

仙茅补肾壮阳有效成分的初步研究及仙茅素 A 的含量测定

张 梅, 宋 芹, 郭 平
(成都中医药大学, 四川 成都 610075)

摘要: 目的 初步研究仙茅补肾壮阳的有效成分,并测定其有效成分仙茅素 A 的含量。方法 采用大孔吸附树脂及反复常压硅胶柱层析分离纯化仙茅乙醇提取物,根据化合物的理化性质和光谱数据进行结构鉴定;采用 HPLC 法测定药材中仙茅素 A 的含量,色谱柱为 Agilent C₁₈ (150 mm ×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈 - 1%磷酸 (21:79),流速 1.0 ml·min⁻¹,检测波长 285 nm。结果 从仙茅中分得 4 个已知化合物,分别为仙茅苷、仙茅苷乙、仙茅素 A 及 2,6-二甲氧基苯甲酸;仙茅素 A 的含量为 0.0084%。结论 所用方法简便、可靠,可用于仙茅药材的质量控制。

关键词: 仙茅;仙茅素 A;补肾壮阳;有效成分;含量测定

中图分类号: R284, R917

文献标识码: A

文章编号: 1006-0103(2007)02-0191-03

The kidney - tonifying and yang - boosting components of *Curculigo orchoides* and content determination of curculigine A by HPLC

ZHANG Mei, SONG Qin, GUO Ping

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate the kidney - yang supplementing components of *Curculigo orchoides* and to establish a method for the content determination of curculigine A. **METHODS** 4 compounds were isolated from the ethanol extracts of rhizomes of *Curculigo orchoides* by means of macroporous resin and silica gel column chromatography. Their chemical structures were elucidated on the basis of their physical and chemical evidences, and the spectra data. The content of curculigine A was determined by HPLC using Agilent C₁₈ column (150 mm ×4.6 mm, 5 μm), acetonitrile - 1% phosphoric acid (21:79) as the mobile phase, and UV 285 nm as the detective wavelength. **RESULTS** 4 known compounds, 2, 6 - dimethoxybenzoic acid, curculigoside, curculigoside B, and curculigine A were isolated. The content of curculigine A in crude *Curculigo* was 0.0084%. **CONCLUSION** This method of content determination is simple and repeatable. This paper has laid a foundation for the quality evaluation on crude *Curculigo*.

Key words: *Curculigo orchoides*; Curculigine A; Kidney - tonifying; Yang - boosting; Component; Content determination

CLC number: R284, R917

Document code: A

Article ID: 1006-0103(2007)02-0191-03

仙茅为石蒜科仙茅属植物仙茅 *Curculigo orchoides* Gaertn 的干燥根茎,味辛、性温,归肾、肝经。具有补肾壮阳、祛风除湿的作用。现在确定仙茅补肾壮阳有效部位的基础上^[1],采用大孔吸附树脂及反复常压硅胶柱层析对该有效部位进行了初步分离,得到 4 个单体成分。通过药效学筛选,确定其中一个单体成分仙茅素 A 具有一定补肾壮阳作用,并采用 HPLC 法测定了仙茅药材中仙茅素 A 的含量。

1 实验部分

1.1 药材、试剂与仪器

仙茅(市售)经成郭平博士鉴定为石蒜科多年生草本植物仙茅 *Curculigo orchoides* Gaertn 的干燥根茎。仙茅素 A 对照品(自制,97.3%);乙腈、甲醇为色谱纯;水为高纯水。1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Bruker Avance 600 核磁共振仪、Bio TOFQ 型 ES 源质谱仪(瑞士 Bruker 公司);

SGWX-4 型熔点测定仪(上海精密科仪有限公司)。

1.2 仙茅补肾壮阳有效成分的初步研究

1.2.1 提取分离 取仙茅药材粗粉,用 80%乙醇于水浴中加热,回流提取,提取液过滤,回收乙醇,将浸膏加适量蒸馏水充分溶解,上大孔吸附树脂柱,反复吸附,大量水洗至澄清后,分别用 20%、40%、60%、95%乙醇洗脱至无色澄清,减压回收溶剂。20%、40%洗脱部位经反复常压硅胶柱层析氯仿 - 甲醇梯度洗脱,得 4 个单体化合物 I ~ IV。

