

紫苏叶挥发油舒张血管作用及其活性物质探究

周勤梅^{1,2}, 谯明鸣^{1,2}, 彭成^{1,2*}, 敖慧¹, 熊亮^{1,2*}, 刘菲^{1,2}¹成都中医药大学药学院 教育部中药材标准化重点实验室 西南特色中药资源国家重点实验室;²成都中医药大学, 西南特色药材创新药物成分研究所, 成都 611137

摘要:为探究紫苏叶挥发油及其代表性成分对 KCl 预收缩胸主动脉血管环的影响, 本文应用大鼠离体胸主动脉环试验对紫苏叶挥发油进行药效学评价, 利用离体组织灌流模型和 PowerLab 数据分析系统采集和记录不同浓度紫苏叶挥发油对氯化钾 (KCl) 刺激下血管张力的影响。应用气质联用 (GC-MS) 技术对紫苏叶油进行化学成分分析, 结合其代表性成分进行活性追踪, 以阐释紫苏油舒张血管的药效物质基础。结果发现紫苏叶挥发油具有显著的舒张 KCl 预收缩胸主动脉血管环作用, 其 EC_{50} 为 $8.6 \mu\text{g}/\text{mL}$, 经 GC-MS 分析表明发挥作用的物质主要为单萜类成分, 且发现其代表性成分紫苏醛具有一定的舒张血管作用。本研究不仅首次发现紫苏叶挥发油具有舒张血管活性, 同时证实紫苏醛是紫苏叶油发挥舒张血管的药效物质基础之一, 为紫苏叶的研究与开发提供新的依据。

关键词:紫苏叶; 挥发油; 舒张血管; 紫苏醛

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)11-1949-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.11.014

Study on the vasodilatory activity of volatile oil from *Perilla* leaves and its active substances

ZHOU Qin-mei^{1,2}, QIAO Ming-ming^{1,2}, PENG Cheng^{1,2*}, AO Hui¹, XIONG Liang^{1,2*}, LIU Fei^{1,2}¹Pharmacy College, Chengdu University of TCM, The Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, The State Key Laboratory of Characteristic Chinese Medicine Resources in Southwest China;²Institute of Innovative Medicine Ingredients of Southwest Specialty Medicinal Materials, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: To investigate the effect of volatile oil and its representative components on the vessels under tension stimulated with potassium chloride (KCl) from *Perilla* leaves. The pharmacodynamic effects of volatile oil were evaluated by rat aortic rings, which were collected and recorded by the tissue perfusion model and the PowerLab data analysis system. The components of the essential oil obtained by hydrodistillation were investigated by GC-MS. And the representative compound was further studied in order to explain the pharmacodynamic basis of vasodilatation of perilla oil. The volatile oil exhibited significant activities on KCl-induced vascular rings, with EC_{50} values of $8.6 \mu\text{g}/\text{mL}$. Thus, according to the GC/MS analysis, the vasodilatory activity of perilla oil was relevant to the monoterpenoids. And perilla aldehyde was found to exhibit certain vasodilatory activity. The perilla oil was found to showed vasodilatory activity for the first time. And further study showed that perilla aldehyde was an active constituent, which provided a new basis for the research and development of the perilla leaves.

Key words: leaves of *Perilla frutescens*; volatile oil; vasodilatory activity; perilla aldehyde

紫苏叶来源于唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的干燥叶 (或带嫩枝)。在我国应用历史悠久, 具有解表散寒, 行气和胃的传统功效, 常用于

风寒感冒, 咳嗽呕恶, 妊娠呕吐, 鱼蟹中毒等^[1]。由于气味芳香, 也常作为香精和调料使用^[2,3], 紫苏叶挥发油含量高, 约 0.2% ~ 1.5%^[3], 《中国药典》2015 年版中规定药材含挥发油不得少于 0.40%。

