr24,流分 Fr7 ~ Fr18 制备 TLC,环己烷-丙酸乙酯(7:3)展开,制备液相纯化得化合物 **1**(103 mg)。B 组分经过硅胶柱色谱,石油醚-乙酸乙酯(4:3)梯度洗脱,得流分 Fr1 ~ Fr19,流分 Fr2 ~ Fr10 进行硅胶柱色谱,石油醚-甲酸乙酯-三氯甲烷(1:9:1)洗脱,得化合物 **2**(59 mg)。C 组分经过硅胶柱色谱,石油醚-乙酸乙酯(8:1 ~ 1:9)分离,得流分 Fr1 ~ Fr63,流分 Fr10 ~ Fr32 经反相柱色谱分离,甲醇-水(2:8 ~ 7:3)洗脱,经制备液相[甲醇-水(6:4)]分离得化合物 **3**(45 mg)。D 组分经过硅胶柱色谱,石油醚-乙酸乙酯(9:1 ~ 3:7)分离得流分 Fr1 ~ Fr83,流分 Fr10 ~ Fr32 经制备 TLC,石油醚-丙酮-三氯甲烷(4:7:5)展开,分离得化合物 **4**(53 mg);流分 Fr45 ~ Fr72 经过硅胶柱色谱,用石油醚-乙酸乙酯(3:5)分离得流分 Fr1 ~ Fr29,流分 Fr11 ~ Fr23 经制备液相甲醇-水(43:57)得化合物 **5**(34 mg)。E 组分经制备 TLC,正己烷-丙酮(2:9)展开,分离得化合物 **6**(41 mg)。F 组分多次经过硅胶柱色谱,石油醚-丙酮-三氯甲烷(3:9:2),制备液相分离纯化得化合物 **7**(29 mg)。G 组分环己烷-乙酸乙酯梯度洗脱得流分 Fr1 ~ Fr35,Fr12 ~ Fr27 进行硅胶柱色谱,乙酸乙酯-甲醇-三氯甲烷(7:2:3)洗脱,得化合物 **8**(27 mg)。H 组分经硅胶柱色谱,正己烷-甲醇梯度洗脱得流分 Fr1 ~ Fr15,Fr4 ~ Fr11 进行硅胶柱色谱,乙酸乙酯-甲醇(8:3)洗脱,分离得流分 Fr1 ~ Fr9,合并流分 Fr3 ~ Fr7 进行硅胶柱色谱[乙酸乙酯-甲醇(1:9)]纯化得化合物 **9**(40 mg)。

2.1.1 化合物 1 ¹H-NMR(600 MHz, CDCl₃), 5.77

(s, 1H, HC = C), 4.74 (s, 1H, C = CH₂), 4.72 (s, 1H, C = CH₂), 1.74 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 0.97 (d, 3H, *J* = 6.76 Hz)。¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ: 199.6, 170.5, 149.0, 124.7, 109.3, 43.9, 42.1, 40.5, 40.3, 39.3, 33.0, 31.6, 20.8, 16.8, 14.9。上述光谱数据与参考文献[6]比较基本一致,故鉴定该化合物为圆柚酮。

2.1.2 化合物 2 [α]_{26.8}^D + 112.50 (600 MHz, CHCl₃)。EI-MS *m/z* 237 ([M + H]⁺, 1)。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 5.71 (1H, s, H-1), 2.43 (1H, m, H-9), 2.33 (1H, m, H-9), 2.24 (1H, dd, *J* = 13.8 Hz, 17.0, H-3), 2.17 (1H, m, H-3), 2.00 (1H, m, H-8), 2.00 (1H, m, H-6), 1.95 (1H, m, H-4), 1.69 (1H, m, H-7), 1.16 (3H, s, H-12), 1.15 (1H, m, H-8), 1.14 (3H, s, H-13), 1.03 (3H, s, H-14), 0.93 (1H, m, H-6), 0.93 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-15)。¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 199.9 (s, C-2), 171.0 (s, C-10), 124.2 (d, C-1), 72.3 (s, C-11), 43.7 (d, C-7), 41.9 (t, C-3), 40.4 (d, C-4), 39.5 (t, C-6), 39.1 (s, C-5), 32.9 (t, C-9), 27.6 (t, C-8), 27.2 (q, C-12), 26.8 (q, C-13), 16.8 (q, C-14), 14.9 (q, C-15)。上述光谱数据与参考文献[7]对照基本一致,故鉴定该化合物为 11-hydroxy-valenc-1(10)-en-2-one。

