

鸭舌草中抗氧化活性物质的分离与鉴定*

周勇军¹ 徐效华² 乔风云¹ 张建萍¹ 余柳青^{1**}(¹ 中国水稻研究所水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310006; ² 南开大学元素有机化学国家重点实验室, 天津 300071)

摘要 采用溶剂萃取法将鸭舌草 75% 乙醇提取物浸膏分成 4 个不同组分, 并用碘量法测定其抗氧化活性. 结果表明, 高极性组分正丁醇相具有最强的抗氧化活性, 与天然抗氧化剂茶多酚和化学合成抗氧化剂 BHT 的抗氧化活性相当, 显著高于对照. 利用柱层析技术对具有高抗氧化活性组分正丁醇相进一步分离纯化, 并确定为豆甾醇葡萄糖甙. 以 BHT 为对照对羟自由基进行清除试验, 结果表明, 与对照抗氧化剂 BHT 相比, 它们对羟自由基具有更高的清除率.

关键词 鸭舌草 抗氧化活性 分离 鉴定 食品安全

文章编号 1001-9332(2007)03-0509-05 **中图分类号** Q949.9; S451 **文献标识码** A

Isolation and identification of an antioxidant from *Monochoria vaginalis*. ZHOU Yong-jun¹, XU Xiao-hua², QIAO Feng-yun¹, ZHANG Jian-ping¹, YU Liu-qing¹(¹State Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; ²State Key Laboratory of Elemento-organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2007, 18(3): 509-513.

Abstract: With solvent extraction, a total of four fractions were separated from 75% alcohol extract of *Monochoria vaginalis*, and their antioxidative activities were measured by iodine method. The results showed that among the fractions, n-butanol fraction exhibited the highest antioxidative activity, which was not only significantly higher than CK (water), but also equivalent to the natural antioxidant tea polyphenols and synthetic antioxidant butylated hydroxyl toluene (BHT). A compound was isolated from the n-butanol fraction by using column chromatography, and identified as stigmasteryl 3-O-β-D-glucopyranoside. Its antioxidative activity estimated by the determination of the percentage of scavenged free radicals indicated that this compound exhibited a higher activity than BHT in scavenging free radicals.

Key words: *Monochoria vaginalis*; antioxidative activity; isolation; identification; food safety.

1 引言

目前常用的抗氧化剂以化学合成为多, 如二丁基羟基甲苯(BHT)、丁基羟基茴香醚(BHA)、没食子酸内酯(PG)等, 但这些化学物质对人体肝、肺等器官均有不良影响. 而从天然植物中提取的抗氧化剂对人类健康无不良影响^[1,9,21,24]. 天然抗氧化物质主要为酚类或多酚化合物, 如生育酚、类黄酮类化合物以及肉桂酸、磷脂、绿原酸、咖啡酸和其他有机酸的衍生物等. 其中黄酮类化合物具有很强的清除氧自由基的能力; 植酸类物质如柠檬酸和多聚磷酸等, 具有极强的螯合金属的能力, 可减少金属离子所催化的氧化反应; 含氮化合物如咖啡碱、咖啡因以及分

子中含有-SH基的蛋白质及其衍生物类、多肽、氨基酸等也具有较高的抗氧化活性.

目前已开发利用的植物源抗氧化剂主要用于医药、饮料、果蔬和香料等. 如从大豆中提取的黄酮类物质, 可显著地提高大鼠抗氧化酶活性^[12], 从茶叶中提取的茶多酚具有降血脂、降血糖、抗动脉粥样硬化、抗病毒以及抗菌等保健和药理作用^[3,13], 但大豆和茶叶等经济作物作为抗氧化剂的原料, 成本较高. 而杂草资源丰富, 并且含有丰富的功能物质^[2,7], 如能从杂草植物中提取抗氧化剂, 可以降低成本, 获得较高的经济效益. 中国水稻研究所对 12 种稻田杂草的抗氧化作用进行了评价, 确定鸭舌草(*Monochoria vaginalis*)乙醇提取物的抗氧化作用显著^[15]. 鸭舌草是重要的稻田杂草, 广泛分布于我国长江中下游地区, 资源量巨大. 本研究测定了鸭舌草乙醇提取物不

* 国家自然科学基金资助项目(30571231).

