

秦皮中有效成分的高效液相层析分离和测定

郭希圣* 章育中**

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

提要 本文报道用高效液相层析法分离和测定秦皮乙醇提取液中的有效成分。填充剂为十八烷基键合相, 洗脱剂为甲醇-水-乙酸(31:69:0.4)。七叶亭、七叶灵、梣皮甙和丁香甙得到基线分离。用254 nm检测器检测, 测定结果用数据处理机处理和计算。方法简便、灵敏、结果准确(变异系数为2.4%), 分析三种生药样品, 得出了结果。

关键词: 秦皮; 七叶灵; 梣皮甙; 七叶亭; 丁香甙; 高效液相层析

作者曾报道秦皮中香豆素成分的薄层分离和光密度法测定⁽¹⁾。秦皮中除含有多种药理活性的香豆素成分外, 还含有一些酚性成分, 其中含量较多的是丁香甙, 文献报道有止血作用⁽²⁾, 但因丁香甙在340 nm波长处无吸收且无荧光, 故在薄层光密度法中未曾定量。本文报告了用十八烷基键合相分离和测定秦皮中所含的三种香豆素成分和丁香甙。生药的乙醇提取液可直接进样, 分析时间只需15分钟, 方法简便、快速、灵敏, 对不同品种的秦皮进行分析的结果与薄层光密度法一致。

实 验 部 分

(一) 仪器和药品

液相色谱仪 Sy-01 型(北京分析仪器厂), 检测器: 254 nm 紫外检测器。不锈钢柱: 长 25 cm、内径 5 mm。填充剂: YWG-C₁₈H₃₇, 10 μm (天津化学试剂二厂), 用匀浆法装填。

数据处理机: 岛津 C-RIA 型。微量注射器: 10 μl (上海注射器三厂);

标准品: 均由作者从植物中提取⁽³⁾, 薄层均为一个斑点。(1) 丁香甙(syringin): mp 194~196°C; (2) 七叶亭(esculetin): mp 270°C(d); (3) 七叶灵(esculin): mp 204~205°C; (4) 梣皮甙(fraxin): mp 209~210°C。

水为二次重蒸馏水。其余试剂均为化学纯以上规格(北京化工厂)。

(二) 液相层析分离

洗脱剂的配制 将甲醇-水-乙酸(31:69:0.4)混匀后, 用 G 4 玻璃垂熔漏斗抽滤脱气后备用。

将各标准品分别用乙醇溶解(必要时微热)成一定浓度的溶液[见(四)(1)节], 用微量注射器进样 1 μl, 测得各组分的保留时间。再将秦皮生药 (*F. chinensis*) 的乙醇提取液, 用微量注射器进样后进行层析, 将所得到的色谱峰与标准品对照, 由保留时间确定欲测定各组分, 并计算相邻谱带的分离度(Rs)。结果见表 1。

从表 1 可以看出, 样品中的各个欲测峰能够完全分离, 可用于定量分析。在洗脱剂中加

本文于 1982 年 2 月 15 日收到。

* 现在工作单位: 卫生部药品生物制品检定所

** 现在工作单位: 中医研究院中药研究所

本文曾在中国药学会药物分析学术会议(1981年, 无锡)上宣读

入 0.4%左右的乙酸可改善七叶亭峰的拖尾情况。

表 1 秦皮(*F. chinensis*)乙醇提取液液相层析数据

出峰顺序	名 称	保留时间 t_R (min)	分 离 度 R_s
1	七 叶 灵	7.98	2.31
2	丁 香 甙	9.47	3.67
3	梣 皮 甙	11.65	2.83
4	七 叶 亭	13.88	5.63
5	未 知 物	18.79	

