

茵陈蒿汤水提物和醇提物活性组分的差异 及对 *D*-GalN 诱导大鼠急性肝损伤预防作用的比较

蔡华丹, 张慧芹, 续畅, 唐炳华, 郝钰, 李健*

(北京中医药大学基础医学院细胞生物化学实验室, 北京 100029)

[摘要] **目的:**比较茵陈蒿汤水提物和醇提物对大鼠肝损伤的疗效,并初步探讨二者疗效差异的原因。**方法:**用 TLC 初步比较茵陈蒿汤水提物和醇提物的成分差异,HPLC 测定茵陈蒿汤水提物和醇提物中栀子苷和大黄素的含量,并以 *D*-氨基半乳糖(*D*-GalN)复制大鼠肝损伤模型,随机分为正常对照组、模型对照组、乙醇提取物高剂量预防组、乙醇提取物低剂量预防组、水提物高、低剂量组。水提物和醇提物的高、低剂量分别以预防性 ig 高剂量 $1.67 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、低剂量 $0.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药 7 d,对照组正常饮食。8 d 后观察提取物对大鼠血清肝损伤指标的影响,对肝组织进行常规 HE 染色。**结果:**茵陈蒿汤水提物和醇提物的成分存在差别,但二者均具有肝损伤的保护作用,其中水提物能明显降低模型大鼠血清天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、甘油三酯(TG)、总胆红素(T-Bil)含量($P < 0.05, P < 0.01$),改善了肝脏的炎症病理状态。醇提物对血清 AST,ALT,ALP 等部分指标有所改善($P < 0.05, P < 0.01$)。但水提取物中栀子苷和大黄素的含量均低于醇提取物。**结论:**以药效为指标,茵陈蒿汤对 *D*-氨基半乳糖所致大鼠肝损伤的保护作用,以水提取工艺为佳。

[关键词] 茵陈蒿汤; 水提物; 醇提物; 化学指标

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0216-05

[doi] 10.11653/syfy2013100216

Comparative Study of Yinchenhao Tang Water Extract and Its Alcohol Extract and Their Effects on Rat Liver Injury Model

CAI Hua-dan, ZHANG Hui-qin, XU Chang, TANG Bing-hua, HAO Yu, LI Jian*

(Cellular & Biochemical laboratory, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the effects of Yinchenhao Tang water extract and its alcohol extract on rat liver injury model and explore the possible reasons for differences in efficacy. **Method:** The differences were compared in composition of the two extracts by TLC and determining the content of geniposide and emodin by HPLC. The liver injury model was established with galactosamine, the rats were randomized into natural group, model group, Yinchenhao Tang water extract of high dose group, Yinchenhao Tang water extract of low dose group, Yinchenhao Tang alcohol extract of high dose group, Yinchenhao Tang alcohol extract of low dose group. Rats in medication groups were administrated ig with corresponding herbs, water extract group ($1.67, 0.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), alcohol extract group ($1.67, 0.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and natural group was given normal diet. After treatment for 8 days, the influence of the treatments on the serum hepatic injury indicators was investigated. Hepatic tissues were detected by HE. **Result:** There were differences between the compositions of two extracts, but both had the protection effect of liver injury with different intensity, and the level of aspartate aminotransferase (AST), glutamic-pyruvic transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), triglycerides (TG), total bilirubin (T-Bil) in liver of water extract group were significantly lower than those of model group ($P < 0.05, P < 0.01$). It

[收稿日期] 20121120(002)

[基金项目] 北京中医药大学自主选题项目(JYBZZ-JS004);高等学校学科创新引智计划项目(B07007)

[第一作者] 蔡华丹,研究生,从事中医药防治肝病的研究,Tel:010-64487524,E-mail:caihuadan1988@126.com

[通讯作者] *李健,医学博士,副教授,从事中医药防治肝病的研究,E-mail:lijiancn922@126.com

can improve the steatosis of liver in rats. Meanwhile, the level of AST, ALT, ALP in serum of alcohol extract group were also significantly lower than those of model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). And the content of geniposide and emodin of water extract were lower than those of alcohol extract. **Conclusion:** Comparing with ethanol extracts of Yinchenhao Tang, its water extracts had certain advantage of the protective effect on *D*-galactosamine-induced liver injury in rats according to pharmacodynamics results.

