

# 郁杖丹的提取工艺及其保肝作用研究

金娅玮<sup>1</sup>, 周婧<sup>2</sup>, 潘建明<sup>3</sup>, 张如松<sup>1</sup>, 杨苏蓓<sup>3\*</sup> (1.浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2.杭州市西溪医院, 杭州 310023; 3.浙江省中药研究所有限公司, 杭州 310023)

**摘要:** 目的 确定郁杖丹的最佳提取工艺, 研究郁杖丹提取物对 CCl<sub>4</sub> 所致小鼠急、慢性肝损伤的保护作用。方法 以川芎中的阿魏酸含量为考察指标, 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验, 考察乙醇浓度、乙醇用量、提取时间及次数对醇提工艺的影响; 以虎杖中的虎杖苷含量为考察指标, 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验, 考察加水量、提取时间及提取次数对水提工艺的影响; 以 0.125% CCl<sub>4</sub> 10 mL·kg<sup>-1</sup> 腹腔注射制备小鼠急性肝损伤模型, 检测血清 ALT、AST 水平, 评价郁杖丹提取物对小鼠急性肝损伤的保护作用; 以 20% CCl<sub>4</sub> 5 mL·kg<sup>-1</sup> 皮下注射, 每 5 天 1 次, 连续 8 周制备小鼠慢性肝损伤模型, 以血清 ALT、AST、肝脏病理组织学等为评价指标, 评价郁杖丹提取物对小鼠慢性肝损伤的保护作用。结果 川芎等最佳醇提工艺: 5 倍量 70% 乙醇, 提取 1 次, 加热回流 1.5 h; 虎杖等最佳水提工艺: 10 倍量水, 提取 3 次, 每次 1 h。郁杖丹高剂量组能显著降低急性肝损伤小鼠的血清 ALT、AST ( $P < 0.05$ ); 郁杖丹各剂量组均能降低慢性肝损伤小鼠的血清 ALT、AST ( $P < 0.05$ ), 减轻小鼠肝脏病理损伤程度。结论 确定的郁杖丹最佳提取工艺简便, 有效成分提取率高, 稳定性好。郁杖丹提取物有对 CCl<sub>4</sub> 引起的小鼠急、慢性肝损伤具有一定的保护作用。

**关键词:** 郁杖丹; 肝损伤; 提取工艺

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)01-0062-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.01.015

## Study on Extraction Technology and Liver Protection of Yuzhang Pills

JIN Yawei<sup>1</sup>, ZHOU Jing<sup>2</sup>, PAN Jianming<sup>3</sup>, ZHANG Rusong<sup>1</sup>, YANG Subei<sup>3\*</sup> (1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Xixi Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310023, China; 3. Zhejiang Research Institute of Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Hangzhou 310023, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To optimize the extraction process of Yuzhang pills and study on its protective effect of acute and chronic liver injury in mice induced by CCl<sub>4</sub>. **METHODS** L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test was used to investigate the ethanol concentration, amount of alcohol, extraction time and times, with the content of offerulic acid as an index. L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test was used to investigate the amount of water, extraction time and extraction times, with the content of polydatin as an index. 0.125% CCl<sub>4</sub> (10 mL·kg<sup>-1</sup> intraperitoneal injection)-induced acute liver injury model was established in mice, and the liver protection of Yuzhang pills extract was evaluated by the AST and ALT in serum. The chronic hepatic model was built by hypodermic injection of 20% CCl<sub>4</sub> (5 mL·kg<sup>-1</sup>), 5 d one time for 8 weeks, and the liver protection of Yuzhang pills extract was evaluated by the AST and ALT in serum, pathological changes of liver. **RESULTS** The best extraction process of Chuanxiong Rhizoma and Curumae Radix were using 5 times of 70% ethanol, extract one time for 1.5 h. The best extraction process of Polygoni Cuspidati Rhizoma Et Radix and other herbs were using 10 times of water, extract 3 times for 1.0 h. The high dose group of Yuzhang pills extract could significantly decrease the level of ALT and AST in acute hepatic mice induced by CCl<sub>4</sub> ( $P < 0.05$ ). All groups of Yuzhang pills extract could significantly decrease the level of ALT and AST in chronic hepatic mice induced by CCl<sub>4</sub> ( $P < 0.05$ ), reduced the liver pathological damage degree. **CONCLUSION** The optimum extraction process of Yuzhang pills is simple, high extraction yield and stable. Yuzhang pills extract has protective effect on the acute and chronic hepatic injury induced by CCl<sub>4</sub> in mice.

