

花椒挥发油的提取工艺优化及抗肿瘤活性分析

韩胜男, 李妍, 张晓杭, 蒋建兰*
(天津大学化工学院, 天津 300072)

摘要: 采用水蒸气蒸馏法提取花椒中的挥发油, 以得油率为评价指标, 以料液比、冷浸时间和提取时间为考察因素, 通过星点设计-响应面法优选花椒挥发油提取工艺。结果表明: 花椒挥发油水蒸气蒸馏提取的最佳工艺条件为料液比1:12 (g/mL)、冷浸时间2.5 h、提取时间4.7 h, 得油率可达9.284%。采用MTT法检测花椒挥发油的体外抗肿瘤活性, 测得花椒挥发油对HeLa、A549、K562三种细胞的 IC_{50} 值分别为 (11.2 ± 0.2) 、 (6.26 ± 0.05) 、 (1.37 ± 0.03) mg/mL。表明花椒挥发油具有较强的体外抗肿瘤活性, 且对3种肿瘤细胞的生长均有抑制作用。

关键词: 花椒; 挥发油; 水蒸气蒸馏提取; 抗肿瘤

Extraction and Antitumor Activity of Essential Oil from *Zanthoxylum bungeanum* Seeds

HAN Sheng-nan, LI Yan, ZHANG Xiao-hang, JIANG Jian-lan*
(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Response surface methodology was used to optimize the steam distillation extraction of essential oil from *Zanthoxylum bungeanum* seeds. The yield of essential oil was investigated with respect to solid-to-solvent ratio, cold water soaking time and extraction time. The optimum extraction conditions were determined as follows: solid-to-solvent ratio 1:12 (g/mL), cold water soaking time 2.5 h and extraction time 4.7 h, leading to an extraction yield of 9.284%. MTT assay was used to detect the antitumor activity of the essential oil. Its 50% inhibition concentration (IC_{50}) for HeLa, A549 and K562 cells were (11.2 ± 0.2) , (6.26 ± 0.05) and (1.37 ± 0.03) mg/mL, respectively, suggesting potent antitumor activity *in vitro* and inhibitory effect on various cancer cells.

Key words: *Zanthoxylum bungeanum*; essential oil; steam distillation; antitumor activity

中图分类号: R284

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)18-0013-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201418003

花椒, 又称秦椒、川椒或山椒, 为芸香科花椒属植物青椒 (青花椒) (*Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc.) 或花椒 (红花椒) (*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.) 的干燥成熟果皮^[1], 原产于我国, 是一种传统的药食两用食物。花椒具有独特浓烈香气, 是一种重要的调味品, 也可作为香料香精原料^[2]; 同时, 花椒性温, 归脾、胃、肾经, 具有温中散寒、除湿、杀虫、止痛等功效^[3-5]。花椒中含有多种化学成分, 其主要成分为挥发油。现代研究表明花椒挥发油含有多种活性成分且具有抗菌、杀虫等多种药理活性^[6-8], 具有广阔的开发应用前景^[9-10]。目前, 花椒挥发油提取已有微波、超临界等多种方法的研究报道^[11-13], 关于花椒挥发油的研究多集中于成分分析以及抗菌、杀虫等药理活性研究^[14-16]。臧林泉等^[17]采用SRB方法对花椒挥发油进行抗人A549肺癌杀伤及诱导凋亡试验, 结果表明高浓度花椒挥发油对其有杀伤作用, 低浓度挥发油对其有

诱导凋亡作用。Paik等^[18]研究发现花椒挥发油可通过促进活性氧含量杀伤人HepG2肝癌细胞。尽管, 近年来研究表明花椒挥发油具有抗肿瘤活性^[17-18], 但报道尚少。本研究采用水蒸气蒸馏法进行花椒挥发油提取, 操作简单方便, 节约成本, 制得挥发油杂质含量少, 通过星点设计-响应面法对提取条件进行优化, 提高挥发油得油率, 同时采用MTT法检查挥发油对人宫颈癌HeLa细胞、人肺癌A549细胞和人红白血病K562细胞3种不同细胞的体外抗肿瘤活性, 为花椒挥发油的进一步开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

