

# 祛白片乙酸乙酯部位成分分析及其对小鼠脱黑色素细胞模型的药效学研究<sup>Δ</sup>

段松冷<sup>1,2\*</sup>, 顾红燕<sup>1,2</sup>, 年宏蕾<sup>1,2</sup>, 邢若<sup>1,2</sup>, 姜德春<sup>1,2#</sup> (1.首都医科大学附属北京世纪坛医院药剂科, 北京 100038; 2.临床合理用药评价北京市重点实验室, 北京 100038)

中图分类号 R917;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)07-0853-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.07.15



**摘要** 目的 研究祛白片乙酸乙酯部位成分及其对小鼠脱黑色素细胞模型的药效学作用,探寻祛白片抗白癜风作用的物质基础。方法 采用萃取法获得祛白片乙酸乙酯部位,以超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS)分析其成分。实验设模型对照组、溶媒对照组、8-甲氧补骨脂素(8-MOP)给药组(10、50、100、150、200 μmol/L)和祛白片乙酸乙酯部位给药组(10、50、100、150、200 μg/mL),通过建立小鼠黑色素瘤细胞的脱黑色素细胞模型,从细胞数量、细胞活力情况、黑色素形成、酪氨酸酶活性4个方面研究祛白片乙酸乙酯部位对脱黑色素细胞的影响。结果 UPLC-MS成分分析初步确定了祛白片乙酸乙酯部位的64种化合物结构,其中14种化合物在正、负离子模式下均有检出,补骨脂类化合物占比最大,补骨脂色烯查尔酮在正、负离子模式下含量均最高。药效学研究结果显示,祛白片乙酸乙酯部位可使脱黑色素细胞数量增加,显著提高细胞增殖率、促黑色素生成率及黑色素形成过程中酪氨酸酶活性促进率( $P<0.01$ )。结论 补骨脂类化合物可能是祛白片乙酸乙酯部位发挥抗白癜风作用的物质基础;祛白片乙酸乙酯部位良好的抗白癜风作用可能与提高酪氨酸酶活性有关。

**关键词** 祛白片;乙酸乙酯部位;成分分析;脱黑色素细胞模型

## Component analysis of ethyl acetate fraction in Qubai tablet and its pharmacodynamic study on de melanocyte model of mice

DUAN Songleng<sup>1,2</sup>, GU Hongyan<sup>1,2</sup>, NIAN Honglei<sup>1,2</sup>, XING Ruo<sup>1,2</sup>, JIANG Dechun<sup>1,2</sup> (1. Dept. of Pharmacy, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China; 2. Beijing Key Laboratory of Evaluation of Rational Drug Use, Beijing 100038, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To study the components of ethyl acetate fraction in Qubai tablet, and its pharmacodynamics on de melanocyte model, and explore the material basis for anti-vitiligo effect of Qubai tablet. **METHODS** The ethyl acetate fraction of Qubai tablets was obtained by extraction, and its components were analyzed by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS). Model control group, vehicle control group and 8-methoxypsoralen (8-MOP) administration groups (10, 50, 100, 150, 200 μmol/L), ethyl acetate fraction administration groups of Qubai tablet (10, 50, 100, 150, 200 μg/mL) were set up in the experiment. By establishing the de melanocyte model, the effects of ethyl acetate fraction of Qubai tablet on de melanocyte were studied from four aspects: cell number, cell viability, melanin formation and tyrosinase activity. **RESULTS** UPLC-MS component analysis preliminarily determined the structure of 64 compounds in the ethyl acetate fraction of Qubai tablet, of which 14 compounds were detected in positive and negative ion mode; psoralen compounds accounted for the largest proportion, and the content of psoralen chromone chalcone was the highest in positive and negative ion mode. The results of pharmacodynamic study showed that the ethyl acetate fraction of Qubai tablet could increase the number of de melanocytes, and significantly improve the cell proliferation rate, the rate of promoting melanin formation and the rate of promoting tyrosinase activity in the process of melanin formation ( $P<0.01$ ). **CONCLUSIONS** Psoralen compounds may be the material basis for the anti-vitiligo effect of ethyl

<sup>Δ</sup> 基金项目:北京市属医院科研培育计划项目(No.PZ2017020);首都医科大学附属北京世纪坛医院科研课题-青年基金项目(No.2015-q12)

\* 主管药师,硕士。研究方向:中药及其制剂的化学成分、生物活性研究。电话:010-63926342。E-mail:duansongleng@126.com

# 通信作者:主任药师,教授。研究方向:治疗药物监测。电话:010-63926732。E-mail:jiangdechun@sina.com

acetate fraction of Qubai tablet; good anti-vitiligo effect of ethyl acetate fraction of Qubai tablet may be related to the promotion of tyrosinase activity.

**KEYWORDS** Qubai tablet; ethyl acetate fraction; component analysis; de melanocyte model

祛白片(京药制字Z20063383)为首都医科大学附属北京世纪坛医院应用多年的院内制剂。该制剂由炒蒺藜、补骨脂、制首乌、黑芝麻等15味中药组成,功效为滋补肝肾、活血通络,用于治疗血虚瘀阻、肝郁肾亏、肤失所养引起的白癜风,临床疗效稳定有效,因患者好评较多而多年沿用<sup>[1-2]</sup>。因医院制剂室生产规模有限,目前产量无法满足临床需求。为使更多患者受益,早日实现祛白片成果转化,笔者团队前期从特征图谱入手建立了祛白片质量标准,分别考察了该制剂全方和挥发油部位的药效学,初步证实了该处方的抗白癜风作用<sup>[3-4]</sup>。为解决患者普遍反映的服药量大的问题(说明书中规定:每次5片,每日3次),本研究拟对祛白片进行有效部位研究,以去除杂质,富集有效成分,进一步提高疗效<sup>[5]</sup>。对中药水提物采用极性从小到大的溶剂提取并追踪各部位活性是获得有效部位和活性化合物的重要途径,如青蒿素的活性化合物就是从此研究路径获得的<sup>[6-7]</sup>。本研究选择极性适中、溶解性好的乙酸乙酯作为萃取溶剂<sup>[8-12]</sup>,获得祛白片乙酸乙酯部位,采用超高效液相色谱-质谱联用(ultra performance liquid chromatography-mass spectrometer, UPLC-MS)技术初步确定祛白片乙酸乙酯部位的成分及其相对百分含量,并从细胞数量、细胞活力情况、黑色素形成、酪氨酸酶活性4个方面初步研究该部位对小鼠脱黑色素细胞模型的药效学<sup>[4]</sup>,探讨祛白片抗白癜风作用的物质基础,为进一步优化其工艺及用法用量提供理论指导。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器与试剂

