

伯糖、木糖、半乳糖和半乳糖醛酸, 比例为 4.3 : 1.5 : 1 : 4.0 : 5.0, 糖醛酸的量与比色法所测基本一致。

PSW1B-b 由单一半乳糖组成的半乳聚糖; PSW4A 组成为鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖和半乳糖醛酸, 比例为 1 : 1.4 : 1.9 : 0.8; PSW5B 中性糖组成为鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖和葡萄糖, 比例为 1 : 1.5 : 3.4 : 1.3。

3.4 IR 光谱分析和 ^{13}C -NMR 谱: PSW1B-b, PSW2A-1 和 PSW3A-1 的 IR 谱中都显示了典型的糖环结构, 810、870 cm^{-1} 处没有吸收峰, 表明不含有甘露糖。PSW2A-1 和 PSW3A-1 在 1730 cm^{-1} 左右出现吸收峰, 说明可能含有糖醛。PSW1B-b 的 ^{13}C -NMR 谱中, δ 106.43~10.66 为 β -半乳糖的 C-1 吸收峰。PSW2A-1 的 ^{13}C -NMR 谱中, δ 176.02 为 α -半乳糖醛酸 6 位羰基碳的吸收峰, δ 109.8~111.8 为 α -阿拉伯糖的 C-1 信号, δ 19.18 和 18.93 处的吸收峰为 α -鼠李糖的 C-6 信号。PSW3A-1 在 δ 178.02 出现信号较强的半乳糖醛酸吸收峰, 说明含糖醛酸的量较高, δ 110.3 处吸收峰为 α -阿拉伯糖产生, δ 107.4 为 β -半乳糖产生, δ 101.7 处吸收峰则为鼠李糖的异头碳信号, 信号归属参阅文献报道^[12]。

3.5 药理活性“药理试验结果显示所有样品均无细胞毒性, PSW3A-1、PSW4A、PSW5 具有明显的促进免疫功能活性。

4 结论

实验结果表明黄精水提物中含有中性多糖、酸性多糖和糖蛋白复合物, 其主要特征是均含有较高

量的半乳糖。免疫活性实验结果初步表明酸性多糖 (PSW2A-1、PSW3A-1) 的活性高于中性糖 (PSW 1B-b), 而糖蛋白复合物 (PSW 3A-1、PSW 4A、PSW 5B) 的活性也高于一般多糖 (PSW2A-1、PSW 1B-b), 具体的构效关系待进一步研究。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol. 1. 1995.
- [2] Shi L, Meng Y W, Li W. Progress of *Polygonatum* and its polysaccharides studies on pharmacology [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1999, 11(3): 67-71.
- [3] Yang M H, Yu D Q. Study on the polysaccharides and oligosaccharides of *Polygonatum sibiricum* [J]. *Chin Pharm J* (药学通报), 1980, 15(7): 44.
- [4] Whistler R L. *Methods in Carbohydrate Chemistry* [M]. New York: Academic Press Inc, 1965.
- [5] Wei Y A, Fang J N. Determination of homogeneity and molecular weight of polysaccharides by HPGPC [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1989, 24(7): 532-536.
- [6] Zhang W J. *Biochemical Techniques in Complex Carbohydrates* (糖复合物生化研究技术) [M]. Hangzhou: Zhejiang University Publisher, 1999.
- [7] Blumencrantz N, Asoe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids [J]. *Anal Biochem*, 1973, 54(2): 484-489.
- [8] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin-phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, 193(1): 265-275.
- [9] Duan J Y, Zhen Y. Structural analysis of a pectic polysaccharide from the leaves of *Diospyros kaki* [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(5): 609-615.
- [10] Taylor R L, Conrad H E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimideactivated carboxyl groups [J]. *Biochemistry*, 1972, 11(8): 1383-1388.
- [11] Li X Y, Wang J F, Zhu P P, et al. Immune enhancement of a polysaccharide peptide isolated from *Corioliolus versicolor* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1990, 11(6): 542-545.
- [12] Wang S X, Dong Q, Zuo J P, et al. Structure and potential immunological activity of a pectin from *Cetella asiatica* (L.) Urban [J]. *Carbohydr Res*, 2003, 338(22): 2393-2402.

