

山茱萸果肉之成分研究(I)

楊藏雄 劉世智 辛美慧

臺北醫學院 藥物化學科

(本論文於民國59年11月受理)

中藥山茱萸 (*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc., family Cornaceae) 又名蜀酸棗或肉棗, 自生於中國之山東, 陝西及浙江等地之山野地帶, 為山茱萸科之一種落葉小喬木, 核呈橢圓形。在民間供作開脾, 利尿用, 亦為著名六味丸主要成分之一¹⁾。本草綱目上²⁾記載其果肉具有強壯作用, 治遺精, 多尿症及腰痛等功效。近年嶋田³⁾等及Hartwell⁴⁾各個別報告山茱萸有抗腫瘍及治血癌等作用。

關於山茱萸之化學成分研究, 中沖⁵⁾曾於其果實中報告有沒食子酸, 蘋果酸及酒石酸之存在, 同時亦提及一未知化學結構的有機酸 (mp. 245°)。最近塚本糾夫⁶⁾又應用 gas chromatography 來檢討植物中的 non-glycosidal sterols 及 terpenes, 結果又從其果肉中證明有 stigmasterol, β -amyrin 及 β -sitosterol 之存在。

從以上已知之諸成分仍不能充分了解本植物之重要作用, 是否未知化學結構之有機酸為主宰上述作用的成分而引起著者等對於本植物成分作更進一步探討之興趣。本實驗所用之材料為民國五十八年二月間在臺北市中藥行購得韓國產山茱萸之乾燥果肉(4.72公斤), 以 Soxhlet 抽出器乙醚抽取, 乙醚抽出液經預試驗初步分析結果, mayer 試驗呈陰性反應, Mg + HCl 試驗亦呈陰性, Liebermann-Burchard (以後簡稱 L.B.) 反應呈陽性(紫紅色)推定有 terpenoid 或 steroid 之存在。然後按照實驗部分所詳述之方法, 經萃取, 分離步驟, 結果在中性部分得一種結晶性物質, mp. 146~148°, L.B. 試驗呈陽性(紫紅色), 關於其構造之決定, 今仍在追查中。另外在酸性部分得一種白色細針狀結晶, mp. 278~280°, L.B. 試驗呈陽性(紫紅色), 其質量光譜及元素分析結果其分子組成相當於 $C_{30}H_{46}O_8$ (M^+456^m/e), $[\alpha]_D^{25} + 50.6^\circ$ (C=0.85, pyridine), nujol 及 KBr 中測定之紅外線吸收光譜在 3420cm^{-1} 顯示有 hydroxyl 基之吸收, 1690cm^{-1} 有一長而尖銳之吸收帶表示為 acid carbonyl 基, 1380cm^{-1} 之分歧特徵顯示為 geminal dimethyl 基等。NMR(C_6D_6N) 於 4.56τ 有一個 trisubstituted olefinic proton, 6.63τ 之 triplet (1H) 推定為 $>CH-$ OH, $8.69, 8.79, 8.98, 9.01, 9.10\tau$ 共計有 21 個 protons, 表示為七個 methyl 基。由以上物理化學諸恆數可知本結晶性物質為含有 hydroxyl 基, geminal dimethyl 基, 雙鍵及碳酸基之酸性 triterpenoid。

本結晶物 (I) 以無水醋酸與 pyridine 經酯化反應得一酯化物 (II), mp. 280~282°, 其元素分析值相當於 $C_{32}H_{50}H_4$, $[\alpha]_D^{25} + 51.5^\circ$ (C=1, $CHCl_3$), IR(nujol) 光譜中 3410cm^{-1} 表示 hydroxyl 基, 1725 及 1250cm^{-1} 之吸收出現 ester carbonyl 基, 1685cm^{-1} 為 acid carbonyl 基。NMR($CDCl_3$) 之 4.75τ 為原有的 trisubstituted olefinic proton, 5.50τ 之 triplet 表示 $CH_3COOC-\overset{H}{\text{C}}$ proton, 7.95τ 之 singlet 為 $-OCOCH_3$ 之三 proton, $8.75, 8.93, 9.04, 9.10, 9.20\tau$ 共計 21 個 protons 表示為七個 methyl 基。

