

# 山茶叶子的化学成分及其抗氧化活性研究

何泉泉<sup>1\*</sup>, 熊智<sup>1</sup>, 郑希<sup>1</sup>, 余昊阳<sup>1</sup>, 延在昊<sup>1</sup>, 邹伟杰<sup>2</sup>, 王思蓓<sup>2</sup>, 张依<sup>2</sup>, 罗建光<sup>2</sup>

<sup>1</sup>爱茉莉太平洋(上海)研发有限公司, 上海 201801; <sup>2</sup>中国药科大学中药学院, 南京 211198

**摘要:** 本文主要研究了山茶 (*Camellia japonica*) 叶子的化学成分。采用硅胶、ODS、MCI、Sephadex LH-20、Preparative HPLC 等技术进行分离纯化, 并结合多种波谱学方法进行化合物结构鉴定。从山茶叶子的乙醇提取物中分离得到了 10 个化合物, 包括 6 个黄酮类, 3 个苯丙素类和 1 个单萜类化合物, 分别为 kaempferol (1)、quercetin (2)、quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucoside (3)、rutin (4)、saluenin (5)、quercetin 3-O-(6''-O-Galloyl)- $\beta$ -galactoside (6)、honokiol (7)、magnolol (8)、dihydroxyrungenin (9)、loliolide (10)。化合物 5 为首次从山茶中分离得到, 化合物 6~10 为首次从该属植物中分离得到, 化合物 9 和 10 具有较好的抗氧化活性。

**关键词:** 山茶叶子; 化学成分; 黄酮; 苯丙素; 单萜; 抗氧化

中图分类号: TQ041+.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019) Suppl-0071-05

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.S.010

## Chemical constituents and their anti-oxidative activities of *Camellia japonica* leaves

HE Quan-quan<sup>1\*</sup>, XIONG Zhi<sup>1</sup>, ZHENG Xi<sup>1</sup>, YU Hao-yang<sup>1</sup>,

YEON Jae-ho<sup>1</sup>, ZOU Wei-jie<sup>2</sup>, WANG Si-bei<sup>2</sup>, ZHANG Yi<sup>2</sup>, LUO Jian-guang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Amorepacific (Shanghai) R&I Center Co Ltd, Shanghai 201801, China;

<sup>2</sup>School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

**Abstract:** This study aimed to analyze the chemical constituents of the leaves of *Camellia japonica*. The compounds were isolated and purified by extensive means of chromatographic separation techniques, and their structures were elucidated by their physicochemical properties, NMR and MS spectroscopic data, as well as comparison with literature data. Ten compounds, including kaempferol (1), quercetin (2), quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucoside (3), rutin (4), saluenin (5), quercetin 3-O-(6''-O-Galloyl)- $\beta$ -galactoside (6), honokiol (7), magnolol (8), dihydroxyrungenin (9), loliolide (10), were isolated from the leaves of *Camellia japonica*. Among them, compound 5 were obtained from *C. japonica* for the first time. Compounds 6-10 were isolated from the genus of *Camellia* for the first time; Compounds 9 and 10 have good antioxidant activity.

**Key words:** *Camellia japonica*; chemical constituents; flavonoids; phenyl propanoids; monoterpene; anti-oxidation

山茶 (*Camellia japonica*) 为山茶科山茶属 (*Camellia*) 植物, 常绿灌木, 可作为观赏植物, 为中国传统的十大名花之一; 广泛分布于我国四川、山东、江西、台湾等地。山茶的药用价值很高, 有凉血止血、治疗烫伤灼伤、血崩、痔疮出血等疗效, 由于种子中存在含量较高的不饱和脂肪酸, 将其榨油, 可供工业用。近年来, 国内外对山茶各个部位的化学成分展开过一系列研究<sup>[1-6]</sup>。本实验的目的是对山茶叶子进行系统的研究, 将提取得到的山茶粗浸膏分别用

