

提取方法对木槿叶挥发油成分及其对肺癌 A549 细胞抑制作用的影响

Effect of extration method on volatile oils' chemical components from leaves of *Hibiscus syriacus* L. and lung cancer cell A549 inhibitory activities

卫 强 鲁 轮 龙先顺 刘媛媛

WEI Qiang LU Lun LONG Xian-shun LIU Yuan-yuan

(安徽新华学院药学院, 安徽 合肥 230088)

(Pharmacy School, Anhui Xinhua University, Hefei, Anhui 230088, China)

摘要:分别采用超临界 CO₂ 萃取(SFE—CO₂)和水蒸气蒸馏法(SDE)提取木槿叶中挥发油,利用气相色谱—质谱(GC—MS)鉴定化合物,检测细胞凋亡指数和凋亡率评定挥发油抑制肺癌 A549 细胞作用。从 SFE—CO₂ 挥发油中鉴定 40 个化合物,从 SDE 挥发油中鉴定 47 个化合物。结果表明:木槿叶 SFE—CO₂ 挥发油与 SDE 挥发油对肺癌 A549 细胞抑制率(浓度 25 mg/L,作用 48 h)分别为 80.08%,62.75%,说明不同方法提取的挥发油抗肿瘤活性差异显著。验证实验表明,雌甾-1,3,5(10)-三烯-17-醇、1-己基-6-羟基-4-甲基六氢嘧啶-2-硫酮、6,6-二甲基-9-(3-环氧丙烷-2-基)-1,4-二氧杂螺[4.5]癸烷、2,4-二叔丁基苯酚、丁香酚是抑制肺癌细胞 A549 的主要活性成分。

关键词:木槿叶;挥发油;超临界 CO₂ 萃取;水蒸气蒸馏法;化学成分;肺癌

Abstract: The volatile oils from leaf of *Hibiscus syriacus* L., which extracted by supercritical fluid extraction of carbon dioxide (SFE—CO₂) and steam distillation extraction (SDE) were separated and identified by GC—MS, respectively. And then studied the lung cancer cell A549 inhibitory activities by inhibiting rate and cell apoptosis rate for lung cancer cell A549. Forty components were identified from the SFE—CO₂ volatile oil. Forty-seven components were identified from the SDE volatile oil. The SFE—CO₂ and SDE essential oils of the leaf showed their activities against lung cancer cells A549 with the inhibition rate of 80.08% and 62.75%, which indicated different volatile oils extracted by different methods had significant effect on their antitumor activities. The verification experiments showed that

estra-1,3,5(10)-trien-17-ol, 1-hexyl-6-hydroxy-4-methylhexahydro-pyrimidin-2-thione, 6,6-dimethyl-9-(3-methyloxiran-2-yl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decane, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol and eugenol were the main active components of inhibiting lung cancer cells A549.

Keywords: Leaf from *Hibiscus syriacus* L.; volatile oil; SFE—CO₂; SDE; chemical components; lung cancer

植物木槿(*Hibiscus syriacus* L.)别名荆条、藩篱草、篱障花、朝开暮落花、面花,为锦葵科落叶灌木或小乔木^[1-2],由于其树木姿态优美,夏秋两季开放,花朵绚丽,古人称为“美女花”^[3-4],为韩国国花。木槿有清热、解毒、利湿、杀虫等功效,用于治疗痢疾、痔疮出血、疮疖痈肿、烫伤、阴囊湿疹等症^[5-6]。木槿叶偏于清热凉血,解毒消肿^[7],主肠风,痢后热渴,能除诸热,滑利能导积滞,善治赤白积痢,干涩不通,下坠欲解而不解,捣汁和白酒温饮^[8]。国内外已有报道,木槿花中氯化花翠素 3-桑布双糖苷具有促进肺癌 HL-60 细胞凋亡作用^[9],木槿根中三萜类化合物诱导凋亡和抑制乳腺癌细胞的细胞迁移^[10]。从木槿叶可以分离出黄酮、萜类、醌类成分,其中 syriacusin A 和异牡荆素抑制 α -葡萄糖苷酶活性作用较强^[11]。蔡定建等^[12]采用水蒸气蒸馏法(steam distillation extraction, SDE)提取和乙醚萃取从木槿花挥发油中分离 43 种化合物,其主要成分有十三烷酸、亚油酸、油酸、二十一烷等,对木槿叶中挥发油成分研究未见报道。

