

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20171229.001

柴玲,刘布鸣,林霄,等.不同产地两面针果壳挥发油化学成分及其抗肿瘤活性[J].广西科学,2018,25(2):223-228.

CHAI L,LIU B M,LIN X, et al. Chemical constituents and antitumor activities research of essential oil of the fruit shell of *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.)DC. from different areas[J]. Guangxi Sciences,2018,25(2):223-228.

不同产地两面针果壳挥发油化学成分及其抗肿瘤活性^{*}

Chemical Constituents and Antitumor Activities Research of Essential Oil of the Fruit Shell of *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.)DC. From Different Areas

柴玲,刘布鸣,林霄,赖茂祥,蒋珍藕^{**}

CHAI Ling,LIU Buming,LIN Xiao,LAI Maoxiang,JIANG Zhen'ou

(广西中医药研究院,广西中药质量标准研究重点实验室,广西南宁 530022)

(Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards,Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Science,Nanning,Guangxi,530022,China)

摘要:【目的】研究不同产地两面针果壳挥发油的化学成分及其抗肿瘤活性,并比较不同产地两面针果壳挥发油的主要化学成分及含量差异,为两面针植物的综合开发利用提供科学依据。【方法】采用水蒸气蒸馏法提取两面针果壳挥发油,应用GC毛细管柱进行分离,质谱检测,面积归一化法测定其相对含量。采用MTT法检测挥发油对宫颈癌细胞(Hela)、乳腺癌细胞(MCF-7)、肺癌细胞(A549)、胃癌细胞(MGC-803)、结肠癌细胞(COLO-205)的增殖影响。【结果】不同产地两面针果壳挥发油主要成分基本相同,以烯醇类成分为主,其中芳樟醇含量最高,其次为 β -蒎烯、 β -水芹烯。MTT法提示两面针果壳挥发油可抑制Hela、MCF-7、A549、MGC-803和COLO-205细胞的生长。【结论】不同产地两面针果壳挥发油主要成分基本相同,但含量有差异。两面针果壳挥发油对Hela、MCF-7、A549、MGC-803和COLO-205细胞增殖有抑制作用。

关键词:两面针 果壳 挥发油 化学成分 抗肿瘤活性

中图分类号:R284.1,R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2018)02-0223-06

Abstract:【Objective】To investigate the chemical constituents and the antitumor activities of volatile oil of the fruit shell of *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.)DC. from different areas, and to compare the main chemical constituents and content differences of essential oil of the fruit shell could provide a scientific foundation for the comprehensive development and utilization of this plant.【Methods】The volatile oil was extracted by steam distillation. GC capillary column was used for separation, and the mass spectrometry detection and the normalization method were

used to determine the relative content. MTT assay was adopted to evaluate the cytotoxicity on Hela, MCF-7, A549, MGC-803 and COLO-205 cells.【Results】The main chemical constituents of volatile oil of fruit shell of *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.)DC. from different areas were basically the same, with the enol-type constituents being the major components. Among the main components, the content of linalool was the

收稿日期:2018-01-06

修回日期:2018-03-05

作者简介:柴玲(1986—),女,助理研究员,硕士研究生,主要从事中药、天然产物化学成分分析与质量标准研究。

^{*}广西科学研究与技术开发计划项目(桂科重1598005-12),玉林市科学研究与技术开发计划项目(玉市科攻1535015)资助。

^{**}通信作者:蒋珍藕(1964—),女,硕士,主任药师,主要从事中草药开发及质量评价研究,E-mail:zhenoujiang@163.com。

highest, followed by β -phellandrene and β -pinene. MTT assay indicated that the volatile oil could inhibit the growth of HeLa, MCF-7, A549, MGC-803 and COLO-205 cells. **【Conclusion】** The main chemical components of volatile oil of fruit shell of *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. from different areas were similar, but the contents were different. The volatile oil of the fruit shell could inhibit the proliferation of HeLa, MCF-7, A549, MGC-803 and COLO-205 cells. **Key words:** *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC., fruit shell, volatile oil, constituents, antitumor activities

