

# 岗梅根和茎超临界CO<sub>2</sub>萃取物中低极性挥发性成分比较及其对IEC-6细胞增殖活性的影响<sup>Δ</sup>

马洪艳\*,汪天呈,李武国,刘嘉炜\*(广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心/岭南中药资源教育部重点实验室/国家中成药工程技术研究中心南药研发实验室,广州 510006)

中图分类号 R917;S481<sup>+</sup>.9 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)08-1056-05  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.08.09

**摘要** 目的:比较岗梅根和茎的超临界CO<sub>2</sub>萃取物中的低极性挥发性化学成分及其体外对大鼠小肠隐窝上皮细胞IEC-6增殖活性的影响,为充分利用岗梅野生资源和扩大其药用部位提供参考。方法:采用超临界CO<sub>2</sub>萃取法提取岗梅根和茎中的低极性挥发性化学成分,通过气质联用法(GC-MS)分析其化学成分组成。以IEC-6细胞为对象,采用不同质量浓度的岗梅根或茎超临界CO<sub>2</sub>萃取物(0、1、5、10、20、40、60、80、100 μg/mL)处理细胞,以MTT法检测细胞相对活力,绘制细胞增殖曲线图并计算各萃取物的半数有效浓度(EC<sub>50</sub>)。结果:通过GC-MS分析技术从岗梅根和茎超临界CO<sub>2</sub>萃取物中分别鉴定出62、46个低极性挥发性化学成分,其中共有成分24个,主要为壬酸(根、茎中分别含14.18%、6.14%)、辛酸(根、茎中分别含10.59%、4.35%)、己酸(根、茎中分别含8.63%、10.86%)、丹皮酚(根、茎中分别含7.79%、6.00%)、2-甲基-3-苯基-丙醇(根、茎中分别含6.30%、0.58%)、乙酸(根、茎中分别含1.72%、33.77%)等。细胞体外试验结果显示,岗梅根和茎超临界CO<sub>2</sub>萃取物质量浓度较低(≤60 μg/mL)时,能显著促进IEC-6细胞增殖,EC<sub>50</sub>分别为16.35、20.20 μg/mL;而当质量浓度较高(≥80 μg/mL)时,则表现出细胞毒活性,对IEC-6细胞增殖呈抑制作用。结论:岗梅根和茎中的低极性挥发性化学成分种类相似,其萃取物对IEC-6细胞的体外生物活性也相似;短链脂肪酸很可能是其促进细胞增殖的活性成分,而丹皮酚则可能是其细胞毒活性成分。

**关键词** 岗梅;根;茎;低极性;挥发性成分;超临界CO<sub>2</sub>萃取;气质联用;IEC-6细胞;细胞增殖

## Comparison of Low-polarity Volatile Constituents in Supercritical CO<sub>2</sub> Extract from the Roots and Stem of *Ilex asprella* and Its Effects on the Proliferation of IEC-6 Cells

MA Hongyan, WANG Tiancheng, LI Wuguo, LIU Jiawei (Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of TCM/Key Lab of Chinese Medicinal Resource from Lingnan/Lingnan Pharmaceutical Research and Development Laboratory, National Center for Engineering and Technology of Chinese Patent Medicine, Guangzhou 510006, China)

[17] WANG J, BAO A, MENG X, et al. An efficient approach to prepare sulfated polysaccharide and evaluation of anti-tumor activities in vitro[J]. *Carbohydr Polym*, 2018. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.12.065.

[18] GRINE L, DEJAGER L, LIBERT C, et al. An inflammatory triangle in psoriasis: TNF, type I IFNs and IL-17[J].

<sup>Δ</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81373432);广东省教育厅特色创新类项目(自然科学)(No.2017KTSCX044)

\* 硕士研究生。研究方向:天然药物化学、抗肿瘤创新药物。E-mail:mahongyan2019@163.com

# 通信作者:研究员,博士生导师,博士。研究方向:天然药物化学、抗肿瘤创新药物。电话:020-39358547。E-mail:jiawei.liu@ymail.com

*Cytokine Growth Factor Rev*, 2015, 26(1):25-33.

[19] 赵京霞,底婷婷,王燕,等. IL-23/IL-17 炎症轴在咪喹莫特诱导的小鼠银屑病样皮肤损害中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(6):1086-1094.

