

基于 HPLC 特征图谱与制备分离技术川木通 标准汤剂化学成分研究

李振雨^{1,2}, 唐本欣³, 段志文^{1,2}, 何民友^{1,2}, 周湘媛^{1,2}, 卢晓莹^{1,2}, 陈向东^{1,2*}, 孙冬梅^{1,2}

(1. 广东一方制药有限公司, 广东 佛山 528244; 2. 广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东 佛山 528244; 3. 顺德职业技术学院, 广东 佛山 528300)

摘要:目的: 建立川木通标准汤剂特征图谱, 结合柱色谱和制备色谱分离技术对未知特征峰进行分离、纯化和结构鉴定, 为川木通标准汤剂及其制剂质量标准的提高提供参考。方法: 制备 12 批川木通标准汤剂, 采用高效液相色谱法(HPLC)建立川木通标准汤剂特征图谱, 将十八烷基硅烷键合硅胶填料(ODS)的柱色谱和半制备高效液相色谱相结合, 对川木通标准汤剂特征图谱的特征峰进行分离、纯化, 并采用核磁共振(NMR)和质谱(MS)分析对分离得到的未知化合物进行结构鉴定。结果: 12 批川木通标准汤剂特征图谱共标识出 7 个共有特征峰, 其整体相似度均在 0.90 以上。经分离制备和结构分析, 共鉴定出 5 个化合物, 分别为腺苷、落叶松树脂醇-4,4'-二-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、落叶松树脂醇-4-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、开环异落叶松树脂酚和落叶松树脂醇, 其中腺苷、开环异落叶松树脂酚和落叶松树脂醇系首次从川木通中分离得到。结论: 通过对川木通中极性较大的水溶性成分的研究, 为川木通药材、饮片及其制剂质量标准的提高提供有益参考。

关键词: 川木通标准汤剂; 特征图谱; 化学成分; 制备分离; 结构鉴定

DOI: 10.11954/ytctyy.202409009

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

中图分类号: R284; R283

文献标识码: A

文章编号: 1673-2197(2024)09-0042-06



Study on Chemical Constituents of *Caulis Clematidis Armandii* Standard Decoction Based on HPLC Specific Chromatogram and Preparation Separation Techniques

Li Zhenyu^{1,2}, Tang Benxin³, Duan Zhiwen^{1,2}, He Minyou^{1,2}, Zhou Xiangyuan^{1,2}, Lu Xiaoying^{1,2},
Chen Xiangdong^{1,2*}, Sun Dongmei^{1,2}

(1. Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528244, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula, Foshan 528244, China; 3. Shunde Vocational and Technical College, Foshan 528300, China)

Abstract; Objective: To provide reference for improving the quality standards of *Caulis Clematidis Armandii* standard decoction and its preparations, the specific chromatogram of *Caulis Clematidis Armandii* standard decoction was established and the unknown characteristic peaks were separated, purified, and identified by column chromatography and preparative chromatography separation techniques. **Methods:** 12 batches of *Caulis Clematidis Armandii* standard decoction were prepared, and the specific chromatograms of *Caulis Clematidis Armandii* standard decoction were established using high-performance liquid chromatography (HPLC). The column chromatography of octadecylsilane bonded silica (ODS) gel packing and semi preparative high-performance liquid chromatography were combined to separate and purify the characteristic peaks of *Caulis Clematidis Armandii* standard decoction. The structure of the isolated unknown compounds was identified using nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS) analysis. **Results:** A total of 7 common characteristic peaks were identified in the specific chromatograms of 12 batches of *Caulis Clematidis Armandii* standard decoction, with an overall similarity of over 0.90. After separation, preparation, and structural analysis, a total of 5 compounds were identified, namely adenosine, lariciresinol-4,4'-bis-O- β -D-glucopyranoside, lariciresinol-

收稿日期: 2023-09-29

基金项目: 国家工信部产业技术基础公共服务平台项目—中药全产业链质量技术服务平台(2022-230-221)

作者简介: 李振雨(1989—), 男, 硕士, 广东一方制药有限公司副主任中药师, 研究方向为中药饮片及中药配方颗粒。

通讯作者: 陈向东(1979—), 男, 广东一方制药有限公司高级工程师, 教授, 研究方向为中药饮片及中药配方颗粒。

E-mail: 1083656123@qq.com

4-*O*- β -D-glucopyranoside, secoisolariciresinol and lariciresinol. Among them, adenosine, secoisolariciresinol and lariciresinol were first isolated from *Caulis Clematidis Armandii*. **Conclusion:** This study provides useful references for improving the quality standards of *Caulis Clematidis Armandii* medicinal materials, decoction pieces, and preparations by studying the highly polar water-soluble components in *Caulis Clematidis Armandii*.

