

川芎茎叶中一个新的脂肪酸单甘油酯

闫洪玲¹, 陈瑶¹, 唐飞¹, 冯健², 郭晨婉¹, 胡昌江², 鲁军^{1*}, 谭玉柱^{1*}

(1. 西南特色中药资源国家重点实验室, 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137; 2. 国家中医药管理局“中药配方颗粒质量与疗效评”重点研究室, 四川新绿色药业科技发展有限公司, 四川 彭州 611930)

摘要: 利用 MCI、硅胶、Sephadex LH-20 及半制备高效液相等多种色谱技术, 从川芎茎叶石油醚部位分离得到 2 个脂肪酸单甘油酯。经 1D NMR、2D NMR、HR-ESI-MS 和旋光数据解析确定结构, 其中 1 个为新化合物, 命名为 14,15-dehydrocrepenynic acid monoglyceride (**1**), 另 1 个为已知化合物 (*R*)- α -(7'Z,10'Z,13'Z)-hexadecatrienoic acid monoglyceride (**2**), 二者均为首次从川芎中分离得到。体外抗肿瘤活性结果显示, 化合物 **1** 和 **2** 对 MCF-7 增殖有一定抑制作用, IC₅₀ 分别为 30.75 和 36.82 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

关键词: 川芎; 茎叶; 脂肪酸单甘油酯; 结构鉴定; 抗肿瘤活性

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)09-2573-04

A novel fatty acid monoglyceride from the stem and leaves of *Ligusticum chuanxiong* Hort.

YAN Hong-ling¹, CHEN Yao¹, TANG Fei¹, FENG Jian², GUO Chen-wan¹, HU Chang-jiang², LU Jun^{1*}, TAN Yu-zhu^{1*}

(1. Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Key Laboratory of Quality Control and Efficacy Evaluation of Traditional Chinese Medicine Formula Granules, Sichuan New Green Medicine Science and Technology Development Co., Ltd., Pengzhou 611930, China)

Abstract: Two fatty acid monoglycerides were isolated from the petroleum ether fraction of the stem and leaves of *Ligusticum chuanxiong* by using MCI column, silica gel column, Sephadex LH-20 column and semi-preparative HPLC. Their structures were elucidated by 1D-NMR, 2D-NMR, HR-ESI-MS and optical rotation data. One of them is a new compound, named 14,15-dehydrocrepenynic acid monoglyceride (**1**), the other was a known compound (*R*)- α -(7'Z,10'Z,13'Z)-hexadecatrienoic acid monoglyceride (**2**), both of which were isolated from *Ligusticum chuanxiong* for the first time. The results of *in vitro* antitumor activity assay showed that compounds **1** and **2** could inhibit the proliferation of MCF-7 with IC₅₀ values of 30.75 and 36.82 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

Key words: *Ligusticum chuanxiong*; stem and leaves; fatty acid monoglyceride; structure identification; anti-tumor activity

收稿日期: 2021-03-17; 修回日期: 2021-04-12.

基金项目: 成都中医药大学杏林学者学科人才科研提升计划 (QNXZ2018009); 四川省杰出青年科技人才计划 (2021JD-JQ0040).

*通讯作者 Tel: 86-28-61800231,

E-mail: tanyuzhu@cdutcm.edu.cn; ljaa111@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0377

川芎 (*Ligusticum chuanxiong* Hort.) 为伞形科多年生草本植物^[1], 其药用部位是根茎, 具有活血行气、祛风止痛的功效^[2], 主要化学成分为苯酞和生物碱^[3,4]。川芎为临床常用品种, 临床需求量大, 而采收加工时占全株鲜重 75% 以上的茎叶作为非药用部位丢弃, 造成了严重的资源浪费^[5]。川芎茎叶古称藜莖, 应用古已