挥发油是植物中重要的次级代谢产物,具有一定的生物活性。SDE 提取挥发油,由于加热时间长,温度高,会导致挥发油成分发生水解或降解^[13]。超临界 CO₂ (supercritical fluid extraction of carbon dioxide, SFE—CO₂) 萃取技术是 20 世纪 70 年代研究开发的一项新技术,可实现常温提取和保证热敏性成分不被热分解,特别适合于热不稳定性天然产物和生理活性物质的分离与精制^[14-15]。挥发油抗肿瘤是目前研

基金项目:安徽省质量工程项目(编号:2014zy078);国家大学生创新创业训练项目(编号:201412216008)

作者简介:卫强(1977—),男,安徽新华学院副教授,硕士。

E-mail: weiqiang509@sina.com

收稿日期:2015-11-23

究的热点,因其亲脂性可穿过细胞膜,破坏细胞膜的多糖、脂肪酸和磷脂的结构,导致大分子泄露而诱导肿瘤细胞凋亡^[16]。超临界萃取挥发油具有良好的适应性,同时也显示优越的抗肿瘤作用,如定心藤挥发油抗人白血病细胞 K562 增殖^[17],金边黄杨叶挥发油抑制肺癌细胞 A549 和胃癌细胞 SGC-7901 增殖^[18],盾叶唐松草叶挥发油抑制胃癌细胞 MGC-803 增殖等^[19]。现代研究^[20]还发现,氧化分解前后的白术挥发油对人类卵巢癌细胞(SKOV-3)周期的影响不同,分解前挥发油可将细胞阻滞在 G2/M 期,分解后挥发油可将细胞阻滞在 S 期,原因在于分解前后挥发油的主要成分不同,导致其对肿瘤细胞周期的影响也不同。

本试验拟分别采用 SFE—CO₂、SDE 提取木槿叶挥发油,比较两种提取方法对其化学成分的影响,进而比较两种挥发油总成分对肺癌 A549 细胞毒性的差异,旨在探索 SFE—CO₂的提取优势提供一定参考。通过验证挥发油中成分抑制肺癌 A549 细胞的作用,阐明其主要活性单体组成。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

木槿叶:采集于 2013 年 9 月,来自安徽合肥大蜀山地区,经鉴定为锦葵科木槿(*Hibiscus syriacus* L.)的叶。

A549 细胞株:美国模式培养物集存库(ATCC)公司;

所有挥发油成分对照品:含量均>98%,美国 Sigma 公司;

其他试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

超临界萃取设备:HA221-50-01 型,江苏南通华安超临界有限公司;

挥发油测定器:2 000 mL,合肥三元化玻有限公司;

气相色谱—质谱联用仪:5975B/6890N 型,美国安捷伦公司;

超净工作台:SW-CJ-2G 型,苏州净化设备有限公司;

荧光显微镜:IX71 型,日本 Olympus 公司;

全自动酶标仪:EPOCH 型,美国 BioTek 公司;

CO₂培养箱:MCO-18AIC 型号,日本 Sanyo 公司;

电子天平:FA1004 型,上海民桥精密科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 挥发油的提取 称取干燥木槿叶药材 2 kg,粉碎成粗粉,等分成两部分。一部分置于超临界 CO₂萃取釜,分次萃取,每次 200 g,萃取条件为:压力 35 MPa,温度 25 ℃,萃取时间 60 min;分离釜 I 压力 15 MPa,温度 20 ℃,分离釜 II 压力 10 MPa,温度 15 ℃。收集萃取液。另一部分以水蒸气蒸馏法(以挥发油测定器进行测定)分次提取,每次 200 g,提取 5 h,收集上层油状液体。萃取液和水蒸气蒸馏得油状液体均以无水硫酸钠脱水,得到挥发油,呈微黄色,以油重/样品重计算得挥发油收率分别为 0.20%,0.51%。

1.2.2 色谱条件 色谱柱 HP-5MS(30 mm×0.25 mm×

0.25 μm);载气为高纯氮气,载气流速 1 mL/min;进样量 1 μL;分流比 10:1;气化温度 280 ℃;GC—MS 接口温度 280 ℃;GC 升温程序:初始温度 200 ℃,恒温 2 min,以 5 ℃/min 升至 200 ℃,恒温 3 min 后以 5 ℃/min 升至 280 ℃。电离方式 EI,电子能量 60 eV,扫描范围 *m/z* 25~550,离子源温度 220 ℃,接口温度 300 ℃,全离子扫描。GC—MS 定性分析:通过面积归一化法测定化合物的相对含量,检索为 NIST 2011 数据库。

