

莞香叶芒果总苷的制备及其抗炎镇痛药效学研究

张炜华 吴庆光 曾宝 易智彪 赖小平 余剑平 魏秀娟 甘智诚

摘要 目的 从莞香叶中分离得到芒果总苷，并研究该部位抗炎镇痛药效学作用，为莞香资源的药效开发利用提供实验依据。**方法** 通过一系列分离纯化手段，得到莞香叶芒果总苷部位。通过醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性模型与二甲苯致小鼠耳肿胀模型，评价莞香叶芒果总苷的抗炎药效学作用，通过小鼠热板模型与醋酸致小鼠疼痛模型，评价莞香叶芒果总苷的镇痛药效学作用。**结果** 与空白对照组比较，莞香叶芒果总苷高、中剂量给药能够显著抑制小鼠腹腔毛细血管通透性，并能够显著提高小鼠热板法痛阈百分率($P < 0.05$)；莞香叶芒果总苷各剂量组均可显著降低二甲苯致炎小鼠的耳肿胀度以及显著减少小鼠20min内扭体次数($P < 0.05$)。**结论** 莞香叶芒果总苷对于上述4种动物模型均具有显著的药理作用，证明莞香叶芒果总苷具有显著的抗炎镇痛药效。

关键词 莞香叶 芒果总苷 抗炎 镇痛

[中图分类号] R285

[文献标识码] A

Effects of Total Mangiferin from Guanxiang Leaves on Anti-inflammation and Abirritation. Zhang Weihua, Wu Qingguang, Zeng Bao, Yi Zhibiao, Lai Xiaoping, Yu Jianping, Wei Xiujuan, Gan Zhicheng. Research Institute of Mathematical Engineering of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong 523808, China

Abstract Objective To investigate the anti-inflammation and abirritation effect of Total mangiferin extracted from GuanXiang leaves. To provide experimental support for developing drugs from Aquilaria sinensis (Loun) Gilg source. **Methods** Total mangiferin from GuanXiang leaves was extracted by a serial separation, purification method. The ear swelling degree induced by dimethylbenzene and the capillary permeability in abdominal cavity induced by acetic acid were used to evaluate anti-inflammation effect of total mangiferin from GuanXiang leaves. To evaluate the effect of Abirritation, two animal modes – hot plate tests and acetic acid stretching experiment in mice were used. **Results** Compared with control group, high and mid dose of total mangiferin from Guanxiang leaves can effectively suppress the capillary permeability in abdominal in mouse and increase the percent of pain in the limitation in the hot-plate tests ($P < 0.05$). All doses tested can effectively reduce auricles inflammation resulted from xylene and reduce times of writhing in 20min ($P < 0.05$) observation time. **Conclusion** Total mangiferin from Guanxiang leaves is effective in all the four animal models tested which suggest that total mangiferin from Guanxiang leaf has anti-inflammation and abirritation effect.

Key words Guanxiang leaves; Total mangiferin; Anti-inflammation; Abirritation

产于东莞地区的白木香被称之为莞香，是我国唯一以地区而得名的植物，其药材来源为瑞香科植物白木香 [*Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg.] 含有树脂的心材。具有行气止痛，温中止呕，纳气平喘等功效，临床常用于胸腹胀闷疼痛、胃寒呕吐呃逆、肾虚气逆喘急等症的治疗^[1]。目前莞香资源的开发利用仅限于其药用部位(含树脂心材)的研究，而莞香叶作为该植物最为丰富的资源部位，其药理研究却寥寥无几。

基金项目：广东省高新区引导专项基金资助项目(2012B011000050)

作者单位：523808 东莞，广州中医药大学中医药数理工程研究院(张炜华、吴庆光、曾宝、易智彪、赖小平)；510006 广州中医药大学(张炜华、吴庆光、曾宝、易智彪、赖小平、余剑平、魏秀娟、甘智诚)