花椒购于安国市新东方药业有限责任公司, 产地陕西, 剔除枝叶和花椒籽, 50℃烘干1h, 粉碎过40目筛, 备用。

收稿日期: 2013-12-17

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81102900)

作者简介: 韩胜男 (1989—), 女, 硕士, 研究方向为中药现代化工程。E-mail: lingnanshengxue@163.com

*通信作者: 蒋建兰 (1972—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为中药现代化工程。E-mail: jljiang@tju.edu.cn

Na₂SO₄ (分析纯) 天津江天化工技术有限公司;
RPMI1640培养基、胰蛋白酶、青霉素、链霉素 美国
生命技术公司; 胎牛血清 北京鼎国生药技术有限责任
公司; 四甲基偶氮唑盐 (MTT)、二甲亚砜 (dimethyl
sulfoxide, DMSO) 美国Sigma公司; 依托泊苷 (批
号: 09090731) 江苏恒瑞医药股份有限公司; HeLa细
胞、A549细胞、K562细胞均由武警医学院生药与药剂学
教研室提供。

1.2 仪器与设备

JD100-3电子天平 沈阳龙腾电子有限公司;
NAPCO5420-1型CO₂培养箱 美国Napco公司; JJT-
900/1300型超净工作台 北京半导体设备一厂; Model
680型酶标仪 美国伯乐生命医学公司; Olympus1×70
倒置显微镜 日本Olympus公司; Adventurer万分之一电
子天平 美国Ohaus公司。

1.3 方法

1.3.1 花椒挥发油提取工艺

准确称取花椒粉末100 g, 冷水浸泡一定时间后, 转
移至2 000 mL圆底烧瓶, 加一定量水用挥发油提取器提取
一定时间。收集精油部分, 缓慢加入适量Na₂SO₄干燥, 除
去Na₂SO₄, 得挥发油称质量, 按式(1)计算得油率^[19]:

$$\text{挥发油得油率}/\% = \frac{\text{挥发油质量}/\text{g}}{\text{花椒粉末质量}/\text{g}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.2 最佳提取工艺优化

根据相关文献资料^[20-22]及预实验, 选取影响提取工
艺的主要因素料液比(A)、冷浸时间(B)、提取时间
(C)作为考察因素, 以花椒挥发油得油率为响应值, 进
行星点设计-响应面法。因素与水平见表1。

表1 响应面因素与水平
Table 1 Factors and levels used in response surface analysis

因素	水平				
	-1.68	-1	0	1	1.68
A料液比(g/mL)	1:8.64	1:10	1:12	1:14	1:15.4
B冷浸时间/h	0.32	1	2	3	3.68
C提取时间/h	2.32	3	4	5	5.68

1.3.3 花椒挥发油体外抗肿瘤活性测定

1.3.3.1 样品制备及细胞培养

取最佳提取工艺条件下制备的花椒挥发油适量, 加
入DMSO溶解, 用RPMI1640无血清培养液稀释成250、
25、2.5、0.25、0.025 mg/mL; HeLa细胞、A549细胞、
K562细胞细胞株分别培养于RPMI1640培养基中, 内含体
积分数10%的胎牛血清、100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉
素, 置37℃、5% CO₂培养箱中常规培养。

