

# 贵州苗族药酢浆草不同溶剂提取物的 药效比较及 HPLC 测定

崔琚<sup>1</sup>, 刘星星<sup>1</sup>, 李月婷<sup>1</sup>, 李靖<sup>2</sup>, 何彬<sup>2</sup>, 刘亭<sup>1</sup>, 王永林<sup>1</sup>, 何迅<sup>2\*</sup>

(1. 贵阳医学院药学院贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004;  
2. 贵阳医学院民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 研究酢浆草 70% 乙醇和水提取物的急性毒性、抗炎和镇痛作用, 分析 HPLC 图中峰信息量。方法: 采用急性毒性最大耐受量试验评价酢浆草 70% 乙醇和水提取物的急性毒性; 冰乙酸致腹腔毛细血管通透性试验考察抗炎作用, 冰醋酸致扭体反应考察镇痛作用; 使用 HPLC 对不同溶剂提取物进行分析。结果: 在 35 ~ 1 120 mg·kg<sup>-1</sup> 的剂量范围内各组小鼠活动正常, 未见死亡, MTD 大于 1 120 mg·kg<sup>-1</sup>; 与水提取物比较, 70% 乙醇提取物能更好地抑制冰乙酸引起的毛细血管通透性增高及扭体反应, HPLC 峰信息更丰富, 共有峰的提取率更高。结论: 酢浆草 70% 乙醇和水提取物的致死剂量较高, 毒性较小, 70% 乙醇提取物的抗炎镇痛作用优于水提取物, 并且能够更充分的富集有效成分。

**[关键词]** 酢浆草; 不同溶剂提取物; 抗炎; 镇痛; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0053-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020053

**Comparison of Effects and HPLC Detection on Different Extracts of Miao Medicine *Oxalis corniculata* in Guizhou Province** CUI Jun<sup>1</sup>, LIU Xing-xing<sup>1</sup>, LI Yue-ting<sup>1</sup>, LI Jing<sup>2</sup>, HE Bin<sup>2</sup>, LIU Ting<sup>1</sup>, WANG Yong-lin<sup>1</sup>, HE Xun<sup>2\*</sup> (1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine (Ministry of Education), Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study acute toxicity, anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of 70% ethanol extract ( $E_{70\% \text{ EtOH}}$ ) and water extract ( $E_{\text{water}}$ ) of *Oxalis corniculata*, HPLC was used to analyze figure information and determine the best extract. **Method:** The maximum dosage test was used to evaluate safety of  $E_{70\% \text{ EtOH}}$  and  $E_{\text{water}}$ . Permeability increase of celiac capillary induced by glacial acetic acid in mice was performed to investigate the anti-inflammatory effect, writhing test induced by glacial acetic acid in mice was used to observe the anti-nociceptive activity. Analyze different extracts by HPLC. **Result:**  $E_{70\% \text{ EtOH}}$  and  $E_{\text{water}}$  didn't show toxicity in the range of 35 to 1 120 mg·kg<sup>-1</sup>, MTD > 1 120 mg·kg<sup>-1</sup>. Compare with  $E_{\text{water}}$ ,  $E_{70\% \text{ EtOH}}$  could remarkable inhibit the permeability increase of celiac capillary and the writhing reaction in mice, HPLC peak information is richer and the common peak ratio is higher than that of  $E_{\text{water}}$ . **Conclusion:** Lethal dose of  $E_{70\% \text{ EtOH}}$  and  $E_{\text{water}}$  may be very high and toxicity of  $E_{70\% \text{ EtOH}}$  and  $E_{\text{water}}$  may be very low. The effects of  $E_{70\% \text{ EtOH}}$  is better than that of  $E_{\text{water}}$ ,  $E_{70\% \text{ EtOH}}$  can more fully the enrichment of active component.

