

吴茱萸水提取物化学成分研究

刘珊珊^{1,2}, 周兴清^{2,3}, 梁彩霞², 张启伟², 闫利华^{2*}, 王智民^{2*}

(1. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700; 3. 云南中医学院, 昆明 650500)

[摘要] 目的:研究吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* 果实水提取物的化学成分。方法:采用大孔吸附树脂,硅胶,小孔树脂凝胶(MCI),羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20),ODS柱色谱以及半制备高效液相色谱等方法进行分离纯化,根据理化性质和波谱数据鉴定化合物结构。结果:从吴茱萸果实的水提取物中分离鉴定了11个化合物,包括5个酚酸及其苷,分别为绿原酸(1),新绿原酸(2),隐绿原酸(3),松柏苷(4),咖啡酸(5);4个黄酮及其苷,分别为槲皮素-3-O- α -D-吡喃阿拉伯糖苷(6),金丝桃苷(7),芦丁(8),槲皮素(9);1个柠檬苦素苷,为 limonin diosphenol 17- β -D-glucopyranoside (10);1个生物碱,为去氢吴茱萸碱(11)。结论:化合物2~4,6为首次从该属植物中分离得到。通过二维核磁共振谱确证,首次完整报道化合物10的氢谱数据。鉴于吴茱萸的基原有3个(吴茱萸、石虎和疏毛吴茱萸),通过对照品的超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS)分析,对3种植物基原的吴茱萸药材进行成分确认,从石虎和疏毛吴茱萸中首次鉴定出绿原酸(1),新绿原酸(2)和隐绿原酸(3),从石虎中鉴定出金丝桃苷(7)。

[关键词] 吴茱萸; 化学成分; 酚酸; 柠檬苦素苷; 超高效液相色谱-质谱联用

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)08-0058-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016080058

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160311.1042.018.html>

[网络出版时间] 2016-03-11 10:42

Chemical Constituents from Aqueous Extract of *Euodiae Fructus*

LIU Shan-shan^{1,2}, ZHOU Xing-qing^{2,3}, LIANG Cai-xia²,
ZHANG Qi-wei², YAN Li-hua^{2*}, WANG Zhi-min^{2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Herbal Medicine, Beijing 100700, China;

3. Yunnan University of TCM, Kunming 650500, China)

[Abstract] **Objective:** To study the chemical constituents from the aqueous extract of the fruits of *Euodia rutaecarpa*. **Method:** Compounds were isolated and purified by macroporous resin, silica gel, MCI resin, Sephadex LH-20, ODS column chromatography, and semi-preparative HPLC. Their structures were identified on the basis of physicochemical properties and spectral data. **Result:** Eleven compounds (including five phenolic acids and their glycosides, four flavonoids, one limonin glucoside and one alkaloid) were isolated from the aqueous extract of the fruits of *E. rutaecarpa* and identified as chlorogenic acid (1), 5-O-caffeoylquinic acid (2), 4-O-caffeoylquinic acid (3), coniferin (4), caffeic acid (5), quercetin 3-O- α -D-arabinopyranoside (6), hyperin (7), rutin (8), quercetin (9), limonin diosphenol 17- β -D-glucopyranoside (10), dehydroevodiamine (11).

[收稿日期] 20151204(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31200244);中医药行业科研专项(201507002)

[第一作者] 刘珊珊,在读硕士,从事中药化学和质量评价研究,E-mail:blackshan0703@163.com

[通讯作者] *闫利华,博士,副研究员,从事中药化学和质量评价研究,E-mail:yanlihua2829@163.com;

*王智民,博士,研究员,从事中药化学和质量评价研究,Tel/Fax:010-84014128,E-mail:zhmw123@263.net

Conclusion: Compounds **2** ~ **4** and **6** were isolated from this genus for the first time. As confirmed by two-dimensional nuclear magnetic spectrum, the $^1\text{H-NMR}$ spectral data of compound **10** was totally reported for the first time. In addition, by ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS), chlorogenic acid (**1**), 5-*O*-caffeoylquinic acid (**2**) and 4-*O*-caffeoylquinic acid (**3**) were identified from *E. rutaecarpa* var. *officinalis* and *E. rutaecarpa* var. *bodinieri* for the first time, whereas, hyperin (**7**) was identified from *E. rutaecarpa* var. *officinalis*.

