

# 海藻羊栖菜化学成分全谱分析及其体外抗神经炎症活性研究<sup>△</sup>

彭红<sup>1,2,3\*</sup>, 黄品哲<sup>1,3</sup>, 宋永贵<sup>2,3</sup>, 徐焕华<sup>2,3,4</sup>, 周明月<sup>2,3</sup>, 朱根华<sup>2,3</sup>, 杨明<sup>4</sup>, 艾志福<sup>2,3</sup>, 苏丹<sup>1,2,3#</sup>(1.江西中医药大学药学院, 南昌 330004; 2.江西中医药大学抑郁症中医证候动物模型江西省中医药管理局重点研究室, 南昌 330004; 3.江西中医药大学中医药防治认知障碍脑疾病江西省重点实验室, 南昌 330004; 4.江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

中图分类号 R917;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)07-0800-09

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.07.06



**摘要** 目的 研究羊栖菜的化学成分组成及体外抗神经炎症活性,为其开发利用以及药效物质研究提供参考。方法 基于超高效液相飞行时间质谱联用技术(UHPLC-QTOF-MS/MS)和气相色谱-质谱联用技术(GC-MS/MS)对羊栖菜中化学成分进行全谱分析。利用脂多糖(1 μg/mL)建立小鼠小胶质细胞BV2的炎症模型,以帕罗西汀(5 μg/mL)为阳性对照药物,通过CCK-8法检测20、40、60、80、100 μg/mL羊栖菜提取物作用24 h后对细胞活性及形态的影响,通过酶联免疫吸附法检测40、60、80 μg/mL羊栖菜提取物作用24 h后对细胞上清液中肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素6(IL-6)含量的影响。结果 经UHPLC-QTOF-MS/MS分析共鉴定出103种非挥发性成分,经GC-MS/MS分析共鉴定出60种挥发性成分。40、60、80 μg/mL羊栖菜提取物可显著降低因脂多糖诱导而异常升高的BV2细胞活化程度和细胞上清液中TNF-α、IL-6的含量( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结论 本研究建立了海藻羊栖菜的化学成分全谱,并证实了羊栖菜具有一定的体外抗神经炎症活性。

**关键词** 羊栖菜;全谱分析;挥发性成分;非挥发性成分;抗神经炎症活性

## Full spectrum analysis of chemical constituents of *Sargassum fusiforme* and its *in vitro* anti-neuroinflammatory activity

PENG Hong<sup>1,2,3</sup>, HUANG Pinzhe<sup>1,3</sup>, SONG Yonggui<sup>2,3</sup>, XU Huanhua<sup>2,3,4</sup>, ZHOU Mingyue<sup>2,3</sup>, ZHU Genhua<sup>2,3</sup>, YANG Ming<sup>4</sup>, AI Zhifu<sup>2,3</sup>, SU Dan<sup>1,2,3</sup>(1. College of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Key Laboratory of Depression Animal Model Based on TCM Syndrome of Jiangxi Administration of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 3. Jiangxi Provincial Key Laboratory of TCM for Prevention and Treatment of Brain Diseases with Cognitive Impairment, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 4. Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Medicine of Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To study the composition of chemical constituents of *Sargassum fusiforme* and its *in vitro* anti-neuroinflammatory activity, and to provide reference for its development and utilization and the study of pharmacodynamic substances. **METHODS** UHPLC-QTOF-MS/MS analysis method and GC-MS/MS method were used to analyze the chemical constituents of *S. fusiforme*. The lipopolysaccharide (1 μg/mL) was adopted to establish the inflammatory model of neuromicroglia BV2. Using paroxetine (5 μg/mL) as positive control, CCK-8 assay was used to detect the effects of the extracts of *S. fusiforme* (20, 40, 60, 80, 100 μg/mL) on the activity and morphology of neuromicroglia BV2. The effects of the extracts of *S. fusiforme* (40, 60, 80 μg/mL) on the contents of tumor necrosis factor α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) in cell supernatant were detected by ELISA. **RESULTS** A total of 103 non-volatile constituents were identified by UHPLC-QTOF-MS/MS, and 60 volatile constituents were obtained by GC-MS/MS. The extracts of *S. fusiforme* (40, 60, 80 μg/mL) could significantly reduce the abnormally increased activation of neuromicroglia BV2 and the contents of TNF-α and IL-6 due to lipopolysaccharide ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). **CONCLUSIONS** The study establish the full spectrum of chemical constituents of *S. fusiforme*, and it is confirmed that

△ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.82060808)

\* 教授, 硕士。研究方向:药物分析及质量控制。电话:024-23986285。E-mail:sherlockfez@sina.cn

# 通信作者:教授, 博士。研究方向:药物分析、中药药效物质及中医脑科学。电话:024-23986285。E-mail:sudan\_nj@163.com

*S. fusiforme* has certain *in vitro* anti-neuroinflammatory activity.

**KEYWORDS** *Sargassum fusiforme*; full spectrum analysis; volatile constituents; non-volatile constituents; anti-neuroinflammatory activity

羊栖菜 *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setch. 是褐藻门马尾藻科马尾藻属植物的干燥藻体, 习称“小叶海藻”, 主要分布于辽宁、山东、福建、浙江、广东等沿海地带的温暖水域<sup>[1]</sup>, 是我国一种较为常见且资源丰富的海藻。据2020年版《中国药典》(一部)记载, 羊栖菜的形状特点为分枝互生、无刺状突起、藻体较小、叶条形或细匙形<sup>[2]</sup>。羊栖菜早在《神农本草经》中就有记载, 具有软坚散结、消痰利水之功效<sup>[3]</sup>。相关研究显示, 羊栖菜所含成分具有降血糖<sup>[4]</sup>、减轻动脉粥样硬化的作用<sup>[5]</sup>, 是一种极具研究前景的药食两用植物。

我国的海洋资源十分丰富, 海洋药物展现出了良好的开发前景<sup>[6-9]</sup>。但相比于传统中药, 海洋药物的总体研究开发以及质量控制水平仍需加强, 《中国药典》对包括羊栖菜在内的海洋药物主要是采用硫酸-蒽酮显色法控制其多糖含量, 相关研究也多集中在羊栖菜多糖的制备、分离、结构确定及活性评价等方面<sup>[10-11]</sup>, 尚缺乏对羊栖菜相关功效涉及的潜在活性化合物(如黄酮类、香豆素类、生物碱类化学成分)的研究<sup>[12-13]</sup>, 忽视了羊栖菜所富含的小分子活性成分及其具备的潜在活性。

目前, 已有报道采用化学分离的方法对羊栖菜乙酸乙酯、石油醚等萃取部位的成分进行分析<sup>[14]</sup>, 但对羊栖菜所含成分的全面分析研究尚为空白。鉴于此, 本研究采用超高效液相飞行时间质谱联用技术(UHPLC-QTOF-MS/MS)和气相色谱-质谱联用技术(GC-MS/MS)获得海藻羊栖菜的全谱分析数据库, 完善对海藻羊栖菜多糖以外的小分子化合物的研究, 并开展以细胞模型为基础的羊栖菜体外抗神经炎症活性实验, 为其今后功效活性成分的研究、质量控制方法的优化以及后续活性化合物的开发提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有 AB SCIEX Triple TOF 5600+型高分辨飞行时间质谱联用仪(美国 Sciex 公司), LC-30A 型超高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司), Agilent 7890A/5975C 型 GC-MS/MS 仪(美国 Agilent 公司), MS105DU 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司), KQ-500B 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司), DZTW 型调温电热套(北京市永光明医疗仪器有限公司), 64R 型恒温高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司), Varioskan LUX 型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), TS100 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

