

金丝梅石油醚超声提取物 GC-MS 分析及其体外抗氧化作用

周福佳, 李恩超, 陈伟, 王勇鉴, 段静雨, 张春平* (徐州医科大学药学院, 江苏省新药研究与临床药学重点实验室, 江苏 徐州 221004)

摘要: 目的 采用 GC-MS 分析金丝梅(*Hypericum patulum* Thumb.)石油醚超声提取物中的化学成分, 并研究该提取物的抗氧化作用。方法 以石油醚为溶剂, 采用超声提取法提取金丝梅中的化学成分, 并采用 GC-MS 分析石油醚超声提取物中的化学成分; 采用 DPPH 和 ABTS 2 种方法研究金丝梅石油醚超声提取物的抗氧化活性。**结果** 从金丝梅石油醚超声提取物中共鉴定了 24 个化合物。其中, 3-甲基庚烷含量最高, 达 26.329%, 检测出的化合物类型为烷烃类(57.99%)、萜类(17.22%)、芳烃(7.78%)和其他类型(17.01%)化合物。该提取物对 DPPH 自由基和 ABTS⁺自由基的清除作用在一定浓度范围内成对数关系, 对 DPPH 自由基清除作用的 IC_{50} 值 $>20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 对 ABTS⁺自由基的清除作用 TEAC 值为 $(3.71\pm 0.1)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。**结论** 金丝梅石油醚超声提取物中脂溶性成分较多, 具有一定的抗氧化活性。该研究结果为金丝梅化学成分的研究及进一步利用提供了科学依据。

关键词: 金丝梅; 超声提取; 气相色谱-质谱法; 抗氧化活性

中图分类号: R917.101; R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)01-0030-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.01.006

引用本文:周福佳, 李恩超, 陈伟, 等. 金丝梅石油醚超声提取物 GC-MS 分析及其体外抗氧化作用[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(1): 30-34.

Compositional Analyses by GC-MS and Antioxidant Activities *in Vitro* of Petroleum Ether Extract of *Hypericum Patulum* Thumb. Under Ultrasound Irradiation

ZHOU Fujia, LI Enchao, CHEN Wei, WANG Yongjian, DUAN Jingyu, ZHANG Chunping* (School of Pharmacy, Jiangsu Key Laboratory New Drug Research and Clinical Pharmacy, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the chemical constituents by GC-MS and antioxidant activities of petroleum ether extract of *Hypericum patulum* Thumb. under ultrasound irradiation. **METHODS** The chemical constituents of *Hypericum patulum* Thumb. were extracted with petroleum ether using the ultrasonic extraction method and analyzed by GC-MS. Furthermore, the antioxidant activities of petroleum ether extract were measured by DPPH and ABTS⁺ radicals scavenging activity assays. **RESULTS** The 24 compounds were identified from the petroleum ether extract of *Hypericum patulum* Thumb. under ultrasound irradiation, 3-methyl heptane with relative content of 26.329% was the most among them. The types of detected compounds were alkane(57.99%), terpenoids(17.22%), aromatics(7.78%) and others(17.01%). The DPPH radical scavenging effect and ABTS⁺ radical scavenging effect were individually in logarithm relation with concentration in a certain range. The IC_{50} value of DPPH radical scavenging was $>20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, the TEAC value of ABTS⁺ radical scavenging effect was $(3.71\pm 0.1)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. **CONCLUSION** The liposoluble constituents of *Hypericum patulum* Thumb. are abundant, and show certain antioxidant activity, which offer a scientific basis for further chemical study and utilization of *Hypericum patulum* Thumb..

