

黄秋葵提取物抗疲劳的实验研究

杨毅, 金祖汉*, 毛培江, 金捷, 黄晶晶, 杨明华(浙江省中药研究所, 杭州 310023)

摘要: 目的 观察黄秋葵水提取物对实验动物的抗疲劳作用, 探讨黄秋葵水提取物抗疲劳作用的机制。方法 以观察小鼠负重力竭游泳时间探讨黄秋葵提取物抗疲劳作用; 测定小鼠游泳前后血清尿素的变化、小鼠肝糖原含量、小鼠血乳酸等探讨抗疲劳机制。结果 黄秋葵提取物能明显延长小鼠负重游泳时($P<0.05$), 减少小鼠血清尿素产生($P<0.01$), 减少小鼠血乳酸含量($P<0.05$), 对小鼠肝糖原含量无明显影响。结论 黄秋葵提取物具有良好的抗疲劳作用。该作用可能与提高小鼠代谢能力和增强应激能力有关。

关键词: 黄秋葵; 抗疲劳; 小鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)12-1091-04

Study on Anti-fatigue Effects of Okra Extracts

YANG Yi, JIN Zuhan*, MAO Peijiang, JIN Jie, HUANG Jingjing, YANG Minghua(Zhejiang Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the water extracts from okra on anti-fatigue effects in mice, to explore anti-fatigue effect mechanism of water extracts from okra. **METHODS** To discuss the anti-fatigue effects of water extracts from okra through weight loading swimming test on mice; to explore the anti-fatigue mechanism by analysis of serum urea changes, hepatic glycogen and serum lactic acid before and after swimming. **RESULTS** Compared with the control group, the swimming time was increased significantly($P<0.05$) in okra extracts groups, and the production of serum urea and serum lactic acid was decreased($P<0.05$ and $P<0.01$), while there was no significant difference of muscle glycogen. **CONCLUSION** The anti-fatigue effects of okra extracts was obvious. It may be related to the improved metabolic capacity and enhanced ability stress of mice.

KEY WORDS: okra; anti-fatigue; mice

疲劳是身体在高强度或长时间活动后, 产生的一种生理或心理现象, 表现为身体困倦、精神倦怠, 注意力减退, 工作效率下降, 经常处于疲劳状态就会发展为病理性损害。因此, 在天然植物中寻找、筛选具有抗疲劳作用的有效成分、探讨其作用机制具有实际意义。黄秋葵(okra)味淡, 性寒^[1], 属锦葵科(Malvaceae)秋葵属(*Abelmoschus*)咖啡黄葵[*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench]植物^[2-4], 有不少科学研究表明, 黄秋葵水提取物具有抗疲劳作用^[5]。本研究采用小鼠负重力竭游泳模型, 对黄秋葵提取物的抗疲劳效果进行更深层次的观察, 并对其相关机制进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

基金项目: 浙江省科技厅重大科技专项(2010C12013)

作者简介: 杨毅, 男, 助理工程师 Tel: 13967194411
13675811730 E-mail: j_zh502@hotmail.com

E-mail: yky2276@163.com

*通信作者: 金祖汉, 男, 高级工程师

Tel:

1.1.1 生药 本实验用黄秋葵样品由浙江葵瑞农业开发有限公司提供。实验用黄秋葵为 9 月份新鲜采摘的药材真空干燥后的果实, 经浙江省中药研究所俞旭平教授级高级工程师鉴定为秋葵属咖啡黄葵 *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench。

1.1.2 动物 ICR 小鼠, ♂, 体质量 18~22 g, 由浙江省实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK(浙)2003-0001。

