

基于部分酸水解寡糖特征图谱及免疫活性评价的不同产地黄芪的品质比较

曹宇欣¹, 李 科^{1,2*}, 秦雪梅^{1*}, 焦思明², 杜昱光², 李先荣³

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 中国科学院过程工程研究所, 北京 100190

3. 山西健硕食品药品研究院有限公司, 山西 太原 030000

摘要: **目的** 比较不同产地的蒙古黄芪多糖 (APS) 部分酸水解产物寡糖特征图谱及免疫活性差异, 建立以寡糖混合物为指标的黄芪品质评价方法。 **方法** 以黄芪多糖为研究对象, 首先通过正交试验选择了最佳部分酸水解的条件, 将多糖水解成可供分析的寡糖, 建立基于部分酸水解-亲水作用色谱的黄芪寡糖特征图谱, 利用 SIMCA 软件对数据进行多元统计分析以区分不同产地的蒙古黄芪, 采用亲水作用色谱与质谱联用对黄芪多糖部分酸水解产物进行结构表征, 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** 通过正交试验得到的最佳水解条件为温度 90 °C、三氟乙酸浓度 1 mol/L, 水解时间 1 h。黄芪寡糖特征图谱的 PCA 结果显示, 可以将 3 种不同的蒙古黄芪区分开。质谱解析可知 3 种不同的黄芪多糖均主要为 1→4 连接的线性葡聚糖, 水解得到聚合度 3~8 的葡寡糖。山西浑源仿野生黄芪多糖的部分酸水解产物增强巨噬细胞吞噬活性的能力较高于移栽芪且高于未水解的总黄芪多糖。 **结论** 表明基于部分酸水解-亲水作用色谱的黄芪寡糖特征图谱及对细胞免疫功能影响差异可为不同产地及不同种植方式的蒙古黄芪进行品质评价, 也是对黄芪质量评价方法的重要补充。同时对其他中药多糖的表征具有一定的启蒙作用。

关键词: 部分酸水解; 亲水作用色谱; 黄芪多糖; 结构表征; 活性评价; 质量评价

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)21-5598-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.21.025

Comparative study on different areas of *Astragali Radix* based on oligosaccharides characteristic map and immunological activity evaluation of partial acid hydrolyzed

CAO Yu-xin¹, LI Ke^{1,2}, QIN Xue-mei¹, JIAO Si-ming², DU Yu-guang², LI Xian-rong³

1. Modern Research Center of Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

3. Shanxi Jianshuo Food and Drug Research Institute Co., Ltd., Taiyuan 030000, China

Abstract: Objective The characteristic maps and immunological activities of some acid hydrolysates of polysaccharides from *Astragali Radix* (APS) from different areas were compared. The quality evaluation method of *Astragali Radix* with oligosaccharide mixture as quality control index was established. **Methods** In this study, the polysaccharides from the traditional Chinese medicine *Astragali Radix* were used as the research object. Firstly, the optimal partial acid hydrolysis conditions were selected by orthogonal test. The polysaccharide was hydrolyzed into oligosaccharides for analysis. The characteristic map of Astragalus oligosaccharides based on partial acid hydrolysis-hydrophilic interaction chromatography was established. Multivariate statistical analysis was performed on the data by SIMCA software to distinguish Mongolian Astragalus from different areas. The partial acid hydrolysis products of Astragalus polysaccharides were characterized by hydrophilic interaction chromatography and mass spectrometry, and the activity was evaluated by mouse peritoneal macrophage phagocytosis neutral red experiment. **Results** The optimal hydrolysis conditions obtained by orthogonal experiment were temperature 90 °C, trifluoroacetic acid concentration 1 mol/L, hydrolysis time 1 h. Under this condition, Astragalus polysaccharide was hydrolyzed into characteristic oligosaccharide fragments, and the method is

收稿日期: 2020-03-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872962); 山西省优秀人才科技创新项目 (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 (ZYZH-Y-JIN-34); 山西省科技攻关项目 (20150313004-5)

作者简介: 曹宇欣 (1994—), 在读硕士研究生, 研究方向为中药质量控制。E-mail: 18835196398@163.com

*通信作者 秦雪梅 Tel/Fax: (0351)7018379 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn;

李 科 Tel/Fax: (0351)7019297 E-mail: like@sxu.edu.cn

reproducible. The characteristic map of Astragalus oligosaccharides based on partial acid hydrolysis-hydrophilic interaction chromatography showed that the maps of the same Astragalus oligosaccharides had good consistency, and the maps of different Astragalus oligosaccharides were quite different. PCA showed that three different kinds of Mongolian Astragalus can be distinguished. It was found by mass spectrometry that the extracted Astragalus polysaccharides were mainly 1→4 linear glucan, and gluco-oligosaccharides with the degrees of polymerization 3—8 were obtained after partial acid hydrolysis. The partial acid hydrolysate of the wild Astragalus polysaccharides from Shanxi Hunyuan had higher ability to enhance the phagocytic activity of macrophages than the transplanted Astragalus and higher than the unhydrolyzed total astragalus polysaccharide. **Conclusion** This study showed that the characteristics of Astragalus polysaccharides based on partial acid hydrolysis-hydrophilic interaction chromatography and the effects on cellular immune function can be used to evaluate the quality of *Astragali Radix* in different habitats and different planting methods, and it is also an important supplement to the quality evaluation method of *Astragali Radix*. At the same time, it has a certain exemplary role in the characterization of other Chinese materia medica polysaccharides.

