

香附挥发油的生物活性及其 GC-MS 分析

张跃飞¹, 李鑫², 孟宪生^{2,3*}, 王帅^{2,3}, 包永睿^{2,3}, 崔亚玲²

(1. 国家中成药工程技术研究中心, 辽宁 本溪 117004;

2. 辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600;

3. 辽宁省组分中药工程技术研究中心, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的:采用体内半固体糊碳末推进法及体外 MTT 法证明香附挥发油促胃肠动力的生物活性,并揭示其发挥药效的物质基础。方法:采用半固体糊碳末推进法测定香附挥发油胃残留率及小肠推进率,MTT 法测定香附挥发油对大鼠小肠平滑肌细胞的体外增殖率,同时采用 GC-MS 法解析发挥药效的挥发油成分组成。结果:香附挥发油中、高浓度的胃残留率及小肠推进率较空白对照组有显著性差异,对大鼠小肠平滑肌细胞均有一定的增殖促进作用,且表现出一定的量效关系;共鉴定出 17 种香附挥发油成分,主要包括 α -香附酮,氧化石竹烯,2(1H)naphthalenone,3,5,6,7,8,8a-hexahydro-4,8a-dimethyl-6-(1-methylethenyl)等。结论:该实验揭示了香附挥发油促胃肠动力的物质基础主要为萜类,为其临床合理应用及进一步的研究开发提供合理依据。

[关键词] 香附;挥发油;胃肠动力;气相色谱-质谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0032-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015140032

Biological Activity of Cyperi Rhizoma Volatile Oil and Its GC-MS Analysis ZHANG Yue-fei¹, LI Xin², MENG Xian-sheng^{2,3*}, WANG Shuai^{2,3}, BAO Yong-rui^{2,3}, CUI Ya-ling² (1. NERC for the Pharmaceutics of Traditional Chinese Medicine (TCM), Benxi 117004, China; 2. College of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Dalian 116600, China; 3. Liaoning Province Multi-component Chinese Medicine Engineering Technology Research Center, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To verify the promoting gastrointestinal motility activity of Cyperi Rhizoma volatile oil using semi-solid paste method (*in vivo*) and MTT assay (*in vitro*). The chemical components of volatile oil were analyzed. **Method:** Stomach and small intestine propulsion rate of residual semi-solid paste of carbon propelling was used to determine the promoting gastrointestinal motility activity. MTT method was used to investigate the proliferation rate of small intestine smooth muscle cells *in vitro*. At the same time GC-MS method was used to analyze the components of volatile oil. **Result:** The rate of stomach and small intestine propulsion were significant differences between high concentration group and control group. Cyperi Rhizoma volatile oil with different concentration presents certain promoting effect to small intestine smooth muscle cells, and showed some concentration-response relationship. 17 ingredients were identified, containing α -cyperone, caryophyllene oxide, 2(1H)-naphthalenone,3,5,6,7,8,8 α -hexahydro-4,8 α -dimethyl-6-(1-methylethenyl), and so on. **Conclusion:** This study reveals the material base of Cyperi Rhizoma volatile oil promoting gastrointestinal motility is mainly terpenoids, which provide reasonable basis for its clinical application and further research and development.

[Key words] Cyperi Rhizoma; volatile oil; gastrointestinal motility; GC-MS

[收稿日期] 20150128(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81241111);辽宁省高等学校优秀人才支持计划项目(LR2013044)

[第一作者] 张跃飞,博士,高级工程师,E-mail:zyf04@999.com.cn

[通讯作者] *孟宪生,教授,从事中药组分配伍、代谢组学及药品质量分析研究,Tel:0411-85890185,E-mail:mxsvvv@126.com

香附具有调经止痛、行气解郁的功效^[1]。《本草纲目》称香附为“气病之总司,女科之主帅”^[2]。有文献报道,香附具有显著的抗炎镇痛作用^[3],也有少量文献报道香附总黄酮有促胃肠动力作用^[4],而香附挥发油在促胃肠动力作用及生物活性的研究报道非常少见。它的有效成分中含有多种单萜、倍半萜及其氧化物,主要在其挥发油中^[5]。因此对其挥发油成分的深入研究,在指导临床用药和新药开发上具有重要的意义。本实验采用水蒸气蒸馏法提取香附挥发油,研究香附挥发油促胃肠动力的生物活性并分析其化学成分,选用大鼠及大鼠小肠平滑肌细胞珠进行体内、体外试验,对香附挥发油在体外促胃肠动力生物活性进行研究,同时采用 GC-MS^[6],对其成分进行解析。本研究为促胃肠动力候选药物研究开发提供了参考依据,为揭示香附挥发油促胃肠动力作用物质基础和作用机制提供依据。

