

秦皮中香豆素成分的薄层分离和光密度法测定

郭希圣* 章育中**

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

提要 秦皮的乙醇提取液在硅胶G薄板上, 用氯仿-甲醇-水(30:10:3)的下层 25 ml 加甲酸 0.5 ml 为展开剂, 成功地分离了七叶亭、七叶灵、梣皮亭、梣皮甙和宿柱白蜡甙五种香豆素甙和甙元。用岛津 CS-910 型双波长薄层扫描仪测定其含量。对定量前薄板上分开的组分的定性进行了探讨。

测定方法快速、灵敏、稳定、简便, 为评价秦皮质量提供了有效的定量方法。

关键词 秦皮; 梣皮亭; 七叶亭; 梣皮甙; 七叶灵; 宿柱白蜡甙; 薄层光密度法测定

秦皮为木犀科植物苦枥白蜡树(*Fraxinus rhynchophylla* Hance)、白蜡树(*F. chinensis* Roxb.)和宿柱白蜡树(*F. stylosa* Lingelsh.)的干燥枝皮或干皮。分布于我国东北、西北、西南、华东等十余省。主产于陕西和东北的南部及东部山区。含有七叶亭(esculetin)、七叶灵⁽¹⁾(esculin)、梣皮亭⁽²⁾(fraxetin)、梣皮甙⁽³⁾(fraxin)和宿柱白蜡甙⁽³⁾(stylosin)等多种香豆素成分。宿柱白蜡甙是我们从宿柱白蜡树中所得到的新成分, 为香豆素多糖甙。

上述前四种成分对实验动物都具有增加尿量和增加尿酸从组织中排出的效果, 因此有报道梣皮亭和梣皮甙可用于风湿性关节炎的治疗⁽⁴⁾。七叶灵和七叶亭分别可抑制痢疾杆菌⁽¹⁾、减少血液凝固和促进血液循环作用, 已用于临床⁽⁵⁾。

为了对秦皮质量提出客观指标, 需要有效成分的含量测定方法。已报道的七叶灵、七叶亭、梣皮亭和梣皮甙的测定方法有: 纸层析法⁽⁶⁾、柱层析法⁽⁷⁾、电泳法⁽⁸⁾、薄层光密度法⁽⁹⁾、高效液相层析法⁽¹⁰⁾和溴量法⁽¹¹⁾。也有将其制备成三甲基硅烷衍生物的气相层析法⁽¹²⁾。这些方法大多只能测定简单的混合物和制剂。张秀琴等⁽¹³⁾用极谱法测定了秦皮中香豆素的总成分。为了测定生药中单一成分的含量, 我们采用硅胶薄层一次展开分离了五种香豆素甙和甙元, 然后用薄层光密度计进行定量测定。对薄层定量前的定性方法也进行了探索和改进。本法准确、灵敏、简便、重现性好。曾用此方法对不同品种、不同部位和不同采收期的秦皮样品中的香豆素进行了分析。

仪器和药品

标准品七叶亭、七叶灵、梣皮甙和宿柱白蜡甙均由作者从生药(*F. stylosa*)提取所得⁽⁹⁾; 梣皮亭由梣皮甙水解得到, 经熔点、红外光谱和元素分析确证。薄层层析均只显一个斑点。

七叶亭($C_9H_8O_4$), mp 270°C(d); 七叶灵($C_{15}H_{16}O_9$), mp 204~205°C; 梣皮亭($C_{10}H_8O_5$), mp 226~228°C; 梣皮甙($C_{16}H_{18}O_{10} \cdot \frac{1}{2}H_2O$) mp 209~210°C; 宿柱白蜡甙($C_{28}H_{38}O_{18}$) mp 234~236°C。硅胶G 青岛海洋化工厂、薄层层析规格。所用溶剂均为北京化工厂二级规格。

