

# 马齿苋中抗炎活性物质的提取、分离及结构鉴定

张会敏<sup>1</sup>, 邢岩<sup>2</sup>, 仇润慷<sup>1</sup>, 张丽梅<sup>2</sup>, 倪贺<sup>3</sup>, 赵雷<sup>1\*</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 国珍健康科技(北京)有限公司, 北京 100000)

(3. 华南师范大学生命科学学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 以活性物质示踪为导向, 建立脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型对马齿苋中的抗炎物质进行跟踪, 采用柱层析提取法、硅胶柱色谱分离法、制备液相色谱法及气相色谱-质谱联用技术对抗炎物质进行提取分离和结构鉴定。结果表明, 石油醚-乙醇、无水乙醇和纯水溶剂依次对马齿苋样品进行提取, 三种粗提物将细胞中一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 的分泌量分别减少至 33.13、25.83 和 20.53  $\mu\text{mol/L}$ , 其中石油醚相粗提物的抑制效果最强 ( $P < 0.05$ )。对石油醚相进一步分离得到四个组分, Fr.1、Fr.2 和 Fr.3 组分具有较强的抗炎效果, 但 Fr.1 和 Fr.2 组分含有潜在的毒性成分, 选择 Fr.3 组分继续分离。Fr.3 组分经硅胶柱分离得到三个组分, Fr.3.1 组分表现出最强的抑制 NO 的分泌量效果 (11.80  $\mu\text{mol/L}$ )。经制备液相色谱进一步纯化及气质分析, 确定 Fr.3.1 组分的主要成分为硬脂酸 (47.09%)、邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯 (13.21%) 和其他成分。该研究建立了一种从马齿苋中分离纯化出抗炎物质方法, 为马齿苋的开发利用提供理论参考。

**关键词:** 马齿苋; 抗炎活性; 提取分离; 鉴定

文章编号: 1673-9078(2024)03-191-199

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.3.0324

## Extraction, Separation and Structural Identification of Anti-inflammatory Active Substances from Purslane (*Portulaca oleracea* L.)

ZHANG Huimin<sup>1</sup>, XING Yan<sup>2</sup>, QIU Runkang<sup>1</sup>, ZHANG Limei<sup>2</sup>, NI He<sup>3</sup>, ZHAO Lei<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Guozhen Health Technology (Beijing) Co. Ltd., Beijing 100000, China)

(3. College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** To track the anti-inflammatory substances in purslane, the lipopolysaccharide-induced RAW264.7 macrophage inflammation model was established, which was guided by the tracer of active substances. The extraction, separation and structural identification of anti-inflammatory substances in purslane were performed by column chromatography (for extraction), silica gel column chromatography (for separation), and preparative high performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry (for analyses). The results showed that the three crude extracts obtained from purslane through sequential extractions with petroleum ether-ethanol, anhydrous ethanol and pure

引文格式:

张会敏, 邢岩, 仇润慷, 等. 马齿苋中抗炎活性物质的提取、分离及结构鉴定[J]. 现代食品科技, 2024, 40(3): 191-199.

ZHANG Huimin, XING Yan, QIU Runkang, et al. Extraction, separation and structural identification of anti-inflammatory active substances from purslane (*Portulaca oleracea* L.) [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(3): 191-199.

收稿日期: 2023-03-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31771980); 广东省自然科学基金 (2023A1515012599)

作者简介: 张会敏 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 活性物质分离提取, E-mail: zhanghuimin21@163.com; 共同第一作者: 邢岩 (1981-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 抗氧化与抗衰老, E-mail: xingyan135@163.com

通讯作者: 赵雷 (1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物绿色修饰及热带水果加工, E-mail: scauzl@scau.edu.cn

water solvents reduced the secretion of nitric oxide (NO) in the cells to 33.13, 25.83 and 20.53  $\mu\text{mol/L}$ , respectively, with the crude petroleum ether extract exhibiting the strongest inhibitory effect ( $P<0.05$ ). The petroleum ether phase was further separated into four fractions, with the Fr.1, Fr.2 and Fr.3 fractions had stronger anti-inflammatory effects, though the Fr.1 and Fr.2 fractions contained potential toxic components. Therefore, the Fr.3 fraction was selected for further separation. The Fr.3 fraction was separated through a silica gel column to obtain three fractions. The Fr.3.1 subfraction exhibited the strongest inhibitory effect against the NO secretion (11.80  $\mu\text{mol/L}$ ). The Fr.3.1 subfraction was further purified by the preparative liquid chromatography and GC-MS analysis, and the main components of the Fr.3.1 subfraction were identified as stearic acid (47.09%), di(2-ethylhexyl)phthalate (13.21%) and other components. This study established a method for separating and purifying anti-inflammatory substances from purslane, and provides a theoretical reference for the development and utilization of purslane.

**Key words:** *Portulaca oleracea* L.; anti-inflammatory activity; extraction and isolation; identification

炎症是机体受到外部刺激时做出的一种保护性生理反应,能够及时清除体内受损或死亡的细胞,帮助机体恢复内部平衡<sup>[1]</sup>。然而,持续的炎症反应会导致急性炎症性疾病的产生。非甾体抗炎药和甾体抗炎药是治疗炎症最常见的药物,但这类药物在使用过程中会产生明显的副作用<sup>[2]</sup>。近年来,中草药中的天然成分,尤其是药食同源植物中的活性成分,已被成功应用于人类疾病的预防和治疗<sup>[3]</sup>。相比于抗炎药物,中草药成分来源天然、安全且无副作用,因此,从天然植物中提取抗炎活性物质进行抗炎药物的研究具有重要意义。

