

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 (ϕ 10mm \times 250 mm, 5 μ 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- β -D-半乳糖-6-O- α -L-鼠李糖]- β -D-葡萄糖苷 (I) 和山奈酚 3-O-[2-O- β -D-木糖-6-O- α -L-鼠李糖]- β -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 *Camellia 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 (ϕ 10 mm \times 250 mm, 5 μ 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 to IR, MS and NMR, the two compounds were identified to be kaempferol 3-O-[2-O- β -D-galactopyranosyl-6-O- α -L-rhamnopyranosyl]- β -D-glucopyranoside (I) and kaempferol 3-O-[2-O- β -D-xylopyranosyl-6-O- α -L-rhamnopyranosyl]- β -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^[1], 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 hm^2 , 年产茶油约 30 万吨^[2]。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^[3]。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^[4-7]。俞斌等^[8]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 (ϕ 4.6 mm \times 250 mm, 5 μ 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 μ 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: shirenyahu@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: wangczh@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 μm)。

1.2 主要仪器

LG-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 (ϕ 4.6 mm \times 200 mm, 5 μm); 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 (ϕ 10 mm \times 250 mm, 5 μm); 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 cm^{-1} , 分辨率为 2 cm^{-1} 。核磁共振: 采用氘代甲醇作溶剂, ^{13}C NMR 在 125 MHz 的条件下进行扫描, ^1H 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。

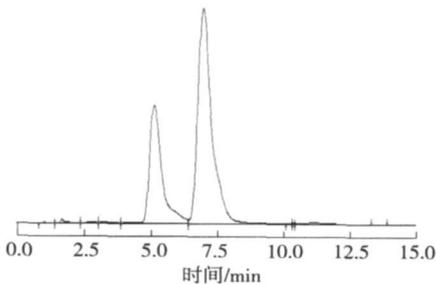


图 1 中低压制备色谱分离后样品的 HPLC 谱图

Fig 1 HPLC spectrum of sample after middle pressure chromatography

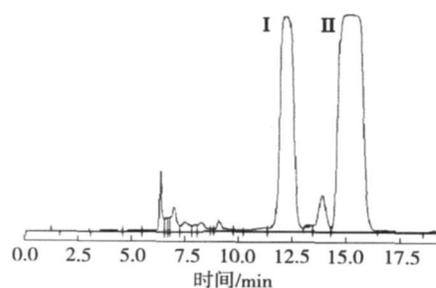


图 2 样品的高效液相色谱制备图

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。

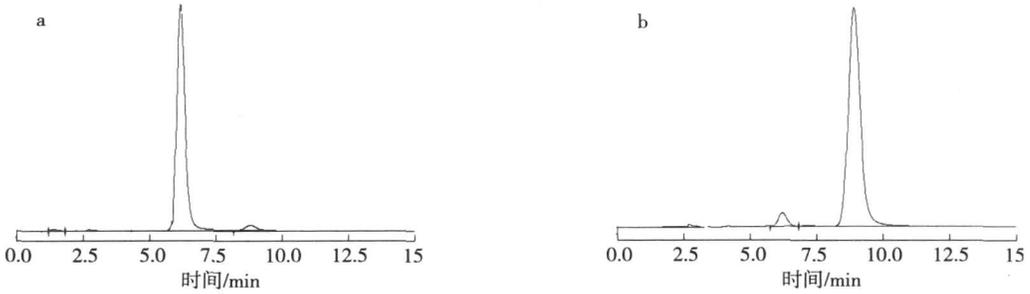


图 3 化合物 I (a) 和化合物 II (b) 的 HPLC 谱图

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 $C_{33}H_{40}O_{26}$ 。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- β -D-半乳糖-6-O- α -L-鼠李糖]- β -D-葡萄糖苷 (kaempferol 3-O-[2-O- β -D-galactopyranosyl+6-O- α -L-rhamnopyranosyl]- β -D-glucopyranoside)。

