

基于糖特征图谱及免疫细胞活性研究的不同产地黄芪的质量评价

曹宇欣¹, 李科^{1,3*}, 秦雪梅^{1*}, 焦思明³, 杜昱光³, 李树颖^{1,2}, 李先荣⁴

(山西大学 1. 中医药现代研究中心, 2. 化学化工学院, 山西太原 030006; 3. 中国科学院过程工程研究所, 北京 100190; 4. 山西健硕食品药品研究院有限公司, 山西太原 030000)

摘要: 通过建立黄芪多糖和单糖糖谱, 结合技术成熟的细胞免疫活性实验, 建立以多糖为质控指标的黄芪品质评价方法。本研究采用高效液相色谱仪 (HPLC) 建立黄芪总多糖和单糖特征图谱, 利用 SIMCA 软件和 SPSS 软件对数据分别进行多元统计分析和聚类分析以区分不同产地及不同种植方式的蒙古黄芪, 并通过小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红实验进行活性评价。结果表明山西浑源仿野生黄芪多糖含量和增强巨噬细胞吞噬活性的能力较高于移栽芪。山西浑源、山西五寨和甘肃陇西的黄芪多糖具有相似的分子量分布, 但每个部分的峰面积占总峰面积的百分比具有明显差异, 山西黄芪多糖中分子量为 10 kDa 左右的部分高于甘肃黄芪, PCA 显示可以将山西黄芪和甘肃黄芪区分开。三者都是由鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖和半乳糖醛酸 5 种单糖组成的。但 3 个产地的黄芪多糖 (APS) 具有不同的单糖物质的量比。PCA 显示可以将 3 种不同的蒙古黄芪区分开。本研究采用了将糖谱技术与 APS 对细胞免疫功能的影响相结合的方法为不同产地及不同种植方式黄芪的品质评价及质量控制提供了依据。

关键词: 黄芪多糖; 特征图谱; 细胞免疫活性; 仿野生; 移栽; 品质评价

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)07-1277-11

Quality evaluation of different areas of Astragali Radix based on carbohydrate specific chromatograms and immune cell activities

CAO Yu-xin¹, LI Ke^{1,3*}, QIN Xue-mei^{1*}, JIAO Si-ming³, DU Yu-guang³, LI Shu-ying^{1,2}, LI Xian-rong⁴

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 3. Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; 4. Shanxi Jianshuo Food and Drug Research Institute Co. Ltd., Taiyuan 030000, China)

Abstract: To establish a quality evaluation method for Astragali Radix using polysaccharide as quality control index, we established the *Astragalus* polysaccharide and monosaccharide sugar spectra, and combined with immunological activity test. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to establish the specific chromatograms of *Astragalus* polysaccharides and monosaccharides. The data were analyzed by multivariate statistical analysis and cluster analysis using SIMCA software and SPSS software to distinguish *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* from different habitats or planting methods. The activity was evaluated by testing mouse peritoneal macrophage phagocytosis using neutral red. The results showed that the content of polysaccharides and the ability of enhancing phagocytic activity of macrophages from imitation wild Astragali Radix in Shanxi Hunyuan was higher than cultured Astragali Radix. The polysaccharides of Astragali Radix from Shanxi Hunyuan, Shanxi Wuzhai and Gansu Longxi have similar molecular weight distribution, but the peak area of each

收稿日期: 2019-02-26; 修回日期: 2019-04-23.

基金项目: 山西省优秀人才培养计划项目 (201605D211030, 201705D211020); 山西省重点研发计划重点项目 (201603D311101); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-JIN-34); 山西省科技攻关项目 (20150313004-5); 国家自然科学基金资助项目 (81872962).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-351-7018379, E-mail: qinxm@sxu.edu.cn;

Tel / Fax: 86-351-7019297, E-mail: like@sxu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0140

part has a significant difference in the percentage of the total peak area. The part of the polysaccharide of Shanxi *Astragalus membranaceus* with a molecular weight of about 10 kDa is higher than that of Gansu. Principal component analysis (PCA) shows that Astragali Radix from Shanxi and Gansu can be separated. All three are composed of five monosaccharides such as rhamnose, glucose, galactose, arabinose and galacturonic acid. However, the *Astragalus* polysaccharides (APS) in the three regions have different ratios of monosaccharide substances. The PCA display can distinguish three different *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*. This study used a combination of fingerprint of carbohydrates and the effects of APS on cellular immune function to provide a basis for quality evaluation and quality control of different habitats or planting methods.

Key words: *Astragalus* polysaccharide; specific chromatogram; cellular immune activity; imitation wild; cultured; quality evaluation

黄芪是我国古老的补益中药材,为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根^[1],始载于《神农本草经》,市场用量大,素有“十方八芪”之说,具有补气升阳、固表止汗、利水消肿、敛疮生肌等功效。

目前蒙古黄芪产量较大,为市场上的主流商品。依据其种植方式的不同,分为了仿野生芪和移栽芪,其中主产于山西恒山山脉的6~8年生仿野生黄芪为业界公认的道地药材,具有“主根粗长、少分支、绵性大、粉性强、甜味足、豆腥味浓”等特点,占据高端市场,价高且供不应求,主要用于出口及食用。由于黄芪用量不断增加,移栽芪以其生长年限短(2~3年)、成本低(平地移栽,机械化采挖)、产量大等特点,迅速占领市场。其外观与仿野生黄芪有较大差别,呈现“主根短,分枝多,质坚硬,鸡爪形,微甜而淡”等特征。2015版《中国药典》将黄芪甲苷与毛蕊异黄酮葡萄糖苷作为评价黄芪的质控指标,然而研究表明虽然仿野生芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量明显高于移栽芪,但移栽芪中黄芪甲苷含量并不低,甚至超过仿野生芪的特等、一等^[2-4]。本课题组前期通过抗疲劳及抗心衰药效实验证明了仿野生芪要优于移栽芪^[5,6]。因此建立更加合理的质控指标,对于探明道地药材黄芪的物质基础,保障市场的优质优价,促进优质中药材资源的发展均具有重要的意义。

黄芪多糖是黄芪药材中含量最多、免疫活性最强的一类物质^[7],应该作为质控指标用于黄芪的品质评价。然而,由于其分离制备困难、糖链序列及分支结构等尚无法准确测定,限制了其应用。近年来,随着色谱填料技术的发展,多糖分子量分布特征可以通过糖谱形式直接表征。该方法避免了直接测定多糖结构的技术瓶颈,可以从整体上表征中药材多糖的结构特点^[8]。因此,该方法不仅可鉴别出不同种属、不同基原、不同生长方式及环境下药材的差异,而且为阐明道地药材

的物质基础特征奠定了基础。此外,结合公认的、成熟的生物活性评价方法,即可建立以黄芪总多糖为指标的黄芪药材品质评价方法。目前,抗凝类药物低分子肝素(LMWH)已采用分子量特征图谱与效价评价法相结合的方法,来规范和完善现行的LMWH质量标准^[9]。

因此,在本研究中采用高效凝胶过滤色谱法建立不同黄芪药材的多糖特征图谱,并通过总多糖的酸降解方法,结合柱前衍生化,采用HPLC-UV建立不同黄芪药材的单糖特征图谱,通过对36批黄芪总多糖及单糖图谱的分析,结合多元统计分析和聚类分析等类似评估来处理数据,找出不同产地及种植方式的蒙古黄芪中黄芪多糖(APS)的相似性和差异性,并通过技术成熟的、方法公认的小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红实验比较了3种蒙古黄芪中APS的免疫调节活性。本方法不仅具有样品消耗较低,预处理步骤较少和重现性良好的优点,为不同来源黄芪品质的评价和其他植物多糖的质量控制提供了新的策略,而且为探明道地药材的物质基础提供了技术支撑。

