

南山茶籽中新发现的一个乙酰基黄酮苷 的核磁结构解析

Structure determination on a new acetyl flavonoid glycoside in seeds
of *Camellia semiserrata* Chi. by NMR spectroscopy

曹清明^{1,2} 兰芳¹ 王蔚婕¹ 包莉圆¹ 钟海雁^{1,2}

CAO Qing-ming^{1,2} LAN Fang¹ WANG Wei-jie¹ BAO Li-yuan¹ ZHONG Hai-yan^{1,2}

(1. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南 长沙 410004;

2. 经济林培育与保护省部共建教育部重点实验室, 湖南 长沙 410004)

(1. Faculty of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China; 2. Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-Wood Forest Trees [Central South University of Forestry and Technology], Ministry of Education, Changsha, Hunan 410004, China)

摘要:以南山茶籽为原料,利用溶剂提取法、液液分离、硅胶层析、高效液相半制备色谱等手段提取分离得到了一个高纯度的化合物,通过理化性质、质谱和核磁鉴定该化合物为乙酰基黄酮苷类化合物山奈酚-3-O-[α -L-鼠李糖基-(1-3)-2,4-di-O-乙酰基- α -L-鼠李糖基-(1-6)]- β -D-葡萄糖苷。运用 H-H COSY、HSQC、HMBC 和 TOCSY 等二维核磁共振(2D-NMR)技术对其¹H 和¹³C NMR 数据进行了全归属和详细解析。

关键词: 2D-NMR; 南山茶; 乙酰基黄酮苷; 结构解析

Abstract: A high-purity compound was extracted by solvent extraction, liquid-liquid separation, silica gel chromatography and high-performance liquid semi-preparative chromatography by using seeds of *Camellia semiserrata* Chi. as raw materials. The compound was identified as kaempferol-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1-3)-2,4-di-O-acetyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1-6)]- β -D-glucopyranoside, an acetyl flavonoid glycoside, by physical and chemical properties, mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. Two-dimensional nuclear magnetic resonance (2D-NMR) techniques including H-H COSY, HSQC, HMBC and TOCSY were used to affiliate its ¹H and ¹³C NMR chemical shift and explain the structure.

Keywords: 2D-NMR; *Camellia semiserrata* Chi.; Acetyl flavonoid

基金项目: 湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划(编号: XJT2016[283]-254); 湖南省教育厅重点项目(编号: 17A2292017); 湖南省林业厅项目(编号: XLK201664, XKL201735); 湖南省科技重大专项(编号: 2016NK1001)

作者简介: 曹清明,女,中南林业科技大学副教授,博士。
通信作者: 钟海雁(1963—),男,中南林业科技大学教授,博士。
E-mail: zhonghaiyan631210@126.com

收稿日期: 2017-04-06

glycoside; Structure analysis

油茶是世界四大木本油料作物之一,作为一种天然的高级油料,其种子含油 30% 左右^[1-3],可用来榨油,即茶油。茶油中不饱和脂肪酸的含量高达 90%^[4-5],其脂肪酸组成与橄榄油极为接近^[6-7],被誉为“东方橄榄油”。中国政府高度重视油茶产业,激发了人们对油茶籽^[8-9]、油茶叶^[10-11]、油茶果皮^[12-16]、油茶种质资源^[17-18]等方面的研究。油茶的黄酮类化合物具有猝灭自由基^[19]、降脂^[15, 20]、防骨质疏松^[21]、抗炎^[22]等作用。油茶的研究开展至今,对于现在文献报道的一些化合物,从 Sigma 公司等试剂公司都买不到标品,各实验室在开展试验时都需要临时制备标准品,难度大,费用高,影响了研究工作的开展。

南山茶(*Camellia semiserrata* Chi.)又叫做广宁红花油茶、广宁油茶、华南红花油茶等,属于山茶科(*Theaceae*)山茶属(*Camellia* L.)山茶亚属的红山茶组^[23],为多年生乔木或灌木。主要分布在中国的广西东南部以及广东西部^[24-25]。本研究以南山茶饼为原料,旨在分析乙醇提取物乙酸乙酯萃取部位的化学成分,为研究活性与成分及其量效关系打下基础。