紫苏全身是宝, 其叶、梗、籽都可以药食两用, 有助于预防心血管疾病^[4]。紫苏子压榨的植物油富含 α -亚麻酸, 具有调脂、抗动脉硬化作用, 对降低心

收稿日期: 2019-05-13 接受日期: 2019-10-11

基金项目: 四川省青年科技创新研究团队专项 (2017TD0001); 成都中医药大学青年教师创新项目 (ZRQN2018015)

* 通信作者 Tel: 86-28-61800018; E-mail: pengchengchengdu@126.com

脑血管疾病具有积极意义^[5],从而备受人们亲睐。同样,紫苏叶作为重要的食材,生活中应用颇广,现代药理研究主要集中于其挥发油具有明显的抗病原微生物、抗过敏、抗炎、抗氧化等作用^[6-9],而对于心血管疾病方面的研究鲜有报道。本研究开展了紫苏油舒张血管活性及其活性物质研究,为紫苏叶的应用和推广提供科学内涵。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

肌张力传感器:JH-2型,中国北京航天医学工程研究所;离体组织器官恒温灌流系统:埃德仪器国际贸易(上海)有限公司;气相色谱-质谱联用仪:美国Agilent 7890A/5975C气相色谱/质谱联用仪;电子分析天平:Sartorius系列,型号BP221S型;优普超纯水制造系统,型号UPT-II-20T,成都超纯科技有限公司;可调式移液器:Thermo Fisher Scientific。

紫苏叶药材于2017年6月购自于四川省新荷花饮片公司,经成都中医药大学高继海副教授鉴定为紫苏 *Perilla frutescens* 的干燥叶。紫苏醛标准品(纯度 $\geq 98\%$),由成都化夏化学试剂有限公司提供,批号:253466。Acetylcholine chloride:Bomei;二甲亚砜(DMSO):成都科龙试剂厂,分析纯,批号:2015110201;NaCl, KCl, KH_2PO_4 , MgSO_4 , NaHCO_3 , Glucose, EDTA, CaCl_2 均为分析纯,购自成都科隆化学制品有限公司。

1.2 实验动物

SD大鼠,清洁级,雌雄不限,体重 200 ± 20 g,由成都中医药大学实验动物研究中心提供。动物生产许可证号:SCXK(川)2013-24,检疫后用。饲养温度 $21 \sim 27$ °C,湿度 $50\% \pm 5\%$,昼夜光照及通风环境自然调节。

1.3 挥发油的提取

取紫苏叶药材500 g,参照《中国药典》2015年版紫苏叶项下挥发油提取方法^[1](水蒸气蒸馏法)得到紫苏叶挥发油2.2 mL,经无水硫酸钠干燥除水后,贮存于4 °C冰箱,备用。

1.4 舒张血管活性筛选

1.4.1 溶液的配制

K-H溶液配制:称取NaCl 6.92 g, KCl 0.35 g, KH_2PO_4 0.16 g, MgSO_4 0.14 g, NaHCO_3 2.1 g, Glucose 1.82 g, EDTA 0.009 g, CaCl_2 0.28 g,加入纯水,溶解并定容于1 000 mL量瓶中,现用现配。

样品溶液的配制:精密称取紫苏油适量,加二甲

基亚砷配制成40 mg/mL的母液,备用。实验中采取累积给药方式,加入K-H溶液的浴槽中,使其在浴槽中的终浓度分别0.2、0.7、2、7、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。实验中其他若非特别说明,则以去离子水为溶剂。

1.4.2 大鼠胸主动脉血管环的制备

大鼠脱颈椎处死,迅速打开胸腔,快速取出胸主动脉,并置于 O_2 饱和4 °C K-H液($\text{pH} = 7.4$)中,剔除周围的结缔组织,冲洗血管内血液,剪成3~5 mm的血管环。血管环用两根不锈钢蹬型挂钩水平悬挂于浴管内,一端固定于浴管内,另一端连接张力换能器,调节1 g的基础张力,采用离体组织灌流模型和PowerLab数据分析系统采集和记录离体血管环张力的变化。浴槽内含有K-H液,温度恒定在37 °C,持续通95% O_2 + 5% CO_2 混合气体,平衡60 min,每15 min换37 °C K-H液。