马齿苋 (*Portulaca oleracea* L.) 是一种药食同源植物,主要分布在热带和亚热带地区。马齿苋全草富含多种活性化合物,如多糖、生物碱、黄酮类和脂肪酸<sup>[4,5]</sup>。因其具有消炎镇痛、清热解暑等传统药用功效,也被称为天然抗生素<sup>[6]</sup>。研究表明,马齿苋的水提物具有抗炎镇痛作用,可显著减轻小鼠的耳廓肿胀度<sup>[7]</sup>。Miao 等<sup>[8]</sup>发现其甲醇提取物通过显著抑制 RAW264.7 细胞中炎症介质 NO 的分泌及环氧合酶-2 的表达发挥抗炎作用。此外, Kim 等<sup>[9]</sup>报道了马齿苋的乙酸乙酯提取物通过抑制肿瘤坏死因子- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), 白介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 和白介素-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 等炎症细胞因子的分泌水平,而对炎症性肠病小鼠产生治疗作用。以上研究表明马齿苋及其提取物具有显著的抗炎活性,目前对马齿苋抗炎作用的研究主要集中在不同的提取物及植物本身,而对于其发挥抗炎活性功效成分仍不清楚,有待进一步研究。

因此,本研究以抗炎活性为导向,对马齿苋中的抗炎活性物质进行提取分离及结构鉴定。通过测定细胞 NO 的分泌量监测每个组分的抗炎活性,筛

选最有效的活性组分,从而鉴定马齿苋中的抗炎活性成分,以期为进一步充分利用马齿苋的抗炎活性提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞,中国科学院细胞库;胎牛血清, Gibco 公司;青霉素,硫酸链霉素, DMEM 培养基,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 和硬脂酸,美国 Sigma 公司;硅胶 200 目,青岛海洋化工有限公司;细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 和 Griess 检测试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.2 仪器与设备

玻璃层析柱 (直径 2 cm $\times$  长度 60 cm), 广州市芊荃化玻仪器有限公司; DHG-9425A 电热恒温鼓风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司; BJ-150 多功能粉碎机, 德清拜杰电器有限公司; SW-CJ-1D 无菌操作台, 苏州净化设备有限公司; BPN-150CW 细胞培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; QP2010 气相色谱与质谱联用仪, 日本岛津公司; 1625812W 复合型恒温器, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; SpectraMax i3x 多功能酶标仪, 美谷分子仪器有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 马齿苋不同粗提物的提取

马齿苋样品清洗后于 60  $^{\circ}\text{C}$  烘箱中干燥, 粉碎后过 40 目筛, 于干燥器中密封保存。采用实验室先前建立的柱层析提取法 (Column Chromatographic

Extraction, CCE)<sup>[10]</sup>制备马齿苋粗提物,即准确称取 50 g 马齿苋样品,将样品在室温下以 1:3.5 (*m/V*) 的比例在石油醚-乙醇 (8:2, *V/V*) 溶液中浸泡 2 h, 搅拌混匀后,按照柱层析湿法装柱的方法,将马齿苋混合液装入玻璃层析柱中,装柱径高比为 1:10, 依次使用石油醚-乙醇 (8:2, *V/V*) 溶液、无水乙醇溶液和纯水进行洗脱,洗脱体积均为 175 mL,即提取溶剂用量的最小体积 (Minimum Volume, MV) 单位,以 1 MV/h 的流速进行洗脱,按 1 MV 的体积收集得到石油醚相、乙醇相和水相提取液。石油醚相和乙醇相提取液使用旋转蒸发仪在 40 °C 下旋蒸,并于 60 °C 真空干燥后得到石油醚相粗提物和乙醇相粗提物,水相提取液进行冷冻干燥得到水相粗提物。

### 1.3.2 石油醚相粗提物的分离纯化

#### 1.3.2.1 薄层色谱分离

采用薄层色谱法 (Thin Layer Chromatography, TLC) 对石油醚相粗提物进行初步检测,以确定最佳洗脱溶剂。将硅胶薄层板切割成 10 cm×5 cm 的薄板,并在距离两端各 1 cm 处用铅笔轻轻画出两条平行直线,以标起始线和终止线。取少量样品溶于石油醚中,使用毛细吸管吸取 5 μL 溶液在起始线上点样,将薄板放入层析缸中展开,展开溶剂为不同比例的石油醚-乙酸乙酯体系。

#### 1.3.2.2 硅胶柱色谱分离

将石油醚相粗提物复溶在石油醚中,使用滴管将其缓慢加入到硅胶柱中,采用石油醚-乙酸乙酯体系为硅胶柱色谱分离的洗脱剂,依次使用石油醚-乙酸乙酯 (18:3、9:3, *V/V*) 和无水乙醇溶液进行洗脱,流量控制在 5 mL/min,每 10 mL 收集一次洗脱液,通过 TLC 跟踪并合并相同的组分,浓缩干燥后得到四个组分,依次命名为 Fr.1、Fr.2、Fr.3 和 Fr.4,并采用生物活性测定跟踪其活性强度。组分经活性筛选后,采用 TLC 确定 Fr.3 组分以二氯甲烷-甲醇体系作为展开剂,使用二氯甲烷-甲醇 (100:1, *V/V*) 进行等度洗脱硅胶柱,收集并合并相同组分,干燥后得到三个亚组分,依次命名为 Fr.3.1、Fr.3.2 和 Fr.3.3。经活性筛选后,对 Fr.3.1 组分进行全波长扫描,使用制备液相色谱对其进行纯化,收集保留时间在 17.5~19 min 的组分,干燥后得到纯化的脂溶性化合物,对该化合物进行高效液相分析及结构鉴定。