通讯作者：易智彪，副研究员，电子信箱：zhibiaoyi@163.com

本课题组前期研究结果表明，莞香叶中含有大量的以芒果苷为代表的双苯毗酮类化合物—芒果总苷(包括芒果苷、异芒果苷、高芒果苷等)，而黄酮类化合物一般具有抗炎、抗氧化、抗菌、降压、降脂等多重药效活性^[2]。因此本实验拟从抗炎镇痛药效作用入手，来探讨莞香叶中芒果总苷抗炎镇痛的作用效果，以期为莞香资源的进一步开发利用提供理论依据。

材料与方法

1. 实验材料：(1) 实验药品：①受试药物：莞香叶(批号：20130523)，于2013年6月采自广东省东莞市沉香规范化种植基地，经东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院赖小平研究员鉴定为瑞香科植物白木香 [*Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg.] 带有嫩枝的叶片，60℃烘干12h后粉碎，过4号筛，备用；②阳性对照药：醋酸地塞米松片，规格0.75毫克/片，浙江

仙琚制药生产,生产批号:100405。罗通定片,规格 30 毫克/片,成都市渝江制药厂生产,生产批号:H51021203。(2)实验动物:KM 种小鼠,体重 18~22g,雌性 [SPF 级别,由广州中医药大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(粤)2008-0020]。(3)主要试剂:芒果苷标准品(由本实验室自制,经岛津 HPLC-DAD 检测,纯度≥98%);AB-8 大孔吸附树脂(沧州宝恩化工有限公司,批号:100805);伊文思兰(CAS:314-13-6,aladdin,广州东巨仪器有限公司代销);二甲苯(分析纯,天津大茂化学试剂厂,批号:100506);冰醋酸(分析纯,天津大茂化学试剂厂,批号:100709);(4)主要仪器:BSIIOS 万分之一分析天平(香港佳立国际有限公司);TU1810 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);YLS-6A 智能热板仪(山东医学科学院设备站)。

2. 实验方法:(1)芒果总苷的制备:称取干燥的莞香叶粉末 1kg 分置于圆底烧瓶中,以 10 倍量石油醚回流脱脂 2 次,每次 1h,滤过,滤渣通风厨内放置 24h 挥干。再将挥干的滤渣置于圆底烧瓶中,加入 8 倍量 70% 乙醇,回流 3 次,每次 1h,滤过,合并滤液。将上述滤液真空减压浓缩至稠膏状得总浸膏,将总浸膏混悬于适量水中,依次别用乙醚、正丁醇按 1:1 体积各萃取 3 次,收集正丁醇部位^[3]。将该部位彻底挥干溶剂,得正丁醇部位干膏,将该干膏混悬于少量水中,过 AB-8 大孔树脂柱(上样质量浓度 10mg/ml,流速 1.5BV/h),分别以水、10% 乙醇、30% 乙醇、50% 乙醇梯度洗脱,各浓度 3 倍柱体积。收集 30% 乙醇部位。将收集到的大孔树脂 30% 乙醇部位浓缩后过聚酰胺层析柱,分别用蒸馏水及不同浓度的乙醇洗脱,经聚酰胺薄层色谱点样,以 1% 三氯化铝为显色剂,合并在 365nm 紫外波长下显亮蓝色荧光斑点的流分,挥干溶剂,得莞香叶芒果总苷部位^[3]。(2)芒果总苷的含量测定:对所得浸膏中芒果总苷进行含量测定,以便后续药理实验能够准确给药。1)对照品的选择:本实验采用芒果苷作为对照品,该化合物由本实验室自芒果叶中分离得到,经岛津 HPLC-DAD 检测,纯度≥98%。2)对照品溶液制备:精密称取芒果苷对照品 20.0mg 置 50ml 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成浓度为 0.4mg/ml 的芒果苷对照品溶液。3)供试品溶液制备及测定波长的选择:取得到的莞香叶芒果总苷粉末 10.0mg 置 100ml 容量瓶中,加入甲醇超声溶解并稀释至刻度,制成浓度为 0.1mg/ml 的供试品溶液。以甲醇为空白溶液进行调零,使用紫外分光光度计在 190~800nm 对该供试品及标准品溶液全波长扫描,确定其最大吸收波长。4)标准曲线的制备:精密吸取芒果苷标准溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6ml 于 10ml 容量瓶中,定容至刻度后分别测定其 OD 值,以对照品溶液浓度(C, μg/ml)为横坐标,吸光度值(A)值为纵坐标绘制标准曲线^[4]。5)样品的含量测定:取样品溶液 0.2ml 于 10ml 容量瓶中,同时吸取甲醇溶液适量作空白溶液,于 258nm 波长处测其 OD 值。并计算所得莞香叶芒果总苷部位粉末中芒果总苷的准确含量。