日本岛津 CS-910 型双波长薄层扫描仪, Chromatopac E1B 型数据处理机。点样毛细管 (Microcap,

本文于 1982 年 2 月 15 日收到。

本文曾在中国药学会药物分析学术会议(1981 年, 无锡)上宣读

* 卫生部药品生物制品检定所 ** 中医研究院中药研究所

Drummond, 美国) 2 μ l。荧光灯上海顾村电光仪器厂, 365 nm。薄层玻璃板, (15 \times 20 cm), 天津和平区人民中学工厂。

方法和结果

(一) 薄层层析和定性

1. 薄层层析

薄板的制备: 硅胶 G 2.7 g 加 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液 9 ml (必要时加数滴蒸馏水) 调成糊状, 用自制涂布器涂布于玻璃板上, 室温干燥过夜后备用, 薄层厚度 0.2 mm。

展开剂: 氯仿-甲醇-水 (30:10:3) 振摇, 静置分层后取下层液 25 ml, 加甲酸 0.5 ml。

展开: 将四种标准品的乙醇溶液和生药乙醇提取液, 分别点于层析板上, 展开槽预先饱和和 20~30 分钟, 用上行法室温展开 15 cm 左右。

2. 定性

(1) 经展开后的薄板, 自然挥去溶剂, 在荧光灯下观察, 得到层析图谱和各斑点的 Rf 值 (见图 1 和表 1)。各斑点均为圆形, 能很好分离。

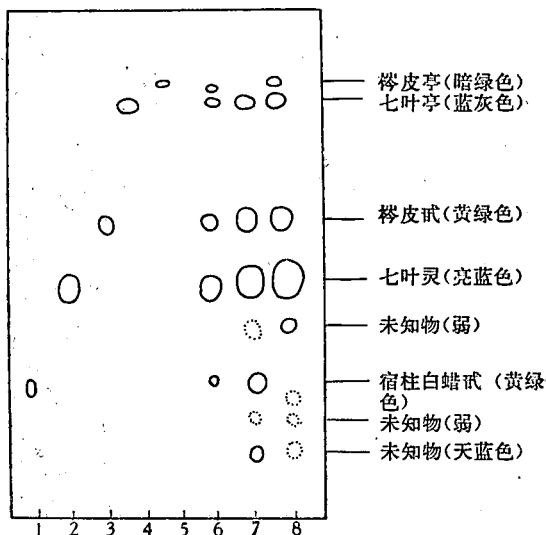
表 1 秦皮中五种香豆素的薄层数据

香 豆 素	Rf*
梣皮亭	0.84
七叶亭	0.78
梣皮甙	0.55
七叶灵	0.44
宿柱白蜡甙	0.25

Rf* 值为三次测定平均值

图 1 *F. stylosa* 和 *F. bungeana* 薄层层析图谱

1. 宿柱白蜡甙
2. 七叶灵
3. 梣皮甙
4. 七叶亭
5. 梣皮亭
6. 标准品混合液
7. *F. stylosa* 提取液
8. *F. bungeana* 提取液