[20] 宋红霞,薛晓东.消银汤联合窄谱中波紫外线治疗寻常型银屑病血热证疗效及其对外周血IL-17、IL-23、IL-6水平的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(5):192-196.

[21] 刘铭,李娜娜,耿越.硫酸酯化马尾松花粉多糖对小鼠脾脏B淋巴细胞免疫调节作用的研究[J]. *中国细胞生物学学报*, 2014, 36(4):461-469.

(收稿日期:2018-07-29 修回日期:2018-12-14)

(编辑:张元媛)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To compare low-polarity volatile constituents in supercritical CO<sub>2</sub> extract from the roots and stem of *Ilex asprella* and its effects on the proliferation of IEC-6 *in vitro*, and to provide reference for making full use of wild resources of *I. asprella* and expanding its medicinal parts. METHODS: The low-polarity volatile constituents were extracted from the root and stem of *I. asprella* with supercritical fluid CO<sub>2</sub> extraction(SFE-CO<sub>2</sub>). The chemical constituents were analyzed by GC-MS. IEC-6 cells were treated with different concentrations of supercritical CO<sub>2</sub> extracts (0, 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μg/mL) from roots or stems of *I. asprella*. MTT assay was used to detect the relative viability, and cell proliferation curve was drawn and EC<sub>50</sub> of each extract were calculated. RESULTS: Sixty-two and forty-six low-polarity volatile constituents were identified from supercritical CO<sub>2</sub> extract in the roots and stem of *I. asprella* with GC-MS; there were 24 common constituents totally, mainly including pelargonic acid(14.18% and 6.14%), octanoic acid(10.59% and 4.35%), hexanoic acid(8.63% and 10.86%), paeonol(7.79% and 6.00%), 2-methyl-3-phenyl-propanal(6.3% and 0.58%), acetic acid(1.72% and 33.77%) in root and stem, respectively. The results of cell culture *in vitro* showed that when the concentration of supercritical CO<sub>2</sub> extract from the roots and stems of *I. asprella* was lower (≤60 μg/mL), it could significantly promote the proliferation of IEC-6 cells and their EC<sub>50</sub> were 16.35, 20.20 μg/mL, respectively; when the concentration of the extract was higher (≥80 μg/mL), it showed cytotoxicity and inhibited the proliferation of IEC-6 cells. CONCLUSIONS: There are similar species of volatile constituents in roots and stems of *I. asprella* and similar *in vitro* bioactivity of the supercritical CO<sub>2</sub> extracts to IEC-6 cells. The short-chain fatty acids may be the active ingredient to promote cell proliferation, while paeonol may be the cytotoxic active ingredient.

**KEYWORDS** *Ilex asprella*; Root; Stem; Low polarity; Volatile constituents; SFE-CO<sub>2</sub>; GC-MS; IEC-6 cell; Cell proliferation

岗梅为冬青科冬青属落叶灌木梅叶冬青 [*Ilex asprella*(Hook. et Arn.)Champ. ex Benth], 属于多年生木本植物, 生于海拔 400~1 000 m 的山地疏林中或路旁灌丛中, 主产于我国浙江、江西、福建、湖南、广东、广西、香港、台湾等地, 在菲律宾群岛等东南亚地区也有分布<sup>[1]</sup>。岗梅传统药用部位为其根部, 传统医学认为岗梅根入药能清热解毒、活血生津, 常用于防治风热感冒、上呼吸道感染等疾病<sup>[2-3]</sup>。现代药理研究表明, 岗梅根提取物及其分离化合物具有抗病毒、抗炎、肿瘤细胞毒性、调节脂质代谢等生物活性<sup>[4-6]</sup>。岗梅根为三九感冒灵、王老吉和加多宝等中成药及凉茶饮品的主要原料, 是岭南地区大宗药材之一, 在药材市场的需求量日益剧增, 使得野生岗梅被过度采伐, 其植物资源逐年减少, 其药材资源严重匮乏, 难以满足临床需求。已有研究显示, 岗梅根主要含有三萜酸、三萜皂苷、黄酮等极性化学成分, 而岗梅茎所含化学成分与根相似<sup>[6-10]</sup>。然而岗梅根和茎中的低极性挥发性成分研究鲜有报道。为了扩大岗梅药用部位, 充分开发利用岗梅药材资源, 本课题通过超临界 CO<sub>2</sub> 萃取岗梅根和茎中的低极性挥发性成分, 以气质联用法(GC-MS)鉴定并比较其化学成分异同, 进一步评价其对大鼠小肠隐窝上皮细胞 IEC-6 增殖活性的影响, 以期为扩大岗梅药用部位提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