1.3.3.2 MTT法检测抗肿瘤活性

采用MTT法, 检测花椒挥发油分别对人宫颈癌HeLa

细胞、A549肺癌细胞、白血病K562细胞3种癌细胞的
生长抑制作用^[23]。取对数生长期的各细胞分别接种于96
孔板中, 调整细胞密度为4×10⁴个/mL, 每孔100 μL,
37℃、5% CO₂培养箱内培养24 h后给药。药物处理组每
孔加入不同质量浓度的花椒挥发油溶液100 μL, 使终质
量浓度分别为125、12.5、1.25、0.125、0.0125 mg/mL,
另设阳性对照组(加入不同浓度的依托泊苷100 μL)、
阴性对照组(加入溶剂100 μL)和空白对照组(加入
培养基100 μL)。每组均设4个复孔。培养48 h后弃去
培养液每孔加入MTT溶液(1 mg/mL) 50 μL, 37℃培
养4 h, 离心弃去上清液, 每孔加入150 μL DMSO, 轻
度振荡10 min。酶标仪测定490 nm波长处各孔光密度
(optical density, OD)值, 计算药物对细胞的生长抑制
率, 计算公式为:

$$\text{抑制率}/\% = \frac{\text{阴性对照组OD值} - \text{实验组OD值}}{\text{阴性对照组OD值} - \text{空白组OD值}} \times 100 \quad (2)$$

样品平行制备2份, 每份样品重复实验3次。依据待
测药物不同剂量下的细胞抑制率, 用GraphPad软件计算
药物半数抑制质量浓度(IC₅₀)值。

2 结果与分析

2.1 花椒挥发油提取工艺优化

2.1.1 数学回归模型的建立及方差分析

表2 响应面因素设计与结果
Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	A	B	C	得油率/%
1	1	-1	-1	6.452
2	1	-1	1	7.205
3	0	0	0	8.828
4	-1	1	1	8.286
5	1.68	0	0	7.917
6	0	0	-1.68	7.551
7	-1	-1	1	7.577
8	0	0	0	9.785
9	0	1.68	0	8.702
10	0	0	1.68	8.881
11	0	0	0	9.108
12	0	0	0	8.702
13	1	1	-1	7.445
14	0	-1.68	0	8.020
15	0	0	0	7.706
16	-1	-1	-1	5.501
17	-1.68	0	0	8.033
18	-1	1	-1	6.134
19	1	1	1	8.488
20	0	0	0	8.901

响应面因素设计与结果见表2。利用Design-
Expert 8.0.5b软件对试验结果进行回归分析, 得到花椒挥

发油得油率与料液比、冷浸时间、提取时间3个因素之间的编码值回归模型: 得油率 $Y=8.871+0.139A+0.349B+0.605C+0.117AB-0.304AC+0.0458BC-0.518A^2-0.382B^2-0.433C^2$ 。

表3 回归模型方差分析结果
Table 3 ANOVA results for the fitted regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	15.05	9	1.67	7.32	0.010 5
A	0.26	1	0.26	0.41	0.537 0
B	1.66	1	1.66	2.58	0.139 4
C	5.00	1	5.00	7.75	0.019 3
AB	0.11	1	0.11	0.17	0.689 5
AC	0.74	1	0.74	5.56	0.022 0
BC	0.017	1	0.017	0.026	0.875 2
A ²	3.87	1	3.87	6.00	0.034 3
B ²	2.10	1	2.10	3.25	0.101 4
C ²	2.70	1	2.70	4.19	0.067 9
残差	6.45	10	0.64		
失拟项	4.17	5	0.83	1.84	0.260 6
纯误差	2.27	5	0.45		
总和	21.50	19			

对拟合的方程进行方差分析, 结果见表3。由表3可知, 模型 $P=0.010\ 5<0.05$, 表明回归模型显著; 失拟项 $P=0.260\ 6>0.05$, 差异不显著, 说明未知因素对试验结果干扰小, 残差均由随机误差引起; 回归方程的相关系数 $R^2=0.800\ 2$, 说明模型拟合程度良好。因素C、交互项AC及二次项A²对花椒挥发油得油率有显著影响($P<0.05$), 其余项不显著, 表明各因素对挥发油得油率的影响不是简单的线性关系。