Key words: partial acid hydrolysis; hydrophilic interaction chromatography; Astragalus polysaccharide; structural characterization; activity evaluation; quality evaluation

黄芪是我国常用的传统中药材之一,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],可补益元气而托毒,治一切气衰血虚之症^[2]。蒙古黄芪作为主流商品目前存在两种生长模式,一种为分布在恒山山脉及其周边地区的仿野生黄芪(以下简称仿野生芪),另一种为产地以甘肃、内蒙古为主,而甘肃产量最大的栽培黄芪^[3](以下简称移栽芪)。山西仿野生黄芪作为传统优质道地黄芪药材,在国内外有很高的声誉^[4]。而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)、产量大等优势,迅速占领市场。《中国药典》2015年版将黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷作为评价黄芪品质的指标,然而有研究表明^[5],虽然移栽芪的化学成分与野生芪相似,但含量有较大差异。对不同年限、不同生长方式、不同规格等级的黄芪样品进行测定,发现仿野生芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量明显高于移栽芪,但随着黄芪生长年限的增长,等级的增高,黄芪甲苷的含量逐渐下降,且栽培芪的含量要高于仿野生芪^[6-8]。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^[9-10]。这些矛盾说明目前黄芪品质评价指标存在不足。因此建立更加合理的评价指标,对于探明道地药材黄芪的物质基础,保护和发展道地黄芪具有重要意义。

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^[11],应该作为黄芪品质评价的新指标。但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。本实验室前期已经通过采用黄芪多糖和单糖糖谱,结合技术成熟

的细胞免疫活性实验,建立了以多糖为质控指标的黄芪品质评价方法^[12]。但是,其糖链序列及分支结构等还无法准确测定,且大分子的黄芪多糖虽具有一定的生物活性,可由于其相对分子质量大,溶解性较差,生物利用率较低,制约了其药效的发挥。有研究表明,黄芪多糖的生物活性与其相对分子质量大小相关。邓六勤等^[13]通过比较黄芪多糖及其氧化降解片段的抗氧化、抗肿瘤活性,发现体外抗氧化和抗肿瘤作用随着黄芪多糖降解片段相对分子质量降低而活性增强,从而推测降解后的黄芪寡糖的活性要强于大分子的黄芪多糖。因此,借鉴肽谱技术^[14-15](对于蛋白质这样的大分子物质通常被降解为特征性肽片段,然后通过分析片段来表征蛋白质),先将中药多糖降解为特征性的寡糖片段(2~10个单糖通过糖苷键连接形成直链或支链的一类糖),然后使用色谱以及色谱-质谱联用方法对特征性寡糖片段进行分离和结构表征。该方法操作简便、可重复性高,不同来源的多糖可形成专一性的糖谱,可用于鉴别和品质评价不同产地及不同种植方式的黄芪。

在本研究中建立了一种基于部分酸水解的亲水色谱(HILIC)特征图谱分析方法用于黄芪的品质评价。对36批黄芪多糖(APS)水解产物特征图谱进行分析,结合多元统计分析来处理数据,找出不同产地及种植方式的蒙古黄芪中APS的相似性和差异性,并使用亲水作用色谱与质谱联用方法对黄芪寡糖片段进行分离和结构表征。通过技术成熟、方法公认的小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红实验对其免疫调节活性进行评价。本方法为不同来源黄芪药材的品质评价和其他中药多糖的质量控制提供了新策略。

1 材料与试剂

1.1 材料

本实验所需植物材料包括仿野生黄芪和移栽黄芪, 药材均由山西大学秦雪梅教授鉴定为蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao, 其中编号 1~12 为采自山西浑源 (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 (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 (GSLX) 的移栽黄芪, 采收时间为 2017 年, 生长年限为 2 年。

1.2 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; Thermo 三重四极杆质谱仪 (Thermo 公司, 美国); 配有电喷雾离子源 (ESI), 工作站为 Xcalibur 2.1 (Thermo 公司, 美国); 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)。

1.3 试剂

木瓜蛋白酶 (Solarbio 公司, 美国); 三氯乙酸、三氟乙酸 (TFA) 购自阿拉丁化工有限公司 (中国, 上海); HPLC 级乙腈购自 Merck 公司 (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 公司; 中性红试剂购自 Solarbio 公司 (美国)。

2 方法

2.1 APS 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, 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 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体积分数为 90%, 静置过夜。收集沉淀, 冷冻干燥得多糖粗粉, 备用。

2.2 APS 部分酸水解

2.2.1 正交试验优化酸水解条件 称取 5 mg APS (以 SXHY 的 APS 为例), 放入水解管中, 以水解酸浓度 (A)、时间 (B) 及温度 (C) 为试验因素, 每个因素设计 3 个水平, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 以产生的特征性寡糖片段的数量和含量为指标, 优选 APS 的酸水解条件。正交试验因素水平见表 1。水解后旋干, 用 1 mL 乙腈-水 (50:50) 复溶, HILIC-ELSD 分析。

36 批不同产地及种植方式黄芪中的 APS 在最适合条件下按上述方法操作得到水解产物用于后续实验分析。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factor and level of orthogonal test

