

苦丁茶叶的化学成分研究

左文健^{1,2*}, 陈惠琴¹, 李晓东¹, 王振辉¹, 戴好富², 王金辉^{1*}

1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 农业部热带作物生物技术重点开放实验室, 海南 海口 571101

摘要: 目的 研究苦丁茶 *Ilex kudingcha* 叶的化学成分。方法 利用硅胶柱色谱、大孔树脂柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶色谱、制备 HPLC 进行分离, 通过波谱数据和理化性质进行化合物结构鉴定。结果 共分离得到 8 个化合物, 分别鉴定为 mateglycoside D (1)、咖啡酸甲酯 (2)、香草醛 (3)、没食子酸 (4)、咖啡酸 (5)、 β -谷甾醇 (6)、对羟基苯甲醛 (7)、阿魏酸 (8)。结论 化合物 2、7 为首次从冬青属植物中分离得到, 化合物 1、3、4、8 为首次从该植物中分离得到。

关键词: 苦丁茶; 冬青属; mateglycoside D; 香草醛; 没食子酸

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)01-0018-03

Chemical constituents of *Ilex kudingcha* leaves

ZUO Wen-jian^{1,2}, CHEN Hui-qin¹, LI Xiao-dong¹, WANG Zhen-hui¹, Dai Hao-fu², WANG Jin-hui¹

1. College of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents in the leaves of *Ilex kudingcha*. **Methods** Repeated column chromatography with silical gel, maroporous resin column, Sephadex LH-20, and preparative HPLC were used to isolate the chemical constituents, and their structures were elucidated on the basis of spectral data. **Results** Eight compounds were isolated and identified as mateglycoside D (1), methyl caffeate (2), vanillin (3), gallic acid (4), caffeic acid (5), β -sitosterol (6), *p*-hydroxy-benzaldehyde (7), and ferulic acid (8). **Conclusion** Compounds 2 and 7 are first obtained from the plants of *Ilex* L., and compounds 1, 3, 4, and 8 are first obtained from *I. kudingcha*.

Key words: *Ilex kudingcha* C. J. Tseng; *Ilex* L.; mateglycoside D; vanillin; gallic acid

苦丁茶 *Ilex kudingcha* C. J. Tseng 属冬青科冬青属植物, 为我国南部及西南部民间传统的药用植物, 多以植物的嫩叶或叶入药。性味苦甘, 具有清热凉血、滋养肝肾之功效, 能散风热、清头目、除烦渴, 多用于治疗头痛、齿痛、目赤、热病烦渴和痢疾等症^[1]。其化学成分主要为三萜类化合物^[2-8], 还含有黄酮^[9]、萜类^[10]、氨基酸^[11]、维生素^[12]和多种微量元素^[13]等。本实验从苦丁茶冬青干燥叶的 95%乙醇提取物中, 运用反复硅胶柱色谱、大孔树脂柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱、制备 HPLC 等分离纯化手段共得到 8 个化合物, 通过化合物的理化性质和波谱数据鉴定了这些化合物的结构分别为:

mateglycoside D (1)、咖啡酸甲酯 (methyl caffeate, 2)、香草醛 (vanillin, 3)、没食子酸 (gallic acid, 4)、咖啡酸 (caffeic acid, 5)、 β -谷甾醇 (β -sitosterol, 6)、对羟基苯甲醛 (7) 和阿魏酸 (ferulic acid, 8)。其中化合物 2、7 为首次从冬青属植物中分离得到, 化合物 1、3、4、8 为首次从该植物中分离得到。

1 药材、仪器与试剂

德国 Bruker ARX—300 和 ARX—600 型核磁共振光谱仪; Waters LCT Premier XE 质谱仪; FL 2000 液相色谱仪 (浙江温岭福立仪器有限公司)。硅胶 (青岛海洋化工厂, 200~300 目); Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司); 硅胶 GF₂₅₄-TLC 薄层预制板 (实

收稿日期: 2010-03-22

作者简介: 左文健 (1973—), 男, 河北省沧州市人, 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 讲师, 博士, 研究方向为天然药物化学。

