

## 油茶饼粕中黄酮苷类化合物的分离与结构鉴定



CHEN Hong-xia

陈虹霞, 王成章\*, 叶建中, 周昊

(中国林业科学研究院林产化学工业研究所; 生物质化学利用国家工程实验室;  
国家林业局林产化学工程重点开放性实验室, 江苏南京 210042)

**摘 要:** 以茶籽饼粕为原料, 采用体积分数 65% 乙醇-水溶液提取, 并通过中低压色谱快速分离得到高纯度的黄酮苷混合物。进一步采用高效液相色谱制备, 柱子 XB-C18 ( $\phi$  10 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相甲醇-水 (体积比 2:3), 紫外 270 nm, 流速 3 mL/min, 分离得到黄酮苷化合物 I 和 II。

经 IR、MS 和 NMR 鉴定, 两种化合物分别为山奈酚 3-O-[2-O- $\beta$ -D-半乳糖-6-O- $\alpha$ -L-鼠李糖]- $\beta$ -D-葡萄糖苷 (I) 和山奈酚 3-O-[2-O- $\beta$ -D-木糖-6-O- $\alpha$ -L-鼠李糖]- $\beta$ -D-葡萄糖苷 (II)。

**关键词:** 油茶饼粕; 黄酮苷; 高效液相色谱; 分离

中图分类号: TQ351

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2011)01-0013-04

## Isolation and Identification of Flavonoid Glycosides from *Gamellia oleifera* Abel. Cake

CHEN Hong-xia, WANG Cheng-zhang, YE Jian-zhong, ZHOU Hao

(Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF; National Engineering Lab. for Biomass Chemical Utilization; Key and Open Lab. on Forest Chemical Engineering, SFA, Nanjing 210042, China)

**Abstract:** The dreg-cakes of oil camellia (*Camellia oleifera* Abel.) were extracted with 65% ethanol. The extract was separated by middle-pressure chromatography. The flavonoid glycosides mixture in high purity was obtained two compounds were isolated by HPLC, using XB-C18 column ( $\phi$  10 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m) with a mobile phase which consists of a mixture of methanol and water (volume ratio 2:3). It had a flow rate of 3.0 mL/min. UV detection was made at 230 nm. According of IR, MS and NMR, the two compounds were identified to be kaempferol 3-O-[2-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-6-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl]- $\beta$ -D-glucopyranoside (I) and kaempferol 3-O-[2-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl-6-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl]- $\beta$ -D-glucopyranoside (II), respectively.

**Key words:** *Camellia oleifera* Abel. cake; flavonoid glycosides; HPLC; isolation

油茶 (*Camellia oleifera* Abel.) 属山茶科山茶属植物, 为多年生乔木或灌木<sup>[1]</sup>, 广泛分布于湖南、江西、广西等 15 个省、自治区。我国现有油茶林种植面积 368 万  $\text{hm}^2$ , 年产茶油约 30 万吨<sup>[2]</sup>。茶籽经榨油后, 产生了大量的副产品——油茶饼粕, 它含有多种有效成分, 其中茶皂素的含量非常丰富, 是一种纯天然的非离子型表面活性剂, 同时还具有抗渗、消炎、镇痛等作用<sup>[3]</sup>。但是油茶饼粕中还有其它有效成分如黄酮苷, 近年来研究表明: 黄酮类物质具有多种多样的生理活性, 如抗氧化、调节血管渗透性, 改善记忆, 抗抑郁, 抗焦虑、中枢抑制和神经保护等功能<sup>[4-7]</sup>。俞斌等<sup>[8]</sup>采用硅胶柱层析方法分离得到 2 种黄酮苷, 并建立了两种黄酮苷的高效液相色谱方法, 色谱柱: C18 Hypersil ( $\phi$  4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相: 乙腈-水 (体积比 20:80), 检测波长 266 nm, 流速 1.0 mL/min, 进样量 10  $\mu$ L。本研究通过中低压制备色谱仪进行快速分离, 并建立高效液相色谱制备的方法, 分离得到 2 种黄酮苷, 并通过 IR、NMR 和 MS 等方法进行结构鉴定。

收稿日期: 2010-07-20

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划资助 (2009BADB1B03)

