

# 艾叶提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用及 对高尿酸血症小鼠的降尿酸作用

李美萍, 王微, 张婕, 张生万, 杨喜花, 尉立刚, 郭彩霞

(山西大学生命科学学院, 山西太原 030006)

**摘要:**以蒸馏水、无水乙醇为溶剂结合超声波辅助及传统煎煮方法对艾叶进行提取,测定各提取物总黄酮和总酚含量、自由基清除能力以及艾叶提取物对黄嘌呤氧化酶(Xanthine Oxidase, XOD)的抑制作用,并选取抑制效果较好的艾叶醇提取物,利用动物实验,测定小鼠血清尿酸(UA),肌酐(Scr),尿素氮水平(BUN),肝脏XOD活性,研究艾叶提取物对高尿酸血症小鼠的降尿酸的作用。结果表明:总黄酮和总酚含量:醇提取物>传统法提取物>水提取物,清除自由基能力和抑制XOD作用:醇提取物>传统法提取物>水提取物,三种提取物对XOD的抑制作用均表现为不可逆抑制,其中传统法和醇提取物对XOD的抑制类型为反竞争性抑制,水提取物为混合性竞争性抑制;传统法和水提取物与别嘌呤醇联合抑制作用表现为相加作用,醇提取物表现为弱协同作用;艾叶醇提取物对高尿酸血症小鼠的UA,Scr,BUN水平均具有降低效果,对肝脏XOD活性具有抑制作用。结论:艾叶各提取物具有较好的抑制黄嘌呤氧化酶和抗氧化作用,醇提取物具有开发成为预防和治理高尿酸血症药物的潜力。

**关键词:**艾叶提取物;黄嘌呤氧化酶;抗氧化性;抑制作用;高尿酸血症

文章编号:1673-9078(2019)01-22-30

DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.1.004

## Inhibitory Effect of *Artemisia argyi* Extracts on Xanthine Oxidase

## Activities and Their Uric Acid-lowering Effect on Hyperuricemia in Mice

LI Mei-ping, WANG Wei, ZHANG Jie, ZHANG Sheng-wan, YANG Xi-hua, YU Li-gang, GUO Cai-xia

(College of Life Science Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** The total flavonoids, total phenols, the inhibitory effect on xanthine oxidase (XOD) activities and free radical scavenging capacity of the extracts from *Artemisia argyi* by distilled water, anhydrous ethanol assisted with ultrasonic and traditional decoction were measured. Alcohol extract was selected to investigate the effect on hyperuricemia. Potassium oxazidate was used as the inducer for hyperuricemia mice. The mice were continuously fed for 7 days, and serum uric acid (UA), creatinine (Scr), urea nitrogen (BUN) level and liver XOD activity were measured. Results showed that the order of total flavonoids and total phenolics content of *Artemisia argyi* extracts was anhydrous ethanol assisted with ultrasonic method > traditional decoction method distilled > water method; the order of free radical scavenging capacity and XOD inhibitory activity was anhydrous ethanol assisted with ultrasonic method > traditional decoction method distilled > water method. The inhibition mechanism of the three extracts showed irreversible inhibition. The inhibition type of traditional and alcohol extracts effect on XOD is anti-competitive inhibition. The water extract effect on XOD is mixed inhibition. The type of associated inhibition with allopurinol of traditional and water extracts is additive effect. The alcohol extract is weak synergies. The level of UA, Scr and BUN in hyperuricemia mice decreased and the XOD activity of liver was inhibited. The *Artemisia argyi* extracts have better potential for XOD inhibitory effect and antioxidation. The alcohol extract may be developed to prevent and treat hyperuricemia.

**Key words:** extracts of *Artemisia argyi*; xanthine oxidase(XOD); antioxidant activity; inhibition; hyperuricemia

黄嘌呤氧化酶(Xanthine Oxidase, XOD)是人体尿酸生成过程中最重要的酶<sup>[1]</sup>。尿酸生成过多,及肾清除能力下降,导致尿酸在体内积蓄,尿酸盐结晶在关节及各脏器沉积,即产生了人们常说的痛风疾病<sup>[2-5]</sup>。

收稿日期:2018-09-23

基金项目:山西大学引进人才建设项目(228545011)

作者简介:李美萍(1977-),女,博士,讲师,研究方向:食品化学

越来越多研究表明,高尿酸血症不是一种单纯的尿酸含量超标的病症,它与肾病、心脑血管疾病等紧密相关<sup>[6-8]</sup>,V.Massey<sup>[9]</sup>等人研究发现XOD是一种专一性不高的酶,能催化由黄嘌呤形成尿酸并且催化由次黄嘌呤形成黄嘌呤的氧化过程,也能催化醛类的氧化,有时会生成过氧化物,引起连锁反应。黄酮类化合物作为一类重要的天然有机化合物,具有良好的清

除自由基能力和抑制黄嘌呤氧化酶作用<sup>[10-13]</sup>。因此,研究天然产物提取物中总黄酮、总酚含量与抑制黄嘌呤氧化酶及抗氧化作用的关系是有必要的。而黄嘌呤氧化酶抑制剂主要有化学合成物和天然提取物<sup>[14,15]</sup>,由于化学类药物品种极少,且均有不同程度的毒副作用,因此寻找对 XOD 有抑制作用的天然产物对人类健康具有非常重要的意义<sup>[16-19]</sup>。艾叶(*Artemisia argyi*)为菊科植物艾草干燥叶,具有很高的药用价值<sup>[20]</sup>,近年来,已有不少关于艾叶在生药学、化学成分、药理作用、临床应用、工艺及质量控制等方面的报道<sup>[21,22]</sup>。林伟青<sup>[23]</sup>、谢建祥<sup>[24]</sup>等人通过体内外酶学实验研究了白艾水提液对黄嘌呤氧化酶活性抑制作用,及对高尿酸血症大鼠尿酸水平的影响,但对艾叶提取物抑制 XOD 和高尿酸血症的系统研究鲜有报道。本实验采用蒸馏水、无水乙醇为溶剂结合超声波辅助及传统煎煮方法对艾叶进行提取,测定各提取物总黄酮和总酚含量,通过体外酶学实验测定其对 XOD 的抑制率、抑制动力学、与别嘌呤醇协同作用及抗氧化能力(DPPH·自由基、ABTS<sup>+</sup>·自由基、·OH 自由基),选出抑制 XOD 及抗氧化作用较好的艾叶醇提物,建立高尿酸血症模型,进行体内试验,为艾叶的开发利用提供一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

