

# 复方茵黄解毒汤有效部位体外抗乙肝病毒活性测定 及薄层扫描指纹图谱的构建

许重远<sup>1,2\*</sup>, 张 焜<sup>2</sup>, 杨 芳<sup>1</sup>, 方岩雄<sup>2</sup>, 彭树灵<sup>1</sup>, 魏 莉<sup>2</sup>

(1. 南方医科大学南方医院, 广东 广州 510515; 2. 广东工业大学轻化学院, 广东 广州 510090)

[摘要] 目的: 初步构建复方茵黄解毒汤乙酸乙酯有效部位体外抗乙肝病毒活性指导下的薄层扫描指纹图谱, 为复方茵黄解毒汤建立更高的质量标准打下基础。方法: 以 HepG<sub>2</sub>-2.2.15 细胞系为模型, 采用 ELISA 法测定复方茵黄解毒汤的乙酸乙酯有效部位活性, 再通过薄层色谱法对乙酸乙酯有效部位进行展开, 运用岛津 CS9000 薄层扫描仪进行单波长扫描。结果: 该有效部位在体外培养中对病毒抗原的分泌有较强的抑制作用。同时其薄层色谱峰也得到较好分离, 获得了较理想的薄层色谱指纹图谱, 并确定其中小檗碱、咖啡酸、阿魏酸和大黄酸峰的归属。结论: 在活性指导下的薄层扫描指纹图谱将谱与效联系起来, 可更好地体现和控制复方中药制剂的质量。

[关键词] 复方茵黄解毒汤; 抗乙肝病毒活性; 薄层扫描; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)07-0016-04

## Determination of Anti-HBV Activity *in Vitro* and Establishment of Thin-layer Chromatography Scan(TLCS) Fingerprinting for the Active Extract of Compound Decoction of Yinchenhao and Huanglianjiedu(CDYH)

XU Zhong-yuan<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Kun<sup>1</sup>, YANG Fang<sup>1</sup>, FANG Yan-xiong<sup>2</sup>, PENG Shu-ling<sup>1</sup>, WEI Li<sup>2</sup>

(1. Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. College of Chemistry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510090, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a TLCS fingerprinting for ethyl acetate extract of CDYH with anti-HBV activity *in vitro*, Which will be helpful for the quality standard of CDYH. **Methods:** Using HepG<sub>2</sub>-2.2.15 cells strain, the anti-HBV activity of ethyl acetate extract of CDYH was detected by ELISA, meanwhile ethyl acetate extract of CDYH was chromatographed by TLC and analyzed by CS9000 TLCS. **Results:** The ethyl acetate extract of CDYH has a significant inhibitory effect on antigen of HBV *in vitro*, and A good separating TLCS fingerprinting was established and four peaks were identified as berberine, caffeic acid, ferulic acid and rhein respectively. **Conclusion:** The fingerprinting was connected with the effect of anti-HBV activity, and the quality of this preparation was controlled better.

[Key words] Compound decoction of Yinchenhao and Huanglianjiedu (CDYH); Anti-HBV activity; TLCS; Fingerprinting

复方茵黄解毒汤是南方医院药学部在开发经典复方时, 将茵陈蒿汤和黄连解毒汤二者联合命名来

的。由茵陈蒿、大黄、栀子、黄芩、黄柏、黄连、蒲公英等多味中药组成, 其功能为清热利湿、疏肝解郁、利胆退黄, 迅速降低转氨酶, 调理消化功能。为进一步开发该复方制剂, 采用指纹图谱技术提高其质量标准, 首先对其汤剂进行研究。首先对复方茵黄解毒汤的乙酸乙酯部位进行抗乙肝病毒活性研究, 初步

[收稿日期] 2005-10-08

[通讯作者] 许重远, Tel: 13926186470; E-mail: xuzy9806@vip.sina.com

构建了复方茵黄解毒汤乙酸乙酯有效部位体外抗乙型肝炎病毒活性指导下的薄层扫描指纹图谱。

### 1 仪器与试药

**1.1 主要仪器** 96孔细胞培养板(美国 Corning 公司);  $\Sigma$ 960 酶标仪(台湾 Metertech Inc 公司); MCO-15Ac CO<sub>2</sub> 培养箱(日本三洋公司); KSB-IA 超净工作台(天津尘埃净化设备厂); CS-9000 型双波长飞点薄层扫描仪(日本岛津公司)。

