

# 丁岙杨梅挥发油成分及抗肿瘤活性的研究

刘 涛,金吉林,金吉芬,彭志军,罗福贤\*

贵州省农业科学院果树科学研究所,贵阳 550006

**摘要:**采用水蒸气蒸馏法提取丁岙杨梅果实挥发油,通过气相色谱-质谱联用法(GC-MS)分析其化学成分,同时使用MTT法检测其对肿瘤细胞的体外增殖的抑制活性。从丁岙杨梅果实挥发油中分离得到33个峰,鉴定出了其中的27个化合物,已鉴定的化合物占总组分的92.37%,其主要成分为:石竹烯(20.80%)、邻苯二甲酸己烷-3-醇异丁醇酯(9.73%)、棕榈酸(26.55%)、2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚)(6.55%)、邻苯二甲酸二异辛酯(4.23%)、 $\beta$ -谷甾醇(3.23%)等。丁岙杨梅果实挥发油表现出了较好的抗肿瘤活性,浓度为200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对肿瘤细胞MGC-803、MCF-7和A549体外增殖的抑制率分别为57.3%、42.0%和42.4%。丁岙杨梅果实挥发油化学成分复杂,含有大量的有机酸、酯、萜、酚、甾体、烷烃等,同时也对肿瘤细胞的体外增殖表现了较好的抑制作用。

**关键词:**丁岙杨梅;挥发油;气相色谱-质谱联用;抗肿瘤

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

## Volatile Constituents from *Myricarubra* cv. DingAo Orient Pearl and Its Antitumor Activity

LIU Tao, JIN Ji-lin, JIN Ji-fen, PENG Zhi-jun, LUO Fu-xian\*

Guizhou Fruit Institute, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China

**Abstract:** To study the chemical compositions of volatile oil from *Myricarubra* cv. DingAo Orient Pearl and its anti-tumor activity. The volatile oil from *M. rubra* was extracted by steam distillation, and was identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The antitumor effect of the oil was evaluated by MTT assay. Twenty-seven compounds were identified, accounted for 92.37% of the extract. The major components were caryophyllene (20.80%), phthalic acid, hex-3-yl isobutyl ester (9.73%), *n*-hexadecanoic acid (26.55%), phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl (6.55%), diisooctyl phthalate (4.23%) and  $\beta$ -sitosterol (3.23%). The oil showed significant antitumor activities against MGC-803, MCF-7, and A549 cells (tumor growth inhibitory rates were 57.3%, 42.0%, and 42.4% at 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively).

**Key words:** *Myricarubra* cv. DingAo Orient Pearl; volatile oil; GC-MS; antitumor activity

杨梅(*Myricarubra* Sieb. et Zucc)为杨梅科杨梅属亚热带常绿果树,原产我国东南部,以浙江、江苏、福建等省为主要产区<sup>[1-4]</sup>。杨梅果鲜汁旺、风味独特、营养丰富<sup>[5,6]</sup>。作为我国的传统特产水果,杨梅色泽鲜艳、汁液多,营养价值高,风味独特,能生津解渴,助消化,浸酒。中医认为,杨梅性温味甘酸,具有生津止渴、和胃调食、行气止痛的功效<sup>[5]</sup>。《本草纲目》中记载:“杨梅味酸甜,性温、无毒。能止渴、和五脏、涤肠胃,除烦溃恶气”<sup>[7]</sup>。《开宝本草》中记

载:杨梅“主去痰、止呕、断下痢,清食解酒”<sup>[3]</sup>。果实中主要含有葡萄糖、果糖、维生素、蛋白质、柠檬酸等<sup>[8]</sup>,杨梅中的微量营养元素主要包括花青素和多酚类,这两类物质对于杨梅的营养、感官、生物活性、商业价值均具有重要的意义,其中多酚类化合物主要有:对羟基苯甲酸类(食子酸、原儿茶酸等)、黄酮类(槲皮素、杨梅黄酮等)、鞣质(水解鞣质、缩合鞣质)等<sup>[9]</sup>。在温州市茶山镇大罗山上,满山是清一色的杨梅树,称茶山“丁岙梅”。王贤亲等采用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术对丁岙杨梅叶的挥发油化学成分进行了分析<sup>[10]</sup>,而目前对于丁岙杨梅果实挥发油化学成分的研究尚未见报道。本文以水蒸气蒸馏法提取其挥发性成分,采用气相色谱-质谱

(GC-MS)联用技术对其化学成分进行分析鉴定,同时研究了丁香杨梅挥发油的抗肿瘤生物活性,为其质量全面评价提供科学依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 材料与试剂

