

黄花倒水莲3种成分含量测定及抗炎、调血脂作用研究

陆梅元¹, 廖国富², 雷虹², 谢臻², 李杉^{1*}

1. 广西壮族自治区食品药品审评查验中心, 广西 南宁 530029

2. 广西中医药大学, 广西 南宁 530201

摘要: 目的 建立黄花倒水莲醇 *Polygala fallax* Hemsl. 提取物中3种成分的含量测定方法; 探讨黄花倒水莲醇提取物抗炎、调血脂作用。方法 采用HPLC法测定黄花倒水莲醇提取物中3种成分——细叶远志皂苷、獐牙菜苦苷、芦丁的含量; 建立二甲苯致小鼠耳肿胀、冰醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增加、角叉菜胶致小鼠足跖肿胀炎症模型, 评价黄花倒水莲醇提取物高、中、低剂量(40、20、10 g·kg⁻¹)改善急、慢性炎症的药理作用; 建立二甲苯致摘除双侧肾上腺小鼠耳肿胀、角叉菜胶致摘除双侧肾上腺小鼠足跖肿胀模型, 判断其抗炎作用是否依赖下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPAA)系统, 试剂盒法测定足跖炎症组织丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)水平和超氧化物歧化酶(SOD)活性; 采用高脂饲料喂食SD大鼠建立高脂大鼠模型, 考察黄花倒水莲醇提取物高、中、低剂量(40、20、10 g·kg⁻¹)对高脂大鼠血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平的影响。结果 HPLC法方法学考察各项指标符合规定, 细叶远志皂苷、獐牙菜苦苷、芦丁的平均加样回收率均在97.13%~101.82%, RSD值均小于3.0%; 黄花倒水莲醇提取物中细叶远志皂苷、獐牙菜苦苷、芦丁的质量分数分别为121.71、84.02、52.53 μg·g⁻¹。与模型组比较, 黄花倒水莲醇提取物高、中剂量对小鼠耳肿胀有明显的抑制作用($P<0.05, 0.01$), 高、中、低剂量对小鼠腹腔毛细血管通透性增加均有显著抑制作用($P<0.05, 0.01$), 高、中、低剂量对角叉菜胶造成的小鼠足跖肿胀都有明显的抑制作用($P<0.05, 0.01$)。与模型组比较, 在摘除双侧肾上腺小鼠中, 黄花倒水莲醇提取物高、中剂量能显著抑制二甲苯致该模型小鼠耳肿胀($P<0.05, 0.01$), 显著抑制角叉菜胶致该模型小鼠足跖肿胀($P<0.05, 0.01$); 黄花倒水莲醇提取物高、中、低剂量均能显著降低足跖中MDA、NO水平($P<0.05, 0.01$), 均能显著提高足跖中SOD活性($P<0.05, 0.01$)。ig高脂饲料28 d后, 与模型组比较, 黄花倒水莲醇提取物高、中、低剂量能显著降低大鼠血清的TC、TG和LDL-C水平($P<0.05$)。结论 建立的HPLC含量测定方法专属性强、重复性好、准确度高, 可用于黄花倒水莲醇提取物中细叶远志皂苷、獐牙菜苦苷、芦丁的含量测定; 黄花倒水莲醇提取物具有抗炎活性, 其抗炎作用的发挥不依赖HPAA系统, 与减少MDA、NO水平, 提高SOD活性有关; 对高脂大鼠发挥明显的调血脂作用。

关键词: 黄花倒水莲; 细叶远志皂苷; 獐牙菜苦苷; 芦丁; 抗炎; 调血脂

中图分类号: R284.1; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)01-0079-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.01.009

Experimental study on content determination of three components and anti-inflammatory and hypolipidemic effects of *Polygala fallax*

LU Meiyuan¹, LIAO Guofu², LEI Hong², XIE Zhen², LI Shan¹

1. Guangxi District Food and Drug Review and Inspection Center, Nanning 530029, China

2. Guangxi University of Chinese Traditional Medicine, Nanning 530201, China

Abstract: Objective To establish a method for the determination of three components in *Polygala fallax* alcohol extract (PFAE) to investigate the anti-inflammatory and hypolipidemic effects of PFAE. **Methods** The contents of three components (tenuifolin, swertiamarin and rutin) in PFAE were determined by HPLC. The inflammatory models such as xylene induced ear swelling in mice, acetic acid induced increased permeability of abdominal capillaries in mice, and carrageenan induced paw swelling inflammation in

