

文章编号: 1006-2858(2006)02-0088-03

山楂叶的化学成分

宋少江, 陈佳, 寇翔, 宋永华, 徐绥绪

(沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 分离、鉴定山楂叶乙醇提取物中的化学成分。方法 山楂叶的体积分数为 80 % 的乙醇-水提取物经 D101 大孔树脂处理, 用水和不同浓度的乙醇洗脱, 体积分数为 55 % 的乙醇-水洗脱部分采用硅胶吸附柱色谱和制备高效液相色谱法进行分离并纯化, 根据化合物的理化性质和光谱数据 (IR、NMR) 分析进行结构鉴定。结果 分离得到 5 个化合物, 分别鉴定为: 2 α , 3 β , 19 α -三羟基熊果酸 (2 α , 3 β , 19 α -trihydroxyl ursolic acid, 1)、熊果酸 (ursolic acid, 2)、牡荆素 (vitexin, 3)、2 α -鼠李糖基牡荆素 (2 α -rhamnosyl vitexin, 4)、山奈酚 (kaempferol, 5)。结论 化合物 2 α , 3 β , 19 α -三羟基熊果酸 (2 α , 3 β , 19 α -trihydroxyl ursolic acid, 1) 为首次从山楂属植物中分离得到, 作者经过对化合物 1 的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、HMBC 谱和 HMBC 谱认真解析并对照已知文献, 对文献中部分 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱信号的归属错误进行了纠正。

关键词: 药物化学; 结构鉴定; 核磁共振光谱; 山楂叶; 三萜

中图分类号: R 914; R 284.1

文献标识码: A

山楂为蔷薇科山楂属植物山里红 (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br) 或山楂 (*C. pinnatifida* Bge.) 的干燥成熟果实。主要功能为消食健胃、行气散瘀。用于肉食积滞、胃脘胀满、泻痢腹痛、瘀血经闭、产后瘀阻、心腹刺痛、高血脂症等。近年来, 用其叶治疗心血管方面疾病的研究较多。其化学成分主要有三萜和黄酮两大类, 尤其以黄酮类研究较多^[1-3]。为开发山楂资源, 作者对山楂叶乙醇提取物中的化学成分进行了初步研究。

1 仪器与材料

X-4 显微熔点测定仪 (北京泰克仪器有限公司), ARX-300 核磁共振光谱仪 (瑞士 Bruker Corporation), LC 制备型高效液相色谱仪 (日本日立公司)。

ODS 制备柱 (250 mm $\times$ 22 mm, 10 μm , 美国 Alltech 公司), 薄层色谱硅胶 (青岛海洋化工厂), 柱色谱硅胶 (200 ~ 300 目, 青岛海洋化工厂), 分离纯化试剂 (分析纯, 市售)。

山楂药材, 购于辽宁省药材公司, 由沈阳药科大学路金才副教授鉴定为山楂 (*C. pinnatifida* Bge.) 的叶。

2 提取分离

山楂叶 (20 kg) 用体积分数为 80 % 的乙醇-水溶液加热回流提取 3 次, 每次 2 h。药液回收至无醇味后用大孔树脂处理, 乙醇-水梯度洗脱, 收集体积分数为 55 % 的乙醇-水洗脱部分, 回收溶剂, 低温真空干燥得棕红色粉末。取 80 g 提取物经硅胶柱色谱, 氯仿-甲醇梯度洗脱, 得到 Fr. 1 ~ Fr. 12 共 12 个部分。Fr. 3 析出结晶, 滤过, 重结晶后得到熊果酸 (Ursolic acid, 2); Fr. 5 经硅胶柱色谱 (氯仿-甲醇, 体积比为 20 : 1 ~ 10 : 1) 及制备高效液相色谱 (甲醇-体积分数为 0.1 % 的磷酸水溶液, 体积比为 7 : 3) 得到 2 α , 3 β , 19 α -三羟基熊果酸 (2 α , 3 β , 19 α -trihydroxyl ursolic acid, 1) 和山奈酚 (kaempferol, 5); Fr. 9 再经反复硅胶柱色谱 (氯仿-甲醇, 体积比为 10 : 1 ~ 1 : 1) 得到牡荆素 (vitexin, 3) 和 2 α -鼠李糖基牡荆素 (2 α -rhamnosyl vitexin, 4)。

3 结构鉴定

化合物 1: 白色粉末, 熔点: 222 ~ 224 (氯仿-甲醇)。Liebermann-Burchard 反应阳性。其 TLC 硫酸显色为黄色斑点。 $^1\text{H-NMR}$ 谱

收稿日期: 2005-03-24

作者简介: 宋少江 (1970-), 男 (汉族), 辽宁沈阳人, 副教授, 从事中药及天然产物活性成分及质量控制研究, Tel. 024-23986510, E-mail: songsj99@yahoo.com.cn。