1.4.3 血管环活性检测

在开始实验前,采用KCl(60 mmol/L)预收缩血管环,当收缩张力达到坪值后,往浴槽内加入Ach(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)舒张血管环,连续刺激3次。每次刺激后,K-H液连续冲洗三次,每次5 min,恢复到基础状态后,稳定30 min。当连续的两次收缩或舒张幅度小于10%,认为血管环组织结构完整,血管环活性良好,可重复实验。

1.4.4 紫苏叶油以及单体化合物对KCl收缩曲线影响检测

待血管环平衡60 min后,用KCl(60 mmol/L)连续刺激血管环至少2~3次。每次刺激后,K-H液连续冲洗三次,每次5 min,恢复到基础状态后,稳定30 min。当连续相同刺激所引起的血管收缩幅度小于10%,往浴槽内加入KCl(60 mmol/L)预收缩胸主动脉环,血管收缩张力达到坪值时,累积加入5个浓度的紫苏叶挥发油,观察浓度与舒张效应曲线,比较不同浓度下紫苏叶挥发油对KCl(60 mmol/L)预收缩血管环的舒张作用。同法,对单体化合物紫苏醛(依次为0.5、1.5、5、15、50 $\mu\text{mol}/\text{L}$)进行活性筛选,比较不同浓度下对KCl(60 mmol/L)预收缩血管环的影响。

1.4.5 数据统计

以KCl(60 mmol/L)所致的最大收缩张力为100%,计算各浓度挥发油所致的舒张百分比(%)。采用血管张力值变化反映药物的舒张作用,单位为g。实验数据以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示($n = 6$),组间比较采用 t 检验,SPSS 18.0统计完成($P < 0.05$,有显著

性差异; $P < 0.01$, 有极显著性差异)。化合物的浓度依赖舒张效应曲线图采用 Graphpad Prism 5 软件完成(以不同给药浓度下最大舒张率为纵坐标, 累积给药浓度的对数值为横坐标)。

1.5 GC-MS 分析

为进一步分析紫苏油发挥抗血管生成活性的物质组成, 本实验采用了气质联用技术(GC-MS)对其进行分析。方法参照气相色谱法(中国药典 2015 版二部附录 V E)测定。

1.5.1 色谱条件

色谱柱为 HP-5 MS 型石英毛细管色谱柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m), 柱流量 1.0 ml/min, 载气为高纯度氦气(99.999%), 柱前压 7.65 psi。程序升温: 初始温度 60 $^{\circ}$ C, 以每分钟 10 $^{\circ}$ C 的速率升温至 90 $^{\circ}$ C, 以每分钟 2 $^{\circ}$ C 的速率升温至 180 $^{\circ}$ C, 进样口温度 280 $^{\circ}$ C, 分流比 20:1。离子源为 EI 源, 离子源温度 230 $^{\circ}$ C, 四极杆温度 150 $^{\circ}$ C, 电子能量 70 eV, 发射电流 34.6 μ A, 质量范围 20 ~ 800 amu。

1.5.2 GC-MS 数据处理

通过 Agilent 5975C MSD 化学工作站检索 Nist 14.0 标准质谱图库, 同时结合有关质谱图文献解析, 对紫苏叶油中的化学成分进行鉴定。通过 Agi-

lent 5975C MSD 化学工作站数据处理系统, 按峰面积归一化法计算求出各化学成分的峰面积相对百分含量。

2 结果与分析

2.1 紫苏叶油对 KCl 预收缩血管环的影响

实验中以 DMSO 为空白溶剂, 可以看出其对血管舒张无明显影响(见图 1)。本实验选择 Methoxyverapamil 作为 KCl 诱导血管环收缩模型的阳性对照药, 维拉帕米(verapamil)是常见的治疗高血压、心率失常、心绞痛的药物, 其作用机制为阻断钙离子通道^[10-11], 观察其对 KCl 诱导血管环收缩张力的影响。按照累积给药方式, Methoxyverapamil 对 KCl 诱导血管环收缩模型具有明显的舒张作用, EC_{50} 为 0.69 μ mol/L。

