

卷柏中挥发性组分的酶提取及气相色谱-质谱分析

回瑞华, 侯冬岩, 刘晓媛, 郭 华, 李学成, 耿红苓

(鞍山师范学院化学系, 辽宁 鞍山 114005)

摘要:用酶提取卷柏中挥发性组分, 考察 pH 值、酶用量、样品粒度等因素对提取率的影响。测得其挥发油的含量为 $\omega=5.85\%$ 。采用气相色谱-质谱法(GC/MS)分离确认出 31 种化学成分, 其中主要成分为雪松醇, 占总挥发油的 45.07%。并将酶提取法(CE)与水蒸汽蒸馏-萃取法(DSE)法进行了对比。

关键词:酶提取法; 卷柏; 挥发性成分; 气相色谱-质谱(GC/MS)

中图分类号: O657.63; Q949.751.8 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2006)01-17-05

Analysis of Cellulase Exteacts from the Volatile Constituents of *Herba Selaginellae* by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

HUI Rui-hua, HOU Dong-yan, LIU Xiao-yuan, GUO Hua, LI Xue-cheng, GENG Hong-ling
(Department of Chemistry, Anshan Normal University, Anshan 114005, China)

Abstract: The cellulase was used for extracting the volatile constituents of the *Herba Selaginellae*. The effects of pH, the amounts and the fineness of cellulase on extraction were discussed. The average yield was 5.85%. Thirty one chemical components were identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The main compound of them is cedrol. The content of cedrol makes up 45.07%. The cellulase extraction (CE) method was made a comparision with distillation extraction (DSE) method.

Key words: cellulase extraction method; *Herba Selaginellae*; volatile constituents; gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS)

卷柏是卷柏属植物 *S. pulvinata* 的干燥全草, 别名还魂草、万年松。矮小草本, 主茎直立, 侧枝丛生, 呈莲座状。中国大部分地区均有分布, 主产辽宁、河北、山东等地。卷柏全草味淡、微苦、性凉, 具有活血通经之功能, 经炒炭而成卷柏炭, 在临床上常用于化瘀、消炎、止血, 治疗吐血崩漏、便血、脱肛。国内外学者对其临床、药理作用及化学成分进行过研究^[1-4], 但有关卷柏的

挥发性成分的研究报道尚不多见。采用酶提取技术提取卷柏挥发性成分, 与水蒸汽蒸馏-萃取法相比提取率提高了 3.0%。利用气相色谱-质谱法(GC/MS)分析提取物, 获得 31 种化学成分, 其中酶提取物主要成分为雪松醇, 占总挥发油的 45.07%, 水蒸汽蒸馏-萃取法的萃取物主要成分亦为雪松醇, 占总挥发油的 39.50%。

收稿日期: 2005-05-16; 修回日期: 2005-08-23

基金项目: 辽宁省教育厅科学技术基金资助课题(No. 20331079)

作者简介: 回瑞华(1945~), 女(回族), 辽宁海城人, 教授, 从事有机分析及天然产物化学教学与研究。

E-mail: ruihuahui@163.com

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP 6890-5973 型气相色谱-质谱仪;惠普公司产品;R2-201 型旋转蒸发器;上海中科机械研究所产品;无水硫酸钠、亚硫酸氢钠等均为分析纯。

卷柏:2002 年 9 月采自中国千山,经辽宁大学环境与生命科学技术学院鉴定为 *S. pulvinata* 的全草,阴干粉碎(过孔径为 0.3 mm 筛)备用。纤维素酶:由辽宁大学环境与生命科学技术学院提供,采用文献[5]方法测定其活力。

1.2 酶提取法

取 50 g 干燥的卷柏粉末置于 1 000 mL 圆底烧瓶中,加入 400 mL 去离子水浸泡,调节 pH 值为 4.5,加入 1.0 g 纤维素酶,用水蒸汽蒸馏 4 h;馏出液用乙醚连续萃取三次,萃取液用旋转蒸发器除去乙醚,得到黄色透明液体,用活化过的无水硫酸钠脱水,收率为 $w=5.85\%$ 。密封保存于 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.3 水蒸汽蒸馏-萃取法

