

阳桃根中苯醌类化合物的分离鉴定与含量测定

温庆伟, 陈春霞, 梁杏梅, 徐小惠, 黄仁彬*
(广西医科大学药理学教研室, 南宁 530021)

[摘要] **目的:** 研究阳桃根(ACLR)中苯醌类化学成分的类型及含量测定方法。**方法:** 利用色谱分离法、核磁共振技术对阳桃根药材60%乙醇提取物中的环己烷萃取部位进行分离、鉴定, 并应用HPLC法对药材中的苯醌类化学成分进行含量测定。**结果:** 分离得到2个苯醌类化合物: 2-methoxy-6-nonyl-cyclohexa-2, 5-diene-1, 4-dione (MNDD); 2-dodecyl-6-methoxy-cyclohexa-2, 5-diene-1, 4-dione (DMDD); MNDD, DMDD分别在0.177~2.657 μg 和0.094~1.416 μg 进样量与峰面积有良好的线性关系; 平均加样回收率为98.96% (RSD 1.59%), 99.55% (RSD 0.98%)。**结论:** 首次从植物中分离得到2个苯醌类化合物; HPLC测定方法简便、快速、稳定、准确可靠、重复性好, 可用于阳桃根药材中MNDD, DMDD的质量控制。

[关键词] 阳桃根; 苯醌类化合物; 分离鉴定; 2-methoxy-6-nonyl-cyclohexa-2, 5-diene-1, 4-dione (MNDD); 2-dodecyl-6-methoxy-cyclohexa-2, 5-diene-1, 4-dione (DMDD)

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0070-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110070

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140324.1609.024.html>

[网络出版时间] 2014-03-24 16:09

Isolation, Identification and Determination for Benzoquinone Compounds from *Averrhoa carambola* Root

WEN Qing-wei, CHEN Chun-xia, LIANG Xing-mei, XU Xiao-hui, HUANG Ren-bin*
(Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To isolate and identify the benzoquinone compounds from *Averrhoa carambola* root (ACLR) and establish its HPLC determination method. **Method:** The cyclohexane fraction of 60% ethanol extract of the herb was separated by the repeated silica gel column, and identified by $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC and FTIR, etc. And the determination method of benzoquinone compound isolated from ACLR was established by HPLC. **Result:** Two benzoquinone compounds were isolated from ACLR, namely 2-methoxy-6-nonyl-cyclohexa-2, 5-diene-1, 4-dione (MNDD), 2-dodecyl-6-methoxy-cyclohexa-2, 5-diene-1, 4-dione (DMDD). MNDD and DMDD had a good linear relationship between sample size and peak area at the range of 0.177-2.657 μg and 0.094-1.416 μg , and their average recovery were 98.96% (RSD 1.14%) and 99.55% (RSD 0.98%), respectively. **Conclusion:** The two benzoquinone compounds were separated for the first time from plants. And the HPLC determination method can used for ACLR quality control for its convenience, rapidity, stability, accuracy, reliability and good reproducibility.

[Key words] *Averrhoa carambola* root; benzoquinone compound; isolation and identification; determination method

[收稿日期] 20130906(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160533, 81360129)

[第一作者] 温庆伟, 高级工程师, 博士, 从事药效物质基础研究, Tel: 0771-3218026, E-mail: wqw760623@163.com

[通讯作者] * 黄仁彬, 教授, 博士生导师, 从事生化药理学研究, Tel: 0771-5339805, E-mail: huangrenbin518@163.com

阳桃根为酢浆草科植物阳桃的干燥根(亦称“杨桃根”),分布于云南、广东、广西及台湾地区,马来西亚等国家也有分布^[1-2],在《广西本草选编》、《全国中草药汇编》等均有收录。本课题组前期研究证实其醇提取物、水提取物中的多糖等均具有明显降低动物血糖水平、抗氧化等作用^[3-5]。我们从化学成分预试验结果发现:其石油醚提取液的醋酐/三氯甲烷-浓硫酸反应明显,推测可能与其含有较大的甾体、三萜或苯醌类化学成分有关^[6]。

为了证实这个推测,本文对阳桃根药材 60% 乙醇提取物的化学成分进行分离、鉴定,并测定其含量,详细方法与结果如下。

1 材料

1.1 药材 阳桃根 *Averrhoa carambola* L. 在 2010 年 6 月收集于广西灵山县,经过广西中医药研究院赖茂祥教授鉴定,晒干,粉碎。

1.2 仪器与试剂 CAMAG Linomat 5 型半自动点样仪、Reprostar 3 型薄层色谱仪(瑞士);红外光谱仪(PE,美国);Bruker AV-600 型核磁共振仪(TMS 内标,德国),¹H-和¹³C-NMR 谱分别在 600, 150 MHz 条件下测定;X-5 型熔点测定仪(北京);柱层析硅胶(200~300 目,青岛)。

