

两种水蒸气蒸馏法 提取金弹金柑挥发油成分的 GC - MS 分析

吴 斌 陈子龙 曾治君 张吉日木吐 刘红宁 朱卫丰 刘 勇 李 斌*

(江西中医药大学院士工作站 江西 南昌 330004)

摘要: 目的 对金弹金柑的挥发油成分进行分析鉴定。方法 分别采用与水共沸蒸馏法和纯蒸气蒸馏法提取金弹金柑挥发油,以 GC-MS 分析鉴定挥发油化学成分。结果 与水共沸蒸馏法挥发油提取率为 0.61%,共分离 72 个峰,鉴定 50 个成分,占挥发油总量 96.38%;纯蒸气蒸馏法挥发油提取率为 0.89%,共分离 40 个峰,鉴定 33 个成分,占挥发油总量 99.26%。结论 两种方法共分离鉴定 74 个化学成分,D-柠檬烯为金弹金柑挥发油的主要成分。两种提取方法成分差异较大,与水共沸蒸馏法提取种类多而杂且得率低,纯蒸气蒸馏法提取种类少而精且得率高。

关键词: 金弹金柑; 挥发油; GC-MS; 与水共沸蒸馏法; 纯蒸气蒸馏法

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2020.03.023

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2020)03-0589-02

金弹金柑为芸香科金柑属植物金弹金柑 *Fortunella crassifolia* Swingle 的果实,别名金柑,亦称美华金柑、宁波金柑,主要产于江西、浙江、湖南等地^[1]。金弹金柑果实椭圆至圆形,果皮厚且光滑,色泽金黄,果肉味香甜酸醇适口,营养丰富。金弹金柑入药,具有开胃通气、润肺、化痰镇咳、预防感冒、醒酒止渴、理气散寒和调理生理功能紊乱等功效,民间常用于治气管炎、高血压、胃病、产妇产后腹痛等病症^[2]。现代药理学研究表明,金弹金柑中富含挥发油、黄酮、柠檬苦素等多种活性成分,具有很高的药用价值,主要表现在抗氧化、抑菌、抗癌、免疫调节和防治心脑血管疾病等多种功效,是一种具有很大开发潜力的药用保健资源^[3]。

目前,对金弹金柑的研究多集中于生物学特性、营养成分、储藏保鲜方面。本文通过两种不同的蒸馏法提取金弹金柑挥发油,并采用 GC-MS 联用技术分离鉴定,为金弹金柑的提取方法及合理开发利用提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 材料 新鲜金弹金柑 2017 年 4 月 10 日采自江西吉安,经江西中医药大学药学院刘勇教授鉴定为芸香科金柑属植物金弹金柑 *Fortunella crassifolia* Swingle 的果实。

1.2 仪器及试剂 Agilent 7890A 气相色谱-5975C 质谱联用仪(美国 Finnigan 公司)。DT5-2B 型低速台式离心机(北京时代北利离心机有限公司)。HR-12 型食品碎切机(安徽华菱西厨装备股份有限公司)。中药精油智能提取设备(江西赫柏康华制药设备有限公司)。试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 金弹金柑挥发油的提取

2.1.1 与水共沸蒸馏法提取金弹金柑挥发油 新鲜金弹金柑药材 77 kg,洗净,常温干燥粉碎。粗碎后的金弹金柑置提取罐中,按 1:5 的料水质量比加水,加热提取,冷凝后得油水混合物,待油份体积不再增加时,停止加热,冷却分层,移取上层液体于棕色瓶中,密封静置一晚,离心(3000 r·min⁻¹,10min)取上清液,置 500ml 棕色瓶中,4℃冰箱中保存,得挥发油 470ml,得油率 0.61%。

2.1.2 纯蒸气蒸馏法提取金弹金柑挥发油 新鲜金弹金柑药材 112kg,洗净,常温干燥粉碎。粗碎后的金弹金柑置提取罐中,通

水蒸气提取,冷凝后得到油水混合物,待油份体积不再增加时,停止通水蒸气,冷却分层,移取上层液体于棕色瓶,密封静置一晚,离心(3000 r·min⁻¹,10min)取上清液,置 1000ml 棕色瓶中,4℃冰箱中保存,得挥发油 1000ml,得油率为 0.89%。

