

通过量效关系评价CO₂超临界提取肉豆蔻挥发油质量

王小宁, 董馨, 布仁, 王跃武, 于娟, 陆景坤* (内蒙古医科大学基础医学院, 呼和浩特 010010)

摘要 目的: 气相色谱-三重四极杆质谱(GC-MS/MS)法定量分析16批次肉豆蔻挥发油中4-萜烯醇、 α -蒎烯、甲基丁香酚、榄香素、黄樟素和肉豆蔻醚, 结合抗炎活性量效分析, 对肉豆蔻的药效成分进行质量评价。方法: 采用CO₂超临界萃取法提取肉豆蔻挥发油, 建立GC-MS/MS法分析肉豆蔻中6个成分的检测方法, 进行方法学考察并对16批次挥发油样品中6个成分进行含量测定。气相色谱条件: J&W DB-17ms气相色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μ m); 升温程序: 50 $^{\circ}$ C, 保持1 min, 以10 $^{\circ}$ C·min⁻¹的速率升高到150 $^{\circ}$ C, 保持3 min; 再以20 $^{\circ}$ C·min⁻¹的速率升高到250 $^{\circ}$ C, 保持3 min。进样口温度280 $^{\circ}$ C; 载气为氮气, 流速为1 mL·min⁻¹, 分流比为10:1, 进样量为1 μ L; 建立16批次挥发油处理脂多糖(LPS)诱导的Raw264.7巨噬细胞炎症模型, 并进行药效分析; 对挥发油中6个成分进行主成分分析(PCA-X)、Pearson相关性分析及药效分析, 并将变量重要性投影(VIP)值>1及Pearson系数为正的化合物作为贡献性成分。结果: 4-萜烯醇、 α -蒎烯、甲基丁香酚、榄香素、黄樟素、肉豆蔻醚在相应的浓度范围内呈现良好的线性关系; 6个成分精密度试验的RSD在0.18%~0.90%, 重复性试验的RSD在1.53%~2.90%, 稳定性试验的RSD在2.11%~2.94%; 平均加样回收率($n=9$)分别为98.32%、99.41%、94.79%、98.82%、96.14%、97.81%, RSD分别为1.51%、1.62%、1.87%、0.71%、1.82%、1.31%。16批次挥发油样品中4-萜烯醇、 α -蒎烯、甲基丁香酚、榄香素、黄樟素、肉豆蔻醚的含量范围分别为4.674~12.432、2.316~11.121、0.201~4.653、1.047~10.488、201.776~402.163、7.888~39.570 mg·g⁻¹。量效关系分析显示, 抗炎活性与6个成分含量具有一定的相关性, 甲基丁香酚、榄香素、肉豆蔻醚对抗炎活性有贡献, 其中榄香素贡献最大。结论: 建立了肉豆蔻16批次挥发油中6个成分的抗炎活性量效关系分析方法, 本法简便快速, 为肉豆蔻的质量控制及安全、有效的应用提供依据。

关键词: 肉豆蔻挥发油; CO₂超临界萃取法; 气相色谱-三重四极杆质谱; 含量测定; 量效关系

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2024)09-1020-012

doi:10.16153/j.1002-7777.20240457

Evaluating the Quality of Volatile Oil Extracted from Nutmeg by CO₂ Supercritical Extraction by Dose-effect Relationship

Wang Xiaoning, Dong Xin, Bu Ren, Wang Yuewu, Yu Juan, Lu Jingkun* (School of Basic Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010010, China)

Abstract Objective: Gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (GC-MS/MS) was used to

基金项目: 国家自然科学基金(编号 82260813, 81960757); 内蒙古自然科学基金(编号 2020MS08045); 内蒙古医科大学重点项目(编号 YKD2023ZD005)

作者简介: 王小宁 E-mail: 1737285864@qq.com

通信作者: 陆景坤 E-mail: 20070123@immu.edu.cn

quantitatively analyze terpinen-4-ol, α -pinene, methyleugenol, elemicin, safrole and myristicin in 16 batches of volatile oil of nutmeg. Combined with anti-inflammatory activity dose-effect analysis, the quality of the active ingredients in nutmeg was evaluated. **Methods:** CO₂ supercritical extraction method was used to extract the volatile oil of nutmeg, and a GC-MS/MS method was established to analyze the six components in nutmeg. Methodological investigation was conducted and the content of six components in 16 batches of volatile oil samples was determined. Gas chromatographic conditions: J&W DB-17ms gas column (30 m×0.25 mm, 0.25 μ m); temperature rise procedure: 50 °C, keep for 1 min, rise to 150 °C at the rate of 10 °C · min⁻¹, keep for 3 min; then it was raised to 250 °C at the rate of 20 °C · min⁻¹ and keep for 3 min. Inlet temperature 280 °C; the carrier gas was nitrogen, the flow rate was 1 mL · min⁻¹, the shunt ratio was 10 : 1, and the sample size was 1 μ L. The inflammation model of Raw264.7 macrophages induced by lipopolysaccharide (LPS) was established in 16 batches of volatile oil, and the pharmacodynamic analysis was performed. The volatile oil samples were analyzed by principal component analysis (PCA-X) and Pearson coefficient was positive compounds as contributing components. **Results:** There was a good linear relationship between terpinen-4-ol, α -pinene, methyleugenol, elemicin, safrole and myristicin in the corresponding concentration range. RSD of the six components ranged from 0.18% to 0.90% for precision test, 1.53% to 2.90% for repeatability test, and 2.11%-2.94% for stability test. The average recoveries ($n=9$) were 98.32%, 99.41%, 94.79%, 98.82%, 96.14%, 97.81%, and RSD was 1.51%, 1.62%, 1.87%, 0.71%, 1.82%, 1.31%, respectively. The contents of terpinen-4-ol, α -pinene, methyleugenol, elemicin, safrole and myristicin in 16 batches of volatile oil samples ranged from 4.674-12.432 mg · g⁻¹, 2.316-11.121 mg · g⁻¹, 0.201-4.653 mg · g⁻¹, 1.047-10.488 mg · g⁻¹, 201.776-402.163 mg · g⁻¹, 7.888-39.570 mg · g⁻¹, respectively. The results showed that there was a correlation between the anti-inflammatory activity and the content of six components. The anti-inflammatory activity of methyleugenol, elemicin and myristicin contributed, and elemicin contributed the most. **Conclusion:** A dose-effect relationship analysis was established for the anti-inflammatory activity of six components in 16 batches of volatile oil of nutmeg. The method is simple and rapid, and provides a basis for the quality control, safe and effective application of nutmeg.

