

文章编号: 1000-5862(2014)02-0196-05

# 突托蜡梅叶化学成分及其 乙酰胆碱酯酶抑制活性研究

凌 青, 邹峥嵘\*

(江西师范大学生命科学学院, 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室, 江西 南昌 330022)

**摘要:** 采用乙醇浸提法、液液萃取法得到突托蜡梅叶石油醚萃取物, 用气-质联用法对其进行组成分析并用面积归一化法测定各化学成分的相对百分含量. 使用改进了的 Ellman 比色法检测突托蜡梅叶石油醚萃取物对乙酰胆碱酯酶的抑制活性. 突托蜡梅叶石油醚组分共鉴定了 33 个化学成分, 其中螺[2.3]己烷-4-1,5,5-二乙基-6-甲基含量最高, 占总质量的 61.311%, 其次是喇叭烯氧化物 II, 占总质量的 2.042%. 突托蜡梅叶石油醚组分的乙酰胆碱酯酶抑制率在  $1 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围变化明显, 显示出一定的抑制活性, 这为突托蜡梅叶的进一步开发利用提供了科学依据.

**关键词:** 突托蜡梅叶; 石油醚组分; GC-MS; 乙酰胆碱酯酶抑制活性

**中图分类号:** R 931.77

**文献标志码:** A

## 0 引言

突托蜡梅(*Chimonanthus grammatus* M. C. Liu)是蜡梅科蜡梅属植物, 1984 年刘茂春将其鉴定为新种, 并列为蜡梅属蜡梅组和新蜡梅组之间的过渡类群<sup>[1]</sup>. 突托蜡梅分布于江西省安远县蔡坊乡和会昌县清溪县交界处的狭长地带, 为江西独有物种. 蜡梅属植物向来具有药用价值, 民间常服用山蜡梅茶来治疗感冒, 将突托蜡梅叶抛入鱼塘中用以防止鱼病产生<sup>[2]</sup>. 为进一步了解突托蜡梅叶中所含的化学成分及其药理活性和作用机理, 本文采用溶剂提取法、液液萃取法和各种色谱学、波谱学方法对突托蜡梅叶的化学成分进行了系统的分离纯化和结构鉴定研究. 对于石油醚萃取物采用 GC-MS 联用法进行了成分分析, 采用色谱面积归一化法测定了各个化学成分质量分数.

阿尔茨海默氏病(Alzheimer's Disease, AD)是发生于老年和老年前期以进行性神经退化为特征的大脑退行性病变, 该病严重威胁老年人身心健康. 研究结果表明, 阿尔茨海默氏病的发生与突触间隙中乙酰胆碱酯酶活性过高有关. 发现新型乙酰胆碱酯酶抑制剂(AChEI)是阿尔茨海默氏病防治研究最为

活跃的领域<sup>[3]</sup>. 本文对突托蜡梅叶石油醚萃取组分进行乙酰胆碱酯酶抑制活性检测, 期待从突托蜡梅叶中获取具有乙酰胆碱酯酶抑制活性的化合物.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

突托蜡梅叶采自于江西省赣州市会昌县, 经江西省林业科学院彭九生鉴定为突托蜡梅(*C. grammatus* M. C. Liu.) 植物标本存放于江西师范大学亚热带植物资源保护与利用重点实验室. 将山蜡梅的叶自然阴干保存备用; 乙酰胆碱酯酶(AChE, Sigma 公司),  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 值为 8.0 的磷酸盐缓冲液(PBS),  $7.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的硫代乙酰胆碱(ATCh, Sigma 公司), 用  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 值为 8.0 的 PBS 配制;  $7.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 5,5-二巯基-2,2-二硝基苯甲酸(DTNB, Sigma 公司), 用  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 值为 8.0 的 PBS 配制; 4% 十二烷基硫酸钠(SDS, 西陇化工股份有限公司), 阳性对照石杉碱甲; 95% 酒精、石油醚, 分析纯, 购自于西陇化工.

