

蓬莪术中一个新的榄香烷型倍半萜苷

李承哲^{1,2}, 彭成¹, 李小翠^{1,2}, 刘娟^{1,2}, 周勤梅^{1,2,3}, 蒙春旺^{1,2},
刘菲^{1,2*}, 熊亮^{1,2*}

(1. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137; 2. 成都中医药大学西南特色药材创新药物成分研究所, 四川 成都 611137; 3. 成都中医药大学中医药创新研究院, 四川 成都 611137)

摘要: 为研究蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* 根茎中化学成分及其生物活性, 采用硅胶柱色谱、反相中压液相色谱、制备薄层色谱及半制备高效液相色谱等技术进行分离纯化, 运用现代波谱学手段鉴定化合物的结构。同时采用 MTT 法测定了化合物对 HUVECs 细胞增殖的影响。从蓬莪术根茎 95% 乙醇提取物的正丁醇萃取部位分离得到 1 个新的榄香烷型倍半萜苷, 鉴定为 (1Z)-2-羟基-莪术酮 2-O-β-D-葡萄糖苷, 该化合物对 HUVECs 细胞增殖无明显抑制作用。

关键词: 蓬莪术; 倍半萜苷; 榄香烷型; 分离鉴定

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)03-0736-04

A new elemene-type sesquiterpenoid glycoside from *Curcuma phaeocaulis*

LI Cheng-zhe^{1,2}, PENG Cheng¹, LI Xiao-cui^{1,2}, LIU Juan^{1,2}, ZHOU Qin-mei^{1,2,3},
MENG Chun-wang^{1,2}, LIU Fei^{1,2*}, XIONG Liang^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Institute of Innovative Medicine Ingredients of Southwest Specialty Medicinal Materials, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 3. Innovative Institute of Chinese Medicine and Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

Abstract: To study the chemical constituents and their biological activities in the rhizomes of *Curcuma phaeocaulis*, silica gel column chromatography, reverse medium pressure liquid chromatography, preparative thin layer chromatography, and semi-preparative high performance liquid chromatography were used for isolation and purification and modern spectroscopic methods were used to determine the structure of the isolated compound. Moreover, the effect of the compound on the proliferation of HUVECs was determined by the MTT assay. A new elemene-type sesquiterpenoid glycoside was isolated from the *n*-butanol soluble fraction of 95% ethanolic extract of the rhizomes of *Curcuma phaeocaulis*. Its structure was identified as (1Z)-2-hydroxy-curzerenone 2-O-β-D-glucoside. It showed no inhibitory effect on the proliferation of HUVECs.

Key words: *Curcuma phaeocaulis*; sesquiterpenoid glycoside; elemene-type; isolation and identification

收稿日期: 2022-09-23; 修回日期: 2022-10-19.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81903777, 82104371); 国家自然科学基金优秀青年基金项目 (82022072); 国家中医药多学科交叉创新团队项目 (ZYXCXTD-D-202209).

*通讯作者 Tel: 18687517547, E-mail: feifeifly555@126.com;

Tel: 86-28-61800231, E-mail: xiling@cdutcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1076

莪术为姜科植物蓬莪术 *Curcuma phaecocaulis* Val.、广西莪术 *C. kwangsiensis* S. G. Lexe et C. F. Liang 或温郁金 *C. wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥根茎。性温味辛, 具有破血行气、消积止痛的功效^[1]。其始载于《药性论》, 谓曰“治女子血气心痛, 破瘀癖冷气”;《本草经疏》曰“莪术主积聚诸气, 为最要之药”, 故莪术素有“破血消癥”要药的美称。现代研究表明莪术成分类型主要为姜黄素类与萜类^[2-6], 具有抗肿瘤、抗炎、抗菌、镇痛、抗血栓等作用^[7-13]。目前对莪术功效物质基础研究多集中于提取物、姜黄素类化合物及莪术二酮等大量的萜类成分, 莪术萜类单体成分的相关研究明显不足^[14-16]。因此, 为进一步阐明莪术传统功效的药效物质, 本课题在前期研究基础上进一步对莪术萜类成分进行了研究。前期探索发现, 蓬莪术乙醇提取物的正丁醇部位对 HUVECs 细胞增殖具有一定的抑制作用, 因此进一步对该部位中的化学成分进行了研究, 分离得到一个新的榄香烷型倍半萜苷 (图 1), 鉴定为 (1Z)-2-羟基-莪术酮 2-O-β-D-葡萄糖苷。并采用 MTT 法测定了该化合物对 HUVECs 细胞增殖的影响。