0 引言

【研究意义】两面针药材为芸香科花椒属植物两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. 的干燥根, 有行气止痛、活血散瘀、通络祛风等作用, 为广西主产药材之一, 主要用于治疗跌打损伤、风湿痹痛、牙病、胃病、咽喉肿痛及毒蛇咬伤等症^[1]。在广西民间, 除法定的根部位入药外, 两面针的叶也被广泛使用。因其疗效好, 价值高, 近年来两面针的使用范围不断拓宽, 用量逐年增大, 但因生长周期长, 加上长期大量的采挖, 致使两面针植物资源急剧锐减, 目前两面针的野生蕴藏量(干质量)约为 2 600 吨^[2]。研究如何充分利用现有的两面针植物资源意义重大。**【前人研究进展】**目前, 两面针的研究大多集中在药用部位根和叶的挥发油化学成分活性方面^[3-5], 而对其果壳挥发油的提取与化学成分及活性的研究未见报道。本课题组研究发现, 两面针的鲜果富含挥发油, 水蒸气蒸馏法获得挥发油的得率为 0.4%^[6], 其主要成分与已有文献^[3-5]报道的根和叶部位的挥发油成分不同。**【本研究切入点】**为开发两面针新的药用部位, 发掘新的活性成分, 本研究对不同产地的两面针果壳进行挥发油提取。**【拟解决的关键问题】**运用 GC-MS 对两面针果壳挥发油化学成分进行分析, 并进行抗肿瘤活性研究, 拟为两面针的综合利用与开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

Agilent 7890B-5977A 气相色谱-质谱联用仪、Agilent 7693A 自动进样器、MassHunter 质谱工作站、NIST 11 版质谱数据库、CO₂ 细胞培养箱(Thermo 公司)、酶标仪(BioTek ELx800)。

1.2 材料

两面针果实采集于广西灵山、玉林、马山等地, 由广西中医药研究院中药资源研究所赖茂祥研究员鉴定为芸香科植物两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. 的果实, 果实阴干后去除果核, 果壳

备用。

DMEM 培养基(Dulbecco's Modified Eagle Media)、胎牛血清(GIBCO 公司); 3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-2H-四氮唑溴盐(MTT, MP Biomedicals 公司)。

细胞株: 宫颈癌细胞(HeLa)、乳腺癌细胞(MCF-7)、肺腺癌细胞(A549)、胃癌细胞(MGC-803)、结肠癌细胞(COLO-205)菌株均为海南师范大学化学化工学院付艳辉副教授赠送。

1.3 方法

1.3.1 挥发油的提取

称取干燥的两面针果壳适量, 按 2015 版《中国药典》四部通则 2204 挥发油测定法提取挥发油, 经无水硫酸钠脱水, 即得无色澄清液体。

1.3.2 气相-质谱分析条件

色谱条件: 色谱柱 Agilent HP-5Ms(30 m×250 μ m×0.25 μ m) 毛细管柱; 初始温度 60℃, 以 2℃/min 升温到 180℃, 再以 5℃/min 升温到 210℃; 进样量: 0.2 μ L; 分流比: 150:1; 流速: 0.8 mL/min; 进样口温度: 250℃; 传输线温度: 280℃; 离子源温度: 230℃; 四级杆温度: 150℃; EI 源: 电子能量 70 eV; 质量扫描范围(m/z) 35~450 amu。

1.3.3 细胞毒性试验^[7-9]

1.3.3.1 接种细胞

用含 10% 胎牛血清的培养液(DMEM)配成单个细胞悬液, 以每孔 5 000 个细胞接种到 96 孔板, 每孔体积 100 μ L, 贴壁细胞提前 12 h 接种培养。

