

中图分类号: R932; R284.1; R285
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.04.012

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2023)04-0055-04



鬼点灯药材脂溶性成分及抗氧化活性研究*

赵小超¹, 胡筱希², 程英歌^{3△}, 柴玲², 商勋¹, 廖承谱⁴

(1. 江苏省宿迁市中医院, 江苏 宿迁 223800; 2. 广西中医药研究院, 广西 南宁 530022; 3. 江苏省宿迁市第一人民医院, 江苏 宿迁 223800; 4. 浙江大学金华研究院, 浙江 金华 321000)

摘要:目的 研究鬼点灯药材脂溶性成分及其抗氧化活性。方法 采用气相色谱-质谱联用法检测鬼点灯药材的脂溶性成分(石油醚提取物), 并参考标准质谱库数据进行鉴定; 采用 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除实验检测其抗氧化活性, 均以维生素 C 作阳性对照。结果 共检测出 46 个化学成分, 鉴定出 22 个主要化学成分, 含量较高的包括棕榈酸(26.19%)、反式-13-十八碳烯酸(22.92%)、生育酚(10.03%)、5,7-二甲氧基香豆素(8.80%)、肌醇(4.55%)等。药材脂溶性成分对 DPPH 自由基的半数抑制浓度(IC₅₀)为 208.69 μg/mL, 对 ABTS⁺ 自由基的 IC₅₀ 为 146.00 μg/mL, 阳性对照的 IC₅₀ 分别为 25.80 μg/mL 及 21.20 μg/mL。结论 首次鉴定出鬼点灯脂溶性成分主要含有脂肪酸类、脂肪醇类及维生素类成分; 该类成分抗氧化活性较强。

关键词: 鬼点灯药材; 石油醚提取物; 脂溶性成分; 气相色谱-质谱联用法; 抗氧化活性

Liposoluble Constituents and Antioxidant Activity of *Bothriospermum Tenellum*

ZHAO Xiaochao¹, HU Xiaoxi², CHENG Yingge³, CHAI Ling², SHANG Xun¹, LIAO Chengpu⁴

(1. Suqian Traditional Chinese Medicine Hospital, Suqian, Jiangsu, China 223800; 2. Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science, Nanning, Guangxi, China 530022; 3. Suqian First People's Hospital, Suqian, Jiangsu, China 223800; 4. Jinhua Institute of Zhejiang University, Jinhua, Zhejiang, China 321000)

Abstract: **Objective** To study liposoluble constituents and antioxidant activity of *Bothriospermum tenellum*. **Methods** The liposoluble constituents (petroleum ether extract) of *Bothriospermum tenellum* were detected by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and identified with reference to the data in the standard mass spectrometry library. DPPH and ABTS⁺ free radical scavenging tests were used to detect the antioxidant activity of *Bothriospermum tenellum* with vitamin C as the positive control. **Results** A total of 46 chemical constituents were detected and 22 main chemical constituents were identified. The chemical constituents with higher content included palmitic acid (26.19%), trans-13-octadecanoic acid (22.92%), tocopherol (10.03%), 5,7-dimethoxycoumarin (8.80%), inositol (4.55%), etc. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of liposoluble constituents of the medicinal material on DPPH free radical was 208.69 μg/mL, the IC₅₀ of ABTS⁺ free radical was 146.00 μg/mL, and the IC₅₀ of positive control was 25.80 μg/mL and 21.20 μg/mL, respectively. **Conclusion** The liposoluble constituents of *Bothriospermum tenellum* are mainly fatty acids, fatty alcohols and vitamins, and these constituents have strong antioxidant activity.

