辽东楤木叶总皂苷的 HPLC 及抗肿瘤作用谱效关系分析

邹淑君[1]，李靖[1]，许树军[1]，吕邵娃[1]，王秋红[2]，肖洪彬[1*]
(1. 黑龙江中医药大学 药学院，实验中心，哈尔滨 150040；2. 广东药科大学 中药学院，广州 510006)

［摘要］ **目的**：对辽东楤木叶总皂苷进行 HPLC 分析并确定不同的极性部位，利用 C_{18} 反相硅胶（ODS）柱分离获得不同极性部位，比较不同部位的体外抗肿瘤作用效果。**方法**：辽东楤木叶经 70% 乙醇提取后通过 AB-8 型大孔树脂柱，获得总皂苷，用不同体积分数甲醇经 ODS 柱洗脱分离获得经 HPLC 确定的不同部位。利用噻唑蓝（MTT）比色法测试不同部位对人肺腺癌细胞株（A549），人宫颈癌细胞株（HeLa）和人结肠癌细胞株（HT-29）的体外生长抑制作用。**结果**：由总皂苷 HPLC 的保留时间确定了 5 个极性部位，分别为 A（保留时间 20 min 以前的部位，ODS 柱上 0 ~ 25% 甲醇洗脱组分），B（保留时间 20 ~ 45 min，ODS 柱上 30% ~ 45% 甲醇洗脱组分），C（保留时间 50 ~ 75 min，ODS 柱上 50% ~ 65% 甲醇洗脱组分），D（保留时间 80 ~ 110 min，ODS 柱上 70% ~ 75% 甲醇洗脱组分）和 E（保留时间 > 110 min，ODS 柱上 80% ~ 100% 甲醇洗脱组分）。5 个部位给药 48 h 后对 3 种细胞的抑制作用明显不同，A 部位对 3 种癌细胞均无抑制作用；B 部位对 3 种癌细胞抑制作用微弱；C，D，E 部位对 3 种癌细胞表现出较强的抑制作用，且明显强于总皂苷，最佳的 D 部位对 A549，Hella 和 HT-29 抑制作用的半抑制浓度分别为 4.06，4.29，3.60 $mg \cdot L^{-1}$。**结论**：辽东楤木叶总皂苷经 HPLC 分析后，利用 ODS 柱进行分离，可获得其抗肿瘤作用的有效部位及最佳部位。

［关键词］ 辽东楤木叶；总皂苷；反相硅胶柱；抗肿瘤；噻唑蓝比色法；谱效关系
［中图分类号］ R945；R283.6；R284；R285.5 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1005-9903(2017)21-0013-05
［doi］ 10.13422/j.cnki.syfjx.2017210013
［网络出版地址］ http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170809.1412.078.html
［网络出版时间］ 2017-08-09 14:12

HPLC of Total Saponins in *Aralia elata* Leaves and Spectral Efficiency Analysis of Its Antitumor Effect

ZOU Shu-jun[1], LI Jing[1], XU Shu-jun[1], LYU Shao-wa[1], WANG Qiu-hong[2], XIAO Hong-bin[1*]
(1. *School of Pharmacy*, *Experiment Center*, *Heilongjiang University of Chinese Medicine*, *Harbin* 150040, *China*;
2. *School of Traditional Chinese Medicine*, *Guangdong Pharmaceutical University*, *Guangzhou* 510006, *China*)

［**Abstract**］ **Objective**: To analyze the total saponins in *Aralia elata* leaves by high performance liquid chromatography (HPLC) and determine the different polar sites, and separate different polar sites by C_{18} reversed-phase silica gel (ODS) column, then to compare the antitumor effect *in vitro* of different parts. **Method**: The total saponins was gained after extraction of *A. elata* leaves with 70% ethanol, and the extract was purified by AB-8 macroporous resin. Different polarity parts was determined by HPLC, and was eluted by methanol with different concentration on ODS column. Inhibitory effect of different parts on cancer cells was determined by thiazolyl blue (MTT) colorimetry, the cancer cells included human lung adenocarcinoma cell line (A549), human cervical cancer cell line (HeLa) and human colon cancer cell line (HT-29). **Result**: Five polar sites was identified by retention time of HPLC of the total saponins. The corresponding five parts were separated by ODS column, they were 0-20 min part of HPLC and eluents with 0-25% methanol (A for short), 20-45 min part of HPLC and