艾叶,2016年7月份采自山西省霍州市(经度:东经 111.7,纬度:北纬 36.1)霍山,并自然风干;雄性昆明种小鼠 36 只,体重(24±2)g,实验动物由山西省肿瘤研究所动物实验室提供并饲养,生产许可证号:SCXK(晋)2017-0001,使用许可证号:SYXK(晋)2017-0003。动物实验经山西省肿瘤医院(研究所)实验动物伦理审查委员会审查通过。

过硫酸钾、硫酸亚铁、30%过氧化氢、碳酸钠、亚硝酸钠、氢氧化钠、硝酸铝、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、二甲亚砷、无水乙醇、甲醇、水杨酸、焦性没食子酸(以上试剂均为分析纯)、二苯代苦味酰基自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH),东京化成工业株式会社;2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6 磺酸)二铵盐(ABTS 试剂)、福林-酚试剂,北京索莱宝科技有限公司;黄嘌呤、别嘌呤醇,上海麦克林生化科技有限公司;黄嘌呤氧化酶(100 U),南京都莱生物技术有限公司;芦丁,上海融禾医药科技有限公司;氧嗪酸钾,合肥博美生物科技有限责任公司;Scr、BUN、UA、肝脏 XOD 测定试剂盒,南京建成生物工

程研究所;实验用水为蒸馏水。

### 1.2 仪器与软件

UV-2550 紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;SC-3614 低速离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;SCIENTZ-18N 真空冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;HH-S 型水浴锅,巩义市英峪予华仪器厂;超声波清洗器,宁波新芝生物科技股份有限公司;分析天平,德国塞多利斯仪器系统有限公司;高速万能粉碎机,上海科恒实业发展有限公司;多样品组织研磨仪, XIANOU-24,南京先欧科技有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 样品制备

样品前处理:采用高速粉碎机将艾叶粉碎,粉末用密封袋封好,4℃冰箱保存备用。

传统煎煮法:取 5 g 艾叶粉末,加入蒸馏水 100 mL 浸泡 0.5 h,煮沸后文火煎 10 min,将样液用离心机离心、抽滤后得提取液,经冷冻干燥后称重,放入干燥皿中备用。

超声波辅助提取法:取两份 5 g 艾叶粉末,分别加入 100 mL 水、无水乙醇置于超声波清洗器中,超声波(功率为 40 Hz)累计处理 120 min,样液离心、抽滤得提取液,水提液经冷冻干燥,醇提物经水浴锅蒸干溶剂后称重,放入干燥皿中备用。

将处理所得固形物的质量带入下面公式,计算各提取方法的提取率。提取率  $E = m/M \times 100\%$ 。其中,  $m$  为各方法所得固形物重量,  $M$  为样品干粉质量。

#### 1.3.2 总酚、总黄酮含量的测定

采用 Folin-Ciocalteu 方法测定总酚含量<sup>[25]</sup>。

采用亚硝酸钠-硝酸铝显色法测定总黄酮,以芦丁为标准品<sup>[26]</sup>。

#### 1.3.3 黄嘌呤氧化酶体外抑制实验

##### 1.3.3.1 黄嘌呤氧化酶活力测定

在试管中加入 2.0 mL 底物溶液,25℃预温 10 min,加入磷酸盐缓冲溶液 0.1 mL,再加入经 25℃预温的酶溶液 1.0 mL,涡旋混匀,用分光光度计测 290 nm 处不同时间点反应体系的吸光度值,每分钟测定 1 次,连续测定 6 min,以时间与吸光度进行线性回归,计算斜率 Rate 酶(dA/min)。每个样品平行测定 3 次,取斜率平均值。

##### 1.3.3.2 酶促反应米氏方程的绘制

实验体系中黄嘌呤采用 100、200、300、400、500 μmol/L 5 个浓度,黄嘌呤氧化酶浓度为 50 U/L,测试方法同 1.3.3.1。得米氏方程为  $1/V = 4.1768/[S] + 0.214$ ,

根据米氏方程  $1/V=(K_m/V_m)/[S]+1/V_m$ , 得  $K_m/V_m=4.1768$ ,  $1/V_m=0.214\times 10^{-3}$ , 即  $V_m=4.673$ ,  $K_m=19.5$   $\mu\text{mol/L}$ 。

### 1.3.3.3 提取物对黄嘌呤氧化酶半抑制浓度的测定

样品测定方法同 1.3.3.1。空白对照: 不加样品和 XOD, 但加 0.1 mL 的 DMSO 和 1.0 mL 缓冲液, 记录吸光度的变化, 得 Rate 空白(dA/min), 计算抑制率时将它扣除。计算半数抑制浓度  $IC_{50}$ , 酶促反应中的药物浓度  $C=C_0\times 0.1/3.1$ ,  $C_0$  是样品溶液浓度, 抑制率  $I=(\text{Rate 酶}-\text{Rate 样品})/(\text{Rate 酶}-\text{Rate 空白})\times 100\%$ 。将样品浓度与抑制率进行回归, 得回归方程, 根据方程计算抑制率  $I=50\%$  时  $C$  的值。测得艾叶提取物对黄嘌呤氧化酶的半数抑制率及与总酚、总黄酮相关性。

### 1.3.3.4 别嘌呤醇抑制率测定

将样品溶液换成 0.5 mg/mL 别嘌呤醇溶液, 测定吸光度值, 以时间与吸光度进行线性回归, 计算斜率 Rate 样品(dA/min), 再将此抑制率带入各提取物抑制率回归方程求得各提取物在该抑制率时的浓度。

### 1.3.3.5 艾叶各提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用研究

(1) 艾叶各提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制机理研究:

固定黄嘌呤底物浓度 0.25 mmol/L 不变, 反应体系中黄嘌呤氧化酶的浓度为 0、20、40、60、80 U/L 五个酶浓度, 依次改变各提取物的浓度(水提物 1.61、4.84、6.45、9.68、12.9  $\mu\text{g/mL}$ ; 醇提物 0.16、0.32、0.65、1.29、1.61  $\mu\text{g/mL}$ ; 传统提取物 0.32、0.65、1.61、3.23、4.84  $\mu\text{g/mL}$ ), 分别测定在不同酶浓度不同提取物浓度的条件下此反应的初速率, 以初速率对酶浓度作图。

(2) 艾叶各提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制类型研究:

固定黄嘌呤氧化酶浓度 50 U/L 不变, 将黄嘌呤底物的浓度设置为 0.08、0.16、0.25、0.32、0.4 mmol/L 五个浓度, 改变各提取物的浓度(同 1.3.3.5 (1)), 测定在不同底物浓度不同提取物浓度的条件下此反应的初速率, 以初速率的倒数对底物浓度的倒数作图。

### 1.3.3.6 艾叶各提取物与别嘌呤醇的协同作用研究

采用等毒法进行优化处理, 评价二元混合物是否具有协同效应<sup>[27]</sup>。分别测出当抑制剂和别嘌呤醇对黄嘌呤氧化酶的抑制率达到 25% 时的浓度, 二者混合, 测定二元混合物对黄嘌呤氧化酶的抑制率, 预期抑制率应为 50%, 由实际测得的抑制率与混合后的抑制率计算得到共毒系数, 以此作为评价联合抑制作用类型的标准。共毒系数的计算如公式(1):

共毒系数=(实测抑制率-预期抑制率)/预期抑制率 $\times 100\%$  (1)

### 1.3.4 抗氧化作用的测定

DPPH·自由基清除率的测定参照文献<sup>[28]</sup>作适当调整。取浓度为 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mg/mL 的待测样品溶液各 2.0 mL, 分别加入 4.0 mL 15.0 mg/L DPPH·工作液和 4.0 mL 无水乙醇溶液, 振荡混匀, 避光保存 20 min。以无水乙醇做空白对照, 于波长 517 nm 处测吸光度。按公式(2)计算 DPPH·清除率。

DPPH·清除率= $[1-(A_1-A_2)]/A_3\times 100\%$  (2)

式中:  $A_1$ : 2.0 mL 待测样品溶液+4.0 mL DPPH·工作液的吸光度;  $A_2$ : 2.0 mL 待测样品溶液+4.0 mL 无水乙醇的吸光度;  $A_3$ : 2.0 mL 乙醇溶液+4.0 mL DPPH·工作液的吸光度。

ABTS<sup>+</sup>·自由基清除率的测定: 取 2.0 mL 浓度为 0.05、0.1、0.15、0.2、0.3、0.4 mg/mL 待测样品溶液于 5 支试管中, 依次加入 2.0 mL ABTS<sup>+</sup>·溶液, 混合均匀(空白试管加入 2.0 mL ABTS<sup>+</sup>·溶液和 2.0 mL 蒸馏水)。于室温避光处放置 40 min。在紫外-可见分光光度计波长 734 nm 处测定吸光度, 记做  $A$ , 空白试管的吸光度为  $A_0$ , 按公式(3)计算 ABTS<sup>+</sup>·清除率, 以样品浓度为横坐标, 清除率为纵坐标绘制标准曲线, 计算清除率为 50% 时的样品浓度。

ABTS<sup>+</sup>·清除率= $(A_0-A)/A_0\times 100\%$  (3)

·OH 自由基清除率的测定参照文献<sup>[29]</sup>稍作修改。取 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL 的待测样品溶液 2.0 mL 于试管中, 分别加入 2.0 mL 3.0 mmol/L FeSO<sub>4</sub> 和 2.0 mL 3.0 mmol/L 水杨酸, 最后加入 2.0 mL 3.0 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 室温下反应 1 h 后于波长 510 nm 处测其吸光度, 按公式(4)计算·OH 自由基清除率。

·OH 自由基清除率= $[A_0-(A_1-A_2)]/A_0\times 100\%$  (4)

式中:  $A_0$  为蒸馏水代替待测液在 510 nm 处的吸光度;  $A_1$  为各待测液在 510 nm 处的吸光度;  $A_2$  为蒸馏水代替水杨酸在 510 nm 处的吸光度。

### 1.3.5 艾叶醇提物对高尿酸血症小鼠的研究

#### 1.3.5.1 别嘌呤醇和氧嗪酸钾盐混悬液的制备

精密称取别嘌呤醇和氧嗪酸钾盐, 分别用 0.5% CMC-Na(carboxymethylcellulose)配制混悬液, 其浓度分别为 0.4 mg/mL 和 8 g/L。

#### 1.3.5.2 艾叶醇提物的制备

方法同 1.3.1 中醇提物的制备。

#### 1.3.5.3 实验分组和给药

实验小鼠购回后适应环境一周。将小鼠随机分为正常组 6 只, 模型组 30 只, 分为 5 组, 分别为辅料组, 别嘌呤醇组、艾叶醇提物高、中、低剂量组。各组每日上午定时进行灌胃给药, 别嘌呤醇作为阳性对照组

按 4 mg/(kg·d) 剂量给药, 艾叶醇提物高、中、低剂量组剂量分别为 1.7、1.1、0.5 g/kg; 各组小鼠给药喂养一周, 于第 7 d, 除正常组外, 其余各组在末次给药前 1 h 腹腔注射氧嗪酸钾盐 120 mg/kg, 造成小鼠高尿酸血症模型, 正常组注射等量 0.5% CMC-Na。

#### 1.3.5.4 小鼠血清 UA、Scr、BUN、肝脏 XOD 含量的测定

注射氧嗪酸钾盐后, 各组小鼠按照给药方法灌胃给药, 1 h 后, 摘眼球取血, 离心分离血清后按照试剂盒说明测定其血清尿酸、肌酐和尿素氮。取血完成后, 断颈处死, 取其肝脏, 按照试剂盒说明测定其 XOD

活性。

#### 1.3.6 数据统计分析

实验所有样品平行测定三次, 结果以平均值±标准偏差 ( $\bar{x}\pm SD$ ) 表示, 采用 SPSS16.0 进行数据处理和单因素方差分析,  $p<0.05$  时具有统计学意义, 采用 Origin 6.0 软件计算样品清除自由基或抑制酶活性的  $IC_{50}$  值, 并作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 总酚、总黄酮含量

表 1 艾叶提取物的提取率、总黄酮和总酚含量

Table 1 Extraction rate, total flavonoids and total phenolic content of extracts for *Artemisia argyi*

提取方法	提取率/%	总酚含量/(mg/g) 初提物	总黄酮含量/(mg/g) 初提物
传统煎煮法	2.0±0.09 <sup>a</sup>	100±3.21 <sup>b</sup>	14±2.08 <sup>a</sup>
蒸馏水超声波辅助	9.6±0.15 <sup>c</sup>	40±1.53 <sup>a</sup>	12±2.52 <sup>a</sup>
无水乙醇超声波辅助	6.1±0.17 <sup>b</sup>	140±4.58 <sup>c</sup>	36±1.15 <sup>b</sup>