Keywords: *Caulis Clematidis Armandii* Standard Decoction; Specific Chromatogram; Chemical Components; Preparation Separation; Structure Identification

中药川木通为毛茛科植物小木通 *Clematis armandii* Franch. 或绣球藤 *Clematis montana* Buch. Ham. 的干燥藤茎,具有利尿通淋、清心除烦、通经下乳之功效^[1]。川木通主产于四川、贵州、云南和西藏等地^[2],野生资源丰富,是较为常用的中药。目前关于川木通的化学成分研究报道较少,已有研究报道显示,川木通中含有三萜、甾醇、黄酮、木脂素和酚类成分^[2-4],但《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)川木通药材项下只有性状、薄层鉴别和浸出物测定,目前尚无含量测定指标,川木通的药材标准仍需进一步提高与完善。

传统中药以汤剂为主要用药形式,经过上千年的临床实践,目前仍被广泛使用。但是传统汤剂因煎煮时间长、携带不便、无法长时间存放、质量不均一等缺点给临床用药带来极大不便,也阻碍中药现代化进程,因此,中药配方颗粒等现代中药剂型应运而生。为标定中药配方颗粒等现代中药的质量,保证临床用药的安全有效,也为市场监管提供依据,“中药标准汤剂”的概念被正式提出。中药标准汤剂是以中药饮片为原料,以水为溶剂,参考传统中药汤剂煎煮习惯,并以标准化煎药模式制备得到的中药饮片水煎液,用于标准化中药临床用药,保证中药配方颗粒等新型中药在临床使用的准确性和质量可控^[5-6]。

目前,关于川木通标准汤剂的研究报道尚未见到,本课题组在以川木通标准汤剂质量指标为基础进行川木通配方颗粒质量标准的研究过程中,希望通过建立川木通标准汤剂特征图谱,完善川木通标准汤剂和配方颗粒的质量控制。为解决川木通标准汤剂定量指标缺乏和特征图谱特征峰指认的难题,以柱色谱和制备液相色谱相结合,对川木通标准汤剂特征图谱中的目标特征峰进行制备分离和结构鉴定,以期为川木通药材、饮片及其制剂质量标准的提高提供有益参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器、色谱柱与填料

仪器: Waters Arc UHPLC-DAD-QDa 联用仪(美国 Waters 公司);岛津 LC-20AR 制备液相(日本岛津公司);Bruker Avance III 400 MHz 核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司);薄层用色谱硅胶(青岛海洋化工

厂);Waters XSelect HSS T3 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m)色谱柱;反向柱填料 ODS(日本 YMC 公司, L 粒径:50 μ m);超纯水系统 Milli-Q Direct(德国默克公司);万分之一天平 ME204E(瑞士梅特勒-托利多公司);数控超声波清洗器 KQ-500DE(中国昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

色谱纯甲醇、乙腈(德国默克公司);水为自制超纯水;其他试剂均为分析纯。

1.3 试药

12 批川木通药材,分别产自广东、湖南、湖北、广西、安徽和四川,产地信息见表 1 所示,经广东一方制药有限公司孙冬梅主任中药师鉴定为毛茛科植物小木通 *Clematis armandii* Franch. 的干燥藤茎。12 批川木通药材按照 2020 年版《中国药典》“川木通”饮片项下炮制规定制成 12 批川木通饮片,具体炮制方法为:取川木通药材,略泡,润透,切厚片,干燥,即得。

表 1 17 批川木通药材产地信息

序号	产地
S1	广东省韶关市
S2	湖南省邵阳市
S3	湖北省恩施市
S4	湖北省恩施市
S5	湖北省恩施市
S6	湖北省恩施市
S7	广西壮族自治区桂林市
S8	广西壮族自治区桂林市
S9	安徽省六安市
S10	四川省绵阳市
S11	四川省广元市
S12	四川省绵阳市

2 方法与结果

2.1 川木通标准汤剂特征图谱的建立

2.1.1 色谱条件 采用 Waters XSelect HSS T3 C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μ m) 色谱柱;以乙腈为流动相 A, 0.1% 磷酸溶液为流动相 B;梯度洗脱(0~5 min, 3% A; 5~20 min, 3%→18% A; 20~30 min, 18%→22% A; 30~45 min, 22%→35% A);检测波长为 205 nm;柱温为 30℃;流速为 1.0 mL/min。

