

辽东楸木叶总皂苷高效薄层色谱指纹图谱分析

邹淑君¹, 许树军^{2*}, 孙楠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 实验实训中心, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:建立辽东楸木叶总皂苷高效薄层色谱指纹图谱,并分析不同产地不同采收期的辽东楸木叶成分的差别。方法:采用高效硅胶 G 薄层板(20 cm×20 cm)载样,以三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-甲酸-水(9.5:10:20:0.5:5)为展开剂,以 10% 浓硫酸乙醇溶液为显色剂,于恒温鼓风干燥箱里 100 ℃ 条件下加热至斑点清晰,置于 365 nm 紫外光下照射获得其显色后的荧光高效薄层色谱图,经软件组合处理生成斑点灰度峰曲线,建立共有模式,并进行相似度分析及聚类分析。结果:获得分离度良好、斑点清晰的高效薄层色谱指纹图谱,建立了辽东楸木叶总皂苷薄层色谱指纹图谱共有模式,由 10 个共有斑点峰组成,并指认了其中的 4 个斑点峰代表的具体成分。分析表明不同地区 8 月初至 9 月中旬的辽东楸木叶相似度较高;聚类分析将 11 个不同批次的样品聚为一大类。结论:建立的薄层色谱指纹图谱方法简单、快速、可靠,可用于辽东楸木叶药材的鉴定和质量控制评价。确定东北地区 8 月采收的辽东楸木叶药材均符合质量要求,可作为以总皂苷为主要药效部位的药材使用。

[关键词] 辽东楸木叶总皂苷;薄层色谱;指纹图谱;相似度分析;聚类分析
[中图分类号] R284.1;R289;R22;R2-031 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2019)03-0151-05
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20182116
[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180822.1428.013.html>
[网络出版时间] 2018-08-23 13:55

HPTLC Fingerprints of Total Saponins of *Aralia elata* Leaves

ZOU Shu-jun¹, XU Shu-jun^{2*}, SUN Nan¹, XIAO Hong-bin²

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

2. Graduate School of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] Objective: To establish high performance thin layer chromatography (HPTLC) fingerprint of the total saponins from *Aralia elata* leaves, and compare the difference of components in *A. elata* leaves from different harvest time and different regions. Method: High efficiency silica gel G thin sheet (20 cm ×20 cm) was used, with chloroform-methanol-ethyl acetate-water (9.5:10:20:0.5:5) as developing system, ethanol solution of 10% concentrated sulfuric acid as chromogenic reagent, heating at 100 ℃ in constant-temperature air dry oven until clear spots. The fluorescence HPTLC chromatogram fingerprints were obtained under 365 nm ultraviolet light. Speckle patterns were obtained by software processing and the common pattern was established for similarity analysis and cluster analysis. Result: The HPTLC fingerprints with good separation and clear spots were obtained and the common pattern of fingerprints was established. The common pattern was composed of 10 common speckled peaks, 4 of which were identified for components. The results showed that samples in early August to mid September from different regions had good similarity. 11 samples of different batches were clustered into one class. Conclusion: The HPTLC method is simple, fast and reliable, and can be used for the identification and quality evaluation of medicinal materials of *A. elata* leaves. The *A. elata* leaves collected in August conform to the quality standard, so

[收稿日期] 20180307(007)
[基金项目] 中国博士后科学基金面上项目(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, 从事中药质量标准及药物分析研究, E-mail: zou_sj1974@163.com
[通信作者] * 许树军, 硕士, 高级实验师, 从事药物分析研究, E-mail: xusj_20051009@163.com

they can be used as medicinal materials.

[**Key words**] saponins of *Aralia elata* leaves; thin-layer chromatography; fingerprint; similarity analysis; cluster analysis

