

石榴皮总多酚有效部位的化学成分分析

刘丽, 常文, 邱慧敏, 马桂芝*

(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054)

[摘要] **目的:**研究石榴皮总多酚有效部位正丁醇萃取物的化学成分, 阐述其抗肿瘤作用的物质基础, 为其深度开发利用提供科学依据。**方法:**采用硅胶柱色谱和反相硅胶柱色谱及制备液相色谱等多种分离技术, 从石榴皮总多酚有效部位正丁醇萃取物分离得到了 6 个单体化合物, 根据理化性质和¹H-NMR, ¹³C-NMR 等波谱学数据进行结构鉴定。**结果:**经过结构鉴定, 从石榴皮总多酚有效部位正丁醇萃取物中分离得到的 6 个单体化合物分别为水仙苷(1), 1-*O*-没食子酰基-β-*D*-葡萄糖(2), 2-甲氧基对苯二酚-4-*O*-葡萄糖苷(3), 对羟基苯甲酸葡萄糖酯(4), 对香豆酸葡萄糖酯(5), 苯乙醇芸香糖苷(6)。**结论:**除化合物 2 外, 其他化合物均为首次从石榴皮中分离得到。

[关键词] 石榴皮总多酚有效部位; 化学成分; 结构鉴定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)06-0071-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016060071

Chemical Compositions of Effective Part in Total Polyphenols From Pomegranate Peel

LIU Li, CHANG Wen, QIU Hui-min, MA Gui-zhi*

(Pharmacy College of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

[Abstract] **Objective:** To study the chemical constituents from *n*-butyl alcohol extracts of total polyphenols effective part from pomegranate peel, expound the material foundation of its anti-tumor effect, and provide scientific basis for its development and utilization. **Method:** Separation techniques such as silica gel column chromatography, reversed-phase silica gel column chromatography and preparation liquid chromatography were used, and 6 monomer compounds were isolated from total polyphenols effective part from pomegranate peel. Their structures were identified according to the physicochemical properties, ¹H-NMR spectroscopy data and ¹³C-NMR spectroscopy data. **Result:** Six monomer compounds were obtained from *n*-butyl alcohol extracts of total polyphenols effective part from pomegranate peel, and were identified as narcissin (1), 1-*O*-galloyl-β-*D*-glucos (2), tannin (3), *p*-hydroxybenzoic acid glucose ester (4), coumaric acid glucose ester (5), 2-phenylethyl rutinoside (6). **Conclusion:** All other compounds except compound 2 were isolated from pomegranate peel for the first time.

[Key words] total polyphenols effective part from pomegranate peel; chemical composition; structure identification

石榴 *Punica granatum* 原名“安石榴”, 又名丹若、若榴、天浆等, 为石榴科 Punicaceae 落叶灌木或小乔木^[1], 维吾尔语称阿娜尔。石榴原产于伊朗及阿富汗等中亚地带, 于汉代传入我国, 目前已有 70

多个品种, 中国南北各地除极寒地区外, 均有分布^[2]。石榴果实汁多味美、营养丰富, 具有很高的食用价值和药用价值。在我国传统中医药、维族医药、藏族医药以及世界多个国家地区的传统医药中

[收稿日期] 20150904(006)

[基金项目] 新疆维吾尔自治区科技支撑计划项目(201233135)

[第一作者] 刘丽, 硕士, 从事中药民族药研究, Tel:15899209760, E-mail:754347807@qq.com

[通讯作者] * 马桂芝, 博士, 副教授, 从事中药民族药研究, Tel:13565406975, E-mail:maguizhi000@126.com

具有悠久的历史。

石榴皮,为石榴科植物石榴 *P. granatum* 的干燥果皮^[3],又名石榴壳、酸榴皮、酸石榴皮。始载于《名医别录》,原名酸实壳。具有涩肠止泻,止血,驱虫等功效,用于久泻,久痢,便血,脱肛,崩漏,带下,虫积腹痛^[4]。近年来国内外多项研究表明石榴具有抗菌^[5-6],抗病毒^[7],抗肿瘤^[8-9],抗氧化^[10-11],降血糖^[12-13],免疫调节^[14-15],改善消化系统^[16-17],心血管系统^[18-19],促进表皮再生^[20],避孕^[21]等作用。