[**Key words**] Yinchenhao Tang; water extract; alcohol extract; chemical indicators

茵陈蒿汤是《伤寒论》的经典名方,由茵陈、栀子、大黄组成,具有清热、除湿、利胆、退黄的功能,为中医治疗湿热黄疸之第一要方,现广泛用于各种肝炎、胆囊炎等病的治疗,具有很好的开发前景^[1-2]。现有的文献资料表明,茵陈蒿汤对多种因素诱导的肝损伤具有较好的保肝作用^[3-9]。然而,茵陈蒿汤不同提取工艺制备的制剂,其成分和药效均存在显著差异^[10-11]。本课题组对茵陈蒿汤水提物和乙醇提取物预防 *D*-氨基半乳糖(*D*-GalN)诱发大鼠急性肝损伤的药效进行了比较观察,发现茵陈蒿汤水提物在降胆红素、降甘油三酯及肝保护作用方面优于乙醇提取物。为了进一步揭示两种提取物药效学差异所对应的物质基础,本文采用薄层及液相色谱方法对茵陈蒿汤水提和醇提工艺制备的提取物的化学指标进行分离、比较和鉴定,期望能发现水提物及醇提物中活性组分的不同,为揭示茵陈蒿汤化学指标与药效的相关性,及中药制剂工艺的研究提供实验数据和支撑。

1 材料

1.1 药物与试剂 茵陈、栀子、大黄均购自北京同仁堂总店。栀子苷、大黄素对照品均购自通拓色谱技术(天津)有限公司。*D*-氨基半乳糖(*D*-GlaN,购于 Sigma 公司, Cat. G0500)。天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒(批号 20110625)、丙氨酸转氨酶(ALT)试剂盒(批号 20110625)、碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(批号 20110625)、甘油三酯(TG)试剂盒(批号 20110922)及总胆红素(T-Bil)试剂盒(批号 20110625),均为中生北控生物技术股份有限公司生产。甲醇、乙腈等均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.2 动物 健康雄性 Wister 大鼠,体重(200 ± 20) g,北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2006-2009。

1.3 仪器 LC-20A 型高效液相色谱仪(日本,岛津),SPD-20A 紫外检测器(日本,岛津)。

2 方法

2.1 茵陈蒿汤水提物、醇提物的制备 取茵陈

(1 200 g)、栀子(600 g)、大黄药材(400 g),20 倍量水煎煮 2 次,每次 30 min,过滤,滤液合并,减压浓缩得到水提物(1 mL ≈ 2.88 g 生药)。取相同量药材,20 倍 95% 乙醇浸泡 1 h,加热回流提取 1 h,过滤;第 2 次加 10 倍量 95% 乙醇回流提取 1 h,过滤,合并 2 次滤液,回收乙醇,得到 95% 乙醇提取物(1 mL ≈ 2.05 g 生药)。

2.2 药效学实验

2.2.1 动物分组及处理 大鼠随机分为 6 组(10 只/组):① 正常对照组;② 模型对照组;③ 乙醇提取物高剂量预防组(1.67 g·kg⁻¹);④ 乙醇提取物低剂量预防组(0.84 g·kg⁻¹);⑤ 水提物高剂量预防组(1.67 g·kg⁻¹);⑥ 水提取低剂量预防组(0.84 g·kg⁻¹)。大鼠 ig 给药,给药剂量根据提取物的得率及人临床常用量(约 24 g·d⁻¹)换算;模型及正常对照组 ig 等量自来水。各组动物连续 ig 给药 7 d 后,除正常对照组外,各组大鼠在末次给药 6 h 1 次性 ip *D*-GlaN(0.4 g·kg⁻¹)诱发急性肝损伤(正常对照组 ip 等量生理盐水)。*D*-GlaN ip 24 h 后,麻醉大鼠,取血清及肝组织待测。