2.1.3 化合物 3 [M - H₂O]⁺ *m/z* 216.151 8, 理论值 216.151 4; IR *ν*_{max}: 3 550, 3 400, 1 660, 1 380, 900 cm⁻¹; ¹H-NMR (200 MHz) δ: 0.88 (3H, s), 1.86, 1.89 (3H, d), 2.29 (2H, s), 2.97 (2H, d), 4.88 (1H, t, *J* = 1.4 Hz), 5.10 (1H, s), 5.91 (1H, br s); EI-MS *m/z* 216 [M - H₂O]⁺ (38), 201 (21), 159 (19), 145 (10), 145 (10)。上述光谱数据与参考文献[7]对照基本一致,故鉴定该化合物为香科酮 (teucrenone)。

2.1.4 化合物 4 无色油状物, [M - H₂O]⁺ *m/z* 216.150 9, 理论值 216.150 8, MS *m/z* 234 [M]⁺ (2), 216 (18), 201 (9), 161 (16), 149 (25), 135 (70), 123 (30)。*ν*_{max}: 3 550, 3 400, 1 660, 1 455, 1 380, 915 cm⁻¹。¹H-NMR (200 MHz) δ: 0.97 (3H, s), 1.86 (3H, s); 1.92 (3H, br s), 5.11 (2H, br s, H-12), 2.34 (1H, br d, *J* = 12 Hz, H-5), 5.89 (1H, br s, H-3)。数据与文献[7]对照基本一致。故鉴定该化合物为 7-表-香科酮 (7-epi-teucrenone B)。

2.1.5 化合物 5 FAB-MS *m/z* 235 ([M + H]⁺, 18)。¹³C-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 5.76 (1H, s, H-

1), 5.07, 4.90 (1H, br s, H₂-12), 4.14 (2H, t, H₂-13), 2.49 (1H, m, H-9), 2.41 (1H, m, H-7), 2.38 (1H, m, H-9), 2.18 (2H, m, H-3), 1.97 (1H, m, H-6), 1.96 (1H, m, H-4), 1.94 (1H, m, H-8), 1.34 (1H, m, H-8), 1.12 (1H, t, *J* = 13.0 Hz, H-6), 1.07 (3H, s, H-14), 0.93 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-15)。¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 199.9 (s, C-2), 170.8 (s, C-10), 152.5 (s, C-11), 124.6 (t, C-12), 124.6 (d, C-1), 65.0 (t, C-13), 44.3 (t, C-6), 41.9 (t, C-3), 40.3 (d, C-4), 39.4 (s, C-5), 35.8 (d, C-7), 33.1 (t, C-9), 32.0 (t, C-8), 16.8 (q, C-14), 14.9 (q, C-15)。上述光谱数据与文献[7]对照基本一致,故鉴定该化合物为 12-羟基圆柚酮 (12-hydroxynootkatone)。

2.1.6 化合物 6 ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ: 3.86 (3H, s, 7-OCH₃), 6.36 (1H, br s, H-6), 6.76 (1H, br s, H-8), 6.96 (1H, s, H-3), 7.56 ~ 7.62 (3H, m, H-3', 4', 5'), 8.06 (2H, d, *J* = 7.8 Hz, H-2', 6'), 12.81 (1H, br s, 5-OH)。¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ: 182.1 (C-4), 165.1 (C-7), 164.2 (C-2), 161.4 (C-5), 157.8 (C-9), 132.2 (C-4'), 130.8 (C-1'), 29.3 (C-3', 5'), 126.6 (C-2', 6'), 105.2 (C-3), 105.5 (C-10), 99.1 (C-6), 92.2 (C-8), 56.1 (7-OCH₃)。上述光谱数据与文献[8]对照基本一致,故鉴定该化合物为杨茅黄素。

