

益母草中脂肪族化合物的研究

周勤梅¹, 彭成¹, 蒙春旺¹, 刘露丝¹, 杨雨婷¹, 郭力¹, 熊亮^{1*}, 刘昭华²

1. 成都中医药大学 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137

2. 成都第一药业有限公司, 四川 成都 610031

摘要: 目的 研究益母草 *Leonurus japonicus* 的低极性化学成分。方法 采用硅胶、Sephadex LH-20 以及反相 C₁₈ 柱色谱等方法进行分离纯化, 根据理化性质及波谱数据鉴定化合物结构。结果 从益母草的醋酸乙酯提取部位分离得到 6 个化合物, 包括叠烯类化合物 2 个: (-)-十九碳-5,6-二烯酸甲酯 (1)、十八碳-5,6-二烯酸甲酯 (2); 饱和脂肪族化合物 4 个: 二十一烷酸 (3)、花生酸 (4)、二十七烷酸 (5) 和肉豆蔻酸甲酯 (6)。结论 所有化合物均为首次从益母草中分离得到, 其中化合物 1 为新化合物, 命名为益母草叠烯酸酯 A, 化合物 2 为首次从益母草属植物中分离得到。

关键词: 益母草; 脂肪族化合物; 叠烯; 益母草叠烯酸酯 A; 十八碳-5,6-二烯酸甲酯; 肉豆蔻酸甲酯

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)09-1283-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.09.005

Aliphatic compounds from *Leonurus japonicus*

ZHOU Qin-mei¹, PENG Cheng¹, MENG Chun-wang¹, LIU Lu-si¹, YANG Yu-ting¹, GUO Li¹, XIONG Liang¹, LIU Zhao-hua²

1. State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Chengdu No. 1 Pharmaceutical Co., Ltd., Chengdu 610031, China

Abstract: Objective To study the low polar chemical constituents from *Leonurus japonicus*. **Methods** The chemical constituents were isolated and purified by various chromatographic methods including column chromatography over silica, Sephadex LH-20, and Rp C₁₈ columns. Their structures were identified by physicochemical properties and spectroscopic analysis. **Results** Six aliphatic compounds were isolated from the EtOAc extracts of *L. japonicus*, including two allenes: (-)-nonadeca-5,6-dienoic acid methyl ester (1) and methyl octadeca-5,6-dienoate (2); four saturated aliphatic compounds: heneicosanoic acid (3), arachidic acid (4), heptacosanoic acid (5), and methyl myristate (6). **Conclusion** All the compounds are isolated from *L. japonicus* for the first time. Compound 1 is a new one named leonuallenote A, while compound 2 is first reported from the plants of *Leonurus* L.

Key words: *Leonurus japonicus* Houtt.; aliphatic compounds; allenes; leonuallenote A; methyl octadeca-5,6-dienoate; methyl myristate

传统中药益母草为唇形科 (Labiatae) 植物益母草 *Leonurus japonicus* Houtt. 的新鲜或干燥地上部分, 生于山野荒地、田埂、草地等, 全国大部分地区均有分布。益母草具有活血调经、利尿消肿、清热解毒的功效, 用于月经不调、痛经经闭、恶露不尽、水肿尿少、疮疡肿毒等症^[1]。目前, 从益母草中得到的化合物主要有生物碱^[2]、二萜^[3]、倍半萜^[4]、黄酮^[5]、木脂素和香豆素^[6]等, 而关于脂肪族类化

合物的报道很少。本实验对益母草乙醇提取物的醋酸乙酯提取部位进行了研究, 分离得到 6 个化合物, 包括 2 个叠烯类化合物和 4 个饱和脂肪酸 (酯), 分别鉴定为 (-)-十九碳-5,6-二烯酸甲酯 [(-)-nonadeca-5,6-dienoic acid methyl ester, 1]、十八碳-5,6-二烯酸甲酯 (methyl octadeca-5,6-dienoate, 2)、二十一烷酸 (heneicosanoic acid, 3)、花生酸 (arachidic acid, 4)、二十七烷酸 (heptacosanoic acid, 5) 和肉豆蔻

收稿日期: 2015-01-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81303209); 中国博士后科学基金项目 (2014M562291); 四川省应用基础研究项目 (2012JYZ005); 四川省科技支撑计划 (2011SZ0056)

作者简介: 周勤梅, 博士研究生, 主要从事中药药效物质基础研究。E-mail: zhqmyx@sina.cn

*通信作者 熊亮, 男, 博士, 副研究员, 主要从事中药药效物质基础研究。Tel: (028)61800231 E-mail: xiling0505@126.com

酸甲酯 (methyl myristate, **6**)。其中化合物 **1** 是新化合物, 命名为益母草叠烯酸酯 A; 化合物 **2** 为首次从益母草属植物中分离得到。