1.3.3.2 挥发油介导

精确称取两面针果壳挥发油, 将其溶于 0.01 mol/LPBS(制备方法: 准确称量 KCl 0.2 g、KH₂PO₄ 0.2 g、NaCl 8.0 g、Na₂HPO₄·2H₂O 1.56 g, 各成分依次溶解于三蒸水中, 在 1 000 mL 容量瓶中定容, 分装消毒)中, 使其终浓度为 200 mg/mL 后, 以 0.22 μ m 微孔滤膜滤过除菌, 放置于 -20℃ 保存备用。取两面针果壳挥发油储液, 用 DMEM 完全培养基配置成梯度浓度(依次为 200 μ g/mL、100 μ g/mL、50 μ g/mL、25 μ g/mL、12.5 μ g/mL), 取 100 μ L

作用于细胞进行初筛,每孔终体积 100 μL ,每种处理均设 6 个复孔。再对肿瘤细胞生长抑制在 50% 附近的挥发油溶液设同样 5 个浓度进入梯度复筛。

1.3.3.3 显色

37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后,每孔加 MTT 溶液 20 μL 。继续孵育 4 h,终止培养,吸弃孔内培养上清液,每孔加 150 μL 的 DMSO 溶液,使结晶物充分融解。

1.3.3.4 比色

选择 490 nm 波长,酶标仪读取各孔光吸收值,记录结果。计算挥发油溶液的 IC_{50} 值。

2 结果与分析

2.1 挥发油化学成分分析

不同产地两面针果壳挥发油得率为 0.5%~0.7%(mL/g)。从 3 个产地两面针果壳挥发油中共分离出 41 个峰(图 1~3),根据标准谱图库(NIST11)检索并按各色谱峰的质谱裂片图与文献核对,分别对各色谱峰进行确认,从而鉴定出大部分化学成分,并采用面积归一化法分别计算挥发油中各成分的峰面积相对百分比(表 1),所鉴定的组分峰面积之和占挥发油总色谱峰面积总和的 90% 以上。

图 1~3 中灵山、马山、玉林 3 个产地两面针果壳的挥发油总离子流图相似,表明其主要化学成分相同,均含有芳樟醇、 β -水芹烯、 β -蒎烯、柠檬烯、1,8-桉叶素等主要化学成分。采用面积归一化法对 3 个产地两面针果壳挥发油总离子流图中各主成分含量进行计算和比较,发现三者主要成分百分含量有一定的区别,灵山和玉林 2 个产地挥发油中的主要成分含量无显著性差别,但两者与马山采集的两面针果壳挥发油比较有较大的差异,主要体现在灵山和玉林采集的两面针果壳挥发油中芳樟醇含量为 20% 左右、 β -水芹烯含量低于 10%,而马山采集的两面针果壳挥发油中芳樟醇含量高达 50% 以上, β -水芹烯含量高于 20%。

2.2 对细胞增殖的影响

两面针果壳挥发油对宫颈癌细胞(Hela)、乳腺癌腺癌细胞(MCF-7)、肺腺癌细胞(A549)、胃癌细胞(MGC-803)、结肠癌细胞(COLO-205)的生长表现出一定的抑制作用, IC_{50} 值分别为 54.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、58.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、62.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、56.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、78.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。由此可以初步认为两面针果壳挥发油具有一定的抗肿瘤活性,但其作用机制尚待进一步研究。