核磁共振联用技术可用于化合物的结构鉴定。近年来 NMR 技术应用于天然产物分析已日趋广泛和成熟。与一维相比,二维核磁共振谱能将化学位移、耦合常数等核磁共振参数呈现在二维平面上,能够得到自旋核之间相互作用的信息,分子结构和分子间的关系表现得更加清晰,极大地方便了核磁共振的谱图解析。课题组前期报道^[26]以南山茶籽为原料,利用高效液相半制备得到了 5 个高纯度化合物,本试

验拟利用 2D-NMR 研究化合物 4 的结构,并对其¹H 和¹³C 化学位移信号进行全归属分析。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料

油茶籽:广西藤县红羽油茶发展有限公司,经中南林业科技大学谭晓风教授鉴定为南山茶(*Camellia semiserrata* Chi.)。

1.1.2 试剂

柱层析硅胶:200~300 目,青岛海洋化工厂分厂;
凝胶:Sephadex LH-20,美国 GE Healthcare Bio-Science AB 公司;
氘代试剂 CH₃OD:氘代率≥99.8%,美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.1.3 试验仪器

超导傅立叶变换核磁共振仪:Bruker avance III 600MHz 型,瑞士 Bruker 公司;
高效液相色谱仪(分析型):Waters 2695-2996 型,配备 Waters 2996 Photodiode Array Detector 检测器,沃特世科技有限公司;
质谱仪:HPLC-QTOF/1290-6530 型,安捷伦科技有限公司;

高效液相色谱仪(分析型):LC3000 型,配备 Newstyle NU3000 Serials UV/VIS Detector 检测器,北京创新恒通科技有限公司;
高效液相色谱仪(半制备):LC3000 型,北京创新恒通科技有限公司;

分析用色谱柱:C18ME(4.6 mm×250 mm,5 μm)、C18HCE(4.6 mm×250 mm,5 μm)、Unitary C18(4.6 mm×250 mm,5 μm),华谱新创科技有限公司;

制备用色谱柱:C18HCE(20 mm×250 mm,10 μm)、C18ME(20 mm×250 mm,10 μm),华谱新创科技有限公司。

1.2 样品制备

课题组^[26]分离制备得到了一个高纯度的化合物 16 mg,液相色谱检测其纯度约为 99.1%,满足核磁结构鉴定的要求。

1.3 结构鉴定

1.3.1 质谱和液相色谱软件 Agilent UHPLC-QTOF/1290-6530 LC/MS 配 ESI 电喷雾离子源数据采集和分析使用软件 Mass Hunter Workstation software (Agilent Mass Hunter Workstation Software, Qualitative Analysis Version B.06.00, Build 6.0.633.0, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)。

1.3.2 LC-MS 工作条件 Unitary C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱,洗脱剂乙腈—水(体积比 25 : 75),进样量 2 μL,检测波长 254 nm;电喷雾离子源正离子检测,氮气为干燥气,干燥气温度 300 ℃,干燥气流速 6 L/min,雾化器压力 344 737.86 Pa,鞘气温度 400 ℃,鞘气流速 12 L/min,毛细管电压 4 000 V,喷嘴电压 0 V,参比离子流速 10 μL/min,参

比离子 121.085 5,922.092 2,采集范围 100~1 000,扫描速度 2 scan/s。

1.3.3 核磁共振检测条件 溶剂为 CH₃OD,NMR 的工作频率分别为¹H 谱 600 MHz,¹³C 谱为 150 MHz,核磁共振一维和二维脉冲序列采用仪器的相应标准程序,¹H-NMR 谱采样脉冲宽度 90°,累加 32 次;¹³C-NMR 谱采样脉冲宽度 90°,累加 2 000 次,H-H COSY,HSQC,HMBC 这 3 种试验采样数据点阵均为 F₂×F₁=2 048×256,零填充至 2 048×1 024 进行 FT 变换,窗函数处理谱图。

2 化合物的结构鉴定

课题组前期报道^[26],该化合物为黄色晶体,易溶于甲醇、乙醇和丙酮,难溶于氯仿和水,盐酸镁粉反应显阳性,三氧化铝反应呈黄绿色荧光,Molish 反应呈阳性,提示结构为黄酮苷类化合物。质谱准分子离子峰为 *m/z* 825.245 3[M+H]⁺,由安捷伦分子式计算器推测其分子式为 C₃₇H₄₄O₂₁,有离子碎片 *m/z* 679.1873 [(M+H)-146]⁺,287.055 0 [(M+H)-146-42-42-162]⁺,推测其化合物有山奈酚母核、1 个葡萄糖基、2 个鼠李糖基以及 2 个乙酰基。

