

瑶药破骨风的水提工艺优化及其水提物的抗炎镇痛作用研究[△]

黄健军^{1*}, 岑芳², 邓刚^{1#} (1. 广西中医药大学高等职业技术学院, 南宁 530001; 2. 南宁市中医医院, 南宁 530012)

中图分类号 R284.2; R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)08-1052-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.08.10

摘要 目的: 优化瑶药破骨风的水提取工艺, 并考察其水提物的抗炎镇痛作用。方法: 采用单因素试验和正交试验, 以阿魏酸含量、干膏率为指标, 考察提取时间、液料比、提取次数3个因素对水提取工艺的影响, 优选最佳工艺, 并进行验证试验。以阿司匹林为阳性对照, 采用二甲苯致小鼠耳廓肿胀法和角叉菜胶致小鼠足肿胀法观察低、中、高剂量(3、6、12 g/kg, 以生药计)的破骨风水提物的抗炎作用, 采用热板致小鼠疼痛反应和醋酸致小鼠扭体反应考察其镇痛作用; 采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定小鼠以角叉菜胶致炎后血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素1 β (IL-1 β)的含量, 采用紫外分光光度法检测小鼠血清和炎症组织中前列腺素E₂(PGE₂)的含量。结果: 最优提取工艺为提取时间120 min, 液料比16:1(mL/g), 提取3次。与模型组比较, 破骨风水提物低、中、高剂量组小鼠耳廓肿胀度、足肿胀率均显著降低, 扭体次数显著减少, 疼痛反应痛阈值显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 该水提物低、中、高剂量组小鼠血清中的TNF- α 、IL-1 β 、PGE₂含量与炎症组织中的PGE₂含量均显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 优选的瑶药破骨风水提工艺效率高、稳定可行; 其水提物对模型小鼠具有明显的抗炎镇痛作用, 可能是通过降低体内TNF- α 、IL-1 β 、PGE₂水平发挥作用。

关键词 瑶药; 破骨风; 水提取; 工艺优化; 抗炎; 镇痛

Study on the Optimization of Water-extraction Technology of Yao Medicine *Jasminum lanceolarium* and the Anti-inflammatory and Analgesic Effect of Its Water Extract

HUANG Jianjun¹, CEN Fang², DENG Gang¹ (1. Higher Vocational College, Guangxi University of TCM, Nanning 530001, China; 2. Nanning Hospital of TCM, Nanning 530012, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the water-extraction technology of Yao medicine *Jasminum lanceolarium* and study the anti-inflammatory and analgesic effect of its water extract. METHODS: The single factor test and orthogonal test were used to investigate the effects of extraction time, liquid-solid ratio and extraction times on water-extraction technology and optimize extraction technology using ferulic acid content and dry extract yield as index. The validation test was also conducted. With aspirin as positive control, the method of ear edema induced by xylene and paw edema induced by carrageenan in mice were used to observe the anti-inflammation effects of low-dose, medium-dose and high-dose (3, 6, 12 g/kg, by crude drug) of *J. lanceolarium* water extract; the analgesic effect of those was investigated by hot-plate induced pain response test and mice writhing response test. The contents of TNF- α and IL-1 β were determined by ELISA after carrageenan induced inflammation in mice. The contents of PGE₂ in serum and inflammation tissue were detected by UV spectrophotometry. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows as extraction time of 120 min, liquid-solid ratio of 16:1 (mL/g), extracting for 3 times. Compared to model group, the ear edema degree and paw edema rate of mice were reduced, writhing response times were lessened, and pain response threshold was enhanced significantly in low-dose, medium-dose and high-dose groups of *J. lanceolarium* water extract ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to model group, the contents of TNF- α , IL-1 β and PGE₂ in serum and the content of PGE₂ in inflammation tissue of mice were reduced significantly in low-dose, medium-dose and high-dose groups of *J. lanceolarium* water extract ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: The optimized water-extraction technology of Yao medicine *J. lanceolarium* shows high efficiency, stable and feasible. Water extract shows significant anti-inflammatory and analgesic effects through reducing the contents of TNF- α , IL-1 β and PGE₂.