辽东槲木为五加科槲木属植物,在中国东北地区、日本、韩国、俄罗斯等地均有分布^[1-2]。可用于治疗神经衰弱、风湿性关节炎、糖尿病、阳虚气弱、胃炎、胃溃疡、肾炎水肿、肿瘤等疾病^[3-4]。由于早期人们不断地采伐辽东槲木的根及根皮入药,导致天然资源越来越少,叶资源可以再生,因此,近年来学者们开始逐渐重视对辽东槲木叶资源的开发研究,其叶在嫩芽期为药食两用珍品,现代研究证明从辽东槲木叶中提取的皂苷类物质具有显著的抗肿瘤作用及保肝作用等^[5-6],已经明确抗肿瘤作用机制^[7],并且口服相对安全^[8],有望开发成为抗肿瘤中药新药或抗肿瘤辅助新药。为能有效利用辽东槲木叶药材资源,建立该药材质量标准是很有必要的。薄层色谱(TLC)是中药鉴定及质量评价中常用方法之一,简便、快捷、灵敏、经济^[9]。该法可以提供荧光图像或可见光图像,并且具有图像直观、展开剂选择范围广的特点,常用来作为中药质量评价和控制的方法之一^[10-12]。由于薄层扫描仪的应用和薄层成像系统的应用,使原来的薄层板可以转换成薄层图谱,也更具“指纹图谱”的特色^[13]。本研究拟利用TLC法对辽东槲木叶进行分析并建立指纹图谱,为辽东槲木叶药材提供质控标准。

表 1 辽东槲木叶样品信息

Table 1 Samples information of *Aralia elata* leaves

编号	来源	采收时间	编号	来源	采收时间
S1	黑龙江省宝清县	2014 年 6 月上旬	S7	黑龙江省通河县	2014 年 8 月上旬
S2	黑龙江省宝清县	2015 年 8 月上旬	S8	对照品混合物	自制
S3	黑龙江省宝清县	2015 年 7 月上旬	S9	辽宁省抚顺市	2013 年 8 月上旬
S4	黑龙江省凤凰山山上	2014 年 8 月中旬	S10	黑龙江省哈尔滨市	2015 年 9 月上旬
S5	黑龙江省凤凰山山下	2014 年 8 月中旬	S11	黑龙江省尚志市	2014 年 9 月中旬
S6	黑龙江省齐齐哈尔市	2014 年 7 月中旬	S12	吉林省辉南县	2014 年 9 月下旬

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品 a,b,c,d,e 各 2.0 mg 分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容。获得质量浓度各为 0.20 g·L⁻¹的对照品溶液。精密称取对照品 a,b,c,d,e 各 2.0 mg 置于同一个 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解定容。获得质量

1 材料

DHG-9070A 型台式电热恒温鼓风干燥箱(北京恒泰丰科试验设备有限公司);硅胶 G 高效预制薄层板(20 cm×20 cm,青岛海洋化工有限公司,批号 20150312);ILCE-5100L 型数码相机(日本 SONY)。

11 个不同批次的辽东槲木叶干燥药材粉末(过 100 目筛),样品信息见表 1。所用药材经黑龙江中医药大学吕邵娃教授鉴定为五加科槲木属植物辽东槲木 *Aralia elata* 的干燥叶。对照品 a~e{3-*O*- β -D-葡萄糖吡喃糖基常春藤皂苷元,3-*O*-[β -D-葡萄糖吡喃糖基(1→2)][β -D-葡萄糖吡喃糖基(1→3)]- β -D-葡萄糖吡喃糖基-常春藤皂苷元,3-*O*-[β -D-葡萄糖吡喃糖基(1→2)][β -D-葡萄糖吡喃糖基(1→3)]- β -D-葡萄糖吡喃糖基-常春藤皂苷元,3-*O*-[β -D-吡喃葡萄糖基(1→2)][β -D-吡喃葡萄糖基(1→3)]- β -D-吡喃葡萄糖基-齐墩果酸-28-*O*- β -D-吡喃葡萄糖酯,3-*O*-[β -D-吡喃葡萄糖基(1→3)][β -D-吡喃葡萄糖基(1→3)]- β -D-吡喃葡萄糖基-齐墩果酸-28-*O*- β -D-吡喃葡萄糖酯}为黑龙江中医药大学中药化学实验室提取纯化鉴定(HPLC 测定纯度均>98%),结构见图 1。其他试剂均为国产分析纯。

浓度均为 0.20 g·L⁻¹的混合对照品溶液。

2.2 样品溶液的制备 取不同批次的辽东槲木叶,粉碎,过 100 目筛,精密称取干燥的样品粉末 5 g 于具塞锥形瓶中,加 50% 乙醇水溶液 25 mL,超声 1 h,滤过,弃去残渣,滤液蒸干,加水 20 mL 溶解,加水饱和和正丁醇溶液萃取 3 次,每次 20 mL,合并萃取液,