海藻羊栖菜干燥药材(批号 19061309)购自安国市一方药业有限公司, 经江西中医药大学岐黄国医书院吴蜀瑶中药师鉴定为真品; 7-羟基香豆素对照品(批号 DSTDQ006601, 纯度  $\geq 98\%$ )、川陈皮素对照品(批号 DST00690120, 纯度  $\geq 98\%$ )、滨蒿内酯对照品(批号 AF21052105, 纯度  $\geq 98\%$ )、异贝壳杉烯酸对照品(批号

DST210311-187, 纯度  $\geq 98\%$ )均购自成都埃法生物科技有限公司; 蛇床子素对照品(批号 201601114, 纯度  $\geq 98\%$ )、帕罗西汀对照品(批号 2019021134, 纯度  $\geq 98\%$ )均购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 磷酸盐缓冲液(PBS, 批号 20210506)、高糖 DMEM 培养基均购自美国 CellMax 公司; 胎牛血清购自美国 Gibco 公司; 胰酶购自美国 Solarbio 公司; 青霉素-链霉素(批号 191118164)购自苏州新赛美生物科技有限公司; CCK-8 试剂(批号 GK100011)购自美国 GIpBio 公司; 脂多糖购自美国 Sigma 公司; 小鼠肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 酶联免疫吸附检测(ELISA)试剂盒(批号分别为 202107、202106)均购自江苏酶免实业有限公司; 甲醇、乙醇、甲酸、乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为去离子水。

### 1.3 细胞株

小鼠小胶质细胞 BV2 购自中国科学院上海细胞库。

## 2 方法

### 2.1 羊栖菜化学成分分析

2.1.1 UHPLC-QTOF-MS/MS 分析供试品溶液的制备 称取 1 g 羊栖菜药材粉末, 加入 10 mL 80% 甲醇, 超声(功率 280 W, 频率 40 kHz)提取 60 min, 过滤, 取续滤液置于 10 mL 量瓶中, 以 80% 甲醇定容, 即得。进样前, 使用 0.22  $\mu\text{m}$  滤头过滤。

2.1.2 GC-MS 分析供试品溶液的制备 取剪碎的药材 500 g, 置于 10 000 mL 圆底烧瓶中, 加 10 倍量(5 000 mL)水, 使用挥发油提取器提取 8 h, 收集所得挥发油, 用精油小瓶封存。进样时, 取 200  $\mu\text{L}$  挥发油置于 10 mL 量瓶中, 加无水乙醇定容, 然后使用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤。

### 2.2 色谱与质谱条件

2.2.1 UHPLC-QTOF-MS/MS 分析条件 色谱条件如下: 使用 Acquity UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  色谱柱(100 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ), 以水(含 0.1% 甲酸, A 相)-乙腈(含 0.1% 甲酸, B 相)为流动相进行梯度洗脱(0~15 min, 5% B  $\rightarrow$  55% B; 15~45 min, 55% B  $\rightarrow$  95% B; 45~47 min, 95% B; 47~47.10 min, 95% B  $\rightarrow$  5% B); 柱温为 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 流速为 0.3 mL/min, 进样量为 3  $\mu\text{L}$ 。质谱条件如下: 使用正、负离子 2 种扫描模式, 扫描范围为  $m/z$  50~1 550; 电压设置正、负值均为 4 500 V, 去簇电压为 100 V; 电喷雾离子源(ESI)温度为 500  $^{\circ}\text{C}$ ; 气帘气压力为 40 psi, 雾化气、辅助气压力均为 50 psi; 碰撞能量为  $(40 \pm 10)$  eV。

2.2.2 GC-MS 分析条件 色谱条件如下: 使用 HP-5MS 色谱柱(30 m  $\times$  0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ ); 采用程序升温(初始温度为 60  $^{\circ}\text{C}$ 、保持 2 min, 以 2  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升温至 80  $^{\circ}\text{C}$ 、保持 2 min, 以 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升温至 120  $^{\circ}\text{C}$ 、保持 5 min, 以 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升温至 160  $^{\circ}\text{C}$ 、保持 5 min, 以 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升温至 280  $^{\circ}\text{C}$ 、保持 10 min); 载气为氮气, 载气流速为 1.2 mL/min; 进样量为 2  $\mu\text{L}$ , 进样口温度为 260  $^{\circ}\text{C}$ , 分流比为 20:1; 传输管线温度为 280  $^{\circ}\text{C}$ 。质谱条件如下: 电子轰击离子源(EI)温

度为 230 ℃,四极杆温度为 150 ℃,质量扫描范围为 30~600 amu。

2.2.3 成分分析 利用 Analyst TF 1.6、PeakView1.2 数据处理系统获取 UHPLC-QTOF-MS/MS 分析化合物的保留时间、质谱碎片信息等内容,通过与质谱数据库匹配以及与相关文献报道、对照品比对进行化合物鉴定。利用 MSD ChemStation F.01.00.1903 软件获取 GC-MS/MS 分析化合物的信息,并与 NIST17 数据库进行信息匹配,匹配度不低于 90%<sup>[15]</sup>。

## 2.3 羊栖菜提取物的体外抗炎作用考察

2.3.1 提取物的制备 将羊栖菜干燥藻体剪碎后置于 10 000 mL 圆底烧瓶中,加入 80% 乙醇[料液比为 1:10 (g/mL)]回流提取 8 h,使用双层纱布过滤,收集滤液;残渣加 5 倍量(mL/g)80%乙醇回流提取 1 h,使用双层纱布过滤;混合 2 次所得提取液,旋蒸挥去乙醇,将剩余浓缩液冷冻干燥 24 h,研磨后制成冻干粉,置于干燥器内避光保存。给药时取该提取物冻干粉用 PBS 溶解,然后过 0.2 μm 除菌滤膜。

2.3.2 BV2 细胞的培养 将 BV2 细胞接种于含有 10% 胎牛血清、1% 双抗(100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素)的高糖 DMEM 完全培养基中,将细胞置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养、传代。本研究使用第 6 代细胞进行实验。

2.3.3 BV2 细胞活性测定 采用 CCK-8 法测定细胞存活率。取对数生长期的 BV2 细胞,均匀接种在 96 孔板中(6×10<sup>3</sup>个/孔),分为空白对照组、模型组(1 μg/mL 脂多糖)、阳性药物组(1 μg/mL 脂多糖+5 μmol/L 帕罗西汀,浓度根据前期预实验结果设置)、不同质量浓度羊栖菜提取物组[1 μg/mL 脂多糖+20(或 40、60、80、100) μg/mL 海藻羊栖菜提取物,浓度梯度均根据前期预实验结果设