** 通讯作者. E-mail: liuquy53@yahoo.com.cn

2006-02-13 收稿, 2006-12-26 接受.

同溶剂萃取相的抗氧化活性,分离鉴定了抗氧化活性化合物分子结构,为探明鸭舌草的抗氧化作用机理提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 供试材料

鸭舌草采自浙江省富阳市,采集后用自来水冲洗,在45℃下烘烤2d,研磨成粉末^[24]。茶多酚80%粉剂,由中国农业科学院茶叶研究所提供。二叔丁基对甲酚(BHT),分析纯。大豆油,市售。各种试剂为分析纯。

2.2 试验方法

2.2.1 不同溶剂提取物的抗氧化活性测定 室温下用75%的乙醇将烘干的鸭舌草粉末浸提3次,每次24h,将浸提液合并,并在旋转蒸发仪上蒸干得鸭舌草的75%乙醇浸提物,溶于水后,先后用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇按1:1萃取,每种溶剂萃取3次,同一种溶剂的3次萃取液合并,在旋转蒸发仪上分别浓缩得到4种溶剂萃取相。密封,并于4℃冷藏备用^[6,18]。

抗氧化活性测定采用碘量法^[14,22-23]:称取试样为2g含萃取物0.08%和0.12%的大豆油,置于250ml碘量瓶中,加30ml三氯甲烷-冰乙酸混合液,使油样完全溶解。加入1.00ml饱和碘化钾溶液,紧密塞好瓶塞,并轻轻振摇0.5min,然后在暗处放置3min。取出加100ml水,摇匀,立即用0.002mol·L⁻¹硫代硫酸钠标准溶液滴定,至淡黄色时,加1ml淀粉指示液,继续滴定至淡蓝色消失为止。以含0.02%BHT的大豆油作为化学合成的抗氧化剂对照,以含茶多酚0.02%的大豆油作为天然抗氧化剂对照,并设水为空白对照。每2d定期测定豆油样品的过氧化值(POV),3次重复,结果取平均值。计算公式如下:

$$X_1 = (V_1 - V_2) \times N \times 1000 \times M^{-1}$$

式中: X_1 为样品的过氧化值(mol·kg⁻¹); V_1 为样品消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积(ml); V_2 为对照消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积(ml); N 为硫代硫酸钠标准溶液的当量浓度; M 为样品质量(g)。以其过氧化值升高快慢来衡量抗氧化活性的强弱。

2.2.2 抗氧化活性物质的分离与鉴定 通过对鸭舌草不同萃取组分的抗氧化活性比较,将具有高抗氧化活性组分的正丁醇相300g拌等量200~300目硅胶晾干,在研钵中研磨成均匀粉末后,在硅胶柱上用乙酸乙酯:乙醇进行梯度洗脱,洗脱梯度为:50:0,

50:1,20:1,5:1,2:1,1:1,2:1,5:1,20:1,50:1,50:0,所得流分在TLC监测下相同部分合并。再对分离较好的流分进行多次柱层析分离,后得到一个白色固体粉末,在薄层板上为一个点。对该分离白色固体进行了ESI-MS,¹H NMR,¹³C NMR的测定,但分析谱图显示该物质结构复杂。于是对该固体做了水解反应,在盐酸甲醇溶液中水解,再对水解产物进行分离,并对所得到的晶体之一进行了结构鉴定,结合对固体所测得的ESI-MS,¹H NMR,¹³C NMR图谱反推分离固体的分子结构。