水平	A/(mol·L ⁻¹)	B/h	C/°C
1	0.5	1	80
2	1.0	2	90
3	2.0	4	100

2.2.2 色谱条件 色谱柱为华谱 XAmide (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为水 (A)-乙腈 (B)-甲酸铵 (C); 梯度洗脱: 0~110 min, 85%~50% B, 15% C; 110~120 min, 50%~40% B, 15% C; 体积流量 1 mL/min; ELSD 检测参数: 漂移管温度 90 °C; 雾化器 (N₂) 压力 179 kPa; 增益值为“6”。

2.2.3 LC-MS 联用条件 流动相为水 (A)-乙腈 (B)-甲酸铵 (C); 洗脱梯度: 0~80 min, 85%~50% B, 15% C; 80~100 min, 50%~40% B, 15% C; 体积流量 1 mL/min。ESI 离子源接口, 正离子模式一级全扫描, 质量扫描范围为 m/z 200~2 000。脱溶剂气为氮气, 离子传输毛细管温度为 300 °C, 鞘气体积流量为 206 mL/min, 辅助气体积流量为 41.2 mL/min, 喷雾电压为 5 kV, 毛细管电压为 30 V。

2.3 APS 对 RAW264.7 细胞免疫功能的影响

2.3.1 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 青霉素及 100 g/L 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。

2.3.2 药物配制 精密配制质量浓度为 1 000、500、200、100、75、50、25 μg/mL 的 APS 水解产物溶液, 用直径为 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌备用。

2.3.3 对 RAW264.7 细胞吞噬活性的影响 将 1×10^5 个/mL RAW 264.7 细胞悬液接种于 96 孔板中, 200 μ L/孔, 设 8 个平行孔。培养板置 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中 24 h 使细胞完全贴壁。吸去培养液, 用 PBS 洗去除未贴壁细胞, 加入不同质量浓度多糖 200 μ L/孔, 阳性对照组加入 0.4 $\mu\text{g/mL}$ 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 μ L 中性红生理盐水 (0.075%), 培养 1 h 后弃去中性红, 磷酸缓冲溶液 (PBS) 洗 3 次, 再加细胞裂解液 200 μ L/孔, 室温静置过夜。在酶标仪 540 nm 处测定吸光度 (A) 值。

2.4 数据处理

APS 酸水解产物色谱数据用 Sigmaplot 14.0 处理。在 HILIC-ELSD 特征图谱中, 两个谱图之间的相似性被表示为 $\cos \theta$ 式 (1) 和 R 式 (2)。

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

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

$1 \leq i \leq n$, n 为 2 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 2 个不同样品中 i 成分的峰面积或峰高值, $\bar{A}$ 和 $\bar{B}$ 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 APS 中, 选取每种 APS 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 软件对水解条件进行正交试验设计; 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 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 正交试验优化酸水解条件

水解过程的控制对于获得稳定的指纹图谱至关重要, 可以反映出多糖的大信息。水解过程的目的是获得具有不同聚合度 (DP) 的低聚糖片段, 水解过量或过于轻微都不能满足要求。所以为了得到特征性的寡糖片段, 首先对影响水解过程的

各种因素进行了研究, 具体包括水解温度、水解时间和酸浓度。在水解过程中应用了具有挥发性的三氟乙酸 (TFA), 氧化性较弱, 对多糖的破坏小, 且易去除, 所以较无机酸好。水解后的多糖采用 HILIC-ELSD 方法对其进行分析, 结果如图 1 所示。在 HILIC 模式下, 黄芪寡糖在 XAmide 酰胺色谱柱上得到了较好的分离, 按照极性由小到大的顺序依次被洗脱, 在给定的实验条件下, 20 min 之前出现的峰为单糖或二糖, 20 min 后出现较高 DP 的低聚糖。较低 DP 的 APS 降解为单糖的可能性更大, 导致单糖区域的峰面积比含有低聚糖区域的峰面积大得多。在最后 120 min 左右出现的峰是未水解的 APS。

从图 1 可以看出, 当水解条件为 80 $^{\circ}\text{C}$ 、0.5 mol/L, 1 h 和 80 $^{\circ}\text{C}$ 、2 mol/L, 2 h 时, 在 120 min 左右会出现较明显的 APS 未水解的峰, 水解到寡糖和单糖的量均较低, 说明水解不够彻底, 而当水解条件为 90 $^{\circ}\text{C}$ 、2 mol/L, 4 h 和水解温度达到 100 $^{\circ}\text{C}$ 时, APS 几乎全部水解为单糖和聚合度较小的寡糖, 说明水解条件过于剧烈。水解条件为 80 $^{\circ}\text{C}$ 、1 mol/L, 4 h; 90 $^{\circ}\text{C}$ 、0.5 mol/L, 2 h 和 90 $^{\circ}\text{C}$ 、1 mol/L, 1 h 时水解程度较为适宜, 但相比之下, 90 $^{\circ}\text{C}$ 、1 mol/L, 1 h 时水解得到的寡糖特征性片段更多且含量更高。所以, 根据正交试验结果, APS 部分酸水解的最适宜条件是水解温度为 90 $^{\circ}\text{C}$, TFA 浓度为 1 mol/L, 水解时间为 1 h。