1 仪器与材料

Bruker AV-400、Inova-500 和 Bruker AVIII HD-600 核磁共振波谱仪, Waters Synapt G₂ 高分辨质谱仪。中压液相色谱仪 (Büchi Gradient Former B-687, Rp C₁₈, 40~60 μ m, Welch 公司); 薄层色谱硅胶 GF₂₅₄、柱色谱硅胶 (200~300 目) 均为青岛海洋化工厂生产; Sephadex LH-20 为瑞典 Amersham Pharmacia 公司生产。所用试剂均为分析纯。

益母草药材 2012 年 5 月采于四川省成都市温江区, 经成都中医药大学李敏教授鉴定为益母草 *Leonurus japonicus* Houtt. 的干燥全草, 标本 (SYMC-0522) 存放于成都中医药大学药学院中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地。

2 提取与分离

干燥粉碎的益母草 20 kg, 用 95% 乙醇 (3×160 L) 回流提取 3 次, 每次 2 h。提取液减压浓缩得浸膏 1.2 kg, 混悬于水中, 用醋酸乙酯萃取, 回收溶剂得醋酸乙酯提取物 (400 g)。醋酸乙酯部分用硅胶柱色谱分离, 石油醚-丙酮 (100:1→0:1) 梯度洗脱, 洗脱液经薄层色谱检测, 合并, 浓缩得到 19 个洗脱部分 F₁~F₁₉。F₄ (5.0 g, 石油醚-醋酸乙酯 5:1 洗脱部分) 经 Sephadex LH-20 柱色谱, 以石油醚-三氯甲烷-甲醇 (5:5:1) 洗脱, 再经中压液相色谱, 反复硅胶柱色谱以及制备薄层色谱和 HPLC 半

制备色谱等方法分离得到化合物 **1** (12.0 mg)、**2** (15.0 mg); F₅ (7.0 g, 石油醚-醋酸乙酯 5:1 洗脱部分) 经中压液相色谱、反复凝胶柱色谱、硅胶柱色谱以及制备薄层色谱和重结晶等方法分离得到化合物 **3** (35.0 mg)、**4** (20.0 mg)、**5** (26.0 mg)、**6** (15.0 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 无色油状物, $[\alpha]_D^{20}$ -5.8°; HR-ESI-MS m/z : 331.261 9 $[M+Na]^+$, 分子式 C₂₀H₃₆O₂ (计算值为 331.261 3), 不饱和度为 3。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 3.67 (3H, s), 2.38 (2H, t, J = 7.8 Hz), 0.92 (3H, t, J = 6.6 Hz), 1.30 (16H, brs) 和 ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 175.9, 表明该化合物为脂肪酸甲酯类化合物。同时 ¹H-NMR 低场区显示 2 个烯氢信号 δ 5.11 (1H, m) 和 5.08 (1H, m), 结合 ¹³C-NMR 和 DEPT 中 3 个特殊的碳信号 δ_C 205.9, 92.3, 90.9, 进一步推断该化合物为叠烯酸酯类化合物^[7]。为了确定化合物双键所在的位置, 本实验进行了 2D NMR 分析。通过 HSQC 数据分析, 可以将化合物 **1** 中直接相连的 C-H 进行关联, 从而确定各质子与相应碳原子的归属 (表 1)。根据 ¹H-¹H COSY 谱确定了化合物 **1** 中存在的质子间相互耦合的结构片段 (图 1)。在 HMBC 谱中, H-5 与 C-3、C-4、C-6 和 C-7 相关, H-7 与 C-5、C-6、C-8 和 C-9 相关, H-3 与 C-1、C-2、C-4 和 C-5 相关, -OCH₃ 与 C-1 相关, 表明双烯片段位于 C-5、C-6 和 C-7。结合化合物的分子式和比旋度, 确定化合物 **1** 的结构为 (-)-十九碳-5,6-

表 1 化合物 **1** 的核磁数据

Table 1 NMR data for compound **1**

碳位	δ_H	δ_C (DEPT)	碳位	δ_H	δ_C (DEPT)
1	—	175.8 (C)	8	1.99 (m)	30.5 (CH ₂)
2	2.36 (t, J = 7.2 Hz)	34.1 (CH ₂)	9	1.41 (m)	30.3 (CH ₂)
3	1.73 (m)	25.4 (CH ₂)	10~16	1.30 (brs)	30.6~33.2 (CH ₂)
4	2.01 (m)	29.3 (CH ₂)	17	1.30 (m)	33.1 (CH ₂)
5	5.06 (m)	90.7 (CH)	18	1.33 (m)	23.7 (CH ₂)
6	—	205.5 (C)	19	0.90 (t, J = 7.2 Hz)	14.4 (CH ₃)
7	5.10 (m)	92.1 (CH)	-OCH ₃	3.66 (s)	52.0 (CH ₃)