2.1.2 工艺条件优化及预测

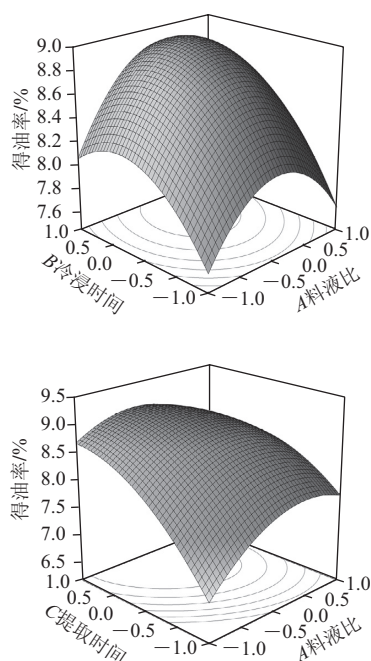


图1 料液比、冷浸时间和提取时间对挥发油得油率的响应面图

Fig.1 Response surface plots showing the effects of solid to liquid ratio, soaking time and extraction time on the yield of essential oil

根据回归模型方程, 将料液比(A)、冷浸时间(B)、提取时间(C)对花椒挥发油得油率的影响绘制成响应面图(图1)。由图1可知, 提取时间对挥发油得油率影响最显著, 表现为曲线最陡, 料液比次之, 冷浸时间的影响最小。根据回归方程及响应面, 得到最佳提取条件: 料液比1:11.95(g/mL)、冷浸时间2.5 h、提取时间4.74 h。考虑到实际操作方便性, 将最佳提取条件修正为料液比1:12(g/mL)、冷浸时间2.5 h、提取时间4.7 h。在此条件下, 平行提取花椒挥发油3次, 得到的实际得油率为9.284%, 与理论预测值9.178%接近, 说明该回归方程能较真实地反映各因素对花椒挥发油得油率的影响, 可用于花椒挥发油提取工艺的优化。

2.2 花椒挥发油体外抗肿瘤活性

花椒挥发油对HeLa细胞、A549细胞和K562细胞的生长均表现出一定的抑制作用。花椒挥发油及阳性对照组对各细胞的IC₅₀值计算结果见表4。本实验采用依托泊苷为阳性对照组, 依托泊苷是常用的抗肿瘤药物, 现已广泛应用于癌症的化疗方案。由表4可知, 花椒挥发油对K562细胞生长抑制作用较强, 对HeLa细胞生长抑制作用相对较弱。与阳性对照组对比可知, 花椒挥发油对A549细胞和K562细胞的IC₅₀值偏小、对HeLa细胞的IC₅₀值偏大, 表明其对A549细胞和K562细胞的抑制作用略优于阳性对照药物, 对HeLa细胞的抑制作用则偏差。总体说明, 花椒挥发油具有良好的抗肿瘤作用, 且对多种不同肿瘤细胞均有抑制作用。

表4 花椒挥发油对肿瘤细胞的IC₅₀值($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 4 IC₅₀ of the essential oil for three cancer cell lines ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

细胞系	花椒挥发油IC ₅₀ /(mg/mL)	阳性对照组IC ₅₀ /(mg/mL)
HeLa	11.2±0.2	4.39±0.03
A549	6.26±0.05	9.02±0.05
K562	1.37±0.03	4.79±0.06

