

冷饭藤挥发油成分 GC-MS 分析 及对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响

廖静妮¹, 覃山丁¹, 曲啸声¹, 卢利敏², 樊兰兰^{1*}

(1. 广西药用植物园西南濒危药材资源开发国家工程实验室, 南宁 530023;

2. 桂林医学院, 广西 桂林 541004)

[摘要] 目的:分析冷饭藤挥发油的化学成分并探讨对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响。方法:采用水蒸气蒸馏法提取挥发油,用气相色谱-质谱联用法(GC-MS)联合 NIST08 和 WILEY275 谱库检索,同时结合 Kováts 保留指数(Retention index, RI)对其化学成分进行定性。采用 MTT 法测定冷饭藤挥发油对人乳腺癌细胞 MCF-7 生长的抑制作用。结果:从冷饭藤挥发油中共鉴定出 50 个化合物,占所提取物挥发油总量的 98.421%。挥发油对 MCF-7 细胞生长有抑制作用,且其作用具有浓度依赖性,半数抑制浓度(IC₅₀)为 377.61 mg·L⁻¹。结论:冷饭藤挥发油主要成分为莜烯(17.770%)、龙脑(12.080%)、(1,7,7-三甲基降冰片烷-2-yl)乙酸(8.239%)和 *d*-杜松烯(7.315%)。冷饭藤挥发油对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖起到抑制作用,且呈浓度依赖性。

[关键词] 冷饭藤; 挥发油; 气相色谱-质谱; 保留指数; MCF-7; 细胞增殖

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)20-0095-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014200095

Chemical Components of Essential Oils from *Kadsurae Oblongifoliae* Radix by GC-MS and Effect on Proliferation of Human Breast Cancer Cell Line MCF-7

LIAO Jing-ni¹, QIN Shan-ding¹, QU Xiao-sheng¹, LU Li-min², FAN Lan-lan^{1*}

(1. National Engineering Laboratory of Southwest Endangered Medicinal Resources Development,

Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning 530023, China;

2. Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the chemical components of essential oils from *Kadsurae Oblongifoliae* Radix and investigate their effect on proliferation of breast cancer cell line MCF-7. **Method:** The essential oil was extracted by steam distillation, and analyzed by GC-MS. Comparing with the data base NIST08 and WILEY275, and combing with Kováts retention index to identify the essential oil constituents. MTT assays were used to measure the inhibitory effect on the human breast cancer cell MCF-7. **Result:** Fifty compounds, account for 98.421% of the essential oils, were identified. The volatile oil has inhibitory effect on the growth of MCF-7 cells, and the effect is concentration dependant, IC₅₀ 377.61 mg·L⁻¹. **Conclusion:** The main chemical constituents of the essential oils from *Kadsurae Oblongifoliae* Radix are camphene (17.770%), borneol (12.080%), bicyclo [2.2.1] heptan-2-ol, 1, 7, 7-trimethyl-2-acetate (8.239%) and (+)-delta-cadinene (7.315%). And the essential oils of *Kadsurae Oblongifoliae* Radix can inhibit proliferation of MCF-7 cells, which shows concentration dependence.

[收稿日期] 20140402(006)

[基金项目] 《广西壮族自治区瑶药质量标准》(第一卷)研究资助(MZY2012026)

[第一作者] 廖静妮, 硕士, 助理研究员, 从事天然药物化学研究, Tel:0771-5602461, E-mail: liaojingni@126.com

[通讯作者] * 樊兰兰, 博士, 副研究员, 从事民族药物质量标准及代谢研究, Tel:0771-5602461, E-mail: fanlanlan1024@gmail.com

[Key words] Kadsurae Oblongifoliae Radix; essential oil; GC-MS; retention index; MCF-7; cell proliferation