(C₅D₅N) 给出三萜化合物特征的 6 个甲基质子信号 (δ 1.69、1.42、1.25、1.09、1.05、0.99, 各 3 H, s)。另外, 在 δ 1.11 处还出现甲基双峰, 这是乌苏烷型 20-Me (C-30) 的特征峰。¹³C-NMR 谱中共有 30 个碳原子的信号, 其中有 2 个为双键碳信号 (δ 128.0、140.0), 提示该化合物为乌苏烷 1,2-烯型五环三萜化合物。与熊果酸比较该化合物多出 2 个含氧碳信号 (δ 68.7、72.7)。此外, C-1、C-18、C-20 相应发生低场位移。在 HMBC 谱中, δ 68.7 的碳信号与 δ 3.38 (H-3) 及 δ 2.24 (H-1) 的氢信号分别存在远程相关, δ 72.7 的碳信号与 δ 1.42 (29-CH₃)、1.11 (30-CH₃)、3.06 (H-18) 的氢信号分别存在远程相关, 提示在化合物的 C-2 及 C-19 位分别连有 2 个羟基。结合 HMQC 谱将化合物碳谱数据进行了归属, 与文献[4]数据对比 (见表 1), 证实该化合物所连羟基分别为 2 α 、3 β 、19 α 羟基。另外, 在 HMBC 谱中 δ 39.9 的季碳信号 (C-4) 与 δ 3.38 (H-3)、1.25 (23-CH₃)、1.05 (24-CH₃) 的氢信号分别存在远程相关, 而 δ 38.6 的季碳 (C-10) 信号则分别与 δ 2.24 (H-1)、0.99 (25-CH₃)、1.94 (H-9) 的氢信号存在远程相关, 证明文献部分信号的归属错误 (见表 1)。具体 ¹H-NMR 数据如下: δ 0.99 (3H, s, H-25)、1.05 (3H, s, H-24)、1.09 (3H, s, H-26)、1.11 (3H, d, H-30)、1.25 (3H, s, H-23)、1.42 (3H, s, H-29)、

1.69 (3H, s, H-27)、2.24 (2H, dd, J = 4.2 Hz, H-1)、3.38 (1H, d, J = 9.3 Hz, H-3 α)、4.10 (1H, ddd, J = 4.2, 9.3, 10.2 Hz, H-2 β)、5.7 (1H, t, H-12), 根据以上波谱数据分析, 化合物 1 鉴定为 2 α 、3 β 、19 α -三羟基熊果酸 (见图 1), 该化合物为本属植物首次分离得到。

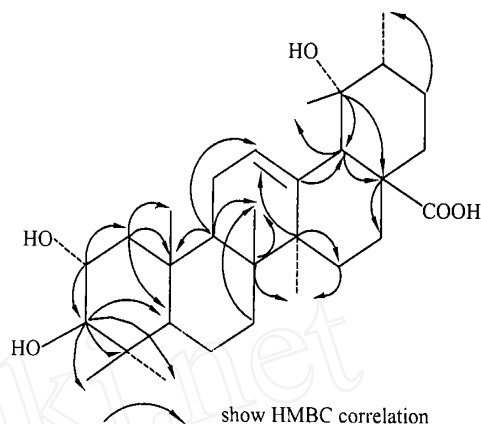


Fig. 1 2 α 、3 β 、19 α -trihydroxy ursolic acid(1)

化合物 2: 白色粉末, mp 260 ~ 262 (MeOH)。¹H-NMR 谱中烯氢质子信号 δ 5.25, ¹³C-NMR (见表 1) 示有 30 个碳信号, 其中双键碳信号 δ 139.4 (C-13) 和 δ 125.6 (C-12), 示为乌索烷型三萜。质子信号 δ 3.21 (1H, m) 为 H-3 α 。将化合物 (2) 与对照品熊果酸共 TLC 检查, R_f 值相同, 故鉴定为熊果酸。

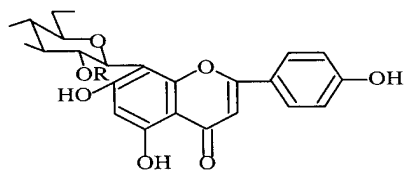
Table 1 The ¹³C-NMR chemical shifts of compound 1, 2 and literature (0 = TMS, in C₅D₅N)