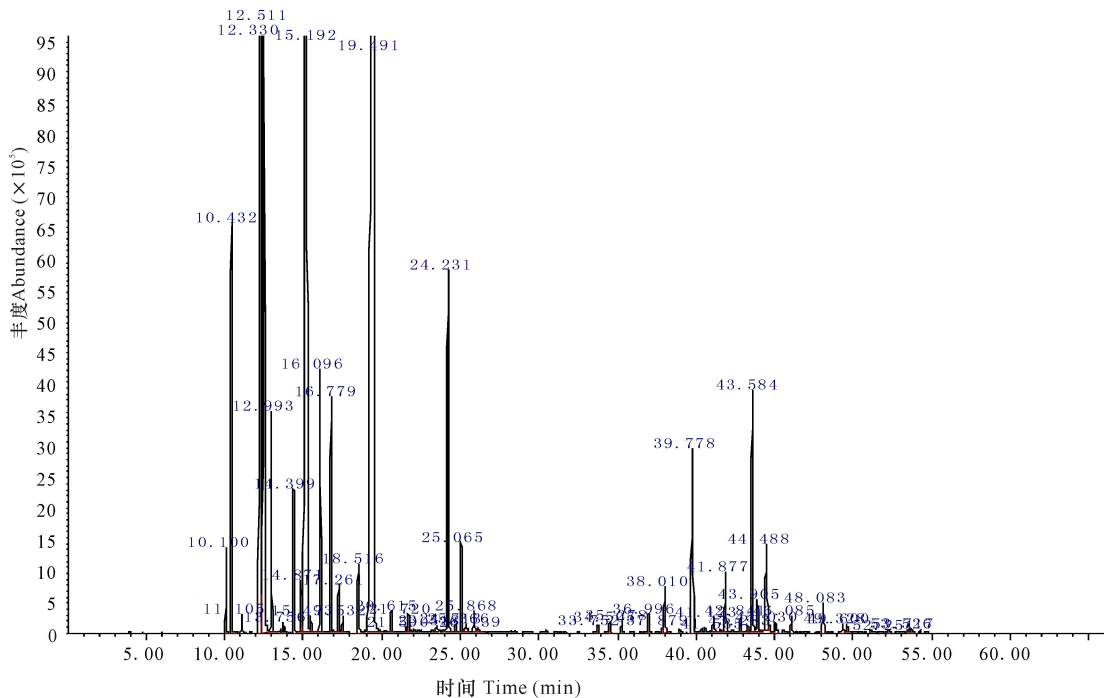


图 1 灵山两面针果壳挥发油总离子流图

Fig. 1 TIC of essential oils of *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. from Lingshan

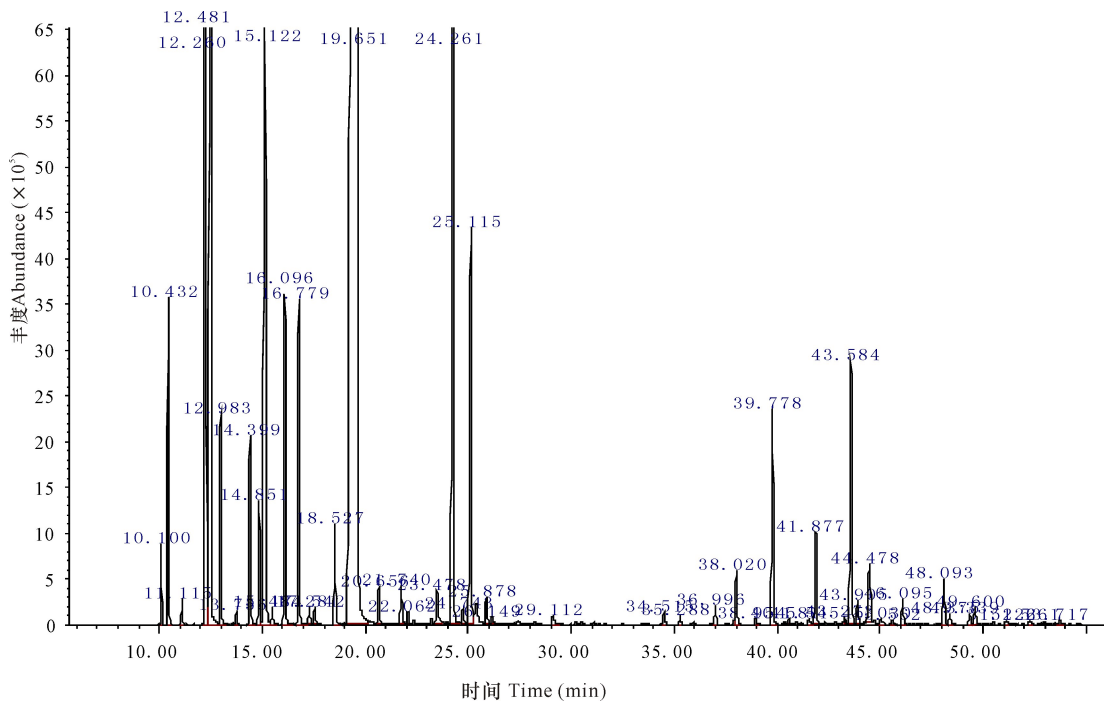


图2 马山两面针果壳挥发油总离子流图

Fig. 2 TIC of essential oils of *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. from Mashan