Dionex™ UltiMate™ U3000 UPLC 仪、Q Exactive™ 四极杆轨道离子阱 MS 仪均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;MCO-15AC 型 CO<sub>2</sub> 培养箱购自日本 Panasonic 公司;COIC XDS-1B 型倒置生物显微镜购自重庆重光实业有限公司;RT-TDL-40B 型低速台式离心机购自无锡市瑞江分析仪器有限公司;YT-CJ-1ND 型无菌操作台购自北京亚泰科隆仪器技术有限公司;血球计数板购自上海求精生化试剂仪器有限公司。

8-甲氧补骨脂素(8-methoxypsoralen, 8-MOP, 批号 M3501-1G)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 D2650)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(批号 H1009-100 mL)、TritonX-100 L-DOPA(货号 72816)均购自日本 Sigma 公司;DMEM 培养基(批号 C11965500BT)购自美国 Invitrogen 公司;胎牛血清(货号 900-108)购自美国 Gemini 公司;1% 青霉素-链霉素(货号 151401223)购自美国 Gibco 公司;CCK-8(货号 CK04)购自日本 Dojindo 公司;磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7.4, 货号 P1020)购自北京索莱宝科技有

限公司。

### 1.2 主要药品及其配制

祛白片组方中药饮片购自北京金崇光药业有限公司,经首都医科大学附属北京世纪坛医院药检室检验符合 2020 年版《中国药典》(一部)要求<sup>[13]</sup>。根据祛白片处方称量饮片,按制法得祛白片水煎液,水煎液蒸干后得干浸膏(祛白片为水煎液的干浸膏粉碎后压制成片而得),粉碎待用。取祛白片干浸膏适量充分溶解于热水,用等体积的乙酸乙酯分3次萃取<sup>[14]</sup>,合并萃取液,回收溶剂干燥后得祛白片乙酸乙酯部位干浸膏。8-MOP(因化学结构简单,易与 DNA 发生相互作用,生物活性易发挥作用<sup>[15-16]</sup>,故选择其为阳性对照药物)供试液的配制:取 0.216 2 g 8-MOP 加入 DMSO 溶解至 10 mL,配制成含 0.1 mol/L 8-MOP 的培养液,分装于 1 mL EP 管中,于 -20 ℃ 保存备用,使用时加入无血清 DMEM 培养基稀释至所需浓度。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 供试液的配制:取 102.1 μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 原液加入 897.9 μL DMEM 培养基,配制成含 1 mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的培养液,于 -20 ℃ 保存备用,使用时加入 DMEM 培养基稀释至 0.1 mmol/L。

### 1.3 细胞来源

小鼠 B16 黑色素瘤细胞(编号为 3111C0001CCC-000324)购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心。

## 2 方法

### 2.1 祛白片乙酸乙酯部位成分分析

采用 UPLC-MS 技术对祛白片乙酸乙酯部位进行成分分析。

2.1.1 样品制备方法 取祛白片乙酸乙酯部位干浸膏适量加甲醇充分溶解后,取 100 μL 置于 200 μL 的内衬管中,待测。

2.1.2 UPLC-MS 条件 (1) 色谱条件: Waters UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 流动相:A(含 0.05% 乙酸、1 mmol/L 乙酸铵的水溶液)-B(异丙醇-乙腈, 体积比 1:1), 洗脱程序(0~3 min, 90% A→65% A; 3~6 min, 65% A→15% A; 6~8 min, 15% A→100% B; 8~11 min, 100% B; 11~11.1 min, 100% B→90% A; 11.1~13 min, 90% A), 柱温 50 ℃, 流速 0.3 mL/min。(2) 质谱条件:正、负离子源电压分别为 3.7、3.5 kV;毛细管加热温度为 320 ℃;鞘气、辅助气、碰撞气均为氮气,其中鞘气压力为 30 psi,辅助气压力为 10 psi,碰撞气压力为 1.5 mTorr。溶剂热蒸发温度为 300 ℃。一级全扫描参数:分辨率为 7×10<sup>5</sup>,自动增益控制目标为 3×10<sup>6</sup>,最大隔离时间为 100 ms,质荷比扫描范围为 50~1 500。液质系统由 Xcalibur 2.2 SP 1.48 软件控制。

2.1.3 UPLC-MS检测 采用Dionex™ UltiMate™ U3000 UPLC仪进行色谱分离,使用反相色谱样本进行分析。按“2.1.2”项下条件对祛白片乙酸酯部位化学成分进行分析,采用Progenesis QI软件<sup>[17]</sup>依次进行原始数据导入、峰对齐、峰提取、归一化处理,最后通过保留时间、质荷比、峰强度等信息在正、负离子模式下全扫描检测,分别确定祛白片乙酸酯部位的化合物结构及相对百分含量。

## 2.2 脱黑色素细胞模型的初步药效学研究

2.2.1 供试品溶液的制备 精密称取0.1 g祛白片乙酸酯部位干浸膏,加入不含血清的DMEM培养基溶解至10 mL,0.22 μm滤膜过滤后得祛白片乙酸酯部位母液,后稀释成所需浓度作为供试品溶液。

2.2.2 脱黑色素细胞模型的建立 制备B16黑色素瘤细胞悬液,用血球计数板进行计数。加入含10%胎牛血清、DMEM培养基、1%青霉素-链霉素的培养液稀释细胞,将细胞接种于96孔板,每孔含 $10^5$ 个细胞,5个复孔;长满后,再将细胞接种于24孔板,每孔含 $10^5$ 个细胞,5个复孔。将B16黑色素瘤细胞于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h,更换为含0.1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的培养液与细胞共同孵育4 h后<sup>[16]</sup>,弃掉培养液,得脱黑色素细胞。用DMEM培养基清洗细胞1次,更换含不同药物的培养液。

