

油菜蜂花粉抗炎成分的 GC-MS 初步分析*

孙丽萍¹, 徐响¹, 廖磊², 刘魁英², 彭文君¹

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093; 2. 北京市卫生局临床药学研究所, 北京 100035)

摘要: 研究油菜蜂花粉及其不同溶媒萃取物对小鼠抗炎作用的影响。采用二甲苯致小鼠耳肿胀法评价抗炎药效作用, 然后用 GC-MS 分析主要抗炎组分中的化学成分。结果显示油菜蜂花粉不具有抗炎活性, 但其氯仿萃取组分与水萃取组分对二甲苯所致耳肿胀有显著的抑制作用 ($P < 0.01$)。GC-MS 分析表明, 油菜蜂花粉氯仿组分中邻苯二甲酸二丁酯含量为 17.454%。油菜蜂花粉系统萃取物中氯仿萃取组分和水萃取组分具有抗炎活性, 氯仿组分中的邻苯二甲酸酯可能是花粉氯仿萃取物抗炎作用的物质基础。研究为从油菜蜂花粉中开发抗炎药物提供理论依据。

关键词: 油菜蜂花粉; 花粉萃取物; 抗炎

中图分类号: S 896.4 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X (2010) 02-0246-04

GC-MS Analysis of Different Anti-inflammatory Extracts from Bee Collected Rape Pollen

SUN Li-ping¹, XU Xiang¹, LIAO Lei², LIU Kue-ying², PENG Wen-jun¹

(1. Bee Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China;

2. Institute of Beijing Health Administration Clinical Pharmacy, Beijing 100035, China)

Abstract: The purpose of this paper was to investigate the anti-inflammatory effects (in vivo) of different extracts from bee collected rape pollen (BCRP). The method of xylene-induced ear swelling in mice was used to determine the anti-inflammatory effects of different extracts of BCRP. The chemical components of low-polar fractions in effective extract were analyzed with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Compared with the positive control, the chloroform extract and water extract showed significant ($P < 0.01$) anti-inflammatory effect, but the BCRP showed negative effect. GC-MS analysis demonstrated that the content of dibutyl phthalate in the chloroform extract was 17.454%. The chloroform and water extracts from BCRP had strong anti-inflammatory effect. Acyl phthalate derivatives in the chloroform extract were the active components for its anti-inflammatory activity. This study provided useful theoretical evidence for developing anti-inflammatory drug from bee collected bee pollen.

Key words: bee collected rape pollen, extracts of BCRP, anti-inflammatory activity

花粉是高等植物的雄性生殖器官, 不仅含有大量的营养成分, 而且还含有许多与生命科学有关的信息物质。花粉的营养成分主要包括蛋白质,

氨基酸, 磷脂, 维生素, 酚类, 酶, 微量元素等^[1], 花粉因其含有的营养物质全面而均衡, 被人们用日常生活保健中。在以往的研究中证明,

收稿日期: 2009-06-23 修回日期: 2009-06-22

* 基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项经费 (nyhyzx07-041)。

作者简介: 孙丽萍 (1963-), 女, 副研究员, 主要从事蜂产品功能因子的分离纯化研究。

E-mail: caasun@126.com

花粉具有抗疲劳、抗衰老、保护心脑血管、控制体重等作用^[2-5]。笔者在前期的研究中利用不同极性溶剂依次对油菜蜂花粉进行了萃取,得到A, B, C, D, E五个萃取部位,考证了油菜蜂花粉及其不同溶剂萃取物对酒精性肝损伤的保护作用^[6,7]以及对小鼠免疫功能的影响^[8]。笔者在前期小鼠免疫实验中发现油菜花粉分级萃取的某些组分表现出免疫抑制效果^[8],关于花粉是否具有抗炎免疫的功能未见报道。笔者通过小鼠抗炎试验对油菜蜂花粉及其不同溶剂萃取物的抗炎作用进行研究,并采用GC-MS技术对其中一个抗炎组分进行研究,以期筛选出油菜蜂花粉中的主要抗炎组分及其中的抗炎成分。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

油菜蜂花粉(由北京中蜜科技发展有限公司生产,为新鲜市售的蜂花粉, -20℃保存备用),二甲苯(分析纯,北京化学试剂公司生产),醋酸地塞米松(天津力生制药股份有限公司生产)。