其中石榴中的多酚类成分具有明显的抗肿瘤作用^[22],同时研究表明石榴皮在石榴各部位中多酚类成分含量最高^[23]。

本课题组完成了石榴皮总多酚有效部位的制备工艺^[24]、质量研究等药学研究工作:通过品种筛选得出新疆喀什市酸石榴中多酚含量最高,确定了石榴皮总多酚有效部位的提取工艺并建立了质量标准;制得石榴皮多酚有效部位中安石榴苷、鞣花酸、没食子酸的含量大于总量的 50%,符合中药有效部位标准要求。对石榴皮总多酚有效部位进行单次给药毒性试验^[25],其 LD_{50} 为 $8\,520.9\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;对体外抗肿瘤作用进行研究,结果表明该有效部位的对人前列腺癌 PC-3 细胞具有明显的生长抑制和诱导凋亡的作用,且抑制率随着时间的延长而提高^[26],可有效抑制裸鼠人前列腺癌 PC-3 细胞皮下移植瘤的生长^[27]。

国内外学者对石榴中化学成分研究较多^[28],但关于石榴皮多酚有效部位的化学成分未见报道,本文对石榴皮总多酚有效部位进行了系统的化学成分研究,从中分离得到 6 个单体化合物,分别为水仙苷(1),1-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖(2),2-甲氧基对苯二酚-4-*O*-葡萄糖苷(3),对羟基苯甲酸葡萄糖酯(4),对香豆酸葡萄糖酯(5),苯乙醇芸香糖苷(6)。除化合物 2 外,其余 5 个化合物均为首次从石榴皮中分离得到。该研究为阐明其抗肿瘤作用的物质基础,进而为以石榴皮多酚有效部位为原料的制剂开发及其质量控制奠定了一定的试验基础。

1 材料

ZF-2 型紫外分光仪(上海安亭电子仪器厂),LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津),CBM-20A 型制备液相(SHIMADZU CORPORATION, JAPAN),Bruker-600 型核磁共振仪。

薄层色谱用硅胶 G100~200 目,柱色谱用硅胶 200~300 目(均青岛海洋化工厂),反相柱色谱硅胶(北京绿百草科技发展有限公司),Kromasil C₁₈ 分析

色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),Kromasil C₁₈ 制备色谱柱(20 mm×250 mm,10 μm),均由日本 Nacalai Tesque, Inc. 公司提供。TLC 以 0.5% CMC-Na 铺制,阴干备用。

提取、薄层及常压硅胶柱分离用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇、乙醇等均为分析纯试剂;高效液相(HPLC)用色谱甲醇为 Sigma 公司产品;水为屈臣氏蒸馏水。

喀什酸石榴皮收集于新疆喀什市,经新疆医科大学药学院帕丽达教授鉴定为石榴科喀什酸石榴 *P. granatum* 的果皮。

石榴皮总多酚有效部位的制备^[24]:喀什市酸石榴皮粉末(过 80 目筛)用 60% 乙醇浸提 30 min,过滤,减压浓缩得 $20.8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶液,选用 HPD500 型大孔吸附树脂上样后,以 7 倍柱体积(7 BV)蒸馏水,8 BV 50% 乙醇洗脱,收集乙醇洗脱液,减压浓缩,冷冻干燥,即得。

