

·中药制剂与分析·

本文引用:李诗卉,邓静,粟倩,梁诗瑶,伊美瑾,林丽美,孙维广.夏枯草果实石油醚提取物GC-MS分析及抗炎活性研究[J].湖南中医药大学学报,2020,40(6):689-692.

夏枯草果实石油醚提取物GC-MS分析及抗炎活性研究

李诗卉^{1,2},邓静^{1,2},粟倩^{1,2},梁诗瑶^{1,2},伊美瑾^{1,2},林丽美^{1,2*},孙维广³

(1.湖南中医药大学药学院,湖南长沙410208;2.湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室,湖南长沙410208;
3.广州白云山星群(药业)股份有限公司,广东广州510288)

[摘要] 目的 表征夏枯草果实石油醚提取物化学成分,评价其抗炎活性。方法 采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)对夏枯草果实的化学成分进行分析。建立RAW264.7细胞炎症模型,评价其抗炎效果。结果 共鉴定夏枯草果实石油醚提取物中19个化学成分。抗炎活性发现,夏枯草果实石油醚提取物均具有明显的抗炎效果。结论 夏枯草果实石油醚提取物成分及抗炎活性均具一定差异性。

[关键词] 夏枯草果实;石油醚提取物;气相色谱-质谱联用;抗炎

[中图分类号]R284.1;R285.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.06.009

Analysis of Petroleum Ether Extract from *Prunella Vulgaris* L. Fruit by GC-MS and Its Anti-inflammatory Activity

LI Shihui^{1,2}, DENG Jing^{1,2}, SU Qian^{1,2}, LIANG Shiyao^{1,2}, YI Meijin^{1,2}, LIN Limei^{1,2*}, SUN Weiguang³

(1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs of Hunan Province, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Guangzhou Baiyun Mountain Star Group (Pharmaceutical) Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510288, China)

[Abstract] **Objective** To characterize the chemical constituents of petroleum ether extract from *Prunella vulgaris* L. fruit, and to evaluate its anti-inflammatory activity. **Methods** GC-MS was used to detect the chemical constituents of the fruits of *Prunella vulgaris* L. The RAW264.7 cell inflammation model was established, and its anti-inflammatory effect was evaluated. **Results** A total of 19 chemical compounds were identified from *Prunella vulgaris* L. The research on anti-inflammatory activity found that the petroleum ether extracts of *Prunella vulgaris* L. had significant anti-inflammatory effects. **Conclusion** The constituents and anti-inflammatory activities of the petroleum ether extracts of *Prunella vulgaris* L. have certain differences.

[Keywords] fruit of *Prunella vulgaris* L.; petroleum ether extract; GC-MS; anti-inflammatory

夏枯草(*Prunella vulgaris* L.)为唇形科夏枯草属多年生草本植物,药用部位为干燥果穗,具有清火、明目、散结等功效,其主要化学成分有挥发油类、多糖类、黄酮类、三萜类等^[1-2]。夏枯草为药食两用大宗中药材之一,是中成药夏枯草膏、夏桑菊颗粒等最为重要的原料药材,也是王老吉、夏桑菊饮

料等凉茶的主要原料药材,市场需求极大。药用部位夏枯草果穗在入药前,通常堆放在仓库储存,一段时间后果穗中的部分果实散落于地。待果穗入药之后,通常会将散落地面的果实与尘土一起当成垃圾丢弃,造成资源的严重浪费。夏枯草果实是夏枯草果穗药用部位的组成之一,夏枯草果穗的活性成分

[收稿日期]2020-01-14

[基金项目]“中医药现代研究”国家重点研发计划(2017YFC1701900);长沙市科技计划项目(Kq1801046,Kq1804027)。

[作者简介]李诗卉,女,在读硕士研究生,研究方向:中药系统生物学。

[通讯作者]*林丽美,女,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:122448569@qq.com。

在果实部位中也有大量分布^[5]。因此,本文选择夏枯草果实为研究对象,首先进行其石油醚部位的提取,对提取部位采用GC-MS进行成分表征,采用体外炎症模型对该提取部位进行活性评价,报道如下。

1 材料

1.1 原料

夏枯草采购于湖南长沙高桥药材市场,经湖南中医药大学刘塔斯教授鉴定为唇形科夏枯草属植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L.,取干燥夏枯草果实部分;小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 来自中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂

无水乙醇、石油醚、甲醇、正己烷(国药集团化学试剂有限公司);浓硫酸(株洲市星空化玻试剂有限公司);胎牛血清、DMEM 高糖培养基、双抗(链霉素、青霉素)、PBS 磷酸缓冲液、胰蛋白酶(Hyclone 公司);噻唑蓝、脂多糖、二甲基亚砷(Sigma 公司);细胞冻存液(NCM bioech);小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒、小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒(联科生物科技有限公司);NO Griess 试剂盒(碧云天生物技术研究室)。

