

## 拳卷地钱不同提取部位的气相色谱-质谱分析 比较和部分生物活性研究

曹慧<sup>1</sup>, 肖建波<sup>1,\*</sup>, 周春山<sup>1</sup>, 张懿伟<sup>2</sup>

(1. 中南大学化学化工学院, 湖南长沙 410083; 2. 中南大学湘雅医学院分子药物所, 湖南长沙 410078)

**摘要:** 基于拳卷地钱不同部位生物活性的不同, 建立了采用气相色谱-质谱(GC/MS)技术分析拳卷地钱不同提取部位的方法。拳卷地钱乙醇粗提物依次用石油醚和乙酸乙酯萃取, 以GC/MS确定两部位挥发性成分的差异, 并进行体外抗肝癌细胞试验。从石油醚部位共分离出54个峰, 鉴定了其中25种物质, 占总出峰面积的65.0%以上, 在所分离的化合物中, 以有机酸和酯类化合物为主; 从乙酸乙酯部位分离出23个峰, 鉴定了其中19种物质, 占总出峰面积的89.0%以上, 在所分离的化合物中, 以苯并噻唑(14.97%)和雪松醇(20.69%)为主。体外抗肝癌细胞试验, 发现乙酸乙酯部位有明显抑制肝癌细胞的作用, 并有剂量依赖关系; 当质量浓度达40 mg/L时, 对肝癌细胞有明显抑制作用。石油醚部位对肝癌细胞抑制作用不明显。

**关键词:** 拳卷地钱; 气相色谱-质谱; 生物活性; 体外抗肝癌细胞

**中图分类号:** O 657.63; Q 949.351.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2005)01-01-05

## Comparison of Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis in Different Extract Parts of *Marchantia convoluta* and Study on Partial Biologic Activity

CAO Hui<sup>1</sup>, XIAO Jian-bo<sup>1,\*</sup>, ZHOU Chun-shan<sup>1</sup>, ZHANG Yi-wei<sup>2</sup>

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China;

2. Institute of Clinical Pharmacology, Central South University, Changsha 410078, China)

**Abstract:** The analysis method of different extract parts of *Marchantia convoluta* by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) was established because of the different partial biologic activity in different parts of *M. convoluta*. The crude extracts of *M. convoluta* leaves was obtained after *M. convoluta* leaves were extracted with 80% ethanol and the extracts were concentrated under reduced pressure. Then the extract was partitioned using sequential extraction with organic solvents: petrol and ethyl acetate and *n*-butanol saturated with water. The petrol and ethyl acetate extracts were performed GC/MS analysis to identification the chemical constituents. Anti-liver cancer cells effect was studied. 54 peaks were separated and 25 compounds were identified by GC/MS from petrol extract. The main com-

收稿日期: 2004-09-10; 修回日期: 2004-12-01

基金项目: 广西省科技攻关项目(0235022-1B)

作者简介: 曹慧(1978~), 女(汉族), 江苏盐城人, 在读研究生, 从事天然产物的分离分析工作

\*通讯作者: 肖建波, 男(汉族), 江苏射阳人, 在读研究生, 有机化学专业。E-mail: newfourthamy@163.com



ponents were organic acid and ester (10). The other 7 kinds of terpenes and 8 kinds of terpenones were identified, too. 23 peaks were separated and 19 compounds were identified by GC/MS (reliability to standard MS > 80%) from ethyl acetate extract. The main components were benzothiazole and cedrol (accounting for 14.97% and 20.69%). Only 4 kinds of organic acid and ester were identified from ethyl acetate extract. It was found that ethyl acetate extract induced cytotoxicity of liver cancer cells in a dose-dependent manner and 40 mg/L of ethyl acetate extract can inhibited liver cancer cells evidently. Petrol extract had no effect on inhibiting liver cancer cells.