1.2.2 化合物 I 分子式为 C₉H₁₀O₄,无色针晶(乙醚),mp 164°C ~ 165°C。 ¹H NMR (600 Hz, CD₃OD): δ 3.76 (6H, s, 2OCH₃), 6.66 (2H, d, J = 8.5 Hz, H - 3, H - 5), 7.32 (1H, t, J = 8.5 Hz, H - 4)。 ¹³C NMR (600 Hz, CD₃OD): δ 113.68 (C - 1), 156.95 (C - 2), 103.75 (C - 3), 130.94 (C - 4), 103.75 (C - 5), 156.95 (C - 6), 55.11 (OCH₃), 169.00 (-COOH)。以上数据同文献中的 2,6-二甲

作者简介:张梅,女,博士,副教授,从事中药及其复方物质基础及质量标准化的研究。E-mail: zhangmei63@yahoo.com.cn

氧基苯甲酸 (2,6 - dimethoxybenzoic acid) 一致^[2]。

1.2.3 化合物 II 分子式为 $C_{22}H_{26}O_{11}$, 白色针晶 (MeOH), mp 158℃ ~ 160℃。 1H NMR (600 Hz, CD_3OD): δ 3.86 (6H, s, $2OCH_3$), 4.80 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, glc. H - 1), 5.47 (2H, AB, $PhCH_2O$ -), 6.72 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H - 3 和 H - 5), 6.73 (1H, dd, $J = 9.3, 3.1$ Hz, H - 4), 6.96 (1H, d, $J = 3.1$ Hz, H - 6), 7.12 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, H - 3), 7.39 (H, t, $J = 8.4$ Hz, H - 4)。 ^{13}C NMR (600 Hz, CD_3OD): δ 131.18 (C - 1), 152.56 (C - 2), 114.78 (C - 3), 117.48 (C - 4), 148.24 (C - 5) 114.94 (C - 6), 55.10 ($2OCH_3$), 61.79 ($PhCH_2O$ -), 167.16 (C = O), 112.89 (C - 1), 157.38 (C - 2), 103.76 (C - 3), 127.42 (C - 4), 103.76 (C - 5), 157.38 (C - 6), 103.76 (C - 1), 73.62 (C - 2), 76.73 (C - 3), 70.03 (C - 4), 76.66 (C - 5), 61.22 (C - 6)。以上数据同文献中的仙茅苷 (curculigoside) 一致^[2]。

1.2.4 化合物 III 分子式为 $C_{21}H_{24}O_{11}$, 无色针晶 (MeOH), mp 219℃ ~ 222℃。 1H NMR (600 Hz, CD_3OD): δ 3.87 (3H, s, OCH_3), 6.54 (H, d, $J = 8.3$ Hz, H - 3), 7.29 (H, t, $J = 8.3$ Hz, H - 4), 6.50 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H - 5), 5.47 (2H, AB, $PhCH_2O$ -), 7.09 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H - 3), 6.70 (1H, dd, $J = 8.88, 2.9$ Hz, H - 4), 6.98 (1H, d, $J = 2.9$ Hz, H - 6)。 ^{13}C NMR (600 Hz, CD_3OD): δ 133.23 (C - 1), 152.62 (C - 2), 114.82 (C - 3), 117.65 (C - 4), 148.20 (C - 5) 114.82 (C - 6), 55.18 (OCH_3), 62.05 ($PhCH_2O$ -), 169.27 (C = O), 108.80 (C - 1), 159.76 (C - 2), 102.92 (C - 3), 127.37 (C - 4), 102.92 (C - 5), 148.20 (C - 6), 102.21 (C - 1), 73.62 (C - 2), 76.74 (C - 3), 70.03 (C - 4), 76.68 (C - 5), 61.22 (C - 6)。以上数据同文献中的仙茅苷乙 (curculigoside B) 一致^[3]。

1.2.5 化合物 IV 分子式为 $C_{20}H_{28}O_{12}Cl_2$, 白色针晶 (MeOH), mp 206℃ ~ 208℃。 FAB - MS 谱显示准分子离子峰 $[M + Na]^+$ 为 553, $[M + K]^+$ 为 569, 它们的 $M : [M + 2] : [M + 4]$ 的丰度比为 9 : 6 : 1, 示该结构含有两个氯原子。 1H NMR (600 Hz, CD_3OD): δ 2.43 (3H, s, CH_3), 3.92 (3H, s, OCH_3), 4.19 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, glc. H - 1), 5.01 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, glc. H - 1), 7.21 (1H, s, Ar - H)。 ^{13}C NMR (600 Hz, CD_3OD): δ 155.68 (C - 1), 117.42 (C - 2), 136.24 (C - 3), 116.78 (C - 4), 154.20 (C - 5), 103.92 (C - 6), 18.82 (CH_3), 57.55 (OCH_3), 103.92 (C - 1), 75.54 (C - 2), 79.53 (C - 3), 72.18 (C - 4), 78.57 (C - 5), 71.41 (C - 6),

