

吴茱萸苦味拆分组分物质基础研究

杨志欣,孟永海,王秋红,杨炳友,匡海学*

(黑龙江中医药大学北药基础与应用研究省部共建教育部重点实验室、
黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室,哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:研究疏毛吴茱萸苦味拆分组分——95%乙醇洗脱组分的物质基础。方法:采用硅胶柱色谱、ODS 反相柱色谱以及 HPLC 等现代分离技术与方法进行分离纯化,根据化合物的理化性质和波谱学数据进行结构鉴定。结果:从疏毛吴茱萸苦味拆分组分——95%乙醇洗脱组分中分离并鉴定了 7 个化合物,分别为水仙苷(narcissin)(Ⅰ)、异鼠李素-3-O-半乳糖苷(isorhamnetin-3-O-galactoside)(Ⅱ)、金丝桃苷(hyperoside)(Ⅲ)、异槲皮苷(isoquercitrin)(Ⅳ)、紫丁香苷(syringoside)(Ⅴ)、β-谷甾醇(Ⅵ)、去氢柠檬苦素(dehydrolimonin)(Ⅶ)。结论:吴茱萸苦味拆分组分——95%乙醇洗脱组分的物质基础有黄酮、柠檬苦素类等成分。化合物Ⅰ,Ⅳ,Ⅴ为首次从该植物中分离得到。

[关键词] 疏毛吴茱萸;物质基础;化学成分;性味;苦味

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)21-0074-04

Substance Basis of Bitter Resolution and Composition from Fructus Evodiae

YANG Zhi-xin, MENG Yong-hai, WANG Qiu-hong, YANG Bing-you, KUANG Hai-xue*

(Key Laboratory of Chinese Materia Medica(Heilongjiang University of Chinese Medicine), Ministry of Education, Heilongjiang Key Laboratory of TCM Pharmacodynamic Material Bases, Harbin 150040, China)

[Abstract] Objective:To investigate the effective substance basis from 95% Alcohol elution constituents - bitter resolution and composition of *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. Var. *bodinieri* (Dode) Huang. Method: Isolation and purification were carried out by silica gel column chromatography, ODS RP- column chromatography, HPLC etc. Structural determination of the pure compounds was based on physico-chemical properties and various spectral data analysis. Result: Seven compounds were obtained from *E. rutaecarpa*. They were identified as narcissin (Ⅰ), Isorhamnetin-3-O-galactoside (Ⅱ), hyperoside (Ⅲ), isoquercitrin (Ⅳ), syringoside (Ⅴ), β-sitosterol (Ⅵ), dehydrolimonin(Ⅶ). Conclusion: Compound Ⅰ,Ⅳ,Ⅴ are isolated from *E. rutaecarpa* for the first time.

[Key words] *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. Var. *bodinieri* (Dode) Huang; substance basis; chemical constituents; character and taste; bitter

[收稿日期] 20110622(009)

[基金项目] 国家重点基础研究发展(973)计划项目(2006CB504708)

[第一作者] 杨志欣,博士,副教授,研究方向:中药性味理论研究、药物新剂型及中药新药开发研究,Tel:0451-82195724,E-mail:zhixin_y@163.com

[通讯作者] *匡海学,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:中药性味理论研究、中药复方药效物质基础及其作用机制,Tel: 0451-82110803, E-mail: hxkuang@hotmail.com

中药药性理论是中药理论体系的核心,是中医理论的重要组成部分,也是中药学的特色。性味理论是中药药性理论的重要内容,对其进行彻底地研究,对于准确把握中医药的特色优势,真正认识中医药的科学价值有重要意义。遵循中医药学基本理论,本课题组提出了“中药一味一性,一药 X 味 Y 性(Y≤X)”的假说和基于中药性味可拆分性和可组合性的研究思路,并构建了中药性味理论研究的新模式^[1-2]。为阐明吴茱萸辛味和苦味的物质基础,我们

采用与吴茱萸性味功效相关的抗炎、镇痛、抗胃溃疡、止呕、止泻等复合药理学指标作为吴茱萸性味功效评价体系,对吴茱萸的各化学拆分组分的生物学效应^[3-4]进行了研究。研究结果表明,化学拆分组分——95%乙醇洗脱组分主要表现为止泻作用,根据所建立的吴茱萸性味药理学评价体系推测其作用与苦味有关。为进一步阐明吴茱萸苦味拆分组分的物质基础,本文对95%乙醇洗脱组分进行了系统分离,从而为充分利用疏毛吴茱萸这一药用资源提供实验数据。