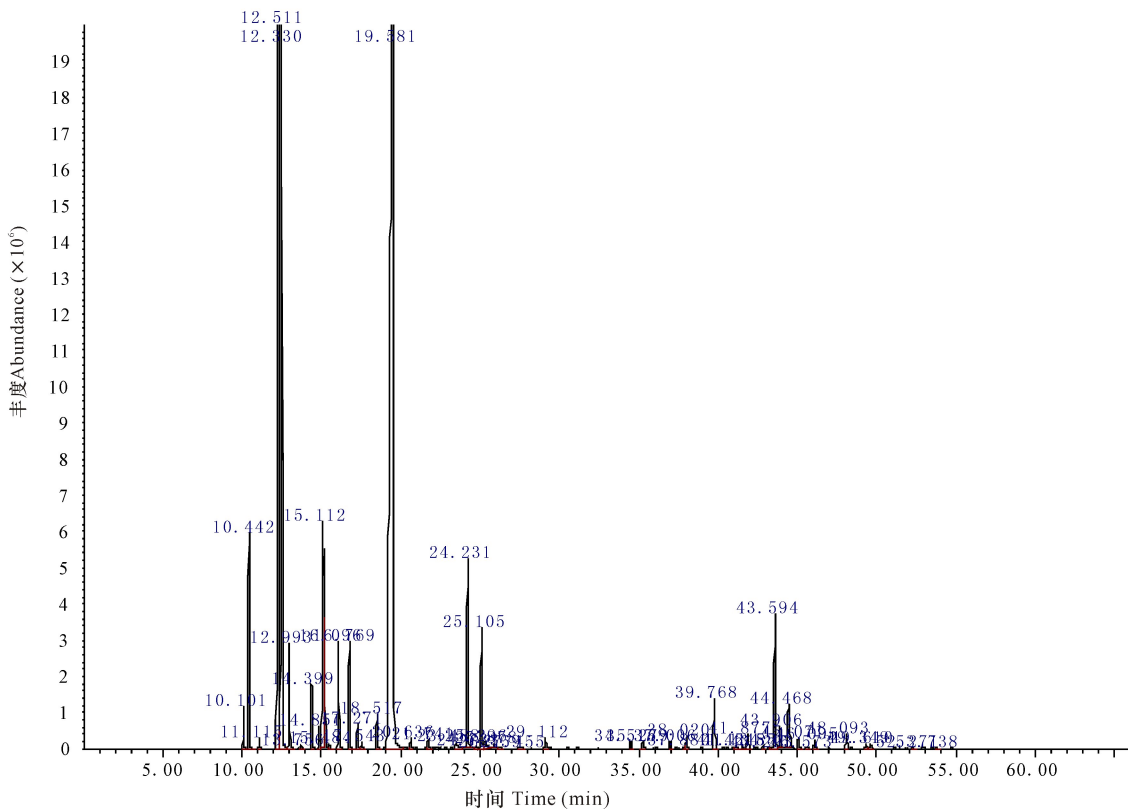


图3 玉林两面针果壳挥发油总离子流图

Fig. 3 TIC of essential oils of *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. from Yulin

表 1 不同产地两面针果壳挥发油化学成分表

Table 1 Chemical constituents of *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. from different regions