Keywords: volatile oil of nutmeg; CO₂ supercritical extraction method; GC-MS/MS; content determination; dose-effect relationship

肉豆蔻为肉豆蔻科中肉豆蔻 *Myristica fragrans* Houtt. 的干燥种仁，是一种传统中蒙药^[1]。其味辛、微苦，性温，具有温中行气、涩肠止泻的功效^[2-4]。肉豆蔻在蒙、藏、维等少数民族医学中被广泛应用，例如在蒙药中常用于治疗心脏疾病，如心赫依、心刺痛、谵语、晕厥和心慌等^[5]。肉豆蔻主产于印度尼西亚、马来西亚、西印度群岛、巴西等地，在我国海南、云南、广东、广西、台湾等地也有栽培，并于春冬季节成熟期采收^[2,6]。肉豆蔻的化学成分主要为挥发油、脂肪油、苯丙素、木脂素和黄酮等^[7]。其中挥发油含量为8%~15%，主要为单萜烃类、倍半萜烯类、芳香醚类、单萜醇类、酯类等；脂肪油含量为25%~46%，主要为肉豆蔻科的特征成分二芳基壬酮类^[8-9]。挥发油的主要药

理作用包括降血脂、抗菌、抗抑郁、抗氧化、抗炎、保肝等^[10]。2020年版《中华人民共和国药典》（以下简称《中国药典》）（一部）中，肉豆蔻的质控指标为挥发油和去氢二异丁香酚的含量，且挥发油为含量测定项，但目前还未明确其化学成分，质量控制与评价仍有待商榷，尤其是对毒/效两用成分缺乏质控。例如肉豆蔻醚和榄香素为其主要的活性和毒性成分，两者为单胺氧化酶抑制剂，能抗抑郁、抗癫痫，同时还有致幻、麻醉作用^[2,11-12]。萜类化合物黄樟素具有较强的抗炎活性，但含量超过0.5%时能够引起肝细胞瘤，对人体有一定的毒副作用，易诱发基因突变和肝损伤，对于消化、泌尿以及血液系统具有较强的致癌作用^[13]。

挥发油作为一种挥发性的芳香物质被广泛应用,常见的提取方法主要有水蒸气蒸馏、有机溶剂萃取法、压榨法、超临界流体萃取法等^[14],其中CO₂超临界萃取技术应用范围较广,其可以在接近室温(35~40℃)及CO₂气体笼罩下进行提取,与传统水蒸气蒸馏提取法相比,具有提取率高、有效防止受热易分解成分的损失等优点^[15];而CO₂作为萃取溶剂,具有无毒、廉价以及来源丰富等特点^[16]。目前,肉豆蔻挥发油的定量分析报道较少,多为定性分析,仅见HPLC法^[17]测定挥发油中少量成分,而通过气相色谱-三重四极杆质谱(GC-MS/MS)法测定肉豆蔻挥发油中 α -蒎烯、4-萜烯醇、甲基丁香酚、榄香素、黄樟素、肉豆蔻醚含量的方法报道较少,由此本研究采用GC-MS/MS法对肉豆蔻中这6个成分进行含量测定,并进行抗炎谱效分析,以期对肉豆蔻挥发油的提取及质量控制提供理论基础。

1 材料

1.1 仪器

SCC35-10-AC型超临界萃取设备(大连国宏能源石化设备有限公司),EXPEC 5250型气相色谱-三重四极杆质谱联用仪(杭州谱育科技发展有限公司),KH-500DVK型数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司),Sartorius BSA224S 24790370系列万分之一电子天平(Sartorius公司),电子天平(赛多利斯科学仪器<北京>有限公司),酶标仪(Thermo Fisher公司),生物安全柜(Haier集团,批号HR1200-II A2),细胞培养箱(Thermo Fisher公司,批号HERAcell 150i)等。

1.2 试剂

对照品: α -蒎烯(批号C15173389,纯度 $\geq 99.50\%$)购自上海麦克林生物科技有限公司;4-萜烯醇(批号J13A9S58322,纯度 $\geq 98.00\%$)购自上海源叶生物科技有限公司;榄香素(批号200825-076,纯度 $\geq 95.00\%$)、甲基丁香酚(批号230518,纯度 $\geq 98.00\%$)、黄樟素(批号041806,纯度 $\geq 99.00\%$)、肉豆蔻醚(批号230214,纯度 $\geq 98.00\%$)均购自北方伟业计量集团有限公司,正己烷购自天津市鑫铂特化工有限公司。

DMEM高糖培养液(大连美仑生物科技有限公司,批号MA0212-2),青霉素/链霉素溶液(大连美仑生物科技有限公司,批号PWL062),胎牛血清(舜冉<上海>生物科技有限公司,批号st30-3302),磷酸盐缓冲液(PBS)(大连美仑生物科技有限公司,批号MA0015),0.25%胰蛋白酶(赛默飞世尔科技<中国>有限公司,批号25200114),脂多糖(LPS)(西格玛奥德里奇<上海>贸易有限公司,批号SMB00704),一氧化氮(NO)检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号S0021),IL-1 β 酶联免疫分析(ELISA)试剂盒(达科为生物技术公司,批号2311-2)。