2.2.3 纯化合物的抗氧化活性测定 将分离所得化合物以0.02%的浓度溶解于95%的乙醇溶液中,记作a溶液;同时配制同浓度的BHT 95%乙醇溶液作为对照,记作b溶液,装瓶备用。取4支10ml(下同)比色管,分别依次加入0.3ml的7.5mmol·L⁻¹硫酸亚铁溶液、0.3ml的7.5mmol·L⁻¹邻二氮菲溶液、1mlpH=7.47的Tris-HCl缓冲液,在2、3和4号比色管中各加入0.2ml的7.5mmol·L⁻¹H₂O₂,然后在3和4号比色管中分别加入0.3ml的a、b溶液,用二次纯化水定容至刻度,在37℃水浴中反应1h,在450~550nm波长范围内扫描,得最大吸收波长为546nm,并在此波长下测其吸光度,结合以下公式^[16,19]:

$$E = (A_{\text{样品}} - A_{\text{损}}) \times (A_{\text{未损}} - A_{\text{损}})^{-1} \times 100\%$$

式中, E 为清除率, $A_{\text{样品}}$ 、 $A_{\text{未损}}$ 及 $A_{\text{损}}$ 分别为加入化合物的羟自由基体系、不加H₂O₂及加入H₂O₂的吸光度值。

计算清除率以评价它们的抗氧化活性。

2.3 数据分析

所有数据用DPS软件^[20]中的Duncan法进行方差分析和差异显著性检验。

3 结果与分析

3.1 不同溶剂提取物的抗氧化活性

由表1可以看出,在加有石油醚相、二氯甲烷相以及乙酸乙酯相的大豆油的两个浓度下,不同处理时间的过氧化值都显著高于加有茶多酚和BHT的大豆油的过氧化值。且加有正丁醇相的大豆油在2d、4d、6d和8d的过氧化值升高最慢,与加有茶多酚和BHT的大豆油的过氧化值变化趋势相近,而加其他几种溶剂萃取相的大豆油及对照的过氧化值升高明显。这说明正丁醇相对大豆油具有最高的抗氧化活性,且与茶多酚和BHT对大豆油的抗氧化活性相近。

表 1 鸭舌草粗组分提取物的抗氧化活性*

Tab. 1 Antioxidation activity of extracts from *M. vaginalis*

序号 No.	溶剂 Solvent	浓度 Concentration (%)	过氧化值 Peroxide value (%)			
			2 d	4 d	6 d	8 d
1	石油醚 Petroleum ether	0.08	12.6474ab	24.3334a	18.2264b	33.3088d
2	石油醚 Petroleum ether	0.12	13.5851a	27.7770a	21.9143a	40.5505c
3	二氯甲烷 CH ₂ Cl ₂	0.08	13.0650a	17.3360b	16.4692c	29.8494e
4	二氯甲烷 CH ₂ Cl ₂	0.12	13.2148a	19.0302b	16.3195c	28.0219e
5	乙酸乙酯 Ethyl acetate	0.08	13.2069a	10.8665cd	19.3927b	32.0795d
6	乙酸乙酯 Ethyl acetate	0.12	11.9224bc	12.1194c	18.8962b	53.5682b
7	正丁醇 n-butanol	0.08	9.3536e	9.9997cd	11.3078d	12.2619f
8	正丁醇 n-butanol	0.12	9.5033e	10.5671cd	11.8515d	12.3480f
9	茶多酚 Tea Polyphenols	0.02	11.3708cd	9.7397cd	11.2054d	11.8121f
10	二叔丁基对甲酚 BHT	0.02	11.1502cd	10.7562cd	11.0241d	12.4819f
11	对照 CK	0	10.3307de	18.8253b	27.6352a	52.2208a

* 同列不同字母表示在 5% 水平差异显著 Values within the same column followed by different letters meant significant difference at 0.05 level by Duncan's multiple range test.

