

油橄榄叶中三萜类成分的提取、分离与结构鉴定^Δ

王晓飞^{1*}, 李辉^{1,2}, 刘铭佩¹, 焦海胜^{1#}(1.兰州大学第二医院药学部, 兰州 730030; 2.兰州大学药学院, 兰州 730000)

中图分类号 R284.1; R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)19-2639-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.19.13

摘要 目的:提取、分离油橄榄叶中的三萜类成分并进行结构鉴定,为油橄榄叶的开发利用提供参考。方法:采用硅胶柱色谱等方法对油橄榄叶乙醇提取物的乙酸乙酯部位进行洗脱、柱层析、重结晶,并通过核磁共振等技术对分离出的化合物进行结构鉴定。结果:从油橄榄叶乙酸乙酯部位分离得到6个化合物,分别鉴定为 β -香树素、高根二醇、2 α , 3 β -二羟基乌苏烷-12-烯-28-酸(化合物3)、齐墩果酸、Camaldulenic acid(化合物5)、3 α -山楂酸。其中,化合物3和化合物5首次从油橄榄叶中分离得到。结论:本研究为油橄榄叶的进一步开发和合理应用提供了试验基础。

关键词 油橄榄叶;三萜类成分;乙醇提取物;乙酸乙酯部位;分离;结构鉴定

Extraction, Isolation and Structural Identification of Triterpenes from the Leaves of *Olea europaea*

WANG Xiaofei¹, LI Hui^{1,2}, LIU Mingpei¹, JIAO Haisheng¹(1.Dept. of Pharmacy, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China; 2.College of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To extract, isolate the triterpenes from the leaves of *Olea europaea*, then conduct structural identification, and provide reference for development and application of the leaves of *O. europaea*. METHODS: Silica gel column and other methods were used for elution, column chromatography and recrystallization of the ethyl acetate part of ethanol extracts from the leaves of *Olea europaea*. The structures of separated compounds were identified by nuclear magnetic resonance. RESULTS: 6 compounds were isolated from ethyl acetate part of the leaves of *O. europaea*, identified as β -amyrin, erythrodiol, 2 α , 3 β -dihydroxyl-12-ursen-28-acid (compound 3), oleanolic acid, camaldulenic acid (compound 5), 3 α -maslinic acid. Compound 3 and compound 5 were isolated from the leaves of *O. europaea* for the first time. CONCLUSIONS: The study has provided test basis for the further development and reasonable application of the leaves of *O. europaea*.

KEYWORDS Leaves of *Olea europaea*; Triterpenes; Ethanol extracts; Ethyl acetate part; Isolation; Structural identification

油橄榄(*Olea europaea* L.)为木犀科木犀榄属常绿乔木,主要分布于地中海国家,希腊、意大利、突尼斯、西班牙为其集中产地。自20世纪60年代起,油橄榄开始在我国引种,甘肃省陇南市是我国最大的油橄榄种植基地之一,而每年因修剪产生大量的废弃油橄榄叶,造成了严重的资源浪费。现代药理研究表明,油橄榄叶具有抗胆固醇、降血糖、降血压、抗氧化等多种药理活性^[1]。目前油橄榄叶化学成分研究多集中于抗氧化活性成分黄酮类^[2]和环烯醚萜类化合物^[3],而三萜类成分的研究报道较少。为了充分利用甘肃省丰富的油橄榄叶资源,本试验研究了从油橄榄叶乙醇提取物中乙酸乙酯部位分离出的成分,从中分离得到6个化合物,并通过核磁共振技术(NMR)鉴定了其结构,为科学合理地利用油橄榄叶资源提供了科学依据,现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

Inova-400 FT-NMR 仪(美国 Varian 公司); ME215S

^Δ 基金项目:兰州大学第二医院博士科研基金(No.Ynbsky-jj2015-1-27)

* 主管药师,博士。研究方向:天然产物分析与分离。电话:0931-8942491。E-mail:wxf_2511@163.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:药物新剂型、新技术。电话:0931-8942571。E-mail:ldeyjh@sohu.com