[Key words] Euodiae Fructus; chemical constituents; phenolic acid; limonin glucoside; UPLC-MS

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa*, 石虎 *E. rutaecarpa* var. *officinalis* 或疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* var. *bodinieri* 的干燥近成熟果实, 具有散寒止痛, 降逆止呕, 助阳止泻的功效^[1]。吴茱萸始载于《神农本草经》, 列为中品, 以吴茱萸为主药的中医方剂很多, 如《伤寒论》中治厥阴头痛、干呕涎沫的“吴茱萸汤”^[2], 《金匱要略》中治冲任虚寒、瘀血阻滞的“温经汤”^[3], 《丹溪心法》中治肝火犯胃、呕吐吞酸的“左金丸”^[4]等。从 20 世纪 60 年代开始, 国内外学者陆续对吴茱萸的化学成分展开研究, 已从中分离得到生物碱^[5-9]、柠檬苦素^[10-11]、黄酮^[12-13]、酚酸^[14]等多种类型的化合物。现代药理学研究表明吴茱萸具有镇痛^[15]、抗炎^[16]、抗菌^[17]、止呕^[18]、止泻^[18]、抗肿瘤^[19]等作用。但在以往研究中, 吴茱萸的提取方式绝大多数是采用乙醇或甲醇等有机溶剂提取, 对生物碱等脂溶性成分的关注较多。然而, 吴茱萸的传统用药习惯为水煎煮, 但其水溶性成分报道较少。目前, 已报道从吴茱萸中分离得到的水溶性化合物如黄酮类成分约 15 个, 主要为异鼠李素、柠檬黄素、槲皮素母核及其苷^[20-21], 及香叶木素-7-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷, 香叶木苷, 柯伊利素-7-*O*-芸香糖苷, 金丝桃苷、橙皮苷等化合物^[12-13], 药理学研究表明上述黄酮类化合物具有抗肿瘤^[22]、抗缺血性缺氧及抗脂质过氧化^[12]等作用。此外还报道有绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、对羟基桂皮酸等酚酸类成分^[23]。为了进一步探究吴茱萸水提物的药效物质基础, 本课题组从吴茱萸水提取物中分离鉴定了 11 个化合物, 分别为绿原酸(chlorogenic acid, **1**), 新绿原酸(5-*O*-caffeoylquinic acid, **2**), 隐绿原酸(4-*O*-caffeoylquinic acid, **3**), 松柏苷(coniferin, **4**), 咖啡酸(caffeic acid, **5**), 槲皮素-3-*O*- α -*D*-吡喃阿拉伯糖苷(querctin 3-*O*- α -*D*-arabinopyranoside, **6**), 金丝桃苷(hyperin, **7**), 芦丁(rutin, **8**), 槲皮素(querctin, **9**), limonin diosphenol 17- β -*D*-glucopyranoside (**10**), 去氢吴茱萸碱(dehydroevodiamine, **11**)。其中, 化合物**2**~**4**, **6**为

首次从该属植物中分离得到。通过超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS)分析, 将上述化合物在 3 种植物来源的吴茱萸药材中进行确认, 进一步明确上述化合物在 3 种吴茱萸药材中的分布情况。

1 材料

Avance 型 600 MHz 核磁共振仪(TMS 内标, 瑞士 Bruker 公司), UPLC-QTOF/MS(Waters Xevo G₂-S Q TOF, 美国 Waters 公司), Shimadzu LC-6A 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司), LC3000 型制备高效液相色谱仪(北京创新通恒科技有限公司), Flash 全息快速制备色谱仪(美国 Grace 公司), YMC C₁₈ 半制备色谱柱(20 mm × 250 mm, 5 μm), Kromasil C₁₈ 半制备色谱柱(10 mm × 250 mm, 5 μm), HPD-100 大孔吸附树脂(河北宝恩生物科技有限公司), MCI GEL CHP20/P120 填料(日本三菱化学公司), ODS 填料(50 μm , 日本 YMC 公司), 羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20, 美国 GE 公司), 柱色谱用硅胶及 GF₂₅₄ 薄层色谱板(青岛海洋化工厂分厂), 聚酰胺薄膜(浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂); 色谱甲醇、乙腈(美国 Fisher 公司), 娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈公司), 其他试剂均为分析纯。槲皮素、金丝桃苷、芦丁、绿原酸(中国食品药品检定研究院, 批号分别为 100080-200907, 111521-201004, 100080-200707, 110753-200413), 新绿原酸(成都瑞芬思生物科技有限公司, 批号 X-014-140801), 隐绿原酸(成都瑞芬思生物科技有限公司, 批号 Y-067-140801)。

吴茱萸药材于 2012 年 9 月采自广西大化县七百弄乡, 经中国医学科学院药用植物研究所林余霖研究员鉴定为吴茱萸 *E. rutaecarpa* 干燥近成熟果实。凭证标本(GXDH201209)保存于中国中医科学院中药研究所中药质量标准研究中心。

2 提取与分离

吴茱萸干燥近成熟果实 8.0 kg, 粉碎, 用去离子水回流提取 2 次(第 1 次加水 15 倍量、第 2 次加水 10 倍量), 每次 2 h, 提取液过滤, 合并。滤液经大孔

