

編號：CCMP95-RD-023

## 台灣市售五倍子之指紋圖分析 與活性成分之研究

張芳榮

高雄醫學大學天然藥物研究所生藥科室

### 摘要

五倍子是倍蚜蟲等寄生蟲寄生在寄主漆樹科植物鹽膚木(*Rhus chinensis*)的葉柄或嫩被等組織內，而逐漸腫大所變成的蟲癭。目前針對台灣市售五倍子已完成萃取工作，並依據活性導引分離法，進行活性成分之分離，至今已從五倍子的氯仿抽出物中分離純化得到四個化合物為 Moronic acid、Betulinic acid、Semimornic acid 及 Lantabetulic acid，該化合物均經由光譜及質譜分析加以證明。再將所得到之化合物當為本研究之標準品，利用 HPLC 進行該標準品之定性、定量分析，完成五倍子之指紋圖譜鑑定分析，以建立一個中草藥品管標準。

關鍵詞：五倍子、指紋圖、HPLC、活性導引分離

編號：CCMP95-RD-023

# **The Studies of Fingerprints and Bioactive Constitutes of *Rhus chinensis* in Taiwan**

**Fang-Rong Chang**

**Graduate Institute of Natural Products, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung 807, Taiwan, Republic of China**

## **ABSTRACT**

*Rhus galla* comes from petioles or new tissues of *Rhus chinensis* infected by special insects, aphids, and swells gradually. Till now, we finished the extraction, followed by bioactivity-guided fractionation, and then separated the active compounds, moronic acid, betulinic acid, semimornic acid, and lantabetulic acid. All structures of isolates were identified by spectroscopic and mass analysis. Furthermore, the isolates were taken as standards in HPLC fingerprints for qualification and quantification analysis. We wish the results can serve as a standard for quality control of traditional medicine.

**Keywords :** *Rhus chinensis*, Fingerprint, HPLC, bioactivity-guided fractionation

## 壹、前言

五倍子是倍蚜蟲等寄生蟲寄生在寄主漆樹科植物鹽膚木(*Rhus chinensis*)的葉柄或嫩被等組織內，而逐漸腫大所變成的蟲癭。五倍子主治下痢，久咳，糖尿病，下血，便血，多汗等症。在九十一年度行政院衛生署中醫藥委員會委託研究計畫成果報告書中曾經進行了市售五倍子的品質調查、抗菌活性外、也曾進行成分探討之 TLC 分析。最近五年來，五倍子的某些成分(例如 moronic acid) 已被研究證實具有抗病毒活性。申請人於過去與美國李國雄院士合作的過程中，曾經發現 moronic acid 對抗 HIV 病毒有非常好的活性( $EC_{50} < 0.1 \mu\text{g/mL}$ ,  $T_1 > 186$ ) (Junko Ito, **Fang-Rong Chang**, Hui-Kang Wang, Yong Kun Park, Masaharu Ikegaki, Nicole Kilgore, and Kuo-Hsiung Lee, 2001, *Anti-AIDS Agents*. 48. Anti-HIV activity of Moronic Acid Derivatives and the New Melliferone-Related Triterpenoid Isolated from Brazilian Propolis. *J. Nat. Prod.*, **64**, 1278-1281.)，其衍生物更對 drug resistant 的 HIV 病毒有非常好的活性 (Donglei Yu, Yojiro Sakurai, Chin-Ho Chen, **Fang-Rong Chang**, Li Huang, Yoshiki Kashiwada, and Kuo-Hsiung Lee\*, 2006, “*Anti-AIDS Agents* 69. Moronic Acid and Other Triterpene Derivatives as Novel Potent Anti-HIV Agents”, *J. Med. Chem.*, 49, 5462-5469. (SCI)，在 2005 年李教授更提出了此化合物及其衍生物之專利申請 (Kuo-Hsiung Lee, **Fang-Rong Chang**, Yojiuro Sakurac, Chin-Ho Chen, New PCT International Application filed on May, 24, 2005 for “Anti-Retroviral Moronic Acid Derivatives”, PCT General Power of Attorney, UNC Ref. No. OTD04-003, United States Application No. 11/134,904.)。由於以上原因，moronic acid 原料藥之製備技巧，有可能在未來成為一項重要之工業，五倍子曾被報導含有 moronic acid，故本計畫將進行台灣市售五倍子指紋圖譜的建立，藉此加強對五倍子中藥材活性成分的了解及品質的管控。應用  $^1\text{H-NMR}$  與 HPLC 兩種儀器進行兩階段的指紋圖譜的鑑定分析。依照分析結果對市售五倍子建立出標準的指紋圖鑑定分析程序。此外，我們將依據活性導引分離法針對台灣市售五倍子進行活性成分的分離，希望從中獲得大量的指標成分，進一步拓展五倍子的藥用資源，建立一個化學與生物活性皆有良好管控之之中藥材品管標準。

## 貳、材料與方法

### 一、材料

#### (一) 五倍子成份分離

依下圖實驗流程，將五倍子 20Kg 研磨成粉末，以 25 公升氯仿在室溫下連續抽取五次，將所得之抽取液經減壓濃縮合併後共得 982.41g，將此粗萃物利用管柱色層分析法(Silica gel, 70-230 mesh, 35X15 cm)，使用  $n$ -Hexane:EtOAc=10:1 →  $n$ -Hexane:EtOAc=5:1 →  $n$ -Hexane:EtOAc=3:1 →  $n$ -Hexane:EtOAc=1:1 → Pure EtOAc → EtOAc:MeOH =40:1 → EtOAc:MeOH =40:1 → EtOAc:MeOH =30:1 → EtOAc:MeOH =20:1 → EtOAc:MeOH =10:1 → EtOAc:MeOH =5:1 → MeOH 為沖提溶媒系統，依次增加溶媒極性，以矽膠薄層色層分析法(TLC) 判斷，共粗分成 16 fractions (frs.)。在 fr. 9 經過進一步分離得到 moronic acid (約 3 g)，另在 fr. 8 微黃褐色固體析出進一步分離後確認為 betulinic acid (50 mg)，在 fr. 12 及 fr. 15，經進一步分離純化之後，再經 NMR 及 MS 光譜鑑定後確認，fr. 12 含有 lantabetulic acid(約 1.0 g)，fr. 15 含有 semimoronic acid(約 1.5 g)。