基于 $\text{DP} \geq 3$ 的寡糖峰面积之和的极差分析和方差分析结果见表 2。根据极差分析的值可以发现, 温度的变化对 APS 水解程度的影响最明显, 其次是 TFA 的浓度, 而时间对水解程度的影响最小。方差分析得出的结果与其一致。温度 P 值小于 0.05, 表明具有显著性。而 TFA 浓度和水解时间的 P 值均大于 0.05, 说明影响不显著。最终, 得到的结果与色谱图结果一致, 最佳水解条件为温度 90 $^{\circ}\text{C}$, TFA 浓度 1 mol/L, 水解时间 1 h。

3.2 不同产地 APS 水解产物 HILIC-ELSD 特征图谱分析及质量评价

3.2.1 APS 水解产物 HILIC-ELSD 特征图谱分析 采用由正交试验得到的最适宜水解条件对提取得到的 36 批 APS 进行水解, 并用 HILIC-ELSD 进行检测, 其结果如图 2 及表 3 所示。从图 2 可以看出, 相同产地不同批次之间的 HILIC 特征图谱一致性较好, 而不同产地之间图谱的相对峰面积

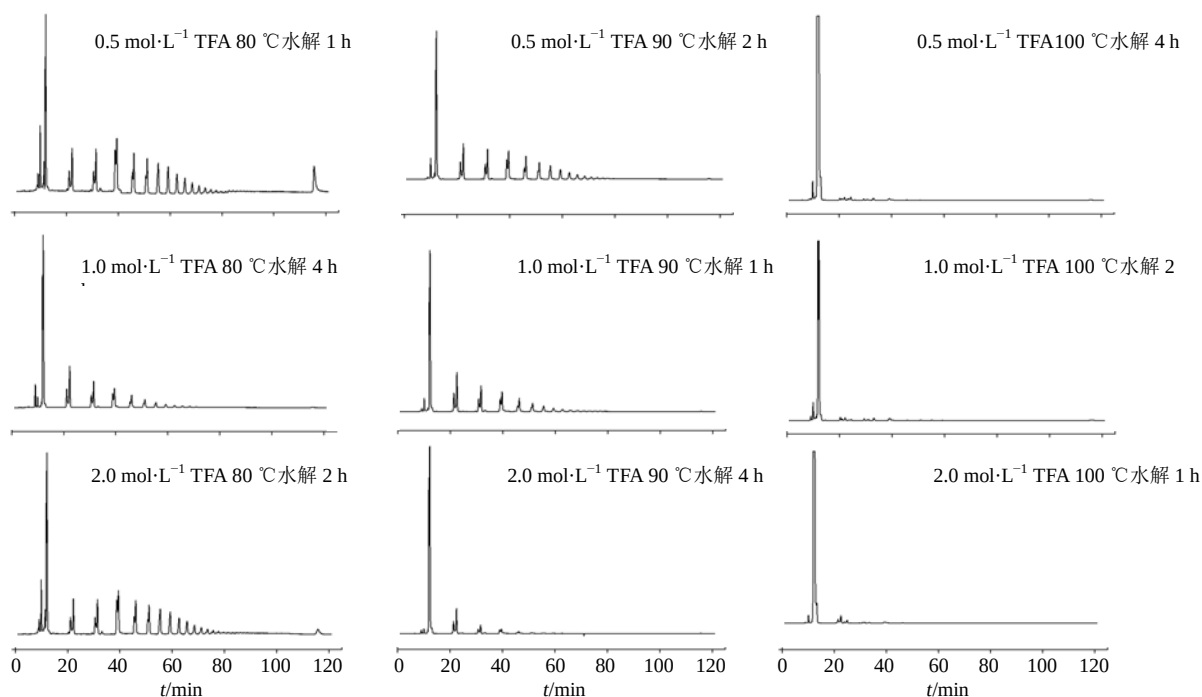


图 1 不同正交试验条件下 APS 水解产物的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of APS hydrolyzed at different conditions according to orthogonal test

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

编号	A/(mol·L ⁻¹)	B/h	C/°C	峰面积
1	0.5	1	80	11 854
2	1.0	4	80	14 975
3	2.0	2	80	11 244
4	0.5	2	90	17 197
5	1.0	1	90	20 443
6	2.0	4	90	13 405
7	0.5	4	100	3 011
8	1.0	2	100	2 476
9	2.0	1	100	4 019
K_1	10 687	11 772	12 691	
K_2	12 631	9 972	17 015	
K_3	9 556	10 464	3 169	
P 值	0.483	0.695	0.043	

($DP \geq 3$) 有明显差异, 且 SXHY 多糖水解产物的相对峰面积 ($DP \geq 3$) 远大于 SXWZ 和 GSLX, 与表 3 结果一致。结果表明在相同水解条件下, SXHY 的 APS 大多降解为不同聚合度的寡糖, 而 SXWZ 和 SXLX 的 APS 可能更多的降解为二糖或单糖。

3.2.2 HILIC-ELSD 特征图谱相似性评估 基于从 HILIC-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 0.992 3、0.973 5; 0.981 4、0.962 6

和 0.985 7、0.964 5。而 SXHY、SXWZ 之间的平均 $\cos\theta$ 值和 R 值为 0.947 2、0.880 1, SXHY、GSLX 的平均 $\cos\theta$ 值和 R 值分别为 0.932 5、0.863 2, SXWZ 和 GSLX 的平均 $\cos\theta$ 值和 R 值分别为 0.954 3、0.892 2。结果表明, 相同产地 APS 之间的相似性非常高, 而不同产地之间的差异性很大。