吸附树脂(12 L)分离,依次用水(12 L),30%乙醇(36 L),50%乙醇(36 L),95%乙醇(12 L)洗脱,洗脱液每12 L收集为1个流分,共收集8个流分。经HPLC检测,相同流分合并,减压回收溶剂,共得A(145 g,流分1),B(365 g,流分2),C(265 g,流分3~5),D(214 g,流分6~7),E(107 g,流分8)5个部位。

其中,部位A(145 g)溶解于水中,经MCI树脂Flash柱色谱分离,依次用水,10%,30%,50%甲醇洗脱,经HPLC检视合并,得到4个组分A1~A4。A1(105 g)经反相C₁₈ Flash柱色谱(甲醇-水1:19~1:1)分离,得到亚组分A1-1~A1-6。A1-3(3.77 g)经Sephadex LH-20柱色谱(水)分离,得到A1-3-1~A1-3-3。A1-3-2(102 mg)和A1-3-3(82 mg)分别经Sephadex LH-20柱色谱(水)及半制备HPLC(乙腈-0.1%甲酸水7:93)纯化,得到化合物2(29 mg)和化合物1(33 mg)。A1-5(3.75 g)经Sephadex LH-20柱色谱(水)分离,得到A1-5-1~A1-5-3。A1-5-3(80 mg)经半制备HPLC(甲醇-0.1%甲酸20:80)纯化,得到化合物3(30 mg)。A2(13.44 g)经Sephadex LH-20柱色谱(水)分离,得到亚组分A2-1~A2-8。A2-6(26 mg)经半制备HPLC(乙腈-0.1%甲酸10:90)纯化,得到化合物4(13 mg)。A2-8(25 mg)经半制备HPLC(甲醇-0.1%甲酸20:80)纯化,得到化合物5(2.7 mg)。A3~A4(13.59 g),经硅胶柱色谱(三氯甲烷-甲醇-水7.8:2.2:0.22~6:4:0.4)及Sephadex LH-20柱色谱(甲醇-水17:83)分离,得到A3-1~A3-4。A3-3(408 mg)经半制备HPLC(甲醇-0.1%甲酸30:70)分离,得到化合物10(19 mg)。

部位C(265 g)经VLC硅胶柱色谱(三氯甲烷-甲醇-水8.7:1.3:0.13~7:3:0.3)分离,得到4个组分C1~C4。C2(7 g)经Sephadex LH-20柱色谱(甲醇)分离,得到C2-1~C2-3。C2-3(432 mg)经Sephadex LH-20柱色谱(甲醇)分离,得到C2-3-1~C2-3-4。C2-3-2(122 mg)经半制备HPLC(乙腈-水12:88)纯化,得到化合物7(35 mg)。C2-3-3(70 mg)经半制备HPLC(乙腈-水15:85)纯化,得到化合物6(4.6 mg)。C2-3-4(42 mg)经半制备HPLC(乙腈-水25:75)纯化,得到化合物9(10 mg)。C4(16 g)经硅胶柱色谱(三氯甲烷-甲醇-水8.5:1.5:0.15~7.5:2.5:0.25)分离,得到C4-1~C4-5。C4-4(2.14 g)经Sephadex LH-20柱色谱(甲醇-水80:20)分离,得到C4-4-1~C4-4-4。C4-4-4(283 mg)经半制备HPLC(乙

腈-水14:86),得到化合物8(1.3 mg)。

取部位E(20 g)经硅胶柱色谱(三氯甲烷-甲醇9.7:0.3~9.3:0.7)除杂,经TLC检视,合并目标流分,再经三氯甲烷反复热溶除杂,得到化合物11(136 mg)。

3 结构鉴定

化合物1 白色粉末(甲醇),ESI-MS m/z 355 $[M + H]^+$, 163 $[M - C_7H_{11}O_6]^+$, 353 $[M - H]^-$ 。¹H-NMR(CD₃OD, 600 MHz) δ : 7.58(1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-7'), 7.07(1H, br s, H-2'), 6.97(1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6'), 6.80(1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5'), 6.29(1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-8'), 5.36(1H, m, H-3), 4.19(1H, m, H-5), 3.75(1H, m, H-4), 2.01~2.22(4H, m, H-2,6);¹³C-NMR(CD₃OD, 150 MHz) δ : 175.9(C-7), 167.3(C-9), 148.2(C-4'), 145.7(C-3'), 145.4(C-7'), 126.4(C-1'), 121.6(C-6'), 115.1(C-5'), 113.9(C-8'), 113.8(C-2'), 74.9(C-1), 72.2(C-4), 70.6(C-5), 70.1(C-3), 37.5(C-2), 36.9(C-6)。以上数据与文献[24]报道绿原酸的数据基本一致。在相同的HPLC色谱条件下检测,与绿原酸对照品的保留时间一致。故确定化合物1为绿原酸(chlorogenic acid)。

