

葛花人参配伍的解酒护肝机制

戴雨霖, 郑飞, 黄鑫, 李晓宇, 越皓, 刘淑莹*

(长春中医药大学 吉林省人参科学研究院, 长春 130117)

[摘要] **目的:**初步阐释中药葛花和人参在化学和药效学层面的配伍机制,为临床应用提供理论参考依据。**方法:**利用高分离度快速液相色谱与四极杆-飞行时间质谱联用(RRLC-Q-TOF-MS)分析葛花人参配伍前后的化学成分,流动相 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~12 min, 15% B; 12~20 min, 15%~50% B),流速 0.4 mL·min⁻¹,样品进样量 5 μL。主成分分析法(principal component analysis, PCA)统计配伍前后化学成分的差异,并对 2 味中药配伍进行药效学实验。**结果:**鉴定了葛花和人参配伍前后的化学成分,质谱负离子模式时,配伍合煎液中尼泊尔鸢尾素, 6"-O-木糖黄豆苷, 人参皂苷 Rg₁, 人参皂苷 Rf 等含量明显增高。通过 PCA 分析,可以明显区分配伍前后的 2 个组分。酶活性实验葛花对酶反应有促进作用,体内实验中 3 个考察指标有显著变化。**结论:**葛花和人参配伍在体内外实验中的解酒护肝作用明显,并且检测出了化学成分的含量及变化,为临床应用和产品开发提供了理论参考。

[关键词] 葛花; 人参; 液相色谱-质谱法; 解酒护肝

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)04-0045-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016040045

Effect of Compatibility of Ginseng Radix et Rhizoma and Flower of *Pueraria lobata* on Alleviating Hangover and Protecting Liver

DAI Yu-lin, ZHENG Fei, HUANG Xin, LI Xiao-yu, YUE Hao, LIU Shu-ying*

(Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To preliminarily interpret the compatibility of ginseng and flower of *Pueraria lobata* in chemical and pharmacodynamical levels, thus provide theoretical basis for its clinical application. **Method:** Rapid resolution liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry (RRLC-Q-TOF-MS) has been applied to identify and analyze the chemical components of the flower of *Pueraria lobata* and Ginseng Radix et Rhizoma before and after compatibility. 0.1% formic acid water (A) -acetonitrile (B) was used as the mobile phase for gradient elute (0-12 min, 15% B; 12-20 min, 15%-50% B). The flow rate was set to 0.4 mL·min⁻¹ and the sample injection volume was 5 μL. Principal component analysis (PCA) was used to find the differences in chemical components before and after compatibility, and pharmacodynamical experiment was conducted for the compatibility of these two herbs. **Result:** The chemical components of flower of *Pueraria lobata* and Ginseng Radix et Rhizoma were identified before and after the compatibility; in negative ion mode of mass spectrometry, irisolidon, 6"-O-xylosyl-glycitin, ginsenoside Rg₁, and ginsenoside Rf contents in the compatibility mixture were significantly increased. By PCA analysis, the components before and after compatibility can be clearly distinguished. In the enzymatic activity assay, flower of *Pueraria lobata* had the acceleration effect for enzyme reaction, and three indicators had significant changes during the *in vivo* experiments. **Conclusion:** Compatibility of Ginseng Radix et Rhizoma and flower of *Pueraria lobata* has significant effect on alleviating

[收稿日期] 20150224(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31400682)

[第一作者] 戴雨霖, 硕士, 研究实习员, 从事天然产物分析研究, Tel: 18686418915, E-mail: cmw-duncan@163.com

[通讯作者] * 刘淑莹, 博士, 研究员, 从事天然产物分析研究, Tel: 86-431-86045467, E-mail: syliu@ciac.jl.cn

hangover and protecting liver *in vitro* and *in vivo*, and the content and changes of chemical components have been detected, providing theoretical basis for its clinical application and development.

