

浊点萃取结合 UPLC-MS/MS 法测定气道炎症模型豚鼠灌胃射干提取物后血浆中 LTB₄ 的浓度^Δ

杨 瑞*, 邸子真, 吴 怡, 陶弘武*(辽宁省中医药研究院, 沈阳 110034)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)15-2086-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.15.16

摘要 目的:建立测定气道炎症豚鼠血浆中白三烯 B₄(LTB₄)浓度的方法,考察给予射干提取物后其对豚鼠血浆中 LTB₄浓度的影响,为阐明射干提取物抗炎止咳的作用机制提供参考。方法:将 30 只豚鼠随机分为空白组、模型组和射干提取物组,每组 10 只。除空白组外,其余 2 组豚鼠采用烟熏+合胞病毒滴鼻法制造气道炎症模型。造模结束后次日,射干提取物组豚鼠灌胃给药(10 mg/kg 射干提取物,以野鸢尾黄素计),空白组和模型组豚鼠灌胃等体积生理盐水,每天给药 1 次,连续给药 7 d,末次给药后收集血浆样品。分别考察表面活性剂 Triton X-114 浓度、盐酸浓度、盐酸加入量、平衡温度和平衡时间对 LTB₄提取回收率的影响(以 44.5 g/L 的牛血清白蛋白生理盐水溶液替代空白血浆),确定最优浊点萃取工艺进行生物样品处理。然后以吲哚美辛为内标,采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定血浆中 LTB₄浓度。色谱条件:色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈,流动相为 0.2% 甲酸水-乙腈(40:60, V/V),流速为 0.4 mL/min,柱温为 40 ℃,进样量为 5 μL;MS 条件:电喷雾离子源,正离子模式下扫描,LTB₄用于定量的离子为[M+H]⁺质荷比(*m/z*)335.219 4→195.099 8,吲哚美辛为[M+H]⁺ *m/z* 356.083 6→312.084 2。结果:浊点萃取最优条件为 Triton X-114 浓度 5%,加入 0.3 mol/L 盐酸 50 μL 调至酸性、平衡温度 50 ℃,平衡时间 20 min。在该含量测定条件下方法学验证结果均符合相关要求。与空白组比较,模型组豚鼠血浆中 LTB₄浓度显著升高(*P*<0.05);与模型组比较,射干提取物组豚鼠血浆中 LTB₄浓度显著降低(*P*<0.05)。结论:本研究中样品处理方法绿色环保,含量检测方法灵敏度高、准确性好,适用于血浆中 LTB₄浓度的测定;射干提取物可使气道炎症豚鼠血浆中升高的 LTB₄浓度得到显著回调。

关键词 浊点萃取;超高效液相色谱-串联质谱法;射干提取物;白三烯 B₄;豚鼠

Concentration Determination of LTB₄ in Plasma of Airway Inflammatory Model Guinea Pigs after Intra-gastric Administration *Belamcanda chinensis* Extract by Cloud Point Extraction Combined with UPLC-MS/MS Method

