

doi:10.3969/j.issn.1006-9690.2021.12.005

互花米草生物活性成分的分离纯化和鉴定研究

张焕仕^{1**}, 赵飞¹, 刘畅¹, 朱昌玲¹, 张鹤云², 钦佩^{2*}

(1.南京野生植物综合利用研究所, 江苏南京 211111; 2.南京大学盐生植物实验室, 江苏南京 210093)

摘要 目的: 为充分开发利用互花米草, 对其体内的生物活性成分进行了分离、纯化和鉴定。方法: 采用 ODS 反相层析、高效液相层析、核磁共振 H、核磁共振 C 谱等技术。结果: 共获得 18 个单体化合物, 分别为: 异戊基奎尼酸, 4-氢-1-苯并吡喃-4-酮, 苜蓿素, 1-甲氧基-4-苯甲醛, 3, 7-二羟基-2-戊二烯酸甲酯-色烯, 3-羟基-8-甲氧基-6, 9-二甲基-5-异丙基-1-酮, 3-羟基-8-甲氧基-6, 9-二甲基-5-丙基-1-酮, 4, 4'-醛基二苯酮, 氨基脒, 1-氢吲哚-苯并呋喃, 1, 5-萘二甲醛, 对香豆酸, 3-氢-2-苯并吡喃-3-酮, 苯甲酸, 2-甲氧基-5-乙酰基苯酚, 对羟基苯甲酸, 1, 2-苯二酚, 3-羟基-2H-吡喃-2-酮。结论: 本研究所获得的 18 种化合物中, 异戊基奎尼酸、对香豆酸和苜蓿素都是典型的降血脂、抗氧化以及抗痛风等功效很强的功能成分。

关键词 互花米草; 成分; 分离纯化; 结构鉴定

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 1006-9690(2021)12-0019-04

Study on Separation, Purification and Identification of Biologically Active Composition from *Spartina alterniflora*

Zhang Huanshi^{1**}, Zhao Fei¹, Liu Chang¹, Zhu Changling¹, Zhang Heyun², Qin Pei^{2*}

(1. Nanjing Institute for Comprehensive Utilization of Wild Plant, Nanjing 211111, China;

2. Halophyte Research Lab, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract Objective: In order to make full use of *Spartina alterniflora*, the biologically active composition in its body were separated, purified and identified. Methods: The ODS reversed-phase chromatography, high performance liquid chromatography, nuclear magnetic resonance H spectrum, nuclear magnetic resonance C spectrum and other techniques were used. Results: A total of 18 monomer compounds were: isoamylquinic acid, 4-hydroxy-1-benzopyran-4-one, alfalfa, 1-methoxy-4-benzaldehyde, 3, 7-dihydroxy-2-Methyl pentadienoate-chromene, 3-hydroxy-8-methoxy-6, 9-dimethyl-5-isopropyl-1-one, 3-hydroxy-8-methoxy-6, 9-Dimethyl-5-Propyl-1-one, 4, 4'-aldehyde benzophenone, semicarbazide, 1-indoline-benzofuran, 1, 5-naphthalaldehyde, p-coumaric acid, 3-hydroxy-2-benzopyran-3-one, benzoic acid, 2-methoxy-5-acetylphenol, p-hydroxybenzoic acid, 1, 2-benzenediol, 3-hydroxy-2H-pyran-2-one. Conclusion: Among the 18 compounds obtained in this research, isoamylquinic acid, p-coumaric acid and alfalfa are typical functional components with strong antihyperglycemic, antioxidant, and anti-gout effects.

Key words *Spartina alterniflora*; Composition; Separation and purification; Structural identification

互花米草(*Spartina alterniflora* Loisel.)原产于北美洲大西洋沿岸和墨西哥海湾,是禾本科米草属多年生 C₄ 草本植物,其主要生长于滨海盐沼中潮带上部至高潮带。1979 年互花米草由美国引入我国,在

抗风消浪、保滩护岸、促淤造陆、湿地修复等方面起到了重要作用。最新研究发现,中国沿海地区互花米草分布总面积达到 55 468 hm²,江苏滩涂互花米草面积最大,发展为 21 843 hm²[1]。

收稿日期: 2021-08-11, 录用日期: 2021-12-14

基金项目: 江苏省产学研合作项目(BY2020407)。

*通讯作者: 钦佩(1946-), 男, 硕士, 教授, 研究方向为海滨系统生态学。E-mail: qinpei@nju.edu.cn; 张焕仕(1978-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为土壤生态学与植物资源利用。E-mail: zhanghuanshi@126.com

