

津 ODS 柱进行分析, 原儿茶酸的保留时间基本一致, 样品分离情况良好。

2.7 样品的测定: 按 2.4 项制备供试品溶液, 分别精密量取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL , 注入液相色谱仪, 用峰面积按外标法计算, 几批市场上购得的五味子药材中原儿茶酸的含量结果见表 2。

表 1 五味子中原儿茶酸含量测定结果

Table 1 Protocatechuic acid in <i>S. chinensis</i>		
产地	原儿茶酸/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/%
辽 宁-1	0.221	0.7
辽 宁-2	0.238	0.5
河 北	0.099	0.8
吉 林	0.130	3.6
020801	0.204	1.3
011001	0.398	1.7
021101	0.303	1.0
韩 国	0.276	0.2

3 讨论

3.1 分别采用甲醇-水-酸、乙腈-水-酸的流动相系统进行分析, 发现乙腈-水-酸系统的分离效果较甲醇-水-酸好。在流动相中加入醋酸铵可使原儿茶酸保留时间缩短, 并改善原儿茶酸和相邻组分的分离。用二级管阵列检测器检测, 发现原儿茶酸在 224、258、295 nm 处均有最大吸收, 其中 258 nm 处吸收最强, 故选择 258 nm 为检测波长。

3.2 提取溶剂的选择: 曾采用乙醇-水、水系统进行提取, 发现水煎法比较费时费力, 且和最终采用的乙醇-水超声提取的测定结果相比, 结果偏低, 故未采用水煎法。分别用 10%、30%、50% 乙醇作为提取溶剂, 结果以 50% 乙醇为溶剂的测定结果最高, 且 10%、30% 乙醇的提取物有大量的絮状物。故采用

50% 乙醇作为提取溶剂加入 1% 冰醋酸可以提高提取率。

3.3 提取条件的优化: 对放置时间和超声提取时间等条件进行了优化, 结果表明, 放置 1 h 和放置 3 h 测定结果无明显差别, 故选择放置 1 h。放置 1 h 后分别超声 20、30 min 后测定, 结果基本一致, 可以认为超声 20 min 已提取完全。

3.4 测定结果表明, 从市场上购买及雅安三九药业有限公司提供的 8 个五味子样品中均含有原儿茶酸, 原儿茶酸的质量分数在 0.1~0.4 mg/g。

3.5 华中五味子 *Schisandra sphenanthera* Rehd et Wils 干燥果实习称“南五味子”, 经测定, 其中也含有原儿茶酸, 采用本法测定了南五味子中原儿茶酸的含量, 4 批南五味子药材中原儿茶酸的质量分数为 0.15~0.4 mg/g。本法也可以用于南五味子中原儿茶酸的含量测定。

3.6 生脉注射液中含有五味子, 本法也可以用于生脉注射液中原儿茶酸的含量测定, 人参和麦冬的成分不干扰原儿茶酸的测定。

References

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol I. 2000.
- [2] Li X N, Cui H, Song Y Q, et al Analysis of volatile fractions of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill using GC-MS and chemometric resolution [J]. *Phytochem Anal*, 2003, 14 (1): 23-33.
- [3] Dai H F, Zhou J, Peng Z G. et al Studies on the chemical constituents of *Schizandra chinensis* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 13(1): 24-26.
- [4] Information Center of Chinese Herbal Medicine, State Pharmaceutical Administration of China. *Handbook of Active Constituents in Phyto medicine* (植物药有效成分手册) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1986.

HPLC 法测定秦皮中香豆素类成分的含量

刘丽梅¹, 李曼玲², 冯伟红², 陈琳¹, 王瑞海¹, 吴萍^{1*}

(1. 中国中医研究院基础理论研究所, 北京 100700; 2. 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

秦皮为常用中药, 《神农本草经》列为上品。《中华人民共和国药典》2000 年版一部规定秦皮为木犀科植物苦枥白蜡树 *Fraxinus rhynchophylla* Hance、白蜡树 *F. chinensis* Roxb、尖叶白蜡树 *F. szaboana* Lingelsh 或宿柱白蜡树 *F. stylosa* Lin-

gelsh 的干燥枝皮或干皮。本实验对苦枥白蜡树皮进行了研究, 从中分离到 5 种香豆素类成分, 并进行了结构鉴定, 它们是秦皮乙素(I)、秦皮素(II)、6, 7-二甲氧基-8-羟基香豆素(III)、秦皮苷(IV)、秦皮甲素(V), 化合物 II~IV 为首次从该植物