[Key words] flower of *Pueraria lobata*; Ginseng Radix et Rhizoma; liquid chromatography-mass spectrometry; alleviating hangover and protecting liver

葛花具有解酒醒脾功效,对于治疗伤酒发热烦渴十分显著,是具有代表性的解酒药物^[1]。葛花主要含有的化学成分包括葛花苷、尼泊尔鸢尾素、鸢尾黄素、鸢尾苷等^[2]。葛花中含量较高的鸢尾黄素可以对化学引起的肝损伤有保护作用^[3]。Han 等^[4]研究报道了葛花苷的解酒保肝作用,同时发现葛花苷是尼泊尔鸢尾素的前体药物。人参是五加科人参属植物,很多医著记载人参与其他药物配伍治疗不同疾病。其中就有人参可以保肝护肝疗效的记载^[5]。经典医书《普济方》中的“葛花解醒汤”具有治疗宿食酒伤、恶食呕逆等作用,有散酒毒的功效。“葛花解醒汤”是中医的重要解酒剂,组方中葛花为君药,人参为臣药,起辅佐葛花解酒毒的作用。关于中药配伍前后的化学成分变化有很多报道^[6],但研究葛花和人参配伍的并不多,中药配伍前后的酶活性方面研究也鲜有报道。

液相色谱质谱联用技术是天然产物有效成分定性定量分析的常用工具^[7-8]。本实验采用 RRLC/Q-TOF-MS 技术,结合主成分分析方法(PCA)进行数据分析,并对乙醇脱氢酶反应和动物肝脏中的指标进行研究。探讨葛花人参配伍的解酒护肝机制,试图从化学和药效学的角度对两者合用的机制进行初步研究。

1 材料

1200 型高分离度快速液相色谱系统和 6520 型 Q-TOF 质谱仪(美国 Agilent 公司),680 型酶标仪(美国伯乐 BIO-RAD 有限公司),TGL-18C 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂),AR2140 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。MDA, GSH 和 ADH 试剂盒(北京鼎国生物技术有限责任公司);52 度白酒(北京红星酒业有限公司),乙醇脱氢酶(Sigma 公司),氧化型辅酶 I(NAD,南京泽朗试剂公司),乙腈色谱纯,甲醇分析纯;经长春中医药大学王淑敏教授鉴定人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* 的干燥根和根茎;葛花为豆科植物葛 *Pueraria lobata* 的干燥花,购于长春市吉林大药房。

健康昆明小鼠,体重(20 ± 2) g,雄性。实验用饲料为鼠专用饲料,所有实验动物及饲料均购于吉林大学白求恩医学院实验动物中心,合格证号

SCXK2013-0005。

2 方法与结果

2.1 样品的制备 葛花-人参按 1:1 比例称重混合,加入 8 倍量水浸泡 1 h,煎煮,煮沸 1 h,纱布过滤;第二次加入 5 倍量水,煎煮 30 min,过滤,合并 2 次滤液,即葛花-人参合煎液(下文简称“合煎液”);葛花单煎液和人参单煎液(二者混合后的供试品下文简称“混合液”),制备方法同上。按照 2010 年版《中国药典》方法提取人参总皂苷,按照水提醇沉法提取人参多糖。水煎液静置 2 h,经 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,0.22 μm 微孔滤膜过滤即为样品,4 °C 保存,待测。为体内肝脏实验配制含生药 0.2,0.4,0.8 g·mL⁻¹ 低、中、高剂量组的葛花人参合煎液。

2.2 药效学实验方法

2.2.1 体外酶活性实验 酶活性实验是应用瓦勒-霍赫(Valle&Hoch)法体外测定药物对乙醇脱氢酶的活性影响,共设对照组、葛花单煎组、人参单煎组、混合液组、合煎液组、人参总皂苷组和人参粗多糖组 8 组。测试中各组均为等剂量。

