

# 蜈蚣藻中萜类化合物的超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取及 GC-MS 分析

李娜, 邓永智\*, 李文权  
(厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 对蜈蚣藻中萜类化合物进行提取、分离纯化和 GC-MS 分析。采用正交试验研究超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取蜈蚣藻中萜类化合物的条件, 并用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术分析蜈蚣藻中萜类化合物的主要化学成分。正交试验结果显示: 以得油量为指标, 各萃取条件按对结果影响的顺序列为萃取压力 > 萃取时间 > 萃取温度 = CO<sub>2</sub> 流速; 最佳萃取条件为萃取压力 30MPa、萃取时间 2h、萃取温度 40℃、CO<sub>2</sub> 流速 10L/h。各浓度洗脱液经 GC-MS 分析后, 通过检索 NIST 谱图库, 并结合有关文献, 从中初步确认出 11 种萜类化合物。

**关键词:** 蜈蚣藻; 萜类化合物; 超临界流体萃取; GC-MS

Supercritical Fluid Extraction and GC-MS Analysis of Terpenoid Compounds from *Grateloupia filicina* C.Ag.

LI Na, DENG Yong-zhi\*, LI Wen-quan  
(College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** The extraction, purification and GC-MS analysis of terpenoid compounds from *Grateloupia filicina* C.Ag. were investigated in the present study. The supercritical fluid extraction conditions of terpenoid compounds from *Grateloupia filicina* C.Ag. were optimized by orthogonal test, and the main components in the terpenoid compounds were analyzed by GC-MS. The results of orthogonal test showed that the extraction pressure presented the most significant effect on yield of terpenoid compounds, followed by extraction duration, temperature and flow rate in turn, and the optimum extraction conditions were as follows: with flow rate of 10 L/h, extraction at 30 MPa and 40℃ for 2 h. By searching in NIST98 spectrum library and referring to related literature, finally 11 kinds of terpenoid compounds were confirmed from the extract of *Grateloupia filicina* C. Ag.

**Key words:** *Grateloupia filicina* C. Ag.; terpenoid compounds; supercritical fluid extraction; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

中图分类号: O657.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)12-0131-04

蜈蚣藻(*Grateloupia filicina* C. Ag.)属于红藻门、真红藻纲、隐丝藻目、海膜科、蜈蚣藻属, 藻体紫红色, 黏滑, 丛生。线形或略扁压, 单一及顶, 主干明显, 规则或不规则的羽状分枝, 生长在低潮带附近岩石和贻贝养殖架上。产于我国南北各地, 为世界性的暖温带型海藻。多可食用或作制胶原料, 广东潮阳等地居民常用作驱蛔虫药<sup>[1]</sup>。

20 世纪 50 年代就开始对该属海藻进行了多糖、化学成分和生物活性方面的研究。主要包括多糖的提取、纯化、结构分析和化学成分分离、结构鉴定等<sup>[2]</sup>, 对

于该属海藻中萜类化合物的研究较少。萜类化合物(terpenoids)是所有异戊二烯聚合物及其衍生物的总称。萜类化合物作为海藻中重要的次生代谢产物具有重要的生物活性, 如抗肿瘤<sup>[3-8]</sup>、抗氧化<sup>[3-4]</sup>、增强免疫力<sup>[9]</sup>、抗菌<sup>[10-13]</sup>、杀虫<sup>[14]</sup>等。蜈蚣藻中萜类化合物的提取与研究, 对开发海藻利用、开发活性海洋天然药物具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

收稿日期: 2008-08-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(30600053)

作者简介: 李娜(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋天然产物。E-mail: xiaoyali83@163.com

\* 通讯作者: 邓永智(1969-), 男, 副教授, 博士, 研究方向为海洋有机化学。E-mail: xmudyz@sina.com

蜈蚣藻(*Grateloupia filicina* C. Ag.)于2008年2月采于福建近海海岸。

硅胶(100~200目)、无水乙醇、乙酸乙酯、石油醚(60~90)、无水硫酸钠均为分析纯。

## 1.2 仪器与设备

3900-2100T型气相色谱-质谱联用仪 美国瓦里安公司; HA 120-50-01型超临界CO<sub>2</sub>萃取仪 江苏省南通市华安超临界流体萃取设备公司; RE52CS-1型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; GM-0.33型隔膜真空泵 天津市津腾实验设备有限公司; GZX-DH-30型电热恒温干燥箱 上海跃进医疗器械厂。

