

应用GC/MS测定燕山蛭抗癌 活性部分的化学成份

刘应泉

卞慕唐* 李畅开

(中医研究院中药研究所)

(中国计量科学院)

〔摘要〕 燕山蛭 (*Spirobolus bungii* Brandt) 的醇和醚提取物经药理试验证明具有抗癌活性。本文对其化学成份进行了测定, 证明它是含有一系列的脂肪酸酯类物质, 其中油酸及其甲酯是具有抗癌活性的物质。此外还揭示了燕山蛭虫体中的脂质是以乙酯形态存在。

燕山蛭系倍足纲山蛭属动物^{〔1〕}。民间流传用燕山蛭可以治疗食道癌。在抗动物肿瘤药物筛选中, 发现它的醚溶性部分对小鼠实体型宫颈癌 (U₁₄)、腹水型宫颈癌 (U₁₄A)、内瘤 (S₁₈₀A)、肺癌 (Lewis) 和艾氏腹水癌 (ECA) 等都有一定的抑制作用, 且毒性不大^{〔2〕}。本文采用GC/MS对燕山蛭中抗实验肿瘤的有效部分进行了成分分析。

有效部分的提取和成分分析 燕山蛭中抗癌有效部分的提取步骤是: 将燕山蛭干虫体粉碎、经用乙醇、石油醚及丙酮提取, 然后用硅胶柱层析, 最后用石油醚、氯仿洗脱, 按色带分为四类分别收集: (I) 类为黄色脂状物, (II) 类为红色油状物, (III) 和 (IV) 类分别为褐色脂状物和黑色胶状物。药理实验证明 (II) 类对实验肿瘤的抑制效率最高。

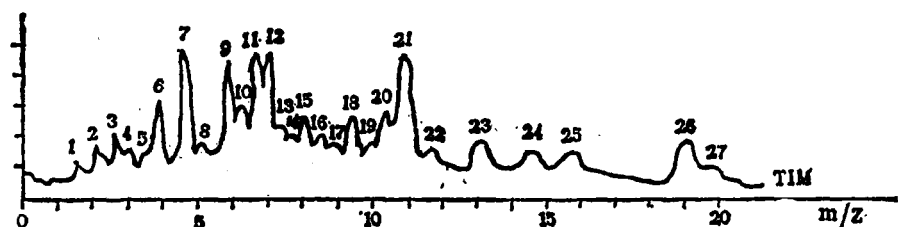
有效部分 (II) 易溶于石油醚、乙醚及丙酮等溶剂, 油脂检查反应、羟肟酸形成试验以及皂化反应均呈阳性; 它还溶于5%氢氧化钠溶液而不溶于5%盐酸和85%磷酸溶液^{〔3〕}, 这些性质表明它是一种中性脂质。该部分经硅胶薄层层析, 以9:1的氯仿/甲醇作展开剂, 可分离为 (II_a) 和 (II_b) 两部分。 (II_a) 部分是红色油状液体, 比重为0.91, R_f 值为0.9左右, 在紫外光照射下, 呈兰色荧光。 (II_b) 在紫外光照射下呈绿色荧光, 强度较 (II_a) 大, 这部分经GC/MS测定主要是胆甾醇 (65.1%)、 β -谷甾醇 (12.4%) 和菜油甾醇 (22.5%)。 (II_a) 部分的色谱分析结果 (图1) 表明是一个非常复杂的混合物。质谱测定其成份结果见表1。

上述测定所用仪器是JMS-300型质谱计。色谱测定条件是: 2.5% SE-30涂于60—80目 Chromsorb WAW; 不锈钢柱长2米, 内径2毫米; 载气为He; 柱温140℃~230℃, 升温速率为5°/分; 汽化温度300℃; 一级玻璃喷嘴分离器, 界面温度250℃。质谱的测定条件为: 离子源温度230℃, 电离电压70电子伏特; 发射电流300微安; 分辨为500。

