

不同来源威灵仙常春藤皂苷元和齐墩果酸的含量测定

李璐^{1,2}, 林文华^{1,2}, 严萍^{1,2*}, 詹若挺^{1,2}, 潘华峰³ (1. 广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心, 广东广州 510006; 2. 广州中医药大学岭南中药资源教育部重点实验室, 广东广州 510006; 3. 广州中医药大学, 广东广州 510006)

摘要 [目的] 测定不同来源威灵仙药材中常春藤皂苷元和齐墩果酸的含量。[方法] 采用反相高效液相色谱法, 色谱柱为 Waters Xbridge™-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (90:10, V/V), 体积流量为 1 ml/min, 检测波长为 205 nm, 柱温为 25 °C。[结果] 计算得常春藤皂苷元的回归方程为 $Y = 7 \times 10^6 X - 429 884$, $R^2 = 0.999 8$, 齐墩果酸的回归方程为 $Y = 8 \times 10^6 X - 94 259$, $R^2 = 0.999 1$, 表明常春藤皂苷元在 2.008 ~ 25.100 ng/ml 范围内, 齐墩果酸在 2.238 ~ 22.380 ng/ml 浓度范围内与峰面积有良好的线性关系。不同来源的威灵仙药材齐墩果酸含量基本大于 0.3%; 来源于两广的威灵仙品种粉灵仙中常春藤皂苷元含量较高, 其他来源的威灵仙药材中常春藤皂苷元含量极低。[结论] 该方法简单、准确、稳定, 可用于威灵仙药材质量评价; 不同来源的威灵仙药材在含量上存在较大差异, 其中来源于两广的粉灵仙含量较高。

关键词 威灵仙 (RADIX ET RHIZOMA CLEMATIDIS); 常春藤皂苷元; 齐墩果酸; 含量测定
中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)07-02910-02

Content Measurement of Hederagen and Oleanolic Acid in RADIX ET RHIZOMA CLEMATIDIS from Different Areas

LI Lu et al (Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006)

Abstract [Objective] To determine content of hederagen and oleanolic acid in RADIX ET RHIZOMA CLEMATIDIS from different areas. [Method] By using RP-HPLC method, Xbridge™-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) at 25 °C, acetonitrile-water (90:10) was used as the mobile phase, the flow rate was 1.0 ml/min. The PDA detection wavelength was 205 nm. [Result] The hederagen had a good linearity relationship between 2.008 - 25.100 ng ($R^2 = 0.999 8$), the oleanolic acid had a good linearity relationship between 2.238 - 22.380 ng ($R^2 = 0.999 1$). The content of hederagenin in RADIX ET RHIZOMA CLEMATIDIS from different areas meet the quantitative specification of the Chinese Pharmacopoeia, while that of oleanolic acid don't. [Conclusion] The method is simple, accurate, stable, which can be used in quality evaluation for RADIX ET RHIZOMA CLEMATIDIS. Significant differences do exist among RADIX ET RHIZOMA CLEMATIDIS from different areas.

Key words RADIX ET RHIZOMA CLEMATIDIS; Hederagenin; Oleanolic acid; Content determination

威灵仙 (RADIX ET RHIZOMA CLEMATIDIS) 为临床常用中药, 具有祛风除湿和通络止痛的功效。《中国药典》2010 版收载的威灵仙为毛茛科植物威灵仙 (*Clematis chinensis* Osbeck.)、棉团铁线莲 (*C. hexapetala* Pall.) 和东北铁线莲 (*C. mandshurica* Rupr.) 的根及根茎^[1]。目前, 国内作为威灵仙药材流通及使用的品种非常混乱, 两广地区有一个品种俗称“粉灵仙”, 价格相对威灵仙较高, 是两广地区威灵仙的主流品种, 但是文献研究报道较少。笔者收集不同批次两广地区粉灵仙和其他威灵仙共 20 批, 进行常春藤皂苷元和齐墩果酸的含量测定, 以期对威灵仙的质量控制和品种优选提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。粉灵仙和其他威灵仙药材, 分别来源于广东清平药材市场、广西玉林药材市场及广东省各药材公司, 经广州中医药大学中药鉴定教研室童家赟老师鉴定为正品威灵仙。