用薄层扫描仪对薄板作直线轮廓扫描, 结果见图 2 和图 3。所测定斑点均达到基线分离, 可以定量。

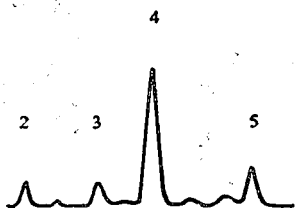


图 2 *F. stylosa* 的薄层扫描图

1. 梣皮亭
2. 七叶亭
3. 梣皮甙
4. 七叶灵
5. 宿柱白蜡甙

$\lambda_s = 340 \text{ nm}$ $\lambda_R = 440 \text{ nm}$ 反射法直线扫描

扫描速度 40 mm/min 纸速 20 mm/min

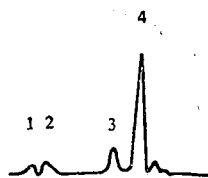


图 3 *F. bungeana* 的薄层扫描图

(2) 高效液相层析法检查斑点纯度 将生药提取液层析后的七叶亭、梣皮甙、七叶灵和

宿主白蜡甙四个斑点用吸集器分别收集,用乙醇洗脱,洗脱液浓缩,用高效液相层析条件⁽¹⁴⁾,十八烷基键合相柱,甲醇—水—乙酸为洗脱剂进行层析,均得到单一色谱峰。

(3) 用薄层扫描仪对斑点扫描定性——薄板上的吸收曲线定性

将层析后的 1~4 各纯品斑点与生药提取液中的对应斑点分别扫描,得到曲线如图 4。

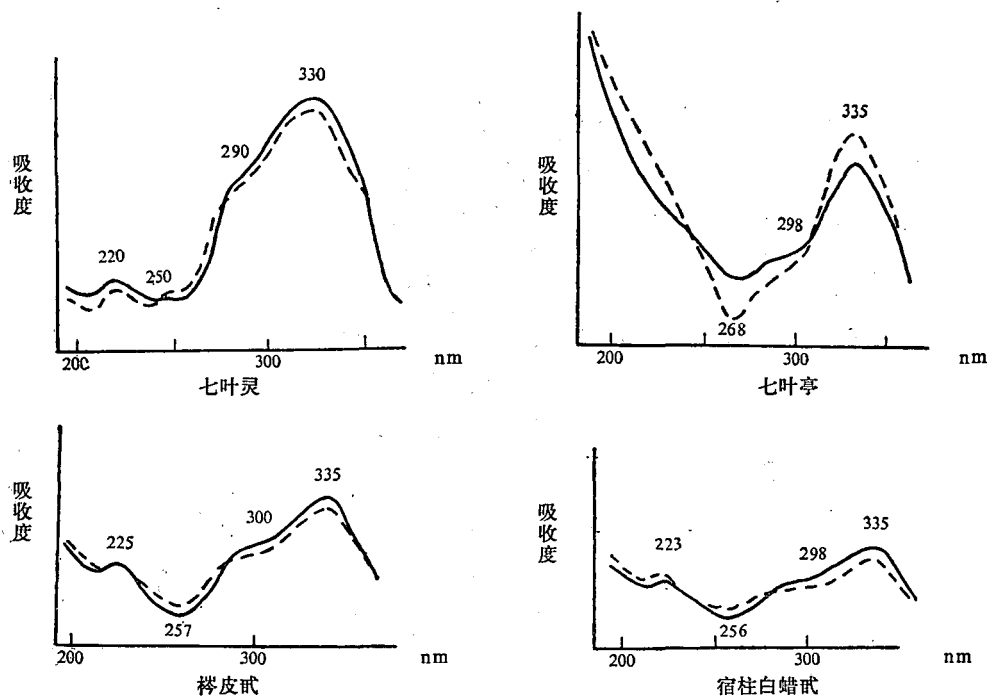


图 4 四种成分在薄层上的紫外吸收曲线

—— 标准品 $\lambda_s = 200 \sim 370 \text{ nm}$
 - - - 样品 $\lambda_R = 440 \text{ nm}$

单波长反射法锯齿扫描,背景补偿
 纸速 40 mm/min 狭缝 1.25 × 1.25 mm

由图可看出样品各斑点与其对应的标准品的紫外吸收曲线是一致的。不同组分由于化学结构不同,吸收曲线也有差别;栲皮甙与宿主白蜡甙的甙元部分结构相同,只是所结合的糖不同,因而吸收曲线相似。

(二) 含量测定

1. 标准曲线的制备 精密称取各标准品一定量加热溶于乙醇中,使溶液的最后浓度为:七叶亭 0.15 mg/ml;七叶灵 2 mg/ml;栲皮甙 0.5 mg/ml;宿主白蜡甙 0.3 mg/ml。将各标准品溶液用点样毛细管点不同量于硅胶薄板上,原点直径为 2.5 mm,间距为 1.5 cm,上行法展开 15 cm(不发生边缘效应),取出俟展开剂完全挥去后,用薄层扫描仪扫描,结果见表 2。用标准品重量对斑点面积值作图,得一通过原点的直线。

