

广西莪术挥发油抗肿瘤作用的谱效关系研究

曾建红<sup>1</sup>, 莫炫永<sup>2</sup>, 戴平<sup>1\*</sup>, 黄凤香<sup>1</sup>, 廖迎<sup>1</sup>, 王建红<sup>1</sup>, 陈旭<sup>1</sup>

(1. 桂林医学院药学院, 广西 桂林 541004; 2. 东莞市国药质量检测中心, 广州 东莞 523010)

[摘要] 目的:探讨广西莪术挥发油气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)指纹图谱所代表的“有效组分群”对药效贡献的大小,为中药的质量控制和药效评价标准的制定提供参考。方法:通过 GC-MS 分析技术建立广西莪术挥发油指纹图谱,并对广西莪术挥发油的抗肿瘤作用进行研究,在获得的挥发油 GC-MS 指纹图谱特征峰面积与对鼻咽癌细胞的增殖抑制作用的数据基础上,采用灰关联度分析技术,计算各特征峰与对肿瘤细胞的增殖抑制率的关联度和关联序。结果:依据关联度的大小,确定各成分对抗肿瘤作用贡献的大小顺序为莪术醇>莪术二酮> $\beta$ -榄香烯>吉马酮>莪术酮> $\alpha$ -丁子香烯> $\delta$ -瑟林烯> $\beta$ -石竹烯> $\beta$ -榄香烯酮> $\alpha$ -蒎烯> $\alpha$ -石竹烯>桉油素>樟脑>2-壬醇>异龙脑莪术烯> $\delta$ -榄香烯>茨烯>*D*-柠檬烯>龙脑。结论:广西莪术抗肿瘤作用是其内“有效组分群”共同作用的结果,本研究确定了广西莪术挥发油“有效组分群”指纹特征对药效贡献的大小,为中药的“谱效关联”的指纹图谱的建立、中药的质量控制和药效评价标准的制定提供了新的思路和方法。

[关键词] 广西莪术; 挥发油; 指纹图谱; 抗肿瘤作用; 灰关联度; 谱效关系

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)13-0091-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120504.1154.005.html>

[网络出版时间] 2012-05-04 11:54

Study on Spectrum-effect Relationship between Fingerprint  
of Essential Oil and of Anti-tumor Effect from *Curcuma kwangsiensis*

ZENG Jian-hong<sup>1</sup>, MO Xuan-yong<sup>2</sup>, DAI Ping<sup>1\*</sup>, HUANG Feng-xiang<sup>1</sup>,  
LIAO Ying<sup>1</sup>, WANG Jian-hong<sup>1</sup>, CHEN Xu<sup>1</sup>

(1. School of Pharmacy, Guilin Medical College, Guilin 541004, China;

2. Guoyao Quality Inspection Center in Dongguan City, Dongguan 523010, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effective component group represented by fingerprint contributed to pharmacodynamic by grey relational analysis, and provide a reference for traditional Chinese medicine quality control and develop evaluation criteria of pharmacodynamics. **Method:** The fingerprint of essential oil from *Curcuma kwangsiensis* was established by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and the anti-tumor effect of curcuma oil was studied. At the premise of the acquired GC-MS characteristic of fingerprint and pharmacodynamic data to inhibiting proliferation of nasopharyngeal carcinoma cell, the relational grade and relational sequence between fingerprint of essential oil and of inhibiting proliferation rate were calculated by grey relational analysis. **Result:** According to the relational grade the sequence of contribution to inhibiting proliferation to nasopharyngeal carcinoma cell was curcumol > curdione >  $\beta$ -elemene > germacrone > curzerenone >  $\alpha$ -caryophyllene >  $\delta$ -selinene >  $\beta$ -caryophyllene >  $\beta$ -elemenone >  $\alpha$ -pinene >  $\alpha$ -caryophyllene > eucalyptol > camphor > 2-nonanol > isoborneol > curzerene >  $\delta$ -elemene > camphene > *D*-limonene > borneol. **Conclusion:** The anti-tumor effect of *C. kwangsiensis* is the result of combined effect of effective component group. This study identifies the

