

## 基于谱-效关系的辽东楸木叶质量评价研究

邹淑君<sup>1</sup>, 贾力维<sup>1</sup>, 吕邵娃<sup>1</sup>, 管庆霞<sup>1</sup>, 张又天<sup>1</sup>, 李靖<sup>1</sup>, 许树军<sup>2\*</sup>

1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学 实验实训中心, 黑龙江 哈尔滨 150040

**摘要:** 目的 建立辽东楸木 *Aralia elata* 叶指纹图谱, 并寻找能够反映辽东楸木叶抗肿瘤活性能力的质量评价方法。方法 采用 70%乙醇和水饱和的正丁醇提取各批次辽东楸木叶总皂苷, 运用 HPLC-ELSD 测试分析皂苷并建立指纹图谱, MTT 法测试楸木叶总皂苷和单体皂苷对人肺腺癌 A549 细胞、人肝癌 SMMC-7221 细胞、人结肠癌 HT-29 细胞的抑制作用, 用灰色关联法分析指纹图谱峰与抗肿瘤作用之间的关系。结果 建立了含有 28 个共有峰的辽东楸木叶 HPLC-ELSD 指纹图谱, 各批次图谱与共有模式图谱间相似度在 0.850 以上, 指认并归属其中 5 个峰成分。各批次楸木叶总皂苷抗肿瘤作用的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration,  $IC_{50}$ ) 为 7.39~79.13 mg/L, 其中, 黑龙江凤凰山 7 月的样品抗肿瘤效果最佳。谱-效相关性表明 28 个共有峰成分与抗肿瘤活性的关联度为 0.469 2~0.810 3, 其中 10 个成分与抗肿瘤活性间的关联度大于 0.70, 8 个成分与抗肿瘤活性间的关联度小于 0.60。图谱中有 2 个峰成分在各批次药材中含量都相当大, 但谱-效关联度却很小。5 个已知的峰成分中, 楸木皂苷 TTP 和楸木皂苷 V 抗肿瘤作用的  $IC_{50}$  均小于 190 mg/L, 楸木皂苷 IV、VI、VII 抗肿瘤作用的  $IC_{50}$  均大于 200 mg/L。结论 辽东楸木叶 HPLC 指纹图谱及抗肿瘤相关性分析可以为辽东楸木叶的质量评价提供参考。若从已知的 5 种楸木皂苷中挑选质量控制成分, 楸木皂苷 TTP 和 V 要优于楸木皂苷 IV、VI、VII。

**关键词:** 辽东楸木叶; HPLC 指纹图谱; 抗肿瘤作用; 灰关联分析; 楸木皂苷 IV; 楸木皂苷 V; 楸木皂苷 VI; 楸木皂苷 VII; 楸木皂苷 TTP

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)07-2172-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.07.017

## Quality evaluation of *Aralia elata* leaves based on spectrum-effect relationship

ZOU Shu-jun<sup>1</sup>, JIA Li-wei<sup>1</sup>, LYU Shao-wa<sup>1</sup>, GUAN Qing-xia<sup>1</sup>, ZHANG You-tian<sup>1</sup>, LI Jing<sup>1</sup>, XU Shu-jun<sup>2</sup>

1. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Laboratory Training Center, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

**Abstract: Objective** To establish the fingerprint of *Aralia elata* leaves and find a quality evaluation method that can reflect the anti-tumor activity of *Aralia elata* leaves. **Methods** Total saponins were extracted from *A. elata* leaves in each batch with 70% ethanol and *n*-butanol. HPLC-ELSD was used to analyze saponins and establish fingerprint combined with the similarity analysis. MTT method was used to test the inhibitory effect of total saponins and monomer saponins of *A. elata* leaves on A549, SMMC-7221 and HT-29 cells. The relationship between the fingerprints and antitumor effect was analyzed by gray correlation analysis. **Results** The HPLC-ELSD fingerprint of *A. elata* leaves containing 28 common peaks was established. The similarity between each batch map and common pattern map was above 0.850, and five peak components were identified and assigned. The half inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of each batch of total saponins in anti-tumor effect was (7.39—79.13) mg/L, among which, the samples from Fenghuang mountain in Heilongjiang Province had good anti-tumor effect, and the samples from July had good anti-tumor effect. The results of correlation between spectrum and effect showed that the correlation degree between 28 common peak components and anti-tumor activity was 0.469 2—0.810 3. The correlation coefficient between 10 peaks and anti-tumor activity was greater than 0.70, and the correlation degree between eight peaks and anti-tumor activity was less than 0.60. There were two peaks in the spectrum, which were quite large

收稿日期: 2022-11-28

基金项目: 黑龙江省中医药管理局项目 (ZHY18-076); 中国博士后科学基金项目 (2014M551289); 黑龙江中医药大学药学院本科科研专项 (2019BK09); 黑龙江中医药大学优秀青年骨干教师项目 (2020GG26); 黑龙江省中医药管理局项目 (ZHY2020-078)

作者简介: 邹淑君, 副教授, 博士, 研究方向为药物分析。E-mail: zou\_sj1974@163.com

\*通信作者: 许树军, 高级实验师, 博士, 研究方向为中药质量标准。Tel: 18745043661 E-mail: 1529548631@qq.com

in each batch of medicinal materials, but the spectrum effect correlation was very small. Among the five known saponins, IC<sub>50</sub> of *A. elata* saponin TTP and *A. elata* V in anti-tumor effect were less than 190 mg/L, IC<sub>50</sub> of *A. elata* saponin IV, VI and VII in anti-tumor effect were greater than 200 mg/L. **Conclusion** HPLC fingerprint of *A. elata* leaves and correlation analysis of anti-tumor can provide reference for quality evaluation of *A. elata* leaves. If the quality control components are selected from the five known aralia saponins, *A. elata* saponins TTP and V are superior to *A. elata* saponins IV, VI and VII.