吉尼斯系列电子分析天平(德国赛多利斯仪器有限公司);HX2002T 电子天平(慈溪市田东衡器厂)。

1.2 药材、硅胶与试剂

油橄榄叶于2011年9月采自甘肃省陇南市武都区,经中国科学院兰州化学物理研究所戚欢阳副研究员鉴定为木犀科木犀榄属植物油橄榄的叶;柱层析硅胶(200~300目)和薄层色谱(TLC)层析硅胶(GF254)均购自青岛海洋化工厂;石油醚(60~90℃)、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、丙酮、甲醇、95%乙醇均为分析纯,购自天津市化学试剂一厂。

2 提取与分离

取油橄榄叶2.5 kg,剪碎,加入95%乙醇25 L,加热回流提取3次,每次2 h。合并提取液,减压浓缩至无醇味,加入适量的水混悬,用石油醚萃取6次脱脂,然后用乙酸乙酯萃取6次,合并萃取液并减压浓缩,得乙酸乙酯部位300 g。将乙酸乙酯部位加入乙酸乙酯溶解,用300 g 硅胶拌样,干法上样,依次用体积比分别为100:1、100:3、100:5的氯仿-甲醇进行梯度洗脱。每500 mL 收集流分1次并编号,其中氯仿-甲醇(100:5)洗脱的流分59~95经TLC 检识后合并具有相同斑点[颜色与比移值(R_f)均相同]的组分,将流分59~66、67~73、74~82、83~95合并,分别得到4个部分(A、B、C、D)。A部分以石油醚-丙酮(9:1)为洗脱液经硅胶柱层析,每10 mL 收集流分1次

并编号, TLC 检识后合并具有相同斑点的流分 10~21、25~42, 以上两部分经重结晶后, 分别得到化合物 1(20 mg) 和化合物 2(16 mg)。D 部分以石油醚-丙酮(8:2)为洗脱液经硅胶柱层析, 每 10 mL 收集流分 1 次并编号, TLC 检识后合并具有相同斑点(颜色与 R_f 均相同)的流分 6~11、13~22、27~32、36~44, 以上各部分经重结晶后, 分别得到化合物 3(25 mg)、化合物 4(45 mg)、化合物 5(13 mg) 和化合物 6(30 mg)。

3 结构鉴定

采用 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 $^1\text{H-NMR}$ 对化合物 1~6 的结构进行表征, 确定其结构。

3.1 化合物 1

化合物 1 为无色针状结晶(结晶用试剂为乙酸乙酯)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) 图谱中峰信号 δ 145.2 (C-13)、121.7(C-12) 与 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) 图谱中双键质子信号 δ 5.16(1H, s, H-12) 的存在提示该化合物为 Δ^{12} -齐墩果烷型的三萜类化合物。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) 图谱中峰信号 δ 79.0(C-3) 和 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) 图谱中峰信号 δ 3.29(1H, m, H-3) 的存在提示该化合物中含有 1 个羟基。此外, 在 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) 图谱中可以观察到 8 个角甲基单峰 [δ 1.23(3H, s), 1.11(3H, s), 0.98(3H, s), 0.94(3H, s), 0.91(3H, s), 0.85(3H, s), 0.81(3H, s), 0.77(3H, s)], 表明该羟基不与角甲基相连。化合物 1 的 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据见表 1(注: ppm 表示百万分之一)。

表 1 中化合物 1 光谱数据与文献[4]报道的数据基本一致, 故确定化合物 1 为 β -香树素。

3.2 化合物 2

化合物 2 为无色针状结晶(结晶用试剂为乙酸乙酯)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) 图谱中峰信号 δ 122.4 (C-12)、144.2(C-13) 与 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) 图谱中双键质子信号 δ 5.19(1H, t, $J=3.2$ Hz, H-12) 的存在表明该化合物为 Δ^{12} -齐墩果烷型的三萜类化合物。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) 图谱中信号峰 δ 79.0(C-3)、69.7(C-28) 与 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) 图谱中峰信号 δ 3.22(1H, m, H-3)、3.55(1H, d, $J=12.0$ Hz, H-28)、3.21(1H, d, $J=12.0$ Hz, H-28) 的存在, 提示该化合物中含有 2 个羟基。此外, 在 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) 图谱的高场区还可以观察到 7 个角甲基单峰 [δ 0.79(3H, s), 0.88(3H, s), 0.89(3H, s), 0.93(3H, s), 0.94(3H, s), 0.99(3H, s), 1.17(3H, s)], 表明有 1 个角甲基与羟基相连。化合物 2 的 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据见表 1。表 1 中化合物 2 的光谱数据与文献[5]报道的数据基本一致, 故确定化合物 2 为高根二醇。