化合物2 白色粉末(甲醇),ESI-MS m/z 355 $[M + H]^+$, 163 $[M - C_7H_{11}O_6]^+$, 353 $[M - H]^-$ 。¹H-NMR(CD₃OD, 600 MHz) δ : 7.61(1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7'), 7.07(1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-2'), 6.96(1H, dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz, H-6'), 6.79(1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5'), 6.33(1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8'), 5.39(1H, m, H-5), 4.15(1H, m, H-3), 3.68(1H, m, H-4), 1.98~2.18(4H, m, H-2,6);¹³C-NMR(CD₃OD, 150 MHz) δ : 177.5(C-7), 167.6(C-9'), 148.1(C-4'), 145.4(C-3',7'), 126.6(C-1'), 121.5(C-6'), 115.1(C-5'), 114.4(C-8'), 113.7(C-2'), 74.2(C-1), 73.2(C-4), 71.5(C-3), 67.2(C-5), 39.8(C-6), 35.4(C-2)。以上数据与文献[24]报道新绿原酸的数据基本一致。在相同的HPLC色谱条件下检测,与新绿原酸对照品的保留时间一致。故确定化合物2为新绿原酸(5-O-caffeoylquinic acid)。

化合物3 白色粉末(甲醇),ESI-MS m/z 355 $[M + H]^+$, 163 $[M - C_7H_{11}O_6]^+$, 353 $[M - H]^-$ 。¹H-NMR(DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ : 7.50(1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-7'), 7.05(1H, br s, H-2'), 7.00(1H,

d, $J = 7.8$ Hz, H-6'), 6.77 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5'), 6.28 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-8'), 4.86 (1H, m, H-5), 4.67 (1H, m, H-3), 4.10 (1H, m, H-4), 1.95 (2H, m, H-6), 1.84 (2H, m, H-2); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 176.0 (C-7), 166.8 (C-9'), 148.8 (C-4'), 146.1 (C-3'), 145.3 (C-7'), 126.1 (C-1'), 121.7 (C-6'), 116.2 (C-5'), 115.2 (C-8'), 115.1 (C-2'), 77.3 (C-1), 74.5 (C-5), 66.9 (C-4), 64.5 (C-3), 41.03 (C-2), 38.3 (C-6)。以上数据与文献[25]报道隐绿原酸的数据基本一致。在相同的 HPLC 色谱条件下检测,与隐绿原酸对照品的保留时间一致。故确定化合物 **3** 为隐绿原酸 (4-*O*-caffeoylquinic acid)。

化合物 **4** 白色粉末 (甲醇)。ESI-MS m/z 365 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 387 $[\text{M} - \text{HCOO}]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz) δ : 7.10 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 7.07 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 6.94 (1H, dd, $J = 8.4$, 1.8 Hz, H-6), 6.54 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-7), 6.28 (1H, dt, $J = 16.2$, 5.4 Hz, H-8), 4.89 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1'), 4.20 (2H, d, $J = 5.4$ Hz, H-9), 3.87 (3H, s, -OCH₃), 3.86 (1H, m, H-6'), 3.69 (1H, m, H-6'), 3.39 ~ 3.47 (4H, m, H-2', 3', 4', 5'); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz) δ : 149.5 (C-3), 146.2 (C-4), 132.3 (C-1), 129.9 (C-7), 127.5 (C-8), 119.3 (C-6), 116.5 (C-5), 109.9 (C-2), 101.3 (C-1'), 76.8 (C-5'), 76.4 (C-3'), 73.5 (C-2'), 69.9 (C-4'), 62.3 (C-9), 61.1 (C-6'), 55.3 (-OCH₃)。以上数据与文献[26]报道松柏苷 (coniferin) 的数据基本一致。

化合物 **5** 白色粉末 (甲醇), 1% 香草醛-浓硫酸显紫红色, ESI-MS m/z 181 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 179 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 7.39 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-7), 7.01 (1H, br s, H-2), 6.95 (1H, br d, $J = 7.8$ Hz, H-6), 6.75 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 6.16 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 167.5 (C-9), 147.5 (C-7), 145.0 (C-3), 143.6 (C-4), 125.1 (C-1), 120.4 (C-6), 115.1 (C-5), 114.9 (C-2), 114.0 (C-8)。以上数据与文献[27]报道咖啡酸 (caffeic acid) 的数据基本一致。

化合物 **6** 黄色粉末 (甲醇), 1% AlCl_3 -乙醇溶液显黄色。ESI-MS m/z 435 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 433 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 12.65 (1H, s, 5-OH), 7.67 (1H, dd, $J = 8.4$, 1.8 Hz, H-

