葛根素的提取及对小鼠解酒护肝功能的鉴定

王 晶[1],李洪敏[1],艾 芳[1],曹 雄[1],吴爱娟[1],韩 琴[2] (1. 成都医学院预防医学专业,四川 成都 615000;2. 成都医学院公共卫生系,四川 成都 615000)

[摘 要] **目的** 提取葛根中的葛根素,HPLC 法检测提取的葛根素,并比较不同剂量的葛根素与解酒效果的相关性,评价不同剂量葛根素解酒护肝效果。**方法** 在前期实验所得的最优条件下提取葛根素备用,HPLC 法定性定量检测葛根醇提物(PRE),将雄性健康昆明小鼠随机分为空白组、阳性对照组、葛根素干预组(每组 10 只)。先给小鼠灌胃葛根提取物,30 min 后灌胃白酒,观察醉酒小鼠的醒酒时间及测定小鼠肝组织 ADH、GOT、GPT 含量变化,以探讨葛根素对醉酒小鼠的影响。**结果** HPLC 测定 8 倍体积分数的 70% 乙醇,在 60 ℃恒温摇床水浴提取 30 min 为葛根素提取的最优条件;与阳性对照组相比,低、中、高剂量的葛根醇提物能显著缩短醉酒小鼠的醒酒时间,中剂量的 PRE 能有效抑制酒精的吸收,降低肝组织中 ADH、GOT、GPT 的浓度,而高剂量的 PRE 对酒精的吸收影响较小。**结论** HPLC 法能对葛根素提取物进行定性定量测定;葛根素对急性酒精中毒导致的小鼠肝损伤有保护性调控作用,葛根素剂量与解酒效果呈良好的正性相关。

[关键词] 葛根素;HPLC;解酒护肝;急性酒精中毒

[中图分类号] R931.6;R34 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)04-0358-04

doi:10.11659/jjssx.12E014060

[基金项目] 四川省厅级川菜发展研究项目(CC13Z08)

[通讯作者] 韩 琴,E-mail:16964791@qq.com

[收稿日期] 2015-03-17 [修回日期] 2015-04-15

[4] Li T, Fang YQ, Yang GM, et al. Effects of the balance in activity of RhoA and Rac1 on the shock-induced biphasic change of vascular reactivity in rats[J]. Ann Surg, 2011, 253(1): 185 – 93.

[5] 杨光明,彭小勇,李 涛,等. 环孢素 A 对严重创伤失血性休克大鼠的治疗作用[J]. 局解手术学杂志, 2014, 23(3): 250 – 252.

[6] 朱 娱,田昆仑,吴 跃,等. 不同复苏压力对颅脑创伤合并非控制性失血性休克大鼠血流动力学及存活率的影响[J]. 局解手术学杂志, 2014, 23(4): 372 – 375.

[7] Jerez S, Scacchi F, Sierra L, et al. Vascular hyporeactivity to angiotensin Ⅱ and noradrenaline in a rabbit model of obesity[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2012, 59(1): 49 – 57.

[8] Tunctan B, Korkmaz B, Sari AN, et al. A novel treatment strategy for sepsis and septic shock based on the interactions between prostanoids, nitric oxide, and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid[J]. Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem, 2012, 11(2): 121 – 150.

[9] Steppan J, Nyhan SM, Sikka G, et al. Vasopressin-mediated enhancement of adrenergic vasoconstriction involves both the tyrosine kinase and the protein kinase C pathways[J]. Anesth Analg, 2012, 115(6): 1290 – 1295.

[10] 胡 弋,李 涛,徐 竞,等. 缺血预处理对失血性休克大鼠血管反应性及钙敏感性的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(3): 437 – 442.

[11] Mishra N, Nugent WH, Mahavadi S, et al. Mechanisms of enhanced vascular reactivity in preeclampsia[J]. Hypertension, 2011, 11(2): 867 – 873.

[12] Chaplin NL, Amberg GC. Stimulation of arterial smooth muscle L-type calcium channels by hydrogen peroxide requires protein kinase C[J]. Channels (Austin), 2012, 6(5): 385 – 389.

[13] Scruggs SB, Solaro RJ. The significance of regulatory light chain phosphorylation in cardiac physiology[J]. Arch Biochem Biophys, 2011, 510(2): 129 – 134.

