

基于炮效关系研究白芥子镇咳药效物质基础

冯宝民¹, 邱琳¹, 湛启鹏², 王惠国¹, 史丽颖¹, 蒋革¹, 唐玲¹, 王永奇¹, 苑艳霞¹

(1. 大连大学生物工程学院药物研究所, 辽宁 大连 116622; 2. 大连市中山区疾病预防控制中心检验科, 辽宁 大连 116013)

中国图书分类号: R-332; R 282.710.5; R 283.1; R 974.2

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2010)09-1173-04

摘要: 目的 基于炮制方法与药效之间的关系研究白芥子镇咳的药效物质基础。方法 采用 HPLC 比较炒制前后白芥子中化学成分的变化。以体积比为 0.25 的浓氨水做引咳实验, 以实验动物的咳嗽潜伏期、2 min 内咳嗽次数为评价指标, 比较炒制前后白芥子的镇咳作用。分离纯化炒制后含量明显增加的对羟基苯乙腈成分并考察其镇咳作用。结果 白芥子炒制后, 镇咳作用明显增强, 其对羟基苯乙腈含量明显增高。对羟基苯乙腈具有明确镇咳作用, 与空白对照组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 且中、高剂量对羟基苯乙腈的镇咳作用优于炒白芥子。结论 炒制后白芥子镇咳作用增强, 炒制法可以增加白芥子中对羟基苯乙腈的含量, 对羟基苯乙腈镇咳作用明显, 是白芥子镇咳的药效物质。

关键词: 炮效关系; 对羟基苯乙腈; 引咳时间; 引咳次数; 药效物质基础; HPLC

中药炮制是体现中医用药特点的主要内容之一, 直接关系到临床用药的疗效。有些药物必须进行炮制, 有效成分才能溶出, 有些药物经炮制后, 有效成分的溶出率明显增加, 因此, 中药的炮制与其炮制方法有着极为密切的联系。

白芥子为十字花科(Cruciferae)芥属植物白芥 *Sinapis alba* L. 的种子, 辛, 温, 归肺经, 临床入药常以炒黄法炮制^[1]。现代药理学研究表明: 炒白芥子的镇咳作用优于生白芥子^[2-3], 提示炒制法可以提高白芥子镇咳药效成分的溶出率。为明确白芥子镇咳的药效物质基础, 本研究前期从炒白芥子中分离得到了 10 个化合物, 分别鉴定为 4-羟基苯乙酸-2'-醛基-5'-咪喃甲酯(I)、对羟基苯乙腈(II)、对羟基苯甲醛(III)、胡萝卜苷(IV)、软脂酸-1-单甘油酯

(V)、 β -谷甾醇(VI)、芥子酸(VII)、对羟基苯甲酸(VIII)、对羟基苯乙酸(IX)和双(5-甲酰基糠基)醚(X)^[4]。HPLC 研究结果显示, 上述成分中, 对羟基苯乙腈含量在炒制后明显增加。对羟基苯乙腈的氰基结构可能在体内经过 I 相酶系的作用产生氰化氢(HCN), 从而起到中枢镇咳作用^[5], 因此, 本研究拟分离纯化对羟基苯乙腈并对其镇咳作用进行研究, 为白芥子炮制机制及白芥子镇咳活性成分的研究提供实验依据。

1 仪器与材料

XT4A 显微熔点测定仪, JEOL JNM-AL400 型、Bruker ARX-500 型核磁共振仪, JEOL JMS-700 型质谱仪, Waters 515 高效液相色谱仪, Waters 2487 Dual λ 紫外检测器, Chromstation 数据处理系统, BP210s 1/1 万电子天平(Sartorius 公司), BP211s 1/10 万电子天平(Sartorius 公司), Laborato 4000 型旋转蒸发器(Heidolph 公司), 秒表(深圳追日电子公司)。

白芥子购自河北安国, 经大连大学医学院高松副教授鉴定为十字花科植物白芥 *Sinapis alba* L. 的干燥成熟种子。氨水(安徽宿州化学试剂厂), 10 ~ 40 μ m 薄层色谱用硅胶、200 ~ 300 目柱色谱用硅胶(青岛海洋化工厂)。