[收稿日期] 20120221(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960498);广西教育厅科研项目(200810MS143)

[第一作者] 曾建红,博士,副教授,从事生药的品质评价与药理学研究,Tel:0773-2295140, E-mail:zjhong0621@163.com

[通讯作者] \*戴平,硕士,讲师,从事药物质量标准与药理学研究, Tel:0773-2295296, E-mail:mr.byte@163.com

effective component group represented by fingerprint contributed to pharmacodynamic, and provides a reference for establishing fingerprint of traditional Chinese medicine's spectrum-effect relationship, traditional Chinese medicine quality control and develop evaluation criteria of pharmacodynamics.

[ **Key words** ] *Curcuma kwangsiensis*; essential oil; fingerprint; anti-tumor effect; grey relational analysis; spectrum-effect relationship

广西莪术是 2010 年版《中国药典》收载的 3 种基原莪术(蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* val., 广西莪术 *C. kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang 和温郁金 *C. wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling)中的一种,为姜科姜黄属植物的干燥根茎。莪术的主要有效部位为根和根茎,挥发油是莪术的主要活性成分<sup>[1]</sup>。文献报道莪术油具有抗癌、抗凝血、抗氧化和保肝等作用<sup>[2]</sup>,其中莪术醇、 $\beta$ -榄香烯、莪术酮、莪术二酮是莪术的主要抗肿瘤活性成分<sup>[3]</sup>。目前对于莪术的质量评价多以化学成分为评价标准,没有将化学分组或者“有效组分群”与药效结合起来,而中药药效物质基础具有整体性、模糊性的特征,是有效物质群综合效应结果<sup>[4]</sup>。因此,本文在已发表的广西莪术挥发油 GC-MS 指纹图谱基础上<sup>[5]</sup>,通过体外实验,研究莪术油对鼻咽癌细胞 CNE-2 的生长抑制作用,寻找与莪术抗肿瘤作用相关的“有效组分群”,寻找不同产地的广西莪术挥发油与化学特征指纹峰之间的关系,以阐明广西莪术抗肿瘤的药效物质基础。

## 1 材料

**1.1 仪器** 5973N-6890 型气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司),色谱柱 HP-5MS 毛细管柱(美国 Agilent 公司);FA1004 型电子天平(海精科天平仪器厂),调温加热器(上海电理仪器厂),Thermo CO<sub>2</sub> 孵箱(美国 Thermo scientific company),Olympus 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司),激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司),Bio-TEK 酶标仪(美国 Bio 公司),电泳槽(美国 Bio-RAD 公司),GENIUS 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)。

**1.2 试剂** Hoechst 33342(凯基生物公司),四唑盐(MTT)(美国 Amresco 公司)、二甲基亚砜(DMSO)(Sigma 公司),细胞培养基 PRMI 1640(Gibco 公司),胎牛血清(FBS)(杭州四季青公司),一抗及二抗(北京中衫金桥生物公司),其余均为国产分析纯。CNE-2 细胞株为本科学实验中心传代保株。

**1.3 药材** 广西莪术样品分别于 2007 年 1 月采自灵山、贵港、横县 3 个主产区,其中灵山共采 4 批次、贵港和横县各采 3 批次,共计 10 个批次,样品编号

依次为 1~10。样品采收后洗净、切片、晒干、打碎,过 20 目筛,干燥器储藏备用。所有样品经本教研室鉴定为姜科姜黄属植物广西莪术 *C. kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang。