**Key words:** *M archantia convoluta*; gas chromatography mass spectrometry; biologic activity; anti-liver cancer cell

地钱又名地衣,广泛分布于各地,多生于阴暗潮湿的地方<sup>[1]</sup>。地钱的药用始载于《名医别录》,《本草纲目》中谓之“石衣”,味淡,性凉,归肝经<sup>[2]</sup>。清热利湿,解毒敛疮。经过资源调查,根据产地调查、标本采集和生药鉴定,查明广西境内3种地钱属植物,分别是地钱 (*M archantia apolyomorpha*)、拳卷地钱 (*M archantia convoluta*)及粗裂地钱 (*M archantia paleacea*),其中以拳卷地钱为主<sup>[3]</sup>。民间常用拳卷地钱来治疗急性肝炎。地钱的化学成分主要包括黄酮类化合物、联苜类化合物、香豆素类及萜类化合物等<sup>[4-6]</sup>。而国内外对拳卷地钱的研究报道较少,国内曾有拳卷地钱中黄酮类化合物的报道<sup>[7,8]</sup>。通过成分预试验,发现拳卷地钱中挥发性成分以萜类化合物为多,主要是单萜、倍半萜及其含氧衍生物,而倍半萜的含氧衍生物大多有较强的香气和生物活性,是医药、食品、香料和化妆品工业的重要原料<sup>[9]</sup>,因此对拳卷地钱挥发性成分进行化学成分和生物活性研究具有重要意义,为开发利用地钱提供依据。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与装置

GC-17A/QP5000型气相色谱-质谱联用仪:日本Shimadzu公司产品;色谱柱:非极性毛细管柱HP5柱60 m × 0.25 mm。

### 1.2 主要试剂与材料

石油醚、乙酸乙酯等试剂均为分析纯;湖南师范大学试剂厂提供;人肝癌细胞(7721细胞):中南大学湘雅医学院分子药物所提供,用DMEM培养基常规传代培养;DMEM培养基、胰蛋白酶、噻唑蓝(MTT)、二甲亚砜(DMSO):

美国Sigma公司产品;琼脂、胎牛血清:上海生工公司产品;拳卷地钱:采自广西壮族自治区靖西朔湖乡山沟,原植物由广西中医学院中药鉴定教研室周子静教授鉴定为*M archantia convoluta* Gao et Chang的叶状体。样品(编号No. 20020922)保存于广西中医学院中药鉴定室。

### 1.3 GC/MS 实验条件

**1.3.1 色谱条件** 载气(Ar)压力0.50 MPa,流速37.3 mL/min;汽化温度250℃;柱温60~250℃;升温程序:升温速率5℃/min,230℃保持3 min;进样量0.1 μL。

**1.3.2 质谱条件** 电子轰击离子源;质量扫描范围 $m/z$  40~650;质谱电离室温度270℃。

### 1.4 GC/MS 测定

称取拳卷地钱干燥品20 g,加入80%乙醇-水溶液200 mL,提取温度70℃,时间0.5 h,提取3次,过滤,合并滤液,减压蒸馏,回收乙醇,浓缩至干,得拳卷地钱粗提物。粗提物依次分别用石油醚和乙酸乙酯萃取,直到萃取液为无色,将石油醚和乙酸乙酯萃取液减压蒸馏,回收溶剂,浓缩至干,取一部分进行GC/MS分析。

### 1.5 体外抗肝癌细胞试验

将处于对数生长期的细胞经胰蛋白酶消化后制备细胞悬浮液,然后接种于96孔培养板中,每孔104个细胞,贴壁生长24 h后,换含有药物提取液的DMEM培养液(设6个试验组,每组6孔,提取液中活性部位浓度分别为0.5、10、20、30、40、50 mg/L),培养24 h后,换为不含血清的DMEM培养液,同时加入20 μL MTT (5 g/L),4 h后去上层清液,每孔加入200 μL DMSO,水平振荡10 min,使结晶物充分溶解,在酶标仪测定吸光度(波长570 nm),测定光密度值(OD值),计算细胞存活率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 石油醚部位的 GC/MS 分析

按 1.3 实验条件对拳卷地钱石油醚部位进行分析, 得总离子流图 (TIC) (图 1), 共计分离出

54 个峰。对总离子流图中的各峰经质谱扫描后质谱图, 经过质谱计算机数据系统检索对各色谱峰加以确认, 从其中鉴定出 25 种物质, 占石油醚部位总组分的 46.29% (表 1)。