1.3 药材

药材产地与来源见表1,经内蒙古医科大学药学院中药资源与开发教研室渠弼副教授鉴定为肉豆蔻科肉豆蔻属植物肉豆蔻*Myristica fragrans* Houtt.的干燥种仁。

表1 16批肉豆蔻样品信息

编号	产地	批号	生产厂家
S1	广西	C189220601	河北安嘉药业有限公司
S2	广东	CP111210101	河北钰隆堂药业有限公司
S3	广东	22030501	内蒙古幕昕药业有限公司
S4	广西	2208001	安国市仁德兴药材有限公司
S5	广西	211101223	河北济鑫堂药业有限公司
S6	广西	22071304	安国市久旺药业有限公司
S7	广西	22011301	安国市久旺药业有限公司

续表 1

编号	产地	批号	生产厂家
S8	广西	230201223	河北济鑫堂药业有限公司
S9	海南	210301	安徽知源中药饮片有限公司
S10	巴西*	-	巴西哥伦比亚
S11	云南	210501	广州至信中药饮片有限公司
S12	印尼*	-	印度钦奈坦巴拉姆的西达国家研究所
S13	广东	230401	广东天诚中药饮片有限公司
S14	马来西亚*	-	东南亚马来西亚
S15	福建	1808147	中山市仙逸堂中药饮片有限公司
S16	广西	2203003	江西樟树天齐堂中药饮片有限公司

注：海外产地（巴西、印尼、马来西亚）为散装样品暂无确定批号。

2 方法与结果

2.1 CO₂超临界萃取肉豆蔻挥发油

分别称取各批次肉豆蔻粗粉，每份1 kg，在压力28 mPa、萃取温度40 °C条件下连续萃取1.5 h。

当压力达到8 mPa时，即为挥发油组分，当压力达到5 mPa压力时，收集的萃取物为挥发油半固体。各批次挥发油的提取率见表2。

表 2 16 批次挥发油样品的提取率结果

编号	提取率 /%	编号	提取率 /%	编号	提取率 /%	编号	提取率 /%
S1	35.50	S5	33.33	S9	33.97	S13	42.00
S2	33.86	S6	37.34	S10	35.16	S14	33.68
S3	36.97	S7	37.74	S11	39.79	S15	31.59
S4	35.38	S8	31.78	S12	30.75	S16	25.42

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液

精密吸取挥发油样品50 μL置于5 mL量瓶中，并加入正己烷定容，混匀，取1 mL溶液微孔滤膜（0.45 μm）过滤，即得。

2.2.2 对照品储备液

精密称取各对照品适量，加入正己烷，超声、溶解并定容至5 mL，制成质量浓度分别为1.980、2.000、0.922、0.924、7.200、4.000 mg·mL⁻¹的4-萜烯醇、α-蒎烯、甲基丁香酚、榄香素、黄酮素、肉豆蔻醚对照品储备液，密封，4 °C保存备用。

2.3 GC-MS/MS条件

2.3.1 GC条件

采用J&W DB-17ms气相色谱柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm）；升温程序：50 °C，保持1 min；以10 °C·min⁻¹的速率升高到150 °C，保持3 min；再以20 °C·min⁻¹的速率升高到250 °C，保持3 min。进样口温度为280 °C；载气为氮气（99.99%），流速为1 mL·min⁻¹，分流比为10：1，进样量为1 μL。

2.3.2 质谱条件

离子源为电子轰击源（EI）离子源；电压为70 eV；离子源温度为260 °C；四极杆温度为150 °C；扫描范围为m/z 30~350；溶剂延迟为3 min。待测成分的保留时间见表3。

表3 待测成分的保留时间

序号	化合物	保留时间 /min
1	α -蒎烯	4.65
2	4-萜烯醇	9.38
3	黄樟素	12.07
4	甲基丁香酚	14.60
5	肉豆蔻醚	16.28
6	榄香素	16.70

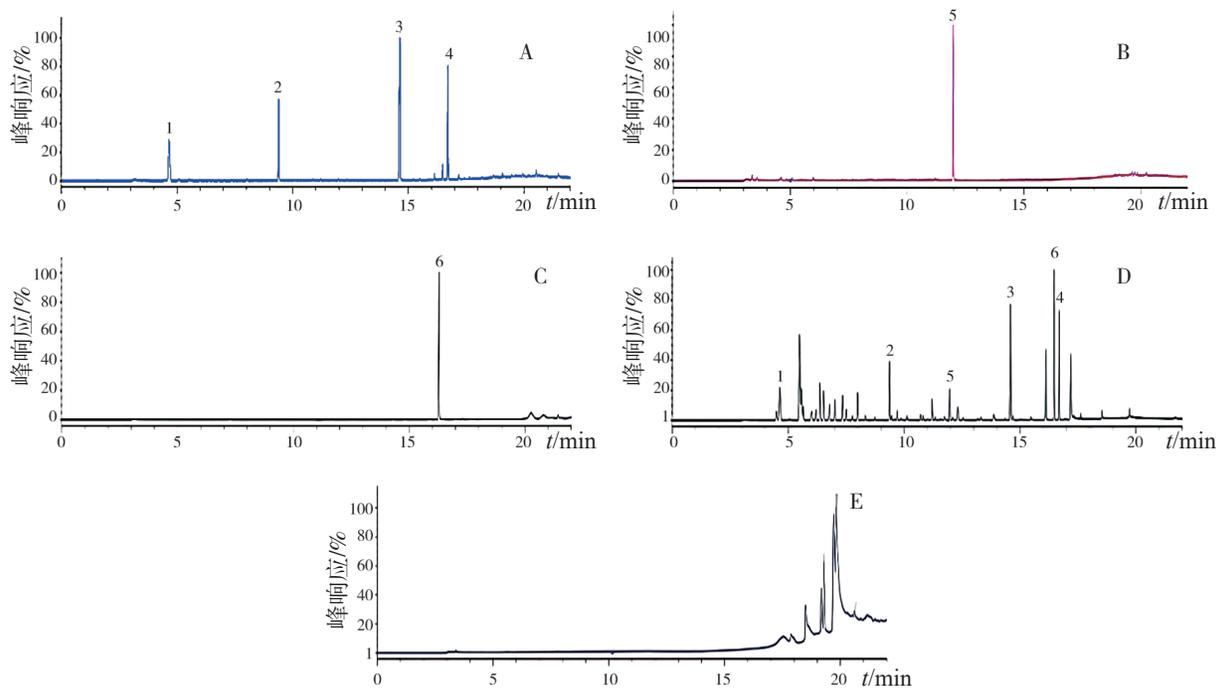
2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察

