

青龙衣不同萃取部位化学成分 GC-MS 分析

曲中原^{1,2}, 邹翔^{1,2}, 管小玉^{1,2}, 陆婉^{1,2}, 季宇彬^{1,2*}

(1 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076;

2 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 研究青龙衣乙醇提取物氯仿和醋酸乙酯萃取部位的化学成分。方法 采用气质联用色谱法(GC-MS)对青龙衣乙醇提取物的氯仿和醋酸乙酯萃取部位进行分离测定,结合质谱数据库NIST98对分离的化合物进行结构鉴定,并应用色谱峰面积归一化法计算各成分的质数分数。结果 共分离出65种成分,确认了其中56种主要成分,氯仿部位萘醌类成分有3种,占5.00%;酯类3种,占3.78%;烷烃类19种,占69.26%。醋酸乙酯部位萘醌类成分4种,占3.25%;酯类6种,占32.49%;烷烃类7种,占10.62%;杂环化合物5种,占11.70%。结论 氯仿和醋酸乙酯萃取部位的化学成分分析结果有助于发现青龙衣的特征性成分,为针对性的提取分离化合物提供参考。

关键词:青龙衣;氯仿萃取部位;醋酸乙酯萃取部位;气相色谱-质谱

中图分类号:R284.1 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2010)10-1625-04

青龙衣为胡桃科核桃属植物胡桃楸 *Juglans mandshurica* Maxim. 和核桃 *J. regia* L. 的未成熟外果皮,味辛、苦、涩、平,具有清热解毒、祛风疗癣、止痛止痢的功效^[1]。主产于河北、山东、东北等地^[2]。现代药理研究表明青龙衣具有明显的抗肿瘤作用^[3],周媛媛等^[4]从青龙衣氯仿抗肿瘤活性部位,分到几个三萜类化合物和1个新的天然产物。课题组前期实验研究表明青龙衣醇提物的氯仿和醋酸乙酯萃取部位是抗肿瘤活性部位^[5],胡桃醌是青龙衣中有明确抗肿瘤作用的小分子萘醌^[6]。本实验运用GC-MS联用方法对青龙衣乙醇提取物氯仿和醋酸乙酯萃取部位的化学成分进行分析,有助于发现其特征性成分,对进一步阐明青龙衣的药效物质基础具有一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 仪器:Agilent 6890N 气相色谱 Agilent 5973N 质谱联用仪(美国安捷伦科技有限公司);KQ5200DB 型超声机(江苏省昆山市超声仪器有限公司);BS110S 型电子分析天平(北京赛多利斯天平有限公司);N-1000 型旋转蒸发仪(EYELA 上海爱朗仪器有限公司)。

1.2 药品及试剂:青龙衣药材均采于伊春,经作者鉴定为胡桃科胡桃属植物胡桃楸 *Juglans mandshurica* Maxim. 未成熟果实的干燥肉质果皮。乙醇、醋酸乙酯、氯仿、石油醚均为分析纯,水为双蒸水。

1.3 青龙衣萃取部位的制备:取青龙衣药材2.5 kg 粉碎过40目筛,加10倍量95%乙醇浸泡24 h 再超声提取30 min(100 kHz),滤过,药渣继续加10倍量95%乙醇热回流1 h;滤过,合并药液,减压浓缩(温度不超过40℃)药膏挥至无醇味,得浸膏233.7 g。加水适量使其混悬,依次用石油醚、氯仿、醋酸乙酯萃取,得氯仿层和醋酸乙酯层浸膏。

1.4 样品的处理:精确称取氯仿萃取浸膏0.050 0 g,醋酸乙酯萃取浸膏0.050 0 g,置于10 mL 量瓶中,加入氯仿溶解定容,摇匀,用0.45 μm 微孔滤膜滤过,进行GC-MS分析。

1.5 分析条件

1.5.1 色谱条件:HP-5 毛细管柱(5%甲基聚硅氧烷,30 m×0.32 mm,0.25 μm),气化室温度260℃,载气为氦气,柱流量1 mL/min,进样量1 μL,分流比30:1。起始温度为60℃,以20℃/min升温至200℃,再以5℃/min升温至280℃,保留5 min。GC-MS接口温度290℃。