¹H-NMR(见图 1)中,δ 6.11(H, d, *J* = 1.7 Hz)与 δ 6.26(H, d, *J* = 1.7 Hz),其化学位移、裂分及耦合常数均符合苯环上间位氢的特征,推断其分属于山奈酚 A 环 H-6 与 H-8。δ 8.03(2H, d, *J* = 8.7 Hz)与 δ 6.89(2H, d, *J* = 8.7 Hz),通过积分面积可得该两组信号均包含 2 个质子,应属于对称结构,其化学位移、裂分及耦合常数符合苯环上邻位氢的特征,该结果与山奈酚 B 环结构相符合,因此推断其分属于山奈酚 B 环 H-2',6'与 H-3',5'。δ 5.39(H, d, *J* = 7.5 Hz)为葡萄糖苷端基质子信号;δ 4.57(H, s)、5.05(H, s)为鼠李糖苷端基质子信号;δ 2.08(H, s)、2.00(H, s)为乙酰基质子信号;δ 1.22(H, d, *J* = 6.2 Hz)、0.82(H, d, *J* = 6.2 Hz)为鼠李糖苷甲基质子信号;δ 3.0~4.0 段多组信号为糖苷其它质子信号,该结果与质谱推断相吻合。

¹³C-NMR(见图 2)中,δ 103.54、75.80、76.89、70.95、78.09、67.78 为一组葡萄糖苷信号,δ 100.12、73.20、76.05、73.91、70.65、17.38 以及 δ 103.90、72.38、72.07、73.61、70.65、17.93 为两组组鼠李糖苷信号,δ 171.79、20.79 和 δ 171.88、