KEYWORDS: *Hypericum patulum* Thumb.; ultrasonic extraction; GC-MS; antioxidant activities

金丝梅又名金丝桃、芒种花、云南连翘、黄花香、栽秧花等, 为藤黄科金丝桃属(*Hypericum* Linn.)植物, 全株具有清热解毒、利尿、行瘀的功效, 在我国西南部民间常用于治疗肝炎、感冒、痢疾、筋骨疼痛、跌打损伤等。金丝梅主要分布在我国西南部、中部和台湾地区, 为半常绿或常绿小灌木, 小枝红色或暗褐色, 通常也用于庭院

绿化和盆栽观赏^[1]。早在 20 世纪 90 年代, 日本学者 Ishiguro 等^[2-8]发表多篇文章, 从该植物的组织培养物中分离鉴定了一系列 xanthone 类化合物。超声提取技术是近年来应用到中药及天然药物有效成分提取分离中的一种较为成熟的方法。与常规提取方法相比, 超声提取法速度快、时间短、收率高, 避免了高温对有效成分的影响^[9], 已广泛

基金项目: 江苏省自然科学基金面上项目(BK20181154)

作者简介: 周福佳, 男, 硕士生 Tel: (0516)83262140 E-mail: chunpingzhang520@163.com

E-mail: 276725503@qq.com

*通信作者: 张春平, 男, 副教授

Tel:

应用于中药及天然药物中化学成分的提取。本研究以石油醚为溶剂,采用超声提取法提取金丝梅中的脂溶性成分并进行 GC-MS 分析,采用 DPPH 和 ABTS 2 种方法研究金丝梅石油醚超声提取物的抗氧化活性。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

6890/5793 型气相色谱质谱联用仪(美国 HP); BP 110S 型电子天平(Sartorius 公司); R-215 型旋转蒸发器(瑞士 BUCHI 公司); 752 型紫外可见分光光度计(上海精科仪器有限公司); 真空干燥箱(巩义市英预予华仪器厂); 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。所用石油醚(30~60 °C)为市售分析纯试剂,使用前采用旋转蒸发器蒸馏精制。DPPH(日本和光纯药工业株式会社); ABTS(Sigma 公司); Trolox 试剂(Sigma 公司); 高硫酸钾($K_2S_2O_8$)(汕头市西陇化工有限公司); 维生素 C(北京化学试剂有限公司)。

1.2 材料

金丝梅采于江苏宿迁,经徐州医科大学药学院中药学教研室王健慧副教授鉴定该植物为藤黄科金丝桃属金丝梅 *Hypericum patalum* Thumb.。

1.3 方法

1.3.1 金丝梅石油醚超声提取物的制备 精密称取过 5 号筛的金丝梅全株粉末 10 g,加入具塞锥形瓶中,同时加入石油醚 100 mL,室温浸泡 2 h 后超声提取 30 min,提取液采用 0.8 μm 聚四氟乙烯膜减压抽滤,滤液减压浓缩并冷冻干燥,得金丝梅石油醚超声提取物,提取率为 2.38%。提取物储存在干燥器中备用。进样前用石油醚溶解。

1.3.2 GC-MS 分析 HP190915-433X 型毛细管柱(250 μm ×60 m, 0.25 μm); 载气为高纯氦气; 流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 分流进样,分流比 2:1; 进样量 0.4 μL ; 溶剂延迟 6 min,升温程序:起始温度 60 °C,恒温 2 min,以 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升至 150 °C,保留 2 min,再以 2 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升至 200 °C,保留 2 min,再以 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升至 280 °C,保留 3 min; 质谱条件为 EI 源,电子能量 70 eV,离子源温度 230 °C,质量扫描范围 m/z 33~500。

1.3.3 样品溶液和对照品溶液的配制 精密称取金丝梅石油醚超声提取物 1/10 的量,即相当于原生药 1 g,加入一定量的无水乙醇超声溶解,定容

至 10 mL,即配成浓度均为生药 100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,备用。精密称取维生素 C 5.0 mg,加入一定量的无水乙醇溶解,定容至 25 mL,配成 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,备用。