6'), 7.51 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.85 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.42 (1H, s, H-8), 6.21 (1H, s, H-6), 5.28 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, H-1"), 3.76 (1H, m, H-2"), 3.66 (1H, m, H-4"), 3.60 (1H, dd, $J = 12.0$, 5.4 Hz, H-5"), 3.51 (1H, m, H-3"), 3.23 (1H, dd, $J = 12.0$, 1.8 Hz, H-5"); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 178.0 (C-4), 164.7 (C-7), 161.7 (C-5), 156.7 (C-2, 9), 149.1 (C-4'), 145.5 (C-3'), 134.2 (C-3), 122.6 (C-6'), 121.3 (C-1'), 116.2 (C-2'), 115.8 (C-5'), 104.4 (C-10), 101.9 (C-1"), 99.1 (C-6), 94.0 (C-8), 72.1 (C-3"), 71.2 (C-2"), 66.5 (C-4"), 64.7 (C-5")。以上数据与文献报道槲皮素-3-*O*- α -*D*-吡喃阿拉伯糖苷[28]的数据基本一致。

化合物 **7** 黄色粉末 (甲醇), 1% AlCl_3 -乙醇溶液显黄色, λ_{max} (256, 351 nm), 提示为黄酮类化合物。ESI-MS m/z 465 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 463 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 。在同一硅胶薄层色谱板上,分别用三氯甲烷-甲醇-水-甲酸 (7:3:0.3:0.05), 正丁醇-冰乙酸-水 (4:1:5, 上层), 三氯甲烷-异丙醇-水-甲酸 (6:4:0.5:0.1) 3 种展开系统展开,与金丝桃苷对照品的 R_f 值均一致。在相同的 HPLC 色谱条件下,乙腈-0.1% 甲酸 (15:85 ~ 19:81) 梯度洗脱,与金丝桃苷对照品的保留时间一致,故确定化合物 **7** 为金丝桃苷。

化合物 **8** 黄色粉末 (甲醇), 1% AlCl_3 -乙醇溶液显黄色, λ_{max} (255, 354 nm), 提示为黄酮类化合物。ESI-MS m/z 611 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 609 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 。在同一硅胶薄层色谱板上,分别用三氯甲烷-甲醇-水-甲酸 (7:3:0.3:0.05), 正丁醇-冰乙酸-水 (4:1:5, 上层), 三氯甲烷-异丙醇-水-甲酸 (6:4:0.5:0.1) 3 种展开系统展开,与芦丁对照品的 R_f 值均一致。在相同的 HPLC 色谱条件下,乙腈-0.1% 甲酸水 (15:85 ~ 19:81) 梯度洗脱,与芦丁对照品保留时间一致,故鉴定化合物 **8** 为芦丁。

化合物 **9** 黄色针状结晶 (甲醇), 1% AlCl_3 -乙醇溶液显黄色, λ_{max} (255, 369 nm), 提示为黄酮类化合物。ESI-MS m/z 303 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 301 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 。在同一硅胶薄层色谱板上,分别用三氯甲烷-甲醇-水-甲酸 (7:3:0.3:0.05), 石油醚-丙酮-冰乙酸 (4:6:0.2), 三氯甲烷-异丙醇-甲酸-水 (9:1:0.1:0.1) 3 种展开系统展开,与槲皮素对照品的 R_f 值均一致。在相同的 HPLC 色谱条件下,乙腈-0.1% 甲酸 (15:85 ~ 25:75) 梯度洗脱,与槲皮素对照品保留时间一致,故鉴定化合物 **9** 为槲皮素。

化合物 **10** 白色粉末(甲醇),ESI-MS m/z 663 $[M-H]^-$ 。¹H-NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 8.82 (1H, s, 6-OH), 7.55 (1H, s, H-21), 7.51 (1H, t, $J = 1.2$ Hz, H-23), 6.53 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-22), 5.34 (1H, s, H-17), 4.64 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-19), 4.42 (1H, br s, H-1), 4.10 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1'), 3.90 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-19), 3.48 (2H, m, H-6'), 3.05 (2H, m, H-3', 4'), 2.96 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-2'), 2.91 (1H, m, H-5'), 2.77 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-2), 2.74 (1H, s, H-15), 2.64 (1H, dd, $J = 3.6, 16.0$ Hz, H-2), 2.58 (1H, dd, $J = 12.0, 9.0$ Hz, H-9), 1.93 (1H, m, H-12), 1.86 (1H, m, H-11), 1.72 (1H, m, H-11), 1.62 (1H, m, H-12), 1.45 (3H, s, H-29), 1.35 (3H, s, H-18), 1.28 (3H, s, H-28), 0.74 (3H, s, H-30);¹³C-NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 195.4 (C-7), 170.9 (C-3), 170.3 (C-16), 145.0 (C-5), 141.7 (C-21), 141.5 (C-23), 140.4 (C-6), 126.0 (C-20), 113.0 (C-22), 104.7 (C-1'), 81.5 (C-4), 78.1 (C-1), 77.3 (C-17, 3'), 76.9 (C-5'), 74.4 (C-2'), 72.5 (C-19), 70.5 (C-14), 70.4 (C-4'), 61.5 (C-6'), 58.5 (C-15), 48.5 (C-10), 47.1 (C-8), 44.6 (C-13), 43.0 (C-9), 35.9 (C-2), 27.0 (C-12), 26.5 (C-29), 25.4 (C-18), 24.9 (C-28), 18.3 (C-30), 16.0 (C-11)。以上数据与文献[29]报道的 limonin diosphenol 17- β -D-glucopyranoside 数据基本一致。

