

树豆萜类化合物 longistylin A 和 longistylin C 的检测

王达武¹, 肖敏勋¹, 李宜融^{1, 2}, 沈小玲¹, 卢元媛¹, 刘抗伦¹, 李正红³, 胡英杰^{1*}

(1. 广州中医药大学 热带医学研究所 药学研究室, 广东 广州 510405;

2. 国立中医药研究所 中药标本馆, 台湾 台北;

3. 中国林业科学研究院 资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224)

[摘要] 目的: 建立以药物活性和专属性萜类成分 longistylin A 与 longistylin C 为评价指标的树豆(木豆)药材质量控制方法。方法: 采用硅胶柱色谱分离纯化有关成分, 光谱技术鉴定化学结构; 反相高效液相色谱法测定指标成分的含量。结果: 从树豆叶分离鉴定了2种指标成分 longistylin A 和 longistylin C; 采用 Thermo BDS Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-水(80:20)为流动相可使指标成分获得良好分离; longistylin A 和 longistylin C 分别在 0.002 88 ~ 0.057 6 μg 和 0.011 2 ~ 0.224 μg 呈良好的线性关系, 平均回收率分别为 98.9%、97.2%, RSD 分别为 2.4%、2.2%。结论: 建立了以树豆叶中药物活性萜类成分为指标的药物分析方法, 可用于树豆(木豆)药材的质量控制。

[关键词] 树豆; longistylin A; longistylin C; 结构鉴定; 高效液相色谱

树豆 *Cajanus cajan* (L.) Millsp. 是一种豆科灌木, 又名木豆、鸽子豆、柳豆等, 起源于南亚印度半岛, 在我国云南、海南、广东及台湾等地区均有广泛栽培^[1]。叶有抑菌消炎、清热解毒、祛腐生肌等作用^[2]; 国内用含有木豆叶提取物的药物治疗股骨头坏死取得了较好疗效^[3]。树豆叶主要含有 longistylin A、longistylin C 等萜类(stilbenes)化合物, 以及以牡荆苷、异美五针松双氢黄酮等黄酮类成分^[4-5]。Longistylin A 和 longistylin C 是仅存在于 *Lonchocarpus longistylus* 和树豆等少数几种豆科植物的特征化学成分。中国医学科学院研究发现, 含有 longistylin A、longistylin C 等萜类化合物的树豆叶脂溶性部位具有显著降低高脂模型小鼠体重、血清总甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)以及低密度脂蛋白胆固醇的水平, 减少肝脏 TG 和 TG 蓄积等作用^[6]; 国外学者报道 longistylin A 和 longistylin C 具有显著的体外抗恶性疟原虫的作用^[7]。鉴于 longistylin A、longistylin C 是药用植物树豆的专属性成分, 又是药材的药物活性成分, 值得将其作为药材质量控制的有效成分指标。本文介绍了对 longistylin A 和

longistylin C 的分离鉴定, 高效液相色谱(HPLC)技术建立含量测定方法, 以及对不同产地药材进行检测分析的结果。

1 材料

紫外光谱 TU-1901 紫外-可见分光光度计测定; 红外光谱美国 ANALECT RFX65A 型光谱仪测定; 质谱 API 2000 质谱仪测定; 核磁共振谱 Bruker DRX-400 仪测定, TMS 为内标。Dionex 高效液相色谱仪, P680 输液泵, UVD170U 紫外检测器, ASI-100 自动进样器, TCC-100 柱温箱, Chromeleon 色谱工作站; BS224S 电子分析天平(Sartorius); KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器公司); 硅胶 TLC 板、柱色谱硅胶(青岛海洋化工厂); TLC 显色剂: 3% 香草醛-6% 高氯酸溶液(取 6% 香草醛乙醇液与 12% 高氯酸水液等体积混合); 甲醇为色谱纯(Dikma 公司, 其他试剂均为分析纯)。采集的树豆样品由植物学研究员李正红鉴定为豆科植物 *C. cajan*。