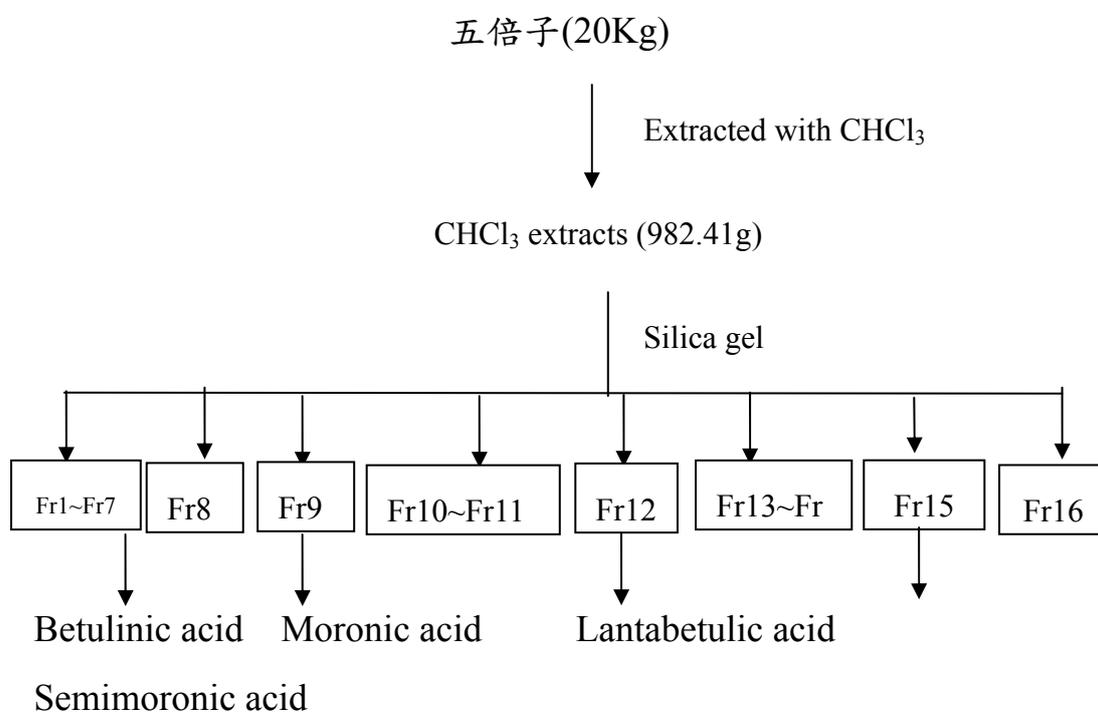
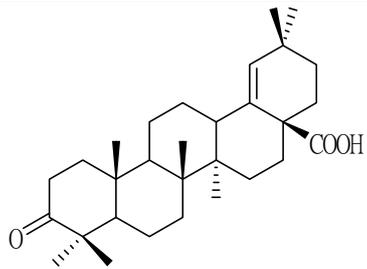
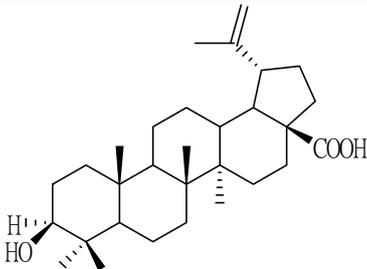
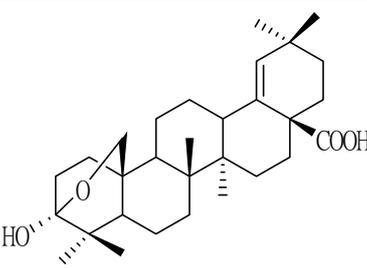
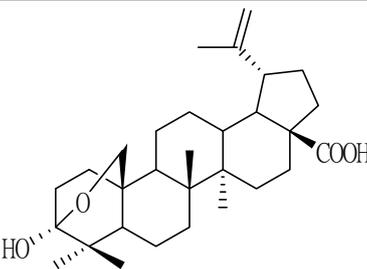


Fig1. 五倍子萃取分離流程圖

(二) 已知之五倍子 (*Rhus chinensis*) 分出之標準品 4 個。

Table1. 標準品總表：

Triterpene isolated from <i>Rhus chinensis</i>				
編碼	化學名與實 驗編碼	分子式	分子量	結構
S1	<b>Moronic acid</b>	$C_{30}H_{46}O_3$	454.68	
S2	<b>Betulinic acid</b>	$C_{30}H_{48}O_3$	456.70	
S3	<b>Semimoron ic acid</b>	$C_{30}H_{46}O_4$	470.68	
S4	<b>Lantabetuli c acid</b>	$C_{30}H_{46}O_4$	470.68	

(二) 取市售五倍子

其藥材來自於南部某中藥行

(三) 儀器：

1. 定量用 pipet、tips
2. sample 瓶
3. HPLC 儀器規格

廠牌：Jasco

(1) RI-930 Intelligent RI Detector

(2) PU-986 Intelligent Prep.Pump

二、方法

(一) 標準品備製：

1. Moronic acid、Semimoronic acid、Lantabetulic acid

取 15mg 標準品，用 0.5mL 的 solvent (chloroform) 溶解之，得濃度為 30000 ppm 之 Stock Solution，以 4mL sample 來配製。

