

乌拉尔甘草中两个新的二氢黄酮苷类成分

刘圆圆¹, 杨桢楠¹, 王 尉², 杜 宁², 张经华², 冯子明¹, 姜建双¹, 张培成^{1*}

(1. 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050;
2. 北京市理化分析测试中心, 北京 100089)

摘要: 为进一步研究乌拉尔甘草中的黄酮类化学成分, 通过采用大孔吸附树脂、RP-C₁₈、Sephadex LH-20、MCI 柱色谱和 HPLC 等多种色谱分离方法从乌拉尔甘草 80% 乙醇提取物中分离得到 2 个黄酮类化合物。根据化合物的理化性质和光谱数据, 鉴定其结构分别为: (2*S*)-甘草素-4'-*O*- β -D-葡萄糖-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -D-葡萄糖苷 (**1**)、(2*R*)-甘草素-4'-*O*- β -D-葡萄糖-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -D-葡萄糖苷 (**2**)。化合物 **1** 与化合物 **2** 均为新化合物, 其母核结构为一对对映异构体。

关键词: 乌拉尔甘草; 化学成分; 二氢黄酮

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 06-0948-04

Two new flavanone glucosides identified in *Glycyrrhiza uralensis*

LIU Yuan-yuan¹, YANG Ya-nan¹, WANG Wei², DU Ning², ZHANG Jing-hua²,
FENG Zi-ming¹, JIANG Jian-shuang¹, ZHANG Pei-cheng^{1*}

(1. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;
2. Beijing Centre for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100089, China)

Abstract: Two flavanone glucosides were isolated from the 80% ethanol extract of *Glycyrrhiza uralensis* using various chromatographic techniques, including macroporous adsorbent resin, RP-C₁₈, Sephadex LH-20, MCI and preparative HPLC. On the basis of chemical properties and spectra data, these compounds were identified as (2*S*)-liquiritigenin-4'-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -D-glucopyranoside (**1**), (2*R*)-liquiritigenin-4'-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -D-glucopyranoside (**2**), respectively. Compounds **1** and **2** are new compounds, and their aglycones are enantiomers.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis*; chemical composition; flavanone

甘草 (*Radix Glycyrrhiza*) 为豆科多年生草本植物, 作为药用甘草有乌拉尔甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*)、胀果甘草 (*Glycyrrhiza Inflate*) 及光果甘草 (*Glycyrrhiza glabra*) 的根及根茎。甘草性平、味甘, 具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛等功效, 被广泛

应用于医药及食品工业的调味剂和赋形剂^[1]。

乌拉尔甘草是甘草属植物中分布最广、产量最多的药用甘草, 主要分布于吉林、辽宁、内蒙古、新疆、青海等地^[2]。现代药理学研究^[3-5]表明甘草具有抗氧化、抗炎、抗病毒、免疫抑制、抗菌、抗肿瘤、保肝、降糖等活性。目前已从甘草中得到黄酮类^[6]、三萜皂苷类^[7]、香豆素类^[8]、多糖^[9]等多种化学成分。通过文献^[10-12]调研发现, 甘草中黄酮类化合物是其主要的活性物质基础之一。为了进一步揭示乌拉尔甘草的药效物质基础, 本实验通过对乌拉尔甘草的 80% 乙醇

收稿日期: 2017-03-06; 修回日期: 2017-03-17.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助 (2016-I2M-1-007).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165231, E-mail: pczhang@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0204