2.2.3 显微镜下小鼠脱黑色素细胞变化的观察 用倒置生物显微镜观察脱黑色素细胞变化情况,研究祛白片乙酸酯部位对其数量的影响。实验设溶媒对照组、模型对照组、8-MOP给药组(10、50、100、150、200 μmol/L)和祛白片乙酸酯部位给药组(10、50、100、150、200 μg/mL)<sup>[4]</sup>。由于8-MOP母液溶剂为DMSO,因此实验设溶媒对照组(DMSO原液稀释1 000倍)。模型对照组为脱黑色素细胞造模后加入相同体积的DMEM培养基。溶媒对照组和模型对照组其余操作与各给药组平行。分别精密称取0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 g祛白片乙酸酯部位干浸膏,加入不含血清的DMEM培养基溶解至10 mL,0.22 μm滤膜过滤,作为祛白片乙酸酯部位给药组给药溶液。各组细胞于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24、48 h后,分别观察乙酸酯部位和8-MOP作用后脱黑色素细胞的变化。

2.2.4 小鼠脱黑色素细胞增殖的检测 采用CCK-8比色法<sup>[18]</sup>检测脱黑色素细胞活性,研究祛白片乙酸酯部位对其增殖的影响。取对数生长期B16黑色素瘤细胞,胰酶消化后制成单细胞悬液,接种于96孔板,每孔含 $10^4$ 个细胞。细胞于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h,根据“2.2.2”项方法下建立脱黑色素细胞模型。每张孔板的

前3行为对照组,加入100 μL含10%胎牛血清的DMEM培养基。实验除上述溶媒对照组、模型对照组、8-MOP给药组和祛白片乙酸酯部位给药组外,另设本底对照组(不含细胞的本底,仅加入培养基)。每组设5个复孔,加入相应培养基或试剂或药物至培养板中,每孔200 μL。各组细胞继续培养24、48 h,吸去上清液,更换为含CCK-8(CCK-8试剂与DMEM培养基体积比为1:10)的溶液,放入培养箱中培养4 h。用酶标仪在450 nm波长处测定各孔光密度(OD)值,取平均值即为各组OD值。细胞增殖率(%)=[(OD<sub>各给药组</sub> - OD<sub>本底对照组</sub>)/(OD<sub>模型对照组或溶媒对照组</sub> - OD<sub>本底对照组</sub>)]×100%<sup>[17]</sup>,其中祛白片乙酸酯部位给药组细胞增殖率取模型对照组OD值计算,8-MOP给药组细胞增殖率取溶媒对照组OD值计算。

2.2.5 黑色素形成的检测 采用裂解法<sup>[19]</sup>检测促黑色素生成率,研究祛白片乙酸酯部位对黑色素形成的影响。接种、分组、给药方法同“2.2.3”项下,各组细胞继续培养48 h,吸去上清液,PBS清洗2次后,采用12通道排枪每孔加入200 μL NaOH溶液(1 mol/L),恒温水浴保温(80℃)2 h后,待充分裂解细胞和溶解黑色素颗粒,用酶标仪在490 nm波长处测定各孔OD值,取平均值即为各组OD值。促黑色素生成率(%)=[(OD<sub>各给药组</sub> - OD<sub>模型对照组或溶媒对照组</sub>)/OD<sub>模型对照组或溶媒对照组</sub>]×100%,其中祛白片乙酸酯部位给药组促黑色素生成率取模型对照组OD值计算,8-MOP给药组促黑色素生成率取溶媒对照组OD值计算。

2.2.6 酪氨酸酶活性的检测 采用酶标法<sup>[20]</sup>检测酪氨酸酶活性,研究祛白片乙酸酯部位对黑色素形成过程中限速酶酪氨酸酶活性的影响。接种、分组、给药同“2.2.3”项下,加入相应药物处理24、48 h,弃去上清液,PBS洗涤2次,每孔加入1% TritonX-100溶液90 μL,于-80℃放置30 min,随后室温融化使细胞完全破裂,37℃预温后加入10 g/L L-DOPA溶液(每孔100 μL),37℃孵育30 min,用酶标仪在490 nm波长处测定OD值,取平均值即为各组OD值。酪氨酸酶活性促进率(%)=[(OD<sub>各给药组</sub> - OD<sub>模型对照组或溶媒对照组</sub>)/OD<sub>模型对照组或溶媒对照组</sub>]×100%,其中祛白片乙酸酯部位给药组酪氨酸酶活性促进率取模型对照组OD值计算,8-MOP给药组酪氨酸酶活性促进率取溶媒对照组OD值计算。

## 2.3 统计学分析

采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。计量资料满足正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

