

威靈仙

(CLEMATIDIS RADIX ET RHIZOMA)

威靈仙 MI

一、藥材採購及鑑定.....	2
二、藥材性狀描述（圖 1）.....	2
三、藥材組織顯微鑑別.....	2
四、藥材粉末顯微鑑別（圖 4）.....	3

威靈仙 HPLC

一、材料.....	7
二、儀器及層析管柱.....	7
三、實驗藥品及試劑來源.....	7
四、方法.....	7
五、結果.....	11

威靈仙 TLC

一、方法.....	29
二、萃法選擇及濃度測試.....	30
三、溶媒系統選擇.....	31
四、觀察方式選擇.....	33
五、十批樣品檢測.....	34

威靈仙

(CLEMATIDIS RADIX ET RHIZOMA)

一、藥材採購及鑑定

收集 10 批來自全臺北、中、南、東各地不同通路之中藥販賣業或中藥製造業的藥材樣品，確認所收集之藥材為威靈仙。

二、藥材性狀描述 (圖 1)

藥材名：威靈仙

生藥名：CLEMATIDIS RADIX ET RHIZOMA

英文名：Chinese Clematis Root

基原：毛茛科 Ranunculaceae 植物威靈仙 *Clematis chinensis* Osbeck 的乾燥根和根莖。

採收加工：秋季採挖，除去泥沙，曬乾。

藥材性狀：本藥材為威靈仙的乾燥根和根莖。根莖橫長，呈不規則圓柱狀，長 1.5~10 cm，直徑 0.5~1.5 cm，兩側及下方著生多數細根；表面黃棕色，皮部常脫落而呈纖維狀，節隆起，頂端常殘留木質莖基；質較堅韌，斷面纖維性。根呈細長圓柱形，稍彎曲，長 7~25 cm，直徑 0.1~0.4 cm；表面棕褐色或黑褐色，有細縱紋，有時皮部脫落而露出淡黃色木部；質硬脆，易折斷，斷面皮部較寬，皮部與木部間常有裂隙；木部淡黃色，略呈方形。氣微，味淡。

生長分佈：木質藤本植物，花期 6~8 月，果期 9~10 月，喜溫暖濕潤氣候，生於山坡、山谷或灌叢中。藥材主產江蘇、安徽、浙江等地。山東、四川、廣東、福建等地亦產。

三、藥材組織顯微鑑別

根橫切面 (圖 2)

1. 表皮細胞較小，呈類長方形或類卵圓形，外壁增厚顯深棕色。
2. 外皮層細胞排列緊密。
3. 皮層寬厚，均為薄壁細胞，呈類圓形、類長方形、類多邊形，有明顯的紋孔，細胞含澱粉粒。
4. 內皮層明顯，可見凱氏帶。
5. 韌皮部狹窄，外側有韌皮纖維束和石細胞群。
6. 形成層明顯。
7. 木質部全部木化。

根莖橫切面 (圖 3)

1. 表皮細胞一行，外壁增厚，棕黑色。
2. 皮層為薄壁細胞。
3. 韌皮部可見少數木化的纖維及石細胞。
4. 木質部均木化。
5. 髓部由薄壁細胞組成。

四、藥材粉末顯微鑑別(圖 4)

1. 本品粉末灰棕色或棕色。
2. 表皮細胞表面觀呈類長方形，長 $36\sim 84\ \mu\text{m}$ ，寬 $20\sim 48\ \mu\text{m}$ ，外被深棕色角質層。
3. 纖維單個散在或數個成束，呈長梭形，末端漸尖或不規則彎曲漸尖，長 $75\sim 300\ \mu\text{m}$ ，壁厚及木化，孔溝較密。
4. 導管為有緣紋孔，長 $50\sim 150\ \mu\text{m}$ ，有緣紋孔稀密不一。
5. 澱粉粒眾多，單粒類圓形，直徑 $4\sim 15\ \mu\text{m}$ ，具臍點點狀；偏光顯微鏡下呈黑十字狀；複粒眾多，由 $2\sim 6$ 分粒組成。



圖 1 威靈仙藥材圖

a. 威靈仙根及根莖 b. 根橫切面放大圖

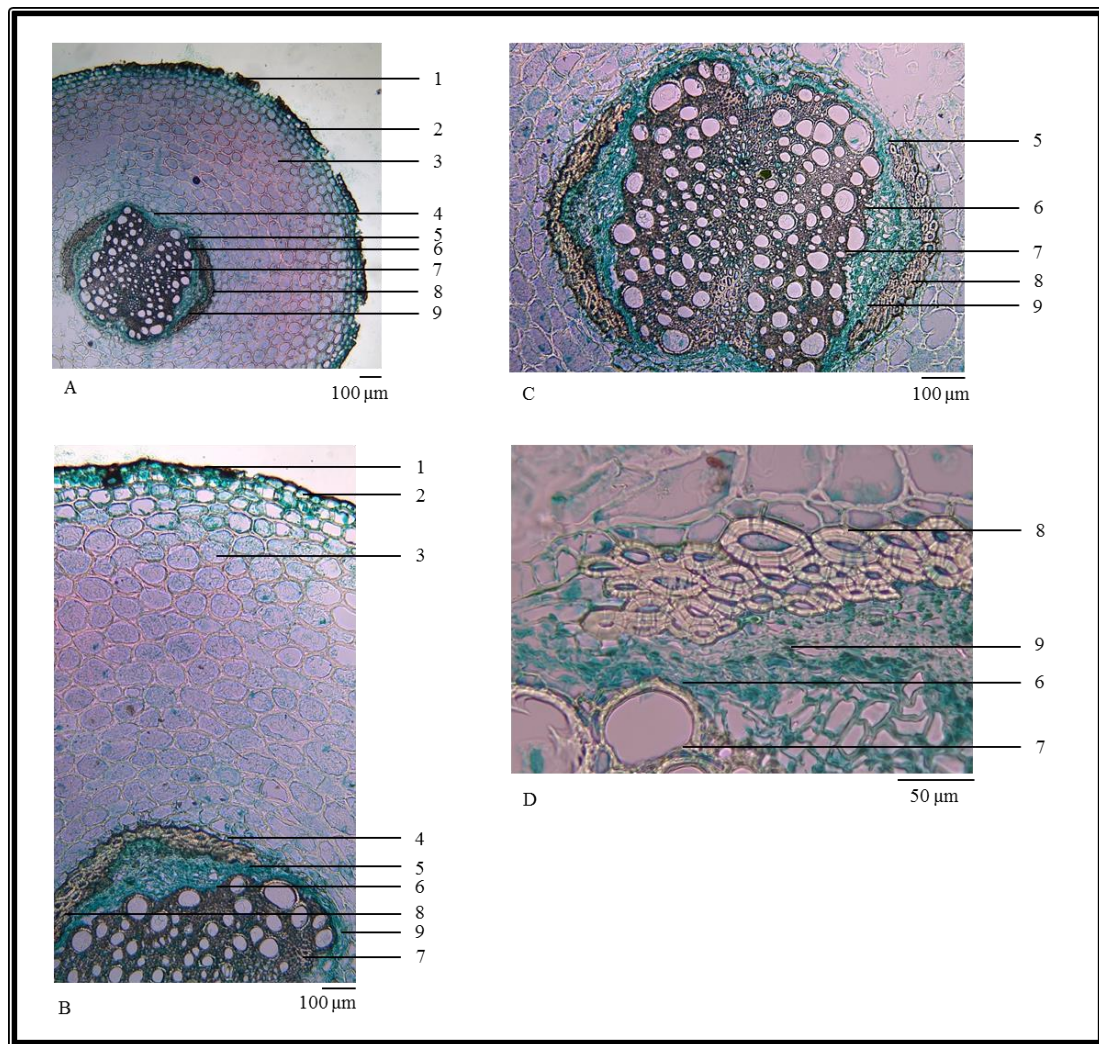


圖 2 威靈仙根橫切面顯微特徵圖

A.簡圖 B.橫切面圖 C.橫切面放大圖 D.韌皮纖維束和石細胞群

1.表皮 2.外皮層 3.皮層 4.內皮層 5.韌皮部 6.形成層 7.木質部
8.石細胞 9.韌皮纖維

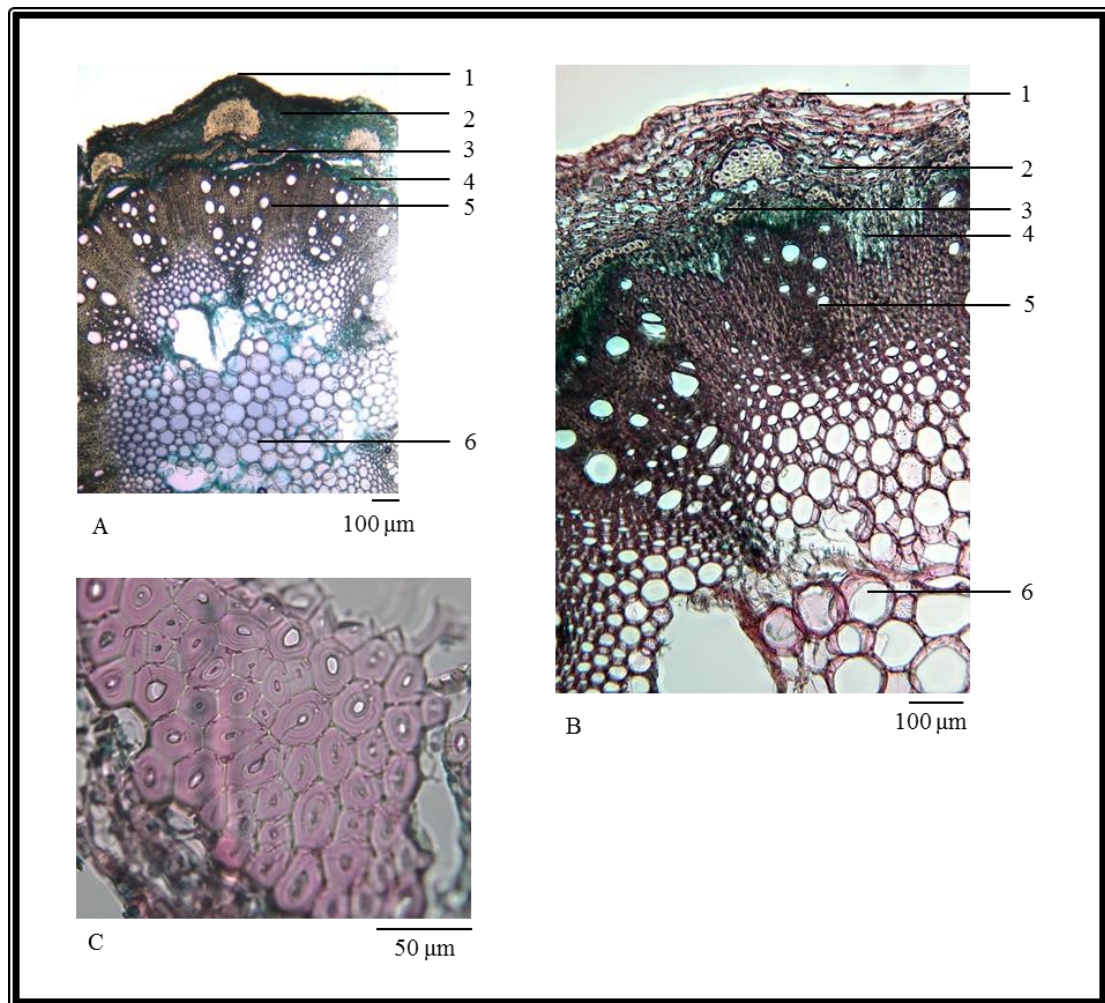


圖 2 威靈仙根莖橫切面顯微特徵圖

A.簡圖 B.橫切面圖 C.石細胞群

1.表皮 2.皮層 3.石細胞 4.韌皮部 5.木質部 6.髓



圖 4 威靈仙粉末顯微特徵圖

a. 光學顯微鏡下特徵 b. 偏光顯微鏡下特徵

1. 表皮細胞 2. 纖維 3. 有緣紋孔導管 4. 澱粉粒

威靈仙(Clematidis Radix)

