

山莓叶抑制兔离体肠运动活性物质的提取及活性稳定性研究

常云佩¹, 刘晓娟¹, 周丽萍¹, 熊平², 陈雪香¹, 曹庸¹

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 华南农业大学资源环境学院, 广东广州 510642)

摘要: 本研究以山莓叶为原料, 以兔离体肠运动为模型, 80%乙醇提取后采用 4 种不同极性溶剂进行提取, 筛选具有抗腹泻的活性组分, 并考察温度、pH、光质、光照时间和脱鞣质处理对粗提物抑制兔离体肠运动活性的影响。结果表明: 山莓叶抑制兔离体肠运动的活性物质主要在乙酸乙酯层, 其它层提取物的活性大小依次为: 石油醚层>水层>正丁醇层>氯仿层; 山莓叶醇提物在 30℃~60℃ 范围内抑制兔离体肠运动活性稳定, 高温(90℃和 120℃)条件下离体肠的张力增量变化率较 30℃处理分别下降了 15.43%和 32.45%; pH 对抑制肠运动活性影响较大, 酸性条件下活性最高, 其次是中性, 碱性条件下抑制其活性, pH 12 处理后张力增量变化率仅为 11.90%; 不同光质和不同光照时间处理后仍具有极显著抑制兔离体肠运动的作用 ($P<0.01$); 脱鞣质处理会使山莓叶醇提物抑制肠运动活性减弱, 说明鞣质可能是山莓叶抗腹泻活性成分之一。

关键词: 山莓叶; 兔离体肠; 提取物; 抗腹泻; 稳定性

文章编号: 1673-9078(2014)4-85-92

Inhibitory Effect of *Rubus corchorifolius* Leaves Extract on the Movement of Isolated Intestinal from Rabbit and Its Active Stability

CHANG Yun-pei¹, LIU Xiao-juan¹, ZHOU Li-ping¹, XIONG Ping², CHEN Xue-xiang¹, CAO Yong¹

(1. College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

(2. College of Resource Environment, South China Agriculture University, Guangzhou, 510642, China)

Abstract: Using the movement of isolated intestinal from rabbit as the model, the extraction of anti-diarrhea active components from *Rubus corchorifolius* leaves and their active stability were investigated. The active components were extracted with 80% ethanol, followed by five different polar solvents. The effects of temperature, pH, light quality, illumination time, and the tannins removal treatment on the activity of the extracts were also studied. The results showed that the active components mainly existed in ethyl acetate layer, the sequence of the extract activity in different solvent layer was petroleum ether layer>water layer>n-butanol layer>chloroform layer. The ethanol extract of *Rubus corchorifolius* leaves were stable in the range of 30–60℃. But at high temperature of 90℃ and 120℃, the tensional variation percentage of isolated intestinal from rabbit decreased by 15.43% and 32.45%, respectively. pH showed significant influence on the activity, and the highest activity was found under acidic conditions, followed by neutral and alkaline conditions. The tensional variation percentage was only 11.90% at pH 12. The ethanol extract after different light qualities and different illumination time treatments still had high activity ($P<0.01$), while the activity was decreased by tannin removal treatment, indicating tannin might be one of the components for anti-diarrheal activity in *Rubus corchorifolius* leaves.

Key words: *Rubus corchorifolius* leaves; isolated intestinal from rabbit; extract; anti-diarrhea; stability

腹泻是世界性公共卫生问题, 据 2013 年 4 月世

收稿日期: 2013-10-13

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动项目(粤科基办字[2011]3号); 高等学校博士学科点专项科研基金联合资助课题(20114404120022); 广东省科技计划农业公关项目(2012A020602038); 广东高校优秀青年创新人才培养计划项目(育苗工程)(LYM11027)

作者简介: 常云佩(1989-), 女, 在读研究生, 研究方向为食品化学与营养

通讯作者: 刘晓娟(1980-), 女, 博士, 讲师, 研究方向为食品化学与营养

界卫生组织的调查显示, 全球每年约有 17 亿例腹泻病, 每年约有 76 万五岁以下儿童死于腹泻病。同时, 腹泻是常见的畜禽多发病, 业已成为现代畜牧业发展的重要障碍。抗生素是治疗腹泻的主要措施, 但随着抗生素的大量使用和不合理滥用, 出现了病原菌抗药性增强、畜禽产品药物残留增加等问题, 从而间接危害人体健康。欧盟从 2006 年 1 月起, 全面禁止将抗生素作为畜禽生长促进剂。2012 年美国和日本也先后出

台了限制或者禁止抗生素在饲料中使用的规定。因此寻找高效、安全的药物已成为防治腹泻迫切需要解决的问题^[1-2]。我国中草药种类多,来源广泛,中草药来替代抗生素是防治腹泻的新领域。中草药含有某些特异性生理活性物质,如挥发油、有机酸、酚类物质、萜类成分、生物碱和多肽等,长期使用被认为是相对安全、经济的抗生素替代物^[3]。