［收稿日期］ 20170510(007)
［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

eluents with 30%-45% methanol (B for short), 50-75 min part of HPLC and eluents with 50%-65% methanol (C for short), 80-110 min part of HPLC and eluents with 70%-75% methanol (D for short), after 110 min part of HPLC and eluents with 80%-100% methanol (E for short), respectively. The inhibitory effects of A, B, C, D and E on three kinds of cells were significantly different. A had no effect on the three kinds of cancer cells, Inhibitory effect of B on the three kinds of cancer cells was weak. C had strong inhibitory effects on the three kinds of cancer cells; E had stronger inhibitory effects on the three kinds of cancer cells; D showed the strongest inhibitory effect on the three kinds of cancer cells, and Its IC_{50} of inhibition on A549, Hella and HT-29 were 4.06, 4.29, 3.60 $mg \cdot L^{-1}$, respectively. **Conclusion**: After total saponins in *A. elata* leaves being identified by HPLC and separated on ODS column, the best part of antitumor effect can be obtained.

[**Key words**] *Aralia elata* leaves; total saponins; reversed-phase silica gel column; antitumor; MTT colorimetry method; spectrum and efficiency

辽东楤木为五加科楤木属植物,又名龙牙楤木、刺老芽等,主产于我国东北三省。民间将其嫩芽作为山野菜食用,传统医学以辽东楤木的根皮和树皮入药,具有补气安神、强精滋肾、祛风活血、除湿止痛的功效,用于治疗神经衰弱、风湿性关节炎、糖尿病、便秘、外伤出血及阳虚气弱、肾气不足等[1-3]。现代研究不仅重视该药材的嫩芽及根茎,也将辽东楤木叶作为该植物开发的重点。实验研究证明辽东楤木叶总皂苷具有较强的抗肿瘤作用,对肉瘤 S180,腹水性肝癌 H22 细胞均有明显的杀伤作用,对 H22 荷瘤小鼠有明显的生命延长作用,并呈现一定的量效关系[4]。相关研究提示辽东楤木叶总皂苷可通过多种机制抑制肿瘤的发生[5]。张秀萍等[6]通过体外实验磺酰罗丹明 B(SRB)法证明辽东楤木叶总皂苷对人肺腺癌 A549,胃癌 BGC,人肝癌 BEL-7402 细胞和人结肠癌 HCT-8 细胞都有不同程度的抑制和杀伤作用;对细胞抑制/杀伤/凋亡作用的机制基本也得到了阐释[7-11]。

本课题组前期研究证明辽东楤木叶的总皂苷为其抗肿瘤有效部位,为获得辽东楤木叶药材抗肿瘤作用有效部位总皂苷,并保证具有良好的药效,吕邵娃等[12-14]通过系列实验与方法最终确定辽东楤木叶总皂苷的提取纯化方法为药材粉末经 70% 乙醇回流浸提,经 AB-8 型树脂交换柱色谱吸附法纯化。辽东楤木叶总皂苷经添加辅料制得的胶囊制剂已经作为黑龙江中医药大学附属医院的院内制剂,已被应用于临床辅助治疗癌症患者。为了能够使辽东楤木叶总皂苷提取物在临床上获得更良好的效果,本实验在前期研究基础上,采用反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法(RP-HPLC-ELSD)分析并确定辽东楤木叶总皂苷的不同极性部位组分,用甲醇经过 C_{18} 反相硅胶(ODS)柱分离,获得不同部位组分;利用噻唑蓝(MTT)比色法测试不同极性部位的体外抗肿瘤效果,以确定辽东楤木叶总皂苷中抗肿瘤作用最佳组分群,为临床筛选效果更加良好的辽东楤木叶皂苷组分奠定基础。