Key words: *Bothriospermum tenellum*; petroleum ether extract; liposoluble constituents; GC-MS; antioxidant activity

鬼点灯为紫草科植物柔弱斑种草 *Bothriospermum tenellum* (Hornem.) Fisch. Et Mey. 的全草, 又名细叠子

*基金项目: 江苏省宿迁市科技项目[k202011]。

第一作者: 赵小超, 男, 硕士, 中药师, 研究方向为中药药效物质基础及药理学, (电子信箱)515532094@qq.com。

△通信作者: 程英歌, 女, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为药理学, (电子信箱)495654602@qq.com。

- [10] 俞大亮, 傅艳平, 李浪, 等. 可溶性 B7-H4 对系统性红斑狼疮和疾病活动的诊断价值[J]. 实用医学杂志, 2021, 37(2): 260-263.
- [11] 王照娟, 陈龙华. 丹皮提取物对系统性红斑狼疮模型小鼠的免疫调节作用及其机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(13): 1279-1282.
- [12] 刘思琪, 王苏, 吴亚平, 等. 补充维生素 D 治疗对自身免疫性甲状腺炎患者甲状腺自身抗体水平影响的 Meta 分析[J]. 东南大学学报(医学版), 2021, 40(2): 207-213.
- [13] WATAD A, NEUMANN SG, SORIANO A, et al. Vitamin D and systemic lupus erythematosus: myth or reality? [J]. Isr Med Assoc J, 2016, 18(3-4): 177-189.
- [14] 高瑛瑛, 王雪琴. 系统性红斑狼疮患者血清 25-羟维生素 D₃ 水平与调节性 T 细胞亚群的关系[J]. 现代免疫学, 2020, 40(6): 501-505.
- [15] MATASSA DS, AGLIARULO I, AVOLIO R, et al. TRAP1 Regulation of Cancer Metabolism: Dual Role as Oncogene or Tumor Suppressor [J]. Genes (Basel), 2018, 9(4): 195.
- [16] 李晓晖, 李晓岚. 核转录因子 NF-κB、A20 蛋白与多种皮肤病相关性研究进展[J]. 皮肤病与性病, 2018, 40(6): 807-810.
- [17] 王医林, 刘英纯, 王健, 等. 系统性红斑狼疮患者外周血 25(OH)D 与 T 淋巴细胞亚群及 IFN-α 关系研究[J]. 临床军医杂志, 2017, 45(11): 1199-1201.
- [18] 潘冠和, 马胜, 廖雁玲, 等. 系统性红斑狼疮患者血清维生素 D 水平的变化意义[J]. 实用医技杂志, 2018, 25(1): 9-11.

(收稿日期: 2022-05-09; 修回日期: 2022-09-01)

草、雀灵草、小马耳朵,国内各地均有分布,国外主要分布在朝鲜、日本、越南、印度、巴基斯坦及俄罗斯中亚等地区,以全草入药,味微苦、涩,性平,有小毒,归肺经,具有止咳、止血功效^[1],并明确记载于《民间常用草药汇编》《中药大辞典》《中华本草》,应用历史悠久,疗效确切。国内外文献暂无关于鬼点灯化学成分的报道,对于鬼点灯的现代研究也未见报道,江苏省扬州市及关中等多地区进行麦田杂草危害调查,结果显示均有鬼点灯药材^[2],其本身并无大害且具有一定的药用价值,却被视为杂草。本研究中采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)仪,以鬼点灯石油醚提取物为研究对象,分析其化学成分,并采用清除自由基试验研究其抗氧化活性作用。现报道如下。

1 仪器与试药

仪器:8860-5977B型气相色谱-质谱联用仪(美国Agilent公司);UV2550型紫外-可见分光光度计(日本Shimadzu公司);XS205型分析天平(精度为十万分之一,意大利Mettler Toledo公司);RE-52A A型旋转蒸发器,SHB-Ⅲ型真空泵(郑州长城科工贸有限公司);CA-1115A型冷却水循环装置(上海爱郎仪器有限公司)。

试药:1,1-二苯基-2-苦肟基(DPPH,批号为EKKS1297)、2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS,批号为EK171020),均购自美国Sigma公司;维生素C(华中药业股份有限公司,批号为20220108);95%乙醇、石油醚(60~90℃)、甲醇、无水乙醇等均为国产分析纯;水为纯净水。鬼点灯采于江苏省宿迁市宿豫区曹集乡田间,经广西壮族自治区中医药研究院黄云峰副研究员鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 试验条件