1.2 实验动物

清洁级ICR小鼠,雄性,体重20~22 ng/g(北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号:SCXK京2002-0003)。SPF级清洁级实验动物中心群笼饲养,每笼10只,自由饮水、进食,温度22~26℃,湿度为40%~60%。

1.3 油菜蜂花粉各萃取组分的制备

首先用超临界CO₂对油菜蜂花粉进行破壁^[9],然后采用溶剂分级萃取,利用极性由小到大的各种溶剂(石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、水)连续萃取,获取不同溶剂萃取的有效成分,得到5个油菜蜂花粉萃取组分:A, B, C, D, E组分^[6,7]。

1.4 抗炎试验方法

将90只体重在20~22 g体重的ICR小鼠按体重随机分为空白对照组、模型对照组、阳性药醋酸地塞米松(0.75 mg/kg)组、花粉原粉(10 g/kg)组、花粉萃取物A(10 g原粉/kg)组、花粉萃取物B(10 g原粉/kg)组、花粉萃取物C(10 g原粉/kg)组、花粉萃取物D(10 g原粉/kg)组、花粉萃取物E(10 g原粉/kg)组,每组10只,连续口服给药8 d,空白对照组、模型对

照组给予等体积无菌饮用水。末次给药1 h后,于每只小鼠右耳两面涂抹二甲苯0.05 mL, 15 min后用颈椎脱臼法处死小鼠,用直径6 mm的打孔器在小鼠左右耳相同位置打下耳片,立即称重,按以下公式计算肿胀率^[10]。

计算公式:

$$\text{肿胀率}(\%) = \frac{\text{右耳重量}(\text{mg}) - \text{左耳重量}(\text{mg})}{\text{左耳重量}(\text{mg})} \times 100$$

1.5 统计学方法

试验数据用平均值±标准差($\bar{X} \pm SD$)表示,采用SPSS统计软件包进行分析,经t检验比较组间差异。

1.6 GC-MS分析

样品溶于氯仿中过0.45 μm滤膜后进行GC-MS分析,GC条件为:DB-5MS(30 m×0.32 mm ID×0.25 μm)色谱柱;载气:氦气,1 mL/min;进样口温度260℃;分流进样量:1 μL;分流比:1:20;柱温升温程序:初始80℃,保持1 min,以7.5℃/min速度升温至140℃,保持1 min;以5℃/min速度升温至310℃,保持10 min。MS条件为:电离方式EI;离子源温度230℃;四极杆温度150℃;接口温度280℃;电子能量70 eV;质量扫描范围为50~550 amu。

2 结果与分析

2.1 油菜蜂花粉及其萃取物对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀率的影响

试验数据表明,花粉萃取物B, E组与模型组比较肿胀率明显降低($P < 0.01$),表现出明显的抗炎作用,说明通过分离萃取可以得到抗炎组分充分发挥油菜蜂花粉的抗炎作用(表1)。

在前期小鼠DTH超敏试验中^[7],花粉与萃取物A, B, C, D, E组动物耳肿胀度与模型组比较有抑制作用,统计学差异显著($P < 0.05$),其中花粉萃取物B, E组与模型组比较有明显抑制作用,统计学差异极显著($P < 0.01$)。花粉与萃取物A, B, C, E组动物耳肿胀率与模型组比较有抑制作用,统计学差异显著($P < 0.05$),其中花粉萃取物A, B, E组与模型组比较有明显抑制作用,统计学差异极显著($P < 0.01$)。说明油菜蜂花粉中存在不同极性的免疫抑制物质,具有免疫调节作用。

表 1 油菜蜂花粉及其萃取物对小鼠二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

Tab. 1 Effect of bee collected rape pollen (BCRP) and its extracts on mice swelling induced by Xylene ($\bar{X} \pm SD$)

组别 group	剂量 dose	肿胀率/% ear swelling rate
空白对照 blank control	-	10.16 ± 5.73
模型对照 model control	-	78.41 ± 26.21 ^{▲▲}
地塞米松 dexamethasone	0.75 mg/kg	26.78 ± 18.59 ^{**}
花粉 bee pollen	10 g/kg	119.60 ± 40.78 [*]
萃取物 A extract A	10 g/kg	91.39 ± 21.50
萃取物 B extract B	10 g/kg	43.26 ± 11.65 ^{**}
萃取物 C extract C	10 g/kg	73.77 ± 48.89
萃取物 D extract D	10 g/kg	80.64 ± 44.32
萃取物 E extract E	10 g/kg	33.46 ± 21.12 ^{**}