紫苏叶挥发油对 KCl 预收缩的离体大鼠胸主动脉环具有良好的舒张作用, 在 0.2 ~ 20 μ g/mL 剂量范围内呈依赖性, 其 EC_{50} 为 8.6 μ g/mL。KCl 通过高 K^{+} 去极化, 使细胞膜上的 VDCCs 开放, 外钙内流, 细胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高, 血管平滑肌出现收缩^[12]。因此紫苏叶挥发油舒张血管作用可能是通过影响 KCl 导致的 VDCCs 开放, 减少胞外 Ca^{2+} 的内流而实现。

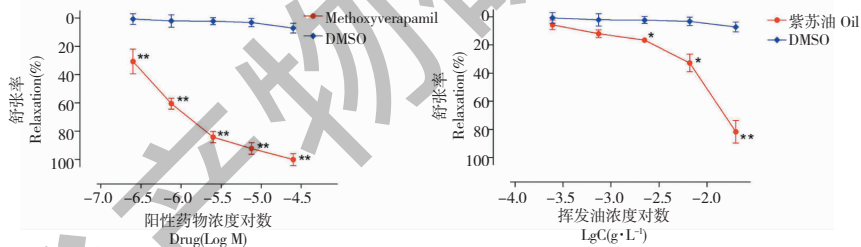


图 1 空白溶剂、阳性药以及紫苏叶挥发油对 KCl 预收缩胸主动脉环的舒张量效曲线($\bar{x} \pm SEM, n = 6$)

Fig. 1 Vasorelaxant activity of solvent, methoxyverapamil and the volatile oil against KCl-induced contractions($\bar{x} \pm SEM, n = 6$)

注: 与空白溶剂组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2 紫苏油活性部位的化学组成

采用 GC-MS 对紫苏挥发油进行分析, 发现水蒸气蒸馏法提取的紫苏叶挥发油含量及主要成分相对

百分含量见表 1; 按上述色谱条件进样得到挥发油的总离子流色谱图见图 2。

表 1 紫苏叶挥发油化学成分及其相对百分含量

Table 1 Chemical constituents and relative percentages of volatile oil from *Perilla* leaves

峰号 No.	保留时间 t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight	相对百分含量 Relative percentage (%)
1	4.166	(-)- β -蒎烯 (-)- β -Pinene	$C_{10}H_{16}$	136	0.18
2	5.027	D-柠檬烯 D-Limonene	$C_{10}H_{16}$	136	7.86
3	6.566	芳樟醇 Linalool	$C_{10}H_{18}O$	154	1.47

续表 1 (Continued Tab. 1)

峰号 No.	保留时间 t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight	相对百分含量 Relative percentage (%)
4	9.706	香薷酮 Elsholtzia ketone	$C_{10}H_{14}O_2$	166	2.70
5	10.583	未鉴定 Unknown	-	-	0.57
6	11.650	1-(呋喃-2-基)-4-甲基戊-1-酮 1-(Furan-2-yl)-4-methylpentan-1-one	$C_{10}H_{14}O_2$	166	22.18
7	12.744	紫苏醛 Perillaldehyde	$C_{10}H_{14}O$	150	37.15
8	13.480	未鉴定 Unknown	-	-	1.13
9	13.865	未鉴定 Unknown	-	-	10.66
10	19.320	石竹烯 Caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	5.97
11	21.032	α -律草烯 α -Humulene	$C_{15}H_{24}$	204	0.59
12	23.453	2,6-二甲基-6-(4-甲基-3-戊烯基)双环[3.1.1]庚-2-烯 2,6-Dimethyl-6-(4-methyl-3-pentenyl)bicyclo[3.1.1]hept-2-ene	$C_{15}H_{24}$	204	2.56
13	27.806	氧化石竹烯 Caryophyllene oxide	$C_{15}H_{24}O$	220	2.99
14	29.030	未鉴定 Unknown	-	-	0.46
15	30.516	δ -芹子烯 δ -Selinene	$C_{15}H_{24}$	204	0.82
16	31.464	β -桉叶醇 β -Eudesmol	-	-	1.36
17	31.618	α -桉叶醇 α -Eudesmol	$C_{15}H_{26}O$	222	1.37

