

乌柏叶片中抑螺提取物的主要化学成分分析

杨永峰¹, 孙启祥²

(1. 国家林业局调查规划设计院, 北京 100714; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

Analysis on main chemical components in oncomelania-inhibited extracts from leaf of *Sapium sebiferum* YANG Yongfeng¹, SUN Qixiang² (1. Academy of Forestry Inventory and Planning, State Forestry Administration, Beijing 100714, China; 2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2015, 24(3): 115-117

Abstract: Oncomelania-inhibited component in petroleum ether extracts from leaf of *Sapium sebiferum* (Linn.) Roxb. was researched by column separation technology and GC-MS method, and compound separated from leaf was identified by NIST 107 and Wiley 6.0. The results show that relative peak areas of 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol, hexadecanoic acid, 9,12,15-octadecadienoic acid methyl ester, 1,2-benzenedicarboxylic acid bis (2-ethylhexyl) ester and 8,11,14-eicosatrienoic acid are larger, and suggesting that they are the main oncomelania-inhibited compounds. In which, hexadecanoic acid may be one of active materials inhibiting oncomelania from *S. sebiferum*. This result has an important value to extension of biological measure controlling schistosomiasis.

关键词: 乌柏; 钉螺; 抑螺成分; GC-MS

Key words: *Sapium sebiferum* (Linn.) Roxb.; oncomelania; oncomelania-inhibited component; GC-MS

中图分类号: Q946; Q949.99 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2015)03-0115-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2015.03.17

血吸虫病是严重危害人类生命健康的寄生虫病,中国是血吸虫病流行最严重的国家之一^[1-2],虽然近期得到了有效控制,但局部地区并不乐观^[3]。主要原因之一是无法有效控制血吸虫病中间宿主钉螺的传播。湿热适宜地区钉螺生命力异常活跃,很难彻底清除,致使部分区域血吸虫病依然蔓延,因此,抑制钉螺即可有效控制血吸虫病^[4]。生物法是费效比最低、对环境污染最小的抑螺方法^[5]。

乌柏(*Sapium sebiferum* (Linn.) Roxb.)是重要的经济植物之一,在湿热地区栽培甚广^[6],也是一种很好的抑螺植物^[4]。以乌柏林为主形成的微环境及产生的化感物质能显著降低滩地钉螺密度与阳性感染螺密度^[7];乌柏叶片石油醚提取物具有很强的抑螺效果^[8]。在前期工作的基础上,作者结合抑螺实验采用柱分离技术和GC-MS法,分离和鉴定抑螺提取物的主要成分,以期对血吸虫病的防治提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 材料

乌柏新鲜叶片于2013年5月采自湖北省林业科学研究院九峰林业基地。叶片用蒸馏水洗净后,在60℃烘箱里烘干,粉碎后过30目筛,密封、备用。钉螺采自湖北省荆州市沙市

区,在去氯水中饲养2 d(25℃);挑选个体一致、活力较强的成螺进行实验^[7-8]。

正己烷、三氯甲烷和二氯甲烷均为分析纯,重蒸后使用;甲醇为色谱纯。薄层层析硅胶板GF254购自安徽良臣硅源材料有限公司;柱层析硅胶(0.075~0.150 mm,购自青岛海洋化工厂)。

1.2 方法

1.2.1 柱分离实验

1.2.1.1 抑螺活性成分的粗分离 采用湿法将弗罗里硅土装到填充柱中,用500 mL正己烷冲洗填充柱;装入叶片粉末100 g并依次用正己烷、正己烷-二氯甲烷混合溶液(体积比1:1)、二氯甲烷、甲醇洗脱,每种洗脱液1 L,以1 min 10滴左右的速度洗脱,收集洗脱液。以三氯甲烷-甲醇-蒸馏水混合溶液(体积比12:7:1)作为展开剂,用薄层硅胶板鉴别各洗脱液,经荧光照射检验后合并洗脱成分相同的洗脱液,减压浓缩、真空干燥。参照文献^[8]的方法进行抑螺实验,确定抑螺效果显著的提取物。

1.2.1.2 抑螺活性成分的细分离 采用湿法将200~300目硅胶装入细分离层析柱中,先用300 mL甲醇冲洗净化柱材料,再装入抑螺效果显著的提取物2 g,使用甲醇进行洗脱,并收集洗脱液。以三氯甲烷-甲醇-蒸馏水混合溶液(体积比

收稿日期: 2015-03-12

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD38B07)