1.2.3 木槿叶挥发油对肺癌 A549 细胞抑制作用试验设计

(1) 细胞培养与增殖检测:人肺癌 A549 细胞以 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液(庆大霉素 8 万 U/L),条件为 37 ℃和 5% CO₂饱和湿度条件下培养。细胞密度 85%~90%时,以 0.25%胰蛋白酶消化、传代,取对数生长期细胞制备成 5×10⁵ mL⁻¹,按照每孔 100 μL 接种于 96 孔板。培养 24 h 后,试验组加入以 DMSO 稀释的不同浓度木槿叶 SFE—CO₂和 SDE 挥发油溶液各 100 μL,于 24,48 h 后检测,于波长 570 nm 测定吸光度(*A_m*);对照组加入同体积的培养基,按照以上操作测定吸光度(*A_n*),根据式(1)计算抑制率。

$$I = \frac{A_n - A_m}{A_n} \times 100\%,$$
 (1)

式中:

I——抑制率,%;

A_m——样品测定吸光度值;

A_n——空白对照测定吸光度值。

(2) 细胞凋亡指数检测:取浓度为 2×10⁴ 个/mL 的肺癌 A549 细胞溶液,接种于 96 孔培养板接种 A549 单细胞悬液,待细胞贴壁后弃掉培养基,加入木槿叶 SDE、SFE—CO₂挥发油使终浓度分别为 0,5,10,15,20,25 mg/mL,24,32,48 h 后以多聚甲醛进行细胞固定,再以 PBS 冲洗,加入 Hoechst 33342(浓度 10 μg/mL),室温染色 30 min。按式(2)计算凋亡指数。

$$AI = \frac{N_1}{N_2} \times 100\%,$$
 (2)

式中:

AI——凋亡指数,%;

N₁——凋亡细胞数,个;

N₂——总细胞数,个。

(3) SFE—CO₂挥发油中活性成分抑制肺癌 A549 细胞的研究:选取木槿叶 SFE—CO₂挥发油中含量>1%的成分(1,3-二硬脂酸甘油酯、十八醛、金合欢基丙酮、2,6,10-三甲基十四烷等)相应对照品,以 50% DMSO 配制成浓度为 10 mg/mL 的储备液,使用时用 PBS 稀释。分别将肿瘤细胞以 2×10⁴ 个/mL 接种于 96 孔板中,每孔体积 200 μL,在 CO₂培养箱内培养 8~12 h。待细胞贴壁后,每孔加入不同浓度药液 20 μL,继续培养 44 h。每孔加入 50 μL MTT 溶液(PBS 稀释成 1 mg/mL),继续培养 4 h,吸取上清液倾去,每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 min 后,使用酶联免疫检测仪于 570 nm 波长处测定各孔吸光度(*A* 值)。初筛以最大浓度

检测其抑制率,按式(1)计算。计算凋亡细胞与全部细胞数之比等于 50%时所对应的浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。

数据统计以 SPSS 17.0 软件统计,组间数据进行 Cochran & Cox 近似 t 检验。

2 结果与讨论

2.1 不同提取方法的木槿叶油 GC—MS 测定结果与分析

不同方法提取的木槿叶挥发油经 GC—MS 测定,结果见图 1 和表 1、2。

由表 1 可知,从木槿叶 SFE—CO₂挥发油中鉴定出 40 个化合物,占挥发油总量的 81.58%。挥发油中相对含量>5%的化合物依次有:1,3-二硬脂酸甘油酯(10.72%)、十八醛(9.94%)、金合欢基丙酮(7.25%)、2,6,10-三甲基十四烷(6.19%)、雌甾-1,3,5(10)-三烯-17-醇(5.10%)。从木槿叶 SDE 挥发油中鉴定出 47 个化合物,占挥发油总量的 66.62%。其中相对含量>5%的化合物有:cis-十八碳烯酸(10.79%)、二十七烷(10.26%)、亚油酸(8.01%)、正己醛(6.30%)。由表 2 可知,SFE—CO₂挥发油相对于 SDE 挥发油,其醇类、酯类成分比例分别由 10.79%,1.46%提高至 20.56%,

