

陆 潭,张李阳,陈玉胜.一种黄芪药渣发酵产物的抗高尿酸血症活性[J].江苏农业科学,2013,41(9):288-291.

一种黄芪药渣发酵产物的抗高尿酸血症活性

陆 潭,张李阳,陈玉胜

(南京晓庄学院生物化工与环境工程学院,江苏南京 211171)

摘要:在建立氧嗉酸钾盐诱导小鼠产生高尿酸血症模型的基础上,探讨一种黄芪药渣发酵产物的抗高尿酸血症活性。将雄性昆明小鼠随机分为正常组,高尿酸血症模型组,50、100、200 mg/kg 剂量黄芪药渣发酵产物组,5 mg/kg 剂量别嘌醇组;每天先用 250 mg/kg 氧嗉酸钾盐灌胃 1 h,再继续灌胃给药 1 周,分别测定血清中的尿酸、肌酐、尿素氮水平,尿液中的尿酸、肌酐水平。结果表明,与模型组相比,黄芪药渣发酵产物能显著降低高尿酸血症小鼠血清中尿酸、肌酐和尿素氮水平,能显著提高 24 h 尿液中尿酸和肌酐的排泄量以及尿酸的排泄分数,具有促进肾脏尿酸排泄的作用,初步认为黄芪药渣发酵产物具有抗高尿酸血症活性。

关键词:黄芪药渣;发酵;高尿酸血症;昆明小鼠

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0288-03

随着生活节奏的加快,人们的生活水平在提高,运动时间在减少,而高尿酸血症的发病率则呈上升趋势。高尿酸血症的发病机理是由于嘌呤代谢紊乱而导致尿酸生成过多^[1]或者肾脏发生排泄障碍而造成的^[2],其严重的后果是可导致痛风性关节炎和尿酸性肾损害^[3]。目前有效、安全、经济的降血尿酸药物很少,有些促进尿酸排泄类药物或者黄嘌呤氧化酶抑制剂类降尿酸药物会引起胃肠道毒副作用、骨髓造血功能抑制、肾毒害和过敏等临床症状,这些副作用限制了它们在临床上的应用^[4-6],因此研制新型无副作用的降血尿酸药物具有重要的意义。

《中华人民共和国药典》2005 版(一部)中将黄芪(*Radix Astragali*)定义为豆科黄芪属植物蒙古黄芪[*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao]及膜荚黄芪[*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.]的干燥根,为常用的中药之一。研究表明,黄芪的主要有效化学成分为多种黄酮类、三萜皂苷类化合物和多糖等,其中类黄酮广泛存在于蔬菜和水果中,是强抗氧化剂,可有效防止氧化损伤。Hanasaki 等研究表明,槲皮素和芹菜素这 2 种类黄酮物质除了具有抗氧化、抗癌、抗炎、镇静等作用外,还能够很好地控制高尿酸血症大鼠的血清尿酸水平,增强高尿酸血症大鼠的抗氧化能力和清除氧自由基的能力,从而减少脂质的过氧化^[7-12]。徐慧静等研究表明,海参皂苷可显著降低高尿酸血症小鼠的血清尿酸水平^[13]。

本试验选择灵芝(*Ganoderma lucidum*)作为发酵菌种,用特选的中药材黄芪药渣作为药性基质,再掺入农副产品作为营养基质,共同构成一个发酵组合,在特定条件下进行双向发酵,该发酵技术受国家专利保护^[14]。已有的试验表明,黄芪

药渣发酵产物具有提高机体免疫力^[15]、抗疲劳^[16]、抗抑郁^[17]的功效,这些分析从理论上间接表明,黄芪药渣发酵产物应该具有抗高尿酸血症的功效,但关于其抗高尿酸血症功效的研究尚未见报道。因此本试验通过应用氧嗉酸钾盐诱导小鼠形成高尿酸血症模型,以期从实际上验证黄芪药渣发酵产物的抗高尿酸血症功效,为抗高尿酸的新药研发工作开辟新的思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 选择 60 只健康的雄性昆明小鼠(20±2)g 作为试验动物,购自南京青龙山动物中心。小鼠被随机分成 6 组,每组 10 只,饲养在温度为(24±2)℃的室内,12 h 光照/12 h 黑暗的条件下进行培养,让其自由饮水进食,适应 7 d。