作者简介: 杨永峰(1983—),男,安徽阜阳人,博士,主要从事湿地保护与管理与林业生态工程方面的研究。

12:7:1)作为展开剂,用薄层硅胶板鉴别各洗脱液,经荧光照射检验后合并洗脱成分相同的洗脱液,减压浓缩至干。参照文献[8]的方法进行抑螺实验,确定抑螺活性最强的 I、II、III和IV组提取物。每组分别取约2 mg 提取物,溶解于1 mL 正己烷中,用无水硫酸钠脱水12 h 以上,然后吸取2 μ L 进行GC-MS分析。

1.2.2 气相色谱-质谱联用仪及条件 采用QP2010型气相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司)进行检测。检测条件为:DB-5 石英毛细管柱(30 m \times 0.25 mm,0.25 μ m);不分流进样,进样口温度250 $^{\circ}$ C。毛细管柱程序升温条件为:初始温度50 $^{\circ}$ C,保持2 min;以1 $^{\circ}$ C \cdot min $^{-1}$ 速率升温至60 $^{\circ}$ C,保持2 min;以3 $^{\circ}$ C \cdot min $^{-1}$ 速率升温至150 $^{\circ}$ C,保持2 min;最后以10 $^{\circ}$ C \cdot min $^{-1}$ 速率升温至230 $^{\circ}$ C,保持6 min。载气为氦气,恒压模式分离。离子源温度200 $^{\circ}$ C;EI 离子源,电离电压70 eV;质量扫描范围40~600 amu;传输线温度250 $^{\circ}$ C。

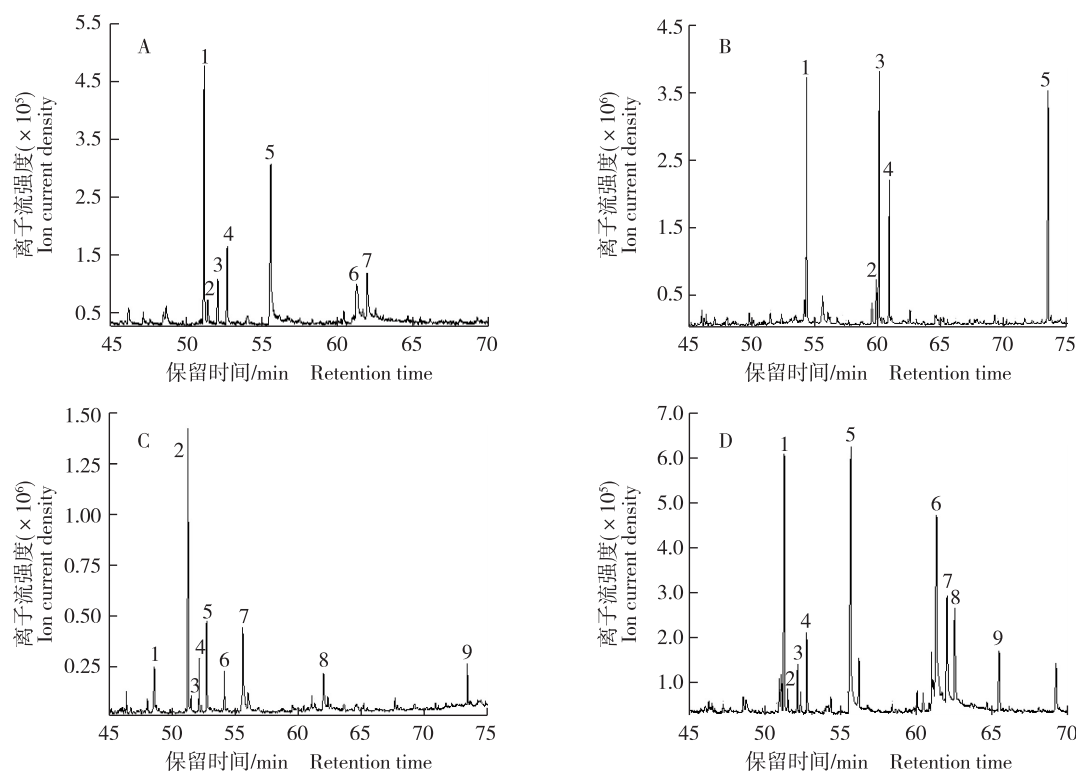
采用NIST 107及Wiley 6.0 质谱图库,根据相似度初步确定各成分^[9-10]。