1.3.4 DPPH 自由基清除活性试验^[10-13] 参考文献,配制 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DPPH 溶液,其吸光度值 A 为 1 左右,备用。量取 1.9 mL 的 DPPH 乙醇溶液置试管中,分别加入 100, 80, 60, 40, 20, 10, 5 μL 的样品溶液,如果反应体系不足 2 mL,加一定量的乙醇补足,振摇试管使反应液混合均匀,反应 60 min 后在紫外可见分光光度计 517 nm 处测定吸光度值,记为 A_1 ,平行测定 3 次。另取一试管在其中加入 1.9 mL 的无水乙醇,加入与以上反应体系中同等体积的样品溶液,并加乙醇补足 2 mL,在 517 nm 处测定吸光度值 A_2 ,同时测定 1.9 mL 的 DPPH 乙醇溶液中加入 100 μL 无水乙醇的吸光度值 A_0 。

$\text{DPPH 清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$ 。通过测定可以得出样品反应浓度与 DPPH 清除率之间的标准曲线,并通过标准曲线方程计算 DPPH 清除率为 50% 时样品溶液的浓度即为 IC_{50} 值。

1.3.5 ABTS⁺自由基清除活性试验^[14-15] 参考文献配制 7 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ABTS 水溶液和 140 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $K_2S_2O_8$ 水溶液。再精密量取 $K_2S_2O_8$ 溶液 88 μL 于 5 mL ABTS 溶液中,使得溶液中过硫酸钾的最终浓度为 2.45 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,室温及避光条件下放置 16 h,获得 ABTS⁺储备液。使用前取一定量的 ABTS⁺储备液用无水乙醇稀释成工作液,要求工作液在 734 nm 波长下的吸光值为 0.70±0.02。量取 1.9 mL 的 ABTS⁺溶液置试管中,按 DPPH 自由基清除活性试验方法加样,反应一定时间在紫外分光光度计 734 nm 处测定吸光度值。

$\text{ABTS}^+\text{清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$ 。

照上述测定方法分别测定 Trolox 同浓度时的 ABTS⁺清除率,以 Trolox 反应浓度(C)为横坐标、清除率(Y)为纵坐标绘制标准曲线回归方程。根据该标准曲线计算各样品的 TEAC 值。TEAC 值是指生药浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的受试物质相当于产生相同清除 ABTS⁺效果的 Trolox 的浓度。

1.3.6 Trolox 标准曲线的制定 按要求将 Trolox 配成 3 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乙醇溶液。用移液器量取 1.9 mL 的 ABTS⁺溶液置试管中,分别取 2, 5, 8,

10, 12, 15 μL Trolox 于试管中, 并加乙醇补足 2 mL 作为反应体系, 在 734 nm 处测定不同反应浓度的 Trolox 溶液与 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 溶液反应的吸光度值, 计算 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 自由基清除率。

2 结果

2.1 GC-MS 分析结果

金丝梅石油醚超声提取物的总离子流色谱图

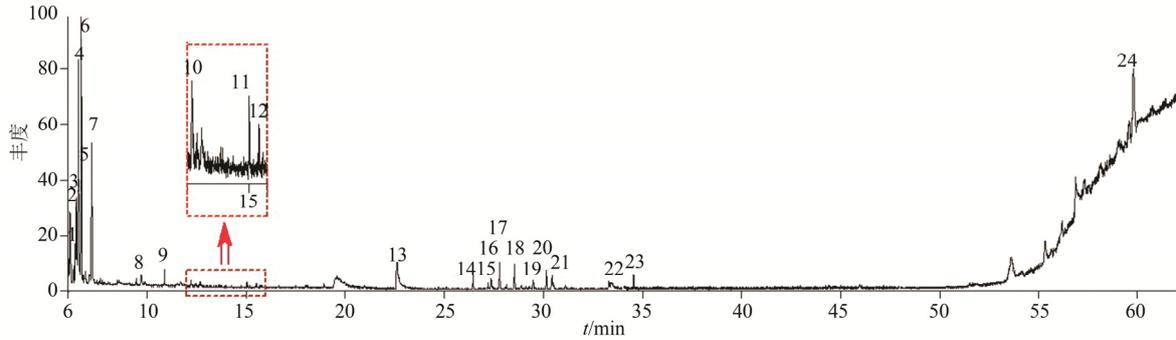


图 1 金丝梅石油醚超声提取物的总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion chromatograms of petroleum ether extract of *Hypericum patulum* Thumb. under ultrasound irradiation

