

大黄柳叶中新黄酮苷的结构鉴定

许传莲^{*1} 郑毅男² 杨秀伟³ 李 想³ 孙光芝²

¹ (浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018) ² (吉林农业大学中药材学院, 长春 130118)

³ (北京大学医学院天然药物及仿生药物实验室, 北京 100083)

摘 要 利用聚酰胺柱色谱法和制备型高效液相色谱法从柳属植物大黄柳叶中分离得到了一种新黄酮苷和两个已知黄酮化合物。利用核磁共振谱、质谱、紫外光谱、红外光谱对化合物结构进行了分析和表征。结果表明, 新化合物为地奥亭 7-O-β-D-吡喃木糖 (1→6) β-D-吡喃葡萄糖苷, 为从自然界中首次发现的新黄酮苷类化合物。2 种已知黄酮化合物为槲皮素 3-O-芸香糖苷和槲皮素 3-O-β-D-吡喃半乳糖苷。

关键词 大黄柳, 黄酮苷, 核磁共振, 质谱, 紫外光谱, 红外光谱

1 引 言

大黄柳 (*Salix raddeana* Laksch) 为杨柳科 (Salicaceae) 柳属 *Salix* L.) 黄花柳组 (*Vetrix* Dum) 植物, 主产于小兴安岭和长白山地区^[1]。当地民间采其树叶用于治疗口腔溃疡。本研究组已对柳属植物旱柳和垂柳的化学成分和药理活性进行了研究, 体外实验证实旱柳叶醇提取物对花生四烯酸代谢产物形成血栓的血栓烷 A₂ (TXA₂) 和引起动脉硬化及过敏性疾病的 12-羟基二十四碳烯酸 (12-HETE) 的生成均有较强的抑制作用^[2]。从旱柳中分离得到的两种黄酮类化合物具有抗血栓、抗动脉硬化的作用^[3]。对旱柳叶几种脂溶性化学成分的分离与鉴定, 鉴定出 β-谷甾醇、五十五碳烷醇、二十七碳烷醇、软脂酸和硬脂酸 5 种脂溶性单体成分^[4]。本研究组从大黄柳叶中分离得到的两种黄酮化合物, 药理研究显示大黄柳树叶乙醇提取物的正丁醇组有促进脂肪分解和抑菌的活性, 为了合理地开发利用这一资源, 对大黄柳叶的醇提取物进行了系统的化学成分和活性研究, 从大黄柳叶的乙醇提取物中又得到了 1 个新黄酮苷和 2 个已知化合物, 今报道新化合物的核磁共振 (¹H NMR, ¹³C NMR)、质谱 (MS)、紫外和红外光谱 (UV、IR), 详细讨论了其 ¹H NMR、¹³C NMR 谱的特征, 并结合该化合物的高分辨质谱、紫外和红外光谱, 对化合物进行了结构分析和鉴定, 新化合物被确认为: 地奥亭 7-O-β-D-吡喃木糖 (1→6) β-D-吡喃葡萄糖苷, 两种已知黄酮化合物结构鉴定为槲皮素 3-O-芸香糖苷和槲皮素 3-O-β-D-吡喃半乳糖苷。

2 实验部分

2.1 实验材料

大黄柳叶分别采自吉林省临江地区 (7 月) 和露水河地区 (10 月)。

2.2 仪器与试剂

XRC-1 型显微熔点测定仪 (北京泰克仪器公司); 尼力高 Nicolet 470 型傅里叶变换红外光谱测定仪 (KB 压片); Varian NOVA-500 型核磁共振仪; Avance Bruker A&T BNU 型核磁共振仪; 低分辨质谱 ESI-MS 用 Finnigan MAT LCQ 电喷雾质谱测定; 高分辨质谱 MDS 用 SCIEX API QSTAR 质谱仪测定 (美国 Bruker 公司); 1100 液相色谱仪 (美国安捷伦公司); 60F₂₅₄ TLC 高效薄层硅胶 (德国 Merck 公司); ZORB-AX SB C₁₈ (250 mm × 94 mm) 制备型色谱柱 (美国安捷伦公司)。柱色谱填料用聚酰胺 (浙江路桥四青生化材料厂)。

