中图分类号：R932；R284.1；R286.0　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2024)19－0058－06
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.19.013

芩珠凉血合剂化学成分及抗银屑病活性研究*

彭　莹，年　华，聂依文，张若曦，宫思邈，侯奇晔，黎　瑞，李福伦，朱建勇△

（上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院，上海　200437）

摘要：目的　筛选芩珠凉血合剂中具有治疗银屑病作用的化学成分。**方法**　采用色谱技术对芩珠凉血合剂进行分离纯化，经波谱数据鉴定化合物结构，采用MTT法进行体外抗银屑病活性研究。**结果**　从芩珠凉血合剂中分离鉴定出11种化合物，包括甘草素（化合物**1**），甘草苷（化合物**2**），芹糖甘草苷（化合物**3**），升麻素（化合物**4**），5－*O*－甲基维斯阿米醇苷（化合物**5**），黄芩苷（化合物**6**），黄芩素（化合物**7**），汉黄芩素（化合物**8**），丹皮酚（化合物**9**），苯甲酸（化合物**10**），对羟基苯甲酸乙酯（化合物**11**）。化合物**2**－**3**，**5**－**7**对角质形成细胞的增殖均有不同程度的抑制作用，化合物**6**对角质形成细胞的增殖抑制活性最强（半数抑制浓度为2.5 μmol/L）。**结论**　化合物**1**－**11**均为首次从芩珠凉血合剂中分离得到，具有抗角质形成细胞增殖的作用。

关键词：芩珠凉血合剂；化学成分；银屑病；细胞增殖

Chemical Compounds from Qinzhu Liangxue Mixture and Its Effect on Psoriasis

PENG Ying, NIAN Hua, NIE Yiwen, ZHANG Ruoxi, GONG Simiao, HOU Qiye, LI Rui, LI Fulun, ZHU Jianyong

(Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, China 200437)

Abstract: Objective　To screen the chemical compounds in Qinzhu Liangxue Mixture that have therapeutic effects on psoriasis. **Methods**　The compounds in the Qinzhu Liangxue Mixture were isolated and purified by the chromatography technology, the compound structures were identified by the spectral data, and the *in vitro* anti－psoriasis activity was studied by the MTT assay. **Results**　Eleven compounds were isolated and identified from Qinzhu Liangxue Mixture, including liquiritigenin (compound **1**), liquiritin (compound **2**), liquiritin apioside (compound **3**), cimifugin (compound **4**), 4′－*O*－*β*－*D*－glucosyl－5－*O*－methylvisamminol (compound **5**), baicalin (compound **6**), baicalein (compound **7**), wogonin (compound **8**), paeonol (compound **9**), benzoic acid (compound **10**), and ethylparaben (compound **11**). Compounds **2**－**3** and **5**－**7** showed different degrees of inhibitory effects on the proliferation of keratinocytes, and compound **6** had the strongest inhibitory activity on the proliferation of keratinocytes, with a half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 2.5 μmol/L. **Conclusion**　Compounds **1**－**11** were isolated for the first time from Qinzhu Liangxue Mixture and have anti－proliferative effects on keratinocytes.

Key words: Qinzhu Liangxue Mixture; chemical compounds; psoriasis; cell proliferation

*基金项目：国家中医药管理局“青年岐黄学者”人才培养项目[RY410.13.04]；国家中医药管理局2023年中央财政转移支付地方项目[YY026.03]；上海市卫生健康委员会中医药科研创新团队项目[2022CX011]；上海市中药专家传承工作室建设项目[2020ZYGZS－002]；上海市大学生创新创业训练计划项目[202310268080，SHUTCM2023029]；上海中医药大学医养结合高水平科创项目[YYKC－2021－01－156]。

第一作者：彭莹，女，硕士研究生在读，研究方向为中药药效物质基础及机制，（电子信箱）py960360834@163.com。

△通信作者：朱建勇，男，博士研究生，副主任药师，研究方向为中药药效物质基础和院内制剂开发，（电子信箱）jyzhu@foxmail.com。

[23] 张天柱，杨世海，张景龙．桑菊饮对内毒素诱导小鼠急性肺损伤的保护作用[J]．中药药理与临床，2014，30(5)：12－14.

[24] 苏治福，张钰应，万泽房，等．桑菊饮抗菌及对小鼠免疫功能影响的初步研究[J]．中国民族民间医药，2016，25(2)：16－17.

[25] 王　佳，冯星火，国丽娜，等．银翘散对流感病毒感染性重症肺炎小鼠肺组织的修复机制研究[J]．陕西中医，2020，41(2)：156－159.

[26] MEHRBOD P, HUDY D, SHYNTUM D, et al. Quercetin as a Natural Therapeutic Candidate for the Treatment of Influenza Virus[J]. Biomolecules, 2020, 11(1): 10.

[27] 黄家望，王康宇，马心悦，等．基于VEGF/PI3K/Akt/eNOS信号通路探讨木犀草素干预A型流感病毒的作用机制[J]．湖南中医药大学学报，2023，43(9)：1584－1590.