3.3 化合物 3

化合物 3 为无色针状结晶(结晶用试剂为乙酸乙酯)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) 图谱中峰信号 δ 178.3 (C-28) 的存在, 提示该化合物中含有羧基。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) 图谱中峰信号 δ 138.3(C-13)、124.8

表 1 化合物 1~6 的 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) 数据 (ppm)

Tab 1 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) data of compounds 1-6(ppm)

| C 位 | 化合物 1 | 化合物 2 | 化合物 3 | 化合物 4 | 化合物 5 | 化合物 6 |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 38.6 | 38.5 | 45.4 | 37.1 | 46.2 | 41.5 |
| 2 | 26.9 | 27.2 | 67.1 | 27.2 | 67.9 | 65.2 |
| 3 | 79.0 | 78.9 | 82.3 | 79.0 | 83.0 | 78.1 |
| 4 | 38.8 | 38.7 | 38.9 | 38.7 | 39.0 | 37.9 |
| 5 | 55.2 | 55.1 | 54.7 | 55.2 | 54.4 | 47.8 |
| 6 | 18.4 | 18.3 | 18.0 | 18.3 | 18.2 | 17.7 |
| 7 | 32.6 | 32.5 | 32.6 | 32.6 | 32.2 | 32.4 |
| 8 | 39.8 | 39.7 | 39.5 | 39.2 | 40.2 | 39.2 |
| 9 | 47.6 | 47.5 | 46.8 | 47.6 | 54.9 | 47.2 |
| 10 | 36.9 | 36.9 | 37.5 | 37.1 | 37.7 | 37.8 |
| 11 | 23.5 | 23.5 | 17.1 | 22.9 | 126.4 | 32.1 |
| 12 | 121.7 | 122.4 | 124.8 | 122.6 | 125.5 | 121.9 |
| 13 | 145.2 | 144.2 | 138.3 | 143.6 | 136.0 | 143.9 |
| 14 | 41.7 | 41.7 | 41.7 | 41.6 | 42.0 | 41.5 |
| 15 | 28.4 | 25.5 | 28.8 | 27.7 | 24.9 | 27.3 |
| 16 | 26.1 | 21.9 | 23.8 | 23.4 | 35.4 | 23.1 |
| 17 | 32.5 | 36.9 | 47.1 | 46.5 | 47.8 | 45.8 |
| 18 | 47.2 | 42.3 | 52.4 | 41.0 | 132.4 | 41.1 |
| 19 | 46.8 | 46.4 | 39.1 | 45.9 | 40.2 | 45.8 |
| 20 | 31.1 | 31.0 | 38.9 | 30.7 | 30.7 | 30.2 |
| 21 | 34.7 | 34.1 | 30.2 | 33.8 | 32.2 | 33.4 |
| 22 | 37.1 | 30.9 | 36.3 | 32.6 | 32.5 | 32.3 |
| 23 | 28.1 | 28.1 | 27.5 | 28.1 | 28.0 | 28.8 |
| 24 | 15.5 | 15.5 | 16.4 | 15.3 | 16.2 | 21.2 |
| 25 | 15.6 | 15.6 | 17.0 | 15.3 | 19.3 | 16.6 |
| 26 | 16.8 | 16.7 | 17.2 | 17.1 | 16.0 | 17.7 |
| 27 | 26.0 | 25.9 | 23.9 | 25.9 | 18.8 | 25.3 |
| 28 | 27.2 | 69.7 | 178.3 | 182.9 | 176.9 | 178.2 |
| 29 | 33.3 | 33.2 | 23.3 | 33.1 | 31.7 | 32.4 |
| 30 | 23.7 | 23.6 | 21.1 | 23.6 | 23.5 | 22.9 |