3. 莞香叶芒果总苷抗炎药效学研究:(1)莞香叶芒果总苷

实验剂量设计:实验中设计芒果总苷高、中、低 3 个剂量组,给药剂量分别相当于莞香叶芒果总苷量 56、28、14mg/kg。小鼠给药体积均为 10ml/kg,因此高、中、低剂量组药物浓度分别为 5.6、2.8、1.4mg/ml。(2)莞香叶芒果总苷对醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性的影响实验:取 18~22g KM 小鼠 50 只,雌雄各半,随机分为 5 组,即空白对照组、醋酸地塞米松组、莞香叶芒果总苷高、中、低剂量组,每组 10 只。各组每天灌胃给药 1 次,连续 6 天,空白对照组给予 0.1ml/10g 生理盐水,其他各组给药剂量见表 1。末次给药前禁食 12h,给药后 1h 每鼠尾静脉注 0.5% 伊文思兰溶液 0.1ml/10g,并腹腔注射 0.1ml/10g 的 0.6% 醋酸溶液。30min 后小鼠脱颈处死,剪开腹膜,用少量生理盐水冲洗腹腔,取洗涤液,4000r/min 离心 10min,取上清液定容至 10ml,以生理盐水作空白对照,于 610nm 波长处测定 OD 值^[5]。(3)莞香叶芒果总苷对二甲苯致小鼠耳肿胀抑制作用:取 KM 小鼠 50 只,体重 18~22g,雌雄各半,随机分为空白对照组、醋酸地塞米松组、莞香叶芒果总苷高、中、低剂量组 5 组,每组 10 只。各组灌胃给药每天 1 次,连续 6 天,除空白对照组给予等体积生理盐水外,其他组给药剂量见表 1。末次给药前小鼠禁食不禁水 12h,给药后 1h,立即将 40μl 二甲苯均匀涂于每只小鼠右耳两面,左耳不涂,留作对照。20min 后将小鼠脱颈处死,用直径 8mm 打孔器分别在左右两耳同一部位打下圆形耳片,精密称取耳片重量,以同一只小鼠左右耳片重量之差表示肿胀度,根据下面公式计算小鼠耳廓肿胀度和肿胀抑制率。耳肿胀度 = 右耳片重量 - 左耳片重量,肿胀抑制率(%) = (空白对照组肿胀度 - 给药组肿胀度)/空白对照组肿胀度 × 100%^[5]。(4)莞香叶芒果总苷对小鼠热板法痛阈值的影响:取雌性 KM 小鼠 70 只,体重 18~22g,首先进行实验前的痛阈筛选,方法如下:将小鼠置于 55.0 ± 0.5°C 的热板仪上,记录其足底接触热板到出现舔后足的时间,即热板反应潜伏期,作为痛阈指标,筛选出 50 只痛阈值在 5~30s 的合格小鼠做正式实验,痛阈 < 5s 或 > 30s 者以及喜跳跃者剔除。将符合标准的小鼠随机分为空白对照组、罗通定组、莞香叶芒果总苷高、中、低剂量组 5 组,每组 10 只。给药前每鼠隔 20min 测 1 次基础痛阈值,取 3 次测定数值的平均痛阈值作为基础痛阈值。各组灌胃给药每天 1 次,连续 6 天,除空白对照组给予 0.1ml/10g 生理盐水外,罗通定组按 60mg/kg 给药,莞香叶芒果总苷高、中、低剂量组分别按 56、28、14mg/kg 给药。分别于末次给药后 30、60、90、120min,分别测量小鼠痛阈值,超过 60s 者按 60s 计。按下式计算痛阈提高百分率。痛阈提高百分率(%) = $\frac{\text{药后痛阈} - \text{基础痛阈}}{\text{基础痛阈}} \times 100\%$ ^[5]。(5)