表 1 金丝梅石油醚超声提取物中检测到的化学成分

Tab. 1 Constituents detected from petroleum ether extract of *Hypericum patulum* Thumb. under ultrasound irradiation

No.	保留时间/min	化合物名称	分子式	分子量	相对含量/%
1	6.181	乙基环戊烷	C_7H_{14}	98.11	1.382
2	6.229	3,3-二甲基己烷	C_8H_{18}	114.14	5.213
3	6.547	2,3-二甲基己烷	C_8H_{18}	114.14	4.320
4	6.624	2,5-二甲基己烷	C_8H_{18}	114.14	9.212
5	6.659	4-甲基庚烷	C_8H_{18}	114.14	1.185
6	6.783	3-甲基庚烷	C_8H_{18}	114.14	26.329
7	7.327	辛烷	C_8H_{18}	114.14	10.250
8	9.788	邻二甲苯	C_8H_{10}	106.08	1.101
9	10.981	(1R)-2,6,6-三甲基双环[3.1.1]庚-2-烯	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	136.13	1.240
10	12.280	(1S)6,6-二甲基-2-亚甲基双环[3.1.1]庚烷	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	136.13	0.499
11	15.084	顺式-氧化芳樟醇	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$	170.13	0.475
12	15.591	1-甲基-4-(丙-2-烯)环己-1-烯	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	136.13	0.300
13	22.665	2-甲基萘	$\text{C}_{11}\text{H}_{10}$	204.19	6.778
14	26.524	石竹烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	204.19	1.272
15	27.286	1,1,7-三甲基-4-亚甲基-十氢-1H-环丙烷[e]萘	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	204.19	0.514
16	27.404	反式- β -金合欢烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	204.19	0.905
17	27.870	蛇麻烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	204.19	2.756
18	28.620	γ -依兰油烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	204.19	2.690
19	29.529	(1aS,3aR,7aS,7bS)-1,1,3a-三甲基-7-7-亚甲基-十氢-1H-环丙烷[a]萘	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	204.19	1.164
20	30.231	1-异丙基-4,7-二甲基-1,2,4a,5,6,8a-六氢萘	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	204.19	2.122
21	30.527	(1S,8aR)-1-异丙基-4,7-二甲基-1,2,3,5,6,8a-六氢萘	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	204.19	1.425
22	33.378	1,4-二甲基-3-(2-甲基丙-1-烯-1-基)4-乙烯环庚-1-烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	204.19	0.788
23	34.529	(1R,3E,7E,11R)-1,5,5,8-四甲基-氧杂双环[9.1.0]十二-3,7-二烯	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	220.18	1.069
24	59.819	γ -生育酚	$\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_2$	416.37	17.009

见图 1, 分析结果见表 1。

由图 1 和表 1 可知, 从金丝梅石油醚超声提取物中共鉴定了 24 种化合物, 其中, 3-甲基庚烷 (No.6) 含量最高, 达 26.329%, 其次为 γ -生育酚 (No.24), 含量为 17.009%, 另外, 辛烷 (No.7) 和 2,5-二甲基己烷 (No.4) 的含量也较高, 分别为 10.250% 和 9.212%。检测出的化合物类型为烷烃类 (57.99%)

和萜类(17.22%)化合物,除此之外,还有芳烃(7.78%)和其他类型(17.01%)化合物。

2.2 Trolox 标准曲线

以 Trolox 反应浓度为横坐标, ABTS⁺自由基清除率(%)为纵坐标, 绘制标准曲线。结果表明, Trolox 反应浓度在 3.0~22.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, ABTS⁺自由基清除率与 Trolox 反应液浓度呈良好的线性关系, 线性方程为 $Y=4.4885X-2.1155 (r>0.99)$ 。根据该标准曲线计算样品的 TEAC 值, TEAC 值越大, 样品的清除 ABTS⁺自由基的作用越强, 抗氧化能力越强。