## 1.3 萃取与分离方法

将采集的蜈蚣藻藻体用蒸馏水清洗后自然风干,粉碎。称取蜈蚣藻9组平行样品各377.1g,以无水乙醇为夹带剂,进行超临界CO<sub>2</sub>流体萃取正交试验<sup>[15-17]</sup>。40℃水浴减压旋转蒸发至干,所得的油状物加10倍(V/V)水混悬,分别加石油醚和乙酸乙酯萃取3次,各萃取液合并,加无水硫酸钠干燥过夜,旋转蒸发浓缩,所得油状物称重并记录相应的得油量(W)。通过预实验确定正交试验因素与水平(表1)。

表1 正交试验因素与水平  
Table 1 Factors and levels of orthogonal test

| 水平 | A CO <sub>2</sub> 流速(L/h) | B 萃取压力(MPa) | C 萃取温度(°C) | D 萃取时间(h) |
|----|---------------------------|-------------|------------|-----------|
| 1  | 10                        | 15          | 40         | 0.5       |
| 2  | 15                        | 20          | 50         | 1         |
| 3  | 20                        | 30          | 60         | 2         |

石油醚萃取层油状物合加于硅胶柱中,以乙酸乙酯-石油醚[其浓度依次为乙酸乙酯(%)=0、1、3、5、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、100]梯度洗脱液洗脱分离,得到19个洗脱组分。

## 1.4 气相色谱-质谱分析

### 1.4.1 气相色谱条件

色谱柱为毛细管cp-sil 8柱(50m × 0.25mm, 0.25 μm); 色谱柱温度60℃(保持4min),以10℃/min升至280℃,保留15min;载气为高纯氦气,纯度大于99.999%;流速为1ml/min;进样量:1 μl;进样方式:不分流进样。

### 1.4.2 质谱条件

电子轰击源:70eV;离子阱温度:180℃;GC-MS接口温度:280℃;扫描模式:全扫描模式;质量扫描范围(m/z):40~650amu。

## 2 结果与分析

### 2.1 萃取剂的选择

萜类化合物是一类弱极性化合物,在大多数弱极性

溶剂中均能溶解。实验首先考察了不同溶剂对萃取的影响,分别采用二氯甲烷、乙醇、乙酸乙酯、石油醚(60~90℃)作为萃取剂萃取,对比各种溶剂萃取所得油状物质量的大小,结果表明乙醇的萃取物质量最大,效率最高。所以采用乙醇做夹带剂,获得最高萃取效率。

### 2.2 最佳萃取条件的选择

表2 正交试验结果  
Table 2 Results of orthogonal test and range analysis

| 试验号            | A 萃取流速(L/h) | B 萃取压力(MPa) | C 萃取温度(°C) | D 萃取时间(h) | 得油量(g) |
|----------------|-------------|-------------|------------|-----------|--------|
| 1              | 1           | 1           | 1          | 1         | 1.4    |
| 2              | 1           | 2           | 2          | 2         | 1.9    |
| 3              | 1           | 3           | 3          | 3         | 2.2    |
| 4              | 2           | 1           | 2          | 3         | 1.5    |
| 5              | 2           | 2           | 3          | 1         | 1.5    |
| 6              | 2           | 3           | 1          | 2         | 2.2    |
| 7              | 3           | 1           | 3          | 2         | 1.3    |
| 8              | 3           | 2           | 1          | 3         | 2.0    |
| 9              | 3           | 3           | 2          | 1         | 1.6    |
| K <sub>1</sub> | 5.5         | 4.2         | 5.6        | 4.5       |        |
| K <sub>2</sub> | 5.2         | 5.4         | 5.0        | 5.4       |        |
| K <sub>3</sub> | 4.9         | 6.0         | 5.0        | 5.7       |        |
| k <sub>1</sub> | 1.83        | 1.40        | 1.87       | 1.50      |        |
| k <sub>2</sub> | 1.73        | 1.80        | 1.67       | 1.80      |        |
| k <sub>3</sub> | 1.63        | 2.00        | 1.67       | 1.90      |        |
| R              | 0.20        | 0.60        | 0.20       | 0.40      |        |

由表2可得最佳萃取条件为萃取压力30MPa、萃取时间2h、萃取温度40℃、CO<sub>2</sub>流速10L/h。在最佳萃取条件下三组超临界萃取平行样最后得到的油状物的质量分别为2.7、2.7、2.5g。其平均值为2.63g,此得油量明显高于正交试验中的各组得油量。说明在上述条件下,应用超临界CO<sub>2</sub>流体萃取法结合正交试验所得到的最佳萃取条件提取蜈蚣藻中的萜类化合物的提取效率最高。