(C-12) 与 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) 图谱中双键质子信号 δ 5.12(1H, m, H-12) 的存在表明该化合物为 Δ^{12} -乌苏烷型三萜类化合物。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) 图谱中峰信号 δ 67.1(C-2)、82.3(C-3) 与 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) 图谱中峰信号 δ 3.41(1H, H-2 β)、3.15(1H, m, H-3 α) 的存在表明该化合物中含有 2 个羟基。此外, 在 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) 图谱的高场区还可以观察到 5 个甲基单峰 [δ 0.69(3H, s), 0.73(3H, s), 0.86(3H, s), 0.91(3H, s), 1.08(3H, s)] 和 2 个甲基双峰 [δ 0.80(3H, d, $J=5.2$ Hz), 1.07(3H, d, $J=5.7$ Hz)], 进一步证实了该化合物为 Δ^{12} -乌苏烷型三萜类化合物。化合物 3 的 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据见表 1。表 1 中化合物 3 的光谱数据与文献[6]报道的数据基本一致, 故确定化合物 3 为 $2\alpha, 3\beta$ -二羟基乌苏烷-12-烯-28-酸。

3.4 化合物 4

化合物 4 为无色针状结晶(结晶用试剂为丙酮)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) 图谱中峰信号 δ 182.9(C-28) 的存在, 提示该化合物中含有羧基。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) 图谱中峰信号 δ 122.6(C-12)、143.6(C-13) 与 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) 图谱中双键质子信号 δ 5.27

(1H, m, H-12)的存在表明该化合物为 Δ^{12} -齐墩果烷型的三萜类化合物。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz)图谱中峰信号 δ 79.0(C-3)与 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)图谱中峰信号 δ 3.20(1H, m, H-3)的存在提示该化合物中含有1个羟基。此外,该化合物的 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)图谱在高场区还可以观察到7个甲基单峰[δ 0.73(3H, s), 0.75(3H, s), 0.88(3H, s), 0.89(3H, s), 0.90(3H, s), 0.96(3H, s), 1.11(3H, s)],提示该化合物28位为羧基。化合物4的 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据见表1。表1中化合物4的光谱数据与文献[7]报道的数据基本一致,故确定化合物4为齐墩果酸。

3.5 化合物5

化合物5为无色针状结晶(结晶用试剂为丙酮)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz)图谱中峰信号 δ 176.9(C-28)的存在表明该化合物中含有羧基。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz)图谱中峰信号 δ 136.0(C-13)、132.4(C-18)、126.4(C-11)、125.5(C-12)与 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)图谱中峰信号 δ 6.47(1H, dd, $J=10.8, 4$ Hz, H-11)、5.66(1H, d, $J=10.8$ Hz, H-12)的存在表明该化合物为 $\Delta^{11,13}$ -齐墩果烷型三萜类化合物。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz)图谱中峰信号 δ 83.0(C-3)、67.9(C-2)与 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)图谱中峰信号 δ 2.92(1H, d, $J=9.2$ Hz, H-3)、3.63(1H, m, H-2)的存在表明该化合物中含有2个羟基。在 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)图谱的高场区有7个甲基单峰[δ 0.74(3H, s), 0.74(3H, s), 0.79(3H, s), 0.91(3H, s), 0.96(3H, s), 0.97(3H, s), 0.99(3H, s)],表明该化合物28位为羧基。化合物5的 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据见表1。表1中化合物5的光谱数据与文献[8]报道的数据基本一致,故确定化合物5为Camaldulenic acid。

3.6 化合物6

化合物6为无色针状结晶(结晶用试剂为丙酮)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz)图谱中峰信号 δ 178.2(C-28)的存在表明该化合物含有1个羧基。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz)图谱中峰信号 δ 121.9(C-12)、143.9(C-13)与 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)图谱中双键质子信号 δ 5.21(1H, m, H-12)的存在表明该化合物为 Δ^{12} -齐墩果烷型的三萜类化合物。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz)图谱中峰信号 δ 78.1(C-3)、65.2(C-2)与 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)图谱中峰信号 δ 3.89(1H, m, H-3)、4.36(1H, m, H-2)的存在表明该化合物含有2个羟基且3位羟基的构型为 α 。此外,在 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)图谱高场区有7个甲基单峰[δ 0.76(3H, s), 0.82(3H, s), 0.87(3H, s), 0.89(3H, s), 0.94(3H, s), 0.96(3H, s), 1.14(3H, s)],表明该化合物28位为羧基。化合物6的 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据见表1。表1中化合物6的光谱数据与文献[9]报道的数据基本一致,故确定化合物6为 3α -山楂酸。