置],每组设置 3 个复孔;并设置空白孔进行调零。将细胞常规培养至 60% 贴壁后,加入相应药液或空白培养基干预 24 h,然后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,孵育 1.5 h。使用酶标仪在 450 nm 波长处检测各孔的光密度(OD),计算细胞的存活率=(给药孔 OD-空白孔 OD)/(空白对照孔 OD-空白孔 OD)×100%;并使用显微镜观察各组细胞的形态进行综合分析。实验重复 3 次。

## 2.3.4 细胞上清液中炎症因子 TNF-α、IL-6 含量的测定

采用 ELISA 法进行测定。取对数生长期的 BV2 细胞,均匀接种在 96 孔板中(6×10<sup>3</sup>个/孔),分为空白对照组、阳性药物组(1 μg/mL 脂多糖+5 μmol/L 帕罗西汀)和不同质量浓度羊栖菜提取物组[1 μg/mL 脂多糖+20(或 40、80) μg/mL 羊栖菜提取物],每组设置 3 个复孔。待细胞培养至 60% 贴壁左右时,加入药物干预 24 h,然后取细胞上清液,按照试剂盒说明书操作,检测细胞上清液中炎症因子 TNF-α、IL-6 的含量。实验重复 3 次。

## 2.4 统计学方法

使用 Graphpad Prism 8.0.2 软件对数据进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析;方差齐时组间两两比较用 Tukey 法,方差不齐时组间两两比较用 Dunnett's T3 法。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 UHPLC-QTOF-MS/MS 分析结果

经 UHPLC-QTOF-MS/MS 分析,从羊栖菜中共鉴定出 103 种非挥发性成分,包括有机酸类成分 3 种、生物碱类成分 13 种、萜类成分 24 种、黄酮类成分 13 种、醌类成分 1 种、糖苷类成分 2 种、维生素类成分 5 种、苯丙素类成分 5 种、香豆素类成分 7 种、木脂素类成分 2 种、氨基酸类成分 8 种、脂肪酸类成分 1 种、皂苷类成分 3 种、甾体类成分 4 种和其他类成分 12 种。结果见图 1、表 1。

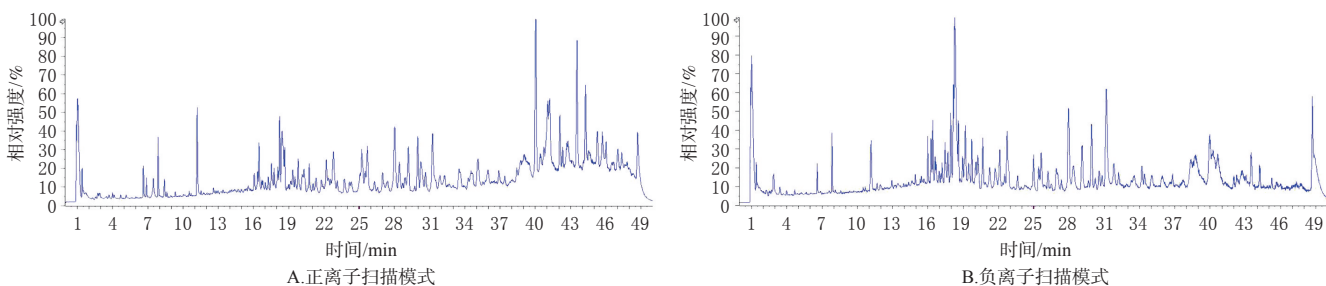


图 1 正、负离子扫描模式下羊栖菜的总离子流图

表 1 羊栖菜中非挥发性成分的 UHPLC-QTOF-MS/MS 分析鉴定结果

编号	化合物	分子式	保留时间/min	加合模式	实测分子量	误差/ppm	碎片离子 m/z	化合物类型
1	亚油酸	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	31.80	-H	279.233 0	2.5	261.224 6	有机酸
2	菊苣酸	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	10.42	-H	473.072 6	-2.1	401.088 6, 313.069 7, 269.093 3	有机酸
3	胆酸	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>3</sub>	14.21	-H	407.280 3	-3.7	343.251 5	有机酸
4	毕扣扣灵碱	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>6</sub>	7.32	+H	368.112 9	0.1	319.059 9, 307.059 9, 289.045 5, 277.040 5, 249.055 3, 221.060 3, 190.085 7, 165.071 4	生物碱
5	甜菜碱 <sup>[6]</sup>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	12.68	+H	118.086 3	2.8	59.077 0, 58.069 3	生物碱
6	腺苷	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	1.87	+H	268.104 0	-0.8	136.062 4, 119.035 0, 57.047 6	生物碱
7	腺嘌呤	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	1.67	+H	136.061 8	0.6	119.035 7, 92.026 1, 65.015 7	生物碱

