

玉屏风散乙酸乙酯萃取物抑制迟发型超敏反应效应及成分分析

洪敏^{1,2*}, 周红华³, 王亮¹, 华永庆^{1,2}, 段金敖²

- (1. 南京中医药大学 科技部规范化中药药理实验室, 江苏 南京 210029;
2. 江苏省方剂研究重点实验室, 江苏 南京 210046;
3. 中国药科大学 现代分析中心, 江苏 南京 210009)

[摘要] **目的:**考察玉屏风散乙酸乙酯萃取物(YA)抑制迟发型超敏反应的效应并分析其化学成分。**方法:**以2,4-二硝基氯苯(DNCB)诱导小鼠变应性接触性皮炎(ACD),观察不同剂量YA对耳廓肿胀度的影响;以高效液相-质谱联用法(HPLC-MS)对YA的化学成分进行初步分析。**结果与结论:**YA可剂量依赖性的抑制小鼠变应性接触性皮炎,改善炎症病理状态;HPLC结果表明有21个主要表达的色谱峰,HPLC-MS分析提示其中包括黄芪黄酮(苷)、皂苷、防风色原酮(苷)等成分。YA中的成分与其抑制迟发型超敏反应效应之间的关系有待进一步研究。

[关键词] 玉屏风散;变应性接触性皮炎;迟发型超敏反应;高效液相-质谱联用法

[中图分类号] R285.5;284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)01-0071-02

玉屏风散是中医扶正固本的经典方剂,由黄芪、

白术、防风组成,常用于治疗或预防反复发作的上呼吸道感染,同时还用于治疗变态反应性疾病^[1]。而

玉屏风散中对迟发型超敏反应性疾病作用及物质基础尚不明确。本研究在前期筛选的基础上进一步观察了玉屏风散乙酸乙酯萃取物(YA)对ACD迟发型超敏反应(DTH)动物模型的效应,并对YA中成分进行初步分析,提示可能的作用物质,为进一步的物质基础研究提供积累。

[收稿日期] 2009-04-28

[基金项目] 江苏省方剂重点实验室开放课题(022021014001);南京中医药大学基础研究重点培育项目(012073005010)

[通讯作者] *洪敏, Tel: (025)86798184; E-mail: hongmin72@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 药物、试剂及仪器 黄芪饮片,产地内蒙,批号20080308;防风饮片,产地内蒙,批号20080311;白术饮片,产地浙江,批号20071202。上述3药材均购于安徽省亳州市药材总公司医药公司。提取工艺:黄芪、白术、防风,按3:1:1投料,依次以醇提和水提,分别浓缩得到醇提浓缩液和水提浓缩液。水提液醇沉,得到醇沉淀。醇提浓缩液与水提后醇沉液合并,依次以正丁石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,分别得到石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物及剩余水液。本研究所用的是乙酸乙酯萃取物(YA),得率为2.53%。

2,4-二硝基氯苯(DNCB)(sigma)、地塞米松磷酸钠注射液(浙江仙琚制药股份有限公司)批号050115。

Agilent 1100 HPLC 色谱仪、Agilent 1100 series LC/MSD Trap(ITMS)联用系统。

1.2 动物 ICR 清洁级小鼠,雌雄各半,18~22 g,南京医科大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(苏)2008-0004。

1.3 造模、分组与给药 ICR 清洁级小鼠,适应性喂养3 d,实验首日于小鼠腹部刮毛约2×2 cm²,d2和d3于刮毛部位涂5% DNCB 丙酮溶液80 μL致敏,d7用1% DNCB 丙酮溶液50 μL涂布于左耳进行攻击,右耳涂布丙酮溶液作为对照。攻击后24 h,给药1 h后用打孔器打下两耳,称重。造模小鼠随机分为5组,每组12只。分别为模型组(生理盐水)、阳性对照组地塞米松0.65 mg·kg⁻¹、YA 13生药 g·kg⁻¹、YA 6.5生药 g·kg⁻¹、YA 3.2生药 g·kg⁻¹。中剂量是由临床人用剂量(50生药 g/d)换算所得的等效量。从造模d1~d8 ig 药物1次/d。计算左耳片与右耳片的重量差,即为耳肿胀度。耳片10%福尔马林固定,常规病理切片,HE染色。