编号 No.	相对保留时间 Relative retention time(min)	成分 Component	分子式 Molecular formula	分子量 Molecular weight	相对百分含量 Relative percentage content(%)		
					灵山 Lingshan	马山 Mashan	玉林 Yulin
1	10.100	α -水芹烯 α -phellandrene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.482	0.333	0.442
2	10.439	α -蒎烯 α -pinene	C ₁₀ H ₁₆	136	2.332	1.381	2.242
3	11.110	茨烯 Camphene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.128	0.126	0.137
4	12.333	β -水芹烯 β -phellandrene	C ₁₀ H ₁₆	136	21.441	8.918	21.64
5	12.513	β -蒎烯 β -pinene	C ₁₀ H ₁₆	136	10.398	10.738	11.118
6	12.992	β -月桂烯 β -myrcene	C ₁₀ H ₁₆	136	1.421	0.965	1.225
7	14.406	α -松油烯 α -terpinene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.991	0.944	0.799
8	14.872	对伞花烃 p-cymene	C ₁₀ H ₁₄	134	0.464	0.663	0.321
9	15.191	D-柠檬烯 + 1,8-桉叶素 D-limonene + 1,8-cineole	C ₁₀ H ₁₆ C ₁₀ H ₁₈ O	136 154	18.406	5.623	6.381
10	15.493	反式- β -罗勒烯 <i>trans</i> - β -ocimene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.139		
11	16.102	β -罗勒烯 β -ocimene	C ₁₀ H ₁₆	136	1.816	1.674	1.358
12	16.778	γ -松油烯 γ -terpinene	C ₁₀ H ₁₆	136	1.718	1.742	1.418
13	17.267	反式-4-侧柏醇 <i>trans</i> -4-thujanol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.371	0.11	0.39
14	17.538	顺式-4-侧柏醇 <i>cis</i> -4-thujanol	C ₁₃ H ₂₂ O ₄	154	0.142	0.108	0.115
15	18.519	(+)-4-萜烯 (+)-4-carene	C ₁₀ H ₁₆	136	0.621	0.6	0.555
16	19.496	芳樟醇 Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	154	26.265	51.227	39.323
17	20.617	反式-对盖-2-烯-1 醇 <i>trans</i> -p-menth-2-en-1-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.192	0.212	0.162
18	21.723	顺式-对盖-2-烯-1 醇 <i>cis</i> -p-menth-2-en-1-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.176	0.277	0.164
19	23.485	冰片 Endo-borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	154		0.297	0.175
20	24.234	松油烯-4-醇 Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	3.305	4.643	3.186
21	25.068	α -松油醇 α -terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.759	2.649	1.968
22	25.305	水杨酸甲酯 Methyl salicylate	C ₈ H ₈ O ₃	152			0.242
23	25.394	桃金娘烯醇(-)-myrtenol	C ₁₀ H ₁₆ O	152		0.244	
24	25.869	癸醛 Decanal	C ₁₀ H ₂₀ O	156	0.155	0.151	
25	29.122	乙酸芳樟酯 Linalyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196			0.195
26	34.520	4-乙基-甲基-1-(丙-2-基)-3-(丙-1-烯-2-基)环己烯 4-ethenyl-4-methyl-1-(propan-2-yl)-3-(prop-1-en-2-yl)cyclohexene	C ₁₅ H ₂₄	204			0.119
27	35.286	α -葑烯 α -cubebene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.102		0.162
28	36.999	α -可巴烯 α -copaene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.192	0.135	0.122
29	38.017	(-)- β -榄香烯 (-)- β -elemene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.426	0.39	0.207
30	39.780	石竹烯 Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	204	1.709	1.477	0.854
31	41.127	α -愈创木烯 α -guaiene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.151		
32	41.878	葑烯 Humulene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.55	0.623	0.258
33	42.848	4,5-二-表-马兜铃烯 4,5-di-epi-aristolochene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.155		
34	43.592	大牻牛儿烯 D Germacrene D	C ₁₅ H ₂₄	204	2.284	1.803	2.312
35	43.906	(-)- α -芹子烯 (-)- α -selinene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.322	0.166	0.395
36	44.492	γ -榄香烯 γ -elemene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.998	0.562	1.06
37	45.037	榄香烯 Elemene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.123		
38	45.077	α -法尼烯 α -farnesene	C ₁₅ H ₂₄	204			0.199
39	46.090	δ -杜松烯 δ -cadinene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.159	0.178	0.148
40	48.091	别香橙烯 Alloaromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.276	0.313	0.261
41	49.337	匙桉醇 Espotulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.105	0.135	0.103