Tel: (0898) 66988061 E-mail: zuowenjian2009@yahoo.com.cn

*通讯作者 王金辉 Tel: (024) 23986479 E-mail: wjh.1972@yahoo.com.cn

实验室自制); 氘代试剂为 Cambridge Isotope Laboratories, Inc; 柱色谱试剂规格均为分析纯; 半制备型色谱柱为 YMC C₁₈ 反相柱 (250 mm×10 mm, 5 μm); HPLC 所用试剂均为色谱纯。实验药材于 2007 年 5 月购于沈阳南五马路, 经沈阳药科大学药用植物教研室路金才副教授鉴定为苦丁茶 *Ilex kudingcha* C. J. Tseng, 样品保存于沈阳药科大学天然药物化学教研室 (编号 20070508)。

2 提取和分离

苦丁茶冬青的干燥叶 6 kg, 用 95%乙醇 60 L 回流提取 2 次。减压回收乙醇得浸膏。用适量水混悬, 依次用石油醚、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇萃取。醋酸乙酯萃取层 (85 g) 经反复硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮梯度洗脱, 再经制备薄层、Sephadex LH-20 柱色谱等分离得到化合物 2 (15 mg)、3 (2 mg)、4 (5 mg)、5 (35 mg)、6 (60 mg)、7 (3 mg)、8 (3 mg)。正丁醇萃取层 (640 g) 经大孔树脂 D-101 柱色谱依次以水, 30%、70%、95%乙醇洗脱。取 70%乙醇洗脱部分 100 g, 经硅胶柱色谱, 以氯仿-甲醇梯度洗脱, 再经 Sephadex LH-20 柱色谱、制备 HPLC 等分离纯化手段, 分离得到化合物 1 (6 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 白色结晶, Liebermann-Burchard 反应呈阳性, Molish 反应呈阳性。高分辨质谱给出 $[M+Na]^+ m/z$: 919.504 1, 计算值 919.503 1, 结合碳谱确定分子式为 C₄₇H₇₆O₁₆。UV 最大吸收波长为 246 nm。¹H-NMR (600 MHz, pyridine-*d*₅) 谱中给出 7 个甲基质子信号 δ 1.25 (3H, s), 1.15 (3H, s), 1.08 (3H, s), 1.05 (3H, s), 0.90 (3H, s), 0.87 (3H, s), 0.85 (3H, s); 3 位连氧碳质子信号 3.22 (1H, dd, *J* = 12.0, 4.2 Hz, H-3), 一个烯氢质子信号 δ 5.41 (1H, t, *J* = 3.0 Hz, H-12)。¹³C-NMR (150 MHz, pyridine-*d*₅) 谱中, δ 176.5 为 28 位羰基碳信号, 两个烯碳信号 δ 122.9, 144.1 为齐墩果烷型特征 12、13 位双键碳信号, δ 88.8 为 3 位成苷的连氧碳信号, 其余信号为三萜化合物的骨架碳信号, 化合物 1 的碳谱数据与文献对照基本一致^[14], 可以确定苷元为齐墩果酸。

¹H-NMR 谱中, δ 4.88 (1H, d, *J* = 5.4 Hz) 为阿拉伯糖的端基质子信号; δ 6.31 (1H, d, *J* = 8.4 Hz) 为葡萄糖的端基质子信号, 偶合常数显示苷键构型为 β; δ 6.10 (1H, br s) 为鼠李糖的端基质子信号, δ 1.61 (3H, d, *J* = 6.0 Hz) 为鼠李糖 6''' 位甲基特征质子信号。¹³C-NMR 中也给出阿拉伯糖 (δ 104.8)、葡萄

糖 (δ 95.8) 和鼠李糖 (δ 101.8) 端基碳信号。经与文献对照^[3,14], 碳谱数据基本一致, 可以确定葡萄糖连在苷元的 28 位, 阿拉伯糖连在 3 位, 鼠李糖连在阿拉伯糖的 2' 位上。由此确定化合物 1 的结构为 3-*O*-α-*L*-rhamnopyranosyl(1→2)-α-*L*-arabinopyranosyl-oleanolic acid-28-*O*-β-*D*-glucopyranosyl ester (图 1), 即 mateglycoside D。

