

中药虎杖雌激素活性组分的分离及活性测试*

张彩宁 王煦漫 (西安工程大学纺织与材料学院 西安 710048)

张晓哲 肖红斌 梁鑫森** (中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)

摘要:药材虎杖用 70%乙醇冷浸法进行提取。对虎杖中蒽醌类化合物集中分布的乙酸乙酯分配组分首先进行硅胶柱分离,得到 6 个组分,利用转基因酵母法测定其雌激素活性,结果表明前三个组分具有较高的雌激素活性。进一步对其中的第三个活性组分利用制备高效液相色谱进行了精制,对流出物按 2 分钟间隔收集,共得到 20 个馏分。转基因酵母法测定其雌激素活性的结果显示,在这 20 个馏分当中,有 5 个馏分具有较强的雌激素活性。分别将其雌激素活性与化学组成进行关联,发现其中的 sub - fraction - 13 中可能存在非大黄素的雌激素活性成分。

关键词:虎杖 制备高效液相色谱 雌激素活性 转基因酵母

中药虎杖为蓼科蓼属多年生草本植物虎杖 (*Polygonum cuspidatum* Sieb et Zucc.) 的根及根茎,主要分布于江苏、广东、四川等省区。虎杖味苦、性寒,具有祛风利湿、散癖定痛、止咳化痰等功效^[1]。虎杖中主要含有蒽醌类、二苯乙烯类、黄酮类、萘醌类等成分,具有抗肿瘤、抗炎、抗衰老等药理作用^[2-3],尤其是其中的蒽醌类化合物在抗雌激素缺乏型肿瘤方面具有突出的效果。目前在临床上,虎杖还广泛被用于心血管疾病和肝病等症的治疗^[4]。

近年来,植物雌激素由于其对激素依赖性疾病如乳腺癌、前列腺癌、心血管疾病及骨质疏松等具有广泛的防治作用,并少有雌激素样副作用的产生,因此正日

益受到人们的重视^[5]。针对中药虎杖的雌激素活性,日本的松田久司研究证实虎杖中的雌激素活性成分主要是蒽醌类化合物^[6]; Hisashi Matsuda 等发现中药虎杖的甲醇提取物 (30 ~ 100 μg/mL) 可促进人乳腺癌细胞株 MCF - 7 细胞的增殖,其中大黄素和大黄素 - 8 - O - - D - 葡萄糖苷是虎杖最主要的雌激素活性成分^[7]。另外,虎杖中的二苯乙烯类化合物 - 白藜芦醇也被证实具有雌激素样活性^[8-9]。而我国在虎杖的雌激素研究方面尚无报道。为了更加深入的研究中药虎杖的雌激素活性成分,同时发现新的具有雌激素活性的微量成分,本文采用制备效率高、重复性好的高效液相色谱制备手段和具有高通量特性的转基因酵母雌激素活性测试方法相结合,即活性跟踪分离法来研究虎杖中的雌激素活性成分,以期对虎杖中的雌激素活性成分进行比较系统的研究。

收稿日期: 2006-12-05

修回日期: 2007-03-12

* 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KGGX2-SW -213): “基于现代理论和技术的复方中药系统研究”, 负责人: 梁鑫森。

** 联系人: 梁鑫森, 研究员, 本刊编委, 主要研究方向: 组分中药研究, Tel: 0411-84379519, E-mail: liangxm@dicp. ac. cn.

一、实验

1. 试剂

虎杖,购于大连群益药房,产地山东,70%乙醇冷浸法提取。

用于酵母生长的培养基为 SC培养基(不含色氨酸和尿嘧啶);17-雌二醇(sigma);酶反应底物 o-nitrophenol - D - galactopyranoside (ONPG) (sigma);破壁酶 lyticase (sigma); - 巯基乙醇 (sigma); triton X - 100 (上海生工);二甲基亚砜 (DMSO) (科密欧);大黄素 (emodin)和白藜芦醇标准品(中国药品生物制品检定所)。

高效液相分析及制备用甲酸为色谱纯,购自美国 Alfa Aesar公司;水为 Milli - Q 二次水;甲醇和乙醇分别为色谱纯和分析纯,购于天津科密欧化学试剂开发中心。