**KEY WORDS:** Yuzhang pills; liver injury; extraction process

郁杖丹是浙江大学医学院附属第一医院临床应用多年的经验方, 用于急、慢性肝炎的治疗。郁杖丹由虎杖、积雪草、川芎、郁金、金钱草组成, 虎杖为君药, 具有祛风除湿、散瘀定痛、保肝利胆之功效<sup>[1]</sup>; 积雪草清热祛湿, 消肿排毒<sup>[2]</sup>; 川芎活血行气、祛风止痛<sup>[3]</sup>, 与积雪草同为臣药;

郁金利胆退黄、活血行气、止血止痛、静心解郁<sup>[4]</sup>, 为方中佐药; 金钱草祛湿降黄、利尿消肿、清热解毒<sup>[5]</sup>, 为使药, 5 味药共奏活血化瘀, 清热祛湿, 利胆退黄之功效。目前, 郁杖丹以汤剂形式应用于临床。

本实验采用水提和醇提对郁杖丹中不同药材

作者简介: 金娅玮, 女, 硕士生 Tel: 17826865002 E-mail: jinyawei@163.com  
博导 Tel: (0571)85229722 E-mail: yangsp@mail.hz.zj.cn

\*通信作者: 杨苏蓓, 女, 硕士, 教授级高工,

进行提取,并通过正交试验确定其最佳提取工艺;采用  $\text{CCl}_4$  制备小鼠急、慢性肝损伤模型,观察郁杖丹对肝损伤的保护作用,为郁杖丹的临床使用以及将其进一步开发成保肝护肝的中药新药提供部分动物实验基础。

## 1 材料与仪器

### 1.1 动物

健康 ICR 小鼠 60 只,♂,清洁级,体质量  $(20 \pm 2)\text{g}$ ,合格证号:SYXK(浙)2010-0166,由浙江省医学科学院实验动物中心提供。

### 1.2 仪器

Agilent1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); R-501 旋转蒸发仪(上海申顺生物科技有限公司); W501 升降恒温水浴锅(上海申顺生物科技有限公司); SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); ME204E 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); 98-1-B 型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司); 日立 7020 全自动生化分析仪(日立 HITACHI); TD5A 台式低速离心机(湖南长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

### 1.3 试药

虎杖(产地湖北)、积雪草(产地云南)、金钱草(产地四川)、川芎(产地云南)、郁金(产地广西)药材均购自浙江华东医药股份有限公司,经浙江中医药大学张如松教授鉴定,符合中国药典 2015 年版相关项下的规定;郁杖丹提取物(由浙江省中药研究所有限公司制备,  $13\text{ g 生药}\cdot\text{mL}^{-1}$ );虎杖苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111575-200502,纯度  $>98\%$ );阿魏酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110773-201313,含量:  $99\%$ );联苯双酯滴丸(万邦德制药集团股份有限公司,批号: A02140820);甲醛溶液(上海凌峰化学试剂有限公司,批号: 20131125);四氯化碳(上海凌峰化学试剂有限公司,批号: 20121014);ALT、AST 试剂盒(德国 DiaSys Diagnostico Systems GmbH,批号: 07137, 07218);乙腈、甲醇(美国 TEDIA 公司,色谱纯)。

## 2 方法与结果

郁杖丹处方中,川芎、郁金主要含有挥发油、内酯等脂溶性成分,易溶于乙醇,采用乙醇提取;虎杖、积雪草、金钱草主要成分为苷类、黄酮类等,易溶于热水,采用水提取;对提取工艺分别进行了正交试验。

## 2.1 川芎、郁金醇提工艺的研究与结果

**2.1.1 阿魏酸含量测定** 色谱柱: Diamonsil  $(250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}, 5\ \mu\text{m})$ ; 流动相: 甲醇-1%醋酸溶液  $(30:70)$ ; 流速:  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 柱温:  $30\text{ }^\circ\text{C}$ ; 检测波长:  $321\text{ nm}$ 。以阿魏酸计理论板数  $>4\ 000$ 。

对照品溶液的制备:精密称取以五氧化二磷作为干燥剂减压干燥 24 h 的阿魏酸对照品  $3.51\text{ mg}$ ,置  $25\text{ mL}$  棕色量瓶中,加 70%甲醇稀释至刻度,摇匀得  $140.4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  对照品溶液。