取 50 g 干燥的卷柏粉末置于 1 000 mL 圆底烧瓶中,加入 400 mL 去离子水浸泡,用水蒸汽蒸馏 4 h;馏出液用乙醚连续萃取三次,萃取液用旋转蒸发器除去乙醚,得到黄色透明液体,用活化过的无水硫酸钠脱水,收率为 $w=2.85\%$ 。密封保存于 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.4 气相色谱-质谱测定

1.4.1 色谱条件 色谱柱:HP-5 (25 m × 0.25 mm × 0.33 μm) 弹性石英毛细管柱;升温程序:初始温度 60 °C,以 5 °C/min 升至 200 °C;汽化温度 230 °C;进样量 0.2 μL;溶剂延迟 3 min;载气(He)流量 2 mL/min;分流比 20:1。

1.4.2 质谱条件 电子轰击(EI)离子源;离子源温度 200 °C;电子能量 70 eV;发射电流 34.6 μA;电子倍增器电压 1 200 V;接口温度 230 °C;质量扫描范围 m/z 20~500。

1.5 测定方法

1.5.1 定性分析 分别取上述酶提取法和水蒸汽蒸馏-萃取法提取的卷柏挥发油样品 0.2 μL,用气相色谱-质谱仪进行分析鉴定。通过 G170 LBA 化学工作站数据处理系统,检索 NIST98 谱图库,并分别与八峰索引及 EPA/NIH 质谱图集的标准谱图进行对照[6],复核,再结合有关文献[7-8]进行人工谱图解析确认其挥发油的各个化学成分。

1.5.2 定量分析 通过 G170LBA 化学工作站数据处理系统,用面积归一化法进行定量分析,分别求得各化学成分在挥发油中的相对含量。

2 结果与讨论

2.1 纤维素酶对提取过程的影响

图 1 为纤维素酶对卷柏挥发性组分提取过程的影响,结果表明,纤维素酶对卷柏挥发性组分的提取具有促进作用。与水蒸汽蒸馏-萃取法相比,卷柏挥发性组分的提取率提高了 3.0%。

2.2 pH 值对酶提取的影响

图 2 为 pH 值对纤维素酶活力的影响,实验表明,当 pH=4.5 时,纤维素酶活力单位最高,表明该值是纤维素酶的最适酶解 pH 值。表 1 为 pH 值对卷柏挥发性组分的提取率的影响,由表 1 可知 pH 值为 4.5 时卷柏挥发性组分的提取率最高。

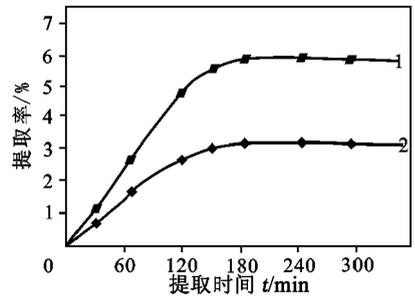


图 1 纤维素酶对卷柏挥发性组分提取过程的影响

Fig. 1 Effect of cellulase on extracting the volatile constituent

1—酶提取法(CE method);
2—水蒸汽蒸馏-萃取法(DSE method)

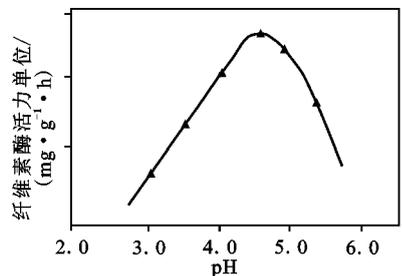


图 2 pH 值对纤维素酶活力的影响
Fig. 2 Effect of pH on cellulase activity

表 1 pH 值对酶提取卷柏挥发性组分的影响

Table 1 Effect of pH on cellulase extracting the volatile constituent from *Herba Selaginellae*

pH 值	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0
提取率/%	3.05	3.55	5.85	5.10	4.02	3.70	3.35	2.75

2.3 纤维素酶用量对提取过程的影响

图 3 为纤维素酶用量对卷柏挥发性组分提取率的影响, 结果表明, 纤维素酶用量为 0.4 g 时, 卷柏挥发性组分的提取率最高。

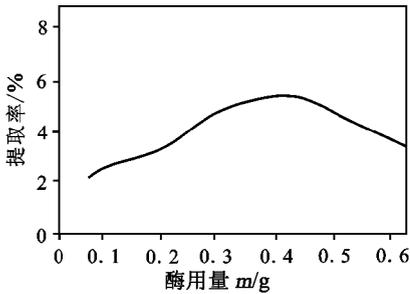


图 3 纤维素酶用量对卷柏挥发性组分提取过程的影响

Fig. 3 Effect of the contents of cellulase on extracting the volatile constituent