**1.2 试剂** DMEM 干粉培养基和胎牛血清(美国 Gibco 公司); HBsAg HBeAg ELISA 检测试剂盒(上海荣盛生物工程公司); 硅胶 G 薄层板(100mm × 200mm, 青岛海洋化工厂); 氯仿, 乙酸乙酯, 正丁醇, 苯, 甲醇, 甲酸, DMSO 均为分析纯。复方茵黄解毒汤 3 批(030523, 030918, 031204), 由南方医院药学部提供; 盐酸小檗碱(批号: 713-8702), 咖啡酸(批号: 885-200001), 阿魏酸(批号: 0773-9910), 大黄酸(批号: 0757-9804) 等对照品由中国药品生物制品检定所提供。

### 2 方法与结果

#### 2.1 样品液的制备

**2.1.1 供试品溶液的制备** 取复方茵黄解毒汤 20mL, 用氯仿萃取 3 次(20mL, 15mL × 2), 弃氯仿层; 水层用乙酸乙酯提取 3 次(20mL, 15mL × 2), 合并乙酸乙酯液, 取 20mL 水浴蒸干, 残渣加 10mL 甲醇溶解作为薄层色谱供试液; 剩余水浴蒸干, 残渣加少量 DMSO 溶解后, 再用含 10% 胎牛血清的 DMEM 倍比稀释至相应浓度, 作为细胞实验含药供试液。

**2.1.2 标准品对照液的制备** 分别配制 1mg/mL 的盐酸小檗碱, 咖啡酸, 阿魏酸, 大黄酸标准品甲醇溶液。

**2.2 细胞培养与接种** 将 HepG<sub>2</sub>-2.2.15 细胞接种于 DMEM 培养液中, 置 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养。

**2.3 HBsAg HBeAg 检测** HepG<sub>2</sub>-2.2.15 细胞以 3 × 10<sup>4</sup> 细胞/孔接种于 96 孔板, 2d 后换用含药供试液, 每个浓度加 4 孔。含药供试液浓度分别为 2, 0.4, 0.08, 0.02mg/mL。与细胞作用 12d 后, 吸取细胞上清液, 用 ELISA 法检测 HBsAg HBeAg, 设不加药的对照组。

**2.4 薄层展开** 吸取供试品溶液乙酸乙酯部位 15 $\mu$ L, 盐酸小檗碱、咖啡酸、阿魏酸及大黄酸标准对照液 1 $\mu$ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板(100 × 200mm) 上, 以苯-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(5: 1: 1.5: 5 滴) 为展开剂, 同行展开 15cm 后, 取出, 晾干, 不经显

色剂处理。

**2.5 薄层扫描** 选择  $\lambda = 275\text{nm}$ ,  $\lambda_r = 365\text{nm}$  双波长扫描与  $\lambda = 435\text{nm}$  单波长扫描<sup>[1]</sup>, 均为反射法锯齿扫描,  $S_x = 3$ , Swing Width = 10, 狭缝 0.4 × 0.4mm。对制剂的展开斑点进行全程扫描, 对盐酸小檗碱、咖啡酸、阿魏酸、大黄酸的斑点及空白进行部分或全程扫描。如图 1, 2。