2. Betulinic acid

取 5mg 標準品，用 0.5mL 的 solvent(chloroform) 溶解之，得濃度為 10000 ppm 之 Stock Solution，以 4mL sample 瓶來配製。

(二) 檢品備製：

取 100 mg 檢品，用 0.5mL 的 solvent 溶解之，得濃度為 200000 ppm 之 Stock Solution，以 4mL sample 瓶來配製。

**註：RI-detector 偵測敏感程度不如 UV-detector，所以必須提高樣品濃度。**

(三) HPLC 操作：

設定：

流速：1.0000 mL/min

溫度：35°C

壓力：39bar~115bar 之間（不同溶媒系統分別有不同壓力）

溶媒系統：*n*-hexane / ethyl acetate 7/1(moronic acid)

*n*-hexane / ethyl acetate 4/1(betulinic acid)

chloroform/ ethyl acetate 4/1(semimoronic acid、lantabetulic acid)

acid)

Column : Si-gel , 4×250mm

LiChroCART<sup>R</sup> 250-4

HPLC-Cartridge

Cat.1.50830

LiChrospher<sup>R</sup>

Si 60(5μm)

Lot. F 1121840

No.433419

上述設定之實驗方法各以三種不同溶媒系統方式進行，所使用的流速為 1.0mL/min，column 規格如上述。

## 參、結果

(一) 說明：

將市售五倍子與四個標準品比對，做出定性指紋圖譜與活性成分（標準品成分）。以下將市售品依序以 Sample 示，標準品則以 S1、S2、S3、S4 表示。實驗結果列出市售品中具有標準品成分含量。

(二) 實驗結果：Table2. 五倍子市售品 Sample 所含指標成份含量

標準品	結果說明
S1	0.13951%，即 crude 中 S1 含量為 35.50530 mg/Kg (實際分得約 3 g/20 kg)
S2	0.00763%，即 crude 中 S2 含量為 1.94184 mg/Kg (實際分得約 50 mg /20 kg)
S3	0.01520%，即 crude 中 S3 含量為 3.8684 mg/Kg (實際分得約 1.0 g /20 kg)
S4	0.05145%，即 crude 中 S4 含量為 13.09403 mg/Kg (實際分得約 1.5 g /20 kg)

由於四種標準品皆無 UV 吸收，在 PhotoDiodeArray 偵測器上，也無法觀察，故在經過多次嘗試後，放棄使用 UV system 進行偵測。很明顯在 RI 偵測器上的測定上所計算出來的值，遠低於實際分得的量，但其相對強度，有一定的參考價值。另外，本研究所找出之方法，可以準確的在五倍子生藥進行四種標準品定性檢測工作。

## 肆、討論

- (一) 五倍子市售品來源由台灣南部某中藥行購得，此次的研究重點在於活性成份分離，研究指標成分之含量，並以 HPLC 進行標準品定性工作，建立五倍子 HPLC 指紋圖譜鑑定分析。
- (二) 本實驗室已由五倍子中分離出四個具有活性之化合物，分別為 moronic acid、betulinic acid、lantabetulic acid 及 semimoronic acid。以這四個化合物作為標準品與粗萃物進行定性比對，確定五倍子中具有這四種活性成份。其中 moronic acid 已由文獻確定具抗 HIV 之活性，而其餘三個成分接持續進行 HIV、EB virus 及流感病毒之活性測試。
- (三) 標準品含量的定量主要是以線性迴歸方式做出，濃度為 x 軸，積分面積為 y 軸，以三濃度、三重複方式建立出每個標準品的線性迴歸線，再回推五倍子市售品所含標準品含量。(此部份主要是以 HPLC 操作後，以 excel 建立數據資料的整理與線性迴歸圖形，再進一步換算出其標準品成分含量)
- (四) 以 RI-detector 偵測之結果計算標準品含量，與實際分離所得之含量並不相符，但已成功建立五倍子以 HPLC 大量分離之條件與方法。

## 伍、結論與建議

- (一) 實驗室目前自五倍子  $\text{CHCl}_3$  層中分離四個化合物，其中三個樣品獲得超過一克以上天然藥物之量，預期對於未來相關研究將有很大的助益。
- (二) 此四個化合物均為 triterpene 結構，經 photodiary HPLC 分析後以 TLC 比對，確認無 UV 吸收無法以 UV-detector 分析，故利用 RI-detector HPLC 進行定性分析。實驗過程中使用 RI-detector，其敏感度較低易受機器本身溫度或溶媒系統影響，導致精準度不如 UV-detector，因此實驗過程必須盡量在相同環境下完成同一樣品。
- (三) 已建立四種活性物質之 HPLC 分析條件，可供日後做為五倍子之檢測比對，後續藥廠或研究者，至少可以重複本研究結果，取得標準品，進行比對分析。本研究結果已經在成果之後，詳附四種標準品之理化與光譜性質，完全可以確認其結構。