山莓(*Rubus corchorifolius* L f)是蔷薇科悬钩子属植物,作为药用植物在国内外已有很长的历史,是湘西、鄂西北等地区少数民族长期用来治疗腹泻的传统中草药。山莓的根、茎、叶、果实皆可入药,具有消积食、止泻痢、解毒、活血、调经、止血等功效^[4]。比较研究山莓根、茎、叶三个部位提取物对兔十二指肠运动的影响,表明叶的抗腹泻效果最强,且山莓叶提取物对兔十二指肠、空肠、回肠、结肠的运动均有抑制作用,从而揭示山莓叶可能通过抑制肠管运动的张力使肠管内容物停留时间延长起到抗腹泻的作用^[5]。山莓叶提取物对番泻叶、蓖麻油和致泻大肠埃希氏菌导致的小鼠腹泻均有显著抑制作用,表明其是一种很好的抗腹泻药物^[6]。离体肠模型是国内外最常用的研究腹泻的模型之一,如韩国当地草药 *Soonkijangquebo*、印度抗腹泻秘方山苍子多花蔷薇(*Litsea polyantha*)树皮、中草药吴茱萸(*Evodia fructus*)等都运用了离体肠模型研究抗腹泻作用^[7-9]。但迄今为止,山莓叶起抗腹泻的主要活性物质尚不清楚,并且活性物质的作用效果容易受到外界因素(光照、温度和 pH 等)的干扰,如高温和强光条件下,儿茶止泻霜剂的抗腹泻效果显著降低^[10];高温条件下山莓叶提取物对大肠杆菌的抑菌效果明显下降^[11];短乳杆菌分泌的抑菌物质的抑菌活性随 pH 值的升高呈显著下降趋势^[12]。

本研究以山莓叶为原料,以兔离体肠运动为模型,采用 4 种不同极性的溶剂进行提取,筛选抗腹泻活性最强的组分,并考察了温度、pH、光质、光照时间和脱鞣质处理对粗提物抑制兔离体肠运动活性的影响,为深入开展山莓叶抗腹泻活性物质的分离鉴定及其作用机理打下研究基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 实验材料

新西兰兔,雌雄不限,4~6 月,体重 2~2.5 kg,购于南方实验动物中心,合格证号为 SCXK(粤)2008-0020。

1.1.2 药品与试剂

山莓叶采于湖南张家界;无水乙醇,分析纯,购自天津市富宇精细化工有限公司;氯化钠、氯化钾、氯化钙、碳酸氢钠、磷酸二氢钠、氯化镁、葡萄糖,盐酸、氢氧化钠,分析纯,购自天津市福晨化学试剂厂。

1.1.3 仪器

BL-420S 型生物信号采集处理系统,成都泰盟科技有限公司;FT-100 型张力传感器,成都泰盟科技有限公司;FW100 型高速万能粉碎机,天津市华鑫仪器厂;AL 104 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;R204 旋转蒸发器,上海申生科技有限公司;SHB 循环水式多用真空泵,河南省予华仪器有限公司;Sim FD8-6P 冷冻干燥机,西盟国际公司;WZ-100 恒温水浴锅,上海申生科技有限公司;pH 计,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;KQ-500B 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;电热高压蒸汽灭菌锅,江阴滨江医疗设备厂。

1.2 实验方法

1.2.1 溶剂提取及药液配制

山莓叶粗提物的制备:将山莓叶阴干去杂,粉碎,过 80 目筛。称取适量山莓叶粗粉置于瓶中,按料液比 1:10 加入 80%乙醇,密闭后常温浸提 48 h,倒出浸提液,重复浸提 1 次,合并浸提液并过滤,用旋转蒸发器于 60 °C、120 r/min 浓缩至原体积的 1%,冷冻干燥 72 h(-45 °C, -30 Pa)得山莓叶浸膏。将得到的山莓叶浸膏先用 80%乙醇水溶液溶解,然后依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇 4 种有机溶剂反复多次萃取,将萃取液和最后的水层分别浓缩,冷冻干燥,分别得石油醚层、氯仿层、乙酸乙酯层、正丁醇层、水层 5 种萃取物。分别取 4 g 粗提物和 5 种萃取物用 10 mL 含 30%乙醇的台氏液溶解,配制成浓度为 0.4 g/mL 的药液。

1.2.2 兔离体肠模型的建立^[13]

1.2.2.1 离体肠段的制备

含 30%乙醇的台氏液配制:称取氯化钠 8.0 g、氯化钾 0.2 g、氯化钙 0.2 g、碳酸氢钠 1.0 g、磷酸二氢钠 0.05 g、氯化镁 0.1 g、葡萄糖 1.0 g,加 300 mL 无水乙醇后,用蒸馏水定容至 1 L。

实验前将家兔禁食 24 h,用静脉注射空气法使家兔死亡,迅速剖开腹腔,距胃幽门 5 cm 为起点,剪取十二指肠约 8 cm,放入 38 °C 台氏液中,剪成约 2~3 cm 的肠段。将离体肠段放在通气的 38 °C 台氏液中,充分洗去内容物后,移入 38 °C 新鲜台氏液中通气备用。

1.2.2.2 观察方法和指标

在 (38±0.5) °C 条件下, 不断往台氏液中通气, 用生物信号采集处理系统记录肠段收缩曲线。观察在正常情况下离体肠管的自动节律性收缩稳定后, 然后加入 100 μL 1.2.1 中配置好的药液, 以收缩张力 (g)、收缩频率 (次/min) 为指标, 记录一段时间。在加样前后各选 10 个波形, 计算张力增量和频率。

$$\text{张力增量变化率} = \frac{(\text{加样前张力} - \text{加样后张力}) \times 100}{\text{加样前张力}}$$

$$\text{频率} = \frac{\text{波形数}}{\text{时间}}$$

1.2.3 不同因素处理对山莓叶粗提物抑制兔离体肠管运动的影响

1.2.3.1 不同温度对山莓叶粗提物抑制兔离体肠管运动的影响

取 1.2.1 配置好的药液 4 mL, 分装到四个小玻璃瓶中, 分别置于 30 °C、60 °C、90 °C 的水浴条件和 120 °C 热风干燥各处理 3 h 后, 用兔离体肠模型来测定提取物的活性。