2.1.3 GC-MS 分析条件

2.1.3.1 气相色谱条件 Agilent 19091s-433:93.92873 柱,30m×0.25mm×0.25μm。进样口温度为 250℃,总流量为 19.6 ml·min⁻¹,分流比为 20:1,柱流量为 1ml·min⁻¹。接口温度为 280℃。升温程序 40℃保持 2min,以 10℃·min⁻¹升至 250℃,保持 2min,再以 20℃·min⁻¹升至 280℃,保持 1min。载气为高纯氦。进样量为 1μl。

2.1.3.2 质谱条件 EI 电离源,电子能量为 70eV,离子源温度为 230℃,四级杆温度为 150℃。测定方式为全扫描,质量范围为 35~550u,倍增器电压为 1482V,灯丝发射电流为 34.6μA。溶剂延迟时间为 2.0min。

2.1.3.3 定性和定量 应用 NIST11.L 谱库检索,并逐个解析各峰相应的质谱图,对基峰、质荷比以及相对丰度等与标准图谱比较、鉴定。定量用峰面积归一化法计算各化学成分在挥发油中的相对百分含量。

3 结果

采用 GC-MS 联用技术对与水共沸蒸馏和纯蒸气蒸馏两种方法提取的挥发油进行化学成分分析。得与水共沸蒸馏法提取总离子流图,见图 1。纯蒸气蒸馏法提取总离子流图,见图 2。两种方法共检测 93 个峰。以面积归一化法计算各组分的相对百分含量,结合质谱计算机软件 and NIST11.L 质谱库、保留指数和文献资料共同分析鉴定 74 个化学成分匹配度都在 80% 以上。成分鉴定结果见表 1。

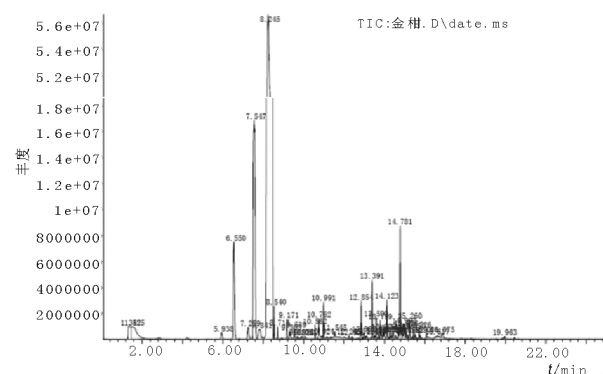


图 1 与水共沸蒸馏法 GC-MS 总离子流图

收稿日期: 2019-05-15; 修订日期: 2019-12-06

基金项目: 江西省 2011 协同创新项目(JXXT2018002)