1.1.2 主要仪器。Waters e2695 高效液相色谱仪 (四元泵自动进样系统) 和 Waters 2998 二极管阵列检测器, 均购自美国 Waters 公司; Empower 化学工作站, 购自美国沃特世公司;

基金项目 教育部 2011 年博士点基金——基于 Mincle 受体的祛风湿中药抗炎成分研究 (20114425120010); 广东省教育部科技部产学研结合项目——中药配方颗粒产业化产学研结合科技创新平台 (2011A091000005)。

作者简介 李璐 (1988-), 女, 浙江丽水人, 硕士研究生, 研究方向: 中药质量评价, E-mail: liliu8867@163.com。* 通讯作者, 副研究员, 从事中药质量评价研究, E-mail: ping_yan_yp@yahoo.com.cn。

收稿日期 2013-02-27

Milli-Q 超纯水设备, 购自法国 Millipore 公司; BS224S 万分之一电子天平, 购自德国赛多利斯公司; KQ-700DE 型超声波清洗器, 购自昆山市超声仪器有限公司。

1.1.3 主要试剂。常春藤皂苷元对照品 (批号: 120823), 购自上海融禾医药科技有限公司; 齐墩果酸对照品 (批号: 110709-200505), 购自中国药品生物制品检定所; 乙腈为色谱纯, 购自德国 Merck 公司; 水为双蒸水, 自制; 其他试剂均为分析纯, 购自广州试剂厂。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件。色谱柱为 Waters Xbridge™-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (90:10, V/V); 体积流量为 1 ml/min; 检测波长为 205 nm; 柱温为 25 °C; 进样量为 10 μl, 理论塔板数按常春藤皂苷元峰和齐墩果酸峰计算均不低于 3 000。

1.2.2 对照品溶液的制备。精密称定 10.24 mg 常春藤皂苷元和 10.16 mg 齐墩果酸, 置 10 ml 量瓶中, 加无水甲醇溶解, 然后加入无水甲醇稀释至刻度, 摇匀, 使常春藤皂苷元的浓度为 1.024 mg/ml, 齐墩果酸浓度为 1.016 mg/ml, 作为对照品溶液。

1.2.3 供试品溶液的制备。精密称取 1.000 g 样品粉末 (过四号筛), 置 150 ml 锥形瓶中, 精密加入 50 ml 浓度 70% 乙醇, 称定重量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定重量, 用浓度 70% 乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 25 ml, 置水浴上蒸干, 残渣加 30 ml 浓度 2 mol/L 盐酸溶液使溶解, 加热回流 1 h, 立即冷却, 移入分液漏斗中, 用 10 ml 水分

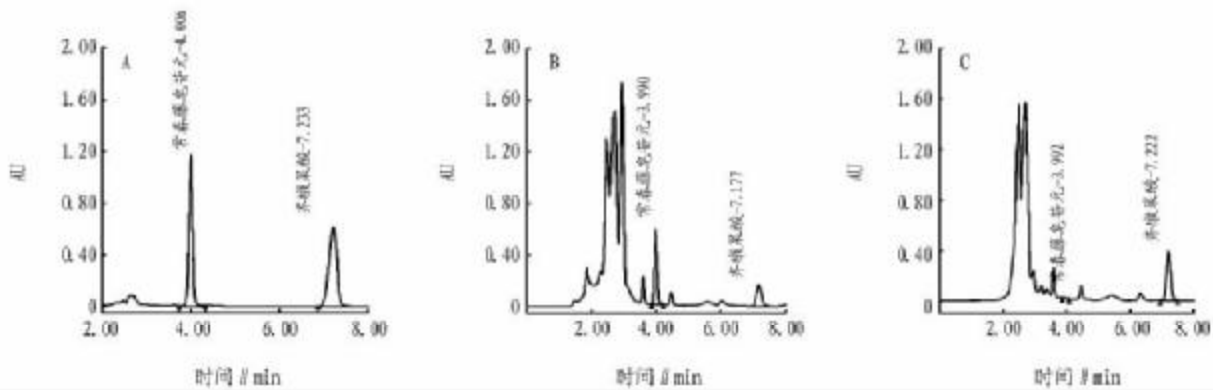
次洗涤容器,洗液并入分液漏斗中,再加乙酸乙酯振摇,提取3次,每次15 ml,合并乙酸乙酯液,然后于70 ℃以下浓缩至近干,加无水甲醇溶解,最后转移至10 ml量瓶中,用无水甲醇稀释至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