1.4 成分分析的 HPLC-MS 条件 色谱条件:色谱柱:Lichrospher C18 柱,250 mm×4.6 mm,5 μm(淮阴汉邦科技有限公司);流动相:A:10 mM 乙酸铵;B:乙腈。B相梯度:0~10 min,1%~5%;10~25 min,5%~20%;25~50 min,20%~35%;50~60 min,35%~95%;60~70 min,95%。流速1 mL·min⁻¹。柱温:30℃;DAD:220,280 nm。质谱条件:离子化方式:电喷雾离子化(ESI);质量扫描范围:m/z 100-1 000。离子源参数为:雾化器384 kPa

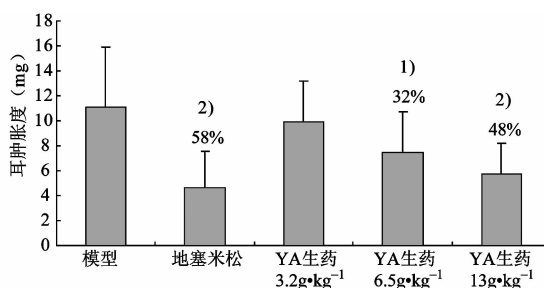
(40psi),干燥气(N₂)9 L/min,气体温度350℃,毛细管电压3.5 kV,毛细管出口电压40 V。

1.5 统计学方法 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Student-t 检验。

2 结果

2.1 YA 对 ACD 小鼠模型耳肿胀的影响 结果表明 YA 中、高剂量表现出明显抑制 ACD 耳肿胀的作用,提示 YA 具有抗迟发型超敏反应的作用,并存在一定的剂量依赖性(图1)。

2.2 病理组织学检查 模型组小鼠左耳表皮增厚,可见细胞内水肿及轻度细胞间水肿,真皮乳头水肿,大量以淋巴细胞为主的单核细胞浸润。真皮血管扩张充血明显。偶可见血管外红细胞,而 YA 中、高剂量可显著改善炎症病理损害,减少淋巴细胞浸润。



注:%为肿胀抑制率;与模型组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01

图1 YA 对小鼠 ACD 模型耳肿胀度的影响

2.3 YA 中化学成分初步分析 方法学考察结果表明 YA 的 HPLC 图谱的稳定性、精密度及重复性试验均符合定性检测要求。HPLC 分析结果表明在本文应用的检测条件下有21个稳定表达的主要紫外色谱峰,标示如图2。应用 HPLC-MS 分析(图3,图4),对其中部分色谱峰的化合物分子量归属做了初步推断(表1),推断的10个成分中,6个来源于黄芪(3个黄酮苷元,3个皂苷),4个来源于防风(色原酮及苷类)。

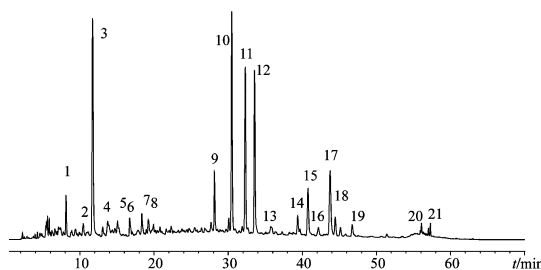


图2 YA 的 HPLC 图谱(280 nm)