1.2.3.2 不同光质和光照时间对山莓叶粗提物抑制兔离体肠管运动的影响

取 1.2.1 配置好的药液 6 mL, 分装到六个小玻璃瓶中, 将药液分别置于白炽灯和紫外光下, 各处理 6 h、9 h、12 h, 另取 1 mL 药液放于暗室处理 12 h, 用兔离体肠模型来测定提取物的活性。

1.2.3.3 不同 pH 对山莓叶粗提物抑制兔离体肠管运动的影响

取 1.2.1 配置好的药液 4 mL, 分装到四个小玻璃瓶中, 用稀盐酸和稀氢氧化钠将 pH 值分别调至 3、7、10、13, 分别取 1 mL, 用兔离体肠模型来测定提取物的活性。

1.2.3.4 脱鞣质处理对山莓叶粗提物抑制兔离体肠管运动的影响

称取粗提物样品 0.5 g, 用蒸馏水充分溶解, 加入 2%~5% 明胶溶液, 不再产生沉淀表示粗提物已充分沉淀, 静置, 过滤除去沉淀, 浓缩滤液后, 加入乙醇使含量达 75% 以上, 以除去过量明胶。脱鞣质层用兔离体肠模型来测定提取物的活性。

1.2.4 数据处理

用 SAS 统计分析软件 (v8) 处理, 采用配对实验设计, 实验数据以平均数±标准差表示, 组间数据采用 t 检验。采用单因素方差分析不同因素处理组之间的张力增量变化率差异性 (P<0.05), 差异显著采用不同字母表示, 差异不显著采用相同字母表示。

2 结果与分析

2.1 山莓叶抑制兔离体肠运动活性物质的提取

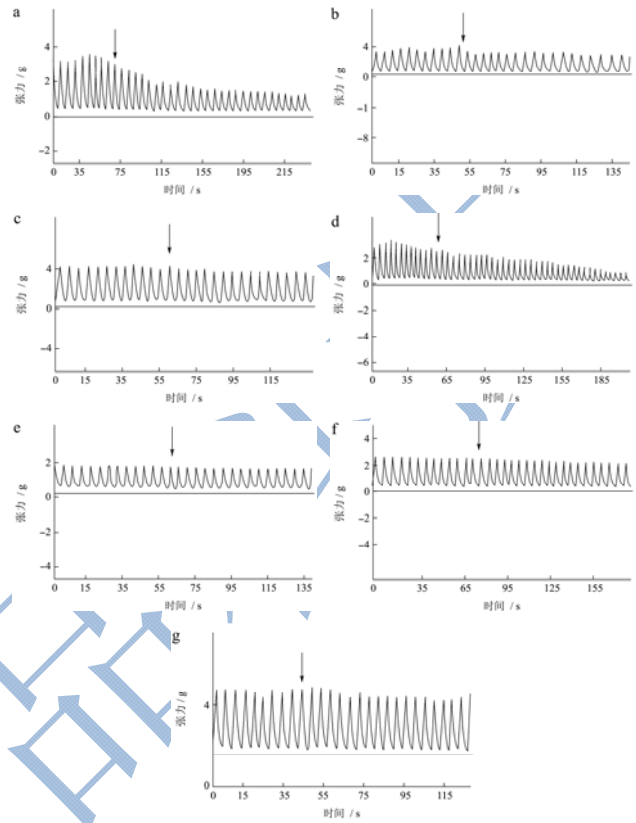


图 1 山莓叶不同提取物加入前后兔离体肠的运动波形图 (↓表示加样)

Fig.1 Movable waving pattern of isolated intestinal from rabbit before and after adding different *Rubus corchorifolius* extracts

注: a: 粗提物; b: 石油醚层; c: 氯仿层; d: 乙酸乙酯层; e: 正丁醇层; f: 水层; g: 30%乙醇。

为了提高山莓叶粗提物和各萃取物的溶解度, 选择含有 30%乙醇的台氏液作为溶剂。山莓叶粗提物、5 种萃取物和含 30%乙醇的台氏液对兔离体肠运动影响的效果如图 1 所示。由图 1 可以看出, 含有 30%乙醇的台氏液加入后, 兔离体肠管的收缩张力没有明显的改变, 表明用含 30%乙醇的台氏液来溶解各层萃取物不会对实验结果造成影响, 以下实验均采用含 30%乙醇的台氏液作为溶剂。

在加入山莓叶粗提物后, 兔离体肠收缩波幅度明显减小, 说明山莓叶中存在活性很强的抗腹泻物质, 山莓叶粗提物具有显著的抑制兔离体肠运动的效果。为了进一步分析山莓叶中抗腹泻的活性物质, 采用 4 种不同极性的溶剂对山莓叶粗提物进行萃取, 并将冻干后的萃取物也用含 30%乙醇的台氏液溶解。加入各萃取物后, 乙酸乙酯层样品兔离体肠波形图变化最明

显, 离体肠收缩波幅度明显减小, 而石油醚层、氯仿层、正丁醇层、水层提取物加入后, 波形图无明显变化。

根据以上波型图, 山莓叶不同提取物对兔离体肠管张力和频率的变化如表 1 所示, 并利用 SAS 软件进行显著性差异分析, 加入粗提物后, 兔离体肠管的收缩张力明显减小, 与给药前比较呈极显著差异 ($P<0.01$), 说明山莓叶粗提物具有较强抑制肠蠕动的的作用效果。加入乙酸乙酯层提取物前后的肠管张力差异均极显著 ($P<0.01$), 其它各层提取物 (石油醚层、氯仿层、正丁醇层、水层) 和 30%乙醇加入前后差异均不显著 ($P>0.05$), 各提取物对其频率的影响均不显著 ($P>0.05$)。