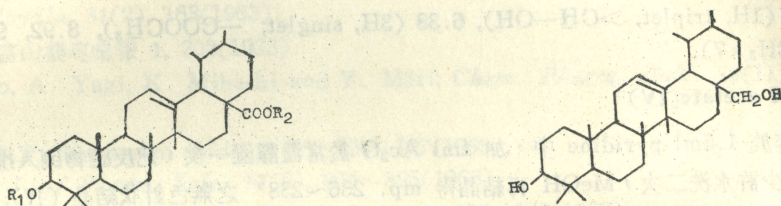
I 以 diazomethane 經 methylation 得一結晶性的 methyl ester (III), mp. 165~166°, 其元素分析值相當於 $C_{31}H_{50}O_4$ (M^+470^m/e), IR(nujol) 光譜之 3350cm^{-1} 為 alcoholic-OH, 1725cm^{-1} 表示 ester carbonyl 基, 比原來 acid carbonyl 基之吸收轉移至更高波數處。NMR($CDCl_3$) 亦比原來多 6.38τ (3H) singlet 之 $-COOCH_3$ protons。

由 methyl ester (III) 加無水醋酸及 pyridine 實施酯化反應, 結果得到一種無色針晶 (IV), mp. 236~238°, 其元素分析值相當於 $C_{31}H_{52}O_4$ 。IR (nujol) 光譜中原有之 hydroxyl 基之吸收已消失, 僅 1735 及 1240cm^{-1} 之 ester carbonyl 基之吸收呈現而已。NMR ($CDCl_3$) 有 6.38τ (3H) singlet 之 $-COOCF_3$ protons 及 7.93τ (3H) singlet 之 $OCOCH_3$ protons。

Methyl ester (III) 以 LiAlH_4 還原結果得一種白色細針狀結晶 (V) mp. $222\sim 223.5^\circ$ (M^+442), 其元素分析值相當於 $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$. 從 IR(nujol) 光譜中原有之 ester carbonyl 基之吸收已消失, 僅 3533cm^{-1} 有 hydroxyl 基之吸收出現, 故知原來的 methyl ester (III) 被還原成 alcohol (V). 又由 NMR(CDCl_3) 原來 6.38τ 之 $-\text{COOCH}_3$ protons 吸收消失, 而 6.77τ (2H) quartet 表示為 $-\text{CH}_2-\text{OH}$ 之 protons.

最後 methyl ester (III) 先以 alcoholic-KOH 加水分解, 結果回收原物. 再改以 diethylene glycol 與 KOH 於油鍋上還流 11 小時, 才得水解產物與原來之酸性結晶 (I) 相同. 基於此難以水解之事實推定 $-\text{COOH}$ 之位置最可能在 C-28 位之 α -amyrin 型 oleanolic acid⁹⁾ 或者 β -amyrin 型 ursolic acid^{7), 8)}, 尤其上述諸衍生物之諸恆數接近後者, 經與標品 ursolic acid 及 ursolic acid methyl ester 之直接比較 TLC, IR(nujol) 及混融試驗結果均一致, 故證明本結晶物為 ursolic acid (I).

從本實驗中發現山茱萸果肉之主成分為 ursolic acid (0.22%), 雖未經直接比較但可能就是中沖⁵⁾ 所報告未知結構之有機酸. 山茱萸中單離證明 ursolic acid 本研究尚屬首次. ursolic acid 有強心作用¹⁰⁾ 很可能代表山茱萸中有趣之藥理作用的主要成分。



- (I). $R_1=R_2=\text{H}$
 (II). $R_1=\text{Ac}, R_2=\text{H}$
 (III). $R_1=\text{H}, R_2=\text{CH}_3$
 (IV). $R_1=\text{Ac}, R_2=\text{CH}_3$

(V)

