常用铁线莲属药材总黄酮及主要活性黄酮苷元含量研究

吴浩震[1,2,3],杨俊峰[1,2,3],刘玉宁[1,2,3],尼玛次仁[3,4],朱业锦[5*],谢和兵[1,2,3,4*]
(1. 安徽中医药大学药学院,安徽 合肥 230012;2. 南通市海门长三角药物高等研究院,江苏 南通 226133;
3. 江苏神猴医药研究有限公司,江苏 南通 226133;4. 西藏神猴药业有限责任公司,西藏 日喀则 857000;
5. 南京中医药大学医学院·整合医学院,江苏 南京 210023)

摘要　目的:研究常用铁线莲属药材总黄酮及主要活性黄酮苷元含量。方法:以 2020 版《中国药典》《中华人民共和国卫生部药品标准》收载的东北铁线莲、威灵仙、棉团铁线莲、川木通、唐古特铁线莲、细叶铁线莲 6 种常用铁线莲属药材以及采集到的威灵仙叶、川木通叶为研究对象,采用紫外分光光度法和高效液相色谱法分别测定总黄酮以及主要活性黄酮苷元槲皮素、山柰酚、木犀草素、芹菜素含量。结果:细叶铁线莲中总黄酮的含量最高,其次分别是威灵仙叶、川木通叶、唐古特铁线莲、东北铁线莲、威灵仙、棉团铁线莲和川木通;威灵仙、东北铁线莲、棉团铁线莲、川木通中不含主要活性黄酮苷元,细叶铁线莲中槲皮素、木犀草素、山柰酚含量最高,威灵仙叶中芹菜素含量最高。结论:常用铁线莲属药材中总黄酮含量以及主要活性黄酮苷元组成差异显著,2020 年版《中国药典》收载的东北铁线莲、威灵仙、棉团铁线莲、川木通药材不适宜作为黄酮活性成分来源,本研究可为常用铁线莲属药材的综合利用以及修订完善《中国药典》的铁线莲属药材的质量标准提供参考。

关键词　铁线莲;总黄酮;紫外分光光度计;高效液相色谱;含量测定
中图分类号:R284.1　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1002-2392(2025)04-0038-05
DOI:10.19664/j.cnki.1002-2392.250071

铁线莲(*Clematis*)是毛茛科铁线莲属草质藤本[1],在世界范围内广泛分布,全世界大约有 355 种,其中中国分布约有 147 种[2],大多为观赏类植物。目前常用的铁线莲属主要为 2020 版《中华人民共和国药典》收录的以根茎入药的威灵仙、东北铁线莲、棉团铁线莲和川木通 4 种铁线莲属药材[3],《中华人民共和国卫生部药品标准》收录的以茎叶入药的唐古特铁线莲和细叶铁线莲药材[4]。

铁线莲属药材具有祛风湿、通经络的功效,临床常被用作治疗风湿性关节痛、肢体麻木、肌腱收缩和屈伸不便[5]等。现代研究表明,铁线莲属药材中的主要成分包括黄酮类、皂苷类和木脂素类,此外还有少量的芳香族化合物、白头翁素和原白头翁素[6]。其中皂苷类活性成分主要的药效作用为抗心肌缺血缺氧、抗肿瘤、抗血栓[7-10],而黄酮类化合物主要的药效作用为具有抗心肌缺血、抗炎、抗氧化等生物活性[11-12]。因此,黄酮成分是铁线莲属药材发挥药效作用的主要有效物质之一。

本研究以 6 种常用铁线莲属药材和采集到的威灵仙叶、川木通叶为研究对象,分别采用紫外分光光度(UV)法和高效液相色谱(HPLC)法测定总黄酮以及主要活性黄酮苷元槲皮素、木犀草素、山柰酚和芹菜素的含量,为常用铁线莲药材的综合利用以及修订完善《中国药典》收载的铁线莲属药材的质量标准提供参考。

1　材料

1.1　药品与试剂

细叶铁线莲(批号 20220314)与唐古特铁线莲(批号 20220729)均购自西藏神猴药业有限责任公司;威灵仙(批号 20240322)、东北铁线莲(批号 20240464)、棉团铁线莲(批号 20240338)和川木通(批号 202403023)均购自安徽援康中药饮片股份有限公司;