- (四) 由於有專利與未來進行藥化修飾進一步開發研究之潛力，懇請貴會延後兩年將成果登於公報上。

## 陸、參考文獻

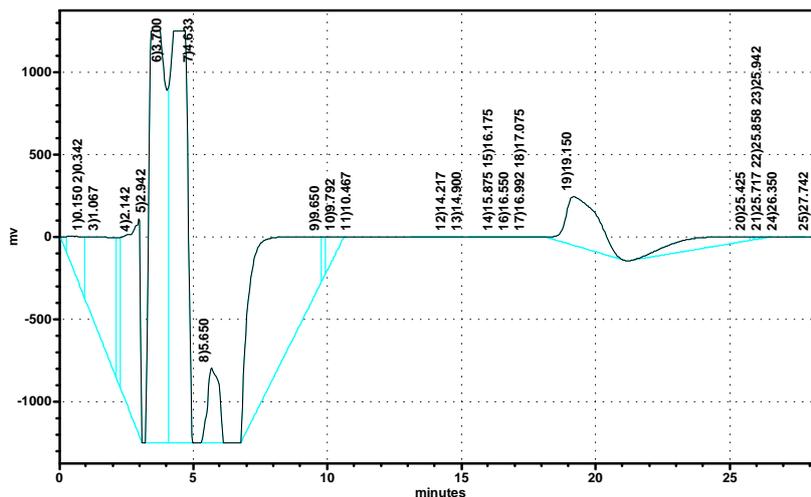
- (一) Tzong-Huei Lee, Jong-Liang Chiou, Chinf-Kuo Lee and Yueh-Hsiung Kuo, "Separation and Determination of Chemical Consituents in the Roots of *Rhus javanica* L. var. *roxburghiana*" *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2005, 52, 833-841
- (二) Monira Ahsan, James A. Armstrong, Alexander I. Gray and Peter G. Waterman, "Terpenoids, Alkaloids and Coumarins from *Boronia Inornata* and *Boronia Gracilipes*" *Phytochemistry*, Vol.38, No.5, pp.1275-1278
- (三) Junko Ito, Fang-Rong Chang, Hui-Kang Wang, Yong Kun Park, Masaharu Ikegaki, Nicole Kilgore and Kuo-Hsiung Lee, "Anti-AIDS Agent. 48 Anti-HIV Activity of Moronic Acid Derivative and the New Melliferone-Related Triterpenoid Isolated feom Brazilian Propolis" *Journal of Natural Product*, 2001,64,1278-1281

## 柒、圖、表

標準品進行 HPLC 實驗結果位置圖，以及 Sample 粗萃物與標準品進行 HPLC 比較圖。

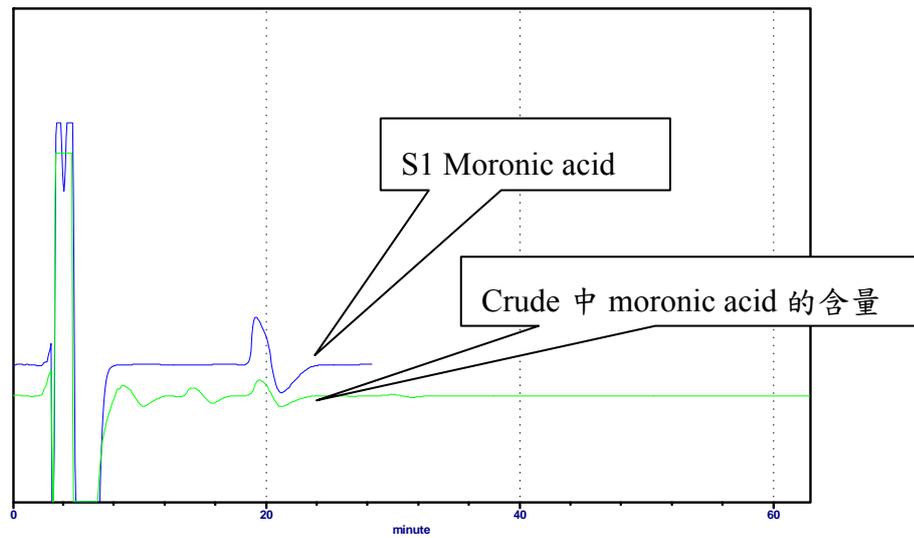
### (一) 第 1 部分

#### 1. Fig3. S1 (moronic acid) 總圖



此圖形為 RI-Detector 在溶媒系統 EA/*n*-Hex 1/7 時所偵測到的圖形，取 30 mg moronic acid 以 0.5mL CHCl<sub>3</sub> 溶解，inject 50 μL，前面 2.142 到 7.825 分鐘所顯示波峰為 solvent peak(CHCl<sub>3</sub>)，後面 18.633 到 23.558 分鐘的正反對稱波峰經 TLC 確認為 moronic acid。

2. Fig4. Crude 與 Standard1 比對圖

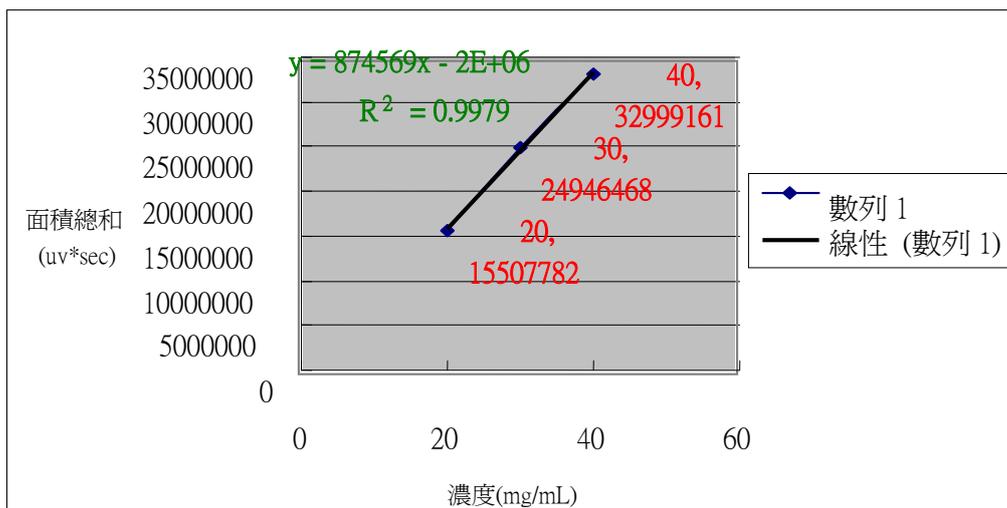


上圖圖形為 moronic acid 標準品與 sample 之 CHCl<sub>3</sub> 萃取物比對對照圖，由此可比對出 CHCl<sub>3</sub> 萃取物中確實含有 morornic acid。

