

大乌泡叶镇痛活性部位筛选*

孟鑫**, 刘瑶, 蔡进, 陈瑞, 毛政益, 刘珈妮, 刘丽娜, 黄静***

(贵州医科大学药学院, 贵州贵阳 550025)

[摘要] 目的: 对苗药大乌泡叶提取部位进行镇痛活性筛选。方法: 用80%乙醇回流提取获得大乌泡叶醇提物,再用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇分别萃取得到石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位及剩余部位;70只昆明种小鼠,均分为大乌泡叶80%醇提物部位、石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位、剩余部位组,阳性组和阴性对照组,阳性组灌胃吗啡美辛(10 mg/kg)给药,阴性对照组给予同剂量生理盐水灌胃,灌胃5 d,扭体法观察各组小鼠扭体次数,计算镇痛抑制率;另取70只小鼠按以上方法分为7组,但阳性对照组小鼠给予皮下注射吗啡(10 mg/kg),热板法测定各组小鼠灌胃前和末次灌胃给药后于30、60、90及120 min时小鼠痛阈。结果: 正丁醇部位和大乌泡叶80%醇提物部位在两种模型中均能较为显著的抑制小鼠疼痛,但乙酸乙酯部位仅在小鼠扭体模型中能显著抑制小鼠腹部疼痛。结论: 大乌泡叶主要镇痛活性部位为乙酸乙酯部位和正丁醇部位。

[关键词] 大乌泡; 镇痛; 活性部位; 筛选; 扭体法; 热板法

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)02-0176-04

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.02.011

Screening of Analgesic Active Components from Leaves of *Rubus multibracteatus* levl &vant

MENG Xin, LIU Yao, CAI Jin, CHEN Rui, MAO Zhengyi, LIU Jiani, LIU Lina, HUANG Jing
(College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To screen analgesic active components of different extracts from leaves of *Rubus multibracteatus* Levl. &Vant. **Methods:** Different extracts (DE) isolated from the leaves of *Rubus multibracteatus* Levl. &Vant with 80% ethanol reflux extraction were again leached with petroleum ether (PE), ethyl acetate (EA), and n-butyl alcohol (NA). The products included parts of PE, EA, NA and the remaining (RE) part. Seventy mice of Kunming strain were evenly divided into 7 groups, and treated with DE, PE, EA, NA, and RE by gavage respectively for 5 days. The positive control group was given indometaxin (10 mg/kg), and the negative control group was given same dose of normal saline. Pain suppression rates were evaluated by calculating writhing times of mice in different groups with writhing method. The other batch of 70 mice were also divided into 7 groups like the above, except that the positive control group was given subcutaneous injection of morphia at 10 mg/kg. Mouse pain threshold was tested with hot plate method before the treatment, and in 30, 60, 90, and 120 minutes after the last treatment. **Results:** DE and NA parts showed marked analgesic and anti-inflammatory activity in both experiments, but part EA suppressed mouse abdominal pain only in body writhing experiment. These results suggested that parts NA and EA be the analgesic active parts of leaves of *Rubus multibracteatus*. The rank of its different parts for analgesic activity: NA > EA > PE. **Conclusion:** The main analgesic active parts of leaves of *Rubus multibracteatus* are parts of EA and UA. **[Key words]** *Rubus multibracteatus* Levl. &Vant; analgesic; active components; screen; writhing test;

* [基金项目] 贵州省科技厅中药攻关项目[黔科合 ZY(2011)3005]

** 贵州医科大学2012级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: huangjy@sohu.com

网络出版时间:2017-02-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170217.1104.012.html>

hot-plate test

大乌泡主产于四川、云南、贵州等地,系贵州苗药之一,其植物主要含有糖类、黄酮类、三萜类、氨基酸和挥发油等成分,黄酮类成分作为中草药重要的活性物质,具有抗氧化、抗炎、抗菌、抗病毒、保护心血管系统等方面的疗效^[1-7]。李天平等^[8]采用四氮唑盐比色法(MTT)和巨噬细胞色谱(CMC)法对大乌泡醇提物的不同萃取部位以及超临界萃取部分进行活性筛选,发现超临界、乙醚、乙酸乙酯部位对炎性细胞的生长具有抑制作用,表现良好的抗炎活性。为促进植物资源的合理开发和利用,本研究对大乌泡叶进行粗提物的提取和有效部位的筛选,并观察其对扭体法、热板法疼痛模型小鼠的镇痛作用,筛选大乌泡叶的镇痛活性部位,为大乌泡的进一步研究开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药材与动物 药材大乌泡于2013年6月采自贵州凯里市,试验样本由贵州医科大学中药学教研室龙庆德教授鉴定为蔷薇科悬钩子属大乌泡(*Rubus multibroacteatus* Levl&Vant.)的干燥叶。昆明种小鼠由贵州医科大学动物试验中心提供[动物合格证号SCXK(黔)2002-0001],体质量18~22 g,雌雄兼有。小鼠在20℃下饲养7 d,并在试验前15 h内停止进食,符合国家道德伦理委员会关于动物试验的要求规定。