[28] FENSTERL V, SEN GC. Interferons and viral infections[J]. Biofactors, 2009, 35(1): 14－20.

[29] XU L, YOON H, ZHAO MQ, et al. Cutting edge: pulmonary immunopathology mediated by antigen－specific expression of TNF－alpha by antiviral CD_8^+ T cells[J]. J Immunol, 2004, 173(2): 721－725.

[30] KULDO JM, WESTRA J, ASGEIRSDOTTIR SA, et al. Differential effects of NF－kappaB and p38 MAPK inhibitors and combinations thereof on TNF－alpha－and IL－1beta－induced proinflammatory status of endothelial cells in vitro[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 289(5): C1229－C1239.

（收稿日期：2024－03－06；修回日期：2024－05－24）

银屑病也称牛皮癣，是一种免疫介导的慢性皮肤病，与免疫系统失调、角质细胞异常增殖、炎性反应、遗传、环境因素等相关[1]，临床表现为红色斑块样皮损、银白色鳞屑等。其中，免疫系统对银屑病起关键作用，如T细胞异常激活，错误攻击正常的皮肤细胞，会导致肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细胞介素17（IL-17）、白细胞介素23（IL-23）、γ干扰素（IFN-γ）等炎性因子[2]的释放，引发局部炎性反应和表皮细胞异常增殖。芩珠凉血合剂为我院自制制剂（沪药制字Z05050993），由珍珠母、黄芩、新疆紫草、徐长卿、佛耳草、磁石、防风、甘草、生牡蛎等中药材组方，具有清热、凉血、潜阳功效，治疗血热证银屑病等及各类皮肤瘙痒症的临床疗效良好[3]。为探讨芩珠凉血合剂的药效物质基础，本研究中对其化学成分进行了系统研究，并对其抑制角质形成细胞增殖活性的主要成分进行初步筛选，为后续新药开发奠定基础。现报道如下。

1 仪器、试药与细胞

1.1 仪器

Heracell 150i GP型CO_2培养箱，Varioskan LUX型多功能酶标仪，EVOS FL型荧光显微镜，均购自美国Thermo Fisher公司；Agilent 1260型高效液相色谱仪（美国Agilent公司）；CP225D型电子天平（北京赛多利斯仪器系统有限公司，精度为0.01 mg）；DL720-A型超声清洗仪（上海之信仪器有限公司，功率为600 W，频率为60 kHz）；SHZ-D Ⅲ型循环水式真空泵（郑州博科设备有限公司）；RV-10型旋转蒸发仪（德国IKA公司）；BD-Ⅱ型多功能紫外分析仪（北京启航博达科技有限公司）；HWS28型电热恒温水浴锅（上海一恒科学实验有限公司）；DNG-9140A型电热恒温干燥箱（上海精宏实验设备有限公司）；Avance Ⅲ-600MHz型核磁共振仪（瑞士Bruker公司）。

1.2 试药

芩珠凉血合剂（医院制剂，批号分别为2208001，2208002，2208003）；正丁醇、乙醇、氯仿（分析纯，国药集团化学试剂公司）；甲醇（色谱纯），RPMI 1640培养基（货号为11875093），磷酸盐缓冲液（PBS，货号为10010049），双抗（货号为15140122），均购自美国Thermo Fisher公司；胎牛血清（FBS，货号为S9030），二甲基亚砜（DMSO，货号为D8371），MTT试剂盒（货号为M1020），碘化丙啶（PI，货号为P8080），均购自北京索莱宝科技有限公司；黄芩苷对照品（批号为110715-201821，含量为95.4%），黄芩素对照品（批号为111595-201808，含量为97.9%），汉黄芩素对照品（批号为111514-201706，含量未标识），丹皮酚对照品（批号为110708-201908，含量为99.8%），均购自中国食品药品检定研究院；甘草素对照品（含量为98%），甘草苷对照品（含量为95%），芹糖甘草苷对照品（含量为98%），升麻素对照品（含量为98%），5-*O*-甲基维斯阿米醇苷对照品（含量为98%），苯甲酸对照品（含量为98%），对羟基苯甲酸乙酯对照品（含量为98%），均为成分分离和结构鉴定所得；水为超纯水。