收稿日期: 2023-05-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81360524); 2020年度广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2020KY13034); 广西壮族自治区中医药管理局科研课题(GZZC2019147)

第一作者: 陆梅元(1981—), 工程师, 从事药品流通、医疗器械审评查验及中药相关研究工作。E-mail: 182830367@qq.com

*通信作者: 李杉(1985—), 副主任药师, 主要从事药物分析研究。E-mail: 188097724@qq.com

mice models were established to evaluate the pharmacological effects of high, medium and low doses (40, 20, and 10 g·kg⁻¹) PFAE on acute and chronic inflammation. The ear swelling model of mice with bilateral adrenalectomy induced by xylene and the paw swelling model of mice with bilateral adrenalectomy induced by carrageenan were established to determine whether its anti-inflammatory effect depends on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPAA) system. The contents of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in the inflammatory tissue of the paw were determined by kits. A high-fat rat model was established by feeding SD rats with high-fat feed, and the effects of high, medium, and low doses (40, 20, and 10 g·kg⁻¹) of PFAE on serum total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels in hyperlipidemic rats were investigated. **Results** The indexes of methodological investigation were in accordance with the regulations. The average recovery rates of tenuifolin, swertiamarin and rutin were 97.13%—101.82%, and the RSD values were less than 3.0%. The mass fractions of tenuifolin, swertiamarin and rutin in the extract were 121.71, 84.02 and 52.53 μg·g⁻¹, respectively. Compared with model group, except for the low dose group was not statistically significant, the high and middle dose groups of PFAE had significant inhibition on ear swelling in mice ($P < 0.05, 0.01$). The high, medium and low dose groups of PFAE had obvious inhibition on the permeability of abdominal capillary in mice ($P < 0.05, 0.01$), and the swelling of foot caused by carrageenan had significant inhibition ($P < 0.05, 0.01$). Compared with model group, in the mouse model of bilateral adrenalectomy, the high and medium dose groups of PFAE could significantly inhibit the ear swelling of the model mice induced by xylene ($P < 0.05, 0.01$), and can significantly inhibit carrageenan-induced paw swelling in the model mice ($P < 0.05, 0.01$), the high, medium and low dose groups of PFAE could significantly reduce the levels of MDA and NO in the toes, and significantly increase the content of SOD in the toes ($P < 0.05, 0.01$). After 28 days of high-fat diet, compared with the model group, high, medium, and low doses of PFAE significantly reduced the levels of TC, TG, and LDL-C in rat serum ($P < 0.05$). **Conclusion** The content determination method established in this study has strong specificity, good repeatability and high accuracy, which can be used for the content determination of tenuifolin, swertiamarin and rutin in PFAE. PFAE has anti-inflammatory activity, and its anti-inflammatory effect may not depend on the hypothalamic pituitary adrenal axis (HPAA) system. At the same time, the anti-inflammatory mechanism of PFAE is related to reducing MDA, NO and increasing SOD activity. PFAE has obvious hypolipidemic effect on experimental hyperlipidemia.

Key words: *Polygala fallax* Hemsl.; tenuifolin; swertiamarin; rutin; content determination; anti-inflammatory; hypolipidemic effect

黄花倒水莲 *Polygala fallax* Hemsl. 为远志科远志属灌木或小乔木, 又名假黄花远志、黄花参、倒吊黄等, 主要分布于广西、云南等地区^[1]。黄花倒水莲主要含有皂苷类、黄酮类、多糖、酚类、有机酸等成分^[2], 一般用于治疗病后体虚、腰膝酸痛、跌打损伤、急慢性肝炎等^[3]。黄花倒水莲是广西民间常用药, 同时也作为少数民族药食两用药材^[4]。黄花倒水莲具有抗炎、调血脂^[5-6]、抗凝、保肝、增强免疫、抑制乙肝病毒等作用^[7]。但目前对黄花倒水莲有效成分的研究不多, 研究发现其主要含有芦丁、獐牙菜苦苷、马钱苷等成分, 具有多种生物活性。本课题组前期预试验发现, 黄花倒水莲具有较好的抗炎、调血脂作用, 考虑到其相关作用的研究报道较少, 本研究建立其高效液相色谱(HPLC)含量测定方法, 同时, 对其进行抗炎、调血脂药效研究, 为黄花倒水莲质量标准的建立及药用资源的进一步开发利用奠定基础, 也为寻找新的抗炎、调血脂药物, 为今后其临床应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