1 材料

Bruker-400型超导核磁共振光谱仪(TMS为内标), Finnigan MAT LCQ 质谱仪, Waters 2695-2996型HPLC仪、Delta-600-2487型制备HPLC仪。分析型色谱柱采用大连依利特公司Hypersil ODS II(4.6 mm×200 mm, 5 μm), Senshu Pak PEGASIL ODS II 半制备型色谱柱(10 mm×250 mm, 10 μm), 大连依利特公司Hypersil-ODS II制备型色谱柱(20 mm×300 mm, 10 μm), 硅胶(青岛海洋化工厂, 80~100, 200~300目), 薄层色谱用硅胶板(Silica gel60F₂₅₄)和反相板(Rp-18)均为德国Merck公司产品;柱色谱用反相ODS(ODS-AM)为日本YMC公司产品。

实验用植物于2006年7月购自哈尔滨市药材公司。经黑龙江中医药大学药学院中药资源学教研室王振月教授鉴定为芸香科植物疏毛吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实。样品标本保存于黑龙江中医药大学药学院(20060132)。

2 提取与分离

取干燥的疏毛吴茱萸4.0 kg,水煎煮提取,提取液浓缩氯仿萃取,剩余药液除去氯仿浓缩,加于大孔吸附树脂柱上,收集95%乙醇洗脱部分。以硅胶柱色谱(200~300目)分离,以氯仿-甲醇梯度洗脱, TLC检查合并相同组分,得到Fr. 1~Fr. 5等5个部分。Fr. 1以硅胶柱色谱石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱,析出2个无色针晶分别为11 mg(化合物Ⅵ)和25 mg(化合物Ⅶ)。Fr. 2以氯仿-甲醇梯度洗脱, TLC检查合并相同组分,得到Fr. 2.1~Fr. 2.3等3个部分,Fr. 2.2以ODS柱色谱分离,经pre-HPLC及semi-HPLC黄色针晶20 mg(化合物Ⅰ)、黄色粉末17 mg(化合物Ⅱ);Fr. 3以氯仿-甲醇梯度洗脱, TLC检查合并相同组分,得到Fr. 3.1~Fr. 3.3等3个

部分,Fr. 3.2以ODS柱色谱分离,经pre-HPLC及semi-HPLC得到黄色粉末80 mg(化合物Ⅲ)及另一黄色粉末16 mg(化合物Ⅳ);Fr. 3.2以ODS柱色谱分离,经pre-HPLC及semi-HPLC得到无色针晶12 mg(化合物Ⅴ)。

3 结构鉴定

化合物Ⅰ 淡黄色针晶,易溶于甲醇。Molish反应呈紫色环,盐酸镁粉反应显红色,二氯氧锆反应加枸橼酸黄色褪去。UV光谱(MeOH)在255.6, 355.3 nm处分别出现最大吸收,表明其可能是黄酮类化合物,经酸水解后,其糖部分经薄层色谱检视证明含有葡萄糖和鼠李糖,推测其为含有葡萄糖和鼠李糖组成的黄酮苷类化合物。ESI-MS(pos.)谱中,在 m/z 624处可见[M]⁺离子峰,表明相对分子质量为624。结合¹H-、¹³C-NMR谱,推测其分子式为C₂₈H₃₂O₁₆,计算其不饱和度为12。¹H-NMR:6.20(1H, *d*, *J*=2.0 Hz, H-6), 6.42(1H, *d*, *J*=2.0 Hz, H-8), 7.85(1H, *d*, *J*=2.0 Hz, H-2'), 6.90(1H, *d*, *J*=8.4 Hz, H-5'), 7.51(1H, *dd*, *J*=8.4, 2.0 Hz, H-6'), 3.83(3H, *s*, C₃-O-CH₃), 5.44(1H, *d*, *J*=7.6 Hz, H-1''), 3.03~3.72(6H, *m*, H-2''~6''), 5.17(1H, *d*, *J*=4.4 Hz, H-1'''), 3.03~3.72(4H, *m*, H-2'''~5'''), 0.97(3H, *d*, *J*=6.0 Hz, H-6''')。¹³C-NMR:156.4(C-2), 132.9(C-3), 177.2(C-4), 161.1(C-5), 98.6(C-6), 164.1(C-7), 93.7(C-8), 156.4(C-9), 101.1(C-10), 122.2(C-1'), 113.2(C-2'), 146.8(C-3'), 149.3(C-4'), 115.1(C-5'), 120.9(C-6'), 55.5(C₃-O-CH₃), 103.9(C-1''), 74.2(C-2''), 76.3(C-3''), 71.7(C-4''), 75.8(C-5''), 66.7(C-6''), 101.1(C-1'''), 68.2(C-2'''), 70.5(C-3'''), 70.2(C-4'''), 70.0(C-5'''), 17.6(C-6''')。以上数据与文献[5]报道基本一致,故鉴定该化合物为5, 7, 4'-三羟基-3'-甲氧基黄酮醇-3-*O*-芸香糖苷(5, 7, 4'-trihydroxy-3'-methoxyflavonol-3-*O*-rutinoside),即水仙苷(narcissin)。