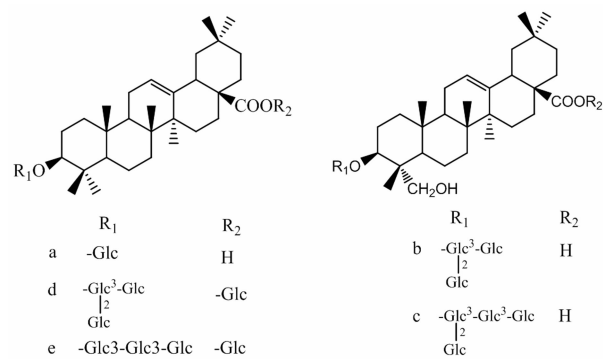


图 1 对照品 a~e 的结构

Fig.1 Structures of control samples a-e

蒸干。精密称取干燥恒重的固体 0.02 g,依次加入正丁醇 1.5 mL,氨试液饱和的正丁醇 2 mL,摇匀,超声 15 min,2 500 r·min⁻¹离心 5 min,吸取上清液,得供试品溶液,备用。

2.3 TLC 测定及图谱处理方法 精密吸取供试品溶液 2 μL,对照品溶液 5 μL,分别点于硅胶 G 高效预制薄层板上,点样间距 12 mm,上行展开距离 170 mm,以三氯甲烷-甲醇-乙酸乙酯-甲酸-水(9.5:10:20:0.5:5)为展开剂,展开结束后取出自然挥干,喷 10% 硫酸乙醇溶液,置干燥箱中 100 ℃ 加热,直至显色清晰,立即置于紫外分析仪 365 nm 灯光下检视,拍照,获得样品荧光薄层色谱图。

数据及图像处理用 Get Data Graph Digitizer 及 Origin Pro 8.5.1 软件处理。将荧光薄层色谱图生成灰度图片并转换为曲线,将曲线进行积分可得出比移值(*R_f*)和积分面积。用 SPSS 19.0 进行分析。

2.4 结果

2.4.1 TLC 图谱分析 图 2 给出的是相机拍摄的薄层色谱荧光图谱,其中 S8 是对照品(按比移值从远至近分别是 a,b,c,d,e),S13 是空白溶剂,其余是辽东楸木叶样品。从图中可以看出,11 个样品在薄层板上分离良好,斑点清晰。S9 样品斑点数目最多,S1,S12 样品斑点数目略少,其他样品清晰的斑点的数目差别不大,比移值比较相似。S1,S2,S3 号样品为同一地区 6,8,7 月份样品,6 月份样品斑点比 7 月斑点数少,且斑点颜色略浅,7 月份样品斑点比 8 月斑点数少,但斑点颜色差别不大。S4,S5 为同一地区同一时间不同海拔高度的样品,斑点个数及深浅相当,主要成分及含量差别不大。

2.4.2 TLC 指纹图谱灰度曲线分析 运用软件将斑点转化为灰度值曲线峰,所有样品及对照品的斑点灰度曲线见图 3。在图中,第一个峰对应的是点样原点,是吸附能力较强,不能被展开剂洗脱的物质

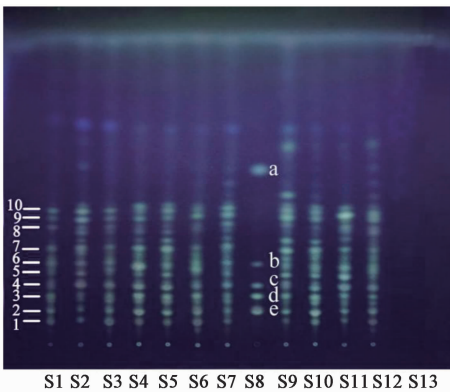


图 2 辽东楸木叶总皂苷高效薄层色谱指纹谱

Fig.2 HPTLC fingerprint of saponins of *Aralia elata* leaves

峰;最后一个强峰是吸附能力较弱,随着展开剂移动较远的混合物质峰;中间的是吸附能力不同,随展开剂前行而被分离的成分峰。由图 3 可见,S8 的对照品灰度曲线峰与图 2 中荧光图谱斑点一一对应,峰位及峰强能够体现荧光图谱的比移值及含量特征。因此 11 个样品的斑点灰度曲线峰也直接体现样品成分分离情况及含量情况。