材料与amp;方法

材料 本实验所需植物材料包括蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的仿野生黄芪和移栽黄芪,其中编号1~12为来自山西浑源(Shanxi Hunyuan, SXHY)的仿野生黄芪,采收时间为2017年,生长年限为5年;编号13~24为山西五寨(Shanxi Wuzhai, SXWZ)的移栽黄芪,采收时间为2017年,生长年限为2年;编号25~36为甘肃陇西(Gansu Longxi, GSLX)的移栽黄芪,采收时间为2017年,生长年限为2年,药材均由山西大学秦雪梅教授鉴定。

仪器 华谱S6000高效液相色谱仪; Chromachem 蒸发光散射检测器; ACstation 色谱工作站; 华谱S6000 紫外检测器; Mettler Toledo 万分之一分析天平; IKA

RH digital 磁力搅拌器; EYELA N-1100 旋转蒸发仪; 湘仪 TL5R 离心机; FD-1D-80 真空冷冻干燥机 (北京博医康实验仪器有限公司); Infinite M200 酶标仪; 细胞培养箱 (力康生物医疗科技控股有限公司)。

试剂 系列分子量右旋糖酐对照品 (M_w : 180、2 700、5 250、9 750、13 050、36 800、64 650、135 350、300 600、2 000 000 Da) 均购自中国食品药品检定研究院; 葡萄糖 (Glu)、半乳糖醛酸 (GalA)、半乳糖 (Gal)、甘露糖 (Man)、*N*-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc)、岩藻糖 (Fuc)、鼠李糖 (Rha) 和阿拉伯糖 (Ara) 均购自 Meilun Biotechnology Co., Ltd. (中国大连); 木瓜蛋白酶购自 Solarbio (美国); 三氯乙酸、三氟乙酸 (TFA) 购自阿拉丁 (中国上海); 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 购自 Sigma (美国); HPLC 级乙腈购自 Merck (德国); 所有其他试剂均为分析级; RAW264.7 (小鼠单核巨噬细胞白血病细胞) 来源于美国模式培养物研究所; RPMI-1640 培养基购自美国 Cellgro; 中性红试剂购自 Solarbio (美国)。

黄芪多糖的制备 将每批干燥的仿野生、移栽蒙古黄芪粉碎成粉末, 过 100 目筛, 取黄芪细粉约 15 g, 置于 500 mL 烧杯中, 按照料液比 1:20 比例加入去离子水 300 mL, 置于 IKA RH digital 磁力搅拌器上搅拌, 热提温度为 90 °C, 提取时间为 4 h。经水提后样品置于离心机中离心 (4 000 r·min⁻¹, 30 min), 抽滤后浓缩至 150 mL, 用酶解方法 (加入木瓜蛋白酶 200 U, 45 °C 下恒温水浴反应 6 h), 结合三氯乙酸法 (加 10% 三氯乙酸至总体积 200 mL, 反应体系置于冰浴中搅拌 15 min 后静置 30 min, 4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 弃沉淀) 用于去除蛋白质。离心上清中缓缓加入无水乙醇至最终醇浓度为 90%, 静置过夜。收集沉淀, 冷冻干燥得多糖粗粉, 备用。通过冻干 APS 与干燥黄芪粉末重量的比率计算得率。

黄芪多糖总糖含量的测定 采用苯酚-硫酸法测定总糖含量, 使用不同浓度的葡萄糖来构建标准曲线。

标准液制备 精密称取无水葡萄糖对照品 10 mg 于 100 mL 量瓶中稀释至刻度, 即得 100 μg·mL⁻¹ 的葡萄糖对照品溶液。

标准曲线绘制 精密量取上述葡萄糖标准液 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1 mL, 分别置于具塞试管中加水至 1 mL, 加 5% 苯酚溶液 1 mL, 涡旋, 加入浓硫酸 5 mL, 涡旋, 沸水浴 15 min, 取出冰浴至室温, 采用分光光度法, 于波长 490 nm 处测定吸光度 (*A*) 值。以 *A* 值为纵坐标, 葡萄糖浓度 (*C*) 为横坐标, 得葡萄糖的线性回归方程 $A = 7.6031C + 0.0337$ ($r = 0.9963$), 结果表明, 葡萄糖溶液在 0.01~0.1 mg·mL⁻¹ 浓度内呈良好的线性关系。

样品多糖的含量测定 称取黄芪多糖粗制品 1 mg 溶解于 10 mL 的蒸馏水中, 摇匀得 100 μg·mL⁻¹ 的供试品溶液。精密吸取供试品 1.0 mL, 按标准曲线制备各项下自“加 5% 苯酚水溶液 1.0 mL 起”依法操作, 测定 *A* 值并由回归方程计算样品溶液中糖含量。

黄芪多糖分子量的测定

色谱条件 色谱柱为 TSK-GMPWXL (10 μm, 7.8 mm×300 mm) 凝胶柱 (日本 Tosoh 公司); 漂移管温度 90 °C, 雾化器 (N₂) 压力 26 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa); 流动相为水; 流速为 0.5 mL·min⁻¹; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。

标准曲线绘制 取 10 个已知相对分子质量的右旋糖酐对照品, 分别加流动相稀释制成约含 5 mg·mL⁻¹ 的单标溶液作为对照品溶液, 分别进样。以保留时间 (t_R) 为横轴, 以 $\lg M_w$ 为纵轴, 作图, 得到右旋糖酐对照品线性回归方程 $\lg M_w = -0.5336t_R + 14.898$ ($r = 0.9901$)。

供试品溶液的配制 取 APS 粉末, 加水配制成 5 mg·mL⁻¹ 的供试品溶液, 即得。

单糖组成的测定

色谱条件 色谱柱为华谱 Unitary C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 A 相-磷酸二氢钾缓冲液 (pH 6.7, 50 mmol·L⁻¹), B 相-乙腈; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 35 °C; 检测波长 250 nm; 进样量 20 μL。

多糖的水解 称取 5 mg 待测样品置于水解管中, 加入 2 mol·L⁻¹ 三氟乙酸 3 mL 溶解, 密封, 置于 120 °C 烘箱中加热水解 2 h。取出放置冷至室温后, 转移至 25 mL 圆底烧瓶中。45 °C 减压条件下反复加入少量甲醇, 去除残余的三氟乙酸。

单糖对照品的衍生化 分别精密称取甘露糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、岩藻糖、*N*-乙酰葡萄糖胺和鼠李糖对照品 0.09、0.106、0.099、0.09、0.075、0.082、0.111 和 0.091 g, 将各单糖对照品称至同一个 10 mL 离心管中, 加 5 mL 超纯水, 溶解并混匀, 至终浓度为 100 mmol·L⁻¹, 即得混合对照品溶液。取 1 mL 浓度为 100 mmol·L⁻¹ 的混合对照品, 加入 9 mL 超纯水, 将混合对照品稀释成 10 mmol·L⁻¹。置于 20 mL 量瓶中加水溶解, 并加至刻度, 即得混合对照品溶液。取混合对照品 0.2 mL 至 2 mL EP 管中, 与 0.5 mol·L⁻¹ PMP 溶液 0.24 mL 及 0.3 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 0.2 mL 溶液混合, 充分振摇, 放至恒温金属浴中, 70 °C、300 r·min⁻¹ 反应 70 min。冷却至室温, 加入 0.3 mol·L⁻¹ HCl 溶液 0.2 mL 进行中和, 加入氯仿 1 mL 萃取, 离心, 弃去有机层, 重复萃取 3 次, 得上层水液, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 备用。