化合物 **11** 淡黄色粉末(三氯甲烷-甲醇),改良碘化铋钾显色呈橘黄色。ESI-MS m/z 302 $[M+H]^+$ 。¹H-NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 12.33 (1H, br s, H-1), 8.36 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-19), 8.20 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-16), 8.14 (1H, dt, $J = 7.8, 0.6$ Hz, H-17), 7.89 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-9), 7.81 (1H, br t, $J = 7.8$ Hz, H-18), 7.68 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-12), 7.54 (1H, br t, $J = 8.4$ Hz, H-11), 7.29 (1H, br t, $J = 8.4$ Hz, H-10), 4.48 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-5), 4.35 (3H, s, 14-CH₃), 3.34 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-6);¹³C-NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ : 158.8 (C-21), 150.5 (C-3), 141.8 (C-13), 140.2 (C-15), 137.2 (C-17), 130.9 (C-2), 129.4 (C-11), 129.2 (C-18), 128.2 (C-19), 123.8 (C-8), 122.2 (C-9, 10), 120.7 (C-7), 119.2 (C-20), 119.1 (C-16), 113.9 (C-12), 42.6 (C-5), 41.3 (CH₃-14), 19.0 (C-6)。以上数据与文献[30]报道去氢吴

茱萸碱的数据基本一致。

4 3种植物来源的吴茱萸药材中化合物 1~11 的 UPLC-MS 指认

4.1 UPLC-MS 条件 液相条件: 色谱柱 Waters Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m); 流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸(B), 梯度洗脱(0~12 min, 4% A; 12~14 min, 4%~9% A; 14~16 min, 9%~10% A; 16~26 min, 10%~12% A; 26~28 min, 12%~14% A; 28~29 min, 14%~16% A; 29~34 min, 16%~18% A; 34~39 min, 18%~30% A); 柱温 35 $^{\circ}$ C, 进样量 1 μ L, 流速 0.4 mL \cdot min⁻¹。质谱条件: 采用正负离子模式扫描测定。电喷雾离子源(ESI); 毛细管电压 2.4 kV (负离子模式), 2.8 kV (正离子模式); 锥孔电压 40 V; 离子源温度 120 $^{\circ}$ C; 脱溶剂气温度 500 $^{\circ}$ C; 脱溶剂氮气流量 700 L \cdot h⁻¹; 锥孔气流量 50 L \cdot h⁻¹; 碰撞电压 20.0~45.0 V; 扫描范围 m/z 100~1 500。数据工作站为 Masslynxv 4.1。

4.2 对照品溶液制备 分别取化合物 **1~3, 5, 7~9, 11** 适量, 精密称定, 甲醇溶解, 制成各化合物质量浓度为 8 mg \cdot L⁻¹ 的混合溶液。另取化合物 **4, 6, 10** 适量, 甲醇溶解, 分别制成浓度适宜的溶液。将上述溶液置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中, 备用。

4.3 供试品溶液的制备 石虎和疏毛吴茱萸药材分别于 2014 年 8 月, 2015 年 9 月采自江西樟树市吴城乡、湖南吉首市湘泉制药园区, 经中国中医科学院中药研究所闫利华副研究员鉴定。凭证标本(JXZS201408, HNJS201509) 保存于中国中医科学院中药研究所中药质量标准研究中心。分别取吴茱萸、石虎、疏毛吴茱萸药材粉末(60 目) 各约 0.3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 45 min, 取出放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 经微孔滤膜(0.22 μ m) 滤过, 即得。

4.4 UPLC-MS 鉴定 将上述对照品溶液和供试品溶液进行 UPLC-MS 分析, 通过对照品溶液色谱图中各化合物的保留时间及特征碎片离子等信息(表 1), 对药材中的相应化合物进行指认。对照品溶液和供试品溶液总离子流图如图 1 所示。

从图 2 可以看出, 吴茱萸、石虎、疏毛吴茱萸药材中均含有绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷、去氢吴茱萸碱。其中绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸首次从石虎及疏毛吴茱萸中鉴定, 金丝桃苷首次在石虎中鉴定。咖啡酸、芦丁、槲皮素的色谱峰分别与 3

