

山茱萸化学成分的分离鉴定

杨 晋, 陈随清*, 冀春茹, 刘延泽**

(河南中医学院, 河南 郑州 450008)

山茱萸是山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 除去果核的干燥成熟果实, 称为山萸肉, 为我国常用中药材, 具补益肝肾、涩精固脱之功效, 主治眩晕耳鸣、腰膝酸软、阳痿遗精、遗尿、尿频、崩漏带下、大汗虚脱、内热消渴等症。现代研究证明山萸肉具有较好的调节免疫系统功能和显著的降血糖作用。山茱萸中含有多种成分。主要是环烯醚萜苷类及鞣质类。前人先后从中分离到山茱萸苷(cornin, 即马鞭草苷 verbenalin)、莫诺苷(morroniside)、马钱子苷(马钱素 loganin)、獐牙菜苷(sweroside)、7-氧-甲基莫诺苷脱水莫诺苷元(dehydromorronia glycon)^[1]、7-脱氢马钱素(7-dehydrologanin)^[2]、山茱萸新苷(cornuside)^[3]、楝木鞣质A、B、C、D、E、G(cornusiin A、B、C、D、E、G)、水杨梅素D(gemin D)、异诃子素(isoterchebin)、特里马素I、II(tellimagrandin I、II)、喜树鞣质A、B(camptothin A、B)、2,3-二-O-没食子酰-β-D-葡萄糖(2,3-di-O-galloyl-β-D-glucose)、1,2,3-三-O-没食子酰-β-D-葡萄糖(1,2,3-tri-O-galloyl-β-D-glucose)、1,2,6-三-O-没食子酰-β-D-葡萄糖(1,2,6-tri-O-galloyl-β-D-glucose)、1,2,3,6-四-O-没食子酰-β-D-葡萄糖(1,2,3,6-tetra-O-galloyl-β-D-glucose)^[4~7]等化合物。

山茱萸是常用中药材和山区农村种植结构调整的首选经济树种, 随着近几年来我国农村种植结构的调整, 山茱萸的栽培面积逐年扩大。但山茱萸在长期的应用和栽培过程中, 种内产生很大变异, 主要表现在果实的外形上, 根据果实的形状, 将山茱萸的栽培品种分为7种: 长圆柱形、椭圆形、短圆柱形、圆柱形、长梨形、短梨形、纺锤形^[8]。但是, 这种在果实的形状上的变化是否同时也引起所含化学成分的变化, 进而影响了山茱萸的内在质量, 则尚未见研究报道。为了考察这些栽培品种的质量变化, 建立指纹图

谱, 促进山茱萸质量标准的标准化、客观化, 本实验对山茱萸的化学成分进行了进一步的研究。

利用 Diaion HP-20(Tsk)、Toyopearl HW-40(C)柱色谱分离, 得到14个单一化合物, 包括三萜、甾体、环烯醚萜类和多元酚类化合物, 经波谱分析, 分别鉴定为齐墩果酸(oleanolic acid, I)、β-谷甾醇(β-sitosterol, II)、熊果酸(ursolic acid, III)、苹果酸甲酯(methyl malic acid, IV)、胡萝卜苷(daucosterol, V)、蔗糖(sucrose, VI)、没食子酸(gallic acid, VII)、马钱素(loganin, VIII)、莫诺苷(morroniside, IX)、7-O-乙基莫诺苷(7-O-ethyl-morroniside, X)、水杨梅素D(genin D, XI)、特里马素I(tellimagrandin I, XII)、1-O-没食子酰基-4,6-O-六羟基联苯二甲酰基-β-D-葡萄糖(1-D-galloyl-4,6-O-HHDP-β-D-glucose, XIII)、1,2,3,4,5-五-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖(1,2,3,4,5-penta-O-galloyl-β-D-glucose, XIV)。其中化合物IV、V、XIII、XIV为首次从山茱萸植物中分离得到。

1 仪器和试剂

IR 用 FTIR-8201PC; NMR 用 Bruker AM-400 MHz 核磁共振仪, 溶剂为 D₂O、CDCl₃、DMSO-d₆ 及 Me₂CO-d₆。

柱色谱用凝胶: Toyopearl HW-40(C级和F级)为日本 TOSOH CO. 产品。Diaion HP-20 为日本 Mitsubishi Chemical Industries LTD. CO. 产品。柱色谱用吸附剂: 硅胶(柱色谱用)为上海五四化学有限公司产品; 硅胶 H 60 型(薄层色谱用)为青岛海洋化工工业有限公司产品。TLC 用薄层板: 薄层色谱用硅胶 G 60 型(青岛海洋化工厂产品), 以 0.3% CMC-Na 制板, 自然晾干后即用于。