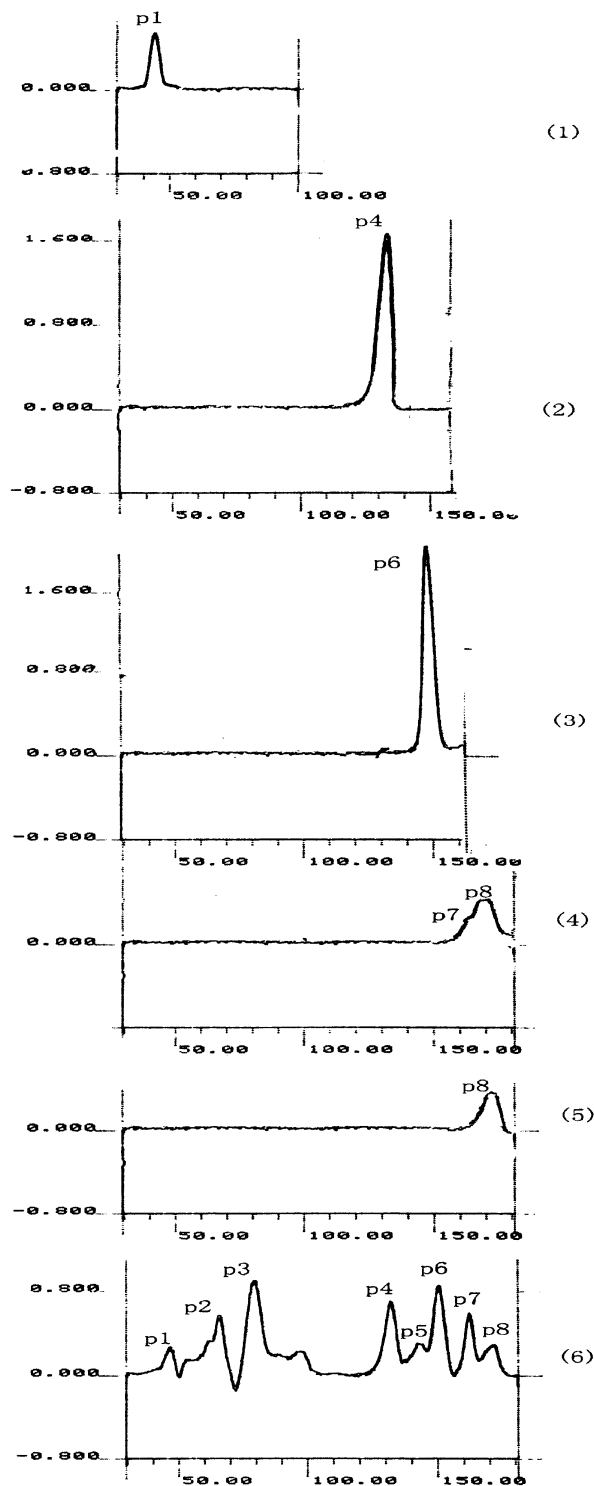


图1 紫外双波长薄层扫描图

(1)p1. 盐酸小檗碱 (2)p4. 咖啡酸 (3)p6. 阿魏酸  
(4)p7. 大黄酸(肩峰) (5)p8. 空白对照 (6)复方茵黄解毒汤

## 2.6 结果与分析

**2.6.1 活性结果** 复方茵黄解毒汤的乙酸乙酯部位对 HepG<sub>2</sub>-2.2.15 细胞分泌的 HBsAg、HBeAg 有较强的抑制作用。当浓度从 0.02~2mg/mL 时,对二者的抑制率分别呈剂量相关方式递增,详见表 1。

表 1 有效部位对 HepG<sub>2</sub>-2.2.15 细胞分泌的 HBsAg、

样品	剂量(mg/mL)	HBeAg 的抑制率	
		HBsAg 抑制率(%)	HBeAg 抑制率(%)
1	2.0	93.64	76.41
2	0.4	88.58	44.73
3	0.08	64.09	31.18
4	0.02	52.44	18.73

**2.6.2 指标峰的确定** 比较紫外双波长扫描图谱,可见供试品的扫描图在与盐酸小檗碱标准品峰的位置(约 40~50mm, Peak1)、咖啡酸标准品峰的位置(约 125~135mm, Peak2)、阿魏酸校准品峰的位置(约 145~155mm, Peak3)有相对应的峰。另外,成品在大黄酸的位置(约 155~165mm, Peak4)的峰很明显,但大黄标准品由于受前沿溶剂荧光带峰(约 165~180mm, Peak8,如空白对照所示)的影响较大,峰不明显,但仍可看到由大黄酸引起的肩峰。如图 1 所示。比较可见光单波长扫描图谱,可见供试品的扫描图在与盐酸小檗碱标准品峰的位置(约 40~50mm)、大黄酸标准品峰的位置(约 160~170mm)相对应,空白峰对于大黄酸的影响已消除,如图 2。

**2.6.3 不同批次复方茵黄解毒汤指纹图谱比较** 本研究比较了不同批次的复方茵黄解毒汤(批号:030523, 030918, 031204)在相同条件下所得的图谱,发现 peak1, peak2, peak3, peak4, peak5, peak6, peak7, peak8 为不同批次复方茵黄解毒汤指纹图谱较明显的共有峰,其中紫外扫描图中的 peak8 为空白对照峰,不作研究。

**2.6.4 共有峰标定** 以盐酸小檗碱峰的位置为参照,对以上 3 个批次的复方茵黄解毒汤的共有峰的位置进行标定,得出各峰的相对比移值,并计算其平均值和 RSD(见附表 2.3)。结果,各峰相对位置的 RSD 均小于 1.1%,可见各批制剂中共有峰的相对位置较为一致。

**2.6.5 共有峰面积比值** 参考“中药注射剂指纹图谱研究的技术要求”<sup>[2]</sup>:以对照品作为参照物的指纹图谱,以参照物峰面积作为 1。在本指纹图谱中用了 4 种对照品,对于紫外扫描图,咖啡酸峰和阿魏酸峰的面积较盐酸小檗碱峰和大黄酸峰面积大,但阿

