

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.02.09

枫蓼醇提液槲皮素含量测定及药效

高彪, 彭新宇*, 袁明贵, 徐志宏

(广东省农业科学院动物卫生研究所 农业部兽用药物与诊断技术广东科学观测实验站广东省畜禽疫病防治研究重点实验室
广东省中兽药工程技术研究中心, 广州 510640)

[收稿日期] 2017-09-20 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 02-0053-09 [中图分类号] S853.7

[摘要] 建立一种枫蓼醇提液中槲皮素含量测定方法, 通过不同的实验方法和动物模型评价枫蓼醇提液的药效学, 为临床合理用药提供依据。以高效液相色谱法建立枫蓼药材中槲皮素含量测定方法。采用热板法和醋酸扭体试验, 观察其镇痛效果; 采用二甲苯诱导小鼠耳肿胀法及醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性影响试验, 观察其抗炎效果。槲皮素 $y=43215x-146476$, $R^2=0.9995$, 在 $10\sim 50\ \mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 线性关系良好。与生理盐水组比较: 热板法试验中醇提液高剂量组 15 min 痛阈值显著延长 ($P<0.05$); 醋酸扭体法试验中醇提液高、中剂量组能显著降低小鼠的扭体次数 ($P<0.05$); 二甲苯致耳肿胀法: 醇提液高剂量组肿胀抑制率显著增加 ($P<0.05$); 醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性影响: 醇提液高、中剂量组吸光度显著性下降 ($P<0.05$), 能有效降低早期炎性组织液的渗出。槲皮素检测方法准确度高, 稳定性强。枫蓼醇提取液具有抗炎镇痛作用。

[关键词] 枫蓼; 槲皮素; 醇提液; 镇痛; 抗炎

Detection Quercetin and Efficacy Text of Fengliao Alcohol Extract

GAO Biao, PENG Xin-yu*, YUAN Ming-gui, XU Zhi-hong

(Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Scientific observing and experimental Station of veterinary drugs and diagnostic techniques of Guangdong Province, Ministry of Agriculture, Guangdong Provincial Key Laboratory of Animal Disease Prevention, Guangzhou Guangdong, Chinese Traditional Medicine Engineering Technology Research Center of Guangdong Province, Guangzhou 510640, China)

Corresponding author: PENG Xinyu, E-mail: p-xy@163.com

Abstract: A method was established for determination of quercetin contents in Fengliao alcohol extract. Various animal models were used to evaluate the pharmacodynamics of Fengliao alcohol extract. HPLC was used to determine the content of quercetin in FengLiao alcohol extract. The analgesic effect was observed by the acetic acid induced writhing action model and hot plate induced licking paws of mouse, the anti-inflammatory effect was observed by dimethylbenzene induced ear edema model and acetic acid induced penetration increase of mouse abdominal blood capillary model. The standard curve regression equation is $y=43215x-14647$, $R^2=0.9995$, and the content of quercetin had good linearity with the area of peak over the range of $10\sim 50\ \mu\text{g/mL}$. Compared with

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303040-16); 广东省省级科研计划(2014A020208133)

作者简介: 高彪, 硕士, 从事新兽药方向研究。

通讯作者: 彭新宇。E-mail: p-xy@163.com

normal saline group, in the hot plate test; the threshold of 15 min pain was significantly prolonged in the high dose group ($P<0.05$). In the acetic acid writhing test, in high and middle dose groups of alcohol extract writhing times were reduced significantly ($P<0.05$). In test of ear swelling induced by xylene, the swelling inhibition rate of alcohol in high dose group was significantly increased ($P<0.05$). In the test of acetic acid on the permeability of capillary in the small intestine of rats, the absorbance of the high and middle dose groups decreased significantly ($P<0.05$). The HPLC method was simple, accurate and showed good reproducibility. The alcohol extract of Fengliao has anti-inflammatory and analgesic effects.

