·实验研究·

野鸢尾苷的制备及其对小鼠离体小肠平滑肌调节作用研究

熊　豪[1],高　萌[2],杨元丰[1],郭文慧[1],单家明[1],朱文杰[1],杨武亮[1]
(江西中医药大学 1 现代中药制剂教育部重点实验室,2 中医学院,南昌 330004)

[摘要]　**目的:**从中药川射干中分离制备野鸢尾苷单体,初步探究野鸢尾苷对小鼠离体小肠平滑肌调节作用。**方法:**采用多溶剂萃取法制备野鸢尾苷,采用改良的 Ellman 比色法探究野鸢尾苷对乙酰胆碱酯酶(AChE)活性的影响;并结合采用离体小肠平滑肌实验方法,取小鼠小肠平滑肌,在 K-H 液中制备小肠平滑肌环,通过 BL-420S 生物机能实验系统测定其张力的变化,观察野鸢尾苷对小鼠离体小肠平滑肌静息张力及对新斯的明、碘解磷定诱导小肠平滑肌收缩的影响。**结果:**多溶剂萃取法所得的野鸢尾苷单体,经 HPLC 峰面积归一化法计算其纯度 >98%;野鸢尾苷对 AChE 活性具有抑制作用,其 IC_{50} 为 4.09 mg·mL^{-1},且呈剂量依赖关系;野鸢尾苷(0.014 ~4.604 mg·mL^{-1})对正常小鼠离体小肠收缩有明显的兴奋作用,且抑制作用呈剂量依赖性,野鸢尾苷对胆碱酯酶复活剂碘解磷定引起小肠收缩抑制有显著性的拮抗作用($P<0.05$),对胆碱酯酶抑制剂新斯的明促进小肠运动没有显著性协同作用($P>0.05$)。**结论:**多溶剂萃取法是一种简单、高效的分离制备川射干中野鸢尾苷的方法;野鸢尾苷具有抑制 AChE 的拟胆碱作用,可促进小肠收缩运动,有望成为 AChE 抑制剂的候选物。

[关键词]　川射干;野鸢尾苷;多溶剂萃取;离体实验;乙酰胆碱酯酶抑制作用;小肠平滑肌
[中图分类号] R932　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003 -3734(2023)15 -1578 -07

Preparation of iridin and its regulatory effect on isolated mouse intestinal smooth muscle

XIONG Hao[1], GAO Meng[2], YANG Yuan-feng[1], GUO Wen-hui[1], SHAN Jia-ming[1], ZHU Wen-jie[1], YANG Wu-liang[1]
(1 *Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine*, *Ministry of Education*, 2 *College of Traditional Chinese Medicine*, *Jiangxi University of Chinese Medicine*, *Nanchang* 330004, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To isolate and prepare iridin monomer from traditional Chinese medicine Iridis tectori Rhizoma, and to explore the regulatory effect of iridin on the isolated intestinal muscle *in vitro*. **Methods**: The multi-solvent extraction method was used to prepare Iridin. The effect of iridin on acetylcholinesterase (AChE) activity was studied by modified Ellman colorimetry. The isolated intestinal muscle experiment was used for *in vitro* evaluation. In this study, the mouse small intestinal smooth muscle was obtained, from which the small intestinal smooth muscle ring was prepared in K-H solution. The change of the tension was measured by the BL-420S biological function experimental system. The resting tension and its effects on the contraction of small intestinal smooth muscle induced by neostigmine and pralidoxime iodide were investigated. **Results**: The iridin monomer obtained by the multi-solvent extraction method has a purity of over 98% calculated by the HPLC peak area normalization method. Iridin had inhibitory effect on AChE activity with a dose-dependent manner, and its half-inhibitory concentration

[基金项目]　博士启动基金资助项目(2021WBZR003)
[作者简介]　熊豪,男,硕士,主要从事中药药效物质基础与质量评价研究。E-mail:2455386979@qq.com。
[通讯作者]　杨武亮,男,教授,主要从事中药药效物质基础与质量评价研究。E-mail:yangwuliang@163.com。

(IC_{50}) is 4.09 mg·mL^{-1}. Iridin (0.014 ~ 4.604 mg·mL^{-1}) had obvious excitatory effect on the contraction of isolated small intestine in normal mice, and the inhibitory effect was dose-dependent. Iridin had a significant antagonistic effect on the inhibition of small intestinal contraction caused by the cholinesterase revitalizer iodopyridine ($P<0.05$), but had no significant synergistic effect on promoting the small intestinal motility by the cholinesterase inhibitor neostigmine ($P>0.05$). **Conclusion**: Multi-solvent extraction method is a simple and efficient method for the isolation and preparation of iridin in Iridis tectori Rhizoma, and iridin has the cholinergic effect on inhibiting AChE. It can promote the contraction of the small intestine, and is expected to be a candidate for ache inhibitor.

