

羊耳菊挥发油化学成分及其清除自由基的作用研究

刘胜贵^{1,2}, 胡兴¹, 刘霞¹, 邓乐² (1. 怀化学院生命科学系, 湖南怀化 418008; 2. 湖南师范大学生命科学院, 湖南长沙 410081)

摘要 [目的]研究羊耳菊挥发油的化学成分及其对自由基的清除作用。[方法]采用水蒸汽蒸馏法提取羊耳菊的挥发油, 利用气相色谱-质谱联用法对该挥发油的化学成分进行分离鉴定, 利用 Fenton 反应产生羟基自由基($\cdot\text{OH}$)及邻苯三酚自氧化产生超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$), 以比色法测定羊耳菊挥发油对这 2 种自由基的清除作用。[结果]挥发油得率为 0.486% (V/W), 确定了 28 种化合物的结构和相对含量。挥发油主要含 3-甲基-5-异丙基-甲基氨基甲酸酯(74.37%)、11,14-二十碳二烯酸乙酯(9.50%)和 2,2-二甲基丙酸-2-[1,1-二甲基乙基]酯(7.59%) 3 种酯类化合物。挥发油对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)都有一定的清除能力, 但清除羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的能力较强。[结论]通过对羊耳菊挥发油化学成分的研究, 为进一步开发利用该植物提供了科学依据。

关键词 羊耳菊; 挥发油; 气相色谱-质谱法; 清除自由基

中图分类号 S567.23+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)26-12536-02

Chemical Composition of the Essential Oil from *Inula cappa* and Their Effects on Free Radicals Scavenging

LIU Sheng-gui et al (Department of Life Sciences, Huaihua University, Huaihua, Hunan 418008)

Abstract [Objective] The essential oils extracted from *Inula cappa* by steam distillation were analyzed by GC-MS. [Method] Essential oil from *Inula cappa* extracted by steam distillation, chemical compositions of essential oil were isolated and identified by GC-MS method. Hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) produced by Fenton reaction and superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) produced by pyrogallol autoxidation, the scavenging effects of essential oil from *Inula cappa* to two kinds of free radicals determined by colorimetric method. [Result] Extracting rate of essential oil from *Inula cappa* was 0.486% (V/W), structure of 20 kinds of compounds and their relative contents were confirmed. Essential oil mainly contained three main ester compounds of Phenol, 3-methyl-5-[1-methylethyl]-, methylcarbamate (74.37%), 11, 14 - eicosadienoic acid, methyl ester (9.50%), Propanoic acid, 2,2-dimethyl-, 2-[1,1-dimethylethyl] phenylester (7.59%). Essential oil had a certain scavenging activity on hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) and superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$), and had a better scavenging activity on hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$). [Conclusion] Through the study on the chemical composition of essential oil from *Inula cappa*, which provides scientific basis for the further development and utilization of this plant.

Key words *Inula cappa* DC.; Essential oil; GC-MS; Free radicals scavenging

羊耳菊 (*Inula cappa* DC.) 系菊科旋覆花属植物, 亚灌木, 在我国南方分布较为广泛, 主要生长在亚热带和热带的低山和亚高山的湿润或干燥的丘陵地、荒地、灌丛或草地, 在酸性土、砂土和黏土上都常见, 生长地海拔 500~3 200 m^[1]。羊耳菊味苦、微辛, 性平无毒, 全草或根、花供药用^[2]。经调查了解, 湖南通道县侗族民间常用羊耳菊治疗疟疾、痢疾、风湿关节疼痛、泄泻、产后感冒、肝炎、痔疮和疥癣, 中兽医也常用来治疗牛的痢疾。迄今为止, 对羊耳菊挥发油的化学成分分析尚未见报道。笔者采用水蒸汽蒸馏法从羊耳菊中提取挥发油, 利用气相色谱-质谱联用法 (GC-MS) 分析挥发油化学成分, 研究挥发油抗氧化作用, 为该草药的进一步开发和利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 羊耳菊采于湖南通道侗族自治县, 经鉴定后标本收藏于怀化学院植物标本室。所用试剂均为国产分析纯。美国 ThermoFinnigan Trace GC + Trace Ms^{plus} 型气相色谱-质谱联用仪。

1.2 方法

1.2.1 羊耳菊挥发油的提取。将新鲜的羊耳菊根洗净、晾干, 切成薄片, 称取 350 g, 用水蒸汽蒸馏法提取挥发油^[3]。挥发油用无水 Na₂SO₄ 干燥后保存于 -10℃ 备用。