表 1 不同山莓叶提取物对兔离体肠管张力和频率的影响
($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effects of different *Rubus corchorifolius* extracts on the tension and frequency of isolated intestinal from rabbit

样品	张力/g		频率/次/分	
	加样前	加样后	加样前	加样后
粗提物	2.81±0.09	1.11±0.08**	12.28±0.77	12.16±0.11 ^Δ
石油醚层	3.12±0.26	2.59±0.12 ^Δ	13.88±0.43	13.04±1.10 ^Δ
氯仿层	3.17±0.07	2.98±0.21 ^Δ	12.80±0.25	12.80±0.58 ^Δ
乙酸乙酯层	3.23±0.21	0.87±0.04**	18.28±0.46	17.78±0.33 ^Δ
正丁醇层	1.30±0.05	1.21±0.03 ^Δ	21.86±0.67	21.00±0.14 ^Δ
水层	2.12±0.04	1.90±0.06 ^Δ	20.00±0.51	20.28±0.48 ^Δ
30%乙醇	2.77±0.04	2.62±0.14 ^Δ	13.80±0.32	13.64±0.36 ^Δ

注: **表示与给药前比较差异极显著 ($P<0.01$); ^Δ表示与给药前比较无显著差异 ($P>0.05$)。

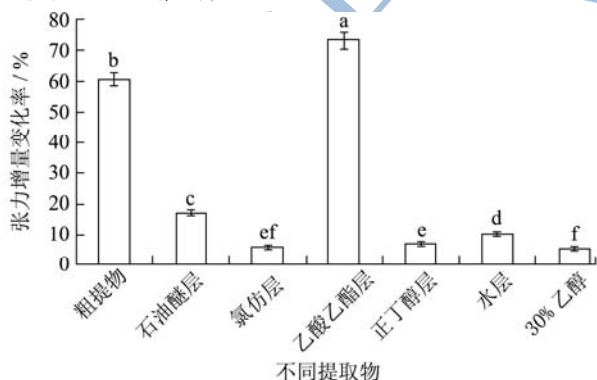


图 2 山莓叶不同提取物对兔离体肠管张力增量变化率的影响

Fig.2 Effects of different *Rubus corchorifolius* extracts on the tensional variation percentage of isolated intestinal from rabbit

2.2 不同因素处理对山莓叶粗提物抑制兔离体肠管运动活性的影响

2.2.1 不同温度对山莓叶粗提物抑制兔离体肠

管运动的影响

将山莓叶粗提物用不同温度处理后, 其抑制作用受到了不同程度的影响, 说明山莓叶中抑制兔离体肠运动的有效成分在温度的影响下受到了不同程度的破坏 (如图 3)。经 30 °C, 60 °C 处理后的山莓叶粗提物在加入 30 s 后, 肠管的收缩张力趋近于一条直线, 说明山莓叶粗提物经 30 °C 和 60 °C 处理后仍具有很高的抑制肠蠕动活性。当温度达到 90 °C 时, 加样后离体肠收缩波幅度变化较 30 °C 和 60 °C 处理的样品有所缓和, 而经 120 °C 高温处理 3 h 加样后离体肠收缩波幅度没有明显变化, 说明在高温条件下 (>90 °C), 山莓叶抑制兔离体肠运动的有效活性成分遭到了破坏。

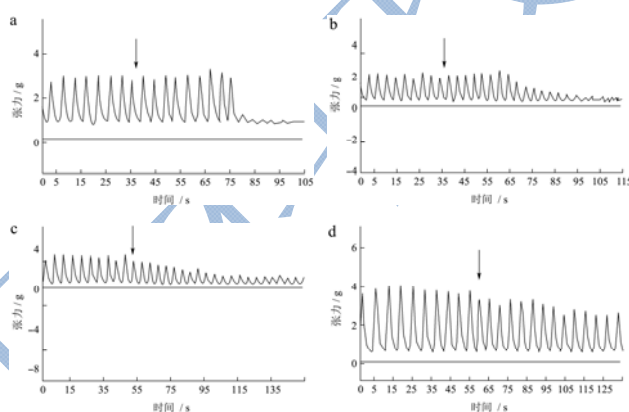


图 3 不同温度对山莓叶粗提物抑制兔离体肠运动的影响 (↓表示加样)

Fig.3 Effects of different temperatures on the movement of isolated intestinal from rabbit before and after adding *Rubus corchorifolius* extracts

注: a: 30 °C 处理 3 h; b: 60 °C 处理 3 h; c: 90 °C 处理 3 h; d: 120 °C 处理 3 h。

表 2 不同温度对山莓叶提取物抑制兔离体肠管张力和频率影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effects of different temperatures on the tension and frequency of isolated intestinal from rabbit before and after adding *Rubus corchorifolius* extracts

样品	张力/g		频率/次/分	
	加样前	加样后	加样前	加样后
30 °C 处理	2.81±0.09	1.41±0.18**	16.28±0.77	15.86±0.41 ^Δ
60 °C 处理	1.04±0.06	0.57±0.08**	15.88±0.23	15.34±0.20 ^Δ
90 °C 处理	1.57±0.05	1.03±0.23 ^Δ	14.97±0.49	14.80±0.53 ^Δ
120 °C 处理	1.67±0.11	1.38±0.14 ^Δ	15.28±0.66	14.98±0.43 ^Δ
30%乙醇	2.77±0.04	2.66±0.10 ^Δ	15.80±0.62	15.64±0.56 ^Δ