2 提取与分离

取石榴皮总多酚有效部位,用乙酸乙酯、正丁醇萃取后,取正丁醇萃取物约 180 g,经常压硅胶(100~200 目)柱色谱,三氯甲烷-甲醇(50:1,20:1,10:1,8:1,5:1,2:1,1.5:1,1:1,1:2)梯度冲洗,得到 25 个部分(Fr. 1~Fr. 25)。Fr. 11(2.5 g)经反相硅胶柱色谱,甲醇-水(0:100~35:65)梯度洗脱,分为 4 个部分(Fr. 11.1~Fr. 11.4)。Fr. 11.4(300 mg),经制备 HPLC(40% 甲醇),得化合物 1(25 min,11.2 mg)。Fr. 13 经反相硅胶柱色谱(ODS),甲醇-水(0:100~100:0)梯度洗脱,分为 8 个部分(Fr. 13.1~Fr. 13.8)。Fr. 13.1(5 g),经制备 HPLC(10% 甲醇),得化合物 2(7 min,4.0 mg)。Fr. 13.3(44 mg),经制备 HPLC(10% 甲醇),得化合物 3(9 min,7 mg)。Fr. 13.4(83 mg),经制备 HPLC(10% 甲醇),得化合物 4(21 min,4 mg),Fr. 13.4 有结晶析出,将结晶复溶后经制备 HPLC(15% 甲醇),得化合物 5(40 min,4.7 mg)。Fr. 13.5(58.4 mg),经制备 HPLC(35% 甲醇),得化合物 6(18 min,12 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1 黄色针晶(甲醇),¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ :6.21(1H, d, $J = 1.8\text{ Hz}$, H-6), 6.40(1H, d, $J = 1.8\text{ Hz}$, H-8), 7.68(1H, d, $J = 1.8\text{ Hz}$, H-2'), 6.88(1H, d, $J = 8.4\text{ Hz}$, H-5'), 7.64(1H, dd, $J = 8.4, 1.8\text{ Hz}$, H-6'), 5.10(1H, d, $J = 7.8\text{ Hz}$, H-1"), 3.20~3.90(10H, m, H-2", 3", 4", 5", 6"), 4.53(1H, m, H-1"), 3.20~3.90(10H,

m, H-2''', 3''', 4', 5'''), 1.13 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6'''), 3.61 (3H, s, OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 158.6 (C-2), 135.6 (C-3), 179.3 (C-4), 162.9 (C-5), 104.8 (C-6), 166.7 (C-7), 95.0 (C-8), 158.6 (C-9), 105.4 (C-10), 123.1 (C-1'), 116.1 (C-2'), 149.9 (C-3'), 145.9 (C-4'), 117.7 (C-5'), 123.5 (C-6'), 102.4 (C-1''), 75.7 (C-2''), 78.2 (C-3''), 72.2 (C-4''), 77.2 (C-5''), 68.6 (C-6''), 100.2 (C-1'''), 71.4 (C-2'''), 72.1 (C-3'''), 74.0 (C-4'''), 69.7 (C-5'''), 17.9 (C-6'''), 64.3 (OCH₃)。与文献[29]报道基本一致,故确定化合物**1**为水仙苷(narcissin)。

化合物**2** 白色粉末(甲醇), ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 5.67 (2H, s, H-2, 6), 4.22 (1H, s, H-1'), 2.00 ~ 2.50 (6H, m, H-2', 3', 4', 5', 6'); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 120.5 (C-1), 111.7 (C-2, 6), 146.5 (C-3, 5), 140.3 (C-4), 167.8 (C-7), 95.8 (C-1'), 73.4 (C-2'), 76.8 (C-3'), 70.6 (C-4'), 78.1 (C-5'), 61.7 (C-6')。与文献[30]报道基本一致,故确定化合物**2**为1-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖(1-*O*-galloyl-*D*-glucose)。

化合物**3** 白色粉末(水), ¹H-NMR (600 MHz, D₂O) δ : 6.68 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6), 6.66 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3), 6.48 (1H, dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz, H-5), 4.82 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 3.75 (1H, dd, $J = 12.6, 1.8$ Hz, H-6'a), 3.56 (1H, dd, $J = 12.6, 6.0$ Hz, H-6'b), 3.28 ~ 3.43 (4H, m, H-2', 3', 4', 5'), 3.18 (3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, D₂O) δ : 152.1 (C-4), 149.3 (C-2), 141.9 (C-1), 117.0 (C-6), 110.2 (C-5), 105.3 (C-3), 102.7 (C-1'), 77.5 (C-3'), 77.0 (C-5'), 74.3 (C-2'), 70.9 (C-4'), 62.0 (C-6'), 57.3 (-OCH₃)。与文献[31]报道基本一致,故确定化合物**3**为2-甲氧基对苯二酚-4-*O*-葡萄糖苷(tachioside)。