YANG Rui, DI Zizhen, WU Yi, TAO Hongwu(Liaoning Academy of TCM, Shenyang 110034, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for determining the concentration of leukotriene B₄ (LTB₄) in plasma of airway inflammatory guinea pigs, investigate the effects after giving *Belamcanda chinensis* extract on plasma concentration of LTB₄ in guinea pigs and provide reference for clarifying the mechanism of anti-inflammatory and antitussive effects of *B. chinensis* extract. METHODS: Totally 30 guinea pigs were randomly divided into blank group, model group and *B. chinensis* extract group, with 10 guinea pigs in each group. Except for blank group, airway inflammation model was induced by smokation+syncytial virus intranasal method in other 2 groups. At next day after modeling, guinea pigs were given relevant medicine (10 mg/kg *B. chinensis* extract, calculated by irigenin) intragastrically in *B. chinensis* extract group; blank group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically, once a day, for consecutive 7 d, and the plasma samples were collected after last administration. Then, the effects of surface active agent Triton X-114 concentration, hydrochloric acid concentration, hydrochloric acid amount. Equilibrium temperature and equilibrium time on extraction recovery rate of LTB₄ were investigated (using 44.5 g/mL BAS saline solution instead of blank plasma). The optimal cloud point extraction technology was determined for biological sample treatment. Using indometacin as internal standard, UPLC-MS/MS method was used to determine the concentration of LTB₄ in plasma. Chromatographic conditions: the chromatographic column is ACQUITY UPLC BEH C₁₈, the mobile phase is 0.2% formic acid-acetonitrile (40 : 60, V/V), flow rate is 0.4 mL/min, column temperature is 40 ℃, sample volume is 5 μL. MS condition: Electrospray ion source, positive ion mode scanning, and the LTB₄ used for the [M+H]⁺ mass ratio (*m/z*) 335.219 4→195.099 8, Indomethacin is [M+H]⁺ *m/z* 356.083 6→312.084 2. RESULTS: The optimal cloud point extraction condition included Triton X-114 concentration 5%, added into 0.3 mol/L hydrochloric acid 50 μL adjusted to acid and equilibrium temperature 50 ℃, for 20 min. The results of methodology validation were all in line with the content determination requirements. Compared with blank group, the plasma concentration of LTB₄ in guinea pigs was increased significantly in model group (*P*<0.05). Compared

^Δ 基金项目:国家科技重大专项课题(No.2017ZX09301019);辽宁省大型仪器设备共享服务能力建设项目(No.2016LD0113)

* 助理研究员,博士。研究方向:药物新剂型、药理学。电话:024-86803043。E-mail:yang_rui1983@163.com

通信作者:主任医师,教授,硕士生导师。研究方向:中药分析。电话:024-86803507。E-mail:taohw@126.com

with model group, the plasma concentration of LTB₄ in guinea pigs was decreased significantly in *B. chinensis* extract group (*P*<0.05). CONCLUSIONS: The method of sample processing is environmental friendly, and the content determination method is high sensitivity and accuracy, and applicable for determination of LTB₄ in plasma samples. *B.*

chinensis extract can significantly regulate the increase of LTB₄ concentration in plasma of guinea pigs with airway inflammation.

KEYWORDS Cloud point extraction; UPLC-MS/MS; *Belamcanda chinensis* extract; Leukotriene B₄; Guinea pig

随着绿色化学的发展,生物样品分析技术逐渐向着不使用或者尽可能少使用有机溶剂的方向发展。目前,在生物样品的测试过程中,样品的前处理及分析过程中需要大量的有机试剂,产生了大量的化学污染物。因此,发展“创新、绿色”的生物样品分析技术成为当前研究的热点。浊点萃取(Cloud point extraction, CPE)是一种新型的液-液萃取技术,利用非离子表面活性剂的增溶作用和和浊点温度时两相分离而达到对待测物分离富集的效果。相比于传统的生物样品前处理方法,CPE技术具有萃取效率高、富集因子大、不使用有机溶剂、对环境 and 操作人员危害小、表面活性剂易于处理、易与其他分析仪器联用、便于进行大规模操作等优势^[1]。目前,CPE技术已广泛应用于生物样品分析领域^[2-4]。

白三烯B₄(LTB₄)是花生四烯酸在脂氧酶代谢途径中的产物,为变应性疾病发病的关键炎症介质^[5-8],具有强大的细胞趋化作用,可吸引包括淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞在内的多种细胞向炎症反应部位聚集和激活^[9]。前期研究表明^[10-12],射干提取物具有良好的抗炎、止咳多靶标作用,能够显著抑制花生四烯酸的脂氧酶和环氧合酶代谢。本研究在此基础上,采用CPE技术,并结合超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法监测射干提取物灌胃给药后气道炎症豚鼠血浆中的LTB₄浓度的变化,为射干提取物抗炎、止咳机制研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Xevo G2-XS 超高效液相色谱-飞行质谱联用(UPLC-QTOF-MS)仪、Masslynx 4.1数据处理系统(美国Waters公司);XW-80A微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂);XS105分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];SIGMA3-18K低温冷冻高速离心机(德国Sigma公司)。