* 收稿日期: 2003-10-11
基金项目: 国家重点科技攻关项目 (99-929-01-24-8)

中获得。对上述成分的提取、分离、鉴定已在秦皮化学成分的研究中进行了报道^[1,2],这些香豆素类成分具有抗菌抗炎、止咳、化痰、平喘、促进尿酸排泄、镇痛镇静、调节血液循环、抑制肠蠕动、防紫外线等多种功能。为了更好地控制秦皮药材的质量,针对专属性强的有效成分建立灵敏、快速的含量测定方法是首要工作。秦皮的含量测定方法有纸色谱法、柱色谱法、电泳法、薄层光密度法、高效液相色谱法和溴量法^[3]。目前《中华人民共和国药典》2000年版一部秦皮的含量测定采用的是分光光度法测定秦皮甲素的含量。本实验采用了十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱,针对秦皮的主要有效成分香豆素类化合物,建立了一种灵敏、专属可靠的HPLC法测定秦皮药材中秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮素、秦皮苷的含量,用这4个成分来共同标定秦皮药材的质量。

1 仪器和试剂

Waters 600E (美国)液相色谱仪,四元泵,996二级管矩阵检测器及Millennium³²色谱工作站。甲醇为GR,其他试剂均为AR,水为自制高纯水。秦皮甲素、秦皮乙素对照品购于中国药品生物制品检定所(批号:秦皮甲素740-9403、秦皮乙素741-200105)。秦皮素、秦皮苷对照品为自制(纯度均在98%以上)。秦皮 *Fraxinus rhynchophylla* Hance, *F. chinensis* Roxb., *F. szaboana* Lingelsh., *F. stylosa* Lingelsh. 药材购自全国各地,均经中国中医研究院中药研究所谢宗万研究员鉴定为正品。

2 方法和结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Dimasil C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-水-冰醋酸(6:40:0.1); 检测波长: 340 nm; 体积流量: 1.5 mL/min; 柱温: 40 °C。理论塔板数按秦皮甲素峰计算不低于2000。

2.2 对照品溶液的制备: 分别精密称取对照品秦皮甲素2 mg, 置5 mL量瓶中, 秦皮乙素、秦皮素、秦皮苷各1 mg, 置10 mL量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得(含秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮素、秦皮苷分别为0.4、0.1、0.1、0.1 mg/mL)。

2.3 供试品溶液的制备: 取样品粉末(过四号筛)约0.5 g, 精密称定, 置50 mL锥形瓶中, 精密加入甲醇25 mL, 称定质量, 加热回流1 h, 取下, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系的考察: 精密吸取秦皮甲素对照品溶液(0.4 mg/mL) 3、6、9、12、15 μL, 秦皮乙素对照

品溶液(0.1 mg/mL) 2、4、6、8、10 μL, 秦皮素对照品溶液(0.1 mg/mL) 2、4、6、8、10 μL, 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积, 以对照品峰面积积分值为纵坐标, 对照品的量为横坐标绘制标准曲线, 计算回归方程: $Y_{\text{秦皮甲素}} = -6.9 \times 10^3 + 1.33 \times 10^6 X$, $r = 0.9994$ ($n = 5$), 表明秦皮甲素在1.2~6.0 μg呈线性关系; $Y_{\text{秦皮乙素}} = -2.28 \times 10^4 + 1.81 \times 10^6 X$, $r = 0.9997$ ($n = 5$), 表明秦皮乙素在0.2~1.0 μg呈线性关系; $Y_{\text{秦皮素}} = -1.14 \times 10^4 + 1.15 \times 10^6 X$, $r = 0.9995$ ($n = 5$), 表明秦皮素在0.2~1.0 μg呈线性关系。

2.5 精密度试验: 精密吸取供试品溶液, 重复进样5次, 测定质量分数, 秦皮甲素RSD=1.77%, 秦皮乙素RSD=1.63%, 秦皮素RSD=1.38%。

