

黑龙江凤凰山不同海拔及不同采收期辽东 椴木叶中2种皂苷类成分含量的比较

邹淑君¹, 许树军², 李靖¹, 吕邵娃¹, 肖洪彬^{2*}

(1. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学实验中心, 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:**比较黑龙江凤凰山地带不同海拔及不同采收期辽东椴木叶中三萜皂苷 3-O-[β -D-吡喃葡萄糖基(1 \rightarrow 2)] [β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)]- β -D-吡喃葡萄糖基-刺囊酸-28-O- β -D-吡喃葡萄糖酯(简称为 ECA)和 3-O- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)- β -D-吡喃葡萄糖基-齐墩果酸-28-O- β -D-吡喃葡萄糖酯(以下简称为 OLA)的含量,了解这一区域采收辽东椴木叶的最佳时间和海拔高度。**方法:**用反相高效液相色谱-蒸发光散射检测(HPLC-ELSD)法测试,色谱柱为 Diamonsil C₁₈(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),柱温 30 $^{\circ}$ C;流动相为乙腈、水二元梯度系统;进样量 10 μ L,流速 1.0 mL \cdot min⁻¹;载气流速 3.2 L \cdot min⁻¹;漂移管温度 110 $^{\circ}$ C。**结果:**两种三萜皂苷在各自测定的范围内均呈良好线性关系(r 均为 0.999 8),平均加样回收率分别为 97.71%, 98.06%。各批次供试品中 OLA 的含量都远高于 ECA。从 6 月初至 9 月初,两种皂苷含量几乎都呈递增趋势,6 月至 8 月增幅很大,差别显著,8 月至 9 月增幅较小,甚至略减;不同海拔高度条件下同时期的叶中两种皂苷含量没有显著性差异。**结论:**所用测试方法简单、快捷、重复性好,可为凤凰山地带辽东椴木叶的质量控制提供依据。

[关键词] 辽东椴木叶; 三萜皂苷; 不同海拔高度; 不同采收期; 含量比较

[中图分类号] R282.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)12-0033-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017120033

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170324.1413.024.html>

[网络出版时间] 2017-03-24 14:13

Content of Two Saponins in Leaves of *Aralia elata* from Different Altitudes and Different Gathering Periods of Fenghuang Mountain

ZOU Shu-jun¹, XU Shu-jun², LI Jing¹, LYU Shao-wa¹, XIAO Hong-bin^{2*}

(1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. Experiment Center, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the contents of 3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)] [β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl echinocystic acid-28-O- β -D-glucopyranosyl ester (ECA for short) and 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl oleanolic acid-28-O- β -D-glucopyranosyl ester (OLA for short) in leaves of *Aralia elata* collected from Fenghuang mountain of Heilongjiang Province in different altitudes and different gathering periods. **Method:** HPLC-ELSD was used to determine the content. The column was Diamonsil C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m). The column temperature was 30 $^{\circ}$ C. The mobile phase was the mixture liquid of acetonitrile and water for gradient elution. The sample size was 10 μ L, and the flow rate was 1.0 mL \cdot min⁻¹. The detector was HPLC-ELSD, the temperature of drift tube was 110 $^{\circ}$ C, and the flow rate of carrier gas was 3.2 L \cdot min⁻¹. **Result:** The two triterpenoid saponins showed a good linearity ($r = 0.999 8$) within their detection range, and the average recovery rate were 97.71% and 98.06%, respectively. The

[收稿日期] 20170212(009)

[基金项目] 中国博士后科学基金项目(2014M551289);国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09102-001-18)

[第一作者] 邹淑君, 博士, 副教授, 从事药物分析研究, Tel:18745043661, E-mail:zou_sj1974@163.com

[通讯作者] *肖洪彬, 硕士, 教授, 从事中药方剂及药理学研究, Tel:13804526660, E-mail:hrbxiaohongbin@126.com

results showed that the content of OLA was higher than ECA in various batches of samples. From June to September, the contents of the two saponins showed an increasing trend. The contents increased significantly from June to August, but slowly from August to September. In addition, there were no significant difference in content of the two saponins between high altitude and low altitude. **Conclusion:** The method is simple, rapid and reproducible, and can provide a basis for the quality control of leaves of *A. elata* from Fenghuang Mountain.