多糖样品的衍生化 精密吸取多糖水解液 0.2 mL, 按“单糖对照品的衍生化”项下方法处理后, 即得。

黄芪多糖对RAW264.7细胞免疫功能的影响

细胞培养 RAW264.7细胞在37 °C、5% CO₂饱和湿度下,于含10%胎牛血清、100 g·L⁻¹青霉素及100 g·L⁻¹链霉素的RPMI1640培养液中进行培养,待细胞生长至对数期时进行实验。

药物配制 精密配制浓度为100、90、75、60、50、40和25 μg·mL⁻¹的APS溶液,用直径为0.22 μm的微孔滤膜过滤除菌备用。

APS对RAW264.7细胞吞噬活性的影响 将1×10⁵个·mL⁻¹ RAW264.7细胞悬液接种于96孔板中,200 μL/孔,设8个平行孔。培养板置5% CO₂、37 °C孵箱中24 h使细胞完全贴壁。吸去培养液,用PBS洗去未贴壁细胞,加入不同浓度多糖200 μL/孔,阳性对照组加入0.4 μg·mL⁻¹ LPS溶液,对照组只加培养液,继续培养24 h,作用结束后,吸出培养液。每孔加200 μL中性红生理盐水(0.075%),培养1 h后弃去中性红,PBS洗3次,再加细胞裂解液每孔200 μL,室温静置过夜。在酶标仪540 nm处测定A值。

数据处理 黄芪多糖和单糖糖谱数据用Sigmaplot 14.0处理。在HPGFC-ELSD(凝胶过滤色谱-蒸发光散射)多糖特征图谱中,两个谱图之间的相似性被表示为cos θ式(1)和R式(2)。

$$\cos \theta = \frac{A \cdot B}{|A| \cdot |B|} = \frac{\sum_{i=1}^n A_i B_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n A_i^2} \times \sqrt{\sum_{i=1}^n B_i^2}} \quad [\theta \in (0, \pi/2)] \quad (1)$$

$$R = \frac{\sum_{i=1}^n (A_i - \bar{A})(B_i - \bar{B})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (A_i - \bar{A})^2} \times \sqrt{\sum_{i=1}^n (B_i - \bar{B})^2}} \quad (2)$$

其中,1 ≤ i ≤ n,n为两个不同样品特征图谱中的共有峰的色谱峰数,A_i,B_i分别代表两个不同样品中i成分的峰面积或峰高值,Ā和B̄分别表示它们的平均值。

使用SIMCA-P 14.0软件对糖特征图谱进行多元统计分析。用PLS对模型进行建立和预测时,在SXHY、SXWZ和GSLX的各12批黄芪多糖中,选取每种黄芪多糖样本的1/3为验证集,即SXHY APS 4批(9~12号),SXWZ APS 4批(21~24号)、GSLX APS 4批(33~36号),剩下的则为训练集。先将APS 24批训练集导入SIMCA-P14.0软件中进行PLS分析。

运用SPSS 16.0软件对单糖的种类及量进行聚类分析;采用Graphpad Prism 6对细胞活性测定数据进行t检验分析组间差异,检验水准α=0.05,P<0.05表示具有统计学意义。

结果与讨论

1 黄芪多糖得率和总糖含量的测定

不同产地及不同种植方式黄芪中多糖得率和含量测定结果见表1。结果显示不同产地及不同种植方式黄芪中多糖含量略有差异,SXHY的平均多糖含量为71.28%,平均得率为9.8%,SXWZ的平均多糖含量为69.34%,平均得率为9.6%,GSLX的平均多糖含量为69.32%,平均得率为9.8%,SXHY的仿野生黄芪多糖含量相对较高,这可能是由于不同地区阳光、雨水和土壤质量对植物生长的影响。

2 黄芪多糖分子量的测定

2.1 HPGFC-ELSD多糖特征图谱分析 采用高效凝胶过滤色谱法(HPGFC)对提取得到的36批黄芪多糖进行分子量分布分析,其结果如图1及表2所示,图1的色谱峰上的数据为各切割部分的最高点的相对分子量(M_p)。不同产地、不同批次的黄芪多糖样品的HPGFC图谱均按图1的峰起伏切割成4个部分(或称级分),每个部分的峰面积占总峰面积的百分比数据列于表2中。比较表2可知,各个样品的分子量分布有比较显著的差异。

一般来说,不同的提取方法可能导致不同的分子

Table 1 Yield and content of Astragalus polysaccharides (APS)

Shanxi Hunyuan (SXHY)			Shanxi Wuzhai (SXWZ)			Gansu Longxi (GSLX)		
	Yield/%	Content/%		Yield/%	Content/%		Yield/%	Content/%
1	9.2	70.2	13	8.93	72.8	25	9.7	70.6
2	9.4	68.6	14	9.42	69.4	26	10.3	66.8
3	9.5	73.7	15	9.1	71	27	9.5	70.5
4	10.2	72.2	16	9.2	67.7	28	10.4	69.5
5	9.2	74.3	17	9.9	68.5	29	10.9	70.1
6	9.7	69.9	18	10.1	69.4	30	9.4	67.7
7	10.9	69.8	19	10.6	70.3	31	9.2	68.9
8	10.8	71.7	20	9.2	66.7	32	10.1	70.4
9	9.6	70.4	21	10.2	68.1	33	9.6	67.3
10	9	70.5	22	9.6	70.3	34	9.3	70.5
11	10.5	72.2	23	9.5	68.9	35	9.7	69.8
12	9.9	71.8	24	9.5	69	36	9.9	69.7

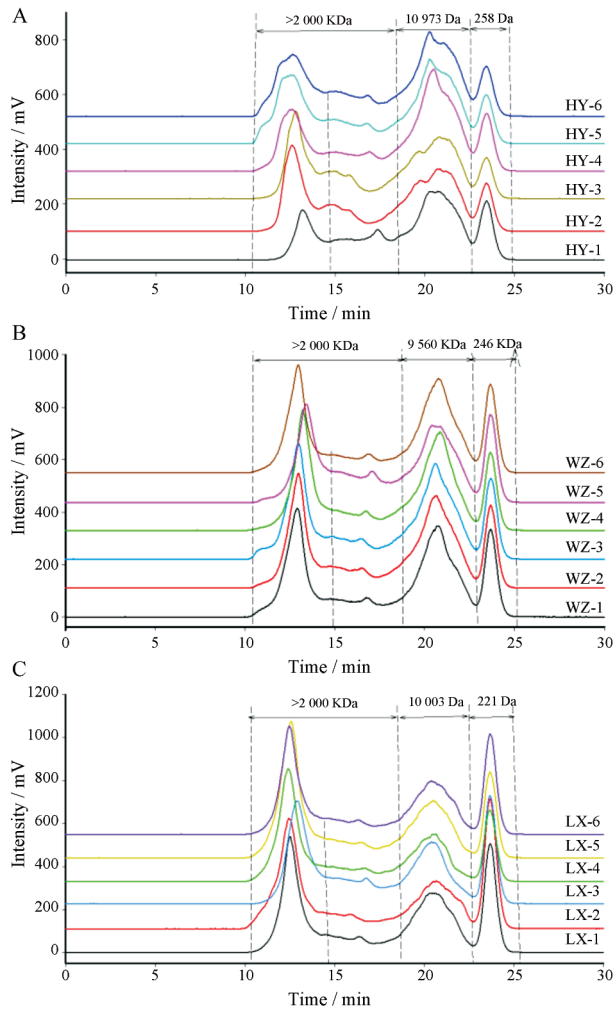


Figure 1 Chromatogram of crude polysaccharides from SXHY (A), SXWZ(B), GSLX(C) by HPGFC