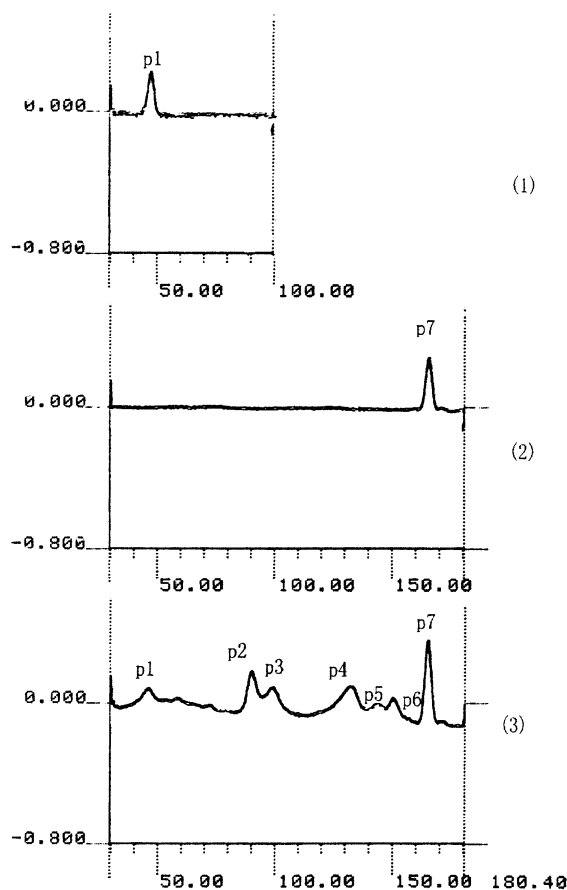


图 2 可见光单波长薄层扫描图

(1) 盐酸小檗碱; (2) 大黄酸; (3) 复方茵黄解毒汤

魏酸峰的左方有一个未达基线分离的峰( Peak5),因此以咖啡酸峰( Peak4)作为参照峰比阿魏酸峰更合适,即咖啡酸峰面积视为 1;对于可见光扫描图,大黄酸峰( Peak7)面积最大且具有很好的分离度,因此该峰作为参照峰最合适。有关数据结果及处理见表 4、表 5。由结果可见不同批次的制剂共有峰面积比值的 RSD 最大可达到 6.7%。

表 2 紫外扫描图共有峰的相对比移值(以咖啡酸峰为参照峰)

样品峰号	030523	030918	031204	Average	RSD(%)
Peak1	0.350	0.355	0.356	0.353	0.0
Peak2	0.500	0.510	0.498	0.498	1.1
Peak3	0.657	0.656	0.658	0.657	0.9
Peak4	1.000	1.000	1.000	1.000	0.0
Peak5	1.087	1.095	1.092	1.092	0.6
Peak6	1.136	1.142	1.153	1.141	0.5
Peak7	1.224	1.234	1.228	1.230	0.7

表 3 可见光扫描图共有峰的相对比移值(以大黄酸峰为参照峰)

样品峰号	030523	030918	031204	Average	RSD(%)
Peak1	0.282	0.282	0.284	0.283	0.0
Peak2	0.551	0.545	1.545	0.547	0.8
Peak3	0.604	0.599	0.599	0.600	0.7
Peak4	0.799	0.802	0.804	0.802	0.2
Peak5	0.878	0.873	0.875	0.875	0.5
Peak6	0.912	0.910	0.918	0.915	0.2
Peak7	1.000	1.000	1.000	1.000	0.3

表 4 紫外扫描图共有峰面积比值(以咖啡酸峰为参照峰)

样品峰号	030523	030918	031204	Average	A(%)	RSD(%)
Peak1	0.283	0.274	0.287	0.281	4.0	2.4
Peak2	1.475	1.491	1.536	1.501	21.5	2.1
Peak3	2.066	2.128	1.992	2.062	29.5	3.3
Peak4	1.000	1.000	1.000	1.000	14.3	0.0
Peak5	0.176	0.163	0.165	0.168	2.4	4.2
Peak6	1.124	1.057	1.205	1.127	16.1	6.7
Peak7	0.899	0.849	0.819	0.855	12.2	4.7
Total Ave				6.994	100.0	

表 5 可见光扫描图共有峰面积比值(以大黄酸峰为参照峰)

样品峰号	030523	030918	031204	Average	A(%)	RSD(%)
Peak1	0.243	0.227	0.219	0.230	8.4	5.3
Peak2	0.471	0.462	0.451	0.461	16.8	2.2
Peak3	0.245	0.253	0.251	0.250	9.1	1.7
Peak4	0.557	0.534	0.521	0.537	19.6	3.4
Peak5	0.069	0.066	0.062	0.066	2.4	5.3
Peak6	0.201	0.197	0.188	0.195	7.1	3.4
Peak7	1.000	1.000	1.000	1.000	36.5	0.0
Total Ave				2.739	100.0	