安捷伦 1100 系列 HPLC(VWD 检测器,美国),UV-3101PC 型紫外-可见光分光光度计(SHIMADZU,日本),GR-202 型电子天平(日本艾安得),KQ-500DE 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司),Millipore 超纯水机(Academic,美国)。甲醇为色谱纯(Merck,德国),水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

1.3 分离步骤 取阳桃根粗粉 12 kg,加 8 倍量 60% 乙醇,常压加热回流提取 3 次(1 h/次),滤过,合并滤液,减压浓缩至约 15 L;药液分别用 3 倍量环己烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取 3 次,合并萃取液,分别减压浓缩得到 10.3, 76.6, 153.0, 553.0 g 的环己烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取物和水溶物。

取环己烷萃取物(10.3 g),上样于硅胶柱中,用环己烷-乙酸乙酯溶液(100:0, 20:1, 18:1, 15:1, 12:1, 10:1, 8:1, 5:1, 3:1, 1:1, 0:100)洗脱,得到组分 Fr.1-Fr.8。Fr.4(5.0 g)再用硅胶柱反复分离,以环己烷-乙酸乙酯溶液(100:0, 20:1, 18:1, 15:1)洗脱,即得到化合物(1) 940 mg 和化合物(2) 1 410 mg。

1.4 结构鉴定 测定以上两个化合物的¹H-、¹³C-NMR, HSQC 和 HMBC 谱,经推导分析,其 H 和 C 的化学位移值及归属如下。

化合物 1 黄色针状结晶,¹³C-NMR(CDCl₃) δ: 187.9 (C-1), 147.3 (C-2), 107.2 (C-3), 182.3 (C-4), 133.3 (C-5), 159.0 (C-6), 56.4 (C-7, OMe), 28.6 (C-1'), 27.8 (C-2'), 32.0 (C-7'), 22.8 (C-8'), 14.3 (C-9'), 29.8-29.4 (m, C3'-6')。¹H-NMR(CDCl₃) δ: 5.87 (1H, d, J = 2.8 Hz, H-3), 6.48 (1H, d, J = 1.7 Hz, H-5), 3.81 (3H, s, H-7), 2.41 (2H, dd, J = 7.2, 0.9 Hz, H-1'), 0.87 (3H, t, J = 7.0 Hz, H-9'), 1.33-1.25 (m, overlapped)。

化合物 2 黄色针状结晶, m. p. 63.5 ~ 64.3 °C。IR (KBr) cm⁻¹: 449.8, 717.6, 896.4, 1 022.0, 1 063.5, 1 177.9, 1 232.7, 1 326.6, 1 472.9, 1 597.8, 1 653.0, 1 683.9, 1 851.0, 2 916.5, 2 955.9。¹³C-NMR(CDCl₃) δ: 186.7 (C-1), 146.6 (C-2), 106.1 (C-3), 181.1 (C-4), 131.8 (C-5), 157.8 (C-6), 55.2 (C-7, OMe), 27.7 (C-1'), 26.7 (C-2'), 30.9 (C-10'), 21.7 (C-11'), 13.1 (C-12'), 28.7-28.2 (m, C3'-9')。¹H-NMR(CDCl₃) δ: 5.87 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-3), 6.47 (1H, d, J = 0.9 Hz, H-5), 3.81 (3H, s, H-7), 2.41 (2H, dd, J = 11.2, 4.1 Hz, H-1'), 0.87 (3H, t, J = 7.0 Hz, H-12'), 1.60-1.24 (m, overlapped)。

由上可确定化合物 1, 2 分别为 2-methoxy-6-nonyl-cyclohexa-2, 5-diene-1, 4-dione (MNDD); 2-dodecyl-6-methoxycyclohexa-2, 5-diene-1, 4-dione (DMDD)。经检索,除有文献报道其合成方法外^[7-8],还未见有从植物中分离得到这两个化合物的报道。其化学结构式见图 1。