乙醇脱氢酶活性测定方法为试管中加入焦磷酸钠缓冲液 2.0 mL, NAD⁺ 1.0 mL, 52 度白酒 0.5 mL, 提取液 0.1 mL 混合后,在室温下加盖 37 °C 温育 7 min 后加入乙醇脱氢酶溶液 0.2 mL, 摇匀,紫外分光光度计测吸光度,检测波长为 340 nm, 每 10 s 读数 1 次,连续测定 4 min。不加提取液的反应组为对照组。加各提取液的为实验组。

乙醇脱氢酶活性计算方法为以吸光度 A 对时间作图,反应过程中计算每 10 s 在 340 nm 的吸光度增加值,根据 NADH 在 340 nm 处的摩尔消光系数为 6.2,计算酶活力。乙醇脱氢酶的活性以单位时间生成 NADH 的摩尔数表示。

2.2.2 体内肝脏实验 动物造模与分组:60 只小鼠随机分为 6 组,每组 10 只,分别为空白对照组、模型组、市售解酒胶囊对照组(阳性对照组,2.70 g·kg⁻¹)、合煎液低、中、高剂量组(1.35, 2.70, 5.40 g·kg⁻¹)。实验开始后,空白对照组及模型对照组小鼠 *ig* 蒸馏水(2 mL·kg⁻¹),市售解酒胶囊对照组和合煎液低、中、高剂量组小鼠均 *ig* 给药,每天 1 次,连

续 30 d;然后将模型对照组及各样品组一次 *ig* 50% 乙醇 12 mL·kg⁻¹,空白组给蒸馏水,禁食 16 h 处死,进行各项指标检测。取肝脏,生理盐水冲洗、拭干、称重、剪碎,匀浆,制成 10% 组织匀浆液,3 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液。通过 ELISA 法测定肝脏丙二醛(MDA)含量,谷胱甘肽(GSH)含量,乙醇脱氢酶(ADH)酶含量。

2.3 RRLC-Q-TOF-MS 条件 色谱条件为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm,3.5 μm),柱温 30 ℃,流动相 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~12 min,15% B;12~20 min,50% B),流速 0.4 mL·min⁻¹,进样量 5 μL。

质谱条件为采用负离子模式,扫描范围 *m/z* 100~1 500,干燥气(N₂),流速 10.0 L·min⁻¹,干燥气温度 350 ℃,雾化气压力 255 kPa,毛细管电压 3.5 kV,碎裂电压 175 V,锥孔电压 65 V。

2.4 体外酶活性试验 葛花人参配伍的酶反应激活率顺序为合煎液 > 混合液 ≈ 葛花单煎液 > 人参单

表 2 合煎液对酒精性肝损伤小鼠肝脏中各生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Indicators of alcoholic liver injury mice after take pills ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	MDA /mol·g ⁻¹	GSH/mg·L ⁻¹	ADH/U·mL ⁻¹
空白	2.898 7 ± 0.528 3	21.327 8 ± 0.732 3	6.704 9 ± 0.256 5
模型	4.536 1 ± 0.532 3 ¹⁾	14.468 7 ± 3.661 3 ¹⁾	6.040 7 ± 0.298 3 ²⁾
解酒胶囊(阳性对照)	3.807 6 ± 0.264 3 ³⁾	16.370 8 ± 1.750 6	6.477 6 ± 0.317 2 ³⁾
合煎液低剂量	3.710 3 ± 0.424 5 ³⁾	17.564 6 ± 1.831 2	6.460 1 ± 0.299 6 ³⁾
合煎液中剂量	3.613 7 ± 0.359 8 ⁴⁾	22.564 6 ± 1.831 2 ³⁾	6.665 8 ± 0.295 4 ⁴⁾
合煎液高剂量	3.591 2 ± 0.338 8 ⁴⁾	23.842 5 ± 1.458 3 ⁴⁾	6.864 7 ± 0.365 4 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01;与模型组比较, ³⁾ *P* < 0.05, ⁴⁾ *P* < 0.01。