2.2.2 大鼠血清中 TG, T-Bil 含量检测 血清中 TG, T-Bil 含量检测采用全自动生化分析仪。

2.2.3 肝组织病理学检测 肝组织经 4% 多聚甲醛固定,依照常规方法进行石蜡包埋、切片、HE 染色。HE 切片使用 Olympus 摄像系统进行观察和摄片。

2.3 薄层层析条件 硅胶 G 板,以石油醚(30 ~ 60 °C)-乙酸乙酯-甲酸(15:5:1)作展开剂。薄层色谱实验分别吸取供试品溶液点于同一硅胶 G 薄层板上。

2.4 色谱条件建立

2.4.1 栀子苷含量测定色谱条件及方法学考察 色谱条件: Hypersil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(15:85),检测波长 238 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温为室温,保留时间约为 50 min。方法学考察:栀子苷含量测定的线性回归方程为 $Y = 52\ 215X + 2\ 601.6$ ($r = 0.999\ 8$),线性

范围: 0.060 0 ~ 0.540 0 μg; 精密度试验 RSD 1.13% (n=6); 稳定性实验 RSD 0.54% (n=3); 经加样回收试验得平均回收率为 103.87%, RSD 0.95% (n=3)。

2.4.2 大黄素含量测定色谱条件及方法学考察
Hypersil-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸 (85:15), 检测波长 280 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温为室温, 保留时间约为 50 min。方法学考察: 大黄素含量测定的线性回归方程为 $Y = 7\ 656.1X - 3\ 012.4$ ($r = 0.999\ 9$, 线性范围 0.026 0 ~ 0.520 0 μg; 精密度试验 RSD 0.65% (n=6); 稳定性实验 RSD 1.17% (n=3); 经加样回收试验得平均回收率为 97.35%, RSD 1.23% (n=3)。

2.5 茵陈蒿提取物中栀子苷、大黄素含量测定

2.5.1 供试品溶液的制备 精密称取茵陈蒿汤水提物、醇提物粉末各 0.20 g, 置锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 密塞, 超声处理 30 min, 取出待冷至室温, 转移至 25 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度线, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.5.2 对照品溶液的制备 分别精密称取栀子苷、大黄素对照品, 用甲醇溶解并定容得 0.030 0, 0.026 0 g·L⁻¹ 溶液, 作为对照品溶液。

2.6 数据分析及统计 计量资料采用 SAS9.2 统计分析软件进行计算, 不同组间差异用描述, 对符合正态分布且方差齐性的计量资料, 组间比较采用广义线性模型单因素方差分析和最小二乘均值 (Least squares means) 的 *t* 检验方法; 水提物与醇提物组间比较采用多因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 茵陈蒿汤水提物及醇提取物药效学比较

3.1.1 对大鼠血清中 AST, ALT, ALP, TG, T-Bil 含量的影响 与正常组比较, *D-GlaN* 诱发的急性肝损伤模型大鼠血清中 AST, ALT, ALP, TG 及 T-Bil 的水平均显著升高, 表明模型制备成功; 与模型组比较, 茵陈蒿汤水提物低剂量组大鼠血清 TG 含量显著降低 ($P < 0.05$, 表 1), 水提物高剂量组大鼠血清中 T-Bil 含量显著降低 ($P < 0.01$, 表 1)。而二者对 AST, ALT, ALP 水平的影响没有显著差异。

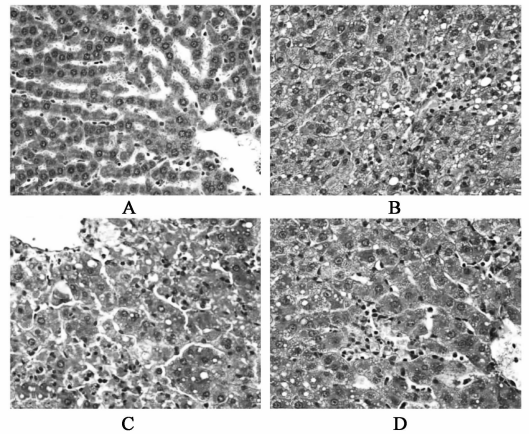
3.1.2 对肝脏病理改变的影响 模型组肝细胞肿胀、胞浆内嗜酸性颗粒增多、核染色质明显减少; 肝细胞伴随较严重的脂肪样变性、肝血窦内 Kupffer 细胞及中性粒细胞增多、门管区及血管周围可见明显