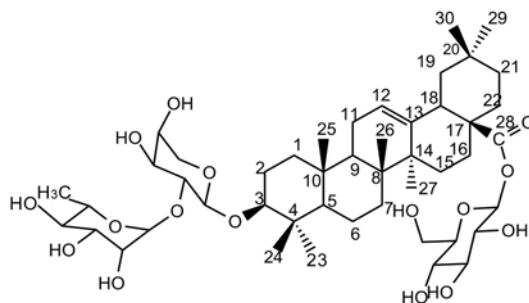


图 1 化合物 1 的结构式

Fig. 1 Structure of compound 1

化合物 2: 白色柱状结晶, 365 nm 下显暗黄色荧光。¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) 中, δ 3.69 (3H, s) 为甲氧基质子信号; δ 6.28 (1H, d, *J* = 16.2 Hz, H-2) 和 δ 7.06 (1H, d, *J* = 16.2 Hz, H-3) 为一组反式双键的质子信号; δ 6.77 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-2')、δ 7.01 (1H, dd, *J* = 1.2, 7.8 Hz, H-6') 和 δ 7.06 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-5') 构成了一组 ABX 偶合系统; δ 9.30 (2H, br s) 为羟基质子信号。在 NOESY 谱中, H₂O 与 OH 的交换峰与 H-2' 和 H-6' 有相关信号, 说明苯环 3'、4' 为羟基取代。将化合物 2 的氢谱数据与文献对照基本一致^[15], 可以确定化合物 2 为咖啡酸甲酯。

化合物 3: 无色结晶 (甲醇)。三氯化铁-铁氰化钾反应呈阳性, 表明存在酚羟基。¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) 中给出醛基质子信号 δ 9.72 (1H, s), 甲氧基质子信号 δ 3.82 (3H, s)。信号 δ 7.38 (1H, br d, *J* = 8.1 Hz)、δ 6.90 (1H, d, *J* = 8.0 Hz) 和 δ 7.34 (1H, br s) 为 ABX 偶合系统, 提示存在三取代苯环。¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 55.6 (-OCH₃), 127.6 (C-1), 115.6 (C-5), 155.0 (C-3), 126.7 (C-6), 148.6 (C-4), 110.5 (C-2), 190.6 (-CHO), 薄层 Emerson 反应提示羟基对位有取代基, 其数据与文献对照基本一致^[16], 故鉴定化合物 3 为香草醛。

化合物 4: 无色针晶, 三氯化铁-铁氰化钾反应呈阳性, 溴甲酚绿反应呈阳性。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.20 (1H, br s, COOH), 9.16 (3H, br s,

OH-3, 4, 5), 6.91 (2H, s, H-2, 6), $^1\text{H-NMR}$ 数据与文献对照基本一致^[17], 确定化合物 **4** 为没食子酸。

化合物 **5**: 无色针晶 (MeOH)。三氯化铁-铁氰化钾反应呈阳性, 提示有酚羟基存在; 溴甲酚蓝反应呈阳性, 提示分子中含有羧基。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) 中给出一对反式偶合的烯氢质子信号 δ 6.16 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-2), 7.40 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-3) 和一组 ABX 偶合系统的质子信号 δ 6.75 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.96 (1H, dd, $J = 8.2$, 1.9 Hz, H-6'), 7.02 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2')。将所得氢谱数据与文献对照基本一致^[18], 确定化合物 **5** 为咖啡酸。

化合物 **6**: 无色针晶 (石油醚-丙酮), mp 136~138 °C。TLC 检查, 与 β -谷甾醇对照品共薄层, 在 3 种溶剂系统下 R_f 值一致, 故鉴定化合物 **6** 为 β -谷甾醇。

化合物 **7**: 白色针晶 (甲醇), 254 nm 下显暗斑。三氯化铁-铁氰化钾反应呈阳性, 示有酚羟基。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD₃OD) 中, δ 9.75 (1H, s) 为醛基质子信号。 δ 6.91 (2H, d, $J = 8.4$ Hz) 和 δ 7.78 (2H, d, $J = 8.4$ Hz) 为苯环上邻偶质子信号, 提示化合物为 1,4-取代苯环。将化合物 **7** 的 $^1\text{H-NMR}$ 数据与文献对照基本一致^[19], 确定化合物 **7** 为对羟基苯甲醛。

