

枳实药材乙醇提取物的化学成分研究^Δ

邓可众*, 苕美燕, 宗 琪, 熊 英[#](江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)04-0458-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.04.07

摘要 目的:研究枳实药材乙醇提取物的化学成分。方法:采用硅胶柱、开放ODS柱、制备液相色谱、HW-40F凝胶柱、大孔树脂柱对枳实药材乙醇提取物进行分离纯化,根据理化性质和波谱(质谱、氢谱、碳谱)数据分析鉴定化合物结构。结果:从枳实药材乙醇提取物中分离得到8个化合物,分别鉴定为Rimboxo(1)、胸苷(2)、尿嘧啶(3)、环-(亮氨酸¹-异亮氨酸²-丙氨酸³-苏氨酸⁴-甘氨酸⁵-苏氨酸⁶-苯丙氨酸⁷)(4)、环-(亮氨酸¹-亮氨酸²-脯氨酸³-酪氨酸⁴-甘氨酸⁵-丝氨酸⁶-脯氨酸⁷)(5)、水合橙皮内酯-β-D-葡萄糖苷(6)、伞形花内酯(7)、里那醇苷(8)。结论:化合物1、2、3、8为首次从柑橘属植物中分离得到,化合物4、5、6为首次从枳实药材中分离得到,该研究为枳实药材质量评价奠定了一定基础。

关键词 枳实;化学成分;结构鉴定;乙醇提取物;柑橘属

Study on Chemical Constituents of Ethanol Extract from *Citrus aurantium*

DENG Kezhong, CHANG Meiyan, ZONG Qi, XIONG Ying (College of Pharmacy, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the chemical constituents of ethanol extract from *Citrus aurantium*. METHODS: The ethanol extract of *C. aurantium* was isolated and purified by silica gel column, open ODS column, preparation liquid chromatography, HW-40F gel column and macroporous resin column. The structure of compounds was analyzed and identified according to physicochemical properties and spectral data (mass spectrum, hydrogen spectrum, carbon spectrum). RESULTS: Eight compounds were isolated from ethanol extract of *C. aurantium*, i.e. Rimboxo (1), Thymidine (2), Uracil (3), Cyclo-(Leu¹-Ile²-Ala³-Thr⁴-Gly⁵-Thr⁶-Phe⁷) (4), Cyclo-(Leu¹-Leu²-Pro³-Tyr⁴-Gly⁵-Ser⁶-Pro⁷) (5), Meranzin hydrate-β-D-glucoside (6), Umbelliferone (7), Linaloyl glucoside (8). CONCLUSIONS: Compound 1, 2, 3, 8 are isolated from *Citrus L.* for the first time, compound 4, 5, 6 were isolated from *C. aurantium* for the first time. The study lays the foundation for quality evaluation of *C. aurantium*.

KEYWORDS *Citrus aurantium*; Chemical constituent; Structural identification; Ethanol extract; *Citrus L.*

常用理气中药枳实主产于江西新干、樟树等地,经产地及市场资源调查发现,绝大多数枳实药材来源于芸香科柑橘属植物酸橙(*Citrus aurantium* L.)的干燥幼果。相关文献报道,酸橙含有多种活性成分,果实中的香豆素类、黄酮类成分均对胃肠道功能具有调节作用^[1-2];此外,多甲氧基黄酮、柠檬苦素类成分还具有抗肿瘤活性^[3]。本研究对枳实药材进行化学成分研究,以期对酸橙幼果的进一步开发利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Avance HD型600 MHz核磁共振仪(德国Bruker公司,四甲基硅烷为内标);2489 Alliance Separations Module型高效液相色谱仪(美国Waters公司);X-4型数字显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限责任公司);VG-Auto-spec-300型质谱仪、1100 LC/MSD Trap SL型质谱仪(美国Agilent公司);ODS-AQ型色谱柱(日本YMC公司);

Δ基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81260621)