有之,《神农本草经》记载“主咳逆,定惊气,辟邪恶,除蛊毒、鬼瘴,去三虫,久服通神”^[6]。现代研究表明,川芎茎叶中的苯酚类成分含量与根茎接近,占挥发油总量的39.95%,有一定的药用开发价值^[7]。为实现川芎资源的综合开发利用,本课题组近年来对川芎茎叶中的化学成分进行了系统研究,从中分离得到多个结构新颖的苯酚类成分^[8,9]。本文报道从川芎茎叶中又分离得到的2个脂肪酸单甘油酯。其中化合物**1**为新化合物,命名为14,15-dehydrocrepenynic acid monoglyceride,另1个为已知化合物(*R*)- α -(7'Z,10'Z,13'Z)-hexadecatrienoic acid monoglyceride (**2**) (图1)。两个化合物均为首次从川芎中分离得到。对化合物**1**、**2**进行肿瘤细胞毒活性测试,发现其对人乳腺癌细胞MCF-7增殖有一定的抑制作用,其IC₅₀分别为30.75和36.82 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

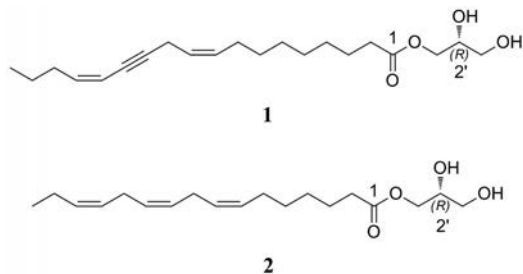


Figure 1 Structures of compounds **1** and **2**

结果与讨论

1 结构鉴定

14,15-dehydrocrepenynic acid monoglyceride (1) 黄色油状液体, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -22.9$ (c 0.12, MeOH)。HR-ESI-MS推断其分子式为C₂₁H₃₄O₄ (m/z 351.252 4 [M+H]⁺), 不饱和度为5。¹H NMR谱中显示1个端甲基 [δ_{H} 0.92 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-18)], 6个与sp³杂化碳原子相连的CH₂ [δ_{H} 1.62 (2H, m, H-3), δ_{H} 1.42 (2H, m, H-17), δ_{H} 1.31 (8H, overlap, H-4, 5, 6, 7)], 3个与sp²杂化碳原子相连的CH₂ [δ_{H} 2.34 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2), δ_{H} 2.25 (2H, qd, $J = 7.4, 1.5$ Hz, H-16), δ_{H} 2.05 (2H, m, H-8)], 1个与sp杂化碳原子相连的CH₂ [δ_{H} 3.08 (2H, m, H-11)], 4个烯烃质子 [δ_{H} 5.45 (2H, overlap, H-9, H-10), δ_{H} 5.43 (1H, m, H-14), δ_{H} 5.82 (1H, dt, $J = 10.7, 7.4$ Hz, H-15)] 和5个与氧相连的烷基质子 [δ_{H} 4.20 (dd, $J = 11.7, 4.6$ Hz, H-1'a), δ_{H} 4.14 (dd, $J = 11.7, 6.2$ Hz, H-1'b), δ_{H} 3.93 (m, H-2'), δ_{H} 3.69 (dd, $J = 11.5, 3.9$ Hz, H-3'a), δ_{H} 3.59 (dd, $J = 11.4, 5.8$ Hz, H-3'b)] (表1)。¹³C NMR显示21个碳信号, 其中有1个酯羰基信号 (δ_{C} 174.6), 结合DEPT显示1个甲基 (δ_{C} 14.0)、12个亚甲基 (δ_{C} 65.4, 63.6, 34.4, 32.3, 29.5, 29.3, 29.3, 29.3, 27.3, 25.1, 22.4, 18.2)、5个

Table 1 NMR data of compound **1** (600 MHz for ¹H NMR, 151 MHz for ¹³C NMR, CDCl₃, J in Hz)