本研究中所使用的转基因酵母由中国科学院武汉水生所提供。

2. 仪器

THZ - 82水浴恒温振荡器,金坛市华峰仪器有限公司;721型分光光度计,上海第三分析仪器厂;101型数显电热恒温干燥箱,上海阳光实验仪器有限公司;HZQ - F全温振荡培养器,哈尔滨东联电子技术开发有限公司;高速冷冻离心机 (Heraeus);TECAN GEN-DS酶标仪;酶标板振荡器 (lab - line instrument, Inc.);Varian高效液相制备仪 (Responder工作站, SD - 2泵,紫外检测器);制备柱 C18 (140mm ×75mm i d;10μm);Waters 2690 高效液相色谱 (包括四元梯度、自动进样器和柱恒温系统);Waters 996 二极管阵列检测器和 Waters Millennium 32 色谱工作站;大连依利特 C18 (250 ×4.6mm i d;10μm)色谱柱。

3. 虎杖样品的制备

1kg药材虎杖的乙醇/水 [V(乙醇):V(H₂O)] = 70:30 提取物用热水混悬后,用乙酸乙酯按照 1:1 的比例萃取 3次,合并乙酸乙酯部分,旋转蒸发至干,得乙酸乙酯分配组分 70g。将 10g该分配组分首先进行硅胶柱层析,用石油醚/乙酸乙酯/甲酸 = 2:8:0.5 进行等度洗脱,共洗脱 3倍于柱体积的量。按照时间间

隔收集,一共得到 33 个小组分,根据薄层跟踪分析结果,最后合并得到 6 个组分,分别命名为 Hz001 - 01 - Hz001 - 06。这 6 个组分旋转蒸发浓缩后,分别称取等量样品用 DMSO 溶解用于生物测试。根据雌激素活性测试的结果,在利用高效液相色谱进行了梯度洗脱条件优化以及考察了上样量的基础上,对其中的高活性组分 Hz001 - 03 进行高效液相精制。流动相 A 为甲醇,B 为 0.2% 甲酸水溶液,梯度洗脱条件如表 1 所示。流速为 150mL/min,检测波长为 254nm,进样体积为 10mL。室温下,每隔 2min 切割一次,共得到 20 个馏分,依次命名为 sub - fraction - 1 - sub - fraction - 20。

表 1 Hz001 - 03 高效液相色谱精制梯度洗脱表

| Step | Time (min) | Flow (mL/min) | methanol % | 0.2% formyl - H ₂ O | Type of gradient |
|------|------------|---------------|------------|--------------------------------|------------------|
| 1 | 0 | 1 | 35 | 65 | |
| 2 | 1 | 1 | 35 | 65 | isocratic |
| 3 | 17 | 1 | 60 | 40 | linear |
| 4 | 22 | 1 | 85 | 15 | linear |
| 5 | 38 | 1 | 100 | 0 | linear |
| 6 | 40 | 1 | 100 | 0 | isocratic |

表 2 虎杖样品 HPLC 的梯度洗脱表

| Step | Time (min) | Flow (mL/min) | methanol % | 0.2% formyl - H ₂ O |
|------|------------|---------------|------------|--------------------------------|
| 1 | 0 | 1 | 10 | 90 |
| 2 | 1 | 1 | 10 | 90 |
| 3 | 50 | 1 | 100 | 0 |
| 4 | 60 | 1 | 100 | 0 |

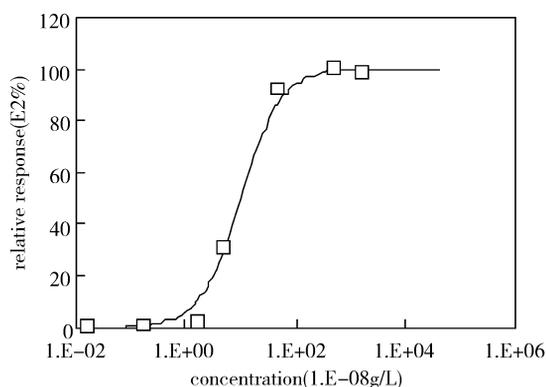


图 1 E2 雌激素活性的剂量 - 效应关系曲线

这 20 个馏分旋转蒸发浓缩后,分别用 DMSO 溶解用于生物测试。

4 转基因酵母法测定样品的雌激素活性

样品的雌激素活性测试过程参照文献 [10] 进行。转基因酵母法测定外来样品的雌激素活性,评价活性大小的两个指标 - 半乳糖苷酶活性和 EC₅₀ (产生最大酶活一半时样品对应的质量浓度