3. 線性回歸 S1

Table3. 標準品 S1 線性迴歸圖形及換算 crude sample 所含 S1 含量

濃度(mg/mL)	20	30	40
積分面積			
(uv ×sec)	15507782	24946468	32999161



**換算 crude sample 相當於標準品的濃度**

	x(concentration)(mg/mL)	y(area)
Sample	13.95112	10201217

**換算 crude sample 的標準品所佔(%) 換算(mg/Kg)**

Sample	0.13951	35.50530
--------	---------	----------

X 軸為濃度，單位為 mg/mL；Y 軸為積分面積總和，單位為 uv×sec

線性回歸：y = A + Bx (A=-1752598.167，B=874568.95，R=0.9989)

以 excel 作出之結果為四捨五入後之式子：

$$y = 874569x - 2E+06$$

$$R^2 = 0.9979$$

將 sample 中對到標準品的積分面積代入線性回歸後的公式  $y = 874569x - 2E+06$ ，可得 crude sample 中所含有相當於標準品的濃度，再除以 crude sample 原來配的濃度 (100mg/mL)，即可得 crude sample 中所含標準品百分比 (%)。

例如上列圖表中，Sample 中對到標準品 peak 的積分面積值為 10201217(y 值)，代入  $y = 874569x - 2E+06$ ，得  $x = 13.95112$ (mg/mL)，

即 crude sample 中所含有相當於標準品的濃度，再除以 crude sample 原濃度 108.8 mg/mL，即可得 crude sample 中所含標準品百分比為 0.12823%。

舉例說明：

(1) Sample 1 為原來 1000g 的蟲癭，以 CHCl<sub>3</sub> 萃取後得 CHCl<sub>3</sub> extract 25.45g，換算原來生藥含標準品 1 (S1) 為：

$$(25.45\text{g} \times 0.13951\%) / (1000\text{g}) \times 10^6 = 35.505295 \text{ mg/Kg}$$

※以下其餘生藥含標準品換算方式 (mg/Kg) 依照上述說明類推。

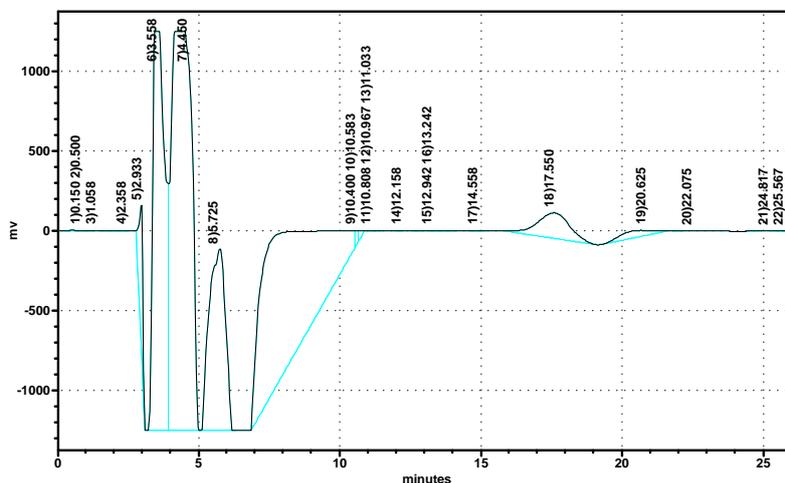
結論：

(1) Sample 的 CHCl<sub>3</sub> 萃取物含 S1 成分 0.13951%，即 crude

(2) 中 S1 含量為 35.505295 mg/Kg

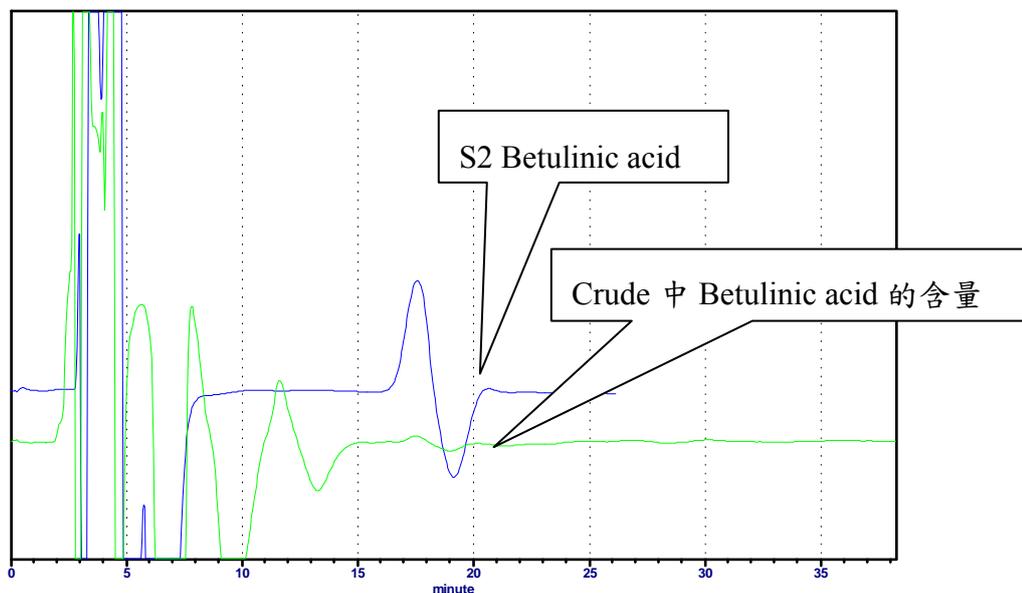
(二) 第 2 部分：S2(betulinic acid)

