

裸花水竹草脂溶性成分及其抗氧化活性研究

黄周锋¹, 卢文杰^{1,2*}, 谭晓¹, 陆国寿¹, 黄建猷¹, 胡筱希¹(1.广西壮族自治区中医药研究院, 南宁 530022; 2.广西中药质量标准研究重点实验室, 南宁 530022)

摘要: 目的 分析裸花水竹草的脂溶性成分及其抗氧化活性。方法 利用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术对裸花水竹草药材的脂溶性成分进行分析和鉴定, 并通过标准质谱谱库的计算机检索进行化学成分定性; 采用清除 DPPH 自由基及 ABTS 自由基能力的方法对裸花水竹草的脂溶性成分进行抗氧化活性研究。结果 从裸花水竹草的脂溶性成分中共鉴定出 23 个成分, 同时抗氧化结果显示裸花水竹草的脂溶性成分对 DPPH 自由基及 ABTS 自由基的半数清除浓度 IC₅₀ 分别为 5.255, 3.848 mg·mL⁻¹。结论 裸花水竹草的脂溶性成分主要为不饱和脂肪酸类化合物及植醇, 均为首次从该植物中鉴定出; 其脂溶性成分具有一定的抗氧化活性。

关键词: 裸花水竹草; 脂溶性成分; 气相色谱-质谱联用; 抗氧化活性

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)05-0674-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.05.012

引用本文: 黄周锋, 卢文杰, 谭晓, 等. 裸花水竹草脂溶性成分及其抗氧化活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(5): 674-677.

Study on the Components and Antioxidant Activities of the Liposoluble Constituents from *Murdannia nudiflora* (Linn.) Brenan

HUANG Zhoufeng¹, LU Wenjie^{1,2*}, TAN Xiao¹, LU Guoshou¹, HUANG Jianyou¹, HU Xiaoxi¹(1. Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science, Nanning 530022, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning 530022, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To analyze the components and antioxidant activities of the liposoluble constituents from *Murdannia nudiflora* (Linn.) Brenan. **METHODS** The liposoluble constituents from *Murdannia nudiflora* (Linn.) Brenan were analyzed by GC-MS and identified by the searching of standard mass spectral library on computer. The antioxidant activities were detected by DPPH free radical and ABTS free radical scavenging method. **RESULTS** The 23 compounds were identified from *Murdannia nudiflora* (Linn.), and the half elimination ratio (IC₅₀) of scavenging activity of free radical in DPPH and ABTS were 5.255, 3.848 mg·mL⁻¹, respectively. **CONCLUSION** The bioassay indicated that the liposoluble constituents from *Murdannia nudiflora* (Linn.) Brenan possessed antioxidant activities. Unsaturated fatty acid and phytol are major chemical constituents of these components. All the compounds were identified from this plant for the first time. The liposoluble constituents from *Murdannia nudiflora* (Linn.) Brenan possessed antioxidant activities.

KEY WORDS: *Murdannia nudiflora* (Linn.) Brenan; the liposoluble constituents; GC-MS; the antioxidant activities

壮药裸花水竹草来源于鸭跖草科水竹草属植物 *Murdannia nudiflora* (Linn.) Brenan 的全草, 其味甘、淡, 性凉, 归肺、胃经, 具有清肺热, 凉血解毒的功效, 主治肺热咳嗽、咳血, 吐血, 咽喉肿痛, 目赤肿痛, 外用则治疮痈肿痛^[1]。随着 PM 2.5 颗粒对我国国民健康的影响日益严重, 加强中草药对呼吸道疾病预防和治疗, 特别是对肺结核、肺炎等疾病方面的应用具有重要的现实意义。根据《壮族民间用药选编》摘录^[2], 裸花水竹草是一种可用于治疗肺结核的壮民族特色药物。通过查阅国内外相关文献, 未见有关裸花水竹草

脂溶性化学成分的研究报道, 为了充分利用和开发其药用资源, 对裸花水竹草脂溶性化学成分的研究显得极有必要。本研究利用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术对裸花水竹草药材的脂溶性成分进行分析和鉴定, 并通过标准质谱谱库的计算机检索进行化学成分定性, 同时采用清除 DPPH 自由基及 ABTS 自由基能力的方法对裸花水竹草的脂溶性成分进行抗氧化活性研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器

气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent

基金项目: 广西中药质量标准研究重点实验室系统性研究课题(桂中重系 201309)

作者简介: 黄周锋, 男, 硕士, 助理研究员 Tel: (0771)5868986
E-mail: luwenjie0771@163.com

E-mail: ferhung@126.com *通信作者: 卢文杰, 男, 主任药师 Tel:

Technologies, HP6890GC/5973MS); UV2550 紫外分光光度计(岛津); RE-52 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); JJ500 型电子天平(常熟市双杰电子仪器厂); SHZ-D 循环水式真空泵(郑州长城科工贸有限公司); V124126 全波长酶标仪(Thermo Multiskan Go)。

1.2 材料

裸花水竹草药材采自广西南宁市郊, 由广西中医药研究院何开家主任中药师鉴定为裸花水竹草 *Murdannia nudiflora* (Linn.) Brenan。石油醚、乙酸乙酯、氢氧化钾、苯、无水乙醇均为分析纯, 购自广东光华科技股份有限公司。2,2-二苯基-1-苦肟基(DPPH, 麦克林公司, 批号: D807297; 纯度: 98%); 2,2-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氢盐(ABTS, 麦克林公司, 批号: A800764; 纯度: 98%)。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

裸花水竹草药材, 阴凉处风干, 粉碎, 称取 11.0 kg, 加 95%乙醇加热回流提取, 过滤, 滤液浓缩至稠膏状, 加水混悬, 用石油醚(60~90 °C)萃取, 得到石油醚萃取液, 浓缩后得石油醚部位 153 g。

取石油醚部位 153 g, 经硅胶层析柱分离, 依次用石油醚-乙酸乙酯(100:0→98:2→95:5→90:10→80:20→70:30)梯度洗脱, 收集得到 279 个流份, 每份 500 mL, 第 1~6 流份为半固体油状物, 合并备用。

取上述备用的半固体油状物 110 mg, 进行甲基化^[2]: 将样品置于 100 mL 具塞烧瓶中, 加石油醚(60~90 °C)-苯(1:1, 体积比)20 mL 使其溶解, 并加入 0.4 mol·L⁻¹ KOH-MeOH 溶液 10 mL, 摇匀, 于 50 °C 恒温水浴 30 min, 停止加热, 加入纯净水 20 mL, 振摇, 静置分层, 取上清液, 上清液加入无水硫酸钠脱水后过滤, 滤液作为 GC-MS 分析试样。

2.2 GC-MS 条件

GC 条件: HP-5MS 石英毛细管柱(30 mm×0.25 mm×0.25 μm); 柱温: 起始温度为 80 °C, 程序升温, 以 5 °C·min⁻¹ 至 260 °C, 保持 30 min; 柱流量为 1.0 mL·min⁻¹; 进样口温度 250 °C; 柱前压 100 kPa; 进样量 1.0 μL; 分流比 50:1; 载气为高纯氦气。

MS 条件: 电离方式 EI; 电子能量 70 eV; 传输线温度 250 °C; 离子源温度 230 °C; 四极杆温度 150 °C; 质量范围 35~500; 色谱峰面积归一化法计算各主要成分的相对含量。采用 NIST11 标准质谱谱库计算机检索定性。

2.3 DPPH 抗氧化方法

采用清除 DPPH 自由基的方法测定脂溶性成分的抗氧化能力^[3-6]: 称取 25.675 mg 的 DPPH, 使用无水乙醇溶解, 定容于 100 mL 量瓶, 得到 6.5×10⁻⁴ mol·L⁻¹ 的 DPPH 乙醇溶液, 备用, 使用时稀释 10 倍, 即浓度为 6.5×10⁻⁵ mol·L⁻¹; 样品浓度设置为 6 个梯度: 6.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.0, 1.0 mg·mL⁻¹, 每个浓度使用 1 cm 比色皿在 517 nm 波长处平行测试 3 次吸光度, 取其平均值; 计算样品对 DPPH 的清除率。

$$\text{清除率}=[1-(A_i-A_j)/A_0] \times 100\%$$

其中: A_0 为加入 10 mL 6.5×10⁻⁵ mol·L⁻¹ DPPH 和 2 mL 的试样溶剂(无水乙醇: 乙酸乙酯=1:1)混匀后测定的吸光度值; A_i 为 10 mL 6.5×10⁻⁵ mol·L⁻¹ DPPH 和 2 mL 的试样混匀后测定的吸光度值; A_j 为 10 mL 无水乙醇和 2 mL 的试样混匀后测定的吸光度值。

以样品浓度为横坐标, 清除率为纵坐标作图, 使用回归分析方法求出清除率为 50% 时样品的浓度(IC₅₀), 使用半数清除浓度(IC₅₀)来表示样品的抗氧化活性结果。