2.1.2 川木通标准汤剂的制备 根据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》^[7]和《医疗机构中药煎药室管理规范》^[8],确定川木通标准汤剂的制

备工艺为:取川木通饮片 200 g,加水煎煮两次,第一次加 10 倍量水,浸泡 30 min,煎煮 30 min,趁热过滤,滤液迅速冷却。第二次加 8 倍量水,煎煮 25 min,趁热过滤,滤液迅速冷却,合并两次滤液,减压浓缩,冷冻干燥,得到川木通标准汤剂冻干粉。

2.1.3 供试品溶液的制备 取川木通标准汤剂冻干粉适量,研细,取 0.1 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 mL,称定质量,超声处理(温度 30℃,功率 300 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 方法学验证 (1)精密度考察。取川木通标准汤剂(编号:S3),按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次,以峰 3(落叶松树脂醇-4,4'-二-O-βD-吡喃葡萄糖苷)为参照峰 S,计算其余特征峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值为 0.27%,相对峰面积 RSD 值为 2.07%,均小于 3.0%,表明仪器精密度良好。

(2)重复性考察。取川木通标准汤剂(编号:S3)适量,平行 6 份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液 6 份,按“2.1.1”项下色谱条件分别进行测定,以峰 3(落叶松树脂醇-4,4'-二-O-βD-吡喃葡萄糖苷)为参照峰 S,计算其余特征峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值为 0.63%,相对峰面积 RSD 值为 2.84%,均小于 3.0%,表明该方法重复性良好。

(3)稳定性考察。取“重复性考察”项下供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件,分别在 2、4、6、8、12、24 h 进样分析,以峰 3(落叶松树脂醇-4,4'-二-O-βD-吡喃葡萄糖苷)为参照峰 S,计算其余特征峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值为 1.21%,相对峰面积 RSD 值为 2.25%,均小于 3.0%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.5 特征图谱的建立 取 12 批川木通标准汤剂冻干粉,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液 12 份,按“2.1.1”项下色谱条件测定样品特征图谱,导出特征图谱 CDF 格式,并导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版本)。以 S1 样品特征图谱为参照,进行多点校正和峰匹配,生成川木通标准汤剂对照特征图谱,12 批川木通标准汤剂样品特征图谱叠加图见图 1 所示,川木通标准汤剂对照特征图谱见图 2 所示。结果显示,川木通标准汤剂特征图谱共标识出 7 个共有特征峰,以位置较为居中的峰 3 为参照峰 S,分别计算其余特征峰与峰 3 的相对保留时间和相对峰面积,峰 1~2、峰 4~7 与 S 峰的相对保留时间均值分别为 0.617(峰 1)、0.642(峰 2)、1.098(峰 4)、1.313(峰 5)、1.739(峰 6)、1.852(峰

7);相对峰面积均值分别为 0.233(峰 1)、0.190(峰 2)、0.151(峰 4)、0.851(峰 5)、2.155(峰 6)、0.932(峰 7);计算各批川木通标准汤剂样品特征图谱与对照特征图谱的相似度,结果见表 2 所示。12 批川木通标准汤剂特征图谱的相似度均在 0.90 以上,特征图谱可以作为共性特征用于川木通标准汤剂的鉴别和质量控制。