1.2.4 方法学考察。(1)系统适应性考察。取适量供试品溶液和对照品溶液,在上述色谱条件下进行测定,记录色谱图,考察系统适应性。(2)检测限与定量限的检测。取已知浓度的各对照品溶液,梯度稀释并进样检测,测定常春藤皂苷元和齐墩果酸的检测限和定量限。(3)线性关系的考察。取已知浓度的对照品溶液,分别精密吸取不同体积进样分析,以常春藤皂苷元、齐墩果酸浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,进行线性回归,计算回归方程。(4)重复性试验。取同一批药材粉末6份,按“1.2.3”项下方法操作,制成供试品溶液,在上述色谱条件下测定,计算常春藤皂苷元和齐墩果酸含量的RSD。(5)精密度试验。精密吸取同一供试品溶液,在上述色谱条件下,连续进样6次,计算样品中常春藤皂苷元和齐墩果酸峰面积的RSD。(6)稳定性试验。取同一批药材粉末,按“1.2.3”项下方法操作,制成供试品溶液,分别于0、2、4、6、8、10和12 h进样分析,计算样品中常春藤皂苷元和齐墩果酸峰面积的RSD。(7)准确度试验。取已知含量的粉灵仙药材粉末(常春藤皂苷元含量为10.50 mg/g,齐墩果酸含量为5.10 mg/g),取样品粉末为0.500 g,平行操作6份,分别加入常春藤皂苷元和齐墩果酸混合对照品溶液(常春藤皂苷元浓度为5.366 mg/ml,齐墩果酸浓度为2.574 mg/ml)1 ml,按“1.2.3”项下方法操作制成供试品溶液,在上述色谱条件下测定,计算平均回收率和RSD。

1.2.5 样品测定。精密称取粉灵仙和不同产地的商品威灵仙药材粉末各1.000 g,按“1.2.3”项下方法操作,在上述色谱条件下测定,计算常春藤皂苷元和齐墩果酸的含量。

2 结果与分析

2.1 方法学考察 (1)系统适应性考察。图1表明,理论塔板数按常春藤皂苷元峰和齐墩果酸峰计算均不低于3 000,各峰之间的分离度良好;供试品色谱和对照品色谱在相同时间上有对应的吸收峰,表明系统适应性良好。(2)检测限与定量限的检测。根据检测限($S/N=3$)和定量限($S/N=10$)计算常春藤皂苷元的检测限为0.040 16 μg,定量限为0.180 72 μg;齐墩果酸的检测限为0.013 34 μg,定量限为0.156 66 μg。(3)线性关系的考察。计算得常春藤皂苷元的回归方程为 $Y=7 \times 10^6 X - 429 884$, $R^2=0.999 8$,和齐墩果酸的回归方程为 $Y=8 \times 10^6 X - 94 259$, $R^2=0.999 1$ 。试验结果表明,常春藤皂苷元在2.008~25.100 ng/ml范围内,齐墩果酸在2.238~22.380 ng/ml浓度范围内与峰面积有良好的线性关系。(4)重复性试验。计算样品中常春藤皂苷元和齐墩果酸含量的RSD分别为1.6%和4.8%,表明重复性良好。(5)精密度试验。计算样品中常春藤皂苷元和齐墩果酸峰面积的RSD分别为1.60%和1.43%,表明仪器精密度良好。(6)稳定性试验。测得样品中常春藤皂苷元和齐墩果酸峰面积的RSD分别为1.41%和2.23%,表明供试品溶液在12 h内稳定。(7)回收率试验。由表1可知,常春藤皂苷元的平均回收率为101.84%;齐墩果酸的平均回收率为102.98%;RSD分别为1.97%和0.961%。试验结果表明,该方法准确、可靠,可用于样品中常春藤皂苷元和齐墩果酸的含量测定。