2.3 实验方法

2.3.1 样品的提取和分离 (1) 大黄柳叶 4.8 kg 晒干, 粉碎成粗粉, 用 20% 乙醇超声波提取, 提取温度 70℃, 每次 8 min, 提取 3 次, 合并提取液浓缩成浸膏, 用水溶解后依次用石油醚、氯仿、水饱和正丁

2004-07-07 收稿; 2005-04-26 接受

本文系吉林省科技厅重点招标项目资助 (No. 20010303-1)

醇萃取。正丁醇萃取物减压回收溶剂,浸膏溶于水上大孔吸附树脂 D101,用乙醇梯度洗脱;取 30%乙醇洗脱液减压回收后上聚酰胺柱,用乙醇梯度洗脱,30%、40%流分浓缩静置 48 h,得到白色絮状沉淀,冷冻干燥得白色粉末 102 mg(化合物)。50%~70%的流分回收溶剂,冷冻干燥后的粉末经高效液相色谱制备,甲醇-水(36:64)为流动相,流速为 4 mL/min,工作波长为 254 nm,柱温 25℃,得化合物和;
(2)制备色谱条件 色谱柱:Zorbax SB C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司);流动相:甲醇-水(40:60; 38:62; 36:64);进样浓度:10 g/L;进样量:500~1000 μL;流速:4.0 mL/min;柱温:25℃,检测波长:254 nm;
(3)化合物的酸水解 取化合物、和 各 2 mg,用 2 mol/L HCl 10 mL 与甲醇 20 mL 置水浴 90℃回流 6 h,冷却后上层用 BaSO₄ 中和,去除沉淀,纸层析(新华层析滤纸)用 BAW 溶剂系统(*n*-BuOH-HOAc-H₂O=4:1:5,上层)展开,苯胺-邻苯二甲酸显色,检出有葡萄糖、木糖、半乳糖和鼠李糖。

2.3.2 NMR 分析条件 Avance Bruker A&T BNU 型核磁共振仪,以 DMSO-*d*₆ 为溶剂, TMS 为内标物。

2.3.3 ESI/MS 分析条件 Finnigan MAT LCQ 电喷雾质谱仪,喷雾电压 5 kV,金属毛细管温度 200℃,雾化气为 N₂,负离子扫描方式。

3 结果和讨论

3.1 化合物的鉴定

白色粉末,熔点 243~245℃,盐酸-镁粉反应阳性, Molish 反应阳性。酸水解后检出有葡萄糖(*R_f* = 0.16)、木糖(*R_f* = 0.28)。高碘酸盐氧化反应结果表明这两种糖均为吡喃型糖。UVλ_{max}(MeOH) nm: 254, 348 为典型的黄酮紫外吸收光谱,加入诊断试剂 AlCl₃/HCl 后,带红移了 38 nm,表明有 5-OH 而无 3-OH,说明此化合物为黄酮类化合物。红外光谱数据显示有羟基宽峰的伸缩振动(3480~3520 cm⁻¹), 缩合羰基的伸缩振动(1650 cm⁻¹), 芳香环的骨架振动(1605, 1590, 1495 cm⁻¹), C—O—C 伸缩振动的强吸收带(1435, 830 cm⁻¹)。HR FAB-MS(*M*⁻) *m/z*: 593.1528(计算值: 593.1511)。结合¹³C NMR 波谱确定其分子式为 C₂₇H₃₀O₁₅。ESI/MS 谱图中碎片离子峰 593 为该化合物(C₂₇H₃₀O₁₅)(*M*⁻), 299(*M*⁻)为苷元(C₁₆H₁₁O₆),各主要碎片峰都能得到合理解释,符合该化合物的结构特征。¹H NMR 谱中, δ 12.95(s)和 9.45(s)为酚羟基特征信号,分别是 5-OH 和 3'-OH。δ: 5.06(1H, d, *J* = 7.5 Hz), 4.17(1H, d, *J* = 7.5 Hz)分别为葡萄糖 1 位氢和木糖 1 位氢的信号,并经 HSQC 谱证实,根据偶合常数 *J* = 7.2 Hz 大于 4.0 说明葡萄糖构型为 β-D 葡萄糖,¹H NMR 谱图中化学位移值高场处出现一系列糖上氢质子信号(δ 3.74~3.23), δ 3.87 为 B 环上 4'-C 上的 OMe 的氢质子信号,低场的化学信号为苷元上氢质子的信号,其特征是 A 环 H-6, H-8 分别以双重峰出现在 δ 6.8~6.4 之间,化学位移值为 δ 6.82(1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.49(1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6)。B 环 H-6', H-5 由于偶合作用均为双重峰,且 H-6 信号因受到邻位 5'-H 与间位 2'-H 偶合影响而形成两个双重峰,化学位移值分别为 7.60(1H, dd, *J* = 2.0 Hz, 8.5 Hz, H-6'), 7.47(1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-2'), 7.15(1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5)。

