

HPLC同时测定五味子提取物中的4种类三萜内酯类物质的含量

韩晓萍^{1,4}, 李德坤², 周大铮², 林瑞超³, 刘丽芳¹, 叶正良^{2*}

(1. 中国药科大学 中药学院, 江苏 南京 211198; 2. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410;
3. 中国药品生物制品检定所, 北京 100150; 4. 青海省药品检验所, 青海 西宁 810003)

【摘要】 目的:研究了HPLC测定五味子提取物中 de-hydroxy arisanlactone D, 25-hydroxy schindilactone, schindilachone A, lancifodilactone D 的含量的方法。方法: Waters Symmetry 色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm) 流动相为乙腈-水(33:67) 柱温 37 °C, 流速 1 mL · min⁻¹ 检测波长 246 nm。结果: De-hydroxy arisanlactone D, 25-hydroxy schindilactone, schindilachone A 和 lancifodilactone D 的线性范围和(μg) 加样回收率分别为 0.075 ~ 1.800(98.57%), 0.098 ~ 0.980(96.44%), 0.095 ~ 0.950(97.96%), 0.053 ~ 0.530(97.27%)。结论: 该方法分离良好、精密准确、能用于五味子提取物中4种类三萜内酯类物质的定量分析。

【关键词】 HPLC; 五味子提取物; 类三萜内酯; de-hydroxy arisanlactone D; 25-hydroxy schindilactone; schindilachone A; lancifodilactone D

五味子作为一味传统中药,具有滋补强壮、宁心安神、止咳化痰之功能,其主要物质基础为木脂素、三萜、挥发油和多糖等大类成分。近年来研究者先后从五味子属植物中发现了约100多种三萜化合物,有较好的抗艾滋和抗肿瘤活性^[1],类三萜内酯是三萜经过一系列结构重排和氧化形成的结构新奇、高度氧化的物质^[2]。五味子的质量控制长期以来主要是在木脂素量的控制上,而对三萜的控制不足。本文在实验室前期五味子植化研究的基础上,对获得的4种五味子中的类三萜内酯类物质建立了定量分析方法,为五味子的质量控制提供了一定技术依据。

1 材料

Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2998 二极管阵列检测器; Agilent 1100 高效液相色谱仪, Agilent 1100 LC/MSD trap 质谱仪; METTLER XS 105 型电子天平; KQ-500ED 型数控超声波清洗器; L550 低速自动平衡离心机。

SPE 柱(StrataTM-X, 内径 1 cm, 树脂床高约 2 cm; 300 μm, 广州菲罗门科学仪器仪器有限公司), 五味子提取物样品 3 批(天津天士力之骄药业有限公司提取, 分别编号为 1~3) 4 种类三萜类对照品分别为 de-hydroxy arisanlactone D, 25-hydroxy schindilactone, schindilachone A, lancifodilactone D (本实验室制备, 经 HPLC 分析纯度 > 96%, 结合光谱数据和理化数据, 参照文献 [3-5] 确认), 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其余均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 waters symmetry 色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm) 流动相为乙腈-水(33:67)^[6-7] 柱温 37 °C, 流速 1 mL · min⁻¹, 检测波长 246 nm, 进样 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取上述 4 种对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 混匀即得。

2.3 供试品溶液的制备 取五味子提取物粉末约 1g, 精密称定, 置于 20 mL 离心管中, 精密加入 0.1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠的 50% 甲醇溶液 5 mL, 超声溶解 30 min(不加热), 混匀, 离心, 精密量取上清液 2 mL 置于已处理(先用 10 mL 水洗脱, 继用 10 mL 甲醇洗脱, 再用 10 mL 水冲洗即可, 流速均为 1 mL · min⁻¹) 的 SPE 小柱(StrataTM-X 商品柱, 内径 1 cm,

【稿件编号】 20101207011

【基金项目】 国家“重大新药创制”科技重大专项(2010ZX09602-004), 重大创新专项(08FDZDSh01404)

【通信作者】 * 叶正良, 研究员, Tel: (022) 86342066, E-mail: yezl@tasly.com

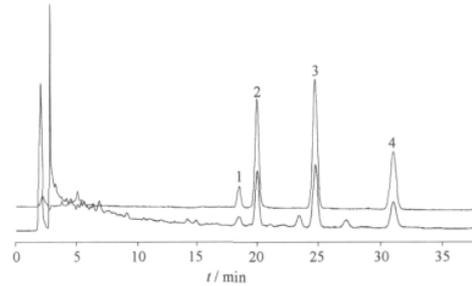
【作者简介】 韩晓萍, 主管药师, 主要研究方向为中药质量控制

树脂床高约 2 cm, 300 μm) 顶端, 先用 50% 甲醇溶液 20 mL 洗脱, 弃去, 继用甲醇洗脱至 10 mL 量瓶中摇匀, 即得。

2.4 专属性 用 LC-MS 方法对上述 2 种溶液中的目标峰进行了一致性指认。液相参数同上, HPLC 图见图 1; 质谱参数为 ESI 源, Nebulizer 379 kPa, dry gas 12 L · min⁻¹, dry temp 350 °C, 扫描范围 *m/z* 200 ~ 1 300, 负离子扫描模式, 在此色谱条件下的峰指认结果见表 1。结果表明在此 HPLC 条件下 4 种物质的分离良好, LC-MS 证明了供试品溶液和对照品溶液中的目标物质的一致性。