化合物Ⅱ 淡黄色无定形粉末,易溶于甲醇。Molish反应呈紫色环,盐酸镁粉反应显红色,二氯氧锆反应加枸橼酸黄色褪去。UV光谱(MeOH)在256.3, 355.0 nm处分别出现最大吸收,表明其可能是黄酮类化合物,经酸水解后,其糖部分经薄层色谱检视证明含有半乳糖,推测其为含有半乳糖的黄酮苷类化合物。ESI-MS(pos.)谱,在 m/z 478处可见

[M]⁺ 离子峰,表明相对分子质量为 478。结合¹H-和¹³C-NMR 谱等推测其分子式为 C₂₂H₂₂O₁₂,计算其不饱和度为 12。¹H-NMR:6.20(1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, H-6), 6.43(1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, H-8), 8.03(1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 6.90(1H, *d*, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 7.49(1H, *dd*, *J* = 8.4, 2.0 Hz, H-6'), 5.52(1H, *d*, *J* = 7.6 Hz, H-1''), 3.25 ~ 3.70(6H, *m*, H-2'' ~ 6''), 3.84(3H, *s*, C₃-O-CH₃)。 ¹³C-NMR 156.2(C-2), 133.3(C-3), 177.4(C-4), 161.1(C-5), 98.6(C-6), 164.1(C-7), 93.4(C-8), 156.2(C-9), 103.8(C-10), 121.9(C-1'), 115.8(C-2'), 144.7(C-3'), 148.4(C-4'), 115.1(C-5'), 121.0(C-6'), 101.6(C-1''), 75.7(C-2''), 73.1(C-3''), 71.1(C-4''), 67.8(C-5''), 60.0(C-6''), 55.9(C₃-O-CH₃)。以上数据与文献[6]报道基本一致,故鉴定该化合物为异鼠李素-3-*O*-半乳糖苷(Isorhamnetin-3-*O*-galactoside)。

化合物 III 淡黄色无定形粉末,易溶于甲醇。Molish 反应呈紫色环,盐酸镁粉反应显红色,二氯氧锆反应加枸橼酸黄色褪去。UV 光谱(MeOH)在 256.3, 355.0 nm 处分别出现最大吸收,表明其可能是黄酮类化合物,经酸水解后,其糖部分经薄层色谱检识证明含有半乳糖,推测其为含有半乳糖的黄酮苷类化合物。ESI-MS(pos.)谱中,在 *m/z* 487 处可见 [M + Na]⁺ 离子峰,在 *m/z* 503 处可见 [M + K]⁺ 离子峰,表明其相对分子质量为 464,结合¹H-和¹³C-NMR 波谱,推测其分子式为 C₂₁H₂₀O₁₂,计算不饱和度为 12。¹H-NMR:6.20(1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, H-6), 6.40(1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, H-8), 7.84(1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 6.85(1H, *d*, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 7.58(1H, *dd*, *J* = 8.4, 2.0 Hz, H-6'), 5.18(1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, H-1''), 3.45 ~ 3.85(6H, *m*, H-2'' ~ 6'')。 ¹³C-NMR:158.4(C-2), 135.7(C-3), 179.5(C-4), 163.0(C-5), 99.9(C-6), 166.1(C-7), 94.7(C-8), 158.8(C-9), 105.6(C-10), 122.9(C-1'), 116.1(C-2'), 145.8(C-3'), 149.9(C-4'), 117.8(C-5'), 122.9(C-6'), 105.3(C-1''), 73.2(C-2''), 75.1(C-3''), 70.0(C-4''), 77.2(C-5''), 61.9(C-6'')。以上数据与文献[6]报道基本一致,故鉴定该化合物为槲皮素-3-*O*-β-*D*-吡喃半乳糖苷(quercetin-3-*O*-β-*D*-galactoranose),即金丝桃苷(hyperoside)。