[14] Dumont O, Mylroie H, Bauer A, et al. Protein kinase Cε activity induces anti-inflammatory and anti-apoptotic genes via an ERK1/2- and NF-κB-dependent pathway to enhance vascular protection[J]. Biochem J, 2012, 447(2): 193 – 204.

[15] Tsai YR, Huang LJ, Lin HY, et al. Inhibition of formyl peptide-stimulated phospholipase D activation by Fal-002-2 via blockade of the Arf6, RhoA and protein kinase C signaling pathways in rat neutrophils[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2013, 386(6): 507 – 519.

[16] Tan HB, Zhong YS, Cheng Y, et al. Rho/ROCK pathway and neural regeneration: a potential therapeutic target for central nervous system and optic nerve damage[J]. Int J Ophthalmol, 2011, 4(6): 652 – 657.

[17] Satoh K, Fukumoto Y, Shimokawa H. Rho-kinase: important new therapeutic target in cardiovascular diseases[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301(2): H287 – 296.

[18] Liu L, Zhu J, Brink PR, et al. Age-associated differences in the inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by cyclosporine A[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2011, 55(5): 622 – 630.

[19] Muthuraman A, Ramesh M, Chauhan A. Mitochondrial dependent apoptosis: ameliorative effect of flunarizine on ischemia-reperfusion of celiac artery-induced gastric lesions in the rat[J]. Dig Dis Sci, 2011, 56(8): 2244 – 2251.

[20] Shi Y, Rehman H, Ramshesh VK, et al. Sphingosine kinase-2 inhibition improves mitochondrial function and survival after hepatic ischemia-reperfusion[J]. J Hepatol, 2012, 56(1): 137 – 145.

(编辑:周小林)

Puerarin extraction and identification of solution wine to protect liver function in mice

WANG Jing[1], LI Hong-min[1], AI Fang[1], CAO Xiong[1], WU Ai-juan[1], HAN Qin[2] (1. Preventive Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu Sichuan 615000; 2. Department of public health, Chengdu Medical College, Chengdu Sichuan 615000, China)

Abstract: Objective Pueraria extract puerarin, HPLC assay puerarin extract and compare different doses of correlation with the hangover effect of puerarin evaluate different doses of puerarin liver hangover effect. **Methods** Extracted under optimal conditions obtained in the previous experiment puerarin spare, HPLC method for qualitative and quantitative detection of alcohol extract of kudzu root (PRE), the male Kunming mice were randomly divided into control group, positive control group and puerarin group, each group of 10. Give mice fed pueraria extract, 30 min after administration of liquor, drunk mice sobering observation time and the determination of mouse liver ADH, GOT, GPT content in order to investigate the effect of puerarin on drunken mice. **Results** HPLC fraction was measured at 8 times the volume of 70% ethanol, 60 ℃ constant temperature water bath shaker at 30 min for optimal extraction conditions puerarin extraction. Compared with the positive control groups: low, medium and high doses of alcohol extract of pueraria can significantly shorten the time to sober up drunken mice, the dose of PRE could effectively inhibit the absorption of alcohol, reduce liver tissue ADH, GOT, GPT, the effects of high doses of PRE absorption of alcohol was small. **Conclusion** HPLC method capable of puerarin extract the qualitative and quantitative determination of puerarin on liver injury caused by acute alcoholism a protective regulatory role, and the hangover effect of puerarin dose showed a good positive correlation.