Key words: Fengliao; quercetin; alcohol extract; anti-inflammation; analgesia

枫蓼制剂是由牛耳枫及辣蓼这两味药材共同组成,是传统民间方剂。牛耳枫(*Daphniphyllum calycinum* Benth.) 又称牛耳铃,是属虎皮楠科(*Daphniphyllaceae*) 虎皮楠属植物,主要分布于我国海南、广东、江西、福建等省份,具有活血散瘀、祛风止痛、止痢清热等功效,主治痢疾、风湿骨痛、感冒发热等疾病。辣蓼(*Polygonum hydropiper* L) 又称柳蓼,为蓼科(*Polygonaceae*) 蓼属(*Polygonum*) 植物。广泛分布于我国广东、云南、海南、台湾等省市^[1],具有止痢、活血化瘀、止痒杀虫等功效,主治腹泻、肠胃炎、风湿性关节炎、跌打损伤等^[2-4]。

现代中药药理研究发现,黄酮类化合物是辣蓼与牛耳枫中的主要活性物质,研究表明黄酮类化合物具有抗氧化、抗炎、镇痛等作用^[5]。目前从辣蓼和牛耳枫中分离的主要黄酮类化合物有芦丁、槲皮素等。其中槲皮素含量可用作评价其质量的定量标准之一,快速、准确的测定方法具有重要意义。通过热板法、醋酸扭体法、二甲苯诱发小鼠耳廓肿胀法及醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性影响,研究了枫蓼乙醇提取液的抗炎、镇痛活性效果,为临床应用提供了科学的依据^[6-7]。

1 材料与方法

1.1 主要仪器 RE-5399 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SB25-12DT 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);Mettler-Toledo-xs 型十万分之一天平(瑞士梅特勒公司);SHZD-D(Ⅲ)型循环式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司)。

1.2 主要材料 牛耳枫药材购于广东茂名(批次

201507);辣蓼药材购于广东茂名(批次 201508);罗通定(批号 A160101 山西云鹏制药有限公司);肠胃康(批号 151002,海口市制药厂有限公司);阿司匹林(批号 160102,湖南新汇制药股份有限公司);伊文斯兰(批号 20130218,国药集团化学试剂有限公司);二甲苯、乙醇、醋酸均是分析纯。

试验动物:昆明小鼠,SPF 级别,体重 18~22 g,雌雄各半,采购于南方医科大学的试验动物中心(合格证号:SCXK(粤)2011-0015)。

1.3 试验方法

1.3.1 枫蓼药材中槲皮素含量测定

1.3.1.1 最佳吸收波长的选择 精密称取槲皮素对照品,甲醇溶解,定容,制得每 1 mL 含 20 μg 的槲皮素标准溶液,采用二极管阵列检测器对标准品进行 200~400 nm 扫描。

1.3.1.2 流动相的选择 本试验研究比较了乙腈、甲醇有机相与水或不同浓度磷酸之间的组合,也对柱温、梯度洗脱方法及流速进行了考察。

1.3.1.3 对照品的配制 精密称量 10 mg 槲皮素对照品于 10 mL 棕色容量瓶中,加甲醇适量,超声溶解,冷却至室温,加适量甲醇定容至刻度,摇匀,制得槲皮素标准品溶液(每 1 mL 含槲皮素 1.00 mg)。分别精密移取槲皮素对照品 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mL 于 5 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,制得浓度为 10、20、30、40、50 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品溶液。0.45 μm 有机滤膜滤过,备用。

1.3.1.4 供试品的配制 精密称取枫蓼粉末 20 g(牛耳枫:辣蓼=2:1),置于圆底烧瓶中,加入 65%乙醇 200 mL,浸泡 1 h,加热回流 1 h,减压浓缩

至 100 mL, 0.45 μm 有机滤膜滤过, 备用。

精密量取上述浓缩液 2.5 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中, 用 65% 的乙醇定容至刻度摇匀, 制得含量为 0.05 g/mL 供试品, 0.45 μm 有机滤膜滤过, 备用。

1.3.1.5 线性关系考察 取上述各浓度对照品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪, 按优选出的色谱条件测定峰面积, 以浓度 x 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线方程。

1.3.1.6 精密度试验 取“1.3.1.3”项下 20 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪中, 连续进样 6 次, 按优选出的色谱条件测定峰面积, 计算相对标准偏差 RSD 考察日内精密度。

1.3.1.7 稳定性试验 取“1.3.1.3”项下 20 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液在 0、4、8、12、16、20、24 h 时取 10 μL 注入高效液相色谱仪中, 按优选出的色谱条件准确测定槲皮素的峰面积, 计算相应的 RSD 值考察对照品稳定性。