压力: 115 kg/cm²; 流量: 0.9 ml/min; 柱温: 室温

用上述条件对三个不同品种的秦皮进行分离, 所得色谱图见图 1~3。

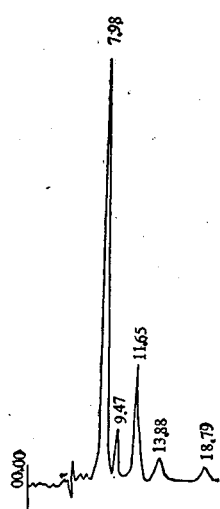


图 1 *F. chinensis* 液相色谱图

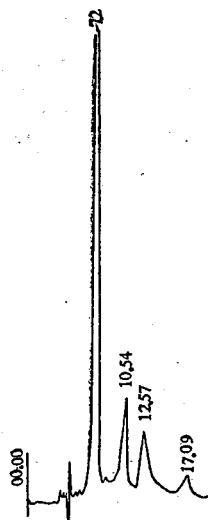


图 2 *F. bungeana* 液相色谱图

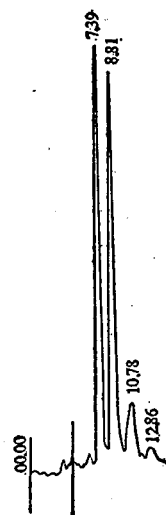


图 3 *F. stylosa* 液相色谱图

从图 1~3 可看出, *F. chinensis* 和 *F. bungeana* 中各组分均可基线分离, *F. stylosa* 中的第三个色谱峰(梣皮甙)变宽, 经用标准品对照, 宿主白蜡甙⁽³⁾与梣皮甙的保留时间很接近, 所以 *F. stylosa* 中的第三个峰应包括宿主白蜡甙与梣皮甙两个组分(前报⁽¹⁾的薄层分离证明宿主白蜡甙只在 *F. stylosa* 中存在, 而在 *F. chinensis* 和 *F. bungeana* 中未检出, 因为后两品种不含有宿主白蜡甙, 所以不影响梣皮甙的分离定量)。

(三) 进样精密密度试验

为了考察进样精密密度, 我们以七叶灵为例进行了实验, 每次进样量为 1 μ l(停流进样), 连续九次, 求得峰面积值(A)计算标准偏差(SX)和变异系数(CV), 见表 2。

表 2 七叶灵进样精密密度试验

A ($\times 10^3$)									\bar{X} ($\times 10^3$)	SX	CV
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)			
145	145	149	156	149	150	148	147	144	148	3621	2.4%

九次进样 1 μl 时的变异系数为 2.4%。

(四) 标准曲线的制备

(1) 标准溶液的配制 精密称取各标准品一定量, 微热溶于乙醇中, 使溶液浓度为:

七叶灵: 1 mg/ml; 丁香甙: 1 mg/ml; 桉皮甙: 0.15 mg/ml; 七叶亭: 0.07 mg/ml。

(2) 液相层析和测定 用微量注射器分别吸取标准溶液不同体积进样 (停流进样), 用(二)节中的方法和条件洗脱。以标准品重量对峰面积值作图, 分别得到通过原点的直线。数据见表 3。

表 3 四种标准品的测定数据*

七 叶 灵		丁 香 甙		桉 皮 甙		七 叶 亭	
μg	A(10^3)	μg	A(10^3)	μg	A(10^2)	μg	A(10^2)
1.02	120	0.612	250	0.159	173	0.067	117
2.04	253	1.22	496	0.318	376	0.134	282
3.06	378	1.84	746	0.437	561	0.201	379
4.08	469	2.45	976	0.636	756	0.268	485

* 均为两次测定平均值

(五) 生药测定

(1) 拟定方法

在层析过程中柱压和洗脱剂流速的变化以及洗脱剂组成的改变均会影响峰面积和保留时间, 因此在分析样品的当天, 首先取各标准品 1~2 μl 进样 (或标准品的混合溶液), 按照(四)、(2)节中的方法, 测定各标准品的峰面积值和保留时间作为对照, 在当天样品分析完毕后再测定各标准品的峰面积值与保留时间, 以核对是否保持不变。