供试品溶液的制备:精密称取 2 个处方量川芎、郁金共 9 份,按表 1 安排试验,加入乙醇,回流提取,浓缩、取  $1\text{ mL}$  浓缩液至  $25\text{ mL}$  棕色量瓶,用 70%甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,作为供试品溶液。

标准曲线的制备:精密吸取对照品溶液  $1\text{ mL}$  至  $10\text{ mL}$  棕色量瓶中,加 70%甲醇稀释至刻度,摇匀,制成  $14.04\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的溶液。精密吸取上述溶液  $0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0\text{ mL}$  分别置于  $10\text{ mL}$  棕色量瓶中,加 70%甲醇稀释至刻度,摇匀,依次吸取  $10\ \mu\text{L}$  进样,记录峰面积,以峰面积为纵坐标  $Y$ ,浓度为横坐标  $X$ ,作标准曲线,得到回归方程为  $Y=30.064X-2.873\ 9$ ,  $r=0.999\ 4$ ,在浓度为  $4.21\sim 28.08\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时与峰面积呈较好的线性关系。

样品测定:分别精密吸取供试品溶液  $10\ \mu\text{L}$ ,按上述色谱条件依次测定,以外标法计算阿魏酸的含量,结果见图 1~2。

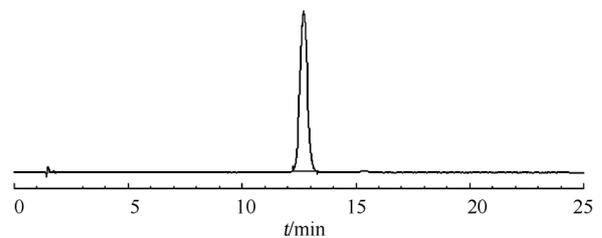


图 1 阿魏酸对照品溶液 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of ferulic acid reference solution

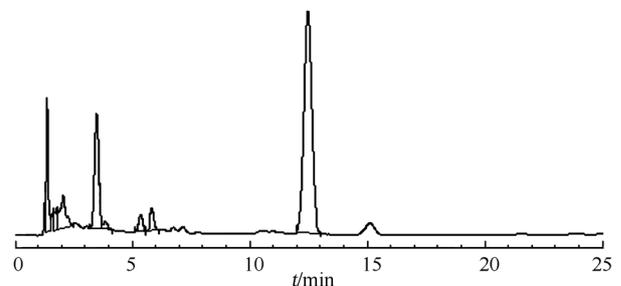


图 2 郁杖丹醇提溶液 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of Yuzhang pills alcohol extraction

**2.1.2 正交试验的方法设计与结果** 选择影响常规醇提工艺的 4 个因素, 即乙醇浓度、乙醇用量、提取次数及时间, 因素水平设计见表 1。采用  $L_9(3^4)$  正交表进行试验, 以阿魏酸含量为检测指标, 然后进行极差分析和方差分析, 结果见表 2~3。

表 1 醇提工艺正交试验因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of alcohol extraction process

水平	因素			
	乙醇的浓度 A/%	空白 B	乙醇的用量 C/倍	提取次数及 时间 D/次
1	50		5	1(1.5 h)
2	70		7	2(1.5, 1.0 h)
3	90		9	3(1.5, 1.0, 1.0 h)

表 2 正交试验设计与结果

Tab. 2 The design and results of orthogonal test

试验号	乙醇的浓度 A/%	空白 B	乙醇的用量 C/倍	提取次数及 时间 D/次	阿魏酸含 量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	1	1	1	1	0.72
2	1	2	2	2	0.96
3	1	3	3	3	1.12
4	2	1	2	3	1.01
5	2	2	3	1	0.99
6	2	3	1	2	0.96
7	3	1	3	2	0.50
8	3	2	1	3	0.60
9	3	3	2	1	0.42
Ij	2.80	2.23	2.28	2.13	
IIj	2.96	2.55	2.39	2.42	
IIIj	1.52	2.50	2.61	2.73	
R	1.44	0.32	0.33	0.60	

表 3 方差分析

Tab. 3 Variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A(乙醇浓度)	0.41	2	0.21	20.5	$P<0.05$
B(空白)	0.02	2	0.01		
C(乙醇用量)	0.02	2	0.01		
D(次数及时间)	0.06	2	0.03	3.00	无
误差(B+C)	0.04	4			