冷饭藤主要分布于广西梧州、桂林、玉林、柳州及海南、广东等省^[1-5]。广西瑶族民间多用冷饭藤来治疗各种“石痈”(肿瘤)^[2]。文献报道冷饭藤具有祛风除湿、行气止痛的功效,主治感冒、风湿痹痛、活血消肿、理气止痛、跌打损伤、心胃气痛及痛经等疾病^[1,6]。五味子属植物大多具有保肝、抗肿瘤及抗人类免疫缺陷病毒(HIV)活性^[7-9]。研究发现冷饭藤中主要含有螺苯骈联苯环辛烯型和联苯环辛烯型等木脂素类及黄酮类化合物^[10-12]。刘抗伦等^[13]研究表明冷饭藤中的 kadsuracoccinic acid B, schizanzrin B, caryophyllene oxide, coccinic acid 在体外对人直肠癌 HCT-15、口腔上皮癌 KB-3-1 瘤株有明显的抑制活性。但迄今鲜有见对冷饭藤挥发油成分的研究,本文运用气相色谱、质谱技术对其挥发油成分进行了分析,同时探讨其对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响,为冷饭藤的进一步运用提供了科学依据。

1 仪器与试剂

300-MS 型气-质联用仪(美国 Varian 公司), HEPA CLASS100 型 CO₂ 培养箱(Thermo 公司), Spec-traMAX 190 型酶标仪(Molecular Devices 公司), 5810 R 型高速冷冻离心机(Eppendorf 公司), IX 71 型倒置相差显微镜(Olympus 公司)。

冷饭藤采自广西省梧州市,经广西中医药研究院方鼎教授鉴定为五味子科粉碎后过 40 目筛备用。植物为冷饭藤 *Kadsura oblongifolia* Merr。

无水乙醚和无水硫酸钠均为分析纯。正构烷烃混标(C₁₀₋₂₀)购自百灵威科技有限公司。细胞株人乳腺癌 MCF-7 细胞株购自中国科学院细胞库。RPMI-1640 培养基培养基购自 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,噻唑蓝(MTT)和胰蛋白酶购自 Amersco 公司。

2 方法与结果

2.1 挥发油的提取 称取冷饭藤粉末 80 g 置圆底烧瓶中,按《中国药典》2010 年版附录 XD 方法提取挥发油,得黄色油状物 0.8 mL,出油率 0.98% (mL·g⁻¹)。

2.2 气相色谱-质谱分析条件

2.2.1 气相色谱条件 选用 VF-5 ms 色谱柱(0.25 mm×30 m,0.25 μm),进样口温度 250 ℃,升温程序(初温 50 ℃,保持 2 min,以 3 ℃·min⁻¹升温至 75 ℃,保持 3 min,以 3 ℃·min⁻¹升温至 120 ℃,最后再以 1 ℃·min⁻¹升温至 165 ℃),进样

量 1 μL,分流比 20:1,载气为高纯氦气,流量 1.0 mL·min⁻¹。

2.2.2 质谱条件 检测模式 Full Scan,电离方式 EI,离子源温度 200 ℃,电子能量 70 eV,传输线温度 250 ℃,扫描质量范围 m/z 45~500。注:样品使用农残级石油醚(60~90 ℃)稀释 1 000 倍。

2.2.3 化学成分分析 本实验运用气相色谱-质谱联用法对冷饭藤挥发油进行分析,共分离出 69 个峰。各分离组分采用 NIST08 和 WILEY275 谱库检索,同时结合保留指数及有关质谱图文献对比进行定性,采用色谱峰面积归一化法进行相对定量,共鉴别 50 个峰,占总挥发油含量的 98.421%。鉴定结果见表 1。冷饭藤挥发油和正构烷烃混标的总离子流图分别见图 1,2。

