

2.3 产物蜂毒肽的生化性质鉴定

2.3.1 纯度测定:按文献方法^[6],分别作产物蜂毒肽及蜂毒的十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺电泳,电泳的结果显示:产物蜂毒肽为一条带,蜂毒有5条明显的条带。

2.3.2 等电点测定:按文献方法^[6],用两性载体 Ampholine (pH4~11)作产物蜂毒肽的凝胶等电聚焦电泳,测得其等电点为10.5。

3 讨论

蜂毒肽是一种含有26个氨基酸的小分子多肽,是蜂毒中的最主要毒性成分,生物活性强,尤其是具有很强的溶血活性;含量高,约占蜂毒干重的50%;属强碱性疏水性多肽,具可逆性的油水两亲性,对生物膜具有特定的作用,已广泛地用作为膜研究的工具药和临床用药的前期实验研究。同时,蜂毒中还含有多个其它小分子的多肽,因此,蜂毒肽的分离提纯一直是众多学者关注的问题^[1~3],本研究利用蜂毒肽的油水两亲性和其分子结构中不含巯基及双硫

键^[1],进行溶媒萃取和化学裂解处理,同时利用其在浓度高时常以四聚体形式存在^[1],因而采用在含4 mol/L 脲(使蜂毒肽的四聚体解散)与不含4 mol/L 脲的两种不同情况的缓冲液系统中进行凝胶过滤柱层析,虽然整个分离纯化的条件要求不高,但达到了较为理想的分离提纯,所获产品的纯度和得率均较高,生物活性没受影响,因此,本课题所设计的从蜂毒中获取蜂毒肽的分离纯化工艺路线,可以在国内中小企业中采用。

参考文献

- 1 陈远聪,袁士龙. 毒素的研究与利用. 北京:科学出版社,1988:128
- 2 Kreil G. FEBS LETTERS,1973;241
- 3 Yves M, Urs B, Bernard W F, et al. Analytical Biochemistry, 1982;61
- 4 法祥光,甘午君,李会元,等. 中华血液学杂志,1984(2):132
- 5 徐 彭,欧阳永伟,黄敬耀,等. 中草药,1996,27(9):542
- 6 莽克强,徐乃正,方荣祥,等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 北京:科学出版社,1975:26,81

(2000-06-15 收稿)

荆芥及其相关药材挥发油的成分研究

南京中医药大学(210029) 吴玉兰* 丁安伟 冯有龙

摘 要 采用薄层色谱、气-质联用等方法对荆芥及其相关药材防风、薄荷、紫苏、广藿香、海州香薷等药材挥发油含量及其中所含的主要化学成分进行分析比较,研究其化学稳定性,为药材的鉴别提供依据。

关键词 挥发油 TLC GC-MS 联用

荆芥为传统中医常用的解表药,具有解表散风、透疹等功效,荆芥挥发油为其主要活性成分之一。药理实验表明,荆芥挥发油具有镇痛、抗炎、扩张支气管和抗过敏等作用^[1],我们认为荆芥挥发油含量及其成分分析应作为药材质量评价和控制的重要指标之一。

为了考察荆芥挥发油的稳定性,我们将1984年所提荆芥挥发油与新提挥发油进行TLC及GC-MS分析比较,以研究其主要成分的变化情况。本文还对防风、薄荷、广藿香、紫苏、海州香薷等5种药材的挥发油成分及含量进行了研究。这些药材或常与荆芥复方配伍,或挥发油中所含主要成分与荆芥相近,或与荆芥外形易混淆。通过比较研究,找出其间主要差异,为上述药材鉴别及质量控制提供依据。

1 供试药材

荆芥:为唇形科植物荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* Briq. 的干燥地上部分,切成3~4 mm小段,产地江苏。

防风:为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischkde 的干燥根,切成2~3 mm厚的圆片,产地黑龙江。

薄荷:为唇形科植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 的干燥地上部分,切成5~6 mm的小段,产地江苏。

紫苏:为唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt 的干燥带嫩枝的叶,切成5~6 mm的小段,产地江苏。