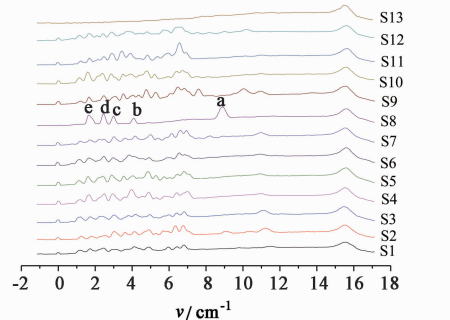


图 3 11 批辽东楸木叶总皂苷及对照品荧光 HPTLC 谱斑点灰度曲线

Fig.3 Graphs of HPTLC fingerprint of saponins of *Aralia elata* leaves from 11 batches and control samples

2.4.3 TLC 指纹图谱共有模式确定 结合图 2 及图 3 分析可见,样品间斑点个数及深浅度有一定的差别,但 11 个样品都稳定出现 10 个斑点,因此,将这 10 个斑点作为 11 个样品的共有模式。与已知的 5 个对照品随行对照,10 个斑点可以指出 4 个斑点所代表的成分。2 号斑点是对照品 e 成分,3 号斑点是对照品 d 成分,4 号斑点峰是对照品 c 成分,6 号斑点峰是对照品 b 成分。11 个样品中,多数样品含有对照品 a,但斑点微弱,说明含量很低。而 b,c,d,e 对照品在 11 个样品中都含有,且含量较高。以 S2 的荧光斑点图及其灰度曲线标识出共有斑点峰位置及 4 个已知成分,见图 4。其中未标识的为非共有峰。

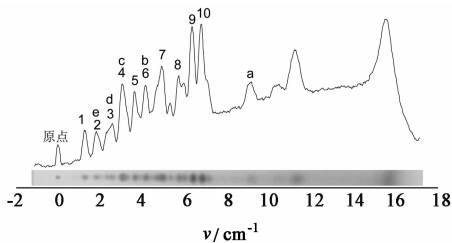


图 4 辽东槲木叶总皂苷 HPTLC 指纹谱共有模式

Fig.4 Common model of HPTLC fingerprint of saponins of *Aralia elata* leaves from 11 batches

2.4.4 指纹图谱相似度分析 通过对 11 个样品的灰度曲线进行积分得出峰面积,并根据峰面积

表 2 11 批辽东槲木叶总皂苷样品共有斑点峰相似度

Table 2 Similarity of same R_f value of saponins of *Aralia elata* leaves from 11 batches

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S9	S10	S11	S12
S1	1.000										
S2	0.904	1.000									
S3	0.873	0.904	1.000								
S4	0.830	0.910	0.890	1.000							
S5	0.951	0.947	0.881	0.970	1.000						
S6	0.925	0.791	0.725	0.850	0.864	1.000					
S7	0.796	0.927	0.891	0.950	0.905	0.863	1.000				
S9	0.800	0.951	0.967	0.960	0.959	0.798	0.931	1.000			
S10	0.726	0.981	0.966	0.920	0.927	0.810	0.927	0.919	1.000		
S11	0.846	0.956	0.923	0.930	0.912	0.815	0.971	0.927	0.944	1.000	
S12	0.913	0.870	0.905	0.870	0.890	0.904	0.926	0.909	0.902	0.926	1.000

2.4.5 TLC 指纹图谱聚类分析 采用 SPSS 19.0 对 S8 对照品及 11 个样品的灰度曲线中 10 个共有峰积分面积进行平均联结(组间)树状图进行聚类分析,分析结果见图 5。由图可见,测试样品分为两大类,即 S8 混合对照品为一类,11 个样品为一类。可见 11 个样品共有峰差别不大,属于一类。若进行次级分类,则发现 S1,S3,S12 样品聚为一类,其他样品聚为一类。而 S1 为 6 月上旬样品,S3 为 7 月上旬样品,S12 为 9 月下旬样品。这一结论与相似度分析相吻合。

3 讨论

选取不同地区的 6 月上旬至 9 月下旬的 11 批次辽东槲木叶药材进行 TLC 分析。通过展开剂在高效薄层板上展开、显色、荧光照射、软件转化分析,建立了辽东槲木叶的荧光-TLC 指纹图谱(HPTLC),对指纹图谱进行斑点灰度曲线积分面积分析,确定斑点位置及含量关系。不同样品均能稳定出现