注:  $F_{0.1}(2,4)=4.32$ ,  $F_{0.05}(2,4)=6.94$ ,  $F_{0.01}(2,4)=18$ 。

Note:  $F_{0.1}(2,4)=4.32$ ,  $F_{0.05}(2,4)=6.94$ ,  $F_{0.01}(2,4)=18$ 。

通过直观分析表可以得出, 最佳提取工艺为  $A_2C_3D_3$ , 从方差分析结果可知, 因素 C 对实验结果几乎无影响, D 对实验结果影响不大, 从降低能耗, 节约成本的方面考虑, 确定乙醇提取的最佳工艺条件为  $A_2C_1D_1$ , 即用 5 倍量 70%乙醇, 提取 1 次, 加热回流 1.5 h。

**2.1.3 醇提工艺验证试验** 按处方比例, 分别取 12 个处方量川芎、郁金, 共 4 份, 按照上述最佳提取工艺进行提取, 回收乙醇, 浓缩, 分别测定提

取物的固体含量以及阿魏酸的含量, 结果见表 4。  
 提取物固体含量( $\%$ )= $(W \times V)/(10 \times 288) \times 100\%$   
 $W$ : 提取物固体净重/g;  $V$ : 药液总体积/mL; 10: 测提取物固体含量所需体积/mL; 288: 药材总质量/g。

表 4 工艺验证结果( $n=3$ )

Tab. 4 Results of process validation( $n=3$ )

样品号	阿魏酸含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	提取物固体含量/ $\%$
1	0.98	8.98
2	1.01	9.25
3	0.95	8.56
平均值	0.98	8.93

## 2.2 虎杖、积雪草、金钱草的水提工艺研究与结果

**2.2.1 含量测定** 色谱柱: Diamonsil(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈-水(22:78); 流速: 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 检测波长: 306 nm。以虎杖苷计理论板数  $>3\ 000$ 。

对照品溶液的制备: 精密称取以五氧化二磷作为干燥剂减压干燥 24 h 的虎杖苷对照品 22.0 mg, 置 100 mL 棕色量瓶中, 加稀乙醇稀释至刻度, 摇匀, 精密移取 4 mL 至 10 mL 棕色量瓶中, 加稀乙醇稀释至刻度, 摇匀, 制成 88.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  对照品溶液。

供试品溶液的制备: 精密称取 2 个处方量的虎杖、积雪草和金钱草共 9 份, 按表 5 安排试验, 加水提取, 滤过、浓缩。取 1 mL 浓缩液至 25 mL 棕色量瓶, 用稀乙醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 作为供试品溶液。

标准曲线的制备: 精密移取对照品溶液 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 mL 分别于置 10 mL 棕色量瓶中, 加稀乙醇稀释至刻度, 摇匀, 依次吸取 10  $\mu\text{L}$  进样, 记录峰面积, 以峰面积为纵坐标  $Y$ , 浓度为横坐标  $X$ , 作标准曲线, 得到回归方程为:  $Y=14.064X+11.93$ ,  $r=0.999\ 8$ , 在 44.0~154.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时与峰面积呈较好的线性关系。

样品测定: 分别精密吸取供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 按上述色谱条件依次测定, 以外标法计算虎杖苷的含量, 结果见图 3~4。

**2.2.2 正交试验的方法设计与结果** 选择影响常规水提工艺的 3 个因素, 即提取次数、加水量、提取时间, 因素水平设计见表 5。采用  $L_9(3^4)$  正交表进行试验, 以虎杖苷含量为检测指标, 然后进行极差分析和方差分析, 结果见表 6~7。

