

· 化学与分析 ·

系统评价蜜炙对黄芪药效物质基础的变化

蔡金坊¹, 代云桃^{2*}, 肖永庆², 赵嵘³, 张立伟^{1*}

(1. 山西大学 分子科学研究所, 太原 030006; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
3. 国立阳明大学 药理学研究所, 台北 112)

[摘要] 目的: 为评价蜜炙对黄芪药效物质基础的影响, 从化学成分含量和雌激素受体作用角度, 以黄芪生品和清炒品为参照, 对蜜炙黄芪进行了系统研究。方法: 采用冷浸法测定了水溶性浸出物含量、苯酚-硫酸比色法测定总多糖含量、二甲喹啉法测定总蛋白含量、高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱仪联用技术(HPLC-Q-TOF-MS)比较化学轮廓和主要成分含量、荧光素酶报告基因法测定雌激素受体作用。结果: 蜜炙增加了黄芪水溶性浸出物、降低了多糖含量; 蜜炙保持了黄芪皂苷 II 的稳定性, 降低了加热对黄芪皂苷 II 含量的破坏; 蜜炙显著增加了异黄酮苷(毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷、芒柄花苷)的含量; 对雌激素受体的作用, 蜜炙品略高于生品, 而远高于清炒品。结论: 蜜炙保护了成分稳定性或提高了成分溶出, 从而提高药材活性。

[关键词] 黄芪; 蜜炙; 化学成分; 雌激素受体

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)08-0047-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016080047

Systemic Evaluation of Effect of Honey-processing on Therapeutical Basis of Astragalus Radix

CAI Jin-fang¹, DAI Yun-tao^{2*}, XIAO Yong-qing², ZHAO Rong³, ZHANG Li-wei^{1*}

(1. Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. Institute of Pharmacology, National Yang-Ming University, Taipei 112, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the effect of honey-processing on therapeutical basis of Astragalus Radix, and systemically study the honey-processing of Astragalus Radix from its chemical composition content and estrogen receptor action and with the crude product and fried product of Astragalus Radix as the control products. **Method:** The content of water-soluble extracts was determined by using cold-maceration method; content of polysaccharides was determined by phenol-sulfuric acid colorimetry method; the total protein content was determined by Dimethyl quinoline method; high performance liquid chromatography-tandem-Q-time of flight mass spectrometry (HPLC-Q-TOF-MS) was used to compare the chemical profile and content of main components. Luciferase assay was used to measure the effect on estrogen receptor. **Result:** An increasing level of the water-soluble extracts and a reducing level of polysaccharides were observed in honey-processed Astragalus Radix. Honey-processing kept the stability of astragaloside II and reduced the destruction on astragaloside II content caused by heating; significantly increased the content of isoflavone glycosides (calycosin-7-O-β-D-glucoside and ononin). The effect of honey-processing on estrogen receptor was slightly higher than that of crude product and much higher than that of fried-processing. **Conclusion:** Honey-processing can protect the component stability and increase the

[收稿日期] 20151202(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473340); 中国中医科学院自主选题项目(ZZ2013011)

[第一作者] 蔡金坊, 在读硕士, 从事中药相关研究, Tel:18835103186, E-mail:1052132317@qq.com

[通讯作者] * 代云桃, 博士, 副研究员, 从事中药药效物质基础研究, Tel:15711173428, E-mail: ytdai@icmm.ac.cn;

* 张立伟, 博士, 教授, 博士生导师, 从事天然产物研究, Tel:0351-7018113, E-mail: lwzhang@sxu.edu.cn

content of extracts, thus enhancing the medicinal activity of Astragalus Radix.