注: 同一列右上标不同字母 (a, b, c) 表示数据间存在显著性差异 ( $p<0.05$ )。

艾叶提取物的提取率、总黄酮和总酚含量见表 1。

如表 1 所示采用不同溶剂、方法所得艾叶提取物的提取率有明显差异。其中, 蒸馏水超声波辅助提取法的提取率较无水乙醇超声波辅助提取法高, 传统煎煮法提取率最低; 醇提物的总黄酮和总酚含量都较高, 水提物最低, 总酚含量介于 38.47~144.58 mg/g 之间, 总黄酮含量介于 9.48~37.15 mg/g 之间, 传统法和水提法的提取物总黄酮含量差异不大。

赵丹<sup>[30]</sup>测得紫米水提物中总酚含量为 78.22 mg/100 g, 总黄酮含量为 61.84 mg/100 g, 紫米无水乙醇提取物中总酚含量 95.29 mg/100 g, 总黄酮含量 72.08 mg/100 g。刘豪<sup>[31]</sup>测得金银花无水乙醇提取物中总酚含量为 39.76±0.022 mg/g, 总黄酮含量 205.21±0.39 mg/g。由此可知, 艾叶水提物中总酚和总黄酮含量较紫米水提物中总酚和总黄酮含量高, 艾叶醇提物中总酚含量较紫米无水乙醇提取物、金银花无水乙醇提取物中总酚和总黄酮含量高, 艾叶醇提物中总黄酮含量较紫米无水乙醇提取物中总黄酮含量高。

## 2.2 黄嘌呤氧化酶体外抑制实验

### 2.2.1 艾叶提取物对黄嘌呤氧化酶的半数抑制

表 3 别嘌呤醇抑制率

Table 3 Allopurine inhibition rate

别嘌呤醇浓度/( $\mu\text{g/mL}$ )	传统法/( $\mu\text{g/mL}$ )	水提物/( $\mu\text{g/mL}$ )	醇提物/( $\mu\text{g/mL}$ )	抑制率/%
16.13	13.87	38.55	0.96	94.01

### 率和别嘌呤醇抑制率

艾叶提取物对黄嘌呤氧化酶的半数抑制率及与总酚、总黄酮相关性如表 2 所示。别嘌呤醇抑制率结果见表 3。

由表 2、表 3 可得, 艾叶提取物对 XOD 的抑制效果与总酚、总黄酮含量具有相关性, 且与总酚含量相关性较显著。醇提物对 XOD 的抑制效果较好, 其次是传统提取物, 水提物对 XOD 的抑制效果较差, 0.96  $\mu\text{g/mL}$  醇提物抑制 XOD 效果与 16.13  $\mu\text{g/mL}$  别嘌呤醇的抑制效果相当, 抑制率达到 94.01%。

表 2 艾叶提取物对 XOD 的半数抑制率及与总酚、总黄酮的相关性系数

Table 2 The half-inhibition rate of XOD of *Artemisia argyi* extracts and the correlation coefficient of total phenol and total flavonoids

提取方法	$IC_{50}$ /( $\mu\text{g/mL}$ )	相关系数	
		总酚	总黄酮
传统煎煮法	5.52		
蒸馏水超声波辅助	16.34	-0.997*	-0.802
无水乙醇超声波辅助	0.15		

注: \*表示相关性显著 ( $p<0.05$ )。

## 2.2.2 艾叶提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用研究

### 2.2.2.1 艾叶提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制机理

固定黄嘌呤底物浓度 0.25 mmol/L 不变, 反应体系中黄嘌呤氧化酶的浓度为 0、20、40、60、80 U/L, 依次改变各提取物的浓度 (水提物 1.61、4.84、6.45、9.68、12.9  $\mu\text{g/mL}$ ; 醇提物 0.16、0.32、0.65、1.29、1.61  $\mu\text{g/mL}$ ; 传统提取物 0.32、0.65、1.61、3.23、4.84  $\mu\text{g/mL}$ ), 分别测定在不同酶浓度不同提取物浓度的条件下此反应的初速率, 以初速率对酶浓度作图。结果见图 1。

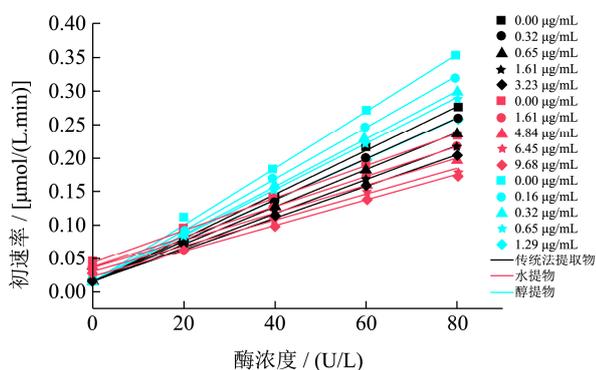


图 1 艾叶提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制机理

Fig.1 Inhibitory mechanism of extractive from *Artemisia argyi* on xanthine oxidase

由图 1 可知, 随着艾叶各提取物浓度的升高, 直线的斜率依次降低, 且不通过原点, 说明艾叶各提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制机理均为不可逆抑制。

### 2.2.2.2 艾叶提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制类型研究

固定黄嘌呤氧化酶浓度 50 U/L 不变, 将黄嘌呤底物的浓度设置为 0.08、0.16、0.25、0.32、0.40 mmol/L 五个浓度, 改变各提取物的浓度 (同 2.2.2.1), 测定在不同底物浓度不同提取物浓度的条件下此反应的初速率, 以初速率的倒数对底物浓度的倒数作图, 见图 2。

如图 2a, 不同浓度的抑制剂在图上呈现为一组平行的直线, 随着抑制剂浓度的升高, 反应速率降低, 体现在双倒数曲线上 Y 轴上的截距逐渐增大; 底物和酶的解离常数减小, 体现在图上即在 X 轴上的截距增大, 这种曲线特征符合反竞争性抑制的特点<sup>[27]</sup>, 所以艾叶传统法提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制类型为反竞争性不可逆抑制。

如图 2b, 以抑制类型图中的 Y 轴截距对抑制剂浓度二次作图, 由直线求得艾叶传统法提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制常数  $K_i=7.76$ 。