*副教授,博士。研究方向:中药成分及品质评价。电话:0791-87118997。E-mail:dengkezhong@126.com

#通信作者:教授,博士。研究方向:中药活性成分。电话:0791-87118993。E-mail:jzxiongying@126.com

R-210型旋转蒸发器(瑞士Buchi公司);ZF-1型三用紫外分析仪(上海宝山顾村电光仪器厂);Exceed-E-UP型实验室超纯水机(成都艾柯有限公司);BSZ-40型自动部分收集器(上海沪西分析仪器厂有限公司)。

1.2 试剂

硅胶[100~200目(拌样)、200~300目(装柱),青岛海洋化工有限公司];开放ODS柱填料(50 μm,加拿大Silicycle公司);HW-40凝胶(30~60 μm,日本Tosoh公司);制备液相色谱柱填料(5 μm,日本YMC公司);大孔树脂(0.3~1.2 mm,日本Mitsubishi Chemical公司);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯;水为纯化水。

1.3 药材

试验药材均由笔者于2013年购自江西省樟树药材市场,经笔者鉴定为真品。

2 提取与分离

取药材50 kg,粉碎,依次以95%、70%乙醇溶液渗漉提取,提取液减压回收,得乙醇提取物浸膏;将上述浸膏以水分散,依次以石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,得各部位萃取液。其中,乙酸乙酯萃取液减压回收,得乙醇乙酯部位浸膏;正丁醇萃取液减压回收,得正丁醇部

位浸膏。

取乙醇乙酯部位浸膏适量,经硅胶柱,以二氯甲烷-甲醇(1:0、49:1、19:1、9:1、8:2、7:3、5:5、0:1, *V/V*)梯度洗脱,经薄层色谱层析检查后合并,得146个流分。其中,第133个流分经开放ODS柱,以水-甲醇(1:0、49:1、19:1、9:1、8:2、6:4、5:5、4:6、3:7、0:1, *V/V*)梯度洗脱,经薄层色谱层析检查后合并,得22个流分(Fr.1A~Fr.22A)。其中,流分Fr.1A经制备液相色谱,以甲醇-水(1:9, *V/V*)等度洗脱,得化合物**2**(3.6 mg);流分Fr.5A和Fr.6A合并后经HW-40凝胶柱,以甲醇等度洗脱,得化合物**3**(5.8 mg);流分Fr.11A、Fr.13A和Fr.17A分别经制备液相色谱、HW-40凝胶柱纯化,得化合物**4**(45 mg)、**5**(9 mg)、**7**(13 mg)和**8**(64.2 mg)。

正丁醇部位浸膏经大孔树脂柱,以30%乙醇溶液等度洗脱,所得洗脱部分经开放ODS柱,以水-甲醇(1:0、49:1、19:1、9:1、8:2、6:4、5:5、4:6、3:7、0:1, *V/V*)梯度洗脱,得22个流分(Fr.1B~Fr.22B)。其中,流分Fr.22B和Fr.3B分别经制备液相色谱,分别以甲醇-水(4.5:5.5, *V/V*)和甲醇-水(3.5:6.5, *V/V*)等度洗脱,得化合物**1**(3.9 mg)和**6**(4.0 mg)。

3 结构鉴定

化合物**1**:黄色油状物,分子式为 $C_8H_{12}O_4$ 。电喷雾质谱(ESI-MS): m/z 173[M+H]⁺。¹H-NMR(CD_3OD , 600 MHz) δ : 3.66(4H, m, H-2, H-2', H-3, H-3'), 3.60(4H, dd, $J=4.8, 11.4$ Hz, H-1a, H-1a', H-4a, H-4a'), 3.53(4H, dd, $J=6.0, 11.4$ Hz, H-1b, H-1b', H-4b, H-4b')。 ¹³C-NMR(CD_3OD , 150 MHz) δ : 78.8(C-2, C-2', C-3, C-3'), 64.4(C-1, C-1', C-4, C-4')。与文献[4]对照,其波谱数据基本一致,可确定该化合物为Rimboxo。