Keywords: puerarin extraction; HPLC; protect liver therapy; acute alcoholism

传统中药葛根有解酒功效，葛根始载于《神农本草经》，具有解肌退热、生津、透疹、升阳止泻等功效[1]，属于无毒中药。现代药理学表明葛根具有提高肝细胞的再生能力，恢复肝脏正常机能，预防肝脏脂肪堆积；促进新陈代谢，增强肝脏解毒功能，预防酒精对肝脏的损伤；改善心肌缺血状态，防治心血管疾病；改善脑缺血状态，防治脑血管疾病；强化肝胆细胞自身免疫力，抵抗病毒入侵等作用功效。葛根的主要成分为异黄酮类、葛根苷类、三帖皂苷类、生物碱及其他化合物4类[2]。在葛根的有效成分中，异黄酮类最受关注，其中又以葛根素研究更受关注。葛根素可防治慢性乙醇中毒引起的记忆减退，提高脑 SOD 活性，从而减少脑内脂褐素积累，逆转乙醇导致的海马突触界面细微结构的衰退性变化[3]。目前，过量饮酒及酗酒的现象日益明显，酒精性肝病的发病率逐年攀升。乙醇的氧化代谢解毒过程绝大多数于肝脏中进行，其在肝脏中主要代谢生成活性中间产物乙醛和多种氧自由基。乙醛能在黄嘌呤氧化酶作用下形成超氧化物，引起脂质过氧化，直接导致肝细胞内线粒体受损[4]。此外，乙醛还可与蛋白质结合形成乙醛复合物，致使蛋白质功能紊乱，导致细胞再次受损[5]。乙醛经与肝脏谷胱甘肽(GSH)结合反应最终生成乙酸解毒，而自由基则继续氧化细胞膜的脂质和蛋白质，最终导致肝细胞结构与功能的损害。谷丙转氨酶(GPT)和谷草转氨酶(GOT)的升高可以直接反映肝脏的受损情况，是肝细胞损害的“金标准”。为此，我们对葛根主要提取物葛根素进行了实验研究，为其解酒护肝的临床应用，以及为低值葛根的高值化利用提供实验和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

实验动物为昆明种雄性小鼠，体质量 25 ~ 35 g，购自四川大学实验动物中心；野葛根购于太极大药房(安国市蔺氏药材有限责任公司)；ADH、GOT、GPT 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所；葛根素标准品购自上海源叶生物科技有限公司。52°红星牌二锅头酒、甲醇为色谱纯、肝素钠、氯化钠、乙醇等均为分析醇。

电子天平 FA2104(上海五久自动化设备有限公司)；高效液相色谱仪 LC-20A/10A(杭州瑞析科技有限公司)；离心机 TD5G(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)；数显水浴恒温振荡器 SHA-CA/SHZ-82 往复(北京成萌伟业科技有限公司)；旋转蒸发仪 RE-5203(常州杰博森仪器有限公司)；酶联免疫检测仪 DNM-9602A(北京普朗新技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 葛根醇提物(PRE)的制备 将葛根干燥，粉碎后过药典 2 号筛。根据前期响应面法优化提取条件的实验结果，称取葛根粉末置于锥形瓶中，加 8 倍体积分数的 70% 乙醇，在 70 ℃恒温摇床水浴提取 30 min。分液漏斗过滤，取滤液，在 50 ℃旋转蒸发仪以 20 r/min 旋蒸浓缩去乙醇。

1.2.2 HPLC 对 PRE 定性分析以及测定 PRE 中葛根素含量 精密称取葛根素适量，加 95% 的乙醇溶解，配制成一定量的葛根素对照品液备用。取该对照品液分别配制成 2、4、6、8、10 mg/L的葛根素标品溶液。在流动相为 80% 甲醇；检测波长 250 nm；流速 1.0 mL/min；进样量 20 μl 的条件下检测葛根素标品的出峰时间及峰面积，以样品浓度为横坐标，出峰时间为纵坐标绘制葛根素标准曲线，检测 PRE 的出峰时间及峰面积计算 PRE 中葛根素的含量。

1.2.3 小鼠急性酒精中毒模型制备 取昆明种雄性小鼠 40 只，体质量为 25 ~ 35 g，随机分 5 组，每组 8 只。禁食 6 h 后，各

组小鼠分别按体质量的 10%、12%、15%、17%、20% 灌胃 52°饮用白酒，连续灌胃 3 d，每次灌酒剂量减少为上次剂量的 2/3，观察小鼠醉酒表现，记录小鼠醉酒时间，醒酒数以及死亡数。以确定最适醉酒剂量。