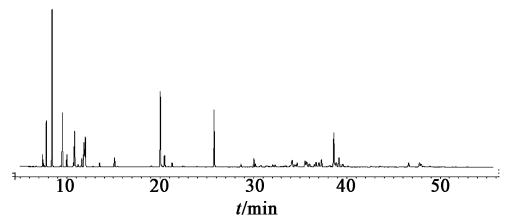


图 1 冷饭藤挥发油总离子

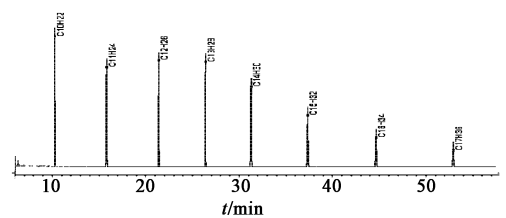


图 2 正构烷烃混标总离子

2.3 对人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞增殖的影响 MTT 法检测抑制率 取对数生长期 MCF-7 细胞以每孔 5 000 个细胞接种于 96 孔板中,每孔体积 100 μL,于培养箱中预培养 24 h。设空白对照组和药物组,每组 3 个复孔。药物组加入 5 个浓度的挥发油(终质量浓度分别为 1 000,500,250,125,62.5 mg·L⁻¹),每孔加入 100 μL,空白对照组加入 RPMI-1640 培养基 100 μL。加药后细胞在同等条件的培养箱中继续培养 48 h,然后加入 10 μL/孔 MTT 溶液(5 g·L⁻¹),继续培养 4 h 后吸去上清,加入二甲基亚砜(DMSO) 150 μL/孔,轻轻振荡 10 min,用酶标仪于 490 nm 波长处测吸光度(A)。计算抑制率(IR)。