2.5 线性范围考察 分别精密称取上述 4 种对照品适量, 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 混匀, 得到 de-hydroxy arisanlactone D, 25-hydroxy schindilactone, schindilachone A, lancifodilactone D 质量浓度依次分别为 1.80, 0.98, 0.95, 0.53 g · L⁻¹

的对照品储备液。此储备液不断稀释得到一系列对照品溶液, 进样分析, 对峰面积和进样量进行线性回归, 结果见表 2。结果表明各对照品在进样范围内呈现良好的线性。



A. 混合对照品溶液; B. 供试品溶液; 1. de-hydroxy arisanlactone D; 2. 25-hydroxy schindilactone; 3. schindilachone A; 4. lancifodilactone D。

图 1 样品和对照品 HPLC 图

表 1 供试品和对照品溶液中峰质谱指认结果

No.	物质名称	<i>t_R</i> / min	<i>m/z</i>	分子式
1	de-hydroxy arisanlactone D	19.0	531 [M - AC] ⁻ , 609 [M + Cl] ⁻	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₀ (574)
2	25-hydro schindilactone	20.6	557 [M - H] ⁻ , 583 [M + Cl] ⁻	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₁ (558)
3	schindilachone A	25.6	541 [M - H] ⁻ , 577 [M + Cl] ⁻	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₀ (542)
4	lancifodilactone D	32.3	525 [M - H] ⁻ , 561 [M + Cl] ⁻	C ₂₉ H ₃₄ O ₉ (526)

表 2 4 种对照品的线性范围

No.	对照品	回归方程	<i>r</i>	线性范围 / μg
1	de-hydroxy arisanlactone D	$Y = 104\ 333X - 2\ 222.6$	0.999 3	0.075 ~ 1.800
2	25-hydro schindilactone	$Y = 711\ 360X - 13\ 964$	0.999 3	0.098 ~ 0.980
3	schindilachone A	$Y = 657\ 143X - 13\ 336$	0.999 6	0.095 ~ 0.950
4	lancifodilactone D	$Y = 669\ 433X - 9\ 465.8$	0.999 2	0.053 ~ 0.530

2.6 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液 10 μL, 按 2.1 项色谱条件连续进样 5 次, 测得 de-hydroxy arisanlactone D, 25-hydroxy schindilactone, schindilachone A, lancifodilactone D 峰面积, RSD 依次为 1.3%, 1.6%, 1.8%, 0.88%, 表明方法精密度良好。

2.7 重复性试验 精密称取同一批号的五味子提取物 5 份, 按 2.3 项下方法制成供试品溶液, 按上述色谱条件进行分析, 测得 de-hydroxy arisanlactone D, 25-hydroxy schindilactone, schindilachone A, lancifodilactone D 的含量, RSD 依次为 1.1%, 1.3%, 0.94%, 1.4%, 结果表明本方法重复性良好。

2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在配置后的 0, 4, 8, 14, 20, 26, 32 h 进样测定, 分别测得 de-hydroxy arisanlactone D, 25-hydroxy schindilactone, schindilachone A, lancifodilactone D 峰面积, RSD 依次为 1.1%, 1.2%, 0.35%, 0.53%, 表明供试品溶液在 32 h 内稳定。

2.9 加样回收试验 精密称取已知含量的五味子提取物样品 6 份, 每份约 0.5 g。精密称定, 各分别加入一定量的 4 种类三萜对照品, 精密加入 0.1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠的 50% 甲醇溶液至 5 mL, 按 2.3 项下方法制成供试品溶液, 进样分析, 计算回收率, 结果见表 3, 结果表明本方法精确性良好。

表 3 4 种类三萜类对照品的加样回收率($n = 2$)

对照品	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
de-hydroxy arisanlactone D	1.836	1.995	3.784	97.65	98.57	0.71
	1.900		3.858	98.13		
	1.887		3.871	99.45		
	1.917		3.876	98.15		
	1.861		3.840	99.15		
	1.940		3.914	98.93		
25-hydroxy schindilactone	0.539	0.747	1.280	99.31	96.44	1.9
	0.558		1.284	97.29		
	0.554		1.272	96.12		
	0.563		1.265	94.03		
	0.546		1.267	96.58		
	0.569		1.281	95.30		
schindilachone A	0.618	0.840	1.450	99.01	97.96	1.2
	0.640		1.469	98.77		
	0.635		1.456	97.66		
	0.645		1.458	96.71		
	0.626		1.459	99.06		
	0.653		1.464	96.57		
lancifodilactone D	0.332	0.409	0.729	97.16	97.27	1.3
	0.343		0.743	97.75		
	0.341		0.740	97.58		
	0.346		0.740	96.26		
	0.336		0.742	99.23		
	0.350		0.741	95.66		