一、材料

購自於台灣各地中藥店威靈仙藥材共 10 批。

二、儀器及層析管柱

(一) HPLC 儀器及層析管柱

Waters 2695 Separation Module，包含 Waters 2996、Photodiode Array Detector；層析管柱 ACCHROM Unitary C18 Column (250 × 4.6 mm, 5 μm)。

(二) UPLC 儀器及層析管柱

Waters AcQuity Ultra Performance LC，包含 Binary Solvent Manager、Sampler Manager、PDA Detector；層析管柱 Waters Acquity UPLC BEH C18 Column (100 × 2.1 mm, 1.7 μm)。

三、實驗藥品及試劑來源

(一) 試劑

乙腈(99.9%)購自於 Sigma-Aldrich；甲醇(HPLC grade)購自於 Merck，乙酸乙酯(GR grade)購自於友和。

(二) 標準品

常春藤皂苷元(Hederagenin)購自於昇漢科技，純度 98%以上；齊墩果酸(Oleanolic acid) 購自於友和，純度 98%以上。

四、方法

(一) 對照標準品溶液

取標準品常春藤皂苷元(Hederagenin)精確稱定 2.0 mg，加 1 mL 的甲醇製成每 1 mL 含常春藤皂苷元(Hederagenin) 2000 μg 的標準品儲備溶液，並以甲醇稀釋至 750 μg/mL 製成對照標準品溶液。

取標準品齊墩果酸(Oleanolic acid)精確稱定 2.0 mg，加 1 mL 的甲醇製成每 1 mL 含齊墩果酸(Oleanolic acid) 2000 μg 的標準品儲備溶液，並以甲醇稀釋至 600 μg/mL 製成對照標準品溶液。

(二) 檢品溶液

取本品粉末(過第 20 號篩網)約 1.0 g，精確稱定，置 250 mL 濃縮瓶，精確加入乙酸乙酯 100 mL，加熱迴流 2 小時，去除乙酸乙酯液，晾乾殘渣，殘渣轉移於 50 mL 離心管，加甲醇 25 mL，超音波震盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，再以 No. 2 濾紙過濾，取濾液。殘渣部分重複提取 2 次，合併濾液，轉移至 50 mL 之定量瓶中，加入溶媒至刻度，再將濾液轉移至 100 mL 濃縮瓶，用濃縮機減壓蒸乾，濃縮物溶於 7.3% (w/v) 鹽

酸 30 mL，加熱迴流 2 小時，冷卻至室溫，取溶液轉移於 125 mL 分液漏斗中，用乙酸乙酯振搖提取 3 次，每次 30 mL。合併乙酸乙酯提取液，轉移至 100 mL 圓底燒瓶中，用濃縮機減壓蒸乾，濃縮物溶於甲醇，轉移於 10 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，再過濾(Syringe filter, PTFE 0.22 μ m)，即得。

(三) 測定法

分別精確吸取常春藤皂苷元(Hederagenin)對照標準品溶液、檢品溶液 10 μ L，注入 HPLC，測定，用標準曲線分別計算溶液中常春藤皂苷元(Hederagenin)的含量，即得。

分別精確吸取齊墩果酸(Oleanolic acid)對照標準品溶液、檢品溶液 10 μ L，注入 HPLC，測定，用標準曲線分別計算溶液中齊墩果酸(Oleanolic acid)的含量，即得。

(四) 檢量線

精確吸取常春藤皂苷元(Hederagenin)標準品儲備溶液適量(2000 μ g/mL)，以甲醇稀釋成含常春藤皂苷元(Hederagenin)分別為 1000、750、250、100 μ g/mL 的標準品溶液。以上溶液各取 10 μ L 分別注入 HPLC 進行定量分析，利用標準品之波峰面積(y 軸)和標準品之濃度(x 軸)進行線性回歸，並求得檢量線之方程式 $y = ax + b$ 與相關係數 R^2 。

精確吸取齊墩果酸(Oleanolic acid)標準品儲備溶液適量(2000 μ g/mL)，以甲醇稀釋成含齊墩果酸(Oleanolic acid)分別為 1000、600、250、100 μ g/mL 的標準品溶液。以上溶液各取 10 μ L 分別注入 HPLC 進行定量分析，利用標準品之波峰面積(y 軸)和標準品之濃度(x 軸)進行線性回歸，並求得檢量線之方程式 $y = ax + b$ 與相關係數 R^2 。

(五) 精密度試驗

以常春藤皂苷元(Hederagenin)濃度為 750 μ g/mL 之對照標準品溶液連續進樣五針，以常春藤皂苷元(Hederagenin)波峰面積為指標，求出相對標準差。

以齊墩果酸(Oleanolic acid)濃度為 600 μ g/mL 之對照標準品溶液連續進樣五針，以齊墩果酸(Oleanolic acid)波峰面積為指標，求出相對標準差。

(六) 再現性與穩定性試驗

1. 再現性:取同一批市售威靈仙粉末，依威靈仙檢品溶液製備方法平行製備五份威靈仙檢品溶液，進樣測定，分別以常春藤皂苷元(Hederagenin)、齊墩果酸(Oleanolic acid)的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性:取同一批市售威靈仙粉末，依威靈仙檢品溶液製備方法製備威靈仙檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以常春藤皂苷元(Hederagenin)、齊墩果酸(Oleanolic acid)波峰面積為指標，求出相對

標準差。

(七) 偵測極限與定量極限試驗

偵測極限(Limit of Detection, LOD)：將已知濃度之標準品溶液不斷稀釋，並以訊號雜訊比為 $\geq 3:1$ 時之濃度，作為偵測極限估計值；定量極限(Limit of Quantitation, LOQ)：將已知濃度之標準品溶液不斷稀釋，並以訊號雜訊比為 $\geq 10:1$ 時之濃度，作為定量極限估計值。

(八) 添加回收率試驗

取已知常春藤皂苷元(Hederagenin)、齊墩果酸(Oleanolic acid)含量的威靈仙藥材粉末約 0.05 g，精確稱定五份，分別加入 1 mL 的常春藤皂苷元(Hederagenin)溶液(700 $\mu\text{g/mL}$)、1 mL 的齊墩果酸(Oleanolic acid)溶液(500 $\mu\text{g/mL}$)，並按檢品溶液製備方法操作測定。

(九) HPLC 分析條件

1. 層析管：ACCHROM Unitary C18 Column (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：UV 205 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：35 $^{\circ}\text{C}$
5. 注入量：10 μL
6. 移動相：

時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	90	10
15	90	10

(十) 臺灣市售威靈仙含量測定

取十批市售威靈仙藥材依檢品溶液製備方法製備檢品溶液，取各 10 μL 連續三針注入 HPLC，所得平均波峰面積依附錄 I 公式計算樣品常春藤皂苷元(Hederagenin)、齊墩果酸(Oleanolic acid)的百分含量。

(十一) 威靈仙檢品之 UPLC 層析條件

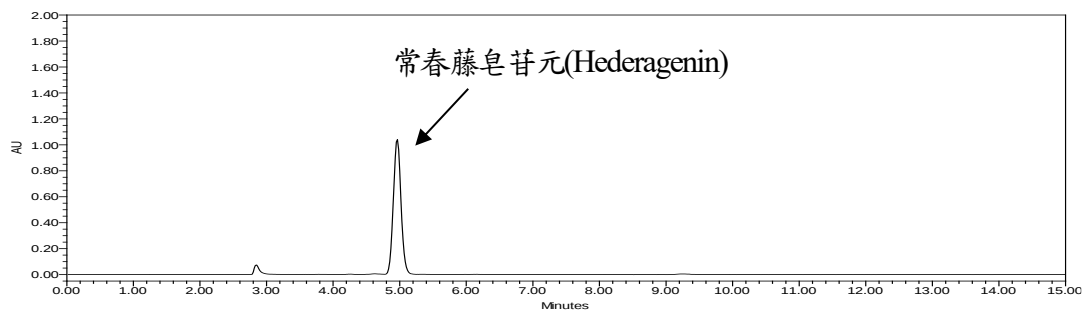
1. 層析管：Waters Acquity UPLC BEH C18 Column (100 × 2.1 mm, 1.7 μm)
2. 檢測波長：UV 205 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：1 μL
6. 移動相：

時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	65	35
2	65	35
5	85	15
7	85	15
9	100	0

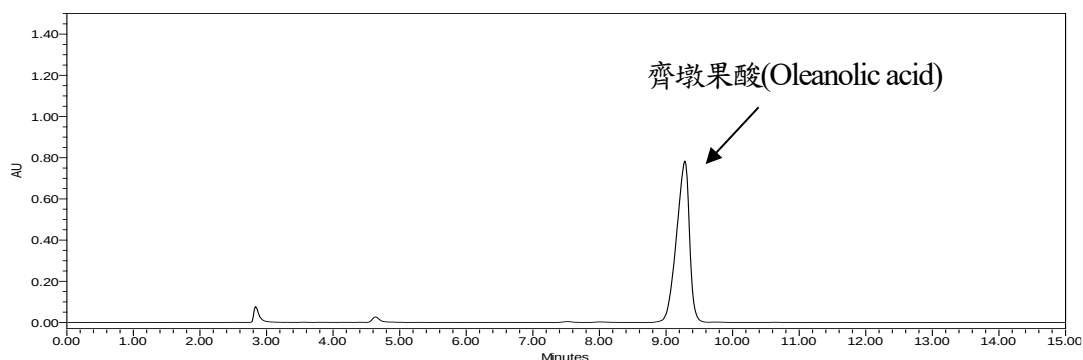
五、結果

(一) 標準品 常春藤皂苷元(Hederagenin)、齊墩果酸(Oleanolic acid)之 HPLC 層析

於滯留時間 4.96、9.26 分鐘處分別顯示常春藤皂苷元(Hederagenin)、齊墩果酸(Oleanolic acid)標準品波峰(圖一)、(圖二)。



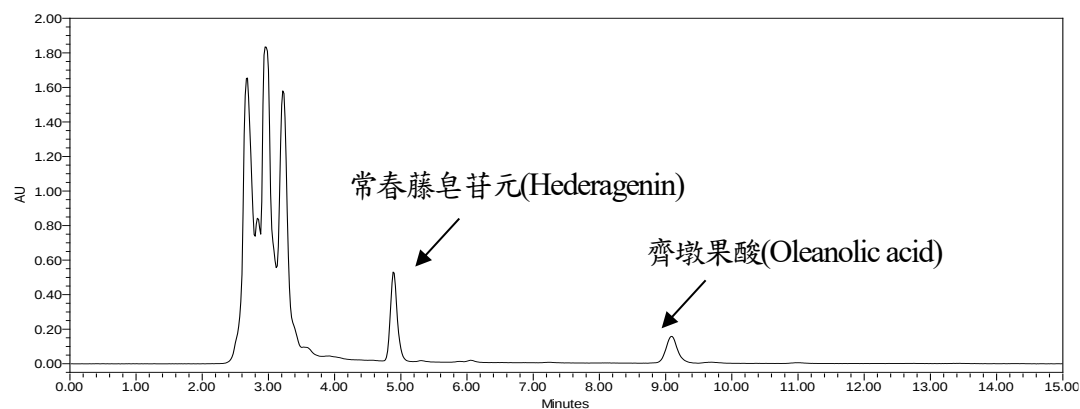
圖一、常春藤皂苷元(Hederagenin)標準品溶液之 HPLC 層析圖



圖二、齊墩果酸(Oleanolic acid)標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售威靈仙檢品之 HPLC 層析