HA121-50-05 型超临界流体萃取仪(江苏华安科研仪器有限公司); R-1001N 型旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司); ME204 型万分之一分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司); XR205SM-DR 型十万分之一电子天平(瑞士 Precisa 公司); Voyager 型 GC-MS 联用仪(美国 Finnigan 公司); 3111 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国 Thermo

Fisher Scientific 公司); CKX41 型相差倒置显微镜(日本 Olympus 公司); TC10 型细胞计数仪、iMark 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); TGL-16G 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器公司)。

### 1.2 药材与试剂

岗梅药材于 2012 年 11 月采于广东从化市三垌塘, 经广州中医药大学中药学院药用植物教研室彭光天博士鉴定为冬青科冬青属植物梅叶冬青 [*Ilex asprella*(Hook. et Arn.)Champ. ex Benth] 的干燥根和茎。

DMEM 培养基(批号: C11995)、磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4, 批号: C10010)、胎牛血清(FBS, 批号: 10099)、0.25% Trypsin-EDTA(批号: 25200)、青-链霉素双抗溶液(批号: 15140)均为美国 Gibco 公司产品; CO<sub>2</sub>(上海源叶生物科技有限公司, 纯度: 99.999%); MTT(美国 Sigma 公司, 批号: M2128); 95% 乙醇、无水硫酸钠、二甲基亚砜(DMSO)、乙醚等试剂均为分析纯, 水为双蒸水。

### 1.3 细胞

大鼠小肠隐窝上皮细胞 IEC-6 细胞株由广州中医药大学脾胃研究所李茹柳研究员惠赠, 液氮保存。

## 2 方法

### 2.1 岗梅根和茎的超临界 CO<sub>2</sub> 萃取

取岗梅根 510 g、茎 505 g, 粉碎, 过 50 目筛, 装入超临界萃取釜中。采用经前期预试验优化所得工艺参数进行超临界 CO<sub>2</sub> 萃取: 萃取压力为 20 MPa, 萃取温度为 45 ℃, 加入一定量 95% 乙醇作为夹带剂, 萃取时间为 2 h。其中分离釜 I 的温度为 45 ℃, 压力为 5.4 MPa; 分离釜 II 的温度为 50 ℃, 压力为 5.4 MPa。

### 2.2 岗梅根和茎超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物的 GC-MS 分析

2.2.1 样品溶液的制备 将“2.1”项下所得超临界 CO<sub>2</sub>

萃取物在 45 °C 下旋转蒸发回收乙醇,得提取物浸膏。取适量浸膏,用乙醚配制成 50 mg/mL(按浸膏质量计算)的溶液,加适量无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>脱水干燥,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过。取滤液备用 GC-MS 分析检测。

**2.2.2 色谱条件** 色谱柱为 TG WAXMS 石英毛细管色谱柱(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm);程序升温:初始温度 40 °C,保持 3 min,再以 5 °C/min 升至 200 °C,立刻以 10 °C/min 升至 240 °C,保持 5 min;进样口温度为 220 °C;载气为高纯度氮气,载气体积流量为 2 mL/min(恒流模式);分流进样,分流比为 15:1;进样量为 1 μL。

**2.2.3 质谱条件** 离子源温度为 200 °C;接口温度为 240 °C;电离方式为电子轰击(EI)源,电子轰击能量为 70 eV;扫描方式为 Full Scan,扫描速度为 1 975.50 amu/s,扫描范围为 19~450 amu,溶剂延迟时间为 3 min。

**2.2.4 低极性挥发性成分的相对含量计算** 采用 NIST Search 2.0 质谱数据库软件对化学成分进行检索匹配,并结合相关文献,人工解析质谱图谱,鉴定并确证化合物结构;采用峰面积归一法计算各化学成分的相对百分含量。

### 2.3 岗梅根和茎超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物对 IEC-6 细胞增殖活性的影响考察

**2.3.1 细胞复苏及培养** 取液氮保存的 IEC-6 细胞,在 37 °C 水浴中解冻(≤1 min),加入 4~6 mL 完全培养液(含 10% FBS+双抗的 DMEM 培养基)中,1 000 r/min 离心 5 min。弃去上清液,重悬细胞,接种于培养瓶,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,次日换液。待细胞生长至约 80% 融合时,用 0.25% Trypsin-EDTA 1 mL 消化传代,备用。