化合物**2**:白色粉末,分子式为 $C_{10}H_{14}N_2O_5$;熔点(mp):183~185 °C。ESI-MS: m/z 241[M-H]⁻。 ¹H-NMR(CD_3OD , 600 MHz) δ : 7.81(1H, s, H-3), 6.28(1H, t, $J=6.6$ Hz, H-1'), 4.40(1H, m, H-3'), 3.91(1H, m, H-4'), 3.79(1H, dd, $J=3.0, 12.0$ Hz, H-5'a), 3.74(1H, dd, $J=3.6, 12.0$ Hz, H-5'b), 2.25(2H, m, H-2'), 1.88(3H, s, H-5)。 ¹³C-NMR(CD_3OD , 150 MHz) δ : 166.5(C-1), 152.4(C-2), 138.2(C-3), 111.5(C-4), 88.8(C-4'), 86.2(C-1'), 72.2(C-3'), 62.8(C-5'), 41.3(C-2'), 12.5(ϵ C-2)。与文献[5]对照,其波谱数据基本一致,可确定该化合物为胸苷(Thymidine)。

化合物**3**:淡红色粉末,分子式为 $C_4H_4N_2O_2$; mp: 320~322 °C。ESI-MS: m/z 113.4[M+H]⁺。 ¹H-NMR(DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ : 7.38(1H, d, $J=7.6$ Hz, H-6), 5.44(1H, d, $J=7.6$ Hz, H-5); ¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ : 164.4(C-4), 151.5(C-2), 142.2(C-6), 100.2(C-5)。与文献[6]对照,其波谱数据基本一致,可确定该化合物为尿嘧啶(Uracil)。

化合物**4**:白色粉末,化学式为 $C_{34}H_{53}N_7O_9$; mp: 261~

264 °C。快原子轰击电离质谱(FAB-MS): m/z 704[M+H]⁺, 591[M+H-Leu]⁺, 120[Ph-CH₂-CH=NH₂]⁺。 ¹H-NMR(CD_3OD , 600 MHz) δ : 7.25(5H, m, Phe⁷-Ar), 4.80(1H, d, $J=6.0$ Hz, Phe⁷- α Hb), 4.53(1H, br. s, Leu¹- α H), 4.48(1H, m, Thr⁴- α H), 4.45(1H, m, Thr⁶- β H), 4.36(1H, d, $J=3.0$ Hz, Thr⁶- α H), 4.13(1H, d, $J=16.2$ Hz, Gly⁵- α H), 4.03(1H, s, Ala³- α H), 4.01(1H, d, $J=7.2$ Hz, Thr⁴- β H), 3.90(1H, d, $J=7.8$ Hz, Ile²- α H), 3.48(1H, d, $J=16.2$ Hz, Gly⁵- α Ha), 3.24(1H, dd, $J=13.8, 6.0$ Hz, Phe⁷- β Ha), 3.02(1H, dd, $J=13.8, 6.6$ Hz, Phe⁷- β Hb), 1.86(1H, m, Ile²- β H), 1.65(2H, m, Leu¹- β H), 1.57(1H, m, Ile²- γ Hb), 1.56(1H, m, Leu¹- γ H), 1.53(2H, d, $J=7.2$ Hz, Ala³- β CH₃), 1.26(1H, m, Ile²- γ Ha), 1.16(3H, d, $J=6.6$ Hz, Thr⁶- γ CH₃), 1.08(3H, d, $J=6.6$ Hz, Thr⁴- γ CH₃), 0.99(6H, d, $J=6.6$ Hz, Leu¹-CH₃), 0.94(6H, m, Ile²-CH₃)。 ¹³C-NMR(CD_3OD , 150 MHz) δ : 175.8(Ala³-CO), 174.5(Leu¹-CO), 173.7(Phe⁷-CO), 173.3(Thr⁶-CO), 173.3(Thr⁴-CO), 172.7(Ile²-CO), 171.7(Gly⁵-CO), 138.3(Phe⁷- γ C), 130.8(Phe⁷- ϵ CH), 129.6(Phe⁷- δ CH), 127.8(Phe⁷- ζ CH), 70.0(Thr⁶- β CH), 67.7(Thr⁶- β CH), 60.7(Thr⁶- α CH), 60.5(Thr⁴- α CH), 60.4(Ile²- α CH), 55.9(Phe⁷- α CH), 52.8(Leu¹- α CH), 52.2(Ala³- α CH), 44.1(Gly⁵- α CH), 41.5(Leu¹- β CH), 37.7(Phe⁷- β CH₂), 37.1(Ile²- β CH), 27.0(Ile²- γ CH), 26.1(Leu¹- γ CH), 23.6(Leu¹- δ CH₃), 21.4(Leu¹- ϵ CH₃), 20.3(Thr⁴- γ CH₃), 20.1(Thr⁴- γ CH₃), 16.6(Ala³- β CH₃), 15.7(Ile²- γ CH₃), 11.3(Ile²- δ CH₃)。与文献[7]对照,其波谱数据基本一致,可确定该化合物为环-(亮氨酸¹-异亮氨酸²-丙氨酸³-苏氨酸⁴-甘氨酸⁵-苏氨酸⁶-苯丙氨酸⁷)[Cyclo-(Leu¹-Ile²-Ala³-Thr⁴-Gly⁵-Thr⁶-Phe⁷)]