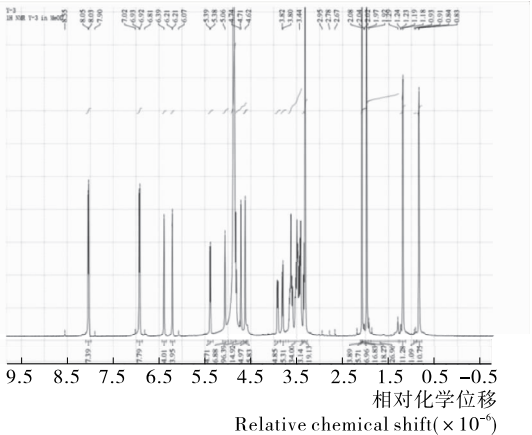


图 1 ¹H-NMR 图谱
Figure 1 ¹H-NMR spectrum

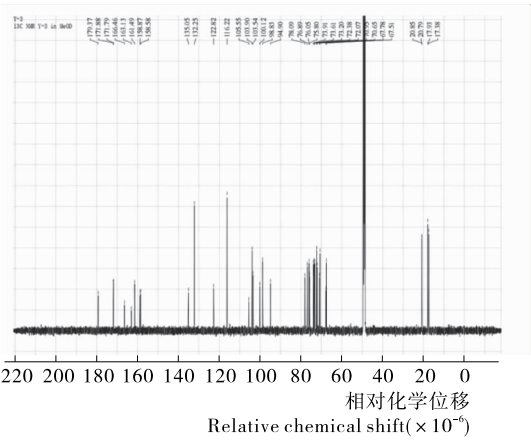


图 2 ¹³C-NMR 图谱
Figure 2 ¹³C-NMR spectrum

20.85 则归属于乙酰基鼠李糖苷中的乙酰基,其余信号与山奈酚特征信号高度吻合,该结果与上述推断一致。

H-H COSY(见图 3)中, δ 6.11(H, d, $J=1.7$ Hz)与 δ 6.26(H, d, $J=1.7$ Hz),其特征符合苯环上间位氢的特征,推断其分属于山奈酚 A 环 H-6 与 H-8; δ 8.03(2H, d, $J=8.7$ Hz)与 δ 6.89(2H, d, $J=8.7$ Hz)相互耦合,形成典型的对位取代苯的 AA'BB'自旋耦合体系,符合山奈酚 B 环结构; δ 5.39(H, d, $J=7.5$ Hz)与 δ 3.50(m)相互耦合,根据化学位移值可推断其 δ 5.39(H, d, $J=7.5$ Hz)归属于葡萄糖苷端基,通过其耦合常数($J=7.3$ Hz >7.0 Hz)可以判断,该葡萄糖苷键为 β 构型。 δ 1.22(H, d, $J=6.2$ Hz)、0.82(H, d, $J=6.2$ Hz)均与 δ 3.00~4.00(m)相互耦合,符合鼠李糖苷甲基质子信号特征。

HSQC(图 4)中, δ 98.83 与 δ 6.11(H, d, $J=1.7$ Hz)对应, δ 94.90 与 δ 6.26(H, d, $J=1.7$ Hz)对应, δ 132.25 与 δ 8.03(2H, d, $J=8.7$ Hz)对应, δ 116.22 与 δ 6.89(2H, d, $J=8.7$ Hz)对应, δ 103.54 与 δ 5.39(H, d, $J=7.5$ Hz)对应, δ 100.12 与 δ 4.57(H, s)对应, δ 103.90 与 δ 5.05(H, s)对应, δ 17.38 与 δ 1.22(H, d, $J=6.2$ Hz)对应, δ 17.93 与

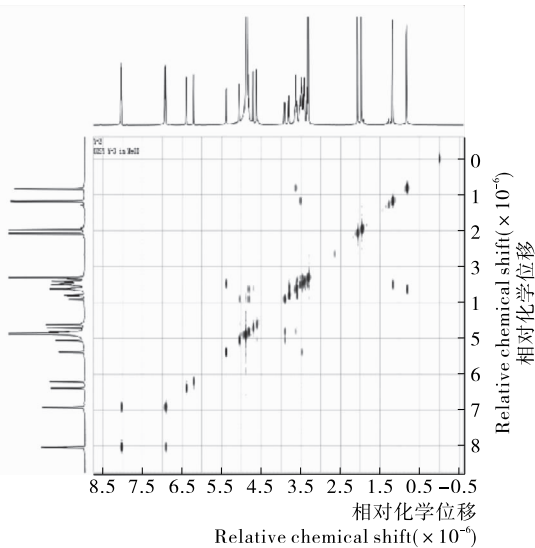


图 3 ¹H-¹H COSY 图谱
Figure 3 ¹H-¹H COSY spectrum

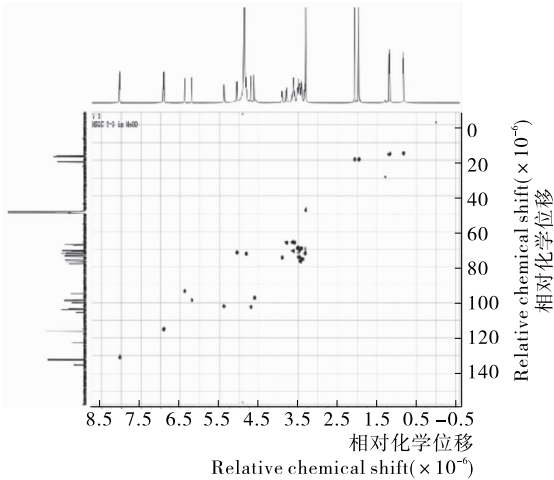


图 4 HSQC 图谱
Figure 4 HSQC spectrum

δ 0.82(H, d, $J=6.2$ Hz)对应。

HMBC(见图 5)中, δ 6.11(H, d, $J=1.7$ Hz)与 δ 163.13、166.46 相关, δ 6.26(H, d, $J=1.7$ Hz)与 δ 166.46、158.58 相关, δ 8.03(2H, d, $J=8.7$ Hz)与 δ 122.82、116.22、161.49 相关, δ 6.89(2H, d, $J=8.7$ Hz)与 δ 132.25、161.49、122.82 相关,其特征与山奈酚完全符合。