**Key words:** *Aralia elata* (Miq.) Seem. leaves; HPLC fingerprint; anti-tumor activity; grey relational analysis; *Aralia elata* saponin IV; *Aralia elata* saponin V; *Aralia elata* saponin VI; *Aralia elata* saponin VII; *Aralia elata* saponin TTP

辽东槲木 *Aralia elata* (Miq.) Seem. 又名龙牙槲木、刺龙牙、刺老芽等，为五加科槲木属植物<sup>[1-2]</sup>，在中国、日本、朝鲜、韩国、俄罗斯等区域均有分布<sup>[1-4]</sup>，尤其在我国东北地区资源丰富且有人工大量栽培<sup>[4]</sup>。辽东槲木为药食两用植物，嫩芽是营养丰富的绿色食品，根和植株的皮作为民间药用于治疗上腹痛、失眠多梦和关节炎等<sup>[3]</sup>，叶用于治疗水肿和腹泻<sup>[2]</sup>，果实用于治疗关节疼痛、痛经和瘀伤<sup>[2]</sup>。研究表明，辽东槲木不同部位含有丰富的三萜皂苷类活性成分<sup>[4-7]</sup>，且其皂苷类成分有抗氧化<sup>[8-9]</sup>、抗肿瘤<sup>[10]</sup>、抗炎<sup>[11]</sup>、抗病毒<sup>[12]</sup>、抗心血管疾病<sup>[13-14]</sup>、保肝<sup>[15-16]</sup>、抗糖尿病及其并发症<sup>[17-18]</sup>、保护神经<sup>[19]</sup>等多种药理活性。其中以辽东槲木皂苷为原料的龙牙肝泰胶囊（批准文号 B20020945）在临床上用于肝炎、肝硬化、肝癌的辅助治疗<sup>[20-21]</sup>。

辽东槲木叶每年可再生，是更丰富的可持续应用资源。近些年，学者们已经证明从辽东槲木叶中提取的皂苷对多种肿瘤细胞都具有良好的生长抑制或杀伤作用<sup>[10]</sup>，且安全无毒<sup>[22-23]</sup>。目前，由辽东槲木叶总皂苷组成的制剂作为抗肿瘤辅助药物受到关注。为了有效利用辽东槲木叶资源及其抗肿瘤作用，建立体现辽东槲木叶抗肿瘤效果的质量评价及控制方法有重要意义。鉴于课题组前期研究证明 7~9 月份的辽东槲木叶三萜皂苷成分种类丰富，且含量高<sup>[24]</sup>，本研究采收我国东北不同地区 7~9 月份的辽东槲木叶药材进行分析，通过测试不同产地、

不同采收期的辽东槲木叶总皂苷的 HPLC 谱分析共有成分，建立指纹图谱；测试和分析不同产地、不同采收期的辽东槲木叶皂苷抗肿瘤作用效果的差异，分析抗肿瘤作用与采收时间和地点的关系；将各批次药材的抗肿瘤效果与指纹图谱共有峰进行关联，阐释谱-效相关性，进一步确定辽东槲木叶药材抗肿瘤作用的代表性成分，从而为辽东槲木叶质量评价方法的建立提供依据。

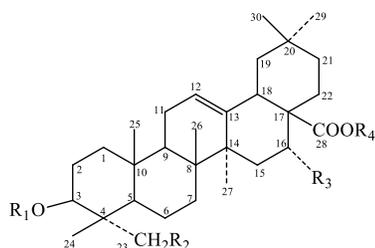
## 1 材料

### 1.1 细胞

人肺腺癌 A549 细胞、人肝癌 SMMC-7221 细胞、人结肠癌 HT-29 细胞由中国医学科学院肿瘤医院细胞库提供。

### 1.2 药品与试剂

槲木皂苷IV、槲木皂苷V、槲木皂苷VI、槲木皂苷VII、槲木皂苷 TTP 均由黑龙江中医药大学教育部中药重点实验室吕邵娃教授分离，并经 EI-MS、<sup>1</sup>H-NMR 和 <sup>13</sup>C-NMR 鉴别，HPLC 检测质量分数均大于 98%，结构见图 1；色谱纯乙腈（批号 106246）、色谱纯甲醇（批号 82661）购自美国 Dikama 公司；娃哈哈纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司；MTT（批号 MKBL6647V）购自美国 Sigma 公司；RPMI 1640 培养基（批号 11875093）、胰蛋白酶（批号 LM1022）、胎牛血清（批号 10099141C）购自德国贝尔公司；PBS 缓冲液（pH 7.4，批号 20200328）购自深圳逗点生物技术有限公司；其余试剂为国产



槲木皂苷IV	$R_1 = \text{glc} \begin{matrix} \nearrow \\ \searrow \end{matrix} \text{glc} \begin{matrix} \nearrow \\ \searrow \end{matrix} \text{glc}$	$R_2 = \text{H}$	$R_3 = \text{OH}$	$R_4 = \text{glc}$
槲木皂苷VI	$R_1 = \text{glc} \begin{matrix} \nearrow \\ \searrow \end{matrix} \text{glc}$	$R_2 = \text{H}$	$R_3 = \text{OH}$	$R_4 = \text{glc}$
槲木皂苷VII	$R_1 = \text{glc} \begin{matrix} \nearrow \\ \searrow \end{matrix} \text{glc}$	$R_2 = \text{OH}$	$R_3 = \text{H}$	$R_4 = \text{glc}$
槲木皂苷 TTP	$R_1 = \text{glc} \begin{matrix} \nearrow \\ \searrow \end{matrix} \text{glc} \begin{matrix} \nearrow \\ \searrow \end{matrix} \text{glc}$	$R_2 = \text{H}$	$R_3 = \text{H}$	$R_4 = \text{glc}$
槲木皂苷V	$R_1 = \text{glc} \begin{matrix} \nearrow \\ \searrow \end{matrix} \text{glc}$	$R_2 = \text{H}$	$R_3 = \text{H}$	$R_4 = \text{glc}$

图 1 5 种三萜皂苷的结构式

Fig. 1 Structural formula of five triterpenoid saponins

通用分析纯试剂。

### 1.3 药材

15批辽东槲木叶采自我国东北地区，具体信息见表1，经黑龙江中医药大学药学院王振月教授鉴定为辽东槲木 *A. elata* (Miq.) Seem. 的叶，标本保存于黑龙江中医药大学药学院教育部中药重点实验室。