有机溶剂萃取, 得到石油醚层、乙酸乙酯层、正丁醇层和水层, 综合运用硅胶、ODS、MCI、Sephadex LH-20、Preparative HPLC 等提取分离手段, 从山茶叶子中共分离得到 10 个化合物, 并通过理化性质和波谱学方法进行结构鉴定。它们分别为: kaempferol (1), quercetin (2), quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucoside (3), rutin (4), saluenin (5), quercetin 3-O-(6''-O-Galloyl)- $\beta$ -galactoside (6), honokiol (7), magnolol (8), dihydroxyrungenin (9), loliolide (10), 其中化合物 1-6 为黄酮类, 7~9 为苯丙素类, 10 为单萜类化合物。体外活性测试结果显示, 化合物 9 和 10 具有较好的自由基 DPPH 清除作用。

## 1 仪器与材料

Bruker AV III-500 核磁共振波谱仪(TMS 为内标)(Bruker, Germany); Agilent 1100 Series LC/MSD Trap 质谱仪(Agilent, USA)。分析型 HPLC 为 Agilent 1260 系列; 色谱工作站: Agilent ChemStation; 检测器: DAD; 色谱柱: Shim-pack ODS-C18 ( $\Phi$  4.6  $\times$  150 mm, SHIMADZU)。制备型 HPLC 用岛津 LC-6A 仪器, 色谱工作站: LC solution; 检测器: SPD-10A; 色谱柱: Shim-pack ODS-C18 ( $\Phi$  20  $\times$  250 mm, SHIMADZU)。D101 大孔吸附树脂, 薄层色谱硅胶及高效薄层板为青岛海洋化工厂产品; Sephadex LH-20 和 ODS-C<sub>18</sub> 为 Pharmacia 公司产品; MCI 为日本三菱化学树脂产品; 甲醇(色谱纯、分析纯), 乙腈(色谱纯): 江苏汉邦科技有限公司; 分析纯如氯仿、乙醇等试剂均为江苏汉邦科技有限公司产品。

山茶叶子, 于 2018 年 8 月采集于中国, 经中国药科大学罗建光教授鉴定为山茶科山茶属植物山茶(*Camellia japonica*), 凭证标本存放于中国药科大学天然药物化学教研室, 标本编号为 NO. 20150823。

## 2 提取与分离

将干燥的山茶叶子 8 kg 粉碎, 用 93% 乙醇回流提取 3 次, 每次 3 h, 减压浓缩得到粗浸膏 501 g。将山茶叶子粗浸膏分散于水中, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 得到石油醚层、乙酸乙酯层、正丁醇层和水层。乙酸乙酯层(179 g) 经过硅胶柱色谱, 氯仿-甲醇系统(1:0~0:1)洗脱, 得到 4 个亚馏分(Fr. A1~A4)。Fr. A1(15 g) 经过 ODS 柱色谱, 用甲醇-水系统(20:80~100:0)系统梯度洗脱, 然后经过制备型 HPLC 分离, 分别得到化合物 **7**(3.5 mg) 和 **8**(4.4 mg)。Fr. A3(12 g) 经过 MCI 柱色谱, 用甲醇-水系统(20:80~100:0)系统梯度洗脱, 然后经过制备型 HPLC 分离, 分别得到化合物 **9**(14.8 mg), **10**(11.2 mg)。Fr. A4(16 g) 经过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 用氯仿-甲醇系统(1:1)等度洗脱, 然后经过制备型 HPLC 分离, 分别得到化合物 **1**(10.3 mg) 和 **2**(6.0 mg)。正丁醇层(130 g) 通过 D101 大孔吸附树脂色谱柱, 用乙醇-水系统(10:90~100:0)进行梯度洗脱, 得到 5 个馏分(Fr. B1~B5)。Fr. B2(10 g) 经过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 用氯仿-甲醇系统(1:1)等度洗脱, 然后经过制备型 HPLC 分离, 分别得到化合物 **4**(3.6 mg) 和 **5**(3.0 mg)。将 Fr. B4(8 g) 经过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 用氯仿-甲醇系统(1:1)等度洗脱, 然后经过制备型