Position	δ (compound 1)	δ (compound 2)	δ (literature [4])	Position	δ (compound 1)	δ (compound 2)	δ (literature [4])
1	48.3	31.0	48.2	16	26.4	24.9	26.4
2	68.7	28.1	68.6	17	47.9	48.0	47.9
3	83.9	78.1	83.9	18	54.7	53.5	54.0
4	39.9	39.4	38.6	19	72.7	39.4	72.7
5	56.0	55.8	56.0	20	42.5	39.0	42.2
6	19.0	18.7	19.0	21	27.2	31.0	27.2
7	33.6	33.5	33.6	22	38.6	37.4	38.5
8	40.5	40.0	40.5	23	29.4	28.8	29.4
9	47.9	48.0	47.9	24	17.7	17.4	16.8
10	38.6	37.4	39.5	25	16.8	17.5	16.9
11	24.1	23.9	24.2	26	16.9	16.5	17.6
12	128.0	125.6	128.0	27	24.7	23.9	24.7
13	140.0	139.4	140.0	28	180.8	179.8	180.6
14	42.3	42.4	42.4	29	27.1	16.5	27.0
15	29.3	28.6	29.3	30	17.3	21.4	17.3

化合物 3: 淡黄色针状晶体 (MeOH), mp 262 ~ 264。盐酸-镁粉反应呈阳性, 三氯化铝反应呈黄绿色荧光。IR (KBr) σ/cm^{-1} : 3 400、1 650、1 610、1 505、1 430, 示有羟基、共轭羰基和芳环, 提示为黄酮类化合物。¹³C-NMR 谱给出

21 个碳信号, 其中黄酮母核有 15 个碳, 6 个为糖上碳。¹H-NMR 谱中 δ 13.15 (1H, s) 为 5'-OH, 由于位于低场, 表明有羰基与其形成强烈的氢键; δ 10.79 (1H, s) 为 7'-OH, δ 10.30 (1H, s) 为 4'-OH; δ 8.01 (2H, d, J = 8.8 Hz) 与 δ 6.88 (2H, d, J =

8.8 Hz) 分别为 2、6 和 3、5 位的氢信号; 结合 ^{13}C -NMR 谱中 δ 129.0 和 δ 115.9 信号高度约为其他峰的 2 倍, 因此该黄酮 B 环为 4'-取代。 δ 6.76 (1H, s) 为 H-3, δ 6.26 (1H, s) 为 H-6。 ^{13}C -NMR 谱中糖上 6 个碳信号分别为 δ 81.9、78.7、73.4、70.9、70.6、61.4, 未见位于低场含氧端基碳信号, 结合 δ 104.7 为 C-8 信号, 表明化合物为一黄酮单糖碳苷。该糖为葡萄糖, ^1H -NMR δ 4.80 (1H, d, $J=9.6$ Hz), 提示该糖端基构型为 β 型。故确定化合物 3 为牡荆素 (见图 2)。



(3) vitexin R=H;
(4) vitexin-2''-O-rhamnosyl R=Rha

Fig. 2 Structures of compound 3 and 4

化合物 4: 淡黄色针状晶体 (MeOH), mp 210 ~ 212。盐酸-镁粉反应呈阳性, 三氯化铝反应呈黄绿色荧光, Molish 反应呈阳性。IR (KBr) σ/cm^{-1} : 3 400 ~ 3 300、1 650、1 610、1 505,

示有羟基, 共轭羰基和芳环提示为黄酮苷类化合物。 ^{13}C -NMR 谱给出 27 个碳信号, 其中黄酮母核有 15 个碳, 12 个为糖上碳。 ^1H -NMR 谱中 δ 13.14 (1H, s) 为 5'-OH, δ 10.84 (1H, s) 为 7'-OH, δ 10.33 (1H, s) 为 4'-OH, δ 8.05 (2H, d, $J=8.8$ Hz)、6.90 (2H, d, $J=8.8$ Hz) 分别为 2、6 和 3、5 位的氢信号, 结合 ^{13}C -NMR 谱中 δ 129.0 和 δ 115.9 两峰信号高度约为其他峰的 2 倍, 因此该黄酮 B 环为 4'-取代。 δ 6.79 (1H, s) 为 H-3, δ 6.26 (1H, s) 为 H-6, 可确定其苷元为芹菜素。 ^{13}C -NMR 谱中, 苷元碳信号与牡荆素基本一致, 糖上 12 个碳信号仅有一低场含氧糖端基碳信号, 表明化合物为一黄酮双糖碳苷。由 ^{13}C -NMR 谱 δ 17.7 和 ^1H -NMR 谱 δ 0.48 (3H, d, $J=6$ Hz) 可知含有鼠李糖, 且鼠李糖并未直接与苷元相连。由苷化位移规律和与文献 [5, 6] 对照可确定鼠李糖与葡萄糖之间为 (1 $\rightarrow$ 2) 连接 (见表 2)。化合物 4 经质量分数为 10 % 的盐酸加热水解, 浓缩水溶液, 用聚酰胺薄层色谱检查, 有牡荆素存在, 纸色谱检查有鼠李糖。故确定化合物 4 为 2''-O-鼠李糖基牡荆素 (见图 2)。

Table 2 The ^{13}C -NMR chemical shifts of compound 3 and 4 (0 = TMS, DMSO- d_6)