量分布。从图2中可以看出,在相同的提取条件下,来自SXHY、SXWZ和GSLX的黄芪多糖都具有相似的分子量分布,均可分为4个部分,其中第1、2部分分子量大于2 MDa(超出线性范围),第3部分分子量约为10 kDa,第4部分分子量约为300 Da。但每个部分的峰面积占总峰面积的百分比具有明显差异。

从图2中可以看出, SXHY 仿野生黄芪和 SXWZ 移栽黄芪总多糖中10 kDa左右的分子量约占总体的50%,

Table 2 Relative molecular mass distribution of polysaccharides from different *Astragalus Radix*. Fraction 1-2: > 2 MDa; fraction 3: ≈10 kDa; fraction 4: < 300 Da (No. 1-12: SXHY APS; 13-24: SXWZ APS; 25-36: GSLX APS)

No.	Fraction/%		
	Fraction 1-2	Fraction 3	Fraction 4
1	41.9	47.9	9.7
2	38	50.6	11.4
3	42.1	48.2	9.7
4	41.6	47.8	10.6
5	38.6	49.2	12.2
6	41.4	47.2	11.4
7	41.3	47.6	11.1
8	41.5	48.3	10.2
9	41.9	48.8	9.3
10	41.2	45.9	12.9
11	41.8	49.1	9.1
12	41.3	48.7	10
13	40.2	45.1	14.5
14	40.2	46.3	13.5
15	40.1	47.1	12.7
16	41.3	45.5	13.2
17	39.7	47.1	13.2
18	38.5	47.3	14.1
19	39.7	46.6	13.7
20	39.5	47.2	13.3
21	39.6	46.8	13.6
22	40.1	46.5	13.4
23	39.8	47.3	12.9
24	41.2	45.6	13.2
25	45.1	35	19.9
26	45.4	34.6	20
27	48.3	33.3	18.4
28	46.9	33.5	19.5
29	47.2	31.3	21.5
30	46.5	32.7	20.8
31	46	33.7	20.3
32	45.9	34.3	19.8
33	46.1	34.4	19.5
34	46.6	33.2	20.2
35	46.8	33.6	19.6
36	47.2	34.1	18.7

大于2 MDa的分子量约占总体的40%,小于300 Da的分子量约占总体的10%,而GSLX的仿野生黄芪总多糖中10 kDa左右的分子量约占总体的30%,大于2 MDa的分子量约占总体的50%,小于300 Da的分子量约占总体的20%。目前已上市的注射用黄芪多糖是20世

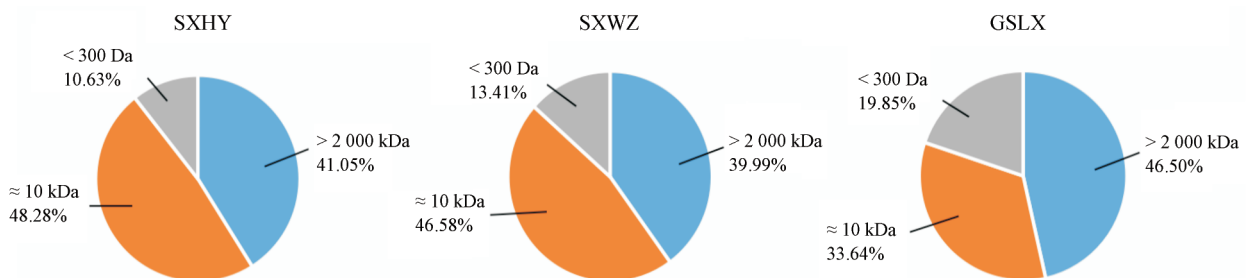


Figure 2 The molecular weight peak area of each part of different *Astragalus* polysaccharides accounts for the percentage of total peak area

纪90年代初山西省中医药研究院根据山西省黄芪资源现状研发的中药静脉用粉针剂。该药能明显促进造血细胞再生和调节免疫功能,是当时国内首个全面改善放疗病人血象、提高肿瘤患者生存质量的中成药。图3为注射用黄芪多糖(生产批号:180801)的HPLC-ELSD图,根据不同浓度葡萄糖绘制的标准曲线,可计算出注射用黄芪多糖的分子量主要集中在10 kDa左右,说明10 kDa左右的分子量是其发挥药效的主要部分,而在山西黄芪总多糖中10 kDa左右的分子量所占百分比远远高于甘肃黄芪。从总多糖分子量分布上,可以明显区分山西黄芪和甘肃黄芪,可作为初步区分不同地区黄芪的依据。

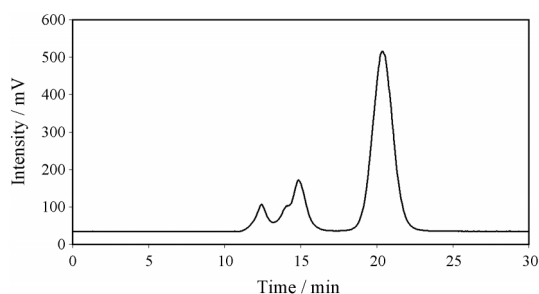


Figure 3 HPLC-ELSD diagram of *Astragalus* polysaccharide for injection

2.2 HPGFC-ELSD 多糖特征图谱相似性评估 基于从HPGFC-ELSD特征图谱中获得的样本变量可计算出 $\cos \theta$ 值和 R 值, SXHY、SXWZ和GSLX的平均 $\cos \theta$ 值和 R 值分别为0.988 7、0.964 5; 0.991 9、0.975 8和0.984 2、0.962 5。而SXHY、SXWZ之间的平均 $\cos \theta$ 值和 R 值为0.978 2和0.937 2, SXHY、GSLX的平均 $\cos \theta$ 值和 R 值分别为0.942 4和0.870 2, SXWZ和GSLX的平均 $\cos \theta$ 值和 R 值分别为0.951 5和0.880 7。结果表明,相同产地APS之间的相似性高于不同产地之间的相似性。

2.3 多元统计分析 PCA的得分散点图能直观地显示不同样品之间的整体差异,反映数据的原始状态,观察到实验样品的自然分布和组别关系,但不能忽略组内误差,消除与研究目的无关的随机误差^[10]。为了保留数据的整体特征与变化规律,确定不同栽培方式黄芪之间的化学差异成分,可以采用有监督的OPLS-DA分析对数据进行进一步分析^[11]。采用PLS可进行建模和预测,统计其判别的准确率。

在训练集所建立的模型中,以 t_1 的得分值($t[1]$)和 t_2 的得分值($t[2]$)分别作为横纵坐标进行得分散点图绘制,即图4A。从图4A中能看出,第一主成分和第二主成分能将3种不同的APS分开。将APS训练集和验证

集样品导入SIMCA-P14.0软件中进行分析,得到得分散点图,即图4B。从图4B中能看出不同种类的APS有较好的区分度,验证集9~12号、21~24号、33~36号分别与SXHY、SXWZ和GSLX的APS聚集在一起,说明所建模型可以较好的判别不同种类的APS。