化合物 IV 淡黄色无定形粉末,易溶于甲醇。Molish 反应呈紫色环,盐酸镁粉反应显红色,二氯氧

锆反应加枸橼酸黄色褪去。UV 光谱(MeOH)在 256.3, 355.6 nm 处分别出现最大吸收,表明其可能是黄酮类化合物,经酸水解后,其糖部分经薄层色谱检识证明含有葡萄糖,推测其为含有葡萄糖的黄酮苷类化合物。ESI-MS(pos.)谱中,在 *m/z* 487 处可见 [M + Na]⁺ 离子峰,在 *m/z* 503 处可见 [M + K]⁺ 离子峰,表明其相对分子质量为 464。结合¹H-和¹³C-NMR 谱等推测其分子式为 C₂₁H₂₀O₁₂,计算其不饱和度为 12。¹H-NMR 6.20(1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, H-6), δ:6.40(1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, H-8), δ:7.52(1H, *d*, *J* = 2.4 Hz, H-2'), δ:6.81(1H, *d*, *J* = 8.4 Hz, H-5'), δ:7.68(1H, *dd*, *J* = 8.4, 2.4 Hz, H-6'), δ:5.39(1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, H-1''), 3.20 ~ 3.70(6H, *m*, H-2'' ~ 6'')。 ¹³C-NMR:156.2(C-2), 133.3(C-3), 177.4(C-4), 161.1(C-5), 98.6(C-6), 164.1(C-7), 93.4(C-8), 156.2(C-9), 103.8(C-10), 121.9(C-1'), 115.8(C-2'), 144.7(C-3'), 148.4(C-4'), 15.1(C-5'), 121.0(C-6'), 101.6(C-1''), 71.1(C-2''), 75.7(C-3''), 67.8(C-4''), 73.1(C-5''), 60.0(C-6'')。以上数据与文献[7]报道基本一致,故鉴定该化合物为槲皮素-3-*O*-β-*D*-葡萄糖吡喃糖苷(quercetin-3-*O*-β-*D*-glucopyranoside)即异槲皮苷(isoquercitrin)。

化合物 V 白色针状结晶,易溶于甲醇。遇浓硫酸显蓝色,Molish 反应呈阳性。经酸水解后,其糖部分经薄层色谱检识证明含有葡萄糖。ESI-MS(pos.)谱中,在 *m/z* 373 处可见 [M + H]⁺ 离子峰,表明相对分子质量为 372。结合¹H-和¹³C-NMR 谱,推测其分子式为 C₁₇H₂₄O₉,计算其不饱和度为 6。¹H-NMR:6.75(1H, *s*, H-3), 6.75(1H, *s*, H-5), 6.54(1H, *d*, *J* = 15.6 Hz, H-1'), 6.32(1H, *dt*, *J* = 15.6, 5.6 Hz, H-2'), 4.22(2H, *dd*, *J* = 5.6, 1.2 Hz, H-3'), 4.87(1H, *d*, *J* = 7.6 Hz, H-1''), 3.20(1H, *m*, H-2''), 3.40(1H, *m*, H-3''), 3.40(1H, *m*, H-4''), 3.46(1H, *m*, H-5''), 3.77(1H, *dd*, *J* = 12.0, 2.4 Hz, H-6''a), 3.66(1H, *dd*, *J* = 12.0, 2.4 Hz, H-6''b)。 ¹³C-NMR:130.0(C-1), 154.4(C-2), 105.4(C-3), 135.2(C-4), 105.4(C-5), 154.4(C-6), 135.8(C-1'), 131.3(C-2'), 62.6(C-3'), 105.3(C-1''), 75.7(C-2''), 77.8(C-3''), 71.3(C-4''), 78.4(C-5''), 63.6(C-6'')。以上数据与文献[8]报道基本一致,故鉴定该化合物为紫丁香苷(syringoside)。

化合物 VI 白色针状结晶,Libermann-Burchard

反应阳性,Molish 反应呈阴性,说明该化合物不是糖苷。化合物Ⅵ的 IR 光谱: V_{cm-1}^{KBr} 3 420(OH), 2 960, 2 863(CH₃), 2 935, 2 851(CH₂), 1 637(C=C), 1 466(环 C-H, 宽), 1 382(CH₃, 宽), 1 050(仲 C-O)。进一步将化合物Ⅵ的 IR 与文献[9]对照, 均与 β -谷甾醇一致, 将化合物与 β -谷甾醇对照品进行硅胶 TLC 检测, 在 2 种展开系统下具有相同的 R_f 值。故确定化合物Ⅵ的结构为 β -谷甾醇。

