

HPLC 测定川木通中齐墩果酸的含量

青琳森¹, 张 浩^{1*}, 吕光华^{1, 2}, 陈金泉³, 梁士贤², 陈 维¹

(1. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041; 2. 香港浸会大学中医药学院研究与开发部, 香港; 3. Department of Pharmacy, School of Applied Sciences, University of Wolverhampton, Wolverhampton, United Kingdom)

摘要: 目的 建立测定水解后的川木通药材中齐墩果酸含量的方法。方法 采用 HPLC 法。Alltima C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇- 水- 冰醋酸- 三乙胺 (89: 11: 0.04: 0.02); 检测波长 207 nm; 流速 1.0 ml·min⁻¹; 柱温 45℃。结果 齐墩果酸色谱峰分离度良好, 线性范围为 0.1003~ 8.024 μg (r = 0.9999, n = 5), 方法的检测限和定量限分别为 0.3 μg·ml⁻¹ 和 1.0 μg·ml⁻¹。平均回收率为 96.1%, RSD = 2.8% (n = 5)。结论 所用结果准确, 重复性好, 专属性强, 可为川木通药材质量控制提供科学的依据。

关键词: 川木通; 齐墩果酸; 高效液相色谱法

中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1006- 0103(2006)03- 0273- 02

Determination of oleanolic acid in *Caulis clematidis armandii* by HPLC

QING Lin- sen¹, ZHANG Hao^{1*}, LÜ Guang- hua^{1, 2}, Kelvin Chan³, Kelvin Sze- yin leung², CHEN Chu¹

(1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Research and Development Division, School of Chinese Medicine, Hong Kong Baptist University, Kowloon Tong, Hong Kong, China; 3. Department of Pharmacy, School of Applied Sciences, University of Wolverhampton, Wolverhampton, United Kingdom)

Abstract: **OBJECTIVE** To develop an HPLC method for the content determination of oleanolic acid in *Caulis clematidis armandii* after hydrolysis. **METHODS** In the system of HPLC, a Alltima C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used with a mixture of methanol- water- acetic acid- triethylamine (89: 11: 0.04: 0.02) as the mobile phase. The measuring wavelength was set at 207 nm. The flow rate was 1.0 ml·min⁻¹ and the column temperature maintained at 45 °C. **RESULTS** The oleanolic acid peak in chromatograms was completely separated from other peaks. The linear range of oleanolic acid was 0.1003- 8.024 μg (r = 0.9999, n = 5). The detection limit and quantitation limit of this method were 0.3 μg·ml⁻¹ and 1.0 μg·ml⁻¹, respectively. The average recovery of oleanolic acid was 96.1% (RSD = 2.8%, n = 5). **CONCLUSION** The method is accurate, precise and reproducible. It can be used to evaluate the quality of *Caulis clematidis armandii*.

Key words: *Caulis Clematidis Armandii*; Oleanolic acid; HPLC

CLC number: R927.2 **Document code:** A **Article ID:** 1006- 0103(2006)03- 0273- 02

川木通为毛茛科铁线莲属植物小木通 *Clematis armandii* Franch. 或绣球藤 *Clematis montana* Buch. - Ham. 的干燥藤茎, 中医广泛用于水肿、淋病、小便不通、关节痹痛、经闭、乳少等症的治疗^[1]。商品木通使用较混乱, 主要有马兜铃科的关木通、毛茛科的川木通、木通科的白木通等不同的来源。关木通所含马兜铃酸可引起肾损伤^[2], 而川木通无此类文献报道, 且未检测到马兜铃酸(另文报道)。因木通类药材外观极为相似, 影响了川木通的安全使用; 同时, 市场上以川木通入药的同属植物也有 10 余种^[3, 4]。川木通经水解可生成齐墩果酸等^[5], 中国药典无其含量测定项。仅有的薄层扫描法测定含量的准确性、重复性差, 且操作烦琐^[6, 7]。为此, 特建立 HPLC 法测定了 9 个不同来源的川木通样品中齐墩果酸的含量, 方法重复性好、专属性强。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1100 型高效液相色谱仪包括自动脱气机、自动进样器、二元泵、柱温箱、DAD 二极管阵列检测器、HP 色谱工作站(美国安捷伦公司)。齐墩果酸对照品(中国药品生物制品检定所); 甲醇为色谱纯, 其余试剂为分析纯; 水为超纯水; 川木通药材采集于 9 个不同产地, 分别经四川大学华西药学院张浩教授和香港浸会大学赵中振教授鉴定。

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件及系统适用性试验 Alltima C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇- 水- 冰醋酸- 三乙胺 (89: 11: 0.04: 0.02); 检测波长 207 nm; 流速 1.0 ml·min⁻¹; 柱温 45℃。在此色谱条件

基金项目: 国家教育部博士点基金资助(编号: 20020610089)

作者简介: 青琳森 (1981-), 男, 正攻读生药学专业的硕士学位。

* 通讯作者 (Correspondent author) ©1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

下,齐墩果酸峰的理论板数不低于 1×10^4 ,与相邻峰之间的分离度不低于1.5,齐墩果酸峰对称因子为0.97~1.02。结果见图1。

1.2.2 溶液的制备 取50℃减压干燥至恒重的齐墩果酸对照品10 mg,精密称定,用甲醇溶解并定容至10 ml量瓶中,即得对照品溶液。取川木通药材粉末(过三号筛)5 g,精密称定,加甲醇50 ml,超声提取30 min,过滤,滤渣同法重复提取两次,合并滤液,减压浓缩至约25 ml,加盐酸3 ml,加热回流2 h,水解液加水10 ml,用二氯甲烷萃取(30 ml×3),合并萃取液,蒸干,残渣加甲醇溶解并定容至5 ml量瓶中,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