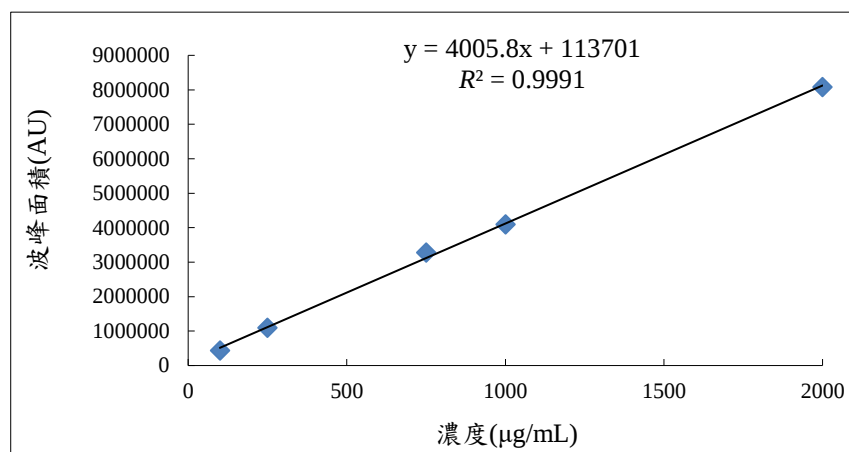
於滯留時間 4.89、9.09 分鐘處分別顯示威靈仙檢品中常春藤皂苷元(Hederagenin)、齊墩果酸(Oleanolic acid)波峰(圖三)。常春藤皂苷元(Hederagenin)分離率為 $R=1.61$ ，托尾因子為 $T=1.02$ ；齊墩果酸(Oleanolic acid)分離率為 $R=8.77$ ，托尾因子為 $T=1.00$ 均在系統適用性要求內。



圖三、市售威靈仙檢品之 HPLC 層析圖

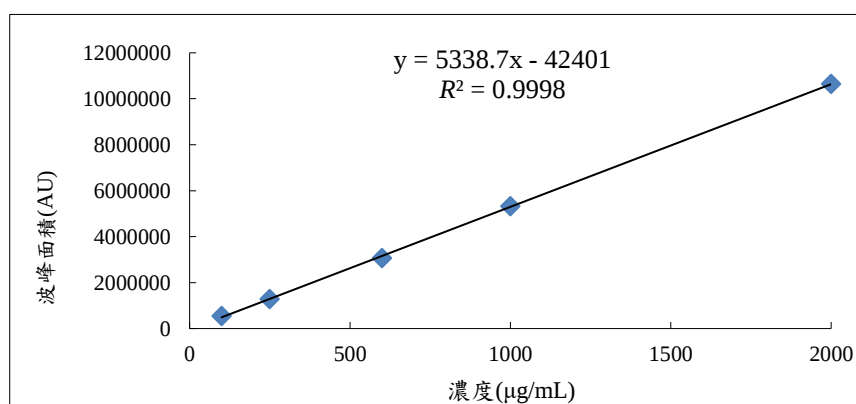
(三) 標準品常春藤皂苷元(Hederagenin) 、齊墩果酸(Oleanolic acid)檢量線

經不同濃度常春藤皂苷元(Hederagenin)(x)對各自層析波峰面積的反應值(y)所得到的檢量線方程式為 $y = 4005.8x + 113701$ ， $R^2 = 0.9991$ ，顯示濃度在 100–2000 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖四)。



圖四、常春藤皂苷元(Hederagenin)之檢量線圖

經不同濃度齊墩果酸(Oleanolic acid)(x)對各自層析波峰面積的反應值(y)所得到的檢量線方程式為 $y = 5338.7x - 42401$ ， $R^2 = 0.9998$ ，顯示濃度在 100–2000 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖五)。



圖五、齊墩果酸(Oleanolic acid)之檢量線圖

表一、常春藤皂苷元(Hederagenin) 、齊墩果酸(Oleanolic acid)之檢量線方程式

對照標準品	濃度($\mu\text{g/mL}$)	線性回歸方程式	R^2
常春藤皂苷元(Hederagenin)	100–2000	$y = 4005.8x + 113701$	0.9991
齊墩果酸(Oleanolic acid)	100–2000	$y = 5338.7x - 42401$	0.9998

(四) 精密度與再現性試驗

實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，常春藤皂苷元

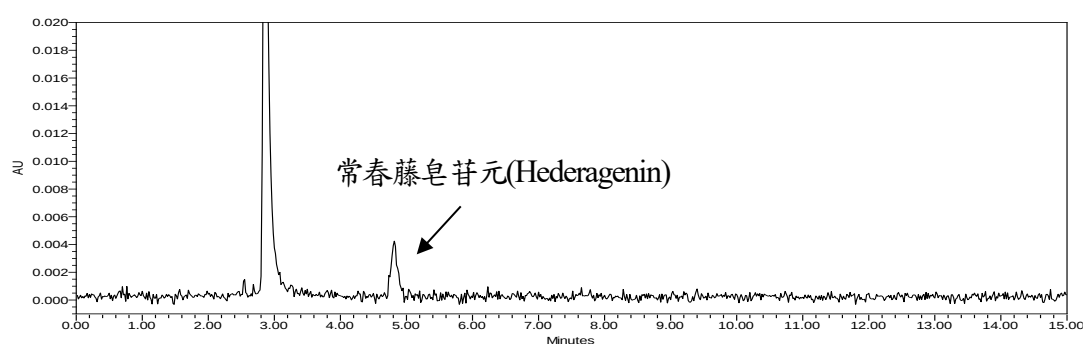
(Hederagenin)、齊墩果酸(Oleanolic acid)精密度之相對標準差分別為 1.87%、1.30%，再現性之相對標準差為 2.29%、1.02%，均在系統適用性要求內。

(五) 穩定性試驗

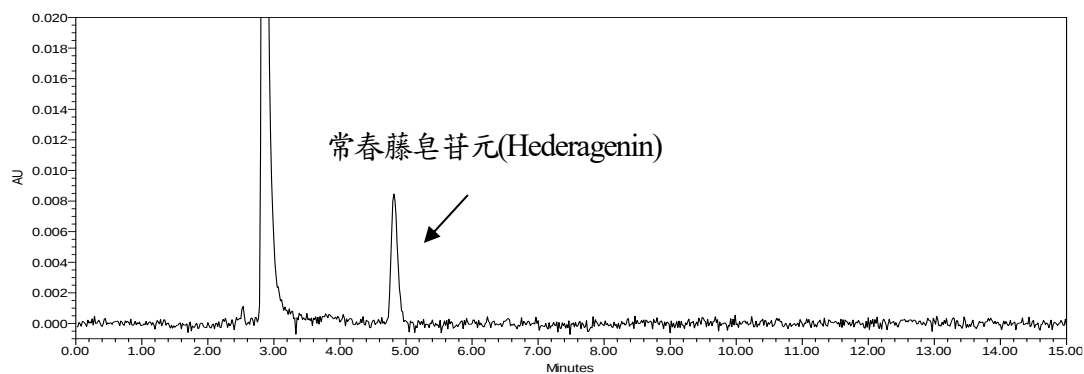
由結果可以得知，常春藤皂苷元(Hederagenin)、齊墩果酸(Oleanolic acid)在 24 小時內穩定，相對標準差分別為 3.47%、1.06%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(六) 偵測極限與定量極限試驗

常春藤皂苷元(Hederagenin)偵測極限(Limit of Detection, LOD)為 1.0 µg/mL (圖六)，定量極限(Limit of Quantitation, LOQ)為 10 µg/mL (圖七)。

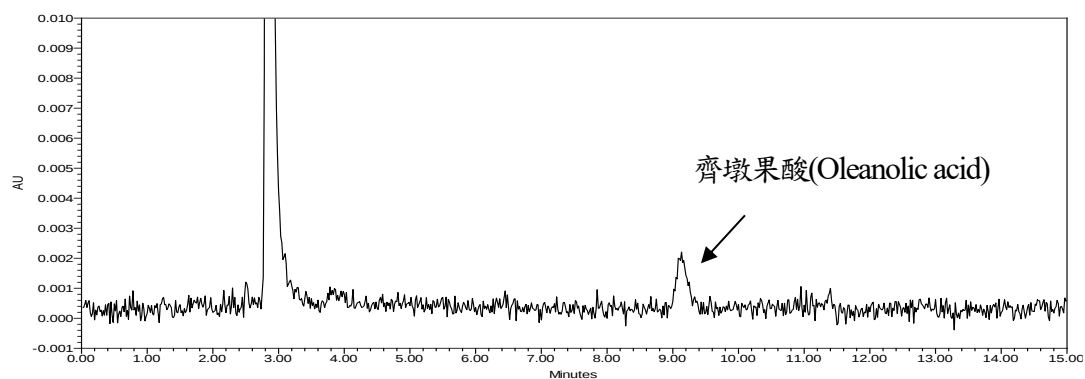


圖六、常春藤皂苷元(Hederagenin)之 LOD 層析圖

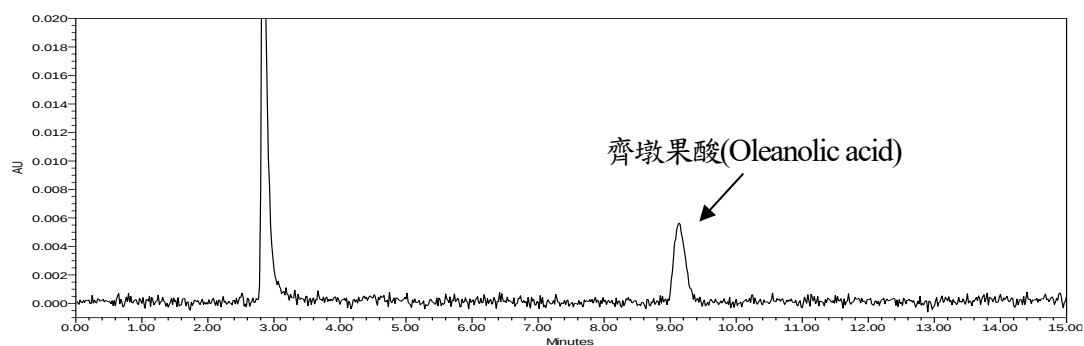


圖七、常春藤皂苷元(Hederagenin)之 LOQ 層析圖

齊墩果酸(Oleanolic acid)偵測極限(Limit of Detection, LOD)為 1.0 µg/mL (圖八)，定量極限(Limit of Quantitation, LOQ)為 5.0 µg/mL (圖九)。



圖八、齊墩果酸(Oleanolic acid)之 LOD 層析圖



圖九、齊墩果酸(Oleanolic acid)之 LOQ 層析圖

表二、各項檢驗分析

檢測項目	常春藤皂苷元(Hederagenin)		齊墩果酸(Oleanolic acid)	
	濃度	R.S.D. (%)	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	750 µg/mL	1.87	600 µg/mL	1.30
再現性 (n=5)	檢品溶液(No.9)	2.29	檢品溶液(No.9)	1.02
穩定性 (n=6)	檢品溶液(No.9)	3.47	檢品溶液(No.9)	1.06
偵測極限 (n=3)	1.0 µg/mL	-	1.0 µg/mL	-
定量極限 (n=3)	10 µg/mL	-	5.0 µg/mL	-

(七) 添加回收率試驗

添加常春藤皂苷元(Hederagenin)平均添加回收率 97.4%，相對標準偏差 0.91%。

表三、常春藤皂苷元(Hederagenin)添加回收率

編號	藥材稱重 (g)	含有量 (mg)	加入量 (mg)	測得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	R.S.D. (%)
1	0.05	0.5544	0.70	1.2341	96.34	97.43	0.91
2	0.05	0.5544	0.70	1.2389	97.20		
3	0.05	0.5544	0.70	1.2477	98.79		
4	0.05	0.5544	0.70	1.2406	97.51		
5	0.05	0.5544	0.70	1.2394	97.29		

添加常春藤皂苷元(Hederagenin)平均添加回收率 97.9%，相對標準偏差 0.90%。

表四、齊墩果酸(Oleanolic acid)添加回收率

編號	藥材稱重 (g)	含有量 (mg)	加入量 (mg)	測得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	R.S.D. (%)
1	0.05	0.4090	0.50	0.8974	97.16	97.92	0.90
2	0.05	0.4090	0.50	0.8993	97.62		
3	0.05	0.4090	0.50	0.9068	99.46		
4	0.05	0.4090	0.50	0.8997	97.72		
5	0.05	0.4090	0.50	0.8993	97.62		