紫苏由于产地的不同其化学组成存在显著性差异^[13,14],结合 GC-MS 法对紫苏油进行化学组成分析发现,本实验中的活性部位紫苏叶油中主要含有

单萜和倍半萜类成分,且紫苏醛为其代表性成分(含量为 37.15%),提示紫苏油发挥舒张血管活性可能与该成分密切相关。

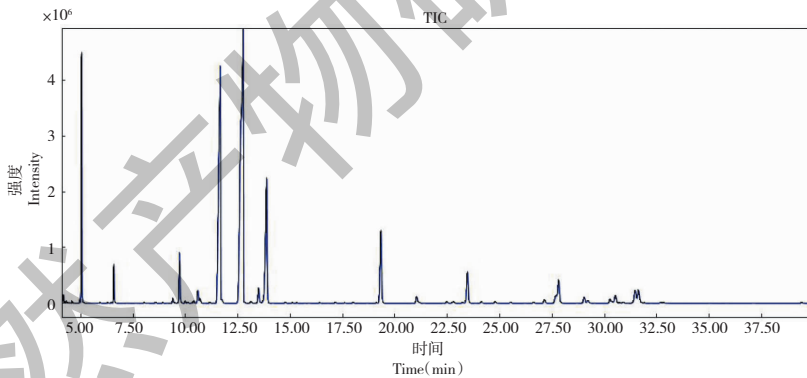


图 2 紫苏叶挥发油的总离子流

Fig. 2 Total ion current chromatography of the volatile oil from *Perilla* leaves

2.3 主要成分紫苏醛的舒张血管活性的评价

本实验进一步选择紫苏叶挥发油中的主要代表性单萜紫苏醛进行研究,观察其对 KCl 预收缩胸主动脉环的活性影响,以浓度与效应绘制曲线,结果发现累积给药加入紫苏醛,对 KCl (60 mmol/L) 预收缩血管环的表现出一定的舒张作用,当浓度为 50 μ mol/L 时,最大舒张率为 35.3% \pm 8.6%,结果见图 3。

3 结论

挥发油是从植物中提取的挥发性芳香物质。本

实验采用水蒸气蒸馏法提取紫苏叶挥发油,该方法适用于具有芳香性成分(萜类或芳香族类)的提取,与文献报道一致^[13,14]。而来源于该植物的种子紫苏子因脂肪油含量较高,常采用压榨法进行提取,其挥发性和芳香性较弱,以 α -亚麻酸为代表的脂肪酸类成分常常需要甲酯化后才能进行检测^[15,16]。因此,挥发油提取方法的选择与药用部位所含成分的性质密切相关。

目前,大量研究表明植物挥发油对心血管具有

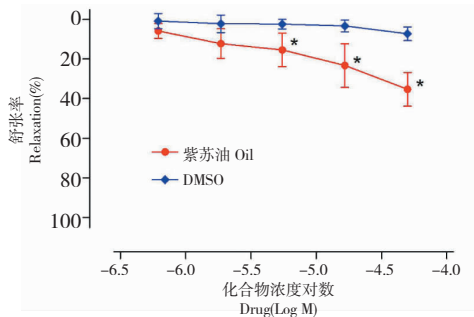


图3 紫苏醛对KCl预收缩胸主动脉环的舒张量效曲线($\bar{x} \pm SEM, n=6$)

Fig. 3 Vasorelaxant activity of perillaldehyde against KCl-induced contractions($\bar{x} \pm SEM, n=6$)

注:与空白溶剂组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。Note: Compared with control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