昆明种小白鼠, $\text{♀} \delta$ 各半, 体质量(20 \pm 2) g, 购自大连医科大学实验动物中心。

2 方法

2.1 炒制前后白芥子中对羟基苯乙腈含量的比较

炒白芥子的制备: 取净白芥子, 分别用文火加热 5、10 min, 炒至表面呈黄色, 有爆裂声, 并放出香辣气味, 取出, 放凉。

色谱柱条件: 色谱柱为 Luna 5u Phenyl-Hexyl (250 mm \times 4.60 mm 5 μ m); 流动相为甲醇-水(35:65, V/V) 流速 0.6 ml \cdot min⁻¹; 检测波长 287 nm。

标准曲线的绘制: 精密称取对羟基苯乙腈对照品加甲醇溶解并定容至质量浓度分别为 10、20、30、40、50 mg \cdot L⁻¹ 的溶液。精密吸取各溶液 10 μ l, 注入液相色谱仪, 测得进样浓度(X) 对峰面积(Y) 的直线回归方程。

供试品溶液的制备: 取生白芥子与 5 min 炒白芥子、10 min 炒白芥子, 各 20 g, 粉碎, 石油醚脱脂,

收稿日期: 2010-05-24, 修回日期: 2010-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No 30600802); 辽宁省高等学校优秀人才支持计划项目(No 2008RC03)

作者简介: 冯宝民(1975-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然药物化学、药理学, Tel: 0411-87402718-601, E-mail: fengbaomin@dlu.edu.cn;

王惠国(1978-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 中药药理学、天然药物化学, Tel: 0411-87402718-607, E-mail: wanghuiguo163@163.com

过滤 药渣用 0.95 乙醇回流提取 3 次,合并提取液;浓缩至无醇味,得其浸膏,分别精密称取样品的浸膏 0.1 g,加甲醇溶解并定容至 50 ml,得浓度为 2 g · L⁻¹ 的溶液,备用。

样品测定:分别精密吸取各供试品溶液 10 μl,注入液相色谱仪,按上述条件测定,根据标准曲线的回归方程求出含量。

2.2 实验动物的筛选及引咳实验 动物筛选:将小鼠放入倒置的烧杯内,迅速放入注有 1.0 ml 浓氨水的棉球,5 s 后立即取出,2 min 内不咳嗽者舍去。

引咳实验:在筛选实验结束 7 d 后,随机分组,给药结束后,将小鼠放在倒置的 600 ml 的烧杯内,迅速放入注有 1.0 ml 浓氨水的棉球,一熏一换氨水球,每次熏 1 只小鼠。记录放入时间,观察并记录咳嗽潜伏期,并记录 2 min 内小鼠的咳嗽次数。

2.3 白芥子炒制前后镇咳作用比较 实验动物灌胃给药。分组及给药剂量如下: A 阴性对照组(蒸馏水 0.5 ml · d⁻¹)、B 生白芥子组(含 4.500 g · kg⁻¹ · d⁻¹ 生白芥子生药醇提液)、C 炒白芥子组(含 4.500 g · kg⁻¹ · d⁻¹ 炒白芥子生药的醇提液)。各组小鼠连续灌胃给药 7 d,在 d 7 给药 30 min 后,参照“2.2”进行引咳实验。

2.4 对羟基苯乙腈的制备 取炒白芥子 5.0 kg,粉碎,用石油醚(60 °C ~ 90 °C)室温冷浸脱脂 3 次(每次 24 h),晾干,以 0.95 乙醇回流提取,合并提取液,减压回收乙醇至无醇味,得浸膏 733 g;该浸膏加入 7 L 蒸馏水溶解分散后,依次用 1/3 体积的醋酸乙酯萃取 4 次,回收溶剂,得醋酸乙酯萃取物 200 g,经多次柱色谱分离及重结晶得到对羟基苯乙腈化合物。

2.5 对羟基苯乙腈镇咳作用研究 实验动物灌胃给药。分组及给药剂量如 Tab 3: A 炒白芥子组(含 4.500 g · kg⁻¹ · d⁻¹ 炒白芥子生药的醇提液,其中含对羟基苯乙腈 0.022 5 g · kg⁻¹ · d⁻¹)、B 对羟基苯乙腈低剂量组、C 对羟基苯乙腈中剂量组、D 对羟基苯乙腈高剂量组。在 d 7 给药 30 min 后,参照“2.2”进行引咳实验。

2.6 统计学处理 所得数据用 SPSS 10.0 软件处理,首先进行正态分布及方差齐性检验,统计结果表明,数据符合正态分布,但方差不齐,故采用近似 *t* 检验,即 *t'* 检验。