1.3 主要仪器

分析电子天平(奥多利斯科学仪器公司);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);超纯水机(苏州赛恩斯仪器公司);高速离心机(德国 Eppendorf 公司);气相色谱-质谱联用仪(GC-MS,日本岛津);多功能酶标仪(Thermo 公司);荧光生物显微镜(日本 OLYMUS);单面净化工作台(苏州净化设备有限公司);漩涡混匀仪(上海沪西分析仪器厂);全自动细胞计数仪(美国 Bio-Rad)。

2 方法

2.1 夏枯草果实石油醚提取物 GC-MS 指纹图谱

2.1.1 石油醚提取物的提取 剥开夏枯草果穗取其干燥果实,粉碎后过 60 目筛。取干燥药材粉末 50 g,置于 500 mL 圆底烧瓶中,加入石油醚(b.p.60~90 °C)300 mL 浸泡 1 h,加热回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩至油状,所得石油醚提取物加入无水乙醇萃取,冷藏过夜分层,取上层液减压浓缩除去乙醇,无水硫酸钠干燥即得石油醚提取物^[6]。

2.1.2 甲酯化前处理 10 mg 石油醚提取物加 400 μ L 1%硫酸-甲醇溶液,于 70 °C 水浴锅加热 30 min,加 400 μ L 正己烷和 1 mL 蒸馏水,混匀,静置分层,

取上清液进行 GC-MS 检测^[5]。

2.1.3 GC-MS 分析条件 色谱柱:DB-5MS 石英毛细管柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m);进样量 1 μ L;柱温:起始温度 80 °C 保持 2 min,以 20 °C/min 的速度升温至 160 °C,再以 8 °C/min 升温至 270 °C,保持 10 min。载气:高纯氦气(99.999%);流速 1.0 mL/min;分流进样,分流比 10:1;进样口温度 280 °C;电子轰击离子源温度 200 °C;溶剂延迟时间 6.5 min;质谱扫描范围 m/z 35~550^[6]。

2.2 抗炎能力测定

2.2.1 MTT 法检测细胞毒性 取对数生长期细胞,以每孔 5×10^3 个种于 96 孔板,每组设置 6 个复孔,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 24 h。分为正常组、模型组、药物组(浓度梯度为 100.00、50.00、25.00、12.50、6.25 μ g/mL)。正常组与模型组加入 100 μ L 细胞培养基,药物组每孔给药 100 μ L,药物组的每个浓度设置 6 个复孔,给药 2 h 后药物组与模型组加入 100 μ L 0.1 μ g/mL 的脂多糖,孵育 24 h 后每孔加入噻唑蓝,4 h 后每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷摇床避光低速振荡 15 min。酶联免疫检测仪于 490 nm 测量吸光值 A,计算细胞存活率^[7-8]。

2.2.2 炎症因子含量检测 各组细胞上清液经 300 \times g 离心 10 min,收集上清。按照 ELISA 与 Griess 试剂盒说明书对 IL-6、TNF- α 及 NO 含量进行测定^[9-11]。

3 结果

3.1 GC-MS 测定结果

3.1.1 提取率 根据“2.1.1”石油醚提取物的提取方法得到夏枯草果实石油醚提取物,夏枯草果实得到石油醚提取物 3.0 g,其提取率为 6.0%。

3.1.2 成分分析 对夏枯草果实石油醚提取物 GC-MS 数据分析,得到夏枯草果实石油醚提取物主要成分为脂肪酸,共鉴定出 19 种化学成分,分别为 2-十二烯基-1-琥珀酸酐、壬醛二甲基缩醛、肉豆蔻酸、9-十六烯酸、十六烷酸、亚麻酸、硬脂酸、亚油酸乙酯、11,13-二十碳二烯酸、顺 11-二十烯酸、十八甲基癸酸、13-二十二碳烯酸、二十二烷酸、15-十四烯酸、二十四烷酸、角鲨烯、4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-Octamethyl-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-octadecahydro-2H-picen-3-one、己二酸、 β -生育酚。见表 1 和图 1。