分别精密吸取对照品储备液4-萜烯醇、 α -蒎烯、甲基丁香酚、榄香素稀释2、5、8、10、100倍配制成不同浓度的混合对照品溶液。黄樟素对照品储备液稀释2、5、8、10倍配制成质量浓度分别为3.60、1.44、0.90、0.69 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液，肉豆蔻醚对照品储备液稀释2、5、20、50倍配制成

质量浓度分别为0.5、0.1、0.05、0.02 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

取上述不同浓度的混合对照品溶液、不同浓度的黄樟素对照品溶液、肉豆蔻醚对照品溶液、供试品溶液及空白对照溶液（为正己烷溶液）1 mL，微孔滤膜过滤，按照“2.3.1”项下色谱条件测定，记录色谱图，见图1，结果表明肉豆蔻挥发油中的6个成分测定无明显干扰。



A. 混合对照品溶液；B. 黄樟素对照品溶液；C. 肉豆蔻醚对照品溶液；D. 供试品溶液；E. 空白对照溶液；
1. α -蒎烯；2. 4-萜烯醇；3. 甲基丁香酚；4. 榄香素；5. 黄樟素；6. 肉豆蔻醚。

图1 GC-MS 色谱图

2.4.2 线性关系考察

精密吸取4-萜烯醇、 α -蒎烯、甲基丁香酚、榄香素的混合对照品储备液稀释2、5、8、10、100倍，黄樟素对照品储备液稀释2、5、8、10倍，肉豆蔻醚对照品储备液稀释2、5、20、50倍。取每个浓度1 mL，微孔滤膜过滤，按照“2.3.1”项下色谱

条件测定，每个浓度进样3次。以各化合物的质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标 (X)，以相应峰面积为纵坐标 (Y)，进行回归分析，获得各对照品的线性回归方程，见表4。结果表明，各成分在各自范围内线性关系良好。

表4 6个成分的线性关系

成分	回归方程	r	线性范围 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
4-萜烯醇	$Y=6.71 \times 10^7 X+8.17 \times 10^6$	0.9922	0.2970~0.0297
α -蒎烯	$Y=1.45 \times 10^8 X+2.45 \times 10^7$	0.9928	0.3000~0.0300
甲基丁香酚	$Y=2.86 \times 10^8 X+8.31 \times 10^6$	0.9906	0.1844~0.0030
榄香素	$Y=7.43 \times 10^7 X+1.37 \times 10^7$	0.9929	0.2772~0.02772
黄樟素	$Y=2.89 \times 10^6 X+9.22 \times 10^5$	0.9912	7.2000~0.7200
肉豆蔻醚	$Y=2.42 \times 10^6 X+1.68 \times 10^7$	0.9984	1.0000~0.0200

2.4.3 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下供试品溶液 (S_2)，按照“2.3.1”项下色谱条件连续进样6次，记录峰面积，计算4-萜烯醇、 α -蒎烯、甲基丁香酚、榄香素、黄樟素、肉豆蔻醚的峰面积RSD分别为0.90%、0.57%、0.63%、0.23%、0.82%、0.18%，表明方法精密度良好。

2.4.4 重复性试验

精密称定同一批次药材 (S_2)，按照“2.2.1”项下方法制备6份供试品溶液，按照“2.3.1”项下色谱条件并采用外标法进行含量测定，4-萜烯醇、 α -蒎烯、甲基丁香酚、榄香素、黄樟素、肉豆蔻醚的平均含量分别为0.246、0.203、0.120、0.249、6.275、0.892 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，RSD分别为2.53%、2.31%、2.72%、2.55%、1.53%、2.90%，表明该方法重复性良好。

2.4.5 稳定性试验

精密吸取“2.2.1”项下供试品溶液 (S_2)，于4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置保存，按照“2.3.1”项下色谱条件分别于0、2、4、6、8、10、12、24 h进样测定。4-萜烯醇、 α -蒎烯、甲基丁香酚、榄香素、黄樟素、肉豆蔻醚的峰面积RSD分别为2.94%、2.49%、2.81%、2.33%、2.11%、2.83%，表明供试品溶液

在24 h内稳定性良好。

2.4.6 加样回收率试验

精密称取“2.2.1”项下已测定含量的挥发油样品25 mg共9份，按各成分含量比例为1:0.5、1:1、1:1.5，加入对照品储备液，每个浓度水平各3份，按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，按照“2.3.1”项下色谱条件测定，4-萜烯醇、 α -蒎烯、甲基丁香酚、榄香素、黄樟素、肉豆蔻醚的平均加样回收率为98.32%、99.41%、94.79%、98.82%、96.14%、97.81%。RSD分别为1.51%、1.62%、1.87%、0.71%、1.82%、1.31%。

2.5 样品含量测定

取每批次样品，按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定，每批次进样3次，记录峰面积的平均值，16批肉豆蔻挥发油样品中6个成分的含量结果见表5。运用SIMCA 14.1软件，导入6个成分的相对含量值，对16批次挥发油的6个成分进行分类，绘制聚类树状图 (HCA) 见图2。由表5和图2可见，各批次药材中黄樟素和肉豆蔻醚均最高。不同产地、生产厂家，各成分含量未见明显的分布规律。挥发油含量同一产地的药材6个成分部分相关，广西产地的S4、S8样品各成分含量较高，挥发油提取率分别为