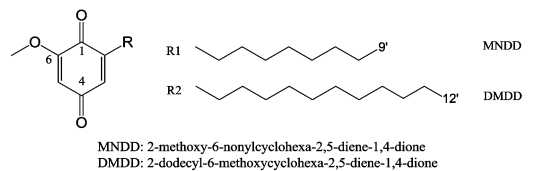


图 1 MNDD 和 DMDD 化学结构

2 含量测定

KKAy 小鼠灌胃给药 DMDD 8 周后,能显著减缓小鼠肾脏 AGE 形成、降低小鼠血糖水平及相关蛋白表达(如 AGE 受体, NF-κB 等);同时,能改善糖尿病依赖型蛋白尿的症状和肾小球系膜基质扩张、增加肌酐清除率,降低血清尿素氮^[9]。以上结果均说明 DMDD 具有一定的降血糖及改善糖尿病症状的作用,是阳桃根主要的降血糖活性成分之一,对药

材质量具有很好的监控作用。本文按照《中药质量标准分析方法验证指导原则》(以下简称“指导原则”)^[10],对药材中上述2种苯醌类化学成分的含量测定方法进行研究。

2.1 色谱条件 Thermo ODS-2HYPERASIL 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水(88:12), 进样量 5 μL, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 270 nm, 柱温 30 ℃。

2.2 方法学考察

2.2.1 最大吸收波长 分别对药材供试品溶液、MNDD 和 DMDD 对照品溶液进行 UV 扫描, 结果在 270 nm 左右均有最大吸收峰, 故选择 270 nm 作为检测波长。

2.2.2 供试品溶液制备 取药材粉末约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加甲醇 25 mL, 称定质量, 加热回流 45 min, 冷却, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过(0.45 μm), 取续滤液即得。

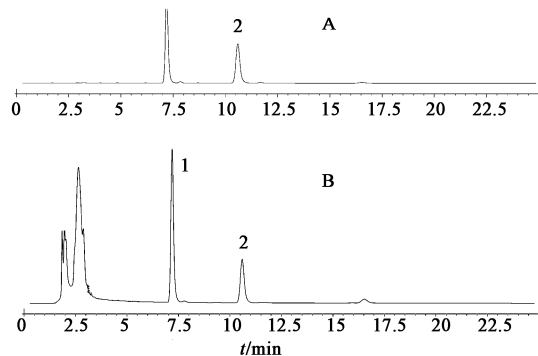
2.2.3 线性范围 取 MNDD(纯度 82.0%) 对照品约 7.2 mg, 精密称定, 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得每 1 mL 含 0.295 mg 的 MNDD 贮备液。

取 DMDD(纯度 82.8%) 对照品约 3.8 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得每 1 mL 含 0.315 mg 的 DMDD 贮备液。

分别精密吸取 MNDD 贮备液 6 mL 和 DMDD 贮备液 3 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 得混合对照品溶液(MNDD 质量浓度为 0.177 g·L⁻¹, DMDD 质量浓度为 94.4 mg·L⁻¹); 精密吸取上述混合对照品溶液 1, 3, 5, 10, 15 μL 进样, 测定, 以进样量(μg)为横坐标(X), 峰面积积分为纵坐标(Y), 绘制标准曲线得回归方程为 $Y_{MNDD} = 1\ 174.0X - 16.331 (R^2 = 0.999\ 9, n = 5)$; $Y_{DMDD} = 1\ 256.3X - 14.343 (R^2 = 0.999\ 9, n = 5)$ 。

结果表明 MNDD, DMDD 进样量在 0.177 ~

2.657, 0.094 ~ 1.416 μg 时, 与峰面积呈良好的线性关系, 且分离度 > 1.5。见图 2。



A. 对照品; B. 供试品; 1. MNDD; 2. DMDD

图2 阳桃根药材 HPLC

2.2.4 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 5 μL, 重复进样 5 次, 测定 MNDD 和 DMDD 峰面积的 RSD 分别为 0.81%, 0.93%, 说明仪器的精密性良好。

2.2.5 重复性试验 取同一批药材粉末 6 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 按 2.2.2 项下方法制备; 精密吸取各供试品溶液 5 μL 进样, 测定。结果 MNDD 和 DMDD 的峰面积 RSD < 2%, 说明本方法重复性较好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 5 μL, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样, 测定。结果 MNDD 和 DMDD 的峰面积 RSD 均 < 2.0%, 说明样品溶液在 10 h 内稳定。

2.2.7 加样回收率试验 取已知含量药材粉末 9 份, 分别称取约 0.125, 0.25, 0.50 g (n = 3), 精密称定, 分别精密加入适量对照品, 按 2.2.2 项下方法制得供试品溶液; 精密吸取溶液 5 μL, 进样, 测定, 计算回收率。结果见表 1~2。

此外, 不同人员的“中间精密度”试验和不同检测波长(265, 270, 275 nm), 柱温(25, 30, 35 ℃), 流速(0.9, 1.0, 1.1 mL/min)以及流动相比例(±5%)的“耐用性试验”结果也达到《指导原则》要求, 说明本方法稳定、可靠。