No.	δ_{H}	δ_{C}	HMBC (H→C)
1		174.6	
2	2.34 (t, 7.5)	34.4	1, 3, 4
3	1.62 (m)	25.1	1, 2, 4, 5
4	1.31 (overlap)	29.3	2, 3, 5, 6
5	1.31 (overlap)	29.3	3, 4, 6, 7
6	1.31 (overlap)	29.3	4, 5, 7, 8
7	1.31 (overlap)	29.5	5, 6, 8, 9
8	2.05 (m)	27.3	6, 7, 9, 10
9	5.45 (overlap)	131.9	8
10	5.45 (overlap)	124.6	11
11	3.08 (m)	18.2	9, 10, 12, 13
12		92.6	
13		77.4	
14	5.43 (m)	109.5	
15	5.82 (dt, 10.7, 7.4)	143.0	13, 14, 16, 17
16	2.25 (qd, 7.4, 1.5)	32.3	14, 15, 17, 18
17	1.42 (m)	22.4	15, 16, 18
18	0.92 (t, 7.4)	14.0	16, 17
1'	4.20 (dd, 11.7, 4.6, a)	65.4	1, 2', 3'
	4.14 (dd, 11.7, 6.2, b)		
2'	3.93 (m)	70.5	
3'	3.69 (dd, 11.5, 3.9)	63.6	1', 2'
	3.59, dd (11.4, 5.8)		

次甲基 (δ_{C} 143.0, 131.9, 124.6, 109.5, 70.5) 和2个季碳 (δ_{C} 92.6, 77.4), 推测此化合物为不饱和脂肪酸酯。¹H-¹H COSY (图2) 的相关信号提示C-2-C-3-C-4-C-5-C-6-C-7-C-8-C-9和C-14-C-15-C-16-C-17-C-18的碳链连接顺序。HMBC显示H-14 (δ_{H} 5.43) 与C-12 (δ_{C} 92.6)、C-16 (δ_{C} 32.3) 相关, H-15 (δ_{H} 5.82) 与C-13 (δ_{C} 77.4)、C-14 (δ_{C} 109.5)、C-16 (δ_{C} 32.3)、C-17 (δ_{C} 22.4) 相关, 提示C≡C-CH=CH-CH₂-CH₃的结构片段; H-11 (δ_{H} 3.08) 与C-9 (δ_{C} 131.9)、C-10 (δ_{C} 124.6)、C-12 (δ_{C} 92.6)、C-13 (δ_{C} 77.4) 相关, 提示C≡C-CH₂-CH=CH-的结构片段; H-1' (δ_{H} 4.20, δ_{H} 4.14) 与C-1 (δ_{C} 174.6) 相关, H-3' (δ_{H} 3.69, δ_{H} 3.59) 与C-1' (δ_{C} 65.4)、C-2' (δ_{C} 70.5) 相关, 提示单甘油酯的结构片段。将该化合物的波谱数据与14,15-dehydrocrepenynic acid^[10,11]比较, 发现其结构与后者相似, 区别在于多了一组典型的甘油酯信号, 包括1个与酰氧基相连的CH₂ (δ_{H} 4.20, dd, $J = 11.7, 4.6$ Hz; δ_{H} 4.14, dd, $J = 11.7, 6.2$ Hz; δ_{C} 65.4)、1个与羟基相连的CH (δ_{H} 3.59, dd, $J = 11.4, 5.8$ Hz; δ_{C} 70.5) 和1个与羟基相连的CH₂ (δ_{H} 3.93, m; δ_{H} 3.69, dd, $J = 11.5, 3.9$ Hz; δ_{C} 63.6)。综上, 推测此化合物为14,15-dehydrocrepenynic acid的单甘油酯化合物。C-14-C-15的相对构型通过耦合常数确定, H-15 (1H, dt, $J = 10.7, 7.4$ Hz) 的氢信号提示其为Z构型。H-9和H-10的氢信号重叠, 无法使用耦合常数确定C-9-C-10的双键构型。有文献报道, 使用¹³C NMR的化学位移来确定共轭亚