收稿日期:2024-07-04　　**修回日期**:2024-12-03
基金项目:国家自然科学基金项目(82304595);西藏自治区科技厅区域科技协同创新专项(QYXTZX-RKZ2022-07)
作者简介:吴浩震(1999-),男,硕士研究生,主要从事中药药物分析、中药药理学研究。
*通信作者:朱业锦(1990-),男,博士,讲师,主要从事药学相关研究。谢和兵(1982-),男,博士,副主任药师,硕士生导师,主要从事高原医学、传统藏药的产业化开发研究。

威灵仙叶与川木通叶均采自陕西省安康县；以上药材均经江苏神猴医药研究有限公司中药 CNAS 检测实验室谢和兵副主任药师检测为正品。芦丁对照品（批号 100080 - 202012，纯度 92.2%），木犀草素对照品（批号 111520 - 202107，纯度 96.3%），山柰酚对照品（批号 110861 - 202214，纯度 97.4%），槲皮素对照品（批号 100081 - 201610，纯度 99.1%）均购自中国食品药品检定研究院；芹菜素对照品（批号 DSTDQ002602，纯度 98.5%）购自成都乐美天医药科技有限公司；甲醇为色谱级，购自安徽时联特种溶剂股份有限公司；盐酸、磷酸、无水氯化铝、亚硝酸钠、氢氧化钠和无水乙醇均为分析级，购自国药集团上海化学试剂有限公司。

1.2 仪器

UV - 1900i 型紫外分光光度计，日本岛津公司；Agilent - 1100 型高效液相色谱仪，安捷伦科技（中国）有限公司；XSR205DU/AC 型电子精密天平，美国梅特勒托利多科技有限公司；JA10003N 型电子精密天平，UC - 250DE 型超声波清洗器，DHG - 9140A 型电热恒温鼓风干燥箱，上海精其仪器有限公司；HH - 6 型数显恒温水浴锅，SHZ - DC（Ⅲ）型循环水式多用真空泵，上海力辰邦西仪器科技有限公司；TRE - 201D 型旋转蒸发器，CCA - 20 型小型低温冷却循环泵，巩义市予华仪器有限责任公司。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量测定

2.1.1 对照品溶液制备

精密称取芦丁对照品 10.10 mg，用 40% 乙醇溶液溶解并定容至 50 mL 容量瓶中，摇匀得质量浓度为 0.202 mg · mL^{-1}的芦丁对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液制备

铁线莲样品先置 40 ℃鼓风干燥箱 24 h，取出，粉碎成细粉，精密称取细粉 2 g，加入 40% 乙醇溶液 25 mL，90 ℃恒温水浴加热回流提取 3 次，每次 1 h，合并滤液，用 40% 乙醇稀释定容至 100 mL 容量瓶中，摇匀，即得提取液。精密吸取提取液 1 mL 置 25 mL 容量瓶，加入 1 mL 5% $NaNO_2$ 溶液，摇匀，静置 6 min 后加入 1 mL 10% $AlCl_3$ 溶液，摇匀，再静置 6 min 后加入 10 mL NaOH 试液，摇匀，最后静置 10 min 后加入 40% 乙醇溶液定容，摇匀，即得供试品溶液。

2.1.3 标准曲线

精密吸取对照品储备溶液 0.5、1、2、3、4、5、6 mL 置于 25 mL 容量瓶中，40% 乙醇溶液加至 6 mL，显色操作同供试品溶液，显色后的标准品溶液分别于波长 508 nm 处测定吸光度，以质量浓度（μg · mL^{-1}）为横坐标（X），吸光度（Y）为纵坐标绘制标准曲线并回归分析。

线性方程为 $Y = 0.012\ 6X - 0.002\ 4$，$r = 0.999\ 8$，芦丁在 4.040 ~ 48.480 μg · mL^{-1}范围内线性关系良好。

2.1.4 样品总黄酮含量测定

取 8 种铁线莲样品，每种样品平行 3 份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，测定并记录吸光度值，根据芦丁对照品标准曲线计算总黄酮含量，利用 SPSS 26.0 分析软件进行数据处理，以总黄酮含量最高的细叶铁线莲样品为对照组，两组间比较采用成对样本 t 检验，结果见表 1。结果表明 8 种铁线莲样品中总黄酮存在显著差异，细叶铁线莲总黄酮含量最高，其余从高到低依次为威灵仙叶、川木通叶、唐古特铁线莲、东北铁线莲、威灵仙、棉团铁线莲、川木通。