[**Key words**] Iridis tectori Rhizoma; iridin; multi-solvent partition; *in vitro* experiment; acetylcholinesterase inhibition; intestinal smooth muscle

中药川射干(Iridis tectori Rhizoma)为鸢尾科鸢尾(*Iris tectorum* Maxim.)多年生草本植物的干燥根茎,具有清热解毒、祛痰、利咽的功效[1]。川射干以“鸢尾”之名收载于《神农本草经》,其功效:主蛊毒,邪气,鬼注,诸毒,破症瘕积聚,去水,下三虫[2];在民间用于治疗“消食积胀满,扁桃腺炎及跌打损伤”等[3],食积胀满和便秘状态下能起到消食积胀满的功效,贵州某药厂利用川射干的消食积、消气积的功效,单用打粉制成了消积通便胶囊新药,并获取批准文号[4];四川省中医药研究院自主研发的川射干黄酮胶囊,用于治疗咽喉肿痛等疾病,另外将腹痛、腹泻,稀便、胃灼热等胃部不适作用认为是其消化系统不良反应[5]。表明川射干在中医临床的主要功效在清热解毒和泻下通便两方面,但《中华人民共和国药典》并没有提到川射干的泻下通便这个比较重要的功效。野鸢尾苷是川射干活性成分之一,具有较强的抗炎[6]、解热[7]、镇痛[8]、止咳平喘[9]等作用,但无泻下通便作用及机制的文献报道。现代研究证明黄酮类化合物具有抗炎的作用,同时具有抑制乙酰胆碱酯酶(AChE)的作用[10-12],对胃肠道自发性收缩产生促进或抑制作用[13-14]。野鸢尾苷属于异黄酮类化合物,为探究野鸢尾苷是否为川射干的泻下通便活性成分,本实验采用多溶剂萃取法[15-16],从川射干提取物中制备高纯度的野鸢尾苷,用于探究其对 AChE 活性的影响,初步揭示野鸢尾苷对小鼠离体小肠平滑肌的调节作用,为揭示川射干泻下通便药效物质基础及质量评价提供科学依据。

材料与方法

1 试药与试剂

野鸢尾苷对照品(成都埃法生物科技有限公司,批号:AF20091506,纯度≥98.0%,化学结构式见图 1);野鸢尾苷样品(自制,^{1}H-和^{13}C-NMR,ESI-MS 鉴定结构,含量采用 HPLC 峰面积归一化法计算≥98%);AChE(220 u·g^{-1},批号:830H021)、碘化乙酰硫代胆碱(ATCI,纯度≥99.0%,批号:830I021)、5,5′-二硫代二硝基苯甲酸(DTNB,纯度≥99.0%,批号:809Q051)均购自北京索莱宝生物科技有限公司;十二烷基硫酸钠(SDS,分析纯,阿拉丁试剂有限公司,批号:310A032);乙腈(美国 TEDIA 公司,HPLC 级);新斯的明(上海信宜金珠药业有限公司,批号:H31022770)、碘解磷定(开封制药有限公司,批号:H41022180)、超纯水(自制,四川沃特尔科技有限发展有限公司)、K-H 营养液(1 000 mL 超纯水中含有 NaCl 8.02 g,KCl 0.344 g,$MgCl_2$ 0.254 g,$CaCl_2$ 0.202 g,$NaHCO_3$ 2.125 g,KH_2PO_4 0.16 g 以及葡萄糖 2.189 g),以上各试剂均为国产分析纯。川射干药材为 2020 年购于江西樟树天齐堂中药饮片有限公司,经江西中医药大学药用植物学科组葛菲教授鉴定为川射的干燥根茎。

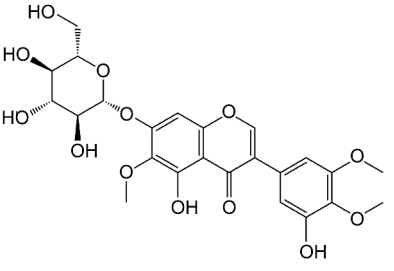


图 1 野鸢尾苷化学结构式

2 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);BT 224 S 万分之一电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);PS－80A 型数码超声波清洗机(深圳市洁康洗净电器有限公司);UPQ－YY600A 型