2.4 卷柏粒度对纤维素酶法提取过程的影响

卷柏粒度对纤维素酶法提取过程的影响如图 4 所示。结果表明, 卷柏粒度越小, 卷柏挥发性组分提取率越高, 当卷柏颗粒目数大于 40~60 目时, 粒度对提取率的影响减弱, 并且粒度过细会导致样品带入提取液, 因此适宜的卷柏粉碎粒度为 40~60 目。

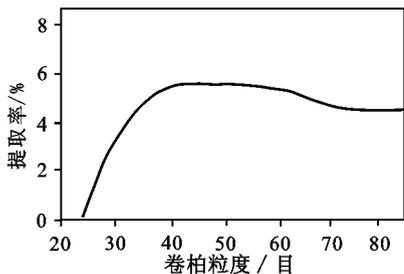


图 4 卷柏粒度对纤维素酶法提取过程的影响

Fig. 4 Effect of the fineness of sample on extracting the volatile constituent

2.5 两种方法的比较研究

按 1.5 测定方法进行实验, 由化学工作站给出两种方法提取卷柏挥发油的总离子流图, 如图 5 所示。

将确认的两种方法提取卷柏挥发油中的化学成分及相对含量列入表 2。

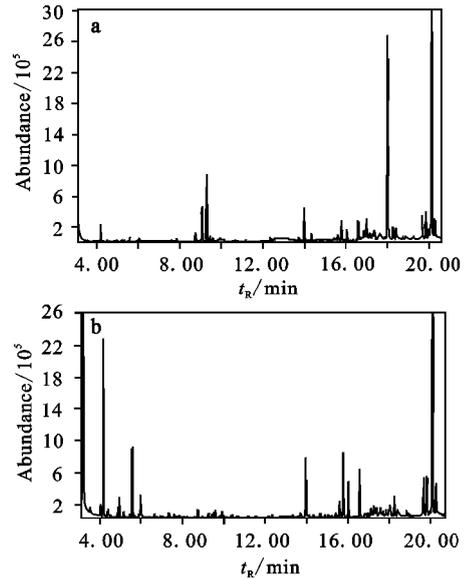


图 5 卷柏挥发油总离子流图

(a) 水蒸汽蒸馏-萃取法提取; (b) 酶提取

Fig. 5 Total ion chromatogram of volatile oil from *Herba Selaginellae*

(a) by CE method; (b) by DSE method

由表 2 可知酶提取卷柏挥发油中得到 31 种化合物, 占挥发油总量的 97.54%; 主要成分为雪松醇, 占挥发油总量的 45.07%, 此外含有其它醇类化合物 8.13%, 烯萜化合物 31.27%, 酮类化合物 1.27%, 酚类化合物 5.60%, 苯的衍生物 2.49% 及烷烃化合物 3.26%。水蒸汽蒸馏-萃取法提取卷柏挥发油中, 鉴定出 23 种化合物, 占挥发油总量的 96.21%; 主要成分为雪松醇, 占挥发油总量的 39.50%, 含有其它醇类化合物 19.19%, 烯萜化合物 28.66%, 酮类化合物 2.99%, 酚类化合物 4.20%, 苯的衍生物 0.67% 及烷烃化合物 1.00%。

由于卷柏的植物细胞由细胞壁及原生质体组成, 细胞壁的主要成分是纤维素, 细胞间存在的细胞间质将细胞网络其中。在提取过程中, 当细胞原生质体中的挥发性成分向提取介质扩散时, 必须克服细胞壁及细胞间质的双重阻力。酶

提取卷柏挥发性化学成分的过程中,由于纤维素酶作用于卷柏的植物细胞,使细胞壁及细胞间质中的纤维素降解,引起细胞壁及细胞间质结构产生局部疏松、膨胀、崩溃等变化,减小细胞壁、细