1.2 药品与试剂

射干药材购自湖北射干种植基地,经辽宁中医药大学李峰教授鉴定为鸢尾科射干属植物射干 *Belamcanda chinensis* (L.) DC.的干燥根茎;LTB₄对照品(美国Cayman Chemical公司,批号:0466969-14,纯度:≥97.0%);吡哌美辛对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100258-200904,纯度:99.9%);牛血清白蛋白(北京索莱宝科技有限公司,批号:B0040);甲醇、乙腈(美国Fisher Scientific公司,质谱纯);表面活性剂曲拉通X-114(Triton X-114,美国Sigma-Aldrich公司);水为自制超纯水。

1.3 病毒

呼吸道合胞病毒购自广州博特生物有限公司。

1.4 动物

SPF级Hartley豚鼠30只,♂,体质量250~300 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2014-0001。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:0.2%甲酸-乙腈(40:60, V/V);流速:0.4 mL/min;柱温:40 °C;进样量:5 μL。

2.1.2 MS条件 电喷雾离子源(ESI),离子源温度:100 °C;毛细管电压:3 kV;锥孔电压:40 V;脱溶剂气温度:350 °C;锥孔气流速:50 L/h;脱溶剂气流速:800 L/h;正离子模式检测,扫描方式为多反应监测(MRM),扫描时间为0.5 s;LTB₄用于定量的离子为[M+H]⁺质荷比(*m/z*):335.219 4→195.099 8,碰撞能量(CE):16 V;内标吡哌美辛用于定量的离子为[M+H]⁺ *m/z*:356.083 6→312.084 2,CE:9 V。

2.2 溶液的制备

2.2.1 LTB₄对照品溶液 精密称取LTB₄对照品10.00 mg于10 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得1 mg/mL的LTB₄储备液;甲醇逐级稀释储备液制成LTB₄质量浓度分别为10、20、50、100、200、250、500、800、1 000 μg/L的LTB₄系列对照品溶液。其中,20、250、800 μg/L的LTB₄溶液为质控(QC)用对照品溶液,其余为标准曲线用对照品溶液。

2.2.2 吡哌美辛内标溶液 精密称取吡哌美辛对照品11.25 mg于10 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,即得1.124 mg/mL的吡哌美辛储备液;取储备液再用甲醇稀释为质量浓度为112.4 μg/L的吡哌美辛内标溶液。

2.3 射干提取工艺

取射干药材1 kg,分别加8、6倍量70%乙醇提取2次,分别提取1、0.5 h,滤过,收集上清液并浓缩,减压干燥,即得射干提取物,出膏率为4.8%(经高效液相色谱法检测,提取物中含野鸢尾黄素1.88 mg/g)。

2.4 动物模型的建立及血浆样品的采集

30只豚鼠适应性饲养1周后随机分成3组,即空白组、模型组和射干提取物组,每组10只。除空白组外,将其余2组豚鼠每日放入自制熏笼中烟熏30 min,连续7 d,分别在第2、3天用乙醚浅麻醉,然后鼻腔滴入合胞病毒液^[13]。射干提取物组豚鼠于第8天灌胃给予射干提取物10 mg/kg(以野鸢尾黄素计)^[13],空白组和模型组豚鼠给予相同体积的生理盐水,连续给药7 d后腹主动脉采血,以1 370×g离心10 min,分离血浆,保存备用。

2.5 血浆样品的处理

采用CPE法进行血浆样品处理。精密吸取100 μL血浆样品于1.5 mL空白离心管中,加入吡哌美辛内标溶

液 10 μL 、甲醇-水(50:50, V/V) 10 μL 、Triton X-114 溶液 150 μL 和一定浓度的盐酸溶液适量, 涡旋混匀 5 min, 水浴环境中一定温度下平衡一定时间后, 取出, 以 1370 $\times g$ 离心 5 min, 弃去水相, 向表面活性剂层中加入乙腈 100 μL , 涡旋混匀, 以 13148 $\times g$ 离心 5 min, 取上清液进样分析。

2.6 血浆样品 CPE 法的条件优选

CPE 过程主要受表面活性剂的浓度、样品酸碱度、平衡温度和平衡时间的影响^[2]。因此, 本研究分别考察上述 4 个因素对 LTB_4 提取回收率的影响, 优化样品 CPE 处理方法。提取回收率计算公式为: LTB_4 提取回收率 (%) = CPE 样品中 LTB_4 与吲哚美辛的峰面积比/纯溶液中 LTB_4 与吲哚美辛的峰面积比 $\times 100\%$ 。

