

## · 论著 ·

## 二妙散免疫抑制活性成分的研究\*

陈婷 李昌勤\*\* 徐强 朱梅芬\*\*\*

(中国药科大学 南京 210038)

**摘要** 以2,4,6-三硝基氯苯(PC)所致迟发型变态反应(PC-DTH)为指标,对二妙散水提物进行提取分离,对有效部位进行定性分析,发现生物碱类组分是其免疫抑制活性成分之一。

**关键词** 二妙散 生物碱 免疫抑制 薄层层析

## Studies on Immunosuppressive Principles of Ermiao Powder

Chen Ting, Li Changqin, Xu Qiang and Zhu Meifen

(China Pharmaceutical University, Nanjing, 210038)

**Abstract:** According to the inhibitory effects on the picryl chloride (PC) — induced delayed type hypersensitivity, separation and qualitative analysis were carried out on effective principles of the aqueous extract from Ermiao powder. The result indicates that the alkaloids contained in the extract are one of active components with immunosuppressive action.

**Key words:** Ermiao powder, Alkaloids, Immunosuppressive action, TLC

二妙散源于《丹溪心法》,由黄柏、苍术二药等量组成,黄柏清热,苍术燥湿,二药合用,具有一清一燥之妙。临床上主要用于湿热下注、足膝红肿热痛、湿证等病症<sup>(1)</sup>。有关二妙散的化学研究尚未见报道。而关于黄柏,国外有报道指出,其对迟发型变态反应有抑制作用,有效成分为生物碱类化合物<sup>(2)</sup>。我们的前期研究表明,二妙散对PC—DTH有显著的抑制作用,且其作用较其组成药物黄柏、苍术为强<sup>(3)</sup>。为此,本研究以PC—DTH为指标,对二妙散水提物进行了提取分离,以寻找其有效部位及组分,并对各有效部位及组分进行了成分分析。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器、药品、试剂和动物

**1.1.1 仪器** 日本岛津CS—930型双波长扫描仪,三用紫外分析仪, S<sub>(BXZ-1)</sub>型旋转蒸发器, SHZ-Bc型全塑不锈钢循环水多用真空泵, ZK-82A型真空干燥箱。

**1.1.2 药品与试剂** 标准品:盐酸小檗碱、盐酸巴马汀均购自中国生物制品检定所;黄柏碱由日本岐阜药科大学森裕志教授惠赠;生物碱甲(HB—1)为自提结晶,结构待定。药材:黄柏和苍术购自南京市药材公司,经中国药科大学中药分析教研室余伯阳副教授鉴定分别为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid 的树皮和菊科植

\* 江苏省自然科学基金资助项目 \* \* 河南省制药技工学校 \* \* \* 天津中央制药厂

物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC 的根茎。

试剂：2, 4, 6-三硝基氯苯 (PC)：东京化成工业株式会社；硅胶 GF<sub>254</sub> 高效薄层板：青岛海洋化工厂；95%乙醇、正丁醇、甲醇、氯仿、乙酸乙酯、冰醋酸、碘化铋钾等。

1.1.3 动物：4~6 周龄 (18~22g) 昆明种雌性小鼠，由中国药科大学动物室及江苏省实验动物中心提供。

### 2 方法

#### 2.1 PC 所致小鼠接触性皮炎 (PC-DTH)

取昆明种小鼠，刮去腹毛，涂 1%PC 乙醇溶液 0.1ml 致敏，6d 后用 1%PC 橄榄油

溶液 30 $\mu$ l 涂于右耳两面攻击，20h 后用千分尺测量两耳厚度，将两耳的厚度差作为 DTH 反应的强度。

2.2 薄层层析样品的制备 取二妙散、黄柏、苍术各提取部位的样品，分别配制成 0.25g (生药量) /ml 的溶液，其中乙醇及正丁醇部位用乙醇作溶剂，其余均为水。