3.2 鸭舌草中的抗氧化活性物质

经分离得到 1 个白色固体粉末. 它在多种溶剂体系条件下的高效 TLC 都显示为一个点, 所以对其进行了 ESI-MS, ¹H NMR, ¹³C NMR 的测定. 但分析图谱结果显示该物质结构复杂. 于是对该固体做了水解反应, 对水解产物分离得到了一个白色针状晶体, mp 167 °C ~ 168 °C. 该晶体遇磷钼酸显蓝色, 易溶于氯仿和乙酸乙酯等溶剂. 其 EI-MS: m/z394 (M-18), m/z379 (M-18-15), m/z255, m/z207, m/z159, 说明该化合物分子量可能为 412. m/z255, m/z207, m/z159 这些典型的碎片峰暗示该化合物可能含有甾体骨架. 其 ¹H NMR: δH 4.9 ~ 5.5 之间出现典型的烯氢信号, δH 5.35 (1H, d, j = 4.8) 和 δH 5.07 (2H, dddd, J = 15, 8.4), 暗示分子中存在三取代烯氢和反式双取代烯氢; δH 3.52 (1H, m) 是连羟基的 H, 多重峰暗示该骨架可能是甾体而非三萜, 因为三萜在这一位置的 H 裂分相对简单; 在高场区的包峰里可以观察到 4 个仲位甲基, 分别为 δH 0.7 (3H, d), δH 0.8 (3H, d) 和 δH 1.0 (6H, d), 伯位甲基不显示. ¹³C NMR: δC 140.76, δC 138.33, δC 129.28, δC 121.72 显示了分子存在 2 个双键, 这与氢谱相符; δC 71.81 为连氧碳. DEPT 图谱显示有 10 个 -CH-: 138.57, 129.45, 121.94, 72.04, 57.06, 56.14, 51.46, 50.33, 40.76, 32.10; 8 个 -CH₂-: 42.49, 39.88, 37.47, 31.85, 29.18, 25.65, 24.59, 21.30; 5 个 -CH₃: 21.45, 19.63, 19.21, 12.52, 12.27; 3 个 -C-: 140.76, 42.22, 36.52. 通过分析并参考相关文献^[8]可以推测该化合物为豆甾醇, 分子量为 412, 分子式为 C₂₉H₄₈O. 整个碳谱中重叠了 3 个碳信号, 分别为 1 个甲基、1 个亚甲基和 1 个次甲基. 可以推导其结构式如图 1.

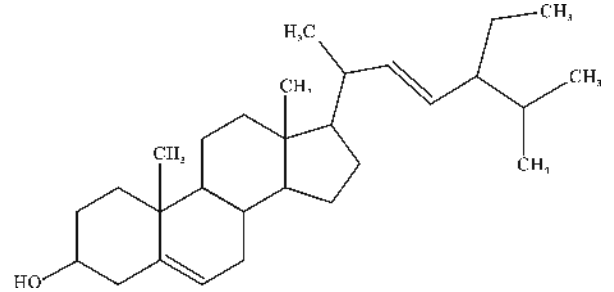


图 1 豆甾醇

Fig. 1 Stigmasterol.

水解产物中含有豆甾醇, 说明固体化合物中含有豆甾醇的甙元, 返回到对固体化合物的分析, ESI-MS 碳谱显示了非常明显的信号峰: m/z 619 (M-1 + 2Na). 这指出了该化合物分子量可能为 574. 从氢谱中可以看出, 与豆甾醇的氢谱相比较, 该固体化合物除了在 δH 4.22 (1H, d, J = 7.8) 和 δH 2.8 ~ 3.6 (糖环质子) 处多出信号外, 其它区域相同. 碳谱中 δC 100.77, δC 79.93, δC 76.65, δC 73.33, δC 69.95 和 δC 60.96 的出现说明该化合物中存在 1 个葡萄糖残基, 其它部分与豆甾醇相似. 这说明该组分的甙元是豆甾醇. 从分子量之差 162 (574 - 412) 也可以验证这一推断. δH 4.22 (1H, d, J = 7.8), 异头碳质子耦合常数为 7.8, 说明糖苷键为 β 键, 结合相关文献^[10-11]推测, 该化合物为豆甾醇葡萄糖甙. 其结构式如图 2 所示.

3.3 化合物豆甾醇葡萄糖甙的抗氧化活性

由表 2 可以看出, 分离化合物对羟自由基的清除率达到了 69.32%, 远远高于对照 BHT 对羟自由基的清除率 (30.86%), 说明该化合物对羟自由基的清除效果比化学合成抗氧化剂 BHT 更好, 具有更高的抗氧化活性.

