



基于木通皂苷探讨中药质量评价用对照提取物研究

袁贤达^{1,2}, 高慧敏^{1,2*}, 王智民^{1,2}, 张启伟^{1,2}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

2. 中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700)

[摘要] 在分析总结中药对照提取物应用现状的基础上, 提出中药质量评价用对照提取物根据用途不同, 分为 3 类: ①药材或挥发油对照提取物, 用于原药材提取物或含原药材的中成药薄层鉴别; ②组分对照提取物, 用于某类组分鉴别或色谱峰定位; ③标示了待测成分含量的对照提取物, 可用于样品的定量分析。针对第 3 类对照提取物, 以木通皂苷为例, 从制备工艺、成分鉴定和含量分析等方面探讨了其研制思路和方法。

[关键词] 木通皂苷; 质量评价; 对照提取物

如何客观、科学地评价中药质量是中药行业面临的必须解决的关键问题之一。中药多成分、多功效的作用特点, 决定了单一成分或指标评价难以全面地表达中药质量, 由此多成分同步测定模式成为建立适宜于中医药特点的质量评价体系的重要发展方向。然而, 在当前单指标质量控制尚遭遇对照品供应不足问题的情况下, 多指标质量控制模式应用于实际生产和监管领域并不现实。本课题组采用“一测多评”质量评价模式部分克服了对照品短缺和检测成本昂贵的问题, 实现对照品缺省情况下的多成分同步测定, 但在实际应用的过程中, 对于成分特别复杂的部分样品, 如中成药, 待测色谱峰存在难以定位的问题^[1]。因此, 提出必要时采用对照提取物进行色谱峰的定位。

中药对照提取物是一类多成分的对照物质, 用作薄层定性鉴别、特殊样品分析时色谱峰定位或者定量用混合对照品使用。根据用途不同, 对照提取物的物质内涵和研制思路亦不相同。鉴于目前对照提取物的品种、数量较少, 国家标准体系中尚未制定具体的技术细则。本文在简要概述对照提取物应用现状的基础上, 以木通皂苷对照提取物为例, 从制备工艺、成分鉴定和含量分析等方面阐明作者关于定

量用对照提取物的研究思路, 供同行参考指正。

1 中药对照提取物分类和内涵

受到中药化学对照品分离难度大、天然含量低或化学性质不稳定或供应价格高等诸多因素的制约, 采用对照提取物进行中药质量评价被认为是实现多指标质量控制模式值得推荐并深入研究的对策之一。2010 年版《中国药典》收录了 16 种药材、挥发油或组分对照提取物, 分别为银杏叶提取物、云南白药提取物、乌灵菌粉、发酵虫草菌粉、八角茴香油、广藿香油、木香挥发油、牡荆油、松节油、温莪术油、薄荷素油、檀香油、三七总皂苷、穿龙薯蓣皂苷提取物、总银杏酸、黄山药皂苷提取物^[2]。根据它们的实际应用情况, 分为 3 类: ①药材或挥发油对照提取物, 主要用于原药材提取物或含原药材中成药的薄层鉴别, 与待分析样品共薄层展开, 相当于同时采用多个对照品进行鉴别, 与单一对照品相比, 提高了鉴别的专属性, 与对照药材相比, 简略了制备过程; ②组分对照提取物, 用于待测样品中某类组分鉴别或色谱峰定位, 比如银杏叶提取物、银杏叶片、银杏叶胶囊质量标准中总银杏酸检查项下各色谱峰的定位; ③标示了多个待测成分含量的对照提取物用于定量分析, 比如标示槲皮素、山柰素、异鼠李素含量的银杏叶对照提取物用于银杏叶提取物、银杏叶片、银杏叶胶囊总黄酮苷的含量测定或者标示白果内酯、银杏内酯 A, 银杏内酯 B 和银杏内酯 C 含量的银杏叶对照提取物用于银杏叶提取物、银杏叶片、银杏叶胶囊萜类内酯的含量测定。

第 1 类对照提取物, 研究时可选取 1 批或多批

[稿件编号] 20111209001

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09301-005, 2009ZX09308-003); 中医药行业科技专项(200707009); 中药质量控制技术国家工程实验室项目(2010DZHT002)

[通信作者] * 高慧敏, 副研究员, 研究方向中药药效物质基础研究, Tel/Fax: (010) 84014128, E-mail: huimin_gao@126.com