4 讨论

本研究中的油橄榄系木犀科木犀榄属常绿乔木,与通常所说的橄榄属橄榄科橄榄属乔木有根本的区别。油橄榄原产于小亚细亚(现在中东叙利亚一带),经希腊

扩展到地中海沿岸地区及周边国家,其栽培已有4 000多年的历史。而橄榄原产于我国,主要分布于两广、闽、台、川南、浙等地,栽培品种主要有白榄和乌榄2种。

研究表明,油橄榄中的化学成分主要为木质素类、黄酮类、香豆精类、环烯醚萜类及咖啡酰苯乙醇苷类^[1]。笔者前期已对油橄榄叶中中等极性的化合物(黄酮类和环烯醚萜类)进行了研究^[2-3],初步确定了其抗氧化活性成分。为了拓展油橄榄叶的应用范围,笔者对其极性较低的化合物进行了进一步研究,从油橄榄叶中分离得到 β -香树素、高根二醇、 $2\alpha, 3\beta$ -二羟基乌苏烷-12-烯-28-酸、齐墩果酸、Camaldulenic acid、 3α -山楂酸等6个化合物。研究报道油橄榄叶中齐墩果酸和 3α -山楂酸含量较高,分别为1.56%和0.73%^[10-11],以上2种成分均属于三环三萜类化合物。大量研究表明,该类化合物具有广泛的药理作用和重要的生物活性,其在抗炎、护肝、抗肿瘤、抗人类免疫缺陷病毒以及机体免疫调节等方面已经显现出令人关注的药理特性^[12-14]。其中,化合物3和化合物5首次从油橄榄叶中分离得到。本试验分离得到的三萜类化合物的其他生物活性则有待进一步研究。

参考文献

- [1] 吉腾飞,冯孝章.木犀榄属植物化学成分和药理活性研究概况[J].天然产物研究与开发,2004,16(4):345-352.
- [2] 王晓飞,李晨,郑媛媛,等.油橄榄叶多酚类成分研究[J].中草药,2011,42(5):848-851.
- [3] Wang XF, Li C, Shi YP, et al. Two new secoiridoid glycosides from the leaves of *Olea europaea* L. [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11(11):940-944.
- [4] 雷军,肖云川,刘森,等.糯米藤化学成分研究[J].中成药,2013,35(7):1489-1493.
- [5] 冯子明,李福双,徐建福,等.白背叶根化学成分研究[J].中草药,2012,43(8):1489-1491.
- [6] 李霁昕,贾忠建.甘青青兰化学成分的研究[J].西北植物学报,2006,26(1):188-192.
- [7] 杨秀伟,赵静.蓝萼香茶菜化学成分的研究[J].天然产物研究与开发,2003,15(6):490-493.
- [8] 王东,崔征,董焱,等.榆树根皮的化学成分: II [J].沈阳药科大学学报,2006,23(12):764-767,801.
- [9] 谭俊杰,谭昌恒,陈伊蕾,等.肾茶化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2009,20(21):592,608-611.
- [10] 谢普军,黄立新,张彩虹,等.佛奥油橄榄叶营养成分测定与分析[J].林产化学与工业,2014,34(4):97-101.
- [11] 焦志敏,陈龙胜,许舒雯,等. HPLC测定油橄榄不同部位山楂酸的含量[J].林产化学与工业,2010,30(2):23-26.
- [12] 程晓华,熊玉卿.三环三萜皂苷的药理作用研究进展[J].中草药,2007,38(5):792-795.
- [13] 孟艳秋,薛菁,赵凤鑫,等.齐墩果酸衍生物的合成及抗肿瘤活性研究[J].化学通报,2013,76(3):265-269.
- [14] 王霆,杨兴海,韩帅,等.山楂酸对人肺细胞增殖与迁移及其诱导破骨细胞分化的调控作用机制研究[J].中国骨与关节杂志,2015,4(9):706-712.

(收稿日期:2016-10-22 修回日期:2017-01-18)

(编辑:刘萍)