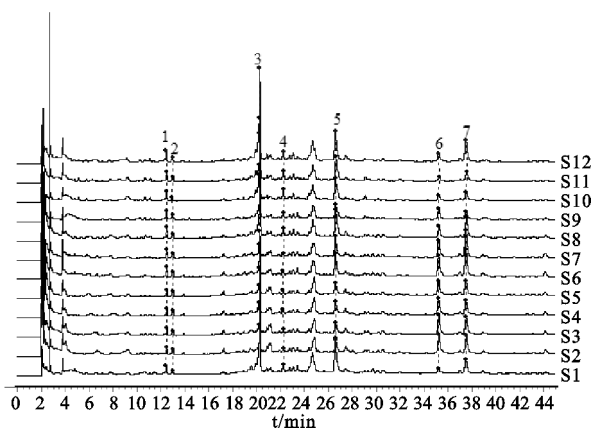


图 1 12 批川木通标准汤剂特征图谱叠加图

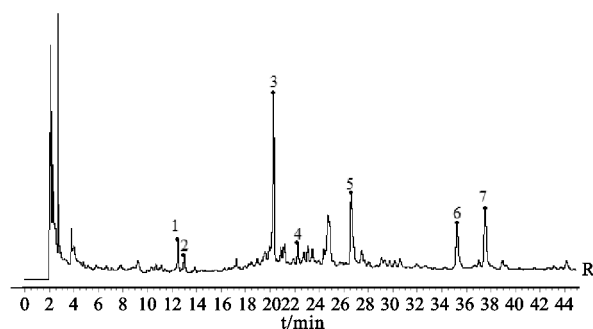


图 2 川木通标准汤剂对照特征图谱

表 2 川木通标准特征图谱相似度计算结果

编号	峰 1
S1	0.933
S2	0.923
S3	0.920
S4	0.956
S5	0.950
S6	0.928
S7	0.902
S8	0.988
S9	0.980
S10	0.920
S11	0.934
S12	0.964

2.2 特征峰的制备分离和结构鉴定

2.2.1 特征峰的提取、分离过程 取川木通标准汤剂冻干粉 10 g,用 1 000 mL 70% 甲醇超声溶解,滤过,取续滤液,减压浓缩,得 70% 甲醇提取物部位

(CM 部位)。将 CM 部位进行 ODS 柱色谱, 甲醇—水(10:90—100:0, v/v) 梯度洗脱, 通过 TLC 及 HPLC 分析, 合并相同流分, 得到四个流分(Fr. 1~Fr. 4)。Fr. 1 经 ODS 柱色谱分离, 甲醇—水(10:90—100:0, v/v) 梯度洗脱, 经 TLC 及 HPLC 分析, 合并相同流分, 得到 6 个子流分(Fr. 1a~Fr. 1f)。Fr. 1a 经半制备 HPLC(乙腈—水 8:92, v/v) 分离纯化, 得到化合物 1(9.5mg); Fr. 1b 经半制备 HPLC(乙腈—水 15:85, v/v) 分离纯化, 得到化合物 2(4.3mg); Fr. 1c 经半制备 HPLC(乙腈—水 20:80, v/v) 分离纯化, 得到化合物 3(4.7mg); Fr. 4 经 ODS 柱色谱, 乙腈—水(3:97—100:0, v/v) 梯度洗脱, 经 TLC 及 HPLC 分析, 合并相同流分, 得到 6 个子流分(Fr. 4a~Fr. 4f)。Fr. 4d 经半制备 HPLC(乙腈—水 30:70, v/v) 分离纯化, 得到化合物 4(5.8mg) 和 5(4.9mg)。

2.2.2 结构鉴定 (1) 化合物 1。淡黄色粉末(甲醇—水); ESI-MS m/z : 302 $[M+Cl]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.35 (1H, s, H-8), 8.14 (1H, s, H-2), 7.37 (2H, s, 6-NH₂), 5.87 (1H, d, $J=6.2$ Hz, H-1'), 5.47 (2H, m, 2', 5'-OH), 5.23 (1H, s, 3'-OH), 4.61 (1H, m, H-2'), 4.14 (1H, s, H-3'), 3.96 (1H, q, $J=3.4$ Hz, H-4'), 3.68 (1H, dt, $J=12.1, 3.9$ Hz, H-5'a), 3.56 (1H, m, H-5'b); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 156.2 (C-6), 152.4 (C-2), 149.1 (C-4), 139.9 (C-8), 119.4 (C-5), 87.9 (C-1'), 85.9 (C-4'), 73.4 (C-2'), 70.7 (C-3'), 61.7 (C-5')。以上数据与文献[9]报道一致, 故鉴定化合物 1 为腺苷(Adenosine)。

(2) 化合物 2。淡黄色油状物(甲醇); ESI-MS m/z : 719 $[M+Cl]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.02 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5), 6.98 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.88 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2), 6.82 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 6.78 (1H, dd, $J=8.4, 2.0$ Hz, H-6), 6.68 (1H, dd, $J=8.3, 2.0$ Hz, H-6'), 4.87 (1H, d, $J=7.0$ Hz, H-1''), 4.85 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-1'), 4.72 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-7), 3.90 (1H, m, H-9'b), 3.74 (6H, s, OMe-3, 3'), 3.58 (1H, m, H-9'a), 2.85 (1H, dd, $J=13.4, 4.7$ Hz, H-7'b), 2.62 (1H, m, H-8'), 2.46 (1H, overlapped, H-7'a), 2.20 (1H, m, H-8); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 148.8 (C-3), 148.7 (C-3'), 145.5 (C-4), 144.8 (C-4'), 137.6 (C-1), 134.6 (C-1'), 120.3 (C-6'), 117.8 (C-6), 115.2 (C-5'), 115.0 (C-5), 113.0 (C-2'), 110.1 (C-2), 100.2 (C-1''), 100.1 (C-1'''), 81.6 (C-7), 77.0 (C-5'', 5'''), 76.9 (C-3'', 3'''), 73.2 (C-2'', 2'''), 71.9 (C-9'), 69.7 (C-4'', 4'''), 60.7 (C-6'', 6'''), 58.6