胞间质等传质屏障对挥发性成分从细胞内向提取介质扩散的传质阻力,从而提高挥发性化学成分的提取率。

表 2 卷柏挥发油中化学成分鉴定结果

Table 2 Components of volatile oil from *Herba Selaginellae*

序号 No.	保留时间 t_R /min	化合物 Compound	相对含量 Content/%		分子式 Formula	相似度 Similarity /%
			CE	DSE		
1	3.14	正己醇 1-hexanol	-	9.70	$C_6H_{14}O$	85
2	3.22	1,3-二甲基苯 1,3-dimethylbenzene	0.66	0.67	C_8H_{10}	92
3	3.53	1,2-二甲基苯 1,2-dimethylbenzene	0.52	-	C_8H_{10}	75
4	4.03	2-甲基-5-(1-甲基乙基)-双环[3.1.0]己-2-烯 2-methyl-5-(1-methylethyl)-bicyclo[3.1.0]hex-2-ene	0.64	-	$C_{10}H_{16}$	81
5	4.16	2,6,6-三甲基双环[3.1.1]庚-2-烯 2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene	0.79	-	$C_{10}H_{16}$	95
6	4.18	2,6,6-三甲基双环[3.1.1]庚-2-烯 2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene	-	1.13	$C_{10}H_{16}$	95
7	4.40	7,7-二甲基-2-亚甲基双环[2.2.1]庚烷 7,7-dimethyl-2-methylenebicyclo[2.2.1]heptane	0.20	-	$C_{10}H_{16}$	95
8	4.86	3-甲基-1-(1-甲基乙基)双环[3.1.0]己-2-烯 3-methyl-1-(1-methylethyl)bicyclo[3.1.0]hex-2-ene	0.59	-	$C_{10}H_{16}$	87
9	4.94	β -蒎烯 β -pinene	1.23	-	$C_{10}H_{16}$	95
10	5.17	α -蒎烯 α -pinene	0.54	-	$C_{10}H_{16}$	87
11	5.61	3-萜烯 3-carene	4.70	0.36	$C_{10}H_{16}$	94
13	6.00	6,6-二甲基-2-亚甲基-双环[3.1.1]庚烷 6,6-dimethyl-2-methylenebicyclo[3.1.1]heptane	1.07	-	$C_{10}H_{16}$	95
14	8.73	双环[2.2.1]庚-2-酮 bicyclo[2.2.1]heptan-2-one	0.78	-	$C_{10}H_{16}O$	97
15	8.75	樟脑 camphor	-	0.84	$C_{10}H_{16}O$	97
16	9.06	冰片 borneol	-	0.94	$C_{10}H_{18}O$	95
17	9.45	5-甲基-2-(1-甲基乙基)环己醇 5-methyl-2-(1-methylethyl)cyclohexanol	-	0.54	$C_{10}H_{20}O$	91
18	9.57	4-甲基-1-(1-甲基乙基)-3-环己烯-1-醇 4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-cyclohexen-1-ol	1.66	-	$C_{10}H_{18}O$	95
19	9.91	$\alpha, \alpha, 4$ -三甲基-3-环己烯-1-甲醇 $\alpha, \alpha, 4$ -trimethyl-3-cyclohexene-1-methanol	2.49	-	$C^{10}H_{18}O$	83
20	13.98	(+)-4-萜烯 (+)-4-carene	5.31	3.27	$C_{10}H_{16}$	90
21	14.35	2,6-双(1,1-二甲基乙基)-4,4-二甲基环己-2,5-二烯-1-酮 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4,4-dimethylcyclohexa-2,5-dien-1-one	-	0.58	$C_{16}H_{26}O$	95
22	15.59	茄苳烯 copaene	1.95	-	$C_{15}H_{24}$	93
23	15.61	1,2,3,4,5,6,7,8-八氢化-1,4,9,9-四甲基-4,7-桥亚甲基菊环 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-1,4,9,9-tetramethyl-4,7-methanoazulene	-	2.58	$C_{15}H_{24}$	90
24	15.76	石竹烯 caryophyllene	2.58	5.21	$C_{15}H_{24}$	99
25	16.04	罗汉柏烯 thujopsene	1.30	3.22	$C_{15}H_{24}$	99
26	16.59	1,1,4,8-四甲基-4,7,10-环十一三烯 1,1,4,8-tetramethyl-4,7,10-cycloundecatriene	2.33	4.33	$C_{15}H_{24}$	98
27	16.90	2,6-双(1,1-二甲基乙基)-2,5-环己二烯-1,4-二酮 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-2,5-cyclohexadiene-1,4-dione	-	0.52	$C_{14}H_{20}O_2$	95
28	17.01	4-(1,1-二甲基乙基)-1,2-苯二醇 4-(1,1-dimethylethyl)-1,2-benzenediol	-	3.26	$C_{10}H_{14}O_2$	80

