

# 气相色谱质谱和分子对接分析预测刺槐花挥发油中的抗埃博拉病毒成分

王海阳<sup>1</sup>, 初婷婷<sup>2\*</sup>, 杨义<sup>2</sup>, 田晶<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 大连工业大学生物工程学院; <sup>2</sup> 大连工业大学轻工与化学工程学院, 大连 116034

**摘要:** 本研究建立了一种基于气相色谱质谱和分子对接技术, 从刺槐花挥发油中鉴定和预测埃博拉病毒抑制剂的方法。通过水蒸气蒸馏法从 500 g 新鲜的刺槐花中提取得到 42 mg 挥发油, 采用 GC-MS 方法鉴定了其中的 15 个化学成分, 其中, 主要成分为 2, 7, 10-三甲基十一烷 14. 67%, 其次 4, 7-二甲基十一烷 13. 89%, 再次正十六烷 11. 60%。通过分子对接技术, 采用 Autodock 软件对鉴定的化合物的抗埃博拉病毒活性逐一评价, 最终发现了 1 个具有潜在埃博拉病毒抑制活性的化合物, 3, 5-二叔丁基苯酚其对接能量为 -4. 10 kJ/mol。

**关键词:** 气象色谱质谱; 分子对接; 挥发油; 埃博拉病毒

中图分类号: Q946. 91

文献标识码: A

DOI: 10. 16333/j. 1001-6880. 2015. S. 012

## Analysis and Prediction of Components with Anti-Ebola virus Activity in the Essential Oil from the Flowers of *Robinia pseudoacacia* L. by GC-MS and Molecular Docking

WANG Hai-yang<sup>1</sup>, CHU Ting-ting<sup>2\*</sup>, YANG Yi<sup>2</sup>, TIAN Jing<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University; <sup>2</sup> School of Light Industry and Chemical Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China

**Abstract:** A strategy based on GC-MS coupled with molecular docking was established for identification, and prediction of Ebola virus inhibitors in the essential oil from the flowers of *Robinia pseudoacacia* L. 42mg essential oil was obtained from 500 g fresh flowers by hydrodistillation. After GC-MS analysis, fifteen compounds were identified. The results indicated that the major compounds in the essential oil were 2, 7, 10-Trimethyl-dodecane (14. 67%), 4, 7-Dimethyl-undecane (13. 89%), Hexadecane (11. 60%). The identified compounds were docked with the target of Ebola Virus using the Autodock software individually. One compound exhibited the potential anti-Ebola virus activity, 3, 5-Di-tert-butyl-phenol with the binding energy of -4. 10 kJ/mol.

**Key words:** GC-MS; Molecular docking; essential oil; Ebola virus

埃博拉病毒是丝状病毒家族的成员, 它会导致严重血热疾病, 是一种强病原体, 对人类和非人灵长类的伤害是致命的<sup>[1]</sup>。埃博拉病毒是丝状包膜病毒, 其 RNA 基因组约 19 kb。该埃博拉基因组是由八大 mRNA 基因组编码的 7 种结构蛋白<sup>[2]</sup>。2014 年 2 月西非大规模爆发埃博拉病毒疫情, 短短的几个月, 全球范围内累计出现埃博拉确诊、疑似和可能感染病例 17290 例, 死亡 6128 人。

天然药物在各种疾病的治疗过程中一直发挥着重要作用<sup>[3]</sup>。在传统的天然药物研究过程中, 主要的模式是原料提取-分离-结构鉴定-活性测定的过

程。为了能够从天然药物提取物中发现活性成分, 首先必须要阐明提取物中有什么, 即分离鉴定化学成分。然后, 再对这些化学成分的活性进行评价, 最终获得活性化合物。研究过程中所消耗的时间和成本是非常大的, 而且得到的化合物的回收率很低。更为重要的是, 很多活性成分含量很低, 在分离的过程中因为固体分离材料的不可逆吸附而消失。即使有时能够分离目标化合物, 但因为得到的量太低而无法实现进一步的活性评价实验。

刺槐 (*Robinia pseudoacacia* L.), 又称洋槐, 在我国大面积广泛种植<sup>[4]</sup>。近些年不管是国内还是国外, 都有对刺槐花进行了大量的研究, 包括: 化学成分分析、药理作用、环保、食品加工及综合利用

等<sup>[5,6]</sup>。作为传统中药,刺槐(尤其是其挥发油中低极性成分)具有抗氧化、抗炎、抗癌和抗病毒等功效<sup>[7,8]</sup>。目前,对于刺槐花挥发油的化学成分早已有所研究<sup>[9]</sup>,但对于其化学成分进一步的生物活性研究也报道的却很少。