化合物**4** 白色簇晶(甲醇), ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.95 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, 6), 6.83 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, 5), 5.67 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1'), 3.85 (1H, dd, $J = 12.0, 1.8$ Hz, H-6'a), 3.70 (1H, dd, $J = 12.0, 4.8$ Hz, H-6'b), 3.40 ~ 3.50 (4H, m, H-2', 3', 4', 5'); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 165.4 (C=O), 163.4 (C-4), 133.5 (C-2, 6), 121.8 (C-1), 116.4 (C-3, 5), 96.1 (C-1'), 79.0 (C-5'), 78.3 (C-3'), 74.2 (C-2'), 71.3 (C-4'), 62.5 (C-6')。与文献[32]报道基本一致,故确定化合物**4**为对羟基苯甲酸葡萄糖酯

(*p*-hydroxybenzoic acid glucose ester)。

化合物**5** 白色粉末(甲醇), ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.40 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-7), 7.46 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2, 6), 6.84 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, 5), 6.39 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-8), 5.59 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 3.87 (1H, dd, $J = 12.0, 1.2$ Hz, H-6'a), 3.69 (1H, dd, $J = 12.0, 4.8$ Hz, H-6'b), 3.39 ~ 3.51 (4H, m, H-2', 3', 4', 5'); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 168.0 (C=O), 161.9 (C-4), 148.2 (C-7), 131.5 (C-2, 6), 126.9 (C-1), 117.0 (C-3, 5), 114.2 (C-8), 95.8 (C-1'), 78.8 (C-3'), 78.0 (C-5'), 74.0 (C-2'), 71.1 (C-4'), 62.3 (C-6')。与文献[33]报道基本一致,故确定化合物**5**为对香豆酸葡萄糖酯(coumaric acid glucose ester)。

化合物**6** 白色粉末(甲醇), ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.24 ~ 7.26 (4H, m, H-2, 3, 5, 6), 7.16 ~ 7.18 (1H, m, H-4), 4.74 (1H, br s, H-1''), 4.29 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1'), 4.01 ~ 4.05 (1H, m, H- α -1), 3.98 (1H, dd, $J = 11.4, 1.8$ Hz, H-6'a), 3.83 (1H, dd, $J = 3.0, 1.8$ Hz, H-5''), 3.74 ~ 3.78 (1H, m, H- α -2), 3.66 ~ 3.68 (2H, m, H-2'', 3''), 3.61 (1H, dd, $J = 10.8, 6.0$ Hz, H-6'b), 3.17 ~ 3.41 (4H, m, H-2', 3', 4', 5', 4''), 2.92 ~ 2.95 (2H, m, H- β), 1.25 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6''); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 140.2 (C-1), 130.2 (C-3, 5), 129.6 (C-2, 6), 127.4 (C-4), 104.7 (C-1'), 102.4 (C-1''), 78.2 (C-3'), 77.0 (C-5'), 75.2 (C-2'), 74.2 (C-4''), 72.5 (C-3''), 72.4 (C-2''), 72.0 (C- α), 71.8 (C-4'), 70.0 (C-5''), 68.3 (C-6'), 37.5 (C- β), 18.2 (C-6'')。与文献[34]报道基本一致,故确定化合物**6**为苯乙醇芸香糖苷(2-phenylethyl rutinoside)。

[参考文献]

- [1] 尤传楷. 中国农业百科全书·观赏园艺卷[M]. 北京: 农业出版社, 1996: 389-390.
- [2] 王庸生. 中国农业百科全书·果树卷[M]. 北京: 农业出版社, 1993: 305-307.
- [3] 施仲安, 洪恂, 丁绪亮, 等. 中国医学百科全书·中药学(78) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 365-366.
- [4] 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: 87.
- [5] Ismail T, Sestili P, Akhtar S. Pomegranate peel and