表 1 8 种铁线莲样品总黄酮含量（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

种类	总黄酮含量/mg·g^{-1}
细叶铁线莲	47.361 0 ± 0.483 9
威灵仙叶	44.557 7 ± 0.705 4 *
川木通叶	39.277 5 ± 1.226 3 **
唐古特铁线莲	28.616 3 ± 0.334 4 ***
东北铁线莲	25.422 5 ± 0.542 9 ***
威灵仙	15.561 9 ± 0.282 4 ***
棉团铁线莲	6.494 7 ± 0.038 7 ***
川木通	6.410 2 ± 0.150 3 ***

注：与细叶铁线莲比较，* $P < 0.05$，** $P < 0.01$，*** $P < 0.001$。

2.2 4 种黄酮苷元含量测定

2.2.1 供试品溶液制备

铁线莲样品先置 40 ℃鼓风干燥箱 24 h，取出，粉碎成细粉，精密称取细粉 3 g，置具塞锥形瓶中，加入 60 mL 甲醇溶液，50 ℃超声（功率 250 W，频率 40 kHz）提取 1.5 h 冷却至室温，减压抽滤，滤液减压浓缩，浓缩后残渣加入甲醇 - 25% 盐酸溶液（4∶1）混合液 25 mL，摇匀，90 ℃水浴加热回流 0.5 h，冷却至室温，过滤，滤液置 25 mL 容量瓶，加甲醇定容，摇匀，0.45 μm有机微孔滤膜滤过，即得供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液制备

精密称取槲皮素对照品 9.64 mg、山柰酚对照品 10.02 mg、木犀草素对照品 10.32 mg、芹菜素对照品 10.08 mg，分别置于 10 mL 容量瓶中，加甲醇溶解定容，摇匀后即得各对照品母液。分别精密吸取各对照品母液适量于 25 mL 容量瓶，加甲醇定容后摇匀，配成

槲皮素、山柰酚、木犀草素、芹菜素质量浓度分别为 231.36 μg·mL^{-1}、40.08 μg·mL^{-1}、4.13 μg·mL^{-1}、20.16 μg·mL^{-1}的混合对照品溶液。

2.2.3　空白溶液制备

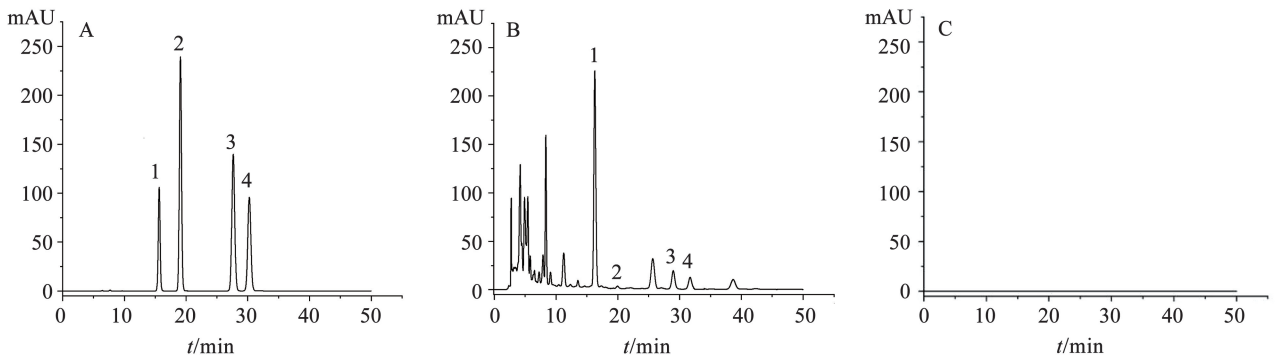
不加铁线莲药材，其余操作同供试品溶液，制得空白溶液。

2.2.4　色谱条件

色谱柱：UItimate XB－C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相为甲醇∶0.2% 磷酸水溶液（50∶50）；流速：1.0 mL·min^{-1}；检测波长：360 nm；柱温：25 ℃；进样量：20 μL。