结果表明,与空白对照组比较,模型组 MDA 含量显著升高 (*P* < 0.05),GSH 含量显著降低 (*P* < 0.05),ADH 含量极显著降低 (*P* < 0.01);与模型组比较,低剂量组 MDA 含量降低,中、高剂量组显著降低,中剂量组 GSH 含量升高,高剂量组显著升高,低剂量组 ADH 活性升高,中、高剂量活性显著升高。

2.6 RRLC-Q-TOF-MS 分析 质谱数据采用 Mass profiler professional (version B.02.02) 软件进行峰提取、峰对齐及归一化等处理,找出混合液与合煎液之间化合物谱的差异。

比较混合液、合煎液负离子模式下总离子流图,并参考文献[11],按照相对分子质量符合 Q-TOF-MS 推定分子式所允许的误差范围的要求。结果见图 1。合煎液在 2.67,3.52,4.29,4.75,6.64,7.62,

煎液。人参总皂苷对乙醇脱氢酶反应激活率高,与文献[9-10]的报道结果一致。而人参多糖对酶反应有抑制作用。葛花单用、混合用、合煎都对乙醇脱氢酶的反应有促进影响,结果见表 1。

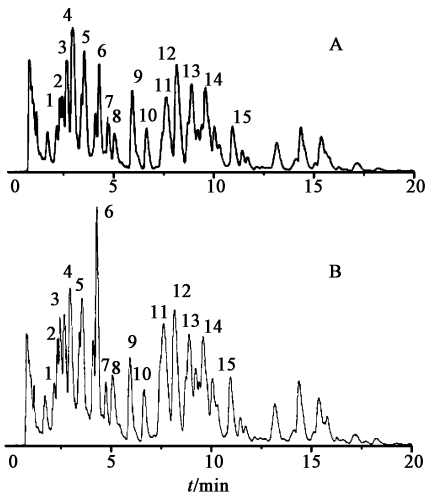
表 1 各种提取物对乙醇脱氢酶活性的影响

Table 1 Extractions on alcohol dehydrogenase activity %

样品	激活率	抑制率
合煎液	21.3	-
混合液	18.2	-
葛花单煎液	17.7	-
人参单煎液	9.5	-
人参总皂苷	15.0	-
人参多糖	-	2.3

2.5 体内酶活性实验结果 由于葛花人参合煎液的体外酶反应活性最强,故肝脏实验中采用合煎液作为实验样品。血清生化指标测定结果见表 2。

8.15,8.89,9.57,10.92 min 离子峰面积增加显著,即 3 号离子峰 6"-O-木糖鸢尾苷,5 号峰离子人参皂苷 Rg₁,6 号离子峰二氢鸢尾苷,7 号离子峰葛花苷,10 号离子峰人参皂苷 Rf,11 号离子峰尼泊尔鸢尾素,12 号离子峰人参皂苷 Rb₁,13 号离子峰 mRb₁,14 号离子峰 Rb₂ 和 15 号离子峰 Rd,配伍前后化学成分的含量变化用色谱峰的峰面积作为参照进行比较,见图 2,可以明显的看出合煎液与混合液的含量不同;合煎液在 2.93,5.91 min 离子峰面积降低,即 4 号离子峰鸢尾苷,9 号离子峰 7-O-葡萄糖-尼泊尔鸢尾素。合煎液与混合液中各主要离子峰化合物,其中 1,2,3,4,6,7,8,9,11 号离子峰即 6"-O-木糖黄豆黄苷,黄豆黄苷,6"-O-木糖鸢尾苷,鸢尾苷,二氢鸢尾苷,葛花苷,葛花亭,7-O-葡萄糖-尼泊尔鸢尾素



A. 混合液; B. 合煎液

图 1 葛花-人参混合液与合煎液总离子流

Fig. 1 Total ion flow chart of mixture decoction and mixtures of various singledrug decoction of *Pueraria labata* flower-Ginseng Radix et Rhizoma