- fruit extracts; a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 143(2):397-405.
- [6] Dahham S S, Ali M N, Tabassum H, et al. Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) [J]. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 2010, 9(3):273-281.
- [7] Watson R R. Nutrients and foods in AIDS [M]. Boca Raton: CRC Press, 1998:179-192.
- [8] Kim N D, Mehta R, Yu W P, et al. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2002, 71(3):203-217.
- [9] Lansky E P, Newman R A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 109(2):177-206.
- [10] Negi P S, Jayaprakasha G K, Jena B S. Antioxidant and anti-mutagenic activities of pomegranate peel extracts [J]. *Food Chem*, 2003, 80(3):393-397.
- [11] Kim N D, Mehta R, Yu W P. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2002, 71:203-217.
- [12] 周众, 焦谊, 连政, 等. 石榴皮提取物对糖尿病大鼠血糖和血脂的影响 [J]. *新疆医科大学学报*, 2012, 35(5):570-574.
- [13] Khalil E A M. Antidiabetic effect of an aqueous extract of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels in normal and alloxan diabetic rats [J]. *Egypt J Hosp Med*, 2004, 16(1):92-99.
- [14] Gracious R R, Selasubramanian S, Jayasundar S. Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits; a preliminary study [J]. *J Ethnopharmacol*, 2001, 78(1):85-87.
- [15] Yamasaki M, Kitagawa T, Koyanagi N, et al. Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice [J]. *Nutrition*, 2006, 22:54-59.
- [16] Neyrinck A M, Van Hée V F, Bindels L B, et al. Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice; potential implication of the gut microbiota [J]. *Br J Nutr*, 2013, 109(5):802-809.
- [17] Qnais E Y, Elokda A S, Abu Ghalyun Y Y, et al. Antidiarrheal activity of the aqueous extract of *Punica granatum*. (pomegranate) peels [J]. *Pharm Biol*, 2007, 45(9):715-720.
- [18] Aviram M, Rosenblat M. Pomegranate protection against cardiovascular diseases [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012:1-20.
- [19] Aviram M, Volkova N, Coleman R, et al. Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic; studies *in vivo* in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient (E0) mice and *in vitro* in cultured macrophages and lipoproteins [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(3):1148-1157.
- [20] Yan H, Peng K J, Wang Q L, et al. Effect of pomegranate peel polyphenol gel on cutaneous wound healing in alloxan-induced diabetic rats [J]. *Chin Med J*, 2012, 126(9):1700-1706.
- [21] Zhou B, Qiu Z, Liu G, et al. Spermicidal and antigonococcal effects of tannins from pomegranate rind [J]. *J Med Plants Res*, 2012, 6(7):1334-1339.
- [22] 姜婧, 高晓黎, 马桂芝. 石榴主要成分的抗肿瘤研究进展 [J]. *农垦医学*, 2010, 32(3):259-262.
- [23] 彭海燕. 石榴不同品种及不同部位多酚含量的比较研究 [D]. 成都: 西华大学, 2012.
- [24] 周湘龙, 高晓黎, 丁楠, 等. 新疆喀什石榴皮总多酚有效部位的纯化工艺优选 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 23(12):54-58.
- [25] 史李娜, 王雪飞, 马桂芝, 等. 石榴皮多酚有效部位单次给药毒性及对无水乙醇致大鼠胃溃疡的保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(5):709-715.
- [26] 王春梅, 马桂芝, 高晓黎, 等. 石榴皮多酚对人前列腺癌 PC-3 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *西北药学杂志*, 2013, 28(3):271-274.
- [27] Ma G Z, Wang C M, Li L, et al. Effect of pomegranate peel polyphenols on human prostate cancer PC-3 cells *in vivo* [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2015, 24(5):1-6.
- [28] 蔡霞, 刘悦, 张芳芳, 等. 石榴的化学成分与质量控制研究进展 [J]. *世界科学技术—中药现代化*, 2014, 16(1):123-129.
- [29] 彭江南, 冯孝章, 梁晓天. 耳草属植物的化学研究 VIII 黄毛耳草化学成分的分离和鉴定 [J]. *中草药*, 1999, 30(3):170-172.
- [30] 张兰珍, 赵文华, 郭亚建, 等. 藏药余甘子化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(10):940-943.
- [31] Shgo I, Manami S, Hiroshi K, et al. Aromatic glycosides from *Berchemia racemosa* [J]. *Phytochemistry*, 1987, 26(10):2811-2814.
- [32] 田宝泉, 杨益平, 何直升, 等. 苦瓜水溶性部位化学成分的研究 [J]. *中草药*, 2005, 35(6):657-658.
- [33] Baderschneider B, Winterhalter P. Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(6):2788-2798.
- [34] 黄永林, 刘金磊, 陈月圆, 等. 红背山麻杆叶的化学成分研究 (II)——黄酮和苯乙醇苷类化合物 [J]. *广西植物*, 2014, 34(2):143-147.

[责任编辑 邹晓翠]