(g/L)),计算方法分别参考文献 [11] 和 [12]。

5 虎杖样品的 HPLC 分析

采用紫外检测器,检测波长为 254nm;流动相为甲醇和 0.2% 甲酸 - 水 (体积比);柱温: 35 ;进样量: 10μl;梯度洗脱条件见表 2。

二、结果与讨论

1. 转基因酵母的生物检测方法与雌二醇 (E2) 标准曲线

目前,检测雌激素的方法很多,包括整体动物实验、细胞增殖实验、受体结合实验等,其中转基因酵母法是使用比较广泛的一种体外检测方法。该系统是将两个基因引入酵母中,一个为人雌激素受体基因 (hER),另一个为与雌激素受体响应元件 (ERE) 相连的 - 半乳糖苷酶 (LacZ) 报告基因。外来雌激素加入培养基中与 ER 结合,受体 - 配体复合物迅速启动 DNA 上的 ERE,从而引发 LacZ 基因的表达,通过测定底物 nitro - D - galactopyranoside 到 nitrophenol 的转化检测酶的活性^[13-14]。

利用酵母测定 E2 雌激素活性的浓度 - 响应曲线如图 1 所示,计算所得 EC₅₀ 值约为 10⁻⁷ g/L。这一结果表明,转基因酵母对雌激素类化合物有较高的灵敏性,可用于对含有雌激素的样品进行雌激素活性的测试。