1. Fig 5. S2(betulinic acid)總圖



此圖形為 RI-Detector 在溶媒系統 EA/n-Hex 1/4 時所偵測到的圖形，取 5mg moronic acid 以 0.5mL CHCl<sub>3</sub> 溶解，inject 50 μL，前面 2.933 到 7.858 分鐘所顯示波峰為 solvent peak(CHCl<sub>3</sub>)，後面 16.583 到 20.175 分鐘的正反對稱波峰經 TLC 確認為 betulinic acid。

## 2. Fig6. Crude 與 Standard2 比對圖

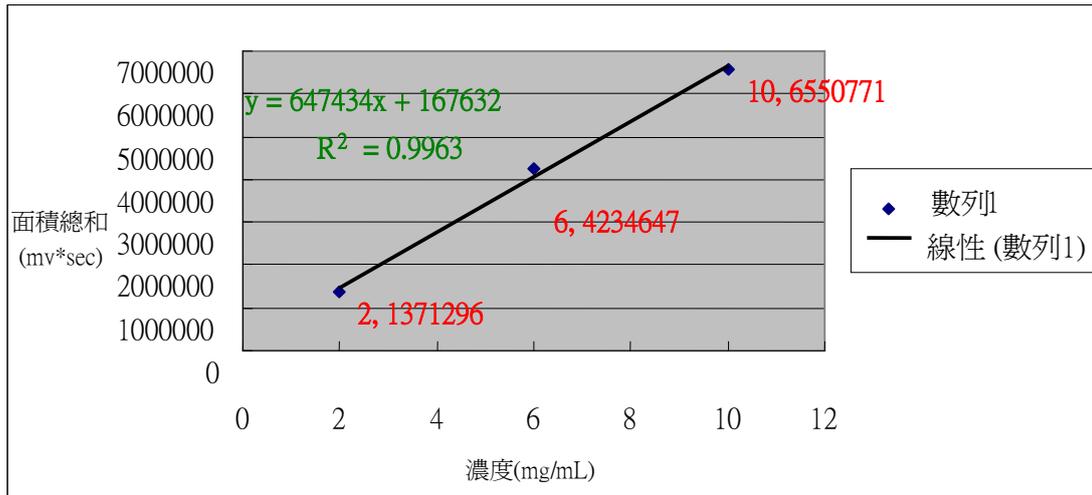


上圖圖形為 Betulinic acid 標準品與 sample 之  $\text{CHCl}_3$  萃取物比對對照圖，由此可比對出  $\text{CHCl}_3$  萃取物中確實含有 Betulinic acid。

## 3. 線性回歸 S2

Table4. 標準品 S2 線性迴歸圖形及換算 crude sample 所含 S2 含量

濃度(mg/mL)	2	6	10
積分面積(ucxsec)	1371296	4234647	6550771



**crude sample 相當於標準品的濃度**

換算	x(concentration)(mg/mL)	y(area)
Sample	0.76338	661871

換算	crude sample 的標準品所佔(%)	換算(mg/Kg)
Sample1	0.00763	1.94184

以 excel 作出之結果為四捨五入後之式子：

$$y = 647434x + 167632$$

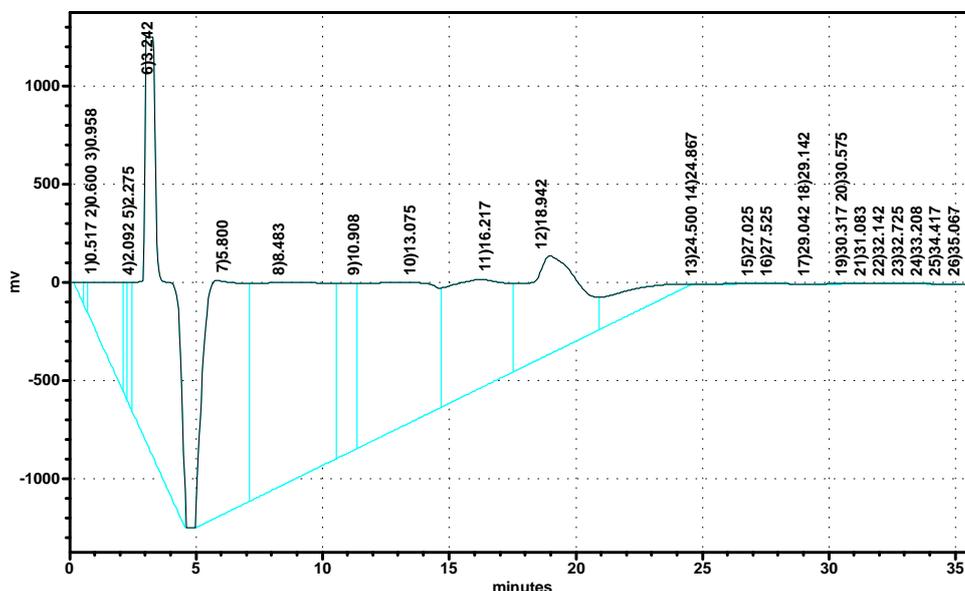
$$R^2 = 0.9963$$

結論：

- (1) Sample 1 的 CHCl<sub>3</sub> 萃取物含 S2 成分 0.00763%，即 crude 中
- (2) S8 含量為 1.94184 mg/Kg