注: **表示与给药前比较差异极显著 ($P<0.01$); ^Δ表示与给药前比较无显著差异 ($P>0.05$)。

利用 SAS 软件进行加样前后兔离体肠管张力和频率显著性差异分析 (表 2), 30 °C 和 60 °C 处理的山

莓叶粗提物加样前后的肠管张力差异均极显著 ($P < 0.01$), 90 °C 和 120 °C 处理的山莓叶粗提物加样前后的肠管张力差异均不显著 ($P > 0.05$), 尤其是高温 120 °C 处理后的张力变化最小, 各处理组对其频率的影响均不显著 ($P > 0.05$)。因此, 山莓叶粗提物抑制兔离体肠运动的有效成分 30 °C~60 °C 范围内活性稳定, 但不耐高温, 经 90 °C 处理后活性下降, 而 120 °C 处理后, 抑制肠蠕动的活性已基本丧失。

不同温度对兔离体肠管张力增量变化率的影响如图 4 所示。经 30 °C 和 60 °C 处理 3 h 后的样品加入后, 兔离体肠管运动张力增量变化率分别为 49.82% 和 45.19%, 表现出很强的抑制兔离体肠运动的活性。经 90 °C 处理 3 h 后的样品加入后, 张力增量变化率为 34.39%, 与 30 °C 和 60 °C 处理后样品有显著差异 ($P < 0.05$), 说明 90 °C 处理对山莓叶抑制兔肠蠕动的活性有所减弱。120 °C 处理后样品加入后, 兔离体肠管张力增量变化率较 30 °C 处理降低了 32.45%, 山莓叶抑制兔离体肠蠕动的活性受到了抑制。

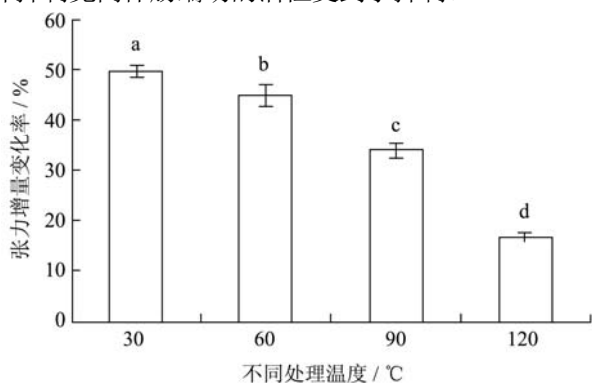


图 4 不同处理温度对兔离体肠管张力增量变化率的影响

Fig.4 Effects of different temperatures on the tensional variation percentage of isolated intestinal from rabbit

2.2.2 不同 pH 对山莓叶粗提物抑制兔离体肠管运动的影响

不同 pH 处理后的山莓叶粗提物对兔离体肠运动的影响如图 5 所示。经 pH 3 和 pH 7 处理后样品加入后, 兔离体肠收缩波幅度逐渐下降, 并可以持续降低兔离体肠管的收缩张力。而 pH 10 和 pH 13 处理后的粗提物样品加样后, 离体肠收缩波幅度与加样前相比, 已几乎不发生变化, 说明在 pH 10 和 pH 13 的处理条件下, 山莓叶中抑制兔离体肠运动的活性物质受到影响而失去活性。

利用 SAS 软件进行加样前后兔离体肠管张力和频率显著性差异分析 (表 3), 与给药前相比, pH 3 和 pH 7 处理的山莓叶粗提物加样前后, 肠管张力差异均极显著 ($P < 0.01$), 而 pH 10 和 pH 13 处理的山莓叶粗提物加样前后的肠管张力差异均不显著 ($P > 0.05$),

各处理组对其频率的影响均不显著 ($P > 0.05$)。因此, 山莓叶粗提物抑制兔离体肠运动的有效成分酸性条件下的活性最高, 中性条件下的活性次之, 碱性条件下丧失活性。

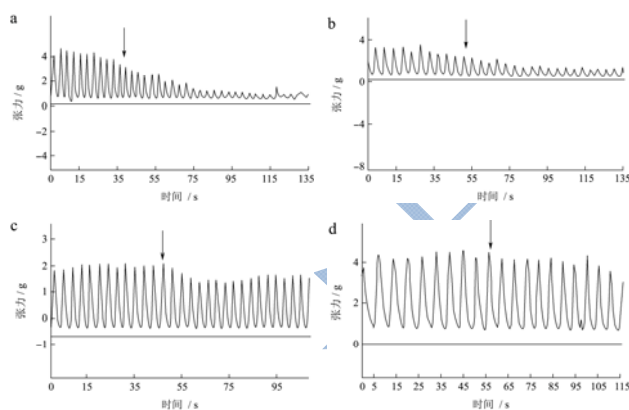


图 5 不同 pH 对山莓叶粗提物抑制兔离体肠运动的影响 (↓表示加样)

Fig.5 Effects of different pH on the movement of isolated intestinal from rabbit before and after adding *Rubus corchorifolius* extracts

注: a: pH 3; b: pH 7; c: pH 10; d: pH 13.