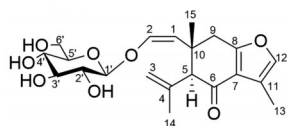


Figure 1 Structure of compound 1

结果与讨论

1 结构鉴定

化合物 1 无色胶状物。HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 431.167 4 $[M+Na]^+$ (计算值 $C_{21}H_{28}O_8Na$, 431.168 2), 推测其分子式为 $C_{21}H_{28}O_8$, 不饱和度为 8。 $[\alpha]_D^{20} +10.0$ (c 0.03, CH_3OH), IR_{\max}^{KBr} : 3 272, 2 925, 2 852, 1 665, 1 592, 1 378, 1 076, 1 037 cm^{-1} , 红外谱数据提示存在羟基、羰基、双键等官能团。化合物 1 的 1H NMR 数据 (表 1) $[\delta_H$ 4.42 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 3.19 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-2'), 3.30 (1H, m, H-3'), 3.28 (1H, m, H-4'), 3.33 (1H, m, H-5'), 3.82 (1H, dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz, H-6a'), 3.65 (1H, dd, $J = 12.0, 4.8$ Hz, H-6b')] 和 ^{13}C NMR 数据 (表 1) δ_C 104.1 (C-1'), 75.1 (C-2'), 78.2 (C-3'), 71.6 (C-4'), 78.6 (C-5'), 62.8 (C-6') 显示有 β-葡萄糖单元的存在。剩下的氢谱数据显示 3 个甲基信号 [2.14 (3H, d, $J = 1.4$ Hz, H-13), 1.81 (3H, s, H-14), 1.23 (3H, s, H-15)], 2 个亚甲基信号 [4.72 (1H, s, H-3a), 5.00 (1H, s, H-3b), 2.95 (1H, d, $J = 17.6$ Hz, H-9a), 2.79 (1H, d, $J = 17.6$ Hz, H-9b)] 和 4 个次甲基信号 $[\delta_H$ 7.27 (1H, q, $J = 1.4$ Hz, H-12), 6.39 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-2), 5.17 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-1),

2.98 (1H, s, H-5)]。剩下的碳谱数据显示 15 个碳信号, 可归属为 3 个甲基碳、2 个亚甲基碳 [包含 1 个烯碳 (δ_C 116.5)], 4 个次甲基碳 [包含 3 个烯碳 (δ_C 146.2, 141.9, 118.7)] 和 6 个季碳 [包含 1 个羰基碳 (δ_C 198.0), 4 个烯碳 (δ_C 168.4, 143.1, 121.5, 120.5)]。以上苷元的核磁数据与已知化合物莪术酮相似^[17], 差别在于化合物 1 中 C-1 及 H-1 化学位移向高场移动 (δ_C 145.3→118.7; δ_H 5.82→5.17), 而 C-2 和 H-2 化学位移则向低场移动 (δ_C 115.4→146.2; δ_H 4.95→6.39), 推测 C-2 双键末端有含氧取代。

为进一步确定化合物 1 的结构, 进行了 2D-NMR 实验 (图 2)。在化合物 1 的 1H - 1H COSY 谱中, H-1 和 H-2 相关以及 HMBC 谱中 H_3 -14 与 C-3、C-4、C-5 相关, H_3 -15 与 C-1、C-5、C-9、C-10 相关, H-5 与 C-3、C-4、C-6、C-9、C-15 相关, H_2 -9 与 C-1、C-5、C-7、C-8 相关, 证明了化合物 1 中苷元的平面结构。此外, H-1' 与 C-2 之间出现 HMBC 相关信号, 说明 OH-2 被糖苷化。化合物 1 的相对构型通过 1D-NOE 照射实验确定。照射 H-1 后, H-5 出现了增益, 而照射 H_3 -15 后, H-5 未出现增益, 提示 H_3 -15 与 H-5 位于异侧, 与莪术酮相对构型一致。此外, 照射 H-1 后, H-2 产生了显著增益, 且 H-1 和 H-2 间耦合常数为 12.6 Hz, 说明 $\Delta^{1(2)}$ 双键构型为 Z。为鉴定糖的绝对构型, 对化合物 1 进行酶水解。以 D-葡萄糖为对照品, 对其酶水解产物进行薄层色谱比对。结果显示, 水解液在与对照品色谱相应的位置上, 显示相同颜色的斑点, 证明化合物 1 中的糖为 D-葡萄糖。经旋光值测定 $\{[\alpha]_D^{20} +42.5$ (c 0.1, H_2O)}, 鉴定为 D-(+)-葡萄糖。因此, 化合物 1 的结构被确定为 (1Z)-2-羟基-莪术酮 2-O-β-D-葡萄糖苷。

