

达瓦依金提亚那丸提取工艺优化及其抗免疫性肝损伤作用

孙小雅¹, 司晓萍², 唐 辉^{1*}, 刘新豫¹, 翟 欣¹

(1. 石河子大学药学院, 新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002; 2. 石河子市食品药品检验所, 新疆 石河子 832001)

摘要: **目的** 优化达瓦依金提亚那丸提取工艺, 并评价其抗免疫性肝损伤作用。**方法** 以乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间为影响因素, 胡椒碱、木香烃内酯、去氢木香烃内酯、龙胆苦苷含量、出膏率的综合评分为评价指标, 正交试验优化醇提工艺; 以煎煮次数、煎煮时间、加水量为影响因素, 总多糖含量、出膏率的综合评分为评价指标, 正交试验优化水提工艺; 以 β -环糊精与挥发油比例、包合时间、包合温度为影响因素, 包合物得率、包合率的综合评分为评价指标, 正交试验优化包合工艺。再评价丸剂对刀豆蛋白 A (ConA) 诱导免疫性肝损伤小鼠丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、超氧化物歧化酶 (SOD), 谷胱甘肽 (GSH) 的活性, 以及丙二醛 (MDA), 一氧化氮 (NO) 含有量的影响。**结果** 最佳醇提条件为 8 倍量 80% 乙醇提取 2 次, 每次 1 h; 最佳水提条件为 14 倍量水煎煮 2 次, 每次 1.5 h; 最佳包合条件为 β -环糊精与挥发油比例 1:8, 在 40 ℃ 下包合 2 h。与模型组比较, 给药组小鼠血清中 ALT、AST 活性、肝内 MDA、NO 含量明显降低 ($P<0.05$), 肝组织匀浆 SOD、GSH 活性明显升高 ($P<0.05$), 并呈良好的量效关系。**结论** 该方法简便可靠, 可用于提取达瓦依金提亚那丸, 优化后其具有良好的抗免疫性肝损伤作用。

关键词: 达瓦依金提亚那丸; 醇提; 水提; 包合; 免疫性肝损伤; 刀豆蛋白 A; 正交试验

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2018)02-0459-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.02.044

达瓦依金提亚那丸是新疆维吾尔医院常用经典方, 由龙胆、黑胡椒、木香、大黄、菊苣子、旱芹子、天冬、毛甘松、青香茅、薄荷、茴芹果、玫瑰花, 三条筋 13 味药材组成, 在临床使用多年, 安全有效, 主要用于慢性肝炎及肝硬化患者, 尤其对慢性病毒性肝炎疗效非常显著^[1]。但其原剂型为全部药材直接打粉入药制成的大蜜丸, 服用剂量大, 患者顺应性较差, 从而使其临床应用大大受到限制, 目前尚无文献报道达瓦依金提亚那丸提取工艺及其抗肝损伤作用^[2]。课题组前期已将方中 13 味单方药材的水提、醇提液分别进行两两混合配伍试验, 根据混合溶液是否发生沉淀、变色等现象筛选出适宜合并提取的药味组合, 从而确定提取工艺路线, 本实验将通过正交试验对其进行优化, 并评价其抗免疫性肝损伤作用。

1 实验材料

LC-20 A HPLC 色谱仪 (日本岛津公司); BP211D 电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); TG16B 高速离心机 (中国恺达科学仪器有限公司); DKZW-C 恒温水浴锅 (北京光明医疗仪器厂); 旋转蒸发仪 (东京理化器械株式会社)。龙胆苦苷 (批号 110770-200906)、胡椒碱 (批号 110757-200206)、木香烃内酯 (批号 111524-201006)、去

氢木香烃内酯 (批号 110758-201413) 对照品均购自中国食品药品检定研究院。达瓦依金提亚那丸 (浓缩丸、大蜜丸, 石河子大学药学院药物分析实验室, 批号 2016001 ~ 2016007)。方中各单味药材均购自新疆麦迪森维药有限公司, 经石河子大学药学院生药学实验室李鹏教授鉴定为正品。ConA (美国 Sigma 公司, 批号 C2016); 联苯双酯滴丸 (北京协和药厂, 批号 08030202)。甲醇、乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 公司); 磷酸为分析纯 (北京化工厂); 水为双蒸水。SPF 级昆明 (KM) 种小鼠, 雌雄各半, 体质量 20 ~ 30 g, 由石河子大学实验动物中心提供。