(八) 台灣市售威靈仙含量測定

10 批威靈仙藥材之含量測定結果(乾燥品)如表五所示，常春藤皂苷元(Hederagenin)的含量為 1.42–2.01%、齊墩果酸(Oleanolic acid) 的含量為 0.67–1.44%。建議威靈仙藥材指標成分常春藤皂苷元(Hederagenin) 的含量不得少於 0.60%，齊墩果酸(Oleanolic acid)的含量不得少於 0.47%。理論板數按常春藤皂苷元(Hederagenin)波峰計算應不低於 4000 (實際值為 7000)，理論板數按齊墩果酸(Oleanolic acid)波峰計算應不低於 5000 (實際值為 10000)。

表五、台灣市售威靈仙檢品之常春藤皂苷元(Hederagenin) 、齊墩果酸(Oleanolic acid) 的含量

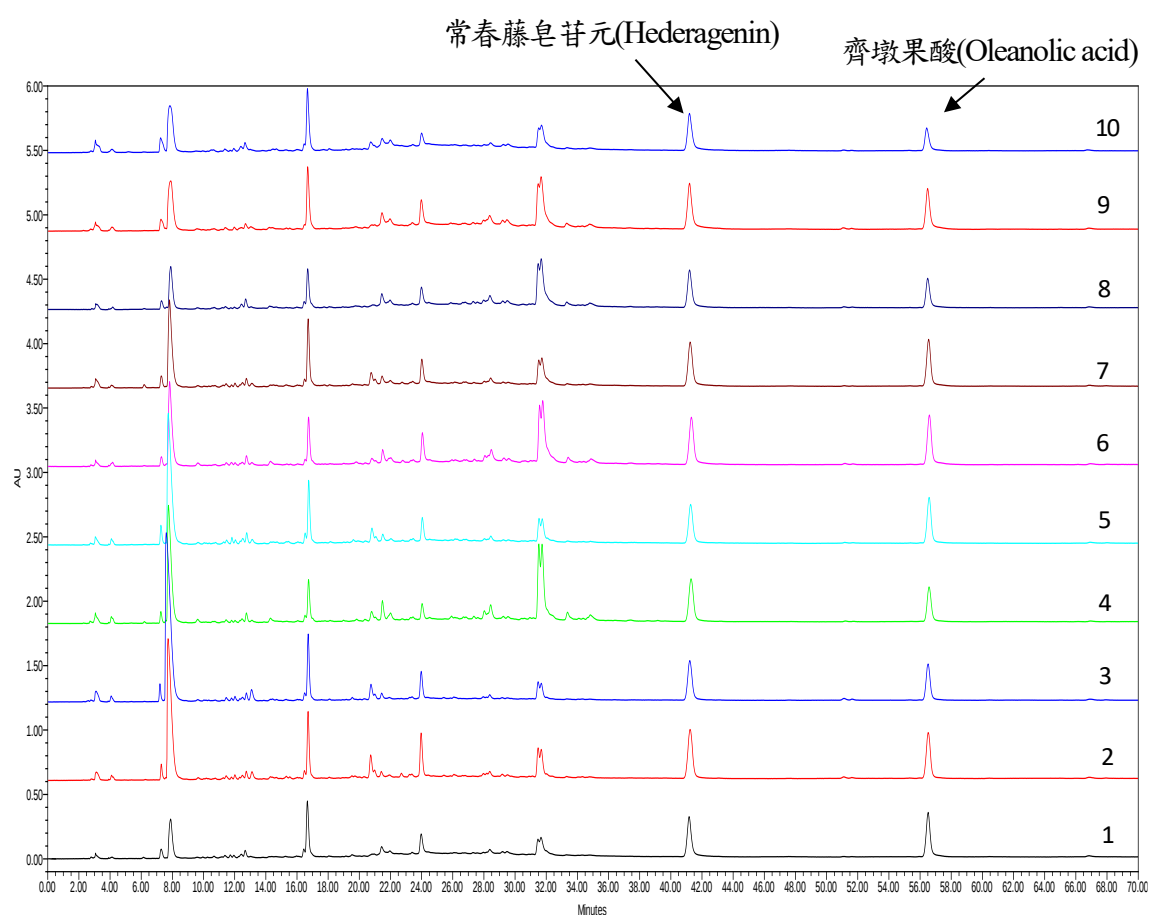
中藥店編號 (No.)	常春藤皂苷元(Hederagenin) 含量(%)	齊墩果酸(Oleanolic acid) 含量(%)
1 (NB)	1.46	0.67
2 (NC)	1.91	1.26
3 (NI)	1.51	1.24
4 (NN)	1.43	0.81
5 (CA)	1.79	1.37
6 (CG)	2.01	1.44
7 (SA)	1.55	1.26
8 (SC)	1.72	0.96
9 (SG)	1.42	0.97
10 (SJ)	1.90	1.28

(九) 市售威靈仙藥材之 HPLC 指紋圖譜的建立

取十批市售威靈仙檢品溶液各 10 μ L 進樣，進行 HPLC 指紋圖譜的測定。

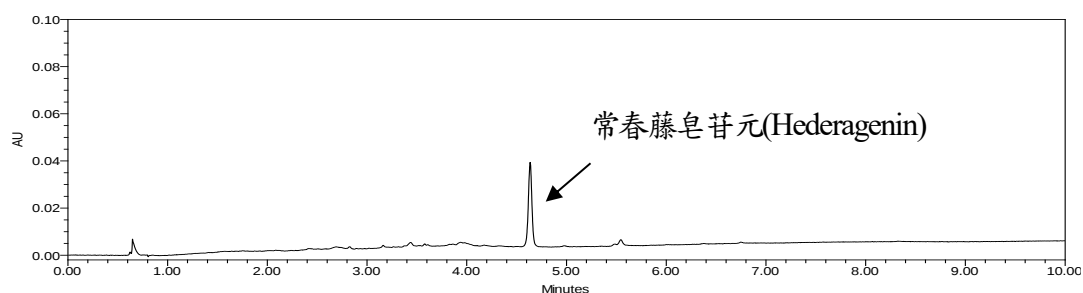
1. 層析管：ACCHROM Unitary C18 Column (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)
2. 檢測波長：UV 205 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：35 $^{\circ}$ C
5. 注入量：10 μ L
6. 移動相：

時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	5	95
35	65	35
45	65	35
50	85	15
60	85	15
70	100	0



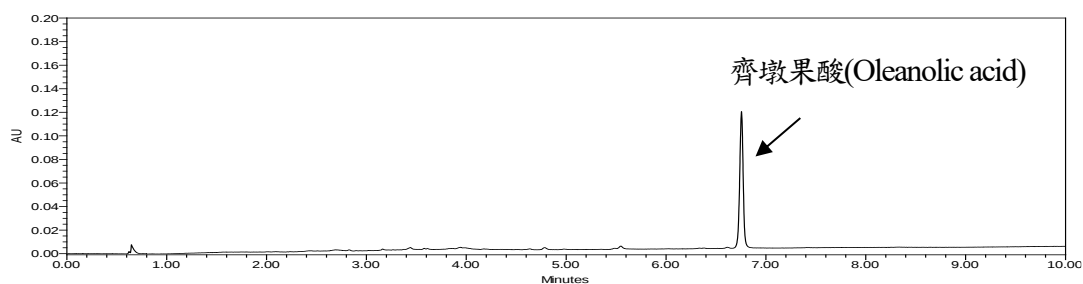
圖十、10 批威靈仙藥材之 HPLC 指紋圖譜

(十) 標準品常春藤皂苷元(Hederagenin)、齊墩果酸(Oleanolic acid)之 UPLC 層析
於滯留時間 4.63 分鐘處分別顯示常春藤皂苷元(Hederagenin)標準品的波峰(圖十一)。



圖十一、常春藤皂苷元(Hederagenin)標準品溶液之 UPLC 層析圖

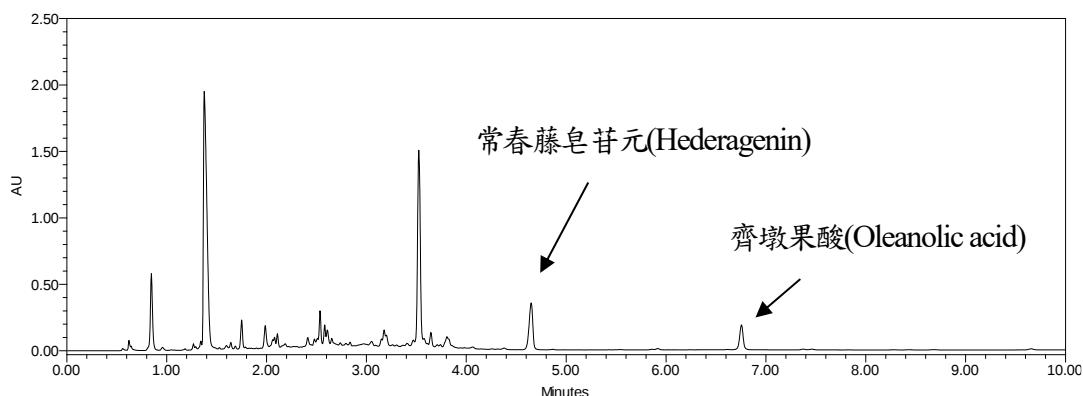
於滯留時間 6.75 分鐘處分別顯示常春藤皂苷元(Hederagenin)標準品的波峰(圖十二)。



圖十二、齊墩果酸(Oleanolic acid)標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十一) 市售威靈仙檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 4.97、6.36 分鐘處分別顯示威靈仙檢品中常春藤皂苷元(Hederagenin)、齊墩果酸(Oleanolic acid)的波峰(圖十三)。