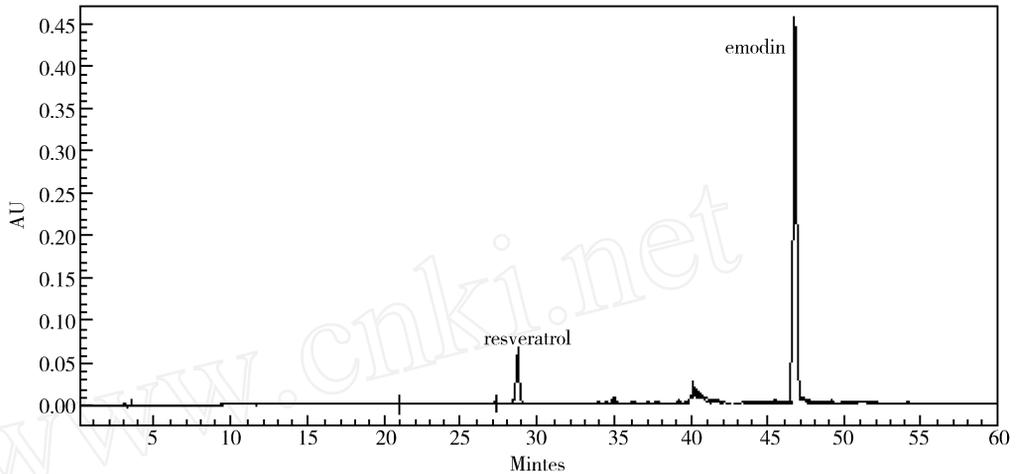


图 2 大黄素等标准品的 HPLC 图谱

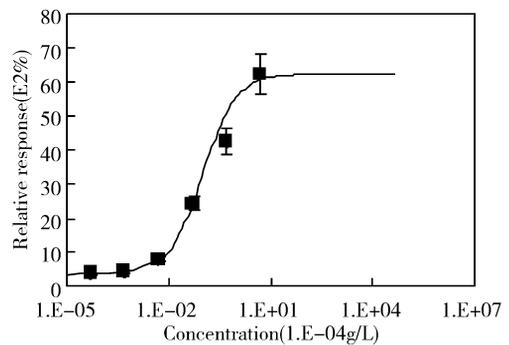


图 3 大黄素雌激素活性的剂量 - 效应关系曲线

2 标准品大黄素和白藜芦醇的 HPLC 分析及雌激素活性

以甲醇配制大黄素和白藜芦醇的混合溶液,按照表 2 所示的方法进行 HPLC 分析。实验结果如图 2 所示,大黄素和白藜芦醇的保留时间依次为 46.9min 和 28.8min。图中保留时间为 40.5min 的峰为溶剂甲醇的杂质峰。此外,应用转基因酵母法测定了这两个标准品的雌激素活性。结果显示,白藜芦醇用转基因酵母检测不显示雌激素活性,而大黄素则显示较强的雌激素活性,它的剂量 - 效应关系如图 3 所示,EC₅₀ 和最大酶活力 (Efficiency) 分别为 10⁻⁵ g/L 和 62.14%。

根据文献报道,大黄素用人乳腺癌细胞 - MCF - 7

细胞检测显示较强的雌激素活性^[7],这与用转基因酵母检测的结果是一致的。而虎杖中的另一种雌激素活性物质 - 白藜芦醇用转基因酵母检测不到雌激素活性的原因可能与其雌激素活性的分子作用机制有关:白藜芦醇跟雌激素受体的结合力差^[8-9],所以它就不能激活转基因酵母当中的雌激素受体响应元件,当然也就不能引发 - 半乳糖苷酶报告基因的表达。

3. HPLC分析虎杖总提取物及其各分配组分的化学组成

针对蒽醌类化合物水溶性差的性质,将虎杖 70%乙醇粗提物根据溶剂分配的原理,液液萃取分为乙酸乙酯和水两个分配组分。对总提物和这两个分配组分分别按照表 2所示的方法进行 HPLC分析,结果如图 4所示。从图中可以看出,经过溶剂分配以后,虎杖中的强极性化合物主要分布在水分配组分,出峰时间集中在 10~30min之间;而活性成分蒽醌类化合物则主要集中分布于乙酸乙酯分配组分,其中保留时间为 46.9min的峰,与标准品对照为大黄素峰,其在乙酸乙酯分配组分当中的含量接近 50%。

4. 虎杖乙酸乙酯分配组分硅胶柱分离产物的雌激素活性

在中药虎杖雌激素活性成分制备过程当中,本文使用硅胶柱层析技术对虎杖的乙酸乙酯分配组分进行了粗分离,实现了对目标组分的初步富集。应用转基因酵母测试层析产物雌激素活性的结果如图 5所示:Hz001 - 01活性最高,Hz001 - 02次之,接下来是 Hz001 - 03,而 Hz001 - 04、Hz001 - 05和 Hz001 - 06这三个组分则无显著雌激素活性。

5. HPLC分析虎杖硅胶柱分离产物的活性组分

利用高效液相色谱分析手段,对虎杖乙酸乙酯分配组

分硅胶柱层析产物 - Hz001 - 01、Hz001 - 02和 Hz001 - 03的雌激素活性与其化学成分进行了关联。高效液相分析色谱图如图 6所示。在这三个组分当中,同样保留时间为 46.9min的高含量成分经标准品对照为大黄素峰。由图可以看出,这三个组分当中均含有大黄素,这是它们具有较高雌激素活性的主要原因。Hz001 - 01中大黄素的相对含量达到了 90%以上;Hz001 - 02除主要成分大黄素以外,还含有其它一些复杂的化学成分,而 Hz001 - 03中大黄素的含量相对比较,组成也比较丰富。本文以 Hz001 - 03为研究

表 3 Hz001 - 03制备高活性馏分的雌激素活性指标比较

| | Efficiency (E2%) | EC50 (10^{-3} g/L) |
|---------------------|------------------|-----------------------|
| sub - fraction - 13 | 56.71 | 3.5 |
| sub - fraction - 14 | 67.75 | 0.09 |
| sub - fraction - 15 | 66.03 | 0.06 |
| sub - fraction - 16 | 85.75 | 0.056 |
| sub - fraction - 17 | 45.48 | 2.6 |

