

· 化学与分析 ·

北五味子总木脂素的 GC-MS 分析及其生物活性

谢旭东^{1,2}, 穆淑珍², 沈晓华^{2,3}, 王道平², 杨付梅², 邓璐璐^{2*}

(1. 贵州大学药学院, 贵阳 550025; 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550002;
3. 贵阳中医学院药学院, 贵阳 550022)

[摘要] 目的:分析北五味子总木脂素中的挥发性成分,并对其抗烟草花叶病毒(TMV)活性和抗肿瘤活性进行研究。方法:运用 GC-MS 技术分析北五味子总木脂素中挥发性化学成分;采用活体半叶枯斑法和 MTT 法分别研究了其抗 TMV 活性和抗肿瘤活性。结果:从北五味子总木脂素中检测出 58 个化合物,鉴定出其中 43 个,含量较多的有五味子素(13.974%),香芹蒎酮(8.064%),去氢香树烯(6.063%),缬草萜烯醇(5.416%),戈米辛 A(4.732%)等,其中非木脂素成分含量为 67.06%。抗 TMV 活性和抗肿瘤活性数据显示北五味子总木脂素对 A549 细胞增殖有一定的抑制作用,对 TMV 有较好的抑制作用。结论:运用 GC-MS 方法对北五味子总木脂素中的低极性成分进行分析检测,该分析方法简便、快捷、准确、可靠,这为分析中药五味子总木脂素中非木脂素成分提供了一种更加高效的检测方法,同时为五味子中总木脂素品质的化学和生物功能研究提供了科学依据。

[关键词] 北五味子;总木脂素;气相色谱-质谱联用;抗烟草花叶病毒活性;抗肿瘤活性

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)02-0033-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016020033

GC-MS Analysis and Bioactivity of Total Lignans from Schisandrae Chinensis Fructus

XIE Xu-dong^{1,2}, MU Shu-zhen², SHEN Xiao-hua^{2,3}, WANG Dao-ping², YANG Fu-mei², DENG Lu-lu^{2*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and
Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China;

3. College of Pharmacy, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550022, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the volatile constituents of total lignans from Schisandrae Chinensis Fructus, and study its antitumor and anti-tobacco mosaic virus (TMV) activity. **Method:** The volatile constituents of total lignans from Schisandrae Chinensis Fructus were analyzed by GC-MS. The anti-TMV and anti-tumor effect were studied by half-leaf necrosis method and MTT method respectively. **Result:** The 58 compounds were detected from the total lignans from Schisandrae Chinensis Fructus, and 43 of them were identified, and the non-lignans accounted for 67.06% in all identified compounds. The compounds with higher content level included schizandrin (13.974%), carvopinone (8.064%), dehydroaromadendrene (6.063%), valerianol (5.416%), and gomisin A (4.732%). Their non-lignans components accounted for 67.06%. The anti-TMV and anti-tumor data showed certain inhibitory activity of total lignans from Schisandrae Chinensis Fructus on A549 cells proliferation, and good inhibitory activity on TMV. **Conclusion:** It is the first time to analyze low polar chemical components of total lignans from Schisandrae Chinensis Fructus by GC-MS, which is simple, fast, accurate and reliable. It provides a

[收稿日期] 20150609(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31160374,81460530)

[第一作者] 谢旭东,在读硕士,从事中药学研究, Tel:0851-83802214, E-mail:907102202@qq.com

[通讯作者] * 邓璐璐, 硕士, 实习研究员, 从事天然产物化学研究, Tel:0851-83802214, E-mail:530529759@qq.com

more efficient detection method for non-lignans of total lignans from *Schisandrae Chinensis Fructus*, and also provides a scientific foundation for the study of total lignans on their chemical and biological functions.

[Key words] *Schisandrae Chinensis Fructus*; total lignans; GC-MS; anti-TMV activity; anti-tumor activity

五味子^[1]多产于辽宁、吉林等地,故习称“北五味子”。具有敛肺滋肾,益气生津,宁心安神,收敛固涩等功效^[2-3]。研究证明,五味子中富含木脂素、挥发油、多糖、维生素、倍半萜、三萜及有机酸等多种化学成分^[4]。其主要有效成分木脂素类,具有保肝、抑菌、抗肿瘤、抗氧化、对中枢神经系统调节等多种药理作用^[5]。五味子中的木脂素类成分大多不易挥发,所以目前分析研究多采用分光光度法^[6]、高效液相色谱^[7]和 LC-MS^[8]等。较多报道采用 GC-MS 分析五味子中的挥发性成分^[9-10],本研究,在利用 GC-MS 技术分析北五味子总木脂素中的挥发性成分的基础上,研究了其抗烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)活性和体外抗肿瘤活性,为分析五味子总木脂素中的低极性成分和非木脂素成分提供了新思路,也为五味子总木脂素的进一步精制和标准化制备中的质量控制提供了科学依据。