[Key words] leaves of *Aralia elata*; triterpenoid saponins; different altitudes; different gathering periods; comparison of contents

辽东槲木为五加科 *Araliaceae* 植物, 又名龙牙槲木, 别名刺老鸦、刺嫩芽等^[1], 广泛分布于中国东北地区。具有抗心律失常、抗肿瘤、抗炎、抗氧化、降血糖、保肝、抗疲劳、抑菌和抗病毒等广泛的药理活性^[2-4]。近几十年来, 人们从辽东槲木的不同部位分离鉴定出三萜皂苷类及多糖类等化合物 200 余种^[4,9]。其中, 三萜皂苷类成分是该植物的重要药效物质^[4]。以辽东槲木总皂苷为原料药的龙牙肝泰于 2002 年获国家食品药品监督管理局批准上市销售, 并在临床上广泛用于急性肝炎、慢性肝炎转氨酶偏高的辅助治疗^[10]。资源丰富且可再生的叶资源近年来越来越受到重视, 国内匡海学教授带领的团队对辽东槲木叶抗肿瘤作用进行系统研究, 证明其叶中提取的三萜皂苷能够抑制多种肿瘤细胞增长和提高免疫功能^[11]。并且其团队研发的以辽东槲木叶为原料的龙牙槲木叶胶囊(黑 20110042 Z)已作为黑龙江中医药大学附属医院的院内制剂用于临床上癌症患者的辅助治疗。随着研究的不断进行, 辽东槲木叶必将显示出更多医药用途。因此对辽东槲木叶的采收资源及质量评价与控制进行研究有重要意义, 能够为该药材的新药研发及临床应用提供参考。

我国黑龙江省的凤凰山位于长白山系张广才西坡, 是辽东槲木重要的天然采集地, 山脚处(海拔 430 m 左右)分布相对密集, 沿山上行至海拔 600 m 左右均有分布。随海拔继续增加, 分布相对稀少。3-*O*-[β -D-吡喃葡萄糖基(1 \rightarrow 2)] [β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)]- β -D-吡喃葡萄糖基-刺囊酸-28-*O*- β -D-吡喃葡萄糖酯(为 echinocystic acid 型三萜皂苷, 简称为 ECA)和 3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)- β -D-吡喃葡萄糖基-齐墩果酸-28-*O*- β -D-吡喃葡萄糖酯(为 oleanolic acid 型三萜皂苷, 简称为 OLA)在辽东槲木叶中都有一定的含量(2 种三萜皂苷的结构式见图 1, 其中-glc 代表 β -D-葡萄糖吡喃糖基)。且经本实验室研究人员确定辽东槲木叶抗肿瘤有效部位中 2 种皂苷含量与抑制肿

瘤细胞生长效果有一定的相关性^[12]。因此, 以这两种皂苷的含量评价控制辽东槲木叶的质量有重要意义。由于海拔高度、采收期等因素都会对成分及其含量造成影响。因此本文采用高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD)对凤凰山上下两处海拔高度及不同采收期的辽东槲木叶中 ECA 和 OLA 的含量进行测定, 为确定该区域辽东槲木叶作为药材的最佳采集高度及最佳采收期提供依据。

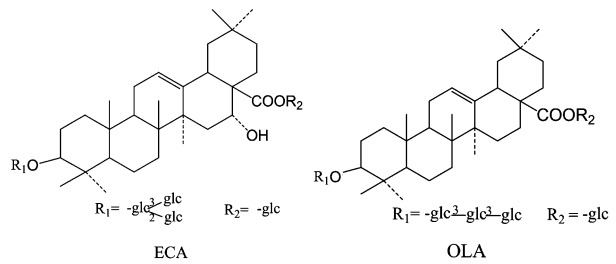


图 1 ECA 与 OLA 的结构式
Fig.1 Structure of ECA and OLA

1 材料

L-3000 型高效液相色谱仪(日本株式会社日立高新技术公司), ELSD-2000ES 型蒸发光散射检测器(美国奥泰科技中国有限公司)。

辽东槲木叶分别于 2014 年, 2015 年和 2016 年的 6, 7, 8, 9 月上旬采于黑龙江省五常市山河屯林业局凤凰山林区内的山下(海拔 430 m 左右)及山上(海拔 580 m 左右)。经黑龙江中医药大学药用植物学教研室樊瑞峰副教授鉴定为五加科植物辽东槲木 *Aralia elata* 的叶, 晾干后使用。对照品 ECA 和 OLA 由黑龙江中医药大学中药化学实验室自制(经 HPLC 面积归一化法检测, 纯度均 > 99%), 乙腈(色谱纯, 美国 Dikama 公司), 甲醇(色谱纯, 美国 Dikama 公司), 水为娃哈哈纯净水, 其余试剂为国产分析纯。

