

金花茶叶皂苷类成分研究

苏琳¹, 莫建光^{2*}, 韦英亮², 陈秋虹², 潘艳坤²

1. 广西中医学院药学院, 广西 南宁 530001

2. 广西分析测试研究中心, 广西 南宁 530022

摘要: 目的 研究金花茶 *Camellia euphlebia* 叶皂苷类成分。方法 利用超声提取、大孔树脂富集以及制备色谱对金花茶叶水溶性部分进行分离纯化, 运用 NMR、MS、IR 等光谱手段进行结构鉴定。结果 分离得到 3 个单体化合物, 分别为人参皂苷 Rg1 (1)、人参皂苷 F1 (2) 和人参皂苷 F5 (3)。结论 化合物 1~3 均为首次从该植物中分离得到的人参皂苷, 其中人参皂苷 Rg1、F5 为首次从山茶属中分离得到。金花茶为国家一级保护的珍稀药用植物, 这些成分的分离鉴定对其进一步的活性研究、开发利用和推广种植具有重要意义。

关键词: 金花茶; 山茶属; 皂苷; 人参皂苷 Rg1; 人参皂苷 F5

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)05-0877-03

Chemical constituents of saponins from leaves of *Camellia euphlebia*

SU Lin¹, MO Jian-guang², WEI Ying-liang², CHEN Qiu-hong², PAN Yan-kun²

1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China

2. Guangxi Research Center of Analysis and Testing, Nanning 530022, China

Key words: *Camellia euphlebia* Merr. ex Sealy; *Camellia* L.; saponin; ginsenoside Rg1; ginsenoside F5

金花茶 *Camellia euphlebia* Merr. ex Sealy 是山茶科山茶属金花茶组金花茶系植物, 为常绿灌木或小乔木。主产于中国广西境内北回归线以南地区, 列为国家一级保护珍稀植物, 被誉为“茶族皇后”。金花茶除具有极高的观赏价值外, 还具有很高的药用价值; 金花茶叶中含有多种活性成分, 其中金花茶皂苷具有降血糖、降血压、调血脂、降胆固醇、防止动脉粥样硬化、抑制肿瘤细胞生长、激活人体多种酶、提高机体免疫能力、延缓衰老等多种生理功能^[1-3]。经查阅文献尚未发现金花茶皂苷类成分分离纯化方面的报道, 由于没有分离出单一的皂苷, 因此无法对皂苷的功效进行进一步的深入研究。

本实验采用水超声浸提金花茶叶, 大孔树脂分离得金花茶皂苷粗品, 制备色谱法分离获得 3 个高质量分数金花茶皂苷单体, 经 NMR、MS 等方法分别鉴定为人参皂苷 Rg1 (ginsenoside Rg1, 1)、人参皂苷 F1 (ginsenoside F1, 2) 和人参皂苷 F5 (ginsenoside F5, 3)。化合物 1~3 均为首次从该植物中分离得到的人参皂苷, 化合物 1 和 3 为首次从

山茶属中分离得到。

1 仪器与材料

Gilson GX—281 制备型高效液相色谱仪 (法国吉尔森); Waters 2695 分析型高效液相色谱仪 (美国 Waters); LCQDECA—1000 液相色谱/质谱联用仪 (美国菲尼根); AVIII600 型超导核磁共振波谱仪 (TMS 为内标, 德国布鲁克); Nicolet 4700 傅里叶变换红外分光光度计 (美国尼高立); 超声波提取器 (昆山市超声仪器有限公司)。乙腈 (色谱纯, 美国费希尔); 水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。

金花茶叶采自广西防城港市十万大山, 经广西中医药研究院赖茂祥研究员鉴定为显脉金花茶 *Camellia euphlebia* Merr. ex Sealy。

2 提取与分离

2.1 金花茶叶皂苷粗品制备

2.1.1 金花茶叶皂苷提取 将金花茶鲜叶 2 kg 粉碎后至超声波提取器中^[4], 加水, 固液比为 1:20, 于 80 °C 条件下以 25 kHz 浸提 2 h, 滤过浓缩后得金花茶浸出液约 700 mL。取浸出液 350 mL 加 3 倍体积