1.1.2 主要试剂 氧嗉酸钾盐、别嘌醇,购自 Sigma 公司;肌酐、尿素氮试剂盒,购自南京建成生物工程研究所。

1.1.3 样品的制作 将黄芪药渣发酵产物(FSAR)经粉碎机粉碎后过 200 目筛,取粉末状发酵产物,分别用蒸馏水溶解成 50、100、200 mg/mL 的浓度;将不同浓度的黄芪药渣发酵产物对小鼠进行灌胃,灌胃量均为 10 mL/kg。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计 正常对照组(第 1 组)用蒸馏水灌胃;模型对照组(第 2 组)于每天 08:00 用 250 mg/kg 氧嗉酸钾盐进行灌胃造模;模型给药组每天在造模后 1 h 进行灌胃给药,按第 3 组至第 6 组的顺序分别给予 5 mg/kg 别嘌醇,50、100、200 mg/kg FSAR,连续给药 7 d,所有药物需均匀分散于蒸馏水中;要求灌胃前 1 h 断粮但不断水,所有程序均遵循中国动物保护协会的要求。

1.2.2 尿液的收集与处理 连续给药处理 6 d 后,将所有小鼠转移至代谢笼内,自由饮水饮食,收集每个代谢笼内小鼠的 24 h 尿液,将尿液样品离心(2 000 g, 10 min)后取上清液用于尿液中尿酸、肌酐的测定。

1.2.3 血清样品的收集 最后 1 d 给药处理后 1 h,摘取小

收稿日期:2013-02-26

基金项目:江苏省高等学校大学生实践创新项目(编号:2160081)。

作者简介:陆 潭(1991—),男,江苏盐城人,研究方向为食品技术。

E-mail:1134034827@qq.com。

通信作者:陈玉胜,男,硕士,实验师,主要研究方向为植物生理生化及药理。Tel:(025)86178272;E-mail:yschen@njxc.edu.cn。

鼠的眼球进行取血,血液经离心(12 000 g, 10 min)后取血清,用于血液中尿酸、肌酐、血清尿素氮的测定。

1.2.4 尿酸、肌酐和尿素氮含量的测定 血清和尿液中的尿酸含量的测定采用磷钨酸法^[18],肌酐、尿素氮含量的测定采用标准试剂盒法。尿酸排泄分数(fractional excretion of uric acid, FEUA)的计算采用如下公式:

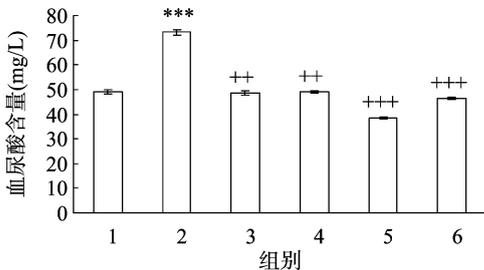
尿酸排泄分数 = (尿液尿酸 × 血清肌酐) / (血尿酸 × 尿肌酐) × 100%

1.2.5 数据分析 所有试验结果以“均值 ± 标准差”的形式表示。采用 SPSS 软件进行单因素方差分析,2 组均数间的差异采用 *t* 检验, *P* < 0.05 时认为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 对高尿酸血症小鼠血尿酸水平的影响

由图 1 可见,250 mg/kg 氧嗪酸钾盐诱导的高尿酸血症模型对照组小鼠的血尿酸水平极显著高于正常对照组 (*P* < 0.001)。与模型对照组比较,各 FSAR 剂量组(50、100、200 mg/kg)和别嘌醇组(5 mg/kg)都极显著降低了模型动物血清中的尿酸水平 (*P* < 0.001 或 *P* < 0.01)。随着剂量在一定范围内的增加,FSAR 的降尿酸作用有增强趋势。



1~6 分别表示正常对照组、模型对照组、模型给药组(5 mg/kg 别嘌醇, FSAR 50、100、200 mg/kg); 相对于对照, ****P* < 0.001, ***P* < 0.01, **P* < 0.05; 相对于高尿酸血症模型组, +++*P* < 0.001, ++*P* < 0.01, +*P* < 0.05。下同。