35.38%、37.78%；云南产地的S11样品挥发油提取率最高，为42.0%，但是其榄香素和甲基丁香酚含量较低。提取率与各成分的含量做Pearson分析发

现，4-萜烯醇、 α -蒎烯与提取率正相关，相关系数分别为0.6897、0.5324 ($P < 0.05$)。

表 5 16 批肉豆蔻挥发油样品中 6 个成分的含量 ($n=3$)

编号	含量 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)					
	4-萜烯醇	α -蒎烯	甲基丁香酚	榄香素	黄樟素	肉豆蔻醚
S1	9.230	5.644	3.930	6.510	287.441	26.857
S2	8.814	7.052	4.229	8.814	221.057	31.379
S3	10.246	11.121	3.859	6.621	343.787	38.969
S4	8.870	10.408	4.235	10.488	276.682	34.001
S5	9.911	6.907	3.360	6.387	229.895	25.923
S6	7.197	8.752	3.121	5.201	281.425	32.478
S7	10.599	6.002	1.586	1.047	334.030	39.570
S8	9.241	5.605	4.110	8.516	251.210	28.852
S9	5.550	7.245	1.567	1.244	240.026	25.800
S10	10.437	6.002	4.653	6.519	219.474	23.776
S11	12.432	7.995	4.592	7.109	272.103	27.147
S12	8.237	4.719	2.338	3.831	354.595	36.423
S13	10.196	6.257	0.201	5.190	207.004	20.794
S14	9.757	7.709	2.780	5.330	351.440	33.319
S15	8.004	4.387	3.275	5.896	201.776	22.999
S16	4.674	2.316	1.637	2.353	402.163	7.888

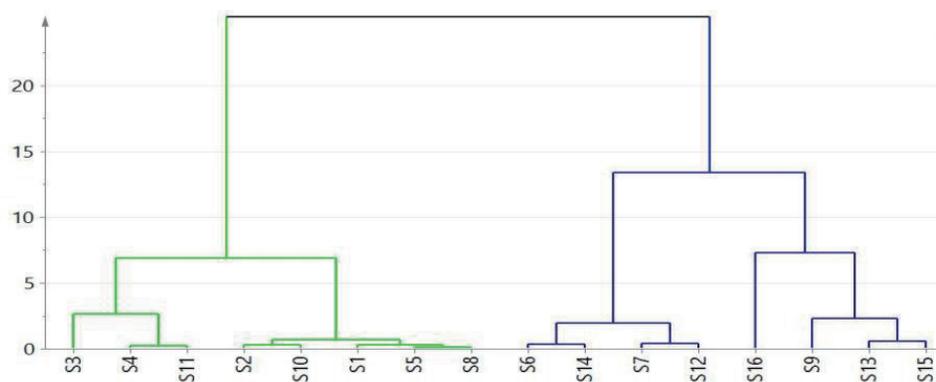


图 2 16 批肉豆蔻挥发油样品中 6 个成分含量的聚类树状图 (HCA)

2.6 挥发油抗炎活性研究

Raw264.7细胞使用90% DMEM高糖培养基+10%胎牛血清, 5%CO₂、37℃条件下培养, 生长至80%融合时进行传代。取处于对数增长期的Raw264.7细胞, 制成单细胞悬液, 调整细胞密度为 5.6×10^5 个/mL接种于96孔板中, 每孔100 μ L。置于细胞培养箱中24 h后, 基于前期预试验及文献, 分为空白组、模型组、药物干预组, 空白组加等量PBS, 模型组以终浓度100 ng·mL⁻¹ LPS干预细胞诱导建立炎症模型; 药物干预组(S1~S16)分

别为终浓度100 ng·mL⁻¹ LPS+15 μ g·mL⁻¹各批次挥发油(以挥发油之质量计)。24 h后使用一氧化氮(NO)测定试剂盒检测上清液中NO含量。试验数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 统计显著性检验分析采用Graphad 10.3软件, 多样本比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义, 结果见表6。与空白组相比, 模型组NO含量显著升高($P < 0.01$); 与模型组相比, 各批次挥发油均可显著降低NO分泌量, 其中广西产地的S4、S8样品以及巴西产地的S10样品抗炎效果更佳。

表6 肉豆蔻挥发油LPS诱导的Raw264.7细胞NO分泌量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	NO分泌量 / (mmol·L ⁻¹)	组别	NO分泌量 / (mmol·L ⁻¹)
空白组	1.130 ± 0.161	模型组	9.930 ± 0.797**
S1	8.187 ± 0.412 ^{##}	S9	8.007 ± 0.117 ^{##}
S2	7.670 ± 0.728 ^{##}	S10	6.757 ± 0.600 ^{##}
S3	7.927 ± 0.522 ^{##}	S11	7.483 ± 0.283 ^{##}
S4	7.017 ± 0.356 ^{##}	S12	8.657 ± 0.155
S5	9.162 ± 0.370	S13	7.770 ± 0.2762 ^{##}
S6	8.080 ± 0.521 ^{##}	S14	7.407 ± 0.0750 ^{##}
S7	7.927 ± 0.367 ^{##}	S15	7.667 ± 0.167 ^{##}
S8	7.303 ± 0.351 ^{##}	S16	7.560 ± 0.080 ^{##}

注: ** $P < 0.01$, 与空白组比较; ^{##} $P < 0.01$, 与模型组比较。

2.7 挥发油主成分含量-药效关联分析

将上述16批次肉豆蔻挥发油样品中6个成分含量设为自变量 X , NO含量为变量 Y , 采用SIMCA 14.1软件进行正交偏最小二乘法判别分析(Orthogonal Partial Least Squares, OPLS)和S-plot分析, OPLS分析结果如图3所示, 变量重要性投影(Variable Importance in Projection, VIP)值见表7。将16批次挥发油的定量数据和抗NO药效指标数据导入SPSS 25.0分析软件, 然后采用Pearson分析相关性。以6个成分含量为自变量, 药效指标为

