

山茱萸中 1 个新的酚酸类化合物

高洪敏^{1,2}, 彭中灿^{1,3,4}, 王利杰^{1,3,4}, 潘雪格^{1,3,4}, 赫军⁴, 张维库^{3*}, 续洁琨^{2*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029
2. 北京中医药大学生命科学院, 北京 100029
3. 中日友好医院 临床医学研究所, 北京 100029
4. 中日友好医院 药学部, 北京 100029

摘要: 目的 研究山茱萸 *Cornus officinalis* 水提取物部位的化学成分。方法 采用多种色谱技术进行分离纯化, 通过质谱及核磁共振等方法对化合物进行结构鉴定, 并以 α -葡萄糖苷酶抑制活性为指标对其降糖活性进行研究。结果 从山茱萸水提取物中分离得到了 1 个酚酸类化合物, 鉴定为 2-(2-乙氧基-2-氧乙基)-3,5-二羟基苯基 4-羟基苯甲酸酯 (**1**); α -葡萄糖苷酶抑制活性的半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 值为 7.439 $\mu\text{mol/L}$ 。结论 化合物 **1** 为新的酚酸类化合物, 命名为山茱萸酸酯 A, 其具有较好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

关键词: 山茱萸; 酚酸类; 山茱萸酸酯 A; α -葡萄糖苷酶抑制活性; 降糖活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)16-5142-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.16.002

A new phenolic acid from *Cornus officinalis*

GAO Hong-min^{1,2}, PENG Zhong-can^{1,3,4}, WANG Li-jie^{1,3,4}, PAN Xue-ge^{1,3,4}, HE Jun⁴, ZHANG Wei-ku³, XU Jie-kun²

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
2. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
3. Institute of Clinical Medical Sciences, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China
4. Department of Pharmacy, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To study on the constituents from water extract of *Cornus officinalis*. **Methods** The water extract of *C. officinalis* was separated and purified by use of various chromatographic techniques, and the structures of the isolates were elucidated by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. The hypoglycemic activity of the compounds using α -glucosidase inhibitory activity as index was also investigated. **Results** One phenolic acid compound was isolated from the extract of *C. officinalis* and identified as 2-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-3,5-dihydroxyphenyl 4-hydroxybenzoate (**1**). The IC₅₀ value of the α -glucosidase inhibitory activity was 7.439 $\mu\text{mol/L}$. **Conclusion** Compound **1** is a new phenolic acid, named cornusester A, with good α -glucosidase inhibitory activity.

Key words: *Cornus officinalis* Sieb.; phenolic acids; cornusester A; α -glucosidase inhibitory activity; hypoglycemic activity

山茱萸又称“山萸肉”, 俗名枣皮, 为山茱萸科山茱萸属植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. 的干燥成熟果实^[1], 味酸涩, 性微温, 主产于陕西、浙江、

河南等省, 有补益肝肾、涩精固脱的功效^[2]。山茱萸的化学成分主要有酚酸类、萜类、黄酮类等^[3-5]。药理学研究表明山茱萸在糖尿病的防治、抗炎、心

收稿日期: 2023-05-30

基金项目: 中央高水平医院临床科研业务费 (2023-NHLHCRF-CXYW-01, 2022-NHLHCRF-YNZJ-01); 国家自然科学基金项目 (82073731, 82273815, 82273809); 中国药学会以岭生物医药创新基金 (CPA-B04-ZC-2021-005); 中国医学科学院基本科研业务费 (2022-JKCS-1616); 天然药物活性物质与功能国家重点实验室开放基金 (GTZK202101, GTZK202206); 中日友好医院菁英计划 (ZRJY2021-BJ06, ZRJY2021-TD06)

作者简介: 高洪敏 (1982—), 女, 在职硕士, 从事中药物质基础研究。

*通信作者: 张维库, 男, 博士, 研究员, 从事中药活性成分的新药开发。Tel: (010)84205766 E-mail: cpuzwk@163.com
续洁琨, 女, 博士, 教授, 研究方向为中药药理和新药开发。Tel: (010)84205360 E-mail: xjkbuem@163.com