106.54 (C - 1), 76.08 (C - 2), 79.40 (C - 3), 72.53 (C - 4), 79.40 (C - 5), 63.57 (C - 6)。以上数据同仙茅素 A (curculigine A) 一致^[4]。

1.3 仙茅素 A 的含量测定

1.3.1 色谱条件 Agilent C_{18} 色谱柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 - 1% 磷酸 (21 : 79); 流速 1.0 ml $\cdot$ min⁻¹; 柱温 35℃, 检测波长 285 nm。在此条件下, 仙茅素 A 的峰形及分离效果较好。仙茅素 A 及供试品的色谱图见图 1。

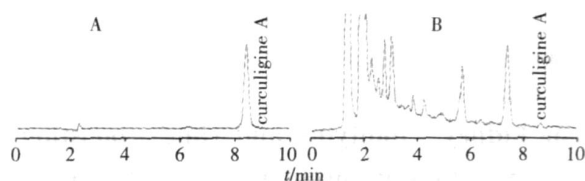


图 1 对照品 (A) 与供试品 (B) 溶液的 HPLC 色谱图

Fig 1 Chromatograms of reference standard solution (A) and sample solution (B)

1.3.2 溶液的制备 精密称取仙茅素 A 对照品适量, 甲醇定容至 10 ml, 即得 0.11 mg $\cdot$ ml⁻¹ 的对照品溶液。取 5 g 仙茅药材粉末 (过 3 号筛), 精密称定, 加甲醇 100 ml, 80℃ 水浴加热回流 2 h, 取出, 放冷, 过滤, 药渣用甲醇洗涤 3 次。合并提取液和洗涤液, 水浴挥干, 残渣加甲醇溶解, 移至 10 ml 量瓶中, 甲醇定容, 摇匀, 微孔滤膜过滤, 即得供试品溶液。

1.3.3 线性关系的考察 精密吸取对照品溶液 2、4、6、8、10 μl 进样, 测定峰面积, 以峰面积值对进样量回归, 得仙茅素 A 标准曲线方程: $A = 25.559C + 1.951$ ($r = 0.9998$)。结果表明, 在 0.22 ~ 1.10 μg 范围内, 峰面积值与进样量的线性关系良好。

1.3.4 精密度的试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μl , 重复进样 5 次, 测定峰面积, 仙茅素 A 峰面积值 $RSD = 2.42\%$ ($n = 5$)。表明仪器精密度的良好。

1.3.5 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液, 在 0、2、4、8、24 h 分别进样 10 μl , 测定峰面积, 其 $RSD = 2.33\%$, 表明样品在 24 h 内稳定性良好。

1.3.6 重复性试验 平行制备 5 份供试品溶液, 按“1.3.8 项”的含量测定方法, 依法检测, 计算仙茅素 A 的含量, $RSD = 3.12\%$, 该方法的重复性较好。

1.3.7 加样回收试验 精密称取 5 g 已知含量的药材粉末, 分别加入对照品溶液 4 ml, 按“1.3.2 项”下方法制备供试品溶液, 进样 10 μl , 测定仙茅素 A 的含量, 计算回收率 (表 1)。

1.3.8 样品的含量测定 精密称取 3 批仙茅药材各约 5 g, 按“1.3.2”“1.3.3 项”下方法制备和测定。3 批样品中仙茅素 A 的含量分别为 0.0083%、0.0087%、0.0083%, 平均 0.0084%。

表 1 回收率测定的结果 (μg, n = 5)

Table 1 Results of recovery test (μg, n = 5)					
Original	Added	Detected	Recovery/%	$\bar{X}$ /%	RSD/%
0.423	0.440	0.871	101.81	100.18	2.33
0.477	0.440	0.915	99.54		
0.415	0.440	0.861	101.36		
0.427	0.440	0.851	96.36		
0.465	0.440	0.913	101.81		

2 讨论

曾采用甲醇 - 1%醋酸、甲醇 - 异丙醇 - 水等流动相系统。当以乙腈 - 1%磷酸 (21: 79)作流动相时,仙茅素 A 的分离效果及峰形较好。对仙茅药材曾采用 80%乙醇提取,所得浸膏上大孔吸附树脂柱,用水和 20%乙醇除杂,60%乙醇洗脱制样。该

法与直接用甲醇提取法比较,提取效率相近,但操作烦琐且极性大的杂质较多,因此,采用甲醇热回流提取制样。

参考文献:

[1] 张梅,宋芹. 仙茅对去势小鼠补肾壮阳作用有效部位研究 [J]. 四川中医, 2005, 23 (5): 22 - 23.