KEYWORDS Yao medicine; *Jasminum lanceolarium*; Water extraction; Technology optimization; Anti-inflammation; Analgesic

[△] 基金项目: 广西壮族自治区科学技术厅(知识产权局)专利专项资金项目(No.桂知管字[2015]31号-桂知专151841-1); 广西中医基础重点实验室(省级)开放课题(No.15-140-32-07); 广西高校中医药方药基础与应用研究重点实验室课题(No.桂教科研[2016]6号-zy-fy201607)

* 讲师, 硕士。研究方向: 中药民族药研发。电话: 0771-3922715。E-mail: hjj198110@163.com

通信作者: 讲师, 硕士。研究方向: 中药民族药制剂工艺。电话: 0771-3110351。E-mail: 13096979@qq.com

瑶药破骨风为木犀科植物清香藤(*Jasminum lanceolarium* Roxb.)的全草, 作为104种经典瑶药之一, 其味苦、辛, 性平, 可祛风除湿、活血散瘀、消肿止痛; 主治“崩闭闷”(风湿痛、类风湿性关节炎)、“改布闷”(腰腿痛)、“播冲”(跌打损伤)、“眸名肿毒”(无名肿毒)及“不锥累”(疮疖痈肿)等^[1]。破骨风收载于《广西瑶族习用药材质量标准》(第一卷), 瑶语发音为“排迸崩”, 别名清香藤, 在广西、广东、云南、贵州等地均有分布^[2]。破

骨风主要含有环烯醚萜、木脂素、黄酮、三萜、简单苯丙素等成分^[3-5]。阿魏酸是破骨风中的主要活性成分之一,具有抗氧化和清除自由基^[6]、抗血栓^[7]、降血压和抗癌^[8]等作用,目前常用高效液相色谱法(HPLC)测定其含量。破骨风在广西尤其是瑶族地区植物资源丰富、民间药用历史悠久^[3-4],但是关于其现代医药学研究的报道较少,极大地制约了该药材的开发利用。将民间习用药材制成中药颗粒剂,具有用量小、起效快、质量可控、携带方便等优点^[9]。为充分发挥破骨风资源和疗效的优势,本研究根据前期预实验结果,以阿魏酸含量和干膏率为指标,采用单因素试验和正交试验优选破骨风的水提工艺;在此基础上考察其水提物对模型小鼠的抗炎镇痛作用并初步探讨其作用机制,为相关制剂的后续研发提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-10A型HPLC仪,包括UV-10A紫外检测器、威玛龙色谱工作站(日本Shimadzu公司);XS205DU型电子分析天平(梅特勒-托利多国际贸易上海有限公司);752型紫外分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);DK-S24型数显恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);TDL80-2B型离心机(上海安亭科学仪器厂);RE-52AA型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);RB-200型智能热板仪(成都泰盟科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

阿魏酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:120927-201110,供含量测定用);阿司匹林片(湖南新汇制药有限公司,批号:160805,规格:50 mg/片);生理氯化钠溶液(四川科伦药业股份有限公司,批号:A17042508-2,规格:500 mL:45 g);角叉菜胶(美国Sigma公司,批号:088K0317);冰醋酸(成都市科龙化工试剂厂产品,批号:20140716);人白介素1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号:E-EL-M0037c)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)ELISA试剂盒(批号:E-EL-M0049c)均由武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司提供;甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

破骨风药材于2015年8月采自广西壮族自治区金秀瑶族自治县,经广西健丰药业有限公司梁可文副研究员鉴定为木犀科植物清香藤(*J. lanceolarium* Roxb.)的全草。

1.4 动物

昆明种小鼠,雌雄各半,体质量为(20 \pm 2)g,购自桂林医学院实验动物中心,使用许可证号:SCXK(桂)2007-0003。

2 方法与结果

2.1 阿魏酸的含量测定方法

2.1.1 色谱条件与系统适用性、专属性试验 色谱柱:

Aichrom C₁₈(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m);流动相:乙腈-0.085%磷酸(15:85, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:316 nm;柱温:35 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。在此条件下,理论板数按阿魏酸峰计均在5 000以上;药材中其他成分对阿魏酸的测定无干扰,专属性良好。色谱见图1。