脑血管的保护、神经保护等方面有较好的活性^[3-6]。本课题组前期对山茱萸的化学成分及其生物活性进行了持续和较为系统的研究^[3-22],发现山茱萸水提取物具有良好的抑制 α -葡萄糖苷酶活性的作用,结合山茱萸常被作为传统中医药在降糖方剂中的药材,因此研究其降血糖作用物质基础具有重要意义。

本研究首先对山茱萸的水提取物进行分离纯化,从中分离得到了1个新的酚酸类化合物,鉴定为2-(2-乙氧基-2-氧乙基)-3,5-二羟基苯基 4-羟基苯甲酸酯(1),命名为山茱萸酸酯A(图1);进而以 α -葡萄糖苷酶抑制活性为指标,评价了其降糖活性。

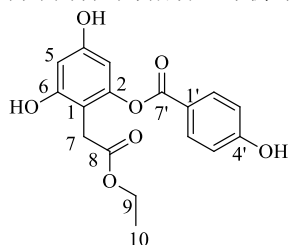


图1 化合物1的化学结构

Fig. 1 Structure of compound 1

1 仪器与材料

Bruker AV-400 型核磁共振 (Bruker Biospin 公司); Nicolet IS5 型红外光谱仪 (Thermo Fisher 公司); Q-Exactive Orbitrap 型液相色谱-质谱联用仪 (Thermo Scientific 公司); Agilent 1260 Infinity II 型分析液相 (DAD 检测器); 岛津制备液相 (泵: LC-20AR, 检测器: SPD-20A); WFH-203 型三用紫外分析仪; Sartorius-BS223S 型电子分析天平; 柱色谱硅胶 (100~200、200~300 目) 为青岛海洋化工厂生产; 硅胶 GF₂₅₄ 薄层预制板为烟台化学工业研究所产品; ODS (30~50 μ m) 为 YMC 公司生产; Sephadex LH-20 型凝胶为 Pharmacia 公司生产; 制备型 HPLC 色谱柱为 Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱 (250 mm \times 20 mm, 5 μ m); 分析型 HPLC 色谱柱为 ES Sonoma C₁₈ 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 酶标仪 Spark (Tecan 公司); 96 孔板 (Coster 公司); pNPG N1377 (源叶生物, 批号 S10137); α -葡萄糖苷酶 (Sigma 公司, 批号 G9259); 阿卡波糖 (源叶生物, 批号 S11190); 磷酸盐缓冲溶液 PBS (Coolaber 公司); 其余试剂均为分析纯 (北京化工厂) 和色谱纯 (Honeywell)。

本研究所用山茱萸为 2013 年 11 月采自陕西省佛坪县, 由北京中医药大学续洁琨教授鉴定为山茱萸属植物山茱萸 *C. officinalis* Sieb. 的干燥成熟果

实, 样品 (20131106) 目前存放于中日友好医院临床医学研究所。

2 提取与分离

将 63 kg 干燥的山茱萸果实用水煎煮提取 2 次 (600、500 L), 每次 2 h。合并提取液, 减压浓缩得到总浸膏约 28.9 kg。总浸膏用水混悬后经 D101 型大孔吸附树脂柱, 依次用水、30%、55%、95%乙醇洗脱。55%乙醇洗脱部位浓缩后得浸膏 388 g, 将其用硅胶 1:1 拌样, 采用硅胶开放柱 (200~300 目, Φ 7.5 cm \times 118 cm) 用氯仿-甲醇梯度洗脱进行分离得到 8 个流分 CO-C1~CO-C8。

流分 CO-C4 (101 g) 经硅胶柱色谱, 二氯甲烷-甲醇 (100:0、90:10、80:20、70:30、60:40、50:50、40:60、30:70) 梯度洗脱, TLC 点板分析合并为 6 个流分 (C4-1~C4-6), 其中流分 C4-2~C4-4 经点板合并后过 ODS 柱色谱 (甲醇-水 1:9 \rightarrow 10:0) 并经 TLC 点板分析合并得到 8 个流分 (C4-B1~C4-B8)。其中 C4-B7 过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (甲醇-水 1:1 \rightarrow 1:0) 经 TLC 分析合并得到 10 个流分 (B7-A~B7-J), B7-G 经 Pre-HPLC 分离得到化合物 1 (38.6 mg) [色谱柱 Phenomenex Gemini C₁₈ (250 mm \times 20 mm, 5 μ m); 体积流量 3 mL/min; 流动相 55%甲醇; t_R =26 min]。