### 3 结果

#### 3.1 祛白片乙酸酯部位UPLC-MS成分分析结果

UPLC-MS正、负离子模式下初步确定祛白片乙酸

酯部位含有64种化合物结构,其中正离子模式下37种,负离子模式下41种,重合14种。总离子流图见图1,化学成分见表1、表2。

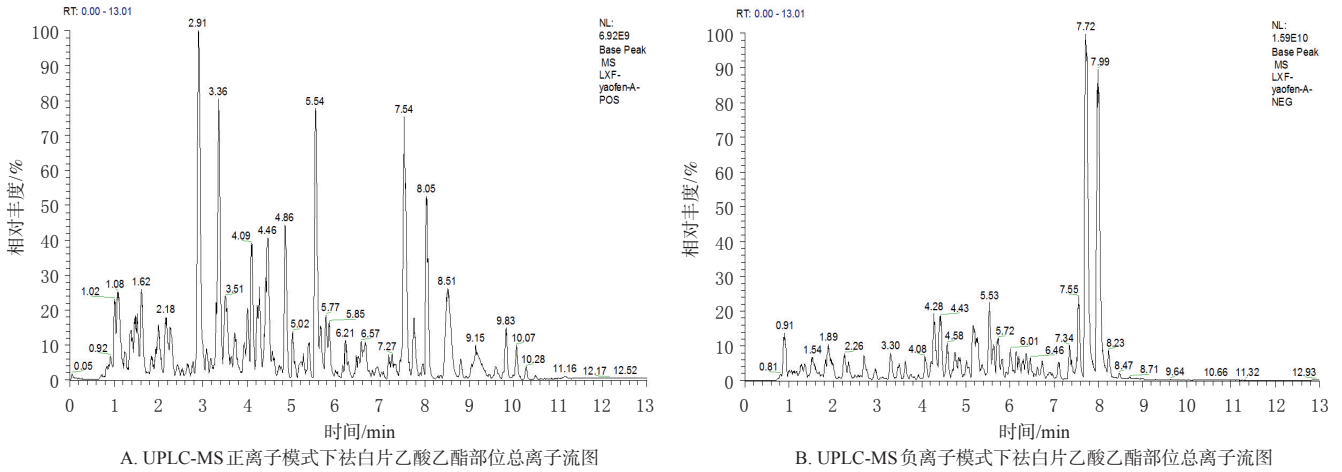


图1 UPLC-MS正、负离子模式下祛白片乙酸酯部位总离子流图

表1 UPLC-MS正离子模式下祛白片乙酸酯部位化学成分

序号	$t_R$ /min	准分子离子峰质荷比	分子量	化合物名称	相对百分含量/%	药材来源
1	2.86	314.1[M+H] <sup>+</sup>	313	反-N-(4-羟基苯乙基)阿魏酸酰胺	1.30	制何首乌
2	2.89	241.1[M+H] <sup>+</sup>	240	去氧大黄酚	0.13	制何首乌
3	2.90	287.1[M+H] <sup>+</sup>	286	异氧化前胡素	4.04	白芷
4	2.91	243.1[M+H] <sup>+</sup>	242	3,5-二羟基-4'-甲氧基二苯乙烯	1.87	制何首乌
5	2.91	261.1[M+H] <sup>+</sup>	260	7-O-(3,3-二甲基烯丙基)-东莨菪素	16.31	北沙参
6	2.97	255.1[M+H] <sup>+</sup>	254	大黄酚	1.51	制何首乌
7	3.10	355.1[M+H] <sup>+</sup>	354	D-芝麻素	0.25	黑芝麻
8	3.30	305.1[M+H] <sup>+</sup>	304	决明子内酯	4.20	决明子
9	3.36	317.1[M+H] <sup>+</sup>	316	比克白芷素	16.21	白芷
10	3.37	203.0[M+H] <sup>+</sup>	202	花椒毒酚	0.15	白芷、独活
11	3.38	377.2[M+H] <sup>+</sup>	376	当归醇A	0.08	独活
12	3.52	187.0[M+H] <sup>+</sup>	186	补骨脂内酯	2.34	补骨脂
13	3.62	345.1[M+H] <sup>+</sup>	344	决明素	0.07	决明子
14	3.64	217.1[M+H] <sup>+</sup>	216	佛手苷内酯	0.84	白芷、独活
15	3.99	585.2[M+H] <sup>+</sup>	584	苯甲酰芍药苷	0.25	赤芍
16	4.10	301.1[M+H] <sup>+</sup>	300	珊瑚菜素	1.02	白芷
17	4.20	321.1[M+H] <sup>+</sup>	320	补骨脂异黄酮	1.24	补骨脂
18	4.26	339.1[M+H] <sup>+</sup>	338	补骨脂异黄酮醇	4.94	补骨脂
19	4.31	331.1[M+H] <sup>+</sup>	330	橙黄决明素	0.29	决明子
20	4.45	163.0[M+H] <sup>+</sup>	162	伞形花内酯	0.13	独活
21	4.48	299.1[M+H] <sup>+</sup>	298	异新补骨脂查尔酮	0.95	补骨脂
22	4.86	229.1[M+H] <sup>+</sup>	228	川白芷素	1.16	白芷
23	4.86	289.1[M+H] <sup>+</sup>	288	二氢欧山芹醇乙酸酯	0.50	独活
24	4.86	359.1[M+H] <sup>+</sup>	358	黄决明素	9.90	决明子
25	5.27	325.1[M+H] <sup>+</sup>	324	补骨脂甲素	1.23	补骨脂
26	5.34	271.1[M+H] <sup>+</sup>	270	异欧前胡内酯	0.21	丹参
27	5.39	337.1[M+H] <sup>+</sup>	336	丹参新醌丁	0.25	丹参
28	5.54	323.1[M+H] <sup>+</sup>	322	补骨脂色烯查尔酮	21.06	补骨脂
29	5.60	279.1[M+H] <sup>+</sup>	278	次甲丹参醌	0.93	丹参
30	5.85	245.1[M+H] <sup>+</sup>	244	蛇床子素	2.55	独活
31	5.98	277.1[M+H] <sup>+</sup>	276	丹参酮I	0.34	丹参
32	6.04	329.1[M+H] <sup>+</sup>	328	哥伦狭缝芹定	0.22	香橼
33	6.11	281.3[M+H] <sup>+</sup>	280	鞣酸	0.07	红花、女贞子
34	6.21	339.2[M+H] <sup>+</sup>	338	8-牻牛儿醇基补骨脂素	2.14	北沙参
35	6.27	297.2[M+H] <sup>+</sup>	296	丹参酮II <sub>B</sub>	0.90	丹参
36	6.58	301.2[M+H] <sup>+</sup>	300	柳杉醇	0.16	丹参
37	6.60	295.1[M+H] <sup>+</sup>	294	异丹参酮II <sub>A</sub>	0.26	丹参