2.6 重现性试验: 取同一批样品同时制备5份, 按照含量测定项下方法进行, 测定质量分数, 秦皮甲素RSD=1.66%, 秦皮乙素RSD=0.62%, 秦皮素RSD=2.17%。

2.7 稳定性试验: 按照含量测定项下方法, 对同一批样品进行了0、1、2、4、8、16、24 h测定质量分数, 秦皮甲素RSD=1.84%, 秦皮乙素RSD=1.94%, 秦皮素RSD=0.11%。

2.8 回收率试验: 采用加样回收法。取已知含量的秦皮药材, 分别加入一定量秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮素对照品, 按上述色谱条件测定, 计算回收率。秦皮甲素平均回收率为97.20%, RSD=0.82% ($n = 5$); 秦皮乙素平均回收率为96.98%, RSD=0.76% ($n = 5$); 秦皮素平均回收率为98.20%, RSD=1.51%。

2.9 样品测定: 分别精密吸取对照品秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮素、秦皮苷溶液各5 μL与供试品溶液5 μL, 依上述色谱条件测定, 按外标一点法计算即得。样品的测定结果见表1, 其色谱图见图1。

根据测定结果, 暂定秦皮药材含秦皮甲素不得少于1.37%; 秦皮乙素不得少于0.26%; 秦皮素不得少于0.13%; 秦皮苷不得少于0.20%。

3 讨论

3.1 《中华人民共和国药典》2000年版一部秦皮的含量测定采用的是分光光度法测定秦皮甲素的含量, 对资料研究发现, 秦皮中含有的秦皮甲素、秦皮乙素不具有专属性。在菊科植物菊苣、茜草科植物土连翘、大戟科植物续随子、茄科植物曼陀罗等一些植物中都含有秦皮甲素^[6]; 在芸香科植物黎檬、菊科菊苣、狼把草、蝎尾菊、茄科植物唐古特莨菪、黄果茄、

表 1 药材测定结果 (n= 2)

Table 1 Results of quantitative detemination of crude drugs (n= 2)

编号	样品来源	样品品种	秦皮甲素/%	秦皮乙素/%	秦皮素/%	秦皮苷/%
1	四川成都	尖叶白蜡树	1. 102	0. 214	0. 112	0. 143
2	四川成都	尖叶白蜡树	0. 635	0. 681	0. 424	0. 106
3	四川成都	尖叶白蜡树	0. 889	0. 288	0. 185	0. 120
4	四川成都	尖叶白蜡树	2. 107	0. 259	0. 088	0. 082
5	四川成都	尖叶白蜡树	1. 092	0. 331	0. 197	0. 148
6	广东深圳	苦枥白蜡树	2. 747	0. 055	0. 109	0. 411
7	广东深圳	尖叶白蜡树	1. 454	0. 172	0. 131	0. 232
8	广东深圳	白蜡树	0. 680	0. 207	0. 090	0. 059
9	南京	苦枥白蜡树	1. 784	0. 420	0. 390	0. 324
10	上海	白蜡树	1. 293	0. 224	0. 149	0. 172
11	辽宁锦州	苦枥白蜡树	2. 207	0. 193	0. 177	0. 377
12	陕西洛南	宿柱白蜡树	3. 043	0. 126	0. 040	0. 216
13	山西大同	白蜡树	2. 335	0. 168	0. 123	0. 070
14	山西大同	尖叶白蜡树	1. 305	3. 025	0. 152	1. 518
15	陕西澄城	尖叶白蜡树	1. 387	4. 473	0. 272	1. 730
16	陕西澄城	尖叶白蜡树	4. 374	1. 919	0. 236	0. 919
17	陕西西安	尖叶白蜡树	1. 956	5. 111	0. 097	0. 336
18	陕西西安	尖叶白蜡树	0. 256	1. 028	0. 064	0. 374
19	陕西西安	尖叶白蜡树	1. 560	1. 093	0. 079	2. 002
20	陕西西安	尖叶白蜡树	1. 982	4. 025	0. 203	1. 991