3 结构鉴定

化合物 1: 褐色粉末。HR-ESI-MS m/z 331.082 3 ($[M-H]^-$, 计算值为 331.081 2), 可确定化合物的分子式为 C₁₇H₁₆O₇, 计算其不饱和度为 10。红外光谱显示其结构中含有羟基 (3415 cm⁻¹) 和羰基 (1713 cm⁻¹) 和苯环 (1516 cm⁻¹) 等基团。紫外光谱显示在 206 nm 和 264 nm 处有特征吸收。

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) 谱 (表 1) 显示 1 个甲基质子信号 δ_H 1.10 (3H, t, J = 7.2 Hz, H-10); 1 组亚甲基质子信号 δ_H 4.00 (2H, q, J = 7.2 Hz, H-9), 3.49 (2H, s, H-7); 1 组对取代苯上质子信号 δ_H 8.00 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2', 6'), 6.90 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3', 5'), 提示该化合物存在 1 个对位取代的苯环结构; 1 对间位偶合的苯环质子信号 δ_H 6.27 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-3), 6.17 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-5), 提示还存在 1 个四取代的苯环结构。

¹³C-NMR (100 MHz, Methanol-*d*₄) 谱 (表 1) 显示共 17 个碳信号, 结合 HSQC 谱确定该化合物含有 1 个甲基碳信号 δ_C 14.5 (C-10); 2 个亚甲基碳信号 δ_C 61.9 (C-9), 30.3 (C-7); 2 组苯环上碳信号 δ_C

表 1 化合物 1 的 ^1H -和 ^{13}C -NMR 数据 (400/100 MHz, Methanol- d_4)Table 1 ^1H - and ^{13}C -NMR data for compound 1 (400/100 MHz, Methanol- d_4)

碳位	δ_{H}	δ_{C}
1		107.3
2		152.5
3	6.17 (d, $J = 2.4$ Hz)	102.3
4		158.7
5	6.27 (d, $J = 2.4$ Hz)	101.1
6		158.5
7	3.49 (s)	30.3
8		174.0
9	4.00 (q, $J = 7.2$ Hz)	61.9
10	1.10 (d, $J = 7.2$ Hz)	14.5
1'		121.5
2'	8.00 (d, $J = 8.8$ Hz)	133.6
3'	6.90 (d, $J = 8.8$ Hz)	116.6
4'		164.4
5'	6.90 (d, $J = 8.8$ Hz)	116.6
6'	8.00 (d, $J = 8.8$ Hz)	133.6
7'		166.2

164.4 (C-4'), 158.7 (C-4), 158.5 (C-6), 152.5 (C-2), 133.6 (C-2', 6'), 121.5 (C-1'), 111.6 (C-3', 5'), 107.3 (C-1), 102.3 (C-3), 101.1 (C-5); 2 个羰基碳信号 δ_{C} 174.0 (C-8), 166.2 (C-7)。化合物 1 的波谱数据与已知化合物 2-*O*-(4-hydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxyphenylacetate^[23]的波谱数据非常相似, 不同之处在于化合物 1 多了 1 个乙氧基信号 [δ_{H} 4.00 (2H, q, $J = 7.2$ Hz), 1.10 (3H, t, $J = 7.2$ Hz); δ_{C} 61.9, 14.5], 少了 1 个甲氧基信号 [δ_{H} 3.54 (3H, s, OCH₃), δ_{C} 52.4]。