¹³C NMR 谱数据表明 δ 103.8 为 C-3 化学位移信号, δ 163.0 为 C-7 化学位移信号, δ 182.0, 99.6, 94.8 为典型的 A 环 C-4, C-6, C-8 的化学位移信号, δ 151.3, 146.8 分别为 B 环 C-4 和 C-3 的化学位移信号,与文献相吻合^[5,6], HMBC 谱证明,葡萄糖的端基氢质子(δ: 5.09)与苷元地奥亭的 C-7(δ: 163.0)相关,这表明葡萄糖连接在苷元的 C-7 位置上。¹³C NMR 波谱中 δ 99.9 为葡萄糖端基碳原子的化学信号并向低场位移了 4.0 × 10⁻⁶, δ 65.7 为葡萄糖 6 位碳原子的化学位移信号,且 HMBC 证明,木糖端基氢质子(δ: 4.17)与葡萄糖的 C-6(δ: 65.7)相关,这表明此双糖连接方式为葡萄糖(6→1)木糖。β-D 葡萄糖和 β-D 木糖的¹³C NMR 波谱中化学位移信号与文献报道相符^[7]。化合物的详细¹H NMR、¹³C NMR 二维波谱数据见表 1。

综上所述,推断化合物为地奥亭 7-O-β-D-吡喃木糖(1→6)-β-D-吡喃葡萄糖苷。结构式见图 1:

3.2 化合物的鉴定

黄色粉末, *m.p.* 186~188℃。酸水解后,纸层析检出有葡萄糖(*R_f* = 0.16)和鼠李糖(*R_f* = 0.23)。UVλ_{max}(MeOH) nm: 258, 268 sh, 300 sh, 359, 为典型的黄酮醇紫外吸收特征。IR(KBr) cm⁻¹: 羟基伸缩振动(3400, 宽峰), 羰基缩合(1678), 芳香环骨架(1620, 1618)。ESI/MS *m/z*: 609(C₂₇H₃₀O₁₆)。

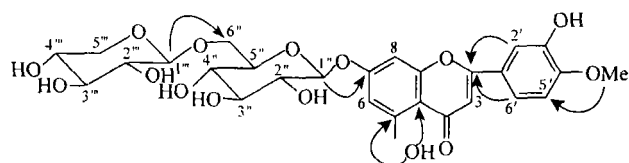


图 1 化合物 地奥亭 7-O-β-D-吡喃木糖 (1→6) β-D-吡喃葡萄糖苷
Fig 1 Compound doismetin 7-o-β-D-xylopyranosyl (1→6) β-D-glucopyranoside

