

# 北柴胡正丁醇部位保肝作用及其化学成分特征初步研究

卫冰, 李晓坤, 杨云\*, 王启帅  
(河南中医学院药学院, 郑州 450008)

**[摘要]** **目的:** 研究北柴胡正丁醇萃取部位对小鼠急性肝损伤的保护作用并对其化学成分特征进行初步研究。**方法:** 采用腹腔注射四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤, 以柴胡正丁醇萃取部位高、中、低剂量(20, 10, 4 g·kg<sup>-1</sup>)同时预防给药 7 d, 检测空白组、模型组、对照组、不同剂量柴胡正丁醇萃取部位组小鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT), 天冬氨酸转氨酶(AST)活性, 同时测定肝组织中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性; 建立并分析北柴胡正丁醇萃取部位 HPLC 色谱图。**结果:** 北柴胡正丁醇萃取部位是以柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 为主要成分的柴胡总皂苷, 可有效抑制造模小鼠血清中 ALT, AST 的升高( $P < 0.05$ ), 同时可提高造模小鼠肝组织中 SOD 的活力, 降低肝组织中 MDA 的含量( $P < 0.05$ )。**结论:** 北柴胡正丁醇萃取部位对于小鼠急性肝损伤具有保护作用, 其化学成分以柴胡皂苷类为主。

**[关键词]** 正丁醇萃取; 急性肝损伤; 四氯化碳; HPLC; 柴胡皂苷

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0141-04

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120731.1038.003.html>

**[网络出版时间]** 2012-07-31 10:38

## Liver Protective Effect and Chemical Constituent Features of n-butanol Extraction from *Bupleurum chinense*

WEI Bing, LI Xiao-kun, YANG Yun\*, WANG Qi-shuai

(College of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the protective effect of n-butanol extraction from *Bupleurum chinense* on acute liver injury in mice induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) and to have a preliminary study on the features of its chemical constituent. **Method:** Preventive administration of total saikosaponin from *B. chinense* (high dose, middle dose, low dose) on acute liver injury mice induced by CCl<sub>4</sub> (ig) lasted for 7 d, then detect the serum AST and ALT activity and liver tissue MDA content and SOD activity in all groups (blank group, model group, control group and saikosaponins groups), meanwhile construct determination and analysis of HPLC chromatogram of n-butanol extraction of *B. chinense* were carried out. **Result:** Total saikosaponin which mainly contained saikosaponin a (SSa) and saikosaponin d (SSd) was the main constituent of n-butanol extraction of *B. chinense* and it could significantly decrease ALT and AST activity in serum ( $P < 0.05$ ) and meanwhile it could obviously enhance the activity of SOD and reduce the contents of MDA in liver ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The n-butanol extraction of *B. chinense* has protective effects on acute liver injury induced by CCl<sub>4</sub> in mice and its main constituent was total saikosaponin.

**[Key words]** n-butanol extraction; acute liver injury; CCl<sub>4</sub>; HPLC; saikosaponin

**[收稿日期]** 20120211(008)

**[基金项目]** 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI006A10);河南省科技成果转化(092201310001)

**[第一作者]** 卫冰, 硕士研究生, 从事中药及制剂中活性成分研究及新药开发研究, E-mail: weibing3381@126.com

**[通讯作者]** \* 杨云, 硕士生导师, 教授, Tel: 0371-65680605, E-mail: yyun@china.com.cn

北柴胡为伞形科植物柴胡的干燥根,具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气之功效<sup>[1]</sup>,为中医治疗少阳病的要药。现代研究证实北柴胡的水提物和醇提物具有抗肝组织纤维化及保护肝细胞的作用<sup>[2-5]</sup>,并对人肝癌细胞具有明显的抑制作用<sup>[6]</sup>,但水提物和醇提物中尚含有大量的黄酮类成分、糖类成分及挥发性成分,因此无法判断是哪类化学成分在发挥作用。为此本研究通过对北柴胡醇提部位进行纯化处理,以正丁醇萃取部位作为研究对象,考察其对急性小鼠肝损伤的保护作用并借助 HPLC 分析技术,分析正丁醇萃取部位主要化学成分的特征,初步判断柴胡保肝作用与其所含化学成分的相关性。

## 1 材料

**1.1 仪器** SUMMIT 高效液相色谱仪配备“CHROMELEONTM”工作站(美国 DIONEX 公司),2000WS 蒸发光散射检测器(美国 ALLTECH 公司),Chromafinger™2005 色谱指纹图谱系统解决方案软件(珠海科曼中药研究有限公司),Hydro-RP80A 色谱柱(广州 Phenomenex 公司),METTLER AE240 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司),BS210S 型电子天平(北京赛多利斯天平公司),SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂),PT2100 型内切式组织匀浆机(美国 Polytron),3-18K 型高速冷冻离心机(德国 Sigma),LDZ5-2 低速自动离心机(北京京立),旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),电热恒温水浴平衡锅(北京长风仪器仪表公司),UV-2000 型紫外-可见分光光度计(尤尼科上海仪器有限公司)。

