

巴马火麻籽脂肪酸成分 GC/MS 分析及生物活性研究

白家峰¹, 钱 薏², 韦 康¹, 李志华¹, 陈义昌¹, 宁振兴¹, 刘绍华^{1*}, 梁 鸿^{2*}

¹广西中烟工业有限责任公司技术中心, 南宁 530001; ²北京大学药学院天然药物学系, 北京 100191

摘要: 为了研究巴马火麻籽脂肪酸成分及其抗炎和神经保护作用, 采用溶剂法提取巴马火麻籽脂肪酸成分, 采用衍生物制备方法进行衍生化。通过气相色谱-质谱联用法分析巴马火麻籽脂肪酸成分, 用面积归一化法获得各脂肪酸成分的相对百分含量。巴马火麻籽提取物中鉴定了 12 个脂肪酸成分的结构及相对含量, 其中 11 个脂肪酸酯, 相对含量较高的亚油酸乙酯占 49.49%, 亚麻酸乙酯占 31.58%, 棕榈酸乙酯占 6.83%, 亚油酸酯和亚麻酸酯占总脂肪酸的 82.64%。火麻籽提取物在实验剂量下没有细胞毒活性, 火麻籽提取物具有抗炎和神经保护作用。

关键词: 巴马火麻籽, 脂肪酸, 主成分分析, 抗炎, 神经保护

中图分类号: R284

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.013

GC/MS Analysis of Organic Acids and Bioactivities of *Cannabis sativa* L. Seeds Extract

BAI Jia-feng¹, QIAN Yi², WEI Kang¹, LI Zhi-hua¹, CHEN Yi-chang¹,
NING Zhen-xing¹, LIU Shao-hua^{1*}, LIANG Hong^{2*}

¹Technical center of China Tobacco Guangxi Industrial Co. Ltd., Nanning 530001, China;

²Department of Natural Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

Abstract: In order to research the chemical composition and the bioactivities of the extract of the seeds of *Cannabis sativa* L., the fatty acid derivatives were isolated by solvent extraction method and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry method and principal components analysis was adopted to investigate their compositions. Cytotoxic, anti-inflammatory and neuroprotective activities were studied on the extract. 12 peaks were detected and 11 components were identified as fatty acid esters according to their mass analysis. The results showed that the relative amount of fatty acid esters was higher in the low-boiling substances in the seeds of *C. sativa*. The amount of (*Z,Z*)-9,12-octadecadienoic acid esters and (*Z,Z,Z*)-9,12,15-octadecatrienoic acid esters is up to 83.64% of total fatty acid derivatives. The extract of the seeds of *C. sativa* have no toxic, have anti-inflammatory and neuroprotective activities.

Key words: *Cannabis sativa* L.; low-boiling substance; principal components analysis; anti-inflammatory; neuroprotection

桑科 Moraceae 大麻属 *Cannabis* Linn. 植物只有大麻 *Cannabis sativa* Linn. 一个种, 原产亚洲, 我国南北各地均有栽培。大麻 *C. sativa* 有二个亚种, 其中一个亚种 ssp. *sativa* 生产纤维和油, 具较高而细长、稀疏分枝的茎和长而空的节间, 分布在锡金、不丹和中国, 常称为火麻^[1]。火麻是一种多用途的经济作物, 茎皮纤维长而坚韧, 可用以织麻布等, 种子可榨油, 含油量 30%, 油渣可做饲料。果实中医称“火麻仁”, 性平, 味甘, 具有润肠通便的功效, 用于血虚津

亏, 肠燥便秘^[2]。火麻籽是一种药食同源的植物资源, 含有丰富的油脂、优质蛋白质、多种氨基酸及矿物质, 甘肃和宁夏产火麻籽油富含不饱和脂肪酸, 主要是油酸、亚油酸和亚麻酸, 其中亚油酸相对含量在 50% 以上, α -亚麻酸相对含量在 20% 以上^[3]。巴马火麻是广西巴马的特色植物, 火麻油是巴马人长期食用的植物油料, 富含不饱和脂肪酸^[4]。本文用溶剂法提取巴马火麻籽脂肪酸成分, 用衍生物制备法得到脂肪酸酯, 利用 GC-MS 对主成分进行分析检测, 确定巴马火麻籽脂肪酸成分的组成, 对巴马火麻籽提取物进行细胞毒、抗炎以及神经保护作用研究, 为巴马火麻籽油类物质的应用提供实验依据。

1 仪器与材料

Agilent 7890A/5975C 气质联用仪; DB-5MS 色谱柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)。实验用巴马火麻籽为广西壮族自治区巴马瑶族自治县种植的品种。