(C-9), 55.6 (-OCH₃), 55.6 (-OCH₃), 52.5 (C-8), 41.8 (C-8'), 32.2 (C-7')。以上数据与文献[10]报道一致, 故鉴定化合物 2 为落叶松树脂醇-4,4'-二- O - β -D-吡喃葡萄糖苷(Lariciresinol-4,4'-bis- O - β -D-glucopyranoside)。

(3) 化合物 3。淡黄色油状物(甲醇); ESI-MS m/z : 557 $[M+Cl]^-$, 521 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.02 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5), 6.88 (1H, $J=2.1$, H-2), 6.78 (1H, dd, $J=8.4, 2.1$ Hz, H-6), 6.74 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 6.67 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-6'), 6.57 (1H, dd, $J=8.0, 2.0$ Hz, H-5'), 4.87 (1H, d, $J=7.0$ Hz, Glc-H-1), 4.71 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-7), 3.89 (1H, m, H-9'a), 3.75 (3H, s, 3-OCH₃), 3.74 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.66 (1H, m, H-9a), 3.57 (1H, m, H-9'b), 3.51 (1H, overlapped, H-9b), 2.80 (1H, dd, $J=13.5, 4.8$ Hz, H-7'a), 2.57 (1H, m, H-8'), 2.42 (1H, m, H-7'b), 2.19 (1H, m, H-8); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 148.7 (C-3), 147.4 (C-3'), 145.5 (C-4), 144.6 (C-4'), 137.7 (C-1), 131.7 (C-1'), 120.6 (C-6'), 117.7 (C-6), 115.4 (C-5'), 115.0 (C-5), 112.7 (C-2'), 110.1 (C-2), 100.1 (C-1''), 81.6 (C-7), 77.0 (C-5''), 76.9 (C-3''), 73.2 (C-2''), 71.9 (C-9'), 69.7 (C-4''), 60.7 (C-6''), 58.6 (C-9), 55.6 (-OCH₃), 55.5 (-OCH₃), 52.5 (C-8), 41.9 (C-8'), 32.1 (C-7')。以上数据与文献[11-12]报道一致, 故鉴定化合物 3 为落叶松树脂醇-4- O - β -D-吡喃葡萄糖苷(Lariciresinol-4- O - β -D-glucopyranoside)。

(4) 化合物 4。淡黄色油状物(甲醇); ESI-MS m/z : 361 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.65 (2H, s, 4,4'-OH), 6.62 (2H, overlapped, H-5, 5'), 6.62 (2H, overlapped, H-2, 2'), 6.49 (2H, dd, $J=8.0, 2.0$ Hz, H-6, 6'), 4.54 (2H, brs, 9,9'-OH), 3.67 (6H, s, 3,3'-OCH₃), 3.37 (4H, overlapped, H-9,9'), 2.52 (4H, overlapped, H-7,7'), 1.82 (2H, m, H-8,8'); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 147.2 (C-3,3'), 144.3 (C-4,4'), 132.2 (C-1,1'), 121.1 (C-6,6'), 115.0 (C-5,5'), 112.9 (C-2,2'), 60.2 (C-9,9'), 55.4 (3,3'-OCH₃), 42.4 (C-8,8'), 33.9 (C-7,7')。以上数据与文献[13]报道一致, 故鉴定化合物 4 为开环异落叶松树脂酚(Secoisolariciresinol)。

(5) 化合物 5。淡黄色油状物(甲醇); ESI-MS m/z : 359 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.82 (2H, overlapped, 4,4'-OH), 6.82 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-2'), 6.74 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-2), 6.71 (1H, brd, $J=8.0$ Hz, H-6'), 6.67 (2H, d, $J=8.0$ Hz,