1.3 细胞

人永生化角质形成细胞（HaCaT细胞，中国科学院细胞库）。

2 方法与结果

2.1 成分分离

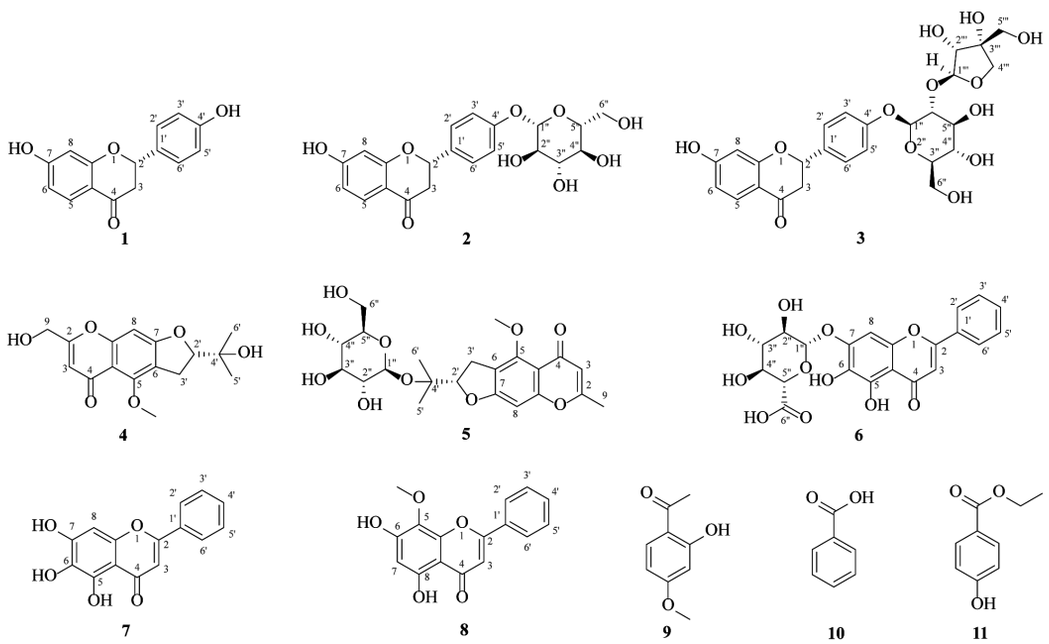
取样品（批号为2208002）10瓶，每瓶200 mL，共2 000 mL，加水饱和的正丁醇萃取3次，合并萃取液，减压浓缩，干燥得水饱和正丁醇萃取物30 g。用D101大孔树脂（0，20%，40%，60%，80%，100%乙醇）冲洗，经高效液相色谱（HPLC）法分析，主要物质在40%～80%部位，合并洗脱液，浓缩得浸膏7 g，采用葡萄糖凝胶柱，以二氯甲烷-甲醇（1∶1，*V*/*V*）洗脱，进行分段得6个馏分Fr. A-F。其中，Fr. F经过葡萄糖凝胶柱，以二氯甲烷-甲醇（1∶1，*V*/*V*）洗脱，得化合物**10**（35 mg）和化合物**11**（29 mg）；Fr. A再通过半制备HPLC［甲醇-水（70∶30，*V*/*V*）］，得化合物**2**（9 mg）和化合物**3**（14 mg）；Fr. B通过硅胶柱［甲醇-水（100∶0→70∶1，*V*/*V*）］，得化合物**1**（9 mg）；Fr. C通过半制备HPLC［甲醇-水（75∶25，*V*/*V*）］，得化合物**4**（17 mg）和化合物**5**（23 mg）；Fr. D和Fr. E经薄层色谱（TLC）显示无成分斑点，弃去。

2.2 结构鉴定

芩珠凉血正丁醇部位共鉴定出11种化合物（结构见图1）。其中，化合物**1**-**5**和化合物**10**-**11**通过核磁鉴定其结构，化合物**6**-**9**通过HPLC法分析其保留时间，以进行确证。

化合物**1**：黄色粉末。HRESIMS *m*/*z* 257.083 0［M+H］$^+$，分子式$C_{15}H_{12}O_4$。^{1}H NMR（600 MHz，CD_3OD）δ_H：7.75（1H，d，*J*=8.7 Hz，H-5），7.34（2H，d，*J*=8.7 Hz，H-2′，6′），6.83（2H，d，*J*=8.8 Hz，H-3′，5′），6.52（1H，dd，*J*=8.7，2.3 Hz，H-6），6.37（1H，d，*J*=2.3 Hz，H-8），5.40（1H，dd，*J*=13.1，2.9 Hz，H-2），3.07（1H，dd，*J*=16.9，13.1 Hz，H-3a），2.71（1H，dd，*J*=16.9，3.0 Hz，H-3b）。^{13}C NMR（150 MHz，CD_3OD）δ_C：81.1（C-2），45.0（C-3），193.5（C-4），129.9（C-5），111.7（C-6），165.6（C-7），103.8（C-8），166.8（C-9），116.3（C-10），131.4（C-1′），129.0（C-2′，6′），116.3（C-3′，5′），159.0（C-4′）。以上数据与文献[4]基本一致，故鉴定化合物**1**为甘草素（liquiritigenin）。

化合物**2**：黄色粉末。HRESIMS *m*/*z* 435.120 0［M+



1. 甘草素　2. 甘草苷　3. 芹糖甘草苷　4. 升麻素　5. 5 - *O* - 甲基维斯阿米醇苷　6. 黄芩苷　7. 黄芩素　8. 汉黄芩素
9. 丹皮酚　10. 苯甲酸　11. 对羟基苯甲酸乙酯