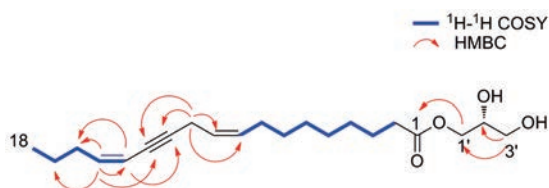


Figure 2 Key ^1H - ^1H COSY (—) and HMBC (H \rightarrow C) correlations for compound **1**

油酸的构型, 与 C-9 烯烃相连亚甲基的化学位移为 δ 27.46 或 δ 32.86, 提示 C-9 烯烃为 *Z* 构型或 *E* 构型^[12,13]。化合物 **1** 中 C-8 化学位移为 δ 27.3, 提示 C-9-C-10 为 *Z* 构型。由于化合物量的限制, 采用旋光值比较的方法代替 Mosher 反应确定化合物的绝对构型。其比旋光值与类似物化合物 **2** 接近 ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} -22.6$ (c 0.11, MeOH)), 手性应与其一致, 确定 C-2' 为 *R* 构型。

2 抑制肿瘤细胞增殖活性

采用 MTT 法测定两个化合物对人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y)、鼠乳腺癌细胞 (MDA-MB-231)、人乳腺癌细胞 (MCF-7) 和人结肠癌细胞 (HCT116) 的体外抗肿瘤活性, 结果见表 2。结果显示 14,15-dehydrocrepenynic acid monoglyceride (**1**) 和 (*R*)- α -(7'*Z*,10'*Z*,13'*Z*)-hexadecatrienoic acid monoglyceride (**2**) 对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖具有一定的抑制作用, 其 IC_{50} 分别为 30.75 和 36.82 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Table 2 The IC_{50} of compounds **1-2** for cytotoxicity on MDA-MB-231, SH-SY5Y, HCT116 and MCF-7

Compound	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$			
	MDA-MB-231	SH-SY5Y	HCT116	MCF-7
1	61.07 \pm 0.146	82.39 \pm 0.276	42.15 \pm 0.168	30.75 \pm 0.301
2	93.52 \pm 0.177	> 100	75.57 \pm 0.173	36.82 \pm 0.221

实验部分

Bruker Avance III 600-NMR spectrometer (德国 Bruker 公司); LTQ Orbitray Velos Pro 质谱仪 (高分辨静电场轨道阱质谱) 和 Ultimate 3000 超高效液相色谱仪 (美国 Thermo Fisher 公司); LC50 型中高压制备液相 (赛谱锐思北京科技有限公司); COSMOS 色谱柱 (10 mm \times 250 mm, 5 μm); RE-52A 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); 优普 UPT 系列超纯水 (成都优普电子产品有限公司); 可调式移液器 (美国 Thermo Fisher 公司); 细胞培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); 多功能酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司)。C₁₈ 色谱硅胶 (日本富士硅化学株式会社); Sephadex LH-20 色谱填料 (瑞士 Pharmacia 公司); MCI 树脂 (日本三菱化学公司); 硅胶 GF₂₅₄ 薄层板、200~300 目正相柱色谱硅胶

(青岛海洋化工厂); 色谱纯甲醇 (美国 TEDIA 公司); 氘代氯仿 (美国 CIL 公司); 其他试剂为分析纯 (成都市科隆化学品有限公司); DMEM 高糖培养基、培养皿、96 孔板 (美国康宁公司); 胎牛血清 (北京全式金生物技术有限公司); 胰蛋白酶、四甲基偶氮唑盐 (德国 Biofroxx 公司)。

人结肠癌细胞 (HCT116)、人神经母瘤细胞 (SH-SY5Y)、人乳腺癌细胞 (MCF-7)、鼠乳腺癌细胞 (MDA-MB-231) 均购自中国科学院上海细胞研究所。

川芎茎叶采自四川眉山, 经胡昌江教授鉴定为川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的茎叶, 样品标本 (CX-1804) 现存于成都中医药大学中药化学 1001 研究室。