提取物进行系统分离和结构鉴定, 得到 2 个二氢黄酮类化合物 (图 1), 均为新化合物。

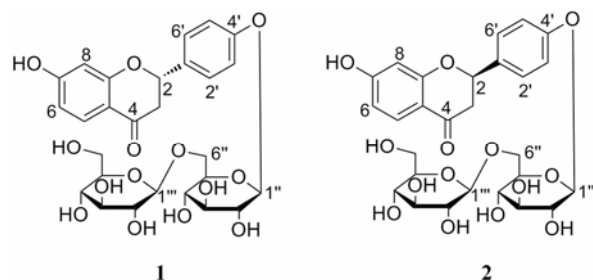


Figure 1 Structures of compounds 1 and 2

化合物 1 淡黄色无定形粉末, UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 275.4 (2.44)、312.4 (2.34) nm, IR 显示该化合物结构中含有羟基 (3366 cm^{-1})、共轭酮羰基 (1663 cm^{-1})、苯环 (1607 、 1512 、 1465 cm^{-1}); HR-ESI-MS m/z 603.167 7 $[M+Na]^+$ (Calcd. 603.168 4), 提示化合物 1 的分子式为 $C_{27}H_{32}O_{14}$ 。 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) 数据 (表 1) 显示 1 组 AA'BB' 偶合系统的苯环质子信号 δ_{H} 7.41 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2'/6') 和 7.13 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3'/5'), 以及 1 组 ABX 自旋偶合系统的苯环质子信号 δ_{H} 7.69 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5)、6.46 (1H, dd, $J=8.5$ 、2.5 Hz, H-6) 和 6.32 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-8)。进一步结合 $^1\text{H NMR}$ 谱中高场区的氢信号 δ_{H} 5.40 (1H, dd, $J=12.5$ 、2.5 Hz, H-2)、3.01 (1H, m, H-3a) 和 2.69 (1H, m, H-3b), 提示该化合物可能为一个二氢黄酮类化合物。经查阅文献^[13,14], 可确定化合物 1 的苷元为甘草素 (liquiritigenin)。在 $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) 谱中共显示了 27 个碳信号, 除了 15 个二氢黄酮碳信号外, 还包括 2 分子葡萄糖的 12 个碳信号。 $^1\text{H NMR}$ 谱中 δ_{H} 4.90 (1H, d, $J=7.5$ Hz) 及 δ_{H} 4.34 (1H, d, $J=7.5$ Hz) 分别是两分子 β -葡萄糖单元的端基质子信号 H-1'' 和 H-1'''。参照文献^[15], 利用酸水解的方法获得单体葡萄糖, 结合 GC 分析, 确定两分子葡萄糖的构型均为 *D* 型。在 HMBC 谱中 (图 2), H-1''' (δ_{H} 4.34) 与 C-6'' (δ_{C} 69.6)、C-2''' (δ_{C} 74.8)、C-3''' (δ_{C} 77.9) 相关, 说明两分子葡萄糖是 1 \rightarrow 6 连接; H-1'' (δ_{H} 4.90) 与 C-4' (δ_{C} 159.1)、C-3'' (δ_{C} 77.9) 相关, 说明糖链连接在 C-4' 位。

CD 光谱显示 (图 3), 化合物 1 在 301.5 nm 出现负 Cotton 效应, 在 329.5 nm 出现正 Cotton 效应, 可确定 C-2 的绝对构型为 *S*^[16]。

综上所述, 化合物 1 的结构被确定为 (2*S*)-甘草素-4'-*O*- β -*D*-葡萄糖-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -*D*-葡萄糖苷。

Table 1 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, δ in ppm, J in Hz) and $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz) data for compounds 1 (CD_3OD) and 2 ($\text{DMSO}-d_6$)

Position	1		2	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2	5.40, dd, (12.5, 2.5)	80.8	5.51, dd, (12.5, 2.5)	78.9
3a	3.01, m	45.0	2.99, m	43.3
3b	2.69, m		2.65, m	
4		193.3		190.0
5	7.69, d, (8.5)	129.8	7.65, d, (8.5)	128.4
6	6.46, dd, (8.5, 2.5)	111.8	6.51, dd, (2.5, 8.5)	110.5
7		166.8		164.6
8	6.32, d, (2.5)	103.8	6.35, d, (2.5)	102.6
9		165.4		163.1
10		114.9		113.5
1'		134.4		132.3
2'/6'	7.41, d, (8.5)	128.9	7.45, d, (8.5)	128.1
3'/5'	7.13, d, (8.5)	117.7	7.12, d, (8.5)	116.3
4'		159.1		157.4
1''	4.90, d, (7.5)	101.9	4.87, d, (7.5)	100.3
2''	3.33, m	75.1	3.11, m	73.6
3''	3.23, m	77.9	3.25, overlap	76.4
4''	3.12, m	71.3	3.24, overlap	70.0
5''	3.25, m	77.8	3.61, m	75.9
6''a	3.77, m	69.6	3.57, d, (10.0)	68.3
6''b	4.10, m		3.99, d, (10.0)	
1'''	4.34, d, (7.5)	104.6	4.21, d, (7.5)	103.3
2'''	3.12, m	74.8	3.01, m	73.2
3'''	3.13, m	77.9	3.57, m	76.9
4'''	3.15, m	71.6	2.94, m	69.7
5'''	3.22, m	77.5	3.40, m	76.6
6'''a	3.57, m	62.8	3.41, m	61.0
6'''b	3.71, m		3.65, m	