许多学者对互花米草的基本生物学特性、生理生态学和生物化学等方面进行了广泛的研究:如互花米草的生产力^[2-3],互花米草体内重金属元素的积累和转移^[4],互花米草入侵对生态系统和碳循环的影响^[5-7]等等。其体内还含有丰富的黄酮、多糖、皂苷等生物活性物质和必需微量元素,具有很好的保健作用^[8]。张怡评等采用硅胶柱色谱与 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱色谱联用首次从互花米草体内分离并鉴定出 15 个化学成分^[9]。徐年军等对米草多糖的提取、纯化及其单糖组成研究表明,米草多糖的单糖主要为鼠李糖、核糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖。根据各峰面积比计算,其相对百分含量分别为 4.13%、3.02%、11.94%、8.89%、6.82%、27.18%、38.00%^[10]。韩顺风等以总黄酮含量为参考标准,采用响应曲面法对互花米草(地上部位)的提取工艺进行优化,对互花米草进行了化学成分的提取、分离、纯化和鉴定的初步研究,确定了其中含有的对羟基肉桂醛、麦角甾醇以及麦黄酮等 15 个化合物的结构^[11]。

本研究拟在秋冬季刈割互花米草地上部分,通过 ODS 反相层析、高效液相层析、核磁共振 H 谱、核磁共振 C 谱等技术分离、纯化和鉴定了其体内的生物活性成分,为其生物活性成分中单体化合物进行系统性功能评价和开发利用提供了技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

2018 年 11 月 12 日采集于江苏省盐城市大丰区草庙镇沿海滩涂的互花米草,经鉴定为禾本科米草属植物互花米草。

1.2 分离与提取

取互花米草地上部分 100 kg 晒干、切割成 2~3 cm 长,加 20 倍热水浸提,浓缩提取液为深棕色液体(10 kg 左右)。将提取液用等体积乙酸乙酯萃取和等体积正丁醇萃取 3 遍,并分别减压旋蒸浓缩,得到乙酸乙酯相粗膏 113.8 g,正丁醇相粗膏 159.6 g。

接着进行硅胶柱层析粗分,分别以石油醚/乙酸乙酯(v/v 100:0、50:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1,各 2 500 ml)和 CH₂Cl₂/MeOH(v/v 100:0、100:1、100:2、100:4、100:8、100:16、100:32 和 1:1,各 2 500 ml)作为流动相梯度洗脱,根据 TLC 薄层层析结果合并相似组分,合并得到乙酸乙酯相的 9 个组分和正丁

醇相的 10 个组分,再将各个组分经过硅胶柱层析、ODS 反相层析、凝胶柱层析进一步分离,再经过高效液相层析技术进行分离纯化,最终得到 18 个单体化合物。

1.3 结构鉴定

将上述 18 个单体化合物经过高分辨质谱、核磁共振 H 谱、核磁共振 C 谱的鉴定,得到各化合物的名称、性状、分子量、分子式和结构式。

2 结果

化合物 1:异戊基奎尼酸 黄色片状,质量为 29.0 mg,根据高分辨质谱推测其分子量为 544,分子式为 C₂₇H₂₈O₁₂,计算可知其不饱和度为 14,结构如图 1。

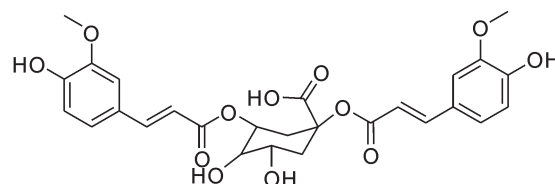


图1 异戊基奎尼酸结构式

Fig. 1 Isoamylquinic acid structure

化合物 2:4-氢-1-苯并吡喃-4-酮 棕色块状,质量为 19.4 mg,根据高分辨质谱推测其分子量为 526,分子式为 C₂₇H₂₆O₁₁,计算可知其不饱和度为 15,结构如图 2。

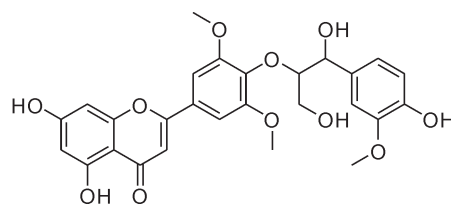


图2 4-氢-1-苯并吡喃-4-酮结构式

Fig. 2 4-hydrogen-1-benzopyran-4-one structure

化合物 3:苜蓿素 黄色块状,质量为 24.3 mg,根据高分辨质谱推测其分子量为 330,分子式为 C₁₇H₁₄O₇,计算可知其不饱和度为 11,结构如图 3。