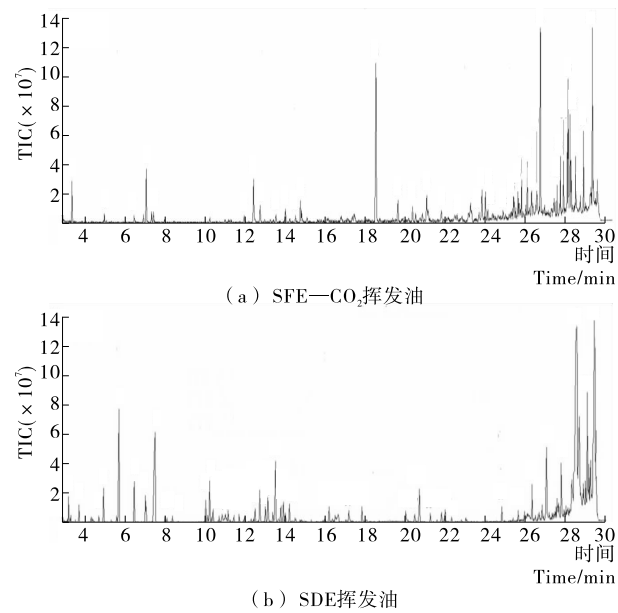


图 1 木槿叶 SFE—CO₂挥发油、SDE 挥发油的总离子流图
Figure 1 Total ion chromatogram of volatile oil of SFE—CO₂ and SDE from *Hibiscus syriacus* L.

表 1 木槿叶 SFE—CO₂和 SDE 挥发油化学成分

Table1 Chemical constituents identified in the SFE—CO₂ and SDE essential oils of leaf from *Hibiscus syriacus* L.

化合物 种类	保留时间/ min	化合物	SFE—CO ₂ 挥发油		SDE 挥发油	
			相似度/%	相对含量/%	相似度/%	相对含量/%
醇类	4.941	(Z)-2-戊烯-1-醇	92	0.26	—	—
	7.003	(Z)-3-己烯-1-醇	96	2.95	—	—
	4.919	正戊醇	—	—	98	1.22
	7.316	cis-2-甲基-环戊醇	99	0.27	—	—
	7.484	1-己醇	95	0.26	95	3.52
	10.375	正庚醇	—	—	94	0.55
	10.673	1-辛烯-3-醇	—	—	94	0.26
	10.820	(1S,2S,3R,5S)-(+) - 蒎烷二醇	—	—	97	0.29
	11.958	1-(1-亚甲基-2-丙烯基)-环戊醇	—	—	93	0.15
	12.376	苯甲醇	97	2.16	—	—
	12.474	3,5-辛二烯-2-醇	—	—	92	0.59
	12.967	4,7-二甲基-4-辛醇	—	—	97	0.47
	13.488	正辛醇	—	—	97	2.44
	13.488	α -甲基- α -[4-甲基-3-戊烯基]环氧丙醇	98	0.17	—	—
	13.876	1-壬烯-4-醇	—	—	98	0.58
	14.724	2,6-二甲基环己醇	96	0.87	—	—
	20.763	4,4,6-三甲基-环己-2-烯-1-醇	—	—	97	0.72
	25.244	正三十七醇	98	1.30	—	—
	25.662	1-己基-6-羧基-4-甲基六氢嘧啶-2-硫酮	92	2.07	—	—
	25.584	2-亚甲基胆甾-3-醇	94	3.19	—	—
	28.359	雌甾-1,3,5(10)-三烯-17-醇	94	5.10	—	—
	28.755	香叶基芳樟醇	99	0.52	—	—
	28.899	叶绿醇	95	1.44	—	—