1.2.2 挥发油的成分分析。采用 GC-MS 对羊耳菊挥发油进行成分分析。所用色谱柱为 DB-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)。柱温从 50℃ 起以 3℃/min 速度升温至 250℃ 后保持

10 min, 汽化室温度为 220℃, 进样量 1 μl, 分液比为 40:1。

质谱条件: 离子源为 EI 源, 离子源温度为 200℃, 溶剂延迟 2 min, 质量数范围为 50~500 amu。采用美国 NIST' 2002 数据挥发性成份的 GC-MS 定性谱库对其进行定性定量分析^[4]。挥发油成分相对含量的确定采用面积归一化法。

1.2.3 羊耳菊挥发油对羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的清除作用。以吐温为分散剂, 配制 6 种不同浓度挥发油溶液, 即: ①1 000 ml/L; ②500 ml/L; ③250 ml/L; ④125 ml/L; ⑤62.5 ml/L; ⑥31.25 ml/L。以不同浓度的挥发油溶液、硫脲、甘露醇溶液作样品, 在比色管中分别加入磷酸缓冲液和 EDTA Na₂-Fe²⁺ 溶液各 1.0 ml、番红溶液 0.2 ml, 空白组以等体积的重蒸水代替样品溶液, 对照组以等体积的重蒸水代替样品溶液和 EDTA Na₂-Fe²⁺ 溶液^[5]。混匀后于 40℃ 水浴保温 30 min, 在波长 520 nm 处测吸光度 A 值, 并计算羟自由基清除率。

$$\text{清除率}(E) = (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4 羊耳菊挥发油对超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 的清除作用。在比色管中加入浓度 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 4.5 ml、蒸馏水 4.2 ml 和浓度 2 mmol/L 的 EDTA 水溶液 1 ml, 混匀后置 25℃ 水浴中保温 20 min, 立即加入已在 25℃ 下预热的浓度 3 mmol/L 的邻苯三酚 4.5 ml。以浓度 10 mmol/L 的 HCl 溶液为空白对照, 在 320 nm 处测量其吸光度值, 绘制邻苯三酚自氧化曲线。按上述方法, 在加入邻苯三酚前加入不同浓度的挥发油样品溶液或 Vc 样品溶液, 测定其吸光值^[6]。

2 结果与分析

2.1 羊耳菊挥发油的化学成分分析 通过水蒸汽蒸馏法提取挥发油, 350 g 羊耳菊新鲜根获挥发油体积为 1.7 ml, 其得率为 0.486% (V/W)。羊耳菊挥发油化学成分的 GC-MS 图谱见图 1。通过各组分的质谱碎片解离规律以及与美国

基金项目 湖南省教育厅科研项目 (06C637)。

作者简介 刘胜贵 (1965-), 男, 湖南宁乡人, 硕士, 教授, 从事民族药用植物活性成分研究。

收稿日期 2009-05-12

NIST2002 数据库和文献中的标准谱图对照分析,确定了其中的 28 种主要组分的化学结构与百分含量,其约占挥发油总组分的 98.33%。

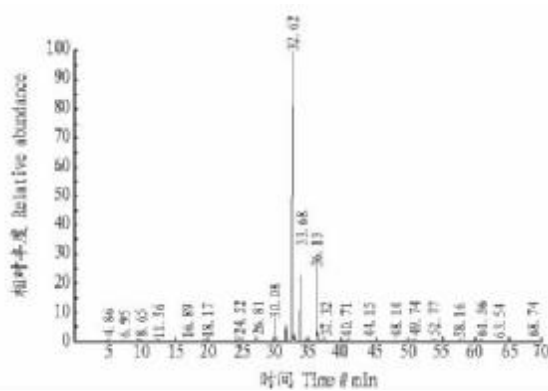


图 1 羊耳菊挥发油在 DB-5 柱上的总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion current chromatogram of essential oil from *Inula cappa* on DB-5 column

由表 1 可知,挥发油主要成分为 3-甲基-5-异丙基-甲基氨基甲酸酯(74.37%)、11,14-二十碳二烯酸乙酯(9.50%)

表 1 羊耳菊挥发油化学成分分析结果

Table 1 Analysis results of chemical composition of essential oil from *Inula cappa*