2.6.1 Triton X-114 浓度的考察 在 CPE 过程中, 固定盐酸的浓度为 0.3 mol/L、加入量 40 μL , 平衡温度为 50 $^\circ\text{C}$, 平衡时间为 30 min, 分别采用浓度为 1%、3%、5%、7%、9% 的 Triton X-114 进行血浆样品的替代基质 (44.5 g/L 的牛血清白蛋白生理盐水溶液)^[14] 处理。结果表明, 当 Triton X-114 浓度从 1% 增加到 5% 时, LTB_4 的提取回收率逐渐增加且趋于平稳, 综合考虑表面活性剂用量可能对质谱的影响, 确定 Triton X-114 浓度为 5%。Triton X-114 浓度对 LTB_4 提取回收率的影响结果见图 1A。

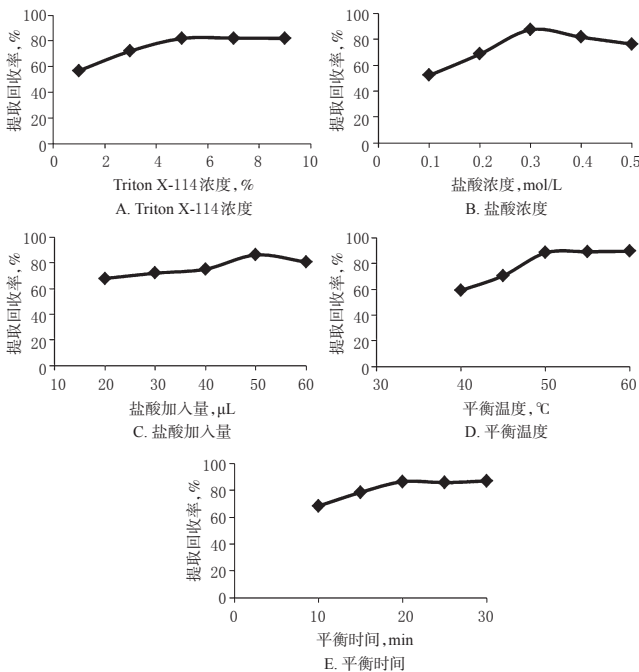


图 1 各因素对 LTB_4 提取回收率的影响

Fig 1 Effects of each factor on extraction recovery of LTB_4

2.6.2 样品酸碱度的考察 在 CPE 过程中, 固定 Triton X-114 浓度为 5%, 平衡温度为 50 $^\circ\text{C}$, 平衡时间为 30 min, 分别考察盐酸的浓度 (0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L) (固定盐酸加入量为 40 μL) 和加入量 (20、30、40、50、60 μL) (固定盐酸浓度为 0.3 mol/L) 对 LTB_4 提取回收率的影响。结果表明, LTB_4 的提取回收率随盐酸浓度的增加

而增加, 当盐酸浓度为 0.3 mol/L 时 LTB_4 提取回收率最大, 继续加大盐酸浓度 LTB_4 提取回收率反而下降; LTB_4 的提取回收率随着盐酸加入量的增加而增加, 加入 50 μL 盐酸时 LTB_4 提取回收率最大, 继续加大盐酸用量时 LTB_4 提取回收率下降。故确定加入盐酸浓度为 0.3 mol/L, 加入量为 50 μL 。样品酸碱度对 LTB_4 提取回收率的影响结果见图 1B、C。

2.6.3 平衡温度 在 CPE 过程中, 固定 Triton X-114 浓度为 5%, 盐酸的浓度为 0.3 mol/L、加入量为 50 μL , 平衡时间为 30 min, 分别考察平衡温度 (40、45、50、55、60 $^\circ\text{C}$) 对 LTB_4 提取回收率的影响。结果表明, LTB_4 提取回收率随温度的升高而增加, 平衡温度为 50 $^\circ\text{C}$ 时, LTB_4 提取回收率最大, 继续升高温度 LTB_4 提取回收率不再增加, 故确定平衡温度为 50 $^\circ\text{C}$ 。平衡温度对 LTB_4 提取回收率的影响结果见图 1D。