#### 1.3.2.3 全波长扫描分析

将 Fr.3.1 组分溶解于乙酸乙酯溶液中,以乙酸

乙酯溶液作为空白对照,在 190~700 nm 波长范围内进行全波长扫描。

#### 1.3.2.4 制备型高效液相色谱分析

将样品充分溶解后使用安捷伦高效液相色谱仪 (VWD 紫外检测器) 进行纯化;色谱柱为 Agilent Pursuit Xrs C18 柱;流动相为 95% 甲醇和 5% 水 (*V/V*) 溶液,进行等度洗脱;流速为 25 mL/min;进样量为 0.5 mL;柱温为 30 °C;检测波长为 410 nm。

### 1.3.3 GC-MS分析

色谱条件:色谱柱 DB-Wax 柱 (30 m×0.25 mm ×0.25 μm);升温程序:从 40 °C 开始,保持 2 min,以 6 °C/min 升温至 240 °C,保持 10 min,总运行 45 min;载气:高纯度 He (99.99%),流速:1.0 mL/min,进样口温度:240 °C;进样 1 μL,采用不分流模式。

质谱条件:EI 源,离子源温度 230 °C,电离电压 70 eV;四极杆温度 150 °C;全扫描模式,质量范围为 30.0~500.0 *m/z*。采用峰面积归一法计算各组分的相对含量。

### 1.3.4 抗炎活性评价

#### 1.3.4.1 细胞培养与模型建立

将 RAW264.7 细胞置于含有 10% (*V/V*) 胎牛血清、1% (*V/V*) 双抗、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 硫酸链霉素的 DMEM 培养基中,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行培养,每 3 d 传代一次。实验分为以下几组,即空白对照组 (Con):即不加样品也不加 LPS 处理;模型组 (LPS):加入质量浓度为 1 μg/mL 的 LPS 处理;样品组:同时加入不同质量浓度的马齿苋样品及 LPS 处理。

#### 1.3.4.2 细胞活力的测定

参照 Xie 等<sup>[11]</sup>的方法进行细胞实验。取对数生长期的 RAW264.7 巨噬细胞以每孔 5×10<sup>5</sup> 个细胞的密度接种于 96 孔细胞培养板中,分别用 1 μg/mL 的 LPS 和不同质量浓度的马齿苋样品培养 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,继续培养 1 h 后,在酶标仪 450 nm 下测定吸光度。

#### 1.3.4.3 NO分泌量的测定

参照 Xie 等<sup>[11]</sup>的方法进行细胞实验。取对数生长期的 RAW264.7 巨噬细胞以每孔 5×10<sup>5</sup> 个细胞的密度接种于 96 孔细胞培养板中,分别用 1 μg/mL 的 LPS 和不同质量浓度的马齿苋样品处理细胞培养 24 h 后,采用 Griess 检测试剂盒说明,在酶标仪 540 nm 下测定吸光值,根据 NO 标准曲线计算细胞上清液中 NO 的分泌量。

## 1.4 数据分析

数据使用 SPSS 26 进行统计学分析, 实验数据以平均值  $\pm$  标准差表示。采用单因素方差分析进行组间比较,  $P < 0.05$  认为有显著性差异。使用 Origin 2018 对所得数据进行画图分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 马齿苋不同粗提物的提取及其抗炎活性筛选

本研究采用 CCE 法从马齿苋样品中提取活性物质, 与传统的有机溶剂提取方法不同, CCE 法是一种简单高效的从天然植物中提取活性物质的方法<sup>[12]</sup>。利用石油醚、乙醇和水溶剂依次对马齿苋样品进行洗脱, 并将提取溶液分离成石油醚相、乙醇和水相, 经减压浓缩干燥后得到三种粗提物。石油醚相、乙醇和水相三种粗提物的提取得率分别为 15.35、140.00 和 12.98 mg/g, 三种粗提物的提取得率存在较大差异, 这可能是由于各粗提物所含物质不同, 以及在不同极性的提取溶剂中的溶解度不同<sup>[13,14]</sup>。

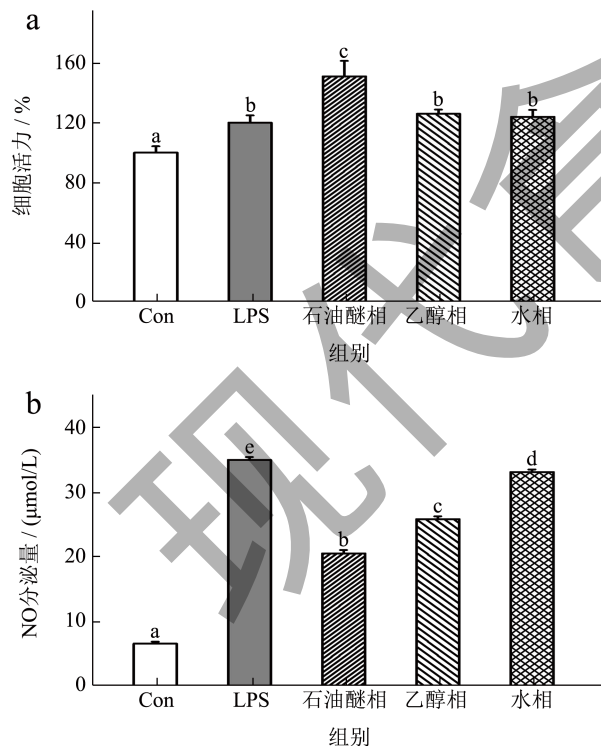


图 1 马齿苋不同粗提物对 RAW264.7 巨噬细胞活力 (a) 和 NO 分泌量 (b) 的影响

Fig.1 Effect of extracts of purslane on cell viability (a) and NO secretion (b) of RAW264.7 macrophages