1.1.3 试剂 血清尿素氮试剂盒购于南京建成生物有限公司, 批号: 20111012。三氯醋酸、浓硫酸、硫脲、钨酸钠、硫酸铜、氟化钠、乳酸锂、对羟基联苯等均购买自华东医药股份有限公司器材化剂分公司, 以上试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 黄秋葵提取 黄秋葵切片干品,水提 2 次,第 1 次 10 倍水,提取 2 h,第 2 次 8 倍水提取 1.5 h 合并 2 次提取液,滤过。滤液减压浓缩到相对密度 1.25 左右(40℃),含生药 0.88 g·mL⁻¹。

1.2.2 小鼠负重力竭游泳模型建立 在参考王君耀等^[6]建立的小鼠负重力竭游泳模型基础上,加以改良复制出以下小鼠负重力竭游泳模型:小鼠末次灌胃 30 min 后,在小鼠尾部负荷相对于体质量 5%的铅皮,置于(30±2)℃的游泳箱中负重游泳。以小鼠游泳至头部深入水中 10 s 不再浮起结束,记录小鼠竭力游泳时间。

1.2.3 动物分组与给药 小鼠分 4 批分别进行小鼠游泳试验、血清尿素的测定试验,肝糖原的测定试验和血乳酸的测定试验。每个试验小鼠随机分为 3 组,分别为黄秋葵提取物高剂量组(8.88 g·kg⁻¹)、黄秋葵提取物低剂量组(4.44 g·kg⁻¹)及对照组,每组 11 只。受试物以无菌水配制,每日灌胃给药 1 次,连续灌胃 2 周后测各项指标。小鼠灌胃体积为 10 mL·kg⁻¹,同时对照组给予无菌水,每日灌胃体积与各受试物组相同。

1.2.4 血清尿素测定 小鼠末次灌胃 30 min 后,在温度为 30℃的水中游泳 90 min,休息 60 min 后立即摘眼球采血 0.5 mL。置 4℃冰箱约 3 h,血凝固后 2 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取血清,加尿素氮(BNN)手工测定试剂,于生化分析仪上测定血清 BNN 含量。

1.2.5 肝糖原测定(蒽酮法) 小鼠末次灌胃 30 min 后,立即处死,取肝脏经生理盐水漂洗后用滤纸吸干,精确称取肝脏 100 mg,加入 4 mL TCA,匀浆 1 min,将匀浆液倒入离心管,以 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液 1 mL,加 95%乙醇 4 mL,充分混匀至 2 种液体间不留有界面,密封,室温下竖立放置过夜。次日以 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min。小心倒掉上清液并使试管倒立放置 10 min。用 4 mL 蒸馏水溶解糖原。取 2 mL 稀释液待测。试剂空白管:吸 2 mL 蒸馏水到干净离心管。标准管:吸 0.5 mL 葡萄糖标准液(5 g·L⁻¹)和 1.5 mL 蒸馏水放入同样的管子。

将 10 mL 蒽酮试剂加入各管,煮沸 15 min,然后移至冰浴,冷却后在 620 nm 波长下用试剂空白管调零后测定吸光度。按下式计算肝糖原含量:肝糖原[mg·(100 g)⁻¹肝]= $DU/DS \times 0.25 \times V/G \times 2 \times 100 \times 0.9$,式中, DU :样品管吸光度; V :提取液

体积(mL);稀释倍数为 2 倍; DS :标准管吸光度;0.25:0.5 mL 葡萄糖标准液中的葡萄糖含量; G :肝组织重量(g);0.9:将葡萄糖换算成糖原的系数。

1.2.6 血乳酸测定 小鼠末次给药 30 min 后采血,然后不负重在温度为 30℃的水中游泳 10 min 后停止,用毛细血管眼眶静脉采血,于 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 吸取血清备用。于 5 mL 试管中加入 0.48 mL 1% NaF 溶液,准备吸取全血 20 μL 加入试管底部。用试管上清液清洗微量吸管数次,再加入 1.5 mL 蛋白质沉淀剂,振荡混匀,于 3 000 r·min⁻¹,取上清液,具体操作见表 1。