3 结果

3.1 炒制前后白芥子中对羟基苯乙腈含量的变化 进样浓度(*X*)对峰面积(*Y*)的直线回归方程为 $Y = 5.841 \times 10^3 X + 3.573 \times 10^3$, $r = 0.999 6$;线性范围 0.5 ~ 2.5 mg。由 Tab 1 可见白芥子中对羟基苯

乙腈含量随着炒制时间的延长而增加。白芥子炒制 5 min 后,其中对羟基苯乙腈的含量是生白芥子的 5.5 倍,白芥子炒制 10 min 后其中对羟基苯乙腈的含量是生白芥子的 7.5 倍。

Tab 1 Comparison of p-hydroxyphenylacetone nitrile content between fresh and roasted sinapis alba seeds

Sample	Concentration of p-hydroxyphenylacetone nitrile / %
Fresh sinapis alba seeds	0.094
Roasted sinapis alba seeds(5 min)	0.515
Roasted sinapis alba seeds(10 min)	0.706

3.2 炒白芥子与生白芥子镇咳作用比较 如 Tab 2 所示,与阴性对照组相比,生白芥子能够延长实验动物的咳嗽潜伏期,但抑制实验动物 2 min 内咳嗽次数作用不明显;炒白芥子具有明确的镇咳作用。与生白芥子相比,相同剂量情况下,炒白芥子延长实验动物咳嗽潜伏期、抑制实验动物 2 min 内咳嗽次数的效果均优于生白芥子,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

Tab 2 Comparison of antitussive action between fresh and roasted sinapis alba seeds ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

Group	Dose / g · kg ⁻¹ · d ⁻¹	Cough latent period / s	Cough times in 2min
A Negative	-	6.229 ± 2.274	27.357 ± 9.312
B Fresh sinapis alba seeds	4.500	14.243 ± 3.471*	23.125 ± 8.413
C Roasted sinapis alba seeds	4.500	25.774 ± 6.903*#	15.800 ± 3.942*#

* $P < 0.05$ vs negative control group; # $P < 0.05$ vs fresh seeds of sinapis alba group

3.3 对羟基苯乙腈的制备 200 g 醋酸乙酯萃取物经多次柱色谱分离及重结晶得到无色棱柱状结晶, mp 66 °C ~ 67 °C (氯仿)。EI-MS m/z : 133 [M^+], 132, 106, 105, 78, 77, 51, 50, 39。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.15 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.83 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 5.87 (1H, brs, OH), 3.62 (2H, s, H-2)。¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 155.4 (C-4'), 129.1 (C-2', 6'), 121.3 (C-1'), 118.2 (-CN), 115.9 (C-3', 5'), 22.9 (C-2)。以上数据经与文献^[6]及 Sadtler 光谱^[7]中对羟基苯乙腈对照基本一致,故鉴定其为对羟基苯乙腈。

3.4 对羟基苯乙腈镇咳作用研究 由 Tab 3 可知,与阴性对照 A 组相比,对羟基苯乙腈具有明确的镇咳作用,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与 B 炒白芥子组相比,对羟基苯乙腈的低剂量组与炒白芥子镇咳效果相当,对羟基苯乙腈的中剂量组,其抑制实

验动物 2 min 内咳嗽次数效果优于炒白芥子,对羟基苯乙腈的高剂量组,其延长实验动物引喘潜伏期、抑制实验动物 2 min 内咳嗽次数作用均优于炒白芥子。

Tab 3 The antitussive effect of p-hydroxyphenylacetoneitrile (n = 6)

Group	Concentration of p-hydroxyphenylacetoneitrile g · kg ⁻¹ · d ⁻¹	Cough latent period /s	Cough times in 2 min
A Negative	-	6.229 ± 2.274 [#]	27.357 ± 9.312 [#]
B Roasted sinapis alba seeds	0.0225	25.774 ± 6.903 [*]	15.800 ± 3.942 [*]
C Low dose of p-hydroxyphenylacetoneitrile	0.0225	24.078 ± 5.449 [*]	14.086 ± 2.461 [*]
D Medium dose of p-hydroxyphenylacetoneitrile	0.0675	27.252 ± 7.485 [*]	13.644 ± 3.122 ^{* #}
E High dose of p-hydroxyphenylacetoneitrile	0.1350	32.318 ± 9.246 ^{* #}	12.021 ± 3.867 ^{* #}

* P < 0.05 vs negative control group; # P < 0.05 vs the roasted sinapis alba seeds group

4 讨论

中药炮制工艺是中医临床用药的一大特色。中药在炮制过程中发生了某些成分的变化,因而导致其药理活性的变化。研究中药材的炮效关系对于分析中药药效物质基础具有一定的指导意义。