丁香杨梅果实由贵州省荔波县甲良杨梅基地提供,于2013年6月采摘同株树上成熟度一致的果实,剔除烂果。RPMI 1640培养基(美国GIBICO公司);胰蛋白酶(美国SIGMA公司);胎牛血清(天津市灏阳生物制品科技有限公司);MTT(北京鼎国生物技术有限公司);SDS(北京鼎国生物技术有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

ISQ型气相色谱-质谱联用仪(美国Thermo公司);YXQ-LS-50灭菌锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);XW-80A旋涡混合器(上海精科实业有限公司);CO<sub>2</sub>培养箱(日本SANYO公司)。

### 1.3 供试细胞

胃癌细胞株MGC-803、乳腺癌细胞株MCF-7以及肺癌细胞株A549购自中科院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库。

## 2 方法与结果

### 2.1 挥发油提取

将新鲜的丁香杨梅去皮及其籽,阴凉处风干后,粉碎。将粉末35g放入1L烧瓶中,加水200mL和数粒玻璃珠,连接挥发油测定器和回流冷凝管,在电热套中进行提取,等沸腾后保持微沸4h,直至挥发油不再增加为止。提取结束后,将挥发油提取器下端的水相除去,收集黄色油层,再用无水硫酸钠干燥备用。

### 2.2 气相色谱条件

气象色谱HP-5 MS 5% phenyl Methyl Siloxane (0.25 μm × 0.25 mm × 30 m)弹性石英毛细管柱,柱

温以50℃起并以5℃/min升温到280℃,保持10min;汽化室温度为250℃,载气为高纯He(99.999%),载气流量为1.5 mL/min,进样量为1 μL(用将样品稀释的溶液),不分流。

### 2.3 质谱条件

离子源为EI源,离子源温度为280℃,电子能量是70 eV,接口温度为280℃,溶剂延迟2 min,质量范围m/z 40~550。所得质谱图通过HPMSD化学工作站,结合Nist 5标准质谱图库,根据有关文献进行人工检索解析鉴定样品中化学成分的质量分数,结果见表1。

### 2.4 抗肿瘤活性测试

将96孔板的上、下行用灭菌二次水封边,每孔200 μL。取对数生长期细胞,胰酶消化后,重悬于含10% FBS的RPMI 1640培养基中,以2 × 10<sup>4</sup> cells/mL的终浓度接种于96孔培养板,每孔100 μL,最右侧一列为空白对照组,加无细胞的有血清RPMI 1640培养基。置于37℃,5% CO<sub>2</sub>的饱和湿度培养箱中培养24 h使细胞贴壁。吸掉培养基,加入含不同药物浓度的有血清培养基,每孔200 μL,注意培养基中DMSO终浓度不能超过0.1%,空白对照组每孔加200 μL完全培养基。分别处理实验要求时间,去除上清,加100 μL/well浓度0.5 mg/mL的MTT。培养4 h后再补加100 μL/well的10%的SDS。37℃下10 h使结晶物充分溶解后取出,微震荡5 min,放置室温下30 min,在A<sub>595</sub>波长下测OD值,并计算细胞活性、抑制率和P值<sup>[11-13]</sup>。以药物浓度或处理时间为横轴,OD值或者抑制率为纵轴,绘制曲线。每样本浓度重复六个孔,每个实验重复三次,取平均值为最终结果。实验结果以SPSS软件进行方差分析,P < 0.05时为差异显著,P < 0.01时为差异极显著,实验结果如图1所示。细胞增殖的抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = \left[ \frac{(\text{对照组吸光度值} - \text{试验组吸光度值})}{\text{对照组吸光度值}} \right] \times 100\%$$

表1 丁香杨梅果实挥发油的成分及相对含量

Table 1 Analytical results for GC-MS identification of volatile compounds in *M. rubra*

保留时间 Retention time	挥发性化学成分 Volatile compositions	相对分子质量 Molecular weight	分子式 Chemical formula	相对含量 Concentration (%)
8.34	壬醛 Nonanal	142	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	0.78
11.20	3,7,11-三甲基-1-十二烷醇 3,7,11-Trimethyl-1-dodecanol	228	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> O	0.48
13.21	(1,4-二噁烷-2,6-二羟基)二甲醇 1,4-Dioxane-2,6-dimethanol	148	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	1.34