2 方法与结果

2.1 提取工艺 课题组前期将方中 13 味单味药材分别进行水提、醇提, 所得溶液两两混合, 共构成 156 组配伍试验数, 监测其是否发生沉淀、变色等现象, 筛选出适宜合并提取的药味组合, 并进行药理实验, 最终得到本实验提取工艺路线。具体见图 1。

2.2 龙胆、黑胡椒、木香、大黄、菊苣子、旱芹子醇提工艺

2.2.1 指标及评分方法^[3] 以龙胆苦苷、胡椒碱、木香烃内酯、去氢木香烃内酯含量、出膏率为评价指标 (各指

收稿日期: 2016-12-26
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81260627, 81660641); 新疆生产建设兵团科技攻关及成果转化计划 (2016AD008); 八师石河子市科技计划项目 (2017H223)

作者简介: 孙小雅 (1988—), 女, 硕士生, 从事药物分析及新药研究。Tel: 18802089871, E-mail: 18809936256@163.com
*** 通信作者:** 唐 辉 (1967—), 博士, 教授, 从事药物分析及新药研究。Tel: 13909938508, E-mail: Th_pha@shzu.edu.cn

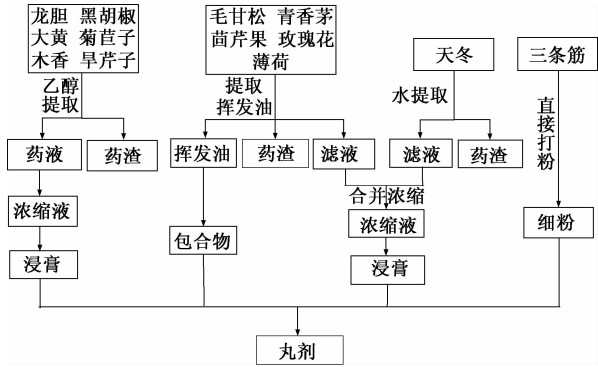


图1 提取工艺流程图

标权重系数均为0.2), 综合评分=(龙胆苦苷含量/最大含量)×20+(胡椒碱含量/最大含量)×20+(木香炔内酯含量/最大含量)×20+(去氢木香炔内酯含量/最大含量)×20+(总浸膏得率/最大得率)×20。

2.2.2 单因素试验^[4-6] 按处方比例, 称取干燥至恒重的

表2 醇提工艺试验设计与结果

试验号	因素				指标					
	A	B	C	D	胡椒碱/ (mg·g ⁻¹)	木香炔内酯/ (mg·g ⁻¹)	去氢木香炔内酯/ (mg·g ⁻¹)	龙胆苦苷/ (mg·g ⁻¹)	出膏率/ %	综合得分
1	1	1	1	1	11.29	8.60	7.25	17.35	16.56	61.05
2	1	2	2	2	11.40	9.93	9.02	14.61	17.43	62.39
3	1	3	3	3	11.43	9.52	10.46	13.73	18.06	63.19
4	2	1	2	3	16.36	13.97	13.17	18.27	18.72	80.05
5	2	2	3	1	16.41	15.72	13.07	18.01	18.38	81.59
6	2	3	1	2	16.31	14.16	13.26	15.79	19.16	78.68
7	3	1	3	2	19.96	19.52	20.00	19.00	19.22	97.71
8	3	2	1	3	19.73	18.36	17.56	20.00	19.52	97.99
9	3	3	2	1	20.00	20.00	18.00	17.04	20.00	92.20
K ₁	62.92	80.07	77.80	80.40						
K ₂	80.65	79.24	80.60	80.16						
K ₃	96.16	80.43	81.33	79.17						
R	33.24	1.19	3.54	1.23						

表3 醇提工艺方差分析

来源	离均差平方和	自由度	均方	F值	P值
A	1 660.136	2	830.068	636.192	0.002
B	2.326	2	1.163	0.891	0.529
C	20.740	2	10.370	7.948	0.112
误差	2.609	2	1.305	—	—
总变异	1 685.81	8	—	—	—

注: F_{0.05}(2,2)=19.00, F_{0.01}(2,2)=99.00

2.3 天冬水提工艺

2.3.1 指标及评分方法 以总多糖含量、出膏率为指标, 进行综合评价(权重系数分别为0.6、0.4), 综合评分=(总多糖含量/最大含量)×60+(出膏率/最大出膏率)×40。