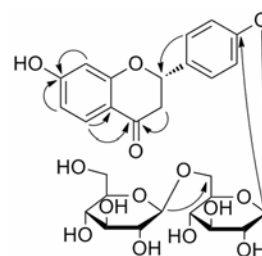


Figure 2 Key HMBC of compound 1

化合物 2 淡黄色无定形粉末, HR-ESI-MS m/z 603.166 1 $[M+Na]^+$ (Calcd. 603.168 4), 提示化合物 2 分子式为 $C_{27}H_{32}O_{14}$ 。化合物 2 的 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 和 $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 数据均与化合物 1 相似。不同之处在于, 化合物 2 的 CD 光谱 (图 4) 显示出与化合物 1 相反的 Cotton 效应, 即在 292.0 nm 出现正 Cotton 效应, 在 317.5 nm 出现负 Cotton 效应。因此, 化合物 2 的 C-2 位构型为 *R*。

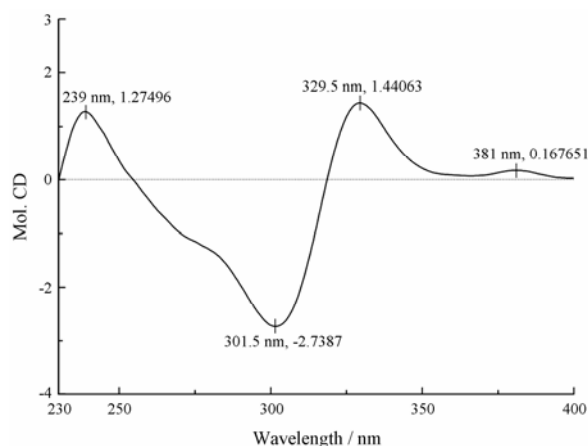


Figure 3 CD spectrum of 1

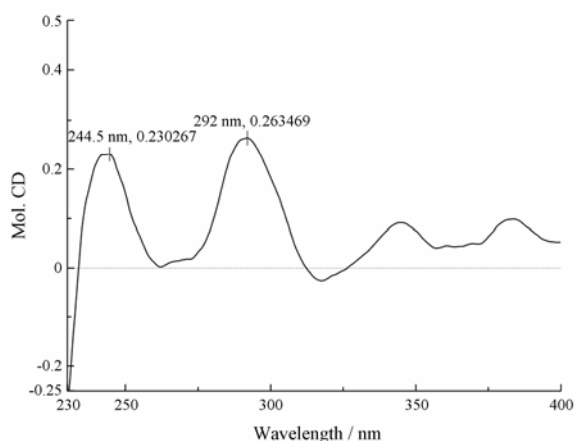


Figure 4 CD spectrum of 2

根据以上推断, 化合物 2 的结构被鉴定为 (2*R*)-甘草素-4'-*O*- β -*D*-葡萄糖-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -*D*-葡萄糖苷。

实验部分

JASCO V-650 型紫外分光光度仪; Nicolet 5700 型红外光谱仪 (美国热电公司); JASCO P-2000 型旋光仪; Bruker-500 MHz 核磁共振仪; Agilent 6520 HPLC-Q-TOF 质谱仪; JASCO J-815 型圆二色谱仪; Agilent 1200 型高效液相色谱仪, 包括四元高压梯度泵、自动脱气机、二极管阵列检测器、自动进样器、柱温箱; Shimadzu LC-6AD 制备型高效液相色谱仪; HP-20 大孔吸附树脂 (日本三菱化学株式会社); Sephadex LH-20 (GE 公司); Rp-C₁₈ (50 μ m, YMC, 日本东京); 分析纯试剂, 北京化工厂生产; 色谱纯试剂, Fischer 公司、天津科密欧公司。

甘草药材于 2013 年 11 月购于内蒙古乌拉尔, 由中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所马林教授鉴定为乌拉尔甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*) 的根及根茎, 标本储存在中国医学科学院、北京协和医学院