化合物名称 Compounds name	保留时间 t/min Retention time	相对体积分数/% Relative volume fraction
反式-1-甲基-4-异丙基-2-环己烯-1-醇	16.89	0.01
顺式-1-甲基-4-异丙基-2-环己烯-1-醇	17.72	0.01
3-甲基-4-亚甲基-环戊烷羧酸甲酯	18.47	0.01
2-甲基-5-异丙基酚	24.14	0.35
5-甲基-2-异丙基酚	24.52	0.41
2-乙基-4,5-二甲基酚	24.88	0.04
1,3,4,5,6,7-六氢-2,5,5-三甲基-二氢-2,4-亚乙烯基萘	26.81	0.10
2,6-二甲基-6-(4-甲基-3-戊烯基)-2-降蒎烯	27.08	0.01
(+)-环萨替文烯	27.93	0.02
2,6,6-三甲基环己烯甲基磺酸苯酯	29.12	0.01
[1R-(1R*,4Z,9S*)]-4,11,11-三甲基-8-亚甲基-二环[7.2.0]-4-十一碳烯	30.08	2.07
[1R-[1 α ,5 α ,6 β]-6-甲基-2-亚甲基-6-[4-甲基-3-戊烯基]-二环[3.1.1]正庚烷	30.66	0.01
(E,E,E)-2,6,6,9-四甲基-1,4,8-十一碳环三烯	31.58	1.39
3-甲基-5-异丙基-甲基氨基甲酸酯	32.62	74.37
别香橙烯	32.72	0.74
(Z)-3,7-二甲基乙酸-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-酯	32.84	0.25
11,14-二十碳二烯酸乙酯	33.68	9.50
1S-[1 α ,4 $\alpha\beta$,8 $\alpha\alpha$]-1,2,4 α ,5,8,8 α -六氢-4,7-二甲基-1-异丙基萘	34.16	0.02
甲基氨基甲酸-3-甲基-5-异丙基苯酚酯	34.63	0.22
2,2-二甲基丙酸-2-[1,1-二甲基乙基]苯酚酯	36.13	7.59
氧化石竹烯	36.66	0.21
3-甲基-5-甲硫基乙基-氨基甲酸酯	37.32	0.46
R-[1R*,3E,7E,11R*]-1,5,5,8-四甲基-12-氧杂二环[9.1.0]-3,7-十二碳二烯	37.75	0.09
3-叔丁基-4-甲氧基苯酚	40.01	0.06
[R*,R*]-1-甲醇- α -4-二甲基- α -[4-甲基-3-戊烯基]-3-环己烯	40.71	0.06
3-叔丁基-4-甲氧基苯酚	40.81	0.06
2-对甲氧基苯基-5-甲基-1-己烯	44.15	0.23
2-甲基丙酸-2-[3-(乙酰氧基甲基)环氧乙烷]-5-甲基苯酚酯	51.85	0.03

和 2,2-二甲基丙酸-2-[1,1-二甲基乙基]酚酯(7.59%)。

2.2 羊耳菊挥发油对羟基自由基的清除率 图 2 为不同浓度的羊耳菊挥发油、甘露醇、硫脲 3 种样品对羟基自由基清除率的影响。由图 2 可知,对 Fenton 反应体系产生的羟基自由基的清除能力,羊耳菊挥发油比甘露醇强,但略低于硫脲,当样品浓度在 310~520 mg/L 时,羊耳菊挥发油则是 3 个样品中清除能力最强的。

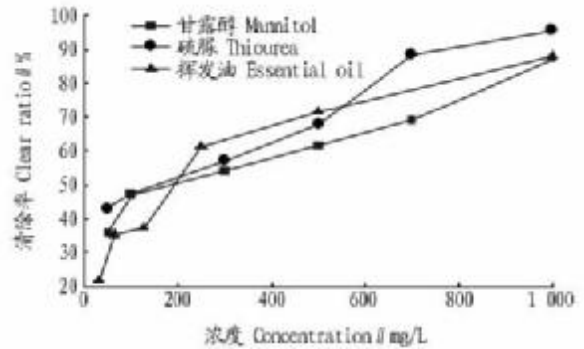


图 2 羊耳菊挥发油、甘露醇、硫脲对羟基自由基的清除率

Fig. 2 Clear ratio of essential oil, mannitol and thiourea hydroxyl radical from *Inula cappa*

2.3 羊耳菊挥发油对超氧阴离子自由基的清除率 在 230 nm 处测定了不同时间邻苯三酚自氧化体系及加入羊耳菊挥发油或维生素 C 后该氧化体系中溶液的光吸收值。根据光吸收值绘制出 3 种不同反应体系的氧化速率曲线,结果如图 3 所示。