**2.3.2 萃取物对细胞增殖活性的影响考察** 采用 MTT 法进行检测。取对数生长期细胞进行消化计数,然后按 1×10<sup>4</sup> 个/孔接种于 96 孔板,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h。将细胞分为空白对照组和给药组,每组平行设置 3 个孔。吸弃各孔中的完全培养液,空白对照组加入含 0.4% DMSO+10% FBS 的 DMEM 培养基 200 μL,给药组加入含梯度质量浓度的岗梅根或茎萃取物(终质量浓度分别为 0、1、5、10、20、40、60、80、100 μg/mL,按浸膏质量计算,剂量根据预试验结果制定)的完全培养液 200 μL,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h。培养完毕后,每孔加入 0.5 mg/mL MTT 溶液(以 PBS 为溶剂配制)20 μL,继续培养 4 h 后吸弃培养基,每孔加入 DMSO 150 μL,振荡 10 min。采用酶标仪在 490 nm 波长处检测各孔吸光度(OD)值,以此表示细胞相对活力;同时,以药物浓度对数值为横坐标、相对细胞活力为纵坐标,采用 GraphPad Prism 软件绘制细胞增殖曲线并计算各萃取物的半数有效浓度(EC<sub>50</sub>)。

## 3 结果

### 3.1 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物的 GC-MS 分析结果

**3.1.1 岗梅根** 经超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取得到岗梅根萃取物 3.29 g,产率为 0.65%。经 GC-MS 分析,共分离得

到 70 个峰。鉴定并确证其中 62 个化合物的结构,按面积归一化法计算,这 62 个化合物含量之和占检出化学成分总量的相对百分含量为 97.70%;其中的主要成分为 2-甲基-3-苯基-丙醇(2-methyl-3-phenyl-propanal)、己酸(Hexanoic acid)、庚酸(Heptylic acid)、辛酸(Octanoic acid)、壬酸(Pelargonic acid)和丹皮酚(Paeonol)等,分别占检出化学成分总量的 6.30%、8.65%、3.58%、10.59%、14.18% 和 7.79%。岗梅根超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物的总离子流图谱见图 1A,GC-MS 分析结果见表 1。

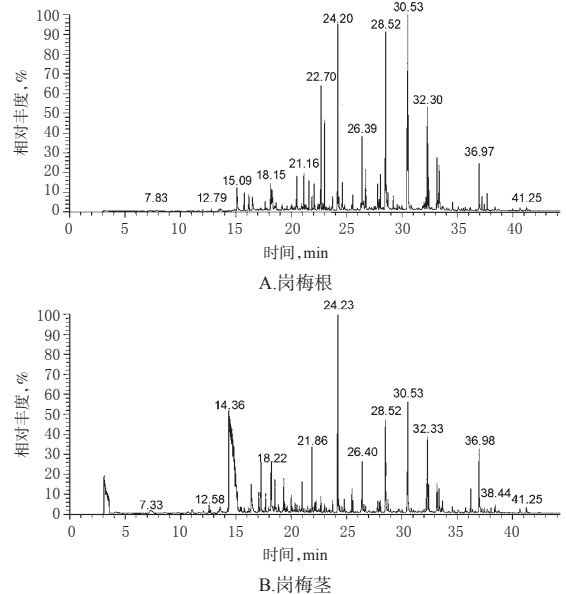


图 1 岗梅根和茎超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物的总离子流图  
Fig 1 TIC of supercritical CO<sub>2</sub> extract from the roots and stem of *I. asprella*

表 1 岗梅根和茎超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物中化学成分的 GC-MS 分析结果

Tab 1 GC-MS analysis results of chemical constituents in supercritical CO<sub>2</sub> extract from the roots and stem of *I. asprella*