续表 1

编号	化合物	分子式	保留时间/min	加合模式	实测分子量	误差/ppm	碎片离子 $m/z$	化合物类型
8	小檗碱 <sup>[7]</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>4</sub>	10.14	+H	336.123 0	1.1	320.093 1, 304.097 8, 292.098 1, 278.082 5	生物碱
9	原阿片碱 <sup>[8]</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub>	8.29	+H	354.133 6	0.8	336.124 7, 275.071 4, 247.075 8, 206.082 6, 188.071 0, 165.056 0, 149.057 6	生物碱
10	虫草素	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	1.91	+H	252.109 1	-0.9	136.062 2, 119.036 1, 69.040 2	生物碱
11	左旋肉碱 <sup>[9]</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	11.53	+H	162.112 5	0.5	102.091 8, 85.029 7, 60.084 0, 58.068 2	生物碱
12	尿苷	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	1.76	-H	243.062 3	3.7	243.021 3	生物碱
13	胸腺嘧啶	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2.02	+H	127.050 2	2.1	110.027 4, 84.046 6, 82.030 6, 54.038 9	生物碱
14	栝楼酯碱	C <sub>27</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	16.02	+H	445.212 1	0.9	252.103 5, 224.107 6, 105.034 5, 91.055 8	生物碱
15	咖啡因 <sup>[20]</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	4.23	+H	195.087 7	-1.2	138.066 1, 123.044 3, 110.073 4, 109.041 0, 83.064 3, 69.046 5	生物碱
16	胡芦巴碱 <sup>[21]</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	17.52	+H	138.055 0	0.9	94.065 8, 92.050 4, 78.035 6, 65.041 1, 51.027 9	生物碱
17	齐墩果酸	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	28.13	-H	455.353 1	-3.5	455.352 6	三萜
18	枞酮	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	12.93	+H	233.117 2	-1	215.106 8, 160.064 7, 105.072 9, 91.053 8, 77.044 0, 67.053 3	三萜
19	黄柏酮	C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	14.71	+H	455.206 4	-4.3	227.096 6, 175.126 0, 133.095 9	三萜
20	栝楼酸	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	38.60	+H	441.372 6	0.6	441.374 0, 357.288 1, 245.186 4, 205.193 6, 189.162 0, 163.148 3, 149.095 0, 135.117 3, 107.086 8	三萜
21	熊果酸	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	26.95	-H	455.353 1	-3.5	455.352 6	三萜
22	诺米林	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	1.40	-H	513.213 0	0.9	366.139 8	三萜
23	羟基积雪草酸	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>6</sub>	14.24	-H	503.337 8	-2.5	293.210 9, 275.204 1	三萜
24	积雪草苷	C <sub>48</sub> H <sub>76</sub> O <sub>19</sub>	42.79	+NH <sub>3</sub>	976.547 6	-0.6	959.569 2, 797.493 2	三萜
25	柠檬苦素	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	13.38	+H	471.201 3	0.3	425.190 7, 367.212 2, 213.087 3, 161.061 6, 95.012 3	三萜
26	积雪草酸	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	15.72	+H	489.357 5	-1.1	407.323 2, 205.156 8, 189.165 2, 147.114 1, 133.102 9	三萜
27	降龙涎香醚	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> O	30.31	+H	237.221 3	0.2	149.130 9, 135.118 6, 121.110 9, 109.100 8, 95.085 6, 93.070 7, 81.071 5, 67.056 2, 55.058 1	二萜
28	香紫苏内酯	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	19.30	+H	251.200 6	-0.3	233.197 9, 135.116 4, 121.102 6, 107.086 6, 95.089 9, 79.054 8, 67.057 1	二萜
29	异贝壳杉烯酸	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	22.20	+H	303.233 4	0.7	285.222 0, 257.189 7, 175.148 3, 161.131 8, 147.116 7, 133.101 2	二萜
30	脱水穿心莲内酯	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	14.62	-H	331.191 5	-2.9	331.249 3, 215.125 4	二萜
31	$\alpha$ -香附酮	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	12.89	+H	219.174 3	-0.6	145.102 1, 119.087 3, 105.071 2, 91.055 6, 77.040 7, 67.059 9	倍半萜
32	白术内酯 I	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	12.05	+H	231.138 0	-0.7	175.072 9, 170.108 7, 155.084 5, 143.086 5, 141.069 8, 128.063 1, 115.055 9, 91.054 7, 77.038 4	倍半萜
33	白术内酯 III	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	11.75	+H	249.148 5	0.3	170.107 6, 161.095 0, 155.086 1, 128.062 7, 105.072 8, 91.054 5, 79.056 4, 55.021 1	倍半萜
34	莪术二酮	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	16.17	+H	237.184 9	-0.2	201.167 5, 159.116 3, 121.099 6, 105.071 8, 93.072 1, 77.041 2, 67.056 1	倍半萜
35	甘松新酮	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	14.39	+H	251.164 1	-0.2	191.147 7, 177.087 5, 149.094 9, 131.084 6, 119.086 8, 105.070 9, 91.051 6, 77.039 9, 65.042 0	倍半萜
36	牻牛儿酮	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	12.89	+H	219.174 3	-0.6	175.115 7, 159.115 8, 144.093 8, 131.081 5, 121.101 3, 105.071 2, 91.055 6, 77.040 7	倍半萜
37	青蒿素	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	12.80	+H	283.154 0	0.7	267.003 4, 205.135 5, 149.060 1, 125.096 9, 105.072 5, 91.055 8, 55.059 2	倍半萜
38	去氢木香内酯	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	12.05	+H	231.137 9	-0.7	175.072 9, 165.073 8, 141.069 8, 128.063 1, 91.054 7, 77.038 4	倍半萜
39	小白菊内酯 <sup>[22-23]</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	11.75	+H	249.215 6	0.3	231.142 8, 213.126 0, 189.090 9, 185.133 4	倍半萜
40	异土木香内酯	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	17.95	+H	233.153 6	-0.6	187.145 4, 159.080 4, 145.100 8, 131.084 3, 105.072 4, 91.058 2, 77.053 6	倍半萜
41	橙皮苷	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	8.09	-H	609.182 4	-0.3	594.161 9, 489.126 7, 301.071 8, 286.047 1, 164.014 7	黄酮
42	高良姜素	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	16.64	-H	269.045 6	-3.0	240.040 0, 225.056 6, 210.034 5, 181.072 7	黄酮
43	黄芩素	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	16.65	-H	269.045 6	0.6	241.050 7, 225.053 8, 185.058 5	黄酮
44	芹菜素 <sup>[24]</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	16.63	-H	269.045 6	-1.3	227.034 1, 195.048 7, 171.042 8, 167.057 4, 143.045 8	黄酮
45	新橙皮苷	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	8.09	-H	609.182 5	-0.3	594.161 9, 489.126 7, 301.071 8, 286.047 1, 164.014 7	黄酮
46	芸香柚皮苷	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	7.61	-H	579.171 9	0.9	459.128 0, 271.065 5, 151.006 6	黄酮
47	川陈皮素 <sup>[25]</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	13.97	+H	403.138 8	0.7	388.115 3, 373.092 7, 358.068 6, 327.086 1, 330.0742, 211.025 4, 183.029 5	黄酮
48	橘皮素 <sup>[26]</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	15.20	+H	373.128 2	0.8	358.105 2, 343.082 8, 297.074 0, 271.059 3, 211.025 1, 183.028 6, 151.045 0	黄酮
49	柚皮苷 <sup>[27]</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	7.61	-H	579.171 9	0.9	459.128 0, 271.065 5, 151.006 6	黄酮
50	小豆蔻明	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	16.49	-H	271.096 5	1.8	269.076 2, 226.060 1, 122.004 5, 94.036 7, 65.008 9	黄酮
51	黄芩苷	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	8.83	-H	445.077 6	-2.0	269.047 0, 223.049 2, 195.056 9, 71.053 6	黄酮
52	芒柄花素 <sup>[28]</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	12.52	+H	269.080 8	-1.9	253.039 3, 237.058 8, 197.060 4, 141.067 1, 118.039 5	黄酮
53	橙皮素	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	8.14	+H	303.086 3	-0.6	177.047 1, 153.010 9, 117.032 6, 89.041 4	黄酮
54	大黄素	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	16.63	-H	269.045 6	-1.3	241.064 7, 227.034 1, 225.056 4, 210.028 3, 195.048 7, 182.040 6, 171.042 8	醌类
55	姜糖脂 B	C <sub>33</sub> H <sub>58</sub> O <sub>14</sub>	19.14	+HCOOH -H	723.380 9	-0.5	677.374 6, 415.145 2, 397.135 6, 279.233 4, 235.082 6, 179.057 6, 161.045 7, 89.026 4	糖苷
56	仙茅苷	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>11</sub>	6.21	-H	465.140 2	-3.4	137.029 3, 121.049 6	糖苷
57	维生素 B <sub>3</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	5.24	-H	375.131 0	0.8	255.088 2, 241.071 6, 212.089 0	维生素
58	维生素 A 酸	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	19.80	+H	301.216 2	1.0	283.211 1, 241.194 8, 199.150 0, 185.132 8, 173.134 4, 159.116 8, 145.101 3, 131.085 8, 117.072 4, 105.071 3, 91.055 8	维生素
59	维生素 D <sub>2</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O	46.73	+H	397.346 5	0.7	379.345 4, 225.162 6, 201.174 6, 161.132 9, 147.117 3, 119.087 5, 109.066 5, 81.073 0	维生素
60	维生素 K <sub>1</sub>	C <sub>31</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	42.53	+H	451.357 0	-1.0	187.076 9	维生素
61	维生素 A	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O	31.24	+H	287.237 0	0	203.178 8, 159.118 1, 131.085 8, 91.055 7, 57.073 0	维生素
62	阿魏酸乙酯	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	22.31	+H	223.096 5	-0.2	207.032 1, 149.026 3, 121.029 5, 91.055 9, 77.038 7	苯丙素
63	补骨脂酚	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O	17.67	+H	257.190 0	-0.9	225.069 9, 128.063 3, 119.103 3, 115.063 7, 91.054 4	苯丙素