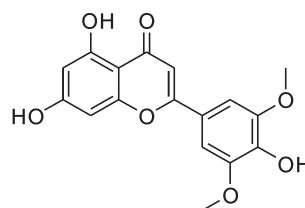


图3 苜蓿素结构式

Fig. 3 Alfalfa structure

化合物 4:1-甲氧基-4-苯甲醛 棕色块状,质量为 11.7 mg,根据高分辨质谱推测其分子量为 298,分子式为 $C_{17}H_{14}O_5$,计算可知其不饱和度为 11,结构如图 4。

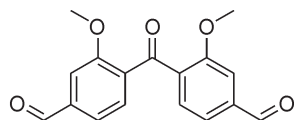


图 4 1-甲氧基-4-苯甲醛结构式

Fig. 4 1-methoxy-4-benzaldehyde structure

化合物 5:3,7-二羟基-2-戊二烯酸甲酯-色烯 棕色油状,质量为 13.5 mg,根据高分辨质谱推测其分子量为 290,分子式为 $C_{15}H_{14}O_6$,计算可知其不饱和度为 9,结构如图 5。

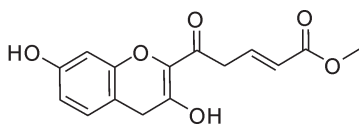


图 5 3,7-二羟基-2-戊二烯酸甲酯-色烯结构式

Fig. 5 3,7-dihydroxy-2-Methyl pentadienoate-chromene structure

化合物 6:3-羟基-8-甲氧基-6,9-二甲基-5-异丙基-1-酮 黄色油状,质量为 7.9 mg,根据高分辨质谱推测其分子量为 262,分子式为 $C_{16}H_{22}O_3$,计算可知其不饱和度为 6,结构如图 6。

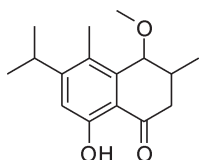


图 6 3-羟基-8-甲氧基-6,9-二甲基-5-异丙基-1-酮结构式

Fig. 6 3-hydroxy-8-methoxy-6,9-dimethyl-5-isopropyl-1-one structure

化合物 7:3-羟基-8-甲氧基-6,9-二甲基-5-丙基-1-酮 黑色油状,质量为 6.6 mg,根据高分辨质谱推测其分子量为 262,分子式为 $C_{16}H_{22}O_3$,计算可知其不饱和度为 6,结构如图 7。

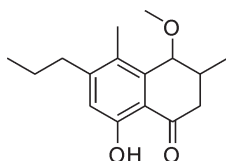


图 7 3-羟基-8-甲氧基-6,9-二甲基-5-丙基-1-酮结构式

Fig. 7 3-hydroxy-8-methoxy-6,9-Dimethyl-5-Propyl-1-one structure

化合物 8:4,4'-醛基二苯酮 黄色针状,质量为 46.3 mg,根据高分辨质谱推测其分子量为 238,分子式为 $C_{15}H_{10}O_3$,计算可知其不饱和度为 11,结构如图 8。

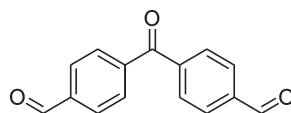


图 8 4,4'-醛基二苯酮结构式

Fig. 8 4,4'-aldehyde benzophenone structure

化合物 9:氨基脒 淡黄色块状,质量为 29.6 mg,根据高分辨质谱推测其分子量为 204,分子式为 $C_9H_8N_4O_2$,计算可知其不饱和度为 8,结构如图 9。

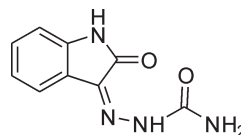


图 9 氨基脒结构式

Fig. 9 Semicarbazide structure

化合物 10:1-氢吲哚-苯并呋喃 黑色油状,质量为 12.4 mg,根据高分辨质谱推测其分子量为 180,分子式为 $C_{13}H_8O$,计算可知其不饱和度为 10,结构如图 10。

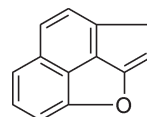


图 10 1-氢吲哚-苯并呋喃结构式

Fig. 10 1-indoline-benzofuran structure

化合物 11:1,5-萘二甲醛 黄色固体,质量为 15.4 mg,根据高分辨质谱推测其分子量为 216,分子式为 $C_{12}H_8O_4$,计算可知其不饱和度为 9,结构如图 11。