化合物**5**:白色粉末,分子式为 $C_{36}H_{53}N_7O_9$; mp: 185~188 °C。FAB-MS: m/z 728[M+H]⁺, 615[M+H-Leu]⁺, 502[M+H-Leu-Leu]⁺, 70[CH₂-CH₂-NH=CH-CH₂]⁺。 ¹H-NMR(CD_3OD , 600 MHz) δ : 7.06(2H, d, $J=8.3$ Hz, Tyr⁴- δ H), 6.72(2H, d, $J=8.3$ Hz, Tyr⁴- ϵ H), 4.66(1H, m, Tyr⁴- α H), 4.58(1H, m, Gly⁵- α Ha), 4.39(1H, m, Ser⁶- α H), 4.22(1H, m, Pro³- α H), 4.18(1H, m, Pro⁷- α H), 4.03(1H, m, Ser⁶- β Ha), 3.99(1H, m, Leu¹- α H), 3.94(1H, m, Leu²- α H), 3.65(1H, m, Gly⁵- α Hb), 3.62(1H, m, Ser⁶- β Hb), 3.55(2H, m, Pro³- δ H), 2.96(2H, m, Pro⁷- δ H), 2.42(1H, m, Tyr⁴- β Ha), 2.29(1H, m, Pro⁷- γ Hb), 2.20(1H, m, Tyr⁴- β Hb), 2.09(1H, m, Pro³- β Ha), 2.02(1H, m, Pro⁷- β Ha), 1.97(1H, m, Pro³- γ Ha), 1.85(1H, m, Pro³- β Hb), 1.81(1H, m, Pro⁷- β Hb), 1.68(1H, m, Leu¹- γ H), 1.65(1H, m, Leu²- γ H), 1.58(2H, m, Leu¹- β H), 1.35(1H, m, Pro³- γ Hb), 1.01(2H, m, Leu²- β H), 1.00(1H, m, Pro⁷- γ Ha), 0.95(3H, d, $J=6.6$ Hz, Leu¹- δ CH₃), 0.93(3H, d, $J=6.6$ Hz, Leu²- δ CH₃), 0.92(3H, d, $J=6.6$ Hz, Leu¹- δ CH₃), 0.86(3H, d, $J=6.6$ Hz, Leu²- δ CH₃)。 ¹³C-NMR(CD_3OD , 150 MHz) δ : 173.0