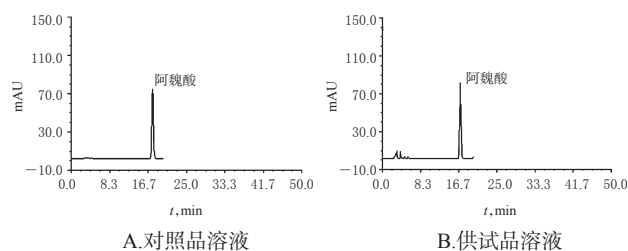


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.1.2 溶液的制备 (1)对照品溶液。精密称取阿魏酸对照品适量,置于棕色量瓶中,以70%甲醇溶解制成56.5 μ g/mL的溶液,即得。(2)供试品溶液。将药材样品粉碎,过2号筛(下同),精密称取适量,置于棕色锥形瓶中,加水,称定质量后回流提取;放冷,再次称定质量,用水补足减失的质量,摇匀,经0.45 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 方法学考察 (1)线性关系考察。精密吸取“2.1.2”项下对照品溶液3、6、9、12、15 μ L,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,以进样量(x, μ g)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $y=2\ 413\ 310.9x+48\ 890.4$ ($r=0.999\ 5$),结果表明阿魏酸检测进样量线性范围为0.169 5~0.847 5 μ g。(2)精密度试验。分别精密吸取“2.1.2”项下对照品溶液和供试品溶液各10 μ L,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样6次,结果对照品溶液和供试品溶液峰面积的RSD分别为0.82%、0.93%。(3)稳定性试验。将“2.1.2”项下对照品溶液和供试品溶液于室温避光放置24 h,分别于0、2、4、8、12、24 h时按“2.1.1”项下色谱条件进样10 μ L,结果对照品溶液和供试品溶液峰面积的RSD分别为1.15%、1.20%。(4)加样回收率试验。取已知含量的药材样品适量,共6份,分别精密加入对照品溶液适量,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件测定阿魏酸含量并计算加样回收率,结果平均加样回收率为99.25%,RSD为1.20%。

2.2 干膏率测定方法

精密吸取“2.3”提取工艺项下的提取液20 mL,置于干燥至恒质量的蒸发皿中,按照2015年版《中国药典》(四部)“通则0831干燥失重测定法”^[10]测定并计算干膏率。干膏率(%)=干膏质量(g)/药材质量(g) \times 100%。

2.3 破骨风水提工艺的优选

2.3.1 单因素试验 对影响提取工艺的主要因素(提取时间、液料比、提取次数)进行单因素考察。(1)提取时间:精密称取适量药材样品粉末5份,各加入25倍量水,分别回流提取30、60、90、120、150 min;(2)液料比:精密

称取适量药材样品粉末5份,分别加入8、12、16、20、24倍量水,回流提取90 min;(3)提取次数:精密称取适量药材样品粉末5份,加入20倍量水,分别回流提取1、2、3、4、5次,每次120 min。按“2.1”“2.2”项下方法分别测定各条件下所得水提物的阿魏酸含量和干膏率。结果显示,提取时间在60~120 min、液料比在12:1~20:1、提取1~3次的条件下,阿魏酸和干膏率的提取效果较好,故在此条件范围内进行正交试验优化。

2.3.2 正交试验 根据单因素试验结果,选择提取时间(A)、液料比(B)、提取次数(C)为主要影响因素,按 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验,每个试验条件下平行试验3次,依法测定水提物的阿魏酸含量和干膏率。因素与水平见表1,正交试验设计与结果见表2,方差分析结果见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A, min	B, mL/g	C, 次
1	60	12:1	1
2	90	16:1	2
3	120	20:1	3

表2 正交试验设计与结果

Tab 2 Design and results of orthogonal tests

试验号	因素				阿魏酸(x), mg/g	干膏率(y), %
	A	B	C	D(空白)		
1	1	1	1	1	0.92	9.57
2	1	2	2	2	1.16	12.17
3	1	3	3	3	1.47	15.65
4	2	1	2	3	1.23	13.18
5	2	2	3	1	1.26	17.86
6	2	3	1	2	1.02	11.31
7	3	1	3	2	1.53	18.04
8	3	2	1	3	1.95	22.98
9	4	3	2	1	1.42	17.66
K_{01}	1.183	1.220	0.997	1.200		
K_{02}	1.163	1.157	1.263	1.237		
K_{03}	1.333	1.303	1.420	1.243		
R_0	0.170	0.146	0.423	0.043		
K_{01}	12.463	13.597	11.287	15.030		
K_{02}	14.117	14.337	14.337	13.840		
K_{03}	16.227	14.873	17.183	13.937		
R_0	3.764	1.276	5.896	1.190		