表 1 茵陈蒿汤 2 种提取物对急性肝损伤大鼠血清中 TG, T-Bil 含量检测 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) mmol·L⁻¹

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TG	T-Bil
模型	-	0.89 ± 0.19	7.66 ± 1.03
正常对照	-	0.48 ± 0.08 ¹⁾	4.20 ± 0.27 ¹⁾
茵陈蒿汤水提取物	1.67	0.73 ± 0.15	5.24 ± 1.12 ¹⁾
	0.84	0.60 ± 0.18 ²⁾	6.00 ± 0.79 ²⁾
茵陈蒿汤醇提取物	1.67	0.78 ± 0.16	6.51 ± 1.62
	0.84	0.82 ± 0.28	6.69 ± 1.01

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$ 。

的炎性细胞浸润。茵陈蒿汤水提物干预组大鼠肝组织内炎性细胞浸润减少、肝细胞内脂肪样病变明显改善, 提示肝保护作用相对好于醇提物 (图 1)。



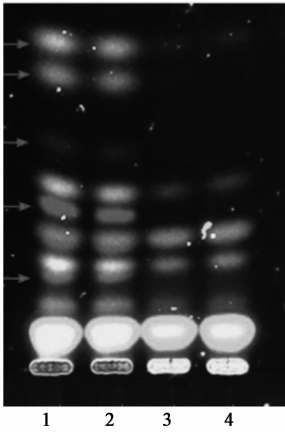
A. 正常对照; B. 模型对照;

C. 茵陈蒿汤水提物低剂量组; D. 茵陈蒿汤醇提物低剂量组

图 1 肝组织病理学检测 (HE 染色, ×400)

3.2 薄层层析 以石油醚 (30 ~ 60 °C)-乙酸乙酯-甲酸 (15:5:1) 作展开剂, 对茵陈蒿汤醇提物与水提物进行了薄层层析。用展开剂展开后, 将薄层板取出晾干, 然后在 365 nm 的紫外灯下观察, 结果如图 3 所示。可以看出, 醇提物和水提物的层析结果差别很大, 除了几个 R_f 相同的点以外, 醇提物比水提物明显多了几个展开点 (红色箭头标识)。这表明, 不同提取方法提取出的药物成分有较大差别, 醇提法比水提法能够提取得到更多化合物。见图 2。

3.3 茵陈蒿水提物及乙醇提取物中栀子苷、大黄素的含量 在对照品的对照下, 采取相同的色谱条件, 对茵陈蒿汤水提物和醇提物供试品溶液进行栀子苷、大黄素含量的测定。见表 2。图 3-A、B、C 分别给出了栀子苷对照品、醇提物中栀子苷含量和水提物中栀子苷含量的色谱图, 可以看出, 醇提物中栀子苷的含量高于水提物。图 3-D、E、F 分别给出了大



1,2. 茵陈蒿汤醇提取物;3,4. 茵陈蒿汤水提取物,箭头标示差异部位

图2 茵陈蒿汤醇提取物、水提取物的薄层色谱

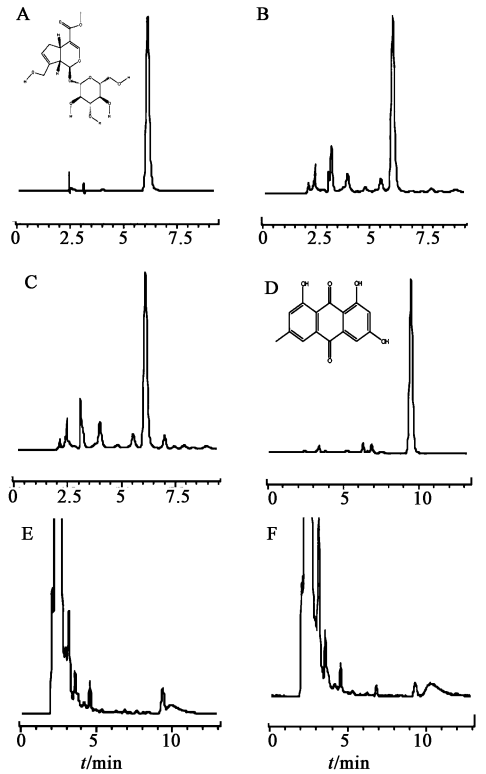
黄素对照品、醇提取物中大黄素含量和水提取物中大黄素含量的色谱图,可以看出,醇提取物中大黄素的含量明显高于水提取物。通过积分面积计算得到的含量结果见表2,给出了与色谱图一致的结果。这表明通过醇提法和水提法都能够获得茵陈蒿汤的主要药效成分栀子苷和大黄素,但是醇提取物中二者的含量均高于水提取物。