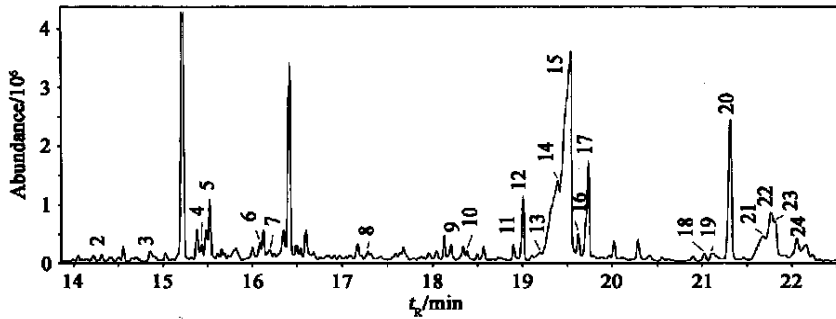


图 1 石油醚部位的总离子流色谱图

Fig 1 TIC of petrol part in *M. archantia convoluta*

### 2.2 乙酸乙酯部位的 GC/MS 分析

按 1.3 实验条件对拳卷地钱乙酸乙酯部位进行分析, 得 TIC 图, 示于图 2, 共计分离出 23 个峰。对 TIC 图中的各峰经质谱扫描后质谱图, 经

过质谱计算机数据系统检索对各色谱峰加以确认, 从其中鉴定出 19 种物质, 占石油醚部位总组分的 82.61% (表 2)。

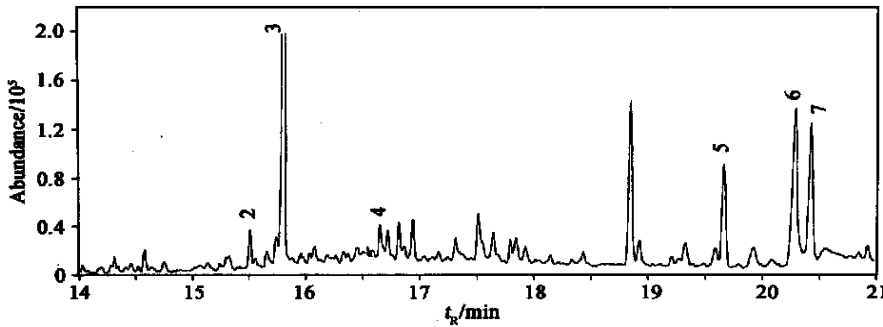


图 2 乙酸乙酯部位总离子流色谱图

Fig 2 TIC of ethyl acetate part in *M. archantia convoluta*

表 1 拳卷地钱石油醚部位化学成分分析结果

Table 1 Analysis results in petrol part of *M. archantia convoluta*

No.	Compound	$t_R$ /min	Relative intensity/%	Similarity/%	No.	Compound	$t_R$ /min	Relative intensity/%	Similarity/%
1	caryophyllene	13.46	0.68	99	14	(Z)-11-hexadecenoic acid	19.39	9.80	83
2	4,11-eudesmadiene	14.32	0.28	80	15	n-hexadecenoic acid	19.54	20.29	99
3	1,3-diisopropenylcyclohexene	14.87	0.49	93	16	(E)-11-hexadecenoic acid methyl ester	19.63	0.84	87
4	1h-cycloprop[elazulen-7-ol	15.44	0.56	95	17	methyl hexadecenoate	19.74	3.95	96
5	caryophyllene oxide	15.53	1.96	91	18	(Z,Z)-9,12-hexadecadienoic acid	21.03	0.30	99
6	7-hexadecyne	16.09	0.54	86	19	9,12,15-hexadecatrienoic acid	21.12	0.65	98