作者简介: 吴 斌(1993-),男(汉族),江西上饶人,江西中医药大学在读硕士研究生,主要从事天然药物化学研究工作。

* 通讯作者简介: 李 斌(1970-),女(汉族),江西南昌人,江西中医药大学教授,博士研究生导师,博士学位,主要从事中药化学研究工作。

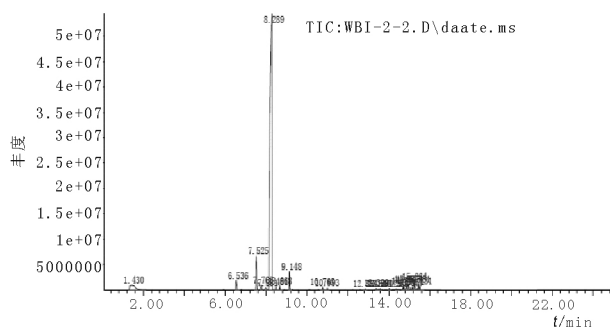


图 2 纯蒸气蒸馏法 GS-MS 总离子流图

表 1 与水共沸蒸馏法和纯蒸气蒸馏法提取金弹金柑挥发油 GS-MS 成分分析结果

序号	保留时间 /min	化合物名称	相对百分含量 /%	
			与水共沸蒸馏法	纯蒸气蒸馏法
1	1.342	Propane	0.830	3.801
2	2.855	Heptane	0.104	-
3	4.247	辛烷	0.053	-
4	5.938	Nonane	0.208	0.066
5	6.536	(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene	-	1.245
6	6.549	α-蒎烯	2.727	-
7	6.795	莰烯	-	0.061
8	6.814	Bicyclo[2.2.1]heptane-2,2-dimethyl-3-methylene-, (1S)-	0.019	-
9	7.258	Bicyclo[3.1.0]hexane-4-methylene-1-(1-methylethyl)-	0.385	-
10	7.547	β-月桂烯	8.577	3.789
11	7.659	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	-	0.039
12	7.765	α-水芹烯	-	0.627
13	7.957	(1S)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene	0.045	-
14	7.981	1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	-	0.384
15	8.245	D-柠檬烯	76.830	83.07
16	8.481	β-罗勒烯	-	0.200
17	8.540	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (Z)-	0.252	-
18	8.714	γ-松油烯	0.111	0.252
19	9.171	1-甲基-4-(1-甲基亚基)-环己烯	0.245	1.172
20	9.303	Undecane	0.169	0.043
21	9.538	1,3,8-p-Menthatriene	0.135	-
22	9.687	2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, trans-	0.049	-
23	9.776	2,4,6-Octatriene, 3,4-dimethyl-	0.022	-
24	9.928	1,4-Cyclohexadiene, 3-ethenyl-1,2-dimethyl-	0.093	-
25	10.062	Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	0.075	-
26	10.128	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	-	0.033
27	10.562	4-松油醇	0.149	0.040
28	10.762	α-蒎品醇	0.328	0.315
29	10.924	癸醛	0.0588	-
30	10.991	乙酸辛酯	0.325	0.141
31	11.546	D-香芹酮	0.217	-
32	11.676	Z-2-甲基-5-(1-甲基乙炔基)-2-环己烯-1-醇	0.042	-
33	12.245	Tridecane	0.040	0.024
34	12.607	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	-	0.034
35	12.689	p-Menth-4(8)-en-9-ol	0.011	-
36	12.854	Cyclohexene-4-ethenyl-4-methyl-3-(1-methylethyl)-1-(1-methylethyl)-, (3R-trans)-	0.360	0.089
37	13.391	(Z)-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇	0.569	-
38	13.399	γ-古巴烯	-	0.155
39	13.489	(E)-7-十四碳烯	0.075	-
40	13.591	Cyclohexane-1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethyl)-, [1S-(1.alpha., 2.beta., 4.beta.)]-	0.242	-

续表 1

序号	保留时间 /min	化合物名称	相对百分含量 /%	
			与水共沸蒸馏法	纯蒸气蒸馏法
41	13.726	Acetic acid, decyl ester	0.061	-
42	13.809	Bicyclo[3.2.1]oct-2-ene, 3-methyl-4-methylene-	-	0.062
43	13.975	β-ylangene	0.215	0.038
44	14.123	γ-榄香烯	0.412	-
45	14.194	Alloaromadendrene	0.024	-
46	14.269	Epizonarene	0.069	0.062
47	14.357	4,7-Methanoazulene-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-1,4,9,9-tetramethyl-, [1S-(1.alpha., 4.alpha., 7.alpha.)]-	0.059	0.136
48	14.358	异喇叭茶烯	-	0.437
49	14.436	Z,Z-1,5,9,9-四甲基-1,4,7-环十一碳三烯	0.094	-
50	14.458	Isocaryophyllene	-	0.183
51	14.551	(+)-epi-Bicyclosesquiphellandrene	0.074	-
52	14.697	Naphthalene-1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-	0.076	0.179
53	14.739	α-依兰二烯	-	0.654
54	14.781	1,6-Cyclodecadiene-1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)-, [S-(E,E)]-	1.151	-
55	14.870	1a,2,3,3a,4,5,6,7b-八氢-1,1,3a,7-四甲基-1-氢环丙[a]萘	0.164	0.064
56	14.877	.delta.-芹子烯	-	0.632
57	14.993	α-金合欢烯	0.272	-
58	15.260	Naphthalene-1,2,3,4,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-	0.203	0.672
59	15.383	Naphthalene-1,2,3,4,7-hexahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-	0.024	-
60	15.449	Longifolene-(V4)	0.096	-
61	15.529	Selina-3,7(11)-diene	0.082	0.248
62	16.081	Cyclohexene-6-ethenyl-6-methyl-1-(1-methylethyl)-3-(1-methylethylidene)-, (S)-	0.087	-
63	16.617	2-Naphthalenemethanol-1,2,3,4,5,6,7-octahydro-.alpha.,.alpha.,.alpha.,.alpha., 4a,8-tetramethyl-, (2R-cis)-	0.099	-
64	16.875	τ-Muurolool	0.215	-