作者简介: 陈虹霞 (1983-), 女, 浙江舟山人, 硕士, 从事天然产物化学研究; E-mail: shirenyahui@126.com

\* 通讯作者: 王成章, 湖北汉川人, 研究员, 主要从事天然产物研究与利用; E-mail: wangczhs@sina.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料及试剂

油茶籽于2009年11月采于江西省。无水乙醇、氯仿均为分析纯,甲醇为色谱纯,蒸馏水自制,硅胶(50  $\mu\text{m}$ )。

### 1.2 主要仪器

LC-10A型高效液相色谱仪,日本岛津公司;AV-500型核磁共振仪,Bruker公司;Nicolet 550红外光谱仪,美国赛默飞世尔公司;C-630型中低压制备色谱仪,瑞士步琦公司。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 提取与分离** 油茶籽粉碎后,用石油醚做溶剂,料液比1:8(g:mL,下同)超声波提取3~4次,过滤得到脱脂后的茶籽饼粕。茶籽饼粕用体积分数65%的乙醇水溶液,料液比1:15,温度70  $^{\circ}\text{C}$ 提取3次,过滤得到滤液,浓缩后得到浸膏。将浸膏以料液比1:20溶于无水甲醇,并置于冰箱中冷冻4 h,过滤,得到滤液,重复3~4次,浓缩后得到黄酮苷类化合物粗品。样品采用中低压制备色谱分离,收集体积分数25%氯仿-甲醇洗脱部分,得到纯度为90%以上的2种黄酮苷的混合物。并进一步通过高效液相色谱仪进行分离,得到黄酮苷类化合物I和II。

**1.3.2 分析液相色谱条件** 色谱柱:Hypersil ODS 2( $\phi$  4.6 mm  $\times$  200 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:甲醇-水(体积比4:6),紫外270 nm,流速:1 mL/min。

**1.3.3 中低压制备色谱条件** 柱子:2 cm  $\times$  45 cm,紫外220 nm检测,流速10 mL/min,压力在2~3 MPa。

**1.3.4 高效液相制备色谱条件** 色谱柱:XB-C18( $\phi$  10 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:甲醇-水(体积比2:3),紫外270 nm,流速:3 mL/min。

**1.3.5 结构鉴定方法** 红外光谱:压片法,测量范围:4000~600  $\text{cm}^{-1}$ ,分辨率为2  $\text{cm}^{-1}$ 。核磁共振:采用氘代甲醇作溶剂, $^{13}\text{C}$  NMR在125 MHz的条件下进行扫描, $^1\text{H}$  NMR在300 MHz的条件下进行扫描。

## 2 结果与讨论

### 2.1 化合物的分离

一般硅胶柱具有上样量少,分离过程较慢,定性分析较复杂等缺点。中低压制备色谱中的柱子具有抗压性,硅胶装填完后,用10 MPa左右的氮气进行冲压,使硅胶分布均匀,达到更好的分离效果。在制备色谱分离过程中,可以调整流速,具有一定的压力,使混合物能够在此过程中得到很好的分离,并同步使用紫外检测器检测,分段收集需要的组分,整个过程快速简洁。

黄酮苷类化合物粗品通过中低压色谱分离,柱子2 cm  $\times$  45 cm,流速10 mL/min时,压力在2~3 MPa,收集体积分数25%氯仿-甲醇部分洗脱液。收集得到的样品HPLC分析如图1所示。

由中低压制备色谱得到的样品,经过高效液相色谱制备后,得到化合物I和II,见图2。

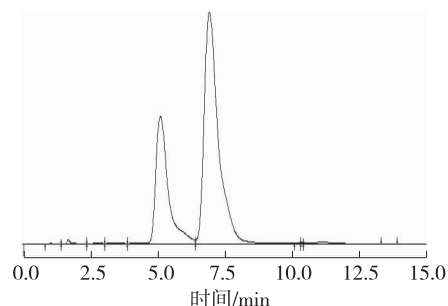


图1 中低压制备色谱分离后样品的HPLC谱图  
Fig.1 HPLC spectrum of sample after middle pressure chromatography