1260-II型安捷伦高效液相色谱仪(2489UV检测器, 真空脱气泵、四元泵、自动进样器、柱温箱和Empower3液相工作站); 酶标仪(Tecan Austria GmbH); 全自动生化分析仪(Roche Modular-p800); UV-1780型紫外可见分光光度计[岛津仪器(苏州)有限公司]; 电子分析天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司); 恒温恒湿培养箱(韶关市泰宏医疗器械有限公司)。

1.2 药物及主要试剂

黄花倒水莲(产地为广西, 批号20211101), 购于广西仙荣中药有限公司, 经广西中医药大学第一附属医院药学部唐春丽主任中药师鉴定为远志科远志属灌木或小乔木黄花倒水莲 *Polygala fallax* Hemsl. 的干燥根。

细叶远志皂苷(批号111849-202207, 质量分数≥98%)、獐牙菜苦苷(批号110785-202205, 质量分数≥98%)、芦丁(批号100080-202012, 质量分数≥98%), 均购自中国食品药品检定研究院。

醋酸地塞米松(批号 220115,规格 0.75 mg,浙江仙琚制药股份有限公司);头孢克肟分散片(批号 220162E,规格 50 mg,浙江莎普爱思药业股份有限公司);辛伐他汀片(每片 20 mg,批号 20210405,涿州东乐制药有限公司)。

甲醇(色谱纯,美国 Sigma 公司);丙二醛(MDA)试剂盒(批号 202201)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号 202205)、一氧化氮(NO)试剂盒(批号 202201)、三酰甘油(TG)试剂盒(批号 2204102)、总胆固醇(TC)试剂盒(批号 2204106)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒(批号 2204062)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒(批号 2204091),均购自南京建成生物工程技术有限公司;角叉菜胶(批号 YY21752,上海源叶生物科技有限公司);伊文思蓝(国药集团化学试剂有限公司,批号 20220721);临用前用纯水配制成 $0.4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液用于 ig 给药。

1.3 实验动物

体质量 $18\sim 22\text{ g}$ 的清洁级雄性昆明种小鼠、体质量 $180\sim 220\text{ g}$ 的雄性 SD 大鼠,购买于广西医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号 SCXK(桂)2014-0002。实验前在本实验室适应 3 d,动物实验通过广西中医药大学实验动物伦理委员会审批,遵守相关的实验动物管理条例,且符合广西中医药大学实验动物伦理委员会的相关指导原则。

1.4 药物的制备及高脂饲料的配方、配制

黄花倒水莲醇提取物的制备:取黄花倒水莲粗粉 10 kg ,加 75%乙醇回流提取 2 次,提取时间分别为 90、60 min,溶剂倍量分别为 10、8 倍,纱布滤过,合并滤液,用旋转蒸发器减压浓缩,再置水浴锅上挥干,称质量,计算得膏率为 21.85%。

基础饲料是由广西中医药大学实验动物中心提供;高脂饲料的配方及配制:基础饲料以质量分数 1.0%胆固醇、0.2%胆酸钠、10%猪油、3.0%蔗糖和 5.0%蛋黄粉制成颗粒状,于 $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱内烘干。

2 方法与结果

2.1 黄花倒水莲中 3 种主要成分含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Waters XBridge C_{18} ($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$),流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液梯度洗脱,洗脱程序见表 1,细叶远志皂苷检测波长 205 nm ^[8],獐牙菜苦苷检测波长 254 nm ^[9],芦丁检测波长 354 nm ^[10],体积流量 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$,理论塔板数按獐牙菜苦苷峰计

算应不低于 3 000,理论板数按芦丁峰计算应不低于 2 500,按上述条件各成分分离度良好,且供试品中的其他成分不干扰含量测定,与目标成分色谱峰分离完全。

表 1 梯度洗脱程序表

Table 1 Gradient elution program table

t/min	流动相		波长切换/ nm
	乙腈/%	0.1%磷酸水溶液/%	
0	10	90	205
8	15	85	205
15	22	78	254
25	36	64	254
32	48	52	360
46	65	35	360
60	75	25	360

2.1.2 混合对照品溶液制备 分别精密称取细叶远志皂苷、獐牙菜苦苷、芦丁对照品适量,以甲醇为溶剂配制成混合对照品溶液,各质量浓度分别为 528 、 417 、 $325\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 取黄花倒水莲干膏 0.1 g ,精密称定,超声使供试品完全溶解后,置于 10 mL 量瓶中定容至刻度,用甲醇对浸膏进行溶解, $13\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的微孔滤膜,取续滤液,作为供试品溶液。