2.3.2 总多糖含量测定^[7] 采用硫酸蒽酮法。精密称取105℃下干燥至恒重的葡萄糖对照品6.9mg, 置于50mL量瓶中, 加水稀释, 配制成每1mL含0.138mg葡萄糖的对照品溶液, 在620nm波长处测定吸光度, 以其为纵坐标

龙胆15g、黑胡椒15g、木香10.5g、大黄10.5g、菊苣子7.5g、早芹子1.5g, 每份60g, 考察各味药材粉碎粒度、乙醇体积分数、料液比、提取次数对各醇提工艺的影响, 按“2.2.1”项下方法进行评价。

2.2.3 正交试验 因素水平见表1, 试验设计及结果见表2, 方差分析见表3。由表2可知, 各因素影响程度依次为A(乙醇体积分数)>C(提取时间)>B(乙醇用量); 由表3可知, 乙醇体积分数具有显著性影响(P<0.05), 提取时间、乙醇用量无显著性影响(P>0.05)。因此, 为了降低提取工艺成本, 节省提取时间, 确定最优醇提工艺为A₃B₁C₁, 即8倍量80%乙醇提取2次, 每次1h。

表1 醇提工艺因素水平

水平	因素		
	A 乙醇/%	B 乙醇用量/倍	C 提取时间/h
1	60	8	1.0
2	70	10	1.5
3	80	12	2.0

(A), 溶液质量浓度为横坐标(X)进行线性回归, 得回归方程为A=0.0389X+0.0036(R²=0.9993), 在2.76~16.56μg/mL范围内线性关系良好。同法测定吸光度, 根据回归方程计算总多糖含量。

2.3.3 单因素试验^[8] 称取干燥至恒重的天冬, 每份20g, 考察煎煮次数(A)、煎煮时间(B)、加水量(C)对总多糖和浸膏得率的影响, 按“2.3.1”项下方法计算综合评分。

2.3.4 正交试验 因素水平见表4, 试验设计及结果见表5, 方差分析见表6。由表5可知, 各因素影响程度依次为A(煎煮次数)>B(煎煮时间)>C(加水量); 由表6

表4 水提工艺因素水平

水平	因素		
	A 煎煮次数/次	B 煎煮时间/h	C 加水量/倍
1	1	1.5	14
2	2	2.0	16
3	3	2.5	18

表 5 水提工艺试验设计与结果

试验号	因素				指标		综合评分
	A	B	C	D(误差)	总多糖/(mg·g ⁻¹)	出膏率/%	
1	1	1	1	1	28.20	38.23	60.83
2	1	2	2	2	39.21	37.67	71.52
3	1	3	3	3	41.79	38.31	74.72
4	2	1	2	3	45.64	43.26	82.77
5	2	2	3	1	47.62	43.78	85.20
6	2	3	1	2	49.02	45.26	87.88
7	3	1	3	2	55.00	47.32	95.73
8	3	2	1	3	56.92	47.55	97.85
9	3	3	2	1	59.04	47.46	99.92
K ₁	69.02	79.78	82.19	81.98			
K ₂	85.28	84.86	84.74	85.04			
K ₃	97.83	87.51	85.22	85.11			
R	28.81	7.73	3.03	3.13			

表 6 水提工艺方差分析

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	1 251.906	2	625.953	65.321	0.018
B	92.582	2	46.291	4.831	0.172
C	15.914	2	7.957	0.830	0.546
D(误差)	19.165	2	9.583	—	—
总变异	1 379.567	8	—	—	—

注： $F_{0.05}(2,2)=19.00,F_{0.01}(2,2)=99.00$

可知,煎煮次数具有显著性影响 ($P<0.05$),煎煮次数、加水量无显著性影响 ($P>0.05$)。因此,确定最优水提工艺为 A₂B₁C₁,即 14 倍量水煎煮 2 次,每次 1.5 h。

2.4 毛甘松、青香茅、薄荷、茵苜果、玫瑰花挥发油提取工艺^[9-10] 称取干燥至恒重的最粗粉毛甘松 63 g,薄荷、茵苜果、青香茅各 9 g,玫瑰花 15 g,每份 105 g,对浸泡时间、加水量和提取时间进行考察。结果,最优提取工艺为 5 味药材最粗粉提前浸泡 8 h 后,加 1 470 mL 水提取 6 h。