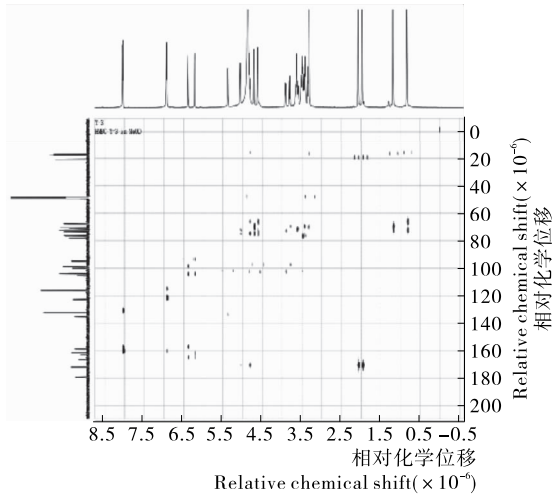


图 5 HMBC 图谱
Figure 5 HMBC spectrum

结合 TOCSY(见图 6)及 HSQC,通过 HMBC 可确定不同片段的连接位点, δ 5.39(H, d, $J=7.5$ Hz)与 δ 135.05 相关,可知葡萄糖苷与山奈酚 C-3 相连; δ 4.57(H, s)与 δ 67.78 相关,可知该鼠李糖苷与 Glu-C-6 相连; δ 5.05(H, s)与 δ 76.05 相关,可知另一鼠李糖苷与之前的鼠李糖苷 Rha(1)-C-3 相连。 δ 2.08(H, s)、2.00(H, s)分别与 δ 73.20、73.91 相关,可知 2 个乙酰基与鼠李糖苷 Rha(1)-C-2 及 Rha(1)-C-4 相连。综合所有核磁谱图及质谱结果,化合物鉴定为山奈酚-3-O-[α -L-鼠李糖基-(1-3)-2,4-di-O-乙酰基- α -L-鼠李糖基-(1-6)]- β -D-葡萄糖苷,将其¹H-NMR、¹³C-NMR 以及质谱数据与文献[27]报道的化合物 2 对照,基本一致,其核磁信号归属见表 1,其结构式见图 7。Teng Xi-fang 等[27]曾在红花油茶花中发现该化合物,在油茶籽中尚属首次发现。

表 1 ¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 核磁信号归属 (溶剂为氘代甲醇)
Table 1 Affiliation of ¹H-NMR and ¹³C-NMR (CD₃OD for the solvent)

编号	¹³ C-NMR	¹ H-NMR	编号	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
2	158.87		6"	67.78	
3	135.05		1"	100.12	4.57(H, s)
4	179.37		2"	73.20	
5	163.13		3"	76.05	
6	98.83	6.11(H, d, J = 1.7 Hz)	4"	73.91	
7	166.46		5"	70.65	
8	94.90	6.26(H, d, J = 1.7 Hz)	6"	17.38	1.22(H, d, J = 6.2 Hz)
9	158.58		AcO—C—2"	171.79	
10	105.55			20.79	2.08(H, s)
1'	122.82		AcO—C—4"	171.88	
2',6'	132.25	8.03(2H, d, J = 8.7 Hz)		20.85	2.00(H, s)
3',5'	116.22	6.89(2H, d, J = 8.7 Hz)	1"	103.90	5.05(H, s)
4'	161.49		2"	72.38	
1"	103.54	5.39(H, d, J = 7.5 Hz)	3"	72.07	
2"	75.80		4"	73.61	
3"	76.89		5"	70.65	
4"	70.95		6"	17.93	0.82(H, d, J = 6.2 Hz)
5"	78.09				