分别在“1.3.1.4”项下供试品溶液制备后, 在 0、4、8、12、16、20、24 h 时取 10 μL 注入高效液相色谱仪中, 按优选出的色谱条件准确测定槲皮素的峰面积, 计算相应的 RSD 值考察样品稳定性。

1.3.1.8 重复性试验 取同一批枫蓼药材, 按“1.3.1.4”项下供试品制备方法制备样品 6 份, 精密量取 10 μL 注入高效液相色谱仪中, 按优选出的色谱条件测定槲皮素峰面积, 计算相对标准偏差 RSD 考察样品的重复性。

1.3.1.9 加样回收率试验 取同批次已知槲皮素含量的枫蓼粉末 6 份, 每份约 0.2 g, 精密称定, 分别精密加入 20 $\mu\text{g/mL}$ 的槲皮素标准品溶液 3 mL, 按“1.3.1.4”项下的方法处理供试品, 精密量取 10 μL 注入高效液相色谱仪中, 按优选出的色谱条件测定槲皮素峰面积, 并测定槲皮素含量, 按公式(1)计算加样回收率。

加样回收率 = (测得值 - 样品中所含成分量) / 对照品加入量 $\times 100\%$ (1)

1.3.2 药效学试验方法

1.3.2.1 枫蓼醇提液制备 称取枫蓼粉末 20 g, 置于圆底烧瓶中, 加入 65% 乙醇 200 mL, 浸泡 1 h, 加热回流 1 h, 过滤, 减压浓缩至 20 mL (1 g/mL), 备用。

1.3.2.2 热板法 水浴锅加满水, 使热板接触水面, 热板温度控制在 55 ± 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 。取 18~22 g 的雌性小鼠, 放于热板上至出现舔后足所需时间作为该鼠的痛阈值, 筛选痛阈值在 5~30 s 的合格小鼠 50 只, 随机分为罗通定对照组 (0.02 g/kg)、肠胃康对照组 (15 g/kg)、空生理盐水组 (0.60 mL)、枫蓼醇提液高剂量组 (20 g/kg)、中剂量组 (10 g/kg)、低剂量组 (5 g/kg), 各组小鼠分别用苦味酸标记, 每天同一时间点灌胃一次, 连续给药 3 d, 末次灌胃后于 15、30、60、90 min 时间点测定痛阈值, 并进行组间比较。

1.3.2.3 醋酸扭体法 取 50 只 18~22 g SPF 级昆明种小鼠, 雌雄各半, 随机分为生理盐水对照组 (0.60 mL)、阿司匹林对照组 (0.2 g/kg)、肠胃康对照组 (15 g/kg)、枫蓼醇提液高剂量组 (20 g/kg)、中剂量组 (10 g/kg)、低剂量组 (5 g/kg)。每天同一时间点灌胃一次, 连续给药 3 d, 末次给药 1 h 后, 每只小鼠腹腔注射 0.6% 的醋酸溶液 0.2 mL, 观察并记录 20 min 内各组小鼠的扭体次数, 计算镇痛率, 并进行组间比较。

镇痛率 = (对照组 - 给药组) / 对照组 $\times 100\%$ 。

1.3.2.4 二甲苯诱发小鼠耳廓肿胀法 取 50 只 18~22 g SPF 级昆明种小鼠, 雌雄各半, 随机分为阿司匹林对照组 (0.2 g/kg)、肠胃康对照组 (15 g/kg)、生理盐水对照组 (0.60 mL)、枫蓼醇提液高剂量组 (20 g/kg)、中剂量组 (10 g/kg)、低剂量组 (5 g/kg)。每天同一时间点灌胃一次, 连续给药 3 d, 最后一次灌胃 60 min 后, 各组小鼠右耳的前后两面均涂抹 0.02 mL 二甲苯, 左耳不处理。120 min 后处死小鼠, 于相同部位在小鼠的左耳和右耳分别打下半径为 4 mm 的圆状耳片, 精密称重, 计算各组小鼠耳肿胀度, 并进行组间比较。

耳肿胀度 (mg) = 右耳重量 (mg) - 左耳重量 (mg)

