

圆果算盘子脂溶性成分及其抗氧化活性研究

谭小青¹, 刘布鸣^{1,2*}, 黄艳¹, 胡筱希¹, 黄云峰¹, 柴玲¹(1.广西中医药研究院, 广西 南宁 530022; 2.广西中药质量标准研究重点实验室, 广西 南宁 530022)

摘要: 目的 分析圆果算盘子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)联用技术对圆果算盘子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圆果算盘子的脂溶性成分进行抗氧化活性研究。结果 从圆果算盘子的脂溶性成分中共鉴定出 47 个成分, 同时抗氧化结果显示圆果算盘子的脂溶性成分对 DPPH 自由基及 ABTS⁺自由基的半数清除浓度 IC₅₀ 分别为 1.103, 0.726 mg·mL⁻¹。结论 圆果算盘子的脂溶性成分主要为脂肪酸类化合物及醇类, 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: 圆果算盘子; 脂溶性成分; 气相色谱-质谱联用; 抗氧化活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)02-0196-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.02.012

引用本文: 谭小青, 刘布鸣, 黄艳, 等. 圆果算盘子脂溶性成分及其抗氧化活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(2): 196-200.

Study on Liposoluble Constituents from *Glochidion sphaerogynum* (Muell. Arg.) Kurz and Its Antioxidant Activities

TAN Xiaoqing¹, LIU Buming^{1,2*}, HUANG Yan¹, HU Xiaoxi¹, HUANG Yunfeng¹, CHAI Ling¹(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 *Glochidion sphaerogynum* (Muell. Arg.) Kurz. **METHODS** The liposoluble constituents from *Glochidion sphaerogynum* (Muell. Arg.) Kurz 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 47 compounds were identified from *Glochidion sphaerogynum* (Muell. Arg.) Kurz, and the half elimination ratio(IC₅₀) of scavenging activity of free radical in DPPH and ABTS⁺ were 1.103, 0.726 mg·mL⁻¹. **CONCLUSION** Unsaturated fatty acid and phytol are major chemical constituents of the liposoluble constituents from *Glochidion sphaerogynum* (Muell. Arg.) Kurz. All the compounds were identified from this plant for the first time. The liposoluble constituents possessed antioxidant activities.

KEYWORDS: *Glochidion sphaerogynum* (Muell. Arg.) Kurz; liposoluble constituents; GC-MS; antioxidant activities

圆果算盘子 [*Glochidion sphaerogynum* (Muell. Arg.) Kurz] 系大戟科 (Euphorbiaceae) 算盘子属 (*Glochidion*) 植物, 分布于印度、缅甸、泰国、越南等, 在我国产于广东、海南、广西、云南等省区, 生于山地阔叶林中。其枝叶可供药用, 具有清热解毒的功效, 常用于治疗感冒发烧、暑燥口干、口腔炎等; 外治刀伤出血、骨折; 外洗治湿疹、疮疡溃烂等^[1]。通过查阅国内外相关文献, 仅有 1 篇研究文献报道了圆果算盘子化学成分, 其分离鉴定得到羽扇豆烯酮、算盘子酮、算盘子醇、算盘子二醇等 7 个化合物^[2], 但国内未见有关圆果算盘子脂溶性化学成分的研究报道。为了充

分利用和开发圆果算盘子的药用资源, 本实验对圆果算盘子脂溶性化学成分进行了研究, 利用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术对圆果算盘子药材的脂溶性成分进行分析和鉴定, 并通过检索计算机的标准质谱谱库进行化学成分定性; 同时, 采用清除 DPPH 自由基和 ABTS⁺自由基能力的方法, 对圆果算盘子的脂溶性成分进行抗氧化活性研究。

1 仪器与试剂

TSQ8000 气相色谱-质谱联用仪、Multiskan Go 全波长酶标仪均来自美国 Thermo; UV2550 紫外分光光度计(日本岛津); EV311 旋转蒸发仪(北京莱

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(桂中重自 201703)

作者简介: 谭小青, 女, 硕士生 Tel: 18100777692 E-mail: 43524960@qq.com *通信作者: 刘布鸣, 男, 研究员 Tel: (0771)5883405 E-mail: 63109938@qq.com

伯泰科仪器有限公司); XS205 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); SHZ-D 循环水式真空泵(郑州长城科工贸有限公司)。