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

指标	方差来源	偏均差平方和	自由度	均方	F	P
阿魏酸含量	A	0.052	2	17.333	19.0	>0.05
	B	0.032	2	10.667	19.0	>0.05
	C	0.275	2	91.667	19.0	<0.05
	误差	0.01	2			
干膏率	A	21.348	2	8.145	19.0	>0.05
	B	2.465	2	0.940	19.0	>0.05
	C	52.177	2	19.907	19.0	<0.05
	误差	2.62	2			

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

Note: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

由表2结果可知, A、B、C 3个因素对破骨风提取效

率的影响大小顺序依次为 $C > A > B$; 由表3结果可知, C因素(提取次数)对阿魏酸量和干膏率的影响均有统计学意义, $A_3B_1C_3$ 工艺结果最佳。但由于B因素影响程度最小, 出于节约成本等多方面综合考虑, 选择最优工艺为 $A_3B_1C_3$, 即提取时间为120 min, 液料比16:1, 提取3次。

2.3.3 验证试验 取药材样品粉末3份, 按“2.3.2”项下优选工艺提取并测定。结果显示, 阿魏酸含量分别为1.56、1.54、1.56 mg/g ($RSD = 0.61\%$, $n = 3$), 干膏率分别为18.36%、18.22%、18.17% ($RSD = 0.44\%$, $n = 3$), 结果稳定, 且均高于正交试验结果, 因此确定 $A_3B_1C_3$ 为最优水提工艺。

2.4 破骨风水提物抗炎镇痛作用研究

考察破骨风水提物对模型小鼠的抗炎镇痛作用。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 13.5统计软件进行统计学分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2.4.1 破骨风水提物给药液的制备 取药材样品粉末, 按“2.3”项下优选工艺提取后, 浓缩成浸膏, 用0.5%羧甲基纤维素钠溶液定容至100 mL (1 g/mL, 以生药计), 于4℃保存备用。本实验中给药剂量(g/kg)均按给药液中所含生药的质量计算。

2.4.2 二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验 参照文献[11]方法, 取小鼠50只, 雌雄各半, 按数字随机表分为模型组(等量生理盐水)、阳性组(阿司匹林水溶液, 0.06 g/kg)和破骨风低、中、高剂量组(破骨风水提物给药液, 3、6、12 g/kg, 下同), 每组10只, 灌胃给药, qd, 连续4 d。末次给药1 h后, 各组小鼠右耳廓两面均匀涂抹二甲苯0.05 mL, 左耳不涂作为正常耳。1 h后脱颈椎处死小鼠, 沿耳廓基线剪下两耳, 用打孔器(直径8 mm)在双耳同一位置取下耳片, 称质量, 并计算肿胀度及肿胀抑制率[肿胀度(mg) = 右耳片质量 - 左耳片质量; 肿胀抑制率(%) = (模型组平均肿胀度 - 给药组平均肿胀度) / 模型组平均肿胀度 × 100%], 结果见表4。

表4 各组小鼠二甲苯致耳廓肿胀度及抑制率($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab 4 The xylene-induced ear edema degree and inhibitory rate among mice of each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量, g/kg	肿胀度, mg	肿胀抑制率, %
模型组		17.55 ± 1.37	
阳性组	0.06	7.21 ± 0.83**	58.9
破骨风低剂量组	3	11.03 ± 1.12*	37.2
破骨风中剂量组	6	9.36 ± 1.23*	46.7
破骨风高剂量组	12	7.05 ± 0.67**	59.8

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

由表4可知, 与模型组比较, 破骨风低、中、高剂量组及阳性组小鼠耳廓肿胀度显著降低, 差异均有统计学意

义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明破骨风水提物对二甲苯致小鼠耳廓肿胀有显著的抑制作用;且随着给药剂量增加,小鼠耳廓肿胀度逐渐降低、肿胀抑制率逐渐升高。