原药材混合,按照稳定、统一的工艺条件,制成具有代表性的、相同检测条件下色谱行为稳定,可重复的对照提取物;对于多基原的药材固定品种,必要时明确并固定产地;应用时可以避免采用对照药材的繁琐提取过程,溶解后直接使用;按照用途可分为用于配方颗粒用的对照提取物,即以水提取制备的对照物质,和用于代替对照药材的一般对照提取物,即全成分的对照物质。第 2 类对照提取物,根据原药材所含有效成分或活性成分的性质,研究具有选择性提取、纯化、重复性好的制备工艺,获得某类总成分的对照提取物。第 3 类对照提取物,制备工艺稳定,化学组成清晰,所含成分个数相对较少,主要用作多指标同步测定时混合对照品使用。第 1, 2 类对照提取物研制相对简单;第 3 类对照提取物不仅要求制备工艺稳定、具备可重复性,尚需对物质组成进行定性定量分析,对其定值进行准确标化。因此,本文以木通皂苷对照提取物为例,探讨中药质量评价定量用对照提取物的研究方法。

2 基于木通皂苷探讨对照提取物研究

木通为木通科植物木通 *Akebia quinata* (Thunb.) Decne, 三叶木通 *A. trifoliata* (Thunb.) Koidz 或白木通 *A. trifoliata* (Thunb.) Koidz. var. *australis* (Diels) Rehd. 的干燥藤茎,化学研究表明其化学成分主要为苯乙醇苷类和三萜皂苷类。2010 年版《中国药典》收录了以木通苯乙醇 B 为对照品的定性定量分析^[2],尚缺乏皂苷类评价指标用于药材及中成药的质量控制。本研究针对含 3 个化学结构相似、性质相近、极难纯化的木通皂苷对照提取物进行探索研究,为木通药材及其中成药多指标质量控制提供新形式的对照物质,或可为其他定量用对照提取物的研制提供可借鉴的思路和方法。

2.1 仪器与试剂

岛津 LC-20A 高效液相系统(日本岛津公司),配备四元泵、自动进样器、在线脱气机和二极管阵列检测器;安捷伦 6320 高效液相-质谱联用仪(安捷伦公司),配备电喷雾离子源和离子阱质谱检测器;HPD100 大孔吸附树脂(河北沧州);柱色谱硅胶(青岛海洋化工厂分厂);硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂);反相色谱硅胶(Fuji Silysia Chemical, Japan);白木通皂苷 B,木通皂苷 P_{II} 和白木通皂苷 C 对照品由本实验室分离纯化并鉴定结构,纯度 > 98% (HPLC 面积归一化法);甲醇、乙腈(色谱级,德国

fisher 公司),娃哈哈纯净水;其余试剂均为分析纯。

分离用白木通药材采于四川,为木通科木通属植物白木通 *A. trifoliata* var. *australis* 的干燥藤茎。

2.2 方法与结果

2.2.1 木通皂苷对照提取物的制备 白木通药材 1 kg,分别用 10, 10, 8 倍量沸水煎煮 3 次,每次 1 h,滤过,合并煎煮液,静置过夜,离心(3 500 r · min⁻¹, 20 min),上清液过 HPD100 大孔吸附树脂柱,依次用 10 倍柱体积的水,30%, 50%, 70%, 95% 乙醇洗脱,收集含目标成分的 50% 乙醇洗脱液,减压干燥,计算得率(半制备组分 I)。50% 乙醇洗脱部位甲醇溶解,滤除不溶性杂质,滤液硅胶拌样,进行硅胶减压柱色谱(200 ~ 300 目),氯仿-甲醇-水(15:6:1)等度洗脱,合并第 3 ~ 5 倍柱体积的洗脱液,干燥,称重,计算粗品得率(半制备组分 II)。粗品经 ODS-C₁₈ 柱色谱纯化,得木通皂苷对照提取物,计算得率(半制备组分 III)。重复上述工艺制备 3 批样品,各批次样品得率见表 1。

表 1 3 批样品不同制备环节的得率及成品中各化合物的质量分数

Table 1 The yield of three batches of the intermediates and finished samples as well as the content of compounds %

No.	半制备 组分 I	半制备 组分 II	半制备 组分 III	成品中各成分质量分数		
				白木通 皂苷 C	白木通 皂苷 B	木通皂 苷 P _{II}
1	4.33	0.649	0.304	25.3	47.5	13.7
2	4.58	0.758	0.371	23.3	43.7	12.8
3	5.50	0.900	0.392	27.8	47.8	13.5

2.2.2 LC-MS/MS 快速鉴定木通皂苷对照提取物

中各成分的结构 对照提取物中各组分的结构鉴定方法主要有 2 类:一种是针对提取物中的各组分进行分离纯化,得到每一个单体化合物后通过理化性质和波谱数据鉴定结构,再与对照提取物比对波谱特征;另一种是采用各种在线快速鉴定方法,比如 LC-MS/MS, LC-DAD-NMR 等。木通皂苷对照提取物中 3 个主要成分均为已知化合物,采用对照品与样品在相同检测条件下比对保留时间和质谱裂解规律的方法进行其中各成分的结构鉴定。