表 1 化合物 1~11 鉴定信息

Table 1 Identification information of compound 1-11

峰号	化合物	t_R /min	特征离子峰
1	绿原酸	7.85	353.08[M-H] ⁻
2	新绿原酸	3.48	353.08[M-H] ⁻
3	隐绿原酸	10.98	353.08[M-H] ⁻
4	松柏苷	7.81	387.12[M-HCOO] ⁻
5	咖啡酸	7.45	179.03[M-H] ⁻
6	槲皮素-3-O- α -D-吡喃阿拉伯糖苷	27.65	433.07[M-H] ⁻
7	金丝桃苷	23.70	463.08[M-H] ⁻
8	芦丁	24.97	609.14[M-H] ⁻
9	槲皮素	36.29	301.03[M-H] ⁻
10	limonin diosphenol 17- β -D-glucopyranoside	28.97	663.23[M-H] ⁻
11	去氢吴茱萸碱	31.19	302.13[M+H] ⁺

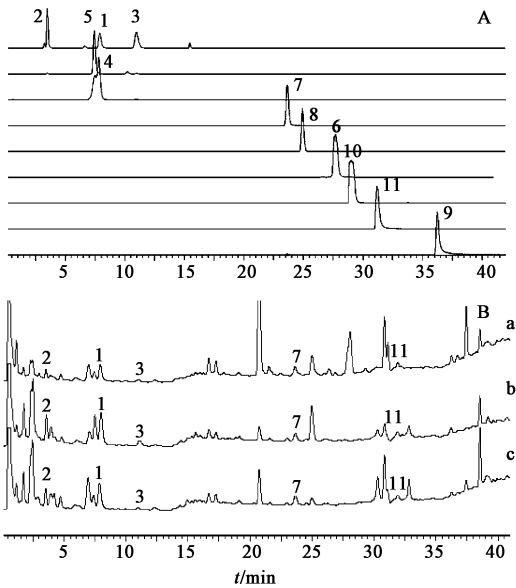


图 1 对照品及 3 批供试品总离子流
Fig. 1 Total ion current chromatography of eleven compounds and three *Euodia* samples

种药材色谱图中, t_R 为 7.45, 24.97, 36.23 min 的色谱峰对应。但因其含量低并被掩盖, 其碎片离子与对照品碎片离子不相符, 未能在药材中指认。在 3 种吴茱萸药材提取液总离子流图中未找到与松柏苷, 槲皮素-3-O- α -D-吡喃阿拉伯糖苷, limonin diosphenol 17- β -D-glucopyranoside 相同保留时间对应的色谱峰, 上述 3 种化合物从吴茱萸中分离得到, 可能是在吴茱萸含量较低, 未能在本次试验中检出。

5 讨论

本文主要侧重于吴茱萸水提取物研究, 这有助于进一步阐明吴茱萸传统用水煎剂的药效物质基础。从吴茱萸水提取物中共分离得到 11 个化合物, 主要为酚酸、黄酮类等大极性成分, 其中新绿原酸、隐绿原酸、松柏苷、槲皮素-3-O- α -D-吡喃阿拉伯糖苷首次从吴茱萸属中分离得到。在吴茱萸药材提取液总离子流图中可看到大极性部分仍有许多未知化合物, 有待进一步探索研究。另外, 通过将分离得到的 11 个化合物与 3 种不同植物来源的吴茱萸药材比较, 可发现吴茱萸 3 个不同品种药材中均含有绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷、去氢吴茱萸碱, 结合文献报道^[31], 说明不同品种吴茱萸药材存在较多共有成分。在查阅相关文献时发现, 在化学成分及质量控制研究中对吴茱萸关注较多, 对其 2 个变种石虎和疏毛吴茱萸研究较少, 因此还需进一步加强吴茱萸其他品种及品种间的比较研究。

[致谢] 感谢中国中医科学院中药研究所冯伟红、陈两绵老师代测质谱, 感谢中药研究所平台管理部代测核磁!