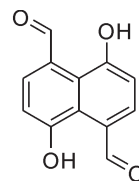


图 11 1,5-萘二甲醛结构式

Fig. 11 1,5-naphthalaldehyde structure

化合物 12: 对香豆酸 棕色块状, 质量为 41.0 mg, 根据高分辨质谱推测其分子量为 164, 分子式为 $C_9H_8O_3$, 计算可知其不饱和度为 6, 结构如图 12。

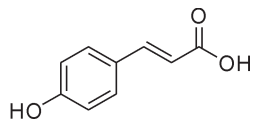


图 12 对香豆酸结构式

Fig. 12 P-coumaric acid structure

化合物 13: 3 氢-2-苯并吡喃-3-酮 黄色片状, 质量为 25.0 mg, 根据高分辨质谱推测其分子量为 146, 分子式为 $C_{10}H_6O_2$, 计算可知其不饱和度为 7, 结构如图 13。

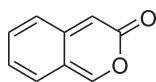


图 13 3 氢-2-苯并吡喃-3-酮结构式

Fig. 13 3-hydroxy-2-benzopyran-3-one structure

化合物 14: 苯甲酸 淡黄色块状, 质量为 27.8 mg, 根据高分辨质谱推测其分子量为 122, 分子式为 $C_7H_6O_2$, 计算可知其不饱和度为 5, 结构如图 14。

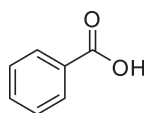


图 14 苯甲酸结构式

Fig. 14 Benzoic acid structure

化合物 15: 2-甲氧基-5-乙酰基苯酚 黄色针状, 质量为 17.7 mg, 根据高分辨质谱推测其分子量为 166, 分子式为 $C_{10}H_{10}O_3$, 计算可知其不饱和度为 5, 结构如图 15。

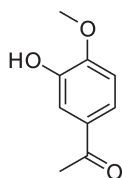


图 15 2-甲氧基-5-乙酰基苯酚结构式

Fig. 15 2-methoxy-5-acetylphenol structure

化合物 16: 对羟基苯甲酸 黄色块状, 质量为 14.6 mg, 根据高分辨质谱推测其分子量为 136, 分子式为 $C_8H_8O_2$, 计算可知其不饱和度为 5, 结构如图 16。

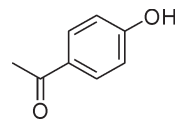


图 16 对羟基苯甲酸结构式

Fig. 16 P-hydroxybenzoic acid structure

化合物 17: 1, 2-苯二酚 黑色油状, 质量为 21.7 mg, 根据高分辨质谱推测其分子量为 110, 分子式为 $C_6H_6O_2$, 计算可知其不饱和度为 4, 结构如图 17。

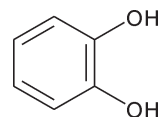


图 17 1, 2-苯二酚结构式

Fig. 17 1, 2-benzenediol structure

化合物 18: 3-羟基-2H-吡喃-2-酮 棕色块状, 质量为 22.3 mg, 根据高分辨质谱推测其分子量为 112, 分子式为 $C_5H_4O_3$, 计算可知其不饱和度为 4, 结构如图 18。

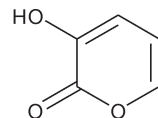


图 18 3-羟基-2H-吡喃-2-酮结构式

Fig. 18 3-hydroxy-2H-pyran-2-one structure

3 结论

互花米草的引进为我国沿海地区保滩护岸、促淤造陆做出了巨大贡献。但随着互花米草的生长蔓延和过度扩张, 其负面作用逐步显现, 影响了部分沿海地区的生物多样性, 特别是滩涂水产养殖。为探索互花米草提取物的生物功效, 实现互花米草的资源化利用, 兴利除弊, 本研究对互花米草提取物进行了分离、纯化和鉴定, 共获得 18 个单体化合物。互花米草提取物的这 18 种化合物中, 异戊基奎尼酸、对香豆酸和苜蓿素都是典型的抗菌消炎、保肝利胆、降血脂、抗氧化、抗痛风、消除自由基等功效很强的功能成分。本研究不仅初步揭示了互花米草发挥生物功能的化学基础, 同时也为进一步深入开发生物医药提供了依据和参考。

参考文献:

- [1] Zhang D H, Hu Y M, Liu M, et al. Introduction and spread of an exotic plant, *Spartina alterniflora*, along coastal marshes of China [J]. Wetlands, 2017, 37: 1181-1193 (下转第 30 页)

体内发育毒性,可为白及的发酵产品提供参考,提高植物资源的高值利用。

目前,对发酵过程中微生物与植物或者中药材之间的作用较多地停留在体外功效和活性物质的研究上,随着皮肤微生态研究领域的发展,还需要进一步考虑发酵产物对人体皮肤微生态的影响。