2 对照品分离鉴定

树豆叶 2.0 kg 用 95% 乙醇加热回流提取 3 次, 合并提取液, 减压回收乙醇, 使残留物混悬于水中, 依次加石油醚、二氯甲烷、醋酸乙酯和正丁醇提取, 各提取液减压浓缩, 得石油醚、二氯甲烷、醋酸乙酯和正丁醇部位。取二氯甲烷提取物行硅胶柱色谱, 在硅胶 TLC 监测下, 依次用石油醚-丙酮(100:0 ~ 50:50, 下同)洗脱, 合并相同组成部分。在 90:10 和 80:20 洗脱部分分别析出粗晶, 经石油

[稿件编号] 20101220006

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-436)

[通信作者] * 胡英杰, 研究员, 博士生导师, Tel: (020) 36585143, Fax: (020) 86373516, E-mail: yjhu01@126.com

[作者简介] 王达武, 硕士研究生, E-mail: dwwang66@163.com

醚-二氯甲烷重结晶得1(3.06 g)和2(0.32 g)。

化合物1 $C_{20}H_{22}O_2$; 白色针状结晶, 易溶于氯仿、微溶于甲醇; 与 $FeCl_3$ 反应呈黄色。EI-MS m/z 294 (M^+), 279, 251, 226, 203, 188, 162, 77。IR ν_{max}^{KBr} : 3 303, 3 057, 3 022, 2 959, 2 924, 1 630 (w), 1 595, 1 461, 1 433 cm^{-1} 。 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 Hz) δ : 7.47 (2H, d, H-2', 6', $J=7.5$ Hz), 7.35 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-3', 5'), 7.26 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-4'), 7.32, 6.92 (各1H, d, $J=16$ Hz, H-7, 8), 6.68, 6.36 (各1H, d, $J=2.5$ Hz, H-4, 6), 5.10 (1H, t, $J=7.0$ Hz, H-2''), 4.87 (1H, m, OH), 3.78 (3H, s, OCH₃), 3.41 (2H, d, $J=7$ Hz, H-1''), 1.67, 1.76 (各3H, s, 4'', 5''-CH₃); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 Hz) δ : 137.5 (C-1), 121.1 (C-2), 158.5 (C-3), 98.5 (C-4), 154.3 (C-5), 104.1 (C-6), 123.4 (C-7), 127.9 (C-8), 137.9 (C-1'), 126.5 (C-2', C-6'), 128.8 (C-3', C-5'), 126.4 (C-4'), 24.1 (C-1''), 123.4 (C-2''), 130.9 (C-3''), 15.7 (C-4''), 17.9 (C-5''), 55.7 (OMe)。

化合物2 $C_{20}H_{22}O_2$; 白色针状结晶, 易溶于氯仿、丙酮, 微溶于甲醇; 与 $FeCl_3$ 反应呈黄色。MS m/z 294 (M^+), 279, 239, 226, 209, 178, 165, 152, 128, 115, 91, 77。IR ν_{max}^{KBr} : 3 557, 3 022, 2 966, 2 924, 2 853, 1 581, 1 510, 1 454 cm^{-1} 。 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 Hz) δ : 7.50 (2H, d, $J=7.5$ Hz, H-2', 6'), 7.35 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-3', 5'), 7.25 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-4'), 7.04, 7.00 (各1H, d, $J=16.5$ Hz, H-7, 8), 6.65, 6.63 (各1H, d, $J=1.5$ Hz, H-2, 6), 5.29 (1H, s, OH), 5.24 (1H, t, $J=7$ Hz, H-2''), 3.87 (3H, s, OCH₃), 3.41 (2H, d, $J=7$ Hz, H-1''), 1.81, 1.74 (各3H, s, 4'', 5''-CH₃); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 Hz) δ : 136.6 (C-1), 101.6 (C-2), 158.1 (C-3), 115.0 (C-4), 155.5 (C-5), 107.1 (C-6), 128.4 (C-7), 127.6 (C-8), 137.3 (C-1'), 126.5 (C-2', C-6'), 128.7 (C-3', C-5'), 128.7 (C-4'), 22.4 (C-1''), 121.9 (C-2''), 134.4 (C-3''), 25.8 (C-4''), 17.9 (C-5''), 55.8 (OMe)。

化合物1和2与树豆中已分离出的单体 longistylin C (2-异戊烯基-3-甲氧基-5-羟基蔗) 和 longistylin A (4-异戊烯基-3-甲氧基-5-羟基蔗) 的光谱数据相一致^[4] 故分别鉴定为 longistylin C 和 longistylin A。经 HPLC (面积归一化法) 测定, 纯度均为 99%。