1 提取分离

自然阴干的川芎茎叶 (20 kg), 粗粉碎, 加 10 倍量 95% 乙醇渗漉提取, 提取液减压浓缩得到浸膏 3 kg。浸膏加温水分散, 石油醚萃取 5 或 6 次, 合并萃取液, 减压回收溶剂后得石油醚部位 0.5 kg。取石油醚部位 0.5 kg, 经 MCI 柱色谱, 90% 甲醇等度洗脱, 除去色素, 其浓缩液经硅胶柱色谱, 石油醚-乙酸乙酯 (99:1~1:99) 梯度洗脱, 得到 7 个组分 A~G。G 组分再经硅胶柱色谱, 石油醚-丙酮 (98:2~1:99) 梯度洗脱, 得到 G1~G4 共 4 个组分。G2 经 Sephadex LH-20 凝胶柱, 二氯甲烷-甲醇 (2:3) 等度洗脱, 得到 G2.1~G2.3 共 3 个组分。G2.2 经反相 C₁₈ 柱色谱以甲醇-水 (66:34) 等度洗脱, 得到化合物 **1** (5.9 mg) 和化合物 **2** (10.4 mg)。

2 结构鉴定

化合物 1 黄色油状液体。 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -22.9$ (c 0.12, MeOH)。IR/cm⁻¹: 3 707, 3 662, 2 970, 2 870, 1 701, 1 054, 1 004; (-)HR-ESI-MS m/z 349.236 9 [M-H]⁻ (Calcd. for C₂₄H₃₃O₄⁻, 349.238 4); (+)HR-ESI-MS m/z 351.252 4 [M+H]⁺ (Calcd. for C₂₄H₃₅O₄⁺, 351.253 0)。¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据见表 1。

化合物 2 黄色油状液体。 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -22.6$ (c 0.11, MeOH)。HR-ESI-MS m/z 325.2 [M+H]⁺。¹H NMR (600 MHz CDCl₃) δ 5.37 (6H, overlap, H-7, 8, 10, 11, 13, 14), 4.21 (1H, dd, J = 11.7, 4.5 Hz, H-1'a), 4.15 (1H, dd, J = 11.6, 6.2 Hz, H-1'b), 3.93 (1H, tt, J = 6.0, 4.2 Hz, H-2'), 3.69 (1H, dd, J = 11.5, 5.8 Hz, H-3'a), 3.60 (1H, dd, J = 11.5, 5.8 Hz, H-3'b), 2.81 (4H, dt, J = 6.7, 4.4 Hz, H-9, H-12), 2.36 (2H, t, J = 7.6 Hz, H-2), 2.08 (4H, overlap, H-6, H-15), 1.36 (4H, overlap, H-4, H-5), 0.98 (3H, t, J = 7.5 Hz, H-16); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 174.5 (C-1), 132.3 (C-14), 130.1 (C-7), 128.6 (C-10), 128.4 (C-11), 128.3 (C-13), 127.3 (C-8), 70.5 (C-2'), 65.4 (C-1'), 63.6 (C-3'), 34.3 (C-2), 29.5 (C-5), 29.0 (C-4), 27.3 (C-

6), 25.9 (C-9), 25.8 (C-12), 25.1 (C-3), 20.8 (C-15), 14.5 (C-16)。以上波谱数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 **2** 为 (*R*)- α -(7'Z, 10'Z, 13'Z)-hexadecatrienoic acid monoglyceride。

3 体外抑制肿瘤细胞增殖活性

采用MTT法进行肿瘤细胞增殖抑制活性测定, 分别将人神经母瘤细胞 (SH-SY5Y)、鼠乳腺癌细胞 (MDA-MB-231)、人乳腺癌细胞 (MCF-7) 和人结肠癌细胞 (HCT116) 培养于含 10% 胎牛血清的细胞培养液中, 取对数生长期细胞以每毫升 2.5×10^4 个细胞将细胞悬浮液接种到 96 孔板中, 每孔 100 μL , 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 1 或 2 天, 使细胞稳定。分别加入不同浓度受试化合物 (3.125、6.25、12.5、25、50 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 于 96 孔板中, 并设阴性对照组, 继续培养 48 h。每孔加入 MTT (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 20 μL , 继续置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中避光孵育, 2 h 后加入 DMSO 溶液 80 μL , 置摇床上振荡直至 MTT 反应的产物甲瓞结晶全部溶解。使用多功能酶标仪于 570 nm 波长下测定吸光度 OD 值。将 OD 值带入公式计算细胞抑制率和 IC_{50} 。实验重复 3 次。抑制率的计算公式为:

$$\text{细胞抑制率} = [(\text{阴性对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}) / \text{阴性对照组 OD 值}] \times 100\%$$