全自动液液萃取仪(北京优谱通用科技有限公司);BL420S 生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司);HW400E 型恒温平滑肌槽(成都泰盟科技有限公司),JH2 型肌张力换能器(北京航天医学工程研究所,50 g);TMWAVE 软件(成都泰盟软件有限公司)。

3 动物

昆明小鼠若干,雌雄各半,体重(20 ± 2) g,购于江西中医药大学动物中心,许可证号:SCXK(赣)2019-0004。本实验所涉及的动物实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会批准,符合相关动物伦理规范。

4 野鸢尾苷的制备

取 5 kg 川射干药材,烘干、粉碎并过三号筛[1],80% 乙醇回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,浓缩至无醇味,得稠浸膏,取适量浸膏加水分散,用乙酸乙酯萃取,萃取 6 次,合并萃取液,浓缩至干,得乙酸乙酯萃取部位 28.5 g(野鸢尾苷占比为 37.96%,含量约为 10.82 g)。乙酸乙酯萃取部位干粉用甲醇-石油醚-水(1∶10∶10)为溶剂系统,萃取 6 次,分取有机层,浓缩至干,用乙酸乙酯溶解,反复重结晶 4 ~ 5 次,得到野鸢尾苷 6.9 g,收率为 63.77%。经 ^{1}H-和 ^{13}C-NMR,ESI-MS 鉴定结构,含量采用 HPLC 峰面积归一化法计算 >98%。

5 对照品溶液的制备

取野鸢尾苷对照品适量,精密称定,置于 25 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得含野鸢尾苷浓度为 0.210 4 mg·mL^{-1} 的对照品溶液,备用。

6 色谱条件

采用 Diamonsil C_{18} 柱(150 mm × 4.6 mm,5 μm),以乙腈(B)-0.1% 磷酸水(A)为流动相,梯度洗脱(0 ~ 60 min,95% ~ 55% A),流速 1.0 mL·min^{-1},柱温为 50 ℃,检测波长为 265 nm,进样量 10 μL。

7 野鸢尾苷对 AChE 活性的影响

7.1 溶液配置 取野鸢尾苷样品适量,精密称定,置于 50 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得含野鸢尾苷浓度为 10 mg·mL^{-1} 的母液。再精密吸取适量母液,用双蒸水稀释得到 0.062 5,0.125,0.25,0.50,0.75,1.00,1.50,2.00 mg·mL^{-1} 的野鸢尾苷样品溶液,置 4 ℃冰箱备用。

7.2 实验分组 本实验采用改良的 Ellman 比色法[17-18]进行测定,其基本原理:碘化乙酰硫代胆碱(ATCI)在 AChE 催化作用下发生水解,生成硫代胆碱,进而硫代胆碱与 5,5′-二硫代二硝基苯甲酸(DTNB)反应产生 2-硝基-5-巯基苯甲酸(TNB),因 TNB 在 412 nm 处具有吸光度值(A),故可通过酶标仪对其进行测定。

利用上述测定原理,对野鸢尾苷进行抑制酶活性测定。实验分为 3 组,分别为空白组、样品组、阴性对照组,在 96 孔酶标板中依次加入 110 μL 的 PBS 缓冲溶液,20 μL 的 AChE,30 μL 的 DTNB,30 μL 的 ATCI,置于 37 ℃恒温摇床中孵育反应,待其显色后,立即加入 10 μL 的 SDS 终止反应并测定 A 值,每组各做 3 次平行实验,使各复孔总体积为 200 μL。根据以下公式计算其抑制率。

$$抑制率/\% = (A_{空白} - A_{样品})/(A_{空白} - A_{阴性}) \times 100\%$$

其中,$A_{空白}$ 指空白组吸光度值,$A_{样品}$ 指样品组吸光度值,$A_{阴性}$ 指阴性对照组吸光度值。

8 野鸢尾苷对小鼠离体小肠平滑肌影响

8.1 样品溶液配置 精密称取野鸢尾苷适量置于 25 mL 容量瓶中,加入适量的超纯水(加入少量甲醇助溶)溶解并定容至刻度,摇匀,得到含野鸢尾苷浓度为 5 mg·mL^{-1} 的母液,再吸取适量母液,稀释得到 0.014 mg·mL^{-1} 的野鸢尾苷样品溶液;采用微量进样器吸取适量规格为 2 mL∶1 mg 的甲硫酸新斯的明注射液,置于 25 mL 容量瓶中,加超纯水定容至刻度,摇匀,即得含甲硫酸新斯的明浓度为 1.2 μg·mL^{-1} 的溶液;取碘解磷定样品适量,精密称定,置于 25 mL 容量瓶中,加超纯水溶解并定容至刻度,摇匀,即得含碘解磷定浓度为 1.2 μg·mL^{-1} 的溶液,以上所有样品均置于 4 ℃冰箱备用。