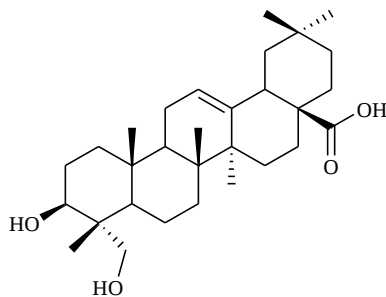


圖十三、市售威靈仙檢品之 UPLC 層析圖

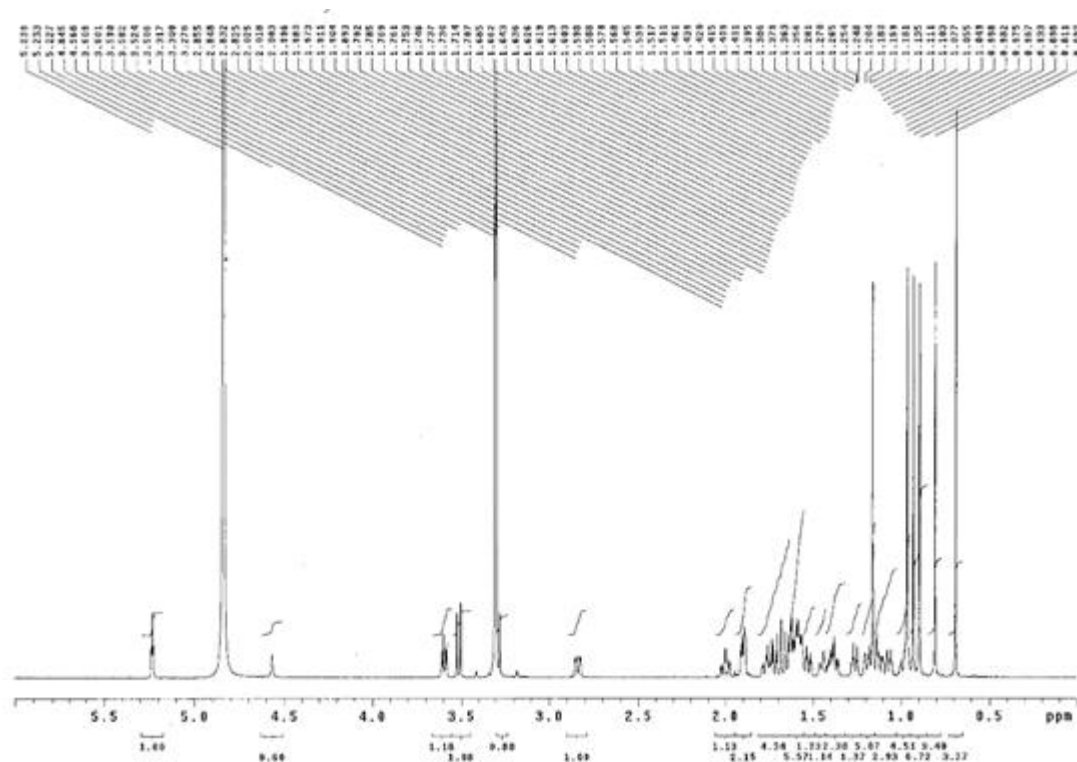
(十二) 常春藤皂苷元(Hederagenin)的分子式、分子量與熔點

分子式： $C_{30}H_{48}O_4$ ；Mol. Wt.：472.7；mp：333–335 °C；白色固體。

(十三) 常春藤皂苷元(Hederagenin)的結構

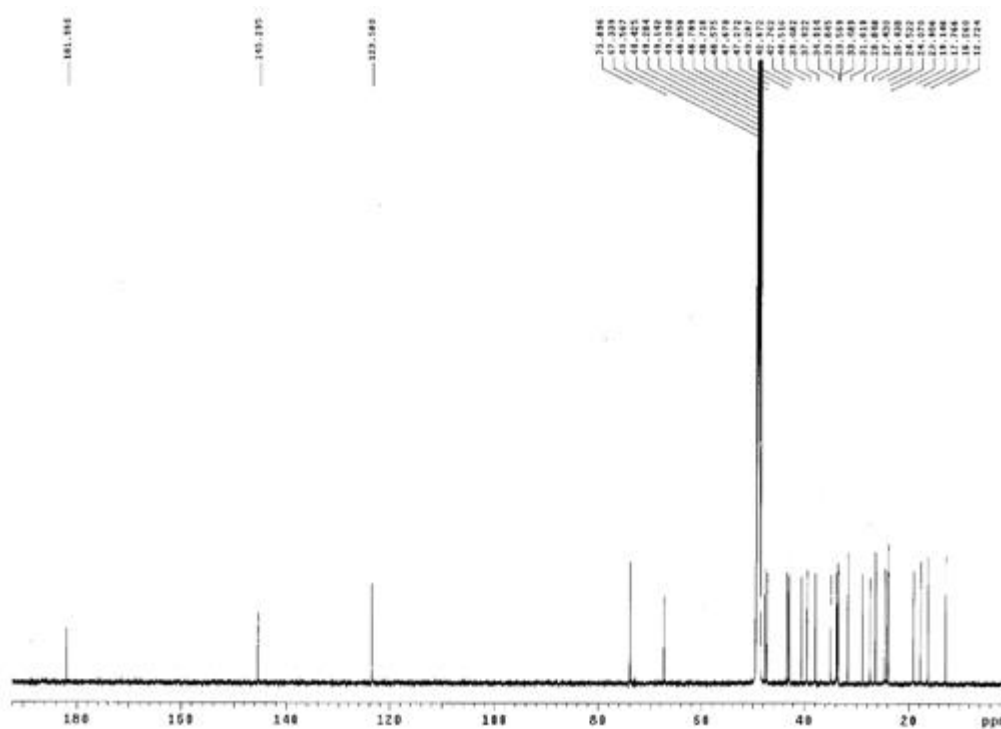


(十四) 常春藤皂苷元(Hederagenin)的 1H NMR 圖譜



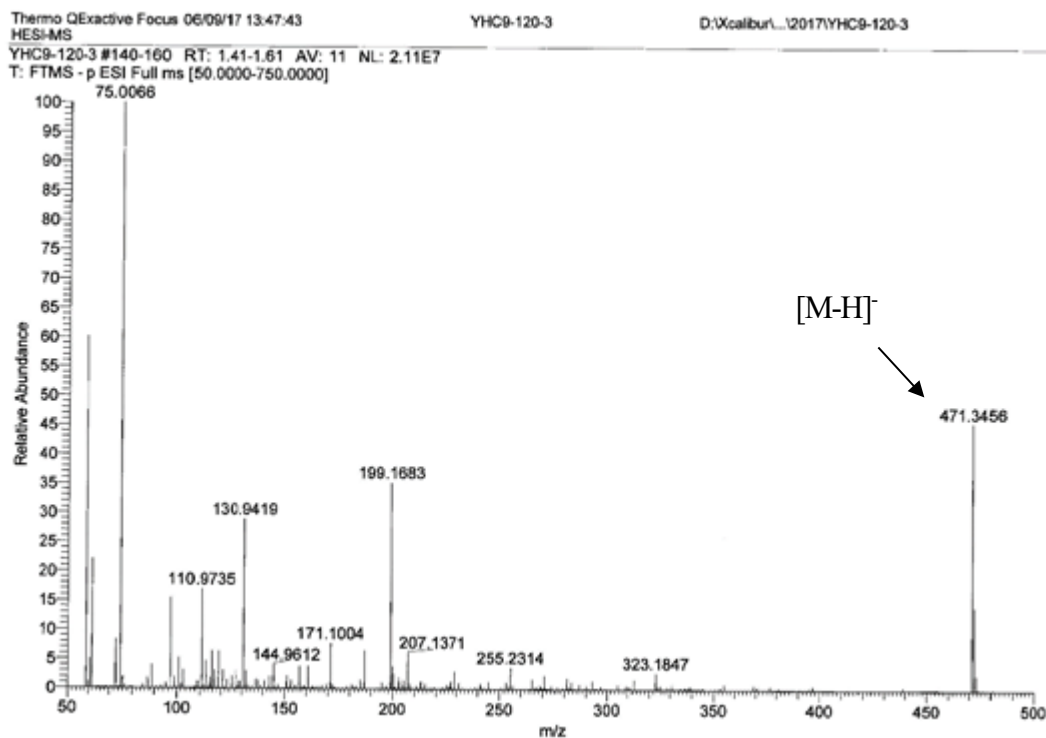
圖十四、常春藤皂苷元(Hederagenin)的 1H NMR 圖譜(CD_3OD)

(十五) 常春藤皂苷元(Hederagenin)的 ^{13}C NMR 圖譜



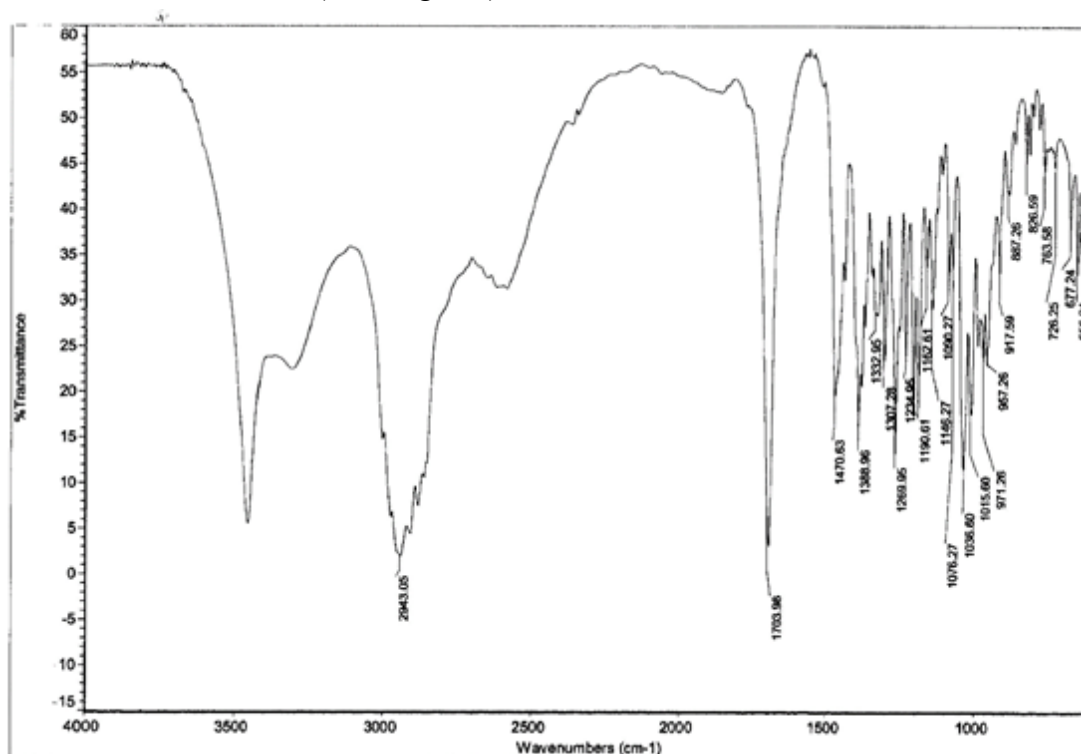
圖十五、常春藤皂苷元(Hederagenin)的 ^{13}C NMR 圖譜(CD_3OD)

(十六) 常春藤皂苷元(Hederagenin)的 ESI-MS 圖譜



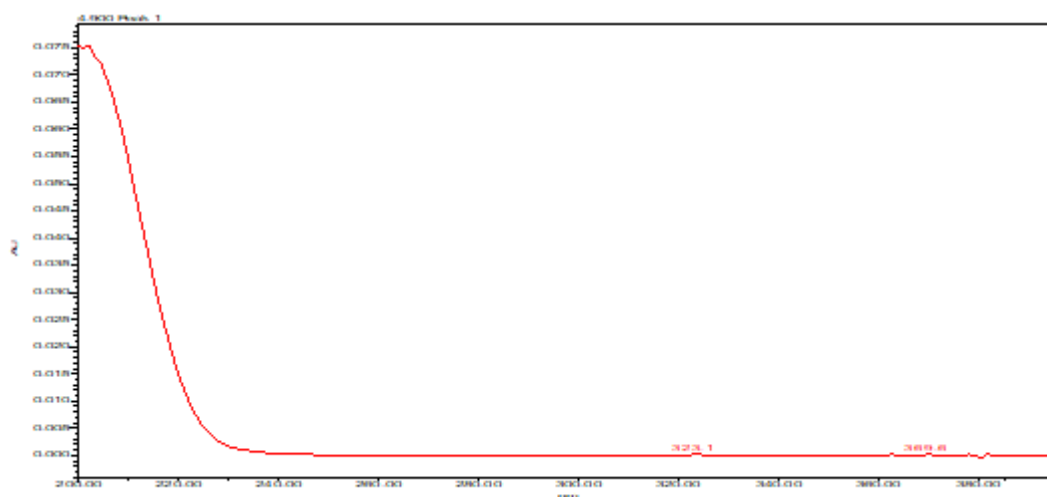
圖十六、常春藤皂苷元(Hederagenin)的 ESI-MS 圖譜

(十七) 常春藤皂苷元(Hederagenin)的 FTIR 圖譜



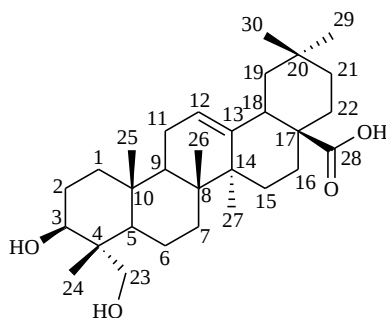
圖十七、常春藤皂苷元(Hederagenin)的 FTIR 圖譜

(十八) 常春藤皂苷元(Hederagenin)的 UV 圖譜



圖十八、常春藤皂苷元(Hederagenin)的 UV 圖譜

(十九) 常春藤皂苷元(Hederagenin)的氫、碳化學位移



常春藤皂苷元(Hederagenin)

表六、常春藤皂苷元(Hederagenin)的氫、碳化學位移(CD₃OD)^a

position	δ_H (600 MHz)	δ_C (150 MHz)
1	0.97–1.00 (m), 1.58–1.64 (m)	39.5
2	1.56–1.66 (m)	27.4
3	3.60 (dd, 11.4, 4.8)	73.9
4	-	43.3
5	1.14–1.17 (m)	48.7
6	1.36–1.46 (m)	19.1
7	1.24–1.28 (m), 1.56–1.61 (m)	33.5
8	-	40.5
9	1.61–1.65 (m)	48.8
10	-	37.9
11	1.89–1.91 (m)	24.5
12	5.23 (t, 3.6)	123.6
13	-	145.3
14	-	43.0
15	1.05–1.08 (m), 1.74–1.79 (m)	28.8
16	1.57–1.61 (m), 1.97–2.03 (m)	24.1
17	-	47.7
18	2.84 (dd, 13.8, 4.2)	42.8
19	1.10–1.13 (m), 1.66–1.73(m)	47.3
20	-	31.6
21	1.17–1.21 (m), 1.36–1.42 (m)	34.9
22	1.51–1.55(m), 1.70–1.75 (m)	33.8
23	3.29 (d, 10.8), 3.52 (d, 10.8)	67.3
24	0.69 (s)	12.7
25	0.97 (s)	16.3
26	0.81 (s)	17.8

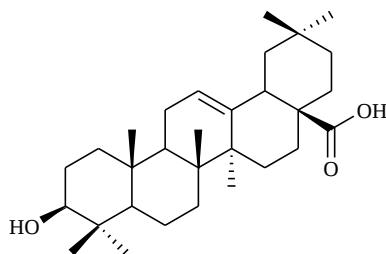
27	1.16 (s)	26.4
28	-	182.0
29	0.90 (s)	33.6*
30	0.93 (s)	24.0*

^a(Multiplicity, *J* in Hz) in ppm. *interchangeable.