[Key words] Astragalus Radix; honey-processing; chemical constituents; estrogen receptor

黄芪为常用大宗药材,具有益气固表、利尿消肿、托毒生肌之功效,是常用的补益中药之一^[1]。蜜炙是黄芪的主要炮制方法,临床上普遍采用的是蜜炙品和生品。研究表明,黄芪蜜炙后其补益作用增强,功效以补中益气为主^[1]。然而,黄芪蜜炙机制与蜜炙对黄芪药效物质基础的影响尚不明确。

目前报道黄芪中主要活性成分为皂苷、异黄酮、多糖及氨基酸等^[2-3]。已有学者对黄芪生品及不同炮制品的质量进行比较研究,存在几个问题。①评价手段多以化学成分评价为主且每个研究仅限于单一类化学成分,例如有的以黄芪皂苷为考察对象,其中黄芪甲苷蜜炙后含量下降^[4-5],黄芪皂苷 I 和黄芪皂苷 III 含量升高^[6];有的以浸出物含量为指标,蜜炙后增加^[7];有的以黄酮类含量为评价指标。②对蜜炙后活性成分的变化规律也未得出一致结论,有研究认为蜜炙后毛蕊异黄酮和芒柄花素^[8-10]、毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷及总黄酮的含量,蜜炙后降低^[9],但也有研究发现,毛蕊异黄酮苷和芒柄花苷含量增加^[10]、总黄酮含量增加^[11],还有研究认为毛蕊异黄酮、芒柄花素的含量不变,毛蕊异黄酮苷和毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷-6"-O-丙二酸酯,蜜炙后降低^[12]。同时,药理实验研究证明蜜炙可提高小白鼠非特异性免疫和巨噬细胞吞噬能力^[13-14],蜜炙黄芪的补气作用高于生品^[15]。但是,这些研究未将化学成分与活性结合起来,需要综合研究炮制对黄芪活性的影响及其相关的化学组分的变化。

中药材化学成分和作用机制复杂,综合评价药材化学成分变化,结合生物活性变化,对于揭示药材蜜炙机制具有重要意义。细胞活性评价为生物活性评价中的一种,其优点为能够半定量药材活性的变化趋势、能快速反映出药材中药效物质基础的变化,有助于阐述药物作用机制。黄芪药理研究显示其具有免疫调节作用,这与其对雌激素受体的调节作用有关^[16-17],雌激素受体是核受体,其作用物质为甾体激素。激素与核受体相结合后,通过调节基因转录、合成相关蛋白,而发挥生物效应。通过转染方法引入受体及含有激素应答元件的报告基因,这种定量方法方便且直观。因此,基于雌激素信号通路的细胞活性评价能够反映出黄芪免疫调节作用物质基础的变化。

传统经验认为蜜炙具有增效减毒的功效。蜜炙

是药材加入炼蜜闷润后的伴炒过程,不同于清炒,清炒可能导致部分成分降解。而蜂蜜的拌入可能对黄芪中某些化学成分的稳定有保护作用或者具有提高有效成分溶出的作用。已有研究很少将清炒与蜜炙做对比,以揭示加热和加蜜 2 个不同因素对黄芪炮制的影响。因此,对比研究黄芪生品、蜜炙品和化学成分的变化及生物活性的变化,便于揭示蜜炙对黄芪药效物质基础的影响,以期对黄芪蜜炙机制的阐释提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器 RE52CS-1 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),HJ-6 型六联磁力加热搅拌器(金坛市万华实验仪器厂),BS 210S 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司),HZQ-F160A 型恒温振荡器(上海一恒科学仪器有限公司),AXLC1820-2 型超纯水机(重庆阿修罗科技发展有限公司),HPLC-Q-TOF-MS 联用色谱仪(美国安捷伦公司,包括 ESI 电喷雾离子源、高压泵、在线脱气装置、自动进样器、柱温箱,数据采集与处理采用 Profinder B. 06. 00 和 Qualitative Analysis 软件)。

1.2 药品与试剂 黄芪药材经鉴定均为豆科植物蒙古黄芪的 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥根(山西浑源万生黄芪开发有限公司),黄芪炮制品由北京仟草中药饮片有限公司制备。蜂蜜(荆条蜂蜜,北京颐和蜂食品有限公司);对照品黄芪皂苷 I,黄芪皂苷 II,黄芪皂苷 III(批号 PCS0466, PCS0465, PCS0464, 购自上海凯博生物科技有限公司);黄芪甲苷,毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷,芒柄花黄素(批号 110781-200613, 111920-201304, 111703-200603, 购自中国食品药品检定研究院);芒柄花苷,毛蕊异黄酮(批号 14040206, 13082713, 成都普瑞法科技开发有限公司),7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基-异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷(批号 YY92210, 上海源叶生物科技有限公司),HPLC 测定纯度均 ≥ 98%。乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,无水葡萄糖、苯酚、乙醇为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄芪样品的制备 生黄芪(S):取同一批黄芪