8.2 小鼠离体小肠平滑肌的制备 实验前小鼠禁食 12 h,自由饮水,取健康小鼠脱颈处死,迅速取出小肠,用 K-H 营养液将内容物漂洗干净,截取备用小肠段约 1 cm,置于 4 ℃的 K-H 营养液中备用。用细线将小段肠管悬挂于通气管和张力换能器之间,置于盛有 20 mL 的 K-H 营养液的组织浴槽中,调节水温至 37.5 ℃,通入 95% O_2 和 5% CO_2 混合气体,气泡量约为 70 个·min^{-1},采用 BL-420S 生物机能实验系统软件记录肌张力的变化。

8.3 野鸢尾苷对正常小鼠离体小肠平滑肌的作用 待离体小肠标本稳定后,每隔 5 min 采用微量进样针吸取适量体积(10,20,50,100,200,500,1 000,2 000 μL)的野鸢尾苷溶液,使其累积终浓度分别达

到 0.014,0.042,0.113,0.253,0.528,1.194,2.515,4.604 mg·mL^{-1},观察不同浓度的野鸢尾苷溶液对小鼠离体小肠平滑肌的作用。

8.4 野鸢尾苷对新斯的明、碘解磷定诱导小鼠离体小肠平滑肌的影响 为进一步考察野鸢尾苷对离体小肠平滑肌的作用机制,待 BL-420S 生物机能实验系统记录的正常小鼠离体小肠平滑肌收缩曲线稳定后,分别加入新斯的明、碘解磷定溶液到组织槽中对正常小鼠离体小肠预诱导,记录单用工具药(新斯的明、碘解磷定)对正常小鼠离体小肠振幅的变化率。5 min 后,再加入野鸢尾苷溶液,计算野鸢尾苷溶液对工具药孵育后的小肠的振幅的变化率,用于评价野鸢尾苷对上述工具药的拮抗和协同作用。为避免药物的相互影响,每次换工具药时均换新的小肠肌条,每个药物的实验至少采用了 6 条不同的小肠肌条进行实验。使用 TM-WAVE 软件测量小肠收缩振幅,计算每次给药前后 1 min 内的平均振幅变化,给药前后离体小肠振幅变化率反映药物对小肠自发性收缩影响,根据以下公式计算其振幅(amplitude,以下简称 A)变化率。

$$A/\% = (A_2 - A_1)/A_1 \times 100\%$$

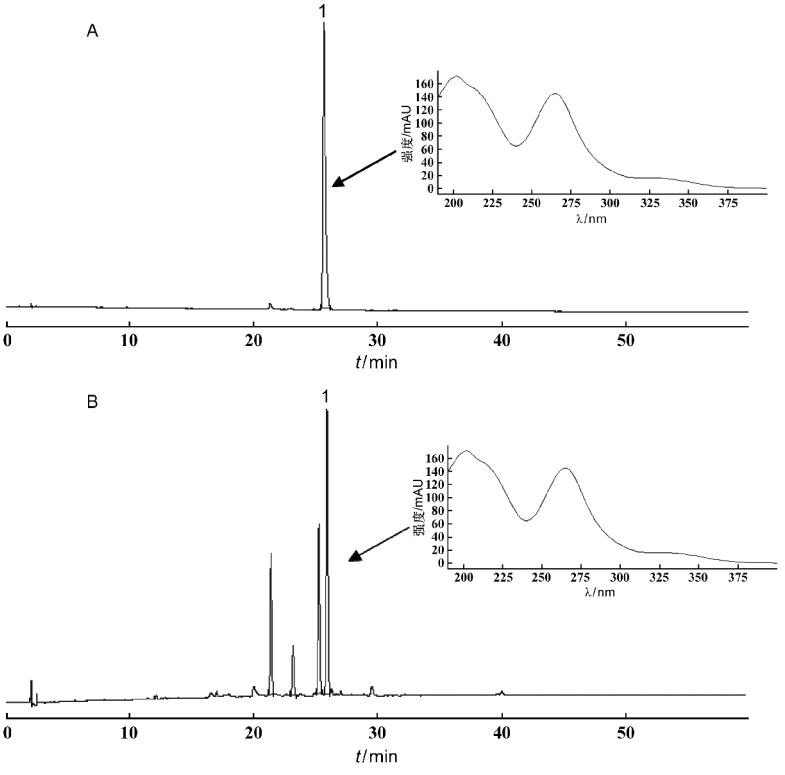
其中 A 指振幅变化率,A_1 指给药前 1 min 内的平均振幅,A_2 指给药后 1 min 内的平均振幅。