1.3.2.5 醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性影响

取 50 只 18~22 g 健康昆明小鼠,雌雄各半,随机分为阿司匹林对照组 (0.2 g/kg)、肠胃康对照组 (15 g/kg)、生理盐水对照组 (0.60 mL)、枫蓼醇提液高剂量组 (20 g/kg)、中剂量组 (10 g/kg)、低剂量组 (5 g/kg)。每天同一时间点灌胃一次,连续给药 3 d,最后一次灌胃 1 h 后,各鼠按体重 0.1 mL/10 g 迅速尾静脉注射 5% 伊文思蓝生理盐水溶液,随即每只腹腔注射 0.6% 醋酸溶液 0.2 mL。20 min 后,脱颈处死小鼠,用 6 mL 生理盐水洗涤腹腔,轻揉腹部 2 min,用针管吸出腹腔洗涤液 4 mL,洗涤液于 3000 r/min 转速下离心 15 min,取上清液。以生理盐水为空白对照,于 590 nm 处用紫外分光光度法测得洗涤液吸光度 A 值,记录并计算炎症抑制率,公式如下:

炎症抑制率 (%) = (生理盐水组吸光度 - 给药组吸光度) / 生理盐水组吸光度 × 100%

1.4 统计学方法 采用 SPASS 17.0 软件进行单因素方差分析,数据以 ($\bar{X} \pm S$) 表示,两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 槲皮素含量的测定

2.1.1 最佳检测波长的确定 于 200~400 nm 波长范围内扫描,确定 370 nm 为槲皮素检测波长。

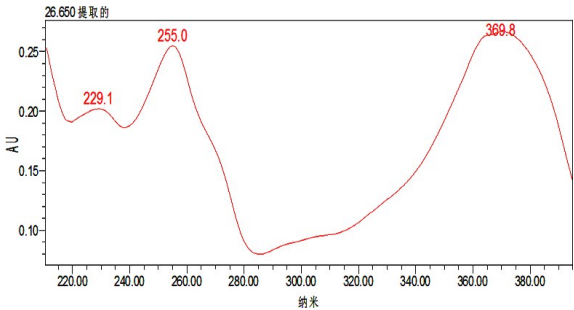


图 1 槲皮素光谱图

Fig 1 The spectrum of Quercetin

2.1.2 色谱条件 Waters Symmetry shield RP18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5.0 μm); 流动相: A 为乙腈, B 为 0.4% 磷酸水溶液; 梯度洗脱: 0~13 min, A 为 20%~45%; 13~15 min, A 为 45%~60%; 15~20 min, A 为 70%~20%。流速: 1 mL/min; 检测波长: 370 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量 10 μL。槲皮素对照品色谱图如图 2。

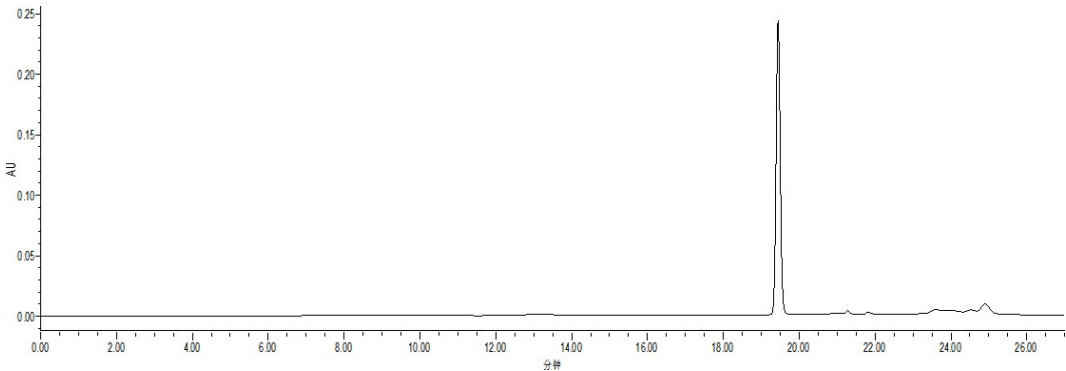


图 2 槲皮素色谱图

Fig 2 Quercetin chromatogram

2.1.3 线性关系考察 以浓度 μg/mL 为横坐标 X, 峰面积 Y 为纵坐标, 做线性回归, 得回归方程为 $Y = 43215X - 146476$, $R^2 = 0.9995$, 结果表明槲皮素在 10~50 μg/mL 浓度范围内, 线性关系良好。结果见