### 1.2 仪器与设备

RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), OSB-2100 旋转蒸发器(东京理化器械株式会社),

收稿日期: 2013-10-18

基金项目: 国家自然科学基金(31260082), 江西省自然科学基金(2010GZN0113)和江西省教育厅科技课题(GJJ10395)资助项目.

通信作者: 邹峥嵘(1970-), 男, 江西高安人, 教授, 博士, 主要从事天然产物化学研究.

CA-1111 冷却水循环器( 东京理化器械株式会社) , A-1000S 真空泵( 东京理化器械株式会社) ,KQ5200 超声波清洗器( 昆山市超声仪器有限公司) ,GG-47 分液漏斗( 四川蜀牛玻璃仪器) ,数显恒温水浴锅 HH-6( 国华电器有限公司) ,电子天平 CP114( 奥豪斯仪器) ,UV759CRT 紫外可见分光光度计( 上海佑科仪器仪表有限公司) .

1.3 方法

1.3.1 突托蜡梅叶石油醚组分的提取 将 5 kg 突托蜡梅干燥叶粉碎后 ,用 70% 乙醇浸泡 24 h ,用超声波震荡提取 20 min. 过滤后将滤渣继续乙醇浸提 ,超声波震荡提取 3 次 ,合并 3 次的提取液减压蒸馏得浓缩液. 浓缩液用石油醚以体积比 1: 1 萃取 ,萃取 3 次 ,收集石油醚相 ,保留水相. 石油醚相经减压蒸馏得石油醚组分.

1.3.2 GC-MS 分析条件 气相色谱条件: Elite-MS 毛细管柱; 气化室温度 280 ℃. 程序升温: 初始温度为 50 ℃ ,保持 5 min; 以 3 ℃ /min 升至 140 ℃ 后立即再以 10 ℃ /min 升至 260 ℃ ,保持 5 min. 进样量 1 μL ,分流比为 10: 1.

质谱条件: EI 离子源温度 180 ℃ ,连接线温度 260 ℃.

1.3.3 突托蜡梅叶石油醚组分对乙酰胆碱酯酶抑制活性的检测 采用改良版的 Ellman 方法 ,依次将 2 650 μL 50 mmol · L<sup>-1</sup> PBS、50 μL AChE、100 μL DTNB、100 μL 样品加入试管中 ,37 ℃ 预热 2 min ,再加入 100 μL ATch ,在 37 ℃ 水浴反应 20 min 后 ,加 4% 的 SDS 1 mL 终止反应 ,将所得溶液立即在 412 nm

下测量吸光值 ( A) . 计算抑制率: 抑制率 =  $[1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品对照}}) / A_{\text{空白}}] \times 100\%$  ,其中  $A_{\text{样品}}$  为添加样品溶液的吸光值 , $A_{\text{样品对照}}$  指未添加酶液时的样品溶液本底吸光值 , $A_{\text{空白}}$  指未添加样品溶液时的吸光值. 每个样品做 3 个平行 ,取平均值 ,计算平均抑制率. 阳性对照为石杉碱甲. 实验重复 3 次 ,最终抑制率取 3 次平均抑制率的平均值<sup>[4]</sup>.

2 结果

2.1 突托蜡梅叶石油醚萃取组分 GC-MS 分析

采用 GC-MS 联用技术分析突托蜡梅叶石油醚组分 ,并用面积归一化法从总离子流图中计算了各组分的百分含量 ,共鉴定了 33 个化合物 ,质量分数为 85.518% . 其中质量分数大于 1% 的有 12 种 ,大于 2% 的有 2 种: 螺[2.3]己烷-4-1,5,5-二乙基-6-甲基、喇叭烯氧化物-( II) . 图 1 为色谱-质谱总离子流图 ,表 1 为各成分的分析鉴定结果.