和尼泊尔鸢尾素为葛花中普遍存在的异黄酮及其苷类化合物;5,10,12,13,14,15 号离子峰分别为人参皂苷 R_{g1}, R_f, R_{b1}, mR_{b1}, R_{b2}, R_d, 它们是人参中常见的化合物。见表 3。

2.7 Mass Profiler Professional 统计 MPP 统计分析结果见图 3。主成分分析是 Mass Profiler Professional

表 3 葛花-人参混合液与合煎液的分子离子峰鉴别

Table 3 RRLC-ESI-MS data of extract of *Pueraria labata* flower-Ginseng Radix et Rhizoma

峰号	保留时间	鉴定化合物	分子式	检测相对分子质量	理论相对分子质量	质量精确度 /ppm
1	2.33	6"-O-木糖黄豆黄苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	623.160 7[M + HCOOH - H] ⁻	623.161 8[M + HCOOH - H] ⁻	-1.7
2	2.44	黄豆黄苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	491.118 0[M + HCOOH - H] ⁻	491.119 5[M + HCOOH - H] ⁻	-3
3	2.67	6"-O-木糖鸢尾苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.150 8	593.151 2	-0.6
4	2.93	鸢尾苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	461.109 5	461.108 9	1.3
5	3.52	人参皂苷 R _{g1}	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	845.490 6[M + HCOOH - H] ⁻	845.490 4[M + HCOOH - H] ⁻	0.2
6	4.29	二氢鸢尾苷	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₁	463.121 3	463.124 6	-7.1
7	4.75	葛花苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	607.163 9	607.166 8	-4.7
8	5.05	葛花亭	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.061 0	283.061 2	-0.7
9	5.91	7-O-葡萄糖尼泊尔鸢尾苷	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	475.124 6	475.124 6	0
10	6.64	人参皂苷 R _f	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	845.486 4[M + HCOOH - H] ⁻	845.490 4[M + HCOOH - H] ⁻	-4.7
11	7.62	鸢尾黄素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.055 7	299.056 1	1.3
12	8.15	人参皂苷 R _{b1}	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1 107.587 3	1 107.595 7	-7.5
13	8.89	人参皂苷 mR _{b1}	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₆	1 193.594 3	1 193.596 1	-1.5
14	9.57	人参皂苷 R _{b2}	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1 077.584 4	1 077.585 1	-0.6
15	10.92	人参皂苷 R _d	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	991.539 0[M + HCOOH - H] ⁻	991.548 3[M + HCOOH - H] ⁻	-9.3

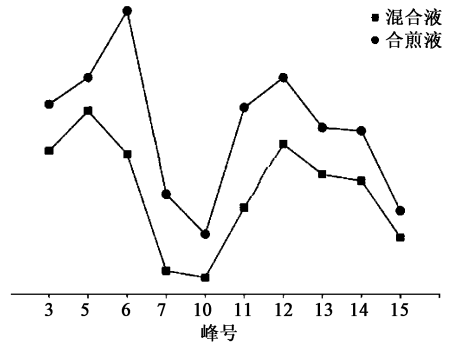


图 2 葛花-人参配伍前后峰面积的变化

Fig. 2 Peak area of *Pueraria labata* flower-Ginseng Radix et Rhizoma boiled together and separately

软件对混合液(A)和合煎液(B)两组数据整体差异性做的分析。每组样品分别重复实验 6 次,图 3 中每一个点代表一次试验结果。统计软件的结果显示,散点图里两组数据中差异最大的几乎都是异黄酮类化合物,因而可以预见两组样品的生物活性有显著性差异。

3 讨论

葛花和人参是常用的中药材,二者配伍产生的解酒护肝功效经历了千百年的验证。体外酶活性试验中,葛花人参合煎液的活性最大,说明了配伍后对酶反应活性的加强;而人参的酶反应活性不高,进一