2 实验方法

2.1 火麻籽提取物制备

巴马火麻籽样品经粉碎处理后,称取 50 g,置于 1000 mL 圆底烧瓶中,加入 200 mL 95% 乙醇回流提取 1 hr,放冷过滤,滤渣再加 200 mL 95% 乙醇回流提取 1 hr,放冷过滤,合并滤液,减压回收溶剂得到火麻籽提取物。

2.2 脂肪酸成分分析样品制备

取火麻籽提取物 0.4 g,溶于 10 mL 石油醚中,加入 5 mL 0.5 mol/L KOH-MeOH 溶液,震荡均匀,水浴回流 20 min,500 rpm 磁力搅拌,冷却,加入 25 mL 水,摇匀,静置过夜,分层后,取上清液备用。

2.3 GC-MS 分析条件

GC 条件:程序升温,初始温度 50 °C,保持 2 min,然后以 5 °C/min 的速率升至 250 °C,保持 20min。以高纯氦气为载气,流速为 1 mL/min,分流进样,分流比 20:1。质谱条件:离子源为 EI 源,电离能量为 70 eV,离子源温度为 230 °C,质量扫描范围 40 ~ 600 amu。

2.4 样品测定

巴马火麻籽脂肪酸衍生物经 GC-MS 分析得到相应的总离子色谱图,利用 NIST 谱库对采集到的质谱图进行检索,结合质谱裂解规律确定其化学结构,仅对能予以定性的物质(SI 和 RSI 值大于 800)进行探讨;定量方法采取峰面积归一法计算各成分的相对含量。

2.5 细胞毒活性研究

采用 MTT 细胞活性分析法,细胞以 5×10^4 /孔密度接种于 48 孔板,培养过夜,火麻籽提取物用药物处理后 24 h,弃上清,加 MTT 染色,温箱孵育 4 h,弃上清,加入 500 μl DMSO,酶标仪 570 nm 处检测光密度值。

2.6 抗炎活性研究(NO 检测)

空白换液组、模型组用 LPS 诱导炎症,火麻籽提取物加药与 LPS 共同处理细胞,刺激维持 24 h,用 NO 化学试剂盒检测 NO 浓度,按照说明书操作:吸取 300 μL 培养基上清,加试剂 1 和 2(试剂盒提

供),6000 rpm 离心 10 min,取 160 μL 上清,加入显色剂,酶标仪 570 nm 检测光密度。

2.7 神经保护作用

细胞培养:PC12 细胞培养液为 DMEM 完全培养液(10% FBS),培养于 95% 空气,5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中。传代接种 24 h 后用于实验。OGD/R 模型的建立:实验前,将 PC12 细胞终于培养板中培养 24 h;细胞准备好后,将细胞培养液移出并加入等量的 Earle's 平衡盐溶液,并将其置于用缺氧袋出去氧气的 37 °C 培养盒中孵育 2、4 或 6 h,造成缺糖缺氧损伤(ORD),损伤之后进入复氧阶段,相应的培养液移出,加入对应的正常培养液,在 95% 空气,5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中继续培养 24 h,而后进行相关指标的测定。

3 实验结果

3.1 脂肪酸成分 GC-MS 分析

巴马火麻籽脂肪酸衍生物 GC-MS 分析结果见图 1 和表 1。从巴马火麻籽脂肪酸衍生物中鉴定 12 个化合物,其中 11 个脂肪酸酯,相对含量较高的亚油酸乙酯占 49.49%,亚麻酸乙酯占 31.58%,棕榈酸乙酯占 6.83%,亚油酸酯和亚麻酸酯占总脂肪酸衍生物的 82.64%。

3.2 细胞毒实验

细胞毒实验结果 1 μg/mL、10 μg/mL 和 100 μg/mL,细胞相对存活率均为 100%,表明火麻子提取物在 24h 内对细胞的存活率没有显著性的影响,因此可以认为在实验剂量内提取物对测试细胞没有明显的细胞毒。

3.3 抗炎活性

抗炎实验结果见图 2,NO 测试结果显示,给 BV-2 细胞 LPS 刺激后,细胞产生 NO 的浓度明显升

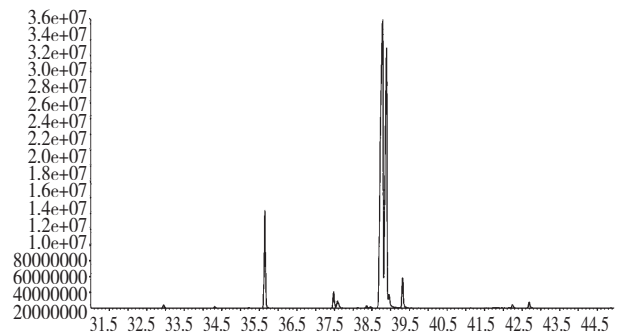


图 1 巴马火麻籽脂肪酸衍生物的 GC-MS 离子图谱

Fig. 1 GC-MS chromatogram of *C. sativa* fatty acid derivative

表 1 巴马火麻籽脂肪酸衍生物组成及其相对含量
Table 1 Components and relative content of *C. sativa* fatty acid derivative