表 3 不同 pH 对山莓叶提取物抑制兔离体肠管张力和频率影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effects of different pH on the tension and frequency of isolated intestinal from rabbit before and after adding *Rubus corchorifolius* extracts

样品	张力/g		频率/次/分	
	加样前	加样后	加样前	加样后
pH 3 处理	1.82±0.18	0.94±0.22**	16.28±0.77	16.16±0.41 ^Δ
pH 7 处理	1.47±0.14	0.81±0.08**	14.88±0.43	15.04±1.10 ^Δ
pH 10 处理	0.98±0.04	0.77±0.05 ^Δ	14.80±0.25	14.80±0.58 ^Δ
pH 13 处理	2.10±0.09	1.85±0.06 ^Δ	14.28±0.46	14.38±0.33 ^Δ

注: **表示与给药前比较差异极显著 ($P < 0.01$); ^Δ 表示与给药前比较无显著差异 ($P > 0.05$)。

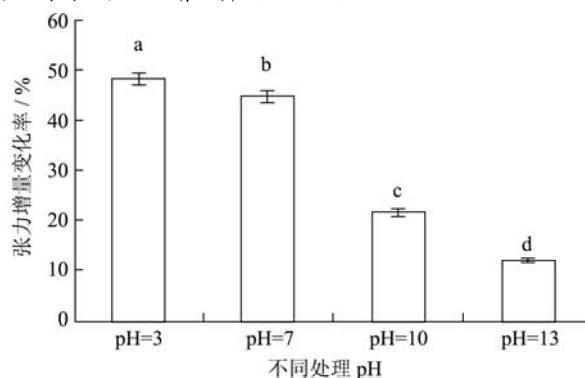


图 6 不同 pH 处理对兔离体肠管张力增量变化率的影响

Fig.6 Effects of different pH on the tensional variation percentage of isolated intestinal from rabbit

不同 pH 处理对兔离体肠管张力增量变化率的影响如图 6 所示。当 pH 3 和 pH 7 处理后的样品加入后,兔离体肠管的张力增量变化率分别为 48.35% 和 44.90%, pH 3 处理与 pH 7 处理之间有显著差异 (P<0.05), 可以得知在酸性条件下, 其活性大于中性。pH 9 和 pH 12 处理张力增量变化率仅为 21.41% 和 11.90%, 说明碱性条件下, 山莓叶中抑制肠运动活性大大降低。综上可初步判定山莓叶中有效成分 pH 偏酸性。

2.2.3 不同光质和光照时间对山莓叶粗提物抑制兔离体肠管运动的影响

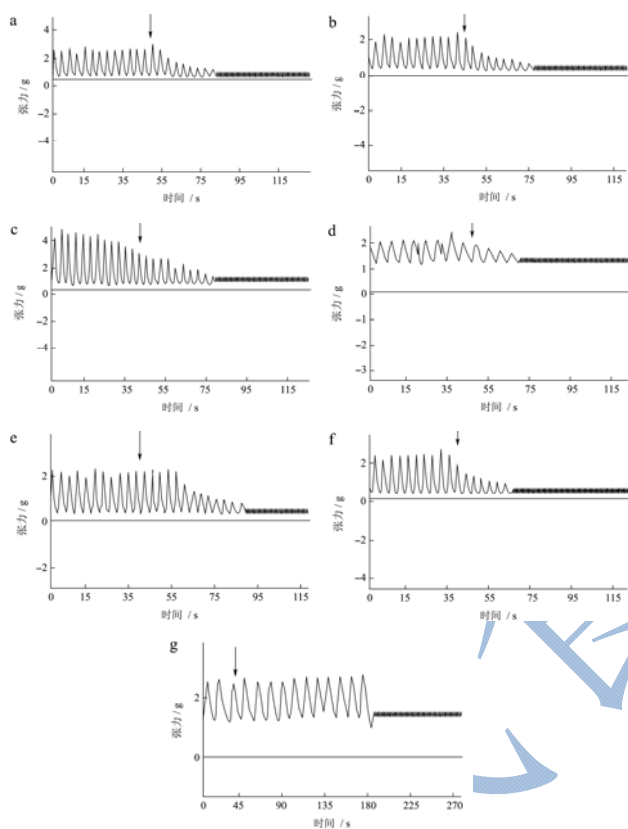


图 7 不同光质和光照时间对山莓叶粗提物抑制兔离体肠运动的影响 (↓表示加样)

Fig.7 Effects of different light qualities and different illumination time on the movement of isolated intestinal from rabbit before and after adding *Rubus corchorifolius* extracts

注: a: 紫外线照射 6 h; b: 紫外线照射 9 h; c: 紫外线照射 12 h; d: 白炽光照射 6 h; e: 白炽光照射 9 h; f: 白炽光照射 12 h; g: 暗室处理。

不同光质和光照时间处理后的山莓叶粗提物对兔离体肠运动的影响如图 7 所示。山莓叶粗提物经紫外线、白炽光照射 6 h、9 h 和 12 h 和暗室处理 12 h 后, 加样离体肠收缩波幅度变化都很明显。利用 SAS 软件进行加样前后兔离体肠管张力和频率显著性差异分析 (表 4), 各处理组加样前后的肠管张力差异均极显著

(P<0.01), 各处理组对其频率的影响均不显著 (P>0.05)。说明经不同光质和光照时间处理后, 山莓叶粗提物仍具有显著抑制兔离体肠运动的作用。

表 4 不同光质和光照时间对山莓叶提取物对兔离体肠管张力和频率影响 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

Table 4 Effects of different light qualities and different illumination time on the tension and frequency of isolated intestinal from rabbit before and after adding *Rubus corchorifolius* extracts