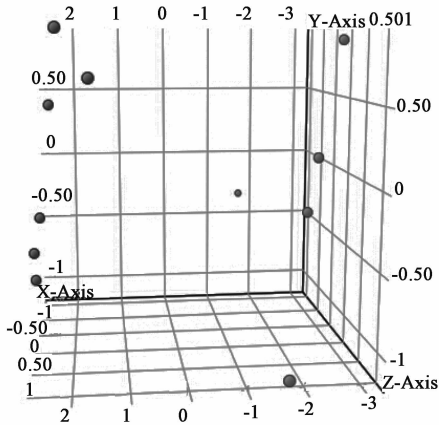


图 3 混合单煎液(红色)与合煎液(蓝色)的主成分分析
Fig.3 PCA profile of mix (red) and boiled together (blue)

步研究人参活性较弱的原因,发现人参中的人参多糖酶活性最弱,而人参多糖是具有生物活性的^[12],它可能在肝脏代谢酒精的其他途径上有作用,需要下一步研究。体内实验中,合煎液可以增强肝脏的GSH系统,抑制自由基和脂质过氧化物的产生,提高肝脏的乙醇脱氢酶的水平,进而加快乙醇体内的代谢。液相色谱质谱联用结果发现解酒护肝作用的有效活性成分配伍之后含量显著上升。可能配伍煎煮的过程中,化合物分子结构的不同导致化学成分溶出度变大,人参可以促进葛花中的有效成分溶出,这在化学层面解释了葛花人参配伍解酒护肝的机制。本实验利用现代科学手段研究中药配伍的化学和药效学两个方面,并且与传统医学的配伍“相须作用”理论结果相联系,为中药配伍的机制研究提供了一种新的有效方法。

[参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:619.
[2] 王胜鹏,陈美婉,王一涛. 葛花化学成分和药理活

性研究进展[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(2): 193-195.
[3] Lee H W, Choo M K, Bea E A. Beta-glucuronidase inhibitor tectorigenin isolated from the flower of *Pueraria thunbergiana* protects carbon tetrachloride-induced liver injury [J]. *Liver Int*, 2003, 23(4): 221-226.
[4] Han Y O, Han M J, Park S H, et al. Protective effects of kakkalide from *Flos Puerariae* on ethanol-induced lethality and hepatic injury are dependent on its biotransformation by human intestinal microflora [J]. *J Pharmacol Sci*, 2003, 93(3): 331-336.
[5] 叶进. 仲景用人参调治脾胃的配伍规律探析[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(8): 1558-1559.
[6] 陈阿丽, 杨永霞, 王淑美, 等. 黄连与人参配伍后生物碱的含量变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11): 13-15.
[7] 张颖, 郝颖, 杨立曼, 等. 不同蒸制工艺对红参中人参皂苷类成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21): 16-20.
[8] 陈貌连, 宋凤瑞, 郭明全, 等. 刺五加叶中黄酮类化合物的结构鉴定[J]. 高等学校化学学报, 2002, 23(5): 805-808.
[9] Lee Y J, Pantuck C B, Pantuck E J. Effect of ginseng on plasma level of ethanol in the rat [J]. *Planta Med*, 1993, 59(1): 17-19.
[10] 李敬常, 周伟贞, 叶丽明, 等. 三七水提物对动物乙醇损伤的保护作用[J]. 中成药, 1992, 14(6): 32-33.
[11] 戴雨霖, 于珊珊, 张颖, 等. 葛花中异黄酮类化学成分的结构鉴定[J]. 高等学校化学学报, 2014, 35(7): 1396-1402.
[12] Wan D B, Jiao L L, Yang H M, et al. Structural characterization and immunological activities of the water-soluble oligosaccharides isolated from the *Panax ginseng* roots [J]. *Planta*, 2012, 235(6): 1289-1297.

[责任编辑 顾雪竹]