饮片, 50 °C 烘干至恒重并分为 7 份, 每份 500.0 g, 第 1 份作为试验用生黄芪样品; 另外 6 份分别按照《中国药典》的方法, 在北京仟草中药饮片有限公司, 制备炒黄芪和蜜炙黄芪。

清炒黄芪(Q):取 3 份生黄芪各 500.0 g, 分别置铁锅中, 用电炉加热, 炒至药材表面呈淡黄色、有焦斑时取出, 放冷备用。

蜜炙黄芪(H):取蜂蜜 125 g, 加水稀释, 加热至金黄色有鱼眼泡时, 将其与 500.0 g 生黄芪拌匀, 闷润 3 h, 将闷润好的黄芪置铁锅中翻炒, 用电炉文火炒至药材表面呈淡黄色且不粘手时, 取出, 放凉备用。蜜炙黄芪表面呈黄色, 有光泽, 质略松脆, 味甜, 具蜜香气。

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 黄芪对照品溶液的配制 分别取 5 个黄酮对照品和 4 个皂苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 定容, 摇匀, 即得质量浓度为毛蕊异黄酮-7-*O*- β -D-葡萄糖苷 0.5 g·L⁻¹, 芒柄花苷 1.0 g·L⁻¹, 毛蕊异黄酮 0.5 g·L⁻¹, 芒柄花素 0.5 g·L⁻¹, 7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基-异黄烷-7-*O*- β -D-葡萄糖苷 1.0 g·L⁻¹, 黄芪皂苷 I, 黄芪皂苷 II, 黄芪甲苷的质量浓度均为 1.0 g·L⁻¹, 黄芪皂苷 III 0.9 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.2.2 无水葡萄糖和苯酚溶液 精密称取 105 °C 干燥 2 h 的无水葡萄糖对照品 0.101 8 g, 加蒸馏水至刻度, 定容于 100 mL 量瓶中。取重蒸苯酚 12.505 3 g 于 250 mL 棕色量瓶中, 加蒸馏水溶解定容, 得 5% 苯酚溶液, 置于 4 °C 冰箱保存, 每次使用前摇匀。

2.2.3 清蛋白溶液的制备 取 2 g·L⁻¹ 的对照品溶液, 分别稀释制备质量浓度为 0.025, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 g·L⁻¹ 的系列对照品溶液。

2.3 测定方法

2.3.1 水溶性浸出物测定 采用 2010 年版《中国药典》冷浸法, 多糖含量测定采用苯酚硫酸法^[18], 总蛋白含量采用二喹啉甲酸法^[19], 化学指纹图谱采用 UPLC-MS, 生物活性采用荧光素酶报告基因法^[16-17, 20-22]。所得试验数据采用 Graphpad prism 软件进行数据统计分析和作图。

2.3.2 标准曲线的绘制 苯酚硫酸法: 精密量取对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL 分别置 50 mL 量瓶中, 加水定容至刻度, 摇匀。精密量取上述各溶液 2 mL, 置具塞试管中, 分别加 5% 苯酚溶液 1 mL, 涡旋, 混匀, 迅速加入浓硫酸 5 mL, 涡旋, 混匀, 于 40 °C 水浴中保持 30 min, 取出, 置冰水浴中迅速冷却至室温,

取出, 以相应试剂为空白, 在 490 nm 处测定吸光度 *A*, 以 *A* 为纵坐标, 质量浓度 (*C*) 为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $A = 12.156C + 0.0073$ ($r = 0.9998$)。结果表明, 葡萄糖在所考察浓度范围内线性关系良好。