圆果算盘子药材采自广西大明山, 由广西中医药研究院黄云峰副研究员鉴定为圆果算盘子 *Glochidion sphaerogynum* (Muell. Arg.) Kurz。2,2-二苯基-1-苦肼基(DPPH, 批号: D807297; 纯度: 98%)、2,2-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐(ABTS, 批号: A800764; 纯度: 98%)均购自麦克林公司; 抗坏血酸(Vc, 分析纯, 北京索莱宝科技有限公司); 石油醚、无水硫酸钠、过硫酸钾、氢氧化钾、苯、95%乙醇、无水乙醇均为分析纯, 均购自广东光华科技股份有限公司。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

圆果算盘子药材, 阴凉处风干, 粉碎, 称取 11.0 kg, 加 10 倍量的 95%乙醇加热回流提取 3 次, 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 50 g。

取石油醚萃取物的半固体油状物 1.0 g, 进行甲基化^[3]: 将样品置于 50 mL 具塞烧瓶中, 加石油醚(60~90 °C)-苯(1:1) 20 mL 使其溶解, 并加入 0.4 mol·L⁻¹ KOH-MeOH 溶液 10 mL, 摇匀, 置于 40 °C 恒温水浴 60 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: TG-SQC 石英毛细管柱(15 m×0.25 mm, 25 μm); 柱温: 起始温度为 40 °C, 程序升温, 以 2.0 °C·min⁻¹ 至 300 °C, 保持 5 min; 柱流量为 1.0 mL·min⁻¹; 进样口温度 280 °C; 进样量 1.0 μL; 未分流; 载气为高纯氮气。

MS 条件: 电离方式 EI; 电子能量 70 eV; 传输线温度 280 °C; 离子源温度 300 °C; 四极杆温度 150 °C; 质量范围 *m/z* 50~450; 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。

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^[4-5]: 称取 25.4 mg DPPH, 使用无

水乙醇溶解, 定容于 100 mL 量瓶, 备用。

Vc 液配制: 称取 1.0 g Vc 置于 100 mL 棕色量瓶中, 蒸馏水定容, 配成 10 mg·mL⁻¹ Vc 水溶液, 分别取 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mL 置于 10 mL 量瓶中, 蒸馏水定容, 配制成 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mg·mL⁻¹ Vc 水溶液。

将之前配制好的 DPPH 标准溶液稀释 10 倍为 DPPH 溶液; 供试品溶液浓度设置为 5 个梯度, 分别为 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2 mg·mL⁻¹, 分别吸取不同浓度的供试品溶液 20 μL 于 96 孔板中(平行 3 次), 再在每个孔中平行加入 180 μL DPPH 溶液。充分混匀将 96 孔板放置在避光环境下反应 30 min。在 515 nm 处测定吸光度(*A*)值, Vc 作为阳性对照, 重复测定 3 次, 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 为无水乙醇+DPPH 溶液的 *A* 值; A_i 为供试品溶液+DPPH 溶液的 *A* 值; A_j 为供试品溶液+无水乙醇的 *A* 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, 使用半数清除浓度(IC_{50})来表示样品的抗氧化活性结果。

2.4 ABTS 抗氧化方法^[6-7]

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置过夜, 形成 ABTS⁺自由基储备液。

Vc 液配制: 按“2.3”项下方法配制。

ABTS⁺自由基储备液使用前加无水乙醇调至 *A* 为 0.700±0.005, 即为 ABTS⁺自由基工作液。在 96 孔板中每孔加入 40 μL 的供试品溶液, 供试品溶液设置 5 个浓度(平行 3 次), 再加入 160 μL ABTS⁺自由基工作液, 以 200 μL 无水乙醇为空白, 混合 10 s, 静置 6 min, Vc 作为阳性对照, 重复测定 3 次, 在 734 nm 波长下测定 *A* 值。

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

其中: A_0 为无水乙醇+ABTS⁺自由基工作液的 *A* 值; A_i 为供试品溶液+ABTS⁺自由基工作液的 *A* 值; A_j 为供试品溶液+无水乙醇的 *A* 值。

