

水蛭中小分子活性成分的 GC-MS研究

黄荣清, 骆传环, 彭江南, 李艳玲*, 张宁, 杨文财**, 梁晓东, 孙晓东***

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

水蛭是传统中药, 俗称蚂蝗, 全世界共有 300 多种, 我国分布有 62 种。国外对水蛭的研究一直非常活跃, 从水蛭中得到了多种活性多肽如能强烈抑制胰蛋白酶、纤维蛋白酶的 bdellins, 抑制弹性硬蛋白酶、组织蛋白酶的 eglins 及 hirustasin, hementin, kallin, hyaluronidase, collagenase 等^[1-6], 目前对水蛭活性成分的研究仍在进行。本实验通过对国内外文献的仔细分析, 根据传统中医应用水蛭要经过炮制、煎煮等特点, 提出水蛭 *Whitmania pigra* Whitman 中含有经口服有效的、较稳定的、小分子抗凝血活性成分, 并通过试验证实了这一观点。我国应用水蛭已有上千年的历史, 《神农本草经》中谓其“味咸平, 主逐恶血、瘀血、月闭, 破血瘀积聚, 无子, 利水道”。《中华人民共和国药典》记载为水蛭科动物蚂蝗 *W. pigra* Whitman 水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 或柳叶蚂蝗 *W. acranulata* Whitman 的干燥体。据对我国 9 省市商品水蛭药材的调查及品种鉴定, 可以认证 95% 以上属于蚂蝗, 其色谱行为、蛋白电泳图谱也表明目前国内使用的水蛭以蚂蝗为主流商品。水蛭性味苦、咸, 归肝、膀胱经, 有破血、逐瘀、通经的功能, 主治癫痫、痞块、血瘀经闭、跌打损伤等症。在治疗多种因瘀血所致的疾病中疗效确切, 适应症涉及心脑血管、肝肾和血液病变、男科妇科疑难症、外伤疼痛及呼吸、神经系统和癌症。现代药理研究表明: 水蛭能扩张脑血管, 降低脑血管的阻力, 增加脑血流量; 能扩张毛细血管, 解除小动脉痉挛, 改善微循环; 有抗凝、纤溶作用, 能降低红细胞压积、全血比粘度和红细胞电泳时间, 抑制血小板聚集; 能降低血脂, 减轻动脉内膜斑块形成和抗血栓作用; 改善局部血液循环, 减少炎症渗出, 促进其吸收的抗炎作用。水蛭化学成分主要含蛋白质, 此外含有十几种氨基酸和 Zn, Mn, Fe, Co, Cr, Se, Mo, Ni 等多种微量元素。国外对水蛭进行了长时间深入的研究, 发现了水蛭素等活性多肽, 目前水蛭及水蛭素是国际抗凝血药物研究的热点之一。在新鲜水蛭唾腺

中含有抗凝血物质水蛭素, 以及肝素、抗血栓素及组胺样物质。不同种水蛭分离出活性成分是不相同的, 大致可分为两大类: 一类是直接作用于凝血系统的成分, 包括凝血酶抑制剂, 以及其它抑制血液凝固的物质, 这或许就是水蛭活血化瘀的物质基础。二类是其它蛋白酶抑制剂及其它活性成分。

本实验应用 GC-MS 技术, 分析鉴定了水蛭中有很强的抗凝血活性提取物中的 15 个化合物, 主要为不饱和脂肪酸甲酯、甾体等。

1 实验部分

1.1 仪器: 美国惠普 HP5890/5970A 型气相色谱仪-质谱联用仪, HP59970 化学工作站, NMS 检索库。Ultra-2 (交联甲基硅酮) 弹性石英毛细管柱 (25 m × 0.20 mm, 0.33 μm)。

1.2 材料: 水蛭 *W. pigra* Whitman 粗粉经甲醇提取后, 提取物用不同极性的有机溶剂萃取, 提取物按极性大小分为 4 个部分, 各部分分别进行抗凝血试验, 结果脂溶性部分 I 表现有较强的抗凝血活性。I 部分经柱色谱分离, 得到一个组份 (Fr. 1), Fr. 1 部分用气质联用技术分析鉴定。

1.3 测试条件: 气相测试条件, 程序升温 140 °C 以 4.0 °C/min 至 260 °C, 保持 8 min, 5 °C/min 升温至 285 °C, 载气为高纯氦。质谱条件: 电子轰击 (EI), 电子能量 70 eV, 进样口温度 260 °C, 传输线温度 280 °C, 离子源温度 250 °C, 电子倍增器电压: 2 400 V, 扫描范围 35~450 amu。

2 结果与讨论

水蛭的 Fr. 1 组份经 GC-MS 分析鉴定, 通过 NBS 的质谱数据系统检索, 并核对质谱标准图谱, 鉴定了 15 个化合物, 各成分的相对百分含量按峰面积归一化法计算得到, 结果见表 1。Fr. 1 组份主要为不饱和脂肪酸甲酯、甾体等。以上的化学成分的研究和正在进行的药理实验为中药水蛭的临床应用提供了科学依据, 为筛选有强抗凝血活性的、较稳定的抗凝血的药物奠定了基础; 同时也为动物中药活性成

收稿日期: 2002-12-10

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 2977209, 29905005, C030502500, 北京市自然科学基金 (No. 7002029)