作者贡献: 闫洪玲是本文的第一作者, 负责成分分离、结构鉴定和论文撰写; 陈瑶测定了两个化合物的体外抗肿瘤活性; 唐飞、郭晨婉协助提取分离工作; 冯健与胡昌江负责药材的采收、粉碎及鉴定, 并提供试验所需试剂耗材; 谭玉柱与鲁军是本文的通讯作者, 设计和组织了整个研究。

利益冲突: 所有作者声明不存在任何利益冲突。

References

- [1] Han W. Advances in chemical constituents and pharmacological effects of *Ligusticum chuanxiong* [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2017, 19: 1341-1349.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- [3] Chen Z, Zhang C, Gao F, et al. A systematic review on the Rhizome of *Ligusticum chuanxiong* Hort. (Chuanxiong) [J]. Food Chem Toxicol, 2018, 119: 309-325.
- [4] Yuan X, Han B, Feng ZM, et al. Three butylphthalide derivatives from the Rhizome of *Ligusticum chuanxiong* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 2674-2678.
- [5] Chen SL, Jiang GH. Security and pharmacological effects for overground parts of Chuanxiong [J]. J Chengdu Univ Tradit Chin Med (成都中医药大学学报), 2009, 32: 63-65.
- [6] (Wei) Wu P, (Qing) Sun XY, Feng XJ, Ed. Shen Nong Ben Cao Jing (神农本草经) [M]. Beijing: Scientific and Technical Documentation Press, 1996: 23.
- [7] Liu JR, Liu SY, Liu HM, et al. Comparison on volatile oil content and chemical constituents among different parts of *Ligusticum chuanxiong* and pieces with different processing methods [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2020, 26: 101-107.
- [8] Tang F, Tan YZ, Ao H, et al. Discovery of phthalides with vasodilating activity in stems and leaves of *Ligusticum chuanxiong* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51: 1190-1195.
- [9] Tang F, Yan YM, Yan HL, et al. Chuanxiongdilolides R4 and R5, phthalide dimers with a complex polycyclic skeleton from the aerial parts of *Ligusticum chuanxiong* and their vasodilator activity [J]. Bioorg Chem, 2021, 107: 104523.
- [10] Mittermeier VK, Dunkel A, Hofmann T. Discovery of taste modulating octadecadien-12-ynoic acids in golden chanterelles (*Cantharellus cibarius*) [J]. Food Chem, 2018, 269: 53-62.
- [11] Jiang MY, Wang F, Dong ZJ, et al. A new hydroxyl acetylenic fatty acid from the basidiomycete *Craterellus aureus* (Cantharellaceae) [J]. Plant Divers (植物分类与资源学报), 2008, 30: 614-616.
- [12] Jie MS, Pasha MK, Alam MS. Synthesis and nuclear magnetic resonance properties of all geometrical isomers of conjugated linoleic acids [J]. Lipids, 1997, 32: 1041-1044.
- [13] Davis AL, McNeill GP, Caswell DC. Analysis of conjugated linoleic acid isomers by ^{13}C NMR spectroscopy [J]. Chem Phys Lipids, 1997, 97: 155-165.
- [14] Ogihara T, Amano N, Mitsui Y, et al. Determination of the absolute configuration of a monoglyceride antitumor compound and isolation of related compounds from radish leaves (*Raphanus sativus*) [J]. J Nat Prod, 2017, 80: 872-878.