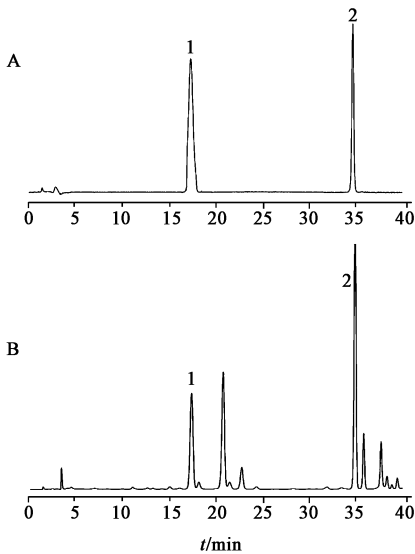
2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取 ECA 对照品 12.75 mg 和 OLA 对照品 10.20 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 溶解配制成储备液; 各取

2 mL 储备液置于同 1 个 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,制得质量浓度为 0.255,0.204 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2 样品溶液的制备 精密称取辽东楸木叶粉末约 0.5 g,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加 50% 乙醇 25 mL,密塞,超声提取 1 h 后,放冷,再称重,用 50% 乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 10 mL 置于蒸发皿中浓缩至干,固体加水溶解至 10 mL,用等体积水饱和的正丁醇萃取 3 次,合并正丁醇溶液,蒸干,固体加甲醇溶解,转移至 10 mL 量瓶中,定容,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液适量,作为供试品溶液。

2.3 HPLC 色谱条件 Diamonsil C_{18} 色谱柱(2) (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(0 ~ 25 min, 27% ~ 29.5% 乙腈; 25 ~ 40 min, 29.5% ~ 38% 乙腈),流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, Alltech 2000ES 型 ELSD 检测器,漂移管温度 110 $^{\circ}\text{C}$,载气流速 3.2 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量 10 μL 。对照品和样品的 HPLC-ELSD 色谱图见图 2。



1. ECA; 2. OLA

图 2 对照品(A)和辽东楸木叶样品(B)的 HPLC-ELSD

Fig. 2 HPLC-ELSD chromatogram of two triterpenoid saponin in reference substance (A) and sample (B) of leaves of *Aralia elata*

2.4 线性关系考察 分别精密吸取 2.1 项下的 ECA 和 OLA 对照品储备液 50, 100, 150, 200, 250 μL 稀释成 1 mL,制成 ECA 质量浓度分别为 63.75, 127.50, 191.25, 255.00, 318.75 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 OLA 质量浓度分别为 51, 102, 153, 204, 255 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液,依次进样 10 μL ,测得峰面积,以进样量(X)的自然对数值为横坐标,峰面积积分值(Y)的自然对数值为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程。得

到 ECA 的回归方程为 $Y = 1.543 1X + 4.908$ ($r = 0.999 8$),OLA 的回归方程为 $Y = 1.51X + 5.364 8$ ($r = 0.999 8$)。表明 ECA 在 0.638 ~ 3.190 μg ,OLA 在 0.51 ~ 2.55 μg 呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取 2.1 项下的对照品溶液,按 2.3 项下色谱条件连续重复进样 6 次,每次 10 μL ,测定峰面积。结果 ECA 和 OLA 峰面积的 RSD 分别为 1.0%, 1.5%,表明仪器的精密度良好。