补中益气汤的 LC-MS 分析及其对免疫抑制小鼠的调节作用

高璟春^{1,2}, 张金超^{2,3}, 陈 瑶⁴, 柏干荣², 杨梦苏^{2*}, 肖培根^{1*}

(1. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094; 2. 香港城市大学 生物及化学系, 香港; 3. 河北大学化学与环境科学学院 化学系, 河北 保定 071002; 4. 香港城市大学深圳研究院, 广东 深圳 518057)

摘要:目的 研究补中益气汤的主要化学成分及其对环磷酰胺免疫抑制小鼠的调节作用。方法 采用 LC-MS 方法对补中益气汤进行了液相和质谱分析, 通过 MTT 法测定补中益气汤对环磷酰胺免疫抑制小鼠的 T、B 淋巴细胞增殖和 NK 细胞活性的影响。结果 补中益气汤中主要化学成分是多糖、黄酮类和皂苷类化合物, 能够显著提高环

收稿日期: 2005-11-10

基金项目: 国家“863”计划基金资助项目 (2003AA2Z2052)

作者简介: 高璟春 (1980-), 女, 河北人, 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所 2002 级直博生, 主要从事生药学研究。

E-mail: gjingchun@hotmail.com

* 通讯作者 肖培根 E-mail: xiaogp@public.bta.net.cn 杨梦苏 E-mail: BHM YANG@cityu.edu.hk

磷酰胺免疫抑制小鼠的 T、B 淋巴细胞增殖能力和 NK 细胞活性。结论 LC-MS 方法可以发展成为复方有效成分研究中一个有效手段,用来阐明复方药理作用的物质基础。

关键词:补中益气汤;LC-MS;免疫;环磷酰胺

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)08-1134-04

LC-MS Analysis of Buzhongyiqi Tang and its regulating effect on immune-depressed mice

GAO Jing-chun^{1,2}, ZHANG Jin-chao^{2,3}, CHEN Yao⁴, BAI Gan-rong², YANG Meng-su², XIAO Pei-gen¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China; 2. Department of Biology and Chemistry, City University of Hong Kong, Hong Kong, China;

3. Department of Chemistry, College of Chemistry and Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002, China; 4. Shenzhen Research Institute, City University of Hong Kong, Shenzhen 518057, China)

Abstract: Objective To study the main chemical constituents in Buzhongyiqi Tang (BYT) and its regulating effect on immune-depressed mice treated by cyclophosphamide (CY). **Methods** LC-MS Analysis of BYT, inhibitory effect of T, B lymphocyte cell proliferation and NK cell activity were observed by MTT method. **Results** The main chemical constituents of BYT are polysaccharides, flavonoids, and saponins, they significantly improve the T, B lymphocyte cell proliferation and NK activity in immune-depressed mice treated by CY. **Conclusion** The LC-MS method could be used in studying on active constituents in Chinese compound formula so as to elucidate their material bases of pharmacology.

Key words: Buzhongyiqi Tang (BYT); LC-MS; immunology; cyclophosphamide (CY)

补中益气汤(以下简称 BYT)是由黄芪、党参、炙甘草、白术、当归、大枣、陈皮、柴胡、升麻、生姜 10 味药材组成的复方制剂,具有补中益气、升阳举陷之功效,用于治疗脾胃虚弱、中气下陷症引起的体倦乏力、食少腹胀、久泄、脱肛、子宫脱垂^[1]。现代药理研究发现 BYT 具有调节细胞免疫、体液免疫和神经内分泌功能的作用^[2],同时还具有抗菌以及预防和治疗肿瘤作用^[3-5],但是其组方规律和免疫调节作用机制尚未完全阐明。本研究通过 LC-MS 方法分析 BYT 中的主要化学成分,联系各味药的传统以及现代药理作用,对 BYT 的免疫学药理机制作初步的阐释。

