

痰火草挥发油成分及抗肿瘤活性研究

陈新颖¹, 许良葵², 杨燕军³, 曾庆钱³, 焦豪妍³, 聂阳^{2,3*}

¹中山大学工学院, 广州 510006; ²广东食品药品职业学院; ³广东省中药研究所, 广州 510520

摘要: 采用水蒸气蒸馏法从痰火草中提取挥发油, 利用气相色谱-质谱对其化学成分进行分析。从痰火草挥发油中分离出 51 个峰, 鉴定出 39 种化学成分, 占挥发油总量的 83.48%, 主要成分为正十六烷酸(17.57%)、萜烯油烯醇(10.62%)、2-十五烷酮(8.50%) 和 1,1,10-三甲基-2-羟基-6,9-环二氧萜烷(6.57%) 等。痰火草挥发油对肿瘤细胞 A549、PC-3、SGC-7901 和 Hep G2 均显示一定的抑制活性, 其中对 SGC-7901 和 Hep G2 的抑制活性较强, IC₅₀ 值分别为 35.01 μg/mL 和 22.43 μg/mL。痰火草挥发油含有多种抗癌成分, 将为其进一步开发研究提供科学依据。

关键词: 痰火草; 挥发油; 气相色谱-质谱技术; 抗肿瘤活性

中图分类号: R966

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.2.014

Composition and Antitumor Activities of Essential Oil from *Murdannia bracteata*

CHEN Xin-yin¹, XU Liang-kui², YANG Yan-jun³,

ZENG Qing-qian³, FANG Chun-sheng², JIAO Hao-yan³, NIE Yang^{2,3*}

¹School of Engineering, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China; ²Guangdong Food and Drug Vocational College;

³Traditional Chinese Medical Institute of Guangdong Province, Guangzhou 510520, China

Abstract: The essential oil from *Murdannia bracteata* was extracted by steam-stilling and analyzed by GC-MS. Fifty-one chromatographic peaks were detected and thirty-nine compounds were identified, which were 83.48% of the essential oil. The major components were n-hexadecanoic acid (17.57%), cubenol (10.62%), 2-pentadecanone (8.50%) and 1,1,10-trimethyl-2-hydroxy-6,9-epidioxycalinalin (6.57%). The essential oil showed significant antitumor activities against A549, PC-3, SGC-7901 and Hep G2 cells, especially against SGC-7901 and Hep G2 cell lines (IC₅₀ value of 35.01 μg/mL and 22.43 μg/mL, respectively). The essential oil from *M. bracteata* contained various antitumor constituents. The results of this study provided scientific reference for further utilization of *M. bracteata*.

Key words: *Murdannia bracteata*; essential oil; GC-MS; antitumor activity

痰火草为鸭跖草科水竹草属植物大苞水竹叶 *Murdannia bracteata* (C. B. Clarke) O. Kuntze ex J. K. Morton 的全草, 具有化痰散结, 清热通淋之功效, 主要分布于广东、广西、海南等地^[1,2]。目前, 痰火草广泛用作园林景观植物, 仅在民间以偏方用于治疗肺结核、肺癌、淋巴结结核等病症, 未见其药理作用及化学成分的相关研究报道^[3-6]。本文采用水蒸气蒸馏法提取挥发油, 应用气相色谱-质谱联用技术 (GC-MS) 分析化学成分及抗肿瘤活性研究, 为痰火草的开发利用提供依据。

1 仪器与材料

Trace GC 气相色谱仪、Trace MSQ 质谱检测器 (美国 Thermo Fisher 公司); MK3 型酶标仪、MSC1.2 超净工作台、Model 311 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Forma 公司)。痰火草采自广东省中药研究所中药园, 经广东省中药研究所曾庆钱副主任中药师鉴定为鸭跖草科水竹草属植物大苞水竹叶 *Murdannia bracteata* (C. B. Clarke) O. Kuntze ex J. K. Morton 的干燥全草。Gibco® RPMI 1640 液体培养基、标准胎牛血清 FBS、胰蛋白酶购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 甲基噻唑兰 (MTT)、顺铂 (cisplatin) 购自 Sigma 公司, 其它试剂均为分析纯。肺癌细胞株 A549、前列腺癌细胞株 PC-3、胃癌细胞株 SGC-7901