表2 UPLC-MS负离子模式下祛白片乙酸乙酯部位化学成分

序号	$t_R$ /min	准分子离子峰质荷比	分子量	化合物名称	相对百分含量/%	药材来源
1	2.59	551.2[M-H] <sup>-</sup>	552	可来灵素C	0.22	北沙参
2	2.74	521.2[M-H] <sup>-</sup>	522	乙酰芍药苷	4.43	赤芍
3	2.84	312.1[M-H] <sup>-</sup>	313	反-N-(4-羟基苯乙基)阿魏酸酰胺	0.34	制何首乌
4	2.96	253.1[M-H] <sup>-</sup>	254	大黄酚	1.28	制何首乌
5	3.09	353.1[M-H] <sup>-</sup>	354	D-芝麻素	0.09	黑芝麻
6	3.43	373.1[M-H] <sup>-</sup>	374	迷迭香酸甲酯	0.11	赤芍
7	3.49	301.0[M-H] <sup>-</sup>	302	槲皮素	3.06	炒蒺藜
8	3.63	271.1[M-H] <sup>-</sup>	272	红镰霉素	1.96	决明子
9	3.76	267.0[M-H] <sup>-</sup>	268	拟雌内酯	0.69	补骨脂
10	4.08	243.1[M-H] <sup>-</sup>	244	蛇床子素	0.05	香橼、独活
11	4.25	469.2[M-H] <sup>-</sup>	470	柠檬苦素	0.14	香橼
12	4.28	329.1[M-H] <sup>-</sup>	330	橙黄决明素	11.13	决明子
13	4.33	567.2[M-H] <sup>-</sup>	568	女贞果苷D	0.22	女贞子
14	4.58	285.0[M-H] <sup>-</sup>	286	山柰酚	4.90	赤芍
15	4.84	357.1[M-H] <sup>-</sup>	358	黄决明素	4.03	决明子
16	4.87	283.1[M-H] <sup>-</sup>	284	大黄素甲醚	2.48	炒蒺藜
17	4.89	229.1[M-H] <sup>-</sup>	230	6-(3,3-二甲基烯丙基)-7-羟基香豆素	0.96	北沙参
18	5.02	343.1[M-H] <sup>-</sup>	344	1-去甲基黄决明素	3.50	决明子
19	5.11	453.2[M-H] <sup>-</sup>	454	黄柏酮	0.21	香橼
20	5.27	323.1[M-H] <sup>-</sup>	324	补骨脂甲素	6.45	补骨脂
21	5.40	269.1[M-H] <sup>-</sup>	270	异欧前胡内酯	2.01	白芷
22	5.46	295.1[M-H] <sup>-</sup>	296	丹参酚	0.14	丹参
23	5.50	259.1[M-H] <sup>-</sup>	260	7-O-(3,3-二甲基烯丙基)-东莨菪素	0.17	北沙参
24	5.53	321.1[M-H] <sup>-</sup>	322	补骨脂色烯查尔酮	13.80	补骨脂
25	5.70	269.0[M-H] <sup>-</sup>	270	大黄素	5.52	制何首乌
26	5.74	247.1[M-H] <sup>-</sup>	248	苍术内酯Ⅲ	0.25	苍术
27	5.77	319.1[M-H] <sup>-</sup>	320	补骨脂异黄酮	2.00	补骨脂
28	5.80	273.1[M-H] <sup>-</sup>	274	β-醋酸基苍术醇	0.07	苍术
29	5.92	335.1[M-H] <sup>-</sup>	336	异补骨脂定	1.31	补骨脂
30	6.22	337.1[M-H] <sup>-</sup>	338	8-牻牛儿醇基补骨脂素	1.57	补骨脂
31	7.08	513.4[M-H] <sup>-</sup>	514	19α-羟基-3-乙酰乌索酸	0.31	女贞子
32	7.10	255.2[M-H] <sup>-</sup>	256	补骨脂酚	2.05	补骨脂
33	7.16	299.2[M-H] <sup>-</sup>	300	柳杉醇	0.30	丹参
34	7.31	455.4[M-H] <sup>-</sup>	456	熊果酸	0.88	女贞子
35	7.34	277.2[M-H] <sup>-</sup>	278	亚麻酸	3.80	黑芝麻
36	7.39	227.2[M-H] <sup>-</sup>	228	肉豆蔻酸	1.41	红花
37	7.55	279.2[M-H] <sup>-</sup>	280	鞣酸	9.62	红花、女贞子
38	7.57	241.2[M-H] <sup>-</sup>	242	13-甲基十四碳酸	0.49	赤芍
39	7.78	281.2[M-H] <sup>-</sup>	282	反油酸	6.94	香橼
40	7.99	283.2[M-H] <sup>-</sup>	284	十八碳酸	0.05	补骨脂
41	8.47	339.3[M-H] <sup>-</sup>	340	山芋酸	1.06	补骨脂

### 3.2 脱黑色素细胞模型初步药效学研究结果

3.2.1 显微镜下小鼠脱黑色素细胞变化的观察结果 倒置生物显微镜观察结果显示,与模型对照组比较,祛白片乙酸乙酯部位给药组随着作用时间和剂量的增加,细胞数量逐渐增加,其中给药培养48 h,使脱黑色素细胞的数量增加最明显。8-MOP 给药培养24 h和48 h,脱黑色素细胞数量变化与祛白片乙酸乙酯部位类似。结果见图2。

3.2.2 祛白片乙酸乙酯部位对脱黑色素细胞增殖的影响 与模型对照组比较,祛白片乙酸乙酯部位给药组均能显著提高脱黑色素细胞的细胞增殖率( $P<0.01$ );与溶媒对照组比较,8-MOP 给药组均能显著提高脱黑色素细胞的细胞增殖率( $P<0.01$ )。细胞增殖率与作用时间

和剂量均呈正相关。结果见图3。

3.2.3 祛白片乙酸乙酯部位对黑色素形成的影响 与模型对照组比较,祛白片乙酸乙酯部位给药组均能显著提高脱黑色素细胞的促黑色素生成率( $P<0.01$ );与溶媒对照组比较,8-MOP 给药组均能显著提高脱黑色素细胞的促黑色素生成率( $P<0.01$ )。促黑色素生成率与作用时间、剂量均呈正相关。结果见图4。