白芥子临床入药以炒制法为主,本研究结果显示,炒白芥子镇咳活性明显优于生白芥子,这说明炒制法可以提高白芥子中镇咳药效成分含量。我们对炒白芥子和生白芥子的化学成分进行对比分析,结果显示,炒制后对羟基苯乙腈含量明显增加,白芥子炒制 10 min 后,其中对羟基苯乙腈含量是炒制前的 7.5 倍。依据炮效关系进行分析,对羟基苯乙腈很可能是白芥子镇咳的药效成分,本研究在此基础上,分离纯化出对羟基苯乙腈并对其镇咳作用进行考察,结果发现,对羟基苯乙腈具有明确的镇咳作用,其延长实验动物咳嗽潜伏期、抑制实验动物 2 min

内咳嗽次数效果明显优于空白对照组,可以确定对羟基苯乙腈为白芥子镇咳药效成分。对羟基苯乙腈在延长实验动物咳嗽潜伏期方面具有一定的量效关系,中剂量的对羟基苯乙腈抑制实验动物 2 min 内咳嗽次数作用效果优于炒白芥子。高剂量的对羟基苯乙腈镇咳效果尤为明显,其延长实验动物咳嗽潜伏期、抑制 2 min 内咳嗽次数效果均优于炒白芥子,组间差异有显著性 (P < 0.05)。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中国药典 I 部 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 110.

[1] China Pharmacopoeia Committee. *Chinese Pharmacopoeia Part I* [S]. Beijing: Chemical Industry Publisher, 2005: 110.

[2] 张学梅, 刘凡亮, 梁文波, 等. 白芥子提取物的镇咳、祛痰及平喘作用研究 [J]. 中草药, 2003, 34(7): 635 - 7.

[2] Zhang X M, Liu F L, Liang W B, et al. Antitussive, expectorant and antiasthmatic effects of Brassica alba extracts [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* 2003, 34(7): 635 - 7.

[3] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 716.

[3] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Traditional Chinese Medicine* [M]. Shanghai: Shanghai People Press, 1977: 716.

[4] 冯宝民, 余正江, 段礼新, 等. 炒白芥子中化学成分的研究 [J]. 天津: 中草药, 2008, 39(3): 331 - 3.

[4] Feng B M, Yu Z J, Duang L X, et al. Chemical constituents of roasted sinapis seeds [J]. *Tianjin: Chin Tradit Herbal Drugs* 2008, 39(3): 331 - 3.

[5] 罗集鹏. 生药学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 336.

[5] Luo J P. *Pharmacognosy* [M]. Beijing: Chinese Medicine Science and Technology Press, 2005: 336.

[6] 吕秋军. 新药药理学研究方法 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 334 - 6.

[6] Lü Q J. *Methodology of new drug research in pharmacology* [M]. Beijing: Chemical Industry Publisher, 2007: 334 - 6.

Study on antitussive substance of sinapis alba seeds based on the relationship between drug processing and activity

FENG Bao-min², QIU Lin¹, CHEN Qi-peng², WANG Hui-guo¹,

SHI Li-ying¹, JIANG Ge¹, TANG Ling¹, WANG Yong-qi¹, YUAN Yan-xia¹

(1. Institute of Materia Medica; Bio-engineering College of Dalian University, Dalian Liaoning 116622, China;

2. Dalian Zhong shan District Center for Disease Control and Prevention, Dalian Liaoning 116013, China)

Abstract: Aim To study the antitussive substance of sinapis alba seeds through the relationship between processing and the activity. **Methods** Compare the ingredient content between fresh and roasted sinapis alba seeds by HPLC. The experimental animal cough symptoms were evoked by 0.25 ammonia. Researchers com-

pared the antitussive effects between fresh and roasted sinapis alba seeds by cough latent period and cough frequency within 2 minutes. The p-hydroxyphenylacetoneitrile that increased markedly after roasting was separated, and the antitussive effect of p-hydroxyphenylacetoneitrile was tested. **Results** After being roasted, the

糖尿病大鼠肾脏水通道蛋白-2 mRNA 的表达及黄芪的调节作用

穆鑫¹ 袁霞¹ 康白² 何国荣¹ 杜冠华¹

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; 2. 潍坊医学院药理学教研室, 山东 潍坊 261042)