3.2.3 多元统计分析 采用 PLS 训练集散点图 (图 3-A) 对所有数据进行分析, 观察 3 组样本的分离趋势, 可以看出 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 3-B), 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 3-C 中能得出, RMSEE 的值为 0.125 679, 且可以看出 SXHY、SXWZ 和 GSLX 能明显分开。从图 3-D 中可以看出 RMSEP 的值为 0.125 131, 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。

通过积分不同 DP 的寡糖片段, 借助多元统计方法对数据进行进一步分析以准确找出不同种植方式及不同产地的 APS 水解产物间的差异性寡糖片段。图 3-E 为 3 种不同 APS HILIC-ELSD 特征图谱的 PCA 得分散点图, 可见, 3 种不同黄芪间都可得到较好得分离。进一步采用 OPLS-DA 分析, 如

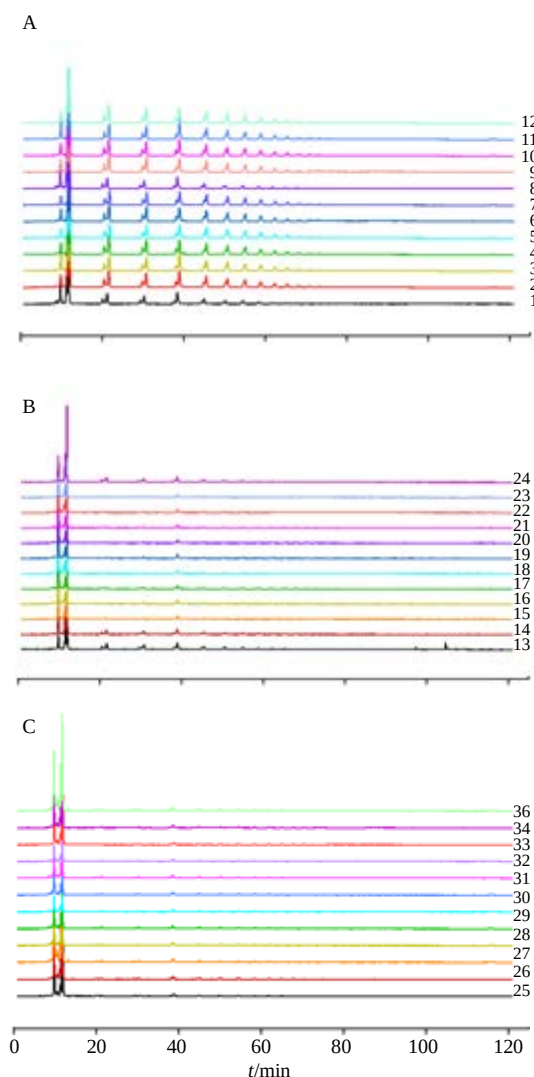


图 2 SXHY (A)、SXWZ (B) 和 GSLX (C) 的基于部分酸水解的黄芪寡糖 HILIC 指纹图谱

Fig. 2 HILIC fingerprint chromatogram of Astragalus oligosaccharides based on partial acid hydrolysis from SXHY (A), SXWZ (B) and GSLX (C)

表 3 不同 APS 水解产物的峰面积 ($DP \geq 3$)

Table 3 Peak area ($DP \geq 3$) of different APS hydrolyzates

SXHY	峰面积	SXWZ	峰面积	GSLX	峰面积
1	8 751	13	4 839	25	1 823
2	9 753	14	4 621	26	2 202
3	9 925	15	4 498	27	2 669
4	9 804	16	4 365	28	2 417
5	9 122	17	4 626	29	2 724
6	9 893	18	4 353	30	2 114
7	9 705	19	4 728	31	2 457
8	9 234	20	4 596	32	2 663
9	9 845	21	4 835	33	2 213
10	9 072	22	4 572	34	1 997
11	9 861	23	4 657	35	2 236
12	9 903	24	4 385	36	2 582

图 3-F, 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 3-G)。由 VIP 值 (图 3-H) 可知使 3 种不同黄芪分开的主要的寡糖片段为 DP3、DP4 和 DP9 ($VIP > 1$)。

3.3 基于 LC-MS 不同产地 APS 酸水解产物的结构表征

APS 经过部分酸水解后得到大量特征性寡糖片段, 采用 HILIC-MS 在正离子模式下对水解后的 APS 进行测定, 所得总离子流图如图 4 所示, 部分组分的质谱图见图 5。

对图 4 中的色谱峰进行分析发现, 14 min 前为杂质峰, 包括单糖、二糖及黄芪提取物中的非糖杂质成分。对 14 min 后的主要色谱峰 1~6 做进一步分析。其一级质谱中糖类化合物在正离子模式下易产生 $[M+Na]^+$ 和 $[M+H]^+$ 离子, 色谱峰 1~6 对应的相对分子质量依次为 504、666、828、990、1 152、1 314, 即聚合度 (DP) 为 3~8 的中性葡寡糖。即本文提取得到的黄芪多糖主要为葡聚糖, 被水解为 DP 3~8 的葡寡糖。