峰号	岗梅根			岗梅茎			化合物名称	分子式	分子量
	保留时间, min	匹配度, %	含量, %	保留时间, min	匹配度, %	含量, %			
1	-	-	-	7.32	73.1	0.60	2-methylcyclopentyl acetate	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	142
2	-	-	-	11.05	80.7	0.36	1-羟基-2-丙酮	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	74
3	-	-	-	12.58	83.3	0.38	n-hexyl methanoate	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	130
4	-	-	-	13.58	79.9	0.63	壬醛	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	142
5	13.64	78.2	0.24	-	-	-	正十四烷	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	198
6	15.11	88.3	1.72	14.40	92.2	33.77	乙酸*	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	60
7	-	-	-	15.42	70.0	0.33	反式-氧化芳樟醇	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	170
8	15.77	88.2	0.99	15.77	88.9	0.24	α-荜澄茄油烯*	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
9	16.18	87.6	1.00	16.18	81.4	0.22	正十五烷*	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	212
10	16.51	75.7	1.35	16.41	76.4	2.08	甲酸*	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	46
11	-	-	-	17.27	83.3	3.09	2,3-丁二醇	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	90
12	17.66	87.4	0.37	-	-	-	戊基环丙烷	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub>	112
13	-	-	-	17.68	90.0	0.71	甲酸辛酯	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	158
14	18.16	76.4	1.59	-	-	-	水菖蒲烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
15	-	-	-	18.2	80.6	3.38	2,3-丁二醇	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	90
16	18.27	90.0	1.74	-	-	-	β-榄香烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204



续表 1

Continued tab 1

峰号	岗梅根			岗梅茎			化合物名称	分子式	分子量
	保留时间, min	匹配度, %	含量, %	保留时间, min	匹配度, %	含量, %			
17	18.48	71.9	0.36	-	-	-	异麝香酮甲醚	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O	164
18	18.63	85.0	0.52	-	-	-	正十六烷	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	226
19	-	-	-	18.87	72.5	0.37	γ-戊内酯	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	100
20	-	-	-	19.32	75.5	1.79	γ-丁内酯	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	86
21	19.64	80.3	0.22	19.65	87.0	0.47	2-葵烯醛*	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154
22	-	-	-	20.02	75.8	0.72	2-甲基戊酸酐	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	214
23	20.07	90.4	0.50	-	-	-	壬醇	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O	144
24	20.34	87.4	0.22	-	-	-	2,6,10,14-四甲基十五烷	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	268
25	-	-	-	20.35	72.6	0.38	异戊酸	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	102
26	20.51	77.9	1.83	-	-	-	γ-murolene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
27	20.95	86.3	0.38	-	-	-	正十七烷	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	240
28	-	-	-	20.97	81.5	0.98	戊酸酐	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	186
29	21.15	91.5	1.91	-	-	-	β-蒎烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136
30	21.35	89.6	0.57	-	-	-	α-医兰油烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136
31	21.60	91.5	1.09	-	-	-	左旋香芹酮	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	150
32	21.89	75.2	0.51	21.87	84.1	2.27	正戊酸*	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	102
33	22.08	87.0	1.32	-	-	-	γ-杜松烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136
34	-	-	-	22.18	79.7	1.07	2(5H)-呋喃酮	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	142
35	22.42	77.0	0.29	-	-	-	(Z)-6-pentadecen-1-ol	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub>	206
36	22.52	85.5	0.29	22.51	73.2	0.32	α-姜黄烯*	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	202
37	22.69	87.6	6.30	22.68	83.3	0.58	2-甲基-3-苯基-丙醛*	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	148
38	22.85	85.9	0.29	-	-	-	2-萜烯-10-醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	150
39	-	-	-	23.00	76.7	0.33	1-羟基-1-苯基-2-丙酮(2,3-环氧丁烷)	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	150
40	23.01	80.4	3.80	-	-	-	2-methyl-1-phenylbut-3-en-1-ol	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O	162
41	23.33	80.9	0.16	-	-	-	2-[[9Z,12Z]-9,12-octadecadienyl]oxy]ethanol	C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	310
42	23.45	71.6	0.16	-	-	-	2-丁基环己酮	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154
43	23.73	86.7	0.73	23.73	88.3	0.47	茴香脑*	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	148
44	24.20	87.6	8.65	24.22	85.3	10.86	己酸*	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	116
45	24.33	81.8	0.59	-	-	-	6,10-二甲基-5,9-十一双烯-2-醇	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O	194
46	24.62	82.9	1.48	-	-	-	亚麻醇	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O	264
47	-	-	-	24.81	85.2	0.60	苯甲醇	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	108
48	-	-	-	25.49	86.4	0.96	苯乙醇	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	122
49	25.56	82.0	0.87	-	-	-	α-丁基-γ-丁内酯	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	142
50	26.39	85.6	3.58	26.39	80.9	1.95	庚酸*	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	130
51	-	-	-	26.55	81.8	0.36	麦芽醇(2-甲基-3-羟基-4-吡喃酮)	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	126
52	26.73	86.5	2.02	26.72	73.1	0.27	石竹素*	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	122
53	27.59	89.3	0.17	-	-	-	甲基丁香酚	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	178
54	27.81	84.0	1.42	27.81	81.6	0.50	α-戊基-γ-丁内酯*	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	156
55	-	-	-	27.96	76.2	0.39	3-羟基-4,4-二甲基-2(3H)呋喃	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	130
56	28.06	89.3	1.89	28.06	89.1	0.39	肉桂醛*	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O	132
57	28.52	88.5	10.59	28.52	87.8	4.35	辛酸*	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	144
58	28.73	69.8	1.00	28.74	70.5	0.54	4,4,6-三甲基-环己烯-1-醇*	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	140
59	29.23	88.8	0.59	-	-	-	4-异丙基苯甲醇	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	150
60	29.56	89.7	0.19	-	-	-	斯巴醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154
61	-	-	-	29.73	81.9	0.27	6,10,14-三甲基-二十五烷酮	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O	268
62	29.74	73.5	0.34	-	-	-	肉桂酸乙酯	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	176
63	30.00	69.1	0.20	-	-	-	丙位十二内酯	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	198
64	30.52	87.6	14.18	30.53	86.9	6.14	壬酸*	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	158
65	30.83	74.5	0.30	-	-	-	反-2-辛烯醛	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	142
66	31.85	71.1	0.18	-	-	-	2-葵甲醚	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	172
67	31.98	76.0	0.46	-	-	-	芳姜黄酮	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O	216
68	32.30	89.5	7.79	32.31	89.5	6.00	丹皮酚*	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	166
69	32.68	71.7	0.16	-	-	-	Isoramadendrene epoxide	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O	220