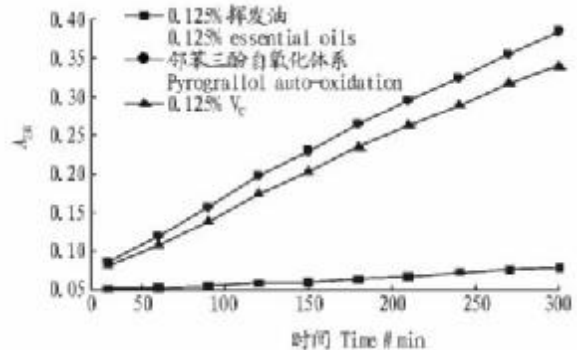


图 3 羊耳菊挥发油在 3 种不同反应体系中对超氧阴离子自由基氧化速率的影响

Fig. 3 Effects of essential oil from *Inula cappa* on oxidation rate of superoxide anion radical in three reaction systems

邻苯三酚在碱性条件下迅速发生氧化链反应,其反应速度依赖于超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)自由基的浓度^[7]的变化。由图 3 可知,羊耳菊挥发油样品和 V_c 样品溶液都能清除反应体系所产生的($O_2^{\cdot-}$),但 V_c 溶液清除能力较强,羊耳菊挥发油的清除能力较弱。

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第 75 卷)[M]. 北京:科学出版社,1985:271.
 [2] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所. 中药志(IV)[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,1988:368.
 [3] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:人民卫生出版社,1995:附录 6.
 [4] ADAMS R P. Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy[M]. Carol Stream:Allured Publishing Corporation, 2001.

流中 Br 的重要来源。Br 替代因子 (BSF) 常用来表示 Br 代 DBPs 在总 DBPs 中占有的比例^[15], 公式 (1) 表示 THMs 的 BSF 值, 从式 (1) 中可以看出, 如果只生成 CHBr_3 , 那么 BSF 为 100%, 全部生成 CHCl_3 时 BSF 为 0。

$$BSF = \frac{\sum_{n=0}^3 n [\text{CHCl}_{(3-n)}\text{Br}_n]}{3 \sum_{n=0}^3 \text{CHCl}_{(3-n)}\text{Br}_n} \times 100\% \quad (1)$$

从表 1 可以看出, $\text{Soil}_{\text{定期}}$ 中 Br 的浓度 ($0.32 \mu\text{g/L}$) 低于 $\text{Soil}_{\text{连续}}$ Br 的浓度 ($0.36 \mu\text{g/L}$), 虽然 $\text{Soil}_{\text{连续}}$ 的 DBPs 浓度高于 $\text{Soil}_{\text{定期}}$ 的 DBPs 浓度, 但是 $\text{Soil}_{\text{定期}}$ 的 Br/DOC ($0.043 \mu\text{g/mg}$) 值高于 $\text{Soil}_{\text{连续}}$ ($0.006 \mu\text{g/mg}$), 两者存在明显差异 ($P < 0.01$), 因此, 2 种土壤中 3 种 BSF 值有相同的规律, 即 $\text{Soil}_{\text{定期}}$ 的 BSF 值较高, 表明 Br/DOC 的值越大则生成的 Br 代 DBPs 所占比例越高。

表 1 2 种土壤中 Br 对 DBPs 形成的影响

Table 1 The influence of Br to DBPs formation in two different soils

土样	Br	Br/DOC	BSF//%		
			THMs	X ₂ AA	X ₃ AA
Soil samples	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/mg}$			
$\text{Soil}_{\text{定期}} \text{Soil}_{\text{regular}}$	0.32	0.043	9.6	7.0	6.0
$\text{Soil}_{\text{连续}} \text{Soil}_{\text{continuous}}$	0.36	0.006	4.6	3.0	3.0

注: X₂AA 表示二卤乙酸, X₃AA 表示三卤酸。

Note: X₂AA. Dihalooacetic acids, X₃AA. Trihalooacetic acids.