13.46	十四烷 Tetradecane	198	$C_{14}H_{30}$	0.85
16.91	石竹烯 Caryophyllene	204	$C_{15}H_{24}$	20.80
18.95	4,6-双(1,1-二甲乙基)-5-甲基苯酚 4,6-di-tert-Butyl-m-cresol	220	$C_{15}H_{24}O$	0.64
20.82	石竹素 Caryophyllene oxide	220	$C_{15}H_{24}O$	0.85
20.95	邻苯二甲酸二甲酯 Diethyl phthalate	194	$C_{10}H_{10}O_4$	0.76
22.73	萜澄茄油烯醇 Cubedol	222	$C_{15}H_{26}O$	0.58
25.14	表雪松醇 Epicedrol	222	$C_{15}H_{26}O$	1.22
26.78	邻苯二甲酸己烷-3-醇异丁醇酯 Phthalic acid, hex-3-yl isobutyl ester	306	$C_{18}H_{26}O_4$	9.73
28.07	9,12-十八烷二烯酸-[2,3-二(三甲基硅氧基)]丙醇酯 1-Monolinoleoylglycerol trimethylsilyl ether	498	$C_{27}H_{54}O_4Si_2$	0.84
28.66	棕榈酸 <i>n</i> -Hexadecanoic acid	256	$C_{16}H_{32}O_2$	26.55
28.77	邻苯二甲酸二丁酯 Dibutyl phthalate	278	$C_{16}H_{22}O_4$	2.06
30.74	十九烷 Nonadecane	268	$C_{19}H_{40}$	1.56
33.32	鲸蜡醇 2-Hexadecanol	242	$C_{16}H_{34}O$	0.97
33.46	植醇 Phytol	196	$C_{20}H_{40}O$	1.21
36.58	2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚) Phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl	340	$C_{23}H_{32}O_2$	6.55
37.56	顺-13-二十碳烯酸 Cis-13-Eicosenoic acid	310	$C_{20}H_{38}O_2$	1.24
38.07	叔十六硫醇 tert-Hexadecanethiol	258	$C_{16}H_{34}S$	0.59
38.21	Oleic acid, 3-(octadecyloxy) propyl ester	592	$C_{37}H_{76}O_3$	0.55
38.53	邻苯二甲酸二异辛酯 Diisooctyl phthalate	390	$C_{24}H_{38}O_4$	4.23
39.57	9,12-十八碳二烯酸 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	280	$C_{18}H_{32}O_2$	1.44
41.45	橙花叔醇乙酸酯 Nerolidyl acetate	264	$C_{17}H_{28}O_2$	1.72
43.82	17-三十五烯 17-Pentatriacontene	490	$C_{35}H_{70}$	0.58
49.71	$\beta$ -谷甾醇 $\beta$ -Sitosterol	414	$C_{29}H_{50}O$	3.23
54.40	十七酸十七烷酯 Heptadecanoic acid, heptadecyl ester	508	$C_{34}H_{68}O_2$	1.02

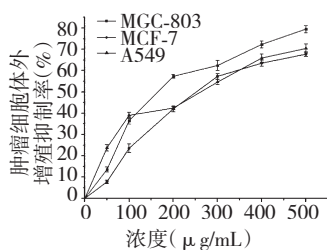


图 1 丁香杨梅果实挥发油对肿瘤细胞抑制率

Fig. 1 The inhibitory effects of volatile oil on different tumor cell lines *in vitro*

### 3 讨论

本文使用水蒸气蒸馏法从丁香杨梅果实中提取挥发油,通过气相色谱-质谱联用方法对其进行化学成分分析。如图 1 所示,从丁香杨梅果实挥发油中分离得到 33 个峰,鉴定出了其中的 27 个化合物,已鉴定的化合物占总组分的 92.37%,其主要成分为:石竹烯(20.80%)、邻苯二甲酸己烷-3-醇异丁醇酯

(9.73%)、棕榈酸(26.55%)、2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚)(6.55%)、邻苯二甲酸二异辛酯(4.23%)、 $\beta$ -谷甾醇(3.23%)等。本文与文献<sup>[10]</sup>分析得出的丁香杨梅叶挥发油化学成分有较大差异,丁香杨梅叶的主要化学成分为石竹烯(49.79%)、 $\alpha$ -石竹烯(24.16%)、橙花叔醇(16.59%)、石竹烯氧化物(2.21%)等。可见,丁香杨梅果实及其叶挥发油的主要化学成分除石竹烯外其它化学成分的鉴定结果不尽相同,且化学成分的含量差异也较大。

此外,本文使用 MTT 法测定了丁香杨梅果实挥发油对肿瘤细胞 MGC-803、MCF-7 和 A549 体外增殖的抑制作用。如图 2 测定结果表明,丁香杨梅果实挥发油表现了较好的抗肿瘤活性,在质量浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时对肿瘤细胞 MGC-803、MCF-7 和 A549 体外增殖的抑制率分别为 57.3%、42.0% 和 42.4%。如图 1 所示,其抑制作用并呈现浓度依赖性,随着浓度的变大,对三种细胞的体外增殖的抑制