1.2.4 小鼠急性酒精中毒酒醒指标的测定 取 50 只昆明雄性小鼠，体质量 25 ~ 35 g，随机分为 5 组，每组 10 只。空白组：1 g/kg PRE 等量的生理盐水 + 体质量的 15% mL/kg 的白酒等量的生理盐水。对照组：1 g/kg PRE 等量的生理盐水 + 体质量的 15% mL/kg 的白酒；低剂量组：0.5 g/kg PRE + 体质量的 15% mL/kg 的白酒；中剂量组：1 g/kg PRE + 体质量的 15% mL/kg的白酒；高剂量组：1.5 g/kg PRE + 体质量的 15% mL/kg的白酒。醒酒指标的确定：翻正反射小时时间以小鼠背部向下保持 30 s 为标准；醒酒时间以活动自如、灵活、精神，即翻正反射恢复的时候；醉酒时间 = 翻正反射恢复时间 - 翻正反射小时时间；醒酒时间 = 翻正恢复时间 - 给酒时间，醒酒时间是醉酒潜伏期和睡眠时间的综合体现。

1.2.5 小鼠急性酒精中毒肝组织中的 ADH、GOT、GPT 的测定

在连续灌胃 3 d 后，第 3 次醒酒后立即断颈处死，取肝右叶制备组织匀浆进行测定。肝组织 ALT 活力测定：准确称取肝组织质量，按质量(g)：体积(mL) = 1∶9 的比例，加入 9 倍体积的生理盐水，冰水条件下机械匀浆，制备 10% 的组织匀浆，2 500 r/min，离心 10 min，取上清液，再用生理盐水 10 倍稀释成 1% 的浓度待测。肝组织 ADH 活力测定：准确称取肝组织质量，按质量(g)：体积(mL) = 1∶9 的比例，加入 9 倍体积的生理盐水制备 10% 的组织匀浆，2 500 r/min，离心 10 min，取上清进行测定。

1.3 统计学处理

所有数据经 Epidata 双向核查输入计算机，使用 SPSS 17.0 进行统计分析，计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，实验组间各指标比较使用两独立样本 t 检验方法，$P < 0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 小鼠模型制备结果

15% 的灌胃剂量能使实验小鼠的醉酒率最高而死亡率最低。在 15% 的灌胃剂量下成功 6 只，死亡 1 只(酒精不耐受)。因此选择此剂量作为后续实验的最适醉酒剂量。

2.2 HPLC 法对葛根素提取物定量定性分析

检测波为 250 nm 时，HPLC 测得 PRE 的出峰时间为 2.6 min，经与标品对比为葛根素，见图 1。回归方程为 Y = -7.253e + 0.04 + 7.122e + 004X，相关系数 $r^2 = 0.999\ 262$，见图 2。将旋蒸浓缩后的 PRE 稀释 10 000 倍后用 HPLC 法计算其浓度，最后得旋蒸后醇提物的浓度为 136 mg/mL。

2.3 葛根素对急性酒精中毒小鼠醒酒时间的影响

葛根各实验组葛根素醇提物能显著缩短急性酒精中毒小鼠的醒酒时间($P < 0.05$)，且能延长小鼠的醉酒潜伏时间，缩短睡眠时间，与阳性对照组相比存在显著差异($P < 0.05$)，且 PRE 的浓度越高，预防醉酒的效果越好(表 1)。

表 1 葛根素的抗醉酒实验结果($\bar{x} \pm s$)

组别	给药剂量 (g/kg)	酒剂量 (mL/kg)	入睡动物 (只)	醉酒潜伏期 (min)	醒酒时间 (min)
阳性对照组	0	15	10	18.47 ± 9.25	473 ± 16
低剂量组	0.5	15	10	25.73 ± 10.23	420 ± 28 *
中剂量组	1	15	9	38.14 ± 16.35 *	398 ± 11 *
高剂量组	1.5	15	9	45.56 ± 14.87 *	372 ± 32 *