2.2.5　系统适用性及专属性

分别吸取“2.2”项下各溶液 20 μL，按“2.2.4”项下色谱条件进样，见图 1，槲皮素、木犀草素、山柰酚和芹菜素的色谱分离度 >1.5，理论塔板数 >3 000，拖尾因子在 0.95～1.05 范围内，且混合对照品溶液与供试品溶液保留时间一致，空白溶液无干扰，表明该方法专属性良好。



注：1. 槲皮素；2. 木犀草素；3. 山柰酚；4. 芹菜素。

图 1　混合对照品（A）、供试品（B）和空白（C）HPLC 色谱图

2.2.6　线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液 0.25、0.5、1、2、3、4、5 mL，分别置于 5 mL 容量瓶，甲醇定容，摇匀，配成不同质量浓度的混合对照品溶液，按“2.2.3”项下色谱条件进样测定。以峰面积为纵坐标 Y，质量浓度（μg·mL^{-1}）为横坐标 X 绘制标准曲线并回归分析，见表 2。

表 2　对照品线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/μg·mL^{-1}
槲皮素	$Y=73.685X+132.79$	0.999 7	11.57～231.36
木犀草素	$Y=81.895X-9.743\ 3$	0.999 3	0.21～4.13
山柰酚	$Y=65.236X+4.706\ 8$	0.999 3	2.01～40.08
芹菜素	$Y=36.293X+2.467\ 9$	0.999 5	1.01～20.16

2.2.7　精密度试验

取“2.2.1”项下供试品溶液，连续测定 6 次，测得槲皮素、木犀草素、山柰酚、芹菜素峰面积 RSD（$n=6$）分别为 1.23%、1.77%、1.02%、0.88%，表明仪器精密度良好。

2.2.8　稳定性试验

按“2.2.1”项下方法制备 1 份供试品溶液，常温放置 0、2、4、8、10、12、24 h 时分别进样，测得槲皮素、木犀草素、山柰酚、芹菜素峰面积 RSD（$n=7$）分别为 1.29%、2.13%、0.69%、0.81%，表明溶液 24 h 内稳定。

2.2.9　重复性试验

按“2.2.1”项下方法制备 6 份供试品溶液，进样测定，测得槲皮素、木犀草素、山柰酚、芹菜素峰面积 RSD（$n=6$）分别为 1.73%、1.95%、1.39%、1.41%，表明该方法重复性良好。

2.2.10　加样回收试验

精密称取已知含量的供试品 6 份，每份 3 g，分别加入适量皮素、木犀草素、山柰酚、芹菜素对照品母液，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，分别进样测定，计算槲皮素、木犀草素、山柰酚、芹菜素的平均回收率分别为 99.52%、98.63%、99.71%、98.99%，RSD（$n=6$）分别为 0.93%、1.32%、1.24%、1.13%。

2.2.11　样品中 4 种黄酮苷元含量测定

取 8 种铁线莲样品各 3 批，分别按“2.2.1”项下方法平行制备供试品溶液，进样测定，并将峰面积代入线性方程计算 4 种黄酮苷元含量，结果见表 3。结果表明 4 种活性黄酮苷元在东北铁线莲、威灵仙、棉团铁线莲、川木通种均未能检出，而在细叶铁线莲、唐古特铁线莲、威灵仙叶、川木通叶中均能检出，且槲皮素、木犀草素、山柰酚在细叶铁线莲中含量最高，芹菜素在威灵仙叶中含量最高，表明 4 种活性黄酮苷元在常用的铁线莲属药材中含量明显差异。

表 3 不同种铁线莲 4 种黄酮苷元含量($\mu g \cdot g^{-1}$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

种类	槲皮素	木犀草素	山柰酚	芹菜素
细叶铁线莲	600.33 ±2.99	10.24 ±0.08	92.71 ±0.94	96.30 ±0.91
唐古特铁线莲	326.24 ±2.08	6.20 ±0.12	14.58 ±0.76	23.19 ±0.89
东北铁线莲	–	–	–	–
威灵仙	–	–	–	–
棉团铁线莲	–	–	–	–
川木通	–	–	–	–
威灵仙叶	522.26 ±2.34	8.09 ±0.23	79.89 ±1.13	122.61 ±1.21
川木通叶	475.58 ±1.92	7.23 ±0.27	49.17 ±0.98	48.50 ±0.87