### 2.3 分离纯化条件的选择

乙醇做夹带剂使得超临界萃取提取效率提高,但提取物中成分较多,须经分离纯化才能满足气相色谱-质谱(GC-MS)分析的进样要求。萜类化合物的极性较小,最接近石油醚的极性,所以用石油醚萃取乙醇萃取液时,大部分萃取液组分转移到石油醚层中,石油醚萃取层为墨绿色。再用乙酸乙酯萃取所得萃取液中提取物较少,颜色为浅黄色,将乙酸乙酯萃取层进样到GC-MS仪中进行检测,未有萜类化合物检出,故将乙酸乙酯层舍弃。石油醚萃取层仍然成分复杂不能满足GC-MS进样要求,需进一步用硅胶柱分离纯化。因为萜类化合物的极性介于石油醚与乙酸乙酯之间,最接近石油醚的极性,为达到将提取物分离的目的,在配制硅胶柱洗脱剂时,低浓度乙酸乙酯(石油醚做溶剂)溶液组分较多,高浓度乙酸乙酯(石油醚做溶剂)溶液组分较少。

2.4 GC-MS 分析结果

各组分离脱液经 GC-MS 检测得到 19 张总离子流图, 选取其中具代表性的 5 张见图 1~5, 对 19 张总离子流图进行数据处理, 通过检索 NIST98 谱图库, 并结合有关文献<sup>[16]</sup>进行人工谱图解析, 得到 11 种萜类化合物, 其化学成分的 GC-MS 分析结果、名称及结构分别见表 3、4。

表 3 蜈蚣藻油状物化学成分的 GC-MS 分析结果

Table 3 Results of GC-MS analysis for supercritical fluid extract of *Grateloupia filicina* C. Ag.

| 序号 | 保留时间 (min) | 相似度 (%) | 化合物编号 | 分子量 | 分子式  | 洗脱液乙酸乙酯浓度 (%) |
|----|------------|---------|-------|-----|--|---------------|
| 1  | 15.470     | 87.6    | 1     | 192 | C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O              | 1             |
| 2  | 16.092     | 79.3    | 2     | 208 | C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> | 1             |
| 3  | 16.217     | 85.8    | 1     | 192 | C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O              | 1             |
| 4  | 20.067     | 85.9    | 3     | 296 | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O              | 1             |
| 5  | 21.227     | 86.5    | 3     | 296 | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O              | 1             |
| 6  | 20.069     | 88.9    | 3     | 296 | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O              | 3             |
| 7  | 20.524     | 85.2    | 3     | 296 | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O              | 3             |
| 8  | 22.856     | 88.3    | 3     | 296 | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O              | 3             |
| 9  | 17.154     | 80.8    | 4     | 180 | C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> | 5             |
| 10 | 17.153     | 88.3    | 4     | 180 | C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> | 7             |
| 11 | 30.165     | 61.0    | 5     | 386 | C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O              | 7             |
| 12 | 20.066     | 86.4    | 3     | 296 | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O              | 8             |
| 13 | 20.517     | 85.2    | 3     | 296 | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O              | 8             |
| 14 | 20.985     | 83.6    | 6     | 262 | C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub> | 8             |
| 15 | 30.141     | 63.8    | 7     | 386 | C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O              | 8             |
| 16 | 17.141     | 72.7    | 8     | 210 | C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O              | 9             |
| 17 | 20.039     | 87.8    | 3     | 296 | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O              | 9             |
| 18 | 20.507     | 84.9    | 3     | 296 | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O              | 9             |
| 19 | 18.691     | 74.6    | 9     | 190 | C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O              | 10            |
| 20 | 20.048     | 86.5    | 3     | 296 | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O              | 10            |
| 21 | 20.512     | 84.8    | 3     | 296 | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O              | 10            |
| 22 | 20.975     | 87.3    | 6     | 262 | C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub> | 10            |
| 23 | 20.054     | 87.6    | 3     | 296 | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O              | 15            |
| 24 | 12.256     | 87.2    | 10    | 154 | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 20            |
| 25 | 20.049     | 87.4    | 3     | 296 | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O              | 20            |
| 26 | 12.253     | 86.8    | 11    | 154 | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 25            |
| 27 | 12.235     | 86.7    | 11    | 154 | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 30            |
| 28 | 12.269     | 87.8    | 11    | 154 | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 35            |
| 29 | 12.236     | 86.9    | 10    | 154 | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 40            |
| 30 | 12.259     | 88.5    | 11    | 154 | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 60            |
| 31 | 12.257     | 88.6    | 10    | 154 | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 70            |
| 32 | 12.253     | 87.8    | 10    | 154 | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 80            |
| 33 | 12.247     | 87.7    | 11    | 154 | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 100           |