## 2 方法与结果

### 2.1 广西莪术挥发油 GC-MS 指纹图谱

**2.1.1 GC-MS 分析条件** HP-5MS 毛细管柱(0.25  $\mu\text{m} \times 250 \mu\text{m} \times 30.0 \text{ m}$ ),载气为高纯氦气,流速 1.0  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,进样量 1  $\mu\text{L}$ ,程序升温:65  $^{\circ}\text{C}$  恒温 2 min,65~90  $^{\circ}\text{C}$  (5  $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 恒温 3 min,90~103  $^{\circ}\text{C}$  (20  $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 恒温 3 min,103~150  $^{\circ}\text{C}$  (8  $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 恒温 15 min,150~280  $^{\circ}\text{C}$  (20  $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ );不分流,进样温度 250  $^{\circ}\text{C}$ ,进样量 1  $\mu\text{L}$ ,倍增器电压 1 435 V,接口温度 280  $^{\circ}\text{C}$ ,离子源温度 230  $^{\circ}\text{C}$ ,电离方式 EI;电子能量 70.1 eV;溶剂延迟 3 min,扫描质量范围  $m/z$  45~550。在此色谱条件下,各特征能有效分离。

**2.1.2 供试品溶液的制备和测定** 根据 2005 年版《中国药典》一部附录 XD 法提取样品挥发油和测定出油率,提取的 10 批次样品挥发油分别用无水硫酸钠除去水分,然后置于 100 mL 量瓶中,加乙醚定容至刻度,0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,即得。取各供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ ,按上述色谱条件进行 GC-MS 分析,得到 GC-MS 指纹色谱图(图 1)。图谱经计算机谱检索及人工解析研究其化学结构,比较 10 批样品色谱图后,从中选定 20 个共有峰指纹峰构成广西莪术指纹图谱的稳定特征峰,选择 14 号峰  $\beta$ -榄香烯为内参峰(S 峰),以其保留时间和峰面积为 1,分别计算各特征峰的调整保留时间之比( $\alpha$  值)和相对峰面积(峰面积之比),结果见表 1。

**2.2 广西莪术挥发油抗肿瘤作用** 将提取干燥的 10 批次莪术油 30 mg,溶于 3 mL 无水乙醇中,莪术油的初始质量浓度为 10  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。实验中用含 12% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养基将莪术油稀释为 100.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的浓度给药,阴性对照组为 10  $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$  的无水乙醇培养基。取对数生长期的 CNE-2 细胞,接种于 96 孔板,细胞贴壁后加入药物。于加药后 48 h 取出板,每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 溶液,

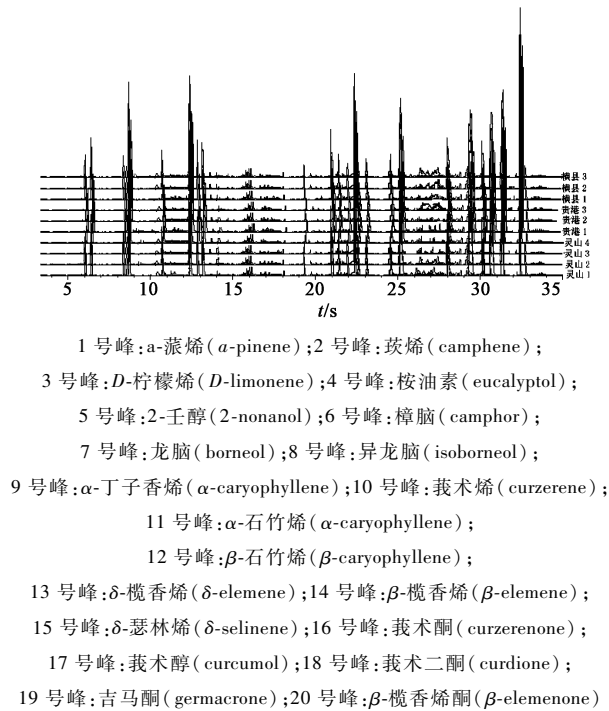


图1 广西莪术10批样品的GC-MS指纹图谱

4 h 后吸出上清液,加入 150  $\mu$ L DMSO,震荡

10 min,在酶标仪上于 490 nm 处测定对照组及加药组的吸光度 (*A*),结果见表 2。

抑制率 =  $(A_{\text{对照组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{对照组}} \times 100\%$