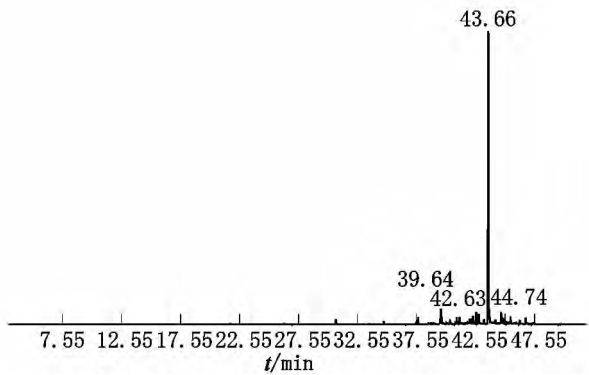


图 1 突托蜡梅叶石油醚组分总离子流图

表 1 突托蜡梅叶石油醚组分 GC-MS 分析

编号	相对分子质量	质量百分含量/%	分子式	化合物名称
1	170.20	0.189	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	十二烷
2	184.22	0.189	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	十三烷
3	280.24	0.162	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	17-十八炔酸
4	196.22	0.124	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub>	7-十四碳烯
5	198.23	1.419	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	正十四烷
6	212.22	0.125	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	2,6,10-三甲基-十二烷
7	212.23	0.703	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	十五烷
8	220.0	0.379	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	顺- <i>Z</i> -环氧化红没药烯
9	226.22	1.224	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	十六烷, 鲸蜡烷
10	400.37	0.404	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O	2-甲烯基胆甾烷-3-醇
11	284.44	0.230	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O	视黄醛
12	220.00	0.330	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	反- <i>Z</i> -环氧化红没药烯
13	268.31	0.600	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>	十九烷

续表 1

编号	相对分子质量	质量百分含量/%	分子式	化合物名称
14	220.00	2.042	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	喇叭烯氧化物(II)
15	204.35	0.176	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	$\beta$ -石竹烯
16	220.00	0.260	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	顺-Z-环氧化红没药烯
17	220.00	0.722	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	异香树烯环氧化物
18	400.37	0.400	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O	2-亚甲基胆甾烷-3-醇
19	254.30	0.819	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>	正十八烷
20	240.28	0.450	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	2,6,10-三甲基十七烷
21	204.35	1.256	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	Corymbolone
22	222.12	0.872	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	双环[4.4.0]dec-2-烯-4-醇 2-甲基-9-(prop-1-烯-3-醇-2-酯)
23	268.31	0.618	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>	十九烷
24	220.00	0.290	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	香橙烯氧化物
25	192.19	1.078	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub>	1,5-二乙丙烯基-2,3-二甲基环己烷
26	206.17	1.693	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	1-二氧螺环[2.5]辛烷 5,5-二甲基-4-(3-甲基-1,3-丁间二烯基)
27	278.15	1.374	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	邻苯二甲酸二丁酯
28	166.14	61.311	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O	螺[2.3]己烷-4-1,5,5-二乙基-6-甲基
29	236.35	1.702	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	柠檬烯-6-醇特戊酸酯
30	306.26	1.146	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	9,12,15-十八碳三烯酸乙酯
31	250.19	1.335	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	甲酸 3,7,11-三甲基-16,10-十二烷三烯-3-乙酯
32	318.26	0.568	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	甲基 8,11,14,17-二十碳四烯
33	318.26	1.328	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	甲基(Z)-5,11,14,17-二十碳四烯

## 2.2 突托蜡梅叶石油醚萃取组分对乙酰胆碱酯酶的抑制活性

选用的石油醚萃取组分浓度与相关抑制率如表 2 所示。

表 2 突托蜡梅叶石油醚萃取物抑制 AchE 活性

样品浓度/(mg · mL <sup>-1</sup> )	抑制率
10.0	0.613 08 ± 0.015 16
8.0	0.494 54 ± 0.020 88
5.0	0.294 84 ± 0.002 93
2.0	0.161 44 ± 0.009 58
1.0	0.106 19 ± 0.009 28
0.5	0.059 59 ± 0.007 93