1.5.2 质谱条件:电离源EI,电子能量70 eV,离子源温度230℃,扫描范围 m/z 30~550。

2 结果

从青龙衣乙醇提取物的氯仿和醋酸乙酯萃取部位的总离子流色谱中,氯仿层共计分离出33个峰。用气相色谱数据处理系统,以峰面积归一化法测得其中各组分的质量分数,对总离子流图中的各峰经质谱

①收稿日期:2010-05-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30600816);高等学校博士点学科点专项科研基金资助项目(20060240001)

作者简介:曲中原(1980—),女,黑龙江哈尔滨人,在读博士,讲师,研究方向为抗肿瘤药物研究。

Tel: (0451)84800922 E-mail: qiuqiuqu@163.com

* 通讯作者 季宇彬

扫描后得到质谱图,经过 NIST 质谱计算机数据系统检索,结合人工谱图解析,按各色谱峰的质谱裂片图与文献核对,对基峰、质荷比和相对丰度等方面进行直观比较,初步确认出其中 33 种化合物的可能结构,其中与质谱数据库匹配度在 90% 以上的有 22 个化合物,占氯仿萃取相的 25.95%,结果见表 1。化合物的定量采用总离子流色谱峰面积归一化法,计算各化学成分的质量分数。其中萘醌类(3 种)占氯仿萃取相的 5.00%;酯类(3 种)占氯仿萃取相的 3.78%;烷烃

类(19 种)占氯仿萃取相的 69.26%。
醋酸乙酯层共计分离出 32 个峰。初步确认出其中 25 种化合物的可能结构,其中与质谱数据库匹配度在 90% 以上的有 14 个化合物,占醋酸乙酯萃取相的 25.95%,结果见表 2。其中萘醌类(4 种)占醋酸乙酯萃取相的 3.25%;酯类(6 种)占醋酸乙酯萃取相的 32.49%;烷烃类(7 种)占醋酸乙酯萃取相的 10.62%;杂环化合物(5 种)占醋酸乙酯萃取相的 11.70%。

表 1 青龙衣氯仿萃取部位化学成分鉴定结果

Table 1 GC MS Data and identified compounds from chloroform acetate extract in bark of *J. mandshurica*

序号	化合物名称	质量分数/ %	相似度	序号	化合物名称	质量分数/ %	相似度
1	2 甲基-5 丙基壬烷	1.124	64	18	8-庚基十五烷	0.860	93
2	十五烷	2.066	93	19	胡桃醌	1.477	93
3	十六烷	1.307	97	20	1,5-萘二酚	1.924	94
4	2,6,10 三甲基十五烷	0.327	87	21	2,6-二甲氧基苯醌	2.966	40
5	十七烷	2.616	98	22	4-乙氧基苯甲醛	4.652	70
6	2,6,10,14 四甲基十五烷	3.705	99	23	1,4,5-三甲基萘	0.855	90
7	十八烷	0.493	96	24	己内酰胺	2.164	90
8	2,6,10,14 四甲基十六烷	0.458	91	25	4-[3-羟基 1-丙烯基]-2-甲氧基苯酚	4.287	94
9	菲	1.756	87	26	4-甲基-2,4-联二苯 1-戊烯	1.369	90
10	邻苯二甲酸二丁酯	1.814	72	27	1,7-二羟基萘	1.598	72
11	1-羟基-2-己基癸醇	0.622	72	28	环二十四烷	1.762	95
12	二丁酸乙酯	1.186	90	29	4-乙基十一烷	22.554	59
13	3-羟-4-甲氧苯甲醛	0.698	91	30	二十烷	2.510	91
14	香草醛	2.118	94	31	二十二烷	1.073	93
15	碘代十八烷	0.451	86	32	二十三烷	25.112	93
16	二十二烷	0.915	94	33	二十四烷	2.380	94
17	乙酸十八酯	0.775	64				

表 2 青龙衣醋酸乙酯萃取部位化学成分鉴定结果

Table 2 GC MS Data and identified compounds from ethyl acetate extract in bark of *J. mandshurica*