3.2.4 祛白片乙酸乙酯部位对酪氨酸酶活性的影响 与模型对照组比较,祛白片乙酸乙酯部位给药组均能显著提高脱黑色素细胞的酪氨酸酶活性促进率( $P<0.01$ );与溶媒对照组比较,8-MOP 给药组均能显著提高脱黑色素细胞的酪氨酸酶活性促进率( $P<0.01$ )。酪氨酸酶活性促进率与作用时间和剂量均呈正相关。结果见图5。

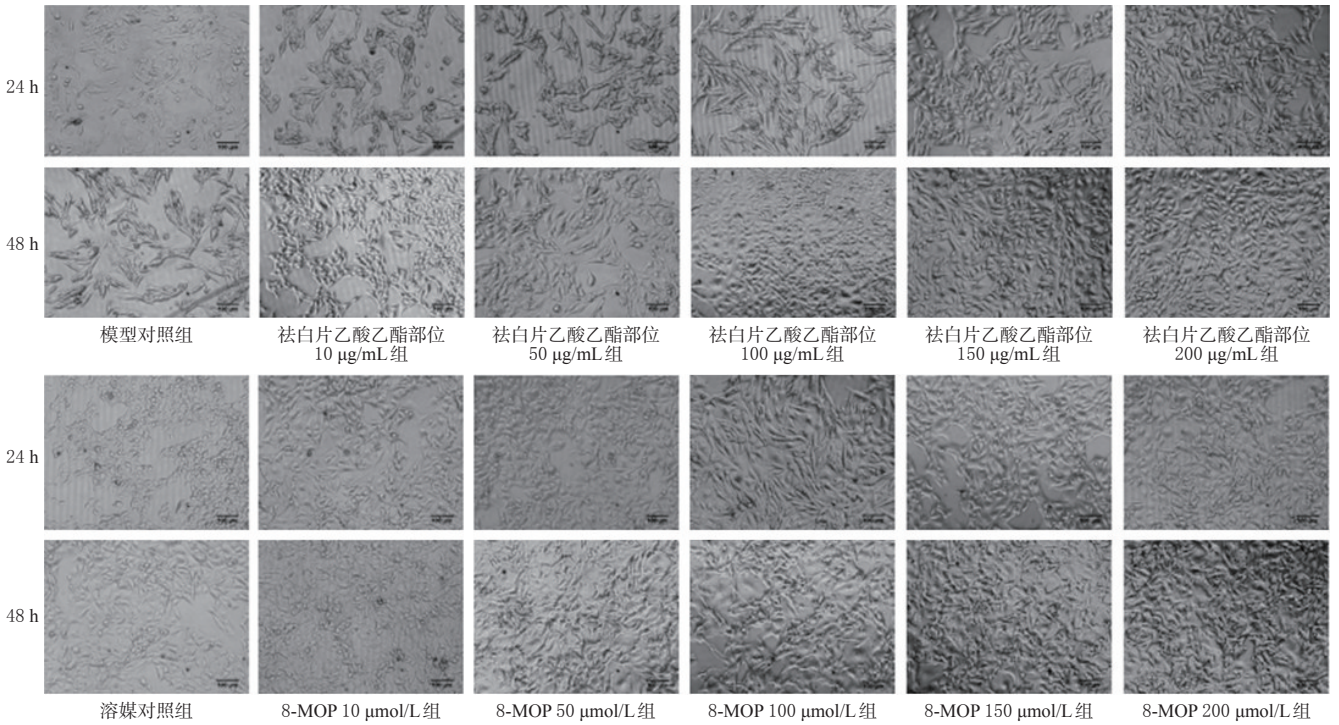
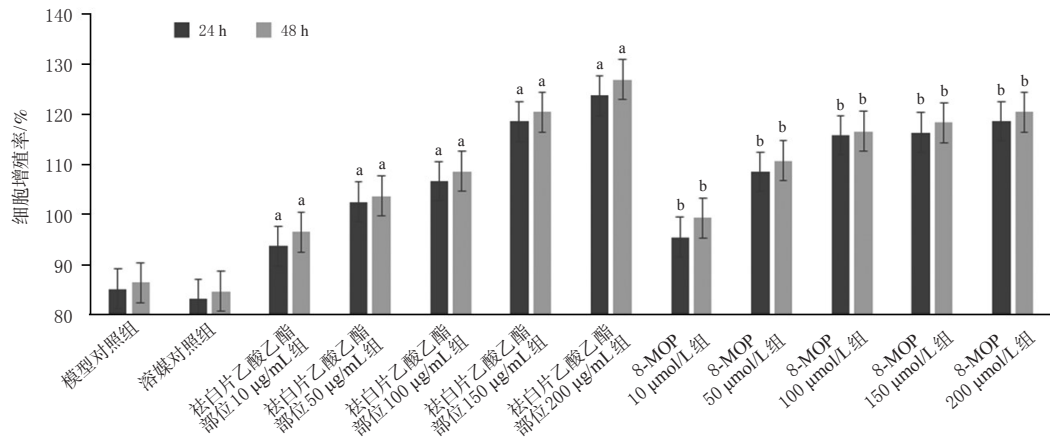
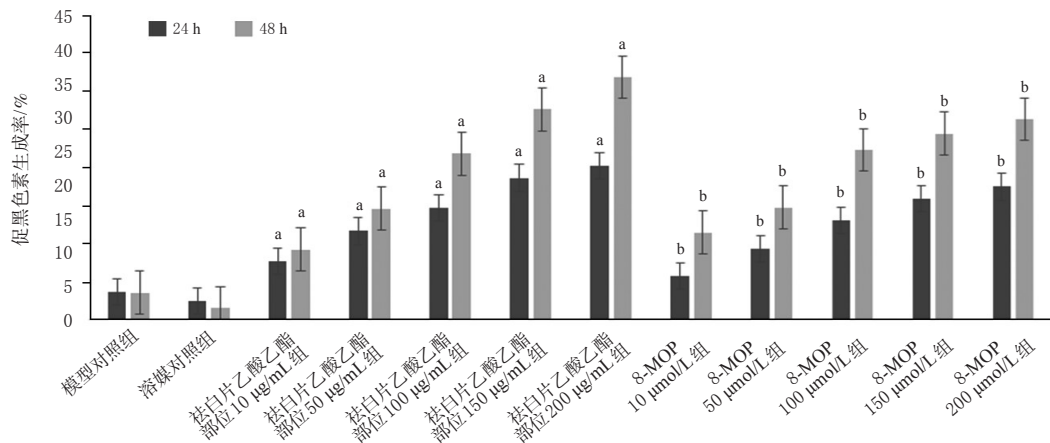