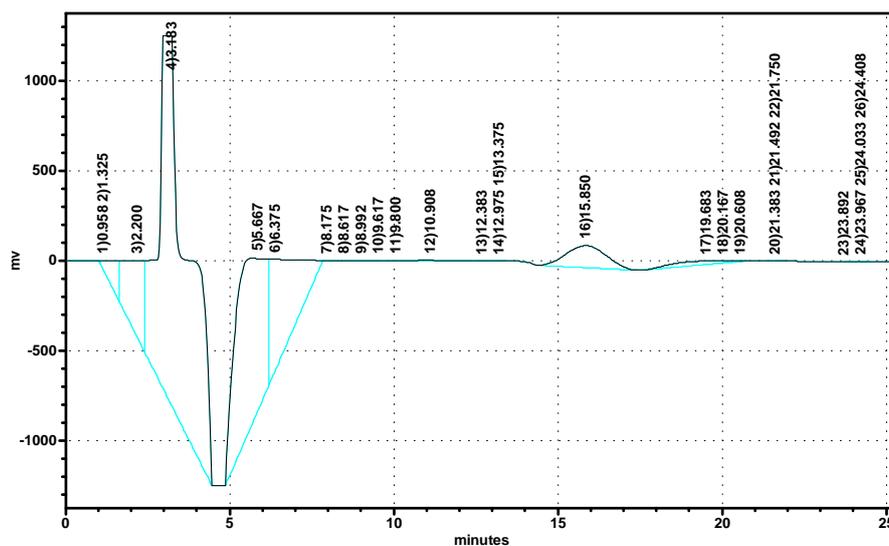
(三) 第 3 部分：S3(semimoronic acid)、S4(lantabetulic acid).

Fig7. S3(semimoronic acid)總圖



此圖形為 RI-Detector 在溶媒系統 EA/CHCl<sub>3</sub>1/4 時所偵測到的圖形，取 30mg semimoronic acid 以 0.5mL CHCl<sub>3</sub> 溶解，inject 50 μL，前面 2.883 到 5.725 分鐘所顯示波峰為 solvent peak(CHCl<sub>3</sub>)，後面 18.392 到 23.383 分鐘的正反對稱波峰經 TLC 確認為 semimoronic acid。

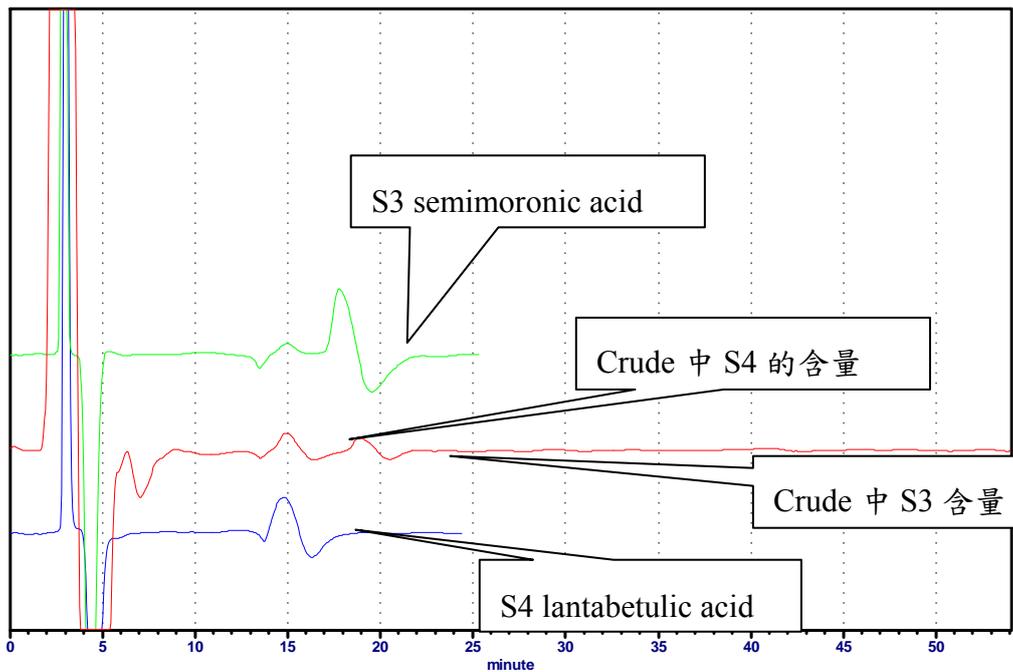
Fig8.S4(lantabetulic acid)總圖



此圖形為 RI-Detector 在溶媒系統 EA/CHCl<sub>3</sub> 1/4 時所偵測到的圖形，取 30 mg lantabetulic acid 以 0.5mL CHCl<sub>3</sub> 溶解，inject 50 μL，前

面 2.808 到 5.542 分鐘所顯示波峰為 solvent peak( $\text{CHCl}_3$ )，後面 14.742 到 18.717 分鐘的正反對稱波峰經 TLC 確認為 lantabetulic acid。

