

significant decrease in ear swelling and dermal inflammatory infiltration were seen in I-IV HTG and the HCTG ($P < 0.05$). IHTG, IVHTG and HCTG showed better effects ($P < 0.01$). **Conclusion:** The pharmacodynamics of FFFLT in treating eczema mostly come from *Paeonia lactiflora* Pall, *Gardenia jasminoides*, *Glycyrrhiza uralensis*, *Poria cocos* and *Angelica sinensis*.

[**Key words**] Fufang Fuling Tang; dermatitis; ultra fast liquid chromatography-photodiode array detector-electrospray ionization-mass spectra

湿疹是临床常见的皮肤病, 瘙痒剧烈, 反复发作, 严重影响患者的身心健康。已有研究证明复方茯苓汤对小鼠变应性接触性皮炎 (allergic contact dermatitis, ACD) 有显著抑制作用, 并对湿疹具有确切疗效^[1-2], 但其有效成分目前尚不清楚。本研究采用超高速液相色谱-二极管阵列检测器-电喷雾-质谱 (UFLC-DAD-ESI-MS) 联用方法对复方茯苓汤化学成分进行了初步分析, 在此基础上, 依据主要物质峰的来源对中药组方进行了拆分, 设立了 4 组中药组合。进而利用 2,4-二硝基氟苯 (DNFB) 诱发的小鼠 ACD 模型观察不同中药组合对 ACD 的影响, 为复方茯苓汤的质量控制、主要活性成分确定以及临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 试剂、药材及仪器 芍药苷、甘草苷、苈草苷、牡荆素对照品由上海中药标准化研究中心提供, 京尼平龙胆双糖苷对照品由第二军医大学药物分析学教研室范国荣教授惠赠, 京尼平苷对照品购自成都曼斯特生物科技有限公司。以上所有对照品纯度均大于 98%。茯苓, 赤芍, 栀子, 甘草, 泽泻, 黄柏, 当归, 浮萍药材购自大连奇运生大药房, 安徽省亳州市双华中药饮片厂, 批号 080110, 由大连医科大学附属第二医院张福海副教授鉴定。色谱纯乙腈及色谱纯甲酸购自美国 TEDIA 公司, UFLC 用水为 Millipore 纯水系统 (法国 Millipore 公司) 所制超纯水, 其他试剂为分析纯。超高速液相色谱系统 (ultra-fast liquid chromatography, UFLC) 购于日本岛津 (SHIMADZU) 公司。超高速液相色谱系统-质谱检测系统 (LCMS-2010EV, 岛津) 用于复方茯苓汤的质谱分析, 离子源为 ESI 源。

1.2 样品制备 将 8 种药材均匀粉碎并过 40 目筛。准确称取茯苓 2.5 g, 黄柏 1.5 g, 当归 1.5 g, 栀子 1.5 g, 浮萍 1.5 g, 赤芍 1.5 g, 泽泻 1.5 g, 甘草 1 g 并混合; 将混合后的粉末放入 100 mL 烧瓶, 加去离子水 60 mL, 将烧瓶置于含 1 000 mL 液体石蜡的 DF-

101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 在搅拌状态下加热, 加热温度控制在 100 °C, 煮沸 60 min 后冷却。经 4 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液定容至 100 mL, 取样品 100 μL , 并加 900 μL 甲醇稀释, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后进行液相分析。