如图 2c, 为一组斜率和截距都改变, 但相交于第三象限的直线, 说明  $K_m$  和  $V_m$  随着抑制剂浓度增大而变化,  $K_m$  值增大而  $V_m$  值下降, 其抑制类型表现为混

合竞争型效应<sup>[32-34]</sup>。以抑制类型图中的 Y 轴截距对抑制剂浓度二次作图, 求得艾叶水提物对黄嘌呤氧化酶的抑制常数  $K_i=19.5$ 。

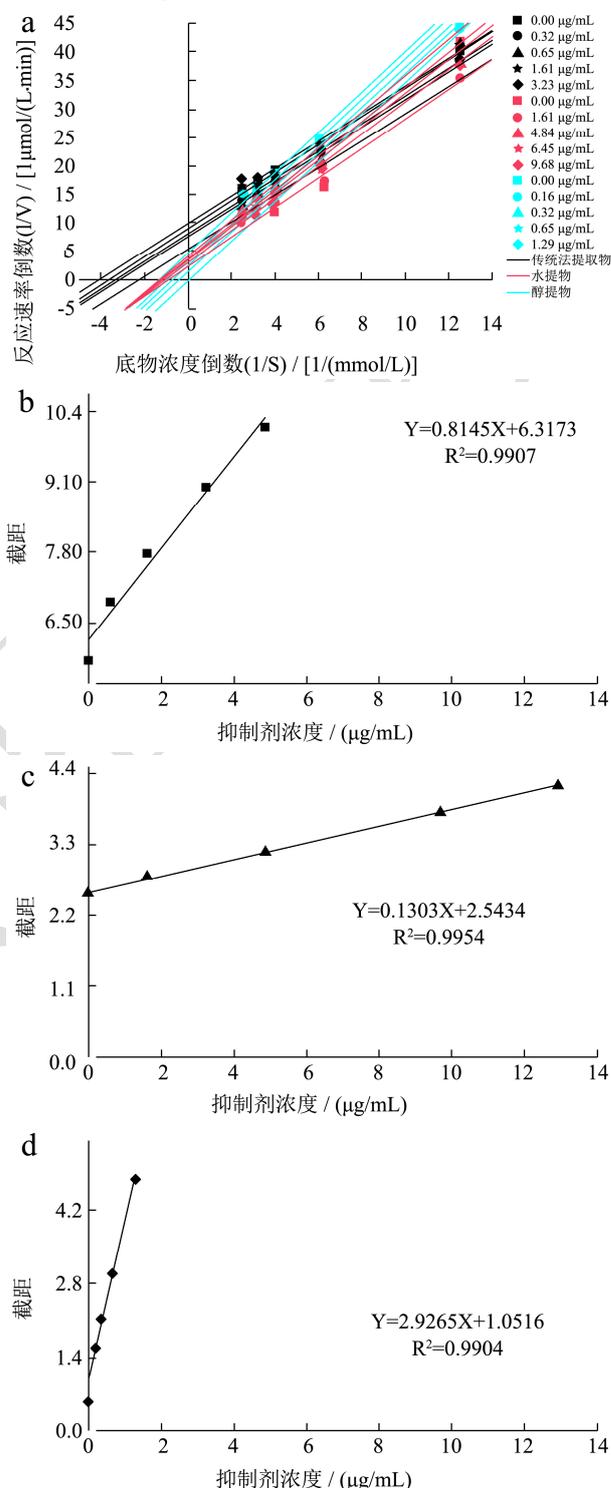


图 2 艾叶提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制类型及抑制常数

Fig.2 Inhibitory type and constant of extractive from *Artemisia argyi* on xanthine oxidase

注: a: 反应速率倒数与底物浓度倒数作图; b: 传统法提取物; c: 水提物; d: 醇提物。

如图 2d, 图中直线分布与传统法提取物相似, 所

以艾叶醇提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制类型属于反竞争性抑制。同样以抑制类型图中的 Y 轴截距对抑制剂浓度二次作图, 求得艾叶醇提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制常数  $K_i=0.36$ 。

由表 4 可知, 艾叶提取物抑制 XOD 作用较其它提取物抑制机理与抑制类型均不同;  $IC_{50}$  与抑制常数在可比较范围内较其它提取物小, 特别是艾叶醇提取物, 说明其抑制效果较好。

### 2.2.3 艾叶提取物与别嘌呤醇的协同作用研究

按照表 5 评价联合抑制作用类型的标准<sup>[27]</sup>得到表 5 艾叶提取物与别嘌呤醇的协同作用结果。

由表 6 可知, 艾叶传统提取物与水提取物共毒系数分别为  $1.2\pm 2.2$ ,  $6.8\pm 3.4$ , 说明这两种混合物对黄嘌呤

氧化酶的抑制呈相加作用, 二者不会影响彼此对酶的抑制率; 醇提取物共毒系数为  $17.4\pm 2.4$ , 说明该混合物对黄嘌呤氧化酶的抑制是弱协同作用, 两者呈现较小促进作用。

### 2.3 抗氧化作用

从以下表 7 可以看出, 艾叶各提取物对 DPPH·、 $ABTS^{+·}$ 、 $\cdot OH$  均有一定的清除作用, 对于各自由基, 醇提取物的清除能力最强, 其次是传统提取物, 能力最弱的是水提取物; 各清除效果均与总酚、总黄酮含量相关, 且 DPPH· 自由基、 $\cdot OH$  自由基清除能力与总酚、总黄酮相关性较显著。

表 4 艾叶提取物与其它提取物抑制 XOD 作用的比较

Table 4 The comparison of inhibits the action on XOD between *Artemisia argyi* and other extracts

样品	抑制机理	抑制类型	$IC_{50}/(\mu g/mL)$	抑制常数 $K_i$
艾叶醇提取物	不可逆抑制	反竞争性抑制	0.15	0.36
艾叶水提取物	不可逆抑制	混合性竞争性抑制	16.34	19.50
红旱莲总黄酮 <sup>[13]</sup>	可逆抑制	竞争性抑制	11.73	0.61
枳椇子醇提取物 <sup>[18]</sup>	-	竞争性抑制	6.49	6.17