注: 不同小写字母表示具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。图 3、5、8 同。

利用 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型评价三种粗提物的抗炎活性, 结果显示它们对细胞生长均具有促增殖作用, 且在 150  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度下无毒性作用 (图 1a)。NO 是炎症反应中的重要介质, 也是用来评估抗炎活性的关键指标之一<sup>[15]</sup>。如图 1b 所示, 与 Con 组相比, LPS 组 RAW264.7 巨噬细胞中 NO 的分泌水平显著升高至 34.98  $\mu\text{mol/L}$  ( $P < 0.05$ ), 表明成功建立了细胞炎症模型<sup>[16]</sup>。添加三种粗提物后, 与 LPS 组相比, RAW264.7 巨噬细胞中 NO 的分泌量分别减少到 33.13、25.83 和 20.53  $\mu\text{mol/L}$ , 该结果显示三种提取物均可降低 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞中 NO 的分泌量, 其中石油醚相粗提物对 NO 的抑制作用显著强于其他两组 ( $P < 0.05$ ), 表明其抗炎活性最强。该结果说明马齿苋石油醚相粗提物是最有效和最有潜力的抗炎组分, 这与 Guo 等<sup>[17,18]</sup>报道的研究结果相似。根据物质极性的不同, 结合相似相溶原理, 使用石油醚提取的化合物中的活性成分属于低极性脂溶性分子<sup>[19]</sup>, 表明抑制 NO 分泌的活性物质可能是极性较低的脂溶性成分。因此, 选择石油醚相粗提物作进一步的分离和活性筛选。

### 2.2 石油醚相粗提物中抗炎活性物质的分离

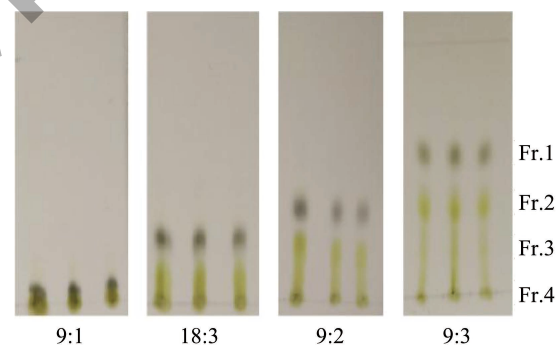


图 2 石油醚相粗提物的薄层色谱图

Fig.2 Thin layer chromatogram of petroleum ether fraction

进一步使用 TLC 和硅胶柱色谱分离法对石油醚相粗提物进行分离。在 TLC 中, 选择石油醚 - 乙酸乙酯体系作为展开剂, 石油醚相粗提物在不同比例的石油醚 - 乙酸乙酯体系中的展开情况如图 2 所示。为使石油醚相粗提物组分充分展开, 根据物质的极性, 且 Rf 值 (比移值) 大小在 0.20~0.80<sup>[20]</sup>之间比较合适, 选择分离效果较好的 18:3、9:3 的石油醚 - 乙酸乙酯体系作为硅胶柱色谱分离的洗脱溶剂。将该粗提物分为四个组分 (Fr.1、Fr.2、Fr.3 和 Fr.4), 使用硅胶柱色谱分离方法对这些组分进行分离和收

集，以石油醚-乙酸乙酯 18:3 进行洗脱得到 Fr.1 和 Fr.2 组分，石油醚-乙酸乙酯 9:3 洗脱得到 Fr.3 组分，最后经无水乙醇洗脱得到极性大的 Fr.4 组分。四个组分的分离得率分别为 2.10、0.80、0.54 和 2.21 mg/g，其中 Fr.1 和 Fr.4 提取得率最高，这可能是由于各组分在不同极性的洗脱剂下分离效果不同<sup>[21]</sup>。

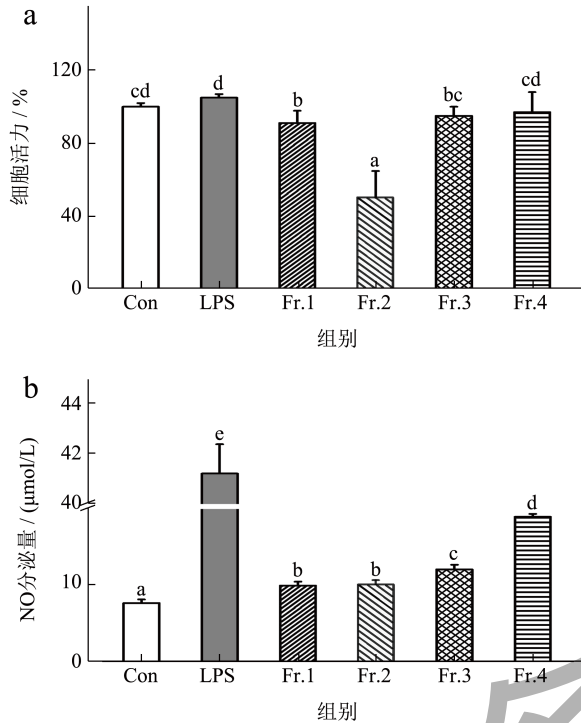


图 3 石油醚相粗提物中的各组分对 RAW264.7 巨噬细胞活力 (a) 和 NO 分泌量 (b) 的影响

Fig.3 Effect of fractions in petroleum ether phase extracts on cell viability (a) and NO secretion (b) of RAW264.7 macrophages