注:A为混合对照品溶液;B为广西粉灵仙供试品溶液;C为河南威灵仙供试品溶液。

图1 供试品溶液和对照品溶液HPLC色谱

表1 加样回收率试验结果

样品重量 g	加样量//mg		检出量//mg		回收率//%		平均回收率//%		RSD//%	
	Hed	Ole	Hed	Ole	Hed	Ole	Hed	Ole	Hed	Ole
0.500 7	5.37	2.57	10.68	5.18	100.94	102.21				
0.501 1	5.37	2.57	10.60	5.23	99.56	103.72				
0.500 8	5.37	2.57	10.78	5.20	102.91	102.85	101.84	102.98	1.97	0.96
0.500 8	5.37	2.57	10.74	5.22	102.91	103.47				
0.500 5	5.34	2.58	10.61	5.17	100.34	101.51				
0.500 9	5.37	2.57	10.90	5.24	105.10	104.14				

注:Hed为常春藤皂苷元;Ole为齐墩果酸。

(下转第2940页)

ies,2008,17:631-642.

- [12] KUSUMO B H, HEDLEY C B, HEDLEY M J, et al. The use of diffuse reflectance spectroscopy for in situ carbon and nitrogen analysis of pastoral soils[J]. Australian Journal of Soil Research, 2008, 46:623-635.
- [13] LU Y L, BAI Y L, YANG L P, et al. Hyperspectral extraction of soil organic matter content based on principal component regression[J]. New Zealand Journal of Agricultural Research, 2007, 50:1169-1175.
- [14] ZHENG L H, LI M Z, PAN L, et al. Estimation of soil organic matter and soil total nitrogen based on NIR Spectroscopy and BP neural network[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2008, 28:1160-1164.
- [15] LUDWIG B, NITSCHKE R, TERHOEVEN-URSELMANS T, et al. Use of mid-infrared spectroscopy in the diffuse-reflectance mode for the prediction of the composition of organic matter in soil and litter[J]. Journal of

Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift, 2008, 171:384-391.

- [16] ROSSEL R A V, FOUAD Y, WALTER C. Using a digital camera to measure soil organic carbon and iron contents[J]. Biosystems Engineering, 2008, 100:149-159.
- [17] SUN J Y, LI M Z, ZHENG L H, et al. Real-time soil sensing with NIR spectroscopy[J]. Computer and Computing Technologies in Agriculture, 2008, 2:1403-1406.
- [18] WANG B W, ZHOU W J, MA S, et al. Regression-kriging of soil organic matter using the environmental variables derived from MODIS and DEM[J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(4):838-842.
- [19] 胡林, 丘耘, 周国民. 基于可见/近红外光谱的土壤有机质快速测定方法的研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(12):7123-7124, 7188.

(上接第 2911 页)

2.2 含量测定 由表 2 可知,不同来源的威灵仙药材齐墩果酸含量基本大于 0.30%;来源于两广的威灵仙品种粉灵仙中常春藤皂苷元含量较高,其他来源的威灵仙药材中常春藤皂苷元含量极低。

表 2 粉灵仙和其他商品威灵仙中常春藤皂苷元和齐墩果酸的含量

商品名	样品来源(产地)	含量/%	
		常春藤皂苷元	齐墩果酸
粉灵仙	北沙饮片厂(广东)	2.23	1.58
	广东广州(广东)	1.59	0.50
	广东广州(广东)	0.95	0.65
	广西玉林(广西)	1.44	0.76
	广西玉林(广西)	1.35	0.50
	致信药业(广西)	1.13	0.59
	北沙饮片厂(广东)	2.03	1.53
	致信药业(广西)	1.21	0.51
	广东广州(广东)	0.98	0.53
	广东广州(广西)	1.53	0.52
威灵仙	中智药业(河南)	0.02	1.13
	源和堂(东北)	0.06	1.32
	广东广州(广西)	0.01	0.60
	广西玉林(河北)	0.19	0.41
	广西玉林(广东)	0.03	0.53
	广东广州(广东)	0.01	0.64
	广东广州(安徽)	0.02	1.08
	广东广州(广西)	0.02	0.89
	广东广州(安徽)	0.01	0.02
	广东广州(安徽)	0.02	0.94