收稿日期: 2016-07-18 接受日期: 2016-09-21

基金项目: 广东省中医药局建设中医药强省课题 (20161035); 广东食品药品职业学院自然科学基金项目 (2015YZ005)

* 通讯作者 Tel: 86-20-28854883; E-mail: abcsunshine365@163.com

和肝癌细胞株 Hep G2 细胞株(武汉博士德生物工程公司)。

2 实验方法

2.1 挥发油的提取

取痰火草干燥全草 300 g,按 2015 年版《中国药典》四部通则 2204 挥发油测定法(甲法),水蒸气蒸馏法提取 6 h,用乙醚萃取 3 次,合并乙醚层用无水硫酸钠干燥,水浴回收乙醚,最后得淡黄色澄清油状物,具有浓郁的芳香味,重量为 1.263,得油率 0.42%。

2.2 气相色谱及质谱条件

气相条件:石英毛细管柱 HP-5(50 m × 0.32 mm × 0.25 μm);载气为氦气;进样口温 250 °C,联接口温度 280 °C;升温程序:柱温 50 °C,保持 3 min;15 °C/min 升温至 180 °C,1 °C/min 升温至 210 °C,保持 2 min;以 10 °C/min 升温至 230 °C,保持 20 min;分流进样,分流比 20:1;载气流速 1.0 mL/min,进样量为 1 μL。

质谱条件:电离电压 1624V,电子能量 70eV,电离方式 EI,质量扫描范围 40 ~ 750 amu。质谱扫描为选择全扫描模式(Scan)采集数据,溶剂延迟 3 min。通过面积归一化法对鉴定出的化合物进行半定量,检索数据库为 NIST 02。

2.3 抗肿瘤活性的测试

取对数生长期的肿瘤细胞,0.25% 胰蛋白酶消化,重悬于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中,按 5×10^4 cells/mL 接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL,在 CO₂ 培养箱培养过夜。贴壁 12 h 后,吸除原培养基,加入含不同挥发油浓度的完全培养基,并设空白对照组、顺铂为阳性对照组,继续培养 24 h。吸除原

培养基,PBS 洗 3 次,加入含 MTT(1 mg/mL)的完全培养基 100 μL,培养 4 h 后,倾去上清液,每孔加入 DMSO 100 μL,振荡 5 min,用酶标仪上于 492 nm 处测定各孔的吸光度(A)。每个样品浓度 6 个复孔,每个实验重复三次,取平均值计算抑制率,公式:细胞增殖抑制率(%) = $(1 - A_{\text{加药}} / A_{\text{空白对照}}) \times 100\%$ 。

3 实验结果

3.1 挥发油成分解析

采用 GC-MS 联用仪分析痰火草挥发油的化学成分,共分离出 51 个成分,用面积归一化法从其总离子流图(图 1)中计算各组分百分含量,经质谱数据库检索、各峰的质谱裂片图与文献资料比对,鉴定出 39 个组分,结果见表 1,占挥发油总质量的 83.48%。结果显示,痰火草挥发油主要为醇类、烃类、有机酸类、醛类、酯类化合物,含量较高的组分为正十六烷酸(17.57%)、萜澄茄油烯醇(10.62%)、2-十五烷酮(8.50%)和 1,1,10-三甲基-2-羟基-6,9-环二氧萜烷(6.57%)等。