表1 辽东槲木叶药材信息

Table 1 Information of *A. elata* leaves

批号	产地	采收时间
S1	黑龙江齐齐哈尔	2017-07-16
S2	黑龙江哈尔滨	2017-08-15
S3	黑龙江帽儿山	2017-07-13
S4	黑龙江帽儿山	2017-08-13
S5	黑龙江帽儿山	2017-09-13
S6	黑龙江宝清	2017-07-16
S7	黑龙江绥棱	2017-08-13
S8	黑龙江凤凰山	2017-07-15
S9	黑龙江凤凰山	2017-08-15
S10	黑龙江凤凰山	2017-09-15
S11	吉林通化市	2017-07-16
S12	吉林通化市	2017-08-16
S13	吉林通化市	2017-09-16
S14	辽宁鞍山市	2017-08-13
S15	辽宁抚顺市	2017-08-13

### 1.4 仪器

AL204型电子天平、XS105DU型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司); SK250LH型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); 高效液相色谱仪(日本Hitachi公司), 其配备有高压力的二元梯度溶剂输送泵、ELSD检测器; HF90/HF240型培养箱(上海力申科学仪器有限公司); CX31型倒置显微镜(日本Olympus公司); ELx800型酶标仪(美国Bio-Tek公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 样品的制备

每批辽东槲木叶干燥、粉碎、过60目筛, 精密称取2.5g粉末, 置于250mL带塞锥形瓶中, 加70%乙醇150mL, 超声提取0.5h, 冷却, 称定质量, 70%乙醇补足质量, 摇匀, 滤过, 精密量取滤过液25mL于蒸发皿中浓缩至干, 加5mL水, 超声混悬后用5mL水饱和的正丁醇萃取3次, 合并萃取液, 蒸干得到固体总皂苷混合物。

量取0.030g固体总皂苷混合物置于10mL量瓶中, 加甲醇溶解, 定容, 摇匀, 经0.22μm的有机过滤头滤过, 滤液作为测试HPLC图谱的溶液。

精密称取5种对照品各2.00mg, 分别置于10mL量瓶中加甲醇至刻度, 摇匀, 制得各质量浓度均为0.20g/L的对照品溶液。

另取各批次辽东槲木叶总皂苷0.020g, 先用少量二甲基亚砷溶解, 再用水稀释得400mg/L作为抗肿瘤实验用的初始质量浓度样品, 对照品也同法配制。

### 2.2 指纹图谱的建立

**2.2.1 色谱条件** Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(250mm×4.6mm, 5μm), 柱温30℃; 进样量10μL; 流动相为乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱: 0~5min, 10%~20%A; 5~10min, 20%~25%A; 10~20min, 25%~27%A; 20~50min, 27%~30%A; 50~65min, 30%~38%A; 65~70min, 38%~40%A; 70~80min, 40%~50%A; 80~90min, 50%~100%A; 体积流量0.8mL/min。蒸发光散射检测器(evaporative light scattering director, ELSD)的漂移管温度110℃, 空气体积流量3.2L/min。

**2.2.2 精密度考察** 将S2样品按“2.1”项下方法制备溶液, 按“2.2”项下色谱条件连续进样测试5次, 色谱图的主要色谱峰相对峰面积的RSD均小于1.5%, 相对保留时间的RSD均小于0.8%, 说明方法精密度良好。

**2.2.3 稳定性考察** 将S2样品按“2.1”项下方法制备溶液, 按“2.2”项下色谱条件分别在0、4、8、16、24h测定样品溶液的色谱图, 各主要色谱峰相对峰面积的RSD均小于2.0%, 相对保留时间RSD均小于1.0%, 表明样品稳定性良好。

**2.2.4 重复性考察** 按“2.1”项下方法平行制备S2样品溶液5份, 按“2.2”项下色谱条件测试, 5份样品色谱图相对峰面积的RSD均小于3.0%, 相对保留时间RSD均小于0.8%, 表明方法重现性均良好。

**2.2.5 指纹图谱建立及部分峰的指认** 15批辽东槲木叶按照“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件测试并采集HPLC信号。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统2012A版将15批样品的HPLC谱图进行分析, 以S10号为参照图谱, 设定时间窗宽度为0.5min, 进行图谱峰匹配。以中位数法生成标准图谱和对照图谱。将分离度好、峰面积占总峰面积比大于0.5%的色谱峰作为共有峰, 确定28个共有峰。各共有峰保留时间相对稳定, 具有指纹图谱特征性, 可以作为指纹成分群, 见图2。相同条件下测试和采集5种三萜皂苷的HPLC信号并进行比较, 确定图谱中的9号峰是槲木皂苷IV,