**2.3 广西莪术挥发油抗肿瘤作用谱效学** 根据文献方法计算广西莪术挥发油指纹图谱特征与药效作用之间的灰关联度及关联序<sup>[6]</sup>。本研究将不同批次的广西莪术挥发油对肿瘤细胞的增殖抑制率设为参考序列(母序列),比较数列(子序列)为 20 个特征峰,1~20 号特征峰分别用  $x_1 \sim x_{20}$  表示。将母序列与子序列进行灰色关联度分析,依据关联度的大小,确定了各特征成分对抗肿瘤作用贡献的大小顺序为:莪术醇>莪术二酮> $\beta$ -榄香烯>吉马酮>莪术酮> $\alpha$ -丁子香烯> $\delta$ -瑟林烯> $\beta$ -石竹烯> $\beta$ -榄香烯酮>*a*-蒎烯> $\alpha$ -石竹烯>桉油素>樟脑>2-壬醇>异龙脑莪术烯> $\delta$ -榄香烯>莰烯>*D*-柠檬烯>龙脑。结果表明广西莪术抗肿瘤作用是其内“有效组分群”共同作用的结果,各特征峰代表的化学成分与其增殖抑制作用的关联度虽大小不一,但都起了一定的作用。结果见表 3。

表1 10 批次广西莪术共有峰调整保留时间与相对峰面积的比值

| 峰号 | 化合物            | $\alpha$ 值 | 样品相对峰面积比值 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----|----------------|------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|    |                |            | 1         | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   |
| 1  | <i>a</i> -蒎烯   | 0.24       | 0.26      | 0.21 | 0.27 | 0.27 | 0.19 | 0.29 | 0.21 | 0.24 | 0.21 | 0.23 |
| 2  | 莰烯             | 0.25       | 0.56      | 0.57 | 0.56 | 0.62 | 0.40 | 0.60 | 0.49 | 0.52 | 0.66 | 0.61 |
| 3  | <i>D</i> -柠檬烯  | 0.34       | 0.25      | 0.22 | 0.29 | 0.40 | 0.20 | 0.31 | 0.22 | 0.33 | 0.49 | 0.23 |
| 4  | 桉油素            | 0.35       | 1.58      | 1.03 | 1.74 | 1.20 | 1.24 | 1.89 | 1.39 | 1.00 | 0.98 | 1.11 |
| 5  | 2-壬醇           | 0.42       | 0.38      | 0.33 | 0.37 | 0.60 | 0.26 | 0.40 | 0.34 | 0.50 | 0.33 | 0.36 |
| 6  | 樟脑             | 0.49       | 1.81      | 1.13 | 1.66 | 1.38 | 1.18 | 1.80 | 1.59 | 1.00 | 0.98 | 1.22 |
| 7  | 龙脑             | 0.51       | 0.51      | 0.53 | 0.23 | 0.62 | 0.16 | 0.24 | 0.45 | 0.83 | 0.66 | 0.57 |
| 8  | 异龙脑            | 0.54       | 0.62      | 0.47 | 0.61 | 0.80 | 0.44 | 0.67 | 0.54 | 0.67 | 0.82 | 0.50 |
| 9  | $\alpha$ -丁子香烯 | 0.85       | 0.60      | 0.46 | 0.85 | 0.40 | 0.60 | 0.92 | 0.53 | 0.33 | 0.33 | 0.49 |
| 10 | 莪术烯            | 0.89       | 1.69      | 1.28 | 1.60 | 1.20 | 1.13 | 1.73 | 1.49 | 1.00 | 1.28 | 1.38 |
| 11 | $\alpha$ -石竹烯  | 0.89       | 0.36      | 0.27 | 0.38 | 0.42 | 0.27 | 0.41 | 0.32 | 0.33 | 0.30 | 0.29 |
| 12 | $\beta$ -石竹烯   | 0.92       | 0.34      | 0.26 | 0.36 | 0.40 | 0.26 | 0.40 | 0.30 | 0.33 | 0.29 | 0.28 |
| 13 | $\delta$ -榄香烯  | 0.97       | 0.37      | 0.29 | 0.39 | 0.60 | 0.29 | 0.67 | 0.34 | 0.33 | 0.31 | 0.30 |
| 14 | $\beta$ -榄香烯   | 1.00       | 1.00      | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| 15 | $\delta$ -瑟林烯  | 1.13       | 0.71      | 0.54 | 0.76 | 0.99 | 0.54 | 1.11 | 0.63 | 0.62 | 0.61 | 0.58 |
| 16 | 莪术酮            | 1.17       | 1.08      | 0.82 | 1.57 | 1.38 | 0.82 | 1.33 | 0.96 | 0.94 | 1.25 | 0.88 |
| 17 | 莪术醇            | 0.96       | 0.62      | 0.47 | 0.86 | 1.02 | 0.47 | 1.11 | 0.55 | 0.54 | 0.00 | 0.00 |
| 18 | 莪术二酮           | 1.21       | 0.97      | 0.73 | 0.61 | 1.20 | 0.73 | 1.33 | 0.85 | 0.84 | 0.49 | 0.79 |
| 19 | 吉马酮            | 1.26       | 1.78      | 1.49 | 1.64 | 2.20 | 1.49 | 2.44 | 1.74 | 1.71 | 1.31 | 1.45 |
| 20 | $\beta$ -榄香烯酮  | 1.29       | 2.42      | 1.69 | 2.46 | 2.04 | 1.69 | 2.22 | 1.97 | 1.93 | 1.97 | 1.97 |