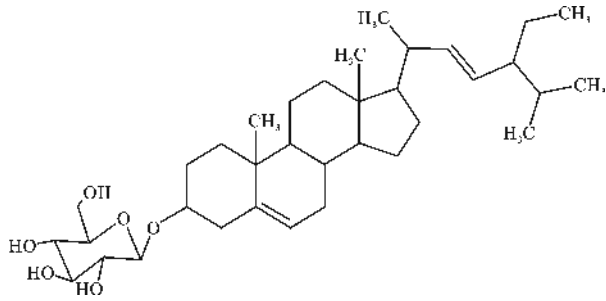


图2 豆甾醇葡萄糖苷

Fig. 2 Stigmasterol-3-O- β -D-glucopyranoside.

表2 豆甾醇葡萄糖苷对自由基的清除活性

Tab. 2 Eliminating ability of the pure compounds from *M. vaginalis* to free radical

序号 No.	处理 Treatment	吸光度 Absorbency	自由基清除率 Percentage of eliminating free radical (%)
1	未损伤系统 No damnification system	0.5802	-
2	损伤系统 Damnification system	0.5397	-
3	豆甾醇葡萄糖苷 stigmasterol-3-O- β -D-glucopyranoside	0.5678	69.32
4	二叔丁基对甲酚 BHT	0.5522	30.86

4 讨 论

鸭舌草乙醇粗提物的正丁醇萃取相的抗氧化活性显著高于其它溶剂萃取相,定性确定了正丁醇可从该杂草的粗提物中萃取数量较多和纯度较高的抗氧化物质,为鸭舌草抗氧化剂的分离提取打下了一定的基础.溶剂萃取是从植物原料中提取抗氧化剂的有效方法,但不同溶剂提取的化合物纯度存在差异.采用乙醇从茶叶中提取茶多酚,仍需要采用正乙烷和乙酸乙酯分别萃取,才能得到纯度较高的茶多酚产品^[4].

豆甾醇葡萄糖苷的保健和药理作用显而易见,如大豆甾醇葡萄糖苷能够显著提高药物的肝脏吸收,提高药物的靶向性. Shimizu 等^[17]试验发现,大豆甾醇葡萄糖苷能使载药脂质体在肝脏的分布从15%提高到80.6%,具有明显的肝细胞靶向性,从而提高抗肿瘤药物的活性.对豆甾醇溶剂提取工艺的研究发现,正丁醇的富集效果最佳,通过调节料液比和结晶温度,以及4~5级分步结晶,从自制的大豆混合植物甾醇(纯度>95%)分离获得纯度为85%的豆甾醇^[5].本研究从正丁醇萃取相中分离纯化获得纯化合物豆甾醇葡萄糖苷也进一步验证了这一结果.但从鸭舌草植株中分离到这一化合物还属首次.

从鸭舌草植株中分离获得的豆甾醇葡萄糖苷具有较高的羟自由基清除率,表明豆甾醇葡萄糖苷是鸭舌草植株中的主要抗氧化活性物质.鸭舌草是我国长江中下游地区重要的水田杂草,其资源量巨大.从鸭舌草中提取抗氧化物质,研制出新的食品保鲜添加素,并开辟在人类保健方面的应用,具有广阔的前景.

参考文献

- [1] Arora A, Byrem TM, Nair MG, *et al.* 2000. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and soflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **373**: 102 - 109
- [2] Chen X (陈欣), Tang J-J (唐建军), Zhao H-M (赵惠明), *et al.* 2003. Sustainable utilization of weed diversity resources in agroecosystem. *Journal of Natural Resources* (自然资源学报), **18**(3): 340 - 346 (in Chinese)
- [3] Chen ZY, Chan PT. 1996. Antioxidative activity of green tea catechins in canola oil. *Chemistry and Physics of Lipids*, **82**: 163 - 172
- [4] Dong W-B (董文宾), Hu Y (胡英), Zhou L (周玲). 2002. Research on producing tea-polyphenolics by organic solvent method. *Science and Technology of Food Industry* (食品工业科技), **23**(9): 44 - 47 (in Chinese)
- [5] Gao Y-Y (高瑜莹), Qiu A-Y (裘爱泳), Xie G (谢光), *et al.* 2000. The enchancement of stigmasterol with solvent. *China Oils and Fats* (中国油脂), **25**(6): 159 - 162 (in Chinese)
- [6] Hamid AA, Shah ZM, Muse R, *et al.* 2002. Characterisation of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Food Chemistry*, **77**: 465 - 469
- [7] Hiroe K, Nobuji N. 1993. Antioxidant effects of some ginger constituents. *Journal of Food Science*, **58**: 1407 - 1410
- [8] Hu A-M (胡安明), Bi Z-M (毕志明), Li P (李萍). 2004. Studies on the chemical constituents of *Achyranthes bidentata*. *Jiangsu Pharmaceutical and Clinical Research* (江苏药学与临床研究), **12**(3): 18 - 19 (in Chinese)
- [9] Jacob RA. 1995. The integrated antioxidant system. *Nutrition Research*, **15**(5): 755 - 766
- [10] Kojimah H, Noriko S, Akiko H, *et al.* 1990. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*, **29**(7): 2351 - 2355
- [11] Lu J-H (陆江海), Zhao Y-Y (赵玉英), Qiao L (乔