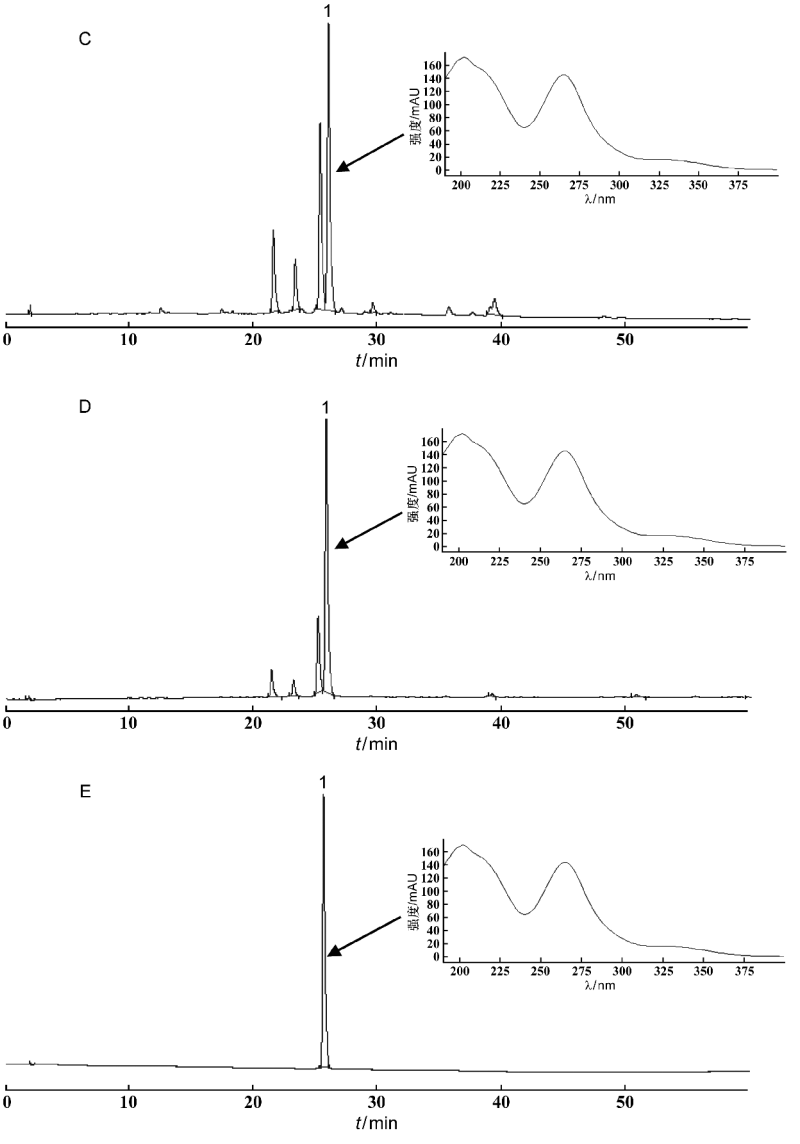
8.5 统计学分析 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 TM-WAVE 软件测量小肠收缩振幅,采用 GraphPad Prism 8.0.1 数据处理软件进行方差分析和多组间均数比较,$P < 0.05$ 为有显著性差异。

结 果

1 野鸢尾苷的制备

采用多溶剂萃取法,将野鸢尾苷从川射干醇提的乙酸乙酯萃取部分(见图 2B)中进行萃取、分离、纯化,经^{1}H-和^{13}C-NMR,ESI-MS 鉴定结构,含量采用 HPLC 峰面积归一化法计算 >98%(见图 2E)。本实验先采用单溶剂萃取法,考察了三氯甲烷、二氯甲烷、石油醚(30 ℃ ~60 ℃)和石油醚(60 ℃ ~90 ℃)等不同极性的溶剂对射干醇提乙酸乙酯部位中野鸢尾苷萃取,结果表明各溶剂萃取物中野鸢尾苷含量的比值无明显差异(见图 2B 和图 2C),故无法用单溶剂萃取法将其分离,故采用甲醇-石油醚-水(1∶10∶10)为分离射干醇提乙酸乙酯部位中野鸢尾苷的多溶剂萃取法,可将野鸢尾苷从乙酸乙酯部位分离出来(见图 2B 和图 2D),经过重结晶,得到纯度 >98.0% 的野鸢尾苷单体。