H-5,5'), 6.57 (1H, dd, $J=7.9, 2.0$ Hz, H-6), 4.71 (1H, brs, 9'-OH), 4.64 (1H, d, $J=6.3$ Hz, H-7'), 3.87 (1H, dd, $J=8.2, 6.5$ Hz, H-9a), 3.74 (3H, s, 3-OCH₃), 3.74 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.64 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-9'a), 3.55 (1H, dd, $J=8.2, 6.5$ Hz, H-9b), 3.46 (1H, overlapped, H-9'b), 2.82 (1H, dd, $J=13.4, 4.7$ Hz, H-7a), 2.58 (1H, m, H-8), 2.41 (1H, dd, $J=13.4, 10.9$ Hz, H-7b), 2.18 (1H, m, H-8'), 2.18 (1H, m, H-8'); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 147.4 (C-3'), 147.4 (C-3), 145.5 (C-4'), 144.6 (C-4), 134.7 (C-1'), 131.7 (C-1), 120.6 (C-6), 118.2 (C-6'), 115.4 (C-5'), 115.0 (C-5), 112.7 (C-2), 109.9 (C-2'), 81.8 (C-7'), 71.8 (C-9), 58.6 (C-9'), 55.6 (3-OCH₃), 55.5 (3'-OCH₃), 52.4 (C-8'), 42.0 (C-8), 32.2 (C-7)。以上数据与文献[14]报道一致,故鉴定化合物5为落叶松树脂醇(Lariciresinol)。

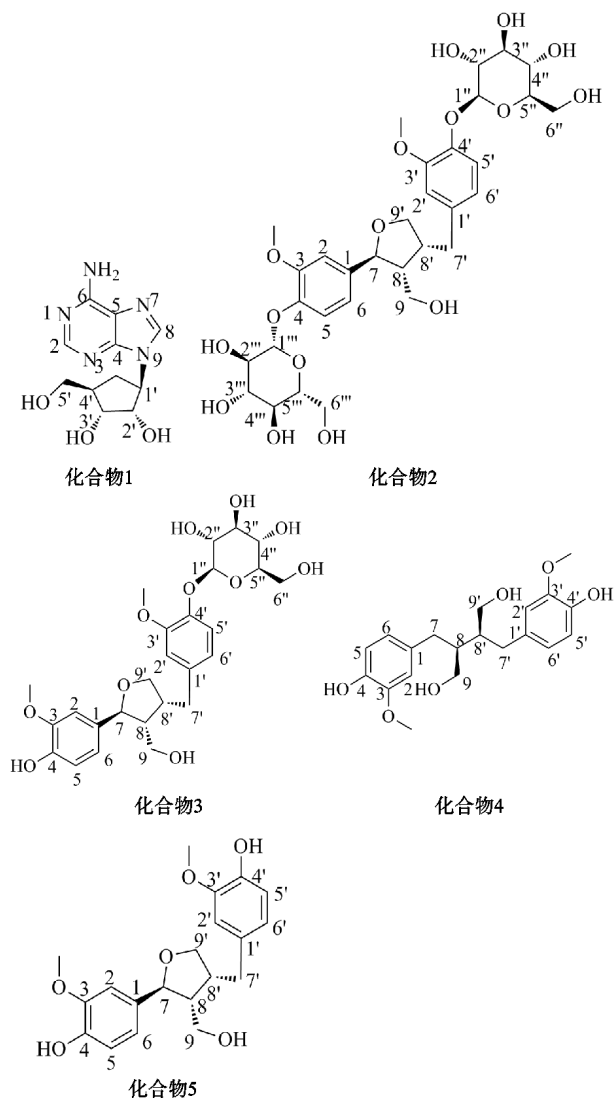
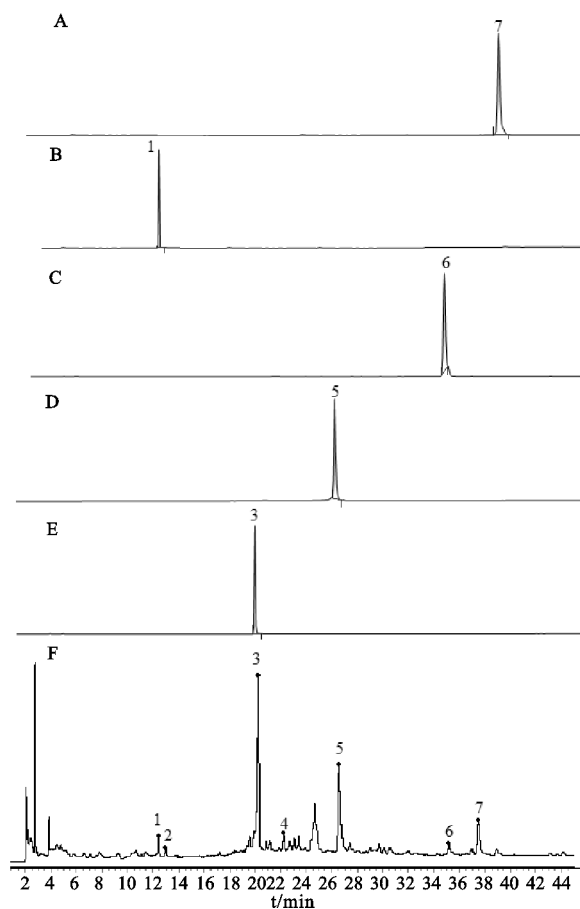