本研究通过气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)对刺槐挥发油中的化学成分进行分析和鉴定,再通过分子对接技术对这些化学成分的抗埃博拉病毒的作用进行了预测。正是由于传统天然产物的研究有很多的不足,本实验所采用的气相色谱质谱结合分子对接技术,直接通过气相色谱质谱对复杂成分进行鉴定,将获得的化合物分别通过分子对接技术进行计算模拟,在较短时间内就可以对一个化合物的活性进行预测,由于不加入任何外界化学物质,因此保证了化合物本身的生物学活性。以往的分子对接技术常用于药物分子设计方面,而本实验通过气相色谱质谱获得的结果结合分子对接技术进行活性模拟具有较大的创新性,还未见该方法有所报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

刺槐花于2014年5月采集于辽宁省大连市。

### 1.2 仪器

挥发油提取器,泰州市三爱斯实验仪器耗材公司;岛津GCMS-QP-2010质谱仪,日本岛津公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 刺槐花的预处理

新鲜的刺槐花,剪碎后置于塑料袋中备用,防止低极性成分挥发到空气中,影响实验结果。

#### 1.3.2 挥发油的提取

准确称取剪碎的刺槐花500 g,放入提取瓶中,加入1600 mL去离子水,充分震荡混匀。采用水蒸气蒸馏法<sup>[10]</sup>回流提取4 h,黄色油状挥发油出现在提取器水层上面,将其收集。并用无水硫酸钠去除挥发油中的水。静置沉淀后过滤,将提取的精油储存在密封的小瓶中,储存在0 °C冰箱中备用。

#### 1.3.3 挥发油气相色谱质谱检测

刺槐花挥发油化学成分的分离、分析和鉴定采用岛津GCMS-QP-2010气相色谱质谱仪。

气相色谱条件:色谱柱为Agilent DB-5MS122-5532型号色谱柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm);柱温以5 °C/min进行升温,从70 °C升至230 °C,维持5 min;氦气作为载气,流速为1.25 mL/min,分流比

为1:5。

质谱条件:离子源温度为200 °C;电离方式EI;碰撞能量为70 eV;传输线温度250 °C;离子源温度200 °C;质量扫描范围 $m/z$  30~500。

定性分析:通过与Nist 147谱库及Wiley 7谱库中已知化合物的质谱相似性和保留指数进行比对,结合相关文献,鉴定刺槐花挥发油中化学成分。

#### 1.3.4 分子对接

采用Chimera软件对刺槐挥发油中的化合物的结构进行优化,获得最低能量的分子结构,保存为PDB格式,作为分子对接的配体。埃博拉病毒的结构从蛋白质数据库(PDB)中获得,作为受体。去除受体结构中的水分子,并且添加氢原子,确保质子化状态是正确的,采用Autodock Tools(ADT 1.5.6)<sup>[11]</sup>对最低能量的配体分子和去水加氢后的受体分子软件进行分子模拟对接。对接时埃博拉病毒活性位点的盒子参数设置为(-17.145) × (-68.452) × 22.276,网格间距0.375 Å,并通过Lamarckian遗传算法<sup>[12]</sup>进行计算,结合对接能量和相互作用的残基对分子对接结果进行评价。

## 2 结果与讨论

### 2.1 挥发油的提取率

通过水蒸气蒸馏的方法从500 g新鲜的刺槐花中提取挥发油,经无水硫酸钠除水,得到刺槐花挥发油42 mg,提取率为0.01%。

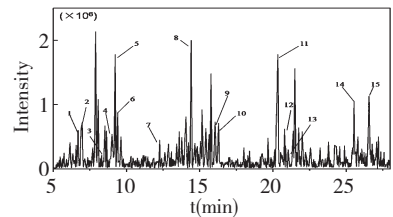


图1 刺槐花挥发油的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of the essential oil from *R. pseudoacacia*

### 2.2 刺槐花挥发油的化学成分分析

随着仪器分析技术的发展,包括GC-MS<sup>[13,14]</sup>, LC-MS<sup>[15,16]</sup>等在内的色谱质谱联用技术已普遍地应用于复杂组分的分析鉴定<sup>[17]</sup>。这些方法可以解答天然药物复杂体系中有什么的问题。其中,GC-MS法适用于低极性可挥发的化学成分研究,因此,本研究采用该方法对提取得到的挥发油进行了分析和鉴定,结果分离出21个组分,经Nist 147谱库及Wiley