2 细胞毒性

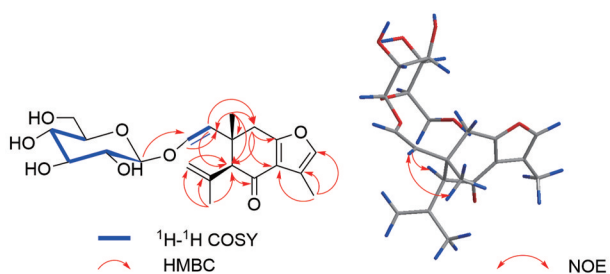
采用 MTT 法测定化合物 1 对 HUVECs 细胞增殖的影响^[18]。结果表明, 化合物 1 在 3.13、6.25、12.5、25 和 50 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 时对 HUVECs 细胞增殖均未表现出抑制活性。

3 讨论

榄香烷属于一种单环倍半萜, 其结构中 C-7 位的异丙基通常与 C-8 位通过 1 个氧原子或氮原子形成一个五元内酯或内酰胺环; C-1/C-2、C-3/C-4 大多数情况下形成末端双键。该种类型倍半萜通常具有良好的抗肿瘤活性^[19,20], 但未见抗 HUVECs 细胞增殖活性报道。本研究采用现代分离手段和有机波谱学技术, 从蓬莪术抗 HUVECs 细胞增殖活性部位分离鉴定出 1 个新的榄香烷型倍半萜苷, 应用 1D-NOE 照射技术确定了新化合物 1 的构型。该化合物的结构与莪术酮极为相似, 区别在于化合物 1 中 C-2 位双键末端连有 β-D-葡萄糖基, 说明在苷元结构中, C-2 位取代有 OH, 形成不稳定的烯醇式

Table 1 ^1H NMR and ^{13}C NMR data (600/150 MHz, CD_3OD) of compound **1**

No.	δ_{C}	δ_{H}
1	118.7	5.17 (1H, d, $J = 12.6$ Hz)
2	146.2	6.39 (1H, d, $J = 12.6$ Hz)
3	116.5	4.72 (1H, s) 5.00 (1H, s)
4	143.1	-
5	66.9	2.98 (1H, s)
6	198.0	-
7	121.5	-
8	168.4	-
9	35.9	2.79 (1H, d, $J = 17.6$ Hz) 2.95 (1H, d, $J = 17.6$ Hz)
10	41.9	-
11	120.5	-
12	141.9	7.27 (1H, q, $J = 1.4$ Hz)
13	9.5	2.14 (1H, d, $J = 1.4$ Hz)
14	25.6	1.81 (3H, s)
15	26.3	1.23 (3H, s)
1'	104.1	4.42 (1H, d, $J = 7.8$ Hz)
2'	75.1	3.19 (1H, t, $J = 7.8$ Hz)
3'	78.2	3.30 (1H, m)
4'	71.6	3.28 (1H, m)
5'	78.6	3.33 (1H, m)
6'	62.8	3.65 (1H, dd, $J = 12.0, 4.8$ Hz) 3.82 (1H, dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz)

**Figure 2** Key ^1H - ^1H COSY, HMBC, and NOE correlations of compound **1**

结构。目前为止,此种类型的榄香烷型倍半萜烯醇苷为首次从天然产物中分离得到。活性评价结果显示,该化合物对 HUVECs 细胞增殖无明显影响,说明该活性部位中还有其他活性成分的存在,值得进一步深入研究。

实验部分

Rudolph Autopol I 自动旋光仪 (美国 Rudolph 公司); 圆二色光谱仪 (Applied Photophysics Chirascan CD 光谱仪, 英国应用光物理公司); Agilent Cary 600 FT-IR 红外光谱仪、Agilent Technologies 1220 Series 高效液相色谱仪、分析型 C18 色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm, 4 μm) (美国 Agilent 公司); Bruker AVIII HD-600 核磁共振波谱仪、Bruker TIMS-TOF 质谱仪 (德国 Bruker 公司); Büchi Gradient Former B-687 中压液相色谱仪 (Rp C18, 40~60 μm , Welch 公司); 电子分析天平 (德国

Sartorius BP221S); Milli-Q 超纯水仪 (美国 Milli-pore 公司); 旋转蒸发器 (亚荣生化仪器); MCO-15AC CO_2 细胞培养箱 (日本 SANYO 公司); SW-CJ-2F 双人双面净化工作台 (苏州净化设备有限公司); 半制备型 C18 色谱柱 (250 mm \times 10 mm, 5 μm , Welch 公司); Varioskan 高级多功能酶标仪 (美国 Thermo 公司); 集热式恒温磁力搅拌浴 (郑州长城科工贸有限公司)。