| 表 2 10 批次样品中莪术油对鼻咽癌 CNE-2 细胞的抑制率比较 |        |    |        |
|------------------------------------|--------|----|--------|
| 批次                                 | 抑制率/%  | 批次 | 抑制率/%  |
| 1                                  | 58. 61 | 6  | 98. 57 |
| 2                                  | 45. 93 | 7  | 52. 69 |
| 3                                  | 78. 36 | 8  | 51. 84 |
| 4                                  | 91. 34 | 9  | 8. 88  |
| 5                                  | 45. 93 | 10 | 8. 49  |

| 表 3 20 个特征峰与抑制率的关联度( $\bar{x} \pm s$ ) |                     |     |
|----------------------------------------|---------------------|-----|
| 特征峰                                    | 关联度                 | 关联序 |
| $x_1$                                  | 0. 755 $\pm$ 0. 066 | 10  |
| $x_2$                                  | 0. 698 $\pm$ 0. 065 | 18  |
| $x_3$                                  | 0. 675 $\pm$ 0. 055 | 19  |
| $x_4$                                  | 0. 747 $\pm$ 0. 054 | 12  |
| $x_5$                                  | 0. 722 $\pm$ 0. 059 | 14  |
| $x_6$                                  | 0. 725 $\pm$ 0. 054 | 13  |
| $x_7$                                  | 0. 602 $\pm$ 0. 072 | 20  |
| $x_8$                                  | 0. 712 $\pm$ 0. 061 | 15  |
| $x_9$                                  | 0. 770 $\pm$ 0. 064 | 6   |
| $x_{10}$                               | 0. 709 $\pm$ 0. 060 | 16  |
| $x_{11}$                               | 0. 752 $\pm$ 0. 060 | 11  |
| $x_{12}$                               | 0. 764 $\pm$ 0. 063 | 8   |
| $x_{13}$                               | 0. 706 $\pm$ 0. 067 | 17  |
| $x_{14}$                               | 0. 781 $\pm$ 0. 046 | 3   |
| $x_{15}$                               | 0. 768 $\pm$ 0. 049 | 7   |
| $x_{16}$                               | 0. 774 $\pm$ 0. 066 | 5   |
| $x_{17}$                               | 0. 921 $\pm$ 0. 024 | 1   |
| $x_{18}$                               | 0. 798 $\pm$ 0. 064 | 2   |
| $x_{19}$                               | 0. 780 $\pm$ 0. 063 | 4   |
| $x_{20}$                               | 0. 756 $\pm$ 0. 074 | 9   |