注: -表示文献未研究。

表 5 联合抑制类型的评价标准

Table 5 Evaluation criterion of the type of joint inhibition

共毒系数	-20~-10	-10~10	10~20	>20
联合抑制类型	弱拮抗作用	相加作用	弱协同作用	协同作用

表 6 混合物对黄嘌呤氧化酶活性的联合抑制作用

Table 6 Associated inhibition of mixture on xanthine oxidase

混合物	预期抑制率	实测抑制率	共毒系数	作用类型
传统提取物+别嘌呤醇	50	$50.6\pm 1.1$	$1.2\pm 2.2$	相加作用
水提取物+别嘌呤醇	50	$53.4\pm 1.7$	$6.8\pm 3.4$	相加作用
醇提取物+别嘌呤醇	50	$58.7\pm 1.2$	$17.4\pm 2.4$	弱协同作用

表 7 艾叶提取物抗氧化作用及与总酚、总黄酮相关性系数

Table 7 The anti-oxidation of extracts of *Artemisia argyi* and the correlation coefficient of total phenol and total flavonoids

提取方法	DPPH· $EC_{50}/(mg/mL)$	相关系数		$ABTS^{+·}$ $EC_{50}/(mg/mL)$	相关系数		$\cdot OH$ $EC_{50}/(mg/mL)$	相关系数	
		总酚	总黄酮		总酚	总黄酮		总酚	总黄酮
传统煎煮法	$0.32\pm 0.03^b$			$0.15\pm 0.02^b$			$0.76\pm 0.04^b$		
蒸馏水									
超声波辅助	$0.58\pm 0.05^c$	-0.998*	-0.879	$0.23\pm 0.04^c$	-0.984	-0.927	$1.33\pm 0.08^c$	-0.997*	-0.881
无水乙醇									
超声波辅助	$0.10\pm 0.02^a$			$0.05\pm 0.01^a$			$0.27\pm 0.08^a$		

注: 同一列右上标不同字母 (a, b, c) 表示数据间存在显著性差异 ( $p<0.05$ ); \*表示相关性显著 ( $p<0.05$ )。

### 2.4 艾叶醇提取物对高尿酸血症小鼠的降尿酸

作用

艾叶醇提取物对小鼠血清 UA、Scr、BUN 水平及肝脏 XOD 活性的影响见表 8, 与正常组比较, 模型对照组 UA、BUN 水平均有显著提高, Scr 水平无显著变化, 别嘌呤醇组 UA、Scr、BUN 水平显著降低; 艾叶

醇提取物高剂量组较模型对照组及正常组在一定程度上有显著降低小鼠血清 UA、Scr、BUN 水平的作用；中、低剂量组较正常组 UA、Scr、BUN 水平无显著差异，UA、BUN 水平较模型对照组有显著差异，Scr 水平变化不大。与正常组相比较，模型对照组 XOD 活性显

著增加，别嘌呤醇组 XOD 活性无明显变化，这是由于别嘌呤醇是竞争性抑制剂，治病机理与 XOD 无关<sup>[27]</sup>；艾叶醇提取物高、中、低剂量组较正常组和模型对照组 XOD 活性都有显著降低，并且在一定范围内剂量越大，XOD 活性越低，起到一定的抑制作用。

表 8 艾叶醇提取物对高尿酸血症小鼠血清 UA、Scr、BUN 水平及肝脏 XOD 活性的影响

Table 8 Effect of *Artemisia argyi* alcohol extracts on serum UA, Scr, BUN and XOD activity in liver of hyperuricemia mice ( $\bar{x}\pm s$ , n=6)

组别	剂量/(g/kg)	UA/( $\mu\text{mol/L}$ )	Scr/( $\mu\text{mol/L}$ )	BUN/(mmol/L)	XOD 活性 U/g prot
正常组		86.20 $\pm$ 2.27*	31.16 $\pm$ 0.22	7.71 $\pm$ 1.78	18.65 $\pm$ 3.59*
模型对照组		90.60 $\pm$ 0.99 $\Delta$	31.73 $\pm$ 0.61	9.01 $\pm$ 0.26 $\Delta$	23.00 $\pm$ 4.27 $\Delta$
别嘌呤组	0.004	79.98 $\pm$ 1.48* $\Delta$	28.31 $\pm$ 1.09* $\Delta$	5.46 $\pm$ 0.48* $\Delta$	18.22 $\pm$ 1.63*
低剂量组	0.5	85.05 $\pm$ 2.13*	31.20 $\pm$ 0.24	7.10 $\pm$ 2.03*	9.82 $\pm$ 2.94* $\Delta$
中剂量组	1.1	83.69 $\pm$ 2.45*	30.68 $\pm$ 0.76	6.68 $\pm$ 1.11*	6.42 $\pm$ 1.60* $\Delta$
高剂量组	1.7	82.37 $\pm$ 2.20* $\Delta$	30.12 $\pm$ 0.38* $\Delta$	5.55 $\pm$ 1.28* $\Delta$	5.09 $\pm$ 0.75* $\Delta$

注：\*与模型对照组相比较  $p<0.05$ ； $\Delta$ 与正常组相比较  $p<0.05$ 。

### 3 结论

实验结果表明，艾叶各提取物对 XOD 具有良好的抑制作用以及抗氧化性，醇提取物具有治疗高尿酸血症的效果。对 XOD 抑制作用能力从大到小：醇提取物>传统提取物>水提取物，醇提取物对 XOD 的抑制效果显著，0.96  $\mu\text{g/mL}$  醇提取物与 16.13  $\mu\text{g/mL}$  别嘌呤醇对 XOD 的抑制作用相当；三种提取物的抑制机理均为不可逆抑制，传统法和醇提取物对 XOD 的抑制类型为反竞争性抑制，水提取物为混合性竞争性抑制；本实验将艾叶提取物与别嘌呤醇进行混合，得到传统法和水提取物表现为相加作用，醇提取物为弱协同作用；艾叶醇提物体内实验表明，其对高尿酸血症小鼠血清 UA、Scr、BUN 水平在一定程度上具有降低效果，对肝脏 XOD 活性具有显著抑制作用。本结果为艾叶的开发利用提供了一条新思路，为降尿酸药物及与别嘌呤醇联合用药的研究提供了一定的理论依据，但具体机制还有待进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] 刘又豪,赵力超,卢嘉欣,等.桉叶提取物抑制黄嘌呤氧化酶活性成分的分离纯化及其动力学研究[J].广东农业科学, 2014,14:100-105  
LIU You-hao, ZHAO Li-chao, LU Jia-xin, et al. Inhibition effects on xanthine oxidase and kinetics research of extracts from eucalyptus leaves [J]. Guangdong Agricultural Science, 2014, 14: 100-105
- [2] Muzychka O V, Kobzar O L, Popova A V, et al. Carboxylated aurone derivatives as potent inhibitors of xanthine oxidase [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2017, 25(14): 3606