二喹啉甲酸法: 分别取不同质量浓度的清蛋白对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L 置于 96 孔板, 每孔重复 3 次。加入二甲喹啉甲酸溶液 200 μ L, 混合均匀, 加盖 37 °C 孵育 30 min, 冷却至室温, 562 nm 测定 *A*。其中, 蜜炙品采用与炮制品相同质量浓度的蜂蜜作空白, 其他样本采用双蒸馏水为空白。以 *A* 为纵坐标, 质量浓度 (*C*) 为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $A = 0.4874C$ ($r = 0.997$)。

2.3.3 色谱与质谱条件 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μ m), 流动相 0.1% 甲酸 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 99% ~ 30% A; 10 ~ 11 min, 30% ~ 1% A; 11 ~ 12 min, 1% A; 12 ~ 15 min, 1% ~ 99% A), 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 1 μ L。质谱条件为 ESI 离子源, 正离子检测模式, 雾化气 N₂, 数据采集范围 *m/z* 100 ~ 1 200, 离子源温度 200 °C, Fragmentor 电压 175 V, 流速 14 L·min⁻¹, 雾化气压 2.41 \times 10⁵ Pa, Nozzle Voltage 电压 1 000 V, 测定样品前均已校正。

2.4 供试品溶液的制备

2.4.1 水溶性浸出物供试品溶液 按照 2010 年版《中国药典》一部附录 XA 浸出物测定法, 水溶性浸出物测定, 冷浸法。

黄芪不同炮制品水溶性浸出物测定结果见表 1, 炮制品相较生品的水溶性浸出物均有增多, 蜜炙黄芪 > 炒黄芪 > 生品。清炒后, 溶出物增加, 这可能与清炒能使细胞和组织疏松有关。蜜炙品与生品相比, 显著提高了溶出物含量, 这说明蜜炙有利于水溶性物质的浸出, 这与前人的研究结果一致^[7]。蜜炙品与清炒品相比, 也显著提高了溶出物含量, 说明蜂蜜的加入具有提高成分溶出的作用。

表 1 黄芪及其不同炮制品水溶性浸出物含量、总多糖和总蛋白含量

Table 1 Content of water-soluble extracts, total polysaccharides and total proteins in different processed Astragalus Radix

样品	水溶性浸出物/%	总多糖/%	总蛋白/ μ g·g ⁻¹
生黄芪	36.69 \pm 0.27	9.95 \pm 0.24	18.85 \pm 0.52
炒黄芪	37.64 \pm 0.32 ¹⁾	8.98 \pm 0.27 ²⁾	32.00 \pm 1.03 ²⁾
蜜炙黄芪	44.07 \pm 0.21 ²⁾	8.26 \pm 0.43 ²⁾	73.62 \pm 3.32 ²⁾

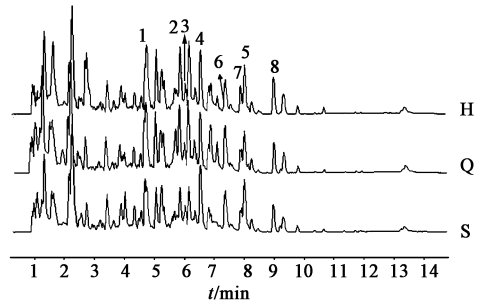
注: 与生品组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

2.4.2 多糖供试品溶液 多糖样本制备参考文献 [18], 制备过程: 取黄芪及其炮制品粗粉约 1 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 加水 100 mL, 加热回流 1 h, 静置, 取上清液, 如上重复提取 1 次, 离心, 合并 2 次滤液, 浓缩至适量, 转移并定容于 100 mL 量瓶中, 摇匀, 精密量取 5 mL, 加 95% 乙醇 26 mL, 涡旋 30 s, 使混匀, 3 500 r·min⁻¹ 离心 20 min, 倾去上清, 取沉淀加水溶解, 定容于 50 mL 量瓶中, 摇匀, 即得供试品溶液。精密量取 2 mL, 按照苯酚硫酸法项下方法, 自“加 5% 苯酚溶液 1 mL”依法测定 A, 从标准曲线上读出供试品溶液中无水葡萄糖的质量, 计算, 即得。各炮制组平行制备 5 份, 每份测定 3 次, 取平均值。

