

生脉饮中五味子醇甲的薄层分离技术与扫描定量法

刘文英 周 炜 吴 荻¹ 殷 岚² 安登魁

(药物分析学教研室)

摘 要 本文将高效薄层色谱法和常规薄层色谱法的程序多次展开技术和小孔线形技术用于生脉饮中难分离物质五味子醇甲的分离研究。结果表明:常规薄层小孔线形分离技术具有实用、简便和快速的特点;生脉饮经乙醚萃取后,硅胶 GF 薄层分离,薄层扫描法测定五味子醇甲的回收率达 99.4%。

关键词 生脉饮;五味子醇甲;高效薄层色谱法;常规薄层色谱法;程序多次展开技术;小孔线形技术;薄层扫描法

生脉饮为党参、麦冬、五味子提取制成的灭菌水溶液,具有益气复脉、养阴生津之功效。朱永新等采用薄层显色光密度法^[1]和高效液相色谱法^[2]定量测定了人参方生脉散制剂中五味子醇甲的含量,但未见生脉饮(党参方)中五味子醇甲的分离分析报道。本文将高效薄层色谱法(high performance thin layer chromatography, HPTLC),常规薄层色谱法的程序多次展开(programmed multiple development, PMD)技术和小孔线形(small hole in line, SHL)技术^[3]应用于生脉饮中难分离物质五味子醇甲的分离研究,从分离效能的比较可见,SHL 技术为最实用;采用乙醚萃取-硅胶 GF₂₅₄薄层分离-薄层扫描法建立了生脉饮中五味子醇甲的定量分析方法,结果准确,精密度好。

1 实验部分

1.1 样品液的制备

精密量取生脉饮 20.0 ml,用乙醚萃取三次(20, 15, 15 ml),合并乙醚萃取液,用水 1 ml 洗涤,分去水层后,蒸除乙醚,残留物用甲醇定容至 0.50 ml,制成供薄层分离用样品液。

1.2 薄层色谱分离技术

1.2.1 仪器与试剂

玻璃板 10×20 cm;10 μl 微量点样器;层析缸;硅胶 G 或 GF₂₅₄ 10~40 μ(青岛海洋化工厂);薄层色谱预制薄板(HPTLC 板)5~10 μ 10×10 cm(北京军事医学科学院预防医学研究所);变色酸 GR(Merck 公司);甲苯、醋酸乙酯、乙醚、硫酸均为 AR;生脉饮(上海中药一厂);五味子醇甲标准品(中国药品生物制品检定所提供)。

1.2.2 薄层色谱条件

薄层板为 HPTLC 板和常规 TLC 板,展开剂为甲苯-醋酸乙酯(6:4),展距(L)前者为 8.5 cm,后者为 16 cm;点样按常法,点样量为 10 μl。

常规 TLC 板(以下简称 TLC 板)铺制:硅胶 G 或 GF₂₅₄与蒸馏水(1:3)湿法铺板,晾干后 105℃活化 1 h,置干燥器内备用。

1.2.3 展开方式

PMD 技术

薄层板用同一展开剂,同一展开方向,但展开距离逐次加大的方法进行展开。第 n 次展开距离按 $L \cdot n/N$ 计算而得, N 为设定的展开次数, n 为 1,2,3,..., N 。每次展开至规定

距离后,取出薄层板,挥干溶剂,重新换取展开剂再进行下一次展开,依次类推进行多次展开。

SHL 技术

在距离薄层底边 1 cm 处,用一端接水泵的玻璃吸管将硅胶一点点吸去,使呈一排圆形小孔,内径约 2 mm,在设定的孔间距(d mm)条件下,再按常法进行薄层色谱实验,如图 1 所示。

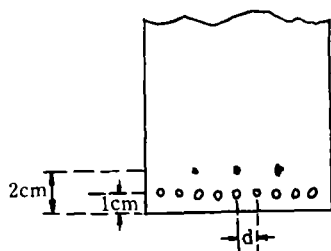


Fig 1. Diagram of SHL technique used in HPTLC or TLC

• The origin of standard or sample; ○ Small hole;
 d (mm), Distance between two holes' center

1.2.4 显色条件

薄层板挥干展开剂后,喷洒变色酸硫酸溶液(10%变色酸水溶液与等体积浓硫酸混合),于 120℃烘箱内烘烤 8 min,出现紫红色斑点;硅胶 GF₂₅₄薄层板在紫外光下观察斑点。