2.3 DPPH 和 ABTS⁺自由基清除活性试验结果

金丝梅石油醚超声提取物对 DPPH 自由基和 ABTS⁺自由基的清除作用在一定浓度范围内成对数关系, 见图 2~3。

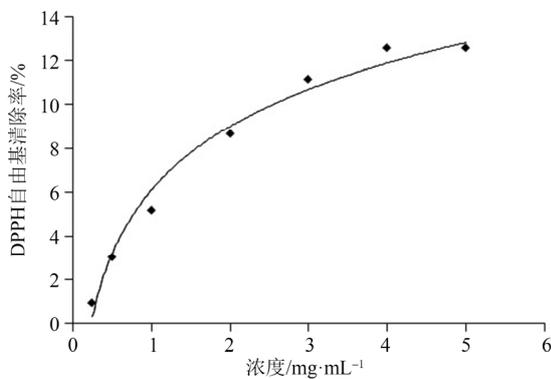


图2 金丝梅石油醚超声提取物对 DPPH 自由基清除作用
Fig. 2 DPPH radical scavenging effect of petroleum ether extract of *Hypericum patulum* Thumb. under ultrasound irradiation

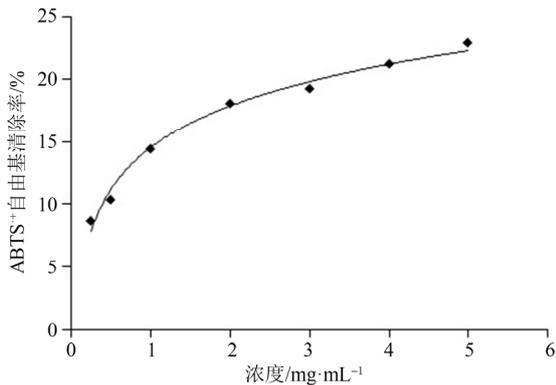


图3 金丝梅石油醚超声提取物对 ABTS⁺自由基清除作用
Fig. 3 ABTS⁺ radical scavenging effect of petroleum ether extract of *Hypericum patulum* Thumb. Under ultrasound irradiation

通过拟合方程, 计算金丝梅石油醚超声提取物对 DPPH 自由基的清除 IC_{50} 值, IC_{50} 值越小,

对 DPPH 自由基的清除作用越强, 抗氧化能力越强。计算在浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对 ABTS⁺自由基的清除率, 并代入 Trolox 线性方程中计算 TEAC 值, TEAC 值越大, 样品对 ABTS⁺自由基的清除作用越强, 抗氧化能力越强。通过 3 次平行实验, 最终得到金丝梅石油醚超声提取物及维生素 C 对 DPPH 自由基清除作用的 IC_{50} 值及对 ABTS⁺自由基清除作用的 TEAC 值见表 2。

表2 金丝梅石油醚超声提取物和维生素 C 的抗氧化作用
Tab. 2 Antioxidant activity of petroleum ether extract of *Hypericum patulum* Thumb. under ultrasound irradiation and Vc

样品	DPPH 自由基清除活性 IC_{50} 值/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	ABTS ⁺ 自由基清除活性 TEAC 值/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
金丝梅石油醚 超声提取物	>20	3.71±0.1
维生素 C	4.18±0.4	2.66±0.4

由表 2 可知, 金丝梅石油醚超声提取物对 DPPH 自由基的清除 IC_{50} 值 >20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 清除能力较弱, 对 ABTS⁺自由基清除作用的 TEAC 值为 3.71 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 清除能力较强, 可能与提取物对 2 种自由基清除机制不同有关。