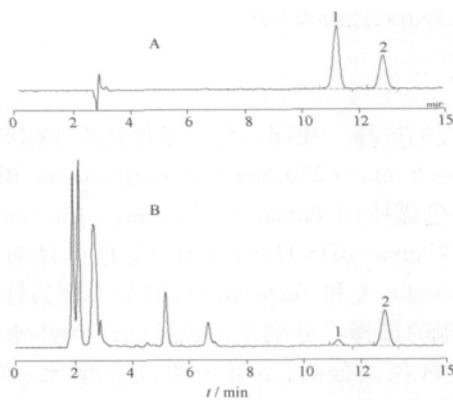
3 方法

3.1 对照品溶液 精密称取2种对照品适量, 加甲醇溶解并配制成 $0.1 g \cdot L^{-1}$ 的 longistylin A 与 longistylin C 对照品溶液。

3.2 混标溶液 精密吸取 longistylin A 对照品溶液 1 mL, longistylin C 对照品溶液 2.5 mL, 加甲醇稀释并定容至 25 mL, 摇匀, 即得 (longistylin A $0.004 g \cdot L^{-1}$, longistylin C $0.010 g \cdot L^{-1}$)。

3.3 供试品溶液 取树豆样品粉末 (过 40 目筛) 约 0.4 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇约 80 mL, 超声 30 min, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 用微孔滤膜 ($0.45 \mu m$) 滤过, 即得。

3.4 色谱条件 Thermo BDS Hypersil C₁₈ 色谱柱 ($4.6 mm \times 250 mm, 5 \mu m$), 流动相为甲醇-水 (80:20), 检测波长 306 nm, 流速 $1 mL \cdot min^{-1}$, 柱温 $30^\circ C$ 。此条件下 longistylin A 与 longistylin C 分离度较好, 并与其他组分达到基线分离, 见图 1, 理论塔板数不低于 3 000。



1. longistylin A; 2. longistylin C; A. 对照品; B. 4号药材样品。

图1 树豆药材相关 HPLC 图

3.5 线性关系考察 取 3.2 项下混标溶液, 进样 1, 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 20 μL , 测定, 以峰面积为纵坐标 (Y), 对照品量 (μg) 为横坐标 (X) 绘制标准曲线, 分别得 longistylin A 回归方程 $Y = 155.3X + 0.1695$, $r = 0.9998$, longistylin A 在 $0.00288 \sim 0.0576 \mu g$ 呈良好的线性关系; longistylin C 回归方程 $Y = 81.615X + 0.0766$, $r = 0.9999$, longistylin C 在 $0.0112 \sim 0.224 \mu g$ 呈良好的线性关系。

3.6 精密度试验 精密吸取对照品溶液, 重复进样

6次, longistylin A和longistylin C峰面积的RSD分别为0.88%、1.1%。

3.7 重复性试验 取4号药材,按3.3项方法配制5份供试品溶液。进样测定,测得longistylin A和longistylin C平均质量分数为0.028%、0.27%,RSD为1.9%、2.2%。结果表明重复性良好。

3.8 稳定性试验 取4号药材,按3.3项方法配制5份供试品溶液,分别于0、2、4、6、8、24 h进样10 μL, longistylin A和longistylin C峰面积的RSD分别为1.3%、2.7%,表明样品中longistylin A和longistylin C在24 h内稳定。

3.9 加样回收试验 取4号药材,精密称取9份,各0.2 g,分别置100 mL量瓶中,精密加入longistylin A对照品溶液(0.072 g·L⁻¹) 0.20、0.25、0.30 mL; longistylin C对照品溶液(0.532 g·L⁻¹) 0.80、1.00、1.20 mL,每个浓度3份;照3.3方法配制供试品液,进样10 μL,计算加样回收率, longistylin A和longistylin C平均回收率分别为98.9%、97.2%; RSD分别为2.4%、2.2%。