图1 不同处理对氧嗪酸钾盐诱导的高尿酸血症小鼠血尿酸水平的影响

2.2 对高尿酸血症小鼠尿尿酸水平的影响

由图 2 可见,250 mg/kg 氧嗪酸钾盐诱导的高尿酸血症模型对照组小鼠的尿尿酸水平极显著低于正常对照组 (*P* < 0.01)。与模型对照组比较,200 mg/kg FSAR 组和别嘌醇组(5 mg/kg)能显著 (*P* < 0.05) 或极显著 (*P* < 0.001) 提高模型动物的尿尿酸水平; 而 50、100 mg/kg FSAR 组的作用效果不显著。

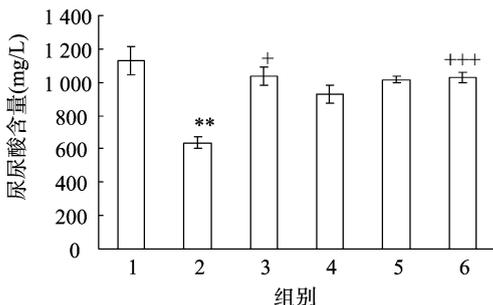


图2 不同处理对氧嗪酸钾盐诱导的高尿酸血症小鼠尿尿酸水平的影响

2.3 对高尿酸血症小鼠血肌酐水平的影响

由图 3 可见,250 mg/kg 氧嗪酸钾盐诱导的高尿酸血症模型对照组小鼠的血肌酐水平极显著高于正常对照组 (*P* < 0.01)。与模型对照组比较,100、200 mg/kg FSAR 组和别嘌醇组(5 mg/kg)都能显著 (*P* < 0.05) 或极显著 (*P* < 0.01 或 *P* < 0.001) 降低模型动物血清中的肌酐水平; 而 50 mg/kg FSAR 组的作用效果不显著。

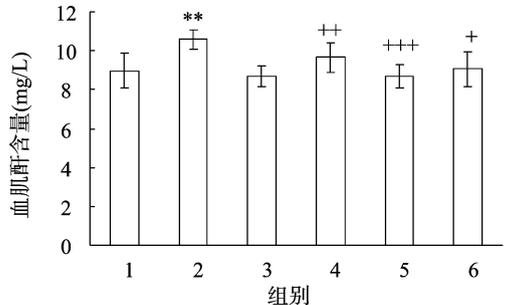


图3 不同处理对氧嗪酸钾盐诱导的高尿酸血症小鼠血肌酐水平的影响

2.4 对高尿酸血症小鼠尿肌酐水平的影响

由图 4 可见,250 mg/kg 氧嗪酸钾盐诱导的高尿酸血症模型对照组小鼠的尿肌酐水平极显著低于正常对照组 (*P* < 0.01)。与模型对照组比较,FSAR 的各剂量组(50、100、200 mg/kg)和别嘌醇组(5 mg/kg)都能显著 (*P* < 0.05) 或极显著 (*P* < 0.001) 提高模型动物的尿肌酐水平,且 200 mg/kg FSAR 组的作用效果与别嘌醇组的作用效果相当。

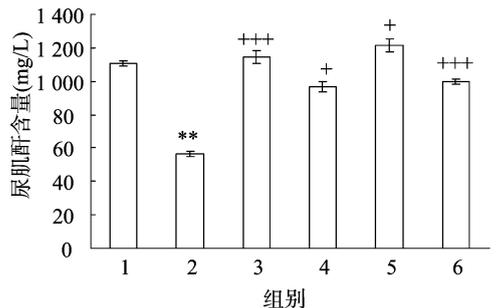


图4 不同处理对氧嗪酸钾盐诱导的高尿酸血症小鼠尿肌酐水平的影响

2.5 对高尿酸血症小鼠血清尿素氮含量的影响

由图 5 可见,250 mg/kg 氧嗪酸钾盐诱导的高尿酸血症模型对照组小鼠的血清尿素氮水平极显著高于正常对照组 (*P* < 0.01)。与模型对照组比较,剂量为 100、200 mg/kg FSAR