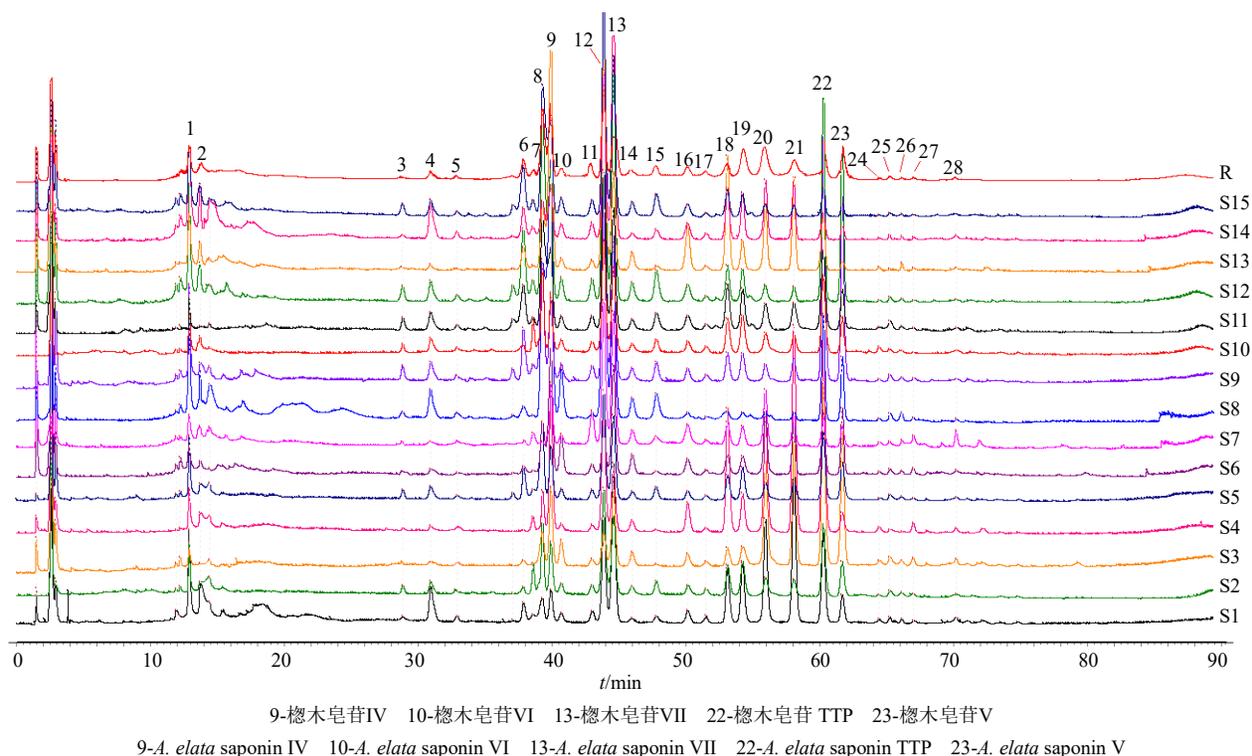


图 2 15 批辽东椴木叶药材的 HPLC-ELSD 指纹图谱

Fig. 2 HPLC-ELSD fingerprint of 15 batches of *A. elata* leaves

10 号峰是椴木皂苷VI, 13 号峰是椴木皂苷VII, 22 号峰是椴木皂苷 TTP, 23 号峰是椴木皂苷V。指纹图谱共有模式峰及已知成分的特征峰见图 2 中的 R 曲线。

**2.2.6 指纹图谱相似度分析** 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版对 15 批辽东椴木叶样品指纹图谱相似度进行评价, 各批次药材从 S1~S15 与共有模式(R)之间的相似度分别为 0.936、0.932、0.928、0.943、0.897、0.942、0.873、0.855、0.958、0.961、0.905、0.926、0.937、0.910、0.912, 说明不同批次的药材各成分含量有较大差别。这可能是随着生长时间的变化, 皂苷的糖链发生变化所致; 另外, 不同地区的气候条件差异也应该对成分含量有很大影响。

**2.3 不同批次药材总皂苷及单体皂苷抗肿瘤作用**

**2.3.1 抗肿瘤测试及分析方法** 常规方法培养 A549、SMMC-7221、HT-29 肿瘤细胞, 取对数生长期的细胞, 调整为  $1 \times 10^5$  个/mL 的混悬液, 置于 96 孔板中, 每孔 100  $\mu$ L, 在培养箱中培养 24 h 后, 设置样品组及空白组。样品组分别以质量浓度为 200、100、50、25、12.5、6.25 mg/L 的不同批次辽东椴木叶总皂苷或质量浓度为 400、200、100、50、25、

12.5 mg/L 的 5 种单体皂苷加入不同孔中, 每孔 100  $\mu$ L, 平行设置 6 个复孔, 空白组加入 100  $\mu$ L 培养基。加样后培养 48 h, 然后每孔加入 MTT 20  $\mu$ L, 继续培养 4 h 后每孔加入二甲亚砜 150  $\mu$ L, 摇匀, 490 nm 下测定吸光度(A)值。采用抑制率和半数抑制浓度(half inhibitory concentration,  $IC_{50}$ )表示样品对细胞的抑制作用, 再用 SPSS 20.0 分析样品对肿瘤细胞作用的  $IC_{50}$ 。

$$\text{细胞抑制率} = 1 - A_{\text{样品}} / A_{\text{空白}}$$

**2.3.2 不同批次药材及单体皂苷抗肿瘤效果** 对 15 批辽东椴木叶药材提取的总皂苷抑制 A549、SMMC-7221、HT-29 细胞生长进行测试及数理分析, 不同批次辽东椴木叶药材、几种单体皂苷对肿瘤细胞株的抑制率及  $IC_{50}$  的结果见表 2、3。

从抑制率及  $IC_{50}$  看, 辽东椴木叶药材抑制 A549 细胞的能力大小为  $S8 > S9 \approx S10 \approx S11 > S3 \approx S12 > S13 > S6 \approx S4 > S5 > S7 > S2 > S1 > S15 > S14$ 。采收于辽宁鞍山 8 月的 S14、辽宁抚顺 8 月的 S15、齐齐哈尔 7 月的 S1、哈尔滨 8 月的 S2 及绥棱 8 月的 S7 对 A549 细胞的抑制作用较弱, 其他批次样品对 A549 抑制作用均较强。

辽东椴木叶药材抑制 SMMC-7221 细胞的能力

表 2 辽东槲木叶药材对 A549、SMMC-7221 和 HT-29 细胞的抑制率及 IC<sub>50</sub>  
 Table 2 Inhibition rate and IC<sub>50</sub> of *A. elata* leaves on A549, SMMC-7221 and HT-29 cells