柱色谱硅胶 (200~300 目, 青岛海洋化工有限公司); 高效薄层色谱硅胶板 (GF254 硅胶, 安徽良臣硅源材料有限公司); 甲醇 (色谱级, 美国 Sigma 公司); 其他所用试剂均为分析纯 (成都市科隆化学品有限公司); 人脐静脉内皮细胞 HUVECs 由成都中医药大学药理教研室提供; DMEM 高糖培养基 (美国 Gibco 公司); 胰蛋白酶 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Biosharp PBS 缓冲液 (北京兰杰柯科技有限公司); MTT (Bio-Froxx 公司), 蜗牛酶 (北京拜尔迪生物技术有限公司)。

蓬莪术药材采于四川省崇州市三江镇宋桥村, 经成都中医药大学高继海副教授鉴定为蓬莪术 *Curcuma phaecocaulis* Val. 的干燥根茎, 植物标本 (CP-20180303) 保存于成都中医药大学西南特色药材创新药物成分研究所。

1 提取与分离

蓬莪术药材 (50 kg) 粉碎后用 95% 乙醇回流提取 3 次, 每次 3 h, 浓缩后将浸膏分散于水中, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取。将各部分萃取液浓缩, 回收溶剂后得到石油醚浸膏 (1 kg)、乙酸乙酯浸膏 (300 g) 和正丁醇浸膏 (500 g)。正丁醇萃取物经大孔吸附树脂, 以不同浓度乙醇水 (20%、50%、70%、95%) 进行梯度洗脱, 回收溶剂得到 5 个流分 (Fr.1~5)。其中 Fr.2 经反相中压液相色谱, 以 30%~80% 甲醇梯度洗脱得到 17 个流分 (Fr.2-1~2-17)。Fr.2-6 经硅胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇 (200:1~0:1) 梯度洗脱, 得到 12 个流分 (Fr.2-6-1~2-6-12), Fr.2-6-3 再经硅胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇, 200:1~0:1) 和制备薄层色谱 (二氯甲烷-甲醇, 8:1) 分离, 随后以 55% 甲醇水为流动相, 流速为 1.5 mL min^{-1} , 进行反相半制备液相色谱分离, 得到化合物 **1** (1.25 mg, $t_{\text{R}} = 55$ min)。

2 化合物的酶水解和糖的鉴定

化合物 **1** 糖的构型, 参照文献报道的方法进行确定^[21]。化合物 **1** (1 mg) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 油浴条件下, 加入 10 mg 蜗牛酶在 4 mL 水中水解 48 h, 水解液以等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 水相减压浓缩后, 以 2 mL 水溶解, 经薄层色谱法检测, 吸取上述 2 种溶液, 以三氯甲烷-甲醇-水 (7:3:0.1) 为展开剂展开, 以 10% 硫酸-乙醇为显色剂。结果显示, 水解液在与对照品色谱相应的位置上, 显示

相同颜色的斑点,证明化合物 1 中的糖为 *D*-葡萄糖。后又经旋光值测定 $\{[\alpha]_D^{20} +42.5 (c 0.1, H_2O)\}$, 鉴定为 *D*-(+) 葡萄糖。

3 细胞毒活性测试

MTT 检测化合物 1 对正常 HUVECs 细胞活力的影响。待 HUVECs 细胞长至 80%~90% 融合,用 0.25% 的胰酶进行消化 6 min 后并离心收集细胞,将细胞混悬于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,悬液以每孔 5×10^3 个铺于 96 孔培养板(每孔 100 μ L),置于温度为 37 $^{\circ}$ C、CO₂ 浓度为 5% 的培养箱中孵育 24 h,实验分为空白对照组和给药组(待测化合物浓度分别为 50、25、12.5、6.25、3.125 和 1.563 μ mol·L⁻¹),各浓度分别设 3 个复孔,给药后继续孵育 48 h 后,每孔加入 20 μ L 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后的 MTT 溶液(5 mg·mL⁻¹),同样条件继续孵育 4 h,取出孔板。用无菌 2 mL 注射器小心吸净上清液,继续加入 DMSO 溶液(每孔 150 μ L)。室温下振荡 10 min 后充分溶解紫色结晶物后,将 96 孔板按正确摆放顺序放置在酶标仪里,在 490 nm 处测得孔板吸光度(OD)值。细胞存活率(%)的计算方式为:(给药组 OD 值 / 空白组 OD 值) \times 100%。