表2 茵陈蒿汤不同提取工艺的药效成分含量测定

茵陈蒿汤提取物	栀子苷/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	大黄素/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
醇提	1.755	0.083
水提	1.311	0.016

4 讨论

中药汤剂是中药传统剂型之一,在中医临床应用最为广泛。然而随着中药现代化进程的加快,有机溶剂(乙醇、石油醚等)在中药制剂中大量使用。众所周知,溶剂不同,提取物中有效物质(活性组分)的含量、种类均发生显著变化。本实验通过薄层层析及高效液相层析技术直观的展示了茵陈蒿汤水提取物和乙醇提取物组分及质控成分的差异,结果表明:乙醇提取物所包含的组分数量及质控成分含量均高于水提取物。然而动物实验结果提示:茵陈蒿汤水提取物的降胆红素、降甘油三酯活性及保肝作用却好于乙醇提取物。该结论与现有的研究结果不完全一致,如:王喜军等研究了茵陈蒿汤对四氯化碳、乙醇及 α -萘异硫氰酸酯等所致肝损伤的保肝作用,结果均表明茵陈蒿汤乙醇提取物的肝损伤保护效果优于水提取物^[12-13]。史红等分别采用 CCl_4 诱导的大鼠肝细胞损伤模型和小鼠急性肝损伤模型对茵陈蒿汤乙醇提取物和水提取物进行药效筛选,结果表明,茵陈蒿汤醇提取物对 CCl_4 诱导原代培养大鼠肝



A. 栀子苷对照品; B. 茵陈蒿汤醇提取物中栀子苷;
C. 茵陈蒿汤水提取物中栀子苷; D. 大黄素对照品;
E. 茵陈蒿汤醇提取物中大黄素;
F. 茵陈蒿汤水提取物中大黄素

图3 茵陈蒿水提取物和醇提取物中栀子苷、大黄素 HPLC

细胞损伤的保护作用优于水提取物;而水提取物对 CCl_4 诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用好于醇提取物^[14]。上述研究结果提示:中药水煎和有机溶剂提取可获得不同的有效组分(部位或基团),各自对应不同的“靶标”。研究经方、验方的功能、主治及现代药理机制应沿用传统的水提取工艺。

现代研究认为,中药的煎煮,不仅是药物有效成分的溶出,也是药物中各种生理活性成分进行化学反应的过程^[15]。而醇提取则是把药物中溶于醇液的成分提取出来了。根据物质的相似相容原理可知:水提取物的极性会比醇提取物的极性大些,水溶性成分一般是一些相对分子质量较大,结构复杂的化学成分如多糖、鞣质等。本实验的色谱实验结果表明:水提取物中栀子苷、大黄素的含量均低于醇提取物。栀子苷是中药栀子的主要活性物质之一,具有保肝利胆、抗氧化、镇痛、消炎、抗肿瘤等广泛的生物活性^[16];大黄素是中药大黄的主要活性物质之一,具有抗氧化和自由基、抗炎等生物活性^[17]。本实验的结果表明,虽然水提取物中栀子苷及大黄素的含量低于乙醇提取物,但是水提取物药效作用却好于乙醇提