表1 阳桃根中 MNDD 加样回收率试验

No.	取样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	RSD/%
1-1	0.125 1	0.799 7	0.590 4	1.378 7	98.07	
1-2	0.123 3	0.788 2	0.590 4	1.384 0	100.91	
1-3	0.124 6	0.796 5	0.590 4	1.370 8	97.27	
2-1	0.250 8	1.603 2	1.180 8	2.750 2	97.14	
2-2	0.252 3	1.612 8	1.180 8	2.766 9	97.74	1.59
2-3	0.253 4	1.619 9	1.180 8	2.784 0	98.59	
3-1	0.502 2	3.210 3	2.361 6	5.585 2	100.56	
3-2	0.501 8	3.207 8	2.361 6	5.596 0	101.13	
3-3	0.503 2	3.216 7	2.361 6	5.559 5	99.20	

表2 阳桃根中 DMDD 加样回收率试验

No.	取样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	RSD/%
1-1	0.125 1	0.306 8	0.314 8	0.621 1	99.84	
1-2	0.123 3	0.302 4	0.314 8	0.621 6	101.40	
1-3	0.124 6	0.305 6	0.314 8	0.622 0	100.51	
2-1	0.250 8	0.615 1	0.629 6	1.244 3	99.94	
2-2	0.252 3	0.618 8	0.629 6	1.237 5	98.27	0.98
2-3	0.253 4	0.621 5	0.629 6	1.242 7	98.67	
3-1	0.502 2	1.231 6	1.259 2	2.480 6	99.19	
3-2	0.501 8	1.230 7	1.259 2	2.475 6	98.86	
3-3	0.503 2	1.234 1	1.259 2	2.484 6	99.31	

2.3 样品测定 取广西灵山县产不同批次药材粉末约 0.5 g,精密称定,照上述方法制得供试品溶液,进样,测定。结果见表 3。

表3 不同批次阳桃根药材中 MNDD,DMDD 含量测定

批号	取样量/g	MNDD 平均值	DMDD 平均值
20100605	0.502 0 0.501 2	8.49	3.34
20121113	0.504 7 0.500 8	0.01	-
20121216	0.505 9 0.504 8	0.10	0.08

注:“-”表示未检出。

3 讨论

试验结果表明 MNDD,DMDD 在阳桃根中含量较大,是药材主要的降血糖有效成分之一^[7],但这两种成分在不同批次的药材中含量差异较大;还需要进一步研究与植物的生长时间、加工方法或保存措施间的关系。

药材溶液、MNDD 和 DMDD 对照品溶液分别在 278.7,267.0,267.2 nm 有最大的紫外吸收。为了能同时兼顾三者,本实验中选择了与 MNDD,DMDD 最大吸收波长较接近的 270 nm 作为检测波长。

MNDD 和 DMDD 同为苯醌类化合物,具有相同的母核,但侧链的长度不一样。本文多次采用甲醇浸泡的方式(不加热)对不同批次药材进行提取、测定,结果均能测出 MNDD。由此说明,MNDD 不应是 DMDD 的次生产物,而是药材中的固有成分。

经检索,MNDD,DMDD 均是首次从植物分离得到的化合物,而且都含有较长的烷烃侧链,为了考察其化学性质是否稳定。分别将 MNDD,DMDD 溶于甲醇(质量浓度分别为 0.295,0.315 mg·g⁻¹),密封,置于冰箱冷藏(4℃)7 d 后,重新进样,用峰面积归一法计算,发现纯度下降了约 7%,并且在色谱图上产生较多小的杂峰。说明 MNDD,DMDD 长期放