黄芪及其不同炮制品的总多糖含量测定结果见表 1。结果表明, 相较生品, 炮制品的总多糖均有一定显著性减少, 生品 > 清炒品 > 蜜炙品。其减少的原因可能与加热过程中, 总多糖的降解而导致的质量损失有关^[23]。总多糖加热过程中可能有数次的质量损失过程, 该过程中总多糖糖链发生降解, 相对分子质量减小和分子间氢键作用增强, 有利于生物活性的提高^[23]。

2.4.3 HPLC-Q-TOF-MS 的供试品溶液 取黄芪及其不同炮制品, 每组 6 份, 精密称定, 取样量均按生品折算为 5 g, 加水 50 mL, 浸泡 30 min, 煮沸提取 1 h, 过滤, 滤渣加水 30 mL, 煮沸提取 30 min, 合并 2 次滤液。浓缩至体积 < 10 mL, 定容于 10 mL 量瓶中, 置于 4 °C 冰箱。取上述的黄芪及其炮制品的水提液各 2 mL, 于离心管中, 15 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液, 共得 18 个样本用于 HPLC-Q-TOF-MS 分析。

采用 UPLC-MS 对黄芪及其炮制品的提取物进行分析, 得总离子流图。与负离子图相比, 正离子模式下能检测出更多的化学成分, 且包括了主要的黄酮类和皂苷类成分。因此, 择了正离子模式采集数



1. 毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷; 2. 芒柄花苷; 3. 7, 2'-二羟基-3', 4'-二甲氧基-异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷; 4. 毛蕊异黄酮; 5. 芒柄花素; 6. 黄芪甲苷; 7. 黄芪皂苷 II; 8. 黄芪皂苷 I

图 1 正离子模式下的生品黄芪(S), 清炒黄芪(Q) 和蜜炙黄芪(H) 的基峰色谱

Fig. 1 Basic peak chromatogram (BPC) of raw Astragali Radix membranaceus (S), Fried Astragali Radix (Q), Honey-fried Astragali Radix (H) in positive ion mode with HPLC-Q-TOF-MS

据, 获得黄芪水提取物化学成分轮廓图, 见图 1。通过与对照品的保留时间和质量数进行对比, 确定了黄芪提取物中 8 个常见的活性成分, 包括 5 个异黄酮类[毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷(1), 芒柄花苷(2), 7, 2'-二羟基-3', 4'-二甲氧基-异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷(3), 毛蕊异黄酮(4), 芒柄花素(5)]和 3 个皂苷类[黄芪甲苷(6), 黄芪皂苷 II(7), 黄芪皂苷 I(8)]成分, 见表 2。黄芪生品、清炒品和蜜炙品的轮廓图谱显示, 不同的炮制品所含成分种类相同, 但有的化学成分的含量差异显著。

生黄芪清炒和蜜炙后, 黄芪甲苷(6)含量略降低, 这与文献报道结果一致^[5]。但是黄芪甲苷(6)含量变化不具有统计显著性, 说明蜜炙和清炒对黄芪甲苷的含量没有显著影响。黄芪皂苷 II(7)和黄芪皂苷 I(8)变化规律相同, 蜜炙品 ≈ 生品 > 清炒品, 与毛蕊异黄酮(4)和芒柄花素(5)变化一致。但是仅黄芪皂苷 II(7)的含量变化具有统计意义。该变化表明黄芪皂苷 II(7)在清炒高温下不稳定, 而蜂蜜的加入有利于保护该成分的稳定。