3 结论

影响花椒挥发油提取的因素主要有料液比、冷浸时间、提取时间, 通过采用星点设计-响应面法对花椒挥发

油水蒸气提取的工艺条件进行优化,建立了花椒挥发油得油率与料液比、冷浸时间、提取时间之间关系的二次多项式回归方程,该模型准确有效,确定了提取花椒挥发油的最佳工艺条件,即料液比1:12(g/mL)、冷浸时间2.5 h、提取时间4.7 h,得油率可达9.284%。在体外抗肿瘤活性实验中,采用MTT法检测了花椒挥发油对HeLa细胞、A549细胞和K562细胞的生长抑制活性,结果表明花椒挥发油对这3种肿瘤细胞的生长均表现出一定的抑制作用,通过与阳性对照药物进行对比,表明花椒挥发油具有良好的体外抗肿瘤作用。本研究为花椒的深入开发利用提供了参考,其抗肿瘤活性成分及作用机制还需进一步探讨。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 149.
- [2] 张卫明, 肖正春. 中国辛香料植物资源开发利用[M]. 南京: 东南大学出版社, 2007: 640.
- [3] 汤喜兰, 徐国良, 李冰涛, 等. 花椒水提取物给药大鼠尿液代谢组学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 127-130.
- [4] 张明发, 沈雅琴. 花椒“温中止痛”药理研究[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(8): 493-497.
- [5] 张明发, 沈雅琴. 花椒温经止痛和温中止泻药理研究[J]. 中药材, 1994, 17(2): 37-40.
- [6] 干信, 吴士筠, 高雯琪. 花椒挥发油抑菌作用研究[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 128-130.
- [7] 王朝晖. 花椒挥发油镇痛作用的实验研究[J]. 中国药房, 2011, 22(3): 218-219.
- [8] 聂霄艳, 邓永学, 王进军, 等. 花椒精油和麻素对赤拟谷盗成虫的控制作用[J]. 中国调味品, 2012, 37(3): 6-10.
- [9] 赵秀玲. 花椒的化学成分、药理作用及其资源开发的研究进展[J]. 中国调味品, 2012, 37(3): 1-5.
- [10] 邵红军, 程俊侠, 段玉峰. 花椒挥发油化学成分、生物活性及加工利用研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(13): 319-322.
- [11] 罗凯, 朱琳, 阚建全. 水蒸气蒸馏、溶剂萃取、同时蒸馏萃取法提取花椒挥发油的效果比较[J]. 食品科技, 2012, 37(10): 234-240.
- [12] 邹小兵, 陶进转, 夏之宁, 等. 微波提取对挥发油化学成分的影响[J]. 分析化学, 2011, 39(1): 142-145.
- [13] 霍文兰. 超临界CO₂萃取花椒挥发油的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 153-156.
- [14] 乐薇, 吴世筠, 高欣. 大红袍花椒挥发油的提取及化学成分的GC-MS分析[J]. 食品科学, 2014, 35(2): 261-265.
- [15] 唐裕芳, 唐小辉, 张妙玲, 等. 花椒挥发油化学组成及抗菌活性研究[J]. 湘潭大学自然科学学报, 2013, 35(2): 64-69.
- [16] 王步江, 李宁. 花椒精油的制备及其对米象生物活性的影响[J]. 天津农学院学报, 2010, 17(3): 17-20.
- [17] 臧林泉, 胡枫, 韦敏. 花椒挥发油抗肿瘤药理作用研究[J]. 蛇志, 2006, 18(3): 183-186.
- [18] PAIK S, KOH K, BEAK S, et al. The essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* pericarp induce apoptosis of HepG2 human hepatoma cells through increased production of reactive oxygen species[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2005, 28(5): 802-807.
- [19] 赵志峰, 覃哲, 雷绍荣. 三种花椒精油的提取研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(12): 143-147.
- [20] 崔红花, 赵英日, 沈志滨, 等. 花椒挥发油的多指标均匀试验数据的提取优化工艺研究[J]. 中成药, 2010, 32(7): 1132-1136.
- [21] 石雪萍, 张宇思, 张卫明. 水溶性花椒生物碱及精油同时提取工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(10): 74-76.
- [22] 石雪萍, 张卫明. 花椒挥发油的超临界CO₂萃取法与水蒸气蒸馏法提取的比较[J]. 中国野生植物资源, 2009, 28(6): 46-51.
- [23] JIANG Jianlan, SU Xin, ZHANG Huan, et al. A novel approach to active compounds identification based on support vector regression model and mean impact value[J]. Chemical Biology and Drug Design, 2013, 81(5): 650-657.