1 材料

Chromaster 系列高效液相色谱仪(日本株式会社日立高新技术公司),Alltech 2000ES 型蒸发光散射检测器(美国奥泰科技中国有限公司),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),BioTek ELx800 型酶标仪(上海旦鼎国际贸易有限公司),中压特制玻璃柱(上海嘉鹏科技有限公司)。

辽东楤木叶于 2013 年 8 月采于黑龙江省通河县清河镇林业局林区内,经黑龙江中医药大学药用植物学教研室苏连杰教授鉴定为五加科植物辽东楤木 *Aralia elata* 的叶,晾干粉碎过 50 目筛后使用;人肺腺癌细胞株(A549),人宫颈癌细胞株(HeLa)和人结肠癌细胞株(HT-29)均由中国医学科学院、中国协和医科大学药用植物研究所药理实验室惠赠;噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司),RPMI-1640 营养液、胰蛋白酶、胎牛血清(德国贝尔公司),磷酸盐缓冲液(PBS,友康基业生物科技北京有限公司,pH 7.4),C_{18}反相硅胶(ODS,成都科普生物有限公司),水为娃哈哈纯净水,乙腈为色谱纯,其余试剂为国产分析纯。

2 方法

2.1 样品的制备 取辽东楤木叶粉末 250 g,过 3 号筛,加 70% 乙醇回流提取 3 次,每次 800 mL,提取液减压浓缩,置于 AB-8 型大孔树脂柱中,用体积分数为 30% 和 70% 的乙醇依次洗脱,收取 70% 乙醇洗脱液,减压浓缩得总皂苷。取总皂苷溶于少量甲醇中,上 ODS 柱,依次用体积分数为 0 ~ 100% 的

甲醇(前一体积分数条件下洗脱出的溶液样品较少时,换下一体积分数洗脱,体积分数每间隔 5% 递变)梯度洗脱,各洗脱部位经减压浓缩得固体。称取固体一定量溶于甲醇中,经 0.25 μm 滤膜滤过,作为 HPLC 样品。精密称取各部位皂苷 0.01 mg,加少量 DMSO 使溶解,用水稀释至 25 mL,得质量浓度 400 $mg \cdot L^{-1}$样品溶液作为抗肿瘤试验的初始样品。

2.2 色谱条件 Diamonsil C_{18}色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min,5% A;5 ~ 30 min,5% ~ 22% A;30 ~ 40 min,22% ~ 26% A;40 ~ 80 min,26% ~ 33% A;80 ~ 115 min,33% ~ 60% A;115 ~ 120 min,60% ~ 100% A;120 ~ 130 min,100% A),蒸发光散射检测器(ELSD),流速 1.0 $mL \cdot min^{-1}$,柱温 30 ℃,漂移管温度 110 ℃,空气流速 3.2 $L \cdot min^{-1}$,进样量 10 μL。总皂苷的 HPLC-ELSD 见图 1。

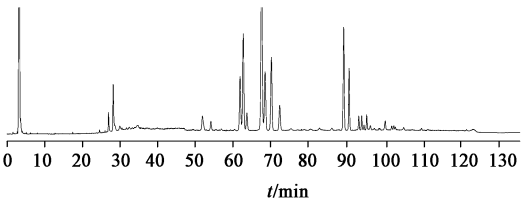

图 1 辽东楤木叶总皂苷的 HPLC-ELSD

Fig. 1 HPLC-ELSD chromatogram of total saponins in *Aralia elata* leaves

2.3 对细胞抑制作用的测试

2.3.1 细胞培养 将 A549,HeLa,HT-29 细胞株置含 10% 胎牛血清、青霉素和链霉素各100 $U \cdot mL^{-1}$的 RPMI-1640 培养基(完全培养基)的培养瓶中,培养瓶置于含 5% CO_2,37 ℃,饱和湿度的培养箱中培养癌细胞。