图4C和4D显示了PLS模型中作为训练集与验证集的3种APS之间的真实值与估计值之间的关系。在图4C中,训练集以真实值为纵坐标、估计值为横坐标,绘制散点图,且两者之间的差异由评估均方差(RMSEE)表示。从图中能得出, RMSEE的值为0.296 609,且可以看出三者能较明显分开。为了验证PLS训练集模型,将3种APS的验证集带入训练集所创建的模型中进行验证。预测3种不同种类APS的模型能力由验证集产生的预测均方差(RMSEP)表示。从图4D中看出RMSEP值为0.323 89,且3种APS也明显地被预测出来。另外由于RMSEP值与RMSEE值相差不大,这也说明了所建模型的效果非常好。图4E为3种黄芪的HPSGFC-ELSD多糖特征图谱PCA得分散点图。由图可见,山西黄芪与甘肃黄芪可得到较好分离,而山西仿野生芪和移栽芪能分开但分离不明显。说明不同产地黄芪之间的差异要大于种植方式间差异,表明土壤、气候、环境等不同的生长条件对黄芪中多糖的分子量分布情况影响较大。进行有监督的正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)(图4F)发现三者有较明显的分离趋势,但存在组间差异。排列实验表明随机变量 y 变量产生的 R^2 、 Q^2 均小于原始值(其中, R^2 和 Q^2 值分别表示对数据的解释程度和对模型的预测能力),证明模型有效可靠(图4G)。由VIP值(图4H)可知,使山西黄芪与甘肃黄芪分开的主要分子量片段为10 kDa左右的部分。

3 黄芪多糖单糖组成的测定

3.1 HPLC-UV 单糖特征图谱分析 用PMP柱前衍生化-高效液相色谱法测定了8种标准单糖混合物色谱图(图5A)和样品黄芪单糖特征图谱(图5B~5D)。将单糖混合对照品图谱与样品黄芪单糖特征图谱进行对照,发现3种蒙古黄芪多糖的HPLC-UV单糖特征图谱具有相似的保留时间,可以确定三者都是由鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖和半乳糖醛酸5种单糖组成的。而相对峰面积不同,表示3个产地的APS具有不同的单糖物质的量比。以阿拉伯糖的物质的量为1,求鼠李糖、葡萄糖、半乳糖和半乳糖醛酸的物质的量比,所得结果如表3所示。其中含葡萄糖是最多的,其次是阿拉伯糖和半乳糖。

3.2 多元统计分析 采用PLS训练集散点图(图6A)对所有数据进行分析,观察3组样本的分离趋势,可以

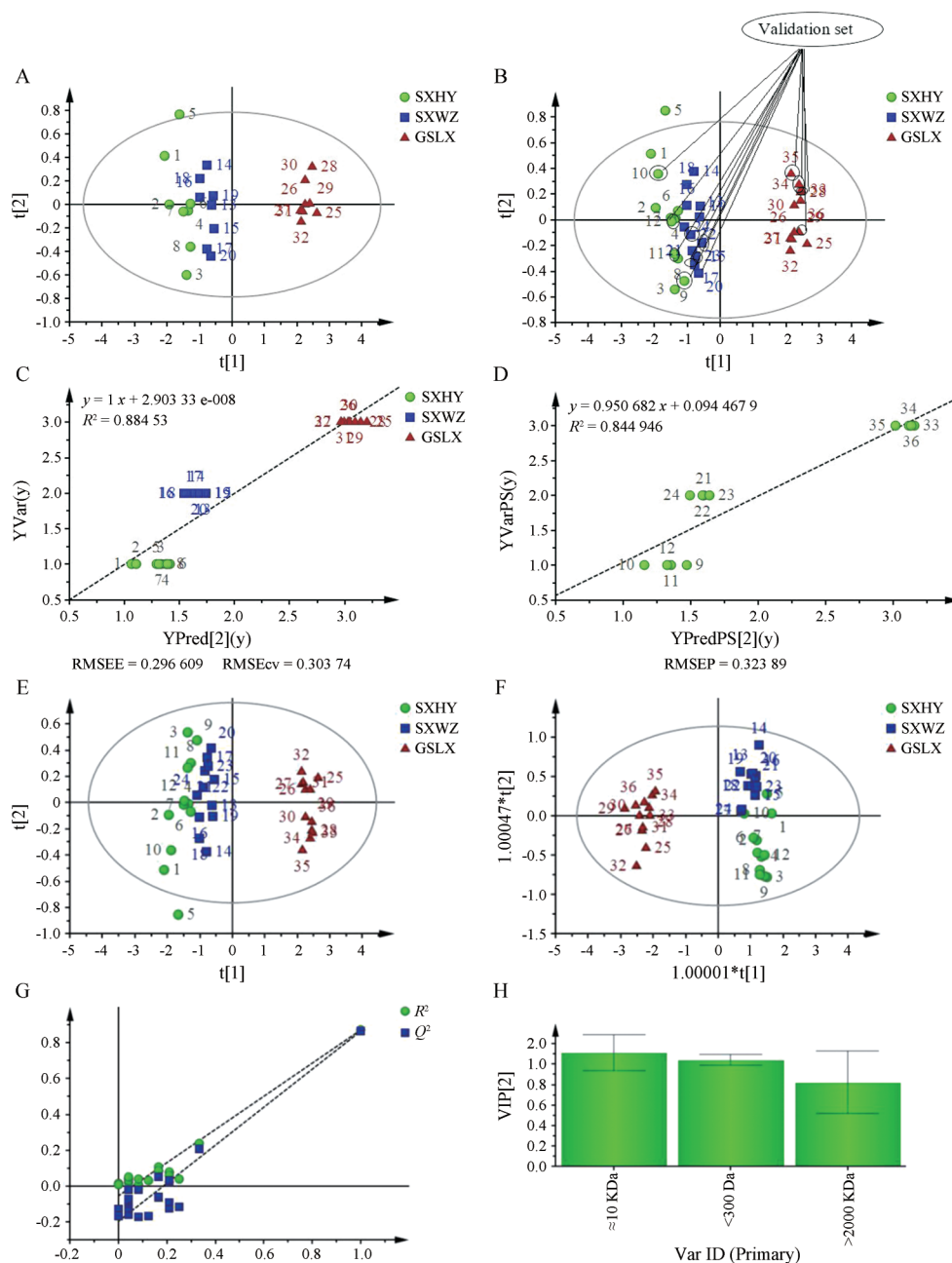


Figure 4 PLS-derived score plot of the training set (A), PLS-derived score plot of overall APS samples (B), PLS-derived relationship between true value and estimate value of training set (C) and validation set (D), PCA (E) and OPLS-DA (F) scores plots, permutations (G) and VIP-plots (H) of Astragalus Radix samples based on polysaccharide specific chromatogram

看出 SXHY、SXWZ、GSLX 明显分离; 进一步分析 APS 样品训练集和验证集散点图 (图 6B), 发现验证集与训练集能聚集在一起, 说明所建模型能很好判别 3 种不同的 APS。从图 6C 中能得出, RMSEE 的值为 0.164 703, 且可以看出 SXHY、SXWZ 和 GSLX 能明显分开。从图 6D 中可以看出 RMSEP 的值为 0.251 807, 且 3 种 APS 也明显的被预测出来。由于 RMSEP 值与 RMSEE 值相差不大, 说明了所建模型的效果非常好。

采用 PCA 散点图 (图 6E) 对所有数据进行分析,

观察 3 组样品的分离趋势, 可以看出 SXHY、SXWZ、GSLX 明显分离; 进一步采用 OPLS-DA 分析 (图 6F), 发现与主成分分析 (PCA) 图基本一致。用外部模型验证方法排列实验来证明模型成立 (图 6G)。由 VIP 值 (图 6H) 可知使山西黄芪与甘肃黄芪分开的主要成分为半乳糖醛酸、鼠李糖和葡萄糖 (VIP>1)。