图2 药物对脱黑色素细胞生长状态影响的显微图(×100)



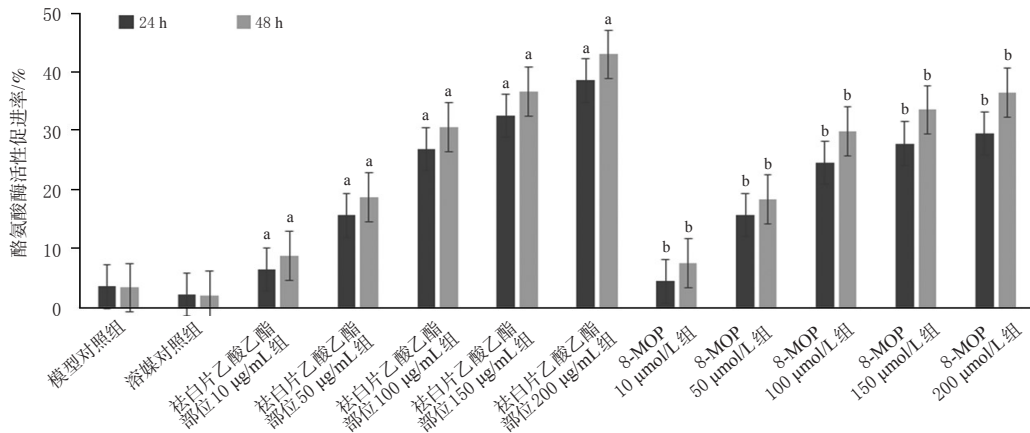
a: 与模型对照组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与溶剂对照组比较,  $P < 0.01$

图3 药物对脱黑色素细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )



a: 与模型对照组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与溶剂对照组比较,  $P < 0.01$

图4 药物对脱黑色素细胞中黑色素形成的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )



a: 与模型对照组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与溶媒对照组比较,  $P < 0.01$

图5 药物对脱黑色素细胞中酪氨酸酶活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

## 4 讨论

### 4.1 祛白片乙酸乙酯部位化学成分分析

祛白片传统工艺为水煎提取, 临床效果较好, 有效成分多为亲水性物质<sup>[4]</sup>。中药有效部位的研究原则为: 如果在水提取液中的有效成分为亲水性物质, 在亲脂性溶剂中难溶解, 就需要用弱亲脂性的溶剂(如乙酸乙酯、丁醇等)对有效成分进行富集<sup>[4]</sup>。本文提取获得祛白片乙酸乙酯部位, 并采用UPLC-MS进行成分分析, 初步确定了祛白片乙酸乙酯部位所含的64种化合物结构(正离子模式下37种, 负离子模式下41种), 得各化合物的相对百分含量。正离子模式下相对百分含量排名前3位的化合物分别为: 补骨脂色烯查尔酮(21.06%)、7-*O*-(3,3-二甲基烯丙基)-东莨菪素(16.31%)和比克白芷素(16.21%); 负离子模式下相对百分含量排名前3位的化合物分别为: 补骨脂色烯查尔酮(13.80%)、橙黄决明素(11.13%)和鞣酸(9.62%)。有14种化合物在正、负离子模式下均有检出, 分别为: 补骨脂色烯查尔酮、7-*O*-(3,3-二甲基烯丙基)-东莨菪素、黄决明素、蛇床子素、8-牻牛儿醇基补骨脂素、大黄酚、反-*N*-(4-羟基苯乙基)阿魏酸酰胺、补骨脂异黄酮、补骨脂甲素、橙黄决明素、D-芝麻素、异欧前胡内酯、柳杉醇、鞣酸。在以上14种化合物中, 补骨脂类化合物占比最大, 其中补骨脂色烯查尔酮在正、负离子模式下相对百分含量均最高。研究显示, 补骨脂类化合物长期用于治疗白癜风<sup>[21-22]</sup>, 故笔者推测祛白片乙酸乙酯部位抗白癜风作用可能是多种补骨脂类化合物共同作用的结果, 但这一观点有待下一步研究明确。

### 4.2 祛白片乙酸乙酯部位对脱黑色素细胞模型的药效学分析

本研究通过倒置生物显微镜观察发现, 与模型对照组、溶媒对照组分别比较, 祛白片乙酸乙酯部位给药组、

8-MOP给药组均可使细胞数量逐渐增加, 且作用时间越长, 细胞增多越明显。CCK-8比色法和裂解法检测结果显示, 与模型对照组、溶媒对照组分别比较, 祛白片乙酸乙酯部位给药组、8-MOP给药组给药培养24、48 h, 均可显著提高脱黑色素细胞的细胞增殖率和促黑色素生成率, 初步证实祛白片乙酸乙酯部位的抗白癜风作用。进一步研究祛白片乙酸乙酯部位对黑色素形成过程中限速酶酪氨酸酶活性影响的结果显示, 与模型对照组、溶媒对照组分别比较, 祛白片乙酸乙酯部位、8-MOP给药培养24、48 h, 均可显著提高脱黑色素细胞中酪氨酸酶活性, 初步推测祛白片乙酸乙酯部位的抗白癜风作用是通过提高酪氨酸酶活性实现的, 这一推测也为下一步药理机制研究奠定了基础。