7 谱库检索, 比对质谱相似度, 结合已经报道过的相关文献, 确认了 15 种成分, 占总含量的 86.39%。图 1 是 GC-MS 分析刺槐挥发油的总离子流图。由图 1 可知, 刺槐花的挥发油组成非常复杂, 包括了已经鉴定得到的 15 个主要化学成分和少量未知低含量化合物。

### 2.3 刺槐花挥发油的化学成分分析

鉴定得到的化合物包括了长链饱和烃、不饱和烃和苯酚类化合物(表 1)。其中, 2,7,10-三甲基十二烷、4,7-二甲基十一烷和正十六烷含量最高, 分别为 14.67%、13.89% 和 11.60%。除此之外, 含量由高到低依次为 3-乙基-3-甲基庚烷、3,8-二甲基十一烷、3,5-二叔丁基苯酚、十一烷、2,6-二甲基壬烷、5-甲基癸烷、2,6,6-三甲基辛烷和 2-甲基-6-乙基癸烷含量在 3-7% 之间。3-甲基十一烷、5-甲基-5-丙基-

表 1 刺槐花挥发油的主要化学成分和与埃博拉病毒活性位点分子对接能量值

Table 1 Chemical compositions of essential oils from the flower of *R. pseudoacacia* L and their binding energies docked in the active site of Ebola Virus

组分 Compounds	保留时间 Retention time (min)	分子式 Formula	名称 Name	含量 Percentages (%)	对接能量 Binding energy (kJ/mol)
1	6.89	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>	5-甲基癸烷	3.78	-2.39
2	6.99	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>	2,6-二甲基壬烷	3.91	-2.63
3	8.53	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub>	3,5,5-三甲基-1-己烯	1.58	-3.15
4	9.01	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	5,7-二甲基十一烷	2.21	-2.44
5	9.23	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	4,7-二甲基十一烷	13.89	-2.44
6	9.40	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>	十一烷	4.78	-2.20
7	12.26	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	3-甲基十一烷	2.83	-2.30
8	14.43	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	2,7,10-三甲基十二烷	14.67	-2.45
9	16.05	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>	2,6,6-三甲基辛烷	3.74	-2.87
10	16.30	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	2-甲基-6-乙基癸烷	3.29	-2.04
11	20.32	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	正十六烷	11.60	-1.68
12	20.79	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	3,5-二叔丁基苯酚	5.68	-4.10
13	21.39	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	5-甲基-5-丙基-癸烷	2.36	-2.04
14	25.55	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	3,8-二甲基十一烷	6.01	-2.43
15	26.56	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>	3-乙基-3-甲基庚烷	6.06	-1.65

分子对接依据配体与受体作用的“锁-钥原理”, 模拟小分子配体与受体生物大分子相互作用。配体与受体相互作用是分子识别的过程, 主要包括静电作用、氢键作用、疏水作用、范德华作用等。该方法利用一种基于能量的评分功能来预测配体和受体的活性位点之间的相互作用, 从而进行药物的虚拟筛选<sup>[20,21]</sup>。从刺槐花挥发油中获得的 15 个化合物采

用 Autodock Tools 软件与埃博拉病毒进行对接分析, 结合能值如表 1 所示, 从对接实验中的最终能量来看, 所有化合物的最低对接能量是从 -1.65 ~ -4.10 kJ/mol, 其中能量最低的是化合物 12 (-4.10 kJ/mol), 其次是化合物 3 (-3.15 kJ/mol), 再次是化合物 9 (-2.87 kJ/mol), 对接能量越低表明结合的越稳定。

### 2.4 分子对接研究刺槐花挥发油化学成分的抗埃博拉病毒活性

在传统的天然药物复杂组分的活性研究中, 只能通过不断的分离纯化, 逐步得到单一的化合物, 通过活性测定, 实现对单体化合物的活性评价<sup>[18,19]</sup>。然而, 由于天然药物的组成十分复杂, 逐一分离结合活性测定的方法, 无法得到所有的化学成分, 因此很难全面了解混合组分中每个化合物的活性情况, 结果造成了活性成分的漏筛。为了解决这一问题, 本研究采用分子对接的方法, 对混合物中的所有化学成分的活性进行模拟对接, 从而全面评价刺槐花挥发油中的抗埃博拉病毒活性。

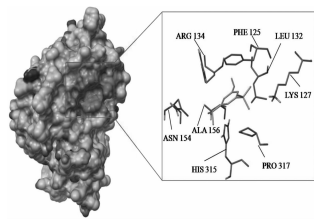


图2 刺槐花挥发油中组分 12 对埃博拉病毒抑制的分子对接结果

Fig. 2 Molecular docking result of Ebola Virus inhibited by the compound 12 in the essential oil from the flower of *R. pseudoacacia* L.