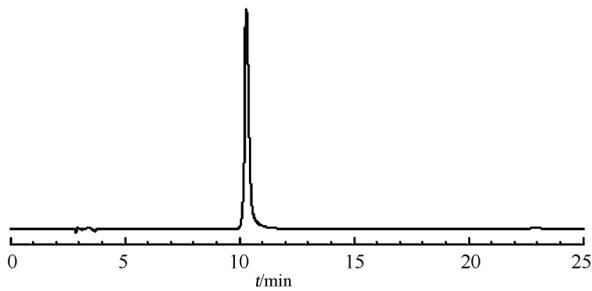


图3 虎杖苷对照品溶液 HPLC 色谱图  
Fig. 3 HPLC chromatogram of polydatin reference solution

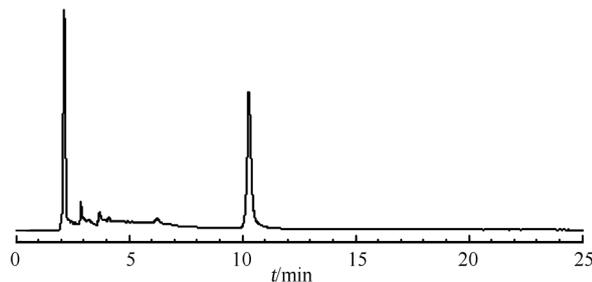


图4 郁杖丹水提溶液 HPLC 色谱图  
Fig. 4 HPLC chromatogram of Yuzhang pills water extraction

表5 水提工艺正交试验因素水平表

水平	因素		
	提取次数 A/次	加水量 B/倍	提取时间 C/h
1	1	8	1
2	2	10	1.5
3	3	12	2

表6 正交试验设计与结果

试验号	提取次数	加水量	提取时间	空白	虎杖苷含量/ mg·g <sup>-1</sup>
	A/次	B/倍	C/h		
1	1	1	1	1	7.22
2	1	2	2	2	10.64
3	1	3	3	3	8.15
4	2	1	2	3	15.60
5	2	2	3	1	20.09
6	2	3	1	2	13.91
7	3	1	3	2	18.23
8	3	2	1	3	19.30
9	3	3	2	1	18.79
Ij	26.01	41.05	40.43	46.10	
IIj	49.60	50.03	45.03	42.78	
IIIj	56.32	40.85	46.47	43.05	
R	30.31	9.18	6.04	3.32	

表7 方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A(提取次数)	168.92	2	84.46	74.74	<0.05
B(加水量)	18.32	2	9.16	8.11	>0.05
C(提取时间)	6.63	2	3.32	2.93	>0.05
D(误差)	2.26	2	1.13		

注:  $F_{0.01}(2, 2)=99.0$ ,  $F_{0.05}(2, 2)=19.0$ ,  $F_{0.10}(2, 2)=9.0$ 。

Note:  $F_{0.01}(2, 2)=99.0$ ,  $F_{0.05}(2, 2)=19.0$ ,  $F_{0.10}(2, 2)=9.0$ 。

通过直观分析表可以得出, 最佳提取工艺为  $A_3B_2C_3$ 。从方差分析结果可知, 因素 A 的水平变化对实验结果影响显著, 因素 B、C 对实验结果影响不大。从降低能耗, 节约成本的方面考虑, 确定水提取的最佳工艺条件为  $A_3B_2C_1$ , 即用 10 倍量水, 提取 3 次, 每次 1.0 h。

正交试验结果显示, 提取次数对虎杖苷含量影响显著, 并且提取 3 次为最佳次数, 但 3 次以上提取次数未列入考察, 故比较了提取 3 次与 4 次对虎杖苷含量的影响, 结果见表 8。

表8 补充试验结果

提取次数/次	虎杖苷含量/mg·g <sup>-1</sup>
3	19.46
4	20.06

由表 8 可知, 提取 3 次与提取 4 次, 其虎杖苷的含量相差不大。故水提工艺的最佳提取工艺为: 10 倍量水, 提取 3 次, 每次 1.0 h。

**2.2.3 水提工艺验证试验** 按处方比例, 分别取 12 个处方量水提部分药材, 共 3 份, 按照上述最佳提取工艺进行提取, 并测定提取物的固体含量及虎杖苷的含量, 结果见表 9。提取物固体含量(%)= $(W \times V) / (10 \times 648) \times 100\%$ 。其中  $W$ : 提取物固体净重/g;  $V$ : 药液总体积/mL; 10: 测提取物固体含量所需体积/mL; 648: 药材质量/g。

表9 工艺验证结果(n=3)

样品号	虎杖苷含量/mg·g <sup>-1</sup>	提取物固体含量/%
1	19.39	22.77
2	19.44	21.13
3	19.40	23.13
平均值	19.41	22.34