对色谱峰 1~6 做二级质谱表征, 判断葡寡糖的连接方式。以 $[M+Na]^+$ 为母离子, 进行二级质谱分析。以聚合度为 6 的寡糖 (色谱峰 4) 为例, 其在正离子模式下的 MS/MS 信息见图 5。丢失葡萄糖残基 (162) 形成一系列 C 型碎片, m/z 527 (C_3)、689 (C_4)、851 (C_5)、1 013 (C_6)、1 175 (C_7)、1 337 (C_8); 丢失葡萄糖, 形成一系列 B 型碎片, m/z 509 (B_3)、671 (B_4)、833 (B_5)、995 (B_6)、1 157 (B_7)、1 319 (B_8)。一系列完整的 B 型和 C 型碎片证明寡糖结构为线性^[16]。同时, $[M+Na]^+$ 发生开环断裂, 丢失 60, 形成 $^{0,2}A_1$ 型碎片, m/z 467 ($^{0,2}A_3$)、629 ($^{0,2}A_4$)、791 ($^{0,2}A_5$)、953 ($^{0,2}A_6$)、1 115 ($^{0,2}A_7$)、1 277 ($^{0,2}A_8$), 或丢失 120, 形成 $^{2,4}A_1$ 碎片, m/z 407 ($^{2,4}A_3$)、569 ($^{2,4}A_4$)、731 ($^{2,4}A_5$)、893 ($^{2,4}A_6$)、1 055 ($^{2,4}A_7$)、1 217 ($^{2,4}A_8$)。丢失 60 和 120, 为 1→4 连接的特征碎片。根据正离子模式下一级和二级质谱数据可知, 本实验中提取得到的 APS 主要为 1→4 连接线性葡聚糖, 该部分酸水解后产生 DP 3~8 的葡寡糖。