1.3 动物 健康 BALB/c 小鼠, 60 只, 雄性, 体重 25 ~ 30 g。由大连医科大学实验动物中心提供 [许可证号 SCXK(辽)2008-0002]。DNFB 以 4:1 丙酮橄榄油为基质, 分别配成 0.25% 和 0.5% 2 种溶液。复方茯苓汤即 I 组由茯苓 7.5 g, 黄柏 4.5 g, 当归 4.5 g, 栀子 4.5 g, 浮萍 4.5 g, 赤芍 4.5 g, 泽泻 4.5 g, 甘草 3 g 组成 (8 味中药), 按照 1.2 所述方法制备水提液, 过滤后得滤液, 滤液用去离子水定容至 100 mL。II 组为栀子 4.5 g, 赤芍 4.5 g, 甘草 3 g (3 味中药); III 组为茯苓 7.5 g, 当归 4.5 g (2 味中药); IV 组为茯苓 7.5 g, 栀子 4.5 g, 赤芍 4.5 g, 当归 4.5 g, 甘草 3 g (5 味中药)。II 组、III 组、IV 组也按照 1.2 所述方法制备水提液, 过滤后得滤液, 滤液用去离子水定容至 100 mL。阳性对照药物为氢化可地松 (购自天津金耀氨基酸公司, 批号 200807311), 20 mg (5 mL) 氢化可地松用生理盐水 28.3 mL 稀释, 干扰素- γ (IFN- γ), 白介素-4 (IL-4), 白介素-10 (IL-10) 试剂盒购自美国 BPB 公司。

2 方法

2.1 色谱分析条件 色谱柱为 Shim-pack XR-ODS 色谱柱 (2.0 mm \times 100 mm, 2.2 μm); 流动相: A 相为乙腈, B 相为 0.1% 甲酸-水; DAD 检测波长选择: 京尼平龙胆双糖苷, 京尼平苷, 芍药苷及甘草苷各自的最大吸收波长, 分别为 239 nm, 239 nm, 230 nm 及 276 nm, 流速 0.4 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温 40 °C。

2.2 质谱条件 在正负离子模式下分别扫描, 检测器电压分别为 +1.55 kV 与 -1.55 kV; 扫描范围为 m/z 100 ~ 500; 曲线脱溶剂管和加热块温度均为 250 °C, 接口电压为 4 kV, CDL 电压为 40 V; 雾化气 (氮气) 流速设定在 1.5 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 干燥气压力设定为 0.06 MPa。

2.3 动物实验 以 DNFB 诱发小鼠变应性接触性皮炎为实验模型,方法按文献[1]进行,实验动物随机分成 6 组,每组 10 只,分别 ig 不同药物,Ⅰ组由 8 味中药组成即复方茯苓汤方剂,Ⅱ组:栀子,赤芍,甘草 3 味中药组,Ⅲ组:茯苓,当归 2 味中药组,Ⅳ组:茯苓,栀子,赤芍,当归,甘草 5 味中药组,氢化可的松组为阳性对照,生理盐水组为阴性对照。各组 ig 给药均为 40 mL · kg⁻¹,给药剂量见表 2。

实验方法如下:①小鼠 ACD 模型建立:实验第 1 日于小鼠腹部去毛约 3 cm × 3 cm,实验第 1 日和第 2 日于去毛部涂 0.5% DNFB 25 μL 致敏,实验第 6 日于左耳背涂 0.25% DNFB 20 μL 诱发皮炎,右耳涂基质对照。②给药方案:第 1,2,3,6 日诱发前 2 h 和诱发后 6 h ig 药液,给药次数均为每日 2 次。③观察指标:1)左耳厚度差(S1):诱发前及诱发后 24 h 用电子数显游标卡尺测量每只小鼠左耳中部厚度,计算诱发前后左耳厚度差(mm)。2)诱发后左右耳厚度差(S2):诱发后 24 h 用电子数显游标卡尺分别测量每只小鼠诱发后左右耳厚度,计算诱发后左右耳厚度差。3)左右耳质量差(S3):诱发后 24 h

取血处死小鼠后,用直径 0.7 cm 金属打孔器在距离鼠耳边缘 0.5 cm 处打孔取组织块,电子天平称重,计算左右耳质量差。4)真皮炎症细胞计数:左右耳组织常规 HE 染色切片,在光学显微镜下计数每高倍镜视野多形核白细胞和单一核白细胞数量。5)血清 IFN-γ,IL-4,IL-10 水平检测:诱发后 24 h 经眼球摘除法取血 1 mL,室温静置后取上清,置于微量离心管内,-80 °C 冰箱保存备用,ELISA 法测定血清细胞因子。

2.4 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.5 软件进行分析,两组间采用两独立样本 *t* 检验分析。*P* < 0.05 为有显著性差异。