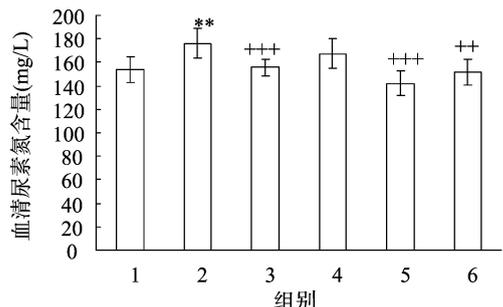


图5 不同处理对氧嗪酸钾盐诱导的高尿酸血症小鼠血清尿素氮水平的影响

组和别嘌醇组(5 mg/kg)都能够极显著降低模型动物血清尿酸氮水平($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),而50 mg/kg FSAR组的作用效果不显著。

2.6 对高尿酸血症小鼠尿酸排泄分数的影响

由图6可见,与正常对照组相比,氧嗉酸钾盐诱导的高尿酸血症模型对照组小鼠的尿酸排泄分数极显著降低($P < 0.01$)。与模型对照组比较,50、100、200 mg/kg剂量的FSAR组则能够极显著提高尿酸排泄分数($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。

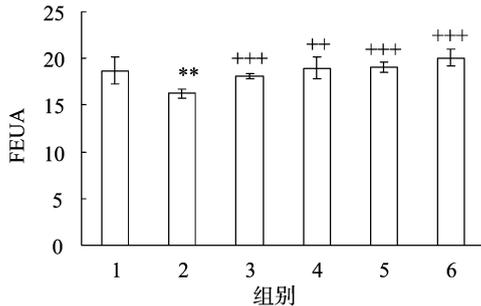


图6 不同处理对氧嗉酸钾盐诱导的高尿酸血症小鼠FEUA水平的影响

3 讨论与结论

在药理学及毒理学研究中,氧嗉酸钾盐被广泛用于诱导高尿酸血症模型^[19]。在本试验中,当小鼠连续灌胃氧嗉酸钾盐1周后,模型对照组血清中尿酸、肌酐、尿素氮水平都极显著高于正常对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。由于血清中的肌酐和尿素氮均为肾功能的重要指标^[20],因此研究结果表明,氧嗉酸钾盐诱导小鼠产生了高尿酸血症和肾损伤。

同时,研究表明,50、100、200mg/kg的FSAR处理能极显著降低高尿酸血症小鼠的血尿酸水平($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$);但是200 mg/kg的FSAR处理则能极显著提高尿酸水平($P < 0.001$),50、100 mg/kg的FSAR对尿酸水平的增加效果不显著。

尿酸排泄分数是一个重要的肾脏尿酸处理指标。在本试验中,氧嗉酸钾盐诱导的高尿酸血症模型对照小鼠的尿酸排泄分数极显著低于正常对照组小鼠($P < 0.01$);50、100、200 mg/kg的FSAR处理则能极显著提高小鼠的尿酸排泄分数($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。因此可以推测,FSAR降低血液中尿酸的机制可能是通过促进尿液中尿酸的排泄来实现的。

本试验选用黄芪药渣作为营养基质,黄芪甲苷是药用黄芪中的有效单体成分,具有抗炎、降压、镇痛、镇静等作用,此外还能够影响血清和肝脏中蛋白质的合成、增加血浆中cAMP含量、再生肝DNA,从而增强器官的免疫能力^[21]。黄芪药渣经药用真菌灵芝固体发酵后,其有效单体黄芪甲苷转化成了异黄芪甲苷,化学名为6-O-β-D-葡萄糖基-环黄芪醇(图7)^[22],具有增强机体免疫力的功效^[23-24]。目前黄芪皂苷功能的研究大多集中于苷元部分及含有较多糖基的黄芪皂苷,而对其低糖基的黄芪皂苷研究较少,因此FSAR降解尿酸的分子学机理及其有效成分的研究有待进一步深入。

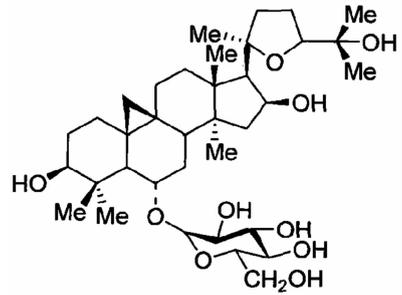


图7 异黄芪甲苷的化学结构

参考文献:

- [1] Emmerson B T. The management of gout[J]. The New England Journal of Medicine, 1996, 334(7): 445 - 451.
- [2] Johnson R J, Kang D H, Feig D, et al. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? [J]. Hypertension, 2003, 41(6): 1183 - 1190.
- [3] Iseki K, Oshiro S, Tozawa M, et al. Significance of hyperuricemia on the early detection of renal failure in a cohort of screened subjects [J]. Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension, 2001, 24(6): 691 - 697.
- [4] Horiuchi H, Ota M, Nishimura S, et al. Allopurinol induces renal toxicity by impairing pyrimidine metabolism in mice[J]. Life Sciences, 2000, 66(21): 2051 - 2070.
- [5] Hammer B, Link A, Wagner A, et al. Hypersensitivity syndrome during therapy with allopurinol in asymptomatic hyperuricemia with a fatal outcome [J]. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 2001, 126(47): 1331 - 1334.
- [6] Terkeltaub R A. Gout[J]. The New England Journal of Medicine, 2003, 349(17): 1647 - 1655.
- [7] Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids[J]. Free Radical Biology & Medicine, 1994, 16(6): 845 - 850.
- [8] Elliott M Jr, Kandaswami C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer [C]//Harborne J B. In the flavonoids: Advances in research since 1986. London: Chapman and Hall, 1994: 619 - 652.
- [9] Hope W C, Welton A F, Fiedler - Nagy C, et al. *In vitro* inhibition of the biosynthesis of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS - A) and lipoxygenase activity of quercetin[J]. Biochemical Pharmacology, 1983, 32(2): 367 - 371.
- [10] Weiss M R. Floral color changes as cues for pollinators[J]. Nature, 1991, 354(6350): 227 - 229.
- [11] Ratty A K, Das N P. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure - activity relationship[J]. Biochemical Medicine and Metabolic Biology, 1988, 39(1): 69 - 79.
- [12] 姚芳芳, 张锐, 傅瑞娟, 等. 槲皮素和芹菜素对高尿酸血症大鼠血尿酸及抗氧化能力的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(5): 287 - 290.
- [13] 徐慧静, 张灏, 刘春花, 等. 摄食海参皂苷对小鼠高尿酸血症的影响[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(8): 1064 - 1067.
- [14] 张李阳, 周业飞, 张敦林, 等. 一种饲料添加剂及其制备工艺和在制造预防禽流感的饲料中的应用: 中国, 200510038072 [P]. 2005 - 09 - 07.

李优琴,吕康. 土壤有机质测定方法中消解条件的优化[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):291-292.

土壤有机质测定方法中消解条件的优化

李优琴,吕康

(江苏省农业科学院食品质量安全与检测研究所/江苏省省部共建食品质量安全重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:为优化土壤有机质测定方法,利用可控温消解炉加热样品反应液进行土壤有机质测定,研究消解炉加热法的最适反应条件。结果表明,最适消解条件为:消解炉温度 230 ℃,反应液微沸 5 min。测定结果准确可靠,稳定性好,方法较国标法中的油浴加热法方便且易于控制,经标准样品测试,结果均在标准定值范围内,重复测定相对标准偏差小于 0.49%。利用消解炉加热消解反应液测定土壤有机质方法简便可行。

关键词:土壤有机质;消解方法;改进;消解炉

中图分类号: S151.9⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0291-02

土壤有机质是存在于土壤中的所有含碳的有机化合物,主要包括土壤中各种动物、植物残体,微生物及其分解和合成的各种有机化合物。土壤有机质含量是衡量土壤肥力的重要指标之一,它能促使土壤形成结构,改善土壤物理、化学及生物学过程的条件,提高土壤的吸收性能和缓冲性能,同时其本身又含有植物所需要的各种养分,如碳、氮、磷、硫等,因此,要了解土壤的肥力状况,必须进行土壤有机质含量的测定。我国地域辽阔,由于各地的自然条件和农林业经营水平不同,土壤有机质含量差异较大,低者少于 1%,多者高达 20%^[1]。