3.4 APS 水解产物免疫活性的测定

巨噬细胞是一种单核细胞衍生的吞噬细胞, 在非特异性和特异性免疫中起着至关重要的作用。巨噬细胞的吞噬功能是面对致病因子或外来物质反

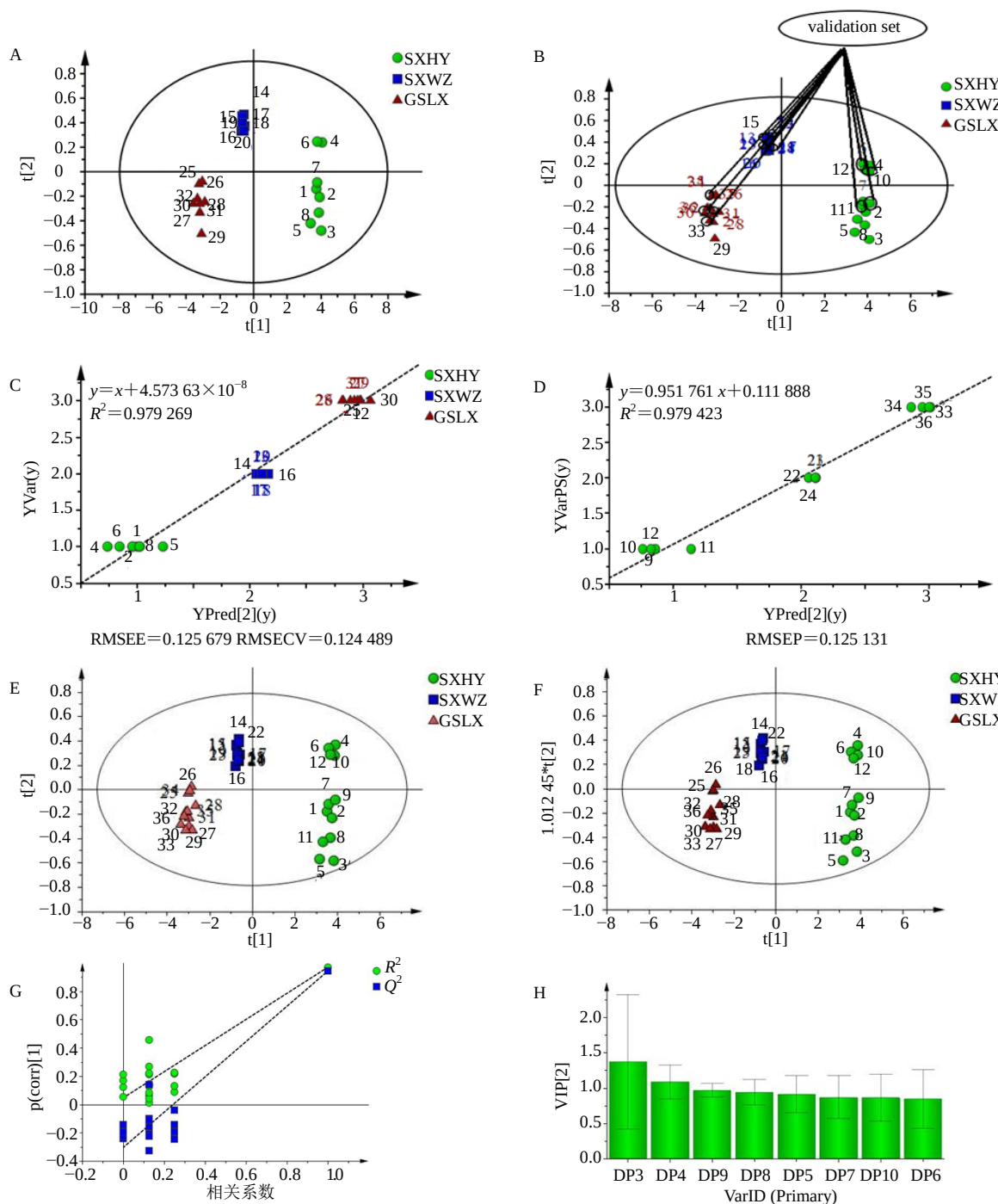


图 3 基于 HILIC-ELSD 特征图谱的 APS 水解产物的训练集 PLS 得分图 (A)、总 APS 样本 PLS 得分图 (B)、训练集 (C) 和验证集 (D) 的真实值和估计值之间的 PLS 得分图、PCA (E) 和 OPLS-DA 散点图 (F)、模型验证结果 (G) 和 VIP 图 (H)
Fig. 3 PLS-derived score plot of training set (A), PLS-derived score plot of overall APS samples (B), PLS-derived relationship between true value 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 APS hydrolyzate based on HILIC-ELSD characteristic map

应时的主要和必不可少的步骤。从图 6 中可以看出, APS 水解产物在 0.025~1.000 mg/mL 均能使处理 24 h 的样品的吞噬指数显著高于空白对照组, 作用强弱依次为 SXHY>SXWZ>GSLX。且在低质量浓

度时随浓度增加而增强, 一定质量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”^[17]。说明多糖调节免疫功能呈双向调节性, 并不是质量浓度越大功能

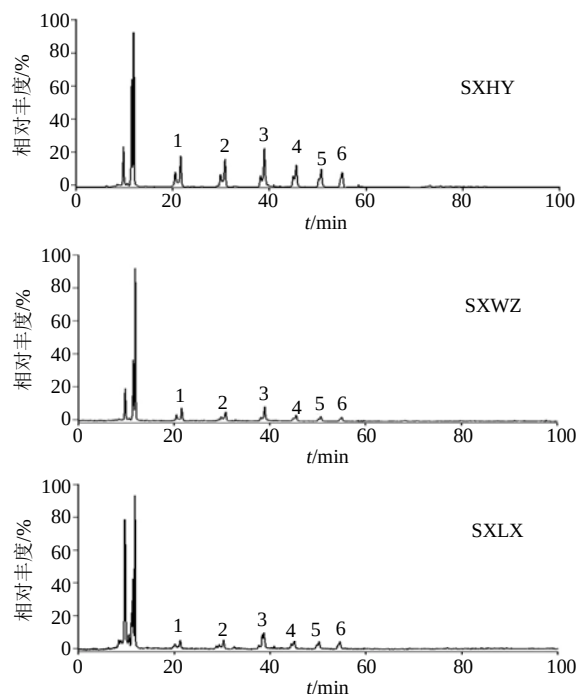


图 4 SXHY、SXWZ 和 GSLX 的 APS 的总离子流色谱图
Fig. 4 Total ion chromatogram of APS from SXHY, SXWZ and GSLX

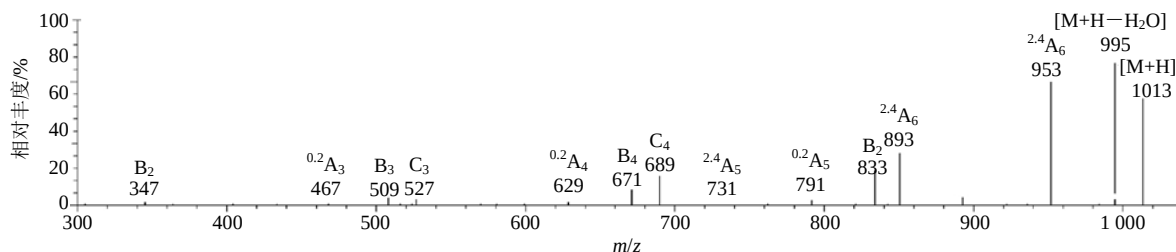


图 5 DP 6 寡糖的 MS/MS 质谱图

Fig. 5 Spectra of MS/MS fragmentation of oligosaccharide with DP 6

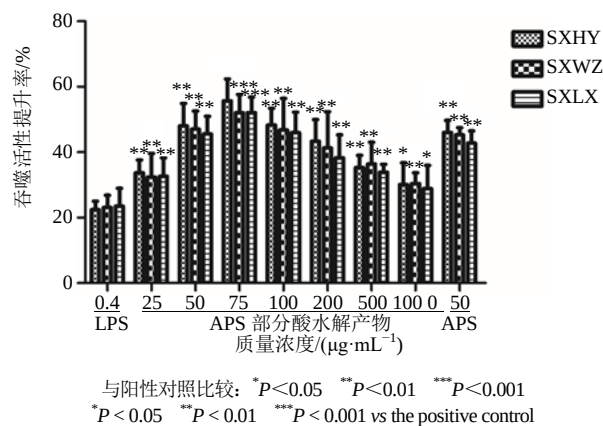


图 6 SXHY、SXWZ 和 GSLX 的不同质量浓度 APS 对 RAW264.7 细胞吞噬活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Effect of different concentrations of SXHY, SXWZ and GSLX Astragalus oligosaccharide on phagocytic activity of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