续表 1

编号	化合物	分子式	保留时间/min	加合模式	实测分子量	误差/ppm	碎片离子 $m/z$	化合物类型
64	肉桂酸	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	17.71	+H	149.059 7	0.4	93.034 0, 77.039 7, 51.029 7	苯丙素
65	丹参素	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	2.69	-H	197.045 5	4.8	135.046 7, 123.047 5, 78.963 0	苯丙素
66	对羟基苯乙酮	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	15.25	+H	137.059 7	0.6	91.055 3, 77.040 4, 65.041 8, 51.028 2	苯丙素
67	7-羟基香豆素 <sup>[20]</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	10.86	+H	163.039 0	0.2	145.058 7, 117.041 1	香豆素
68	8-羟基补骨脂素	C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	17.82	+H	203.033 9	-0.4	147.042 3, 131.048 6, 91.055 3, 77.039 9, 65.043 8	香豆素
69	补骨脂素	C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	14.11	+H	187.039 0	-0.8	131.048 7, 117.069 7, 77.041 8	香豆素
70	花椒毒素 <sup>[20]</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	12.38	+H	217.049 5	-1.0	202.025 2, 174.030 0, 146.034 3, 118.040 8, 89.042 7	香豆素
71	蛇床子素 <sup>[20]</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	17.29	+H	245.117 2	-0.9	189.054 7, 159.044 3, 131.049 8, 103.055 5, 77.040 9	香豆素
72	香豆素	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	1.53	+H	147.044 1	1.0	103.055 4, 91.056 0, 77.040 8, 65.041 9	香豆素
73	7-甲氧基香豆素	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	14.49	+H	177.054 6	-1.7	149.022 3, 121.028 3, 93.034 1, 65.041 6	香豆素
74	异欧前胡素	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	16.49	-H	269.081 9	1.8	254.056 6	木脂素
75	异补骨脂素	C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	14.11	+H	187.039 0	-0.8	131.048 7, 117.069 7, 103.056 0, 77.041 8	木脂素
76	缬氨酸	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	1.07	+H	118.086 3	2.8	59.077 0, 58.069 3	氨基酸
77	L-苯丙氨酸	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	2.75	+H	166.086 3	-0.6	120.081 3, 103.055 2, 91.055 5, 77.040 7	氨基酸
78	谷氨酸	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	1.81	+H	148.060 4	-0.4	84.047 6, 56.053 8	氨基酸
79	5-羟基色氨酸	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2.90	+H	221.092 0	-1.7	205.981 3, 158.060 2, 132.045 2, 130.064 8, 77.041 8	氨基酸
80	六氢吡啶羧酸	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	1.09	+H	130.086 3	0	84.044 7, 56.053 6, 55.058 2	氨基酸
81	左旋多巴	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	2.89	+H	198.076 1	-1.2	152.067 3, 135.042 5, 107.049 1, 93.033 0, 77.038 4, 65.039 6	氨基酸
82	异亮氨酸	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	1.91	+H	132.101 9	2.7	86.098 2, 72.938 9, 69.073 5, 55.059 4	氨基酸
83	亮氨酸	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	1.87	+H	132.101 9	2.1	86.097 2, 69.071 8, 55.057 4	氨基酸
84	亚油酸甲酯	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	33.99	+H	295.263 2	0.8	263.242 4, 161.130 1, 133.103 3, 109.101 5, 81.071 1, 55.060 1	脂肪酸
85	知母皂苷元	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>	39.92	+H	417.336 3	0.7	273.220 4, 161.135 2, 147.117 7	皂苷
86	白头翁皂苷 B <sub>1</sub>	C <sub>50</sub> H <sub>86</sub> O <sub>26</sub>	9.85	-H	1 219.611 7	-1.8	749.443 7, 469.150 9	皂苷
87	$\alpha$ -常春藤皂苷	C <sub>41</sub> H <sub>66</sub> O <sub>12</sub>	15.09	+HCOOH -H	795.453 6	-1.2	749.445 1, 471.349 0	皂苷
88	牛磺熊去氧胆酸	C <sub>26</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>6</sub> S	12.08	-H	498.289 4	-1.0	80.971 6	甾体
89	孕烯醇酮	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	27.98	+H	317.247 5	0	241.194 2, 197.132 4, 157.100 9, 145.101 6, 131.086 6, 105.071 1, 91.056 1, 67.058 5	甾体
90	酯蟾毒配基	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	41.05	+HCOOH +H	431.242 8	0.4	431.181 4	甾体
91	岩藻甾醇	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O	29.63	+H	413.377 7	0.3	271.241 9, 255.210 0, 231.370 1	甾体
92	菝葜内酯	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	9.00	+H	191.106 6	-1.0	173.088 2, 116.999 3, 79.056 6, 65.042 8	其他
93	麝香酮	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O	35.11	+H	239.236 9	-0.1	109.101 4, 95.086 4, 81.072 8, 67.057 5, 57.073 7, 55.059 4	其他
94	洋川芎内酯 A	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	11.81	+H	193.122 3	-0.7	147.138 8, 133.118 2, 93.070 4, 81.070 1	其他
95	芥酸酰胺	C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> NO	41.21	+H	338.341 7	1.1	116.108 9, 97.065 9, 69.073 0, 57.074 3	其他
96	油酸酰胺	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO	30.69	+H	282.279 1	0.8	111.081 4, 83.086 8, 69.072 8, 55.058 1	其他
97	(-)-伞形香青酰胺	C <sub>22</sub> H <sub>39</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	18.85	+H	507.228 3	1.0	252.102 1, 224.107 2, 105.032 4, 91.055 4, 77.040 6	其他
98	茴香醛	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	15.25	+H	137.059 7	0.6	77.404 0, 65.041 8, 51.028 2	其他
99	欧当归内酯 A	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	23.14	+H	381.206 0	-0.3	191.107 3, 173.096 0, 149.060 4, 135.044 8, 117.069 8, 91.056 0, 71.052 0	其他
100	鼠尾草苦内酯	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	13.71	+H	331.190 3	-1.2	238.159 3, 79.056 8	其他
101	呋喃二烯	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O	15.35	+H	217.158 6	-0.9	133.102 2, 119.085 2, 105.070 6, 91.057 2, 79.057 2	其他
102	羟苯乙酯	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	16.59	+H	167.070 2	-0.2	121.026 6, 95.049 7, 77.040 1, 65.043 1	其他
103	樟脑	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	9.87	+H	153.127 3	0.2	93.070 5, 91.056 2, 77.038 5, 67.057 0	其他