峰编号 No.	保留时间 Retention time (min)	相对峰面积 百分含量 Relative peak area (%)	物质名称 Name
1	32.949	0.781	phthalic acid decyl isobutyl ester, 邻苯二甲酸异丁基癸酯
2	34.310	0.075	hexadecanoic acid methyl ester, 棕榈酸甲酯
3	35.638	6.830	hexadecanoic acid ethyl ester, 棕榈酸乙酯
4	37.476	0.926	(Z,Z)-9,12-octadecadienoic acid methyl ester, 亚油酸甲酯
5	37.580	0.650	(Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoic acid methyl ester, 亚麻酸甲酯
6	38.109	0.028	octadecanoic acid methyl ester, 硬脂酸甲酯
7	38.357	0.132	(Z,Z,Z)-8,11,14-eicosatrienoic acid, 8,11,14-二十碳三烯酸
8	38.735	49.488	(Z,Z)-9,12-octadecadienoic acid ethyl ester, 亚油酸乙酯
9	38.836	31.578	(Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoic acid ethyl ester, 亚麻酸乙酯
10	38.939	1.570	ethyl oleate, 油酸乙酯
11	39.308	2.326	octadecanoic acid ethyl ester, 硬脂酸乙酯
12	42.688	0.347	Eicosanoic acid ethyl ester, 二十烷酸乙酯

高,随着加入火麻籽提取物剂量升高,NO 浓度逐渐降低,说明火麻籽提取物能明显抑制 BV-2 细胞产生 NO,并具有剂量依赖性,表明火麻籽提取物有抗炎作用。

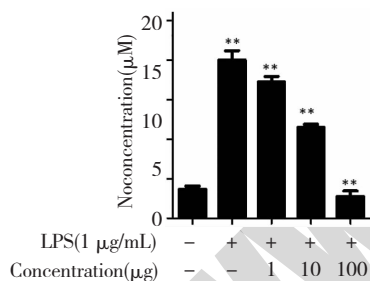


图 2 火麻籽提取物对细胞产生一氧化氮(NO)抑制率

Fig. 2 Inhibition rates of *C. sativa* fatty acid derivative on NO

3.4 神经保护作用

神经保护作用实验结果见图 3, PC12 细胞在 OGD/R 的损伤下,其存活率急剧下降 ($P < 0.01$),加入火麻籽提取物后,随着提取物剂量的增加,存活率呈现剂量依赖性增强。结果表明,火麻籽提取物有神经保护活性。

4 结论

火麻籽是药食同源的植物资源,巴马火麻是世界长寿之乡中国广西巴马县种植的特色植物,号称长寿三宝中的第一宝。巴马火麻籽富含不饱和脂肪酸,其中亚油酸酯(亚油酸甲酯和亚油酸乙酯)占

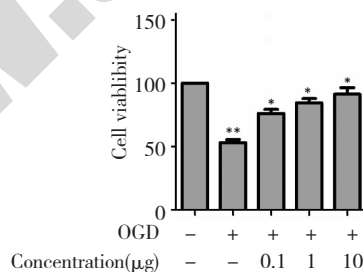


图 3 火麻籽提取物神经保护作用

Fig. 3 Neuroprotective effects of *C. sativa* fatty acid derivative

50.4%, 亚麻酸酯(亚麻酸甲酯和亚麻酸乙酯)占 32.2%, 亚油酸酯和亚麻酸酯占总脂肪酸衍生物的 82.6%。文献报道亚油酸和亚麻酸可降低血浆中总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、极低密度脂蛋白胆固醇,有降血脂作用,文献报道亚麻酸酯和亚油酸酯有抗氧化作用。本文研究确定,火麻籽提取物在实验剂量下没有细胞毒活性,火麻籽提取物具有抗炎和神经保护作用。本文研究结果丰富了火麻籽化学成分及生物活性研究内容,为火麻籽的进一步研究提供了参考资料。

参考文献

- 1 Flora of China Editorial Committee(中国植物志编辑委员会). Flora of China(中国植物志). Beijing: Science Press, 1997. 23, 223. (下转第 197 页)