色谱条件:色谱柱为DB-WAX UI毛细管柱(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm);进样口温度为250℃;检测器温度为250℃;进样量为1 μL;分流比为10:1;载气为氦气,恒流模式,流速为3.5 mL/min;尾吹气流速为20 mL/min;空气流速为450 mL/min;氢气流速为40 mL/min;程序升温(初始温度40℃、保持3 min,以3℃/min的速率升至250℃,保持20 min)。

质谱条件:电离方式为EI源;电子能量为70 eV;离子源温度为230℃;四极杆温度为150℃;传输线温度为250℃;质量范围 m/z 35~500。

2.1.2 供试品溶液制备

取药材样品适量,剪段,以95%乙醇回流提取,

10倍量提取3次,以旋转蒸发仪减压回收溶剂,收集合并浓缩物得总浸膏。采用系统溶剂法萃取,浓缩,得石油醚提取物(以下简称样品);取适量,以甲醇超声(功率100 W,频率40 kHz;下同)溶解,制成质量浓度为0.1 mg/mL的溶液,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液I。

2.1.3 图谱分析

取上述供试品溶液I适量,按2.1.1项下试验条件进样测定,记录总离子流色谱图(见图1)。通过标准质谱库检索比对,并采用面积归一化法计算各组相对含量。共检出46个化学成分,鉴定出其中22个主要化学成分(见表1),以脂肪酸、脂肪醇、脂溶性维生素以及香豆素类化学成分为主,其中含量较高的有棕榈酸、反式-13-十八碳烯酸、生育酚、5,7-二甲氧基香豆素、肌醇。

2.2 抗氧化试验

2.2.1 DPPH 自由基清除实验

溶液制备:取样品100 mg,精密称定,加无水乙醇定容至10 mL,制成供试品溶液II,使用前用无水乙醇倍比稀释成质量浓度分别为1 000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.26, 7.63, 3.81 μg/mL的系列供试品溶液。以维生素C(VC)为阳性对照,同法制成阳性对照品溶液。取DPPH适量,精密称定,用无水乙醇超声溶解,制成质量浓度为254 μg/mL的标准贮备液。

方法:取系列供试品溶液各适量,分别加样到96孔板中,每孔20 μL,然后每孔平行加入贮备液I(标准贮备液以无水乙醇稀释10倍)180 μL,每个质量浓度设置3个平行,同时设立阳性对照及空白对照(70%乙醇200 μL)。充分混匀后将96孔板放置在避光环境下反应30 min,在515 nm波长处测定吸光度(A),并计算清除率^[3-5]。清除率(%) = $[1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$,其中 A_0 为标准贮备液和空白对照溶液混匀后测得的吸光度; A_i 为标准贮备液和供试品溶液混匀后测得的吸光度; A_j 为空白对照溶液和供试品溶液混匀后测得的吸光度(下同)。以供试品溶液质量浓度为横坐标,清除率为纵坐标作图。

结果:结果见图2。脂溶性成分抗氧化活性在3.81~1 000 μg/mL质量浓度范围内呈明显的剂量依赖性,经SPSS 22.0统计学软件计算得脂溶性成分半数抑制浓度(IC₅₀)为208.69 μg/mL,阳性对照的IC₅₀为25.80 μg/mL。当质量浓度达到1 000 μg/mL时,鬼点灯脂溶性成分清除DPPH自由基能力与阳性对照非常接近,且前者仍呈上升趋势。结果显示,虽然在一定质量浓度范围内,供试品抗氧化活性弱于阳性对照,但供试品溶液质量浓