图1　芩珠凉血合剂中化合物的结构

1. Liquiritigenin　2. Liquiritin　3. Liquiritin apioside　4. Cimifugin　5. 4′ - *O* - *β* - *D* - glucosyl - 5 - *O* - methylvisamminol　6. Baicalin
7. Baicalein　8. Wogonin　9. Paeonol　10. Benzoic acid　11. Ethylparaben

Fig. 1　Structures of compounds in Qinzhu Liangxue Mixture

H]$^+$，分子式 $C_{21}H_{22}O_{10}$。^{1}H NMR(600 MHz, CD_3OD)δ_H: 7.74(1H, d, *J* = 8.8 Hz, H - 5), 7.45(2H, d, *J* = 8.7 Hz, H - 2′, 6′), 7.16(2H, d, *J* = 8.7 Hz, H - 3′, 5′), 6.51(1H, dd, *J* = 8.7, 2.2 Hz, H - 6), 6.38(1H, d, *J* = 2.2 Hz, H - 8), 5.47(1H, dd, *J* = 12.8, 3.0 Hz, H - 2), 4.95(1H, d, *J* = 7.60 Hz, H - 1″), 3.91(1H, dd, *J* = 12.1, 5.6 Hz, H - 6a″), 3.72(1H, dd, *J* = 12.1, 5.6 Hz, H - 6b″), 3.18 - 3.31(4H, m, H - 2″ ~ 5″), 3.05(1H, dd, *J* = 16.9, 12.8 Hz, H - 3), 2.75(1H, dd, *J* = 16.9, 2.8 Hz, H - 3)。^{13}C NMR(150 MHz, CD_3OD)δc: 80.7(C - 2), 45.0(C - 3), 193.2(C - 4), 134.5(C - 5), 111.9(C - 6), 167.1(C - 7), 103.9(C - 8), 165.4(C - 9), 114.9(C - 10), 129.9(C - 1′), 128.8(C - 2′, 6′), 117.8(C - 3′, 5′), 159.2(C - 4′), 102.2(C - 1″), 74.9(C - 2″), 78.0(C - 3″), 71.4(C - 4″), 78.2(C - 5″), 62.5(C - 6″)。以上数据与文献[5]基本一致，故鉴定化合物**2**为甘草苷(liquiritin)。

化合物**3**：黄色粉末。HRESIMS *m* / *z* 566.163 6 [M + H]$^+$，分子式 $C_{26}H_{30}O_{14}$。^{1}H NMR(600 MHz, CD_3OD)δ_H: 7.65(1H, d, *J* = 8.7 Hz, H - 5), 7.46(2H, d, *J* = 8.7 Hz, H - 2′, 6′), 7.13(2H, d, *J* = 8.7 Hz, H - 3′, 5′), 6.52(1H, dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, H - 6), 6.38(1H, d, *J* = 2.3 Hz, H - 8), 5.49(1H, d, *J* = 1.6 Hz, H - 2), 5.47(1H, brs, H - 1‴) 5.02(1H, d, *J* = 7.6 Hz, H - 1″), 4.59(1H, d, *J* = 12.1 Hz, H - 1′), [4.08(1H, d, *J* = 9.6 Hz), 3.81(1H, d, *J* = 9.6 Hz), H_2 - 4‴], 3.97(1H, d, *J* = 1.6 Hz, H - 2‴), 3.56(2H, dd, *J* = 3.0, 1.1 Hz, H_2 - 5‴), [3.05(1H, dd, *J* = 12.8, 16.7 Hz), 2.76(1H, m), H_2 - 3]。^{13}C NMR(150 MHz, CD_3OD) δ_C: 80.8(C - 2), 45.0(C - 3), 193.2(C - 4), 129.9(C - 5), 111.9(C - 6) 166.9(C - 7), 103.8(C - 8), 165.4(C - 9), 115.0(C - 10), 134.4(C - 1′), 128.8(C - 2′, 6′), 117.6(C - 3′, 5′), 100.8(C - 1″), 78.6(C - 2″), 78.6(C - 3″), 71.4(C - 4″), 78.1(C - 5″), 62.5(C - 6″), 110.8(C - 1‴), 78.1(C - 2‴), 80.7(C - 3‴), 75.5(C - 4‴), 66.0(C - 5‴)。以上数据与文献[6]基本一致，故鉴定化合物**3**为芹糖甘草苷(liquiritin apioside)。

化合物**4**：无色针晶(甲醇)。HRESIMS *m* / *z* 306.114 5[M + H]$^+$。^{1}H NMR(600 MHz, $CDCl_3$)δ_H: 6.43(1H, s, H - 8), 6.22(1H, s, H - 3), 4.70(1H, t, *J* = 8.8 Hz, H - 3′), 4.46(2H, s, H - 9), 3.91(3H, s, H - 5), 3.25(2H, dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz H - 2′), 1.37(3H, s, H - 5′), 1.24(3H, s, H - 6′)。^{13}C NMR(150 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 165.9(C - 2), 109.4(C - 3), 177.8(C - 4), 112.1(C - 4a), 164.7(C - 5), 117.2(C - 6), 159.5(C - 7), 93.9(C - 8), 155.9(C - 8a), 61.1(C - 9), 91.5(C - 2′),