### 3.2 GC-MS检测结果

经GC-MS分析,初步鉴定出60种挥发性成分,包括烯类、烷类、酯类、酸类等,其中相对含量较高的有环十二烷、正十六烷、异植物醇、邻苯二甲酸二丁酯、棕榈酸、花生四烯酸、植物醇、植酮等。结果见图2、表2。

### 3.3 BV2细胞活性考察结果

与空白对照组比较,模型组细胞的存活率显著升高( $P<0.01$ ),提示脂多糖对BV2细胞有刺激活化的作用。与模型组比较,阳性药物组和羊栖菜提取物40、60、80、100  $\mu\text{g/mL}$ 组细胞的存活率均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),提示上述药物对脂多糖诱导的BV2细胞活化均有一定抑制作用。结果见表3。

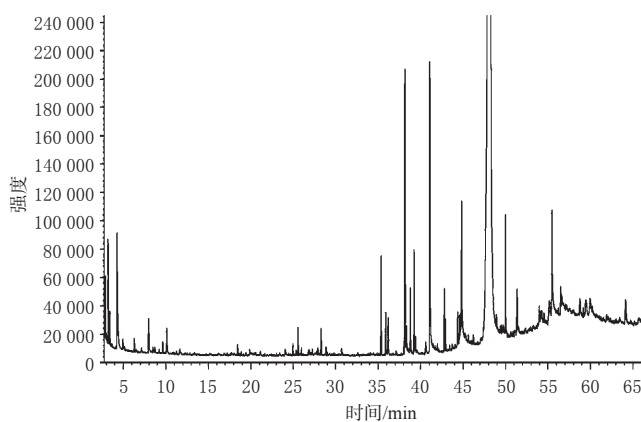


图2 羊栖菜GC-MS/MS分析的总离子流图

表2 羊栖菜中挥发性成分的GC-MS/MS分析鉴定结果

编号	化合物中文名(英文名)	分子式	分子量	保留时间/min	相似度/%	相对含量/%
1	正己酸乙酯(ethyl caproate)	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	144.21	9.555	98	0.07
2	六氢假紫罗酮(6,10-dimethylundecan-2-one)	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O	198.34	25.696	94	0.07
3	2,4-二叔丁基苯酚[2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol]	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	206.32	28.268	97	0.09
4	柏木脑(cedro)	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222.37	30.986	94	0.06
5	环十二烷(cyclododecane)	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub>	168.32	33.444	98	2.87
6	正十六烷(hexadecane)	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	226.44	34.171	98	1.73
7	肉豆蔻酸(tetradecanoic acid)	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	228.37	36.306	98	0.41
8	棕榈酸甲酯(hexadecanoic acid methyl ester)	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	270.45	40.313	98	0.30
9	异植物醇(isophytol)	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	296.53	40.946	96	3.78
10	邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate)	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	278.34	41.271	96	1.61
11	棕榈酸( <i>n</i> -hexadecanoic acid)	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256.42	41.921	98	3.48
12	花生四烯酸(arachidonic acid)	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	304.47	42.944	94	4.54
13	二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid)	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	302.45	43.068	94	2.56
14	植物醇(phytol)	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	296.53	44.573	99	6.64
15	( <i>Z,Z,Z</i> )-7,10,13-hexadecatrienal	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> O	234.38	46.244	91	0.14
16	( <i>Z,Z</i> )-亚油酸(9,12-octadecadienoic acid)	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280.45	47.638	93	0.30
17	甲基环己烷(cyclohexane methyl)	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub>	98.19	2.680	94	0.32
18	乙基环戊烷(cyclopentane ethyl)	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub>	98.19	2.776	96	0.01
19	己酸甲酯(hexanoic acid methyl ester)	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	130.18	6.590	90	0.01
20	2-正戊基呋喃(furan 2-pentyl)	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O	138.21	9.189	93	0.02
21	D-柠檬烯(D-limonene)	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.23	10.905	99	0.02
22	三正丁胺(tributylamine)	C <sub>12</sub> H <sub>27</sub> N	185.35	18.373	96	0.10
23	1,1,5-三甲基-1,2-二氢萘(1,1,5-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene)	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub>	172.27	24.083	96	0.04
24	1,2,3,4-四氢-1,1,6-三甲基萘(naphthalene 1,2,3,4-tetrahydro-1,1,6-trimethyl)	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub>	174.28	24.216	97	0.02
25	正癸酸( <i>n</i> -decanoic acid)	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	172.26	24.530	98	0.05
26	1-methyl-2-(1-methyl-2-propenyl)benzene	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub>	146.23	25.311	90	0.03
27	十四烷(tetradecane)	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	198.39	25.538	91	0.02
28	甲酸正癸酯(formic acid decyl ester)	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	186.29	25.819	94	0.02
29	1-辛烯-3-醇(1-octen-3-ol)	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	128.21	8.639	90	0.04
30	3,8-dimethyldecane	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	170.33	26.916	92	0.01
31	十一烷酸(undecanoic acid)	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	186.29	27.123	96	0.06
32	1-氯十二烷(1-chlorododecane)	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> Cl	204.78	27.244	98	0.04
33	$\alpha$ -姜黄烯( $\alpha$ -curcumene)	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	202.34	27.588	99	0.06
34	$\beta$ -紫罗兰酮(trans- $\beta$ -ionone)	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O	192.28	27.675	97	0.11
35	$\beta$ -蒎烯( $\beta$ -pinene)	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.23	10.905	99	0.02
36	月桂酸(dodecanoic acid)	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	200.32	29.626	96	0.25
37	2-十四烯(2-tetradecene)	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub>	196.37	29.905	97	0.05
38	十三酸(tridecanoic acid)	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	214.34	32.830	98	0.21
39	十二烷二酸(cyclotetradecane)	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub>	196.37	33.279	98	0.06
40	naphthalene,1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-cadalene	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub>	198.30	33.404	93	0.02
41	2-十五烷酮(2-pentadecanone)	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O	226.40	34.038	95	0.10
42	五甲基呋喃溴酯(methyl tetradecanoate)	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	242.40	34.861	98	0.08
43	2,1,3-benzoxadiazole-4,5-dione,6,7-dihydro-,4-hydrazone,5-oxime,1-oxide	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O	197.15	38.504	92	0.52
44	十五烷酸(pentadecanoic acid)	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	242.40	39.046	99	0.47
45	7,9-二叔丁基-1-氧杂螺[4.5]癸-6,9-二烯-2,8-二酮[7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione]	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	276.37	40.199	99	0.11
46	棕榈油酸(palmitoleic acid)	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	254.41	40.974	99	1.69
47	亚麻酸甲酯(methyl linolenate)	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	292.46	44.132	97	0.14
48	$\alpha$ -亚麻酸(linolenic acid)	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	278.43	45.197	99	4.12
49	6,9-pentadecadien-1-ol	C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> O	224.38	45.644	90	0.08
50	花生四烯酸甲酯[5,8,11,14-eicosatetraenoic acid,methyl ester,(all-Z)]	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	318.49	47.143	96	0.05
51	十四酸乙酯(tetradecanoic acid ethyl ester)	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256.42	36.909	95	0.15
52	( <i>Z</i> )-9-十六碳烯醛(cis-9-hexadecenal)	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O	238.41	36.957	94	0.08
53	植烷(hexadecane,2,6,10,14-tetramethyl)	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>	282.55	37.302	92	0.06
54	植酮(2-pentadecanone,6,10,14-trimethyl)	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	268.48	38.561	93	9.55
55	( <i>Z</i> )-6-pentadecen-1-ol	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O	226.40	38.769	98	0.55
56	9-tetradecen-1-ol	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O	212.37	38.823	98	1.16
57	油醇(9-octadecen-1-ol)	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	268.48	38.954	99	0.20
58	( <i>Z</i> )-9-十四碳烯-1-醇(cis-9-tetradecen-1-ol)	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O	212.37	39.029	90	4.09
59	1-十六烯(cetene)	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub>	224.43	39.358	98	1.65
60	3-methyl-2-(3,7,11-trimethyldodecyl) furan	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O	292.50	40.234	94	0.87