续表 1

Continued tab 1

峰号	岗梅根			岗梅茎			化合物名称	分子式	分子量
	保留时间, min	匹配度, %	含量, %	保留时间, min	匹配度, %	含量, %			
70	33.17	85.3	2.73	33.17	81.5	1.29	丙三醇*	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	92
71	33.34	88.7	2.64	33.35	87.7	1.09	乙酰丙酸*	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	116
72	33.71	79.5	0.46	33.67	78.7	0.74	乙酰氧基乙酸*	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	118
73	34.04	79.8	0.16	-	-	-	Aromadendrene oxide-2	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220
74	34.56	70.6	0.42	-	-	-	丙酸-2-辛酯	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	184
75	-	-	-	34.57	70.3	0.26	反-2-十一烯酸	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	186
76	35.08	87.2	0.32	-	-	-	苯甲酸	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	122
77	-	-	-	35.74	81.3	0.21	3,4-二氢-8-羟基-3-甲基-1H-2-苯并吡喃-1-酮	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	178
78	36.19	86.8	0.20	36.20	86.8	0.72	5-羟甲基糠醛*	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	126
79	36.97	87.9	2.07	36.97	88.3	2.46	香草醛*	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152
80	37.23	73.3	0.47	-	-	-	1,2-dideoxy-l-erythro-pentitol	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	120
81	37.43	75.3	0.20	-	-	-	2-羟基-4,6-二甲氧基苯乙酮	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	196
82	37.70	81.6	0.62	-	-	-	4-甲氧基肉桂酸乙酯	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	206
83	-	-	-	38.42	78.8	0.42	6-乙基-3-辛基-丁基-邻苯二甲酸酯	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	362
84	40.66	85.0	0.16	-	-	-	棕榈酸	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256
85	41.25	89.7	0.15	41.25	88.5	0.23	丁香醛*	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	182

注：“-”表示未检出；“\*”为岗梅根和茎的共有成分

Note: “-” means not detected; “\*” means common constituents in the roots and stem of *I. asprella*