^1H NMR (300MHz- $\text{DMSO}-d_6$) 谱中, 12.48 (s), 10.80 (s) 为黄酮苷上的 5-OH, 7-OH, 特征信号。δ 7.66 (1H, d, $J=2.1\text{Hz}$, H-2), δ 7.56 (1H, d, $J=8.7\text{Hz}$, H-6), δ 6.86 (1H, d, $J=8.5\text{Hz}$, H-5), δ 6.42 (1H, d, $J=2.0\text{Hz}$, H-8), 6.20 (1H, d, $J=2.0\text{Hz}$, H-6), δ 5.48 (1H, d, $J=7.0\text{Hz}$, H-1B) 和 3.72 (1H, d, $J=10.0\text{Hz}$, H-1'') 分别为葡萄糖和鼠李糖的端基质子, 4.39 (3H, s) 为鼠李糖的 $-\text{CH}_3$ 质子。 ^{13}C NMR: 156.45 (C-2), 133.32 (C-3), 177.48 (C-4), 156.65 (C-5), 98.66 (C-6), 164.11 (C-7), 93.58 (C-8), 161.25 (C-9), 104.0 (C-10), 121.67 (C-1), 115.25 (C-2), 144.84 (C-3), 148.44 (C-4), 116.26 (C-5), 121.64 (C-6), 101.75 (C-1), 74.10 (C-2), 76.52 (C-3), 70.58 (C-4), 75.92 (5), 69.95 (C-6), 100.78 (C-1''), 70.02 (C-2''), 70.42 (C-3''), 71.86 (C-4''), 68.28 (C-5''), 17.78 (C-6'')。 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据与文献报道^[8]一致。故化合物 鉴定为槲皮素 3-O-芸香糖苷。

3.3 化合物的鉴定

黄色粉末, 熔点 233~235。酸水解后, 纸层析检出有半乳糖 ($R_f=0.15$)。UVmax (MeOH) nm: 254, 300sh, 358。IR (KBr) cm^{-1} : 3400, 1650, 1600, 1500, 1380, 1200。ES/MS (m/z): 463 (M^+) 为准分子离子峰与分子式 ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$) 相符, 300.9 (M^+) 为掉一个半乳糖的碎片峰, 178.9 为半乳糖的碎片峰。

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) 谱中 δ 12.48 (s)、10.80 (s) 为黄酮苷元上的 5-OH, 7-OH 特征信号。δ 7.60 (1H, d, $J=2.1$, H-2), δ 7.59 (1H, d, $J=8.7\text{Hz}$, H-6), δ 6.84 (1H, d, $J=8.7\text{Hz}$, H-5), δ 6.37 (1H, s, H-8), 6.17 (1H, s, H-6), δ 4.26 (1H, s, gal-H-1), 3.87 (1H, d, $J=9.6\text{Hz}$, gal-H-6) 为半乳糖的端基氢质子和 6 位氢质子^[9]。 ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): 156.11 (C-2)、133.36 (C-3)、177.28 (C-4)、156.13 (C-5)、98.60 (C-6)、163.91 (C-7)、93.42 (C-8)、161.04 (C-9)、103.86 (C-10)、121.88 (C-1)、

表 1 化合物 的 ^{13}C NMR 和 ^1H NMR 二维波谱数据

Table 1 The ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data of compound (dimethyl sulfoxide- d_6)							
No	^{13}C	异核单量子相干		No	^{13}C	异核多键相干	
		Heteronuclear single quantum correlation	Heteronuclear multiple bond correlation			Heteronuclear single quantum coherence	Heteronuclear multiple bond coherence
2	164.2 s		6.83, 7.60, 7.47	6'	118.9 d	7.60, d, 8.5	7.47
3	103.8 d	6.83, s		1''	99.9 d	5.06, d, 7.5	3.30, 3.70
4	182.0 s		6.83	2''	73.1 d	3.30, m	5.44,
4a	105.5 s		6.49, 6.82, 6.83, 12.95	3''	75.6 d	3.66, t, 6.5	5.18,
5	157.0 s		6.49, 6.82, 12.95	4''	69.3 d	3.25, m	5.22
6	99.6 d	6.49, d, 2.0	6.82	5''	76.2 d	3.32, m	
7	163.0 s		5.06, 6.49, 6.82	6''	65.7 t	2.99, dd, 5.5, 11.0 3.70, dd, 5.5, 11.0	4.17
8	94.8 d	6.82, d, 2.0	6.49	1'''	104.2 d	4.17, d, 7.5	3.02, 3.64, 3.95
8a	161.2 s		6.82	2'''	73.4 d	3.02, dd, 3.5, 7.5	4.97,
1'	122.9 s		6.83, 7.15, 7.47	3''	76.5 d	3.09, ddd, 3.5, 8.8, 8.8	4.88,
2'	113.2 d	7.47, d, 2.0	7.60	4'''	69.5 d	3.29, m	4.95
3'	146.8 s		7.15, 7.47, 9.45,	5'''	68.4 t	3.64, t, 5.5, H-5'''a 3.95, dt, 3.5, 9.5	
4'	151.3 s		7.15, 7.47, 7.60	OMe	55.8	3.88, s	
5'	112.2 d	7.15, d, 8.5	3.88,				