图 3。
2.1.4 精密度考察 精密度试验结果见表 1。结果显示槲皮素标准品溶液峰面积 RSD 为 0.81%, 表明仪器精密度良好。

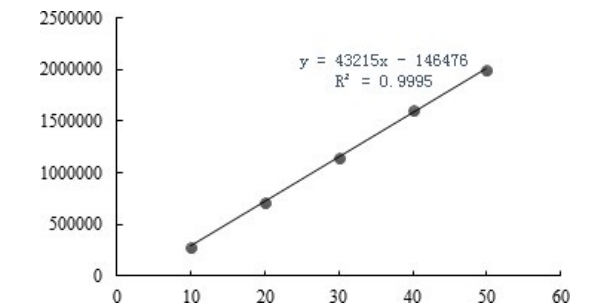


图 3 槲皮素标准曲线图

Fig 3 The standard curve line

表 1 精密度试验结果		
Tab 1 The result of precision test		
试验次数	峰面积	RSD/%
1	735436	0.81
2	744532	
3	730854	
4	735342	
5	735438	
6	746032	

2.1.5 稳定性考察

2.1.5.1 对照品稳定性考察 对照品稳定性考察结果见表 2。结果表明,对照品峰面积 RSD 为 0.92%,表明槲皮素对照品 24 h 内性质稳定。

2.1.5.2 供试品稳定考察 供试品稳定性考察结果见表 3。结果表明,供试品峰面积 RSD 为 1.68%,表明供试品在 24 h 内性质稳定。

表 2 对照品稳定性试验结果		
Tab 2 The results of reference substance stability test		
试验时间/h	峰面积	RSD/%
0	727563	0.92
4	727485	
8	738596	
12	717308	
16	724532	
20	728650	
24	733607	

表 3 供试品稳定性试验结果		
Tab 3 The results of testing sample stability test		
试验时间/h	峰面积	RSD/%
0	1205875	1.68
4	1334817	
8	1237454	
12	1274620	
16	1386032	
20	1306861	
24	1256174	

2.1.6 重复性考察 重复性试验考察结果见表 4。结果表明,供试品中槲皮素平均含量为 353.37 μg/g, RSD 为 1.74%,表明该方法重复性良好。

2.1.7 加样回收率考察 加样回收率考察结果见表 5。结果表明,槲皮素平均回收率为 99.44%, RSD 为 0.59%,表明该法符合试验分析要求,准确度高。

表 4 重复性试验考察结果				
Tab 4 The results of repeatability test				
试验次数	峰面积	槲皮素含量/(μg · g ⁻¹)	槲皮素平均含量/(μg · g ⁻¹)	RSD/%
1	1375623	352.22	353.37	1.74
2	1359566	348.47		
3	1420543	362.61		
4	1345692	345.28		
5	1343796	354.81		
6	1386835	356.84		

表 5 加样回收率试验结果
Tab 5 The results of recovery test

试验次数	样品内 被测成分含量/ μg	加入 对照品含量/ μg	实测量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	68.03	60.00	128.01	99.97	99.44	0.59
2	68.17	60.00	127.58	99.01		
3	68.61	60.00	128.74	100.21		
4	68.34	60.00	127.64	98.83		
5	68.68	60.00	128.06	98.97		
6	68.48	60.00	128.27	99.65		

2.2 枫蓼醇提液药效作用

2.2.1 热板法 热板法观察枫蓼醇提液镇痛结果见表 6。由表 6 可知,15 min 时,与生理盐水组比较,醇提液高剂量组能够显著延长痛阈值($P<0.05$),醇提液高剂量组与罗通定组比较,差异不具有显著性($P>0.05$);30、60 及 90 min 时,与生理盐水比较,醇提液高、中、低剂量组及肠胃康组镇痛效果均不明显,差异无统计学

意义($P>0.05$);与给药前痛阈值比较,15 min 时,罗通定组、肠胃康组、醇提液高剂量组能够显著延长小鼠痛阈值($P<0.05$),30 min 时,罗通定肠胃康组能够显著延长小鼠痛阈值($P<0.05$),其他各给药组剂量组间差异均无统计学意义($P>0.05$)。热板法试验结果表明醇提液高剂量组在给药15 min时能有效延长小鼠痛阈值,具有镇痛作用。