2.1.4 方法学考察

(1)专属性考察 结果如图 1 所示,所用色谱条件均对黄花倒水莲中细叶远志皂苷、獐牙菜苦苷、芦丁的测定无干扰,分离度较好。

(2)线性关系考察 配制系列浓度梯度的混合对照品溶液,以峰面积为纵坐标,以对照品质量浓

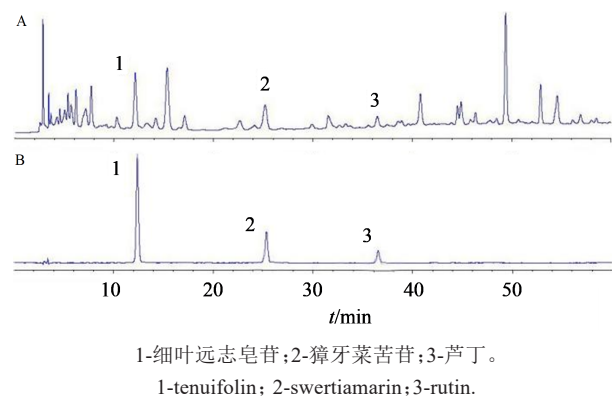


图 1 黄花倒水莲供试品(A)、混合对照品(B)HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatogram of *Polygala fallax* sample (A) and mixed reference substance (B)

度为横坐标,做线性方程,细叶远志皂苷的回归方程为 $Y=4.528 X-47.261$ ($r=0.999\ 7$, $5.28\sim 52.8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、獐牙菜苦苷的回归方程为 $Y=8.729 X+0.185$ ($r=0.999\ 8$, $4.17\sim 41.7\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、芦丁的回归方程为 $Y=11.725 X-0.973$ ($r=0.999\ 5$, $3.25\sim 32.5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

(3)精密度试验 精密量取混合对照品溶液适量,按“2.1.1”项条件连续进样6次,计算细叶远志皂苷、獐牙菜苦苷、芦丁峰面积的RSD均小于3% ($n=6$),说明仪器精密度良好。

(4)稳定性试验 取黄花倒水莲药材粉末1.0 g,精密称定,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,分别在供试品溶液制备后0、2、4、8、12、24 h按“2.1.1”项下条件测定,计算黄花倒水莲中细叶远志皂苷、獐牙菜苦苷、芦丁峰面积的RSD均小于3% ($n=6$),说明24 h内供试品溶液稳定性良好。

(5)重复性试验 精密称取黄花倒水莲药材粉末1.0 g,精密称定,共6份,按“2.1.3”项下的方法制备成供试品溶液,按“2.1.1”项下条件测定,计算黄花倒水莲中细叶远志皂苷、獐牙菜苦苷、芦丁的峰面积RSD均小于3% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

(6)加样回收率试验 精密称取已知含量的黄花倒水莲药材粉末0.5 g,精密称定,共9份,分成3组,即低、中、高加样组(0.5 g药材含量的80%、100%和120%加样),黄花倒水莲低、中、高加样组中成分细叶远志皂苷、獐牙菜苦苷、芦丁的平均回收率均在97.13%~101.82%,其RSD值均小于3% ($n=9$),均符合相关要求,表明该方法准确性良好。

2.1.5 供试品含量测定 取黄花倒水莲醇提取物0.2 g,按“2.1.3”项下供试品溶液的制备方法处理,制备供试品溶液,照“2.1.1”项下色谱条件进行测定,按照外标一点法计算黄花倒水莲醇供试品中细叶远志皂苷、獐牙菜苦苷、芦丁的含量,结果见表2。

表2 黄花倒水莲中各成分含量测定结果($n=3$)
Table 2 Content determination results of each component in *Polygala fallax* ($n=3$)

序号	质量分数/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$		
	细叶远志皂苷	獐牙菜苦苷	芦丁
供试品1	121.81	83.72	52.58
供试品2	120.96	84.37	53.04
供试品3	122.35	83.96	51.96
平均值	121.71	84.02	52.53