HPLC 分离, 分别得到化合物 **3**(5.7 mg) 和 **6**(5.8 mg)。

## 3 结构鉴定

**化合物 1** 黄色油状物(甲醇); <sup>1</sup>H NMR (CH<sub>3</sub>OD, 500 MHz)  $\delta$ : 8.85 (2H, d,  $J$  = 8.9 Hz, H-2', 6'), 7.73 (2H, d,  $J$  = 8.9 Hz, H-3', 5'), 7.24 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz, H-8), 6.99 (1H, d,  $J$  = 1.9 Hz, H-6); <sup>13</sup>C NMR (CH<sub>3</sub>OD, 125 MHz)  $\delta$ : 176.6 (C-4), 164.9 (C-7), 162.3 (C-9), 160.1 (C-4'), 157.7 (C-5), 147.0 (C-2), 136.6 (C-3), 130.4 (C-2'), 130.3 (C-6'), 123.3 (C-1'), 116.3 (C-3'), 116.3 (C-5'), 104.1 (C-10), 99.1 (C-6), 94.5 (C-8)。以上数据与文献<sup>[7]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **1** 为 kaempferol。

**化合物 2** 黄色无定形粉末(甲醇); <sup>1</sup>H NMR (CH<sub>3</sub>OD, 500 MHz)  $\delta$ : 7.67 (1H, d,  $J$  = 2.2 Hz, H-2'), 7.54 (1H, dd,  $J$  = 8.5, 2.2 Hz, H-6'), 6.88 (1H, d,  $J$  = 8.5 Hz, H-5'), 6.39 (s, 1H, H-8), 6.17 (1H, s, H-6); <sup>13</sup>C NMR (CH<sub>3</sub>OD, 125 MHz)  $\delta$ : 175.8 (C-4), 164.2 (C-7), 160.6 (C-9), 156.1 (C-5), 147.7 (C-4'), 146.6 (C-2), 145.0 (C-3'), 135.7 (C-3), 121.9 (C-1'), 119.8 (C-6'), 115.5 (C-5'), 115.0 (C-2'), 102.8 (C-10), 98.2 (C-6), 93.3 (C-8)。以上数据与文献<sup>[8]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **2** 为 quercetin。

**化合物 3** 黄色油状物(DMSO); <sup>1</sup>H NMR (DMSO, 500 MHz)  $\delta$ : 7.57 (1H, m, H-6' and H-2'), 6.83 (1H, d,  $J$  = 9.0 Hz, H-5'), 6.37 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz, H-8), 6.17 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz, H-6), 5.45 (1H, d,  $J$  = 7.3 Hz, H-1"), 3.58 (2H, d,  $J$  = 11.3 Hz, H-6"); <sup>13</sup>C NMR (DMSO, 125 MHz)  $\delta$ : 177.2 (C-4), 164.8 (C-7), 161.1 (C-5), 156.3 (C-2), 156.0 (C-9), 148.5 (C-4'), 144.8 (C-3'), 133.2 (C-3), 121.5 (C-6'), 121.0 (C-1'), 116.1 (C-5'), 115.1 (C-2'), 103.6 (C-10), 100.9 (C-1"), 98.8 (C-6), 93.5 (C-8), 77.5 (C-3"), 76.5 (C-5"), 74.0 (C-2"), 69.9 (C-4"), 60.9 (C-6")。以上数据与文献<sup>[9]</sup>报道基本一致, 故鉴定化合物 **3** 为 quercetin 3-*O*- $\beta$ -D-glucoside。

**化合物 4** 黄色油状物(DMSO); <sup>1</sup>H NMR (DMSO, 500 MHz)  $\delta$ : 7.54 (1H,  $J$  = 8.5 Hz, H-5'), 7.52 (1H, s, H-2'), 6.83 (1H,  $J$  = 8.2 Hz, H-6'), 6.37 (1H, br s, H-8), 6.17 (1H, br s, H-6), 5.33