1 材料

1.1 仪器 6890N GC-5973N MS 型气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent),HD2-BCN-1360B 型生物洁净工作台(哈尔滨东联电子技术开发有限公司),US AUTOFLOW 型 CO₂ 培养箱(德国 Nuair 公司),96 孔无菌培养板(美国 Costar 公司),AE31 型倒置相差显微镜(Motic 公司)。

1.2 药品与试剂 香附药材(由辽宁华润本溪三药有限公司提供,经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为莎草科植物莎草 *Cyperus rotundus* 的干燥根茎);吗丁啉(西安扬森制药有限公司,批号 090608845),环己烷(沈阳试剂一厂,批号 2002031901),无水硫酸钠(沈阳试剂三厂,批号 9606),DMEM 培养基,胰蛋白酶,进口胎牛血清(美国 Gibco 公司),乙二胺四乙酸(EDTA,天津基准化学试剂有限公司),水为超纯水。

大鼠原代小肠平滑肌细胞,购自江阴齐氏生物科技有限公司。

健康 SD 大鼠,体重(200 ± 20) g,雌性,由大连医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(辽)2010-0001。动物饲养于空调室内,室温(20 ± 2) °C,相对湿度 50% ~ 60%,颗粒饲料喂养,自由饮水。

2 方法与结果

2.1 挥发油提取 根据预实验及查阅相关文献,取香附药材 50 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加 9 倍量水,振摇混合后,连接挥发油提取器与回流冷凝管。自冷凝管上端加水充满挥发油提取器的刻度部分,并溢流入圆底烧瓶时为止。置电热套中缓缓加热至

沸、保持微沸约 3 h,至测定器中油量不再增加,停止加热,放置片刻。开启提取器下端的活塞,将水缓缓放出,至油层上端到达刻度 0 线上面 5 mm 处为止。放置 1 h 以上,取挥发油,即得^[7]。

2.2 大鼠体内促胃肠动力药效学试验

2.2.1 半固体糊配制 取羧甲基纤维素钠 5 g,溶于 125 mL 蒸馏水中,然后分别加入奶粉 8 g,糖 4 g,淀粉 4 g,活性炭 1.5 g,搅拌均匀,最后制成 150 mL 约 150 g 的半固体糊状物,放入冰箱冷藏,用前 2 h 取出。

2.2.2 半固体糊碳末推进法 随机分 5 组,每组 10 只,雌、雄各半。分别为空白组,吗叮啉组(按药品说明书转换成大鼠的给药量 2.7 mg·kg⁻¹),香附挥发油高、中、低剂量组(挥发油出膏率 1%,给药剂量分别为 3,9,27 mg·kg⁻¹)。灌服受试物或等容量溶剂,连续 6 d,于末次给药前禁食不禁水 20 h,末次给药 1 h 后灌胃碳末混悬液 2.5 mL/只,20 min 后脱臼处死动物,立即剖开腹腔,结扎胃贲门和幽门,取出胃,用滤纸拭干后称全重,然后沿胃大弯剪开胃体,洗去胃内容物后拭干,称胃净重,按公式:胃内残留率 = (胃全重 - 胃净重)/给药量 × 100% 计算。取出胃肠段;记录碳末前沿至幽门的距离,计算其占小肠全长的比例。本实验证明吗丁啉组与香附挥发油组均有较强的促进胃排空及肠蠕动作用。见表 1。

表 1 香附挥发油促进胃排空及肠蠕动作用

Table 1 Cyperi Rhizoma volatile oil of promote the gastric emptying and bowel movements %

组别	胃残留率	小肠推进率
空白	66.26	45.81
香附挥发油低剂量	64.15	44.38
中剂量	51.99 ¹⁾	56.10 ¹⁾
高剂量	52.34 ¹⁾	56.32 ¹⁾
吗丁啉中剂量	49.23 ¹⁾	69.12 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ P < 0.05(表 2 同)。

2.3 香附挥发油对大鼠小肠平滑肌细胞的作用

2.3.1 含药血浆的制备 将 SD 大鼠随机分为空白组、吗丁啉组(给药浓度 0.25,0.50,1.00 g·L⁻¹)、香附挥发油组(给药浓度 0.25,0.50,1.00 g·L⁻¹),每组 5 只。每日灌胃给药 2 次,每次间隔 12 h,每次 2 mL,连续 3 d。大鼠取血前 12 h 禁食不禁水,末次灌胃 1 h 后,无菌摘取大鼠眼球取血,置 2 mL 肝素化离心管中,静置 30 min,于高速离心机中,3 000

$r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 无菌分离血浆, 合并同组血浆^[8]。经 56 °C, 30 min 灭活处理后, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 置 -20 °C 保存备用。