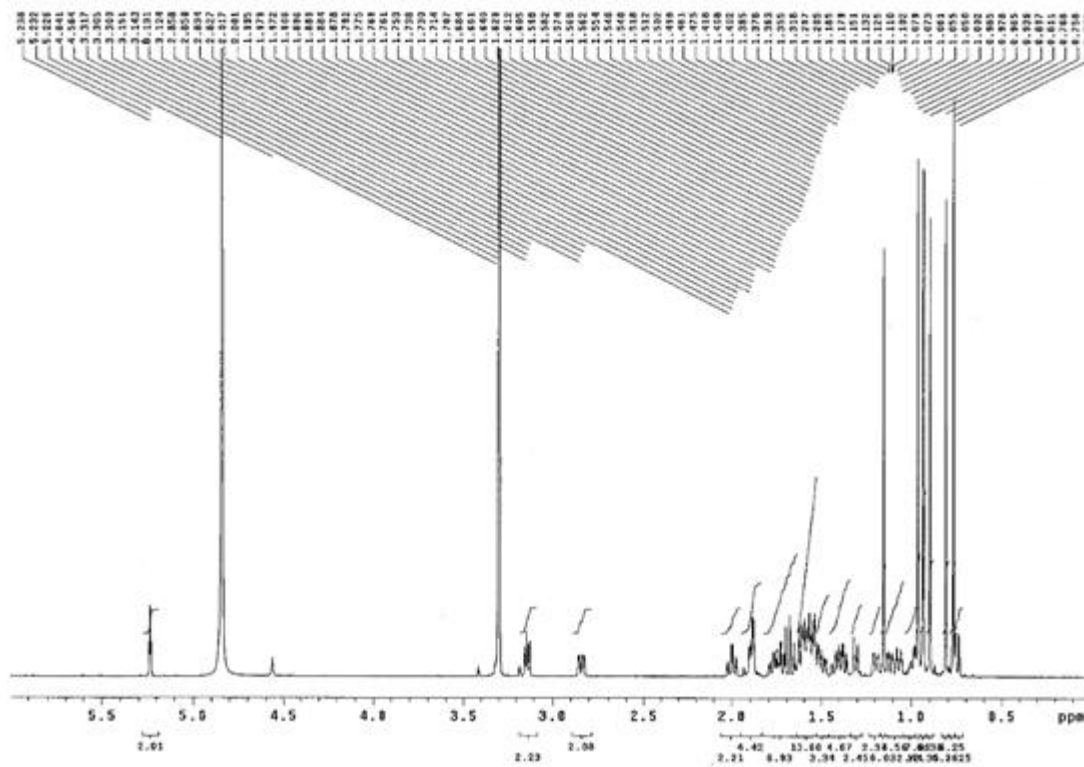
(二十) 齊墩果酸(Oleanolic acid)的分子式、分子量與熔點

分子式： $C_{30}H_{48}O_3$ ；Mol. Wt.：456.7；mp：308–310 °C；白色固體。

(二十一) 齊墩果酸(Oleanolic acid)的結構

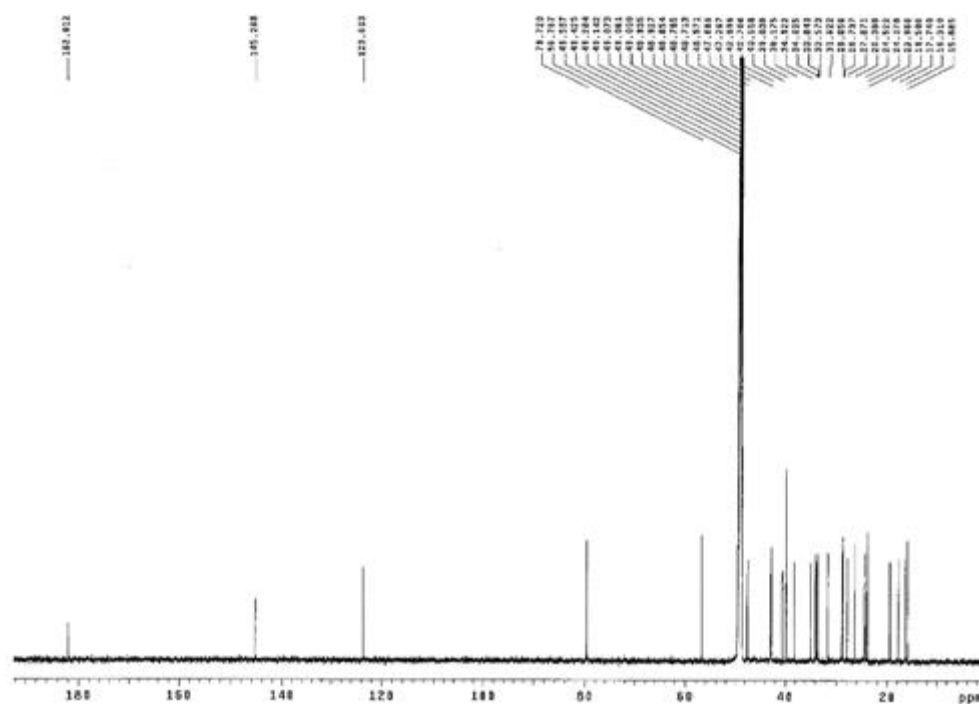


(二十二) 齊墩果酸(Oleanolic acid)的 1H NMR 圖譜



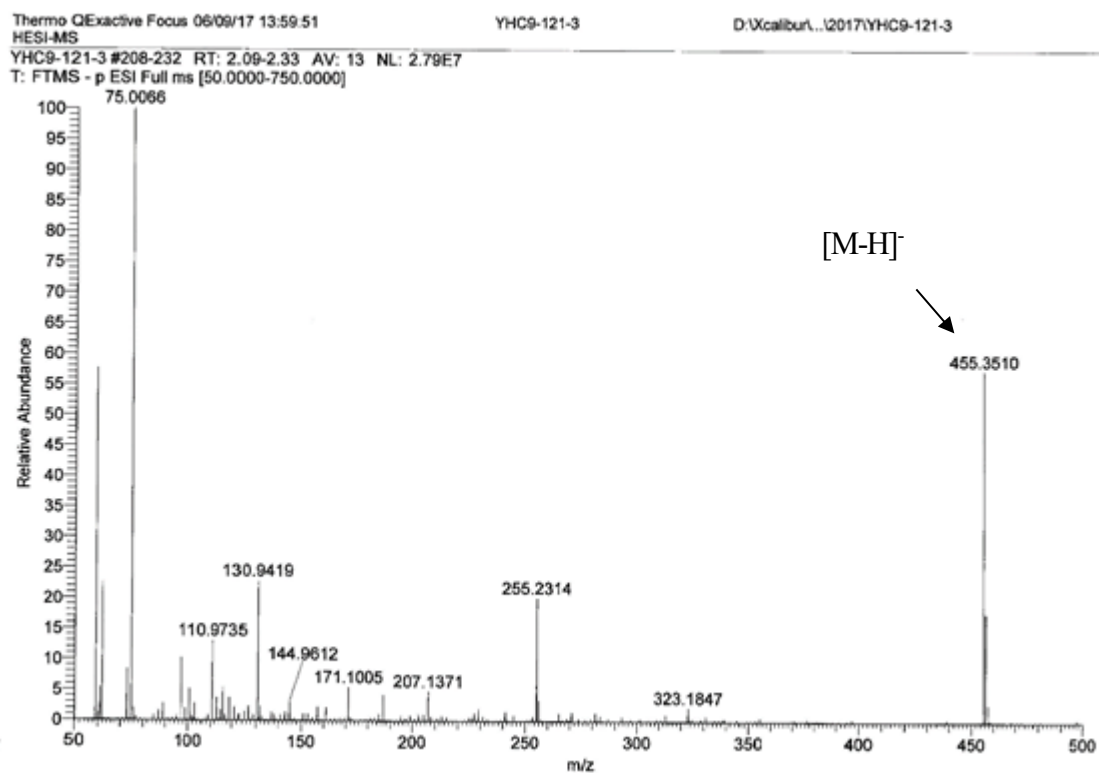
圖十九、齊墩果酸(Oleanolic acid)的 1H NMR 圖譜(CD_3OD)

(二十三) 齊墩果酸(Oleanolic acid)的 ^{13}C NMR 圖譜



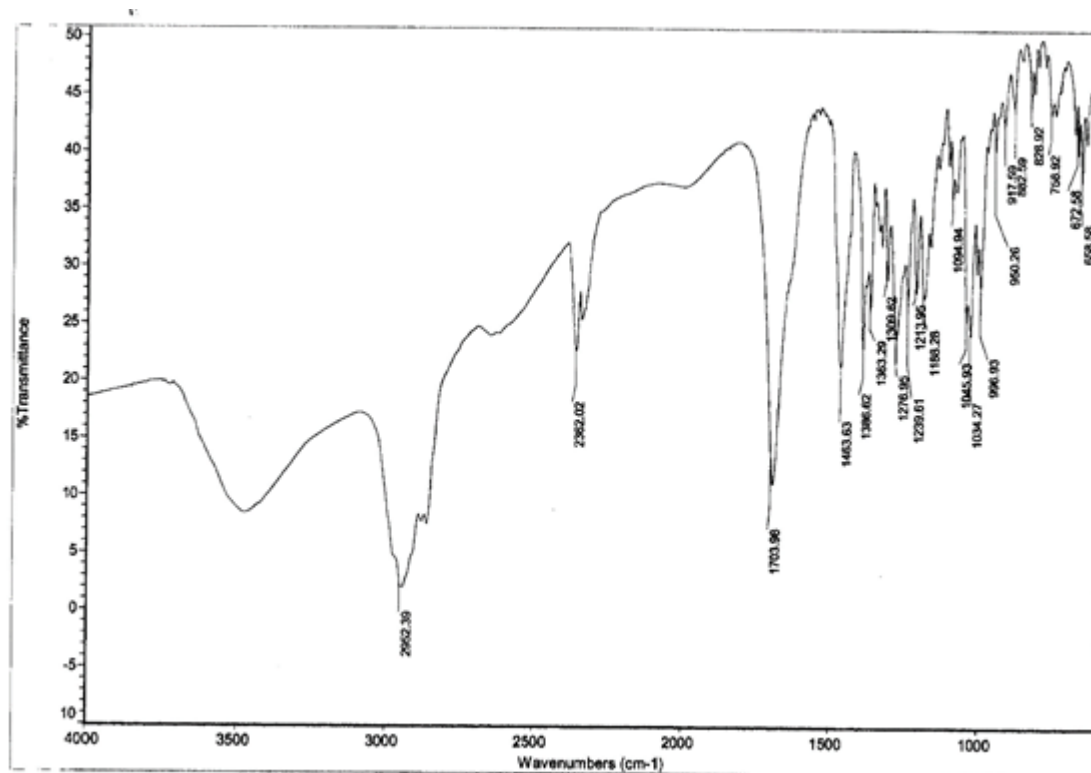
圖二十、齊墩果酸(Oleanolic acid)的 ^{13}C NMR 圖譜(CD_3OD)