2.3.2 加药及 MTT 测试 取指数生长期的 A549,Hella,HT-29 细胞,配成密度约为 1.0×10^5 个/mL 的细胞悬液。按 100 μL/孔置于 96 孔板中,将 96 孔板置于 37 ℃,5% CO_2 的培养箱中培养 12 h;12 h 后将 96 孔板中培养的细胞分为空白组及样品测试组。每个样品设置 7 个质量浓度组,参照文献[15]的测试结果,对 **2.1** 项下的 400 $mg \cdot L^{-1}$样品溶液稀释,获得 200,100,50,25,12.5,6.25,3.125 $mg \cdot L^{-1}$共 7 个不同的质量浓度,加入 96 孔板,各组加相应质量浓度的药物样品 100 μL,每个质量浓度重复 6 个孔。空白组加相同体积的完全培养基。将 96 孔板置于 37 ℃,5% CO_2 的培养箱中培养 48 h;48 h 后每孔加入 MTT 20 μL,于 37 ℃,5% CO_2 的培养箱中培养放置 4 h。4 h 后将孔内液体全部吸出,每孔加入 DMSO 150 μL,在摇床中摇晃 10 min;摇匀后将 96 孔板直接置于酶标仪中,于 490 nm 处测定每孔的吸光度 A。

2.3.3 指标计算与统计分析 不同部位样品对细胞的抑制作用采用抑制率及半数抑制率表示,计算方法为抑制率 = $[1 - (A_{测试组}/A_{空白组})] \times 100\%$,每个部位 7 个质量浓度,每个质量浓度测试 6 个值,结合 SPSS 19.0 统计软件计算半抑制浓度(IC_{50}),组间比较利用 t 检验进行分析。

3 结果

从 250 g 辽东楤木叶原药材中提取出总皂苷 75 g,称取总皂苷 3 g 进行 ODS 柱分离。由总皂苷 HPLC 的保留时间可知,出现了 5 个不同的极性部位。将保留时间在 20 min 以前的组分定为 A 部位;25 ~ 45 min 的组分定为 B 部位;50 ~ 75 min 的组分定为 C 部位;80 ~ 110 min 的组分定为 D 部位;110 min以后的组分定为 E 部位。采用甲醇进行 ODS 柱洗脱分离,以 HPLC 作为是否将上述 5 个部位分离开的判断标准。分离的结果为体积分数 0 ~ 25% 的甲醇洗脱组分的 HPLC 主要对应总皂苷 HPLC 的 A 部位;体积分数 30% ~ 45% 的甲醇洗脱组分对应总皂苷 HPLC 的 B 部位;体积分数 50% ~ 65% 的甲醇洗脱组分对应总皂苷 HPLC 的 C 部位;体积分数 70% ~ 75% 的甲醇洗脱组分对应总皂苷 HPLC 的 D 部位;体积分数 80% ~ 100% 的甲醇洗脱部分对应总皂苷 HPLC 的 E 部位。分离后得 A,B,C,D,E 各部位的质量分别为 0.29,0.43,1.02,0.95,0.17 g,占总皂苷比例分别为 9.67%,14.33%,34.0%,31.67%,5.67%。5 个部位对应的 HPLC-ELSD 见图 2。辽东楤木叶总皂苷,A,B,C,D,E 各部位不同质量浓度样品对 A549,Hella,HT-29 细胞的抑制率及 IC_{50}见表 1 ~ 3。