批号	质量浓度/ (mg·L <sup>-1</sup> )	A549 细胞		SMMC-7221 细胞		HT-29 细胞	
		抑制率/%	IC <sub>50</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )	抑制率/%	IC <sub>50</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )	抑制率/%	IC <sub>50</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )
S1	200	69.6	54.39	72.8	67.09	74.9	60.14
	100	64.7		60.7		67.3	
	50	49.9		44.8		45.1	
	25	36.4		27.9		27.2	
	12.5	26.1		14.3		15.3	
	6.25	10.7		7.1		8.8	
S2	200	78.5	49.15	87.7	52.97	74.8	65.73
	100	68.9		67.5		69.4	
	50	52.6		43.5		39.6	
	25	34.1		29.1		21.0	
	12.5	22.2		13.3		12.6	
	6.25	5.4		8.8		7.9	
S3	200	81.9	11.55	82.4	17.18	89.1	8.97
	100	79.8		78.8		87.9	
	50	66.0		76.6		85.3	
	25	62.5		74.0		79.4	
	12.5	50.1		40.8		62.7	
	6.25	41.3		20.6		30.4	
S4	200	86.2	13.18	75.7	35.66	89.7	11.72
	100	84.0		70.3		88.9	
	50	81.3		60.4		82.3	
	25	56.9		44.3		74.6	
	12.5	48.0		28.5		55.0	
	6.25	36.7		20.3		27.1	
S5	200	85.1	21.77	77.2	32.17	77.9	34.28
	100	83.3		74.4		73.3	
	50	80.2		69.8		65.7	
	25	54.6		38.3		45.4	
	12.5	34.9		29.1		27.2	
	6.25	18.7		20.8		14.8	
S6	200	88.9	13.15	81.2	36.84	76.0	23.98
	100	88.6		71.0		74.2	
	50	83.6		64.5		71.0	
	25	79.5		40.1		51.2	
	12.5	45.1		23.4		37.2	
	6.25	25.0		15.3		25.4	
S7	200	74.9	34.52	71.2	65.19	75.5	51.91
	100	68.6		62.9		67.1	
	50	64.2		46.0		52.4	
	25	46.9		28.7		33.5	
	12.5	34.6		14.3		18.1	
	6.25	13.1		10.6		10.8	
S8	200	88.4	8.64	80.2	14.71	90.3	7.39
	100	88.3		77.2		88.5	
	50	84.5		74.2		84.3	
	25	79.7		71.9		80.2	
	12.5	69.0		48.8		66.8	
	6.25	27.2		25.3		35.4	
S9	200	87.6	10.79	83.3	15.34	91.0	9.88
	100	86.1		79.3		90.0	
	50	83.9		78.3		88.5	
	25	76.9		69.2		83.4	
	12.5	50.2		44.8		60.5	
	6.25	32.6		25.9		25.8	
S10	200	88.3	10.83	84.7	20.66	90.0	10.16
	100	87.1		83.9		89.7	
	50	82.9		83.3		86.4	
	25	77.9		67.3		77.7	
	12.5	54.2		25.5		58.8	
	6.25	29.4		18.5		28.7	

续表 2

批号	质量浓度/ (mg·L <sup>-1</sup> )	A549 细胞		SMMC-7221 细胞		HT-29 细胞	
		抑制率/%	IC <sub>50</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )	抑制率/%	IC <sub>50</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )	抑制率/%	IC <sub>50</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )
S11	200	87.0	10.90	76.3	40.19	89.6	11.05
	100	84.1		73.3		88.8	
	50	75.6		72.5		85.3	
	25	69.0		35.6		72.9	
	12.5	64.2		17.6		56.0	
	6.25	28.0		9.9		29.3	
S12	200	86.9	11.89	78.5	42.45	86.1	15.58
	100	85.5		76.2		83.9	
	50	84.6		56.7		74.6	
	25	79.5		30.5		61.4	
	12.5	55.7		22.4		45.9	
	6.25	22.1		15.3		29.3	
S13	200	85.3	12.19	77.6	48.93	78.8	36.57
	100	85.4		72.5		75.7	
	50	84.5		59.9		65.4	
	25	76.9		28.2		39.7	
	12.5	52.4		12.3		23.5	
	6.25	24.5		10.6		13.9	
S14	200	65.3	78.43	69.9	79.13	73.0	56.82
	100	51.3		54.3		65.1	
	50	43.8		39.5		53.9	
	25	39.9		27.3		29.5	
	12.5	15.8		17.9		16.1	
	6.25	3.9		5.8		9.7	
S15	200	86.4	62.25	66.9	85.13	64.0	62.16
	100	79.2		52.3		59.7	
	50	28.1		41.7		50.5	
	25	15.3		25.1		38.6	
	12.5	9.9		16.3		25.2	
	6.25	2.1		6.5		11.3	

表 3 5种单体皂苷对 A549、SMMC-7221 和 HT-29 细胞的抑制率及 IC<sub>50</sub>

Table 3 Inhibition rate and IC<sub>50</sub> of five monomer saponins on A549, SMMC-7221 and HT-29 cells

皂苷	质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	A549 细胞		SMMC-7221 细胞		HT-29 细胞	
		抑制率/%	IC <sub>50</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )	抑制率/%	IC <sub>50</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )	抑制率/%	IC <sub>50</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )
楸木皂苷IV	400	58.1	274.72	53.9	265.61	58.8	404.79
	200	38.5		47.4		27.9	
	100	33.4		34.6		21.5	
	50	28.4		20.6		15.7	
	25	20.6		12.6		10.1	
	12.5	4.5		6.5		4.8	
楸木皂苷VI	400	63.5	337.49	55.6	368.65	64.1	204.25
	200	23.2		29.1		50.8	
	100	16.4		23.1		32.4	
	50	10.2		17.4		23.9	
	25	4.1		8.4		11.9	
	12.5	2.1		2.3		6.1	
楸木皂苷VII	400	38.9	594.92	48.2	419.40	46.8	416.39
	200	29.3		33.3		35.6	
	100	24.8		22.2		32.2	
	50	16.1		10.4		24.6	
	25	5.2		7.9		13.5	
	12.5	2.7		2.7		4.7	
楸木皂苷 TTP	400	63.7	148.72	68.9	122.04	75.9	74.67
	200	59.1		54.8		68.9	
	100	49.4		49.5		50.1	
	50	28.9		45.5		43.6	
	25	15.5		20.8		38.5	
	12.5	4.9		7.8		18.1	
楸木皂苷V	400	69.3	183.32	56.6	188.85	72.6	148.21
	200	50.6		51.9		50.4	
	100	32.1		40.7		39.4	
	50	27.2		28.3		35.1	
	25	12.5		17.5		21.8	
	12.5	3.3		6.9		6.4	

大小为 S8>S9>S3>S10>S5>S4≈S6>S11>S12>S13>S2>S7>S1>S14>S15。其中,帽儿山 7 月的 S3 和凤凰山 7~9 月的 S8~S10 对 SMMC-7221 细胞抑制作用较强。辽宁鞍山 8 月的 S14 及辽宁抚顺 8 月的 S15 对 SMMC-7221 细胞的抑制效果最弱,其他批次抑制作用相对较弱。

辽东椴木叶药材抑制 HT-29 细胞的能力大小为 S8>S3>S9>S10>S11≈S4>S12>S6>S5>S13>S7>S14>S1>S15>S2。其中,采收于帽儿山 7、8 月的 S3、S4,凤凰山 7~9 月的 S8~S10,吉林通化 7、8 月的 S11、S12,对 HT-29 细胞抑制作用较强,其他批次抑制 HT-29 细胞作用相对较弱。