2 结果和分析

乌柏叶片中抑螺提取物(I~IV组)的抑螺活性成分的总离子流色谱图见图1。

由图1-A可见,I组抑螺提取物的总离子流色谱图有7个较大的色谱峰,初步确定化合物1为3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecan-1-ol(3,7,11,15-四甲基-2-烯-1-十六醇),相似度91%;化合物2为6-chloro-N-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine(6-氯-N-乙基-1,3,5-三嗪-2,4-二胺),相似度85%;化合物3为3,7,11,15-四甲基-2-烯-1-十六醇,相似度91%;化合物4为3,7,11,15-四甲基-2-烯-1-十六醇,相似度93%;化合物5为hexadecanoic acid(棕榈酸),相似度96%;化合物6为9,12,15-octadecatrienoic acid-2,3-dihydroxypropyl ester(9,12,15-三烯-十八酸-2,3-二丙二醇酯),相似度86%;化合物7为octadecanoic acid(十八酸),相似度87%。

由于化合物1、化合物3和化合物4的质谱图极为相似,



A. I组抑螺提取物 Group I of oncomelania-inhibited extract: 1,3,4: 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecan-1-ol; 2: 6-chloro-N-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine; 5: hexadecanoic acid; 6: 9,12,15-octadecatrienoic acid-2,3-dihydroxypropyl ester; 7: octadecanoic acid. B. II组抑螺提取物 Group II of oncomelania-inhibited extract: 1: hexadecanoic acid methyl ester; 2: 9,12-octadecadienoic acid methyl ester; 3: 9,12,15-octadecadienoic acid methyl ester; 4: octadecanoic acid methyl ester; 5: 1,2-benzenedicarboxylic acid bis(2-ethylhexyl) ester. C. III组抑螺提取物 Group III of oncomelania-inhibited extract: 1: tetradecanoic acid; 2,4,5: 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecan-1-ol; 3: 3,7,11-trimethyl-1-dodecanol; 6: 2,6,10-trimethyl-tetradecane; 7: hexadecanoic acid; 8: octadecanoic acid; 9: 1,2-benzenedicarboxylic acid bis(2-ethylhexyl) ester. D. IV组抑螺提取物 Group IV of oncomelania-inhibited extract: 1,2,3,4: 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecan-1-ol; 5: hexadecanoic acid; 6: 8,11,14-eicosatrienoic acid; 7: 9-octadecenoic acid; 8: 9-octadecanamide; 9: [(2-fluorophenyl)methyl]-1H-purin-6-amine.

图1 乌柏叶片抑螺提取物(I~IV组)的总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram of oncomelania-inhibited extracts (group I-IV) from leaf of *Sapium sebiferum* (Linn.) Roxb.

但保留时间不同,推测它们互为异构体,且3,7,11,15-四甲基-2-烯-1-十六醇和棕榈酸的峰面积较大,即二者相对含量较高,推测其是抑螺活性成分的几率较高。

由图1-B可见,Ⅱ组抑螺提取物的总离子流色谱图有5个较大的色谱峰,初步确定化合物1为hexadecanoic acid methyl ester(十六酸甲酯),相似度97%;化合物2为9,12-octadecadienoic acid methyl ester(9,12-十八烯酸甲酯),相似度97%;化合物3为9,12,15-octadecadienoic acid methyl ester(9,12,15-十八烯酸甲酯),相似度93%;化合物4为octadecanoic acid methyl ester(十八酸甲酯),相似度97%;化合物5为1,2-benzenedicarboxylic acid bis(2-ethylhexyl) ester[1,2-苯二甲酸双(2-乙基己酯)],相似度97%。

由图1-C可见,Ⅲ组抑螺提取物的总离子流色谱图有9个较大的色谱峰,初步确定化合物1为tetradecanoic acid(十四酸),相似度95%;化合物2为3,7,11,15-四甲基-2-烯-1-十六醇,相似度94%;化合物3为3,7,11-trimethyl-1-dodecanol(3,7,11-三甲基-1-二十醇),相似度86%;化合物4为3,7,11,15-四甲基-2-烯-1-十六醇,相似度94%;化合物5为3,7,11,15-四甲基-2-烯-1-十六醇,相似度95%;化合物6为2,6,10-trimethyl-tetradecane(2,6,10-三甲基-二十四烷),相似度84%;化合物7为棕榈酸,相似度93%;化合物8为octadecanoic acid(二十酸),相似度94%;化合物9为1,2-苯二甲酸双(2-乙基己酯),相似度89%。