**1.2 试剂及药材** 丙氨酸转氨酶(ALT),天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、丙二醛(MDA)测试盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品(批号 20100529),联苯双酯滴丸(浙江万邦药业有限公司,批号 090906),色谱乙腈(美国 TIDEA 公司),四氯化碳(分析纯,天津四友),实验前用食用花生油配成 0.2% 的四氯化碳植物油溶液,柴胡皂苷 a 对照品(saikosaponin a,SSa)、柴胡皂苷 d 对照品(saikosaponin d,SSd)(本实验室自制<sup>[7]</sup>,HPLC 峰面积归一化法含量测定均大于 98%)。

柴胡样品(辽宁大连),经河南中医学院生药教研室董诚明教授鉴定为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根。

**1.3 动物** SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,(20 ± 2) g,河南医科大学实验动物中心,动物许可

证 SCXK(豫)2005-001,分笼饲养于河南中医学院动物实验中心,温度(24 ± 1) °C,相对湿度 30% ~ 50%,颗粒饲料喂养,自由饮水。

## 2 方法

**2.1 柴胡总皂苷提取液的制备** 取北柴胡粗粉(过 40 目筛)201.0 g,分别加 8 倍量和 6 倍量的 95% 乙醇回流提取两次,每次 1 h,减压过滤,合并滤液,减压回收乙醇至膏状。正丁醇饱和水 1 000 mL 捏溶(超声助溶 20 min),水饱和正丁醇萃取 3 次(等量萃取),合并萃取液,减压回收正丁醇。浸膏加生理盐水 201 mL 溶解(超声助溶 5 min),离心 3 min(3 000 r·min<sup>-1</sup>),沉淀加蒸馏水 201 mL 溶解(超声助溶 5 min),离心 3 min(3 000 r·min<sup>-1</sup>),合并,混匀,减压浓缩至 201 mL,即得质量浓度为 1.0 g·mL<sup>-1</sup> 的药液(每毫升药液相当于 1.0 g 生药。水溶液中柴胡总皂苷的含量经测定为 11.20 g·L<sup>-1</sup>)。其他剂量按比例稀释得到。

**2.2 动物分组** SPF 级小鼠 60 只,随机分成 6 组,即空白组、模型组、阳性药物组、柴胡提取物高、中、低剂量组(各组均为 10 只)。

**2.3 剂量设计及造模** 阳性药物组给予联苯双酯(以 0.5% CMC-Na 配成 7.5 g·L<sup>-1</sup>,给药剂量 0.15 g·kg<sup>-1</sup>),柴胡提取物高、中、低剂量组分别给予相当生药质量浓度为 1.0,0.5,0.2 g·mL<sup>-1</sup>,给药量 20 mL·kg<sup>-1</sup>(给药剂量分别为 20,10,4 g·kg<sup>-1</sup>)。空白组及模型组给予等体积生理盐水。ig 给药,连续 7 d。末次给药后禁食不禁水,2 h 后,空白组 ip 植物油 10 mL·kg<sup>-1</sup>,除空白组外,其余各组均腹腔注射<sup>[8-9]</sup>0.2% 四氯化碳植物油溶液 10 mL·kg<sup>-1</sup>。造模 18 h 后眼球取血,冷冻高速离心机离心(2 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 4 min),分离血清。按照 ALT 和 AST 试剂盒的操作规程测定血清中 ALT 和 AST 的活力水平。取小鼠肝脏用冰生理盐水漂洗数次后,滤纸拭干,称取 0.5 g,加入冰生理盐水 4.5 mL,用内切式组织匀浆机进行匀浆,制成 10% 的肝组织匀浆,低速自动平衡离心机内 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液 2 mL,备用。1% 的肝组织匀浆液由 10% 的肝组织匀浆与生理盐水按 1:9 的比例稀释而成。按 SOD,MDA 和考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒的方法分别检测肝组织中 SOD 的活力和 MDA 的含量。

**2.4 正丁醇部位化学成分特征分析**

**2.4.1 HPLC 色谱条件** 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱,洗脱程序为 0 min:15% A,85% B;15 min:30% A,70% B;25 min:35% A,65% B;

40 min:45% A,55% B;60 min:50% A,50% B;70 min:15% A,85% B。记录时间60 min;恢复平衡时间10 min。检测器蒸发光散射检测器;漂移管温度110 ℃;空气流速3.0 L·min<sup>-1</sup>。进样量10 μL。柱温30 ℃。