[2] 陈昌祥,倪伟,梅文莉. 仙茅根茎中的配糖体 [J]. 化学研究与应用, 1999, 11 (5): 511 - 512.

[3] 徐俊平,徐任生. 仙茅的苷成分研究 [J]. 药学报, 1992, 27 (5): 353 - 357.

[4] 徐俊平,董家颐. 新化合物仙茅素 A 的分离鉴定 [J]. 中草药, 1987, 18 (5): 194 - 195.

收稿日期: 2006 - 10

高效毛细管电泳法手性拆分盐酸 2 - 氨基萘满对映体

苗文娟¹,王述蓉¹,杨 蕾²,陈应春¹,陈 聪¹,叶利明^{1*}

(1. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041; 2 四川省食品药品检验所, 四川 成都 610036)

摘要: 目的 分离盐酸 2 - 氨基萘满对映体。方法 采用高效毛细管区带电泳法,以高磺化 - β - 环糊精作为手性添加剂,考察了不同环糊精种类、缓冲液 pH、分离电压、温度、进样量、分离模式等对分离效果的影响。结果 采用反相分离模式, PDA 检测器在 190 nm 处检测,温度 25℃,分离电压 - 18 kV, 进样量 0.5 psi,分离度 3.4,检测限 10 μg·mL⁻¹。结论 所用方法可快速有效地分离盐酸 2 - 氨基萘满对映体,且重复性好,可用于其手性拆分及纯度测定。

关键词: 高效毛细管电泳; 盐酸 2 - 氨基萘满对映体; 手性拆分; 高磺化 - β - 环糊精; 反相分离

中图分类号: R914

文献标识码: A

文章编号: 1006 - 0103 (2007) 02 - 0193 - 02

Chiral separation of hydrochloric 2 - aminotetralin enantiomers by HPCE

MIAO Wen - juan¹, WANG Shu - rong¹, YANG Lei², CHEN Ying - chun¹, CHEN Cong¹, YE Li - ming^{1*}

(1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2 Sichuan Provincial Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610036, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To establish an HPCE method for separating hydrochloric 2 - aminotetralin enantiomers **METHODS** The type of CDs, pH values of buffer solution, applied voltage, temperature, injection volume and separation pattern were used **RESULTS** Determination was carried out with a PDA detector at 190 nm. The separation was performed at 25℃, with a negative voltage of - 18 kV. Samples were injected at 0.5 psi for 3 s. Two enantiomers were separated at baseline level rapidly, with a resolution reached to 3.4. The method detection limit was 10 μg·mL⁻¹. **CONCLUSION** Capillary zone electrophoresis with HS - β - CD as chiral selector can separate the hydrochloric 2 - aminotetralin enantiomers fast. The effective method could be used for the chiral separation and the purity determination of hydrochloric 2 - aminotetralin enantiomers.

Key words: HPCE; Hydrochloric 2 - aminotetralin enantiomers; Chiral separation; HS - β - CD; Negative voltage separation

CLC number: R914

Document code: A

Article ID: 1006 - 0103 (2007) 02 - 0193 - 02

高效毛细管电泳法 (HPCE) 以其高效、快速、灵敏、经济等优点,应用于各种药物对映体的分离。高磺化 - β - 环糊精 (HS - β - CD) 在电场中本身具有迁移能力,与手性分子的包合作用可带动手性分子

在电场中迁移,同时获得手性拆分^[1]。2 - 氨基萘满为多巴胺 D₃ 受体配体的中间体,可立体选择性作用于多巴胺类物质^[2]。为此,特考察了盐酸 2 - 氨基萘满对映体的毛细管电泳分离,且未见文献报道。

作者简介: 苗文娟 (1983 -), 正攻读药物分析专业的硕士学位。

* 通讯作者 (Correspondent author), E - mail: dryelim@sohu.com