表 6 枫蓼醇提液对热刺激致小鼠疼痛反应的影响
Tab 6 Effect of Fengliao alcohol extract on pain response in mice induced by heat stimulation

组别	剂量	药前痛阈值/s	药后痛阈值/s			
			15 min	30 min	60 min	90 min
生理盐水	0.6 mL	14.00±3.59	15.11±6.19	18.40±8.00	14.50±7.56	13.60±2.80
罗通定	0.02 g/kg	11.10±4.43	15.78±4.74 ^{1,2}	23.50±5.08 ^{1,2}	21.00±8.73 ^{1,2}	20.50±7.43 ^{1,2}
肠胃康	15 g/kg	12.00±5.40	14.50±5.21	18.25±4.89 ¹	14.63±7.09	12.78±3.93
	5 g/kg	12.50±3.87	12.17±3.76	15.38±3.14	15.00±3.70	15.29±3.68
	10 g/kg	11.80±2.04	12.00±4.00	15.40±3.69	14.56±2.79	14.33±2.45
枫蓼醇提液	20 g/kg	11.30±3.92	20.50±6.90 ^{1,2,3}	14.00±3.02	15.44±3.80	15.22±3.80

与给药前痛阈值作比较 1: $P<0.05$;同一时间点,与生理盐水对照组比较 2: $P<0.05$;同一时间点,与罗通定对照组作比较 3: $P<0.05$
The pain threshold compare with before give drugs 1: $P<0.05$; At the same time, compare with normal saline 2: $P<0.05$; At the same time, compare with rotundine 3: $P<0.05$

2.2.2 醋酸扭体法 醋酸扭体法结果见表 7。由表 7 可知,与生理盐水组比较,各给药组扭体次数均有所下降,阿司匹林阳性对照组、肠胃康对照组、枫蓼醇提液高、中剂量组均能够显著降低小鼠扭体次数($P<0.05$),醇提液高、中剂量镇痛率分别为 28.33%、17.41%,作用均显著弱于阿司匹林组($P<$

0.05),醇提液高剂量组镇痛作用与肠胃康组比较无显著性差异($P>0.05$),中剂量组差异显著($P<0.05$)。醋酸扭体法试验结果表明,醇提液高、中剂量均能有效降低小鼠扭体次数,镇痛作用良好,并具有一定的量效关系,醇提液高剂量组镇痛作用与肠胃康组相当。

表 7 枫蓼醇提液对小鼠扭体反应的影响

Tab 7 Effect of Fengliao alcohol extract for injection on mice analgesia caused by acetic acid

组别	剂量	扭体次数/次	镇痛率/%
生理盐水	0.6 mL	29.30±2.21	—
阿司匹林	0.2 g/kg	18.60±2.881,3)	36.52%
肠胃康	15g/kg	21.75±1.941,2)	25.75%
	5 g/kg	27.13±1.73	7.41%
	10 g/kg	24.20±2.20 ^{1,2,3}	17.41%
枫蓼醇提液	20 g/kg	21.00±1.83 ^{1,2}	28.33%

与生理盐水组作比较 1;*P*<0.05;与阿司匹林作比较 2;*P*<0.05;与肠胃康作比较 3;*P*<0.05
Compare with normal saline 1;*P*<0.05;Compare with Acetylsalicylic acid 2;*P*<0.05;Compare with Chang weikang 3;*P*<0.05

2.2.3 二甲苯诱发小鼠耳肿胀法 二甲苯诱发小鼠耳肿胀法结果见表 8。由表 8 可知,与生理盐水组比较,肠胃康中药对照组、阿司匹林西药对照组、醇提液高剂量组均能显著降低小鼠的耳肿胀度 (*P*<0.05),醇提液高剂量组肿胀抑制率约为 53.09%;与阿司匹林组比较,醇提液高剂量组肿胀抑制率弱于阿司匹林组,但无统计学意义 (*P*>0.05);与肠胃康组比较,醇提液高剂量组肿胀抑制率高于肠胃康组,但无统计学意义 (*P*>0.05)。二甲苯诱发小鼠耳肿胀法结果表明,醇提液高剂量组局部镇痛效果良好。