2.6 重复性试验 精密称取 2015 年 8 月份采收的凤凰山山下药材粉末 6 份,每份 0.5 g,分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件进样 10 μL 测定质量分数。结果测得 ECA 和 OLA 的平均质量分数分别为 4.87, 10.22 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD 分别为 1.4% 和 0.9%,表明本法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取 2.6 项下的供试品溶液,分别于 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 按 2.3 项下色谱条件进行测定,通过测得 ECA 和 OLA 的峰面积进行计算,得 RSD 分别为 1.8% 和 1.2%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的辽东楸木叶(2015 年 8 月山下)粉末 6 份,每份约 0.25 g,分别置于 50 mL 具塞锥形瓶中,并分别精密加入 ECA 储备液 1 mL(0.637 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 OLA 储备液 2.5 mL(0.51 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),50% 乙醇补足 25 mL,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件进行测定,计算平均加样回收率,结果 ECA 和 OLA 的平均回收率分别为 97.71%, 98.06%;RSD 分别为 2.2%, 1.9%。结果见表 1。

2.9 不同样品中 ECA 和 OLA 质量分数的测定 取凤凰山山下及山上两处海拔、不同采收期的辽东楸木叶药材,按 2.2 项下方法制备供试品溶液。进样 10 μL ,按 2.3 项下色谱条件进样测试并记录峰面积。样品中 ECA 和 OLA 的质量分数计算结果见表 2。

对表 2 数据运用 IBM SPSS Statistics 19 分析软件进行单因素方差分析,结果表明:ECA 及 OLA 的 2 个海拔高度均值差的显著性水平 P 分别为 0.610 及 0.381,均 > 0.05 ,说明海拔高度不同对两种皂苷含量没有显著性差异。对于采收期的多重比较显示,ECA 的结果为 6 月与 7,8,9 月比较, P 分别为 0.039, 0.00, 0.00,均 < 0.05 ,均有显著性差异。7 月与 8,9 月比较, P 分别为 0.005, 0.004,均 < 0.05 ,有显著性差异。8 月与 9 月比较, P 为 0.865, > 0.05 ,没有显著性差异;OLA 的比较结果

表 1 ECA 和 OLA 的加样回收率试验

Table 1 Recovery tests of ECA, OLA

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值(RSD)/%
ECA	0.251 1	1.223	1.275	2.509	100.86	97.71(2.2)
	0.250 8	1.221	1.275	2.467	97.73	
	0.249 1	1.213	1.275	2.448	96.86	
	0.249 2	1.214	1.275	2.431	95.45	
	0.249 9	1.217	1.275	2.488	99.68	
	0.250 1	1.218	1.275	2.438	95.69	
OLA	0.251 1	2.566	2.556	5.119	99.88	98.06(1.9)
	0.250 8	2.563	2.556	5.095	99.06	
	0.249 1	2.546	2.556	5.019	96.75	
	0.249 2	2.547	2.556	5.106	100.12	
	0.249 9	2.554	2.556	4.996	95.53	
	0.250 1	2.556	2.556	5.035	96.99	

表 2 不同海拔高度、不同采收期辽东楸木叶中 ECA 和 OLA 的质量分数测定

Table 2 Determination results of ECA and OLA in leaves of *Aralia elata* from different altitudes and gathering periods

mg·g⁻¹

样品	采收期	ECA		OLA	
		山下	山上	山下	山上
1	2014 年 6 月	2.93	2.21	4.94	4.75
2	2014 年 7 月	3.27	3.59	8.95	10.23
3	2014 年 8 月	5.70	5.90	13.82	22.11
4	2014 年 9 月	6.18	7.08	14.33	23.32
5	2015 年 6 月	1.92	2.11	4.0	3.17
6	2015 年 7 月	3.25	3.83	6.41	6.31
7	2015 年 8 月	4.87	5.54	10.22	9.93
8	2015 年 9 月	5.11	5.47	9.90	11.24
9	2016 年 6 月	2.57	2.38	4.37	3.70
10	2016 年 7 月	4.26	3.96	7.25	8.92
11	2016 年 8 月	5.37	5.97	10.82	12.33
12	2016 年 9 月	4.89	6.23	11.03	12.81

为 6 月与 7, 8, 9 月比较, P 分别为 0.002, 0, 0, 均 < 0.05 , 均有显著性差异。7 月与 8, 9 月比较, P 均为 0, < 0.05 , 有显著性差异。8 月与 9 月比较, P 为 0.234, > 0.05 , 没有显著性差异。