综合表 2 可见,不同批次药材总皂苷抑制肿瘤效果随着浓度的增加而增强。样品抗肿瘤作用强弱与采收地区及时间有一定的关系,从采收地区看,凤凰山的辽东椴木叶总皂苷对 3 种肿瘤的抑制效果均比较好,内在品质比较高。从采收时间来看,7 月份的药材品质更好一些。

由表 3 可见,椴木皂苷 IV、VI、VII、TTP、V 对 3 种肿瘤细胞的抑制作用效果都远不如总皂苷效果好。这也证明了中药的药效作用是多成分协同作用的结果,某个或某几个成分达不到药材整体的效果。但是,每一个成分对中药整体药效发挥的贡献应该有所不同。5 种单体成分中,椴木皂苷 IV、VI 对 3 种肿瘤细胞的 IC<sub>50</sub> 均在 200 mg/mL 以上,抗肿瘤效果较弱。椴木皂苷 VII 对 3 种肿瘤细胞的 IC<sub>50</sub> 均在 400 mg/mL 以上,该单体效果很弱,可以认为无实际应用意义。椴木皂苷 TTP 对 3 种肿瘤细胞的

IC<sub>50</sub> 均在 150 mg/mL 以下,抑制效果最好。椴木皂苷 V 对 3 种肿瘤细胞的 IC<sub>50</sub> 均在 200 mg/mL 以下,效果仅次于椴木皂苷 TTP。5 种已知的三萜皂苷中,椴木皂苷 TTP 和椴木皂苷 V 应该对辽东椴木叶总皂苷的抗肿瘤作用贡献程度较大。

### 2.4 灰关联法分析指纹图谱与抗肿瘤效果之间的相关性

利用 Excel 2007 软件进行灰关联法分析 HPLC 指纹图谱与肿瘤抑制作用的相关性。将 15 批次辽东椴木叶皂苷 HPLC 指纹图谱中各共有峰峰面积进行均数化处理获取量化特征峰数据,特征峰数据为各峰面积与各个峰平均面积的比值,用 X<sub>i</sub>(k) 表示,作为比较序列。为了使灰关联分析中的参考序列与比较序列呈正相关关系,将不同批次的辽东椴木叶总皂苷对肿瘤细胞作用的 IC<sub>50</sub> 值取倒数作为参考序列,记为 X<sub>0</sub>(k)。则 X<sub>0</sub>(k) 与 X<sub>i</sub>(k) 的关联系数用 ζ<sub>0i</sub>(k) 表示,ζ<sub>0i</sub>(k) 反映 2 个被比较序列的相关程度。可由公式 (1) 进行计算。式中 Δ<sub>i</sub>(k)=|X<sub>0</sub>(k)-X<sub>i</sub>(k)|, Δ(min) 和 Δ(max) 分别表示所有比较序列绝对差中的最小值与最大值,ρ 为分辨系数,ρ∈(0,1),本研究选取 0.5<sup>[25]</sup>。按 2 个比较序列的关联系数的均值计算获取关联度,以 γ<sub>0i</sub> 表示,见公式 (2)。然后以 γ<sub>0i</sub> 为纵坐标,各共有峰峰号为横坐标,使用 Origin Pro9.1 建立柱状图,可清晰不同峰成分对抗肿瘤的贡献,见图 3。

$$\zeta_{0i}(k) = \frac{\Delta(\min) + \rho\Delta(\max)}{\Delta_i(k) + \rho\Delta(\max)}, \rho = (0, 1); k = 1, 2, \dots, 15 \quad (1)$$

$$\gamma_{0i} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n \zeta_{0i}(k), i = 1, 2, \dots, 28; n = 1, 2, \dots, 15 \quad (2)$$

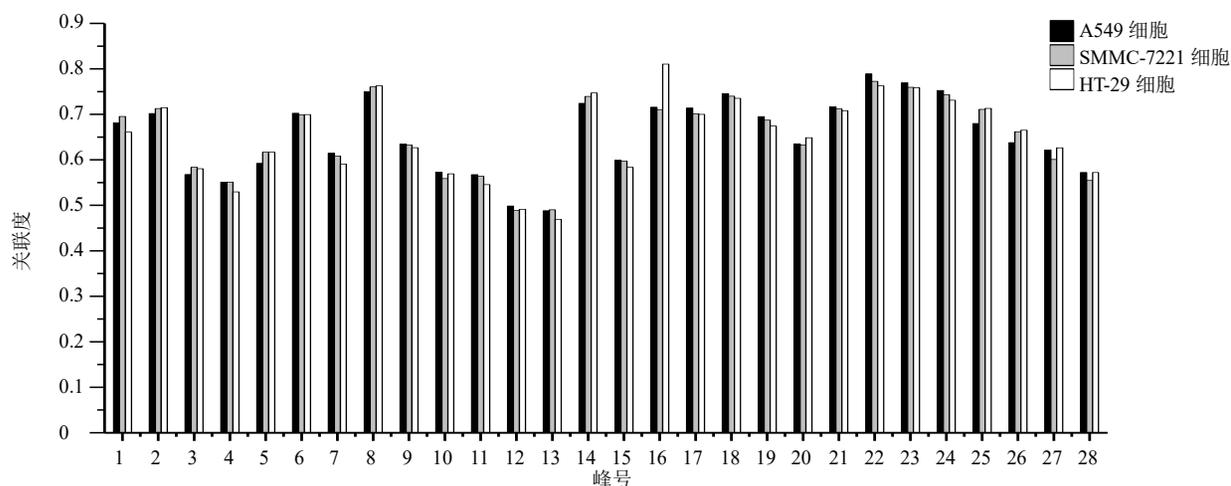


图 3 指纹图谱中各共有峰与抑制 A549、SMMC-7221、HT-29 细胞作用的关联度

Fig. 3 Correlation degree of each common peak in fingerprint with inhibition of A549, SMMC-7221 and HT-29 cells