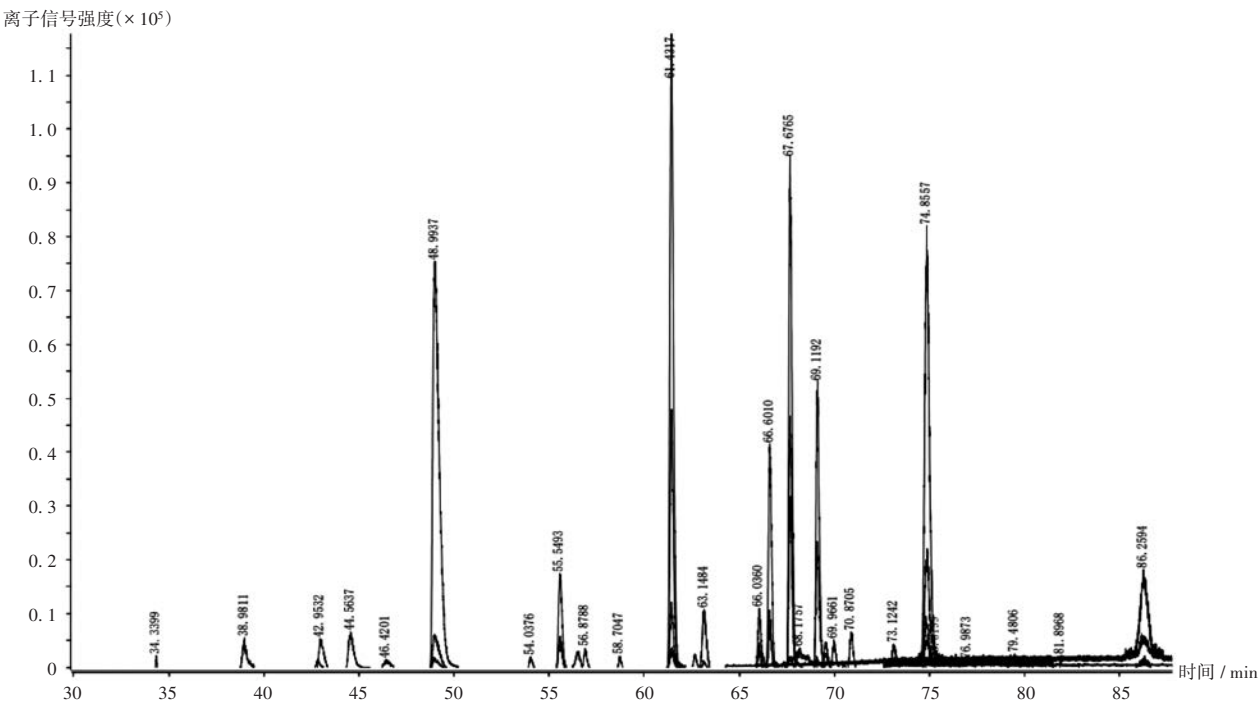


图1 总离子流色谱图

Fig. 1 TIC chromatogram

表1 22个主要化学成分分析结果

Tab. 1 Analysis results of 22 main chemical constituents

序号	保留时间(min)	化学成分	分子式	相对含量(%)
1	38.98	草酸二甲酯	C ₄ H ₆ O ₄	1.47
2	41.27	乙酸酐	C ₁₂ H ₂₂ O ₃	1.29
3	48.96	乙酸异丙酯	C ₅ H ₁₀ O ₂	1.95
4	48.99	γ-十二内酯	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	2.59
5	50.72	2-甲基丁酸丁酯	C ₉ H ₁₆ O ₂	2.02
6	55.09	叶下珠次素	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	3.00
7	55.53	叶绿醇	C ₂₀ H ₄₀ O	0.40
8	55.55	异植物醇	C ₂₀ H ₄₀ O	0.74
9	55.55	植物醇	C ₂₀ H ₄₀ O	1.06
10	61.43	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	26.19
11	61.46	二十碳五烯酸	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	0.88
12	61.46	二十二碳六烯酸	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	1.37
13	62.65	N-甲酰基-L-酪氨酸	C ₁₀ H ₁₁ NO ₄	1.54
14	63.10	肌醇	C ₆ H ₁₂ O ₆	4.55
15	63.15	次亚麻油酸	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	0.99
16	66.05	四氢芳樟醇	C ₁₀ H ₂₂ O	0.75
17	66.60	反式-13-十八碳烯酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	22.92
18	67.68	十八碳二烯酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	0.63
19	69.12	α-亚麻酸	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	4.03
20	69.52	5,7-二甲氧基香豆素	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	8.80
21	75.32	8-氮杂黄嘌呤	C ₄ H ₃ N ₃ O ₂	2.79
22	90.60	生育酚	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	10.03