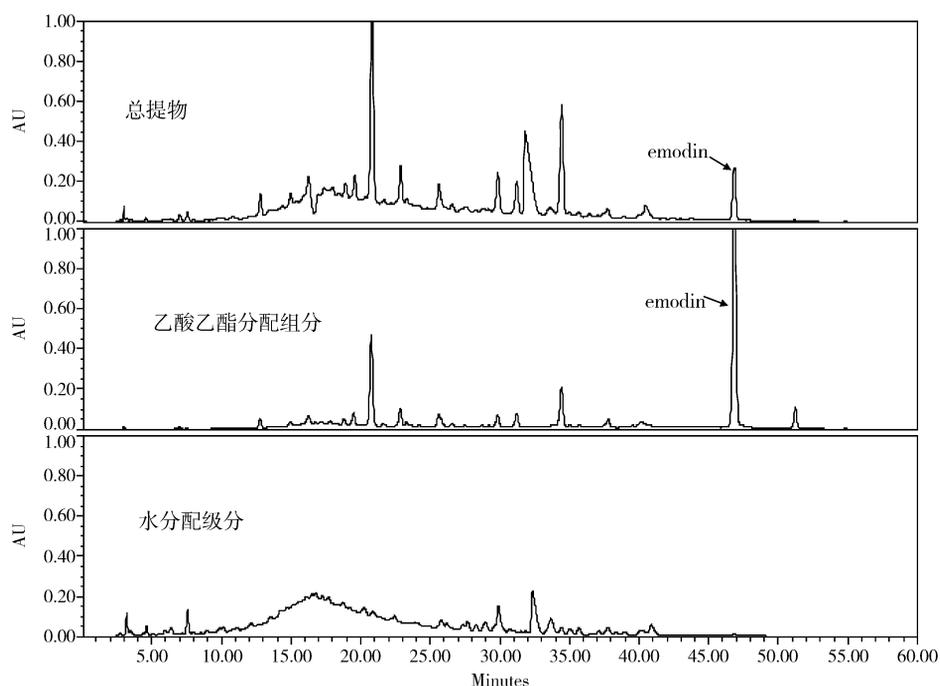


图 4 虎杖总提物、乙酸乙酯以及水分配组分的液相分析谱图

对象,使用 Varian 高效液相制备仪对其进行了更进一步的分离制备,以期发现中药虎杖中未知的雌激素活性成分。

6 转基因酵母法测定高效液相色谱制备产物的雌激素活性

对硅胶柱层析产物 Hz001 - 03 首先进行 HPLC 分析,流动相使用甲醇 - 0.2% 甲酸 / 水溶液,发展了梯度的洗脱方法 (见表 1),使其在分析条件下得到适当的分离。然后将发展的方法进行线性放大后,移到制备型高效液相色谱仪上进行组分的分离。按照时间段 (每 2min) 进行切割,共收集到 20 个馏分。应用转基因酵母法对 Hz001 - 03 的

高效液相色谱制备产物的 20 个馏分进行了雌激素活性的测试。各组分相对于 E2 的最大酶活比较如图 7 所示。从图中可以看出,在这 20 个馏分当中, sub - fraction - 13、sub - fraction - 14、sub - fraction - 15、sub - fraction - 16 以及 sub - fraction - 17 具有较高的雌激素活性,其活性指标数据列于表 3 中 (Efficiency (E2%) 表示各样品相对于 E2 的最大酶活)。

sub - fraction - 13、sub - fraction - 14、sub - fraction - 15、sub - fraction - 16 以及 sub - fraction - 17 这 5 个馏分相对于雌二醇的最大酶活依次为 56.71、67.75、66.03、85.75 和 45.48。其中的 sub - fraction - 14、sub - fraction - 15 和 sub - fraction - 16,计算得到的 EC₅₀ 均达到了 10⁻⁵ g/L,尤其是当中的 sub - fraction - 16,其 EC₅₀ 值最低,为 5.6 × 10⁻⁵ g/L。