表 8 枫蓼醇提液对小鼠耳廓肿胀的影响

Tab 8 Effect of Fengliao alcohol extract on anti-inflammatory of mice ear

组别	剂量	左耳重量/mg	右耳重量/mg	肿胀度/mg	肿胀抑制率/%
生理盐水	0.6 mL	3.86±0.69	6.29±1.11	2.43±0.79	—
阿司匹林	0.2 g/kg	4.44±0.73	5.33±1.00	1.00±0.87 ¹	58.85%
肠胃康	15 g/kg	4.02±0.24	5.22±1.34	1.25±1.03 ^{1,2}	48.55%
	5 g/kg	3.29±0.76	5.33±1.63	2.00±0.89	17.70%
枫蓼醇提液	10 g/kg	3.88±0.35	5.63±1.06	1.75±1.04	27.98%
	20 g/kg	4.14±0.38	5.29±0.95	1.14±0.69 ^{1,2}	53.09%

与生理盐水组作比较 1)*P*<0.05;与阿司匹林作比较 2)*P*<0.05;与肠胃康作比较 3)*P*<0.05
Compare with normal saline 1)*P*<0.05;Compare with Acetylsalicylic acid 2)*P*<0.05;Compare with Chang weikang 3)*P*<0.05

2.2.4 醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性的影响 醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性的影响结果见表 9。与生理盐水组比较,各给药组腹腔毛细血管渗透液吸光度均有所下降,阿司匹林阳性对照组、肠胃康对照组、枫蓼醇提液高、中剂量组下降显著 (*P*<0.05),醇提液高、中剂量平均炎症抑制率分别为 37.10%、35.48%;与阿司匹林组比较,醇提液高、中剂量吸光度显著高于阿司匹林组 (*P*<0.05);与肠胃康组比较,醇提液高、中剂量组吸光度无统计学差异 (*P*>0.05)。结果表明,醇提液高、中剂量组抗炎效果良好,能够有效抑制醋酸所致小鼠腹腔毛细血管的通透性,抑制作用弱于阿司匹林,但与肠胃康作用相当。

表 9 枫蓼醇提液对醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性的影响

Tab 9 Effect of Fengliao alcohol extract on the test of acetic acid on the permeability
of capillary in the small intestine of rats

组别	剂量	吸光度/A	炎症抑制率/%
生理盐水	0.6 mL	0.62±0.18	—
阿司匹林	0.2 g/kg	0.25±0.07 ^{1,3}	59.68
枫蓼醇提液	肠胃康	0.40±0.18 ^{1,2}	35.48
	5 g/kg	0.55±0.12	19.35
	10 g/kg	0.40±0.13 ^{1,2}	35.48
	20 g/kg	0.39±0.04 ^{1,2}	37.10

与生理盐水组作比较 1: $P<0.05$;与阿司匹 5 林作比较 2: $P<0.05$;与肠胃康作比较 3: $P<0.05$
Compare with normal saline 1: $P<0.05$;Compare with Acetylsalicylic acid 2: $P<0.05$;Compare with Chang weikang 3: $P<0.05$

3 讨 论

槲皮素含量测定方法的建立中,流动的选择分别考察了不同比例的有机相及不同酸度的磷酸溶液对目标峰形的影响,结果显示采用乙腈—0.4%磷酸峰形较好,杂质峰无干扰。洗脱方式分别考察了梯度洗脱及等度洗脱方式(乙腈:0.4%磷酸=0.48:0.52),结果显示采用梯度洗脱效果较好,各极性成分能够比较好的分离,因此选用梯度洗脱的方式。研究在建立了含量测定方法的同时,亦进行了稳定性试验、精密度试验、重复性试验等一系列方法学考察,结果表明准确度高,重复性良好,可操作性强,能够满足质量控制的需要。