2.6.4 平衡时间 在 CPE 过程中, 固定 Triton X-114 浓度为 5%, 盐酸浓度为 0.3 mol/L、加入量为 50 μL , 平衡温度为 50 $^\circ\text{C}$, 分别考察平衡时间 (10、15、20、25、30 min) 对 LTB_4 提取回收率的影响。结果表明, 平衡 20 min 可使样品中 LTB_4 的提取回收率达到最大值, 延长平衡时间 LTB_4 提取回收率不再增加, 故确定平衡时间为 20 min。平衡时间对 LTB_4 提取回收率的影响结果见图 1E。

2.7 分析方法验证

2.7.1 专属性 精密量取 100 μL 空白血浆的替代基质, 不加内标; 200 $\mu\text{g/L}$ 的 LTB_4 对照品溶液 10 μL , 氮气下吹干, 加入 100 μL 空白血浆的替代基质; 豚鼠给药后收集的血浆样品。根据“2.6”优化条件, 将以上样品分别按“2.5”项方法处理后进样测定。结果, LTB_4 、内标吲哚美辛与内源性物质分离良好, 保留时间分别为 2.52、2.78 min, 各相邻峰间分离度均大于 1.5, 血浆中内源性物质不干扰 LTB_4 和内标的测定, 色谱图见图 2。

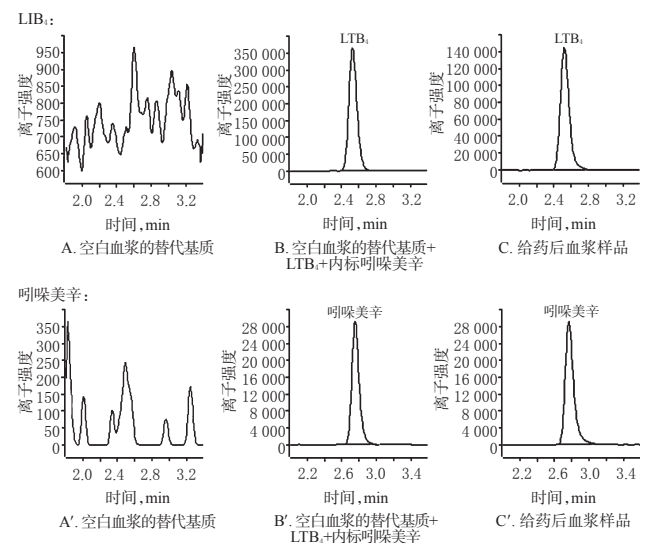


图 2 LTB_4 和吲哚美辛的典型色谱图

Fig 2 Typical chromatograms of LTB_4 and indomethacin

2.7.2 标准曲线及线性范围 分别精密量取LTB₄系列对照品溶液10 μL于1.5 mL空白离心管中,加入空白血浆的替代基质,制备成LTB₄血浆浓度分别为1、5、10、20、50、100 μg/L的样品,根据“2.6”优化的条件按“2.5”项下方法进行样品处理,然后按“2.1”项下条件进样分析。以LTB₄与内标吡喹啉美辛峰面积的比为纵坐标(y)、样品浓度为横坐标(x)进行线性回归,拟合标准曲线方程为 $y=0.054x-0.008(r=0.9990)$ 。结果表明,LTB₄血药浓度在1~100 μg/L范围内与峰面积的线性关系良好。

2.7.3 准确度和精密度 分别配制LTB₄血浆质量浓度为2、25、80 μg/L的QC样品,每个浓度进行6样品分析,根据“2.6”优化的条件按“2.5”项下方法进行样品处理,然后按“2.1”项下条件进样分析,共进行3批次分析,计算批内、批间精密度[以变异系数(CV)表示]和准确度。结果表明,2、25、80 μg/L QC样品的批内和批间精密度以及准确度结果均符合生物样品分析要求。准确度和精密度试验结果见表1。

表1 精密度和准确度试验结果(n=6)