1:野鸢尾苷

图 2 对照品(A)、乙酸乙酯部位(B)、二氯甲烷单溶剂萃取物(C)、多溶剂萃取物(D)及野鸢尾苷样品(E)的 HPLC 图和质谱图

2 野鸢尾苷对 AChE 抑制活性影响

本实验中 AChE 的活性主要受酶浓度、底物浓度和孵育时间的影响,在确定药物对 AChE 活性影响的最佳条件下(即酶浓度为 0.15 U·mL^{-1},底物浓度为 1 mmol·L^{-1},孵育时间为 5 min),其实验结果见图 3。从抑制率曲线图显示野鸢尾苷对 AChE 活性的抑制率线性回归方程分别为:$y = 10.359x + 7.607$($R^2 = 0.973$),IC_{50}为 4.09 mg·mL^{-1},野鸢尾苷对 AChE 活性表现出一定抑制作用,抑制作用与药物浓度具有剂量依赖关系。

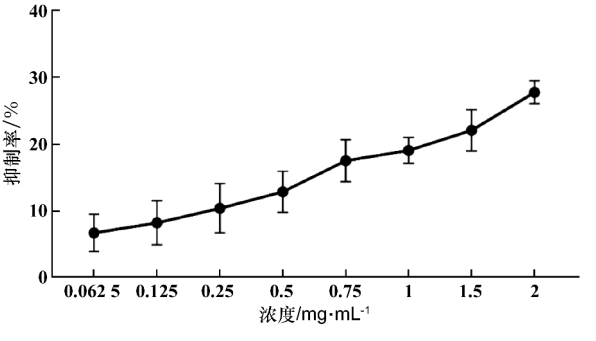


图 3 野鸢尾苷对 AChE 活性抑制的影响($n = 3$)

3 野鸢尾苷对小鼠离体小肠平滑肌的影响

结果见图 4,给药体积为 0 μL 时,小肠的收缩频率和振幅较稳定,处于平衡阶段,波形无明显变化,故作为空白对照。继而加入野鸢尾苷溶液进行实验,整体来看,野鸢尾苷的积累给药体积在 0.014 ~ 4.604 mg·mL^{-1}(10 ~ 2 000 μL)内,对正常小鼠离体小肠收缩具有抑制作用,表现为振幅变化率和张力的减小,并且随着累积给药体积的增加,抑制作用逐渐增强,且呈剂量依赖性,具有显著差异($P<0.05$)。

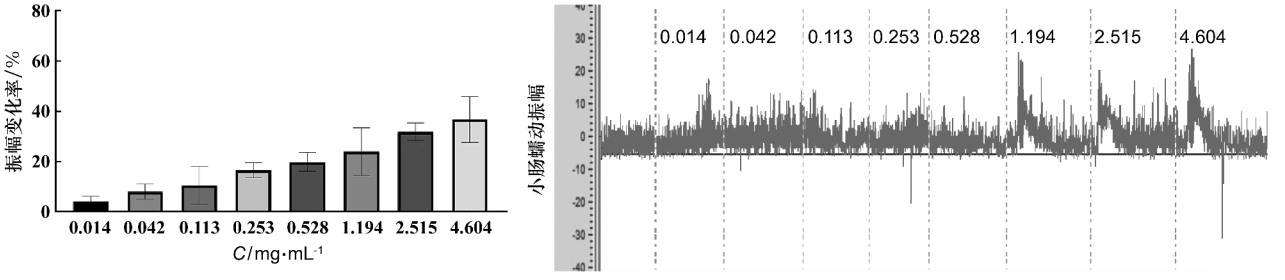
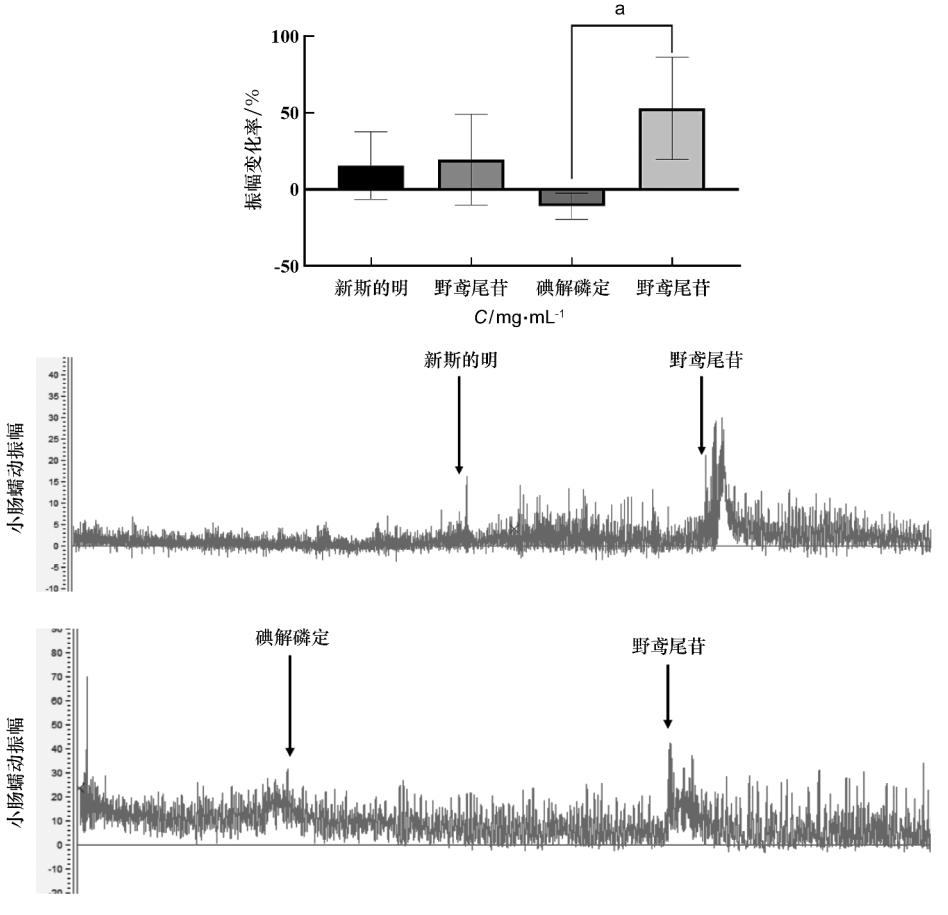