活性呈现增加的趋势。

丁岙杨梅果实挥发油化学成分较为复杂,含有大量的有机酸、酯、萜、酚、甾体、烷烃等,含有少量的醛类化合物,从而构成其特有的药用价值,对这些化学成分的提取分离和纯化以及利用还有待于深入研究,以实现对于丁岙杨梅的深层次开发利用。

#### 参考文献

- Xiao ZB(肖卓炳), Chen S(陈上), Ma MY(麻明友), *et al.* Characterization of polyphenol oxidase in *Myricarubra* fruits. *Food Sci*(食品科学), 2009, 30:306-308.
- Ma HF(马惠芬), Yan ZL(闫争亮), Ze SZ(泽桑梓), *et al.* GC/MS analysis of volatile components from leaf of *Myricaesculenta* Buch.-Ham. *Guangdong Agric Sci*(广东农业科学), 2011, 38:88-89.
- Yang XD(杨晓东), Xiao SM(肖珊美), Han Z(韩铮), *et al.* GC-MS analysis of volatile components in bayberry (*Myricarubra*) fruit. *J Fruit Sci*(果树学报), 2008, 25:244-249.
- Li PP(李培培), Qi XY(戚向阳), Luo T(罗彤), *et al.* Antioxidant activity of flavonoids extracts from different varieties of Chinese bayberry by chemiluminescence. *J Chin Inst Food Sci Technol*(中国食品学报), 2011, 11:191-194.
- Zhou JJ(周建俭). Study on the application of nisin in preserving *Myricarubra* fruits. *Jiangsu Agric Sci*(江苏农业科学), 2012, 40:238-240.
- Liu N(刘宁), Li ZF(李正芬). Studies on germplasm resources of *Myrica nana* Cheval in Guizhou province. *Seed*(种子), 2004, 23:80-82.
- Qin H(秦红), Song QQ(宋庆庆), Hua XY(华晓燕). Bacteriostatic effect of waxberry wine on intestinal bacteria. *Guizhou Agric Sci*(贵州农业科学), 2012, 40:157-159.
- Sun SL(孙石磊), Yao WR(姚卫蓉). Antibacterial activity of different extracts from Chinese waxberry fruit. *Chin J Microecol*(中国微生态学杂志), 2009, 21:229-231.
- Wu WB(吴文彬), Wang BJ(王白娟). Study on extraction and activity of polyphenol in *Myricarubra* (Lour.) Zucc. In Yunan. *Chinese Hortic Abstr*(中国园艺文摘), 2010, 11:5-8.
- Wang XQ(王贤亲), Pan XJ(潘晓军), Lin D(林丹), *et al.* Analysis of the essential oil from the leaves of ding-ao *MyricaRubraby* GC-MS. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2009, 30:98-99.
- Zhao MC(赵满仓), Wei WQ(魏文青), Liu J(刘晶), *et al.* Study on the influencing factors of the MTT based tumor chemosensitivity assay *in vitro*. *Chinese Clin Oncol*(临床肿瘤学杂志), 2009, 14:306-308.
- Huang F(黄菲), Luo M(罗曼). Evaluation of methyl thiazolyltetrazolium(MTT) assay for screening antitumor essential oils. *Food Sci*(食品科学), 2009, 30:75-79.
- Li MY(李明勇), Huang PC(黄培春), Kong X(孔霞). Detecting the anticancer effects of *Squillaoratoria* extract *in vitro* by MTT method. *J Mod Oncol*(现代肿瘤医学), 2005, 13:336-337.
- Feurerer M, Herrero L, Cipolletta D, *et al.* Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*, 2009, 15:930-939.
- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, *et al.* Resveratrol improves health and survival of mice on high-calorie diet. *Nature*, 2006, 444:337-342.
- Kim S, Jin Y, Choi Y, *et al.* Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81:1343-1351.
- Ma X, Hua J, Mohamood AR, *et al.* A high-fat diet and regulatory T cells influence susceptibility to endotoxin-induced liver injury. *Hepatology*, 2007, 46:1519-1529.
- Yang N, Ying C, Xu M, *et al.* High-fat diet up-regulates caveolin-1 expression in aorta of diet-induced obese but not in diet-resistant rats. *Cardiovasc Res*, 2007, 76:167-174.
- de Leeuw van Weenen JE, Parlevliet ET, Schröder-van der Elst JP, *et al.* Pharmacological modulation of dopamine receptor D2-mediated transmission alters the metabolic phenotype of diet induced obese and diet resistant C57Bl6 mice. *Exp Diabetes Res*, 2011, 2011:928523.
- Akieda-Asai S, Koda S, Sugiyama M, *et al.* Metabolic features of rats resistant to a high-fat diet. *Obes Res Clin Pract*, 2013, 7:e235-320.

(上接第 1824 页)