**2.4.2 对照品溶液的制备** 分别取3 mg SSa和SSd,精密称定,置5 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

**2.4.3 供试品溶液的制备** 精密称定柴胡粉末1 g,精密量取甲醇40 mL,超声提取1 h,滤过,残渣加5 mL甲醇洗涤,合并滤液并80 ℃水浴挥干,剩余物以10 mL蒸馏水溶解,饱和正丁醇萃取3次,每次10 mL,合并正丁醇萃取液,80 ℃水浴挥干,残渣以5 mL甲醇溶解并定容于量瓶内,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过即得

**2.5 统计方法** 采用统计软件SPSS 13.0 for windows对各组数据进行单因素方差分析,各组实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

### 3 结果与分析

**3.1 药理实验结果与分析** 在7 d试验期内,各组实验小鼠活动正常,毛色光亮,进食饮水正常,未见粪便的异常改变。与空白组比较,肝损伤模型组及所有治疗组小鼠血清中ALT和AST活性均显著升高( $P < 0.05$ ),表明小鼠急性肝损伤模型建立成功。与模型组相比,预防给药联苯双酯组和柴胡提取物高剂量治疗组均能有效抑制肝损伤小鼠血清中ALT和AST的升高( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 柴胡提取物对急性肝损伤小鼠血清中ALT和AST活性的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ALT/U·L <sup>-1</sup>	AST/U·L <sup>-1</sup>
空白	-	25.40 ± 4.58 <sup>1)</sup>	30.30 ± 5.76 <sup>1)</sup>
模型	-	47.80 ± 4.29 <sup>2)</sup>	89.90 ± 6.21 <sup>2)</sup>
联苯双酯	0.15	30.10 ± 4.07 <sup>1,2)</sup>	47.70 ± 8.25 <sup>1,2)</sup>
柴胡提取物	20	31.60 ± 3.03 <sup>1,2)</sup>	51.60 ± 8.34 <sup>1,2)</sup>
	10	45.50 ± 4.35 <sup>2)</sup>	84.90 ± 8.71 <sup>2)</sup>
	4	47.70 ± 5.19 <sup>2)</sup>	89.30 ± 7.69 <sup>2)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与空白组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ (表2同)。

与空白组相比,模型组小鼠肝组织中MDA含量显著升高,SOD活性显著降低( $P < 0.05$ ),提示造模组小鼠肝脏出现脂质过氧化,造模成功。与模型组相比,联苯双酯组及20 g·kg<sup>-1</sup>的柴胡提取物组可显著抑制肝损伤小鼠肝组织中MDA的升高及SOD活性的降低( $P < 0.05$ ),10 g·kg<sup>-1</sup>柴胡提取物组的

SOD活性水平也显著升高( $P < 0.05$ ),见表2。

表2 柴胡提取物对急性肝损伤小鼠肝组织中SOD活性和MDA水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	SOD/U·mg <sup>-1</sup>	MDA/nmol·mg <sup>-1</sup>
空白	-	285.89 ± 25.10 <sup>1)</sup>	4.08 ± 1.57 <sup>1)</sup>
模型	-	102.82 ± 17.83 <sup>2)</sup>	7.37 ± 1.19 <sup>2)</sup>
联苯双酯	0.15	256.39 ± 22.76 <sup>1,2)</sup>	4.50 ± 0.72 <sup>1)</sup>
柴胡提取物	20	221.98 ± 22.91 <sup>1,2)</sup>	5.51 ± 1.13 <sup>1,2)</sup>
	10	197.48 ± 18.37 <sup>1,2)</sup>	7.81 ± 1.32 <sup>2)</sup>
	4	95.34 ± 22.86 <sup>2)</sup>	7.71 ± 1.23 <sup>2)</sup>

表1,2的结果提示,给予一定剂量的柴胡提取物可增强小鼠抗氧化及清除氧自由基的能力,可用于预防治疗CCl<sub>4</sub>所致小鼠急性肝损伤。

**3.2 HPLC图谱分析** 所建立HPLC系统适应性良好,方法学考察结果显示精密度、稳定性、重复性均符合实验要求<sup>[10]</sup>。SSa,SSd及样品HPLC色谱图见图1~3。以图1~2作为参照,可以得出图3中15号峰和17号峰分别为SSa和SSd,且含量较高,结合柴胡皂苷的性质,可以明确正丁醇萃取部位是以SSa和SSd为主的柴胡总皂苷。