2.10 样品测定 按上述建立好的方法对 3 批五味子提取物中的 4 种物质含量分别进行测定,3

批样品的测定结果均在线性范围内,结果见表 3。

表 3 3 批样品的含量测定($n = 2$)

五味子提取物	de-hydroxy arisanlactone D /mg · g ⁻¹	25-hydro schindilactone /mg · g ⁻¹	schindilachone A /mg · g ⁻¹	lancifodilactone D /mg · g ⁻¹
1	3.634	1.067	1.223	0.656
2	1.898	0.761	0.892	0.336
3	1.778	0.318	0.498	0.252

3 讨论

测定并比较了 4 种对照品的紫外光谱,发现 de-hydroxy arisanlactone D 为末端吸收,其余 3 个物质的 λ_{\max} 分别为 246, 246, 247 nm,故选择了 246 nm 作为检测波长。同时比较了乙腈、甲醇、四氢呋喃、水、0.5% 磷酸水等不同比例和组成的流动相的配比,以分离度和理论塔板数为优化指标,最后确定流动相组成为乙腈-水(33:67)。

类三萜类物质在五味子提取物中的含量很低,且杂质干扰严重,故在前期研究中考察了不同的样品处理方法,比如:001*1 强酸性阳离子树脂柱还

原,D261 强碱性阴离子树脂柱富集,大孔树脂富集梯度洗脱,及离子交换树脂和大孔树脂联用等不同种前处理方法,最后选定为 SPE 小柱富集。

五味子提取物在水中的溶解度欠佳,直接水溶过滤后分析发现目标物质转移不完全。根据前期研究发现,其溶于碱性溶液中,且过大孔树脂时类三萜类物质主要存在于纯甲醇洗脱部分,故本文中选用 0.1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠的 50% 甲醇溶液溶解上 SPE 小柱,且用 4 倍柱体积的 50% 甲醇洗脱前期杂质,继用 10 mL 甲醇洗脱收集。并在此色谱条件下,用 HPLC 考察了前期 4 倍柱体积的 50% 甲醇洗脱液

和后期第2个10 mL 甲醇溶液中的4种目标物质,结果表明,在这2部分溶液中都没有目标物质的损失。

[参考文献]

[1] 许利嘉, 刘海涛, 肖培根. 五味子科药用植物亲缘学初探[J]. 植物分类学报 2008, 46(5): 692.
[2] 王薇丹, 周大铮, 叶正良. 五味子属植物降三萜成分研究进展[J]. 中成药 2009, 31(12): 1912.
[3] Cheng Yuanbin, Liao Tzuching, Lo Yiwen, et al. Nortriterpene lactones from the fruits of *Schisandra arisanensis* [J]. J Nat Prod, 2010, 73(7): 1228.

[4] Xiong Shuangheng, Li Rongtao, Liu Jingping, et al. Isolation and characterization of oxygenated nortriterpenoids from *Schisandra chinensis* [J]. Org Lett 2007, 9(11): 2079.
[5] Li Rongtao, Xiang Wei, Li Shenghong. Lancifodilactones B E, new nortriterpenes from *Schisandra lancifolia* [J]. J Nat Prod, 2004, 67(1): 94.
[6] 李保明, 刘超, 王洪庆, 等. 赤芝中三萜酸 HPLC 特征图谱的研究[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(09): 1514.
[7] 罗君, 张丽艳, 万明香. RP-HPLC 法测定八角莲属植物中槲皮素及山柰酚的含量[J]. 中国中药杂志 2010, 35(22): 3021.

Simultaneous determination of 4 nortriterpenoids in *Schisandra chinensis* extract by HPLC

HAN Xiaoping^{1, #}, LI Dekun², ZHOU Dazheng², LIN Ruichao³, LIU Lifang¹, YE Zhengliang^{2*}

(1. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China;

2. Tianjin Tasly pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China;

3. National Institute for Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100150, China;

4. Qinghai Institute of Drug Control, Xining 810003, China)

[Abstract] **Objective:** To determine 4 nortriterpenoids (de-hydroxy arisanlactone D, 25-hydroxy schindilactone, schindilachone A, lancifodilactone D) in *Schisandra chinensis* extract by HPLC. **Method:** The analysis was performed on a waters symmetry column (4.6 mm × 250 mm 5 μm) with the mobile phase of acetonitrile-water (33:67) at a flow rate of 1 ml · min⁻¹. The column temperature was set at 37°C, and the detector wavelength was 264 nm. **Result:** The linear ranges of de-hydroxy arisanlactone D, 25-hydroxy schindilactone, schindilachone A, and lancifodilactone D are 0.075-1.800, 0.098-0.980; 0.095-0.950, and 0.053-0.530 μg, respectively, and the average recoveries were 98.57%, 96.44%, 97.96%, and 97.27%, respectively. **Conclusion:** The four nortriterpenoids were well separated by this method, and it could be used to determine the four nortriterpenoids in *Schisandra chinensis* extract.

[Key words] HPLC; *Schisandra chinensis* extract; nortriterpenoid; de-hydroxy arisanlactone D; 25-hydroxy schindilactone; schindilachone A; lancifodilactone D

doi: 10.4268/cjcm20111616

[责任编辑 丁广治]