图3 化合物1~5的结构式

2.3 特征峰的再确证

取分离得到的上述5种目标化合物适量,加甲醇分别制成每1 mL含腺苷100 μ g、落叶松树脂醇-4,4'-二-O- β -D-吡喃葡萄糖苷50 μ g、落叶松树脂醇-4-O- β -D-吡喃葡萄糖苷50 μ g、开环异落叶松树脂醇100 μ g和落叶松树脂醇100 μ g的溶液,按照“2.3.1”色谱条件进行分析,结果见图4所示,结果显示,目标化合物与川木通标准汤剂特征图谱特征峰1、3、5、6、7的保留时间基本一致,经紫外可见吸收光谱比对,分离得到的目标化合物紫外可见吸收光谱与相应特征峰的紫外可见吸收光谱完全一致。



注:A:落叶松树脂醇样品;B:腺苷样品;C:开环异落叶松树脂醇样品;D:落叶松树脂醇-4-O- β -D-吡喃葡萄糖苷样品;E:落叶松树脂醇-4,4'-二-O- β -D-吡喃葡萄糖苷样品;F:川木通标准汤剂样品。

图4 特征峰的再确证

3 讨论

3.1 特征图谱的建立

本研究所用的川木通为小木通 *Clematis arman-dii* Franch. 的干燥藤茎,标准汤剂的整体出膏率较低。目前,关于川木通化学成分的研究报道较少,已有研究结果显示,川木通主要有效成分为皂苷、黄酮和木脂素类等^[15],因此,特征图谱研究应尽可能表征

上述成分,在特征图谱的建立过程中,考察甲醇—水、乙腈—水、甲醇—0.1%磷酸溶液、乙腈—0.1%磷酸溶液等溶剂系统的洗脱效果,结果显示,无论采用何种溶剂系统洗脱,川木通标准汤剂的图谱整体色谱峰数量均较少。因此,综合考察色谱峰峰型和分离效果,选择乙腈—0.1%磷酸溶液为流动相。在供试品溶液制备过程中,以色谱峰的个数,“特征峰的总峰面积/称样量”为指标,对供试品的提取溶剂、提取方式、提取时间和溶剂用量进行考察,最终确定最优的供试品溶液制备方法。结合12批样品的共有峰情况,选择分离度好、峰型较高、纯度较高的7个共有峰作为川木通标准汤剂特征图谱的特征峰。

3.2 特征峰的分离、纯化和结构鉴定

关于川木通化学成分尤其是水溶性成分的研究报道较少,目前的质量控制均采用脂溶性的指标^[16],采用柱色谱和制备液相相结合,成功地从川木通的标准汤剂中分离得到5个水溶性较大的成分,除腺苷外,其余4个成分均为木脂素类,其中腺苷、开环异落叶松树脂酚和落叶松树脂醇系首次从川木通中分离得到。传统理论认为,川木通具有利尿作用,研究显示,川木通的利尿作用与含有的甾醇、三萜皂苷和木脂素类成分有关^[17]。2020年《中国药典》在功能与主治上规定,川木通具有利尿通淋、清心除烦、通经下乳的功效,说明川木通主要药效除利尿之外,还应有抗菌、消炎、抗病毒、抗肿瘤等功效。研究结果显示,腺苷能够通过抑制中性粒细胞趋化、黏附、呼吸爆发及吞噬功能,抑制心肌缺血再灌注时中性粒细胞聚集及其损伤发挥抗炎作用^[18],川木通所含的落叶松树脂醇和开环异落叶松树脂酚具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性^[19]、抗肿瘤^[20]、抗抑郁^[21]等作用。而落叶松树脂醇-4-O- β -D-吡喃葡萄糖苷和落叶松树脂醇-4,4'-二-O- β -D-吡喃葡萄糖苷显示对HSV病毒具有一定的抑制作用^[22],可见腺苷、木脂素类成分均是川木通的重要活性成分。

4 结论

由于2020年版《中国药典》对川木通的质量控制仍缺乏含量测定指标,本实验从川木通中分离得到的4个木脂素类化合物生物活性基本明确,且含量较高,具有一定的专属性,目前尚未见到以上述4个木脂素类成分作为定量指标的中药质量控制方法,因此,该研究能够为川木通药材、饮片及其制剂质量标准的提高提供有益参考。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国

医药科技出版社,2020:38.

