

金铁锁中 3-O-6'-O-甲基-β-D-葡萄糖醛酸丝石竹苷的含量测定

秦学玲^{1,2}, 杨崇仁³, 杨庆雄¹, 钱子刚^{2,3*}, 杨璐璐⁴¹云南云药实验室有限公司, 昆明 650031; ²云南中医学院, 昆明 650200;³中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204; ⁴成都军区昆明总医院, 昆明 650032)

摘要 目的: 研究金铁锁提取物中 3-O-6'-O-甲基-β-D-葡萄糖醛酸丝石竹苷的含量测定方法。方法: 金铁锁根粉乙醇提取, 经大孔吸附树脂、硅胶及 RP-C₈、RP-C₁₈ 反相硅胶反复柱层析, 根据化合物的理化性质和光谱数据鉴定结构; HPLC 法对其含量及纯度进行测定; 色谱柱为 Lichrospher[®] 100 RP-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液, 梯度: 0~5 min, 乙腈 15%~20%; 5~55 min, 乙腈 20%~55%; 55~65 min, 乙腈 55%~85%; 65~90 min, 乙腈 85%。检测波长 210 nm, 流速 0.5 mL/min, 柱温 30 °C。结果: 所制备的 3-O-6'-O-甲基-β-D-葡萄糖醛酸丝石竹苷的纯度为 98.38%。对金铁锁原药材进行含量测定, 含量为 3.75%, 线性范围 0.615~3.712 μg ($r=0.9997$), 平均加样回收率 100.4%, RSD 为 0.69% ($n=6$)。结论: 该法灵敏、准确可靠, 制得的化合物可作为衡量金铁锁提取物质量的依据。

关键词 金铁锁; HPLC; 3-O-6'-O-甲基-β-D-葡萄糖醛酸丝石竹苷

中图分类号 TQ460.72 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2006)06-0516-03

Determination of 3-O-6'-O-methyl-β-D-glucuronopyranoside of gypsogenin in *Psammosilene tunicoides*QIN Xue-ling^{1,2}, YANG Chong-ren³, YANG Qing-xiong¹, QIAN Zi-gang^{2,3}, YANG Lu-lu⁴¹Yunnan Yunyao Lab Co., Ltd., Kunming 650031; ²Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650200;³Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204;⁴Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming 650032, China

Abstract Aim: A oleanane acid tetraterpene glucoside compound: 3-O-6'-O-methyl-β-D-glucuronopyranoside of gypsogenin in *Psammosilene tunicoides* Wu WC et Wu CY was provided to measure the quality of extractive in *Psammosilene tunicoides*, and meanwhile to determine its content and purity by HPLC. **Methods:** The roots of *Psammosilene tunicoides* was extracted with EtOH, the concentrated extract was dissolved in water, and the solution was repeatedly subjected to DM-101 column chromatography, silica-gel column chromatography and RP-C₈, RP-C₁₈ column chromatography. Structural identification of the compounds were based on physic-chemical properties and spectral data analysis (FAB-MS, ¹H NMR, ¹³C NMR); the content and purity was determined by HPLC. Column: Lichrospher[®] 100 RP-18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), mobile phase: acetonitrile-0.1% phosphoric acid (15:85……80:20), detect wavelength: 210 nm, flow rate: 0.5 mL/min, the column temperature: 30 °C. **Results:** 3-O-6'-O-Methyl-β-D-glucuronopyranoside of gypsogenin was obtained by this method, which purity is 98.19% and the content is about 3.75%. Linear periods is from 0.615 μg to 3.712 μg ($r=0.9997$). The average recovery was 100.358%. RSD was 0.69% ($n=5$). **Conclusion:** The result was precise, reliable and sensitive. The compound is suitable to the quality control of extractive in *Psammosilene tunicoides*.

Key words *Psammosilene tunicoides*; HPLC; 3-O-6'-O-methyl-β-D-glucuronopyranoside of gypsogenin

This study was supported by the Natural Science Foundation of Yunnan Province (No. 2002C0054M) and the Middle-age and Youth Pioneer and Reserves of Science and Technology of Yunnan Province (No. 2004PY-18)

收稿日期 2006-06-20 * 通讯作者 Tel: 0871-6212608 Fax: 0871-6212252 E-mail: qianzig@yahoo.com.cn

基金项目 云南省自然科学基金资助项目 (No. 2002C0054M); 云南省中青年学术技术带头人后备人才资助项目 (No. 2004PY-18)