### 4.3 祛白片乙酸乙酯部位与祛白片全方对脱黑色素细胞模型影响的对比分析

有学者曾研究祛白片全方对小鼠B16脱黑色素细胞模型的影响, 结果表明, 祛白片50 µg/mL作用24 h或25 µg/mL作用48 h, 均可提高脱黑色素细胞中的酪氨酸酶活性, 而祛白片100 µg/mL作用24、48 h均无酶活性促进作用, 反而呈明显的酶活性抑制作用, 与本文研究结果趋势不同, 但与本研究结果并不矛盾。由于祛白片全方经乙酸乙酯萃取后, 乙酸乙酯中富集了溶解性较好的成分, 不溶或微溶于乙酸乙酯的成分含量极低, 因此, 无论是化合物种类还是化合物相对百分含量均与祛白片全方存在较大差异。本研究以乙酸乙酯部位为研究对象, 探究祛白片的有效部位, 并通过研究乙酸乙酯部位成分及活性进而发现活性化合物, 这也是本研究的根本目的之一。此外, 以上研究结果引发笔者思考优化祛白片原有制备工艺, 即将祛白片水煎液用乙酸乙酯萃取后制备成制剂, 既保留原有药效, 又减小服用剂量和不良反应(除去杂质)。

综上所述,本文研究了祛白片乙酸乙酯部位化学成分及其对脱黑色素细胞模型的药效学,并初步探索了相关机制,为寻找祛白片有效部位迈出了重要的一步,也为进一步优化处方工艺、减少服药剂量提供了有力的理论基础。同时,作者团队平行进行了祛白片正丁醇部位的相关研究(另文待发表),旨在通过全面了解祛白片不同极性部位成分及活性,探寻其抗白癜风作用的物质基础,也为之后将祛白片推广上市提供技术支撑。

## 参考文献

- [1] 屠善庆.中药白癜风片治疗白癜风349例疗效观察[J].北京医学,1991,13(3):182-183.
- [2] 屠善庆.中药白癜风片与部分外用氮芥酒精治疗白癜风112例疗效观察[J].铁道医学,1983,11(4):232-233.
- [3] 顾红燕,韦元元,金锐,等.祛白片对实验性白癜风模型的疗效学及其作用机制探讨[J].中国医院药学杂志,2015,35(19):1741-1746.
- [4] 顾红燕,韦元元,卢文超,等.祛白片对小鼠B16脱黑色素细胞模型促黑色素生成的影响[J].中成药,2020,42(7):1910-1914.
- [5] 吴文博,魏晨玲,齐俊英.对中药复方不同提取部位的相关研究之思考[J].医学与哲学,2007,28(5):76-77.
- [6] 邵璟,狄留庆,刘产明,等.中药有效部位新药研发中关键问题分析[J].中国新药杂志,2010,19(2):98-101.
- [7] 张志轩,崔树婷,朱中博,等.中药有效部位提取技术与筛选方法应用研究进展[J].中国中医药信息杂志,2021,28(5):132-136.
- [8] 屠鹏飞,姜勇,郭晓宇.新形势下中药创新药物的发现与研发[J].中国中药杂志,2015,40(17):3423-3428.
- [9] 吴超.中药有效成分/有效部位治疗溃疡性结肠炎的研究进展[J/OL].临床医药文献电子杂志,2019,6(5):191[2021-09-22]. <https://www.cnki.com.cn/Article/CJFD-Total-LCWX201905167.htm>. DOI: 10.16281/j.cnki.jocml.2019.05.167.
- [10] 王长福,徐嘉智,王思宇,等.六神曲抗菌有效部位化学成分研究[J].时珍国医国药,2020,31(10):2350-2353.
- [11] MENG Y Q, DU Z Y, LI Y, et al. The synergistic mechanism of total saponins and flavonoids in Notoginseng-Safflower pair against myocardial ischemia uncovered by an integrated metabolomics strategy[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 130: 110574.
- [12] HEIDARI-BENI M, MORAVEJOLAHKAMI A R, GORGIAN P, et al. Herbal formulation "turmeric extract, black pepper, and ginger" versus naproxen for chronic knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, controlled clinical trial [J]. Phytother Res, 2020, 34(8): 2067-2073.
- [13] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:1014.
- [14] 高靖.中药有效部位提取物制备研究[J].亚太传统医药,2010,6(2):113-114.
- [15] 秦思,温炬,马静,等.8-甲氧基补骨脂素柔性纳米脂质体凝胶对白癜风豚鼠模型的治疗作用[J].新中医,2013,45(7):180-182.
- [16] 韩瑞玲,罗顺德,何文,等.8-甲氧补骨脂素脂质体凝胶对实验性白癜风的药效学[J].中国医院药学杂志,2004,24(5):15-16.
- [17] 沃特世公司.沃特世推出新一代LC-MS生物信息学产品Progenesis Q1组学分析软件[EB/OL].(2014-05-09)[2021-09-22]. [https://www.instrument.com.cn/netshow/sh100287/news\\_130736.htm](https://www.instrument.com.cn/netshow/sh100287/news_130736.htm).
- [18] GUAN C P, XU W, HONG W S, et al. Quercetin attenuates the effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on endoplasmic Reticulum morphology and tyrosinase export from the endoplasmic Reticulum in melanocytes[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(6): 4285-4290.
- [19] 李敏,周明伟,刘翔宇,等.复方倍他米松注射液对小鼠B16黑素瘤细胞增殖及黑素生成的影响[J].中国实验诊断学,2018,22(7):1253-1254.
- [20] ULLAH S, KANG D W, LEE S, et al. Synthesis of cinnamic amide derivatives and their anti-melanogenic effect in  $\alpha$ -MSH-stimulated B16F10 melanoma cells[J]. Eur J Med Chem, 2019, 161: 78-92.
- [21] 韩宝龙.中药祛白消斑汤加减配合光疗治疗白癜风临床观察[J/OL].临床医药文献电子杂志,2018,5(31):165[2021-09-22]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&dbname=CJFDLAST2018&filename=LC-WX201831137&uniplatform=NZKPT&v=ZAjCfMFs6d-VFO80Jv60dAkYrPXjAuSeKluPxl2EEuwqfFLyGKm6-khMkiXYYNw->. DOI: 10.16281/j.cnki.jocml.2018.31.137.2021-9-5
- [22] 韩春雷,陈海燕,吴洁贞,等.复方槐花补骨脂酊联合NB-UVB治疗稳定期散发型白癜风疗效观察[J].皮肤病诊疗学杂志,2019,26(5):276-279.

(收稿日期:2021-09-22 修回日期:2022-01-12)

(编辑:舒安琴)