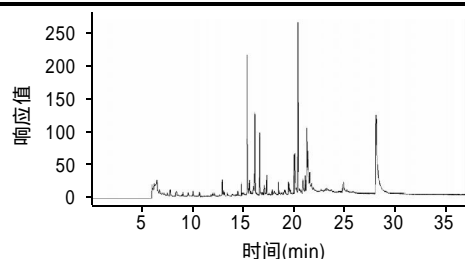


图 1 1% 乙酸乙酯 (石油醚溶剂) 洗脱液的总离子流图

Fig.1 Total ion current chromatogram of 1% ethyl acetate (petroleum ether as solvent) eluent containing terpenoid compounds on silica gel column

表 4 蜈蚣藻油状物化学成分的名称及结构

Table 4 Names and structures of confirmed components

| 化合物编号 | 化合物名称   | 分子式  | 化合物结构 |
|-------|---|--|-------|
| 1     | 3-Buten-2-one, 4-(2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)  | C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O              |       |
| 2     | 3-Buten-2-one, 4-(3-hydroxy-6,6-dimethyl-2-methylenecyclohexyl)   | C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> |       |
| 3     | 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol  | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O              |       |
| 4     | 2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-, (R)   | C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> |       |
| 5     | Cholesterol   | C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O              |       |
| 6     | Homomenthyl salicylate  | C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub> |       |
| 7     | 17-(1,5-Dimethylhexyl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol | C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O              |       |
| 8     | 2-Cyclohexyl-3-isopropylpent-4-en-2-ol  | C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O              |       |
| 9     | 4-(2,6,6-Trimethylcyclohex-1,3-dienyl)but-3-en-2-one  | C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O              |       |
| 10    | 3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,.alpha.4-trimethyl  | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              |       |
| 11    | (+)-.alpha.-Terpineol (p-menth-1-en-8-ol)   | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              |       |

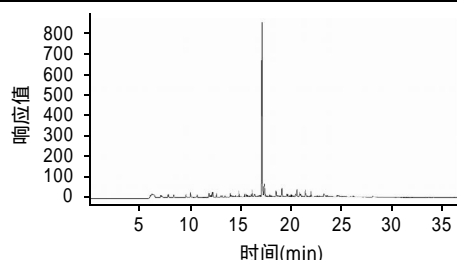


图 2 5% 乙酸乙酯 (石油醚溶剂) 洗脱液的总离子流图

Fig.2 Total ion current chromatogram of 5% ethyl acetate (petroleum ether as solvent) eluent containing terpenoid compounds on silica gel column

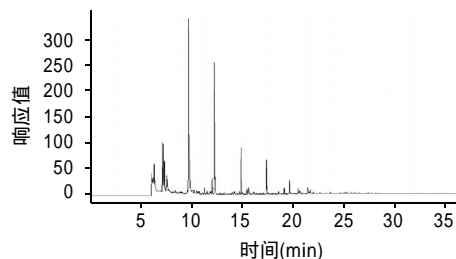


图 3 30% 乙酸乙酯 (石油醚溶剂) 洗脱液的总离子流图

Fig.3 Total ion current chromatogram of 30% ethyl acetate (petroleum ether as solvent) eluent containing terpenoid compounds on silica gel column

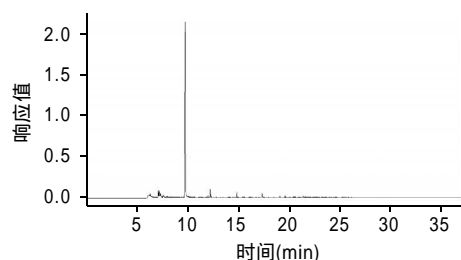


图4 40%乙酸乙酯(石油醚溶剂)洗脱液的总离子流图

Fig.4 Total ion current chromatogram of 40% ethyl acetate (petroleum ether as solvent) eluent containing terpenoid compounds on silica gel column