**[Key words]** *Oxalis corniculata*; anti-inflammatory; anti-nociceptive; HPLC

酢浆草为酢浆草科植物酢浆草的新鲜或干燥全草, 始载于《本草纲目》, 为贵州省苗族习用药材<sup>[1]</sup>。

**[收稿日期]** 20140807(002)

**[基金项目]** 国家科技支撑计划项目(2013BAI11B01); 贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字[2011]2291 号); 贵州省中药现代化专项项目(黔科合中药字[2013]5062 号, 黔科合重 G 字[2013] 4001)

**[第一作者]** 崔琚, 在读硕士, 从事中药新药制剂及质量控制研究, Tel: 13639068271, E-mail: 723824557@qq.com

**[通讯作者]** \* 何迅, 硕士, 教授, 从事中药新药制剂及质量控制研究, Tel: 18985123337, E-mail: 2812878586@qq.com

酢浆草含黄酮类、有机酸类、酯类等成分,具有清热解毒、消炎止痛、利湿消肿、凉血散瘀之功效<sup>[2-3]</sup>。临床现有制剂主要采用水提方法制备而得,其不同提取物的药理作用研究较少,尚未见酢浆草的急性毒性及不同提取物的镇痛作用对比研究的报道。本研究对酢浆草70%乙醇及水提取物的急性毒性及抗炎镇痛作用进行考察,对比HPLC色谱信息,优选提取工艺路线旨在为酢浆草的制剂生产及临床应用提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 药材** 酢浆草分别购买于贵阳市药材市场,药材秋季采收于贵阳市花溪区,经贵阳医学院生药学教研室龙庆德副教授鉴定为酢浆草科植物酢浆草的干燥全草 *Oxalis corniculata*。

**1.2 仪器与试剂** Prominence型高效液相色谱仪、UV2401型紫外分光光度计(日本 Shimadzu 公司)。酢浆草70%乙醇提取物( $E_{70\%EtOH}$ )和水提取物( $E_{water}$ )由贵州省药物制剂重点实验室制备,阿司匹林维生素C泡腾片(沈阳奥吉娜药业有限公司,批号140203),生理盐水(贵州科伦药业有限公司,批号B121001),依文思蓝(国药集团化学试剂有限公司,批号20130608),乙腈、甲酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司)。

**1.3 动物** 清洁级昆明系小白鼠,18~22g,雌雄各半,由贵阳医学院实验动物中心提供,合格证号SCXK(黔)2012-0008。

## 2 方法

**2.1 药材提取前的处理** 取酢浆草干燥全草去掉泥土,使用粉碎机中度粉碎,过筛得药材粗粉备用。

**2.2 酢浆草70%乙醇提取物的制备** 准确称取已粉碎的药材100g,加入70%乙醇1000mL浸泡30min回流提取1.5h,过滤,药渣再加70%乙醇800mL提取1h,过滤,合并2次提取液,抽滤,减压回收溶剂,真空干燥24h,得到酢浆草70%乙醇提取物11.25g,生药含量相当于 $0.056g \cdot mL^{-1}$ 记为 $E_{70\%EtOH}$ ,储存于4℃冰箱中备用。

**2.3 酢浆草水提取物的制备** 准确称取已粉碎的药材100g,加入蒸馏水1000mL浸泡30min后加热至微沸,提取1.5h,过滤,药渣再加800mL蒸馏水提取1h,过滤,合并2次水提取液,50℃水浴挥干,真空干燥24h,得到酢浆草水提取物19.25g,生药含量相当于 $0.056g \cdot mL^{-1}$ 记为 $E_{water}$ ,储存于4℃冰箱中备用。

**2.4 急性毒性最大耐受量试验**<sup>[4-5]</sup>

**2.4.1 酢浆草70%乙醇提取物** 选用56只小鼠,雌雄各半,随机分为7组,每组8只,1~6组给予不同剂量的 $E_{70\%EtOH}$ (35,70,140,280,560,1120 $mg \cdot kg^{-1}$ ),第7组给予40 $mL \cdot kg^{-1}$ 蒸馏水。每日1次,连续灌胃给药7d,观察动物在给药期间的状态及死亡情况。