化合物Ⅶ 白色针状结晶, 易溶于丙酮和氯仿。10% 硫酸乙醇显紫色。化合物Ⅶ的 ESI-MS(pos.) 谱中, 在 m/z 507 处可见 [M + K]⁺ 离子峰, 表明相对分子质量为 468。结合 ¹H-和 ¹³C-NMR 波谱, 推测其分子式为 C₂₆H₃₀O₈, 计算不饱和度为 12。¹H-NMR: 4.08(1H, *t*, *J* = 6.0 Hz, H-1), 2.97(1H, *dd*, *J* = 18, 2.4 Hz, H-2a), 2.85(1H, *dd*, *J* = 18, 2.4 Hz, H-2b), 6.24(1H, *s*, H-6), 2.67(1H, *dd*, *J* = 12.8, 1.6 Hz, H-9), 1.95(1H, *m*, H-11a), 1.69(1H, *m*, H-11b), 1.85(1H, *m*, H-12a), 1.46(1H, *m*, H-12b), 4.13(1H, *s*, H-15), 5.44(1H, *s*, H-17), 1.05(3H, *s*, H-18), 4.67(1H, *d*, *J* = 16 Hz, H-19a), 4.62(1H, *d*, *J* = 16 Hz, H-19b), 7.40(1H, *d*, *J* = 1.2 Hz, H-21), 6.34(1H, *d*, *J* = 0.8 Hz, H-22), 7.41(1H, *br s*, H-23), 1.50(3H, *s*, H-28), 1.55(3H, *s*, H-29), 1.16(3H, *s*, H-30)。¹³C-NMR: 79.1(C-1), 34.8(C-2), 166.4(C-3), 81.8(C-4), 169.0(C-5), 139.4(C-6), 195.2(C-7), 46.8(C-8), 46.3(C-9), 48.3(C-10), 20.6(C-11), 31.7(C-12), 37.3(C-13), 65.2(C-14), 52.1(C-15), 140.1(C-16), 77.7(C-17), 18.1(C-18), 68.5(C-19), 119.7(C-20), 141.1(C-21), 109.6(C-22), 143.3(C-23), 25.2(C-28), 25.7(C-29), 20.5(C-30)。以上数据与文献[10]报道基本一致, 故鉴定该化合物为去氢柠檬苦素(dehydrolimonin)。

4 讨论

吴茱萸苦味拆分组分——95% 乙醇洗脱组分系统分离后, 所得到的化学成分主要为黄酮、柠檬苦素类, 提示吴茱萸的苦味拆分组分物质基础应与此类成分有关。研究中发现上述黄酮以金丝桃苷含量较高, 提示在吴茱萸的止泻作用可能与所含金丝桃苷有一定关系。

[参考文献]

- [1] 匡海学, 程伟. 中药性味的可拆介性、可组合性研究——中药性味理论新假说与研究方法的探索[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2009, 11(6): 768.
- [2] 匡海学, 王艳宏, 王秋红, 等. 基于中药性味可拆介性和可组合性的中药性味理论研究新模式[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2010, 12(6), 1.
- [3] 杨志欣, 孟永海, 王秋红, 等. 吴茱萸化学拆分组分的性味药理学评价——化学拆分组分的制备及其镇痛作用的研究[J]. 中医药学报, 2011, 39(4), 11.
- [4] 杨志欣, 孟永海, 杨炳友, 等. 吴茱萸化学拆分组分的性味药理学评价——化学拆分组分抗炎作用的研究[J]. 中医药信息, 2011, 28(5), 13.
- [5] Markham K R, Ternai B, Stanley R, et al.,. Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III [J]. Tetrahedron, 1978, 34: 1389.
- [6] 潘浪胜, 吕秀阳, 吴平东. 吴茱萸中二种黄酮类化合物的分离和鉴定[J]. 中草药, 2004, 35(3): 259.
- [7] 陈龙. 罗布麻花化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(17): 1340.
- [8] 张宏桂, 吴广宣, 张永茂. 野生东北刺人参茎化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1993, 18(2): 104.
- [9] 黄文哲, 王磊, 段金廛. 短瓣金莲花化学成分的研究[J]. 中草药, 2000, 31(10): 731.
- [10] Yossio Hirose. Studies on components of evodiaefructus. (I). structure of rutaevin and dehydrolimonin [J]. Chem Pharm Bull, 1971, 19(6): 1268.

[责任编辑 邹晓翠]