Position	δ (compound 3)	δ (compound 4)	Position	δ (compound 3)	δ (compound 4)
2	164.0	164.0	Glc-1''	73.4	71.6
3	102.5	102.4	2''	70.9	75.1
4	182.1	182.1	3''	78.7	79.9
5	161.2	161.1	4''	70.6	70.7
6	98.2	98.3	5''	81.9	81.8
7	162.6	162.3	6''	61.4	61.1
8	104.7	104.4	—CH ₃		
9	156.0	155.8	—C=O		
10	104.1	104.2	2''-O-Rha		
1'	121.7	121.6	1'''		100.3
2'	129.0	129.0	2'''		70.2
3'	115.8	115.8	3'''		71.5
4'	160.4	160.6	4'''		70.4
5'	115.9	115.9	5'''		68.2
6'	129.0	129.0	6'''		17.7

化合物 5: 黄色针晶, mp 271 ~ 272 (MeOH), 盐酸-镁粉反应呈阳性, 三氯化铝反应呈黄绿色荧光。IR (KBr) σ/cm^{-1} : 3 400、1 660、1 600、1 510、1 360, 示有羟基、共轭羰基和芳环, 提示为黄酮类化合物。 ^1H -NMR 中质子信号 δ 8.02 (2H, d, $J=8.7$ Hz)、6.91 (2H, d, $J=8.7$ Hz) AA BB' 系统信号为 B 环 2', 6 和 3', 5' 位 H; δ 6.17 (1H, brs) 为 H-6, δ 6.42 (1H, brs) 为 H-8, δ 12.45 (1H, s) 为 5-OH。将化合物 5 与对照品山奈酚共 TLC 检查, 其 R_f 值相同, 故化合物

5 鉴定为山奈酚。

参考文献:

- [1] 高光耀, 冯毓秀. 山楂属植物研究概况 [J]. 国外医药: 植物药分册, 1994, 9(2): 56 - 60.
- [2] Handel A M. Crataegus toxikologie and pharmakologie teil : pharmkodynamik [J]. Plant Med, 1981, 43(3): 209 - 239.
- [3] Kashnikova M V. Sheichenko acetylvitexin a new flavonoid from the flowers of crataegus sanguines [J]. Khim Priir Soedin, 1984, (1): 108 - 109.

(下转至第 96 页)

Abstract : Objective To establish a reversed-phase HPLC method for determination of osthole and isoimperatorin in *Angelica pubescens*. **Methods** The sample was separated on a Thermo C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) using methanol-3 % acetic acid solution (V/V = 70/30) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection was set at 307 nm. **Results** The calibration curve was linear in the range of 29.9 - 180.0 mg · L⁻¹ (*r* = 0.999 9) for osthole and 1.51 - 18.1 mg · L⁻¹ for isoimperatorin (*r* = 1.000). The inner-day RSD was 0.16 % and 0.85 %, and the average was 104.3 % and 100.0 % for osthole and isoimperatorin, respectively. It was stable within 24 hours. **Conclusions** This method is accurate, simple and sensitive, and it can be used for the quality control of *Angelica pubescens*.

Key words : HPLC; *Radix Angelicae Pubescentis*; osthole; isoimperatorin

(上接第90页)

[4] 王进义, 张国林, 程东亮, 等. 中药金樱子的化学成分

[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(1): 21 - 23.

[5] 宋立人. 现代中药学大辞典: 上册 [M]. 北京: 人民卫

生出版社, 2001. 165.

[6] 张培成, 徐绥绪. 山楂果化学成分的研究 [J]. 沈阳化

工学院学报, 1999, 13(2): 87 - 89.

Chemical constituents from leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge.

SONG Shao-jiang, CHEN Jia, KOU Xiang, SONG Yong-hua, XU Sui-xu

(School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract : Objective To study the chemical constituents of the extract from the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. **Methods** The extract from the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. were eluted by water and different concentration of alcohol on the D101 macroporous resin. The 55 % alcohol-water portion was collected and chemical constituents were isolated by silica gel column chromatography and preparative HPLC. Physical-chemical characters and spectroscopic analysis were employed for the structural identification. **Results** Compound 1-5 were obtained and their structures were elucidated as 2 α , 3 β , 19 α -trihydroxyl ursolic acid(1), ursolic acid(2), vitexin(3), 2-*O*-rhamnosyl vitexin(4), kaempferol(5). **Conclusions** 2 α , 3 β , 19 α -trihydroxyl ursolic acid(1) is isolated from *Crataegus pinnatifida* Bge. for the first time. The part data of ¹³C-NMR of compound 1 in the literature were corrected by the 2D-NMR spectroscopic methods.

Key words : structure identification; NMR; *Crataegus pinnatifida* Bge.; triterpenetrirterpene