3 结果

3.1 复方茯苓汤主要化学成分 复方茯苓汤水提液样品在不同波长下的色谱图见图 1。通过与标准品的色谱保留时间,最大吸收波长及质谱分子离子峰与碎片峰对比分析确定,复方茯苓汤中共分离出 11 种成分,其中 4 种主要成分分别为京尼平龙胆双糖苷(4.30 min),京尼平苷(4.84 min),芍药苷(5.46 min)及甘草苷(6.11 min),其他成分含量甚

表 1 11 种成分的保留时间、最大吸收波长、相对分子质量以及 MS 数据

No.	<i>t_R</i> /min	化合物 英文名称	化合物 中文名称	λ_{\max} /nm	MW	Product ions (ESI ⁺ , <i>m/z</i>)	Product ions (ESI ⁻ , <i>m/z</i>)
1	3.15	gardenoside	羟异栀子苷	237	404	427 [M + Na] ⁺ 369 [M + H - 2H ₂ O] ⁺ 167 [M + H - 58-180] ⁺	403 [M - H] ⁻
2	3.36	oxypaeoniflorin	氧化芍药苷	234	496	519 [M + Na] ⁺ 179 [M + H - 180-138] ⁺	495 [M - H] ⁻
3	4.30	genipingentiobio-side	京尼平龙胆双糖苷	239	550	573 [M + Na] ⁺ 209 [M + H - 162-180] ⁺	595 [M + HCOO] ⁻ 585 [M + 2H ₂ O - H] ⁻ 549 [M - H] ⁻
4	4.84	geniposide	京尼平苷	239	388	411 [M + Na] ⁺ 209 [M + H - 162 - H ₂ O] ⁺	433 [M + HCOO] ⁻ 423 [M + 2H ₂ O - H] ⁻
5	5.16	phellodendrine	黄柏碱	214 269	341	342 [M + H] ⁺ 312 [M - HCHO + H] ⁺	386 [M + HCOO] ⁻ 340 [M - H] ⁻
6	5.22	5-O-feruloylquinic acid	5-O-阿魏酰奎宁酸	325	367	390 [M + Na] ⁺ 368 [M + H] ⁺	413 [M + HCOO] ⁻ 366 [M - H] ⁻
7	5.30	albiflorin	芍药内酯苷	229	480	503 [M + Na] ⁺ 481 [M + H] ⁺	525 [M + HCOO] ⁻ 515 [M + 2H ₂ O - H] ⁻
8	5.46	paeoniflorin	芍药苷	230	480	197 [M + H - 162 - BzOH] ⁺ 503 [M + Na] ⁺ 197 M + H - 162 - BzOH] ⁺	479 [M - H] ⁻ 525 [M + HCOO] ⁻ 515 [M + 2H ₂ O - H] ⁻
9	5.57	orientin	荭草苷	346	448	179 [M + H - 180 - BzOH] ⁺ 449 [M + H] ⁺	479 [M - H] ⁻ 493 [M + HCOO] ⁻ 483 [M + 2H ₂ O - H] ⁻ 447 [M - H] ⁻
10	5.94	vitexin	牡荆素	336	432	447 [M + Na] ⁺ 433 [M + H] ⁺	431 [M - H] ⁻
11	6.11	liquiritin	甘草苷	276	418	419 [M + H] ⁺ 298 M + H - 162 + MeCN] ⁺ 257 [M + H - 162] ⁺	463 [M + HCOO] ⁻ 417 [M - H] ⁻

微,见表 1。从表 1 中可以看出,在负离子模式下复方茯苓汤水提液中的主要成分不但可产生 $[M-H]^-$ 分子离子峰,还可产生 $[M+HCOOH-H]^-$ 及 $[M+2H_2O-H]^-$ 的离子峰,这有助于我们快速确定目标化合物的相对分子质量。在正离子模式下,复方茯苓汤水提液中主要成分可产生 $[M+K]^+$, $[M+Na]^+$ 及 $[M+H]^+$ 等分子离子峰,这些信息可用于目标化合物相对分子质量的表征及化合物鉴定。此外,在正离子模式下,京尼平龙胆双糖苷,京尼平苷及甘草苷均可产生-162 的碎片峰,是由于化合物本身的葡萄糖苷键发生断裂所致,该现象与既往文献报道一致^[3-4]。这些特征碎片可帮助我们完成芍药苷的另外 2 个类似物氧化芍药苷(3.36 min)和芍药内酯苷(5.30 min)的归属。此外,通过与对照品比对,我们还确认了来源于浮萍的 2 个微量化学成分荳蔻苷(5.57 min)与牡荆素(5.94 min)^[5]。同时通过实验所得质谱信息与已有文献比对,初步归属了另外 3 种微量化合物:羟异梔子苷(3.15 min),黄柏碱(5.16 min)和 5-O-阿魏酰奎宁酸(5.22 min)^[6-7]。