## 续表

No.	Compound	$R_f/m\ in$	Relative intensity/%	Similarity /%	No.	Compound	$R_f/m\ in$	Relative intensity/%	Similarity /%
7	naphthalene, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 8a-ol	16.20	0.41	90	20	phytol	21.31	6.32	91
8	tetradecanoic acid	17.28	0.54	98	21	2-chloroethyl linoleate	21.67	2.32	87
9	6, 10, 14-trimethyl-2-pentadecanone	18.21	0.61	91	22	(E)-9-octadecenoic acid	21.77	3.59	83
10	3-eicosyne	18.38	0.33	92	23	(Z, Z, Z)-9, 12, 15-octadecatrien-1-ol	21.81	1.58	94
11	methyl 9-hexadecenoate	18.90	0.56	99	24	6-tetradecyne	22.06	1.14	86
12	methyl hexadecenoate	19.01	1.96	98	25	1, 4-dimethyl-8-isopropylidene	24.05	4.93	91
13	1, 5, 9, 13-tetradecatetraene	19.19	0.45	92					

表 2 拳卷地钱乙酸乙酯部位化学成分分析结果

Table 1 Analysis results of ethyl acetate part in *Marchantia convolute*

No.	Compound	$R_f/m\ in$	Relative intensity/%	Similarity /%	No.	Compound	$R_f/m\ in$	Relative intensity/%	Similarity /%
1	benzothiazole	10.71	14.97	94	11	phytol	22.62	2.38	90
2	hexadecane	15.51	0.96	95	12	methyl octadecanoate	22.79	3.02	98
3	cedrol	15.80	20.69	95	13	(Z, Z)-9, 12-octadecadienoic acid	23.23	2.41	92
4	heptadecane	16.65	1.18	96	14	(Z, Z)-2-methyl-3, 13-octadecadienol	22.94	2.77	97
5	methyl hexadecanoate	19.66	4.68	98	15	octadecanoic acid	23.23	2.41	92
6	n-hexadecanoic acid	20.28	8.98	99	16	hexatriacontane	23.69	1.22	87
7	dibutyl phthalate	20.42	6.80	97	17	cyclohexadecane	23.82	1.58	97
8	1-heptadecanol	22.20	2.34	95	18	tricosane	24.82	2.46	96
9	methyl (Z, Z)-9, 12-octadecadienoate	22.38	5.20	99	19	1-chlorooctadecane	25.92	1.34	81
10	methyl(Z)-9-octadecenoate	22.46	4.11	99					

## 2.3 石油醚部位和乙酸乙酯部位的 GC/MS 分析比较

从图 1、图 2 可以看出, 石油醚部位成分较乙酸乙酯部位复杂, 石油醚部位出峰 54 个, 而乙酸乙酯部位只有 23 个峰。石油醚部位含有机酸酯 (10 种) 较高, 其中 (Z)-11-正十六烯酸和正十六酸的含量达 9.80% 和 20.29%, 而含萜烯及其含氧衍生物较少; 乙酸乙酯部位萜烯及其含氧衍生物含量较高, 其中苯并噻唑和雪松醇含量分别达到 14.97% 和 20.69%, 另含有多种酯类化合物, 而含有机酸很少。首次从地钱属植物中检测出雪松醇 (Cedrol)。综上所述通过石油醚和乙酸乙酯

系统萃取, 可以将拳卷地钱中的脂溶性成分初步分离, 从而有助于生物活性研究中确定何种或几种成分起作用。

## 2.4 对肝癌细胞的抑制作用

通过体外抗肝癌细胞试验, 发现乙酸乙酯部位提取物对肝癌细胞有明显的抑制作用, 并呈剂量依赖关系 (图 3)。而石油醚部位对肝癌细胞抑制作用不明显。从图 3 可知, 当乙酸乙酯部位提取物浓度大于 40 mg/L 时对肝癌细胞有明显的抑制作用, 低浓度的乙酸乙酯部位提取物对肝癌细胞抑制作用不明显。雪松醇为乙酸乙酯部位提取物主要成分, 有驱虫作用, 是柏木中抗白蚁的