金铁锁为石竹科(Caryophyllaceae)金铁锁属植物金铁锁 *Psammosilene tunicoides* Wu WC et Wu CY 的根,是我国特有单种属药用植物,具散瘀止痛,祛风除湿、攻痈排脓等功效^[1,2]。药理学研究证明金铁锁总苷具有显著的镇痛、抗炎、促进和调节小鼠细胞免疫功能等作用^[3,4]。在中药制剂中,常用金铁锁与其他中药配伍使用。3-O-6'-O-甲基-β-D-葡萄糖醛酸丝石竹苷在金铁锁总苷中含量较高,是其有效成分。本文采用 HPLC 法对金铁锁提取物中 3-O-6'-O-甲基-β-D-葡萄糖醛酸丝石竹苷的含量进行测定。

1 材料

1.1 仪器和试剂

LC-2010A 高效液相色谱仪,CLASS-VP 色谱工作站(日本岛津公司);DM-101 型大孔吸附树脂(40~60目,天津骨胶厂);硅胶板(50 mm×100 mm,厚度:0.20~0.25 mm,青岛海洋化工厂);柱层析硅胶(300~400目,青岛市市北区海化干燥剂厂);反相柱填料 RP-C₈、RP-C₁₈(青岛海洋化工厂)。其他试剂均为色谱纯或分析纯。

1.2 试药

金铁锁药材经云南中医学院钱子刚教授鉴定为石竹科(Caryophyllaceae)金铁锁属植物金铁锁 *Psammosilene tunicoides* Wu WC et Wu CY 的干燥根。对照品化合物:3-O-6'-O-甲基-β-D-葡萄糖醛酸丝石竹苷自制。

2 方法与结果

2.1 3-O-6'-O-甲基-β-D-葡萄糖醛酸丝石竹苷的分离

金铁锁根粉经乙醇提取,提取物溶于水,经大孔吸附树脂柱层析(80%乙醇洗脱);硅胶层析[氯仿-甲醇-水(10:2:0.1→6:5:1)梯度洗脱]及 RP-C₈、RP-C₁₈反相硅胶柱层析,30%~85%甲醇溶液梯度洗脱层析,通过 HPLC、TLC 检测, FAB-MS、¹H NMR、¹³C NMR 等方法对其结构进行鉴定^[5,6],最后分离纯化得到 3-O-6'-O-甲基-β-D-葡萄糖醛酸丝石竹苷。

2.2 含量测定条件

色谱柱:Lichrospher[®] 100 RP-C₁₈柱(250 mm×

4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸水溶液 0~5 min 乙腈 15%~20%;5~55 min,乙腈 20%~55%;55~65 min,乙腈 55%~85%;65~90 min,乙腈 85%。检测波长 210 nm;流速 0.5 mL/min;柱温 30 ℃。

2.3 方法学考察

2.3.1 溶液的制备

对照品溶液的制备 精密称量 3-O-6'-O-甲基-β-D-葡萄糖醛酸丝石竹苷 3.116 mg 于 10 mL 量瓶中,甲醇定容,制得浓度为 0.306 0 mg/mL 对照品溶液,备用。

供试品溶液的制备 取金铁锁根粉 50 g,用 80%乙醇提取,过滤,浓缩成浸膏。加水混悬,过滤,滤液经大孔吸附树脂柱层析,分别用 0%、10%、20%、80%乙醇依次洗脱,收集 80%乙醇洗脱液减压浓缩后喷雾干燥得金铁锁提取物。精密称量金铁锁提取物 66.44 mg 于 10 mL 量瓶中,80%甲醇定容,制得浓度为 6.644 mg/mL 的供试品溶液,备用。

2.3.2 线性关系的考察 精密吸取上述制备的对照品溶液 2,4,6,8,10,12 μL 进样,按上述色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,以对照品进样量为横坐标,绘制标准曲线,回归方程为 $Y = 5.3528 \times 10^5 X - 8.936 \times 10^4$, $r = 0.9997$,线性范围:0.52~3.67 μg。

2.3.3 精密度及稳定性试验 精密吸取上述制备的同一供试品溶液 10 μL,连续进样 5 次,测得峰面积相对标准偏差(RSD,%)为 0.97~1.22;保留时间 RSD(%)为 0.014~0.36。

取上述制备的供试品溶液,室温放置,在上述色谱条件下于 0,2,4,6,8,12 h 分别进样,测得峰面积 RSD(%)为 0.93~1.53,证明供试品在 12 h 内稳定。