山茱萸采于河南省西峡县, 由河南中医学院生药教研室陈随清副教授鉴定为山茱萸科植物山茱萸 *C. officinalis* Sieb. et Zucc.。

收稿日期: 2005-03-18

基金项目: 河南省科技攻关项目(0224610006)

作者简介: 杨 晋(1971—), 男, 2003年毕业于河南中医学院中药系, 获硕士学位, 现在中国科学院南海海洋研究所攻读博士学位, 主要研究方向为天然产物的研究。

* 通讯作者 陈随清 Tel: (0371)5680591 5962546 E-mail: suiqingchen@shou.com

** 现在美国哈佛大学医学院作博士后研究

2 提取与分离

山茱萸果实 3 kg 粉碎为粗粉,乙醇 40 °C 温浸提取 3 次,每次 48 h,提取液合并滤过,滤液回收乙醇至无醇味,减压浓缩至小体积,得提取物 560 g。用乙醚、醋酸乙酯萃取为 C-1(108 g)和 C-2(56 g)两部分,母液为 C-3。

C-1 部位和 C-2 部位的水溶部分经反复硅胶柱色谱,得到 I ~ IV; C-2 水溶部分进行 Toyopearl HW-40 柱色谱,用水和不同体积分数甲醇梯度洗脱,得到 V。

C-3 部分(水液上样未折算提取量)上 Diaion HP-20 柱(6.5 cm×120 cm),水、10%甲醇、50%甲醇、70%丙酮梯度洗脱,按部位收集为 4 个部位。各部位经反复 Toyopearl HW-40 柱色谱,并配合制备薄层,得到 VI ~ XIV。

3 结构鉴定

化合物 I:白色结晶,溶于乙醚、氯仿,微溶于甲醇,不溶于水。经与文献报道^[9]对照,NMR 数据与报道的基本一致,确定为齐墩果酸。

化合物 II:白色片状结晶,不溶于水、甲醇、丙酮,易溶于石油醚、乙醚、氯仿。经与文献报道^[10]对照,NMR 数据与报道的基本一致,确定为 β-谷甾醇。

化合物 III:白色结晶,溶于乙醚、氯仿,微溶于甲醇,不溶于水。经与文献报道^[9,11]对照,波谱数据与报道的基本一致,确定为熊果酸。

化合物 IV:黄色针晶(CHCl₃),易溶于氯仿、醋酸乙酯、甲醇,不溶于水。¹H-NMR 谱(400 MHz, CDCl₃) δ: 2.91(2H, m, H-2), 4.52(1H, dd, H-3), 3.82(3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ: 173.60(C-1), 38.25(C-2), 66.93(C-3), 175.51(C-4), 53.01(-OCH₃);综上所述,该化合物是苹果酸甲酯。

化合物 V:灰白色粉末,不溶于水、甲醇、丙酮、醋酸乙酯。与文献报道^[10]对照,NMR 数据与报道的基本一致,确定为胡萝卜苷。

化合物 VI:淡黄色结晶,易溶于 MeOH、H₂O。与文献报道^[9]对照,NMR 数据与报道的基本一致,确定其为 D-葡萄糖 1α→2β-D-果糖,即蔗糖。

化合物 VII:白色针晶,易溶于 MeOH、Me₂CO、H₂O,遇 Fe₃Cl 试剂显蓝色,说明为酚性成分。经与文献报道^[2]对照,NMR 数据与报道的基本一致。与标准品 TLC 对照,化合物 VII 色谱行为与对照品一

致,确定其结构为没食子酸。

化合物 VII:白色结晶,易溶于 MeOH、H₂O。¹H-NMR 谱(400 MHz, D₂O) δ: 1.67(1H, m, H-6), 2.04(1H, m, H-8), 3.65(3H, s, -OCH₃), 4.06(1H, t, H-7), 5.32(1H, d, J=3.6 Hz, H-1'), 7.35(1H, s, H-3); ¹³C-NMR(100 MHz, D₂O) δ: 96.35(C-1), 150.55(C-3), 112.83(C-4), 29.48(C-5), 39.96(C-6), 74.03(C-7), 39.71(C-8), 44.64(C-9), 11.65(C-10), 169.81(C-11), 51.49(C-12), 98.30(C-1'), 72.34(C-2'), 75.34(C-3'), 69.25(C-4'), 76.01(C-5'), 60.36(C-6')。经与文献报道^[1]对照,NMR 数据与报道的基本一致,确定其结构为马钱素。