越强,而是存在某一最佳剂量。3 种不同 APS 水解产物的最适质量浓度均为 0.075 mg/mL,此时 RAW 264.7 细胞的吞噬活性分别增加 55.7%、52%、48.8%,显著高于阳性对照组(LPS)。且均高于 APS 在最适质量浓度下(0.05 mg/mL)^[12]对巨噬细胞吞噬活性的作用。这表明 APS 水解产物可显著促进 RAW 264.7 细胞的吞噬摄取能力,这对机体的免疫调节具有潜在的重要作用。

4 讨论

本实验构建了 HILIC-ELSD 特征图谱法来表征 APS 部分酸水解产物,经过验证,该方法稳定且重复性良好,并应用于 36 批不同产地及不同种植方式的黄芪样品。在此研究中,通过该方法,可以明显发现在所选最适条件下水解(90 °C, 1 mol/L 三氟乙酸, 1 h),同种 APS 的部分酸水解产物之间的寡糖特征图谱相似性很高,且可通过计算相似性来量化。3 种不同 APS 部分酸水解产物之间差异较大,主要差异在于不同 DP 寡糖的种类及相对比例,用 SIMICA 软件对数据进行多元统计分析得到结果

与其一致。其中 SXHY 的 APS 部分酸水解后得到的特征性寡糖片段种类最多且含量相对较高,而 SXWZ 和 SXLX 的 APS 大多降解为二糖或单糖,这可能是黄芪生长环境不同所造成的结果。通过建立 HILIC-MS 法来对特征性寡糖片段进行分析表征,结果表明,3 种不同的黄芪多糖均主要为 1→4 连接的线性葡聚糖,水解后得到 DP 3~8 的葡寡糖。该研究对其他中药多糖的表征具有一定的示范作用。巨噬细胞吞噬中性红实验表明,部分酸水解后的 APS 相对分子质量降低,但促进 RAW 264.7 吞噬中性红的能力明显提高,说明相对分子质量对免疫活性有显著影响。且 SXHY 的 APS 水解产物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,这可能是由于 SXHY 的 APS 部分酸水解后得到的特征性寡糖片段种类最多且含量相对较

高造成的。说明山西仿野生黄芪的优势性和不可替代性。然而本研究并未解释 APS 相对分子质量对免疫活性影响的原因及机制,需进一步对其进行深入研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 杨智蕴, 赵德仁, 沙国恒, 等. 黄芪化学成分研究概况 [J]. 东北师大学报, 1985(3): 55-60.
- [3] 杜国军. 恒山黄芪道地药材质量标准研究 [D]. 太原: 山西大学, 2013.
- [4] 牛倩芸, 万燕晴, 李震宇, 等. 不同商品等级黄芪质量评价研究 [J]. 中药材, 2015, 38(6): 1186-1190.
- [5] 熊一峰, 万燕晴, 李 科, 等. 山西恒山地区蒙古传统黄芪和移栽黄芪的质量差异研究 [J]. 中草药, 2017, 48(8): 1635-1643.
- [6] 姜 勇, 金 芳, 鲍 忠, 等. 不同来源黄芪药材中黄芪甲苷的定量分析 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(11): 930-933.
- [7] 石子仪, 鲍 忠, 姜 勇, 等. 不同来源黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芒柄花素的定量分析 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(9): 779-783.
- [8] 胡芳弟, 封士兰, 赵健雄, 等. HPLC 法测定黄芪中黄酮类成分和黄芪甲苷的含量 [J]. 分析测试技术与仪器, 2003, 9(3): 173-177.
- [9] 高四云, 李 科, 秦雪梅, 等. 基于绝对生长年限野生与移栽黄芪质量比较研究 [J]. 中草药, 2018, 49(10): 2248-2257.
- [10] 张 瑞, 李 科, 李爱平, 等. 基于 ^1H NMR 技术黄芪抗疲劳作用的肌肉代谢组学研究 [J]. 药学学报, 2018, 53(5): 782-790.
- [11] 李 钦, 胡继宏, 高 博. 黄芪多糖在免疫调节方面的最新研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(2): 199-206.
- [12] 曹宇欣, 李 科, 秦雪梅, 等. 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 [J]. 药理学学报, 2019, 54(7): 1277-1287.
- [13] 邓六勤, 黎梅桂, 吴宝仪. 黄芪多糖的氧化降解及其抗氧化和抗肿瘤活性研究 [J]. 中国药业, 2018, 27(1): 13-16.
- [14] Reis A, Domingues M R M, Ferrer Coreia A J, et al. Structural characterisation by MALDI-MS of olive xylo-oligosaccharides obtained by partial acid hydrolysis [J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 53(1): 101-107.
- [15] Daniel R, Chevolot L, Carrascal M, et al. Electrospray ionization mass spectrometry of oligosaccharides derived from fucoidan of *Ascophyllum nodosum* [J]. Carbohydrate Res, 2007, 34(6): 826-834.
- [16] Wang H, Xin H X, Cai J F, et al. Fingerprint profiling of Astragalus polysaccharides based on partial acid hydrolysis and comprehensive quality evaluation of *Astragalus membranaceus* combined with reversed-phase liquid chromatography finger print analysis [J]. Chin J Chromatogr, 2016, 34(7): 726-736.
- [17] Gao X X, Wang B X, Fei X J. Effects of polysaccharides (FIO-b) from mycelium of *Gamoderma tsugae* on proinflammatory cytokine production by THP-1 and human PBMC (I) [J]. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21(12): 1179-11921.