由图1-D可见,Ⅳ组抑螺提取物的总离子流色谱图有9个较大的色谱峰,初步确定化合物1为3,7,11,15-四甲基-2-烯-1-十六醇,相似度94%;化合物2为3,7,11,15-四甲基-2-烯-1-十六醇,相似度94%;化合物3为3,7,11,15-四甲基-2-烯-1-十六醇,相似度94%;化合物4为3,7,11,15-四甲基-2-烯-1-十六醇,相似度93%;化合物5为棕榈酸,相似度95%;化合物6为8,11,14-eicosatrienoic acid(8,11,14-烯-二十酸),相似度89%;化合物7为9-octadecenoic acid(9-烯-十八酸),相似度89%;化合物8为9-octadecenamido(9-烯-十八胺),相似度98%;化合物9为[(2-fluorophenyl)methyl]-1H-purin-6-amine[(2-氟苯基)甲基]-1-H-吡啶-6-胺],相似度81%。

上述研究结果显示:3,7,11,15-四甲基-2-烯-1-十六醇、棕榈酸、9,12,15-十八烯酸甲酯、1,2-苯二甲酸双(2-乙基己酯)和8,11,14-烯-二十酸的相对峰面积较大。这些成分分别属于烯醇、有机酸及酯类大分子化合物,沸点低于250℃、稳定性好且较容易气化,适合用气相色谱测定。样品中极性较大、沸点高、难以气化的成分需进行HPLC-MS分析。

3 结 论

从乌柏叶片抑螺提取物中分离得到的3,7,11,15-四甲基-2-烯-1-十六醇、棕榈酸、9,12,15-十八烯酸甲酯、1,2-苯

二甲酸双(2-乙基己酯)和8,11,14-烯-二十酸等成分的相对峰面积较大。由于棕榈酸具有抑制胰岛GLUT2、INS、PDX-1 mRNA表达^[11],导致肌细胞断裂、凋亡^[12]以及抗虫^[13]的作用,因此,推测棕榈酸是乌柏抑螺的活性物质之一。

相对于传统的物理与化学药物,植物抑螺具有经济高效、生态环保和效用持续等优点,利用植物抑螺技术防治血吸虫病有着极其广阔的应用前景。研究乌柏叶片抑螺提取物的主要化学成分,不仅对兴林抑螺和大力推广生物措施防控血吸虫病具有重要意义,还为利用乌柏防治血吸虫病、定向选育高抑螺活性的乌柏品种及开展更有效的抑螺行动提供理论指导。本研究通过抑螺实验结合GC-MS联用分析获得的研究结果,对乌柏叶片的抑螺研究具有重要的参考价值。但这些已鉴定的化合物抑螺效果如何,需要通过进一步的提纯、合成以及单独或联合实验加以验证。

参考文献:

- [1] 杨永峰,彭镇华,孙启祥,等.重大工程对血吸虫病流行区扩散的潜在影响[J].长江流域资源与环境,2009,18(11):1067-1073.
- [2] 刘国华.林业血防工程与血吸虫病防治[J].湿地科学与管理,2007,3(2):16-17.
- [3] 杨二艳,周立志,方建民.长江安庆段滩地鸟类群落多样性及其季节动态[J].林业科学,2014,50(4):77-83.
- [4] 彭镇华,江泽慧.中国新林种:抑螺防病林研究[M].北京:中国林业出版社,1995:3-9.
- [5] LUO K S, HE Y C, XU L C, et al. Progress in researches on active constituents and molluscicidal activity of *Sapium sebiferum* [J]. Chinese Journal of Schistosomiasis Control, 2013, 25: 538-540.
- [6] 张克迪,林一天.中国乌柏[M].北京:中国林业出版社,1994:8-20.
- [7] 孙启祥,张建锋,周金星.林业血防工程建设中的问题探讨[J].湿地科学与管理,2006,2(4):44-46.
- [8] 杨永峰,彭镇华,孙启祥,等.乌柏抑螺效果的研究[J].湿地科学与管理,2011,7(2):4-7.
- [9] 谭和平,谭福元,邹燕,等.核磁共振技术在茶叶生化成分鉴定中的应用[J].中国测试,2009,35(6):70-73.
- [10] 钟瑞敏,曾庆孝,张振明,等.气质联用结合保留指数对比在五种木兰科芳香精油成分鉴定中的应用[J].分析测试学报,2006,25(5):16-20.
- [11] 张丽,高聆,梁军,等.棕榈酸对胰岛的脂毒性及非诺贝特的保护作用[J].中华内分泌代谢杂志,2005,21(2):155-158.
- [12] 毛轲.棕榈酸影响肌肉素基因的表达及其机制的初步研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学生命科学与技术学院,2014:15-28.
- [13] 戈峰,李镇宇,谢映平,等.我国主要松树诱导抗虫性的一些规律比较[J].北京林业大学学报,2002,24(3):61-65.

(责任编辑:张明霞)