$$IR = (\text{对照孔 } A - \text{药物孔 } A) / \text{对照孔 } A \times 100\%$$

表 1 冷饭藤根皮的挥发油化学成分

No.	t_R /min	化合物	分子式	相对 分子质量	相对含量 /%
1	7.396	1,7,7-trimethyltricyclo[2.2.1.0 ^{2,6}]heptanes (1,7,7-三甲基三环[2.2.1.0(2,6)]庚烷)	C ₁₀ H ₁₆	136.1	1.177
2	7.518	3-thujene (3-崖柏烯)	C ₇ H ₁₀	94.1	0.319
3	7.792	α -pinene (α -蒎烯)	C ₁₀ H ₁₆	136.1	4.548
4	8.415	camphene (莰烯)	C ₁₀ H ₁₆	136.1	17.77
5	9.51	β -pinene (β -蒎烯)	C ₁₀ H ₁₆	136.1	5.878
6	10.006	(1S)-(1)- β -pinene (左旋- β -蒎烯)	C ₁₀ H ₁₆	136.1	1.302
7	10.715	α -phellandrene (α -水芹烯)	C ₁₀ H ₁₆	136.1	0.478
8	10.819	3-carene (3-薷烯)	C ₁₀ H ₁₆	136.1	4.813
9	11.21	α -terpinene (α -萜品烯)	C ₁₀ H ₁₆	136.1	0.306
10	11.598	<i>o</i> -cymene (邻异丙基甲苯)	C ₁₀ H ₁₄	134.22	1.073
11	11.831	(-)-limonene [(-)-柠檬烯]	C ₁₀ H ₁₆	136.1	3.288
12	11.899	3-methylene-6-(1-methylethyl)-cyclohexene [3-亚甲基-6-(1-甲基乙基)环己烯]	C ₁₀ H ₁₆	136.1	1.975
13	11.985	cinole (桉叶油醇)	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25	4.224
14	13.501	(1R,4R)-4,7,7-trimethylbicyclo[4.1.0]hept-2-ene [(1S,3R)-顺式-4-薷烯]	C ₁₀ H ₁₆	136.1	0.576
15	15.101	terpinolene (异松油烯)	C ₁₀ H ₁₆	136.1	1.367
16	15.41	1-methyl-4-(1-methylethenyl)-benzene [1-甲基-4-(1-甲基乙烯基)苯]	C ₁₀ H ₁₂	132.2	0.1
17	19.041	camphenhydrate(水合樟烯)	C ₁₀ H ₁₈ O	154.1	0.148
18	20.005	isoborneol(异龙脑)	C ₁₀ H ₁₈ O	154.1	12.08
19	20.464	terpinen-4-ol (4-萜烯醇)	C ₁₀ H ₁₈ O	154.1	1.668
20	21.28	(-)- α -terpineol (α -松油醇)	C ₁₀ H ₁₈ O	154.2	0.529
21	22.418	fenchyl acetate (1,3,3-三甲基-二环[2.2.1]庚-2-醇乙酸酯)	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196.1	0.147
22	25.763	bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol,1,7,7-trimethyl-2-acetate (1,7,7-三甲基降冰片烷-2-YL)乙酸	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196.3	8.239
23	28.652	α -cubebene (α -萆澄茄油烯)	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.472
24	29.719	copaene (古巴烯)	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.115
25	30.034	(+)-ylangene [(+)-衣兰烯]	C ₁₅ H ₂₄	204.4	1.339
26	30.198	1-isopropyl-7-methyl-4-methylene-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydronaphthalene (1-异丙基-7-甲基-4-亚甲基-1,2,3,4,4a,5,6,8a-八氢萘)	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.453
27	30.787	(-)- β -elemene[(-)- β -榄香烯]	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.238
28	31.536	[S-(R*,S*)]-5-(1,5-dimethylhexen-4-yl)-2-methyl-1,3-cyclohexa-1,3-diene [S-(R*,S*)]-2-甲基-5-(1,5-二甲基-4-己烯基)-1,3-环己二烯]	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.134
29	32.055	(+)-sativene [(+)-蒜头素]	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.427
30	32.327	1-caryophyllene (1-石竹烯)	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.347
31	33.375	1-methyl-4-(1-methylethylidene)-2-(1-methylvinyl)-1-vinylcyclohexane (1-甲基-1-乙烯基-2-(1-甲基乙烯基)-4-(1-甲基亚乙基)环己烷)	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.214
32	33.509	campholenic aldehyde (龙脑烯醛)	C ₁₀ H ₁₆ O	152.2	0.134
33	34.14	cyperene (香附子烯)	C ₁₅ H ₂₄	204.4	1.608
34	34.433	(-)-isocaryophyllene [(-)-异丁香烯]	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.407
35	34.672	(-)-alloaromadendrene (香树烯)	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.703
36	35.51	<i>d</i> -cadinene (<i>d</i> -杜松烯)	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.966

续表 1

No.	t_R /min	化合物	分子式	相对 分子量	相对含量 /%
37	35.676	eremophilene (佛术烯)	$C_{15}H_{24}$	204.4	1.252
38	35.987	(1 $\dot{\iota}$, 4 \dot{a} , 8 \dot{a})-1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-naphthalene [(1 $\dot{\iota}$, 4 \dot{a} , 8 \dot{a})-1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 8a-八氢-7-甲基-4-亚甲基-1-(1-甲基乙基)-萘]	$C_{15}H_{24}$	204.4	0.723
39	36.509	β -selinene (β -瑟林烯)	$C_{15}H_{24}$	204.4	0.323
40	36.692	β -cubebene n (β -萆澄茄油烯)	$C_{15}H_{24}$	204.4	0.818
41	36.995	γ -gurjunene (γ -古云烯)	$C_{15}H_{24}$	204.4	0.867
42	37.289	α -muurolene (α -衣兰油烯)	$C_{15}H_{24}$	204.4	1.483
43	38.611	(+)-delta-cadinene [(+)- d -杜松烯]	$C_{15}H_{24}$	204.4	7.315
44	38.854	β -cadinene(β -杜松烯)	$C_{15}H_{24}$	204.4	0.968
45	39.159	4-ethenyl-4-methyl-1-(propan-2-yl)-3-(prop-1-en-2-yl)cyclohexene [4-甲基-4-乙烯基-1-(丙-2-基)-3-(丙-1-烯-2-基)环己烯]	$C_{15}H_{24}$	204.4	2.058
46	39.54	α -cedrene (α -柏木烯)	$C_{15}H_{24}$	204.4	0.624
47	42.599	(+)-espatulenol [(+)-匙叶桉油烯醇]	$C_{15}H_{24}O$	220.4	0.188
48	46.613	torreyol (香榧醇)	$C_{15}H_{26}O$	222.4	1.013
49	47.77	(-)-cubenol [(-)-萆澄茄油烯醇]	$C_{15}H_{26}O$	222.4	0.904
50	47.963	T -muurolol (T -依兰油醇)	$C_{15}H_{26}O$	222.4	0.323