Tab 1 Results of precision and accuracy test(n=6)

样品浓度,ng/mL	批内			批间		
	实测浓度,ng/mL	CV,%	准确度,%	实测浓度,ng/mL	CV,%	准确度,%
2	2.05±0.07	3.56	102.50	2.02±0.09	4.31	101.19
25	25.81±0.53	2.06	103.25	24.66±1.22	4.96	98.65
80	77.37±2.77	3.59	96.71	77.51±3.47	4.47	96.89

2.7.4 提取回收率和基质效应 分别精密量取LTB₄质控用对照品溶液10 μL于1.5 mL空白离心管中,加入空白血浆的替代基质,制备LTB₄质量浓度为2、25、80 μg/L的血浆替代基质样品,按“2.5”项下方法进行样品处理;分别精密量取LTB₄质控用对照品溶液10 μL于1.5 mL空白离心管中,氮气下吹干,加入乙腈100 μL,混匀即得对照品溶液;另分别精密量取空白血浆的替代基质100 μL,不加内标,按“2.5”项下方法进行样品处理,在处理上清液中分别加入10 μL质控用对照品溶液和10 μL内标溶液,混匀即得基质样品。每个质量浓度进行3样品分析,计算LTB₄的提取回收率和内标归一化的基质效应。结果表明,2、25、80 μg/L 3个质量浓度下LTB₄的提取回收率和基质效应均符合生物样品分析要求。提取回收率和基质效应测定结果见表2。

表2 提取回收率和基质效应测定结果(n=3)

Tab 2 Results of extract recovery rate and matrix effect(n=3)

样品浓度,ng/mL	提取回收率,%	CV,%	基质效应,%	CV,%
2	84.23±3.50	4.15	87.29±7.02	8.04
25	88.36±2.18	2.47	88.11±5.27	5.98
80	89.79±2.75	3.06	92.36±3.65	3.95

2.7.5 稳定性 分别制备LTB₄质量浓度为2、80 μg/L的QC样品,考察QC样品在室温放置4 h、自动进样器中(4 ℃)中放置24 h、经历3次冷冻-解冻循环和-70 ℃放置90 d的稳定性,每个浓度进行3样品分析。结果表明,QC样品在上述条件下均稳定,不同条件下稳定性试验结果见表3。

表3 稳定性试验结果(n=3)

Tab 3 Results of stability tests(n=3)

样品浓度,ng/mL	室温放置稳定性(25 ℃, 4h)		自动进样器放置稳定性(4 ℃, 24h)		3次冷冻-解冻循环稳定性(-70 ℃)		长期稳定性(-70 ℃, 90 d)	
	实测浓度,ng/mL	偏差,%	实测浓度,ng/mL	偏差,%	实测浓度,ng/mL	偏差,%	实测浓度,ng/mL	偏差,%
2	2.03±0.17	1.67	1.99±0.27	-0.33	1.85±0.09	-7.67	2.10±0.15	5.17
80	79.25±2.68	2.41	78.88±3.33	-1.40	78.44±1.81	-1.95	80.36±2.54	0.45

2.8 豚鼠血浆中LTB₄的浓度测定

采用UPLC-MS/MS法测得空白组、模型组和射干提取物组豚鼠血浆中LTB₄的质量浓度分别为(1 078.23±12.54)、(1 136.25±11.59)、(1 085.36±10.91)ng/L。采用SPSS 24.0统计学软件对结果进行单因素方差分析。结果表明,与空白组比较,模型组豚鼠血浆中LTB₄浓度显著升高(P<0.05);与模型组比较,射干提取物组豚鼠血浆中LTB₄浓度显著降低(P<0.05),且与空白组差异无统计学意义(P>0.05)。表明造模后气道炎症豚鼠血浆中LTB₄浓度升高,给予射干提取物后血浆中LTB₄浓度上升。