(1H,  $J = 6.9$  Hz, H-1''), 4.38 (1H, s, H-1'''), 0.99 (3H, d,  $J = 6.1$  Hz, H-6''');  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz)  $\delta$ : 177.2 (C-4), 164.1 (C-7), 161.2 (C-5), 156.5 (C-9), 156.4 (C-2), 148.6 (C-3'), 144.8 (C-4'), 133.2 (C-3), 121.5 (C-1'), 121.0 (C-6'), 116.2 (C-2'), 115.2 (C-5'), 103.7 (C-10), 101.2 (C-1''), 100.7 (C-1'''), 98.8 (C-6), 93.6 (C-8), 76.5 (C-3''), 75.8 (C-5''), 74.0 (C-2''), 71.8 (C-4'''), 70.5 (C-3'''), 70.3 (C-2'''), 69.9 (C-4''), 68.2 (C-5'''), 66.9 (C-6''), 17.7 (C-6'''). 以上数据与文献<sup>[8]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物4为 rutin。

**化合物 5** 黄色油状物 (DMSO);  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz)  $\delta$ : 7.54 (1H, s, H-2'), 7.52 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-6'), 6.82 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5'), 6.35 (1H, s, H-6), 6.16 (1H, s, H-8), 5.29 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-1''), 4.38 (1H, s, H-1'''), 4.23 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz, H-1'''), 0.97 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-6''');  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz)  $\delta$ : 177.2 (C-4), 165.0 (C-7), 161.1 (C-5), 156.5 (C-9), 156.4 (C-2), 148.6 (C-4'), 144.8 (C-3'), 133.2 (C-3), 121.4 (C-1'), 121.0 (C-6'), 116.2 (C-2'), 115.2 (C-5'), 105.4 (C-1'''), 103.6 (C-10), 101.3 (C-1''), 101.0 (C-1'''), 98.8 (C-6), 93.6 (C-8), 81.1 (C-2''), 76.4 (C-5''), 76.0 (C-3'''), 75.8 (C-3''), 74.0 (C-2'''), 73.9 (C-2''), 70.9 (C-4'''), 70.2 (C-4'''), 69.7 (C-4''), 69.4 (C-3'''), 67.8 (C-5'''), 67.6 (C-6''), 65.5 (C-5'''), 17.8 (C-6'''). 以上数据与文献<sup>[10]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物5为 salu-enin。

**化合物 6** 黄色油状物 (DMSO);  $^1\text{H}$  NMR (DMSO, 500 MHz)  $\delta$ : 7.65 (1H, dd,  $J = 8.4, 2.1$  Hz, H-6'), 7.51 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2'), 6.87 (2H, s, H-2''' and H-6'''), 6.81 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-5'), 6.38 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-8), 6.17 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz, H-6), 5.34 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H-1''), 4.13 (1H, dd,  $J = 10.5, 7.5$  Hz, H-6''b), 4.04 (1H, dd,  $J = 10.5, 5.7$  Hz, H-6''a);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 125 MHz)  $\delta$ : 177.3 (C-4), 165.4 (COO), 164.1 (C-7), 161.1 (C-5), 156.4 (C-9), 156.3 (C-2), 148.4 (C-4'), 145.5 (C-3''' and C-5'''), 144.9 (C-3'), 138.6 (C-4'''), 133.4 (C-3), 121.9 (C-6'), 120.9 (C-1'), 119.0 (C-1'''), 116.0 (C-5'), 115.2 (C-2'), 108.6 (C-2''' and C-6'''), 103.7 (C-10), 102.2 (C-

1''), 98.7 (C-6), 93.5 (C-8), 72.8 (C-3''), 72.4 (C-5''), 71.0 (C-2''), 67.7 (C-4''), 62.0 (C-6''). 以上数据与文献<sup>[11]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物6为 quercetin 3-O-(6''-O-Galloyl)- $\beta$ -galactoside。