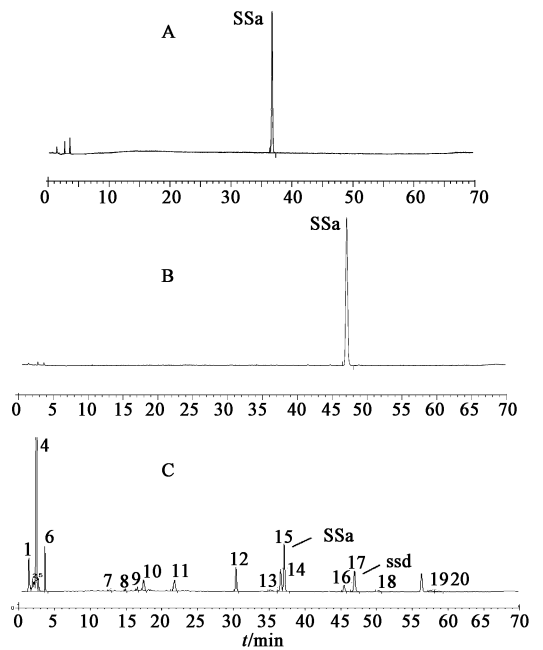


图1 SSa对照品(A),SSd对照品(B),柴胡样品正丁醇萃取部位(C)色谱图

柴胡提取物中皂苷含量的测定方法如下:取2.2项下的水溶皂苷浓缩液0.2 mL(相当于0.2 g生药量),水浴70 ℃挥干溶剂,剩余物适量甲醇溶解,并转移至25 mL量瓶中,定容至刻度。按标准曲

线的测定方法进行含量测定,测得皂苷浓缩液中的总皂苷含量为  $11.20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

#### 4 讨论

在进行 SOD 活力测定前,根据试剂盒的要求需对最佳的肝组织取样量进行选择,本实验的具体过程如下:随机抽取一个肝组织匀浆液,比较不同的取样量(10, 30, 50  $\mu\text{L}$ )的抑制率,最后取抑制率为 50.8% 的一管作为最佳取样量(10  $\mu\text{L}$ )。

如果以小鼠肝组织中的 SOD 活力水平和 MDA 含量以及血清中 ALT 和 AST 作为评价指标,则当给药剂量达到  $20 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  时(按生药计,相当于人体推荐剂量的 15.5 倍。相当于给予  $224 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  的柴胡总皂苷,约为  $\text{LD}_{50}$  的  $1/21^{[11]}$ ),柴胡提取物可有效地对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤起到保护作用。笔者分析柴胡提取物对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的保护作用机制如下:抑制机体脂质过氧化作用的发生,主要的途径为一方面抑制机体内超氧阴离子自由基的形成;一方面激活和增强超氧化物歧化酶的活性,从而加快消除机体内多余的超氧阴离子自由基( $\cdot\text{O}_2$ );另一方面对生物细胞膜产生保护作用,较少自由基与生物细胞膜的接触,有效避免自由基对细胞膜的破坏。

药理实验结果表明,柴胡正丁醇萃取部位对小鼠急性肝损伤具有保护作用,进一步的正丁醇萃取部位 HPLC 色谱分析结果显示该部位是以 SSa 和 SSd 为主要化学成分的柴胡总皂苷类,提示 SSa 和 SSd 与柴胡保肝作用有着密切联系,但是它们是不是柴胡总皂苷保肝作用的主要成分从目前的研究程度来看还不得而知,因此有必要进行更为深入的探讨。

#### [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2005:198.
- [2] 石慧,谢东浩.春柴胡及北柴胡水提部位对急性肝损伤小鼠的保护作用[J].南京中医药大学学报,2009,25(6):461.
- [3] 谢东浩,袁冬平,蔡宝昌,等.春柴胡及北柴胡对二甲基亚硝胺所致大鼠肝纤维化的保护作用比较[J].中国医院药学杂志,2008,28(23):2006.
- [4] 李宛实,延光海,李镭.北柴胡乙醇提取物对急性肝损伤小鼠肝脏的保护作用及成分分析[J].延边大学医学学报,2010,33(2):105.
- [5] 黄幼昇,黄伟,孙荣.柴胡皂苷对肝脏的药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(17):298.
- [6] 宋景贵,肖正明,李师鹏,等.柴胡提取物对人肝癌细胞和小鼠 S-180 肉瘤的抑制作用[J].山东中医药大学学报,2001,25(4):299.
- [7] 田润涛.河南北柴胡 LC 指纹图谱研究及中药色谱指纹图谱技术探讨[D].郑州:河南中医学院,2004.
- [8] 李夏,段冷昕,王楠娅,等.鹿茸多肽对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J].中国药理学杂志,2007,42(24):1864.
- [9] 蔡秀江,丁安伟,闫冰,等.二至丸保肝活性成分群对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(20):113.
- [10] 王启帅,杨云,肖功胜,等.北柴胡 HPLC-ELSD 指纹图谱的建立及色谱数据的分析[J].中成药,2011,33(3):373.
- [11] 江苏新医学院.中药大辞典[M].上海:上海人民出版社,1977:1832.

[责任编辑 聂淑琴]