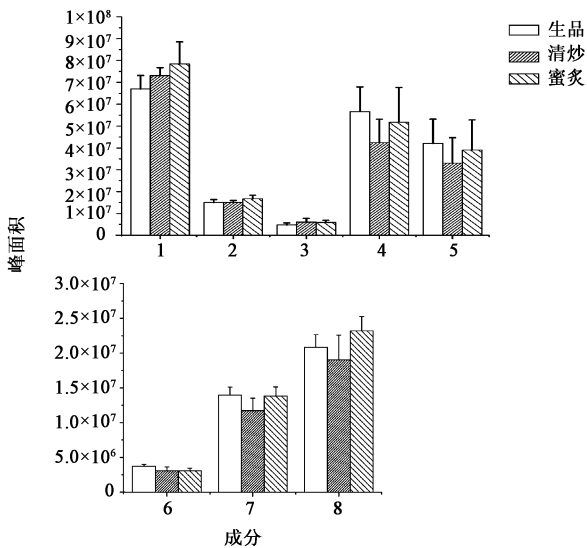
以提取离子流图的峰面积为变量, 对 6 个批次

表 2 黄芪及其炮制品中主要鉴定的活性成分

Table 2 Major components assigned in Astragali Radix and its processed products

No.	t/min	[M + H] ⁺	[M + Na] ⁺	化合物	分子式
1	4.68	447.129 7	469.111 5	毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀
2	5.82	431.134 3	453.115 8	芒柄花苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₉
3	6.23	465.174 3	487.157 6	7, 2'-二羟基-3', 4'-二甲氧基-异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀
4	6.50	285.077 7	307.058 1	毛蕊异黄酮	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
5	8.00	269.080 9	291.062 8	芒柄花素	C ₁₆ H ₁₂ O ₄
6	7.29	785.468 3	807.454 1	黄芪甲苷	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄
7	7.87	827.477 6	849.464 1	黄芪皂苷 II	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅
8	8.98	869.488 4	891.528 2	黄芪皂苷	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆

的黄芪及其炮制品化学成分相对含量进行比较,见图 2。结果显示,炮制方法对不同黄酮类成分的含量影响不同。毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷(1)和芒柄花苷(2)的变化规律一致,蜜炙品 > 生品 ≈ 清炒品,与文献一致^[10]。清炒高温对毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷(1)和芒柄花苷(2)影响不大,说明二者在该条件下稳定性好;而蜜炙组二者的含量显著高于生品,与水溶性浸出物结果一致。二者对应的苷元成分[毛蕊异黄酮(4)和芒柄花素(5)]含量变化趋势:蜜炙品 ≈ 生品 > 清炒品,这与前人的研究结果一致^[12],但该变化趋势不具有统计显著性。此变化表明高温对毛蕊异黄酮(4)和芒柄花素(5)有破坏作用,而蜜炙起了保护二者稳定性的作用。7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基-异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷(3)变化规律为,蜜炙品 ≈ 生品 < 清炒品,但是该变化不具有统计统计显著性。因此,蜜炙和清炒对毛蕊异黄酮(4),芒柄花素(5)和 7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基-异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷(3)的含量没有显著影响。但是,蜜炙能提高毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷(1)和芒柄花苷(2)的含量,而清炒对二者含量影响不大。



1. 毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷; 2. 芒柄花苷; 3. 7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基-异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷; 4. 毛蕊异黄酮; 5. 芒柄花素; 6. 黄芪甲苷; 7. 黄芪皂苷 II; 8. 黄芪皂苷 I

图 2 黄芪及炮制品中皂苷和黄酮类成分的相对含量对比
Fig. 2 Relative content analysis of major saponins and flavonoids in Astragali Radix and its processed products

2.4.4 蛋白质含量测定和雌激素受体活性分析

取黄芪及其不同炮制品,每组 6 份,精密称定,取样量按生品折算为 1 g,加水 10 mL,置 90 °C 水浴加盖煮 1 h,3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,取上清液作为供

试品,共制得 18 个样本用于蛋白含量测定和雌激素活性分析。

黄芪及其不同炮制品总蛋白含量测定结果见表 1,含量顺序为蜜炙品 > 清炒品 > 生品。相较生品,清炒品的总蛋白含量有显著增加,这可能与清炒能使细胞和组织疏松有关。而蜜炙品总蛋白含量提高了 3 倍,其原因可能与蜂蜜的加入有关系。