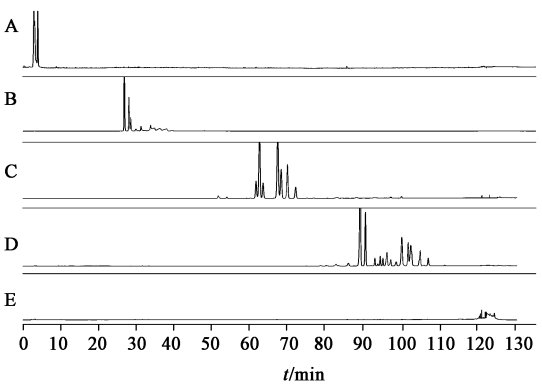

图 2 A,B,C,D,E 各部位的 HPLC-ELSD

Fig. 2 HPLC-ELSD chromatograms of A,B,C,D and E parts

表 1　不同部位和不同质量浓度样品对 Hella 细胞的抑制率及半抑制浓度

Table 1　Inhibition rates and half-inhibitory concentrations of different parts with different concentration on Hella cells

部位	抑制率/%							IC_{50}/mg·L^{-1}
	200 mg·L^{-1}	100 mg·L^{-1}	50 mg·L^{-1}	25 mg·L^{-1}	12.5 mg·L^{-1}	6.25 mg·L^{-1}	3.125 mg·L^{-1}	
总皂苷	71.8	53.5	31.3	23.2	13.9	10.4	9.6	89.12
A	–	–	–	–	–	–	–	–
B	10.6	5.4	1.1	–	–	–	–	–
C	75.6	62.5	35.5	18.5	15.2	05.4	2.9	71.08
D	83.0	80.8	72.7	65.6	62.2	58.8	43.4	4.29
E	82.9	81.8	79.9	51.1	40.8	35.3	16.8	17.52

表 2　不同部位和不同质量浓度样品对 A549 细胞的抑制率及半抑制浓度

Table 2　Inhibition rates and half-inhibitory concentrations of different parts with different concentration on A549 cells

部位	抑制率/%							IC_{50}/mg·L^{-1}
	200 mg·L^{-1}	100 mg·L^{-1}	50 mg·L^{-1}	25 mg·L^{-1}	12.5 mg·L^{-1}	6.25 mg·L^{-1}	3.125 mg·L^{-1}	
总皂苷	79.6	75.0	49.5	13.7	9.5	7.7	6.7	57.81
A	–	–	–	–	–	–	–	–
B	11.2	10.4	2.0	1.3	–	–	–	–
C	83.0	81.3	47.9	29.2	19.3	7.0	3.2	45.83
D	89.2	88.1	86.3	84.0	76.9	59.0	45.1	4.06
E	89.0	86.4	82.3	65.5	51.9	33.4	22.3	12.08

表 3　不同部位和不同质量浓度样品对 HT-29 细胞的抑制率及半抑制浓度

Table 3　Inhibition rates and half-inhibitory concentrations of different parts with different concentration on HT-29 cells

部位	抑制率/%							IC_{50}/mg·L^{-1}
	200 mg·L^{-1}	100 mg·L^{-1}	50 mg·L^{-1}	25 mg·L^{-1}	12.5 mg·L^{-1}	6.25 mg·L^{-1}	3.125 mg·L^{-1}	
总皂苷	87.2	83.6	57.6	33.6	17.1	10.2	8.8	37.32
A	–	–	–	–	–	–	–	–
B	12.1	1.5	1.0	–	–	–	–	–
C	84.5	83.5	83.2	68.2	32.8	22.6	21.4	16.82
D	88.1	87.8	85.3	84.8	82.2	65.4	54.7	3.60
E	86.2	85.5	80.3	79.1	50.4	30.5	26.5	11.10

由表 1 ~ 3 可知，HPLC 中保留时间不同的 5 个极性部位对 3 种癌细胞的抑制作用效果明显不同。保留时间最短的 A 部位对 3 种细胞均无抑制作用，B 部位对 3 种癌细胞抑制作用特别微弱。C，D，E 部位都有较强的抑制作用，低质量浓度时，抑制效果随着药物质量浓度的增加而增强。但当质量浓度达到一定程度时，抑制效果不再明显增强。C，D，E 部位的 IC_{50}明显低于总皂苷，且 D，E 部位抑制 3 种癌细胞的作用效果尤为突出。结合总皂苷 HPLC，确定保留时间在 50 min 以后的 C，D，E 部位是抗肿瘤有效组分，且 80 ~ 110 min 之间的 D 部位组分抗肿瘤效果最佳。