3 讨论

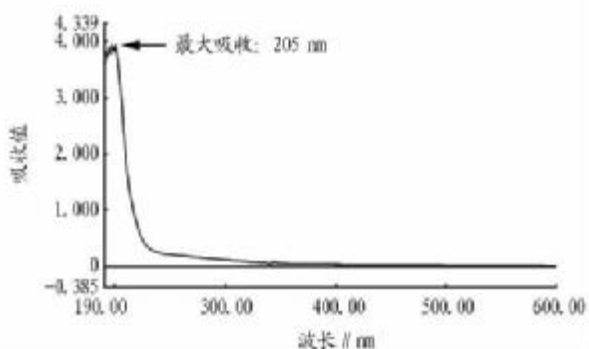


图 2 全波长扫描结果

(1) 试验采用紫外-分光光度仪扫描常春藤皂苷元和齐

墩果酸混合对照品在 190~600 nm 间的吸收光谱,最大吸收值在 205 nm,故选择 205 nm 作为检测波长。

(2) 试验考察比较了无水甲醇、浓度 70% 甲醇、浓度 50% 甲醇、无水乙醇、浓度 70% 乙醇和稀乙醇的提取率,发现以浓度 70% 乙醇的提取率最佳。而且,比较了回流 1 h、回流 2 h、超声提取 60 min 和超声提取 2 次(每次 30 min)的提取率,表明回流提取的提取率较高,且回流 1 h 即可提取完全。试验还比较了水解 1.0、1.5、2.0 和 2.5 h 的常春藤皂苷元和齐墩果酸的含量,发现 1 h 即可水解完全。因此,最终采用浓度 70% 乙醇回流提取 1 h,取滤液蒸干后水解 1 h。

(3) 除了《中国药典》记载的 3 个品种外,全国各地用作威灵仙的药用植物品种繁杂,仅铁线莲属就有 20 多种,包括小木通(*C. arandii* Franch.)、柱果铁线莲(*C. uncinata* Champ.)和毛柱铁线莲(*C. meyeniana* Walp.)等,还有其他科属的植物^[2]。各个品种间化学成分差异较大,有报道东北铁线莲中无常春藤皂苷^[3-7],棉团铁线莲中无齐墩果酸性三萜和常春藤皂苷^[7]。试验结果表明,粉灵仙药材中常春藤皂苷元和齐墩果酸的含量均大于 0.3%,威灵仙其中 9 批药材的齐墩果酸含量大于 0.3%,符合《中国药典》2010 版的规定。但 10 批商品威灵仙药材中常春藤皂苷元的含量在 0.01%~0.19% 之间,均不符合《中国药典》2010 年版规定的限度 0.3%。说明粉灵仙与其他商品威灵仙在《中国药典》规定的指标性成分含量的方面存在较大区别。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典:2010 年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:234-235.
- [2] 徐涛,杨永建,赵汝能. 威灵仙的植物来源及主要伪品[J]. 兰州医学院学报,1995,21(1):12-13.
- [3] SHI S P, JIANG D, ZHAO M B, et al. Preparative isolation and purification of triterpene saponins from *Clematis mandshurica* by high-speed current chromatography coupled with evaporative light scattering detection[J]. Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2007, 852(1/2):679-683.
- [4] SHI S P, JIANG D, DONG C X, et al. Triterpene Saponins from *Clematis mandshurica*[J]. Journal of Natural Products, 2006, 69(11):1591-1595.
- [5] DONG F Y, CUI G H, ZHANG Y H, et al. Clematomandshurica saponin E, a new triterpenoid saponin from *Clematis mandshurica*[J]. Journal Asian Natural Research, 2010, 12(12):1061-1068.
- [6] SUN F, CAI Z, YANG D P, et al. Determination of Triterpenoid Saponins in Radix Clematidis and Related *Clematis* Species by High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2010, 38(9):1293-1298.
- [7] 杨军. 水红木及威灵仙的化学成分研究[D]. 开封:河南大学,2010.