1 材料

1.1 药材 北五味子(辽宁产),经贵阳市中医学董丽莎教授鉴定为木兰科北五味子 *Schisandra chinensis* 的干燥成熟果实。

1.2 仪器与试剂 HP6890/5975C 型 GC-MS 联用仪(美国安捷伦公司),N-1100 型 EYELA 旋转蒸发器(上海爱郎仪器有限公司),AL204 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),Forma 3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司),Spectra Max-190 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司),GXZ 型智能光照培养箱(宁波江南仪器厂);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT,美国 Sigma),阿霉素(宜昌市永诺药业有限公司),8% 宁南霉素水剂(黑龙江强尔生化技术开发有限公司),乙醇、乙酸乙酯为工业重蒸,其他试剂均为分析纯。

1.3 细胞株 人肺癌细胞株(A549),由中国典型培养物保藏中心提供。

1.4 寄主与病毒 普通株系 U1,由贵州省烟草科学研究所提供,繁殖于普通烟 K326 (*Nicotiana tabacum* K326)上,采用 Gooding 等^[11]的方法提纯。TMV 枯斑寄主心叶烟(*Nicotiana glutinosa*),种子购于贵州省烟草科学研究所。

2 方法与结果

2.1 北五味子中总木脂素的提取和富集 参照文献[12,13]报道的最佳提取工艺,对北五味子中的总木脂素进行提取,将北五味子粉碎,用 3 倍量的 80% 乙醇加热回流提取 3 次(3 h/次),合并提取液,回收乙醇至无醇味,得乙醇粗提物。

通过优化文献报道的富集方法^[6,14],对北五味子中的总木脂素进行富集。将上述提取的粗提物加水混悬均匀,用等体积乙酸乙酯萃取至少 5 次,合并乙酸乙酯萃取液,回收乙酸乙酯可得乙酸乙酯萃取浸膏。将乙酸乙酯浸膏用乙醇溶解后吸附于 AB-8 型大孔树脂上,样品质量与树脂用量比例为 1:7~1:8,依次用 50% 乙醇,95% 乙醇洗脱。回收 95% 乙醇洗脱液,得北五味子总木脂素,得率为 28%。

2.2 GC-MS 分析 ZB-5MSI 5% Phenyl-95% Dimethylpolysiloxane 弹性石英毛细管柱(0.25 mm × 30 m,0.25 μm),初始柱温 45 °C,以 5 °C·min⁻¹ 升温至 310 °C(保持 9 min),运行时间 62 min,载气高纯 He(99.999%),载气流量 0.9 mL·min⁻¹,柱前压 7.06 psi,不分流进样,溶剂延迟时间 4 min,气化室温度 250 °C。EI 离子源,离子源温度 230 °C,四极杆温度 150 °C,电子能量 70 eV,发射电流 34.6 μA,倍增器电压 1 249 V,接口温度 280 °C,质量扫描范围 *m/z* 29~500。对总离子流图中的各峰经计算机数据系统检索并核对 Nist2005 和 Wiley275 标准质谱图,确定北五味子粗提物中的化学成分,用峰面积归一化法测定各化学成分的相对含量。

2.3 北五味子总木脂素的抗 TMV 活性(活体半叶枯斑法)

2.3.1 活体治疗作用测试 选取长势一致的心叶烟,先用稀释后的病毒汁液摩擦接种于适龄叶片,2 h 后分别涂施 500 mg·L⁻¹ 样品溶液和宁南霉素水剂在右半叶,左半叶以溶媒为对照,每处理 3 株,重复 3 次。置光照培养箱培养,3~4 d 后统计心叶烟枯斑数,计算枯斑抑制率。

$$\text{抑制率} = [(\text{对照枯斑数} - \text{处理枯斑数}) / \text{对照枯斑数}] \times 100\%$$

2.3.2 活体保护作用测试 选取长势一致的心叶烟,用棉签轻轻在右半叶分别涂施 500 mg·L⁻¹ 样品

溶液和宁南霉素水剂,左半叶涂施溶媒作对照,24 h 后,病毒汁液摩擦接种于处理叶片,每处理 3 株,重复 3 次。置光照培养箱培养,3~4 d 后统计心叶烟枯斑数,计算枯斑抑制率。