1.2.5 HPTLC 中 PMD 技术和 SHL 技术分离效能研究

分离效能以分离度(resolution, R)表示, R 计算公式为:

$$R = D \cdot \left[\frac{(W_1 + W_2)}{2} \right]^{-1}$$

式中 D 为二个斑点中心间的距离, W 为斑点宽度。

当斑点间距离 D 加大,斑点宽度 W 缩小时,可使 R 增大,分离效能提高。采用不同技术所得的 R 结果见图 2。

由图示结果可见, PMD 技术随着展开次数的增加,分离效能呈上升趋势。在 HPTLC 中,五次展开时 R 值达最大,但六次展开的

效能却反而下降。实验也表明, TLC 中,四次展开达最佳分离效果。

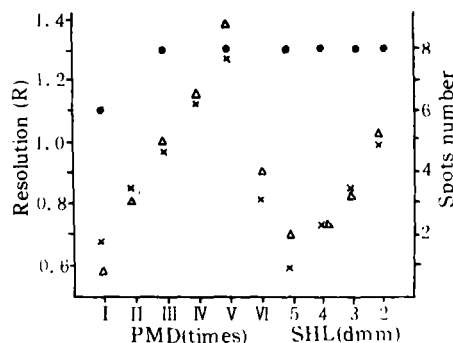


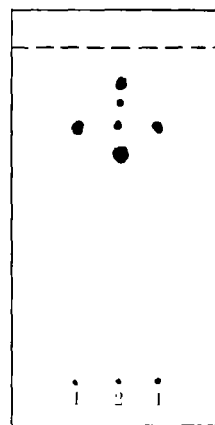
Fig 2. Resolution or spots-number versus times of development with PMD technique and distance (d mm) between two holes' center with SHL technique in HPTLC

Δ R of Wuweizi alcohol A and its upper adjacent chromatographic zones; × R of Wuweizi alcohol A and its lower adjacent chromatographic zones; • spots number

应用 SHL 技术时,随着 d 的减小, R 不断增大。在 HPTLC 中, d 为 5 或 4 mm 的 SHL 板分离效果优于一次展开效果, d 为 3 和 2 mm 时,分离效能则分别与二次和三次程序展开相当。在 TLC 中, SHL 和 PMD 技术的研究结果亦与此类同。

1.2.6 各薄层技术可分离斑点数

HPTLC 中 PMD 和 SHL 技术分离所得呈色清晰的斑点数参见图 2 右侧纵轴。TLC 中一次展开不能观察到清晰的五味子醇甲斑点,四次 PMD 技术则分离得 4 个清晰的斑点(如图 3 所示);采用 d 为 2 mm 的 SHL 技术可得同样的结果。



1.3 薄层扫描定量分析方法

1.3.1 仪器与试药

日本岛津 CS-930 薄层扫描仪; 254 nm 紫

Fig 3. Thin layer chromatogram obtained by four times programmed development.

1. origin of Wuweizi alcohol A;
2. origin of sample solution

外分析仪(上海科艺光学仪器厂);PBQ I 型薄层自动铺板器(重庆南岸新力实验电器厂);10 μl 微量点样器(上海医用激光仪器厂);其它试剂同 1.2.1 项下。

1.3.2 薄层色谱与扫描条件

20 \times 20 cm 薄层板铺制 硅胶 GF₂₅₄ 与 0.5% CMC-Na(1:3)调匀后,用自动铺板器铺制,薄层厚度为 0.6 mm,晾干后,105 $^{\circ}\text{C}$ 活化 1 h,置干燥器内备用;展开剂:甲苯-醋酸乙酯(6:4);展开方式:四次程序展开。

薄层扫描条件 223 nm 单波长反射法锯齿形扫描,狭缝:2 \times 2 mm,扫描速度:20 mm/min,灵敏度: $\times 2$ 。

1.3.3 标准曲线绘制

用微量点样器精密吸取五味子醇甲标准液(0.5 mg/ml 的甲醇液)2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 μl 分别于薄层上点样,按上述薄层色谱条件操作,四次展距各为 4、8、12、16 cm,挥去溶剂后,在 254 nm 紫外分析仪下标记斑点(暗斑),进行薄层扫描。以五味子醇甲点样量 $W(\mu\text{g})$ 为横坐标,相应的扫描积分面积 $A(\mu\text{V} \cdot \text{S})$ 为纵坐标,回归得标准曲线: $A = 3.002 \times 10^3 W - 6.191 \times 10^2$, $r = 0.9999$ ($n = 5$),五味子醇甲的线性范围为 1~5 μg 。生脉饮中五味子醇甲的 TLC 分离图见图 3。

1.3.4 回收率试验

精密吸取生脉饮 20.0 ml 4 份置于 4 只 125 ml 分液漏斗中,分别加入不同量的五味子醇甲标准品,按 1.1 项下方法制备回收率测定用样品液。再精密吸取各液 10.0 μl 点样,同时间隔点上标准对照液,按上述“标准曲线绘制”项下方法进行实验。以单点校正法测得的各液中五味子醇甲的浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)为 Y ,加入的标准品浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)为 X ,计算得回归方程。方程中截距为样品液中五味子醇甲的测得浓度,斜率乘以 100 即为回收率^[4],实验数据列于表 1。