按照前报⁽¹⁾的提取方法, 生药样品用乙醇回流提取 2 小时, 放冷过滤, 弃去初滤液, 根据样品的不同含量用微量注射器精密吸取续滤液 1~3 μl 进样 (停流进样), 按上述方法进行分析, 求得各色谱峰的面积值后按下式计算含量。

$$\text{进样样品中的组分量} = \frac{\text{样品中相应组分面积值}}{\text{标准品峰面积值}} \times \text{标准品的进样量}$$

(2) 样品分析

用拟定的方法测定了不同品种秦皮中各组分的含量并与薄层光密度法⁽¹⁾进行比较, 结果如表 4。

表 4 高效液相层析法与薄层光密度法测定结果比较*

组 分	<i>F. chinensis</i> (北 京)		<i>F. bungeana</i> (北 京)		<i>F. stylosa</i> (陕 西)	
	HPLC	TLC	HPLC	TLC	HPLC	TLC
七 叶 灵	4.33	4.37	7.02	6.79	2.47	2.63
丁 香 甙	0.14	未测	—	—	0.39	未测
桉 皮 甙	1.87	2.07	0.95	1.09	未测	0.46
七 叶 亭	0.36	0.37	0.49	0.55	0.08	0.12

* 均为两次测定平均值

讨 论

1. 本文方法能很好地分离七叶灵、七叶亭、丁香甙和梣皮甙, 对于含有宿柱白蜡甙的样品(如 *F. stylosa*)则不适合, 因为不能使梣皮甙与宿柱白蜡甙完全分离, 我们曾试用不同浓度的甲酸、磷酸代替乙酸, 分离情况大体相同, 采用甲醇—水—甲酸—氯仿为洗脱剂, 情况会有明显改善, 但对这洗脱剂中各组分的比例要求很严格, 分离的重现性较差。梣皮甙与宿柱白蜡甙是同一甙元的两个香豆素甙, 梣皮甙是含葡萄糖的单糖甙宿柱白蜡甙是含有一个葡萄糖和两个鼠李糖的三糖甙, 两者的极性有差别, 用正相薄层层析系统 Rf 值差别较大, 可以分开并定量⁽¹⁾。本文用反相液相层析分离不好, 今后可探索用正相液相层析分离。

2. 七叶亭在反相液相层析中易出现拖尾峰, 我们在洗脱剂中加入酸及采用离子对的办法进行实验。当采用四丁基氢氧化铵作离子对层析时, 如果反离子的量多, 仍然有严重拖尾, 如果反离子量太少, 则有时七叶亭不能被洗脱。最后采用在甲醇—水系统中加入 0.4% 的乙酸可使七叶亭色谱峰的拖尾有明显改善。

致谢 李百龙同志协助仪器调试和装柱, 特致谢意。

参 考 文 献

1. 郭希圣等: 秦皮中香豆素成分的薄层分离和光密度法测定. 药学报 18:446, 1983
2. 王明时: 祖师麻化学成分的研究(第三报)止血成分紫丁香甙的鉴定. 中草药 11:389, 1980
3. 郭希圣等: 中药秦皮的化学研究. 药学报 18:434, 1983

HPLC SEPARATION AND DETERMINATION OF ACTIVE CONSTITUENTS IN CHIN PIE (*FRAXINUS CHINENSIS*)

GUO Xi-sheng and ZHANG Yu-zhong
(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of
Medical Sciences, Beijing)

ABSTRACT

In this paper the chromatographic behaviors of esculin, syringin, fraxin and esculetin using reversed phase high performance liquid chromatography have been studied. These compounds in ethanolic extract of Chin Pie can be well separated on an ODS column (25 cm × 5 mm) with methanol-water-acetic acid (31:69:0.4) as eluant, UV-254 nm detector was used. Linear working curves prepared from peak areas vs. weights of the standards were obtained for the four mentioned constituents.

The proposed method is simple; rapid and more sensitive than the TLC-densitometric method. The coefficient of variation was 2.4%. The analytical results were in good agreement.

Key words Chin Pie (*Fraxinus chinensis*); HPLC; Esculin; Syringin; Fraxin; esculetin