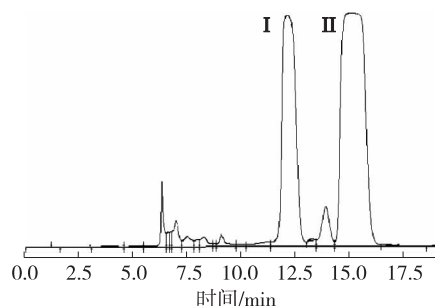


图2 样品的高效液相色谱制备图  
Fig.2 Preparative HPLC spectrum of sample

由图 2 可以看出在此液相条件下,两个化合物能够得到较好的分离。化合物 I 和 II 的 HPLC 图谱见图 3。

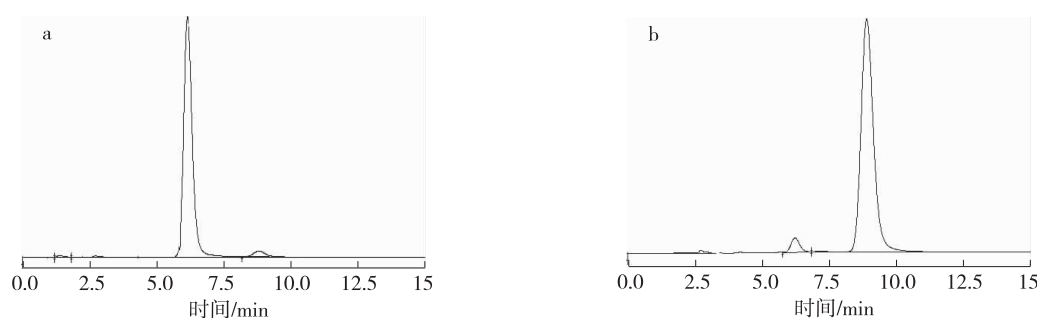


图 3 化合物 I (a) 和化合物 II (b) 的 HPLC 谱图  
Fig. 3 HPLC spectra of compounds I (a) and II (b)

## 2.2 化合物的结构鉴定

**2.2.1 化合物 I** 淡黄色粉末,在紫外灯下显黄色荧光,盐酸-镁粉反应呈阳性,Molish 反应呈阳性,提示该化合物为黄酮苷类化合物。经薄层酸水解与标准品葡萄糖、半乳糖和鼠李糖对照  $R_f$  值相同,说明所连的糖为这 3 种糖。经过稀酸水解后,苷元的 MS, NMR 数据与标准谱图库相匹配为山奈酚。MS  $m/z$ :  $[M + Na]^+$  779, 结合  $^{13}C$  NMR 谱,确定分子式为  $C_{33}H_{40}O_{20}$ 。以上数据经与文献[9]对照,基本一致,故鉴定化合物 I 为山奈酚 3-O-[2-O- $\beta$ -D-半乳糖-6-O- $\alpha$ -L-鼠李糖]- $\beta$ -D-葡萄糖苷 (kaempferol 3-O-[2-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-6-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl]- $\beta$ -D-glucopyranoside)。

红外谱图中,  $3357\text{ cm}^{-1}$  为羟基的伸缩振动,  $1359\text{ cm}^{-1}$  为羟基的弯曲振动,  $2968$  和  $2850\text{ cm}^{-1}$  为化学键  $CH_3$  的伸缩振动,  $2922\text{ cm}^{-1}$  为化学键  $CH_2$  的伸缩振动,  $1450\text{ cm}^{-1}$  为化学键  $CH_3$  和化学键  $CH_2$  的弯曲振动,  $1607$  和  $1498\text{ cm}^{-1}$  为芳烃的骨架振动,  $1655\text{ cm}^{-1}$  为芳香酮的伸缩振动。其氢、碳信号归属如下:  $^1H$  NMR ( $CD_3OD$ , 300 MHz) 谱中,  $\delta$  7.9 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz) 和 6.8 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz) 提示为 B 环上 H-2', 6' 及 H-3', 5' 的质子信号,  $\delta$  6.2 (1H, s, H-8), 6.0 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-6), 5.2 (2H, d,  $J = 1.8$  Hz, Glu H-1, Gla H-1), 4.79 (Rha d,  $J = 1.8$  Hz, H-1), 1.3 (Rha, d,  $J = 6.0$  Hz, H-6), 1.0 (Rha, d, H-5);  $^{13}C$  NMR ( $CD_3OD$ , 125 MHz) 谱中,  $\delta$  179 (C-4), 167 (C-7), 161.5 (C-5), 160 (C-4'), 158.6 (C-2, C-9), 134.7 (C-3), 132.4 (C-2', 6'), 122.9 (C-1'), 116.3 (C-3', C-5'), 104.5 (C-10), 100.3 (C-6), 95.1 (C-8), 101.2 (Glu C-1), 82 (Glu C-2), 78.3 (Glu C-3), 72.3 (Glu C-4), 77.8 (Glu C-5), 68.3 (Glu C-6), 101.2 (Gla C-1), 75.4 (Gla C-2), 77 (Gla C-3), 71.4 (Gla C-4), 77.8 (Gla C-5), 62.6 (Gla C-6), 102.2 (Rha C-1), 72 (Rha C-2), 73.8 (Rha C-3), 71.3 (Rha C-4), 69.73 (Rha C-5), 17.9 (Rha C-6)。