利用 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型对 Fr.1~Fr.4 组分进行抗炎活性筛选，结果如图 3 所示。在 150 μg/mL 质量浓度下，Fr.1、Fr.3 和 Fr.4 组分的细胞存活率均高于 90%，然而 Fr.2 组分的细胞存活率显著下降至 50% ( $P < 0.05$ )，表明 Fr.2 组分对细胞有毒性作用。与 LPS 组相比，添加相同浓度的四个组分后，RAW264.7 巨噬细胞中 NO 的分泌量分别减少到 10.01、10.12、12.13 和 20.00 μmol/L (图 3b)，表明 Fr.1、Fr.2 和 Fr.3 组分显著降低细胞中 NO 的分泌 ( $P < 0.05$ )。采用 GC-MS 对 Fr.1 组分进行分析，其主要物质是邻苯二甲酸二丁酯 (表 1)。邻苯二甲酸二丁酯常被作为一种优良的增塑剂和添加剂，因其良好的溶解性及柔韧性被广泛应用于塑料、化妆品等产品的生产中，然而 Jiang 等<sup>[22]</sup>、耿春辉等<sup>[23]</sup>报道该物质具有潜在的毒性，过多接触可能会引起炎症反应。由此可知，Fr.1 组分中含有潜

在的毒性物质，而 Fr.2 组分对细胞有毒性作用，考虑到食品或药品的安全性，故该组分不适于进行抗炎研究。因此，选择 Fr.3 组分进行下一步分离。

表 1 Fr.1 主要成分的 GC-MS 分析

Table 1 GC-MS analysis of the main components of the sub-fraction Fr.1

编号	保留时间 /min	峰面积 /%	分子式	化合物名称
1	4.253 7	2.54	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>	3,4-二甲基辛烷
2	15.816 1	2.70	C <sub>13</sub> H <sub>27</sub>	1-碘十三烷
3	16.400 4	2.47	C <sub>31</sub> H <sub>64</sub>	三十一烷
4	17.530 1	3.27	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub>	新植二烯
5	18.605 6	2.18	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub>	二十八烷
6	19.158 5	34.30	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	邻苯二甲酸二丁酯

### 2.3 Fr.3 组分中抗炎活性物质的分离

进一步使用 TLC 和硅胶柱色谱分离法对 Fr.3 组分进行分离。在 TLC 中，选择二氯甲烷-甲醇体系作为展开剂，Fr.3 组分在不同比例的二氯甲烷-甲醇体系中的展开情况如图 4 所示。为使 Fr.3 组分充分展开，选择 100:1 的二氯甲烷-甲醇体系作为硅胶柱色谱分离的洗脱溶剂。将该组分为三个亚组分 (Fr.3.1、Fr.3.2 和 Fr.3.3)，采用硅胶柱色谱分离法对这些组分进行分离和收集，以二氯甲烷-甲醇 100:1 进行等度洗脱得到 Fr.3.1、Fr.3.2 和 Fr.3.3 组分。

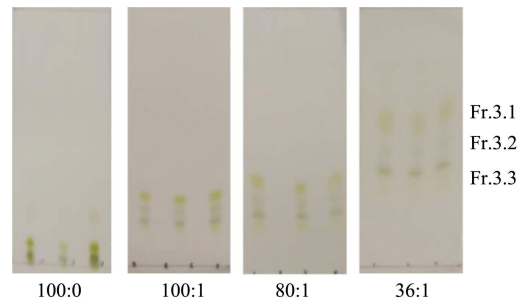


图 4 Fr.3 组分薄层色谱图

Fig.4 Thin layer chromatogram of Fr.3 fraction

利用 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型对 Fr.3.1~Fr.3.3 组分进行抗炎活性测定，结果如图 5 所示，三个组分对细胞均无毒性作用，且均能显著降低 RAW264.7 巨噬细胞中 NO 的分泌量 ( $P < 0.05$ )，分别降至 11.80、13.72 和 16.38 μmol/L。其中，Fr.3.1 组分表现出最强的抑制作用，与 Con 组相比没有显著性差异。与此同时，与石油醚相粗提物中细胞 NO 的分泌量远高于 Con 组相比，Fr.3.1 组分对 NO 的抑制效果更为显著，该结果进一步验证了以抗炎

活性为导向筛选活性物质的有效性。因此，选择 Fr.3.1 组分进行后续研究。

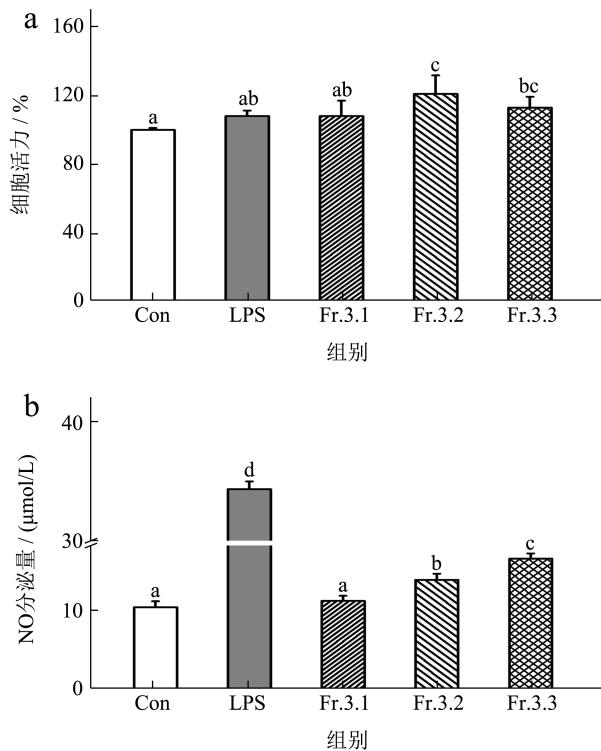


图 5 Fr.3 组分对 RAW264.7 巨噬细胞活力 (a) 和 NO 分泌量 (b) 的影响

Fig.5 Effect of Fr.3 fractions on cell viability (a) and NO secretion (b) of RAW264.7 macrophages