续表 1

化合物 种类	保留时间/ min	化合物	SFE—CO ₂ 挥发油		SDE 挥发油	
			相似度/%	相对含量/%	相似度/%	相对含量/%
醛类	3.162	3-甲基丁醛	—	—	97	1.07
	3.683	戊醛	—	—	97	0.73
	5.684	正己醛	—	—	99	6.30
	6.421/6.449	糠醛	94	0.23	92	1.39
	6.991	(E)-2-己烯醛	—	—	94	1.16
	8.352	庚醛	—	—	98	0.13
	10.006	(Z)-2-庚烯醛	—	—	93	0.69
	10.201	苯甲醛	—	—	96	1.26
	11.018	辛醛	—	—	96	0.30
	11.660	(E,E)-2,4-庚二烯醛	—	—	99	0.18
	12.696	苯乙醛	94	0.92	96	1.21
	13.092	(E)-2-辛烯醛	—	—	95	0.73
	14.182	(E)-2-壬烯醛	—	—	94	0.55
	17.783	2,4-壬二烯醛	—	—	97	0.51
	20.473	(E,E)-2,4-癸二烯醛	—	—	97	0.33
	23.915	cis-2-甲基-3-氧环己烷正丁醛	96	0.18	—	—
	26.192	肉豆蔻醛	96	1.66	—	—
	26.642	十八醛	96	9.94	—	—
	3.336	丙二醇甲醚	97	2.10	—	—
	11.904	2-甲硫基-2,3-二甲基丁烷	93	0.14	—	—
烷烃类	13.759	2-乙基-1,6-二氧杂螺[4.4]壬烷	—	—	97	0.56
	13.959	α,α-5-三甲基- cis-5-乙烯基四氢化呋喃	94	0.31	—	—
	14.453	3,5,5-三甲基环己烯	97	0.16	—	—
	18.429	2,6,10-三甲基十四烷	98	6.19	—	—
	21.937	3-溴癸烷	—	—	99	0.36
	23.588	cis,cis-2-甲基-1-硫杂十氢萘	97	0.13	—	—
	24.766	8-丙氧基-柏木烷	—	—	94	0.55
	25.491	6,6-二甲基-9-(3-环氧丙烷-2-基)-1,4-二氧杂螺[4.5]癸烷	97	1.51	—	—
	26.302	喇叭烯氧化物-(II)	99	1.71	97	0.71
	27.784	亚麻酰氯	97	3.03	—	—
酚类	28.652	二十七烷	—	—	92	10.26
	19.541	丁香酚	94	1.12	—	—
	20.129/20.120	4-乙烯基-2-甲氧基苯酚	96	0.50	94	0.47
	20.930	异丁香酚甲醚	95	1.39	—	—
	23.811	2,4-二叔丁基苯酚	90	1.49	—	—
	4.750	3-戊烯-2-酮	—	—	96	0.21
	7.978	4-甲基-2-己酮	—	—	96	0.12
	21.797/21.793	大马士酮	96	0.40	98	0.32
	22.172	4-(2,6,6-三甲基-1,3-环己二烯)-3-丁烯-2-酮	98	0.22	—	—
	27.416	6,10,14-三甲基-2-十五烷酮	98	1.77	—	—
酮类	23.720	4-[2,2,6-三甲基-7-氧杂二环[4.1.0]庚-1-基]-3-丁烯-2-酮	92	1.46	—	—
	28.088	金合欢基丙酮	92	7.25	—	—

续表 1

化合物 种类	保留时间/ min	化合物	SFE—CO ₂ 挥发油		SDE 挥发油	
			相似度/%	相对含量/%	相似度/%	相对含量/%
酯类	17.143	水杨酸甲酯	—	—	95	0.56
	21.256	二氢-5-戊烯基-2(3H)-呋喃内酯	—	—	96	0.31
	24.695	新戊酸-6-烯酯	98	0.12	—	—
	25.660	γ-十二内酯	—	—	97	0.59
	27.662	邻苯二甲酸二异丁酯	97	3.26	—	—
	29.243	1,3-二硬脂酸甘油酯	93	10.72	—	—
	28.403	7-甲基-Z-十四碳烯-1-乙酸酯	96	3.11	—	—
酸类	16.156	正辛酸	—	—	95	0.53
	22.257	正十二酸	—	—	97	0.20
	26.825	肉豆蔻酸	—	—	96	0.46
	27.041	十五酸	—	—	98	2.55
	27.732	十六烷酸	—	—	99	1.40
	29.047	亚油酸	—	—	94	8.01
	29.422	cis-十八碳烯酸	—	—	95	10.79
苯类	8.081	间二甲苯	—	—	96	0.11
	10.088	1,2,4-三甲基苯	—	—	95	0.22

表 2 SFE—CO₂ 和 SDE 挥发油中不同成分的数目和含量对比

Table 2 Comparison between the number and content of SFE—CO₂ and SDE volatile oils

成分	SFE—CO ₂ 挥发油		SDE 挥发油	
	数目/种	含量/%	数目/种	含量/%
醇类	13	20.56	10	10.79
醛类	5	12.93	15	16.54
烷烃	8	15.28	5	12.44
酚类	4	4.50	3	0.47
酮类	6	11.10	3	0.65
酯类	3	17.21	3	1.46
酸类	0	0.00	8	23.94

表 3 木槿叶 SFE—CO₂、SDE 挥发油对肺癌 A549 细胞的抑制率[†]

Table 3 Inhibiting rate for cancer cell A549 from SFE—CO₂ and SDE essential oil of leaf of *Hibiscus syriacus* L. (n=3)