取物,进一步证实中药复方的药效作用是整体、综合作用,不应强调某一个或几个单体化合物的活性。

本实验采用的 *D*-GalN 诱导肝损伤模型与人类病毒性肝炎的变化相似,肝特异性强,重复性好,因此是比较理想的肝炎动物模型^[18-19]。诚然,该模型只能反映肝炎的部分病理特征,所反映的也只是茵陈蒿汤药理活性的一部分。对茵陈蒿汤水提物降胆红素、降甘油三酯及肝保护作用的深入研究还需引进其他肝损伤模型,如 CCl₄ 肝损伤、酒精性肝损伤、胆汁淤积性肝损伤等动物模型。此外,本实验中通过薄层层析发现的差异组分需进行进一步的分离、鉴定,明确其中的化合物组成,为揭示茵陈蒿汤“退黄、保肝”作用的物质基础及新药研发提供实验数据和支撑。

[参考文献]

[1] 朱世敏,唐志鹏.茵陈蒿汤护肝作用研究进展[J].上海中医药杂志,2008,42:73.

[2] 慕永平,刘平,王磊.茵陈蒿汤的发展及现代研究[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(2):67.

[3] 王喜军,王萍,孙晖,等.茵陈蒿汤对 ANIT 诱导的急性肝损伤的保护作用[J].中医药学报,2007(4):17.

[4] 刘莲,孙晖,王喜军,等.茵陈蒿汤对乙醇诱导的大鼠急性肝损伤的保护作用研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2007,04:35.

[5] 刘莹,张会存,段娜,等.茵陈蒿汤对高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪性肝炎的药效学观察[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(13):217.

[6] 刘果,王风云,唐旭东,等.茵陈蒿汤及其变方对 ConA 诱导慢性免疫性肝损伤小鼠 IP-10、CXCR3 的影响[J].世界华人消化杂志,2012,23:2131.

[7] 陈少东,范应,徐维佳,等.茵陈蒿汤调节高脂饮食诱导大鼠脂质代谢紊乱的作用及机制研究[A].中国中西医结合学会.第二届国际中西医结合肝病学术

会议论文集[C].中国中西医结合学会,2010:2.

[8] 朱平生,龙爱华,王兵.不同经典方剂对肝内胆汁淤积大鼠肝肾功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(5):200.

[9] 刘莹,张会存,段娜,等.茵陈蒿汤对高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪性肝炎的药效学观察[J].中国实验方剂学杂志,2012,13:217.

[10] 王立强,王喜军.茵陈蒿汤乙醇提取物与水提取物对小鼠保肝作用的比较[J].中国医院药学杂志,2002(5):7.

[11] 杜伟,卢金福,樊宏伟.茵陈蒿汤效应成分测定与提取工艺合理性研究[J].南京中医药大学学报,2012(2):175.

[12] 王喜军,孙文军,孙晖,等.CCl₄诱导大鼠肝损伤模型的代谢组学及茵陈蒿汤的干预作用研究[J].世界科学技术,2006(6):101.

[13] 王喜军,刘莲,孙晖,等.乙醇诱导大鼠肝损伤的代谢组学和茵陈蒿汤的干预研究[J].中国药理学通报,2008(4):452.

[14] 史红,陈丽艳.“茵陈蒿汤”复方有效部位群的提取及药效筛选[J].浙江省医学科学院报,2007(71):19.

[15] 陈丹丹,宋亮,刘丽娟.传统中药煎煮方法与新技术的结合应用[J].陕西中医学院学报,2007(5):78.

[16] 刘益华,李晶,林曼婷,等.栀子有效成分栀子苷的现代研究进展[J].中国药学杂志,2012,47(6):406.

[17] 刘晗,高云.大黄素药理作用的分子机制研究进展[J].中国药理学通报,2009,25(12):1552.

[18] 李梅,谷淑玲,马腾飞.*D*-氨基半乳糖致小鼠、大鼠肝损伤模型的实验性研究[J].徐州医学院学报,2007(2):86.

[19] 金永三,贲长恩,王德福.大鼠 *D*-氨基半乳糖肝损伤后肝细胞几种组学之化学定量分析及血清学观察[J].解剖学报,1990,21(增):81.

[责任编辑 聂淑琴]