表3 羊栖菜提取物对脂多糖刺激下BV2细胞活性的影响结果( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

组别	细胞存活率	组别	细胞存活率
空白对照组	100 ± 0.09	羊栖菜提取物 40 μg/mL 组	98.85 ± 0.05 <sup>c</sup>
模型组	124.09 ± 0.01 <sup>a</sup>	羊栖菜提取物 60 μg/mL 组	97.63 ± 0.02 <sup>b</sup>
阳性药物组	91.05 ± 0.14 <sup>b</sup>	羊栖菜提取物 80 μg/mL 组	97.49 ± 0.05 <sup>b</sup>
羊栖菜提取物 20 μg/mL 组	120.87 ± 0.15	羊栖菜提取物 100 μg/mL 组	101.93 ± 0.05 <sup>b</sup>

a: 与空白对照组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.01$ ; c: 与模型组比较,  $P < 0.05$

### 3.4 细胞形态观察结果

空白对照组细胞大多较圆润,胞体直径较小,未见形态较长的细胞突触生长。模型组活化细胞的数量显著增加,且胞体变肥大,细胞突触变长。阳性药物组和不同质量浓度羊栖菜提取物组细胞的胞体大多较圆润,与模型组比较,各给药组细胞的突触增长情况得到缓和、活化细胞数量减少。结果见图3。

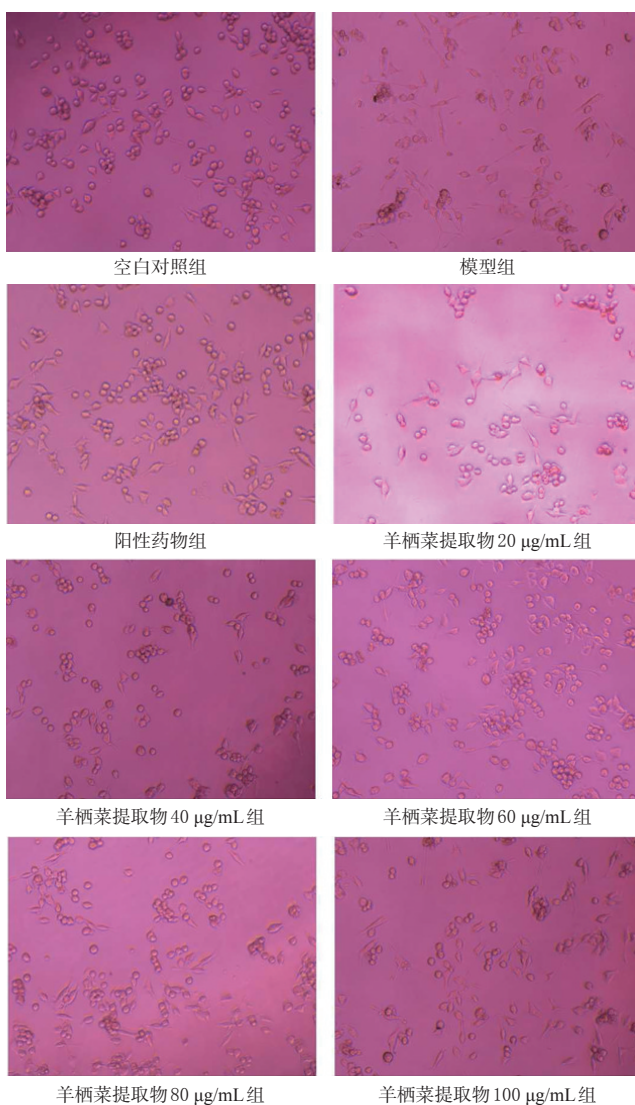


图3 细胞形态显微图( $\times 100$ )

### 3.5 细胞上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-6含量测定结果

与空白对照组比较,模型组细胞上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-6含量显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,阳性药物

组和不同质量浓度羊栖菜提取物组细胞上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-6含量均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结果见表4。

表4 各组细胞上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-6的含量测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3, \text{ng/mL}$ )

组别	TNF- $\alpha$	IL-6
空白对照组	957.56 ± 63.45	87.81 ± 0.36
模型组	1 248.67 ± 14.14 <sup>a</sup>	147.62 ± 3.02 <sup>a</sup>
阳性药物组	795.33 ± 54.02 <sup>b</sup>	83.92 ± 0.53 <sup>b</sup>
羊栖菜提取物 40 μg/mL 组	978.67 ± 56.67 <sup>b</sup>	84.92 ± 5.64 <sup>b</sup>
羊栖菜提取物 60 μg/mL 组	1 020.89 ± 22.19 <sup>c</sup>	96.36 ± 1.51 <sup>b</sup>
羊栖菜提取物 80 μg/mL 组	1 049.78 ± 40.57 <sup>c</sup>	91.71 ± 1.95 <sup>b</sup>

a: 与空白对照组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.01$ ; c: 与模型组比较,  $P < 0.05$

## 4 讨论

物质基础研究是药物开发和活性研究的关键环节。为了更加全面地提取、分析羊栖菜的化学成分,本课题组前期分别比较了不同极性溶剂(80%甲醇、乙酸乙酯、乙醇、水)、不同超声提取时间(10、30、60、90 min)对样品中非挥发性成分提取效果的影响。结果表明,当溶剂为80%甲醇、提取时间为60 min时,提取物中可以检测到的化合物数量最多、各成分的相对含量更高。为使实验操作简便、高效,本研究选择以80%甲醇为提取溶剂,采用超声提取60 min的方式制备UHPLC-QTOF-MS/MS分析的样品。此外,本课题组前期还比较了不同极性溶剂(三氯甲烷、丙酮、石油醚、乙酸乙酯、无水乙醇)、不同提取方式(索氏提取法、水蒸气蒸馏法)和不同提取时间(4、6、8 h)对样品中挥发性成分提取效果的影响。结果发现,当使用索氏提取法以石油醚为溶剂提取4 h时,能检测并鉴定出50种化合物;当使用水蒸气蒸馏法提取8 h时,能检测并鉴定出60种化合物。为了更加全面地分析羊栖菜成分,本研究选择了以水蒸气蒸馏法提取8 h的方式制备GC-MS/MS分析的样品。