收稿日期: 2011-09-25

基金项目: 广西科技攻关项目 (0815005-1-20); 广西创新能力建设项目 (11-114-14B)

作者简介: 苏琳 (1984—), 女, 广西玉林市人, 硕士研究生, 研究方向为药品、保健食品质量控制方法的研究。

*通讯作者 莫建光 Tel: (0771)5301165 E-mail: bhl0771@163.com

无水乙醇,边加边搅拌,溶液中生成絮状沉淀,于 4 °C 冰箱内静置 24 h,离心分离,取上清液旋转蒸发使乙醇挥发后,加入等体积乙醚萃取,弃去上层,重复 3 次至上层无色,下层溶液旋转蒸发浓缩,得金花茶皂苷浓缩液约 120 mL,质量浓度为 32.5 mg/mL。

2.1.2 金花茶叶皂苷粗分离 浓缩液用大孔树脂 Diaion HP-10 分离^[5],树脂依次经 75%乙醇溶液、蒸馏水浸泡后装柱,以充分蒸馏水冲洗色谱柱。上样后分别以水和不同体积分数的乙醇进行洗脱,体积流量为 1 mL/min,每管收集 15 mL 洗脱液,并用香草醛-硫酸法追踪测定皂苷,合并含皂苷的洗脱液,浓缩至干,加入甲醇溶液溶解,在 0 °C 冰箱中静置沉淀。将所得沉淀干燥后得到白色金花茶皂苷粗品 1.3 g,测其总皂苷质量分数为 86.3%。取一定量的金花茶皂苷粗品用甲醇超声溶解,定容,配制成质量浓度为 20 mg/mL 溶液,经 0.45 μm 滤膜滤过,得制备液。

2.2 高质量分数金花茶叶皂苷单体的制备

2.2.1 分析色谱条件 分析色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈ 柱 (300 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈和水,梯度洗脱,体积流量 1 mL/min; 检测波长 203 nm; 柱温为室温; 进样量 10 μL。

2.2.2 制备色谱条件 制备色谱柱为 Cosmosil 公司的 5C18-MS-II (250 mm×10 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A)-水 (B),梯度洗脱条件: 0~5 min, A-B (25:75); 5~28 min, A-B (40:60); 28~37 min, A-B (40:60); 37~42 min, A-B (50:50); 42~60 min, A-B (50:50); 60~65 min, A-B (25:75); 65~70 min, A-B (25:75); 体积流量 5 mL/min; 检测波长 203 nm; 柱温为室温; 进样量 400 μL。

2.2.3 化合物的制备 按“2.2.2”项下条件制备,分别收集 22~52 min 的皂苷馏份,浓缩至干,加入少量甲醇溶液溶解,在 0 °C 冰箱中静置沉淀。将所得沉淀干燥,得到化合物 1 (110 mg)、化合物 2 (8 mg)、化合物 3 (14 mg)。按“2.2.1”项下条件分析各化合物质量分数,均达到 95%以上。

3 结构鉴定

化合物 1: 白色粉末,易溶于吡啶、甲醇等有机溶剂。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 398 (-OH); 2 929, 2 871 (-CH₃, -CH₂); 1 380 (偕二甲基); 1 660 (双键); 1 080 (C-O-C)。ESI-MS m/z : 823 [M+Na]⁺。¹³C-NMR (150 MHz, C₅D₅N) 给出 42 个碳信号,DEPT 谱得出分