[参考文献]

- [1] 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, 2015: 171.
- [2] 李心机. 《伤寒论》少阴病吴茱萸汤证论析 [J]. 北京中医药大学学报, 1996, 19(4): 9-10.
- [3] 李卫民, 李卫红. 《金匱要略》温经汤中半夏的配伍意义 [J]. 广西中医药, 2006, 29(5): 46-47.
- [4] 陈荣, 杨少华. 《丹溪心法》左金丸浅识 [J]. 江西中医药, 2003, 34(11): 33.
- [5] 王晓霞, 高慧媛, 姜勇, 等. 吴茱萸化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(10): 1241-1244.
- [6] Huang X, Wei L, Yang X W. New cytotoxic quinolone alkaloids from fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. Fitoterapia, 2012, 83(4): 709-714.
- [7] Huang X, Zhang Y B, Yang X W. Indoloquinazoline alkaloids from *Euodia rutaecarpa* and their cytotoxic activities [J]. J Asian Nat Prod Res, 2011, 13(11): 977-983.
- [8] Wang T Y, Wu J B, Hwang T L, et al. A new quinolone and other constituents from the fruits of *Tetradium ruticarpum*: effects on neutrophil pro-inflammatory responses [J]. Chem Biodivers, 2010, 7(7): 1828-1834.
- [9] Wang X X, Zan K, Shi S P, et al. Quinolone alkaloids with antibacterial and cytotoxic activities from the fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. Fitoterapia, 2013, 89(7): 1-7.
- [10] Sugimoto T M T, Ueno A. Limonoids and quinolone alkaloids from *Evodia rutaecarpa* Benth. [J]. Chem

- Pharm Bull, 1988, 36(11):4453-4461.
- [11] Teng J, Yang X W. A new limonoid from the fruits of *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth [J]. Pharmazie, 2006, 61(12):1038-1040.
- [12] 胡传芹, 杨鑫宝, 杨秀伟, 等. 吴茱萸中的黄酮苷类化合物 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(17): 2571-2575.
- [13] 张晓拢, 经雅昆, 彭四威, 等. 吴茱萸的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(4): 470-474.
- [14] Zhao M Y, Yang X W. Two new acylgluconic acids from the nearly ripe fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2008, 10(8):759-763.
- [15] Matsuda H, Wu J X, Tanaka T, et al. Antinociceptive activities of 70% methanol extract of *evodiae fructus* (fruit of *Evodia rutaecarpa* var. *bodinieri*) and its alkaloidal components. [J]. Biol Pharm Bull, 1997, 20(3):243-248.
- [16] Moon T C, Murakami M, Kudo I, et al. A new class of COX-2 inhibitor, rutaecarpine from *Evodia rutaecarpa* [J]. Inflamm Res, 1999, 48(12):621-625.
- [17] Rho T C, Bae E A, Kim D H, et al. Anti-Helicobacter pylori activity of quinolone alkaloids from *Evodiae Fructus* [J]. Biol Pharm Bull, 1999, 22(10): 1141-1143.
- [18] 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——化学拆分组分止泻、止呕作用的研究 [J]. 中医药学报, 2011, 39(5):13-16.
- [19] Liao C H, Pan S L, Guh J H, et al. Antitumor mechanism of evodiamine, a constituent from Chinese herb *Evodiae fructus*, in human multiple-drug resistant breast cancer NCI/ADR-RES cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Carcinogenesis, 2005, 26(5):968-975.
- [20] 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):25-26.
- [21] 龚慕辛, 宋亚芳, 王智民, 等. 吴茱萸化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(6):792-794.
- [22] Xie Y Y, Yuan D, Yang J Y, et al. Cytotoxic activity of flavonoids from the flowers of *Chrysanthemum morifolium* on human colon cancer Colon205 cells [J]. J Asian Nat Prod Res, 2009, 11(9):771-778.
- [23] 赵楠, 李占林, 李达翔, 等. 吴茱萸中 1 个新的苯丙素苷类化合物 [J]. 中草药, 2015, 46(1):15-18.
- [24] 宋亚玲, 王红梅, 倪付勇, 等. 金银花中酚酸类成分及其抗炎活性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(4): 490-495.
- [25] 倪付勇, 刘露, 宋亚玲, 等. 金银花中抗补体活性酚酸类成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 269-274.
- [26] 杨竹雅, 卫莹芳, 周志宏, 等. 厚朴叶中具血管活性作用部位的化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(3):260-264.
- [27] 贾献慧, 王晓, 张永清. 忍冬藤酚酸类化学成分分离 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(5):69-71.
- [28] Sanbongi C, Osakabe N, Natsume M, et al. Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao* [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46(2):454-457.
- [29] Ozaki Y, Miyake M, Maeda H, et al. Limonoid glucosides in *Tetradium rutaecarpa* [J]. Phytochemistry, 1991, 30(7):2365-2367.
- [30] 张虎, 杨秀伟, 崔育新. 吴茱萸碱、吴茱萸次碱和去氢吴茱萸碱的碳氢 NMR 信号全指定 [J]. 波谱学杂志, 1999, 16(6):563-565.
- [31] 尹元元, 闫利华, 张启伟, 等. 吴茱萸及其习用品药材中 7 个成分的 HPLC 含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(14):2693-2698.

[责任编辑 邹晓翠]