样品	张力/g		频率/次/分	
	加样前	加样后	加样前	加样后
紫外光照射 6 h	2.12±0.10	1.02±0.09**	14.68±0.18	14.44±0.20 ^Δ
紫外光照射 9 h	2.22±0.06	1.09±0.18**	15.16±0.52	14.54±0.43 ^Δ
紫外光照射 12 h	4.01±0.08	2.01±0.21**	15.00±0.24	14.64±0.27 ^Δ
白炽光照射 6 h	1.45±0.06	0.70±0.09**	14.74±0.15	14.42±0.11 ^Δ
白炽光照射 9 h	2.10±0.04	0.99±0.14**	15.46±0.15	14.82±0.19 ^Δ
白炽光照射 12 h	2.05±0.06	0.98±0.10**	15.00±0.24	14.64±0.27 ^Δ
暗室处理	3.15±0.09	1.40±0.18**	16.33±0.77	15.86±0.41 ^Δ

注: **表示与给药前比较差异极显著 (P<0.01); ^Δ 表示与给药前比较无显著差异 (P>0.05)。

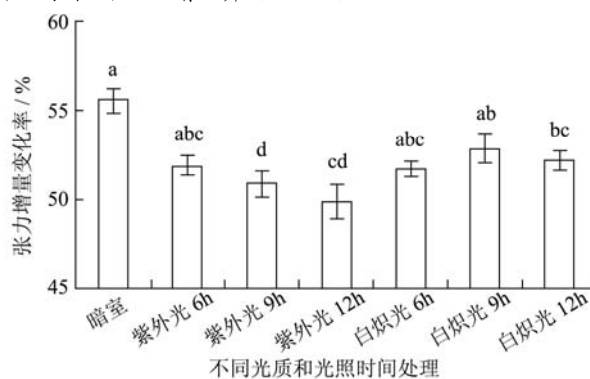


图 8 不同光质和光照时间处理对兔离体肠管张力增量变化率的影响

Fig.8 Effects of different light and illumination time on the tensional variation percentage of isolated intestinal from rabbit

不同光质和光照时间处理对兔离体肠管张力增量变化率的影响如图 8 所示。经过紫外线和白炽光照射后, 其张力增量的变化率相比暗室来说, 均有一定程度的下降。对其进行组间方差分析得出: 与暗室相比, 紫外线处理 9 h、12 h, 以及白炽光处理 12 h 样品对兔离体肠管张力增量变化率有显著降低 (P<0.05)。而紫外

光处理 6 h、白炽光处理 6 h、9 h 均无显著差异 ($P>0.05$)。结合表 4 的实验结果, 尽管不同光质和光照时间处理后, 山莓叶粗提物仍具有显著抑制兔离体肠运动的作用, 但与暗室组相比, 不同光质和光照时间处理后的各组均有不同程度的下降, 样品保存在暗室中的活性成分最稳定。

2.2.4 脱鞣质处理山莓叶醇提物对家兔离体肠运动的影响

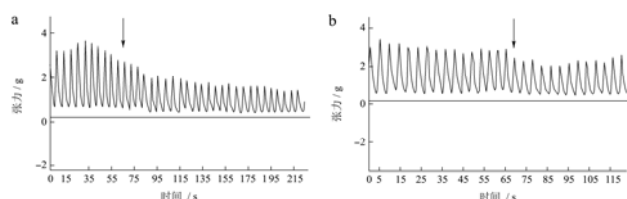


图9 脱鞣质处理对山莓叶粗提物抑制兔离体肠运动的影响(↓表示加样)

Fig.9 Effects of tannins removal treatment on the movement of isolated intestinal from rabbit before and after adding *Rubus corchorifolius* extracts

注: a: 未脱鞣质处理; b: 脱鞣质层。

由图 9 可以看出, 山莓叶粗提物经脱鞣质处理后, 加样离体肠收缩波幅度变化有所降低。利用 SAS 软件进行加样前后兔离体肠管张力和频率显著性差异分析表明, 粗提物和脱鞣质层加样前后的肠管张力差异均极显著 ($P<0.01$), 各处理组对其频率的影响均不显著 ($P>0.05$)。

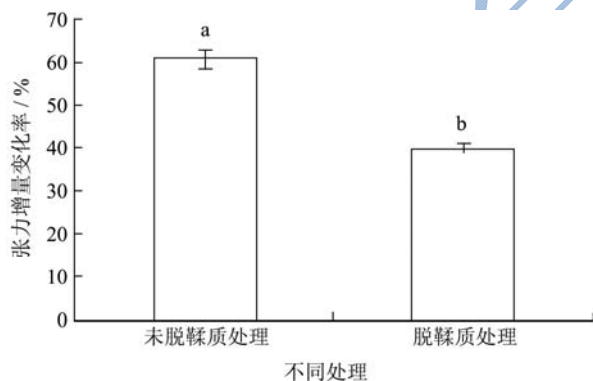


图10 脱鞣质处理山莓叶提取物抑制兔离体肠管张力增量变化的影响

Fig.10 Effects of tannins removal treatment on the tensional variation percentage of isolated intestinal from rabbit before and after adding *Rubus corchorifolius* extracts

对样品计算张力增量变化率可得(图 10), 脱鞣质样品的张力增量变化率与粗提物张力增量变化率有显著差异 ($P<0.05$), 说明山莓叶中含有的鞣质成分有抑制腹泻的效果。脱鞣质后的样品加入后, 兔离体肠张力增量变化率为 39.78%, 仍具有很高的抑制兔离体肠运动的活性, 说明还有其它的成分存在抑制肠蠕动

的效果, 因此鞣质可能是山莓起抗腹泻作用的原因之一。王丽敏等对老鹤草总鞣质的研究表明, 老鹤草总鞣质有较好的治疗腹泻作用, 可减少番泻叶或蓖麻油所引起腹泻次数, 并可显著抑制正常及推进功能亢进小鼠的墨水胃肠推进率, 提示老鹤草总鞣质具有抑制胃肠推进运动的作用^[14]。