结果表明当冷饭藤挥发油质量浓度 $\geq 250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用与空白对照组相比有显著性差异,且具有浓度依赖性, IC_{50} 为 $377.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 2)。

表 2 挥发油对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A	抑制率 /%	IC_{50} / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
空白对照	-	$0.617 \pm 0.030^{1)}$	-	
挥发油	1 000	$0.103 \pm 0.018^{2)}$	83.29	377.6
	500	$0.238 \pm 0.028^{2)}$	61.42	
	250	$0.480 \pm 0.027^{2)}$	22.20	
	125	0.514 ± 0.025	16.73	
	62.5	0.567 ± 0.082	8.20	

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

本实验通过 GC-MS 所鉴定出的 50 个化合物,均为首次从冷饭藤中发现,占其挥发油总量的 98.421%。其主要成分为蒎烯 (17.77%), 龙脑 (12.08%), (1, 7, 7-三甲基降冰片烷-2-yl) 乙酸 (8.24%), d -杜松烯 (7.31%), α -蒎烯 (4.55%) 和桉叶油醇 (4.22%) 等。据文献报道^[14],使用龙脑作为药材之一,可制备神灸植物精油,具有舒经活络、快速止痛的作用。以龙脑为原料还可制成一种骨病

痛消膏药^[15],具有活血祛瘀、清热解毒、疏通经络等多种功效。 α -蒎烯对革兰氏菌有抵抗作用^[16],对杂拟谷盗成虫有驱避、触杀和熏蒸作用^[17]。从冷饭藤根皮中分离的挥发油中含有一定的龙脑和 α -蒎烯,这与其生物活性可能具有一定的联系。蒎烯是制备低黏度、高固相含量碳化硅材料的重要原料^[18],蒎烯也可作为合成拒食活性化合物的原料^[19]。

通过 MTT 法测定冷饭藤挥发油对人乳腺癌细胞 MCF-7 生长的抑制作用表明当浓度 $\geq 250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时与空白对照相比有显著性差异,其对 MCF-7 细胞生长有抑制作用,且其作用具有浓度依赖性, IC_{50} 为 $377.61 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,有望进一步开发利用。以上研究结果为冷饭藤的药用研发提供了一定的参考和依据,对增加冷饭藤的产品附加值具有一定的实用价值。

[参考文献]

- [1] 刘海涛,齐耀东,许利嘉,等. 中国五味子科植物传统药物学调查 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (10):1353.
- [2] 庞声航,余胜民,黄琳芸,等. 广西 20 种传统瑶药抗肿瘤筛选研究 [J]. 广西中医药, 2006, 29(4):53.
- [3] 戴斌等. 广西民族医药研究院. 中国现代瑶药 [M]. 南宁:广西科学技术出版社, 2009:12, 68.
- [4] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物