续表

序号 No.	保留时间 t_R /min	化合物 Compound	相对含量		分子式 Formula	相似度 Similarity /%
			Content/%			
			CE	DSE		
29	17.14	1,2,3,4,4a,5,6,8a-八氢化-7-甲基-4-亚甲基-1-(1-甲基乙基)萘 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(methylethyl)naphthalene	1.02	0.89	C ₁₅ H ₂₄	98
30	17.27	大香叶稀 D germacrene D	1.36	-	C ₁₅ H ₂₄	98
31	17.37	4-(2,6,6-三甲基-1-环己-1-烯基)-3-丁烯-2-酮 4-(2,6,6-trimethyl-cyclohexen-1-yl)-3-buten-2-one	-	1.82	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	92
32	17.39	4,11-桉叶油二烯 eudesma-4,11-diene	1.47	-	C ₁₅ H ₂₄	96
33	17.60	2,5-二甲氧基乙基苯 2,5-dimethoxyethylbenzene	0.75	-	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	83
34	17.85	1-甲基-4-(1,2,2-三甲基环戊基)苯 1-methyl-4-(1,2,2-trimethylcyclopentyl) benzene	0.56	-	C ₁₅ H ₂₂	98
35	18.00	2,6-二叔丁基对甲酚 butylated hydroxytoluene	5.60	4.20	C ₁₅ H ₂₄ O	97
36	18.26	1,2,3,5,6,8a-六氢化-4,7-二甲基-1-(1-甲基乙基)萘 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)naphthalene	1.89	1.38	C ₁₅ H ₂₄	98
37	18.42	5,6,7,7a-四氢化-4,4,7a-三甲基-2(4H)-苯并呋喃酮 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-2(4H)-benzofuranone	0.94	1.05	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	95
38	18.86	4-乙基-2,2,4-三甲基-3-(1-甲基乙基)环戊烷甲醇 4-ethenyl-2,2,4-trimethyl-3-(1-methylethyl)cyclohexanemethanol	0.40	-	C ₁₅ H ₂₆ O	78
39	19.66	石竹烯氧化物 caryophyllene oxide	3.57	4.33	C ₁₅ H ₂₄ O	94
40	19.82	绿花醇 viridiflorol	3.64	4.75	C ₁₅ H ₂₆ O	81
41	19.99	十六烷 hexadecane	-	1.00	C ₁₆ H ₃₄	97
42	20.10	8H-雪松烷醇 8H-cedran-8-ol	45.07	39.50	C ₁₅ H ₂₆ O	96
43	20.26	螺[4.5]癸烷 spiro[4.5]decane	1.99	-	C ₁₀ H ₁₈	86
44	20.28	1,5,5,8-四甲基-12-氧二环[9.1.0]十二-3,7-二烯 1,5,5,8-tetramethyl-12-oxabicyclo[9.1.0]dodeca-3,7-diene	-	1.96	C ₁₅ H ₂₄ O	91

注:CE — 酶提取法; DSE — 水蒸气蒸馏-萃取法

参考文献:

- [1] 何 薇, 曾祖平, 王永红. 药用卷柏的研究概况[J]. 中草药, 2000, 31(12): 954-956.
- [2] 晁 志, 程彰华. 卷柏的止血作用[J]. 中草药, 1997, 28(6): 351-353.
- [3] 戴 忠, 王钢力. 中华卷柏的化学成分研究[J]. 中草药, 2001, 32(9): 784-785.
- [4] 于丽萍, 张 雪, 王玉芝. 单剂卷柏对 FFR 胰岛素敏感性的影响[J]. 中成药, 1995, 14(1): 70-71.
- [5] 刘妙莲, 王 洁. 影响纤维素酶活力测定的几个因素[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(6): 37-39.
- [6] Heller S R, Milne G W A. EPA/NIH Mass Spectral Database: 1-4 [M]. Washington: US Government Print Office, 1978.
- [7] 何 坚, 孙宝国. 香料化学与工艺学[M]. 北京: 化学工业出版社, 1995: 286-305.
- [8] 施钧慧, 汪聪慧. 香料质谱图集[M]. 北京: 中国质谱学会, 1992: 224-225.