度均处于 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 级别,说明鬼点灯脂溶性成分的 DPPH 自由基清除能力(即抗氧化活性)较强。

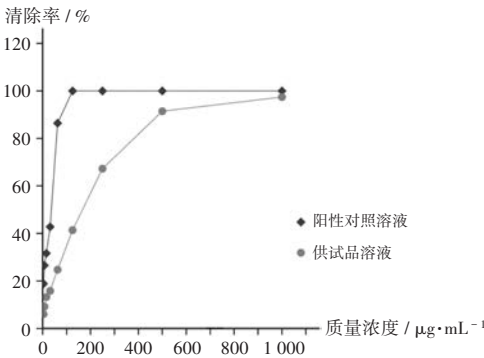


图2 脂溶性成分对 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 2 Scavenging ability of liposoluble constituents to DPPH free radical

2. 2. 2 ABTS⁺ 自由基清除实验

溶液制备:分别取 ABTS(7 mmol/L)和过硫酸钾溶液(2.45 mmol/L)各 3 mL,混合均匀,室温避光条件下静置过夜,制成贮备液 II。

方法:以 70% 乙醇将贮备液 II 的 A 调至 0.700 ± 0.005 后使用。取 2.2.1 项下系列供试品溶液各适量,分别加样到 96 孔板中,每孔 40 μL ,然后每孔平行加入贮备液 II 160 μL ,每个质量浓度设置 3 个平行,同时设立阳性对照(VC)及空白对照(70% 乙醇 200 μL)。重复混合 10 s,静置 6 min,在 734 nm 波长处测定 A,并计算清除率。

结果:结果见图 3。脂溶性成分抗氧化活性在 3.81 ~ 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度范围内呈明显的剂量依赖性。经计算,脂溶性成分的 IC_{50} 为 146.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$,阳性对

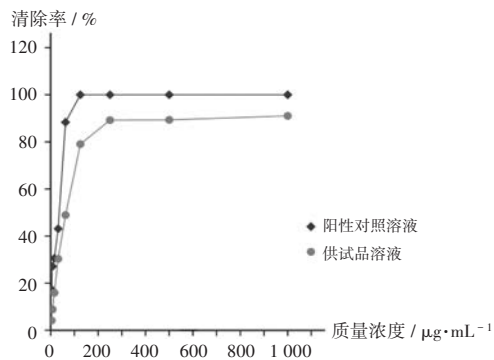


图3 脂溶性成分对ABTS⁺自由基的清除能力

Fig. 3 Scavenging ability of liposoluble constituents to ABTS⁺ free radical

照的 IC_{50} 为21.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。当质量浓度达到1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,鬼点灯脂溶性成分清除ABTS⁺自由基能力与阳性对照接近,且前者清除ABTS⁺自由基能力仍呈上升趋势。结果显示,虽然在一定质量浓度范围内供试品抗氧化活性弱于阳性对照,但供试品溶液质量浓度均处于 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 级别,说明鬼点灯脂溶性成分ABTS⁺自由基清除能力(即抗氧化活性)较强。

3 讨论

鬼点灯石油醚提取物经GC-MS法共检测出48个脂溶性成分,鉴定了22个主要成分,包含脂肪酸、脂肪醇、脂溶性维生素及香豆素等类化合物。抗氧化活性试验显示,鬼点灯脂溶性成分具有较强的抗氧化活性,与其化学成分检测结果前后呼应,印证了检测结果的可靠性。本研究作为鬼点灯药材试验方面的公开报道,首次从该植物石油醚提取物中鉴别出22个化学成分,也证明了其抗氧化活性较强。