(Pro³-CO), 172.9 (Pro⁷-CO), 172.6 (Leu¹-CO), 172.2 (Leu²-CO), 170.8 (Ser⁶-CO), 170.7 (Tyr⁴-CO), 169.4 (Gly⁵-CO), 156.3 (Tyr⁴-ζ C), 129.8 (Tyr⁴-δ CH), 126.4 (Tyr⁴-γ C), 115.0 (Tyr⁴-ε CH), 61.1 (Ser⁶-β CH₂), 61.1 (Pro³-α CH), 59.7 (Pro⁷-α CH), 58.0 (Leu¹-α CH), 57.8 (Leu²-α CH), 52.9 (Ser⁶-α CH), 49.3 (Tyr⁴-α CH), 48.2 (Pro³-δ CH₂), 46.6 (Pro⁷-δ CH₂), 41.6 (Leu¹-β CH₂), 40.4 (Leu²-β CH₂), 39.2 (Gly⁵-α CH₂), 35.7 (Tyr⁴-β CH₂), 31.1 (Pro³-β CH₂), 28.1 (Pro⁷-β CH₂), 24.8 (Pro³-γ CH₂), 24.3 (Leu²-γ CH), 24.2 (Leu¹-γ CH), 22.5 (Leu¹-δ CH₃), 22.2 (Leu²-δ CH₃), 21.9 (Leu¹-ε CH₃), 21.5 (Pro⁷-γ CH₂), 19.9 (Leu²-ε CH₃)。与文献[7]对照,其波谱数据基本一致,可确定该化合物为环-(亮氨酸¹-亮氨酸²-脯氨酸³-酪氨酸⁴-甘氨酸⁵-丝氨酸⁶-脯氨酸⁷)[Cyclo-(Leu¹-Leu²-Pro³-Tyr⁴-Gly⁵-Ser⁶-Pro⁷)]。

化合物 6: 淡黄色粉末, 分子式为 C₂₁H₂₈O₁₀, mp: 210~213 °C。ESI-MS: *m/z* 458[M+NH₄]⁺。¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ: 7.91 (1H, d, *J*=9.0 Hz, H-4), 7.52 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5), 7.07 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-6), 6.26 (1H, d, *J*=9.0 Hz, H-3), 4.59 (1H, d, *J*=7.2 Hz, H-1''), 3.97 (3H, s, 7-OCH₃), 1.43 (3H, s, 14-CH₃), 1.41 (3H, s, 15-CH₃)。 ¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ: 163.8 (C-2), 162.5 (C-7), 154.7 (C-10), 146.39 (C-4), 128.4 (C-5), 117.2 (C-9), 114.4 (C-8), 113.1 (C-3), 109.0 (C-6), 98.7 (C-1'), 81.9 (C-13), 78.1 (C-3'), 78.1 (C-5'), 77.7 (C-12), 75.2 (C-2'), 71.7 (C-4'), 62.7 (C-6'), 56.7 (7-OCH₃), 26.2 (C-11), 23.7 (C-14), 22.7 (C-15)。与文献[8]对照,其波谱数据基本一致,可确定该化合物为水合橙皮内酯-β-D-葡萄糖苷(Meranzin hydrate-β-D-glucoside)。

化合物 7: 无色针状结晶, 分子式为 C₉H₆O₃; 365 nm 波长处显亮蓝色荧光; mp: 231~233 °C。 ¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ: 7.84 (1H, d, *J*=9.6 Hz, H-4), 7.43 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5), 6.77 (1H, dd, *J*=8.4, 2.4 Hz, H-6), 6.69 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-8), 6.15 (1H, d, *J*=9.6 Hz, H-3)。 ¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ: 162.3 (C-7), 161.8 (C-2), 155.8 (C-9), 144.6 (C-4), 129.2 (C-5), 113.1 (C-6), 111.7 (C-3), 110.9 (C-10), 102.0 (C-8)。与文献[9]对照,其波谱数据基本一致,可确定该化合物为伞形花内酯(Umbelliferone)。