#### 2.4 Fr.3.1 组分中抗炎活性物质的分离

采用全波长扫描对 Fr.3.1 组分进行分析，并利用制备液相色谱对 Fr.3.1 组分进一步纯化。图 6a 显示了 Fr.3.1 组分的全波长扫描图，从图中可以看出，在 190~700 nm 波长范围内，Fr.3.1 组分在 410 nm 处具有明显的吸收峰，在此波长下组分基线平稳，因此选择 410 nm 为 Fr.3.1 组分的检测波长。在此波长下，使用制备液相色谱对 Fr.3.1 组分进行纯化，图 6b 制备液相色谱的结果显示，在 0~20 min 内，Fr.3.1 组分呈现出三处明显的吸收峰，分别出现在 2~5 min、10.5~12 min 和 17.5~19 min。由 2.1 和 2.2 结果可知，能够抑制 NO 分泌的活性物质主要存在于极性较低的组分中。由于 17.5~19 min 通过 C18 柱洗脱出来的组分具有较低的物质极性，因此，选择收集保留时间在 17.5~19 min 的组分。将收集的组分经减压浓缩干燥后，得到纯化的脂溶性化合物。进一步对脂溶性化合物进行分析，图 6c 中 HPLC 的结果显示，在 17.5 min 左右呈现出明显的吸收峰，表明通过制备液相收集得到纯化后的脂溶性化合物。

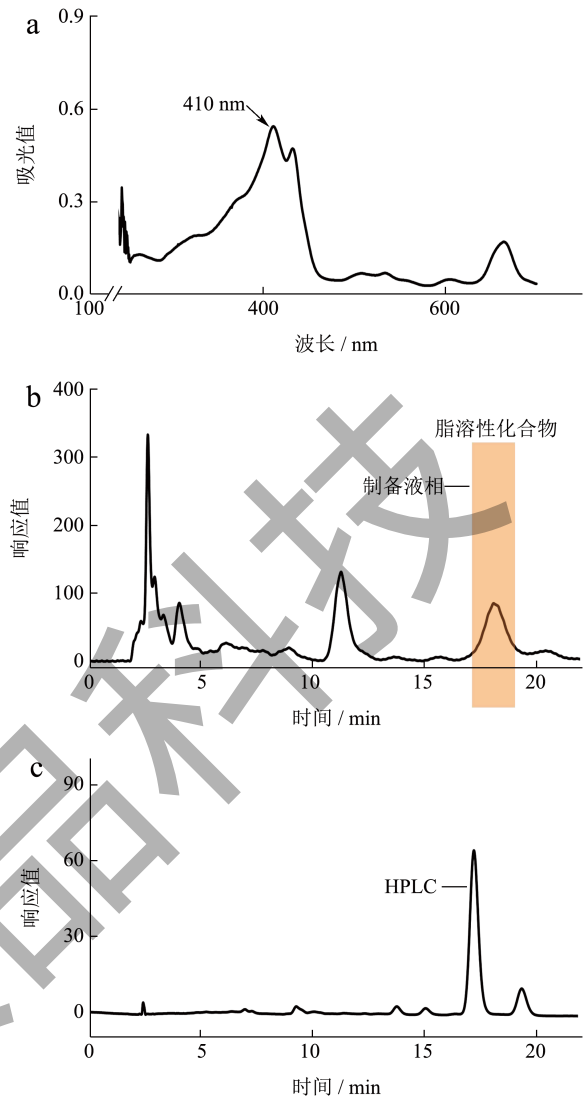


图 6 Fr.3.1 组分的全波长扫描图 (a)、制备液相色谱图 (b) 和脂溶性化合物的 HPLC 图 (c)

Fig.6 Full wavelength scan (a) and preparation of liquid chromatogram (b) of Fr.3.1 fraction and HPLC (c) of lipid soluble compound

#### 2.5 脂溶性化合物的成分分析

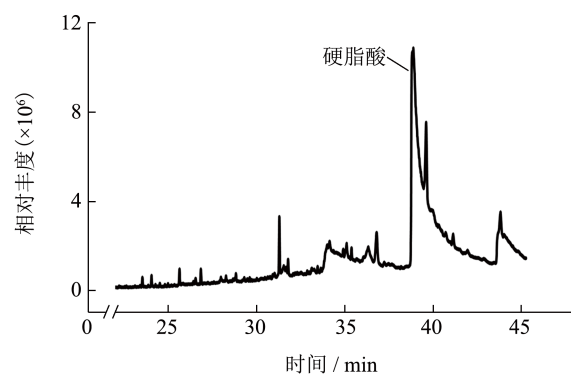


图 7 脂溶性化合物的 GC-MS 总离子流图

Fig.7 GC-MS total ion flow diagram of lipid soluble compound

表 2 脂溶性化合物活性成分的GC-MS分析

Table 2 GC-MS analysis of the active components of lipid soluble compound

编号	保留时间/min	峰面积/%	分子式	化合物名称
1	31.326	1.46	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	硬脂酸甲酯
2	34.043	1.37	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	棕榈酸
3	34.176	1.27	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	δ-十八内酯
4	36.374	1.48	C <sub>20</sub> H <sub>39</sub> NO	(Z)-11-二十烯酰胺
5	36.847	1.66	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	反式角鲨烯
6	38.872	7.08	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	硬脂酸
7	38.905	36.12	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	硬脂酸
8	39.658	13.21	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯
9	39.945	6.71	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO	9-十八烯酰胺
10	40.365	3.89	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	硬脂酸
11	40.768	2.45	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> NO	棕榈酰胺
12	43.882	5.38	C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> O <sub>4</sub>	3-羟基-7-(羟基亚氨基)胆烷酸
13	44.081	4.78	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	亚油酸
14	44.555	1.22	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>4</sub>	二乙二醇单硬脂酸酯
15	44.885	1.04	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> NO	硬脂酸酰胺