虽然植物发酵技术在应用中也存在着各种问题,但随着相关理论和技术的不断深入和完善,植物生物发酵技术会在化妆品中有更光明的应用前景。生物双向发酵技术把我国传统的中医药优势与现代发酵技术相结合,将为我们进行独具中国特色的民族化妆品的开发提供一个新思路。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 103.
- [2] 刘珈羽, 冯靖雯, 方皓, 等. 白及粉末入药历史沿革概述[J]. 中成药, 2018, 40(1): 176-180.
- [3] 王大群, 赵仁全, 刘海, 等. 白及的成分、药理作用和临床应用研究进展[J]. 中国药业, 2017, 26(2): 93-96.
- [4] 任华忠, 何毓敏, 杨丽. 白及化学成分其药理活性研究进展[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(02): 134-140.
- [5] 颜智, 刘刚, 刘育辰, 等. 白及化学成分、药理活性及质量评价研究进展[J]. 广州化工, 2018, 46(16): 42-44+48.
- [6] 邱红梅, 张颖, 周岐新, 等. 白芨多糖对小鼠免疫功能的调节作用[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(6): 676-678.
- [7] 俞林花, 聂绪强, 潘会君, 等. 白及多糖对糖尿病溃疡创面愈合的作用研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(11): 1487-1491.
- [8] 孙达锋, 史劲松, 张卫明, 等. 白芨多糖胶研究进展[J]. 食品科学, 2009, 30(3): 296-298.
- [9] 周选围, 陈文强, 邓百, 等. 生物技术在药用真菌资源开发与保护中的应用[J]. 中草药, 2005, 36(3): 451-455.
- [10] 高合意, 钟娜, 陈正珍. 生物技术在化妆品中的应用[J]. 生物技术世界, 2015(2): 188-190.
- [11] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Anal Chem, 1956, 28: 350-356.
- [12] 国家食品药品监督管理总局.《化妆品安全技术规范(2015版)》[S]. 2015年.
- [13] 国家药典编委会. 中华人民共和国药典(2020版)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2019.
- [14] 万庆家, 黄云祥, 何林燕, 等. 芦笋的美白功效研究[J]. 日用化学品科学, 2020, 43(7): 40-41, 44.
- [15] 王涛. 丹参酮 I 的抗炎作用及安全性评价[D]. 广州: 广东药科大学, 2018.
- [2] Wang M, Chen J, Li B. Characterization of bacterial community structure and diversity in rhizosphere soils of three plants in rapidly changing salt marshes using 16S rDNA[J]. Pedosphere, 2007, 17: 545-556.
- [3] Zheng S, Shao D, Sun T. Productivity of invasive saltmarsh plant *Spartina alterniflora* along the coast of China: A meta-analysis [J]. Ecol Eng, 2018, 117: 104-110.
- [4] Chen L, Gao J, Zhu Q, et al. Accumulation and output of heavy metals by the invasive plant *Spartina alterniflora* in a coastal salt marsh[J]. Pedosphere, 2018, 28(6): 884-894.
- [5] Liu J, Shu Z, Zhao Y, et al. Changes in the chemical composition of the organic carbon in *Spartina alterniflora* litter during decomposition in saltmarsh sediments[J]. J Soils Sediment, 2021, 21: 3438-3450.
- [6] Wang L, Yuan J, Wang Y, et al. Effects of exotic *Spartina alterniflora* invasion on soil phosphorus and carbon pools and associated soil microbial community composition in coastal wetlands [J]. ACS Omega, 2021, 6(8): 5730-5738.
- [7] Ge Y, Pan H, Zhang J, et al. Exotic *Spartina alterniflora* invasion changes temporal dynamics and composition of spider community in a salt marsh of Yangtze Estuary, China [J]. Estuar, Coast Shelf S, 2020, 239: 106755.
- [8] 钦佩, 谢民, 周爱堂. 互花米草初级生产与类黄酮的生成[J]. 生态学报, 1991, 11(4): 293-298.
- [9] 张怡评, 韩顺风, 方华, 等. 互花米草化学成分研究[J]. 中国海洋药物, 2016, 35(1): 55-59.
- [10] 徐年军, 何艳丽, 武敏, 等. 大米草多糖的提取及其单糖组成的GC-MS分析[J]. 海洋科学, 2010, 34(9): 15-18.
- [11] 韩顺风, 张怡评, 洪专, 等. 响应曲面法优化互花米草中总黄酮的提取工艺研究[J]. 中医药导报, 2014, 20(2): 65-71.

(上接第22页)