1 材料

1.1 材料和试剂:昆明种小鼠(4~6 周),购自深圳光明农场实验动物中心;YAC-1 细胞(一种 NK 细胞敏感的小鼠淋巴细胞系)由中国医学科学院药物研究所惠赠;RPMI-1640 培养基和小牛血清购自 Gibco 公司;MTT、刀豆蛋白(ConA)和脂多糖(LPS)购自 Sigma;环磷酰胺(Cyclophosphamide, CY)购自江苏恒瑞制药厂;药材购自深圳博爱医院药店,由肖培根教授鉴定。实验中用于 HPLC 的化学试剂均为色谱纯,购自 Merck 公司。

1.2 主要仪器:Thermo Finnigan LC-MS 系统;Bio-RAD Model 680 酶标仪;Heto LyoLab 3000 冷冻干燥仪;Eppendorf 5810R 离心机。

2 方法

2.1 BYT 的制备^[6]:按照处方配比取各味药(黄芪 68 g、人参 68 g、白术 68 g、当归 50 g、大枣 34 g、陈皮 34 g、柴胡 17 g、甘草 25 g、升麻 17 g、生姜 8.5 g),先用蒸馏水浸泡 3 h,然后煮沸 3 h,滤过,收集滤液;重复操作 1 次后合并滤液,真空浓缩,浓缩液冷冻干燥,得冻干粉 110.9 g,4 ℃保存,备用。

2.2 LC-MS 供试样品制备^[7]:BYT 冻干粉 1.0 g,用 50 mL 甲醇超声提取 3 次,合并提取液,离心 10 min(1 000 r/min),取上清液,真空浓缩至干,加 20 mL 色谱甲醇溶解,离心 10 min(3 000 r/min),上清液经微孔滤膜滤过即可。

2.3 液相色谱及质谱条件:色谱柱:Hanbon Lichrospher C-18 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:(A)酸水(0.5%冰醋酸)、(B)乙腈,线性洗脱:0 min, A-B 90:10;60 min, A-B 0:100;体积流量:1.0 mL/min;检测波长:200~600 nm 全波长扫描;柱温:25 ℃;柱后分流 0.2 mL/min 进质谱仪;ESI 电离源,负离子检测,扫描范围:100~1 500 m/z;喷雾电离电压:4.5 kV;毛细管电压:43 V;进样量:5 μL。

2.4 环磷酰胺免疫抑制模型的建立:小鼠随机分为 5 组,每组 6 只。对照组:第 1~14 天,ig 生理盐水;模型组:第 1~14 天,ig 生理盐水,并且在第 1 天 ip 200 mg/kg 环磷酰胺;给药组:第 1 天 ip 200 mg/kg 环磷酰胺,并且在第 1~14 天 ig BYT(按剂量分为

3 组,分别为 BYT1:500 mg/kg;BYT2: 1 000 mg/kg, BYT3: 2 000 mg/kg 3 个剂量)。

2.5 小鼠脾淋巴细胞悬液制备^[8,9]:各组小鼠无菌取脾,放置到冰冷的 PBS 中,在 200 目筛网上用注射器针芯器轻轻研磨,得细胞悬液,4 ℃离心 5 min (1 000 r/min),弃上清;加入适量红细胞裂解液,吹匀后,4 ℃离心 5 min (1 000 r/min);用 PBS 洗涤 2 次后将细胞用 RPMI-1640 培养液配成 5×10^6 /mL,吹匀,备用。