2.1.7 化合物 7 白色针状结晶 (丙酮), Liebermann-Burchard 反应呈阳性, Molish 反应呈阴性, 与 β-谷甾醇对照品共薄层比较, 二者比移值 (R_f) 相同, 测混合熔点不下降, 故推测该化合物为 β-谷甾醇。

2.1.8 化合物 8 白色粉末 (三氯甲烷-甲醇), TLC 上 10% 硫酸-乙醇溶液显紫红色, Liebermann-Burchard 反应呈阳性, 与胡萝卜苷对照品共薄层 R_f 一致, 测混合熔点不下降, 故鉴定该化合物为胡萝卜苷。

2.1.9 化合物 9 结构鉴定为 C₁₆H₃₂O₂。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.35 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-2), 1.18 ~ 1.30 (28H, m, CH₂ × 14), 1.64 (2H, m, H-15), 0.88 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-16); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 178.9 (C-1), 33.9 (C-2), 27.4 (C-3), 29.1 ~ 29.7 (C-4 ~ 13), 31.9 (C-14), 22.7 (C-15), 14.1 (C-16)。以上数据与文献[9]报道的棕榈酸的数据一致, 故确定该化合物为棕榈酸。

2.2 溶液的配制

2.2.1 7-epi-teucrenone B 供试品溶液 称取 7-epi-

teurenone B 约 20 mg 置量瓶中,加水定容并稀释,得 $0.83 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 供试品溶液^[10]。

2.2.2 氯化乙酰胆碱溶液 称取氯化乙酰胆碱约 2 g,加水配成 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化乙酰胆碱溶液^[10],分别取其稀释成 $1 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2.3 磷酸组胺溶液 精密称取磷酸组胺约 0.3 g,加水配成 $1 \times 10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸组胺溶液^[7],分别取其稀释成 $1 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2.4 氯化钡溶液 精密称取氯化钡^[11]约 0.1 g,加水配成 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钙溶液,分别取其稀释成 $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2.5 盐酸多巴胺溶液 精密称取 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸多巴胺约 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加水超声使溶解并定容,得 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸多巴胺溶液。上述供试品溶液置于温度 $4.0 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱内保存备用。

2.3 豚鼠膀胱逼尿肌肌条观察 猛击豚鼠头部致昏,快速取出膀胱,并用低温营养液漂洗干净,存放于通有 $95\% \text{ O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$ 混合气体的低温营养液中,备用。从豚鼠膀胱三角区部位横切,沿着膀胱逼尿肌纤维纵向切开,取 2 条膀胱逼尿肌肌条。纵行肌条 ($3 \text{ mm} \times 8 \text{ mm}$)。将剪切好的膀胱逼尿肌肌条安置在盛有 (37 ± 0.5) $^\circ\text{C}$ 的 K-R 营养液 10 mL 的平滑肌槽中,持续通以 $95\% \text{ O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$ 混合气体。用手术线系好的肌条,一端固定在肌槽底部的不锈钢弯钩上,另一端与专用测量肌张力灵敏传感器连接。传感器连接生物机能实验系统记录肌条收缩时的平均张力和频率。在 (37 ± 0.5) $^\circ\text{C}$ 的 Krebs 营养液中温育 30 min,同时给予肌条负荷 1 g 张力,膀胱逼尿肌肌条自发收缩活动平稳后,记录 2 min 正常收缩曲线^[5,12-13]。

2.4 7-epi-teurenone B 对豚鼠离体膀胱逼尿肌收缩的影响 待离体膀胱逼尿肌标本稳定后,累积加入 7-epi-teurenone B,使其累积终质量浓度分别达 1.465×10^{-3} , 2.931×10^{-3} , 5.861×10^{-3} , 1.172×10^{-2} , 2.345×10^{-2} , 4.689×10^{-2} , 9.378×10^{-2} , 1.876×10^{-1} , 3.751×10^{-1} , $7.502 \times 10^{-1} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 观察其对豚鼠离体膀胱逼尿肌的作用。结果显示 7-epi-teurenone B 具有剂量依赖性地降低豚鼠离体膀胱逼尿肌收缩张力的作用。在 $1.465 \times 10^{-3} \sim 7.502 \times 10^{-1} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内,亲和力指数 (pD_2) (2.03 ± 0.15),见图 1。