注: ▲▲与空白对照组比较 $P < 0.01$; ▲与空白对照组比较 $P < 0.05$; **与模型对照组比较 $P < 0.01$; *与模型对照组比较 $P < 0.05$ 。

Note: ▲▲ compared with blank control ($P < 0.01$); ▲ compared with blank control ($P < 0.05$); ** compared with model control ($P < 0.01$); * compared with model control ($P < 0.05$)

2.2 有效组分 GC-MS 分析

因为萃取物 A, C, D 组分与模型对照组无显著差异, 抗炎效果不明显, 表明抗炎物质不存在

或含量很低, 不对其组分进行分析。由于萃取物 E 为水萃取物, 无法直接进行 GC-MS 分析, 试验仅对油菜蜂花粉氯仿组分 (萃取物 B) 进行 GC-MS 分析, 得到总离子流色谱图 (图 1)。对谱图进行解析, 检测出 16 种化合物, 用面积归一法测得各组分相对含量, 结果见表 2; 其中脂肪酸酯及脂肪酸 5 种, 共占 36.43%, 芳香族化合物主要是邻苯二甲酸二丁酯, 含量为 17.454%。甾体类抗炎药水杨酸衍生物的结构与邻苯二甲酸酯相似, 这类化合物可能是花粉氯仿萃取物抗炎作用的物质基础^[11]。

从抗炎试验中看到油菜蜂花粉氯仿萃取组分和水萃取组分与模型对照组比较有明显的抑制作用; 前期小鼠 DTH 超敏试验结果显示油菜蜂花粉氯仿萃取物和水萃取物有明显的免疫抑制作用 ($P < 0.01$)^[8]。抗炎试验与小鼠 DTH 超敏试验结果吻合, 说明油菜蜂花粉的氯仿萃取组分和水萃取组分具有抗炎免疫作用。炎症和免疫在组织、细胞、分子水平上是紧密联系不可分割的过程, 单独应用抗炎药或免疫抑制药或免疫增强药治疗慢性炎症性疾病疗效均不理想, 长期应用还可能加重病理过程。研究开发应用既有抗炎活性又有免疫调节活性的药物即抗炎免疫调节药将是抗炎免疫药理发展的主要方向之一^[12]。本试验为今后进行花粉抗炎免疫的进一步研究提供了指导方向。

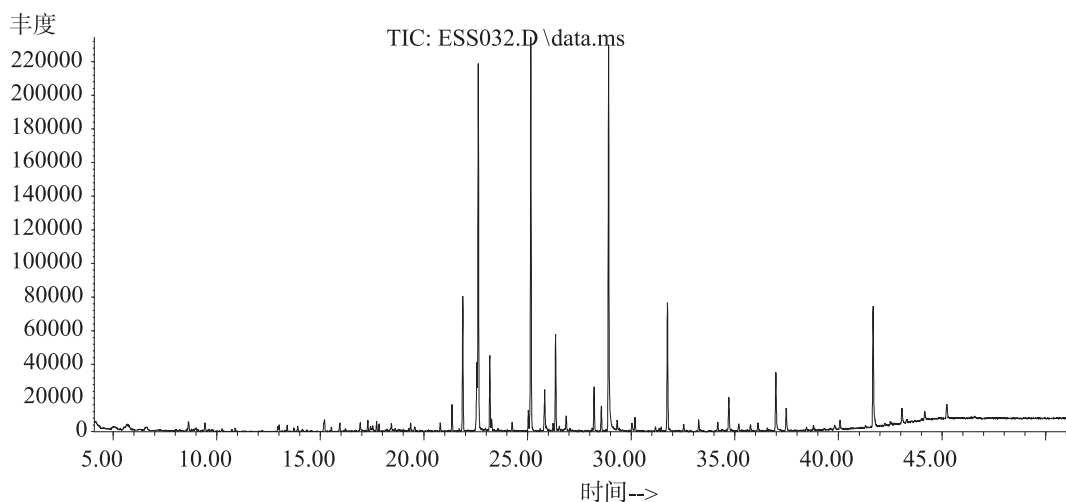


图 1 油菜蜂花粉氯仿组分 GC-MS 总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of the chloroform extract from BCRP