化合物 **8**: 淡黄色针晶 (甲醇), mp 173~174 °C。三氯化铁-铁氰化钾反应呈阳性, 示有酚羟基存在, 溴甲酚蓝反应呈阳性, 示有羧基存在。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) 中给出羧基质子信号 δ 12.34 (1H, s), 酚羟基质子信号 δ 9.55 (1H, s), 甲氧基质子信号 δ 3.81 (3H, s)。 δ 7.49 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8) 和 δ 6.37 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7) 为一组反式双键质子信号, δ 6.78 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 7.08 (1H, br d, $J = 8.2$ Hz, H-6) 和 δ 7.28 (1H, br s, H-2) 构成一组 ABX 偶合系统, 提示化合物中含有一个三取代苯环。薄层 Emerson 反应提示羟基对位有取代基, 其氢谱数据与文献对照基本一致^[20], 确定化合物 **8** 为阿魏酸。

致谢: 高分辨质谱由新疆石河子大学药学院代为测定。

参考文献

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上册. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.

- [2] Ouyang M A, Yang C R, Chen Z L, *et al.* Triterpenes and triterpenoid glycoside from the leaves of *Ilex kudincha* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(3): 871-877.
- [3] 欧阳明安, 滕荣伟, 王德祖, 等. 三萜大叶冬青苷 I 和苦丁冬青苷 K 的 NMR 研究 [J]. 波谱学杂志, 2001, 18(2): 155-160.
- [4] Ouyang M A, Wang H Q, Chen Z L, *et al.* Triterpenoid glycoside from the leaves of *Ilex kudincha* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 43(2): 443-445.
- [5] Ouyang M A, Wang H Q, Liu Y Q, *et al.* Triterpenoid saponins from the leaves of *Ilex latifolia* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 45(7): 1501-1505.
- [6] Tang L, Jiang Y, Chang H T, *et al.* Triterpene saponins from the leaves of *Ilex kudincha* [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68(8): 1169-1174.
- [7] Keiichi N, Toshio M, Hirashi N. Triterpenoids of *Ilex kudincha*, ilekudinols A, B and C, as ACAT inhibitors [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(8): 1128-1133.
- [8] Keiichi N, Toshiyuki F, Toshio M, *et al.* Activity-guided isolation of triterpenoid acyl CoA cholesteryl acyl transferase (ACAT) inhibitors from *Ilex kudincha* [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(7): 1061-1064.
- [9] 杨雁芳, 阎玉凝. 中药枸骨叶的化学成分研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(4): 33-34.
- [10] 杨小生, 赵超, 周欣, 等. 广西苦丁茶的挥发油成分 [J]. 云南植物研究, 2002, 24(3): 406-408.
- [11] 郁建平, 万晴姣. 贵州苦丁茶化学成分研究 [J]. 山地农业生物学报, 1996, 15(4): 60-64.
- [12] 郭雅玲. 苦丁茶应用研究概述 [J]. 福建茶叶, 1999, 1: 8.
- [13] 许旋, 罗一帆. 不同部位苦丁茶叶的微量元素和黄酮含量的测定 [J]. 微量元素与健康研究, 2000, 17(2): 32-33.
- [14] Sugimoto S, Nakamura S, Yamamoto S, *et al.* Brazilian natural medicines. III. Structures of triterpene oligoglycosides and lipase inhibitors from mate, leaves of *Ilex paraguariensis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2009, 57(3): 257-261.
- [15] Li J R, Bai Y J, Wang B, *et al.* A monoterpene glycoside from *Ehinacea purpurea* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2003, 12(4): 181-183.
- [16] 宋治中, 贾忠建, 朱启秀. 兴安柴胡化学成分研究 (II) [J]. 高等学校化学学报, 1991, 12(11): 1469-1472.
- [17] 刘冬, 鞠建华, 杨峻山. 狭叶崖爬藤化学成分的研究 [J]. 中草药, 2003, 34(1): 4-6.
- [18] 童胜强, 黄娟, 王冰岚, 等. 肿节风化学成分的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 198-201.
- [19] 李占林, 李锐, 李宁, 等. 文冠果果壳的化学成分 [J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(4): 271-272.
- [20] 刘明韬, 韩志超, 章漳, 等. 龙胆的化学成分研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(2): 103-104.