红外谱图中, 3357 cm^{-1} 为羟基的伸缩振动, 1359 cm^{-1} 为羟基的弯曲振动, 2968 和 2850 cm^{-1} 为化学键 CH_3 的伸缩振动, 2922 cm^{-1} 为化学键 CH_2 的伸缩振动, 1450 cm^{-1} 为化学键 CH_3 和化学键 CH_2 的弯曲振动, 1607 和 1498 cm^{-1} 为芳烃的骨架振动, 1655 cm^{-1} 为芳香酮的伸缩振动。其氢、碳信号归属如下: 1H NMR (CD_3OD , 300MHz) 谱中, δ 7.9 (2H, d, $J = 9.0\text{ Hz}$) 和 6.8 (2H, d, $J = 9.0\text{ Hz}$) 提示为 B 环上 H-2', 6' 及 H-3', 5' 的质子信号, δ 6.2 (1H, s, H-8), 6.0 (1H, d, $J = 1.8\text{ Hz}$, H-6), 5.2 (2H, d, $J = 1.8\text{ Hz}$, Glu H-1, Gal H-1), 4.79 (Rha d, $J = 1.8\text{ Hz}$, H-1), 1.3 (Rha d, $J = 6.0\text{ Hz}$, H-6), 1.0 (Rha d, H-5); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125MHz) 谱中, δ 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 (Gal C-1), 75.4 (Gal C-2), 77 (Gal C-3), 71.4 (Gal C-4), 77.8 (Gal C-5), 62.6 (Gal 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。HRES-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- β -D-木糖-6-O- α -L-鼠李糖]- β -D-葡萄糖

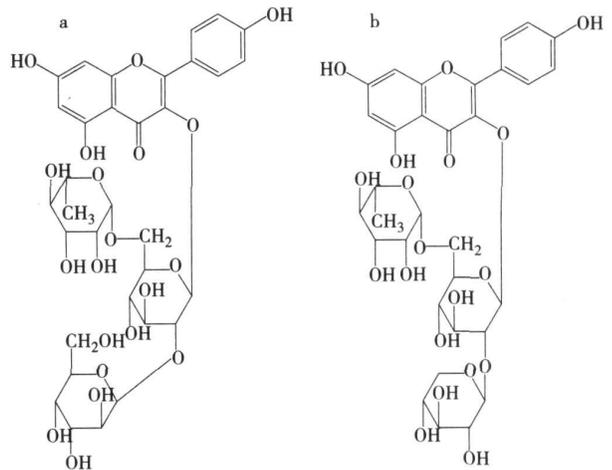


图 4 化合物 I (a) 和化合物 II (b) 的结构图

Fig 4 Structures of compounds I (a) and II (b)

糖苷 (kaempferol 3-O-[2-O- β -D-xylopyranosyl-6-O- α -L-rhamnopyranosyl]- β -D-glucopyranoside)。红外谱图中, 3346 cm^{-1} 为羟基的伸缩振动, 1357 cm^{-1} 为羟基的弯曲振动, 2977 和 2844 cm^{-1} 为化学键 CH_3 的伸缩振动, 2925 cm^{-1} 为化学键 CH_2 的伸缩振动, 1447 cm^{-1} 为化学键 CH_3 和化学键 CH_2 的弯曲振动, 1614 , 1570 和 1497 cm^{-1} 为芳烃的骨架振动, 1653 cm^{-1} 为芳香酮的伸缩振动。其氢、碳信号归属如下: $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 300 MHz) 谱中, $\delta 7.9$ (2H, d, $J = 9.0\text{ Hz}$) 和 6.8 (2H, d, $J = 9.0\text{ Hz}$) 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, $J = 1.8\text{ Hz}$, H-6), 5.2 (2H, d, $J = 1.8\text{ Hz}$, Glc H-1, Gal H-1), 4.79 (Rha d, $J = 1.8\text{ Hz}$, H-1), 1.3 (Rha d, $J = 6.0\text{ Hz}$, H-6), 1.1 (Rha d, H-5); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 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 (Glc C-1), 82 (Glc C-2), 77.0 (Glc C-3), 71.4 (Glc C-4), 78.2 (Glc C-5), 68.1 (Glc 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 $2\text{ cm} \times 45\text{ cm}$, 流速 10 mL/min 时, 压力在 $2\text{--}3\text{ MPa}$ 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 ($\phi 10\text{ mm} \times 250\text{ mm}$, $5\ \mu\text{m}$) 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- β -D-半乳糖-6-O- α -L-鼠李糖]- β -D-葡萄糖苷, 化合物 II 为山奈酚 3-O-[2-O- β -D-木糖-6-O- α -L-鼠李糖]- β -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 法测定油茶桔饼中两种主要黄酮苷 [J]. 分析实验室, 2008, 27(10): 52-54.
- [9] TOH KAZU S, JIRO A, ATSUKO Y, et al. Two flavonol glycosides from seeds of *Camellia sinensis* [J]. Phytochemistry, 1991, 30(3): 991-995.