7. HPLC 分析 Hz001 - 03 制备高活性馏分的化学组成

对上述 5 个高雌激素活性馏分进行高效液相色谱分析,实验结果如图 8 所示,其中保留时间为

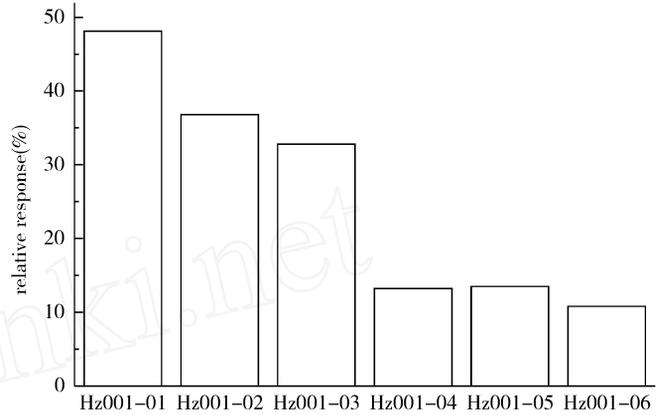


图 5 Hz001 - 01 - Hz001 - 06 酶活力比较

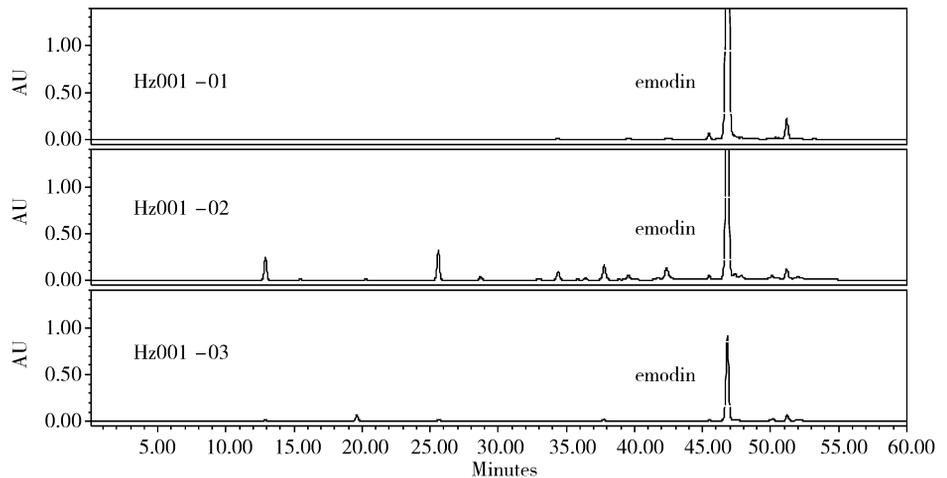


图 6 Hz001 - 01 - Hz001 - 03 液相分析色谱图

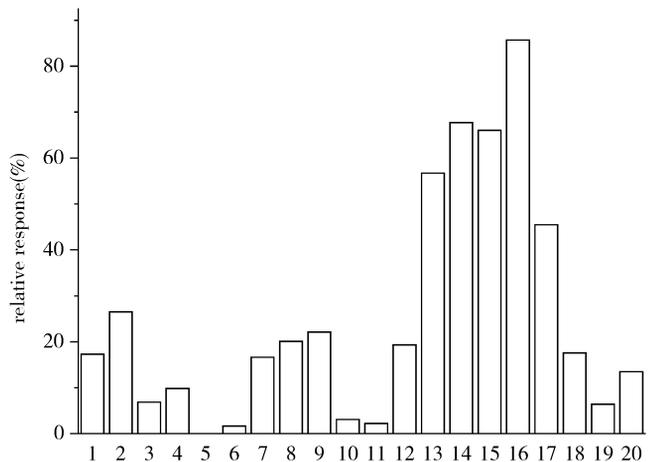


图 7 组分 Hz001 - 03 的高效液相色谱制备产物的雌激素活性比较

31.8min的色谱峰经与标准品对照为大黄素峰,保留时间为29min的色谱峰为溶剂甲醇的杂质峰。由图可知,sub-fraction-14、sub-fraction-15和sub-fraction-16中大黄素含量很高,sub-fraction-17中大黄素的含量相对比较少,而sub-fraction-13中几乎观察不到大黄素的存在。