本研究首次使用UHPLC-QTOF-MS/MS结合GC-MS/MS进行了羊栖菜的全成分分析。通过UHPLC-QTOF-MS/MS分析共鉴定出103种非挥发性成分,通过GC-MS/MS分析共鉴定出60种挥发性成分,完善了羊栖菜的全成分研究。有研究表明,7-羟基香豆素、补骨脂素、蛇床子素等香豆素类小分子化合物对于神经系统有保护作用<sup>[31-34]</sup>。尤其是蛇床子素,其对于阿尔茨海默病患者的神经损伤具有一定保护作用<sup>[35]</sup>。海藻羊栖菜所含成分中包含以上多种小分子香豆素类化合物,故本课题组推测,羊栖菜具有潜在的抗神经炎症作用。

IL-6可调节免疫应答和多种细胞的生长、分化,临床常通过监测IL-6含量来评估炎症反应的严重程度<sup>[36]</sup>。TNF- $\alpha$ 是一种重要的炎症因子,在细胞增殖、分化和凋亡中扮演重要角色<sup>[37]</sup>。本研究建立体外脂多糖诱导BV2细胞炎症模型,选取可调节经典炎症通路——丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,

MAPK)通路、抑制小胶质细胞激活的帕罗西汀作为阳性药物对照<sup>[38]</sup>,来探索羊栖菜的抗神经炎症活性。结果显示,脂多糖可激活BV2细胞,促进炎症因子IL-6、TNF- $\alpha$ 的产生;经羊栖菜提取物干预后,BV2细胞活性和细胞上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-6含量均显著降低,表明羊栖菜提取物具有一定的抗神经炎症活性。

综上所述,本研究建立的UHPLC-QTOF-MS/MS法与GC-MS/MS法可快速、有效地对羊栖菜中化学成分进行全谱分析,为海藻羊栖菜的物质基础研究和质量控制研究提供了理论依据;羊栖菜提取物对BV2细胞具有较好的体外抗神经炎症作用,但是具体的作用机制仍不明确。本课题组后期将继续开展羊栖菜抗神经炎症作用机制研究,期望在当前的物质基础研究结果上进一步探索其主要药效活性成分及作用机制。

### 参考文献

[1] 史永富.羊栖菜(*Sargassum fusiforme*(Harv.)Setchel)的研究现状及前景[J].现代渔业信息,2006,21(5):20-23.

[2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:308.

[3] 崔征,李玉山,肇文荣,等.中药海藻及数种同属植物的药理作用[J].中国海洋药物,1997,16(3):5-8.

[4] JIA R B, LI Z R, OU Z R, et al. Physicochemical characterization of *Hizikia fusiforme* polysaccharide and its hypoglycemic activity via mediating insulin-stimulated blood glucose utilization of skeletal muscle in type 2 diabetic rats[J]. Chem Biodivers, 2020, 17(10): e2000367.

[5] YAN Y, NIU Z M, WANG B Y, et al. Saringosterol from *Sargassum fusiforme* modulates cholesterol metabolism and alleviates atherosclerosis in ApoE-deficient mice[J]. Mar Drugs, 2021, 19(9): 485.

[6] 刘宸畅,徐雪莲,孙延龙,等.海洋小分子药物临床研究进展[J].中国海洋药物,2015,34(1):73-89.

[7] 王成,张国建,刘文典,等.海洋药物研究开发进展[J].中国海洋药物,2019,38(6):35-69.

[8] RUSSO P, KISIALIOU A, LAMONACA P, et al. New drugs from marine organisms in Alzheimer's disease[J]. Mar Drugs, 2015, 14(1): 5.

[9] WANG X Y, SUN G Q, FENG T, et al. Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression[J]. Cell Res, 2019, 29(10): 787-803.

[10] HU P, LI Z X, CHEN M C, et al. Structural elucidation and protective role of a polysaccharide from *Sargassum fusiforme* on ameliorating learning and memory deficiencies in mice[J]. Carbohydr Polym, 2016, 139: 150-158.

[11] ZHANG R, ZHANG X X, TANG Y X, et al. Composition, isolation, purification and biological activities of *Sargassum fusiforme* polysaccharides: a review[J]. Carbohydr

Polym, 2020, 228: 115381.

[12] CHEN X M, YU G Q, FAN S R, et al. *Sargassum fusiforme* polysaccharide activates nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B) and induces cytokine production via Toll-like receptors[J]. Carbohydr Polym, 2014, 105: 113-120.

[13] JIA R B, LI Z R, WU J, et al. Physicochemical properties of polysaccharide fractions from *Sargassum fusiforme* and their hypoglycemic and hypolipidemic activities in type 2 diabetic rats[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 147: 428-438.

[14] 李娟娟,马丽娜,杜瑞华,等.羊栖菜挥发性、半挥发性成分的提取及分析方法研究[J].广东化工,2016,43(16): 80-83.

[15] 史芳芳,周孟焦,梁晓峰,等.竹叶花椒叶挥发油提取及其化学成分的GC-MS分析[J].中药材,2020,43(5): 1191-1195.

[16] WOOD K V, BONHAM C C, MILES D, et al. Characterization of betaines using electrospray MS/MS[J]. Phytochemistry, 2002, 59(7): 759-765.

[17] LIAO C R, CHANG S, YIN S L, et al. A HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantitation of six alkaloids of *Rhizoma Corydalis Decumbentis* in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014, 944: 101-106.

[18] 赵利娟,高文雅,顾欣如,等.蒲地蓝消炎口服液化学成分鉴定及归属研究[J].中国中药杂志,2019,44(8): 1573-1587.

[19] NIE L J, LIANG J, SHAN F, et al. A UPLC-MS/MS method for determination of endogenous L-carnitine and acetyl-L-carnitine in serum of patients with depression[J]. Biomed Chromatogr, 2021, 35(3): e4991.

[20] 芦丽,宫旭,冯有龙. UPLC-IT/TOF MS快速筛查确证保健食品中36种非法添加的减肥、降血脂、通便类药物[J]. 中南药学,2019,17(10): 1667-1676.

[21] LEE M Y, MOON B C, KWON Y K, et al. Discrimination of *Polygonatum species* and identification of novel markers using <sup>1</sup>H-NMR-and UPLC/Q-TOF MS-based metabolite profiling[J]. J Sci Food Agric, 2016, 96(11): 3846-3852.

[22] LIANG X, LIU C S, XIA T, et al. Identification of active compounds of Mahuang Fuzi Xixin Decoction and their mechanisms of action by LC-MS/MS and network pharmacology[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 3812180.

[23] ZHAO A Q, ZHAO J H, ZHANG S Q, et al. Determination of parthenolide in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study[J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 119: 99-103.

[24] 柴冲冲,曹妍,毛民,等.基于HPLC特征图谱、UPLC-Q-TOF/MS定性及多成分定量的黄芩酒炙前后化学成分变化研究[J].中草药,2020,51(9): 2436-2447.

(下转第812页)