嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號:	CNPH9504
計畫名稱:	台灣民間藥活性研究-抗糖尿病活性、尿酸活性評估及作
	用機轉研究

執行期間:95年1月1日至95年12月31日

■整合型計畫	□個別型計畫
計畫總主持人:張建雄	計畫主持人:
子計畫主持人:楊竹茂	
	1
-	
//	

中華民國九十六年二月二十日

中文摘要

本研究計劃系群體總計畫中草藥研究與應用開發(I)-台灣民間藥之研究與應用開發之子計畫,主要探討菊花木及小葉冷水麻之抗尿酸活性。

抗尿酸活性的測定,先以 Oxonic acid (一種尿酸酶抑制劑)誘導小白鼠升高血清尿酸濃度,再觀察投予不同劑量之中草藥萃取物溶液後對小鼠血清尿酸濃度的抑制程度。

血清尿酸濃度之測定採用高壓色層分析法,以逆相 RP-18 管柱配合乙氰/醋酸緩衝液(pH 5.0)作為移動相,在 292 nm 波長偵測下進行定量分析。

由實驗結果得知,小葉冷水麻萃取物在 10-100 μg/mL 濃度範圍內,對血清尿酸濃度呈現顯著劑量相關性的抑制作用,而菊花木並物顯著的降尿酸的作用。前者的作用機轉與有效成分值得進一步的研究。

關鍵字:降尿酸作用、小葉冷水麻、菊花木

計畫緣由與目的

本計畫為總計劃「中草藥研究與應用開發(I)-台灣民間藥之研究與應用開發」之子計畫。本計劃旨在評估菊花木與小葉冷水麻對 Oxonic acid 誘導小白鼠高尿酸血症之降尿酸之活性。

菊花木為豆科(Leguminosae)植物 Bauhinia championii Benth.,又

名為「龍鬚藤」,有袪風除濕、活血止痛之功效,可治風濕性關節炎、腰腿痛、跌打損傷及胃痛等,據記載,菊花木還是治療百步蛇咬傷的特效藥。在去年計畫(CNPH-94-01)的研究中發現其具有最強的抑制Xanthine oxidase 的抗氧化效果;小葉冷水麻為蕁麻科一年生的草本植物 Pilea microphylla L.,有清熱、解毒、利濕、安胎之功效,民間用於治肺病、肝炎、咽喉痛、癰瘡腫傷、創傷、燙火傷。此外,也常被用於治療痛風症,據傳效果非常顯著。

為了瞭解上述兩種台灣常見的民間草藥是否具有降尿酸的效果,乃進行本研究計畫。

材料與方法

- I. 試藥及其他耗材: 尿酸(Uric acid)及 Potassium oxonate 購自 Sigma 公司,其他試藥皆為西德 E. Merck 產品。
- II. 動物:ICR 小白鼠,雌雄不拘,6~8 週齡,體重 25~30 公克,由奇美醫學中心供應。實驗前隨機分成空白組、誘導組、正反應組、菊花木組 [含低(10 mg/kg)、中(50 mg/kg)、高(100 mg/kg)劑量組]與小葉冷水麻組 [含低(10 mg/kg)、中(50 mg/kg)、高(100 mg/kg)劑量組]等組,每組6隻。各組動物在實驗前皆飼養於室溫維持於 25±2℃動物房內至少一週。

III. 儀器: 高壓色層分析儀(Shimadzu LC 10-AD),配備 SPD-10A 紫外光/可視光偵測器、SCL-10A 訊號控制器及 SIL-10A 自動注射器。

IV. 藥材萃取物: 菊花木酒精萃取物由總計劃主持人供應,小葉冷水麻 (1.6 kg)採自雲林縣古坑鄉華山。全草洗淨細切後,以 50%酒精加熱回流 3 小時,萃取液經過濾後,殘渣以同溶劑再次萃取及過濾,合併滤液,以減壓濃縮機濃縮至乾。

V. 高尿酸血症之誘導及藥物投予

- 1. Potassium oxonate 懸濁液之配製: 秤取 375 mg 於乳缽, 加入 10 mg Na CMC 及 2 滴 Tween-80, 加入適量水以研杵研磨成 10 ml 懸濁液
- 2.高尿酸血症之誘導,以腹腔注射(i.p.)方式給予 250 mg/kg 之 potassium oxonate,經1小時後自小鼠心臟抽血1 mL 至離心管,放置室溫令其自然凝固,取出血塊後於 2000 rpm 離心十分鐘,吸出上層血清供測定尿酸濃度。
- 3. 藥物投予:各組動物每日早、晚以餵食管餵食定量之 allopurinol (10 mg/kg; 正反應組)、菊花木萃取物(10、50、100 mg/kg)及小葉冷水麻翠取物(10、50、100 mg/kg)連續二星期。最後一次投藥後依上述(V. 2) 之方法誘導並取血樣供測。