2.6 T、B 淋巴细胞增殖实验^[9]:脾淋巴细胞悬液以 5×10^6 /mL 密度铺 96 孔培养板,每孔 100 μ L。加入 ConA 和 LPS(终质量浓度分别为 5 μ g/mL、10 μ g/mL),设空白对照。37 ℃、5% CO₂ 培养 48 h 后,每孔加入 10 μ L MTT 溶液(5 mg/mL),继续 4 h,离心 10 min(3 000 r/min),弃上清,每孔加入 100 μ L DMSO,充分震荡后 570 nm 处测定吸光度(A),根据公式:增殖率=(给药组 A-对照组 A)/对照组 A \times 100%,计算增殖率。

2.7 NK 细胞活性测定^[8]:混合孔为脾淋巴细胞悬液(效应细胞, 5×10^6 /mL)和 YAC-1 细胞(靶细胞, 1×10^5 /mL)各 100 μ L;另设效应细胞孔(脾淋巴细胞悬液 100 μ L, 5×10^6 个/mL 加 RPMI-1640 完全培养基 100 μ L)和靶细胞孔(YAC-1 细胞 100 μ L, 5×10^6 /mL 加 RPMI-1640 完全培养基 100 μ L),孵育 4 h。每孔加入 10 μ L MTT 溶液(5 mg/mL),继续培养 4 h,离心 10 min(3 000 r/min),弃上清,每孔加入 100 μ L DMSO,充分震荡后 570 nm 处测定 A 值。

$$NK \text{ 细胞活性} = (A_{靶} + A_{效} - A_{混合}) / A_{靶} \times 100\%$$

3 结果

3.1 BYT 的 LC/MS 分析:结果见图 1 和 2。结果表明 BYT 的主要成分为多糖、黄酮和皂苷类化合物。

3.2 根据 UV 光谱和质谱推导出的化合物:结果见表 1。

3.3 淋巴细胞增殖实验结果:见图 3。

3.4 NK 细胞活性实验结果:见表 2。结果表明 BYT 高、中和低剂量组均能提高环磷酰胺免疫抑制小鼠的 NK 细胞活性。

4 讨论

BYT 最早记载于宋金时期李东垣所著的《内外伤寒感论·卷中》,具有调补脾胃等功效,临床应用相当广泛。近年来许多国内外学者进行了大量的实验研究,证明其能够增强机体免疫力,具有抗肿瘤、抗感染作用,并能减轻抗癌药的副作用,是一种有效的生物应答调节剂。

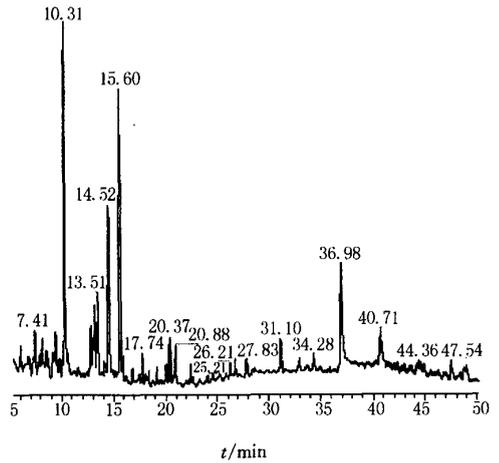


图 1 BYT 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatogram of BYT

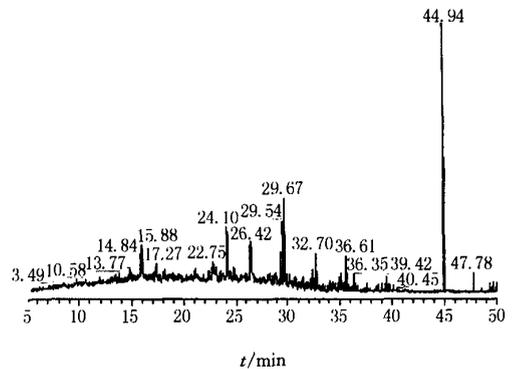


图 2 BYT 的总离子色谱图(ESI-)