2.5 雌激素受体 ER-beta 活性测试

2.5.1 细胞培养

HEK293 细胞,常规培养在含有 10% 胎牛血清的达尔伯克必需基本培养基 (DMEM) 溶液中,培养条件为 37 °C 5% CO₂,相对饱和湿度。实验开始前 3 d 将细胞用聚丁二酸丁二醇酯 (PBS) 洗涤,采用无酚红 DMEM 培养 2 d, PBS 洗涤,采用 0.25% 胰蛋白酶消化,加入无血清 DMEM,以 6 万颗/孔的细胞密度接种于 96 孔板内,每孔培养液体积为 100 μL。培养 24 h 待细胞贴壁后,加入待测药物溶液和阳性对照药 [17β-estradiol, 雌二醇 (E₂), 100 nmol],继续培养 24 h。

2.5.2 活性测定

吸出培养基,每孔加入细胞裂解液 50 μL,震荡 10 min,加入荧光酶溶液 100 μL,混合后进行测定。活性数据计算公式为:

$$\text{Relative luciferase activity} = [(A_{\text{sample}} - A_{\text{control}}) / (A_{E_2} - A_{\text{control}})] \times 100\%$$

黄芪及其不同炮制品对 ER-beta 受体的刺激作用活性相对值测定结果分别为生黄芪 (S) 42.70 ± 8.81,清炒黄芪 (Q) 30.07 ± 4.05,蜜炙黄芪 (H) 43.12 ± 1.25。活性顺序为蜜炙品 = 生品 > 清炒品。相较生品,清炒品对 ER-beta 受体的刺激作用的显著降低,而蜜炙品的作用略有提升。这可能与清炒品中部分黄酮类成分含量的降低,而蜜炙品中黄酮类成分含量提高有关。

3 讨论

本文以化学成分和细胞活性为指标,以黄芪生品和清炒品为参照,整体评价了蜜炙对黄芪化学成分和生物活性的影响,为揭示黄芪的蜜炙机制提供依据。与黄芪生品相比,清炒加热会使黄芪中黄芪皂苷 II 含量降低,也会使黄芪提取物对雌激素受体的作用减弱。而蜜炙增加了水溶性浸出物、总蛋白和异黄酮苷类成分的含量,对雌激素受体的作用也略有增加。该现象揭示蜂蜜可能具有提高某些成分稳定性、提高某些成分在提取时的溶出率的作用。这为蜜炙的增效作用提供了科学依据。同时,笔者认为,综合成分测定和生物活性评价的方法更能反映出药材药效物质基础的变化。

本文测得主要活性成分的变化结果与部分已有报道结果不一致,笔者综合对比已有文献报道,主要原因是炮制品的取样量和分析样本的提取溶剂的不同。首先,炮制对样本的质量有影响,本文炮制试验重复 3 次,每次 3 个批次,每批 200 ~ 500 g,结果显示黄芪清炒得率为 97% ~ 98%,蜜炙品得率为 116% ~ 118%。因此,对黄芪炮制前后有关成分含量变化进行研究时,应折算为等量生黄芪进行计算,才能得出正确结果。以往研究认为蜜炙会降低黄酮类和皂苷类成分的含量,其原因可能与忽略了黄芪炮制品得率有关系。其次,提取溶解的选择会影响所提取成分的种类和含量,本文所有试验均采用水提物。临床应用中饮片多采用水煎方法,因此,水提物中成分的含量变化更具有临床指导意义。

近来的研究指出补气的作用与免疫调节有关。本文结果确定蜜炙导致黄芪化学成分的变化,该变化已经引起雌激素受体活性的变化,但是该化学成分的变化是否与补气作用有关,有待进一步确认。

本文利用不同的测试方法对药材中不同类成分进行了综合测定,同时结合细胞活性评价方法来评价蜜炙对黄芪药效物质基础的影响。此外,信号通路是体内一部分细胞发出信号,另外一部分细胞接受信号,并将其转变为细胞功能上的变化,具有普遍性、网络性的特征,适合用于评价中药材活性的差异。因此,基于雌激素信号通路的细胞活性评价能够反映出黄芪免疫调节作用物质基础的变化。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:283-285.