3.1.2 岗梅茎 经超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取得到岗梅茎萃取物 1.39 g, 产率为 0.28%。经 GC-MS 分析, 共分离得到 53 个峰。鉴定并确证其中 46 个化合物的结构, 按面积归一化法计算, 这 46 个化合物含量之和占检出化学成分总量的相对百分含量为 94.46%; 其中的主要成分为乙酸 (Acetic acid)、己酸 (Hexanoic acid)、辛酸 (Octanoic acid)、壬酸 (Pelargonic acid) 和丹皮酚 (Paeonol) 等, 分别占检出化学成分总量的 33.77%、10.86%、4.35%、6.14% 和 6.00%。岗梅茎超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物的总离子流图谱见图 1B, GC-MS 分析结果见表 1。

### 3.2 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物对 IEC-6 细胞增殖活性的影响考察结果

结果显示, 质量浓度为 1~60 μg/mL 的岗梅根和茎超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物进行处理后, 细胞相对活力随药物质量浓度升高而升高, 表明上述质量浓度的萃取物能促进细胞增殖, 且呈量效关系, 其 EC<sub>50</sub> 分别为 16.35、20.20 μg/mL; 但当质量浓度为 80~100 μg/mL 的萃取物进行处理后, 细胞相对活力随药物质量浓度升高而降低, 表明两者均能抑制细胞增殖活性, 表现出一定的细胞毒活性。不同质量浓度岗梅根和茎超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物作用下的细胞增殖曲线见图 2。

## 4 讨论

岗梅为岭南地区地产药材, 以根入药, 是多种中成药和保健品饮料的重要原料。但岗梅生长缓慢、药材产量低, 加之目前对其野生资源的过度采伐, 导致其药材资源严重匮乏、日趋濒危。因此, 扩大岗梅药用部位成为解决上述问题的思路之一。已有研究证实, 岗梅根和

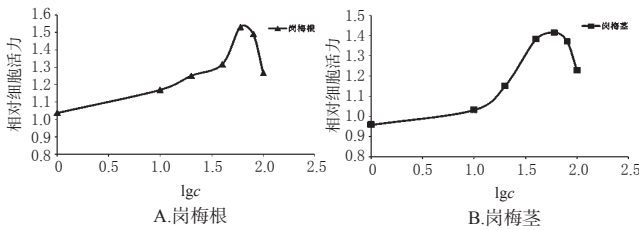


图2 不同质量浓度的岗梅根和茎超临界CO<sub>2</sub>萃取物作用下的细胞增殖曲线

Fig 2 Proliferation curve of cells after treated with different concentrations of supercritical CO<sub>2</sub> extract from the roots and stem of *I. asprella*

茎中含有相似种类的极性化学成分<sup>[6-10]</sup>。为进一步探讨岗梅根和茎所含化学成分的异同,本研究分析比较了两者所含低极性挥发性化学成分,并评价了其萃取物在体外对IEC-6细胞增殖活性的影响。

本研究采用超临界CO<sub>2</sub>萃取岗梅根和茎的低极性挥发性成分,利用GC-MS法分析鉴定其化合物结构,从岗梅根和茎中分别鉴定并确证了62、46个化合物,分别占总检出化学成分的97.54%、96.54%,这些化合物均主要为有机酸类、萜类、醇类、酯类和酮类等;两者的共有成分有24个,分别共占总检出化学成分的相对百分含量为72.48%、75.87%,均包括壬酸、辛酸、己酸、丹皮酚、2-甲基-3-苯基-丙醇、乙酸等共有成分,表明岗梅根和茎的低极性挥发性化学成分种类和含量相似。