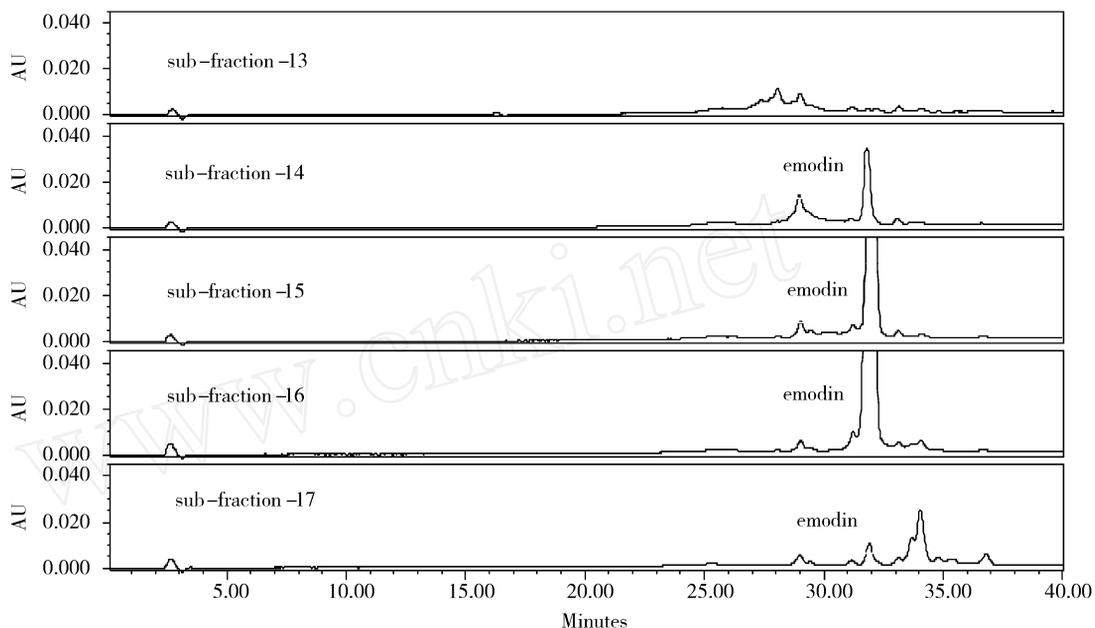


图8 组分 Hz001 - 03制备高活性组分 HPLC分析谱图

将化学组成与雌激素活性进行关联,发现 sub-fraction-14、sub-fraction-15和 sub-fraction-16的 EC₅₀均可达到 10⁻⁵ g/L,与大黄素标准品相同,因此推测它们的雌激素活性直接来源于大黄素。sub-fraction-13和 sub-fraction-17的 EC₅₀均为 10⁻³ g/L,但是化学组成相差很大,因此它们的活性来源不同,sub-fraction-17的活性与其残余的大黄素有关,而 sub-fraction-13中可能存在非大黄素的雌激素活性成分,进一步的富集、制备以及液质联用分析正在进行当中。

三、结论

根据极性差异,将虎杖70%乙醇冷浸提取物分为乙酸乙酯和水两个分配组分,其中雌激素活性成分-蒽醌类化合物主要集中在乙酸乙酯分配组分。

用硅胶柱层析技术,对虎杖乙酸乙酯分配组分进行放大制备。根据薄层检测情况,合并洗脱液得到六个组分,依次为 Hz001-01 - Hz001-06,其中 Hz001-01、Hz001-02和 Hz001-03具有较高的雌激素活性。结合液相分析的结果,确定 Hz001-01的活性来源主要是大黄素,而 Hz001-02和 Hz001-03中除大黄素以外,还含有其它一些复杂的化学成分,而且

Hz001-03中大黄素的含量相对比较少,组成也比较丰富。

对高雌激素活性组分 - Hz001-03,应用优化的洗脱条件在 Varian 高效液相制备仪上进行了高效液相色谱精制。根据时间间隔进行收集,共得到20个馏分。其中5个具有高雌激素活性,分别将其雌激素活性与化学组成进行关联,发现其中的 sub-fraction-13中可能存在非大黄素的雌激素活性成分。

参考文献

- 1 中国医学科学院药物研究所. 中药志(第一卷). 北京:人民卫生出版社,1978,441
- 2 潘明新,王晓阳. 虎杖的分析成分及其药理作用. 中药材,2000,23(1) 56~58
- 3 张海防,窦昌贵,顾菲菲. 虎杖清热解暑药理作用的研究进展. 中药材,2003,26(8) 606~610
- 4 冯雷. 虎杖研究新进展. 医药论坛杂志,2003,24(9) 78
- 5 宋丽华,肖洲生,周宏团. 植物性雌激素的研究进展. 国外医学药学分册,2003,30(1) 25~29
- 6 松田久司. 虎杖及大黄中的雌激素样活性成分:蒽醌类的结构与活性. 国外医学:中医中药分册,2002,24(5) 317
- 7 Hisashi Matsuda, Hiroshi Shimoda, Toshio Morikawa et al. Phytoestrogen