- [3] LIU D, WANG D D, YANG W, et al. Potential anti-gout constituents as xanthine oxidase inhibitor from the fruits of *Stauntonia brachyanthera* [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2017, 25: 3562-3566
- [4] Wan Y, Zou B, Zeng H L, et al. Inhibitory effect of verbascoside on xanthine oxidase activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 93: 609-614
- [5] 李英,陈君,李萍.金银花中酚酸类和黄酮类成分的黄嘌呤氧化酶抑制活性[J].中国药科大学学报,2011,42(5):407-411  
LI Ying, CHEN Jun, LI Ping. Inhibitory activity of the flavonoids and phenolic acids from Jinyinhua on the xanthine oxidase [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2011, 42(5): 407-411
- [6] Ekundayo O J, Dell'Italia L J, Sanders P W, et al. Association between hyperuricemia and incident heart failure among older adults: A propensity-matched study [J]. International Journal of Cardiology, 2010, 142(3): 279-287
- [7] Puddu P, Puddu G M, Cravero E, et al. Relationships among hyperuricemia, endothelial dysfunction and cardiovascular disease: Molecular mechanisms and clinical implications [J]. Journal of Cardiology, 2012, 59(3): 235-242
- [8] 任昊,刘宏发,刘郑荣.高尿酸血症和肾脏[J].现代中西医结合杂志,2008,17(1):152-154  
REN Hao, LIU Hong-fa, LIU Zheng-rong. Kidney and hyperuricemia [J]. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2008, 17(1): 152-154
- [9] Massey V, Brumby P E, Komai H, et al. Studies on milk xanthine oxidase some spectral and kinetic properties [J]. Journal of Biological Chemistry, 1969, 244(7): 1682
- [10] 陈艳,堵锡华.黄酮类化合物抑制黄嘌呤氧化酶活性的定量

- 构效关系[J].时珍国医国药,2011,22(5):1095-1097
- CHEN Yan, DU Xi-hua. Quantitative relationship between xanthine-oxidase inhibition activity and the molecular structure of flavonoids [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2011, 22(5): 1095-1097
- [11] 孟庆华,于晓霞,张海凤,等.天然黄酮类化合物清除自由基机理及其应用进展[J].云南民族大学学报,2012,21(2):79-83
- MENG Qing-hua, YU Xiao-xia, ZHANG Hai-feng, et al. Flavonoids' mechanism of scavenging free radicals and its application as natural antioxidants [J]. Journal of Yunan Nationalities University, 2012, 21(2): 79-83
- [12] Dong Y, Huang H H, Zhao M M, et al. Mechanisms underlying the xanthine oxidase inhibitory effects of dietary flavonoids galangin and pinobanksin [J]. Journal of Functional Foods 2016, 24: 26-36
- [13] 周佳,张国文,胡明明.红旱莲总黄酮对黄嘌呤氧化酶抑制作用及抗氧化研究[J].食品与生物技术学报,2013,32(4):353-357
- ZHOU Jia, ZHANG Guo-wen, HU Ming-ming. Inhibitory effect on xanthine oxidase and antioxidant activity of total flavonoids from *Hypericum ascyron* L. [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2013, 32(4): 353-357
- [14] 祁鑫,王昌禄,李凤娟,等.常见蔬菜提取物对黄嘌呤氧化酶抑制作用的筛选研究[J].现代食品科技,2011,27(5):511-514
- QI Xin, WANG Chang-lu, LI Feng-juan, et al. Inhibitory effects of the extracts of some common vegetables on xanthine oxidase [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(5): 511-514
- [15] 申启荣.中药黄嘌呤氧化酶抑制剂的筛选及抑制动力学研究[D].南昌:南昌大学,2015
- SHEN Qi-rong. The screening and study on the inhibition kinetics of xanthine oxidase inhibitors from Chinese herbal medicine [D]. Nanchang: Nanchang University, 2015
- [16] 赵玲,陈旅翼,李赫宇.一种复合萃取物对黄嘌呤氧化酶抑制作用研究[J].食品研究与开发,2015,36(17):198-200
- ZHAO Ling, CHEN Lyu-yi, LI He-yu. Study on inhibition of xanthine oxidase of an extractive complex [J]. Food Research and Development, 2015, 36(17): 198-200
- [17] Baker J F, Krishnan E, Chen L, et al. Serum uric acid and cardiovascular disease: recent developments, and where do they leave us [J]. Am J Med, 2005, 118(8): 816-826
- [18] 黎莉,戴立珍,杨靖,等.中药提取物中黄嘌呤氧化酶抑制剂的筛选[J].武汉工程大学学报,2010,32(3):44-46
- LI Li, DAI Li-zhen, YANG Jing, et al. Study on xanthine oxidase inhibitory activity of the extracts from Chinese herbal medicines [J]. Journal of Wuhan Institute of Technology, 2010, 32(3): 44-46
- [19] 周凌云,李盼盼,余小红,等.小远志中糖酯类成分及其体外抗黄嘌呤氧化酶活性研究[J].中草药,2016,47(23):4146-4150
- ZHOU Ling-yun, LI Pan-pan, YU Xiao-hong, et al. Glycolipids from *Polygala sibirica* var *megalopha* and their *in vitro* inhibitory activity on xanthine oxidase [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(23): 4146-4150
- [20] 段凯莉,高明景,刘永泉,等.2种艾叶酚类化合物与挥发油成分比较[J].食品科学,2017,38(4):204-210
- DUAN Kai-li, GAO Ming-jing, LIU Yong-quan, et al. Phenolic compounds and essential oil compositions of *Artemisia argyi* leaves from two growing areas [J]. Food Science, 2017, 38(4): 204-210
- [21] 李真真,吕洁丽,张来宾,等.艾叶的化学成分及药理作用研究进展[J].国际药学研究杂志,2016,43(6):1059-1066
- LI Zhen-zhen, LYU Jie-li, ZHANG Lai-bin, et al. Chemical constituents and pharmacology activities of *Artemisia argyi*: Research advances [J]. Journal of International Pharmaceutical Research, 2016, 43(6): 1059-1066
- [22] 王新芳,董岩,孔春燕.艾蒿的化学成分及药理作用研究进展[J].时珍国医国药,2006,17(2):174-175
- WANG Xin-fang, DONG Yan, KONG Chun-yan. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Artemisia argyi* [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2006, 17(2): 174-175
- [23] 林伟青,谢建祥,王海东.白艾提取液对高尿酸血症大鼠的实验研究[J].中华风湿病学杂志,2005,9(8):509-510
- LIN Wei-qing, XIE Jian-xiang, WANG Hai-dong. Experimental study on rats with hyperuricemia of extracts from white *Artemisia argyi* [J]. Chinese Journal of Rheumatology, 2005, 9(8): 509-510
- [24] 谢建祥,林伟青,王海东,等.白艾提取液对黄嘌呤氧化酶活性抑制的实验研究[R].福州,第九次全国中西医结合血瘀证及活血化瘀研究学术大会,2012
- XIE Jian-xiang, LIN Wei-qing, WANG Hai-dong, et al. Experimental study on xanthine oxidase activity inhibition of extracts from white *Artemisia argyi* [R]. Fuzhou, The ninth National Conference on Integrative Medicine for Blood Stasis and Blood-activating and Stasis Research, 2012
- [25] Senji S, Yumi T, Yuki O. Preparation and antioxidant properties of extract of Japanese persimmon leaf tea (Kakinohacha) [J]. Food Chemistry, 2005, 89: 569-575