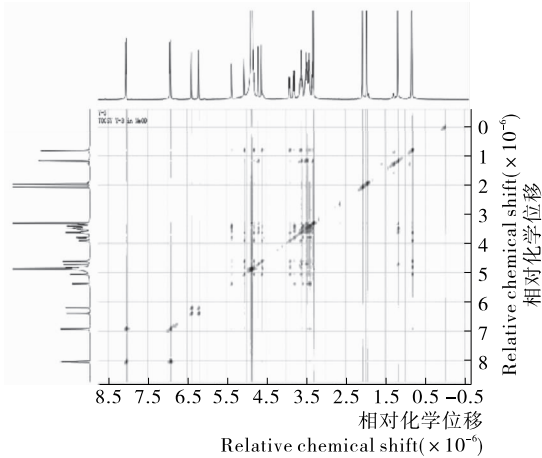


图 6 TOCSY 图谱
Figure 6 TOCSY spectrum

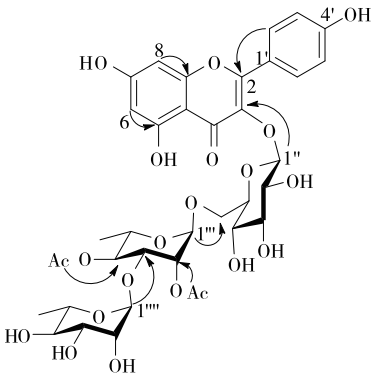


图 7 化合物的结构式及 HMBC 氢—碳相关
Figure 7 Compound structure and HMBC H-C relation

3 结论

对于南山茶饼黄酮类化合物的深入研究,可以为油茶副产物的利用打下理论基础。试验中,南山茶饼提取物在乙酸乙酯萃取和硅胶柱层析分离、纯化的基础上,用液相色谱半制备得到了纯度为 99.1%的化合物 16 mg。通过高清晰质谱和 NMR,鉴定为:山奈酚-3-O-[α -L-鼠李糖基-(1-3)-2,4-di-O-乙酰基- α -L-鼠李糖基-(1-6)]- β -D-葡萄糖苷,在油茶籽中属首次报道,对于该化合物的活性及其量效关系的研究将在以后的文中进行报道。

参考文献

[1] 师江, 刘兴勇. 基于营养成分的变化确定油茶最佳采摘期[J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 71-74.

[2] 郑德勇, 常玉玺, 叶乃兴, 等. 茶籽成熟过程中主要功能成分变化规律研究[J]. 茶叶科学, 2013, 33(3): 253-260.

[3] 李好, 方学智, 钟海雁, 等. 油茶籽成熟过程中油脂及营养物质变化的研究[J]. 林业科学研究, 2014, 27(1): 86-91.

[4] 曹永庆, 姚小华, 任华东, 等. 油茶果实矿质元素含量和油脂积累的相关性[J]. 中南林业科技大学学报, 2013, 33(10): 38-41.

[5] 朱勇, 王湘莹, 马锦林, 等. 不同物种油茶籽仁含油率及其茶油的脂肪酸组成[J]. 经济林研究, 2013, 31(2): 134-137.

[6] 陈轲, 刘零怡, 徐翔, 等. 基于离子迁移谱法对橄榄油与油茶籽油区分鉴别的研究[J]. 中国粮油学报, 2016(11): 130-134.

[7] 柏云爱, 宋大海, 张富强, 等. 油茶籽油与橄榄油营养价值的比较[J]. 中国油脂, 2008, 33(3): 39-41.

[8] 李好, 钟海雁, 方学智, 等. 油茶籽成熟过程中抗氧化物质的变化规律[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 6-9.

(下转第 58 页)

品工业科技, 2014, 35(1): 381-384.

[14] 王福荣. 生物工程分析与检验[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006.

[15] 董施彬, 宁亚萍, 杨喆, 等. 藜麦总黄酮提取及大孔树脂纯化工艺得研究[J]. 食品工业科技, 2015(16): 272-278.

[16] 阙森琳, 蒋玉蓉, 曹美丽, 等. 响应面试验优化藜麦种子多酚提取工艺及其品种差异[J]. 食品科学, 2016(4): 7-12.

[17] 党娟, 秦礼康, 杨先龙, 等. 不同薏米品种萌芽特性比较及工艺条件优化[J]. 食品与机械, 2015, 31(5): 250-255.

[18] MÁRTON M, MÁNDOKI Z, CSAPÓ J. Evaluation of biological value of sprouts-I. Fat content, fatty acid composition[J]. Acta University Sapientiae, Alimentaria, 2010(3): 53-65.

[19] KULJANABHAGAVAD T, THONGPHASUK P, CHAMULITRAT W, et al. Triterpenesaponins from *Chenopodium quinoa* Wild[J]. Phytochemistry, 2008, 69(9): 1 919-1 926.

[20] 沈同. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1996: 50-52.

[21] FORMICA J V, REGELSON W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids[J]. Food and Chemical Toxicology, 1995, 33(12): 1 061-1 080.

[22] 博汗格瓦, 瓦斯塔瓦. 藜麦生产与应用[M]. 任贵兴, 译. 北京: 科学出版社, 2014.