*：与阳性对照组比较，$P < 0.05$

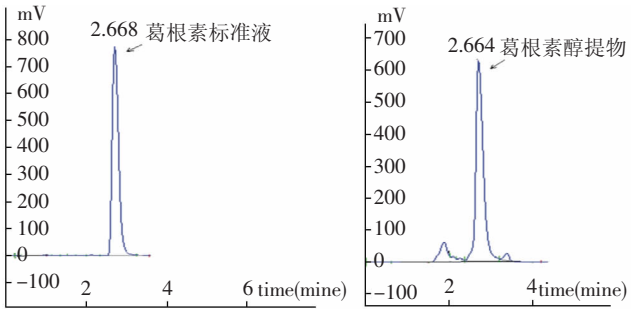


图 1 HPLC 在检测波为 250 nm 时所得的葛根素标准液与葛根素醇提物的出峰时间

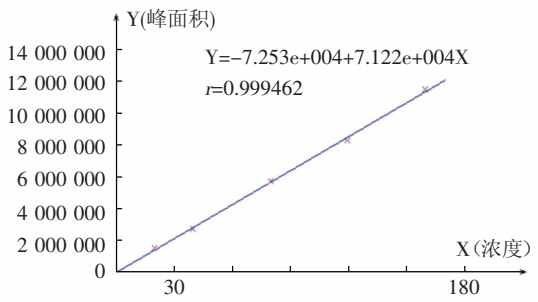


图 2 葛根素标线

2.4 各组肝匀浆 GPT、GOT、ADH 的比较

与空白组比较，模型组 GPT、GOT、ADH 水平均有明显升高($P < 0.05$)，各给药组较阳性对照组有明显降低($P < 0.05$)；各给药组之间没有统计学差异(P > 0.05)，见表 2。

表 2 各肝组织 ALT、AST 的变化($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	GPT(U/mgprot)	GOT(U/mgprot)	ADH(U/mgprot)
空白组	149.6 ± 14.8	180.1 ± 16.8	105.7 ± 23.1
阳性对照组	253.3 ± 14.6 *	312.5 ± 19.7 *	137.6 ± 24.7 *
低剂量组	185.5 ± 18.4 *#	217.8 ± 21.3 *#	132.3 ± 18.5 *#
中剂量组	184.2 ± 15.3 *#	205.1 ± 17.5 *#	127.2 ± 22.9 *#
高剂量组	187.2 ± 20.3 *#	223.5 ± 16.6 *#	135.8 ± 23.3 *#

*：与空白组比较，$P < 0.05$；#：与阳性对照组相比，$P < 0.05$

3 讨论

人体摄入乙醇后，作为人体的重要解毒器官，乙醇的解毒代谢 90% 都是以肝内氧化的方式在体内进行的[6]，其余 10% 则是通过呼气、尿、出汗等形式排泄到体外。大量饮酒或长期酗酒，超过肝脏正常代谢解毒

能力,乙醇在血液和肝脏中大量的蓄积。肝内蓄积的乙醇及其Ⅱ相反应产物直接刺激机体产生内毒素,内毒素刺激肝脏 Kupffer 细胞产生大量的炎症因子,直接引起肝细胞脂肪变性、炎症、坏死和导致肝细胞缺氧,最终导致酒精性肝病的发生[7]。乙醇脂溶性大,体内蓄积的乙醇可透过血脑屏障入脑,抑制运动中枢和呼吸中枢兴奋,严重的急性中毒可发生呼吸、循环衰竭。乙醇进入人体后主要途径:①部分乙醇在胃黏膜 ADH 作用下首过消除;②肝细胞胞浆内的 ADH 氧化反应;③肝微粒体内的乙醇氧化酶系统(MEOS)。④肝过氧化酶体内的触酶四条途径进行代谢[8]。葛根具有多种药理作用,而解酒功能主要机理在于葛根素参与肝脏的代谢过程。葛根素能够在乙醇的肠胃吸收及代谢解毒两个环节发挥作用,现代药理学研究发现,异黄酮可使血中乙醇、乙醛浓度下降,抑制尿素氮(BUN)的升高,从而起到解酒作用[9]。葛根素通过抗自由基,可以减少自由基对肝细胞膜的破坏作用,同时葛根素能有效降低酒精性肝损伤模型大鼠的转氨酶水平,一定程度上抑制酒精导致的肝纤维化的产生[10],从而预防醉酒引起的急性酒精性肝损伤。

本实验在 HPLC 法对葛根醇提物进行定性分析时,发现进样速度影响出峰时间,因此进样时需迅速。对葛根的处理条件能直接影响葛根素的提取量,其原理为:葛根中含有大量的淀粉,所以在提取时应注意避免高温使淀粉糊化。粉碎能增大葛根表面积,加快浸出速度,所以提取葛根素时一定要尽量将葛根破碎。检测波长选择,制备葛根素标准液,参照紫外 - 可见分光光度法,于 190 ~ 900 nm 波长范围内进行全波长光谱扫描,记录吸收光谱。于 250 nm 处出现最大吸收峰,故选用 250 nm 为检测波长[11]。实验结果表明乙醇的体积分数、料液比、提取时间均对葛根素的提取有一定影响,经方差分析,提取时间、料液比对提取效果影响不显著,乙醇的体积分数则有显著影响 。