结合表 3 分析, 山西黄芪鼠李糖-阿拉伯糖的比值 > 0.35:1, 葡萄糖-阿拉伯糖的比值 < 21:1, 而甘肃黄芪鼠李糖-阿拉伯糖的比值 < 0.35:1, 葡萄糖-阿拉

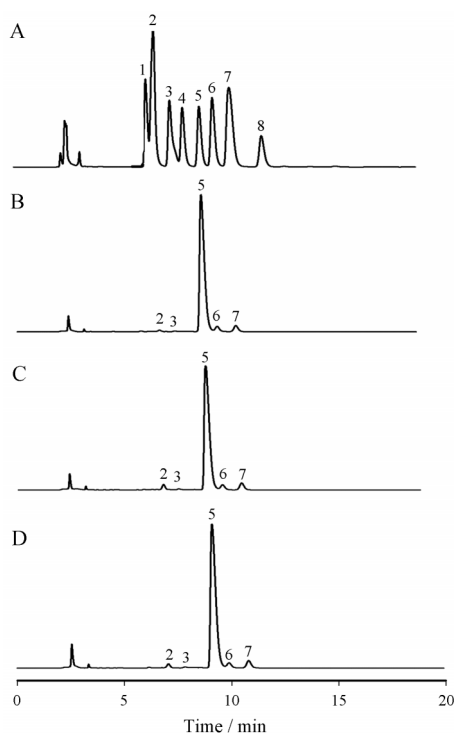


Figure 5 HPLC chromatograms of monosaccharide reference substances (A), SXHY (B), SXWZ(C), and GSLX(D). 1: Mannose; 2: Rhamnose; 3: Galacturonic acid; 4: *N*-Acetylglucosamine; 5: Glucose; 6: Galactose; 7: Arabinose; 8: Fucose

伯糖的比值 > 21:1。山西仿野生黄芪半乳糖醛酸-阿拉伯糖的比值 > 0.18:1, 鼠李糖-阿拉伯糖的比值 < 0.55:1, 山西移栽芪半乳糖醛酸-阿拉伯糖的比值 < 0.18:1, 鼠李糖-阿拉伯糖的比值 > 0.55:1, 由此推测, 测定黄芪中可溶性的鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖和阿拉伯糖, 求算其物质的量的比值, 可用于判断黄芪的产地及种植方式。

3.3 聚类分析 将黄芪中的单糖特征图谱数据标准化后导入 SPSS 16.0 进行聚类分析, 结果如图 7 所示。由图可知, 根据黄芪的单糖特征图谱可以很好地区分山西黄芪与甘肃黄芪, 与 PCA 结果一致。

结果表明, SXHY、SXWZ 和 GSLX 的 APS 基于单糖的含量仍然具有显著的差异, 图 7 直观地显示了山西黄芪和甘肃黄芪之间的差异。单糖组成的测定需要完全酸水解, 然后进行柱前衍生化, 虽然样品预处理复杂, 然而, 单糖特征图谱分析仍然是必要的, 并且是确定 APS 的单糖组成和含量比的有效方法。

4 黄芪多糖免疫活性的测定

黄芪多糖是一种免疫调节剂。巨噬细胞 (M ϕ) 是机体免疫系统的重要细胞成分, 具有吞噬、杀伤、递呈抗原、分泌生物活性物质、调控机体免疫以及抑制肿瘤等多种功能^[12-14]。检测 M ϕ 吞噬能力, 在了解机体免疫

Table 3 Determination results of monosaccharide components in APS. No.1-12: SXHY APS; 13-24: SXWZ APS; 25-36: GSLX APS

No	Ratio of mol/%				
	Rha	GalA	Glu	Gal	Ara
1	0.41	0.22	19.95	0.71	1
2	0.52	0.26	18.93	0.84	1
3	0.47	0.27	19.04	0.67	1
4	0.38	0.31	20.05	0.73	1
5	0.43	0.25	18.94	0.76	1
6	0.36	0.28	19.87	0.77	1
7	0.45	0.20	20.13	0.68	1
8	0.39	0.27	19.83	0.70	1
9	0.40	0.24	20.02	0.66	1
10	0.42	0.21	19.65	0.82	1
11	0.49	0.25	19.43	0.69	1
12	0.47	0.23	19.62	0.74	1
13	0.56	0.12	19.83	0.78	1
14	0.62	0.09	19.92	0.77	1
15	0.59	0.11	19.85	0.83	1
16	0.67	0.08	19.65	0.76	1
17	0.59	0.12	19.78	0.69	1
18	0.64	0.08	19.83	0.74	1
19	0.58	0.12	20.03	0.80	1
20	0.71	0.07	19.43	0.72	1
21	0.66	0.10	19.45	0.78	1
22	0.64	0.10	19.93	0.71	1
23	0.67	0.09	19.85	0.73	1
24	0.69	0.08	19.96	0.76	1
25	0.22	0.14	23.36	0.92	1
26	0.18	0.16	24.12	0.87	1
27	0.26	0.13	23.43	1.03	1
28	0.27	0.13	22.98	1.07	1
29	0.31	0.09	21.99	0.98	1
30	0.20	0.16	24.24	0.90	1
31	0.17	0.17	25.03	0.85	1
32	0.24	0.10	23.76	0.94	1
33	0.32	0.15	22.84	0.9	1
34	0.24	0.12	23.64	1.05	1
35	0.19	0.18	25.11	0.76	1
36	0.26	0.09	24.73	0.89	1

功能和筛选 M ϕ 吞噬功能调节成分等工作中广泛应用。本文使用 RAW264.7 来研究 APS 对吞噬活性的影响。

图 8 显示 APS 在 0.025~0.1 mg·mL⁻¹ 的剂量内均能显著增强 RAW264.7 细胞的吞噬活性, 强弱依次为 SXHY > SXWZ > GSLX。且在低浓度时随浓度增加而增强, 一定浓度时增强作用达到最强, 之后随着浓度的进一步增加增强作用逐渐降低, 量效曲线呈“钟罩型”^[15]。说明多糖调节免疫功能呈双向调节性, 并不是浓度越大功能越强, 而是存在某一最佳剂量。0.05、0.06 和 0.075 mg·mL⁻¹ 的浓度下, 3 种不同 APS 使 RAW264.7 细胞的吞噬活性分别增加 66.6%、65.9% 和 63.1%; 60.6%、61.3% 和 61.5%; 57.8%、60.8% 和 59.8%, 显著高于阳性对照组 (LPS)。LPS 是一种强大的巨噬细胞活化剂, 在 1 μ g·mL⁻¹ 的剂量下, 巨噬细胞吞噬活性增加至 99.31%^[16]。这种增强的吞噬作用可以加速抗原向其他免疫细胞的递送并引发免疫反应。相比之