图 4 不同浓度的野鸢尾苷溶液对小鼠离体小肠平滑肌作用的量效关系($n=6$)

4 野鸢尾苷对新斯的明、碘解磷定诱导小鼠离体小肠平滑肌的影响

野鸢尾苷对新斯的明、碘解磷定诱导小鼠离体小肠平滑肌的影响,实验结果见图 5。野鸢尾苷在 1.286 mg·mL^{-1}对胆碱酯酶活化剂碘解磷定(1.2 μg·mL^{-1})诱导的小肠舒张,具有显著性的拮抗作用($P<0.05$);对胆碱酯酶抑制剂新斯的明(1.2 μg·mL^{-1})引起的小肠收缩张力没有显著协同作用($P>0.05$)。



与野鸢尾苷组比较,a:$P<0.05$

图 5 野鸢尾苷对新斯的明和碘解磷定诱导后小肠平滑肌作用的量效关系($n=6$)

讨　　论

1　野鸢尾苷的制备

多溶剂萃取法是由至少 2 种溶剂混合组成的萃取溶剂和由至少 1 种溶剂组成的分相液共同构成的三元两相溶液体系,采用液-液萃取原理,利用系统中目标化合物在两相混合溶剂中的溶解度差异进行萃取和分离[15-16]。本实验首次采用多溶剂萃取法分离制备川射干中的野鸢尾苷,所得高纯度化合物可用于对小鼠离体小肠平滑肌作用机制研究。该多溶剂萃取法是一种简单、高效的分离制备川射干中野鸢尾苷的方法,可为野鸢尾苷标准物的制备提供新方法,也为其他化合物的分离制备提供了新思路。

2　野鸢尾苷对 AChE 活性的影响

AChE 是生物神经传导中催化乙酰胆碱的关键水解酶[10],可影响大脑中神经递质的正常传导,并且乙酰胆碱也是胃肠道中的神经递质之一[19],当副交感神经兴奋时,乙酰胆碱激活可溶性鸟苷酸环化酶,调节 cGMP(神经系统调节胃肠平滑肌收缩活动信息传递的第二信使)的合成,从而控制胃肠平滑肌收缩[20]。从图 3 结果可知,野鸢尾苷在体外对 AChE 表现出一定的抑制效果,呈剂量依赖关系。因此,推测野鸢尾苷可能通过抑制 AChE 的活性,达到相对增加乙酰胆碱的含量,从而起到促进胃肠运动的作用。

3　野鸢尾苷对小鼠离体小肠平滑肌影响

乙酰胆碱是肠道运动中最重要的神经递质,主要作用于肠道平滑肌 M 受体(G 蛋白偶联受体),可兴奋胃肠道平滑肌,使其肠道收缩幅度、张力、蠕动增加。野鸢尾苷溶液对离体小肠平滑肌表现抑制作用,且对胆碱酯酶活化剂碘解磷定诱导的小肠舒张,具有明显的非竞争性拮抗作用。