在 HMBC 谱(图 2)中, H-5 (δ_{H} 6.27) 与 C-1 (δ_{C} 107.3), C-3 (δ_{C} 102.3), C-4 (δ_{C} 158.7) 相关, H-3 (δ_{H} 6.17) 与 C-1 (δ_{C} 107.3) 相关; 同时, H-2' (δ_{H} 8.00) 与 C-7' (δ_{C} 166.2), C-4' (δ_{C} 164.4) 相关, H-5' (δ_{H} 6.90) 与 C-1' (δ_{C} 121.5), C-4' (δ_{C} 164.4) 相关, 结合碳谱、氢谱进一步确定了其结构中存在 1 个间苯三酚和 1 个对羟基苯甲酰的结构。另外, H-7 (δ_{H} 3.49) 与 C-1 (δ_{C} 107.3), C-2 (δ_{C} 152.5) 和 C-8 (δ_{C} 174.0) 相关, H-9 (δ_{H} 4.00) 与 C-8 (δ_{C} 174.0), C-10 (δ_{C} 14.5) 相关, H-10 (δ_{H} 1.10) 与 C-9 (δ_{C} 61.9) 相关, 说明乙氧基与 C-8 位的羰基相连。综上所述, 该化合物为 2-(2-乙氧基-2-氧乙基)-3,5-二羟基苯基-4-羟基苯甲

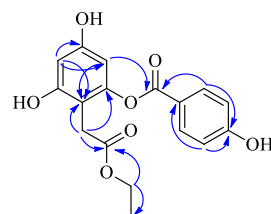


图 2 化合物 1 的主要 HMBC

Fig. 2 Key HMBC correlation of compound 1

酸酯, 经 SciFinder 文献数据库检索发现该化合物为未见报道的新化合物, 命名为山茱萸酸酯 A。

4 降糖活性测定

以 4-硝基酚- β -D-吡喃葡萄糖苷 (4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, PNPG) 为底物测定 α -葡萄糖苷酶的活性, 以阿卡波糖作为阳性对照, 在 96 孔板上进行活性检测。100 μL PBS 缓冲溶液 (pH 7.4) 中加入 20 μL α -葡萄糖苷酶 (0.125 U/mL) 溶液, 以及 20 μL 不同浓度的化合物 1 (0.31、0.62、1.25、2.50、5.00、10.00、20.00、40.00 $\mu\text{mol/L}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 15 min, 然后加入 20 μL PNPG (2.5 mmol/L), 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 15 min, 再加入 40 μL 的 Na_2CO_3 溶液 (0.2 mol/L) 终止反应, 在 405 nm 波长下测定吸光度 (A) 值^[24-26]。按照公式计算 α -葡萄糖苷酶抑制率。

抑制率 = $[(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白对照}}) - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品对照}})] / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白对照}})$
 $A_{\text{空白对照}}$ 为加入缓冲液代替样品的空白对照 0 min 时的 A 值, $A_{\text{对照}}$ 为对照 15 min 时的 A 值, $A_{\text{样品对照}}$ 为加入测试样品 0 min 时的 A 值, $A_{\text{样品}}$ 为加入测试样品 15 min 时的 A 值

结果表明, 化合物 1 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 表现出较好的抑制活性, 半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC_{50}) 值为 7.439 $\mu\text{mol/L}$, 其效果优于阳性药阿卡波糖 ($\text{IC}_{50} = 642.4 \mu\text{mol/L}$)。

5 结语

本研究从山茱萸水提取物中分离鉴定了 1 个新的酚酸类化合物山茱萸酸酯 A, 进一步发现其对 α -葡萄糖苷酶活性 ($\text{IC}_{50} = 7.439 \mu\text{mol/L}$) 明显优于阳性药阿卡波糖 ($\text{IC}_{50} = 642.4 \mu\text{mol/L}$)。本研究一方面丰富了山茱萸的化学成分多样性, 另一方面为阐明山茱萸的降糖药效物质奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第六十九卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1990, 56: 84.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 29.
- [3] Ye X S, He J, Cheng Y C, et al. Cornusides A-O, bioactive