色谱条件: Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 A(甲醇-0.1% 甲酸溶液, 2:3), 流动相 B(乙腈-0.1% 甲酸溶液, 2:3); 梯

度洗脱, 0 ~ 40 min, 87% ~ 37% A; 检测波长 203 nm, 流速 1.0 mL · min⁻¹。

质谱条件: 负离子检测, ESI 离子源, 喷雾压力 310.26 kPa, 干燥气流速 12 L · min⁻¹, 干燥温度 350 °C, 扫描范围 *m/z* 100 ~ 1 500; MS/MS 采用自动多级质谱, 对次级碎片中丰度最强者进行再裂解, 阱内裂解电压根据所选择的碎片结构自动调节。

上述检测条件下, 混合对照品和对照提取物样品中各色谱峰在正离子模式下响应较弱, 负离子检测给出了较为丰富的碎片信息, 色谱图和总离子流图见图 1, 准分子离子峰和主要的碎片信息见表 2。

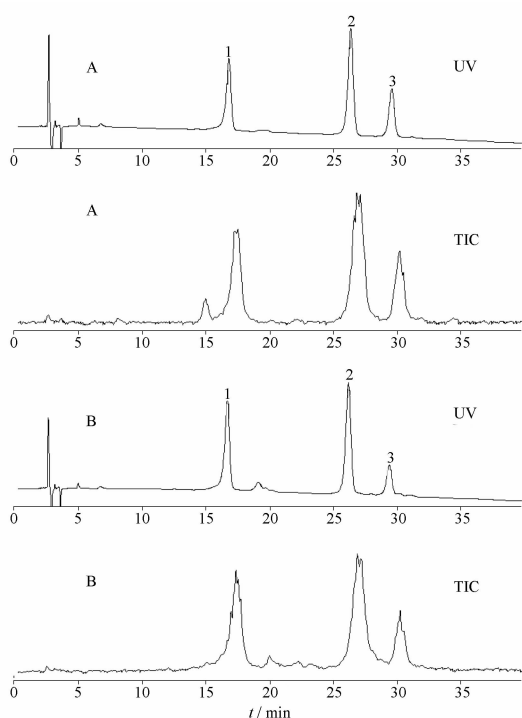
白木通皂苷 B, 白木通皂苷 C 和木通皂苷 P_{II} 结构相似, 糖链部分糖的组成和连接顺序相同, 仅在苷元部分有微小差异, 负离子 LC-MS/MS 分析给出了相似的质谱裂解规律。一级质谱均给出了准分子离子峰 [M - H]⁻, 同时, 由于源内裂解产生了少量的失苷元离子峰和失糖链离子峰; 二级质谱进一步证实准分子离子峰 [M - H]⁻ 由于中性丢失苷元而产生糖链碎片离子 *m/z* 601 [M - H - aglycone]⁻; 三级质谱存在由糖链碎片离子 *m/z* 601 衍生的离子峰 *m/z* 499, 367 和 221。上述裂解规律为表征不同批次木通皂苷对照提取物中化学成分结构奠定了基础。

2.2.3 木通皂苷对照提取物中各组分的含量测定

采用文献 [3] 方法, 对制备的 3 批木通皂苷对照提取物样品进行 HPLC 分析。分别取 3 批对照提取物样品约 6 mg, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释到刻度, 得供试品溶液; 另取白木通皂苷 B, 木通皂苷 P_{II} 和白木通皂苷 C 对照品适量, 甲醇溶解得质量浓度分别为 0.152, 0.403, 0.200 g · L⁻¹ 的混合对照品溶液。分别精密吸取上述 2 种溶液 10 μL, 进样分析, 计算各批次样品中 3 种成分的质量分数, 见表 1。

3 讨论

目前 2010 版《中国药典》收载对照提取物 16 种^[2], 中国食品药品检定研究院发布了 20 种^[4], 鉴于对照提取物的品种数量较少, 且因用途不同, 不同品种的制备工艺和物质组成亦不相同, 其研制思路和方法及其应用可行性尚处于探索阶段。实验以白木通药材中 3 个结构极其相似的皂苷化合物为例, 从制备工艺、成分快速鉴定和含量分析等方面探讨木通皂苷对照提取物研制的工艺和方法, 为木通药材及其中成药多指标质量控制提供新形式的对照物质, 同时, 为其他定量用对照提取物的研制提供可借鉴的思路和方法。