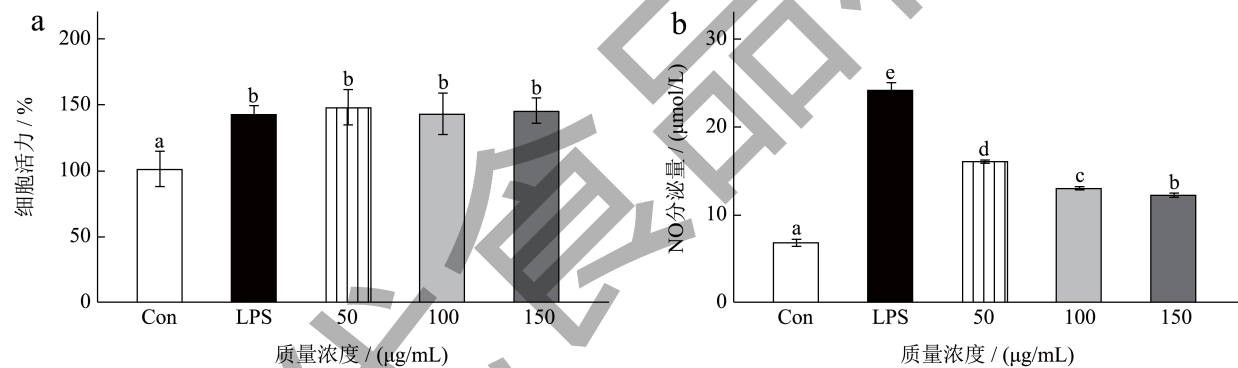


图 8 脂溶性化合物对 RAW264.7 巨噬细胞活力 (a) 和 NO 分泌量 (b) 的影响

Fig.8 Effect of purslane lipid soluble compound on cell viability (a) and NO secretion (b) of RAW264.7 macrophages

为明确脂溶性化合物中的具体成分, 利用 GC-MS 技术对其进行分析, 其总离子流图如图 7 所示。由图 7 和表 2 可知, 从脂溶性化合物中共鉴定出 100 种成分, 主要由长链脂肪酸组成, 其中含量相对较高 (峰面积 > 1%) 的有 15 种, 具体包括硬脂酸 (约为 47.09%)、邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯 (13.21%)、9-十八烯酰胺 (6.71%)、3-羟基-7-(羟基亚氨基)胆烷酸 (5.38%)、亚油酸 (4.78%) 和其他成分。文献表明, 生物活性物质含量与活性强弱呈正相关, 活性物质含量越多, 活性越强<sup>[24]</sup>。因此, 进一步分析脂溶性化合物的体外抗炎活性。

## 2.6 脂溶性化合物的抗炎活性评价

为进一步验证脂溶性化合物 (Lipid Soluble

Compound, LSC) 的抗炎活性, 采用不同质量浓度的 LSC 处理 RAW264.7 巨噬细胞, 结果如图 8 所示。

如图 8a 所示, 在 50~150 μg/mL 的质量浓度范围内 LSC 对 RAW264.7 巨噬细胞生长有促增殖作用, 且对细胞无毒性。因此, 选取 50、100 和 150 μg/mL 的质量浓度作为低、中、高剂量组进行实验。如图 8b 所示, 与 LPS 组相比, 添加不同浓度的 LSC 后, RAW264.7 巨噬细胞中 NO 分泌量以剂量依赖的方式降低, 从 19.81 μmol/L 降至 13.81 μmol/L, 表明 LSC 能够通过抑制 NO 分泌发挥抗炎作用。此外, 与 Fr.3.1 组分中细胞 NO 的分泌量相比, 在相同质量浓度 (150 μg/mL) 下, 未经纯化的 Fr.3.1 组分效果更为显著, 这可能是 Fr.3.1 组分中多种活性成分协同抗炎作用的结果<sup>[25]</sup>, 且硬脂酸

是其抗炎作用的主要活性成分。研究表明,硬脂酸作为一种代谢物,可通过饮食调节人体生理机能发挥抗炎作用<sup>[26]</sup>。Nie等<sup>[27]</sup>从金华火腿中发现饱和脂肪酸如硬脂酸通过抑制炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6的表达水平,从而改善小鼠肝脏中的炎症反应。综上,该结果表明马齿苋中的LSC具有显著的抗炎作用,能够降低LPS刺激RAW264.7巨噬细胞后NO的分泌量,抑制体外炎症反应。

### 3 结论

本研究以抗炎活性为导向,对马齿苋中抗炎活性物质进行了提取分离及结构鉴定。结果表明,马齿苋中的抗炎活性物质主要来源于极性较低的分。在柱层析提取法的基础上,利用石油醚、乙醇和纯水溶剂依次对马齿苋样品进行洗脱,其中石油醚相粗提物的极性最小,表现出最高的抗炎活性。从石油醚相粗提物中进一步分离得到Fr.1、Fr.2、Fr.3和Fr.4四个组分,经活性筛选确定Fr.3组分极性小且活性强。通过对Fr.3组分继续分离得到Fr.3.1、Fr.3.2和Fr.3.3三个组分,其中极性较小的Fr.3.1组分表现出更强的抗炎作用。进一步从Fr.3.1组分中纯化得到极性小的脂溶性化合物,其主要成分被确定为硬脂酸。马齿苋中的脂溶性化合物具有显著的抗炎活性,有进一步开发成为抗炎药物的潜力。在此基础上,将进一步探究该化合物调节炎症途径的确切机制,为充分利用马齿苋的抗炎成分进行研究和开发抗炎新药提供理论支持。