广藿香:为唇形科植物广藿香 *Pogostemon ca-*

* Address: Wu Yulan, Nanjing University of TCM, Nanjing

blin Benth. 的干燥地上部分,切成 1~2 mm 的小段,产地广东。

香薷:为唇形科植物海州香薷 *Elseltzia pseud-cristata* levl 的干燥地上部分,切成 3~4 mm 的小段,产地安徽。

以上药材均购自南京市药材公司,并经本校陈建伟副教授鉴定。

2 仪器和试剂

WZS-1 型阿贝折光仪,上海分析仪器厂。Finnigan 4021 型气相色谱-质谱-计算机联用仪,美国 J&W 公司。薄层自动点样仪,瑞士 CAMAG 公司。UV-2401PC 型紫外扫描仪,日本岛津公司。胡薄荷酮标准品,购于美国 Aldrich 公司。硅胶 G₆₀薄层层析用,青岛海洋化工集团。

光谱分析实验中所用试剂为 GR 级,其余试剂均为 AR 级。

3 方法和结果

3.1 挥发油提取:采用药典法^[2]。各药材挥发油色泽及含量见表 1。

3.2 折光率测定:采用药典法^[2],各挥发油折光率测定值见表 1。

表 1 各样品挥发油含量及折光率比较

编号	挥发油样品	色泽	含量(%)	折光率(20℃)
1	荆芥(1984年提)	棕黄色	/	1.463 2
2	荆芥	淡黄色	0.2	1.468 2
3	防风	深黄色	0.07	1.446 5
4	薄荷	淡黄色	1.0	1.483 5
5	紫苏	亮黄色	0.7	1.478 4
6	广藿香	黄色	0.8	1.510 0
7	海州香薷	橘黄色	0.5	1.513 6

注:以上均为 5 次测定的平均值。

3.3 GC-MS 分析

3.3.1 样品:取荆芥挥发油(1984 年提)、荆芥挥发油、薄荷挥发油、海州香薷挥发油,分别配成 10% 的乙醚液供试。

3.3.2 GC-MS 条件:GC:OV-1701 毛细管柱,25 m;汽化室温度 270℃;柱温:初温 90℃,保持 1 min,以每分钟 3℃程序升温至 120℃,然后以每分钟 6℃升温至 180℃;载气为氦气,柱前压 98.066 5 kPa。MS:EI 源,离子源温度 250℃,电子能量 70 eV,发射电流 0.23 mA,倍增电压 1.2 kV。

气相色谱图(略)。经质谱分析和计算机检索,并查对标准图谱,得出各组分的化学结构和名称。结果见表 2~5。

在此基础上,对各挥发油样品主要成分进行分析比较,结果见表 6。

表 2 荆芥挥发油(1984 年提)主要化学成分

化合物名称	含量(%)	化合物名称	含量(%)
柠檬烯	2.36	四甲基环戊并环辛-3-烯醇	2.08
2-乙基-4-甲基-1-戊醇	1.95	马鞭草烯酮	1.28
薄荷酮	42.17	1,6-二甲基-氢化萘	0.46
异薄荷酮	7.74	1,2-环氧柠檬烯	0.48
香芹酮	0.45	2-壬烯醛	0.94
苜罗薄荷烯酮	1.11	3-十八烯醛	0.35
胡薄荷酮	28.77	2-十二烯醛	1.56
藏茴香酮	0.97	5,7-十二二烯	1.05
3,7-二甲基-1-辛醇	4.91	异牻牛儿醇	0.91
3,4-二甲基-2-戊酮	1.32		