**2.4.2 酢浆草水提取物** 选用56只小鼠,雌雄各半,随机分为7组,每组8只,1~6组给予不同剂量的 $E_{water}$ (35,70,140,280,560,1120 $mg \cdot kg^{-1}$ ),第7组给予40 $mL \cdot kg^{-1}$ 蒸馏水。每日1次,连续灌胃给药7d,观察动物在给药期间的状态及死亡情况。

**2.5 冰乙酸致小鼠腹腔毛细血管通透性试验**<sup>[4-5]</sup> 取昆明系小鼠50只,雌雄各半,随机分为正常组、模型组、阳性药阿司匹林组、酢浆草70%乙醇提取物组、酢浆草水提取物组。正常组和模型组以 $0.01mL \cdot g^{-1}$ 给予等体积蒸馏水,阿司匹林组给药剂量 $0.005mg \cdot g^{-1}$ ,酢浆草不同溶剂提取物给药剂量 $0.14mg \cdot g^{-1}$ ,每日1次,连续灌胃给药3d,末次给药1h后尾静脉注射0.6%依文思蓝生理盐水溶液 $0.01mL \cdot g^{-1}$ ,随即腹腔注射0.8%冰乙酸生理盐水溶液 $0.01mL \cdot g^{-1}$ 致炎,2h后处死小鼠立即腹腔注射6mL生理盐水,轻柔小鼠腹部,轻微振摇,剪开腹腔,用吸管收集腹腔洗涤液,于 $3000r \cdot min^{-1}$ 离心10min,取上清液,用紫外分光光度计于590nm波长处测定吸光度。

**2.6 冰乙酸致扭体试验**<sup>[4-5]</sup> 取昆明系小鼠50只,雌雄各半,随机分为对照组、阳性药阿司匹林组、酢浆草70%乙醇提取物组、酢浆草水提取物组。对照组以 $0.01mL \cdot g^{-1}$ 给予等体积蒸馏水,阳性药阿司匹林以 $0.005mg \cdot g^{-1}$ 剂量给药,酢浆草不同溶剂提取物以 $0.14mg \cdot g^{-1}$ 剂量给药,每日1次,连续灌胃给药3d,末次给药1h后各组小鼠腹腔注射0.8%的冰乙酸生理盐水溶液 $0.01mL \cdot g^{-1}$ ,稳定5min记录15min之内小鼠发生扭体反应的次数(以腹部内凹、躯干和后腿伸张、臀部高起为1次扭体反应),计算药物对扭体反应的抑制率。

抑制率 = (模型组扭体均数 - 给药组扭体均数) / 模型组扭体均数 × 100%

**2.7 酢浆草不同溶剂提取物的HPLC测定**<sup>[6]</sup>

**2.7.1 供试品溶液制备** 准确称取酢浆草70%乙醇提取物0.1125g和水提取物0.1925g,分别加甲醇和50%甲醇超声至完全溶解,于 $10000r \cdot min^{-1}$ 离心15min,得到 $1g \cdot mL^{-1}$ 的供试品溶液备用。

**2.7.2 色谱条件** 流动相系统为0.1%磷酸水

(A), 乙腈-水 (80:20) (B), 梯度洗脱 (0.01 ~ 60 min, 5% B; 60 ~ 65 min, 100% B), 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 35 °C, 检测波长 330 nm, 进样量 20 μL。

**2.8 统计学方法** 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 结果用  $\bar{x} \pm s$  表示。用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 后, 用 Dunnett's test 分析方法比较组间差异, 组间比较采用 T-test,  $\alpha = 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 急性毒性最大耐受量试验** 在 35 ~ 1 120 mg·kg<sup>-1</sup> 的剂量范围内, 不同提取物的各组小鼠活动正常, 未见死亡, 推测酢浆草 70% 乙醇提取物 (E<sub>70% EtOH</sub>) 和水提取物 (E<sub>water</sub>) 的致死剂量较高, 毒性较小, 各提取物的 MTD 大于 1 120 mg·kg<sup>-1</sup>。