表 1 血乳酸测定步骤

Tab 1 Blood lactate determination step

	空白管/mL	标准管/mL	测定管/mL
沉淀剂-NaF 混合液	0.5	—	—
乳酸标准应用液	—	0.5	—
上清液	—	—	0.5
4%CuSO ₄	0.1	0.1	0.1
浓硫酸	3.0	3.0	3.0
充分混匀,置沸水浴加热 5 min,取出后放入冰水浴冷却 10 min			
1.5%对羟基联苯	0.1	0.1	0.1

上述步骤完成后,摇匀,置 30℃水浴 30 min (每隔 10 min 振摇 1 次)。取出后放入沸水浴加热 90 s,取出冷却至室温,在波长 560 nm 处用 5 mm 光径比色皿比色,空白管调零。

血乳酸含量计算:

$$\text{血乳酸含量}(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{A_{\text{测定管}}}{A_{\text{标准管}}} \times 100 \times 10$$

血乳酸曲线下面积计算方法:

血乳酸曲线下面积=1/2×(游泳前血乳酸值+游泳后 0 min 的血乳酸值)×10+1/2×(游泳后 0 min 的血乳酸值+游泳后休息 20 min 的血乳酸值)×20=5×(游泳前血乳酸值+3×游泳后 0 min 的血乳酸值+2×游泳后休息 20 min 的血乳酸值)。

1.2.7 统计学方法 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据用 SPSS 12.0 统计软件分析,2 组间差异用 t 检验计算, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 黄秋葵提取物对疲劳小鼠运动耐力的影响

与对照组比较,黄秋葵提取物能明显延长疲劳小鼠的游泳时间($P < 0.05$),高剂量组时间延长率达到 35.41%,表明黄秋葵提取物具有增强疲劳小鼠运动耐力的作用。结果见表 2。

表 2 黄秋葵提取物对疲劳小鼠运动耐力的影响(n=11)

Tab 2 Effects of okra extracts on exercise endurance in fatigue mice(n=11)

组 别	游泳时间/s	时间延长率/%
对照组	2 662.67±939.63	—
高剂量组	3 605.64±955.131 ¹⁾	35.41
低剂量组	3 523.18±915.31 ¹⁾	32.32

注：与对照组比较，¹⁾P<0.05

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.05

2.2 黄秋葵提取物对疲劳小鼠血清尿素的影响

与对照组比较，黄秋葵提取物高、低剂量均能显著的降低疲劳小鼠的血清尿素(P<0.01)，表明黄秋葵提取物均有减少疲劳小鼠的血清尿素生成的作用。结果见表 3。

表 3 黄秋葵提取物对疲劳小鼠血清尿素的影响(n=11)

Tab 3 Effects of okra extracts on serum urea in fatigue mice(n=11)

组 别	血清尿素/mmol·L ⁻¹
对照组	17.36±2.70
高剂量组	13.11±1.77 ¹⁾
低剂量组	12.78±2.74 ¹⁾

注：与对照组比较，¹⁾P<0.01

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.01

2.3 黄秋葵提取物对疲劳小鼠肝糖原的影响

与对照组比较，黄秋葵提取物对疲劳小鼠肝糖原几乎没有影响，表明黄秋葵提取物无促进疲劳小鼠肝糖原储存的作用。结果见表 4。

表 4 黄秋葵提取物对疲劳小鼠肝糖原的影响(n=11)

Tab 4 Effects of okra extracts on hepatic glycogen in fatigue mice(n=11)

组 别	肝糖原/10 g·kg ⁻¹ 肝
对照组	1.71±0.23
高剂量组	1.73±0.21
低剂量组	1.69±0.26

2.4 黄秋葵提取物对疲劳小鼠血乳酸的影响

与对照组比较，黄秋葵提取物能降低疲劳小鼠的血乳酸，尤其是高剂量组能明显降低其血乳酸(P<0.05)，表明黄秋葵提取物具有减少疲劳小鼠血乳酸生成的作用。结果见表 5。