3 讨论

浊点是非离子表面活性剂的特性,即随温度的升高表面活性剂均相胶束溶液出现浑浊现象时的温度。CPF过程中常用的非离子表面活性剂有Triton X-114、Triton X-100、聚山梨酯20和聚山梨酯80,其浊点分别为23、64、95和85 ℃。由于CPF平衡温度需高于浊点15~20 ℃^[15],而Triton X-114的浊点温度显著低于其他表面活性剂,兼顾生物样品高温下的不稳定性,故本研究最终选择Triton X-114为表明活性剂对生物样品进行萃取。LTB₄为弱酸性物质,采用盐酸调节样品的pH值至弱酸性,既保证了LTB₄以分子状态被包封于表面活性剂胶束的疏水核内部,又有助于提高LTB₄的提取回收率。但是当盐酸加入量过大时,由于离子抑制效应,LTB₄提取回收率反而下降。采用CPF进行生物样品前处理,相比于传统的蛋白沉淀法、液液萃取法、固液萃取法、液相微萃取、固相微萃取等方法,节约了有机试剂的用量、提高了萃取富集效率、降低了分析成本,充分体现了“绿色环保”的理念。

花生四烯酸是一种ω-6多不饱和脂肪酸,分别在环氧合酶、脂氧酶及细胞色素单氧化酶作用下代谢为一系列的代谢产物,为重要的炎症介导因子^[16]。LTB₄是花生四烯酸脂氧酶途径的代谢产物,炎症反应时体内浓度显著上调,建立灵敏度高、专属性强UPLC-MS/MS方法监测血浆中LTB₄浓度,可为炎症诊治提供数据依据。LTB₄作为体内内源性生物标记物,无法得到空白生物样品。因此,本研究制备了44.5 g/L的牛血清白蛋白生理盐水溶液作为血浆替代基质进行UPLC-MS/MS方法验证。建立的含量测定方法灵敏度高、准确性好,LTB₄提取回收率和基质效应均符合生物样品分析要求,可用于LTB₄的准确定量分析。本研究结果显示,气道炎症模型豚鼠血浆中LTB₄浓度显著升高,而给予射干提取物后血

壮药战骨总黄酮提取物经皮给药对大鼠/小鼠的抗炎、镇痛作用研究^Δ

叶勇^{1*},覃妮¹,庾茜¹,邓俊宇¹,黄秋洁^{2#}(1.广西医科大学药学院,南宁 530021;2.广西中医药大学药学院,南宁 530001)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)15-2090-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.15.17

摘要 目的:研究壮药战骨总黄酮提取物经皮给药的抗炎、镇痛作用,为战骨经皮给药新制剂的研发提供参考。方法:分别将小鼠和大鼠分为空白组(40%乙醇溶液)、阳性对照组(双氯酚酸二乙胺,小鼠的给药剂量为0.390 g/kg、大鼠为0.280 g/kg)和战骨总黄酮提取物低、中、高剂量组(以生药计小鼠的给药剂量为0.400、0.791、6.330 g/kg,大鼠为0.136、0.275、2.200 g/kg)。腹部经皮给药,每天给药1次。分别采用二甲苯致炎法测定小鼠耳肿胀率(给药5 d)和弗氏完全佐剂致炎法测定致炎2、4、9、15 d后大鼠的足趾肿胀度(给药18 d),以考察战骨总黄酮提取物的抗炎作用。采用乙酸扭体法测定小鼠注射1%乙酸后20 min内的扭体次数(给药5 d),末次给药后30、60、90 min采用热板致痛法测定小鼠的疼痛抑制率(给药5 d),光热甩尾法测定大鼠的可能最大镇痛百分率(给药18 d)以及鼠尾压痛法测定小鼠的痛阈提高值(给药5 d),以综合评价战骨总黄酮提取物的镇痛作用。结果:与空白组比较,战骨总黄酮提取物高剂量组小鼠耳肿胀率和致炎不同时间后大鼠的足趾肿胀度显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),小鼠扭体次数显著减少($P<0.01$),给药不同时间后小鼠的疼痛抑制率以及可能最大镇痛百分率和痛阈提高值均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);战骨总黄酮提取物中剂量组大鼠在致炎2、4、9 d的足趾肿胀度显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),小鼠扭体次数显著减少($P<0.01$),末次给药后60、90 min的小鼠疼痛抑制率和痛阈提高值显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);战骨总黄酮提取物低剂量组大鼠在致炎2、4、9 d的足趾肿胀度显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),给药后90 min的疼痛抑制率显著升高($P<0.01$)。结论:战骨总黄酮提取物经皮给药具有明显的抗炎、镇痛作用,且呈现一定的量效关系。