化合物 IX:白色结晶,易溶于 MeOH、H₂O。¹H-NMR 谱(400 MHz, D₂O) δ: 3.65(3H, s, -OCH₃), 4.81(1H, d, J=4.0 Hz, H-1'), 5.78(1H, d, H-7), 7.50(1H, s, H-3); ¹³C-NMR(100 MHz, D₂O) δ: 95.23(C-1), 153.71(C-3), 109.91(C-4), 25.53(C-5), 32.02(C-6), 90.55(C-7), 64.94(C-8), 38.17(C-9), 18.32(C-10), 169.15(C-11), 51.48(C-12), 98.45(C-1'), 72.62(C-2'), 75.54(C-3'), 69.31(C-4'), 75.93(C-5'), 60.36(C-6')。经与文献报道^[1]对照,NMR 数据与报道的基本一致,确定其结构为莫诺苷。

化合物 X:白色结晶,易溶于 MeOH、H₂O。¹H-NMR 谱(400 MHz, D₂O) δ: 1.25(3H, t, -CH₃), 3.36(2H, m, -OCH₂-), 3.64(3H, s, -OCH₃), 4.81(1H, d, J=7.6 Hz, H-1'), 5.83(1H, d, H-7), 7.49(1H, s, H-3); ¹³C-NMR(100 MHz, D₂O) δ: 95.02(C-1), 153.68(C-3), 109.77(C-4), 26.10(C-5), 33.64(C-6), 94.91(C-7), 64.81(C-8), 37.98(C-9), 18.08(C-10), 169.10(C-11), 51.40(C-12), 65.10, 13.72(-OCH₂CH₃), 98.50(C-1'), 72.55(C-2'), 75.47(C-3'), 69.20(C-4'), 75.86(C-5'), 60.26(C-6')。与文献报道^[1]对照,该化合物较 7-O-甲基莫诺苷多一个次甲基 C,因此确定其为 7-O-乙基莫诺苷(7-O-ethyl-morroniside)。有报道^[1]称 7-O-甲基莫诺苷可能是在提取过程中溶剂的次生产物,推测化合物 X 也可能是提取过程中使用乙醇作为溶剂的次生产物,故未列为新化合物。

化合物 XI:无定形粉末,易溶于水、甲醇和丙酮,FeCl₃ 反应阳性,说明为酚类化合物。¹H-NMR 谱(400 MHz, Me₂CO-d₆) δ: 7.05, 7.06(各 2H, s, galloyl), 6.67, 6.66, 6.46, 6.45(各 1H, s, HHDP),

5.28 (1H, d, $J=3.6$ Hz, glu-1 α -H), 4.78 (1H, d, $J=8.0$ Hz, glu-1 β -H), 3.84 (1H, glu-2 α -H), 3.63 (1H, glu-2 β -H), 5.54 (1H, glu-3 α -H), 5.34 (1H, glu-3 β -H), 4.98 (2H, glu-4 α -H, glu-4 β -H), 4.61 (1H, glu-5 α -H), 3.76 (2H, glu-6 α -H, glu-6 β -H), 经与文献报道^[12]对照, NMR 数据与报道的基本一致, 确定该化合物为 3-*O*-galloyl-4,6-HHDP-*D*-glucose 即水杨梅素 D (gemin D)。

化合物 XI: 无定形粉末, 易溶于甲醇和丙酮, FeCl_3 反应阳性, 说明是酚类化合物。 ^1H -NMR 谱 (400 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$) δ : 7.07, 7.07, 7.02, 6.98 (各 2H, s, galloyl), 6.64, 6.63, 6.53, 6.50 (各 1H, s, HHDP), 5.52 (1H, d, $J=3.6$ Hz, glu-1 α -H), 5.13 (1H, d, $J=8.0$ Hz, glu-1 β -H), 5.90 (1H, glu-3 α -H), 5.60 (1H, glu-3 β -H)。经与文献报道^[12]对照, 其 NMR 数据与报道的基本一致, 确定该化合物为 2,3-*O*-galloyl-4,6-HHDP-*D*-glucose 即特里马素 I (tellimagrandin I)。