Fig. 1 Total ion chromatogram of BYT

表 1 根据 UV 光谱和质谱推导出的化合物

Table 1 Compounds elucidated from UV and MS spectra

| 化合物 | 相对分子质量 | 保留时间/min | 特征紫外峰(λ_{max})/nm | 化合物类别 | 植物 |
|--------------|--------|----------|-----------------------------|-----------|----|
| 新西兰荊苣 | 594 | 9.65 | 220.0, 255.0, 325.0 | 黄酮 | 甘草 |
| 芹糖甘草苷 | 550 | 13.33 | 220.0, 245.0, 325.0 | 二氢黄酮苷 | 甘草 |
| 柚皮芸香苷 | 580 | 14.84 | 220.0, 245.0, 285.0, 320 | 二氢黄酮苷 | 甘草 |
| 橙皮苷 | 610 | 15.88 | 220.0, 250.0, 285.0, 325.0 | 二氢黄酮苷 | 甘草 |
| 甘草酸新苷 | 984 | 21.04 | 220.0, 250.0 | 皂苷 | 甘草 |
| 异甘草苷 | 418 | 22.54 | 220.0, 250.0, 340.0 | 查耳酮苷 | 甘草 |
| 甘草皂苷 | 822 | 26.41 | 220.0 | 齐墩果烷型三萜皂苷 | 甘草 |
| 柴胡皂苷 b1 和 b2 | 780 | 28.85 | 220.0 | 齐墩果烷型三萜皂苷 | 柴胡 |

表 2 BYT 对环磷酰胺免疫抑制小鼠 NK 细胞活性的影响

Table 2 Effect of BYT on activity of NK cells in immune-depressed mice treated by CY

| 组别 | NK 活性/% |
|------|---------------------|
| 对照组 | 86.84 \pm 4.61 |
| 模型组 | 58.61 \pm 4.13 |
| BYT1 | 65.54 \pm 6.15* |
| BYT2 | 93.32 \pm 3.15*** |
| BYT3 | 85.59 \pm 5.17*** |

与模型组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ *** $P < 0.01$ vs model group

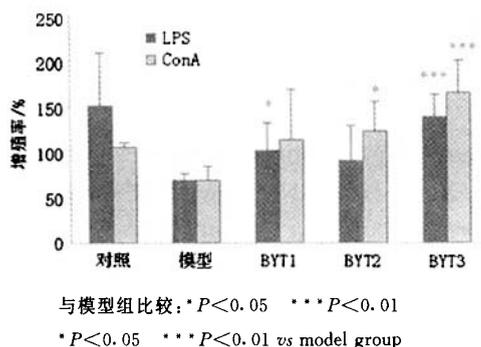


图 3 BYT 对环磷酰胺免疫抑制小鼠淋巴细胞增殖的影响
Fig. 3 Effect of BYT on proliferation of lymphocyte in immune-depressed mice treated by CY

淋巴细胞是在免疫应答过程中起核心作用的免疫活性细胞,按其功能可分为 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞。T 和 B 淋巴细胞可分别在致有丝分裂原 ConA 和 LPS 的刺激下由静止期淋巴细胞转化为淋巴母细胞,发生有丝分裂而增殖;NK 细胞是机体维持免疫监视功能的主要细胞之一,在免疫调节方面起重要作用;淋巴细胞检测 NK 细胞活性水平,可以反映出整个机体免疫功能状态。

本研究根据已知 BYT 的各味药的成分报道,利用质谱技术对 BYT 的成分进行初步定性分析,并检测了其免疫调节作用。结果表明,在本实验的剂量范围内,BYT 基本能够显著提高环磷酰胺免疫抑制小鼠的 NK 细胞活性和 T、B 淋巴细胞增殖能力,说明提高机体免疫力可能是 BYT 抗肿瘤、抗感染等生物活性的机制之一;另外,通过 LC-MS 分析发现,BYT 除了含有多糖类成分,黄酮类和皂苷类也