注:“–”表示未检出。

3 讨论

3.1 常用铁线莲属药材执行标准的合理性

近年来国内外对民族药物的开发掀起一股新浪潮,黄酮类的药物因为其独特的药理作用更是受到国内外研究人员的广泛关注[13]。在野生植物资源日渐匮乏的今天,提高药用植物的资源利用率迫在眉睫。

有研究报道了 11 种铁线莲属药材的地上部分的叶的黄酮成分含量显著高于茎[14]。本研究证实 6 种常用铁线莲属药材的总黄酮及活性黄酮苷元含量差异显著,其中以茎叶入药的细叶铁线莲、唐古特铁线莲显著高于以根茎入药的东北铁线莲、威灵仙、棉团铁线莲、川木通,威灵仙叶、川木通叶也显著高于威灵仙及川木通药材,其主要原因是入药的部位不同导致黄酮成分含量不同,可以推测铁线莲属药材各部位中黄酮成分含量由高到低为叶、茎、根。现代研究表明植物不同部位总黄酮含量的差异与是否接受阳光照射以及遗传差异[15]有关。提示执行2020 版《中国药典》药材标准的东北铁线莲、威灵仙、棉团铁线莲、川木通入药部位不合理,植物资源的有效利用率并不高,不适合作为黄酮成分的来源,需要进一步修改和完善药典标准。而执行《中华人民共和国卫生部药品标准》的唐古特铁线莲、细叶铁线莲的入药部位、植物资源利用率更具合理性。

3.2 活性黄酮苷元的测定

黄酮化合物在植物体中通常与糖结合成苷类,小部分以游离态(苷元)的形式存在,黄酮苷元的检测需要通过柱前处理破坏黄酮化合物的糖苷键,生成黄酮苷元。黄酮苷元的种类丰富,可分为黄酮和黄酮醇、异黄酮和二氢异黄酮等 7 大类。铁线莲属植物中的黄酮苷元一般为槲皮素、木犀草素、山柰酚和芹菜素等[6,16],现代研究证实这些黄酮苷元具有抗炎、抗氧化、抗菌等生物活性[13],因此,本研究选择槲皮素、木犀草素、山柰酚和芹菜素作为主要活性黄酮苷元,并采用 HPLC 法同时测定铁线莲属药材中这 4 种主要活性黄酮苷元含量。

3.3 小结

铁线莲属药材的茎叶中黄酮成分含量显著高于根,更适用于黄酮类成分药物的利用与开发。常用铁线莲属药材因药材标准规定的入药部位不同,导致总黄酮以及活性黄酮苷元含量差异显著,2020 年版《中国药典》收载的以根茎入药的铁线莲属药材标准不能满足对黄酮成分的有效利用。本研究为常用铁线莲药材的综合利用以及修订完善《中国药典》收载的铁线莲药材标准提供参考。此外,本研究建立了 HPLC 法同时测定铁线莲属药材中主要活性黄酮苷元的含量,为提升药材及相关制剂产品的质量标准提供了参考。

参考文献:

[1] 商蕴青,孙磊. 柔韧美丽的藤本皇后——铁线莲[J]. 中国花卉园艺,2023(11):24 – 29.
[2] 王江勇,乔谦,张杰,等. 铁线莲属植物研究进展与园林应用[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2020,51(2):217 – 221.
[3] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:38,262.
[4] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准[M]. 北京:中国医药科技出版社,1995:85.
[5] 赵继荣,杨文通,陈文,等. 威灵仙有效化学成分及镇痛机制研究进展[J]. 中华中医药学刊,2022,40(9):9 – 12.
[6] 胡阿荣,艾力,敖敦格日乐,等. 铁线莲属药材的化学成分以及药理作用研究进展[J]. 中国民族民间医药,2023,32(15):57 – 61.
[7] LEE W, YANG E J, KU S K, et al. Anticoagulant activities of oleanolic acid via inhibition of tissue factor expressions[J]. BMB Rep, 2012, 45(7):390 – 395.
[8] 梁普博,赖迪生,郑云龙,等. 基于腺苷酸活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白介导的自噬途径研究齐墩果酸预处理大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 心脑血管病防治,2022,22(6):19 – 23,60.
[9] GAO C X, TANG C H, WU T J, et al. Anticancer activity of oleanolic acid and its derivatives modified at A – ring and C – 28 position[J]. J Asian Nat Prod Res, 2023, 25(6):581 – 594.
[10] WANG A H, MA H Y, YI Y L, et al. Oleanolic acid derivative alleviates cardiac fibrosis through inhibiting PTP1B activity and regulating AMPK/TGF – β/Smads pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2023, 960:176116.
[11] CHAGAS M D S S, BEHRENS M D, MORAGAS – TELLIS C J, et al. Flavonols and flavones as potential anti – inflammatory, antioxidant, and antibacterial compounds[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022:9966750.
[12] 王回霞,谢和兵,尼玛次仁,等. 电子束辐照对藏药唐古特铁线莲主要活性成分及灭菌效果的影响[J]. 核农学报,2024,38(2):289 – 297.
[13] LEONTE D, UNGUREANU D, ZAHARIA V. Flavones and related compounds: synthesis and biological activity[J]. Molecules, 2023, 28(18):6528.