样品	浓度/ (mg · L ⁻¹)	A _{570 nm}		抑制率/%	
		24 h	48 h	24 h	48 h
对照组	0	0.409±0.008	0.502±0.012		
	5	0.332±0.008**	0.371±0.013**	18.83	26.10
	10	0.289±0.007**△	0.301±0.008**△△	29.34	40.04
	15	0.221±0.012**△	0.224±0.009**△	45.96	55.38
	20	0.165±0.010**△	0.146±0.011**△△	59.66	70.92
	25	0.132±0.010**△	0.100±0.010**△△	67.73	80.08
SFE—CO ₂ 挥发油	5	0.352±0.010*	0.396±0.006**	13.94	21.11
	10	0.321±0.006**	0.322±0.007**	21.52	35.86
	15	0.276±0.011**	0.275±0.010**	32.52	45.22
	20	0.234±0.009**	0.229±0.009**	42.79	54.38
	25	0.202±0.010**	0.187±0.011**	50.61	62.75

[†] 与对照组比较,*表示 P<0.05,**表示 P<0.01;SFE—CO₂挥发油与 SDE 挥发油比较,△表示 P<0.05,△△表示 P<0.01。

2.2.2 细胞凋亡指数检测 由表4可知,在24~48 h内,随着作用时间的延长,木槿叶 SFE—CO₂、SDE 挥发油浓度为15,25 mg/L 时,肺癌 A549 细胞凋亡率明显升高(P<0.05 或 P<0.01)。当浓度达到 25 mg/L 时,木槿叶 SFE—CO₂、

SDE 挥发油最大促 A549 细胞凋亡率分别为 29.36%,12.05%。当浓度大于 15 mg/L 时,木槿叶 SFE—CO₂挥发油促 A549 细胞凋亡率明显高于 SDE 挥发油(P<0.05 或 P<0.01)。

表 4 木槿叶 SFE-CO₂、SDE 挥发油对肺癌 A549 细胞凋亡率的影响[†]
Table 4 Cell apoptosis rate for cancer cell A549 from SFE-CO₂ and SDE essential oil of *Hibiscus syriacus* L. (n=3) %

样品	浓度/(mg·L ⁻¹)	培养 24 h	培养 32 h	培养 48 h
对照组	0	4.24±1.06	4.62±1.12	4.81±2.01
	5	5.52±1.17	6.89±1.65	8.79±1.09
	10	10.21±2.00	13.82±1.55*	15.03±1.73*
	15	14.11±1.67*△	17.26±1.86**△	19.72±1.15**△
	20	16.07±2.50*△	21.58±1.76**△	24.64±2.36**△
SFE—CO ₂ 挥发油	25	18.79±1.23**△△	25.26±2.25**△	29.36±1.32**△△
	5	4.33±1.52	5.60±1.25	6.07±1.24
	10	7.02±1.47	8.11±2.12	10.20±0.96
	15	7.66±1.71	9.08±1.90	11.14±1.82
	20	8.29±1.81	9.62±1.75	11.83±1.49*
SDE 挥发油	25	8.72±1.03*	10.01±1.61*	12.05±1.68*

[†] 与对照组比较,*表示 P<0.05,**表示 P<0.01;SFE—CO₂挥发油与 SDE 挥发油比较,△表示 P<0.05,△△表示 P<0.01。

2.3 SFE—CO₂挥发油中活性成分对肺癌 A549 细胞的抑制作用

天然药物分子广泛存在于自然界,具有抗菌、抗肿瘤等多种药物活性。以天然药物分子为导向,是寻找优良先导化合物和候选药物分子的重要途径^[21]。由表6可知,雌甾-1,3,5(10)-三烯-17-醇、1-己基-6-羟基-4-甲基六氢嘧啶-2-硫酮、6,6-二甲基-9-(3-环氧丙烷-2-基)-1,4-二氧杂螺[4.5]癸烷、2,4-二叔丁基苯酚、丁香酚可能是抑制肺癌细胞 A549 的主要活性成分,其 IC₅₀ 分别为 39.92,18.17,26.01,35.06,22.09 μg/mL。

3 结论

(1) 木槿叶 SFE—CO₂、SDE 挥发油中成分组成、含量差别明显,SFE—CO₂挥发油相对于 SDE 挥发油,其醇类、酯类成分比例上升,酸类成分下降,反映不同提取方法对挥发油成分影响明显。木槿叶 SFE—CO₂、SDE 挥发油对肺癌 A549 细胞抑制率及凋亡率差异显著。初步显示 SFE—CO₂挥发油在抑制肺癌细胞 A549 上有一定的优势,反映不同方法提取的挥发油存在明显的抗肿瘤活性差异。