3 结论

根据文献报道,两面针根挥发油主要成分为斯杞土烯醇、异斯杞土烯醇、异香树素环氧化物^[3],而叶挥发油主要成分为橙花叔醇、 δ -杜松醇、棕榈酸^[4]。本

研究表明两面针果壳挥发油的主要成分与根和叶不同,此外不同产地两面针果壳挥发油主成分含量也存在明显差异。灵山、马山和玉林 3 个产地中,灵山和玉林 2 个产地的两面针生长周期相同,马山采集的两面针生长周期较长,两面针药材通常在生长至

4~5年后采集。因此,生长年限的不同可能为3个产地两面针果壳挥发油主要成分差异的主要因素。本研究通过对两面针果壳挥发油的分析鉴定,为其挥发油化学成分研究提供参考,还可为综合利用两面针以及研究开发两面针果实提供研究基础与科学依据。MTT实验结果表明,两面针果壳挥发油对宫颈癌细胞(Hela)、乳腺癌细胞(MCF-7)、肺腺癌细胞(A549)、胃癌细胞(MGC-803)、结肠癌细胞(COLO-205)具有较强的生长抑制作用,提示两面针果壳挥发油具有体外抗肿瘤活性作用,为两面针果壳的开发研究提供了研究方向。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:169.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the people's republic of china: Section 1[M]. Beijing: China Medical Science Press,2015:169.

[2] 余丽莹. 中药材两面针种质资源的研究[D]. 北京:中国协和医科大学,2007.
YU L Y. Studies on the germplasm of *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. [D]. Beijing: Peking Union Medical College,2007.

[3] 李启发,王晓玲,官艳丽,等. 两面针药材挥发油的 GC-MS 分析[J]. 天然产物研究与开发,2006,18:69-71.
LI Q F, WANG X L, GUAN Y L, et al. GC-MS analysis of essential oil from the roots of *Zanthoxylum nitidum* [J]. Nat Prod Res Dev,2006,18:69-71.

[4] VILAYSACK MACKHAPHONH (阿优),冯洁,李进英,等. 不同采收期两面针叶挥发性成分的 GC-MS 分析[J]. 时珍国医国药,2013,24(5):1244-1246.
VILAYSACK MACKHAPHONH (A You), FENG J, LI J Y, et al. GC-MS analysis of essential oil from the

leaves of different harvest periods of *Zanthoxylum nitidum* DC. [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research,2013,24(5):1244-1246.

[5] 周劲帆,覃富景,冯洁,等. 两面针根挥发油的抗炎镇痛作用研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(1):19-20.
ZHOU J F, QIN F J, FENG J, et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of essential oil from the roots of *Zanthoxylum nitidum* DC. [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research,2012,23(1):19-20.

[6] 刘布鸣,莫建光. 实用芳香精油图谱[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2016.
LIU B M, MO J G. Atlas of practical aromatic essential oil [M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Press,2016.

[7] 梁乔芳,刘华钢,谭强,等. 二去水卫矛醇对人脑肿瘤细胞体外抑制作用[J]. 广西科学,2015(4):454-456.
LIANG Q F, LIU H G, TAN Q, et al. Inhibitory effect of 1,2:5,6-dianhydrogalactitol on human brain tumor cells in vitro[J]. Guangxi Sciences,2015(4):454-456.

[8] 唐思丽,王声,孙明娜,等. 莪术活性成分的分离鉴定及活性研究[J]. 中国现代中药,2017(3):354-357.
TANG S L, WANG S, SUN M N, et al. Isolation, identification and activity assay of active ingredients of *Rhizoma Curcumae* [J]. Modern Chinese Medicine,2017(3):354-357.

[9] 莫斯锐,谢集照,林霄,等. 板蓝根组酸的分离与 GC-MS 分析和体外抗肿瘤活性研究[J]. 广东化工,2017,44(343):13-15.
MO S R, XIE J Z, LIN X, et al. Isolation and structural analysis on GC-MS and study on the antitumor activity in vitro of Banlangen-acids[J]. Guangdong Chemical Industry,2017,44(343):13-15.

(责任编辑:陆雁)