图3显示了上述组分12与埃博拉病毒分子对接结果。其中绿色的为配体即组分12结构,图中表面呈现黄色的是硫原子,橙色的是埃博拉病毒的活性位点。粉红色和浅蓝色的是中性氧和氮原子,而带电的氧和氮原子分别是红色和深蓝色。在分子模拟过程中,配体发现埃博拉病毒的活性位点,根据位点的性状,配体通过平移、键的旋转和扭转等方式对自身的结构进行调整,发生一系列的结构刚体变换。

在埃博拉病毒中,Thr123、Phe125和Arg134是接近单体N-和C-末端结构域的最重要的氨基酸残基<sup>[22]</sup>。在图3中可知,12号化合物包裹在埃博拉病毒的活性位点中,然后与催化位点形成的静电和疏水相互作用,通过对接结果图可以看出,该化合物分别与埃博拉病毒的Phe125和Arg134残基相互做用,同时与活性位点中的其他残基也有微弱的作用。但是这个化合物的对接能量并不是很低,与文献中报道的存在着一定的差异<sup>[22]</sup>,说明尽管上述化合物存在着潜在的抑制埃博拉病毒的活性,但抑制效果可能并不会十分理想,只有微弱的抑制效果。

### 3 结论

本研究通过气相色谱质谱的方法从刺槐花挥发油中鉴定得到15个化合物,并结合分子对接技术,对这些化合物的抗埃博拉病毒活性进行了评价,从低级性复杂体系中直接发现了潜在的活性成分。虽然活性较低,但利用该方法对洋槐中药用成分更深层的进一步研究奠定了重要的基础,不仅可以大大缩短筛选所用的时间,而且克服了低含量化学成分难以分离获取的弊端。该方法还可以进一步拓展到液相色谱-质谱联用和毛细管电泳-质谱联用技术上,可以直接预测上述方法所鉴定的化学成分活性情况,具有重要的研究价值和应用价值。

### 参考文献

- 1 Kuhn JH, Jahrling PB. Clarification and guidance on the proper usage of virus and virus species names. *Arch Virol*, 2010, 155:445-453.
- 2 Feldmann H, Klenk HD. Molecular biology and evolution of filoviruses *Arch Virol Suppl*, 1993, 3:81-100.
- 3 Koehn FE, Cater GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4:206-220.
- 4 Bo CZ (卜朝志). A study on the nutrient analysis of *Robinia pseudoacacia* L. *Chin Wild Plant Res* (中国野生植物资源), 1996, 3(4):42-43.
- 5 Li FY (李凤英), Zheng LH (郑立红), Xiao YJ (肖月娟). Studies on the brewing technology of *Flos Sophaoae Vinegar*. *J Chin Instit Food Sci Techol* (中国食品学报), 2008, 8:38-42.
- 6 Wu YP (吴以平), Dong SG (董树刚), Fu ZY (符宗钰), et al. Relationship between the contents of arsenic, chromium and lead in the flowers of *Robinia pseudoacacia* L and the soil sown to them in urban area of Qingdao. *J Environ Health* (环境与健康杂志), 2002, 19:445-446.
- 7 Lin Y, Shi R, Wang X, et al. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2008, 8:634-646.
- 8 Xu L, Su W, Jin J, et al. Identification of luteolin as enterovirus 71 and coxsackievirus A16 inhibitors through reporter viruses and cell viability-based screening. *Viruses*, 2014, 6:2778-2795.
- 9 Xie JC, Sun BG, Yu MC. Constituents of top fragrance from fresh flowers of *Robinia Pseudoacacia* L. occurring in China. *Flavour Fragr J*, 2006, 21:798-800.
- 10 Daniela C, Olah NK, Docea A, et al. Chromatographic analysis of the flavonoids from *Robinia Pseudoacacia* Species. *Curr Health Sci J*, 2013, 39:232-236.
- 11 Sanner MF. Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model*, 1999, 17:57-61.
- 12 Morris GM, Goodsell DS, Haliday RS. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem*, 1988, 19:1639-1662.
- 13 Li L, Wang Q, Yang Y, et al. Chemical components and antidiabetic activity of essential oils obtained by hydrodistillation and three solvent extraction methods from *Carthamus tinctorius* L. *Acta Chromatogr*, 2012, 24:653-665.