表2 油菜蜂花粉氯仿组分的定性和定量分析结果

Tab. 2 Qualitative and quantitative results of the chloroform extract from BCRP

编号 No.	保留时间/min retention time	化合物 compounds	相对百分含量/% relative percentage
1	21.355	7, 10, 13 - 十六碳三烯醛 cis, cis, cis - 7, 10, 13 - Hexadecatrienal	1.102
2	21.863	十六酸甲酯 Hexadecanoic acid, methyl ester	5.991
3	22.551	十六酸 Hexadecanoic acid	3.382
4	22.626	邻苯二甲酸二丁酯 Dibutyl phthalate	17.454
5	23.180	十六酸乙酯 Hexadecanoic acid, ethyl ester	3.375
6	25.155	(Z, Z, Z) - 9, 12, 15 - 十八烷三烯酸甲酯 (Z, Z, Z) - 9, 12, 15 - Octadecatrienoic acid, methyl ester,	19.128
7	25.819	7, 10, 13 - 十六碳三烯醛 7, 10, 13 - Hexadecatrienal	2.407
8	26.399	11, 14, 17 - 二十碳三烯酸甲酯 11, 14, 17 - Eicosatrienoic acid, methyl ester	4.553
9	28.205	9, 12, 15 - 十八碳三烯醛 9, 12, 15 - Octadecatrienal	1.980
10	28.557	亚硫酸酯 Sulfurous acid, 2 - ethylhexyl isohexyl ester	1.188
11	28.927	N - 2 - 羟乙基癸酰胺 Decanamide, N - (2 - hydroxyethyl) -	19.845
12	31.751	十九烷 Nonadecane	6.567
13	34.708	二十烷 Eicosane	1.702
14	36.977	亚硫酸酯 Sulfurous acid, hexyl pentadecyl ester	3.257
15	37.480	亚硫酸酯 Sulfurous acid, 2 - ethylhexyl nonyl ester	1.275
16	41.696	岩皂甾醇 Fucosterol	6.794

3 结论

抗炎免疫的初步试验结果表明, 油菜蜂花粉的氯仿萃取组分与水萃取组分既对小鼠二甲苯引起的炎症有抗炎作用, 又对 DTH 超敏模型动物有抑制作用, 说明这两个组分具有抗炎免疫作用; 采用 GC-MS 检测具有抗炎作用的氯仿组分, 该组分中含 17.454% 的邻苯二甲酸二丁酯, 其可能是花粉氯仿萃取物抗炎作用的物质基础。

[参考文献]

- [1] 毛礼米, 王开发. 我国花粉资源应用及其研究进展 [J]. 自然杂志, 1998, 25 (5): 271 - 275.
- [2] 李雅晶, 胡福良, 冯磊. 蜂花粉抗氧化的机理与应用 [J]. 蜜蜂杂志, 2005, (3): 9 - 11.
- [3] 王萍, 张蓓, 秦桂芳. 蜂花粉抗衰老的作用机理与应用 [J]. 中国老年保健医学, 2008, 6 (3): 31.
- [4] 瞿凤国, 周福波, 付惠. 蜂花粉抗疲劳作用的实验研究 [J]. 牡丹江医学院学报, 2004, 25 (5): 8 - 10.
- [5] 苏松坤, 陈盛禄, 林雪珍. 蜂花粉中延衰因子 SOD 的研究 [J]. 中国养蜂, 1999, 50 (1): 7 - 9.
- [6] 孙丽萍, 王大仟, 廖磊. 油菜蜂花粉对大鼠酒精性肝损伤防治的研究 [J]. 食品科学, 2008, 29 (10): 543 - 545.
- [7] 孙丽萍, 王大仟, 廖磊. 油菜蜂花粉及其提取物对大鼠酒精性肝损伤组织学影响 [J]. 食品科学, 2008, 29 (7): 442 - 444.
- [8] 孙丽萍, 廖磊, 王大仟. 油菜蜂花粉及其提取物对小鼠免疫功能的影响 [J]. 食品科学, 2008, 29 (9): 547 - 549.
- [9] 孙丽萍, 徐响. 超临界二氧化碳处理对油菜蜂花粉破壁的影响 [J]. 食品科学, 2008, 29 (6): 56 - 58.
- [10] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理试验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [11] 石枫, 郑维发. 芫花根分级提取物的化学成分及抗炎活性研究 [J]. 药物生物技术, 2005, 12 (1): 46 - 51.
- [12] 徐叔云. 抗炎免疫药理学研究十年进展 [J]. 中国药理学通报, 1996, 12 (1): 1 - 6.