运用 Visual Similarity Duplicate Image 软件进行相似度分析,结果见表 2。从表中结果看出,S1,S3,S6,S12 样品与其他样品相似度有 <0.900 的情况出现,其余样品间的相似度均在 0.900 以上。原因可能是由于 S1 样品采收于 6 月上旬,S3 样品采收于 7 月上旬,S6 样品采收于 7 月中旬,S12 号样品采收于 9 月下旬,导致某些成分不同或含量差别较大。其余采收于 8 月份及 9 月份中上旬的样品相似度较大,说明 8 月份样品差别不大,8 月份与 9 月份中上旬样品差别如何,有待分别增加 9 月份上、中、下旬实验样本进一步分析。

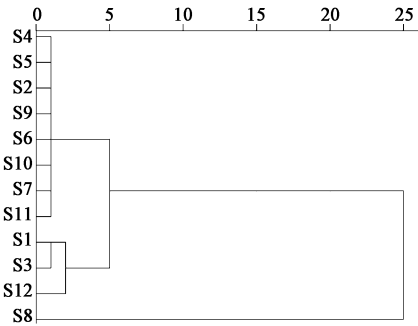


图 5 辽东槲木叶总皂苷聚类分析

Fig.5 Graph of cluster analysis of saponins of *Aralia elata* leaves

10 个共有斑点,将其确定为辽东槲木叶 HPTLC 共有模式。与对照品随行对照,10 个共有峰中指认出其中 4 个斑点的具体成分。从而为辽东槲木叶质量标准建立了一种简便快捷的 HPTLC 指纹图谱方法。

11 批次辽东槲木叶药材中,不同地区的样品 TLC 荧光谱中斑点个数及灰度曲线峰个数有一定

差别,说明来自不同地区的样品所含成分或相应成分含量有一定差别。不同采收期的样品 TLC 荧光谱中斑点个数及灰度曲线峰个数有一定差别,6 月至 7 月中旬及 9 月下旬的样品 10 个成分与其他样品的相似度略小。可能是较早采收的样品某些成分含量还未累积到较大值;而较晚采收的样品某些成分含量有所下降,下降原因可能是由于糖链积累而发生成分转化。同一地区、采集时间也相同的药材成分及含量受海拔高度影响不大。说明辽东槲木叶药材所形成的皂苷成分与地区及生长期都存在一定关系。HPTLC 指纹图谱共有模式的 10 个成分经相似度及聚类分析确定采于 8 月上旬至 9 月中旬的不同产地的样品聚为一类,差别不大。

鉴于上述讨论分析,本研究确定我国东北三省不同地区采收于 8 月份的辽东槲木叶均符合以总皂苷为主的药材标准。7 月份和 9 月份药材还需增加实验样本测试进一步确定是否符合标准。本研究探索的方法可用于辽东槲木叶 HPTLC 指纹图谱的建立,可为辽东槲木叶的质量评价和控制提供依据。

[参考文献]

[1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京:科学出版社,1978:160-167.
[2] 李书心. 辽宁植物志 [M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1988:1268.
[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] 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.
[5] 邹淑君,许树军,李靖,等. 辽东槲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.
[6] 王丽岩,肖洪彬,王鸣慧. 辽东槲木叶总皂苷抗急性肝损伤的实验研究 [J]. 中医药信息, 2009, 26 (2): 29-30, 6.
[7] 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.
[8] 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 Pharm, 2016 (79): 1-11.
[9] 尹丽,宗兰兰,蒲晓辉,等. 薄层色谱法在药物分析中的应用 [J]. 河南大学学报:医学版, 2016, 35 (2): 77-80.
[10] 冯雅斌,杜靓,温静. 薄层色谱法在药物分析中的应用及研究进展 [J]. 疾病监测与控制杂志, 2011, 5 (1): 60-63.
[11] 姚令文,石岩,孙冬梅,等. 人工牛黄薄层指纹图谱多元图像分析及化学计量学研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42 (11): 2117.
[12] 邹纯才,鄢海燕. 我国中药色谱指纹图谱相似度评价方法 30 年 (1988—2017 年) 研究进展与展望 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43 (10): 1969-1977.
[13] 高鹏,代龙. 薄层色谱法在中药指纹图谱研究中的应用 [J]. 山东医药工业, 2002, 21 (6): 17-19.

[责任编辑 顾雪竹]