表1 对YA中部分色谱峰的化合物分子量
归属的初步推断

色谱保留时间(min)	分子量	可能化合物
21.3	157	—
27.99	468	Prim-O-glucosylcimifugin, 升麻素苷 ²⁾
30.22	446	Calycosin-7-O-glucoside, 毛蕊异黄酮-7-O-葡萄糖苷 ¹⁾
32.12	306	Cimifugin, 升麻素 ²⁾
33.47	452	4'-O-glucosyl-5-O-methylvisaminol, 4'-O-葡萄糖基-5-O-甲基齿阿米醇 ²⁾
38.08	618	—
39.12	488	—
39.53	438	—
40.44	430	Formononetin-7-glucoside, 刺芒柄花素-7-葡萄糖苷 ¹⁾
42.09	290	5-O-methylvisaminol, 5-O-甲基齿阿米醇 ²⁾
43.39	462	Rhannonitrin-3-O-glucoside or 9, 10-dimethoxypterocarpan-3-O-β-D-glucoside; 鼠李柠檬素-3-O-葡萄糖甙或9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷 ¹⁾
44.32	438	—
46.50	514	—
51.13	472	—
53.24	504	—
56.5*	826	astragaloside II, 黄芪苷II ¹⁾
58.7*	868	astragaloside I or Isoastragaloside I, 黄芪苷I或异黄芪苷I ¹⁾
60.7*	910	acetylastragaloside I, 乙酰黄芪苷I ¹⁾

注：* 标记UV未检出色谱峰，在质谱总离子流图中检出色谱峰。
1) 黄芪中成分；2) 防风中成分。

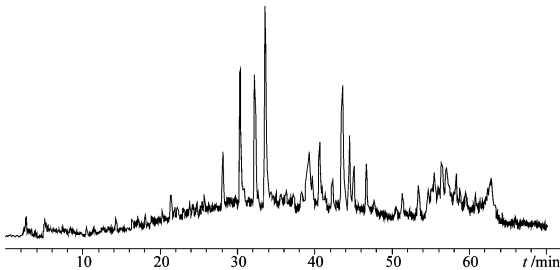


图3 MS正离子总离子流图

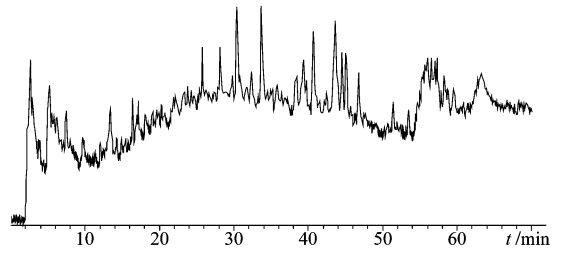


图4 MS负离子总离子流图

3 讨论

本研究发现玉屏风散乙酸乙酯萃取物(YA)对小鼠变应性接触性皮炎有明显的改善作用,并对其中的主要化学成分进行了初步分析。在分析的10个已知成分中,6个属于黄芪(3个黄酮苷元,3个皂苷),4个属于防风(色原酮及苷类)。对于黄芪中成分的报道多属于促进免疫作用,如黄芪总黄酮可能通过提高氢化可的松致免疫功能低下小鼠的CD₄⁺T细胞及IFN-γ水平,增强了机体的细胞免疫功能^[2]。黄芪皂苷能增强巨噬细胞的免疫调节功能,其调节机制可能与其引起细胞内Ca²⁺的浓度升高有关^[3]。防风色原酮苷则具有解热、镇痛、抗炎及抗血小板聚集的作用^[4]。以上研究提示这些已知成分可能是提取物中的活性成分,而其中的未知成分的确定及作用也不可忽视。至于这些成分的是否具有免疫抑制作用,哪些是对于YA抑制ACD有贡献的成分是有待进一步研究的问题。

[参考文献]

- [1] 陈向涛,李俊.玉屏风散的药理学研究进展[J].安徽医药,2003,7(4):241-243.
- [2] 颜培宇.黄芪总黄酮对氢化可的松致免疫功能低下小鼠T细胞亚群的影响[D].黑龙江中医药大学硕士学位论文,2003.
- [3] 杨小敏,徐晓武,卢荷莲,等.黄芪皂苷对小鼠腹腔巨噬细胞的免疫增强作用[J].中国免疫学杂志,2008,24(9):804-807.
- [4] 薛宝云,李文,李丽,等.防风色原酮甙类成分的药理活性研究[J].中国中药杂志,2000,25(5):97-101.