27.9(C－3′), 71.7(C－4′), 24.5(C－5′), 26.3(C－6′), 61.1(5－OCH_3)。以上数据与文献[7]基本一致，故鉴定化合物**4**为升麻素(cimifugin)。

化合物**5**：无色针晶(甲醇)。HRESIMS *m* / *z* 468.161 1[M＋H]$^+$。^{1}H NMR(600 MHz, CD_3OD) δ_H: 6.60(1H, H－3), 6.04(1H, d, *J* = 0.9 Hz, H－8), 4.88(1H, t, *J* = 9.0 Hz, H－2′), 4.60(1H, d, *J* = 7.8 Hz, H－1″), 3.95(3H, s, 5－OCH_3), 3.30～3.68(8H, overlapped, H－3′, 2″～6″), 2.34(3H, s, H－9), 1.38(6H, s, 5′, 6′－OCH_3)。^{13}C NMR(150 MHz, CD_3OD) δ_C: 166.5(C－2), 111.5(C－3), 179.8(C－4), 111.9(C－4a), 166.9(C－5), 118.5(C－6), 161.4(C－7), 94.4(C－8), 157.0(C－8a), 19.7(C－9), 92.0(C－2′), 29.0(C－3′), 79.0(C－4′), 23.9(C－5′), 22.5(C－6′), 98.9(C－1″), 75.1(C－2″), 77.5(C－3″), 71.4(C－4″), 78.1(C－5″), 62.3(C－6″), 61.1(5－OCH_3)。以上数据与文献[8]基本一致，故鉴定化合物**5**为5－*O*－甲基维斯阿米醇苷(4′－*O*－*β*－*D*－glucosyl－5－*O*－methylvisamminol)。

化合物**10**：白色粉末。HRESIMS *m* / *z* 123.033 7[M＋H]$^+$。^{1}H NMR(600 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 10.63(1H, brs, H－OH), 8.14(2H, dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, H－2, 6), 7.62(1H, t, *J* = 7.4 Hz, H－4), 7.49(2H, t, *J* = 7.8 Hz, H－3, 5)。^{13}C NMR(150 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 130.1(C－1), 129.5(C－2, 6), 128.6(C－3, 5), 130.4(C－4), 172.6(COOH－1)。以上数据与文献[9]基本一致，故鉴定化合物**10**为苯甲酸(benzoic acid)。

化合物**11**：白色结晶物。分子式$C_9H_{10}O_3$。^{1}H NMR($CDCl_3$, 600 MHz) δ_H: 7.94(2H, d, *J* = 8.8 Hz, H－3, 5), 6.91(2H, d, *J* = 8.8 Hz, H－2, 6), 4.35(2H, d, *J* = 7.2 Hz, HO－CH_2), 1.38(3H, t, *J* = 7.2 Hz, 10－CH_3)。^{13}C NMR(CD_3OD, 150 MHz) δ_C: 122.2(C－1), 132.0(C－2, 6), 115.5(C－3, 5), 160.9(C－4), 167.6(－C＝O), 61.2(－OCH_2－), 14.4(－CH_2CH_3)。以上数据与文献[10]基本一致，故鉴定化合物**11**为对羟基苯甲酸乙酯(ethylparaben)。

化合物**6**－**9**：通过对比HPLC保留时间，鉴定化合物**6**－**9**分别为黄芩苷(baicalin)、黄芩素(baicalein)、汉黄芩素(wogonin)、丹皮酚(paeonol)。

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件

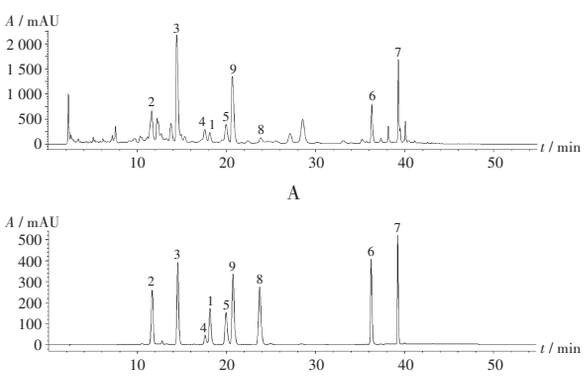
色谱柱：Aglient Zorbax Elipse XDB－C_{18}柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相：甲醇(A)－0.1%磷酸水溶液(B)，梯度洗脱(0～10 min时25%A→45%A, 10～30 min时45%A→50%A, 30～40 min时50%A→90%A, 40～45 min时90%A→100%A, 45～50 min时100%A→25%A, 50～55 min时25%A)；流速：1.0 mL / min；柱温：30 ℃；检测波长：280 nm；进样量：10 μL(混合对照品溶液)和5 μL(供试品溶液)。