2.5 7-epi-teurenone B 对乙酰胆碱诱导豚鼠离体膀胱逼尿肌收缩的影响 待基线稳定后,累积加入 7-epi-teurenone B,使其累积终浓度分别为 $1.465 \times$

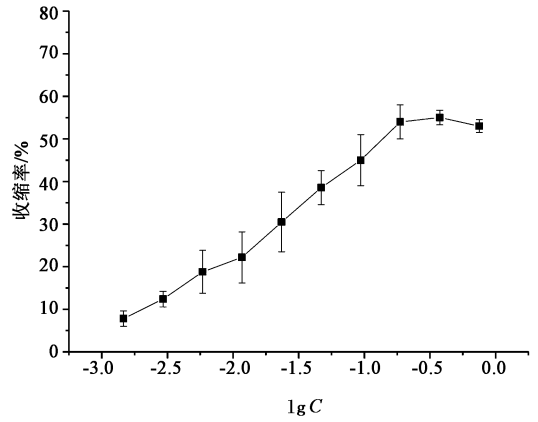


图 1 不同质量浓度 7-epi-teurenone B 对豚鼠离体膀胱逼尿肌的收缩率 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 1 Effect of 7-epi-teurenone B with different concentration on contraction of isolated guinea pig bladder detrusor ($\bar{x} \pm s, n=8$)

10^{-3} , 2.931×10^{-3} , 5.861×10^{-3} , 1.172×10^{-2} , 2.345×10^{-2} , 4.689×10^{-2} , 9.378×10^{-2} , 1.876×10^{-1} , 3.751×10^{-1} , $7.502 \times 10^{-1} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 测定乙酰胆碱诱导对豚鼠离体膀胱逼尿肌的收缩张力作用,记录引起膀胱逼尿肌收缩张力值 (E),以加入药物前的乙酰胆碱引起的最大收缩幅度 (E_{max}) 为 100%,以 $(E_{\text{max}} - E)/E_{\text{max}} \times 100\%$ 计算收缩率。待肌条 E 保持稳定状态时冲洗肌条数次,每 15 min 更换次营养液,待张力记录基线稳定后,分别加入终质量浓度为 4.689×10^{-2} , $9.378 \times 10^{-2} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 7-epi-teurenone B 供试品溶液,孵育 20 min,分别重复上述乙酰胆碱的加入过程,累积加药间隔时间 5 min,记录肌条收缩幅度,考察 7-epi-teurenone B 对乙酰胆碱诱导豚鼠离体肌条收缩的影响。结果显示 7-epi-teurenone B 对乙酰胆碱引起的膀胱逼尿肌兴奋几乎无拮抗作用。同上操作设置空白组 (水)^[14-16]。随着 7-epi-teurenone B 剂量的增大,7-epi-teurenone B 不能拮抗因乙酰胆碱而引起的豚鼠膀胱逼尿肌兴奋效应,与乙酰胆碱兴奋膀胱组比较,无显著性差异。7-epi-teurenone B 对乙酰胆碱诱导的豚鼠膀胱逼尿肌平均 E 降低率、频率降低率无显著改变,见表 1。

2.6 7-epi-teurenone B 对磷酸组胺诱导的豚鼠离体膀胱逼尿肌收缩的影响 方法参照 2.5 项,加入 7-epi-teurenone B 供试品溶液 (9.378×10^{-2} , $1.876 \times 10^{-1} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 后,可使磷酸组胺收缩膀胱逼尿肌的张力降低,呈剂量依赖性,随着 7-epi-teurenone B 质量浓度增加,使豚鼠膀胱逼尿肌最大张力降低,且磷酸组胺组和空白组比较均有显著性差异;高、低质量浓度 7-epi-teurenone B 组与空白组比较有显著性差异;7-epi-teurenone B 对磷酸组胺