甲酯衍生物的成份分析 (II_a) 主要是脂肪酸酯类化合物, 为了进一步弄清其中抗癌

1983年3月24日收

*卞慕唐现在国家进出口商品检验总局

图 1. (II_a) 部分色谱图表 1. GC/MS测定燕山蚕 II_a 部分主要化学成分

峰 号	分子量	化 学 式	名 称	含 量 %
1	254	C ₁₈ H ₃₈	7,9-二甲基十六烷	0.7
2	—	—	—	1.4
*3	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	十五碳酸甲酯及具有双烯(或环烯)的物质未能分开	2.0
4	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	十五碳酸乙酯	1.6
*5	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	十五碳酸乙酯(有支链)	1.1
6	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	棕榈酸甲酯	3.3
7	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	棕榈酸乙酯	6.0
8	—	—	—	2.7
9	296	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	油酸甲酯	4.0
10	298	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	硬脂酸甲酯	5.0
11	310	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	油酸乙酯	5.6
12	312	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	硬脂酸乙酯	4.0
13	326	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	廿酸甲酯	2.8
14	—	—	—	3.6
15	324, 326	C ₂₃ H ₄₈ C ₂₁ H ₄₂ O ₂	正廿三烷 *十九酸乙酯	未能分开 4.2
16	326	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	廿酸甲酯(有支链)	
17	338	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	廿碳烯酸乙酯	4.6
18	340	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	廿酸乙酯	3.5
19	340	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	廿一酸甲酯	4.5
20	348	C ₂₅ H ₄₈	待 定	5.1
*21	354	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	廿一酸乙酯(有支链)	7.6
22	354	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	山萘酸甲酯	3.4
23	368	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	山萘酸乙酯	3.9
24	376	C ₂₇ H ₅₂	待 定	3.4
*25	382	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	廿三酸乙酯(有支链)	4.2
26	396	—	待 定	4.8
27	428	C ₂₉ H ₄₈ O ₂	醋酸胆甾醇酯	3.1

活性物质,按脂质化学方法将其进行皂化。药理证明不皂化部分没有抗癌活性,皂化部分有较好的抗癌活性。将皂化部分水解成脂肪酸,制备成甲酯衍生物,具体步骤于下:取(II_a)皂化部分1克,加KOH(C.P)0.3克和95%乙醇(C.P)5毫升溶于烧瓶中,在氮气流下加热回流30分钟,使其完全水解。蒸去多余的乙醇,将所得脂肪酸钾盐加蒸馏水20毫升溶解,移至分液漏斗中,每次用10毫升乙醚(C.P.)轻轻摇动二次,静置,分为乙醚层和水

表2 燕山蜜有效部分Ⅱ中脂肪酸甲酯衍生物成分

峰 号	保留时间 (分·秒)	相对含量 (%)	分 子 量	名 称
1	1.0	0.6	228	正十三碳酸甲酯
2	1.24	0.3	228	异十三碳酸甲酯
3	1.48	0.2	228	异十三碳酸甲酯
4	2.12	1.7	242	正十四碳酸甲酯
5	2.48	2.8	242	异十四碳酸甲酯
6	3.18	2.9	256	正十五碳酸甲酯
7	3.30		256	异十五碳酸甲酯
8	3.54	1.84	256	异十五碳酸甲酯
9	4.36	2.9	254	十五碳烯酸甲酯
			270	异十六碳酸甲酯
10	5.36	10.3	270	棕榈酸甲酯
11	6.42	11.2	268	棕榈油酸甲酯
12	7.54	0.7	284	十七碳酸甲酯
13	9.12	1.9	282	十七碳烯酸甲酯
14	11.0	2.1	298	硬脂酸甲酯
15	12.30	31.0	296	油酸甲酯
16	15.42	20.4	294	亚油酸甲酯
17	21.0	4.3	292	十八碳-9,12,15-三烯酸甲酯
18		0.8	324	廿碳烯酸甲酯
19	23.12	0.5	294	异亚油酸甲酯
20	25.48	2.2	340	山萘酸甲酯

} 未完全分离

层。乙醚层部分应用蒸馏水洗涤2~3次,加无水硫酸钠干燥,静置过夜,过滤回收乙醚,得不皂化物。该部分经GC/MS分析,其主要成分是甾醇化合物。这部分量为(Ⅱ)的22%。水层部分在氮气流下,加热至600℃去水,用1N硫酸(C.P.)酸化,将游离出脂肪酸,再经乙醚提取,醚层再经水洗至中性,用无水硫酸钠干燥,过滤回收乙醚,得皂化部分(即混合脂肪酸),其量为(Ⅱ)部分的42%。取该部分100毫克于烧杯中,加95%乙醇5毫升溶解,冷至0℃,置通风柜中缓缓滴入重氮甲烷试剂,至不再释放氮气即可。药理试验证明它具有很好的抗癌活性,其成份用GC/MS法进行了测定。测试条件是:10%DEGS涂于80—100目Chromosorb. WAW., 不锈钢柱长2米,内径为2毫米;载气He,流量20毫升/分;柱温145—185℃升温速率6℃/分;一级玻璃喷嘴分离器,界面温度为250℃;电离室温度