- [26] 罗开梅,邹金美,方吉乐,等.楮头红的抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2012,33(21):109-111  
LUO Kai-mei, ZOU Jin-mei, FANG Ji-le, et al. Study on antioxidant activity of *Sarcopyamis nepalensis* Wall extracts [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(21): 109-111
- [27] 张珞.鼠尾藻和羽藻的提取物对黄嘌呤氧化酶抑制作用的研究[D].青岛:中国海洋大学,2013  
ZHANG Luo. Study on inhibition effects of extracts from *Sargassum thumbergii* and *Bryopsis plumose* on the xanthine oxidase [D]. Qingdao Ocean University of China, 2013
- [28] 邹金美,王兵丽,赵晓丹,等.福建金线莲组培苗和移栽苗主要活性成分及抗氧化性的研究[J].食品工业科技,2014,35(23):136-144  
ZOU Jin-mei, WANG Bin-li, ZHAO Xiao-dan, et al. Study on principal active component and antioxidant capacity between tissue culture and transplanting plantlet of Fujian *Anoectochilus roxburghii* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(23): 136-144
- [29] 李润国,高岩,单秀峰.紫甘薯膳食纤维的提取及对自由基的清除作用[J].沈阳师范大学学报(自然科学版),2014,32(2):206-209  
LI Run-guo, GAO Yan, SHAN Xiu-feng, Dietary fiber extracation from purple sweet potato and its ability of removing free radicals [J]. Journal of Shenyang Normal University (Natural Science Edition), 2014, 32(2): 206-209
- [30] 赵丹,勾剑颖,姚世聪,等.真菌固态发酵对紫米总酚和总黄酮含量的影响[J].食品科技,2012(12):136-139  
ZHAO Dan, GOU Jian-ying, YAO Shi-cong, et al. The effects on total phenolics content and flavonoids of purple rice by fungi solid-state fermentation [J]. Food Science and Technology, 2012, 12: 136-139
- [31] 刘豪,张冬青,刘硕,等.金银花不同提取物抗氧化活性的研究[J].食品研究与开发,2016,1:48-52  
LIU Hao, ZHANG Dong-qing, LIU Shuo, et al. Study on the antioxidant activity of different extracts of the flower buds of *Lonicera japonica* [J]. Food Research and Development, 2016, 1: 48-52
- [32] 严航,唐婷,干丽,等.薏苡仁提取物对酪氨酸酶抑制作用[J].中成药,2013,35(4):696-699  
YAN Hang, TANG Ting, GAN Li, et al. Inhibition of coicis semen extract on tyrosinase [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2013, 35(4): 696-699
- [33] 蔡建秀,顾雅青,黄晓冬,等.桐花树叶乙酸乙酯部位提取物对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性作用[J].食品研究与开发,2015,36(24):1-6  
CAI Jian-xiu, GU Ya-qing, HUANG Xiao-dong, et al. Study on  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of the ethyl acetate extract from leaves of *Aegiceras corniculatum* [J]. Food Research and Development, 2015, 36(24): 1-6
- [34] 柴纬明,邓紫薇,石艳,等.秋茄叶缩合单宁对蘑菇酪氨酸酶的抑制机理[J].厦门大学学报(自然科学版),2012,51(6):1070-1073  
CHAI Wei-ming, DENG Zi-wei, SHI Yan, et al. Inhibitory mechanism of condensed tannins from the mangrove plant *Kandelia candel* on mushroom tyrosinase [J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2012, 51(6): 1070-1073

(上接第 113 页)

- [13] Orchard A, Vuuren S V. A review of commercial essential oils as potential antimicrobials to treat skin diseases [J]. Evidence-Based Complementray and Alternative Medicine, 2017, 1: 1-92
- [14] 曾祥吉,李东霞.中药抑菌实验方法的研究[J].现代中西医结合杂志,2011,20(4):518-520  
ZENG Xiang-ji, LI Dong-xia. Study on the method of antibacterial experiment of traditional Chinese medicine [J]. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2011, 20(4): 518-520
- [15] 李文茹,施庆珊,谢小保,等.植物精油化学成分及其抗菌活性的研究进展[J].微生物学通报,2016,43(6):1339-1344  
LI Wen-ru, SHI Qing-shan, XIE Xiao-bao, et al. Advances in the study of chemical constituents of essential oils and their antimicrobial activity [J]. Microbiology China, 2016, 43(6): 1339-1344
- [16] 侯小涛,郝二伟,秦健峰,等.肉桂的化学成分,药理作用及质量标志物(Q-marker)的预测分析[J].中草药,2018,49(1):20-34  
HOU Xiao-tao, HAO Er-wei, Qin Jian-feng, et al. Chemical components and pharmacological action for *Cinnamomum cassia* and predictive analysis on Q-marker [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(1): 20-34
- [17] 周巧仪,张桂君,方炳虎.药动/药效同步模型在兽用抗菌药物研究的应用概况[J].动物医学进展,2016,37(4):104-110  
ZHOU Qiao-yi, ZHANG Gui-jun, Fang Bing-jun. Overview of the application of pharmacokinetic / pharmacodynamic synchronization model in the study of veterinary antibacterial drugs [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2016, 37(4):104-110

现代食品科技