变量, 计算6个成分含量与药效指标之间的Pearson相关系数, 结果见表7, 抗炎活性与6个成分含量具有一定的相关性, 4-萜烯醇、 α -蒎烯、甲基丁香酚、榄香素与药效呈正相关, 黄樟素、肉豆蔻醚与药效呈负相关, 其中甲基丁香酚、榄香素、肉豆蔻醚与药效相关系数较大, 而榄香素对抗炎贡献最多(相关系数最大), 但以上6个成分含量与药效相关性均不显著。由VIP可知, 黄樟素、肉豆蔻醚峰值对其抗炎作用影响最显著(VIP>1)。

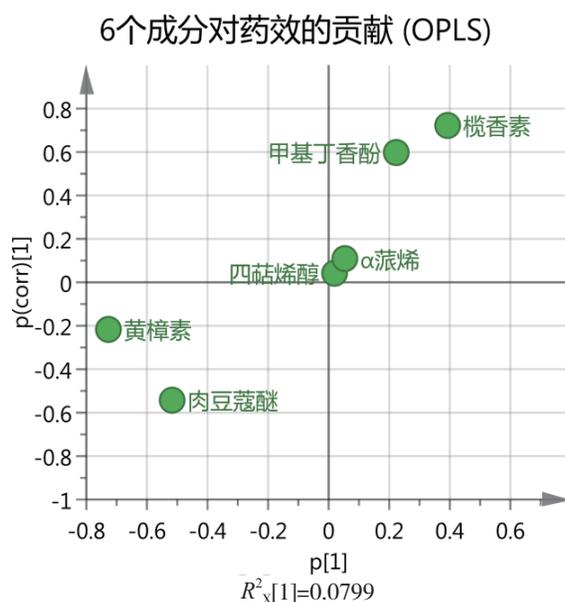


图3 挥发油主成分含量 - 药效关联分析的 OPLS 图

表7 6个成分含量与药效指标的 Pearson 相关系数及 VIP 值

成分	Pearson 相关系数	P 值	VIP 值
4-萜烯醇	0.027	0.922	0.075
α -蒎烯	0.046	0.867	0.174
甲基丁香酚	0.274	0.304	0.209
榄香素	0.308	0.246	0.373
黄樟素	-0.097	0.721	1.232
肉豆蔻醚	-0.238	0.376	2.065

2.8 6个成分抗炎活性研究

Raw264.7细胞使用90% DMEM高糖培养基+10%胎牛血清, 5%CO₂、37℃条件下培养, 生长至80%融合时进行传代。取处于对数增长期的Raw264.7细胞, 制成单细胞悬液, 调整细胞密度为 5.6×10^5 个/mL接种于24孔板中, 每孔500 μ L。置于细胞培养箱中24 h后, Raw264.7细胞以 5.6×10^5 个/mL接种于24孔板, 每孔500 μ L培养24 h, 基于前期预试验及文献, 分为空白组、模型组和药物干预组。其中空白组加等量PBS, 模型组加入LPS进行干预, 干预终浓度为100 ng \cdot mL⁻¹, 药物干预组在加入LPS溶液后, 分别加入终浓度为50

μ mol \cdot L⁻¹的6个成分, 24 h后使用Elisa测定试剂盒、NO测定试剂盒检测上清液中IL-1 β 和NO的水平。结果见表8、表9。与空白组相比, 模型组IL-1 β 含量显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 4-萜烯醇、肉豆蔻醚、甲基丁香酚、榄香素、黄樟素显著抑制IL-1 β 的分泌 ($P < 0.01$), 与空白组相比, 模型组NO的分泌量显著升高 ($P < 0.01$), 与模型组相比, 4-萜烯醇、甲基丁香酚、榄香素、黄樟素显著抑制NO的分泌 ($P < 0.01$)。表明以上成分通过抑制LPS诱导的Raw264.7巨噬细胞中炎症细胞因子的过度表达发挥抗炎作用。

表8 6个单体成分对LPS诱导的Raw264.7细胞IL-1 分泌量的影响 pg · mL⁻¹

空白组	模型组	药物干预组					
		α-蒎烯	4-萜烯醇	肉豆蔻醚	甲基丁香酚	榄香素	黄樟素
15.07 ± 0.8497	17.38 ± 0.4753 ^{###}	15.83 ± 0.1796	14.87 ± 0.8821 ^{**}	14.07 ± 0.6940 ^{**}	14.09 ± 0.2159 ^{**}	13.79 ± 0.4521 ^{**}	14.95 ± 0.1829 ^{**}

注：与空白组相比，^{###}*P* < 0.01；与模型组相比，^{*}*P* < 0.05，^{**}*P* < 0.01。

表9 6个单体成分对LPS诱导的Raw264.7细胞NO分泌量的影响 mmol · L⁻¹

空白组	模型组	药物干预组					
		α-蒎烯	4-萜烯醇	肉豆蔻醚	甲基丁香酚	榄香素	黄樟素
1.625 ± 0.07813	16.16 ± 0.1353 ^{###}	15.35 ± 0.2511 [*]	14.88 ± 0.1966 ^{**}	15.95 ± 0.1966	14.42 ± 0.3713 ^{**}	11.65 ± 0.4130 ^{**}	1.34 ± 0.0902 ^{**}

注：与空白组相比，^{###}*P* < 0.01；与模型组相比，^{*}*P* < 0.05，^{**}*P* < 0.01。

3 讨论

3.1 定量成分的筛选

前期课题组通过GC-MS/MS法对肉豆蔻挥发油成分进行定性分析，经NIST质谱数据库对照分析，结合文献^[18-19]，共鉴定出20个成分，主要为α-蒎烯，3-蒎烯，D-柠檬烯，桉烯，4-萜烯醇，α-松油醇，胡椒烯，黄樟素，甲基丁香酚，甲基异丁香油酚，肉豆蔻醚，榄香素，肉豆蔻酸，并筛选出峰面积值较高的成分α-蒎烯、4-萜烯醇、黄樟素、甲基丁香酚、肉豆蔻醚、榄香素进行后续定量分析。