莞香叶芒果总苷对醋酸所致小鼠扭体反应的影响:取 KM 小鼠 50 只,体重 18~22g,雌雄各半,随机分为 5 组,每组 10 只,即:空白对照组、罗通定组、莞香叶芒果总苷高、中、低剂量组。各组灌胃给药每天 1 次,连续 6 天,除空白对照组给予等体积生理盐水外,其他组给药剂量见表 1。末次给药前禁食 12h,给药 1h 后,每只小鼠以 0.1ml/10g 腹腔注射 0.6% 醋酸溶液,记录小鼠的扭体潜伏期和 20min 内的扭体反应次数,并按以

下公式计算镇痛抑制率: 镇痛抑制率(%) = (空白组扭体次数 - 给药组扭体次数) / 空白组扭体次数 × 100%^[5]。

结 果

1. 芒果总苷制备结果: 按实验方法中“芒果总苷的制备”项下经制备得: 正丁醇部位干膏 187.62g, 并最终得到淡黄色固体粉末(莞香叶芒果总苷) 15.73g, 占原药材总量的 1.57%^[3]。

2. 测定波长: 按“供试品溶液制备及测定波长的选择”项下, 以甲醇为空白溶液进行调零, 使用紫外分光光度计在 190 ~ 800nm 对该供试品及标准品溶液全波长扫描, 确定其最大吸收波长为 258nm, 故确定 258nm 为测定波长。

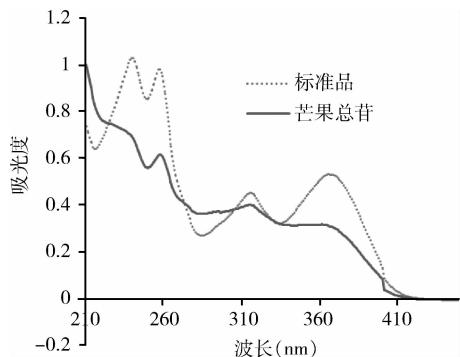


图 1 紫外全波长扫描

3. 标准曲线: 按“标准曲线的制备”项下于 258nm 波长处测定吸光度。以对照品溶液浓度(C , $\mu\text{g}/\text{ml}$)为横坐标, 吸光度值(A)值为纵坐标绘制标准曲线, 计算回归方程为: $y = 0.0376x + 0.0151$, $r = 0.999$ 。结果表明芒果苷在 4 ~ 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内具有良好的线性关系。

4. 含量测定结果: 按“样品的含量测定”项下于 258nm 波长处测定样品的 OD 值为 0.565。经计算得, 所得莞香叶芒果总苷部位粉末中芒果总苷含量为 73.16%。

5. 抗炎镇痛药效实验结果: (1) 醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性实验: 与空白对照组比较, 醋酸地塞米松可显著降低小鼠腹腔洗涤液的吸光度值($P < 0.05$), 提示造模成功, 实验方法可行, 详见表 1。与空白对照组比较, 莞香叶芒果总苷高、中剂量能够显著抑制小鼠腹腔毛细血管通透性($P < 0.05$)。与醋酸地塞米松组比较, 莜香叶芒果总苷高、中剂量组小鼠腹腔毛细血管通透性无显著差异($P > 0.05$), 提示莞香叶芒果总苷能够显著抑制醋酸所致的小鼠腹腔毛细血管通透性增加的急性炎症反应, 具有抗炎药效。(2) 二甲苯致小鼠耳肿胀抑制实验: 与空白对照