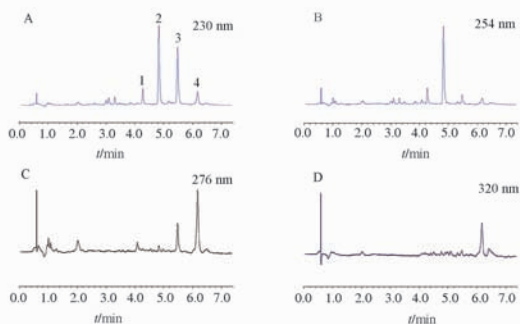


图 1 复方茯苓汤样品不同波长下的液相色谱图

A. 230 nm 波长下的液相色谱图; B. 254 nm 波长下的液相色谱图;
C. 276 nm 波长下的液相色谱图; D. 320 nm 波长下的液相色谱图;
1. 京尼平龙胆双糖苷; 2. 京尼平苷; 3. 芍药苷; 4. 甘草苷

3.2 中药对小鼠耳厚度及耳质量的影响 与生理盐水对照组相比,中药组和氢化可的松组对小鼠左右耳诱发前后的厚度差、诱发后 24 h 左右耳的厚度差及左右耳组织块质量差的影响均有显著性差异

表 2 中药对小鼠耳厚度及耳质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	S1/mm	S2/mm	S3/mg
生理盐水	-	0.137 ± 0.02	0.137 ± 0.02	7.76 ± 1.54
氢化可的松	0.024	0.045 ± 0.02 ²⁾	0.046 ± 0.02 ²⁾	3.99 ± 2.28 ²⁾
8 味中药	15	0.051 ± 0.01 ²⁾	0.053 ± 0.01 ²⁾	4.16 ± 1.45 ²⁾
3 味中药	4.8	0.115 ± 0.02 ¹⁾	0.114 ± 0.02 ¹⁾	5.89 ± 1.53 ¹⁾
2 味中药	4.8	0.119 ± 0.02 ¹⁾	0.118 ± 0.02 ¹⁾	6.01 ± 1.49 ¹⁾
5 味中药	9.6	0.058 ± 0.01 ²⁾	0.058 ± 0.01 ²⁾	4.35 ± 1.68 ²⁾

注:与生理盐水组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3~4 同)

($P < 0.05$),而以氢化可的松组、8 味组、5 味组为更优($P < 0.01$)。见表 2。

组间比较:中药 8 味组和 5 味组比较,3 味组与 2 味组比较均无显著差异;8 味组、5 味组分别与 3 味组、2 味组比较,组间均有显著差异($P < 0.01$)。

3.3 中药对小鼠耳部真皮炎症细胞浸润的影响 生理盐水组 HE 染色组织切片中,真皮内多形核白细胞和单一核白细胞数目明显增加,中药组与氢化可的松组对炎性细胞浸润均有明显抑制作用($P < 0.05$),而以氢化可的松组、8 味组、5 味组更优($P < 0.01$),见表 3。

表 3 小鼠左右耳真皮多形核白细胞及单一核白细胞

组别	差值比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)		个/高倍镜视野
	剂量/ g·kg ⁻¹	多形核白细胞	
生理盐水	-	18.6 ± 1.69	163.3 ± 9.42
氢化可的松	0.024	3.2 ± 1.04 ²⁾	52.1 ± 19.41 ²⁾
8 味中药	15	9.2 ± 2.70 ²⁾	60.0 ± 15.6 ²⁾
3 味中药	4.8	15.2 ± 1.95 ¹⁾	124.1 ± 23.52 ¹⁾
2 味中药	4.8	15.3 ± 2.15 ¹⁾	132.9 ± 25.05 ¹⁾
5 味中药	9.6	10.1 ± 3.66 ²⁾	75.9 ± 16.9 ²⁾