子中有 8 个伯碳 (-CH₃), 10 个仲碳 (-CH₂), 18 个叔碳 (-CH), 6 个季碳,其中包括 2 组葡萄糖残基信号。余下的 30 个碳归属为苷元部分,其中 2 个 -CH 与 -OH 结合。结合质谱给出的相对分子质量推测该化合物分子式为 C₄₂H₇₂O₁₄, 不饱和度为 7。¹H-NMR (600 MHz, C₅D₅N) 给出 8 个甲基单峰信号依次为 δ 0.80, 1.03, 1.15, 1.58, 1.59 (2×-CH₃), 1.61, 2.07; 1 个烯氢质子信号 δ 5.24 (1H, t, J = 6.4 Hz)。根据以上谱图特征信息推测该化合物苷元部分为四环三萜类化合物,由碳谱中 2 个烯碳 δ 130.8, 125.8 可知苷元结构与人参皂苷苷元结构相似。在 HMBC 谱中,葡萄糖残基 H-1' (δ 5.02, d, J = 7.8 Hz) 与叔碳 C-6 (δ 80.1) 相关, H-1'' (δ 5.17, d, J = 7.7 Hz) 与季碳 C-20 (δ 83.2) 相关,显示为原人参三醇 6、20 位苷化特征。结合 ¹H-¹H COSY 和 HSQC 确定 2 组葡萄糖残基碳信号信号分别为 105.8, 75.3, 79.5, 71.5, 78.0, 62.9 和 98.1, 75.0, 79.2, 71.7, 78.2, 62.8。所得结果与文献报道基本一致^[6], 故鉴定化合物 1 为人参皂苷 Rg1。

化合物 2: 白色粉末,易溶于吡啶、甲醇等有机溶剂。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 398 (-OH); 2 929, 2 871 (-CH₃, -CH₂), 1 380 (偕二甲基); 1 660 (双键); 1 080 (C-O-C)。ESI-MS m/z : 661.32 [M+Na]⁺, 638.91 [M+H]⁺。质谱推测该化合物相对分子质量为 638。结合氢谱和碳谱推测该化合物分子式为 C₃₆H₆₂O₉, 不饱和度为 6。¹H-NMR (600 MHz, C₅D₅N) 给出 8 个单峰甲基信号 δ 0.99, 1.03, 1.11, 1.47, 1.60, 1.61, 1.64, 2.01; 1 个烯氢质子信号 δ 5.25 (1H, d, J = 6.7 Hz); 1 个糖端基质子信号 δ 5.18 (1H, d, J = 7.8 Hz)。初步推断该化合物为只有 1 个配糖体的四环三萜类化合物,质谱有脱掉葡萄糖的特征碎片,糖端基质子信号耦合常数为 7.80 Hz,糖与苷元苷键构型为 β-苷键。由 3 个连氧氢 δ 3.96 (1H, m), 4.43 (1H, m), 4.20 (1H, m), 推测苷元部分具有原人参三醇的结构特征。¹³C-NMR (150 MHz, C₅D₅N) 共给出 36 个碳信号,苷元部分 8 个甲基信号 δ 16.5, 17.5, 17.5, 17.6, 17.8, 22.3, 25.8, 32.0。3 个连氧碳信号 δ 67.8, 70.2, 78.3; 2 个烯碳信号 δ 126.0, 130.9。结合 ¹H-¹H COSY 和 HSQC 谱得出葡萄糖 C-1'~6' 化学位移依次为 δ 98.3, 75.2, 79.4, 71.7, 78.5, 62.9。HMBC 谱图中糖端基氢 δ 5.21 与季碳 δ 83.3 (C-20) 远程相关,确定糖与苷元的连接位置。δ 1.61 (H-26), 1.60 (H-27) 都与 δ 126.0 (C-24), 130.9 (C-25) 远程相关,确定双键末端为偕二甲基。所得结果与文献报道一致^[7], 故鉴