序号	化合物名称	质量分数/ %	相似度	序号	化合物名称	质量分数/ %	相似度
1	对二甲苯	0.569	91	17	1,4-萘二酮	0.302	90
2	丁内酯	1.177	90	18	3-羟基苯甲酸乙酯	2.654	95
3	2-己醇	1.850	43	19	胡桃醌	0.700	93
4	反-2,3-二甲基-环氧乙烷	4.244	37	20	3-羟基-4-甲氧基苯甲酸	4.171	95
5	乙烯乙基亚砷	10.484	38	21	α-D-乙基葡萄糖苷	1.425	74
6	3-羟基-4,4-二甲基-2-(3H)-呋喃酮	2.082	83	22	4-乙氧基苯甲醛	1.902	50
7	丁二酸单甲酯	5.067	83	23	甲基丙烯酸十二烷酯	8.123	91
8	2,5-吡咯环烷	1.297	90	24	1,2-苯甲醛	4.622	50
9	3-羟基-4-甲基-2-(3H)-呋喃酮	4.303	49	25	十七烷	0.674	91
10	丁二酸乙酯	14.574	83	26	1,5-萘二酚	1.496	91
11	壬基环丙烷	2.340	78	27	1,7-二羟基萘	0.748	80
12	2,5-二氢噻吩	1.640	80	28	十九烷	0.838	94
13	2,3-二氢噻吩	2.373	56	29	二十一烷	0.967	91
14	苹果酸	11.901	74	30	二十二烷	0.936	93
15	1,3-地西泮-2,4-二酮	4.451	80	31	二十四烷	0.622	91
16	3-乙酰基苯酚	0.569	86	32	邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯	0.899	86

3 讨论

本实验利用气质联用技术将气相色谱的分离功能和质谱的鉴定功能结合在一起的优点,以及庞大、

完善的谱库检索的优势,对青龙衣醇提物的氯仿和醋酸乙酯萃取部位中的化学成分进行初步定性定量
(下转第 1691 页)

藤、冬瓜仁、泻热、破瘀、散结、消肿为主,辅以金银花、地丁、败酱草清热解毒;大黄、蒲公英、薏仁、冬瓜仁清热利湿、排脓,共奏清热解毒、活血化瘀、消痈散结之功。中药药理表明,清热解毒药具有抑菌消炎作用,活血化瘀药能直接影响肠血流量及毛细血管通透性,减少炎症肿胀,抑制炎性肉芽肿形成,减轻出血及坏死等病例损害,通理攻下药有明显改善微循环,增强肠蠕动,防止肠麻痹,促进炎症消散。在治疗组或对照组内,每隔 3 天复查的白细胞计数和 CRP 的正常比例也在不断升高,与症状、体征的逐步消失是相一致的。但客观的炎症指标恢复正常时间要比主观感受的症状、体征消失时间早一些。另外,治疗组有 2 例而对照组有 18 例保守不成功而中转手术。指征经保守治疗效果不佳,脓肿反而增大,脓肿破溃引起腹膜炎需手术。

选用 CRP 和血常规检查作为阑尾脓肿病情转归的指标,从本组资料看来评价炎症反应方面,CRP 是一种有效的实验室参考指标。细菌感染的特征是发热,白细胞增高,以中性粒细胞增高为主,血沉快。但是小儿由于机体免疫力低下,对感染的反差能力差,临床表现往往不典型,有的反应不出来,缺乏特异性,给临床诊断带来一定困难。在炎症或急性组织损伤后,CRP 很快合成,并在 4~6 h 内迅速增

加,36~50 h 达到高峰,同时 CRP 的水平与组织损伤后修复的程度有密切关系,且不受性别、年龄、贫血、高球蛋白血症等因素影响,即使是患儿机体反应低下,常规检查正常时,CRP 也可以呈阳性,并随着感染的加重而升高。在表 2 和表 3 比较中,可以看出治疗组和对照组在第 3 天的 CRP 的正常比例没有同一天的白细胞高。第 6 天与第 3 天相比,两组的 CRP 和白细胞的差距已经较前缩小,说明病情在明显好转;CRP 的恢复正常时间与症状、体征的消失时间更接近,更贴近病情的变化。且在中转手术的病例中,CRP 要比白细胞计数提前出现异常升高情况,由此可见,CRP 测定不受抗生素和激素的影响,可直接反应机体的感染程度,使病症得到控制,炎症得到吸收,CRP 才恢复正常。动态观察血清 CRP 在治疗过程中水平的变化,结合血常规检验结果,可作为疾病转归和疗效观察的有益指标。