2.2 黄花倒水莲抗炎作用实验研究

2.2.1 二甲苯致小鼠耳肿胀实验^[11] 饲养3 d以后,随机取小鼠50只,雄性昆明种属,体质量在18~22 g,随机分为模型组、地塞米松组(阳性对照, $5\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和黄花倒水莲醇提取物高、中、低剂量(40 、 20 、 $10\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,每组10只,每天1次ig给予药物,给药体积是 $20\ \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,连续给药7 d,模型组小鼠ig等体积纯水。末次给药1 h后,于小鼠右耳正反两面各涂二甲苯 $10\ \mu\text{L}$ 致炎,致炎10 min后处死小鼠,沿耳根部剪下两耳,用6 mm打孔器在两耳相同部位等面积打下圆耳片,用电子天平称质量,计算肿胀度。

肿胀度=右耳-左耳

与模型组相比,除低剂量($10\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组无统计学意义外,黄花倒水莲醇提取物高、中剂量对二甲苯引起的小鼠耳肿胀均有显著的抑制作用($P<0.05$ 、 0.01);与地塞米松组比较,黄花倒水莲醇提取物低剂量组小鼠耳肿胀度显著增高,差异有统计学意义($P<0.05$),而高、中剂量组小鼠耳肿胀度差异无统计学意义。见表3。

表3 小鼠耳肿胀的实验结果($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 3 Experimental results of mouse ear swelling ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ $(\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	肿胀度/mg
模型	—	2.53 ± 0.82
地塞米松	0.005	$1.06\pm 0.57^{**}$
黄花倒水莲醇提取物	40	$1.13\pm 0.42^{**}$
	20	$1.22\pm 0.50^{*}$
	10	$1.61\pm 0.43^{#}$

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$;与地塞米松组比较: # $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group; # $P<0.05$ vs dexamethasone group.

2.2.2 冰醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增加实验^[11] 选取雄性昆明种小鼠50只,按体质量随机分为5组,每组10只,分组、给药方法同“2.2.1”项。最后1次ig给药1 h后,给各组小鼠尾iv 0.3%伊文思蓝溶液($10\ \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),同时ip注射0.6%冰醋酸溶液($10\ \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)。10 min后脱颈椎处死动物,ip生理盐水6 mL冲洗腹腔,轻揉腹部1 min,剪开腹腔收集腹腔液,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min后,吸取上清液至比色皿中,在590 nm处使用紫外可见分光光度计测定其吸光度(A)值。

与模型组相比,黄花倒水莲醇提取物能明显抑制冰醋酸引起的小鼠腹腔毛细血管通透性增

加($P<0.05, 0.01$);与地塞米松组比较,黄花倒水莲醇提取物高、中剂量组小鼠腹腔毛细血管通透性未显著增高,而低剂量组小鼠腹腔毛细血管通透性显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

表4 小鼠毛细血管通透性实验结果($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 4 Experimental results of capillary permeability in mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	腹腔液A值
模型	—	0.315 2±0.089 2
地塞米松	0.005	0.138 6±0.085 1**
黄花倒水莲醇提取物	40	0.169 0±0.071 2**
	20	0.182 5±0.092 5**
	10	0.211 7±0.102 4*#

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$;与地塞米松组比较: # $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group; # $P<0.05$ vs dexamethasone group.

2.2.3 角叉菜胶致小鼠足跖肿胀实验^[11] 选取雄性昆明种小鼠50只,按体质量随机分为5组,每组10只,分组、给药方法同“2.2.1”项。最后1次ig给药1 h后,马上在小鼠右后足趾部sc 1%角叉菜胶溶液0.02 mL致炎。致炎15 min后将小鼠颈椎脱臼致死,剪取后双足等同部位,称取质量,以同一小鼠左右后足质量之差计算肿胀度。

与模型组相比,黄花倒水莲醇提取物对角叉菜胶造成的小鼠足跖肿胀都有明显的抑制作用($P<0.05, 0.01$);与地塞米松组比较,黄花倒水莲醇提取物低剂量组小鼠足趾肿胀度显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$),而高、中剂量组小鼠足趾肿胀度未显著增加,差异无统计学意义。结果见表5。

表5 对角叉菜胶致小鼠足趾肿胀实验结果($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 5 Results of mouse toe swelling induced by carrageenan ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肿胀度/mg
模型	—	42.81±4.95
地塞米松	0.005	17.35±3.72**
黄花倒水莲醇提取物	40	18.47±4.31**
	20	21.52±3.90**
	10	27.30±5.04*#

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$;与地塞米松组比较: # $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group; # $P<0.05$ vs dexamethasone group.