2.4.3 角叉菜胶致小鼠足肿胀实验 参照文献[12]方法,取小鼠50只,雌雄各半,分组及给药方式同“2.4.2”项下,连续给药7 d。末次给药30 min后,于小鼠右后足注射0.1%角叉菜胶生理盐水溶液0.1 mL致炎,分别于致炎后0.5、1、1.5、2 h采用游标卡尺测量并记录小鼠右后足爪容积,并计算肿胀率[肿胀率(%)=(致炎后足容积-致炎前足容积)/致炎前足容积 $\times 100\%$],结果见表5。

表5 各组小鼠角叉菜胶致炎的足肿胀率($\bar{x} \pm s, n=10$)
Tab 5 The paw edema degree induced by carrageenan among mice of each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,g/kg	肿胀率,%			
		0.5 h	1 h	1.5 h	2 h
模型组		30.82 \pm 2.13	42.12 \pm 3.13	50.31 \pm 3.57	53.87 \pm 4.02
阳性组	0.06	14.25 \pm 1.64**	19.33 \pm 1.74**	21.23 \pm 2.03**	22.93 \pm 1.90**
破骨风低剂量组	3	21.06 \pm 2.11*	30.84 \pm 2.01*	31.10 \pm 2.24*	33.97 \pm 3.29*
破骨风中剂量组	6	18.13 \pm 1.50*	24.19 \pm 1.93*	26.87 \pm 3.07*	28.35 \pm 2.56*
破骨风高剂量组	12	15.01 \pm 1.31**	19.65 \pm 1.80**	22.12 \pm 2.33**	23.03 \pm 1.98**

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. model group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

由表5可知,与模型组比较,破骨风低、中、高剂量组及阳性组小鼠各时间点的足肿胀率显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明破骨风水提物对角叉菜胶致小鼠足肿胀有显著的抑制作用;且随着给药剂量增加,小鼠足肿胀率逐渐降低。

2.4.4 醋酸致小鼠扭体反应实验 参照文献[13]方法,取小鼠50只,雌雄各半,分组同“2.4.2”项下;模型组和破骨风低、中、高剂量组均灌胃给药,连续4 d;阳性组前3天灌胃生理盐水,第4天灌胃阿司匹林水溶液。末次给药1 h后小鼠腹腔注射0.6%醋酸0.2 mL,记录15 min内小鼠的扭体次数,结果见表6。

表6 各组小鼠醋酸致扭体反应次数($\bar{x} \pm s, n=10$)
Tab 6 The acetic acid-induced writhing response times among mice of each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,g/kg	15 min内扭体次数
模型组		37.30 \pm 8.53
阳性组	0.06	4.60 \pm 1.53*
破骨风低剂量组	3	11.40 \pm 2.02*
破骨风中剂量组	6	9.20 \pm 2.16*
破骨风高剂量组	12	5.80 \pm 1.84*

注:与模型组比较,* $P<0.05$

Note: vs. model group,* $P<0.05$

由表6可知,与模型组比较,破骨风低、中、高剂量组及阳性组小鼠15 min内的扭体次数均明显减少,差异均有统计学意义($P<0.05$),表明破骨风水提物对小鼠腹腔注射醋酸引起的疼痛具有显著的抑制作用;且随着给药剂量增加,小鼠扭体次数逐渐减少。

2.4.5 热板法致小鼠疼痛反应实验 参照文献[13]方

法,取雌性小鼠置热板仪[(55 \pm 0.5) $^{\circ}$ C],以小鼠自投入至舔后足时间作为痛阈值。取痛阈值为5~30 s的小鼠50只,分组及给药方式同“2.4.2”项下,连续给药7 d,分别于末次给药后30、60 min时测定小鼠痛阈值,结果见表7。

表7 各组小鼠热板疼痛反应的痛阈值($\bar{x} \pm s, n=10$)
Tab 7 The pain threshold of hot-plate response among mice of each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,g/kg	痛阈值,s		
		给药前	给药后30 min	给药后60 min
模型组		19.48 \pm 3.05	20.35 \pm 3.32	20.05 \pm 4.28
阳性组	0.06	22.18 \pm 4.13	34.16 \pm 3.32**	35.75 \pm 4.56**
破骨风低剂量组	3	22.37 \pm 4.38	26.88 \pm 7.82*	27.25 \pm 5.89*
破骨风中剂量组	6	21.85 \pm 5.36	29.37 \pm 4.83*	30.11 \pm 4.20*
破骨风高剂量组	12	21.93 \pm 5.36	33.84 \pm 5.91**	36.38 \pm 4.40**