通过 SPSS 软件对数据进行分析,得石油醚萃取物对乙酰胆碱酯酶抑制率与浓度的线性关系为  $Y = 0.038 + 0.057X$ ,其中  $Y$  为抑制率, $X$  为浓度(mg · mL<sup>-1</sup>)。

## 3 讨论

### 3.1 突托蜡梅叶石油醚萃取组分的 GC-MS 结果分析

研究结果表明,突托蜡梅叶石油醚组分中有螺环类 63.004%、烷烃类 6.336%、萜类及其衍生物 6.131%、酯类 5.557%、环烷类 3.206%、烯烃类 2.020%、固醇类 0.804% 及有机酸类 0.162%。

含量最高的是螺[2.3]己烷-4-1,5,5-二乙基-6-甲基,占 61.311%,如图 2(8);此外还鉴定了如图 2(9)所示的另一种简单螺环类。螺环化合物为抗菌

剂的发展开辟了新的领域。螺环化合物的 2 环平面相互垂直<sup>[5]</sup>,研究表明,具有生理活性的螺环化合物大多数是不对称分子或非对称分子,一些具有螺[吲哚-3,3'-四氢吡咯]或螺[吲哚-3,3'-四氢吡啶]类化合物、胞二醚螺环化合物、带双环的螺环原酸酯化合物和含脲结构单元的螺环化合物有很好的生理活性<sup>[6]</sup>。对于图 2(8)和图 2(9)所示的螺环化合物目前研究甚少,鉴于它的天然来源、非对称性及高含量有必要进行进一步研究。

有几种萜类及其衍生物如图 2(1)~图 2(7)、喇叭烯氧化物如图 2(3)、香橙烯氧化物如图 2(6)等萜烯类化合物具抗氧化、抗菌消炎和镇痛、提神等作用<sup>[7]</sup>。视黄醛(见图 2(2))是维生素 A 的一种代谢产物,在脊椎动物的眼球发育中具有多种不同的作用。研究表明:视黄醛对于视网膜背、腹侧范式的形成、巩膜的发育和特定细胞类型(如光感受器细胞、无长突细胞)的分化和成熟具有重要影响<sup>[8]</sup>。