2.4 ABTS 抗氧化方法^[7-8]

将 3 mL 的 7 mmol·L⁻¹ ABTS 和 3 mL 的 2.45 mmol·L⁻¹ 过硫酸钾溶液混合, 在室温避光条件下静止过夜, 形成 ABTS⁺ 自由基储备液。使用前加 70%乙醇调至吸光度为 0.700±0.005, 在 96 孔板中每孔加入 40 μL 的样品, 样品设置 5 个浓度, 10.0, 8.0, 6.0, 4.0, 2.0 mg·mL⁻¹ 再加入 160 μL ABTS⁺ 自由基工作液, 振荡充分混合后, 以 200 μL 70%乙醇为空白, 静置 6 min, 在 734 nm 波长下测定吸光度。

$$\text{清除率}=[1-(A_i-A_j)/A_0] \times 100\%$$

其中: A_0 为加入 160 μL ABTS⁺ 和 40 μL 试样溶剂混匀后测定的吸光度值; A_i 为 160 μL ABTS⁺ 和 40 μL 试样混匀后测定的吸光度值; A_j 为 160 μL ABTS⁺ 溶剂和的 40 μL 试样混匀后测定的吸光度值。以样品浓度为横坐标, 清除率为纵坐标作图。

3 结果与分析

3.1 裸花水竹草脂溶性成分 GC-MS 的分析结果

经 GC-MS 检测, 得到样品的总离子流图, 见图 1。根据总离子流图的结果分析可知, 各组份经 NIST11 标准质谱谱库计算机检索和比对, 并按面积归一化法计算出各组分的相对百分含量, 结果见表 1。结果表明, 裸花水竹草的脂溶性成分主要为不饱和脂肪酸类化合物及植醇, 含量较高的成分分别为十八碳二烯酸(17.10%)、十八碳烯酸(16.09%)、植醇(19.85%)。

表 1 裸花水竹草脂溶性成分的 GC-MS 分析结果

Tab. 1 Analysis of liposoluble constituents from *Murdannia nudiflora* (Linn.) Brenan

序号	保留时间/min	化合物	相似度/%	百分含量/%
1	3.59	2-甲基-反式萘烷 2-methyl-trans-Decalin	95	2.03
2	4.77	正十三烷 Tridecane	97	4.39
3	5.52	2-甲基-十三烷 2-methyl-Tridecane	93	0.37
4	5.71	2,6,10-三甲基-十二烷 2,6,10-trimethyl-Dodecane	97	0.96
5	6.03	正十四烷 Tetradecane	96	1.24
6	7.35	3-苯基-2-丙烯酸 3-phenyl-2-Propenoic acid	97	0.24
7	7.71	正十五烷 Pentadecane	95	0.26
8	8.04	2,4-二叔丁基-苯酚 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-Phenol	94	0.42
9	8.20	十二烷酸 Dodecanoic acid	97	0.89
10	12.97	十四烷酸 Tetradecanoic acid	93	1.17
11	14.04	对-甲氧基肉桂酸乙酯 Ethyl p-methoxycinnamate	99	1.19
12	15.75	十五烷酸 Pentadecanoic acid	91	0.23
13	16.35	6,10,14-三甲基-2-十五烷酮 6,10,14-trimethyl-2-Pentadecanone	96	6.04
14	18.65	十六烷酸 Hexadecanoic acid	98	17.61
15	21.60	十七烷酸 Heptadecanoic acid	91	0.25
16	23.90	十八碳二烯酸 Octadecadienoic acid	99	17.10
17	24.13	十八碳烯酸 Octadecenoic acid	99	16.09
18	24.32	十七碳烯酸 Heptadecenoic acid	93	0.50
19	24.58	植醇 Phytol	93	19.85
20	25.08	硬脂酸 Stearic acid	99	3.95
21	31.05	二十烷 Eicosane	96	0.59
22	31.87	二十烷酸 Eicosanoic acid	99	4.03
23	36.51	二十二烷酸 Docosanoic acid	90	0.85

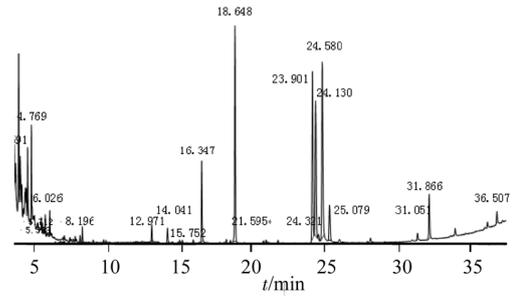


图 1 样品的总离子流图

Fig. 1 Total ion current of the sample

3.2 抗氧化活性的测定结果

清除 DPPH 自由基能力的试验结果显示, 裸花水竹草的脂溶性成分具有一定的抗氧化活性。在测定的浓度范围内, 抗氧化活性随着试样浓度的增加而逐渐增强, 呈现良好的剂量依赖性, 见图 2。使用回归分析方法得到回归方程 $y=8.107x+7.392(R^2=0.9993)$, 计算得到 IC_{50} 值为 $5.255 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