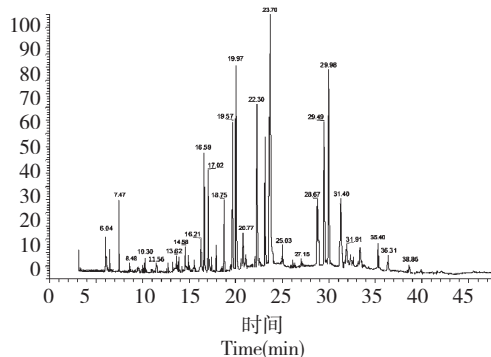


图 1 痰火草挥发油总离子流图

Fig. 1 The total ion chromatogram of essential oil from *M. bracteata*

表 1 痰火草挥发油的化学成分

Table 1 The components and their contents from essential oil from *M. bracteata*

序号 No.	保留时间 Retention time (min)	化合物 Compound	分子式 Formula	分子量 Molecular weight	相对百分含量 Content (%)
1	6.04	2-庚醇 (2-Heptanol)	C ₇ H ₁₆ O	116	0.78
2	6.53	3,5-辛二炔 (3,5-Octadiyne)	C ₈ H ₁₀	106	0.63
3	7.47	环己基甲醇 (Cyclohexanemethanol)	C ₇ H ₁₄ O	114	1.05
4	8.48	苯甲酸正辛酯 (Benzoic acid octyl ester)	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	234	0.37
5	10.13	棕榈油酸 (9-Hexadecenoic acid)	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254	0.18
6	10.30	14-十八烯醛 (14-Octadecenal)	C ₁₈ H ₃₄ O	266	0.51
7	11.56	十八碳-9-烯酸 (9-Octadecenoic acid)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	0.43

序号 No.	保留时间 Retention time (min)	化合物 Compound	分子式 Formula	分子量 Molecular weight	相对百分含量 Content (%)
8	12.86	7-甲基-8-十四碳烯-1-醇乙酸酯 (7-Methyl-8-tetradecen-1-ol acetate)	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	268	0.29
9	13.62	2-十六烷醇 (2-Hexadecanol)	C ₁₆ H ₃₄ O	242	0.56
10	13.84	1-十六烷醇 (1-Hexadecanol)	C ₁₆ H ₃₄ O	242	0.50
11	14.11	13,14-环氧-十四碳烯-1-醇乙酸酯 (13,14-Epoxy tetradecen-1-ol acetate)	C ₁₆ H ₂₈ O ₃	268	0.22
12	14.58	8-甲基-9-十四碳烯-1-醇乙酸酯 (8-Methyl-9-tetradecen-1-ol acetate)	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	268	0.73
13	14.94	十六烷 (Hexadecane)	C ₁₆ H ₃₄	226	0.51
14	15.53	山嵛酸 (Docosanoic acid)	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	340	0.42
15	16.21	9-十八烯醇 (9-Octadecen-1-ol)	C ₁₈ H ₃₆ O	268	0.92
16	16.59	β -榄香烯 (β -Elemene)	C ₁₅ H ₂₄	204	2.09
17	17.02	十二烯基丁二酸酐 (2-Dodecen-1-yl(-) succinic anhydride)	C ₁₆ H ₂₆ O ₃	266	1.57
18	17.37	十八烷酸 (Octadecanoic acid)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	0.51
19	17.88	肉豆蔻酸 (Tetradecanoic acid)	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228	0.75
20	18.75	2,6,10-三甲基-十四烷 (2,6,10-Trimethyl-tetradecane)	C ₁₇ H ₃₆	240	1.22
21	19.57	正十五烷酸 (Pentadecanoic acid)	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242	4.61
22	19.97	2-十五烷酮 (2-Pentadecanone)	C ₁₅ H ₃₀ O	226	8.50
23	20.77	10,11-环丙-十一烷酸 (Cyclopropanenonanoic acid)	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	198	1.02
24	21.54	2,13-十八碳二烯醇 (2,13-Octadec adien-1-ol)	C ₁₈ H ₃₄ O	266	0.45
25	22.30	9-十六碳烯醛 (9-Hexadecenal)	C ₁₆ H ₃₀ O	238	6.18
26	23.17	叶绿醇 (Phytol)	C ₂₀ H ₄₀ O	296	3.66
27	23.70	正十六烷酸 (n-Hexadecanoic acid)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	17.57
28	25.03	油酸 (Oleic acid)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	0.56
29	26.09	1,3,12-十九碳三烯-5,14-二醇 (1,3,12-Nonadecatrienen-5,14-diol)	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294	0.24
30	27.15	3-辛基-环氧乙烷月桂酸 (Oxirane dodecanoic acid,3-octyl)	C ₂₂ H ₄₂ O ₃	354	0.32
31	28.67	2-丁氧基羰基氧基-1,1,10-三甲基-6,9-环二氧萘烷 (2-Butybyxycarbonyxy-1,1,10-trimethyl-6,9-epidioxydecalin)	C ₁₈ H ₃₀ O ₅	326	3.42
32	29.49	1,1,10 三甲基-2-羟基-6,9-环二氧萘烷 (1,1,10- Trimethy-2-Hydroxyl-6,9-epidioxydecalin)	C ₁₃ H ₂₂ O ₃	226	6.57
33	29.98	葎澄茄油烯醇 (Cubenol)	C ₁₅ H ₂₆ O	222	10.62
34	31.40	3,15-十八碳二烯-1-醇乙酸酯 (3,15-Octadecadien-1-ol acetate)	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308	3.60
35	31.91	亚油酸乙酯 (Ethyl linoleate)	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308	0.62
36	32.54	(9,12)-十八碳二烯烷氧基乙醇 (Ehanol,2-(9,12-octadecadienyloxy))	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310	0.36
37	33.77	4,8,13-杜法三烯-1,3-二醇 (4,8,13-Duvatriene-1,3-diol)	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306	0.68
38	35.40	6,10,14-三甲基-2-十五烷酮 (6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone)	C ₁₈ H ₃₆ O	268	0.61
39	36.31	13-二十碳烯酸 (13-Eicosenoic acid)	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310	0.46