1.1.2 仪器与试剂 DFT-200 手提式高速中药粉碎机(温岭市大得中药机械有限公司),EL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),HH-2 数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司),SHB-III 循环式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司),SEF-OBR 型回旋蒸发器(上海申生科技有限公司),D2F-OB 型真空干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司),RB-200 智能热板仪(上海益联科教设备有限公司);95%乙醇(分析纯,国药控股股份有限公司),石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、醋酸(分析纯,上海申博化工有限公司),吲哚美辛(原料药,成都制药厂),盐酸吗啡(10 mg注射剂,沈阳第一制药厂)。

1.2 方法

1.2.1 大乌泡有效部位制备 称取大乌泡叶粉末

(过40目筛)200 g,用10倍量80%乙醇回流提取3次,时间3、3及2 h,合并滤液浓缩得大乌泡叶醇提物浸膏30.8 g;有提取物浸膏分散于水中后分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇分别萃取3次,45℃减压浓缩得到石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位及剩余部位。将一定量大乌泡叶80%醇提物、石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位、剩余部位浸膏加生理盐水分散,并加入0.5%羧甲基纤维素钠,配制成相当于大乌泡叶生药剂量428.6 mg/kg的混悬溶液。

1.2.2 安全性试验 参照文献[9],对各萃取部位进行安全性试验。将昆明种小鼠分为大乌泡叶80%醇提物部位、石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位及剩余部分部位5组,每组6只。分别对每只小鼠灌胃给予2 g/kg的各部位混悬溶液,连续灌胃7 d,记录小鼠的死亡数量。

1.2.3 有效部位筛选 扭体法:参照文献[10],取70只昆明种小鼠均分为大乌泡叶80%醇提物部位、石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位及剩余部分部位5个给药组、阴性对照组及阳性对照组,每组雌雄各半;混悬溶液灌胃给药,阳性组灌胃吲哚美辛(10 mg/kg)给药,阴性对照组给予同剂量生理盐水灌胃,连续5 d。各组小鼠末次灌胃后1 h,按药容积:动物体重为0.1 mL:10 g给予小鼠腹腔注射0.6%醋酸溶液。观察小鼠注射后5~20 min内发生的扭体反应(伸展后肢,腹部内凹,臀部抬高)的次数。计算镇痛抑制率,镇痛抑制率=(对照组扭体次数-给药组扭体次数)/对照组扭体次数×100%。热板法:参照文献[11],筛选昆明种小鼠70只,按扭体法进行分组;阳性对照组小鼠皮下注射吗啡(10 mg/kg),给药组按药容积:动物体质量为0.1 mL:10 g给予相应大乌泡提取部位混悬溶液灌胃给药,阴性对照组给予同剂量生理盐水灌胃,连续5 d。小鼠末次灌胃后1 h,按药容积:动物体重为0.1 mL:10 g给予小鼠腹腔注射0.6%醋酸溶液,于末次灌胃给药的30、60、90及120 min后再次测定小鼠痛阈。

1.3 统计学分析

实验数据使用SPSS 11.5统计软件进行分析,数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)记录,如果方差齐性,数据比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 有效部位的制备及安全性试验

采用 80% 乙醇溶液对大乌泡叶进行回流提取,再用由低极性到高级性的有机溶剂依次萃取,最终在 45 ℃ 下减压浓缩得到 3 个部分的萃取物。结果显示正丁醇部位萃取物最多,其次为乙酸乙酯部位,最少部分为石油醚部位。各部位萃取物的质量、得率与性状描述见表 1。安全性试验结果显示,昆明种小鼠在 2 g/kg 剂量下,7 d 内小鼠无死亡和患病,说明本研究所使用的大乌泡部位和剂量均安全。

表 1 各部位萃取物的结果

Tab. 1 Extract results of different plant components

萃取部位	性状	重量(g)	得率(%)
石油醚部位	墨绿色油状	3.1	1.55
乙酸乙酯部位	墨绿色粉末	5.4	2.70
正丁醇部位	棕褐色粉末	6.2	3.10