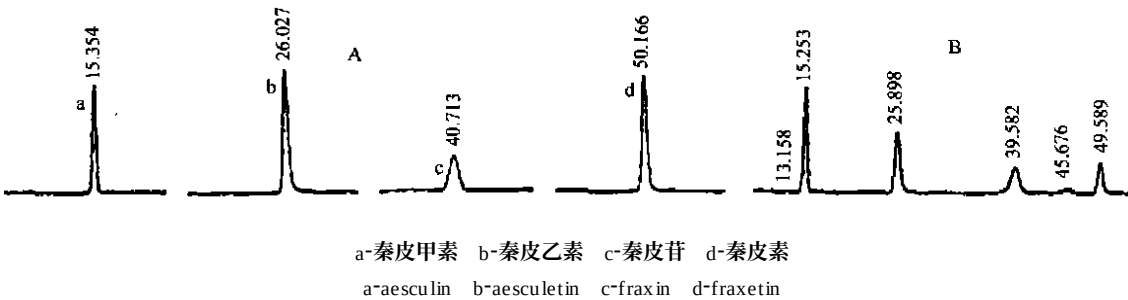


图 1 秦皮对照品 (A) 及样品 (B) 图谱

Fig 1 HPLC chromatograms of referenece substances (A) and sample of Cortex Fraxini (B)

萝摩科植物希腊杠柳、豆科植物草木犀中都含有秦皮乙素^[6]。这说明秦皮甲素、秦皮乙素不是秦皮的专属性成分,只是这两个成分在秦皮药材中的含量较高;但秦皮中的秦皮素、秦皮苷具有一定的专属性,它们仅存在于木犀科^[7]属当中。故对秦皮的含量测定选择了在测定秦皮甲素、秦皮乙素含量的同时,测定具有一定专属性的秦皮素、秦皮苷的含量。用这 4 个成分共同标定秦皮药材的质量。

3.2 从上述样品的测定结果来看,不同品种的秦皮 4 种香豆素成分的含量有差别,即便是同一品种,4 种成分含量也相差较大,这与产地、用药部位和采收期有直接关系,观察样品发现,枝皮的有效成分含量较高,干皮中含粗皮的有效成分含量较低,这与资料报道的结果相符^[5]。另外 4 种秦皮所含有的成分也各有侧重,见表 2。

苦枥白蜡树树皮中秦皮甲素平均含量较高;尖叶白蜡树树皮中秦皮乙素、秦皮苷平均含量较高;白

表 2 不同品种所含成分的对比 %

Table 2 Comparison of components in different species %

样 品	秦皮甲素	秦皮乙素	秦皮素	秦皮苷
苦枥白蜡树 (n= 3)	2. 246 0	0. 223 0	0. 225 0	0. 371 0
白蜡树 (n= 3)	1. 436 0	0. 199 0	0. 121 0	0. 100 0
宿柱白蜡树 (n= 1)	3. 043 0	0. 126 0	0. 040 0	0. 216 0
尖叶白蜡树 (n= 13)	1. 546 0	1. 738 0	0. 127 0	0. 768 0

蜡树树皮中秦皮乙素、秦皮苷平均含量较低;宿柱白蜡树树皮秦皮乙素、秦皮素平均含量较低,但总体来看,这 4 种成分在药材中秦皮甲素含量最高,秦皮素含量最低,而秦皮乙素和秦皮苷的含量居中,有的药材中秦皮乙素含量高于秦皮苷,有的药材中秦皮乙素含量低于秦皮苷。这一结果再次提示:要保证秦皮药材的质量,必须严格按照采收期和采收部位收购药材,针对所需的成分侧重采收不同品种、不同产地的秦皮。

3.3 本方法采用甲醇作为药材的提取溶媒,有文献报道采用 95% 乙醇作为提取溶媒^[3],对甲醇、95% 乙醇及无水乙醇提取情况进行比较试验,结果表明,以甲醇作为提取溶媒测得各成分含量较高,故采用

甲醇为提取溶媒。在确定了甲醇为提取溶媒之后,进一步对提取溶媒用量 20、25、30 mL 甲醇进行了比较试验,结果表明,提取溶媒用量为 25 mL 时测得各成分含量较高。试验中对加热回流、超声处理及冷浸 3 种提取方法进行了比较,结果表明,加热回流法测得各成分含量略高于其他二法。确定选用加热回流法为提取方法后,分别又对加热回流不同时间 30 min、1、2 h 的提取结果进行了比较试验,结果表明,加热回流 1 h 测得各成分含量较高。