115.86 (C-2), 144.66 (C-3), 148.29 (C-4), 115.08 (C-5), 120.98 (C-6), 101.73 (C-1), 71.19 (gal-C-2), 73.14 (gal-C-3), 67.78 (gal-C-4), 75.78 (gal-C-5), 60.11 (gal-C-6)。 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据与文献 [8,9] 报道相符, 因此推定化合物 为槲皮素 3-O-β-D-吡喃半乳糖苷。

References

- 1 Delectis Florae Republicae Popularis Sinice, Agendae Academiae Sinicae Edita (中国科学院植物志编辑部委员会). *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*(中国植物志). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 1984, 20(2): 304
- 2 Zheng Yi han (郑毅男), Cui Shuyu(崔树玉), Sekiya K. *Journal of Jilin Agriculture University* (吉林农业大学学报), 1997, 19(1): 55 ~ 59
- 3 Zhang Jing(张 晶), Zheng Yinan(郑毅男). *Journal of Traditional Chinese Medicine*(中药材), 1999, 22(3): 131 ~ 133
- 4 Liu Moxiang (刘墨祥). *Journal of Jilin Agriculture University* (吉林农业大学学报), 1998, 20(1): 6 ~ 9, 19
- 5 Enji K, Wada S. *Phytochemistry*, 1993, 113(9): 670 ~ 675
- 6 Chari V M, Wanger H, Neszmelyi. *Proceedings of the 5th Hungarian Bioflavonoid Symposium*, Matrafured, Hungary A. 1977a: 49
- 7 Agrawal P K. *Phytochemistry*, 1989, 109(3): 134 ~ 135
- 8 Arisawa M, Hamabe M, Sawai M. *Shoyakugaku Zasshi*, 1984, 38(3): 216 ~ 220
- 9 Markham K R, Stanley B T, Geiger H. *Tetrahedron*, 1978, 34: 1389 ~ 1397

Studies on the Structural Identification of New Flavonol Glycoside of *Salix Raddeana* Laksch

Xu Chuanlian^{*1}, Zheng Yi han², Yang Xiuwei³, Li Xiang³, Sun Guangzh²

¹ (College of Life Science, Zhejiang University of Sciences, Hangzhou 310018)

² (College of Traditional Chinese Medicinal Material, Jilin Agriculture University, Changchun 130118)

³ (National Research Laboratory of Natural and Biochemical Drugs,

School of Pharmaceutical Science Medical and Health Analysis Center, Peking University Beijing, Beijing 100083)

Abstract To study the chemical constituents of *Salix raddeana* Laksch. Some chromatography measurements such as polyamide column chromatography, high performance liquid chromatography (HPLC) and agent system method were carried out respectively. Their structures were elucidated by ultraviolet, infrared electrospray ionization-mass spectrometry, ¹H nuclear magnetic resonance (NMR), ¹³C NMR spectra. Constituents were identified structurally by physicochemical properties. One of the compounds were determined as doismetin 7-O-β-D-xylopyranosyl (1→6)-β-D-glucopyranoside () and the other two as quercetin 3-O-rutinoside () and quercetin 3-O-galactoside (). Compound is a new flavonol glycoside in the nature isolated for the first time.

Keywords *Salix raddeana* laksch, flavonol glycoside, ¹H nuclear magnetic resonance, mass spectrum resonance, ultraviolet, infrared

(Received 7 July 2004; accepted 26 April 2005)