胃肠动力是一系列精确协调的平滑肌收缩和松弛的结果,由一组肌群的节律性收缩、多组肌群的协调舒缩及特殊的推进性收缩完成[21]。研究证实,乙酰胆碱在消化系统产生兴奋性活动,促进胃肠平滑肌收缩,而高浓度可致小肠痉挛[22]。乙酰胆碱对胃肠系统具有双向调节作用,因此,导致野鸢尾苷溶液对离体小肠平滑肌表现抑制作用,而对胆碱酯酶活化剂碘解磷定诱导的小肠舒张表现拮抗作用。上述研究结果表明野鸢尾苷可能是川射干发挥泻下通便作用的药效物质基础。

综上所述,多溶剂萃取法是一种简单、高效的分离制备射干中野鸢尾苷的方法,野鸢尾苷具有抑制 AChE 的拟胆碱作用,可促进小肠收缩运动,有望成为 AChE 抑制剂的候选物。

[参 考 文 献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[2] 魏·吴普等述. 神农本草经[M]. 南宁: 广西科学技术出版社. 2016: 122.

[3] 江西药科学校革命委员会. 草药手册[M]. 南昌: 江西药科学校, 1970.

[4] 贵州神奇药业有限公司. 消积通便胶囊: 批准文号: 国药准字 Z20043596.

[5] 四川逢春制药有限公司. 川射干黄酮胶囊: 批准文号: 国药准字 Z20140008.

[6] GAO B, MA Y, ZHANG LT, *et al*. Identification and characterization of the chemical components of *Iris tectorum* Maxim. and evaluation of their nitric oxide inhibitory activity[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2021, 35(1): e8959.

[7] 宁楠, 刘亚灵, 李利民, 等. 咽喉康胶囊对大鼠的解热作用[J]. 华西药学杂志, 2009, 24(6): 681-682.

[8] 袁崇均, 陈帅, 罗森, 等. 川产道地药材川射干系统开发研究[J]. 四川中医, 2016, 34(10): 220-223.

[9] 王琼. 蜜炙川射干减毒存效的部分实验研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2008.

[10] 邓培渊, 袁伟, 陈龙欣, 等. 连翘脂苷 A 对乙酰胆碱酯酶的抑制作用[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(3): 178-181, 272.

[11] 王岩, 袁凤娟, 张萌, 等. 蔓性千斤拔黄酮类成分对乙酰胆碱酯酶抑制作用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(13): 118-124.

[12] 闫晓娟. 连翘主要成分与乙酰胆碱酯酶的相互作用研究[D]. 太原: 山西大学, 2018.

[13] 高萌. 中药枳壳"道地性"研究[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2021.

[14] 谭舒舒, 陈海芳, 罗小泉, 等. 枳壳中芸香柚皮苷和橙皮苷配伍对正常小鼠小肠推进作用的影响[J]. 江西中医药大学学报, 2017, 29(4): 73-75.

[15] 黄铭. 多溶剂萃取方法: CN1443592A[P]. 2003-09-24.

[16] 宋玉鹏, 刘凯洋, 陈海芳, 等. 多溶剂萃取法分离制备陈皮中的川陈皮素和橘皮素[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(8): 952-956.

[17] ELLMAN GL, COURTNEY KD, ANDRES V Jr, *et al*. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. *Biochem Pharmacol*, 1961, 7: 88-95.

[18] DA SILVA MENDES JW, CAMILO CJ, DE CARVALHO NKG, *et al*. *In vitro* antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory properties of the alkaloid fraction of *Cissampelos sympodialis* Eichler[J]. *S Afr N J Bot*, 2021, 141: 99-104.

[19] ABBAS S, BASHIR S, KHAN A, *et al*. Gastrointestinal stimulant effect of Urginea indica Kunth. and involvement of muscarinic receptors[J]. *Phytother Res*, 2012, 26(5): 704-708.

[20] 邢德刚. C-型钠尿肽对胆碱能系统调节胃运动作用的影响及其离子通道机制[D]. 延吉: 延边大学, 2006.

[21] 冯敬骞, 宋剑锋, 赵四清, 等. 衢枳壳黄酮类成分调节胃肠动力的谱效关系研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(17): 2241-2245.

[22] JOHNSON PJ, BORNSTEIN JC, YUAN SY, *et al*. Analysis of contributions of acetylcholine and tachykinins to neuro-neuronal transmission in motility reflexes in the Guinea-pig ileum[J]. *Br J Pharmacol*, 1996, 118(4): 973-983.

编辑:毕晓帆/接受日期:2022-09-26