作者贡献: 李承哲是本文的第一作者,负责成分分离、结构鉴定,细胞毒活性测定和论文撰写;李小翠参与成分分离;彭成参与课题的指导和管理工作;刘娟、周勤梅和蒙春旺参与稿件修改工作;刘菲与熊亮是本文的通讯作者,设计和组织了整个实验以及负责修改稿件。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] 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) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 252.
- [2] Li XC, Chen JF, Xiong L, et al. Study on germacrane-type sesquiterpenoids from *Curcuma phaeocalis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 28-34.
- [3] Peng BX, Chen SH. Determination of three effective constituents in Rhizoma Curcumae from different area by HPLC [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2009, 44: 1742-1744.
- [4] Zhu JJ, An YW, Hu G, et al. Simultaneous determination of multiple sesquiterpenes in *Curcuma wenyujin* herbal medicines and related products with one single reference standard [J]. Molecules, 2013, 18: 2110-2121.
- [5] Sun J, Sun YT, Zhang ZQ. Determination of curcumin, demethoxycurcumin and dideoxycurcumin in *Curcuma zedoaria* [J]. China J Hosp Pharm (中国医院药学杂志), 2010, 30: 714-716.
- [6] Chen JF, Xiong L, Liu F, et al. Study on curcumins from *Curcuma phaeocalis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51: 16-20.
- [7] Ning N, Liu S, Liu X, et al. Curcumol inhibits the proliferation and metastasis of melanoma via the miR-152-3p/PI3K/AKT and ERK/NF- κ B signaling pathways [J]. J Cancer, 2020, 11: 1679-1692.
- [8] Chen W, Lu Y, Gao M, et al. Anti-angiogenesis effect of essential oil from *Curcuma zedoaria* in vitro and in vivo [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 133: 220-226.
- [9] Huang ZM, He XQ. Study on anti-angiogenesis of traditional Chinese medicine [J]. Pract Clin J Integr Tradit Chin West Med (实用中西医结合临床), 2006, 6: 83-84.
- [10] Ye L, Xu XY, Li RH, et al. Effect of medicated serum of Sanleng and Eshu on human umbilical vein vascular endothelial growth factor and vascular endothelial cell [J]. J Third Military Med Univ (第三军医大学学报), 2007, 29: 121-124.
- [11] Liu TT, Bian Y, Guan HQ, et al. Study on the inhibitory effect of Huangqi-Ezhu-Chonglou combination on metastasis of colon cancer by reducing vascular endothelial permeability [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med (南京中医药大学学报), 2022, 38: 115-121.
- [12] Dosoky NS, Setzer WN. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Curcuma* species [J]. Nutrients, 2018, 10: E1196.
- [13] Chen XJ, Yan KJ, Nong YK, et al. New research progress on pharmacological effects of *Curcumae Rhizoma* [J]. J Pharm Res (药学研究), 2018, 37: 664-668, 682.
- [14] Xu YJ. Study on the Material Foundation of Vinegar-baked *Curcuma kwangsiensis* on Promoting Blood Circulation and Removing Blood Stasis (广西醋莪术活血化瘀物质基础研究) [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2017.
- [15] Wang X. Study on Antithrombotic and Antiplatelet Aggregation Activities of Curdione (莪术二酮抗血栓和抗血小板聚集作用研究) [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2012.
- [16] Yu CL, Dong MX, Niu YC, et al. Differential mechanism of toxicity in normal and blood-stasis mice following Rhizoma Curcumae exposure based on "YOU-GU-WU-YUN" theory [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 329-334.
- [17] Catalan CAN, Bardon A, Retamar JA, et al. The essential oil of *Curcuma aromatica* Salisb [J]. Flavour Frag J, 1989, 4: 25-30.
- [18] Zhou F, Liu F, Liu J, et al. Stachydrine promotes angiogenesis by regulating the VEGFR2/MEK/ERK and mitochondrial-mediated apoptosis signaling pathways in human umbilical vein endothelial cells [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110724.
- [19] Wang Y, Li J, Guo J, et al. Cytotoxic and antitumor effects of curzerene from *Curcuma longa* [J]. Planta Med, 2017, 83: 23-29.
- [20] Zheng T, Xiao H, Shen Y, et al. Anticancer effects of curzerenone against drug-resistant human lung carcinoma cells are mediated via programmed cell death, loss of mitochondrial membrane potential, ROS, and blocking the ERK/MAPK and NF- κ B signaling pathway [J]. J BUON, 2019, 24: 907-912.
- [21] Tian ZH, Peng C, Xiong L. New lignans from the fruits of *Leonurus japonicus* and their hepatoprotective activities [J]. Bioorg Chem, 2021, 115: 105252.