3.10 含量测定 取不同产地的树豆叶药材,按3.3项方法配制供试品溶液(n=2),分别进样10 μL,测定,结果见表1。

表1 不同产地、采收时间树豆叶样品中longistylin A和longistylin C的质量分数

No.	样品	产地	longistylin A/%	longistylin C/%
1	树豆叶(灰豆)	台湾台东	0.028	0.287
2	树豆叶(黑豆)	台湾台东	0.028	0.244
3	树豆叶	海南乐东	0.084	0.281
4	树豆叶	云南鹤庆	0.029	0.271
6、105	树豆枝叶	云南文山	2010-08	0.011
6	树豆叶	云南元谋	0.073	0.265
2	树豆叶	云南弥渡	0.058	0.368

注:药材采集时间为2010年5月。

4 讨论

4.1 色谱柱的选择 在同一色谱条件比较ECOSIL C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm)和Thermo BDS Hypersil C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm)的分离效果,以Thermo BDS HYPERSIL C₁₈色谱柱对蔗糖类成分longistylin A和longistylin C的分离度为佳。

4.2 流动相的选择 分别采用乙腈-水、甲醇-水作为流动相进行色谱分离,结果表明以甲醇-水(80:20)的分离效果为佳。

4.3 检测波长 longistylin A和longistylin C对照品的流动相溶液经紫外-可见光全波长扫描,在306 nm处有最大吸收,故选择在该波长处测定。

本文首次以树豆专属性蔗糖类药物活性成分longistylin A和longistylin C为指标,建立药材的定性定量质量控制方法。所建立的定量分析方法具有简便、快速、准确、重复性好等特点。实验结果,各地药材均以longistylin C为主成分,含量是longistylin A的3~10倍;不同来源的样品含量有一定差异;这

2种成分主要存在于叶片中,含枝条较多的样品(如5号)就只能测得较低含量的longistylin A和longistylin C。

【参考文献】

- [1] 中科院植物研究所. 中国高等植物图鉴. 第2册[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 504.
- [2] 袁浩, 姚伦龙, 陈隆宽, 等. 柳豆叶用于感染创面546例疗效观察[J]. 中西医结合杂志, 1984, 4(6): 352.
- [3] 罗文正, 刘红, 郑稼, 等. 木豆叶总黄酮对股骨头坏死大鼠的作用及机制研究[J]. 中国药师, 2009, 12(7): 857.
- [4] 陈迪华, 李慧颖, 林慧. 木豆叶的化学成分研究[J]. 中草药, 1985, 16(10): 2.
- [5] 林励, 谢宁, 程紫骅. 木豆黄酮类成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 1999(30): 21.
- [6] 骆庆峰, 孙兰, 斯建勇, 等. 木豆叶蔗糖类提取物对高脂模型小鼠血脂和肝脏胆固醇的降低作用[J]. 药学学报, 2008, 43(2): 145.
- [7] Duker Eshun G, Jaroszewski J W, Asomaning W A, et al. Antiplasmodial constituents of *Cajanus cajan* [J]. Phytother Res, 2004, 18(2): 128.

Determination of longistylin A and longistylin C in *Cajanus cajan*

WANG Dawu¹, XIAO Minxun¹, LI Yirong^{1,2}, SHEN Xiaoling¹, LU Yuanyuan¹, LIU Kanglun¹, LI Zhenghong³, HU Yingjie^{1*}

(1. Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. Herbarium of National research Institute of Chinese Medicine, Taipei, China;

3. Institute of Resources Insects of the Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, China)

[Abstract] **Objective:** To establish quality control criteria for medicinal herb *Cajanus cajan* based on the determination of longistylin A and longistylin C, two bioactive and specific stilbenes of the plant. **Method:** Longistylin A and longistylin C were obtained from the leaves of *C. cajan* by silica gel column chromatography and identified as marker compounds of this plant by spectroscopic analysis. A RP-HPLC method was established to determine the two compounds. **Result:** Longistylin A and longistylin C were well separated on a Thermo BDS Hypersil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mobile phase methanol-water (8:2), and showed good linearity in the range of 0.002 88-0.057 6 μg and 0.011 2-0.224 μg, respectively. The average recoveries were 98.9% and 97.2% with RSD of 2.4% and 2.2% for these two compounds, respectively. **Conclusion:** The established analysis method is simple and accurate, which can be used for quality control of *C. cajan*.

[Key words] *Cajanus cajan*; longistylin A; longistylin C; structural identification; HPLC

doi: 10.4268/cjmm20111916

[责任编辑 丁广治]