2.3.2 溶液制备

取甘草苷、升麻素、5－*O*－甲基维斯阿米醇苷、甘草素、黄芩苷、对羟基苯甲酸乙酯、丹皮酚、黄芩素、汉黄芩素对照品各适量，精密称定，加甲醇制成质量浓度分别为0.17, 0.13, 0.09, 0.24, 0.16, 0.14, 0.26, 0.18, 0.22 mg / mL的混合对照品溶液。取样品30 mL，加等体积水饱和的正丁醇液萃取3次，合并萃取液，减压浓缩至干，加甲醇定容至5 mL，经0.45 μm有机相微孔滤膜滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

2.3.3 方法学考察

专属性试验：分别吸取2.3.2项下混合对照品溶液10 μL、供试品溶液5 μL，按2.3.1项下色谱条件进样测定。结果混合对照品溶液和供试品溶液中的甘草苷、升麻素、5－*O*－甲基维斯阿米醇苷、甘草素、黄芩苷、对羟基苯甲酸乙酯、丹皮酚、黄芩素、汉黄芩素色谱峰在相同保留时间处无干扰峰，理论板数符合要求，表明方法专属性良好。色谱图见图2。



A. 供试品溶液　B. 混合对照品溶液
1. 甘草素　2. 甘草苷　3. 升麻素　4. 5－*O*－甲基维斯阿米醇苷　5. 黄芩苷　6. 黄芩素　7. 汉黄芩素　8. 丹皮酚　9. 对羟基苯甲酸乙酯

图2 高效液相色谱图

A. Test solution　B. Mixed reference solution
1. Liquiritigenin　2. Liquiritin　3. Cimifugin　4. 4′－*O*－*β*－*D*－glucosyl－5－*O*－methylvisamminol　5. Baicalin　6. Baicalein　7. Wogonin　8. Paeonol　9. Ethylparaben

Fig. 2 HPLC chromatograms

线性关系考察：精密吸取2.3.2项下混合对照品溶液1.25, 2.5, 5, 10, 12.5, 15 μL，按2.3.1项下色谱条件进样测定，以进样量为横坐标(*X*, μg)、峰面积(*Y*)为纵坐标进行线性回归。结果见表1，表明各成分在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验：精密吸取2.3.2项下混合对照品溶液

表1 方法学察结果（$n=6$）

Tab. 1 Results of the methodological investigation ($n=6$)

成分	回归方程	r	线性范围（μg）	精密度试验的RSD（%）	重复性试验的RSD（%）	稳定性试验的RSD（%）	加样回收试验（%）	
							平均回收率	RSD
甘草苷	$Y=407.63X-30.797$	0.999 8	0.21～2.55	1.83	0.12	0.96	101.07	3.48
升麻素	$Y=561.11X-53.674$	0.999 6	0.16～1.95	1.72	0.08	0.82	101.29	1.53
5-*O*-甲基维斯阿米醇苷	$Y=74.768X-5.326\,4$	0.999 4	0.11～1.35	1.92	0.22	0.73	101.75	2.76
甘草素	$Y=278.45X-14.617$	0.999 9	0.30～3.60	1.74	0.14	0.92	101.06	3.43
黄芩苷	$Y=296.93X-29.315$	0.999 7	0.20～2.40	1.75	0.19	0.92	101.32	1.39
对羟基苯甲酸乙酯	$Y=591.03X+117.71$	0.999 4	0.18～2.10	1.69	0.07	0.94	100.94	1.83
丹皮酚	$Y=541.98X+90.603$	0.999 1	0.32～3.90	1.74	0.66	0.77	99.15	1.91
黄芩素	$Y=477.63X+38.97$	0.999 7	0.22～2.70	1.73	0.62	0.79	100.72	1.49
汉黄芩素	$Y=398.35X+57.837$	0.999 3	0.28～3.30	1.72	0.11	0.99	101.47	1.16

10 μL，按2.3.1项下色谱条件重复进样测定6次，记录峰面积，并计算*RSD*。结果见表1，表明仪器精密度良好。

重复性试验：取样品（批号为2208002）适量，按2.3.2项下方法平行制备供试品溶液6份，按2.3.1项下色谱条件分别进样测定，记录峰面积，并计算*RSD*。结果见表1，表明方法重复性良好。

稳定性试验：取样品（批号为2208002）适量，按2.3.2项下方法制备供试品溶液，分别于室温放置0，6，12，18，24，30 h时按2.3.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算*RSD*。结果见表1，表明供试品溶液在室温放置30 h内稳定性良好。

加样回收试验：取已知含量的样品（批号为2208002）6份，按100%比例分别加入甘草苷、升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、甘草素、黄芩苷、对羟基苯甲酸乙酯、丹皮酚、黄芩素、汉黄芩素对照品，按2.3.2项下方法制备供试品溶液，按2.3.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算回收率。结果见表1。

2.3.4 样品含量测定

取3批样品（批号分别为2208001，2208002，2208003），按2.3.2项下方法制备供试品溶液，按2.3.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算含量。结果见表2。