- [2] 白梦娜. 川木通及常用习用品的生药学研究[D]. 成都:西南交通大学,2017.
- [3] 刘晶晶,陈幸,魏志奇,等. 川木通的化学成分及鉴别研究[J]. 天然产物研究与开发,2010,22(6):998-1000.
- [4] 乌兰其其格,白玉华. 川木通的研究进展[J]. 中国民族医药杂志,2015,21(1):30-32.
- [5] 邓哲,荆文光,王淑慧,等. 中药饮片标准汤剂研究进展与讨论[J]. 中国中药杂志,2019,44(2):242-248.
- [6] 陈士林,刘昌孝,张铁军,等. 基于中药质量标志物和传统用法的中药饮片标准汤剂传承发展研究思路与建议[J]. 中草药,2019,50(19):4519-4528.
- [7] 周蔚昕,刘涛,徐玉玲,等. 对《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》(征求意见稿)部分内容的探讨[J]. 时珍国医国药,2017,28(10):2491-2493.
- [8] 卫生部,国家中医药管理局. 卫生部和国家中医药管理局关于印发医疗机构中药煎药室管理规范的通知[EB/OL]. (2009-03-27)[2022-06-18]. <http://www.satcm.gov.cn/yizhengsi/gongzuodongtai/2018-03-25/6577.html>.
- [9] 崔雪郑,李莹,喻琨,等. 紫花地丁全草化学成分研究[J]. 中草药,2021,52(4):917-924.
- [10] A A A E G, TAKEYA K, ITOKAWA H, et al. Lignan bis-glucosides from *Galium sinaicum*[J]. Phytochemistry, 1997, 45(3): 597-600.
- [11] KIZU H, SHIMANA H, TOMIMORI T. Studies on the constituents of clematis species. VI. the constituents of clematis stans sieb et zucc[J]. Chem Pharm Bull(Tokyo), 1995, 43(12): 2187-2194.
- [12] 黄文武,孔德云,杨培明. 小木通木脂素成分研究[J]. 中国天然药物,2003,1(4):199-203.
- [13] 王景丽,马燕子,赵春雪,等. 三尖杉茎叶的木脂素类化合物研究[J]. 中草药,2020,51(1):36-42.
- [14] 孟凡成,王磊,张健,等. 云南黄连中非生物碱类化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报,2013,44(4):307-310.
- [15] 魏志奇. 川木通化学成分及质量标准的研究[D]. 成都:成都中医药大学,2009.
- [16] 武尉杰,万萌萌,曹雨虹,等. 川木通的质量标准研究[J]. 中华中医药学刊,2015,33(2):313-315.
- [17] 叶潇,朱莹莹,刘婷,等. 川木通对大鼠利尿作用及其物质基础研究[J]. 中国中药杂志,2019,44(9):1889-1894.
- [18] 丁兴杰,熊亮,周勤梅,等. 天然核苷类成分的化学结构和药理活性研究进展[J]. 成都中医药大学学报,2018,41(2):102-108.
- [19] 储春霞,黄圣卓,梅文莉,等. 辣木茎木脂素类和萜类化学成分及其活性研究[J]. 中草药,2019,50(21):5198-5205.
- [20] 张文斌,王璋,杨瑞金,等. 开环异落叶松树脂酚对乳腺癌MCF-7细胞增殖的影响[J]. 营养学报,2008,30(5):495-498.
- [21] 姚广印,姬丹阳,周卫东,等. 开环异落叶松树脂酚改善卵巢摘除小鼠抑郁行为及调控海马BDNF表达的研究[J]. 神经药理学,2013,3(2):13-25.
- [22] 何立巍,董伟,杨婧妍,等. 板蓝根抗病毒有效部位的化学成分及其活性研究[J]. 中草药,2013,44(21):2960-2964.

(编辑:张 吟)