3.2 抗肿瘤活性分析

由抗肿瘤活性测试结果(见图2、表2),可见痰火草挥发油可不同程度抑制肿瘤细胞 A549、PC-3、SGC-7901、Hep G2 的增殖,且具有剂量依赖关系,其对肝癌细胞(Hep G2)、胃癌细胞(SGC-7901)均有较好的抑制作用,对肺癌细胞(A549)有中等强度抑制作用。

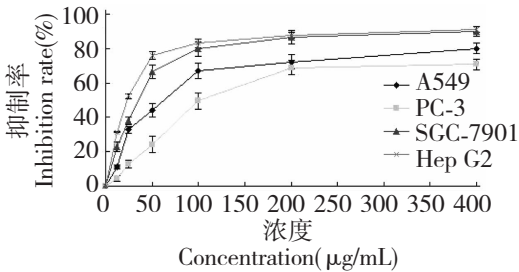
4 讨论

从痰火草挥发油中共鉴定出39个化合物,占总含量的89.32%,主要成分为醇类、烃类、有机酸类、醛类、酯类化合物,其中含有多抗瘤活性成分。有机酸类成分棕榈油酸、肉豆蔻酸、正十五烷酸、正十六烷酸对肺癌细胞 A549、胃癌细胞 SGC-7901 的显

表 2 抗肿瘤半抑制浓度值

Table 2 IC₅₀ values of essential oil from *M. bracteata* against different cancer cells ($\mu\text{g/mL}$)

样品 Sample	A549	PC-3	SGC-7901	Hep G2
痰火草挥发油 <i>M. bracteata</i> essential oil	66.18	126.72	34.27	22.19
顺铂 Cisplatin	121.45	72.45	47.68	35.60

图 2 痰火草对肿瘤细胞增殖的抑制作用 ($n = 6$)Fig. 2 The total ion chromatogram of essential oil from *M. bracteata* ($n = 6$)