表2 芩珠凉血合剂中8种成分含量测定结果（mg/mL）

Tab. 2 Results of the content determination of eight compounds in Qinzhu Liangxue Mixture (mg/mL)

批号	甘草苷	升麻素	5-*O*-甲基维斯阿米醇苷	甘草素	黄芩苷	丹皮酚	黄芩素	汉黄芩素
2208001	4.70	7.65	6.69	2.84	3.73	1.41	3.31	6.67
2208002	4.73	7.68	6.72	2.85	3.75	1.41	3.33	6.16
2208003	4.73	7.69	6.73	2.85	3.77	1.41	3.33	6.71

2.4 芩珠凉血合剂成分抗角质形成细胞增殖的活性

2.4.1 细胞培养

取HaCaT细胞，用含10%FBS的RPMI 1640培养基在37 ℃及5% CO_2饱和湿度条件下传代培养，取对数生长期的细胞进行试验。

2.4.2 MTT法检测化合物**1**－**11**对HaCaT细胞增殖的影响

采用MTT法检测，参考文献[11]，将HaCaT细胞以5×10^3个/孔的密度接种于96孔板，培养24 h，弃培养液，实验组加不同浓度的芩珠凉血合剂提取物作用24 h，空白对照组加新鲜培养液，阴性对照组加150 μL DMSO溶液，每组设3个复孔，每孔加20 μL MTT溶液（质量浓度为5 mg/mL，用PBS溶解），培养箱避光条件下孵育4 h，弃上清液，避免破坏紫色结晶，每孔加入150 μL DMSO溶液溶解MTT结晶，避光条件下平板振荡10 min，采用酶标仪测定560 nm波长处的光密度（*OD*）值，计算芩珠凉血合剂中的化合物对HaCaT细胞生长的抑制率，细胞抑制率（%）=1－（$OD_{阴性对照组}-OD_{实验组}$）/（$OD_{阴性对照组}-OD_{空白对照组}$）×100%。另外，采用Graphpad prism 8软件进行剂量－效应曲线非线性回归拟合，计算其半数抑制浓度（IC_{50}）。结果化合物**1**，**4**，**8**－**11**对HaCaT细胞的增殖均无抑制作用（$IC_{50}>50$ μmol/L）；化合物**2**－**3**，**5**－**7**对HaCaT细胞的增殖均有不同程度的抑制作用，化合物**6**对HaCaT细胞的增殖抑制作用最强（IC_{50}为2.5 μmol/L）。详见表3。

表3 对HaCaT细胞增殖有抑制作用的化合物（$\bar{X}\pm s$，μmol/L）

Tab. 3 Compounds with inhibitory effects on the proliferation of HaCaT cells ($\bar{X}\pm s$, μmol/L)

化合物	IC_{50}	化合物	IC_{50}
2	29.0±2.4	**6**	2.5±0.6
3	17.8±1.2	**7**	12.8±0.8
5	25.2±1.4		

2.4.3 化合物**6**对HaCaT细胞增殖的影响

采用DAPI染色法观察经化合物**6**处理后HaCaT细胞的形态学变化。HaCaT细胞以5×10^5个/孔的密度接

种于6孔板，用含2%胎牛血清和1%双抗的培养液培养24 h，弃培养液，分别用0.63，1.25，2.50，5.00，10.00 μmol / L的化合物**6**处理细胞24 h，以0 μmol / L的培养液作为空白对照。弃培养液，用PBS清洗2次，充分洗去培养液，加入200 μmol / L的DAPI染料200 μL进行染色，室温避光条件下孵育5 min，然后用PBS洗去未结合的染料，在荧光显微镜下以20倍镜观察、拍照。采用Image J软件统计细胞数，计算细胞凋亡率，细胞凋亡率(%) =（凋亡细胞数 / 总细胞数 × 100%）。结果表明，经10.00 μmol / L化合物**6**处理后的HaCaT细胞出现明显凋亡（见图3），且化合物**6**对HaCaT细胞增殖的抑制作用有浓度依赖性（见表4）。

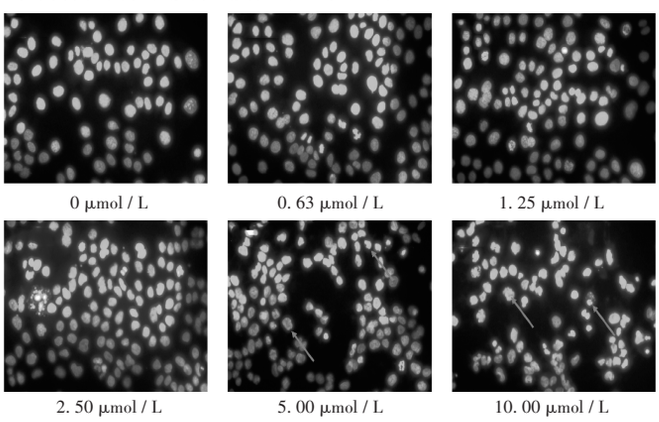


图3　化合物6对HaCaT细胞增殖的抑制作用（× 20）

Fig. 3　Inhibition effect of compound 6 on the proliferation of HaCaT cells（× 20）

表4　化合物6对HaCaT细胞增殖的影响（$\bar{X} \pm s$，%，n = 3）

Tab. 4　Effect of compound 6 on the proliferation of HaCaT cells（$\bar{X} \pm s$，%，n = 3）