4 讨论

实验采用两种不同的蒸馏方法提取金弹金柑挥发油,成分差异较大。与水共沸蒸馏法提取成分种类多而杂且得率低,而纯蒸气蒸馏法提取成分种类少而精且得率高。金弹金柑挥发油中的萜类成分较多,以单萜和倍半萜为主,其中 D-柠檬烯的得率分别为 76.83% 和 83.07%,而 D-柠檬烯是柑橘加工过程中的主要控制参数,说明两种方法都适合提取金弹金柑挥发油,以纯蒸气蒸馏法效果更佳。

与水共沸蒸馏法鉴定 50 个化学成分,占挥发油总量 96.38%,包括单萜类 18 个、倍半萜类 19 个、烷烃类 12 个、其他类 1 个。主要成分为 D-柠檬烯(76.83%)、1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)-, [S-(E,E)]-(1.15%)、α-蒎烯(2.73%)、1,6-Cyclodecadiene-1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)-, [S-(E,E)]-(1.15%)、β-月桂烯(8.58%)等。

纯蒸气蒸馏法鉴定 33 个化学成分,占挥发油总量 99.26%,包括单萜类 12 个、倍半萜类 13 个、烷烃类 5 个、其他类 3 个,主要成分为 D-柠檬烯(83.07%)、Propane(3.80%)、β-月桂烯(3.79%)、(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene(1.26%)等。

两种提取方法得到共有成分 19 种,相对含量大于 3% 的共有成分有 D-柠檬烯和 β-月桂烯等 2 种。D-柠檬烯是一种天

然的功能单萜,在食品中作为香料添加剂使用,药理研究表明具有抗癌^[4]、抗炎^[5]、抗氧化^[6]、抗胆结石、抑菌^[7]和免疫调节等作用,临床用于治疗胃癌、肺癌、肝癌、乳腺癌和白血病等疾病^[8-11]。 β -月桂烯对参与基因毒性物质活化的微粒体酶具有抑制作用,在抗骨关节炎方面具有较好的活性,可用于软骨细胞的抗炎、抗分解代谢和促合成代谢作用^[12,13]。因此,金弹金柑挥发油具有重要生物活性,值得深入研究和开发应用。

参考文献:

- [1] 吴耀溪,潘文忠,陈鸿,等.金柑栽培与开发利用研究进展[J].林业科技开发,2004,18(6):6.
- [2] 白婕,李忠海,庞国歌,等.湖南金弹挥发性化学成分的气相色谱-质谱分析[J].饮料工业,2006,9(11):31.
- [3] 黎继烈.金橘活性物质提取及生物活性研究[D].中南林业科技大学博士学位论文,2007.
- [4] Kawata S, Nagase T, Yamasaki E, et al. Modulation of the mevalonate pathway and cell growth by pravastatin and β -limonene in a human hepatoma cell line (Hep G2) [J]. *Bri J Cancer*, 1994, 69(6): 1015.
- [5] Chi GF, Xie XX, Wei MM, et al. Suppression of MAPK and NF- κ -B Pathways by Limonene Contributes to Attenuation of Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in Acute Lung Injury [J]. *Inflammation*, 2013, 36(4): 982.
- [6] Wei A, Shibamoto T. Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(5): 1737.
- [7] Sinigaglia M. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of eugenol, limonene, and citrus extract against bacteria and yeasts, representative of the spoiling microflora of fruit juices. [J]. *J Food Protect*, 2010, 73(5): 888.
- [8] 邢光明,曲明阳,张贵平,等.右旋柠檬烯对胃癌细胞粘附和侵袭能力影响的研究[J].中华普通外科杂志,2004,19(7):417.
- [9] Yu X, Lin H, Wang Y, et al. β -limonene exhibits antitumor activity by inducing autophagy and apoptosis in lung cancer [J]. *Oncol Targets Ther*, 2018, 11: 1833.
- [10] 路晴,曲明阳,邢光明,等.右旋柠檬烯对乳腺癌淋巴管生成和淋巴转移影响的实验研究[J].中华普通外科杂志,2005,20(7):435.
- [11] 郭晓铭,路晴,刘正娟,等.右旋柠檬烯对HL-60、K562白血病细胞体外作用的研究[J].中国实验血液学杂志,2006,14(4):692.
- [12] De-Oliveira A C, Ribeiro-Pinto L F, Paumgarten J R. In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by β -myrcene and other monoterpene compounds [J]. *Toxicol Lett*, 1997, 92(1): 39.
- [13] Rufino A T, Ribeiro M, Sousa C, et al. Evaluation of the anti-inflammatory, anti-catabolic and pro-anabolic effects of E-caryophyllene, myrcene and limonene in a cell model of osteoarthritis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 750: 141.