表 3 荆芥挥发油主要化学成分

化合物名称	含量(%)	化合物名称	含量(%)
柠檬烯	0.61	藏茴香酮	0.67
间甲基环己酮	0.91	辣薄荷酮	0.73
苯甲醛	0.30	四甲基环戊并环辛-3-烯醇	0.30
乙酸-1-辛烯醇酯	0.36	石竹烯	0.30
反-1-羟基-2,8-孟二烯	0.42	马鞭草烯酮	1.33
薄荷酮	38.33	氧化石竹烯	2.73
异薄荷酮	5.45	广藿香醇	1.23
环熏衣草醛	0.67	桉油烯醇	0.30
香芹酮	2.79	雪松烯醇	0.42
藏茴香醇	0.48	三甲基-2-十五酮	0.67
胡薄荷酮	40.45		

表 4 薄荷挥发油主要化学成分

化合物名称	含量(%)	化合物名称	含量(%)
3-辛醇	3.29	辣薄荷烯酮	0.96
月桂烯醇	1.70	石竹烯	4.03
薄荷酮	8.18	马鞭草烯酮	5.72
异薄荷酮	1.57	1-甲基-氢化萘酮	1.48
环熏衣草醇	1.48	瓜菊醇酮	0.85
薄荷醇	14.97	乙酸-(羟基-薄荷酮)酯	0.74
柠檬醇	0.97	2,3-二甲基-4-氨基-1,3-己二烯	3.61
胡薄荷酮	16.59	氧化石竹烯	4.30
对-甲基-邻-烯丙基苯酚	1.91	氧化蛇麻烯	0.95
乙酸-薄荷酯	3.86	3-乙基-5-甲基-4-氯-苯甲醚	3.41
辣薄荷酮	7.72	檀香醇	2.61
6-羟基-辣薄荷酮	0.95	6,10,14-三甲基-2-十六酮	0.95
对-甲基-邻-乙酰基苯酚	1.17		

表 5 海州香薷挥发油主要化学成分

化合物名称	含量(%)	化合物名称	含量(%)
月桂烯	1.07	乙酸百里香酚酯	6.48
α-松油烯	1.09	石竹烯	1.11
邻-甲基异丙基苯	6.63	氧化石竹烯	0.96
γ-松油烯	1.28	α-蛇麻烯	0.98
松油-4-醇	1.72	氧化蛇麻烯	2.52
α-香柠檬烯	2.92	杜松烯醇	0.56
百里香酚	25.44	桉油烯醇	1.08
香荆芥酚	46.05		

3.4 TLC 分析

3.4.1 样品:A. 紫苏、B. 薄荷、C. 荆芥、O. 胡薄荷酮、D. 荆芥(1984 年提)、E. 防风、F. 广藿香、G. 海州香薷。

3.4.2 色谱条件:固定相:20 cm×20 cm 的硅胶 G

表6 各挥发油样品的主要化学成分

样品	含量大于10%的组分	含量为1%至10%的组分
荆芥挥发油 (1984年提)	薄荷酮 胡薄荷酮	柠檬烯 2-乙基-4-甲基-1-戊醇 异薄荷酮 葑罗薄荷烯酮 3,7-二甲基-1-辛醇 3,4-二甲基-2-戊酮 四甲基环戊并环辛-3-烯醇 马鞭草烯酮 2-十二烯醛 5,7-十二烯
荆芥挥发油	胡薄荷酮 薄荷酮	异薄荷酮 香芹酮 马鞭草烯酮 氧化石竹烯 广藿香醇
薄荷挥发油	胡薄荷酮 薄荷酮	3-辛醇 月桂烯醇 薄荷酮 异薄荷酮 环薰衣草醇 对-甲基-邻-烯丙基苯酚 乙酸-薄荷酯 辣薄荷酮 对-甲基-邻-乙酰基苯酚 石竹烯 马鞭草烯酮 1-甲基-氢化萘醌 2,3-二甲基-4-氨基-1,3-己二烯 氧化石竹烯 3-乙基-5-甲基-4-氯-苯甲醚 檀香醇
海州香薷挥发油	香荆芥酚 百里香酚	月桂烯 α-松油烯 邻-甲基异丙基苯 7-松油烯 松油-4-醇 α-香柠檬烯 乙酸百里香酚酯 石竹烯 氧化蛇麻烯 桉油烯醇