明显的作用^[17]。紫苏叶是药食同源的,现代药理研究主要集中在抑菌、抗肿瘤、抗氧化、提高免疫功能等方面,本研究首次证实紫苏叶挥发油具有显著的舒张血管的作用。经GC-MS联用技术分析该活性部位,发现紫苏叶油中主要含有单萜类和倍半萜类,提示萜类成分可能是其主要的活性物质。为进一步追踪药效物质,本研究选择含量较高的单萜类成分紫苏醛(含量为37.15%)进行筛选,结果发现紫苏醛具有一定的舒张缩血管作用,当浓度为50 μM 时,最大舒张率为35.3%,表明紫苏醛是紫苏叶油舒张血管的重要活性成分之一。

经大量文献查阅,发现紫苏叶挥发油中单萜类成分右旋柠檬烯(D-limonene,含量7.86%)和芳樟醇(linalool,含量1.47%)具有舒张血管的作用。二者均是常见的单萜类化合物,其中,右旋柠檬烯是柑橘类(橙,柠檬,金橘和柚子等)精油的主要成分^[18]。学者Touvay等^[19]研究了右旋柠檬烯对野百合碱(MCT)诱导的大鼠的肺动脉高压和右心室肥厚的影响,每日口服400 mg/只给药大鼠,右旋柠檬烯均能显著降低MCT引起的大鼠肺动脉高压和右心室肥厚,此外还能降低肺动脉中膜厚度。芳樟醇通常为外消旋混合物,存在于多种草本植物中,在化妆品和食品行业常被用作香水和香料^[20]。Höferl等^[21]研究探讨芳樟醇对血压的影响,发现该单萜对人体心血管系统具有明显的影响。综上所述,紫苏叶挥发油发挥舒张血管作用的物质基础主要是单萜类成分,其显著的药效可能与多活性成分的协同作用有关,具体有待进一步研究。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典;第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015, 339-340.
- 2 Gao BC, Wei GJ, Yuan GJ, et al. The contents and constituents of anthocyanidins from different *Perilla* leaves [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 30: 610-615.
- 3 Wei CL, Guo BL, Zhang CW, et al. *Perilla* resources of China and essential oil chemotypes of *Perilla* leaves [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2016, 41: 1823-1834.
- 4 Jia JJ, Li Y, Miao MS. Chemistry, pharmacology and application of *Perilla* [J]. China J Chin Med (中医学报), 2016, 31: 1354-1356.
- 5 Huang XB, Chen JS. Advances in research on pharmacological effects of *Perilla frutescens* seed [J]. Guangming J Chin Med (光明中医), 2015, 30: 2039-2041.
- 6 Wei BY, Huang L, Teng JW. Review on research and development of genus *Perilla* [J]. Food Sci (食品科学), 2005, 26: 274-277.
- 7 Du DJ. The anti-inflammatory and anti-allergy research on *Perilla* in Japan [J]. J Chin Med Mater (中药材), 1994, 36: 81-82.
- 8 Ren YX, Shen YJ, Zeng N. Experimental study on anti-inflammatory effects of volatile oil from *Perilla* leaves [J]. Sichuan J Physiol Sci (四川生理科学杂志), 2001, 23: 129.
- 9 Lin LY, Peng CC, Wang HE, et al. Active volatile constituents in *Perilla frutescens* essential oils and improvement of antimicrobial and anti-inflammatory bioactivity by fractionation [J]. J Essent Oil Bear Pl, 2016, 19: 1957-1983.
- 10 Zhu PL, Yang ZX. Clinical observation of Shensong Yangxin Capsules combined with verapamil in treatment of ventricular tachycardia [J]. Drugs Clin (现代药物与临床), 2019, 34: 663-666.
- 11 Xiong L, Zhou QM, Zou Y, et al. Leonuketol, a spiroketal diterpenoid from *Leonurus japonicus* [J]. Org Lett, 2015, 17: 6238-6241.
- 12 Sheng YM. Correlation between optic nerve protection and calcium antagonism in effective components of *Erigeron breviscapus* [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (成都中医药大学), 2005.
- 13 Nitta M, Kobayashi H, Ohnishi-Kameyama M, et al. Essential oil variation of cultivated and wild *Perilla* analyzed by GC/MS [J]. Biochem Syst Ecol, 2006, 34: 25-37.