主要成分, 但未见其抗肝癌细胞作用的报道, 是否雪松醇起主要作用有待于进一步研究。

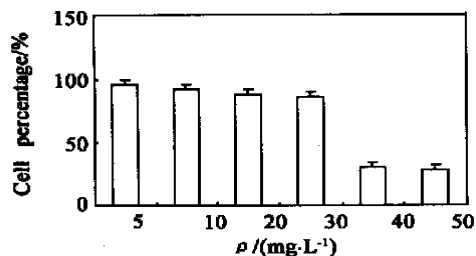


图3 乙酸乙酯部位对肝癌细胞的抑制作用

Fig 3 Inhibiting effect of acetate part on liver cancer cell

### 3 结论

通过对石油醚和乙酸乙酯部位的 GC/MS 分析, 发现其化学成分差异较大, 石油醚部位鉴定出的 25 种物质中, 占总出峰面积的 55.0% 以上, 以有机酸和酯类化合物为主, 碳氢化合物 7 种, 烃类含氧衍生物 8 种, 有机酸和酯类化合物 10 种; 从乙酸乙酯部位, 鉴定出的 19 种物质中, 占总出峰面积的 89.0% 以上, 以苯并噻唑 (14.97%) 和雪松醇 (20.69%) 为主, 碳氢化合物 8 种, 烃类含氧衍生物 7 种, 有机酸和酯类化合物 4 种。石油醚和乙酸乙酯部位对肝癌细胞的抑制作用有明显的不同, 乙酸乙酯部位提取物对肝癌细胞有明显的抑制作用, 而石油醚部位对肝癌细胞抑制作用不明显。由于乙酸乙酯部位所含化合物较多, 探究哪一种或几种起作用还有待进一步的试验研究。

### 参考文献:

- [1] 胡人亮 苔藓植物学[M] 北京: 高等教育出版社, 1987. 2
- [2] 夏征农 辞海[M] 上海: 上海辞书出版社, 1999. 639
- [3] 朱 华 广西地钱属药用植物资源调查和形态构造研究 见: 中国中医药学会编 第三届全国《中药鉴定学》研讨会论文集 成都: 成都中医药大学, 2002 161~ 165
- [4] Akihiko M astsuo, Nakayama M. Enantiomeric Type Sesquiterphenoids of the Liverwort *Marchantia Polymorpha* [J] *Phytochemistry*, 1985, 24 (4): 777~ 781.
- [5] Asakawa, Motoo Tori, Tori Masuya, et al. Entsesquiterphenoids and Cyclic bis (bibenzyls) from the German Liverwort *Marchantia Polymorpha* [J] *Phytochemistry*, 1990, 29 (5): 1577~ 1584
- [6] Asakawa. Distribution of Cyclic bis (bibenzyls) in the South African Liverwort *Marchantia Polymorpha* [J] *Phytochemistry*, 1988, 27(1): 161~ 163
- [7] 朱 华, 肖建波, 钟世安, 等 地钱总黄酮含量的测定[J] *光谱实验室*, 2004, 21(2): 373~ 376
- [8] 朱 华, 肖建波, 钟世安, 等 地钱总黄酮的提取研究[J] *林产化学与工业*, 2004, 24(2): 69~ 72
- [9] 肖建波, 曹 慧, 钟世安, 等 拳卷地钱中黄酮类化合物的结构鉴定[J] *中草药*, 2004 (增刊): 41~ 43
- [10] 国家医药管理局中草药情报中心站 植物药有效成分手册[M] 北京: 人民卫生出版社, 1986 373~ 374

## 《质谱学报》加入台湾华艺CEPS 中文电子期刊服务申明

《质谱学报》期刊自2004年12月起, 加入台湾中文电子期刊服务- 思博网(CEPS)。中文电子期刊服务- 思博网是目前台湾地区最大的期刊全文数据库, 收录台湾地区300余种核心期刊的全文。现收录以中文为主要文字语言的核心学术期刊。收录范围为中国大陆、台湾、香港及其它全球各地以中文为主要语言的地区, 提供全球中文读者在线检索查询以及全文下载服务, 以通过将期刊数字化, 直接扩大两岸学术合作与交流。

由于《质谱学报》被CEPS收录, 故凡向本刊投稿者, 均视为其文稿刊登后可供CEPS收录、转载并上网发行; 其作者文章著作权使用费与稿酬本刊一次付清, 不再另付其它报酬。

《质谱学报》编辑部