## 2.3 郁杖丹提取物保肝作用的研究与结果

**2.3.1 对小鼠急性肝损伤的影响** 50 只 ICR 小鼠按体质量随机分成 5 组: 正常组、模型组、郁杖丹提取物高、低剂量组(高剂量折合生药为  $26 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 低剂量折合生药  $13 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、阳性药组(联苯双酯滴丸<sup>[6]</sup>  $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 给药前饲养 1 周, 灌胃给药, 1 天 1 次, 连续给药 10 d, 期间各组小鼠统一用标准饲料喂养。至末次给药后 1 h, 除正常组腹腔注射  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  的花生油外, 剩余各组均腹腔注射  $0.125\% \text{ CCl}_4$  花生油溶液  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。24 h 后摘眼球取血, 取血前 12 h 禁食不禁水, 静置 30 min,  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取血清测定

ALT、AST 活性。

采用方差分析和  $t$  检验, SPSS 16.0 统计软件处理, 统计数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $P < 0.05$  为具有统计学意义。

**2.3.2 小鼠急性肝损伤实验结果** 模型组的 ALT、AST 明显增高, 与正常组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 说明急性肝损伤模型成立。郁杖丹提取物高剂量组的 ALT、AST 水平均低于模型组, 具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 低剂量组与模型组相比无统计学差异; 阳性药组与模型组相比, ALT 具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), AST 有统计学差异 ( $P < 0.05$ ); 高剂量组与阳性药组相比, ALT、AST 均差异性不显著, 低剂量组与阳性药组相比, AST 差异不显著, 结果见表 10。

**2.3.3 对小鼠慢性肝损伤的影响** 60 只 ICR 小鼠平均分成 6 组: 正常组、模型组、郁杖丹提取物高、中、低剂量组(高剂量折合生药为  $52 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 中剂量折合生药为  $26 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 低剂量折合生药  $13 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、阳性药组(联苯双酯滴丸  $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 给药前饲养 1 周, 灌胃给药, 每天 1 次, 连续 8 周, 期间各组小鼠统一用标准饲料喂养。同时, 除正常组皮下注射花生油溶液外, 其余各组均皮下注射 20%  $\text{CCl}_4$  花生油溶液<sup>[7]</sup>,  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 5 d 1 次。末次给药后 24 h 摘眼球采血, 采血前 16 h 禁食不禁水, 静置 30 min,  $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取血清测定 ALT、AST 活性。同时, 取肝脏, 用

10% 甲醛溶液固定, 取肝右叶石蜡包埋、制备病理切片, HE 染色<sup>[8]</sup>, 树脂封片,  $10 \times 10$  倍光镜下观察肝脏组织病理学变化。

采用方差分析和  $t$  检验, SPSS 16.0 统计软件处理, 统计数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $P < 0.05$  为具有统计学意义。

**2.3.4 小鼠慢性肝损伤实验结果** 模型组与正常组比较, 血清中的 ALT、AST 明显增高, 有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 说明慢性肝损伤模型成立。郁杖丹提取物各剂量组 ALT、AST 水平均低于模型组, 有统计学差异 ( $P < 0.05$ ); 阳性药组与模型组相比, ALT 有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), AST 有统计学差异 ( $P < 0.05$ ); 高剂量组与阳性药组相比, ALT、AST 均差异性不显著, 中、低剂量组与阳性药组相比, AST 差异性不显著, 结果见表 11。

外观观察, 正常组小鼠的肝脏水润、柔软、表面光滑、颜色鲜艳呈红褐色, 模型组的肝脏灰白、暗淡无光、质地较硬、体积增大; 郁杖丹提取物高、中剂量组和阳性药组与模型组比较, 肝脏外观有不同程度的改善。光镜下观察, 正常组肝细胞未变性, 未见炎症细胞, 质地均匀; 模型组可见大片肝细胞坏死, 汇管区有大量炎症细胞浸润, 且肝组织脂肪变性, 出现散在大小不等的大空泡; 与模型组比较, 郁杖丹提取物各剂量组和阳性药组的肝脏组织均有不同程度的改善, 结果见图 5。

表 10 郁杖丹提取物对急性肝损伤小鼠血清 ALT、AST 水平的影响 ( $n=10$ )