3.2 CO₂超临界提取肉豆蔻挥发油的优点

挥发油提取方法目前主要采用水蒸气蒸馏法、微波辅助水蒸气蒸馏法、冷榨法和CO₂超临界萃取法。据文献^[20]报道，肉豆蔻挥发油采用传统水蒸气蒸馏法提取的收率为5.23%，微波辅助水蒸气蒸馏法的收率为4.53%，冷榨法的收率为1.00%，CO₂超临界萃取收率最高为6.78%。CO₂超临界萃取技术的优点主要包括萃取温度低，可以有效防止受热易分解成分的损失，且CO₂价格便宜，可循环使用，同时萃取的能耗低，可极大地降低生产成本。本试验采取的超临界CO₂流体萃取肉豆蔻挥发油的提取率为25.42%~42.00%，其中广东、广西地区的肉豆蔻醚和黄樟素的含量较高达到35%以上，不同批次不同产地肉豆蔻质量分布没有典型地域特征。

3.3 6个成分药效分析及GC-MS方法优化

肉豆蔻中挥发油成分具有调节心脑血管和神经系统的作用。研究^[21]表明榄香素、α-蒎烯^[22]和肉豆蔻醚通过调控巨噬细胞炎症模型分泌COX-2、iNOS、PGE2或TNFα等炎症因子的水平发挥抗炎免疫调节作用^[23]；甲基丁香酚可下调I/R肠缺血/再灌注(I/R)大鼠TNF-α IL-6炎症因子表达，通过抑制PI3K/Akt信号通路减轻肝脏缺血再灌注损伤诱导的肝损伤、炎症反应和凋亡^[24]，而文献^[25]报道细辛中的主要成分黄樟素（占比64.74%）表现出较强的抗炎活性，NO的生成抑制率为（53.14 ± 1.6）%，但细胞存活率仅为（66.87 ± 1.5）%，可能是由于黄樟素毒性的作用。α-蒎烯、4-萜烯醇、甲基丁香酚、榄香素、黄樟素、肉豆蔻醚等均为肉豆蔻挥发油主要的次生代谢产物，不同产地含量差别较大，具有特异性，可作为其挥发油的质量参考^[12]。

对于本试验建立的16批次肉豆蔻挥发油处理LPS诱导的Raw264.7巨噬细胞炎症模型，课题组前期设定不同的LPS造模浓度（10、50、100、200、500、1000、5000 ng · mL⁻¹）干预Raw264.7巨噬细胞建立炎症模型，最终根据NO分泌量及文献^[26]所得常用剂量及病理条件下人体血清中LPS含量，定为100 ng · mL⁻¹；课题组前期测定不同浓度肉豆蔻挥发油萃取物（7.1825、15.625、31.25 μg · mL⁻¹）对NO分泌的影响，NO分泌量分别为

(0.71 ± 0.53)、(1.06 ± 0.10)、(1.34 ± 0.30) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最终选择肉豆蔻挥发油终浓度为 $15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。对于6个成分的抗炎活性研究, 课题组前期采用终浓度分别为12.5、25、50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的6个单体成分干预Raw264.7巨噬细胞建立炎症模型, 并通过检测NO分泌量观察不同单体浓度对该模型的影响。结果表明空白组和模型组的NO分泌量分别为(0.42 ± 0.0000)、(18.12 ± 0.6505) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 以上不同浓度的6个成分平均NO分泌量分别为(11.21 ± 0.3376)、(10.66 ± 0.2404)、(2.040 ± 0.1046) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 因此最终选用单体成分的终浓度为50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

本试验建立了GC-MS/MS法定量分析CO₂超临界提取肉豆蔻挥发油中6个成分的方法, 为了使6个成分具有良好的分离度和合适的保留时间, 在柱温的考察中曾使用50~280℃的程序升温, 但发现250℃以后基本没有峰, 因此选用50~250℃的程序升温; 在溶剂的考察中比较了甲醇、正己烷溶剂的溶解效果, 正己烷溶剂的溶解度大于甲醇, 因此选用正己烷作为溶剂。结果表明4-萜烯醇、 α -蒎烯、甲基丁香酚、榄香素、黄樟素、肉豆蔻醚的含量分别为4.674~12.432、2.316~11.121、0.201~4.653、1.047~10.488、201.776~402.163、7.888~39.570 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 其方法简便、准确, 重复性好。

3.4 毒性成分分析

肉豆蔻醚和榄香素具致幻作用, 人服用7.5 g肉豆蔻粉即可引起眩晕乃至谵妄与昏睡, 其机制可能为肉豆蔻醚和榄香素代谢为具有兴奋神经系统作用的3-甲氧基-4,5-甲氧基-5-苯乙胺。研究^[12]发现对吸入肉豆蔻精油1 mL的小鼠2.0 h后进行活性成分鉴定得知, 肉豆蔻醚、黄樟醚血药浓度可达7.1、1.28 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 含量较高, 故推测以上成分具有毒性。而肉豆蔻挥发油中大量的黄樟素和肉豆蔻醚既是有效成分也是有毒成分。谱效关系分析显示, 抗炎活性与6个成分含量具有一定的相关性, 其中4-萜烯醇、 α -蒎烯、甲基丁香酚、榄香素与药效呈正相关, 两种报道有毒性的成分黄樟素、肉豆蔻醚与药效呈负相关, 甲基丁香酚、榄香素对抗炎活性贡献率较高。6个单体成分均能抑制NO和IL-1 β 的分泌, 因此在实际生产中不仅要肉豆蔻的挥发油提取率和有效含量进行评价, 对毒效成分黄樟素、肉