针对小儿阑尾脓肿的特点,中西医结合治疗是一种安全、有效、可靠的治疗方法。中西医结合体现了局部与整体、标本兼治的有机结合,可以明显提高疗效,缩短疗程,减少并发症,降低复发率,值得临床推广。

参考文献:

- [1] 苏法春,麻百家,柴振显,等. 中西医结合治疗阑尾周围脓肿的体会[J]. 中西医结合外科杂志, 2001, 7(2): 107-108

(上接第 1626 页)

分析。实验考察了样品的预处理和分析条件。起初选用甲醇溶解样品进行气质分析,但是所得的总离子流色谱图基线上漂非常严重,后改用氯仿溶解样品,基线基本平稳。针对本实验是浓度较大的样品,采用分流进样。由于本实验需要对未知的物质进行定性,所以选用全扫描的质谱扫描方式。对总离子流色谱图中的各峰经质谱扫描后,所得质谱信息与 NIST 谱图库中化合物标准谱图对照,对化合物进行鉴定。在质量分数分析中,采用总离子流色谱峰面积归一化法对青龙衣醇提物的氯仿和醋酸乙酯萃取部位中的化学成分的质量分数进行分析。

青龙衣药理作用较为广泛,其抗肿瘤作用显著。据文献报道青龙衣醇提物中的粗萘醌对多种体内移植性肿瘤有明显的抑制作用,体外抗肿瘤作用更强,且毒性较低^[7],推测萘醌类成分是青龙衣中抗肿瘤活性成分。GC-MS 分析结果显示,青龙衣中氯仿萃取部位含有 3 种萘醌类,分别是 1,5-萘二酚、胡桃醌、1,7-二羟基萘。醋酸乙酯萃取部位含有 4 种萘醌类,分别是 1,4-萘二酮、胡桃醌、1,5-萘二酚、1,7-

二羟基萘。胡桃醌的抗肿瘤作用及机制国内外已有明确报道^[8-9]。为了阐明青龙衣及抗肿瘤物质基础,以此实验为基础,运用硅胶柱色谱等方法对青龙衣活性部位做进一步分离、纯化,以期筛选出具有抗肿瘤活性的化合物。

参考文献:

- [1] 吴征镒,周太炎,肖培根,等. 新华本草纲目[M]. 第三册. 上海:上海科学技术出版社, 1990
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 下册. 上海:上海科学技术出版社, 1986
- [3] 季宇彬,马宏图,杨波,等. 青龙衣不同提取部位的抗肿瘤作用研究[J]. 中草药, 2004, 35(10): 1145-1147
- [4] 周媛媛,王栋,牛峥. 抗肿瘤中药青龙衣化学成分研究[J]. 中草药, 2010, 4(1): 11-14
- [5] 曲中原,邹翔,崔兰,等. 青龙衣不同萃取部位抗肿瘤活性研究[J]. 上海中医药杂志, 2009, 43(1): 87-90
- [6] 季宇彬,陆婉,曲中原,等. 不同干燥方法、贮藏年限及采收时间对青龙衣中胡桃醌的影响[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(2): 110-112
- [7] 高奎滨,刘瑞梅. 青核桃及刺五加抗癌作用的药理研究[J]. 中草药, 1980, 11(7): 313
- [8] 季宇彬,曲中原,邹翔,等. 青龙衣中胡桃醌对 S₁₈₀ 肉瘤小鼠的抑瘤作用研究[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(1): 195-199
- [9] Michelle T. The natural toxin juglone causes degradation of p53 and induces rapid H2AX phosphorylation and cell death in human fibroblasts[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 209(4): 1-9