**化合物 7** 棕红色粉末 (氯仿);  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 7.23 (1H, brs, H-2), 7.21 (1H, brs, H-6), 7.05 (1H, brd,  $J = 8.1$  Hz, H-4'), 7.02 (1H, brs, H-2'), 6.91 (2H, brt,  $J = 8.7$  Hz, H-5 and H-3'), 6.10 ~ 5.91 (2H, m, H-8 and H-8'), 5.20 (2H, brt,  $J = 11.8$  Hz, H-9), 5.12 ~ 5.02 (2H, m, H-9'), 3.46 (2H, d,  $J = 6.3$  Hz, H-7), 3.35 (2H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-7');  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$ : 154.1 (C-4), 150.9 (C-2'), 137.9 (C-8'), 136.1 (C-8), 132.3 (C-5'), 131.2 (C-2), 130.3 (C-1), 129.7 (C-6'), 128.9 (C-4'), 128.7 (C-6), 127.8 (C-1'), 126.5 (C-3), 117.0 (C-9), 116.7 (C-3'), 115.7 (C-5), 115.6 (C-9'), 39.5 (C-7'), 35.3 (C-7)。以上数据与文献<sup>[12]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物7为 honokiol。

**化合物 8** 棕红色粉末 (氯仿);  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 7.13 (2H, br s, H-6, 6'), 7.08 (2H, br s, H-2, 2'), 6.98 (2H, br s, H-5, 5'), 5.96 ~ 5.99 (2H, m, H-8, 8'), 5.05 ~ 5.11 (4H, brt, H-9a, 9a', H-9b, 9b'), 3.36 (4H, d,  $J = 5.5$  Hz, H-7, 7');  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$ : 151.4 (C-2, 2'), 137.6 (C-8, 8'), 133.2 (C-5, 5'), 131.3 (C-6, 6'), 130.1 (C-4, 4'), 123.9 (C-1, 1'), 116.8 (C-3, 3'), 115.9 (C-9, 9'), 39.5 (C-7, 7')。以上数据与文献<sup>[13]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物8为 magnolol。

**化合物 9** 无色油状物 (氯仿);  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 6.43 (1H, s, H-2, 6), 3.88 (6H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.69 (2H, t,  $J = 6.4$  Hz, H-9), 2.65 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-7), 1.88 (2H, m, H-8);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$ : 147.0 (C-3, 5), 133.0 (C-4), 133.0 (C-1), 105.0 (C-2, 6), 62.3 (C-9), 56.3 (-OCH<sub>3</sub>), 34.5 (C-8), 32.3 (C-7)。以上数据与文献<sup>[14]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物9为 dihydroxyingenin。

**化合物 10** 无色油状物 (氯仿);  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 5.69 (1H, s, H-10), 4.33 (1H, m, H-5), 1.40-2.56 (4H, m, H-4a, H-4b, H-6a, H-6b), 1.78 (3H, s, CH<sub>3</sub> at C-8), 1.27 (3H, s, 2  $\times$  CH<sub>3</sub> at C-3), 1.47 (3H, s);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125

MHz)  $\delta$ : 182.8 (C-11), 172.11 (C-9), 112.9 (C-10), 87.0 (C-8), 66.8 (C-5), 47.3 (C-6), 45.7 (C-4), 36.0 (C-3), 30.7 (C-7), 27.0 (C-2), 26.5 (C-1)。以上数据与文献<sup>[15]</sup>报道基本一致,故鉴定化合物**10**为 loliolide。

#### 4 DPPH 法测试体外抗氧化活性

根据文献报道<sup>[16]</sup>,山茶叶具有一定的抗氧化活性。因此将分离得到的各化合物储存液配制成 10、

5、2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度的乙醇溶液,阳性对照为维生素 C。向待测样品加入 100  $\mu\text{mol}/\text{L}$  DPPH 的乙醇溶液,密封避光处理,移至摇床摇匀,10 min 后移至 37  $^{\circ}\text{C}$  环境下反应 15 min,在 517 nm 波长处测取最大吸收。按以下公式计算出各样品的自由基清除率,利用自由基清除率来评价各样品的抗氧化性功效。