3 讨论

指纹图谱相似度评价方法是国家中医药管理局认可的用来判断中药化学成分相似性的一种方法。从理论上讲,化学指纹图谱相似度高的药物,化学成分相似,其药效也应该相似。但研究发现,10 批次广西莪术挥发油的指纹图谱用相似度评价软件评价后,在主要特征峰不一致时,仍具有很高的相似度。如在横县主产区的 2 个批次的样品中均未检测到莪术醇,但 GC-MS 相似度均达到了 0. 99 以上。抗肿瘤药效学研究结果发现,不含莪术醇的上述 2 个批次样品对肿瘤增殖的抑制作用较低,抑制率仅为 8. 88% 和 8. 49%。来自贵港的 6 个批次样品莪术醇含量最高,而其对肿瘤增殖的抑制作用大,抑制率 98. 57%。由此可以看出,不能仅以指纹图谱相似度评价的方法来推测药效。

灰关联度分析作为对模糊系统研究的有效手段,已被广泛应用于经济评价、投资决策、环境检测、人员考核、项目评估以及机械加工等过程控制与质量评价中。大量的研究已证实<sup>[7-9]</sup>,上述各领域的研究共同特点是系统的信息量较少,而涉及的因素

多,而且这些因素往往是相互影响、相互作者,并非独立的。目前灰关联度分析应用于对中药材的质量评价研究较少,但其具有既包含有已知信息,又包含有未知信息的特点,通过对其研究可利用已知的信息,去揭示未知的信息<sup>[10-11]</sup>,因此更适于含有复化学成分中药材的质量评价和控制。

基于此,本研究通过寻找“有效组分群”的指纹特征与抗肿瘤活性效应之间的联系来开展研究,在广西莪术挥发油 GC-MS 指纹图谱和药理学研究的基础上,获得了广西莪术挥发油 GC-MS 指纹图谱 20 个特征峰面积与对鼻咽癌细胞的增殖抑制作用的量化数据,采用灰关联度分析技术,以相对关联度为测度,确定了指纹图谱特征所代表的化学成分对药效贡献的大小,继而根据广西莪术挥发油 GC-MS 指纹图谱各特征峰对肿瘤细胞抑制作用贡献的大小程度来推测其抗肿瘤作用。总之,本研究确定了“有效组分群”指纹特征对药效贡献的大小,为中药的“谱效关联”的指纹图谱的建立、中药的质量控制和药效评价标准的制定提供了新的思路和方法。

[参考文献]

[ 1 ] 陈旭,曾建红. 广西莪术挥发油化学成分的研究[J]. 药物生物技术,2008,15(4):324.

[ 2 ] 王地,关怀,于萍,等. 莪术挥发油提取工艺的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(10):20.

[ 3 ] 曾建红,陈旭,蒋小军,等. 广西莪术挥发油抗肿瘤活性成分 GC-MS 研究[J]. 中华中医药杂志,2008,23(增刊):10.

[ 4 ] 石俊英,张会敏,王颖,等. 山东道地药材金银花 HPLC 指纹图谱研究[J]. 山东中医药大学学报,2008,32(1):6.

[ 5 ] 陈旭,曾建红. 广西莪术挥发油 GC-MS 指纹图谱研究[J]. 药物分析杂志,2008,28(8):363.

[ 6 ] 于萍,李克. 使用 Microsoft Excel 进行数据的灰关联分析[J]. 微型电脑应用,2011,27(3):29.

[ 7 ] 刘瑜彬,王晖,唐晓峰,等. 灰关联聚类法评价补中益气汤对大鼠气虚发热的效果[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(18):124.

[ 8 ] 吴忠,郑少珠. 浙贝母、川贝母微量元素灰关联度分析及鉴别分类[J]. 中药材,1997,20(6):291.

[ 9 ] 刘向东,张阳,鹿茸品种鉴定与质量评价的研究近况[J]. 辽宁中医药大学学报,2008,10(7):126.

[10] 李峰,张振秋,李可强,等. 动物药材质量评价模式研究[C]. 长沙:中国药学会,2009.

[11] 李峰,张振秋,康廷国. 灰关联度法评价鹿鞭药材质量的研究[J]. 中药材,2008,31(2):189.

[责任编辑 邹晓翠]