2.5 β-环糊精包合挥发油工艺

2.5.1 指标及评价方法^[11] 采用饱和水溶液法,以包合

物得率、包合率为评价指标,权重系数分别为 0.3、0.7,综合评分=(得率/最大得率)×30+(包合率/最大包合率)×70。

2.5.2 单因素试验 精密称取 β-环糊精 4.0 g,考察包合温度、β-环糊精与挥发油比例、包合时间,按“2.5.1”项下方法评价。

2.5.3 正交试验 因素水平见表 7,试验设计及结果见表 8,方差分析见表 9。由表 8 可知,各因素影响程度依次为 A(β-环糊精与挥发油比例)>B(包合时间)>C(包合温度);由表 9 可知,β-环糊精与挥发油比例包合温度($P<0.05$),包合时间、包合温度无显著性影响 ($P>0.05$)。因此,确定最优包合工艺为 A₂B₂C₂,即 β-环糊精与挥发油比例 1:8,在 40℃下包合 2 h。

表 7 包合工艺因素水平

水平	因素		
	A β-环糊精与挥发油比例	B 包合时间/h	C 包合温度/℃
1	1:6	1.0	30
2	1:8	2.0	40
3	1:10	3.0	50

表 8 包合工艺试验设计及结果

试验号	因素				指标		综合评分
	A	B	C	D(误差)	得率/%	包合率/%	
1	1	1	1	1	59.1	58.7	71.87
2	1	2	2	2	53.2	63.9	74.46
3	1	3	3	3	63.1	60.4	74.73
4	2	1	2	3	85.7	76.9	96.97
5	2	2	3	1	84.4	79.3	98.64
6	2	3	1	2	88.4	77.5	98.41
7	3	1	3	2	73.2	70.4	86.99
8	3	2	1	3	78.3	76.6	94.19
9	3	3	2	1	81.9	74.1	93.20
K ₁	73.69	85.28	88.16	87.90			
K ₂	98.01	89.10	88.21	86.62			
K ₃	91.46	88.78	86.79	88.63			
R	24.32	3.82	1.42	2.01			

表 9 包含工艺方差分析					
来源	离均差平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
A	950.213	2	475.106	152.888	0.006
B	26.966	2	13.483	4.339	0.187
C	3.906	2	1.953	0.628	0.614
D(误差)	6.215	2	3.108	—	—
总变异	987.299	8	—	—	—

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00,F_{0.01}(2,2)=99.00$

2.6 抗免疫性肝损伤的作用

2.6.1 浓缩丸制备 按最优工艺提取后,提取液通过自然沉降法静置 24 h,过滤除杂后,相应浓度溶剂清洗容器壁上的残留药液,滤液定容至 250 mL,提取液减压浓缩,温度 60~70 ℃,真空度 0.025~0.03 MPa,干燥成相对密度 1.05~1.10 (60 ℃) 的稠膏,置于 80 ℃ 真空干燥箱中(真空度 0.06~0.08 MPa),制成相对密度 1.25~1.30 的稠膏。按照 1:10 比例加入淀粉,将药粉粉碎后过 100 目筛,以水为黏合剂,混合后在 Φ5.0 刀具、Φ5.0 出条板中制丸。

2.6.2 大蜜丸制备 全方药材粉碎,过 100 目筛,以炼蜜为黏合剂,混合后在 Φ5.0 刀具、Φ5.0 出条板中制丸。

2.6.3 动物分组、给药与造模 100 只小鼠随机分为 7 组,每组 13 只,分组方法与每日给药剂量见表 10,每日固定时间灌胃给药 1 次,对照组和刀豆蛋白 A (ConA) 模型组给予等量生理盐水,连续 14 d。末次给药 4 h 后,每组尾静脉注射刀豆蛋白 (20 mg/kg),小鼠造模后禁食不禁水,8 h 后摘眼球采血,处死,分离血清,测定血清 ALT、AST。

2.6.4 血清肝功能指标检测^[12] 按“2.6.3”项下方法取血后静置 3 h,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液血清,测定 ALT 和 AST 活性,结果见表 10。由表可知,与对照组比较,模型组小鼠血清中 ALT、AST 水平均明显升高 ($P<0.01$),表明造模成功;与模型组比较,联苯双酯组、浓缩丸组、大蜜丸组小鼠血清中 ALT、AST 水平均明显降低 ($P<0.05$)。