實 驗 部 份

抽取與分離：

本實驗所採用之材料是民國五十八年二月二十八日購於臺北市吉元中藥行. 乾燥之果肉 (4.72 公斤) 利用 Soxhlet 抽出器以乙醚為溶媒, 分二次 (2.52 及 2.2 公斤) 還流抽取至抽出液近乎無色為止. 乙醚總抽出液濃縮至約 5 公升, 加入 10% KOH 溶液 (約 2 公升), 分三次振盪此時產生之白色沉澱物過濾, 濾取並分離乙醚層及 KOH 液層. 此乙醚層以少量水洗二次, 無水硫酸鈉脫水, 蒸去溶媒後得黃棕色之油狀物 (約 20g), 此經 Alumina Column Chromatography (2.7×27cm), 於 CHCl_3 流出部分得一種結晶性物質 (1.1g), mp. $146\sim 148^\circ$, L.B. 試驗陽性呈紫紅色, 今仍在繼續追查中. 上述濾取之白色沉澱物溶於水中, 加稀鹽酸酸性化後以乙醚分次抽取, 所得之乙醚抽出液以少許水洗二次, 無水硫酸鈉脫水, 蒸乾溶媒後得微帶黃色粉末狀結晶 (7.67g), L.B. 試驗陽性呈紫紅色. 上述之 KOH 液層加稀鹽酸酸性化, 乙醚抽取七次, 乙醚總抽出液以少許水洗後以無水硫酸鈉脫水, 蒸去溶媒得一種淡黃色粉末狀結晶 (3.54g), L.B. 試驗亦為陽性呈紫紅色, 以 TLC 比較此兩種黃色粉末狀結晶, 其 R_f 值一樣, $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 試液之呈色亦相同 (桃紅色)。

Ursolic acid (I) 之單離及性質：

上述兩種結晶物合併得 11.4g (0.22%), 以 MeOH 再結晶數次得 mp. $278\sim 280^\circ$ 之無色針狀結晶, $[\alpha]_D^{25} +50.6^\circ$ ($C=0.85$, pyridine) Anal, Calcd, $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ (M^+456 m/e): C, 78.89; H, 10.59. Found: C, 78.59; H, 10.75. IR(KBr) cm^{-1} : 3420 (hydroxyl), 1690 (acid carbonyl), 1380 (geminal dimethyl). NMR ($\text{C}_6\text{D}_6\text{N}$) τ : 4.56 (1H, broad, $\text{H} > \text{C}=\text{C} <$), 6.63 (1H, triplet, $>\text{CH}-\text{OH}$), 8.69, 8.79, 8.98, 9.01, 9.10 (21H, $\text{CH}_3 \times 7$). 與標品 ursolic acid 之混融試驗結果不降下融點, TLC ($\text{SiO}_2/\text{n-hexane}-\text{EtOAc}$ (2:1) / $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ T.S) 及 IR(nujol) 之比較測定亦完全一致, 故確認 (I) 為 ursolic acid.

Ursolic acid acetate (II) :

上記 (I) 100mg 溶於 pyridine(1.5ml), 加入 Ac_2O (1ml) 於常溫下反應一夜, 反應物倒入水中使過量之 Ac_2O 分解, 濾取沉澱物, 以少量水洗二次, 以 aq. MeOH 再結晶得白色細針狀結晶 mp. 280~282°, 產量 76mg, $[\alpha]_D^{25} +51.5^\circ$ (C=1, CHCl_3). Anal. Calcd. $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$: C, 77.29; H, 10.22. Found: C, 76.90; H, 10.53. IR (nujol) cm^{-1} : 3410 (hydroxyl), 1725, 1250 (ester carbonyl), 1685 (acid carbonyl), NMR(CDCl_3) τ : 4.75(1H, broad, $\text{H}>\text{C}=\text{C}<$), 5.50(1H, triplet, $\text{CH}_2\text{COOC}<\text{H}$), 7.95 (3H, singlet, $-\text{OCOCH}_3$), 8.75, 8.93, 9.04, 9.10, 9.20 (21H, $\text{CH}_3 \times 7$).

Ursolic acid methyl ester (III) :

I 2g 溶於 MeOH— CHCl_3 混合液中, 加 7g (p-) $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{N}(\text{NO})\text{CH}_3$ 所製成之 $\text{CH}_2\text{N}_2\text{-Et}_2\text{O}$ 溶液, 封閉於室溫下放置一夜, 俟反應完成後常溫下以減壓濃縮法抽去溶媒, 得淡黃色粗結晶, 此經 alumina 柱層色層分析法, CHCl_3 流出部分濃縮之殘渣以 MeOH 再結晶得 mp. 165~166° 之無色針狀結晶, 產量 1.17g, Anal. Calcd. $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_4$ (M+470m/e). $\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$: C, 77.61; H, 10.71. Found: C, 77.86; H, 10.37. IR(nujol) cm^{-1} : 3350 (hydroxyl), 1735 (ester carbonyl). NMR(CDCl_3) τ : 4.75(1H, broad, $\text{H}>\text{C}=\text{C}<$), 6.78 (1H, triplet, $>\text{CH}-\text{OH}$), 6.38 (3H, singlet; $-\text{COOCH}_3$), 8.92, 9.01, 9.08, 9.21, 9.25 (21H, $\text{CH}_3 \times 7$).