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. model group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

由表7可知,与模型组比较,破骨风低、中、高剂量组及阳性组小鼠的痛阈值在给药后30 min和60 min时均明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明破骨风水提物能提高小鼠热板疼痛反应的痛阈值;且随着给药剂量增加,小鼠痛阈值逐渐升高。

2.4.6 角叉菜胶致炎小鼠血清和炎症组织中炎症因子的测定 对“2.4.3”项下小鼠,在角叉菜胶致炎后4 h时进行眼球取血,然后颈椎脱臼处死。自踝关节剪下发炎肿胀的右后足,剥皮剪碎后投入3 mL生理盐水中浸泡,并不断振摇1 h。将血样与炎症组织标本浸泡液离心(3 000 r/min,离心半径为6 cm,下同)后取上层血清和炎症标本上清液,置于-70 $^{\circ}$ C冰箱保存。参照文献[14]方法,分别取血清和炎症标本上清液各200 μ L,加入0.5 mol/L氢氧化钾甲醇溶液2 mL,50 $^{\circ}$ C水浴温育20 min;加入2.5 mL甲醇,离心后取上清液,以紫外分光光度计测定其在278 nm波长处的吸光度(A),以每毫升血清/每克炎症组织对应的A表示PGE₂的含量;另取血清,采用ELISA法检测IL-1 β 、TNF- α 的含量,严格按照试剂盒说明书进行操作,结果见表8。

表8 各组小鼠角叉菜胶致炎后血清中IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂及炎症组织中PGE₂含量($\bar{x} \pm s, n=10$)
Tab 8 The contents of TNF- α , IL-1 β and PGE₂ in serum and the content of PGE₂ in inflammation tissue among mice of each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,g/kg	血清			炎症组织
		TNF- α ,ng/L	IL-1 β ,ng/L	PGE ₂	PGE ₂
模型组		586.15 \pm 52.21	542.32 \pm 43.63	0.24 \pm 0.03	0.89 \pm 0.05
阳性组	0.06	357.58 \pm 31.46**	329.33 \pm 21.47**	0.08 \pm 0.02**	0.33 \pm 0.06**
破骨风低剂量组	3	413.06 \pm 32.11*	430.34 \pm 42.01*	0.20 \pm 0.04*	0.61 \pm 0.03*
破骨风中剂量组	6	378.23 \pm 41.50**	381.61 \pm 33.49**	0.17 \pm 0.02*	0.48 \pm 0.04**
破骨风高剂量组	12	332.41 \pm 37.51**	341.25 \pm 31.82**	0.11 \pm 0.01**	0.39 \pm 0.02**

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. model group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

由表8可知,与模型组比较,破骨风低、中、高剂量组

及阳性组小鼠以角叉菜胶致炎后,血清中IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂及炎症组织中PGE₂的含量均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

3.1 破骨风提取工艺研究

在破骨风主要活性成分尚待深入研究的情况下,干膏率在某种程度上能直观反映药材的提取效率。因此,笔者选择阿魏酸含量和干膏率作为提取工艺优选的评价指标。

本课题组前期选取甲醇、乙醇(不同体积分数)、水、乙醚等为提取溶剂进行考察,结果乙醚对阿魏酸的提取效率较低;甲醇、乙醇、水提取阿魏酸的提取率相当,但甲醇提取液中有一个与阿魏酸保留时间接近的色谱峰,明显干扰测定;而不同体积分数的乙醇提取与水提取相比较,水提取液色谱图中阿魏酸分离度高,且干膏率明显更高。综合实际生产成本、有机溶剂环境污染等因素,本课题组选择水为提取溶剂。另外,对回流提取法、水煎煮法、冷浸渍法进行考察,结果发现回流提取法(20倍量水提取2次,每次120 min)所得阿魏酸含量和干膏率明显高于水煎煮法(20倍量水煎煮3次,分别煎煮120、60、60 min)和水冷浸提法(20倍量水浸提3次,分别浸提48、24、24 h)。因此,确定水回流提取法为本试验提取方法。