组间比较:中药 8 味组和 5 味组比较,3 味组与 2 味组比较均无显著差异;8 味组、5 味组分别与 3 味组、2 味组比较,组间均有显著差异($P < 0.01$)。

3.4 中药对小鼠血清细胞因子的影响 与生理盐水组比较,氢化可的松组和中药组小鼠血清 IFN- γ 水平均有显著降低($P < 0.05$),8 味组和氢化可的松组尤为明显($P < 0.01$);而各组 IL-4, IL-10 水平无显著性差异,见表 4。

表 4 中药对小鼠血清细胞因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) ng·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IFN- γ	IL-4	IL-10
生理盐水	-	246.2 ± 41.38	410.9 ± 67.37	352.1 ± 53.38
氢化可的松	0.024	149.1 ± 37.92 ²⁾	407.6 ± 74.34	341.0 ± 29.09
8 味中药	15	150.4 ± 37.69 ²⁾	387.9 ± 38.11	369.8 ± 28.98
3 味中药	4.8	187.4 ± 60.84 ¹⁾	427.2 ± 30.11	367.1 ± 38.00
2 味中药	4.8	192.6 ± 36.04 ¹⁾	429.9 ± 48.81	373.1 ± 35.05
5 味中药	9.6	161.8 ± 50.37 ¹⁾	415.8 ± 45.17	341.9 ± 29.55

4 讨论

湿疹是常见皮肤病,对患者生活有严重影响,目前湿疹的治疗仍以外用药为主,而内用药治疗相对薄弱,开发内用中药是湿疹治疗的一个重要发展方向。临床实践证明复方茯苓汤可有效治疗湿疹^[1-2],但由于该中药复方需要煎制、不便携带及其活性物质基础不明确等原因造成其临床应用受到限制,若能明确该方剂的化学成分及有效物质基础,进而将有效成分提取并改制成其他剂型(如片剂或胶囊),将有利于该中药方剂在临床的应用和推广。

超高速液相色谱是近年出现的新技术,具有高

灵敏度、高分离度及分析时间短等优点,适于复杂样品特别是中药复方组分的分析。为揭示复方茯苓汤所含的主要化学成分,本研究采用了 UFLC-DAD-ESI-MS 代谢轮廓分析技术对复方茯苓汤化学成分进行了分析。发现该汤剂主要化学成分为京尼平龙胆双糖苷,京尼平苷,芍药苷及甘草苷,它们分别来自栀子、赤芍及甘草 3 味中药,且已有文献报道证实以上化学成分具有抗炎,抗过敏及免疫抑制等多种药理活性^[8-10]。进一步研究发现其他中药的水提取物中未见明显物质峰,提示栀子、赤芍及甘草这 3 味中药是复方茯苓汤中小分子化合物的主要来源。

为进一步揭示复方茯苓汤的主要药效成分及该方各组成中药在药效中发挥的作用,我们依据化学轮廓分析结果以及参考国内外已有文献将该方的多味组方中药进行分组。考虑到茯苓及当归中含有大量多糖,且文献报道茯苓多糖和当归多糖都具有抗炎活性及免疫调节作用^[11-12],因此茯苓及当归的水提取物对药效是否有贡献也需要实验加以验证。在药效学实验中,我们综合考虑复方茯苓汤中小分子化学成分与潜在的多糖等有效成分,对复方组方进行拆分研究,设计了 II 组栀子,赤芍,甘草 3 味中药组(小分子糖苷活性组分)、III 组茯苓、当归 2 味中药组(多糖组分)和 IV 组茯苓,栀子,赤芍,当归,甘草 5 味中药组与复方茯苓汤 8 味组比较,利用 DNFB 诱发的小鼠 ACD 模型进一步从药效方面验证该方剂的主要有效成分。