(二十四) 齊墩果酸(Oleanolic acid)的 ESI-MS 圖譜



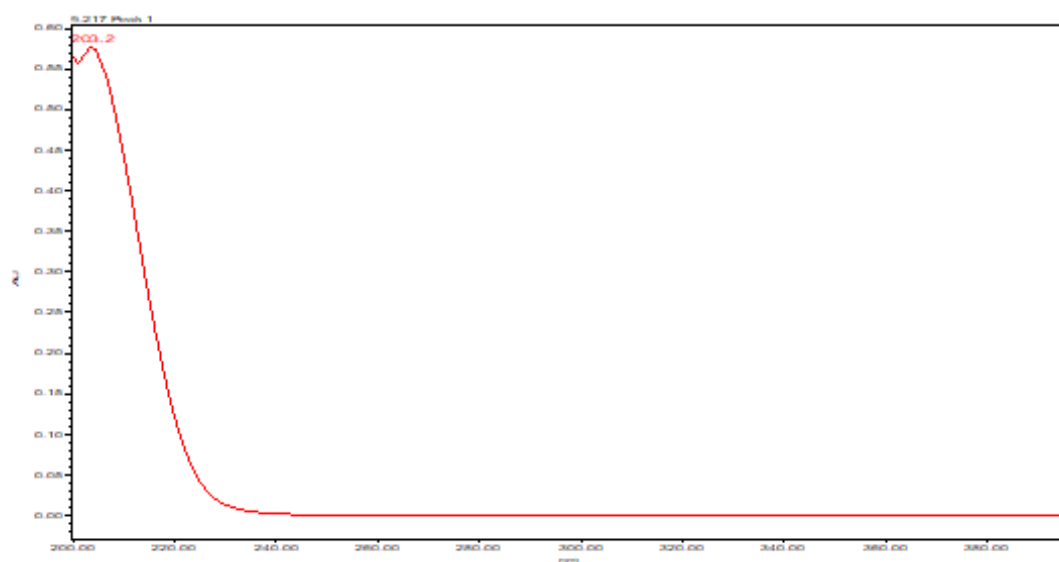
圖二十一、齊墩果酸(Oleanolic acid)的 ESI-MS 圖譜

(二十五) 齊墩果酸(Oleanolic acid)的 FTIR 圖譜



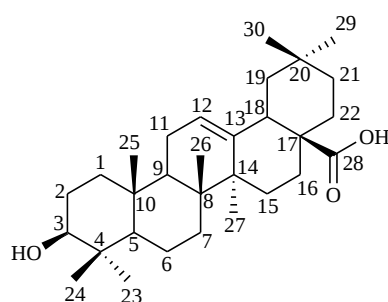
圖二十二、齊墩果酸(Oleanolic acid)的 FTIR 圖譜

(二十六) 齊墩果酸(Oleanolic acid)的 UV 圖譜



圖二十三、齊墩果酸(Oleanolic acid)的 UV 圖譜

(二十七) 齊墩果酸(Oleanolic acid)的氫、碳化學位移



齊墩果酸(Oleanolic acid)

表七、齊墩果酸(Oleanolic acid)的氫、碳化學位移(CD₃OD)^a

position	δ_H (600 MHz)	δ_C (150 MHz)
1	0.98–1.02 (m), 1.59–1.64 (m)	39.8
2	1.53–1.66 (m)	27.9
3	3.14 (dd, 11.4, 4.2)	79.7
4	-	39.8
5	0.75 (dd, 11.4, 1.8)	56.8
6	1.36–1.44 (m), 1.55–1.60 (m)	19.5
7	1.29–1.32 (m), 1.50–1.55 (m)	34.0
8	-	40.6
9	1.56–1.62 (m)	48.7
10	-	38.2
11	1.88–1.91 (m)	24.5
12	5.23 (t, 3.6)	123.6
13	-	145.3
14	-	42.9
15	1.05–1.08 (m), 1.75–1.80 (m)	28.9
16	1.57–1.62 (m), 1.97–2.02 (m),	24.1
17	-	47.7
18	2.84 (dd, 13.8, 4.2)	42.8
19	1.10–1.13 (m), 1.66–1.73 (m)	47.3
20	-	31.6
21	1.18–1.21 (m), 1.36–1.44 (m)	34.9
22	1.48–1.52 (m), 1.71–1.76 (m)	33.8
23	0.97 (s)	28.7*
24	0.77 (s)	16.3*
25	0.94 (s)	15.9
26	0.81 (s)	17.7

27	1.51 (s)	26.4
28	-	182.0
29	0.90 (s)	33.6 [#]
30	0.93 (s)	24.0 [#]

^a(Multiplicity, *J* in Hz) in ppm. [#]interchangeable.

威靈仙

生藥名：CLEMATIDIS RADIX ET RHIZOMA

英文名：Clematis Root

基 原：本品為毛茛科 Ranunculaceae 植物威靈仙 *Clematis chinensis* Osbeck 之乾燥根及根莖。

一、方法

(一) 檢品溶液

【萃取方法 1】(臺灣中藥典第二版 2013)

—取本品粉末 1.0 g，加甲醇 10 mL，超音波處理 30 分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。

【萃取方法 2】(修飾中華人民共和國藥典 2015)

—取本品粉末 1.0 g，加乙醇 50 mL，超音波處理 30 分鐘，過濾，濾液濃縮至乾，殘渣加乙醇 20 mL 使之溶解，加濃鹽酸 3 mL，加熱迴流 1 小時，加水 10 mL，待冷卻後，加正己烷 25 mL 振搖萃取，取正己烷層液濃縮至乾，殘渣加甲醇 10 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

【萃取方法 3】(修飾香港中藥材標準第六冊) ✓

—取本品粉末 1.0 g，加乙酸乙酯 100 mL，加熱迴流 2 小時，待冷卻後過濾，棄濾液，殘渣揮乾後，加甲醇 25 mL，超音波處理 30 分鐘，過濾，重複超音波處理 2 次，合併濾液，濾液濃縮至乾，殘渣加 7.3% (w/v) 鹽酸 30 mL 使之溶解，加熱迴流 2 小時，待冷卻後，用乙酸乙酯振搖萃取 3 次，每次 30 mL，合併乙酸乙酯層液並濃縮至乾，殘渣加甲醇使之溶解，定容至 10 mL，作為檢品溶液。

(二) 對照標準品溶液

取常春藤皂苷元(Hederagenin)及齊墩果酸(Oleanolic acid)對照標準品，加甲醇製成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液，作為對照標準品溶液。

(三) 薄層板

HPTLC silica gel 60 F₂₅₄，10 cm × 10 cm、20 cm × 10 cm

(四) 展開劑

【展開劑 1】(臺灣中藥典第二版 2013)

—二氯甲烷：乙醇 (9：1)

【展開劑 2】(中華人民共和國藥典 2015)

—甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (20：3：0.2)

【展開劑 3】(修飾香港中藥材標準第六冊)

—正己烷：乙酸乙酯：甲酸 (5：3：0.1)

【展開劑 4】(自行開發) ✓

—二氯甲烷：甲醇 (15：1)

(五) 展開槽

10 cm × 10 cm、20 cm × 10 cm

(六) 展開

展開槽預先平衡 15 分鐘，上行展開，展開距離 8 cm。

(七) 顯色&檢視

以 10% 硫酸乙醇試液(H₂SO₄/EtOH TS)噴霧後，105 °C 加熱至條帶顯色清晰，於主波長 365 nm 之紫外燈照射下檢視。

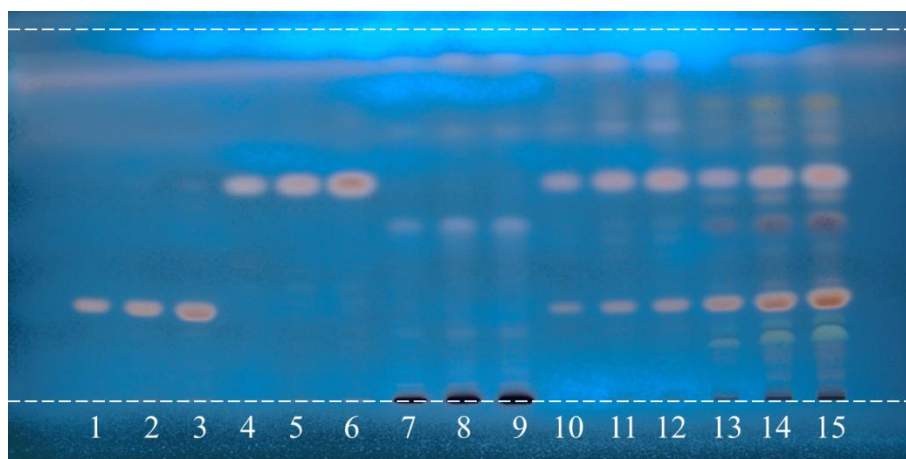
二、萃法選擇及濃度測試

實驗日期：106/06/29

相對溼度(RH)：54%

溫度(RT)：26 °C

【展開劑 4】 (自行開發)——二氯甲烷：甲醇 (15：1)



編號	名稱	點注量
1, 2, 3	常春藤皂苷元(Hederagenin) (0.5 mg/mL)	1, 2, 5 μ L
4, 5, 6	齊墩果酸(Oleanolic acid) (0.5 mg/mL)	1, 2, 5 μ L
7, 8, 9	檢品溶液 1 【萃取方法 1】	2, 5, 8 μ L
10, 11, 12	檢品溶液 1 【萃取方法 2】	2, 5, 8 μ L
13, 14, 15	檢品溶液 1 【萃取方法 3】	2, 5, 8 μ L

建議萃法：唯【萃取方法 2】及【萃取方法 3】之檢品溶液中有分離與檢出標準品常春藤皂苷元及齊墩果酸，而由於條帶顯示較多，故選擇【萃取方法 3】。

建議點注量：常春藤皂苷元(Hederagenin)標準品溶液 1 μ L，齊墩果酸(Oleanolic acid)標準品溶液 1 μ L，檢品溶液【萃取方法 3】2 μ L。

三、溶媒系統選擇

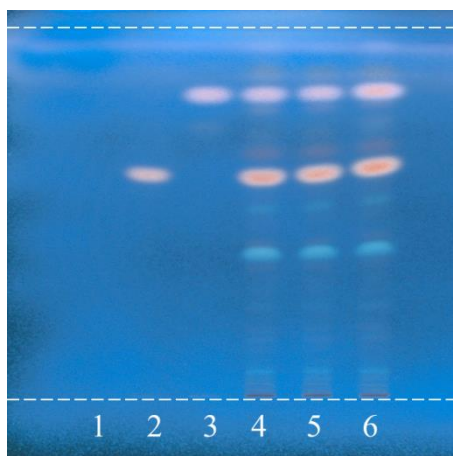
實驗日期：106/06/30

相對溼度(RH)：57%

溫度(RT)：25 °C

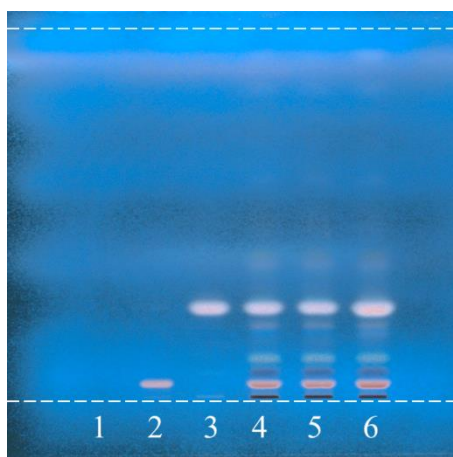
【展開劑 1】 (臺灣中藥典第二版 2013)——二氯甲烷：乙醇 (9：1)