2.2.4 二甲苯致摘除双侧肾上腺小鼠耳肿胀实验^[11] 随机选取雄性小鼠50只,术前1 d用头孢克肟(60 mg·kg⁻¹) ig给药。术前用压力蒸汽灭菌器

120 °C、15 min对手术器械进行灭菌,用75%乙醇清洁手术台及手套。用5%水合氯醛(10 mL·kg⁻¹)麻醉小鼠,减去腰背部毛,用75%乙醇消毒局部皮肤。在胸腰椎交界处,沿背部正中线、背肋后缘做约0.5 cm长的皮肤、肌肉切口。用镊子小心拨开切口,慢慢分开腹腔组织与小鼠脏器,用小镊子轻轻夹住肾上腺与肾脏之间的组织,慢慢的摘除小鼠腺体。同法摘除另一侧肾上腺。用棉球稍止血后缝合肌肉和皮肤,并涂以碘伏,术后第2天以头孢克肟ig给药,术后3 d给予5%葡萄糖生理盐水溶液代替纯水饲养。将摘除双侧肾上腺小鼠随机分为5组,每组10只,分组、给药方法、耳肿胀实验操作均同“2.2.1”项。

与模型组比较,黄花倒水莲醇提取物高、中剂量组均能显著抑制摘除双侧肾上腺小鼠耳肿胀($P<0.05, 0.01$);与地塞米松组比较,黄花倒水莲醇提取物低剂量组二甲苯致肾上腺摘除小鼠耳肿胀度显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$),而高、中剂量组耳肿胀度差异无统计学意义。结果见表6。

表6 二甲苯致摘除双侧肾上腺小鼠耳肿胀实验结果($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 6 Experimental results of ear swelling in mice with bilateral adrenal gland removal induced by xylene ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肿胀度/mg
模型	—	7.12±1.31
地塞米松	0.005	2.57±0.62**
黄花倒水莲醇提取物	40	3.28±0.73**
	20	4.36±0.40*
	10	5.61±0.21#

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$;与地塞米松组比较: # $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group; # $P<0.05$ vs dexamethasone group.

2.2.5 角叉菜胶致摘除双侧肾上腺小鼠足跖肿胀实验^[11] 选取雄性小鼠50只,摘除小鼠双侧肾上腺方法同“2.2.4”项。将摘除双侧肾上腺小鼠随机分为5组,每组10只,分组、给药方法、足跖肿胀实验操作均同“2.2.3”项。随后剪碎右足,取5 mL生理盐水浸泡。手动研磨匀浆后,3 000 r·min⁻¹离心11 min,取离心后的上清液冻存于-20 °C。参照试剂盒说明,用ELISA方法测定SOD活性和MDA、NO含量。

与模型组比较,黄花倒水莲醇提取物中、高剂量组肾上腺摘除小鼠足趾肿胀度显著降低($P<$

0.05、0.01);与地塞米松组比较,黄花倒水莲醇提取物低剂量组肾上腺摘除小鼠足趾肿胀度显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$),而高、中剂量组差异无统计学意义。

与模型组比较,黄花倒水莲醇提取物中、高剂量组肾上腺摘除小鼠足趾炎症部位的MDA、NO水平显著降低,SOD活性显著升高($P<0.05$ 、0.01);与地塞米松组比较,黄花倒水莲醇提取物低剂量组肾上腺摘除小鼠足趾炎症部位中MDA、NO水平显著升高,SOD活性显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),而高、中剂量组差异无统计学意义。结果见表7、8。

对摘除肾上腺的小鼠,黄花倒水莲依然发挥抗炎活性,其抗炎作用不依赖下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPAA)系统。

2.3 黄花倒水莲对大鼠高脂的影响

取SD雄性大鼠60只随机分为6组,每组10只,分别为对照组、模型组、辛伐他汀(阳性对照,0.04 g·kg⁻¹)组和黄花倒水莲醇提取物高、中、低剂量(40、20、10 g·kg⁻¹)组。对照组饲以基础饲料和饮用自来水,模型组及各给药组饲以高脂饲料^[12]和饮用自来水。造模的同时给药,模型组和对照组

表7 黄花倒水莲醇提取物对摘除双侧肾上腺小鼠足趾肿胀的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 7 Effect of PFAE on toe swelling in bilateral adrenalectomized mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肿胀度/mg
模型	—	28.69±4.25
地塞米松	0.005	11.52±1.60**
黄花倒水莲醇提取物	40	15.81±3.12**
	20	18.95±2.58*
	10	24.63±3.64 [#]

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$;与地塞米松组比较: [#] $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group; [#] $P<0.05$ vs dexamethasone group.