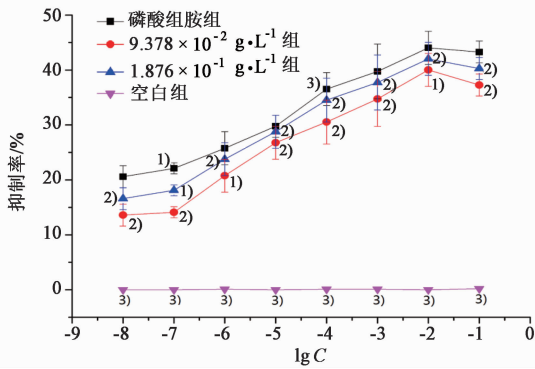
表 1 BaCl₂,多巴胺和乙酰胆碱对膀胱逼尿肌的影响(n=8)

Table 1 Effect of synephrine on contraction of isolated guinea pig bladder detrusor induced by BaCl₂, acetylcholine and dopamine (n=8)

7-epi-teurenone B 终质量浓度/g·L ⁻¹	BaCl ₂				多巴胺				乙酰胆碱			
	平均张力 /m·g ⁻¹	平均张 力降低 率/%	平均 频率 /次·min ⁻¹	频率 降低 率/%	平均 张力 /m·g ⁻¹	平均张 力降低 率/%	平均 频率 /次·min ⁻¹	频率 降低 率/%	平均 张力 /m·g ⁻¹	平均张 力降低 率/%	平均 频率 /次·min ⁻¹	频率 降低 率/%
1.465 × 10 ⁻³	4.35 ± 0.29	0.38	7.91 ± 1.10	1.53	4.51 ± 0.39	0.75 ¹⁾	7.20 ± 1.38	1.03	5.23 ± 0.44	1.04	7.23 ± 0.86	1.42
2.931 × 10 ⁻³	4.23 ± 0.35	0.05	8.11 ± 1.04	1.02	4.42 ± 0.51	0.64	7.11 ± 1.43	1.02	5.31 ± 0.39 ²⁾	0.66	7.01 ± 0.78	1.89
5.861 × 10 ⁻³	4.27 ± 0.33	0.49	8.04 ± 1.17	1.83	4.41 ± 0.44	0.72	7.13 ± 1.34	1.14	5.29 ± 0.43 ²⁾	0.37	7.31 ± 0.81 ²⁾	2.20
1.172 × 10 ⁻²	4.29 ± 0.34	0.48	8.01 ± 1.24	1.63	4.58 ± 0.37	0.48	7.23 ± 1.49 ²⁾	1.56	5.21 ± 0.49	0.86	7.19 ± 0.97	2.14 ¹⁾
2.345 × 10 ⁻²	4.20 ± 0.30	0.39	7.99 ± 1.31	1.82	4.46 ± 0.46	0.62	7.16 ± 1.51	1.25	5.25 ± 0.38	0.56	7.22 ± 0.83	1.06
4.689 × 10 ⁻²	4.19 ± 0.35	0.63	8.06 ± 1.15	2.34 ¹⁾	4.50 ± 0.39	0.71	7.22 ± 1.28	1.62	5.22 ± 0.46	1.52	7.33 ± 0.57	1.27
9.378 × 10 ⁻²	4.24 ± 0.33	0.52	8.02 ± 1.17	1.28	4.43 ± 0.50	0.63	7.16 ± 1.33	1.08	5.19 ± 0.51	0.47	7.27 ± 0.84	1.33
1.876 × 10 ⁻¹	4.31 ± 0.34	0.65 ¹⁾	8.10 ± 1.21	1.25	4.49 ± 0.38	0.57	7.12 ± 1.27	2.14	5.24 ± 0.49	0.36	7.18 ± 0.71	1.17
3.751 × 10 ⁻¹	4.26 ± 0.36	0.72 ¹⁾	8.05 ± 1.19	3.42	4.46 ± 0.49	0.64	7.18 ± 1.41	1.28	5.22 ± 0.43	0.72	7.29 ± 0.94	1.42
7.502 × 10 ⁻¹	4.27 ± 0.29	1.19	8.08 ± 1.31	1.18	4.49 ± 0.37	0.98	7.23 ± 1.36 ²⁾	1.65	5.27 ± 0.50 ²⁾	1.19	7.27 ± 0.82	1.18

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01。

有明显的非竞争性拮抗作用,提示 7-epi-teurenone B 非竞争性拮抗膀胱逼尿肌的组胺受体,从而抑制磷酸组胺引起的收缩张力。表明 7-epi-teurenone B 是盐炙益智仁石油醚部位与温肾缩尿作用密切相关的物质基础,见图 2。