(2) 根据文献[22],1-己基-6-羟基-4-甲基六氢嘧啶-2-硫酮属嘧啶硫酮结构,具有抗突变作用。雌甾-1,3,5(10)-三烯-17-醇类成分可阻止苯并[a]芘导致的肺癌小鼠肺组织凋亡,减少细胞色素 C 由线粒体向胞浆释放,降低 Bax 基因表达量,提高 Bcl-2 蛋白及基因表达量,使 Bcl-2/Bax 比值升高^[23]。2,4-二叔丁基苯酚抑制肺癌活性较强,与瞿麦石油醚萃取物中成分相似^[24]。丁香酚可通过清除 NO 自由基而产生抗癌作用^[25]。而本试验初步得出这4种成分对肺癌细胞 A549 具有较强的抑制作用,进一步证明该类成分具有抗肿瘤活性,其作为先导化合物的可能性有待进一步深入研究。

表 5 SFE—CO₂挥发油活性成分研究
Table 5 Study on the active components of SFE—CO₂ volatile oil (n=3)

对照品	抑制肺癌 A549 细胞 IC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)
1,3-二硬脂酸甘油酯	80.34±1.11
十八醛	76.52±1.15
金合欢基丙酮	70.25±1.15
2,6,10-三甲基十四烷	89.81±1.32
雌甾-1,3,5(10)-三烯-17-醇	39.92±1.16
邻苯二甲酸二异丁酯	80.26±1.33
2-亚甲基胆甾-3-醇	99.16±1.42
7-甲基-Z-十四碳烯-1-乙酸酯	110.74±1.01
亚麻酰氯	73.35±0.92
(Z)-3-己烯-1-醇	109.81±0.68
苯甲醇	95.19±1.02
丙二醇甲醚	84.16±1.21
1-己基-6-羟基-4-甲基六氢嘧啶-2-硫酮	18.17±0.88
6,10,14-三甲基-2-十五烷酮	59.44±1.38
喇叭烯氧化物-(II)	77.23±1.26
肉豆蔻醛	50.15±1.12
6,6-二甲基-9-(3-环氧丙烷-2-基)-1,4-二氧杂螺[4.5]癸烷	26.01±1.02
2,4-二叔丁基苯酚	35.06±1.32
4-[2,2,6-三甲基-7-氧杂二环[4.1.0]庚-1-基]-3-丁烯-2-酮	70.29±1.76
异丁香酚甲醚	100.01±1.29
正三十七醇	90.56±1.31
叶绿醇	120.51±1.52
丁香酚	22.09±0.96

参考文献

[1] 曹涤环, 刘静. 木槿的利用及栽培管理[J]. 绿化与生活, 2013 (5): 19.

[2] 彭毅, 谭金桃. 木槿的生药学研究[J]. 中医药导报, 2006, 12 (8): 98-101.

[3] 胡启山. 木槿[J]. 林业与生态, 2013(5): 33.

[4] 李秀芬, 张建锋, 朱建军, 等. 木槿开花特性及食用价值[J]. 经济林研究, 2014, 32(1): 175-178.

[5] 沈琼桃. 药用、食用、观赏兼备的植物——木槿[J]. 中国林副特产, 1999, 50(3): 53-54.

[6] 韩学俭. 木槿清热利湿润燥[J]. 家庭医学, 2014(9): 53.

[7] 那晓婷, 刘丹. 药用及观赏植物——木槿[J]. 中国林副特产, 2000(3): 53.

[8] 苏万楷, 李裕, 黄家灿, 等. 木槿 de 利用及开发[J]. 湖南林业, 2006(3): 17.

[9] Hou De-xing, Tong Xu-hui, Terahara N, et al. Delphinidin 3-sambubioside, a Hibiscus anthocyanin, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway[J]. Arch Biochem Biophys, 2005, 440(1): 101-109.

[10] Hsu R J, Hsu Y C, Chen Shu-pin, et al. The triterpenoids of Hibiscus syriacus induce apoptosis and inhibit cell migration in breast cancer cells[J]. BMC Complement Altern Med, 2015, 15(1): 65.

[11] 卫强, 纪小影, 徐飞, 等. 木槿叶化学成分及抑制 α -葡萄糖苷酶活性研究[J]. 中药材, 2015, 38(5): 976-980.

[12] 蔡定建, 戎敢, 靖青秀, 等. 木槿花挥发油化学成分的 GC/MS 分析[J]. 中国农学通报, 2009, 25(21): 93-96.

[13] 李松, 吴光斌, 陈发河, 等. 超临界萃取珙溪蜜柚精油工艺优化及组分分析[J]. 食品与机械, 2013, 29(1): 113-118.

[14] Daintree L S, Kordikowski A, York P. Separation process for

organic molecules using SCF technologies[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008, 60: 351-372.