根据体质量给予10 mL·kg⁻¹的CMC-Na溶液。每3天称1次体质量,28 d后,禁食不禁水12 h,腹主动脉取血,3 000 r·min⁻¹离心11 min分离血清,按照试剂盒说明书,测定TC、TG、LDL-C和HDL-C水平。

表9结果显示,给予高脂饲料28 d以后的模型大鼠,血清TC、TG和LDL-C水平显著高于对照组($P<0.05$ 、0.01),表明造模成功。与模型组大鼠相比,辛伐他汀和黄花倒水莲醇提取物高、中、低剂量能显著降低大鼠血清的TC、

表8 黄花倒水莲醇提取物对摘除双侧肾上腺小鼠足趾炎症部位MDA、SOD、NO水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 8 Effect of PFAE on contents of MDA, SOD and NO in inflammatory sites of paws of bilateral adrenalectomy mice

($\bar{x}\pm s, n=10$)				
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	MDA/(nmol·L ⁻¹)	SOD/(pg·mL ⁻¹)	NO/(μmol·L ⁻¹)
模型	—	3.28±0.35	11.38±1.12	22.85±5.32
地塞米松	0.005	1.90±0.21**	20.50±1.36**	13.06±3.64**
黄花倒水莲醇提取物	40	2.15±0.16**	17.16±1.78**	13.24±2.98**
	20	2.31±0.20*	15.03±1.21*	15.53±4.15*
	10	2.47±0.54 [#]	14.52±1.30 [#]	17.02±4.27 [#]

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$;与地塞米松组比较: [#] $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group; [#] $P<0.05$ vs dexamethasone group.

表9 高脂血症大鼠血清TC、TG、HDL-C和LDL-C水平($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 9 Results of TC, TG, HDL-C and LDL-C levels of serum in hyperlipidemic rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	1.71±0.20	0.48±0.11	0.51±0.12	1.86±0.20
模型	—	5.36±1.31 [#]	0.87±0.10 ^{##}	0.46±0.10	4.65±2.38 [#]
辛伐他汀	0.04	4.21±2.18*	0.51±0.13*	0.45±0.09	3.35±1.32*
黄花倒水莲醇提取物	40	4.35±1.45*	0.46±0.10*	0.43±0.13	3.40±1.05*
	20	4.52±1.21*	0.42±0.11*	0.47±0.07	3.69±1.32*
	10	4.63±2.06*	0.39±0.16*	0.44±0.08	3.81±2.27*

与对照组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$;与模型组比较: * $P<0.05$ 。

[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ vs model group.

TG 和 LDL-C 水平 ($P < 0.05$)。但各组 HDL-C 水平比较差异无统计学意义。

2.4 统计分析

实验数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,使用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,均值比较采用单因素方差分析,假定方差齐性用 LSD 法,未假定方差齐性用 Dunnett's T3 法。

3 讨论

本实验建立了 HPLC 法同时测定黄花倒水莲醇中 3 种主要成分,并进行黄花倒水莲的药效学研究。HPLC 法同时测定黄花倒水莲中细叶远志皂苷、獐牙菜苦苷、芦丁成分,分离度良好,所建立的方法准确、可靠。

本研究发现,黄花倒水莲具有明显的抑制小鼠耳肿胀、改善机体炎症通透性增加、抑制小鼠足跖肿胀作用。HPAA 系统是人体重要的神经内分泌轴,其对机体的炎症具有重要的调节作用,本实验通过建立去双侧肾上腺小鼠模型,考察在切除机体内分泌系统的情况下,黄花倒水莲对小鼠耳肿胀度、足跖肿胀度的影响以及对 SOD、MDA、NO 水平的影响,结果发现,黄花倒水莲对小鼠耳肿胀度、足跖肿胀均发挥显著抑制作用,显著降低足跖炎症部位的 MDA、NO 水平,显著升高 SOD 水平。对摘除肾上腺的小鼠,黄花倒水莲依然发挥抗炎活性,其抗炎作用不依赖 HPAA 系统。

黄花倒水莲能明显降低高脂大鼠血清中的 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 水平,推测黄花倒水莲可能含有某种或者一类活性成分刺激免疫系统、促进血液的净化能力,发挥调血脂作用。