由图 3 可见, 辽东椴木叶药材 HPLC 指纹图谱中的各峰成分对于抑制不同肿瘤细胞株的关联度大小不同, 关联度为 0.488 5~0.810 3。各共有峰抑制 A549 细胞的关联序为 22>23>24>8>18>14>16>17>21>6>2>19>1>25>26>20>9>27>7>15>5>10>28>3>11>4>12>13, 关联度在 0.7 以上的峰成分有 11 种; 抑制 SMMC-7221 细胞的关联序为 22>8>23>24>18>14>2>25>16>21>17>6>1>19>26>20>9>5>7>27>15>3>11>10>28>4>13>12, 关联度在 0.7 以上的峰成分有 11 种; 抑制 HT-29 细胞的关联序为 16>8>22>23>14>18>2>25>17>6>21>19>24>26>1>20>9>27>5>7>15>3>28>10>11>12>4>13, 关联度在 0.7 以上的峰成分有 10 种。其中 2、8、14、16~18、21~24 号峰对 3 种肿瘤细胞抑制作用关联度均在 0.70 以上, 3、4、10~13、15、28 号峰对 3 种肿瘤细胞抑制作用关联度均在 0.60 以下, 且 12、13 号峰成分对 3 种肿瘤细胞抑制作用的关联度均为最小, 都在 0.50 以下。

指纹图谱中, 9 号峰是椴木皂苷IV, 对 3 种肿瘤作用的关联度分别为 0.634 7、0.632 4、0.626 5。10 号峰是椴木皂苷VI, 关联度分别是 0.572 8、0.558 8、0.569 3。13 号峰是椴木皂苷VII, 关联度分别为 0.488 2、0.490 1、0.469 2。22 号峰是椴木皂苷 TTP, 关联度分别为 0.789 1、0.772 5、0.762 6。23 号峰是椴木皂苷 V, 关联度分别是 0.769 4、0.759 4、0.758 5。证明单体成分抑制 3 种肿瘤细胞效果越强, 则其指纹峰与抗肿瘤效果间关联度值也越大。说明关联度越大的峰成分, 对辽东椴木叶总皂苷抑制肿瘤作用的贡献越大。

### 3 讨论

在东北地区, 5 月上旬, 辽东椴木开始长出叶芽, 到 10 月上旬, 叶基本变黄脱落。在本工作前期, 通过 TLC 及 HPLC 法对东北地区 5~9 月份辽东椴木叶进行测试, 确定 5、6 月的成分数量远小于 7~9 月, 而 7~9 月成分数量基本一致, 因此选择 7~9 月的辽东椴木叶作为建立指纹图谱的药材研究对象。辽东椴木叶中以皂苷类成分为主<sup>[24]</sup>, 皂苷类物质往往无紫外吸收或只有微弱的末端紫外吸收, 因此用紫外检测器检测难以得到满意的结果, 而应用 ELSD 能够很好地检测皂苷类物质, 因此采用 HPLC-ELSD 法建立指纹图谱。本研究从东北三省 9 个地区收集 15 批次辽东椴木叶药材, 这些地

区相对来说具有比较丰富的辽东椴木资源, 且地区间距离较远, 因此所选药材具有广泛性。前期考察了常用色谱柱 Agilent HC-C<sub>18</sub> 柱、依利特 C<sub>18</sub> 柱、Diamonsil C<sub>18</sub> 柱, 甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-水溶液 3 种不同的溶剂系统, 25、30、35 °C 下的柱温色谱图, 0.6、0.8、1.0 mL/min 的体积流量条件, 也考察了多组梯度洗脱程序, 最终确定了本研究的色谱条件用来建立指纹图谱。依据本色谱条件测试了 15 批药材的 HPLC-ELSD 谱, 都能够稳定出现 28 个共有峰, 但不同批次药材中各个峰成分含量有一定差异, 有些峰成分含量相差较大, 表明生长期、地理气候条件差异都对成分含量有很大影响。因此, 指纹图谱相似度评价中尽管各批次与共有模式间的相似度均在 0.855 以上, 但不同批次的某些药材之间相似度比较小。

从不同批次辽东椴木叶药材对 A549、SMMC-7221 及 HT-29 细胞的抑制效果看, 不同地区同一时期的样品对肿瘤细胞生长抑制作用效果差别明显, 黑龙江凤凰山药材抗肿瘤作用效果明显好于其他地区。同一地区、不同采收期的样品对相同肿瘤细胞生长抑制作用整体表现出 7 月的药材好于 8、9 月。因此黑龙江凤凰山区域 7 月份的药材表现最佳。当然, 是否黑龙江凤凰山地区 7 月份的药材品质最好还需进一步考察才能明确。5 个归属峰单体皂苷对 3 种肿瘤细胞抑制作用均远不及辽东椴木叶总皂苷。说明辽东椴木叶药材总皂苷的良好效果应是多成分协同作用的结果。

通过灰关联法将不同批次药材抗肿瘤效果与指纹图谱中共有峰成分含量及数量联系到一起建立了谱-效相关性。相关分析确定指纹图谱 28 个共有峰成分对抗肿瘤作用均有一定关联。但 10 个关联度大于 0.70 的峰成分更有望成为辽东椴木叶药材抗肿瘤作用的质量控制成分或质量标志性成分。拟在接下来的工作中分离出这些成分进行进一步考察。5 个已知的三萜皂苷成分中, 抗肿瘤效果较好、且在谱-效关系中关联度也很大的椴木皂苷 TTP 和椴木皂苷V可成为辽东椴木叶作为抗肿瘤药材的质量评价和控制的指标性成分来应用。而抗肿瘤效果较弱、在谱-效关系中关联度也较小的椴木皂苷IV、VI、VII不能作为含量测定时的指标性成分来应用。值得关注的是指纹图谱中 12、13 号峰成分在各批次药材中含量都相当高, 是影响药材中总皂苷含量的重要因素, 但在谱-效相关性中关联度均很小, 且本研

究也证实 13 号峰成分对 3 种肿瘤细胞抑制作用都特别弱。因此,认为这 2 个峰成分不能成为辽东槲木叶的抗肿瘤作用质量评价成分。而含量高的成分往往会直接影响着总皂苷在原药材中的含量多少,由此也证明用总皂苷含量高低来评价辽东槲木叶的质量优劣是不够科学的。