与磷酸组胺组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与空白组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01

图 2 不同质量浓度 7-epi-teurenone B 对磷酸组胺作用后豚鼠膀胱逼尿肌收缩作用的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 2 Effect of 7-epi-teurenone B with different concentration on contraction of isolated guinea pig bladder detrusor induced by histamine phosphate($\bar{x} \pm s, n=8$)

2.7 7-epi-teurenone B 对 BaCl₂ 诱导的豚鼠离体膀胱逼尿肌收缩的影响 以累积加药方式向浴槽内加入 7-epi-teurenone B^[13],使其累积终质量浓度为 1.465 × 10⁻³, 2.931 × 10⁻³, 5.861 × 10⁻³, 1.172 × 10⁻², 2.345 × 10⁻², 4.689 × 10⁻², 9.378 × 10⁻², 1.876 × 10⁻¹, 3.751 × 10⁻¹, 7.502 × 10⁻¹ g·L⁻¹, 观察其对豚鼠离体膀胱逼尿肌的作用。结果发现加入 7-epi-teurenone B 质量浓度为 9.378 × 10⁻² g·L⁻¹

时,7-epi-teurenone B 对 BaCl₂ 引起的膀胱逼尿肌兴奋几乎无拮抗作用。随着剂量的增大,7-epi-teurenone B 不能拮抗因 BaCl₂ 而引起的豚鼠膀胱逼尿肌兴奋效应,与 BaCl₂ 兴奋膀胱组比较,无显著性差异。7-epi-teurenone B 对 BaCl₂ 诱导的豚鼠膀胱逼尿肌平均张力降低率、频率降低率无显著改变,见表 1。

2.8 7-epi-teurenone B 对多巴胺诱导的豚鼠离体膀胱逼尿肌收缩的影响 待离体膀胱逼尿肌标本稳定后,累积加入 7-epi-teurenone B,使其累积终质量浓度分别为 1.465 × 10⁻³, 2.931 × 10⁻³, 5.861 × 10⁻³, 1.172 × 10⁻², 2.345 × 10⁻², 4.689 × 10⁻², 9.378 × 10⁻², 1.876 × 10⁻¹, 3.751 × 10⁻¹, 7.502 × 10⁻¹ g·L⁻¹, 结果发现 7-epi-teurenone B 对多巴胺引起的膀胱逼尿肌兴奋几乎无拮抗作用。随着剂量的增大,7-epi-teurenone B 不能拮抗因多巴胺而引起的豚鼠膀胱逼尿肌兴奋效应,与多巴胺兴奋膀胱组比较,无显著性差异。7-epi-teurenone B 对多巴胺诱导的豚鼠膀胱逼尿肌平均张力降低率、频率降低率无显著改变,见表 1。

2.9 其他 8 个成分对豚鼠膀胱逼尿肌张力的影响 参照 2.5 项下方法分别对分离鉴定的其他 8 个成分对豚鼠膀胱逼尿肌张力的影响,进行磷酸组胺、多巴胺、乙酰胆碱和 BaCl₂ 诱导膀胱逼尿肌兴奋的抑制作用,均无明显的抑制作用。

3 讨论

豚鼠膀胱逼尿肌在正常的生理环境下处于相对静息状态,能够保持轻微的静息张力。这种生理状

态主要是靠膀胱逼尿肌上分布的神经释放神经递质来维持。在膀胱逼尿肌上受体有不同的类型,主要分布有 β -肾上腺素能受体、组胺受体和M受体^[16],进行不同的生理调节, β 受体激动后使膀胱逼尿肌产生松弛效应,M受体和H1受体^[17]使膀胱逼尿肌兴奋产生收缩效应。磷酸组胺是H1受体的激动剂,乙酰胆碱是M受体的激动剂,两者促进豚鼠的膀胱逼尿肌产生收缩作用。