1.3.5 样品测定

精密吸取不同批号生脉饮各 20.0 ml,置

Tab 1. Recovery test

Conc. of Wuweizi Alcohol A. $\mu\text{g}/\text{ml}$		Regression equation
Standard Added	Found	
0	124.3	$Y = 9.936 \times 10^{-1} X + 1.264 \times 10^2$ $r = 0.9996$ ($n = 4$)
22.5	149.7	
67.5	195.6	
157.5	281.8	

于分液漏斗中,按“回收率试验”项下方法,但不加五味子醇甲标准溶液,进行样品制备-薄层层析-扫描测定,外标单点校正法测得的含量结果见表 2。

Tab 2. Analysis of samples

Batch No.	Average content, $\mu\text{g}/\text{ml}$	RSD ($n = 3$)
910517-0	5.686	0.16
910517-1	5.701	2.3
910517-2	3.828	3.6
910521	3.260	2.3
910606	4.372	0.77

2 讨论

2.1 样品生脉饮中糖分较多,须经乙醚萃取后,进行薄层分离,方可定量测定五味子醇甲的含量。用乙醚萃取时,振摇操作应轻缓,以避免乳化现象,并待两相完全分层,才分取乙醚萃取液,否则会影响定量结果的准确性。

2.2 生脉饮经乙醚萃取的样品液用 TLC 普通展开方式不能使五味子醇甲与其相邻上、下斑点得到完全分离,采用四次 PMD 分离技术,即可得好的扫描定量结果。但是, PMD 技术的实验操作步骤长,而且实验条件的控制要求又严,所需时间亦长。因此选用 SHL 技术进行试验,结果表明, TLC 中 d 为 2 mm 的 SHL 技术可达相同的分离效能,而 SHL 技术只需一次展开,因而既节省时间,又节省溶剂,更具实用、简便、快速的优点。HPTLC 的 PMD 和 SHL 技术所分离的斑点数多,分离效能亦高,适用于生脉饮中其它有效成分的定量分析。

2.3 PMD 的原理,是依据展开溶剂前沿通过薄层上的斑点时所发生的斑点再浓集现象 (spot reconcentration)^[3]。但实验表明,单向多

次展开的分离效能有最大值,这可能是在数次展开后,薄层活度下降后就不再发生斑点浓集,致使分离效能下降。为了保证分离效能,应进行实验找出最佳的展开次数。

2.4 SHL 技术是利用小孔的间距大小,控制了展开剂展开的速度,展开速度慢,使组分在展开剂和吸附剂之间分配次数增加,理论塔板数增加,而使分离效能提高。但 d 越小,实验操作技能要求越高, d 最小至 2 mm 为宜。

2.5 定量分析采用荧光薄层的优点是斑点分辨率高,较显色剂显色法影响因素少,观察误差小,有利于定量的准确。用 0.5% CMC-Na 溶液制备的薄层板不宜用变色酸硫酸溶液喷洒后烘烤显色,但分离效能与硅胶 G 薄层相近,且利于定量操作。

2.6 薄层色谱点样时,样品原点直径宜小于 3 mm,最好为 2 mm;小孔应圆而净,孔内不能留有残存的硅胶;PMD 技术中,进行下一次展开时,前次薄层上溶剂一定要挥干,展开溶剂须更新,否则要影响分离效能。

致谢 本校分析计算中心杨敬荣同志帮助薄层扫描测定。

参考文献

- 1 朱永新,严克东,涂国土. 生脉散中北五味子有效成分的薄层光密度法测定. 药物分析杂志,1988;8(2):71
- 2 Zhu YX, Yan KD, Wu JM et al. Assay of Lignans of Schizandra chinensis in Sheng Mai San by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr. 1988;438(2):447
- 3 安登魁主编. 药物分析. 济南:济南出版社,1992;371, 402
- 4 刘文英,周 炜,盛龙生等. 离子色谱法同时测定葡萄糖酸钙及其杂质(Cl^- , SO_4^{2-})的含量. 药学学报,1988;23(12):933

Separation Techniques and Quantitative Determination of Wuweizi Alcohol A Contained in Sheng Mai Yin by TLC

Liu Wenying, Zhou Wei, Wu Di, Yin Lan, An Dengkui

Department of Pharmaceutical Analysis

Sheng Mai Yin consisting of *Codonopsis pilosula* Nannf., *Schizandra chinensis* Baill and *Ophiopogon japonicus* Ker-Gawl is widely used in traditional Chinese medicine. The separation efficiency of programmed multiple development (PMD) and small hole in line (SHL) technique in HPTLC and TLC utilized for the separation of Wuweizi alcohol A (Schisandrin), which is one of the active ingredients of lignans of Schizandra chinensis contained in Sheng Mai Yin, has been studied. The SHL technique in TLC is simple, rapid and practical. The method of quantitative determination has been also established by extraction with ether-separation using PMD or SHL technique in silica GF₂₅₄ TLC-densitometry in this paper. The recovery was 99.4% ($n=4$).

Key words Sheng Mai Yin; Wuweizi alcohol A; High performance thin layer chromatography; Thin layer chromatography; Programmed multiple development; Small hole in line technique; Densitometry