本研究建立了辽东槲木叶化学指纹图谱,并在此基础上将数理统计分析方法与抗肿瘤效应联合,构建了以抗肿瘤作用为主要用途的辽东槲木叶的质量综合评价方法,方法具有合理性、可靠性。若以东北地区辽东槲木叶进行药用,建议于 7~9 月份采收,且药材能够稳定出现指纹图谱里 28 个共有峰成分或更多,表明皂苷类成分数量比较丰富、符合标准。若作为抗肿瘤药材使用,在不少于指纹图谱 28 个共有峰的基础上,共有峰中的 2、8、14、16~18、21~24 峰成分含量高抗肿瘤效果会更好,其中 22、23、8 号峰成分含量越大,且 12、13 号峰成分含量越小,则越是质量较优的抗肿瘤药材。若从本研究中涉及到的 5 个单体皂苷成分来看,槲木皂苷 TTP 和槲木皂苷 V 含量越高,且槲木皂苷 IV、VI、VII 含量越低是质量较优的抗肿瘤药材。因此,从本研究结果看,槲木皂苷 TTP 和槲木皂苷 V 可以视为辽东槲木叶抗肿瘤作用的质量控制成分。

**志谢:** 完成工作过程,肖洪彬教授、王秋红教授均提供帮助和指导。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Sun Y C, Li B M, Lin X T, *et al.* Simultaneous determination of four triterpenoid saponins in *Aralia elata* leaves by HPLC-ELSD combined with hierarchical clustering analysis [J]. *Phytochem Anal*, 2017, 28(3): 202-209.
- [2] 赵国平,戴慎,陈仁寿主编,南京中医药大学编著. 中药大辞典 [M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 885-886.
- [3] 中华本草编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 787-789.
- [4] 程瑶,于锡宏,佟雪姣,等. 辽东槲木活性成分与生态因子的相关性研究 [J]. 生态环境学报, 2019, 28(8): 1507-1513.
- [5] 张家鑫,田瑜,孙桂波,等. 龙牙槲木皂苷类成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(6): 770-779.
- [6] 李凤金,肖洪彬. 辽东槲木化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国中医药科技, 2015, 22(3): 353-355.
- [7] Zhang M, Liu G, Tang S H, *et al.* Effect of five triterpenoid compounds from the buds of *Aralia elata* on stimulus-induced superoxide generation, tyrosyl phosphorylation and translocation of cytosolic compounds to the cell membrane in human neutrophils [J]. *Planta Med*, 2006, 72(13): 1216-1222.
- [8] Tian Y Q, Zhao H T, Zhang X L, *et al.* Comparison of different extraction techniques and optimization of the microwave-assisted extraction of saponins from *Aralia elata* (Miq.) Seem fruits and rachises [J]. *Chem Pap*, 2020, 74(9): 3077-3087.
- [9] 张秀萍,孙达辰,肖洪彬. 辽东槲木叶总皂苷抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(11): 232-234.
- [10] Suh S J, Jin U H, Kim K W, *et al.* Triterpenoid saponin, oleanolic acid 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -l-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -l-arabinopyranoside (OA) from *Aralia elata* inhibits LPS-induced nitric oxide production by down-regulated NF- $\kappa$ B in raw 264.7 cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 467(2): 227-233.
- [11] 李凡,田同春,石艳春,等. 龙牙槲木总甙抗病毒作用研究 [J]. 中国中药杂志, 1994, 19(9): 562-564.
- [12] Xing X D, Yan M L, Zhang X J, *et al.* Quantitative analysis of triterpenoids in different parts of *Aralia elata* (Miq.) Seem. using HPLC-ELSD and their inhibition of human umbilical vein endothelial cell ox-LDL-induced apoptosis [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2017, 40(19): 984-990.
- [13] Wang R Y, Yang M H, Wang M, *et al.* Total saponins of *Aralia elata* (Miq.) Seem. alleviate calcium homeostasis imbalance and endoplasmic reticulum stress-related apoptosis induced by myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(1): 28-40.
- [14] Saito S, Ebashi J, Sumita S, *et al.* Comparison of cytoprotective effects of saponins isolated from leaves of *Aralia elata* Seem. (Araliaceae) with synthesized bisdesmosides of oleanolic acid and hederagenin on carbon tetrachloride-induced hepatic injury [J]. *Chem Pharm Bull*, 1993, 41(8): 1395-1401.
- [15] Luo Y, Dong X, Yu Y L, *et al.* Total aralosides of *Aralia elata* (Miq.) Seem. (TASAES) ameliorate nonalcoholic steatohepatitis by modulating IRE1 $\alpha$ -mediated JNK and NF- $\kappa$ B pathways in ApoE<sup>-/-</sup> mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 163: 241-250.
- [16] 宋少江,徐绥绪,曹颖林. 辽东槲木总皂苷降血糖作用研究 [J]. 中药研究与信息, 2005, 7(5): 7-9.
- [17] Kim Y S, Kim M, Choi M Y, *et al.* *Aralia elata* (Miq.) Seem. extract decreases O-GlcNAc transferase expression and retinal cell death in diabetic mice [J]. *J Med Food*,

- 2017, 20(10): 989-1001.
- [18] Zhang Y, Wang W, He H, *et al.* Triterpene saponins with neuroprotective effects from a wild vegetable *Aralia elata* [J]. *J Funct Foods*, 2018, 45: 313-320.
- [19] 张彦文. 龙牙肝泰胶囊治疗非酒精性脂肪肝 62 例的临床观察 [J]. 中医药信息, 2014, 31(1): 91-92.
- [20] 张彦文. 龙牙肝泰胶囊治疗中晚期肝癌临床疗效观察 [J]. 中医药学报, 2013, 41(3): 156-157.
- [21] Li F J, He X L, Niu W Y, *et al.* Sub-chronic safety evaluation of the ethanol extract of *Aralia elata* leaves in Beagle dogs [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2016, 79: 1-11.
- [22] Li F J, Wang W M, Xiao H B. The evaluation of anti-breast cancer activity and safety pharmacology of the ethanol extract of *Aralia elata* Seem. leaves [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2021, 44(4): 427-436.
- [23] 邹淑君, 许树军, 李靖, 等. 辽东楸木叶皂苷成分及其药理学研究进展 [J]. 中医药学报, 2017, 45(4): 111-114.
- [24] 邹淑君, 许树军, 孙楠, 等. 辽东楸木叶总皂苷高效薄层色谱指纹图谱分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 151-155.
- [25] Shen C H, Liu C T, Song X J, *et al.* Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Rubia cordifolia* L. by spectrum-effect relationships [J]. *J Chromatogr B*, 2018, 1090: 73-80.

[责任编辑 李亚楠]