本实验根据前期对盐炙益智仁研究表明,石油醚部位是缩尿作用的主要药效部位。以盐炙益智仁缩尿药效作用为导向,进一步对其石油醚部位进行分离、纯化,并鉴定化合物结构,通过药效学验证分离的化合物是否具有相关性作用^[18]。本实验对盐炙益智仁石油醚部位进行分离和纯化得到了缩尿成分7-epi-teucrone B,该成分对正常豚鼠离体膀胱收缩张力有一定的抑制作用;特别是对激动剂磷酸组胺引起的膀胱逼尿肌收缩亦具有明显的降低张力作用。由此可以推测膀胱逼尿肌的H1受体可能是7-epi-teucrone B缩尿作用的靶点。对其他3种(多巴胺、乙酰胆碱和BaCl₂)作用于膀胱逼尿肌没有影响。本实验结果表明该成分能在一定范围内降低膀胱逼尿肌收缩张力,这可能是盐炙益智仁缩尿作用的物质基础之一。盐炙益智仁的缩尿作用,可能是多成分协同发挥作用,也可能是某一特定成分作用的结果,为相关药物的药效作用研究提供科学合理的新思路。

[参考文献]

[1] 李兴迎,胡昌江,林辉,等. 中药益智仁盐炙工艺的正交实验法研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(7): 1574-1576.

[2] 陈萍,王培培,焦泽滔,等. 益智仁的化学成分及药理活性研究进展[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 617-623.

[3] 黄勤挽,胡昌江,李兴华,等. 盐炙益智仁“缩尿”有效部位指纹图谱研究[J]. 中药与临床, 2011, 1(3): 18-20.

[4] 胡昌江,黄勤挽,余凌英,等. 中药盐炙共性技术研究思路探析[J]. 中国药业, 2007, 16(13): 1-2.

[5] 龚晓猛,吴珊珊,李梦琪,等. 盐炙益智仁石油醚部位“缩尿”作用谱效关系分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(11): 1-5.

[6] Sauer A M, Crowe W E, Henderson G, et al. An efficient

and economic asymmetric synthesis of (+)-nootkatone, tetrahydronootkatone, and derivatives [J]. Org Lett, 2009, 11(16): 3530-3533.

[7] XU J J, SU J, LI Y, et al. Eremophilane-type sesquiterpenes from *Alpinia oxyphylla* with activity against nitric oxide production [J]. Chem Nat Compd⁺, 2013, 49(3): 457-461.

[8] 石绍淮,张晨宁,刘爱敬,等. 益智仁化学成分分离与鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17): 97-100.

[9] 刘悦,刘静,庾石山,等. 大理白前化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(6): 500-503.

[10] 魏莹,裴昆,陈海芳,等. 辛弗林对豚鼠离体气管平滑肌的作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 158-162.

[11] Fraga B M, Hernández M G, Mestres T, et al. Eudesmane sesquiterpenes from *Teucrium heterophyllum*. The X-ray structure of teucdiol A [J]. Phytochemistry, 1993, 34(4): 1083-1086.

[12] 黄勤挽,胡昌江,李兴华,等. 益智仁盐炙对豚鼠膀胱逼尿肌活动影响的研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(19): 2932-2933.

[13] 黄勤挽. 益智仁盐炙“缩尿”作用的研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2008.

[14] 曾俊伟,余梅,骆亚莉,等. 大黄对豚鼠离体膀胱逼尿肌条收缩活动影响的实验研究[J]. 中药药理与临床, 2005, 21(1): 27-29.

[15] 蔺美玲,金珊,李海龙,等. 黄芩对豚鼠体外膀胱逼尿肌条收缩活动的影响[J]. 中国神经再生研究, 2008, 12(53): 10492-10496.

[16] Yoshiyama M, De Groat W C. Role of spinal α_1 -adrenoceptor subtypes in the bladder reflex in anesthetized rats [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001, 280(5): R1414-R1419.

[17] Patel H J, Douglas G J, Herd C M, et al. Antigen-induced bronchial hyperresponsiveness in the rabbit is not dependent on M2-receptor dysfunction [J]. Pulm Pharmacol Ther, 1999, 12(4): 245-255.

[18] 李梦琪,吴珊珊,龚晓猛,等. 益智仁盐炙前后分别组成缩泉丸的缩尿部位指纹图谱比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4): 16-19.

[责任编辑 刘德文]