1.2.3 线性关系的考察 精密吸取对照品溶液0.05、0.40、1.00、1.60、4.00 ml,分别置10 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,分别进样20 μl,记录峰面积,以对照品峰面积对进样量(μg)作线性回归,回归方程为: $Y=5.321\times 10^2X-1.834\times 10^2$ ($r=0.9999$),线性范围为0.1003~8.024 μg。

1.2.4 精密度试验 取“1.2.3”项下对照品溶液(0.1 mg·ml⁻¹),连续进样5次,每次20 μl,峰面积的RSD=0.21%。

1.2.5 稳定性试验 取供试品溶液在0、8、16、32、48 h分别进样20 μl,峰面积的RSD=0.30%,表明供试品溶液在48 h内稳定。

1.2.6 重复性试验 取川木通药材粉末5 g,5份,精密称定,按“1.2.9”项下方法测定,样品中齐墩果酸平均含量为0.0078%,RSD=2.20%($n=5$)。

1.2.7 回收率试验 照“1.2.6”项取样,精密称定,分别精密加入0.1030 mg·ml⁻¹齐墩果酸对照品溶液5 ml。按“1.2.9”项下方法测定,计算回收率,分别为95.6%、93.2%、100.2%、97.1%、94.4%,平均为96.1%,RSD=2.80%($n=5$)。

1.2.8 检测限和定量限 将已知浓度的对照品溶液稀释,分别以S/N=3和S/N=10为此法的检测限和定量限,分别为0.3、1.0 μg·ml⁻¹。

1.2.9 样品的测定 照“1.2.2”项制备供试品溶液。分别吸取供试品溶液和甲醇稀释的0.1 mg·ml⁻¹对照品溶液各20 μl进样,记录色谱图。峰面积外标法计算样品中齐墩果酸的含量(图1、表1)。

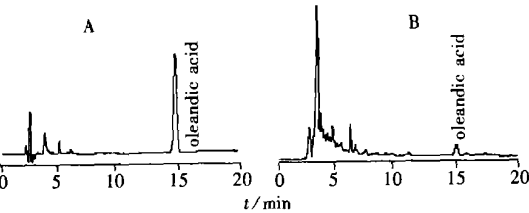


图1 对照品溶液(A)和供试品溶液(B)的HPLC色谱图
Fig 1 HPLC chromatograms of control solution(A) and sample solution(B)

表 1 川木通样品的含量测定结果($n=3$)

Table 1 Quantitative analysis results of the samples ($n=3$)

Samples	Habitat	Oleanolic acid/ %
<i>Clematis armandii</i>	Ya'an, Sichuan	0.0079
	Pingwu, Sichuan	0.0014
	Emei, Sichuan	0.0066
	Emei, Sichuan	0.0124
	Hong Kong	0.0009
	Hong Kong	0.0016
<i>Clematis montana</i>	Emei, Sichuan	0.0117
	Duijiangyan, Sichuan	0.0002
	Sichuan University	0.0018

2 讨论

选用甲醇-水-冰醋酸-三乙胺(89:11:0.04:0.02)为流动相,其中三乙胺可改善峰形;冰醋酸可产生弱酸性环境,既能使齐墩果酸峰形对称,又能与其他成分达到基线分离。此外,分别考察了在20℃、30℃、35℃、40℃、45℃时齐墩果酸峰的分离情况。结果表明,柱温越高分离越好。当柱温定为45℃时,齐墩果酸峰能够达到基线分离。

制备样品时,因皂苷元需经总皂苷水解得到,故选择甲醇-盐酸为溶剂,考察了盐酸在甲醇中浓度分别为2%、4%、6%、8%时对齐墩果酸含量测定的影响,结果表明,4%和6%时含量一致,且高于2%、8%。同时考察水解时间对齐墩果酸含量的影响,酸水解1、2、4 h的结果一致,且高于6、8 h。综合考虑,选用4%盐酸/甲醇水解2 h即可。

同时用LC/UV法测定了川木通中马兜铃酸的含量,结果表明,川木通中马兜铃酸I的含量在检测限(2.5 μg·g⁻¹)之下。再参考USFDA方法,用LC/MS检测马兜铃酸I,川木通样品中马兜铃酸I的含量在USFDA规定限度之下(0.5 μg·g⁻¹),认为川木通临床使用安全。

参考文献:

[1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005. 52

[2] 刘金渊, 曾汉基. 大量关木通致急性肾功能衰竭死亡1例[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(11): 692-693

[3] 唐声武. 川木通的原植物和药材性状鉴定[J]. 中药材, 1989, 12(1): 26-27.

[4] 方清茂, 张美, 钟廷瑜, 等. 四川省川木通的植物资源及其开发利用[J]. 华西药学期刊, 2005, 20(5): 404-406.

[5] 楼之岑, 秦波. 常用中药材品种整理和质量研究(北方编第三册)[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1996. 48.

[6] 唐声武, 裴瑾, 郭力. 川木通中齐墩果酸的含量测定[J]. 成都中医药大学学报, 2000, 23(2): 53-54

[7] 胡君萍, 杨建华, 堵年生. 双波长薄层扫描法测定维吾尔药琐琐葡萄中齐墩果酸的含量[J]. 华西药学期刊, 2003, 18(1): 58-59.