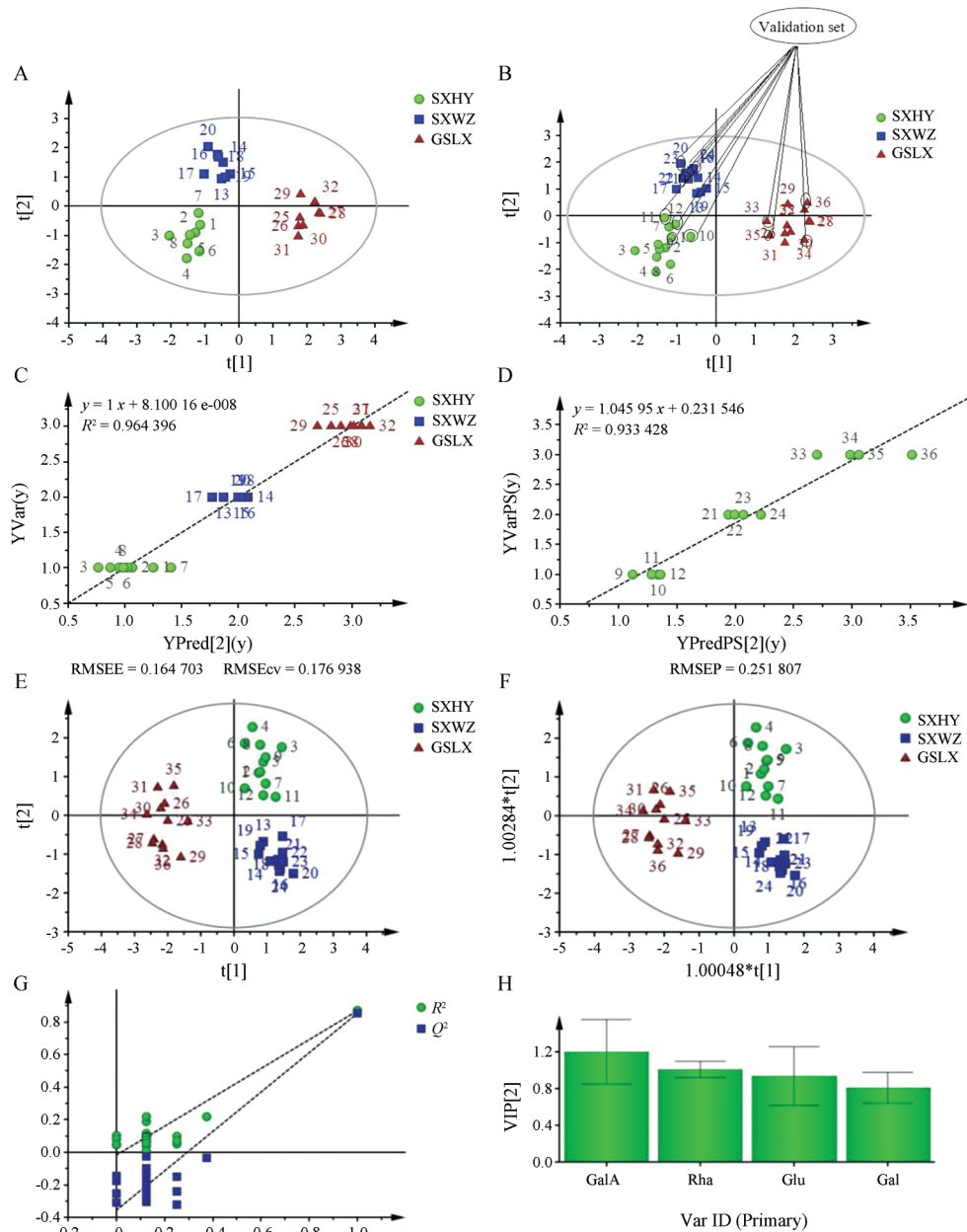


Figure 6 PLS-derived score plot of the training set (A), PLS-derived score plot of overall APS samples (B), PLS-derived relationship between true value and estimate value of training set (C) and validation set (D), PCA (E) and OPLS-DA (F) scores plots, permutations (G) and VIP-plots (H) of *Astragali Radix* samples based on monosaccharides specific chromatogram

下, SXHY 的黄芪多糖对 RAW264.7 细胞吞噬功能的增强作用高于 SXWZ 和 GSLX。

小结

本实验通过测定 36 批不同产地和不同种植方式的黄芪样品, 发现 SXHY 的仿野生黄芪中多糖含量高于 SXWZ 和 GSLX 的移栽芪, 且在最适浓度下对巨噬细胞吞噬能力的增强作用是最显著的。说明山西仿野生黄芪的优势性和不可替代性。在本研究中, 仿野生黄芪的产地为道地产区山西浑源, 它生长在土质疏松

的半坡环境(宜芪坡), 这些宜芪坡土壤由花岗岩和片麻岩分化而成, 有机质含量高, 土质疏松, 土层深厚, 富含微量元素硒。此外, 这里夏季日照充足, 干旱少雨, 昼夜温差大, 冬季寒冷, 仿野生黄芪在此环境中生长长达 6 年以上, 独特的生态环境使恒山黄芪具有道地性。而移栽黄芪则是农户选择肥沃土地, 经移栽施肥生长 1~2 年后采收。相比之下, 仿野生黄芪较移栽黄芪生长环境恶劣。大量研究表明, 植物通常以细胞和整个生物有机体抵抗胁迫。逆境下, 植物会在形态结构、生理生化、渗透调节、植物激素水平、膜保护物质及活性

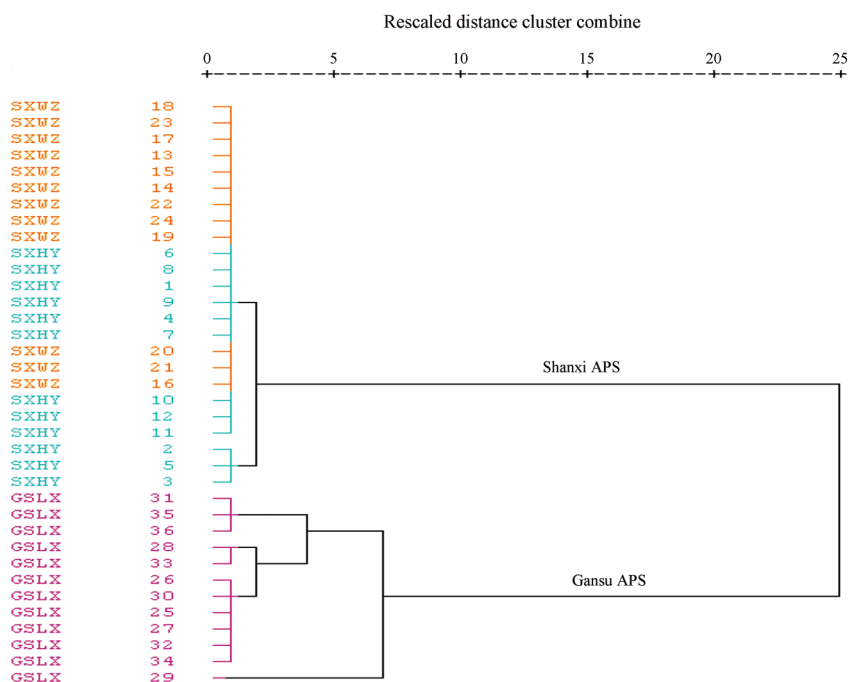


Figure 7 Hierarchical cluster analysis on carbohydrates in Astragali Radix samples from different habitats and different planting methods based on monosaccharides fingerprint