- 志. 第三十卷第一分册[M]. 北京:科学出版社, 1996:242.
- [5] 中国科学院广西植物研究所. 广西植物志. 第一卷 [M]. 南宁:广西科学技术出版社, 1991:109.
- [6] 国家中医药管理局中华本草编辑委员会. 中华本草. 第 6 卷. 第 2 册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999:901.
- [7] Sun Q Z, Chen D F, Ding P L, et al. Three new lignans, longipedunins A-C, from *Kadsura longipedunculata* and their inhibitory activity against HIV-1 protease [J]. Chem Pharm Bull, 2006, 54 (1):129.
- [8] Li H R, Wang L Y, Miyata S, et al. Kadsuracoccinic acids A-C, ring-A seco-lanostane triterpenes from *Kadsura coccinea* and their effects on embryonic cell division of *Xenopus laevis* [J]. J Nat Prod, 2008, 71 (4):739.
- [9] Kuo Y H, Li S Y, Huang R L, et al. Schizanrins (corrected) B, C, D, and E, four new lignans from *Kadsura matsudai* and their antihepatitis activities [J]. J Nat Prod, 2001, 64 (12):1608.
- [10] 刘海涛,五味子科药用植物亲缘学初探及两种五味子科药用植物化学成分的研究[D]. 北京:中国协和医学院中国医学科学院,2009:86.
- [11] Liu H T, Xu L J, Peng Y, et al. Complete assignments of ^1H and ^{13}C NMR data for new dibenzocyclooctadiene lignans from *Kadsura oblongifolia* [J]. Magn Reson Chem, 2009, 47(7):609.
- [12] Huang Z H, Lu Y, Liu Y N, et al. Kadsufolins A-D and Related Cytotoxic Lignans from *Kadsura oblongifolia* [J]. Helv Chim Acta 2011, 94:519.
- [13] 刘抗伦,田汝华,沈小玲,等. 冷饭藤的化学成分及其体外抗肿瘤活性[J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30 (6):843.
- [14] 赵厚玉. 一种神灸植物精油及制备方法及应用:中国, CN201310327572. 6[P]. 2013-11-20.
- [15] 郭其昌. 一种骨病痛消膏药申请号:中国, CN201310261179. 1[P]. 2013-11-06.
- [16] Ozek G, Demirci F, Ozek T, et al. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of volatiles obtained by four different techniques from *Salvia rosifolia* Sm., and evaluation for biological activity [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(5):741.
- [17] 吕建华,林敏华,屠亚伟. α -蒎烯对杂拟谷盗成虫的控制作用[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(12):88.
- [18] 王华,胡传奇,王忠文. 苧烯基碳/碳化硅料浆制备工艺研究[J]. 材料工程, 2010, 2(增刊):226.
- [19] 肖伟,肖转泉,聂旭亮,等. 苧烯酸酰胺的合成及其晶体结构[J]. 江西师范大学学报:自然科学版, 2012, 36 (5):527.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国中药杂志》2015 年征订启事

《中国中药杂志》创刊于 1955 年 7 月,是由中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中医药学术期刊,在国际国内医药学领域内具有广泛影响。位居中国中文核心期刊、中国科技核心期刊“双核心”首位。曾荣获第三届国家期刊奖百种重点期刊、国家新闻出版广电总局“中国百强报刊”,以及历届国家中医药管理局全国优秀中医药期刊评比一等奖、百种中国杰出学术期刊、中国精品科技期刊等奖项。在国际上被 Medline, Scopus 等国外十余家著名数据库收录。全面反映我国中药与天然药物学科领域最新进展与研究动态。主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、临床等专业。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、民族药、学术探讨、药事管理等栏目。主要读者对象为各级管理部门、科研院所、大专院校、工厂企业以及医院等从事中医药科研、管理、生产、医院制剂及临床等方面的人员。

2015 年本刊每期定价为 50 元,208 页,全年定价 1200 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。欢迎广大读者到本编辑部或当地邮局订阅,邮发代号 2-45。本刊地址:北京东直门内南小街 16 号;邮政编码 100700;电子信箱 cjcmm2006@188.com;联系方式详见中国中药杂志网站 www. cjcmm. com. cn