3 讨论

传统的提取方法如煎煮法、回流提取法和索氏提取法等一直应用于植物中有效成分的提取, 但是, 这些方法提取时间长, 使用溶剂多, 而且, 对热不稳定的成分容易被破坏^[16]。而超声提取技术主要是利用超声波的空化作用加速中草药中有效成分的浸出、提取; 另外, 机械振动、乳化、扩散等超声波的次级效应和化学效应也能加速被提取成分的扩散、释放并使之充分与溶剂混合, 利于提取^[17]。超声提取法已广泛应用于挥发油类成分、多糖类成分、萜类化合物、多酚类化合物、黄酮类化合物等的提取。本研究采用超声提取法提取金丝梅中的脂溶性成分, 操作简单, 提取时间短, 避免了有效成分的破坏。该结果为进一步研究金丝梅的化学成分及开发利用奠定了基础。

REFERENCES

- [1] 江苏新医学院编. 中药大辞典. 上册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 837.
- [2] ISHIGURO K, NAGAREYA N, SUITANI A, et al. A prenylated xanthone from cell suspension cultures of *Hypericum patulum* [J]. Phytochemistry, 1997, 44(6): 1065-1066.
- [3] ISHIGURO K, FUKUMOTO H, NAKAJIMA M, et al. Xanthenes in cell suspension cultures of *H. Patulum* [J].

- Phytochemistry, 1993, 33(4): 839-840.
- [4] ISHIGURO K, NAKAJIMA M, FUKUMOTO H, et al. A xanthone substituted with an irregular monoterpene in cell suspension of *Hypericum patulum* [J]. Phytochemistry, 1995, 39(4): 903-905.
- [5] ISHIGURO K, NAGAREYA N, FUKUMOTO H. A phloroglucinol derivative from cell suspension cultures of *Hypericum patulum* [J]. Phytochemistry, 1998, 47(6): 1041-1043.
- [6] ISHIGURO K, NAKAJIMA M, FUKUMOTO H, et al. Co-occurrence of prenylated xanthenes and their cyclization products in cell suspension cultures of *Hypericum patulum* [J]. Phytochemistry, 1995, 38(4): 867-869.
- [7] ISHIGURO K, YAMAMOTO R, OKU H. Patulosides A and B, novel xanthone glycosides from cell suspension cultures of *Hypericum patulum* [J]. J Nat Prod, 1999(62): 906-908.
- [8] ISHIGURO K, FUKUMOTO H, SUITANI A, et al. Prenylated xanthenes from cell suspension cultures of *Hypericum patulum* [J]. Phytochemistry, 1996, 42(2): 435-437.
- [9] SHIRSATH S R, SONAWANE S H, GOGATE P R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations-A review of current status [J]. Chem Eng Process, 2012(53): 10-23.
- [10] FANG J, WU X N, JIANG J P, et al. Related analysis between antioxidant activities and HPLC fingerprint of flavonoids in *Citrus Changshan-huyou* Y. B. Peels [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(10): 1489-1493.
- [11] HE L X, DING K, XIE M H, et al. Study on enzymatic-ultrasonic assisted extraction of total flavonoids from *Polygonatum Sibirici* and its antioxidant activities [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(9): 1075-1080.
- [12] ZHANG H D, HUANG Y L, FAN Y Z. Study on DPPH radical scavenging ability of raw betel nut extract [J]. Food Sci(食品科学), 2008, 29(8): 74-77.
- [13] SAMAGA P V, RAI V R. Free radical scavenging activity and active metabolite profiling of endophytic fungi from *Nothapodytes foetida* and *Hypericum mysorensense* [J]. Int J Chem Anal Sci, 2013(4): 96-101.
- [14] YAGI S, DROUART N, BOURGAUD F, et al. Antioxidant and antiglycation properties of *Hydnora johannis* roots [J]. S Afr J Bot, 2013(84): 124-127.
- [15] THAIPOONG K, BOONPRAKOB U, CROSBY K, et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts [J]. J Food Compos Anal, 2006(19): 669-675.
- [16] VINATORU M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs [J]. Ultrason Sonochem, 2001(8): 303-313.
- [17] TABARAKI R, NATEGHI A. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology [J]. Ultrason Sonochem, 2011(18): 1279-1286.

收稿日期: 2018-12-19

(本文责编: 曹粤锋)