Tab. 10 The effects of extraction of Yuzhang pills on the level of ALT and AST in acute hepatic mice ( $n=10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	最后体质量/g	ALT/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	AST/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
正常组	-	32.99±1.91	24.25±6.56	84.86±13.76
模型组	-	33.15±2.13	1 220.4±481.69 <sup>4)</sup>	737.06±408.18 <sup>4)</sup>
高剂量组	26	33.60±1.98	678.69±659.88 <sup>1)4)</sup>	381.29±427.56 <sup>1)3)</sup>
低剂量组	13	33.17±1.85	982.16±676.75 <sup>4)</sup>	405.37±355.35 <sup>4)</sup>
阳性药组	0.2	33.26±2.53	448.92±348.88 <sup>2)4)</sup>	396.17±265.21 <sup>1)4)</sup>

注: 与模型组比较, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ ; 与正常组比较, <sup>3)</sup> $P < 0.05$ , <sup>4)</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ ; compared with normal group, <sup>3)</sup> $P < 0.05$ , <sup>4)</sup> $P < 0.01$ 。

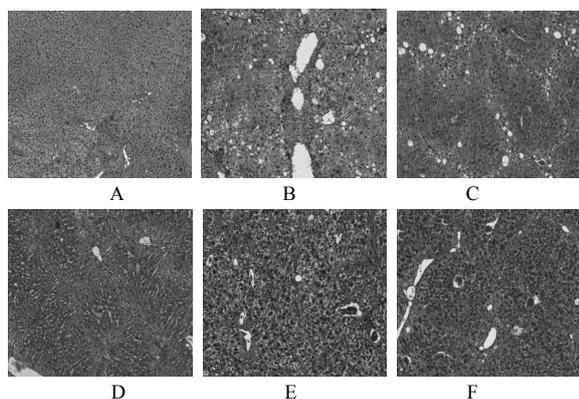
表 11 郁杖丹提取物对慢性肝损伤小鼠血清 ALT、AST 水平的影响 ( $n=10$ )

Tab. 11 The effects of extraction of Yuzhang pills on the level of ALT and AST in chronic hepatic mice ( $n=10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	最后体质量/g	ALT/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	AST/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
正常组	-	40.37±2.61	37.89±6.02	95.71±10.32
模型组	-	39.10±3.20	831.39±465.10 <sup>3)</sup>	649.78±377.18 <sup>3)</sup>
高剂量组	52	38.77±3.15	309.18±93.49 <sup>2)3)</sup>	276.35±107.41 <sup>1)3)</sup>
中剂量组	26	38.81±2.50	355.30±85.87 <sup>1)3)</sup>	274.94±116.26 <sup>1)3)</sup>
低剂量组	13	38.44±2.11	405.53±109.58 <sup>1)3)</sup>	294.18±89.32 <sup>1)3)</sup>
阳性药组	0.2	38.22±2.18	158.48±57.26 <sup>2)3)</sup>	277.16±67.40 <sup>1)3)</sup>

注: 与模型组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ ; 与正常组比较, <sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ ; compared with normal group, <sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。



**图 5** 郁杖丹对慢性肝损伤小鼠肝脏组织的影响  
A-正常组; B-模型组; C-郁杖丹 52 g·kg<sup>-1</sup>; D-郁杖丹 26 g·kg<sup>-1</sup>; E-郁杖丹 13 g·kg<sup>-1</sup>; F-联苯双酯滴丸 0.2 g·kg<sup>-1</sup>。

**Fig. 5** The effect of Yuzhang pills on liver tissues of chronic hepatic mice

A-normal group; B-model group; C-Yuzhang pills 52 g·kg<sup>-1</sup>; D-Yuzhang pills 26 g·kg<sup>-1</sup>; E-Yuzhang pills 13 g·kg<sup>-1</sup>; F-Bifendate pills 0.2 g·kg<sup>-1</sup>.

### 3 讨论

肝损伤是多种肝脏疾病共有的一种病理状态,其长期存在往往可以导致肝纤维化、肝硬化甚至是肝癌。CCl<sub>4</sub>是制备急、慢性肝损伤模型经典的化学毒性物质,它经过肝微粒体中P450酶代谢激活,生成具有活性的三氯甲基自由基(CCl<sub>3</sub>·)和氯自由基(CCl·),这些活性物质可以直接破坏细胞及细胞器的膜,并对肝脏脂质过氧化具有极强的诱导作用<sup>[9]</sup>,此外,三氯甲基自由基(CCl<sub>3</sub>·)还能使膜上的钙泵失活,导致大量钙离子内流,引起细胞中毒坏死<sup>[10]</sup>。一系列的综合作用,最终造成肝细胞变性坏死<sup>[11]</sup>。由于肝细胞大量坏死,细胞膜通透性增加,肝细胞内ALT、AST大量入血<sup>[12]</sup>,故血清ALT、AST水平的高低可灵敏反应肝损伤的程度。