土壤有机质的测定方法有重铬酸钾容量法(外加热法)、目视比色法、灼烧法(重量法)、光度比色法等。我国测定土壤有机质现行的林业、农业行业标准方法分别为 LY/T 1237—1999《森林土壤有机质的测定及碳氮比的计算》与 NY/T 1121.6—2006《土壤检测 第 6 部分:土壤有机质的测定》,均为重铬酸钾氧化外加热法,是沿用多年的经典方法,

原理是利用油浴加热重铬酸钾使土壤有机质氧化。此法温度波动大,需凭经验控制,且试样在油浴锅中受热不均,易产生误差,试验中要特别注意保持溶液呈微沸状态,以防止重铬酸钾的分解,又要准确计算沸腾时间 5 min;同时甘油在高温下挥发,会污染实验室空气。也有报道采用烘箱加热反应液,但反应温度高,且反应产生的废气等会污染实验室空气。笔者利用实验室现有消解炉对重铬酸钾容量法加热消解条件进行了优化,建立了简便易控制的加热消解方法。

1 材料与方 法

1.1 设备与试剂

EHD20 型 DigiBlock 智能样品消解炉(莱伯泰科有限公司),40 mm × 300 mm 消化管。

试验所用试剂除特别注明外均为分析纯,试验用水符合 GB/T 6682—2008《分析实验室用水规格和试验方法》中三级水规定,所述溶液如未指明溶剂,均系水溶液。

浓硫酸;0.2 mol/L 重铬酸钾-硫酸溶液;0.2 mol/L 硫酸亚铁溶液,用前标定;0.100 0 mol/L 重铬酸钾标准溶液;邻菲罗啉指示剂;国家标准物质中心标准土壤样品 GBW07412、GBW07415,有机质含量标准定值分别为(1.82 ± 0.09)%、(3.83 ± 0.12)%。

收稿日期:2013-06-24

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(13)4025]。

作者简介:李优琴(1963—),女,浙江黄岩人,副研究员,主要从事农产品及产地环境检测与控制技术研究。Tel:(025)84390422;

E-mail:lyq@jaas.ac.cn。

[15]张李阳,周业飞,张敦林. 药用真菌发酵产物对 AA 肉鸡免疫功能及生长的影响[J]. 饲料研究,2005(1):44-47.

[16]陈玉胜,张李阳,霍光明,等. “芝芪菌质”超细粉对小鼠的抗疲劳及促生长效应[J]. 江苏农业科学,2010(2):318-320.

[17]陆鸣鸣,陆潭,张雪明,等. 芝芪菌质水提物抗抑郁作用研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(18):10818-10819.

[18]Carroll J J, Coburn H, Douglass R, et al. A simplified alkaline phosphotungstate assay for uric acid in serum[J]. Clinical Chemistry, 1971,17(3):158-160.

[19]Wang Y, Zhu J X, Kong L D, et al. Administration of procyanidins from grape seeds reduces serum uric acid levels and decreases hepatic xanthine dehydrogenase/oxidase activities in oxonate-treated mice[J]. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2004,94(5):232-237.

[20]Huang J, Wang S, Zhu M, et al. Effects of genistein, apigenin, quer-

cetin, rutin and astilbin on serum uric acid levels and xanthine oxidase activities in normal and hyperuricemic mice[J]. Food and Chemical Toxicology, 2011,49(9):1943-1947.

[21]张宇,李玉莲,管海波,等. 黄芪皂苷水解前后黄芪甲苷的含量测定[J]. 中华医药学杂志,2003,2(1):56-57.

[22]刘维周,阮鸣,张李阳,等. 6-O-β-D-葡萄糖基-3,6,16,25-四羟基环菠萝蜜烷的制备方法:中国,200810156224[P]. 2008-10-07.

[23]Verotta L, Guerrini M, El-Sebakhy N A, et al. Cycloartane and oleanane saponins from Egyptian *Astragalus* spp. as modulators of lymphocyte proliferation[J]. Planta Medica, 2002,68(11):986-994.

[24]Yesilada E, Bedir E, Çaltış I, et al. Effects of triterpene saponins from *Astragalus* species on *in vitro* cytokine release[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2005,96(1/2):71-77.