G. M. Rukunga 等<sup>[9]</sup>研究发现 Mustakone 和 Corymbolone(含量 1.256%,如图 2(10))都具有很显著的杀疟原虫活性。

突托蜡梅产地居民常用晒干的蜡梅叶泡茶饮用以养生,对蜡梅叶的石油醚组分分析为突托蜡梅叶的生理药理活性研究提供了一定的理论依据。

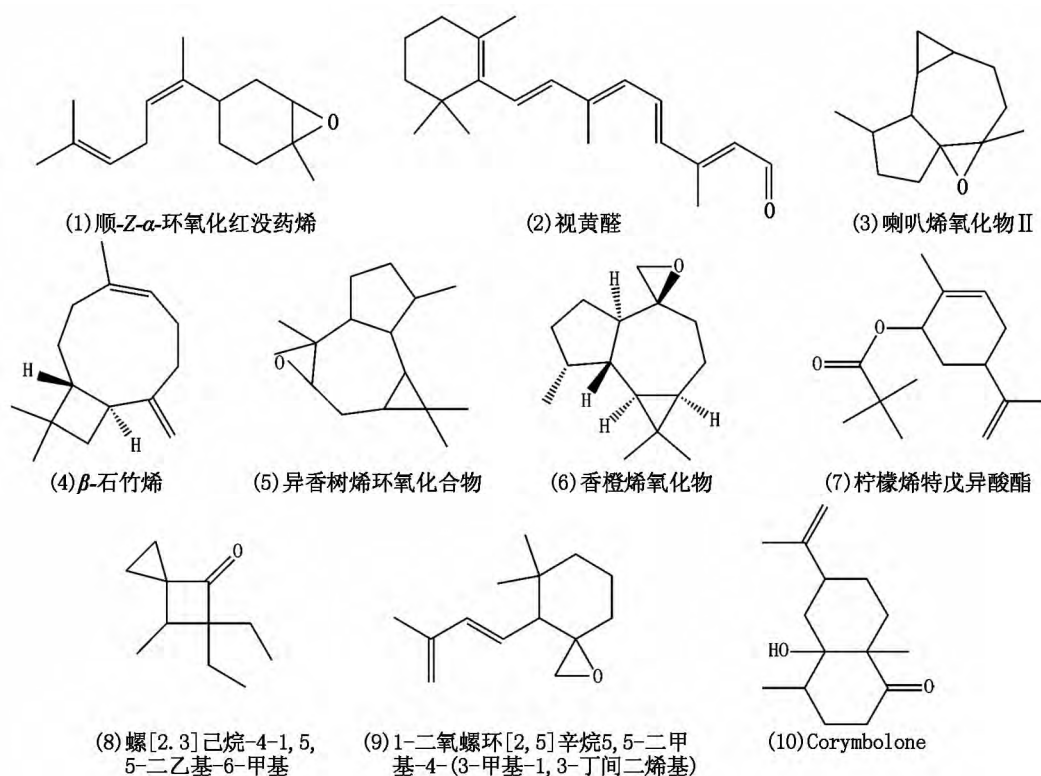


图2 几种活性成分化学结构

### 3.2 突托蜡梅叶石油醚萃取组分的乙酰胆碱酯酶抑制活性结果分析

突托蜡梅叶石油醚萃取组分的 AChE 抑制活性在  $1 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内变化明显。根据 SPSS 数据所得分析,抑制活性与浓度成一定的线性相关,可通过回归所得方程计算出  $IC_{50} = 8.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结果显示:突托蜡梅叶的石油醚组分具有一定的乙酰胆碱酯酶抑制活性。

目前对蜡梅属植物的研究主要集中于山蜡梅<sup>[10]</sup>、柳叶蜡梅<sup>[11]</sup>等,其化学成分主要有黄酮类、生物碱类和香豆素类等<sup>[12]</sup>。在对药用植物活性产物进行系统分离纯化和结构鉴定研究的基础上阐明其活性作用的物质基础和作用机理,以进一步开发利用其有效成分,实现资源的高效利用<sup>[13]</sup>。质谱解析是鉴定物质结构的有效手段<sup>[14]</sup>,对于天然来源的挥发性成分,通过 GC-MS 分析可以提供非常准确有用的信息以阐明挥发性成分的物质种类和含量,为开发利用提供科学依据。

## 4 参考文献

- [1] 刘茂春. 蜡梅属的研究 [J]. 南京林学院学报, 1984, 38 (2): 78.
- [2] 刘易鑫, 颜日明, 鲁顺宝. 突托蜡梅叶中挥发成分及抑菌活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36 (22):

3149-3153.

- [3] 张翼, 冯妍, 李晓明. 海藻组分抑制乙酰胆碱酯酶活性研究 [J]. 海洋与湖沼, 2005, 36 (5): 459-463.
- [4] 殷帅文, 刘丽萍, 王安萍. 等. 17 种植物不同溶剂萃取物乙酰胆碱酯酶抑制活性研究 [J]. 江苏农业科学, 2012, 40 (10): 293-296.
- [5] 丁妍, 田喆, 朱能. 具有抗菌活性的螺环化合物研究进展 [J]. 有机化学, 2010, 30 (8): 1156-1163.
- [6] 魏荣宝, 刘博, 刘洋. 具有生理活性的含氧、氮、硫杂原子螺环化合物研究进展 [J]. 有机化学, 2008, 28 (9): 1501-1514.
- [7] 何恩其, 赵烽. 穿心莲的药理作用及研究进展 [J]. 中医药导报, 2007, 13 (5): 107-108.
- [8] 戴淑真, 曾骏文. 视黄醛在实验性近视中的作用 [J]. 眼视光学杂志, 2003, 5 (1): 55-56.
- [9] Rukunga G M, Muregi F W, Omar S A, et al. Anti-plasmodial activity of the extracts and two sesquiterpenes from *Cyperus articulatus* [J]. Fitoterapia, 2008, 79 (3): 188-90.
- [10] 周斌, 李梦杰, 王平. 等. 中药山蜡梅叶质量标准研究 [J]. 中药材, 2013, 36 (9): 1434-1436.
- [11] 章瑶, 华金渭, 王秀艳. 等. 柳叶蜡梅叶氯仿部位化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (16): 2661-2664.
- [12] 潘小禾, 史小娟, 张新凤. 等. 柳叶蜡梅化学成分及其抗氧化活性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (1): 99-102.