3.2 抗炎能力测定结果

3.2.1 药物浓度筛选 取不同浓度(100.00、50.00、

表 1 夏枯草果实石油醚提取物成分分析及相对含量

编号	化合物	保留时间/min	分子式	分子量	相对含量/%
1	2-十二烯基-1-琥珀酸酐	6.60	C ₁₆ H ₂₆ O ₃	266	0.11
2	壬醛二甲基缩醛	8.68	C ₁₁ H ₂₄ O ₂	188	0.01
3	肉豆蔻酸	16.76	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228	0.07
4	9-十六烯酸	22.66	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254	0.04
5	十六烷酸	23.64	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	7.05
6	亚麻酸	30.92	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278	88.25
7	硬脂酸	31.65	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	1.44
8	亚油酸乙酯	32.83	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308	0.05
9	11,13-二十碳二烯酸	38.32	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308	0.05
10	顺 11-二十烯酸	38.62	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310	0.50
11	十八甲基癸酸	39.78	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312	0.10
12	13-二十二碳烯酸	46.72	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	338	0.11
13	二十二烷酸	47.82	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	340	0.10
14	15-十四烯酸	54.47	C ₂₄ H ₄₆ O ₂	366	0.20
15	二十四烷酸	55.47	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	382	0.14
16	角鲨烯	58.22	C ₃₀ H ₅₀	410	0.43
17	4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-Octamethyl-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-octadecahydro-2H-picen-3-one	60.11	C ₃₀ H ₄₈ O	424	0.13
18	己二酸	62.64	C ₂₆ H ₅₂ O ₂	396	0.07
19	β-生育酚	66.32	C ₃₀ H ₅₀	410	0.06

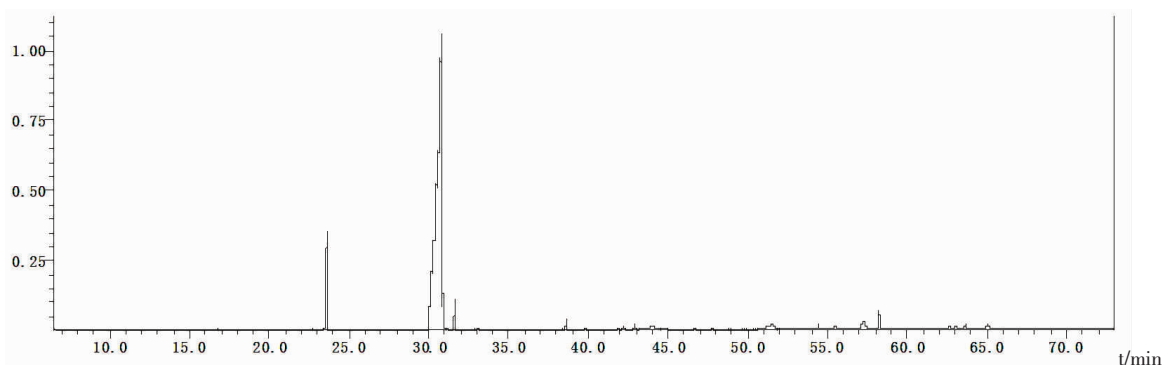
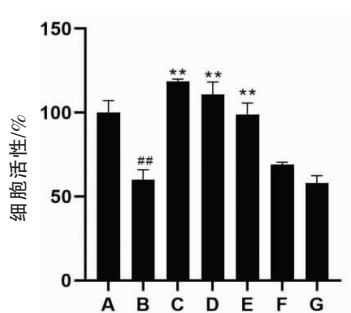


图 1 夏枯草果实石油醚提取物 GC-MS 总离子流图

25.00、12.50、6.25 $\mu\text{g/mL}$ 夏枯草果实石油醚提取物刺激小鼠巨噬细胞,实验结果显示药物浓度小于 25 $\mu\text{g/mL}$ 时基本无细胞毒性,即小于 25.00 $\mu\text{g/mL}$ 为药物的最佳浓度范围。见图 2。



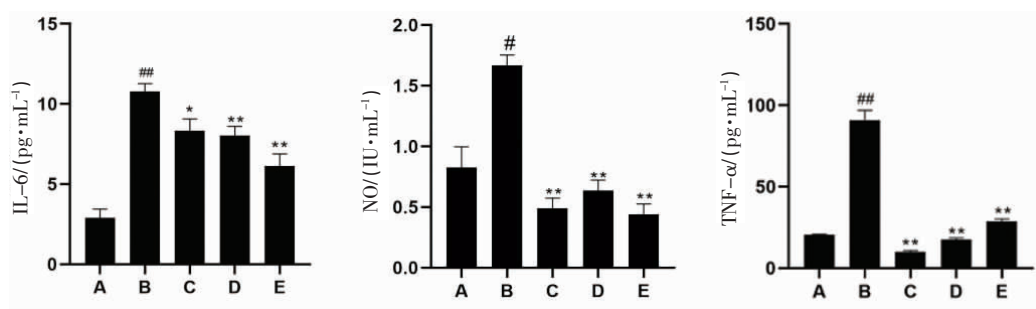
注:A为正常组,B为模型组,C、D、E、F、G分别为 6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{g/mL}$ 药物组;与正常组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$