**2.6.6 稳定性试验** 取批号为 030918 的供试品 1 份,在上述薄层条件下展开,间隔 2h 扫描一次,共扫描 5 次,标定扫描图中各共有峰的相对位置,计算共有峰或共有峰组的面积比和相关 RSD 结果,各共有峰相对位置的 RSD 最大为 3.3%;共有峰面积比 RSD 最大为 2.9%。说明同一样品在相同条件下 10h 内测定的结果稳定。

**2.6.7 精密度试验** 取批号为 030918 的供试品 1 份,在同一块薄层板上点 5 个样,相同条件下展开,扫描。标定扫描图中各共有峰的相对位置,计算共有峰或共有峰组面积比和相关 RSD。结果各共有峰相对位置的 RSD 最大为 1.3%;共有峰面积比的 RSD 最大为 5.1%。说明同一样品在相同条件下测定的结果精密度较可靠。

**2.6.8 重现性试验** 取批号为 030918 的供试品 5 份,在相同条件下展开,扫描。标定扫描图中各共有峰的相对位置,计算共有峰或共有峰组面积比和相关 RSD。结果各共有峰相对位置的 RSD 最大为 1.5%;共有峰面积比的 RSD 最大为 4.8%。说明同一样品在相同条件下测定的结果重现性好。

### 3 讨论

**3.1 通过体外抗乙肝病毒活性测定证实复方茵黄解毒汤乙酸乙酯有效部位对 HepG<sub>2</sub>-2.2.15 细胞分泌**

的 HBsAg HBeAg 均有较强的抑制作用,与临床应用的效果是一致的。因此,在此基础上构建的指纹图谱不仅体现该中药复方化学成分的指纹性,也体现了该中药复方的药效。

**3.2 选择展开剂时**,在文献<sup>[3]</sup>的基础上,对苯-乙酸乙酯-甲醇-甲酸的比例进行了多次调整对比,综合分析以(5:1:1.5:5 滴)为优。另外,在展开剂已定的情况下,会由于展开系统的个别差异造成展开情况略有不同,因而应控制各种条件,使其尽量相同,如温度、湿度、饱和时间等。

**3.3 在斑点归属的研究过程中**用了化学标准品和药材对照液进行同行展开对照,发现蒲公英、溪黄草等 5 种药材在咖啡酸的位置均有相同荧光的斑点,但在该位置薄层扫描得到的峰除蒲公英、溪黄草为正吸收峰外其它为负吸收峰,说明其它药材在此位置的斑点不是咖啡酸,但对该斑点的荧光强度和扫描峰有影响。另外,在阿魏酸的位置存在类似的情况。

**3.4 在进行双波长扫描时**,为了选择恰当的波长对制剂乙酸乙酯部位进行了紫外-可见光扫描,最大吸收波长为 225nm 与 275nm,365nm 后为弱吸收,所以可以选择  $\lambda = 225\text{nm}$ ,  $\lambda_k = 365\text{nm}$  或  $\lambda = 275\text{nm}$ ,  $\lambda_k = 365\text{nm}$ 。但由于 225nm 接近于远紫外区,能量较大,可能少数物质在此波长吸收值大,而大多数物质在近紫外区有吸收,因此 275nm 比较适中。在此设想下分别选择了  $\lambda = 225\text{nm}$ ,  $\lambda_k = 365\text{nm}$  和  $\lambda = 275\text{nm}$ ,  $\lambda_k = 365\text{nm}$ ,对斑点进行扫描。结果发现  $\lambda = 225\text{nm}$ ,  $\lambda_k = 365\text{nm}$  得到的图谱波形较差,信息量较少, $\lambda = 275\text{nm}$ ,  $\lambda_k = 365\text{nm}$  得到的图谱波形波形好,信息量大。另外,进行单波长扫描,主要是为了消除在紫外扫描时产生的空白峰对大黄酸峰的影响,因而以大黄酸的可见光的最大吸收波长<sup>[1]</sup>为扫描波长。

### [参考文献]

[1] 宋友昕,吕武清,虞金宝,等.清淋冲剂中大黄酸含量测定研究[J].中国现代应用药学杂志,2003,20(1):47-48.  
 [2] 国家药品监督管理局.中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[J].中成药,2000,22(10):671-675.  
 [3] 陈美红,曾晓英.复方制剂中苦参与蒲公英的鉴别[J].湖南中医杂志,1997,13(2):89-90.