2.4 北五味子总木脂素的体外抗肿瘤活性 (MTT 法^[15-16]) 测试的细胞株为人肺癌细胞株 A549,阳性对照为阿霉素。取对数期人肺癌细胞,制成悬浊液,调整细胞密度,置于 96 孔板中。将孔板放于饱和湿度,37 ℃,5% CO₂ 的培养箱中培养。精密称取已制备好的总木脂素,用二甲基亚砷溶解,配成 20, 2, 0.2 mg·L⁻¹ 的溶液,给药,于培养箱中继续培养。各培养孔中加入无血的 MTT 溶液继续培养。培养结束后弃去上清液,加入二甲基亚砷避光、低速震荡至完全溶解。用酶联免疫检测仪测量各孔的吸光度 A。计算抑制率。

$$\text{抑制率} = [(A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{对照}}] \times 100\%$$

2.5 GC-MS 分析总木脂素中挥发性成分 通过 GC-MS 共检索出 58 个化合物,鉴定出其中的 43 个,包括烷烃、醇类、醚类、烯烃、萜、酯类、酮类及木脂素

类等化合物,占总量的 65.52%。其中含量较多的化合物有五味子素 (13.974%), 香芹蒎酮 (8.064%), 去氢香树烯 (6.063%), 缬草萜烯醇 (5.416%), 戈米辛 A (4.732%), (-)-lepidozenal (3.658%), 亚油酸甲酯 (2.249%), 棕榈酸甲酯 (1.747%), α-雪松烯 (1.379%), 亚油酸乙酯 (1.330%)。其中非木脂素类化合物的含量占已鉴定化合物的 67.06%。总离子流见图 1,检索确定北五味子中的挥发性成分及其质量分数见表 1。

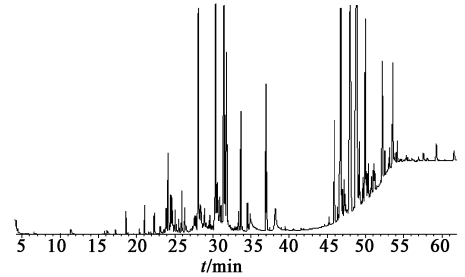


图 1 北五味子中总木脂素挥发性成分的总离子流
Fig. 1 Chemical composition total ion chromatograms of Schisandrae Chinensis Fructus

表 1 GC-MS 检测北五味子总木脂素中的挥发性成分及其相对含量分析

Table 1 Volatile GC and relative content analyze of total lignans from Schisandra hinensis Fructus

| No. | t _R /min | 化合物 | 分子式 | 相对分子质量 | 相对质量分数/% |
|-----|---------------------|-----------------|--|--------|----------|
| 1 | 11.35 | 2-乙基-1-己醇 | C ₈ H ₁₈ O | 130 | 0.235 |
| 2 | 15.60 | L-龙脑 | C ₁₀ H ₁₈ O | 154 | 0.041 |
| 3 | 15.80 | 4-萜品醇 | C ₁₀ H ₁₈ O | 154 | 0.070 |
| 4 | 16.10 | 萜 | C ₁₀ H ₈ | 128 | 0.125 |
| 5 | 16.27 | α-松油醇 | C ₁₀ H ₁₈ O | 154 | 0.074 |
| 6 | 17.24 | 百里基甲基醚 | C ₁₁ H ₁₆ O | 164 | 0.094 |
| 7 | 18.63 | 乙酸冰片酯 | C ₁₂ H ₂₀ O ₂ | 196 | 0.320 |
| 8 | 20.38 | α-乙酸松油醇 | C ₁₂ H ₂₀ O ₂ | 196 | 0.108 |
| 9 | 21.06 | α-依兰烯 | C ₁₅ H ₂₄ | 204 | 0.401 |
| 10 | 21.57 | 正十四烷 | C ₁₄ H ₃₀ | 198 | 0.061 |
| 11 | 21.85 | 双环异长叶烯 | C ₁₅ H ₂₂ | 202 | 0.045 |
| 12 | 22.34 | 3-叔丁基-1,2-二甲氧基苯 | C ₁₂ H ₁₈ O ₂ | 194 | 0.389 |
| 13 | 23.11 | (E)-β-金合欢烯 | C ₁₅ H ₂₄ | 204 | 0.096 |
| 14 | 23.18 | β-花柏烯 | C ₁₅ H ₂₄ | 204 | 0.065 |
| 15 | 23.91 | α-衣兰油烯 | C ₁₅ H ₂₄ | 204 | 0.304 |
| 16 | 24.13 | α-雪松烯 | C ₁₅ H ₂₄ | 204 | 1.379 |
| 17 | 24.51 | γ-雪松烯 | C ₁₅ H ₂₄ | 204 | 0.817 |
| 18 | 24.67 | 花侧柏烯 | C ₁₅ H ₂₂ | 202 | 0.719 |
| 19 | 24.96 | σ-杜松烯 | C ₁₅ H ₂₄ | 204 | 0.081 |
| 20 | 25.05 | 香树烯 | C ₁₅ H ₂₄ | 204 | 0.354 |
| 21 | 25.57 | α-二去氢菖蒲烯 | C ₁₅ H ₂₀ | 200 | 0.225 |