图 2 不同浓度药物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞活力影响

3.2.2 药物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌 IL-6、TNF- α 及 NO 的影响 在药物的最佳浓度范围选择 3 个浓度,即 25.00、12.50、6.25 $\mu\text{g/mL}$,收集 3 个浓度上清液进行炎症因子检测。由图 3 可知,模型组细胞培养液中 IL-6、TNF- α 含量与正常组具有非常显著性差异($P<0.01$),NO 含量与正常组具有显著性差异($P<0.05$)。将样品与模型组进行比较,药物组与模型组在 3 个炎症因子表达比较中大多具非常显著性差异($P<0.01$),说明夏枯草果实石油醚提取物可显著抑制由 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌的 IL-6、TNF- α 及 NO 炎症因子。见图 3。

4 讨论

夏枯草以果穗入药前需晒干,在晒干过程中,大



注:A为正常组,B为模型组,C、D、E分别为6.25、12.50、25.00 μg/mL药物组;与正常组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图3 夏枯草果实石油提取物对炎症因子影响

量果实散落于地上,通常这些果实与尘土一起当成垃圾丢弃,造成资源浪费。有研究^[9]表明夏枯草果实的抗氧化活性比果穗高,为了进一步利用夏枯草药用部位资源,对夏枯草果实进行成分表征和活性评价显得尤为重要。本研究以夏枯草果实石油醚提取物为研究对象,对其化学成分进行表征,且进行抗炎活性研究。夏枯草果实得到石油醚提取物3.0 g,石油醚提取物提取率为6.0%。通过GC-MS检测,得到夏枯草果实石油醚提取物主要成分为脂肪酸,共鉴定出19种化学成分,分别为2-十二烯基-1-琥珀酸酐、壬醛二甲基缩醛、肉豆蔻酸、9-十六烯酸、十六烷酸、亚麻酸、硬脂酸、亚油酸乙酯、11,13-二十碳二烯酸、顺11-二十烯酸、十八甲基癸酸、13-二十二碳烯酸、二十二烷酸、15-十四烯酸、二十四烷酸、角鲨烯、4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-Octamethyl-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-octadecahydro-2H-picen-3-one、己二酸、β-生育酚。采用LPS诱导RAW264.7细胞建立炎症模型,检测夏枯草果实石油醚提取物的抗炎效果,夏枯草果实石油醚提取物能显著抑制由LPS诱导RAW264.7细胞分泌的IL-6、TNF-α及NO炎症因子,具有较好的抗炎效果。

由于实验收集的夏枯草样本有限,且还存在不同年限、存储时间等的影响,因此,课题组拟进一步扩大样本量,采用体内外炎症模型结合谱效相关性,探索和验证夏枯草果实石油醚提取物的得率、成分及活性,以期对夏枯草果实的进一步开发提供依据。

参考文献

[1] RAAFAT K, WURGLICS M, SCHUBERT-ZSILAVECZ M. *Prunella*

vulgaris L active components and their hypoglycemic and antinociceptive effects in alloxan-induced diabetic mice [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 84: 1008-1018.

[2] QU Z, ZHANG J, YANG H, et al. *Prunella vulgaris* L., an edible and medicinal plant, attenuates scopolamine-induced memory impairment in rats[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2016, 65(2): 291-300.

[3] 冯伟红,李春,信伟梅,等.生物测定法用于中药质量评价的探索研究——以夏枯草抗氧化活性与总酚酸含量相关性的研究为例[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(14): 2660-2668.

[4] 白发平,胡静,吉敬,等.水蒸气蒸馏联合顶空进样气质联用分析夏枯草挥发油成分[J]. *环球中医药*, 2019, 12(2): 182-185.

[5] 陈新焕,张莹,李拥军,等.GC-MS法分析植物油酸中的脂肪酸[J]. *分析科学学报*, 2001, 17(5): 438.

[6] 雷思敏.夏枯草果实的成分分析及其抗炎抗氧化活性研究[D].长沙:湖南中医药大学, 2019.

[7] KWON O K, LEE M Y, YUK J E, et al. Anti-inflammatory effects of methanol extracts of the root of *Lilium lancifolium* on LPS-stimulated RAW264.7 cells[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1): 28-34.

[8] XU J, ZHAO Y, AISA H A. Anti-inflammatory effect of pomegranate flower in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages [J]. *Pharmaceutical Biology*, 55(1): 2095-2101.

[9] WEI H, HU S, SU Z, et al. Myricetin attenuates LPS-induced Inflammation in RAW 264.7 macrophages and mouse models[J]. *Future Medicinal Chemistry*, 2018, 10(19): 2253-2264.

[10] KANG N, CHANG K J, PARK S Y, et al. Anti-inflammatory Effects of Galactose-Taurine Sodium Salt in LPS-Activated RAW 264.7 Cells[J]. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 2017: 943-953.

[11] LI G, WANG J, JIN M, et al. A new pentacyclic triterpenoid from the leaves of *Rhododendron dauricum* L. with inhibition of NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells[J]. *Natural Product Research*, 2019: 1-7.

(本文编辑 苏维)