本实验研究表明,PRE 各剂量组均能延长醉酒小鼠的醉酒潜伏期,减少睡眠时间,缩短醒酒时间起到预防醉酒的效果。其机制为葛根素抑制了消化道对乙醇的吸收,加强了乙醇在胃肠道的首过消除,从而减小了乙醇生物利用度[12]。肝脏含酶丰富,由阳性对照组得知,当肝脏受到实质性损害时,会引起肝匀浆中 GPT、GOT 浓度升高。PRE 各剂量组可使肝匀浆中 GPT、GOT 浓度受抑制,表明葛根素能有效地提高机体抗氧化能力,减少脂质过氧化物的产生,从而降低酒精对肝脏的损伤。其作用机制为葛根素促了机体进新陈代谢,增加肝脏乙醇代谢解毒速度[12]。减少乙醇在机体的蓄积,从而降低血中乙醇浓度,减轻乙醇对人体神经系统、消化系统等的损害,起到有效的降醇解酒护肝作用。但并非 PRE 剂量越大肝匀浆中 GPT、GOT 浓度越小,剂量越大效果越好,说明用药剂量要恰当。

本研究分析了葛根的解酒预防效果,通过醒酒时间个肝组织中酶的变化的处以下结论:①葛根素对急性酒精中毒小鼠具有明显的解酒预防效果,能延长醉酒小鼠的醉酒潜伏期,减少睡眠时间,缩短醒酒时间和保护肝脏。②PRE 各剂量组肝匀浆中 GPT、GOT 浓度均受抑制,表明葛根具有素具有降低酒精对肝脏的损伤的作用。其作用机制与提高肝脏 GPT 和 GOT 活力,加速乙醇的代谢过程,提高肝脏抗氧化能力,降低氧自由基对肝细胞膜上脂质和蛋白的损伤,维持细胞膜结构与功能完整性有关。葛根素的解酒效果与葛根素的含量有一定的相关性,随着葛根素摄入剂量的增加,醉酒小鼠的醒酒时间降低。本实验为葛根素作解酒护肝的临床应用,以及低值葛根的高值化加工和利用提供了理论依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 2010 版中国药典一部[M]. 北京:中国中药科技出版社,2010:312.

[2] 宋 卉,李银花,郑 晖,等. 葛根素的药理作用与临床研究进展[J]. 现代医药卫生,2011,27(19):2936 - 2937

[3] 徐晓红. 葛根素注射液对慢性乙醇中毒小鼠记忆障碍的改善作用[J]. 中国药学杂志,2003,38(1):33 - 36

[4] Galli A, Pinaire J, Fischer M, et al. The transcriptional and DNA binging activity of peroxisome proxisome proliferator proliferator-activated receptor alpha is inhibited by ethanol metabolism. A novel mechanism for the development of ethanol-induced fatty liver[J]. J Biol Chem, 2001, 276(1):68 - 75.

[5] 陈 旭,王建国. 乙醇在体内的代谢及对机体的损害[J]. 科技信息,2008,(35):460.

[6] Takahashi A, Masuda A, Sun M, et al. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alternations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alternations in mitochodrial pH[J]. Brain Res Bull, 2004,62(6):497.

[7] 韩 婷,井 源,吴 静,等. 酒精性脂肪肝的肝损伤机制研究近况[J]. 实用肝脏病杂志,2007,10(4):279 - 282.

[8] 高学清,汪何雅,钱 和,等. 葛根和葛花对急性酒精中毒小鼠的解酒作用[J]. 食品与生物技术学报. 2012,41(6):621 - 627.

[9] 田代华. 实用中药辞典(下卷)[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:1897.

[10] 葛晓航. 纳络酮联合维生素 C、葛根素救治急性酒精中毒疗效分析[J]. 山东医药,2009(25):92 - 93.

[11] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 北京:化学工业出版社.

[12] 滕来宾,王静凤,杨延存,等. 海参岩藻聚糖硫酸酯对小鼠急性酒精中毒防治作用的研究[J]. 中国药理学通报,2011,27(6):835 - 839.

(编辑:左艳芳)