[2] 温燕梅. 黄芪的化学成分研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(6):879-883.

[3] Qi L W, Cao J, Li P, et al. Qualitative and quantitative analysis of Radix Astragali products by fast high-performance liquid chromatography-diode array detection coupled with time-of-flight mass spectrometry through dynamic adjustment of fragmentor voltage [J]. J Chromatogr A, 2008, 1203(1):27-35.

[4] 夏英,林新文,王刚. HPLC-ELSD 法测定黄芪、蜜黄芪中黄芪甲苷的含量[J]. 中医药导报, 2007, 13(9):77-78.

[5] 尹丽华,杨中林,张红飞. 不同产地,不同炮制品黄芪中黄芪甲苷的含量差异研究[J]. 中成药, 2005, 27(9):1044-1046.

[6] 张乐林,周倩,孙立立. HPLC-ELSD 分析蜜炙对黄芪中 3 种皂苷成分含量的影响[J]. 中国实验方剂学

志, 2014, 20(2):39-41.

[7] 胡艳萍,李妍. 不同炮制方法对黄芪浸出效果影响的研究[J]. 黑龙江中医药, 2002(3):60-61.

[8] 芮雯,冯毅凡,石忠峰,等. 黄芪及其蜜炙品的 UPLC/Q-TOF-MS 分析[J]. 广东药学院学报, 2012, 28(1):47-50.

[9] 宋肖炜,李清,叶静,等. 黄芪不同炮制品中黄酮类成分的含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9):85-88.

[10] 杨星辰,史秀峰,杨费莉. 高效液相色谱法考察黄芪蜜炙前后 4 种异黄酮含量的变化[J]. 中南药学, 2012, 10(2):89-92.

[11] 赵兴红,王惠琴. 蜜炙对黄芪浸出性成分的影响[J]. 基层中药杂志,1992(1):26-27.

[12] 李兴尚,陈佳,徐自升,等. 黄芪炮制前后相关化学成分的变化研究[J]. 中国药房, 2012, 23(15):1399-1402.

[13] 赵晓峰,何海根,章建萍,等. 黄芪对免疫功能低下小鼠免疫功能的影响[J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 36(6):749-751.

[14] 杨中林,王立新,李晓毛. 炮制黄芪对免疫功能的影响[J]. 中药材,1990,13(7):26-27.

[15] 刘星塔. 黄芪蜜炙方法的历史沿革及效用的探讨[J]. 中国中药杂志,1993,18(3):87-89.

[16] 王海彬,王军舰,黄辉,等. 黄芪注射液对雌激素受体的激活作用研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(11):2113-2115.

[17] 陈健,邵振俊,伍怡颖,等. 毛蕊异黄酮经由雌激素受体及 ERK1/2 的激活促进雌激素受体阳性细胞增殖的体内外研究[C]. 天津:第十三届中国科协年会生物医药博士论坛,2011.

[18] 杜国军,秦雪梅,李震宇,等. 蒙古黄芪主产区 2 种不同种植模式黄芪药材的质量比较[J]. 中草药, 2013, 44(23):3386-3393.

[19] Stoscheck C M. Quantitation of protein [J]. Methods Enzymol, 1990, 182(182):50-68.

[20] 杜彦艳,单保恩. 报告基因荧光素酶在科研中的应用[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(9):715-718.

[21] Miksicek R J. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological Activity [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1995, 208(1):44-50.

[22] Durocher Y, Perret S, Thibaudeau E, et al. A reporter gene assay for high-throughput screening of G-protein-coupled receptors stably or transiently expressed in HEK293 EBNA cells grown in suspension culture [J]. Anal Biochem, 2000, 284(2):316-326.

[23] 倪德江,陈玉琼,谢笔钧,等. 乌龙茶多糖 OTPS 2-1 的光谱特性、形貌特征及热特性研究[J]. 高等学校化学学报,2004,25(12):2263-2268.

[责任编辑 顾雪竹]