**3.2 抗炎试验** 结果显示, 与空白组比较, 模型组的吸光度具有显著性差异,  $P < 0.001$ , 说明冰乙酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增高的炎症模型建立成功。与模型组比较, 阳性药能有效抑制血管通透性增高, 效果显著,  $P < 0.001$ , 70% 乙醇提取物 (E<sub>70% EtOH</sub>) 和水提取物 (E<sub>water</sub>) 均在不同程度上抑制了毛细血管通透性增高, 具有显著性差异, 分别为  $P < 0.001$  和  $P < 0.01$ , 70% 乙醇提取物 (E<sub>70% EtOH</sub>) 的抗炎作用优于水提取物 (E<sub>water</sub>), 见表 1。

表 1 冰乙酸致小鼠腹腔毛细血管通透性试验 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Permeability increasion of celial capillary induced by glacial acetic acid in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·g <sup>-1</sup>	吸光度
空白	-	0.12 ± 0.04
模型	-	1.27 ± 0.18 <sup>1)</sup>
阳性	0.005	0.69 ± 0.13 <sup>3)</sup>
E <sub>70% EtOH</sub>	0.14	0.84 ± 0.20 <sup>3)</sup>
E <sub>water</sub>	0.14	0.99 ± 0.16 <sup>2)</sup>

注: <sup>1)</sup> 与空白组比较:  $P < 0.001$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.001$ 。

**3.3 镇痛试验** 结果显示, 与对照组 (Mod.) 比较, 阳性药 (Asp.) 的镇痛作用明显, 抑制率达到 71.8%。在 0.14 mg·g<sup>-1</sup> 的剂量下, 70% 乙醇提取物 (E<sub>70% EtOH</sub>) 和水提取物 (E<sub>water</sub>) 均能抑制小鼠扭体, 说明这两种提取物具有不同程度的镇痛作用, 抑制率分别为 53.1%, 49%, 70% 乙醇提取物 (E<sub>70% EtOH</sub>) 的镇痛作用优于水提取物 (E<sub>water</sub>), 结果见表 2。

**3.4 HPLC 测定** 生药浓度均为 1 g·mL<sup>-1</sup> 的酢浆草 70% 乙醇和水提取物供试品溶液按 2.7 项下的

表 2 冰乙酸致小鼠扭体试验 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Writhing test induced by glacial acetic acid in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·g <sup>-1</sup>	扭体数/次	抑制率/%
模型	-	12.3 ± 6.9	-
阳性	0.005	2.8 ± 3.4 <sup>2)</sup>	71.8
E <sub>70% EtOH</sub>	0.14	5.8 ± 3.9 <sup>1)</sup>	53.1
E <sub>water</sub>	0.14	6.3 ± 3.1 <sup>1)</sup>	49

注: 与模型组 (Mod.) 比较: <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

色谱条件进行 HPLC 测定, 获得不同溶剂提取物的 HPLC 图, 酢浆草 70% 乙醇提取物的 HPLC 峰信息较水提取物丰富, 峰信息量较完全, 且不同提取物的共有峰提取率有一定差别, 经比较, 70% 乙醇共有峰提取率高于水提取, 相应结果见图 1 和表 3。

表 3 酢浆草 70% 乙醇提取物和水提取物标化后峰面积

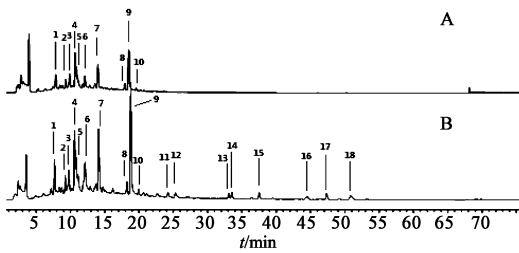
Table 3 Peak area of E<sub>70% EtOH</sub> and E<sub>water</sub>

共有峰	标化后峰面积	
	E <sub>70% EtOH</sub>	E <sub>water</sub>
1	4 078 353	2 626 139
2	2 735 508	1 673 331
3	4 725 899	2 798 780
4	6 675 085	3 509 282
5	4 081 540	2 188 766
6	4 725 899	2 319 997
7	10 033 199	3 730 265
8	3 137 355	1 644 704
9	31 094 717	6 041 686
10	528 428	878 364
11	570 757	-
12	800 153	-
13	659 739	-
14	778 730	-
15	822 181	-
16	658 777	-
17	818 111	-
18	968 917	-