组比较, 阳性药醋酸地塞米松可显著抑制二甲苯致炎小鼠的耳廓肿胀度($P < 0.05$), 提示造模成功, 实验方法可行, 详见表 2。与空白对照组比较, 莜香叶芒果总苷高、中、低剂量均可显著降低二甲苯致炎小鼠的耳肿胀度($P < 0.05$)。与醋酸地塞米松组比较, 莜香叶芒果总苷高、中剂量组小鼠耳肿胀度无统计学差异($P > 0.05$), 提示莞香叶芒果总苷能够显著抑制二甲苯致炎小鼠的耳廓肿胀度, 具有抗炎药效。(3) 小鼠热板痛阈实验: 与空白对照组比较, 罗通定组小鼠在给药后各时间点痛阈提高百分率显著升高($P < 0.01$), 提示造模成功, 实验方法可行, 详见表 3。结果显示, 莜香叶芒果总苷高剂量组的痛阈提高百分率在给药后 60 ~ 120min 显著高于空白对照组($P < 0.05$)。莞香叶芒果总苷中剂量组的痛阈提高百分率在给药后 90 ~ 120min 显著高于空白对照组($P < 0.05$)。莞香叶芒果总苷低剂量组的痛阈提高百分率在给药后各时间段与空白对照组比较均无显著性差异($P > 0.05$)。提示莞香叶芒果总苷高、中剂量给药能够显著增加小鼠的痛阈提高百分率, 具有镇痛药效。(4) 醋酸所致小鼠扭体反应实验: 与空白对照组比较, 罗通定可显著延长小鼠扭体反应潜伏期时间和减少小鼠 20min 内扭体次数($P < 0.01$), 提示造模成功, 实验方法可行, 详见表 4。与空白对照组比较, 莜香叶芒果总苷高、中剂量组能够显著延长小鼠扭体反应潜伏期时间($P < 0.05$)。同时, 与空白对照组比

表 1 莜香叶芒果总苷对醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增加的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量(mg/kg) (以芒果总苷计)	OD 值
空白对照组	-	0.200 ± 0.025
醋酸地塞米松组	2	$0.143 \pm 0.047^*$
莞香叶芒果总苷高剂量组	56	$0.150 \pm 0.039^*$
莞香叶芒果总苷中剂量组	28	$0.164 \pm 0.027^*$
莞香叶芒果总苷低剂量组	14	$0.198 \pm 0.024^*$

与空白对照组比较, * $P < 0.05$, 与醋酸地塞米松组比较, # $P < 0.05$

表 2 莜香叶芒果总苷对二甲苯致小鼠耳肿胀抑制作用的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (mg/kg)	耳肿胀度 (mg)	抑制率 (%)
空白对照组	-	13.85 ± 1.41	-
醋酸地塞米松组	2	$7.06 \pm 1.39^*$	49.03
莞香叶芒果总苷高剂量组	56	$7.39 \pm 1.96^*$	46.64
莞香叶芒果总苷中剂量组	28	$7.60 \pm 2.53^*$	45.13
莞香叶芒果总苷低剂量组	14	$9.35 \pm 1.75^{**}$	32.49

与空白对照组比较, * $P < 0.05$, 与醋酸地塞米松组比较, # $P < 0.05$

较,莞香叶芒果总苷各剂量组均可显著减少小鼠 20min 内扭体次数($P < 0.05$)。与罗通定组比较,莞香叶芒果总苷各剂量组小鼠 20min 内扭体反应次数

均无显著差异($P > 0.05$)。提示莞香叶芒果总苷能够显著减少醋酸所致小鼠 20min 内扭体次数,具有镇痛药效作用。

表 3 莞香叶芒果总苷对热刺激小鼠痛阈提高百分率的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	30min	60min	90min	120min
空白对照组	-18.72 ± 16.28	-17.56 ± 20.19	-17.34 ± 12.87	-19.91 ± 12.85
罗通定组	73.43 ± 21.88 *	82.32 ± 32.61 *	86.52 ± 22.02 *	87.68 ± 26.94 *
莞香叶芒果总苷高剂量组	42.48 ± 11.27	68.14 ± 21.62 *	78.08 ± 13.59 *	81.62 ± 13.84 *
莞香叶芒果总苷中剂量组	26.81 ± 20.67	44.78 ± 19.22	55.84 ± 16.95 *	58.28 ± 21.06 *
莞香叶芒果总苷低剂量组	6.52 ± 3.89	7.67 ± 2.83	35.55 ± 13.13	37.86 ± 12.25