虎杖为该处方的君药,其主要成分虎杖苷具有降糖、止血、保肝降脂等作用,主要用于胆石症、急慢性肝炎等病症<sup>[13]</sup>。中国药典2015年版一部收载的虎杖药材,以虎杖苷和大黄素作为含量测定标准,但有文献报道<sup>[14]</sup>大黄素缺乏专属性,且实验操作过程繁琐,故本实验以虎杖苷含量作为水提工艺的考察指标。阿魏酸是川芎的主要活性成分,具有护肝和抗肝损伤等作用<sup>[15]</sup>,为评价川芎药材质量的重要指标,故将阿魏酸含量作为醇提工艺的考察指标。

本实验以CCl<sub>4</sub>成功诱导小鼠急、慢性肝损伤模型,初步考察郁杖丹提取物对小鼠急、慢性肝

损伤的保护作用。结果显示郁杖丹提取物能够明显降低小鼠急、慢性肝损伤的ALT、AST水平,改善慢性肝损伤小鼠肝组织病理改变。提示郁杖丹提取物具有保肝降酶的作用,对小鼠急、慢性肝损伤具有一定的保护作用。

### REFERENCES

- [1] 韩继武, 宁登科. 虎杖药理作用研究进展[J]. 中国药业, 2001, 10(8): 55-56.
- [2] 戴卫波, 梅全喜, 孔祥康. 积雪草的化学成分与药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 1566-1568.
- [3] 王虎, 胡昌江, 高源, 等. 川芎质量控制的研究进展[J]. 亚太传统医药, 2012, 8(5): 204-205.
- [4] WANG X H, ZHU H, CHEN X, et al. Advances in chemical compositions and quality control of Curcumae Radix [J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2012, 40(10): 5873-5875.
- [5] WANG J M, LIU J, CUI Y, et al. Hepatoprotective effects of *Lysimachia christinae* hance extracts on acute liver injury induced by tripterygium glycosides in mice [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2013, 48(1): 30-34.
- [6] XIAO X H, XU L Y, ZHOU Y Y, et al. The protective effects of *Gardenia iridoids* on acute hepatic injury induced by CCl<sub>4</sub> in mice [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2014, 25(3): 550-552.
- [7] 李丽. 美味猕猴桃根提取物对四氯化碳致小鼠慢性肝损伤的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(6): 1448-1449.
- [8] 刘东, 蒋毅萍, 陈志良. 甘草甜素与苦参碱联合用药对四氯化碳所致小鼠急、慢性肝损伤的保护作用[J]. 中药材, 2007, 30(5): 581-583.
- [9] YAO H Z, LI J X, ZHEN H N. Protective effects of *Isodon rubescens* extract on CCl<sub>4</sub>-induced chronic hepatic injury in mice [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2010, 21(3): 575-577.
- [10] MELLO J C, GUIMARÃES N S, GONZALEZ M V, et al. Hydroxyl scavenging activity accounts for differential antioxidant protection of *Plantago major* against oxidative toxicity in isolated rat liver mitochondria [J]. J Pharm Pharmacol, 2012, 64(8): 1177-1187.
- [11] KASDALLAH-GRISSA A, MOMAQUI B, AOUBANI E, et al. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol induced oxidative stress in rat liver [J]. Life Sci, 2007, 80(11): 1033-1039.
- [12] YIN L H, YU H, PENG J Y. Molecular mechanism and intervention of Chinese medicine of carbon tetrachloride induced liver injury [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(9): 1147-1155.
- [13] CHEN G. Determination of polydatin content in Qinggan Lidan Paishi pills by HPLC [J]. China Pharm(中国药业), 2015, 24(1): 46-47.
- [14] YANG H Y, LIU H J, QIAO R X. Quality standards improvement of Yigan Qingre Jiedu tablets [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2011, 31(10): 1970-1972.
- [15] QIN L, LI P, YANG Q M, et al. Study on quality standard of Danggui Baogan capsules [J]. J Lanzhou Univ(Med Ed)(兰州大学学报 医学版), 2016, 42(2): 5-10.

收稿日期: 2016-03-13