中国图书分类号: R-332; R 282. 71; R 322. 61; R 587. 105. 31
文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2010)09-1176-04
摘要: 目的 观察黄芪注射液(*astragalus membranaceus*, AM)对链脉佐菌素(*streptozotocin*, STZ)诱导糖尿病(*diabetes mellitus*, DM)大鼠肾脏髓质水通道蛋白-2(*aquaporin-2*, AQP-2)基因表达的影响,以探讨黄芪治疗糖尿病分子生物学机制。方法 实验大鼠分为4组:正常组、糖尿病模型组、AM小剂量组和AM大剂量组,后两组应用AM 5、10 g·kg⁻¹·d⁻¹腹腔注射6周,测定各组大鼠血糖、血清胰岛素及C肽水平,用代谢笼法测定各组大鼠24 h尿量,RT-PCR方法测定各组大鼠肾 AQP-2 mRNA 的表达。结果 糖尿病大鼠血糖水平明显增高,血清胰岛素及C肽水平明显下降,单用黄芪注射液治疗对血糖、血清胰岛素和C肽水平无明显影响,但黄芪治疗可使糖尿病大鼠尿量明显增加。RT-PCR检测发现糖尿病大鼠肾髓质 AQP-2 mRNA 的表达明显上调,黄芪治疗可使其表达下降。结论 黄芪治疗糖尿病利尿消肿、改善水平衡代谢紊乱的作用可能与其降低肾髓质 AQP-2 mRNA 的表达有关。

关键词: 水通道蛋白-2; 糖尿病; 黄芪注射液; 水代谢; 尿量; RT-PCR

收稿日期: 2010-05-10, 修回日期: 2010-06-10

基金项目: 重大新药创制科技重大专项-综合性新药研究开发技术大平台(No 2009YZH-LCH07); 卫生部行业基金资助项目(No 200802041)

作者简介: 穆鑫(1981-),男,博士,助理研究员, Tel: 010-63165211, E-mail: muxin@imm.ac.cn;
康白(1955-),女,教授,硕士生导师,研究方向: 内分泌药理学,通讯作者, Tel: 0536-2602725, E-mail: kb615@163.com

antitussive effect and the p-hydroxyphenylacetonitrile content of *sinapis alba* seeds were markedly enhanced. Compared with the negative group, p-hydroxyphenylacetonitrile had stronger antitussive effect and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with roasted *sinapis alba* seeds group, middle and high dose p-hydroxyphenylacetonitrile produced higher antitussive effect. **Conclusions** The antitussive effect and the level of p-hydroxyphenylacetonitrile in *sinapis alba*

糖尿病(*diabetes mellitus*, DM)是一种常见的内分泌疾病,常伴有内分泌调节紊乱及水钠代谢障碍,肾脏病变尤为突出。以往认为糖尿病患者多尿的症状是由于高血糖引起的渗透性利尿,而最近研究发现^[1]水通道蛋白也在其尿液浓缩及水代谢失调过程中发挥重要作用。在1、2型糖尿病人和糖尿病动物模型中均发现血管加压素(AVP)浓度增加数倍,AVP的增加很可能是机体的一种代偿反应,而水通道蛋白-2(*aquaporin-2*, AQP-2)是唯一受AVP调节的水通道蛋白。更令人感兴趣的是糖尿病机体排泌增加的部位和AQP-2存在的部位都是肾脏的集合管,故AQP-2在糖尿病尿液的浓缩过程中的表达引起人们的关注^[2]。

近年来实验研究发现^[3]黄芪对糖尿病大鼠精氨酸血管加压素系统的异常有明显的改善作用,并可纠正其下丘脑血管加压素的过度表达,而AQP-2是目前比较明确的唯一的AVP调节集合管水通透性的靶分子,黄芪治疗糖尿病利尿消肿改善糖尿病水平衡代谢紊乱的作用是否与影响AQP-2的分布与表达有关,国内外尚未见报道。因此,本实验旨在研究糖尿病大鼠肾脏集合管中AQP-2 mRNA的表达水平及黄芪对其的影响,揭示黄芪治疗糖尿病分子生物学机制,为该药的临床应用提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, ♂, 180~220 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号: SCXK(京)2007-0001。

seeds increased after being roasted. The antitussive effects of p-hydroxyphenylacetonitrile is significant and p-hydroxyphenylacetonitrile is antitussive substance of *sinapis alba* seeds.

Key words: relationship between drug processing and activity; p-hydroxyphenylacetonitrile; cough latent period; cough frequently; pharmacodynamic substance; roasted *sinapis alba* seeds; HPLC