- 梁), *et al.* 2001. Studies on chemical constituents from *Buddleja lindleyana* Fert. *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药杂志), **26**(1): 41–43 (in Chinese)
- [12] Ma D-Y (马得莹), Shan A-S (单安山), Du J (杜娟). 2004. Effects of soy isoflavones on animals production, immune and antioxidant status. *Journal of Northeast Agricultural University* (东北农业大学学报), **35**(4): 505–508 (in Chinese)
- [13] Ni L-H (倪立华), Qin W-G (秦卫国). 2003. Research on the natural antioxidants extracting from two plants. *China Oils and Fats* (中国油脂), **28**(1): 47–48 (in Chinese)
- [14] Ozturk G, Erol DD, Uzbay T, *et al.* 2001. Synthesis of 4(¹H)-pyridinone derivatives and investigation of analgesic and anti-inflammatory activities. *Pharmacos*, **56**(4): 251–256
- [15] Qiao F-Y (乔风云), Zhou Y-J (周勇军), Tang J-J (唐建军), *et al.* 2006. Natural antioxidants extracted from weeds in paddy field. *Chinese Journal of Rice Science* (中国水稻科学), **20**(2): 223–226 (in Chinese)
- [16] Sadrzadeh SM, Nanji AA, Price PL. 1994. The oral iron chelator 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one reduces hepatic-free iron, lipid peroxidation and fat accumulation in chronically ethanol-fed rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **269**(2): 632–635
- [17] Shimizu K, Maitani Y, Takayama K, *et al.* 1997. Formulation of liposomes with soybean-derived sterylglucoside mixture and cholesterol for liver targeting. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, **20**(8): 881–886
- [18] Shyu YS, Hwang LS. 2002. Antioxidative activity of the crude extract of lignan glycosides from unroasted Burma black sesame meal. *Food Research International*, **35**: 357–365
- [19] Sies H, Stahl W. 1995. Vitamin E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*, **62**(supp.): 1315–1321
- [20] Tang Q-Y (唐启义), Feng M-G (冯明光). 2002. DPS Data Processing System for Practical Statistics. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- [21] Wu G, Fang YZ, Yang S. 2003. Glutathione metabolism in animals: Nutritional regulation and physiological significance. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*, **9**: 217–227
- [22] Wu K-G (吴克刚), Yang L-S (杨连生), Chai X-H (柴向华). 2000. Study on the antioxidative effect of complex natural natioxidant on eel oil. *Chinese Journal of Marine Drugs* (中国海洋药物), **19**(4): 1–6 (in Chinese)
- [23] Zainol MK, Abd-Hamid A, Yusof S, *et al.* 2003. Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Food Chemistry*, **81**: 575–581
- [24] Zin ZM, Abdul-Hamid A, Osman A. 2002. Antioxidative activity of extracts from Menyikudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. *Food Chemistry*, **78**: 227–231

作者简介 周勇军,男,1977年生,硕士,助研。主要从事杂草生态学研究,已发表论文8篇。Tel: 0571-63370333; E-mail: zhyj88888@163.com

责任编辑 李凤琴