天然饱和脂肪酸广泛存在于自然界植物中,其中棕榈酸含量较多,研究与应用也较多。有研究表明,棕榈酸可促进p-65磷酸化上调KLF7表达,引发脂肪细胞炎性反应,抑制细胞GLUT4表达及葡萄糖消耗能力,主要通过激活GPR40/GPR120发挥以上作用^[6];棕榈酸还具有促进抵抗素-诱导SH-SY5Y人神经母细胞瘤胰岛素抵抗和炎性反应、诱导骨骼肌细胞脂质沉积的作用^[7-8],是精神分裂症急性期主要治疗药物棕榈酸帕利哌酮的合成底物之一^[9]。本研究中鉴定出的生育酚为天然维生素E的重要组成部分,具有较强的抗氧化、抗癌、抗不孕、增强机体免疫功能等作用^[10]。肌醇是维持人体生理功能不可缺少的物质,可治疗各种维生素缺乏症、多囊卵巢综合征、精神及神经性疾病等多种疾病,还具有较强的抗癌作用,是“抗癌之王”肌醇硒酸酯的重要原料^[11-12]。国内外研究表明天然抗氧化剂的安全性远高于合成抗氧化剂^[13-14],本研究中发现鬼点灯

药材石油醚提取物含有大量的天然抗氧化成分,可为天然抗氧化剂的制备提供更多物质基础。

综上所述,本研究中首次鉴定出鬼点灯药材脂溶性成分主要含有脂肪酸类、脂肪醇类及维生素类成分;该类成分抗氧化活性较强。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:5895.
- [2] 杨进,刘学儒,丁涛,等. 扬州市麦田草相特点及杂草防除对策[J]. 杂草科学,2014,32(4):28-31.
- [3] 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.
- [4] 赵小超,胡筱希,柴玲,等. 猫豆脂溶性成分及抗氧化活性研究[J]. 中医药导报,2018,24(22):49-51.
- [5] TONG T, WANG YN, ZHANG CM, et al. *In vitro* and *in vivo* antihypertensive and antioxidant activities of fermented roots of *Allium hookeri* [J]. Chinese Herbal Medicines, 2021, 13(4): 541-548.
- [6] 仇同同. 棕榈酸通过GPRs/NF- κ B信号通路促进脂肪细胞KLF7表达的作用及机制研究[D]. 石河子:石河子大学,2021.
- [7] 何勇,洪莉,黄国涛,等. 棕榈酸对骨骼肌细胞脂质沉积的诱导作用[J]. 吉林大学学报(医学版),2021,47(6):1380-1385.
- [8] AMINE H, BENOMAR Y, TAOUIS M. Publisher Correction: Palmitic acid promotes resistin-induced insulin resistance and inflammation in SH-SY5Y human neuroblastoma[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1):12935-12939.
- [9] 李凌光,李总领,孙健,等. 棕榈酸帕利哌酮合成工艺优化[J]. 浙江化工,2019,50(6):20-23.
- [10] 周洋,杨文婧,操丽丽,等. 生育酚抑制油脂氧化机制研究进展[J]. 中国油脂,2018,43(8):32-38.
- [11] 刘文宝,金玉坤,游松. 肌醇制备方法的现状与进展[J]. 沈阳药科大学学报,2012,29(3):234-240.
- [12] SHOWELL MG, MACKENZIE-PROCTOR R, JORDAN V, et al. Inositol for subfertile women with polycystic ovary syndrome[J]. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2018, 12(12):CD012378.
- [13] KHOJASTEH A, MIRJALILI MH, ALCALDE MA, et al. Powerful Plant Antioxidants: A New Biosustainable Approach to the Production of Rosmarinic Acid[J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(12):1273-1304.
- [14] BARTEKOVÁ M, ADAMEOVÁ A, GÖRBE A, et al. Natural and synthetic antioxidants targeting cardiac oxidative stress and redox signaling in cardiometabolic diseases[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2021, 169:446-477.

(收稿日期:2022-05-07;修回日期:2022-09-24)