著抑制作用^[7,8],四种有机酸占痰火草挥发油总含量的23.11%,其中,正十六烷酸(17.57%)为含量最高成分,可能是其抑制A549、SGC-7901细胞的有效成分。榄香烯占痰火草挥发油总含量的2.09%,具有广谱抗肿瘤特性,能有效降低肿瘤细胞有丝分裂能力,诱发肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞的生长,临床使用其脂质体注射剂,用于肺癌、肝癌、食道癌、鼻咽癌等恶性肿瘤的治疗^[9,10]。4,8,13-杜法三烯-1,3-二醇属于大环双萜西柏烯类化合物,对TPA诱导的肿瘤、DMBA诱导的皮肤癌及前列腺癌有抑制作用,属抗肿瘤促进剂^[11,12]。痰火草挥发油对多种肿瘤细胞有较好的抑制作用,可能是其含有的诸多抗癌活性成分协同作用所致,这提示其可作为潜在天然抗肿瘤药物的来源。但药物的体外抗肿瘤作用与实际的临床疗效可能有一定的差异,所以仍需要体内抗肿瘤试验验证痰火草挥发油的抗肿瘤疗效,并对其抗肿瘤的作用机制深入研究。

参考文献

- 1 Editing Committee of Chinese Materia Medica(中华本草编撰委员会). Chinese Materia Medica, Vol 8(中华本草:第8册). Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999. 304-305.
- 2 《National Chinese Herbal Medicine Compilation》Compilation Group(《全国中草药汇编》编写组). National Chinese Herbal Medicine Compilation: Part ii(全国中草药汇编:下

- 册). Beijing: People's Medical Press, 1996. 631-632.
- 3 Huang SC(黄素嫦), Zhong QS(钟秋生). Traditional Chinese Medicine for a cold fever She Yao. *Pract Inter Med Tradit Chin Med* (实用中医内科杂志), 2002, 16: 116-117.
- 4 Wang TS(王铁僧), Song GJ(宋国杰), Guo RL(郭荣麟), et al. The sorting and identification of folk anticancer medicinal plants. *Res Chin Pat Med* (中成药研究), 1979, 5: 33-35.
- 5 Zhang HW(张宏伟), Ma Y(马骥). Syndrome differentiation and treatment of lung cancer in 237 cases. *New J Tradit Chin Med* (新中医), 1985, 12: 24-27.
- 6 Zhang XP(章湘平), Wu MX(吴茂雄). 1 Case report of Qigong and Chinese herbal medicine in the treatment of advanced lung cancer. *Massage Guid* (按摩与导引), 1985, 3: 37-38.
- 7 Wei Q(卫强), Ji XY(纪小影). Chemical composition and antitumor activities of volatile oil from the leaves and stems of *Euonymus japonicus L. f. aureo-marginatus* Rehd. *Mod Food Sci Technol* (现代食品科技), 2015, 21(12): 42-48.
- 8 Hua YF(华允芬), Wu JL(吴江林), Qian JQ(钱俊青). Inhibitory effect of fatty acids from specifically-cultivated *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) larvae on tumor cells and HIV-1 integrase *in vitro* and their ingredient analysis. *Acta Entomol Sin* (昆虫学报), 2008, 51: 137-142.
- 9 Que X(阙晓). Research progress on the anti-tumor molecular mechanism of β -elemene. *Pharm Clin Chin Mater Med* (中药与临床), 2015, 6: 61-64.
- 10 Tian QF(田锋奇), Du J(杜娟). To observe the clinical curative effect of patients with elemene injection adjuvant treatment of brain metastases of lung cancer. *Chin J Hospital Pharm* (中国医院药学杂志), 2016, 36: 395-397.
- 11 Chen HF(陈慧芳). Dictionary of Plant Active Ingredients: Vol 1(植物活性成分辞典, 第一册). Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2001. 313-315.
- 12 Olsson E, Holth A, Kumlin E, et al. Structure-related inhibiting activity of some tobacco cembranoids on the prostaglandin synthesis *in vitro*. *Plant Med*, 1993, 59: 293-295.