* 河南中医学院硕士研究生 ** 江西医药学校实习生 *** 第一军医大学实习生

分的研究积累了技术经验

表 1 水蛭 Fr. 1 组份的化学成分及相对含量

Table 1 Chemical constituents and relative content of Fr. 1 from *W. pigra*

峰号	化 学 成 分	相对含量 %
1	己醛	4.50
2	4-甲基十四烷酸甲酯	2.95
3	12-甲基十四烷酸甲酯	3.19
4	11-十六碳烯酸甲酯	2.40
5	14-甲基十五烷酸甲酯	7.05
6	11-甲基十六烷酸甲酯	2.10
7	14-甲基十六烷酸甲酯	4.20
8	十七烷酸甲酯	2.33
9	13-十八碳烯酸甲酯	8.27
10	十八烷酸甲酯	4.01
11	10-十九烯酸甲酯	3.65
12	13-二十二烯酸甲酯	7.67
13	2-乙酰氧基-7,9-十九烯酸甲酯	6.75
14	胆固醇	11.57
15	胆甾-5,7-二烯-3-酮	6.90

References

[1] Ou X C. General discussion about effective constituents of activating blood circulation in *Whitmania pigra* Whitman [J]. *China J Basic Med Tradit Chin Med* (中国中医基础医学杂志), 1997, 4(2): 60-61.

[2] Zhang H Z, Dong M H, Zhang H Z. Study on anticoagulant and fibrinolytic activities *in vitro* of actives in *Whitmania pigra* Whitman [J]. *Hubei Coll Tradit Chin Med* (湖北中医学院学报), 2002, 4(2): 31-32.

[3] Hu C, Chen C. Modern clinical study and application of *Whitmania pigra* Whitman [J]. *J Chin Mater Med* (中药材), 2000, 23(4): 239-240.

[4] Liu Z L, Pan J F, Dong C H. Pharmacological effect and clinical application of *Whitmania pigra* Whitman [J]. *Lishizhen Med Mater Med* (时珍国医国药), 2002, 13(6): 376-378.

[5] Zhai M. Applied general discussion in cardiovascular and cerebrovascular disease of *Whitmania pigra* Whitman [J]. *Shandong J Tradit Chin Med* (山东中医杂志), 2000, 19(11): 698-699.

[6] Li Y H, Sha H L. Modern study and clinical application of fresh *Whitmania pigra* Whitman [J]. *Heilongjiang J Tradit Chin Med* (黑龙江中医药), 2000(3): 64.

雀儿舌头化学成分及晶体结构再研究

廖新成, 郁有祝, 陈晓岚, 卢建莎, 屈凌波, 赵玉芬

(郑州大学 化学生物学重点实验室, 河南 郑州 450052)

雀儿舌头系大戟科黑钩叶属, 为一年生草本植物, 辛温, 具有理气止痛之功, 用于治疗胃痛、腹泻下痢等, 民间还用来治疗黄疸、胃炎、水肿等多种疾病^[1,2]。在河南汝州用来治疗癌症。我们观察到雀儿舌头的乙醇提取物和水提取物对食管癌 Eca-109 细胞株体外有较强的抑制作用。为了深入研究其药用价值, 对其进行了化学成分的提取分离和结构测定的研究工作, 首次从雀儿舌头中分离出 6 个化合物, 经过理化常数测定和光谱、波谱学研究, 前文已确定其化合物分别是 α -羟基木栓烷-2-酮, 作为植物生长调节剂的三十烷醇、蔗糖^[3]以及 α 、 β -二羟基木栓烷 (friedelane- α 、 β -diol)、 β -谷甾醇。本文报道了从此植物中首次提取的另一化合物 β -谷甾醇-3-氧- β -D-葡萄糖苷 (β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside) 的提取过程, 另外首次给出了前文提出的 α -羟基木栓烷-2-酮的晶体结构及其重要参数。

1 仪器与材料

药材由河南省汝州外贸局提供, 河南医科大学药

学系潘成学鉴定。X-ray 结果由郑州大学分析测试中心测定。XRC 熔点测定仪 (日本岛津), 核磁共振测定仪 (Bruker-DTX-400), 质谱测定仪 (QP5000) (日本岛津); 硅胶 (青岛海洋化工厂), 乙醇、石油醚、无水乙醚、醋酸乙酯、正己烷、氯仿皆为分析纯。

2 提取与分离

将粉碎后的 5 kg 生药 (全草) 用 95% 医用酒精浸泡两周, 回收乙醇, 浸膏依次用石油醚、无水乙醚、醋酸乙酯萃取。取醋酸乙酯萃取部分浸膏 20.8 g 拌硅胶上柱, 用氯仿-醋酸乙酯-甲醇 (5:4:1) 洗脱, 得白色粉末 (I)。取部分石油醚萃取部分, 硅胶色谱分离, 首先用石油醚-醋酸乙酯 (10:1) 洗脱, 收集合并 38-42 号收集瓶流份, 再重上硅胶柱, 用正己烷-醋酸乙酯 (4:1) 为洗脱剂, 得无色棒状晶体 (II)。

3 鉴定

化合物 I: 白色粉末, C₃₅H₆₀O₆, mp 290 °C, Liebermann-Burchard 反应呈阳性。其 EI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 数据与文献报道部分数据相比

收稿日期: 2002-11-15

基金项目: 河南省自然科学基金和留学人员基金资助

作者简介: 陈晓岚 (1964-), 女, 河南郑州人, 副教授, 留学于英国 READING 大学化学系, 主要从事天然药物化学教学和科研工作, 已在国内外发表文章 20 多篇。