[15] 梁健钦, 杨焕琪, 熊万娜, 等. 超临界 CO₂ 萃取砂糖桔叶挥发油及其 GC—MS 分析[J]. 食品与机械, 2010, 26(3): 28-30.

[16] Oussalah M, Caillet S, Lacroix M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of Escherichia coli O157: H7 and Listeria monocytogenes [J]. J. Food Prot, 2006, 69: 1 046-1 055.

[17] 曾立, 向荣, 傅春燕, 等. 瑶药定心藤挥发油的抗肿瘤活性研究[J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(4): 710-712.

[18] 卫强, 纪小影. 金边黄杨叶、茎挥发油成分分析及抗肿瘤活性研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(12): 42-48.

[19] 刘敏洁, 赵琦, 梁娜, 等. 黔产盾叶唐松草叶挥发油 GC—MS 分析及生物活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (24): 135-138.

[20] 阎克里, 朱秀卿, 刘芳芳, 等. 分解前后白术挥发油对细胞凋亡及细胞周期影响的研究[J]. 中国药物与临床, 2012, 11 (12): 1 372-1 375.

[21] 黄超. 类天然杂环化合物的多样性导向合成及其生物活性研究 [D]. 昆明: 云南大学, 2011: 1-2.

[22] 陆敦, 印木泉, 易杨华. 韭黄中抗突变成分的分离与鉴定[J]. 第二军医大学学报, 1991(5): 453-456.

[23] 李海峰. 苯并[a]比致雄性小鼠肺癌模型建立及雌二醇干预研究[D]. 北京: 军事医学科学院, 2007: 8-51.

[24] 李水清, 张方蕾, 李洁, 等. 瞿麦石油醚萃取物抗肿瘤活性组分筛选及其成分分析[J]. 武汉大学学报: 医学版, 2014, 35 (1): 11-15, 31.

[25] 高崎. 苯丙醇类及木脂素类的抗诱癌作用及自由基清除活性 [J]. 国外医学: 中医中药分册, 2003, 25(4): 249.

(上接第 60 页)

参考文献

[1] 陆俊, 赵安琪, 成策, 等. 核桃营养成分与生理活性及开发利用 [J]. 食品与机械, 2014, 30(6): 238-242.

[2] 高警, 郑甲红, 安碾粮, 等. 偏心击打式核桃破壳机的设计与试验[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 133-136.

[3] 李忠新, 杨军, 杨莉玲, 等. 一种核桃破壳取仁设备的研究[J]. 中国农机化, 2011, 30(3): 104-106.

[4] 吴子岳. 绵核桃剥壳取仁机械的研究[J]. 农业工程学报, 1995, 11(4): 164-169.

[5] 史建新, 赵海军, 辛动军. 基于有限元分析的核桃脱壳技术研究 [J]. 农业工程学报, 2005, 21(3): 185-188.

[6] 何义川, 史建新. 核桃壳力学特性分析与试验[J]. 新疆农业大学学报, 2009, 32(6): 70-75.

[7] 李军政, 孙松林, 谢方平, 等. 山核桃脱壳试验研究[J]. 农机化研究, 2010, 29(12): 25-28.

[8] 高警, 郑甲红, 闫茹, 等. 对影响核桃破壳力大小因素的探究

[J]. 农机化研究, 2014, 33(9): 186-189.

[9] 张宏, 马岩, 兰海鹏, 等. 温 185 核桃破壳取仁工艺试验研究 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(21): 7 187-7 190.

[10] 刘奎, 李忠新, 杨莉玲, 等. 机械破壳时核桃仁损伤特征研究 [J]. 农产品加工: 学刊, 2014, 30(18): 41-44.

[11] 张宏, 马岩, 李勇, 等. 基于遗传 BP 神经网络的核桃破裂功预测模型[J]. 农业工程学报, 2014, 10(8): 78-84.

[12] 杨锐, 陈红. 激光与核桃相互作用的力学推导及有限元分析 [J]. 农机化研究, 2008, 29(4): 52-54.

[13] 余为, 李慧剑, 梁希, 等. 金属半球壳压缩力学性能实验和模拟研究[J]. 工程力学, 2013, 30(11): 260-271.

[14] 庞福振, 姚熊亮, 缪旭弘, 等. 加筋球壳结构稳定性及其优化研究[J]. 机械强度, 2012, 34(3): 342-350.

[15] 张宏, 马岩, 郭文松, 等. 基于细胞水平上的温 185 核桃壳脆裂机理分析[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(3): 128-132.

[16] 李勇, 张宏, 郝忠诚. 温 185 薄壳核桃破壳取仁试验研究[J]. 农机化研究, 2014, 35(7): 174-177.