【萃取方法 3】 (修飾香港中藥材標準第六冊) —— HPTLC 10%硫酸乙醇呈色後
紫外光(365 nm)檢出(常春藤皂苷元 R_f 值為 0.60，齊墩果酸 R_f 值為 0.82)



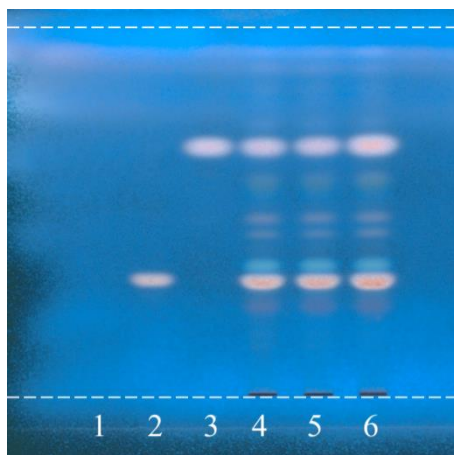
【展開劑 2】 (中華人民共和國藥典 2015)——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (20：3：0.2)

【萃取方法 3】 (修飾香港中藥材標準第六冊) —— HPTLC 10%硫酸乙醇呈色後
紫外光(365 nm)檢出(常春藤皂苷元 R_f 值為 0.03，齊墩果酸 R_f 值為 0.24)



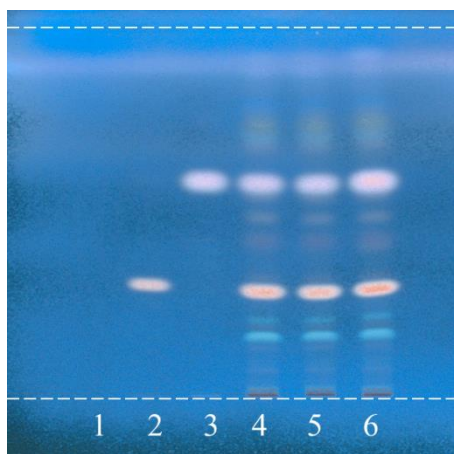
【展開劑 3】 (修飾香港中藥材標準第六冊)——正己烷：乙酸乙酯：甲酸 (5：3：0.1)

【萃取方法 3】 (修飾香港中藥材標準第六冊)——HPTLC 10%硫酸乙醇呈色後紫外光(365 nm)檢出(常春藤皂苷元 R_f 值為 0.31，齊墩果酸 R_f 值為 0.67)



【展開劑 4】 (自行開發)——二氯甲烷：甲醇 (15：1)

【萃取方法 3】 (修飾香港中藥材標準第六冊)——HPTLC 10%硫酸乙醇呈色後紫外光(365 nm)檢出(常春藤皂苷元 R_f 值為 0.30，齊墩果酸 R_f 值為 0.58)



1：Blank

2：常春藤皂苷元(Hederagenin)

3：齊墩果酸(Oleanolic acid)

4，5：檢品溶液 1

6：Spike

建議溶媒系統：以【萃取方法 3】方式，4 種展開劑展開皆可從檢品溶液中分離與檢出常春藤皂苷元及齊墩果酸，而由於展開溶媒製備較簡便，且條帶顯示較多，故採用自行開發之【展開劑 4】。

四、觀察方式選擇

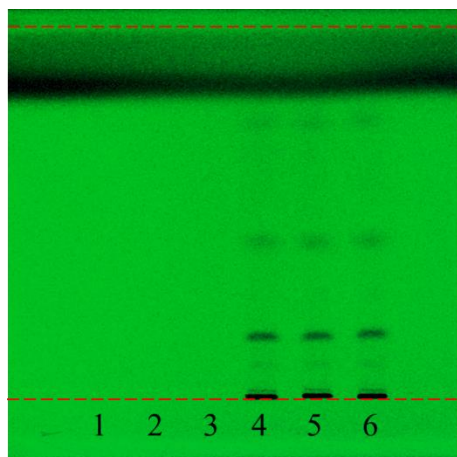
實驗日期：106/06/30

相對溼度(RH)：57%

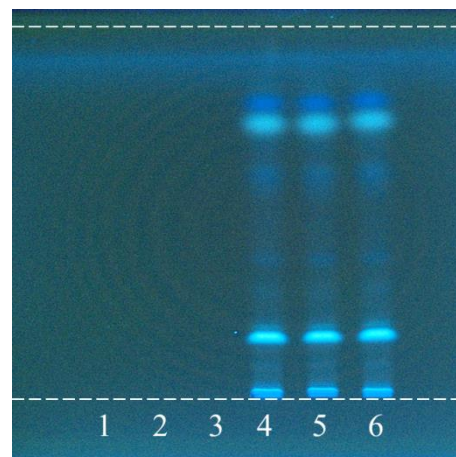
溫度(RT)：25 °C

【展開劑 4】 (自行開發)——二氯甲烷：甲醇 (15：1)

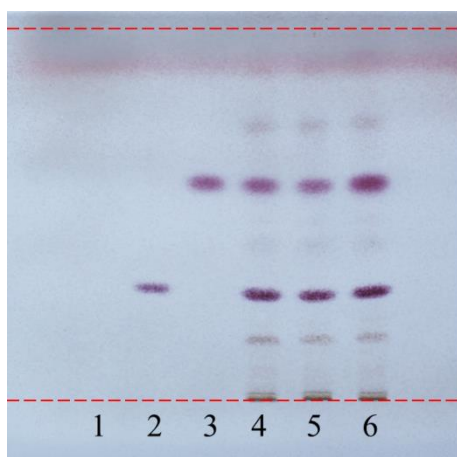
【萃取方法 3】 (修飾香港中藥材標準第六冊) — HPTLC 紫外光(254 nm)檢出



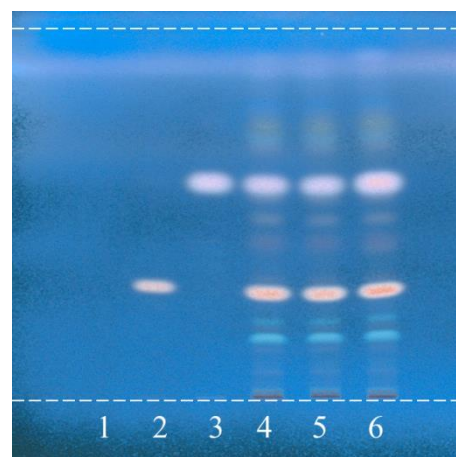
【萃取方法 3】 (修飾香港中藥材標準第六冊) — HPTLC 紫外光(365 nm)檢出



【萃取方法 3】 (修飾香港中藥材標準第六冊) — HPTLC 呈色/可見光檢出



【萃取方法 3】 (修飾香港中藥材標準第六冊) — HPTLC 呈色/紫外光(365 nm)檢出✓



1：Blank

2：常春藤皂苷元(Hederagenin)

3：齊墩果酸(Oleanolic acid)

4，5：檢品溶液 1

6：Spike

建議觀察方式：經 10%硫酸乙醇呈色後，於紫外光(365 nm)檢視較其他觀察方式有較多明顯之條帶及常春藤皂苷元(Hederagenin)與齊墩果酸(Oleanolic acid)標準品斑點。

五、十批樣品檢測

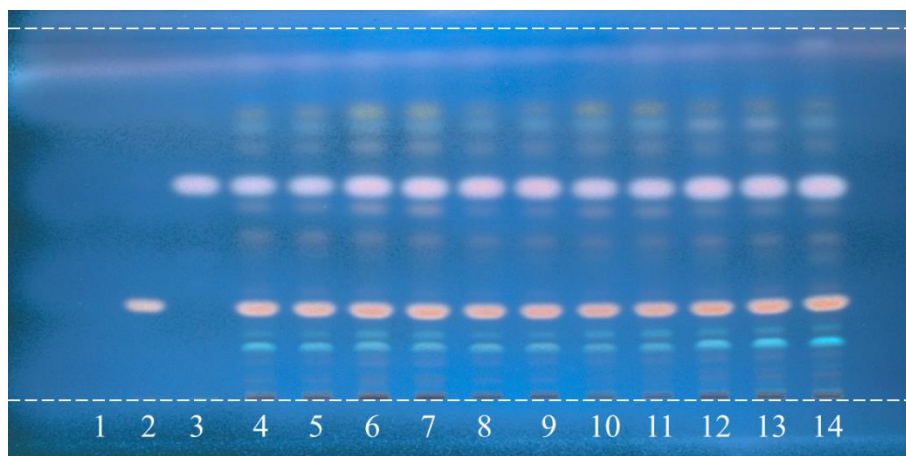
實驗日期：106/06/30

相對溼度(RH)：57%

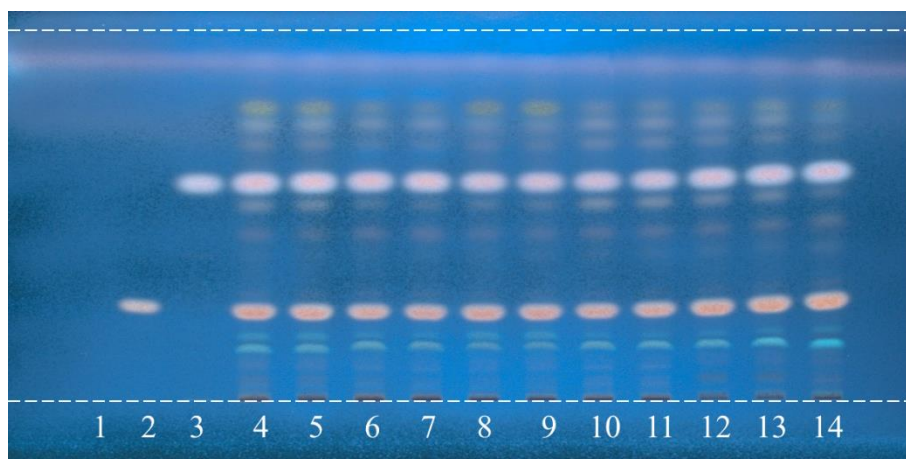
溫度(RT)：25 °C

【展開劑 4】 (自行開發)——二氯甲烷：甲醇 (15：1)

【萃取方法 3】 (修飾香港中藥材標準第六冊) —HPTLC 10%硫酸乙醇呈色後紫外光(365 nm)檢出



1	Blank
2	常春藤皂苷元(Hederagenin) (0.5 mg/mL)
3	齊墩果酸(Oleanolic acid) (0.5 mg/mL)
4 , 5	檢品溶液 1 (NB)
6 , 7	檢品溶液 2 (NC)
8 , 9	檢品溶液 3 (NI)
10 , 11	檢品溶液 4 (NN)
12 , 13	檢品溶液 5 (CA)
14	Spike (檢品溶液 1)



1	Blank
2	常春藤皂苷元(Hederagenin) (0.5 mg/mL)
3	齊墩果酸(Oleanolic acid) (0.5 mg/mL)
4, 5	檢品溶液 6 (CG)
6, 7	檢品溶液 7 (SA)
8, 9	檢品溶液 8 (SC)
10, 11	檢品溶液 9 (SG)
12, 13	檢品溶液 10 (SJ)
14	Spike (檢品溶液 1)

結論與建議：以修飾香港中藥材標準第六冊之【萃取方法 3】方式，並以自行開發之【展開劑 4】分離與檢出常春藤皂苷元(Hederagenin)與齊墩果酸(Oleanolic acid)較佳，以 10%硫酸乙醇顯色後，於紫外光(365 nm)下檢視較佳。