化合物 XIII: 无定形粉末, 溶于甲醇、丙酮, FeCl_3 反应阳性。 ^1H -NMR 谱 (400 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$) δ : 7.19 (2H, s, galloyl), 6.72, 6.70 (each 1H, s, HHDP), 5.73 (1H, d, $J=8.0$ Hz, glu-1-H), 3.69 (1H, t, glu-2-H), 3.81 (1H, t, H-3), 4.90 (1H, t, H-4), 4.11 (1H, dd, H-5), 5.21 (1H, dd, H-6a), 3.76 (1H, d, H-6b)。经与文献报道^[13]对照, NMR 数据与文献报道基本一致, 确定该化合物为 1-*O*-没食子酰基-4,6-*O*-六羟基联苯二甲酰基- β -*D*-葡萄糖 (1-*O*-galloyl-4,6-*O*-HHDP- β -*D*-glucose)。

化合物 XV: 淡土黄色无定形粉末, 易溶于 MeOH、 Me_2CO 、 H_2O , 遇 FeCl_3 试剂显蓝色。 ^1H -NMR 谱 (400 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$) δ : 7.18, 7.11, 7.07, 7.03, 7.00 (each 2H, s, galloyl), 6.33 (1H, d, $J=8.0$ Hz, glu-1-H), 5.64 (1H, t, glu-2-H), 6.02 (1H, t, glu-3-H), 5.68 (1H, t, glu-4-H), 4.58 (2H, m, glu-5-H and 6a-H), 4.36 (1H, dd, glu-6b-H); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$) δ : 121.17, 120.36, 120.26, 119.66 (galloyl-1-C), 110.06, 109.98, 109.82 (galloyl-2-C-6), 145.86, 145.72, 145.60 (galloyl-3-C-5), 139.46, 139.02, 138.84, 138.68 (galloyl-4-C), 166.23, 165.80, 165.59,

165.51, 164.83 (-COO-), 93.13 (glu-1-C), 71.56 (glu-2-C), 73.74 (glu-3-C), 69.09 (glu-4-C), 77.48 (glu-5-C), 62.62 (glu-6-C)。经与文献报道^[12]对照, 其 NMR 数据与报道的基本一致, 确定其为 1,2,3,4,5-五-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖 (1,2,3,4,5-penta-*O*-galloyl- β -*D*-glucose)。

References

- [1] Eado T, Taguchi H. Study on the constituents of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1973, 93(1): 30-32.
- [2] Xu L Z, Li H Y, Tian L, et al. Study on the chemical constituents of *Fructus Corni* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 26(2): 62-65.
- [3] Zhao S P, Xue Z. Study on the chemical constituents of *Fructus Corni* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1992, 27(11): 845-848.
- [4] Okuda T, Hatano T, Ogawa N, et al. Cornusins A, a dimeric ellagitannin forming tautomers and accompanying new tannins in *Cornus officinalis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1984, 32(11): 4662-4665.
- [5] Hatano T, Ogawa N, Kira R, et al. Tannins of Cornaceous Plants. I, Cornusins A, B and C, dimeric monomeric and trimeric hydrolyzable tannins from *Cornus officinalis*, and orientation of valoneoyl group in related tannins [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(8): 2083-2090.
- [6] Hatano T, Yasuhara T, Okuda T, et al. Tannins of Cornaceous Plants. I, Cornusins D, E and F, New dimeric and trimeric hydrolyzable tannins from *Cornus officinalis*, and orientation of valoneoyl group in related tannins [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(10): 2665-2669.
- [7] Hatano T, Yasuhara T, Abe R, et al. a Galloylated monoterpene glucoside and a dimeric hydrolyzable tannins from *Cornus officinalis* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(9): 2975-2978.
- [8] Chen S Q, Dong C M, Zhang Y D, et al. A Survey of *Cornus officinalis* Varieties [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2002, 25(5): 305-306.
- [9] Yu D Q, Yang J S. *Handbook of Analysis Chemistry* (分析化学手册) [M]. 2nd ed. Vol. 7, Beijing: Chemical Industry Press, 1999.
- [10] Kojima H, Sato N, Hatano A, et al. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris* [J]. *Pharm Chem*, 1990, 29(7): 2351-2355.
- [11] Chang X Q, Ding L X. *Handbook of Analysis of Active Constituents in Chinese Materia Medica* (中药活性成分分析手册) [M]. Beijing: Xueyuan Press, 2002.
- [12] Liu Y Z. Research on isolation and structures of compounds of tannin and polyphenols extracted from Chinese medicinal herbs [A]. *Dissertation of Doctor Degree of Zhengzhou University* (郑州大学博士学位论文) [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 1998.
- [13] Zhang X Z. Study on isolation and structures of constituents of tannin and polyphenols from *Epilobium pyrricholophum* and *Rhodomyrtus tomentosa* [A]. *Dissertation of Master Degree of Henan college of Traditional Chinese Medicine* (河南中医学院硕士学位论文) [D]. 1999.