关键词 壮药;战骨总黄酮提取物;抗炎;镇痛;经皮给药;小鼠;大鼠

浆中LTB₄浓度显著回调,且接近正常水平。这提示,射干提取物抗炎、止咳的作用机制可能与降低血浆中异常升高的LTB₄浓度有关。

参考文献

- [1] 王志龙.非离子表面活性剂为溶媒的浊点萃取技术[J].化学工程,2006,34(4):9-12.
- [2] 邱焱,郭忠辉,吴晓玲.浊点萃取联合高效液相色谱法测定血浆中的橙皮素[J].中国医院药学杂志,2017,37(6):493-496.
- [3] 石珊,毕开顺,唐倩,等.浊点萃取结合高效液相色谱法测定大鼠血浆中双氯芬酸钠的浓度[J].药物分析杂志,2009,29(4):551-555.
- [4] 刘超美.浊点萃取技术在药物分析中的应用研究[D].杭州:浙江师范大学,2014.
- [5] 刘海叶,王亚利,王鑫国,等.养阴益肺方对慢性阻塞性肺疾病稳定期气阴两虚证患者白三烯B₄水平的影响[J].中医杂志,2017,58(8):673-677.
- [6] 许光兰,赵媚,钟云青,等.清金化痰颗粒对慢性阻塞性肺疾病加重期(痰热郁肺)大鼠白三烯B₄、白三烯C₄及肺组织病理形态的影响[J].辽宁中医杂志,2017,44(1):174-177.
- [7] 朱杰,吕学东,马航,等.支气管哮喘患者呼出气冷凝液中

- LTB₄和TNF- α 检测的研究[J].内科急危重症杂志,2016,22(4):279-281.
- [8] 张鑫雨,马莲美,李晓梅,等.孟鲁司特治疗儿童咳嗽变异性哮喘的临床研究[J].中国药房,2017,28(29):4103-4105.
- [9] 肖沙,陈德宇,杨西群.白三烯及抗白三烯药物与皮肤病相关性研究进展[J].皮肤病与性病,2010,32(2):19-22.
- [10] 李欣妍,尤献民,邹桂欣,等.射干止咳有效成分白射干素提取优化[J].辽宁中医杂志,2016,43(8):1699-1701.
- [11] 温雯,马跃海,朱竟赫,等.射干传统功效考证及其实验药理学验证[J].世界科学技术:中医药现代化,2017,19(5):846-850.
- [12] 邹桂欣,尤献民,赵金明,等.白射干素对感染后咳嗽豚鼠细胞因子的影响[J].中国现代医学杂志,2016,26(23):6-9.
- [13] 邸子真,杨瑞,吴怡,等.浊点萃取结合LC-MS/MS法测定野鸢尾黄素对气道炎症模型豚鼠体内花生四烯酸的影响[J].辽宁中医杂志,2017,44(9):1932-1935.
- [14] 唐海涛.白蛋白稀释液联合706代血浆在人工肝治疗乙型肝炎肝功能衰竭中的疗效观察[J].临床医药文献杂志,2016,3(25):5086-5087.
- [15] FRANKEWICH RP, HINZE WL. Evaluation and optimization of the factors affecting nonionic surfactant-mediated phase separations[J]. *Anal Chem*, 1994,66(7):944-954.
- [16] 姜连生,谭龙益.色谱法在花生四烯酸代谢产物检测中的应用[J].检验医学,2015,30(8):852-856.

^Δ 基金项目:广西自然科学基金资助项目(No.2013GXNSF-BA019149);广西医科大学校级创新创业项目(No.2013cxcy118)

* 副教授,博士。研究方向:中药新剂型与新技术。电话:0771-5358014。E-mail:yong-ye@163.com

通信作者:副教授,硕士。研究方向:民族药新制剂的开发。电话:0771-2399840。E-mail:hqj8@163.com

(收稿日期:2018-01-05 修回日期:2018-04-20)

(编辑:林静)