表 10 药物对小鼠血清 ALT、AST 的影响($\bar{x}\pm s,n=13$)			
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	ALT/ (U·L ⁻¹)	AST/ (U·L ⁻¹)
正常组	—	48.25±9.00 [#]	355.00±28.44 [#]
模型组	—	83.64±18.16 ^{**}	527.64±76.32 ^{**}
联苯双酯组	1.13	49.57±15.53 [#]	375.57±74.52 [#]
大蜜丸组	1 800	50.30±14.82 [#]	369.90±94.43 [#]
浓缩丸低剂量组	193	66.38±7.65 [#]	339.50±74.71 [#]
浓缩丸中剂量组	385	50.70±14.75 [#]	364.30±128.95 [#]
浓缩丸高剂量组	770	47.75±8.05 [#]	347.37±131.38 [#]

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$

2.6.5 肝组织氧化和抗氧化指标检测^[13-14] 按标准操作制备组织匀浆,测定肝匀浆中 MDA、NO、GSH 含量和 SOD 活力,结果见表 11、12。由表可知,与对照组比较,模型组中 MDA、NO 含量显著上升,SOD 活性、GSH 含量明显降低 ($P<0.01$);与模型组比较,各治疗组、联苯双酯组 MDA 含量明显降低 ($P<0.05$),大蜜丸组、

联苯双酯组、浓缩丸中、高剂量组 SOD 酶活性明显升高,NO 含量明显降低 ($P<0.05$),GSH 含量明显上升 ($P<0.05$)。以实验前后小鼠脏器质量除以体质量计算脏器指数,结果见表 13,可知与模型组比较,联苯双酯组、大蜜丸组、浓缩丸中、高剂量组肝脏指数和脾指数均有不同程度的下降 ($P<0.01$)。

表 11 药物对小鼠肝组织中 SOD、MDA 的影响($\bar{x}\pm s,n=13$)			
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	SOD/ (U·mg prot ⁻¹)	MDA/ (nmol·mg prot ⁻¹)
正常组	—	142.79±9.94 [#]	11.96±2.46 [#]
模型组	—	75.59±14.21 ^{**}	17.87±5.63 ^{**}
联苯双酯组	1.13	131.01±18.19 [#]	14.02±4.15 [#]
大蜜丸组	1 800	112.53±8.09 [#]	14.12±3.71 [#]
浓缩丸低剂量组	193	96.40±7.58	14.80±5.25 [#]
浓缩丸中剂量组	385	113.02±13.68 [#]	14.16±3.78 [#]
浓缩丸高剂量组	770	133.82±13.38 [#]	13.24±2.93 [#]

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$

表 12 药物小鼠肝组织中 NO、GSH 的影响($\bar{x}\pm s,n=13$)			
组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	NO/ (μmol·g prot ⁻¹)	GSH/ (mg·g prot ⁻¹)
正常组	—	1.45±0.46 [#]	4.36±0.52 [#]
模型组	—	3.67±0.84 ^{**}	2.77±0.85 ^{**}
联苯双酯组	1.13	1.89±0.57 [#]	4.13±0.62 [#]
大蜜丸组	1 800	1.98±0.64 [#]	3.98±0.31 [#]
浓缩丸低剂量组	193	2.86±0.43 [#]	3.04±0.49 [#]
浓缩丸中剂量组	385	2.23±0.78 [#]	3.82±0.65 [#]
浓缩丸高剂量组	770	2.04±0.34 [#]	4.16±0.34 [#]

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$

表 13 药物对小鼠脏器指数的影响($\bar{x}\pm s,n=13$)			
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肝脏系数/%	脾脏系数/%
正常组	—	4.04±1.17 [#]	0.32±0.08 [#]
模型组	—	5.10±0.70 ^{**}	0.58±0.13 ^{**}
联苯双酯组	1.13	4.47±1.10 [#]	0.39±0.11 [#]
大蜜丸组	1 800	4.43±0.91 [#]	0.41±0.02 [#]
浓缩丸低剂量组	193	5.02±1.25	0.48±0.10 [#]
浓缩丸中剂量组	385	4.41±1.05 [#]	0.42±0.07 [#]
浓缩丸高剂量组	770	4.19±0.43 [#]	0.40±0.11 [#]

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$

2.6.6 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计学软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较用 one-way ANONA,计数资料组间比较采用 χ^2 ,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义^[15]。

3 讨论

在醇提工艺中,以君药龙胆、黑胡椒,木香中与药效高度相关的主要活性成分,以及总浸膏得率作为评价指标,可全面系统地反映该工艺。天冬中多糖为其主要活性成分,而且含量很高,采用水提工艺可保证其提取完全。考虑到薄荷、玫瑰花,茵陈果等 5 味药材中挥发油为重要有效成分,并具有一定的保肝作用,故选择在制药行业中最常用的水蒸气蒸馏法进行提取,同时还可收集其水提液,充