3 结论

(1) 连续灌溉模式土壤较定期灌溉模式土壤 DOC 浓度高 87.5%, 加氯生成的 THMs 高 71.4%, HAAs 高 65.5%。不同的灌溉模式对农田土壤的 THMs 与 HAAs 生成具有显著影响, 而 Br 的存在和增加改变了 DBPs 的种类和数量。连续灌溉模式的农田土壤中 DBPs 前驱物的种类和浓度高于定期灌溉的农田, 连续灌溉模式土壤对饮用水源具有大的潜在风险。

(2) 我国南方地区降雨量偏多, 水稻面积较大。雨水和农业排水携带土壤中的 DOC 和 Br 进入水源造成污染, DBPs 前驱物越多, 则在氯化消毒工艺中将消耗更多的消毒剂, 生成的消毒副产物也将增加。尽管各种水处理工艺如混

凝和过滤等可以去除水中的一些前驱物^[11], 但是控制水源头的措施更为有效。连续灌溉模式土壤中含有较高浓度的 DOC, 给饮用水的安全带来隐患。因此, 合理控制和利用该农业排水显得尤其重要。

参考文献

- [1] 桑义敏, 张广远, 孔惠, 等. 饮用水氯化消毒及其消毒副产物的控制对策[J]. 水处理技术, 2006, 32(3): 1-4.
- [2] 赵生有, 王浩. 饮用水加氯消毒副产物的毒性与控制[J]. 中国卫生工程学, 2007, 6(1): 51-52.
- [3] 董丽丽, 黄骏雄. 饮用水消毒副产物及其分析技术[J]. 化学进展, 2005, 17(2): 350-357.
- [4] 刘帅霞, 汪蕊. 组合工艺控制有机物和消毒副产物的研究[J]. 环境科学与技术, 2007, 30(8): 88-90.
- [5] ROOK J J. Formation of haloforms during chlorination of natural waters [J]. Water Treat Exam, 1974, 23: 234-243.
- [6] BELLAR T A, LICHTENBERG J J, KRONER R C. The occurrence of organohalides in chlorinated drinking waters [J]. J Am Water Works Assoc, 1974, 66(12): 703.
- [7] National Cancer Institute (NCI). Report on Carcinogenesis Bioassay of Chloroform; NTIS PB-264018. U. S [M]. Government Printing Office: Washington, DC, 1976.
- [8] RICHARDSON S D. Drinking water disinfection by-products [M]//MEYERS R A. Encyclopedia of environmental analysis and remediation. Wiley, New York, NY, 1998: 1398-1421.
- [9] 葛飞, 舒海民. 饮用水中氯化消毒副产物的研究进展[J]. 净水技术, 2006, 25(1): 34-38.
- [10] EDZWALD J K. Coagulation in drinking water treatment: particles, organics and coagulants [J]. Water Science and Technology, 1993, 27(12): 21-35.
- [11] XIE Y. Disinfection byproducts in drinking water. Formation, analysis, and control [M]. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 2004.
- [12] 柳敏, 宇万太, 姜子绍, 等. 土壤溶解性有机碳 (DOC) 的影响因子及其生态效应[J]. 土壤通报, 2007, 38(4): 758-764.
- [13] CHOW A T, TANJI K K, GAO S D. Production of dissolved organic carbon (DOC) and trihalomethane (THM) precursor from peat soils [J]. Water Research, 2003, 37(18): 4475-4485.
- [14] SUMMERS R SCOTT, STUART M HOOPER, HIBA M SHUKAIRY, et al. Assessing DBP yield: uniform formation conditions [J]. J AWWA, 1996, 88(6): 80-93.
- [15] CHOW A T, DAHLGREN R A, HARRISON J A. Watershed sources of disinfection by-product precursors in Sacramento and San Joaquin Rivers, California [J]. Environ Sci Technol, 2007, 41: 7645-7652.
- [16] RICHARDSON S D, THRUSTON A D, RAV-ACHA C, et al. Tribromopyrrole, brominated acids, and other disinfection byproducts produced by disinfection of drinking water rich in bromide [J]. Environ Sci Technol, 2003, 37: 3782-3793.

(上接第 12537 页)

- [5] SINGH R P, PADMAVATHI B, RAO A R. Chemomodulatory influence of *Adhatoda vesica* (*Justicia adhatoda*) on the enzymes of xenobiotic metabolism, antioxidant status and lipid peroxidation in mice [J]. Mol Cell Biochem, 2000, 213: 99-109.
- [6] 静天玉, 赵晓瑜. 用终止剂改正超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法 [J].

生物化学和生物物理进展, 1995, 22(1): 84-86.

- [7] PREDRAG LJUBUNCIC, SUHA DAKWAR, IRINA PORTNAYA, et al. Aqueous extracts of teucrium polium possess remarkable antioxidant activity *in vitro* [J]. eCAM Advance Access Originally Published, 2006, 3(3): 329-338.