置后容易降解,这可能也是有些药材测不到这两个成分的原因之一,提示在采收或加工阳桃根药材时应避免使用暴晒、加热等加工方式;同时,应尽量缩短保存或贮藏的时间,以免化学成分降解。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院.中药大词典.上册[M].上海:上海科学技术出版社,1996.
- [2] 胡旭佳,孙先凤,方岚,等.阳桃根的生药学研究[J].中国药品标准,2002,3(4):25.
- [3] 黄桂红,邓航,黄纯真,等.杨桃根多糖对糖尿病小鼠降血糖作用的实验研究[J].中成药,2009,31(9):1438.
- [4] 黄桂红,黄纯真,黄仁彬.阳桃根多糖对糖尿病小鼠胰岛素及胸、脾指数的影响[J].中国药师,2009,12(7):848.
- [5] 罗旭艳,黄建春,杨欣,等.杨桃根多糖体外抗氧化作用的研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):111.
- [6] 温庆伟,郑妮,陈春霞,等.阳桃根中化学成分类型的试验研究[J].中药与临床,2013,4(2):3.
- [7] König W A, Faasch H, Heitsch H, et al. Synthesis of Side-Chain-Modified Analogs of the Allergen Primin [J]. Z Naturforsch B Z Naturforsch B, 1993, 48(3):387.
- [8] Schmalle H, W Jarchow, O H Adiwidjaja, et al. Structure of 6-dodecyl-2-methoxy-1,4-benzoquinone, a new synthetic contact allergen[J]. Acta Crystallogr C, 1988, 44 (Pt 4):693.
- [9] Ni Zheng, Xing Lin, Qingwei Wen, et al. Effect of 2-dodecyl-6-methoxycyclohexa-2,5-diene-1,4-dione, isolated from *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae) roots, on advanced glycation end-product-mediated renal injury in type 2 diabetic KKAY mice [J]. Toxicology Letters, 2013, 219:77.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:附录 X VIII A.

[责任编辑 顾雪竹]

柱前衍生 HPLC 分析黄连多糖的单糖组成

范刚, 唐策, 李艳, 杨永东, 张艺*

(成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137)

[摘要] **目的:** 建立柱前衍生 HPLC 测定黄连多糖中的单糖组成, 并分析 3 种黄连多糖的单糖差异。**方法:** 采用水提醇沉法提取黄连多糖, 经硫酸水解后, 用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生, 再利用 HPLC 法分析单糖的 PMP 衍生物。**结果:** 黄连多糖主要由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖 7 种单糖组成, 其中半乳糖醛酸含量最高, 葡萄糖次之。另外, 雅连多糖、云连多糖和味连多糖中的 7 种单糖的平均摩尔比分别为 1:2.34:0.38:17.58:12.40:6.11:5.93, 1:2.43:0.25:16.76:15.18:6.51:9.78 和 1:3.25:0.40:22.35:12.96:6.66:10.28。**结论:** 建立的方法简便、准确, 重复性好, 可用于黄连多糖中单糖的组成分析和含量测定。雅连多糖、云连多糖和味连多糖中的 7 种单糖含量有差异。

[关键词] 黄连多糖; 柱前衍生; 单糖; 云连; 雅连; 味连

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0074-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014110074

Analysis of Monosaccharide Compositions of Polysaccharides in Coptidis Rhizoma by Pre-column Derivatization HPLC Method

FAN Gang, TANG Ce, LI Yan, YANG Yong-dong, ZHANG Yi*

(College of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a pre-column derivation HPLC method for the determination of monosaccharide compositions in Coptidis Rhizoma polysaccharides, and analyze the monosaccharides differences between three Coptidis Rhizoma polysaccharides. **Method:** The polysaccharides were extracted by hot distilled water, precipitated by alcohol, and hydrolyzed into monosaccharides with $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sulfuric acid. The hydrolysate was derivatized with PMP, and then the PMP derivates of monosaccharides were analyzed by HPLC method. **Result:** The Rhizoma Coptidis polysaccharides were composed of mannose, rhamnose, glucuronic acid, galacturonic acid, glucose, galactose and arabinose. Among them, the content of galacturonic acid was the most abundant, followed by glucose. In addition, the average molar ratio of seven monosaccharides of *C. deltoidea* polysaccharide, *C. teeta* polysaccharide and *C. chinensis* polysaccharide were 1:2.34:0.38:17.58:12.40:6.11:5.93, 1:2.43:0.25:16.76:15.18:6.51:9.78 and 1:3.25:0.40:22.35:12.96:6.66:10.28, respectively. **Conclusion:** The established method in this study is simple, accurate, reproducible, and can be used for the analysis of monosaccharide compositions of Coptidis Rhizoma polysaccharides. The content of seven monosaccharides of *C. deltoidea* polysaccharide, *C. teeta* polysaccharide and *C. chinensis* polysaccharide are different.

[Key words] Coptidis Rhizoma polysaccharide; pre-column derivatization; monosaccharide; *Coptis chinensis*; *C. deltoidea*; *C. teeta*

[收稿日期] 20131124(001)

[基金项目] 四川省教育厅项目(13ZB0315); 成都中医药大学科技发展基金项目(ZRMS201342)

[第一作者] 范刚, 博士, 讲师, 从事中药质量控制研究, Tel:028-61800160, E-mail:fangang1111@163.com

[通讯作者] * 张艺, 博士, 博士生导师, 研究员, 从事中药质量控制及药效物质基础研究, Tel:028-61800160, E-mail:9006zmy@sina.com