豆蔻醚也需要限定适宜的的含量范围, 提高其安全性和有效性。

本试验通过对肉豆蔻中主要挥发性成分的定量分析及其量效关系考察来评价不同产地肉豆蔻挥发油的质量差异, 肉豆蔻的抗炎活性是多成分协同作用, 未来还需要关注肉豆蔻的毒效阈值, 各成分协同比例, 对其毒理学进行探讨, 为其临床中毒救治、合理应用提供依据。

参考文献:

- [1] 何乌云嘎, 王秀兰, 阿润. 肉豆蔻在中、蒙医药中的应用及药理作用概况[J]. 北方药学, 2023, 20(7): 193-196.
- [2] 赵祥升, 黄立标, 杨海建, 等. GC法同时测定肉豆蔻中丁香酚、异丁香酚、肉豆蔻醚和榄香素的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1569-1573.
- [3] 马存, 冼少华, 相雨, 等. 肉豆蔻药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2017, 19(8): 1200-1206.
- [4] 田卉玄, 杨瑞琦, 邹慧琴, 等. 电子鼻与HS-GC-MS技术快速鉴别肉豆蔻霉变过程中气味变化及其物质基础[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(22): 5853-5860.
- [5] 黄盼, 周改莲, 王倩, 等. 基于主成分和聚类分析评价国产不同批次肉豆蔻挥发油的质量[J]. 现代食品科技, 2020, 36(5): 310-318.
- [6] 张爱武, 刘乐乐, 何学敏, 等. 肉豆蔻化学成分与药理活性的研究进展[J]. 内蒙古医科大学学报, 2014, 36(1): 85-88.
- [7] 方爱娟, 徐凯节. 肉豆蔻的化学成分及生物活性研究进展[J]. 中国药业, 2013, 22(15): 113-115.
- [8] 王莹, 杨秀伟. 印度尼西亚产肉豆蔻挥发油成分的GC-MS分析[J]. 中华中医药杂志, 2007(9): 603-606.
- [9] 黄立标, 冯锦东, 王德立, 等. 海南产肉豆蔻叶挥发油及其主要成分动态变化研究[J]. 中成药, 2010, 32(12): 2126-2130.
- [10] 马可, 南星梅, 赵婧, 等. 肉豆蔻的药理和毒理作用研究进展[J]. 中药药理与临床, 2022, 38(1): 218-224.
- [11] Hattori M, Yang XW, Miyashiro H, et al. Inhibitory Effects of Monomeric and Dimeric Phenylpropanoids from Mace on Lipid Peroxidation *in Vivo* and *in Vivo*[J]. Phytotherapy Research, 2010, 7(6): 395-401.

- [12] 刘润润, 孙爱清, 于小钧, 等. 肉豆蔻化学成分和药理作用研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测分析[J]. 中草药, 2023, 54(14): 4682-700.
- [13] 韩梅, 侯雪, 贺光云, 等. 气相色谱-串联质谱法测定生姜中的黄樟素[J]. 现代食品科技, 2021, 37(1): 292-297.
- [14] 张苏慧, 廖良坤, 魏晓奕, 等. 超临界CO₂萃取斜叶黄檀精油工艺优化及精油成分分析[J]. 热带作物学报, 2018, 39(4): 791-796.
- [15] Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, et al. Cytotoxic Activity of Essential Oils from Labiatae and Lauraceae Families Against *in Vitro* Human Tumor Models[J]. Anticancer Res, 2007, 27(5a): 3293-3299.
- [16] 王立英, 王艳珍, 吴丽艳, 等. 响应面法优化超临界CO₂萃取决明子挥发油工艺及其抑菌活性研究[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(4): 594-601.
- [17] 赵启苗, 王远志, 贾天柱. HPLC测定长形肉豆蔻及其不同炮制品挥发油中甲基丁香酚、异甲基丁香酚及黄樟醚含量[J]. 中成药, 2009, 31(5): 801-802.
- [18] 王锐, 潘贝, 赵华伟, 等. 肉豆蔻挥发油β-CD包合物GC-MS成分分析及其抗抑郁活性物质研究[J]. 世界中医药, 2018, 13(4): 785-789.
- [19] 杨瑞琦, 李佳慧, 陈慧荣, 等. 肉豆蔻药材霉变前后挥发油成分的GC-MS分析[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(10): 4812-4815.
- [20] 李力, 潘倩雯, 郭偲, 等. 不同方法提取肉豆蔻挥发油成分的气相色谱-质谱法分析[J]. 医药导报, 2019, 38(12): 1630-1640.
- [21] Wang YT, Zhu L, Zeng D, et al. Chemical Composition and Anti-inflammatory Activities of Essential Oil from *Trachydium Roylei*[J]. J Food Drug Anal, 2016, 24(3): 602-609.
- [22] Kim DS, Lee HJ, Jeon YD, et al. Alpha-Pinene Exhibits Anti-Inflammatory Activity through the Suppression of MAPKs and the NF-κB Pathway in Mouse Peritoneal Macrophages[J]. Am J Chin Med, 2015, 43(4): 731-742.
- [23] Qiburi Q, Temuqile T, Baigude H. Synergistic Regulation of Microglia Gene Expression by Natural Molecules in Herbal Medicine[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, ID9920364.
- [24] Wang M, Zhang J, Zhang J, et al. Methyl Eugenol Attenuates Liver Ischemia Reperfusion Injury Via Activating PI3K/Akt Signaling[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 99, ID108023.
- [25] Minh PTH, Tuan NT, Van NTH, et al. Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of Four *Asarum* Species Growing in Vietnam[J]. Molecules, 2023, 28(6): 2580-2592.
- [26] 罗进芳, 朱瑞丽, 易浪, 等. 青藤碱对LPS、IL-4诱导的小鼠RAW264.7巨噬细胞极化的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(1): 56-60.

(收稿日期 2024年6月5日 编辑 郑丽娥)