Ursolic acid methyl acetate(IV) :

上記 III 98mg 溶於 1.5ml pyridine 中, 加 1ml Ac_2O 於常溫靜置一夜, 把反應物倒入攪拌下之水中, 濾取沉澱物, 以少許水洗二次, MeOH 再結晶得 mp. 236~238° 之無色針狀結晶 (IV), 產量 74mg. Anal. Calcd. $\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_4$: C, 77.29; H, 10.22. Found: C, 77.41; H, 10.21. IR (nujol) cm^{-1} : 1735, 1240 (ester carbonyl), NMR(CDCl_3) τ : 4.73(1H, broad, $\text{H}>\text{C}=\text{C}<$), 5.50(1H, triplet, $\text{CH}_2\text{COOC}<\text{H}$), 6.38(3H, singlet, $-\text{COOCH}_3$), 7.93 (3H, singlet, $-\text{OCOCH}_3$), 8.87, 8.93, 9.06, 9.15, 9.25(21H, $\text{CH}_3 \times 7$).

Ursolic acid methyl ester (III) 之還原 :

上記 III 1.1g 溶於 150ml abs. ether, 室溫下攪拌滴入含 2.6g LiAlH_4 之 abs. ether 懸濁液中, 以 TLC 確認反應, 反應完全後加 3ml. EtOAc 攪拌之, 使過量的 LiAlH_4 破壞, 過濾殘餘物以 Et_2O 洗滌三次, 濾液蒸乾溶媒後得一微帶黃色之結晶 diol (V), 產量 821mg, 取 110mg 以 alumina 柱層色層分析法純化, 於 CHCl_3 流出部分, 蒸去溶媒之殘渣, 以 MeOH 再結晶得 mp. 222~223.5° 之白色細針狀結晶, 重約 88mg, Anal. Calcd. $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$ (M+442m/e): C, 81.39; H, 11.38, Found: C, 82.23; H, 11.82, IR (nujol) cm^{-1} : 3353(hydroxyl). NMR(CDCl_3) τ : 4.88 (1H, broad, $\text{H}>\text{C}=\text{C}<$), 6.77(2H, quartet, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 8.75, 8.90, 9.00, 9.04, 9.21(21H, $\text{CH}_3 \times 7$).

Ursolic acid methyl ester (III) 之加水分解 :

i). III 100mg 加入 3.5% alcoholic-KOH 溶液 (20ml), reflux 3 天 TLC 檢查發現僅很少部分被分解, 此經真空濃縮後改用 10% KOH 溶液, 還流加熱水解之, 結果亦與 alcoholic-KOH 水解一樣, 不能得完全之水解。

ii). III 95mg 加 KOH 3g, 水 5ml 及 diethylene glycol 10ml, 於 oil bath 上還流加熱 11 小時, 把反應物以水稀釋之, 加稀鹽酸 (1:2) 使酸性並以 Et_2O 抽取七次, Et_2O 抽出液以少量水洗二次, 無水硫酸鎂脫水, 蒸乾溶媒後得紅棕色摻雜白色粉末狀之殘渣, 以 EtOH 再結晶得 mp. 278~280° 之無色針狀結晶 87mg, 與 ursolic acid (I) 比較 TLC, IR(nujol) 結果一致。

結 論

山茱萸 (*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.) 之果肉在民間供開脾、利尿用, 本草綱目記載¹⁾ 有強壯, 治遺精及腰痛之功效, 嶋田玄彌²⁾ 等及 Hartwell³⁾ 亦各個別發表有抗腫瘤及治血癌之作用。關於其化學成分中沖⁴⁾ 報告有一種 mp. 245° 未知化學結構之有機酸。茲爲了要闡明山茱萸之化學成分及檢討其藥用價值而着手本研究。