2. 稳定性试验

将四种标准品溶液点于硅胶薄板上,展开后每隔一定时间测定一次各斑点面积值。结果见图 5。

由图 5 可见,各成分在硅胶薄板上的稳定性不同,有的可稳定数小时,有的如七叶亭随时间延长吸收度下降,但由于采用随行标准,且其量与样品含量接近,故对测定结果几无影响。样品中的七叶亭和标准品每小时同时测定一次,连续测定五小时,结果见表 3。

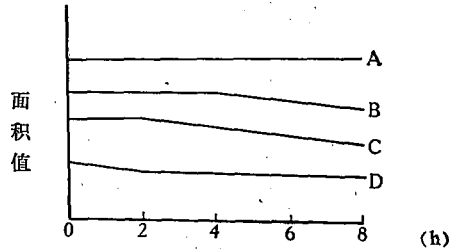


图 5 时间对标准品各斑点面积值的影响

A. 七叶灵 B. 椴皮甙
C. 宿柱白蜡甙 D. 七叶亭

表 2 四种标准品的测定数据

七 叶 亭		椴 皮 甙		七 叶 灵		宿柱白蜡甙	
μg	面积值	μg	面积值	μg	面积值	μg	面积值
0.335	37335	1.12	24345	3.93	25115	0.710	15994
0.670	62502	2.24	50049	7.87	49661	1.34	31867
1.01	99261	3.36	75003	11.8	74123	2.01	47700
1.34	134124	4.48	98357	15.7	94815	2.68	66132
1.68	160843	5.60	125678	19.7	112475	3.35	83136

$\lambda_s=340\text{nm}$, $\lambda_R=440\text{nm}$, 反射法锯齿扫描, $S_x=3$

表 3 七 叶 亭 的 稳 定 性

时 间 (h)	0	0.5	1	2	3	5
标准品面积值	7901	7785	7267	7359	7189	6892
样品面积值	5421	5424	5366	5160	5033	4690
含 量(%)	0.118	0.120	0.127	0.121	0.121	0.117

3. 生药测定

(1) 提取方法

精密称取约 1.00 g 样品粉末(55 目), 准确加入 25.00 ml 溶剂, 分别用甲醇或乙醇冷浸及加热回流提取和沙氏提取。结果表明, 乙醇回流 2 小时即可提取完全。

(2) 拟定方法

精密称取干燥生药样品(55 目)约 0.5 g 置 50 ml 圆底烧瓶中, 精密加入 10.00 ml 乙醇回流 2 小时, 放冷, 用少量脱脂棉过滤, 弃去初滤液, 根据样品含量的不同, 精密取续滤液 2.0~4.0 μl 点于薄板上。另点标准品溶液 2.0 μl 于薄板上作随行标准(标准品与样品间隔点在薄板上)用氯仿-甲醇-水(30:10:3)下层 25 ml 加甲酸 0.5 ml 为展开剂, 上行展开 15 cm, 取出, 自然挥去溶剂, 分别测定标准品斑点和样品中各成分斑点的面积值进行比较, 计算含量。

由于椴皮亭标准品较少, 可用椴皮甙作为标准进行测定, 所得结果应乘以换算因子 0.562。

也可直接利用数据处理机计算出各成分的百分含量。

(3) 精密度实验

按拟定的方法,在同一块薄板上点五个同样量的样品溶液和两个随行标准溶液,测定样品分析的误差,结果见表4。

表4 方法的精密度

	七叶亭	桦皮甙	七叶灵	宿柱白蜡甙
含 量 (%)	0.112	0.435	2.50	0.343
	0.118	0.439	2.53	0.349
	0.117	0.449	2.56	0.350
	0.115	0.439	2.57	0.328
	0.115	0.441	2.65	0.333
\bar{X}	0.115	0.441	2.56	0.341
SD	0.0023	0.0052	0.056	0.0098
CV	2.0%	1.2%	2.2%	2.8%