表 5 黄秋葵提取物对疲劳小鼠血乳酸的影响(n=11)

Tab 5 Effects of okra extracts on serum lactic acid in fatigue mice(n=11)

组 别	血乳酸曲线面积/mg·L ⁻¹
对照组	16.21±7.00
高剂量组	10.61±3.05 ¹⁾
低剂量组	13.51±6.01

注：与对照组比较，¹⁾P<0.05

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.05

3 讨论

疲劳的评价方法有 2 种。耐力实验和生化指标的检查。运动耐力的提高是抗疲劳能力加强的主要指标，游泳时间的长短可以反应机体运动疲劳的程度^[7]。在疲劳小鼠的运动耐力实验中，与对照组相比，黄秋葵高、低剂量组游泳时间均显著延长，表明黄秋葵提取物能明显提高小鼠的运动耐力，小鼠的抗疲劳能力得以增强。

当机体长时间活动不能通过糖和脂肪分解代谢得到足够的能量时，机体蛋白质和氨基酸分解代谢随之增强，机体血清尿素氮含量随运动负荷的增加而增加。由于血清尿素氮的含量反应体内肌肉蛋白质的分解与合成代谢状况以及肌肉细胞大强度训练后的损伤及恢复状况，所以血清尿素氮对评价机体在体力负荷时的承受力是一个灵敏的指标^[8]，运动后血清尿素氮含量增加越多，表明机体对负荷运动适应能力越差。本研究中，黄秋葵提取物高、低剂量组均能显著的降低疲劳小鼠的血清尿素，表明黄秋葵具有提高小鼠对负荷运动的适应能力，延缓小鼠疲劳产生的作用，其作用机制可能与维持肌肉中能量代谢平衡有关。

乳酸则是运动性疲劳产生的重要因素。机体剧烈运动时产生大量乳酸，乳酸进入血液，使血乳酸浓度显著增加，氢离子浓度升高，肌肉 pH 值下降，代谢失调，引起疲劳。乳酸在肌肉中堆积越多，疲劳程度就越严重，所以降低血乳酸含量的物质，就可以起到抗疲劳的作用^[9]。本研究中，黄秋葵能够降低疲劳小鼠的血乳酸含量，延缓疲劳的产生。

综上所述，黄秋葵提取物能显著提高疲劳小鼠的耐力，明显降低疲劳小鼠体内血清尿素和血乳酸的含量，尽管在本次研究中，黄秋葵提取物对疲劳小鼠体内肝糖原影响不大，但上述研究结果足以表明，黄秋葵提取物抗疲劳作用显著。黄秋葵提取物抗疲劳的作用和机制值得进一步研究。

REFERENCES

[1] State Administration of Traditional Chinese Materia Medica. Chinese herbal medicine(中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing, 1999: 4322-4323.

[2] LU L G. Nutriology research on pretein of okra seeds [J]. J Hyg Res(卫生研究), 1993, (4): 240-243.

[3] YANG Q, ZHANG K. Preparation and quality control of okra capsules [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(13): 1323-1326

[4] LV M Y, GUO M P. An exploratory study on six trace Chin JMAP, 2012 December, Vol.29 No.12

- elements determining and medical values of edible okra [J]. Stud Trace Elements Health(微量元素与健康研究), 2000, 17(1): 46-47.
- [5] WANG J Y, ZHOU J, TANG G P. Study on anti-fatigue effects of okra [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2003, 20(4): 316-317
- [6] The Standard of Health Food Test and Asses(保健食品检验与评价技术规范 2003 年版) [S]. 2003: 87-93
- [7] CHEN D D, PENG C. Study on anti-fatigue and anti-oxidant effects of *Chuanminshen violaceum* [J]. Res Pract Chin Med(现代中药研究与实践), 2011, 25(1): 28-30
- [8] ZHOU X Y, CHEN J, LIU C X, et al. Empirical study on anti-fatigue effect of L-Carnitine [J]. J Trop Med(热带医学杂志), 2011, 11(7): 740-742.
- [9] YI J, JI Y, LIU J, et al. Study on anti-fatigue effects and mechanism of *Hovenia dulcis* Thunb water extracts [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2009, 32(6): 962-965.
- 收稿日期: 2012-02-03