- gens from the Roots of *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae): Structure - Requirement of Hydroxyanthraquinones for Estrogenic Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2001, 11 1839 ~ 1842.
- 8 吕秋军, 吴祖泽, 白黎芦醇的雌激素活性及其分子机制研究进展. *中国药学杂志*, 2003, 38 (9) 651 ~ 653.
- 9 江文沁, 沈金芳. 白葫芦醇的药理活性及作用机制. *药学进展*, 2003, 27 (3) 159 ~ 162.
- 10 张彩宁, 张晓哲, 肖红斌, 等. 提取方法对 4 种中药雌激素活性的影响. *精细化工*, 2005, 22 (12) 903 ~ 905.
- 11 Wang J, Wu W, Henkelmann B, *et al* Presence of estrogenic activity from emission of fossil fuel combustion as detected by a recombinant yeast bioassay. *Atmospheric Environ*, 2003, 37 3225 ~ 3235.
- 12 Rehmann K, Schramm KW, Ketrup A. Applicability of a yeast oestrogen screen for the detection of oestrogen - like activities in environmental samples. *Chemosphere*, 1999, 38 3303 ~ 3312.
- 13 Balmelli - Gallacchi P, Schoumacher F, Liu JW, *et al* A yeast - based bioassay for the determination of functional and non - functional estrogen receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1386 (1) 121 ~ 131.
- 14 何世华, 梁增辉, 战威. 环境雌激素重组酵母测评系统的建立. *环境与健康杂志*, 2002, 19 (1) 57 ~ 59.

Preparation and Bioassay of Estrogenic Compounds in *Polygonum cuspidatum*

Zhang Caining, Wang Xunan

(Textile and Material Institute, Xi'an Polytechnic University, 710048 Xi'an, Shanxi)

Zhang Xiaozhe, Xiao Hongbin, Liang Ximiao

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, 116023 Dalian, Liaoning)

In this study, the Chinese herb - *Polygonum cuspidatum* was extracted using a 70% ethanol. The ethyl acetate fraction was isolated from the extract using silica gel column chromatography. Total six fractions were obtained. The recombinant yeast cells were used to determine estrogenic activities of the fractions. Experimental results showed that three fractions had a higher estrogenic activity, compared with the rest of fractions. Preparative high performance liquid chromatography was then employed to separate the active compound Hz001 - 03, from which 20 sub - fractions were produced. Among them, five sub - fractions were found with a higher estrogenic activity. The results of both bioassay and HPLC analysis have led to the conclusion that unknown bioactive compounds might exist in sub - fraction - 13.

Keywords: *Polygonum cuspidatum*; preparative high performance liquid chromatography; estrogenic activity; recombinant yeast

(责任编辑:王 瑀, 责任编审:张志华, 责任译审:邹春申)

中药复杂体系方法学及物质基础研究 成果获吉林省科技进步一等奖

由中科院长春应化所承担的“基于质谱学技术的中药复杂体系方法学及物质基础研究”,在国家科技部前期重大基础研究项目、国家自然科学基金和吉林省科技发展计划项目的资助下,经过科技人员的艰苦努力,取得了系列创新成果。2007年1月,该项目荣获吉林省科技进步一等奖。

中科院长春应化所的科研人员充分发挥质谱技术在中药

研究中的优势,围绕着中药复杂体系的方法学及物质基础开展了系统的研究工作,取得了一系列创新研究成果:他们合成不同内能的离子,从表现出不同的CD谱,获得不同层面的结构信息,成功地应用到寡糖、皂苷、黄酮类化合物分析;建立的某些中药化学成分几何异构体的质谱分析方法;基于非共价复合物研究建立了手性化合物异构体的质谱区分方法。与常规方法相比,具有灵敏度高、简捷、快速的特点。为中药复杂体系化学物质基础的研究奠定了基础。

(文 摘)