[13] 丁立稳, 汤建萍, 杨书武, 等. HPD-300 大孔树脂吸附纯化荔枝黄酮特性研究 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2013, 37(1): 74-78.

[14] 肖转泉, 刘艳, 陈金珠, 等. 氢化诺卜基甲酸及其酯类化合物的质谱解析 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2013, 37(4): 345-348.

## The Study on Chemical Constituents and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Petroleum Ether Extracts from Leaves of *Chimonanthus grammatus*

LING Qing, ZOU Zheng-rong\*

(College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Protection and Utilization of Jiangxi Province  
Key Laboratory of Subtropical Plant Resources, Nanchang Jiangxi 330022, China)

**Abstract:** The petroleum ether extracts from leaves of *C. grammatus* were extracted from by ethanol extraction and liquid-liquid extraction, identified by GC-MS, and its AChE inhibitory activity were evaluated with the improved Ellman colorimetry. The petroleum ether extracts from leaves of *C. grammatus* contain 33 kinds of compounds, the major compounds include Spiro [2,3] hexan-4-one, 5,5-diethyl-6-methyl is highest (61.311%) and Ledene oxide-(II) (2.042%). However, the inhibition rate of AChE changed very obviously from  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  to  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , which shows some inhibition activity. According to the result, it shows that petroleum ether fraction owns certain extent inhibition activity, which provides the experimental and theoretical basis to the further study on *C. grammatus*.

**Key words:** the leaves of *Chimonanthus grammatus*; components of petroleum ether; GC-MS analysis; anticholinesterase activity

(责任编辑: 刘显亮)

(上接第 190 页)

## The Synthesis and Characterization of a Supramolecular Compound { Cd( H<sub>2</sub>dtca) ( bipy) }

SU Yong-chao, GAO Lou-jun\*, WANG Ji-jiang

(Department of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi Key Laboratory of Chemical  
Reaction Engineering, Yan'an University, Yan'an Shanxi 716000, China)

**Abstract:** A new supermolecular compound { Cd<sub>2</sub>( H<sub>2</sub>dtca)<sub>2</sub>( bipy)<sub>2</sub> } [H<sub>2</sub>dtca = 1,3-di(2',4'-dicarboxyphenyl) - benzene, bipy = 2,2'-bipyridine] was synthesized hydrothermally and characterized by means of elemental analysis, IR and single crystal X-ray diffraction. Complex crystallizes in monoclinic space group *P21/n*,  $a = 1.604\ 06(7) \text{ nm}$ ,  $b = 1.037\ 30(4) \text{ nm}$ ,  $c = 1.720\ 97(7) \text{ nm}$ ;  $\beta = 101.803\ 0(10)^\circ$ ;  $Z = 4$ ,  $\mu R_1 = 0.034\ 2$ ,  $\mu R_2 = 0.079\ 5$ . The crystal structure of compound revealed that one 1,3-di(2',4'-dicarboxyphenyl) benzene ligand links two Cd<sup>II</sup> ions to form a symmetrical dimer, and the binuclear units form a 3D supramolecular structure under the action of the hydrogen bonds. The luminescence property in solid state of complex have been further studied and discussed in this paper.

**Key words:** Cd(II) complex; supramolecular compound; crystal structure; luminescence property

(责任编辑: 刘显亮)