经单因素试验和正交试验研究发现,提取次数是影响阿魏酸含量和干膏率的最主要因素,且均有统计学意义。经正交试验优选,最优工艺为提取时间120 min、液料比16:1、提取3次;经验证试验证实,该工艺提取效率高、稳定可行。

3.2 破骨风抗炎镇痛作用研究

阿司匹林为非甾体抗炎药,抗炎镇痛作用显著,常作为阳性对照药应用于实验研究^[15-16],因此本实验采用阿司匹林作为阳性对照,对不同剂量的破骨风水提物进行了抗炎镇痛作用研究。结果表明,破骨风水提物对二甲苯致小鼠耳廓肿胀、角叉菜胶致小鼠足肿胀、醋酸致小鼠扭体反应和热板致小鼠疼痛反应均具有显著抑制作用,其抗炎镇痛作用明确。

已有研究证实,IL-1 β 、TNF- α 是主要致炎介质,可作用于单核细胞和中性粒细胞而引起炎症反应;PGE₂可与缓激肽等炎症介质起协同作用,加剧炎症反应;大量PGE₂、白三烯等与氧自由基的作用是致痛的主要原因,为致炎致痛介质^[17-18]。本研究表明,破骨风水提物可降低角叉菜胶致炎小鼠血清中的TNF- α 、IL-1 β 、PGE₂含量与炎症组织中的PGE₂含量,提示这可能为其抗炎镇痛的作用机制。

参考文献

- [1] 广西壮族自治区食品药品监督管理局.广西瑶族习用药材质量标准[S].2013:147.
- [2] 孙佳明,杨峻山,张辉.破骨风的化学成分研究[J].中国中药杂志,2008,33(17):2128-2130.
- [3] 张子川,楼丽丽,孟大利,等.清香藤化学成分分离与鉴定[J].沈阳药科大学学报,2010,27(11):880-882.
- [4] 张毅,梁旭,张正锋,等.清香藤茎化学成分分离与鉴定[J].沈阳药科大学学报,2014,31(8):610-612.
- [5] 胡益勇,徐晓玉.阿魏酸的化学和药理研究进展[J].中成药,2006,28(2):253-255.
- [6] KAWABATA K, YAMAMOTO T, HARA A, et al. Modifying effects of ferulic acid on azoxym ethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats[J]. *Cancer Lett*, 2000, 157(1):15-21.
- [7] 黄丰阳,徐秋萍.中药有效成分的抗血小板作用研究进展[J].北京中医药大学学报,1999,22(2):28-31.
- [8] SUZUKI A, KAGAWA D, FUJII A, et al. Short-and long-term effects of ferulic acid on blood pressure in spontaneously hypertensive rats[J]. *Am J Hypertens*, 2002, 15(4 Pt 1):351-357.
- [9] 刘斌岭.中药颗粒剂临床应用体会[J].中医药导报,2014,20(59):134-136.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典,四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:103.
- [11] 蒋才武,杜冲,伍敏,等.壮药山芝麻抗炎镇痛止血有效部位的研究[J].中华中医药杂志,2010,25(10):1672-1674.
- [12] 张大方.药理与中药药理实验[M].上海:上海科学技术出版社,2002:44,93.
- [13] 蒙衍强,唐献兰,黄健军,等.闪提法对仙鹤草止血镇痛作用的影响[J].中成药,2013,35(7):1560-1562.
- [14] 孙爱静,徐先祥,黄晓东,等.七叶莲花抗炎镇痛作用及机制研究[J].中药材,2014,37(2):311-315.
- [15] 韦锦斌,周劲帆,冯洁,等.两面针叶不同提取部位的抗炎镇痛作用研究[J].中药新药与临床药理,2013,24(2):122-125.
- [16] 蒋征奎,李晓,罗彬.野菊花挥发油抗炎镇痛作用[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(16):124-127.
- [17] 李恒华,陈国庆,张毅,等.四乙酰葛根素抗炎作用及机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(13):177-180.
- [18] GRISHAM MS, GRANGER DN, LEFER BJ. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease[J]. *Free Radic Biol Med*, 1998, 25(4/5):404-433.

(收稿日期:2017-10-18 修回日期:2018-01-28)

(编辑:段思怡)