从此表可见,采用随行标准法测定样品,可以获得较好的重现性。

(4) 样品分析

用拟定的方法比较了不同品种,同一植物不同部位以及不同采收期各组分的含量,如表5~7。

表5 不同品种的含量测定(%)*

组 分	宿柱白蜡树 <i>F. stylosa</i>	白蜡树 <i>F. chinensis</i>	苦枈白蜡树 <i>F. rhynchophylla</i>	小叶白蜡树 <i>F. bungeana</i>	美国白蜡树 <i>F. americana</i>
桦皮亭	0.119	0.149	...
七叶亭	0.122	0.127	1.01	0.554	...
桦皮甙	0.457	0.561	0.848	1.09	...
七叶灵	2.63	3.08	2.73	6.79	...
宿柱白蜡甙	0.338	0.133
总 和	3.55	3.90	4.71	8.58	...

* 宿柱白蜡树、白蜡树、苦枈白蜡树分别购自山西省和辽宁省药材公司。小叶白蜡树和美国白蜡树采于北京。

表6 同株植物不同部位树皮的含量(%)

组 分	苦枈白蜡树(北京)		白蜡树(北京)	
	干皮(厚9~11mm)	枝皮(厚0.5~1.5mm)	粗枝皮(厚3~5mm)	细枝皮(厚0.5~2mm)
七叶亭	0.158	0.253	0.288	0.370
桦皮甙	0.768	1.03	1.16	2.07
七叶灵	2.66	3.09	2.10	4.37
宿柱白蜡甙
总 和	3.59	4.37	3.55	6.81

表7 同株植物(苦枈白蜡树,北京)同一部位不同采收期的含量(%)**

组 分	休眠期(1月)	花 期(4月)	果 期(7月)	叶黄期(10月)
七叶亭	0.182	...
桦皮甙	0.788	0.946	0.900	0.892
七叶灵	2.27	2.29	2.53	2.36
宿柱白蜡甙
总 量	3.06	3.24	3.61	3.25

** 均为两次测定平均值

讨 论

1. 秦皮中的主要有效成分是香豆素, 本文测定结果表明在植物体内主要以香豆素甙的形式存在, 甙元的含量只有甙的4~14%。本法快速、灵敏所测各组分的量为数百ng~数 μ g。

2. 秦皮中除含有多种香豆素成分外, 还含有酚性成分、皂甙和鞣质等, 它们在薄层上有可能混杂在所测定的斑点内, 因此我们在薄层定量前, 除了用标准品对照它们的Rf值外, 还用高效液相层析法对斑点物质进行了纯度检查和在薄层上用斑点吸收曲线法对斑点进行了定性, 两法均表明所测定的各斑点均为单一成分。

3. 用七叶灵和梣皮甙证实, 不用线性校正仪时, 标准曲线为一不通过原点的直线, 当用线性校正仪时($S_x=3$), 标准曲线为通过原点的直线⁽¹⁵⁾, 因此在分析样品时可采用外标一点法, 以简化测定步骤。

4. 小叶白蜡树为中国药典(63年版)收载品种, 其香豆素成分的含量(特别是七叶灵)明显高于其它品种, 这可能与品种有关, 也可能与采集植物的大小、树皮薄厚有关。美国白蜡树是侧生花序的植物, 与上述其它品种不同, 用本法未能检出香豆素成分, 与文献⁽¹⁶⁾结果一致。对不同种不同部位的测定结果(表6)表明, 其含量细枝皮>粗枝皮>树干皮, 即树皮薄者含量高。从同一株植物同一部位的不同采收期的结果看(表7), 花期与果期含量最高, 黄叶期次之, 休眠期含量最低。在苦枈白蜡树中七叶亭只有在果期出现, 其它时期含量极微, 未能检出。另外, 表5~7所用的白蜡树和苦枈白蜡树, 因产地不同, 所检出的成分及各种成分的含量也有所差别。