续表 1

| No. | t_R /min | 化合物 | 分子式 | 相对分子质量 | 相对质量分数/% |
|-----|------------|------------------|----------------------|--------|----------|
| 22 | 25.93 | 反式苦橙油醇 | $C_{15}H_{26}O$ | 222 | 0.599 |
| 23 | 26.34 | 白千层醇 | $C_{15}H_{26}O$ | 222 | 0.505 |
| 24 | 28.05 | 缙草萜烯醇 | $C_{15}H_{24}O$ | 220 | 5.416 |
| 25 | 28.35 | τ -依兰油醇 | $C_{15}H_{26}O$ | 222 | 0.297 |
| 26 | 28.46 | β -雪松烯 | $C_{15}H_{24}$ | 204 | 0.292 |
| 27 | 28.90 | 十六烷 | $C_{16}H_{34}$ | 226 | 0.437 |
| 28 | 30.20 | 桔利酮 | $C_{15}H_{22}O$ | 218 | 0.252 |
| 29 | 30.33 | 去氢香树烯 | $C_{15}H_{22}$ | 202 | 6.063 |
| 30 | 31.46 | 香芹萜酮 | $C_{15}H_{22}O$ | 218 | 8.064 |
| 31 | 31.78 | (-)-lepidozenal | $C_{15}H_{22}O$ | 218 | 3.658 |
| 32 | 33.66 | 棕榈酸甲酯 | $C_{17}H_{34}O_2$ | 270 | 1.747 |
| 33 | 34.54 | 邻苯二甲酸丁二酯 | $C_{16}H_{22}O_4$ | 278 | 0.433 |
| 34 | 34.88 | 棕榈酸 | $C_{16}H_{32}O_2$ | 256 | 0.461 |
| 35 | 36.96 | 亚油酸甲酯 | $C_{19}H_{34}O_2$ | 294 | 2.249 |
| 36 | 37.07 | 亚麻酸甲酯 | $C_{19}H_{32}O_2$ | 292 | 1.131 |
| 37 | 37.51 | 硬脂酸甲酯 | $C_{19}H_{38}O_2$ | 298 | 0.049 |
| 38 | 38.18 | 亚油酸乙酯 | $C_{20}H_{36}O_2$ | 308 | 1.330 |
| 39 | 46.33 | 亨氏马钱醇碱 | $C_{22}H_{26}N_2O_5$ | 398 | 0.304 |
| 40 | 46.98 | ustrobailignan-6 | $C_{20}H_{24}O_4$ | 328 | 0.566 |
| 41 | 48.82 | 五味子素 | $C_{24}H_{32}O_7$ | 432 | 13.974 |
| 42 | 49.19 | 五味子丙素 | $C_{22}H_{24}O_6$ | 384 | 0.868 |
| 43 | 49.99 | 戈米辛 A | $C_{23}H_{28}O_7$ | 416 | 4.732 |

2.6 北五味子总木脂素的抗 TMV 活性 北五味子总木脂素对烟草花叶病毒的活体治疗作用和保护作用的实验数据见表 2。由数据分析可知,北五味子总木脂素具有一定的抗 TMV 活性。总木脂素对 TMV 的治疗活性可达 67.87%,其治疗活性高于阳性对照药剂宁南霉素(47.65%);同时总木脂素对寄主还具有较好的保护作用,活性为 81.19%。与阳性对照药宁南霉素相比,同等剂量下,总木脂素的抗 TMV 活性更强。

表 2 北五味子总木脂素对 TMV 侵染的活体治疗和保护作用抑制率($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Curative and inhibition effect to TMV of total lignans from Schisandrae Chinensis Fructus in vivo ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

| 组别 | 治疗作用 | 保护作用 |
|----------|--------------|--------------|
| 北五味子总木脂素 | 67.87 ± 7.48 | 81.19 ± 4.98 |
| 宁南霉素 | 47.65 ± 3.41 | 78.13 ± 1.94 |