從其果肉中單離一種酸性 triterpenoid, mp. 278~280°, $C_{33}H_{48}O_3$, $[\alpha]_D^{25} + 50.6^\circ$ (C=0.85, pyridine), 此酸性物誘導之醋化物 (II), mp. 280~282°, $C_{33}H_{50}O_4$, $[\alpha]_D^{25} + 51.5^\circ$ (C=1, $CHCl_3$), methyl ester (III), mp. 165~166°, methyl acetate(IV), mp. 235~233°, diol(V), mp. 222~223.5°. 這些衍生物之物理化學諸恆數及光譜儀等分析結果, 推定其為 ursolic acid(I), 再與標品 ursolic acid 及其 methyl ester 直接比較混融試驗結果融點並無下降, IR(nujol) 及 TLC 又完全一致, 故確證本結晶為 ursolic acid (I). 山茱萸中單離證明 ursolic acid 尚屬首次, 很可能代表山茱萸中有趣之藥理作用的主要成分。

參 考 文 獻

- (1) 刈米達夫, 木村雄四郎: 最新和漢藥用植物, 127 (1942), Stuart: *Chinese Materia Medica*, 128 (1911).
- (2) 李時珍: 本草綱目 36卷 p1139.
- (3) 嶋田玄彌、澤田德之助、永井吉澄、小松信彦、中澤昭三、福田玲子: 日本生藥學雜誌, 14 (1), 49~50(1960).
- (4) Hartwell: *Lloydia*, 31(2), 163(1963).
- (5) 中沖太七郎: 富山藥專彙報 1, 202(1933).
- (6) T. Tsukamoto, A. Yagi, K. Mihashi and Y. Mōri: *Chem. Pharm. Bull.* 16(11), 2123~2129 (1968)
- (7) T. Inoue and F. Nakataba: *ibid.*, 17(1), 124~127(1969).
Mario Silva: *J. of Pharm. Scie.*, 57(5), 864~865(1968).
- (8) R.G. Wilson and D.H. Williams: *Tetrahedron*, 25, 155~162(1969).
- (9) S.R. Rangaswami and S. Sarangan: *Tetrahedron*, 25, 3071~3075(1969).
- (10) 石館、田村、岡田: 化學領域 2, 6(1948).

誌 謝

本研究承蒙本學院院長徐千田博士之鼓勵, 元素分析、質譜儀分析及磁核共鳴等之測定及標品 ursolic acid 承日本武田藥品株式會社後藤實博士之惠贈, 又本研究承蒙國家科學委員會之補助特此致謝。

SUMMARY

Studies on The Constituents of the fructus of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.

Tsang-Hsiung Yang, Shih-Chih Liu and Mei-Huei Sin

Department of Pharmaceutical Chemistry, Taipei Medical College

The fructus of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc., family Cornaceae is a Chinese drug which has been used¹⁾ for diuretic, astrigent, tonic, anthelmintic and antilithic, and recommended for menorrhagia, impotence and urinary difficulties of the aged. It also has antitumor activity against Ehrlich carcinoma cell reported by G. Shimada²⁾.

In the course of our searching for the antitumor constituent from the Formosan and Chinese drug, the examination was carried out on the fructus of *Cornus officinalis*. An acid triterpenoid was obtained as colorless needles, mp. 278—280°; $C_{33}H_{48}O_3$ ($M^+456^{m/e}$), $[\alpha]_D^{25} + 50.6^\circ$ (C=0.85, pyridine), gave a positive Liebermann-Burchard test (reddish-violet). Its acetate(II), mp. 280—282°, as colorless needles, $C_{33}H_{50}O_4$, $[\alpha]_D^{25} + 51.5^\circ$ (C=1, $CHCl_3$), and other derivatives methyl ester (III), mp. 165—165°, methyl acetate(IV), mp. 233—233° and diol(V), mp. 222—223.5° are also derived from this acid(I). From the spectral analyses of these derivatives and direct comparison of their infrared spectra, tlc and mixed melting point with authentic samples have proved this acid to be ursolic acid (I). This is the first time ursolic acid being isolated from *Cornus officinalis* and it may be suggested that the main action of this plant is attributed to this highly yielded acid which has not been solved until recently.