化合物 8: 无色胶状物, 分子式为 C₁₆H₂₈O₆。ESI-MS: *m/z* 317[M+H]⁺。 ¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ: 5.93 (1H, dd, *J*=17.4, 10.6 Hz, H-2), 5.23 (1H, dd, *J*=17.4, 1.2 Hz, H-1a), 5.19 (1H, d, *J*=10.6, 1.2 Hz, H-1b), 5.10 (1H, m, H-6), 4.35 (1H, d, *J*=7.8 Hz, H-1'), 3.80 (1H, dd, *J*=12.0, 2.4 Hz, H-6' a), 3.63 (1H, dd, *J*=12.0, 6.0 Hz, H-6' b), 3.33~3.14 (4H, m, H-2', H-3', H-4',

H-5'), 2.07 (2H, m, H-5), 1.66 (3H, s, H-9), 1.59 (3H, s, H-8), 1.61~1.57 (2H, m, H-4), 1.38 (3H, s, H-10)。 ¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ: 144.5 (C-2), 132.1 (C-7), 125.7 (C-6), 115.8 (C-1), 99.5 (C-1'), 81.4 (C-3), 78.3 (C-3'), 77.6 (C-5'), 75.2 (C-2'), 71.7 (C-4'), 62.8 (C-6'), 42.6 (C-4), 25.8 (C-9), 23.6 (C-5), 23.2 (C-8), 17.7 (C-10)。与文献[10]对照,其波谱数据基本一致,可确定该化合物为里那醇苷(Linaloyl glucoside)

4 讨论

本试验从枳实药材中分离鉴定了5个杂环类化合物,即 Rimboxo、胸苷、尿嘧啶、环-(亮氨酸¹-异亮氨酸²-丙氨酸³-苏氨酸⁴-甘氨酸⁵-苏氨酸⁶-苯丙氨酸⁷)、环-(亮氨酸¹-亮氨酸²-脯氨酸³-酪氨酸⁴-甘氨酸⁵-丝氨酸⁶-脯氨酸⁷); 2个香豆素类化合物,即水合橙皮内酯-β-D-葡萄糖苷、伞形花内酯; 1个单萜苷类化合物,即里那醇苷。其中,化合物 1、2、3、8 为首次从柑橘属植物中分离得到,化合物 4、5、6 为首次从枳实药材中分离得到; Rimboxo 为二噁烷类化合物,二噁烷和单萜苷为首次从柑橘属植物中分离得到。本研究为枳实药材的质量评价奠定了一定的基础。

参考文献

- [1] 贺梅娟, 杨晋翔, 魏玥, 等. 枳实挥发油对慢传输型便秘大鼠的影响[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(5): 1487-1491.
- [2] 张明智, 隋海娟, 张玲玲, 等. 橙皮苷对功能性消化不良大鼠胃肠运动及 Ghrelin 表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(2): 30-34.
- [3] 苏名媛, 牛江龙, 李林, 等. 川陈皮素的体外抑癌活性及其机制研究[J]. 中成药, 2011, 33(9): 1479-1483.
- [4] YAPA AC, CHANB KG, SIMB KS, et al. A new oxolane from *Enterobacter cloacae*[J]. *Nat Prod Res*, 2016, 30(7): 783-788.
- [5] 邓慧颖, 邢建广, 罗都强. 海莲内生真菌 *Pestalotiopsis clavispora* 代谢产物研究[J]. 菌物学报, 2011, 30(2): 263-267.
- [6] 孙变娜, 沈和定, 吴洪喜, 等. 紫色疣石磺化学成分分离与鉴定[J]. 中国药房, 2014, 25(11): 1019-1021.
- [7] 彭文文, 黄茂波, 宋卫武, 等. 中药枳壳中环肽成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(9): 1416-1420.
- [8] MCHALE D, KHOPKAR PP, SHERIDAN JB. Coumarin glycosides from *Citrus flavedo*[J]. *Phytochemistry*, 1987, 26(9): 2547-2549.
- [9] 邓可众, 丁邑强, 周斌, 等. 枳壳化学成分分离与鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(14): 36-38.
- [10] SEO Y, SHIN J, CHA HJ, et al. A new monoterpene glucoside from *portulaca oleracea*[J]. *Cheminform*, 2004, 35(10): 1475-1477.

(收稿日期: 2017-04-30 修回日期: 2017-06-26)

(编辑: 张静)