致谢 承辽宁省药材公司王冶钢同志提供苦枈白蜡树样品; 本所植物室朱兆仪、王恒、李万宏同志和分析室刘洪月同志以及中药研究所郭家林同志协助采集、鉴定植物标本, 谨表深切谢意。

参 考 文 献

1. 梅斌夫等: 中药秦皮的有效成分. 化学学报 28:25, 1962
2. 胡之璧等: 秦皮中香豆素的分离与鉴定. 中草药通讯 (9):8, 1979
3. 郭希圣等: 中药秦皮的化学研究. 药学报 18:434, 1983
4. 渡道親考, 他: 秦皮総配糖體の臨床的研究. 日本薬理学雜誌 43:18, 1947
5. Schoch J.: Pharmaceutical compositions containing ergot alkaloids. *Brit* 1,175,430; *CA* 73:91256j, 1970
6. Sumere C F, et al: Quantitative paper-chromatographic determinations. I. Coumarins and phenolic acid, especially esculetin, daphnetin and ferulic acid. *J Chromatog* 6:481, 1961
7. Hörhammer L, et al: Quantitative Bestimmung von Rotin und Aesculin in einem arzneigemisch nach chromatographischer Trennung an Polyamidpulver. *Arch Pharm* 293:1001, 1960
8. Tabourim C L, et al: Identification and determination of esculoside in a complex pharmaceutical preparation. *Bull Trav Soc Pharm Lyon* 19:3, 1975; *CA* 85:51798 d
9. Ibrahim R K.: Quantitative in situ fluoremetry of plant phenolic compounds on thin-layer plates. *J Chromatog* 42:544, 1969
10. Court W A: High-performance reversed-phase liquid chromatography of naturally occurring phenolic compounds. *Ibid* 130:287, 1977
11. Faure M, et al: Determination of esculoside. *Bull Trav Soc Pharm Lyon* 5:53, 1961
12. Furuya T: Gas-liquid chromatography of coumarins. *J Chromatog* 29:382, 1967
13. 张秀琴等: 秦皮中秦皮素的极谱测定. 药学报 17:305, 1982
14. 郭希圣等: 药学报, 待发表
15. 章育中等: 青岛薄层层析硅胶分离性能考察. 药物分析杂志 2:37, 1982
16. 島田玄弘: トネリコ属植物樹皮成分の研究(第7報)シオジ樹皮成分. 薬学雜誌 72:501, 1952

QUANTITATIVE TLC-DENSITOMETRY OF COUMARINS IN QIN PI (*FRAXINUS STYLOSA*)

Guo Xi-sheng and Zhang Yu-zhong

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of
Medical Sciences, Beijing*)

ABSTRACT

We have reported previously, the isolation of four coumarins and a phenolic glycoside from Qin Pi (*Fraxinus stylosa*). This paper deals with the TLC-densitometry of the coumarins in the drug. Fraxetin, esculetin, fraxin, esculin and stylosin were separated on silica gel G thin layer, 25 ml of the lower layer of chloroform-methanol-water (30:10:3) plus 0.5 ml of formic acid were used as developing solvent. Densitometric determination was carried out with a Shimadzu dual-wavelength TLC scanner CS-910 and the spot areas were determined and recorded by the Chromatopac C-E 1B data processor. The parameters for the linearization of working curves were: $\lambda_s=340$ nm, $\lambda_R=440$ nm, reflectance mode, zig-zag scanning, $S_x=3$, working curves were obtained, all passing through the origin.

The method has been applied to the analysis of various samples, including those from different sources, of different parts of the plant and of different collecting seasons.

The procedure was simple and rapid, the results were stable and reproducible. The coefficient of variation was 1.2~2.8%.

Key words Qin Pi (*Fraxinus stylosa*); Fraxetin; Esculetin; Fraxin; Esculin; Stylosin; TLC-densitometry.