2.3.2 MTT 法药效检测 取对数生长期、生长状态良好的大鼠小肠平滑肌细胞, 经 PBS 清洗, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 待细胞趋于变圆, 用含 15% 进口胎牛血清的 DMEM 培养液冲洗吹打细胞, 制成单细胞悬液。细胞计数板上计数, 细胞浓度 = 细胞总数 $\times 10^4 / 4$ 个/mL; 加培养基稀释至浓度为 1×10^5 个/mL, 接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μL (除空白调零孔外), 继续培养约 12 h, 待细胞贴壁完全。设空白调零孔 (只加培养基, 酶标仪调零用)、空白对照孔 (只加细胞), 和给药试验孔 (分别加入不同浓度吗丁啉组和香附挥发油组的 15% 含药血浆), 每组设 5 个复孔。在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中继续培养 24 h 后, 每孔加入二甲基亚砷 (20 μL ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)) MTT, 继续培养 4 h 后吸净孔内上清液, 每孔加入 DMSO 150 μL。用酶标仪振摇 10 min, 使紫色结晶完全溶解, 在 492 nm 处扫描, 测定吸光度 $A^{[9-11]}$ 。计算细胞增殖率 = $(A_{\text{给药组}} / A_{\text{空白组}} - 1) \times 100\%$ 。结果表明, 各给药组与空白组比较, 除香附挥发油低剂量组外均具有显著差异 ($P < 0.05$), 说明香附挥发油对大鼠小肠平滑肌细胞有增殖促进作用, 随着药物剂量的加大, 促进细胞增殖作用表现明显, 呈一定的量效关系。见表 2。

2.4 GC-MS 分析

2.4.1 气相色谱条件 ULTRA-2 弹性石英毛细管柱 (0.20 mm \times 50 m, 0.25 μm), 进样口温度 260 °C, 传

表 2 大鼠小肠平滑肌细胞的增殖率考察

Table 2 To investigate proliferation rate of intestinal smooth muscle cells in rat

组别	给药质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$A(\bar{x} \pm s)$	细胞增殖率 / %
空白	-	0.631 \pm 0.005	-
吗丁啉	0.25	0.783 \pm 0.006 ¹⁾	24.09
	0.50	0.821 \pm 0.008 ¹⁾	30.11
	1.00	0.878 \pm 0.008 ¹⁾	39.14
香附挥发油	0.25	0.680 \pm 0.011	7.76
	0.50	0.709 \pm 0.006 ¹⁾	12.36
	1.00	0.762 \pm 0.007 ¹⁾	20.76

输线温度 250 °C, 载气氦气, 体积流量 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 分流比 60:1, 进样量 1 μL; 升温程序柱温 70 °C, 以 $2 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 150 °C, 再 $6 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 240 °C, 保持 1 min, 再 $25 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 300 °C。

2.4.2 质谱条件 电离方式 EI, 电子轰击能量 70 eV, 离子源温度 230 °C, 加速电压 34.6 V, 分辨率 2 500, 倍增器电压 1 388 V, 四极杆温度 150 °C, 扫描范围 m/z 30 ~ 350, 扫描数 4.45 次/s。

2.5 统计学分析 结果采用 SPSS 19.0 统计软件进行处理, 并采用 t 检验进行方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

取香附挥发油, 按 2.2 项下色谱条件进行分析, 所得质谱图经计算机数据处理和 NIST298, WIL EY275 标准质谱图库检索鉴定各种化学成分, 共鉴定出 17 种成分。见表 3。

表 3 香附挥发油化学成分解析

Table 3 Chemical component analysis of Cyperus volatile oil

峰号	t_R /min	化合物	分子式	M_r	英文名称
1	6.031	β -蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	136	β -pinene
2	12.652	反-松香芹烯	C ₁₀ H ₁₆ O	152	<i>trans</i> -pinocarveol
3	14.712	4-松油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	154	terpinen-4-ol
4	25.040	11-isopropylidenetricyclo[4.3.1.1(2,5)]undec-3-en-10-one	C ₁₄ H ₁₈ O	174	11-isopropylidenetricyclo[4.3.1.1(2,5)]undec-3-en-10-one
5	25.718	β -蒎烯	C ₁₅ H ₂₂	202	β -vatirenene
6	27.353	γ -蛇床烯	C ₁₅ H ₂₄	204	γ -selinene
7	29.333	isolongifolene, 9,10-dehydro-	C ₁₅ H ₂₂	202	isolongifolene, 9,10-dehydro-
8	31.978	naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1 <i>S</i> - <i>cis</i>)-	C ₁₅ H ₂₄	204	naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1 <i>S</i> - <i>cis</i>)-
9	32.324	4,4-dimethyl-3-(3-methylbut-3-enylidene)-2-methylenebicyclo[4.1.0]heptane	C ₁₅ H ₂₂	202	4,4-dimethyl-3-(3-methylbut-3-enylidene)-2-methylenebicyclo[4.1.0]heptane