3 结论

3.1 山莓叶山莓叶乙酸乙酯层提取物的抑制兔离体肠运动活性显著高于粗提物和其它溶剂层提取物 ($P<0.05$), 说明山莓叶中抗腹泻的活性物质主要在乙酸乙酯层, 其它层提取物抑制兔离体肠运动的活性大小依次为: 石油醚层>水层>正丁醇层>氯仿层。各提取物对兔离体肠管运动频率的影响均不显著 ($P>0.05$)。

3.2 山莓叶粗提物在 30~60 °C 范围内抑制兔离体肠运动活性稳定, 高温 (>90 °C) 条件下活性降低, 120 °C 处理活性丧失; pH 对抑制肠运动活性影响较大, 酸性条件下活性最高, 其次是中性, 碱性条件下 (pH 9~13) 活性显著受到抑制; 不同光质和不同光照时间处理后仍具有极显著抑制兔离体肠运动的作用 ($P<0.01$); 脱鞣质处理会使山莓叶醇提物抑制肠运动活性减弱, 说明鞣质可能是山莓叶抗腹泻活性成分之一。

3.3 今后将在兔离体肠活性模型追踪指导下进一步分离纯化抗腹泻活性物质, 采用核磁共振、质谱、红外等检测方法, 以期鉴定其结构, 深入揭示山莓叶抗腹泻作用机理, 为开发高效安全的新型抗腹泻药物奠定基础。

参考文献

- [1] Madikizela B, Ndhlala A R, Finnie J F, et al. Ethnopharmacological study of plants from Pondoland used against diarrhoea [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 141(1): 61-71
- [2] Hashemi S R, Davoodi H. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition [J]. Vet Res. Commun., 2011, 35(3): 169-180
- [3] Vondruskova H, Slamova R, Trckova M, et al. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review [J]. Veterinarni Medicina, 2010, 55(5): 199-224
- [4] 王世清, 潘文刚, 张志勇. 苗族药三月泡的品种鉴定和成分研究[J]. 中国民族民间医药杂志, 2002, 54(1): 47-62
WANG Shi-qing, PAN Wen-gang, ZHANG Zhi-yong. Species Identification and Ingredients Study of Sanyuepao [J].

- Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2002, 54(1): 47-62
- [5] 朱深海,侯菊溶,程天印,等.山莓粗提物对家兔离体十二指肠运动的影响[J].动物医学进展,2004,25(5):120-123
ZHU Shen-hai, HOU Ju-rong, CHENG Tian-yin, et al. The Effect of the Extraction from Rubus Corchorifolius on the Movement of Isolated Duodenum from Rabbit [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2004, 25(5): 120-123
- [6] 章丽,刘晓娟,熊平等.山莓叶醇提物对不同模型小鼠腹泻的影响[J].现代食品科技,2012,28(9):1111-1115
ZHANG Li, LIU Xiao-juan, XIONG Ping, et al. Effects of Ethanol Extracts from Rubus Corchorifolius Leaves on Different Models of Mice Diarrhea [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(9): 1111-1115
- [7] Ryu S D, Park C S, Baek H M, et al. Anti-diarrheal and spasmolytic activities and acute toxicity study of Soonkijangquebo, a herbal anti-diarrheal formula [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2004, 91(1): 75-80
- [8] Poonia B S, Sasmal D, Mazumdar P M. Anti-diarrheal activity of methanol extract of Litsea polyantha bark in mice [J]. Fitoterapia, 2007, 78(3): 171-174
- [9] Yu L L, Liao J F, Chen C F. Anti-diarrheal effect of water extract of Evodiae fructus in mice [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2000, 73(1): 39-45
- [10] 杨智超,李强,高明.复方儿茶止泻霜剂稳定性研究[J].中华中医药学刊,2013,31(8):1613-1615
YANG Zhi-Chao, LI Qiang, GAO Ming. Experimental Study on Stability of Compound Catechu anti-diarrhea Ointment [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2013, 31(8): 1613-1615
- [11] 陈雪香,谭斌,周双德,等.山莓叶抑菌活性物质的提取、抑菌效果及其化学成分初步研究[J].食品科技,2008,9:192-195
CHEN Xue-xiang, TAN Bin, ZHOU Shuang-de, et al. Preliminary Research on Extraction, Antibiotic Effect and Chemical Constituents of Rubuscor Chorifolius Leaves Extract [J]. Food Science and Technology, 2008, (9): 192-195
- [12] 肖仔君,杨汝德,黄国清.西藏雪莲中乳酸菌的分离鉴定及抑菌活性的研究[J].现代食品科技,2009,25(3):249-251
XIAO Zi-jun, YANG Ru-de, HUANG Guo-qing. Isolation and Identification of a Strain of Lactic Acid Bacteria in Fermented Saussurea Involucrate and its Bacteriostatic Action [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(3): 249-251
- [13] Jing Hu, Wen-Yuan Gao, Ning-Sheng Ling, et al. Antidiarrhoeal and intestinal modulatory activities of Wei-Chang-An-Wan extract [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 125: 450-455
- [14] 王丽敏,卢春风,路雅真,等.老鹳草鞣质类化合物的抗腹泻作用研究[J].黑龙江医药科学,2003,26(5):28-29
WANG Li-min, LU Chun-feng, LU Ya-zhen, et al. Effects of tannin compounds from Geranium on anti-diarrheal activity [J]. Heilongjiang Pharmaceutical Sciences, 2003, 26(5): 28-29