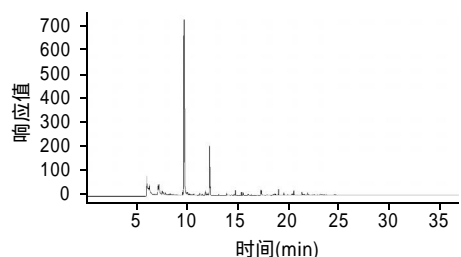


图5 70%乙酸乙酯(石油醚溶剂)洗脱液的总离子流图

Fig.5 Total ion current chromatogram of 70% ethyl acetate (petroleum ether as solvent) eluent containing terpenoid compounds on silica gel column

### 3 讨论

本实验采用超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取技术通过正交试验优化萃取条件,以萃取得油量为指标得出最佳萃取条件为萃取压力 30MPa、萃取时间 2h、萃取温度 40 °C、CO<sub>2</sub> 流速 10L/h。

对经硅胶柱洗脱纯化后得到的各浓度洗脱液进行 GC-MS 分析,从所得的谱图中可初步确认出 11 种萜类化合物。为蜈蚣藻中萜类化合物的生物活性研究提供了依据,对蜈蚣藻中化学成分的进一步研究提供帮助。

参考文献:

- [1] 曾成奎. 中国经济海藻志[M]. 北京: 科学出版社, 1962.
- [2] 芮雯. 带形蜈蚣藻(*Grateloupia turuturu*)、总状蕨藻(*Caulerpa racemosa*)的部分化学成分分析及生物活性研究[D]. 广州: 暨南大学, 2006: 2-22.
- [3] 关美君, 丁源. 我国海洋药物主要成分研究概况(一)[J]. 中国海洋药物, 1999, 18(1): 32-37.
- [4] 梁惠, 贺娟, 董春景, 等. 凹顶藻萜类化合物抑瘤作用及其机制研究[J]. 营养学报, 2005, 27(16): 502-505.
- [5] 董春景, 梁惠, 贺娟, 等. 海藻萜类化合物对二甲苯诱导的大鼠乳腺癌的抑制作用[J]. 营养学报, 2007, 29(2): 197-198.
- [6] 关美君, 丁源. 我国海洋药物主要成分研究概况(二)[J]. 中国海洋药物, 1999, 18(1): 32-37.
- [7] FULLER R W, CARDELLINA J H I I, JURCK J, et al. Isolation and structure/activity features of halomon-related antitumor monoterpenes from the red alga *Portieria hornemannii*[J]. Med Chem, 1994, 37: 4407-4411.
- [8] VALERIOTE F, CORBETT T, LORUSSO P, et al. Effect of short course of 1,25-dihydroxyvitamin 30N biochemical markers of bone remodeling in postmenopausal women[J]. Pharmacog, 1996, 33: 59-66.
- [9] FULLER R W, CARDELLINA J H I I, KATO Y, et al. Neuronal nicotinic receptors, pharmacology and therapeutics opportunities[J]. Med Chem, 1999, 42(15): 3007-3010.
- [10] GERWICK W H, FENICAL W. Ichthyotoxic and cytotoxic metabolites of the tropical brown alga *Styopodium zonale* (lamouroux) papenfuss [J]. Org Chem, 1981, 46(1): 22-27.
- [11] PECK D G, MEHTA A J, JOHNSTON K P. Pressure tuning of chemical reaction equilibrium in supercritical fluids[J]. J Phys Chem, 1989, 93: 4297-4304.
- [12] WESSELS M, KONIG M, WRIGHT A D. A new tyrosine kinase inhibitor from the marine brown alga *Styopodium zonale*[J]. Nat Prod, 1999, 62: 929-930.
- [13] 符波, 扎伊采夫. 海洋生物综合利用[M]. 北京: 海洋出版社, 1987.
- [14] ROVIROSA J, SEPULVEDA M, QUEZADA E, et al. Isoepitaondiol, a diterpenoid of *styopodium flabelliforme* and the insecticidal activity of styptotriol, epitaondiol and derivatives[J]. Phytochemistry, 1992, 31: 2679-2681.
- [15] 上海市科学技术交流站. 正交试验设计法: 多因素的试验方法[M]. 上海: 上海人民出版社, 1975: 3-48.
- [16] 童星, 陈晓青, 蒋新宇, 等. 常春藤挥发油的提取及 GC-MS 分析[J]. 精细化工, 2007, 24(6): 559-561.
- [17] 佟健. 香叶中挥发性组分的超临界萃取及气相色谱-质谱分析[J]. 质谱学报, 2006, 27(2): 94-98.
- [18] 杨峻山. 萜类化合物[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.