- iridoid glucoside dimers from the fruit of *Cornus officinalis* [J]. *J Nat Prod*, 2017, 80(12): 3103-3111.
- [4] Peng Z C, He J, Pan X G, *et al.* Secoiridoid dimers and their biogenetic precursors from the fruits of *Cornus officinalis* with potential therapeutic effects on type 2 diabetes [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 117: 105399.
- [5] Peng Z C, Wang Y M, He J, *et al.* Chemical constituents and their antioxidant and anti-inflammatory activities from edible *Cornus officinalis* fruits [J]. *Eur Food Res Technol*, 2022, 248(4): 1003-1010.
- [6] Guo Y X, Xia C Y, Yan Y, *et al.* Loganin improves chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviors and neurochemical dysfunction [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 308: 116288.
- [7] Ye X S, He J, Xu J K, *et al.* Undescribed morroniside-like secoiridoid diglycosides with α -glucosidase inhibitory activity from *Corni Fructus* [J]. *Phytochemistry*, 2020, 171: 112232.
- [8] He J, Xu J K, Pan X G, *et al.* Unusual cadinane-type sesquiterpene glycosides with α -glucosidase inhibitory activities from the fruit of *Cornus officinalis* Sieb. et Zuuc [J]. *Bioorg Chem*, 2019, 82: 1-5.
- [9] He J, Xu Y, Xu J K, *et al.* Cornusglucosides A and B, two new iridoid glucosides from the fruit of *Cornus officinalis* [J]. *Chem Biodivers*, 2019, 16(11): e1900421.
- [10] He J, Ye X S, Wang X X, *et al.* Four new iridoid glucosides containing the furan ring from the fruit of *Cornus officinalis* [J]. *Fitoterapia*, 2017, 120: 136-141.
- [11] 彭中灿, 赫军, 潘雪格, 等. 山茱萸化学成分的分离与鉴定 [J]. 中草药, 2021, 52(15): 4480-4486.
- [12] 赫军, 续洁琨, 潘雪格, 等. 山茱萸中 1 个新苯丙素苷类化合物 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(21): 4264-4266.
- [13] 乔灏祯, 叶贤胜, 赫军, 等. 山茱萸中一个新的环烯醚萜苷类化合物 [J]. 中国药学杂志, 2017, 52(14): 1212-1216.
- [14] 叶贤胜, 赫军, 张佳琳, 等. 山茱萸的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(24): 4605-4609.
- [15] Xia C Y, He J, Du L D, *et al.* Targeting the dysfunction of glutamate receptors for the development of novel antidepressants [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 226: 107875.
- [16] Zhang F, Yan Y, Zhang J A, *et al.* Phytochemistry, synthesis, analytical methods, pharmacological activity, and pharmacokinetics of loganin: A comprehensive review [J]. *Phytother Res*, 2022, 36(6): 2272-2299.
- [17] Xia C Y, Xu J K, Li L, *et al.* Identifying the mechanism underlying antidepressant-like effects of loganin by network pharmacology in combination with experimental validation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 281: 114526.
- [18] Wang Z X, Lian W W, He J, *et al.* Cornuside ameliorates cognitive impairments in scopolamine induced AD mice: Involvement of neurotransmitter and oxidative stress [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 293: 115252.
- [19] Shi R, Han Y, Yan Y, *et al.* Loganin exerts sedative and hypnotic effects via modulation of the serotonergic system and GABAergic neurons [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 409.
- [20] Pan C H, Xia C Y, Yan Y, *et al.* Loganin ameliorates depression-like behaviors of mice via modulation of serotonergic system [J]. *Psychopharmacology*, 2021, 238(11): 3063-3070.
- [21] 迪更妮, 张维库, 李壮, 等. 马钱苷人工抗原的合成、鉴定及免疫原性的初步研究 [J]. 中草药, 2015, 46(19): 2870-2873.
- [22] 于蕾, 白雪, 车若梅, 等. 山茱萸新苷对过氧化氢诱导人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(3): 95-100.
- [23] Yang X W, Li Y L, Li S M, *et al.* Mono- and sesquiterpenoids, flavonoids, lignans, and other miscellaneous compounds of *Abies georgei* [J]. *Planta Med*, 2011, 77(7): 742-748.
- [24] Joshi S R, Standl E, Tong N W, *et al.* Therapeutic potential of α -glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus: An evidence-based review [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2015, 16(13): 1959-1981.
- [25] Ghani U. Re-exploring promising α -glucosidase inhibitors for potential development into oral anti-diabetic drugs: Finding needle in the haystack [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 103: 133-162.
- [26] Alam F, Shafique Z, Amjad S T, *et al.* Enzymes inhibitors from natural sources with antidiabetic activity: A review [J]. *Phytother Res*, 2019, 33: 41-54.

[责任编辑 王文倩]