续表 3

峰号	t_R /min	化合物	分子式	M_r	英文名称
10	32.444	azulene, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8-octahydro-1, 4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1S-(1 α , 4 α , 7 α)]-	C ₁₅ H ₂₄	204	azulene, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8-octahydro-1, 4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1S-(1 α , 4 α , 7 α)]-
11	34.265	naphthalene, 1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 8a-octahydro-4a, 8-dimethyl-2-(1-methylethenyl)-[2R-(2 α , 4 α , 8a β)]-	C ₁₅ H ₂₄	204	naphthalene, 1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 8a-octahydro-4a, 8-dimethyl-2-(1-methylethenyl)-[2R-(2 α , 4 α , 8a β)]-
12	35.035	匙叶桉油烯醇	C ₁₅ H ₂₄ O	220	(+)-spathulenol
13	37.760	氧化石竹烯	C ₁₅ H ₂₄ O	220	caryophyllene oxide
14	39.502	6-isopropenyl-4, 8a-dimethyl-1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 8a-octahydro-naphthalen-2-ol	C ₁₅ H ₂₄ O	220	6-isopropenyl-4, 8a-dimethyl-1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 8a-octahydro-naphthalen-2-ol
15	39.993	异长叶烯-5-酮	C ₁₅ H ₂₂ O	218	isolongifolen-5-one
16	44.433	α -香附酮	C ₁₅ H ₂₂ O	218	α -cyperone; 7-isopropenyl-1, 4a-dimethyl-4, 4a, 5, 6, 7, 8-hexahydro-3H-naphthalen-2-one
17	48.351	2(1H) naphthalenone, 3, 5, 6, 7, 8, 8a-hexahydro-4, 8a-dimethyl-6-(1-methylethenyl)-	C ₁₅ H ₂₂ O	218	2(1H) naphthalenone, 3, 5, 6, 7, 8, 8a-hexahydro-4, 8a-dimethyl-6-(1-methylethenyl)-

3 讨论

现代研究表明香附挥发油具有镇静、保护胃黏膜、降血脂、降血糖、抗菌消炎等药理活性,尤其对由物理、化学刺激引起的疼痛有较强的镇痛作用,但对其促胃肠动力作用及发挥该作用的物质基础鲜有报道。本研究采用体内半固体糊碳末推进体外细胞实验,通过考察香附挥发油对大鼠胃残留率、小肠推进率证明香附挥发油具有促胃肠动力的作用,同时测定小肠平滑肌细胞的体外增殖率,发现其具有较好的增殖促进作用,并呈现一定的量效关系,进而对其挥发性成分进行 GC-MS 分析,共找到 α -香附酮、氧化石竹烯等 17 个化学成分,以 α -香附酮为主,与文献报道的 α -香附酮对肠管收缩呈抑制作用^[12]结果一致,其他成分为单萜、倍半萜及其氧化物。本实验揭示了香附挥发油发挥促胃肠动力作用的药效物质基础,为其进一步的作用机制研究奠定基础,同时也为其临床合理用药提供参考。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:241.
[2] 李梅,王秋,彭崇胜,等. 中医学基础[M]. 2版. 北京:中国医药科技出版社,2009:253.

[3] 赵洪超. 香附抗炎镇痛组分纯化方法研究[J]. 中国卫生产业,2012,9(31):158-159.
[4] 王贺玲. 理气中药对鼠胃肠动力的影响[J]. 世界华人消化杂志,2004,12(5):1136-1138.
[5] 林晓珊,吴惠勤. 香附挥发油的提取和 GC/MS 分析[J]. 质谱学报,2006,27(1):41-44.
[6] 陈军,姚成,夏黎明,等. 猫爪草中的脂肪酸及有机酸的 GC-MS[J]. 光谱学与光谱分析,2006,26(8):1550-1552.
[7] 滕建业. 枳壳促进胃动力化学物质组的筛选及作用机理研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2011.
[8] 朱英环,孟宪生,包永睿,等. 余甘子总酚酸和总黄酮配伍抑制肝癌细胞增殖及对免疫功能的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):132-135.
[9] Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods,1983,65(1):55.
[10] 包永睿,王帅,孟宪生,等. 白茅根水提物对人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞周期及细胞凋亡的影响[J]. 时珍国医国药,2013,24(7):1584-1586.
[11] 魏一萌,王帅,孟宪生,等. 基于 SMMC-7721 肝癌细胞生长抑制的两种败酱草药效比较及提取方法研究[J]. 药物研究,2013,3(11):35-37.
[12] 田友青,丁平. 香附挥发油的研究进展及其开发前景[J]. 中国药业,2010,19(3):1-2.

[责任编辑 顾雪竹]