3 结果与分析

3.1 圆果算盘子脂溶性成分

经 GC-MS 检测, 得到样品的总离子流色谱图, 见图 1。根据总离子流图的结果分析可知, 各组分

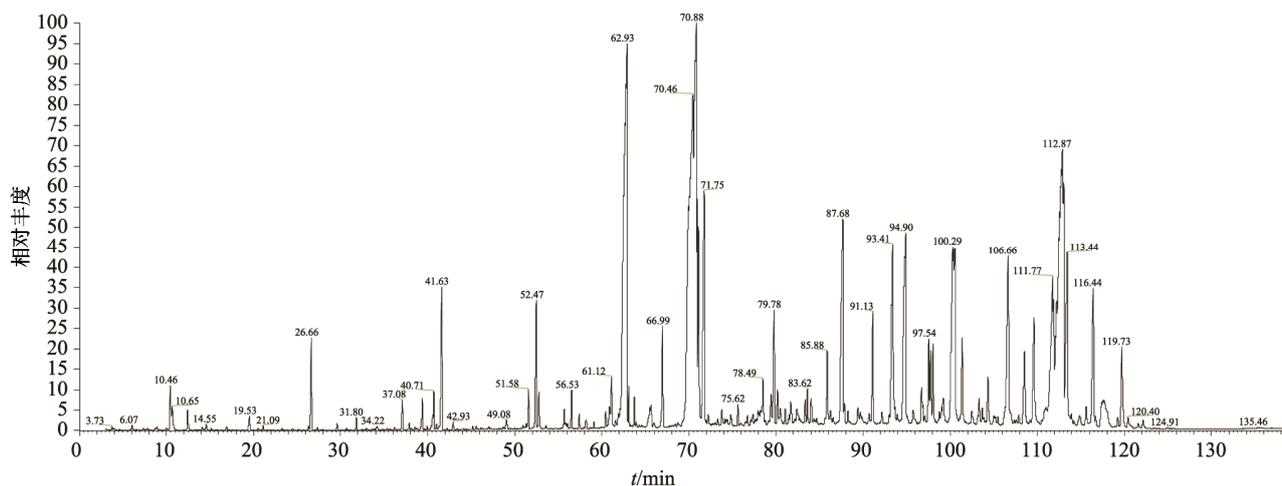


图1 样品的总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram of the sample

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,圆果算盘子的脂溶性成分含量较高的成分分别为棕榈酸(5.79%)、油酸(7.11%)、硬脂酸(4.41%)、山嵛酸(5.28%)、二十四酸(3.64%)、二十五烷(2.77%)、 β -谷甾醇(1.96%)等。

3.2 脂溶性成分抗氧化活性

清除 DPPH 自由基能力的试验结果显示,当浓度 $<3.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,阳性对照物 Vc 对 DPPH 的清除率较高,保持 $>80\%$,当浓度达到 $3.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,圆果算盘子的脂溶性成分对 DPPH 的清除率与 Vc 相当。在测定的浓度范围内,圆果算盘子脂溶性成分抗氧化活性随着试样浓度的增加而逐渐增强,见图 2。使用回归分析方法得到回归方程 $Y=23.851X+23.703(R^2=0.999 1)$,计算得到 IC_{50} 值为 $1.103 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

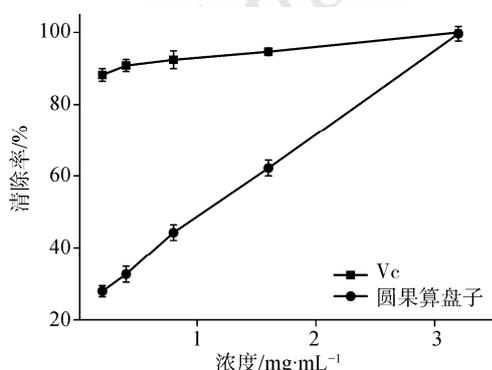


图2 圆果算盘子脂溶性成分对 DPPH 自由基的清除能力
Fig. 2 Scavenging ability of DPPH free radical of liposoluble constituents from *Glochidion sphaerogynum* (Muell. Arg.) Kurz

清除 ABTS^+ 自由基能力的试验结果见图 3,低浓度时,阳性对照物 Vc 对 ABTS^+ 的清除率较高,保持 $>80\%$,当浓度达到 $3.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,圆果算盘子的脂溶性成分对 ABTS^+ 的清除率与 Vc 相当。在测定的浓度范围内,圆果算盘子脂溶性成分的抗氧化活性随着试样浓度增大而增加,使用回归分析方法得到回归方程: $Y=19.869X+35.573(R^2=0.999 5)$,计算得到 IC_{50} 值为 $0.726 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