**2.2.2 化合物 II** 淡黄色粉末,在紫外灯下显黄色荧光,盐酸-镁粉反应呈阳性,Molish 反应呈阳性,提示该化合物为黄酮苷类化合物。经薄层酸水解与标准品葡萄糖、木糖和鼠李糖对照  $R_f$  值相同,说明所连的糖为这 3 种糖。经过稀酸水解后,苷元的 MS, NMR 数据与标准谱图库相匹配为山奈酚。HRESI-MS  $m/z$ :  $[M + Na]^+$  749, 结合  $^{13}C$  NMR 谱,确定分子式为  $C_{32}H_{38}O_{19}$ 。以上数据经与文献[9]对照,基本一致,故鉴定化合物 II 为山奈酚 3-O-[2-O- $\beta$ -D-木糖-6-O- $\alpha$ -L-鼠李糖]- $\beta$ -D-葡萄

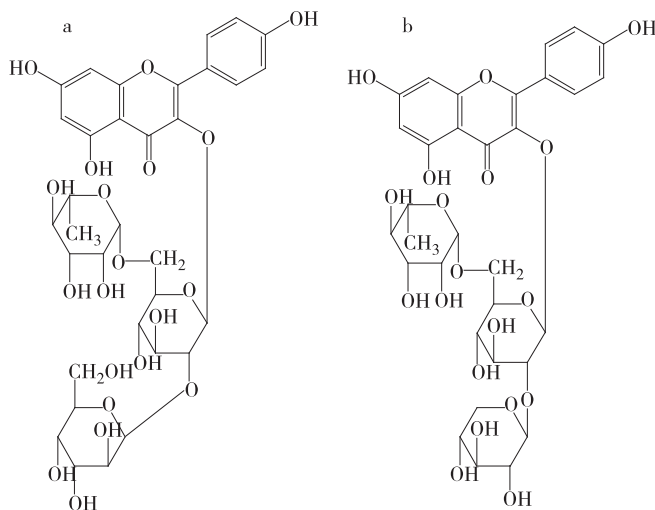


图 4 化合物 I (a) 和化合物 II (b) 的结构图  
Fig. 4 Structures of compounds I (a) and II (b)