[23] United States Department Of Agriculture. National nutrient data-base for standard reference[DB/OL]. USDA; Nutrient Data Laboratory, 2005. <http://amh.adam.com/graphics/pdf/en/1998>.

(上接第 24 页)

[9] DU Li-chun, WU Bei-li, CHEN Jian-min. Flavonoid triglycosides from the seeds of *Camellia oleifera* Abel.[J]. Chinese Chemical Letters, 2008, 19(11): 1 315-1 318.

[10] 曹清明, 邬靖宇, 钟海雁. 油茶叶提取物中两种联苜化合物的分离与鉴别[J]. 中国食品学报, 2015, 15(9): 206-214.

[11] 曹清明, 钟海雁, 邬靖宇, 等. 液相制备油茶叶提取物组分及其结构鉴定[J]. 经济林研究, 2015, 33(3): 68-74.

[12] 侍银宝, 钟海雁. 油茶果皮多酚粗提物对 DNA 氧化损伤的影响[J]. 食品与机械, 2013, 29(6): 143-146.

[13] 张微微, 于大永, 史丽颖, 等. 南山茶果皮化学成分的研究[J]. 广西植物, 2012, 32(5): 698-700.

[14] 彭凌, 朱必凤, 刘主. 油茶肉质果和肉质叶提取液降血糖及抗氧化作用的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(12): 1 679-1 680.

[15] YE Y, XING H T, GUO Y. Hypolipidemic effect of a novel biflavonoid from shells of *Camellia oleifera* (Abel.) [J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2013, 51(6): 458-463.

[16] ZHANG Liang-liang, WANG Yong-mei, WU Dong-mei, et al. Microwave-assisted extraction of polyphenols from *Camellia oleifera* fruit hull[J]. Molecules, 2011, 16(6): 4 428-4 437.

[17] 刘应珍, 邹天才. 贵州山茶属植物资源及其开发利用探讨[J]. 贵州科学, 2008, 26(2): 75-81.

[18] 田晔林. 湖南省山茶属红山茶组植物分类及园林应用研究[D]. 长沙: 中南林学院, 2001.

[19] YE Yong, GUO Ya, LUO Yue-ting, et al. Isolation and free radical scavenging activities of a novel biflavonoid from the shells of *Camellia oleifera* Abel.[J]. Fitoterapia, 2012, 83(8): 1 585-1 589.

[20] MORIKAWA T, NINOMIYA K, MIYAKE S, et al. Flavonol glycosides with lipid accumulation inhibitory activity and simultaneous quantitative analysis of 15 polyphenols and caffeine in the flower buds of *Camellia sinensis* from different regions by LCMS[J]. Food Chemistry, 2013, 140(1/2): 353-360.

[21] WU Xiao-Juan, TANG Ling, LIN Hong-jing, et al. Flavonoids from Seeds of *Camellia semiserrata* Chi. and Their Estrogenic Activity [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2008, 72(9): 2 428-2 431.

[22] YE Yong, GUO Ya, LUO Yue-ting. Anti-Inflammatory and Analgesic Activities of a Novel Biflavonoid from Shells of *Camellia oleifera*[J]. International journal of molecular sciences, 2012, 13(10): 12 401-12 411.

[23] 漆龙霖, 吕芳德, 李克瑞, 等. 湖南山茶属植物种质资源调查、收集和利用的研究[J]. 武汉植物学研究, 1989, 7(3): 275-284.

[24] 孙佩光. 广宁红花油茶种质特性与变异研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2012.

[25] SUN L, LIAO Z, LI X S, et al. Flavonoids from the fruits of *Camellia oleifera*. [J]. Asian Journal of Chemistry, 2012, 24 (11): 4 892-4 894.

[26] 包莉圆, 钟海雁, 王蔚婕, 等. 南山茶饼中乙醇提取物 5 个多酚化合物的分离纯化[J]. 食品与机械, 2017, 33(4): 133-138.

[27] TENG Xi-feng, YANG Jia-yue, YANG Chong-ren, et al. Five New Flavonol Glycosides from the Fresh Flowers of *Camellia reticulata*[J]. Helvetica Chimica Acta, 2008, 91(7): 1 305-1 312.