2.7 抗肿瘤活性 北五味子总木脂素对人肺癌细胞增殖的抑制活性见表 3。由结果可知与阳性对照

阿霉素相比总木脂素对人肺癌细胞增殖的抑制作用较微弱。

表 3 北五味子总木脂素抑制人肺癌细胞 A549 增殖的活性($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Growth inhibition effect on human lung cancer cells A549 of total lignans from Schisandrae Chinensis Fructus ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 浓度 | 抑制率/% |
|----------|---|--------------|
| 北五味子总木脂素 | 20 mg·L ⁻¹ | 18.54 ± 4.73 |
| | 2 mg·L ⁻¹ | 0 |
| | 0.2 mg·L ⁻¹ | 0 |
| 阿霉素 | 8.00 × 10 ⁻⁷ mol·L ⁻¹ | 63.40 ± 1.07 |
| | 4.00 × 10 ⁻⁷ mol·L ⁻¹ | 52.81 ± 1.05 |
| | 2.00 × 10 ⁻⁷ mol·L ⁻¹ | 46.46 ± 0.26 |
| | 1.00 × 10 ⁻⁷ mol·L ⁻¹ | 39.50 ± 3.74 |

3 讨论

目前针对北五味子总木脂素的提取方法主要有传统有机溶剂提取法(甲醇、乙醇)、超临界 CO₂ 萃取法、水提法、超声提取法以及微波提取法;富集总

木脂素的方法有硅藻土索氏提取法、大孔树脂(D101, AB-8, HPD-100, DA201 等)富集法。本研究进行了大量的预试验,最终确定了用 80% 乙醇回流提取,乙酸乙酯萃取,AB-8 大孔树脂富集的方法来提取制备北五味子总木脂素。

通过 GC-MS 分析鉴定出的总木脂素挥发性成分包括烷烃、醇类、醚类、烯烃、萜、酯类、酮类及木脂素类,其含量占总木脂素的 65.52%。此外,对北五味子总木脂素的体外抗肿瘤活性及抗 TMV 活性进行研究,结果表明北五味子总木脂素对人体肺癌细胞 A549 的增殖具有微弱的抑制作用,而对烟草花叶病毒具有较好的抑制作用。针对北五味子总木脂素的抗肿瘤和抗烟草花叶病毒的研究均为首次研究报道,具有一定创新性。本研究发现的北五味子总木脂素较显著的抗烟草花叶病毒活性具有潜在的应用前景,对生物源农药的研发提供了新的对象,具有重要价值。本研究通过对北五味子总木脂素的 GC-MS 分析以及生物活性的研究,为北五味子中主要有效成分木脂素的富集效果及标准化制备的质量控制技术提供了新思路,也为北五味子中木脂素的药理学研究提供了新的内容,有望促进植物源农药的发展。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:61-62.
[2] 余凌虹, 刘耕陶. 五味子联苯环辛烯类木质素成分的结构与药理活性关系和药物创新[J]. 化学进展, 2009, 21(1):66-76.

[3] 王春梅, 李贺, 李生, 等. 北五味子木脂素对小鼠酒精性肝损伤的保护作用[J]. 食品科学, 2014, 35(13):262-265.
[4] 高雁, 李廷利. 五味子有效成分的药理作用研究进展[J]. 中医医学报, 2011, 39(6):104-106.
[5] 李妍, 吕士杰, 张巍. 五味子生物活性成分及其药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2013, 34(6):454-456.
[6] 薛雪, 孟宪军, 李斌, 等. AB-8 大孔树脂分离纯化北五味子藤茎总木脂素的研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(1):22-25.
[7] 付绍平, 张峰, 张慧, 等. 反相高效液相色谱法测定五味子中木脂素的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2005, 18(S1):32-33.
[8] 高文新. 五味子木脂素类成分 HPLC, CUPLC/Q-TOF-MS 分析[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2012.
[9] 庄红卫, 陈建华, 王森, 等. 不同种源五味子油化学组分的差异性分析[J]. 中国食品学报, 2014, 14(11):237-250.
[10] 王炎, 王进福, 尤宏. 北五味子种子挥发油的 GC-MS 分析[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(2):91-92.
[11] Gooding G V, Hebertt A. Simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities[J]. Phytopathology, 1967, 57(11):1285-1289.
[12] 刘华英. 北五味子木脂素提取工艺及提取物抑菌作用的研究[D]. 长春:吉林工业大学, 2006.
[13] 程振玉, 杨英杰. 五味子木脂素提取工艺研究新进展[J]. 吉林化工学院学报, 2013, 30(1):18-21.
[14] 尹恬, 刘严生, 于叶玲, 等. 用大孔树脂提取和纯化五味子总木脂素[J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(2):113-116.

[责任编辑 顾雪竹]