糖苷(kaempferol 3-O-[2-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl-6-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl]- $\beta$ -D-glucopyranoside)。红外谱图中,3346  $\text{cm}^{-1}$  为羟基的伸缩振动,1357  $\text{cm}^{-1}$  为羟基的弯曲振动,2977 和 2844  $\text{cm}^{-1}$  为化学键  $\text{CH}_3$  的伸缩振动,2925  $\text{cm}^{-1}$  为化学键  $\text{CH}_2$  的伸缩振动,1447  $\text{cm}^{-1}$  为化学键  $\text{CH}_3$  和化学键  $\text{CH}_2$  的弯曲振动,1614、1570 和 1497  $\text{cm}^{-1}$  为芳烃的骨架振动,1653  $\text{cm}^{-1}$  为芳香酮的伸缩振动。其氢、碳信号归属如下:<sup>1</sup>H NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,300 MHz) 谱中, $\delta$  7.9 (2H, d,  $J$  = 9.0 Hz) 和 6.8 (2H, d,  $J$  = 9.0 Hz) 提示为 B 环上 H-2',6' 及 H-3',5' 的质子信号, $\delta$  6.2 (1H, s, H-8),6.0 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz, H-6),5.2 (2H, d,  $J$  = 1.8 Hz, Glu H-1, Gla H-1),4.79 (Rha d,  $J$  = 1.8 Hz, H-1),1.3 (Rha, d,  $J$  = 6.0 Hz, H-6),1.1 (Rha, d, H-5);<sup>13</sup>C NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,125 MHz) 谱中, $\delta$  179.5 (C-4),166 (C-7),163 (C-5),161.4 (C-4'),158.7 (C-2, C-9),134.7 (C-3),132.8 (C-2',6'),122.9 (C-1'),116.2 (C-3', C-5'),105.2 (C-10),99.9 (C-6),94.9 (C-8),100 (Glu C-1),82 (Glu C-2),77.0 (Glu C-3),71.4 (Glu C-4),78.2 (Glu C-5),68.1 (Glu C-6),102 (Xyl C-1),74.7 (Xyl C-3),76.9 (Xyl C-2),71 (Xyl C-4),66.6 (Xyl C-5),102.1 (Rha C-1),72.1 (Rha C-2),73.8 (Rha C-3),72.3 (Rha C-4),69.7 (Rha C-5),17.8 (Rha C-6)。

### 3 结论

**3.1** 茶籽饼粕经过乙醇水溶液提取,浸膏采用甲醇溶解并冷冻后去除不溶物,通过中低压色谱制备得到黄酮苷类化合物,再进一步通过高效液相制备得到黄酮苷化合物 I 和 II。

**3.2** 中低压制备色谱采用硅胶作填料,柱子 2 cm  $\times$  45 cm,流速 10 mL/min 时,压力在 2~3 MPa 下,收集体积分数为 25% 氯仿-甲醇部分洗脱液,得到纯度 90% 以上的黄酮苷类化合物。

**3.3** 高效液相制备采用 XB-C18 ( $\phi$  10 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 柱子,在流动相甲醇-水(体积比 2:3),紫外 270 nm,流速 3 mL/min。在此条件下,两个黄酮苷化合物能够得到很好的分离。

**3.4** 收集得到的黄酮苷化合物 I 和 II 分别通过 IR、MS 和 NMR 进行结构鉴定,并与文献进行比对,化合物 I 为山奈酚 3-O-[2-O- $\beta$ -D-半乳糖-6-O- $\alpha$ -L-鼠李糖]- $\beta$ -D-葡萄糖苷,化合物 II 为山奈酚 3-O-[2-O- $\beta$ -D-木糖-6-O- $\alpha$ -L-鼠李糖]- $\beta$ -D-葡萄糖苷。

#### 参考文献:

- [1] 柳荣祥,朱全芬,夏春华. 茶皂素生物活性应用研究进展及发展趋势[J]. 茶叶科学,1996,16(2):81-86.
- [2] 冯纪福. 我国油茶产业发展的主要模式及模式选择要素研究[J]. 林产工业,2010,30(1):58-61.
- [3] 夏辉,田呈瑞. 茶皂素提取纯化及生物活性研究进展[J]. 粮食与油脂,2007(6):41-43.
- [4] 王龙,孙建设. 类黄酮的化学结构及生物学功能[J]. 河北农业大学学报,2003,26(5):144-147.
- [5] 张鞍灵,刘国强,马琼,等. 黄酮类化合物生物活性与结构的关系[J]. 西北林学院学报,2001,16(2):75-79.
- [6] 白凤梅,蔡同一. 类黄酮生物活性及其机理的研究进展[J]. 食品科学,1998,8(1):11-13.
- [7] 陆柏益,张英,吴晓琴. 竹叶黄酮的抗氧化性及其心脑血管药理活性研究进展[J]. 林产化学与工业,2005,25(3):120-124.
- [8] 俞斌,颜流水,罗旭彪,等. HPLC 法测定油茶枯饼中两种主要黄酮苷[J]. 分析实验室,2008,27(10):52-54.
- [9] TOSHIKAZU S,JIRO A,ATSUKO Y, et al. Two flavonol glycosides from seeds of *Camellia sinensis*[J]. Phytochemistry,1991,30(3):991-995.