浓度	凋亡率	浓度	凋亡率	浓度	凋亡率
0 mmol / L	3.70 ± 0.07	1.25 mmol / L	15.94 ± 1.91	5.00 mmol / L	42.60 ± 5.65
0.63 mmol / L	10.95 ± 1.07	2.50 mmol / L	22.64 ± 1.46	10.00 mmol / L	65.43 ± 6.37

3　讨论

银屑病的发病机制与炎性细胞浸润、炎性因子等相关，多数患者治疗周期长、病情易复发，对其正常生活及身心健康造成了极大的困扰[12]。现有治疗方法主要包括局部药膏、光疗法、口服药物，以及针对免疫系统的生物制剂等，但都存在副作用和局限性。经临床验证，芩珠凉血合剂对银屑病有一定疗效，可明显改善银屑病并发的皮损[13]。

本研究中利用色谱分离技术对芩珠凉血合剂的化学成分进行了定性和定量分析，分离鉴定出甘草素、甘草苷、芹糖甘草苷、升麻素、5－*O*－甲基维斯阿米醇苷、苯甲酸、羟基苯甲酸乙酯、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、丹皮酚等化学成分。经方法学考察，本方法操作简便、快速、准确，具有良好的精密度、稳定性及重复性，为芩珠凉血合剂的多指标质量控制提供了科学依据。体外活性试验表明，化合物**2**－**3**，**5**－**7**对角质形成细胞的增殖有不同程度的抑制作用，其中化合物**6**（黄芩苷）的抑制活性最强（IC_{50}为2.5 μmol / L），为治疗银屑病的主要活性物质，表明芩珠凉血合剂中的化学成分具有抗角质形成细胞的增殖作用。这为进一步研究银屑病的病因、病机提供了理论基础，也为银屑病的治疗提供了新的方向。但本研究中仅进行了体外试验，尚未明确芩珠凉血合剂中具有治疗银屑病作用的化学成分的具体作用机制，有待深入研究。

参考文献

[1] ZHANG S, LI HJ, YANG CM, et al. Inflammatory and Immunomodulatory Effects of *Tripterygium wilfordii* Multiglycoside in Mouse Models of Psoriasis Keratinocytes [J]. Chin J Integr Med, 2024, 30(3): 222－229.

[2] DAPAVO P, SILIQUINI N, MASTORINO L, et al. Efficacy, safety, and drug survival of IL－23, IL－17, and TNF－alpha inhibitors for psoriasis treatment: a retrospective study [J]. J Dermatolog Treat, 2022, 33(4): 2352－2357.

[3] 秦　涛，何丽娜. 芩珠凉血方配合NB－UVB治疗寻常型银屑病血热证疗效及对其T淋巴细胞亚群和MCP－1、M－CSF水平的影响[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志，2019，18(2)：127－131.

[4] 陈颖志，肖朝江，颜宇洁，等. 无茎黄芪根的化学成分研究[J]. 中国药学杂志，2020，55(15)：1253－1258.

[5] 霍金海，刘吉飞，王　昶，等. 枇榔子黄酮类化学成分研究[J]. 广西植物，2021，41(11)：1855－1861.

[6] 史文中，晁利平，阮静雅，等. 绵革藓根茎中黄酮类成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报，2017，34(2)：124－130.

[7] 李　阳，王　旭，李壮壮，等. 防风化学成分分离鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23(15)：60－64.

[8] 王　嵩，邵路平，郤　庆，等. 玉屏风散化学成分的研究[J]. 中成药，2017，39(2)：342－346.

[9] 佟雪琦，赵　明，李　军，等. 汉麻根化学成分研究[J]. 中草药，2022，53(24)：7649－7655.

[10] 陈　靖，张朝凤，张　勉. 卷茎蓼地上部分化学成分研究[J]. 中国中药杂志，2010，35(23)：3165－3167.

[11] GUO WJ, WANG Y, DENG Y, et al. Therapeutic effects of the extract of Sancao Formula, a Chinese herbal compound, on imiquimod－induced psoriasis via cysteine－rich protein 61[J]. Journal of Integrative Medicine, 2022, 20(4): 376－384.

[12] 韩　健. 芩珠凉血方联合阿维A胶囊治疗寻常性银屑病的效果分析[J]. 中国医药指南，2019，17(25)：170.

[13] 茅玮炜，华圣元，陈　洁，等. 芩珠凉血方治疗寻常型银屑病的临床疗效[J]. 上海医药，2020，41(3)：15－16.

（收稿日期：2023－09－12；修回日期：2024－05－04）