体外细胞试验结果显示,岗梅根和茎的超临界CO<sub>2</sub>萃取物质量浓度≤60 μg/mL时,能显著促进IEC-6细胞增殖;而当萃取物质量浓度≥80 μg/mL时,则表现出明显细胞毒性,对IEC-6细胞增殖呈抑制作用。通过GC-MS分析表明,岗梅根和茎超临界CO<sub>2</sub>萃取物均含有较丰富的挥发性短链脂肪酸如乙酸、己酸、辛酸和戊酸等。研究表明,这些短链脂肪酸具有营养肠生理作用,是肠上皮细胞的主要能量来源<sup>[11]</sup>;辛酸是低分子量脂肪酸,具有促进P12神经细胞神经突触成长的活性<sup>[12]</sup>;戊酸能促进仓鼠卵巢细胞(CHO)的蛋白质合成和细胞增殖<sup>[13]</sup>。较高含量的短链脂肪酸很可能是岗梅根和茎超临界CO<sub>2</sub>萃取物中促进IEC-6细胞增殖的活性成分,也可能是岗梅的药效物质基础。与此同时,丹皮酚也是岗梅根和茎超临界CO<sub>2</sub>萃取物中相对含量较高的化学成分,分别占7.79%、6.00%,该化合物很可能是萃取物中的细胞毒活性物质基础。研究证明,丹皮酚能通过下调ErbB2并抑制核因子κB(NF-κB)信号通路,从而抑制胃癌细胞SGC-7901细胞增殖、诱导细胞凋亡<sup>[14]</sup>;还能通过抑制金属基质蛋白酶2(MMP-2)、MMP-9的表达水平,从而抑制胃癌细胞BGC823的增殖、迁移和侵袭<sup>[15]</sup>。据此推测,丹皮酚可能也是岗梅根和茎的药效物质基础,有待后续进一步深入研究。

综上所述,岗梅根和茎中所含低极性挥发性化学成分种类相似,其超临界CO<sub>2</sub>萃取物对IEC-6细胞增殖活

性的影响作用也相似。本研究可为扩大岗梅药用部位和充分利用其野生资源提供参考。

## 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:第45卷:第二分册[M].北京:科学出版社,1984:258.
- [2] 陈蔚文,徐鸿华.岭南道地药材研究[M].广州:广东科技出版社,2007:291.
- [3] 广东省食品药品监督管理局.广东省中药材标准:第一册[S].广州:广东科技出版社,2004:111.
- [4] YOSHIKI K, DE CZ. Antitumor agents, cytotoxic asperlic acid A and C and asperlic acid B, new p-coumaroyl triterpenes, from *Ilex asprella*[J]. *J Nat Prod*, 1993, 56(12): 2077-2082.
- [5] HU XY, SHU XC, GUO Y, et al. Effect of an *Ilex asprella* root decoction on the related genes of lipid metabolism from chronic stress and hyperlipidemic fatty liver in rats [J]. *Chin Med J: Engl*, 2012, 125(19): 3539-3542.
- [6] ZHOU M, XU M, MA XX, et al. Antiviral triterpenoid saponins from the roots of *Ilex asprella*[J]. *Planta Medica*, 2012, 78(15): 1702-1705.
- [7] WANG L, CAI Y, ZHANG XQ, et al. New triterpenoid glycosides from roots of *Ilex asprella*[J]. *Carbohydr Res*, 2012. DOI: 10.1016/j.carres.2011.12.003.
- [8] 蔡艳,张庆文,李旨君,等.岗梅根化学成分的研究[J]. *中草药*, 2010, 41(9): 1426-1429.
- [9] ZHANG ZX, FU Q, ZHENG KYZ, et al. Three new triterpene glycosides from *Ilex asprella*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2013, 15(5): 453-458.
- [10] 李敏华,俞世杰,杜上鑑.岗梅根化学成分的研究[J]. *中草药*, 1997, 28(8): 454-456.
- [11] 王璐璇,刘玥宏,朱继开,等.短链脂肪酸在疾病治疗中的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2017, 25(13): 1179-1186.
- [12] KANATA Y, SHIRAGA H, TAI A, et al. Induction of neurite outgrowth in PC12 cells by the medium-chain fatty acid octanoic acid[J]. *Neuroscience*, 2007, 146(3): 1073-1081.
- [13] LIU C, CHU I, HWANG S. Pentanoic acid, a novel protein synthesis stimulant for Chinese hamster ovary(CHO) cells[J]. *J Biosci Bioeng*, 2001, 91(1): 71-75.
- [14] FU J, YU L, LOU J, et al. Paeonol induces the apoptosis of the SGC-7901 gastric cancer cell line by downregulating ERBB2 and inhibiting the NF-κB signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(3): 1473-1483.
- [15] LYU ZK, LI CL, JIN Y, et al. Paeonol exerts potential activities to inhibit the growth, migration and invasion of human gastric cancer BGC823 cells via downregulating MMP-2 and MMP-9[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 7513-7519.

(收稿日期:2018-11-28 修回日期:2019-02-26)

(编辑:段思怡)