与空白对照组比较, * $P < 0.05$

表 4 莜香叶芒果总苷对醋酸所致小鼠扭体反应的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药剂量(mg/kg)	扭体潜伏期(s)	20min 内扭体次数	镇痛抑制率(%)
空白对照组	-	211.9 ± 31.7	51 ± 8	-
罗通定组	60	405.3 ± 40.6 *	26 ± 5 *	49.01
莞香叶芒果总苷高剂量组	56	267.7 ± 24.8 * #	26 ± 4 *	49.01
莞香叶芒果总苷中剂量组	28	247.1 ± 39.1 * #	28 ± 7 *	45.10
莞香叶芒果总苷低剂量组	14	219.8 ± 26.4 #	30 ± 5 *	41.18

与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与罗通定组比较, # $P < 0.05$

讨 论

本实验首先以莞香叶为原料,通过提取、萃取、大孔树脂层析谱、聚酰胺色谱等一系列分离纯化手段,得到该药材芒果总苷部位。并醋酸地塞米松为阳性药,通过醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性模型与二甲苯致小鼠耳肿胀模型,评价莞香叶芒果总苷的抗炎药效学作用,以罗通定为阳性药,通过小鼠热板模型与醋酸致小鼠疼痛模型,评价莞香叶芒果总苷的镇痛药效学作用。实验结果表明,莞香叶芒果总苷对于上述 4 种动物模型均具有显著的药理作用,证明莞香叶芒果总苷具有显著的抗炎镇痛药效。

关于莞香叶(沉香叶)抗炎药效学研究,有过一些相关报道,但类似研究较为粗略,研究目标仅仅为沉香叶水提液以及醇提液,未见相关物质基础的进一步深入研究^[6]。本课题组通过前期相关筛选研究,将莞香叶抗炎镇痛物质基础确定在其芒果总苷部位进行相关研究,明确了莞香叶抗炎镇痛物质基础,对莞香资源的药效开发利用提供了重要实验依据。

芒果苷又名莞知母宁,是一种具有双苯吡酮结构的类黄酮化合物。除莞香叶外,此类物质也是知母及芒果叶的指标性成分之一。关于其他药材中芒果苷抗炎药效学研究已有相关报道,但在莞香叶中由于其同分异构体存在较多,形成了以芒果苷为主,各种同分异构化合物并存的现象^[2]。各单体化合物由于具

有相似的母核结构,因而在抗炎镇痛药效方面起着协同作用,故本实验以莞香叶芒果总苷部位为研究对象,能够在充分发挥莞香叶抗炎药效的同时,减少单个化合物的用量,简化分离工艺流程。

由于莞香叶未被药典及部颁标准收载,其芒果总苷部位也未有相关药效学研究报道。故本实验参考药典规定知母中芒果苷用量进行折算而确定其给药剂量。药典规定知母每日用法用量为:口服,每日 12g;干品知母中芒果苷含量 ≥ 0.70%,即芒果苷摄入量最低应为 84mg/d,故本实验中芒果总苷用量设为 1.4mg/kg 体重^[5,7]。

参考文献

- 林焕泽, 李红念, 梅全喜, 等. 沉香叶的研究进展[J]. 今日药学, 2011, 21 (9): 547 - 549
- 冯洁, 杨秀伟. 白木香叶化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (2): 230 - 234
- 李文琪, 陈明生, 温幼敏, 等. 光石韦药材中芒果苷的定性定量分析方法研究[J]. 广西科学, 2012, 19 (1): 77 - 79
- 邓胜国, 邓泽元, 范亚苇, 等. 紫外分光光度法测定荷叶总黄酮含量[J]. 南昌大学学报, 2008, 32 (2): 148 - 150
- 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 223
- 余伯阳. 一种沉香叶提取物及其医药和保健用途[P]. 中国专利: 200710019969.3. 2007 - 08 - 08
- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 74

(收稿日期: 2013-11-01)

(修回日期: 2013-11-11)