A. 混合对照品; B. 木通对照提取物样品; 1. 白木通皂苷 B; 2. 木通皂苷 P_{II}; 3. 白木通皂苷 C。

图 1 混合对照品和样品的 HPLC 和 TIC 图

Fig. 1 HPLC and TIC chromatograms of mixed reference substances and sample

表 2 对照提取物中 3 个主成分的质谱信息

Table 2 LC-MS and MS/MS data of three compounds in the reference mutongsaponin

化合物	MW	[M - H] ⁻ / <i>m/z</i>	MS ⁿ / <i>m/z</i>
白木通皂苷 B	1 074	1 073	601 [M - H - aglycone] ⁻ , 471 [M - H - 2glc-rha-xyl] ⁻ , 499, 367, 221
木通皂苷 P _{II}	1 090	1 089	601 [M - H - aglycone] ⁻ , 487 [M - H - 2glc-rha-xyl] ⁻ , 499, 367, 221
白木通皂苷 C	1 090	1 089	601 [M - H - aglycone] ⁻ , 487 [M - H - 2glc-rha-xyl] ⁻ , 499, 367, 221



实验针对木通皂苷对照提取物制备过程中沸水提取、组合大孔吸附树脂富集浓缩、硅胶减压柱色谱、反相 C_{18} 柱纯化等关键环节开展深入研究,以获得稳定、可重复的批量制备工艺。皂苷传统的富集方法为正丁醇萃取,考虑到正丁醇毒性较大,沸点较高,批量制备时溶剂回收存在困难和成分易降解,实验根据前期研究基础,将沸水提取液直接上大孔吸附树脂柱,水洗脱除去多糖等水溶性杂质、30%乙醇洗脱除去苯乙醇苷和木脂素类成分、50%乙醇洗脱部位很好地富集了木通总皂苷,而一些非极性成分继续保留在树脂柱上。50%乙醇洗脱液减压浓缩过程中,随着乙醇量的减少,液体由于富含皂苷发泡现象严重,导致直接回收效率较低,此时采用一定量水稀释洗脱物,再次通过大孔吸附树脂柱,除去水液,直接以95%乙醇洗脱,达到快速浓缩的目的。在硅胶减压柱粗分、反相柱纯化环节,针对柱子径高比、上样量、洗脱速度和洗脱体积等工艺参数进行了优化,综合考虑产品纯度和收率,最终确定了实验采用的工艺流程。

木通来源于木通科植物木通、三叶木通和白木通的干燥藤茎,实验设计时曾考察了不同产地、不同

来源木通药材中3种皂苷化合物之间的比例关系(1:5:3左右),期望能获得工艺稳定、可重复、制备的对照提取物化学组成比例关系恒定的制备工艺。从同一批原料药材按照确定的制备工艺制得的3批样品含量结果分析,不同批次对照提取物样品3种化合物的比例关系略有差异,三者的总含量平均值为85.1%,3种化合物之间比例在2:3.5:1左右,与药材中三者实际比例关系也存在偏差。由此提出,既然实际应用前每一批对照提取物中各成分均需要标化、定值,那么在研制时则不必要求制备的每一批对照提取物样品的化学组成比例恒定,只需要混批时进行标定,且色谱行为稳定、可重复,稳定性满足贮藏条件需求即可。

[参考文献]

- [1] 高慧敏,宋宗华,王智民,等. 适合中药特点的质量评价模式——QAMS研究概述[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(4): 405.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2010:59,附录 XV G.
- [3] 王智民,高慧敏,付雪涛,等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23):1925.
- [4] 马玲云,马双成. 中药标准物质的发展现状与展望[J]. 中国药事, 2010, 24(12):1232.

Study on reference extracts for quality assessment on traditional Chinese medicines based on akebiae saponin

YUAN Xianda^{1,2}, GAO Huimin^{1,2*}, WANG Zhimin^{1,2}, ZHANG Qiwei^{1,2}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. National Engineering Laboratory of Quality Control Technology of Chinese Materia Medica, Beijing 100700, China)

[Abstract] On the basis of analysis and summary of current application of reference extracts of traditional Chinese medicine, reference extracts for quality assessment of traditional Chinese medicines are divided into three classes by purpose: ①herbal or volatile oil reference extracts for TLC identification of original herbal medicines or patent traditional Chinese medicines containing original herbal medicines. ②component reference extracts for identification of certain components or positioning of chromatographic peaks. ③reference extracts marked with component content to be determined for quantitative analysis on samples. For the third kind of reference extracts, akebiae saponin was taken as an example for preparation thought and methods in such aspects as preparation process, component identification and content analysis.

[Key words] akebiae saponin; quality evaluation; reference extract

doi:10.4268/cjcm20121614

[责任编辑 孔晶晶]