3 结论与讨论

3.1 样品制备方法的选择 在样品制备过程中对提取液进行考察, 分别考察了体积分数 30%, 50%, 70%, 100% 乙醇及甲醇进行比较, 发现以体积分数 50%, 70%, 100% 乙醇及甲醇的提取液中 2 种三萜皂苷的含量接近, 但 50% 乙醇提取液中色素含量相对较低; 对超声时间进行考察, 分别考察了 0.5, 1,

1.5 h, 结果表明 1 h 比 0.5 h 含量略高, 1 h 与 1.5 h 无明显差异; 另外, 考查了 50% 乙醇提取液蒸干后用正丁醇萃取及不用正丁醇萃取的情况, 结果表明正丁醇萃取后的样品 HPLC 色谱杂质峰少, 且峰形理想。因此最终选择用 50% 乙醇溶液超声提取 1 h, 蒸干, 水饱和的正丁醇萃取, 蒸干, 甲醇溶解, 微孔滤膜(0.22 μm) 滤过制备样品。

3.2 HPLC 色谱条件 皂苷类成分无紫外吸收或仅有末端吸收, HPLC-DAD 测定时杂质干扰大, 峰面积小, 重复性差; 而 HPLC-ELSD 测定克服上述缺点。并经反复试验, 确定了色谱条件。

3.3 样品的测定 12批采自凤凰山2个海拔高度的供试品测试结果显示,各批次样品中OLA的含量都远高于ECA。从6月初至9月初,2种皂苷含量几乎都呈递增趋势,6月至8月间增幅很大。8月至9月间增幅较小,甚至略减。统计显示各月份采集的样品中,其他月份的样品都有显著性差异,只有8,9月份的没有显著性差异。山下6月初的叶中2种皂苷含量均比山上6月初的含量大,但以后各月的多为山上含量偏大,但海拔高度的不同没有显著性差异。

对5月初采集的样品进行测试,没有检测出ECA和OLA,9月中旬以后由于北方气温较低,叶片逐渐变黄甚至脱落。因此采集6月初至9月初的药材作为实验材料。本实验建立的样品制备及测试方法简便快捷。若以药用目的采收凤凰山地带辽东椴木叶,应在8月至9月初采收,且高海拔处略佳。这为该地区辽东椴木叶药材的质量评价提供了实验依据。

[参考文献]

[1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:885-886,1834-1835.
[2] 《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.
[3] Clement J A, Clement E S H. The medicinal chemistry of Genus *Aralia*[J]. *Curr Top Med Chem*,2014,14(24): 2783-2801.
[4] 张家鑫,田瑜,孙桂波,等. 龙芽椴木皂苷类成分及药理活性研究进展[J]. *中草药*,2013,44(6):770-779.

[5] Ho L G, Wook J J, MI A E, et al. Antioxidant activity of isolated compounds from the shoot of *Aralia elata* Seem [J]. *Herbology*,2009,24(4):137-142.
[6] Kang S S, Kim J S, Lee E B. Two new saponins from the root bark of *Aralia elata*[J]. *Int J Pharm*,1996,34(2): 119-123.
[7] Saito S, Sumita S, Tamura N, et al. Saponins from the leaves of *Aralia elata* SEEM. (*Araliaceae*) [J]. *Chem Pharm Bull*,1990,38(2):411-414.
[8] Tomatsu M, Ohnishi-Kameyama M, Shibamoto N. Aralin, a new cytotoxic protein from *Aralia elata*, inducing apoptosis in human cancer cells[J]. *Cancer Lett*,2003, 199(1):19-25.
[9] 王丽君,姜虹. 龙芽椴木多糖抗肿瘤活性及对荷瘤小鼠免疫功能的影响[J]. *中国免疫学杂志*,2011,27(2):130-134.
[10] WANG Z B, WU Q, MENG Y H, et al. Determination and pharmacokinetic study of two triterpenoid saponins in rat plasma after oral administration of the extract of *Aralia elata* leaves by UPLC-ESI-MS/MS [J]. *J Chromatography B*,2015,985:164-171.
[11] 张秀萍,孙达辰,肖洪彬. 辽东椴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.
[12] KUANG H X, WANG Z B, WANG Q H, et al. Triterpene glucosides from the leaves of *Aralia elata* and their cytotoxic activities[J]. *Chem Biodivers*,2013,10(4):703-710.

[责任编辑 邹晓翠]