注: “-” 表示该峰未积分。

### 4 讨论

酢浆草是贵州省苗族习用药材, 收载于《贵州省中药材、民族药质量标准》2003 年版<sup>[1-2]</sup>, 以酢浆草为主药开发的制剂品种在临床上发挥了较好的治疗作用, 带动贵州制药产业和经济水平的发展。目前, 水提取法是开发酢浆草临床制剂的常用提取方



A. 酢浆草水提取物; B. 酢浆草 70% 乙醇提取物

图 1 酢浆草 HPLC 色谱

Fig. 1 E<sub>water</sub> and E<sub>70% EtOH</sub> HPLC chromatogram

法<sup>[7]</sup>, 酢浆草药理活性研究主要集中在体外抗菌方面<sup>[3,6-7]</sup>, 也有报道其具有抗炎降血脂及抗焦虑的作用<sup>[8-9]</sup>, 尚无关于酢浆草急性毒性及不同溶剂提取物抗炎镇痛药效对比的报道。

本研究采用 70% 乙醇及水制备酢浆草提取物, 水提取率高于 70% 乙醇提取。分别建立药理学抗炎和镇痛模型, 以此考察酢浆草不同溶剂提取物在体内的抗炎和镇痛药效。在急毒实验期间, 小鼠均未出现中毒死亡等现象, 推测酢浆草 70% 乙醇及水提取物的毒性较小。在经典抗炎镇痛药理模型中<sup>[4-5,10]</sup>, 酢浆草 70% 乙醇及水提取物均能抑制小鼠腹腔毛细血管通透性增高, 并抑制小鼠扭体, 说明其具有抗炎镇痛作用, 其中 70% 乙醇提取物的活性优于水提取物。HPLC 测定表明 70% 乙醇提取物峰信息量大于水提取物, 一方面是(1~10 号共有峰的提取率较高, 另一方面 70% 乙醇提取物的 11~18 号峰也可能富集药效成分(图 1, 表 3), 结合抗炎镇痛试验结果, 70% 乙醇提取物的药效更好可能与这两方面有关。酢浆草的最佳提取方法及其作用机制还有待于进一步研究。酢浆草在贵州的资源丰富, 作为民族药材, 它具有很大的开发潜力和应用价值,

本研究为其制剂生产、临床应用提供了坚实的理论依据。

[参考文献]

[1] 贵州省食品药品监督管理局编. 贵州省中药材、民族药材质量标准. [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003:366.

[2] 江毅, 李朝斗, 杨卫平, 等. 草药彩色图集[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2001:324.

[3] 王海生, 王隶书, 范艳君, 等. 酢浆草提取物中总黄酮含量的分光光度法测定[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3):578-579.

[4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001:877-934.

[5] Wang Q S, Yang L, Cui W Y, et al. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of methanol extract from aerial part of *Phlomis younghusbandii* Mukerjee[J]. Plos One, 2014, 9(3): e89149.

[6] 刘受先, 吴欢, 邓志清, 等. RP-HPLC 测定不同产地酢浆草中刺槐素-6-C-β-D-葡萄糖苷含量[J]. 江西中医学院学报, 2011, 23(1):55-56.

[7] 王玉仙, 丁良, 申文增, 等. 酢浆草的抗炎作用[J]. 医学研究与教育, 2010, 27(5):11-13.

[8] 马鸿军, 丁良, 申文增. 酢浆草对高脂血症大鼠血脂代谢的影响[J]. 中国中医药咨讯, 2010, 2(16):177-178.

[9] Sai Sampath T, Santosh P, Mangala Lahkar, et al. Anxiolytic effect of ethanolic of *Oxalis corniculata* L. in mice[J]. Int J Pharma Bio Sci, 2011, 2(3):288.

[10] 莫佳佳, 徐慕蝶, 杨丹丹, 等. 侗族药羊耳菊醇提物抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21):259.

[责任编辑 顾雪竹]