4　讨论

辽东楤木叶总皂苷的制备工艺已经比较成熟，总皂苷中各类成分极性比较接近，一般不易分离开。辽东楤木叶总皂苷胶囊目前已在临床上作为抗肿瘤辅助制剂应用。为了获得更好的抗肿瘤药效，本研究将总皂苷进行 HPLC-ELSD 分析，根据保留时间确定出 5 个极性部位，并利用甲醇经 ODS 柱分离获取了这 5 个部位的组分。以 MTT 比色法测试不同部位组分对人癌细胞 A549，Hella 和 HT-29 的抑制作用。确定了本研究条件下，50 min 以后的组分为抗肿瘤效果有效组分，处于 80 ~ 110 min 的组分为抗肿瘤效果最佳组分。考虑不同极性部位占总皂苷的

比率问题,可将 HPLC 图谱中 50 min 以后的组分定为抗肿瘤有效部位。说明可将辽东楤木叶总皂苷进一步分离,以获得抗肿瘤效果更佳的药效部位。

本研究在前期获得辽东楤木叶总皂苷的基础上,进一步对总皂苷进行分离,获得了抗肿瘤效果更好的药效组分,为进一步优化和开发辽东楤木叶抗肿瘤药物提供了实验基础。后续将会对本研究确定的较佳抗肿瘤药效部位进行分离,以获得不同成分,并测试不同成分的抗肿瘤作用,寻找辽东楤木叶中抗肿瘤作用的有效成分或最佳成分组合。

[参考文献]

[1] 中国药材公司. 中国中药资源志要[M]. 北京:科学出版社,1994:836.

[2] 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.

[3] 国家中医药管理局《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] 王晶. 龙牙楤木叶总皂苷对肿瘤细胞凋亡及 p53 基因表达影响的实验研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2004.

[5] 赵俊男,谭玉婷,姜天童,等. 龙牙楤木药理作用研究进展[J]. 吉林中医药,2016,36(2):207-210.

[6] 张秀萍,尹丽颖,牛雯颖,等. 辽东楤木叶总皂苷体外抗肿瘤作用的研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(12):2966-2968.

[7] 李凤金,毕明刚,武爽,等. 辽东楤木叶总皂苷抗人乳腺癌作用的研究[J]. 中国药理学通报,2013,29(12):1663-1666.

[8] 尹丽颖,仲丽丽,边晓燕,等. 辽东楤木叶总皂苷对人胃癌 BGC 细胞凋亡的影响[J]. 中医药学报,2012,40(3):12-14.

[9] 尹丽颖,边晓燕,肖洪彬,等. 辽东楤木叶总皂苷对 H22 荷瘤小鼠 p53 及 PCNA 蛋白表达的影响[J]. 中医药学报,2010,38(1):18-20.

[10] 张秀萍. 辽东楤木叶总皂苷抗肿瘤作用分子机制研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2009.

[11] 尹丽颖,李凤金,边晓燕,等. 辽东楤木叶总皂苷对结肠癌 HT-29 细胞的生长抑制作用及机制研究[J]. 中国药理学通报,2013,29(12):1663-1666.

[12] 吕邵娃,刘栋,夏永刚,等. 大孔树脂分离纯化龙芽楤木叶皂苷的研究[J]. 中药材,2010,33(12):1959-1961.

[13] 吕邵娃,刘栋,胡畔盼,等. 星点设计-效应面法优化龙芽楤木叶提取工艺[J]. 中药材,2010,33(3):442-445.

[14] 吕邵娃,刘栋,胡畔盼,等. 12 种大孔树脂对辽东楤木皂苷吸附特性的比较研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(11):2696-2698.

[15] 张秀萍,孙达辰,肖洪彬. 辽东楤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.

[责任编辑　刘德文]