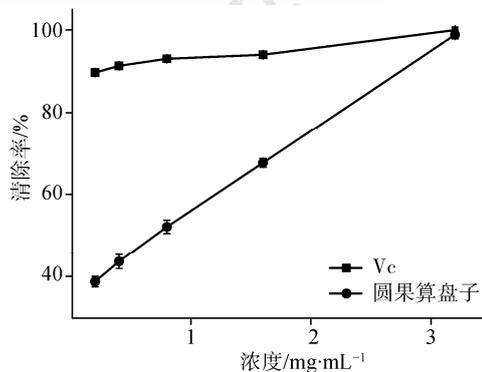


图3 圆果算盘子脂溶性成分对 ABTS^+ 自由基的清除能力
Fig. 3 Scavenging ability of ABTS^+ free radical of liposoluble constituents from *Glochidion sphaerogynum* (Muell. Arg.) Kurz

4 讨论

本实验通过使用 GC-MS 联用技术对圆果算盘子脂溶性成分进行检测分析,共检出并鉴定了 47 个成分。从分析结果可知,分离得到的脂溶性成分主要为脂肪酸类化合物及醇类。清除 DPPH 自由基能力和清除 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,

表 1 圆果算盘子脂溶性成分的 GC-MS 分析结果

Tab. 1 Results of GC-MS analysis of liposoluble constituents from *Glochidion sphaerogynum* (Muell. Arg.) Kurz

序号	保留时间/min	化合物名称	分子式	百分含量/%
1	3.73	乙苯/Ethylbenzene	C ₈ H ₁₀	0.02
2	6.07	α -蒎烯/ α -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	0.04
3	7.33	邻乙基甲苯/1-Ethyl-2-methylbenzene	C ₉ H ₁₂	0.02
4	10.46	邻-异丙基甲苯/O-Cymene	C ₁₀ H ₁₄	0.44
5	12.42	1-甲基-4-(1-甲基乙基)-1,4-环己二烯/4-Isopropyl-1-methyl-1,4-cyclohexadiene	C ₁₀ H ₁₆	0.23
6	14.12	1-甲基-4-(1-甲基乙基)环己烯/1-methyl-4-(1-methylethenyl)-Cyclohexene	C ₁₀ H ₁₆	0.04
7	14.54	苯甲酸/Benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	0.07
8	16.89	辛酸/Octanoic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂	0.04
9	20.50	α -蒎品醇/ α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.03
10	21.09	4-烯丙基苯甲醚/Estragole	C ₁₀ H ₁₂ O	0.05
11	26.32	1-甲基萘/1-Methylnaphthalene	C ₁₁ H ₁₀	0.03
12	26.67	对丙基茴香醚/Anethole	C ₁₀ H ₁₂ O	1.11
13	29.60	癸酸/Decanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	0.07
14	31.80	A-可巴烯/Copaene	C ₁₅ H ₂₄	0.15
15	37.08	邻苯二甲酸/Phthalic acid	C ₈ H ₆ O ₄	0.33
16	37.91	α -衣兰油烯/ α -Murolene	C ₁₅ H ₂₄	0.08
17	39.37	1,2,4a,5,6,8a-六氢-4,7-二甲基-1-(1-甲基乙基)萘/1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-Naphthalene	C ₁₅ H ₂₄	0.36
18	40.56	1,6-二甲基-4-丙烷-2-基-1,2,3,4-四氢萘/4-isopropyl-1,6-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene	C ₁₅ H ₂₂	0.06
19	40.71	(1S,8aR)-1-异丙基-4,7-二甲基-1,2,3,5,6,8a-六氢萘/1-isopropyl-4,7-dimethyl-1,2,3,5,6,8a-hexahydronaphthalene	C ₁₅ H ₂₄	0.37
20	41.63	月桂酸/Dodecanoic acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	1.87
21	45.16	1-十六烷醇/1-Hexadecanol	C ₁₆ H ₃₄ O	0.04
22	45.59	十六烷/Hexadecane	C ₁₆ H ₃₄	0.03
23	52.47	肉豆蔻酸/Myristic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	1.54
24	57.41	十五酸/Pentadecanoic acid	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	0.18
25	61.14	棕榈油酸/9-Hexadecenoic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	0.55
26	62.93	棕榈酸/Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	5.79
27	63.74	酞酸二丁酯/Di-n-butylphthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	0.33
28	66.99	十七烷酸/Heptadecanoic acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	1.20
29	70.88	油酸/9-Octadecenoic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	7.11
30	71.13	叶绿醇/Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	1.82
31	71.77	硬脂酸/Octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	4.41
32	73.78	香叶基香叶醇/trans-Geranylgeraniol	C ₂₀ H ₃₄ O	0.18
33	75.62	十九烷酸/Nonadecanoic acid	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	0.25
34	79.78	二十酸/Eicosanoic acid	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	1.44
35	85.88	二十四醇/Tetracosanol	C ₂₄ H ₅₀ O	0.84
36	87.68	山嵛酸/Docosanoic acid	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	5.28
37	87.86	邻苯二甲酸二(2-丙戊基)酯/Phthalic acid, di(2-propylpentyl) ester	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	0.19
38	91.13	二十三烷酸/Tricosanoic acid	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	1.42
39	94.90	二十四酸/Tetracosanoic acid	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	3.64
40	96.72	二十七烷醇/1-Heptacosanol	C ₂₇ H ₅₆ O	0.52
41	97.54	角鲨烯/Squalene	C ₃₀ H ₅₀	0.89
42	106.66	二十五烷/Pentacosane	C ₂₅ H ₅₂	2.77
43	108.55	菜油甾醇/Campesterol	C ₂₈ H ₄₈ O	1.03
44	109.63	豆甾醇/Stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	1.39
45	111.77	β -谷甾醇/ β -Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	1.96
46	113.44	羽扇豆醇/Lupeol	C ₃₀ H ₅₀ O	1.72
47	116.44	无羁萜/Friedelan-3-one	C ₃₀ H ₅₀ O	1.80