表3 燕山蜜有效部分Ⅱ中各部分和主要成分抗肿瘤作用

名 称	抑制率(%)
不皂化部分	-55, -4, -51, 15.2, 8
皂化部分	86, 73, 75.5, 69, 84
(Ⅱ)的汽化部分	80, 81, 52
(Ⅱ)的甲酯衍生物	100, 72
*油酸甲酯	71, 95, 100, 100
油酸甲酯	54, 98.6, 68.2, 80, 100, 100
油 酸	80, 64, 100, 97
*亚油酸甲酯	17
亚油酸	-26, 17
棕榈酸	-35, 22
棕榈酸甲酯	30, -35, 48
棕榈酸乙酯	51, -33
花生酸	-180, -37
花生酸甲酯	4, 1, 30
花生酸乙酯	-109, -30

有*号者系从燕山蜜有效部分Ⅱ中分离得到的纯品

220℃; 电离电压70电子伏特, 电离电流300微安; 分辨500, 结果见表2。从表2可看到, 其脂质是从十三碳到廿一碳的饱和酸和不饱和酸的脂类, 而其中油酸甲酯含量最高, 达31%。关于油酸和油酸甲酯的抗癌作用国内外已有报导。

油酸甲酯、亚油酸甲酯的确证 将甲酯衍生物分离得到的油酸甲酯和亚油酸甲酯分别用GLC、MS、IR和NMR等方法进行了测定, 并与标准品比较而得到了验证^[4,7]。对油酸甲酯还用臭氧解及化学电离质谱法测定了其双键的位置。结果表明与未作臭氧解的样品相比, 原十八碳烯酸甲酯(m/z 297即 $M+1$)的峰大为减弱, 但新产生了 m/z 143和 m/z 187两个较强的峰, 这表明该十八碳烯酸甲酯的双键在第9位, 从而确证了所得油酸甲酯和亚油酸甲酯的可靠性。

燕山蚤虫体内脂质存在形式 生物体内多以甲酯形存在^[8]。表1中既有甲酯也有乙酯。为了弄清脂质在该虫体内存在的形式, 将研碎的干虫体用不含甲基、乙基的试剂石油醚和乙烷提取, 用GC/MS进行了测定(同甲酯衍生物测试条件), 结果列入表3。从表中可知, 除苯酯酸甲酯及十七、十八酮外, 其主要成分与表1中所列主要脂肪酸基本相同, 不同的只有乙酯, 说明该虫体内脂质是以乙酯形式存在, 这是比较少见的, 在生物化学上有一定意义。

本工作承蒙中国医学科学院梁晓天教授指导, 北京化工研究院沈其丰副教授, 罗广荣同志帮助作了核磁共振测定、中药所段树民同志作了红外光谱测定, 在此一并致谢。

参 考 文 献

1. 张崇明、李志英《中医杂志》66—67(6)1980
2. 姜庭良等《中医杂志》59—63(6)1980
3. 山川民夫等《脂质の化学》日本生化学会编1974
4. Stenhagen, E et al, Registry of Mass Spectral Data, pub. John Wiley Sons, 1974
5. Crasselli J. G. and Ritchey W.M., (Ed.), Atlas of Spectral Data and physical Constants for Organic Compounds, 2nd, Ed., pub. CRC press 1975
6. Mass Spectrometry Data Centre, Eight peak Index of Mass Spectra, 2nd Ed., 1974
7. Sadtler Research Laboratories, INC. The Sadtler Standard Spectra 1967
8. 高木彻《油化学》27(2), 107, 1978

Analysis of Effective Anticancer Constitutes of *Spirobolus Bungii* Brandt by GC/MS

Liu Yingquan

(Institute of Traditional Chinese Medicine,
Academy of Traditional Chinese Medicine)

Bian Mutang* Li Changkai

(Chinese Academy of Metrological Sciences)

Received 24 March 1983

Abstract

The anticancer effect of ethanol-ether extract of *Spirobolus bungii* Brandt has been medically proved with screening experiments. On this basis, the chemical analysis by GC/MS shows that the extract contains a series of ester of fatty acid. Among them oleic acid and methyl oleate are effective anticancer constitutes. It is also proved that the ester exists as ethyl ester in the body of *Spirobolus bungii* Brandt.

* The author is now in The State Administration for Inspection of Import and Export Commodities, PRC