对全部数据进行 T. Test 检验,结果见图 1。

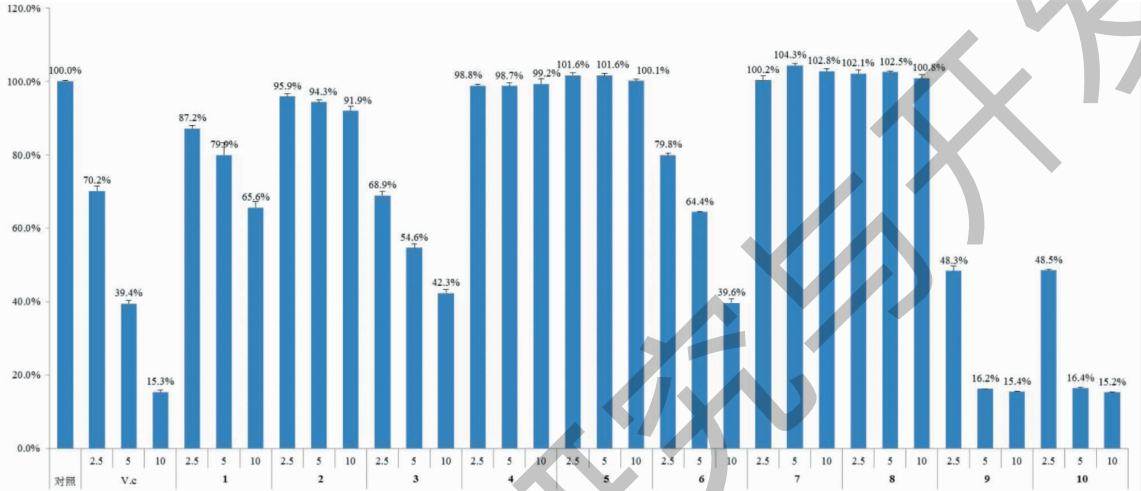


图 1 山茶叶子中单体化合物自由基清除率

Fig. 1 Free radical scavenging rate of compounds 1-10

与对照组相比化合物**1**、**3**、**6**、**9**、**10**均表现出不同水平的抗氧化性功效。其中:化合物**3**在 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度下表现出与相同浓度的维生素 C 相似的抗氧化能力;化合物**9**和**10**在 5 和 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度条件下,具有相似的自由基清除率,表现出非常活跃的抗氧化能力。

#### 5 结论

天然抗氧化剂一直是近年来的研究热点,比如山茶花由于其良好的抗氧化活性,已经被广泛应用于国内外的功效护肤品中。与山茶花相比,针对山茶叶活性的研究不多。我们的研究发现了山茶叶中具有自由基清除作用的物质(化合物**1**、**3**、**6**、**9**、**10**),提示了其在开发天然抗氧化剂方面有较好的前景。

#### 参考文献

- 1 Onodera K, Hanashiro K, Yasumoto T. Camellianoside, a novel antioxidant glycoside from the leaves of *Camellia japonica* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2006, 70: 1995-1998.
- 2 Thao NT, Hung TM, Cuong TD, et al. 28-Nor-oleanane-type triterpene saponins from *Camellia japonica* and their inhibito-

ry activity on LPS-induced NO production in macrophage RAW264.7 cells [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20: 7435-7439.

- 3 Thao NT, Hung YM, Mikyoung L, et al. Triterpenoids from *Camellia japonica* and their cytotoxic activity. Chem Pharm Bull [J], 2010, 58: 121-124.
- 4 Fujimoto K, Nakamura S, Nakashima S, et al. Medicinal flowers. XXXV. Nor-oleanane-type and acylated oleanane-type triterpene saponins from the flower buds of Chinese *Camellia japonica* and their inhibitory effects on melanogenesis [J]. Chem Pharm Bull, 2012, 60: 1188-1194.
- 5 Nakamura S, Moriura T, Park S, et al. Melanogenesis inhibitory and fibroblast proliferation accelerating effects of noroleanane- and oleanane-type triterpene oligoglycosides from the flower buds of *Camellia japonica* [J]. J Nat Prod, 2012, 75: 1425-1430.
- 6 Yang J, Ha TK, Dhodary B, et al. Oleanane triterpenes from the flowers of *Camellia japonica* inhibit porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) replication [J]. J Med Chem, 2015, 58: 1268-1280.