[14] 冯玲枫,翁美娅,田富饶,等. 11 种铁线莲属药用植物地上部分总黄酮含量比较研究[J]. 中国现代中药,2011,13(7):14 - 18.
[15] 张少平,鞠玉栋,李洲,等. 遮阴对柠檬香茅类黄酮及其合成酶基因差异表达研究[J]. 热带亚热带植物学报,2023,31(5):615 - 622.
[16] 刘正信,高海翔,郑培清,等. 粉绿铁线莲挥发油成分分析[J]. 天然产物研究与开发,2001,13(5):25 - 27.

Content Determination of Total Flavonoids and Main Active Flavonoid Aglycones in Common Clematis Medicinal Materials

WU Haozhen[1,2,3], YANG Junfeng[1,2,3], LIU Yuning[1,2,3], NIMA Ciren[3,4], ZHU Yejin[5], XIE Hebing[1,2,3,4]

(1. *School of pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012, *China*;
2. *Nantong Haimen Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute*, *Nantong* 226133, *China*;
3. *Jiangsu Shenhou Pharmaceutical Research Co., Ltd.*, *Nantong* 226133, *China*;
4. *Tibet Shenhou Pharmaceutical Co., Ltd.*, *Shigatse* 857000, *China*;
5. *School of Medicine & Holistic Integrative Medicine*, *Nanjing University of Chinese Medicine*, *Nanjing* 210023, *China*)

Abstract Objective: To determine the content of total flavonoids and main active flavonoid aglycones in common Clematis medicinal materials. Methods: Using six commonly used Clematis medicinal materials recorded in the 2020 edition of the Chinese Pharmacopoeia and Drug Standards of the Ministry of Health of the People's Republic of China (Clematis mandshurica, Clematis chinensis, Clematis hexapetala, Clematis armandii, Clematis tangutica, and Clematis australis), as well as collected Clematis chinensis leaves and Clematis armandii leaves as study objects. Total flavonoid content and the content of main active flavonoid aglycones (quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) were determined by ultraviolet spectrophotometry and high - performance liquid chromatography (HPLC). Results: The total flavonoid content was highest in Clematis australis, followed by Clematis chinensis leaves, Clematis armandii leaves, Clematis tangutica, Clematis mandshurica, Clematis chinensis, Clematis hexapetala, and Clematis armandii. The main active flavonoid aglycones were absent in Clematis chinensis, Clematis mandshurica, Clematis hexapetala, and Clematis armandii. The content of quercetin, luteolin, and kaempferol was highest in Clematis australis, while the content of apigenin was highest in Clematis chinensis leaves. Conclusion: Significant differences were observed in the total flavonoid content and composition of main active flavonoid aglycones among commonly used Clematis medicinal materials. The Clematis medicinal materials recorded in the 2020 edition of the Chinese Pharmacopoeia (Clematis mandshurica, Clematis chinensis, Clematis hexapetala, and Clematis armandii) are not suitable as sources of flavonoid active ingredients. These findings provide a reference for the comprehensive utilization of Clematis medicinal materials and the revision of Chinese Pharmacopoeia quality standards for Clematis medicinal materials.

Key words Clematis; Total flavonoids; Ultraviolet spectrophotometry; High - performance liquid chromatography (HPLC); Content determination