本研究建立的 HPLC 含量测定方法专属性强、重复性好、准确度高,可用于黄花倒水莲中细叶远志皂苷、獐牙菜苦苷、芦丁的含量测定;黄花倒水莲具有抗炎活性,其抗炎作用的发挥不依赖 HPAA 系统,其抗炎作用机制与减少 MDA、NO 水平,提高 SOD 活性有关;黄花倒水莲对高脂大鼠有明显的调血脂作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第43卷第3分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1997.
Editorial Committee of Flora of China. *Chinese Academy of Sciences Flora of China (Volume 43, Division 3)* [M]. Beijing: Science Press, 1997.
- [2] 张嫦丽, 张可锋, 许有瑞, 等. 黄花倒水莲的化学成分与药理活性研究进展 [J]. 中国药房, 2017, 28(19): 2724-2728.
Zhang C L, Zhang K F, Xu Y R, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of water lily [J]. *China Pharm*, 2017, 28(19): 2724-2728.
- [3] 谢万宗, 范催生, 朱北仪. 全国中草药汇编 [M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1996, 791.
Xie W Z, Fan Q S, Zhu B Y. *National Compilation of Chinese Herbal Medicine* [M]. 2nd edition. Beijing: People's Health Publishing House, 1996, 791
- [4] 贾敏如, 李星炜. 中国民族药志要 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005.
Jia M R, Li X W. *Essentials of Chinese Ethnic Medicine* [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2005.
- [5] 黄金兰, 钟振国. 黄花倒水莲皂苷类成分调血脂作用及临床应用的研究进展 [J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(10): 919-920.
Huang J L, Zhong Z G. Research progress on lipid-regulating effect and clinical application of saponins from water lily [J]. *World J Integr Tradit West Med*, 2010, 5(10): 919-920.
- [6] 李良东, 李洪亮, 范小娜, 等. 黄花倒水莲提取物抗血脂作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 151(3): 650.
Li L D, Li H L, Fan X N, et al. Effect of *Polygala fallax* hemsl. on blood lipid of mice [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2008, 19(3): 650.
- [7] 陈家宝, 潘为高, 罗彭, 等. 黄花倒水莲的研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2018, 14(5): 86-89.
Chen J B, Pan W G, Luo P, et al. Research progress of water lily [J]. *Asia Pac Tradit Med*, 2018, 14(5): 86-89.
- [8] 陈涛, 康闽, 陈雪婷, 等. 远志流浸膏中 3 种指标性成分的含量测定 [J]. 药学研究, 2023, 42(2): 105-108.
Chen T, Kang M, Chen X T, et al. Determination of three index components in *Polygala* liquid extract [J]. *J Pharm Res*, 2023, 42(2): 105-108.
- [9] 杨深应, 吉翠莲, 陶明宝, 等. HPLC 法同时测定利胆解毒胶囊中獐牙菜苦苷和龙胆苦苷的含量 [J]. 中国药品

- 标准, 2020, 21(5): 414-417.
- Yang S Y, Ji C L, Tao M B, et al. Simultaneous determination of swertiamain and gentiopicrin in Lidan Jiedu capsules by HPLC [J]. Drug Stand China, 2020, 21(5): 414-417.
- [10] 叶亚茹, 马霞, 姜紫含, 等. 木薯叶不同溶剂提取物中芦丁含量测定及抗氧化活性研究 [J]. 中国处方药, 2022, 20(8): 30-33.
- Ye Y R, Ma X, Jiang Z H, et al. Determination of rutin content and antioxidant activity in different solvent extracts from cassava leaves [J]. J China Prescr Drug, 2022, 20(8): 30-33.
- [11] 魏江存, 秦祖杰, 钟文, 等. 民族药六棱菊抗炎作用及其机制研究 [J]. 中国新药杂志, 2021, 30(9): 818-823.
- Anti-inflammatory effect and its mechanism of national medicine *Laggera alata* (D. Don) Sch. Bip. ex Oliv [J]. Chin J New Drugs, 2021, 30(9): 818-823.
- [12] 魏江存, 谢臻, 陈勇, 等. 不同微波烘烤程度的山绿茶炮制品降血压作用比较研究 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(20): 2465-2468.
- Wei J C, Xie Z, Chen Y, et al. Comparative study on the antihypertensive effects of processed products of different *Ilex hainanensis* merr. processed by microwave baking [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2020, 37(20): 2465-2468.

[责任编辑 兰新新]

•公益广告•