在低浓度时, Vc 对 DPPH 和 ABTS⁺的清除率都高于圆果算盘子, 当达到所测最高浓度时, 两者对 DPPH 和 ABTS⁺的清除效果相当。圆果算盘子的脂溶性成分对 DPPH 自由基及 ABTS⁺自由基的 IC₅₀ 分别为 1.103, 0.726 mg·mL⁻¹。结果表明, 圆果算盘子的脂溶性成分具有一定的抗氧化活性。可能是其中的不饱和脂肪酸中的不饱和键表现出一定的抗氧化能力。棕榈酸可以用来合成抗坏血酸棕榈酸单酯, 该酯类化合物是一种新型的 Vc 衍生物, 不仅保存了 Vc 结构上连烯二醇的活性, 而且具有很强的抗氧化能力^[8]。β-谷甾醇在圆果算盘子中的脂溶性成分含量为 1.96%, 其具有抗肿瘤、镇痛、抗炎、降脂、抗氧化、降血糖等药理活性, 在降血脂方面也已经应用到临床实践中^[9]。本研究为圆果算盘子药用价值的进一步开发和利用提供了科学依据。

REFERENCES

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [2] PUAPAIROJ P, NAENGCHOMNONG W, KIJJOA A, et al. Cytotoxic activity of lupane-type triterpenes from *Glochidion sphaerogynum* and *Glochidion eriocarpum* two of which induce apoptosis[J]. *Planta Med*, 2005, 71(3): 208-213.
- [3] HUANG Z F, LU W J, TAN X, et al. Study on the components and antioxidant activities of the liposoluble constituents from *Murdannia nudiflora*(linn.) Brenan[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2018, 35(5): 674-677.
- [4] PAN D M, ZHANG Q P, LU L Z, et al. Study on total flavonoids purification by macroporous resin and antioxidant activity of flavonoids in *Commelinae Herba*[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2018, 35(2): 231-234.
- [5] MA S, MA P P, CHEN W Y, et al. Anti-aging effects of *Epimedium acuminatum* based on the anti-oxidant effect[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2017, 34(6): 836-840.
- [6] XU H T, MA S M, ZHANG J Y. Correlations between antioxidant activities 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): 121-125.
- [7] LI C Q, YAO C, ZHU R Y, et al. Spectrum-effect relationship in antioxidant activity of *Ligustri Lucidi Fructus* based on DPPH, ABTS and FRAP assays[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2016, 41(9): 1670-1677.
- [8] 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 Trop Crop*(热带作物学报), 2011, 32(9): 1669-1672.
- [9] 肖志彬, 贾韩学, 刘小雷. β-谷甾醇药理活性的研究现状[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2015, 15(8): 66-68.

收稿日期: 2019-11-19
(本文责编: 沈倩)