马钱子生物碱组分的提取和分离制备

蒋莹莹, 陈海波, 李玉燕, 朱敏, 马凤森* (浙江工业大学, 杭州 310014)

摘要: 目的 建立马钱子生物碱组分的超声提取方法, 研究其分离纯化工艺。方法 以马钱子碱和士的宁含量为指标, 采用均匀设计筛选马钱子生物碱的最佳超声提取工艺, 并采用高速逆流色谱法分离其生物碱组分。结果 最佳提取工艺为 10 倍量 50%乙醇溶液(pH=5), 在 600 W 功率下超声 60 min; 应用高速逆流色谱法, 以正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(3:5:3:5)为溶剂体系, 分离得到纯度为 94.1%的马钱子碱组分和纯度为 92.5%的士的宁组分。结论 本实验优选出的提取工艺稳定、经济、可行, 高速逆流色谱适用于马钱子生物碱的分离纯化。

关键词: 马钱子; 生物碱; 超声提取; 高速逆流色谱

中图分类号: R284.1; R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)12-1094-04

Extraction and Isolation of Alkaloids from Strychni Semen

JIANG Yingying, CHEN Haibo, LI Yuyan, ZHU Min, MA Fengsen* (Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an efficient method for extracting and isolating the alkaloids from Strychni Semen. **METHODS** With the content of brucine and strychnine as index, the ultrasonic assisted extraction process was optimized by uniform design method, and high-speed counter-current chromatography(HSCCC) was employed to separate the alkaloids. **RESULTS** The optimum condition of extraction was as follows: ratio of solid to liquid was 1 : 10, ethanol concentration was 50%(pH=5), ultrasonic power was 600 W, and the extraction time was 60 min; the two-phase solvent system of HSCCC composed of *n*-hexane-ethyl acetate-methanol-water(3 : 5 : 3 : 5) was selected, brucine with the purity of 94.1% and strychnine with the purity of 92.5% were obtained. **CONCLUSION** The optimum extraction method is economical and feasible. HSCCC is suitable for the isolation of alkaloids from Strychni Semen.

KEY WORDS: Strychni Semen; alkaloids; ultrasonic extraction; high-speed counter-current chromatography

马钱子(*Strychni Semen*)为马钱子科植物马钱子(*Strychnos nux-vomica* L.)及云南长籽马钱(*Strychnos pierriana* A.W.Hill)的干燥成熟种子, 研究发现其主要有效成分为生物碱类, 含量约为生药的 1.5%~5%, 主要为士的宁(strychnine)、马钱子碱(brucine)及其氮氧化物等, 其中士的宁含量最大, 占生物碱的 35%~50%。这 2 种生物碱既是主

要生物活性成分, 又是主要毒性成分。士的宁有强中枢兴奋作用、剧毒(成人口服 5~10 mg 就会有中毒现象, 30 mg 即可致死)。有研究表明^[1]马钱子粉末及非士的宁生物碱部分有明显抗炎作用, 士的宁部分无此作用, 提示在治疗风湿痹症的临床应用上, 去士的宁的生物碱组分的药效较为显著, 且毒性比士的宁低, 因此定向提取分离马钱子生

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(Y2111194); 浙江省重大科技专项重点社会发展项目(2010C13014)

作者简介: 蒋莹莹, 女, 硕士生 Tel: (0571)88871500 E-mail: emily-one@163.com *通信作者: 马凤森, 男, 硕士, 教授 Tel: (0571)88871500 E-mail: merrigen@126.com