## 2. Fig 9. Crude 與 Standard3、standard4 比對圖：

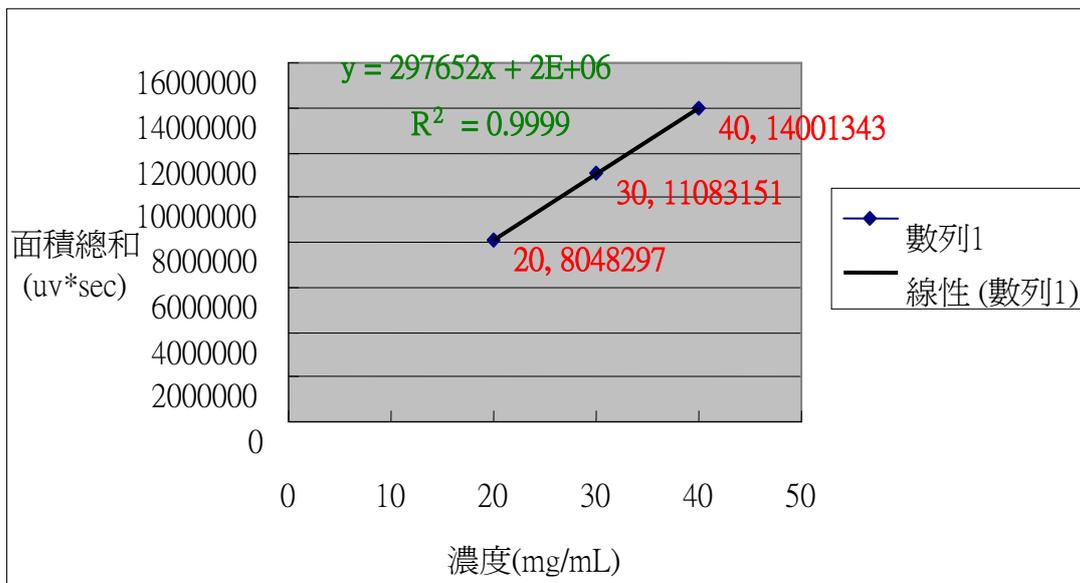


上圖圖形為 Semimoronic acid 及 Lantabetulic acid 標準品與 sample 之  $\text{CHCl}_3$  萃取物比對對照圖，由此可比對出  $\text{CHCl}_3$  萃取物中確實含有 Semimoronic acid 及 Lantabetulic acid。

## 3. 線性回歸

Table.5 標準品 3 線性迴歸圖形及換算 crude sample 所含 S3 含量

濃度(mg/mL)	20	30	40
積分面積(uv×sec)	8048297	11083151	14001343



**crude sample 相當於**

換算                      標準品的濃度

	x(concentration)(mg/ mL)	y(area)
Sample	1.52053	2452588

**crude sample 的標準**

換算                      品所佔(%)                      換算(mg/Kg)

Sample	0.01520	3.8684
--------	---------	--------

以 excel 作出之結果為四捨五入後之式子：

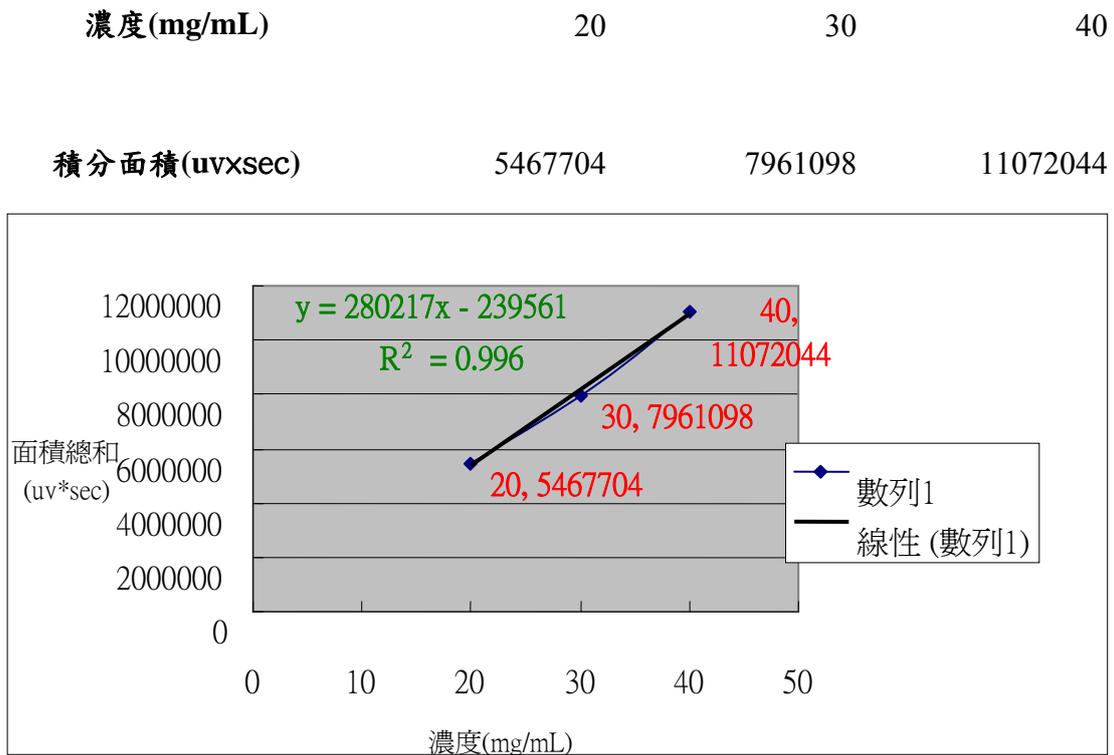
$$y = 297652x + 2E+06$$

$$R^2 = 0.9999$$

結論：

- (1) Sample 1 的 CHCl<sub>3</sub> 萃取物含 S3 成分 0.01520%，即 crude 中 S3 含量為 3.8684mg/Kg

**Table.6 標準品 S4 線性迴歸圖形及換算 crude sample 所含 S4 含量**



**crude sample 相當於標準**

換算	品的濃度
----	------

	x(concentration)(mg/mL)	y(area)
Sample	5.14512	1202190

**crude sample 的標準品所**

換算	佔(%)	換算(mg/Kg)
----	------	-----------

Sample	0.05145	13.09403
--------	---------	----------

以 excel 作出之結果為四捨五入後之式子：

$$y = 280217x - 239561$$

$$R^2 = 0.996$$

結論：

- (1) Sample 的 CHCl<sub>3</sub> 萃取物含 S4 成分 0.05145%，即 crude 中 S4 含量為 13.09403 mg/Kg