加味凉血消风散对寻常型银屑病患者外周血 JAK3、STAT3、Bcl-2、p53 基因及蛋白表达的影响

谭红雁,胡霞,谭雯,赵晨,何中秋,郝平生*
(成都中医药大学附属医院,四川成都 610072)

摘要:目的 通过比较寻常型银屑病(血热证)患者加味凉血消风散治疗前后外周血白细胞 JAK/STAT 信号通路中 JAK3、STAT3 及其下游 Bcl-2、p53 基因及蛋白的表达情况,来揭示加味凉血消风散调控 JAK/STAT 信号通路治疗银屑病的作用机制。方法 采用银屑病皮损面积与严重程度指数(PASI)评分对患者病情进行评定;分离外周血白细胞,分别采用 RT-PCR 定量、Western Blot 法检测 JAK/STAT 信号通路中 JAK3、STAT3 及下游 Bcl-2、p53 基因及蛋白的表达,将加味凉血消风散治疗前与 10 例健康人、治疗后比较。结果 治疗前 JAK3、STAT3、Bcl-2 基因及蛋白表达均高于健康组,而 p53 的表达水平低于健康组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);治疗后 JAK3、STAT3、Bcl-2 基因及蛋白表达均有下调,而 p53 的表达上调,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 JAK/STAT 信号通路中 JAK3、STAT3、Bcl-2 基因及蛋白升高及 p53 降低与银屑病发病密切相关;实验表明加味凉血消风散能使 JAK/STAT 通路中 JAK3、STAT3 基因及蛋白的表达下降从而阻断 JAK/STAT 信号通路活性,同时可以下调抑凋亡基因及蛋白 Bcl-2,上调促凋亡基因及蛋白 p53 的表达水平诱导细胞凋亡,达到治疗寻常型银屑病(血热证)的目的。

关键词:寻常型银屑病;加味凉血消风散;JAK/STAT 信号通路;细胞凋亡

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2020.03.024

中图分类号: R285.6 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2020)03-0591-03

寻常型银屑病临床表现为局限或泛发的红斑,上覆银白色鳞

屑,伴有不同程度的瘙痒。该病易复发,病程缠绵,有的自幼发病,持续十余年或数十年,甚至有迁延终身者,皮损瘙痒影响患者的生活质量^[1]。全世界银屑病的患病率为 1.5%~3.0%^[2],患病人群数量庞大,且发病机制非常复杂,近年来,阿达木单抗等生物制剂在治疗上取得了很好的疗效,但患者在使用生物制剂后发生恶性肿瘤和严重感染的风险也随之增加,且治疗价格昂贵,部分患者还出现生物制剂抵抗的现象^[3],故该病仍然是研究的重点疾病。目前,在临床上随着研究的不断深入,信号通路、细胞凋亡与寻常型银屑病的关系备受关注。JAK/STAT 信号通路是参

收稿日期: 2019-07-10; 修订日期: 2020-01-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81573866);

四川省中医药管理局中医药科学技术研究专项(2016C012)

作者简介: 谭红雁(1993-),女(土家族),重庆人,成都中医药大学附属医院硕士研究生,学士学位,主要从事中医外科学皮肤病研究工作。

* 通讯作者简介: 郝平生(1976-),男(汉族),山西晋中人,成都中医药大学教授,博士学位,主要从事中医外科学皮肤病研究工作。