2.2 大乌泡镇痛活性部位

2.2.1 扭体法 与阴性对照组比较,正丁醇部位

能够显著抑制 0.6% 醋酸引起的疼痛,其次为 80% 醇提物部位和乙酸乙酯部位,石油醚部位的抑制效果最差。各部位镇痛抑制率见表 2。

表 2 各组小鼠扭体法试验结果($n=10$)

Tab. 2 The results of writhing responses of mice in different groups

组别	扭体次数($\bar{x} \pm s$)	抑制率(%)
阴性对照组	38.8 ± 2.65	0.00
给药组		
80% 醇提物部位	20.0 ± 3.62 ⁽¹⁾	48.45
石油醚部位	26.1 ± 3.81	32.73
乙酸乙酯部位	21.0 ± 2.05 ⁽²⁾	45.88
正丁醇部位	14.1 ± 2.28 ⁽¹⁾	63.65
剩余部分	24.2 ± 4.59	37.63
阳性对照组	3.7 ± 2.50 ⁽¹⁾	90.46

与阴性对照组比较,⁽¹⁾ $P < 0.01$,⁽²⁾ $P < 0.05$

2.2.2 热板法 与阴性组比较,正丁醇部位延迟高温对小鼠皮肤引起的灼热疼痛的反应,正丁醇部位组和 80% 醇提物部位组小鼠对高温引起的皮肤灼热疼痛反应的镇痛持续时间较阳性对照组持续时间长。而石油醚部位、乙酸乙酯部位不能延迟小鼠的疼痛反应;见表 3。

表 3 各组小鼠对高温的痛反应时间($n=10$)

Tab. 3 The pain response time of mice in different groups in hot plate test

组别	给药前(min)	对高温的痛反应时间(min)			
		30	60	90	120
阴性组	18.05 ± 4.32	18.09 ± 3.72	16.35 ± 5.15	17.06 ± 2.75	17.46 ± 3.58
给药组					
80% 醇提物部位	20.78 ± 3.78	21.25 ± 2.89	28.47 ± 2.81 ⁽¹⁾	29.31 ± 2.99 ⁽¹⁾	30.29 ± 2.67 ⁽¹⁾
石油醚部位	17.32 ± 3.03	17.42 ± 2.26	15.52 ± 3.99	15.18 ± 4.84	15.06 ± 2.98
乙酸乙酯部位	14.93 ± 1.11	13.83 ± 3.26	15.03 ± 3.60	17.56 ± 4.99	14.29 ± 3.74
正丁醇部位	16.16 ± 1.84	20.00 ± 5.81	28.32 ± 2.58 ⁽¹⁾	27.70 ± 2.95 ⁽¹⁾	26.35 ± 3.10 ⁽¹⁾
剩余部分	16.50 ± 2.39	17.18 ± 2.74	16.17 ± 0.56	17.75 ± 2.49	17.32 ± 2.99
阳性组	13.98 ± 2.00	57.23 ± 1.18 ⁽¹⁾	58.28 ± 3.84 ⁽¹⁾	25.35 ± 2.93 ⁽¹⁾	18.92 ± 3.33

⁽¹⁾与阴性对照组比较, $P < 0.01$

2.2.3 总镇痛活性 综上,正丁醇部位和 80% 醇提物部位在两种模型中均能较为显著的抑制小鼠疼痛,但乙酸乙酯部位仅在小鼠扭体模型中能显著抑制小鼠腹部疼痛。因此认为正丁醇部位和 80% 醇提物部位是大乌泡叶的镇痛活性部位。

3 讨论

大乌泡为蔷薇科悬钩子属大乌泡(*Rubus*

multibroacteatus Levl&Vant.),又名倒生根、黄水泡、无刺乌泡、糖泡叶、马莓叶,性苦、凉,入脾、肝二经,在全国大部分地区均有分布,主产于四川、云南、贵州等地,系贵州苗药之一。悬钩子属植物为传统药用植物,其主要药理活性有:抗肿瘤活性,抗自由基抗氧化活性,保肝作用及抗菌抗炎活性等^[12]。具有清热解毒,祛风除湿,凉血,止血,接骨的功效,主要用于治痢疾,腹泻,风湿痹痛,咳血,妇女倒经,骨折等^[13-15]。由于其疗效显著,采集方便,在贵州苗

族地区被广泛用于治疗风热感冒、止血接骨、痢疾、腹泻、咳血、妇女倒经等疾病。目前,根据苗族用药经验,大乌泡具有消肿止痛、祛风除湿等功效,主要用于治疗龋齿痛、骨折、痢疾等,具有独特的疗效,且通过民间广泛应用证明其作用安全可靠。为促进植物资源的合理开发和利用,本研究对大乌泡叶进行粗提物的提取和有效部位的筛选,并观察其对扭体法、热板法疼痛模型小鼠的镇痛作用,筛选大乌泡叶的镇痛活性部位。