药效学实验结果证实, I 组、IV 组、氢化可的松组和生理盐水组比较,对 DNFB 诱发的小鼠 ACD 有显著抑制作用,且优于 II 组和 III 组,组间比较的结果也支持以上结论。虽然 II 组、III 组对诱发的 ACD 也有作用,但都不及 IV 组的疗效,这一结果提示小分子糖苷组分和多糖组分(来自茯苓及当归水提取物)均具有抗炎作用,即复方茯苓汤的主要药效成分多集中在栀子,赤芍,甘草,茯苓和当归 5 味中药。氢化可的松组和中药组小鼠血清 IFN- γ 水平与生理盐水对照组相比均有显著降低($P < 0.01$),各组小鼠血清 IL-4 和 IL-10 之间无显著差异($P > 0.05$),推测该药物可能是通过降低 IFN- γ 水平发挥抗炎作用。

综上所述,本研究首先采用 UFLC-DAD-ESI-MS 代谢轮廓分析方法对复方茯苓汤的主要化学成分进行分析和鉴定,在明确该方化学组成的基础上对组方中药进行了拆分,并利用 DNFB 诱发的小鼠 ACD 模型对组方中的有效物质群进行药效学验证,初步确定复方茯

苓汤的主要药效成分多来源于栀子,赤芍,甘草,茯苓和当归 5 味中药,为本方剂活性成分确定及原材料的质量控制提供了实验依据。由于目前对中药中多糖的分离及分析难以实现,因此对茯苓多糖和当归多糖在湿疹治疗中发挥的作用及程度有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Lin X R, Tu C X, Meng X M, et al. Studies on treating eczema by Chinese herbal medicine with anti-type IV allergic activity [J]. Chin J Integr Med, 2001, 7(2):7.
- [2] 涂彩霞,刘芳,李敬,等. 复方茯苓汤治疗湿疹 582 例临床观察及实验研究[J]. 中国中西医结合皮肤性病学期杂志, 2002, 1(1):13.
- [3] Li R, Wang X, Zhou Y, Cai M, et al. Analysis of sodium adduct paeoniflorin, albiflorin and their derivatives by (+) ESI-MSn, DFT calculations and computer-aided mass spectrometry analysis program[J]. J Mass Spectrom, 2007, 42(3):335.
- [4] Xu S J, Yang L, Zeng X, et al. Characterization of compounds in the Chinese herbal drug Mu-Dan-Pi by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20(22):3275.
- [5] Moiteiro C, Gaspar H, Rodrigues A I, et al. HPLC quantification of dye flavonoids in *Reseda luteola* L. from Portugal[J]. J Sep Sci, 2008, 31(21):3683.
- [6] Hu Y M, Su G H, Sze S C, et al. Quality assessment of Cortex Phellodendri by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry[J]. Biomed Chromatogr, 2010, 24(4):438.
- [7] Hatano T, Takagi M, Ito H, et al. Acylated flavonoid glycosides and accompanying phenolics from licorice [J]. Phytochemistry, 1998, 47(2):287.
- [8] Lee B, Shin Y W, Bae E A, et al. Antiallergic effect of the root of *Paeonia lactiflora* and its constituents paeoniflorin and paeonol [J]. Arch Pharm Res, 2008, 31(4):445.
- [9] Koo H J, Lim K H, Jung H J, et al. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin [J]. J Ethnopharmacol, 2006, 103(2/3):496.
- [10] Yoon T, Cheon M S, Kim S J, et al. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Glycyrrhiza uralensis* according to extracting solvents [J]. Planta Medica, 2009, 75(4):1050.
- [11] Wong V K, Yu L, Cho C H, et al. Protective effect of polysaccharides from *Angelica sinensis* on ulcerative colitis in rats [J]. Inflammopharmacology, 2008, 16(4):162.
- [12] Cuellar M J, Giner R M, Recio M C, et al. Effect of the basidiomycete *Poria cocos* on experimental dermatitis and other inflammatory conditions [J]. Chem Pharm Bull, 1997, 45(3):492.

[责任编辑 聂淑琴]