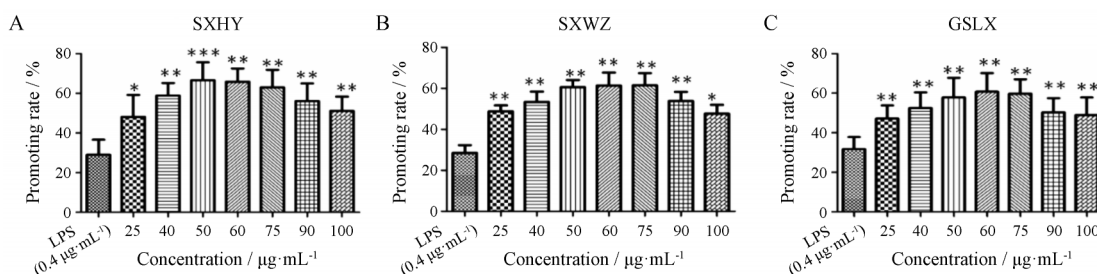


Figure 8 Effect of different concentrations of SXHY(A), SXWZ(B) and GSLX(C) Astragalus polysaccharides on phagocytic activity of RAW264.7 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs the positive control. $n = 8, \bar{x} \pm s$

氧平衡、逆境蛋白等诸多环节发生变化, 涉及到植物水分、光合、呼吸、物质代谢等多项生理过程^[17-21]。因此, 仿野生黄芪中的次生代谢产物多糖含量高于移栽黄芪, 可能是在环境影响下, 仿野生黄芪比移栽黄芪经受更多的胁迫因素所造成的。

从黄芪的多糖和单糖特征图谱来看, SXHY 仿野生芪和 SXWZ 的移栽芪之间的相似度较高, 而 GSLX 的移栽芪与前两者的差异性较大。说明对于多糖分子量分布情况和组成单糖的比例, 不同产地的影响要大于不同种植方式。中药材的疗效与产地有关, “离其本土, 则质同而效异”, 故而有药材道地性之说^[22]。而不同产地的生态因子对药用植物品质的影响和道地药材的形成是道地药材研究的重要内容。其中气候因子能直接或间接影响药用植物的生长、发育、生殖、行为和分布^[23,24], 土壤无机元素能够影响植物根系营养及生

理代谢活动, 促进植物的生长, 影响药用植物化学成分积累, 最终影响中药材品质^[25,26]。但这些影响并不是孤立的, 而是多种因子综合作用的结果。不同产地的各种环境因素可能是导致山西黄芪和甘肃黄芪多糖分子量分布情况和组成单糖比例不同的重要原因。

本实验利用多糖和单糖特征图谱技术, 找出了山西黄芪与甘肃黄芪中多糖分子量分布和单糖组成比例上的差异, 并发现了导致山西黄芪与甘肃黄芪差异的不同分子量片段和单糖比例, 这为不同种植方式黄芪的鉴别提供了依据。同时 SXHY 仿野生黄芪的多糖含量和增强巨噬细胞吞噬活性的能力高于移栽芪, 且具有显著性差异, 说明仿野生黄芪是不能被移栽芪替代的。因此, 本研究所建立的多糖、单糖特征图谱结合免疫活性评价方式为中药材多糖的质量控制方法提供了新的研究思路。同时, 本研究也为探明道地药材黄芪

的物质基础奠定了基础,对于建立更加合理的多糖质控标准用于黄芪品质评价,保障市场的存优淘劣,促进优质中药材资源的发展均具有重要的意义。然而,本研究还未对不同产地黄芪多糖结构上的差异进行深入地比较分析,接下来将进一步对其进行研究,找出不同产地黄芪多糖的差异性结构,并探讨其与活性之间的关系。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part 1. 2015 ed. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 302-303.
- [2] Du GJ, Qin XM, Li ZY, et al. Comparison of quality of two different planting patterns of *Astragalus membranaceus* in the main producing area of *Astragalus membranaceus* in Mongolia [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2013, 44: 3386-3393.
- [3] Jiang Y, Jin F, Bao Z, et al. Quantitative analysis of astragaloside IV in different sources of Radix Astragali [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2006, 31: 930-933.
- [4] Hu FD, Feng SL, Zhao JY, et al. Determination of flavonoids and astragaloside IV in Radix Astragali by HPLC [J]. Anal Testing Technol Instrum (分析测试技术与仪器), 2003, 9: 173-177.
- [5] Gao SY, Li K, Qin XM, et al. Quality comparison study between wild and cultivated Astragali Radix based on absolute growth years [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 2248-2257.
- [6] Zhang R, Li K, LI AP, et al. ¹H NMR-based metabolomics analysis the anti-fatigue effects of Astragali Radix based on muscle tissue Pubescentis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 782-790.
- [7] Li Q, Hu JH, Gao B, et al. The latest research progress of *Astragalus* polysaccharides in immune regulation [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2017, 23: 199-206.
- [8] Li SP, Wu DT, Zhao J. Saccharide mapping and its application in quality control of polysaccharides from Chinese medicines [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2015, 40: 3505-3513.
- [9] Li YY. Low Molecular Weight Heparin Quality Study (低分子肝素质量研究) [D]. Beijing: National Institutes for Food and Drug Control, 2013.
- [10] A JY. Metabolomics data processing method - principal component analysis [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学与治疗学), 2010, 15: 481-489.
- [11] Tian D, Li ZY, Fan SC. Chemical composition analysis of water soluble leachables from different habitats based on NMR metabolomics [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2014, 49: 89-94.
- [12] Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology [M]. 5th Ed. Beijing: Peking University Medical Press, 2004: 16-104.
- [13] Chieppa M, Bianchi G, Doni A, et al. Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program [J]. J Immunol, 2003, 171: 4552-4560.
- [14] Fraser IP, Kozielb H, Ezekowitz RAB. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity [J]. Immunology, 1998, 10: 363-372.
- [15] Gao XX, Wang BX, Fei XJ. Effects of polysaccharides (FIO-b) from mycelium of *Ganoderma tsugae* on proinflammatory cytokine production by THP-1 and human PBMC(I) [J]. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21: 1179-11921.
- [16] Liu MM, Zeng P, Li XT, et al. Antitumor and immunomodulation activities of polysaccharide from *Phellinus baumii* [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 91: 1199-1205.
- [17] Cai MS, Li ZJ. Sugar Chemistry (糖化学) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006.
- [18] Morcuende R, Krappe A, Hhrry V, et al. Sucrose feeding leads to increased rates of nitrate assimilation, increased rates of α -oxoglutarate synthesis, and increased synthesis of a wide spectrum of amino acids in tobacco leaves [J]. Plants, 1998, 206: 394-409.
- [19] Koch KE, Ying Z, Wu Y, et al. Multiple paths of sugar-sensing and a sugar/oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism [J]. J Exp Bot, 2000, 51: 417-427.
- [20] Buchanan BB. Plant Biochemistry and Molecular Biology [M]. Beijing: Science Publishing Company, 2004.
- [21] Su WH, Zhang HF, Li XH, et al. Relationship between accumulation of secondary metabolites of plant medicinal materials and environment [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2005, 36: 1415-1418.
- [22] Zhang ZY, Li P, Qi T, et al. Analysis of geological background and soil physical and chemical status of honeysuckle land and non-property real estate area [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2003, 28: 114-117.
- [23] Meng XC, Yu DM, Yang GH, et al. Active ingredients in *Acanthopanax senticosus* roots and associated ecological factors [J]. Mod Tradit Chin Med Mater -World Sci Technol (世界科学技术-中医药现代化), 2009, 11: 423-427.
- [24] Huang LF, Fu J, Chen SL. Academic study on ecological variation of traditional Chinese medicinal materials [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2012, 43: 1249-1258.
- [25] Guo LP, Huang LQ. Ecological research on resources of Chinese herbal [J] medicine [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2004, 29: 9-12.
- [26] Gu ZR, Shi FG, Jin Y. Advance in studies on the relationship between soil inorganic elements and quality of traditional Chinese medicine [J]. Guangdong Trace Elements Sci (广东微量元素科学), 2013, 20: 18-22.