分提取有效成分。挥发油在制剂中的处理方法很多，如直接喷洒、包合等，考虑到前者稳定性差、不能长时间储存、挥发油易逸散，故选用后者。

大量研究表明，由刀豆蛋白 A 所诱发的小鼠免疫性肝损伤模型的病理过程与多种慢性肝病非常相似，能更好地模拟人类自身免疫性肝病和病毒性肝炎的发病过程^[16]。本实验结果表明，达瓦依金提亚那丸浓缩丸给药组小鼠肝组织中 SOD 活性显著升高，且具有一定量-效关系，表明其可诱导 SOD 的表达，提高机体清除自由基的活性；与模型组比较，治疗组能明显升高 GSH 含量（ $P<0.05$ ），可直接清除自由基，或是通过促进谷胱甘肽合成酶的合成来升高其含量。ConA 诱导的肝损伤是典型的 T 细胞依赖性肝损害，多种细胞因子参与了这一过程，其机制可能与抗氧化，以及抑制 IL-1、IFN- γ 、TNF- α 水平有关^[17]，具体还有待于深入探索。本实验首次对达瓦依金提亚那丸的提取工艺及其抗肝损伤作用进行初步研究，可为相关新药开发和药材资源有效利用提供了丰富的理论及实践基础。

参考文献：

[1] 刘红虹,王福生. 慢性乙型肝炎的中医免疫调节药物治疗进展[J]. 中医杂志, 2011, 52(S1): 195-196.

[2] 张 涛, 安熙强, 刘君琳, 等. 维药恰玛古硫代葡萄糖苷的提取纯化工艺及其抗肿瘤药理作用研究[J]. 中成药, 2016, 38(8): 1831-1835.

[3] 王 幻, 唐 辉, 王国军, 等. 高效液相色谱法同时测定维药达瓦依金丸中 8 种有效成分[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(11): 1316-1320.

[4] 李祖光, 高云芳, 刘文涵. 黑胡椒风味成分的研究[J]. 食品科学, 2013, 24(10): 128-131.

[5] Lin C C, Wu C I, Lin T C, *et al.* Determination of 19 rhubarb constituents by high-performance liquid chromatography-ultraviolet-mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2006, 29 (17): 2584-2593.

[6] 刘迎春,王绍宁,张 莹, 等. RP-HPLC 法测定六味木香胶囊中木香炔内酯含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(4): 229-231.

[7] 熊大胜, 许云香, 郭春秋. 天冬块根药用成分对小鼠抗氧化延缓衰老的影响[J]. 湖南文理学院学报 (自然科学版), 2009, 21(4): 40-43, 46.

[8] 曲凤玉, 毛金军, 魏晓东, 等. 天门冬对 D-半乳糖衰老模型小鼠红细胞膜、肝细胞膜 MDA 影响的实验研究[J]. 中草药, 1999, 30(10): 763-764.

[9] 陈集双, 彭崇胜, 杜琪珍, 等. 香茅叶挥发油化学成分的研究[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(7): 462.

[10] Fu M, Ng T B, Jiang Y, *et al.* Compounds from rose (*Rosa rugosa*) flowers with human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitory activity[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2006, 58(6): 1275-1280.

[11] Al-Bayati F A. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts[J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 116(3): 403-406.

[12] 杨莉莉, 董 文, 贺巾超, 等. 重组牛胰蛋白酶抑制剂对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(4): 448-451.

[13] 帅学宏, 胡庭俊, 曾 芸, 等. 山豆根多糖对免疫抑制模型小鼠免疫器官指数和自由基相关酶活性的影响[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(2): 170-172.

[14] 石 晶, 王中孝, 田亚平, 等. 姜黄素对高脂血症大鼠血浆和肝脏超氧化物歧化酶和脂质过氧化物的影响[J]. 中草药, 1997, 28(5): 285-287.

[15] 李春雨, 李晓菲, 涂 灿, 等. 基于内毒素模型的何首乌特异质肝损伤评价[J]. 药学报, 2015, 50(1): 28-33.

[16] 张 宁, 杨楠楠, 刘海洋, 等. 逍遥散干预肝损伤小鼠的代谢组学研究[J]. 中成药, 2014, 36(1): 171-175.

[17] 李常青, 刘丽丽, 莫传伟, 等. 苦参碱对刀豆蛋白 A 致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(3): 175-177.