药效试验中,热板法和醋酸扭体法考察的是枫蓼醇提液的镇痛效果。热板法为物理致痛,借助通过热的刺激传入神经中枢,使动物产生疼痛的感觉,使用罗通定可以抑制痛觉向中枢的传递,从而抑制热刺激所引起的疼痛反应,而非甾体化合物阿司匹林作用效果较弱;醋酸扭体法为H⁺刺激而产生的化学疼痛,同进还会出现炎症反应,非甾体化合物阿司匹林对这类疼痛作用较强^[8-9]。故在镇痛试验研究中,罗通定作为热板法西药阳性对照药,阿司匹林作为醋酸扭体法西药阳性对照药。同时选择肠胃康作为中药阳性对照。由热板法试验结果可知,醇提液高剂量组在15 min时痛阈时间显著延长,而其他时间段皆无显著性变化;由醋酸扭体法试验结果可知,各剂量组均可减少扭体次数,其

中醇提液高、中剂量组作用明显。由此可知,枫蓼醇提液制剂对中枢神经镇痛作用稍弱于外周神经的镇痛作用。

二甲苯诱发小鼠耳肿胀法及醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性影响试验考察的是枫蓼醇提液的抗炎效果。早期炎症的特点包括因毛细血管通透性增加或扩张而引起的炎性渗出或肿胀^[10]。在二甲苯诱发小鼠耳肿胀试验中,120 min后生理盐水造模组耳片肿胀明显,与生理盐水组比较,各组小鼠肿胀度均降低,且阳性对照组及醇提液高剂量组均有显著性降低作用($P<0.05$),试验表明枫蓼醇提液能显著抑制二甲苯所致的小鼠耳肿胀炎症反应。在醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性影响的试验中,与生理盐水组比较各给药组吸光度均呈下降状态,且阳性对照组及醇提液高、中剂量组具有吸光度显著性下降($P<0.05$)。试验表明枫蓼醇提液能有效降低早期炎性组织液的渗出,且呈现量效关系,即剂量越高,抑制率越大。

参考文献:

[1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2010 版[S].
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committees. Chinese Veterinary Pharmacopoeia, 2010 edition[S].
[2] Kumar R V, Venkatrajireddy G, Bikshapathi T, *et al.* Antioxdant—the maximum expressed activity among 63 medicinal plants[J]. J Phytotherapy Pharmacol, 2012, 15 (1): 1–13.

- [3] Munira S, sultana F, Molloka S, *et al.* Anti-neoplastic activities of Polygonum hydropiper Linn. Against ehrlich ascites carcinoma in swiss albino mice[J].Adv Biol Res,2013,7(1):9-14.
- [4] Maheswaran R, Sararimuthu L, Bioefficacy of essential oil from Polygonum hydropiper L. against mosquitoes, Anopheles stephensi and Culex quinquefasciatus[J]. Ecotoxicol Environ Safety,2013,97:26-31.
- [5] Wang P, Vадgama J V, Said J W, *et al.* Enhanced inhibition of prostate cancer xenograft tumor growth by combining quercetin and green tea[J].J Nutr biochem,2014,25(1):73-80.
- [6] 赵婵娟. 中药清温消热饮的抗炎镇痛活性研究[J]. 中国兽药杂志,2016,50(04):41-44.

Zhao Ch J. Study on anti-Inflammatory and analgesic activities of Qingwen Xiaore Yin in mice[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug,2016,50(04):41-44.
- [7] 肖蓉, 聂奎, 李娇, 等. 抗炎中药方蒲和饮的抗炎作用试验[J]. 中国兽医杂志,2015,51(02):53-55.

Xiao R, Nie K, Li J, *et al.* Effects of Puheyin—a Traditional Chinese drug prescription on inflammation response in mice[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2015, 51(02): 53-55.
- [8] Zhou F, Pan Y, Huang Z, *et al.* Visfatin induces cholesterol accumulation in macrophages through up-regulation of scavenger receptor-A and CD36[J]. Cell Stress Chaperones, 2013, 18(5): 643-652.
- [9] Hu J Y, Jin G Z. Supraspinal D2 receptor involved in antinociception induced by 1-tetrahydropalmatine[J]. Act Pharmacol Sin, 1991, 20(8): 715-719.
- [10] 杨巧芳, 孟庆刚. 炎症动物模型探要[J]. 中华中医药学刊, 2008, (03): 516-517.

Yang Q F, Meng Q G. Discuss the animal model about inflammation[J]. Chinese Archives Of Traditional Chinese Medicine, 2008, (03): 516-517.

(编辑:陈希)