是 BYT 的重要组成部分之一,可能在其免疫活性中发挥着重要作用。LC-MS 方法可以发展成为复方有效成分研究中一个有效手段,用来阐明复方药理作用的物质基础。

References:

- [1] Hu X W, Ye J C. RP-HPLC method determine the content of hesperidin in Buzhong Yiqi Pill [J]. *Chin Pharm (中国药业)*, 2003, 12(3): 54-55.
- [2] Wu Z Q, Xie J G. Summary of center-supplement Qi-boosting decoction to improve immunity [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2002, 24(1): 62-64.
- [3] Xiao Q Y, Masakazu K, Masato M, et al. Antibacterial effect of kampo herbal formulation Huchu-Ekki-To (Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang) on *Helicobacter pylori* infection in mice [J]. *Microbiol Immunol*, 2002, 46(7): 475-482.
- [4] Masahiro K, Takuya K, Yoshio K, et al. Accelerated recovery from cyclophosphamide-induced leucopenia in mice administered a Japanese ethical herbal drug, Hochu-ekki-to [J]. *Immunopharmacology*, 1999, 44: 223-231.
- [5] Shung T K, Chia C Y, Chang C H, et al. The Chinese medicine Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang inhibited proliferation of hepatoma cell lines by inducing apoptosis via G₀/G₁ arrest [J]. *Life Sci*, 2001, 69: 1485-1496.
- [6] Masahiro K, Kenji K, Takuya K, et al. Suppression of IgE production in mice treated with a traditional Chinese medicine, Bu-zhong-yi-qi-tang (Japanese name: Hochu-ekki-to) [J]. *Immunopharmacology*, 1997, 36: 79-85.
- [7] Kazuya M, Toshitaka K, Haruyuki D, et al. Effect of Hochu-ekki-to (TJ-41), a Japanese herbal medicine on the survival of mice infected with influenza virus [J]. *Antivir Res*, 1999, 44: 103-111.
- [8] Fatima R D, JoseAlexandre M B, Maristela T, et al. Discrimination between NK and LAK cytotoxic activities of murine spleen cell by MTT assay; differential inhibition by PGE₂ and DETA [J]. *J Immunol Methods*, 2000, 241: 121-129.
- [9] Wang Y P, Li X Y, Song C Q, et al. Effect of astragaloside IV on T, B lymphocyte proliferation and peritoneal macrophage function in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin (中国药理学报)*, 2002, 23(3): 263-266.

复方五仁醇胶囊血清药化学研究

窦志华¹, 丁安伟^{1*}, 王陆军², 罗琳³, 张兵², 施忠²

(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210029; 2. 南通市第三人民医院, 江苏 南通 226006; 3. 南通大学, 江苏 南通 226006)

摘要:目的 对复方五仁醇胶囊进行血清药化学研究,以便与该制剂血清药理学研究结果进行谱效关系分析,阐明其药效物质基础。方法 以已经建立的高效液相色谱指纹图谱分析方法,比较复方五仁醇胶囊含药血清色谱图和空白血清色谱图,分辨该制剂给药后血清中产生的药源性成分,进一步比较全方制剂及各缺味、单味制剂给药后的血清色谱图,分析血中药源性成分的来源,并通过对照品比对对部分成分进行鉴定。结果 ig 给药后血清中产生药源性成分 13 个,13 个成分全部来自君药五味子,其中 8 个为制剂原形成分,包括五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素,其余 5 个为代谢产物。结论 复方五仁醇胶囊体内直接作用物质很可能出自血清中的 13 个药源性成分,

收稿日期:2005-10-28

基金项目:江苏省中医药局中医药科学技术研究专项课题(编号 H05173);江苏省南通市社会发展科技计划项目(编号 S4006)

作者简介:窦志华(1966-),男,江苏南通人,副主任中药师,博士研究生,主要从事中药炮制与复方研究工作。

* 通讯作者 丁安伟 Tel: (025)51997178 E-mail: daw@njutcm.edu.cn