### 参考文献

- [1] GRETEN F R, GRIVENNIKOV S I. Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences [J]. *Immunity*, 2019, 51(1): 27-41.
- [2] LU Q, LI R, YANG Y, et al. Ingredients with anti-inflammatory effect from medicine food homology plants [J]. *Food Chemistry*, 2022, 368: 130610.
- [3] ZHOU Y X, XIN H L, RAHMAN K, et al. *Portulaca oleracea* L.: a review of phytochemistry and pharmacological effects [J]. *BioMed Research International*, 2015, 26: 925631.
- [4] 赵阳,卢育新,程晓晨,等.马齿苋中化学成分及其抗炎活性研究[J].*国际药学研究杂志*,2020,47(11):995-1000.
- [5] 张雯雯,郑必胜,刘瑞海,等.不同产地马齿苋的抗衰老活性比较[J].*现代食品科技*,2020,36(5):57-63.
- [6] IRANSHAHY M, JAVADI B, IRANSHAHI M, et al. A review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Portulaca oleracea* L [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017, 205: 158-172.
- [7] 王国玉,王璐,王玮,等.马齿苋水提取物抗炎作用研究[J].*河北医学*,2014,20(11):1866-1868.
- [8] MIAO L, TAO H, PENG Y, et al. The anti-inflammatory potential of *Portulaca oleracea* L.(purslane) extract by partial suppression on NF- $\kappa$ B and MAPK activation [J]. *Food Chemistry*, 2019, 290: 239-245.
- [9] KIM Y, LIM H J, JANG H J, et al. *Portulaca oleracea* extracts and their active compounds ameliorate inflammatory bowel diseases *in vitro* and *in vivo* by modulating TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  signalling [J]. *Food Research International*, 2018, 106: 335-343.
- [10] CHEN R, WANG X, ZHANG Y, et al. Simultaneous extraction and separation of oil, proteins, and glucosinolates from *Moringa oleifera* seeds [J]. *Food Chemistry*, 2019, 300: 125162.
- [11] XIE C, WANG K, LIU X, et al. Characterization and bioactivity of A-type procyanidins from litchi fruitlets at different degrees of development [J]. *Food Chemistry*, 2023, 405: 134855.
- [12] HAN H, LI H, HAO R, et al. One-step column chromatographic extraction with gradient elution followed by automatic separation of volatiles, flavonoids and polysaccharides from *Citrus grandis* [J]. *Food Chemistry*, 2014, 145: 542-548.
- [13] 黄安香,王忠伟,杨守禄,等.黔产油茶籽油不同制取方法营养成分差异分析及品质评价[J].*食品工业科技*,2022, 43(7):294-302.
- [14] 于秋菊,耿凤英,张磊磊.微波辅助低共熔溶剂提取覆盆子总黄酮的工艺优化及活性研究[J].*中国食品添加剂*, 2023,34(2):43-51.
- [15] CHEN H, WANG K, XIAO H, et al. Structural characterization and pro-inflammatory activity of a thaumatin-like protein from pulp tissues of *Litchi chinensis* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(23): 6439-6447.
- [16] MENG Y, XU Y, CHANG C, et al. Extraction, characterization and anti-inflammatory activities of an inulin-type fructan from *Codonopsis pilosula* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 163: 1677-1686.
- [17] GUO D, XU L, CAO X, et al. Anti-inflammatory activities and mechanisms of action of the petroleum ether fraction of *Rosa multiflora* Thunb. hips [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 138(3): 717-722.
- [18] HAMDY A, MAJOUJI K, ABDELHAMID A, et al. Pharmacological activities of the organic extracts and fatty acid composition of the petroleum ether extract from *Haplophyllum tuberculatum* leaves [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018, 216: 97-103.
- [19] HU R, WANG J, LI H, et al. Simultaneous extraction of



- nicotine and solanesol from waste tobacco materials by the column chromatographic extraction method and their separation and purification [J]. Separation and Purification Technology, 2015, 146: 1-7.
- [20] 滕春红,冯曦茹,徐永清,等.黄花蒿叶醇提取物除草活性物质的分离及结构鉴定[J].中国生物防治学报,2021, 37(2):244-250.
- [21] 姚双燕,张沁强,窦伟国,等.大豆胚芽甾醇酯的分离纯化[J].食品研究与开发,2023,44(4):72-78.
- [22] JIANG N, SONG P, LI X, et al. Dibutyl phthalate induced oxidative stress and genotoxicity on adult zebrafish (*Danio rerio*) brain [J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 424: 127749.
- [23] 耿春辉,郭峰,孙琛,等.核壳式CdSe/ZnS量子点对邻苯二甲酸二丁酯的快速高灵敏荧光测定[J].广州化工,2022, 50(21):123-126.
- [24] 杨锡金,王艳,陈梓瀚,等.基于HPLC-ECD研究景天三七抗氧化活性的谱效关系[J].食品工业科技,2023,44(16): 15-24.
- [25] 赵春草,曾佳.藤茶的药理作用和安全性研究新进展[J].中国药房,2023,34(3):380-384.
- [26] SENYILMAZ-TIEBE D, PFAFF D, VIRTUE S, et al. Dietary stearic acid regulates mitochondria *in vivo* in humans [J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 1-10.
- [27] NIE W, XU F, ZHOU K, et al. Stearic acid prevent alcohol-induced liver damage by regulating the gut microbiota [J]. Food Research International, 2022, 155: 111095.

现代食品科技