药物研究所标本室, 标本号为 ID-S-2813。

1 提取分离

乌拉尔甘草 100 kg, 80% 乙醇回流提取 (3 \times 2 h), 得总浸膏 35 kg。将浸膏分散于水中, 搅拌, 静止, 除去沉淀。所得水溶性部位 (10 kg) 经大孔吸附树脂柱色谱分离, 以水-乙醇梯度洗脱, 共得到 5 个部分, 分别为 Fr.1 (H₂O)、Fr.2 (15% EtOH-H₂O)、Fr.3 (30% EtOH-H₂O)、Fr.4 (50% EtOH-H₂O) 和 Fr.5 (95% EtOH-H₂O)。Fr.3 (260 g) 经中压反相柱色谱, 用水-甲醇进行梯度洗脱 (100:0~0:100), 共得到 40 个部分 (Fr.3-1~Fr.3-40), 其中 Fr.3-28 (60 mg) 再经 Sephadex LH-20 柱色谱和制备型高效液相分离 (流动相: 25% MeOH-H₂O; 流速: 5 mL \cdot min⁻¹), 得到化合物 1 (32 mg, *R*_t=114 min) 与化合物 2 (16 mg, *R*_t=124 min)。

2 结构鉴定

化合物 1 淡黄色无定形粉末; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 275.4 (2.44)、312.4 (2.34) nm; [α]_D²⁰ -48.2 (*c* 0.067, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} : 3 366、1 663、1 607、1 512、1 465 cm⁻¹; CD (MeOH) λ_{\max} ($\Delta\epsilon$): 301.5 (-2.73)、329.5 (1.44) nm; HR-ESI-MS *m/z* 603.167 7 [M+Na]⁺ (C₂₇H₃₂O₁₄)。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) 和 ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) 数据见表 1。

化合物 2 淡黄色无定形粉末; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 276.2 (2.50)、313.6 (2.30) nm; [α]_D²⁰ -45.2 (*c* 0.067, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} : 3 391、1 739、1 608、1 510 cm⁻¹; CD (MeOH) λ_{\max} ($\Delta\epsilon$): 292.0 (0.26)、317.5 (-0.03) nm; HR-ESI-MS *m/z* 603.166 1 [M+Na]⁺ (Calcd. 603.168 4), 确定分子式为 C₂₇H₃₂O₁₄。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) 和 ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) 数据见表 1。

References

- [1] Kitagawa I, Sakagami M, Hashiuchi F, et al. Apioglycyrrhizin and araboglycyrrhizin, two new sweet oleanene-type triterpene oligoglycosides from the root of *Glycyrrhiza inflata* [J]. Chem Pharm Bull, 1989, 37: 551–553.
- [2] Wang Q, Miao WJ, Ye M, et al. Chemical constituent from *Glycyrrhiza uralensis* [J]. China Tradit Herb Drugs (中草药), 2012, 43: 1886–1890.
- [3] He J, Chen L, Heber D, et al. Antibacterial compounds from *Glycyrrhiza uralensis* [J]. J Nat Prod, 2006, 69: 121–124.
- [4] Gao XY, Wang WQ, Li WD, et al. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza Radix* and its bioactive compounds [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2009, 34: 2695–

- 2700.
- [5] Li SP, Li W, Wang YH, et al. Prenylflavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* and their protein tyrosine phosphatase-1B inhibitory activities [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 5398–5401.
- [6] Saitoh T, Kinoshita T, Shibata S. Flavonols from licorice root [J]. *Chem Pharm Bull*, 1976, 24: 1242–1245.
- [7] Kitagawa I, Zhou JL, Sakagami M, et al. Licorice-saponins A3, B2, C2, D3 and E2, five new oleanene-type triterpene oligoglycosides from Chinese *Glycyrrhiza Radix* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36: 3710–3713.
- [8] Wang CL, Zhang RY, Han YS, et al. Chemical studies of coumarins from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1991, 26: 147–151.
- [9] Zhang QY, Ye M. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice) [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 1954–1969.
- [10] Ji S, Li ZW, Song W, et al. Bioactive constituents of *Glycyrrhiza uralensis* (licorice): discovery of the effective components of a traditional herbal medicine [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79: 281–292.
- [11] Ye RG, Fan YH, Ma CM. Identification and enrichment of α -glucosidase-inhibiting dihydrostilbene and flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* leaves [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65: 510–515.
- [12] Asl MN, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyhiza* sp. and its bioactive compounds [J]. *Phytother Res*, 2008, 22: 709–724.
- [13] Zhang HJ, Liu Y, Zhang RY. Chemical studies of flavonoid compounds from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1994, 29: 471–474.
- [14] Yahara S, Nishioka I. Flavonoid glucosides from licorice [J]. *Phytochemistry*, 1984, 23: 2108–2109.
- [15] Agrawal PK. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31: 3307–3330.
- [16] Gaffield WJ. Circular dichroism, optical rotator dispersion and absolute configuration of flavanones, 3-hydroxyflavanones and their glycosides [J]. *Tetrahedron*, 1970, 26: 4093–4108.