References

- [1] Liu L M, Chen L, Wang R H, et al. Studies on chemical constituents of Q inpi [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(12): 1073-1074.
- [2] Liu L M, Wang R H, Chen L, et al. Studies on chemical constituents of Q inpi [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(10): 889-890.
- [3] Guo X S, Zhang Y Z. Thin-layer separation and determination of thin-layer chromatographic densitometry of some coumarin in Q inpi [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1983, 18(6): 446-452.
- [4] Guo X S, Zhang Y Z. HPLC separation and determination of active components in Q inpi [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1983, 18(7): 525-528.
- [5] Wu J L, Fu G L, Zen M L. Studies on quality and resources of Q inpi [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1983, 3(1): 12-18.
- [6] Information Center of Chinese Herbal Medicine, State Pharmaceutical Administration of China. *Handbook of Active Constituents in Phytonedicine* (植物药有效成分手册) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1986.

RP-HPLC 法测定芫花叶中 3 种黄酮苷的含量

李尧尧¹, 刘延泽^{2*}

(1. 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700; 2. 河南中医学院, 河南 郑州 450008)

芫花叶为瑞香科植物芫花 *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. 的干燥叶。为了扩大芫花及芫花根的药用植物资源, 河南中医学院冀春茹教授等自 20 世纪 80 年代以来对其化学成分进行了较系统研究, 从中发现了多种黄酮苷元及苷类^[1]、绿原酸类化合物^[2]及木脂素类成分^[3], 并发现其水溶性部位对心血管系统有良好的作用, 能明显增加冠脉流量, 而对心率的影响不明显, 并对心肌缺氧有保护作用, 还能降低麻醉猫的血压, 抑制麻醉猫在结扎左冠状动脉前降支血清磷酸激酶(CPK)活性的升高, 静脉注射以后还可产生短暂但明显的降压作用^[4]。该部位除含有已分离得到的绿原酸类化合物及其他糖类、无机成分等小分子化合物外, 可能含有较多的黄酮苷类化合物。为了进一步探讨其活性成分和为开发新的药用部位提供科学依据, 本实验采用 RP-HPLC 法同时测定了芫花叶中芫花叶苷、木犀草苷和异槲皮苷的含量。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪(Waters600E 泵, Waters 996DAD 检测器, 美国 Waters 公司); 乙腈、甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为高纯水。

芫花叶采自河南信阳地区, 经河南中医学院刘

若壖教授鉴定为瑞香科植物芫花 *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. 的干燥叶。

芫花叶苷、木犀草苷及异槲皮苷均为自制, 其光谱数据与文献中 3 种黄酮苷的数据一致^[1,5,6], 经 HPLC 归一化法测定, 三者的纯度均在 99% 以上。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Kromasil-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-甲醇-水-冰醋酸(11:21:68:0.4), 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长为 254 nm。该条件下芫花叶苷、木犀草苷及异槲皮苷与其他干扰成分能基线分离。按外标法以峰面积定量。

2.2 对照品溶液的制备: 称取芫花叶苷、木犀草苷及异槲皮苷适量, 精密称定, 用甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 即得 3 个黄酮苷的对照品溶液, 质量浓度分别为 0.246 8、0.087 和 0.060 6 mg/mL。

2.3 供试品溶液的制备: 取本品于 60 °C 烘 6 h, 粉碎后取约 2 g, 精密称定, 加入甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 称质量, 用甲醇补足损失质量, 摇匀, 滤过, 弃去初滤液, 取续滤液过微孔滤膜(0.45 μm)作为供试品液。

2.4 线性关系考察: 在上述色谱条件下, 分别精密

* 收稿日期: 2003-08-12

作者简介: 李尧尧(1974—), 女, 2001 年毕业于河南中医学院中药系, 获硕士学位, 现攻读中国中医研究院中药专业博士学位。

Tel: (010)64014411-2975 E-mail: leerao@hotmail.com