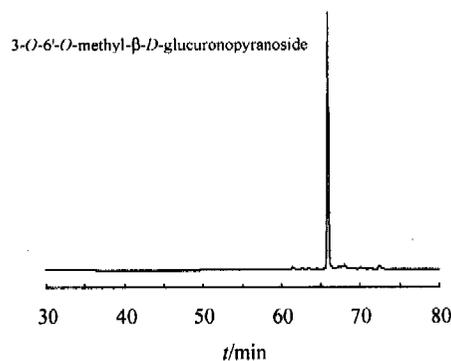
2.3.4 回收率试验 精密称取上述已制备好供试品 0.247 0 g,分别加对照品各 0.093 g 做回收率试验,结果见表 1。平均回收率为 100.4%,RSD 为 0.69%。

2.4 纯度及含量测定

2.4.1 纯度测定 在方法学考察的基础上,运用上述测试条件对 3-O-6'-O-甲基-β-D-葡萄糖醛酸丝石竹苷的纯度进行了测定,其纯度为 98.38%(见图 1)。

Tab.1 Results of recovery test ($n = 6$)

Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)	Average recovery (%)	RSD (%)
0.093	0.094 0	101.1		
0.093	0.093 6	100.6		
0.093	0.093 9	101.0	100.4	0.69
0.093	0.092 3	99.25		
0.093	0.092 9	99.89		
0.093	0.093 3	100.3		

Fig.1 HPLC of 3-O-6'-O-methyl- β -D-glucuronopyranoside of gypsogenin

2.4.2 含量测定 取不同批次的金铁锁原药材,在对照品 3-O-6'-O-甲基- β -D-葡萄糖醛酸丝石竹苷自制的基础上,采用前述测定方法对不同批次的金铁锁原药材中 3-O-6'-O-甲基- β -D-葡萄糖醛酸丝石竹苷的含量进行测定,其含量 (%) 分别为 4.24, 3.75, 2.30, 1.70。

3 讨论

金铁锁总苷的成分较为复杂,3-O-6'-O-甲基- β -D-葡萄糖醛酸丝石竹苷在金铁锁总苷中含量较高,其结构特征能代表总苷的特点,本文选其为标志性成分,并采用 HPLC 法对金铁锁提取物中 3-O-6'-O-甲基- β -D-葡萄糖醛酸丝石竹苷含量及纯度进行测定,为金铁锁提取物质量控制提供依据。

参考文献

- [1] 中国医学科学院药物研究所. 中药志[M]. 北京:人民卫生出版社,1979:471.
- [2] 兰茂(Lan M). 滇南本草[M]. 昆明:云南人民出版社,1976:86.
- [3] 许建阳(Xu JY),王发强(Wang FQ),郑维发(Zheng WF),等. 金铁锁水煎浸膏对实验性类风湿关节炎镇痛作用的研究[J]. 武警医学(*Med J Chin PAPF*),2003,14(10):589-591.
- [4] 郑维发(Zheng WF),石枫(Shi F),王莉(Wang L),等. 金铁锁总苷对小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 武警医学(*Med J Chin PAPF*),2003,14(10):598-602.
- [5] 钟惠民(Zhong HM),华燕(Hua Y),倪伟(Ni W),等. 金铁锁的两个新三萜皂苷[J]. 云南植物研究(*Acta Bot Yunnan*),2003,25(3):361-365.
- [6] 钟惠民(Zhong HM),倪伟(Ni W),华燕(Hua Y),等. 金铁锁的新三萜皂苷[J]. 云南植物研究(*Acta Bot Yunnan*),2002,24(6):781-786.

· 征订启事 ·

欢迎订阅《中国药科大学学报》校庆 70 周年学术论文集

为庆祝中国药科大学建校 70 周年暨《中国药科大学学报》创刊 50 周年,《中国药科大学学报》编辑部特邀校内外知名药学界专家教授以及校友为本刊撰稿,目前该论文集已经正式出版发行。《中国药科大学学报》校庆 70 周年学术论文集(2006 年专刊)收录了药物化学、天然药物化学、中药学、生药学、药剂学、药理学、药物分析、生化药学、药理学、药物代谢动力学、医药经济学以及部分交叉学科等多方面的最新研究进展,不少论著是知名专家教授、编委以及校友多年来科研工作的总结,对药学工作者开拓思路,追踪观察学科动向,具有很高的参考价值。

学术论文集为 A4 开本,203 页,印刷精美,定价:60 元(含邮资)。校庆活动结束后尚有少量余书,限量发行,预购从速。

从邮局汇款者,请汇至:南京市童家巷 24 号,《中国药科大学学报》编辑部;邮政编码:210009。

从银行汇款者,请汇入:

中国药科大学(28),开户银行:南京工行湖南路分理处,

帐号:4301011019001029831。

电话:025-83271566;传真:025-83271279

联系人:顾凯; 电子信箱:cpixuebao@sohu.com

(本刊编辑部)