定化合物 **2** 为人参皂苷 F1。

化合物 **3**: 白色粉末, 易溶于吡啶、甲醇等有机溶剂。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3 398 (-OH); 2 929, 2 871 (-CH₃, -CH₂); 1 380 (偕二甲基); 1 660 (双键); 1 080 (C-O-C)。ESI-MS m/z : 793.31 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 771.14 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。质谱推测该化合物相对分子质量为 770.20。结合氢谱和碳谱推测该化合物分子式为 C₄₁H₇₀O₁₃, 不饱和度为 7。¹H-NMR (600 MHz, C₅D₅N) 给出 8 个都是单峰苷元甲基信号 δ 0.95, 0.99, 1.09, 1.45, 1.63, 1.63, 1.66 和 1.98; 1 个烯氢质子信号 δ 5.25 (1H, t, $J = 12.7$ Hz); 2 个糖端基质子信号 δ 5.14 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 5.67 (1H, d, $J = 1.4$ Hz)。推断该化合物为有 2 个配糖体的四环三萜类化合物, 质谱有依次脱掉阿拉伯糖和葡萄糖的特征碎片, 且糖端基质子信号耦合常数为 7.80 和 1.38 Hz, 苷键应分别为 β 和 α 构型。由 3 个连氧氢 δ 4.21, 4.25, 4.26 推测苷元部分具有原人参三醇的结构特征。¹³C-NMR (150 MHz, C₅D₅N) 共给出 41 个碳信号, 苷元部分与 ¹H-NMR 有 8 个相应的甲基信号 δ 16.5, 17.3, 17.3, 17.4, 17.6, 17.8, 25.7, 31.9; 3 个连氧碳信号 δ 67.7, 70.2, 79.2; 2 个烯碳信号 δ 126.105, 131.1。结合 ¹H-¹H COSY 和 HSQC 谱得出葡萄糖 C-1'~6' 的化学位移依次为 98.0, 74.9, 79.2, 72.1, 76.5, 68.5。阿拉伯糖 C-1''~5'' 化学位移依次为 δ 110.2, 83.3, 78.8, 86.0, 62.7。HMBC 谱中糖端基氢 δ 5.14 与季碳 δ 83.4 (C-20) 远程相关, 确定葡萄糖与苷元的连接位置为 20 位。 δ 5.67 与季碳 δ 68.4 (C-6') 远程相关, 确定葡萄糖与阿拉伯糖的连接顺序为 Glc (6 $\rightarrow$ 1) Ara; δ 1.61 (H-26), 1.62 (H-27) 都与 δ 126.0 (C-24), 130.9

(C-25) 确定双键末端为偕二甲基。所得结果与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **3** 为人参皂苷 F5。

4 结论

金花茶皂苷是一类结构相似的混合物, 由于茶皂苷的多样性和复杂性, 单体皂苷分离十分困难。本实验首次从金花茶叶中分离得到 3 个单体化合物, 也是首次发现金花茶中含有人参皂苷类化合物。这对进一步了解珍稀药用植物金花茶的化学成分, 深入研究金花茶皂苷的功效关系有重要意义, 为金花茶中皂苷活性物质提供了基础研究数据以及为金花茶资源的高值化加工利用提供理论依据。

参考文献

- [1] 宁恩创, 秦小明, 杨 宏. 金花茶叶水提物的降脂功能试验研究 [J]. 广西大学学报: 自然科学版, 2004, 29(4): 350-352.
- [2] 秦小明, 林华娟, 宁恩创, 等. 金花茶叶水提物的抗氧化活性研究 [J]. 食品科技, 2008, 33(2): 189-191.
- [3] 宁恩创, 辛 明, 韦 璐, 等. 金花茶皂苷的抗氧化活性研究 [J]. 食品科技, 2009, 34(11): 197-203.
- [4] 秦小明, 宁恩创, 杨 宏. 金花茶叶药用保健成分提取新工艺研究 [J]. 食品工业科技, 2005, 26(10): 122-124.
- [5] 林华娟, 秦小明, 宁恩创, 等. 金花茶皂苷分离纯化的初步研究 [J]. 广西热带农业, 2009(2): 1-4.
- [6] Teng R W, Li H Z, Chen J T, *et al.* Complete assignment of ¹H and ¹³C NMR data for nine protopanaxatriol glycosides [J]. *Magn Reson Chem*, 2002, 40(7): 483-488.
- [7] 吕永俊, 徐绥绪. 人参皂苷的化学研究方法 [J]. 沈阳药学院学报, 1985, 2(1): 63-82.
- [8] Dou D Q, Chen Y J, Ma Z Z, *et al.* A novel minor saponin from the leaves of *Panax ginseng*. C. A. Meyer [J]. *J Chi Pharm Sci*, 1996, 5(1): 48-52.