薄层板(厚 0.3 mm);展开剂:石油醚-乙酸乙酯=19:1,上行展开,展距 16 cm;上样:样品配成 10%的乙醚溶液,自动精确点样 2 μL;显色剂:香草醛试剂,加热显色。展开结果见图 1。

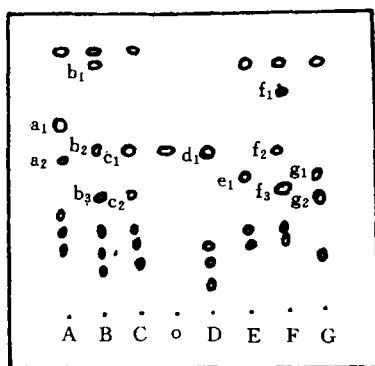


图1 各挥发油样品 TLC 图谱

各有关斑点 Rf 值及色泽如下:

a₁=0.65(紫), a₂=0.50(土黄); b₁=0.94(橙), b₂=0.58(紫红), b₃=0.43(棕黄); c₁=0.58(紫红), c₂=0.43(棕黄); d₁=0.58(紫红); e₁=0.52(蓝); f₁=0.85(蓝), f₂=0.62(蓝); f₃=0.53(红); g₁=0.56(紫), g₂=0.46(红)。

由图 1 可见,除荆芥挥发油(1984 年提)外,其余样品在 Rf=0.97 处均有一紫色斑点,且荆芥挥发

油(1984 年提)与新提荆芥挥发油的其余斑点亦有不同。薄荷、荆芥挥发油与胡薄荷酮标准品在相同的 Rf 值处可见色泽相同的斑点,此可作为上述药材与其他样品的鉴别因素之一。此外,紫苏的 a₁、a₂ 斑点,薄荷的 b₁、b₃ 斑点,防风的 e₁ 斑点,广藿香的 f₁、f₂、f₃ 斑点,以及海州香薷的 g₁、g₂ 斑点,均可视为各自的特征斑点而在与其他样品相鉴别时提供参考。

4 小结与讨论

本文测定了各挥发油样品的折光率,从折光率数值来看,新提荆芥挥发油与 1984 年所得荆芥挥发油折光率值较接近,而与其它挥发油样品相比差值较大。此外,还通过 TLC 分析,比较了各样品图谱及主要斑点的差异,并以胡薄荷酮标准品为对照,观察各样品中该成分的存在情况。实验结果显示,以石油醚-乙酸乙酯=19:1 为展开剂,能使荆芥及其相关药材挥发油均得到良好分离,并能将荆芥挥发油与其它样品挥发油较好地区分开来。以上结果可为荆芥及相关药材挥发油的鉴别提供依据。

各挥发油样品折光率及薄层色谱的差异,是由于化学成分的差异所致。我们选择了不同时间提取的荆芥挥发油、薄荷挥发油、海州香薷挥发油等 4 个样品进行 GC-MC 分析。结果表明,荆芥挥发油在放置了近 15 年后,其主要成分仍为薄荷酮和胡薄荷酮,但二者的相对含量发生了较大变化,特别是含双键的胡薄荷酮含量降低了许多,其它成分的变化也较明显,这些变化在药效学上的意义尚待进一步研究。其次,薄荷挥发油与荆芥挥发油相比,虽然二者均含薄荷酮和胡薄荷酮,但含量差异较大,且薄荷挥发油中含有特征成分薄荷醇,其含量高达 14% 以上,而该成分为在荆芥挥发油中未能检出。海州香薷挥发油的分析结果显示,其主要成分百里香酚和香荆芥酚,其他成分组成亦与荆芥挥发油明显不同。在江苏地区曾发现以海州香薷误作荆芥使用的情况,该二味药材除外形和气味的差异外,挥发油的差异应更为显著,以此作为荆芥真伪品种鉴别应属可行。

参考文献

1 江苏新医学院编. 中药大辞典. 上海:上海人民出版社,1977: 1553
2 中华人民共和国药典(一部). 1995:附录 62,45

(1999-06-11 收稿)