VI. 血清中 Uric acid 濃度 HPLC 測定法

1. 尿酸標準溶液(10, 20, 50, 100, 200 μg/mL)之配置

- (1)精確稱取 100 mg 之尿酸置於 100-mL 容量瓶,以少量 0.1N NaOH 溶解,以水稀釋至刻度 (最終濃度:1000 μg/mL)。
- (2)各精確量取上液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mL 至 10-mL 容量瓶中,各以水稀釋至刻度(最終濃度:10, 20, 50, 100, 200 μg/mL)。

2. HPLC 分析條件

Column: LiChrosphere RP-18, 5 mm, 250 x 4 mm

Detection: 292 nm

Flow Rate: 1 mL/min

Injection volume: 20 μL

Mobile Phase: sodium acetate (35 mmol/L, pH 5.0)/MeCN=9/1)

- 3. **標準線製作**:取各標準液 100 μL 於 1.5-mL Eppendorf tube 中,各加 100 μL MeCN,經 Votex 震盪 10 秒,注射 20 μL 於 Column。

結果與討論

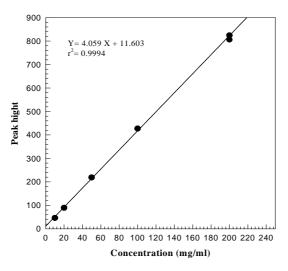
I. 尿酸之典型圖譜

(a) (b)

Figure 1. (a) The typical chromatogram of uric acid
(b) The chromatogram of uric acid in serum of mice induced by

i.p. injection of potassium oxonate (250 mg/kg)

II. 尿酸之校正曲線



Calibration curve for the determination of uric acid in serum

Fig. 2. The calibration curve for the determination of uric acid in serum of mice

III. 菊花木及小葉冷水麻之降尿酸活性

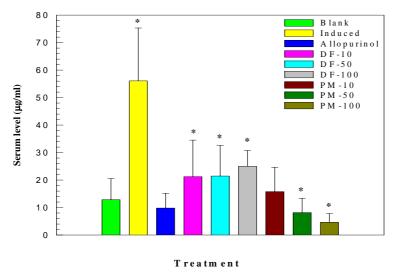


Fig. 3 The hypouricemic effects of DF and PM extracts on the hyperuricemic mice induced by oxonic acid \ast Statistically significant from blank group, p<0.01

D F : D ischidia form o sana M axim ; P M : Pilea m icrophylla (L .) 10 : 10 $\,\mu$ g/m l; 50 : 50 $\,\mu$ g/m l; 100 : 100 $\,\mu$ g/m l

由圖 1 及圖 2 顯示以 HPLC 方法測定血清中尿酸濃度是一種可靠的分析方法,不僅在短時間內即可測出,而且準確。雖然血清中之某些成分可能干擾到尿酸之波峰,然而在本研究中採用波峰高度對濃度作圖即可排除其干擾而得到精確測定的目的。

由圖 3 顯示小葉冷水麻在 10~100 mg/kg 劑量範圍能呈現劑量相關的抑制尿酸的形成,其活性不亞於正反應組 allopurinol (100 mg/kg)之活性。雖然菊花木也具有某些程度的抑制作用,然而在實驗中發現其萃取物具有毒性,實驗中即有數隻小鼠死亡,經解剖後觀察到小腸膨脹,其中充滿氣體。實驗終止後,將犧牲的動物解剖仍能觀察到類似的情形。有關其毒性之病理機轉有待進一步的探討。相反的,小葉冷水麻再整個實驗過程中並未顯現任何毒性。

小葉冷水麻之降尿酸活性及有效成分尚未見到相關文獻報告,由 本研究所觀察到的結果,顯現出其為有效且安全的台灣本土藥草,值 得再進進行詳細且大規模的探討。

参考文獻

- 1. Ole Christian Ingebretsen, Jan Borgen, and Mikael Farstad, "Uric Acid Determinations: Reversed-Phase Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection Compared with Kinetic and Equilibrium Adaptations of the Uricase Method", Clin. Chem., 28: 496-498, 1982.
- 2. Mftsunao Tanaka and MichIoHam, "ImprovedRapid Assay of Unc Acid in Serum by LiquidChromatography", Clin. Chem. 34: 2567-2568, 1988.
- 3. Hediger, Matthias A., "Kidney function: Gateway to a long life?", Nature, 417:393, 395, 2002.
- 4. Mazzali, Marilda; Hughes, Jeremy; Kim, Yoon-Goo; Jefferson, J. Ashley; Kang, Duk-Hee; Gordon, Katherine L.; Lan, Hui Y.; Kivlighn, Salah; Johnson and Richard J., "Elevated Uric Acid Increases Blood Pressure in the Rat by a Novel Crystal-Independent Mechanism", Hypertension, 38:1101-1106, 2001.
- 5. K.R. Prabhakar, V.P. Veerapur, Punit Bansal, Vipan Kumar Parihar, Machendar, Reddy Kandadi, P. Bhagath Kumar, K.I. Priyadarsini, and M.K. Unnikrishnan, "Antioxidant and radioprotective effect of the active fraction of *Pilea microphylla* (L.) ethanolic extract", Chemico-Biol. Interact., 165: 22–32, 2007.