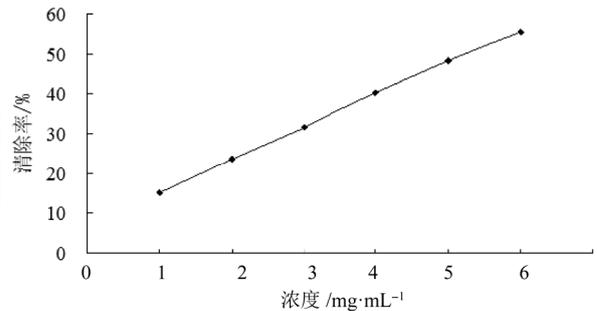


图 2 裸花水竹草脂溶性成分对 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 2 The scavenging activity of free radical in DPPH

清除 $ABTS^+$ 自由基能力的试验结果显示, 在测定的浓度范围内, 抗氧化活性随着试样浓度的增加而逐渐增强, 呈现良好的剂量依赖性, 结果见图 3。使用回归分析方法得到回归方程: $y=3.648x+35.961(R^2=0.9993)$, 计算得到 IC_{50} 值为 $3.848 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

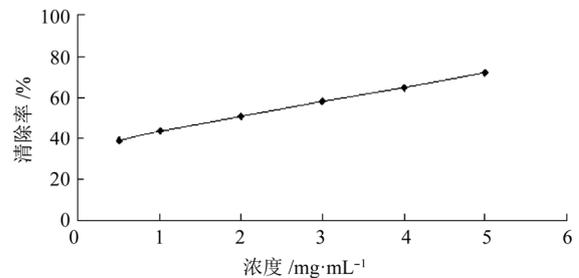


图 3 裸花水竹草脂溶性成分对 ABTS 自由基的清除能力

Fig. 3 The scavenging activity of free radical in ABTS

4 结论

通过使用 GC-MS 联用技术对裸花水竹草脂溶性成分进行检测分析,共检出 42 个组分,并鉴定了 23 个成分。从分析结果可知,分离得到的脂溶性成分主要为不饱和脂肪酸类化合物及植醇,其中十八碳二烯酸、十八碳烯酸和植醇的含量分别为 17.10%, 16.09% 和 19.85%。同时从抗氧化结果显示裸花水竹草的脂溶性成分具有一定的抗氧化活性,可能是其中的十八碳二烯酸即亚油酸,以及十八碳烯酸等不饱和脂肪酸中的不饱和键表现出一定的抗氧化能力。同时十八碳二烯酸属于多不饱和脂肪酸,临床实验发现,多不饱和脂肪酸具有抗炎症、抗肿瘤、调节血脂、提高免疫力、预防心血管疾病及治疗精神分裂症等多种生理功能^[9],因此对本药物的抗肺炎方面的功效具有较高的开发利用价值。本研究为裸花水竹草药用价值的进一步开发和利用提供了科学依据。

REFERENCES

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(第八册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 306.
[2] 方鼎, 罗金裕, 苏广洵等. 壮族民间用药选编(上册)[M]. 南

宁: 广西民族出版社, 1985:241.

- [3] ZHANG X R, WANG Z N, WANG M Y, et al. Study on the components and antioxidant activities of liposoluble extract from *Crotalaria pallida* seed [J]. Chin J Tropic Crops(中国热带植物), 2011, 32(9): 1669-1672.
[4] HE Y J, YUE Y D, TANG F. Detection of an tioxidative capacity of essential oils from the bamboo leaves by scavenging inorganic free radical DPPH [J]. J Anhui Agricult Univ(安徽农业大学学报), 2009, 36(3): 408-412.
[5] MA S, MA P P, ZHAN W Y, et al. Anti-aging effects of *Epimedium Acuminatum* based on the anti-oxidant effect [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2017, 34(6): 836-840.
[6] LI J, ZHU Y, CHEN E Y, et al. Spectrum-effect relationship between mid-infrared spectrum fingerprint of *Hedysari Radix* and antioxidant capacity *in vitro*[J]. Chin J Mod App Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(11): 1382-1387.
[7] XU H T, MA S M, ZHANG J Y. Correlations between antioxidant and contents of total flavonoids and total phenols of four extracts from *Nervilia Fordii* [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2017, 39(1): 121-124.
[8] LI C Q, YAO C, ZHU Y R, et al. Spectrum-effect relationship in antioxidant activity of *Ligustri Lucidi Fructus* based on DPPH, ABTS and FRAP assays [J]. China J Chin Mate Med(中国中药杂志), 2016, 41(9): 1670-1677.
[9] 王萍, 张银波, 江木兰. 多不饱和脂肪酸的研究进展[J]. 中国油脂, 2008, 33(12): 42-46.

收稿日期: 2017-05-24

(本文责编: 蔡珊珊)