2.3 统计 t-检验。

### 3 结果

#### 3.1 二妙散各有效组分的提取分离

以二妙散对 PC-DTH 的抑制率为指标，对有效部位进行了一系列的分离提取，如图 1 所示。

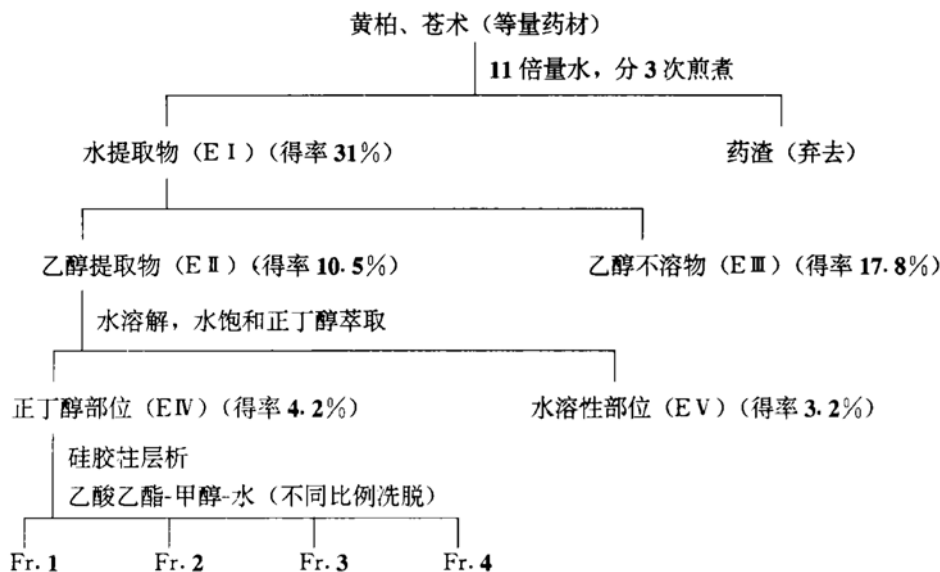


图 1 二妙散提取分离流程图

取 EI-EV，自 PC 致敏的当天起连续 6 天灌胃给药，阳性对照药氢化泼尼松为肌肉注射。对 PC-DTH 的抑制作用如表 1 所示，乙醇提取物及乙醇不溶物的高剂量对 PC-DTH 均有显著的抑制作用。将乙醇提取物用水饱和正丁醇萃取，其有效组分移至正丁醇部位，后者经硅胶柱层析得到四个组分。表 2 显示了这四个组分对 PC-DTH 的抑制作

用。其中 Fr. 3 的作用有显著意义，Fr. 2 有一定的抑制趋势，Fr. 1 和 Fr. 4 无作用。

#### 3.2 二妙散各有效部位的成分分析

##### 3.2.1 二妙散及其单味中药水提物的成分预试

按图 1 所示提取得二妙散水提物 (EI) 及单味黄柏或苍术水提物 (HI、CI)，对各水提物按中草药成分常规分析方法进行定性分

析, 结果如表 3 所示, 可见二妙散兼含黄柏和苍术中的各类成分。

表 1 二妙散各提取部位对 PC-DTH 的抑制作用

组别	剂量 mg/kg	动物	耳肿胀度 $\times 10^{-3}$ mm	抑制率 %
对照	—	17	90.6 ± 45.8	
E I	100	9	60.6 ± 50.0	33.1
	200	15	47.3 ± 18.6 <sup>2)</sup>	47.8
	400	16	45.3 ± 18.5 <sup>2)</sup>	50.0
E II	100	8	54.4 ± 16.8 <sup>1)</sup>	40.0
	200	8	42.5 ± 18.9 <sup>2)</sup>	53.1
E III	100	8	58.8 ± 30.3	35.1
	200	8	34.4 ± 18.4 <sup>2)</sup>	62.0
E IV	50	8	68.8 ± 15.5	24.1
	100	8	53.1 ± 20.1 <sup>1)</sup>	41.4
E V	50	8	68.8 ± 30.6	24.1
	100	8	88.8 ± 48.1	2.0
氢化泼尼松	10	16	16.6 ± 12.9 <sup>2)</sup>	81.7

注: ① $\bar{X} \pm SD$  ②与对照组比较 <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ .

<sup>2)</sup>  $P < 0.01$

表 2 正丁醇部位柱层析组分对 PC-DTH 的抑制作用

组别	耳肿胀度 $\times 10^{-3}$ mm	抑制率 %
对照	171.9 ± 40.5	
Fr. 1	170.0 ± 45.0	1.1
Fr. 2	140.6 ± 39.0	18.2
Fr. 3	115.6 ± 44.8 <sup>1)</sup>	32.8
Fr. 4	173.8 ± 45.2	0
E IV	124.4 ± 32.6 <sup>1)</sup>	27.6

注: ①剂量均为 100mg/kg

②n=8

表 3 二妙散及其组成中药水提物的成分

样品	生物碱	类别						
		酚类	鞣质	糖类	皂甙	甾体	挥发油	有机酸
HI	+++	+	++	++	+	+	-	-
CI	-	+	+	++	+	+	+	-
EI	++	+	++	++	+	+	+	-

### 3.2.2 二妙散各提取部位的生物碱类薄层析

按图 1 方法分别提取分离得到与二妙散相对应的单味黄柏、苍术的各提取部位 (HI-HV、CI-CV)。取经 105℃活化半小时的高效硅胶薄层板, 将浓度为 0.5mg/ml 的标准液作为混标(s), 与各提取部位的样品液间隔点样 4μl, 以正丁醇: 冰醋酸: 水 (7:1:2) 为展开剂展开, 展距 15cm, 取出挥干溶剂, 用



图 2 二妙散及黄柏、苍术各提取部位的薄层图谱

S: 标准品, 1 盐酸小檗碱; 2 盐酸巴马汀; 3 黄柏碱; 4 HB-1  
 HI、EI、CI: 分别为黄柏、二妙散、苍术水提物  
 HII、EII、CII: 分别为黄柏、二妙散、苍术乙醇提取物  
 HIII、EIII、CIII: 分别为黄柏、二妙散、苍术乙醇不溶物  
 HIV、EIV、CIV: 分别为黄柏、二妙散、苍术正丁醇部位  
 HV、EV、CV: 分别为黄柏、二妙散、苍术水溶性部位

碘化铋钾显色剂显色, 结果可见生物碱显桔红色斑点, 由图 2 可知, 除黄柏的醇不溶部位仍残留少量生物碱, 而同等提取条件下二妙散的醇不溶部位已不含生物碱以外, 二妙散与黄柏各提取部位中的生物碱斑点无差异, 而苍术各部位均未检出生物碱。

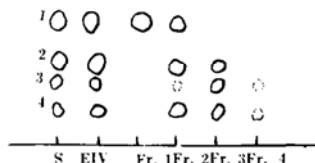


图 3 柱层析各组分的薄层图  
S: 见图 2 注

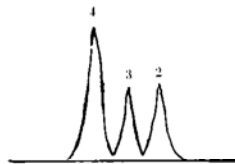


图 4 Fr. 3 的薄层扫描图

峰 2, 峰 3, 峰 4 分别为巴马汀, 黄柏碱, HB-1  
测定波长  $\lambda_s = 620\text{nm}$ , 参比波长  $\lambda_R = 360\text{nm}$

3.2.3 柱层析各组分的生物碱薄层层析按图 1 方法分离得到的各柱层析组分的薄层层析见图 3。从图中可知, Fr. 1 仅含小檗碱; Fr. 4 几乎不含生物碱; Fr. 2 包含了四种生物碱; Fr. 3 不含小檗碱, 黄柏碱的含量大为提高; 图 4 为 Fr. 3 的薄层扫描图, 以 HB-1 的含量为最高。

#### 4 讨论

4.1 以上结果表明, 仅含小檗碱的 Fr. 1 和几乎不含生物碱的 Fr. 4 均无免疫抑制作用; 巴马汀含量较高且包含四种生物碱的 Fr. 2 也仅有一定的抑制趋势, 黄柏碱和 HB-1 含量较高的 Fr. 3 具有显著的免疫抑制活性, 从而推测黄柏碱和 HB-1 为抑制 PC-DTH 的主要活性成分, 而小檗碱和巴马汀与抑制 PC-DTH 活性的关系不大。

4.2 从二妙散的醇不溶部位虽不含生物碱也有明显的免疫抑制活性推测, 生物碱不是免疫抑制的唯一成分。进一步研究该部位与黄柏碱、HB-1 的关系, 将有助于阐明二妙散免疫抑制作用的化学基础。

#### 参 考 文 献

- [1] 中医大辞典编辑委员会. 中医大辞典 (方剂分册). 北京: 人民卫生出版社, 1983: 7
- [2] 森裕志等. Medical Tribune 1990; 3: 98
- [3] 徐强等. 中国免疫学杂志 1993; 9 (4): 244