本研究采用 80% 乙醇溶液对大乌泡叶进行回流提取,再用由低极性到极高性的有机溶剂依次萃取,最终在 45 ℃ 下减压浓缩得到 3 个部分的萃取物。结果显示正丁醇部位萃取物最多,其次为乙酸乙酯部位,最少部分为石油醚部位。安全性试验也证实本研究所使用的部位剂量是安全可靠的。本研究最后发现大乌泡叶的镇痛活性部位主要集中在正丁醇和 80% 醇提部位,能够提高小鼠热刺激体表的痛阈,抑制醋酸刺激腹腔黏膜引起的痛反应,减少扭体次数。本研究的结果为进一步活性成分的研究提供了研究方向,并为大乌泡药材深层次的开发提供了理论依据。

4 参考文献

- [1] 刘明生,李锐,朱廷儒. 悬钩子属植物化学成分的研究概况[J]. 沈阳药学院学报, 1994 (1): 68 - 72.
 - [2] 徐树芸. 贵州十种民族药的应用研究[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2006 (6): 74.
 - [3] 陈丛莲,王琪,李欣. 黄酮类化合物抗氧化和抗菌生物活性研究进展[J]. 中国药房, 2011 (35): 3346 - 2248.
 - [4] 聂彝,余陈欢,王芳芳,等. 石荠苎总黄酮抗炎作用及其机制研究[J]. 时珍国医国药, 2008 (1): 65 - 66.
 - [5] 崔永明,余龙江,敖明章,等. 甘草总黄酮的提取技术及其抑菌活性研究[J]. 中药材, 2006 (8): 838 - 841.
 - [6] 宣以巍,刘英,江萍,等. 柑橘类黄酮的生理活性及其研究现状[J]. 科技通报, 2008 (4): 494 - 497.
 - [7] 曹伟国,刘志勤,邵云,等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 西北植物学报, 2003 (12): 2241 - 2247.
 - [8] 李天平,张彦民,李森,等. 大乌泡抗炎活性成分的筛选及 GC/MS 分析[N]. 2009 年药物分析论文汇总, 2009: 221 - 225.
 - [9] Bruce RD. An up-and-down procedure for acute toxicity testing[J]. Fundam Appl Toxicol, 1985 (5): 151 - 157.
 - [10] García MD. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *Pimenta racemosa*-var. *ozua* (Mirtaceae) [J]. J Ethnopharmacol, 2004 (91): 69 - 73.
 - [11] Franzotti EM. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L [J]. J Ethnopharmacol, 2000 (72): 273 - 277.
 - [12] 傅正生,杨爱梅,梁卫东,等. 悬钩子属植物化学成分及生物活性研究新进展[J]. 天然产物研究与开发, 2001 (5): 86 - 90.
 - [13] 李永康,陈谦海. 贵州植物志[M]. 成都: 四川民族出版社, 1989: 155.
 - [14] 邱德文,杜江. 中华本草苗药卷[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2005: 62.
 - [15] 贵州省药品监督管理局编委. 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: 30.
(2016-11-02 收稿, 2017-01-22 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 苏晓庆
-
- (上接第 175 页)
- [10] 刘家常,李欣. 高压消解 - 原子吸收光谱法测定奶粉中铜含量[J]. 中国卫生监督杂志, 2011 (5): 458 - 459.
 - [11] 宋庆国,石杰,赵开楼,等. 氢化物 - 原子荧光法测定中草药中的痕量铋[J]. 光谱学与光谱分析, 2005 (8): 1355 - 1357.
 - [12] 秦樊鑫,张明时,张丹,等. 贵州省 GAP 基地 26 种中药材重金属含量调查与评价[J]. 中成药, 2007 (10): 1483 - 1487.
 - [13] 王正,王永林,关焕玉,等. 黔产蓝布正有害元素与农药残留分析[J]. 时珍国医国药, 2013 (12): 3023 - 3025.
 - [14] 陈晋红,汤毅珊,刘大伟,等. 姜黄药材中 6 种重金属残留量测定[J]. 中药新药与临床管理, 2009 (5): 457 - 460.
 - [15] 王正,王永林,廖尚高,等. 贵州马兰草重金属与有机氯农药残留分析[J]. 贵阳医学院学报, 2015 (1): 41 - 44.
(2016-10-30 收稿, 2017-01-22 修回)
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 苏晓庆