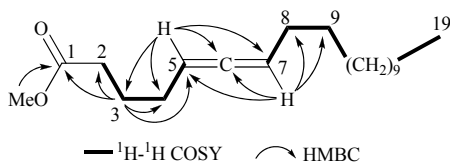


图 1 化合物 **1** 的结构及主要的 COSY 和 HMBC 相关

Fig. 1 Structure and key COSY and HMBC correlations of compound **1**

二烯酸甲酯。经过 Scifinder 数据库检索, 确定该化合物为新化合物, 命名为益母草叠烯酸酯 A。

化合物 **2**: 无色油状物; HR-ESI-MS m/z : 317.244 9 $[M+Na]^+$, 分子式 C₁₉H₃₄O₂ (计算值为 317.245 7)。¹H-NMR (600 MHz, CD₃COCD₃) δ : 0.87 (3H, t, J = 7.2 Hz, H-18), 1.29 (16H, brs, H-10~17), 1.41 (2H, m, H-9), 1.70 (2H, m, H-3), 2.00 (4H, m,

H-4, 8), 3.61 (3H, s, 1-OCH₃), 5.12 (1H, m, H-5), 5.09 (1H, m, H-7), 2.35 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-2); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃COCD₃) δ : 205.5 (C-6), 174.5 (C-1), 92.4 (C-5), 91.3 (C-7), 52.1 (1-OCH₃), 34.2 (C-2), 30.5~33.2 (C-10~16), 30.2 (C-9), 29.5 (C-8), 25.7 (C-3), 23.9 (C-17), 14.9 (C-18)。以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **2** 为十八碳-5,6-二烯酸甲酯。

化合物 **3**: 无色晶体(甲醇); ESI-MS m/z : 349.2 [M+Na]⁺, 分子式 C₂₁H₄₂O₂。 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃COCD₃) δ : 0.87 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-21), 1.25 (34H, m, H-4~20), 1.61 (2H, m, H-3), 2.28 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-2)。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **3** 为二十一烷酸。

化合物 **4**: 无色晶体(甲醇); ESI-MS m/z : 335.2 [M+Na]⁺, 分子式 C₂₀H₄₀O₂。 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.87 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-20), 1.25 (32H, m, H-4~19), 1.62 (2H, m, H-3), 2.34 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-2); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 177.3 (C-1), 34.1 (C-2), 32.1 (C-3), 29.8~29.2 (C-4~17), 24.8 (C-18), 22.8 (C-19), 14.3 (C-20)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **4** 为花生酸。

化合物 **5**: 无色油状物; ESI-MS m/z : 433.2 [M+Na]⁺, 分子式 C₂₇H₅₄O₂。 ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 0.88 (3H, t, $J = 6.0$ Hz, H-27), 1.26 (46H, m, H-4~27), 1.63 (2H, m, H-3), 2.35 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-2); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 177.8 (C-1), 33.8 (C-2), 32.1 (C-3), 29.9~29.2 (C-4~24), 24.9 (C-25), 22.9 (C-26), 14.3 (C-27)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **5** 为二十七烷酸。

化合物 **6**: 无色油状物; ESI-MS m/z : 242.2 [M+Na]⁺, 分子式 C₁₅H₃₀O₂。 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃COCD₃) δ : 0.88 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-14), 1.29 (20H, m, H-4~13), 1.58 (2H, m, H-3), 2.29 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-2), 3.61 (3H, s, -OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **6** 为肉豆蔻酸甲酯。

4 讨论

益母草为常用的活血化瘀中药, 在临床中应用广泛, 而现代药理主要针对益母草调节子宫的作用, 对其活血物质研究较少^[13-14]。由于文献报道多烯脂肪酸具有较好的抗血小板聚集活性^[15], 因此本实验对该活性成分进行了筛选。同时, 不饱和脂肪酸如亚油酸、亚麻酸还具有抑制肿瘤细胞生长的作用^[16], 故本实验还对2个叠烯类化合物进行了细胞毒活性筛

选^[17]。结果显示, 化合物 **1** 和 **2** 对 ADP 诱导的血小板聚集和多株肿瘤细胞均无明显作用。

益母草的生物碱^[18-19]、二萜类^[20-21]化合物研究较多, 关于脂肪族化合物的报道很少。本实验首次从益母草中分离得到叠烯类化合物 **1** 和 **2**, 其中化合物 **1** 为新化合物, 进一步丰富了益母草的化合物结构类型, 为益母草低极性活性成分的研究提供一定的参考。

参考文献

- [1] 彭成. 中华道地药材 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2011.
- [2] Luo S R, Mai L. Analysis on alkaloids constituents of *Leonurus japonicus* Houtt. [J]. *Chin J Pharm Anal*, 1986, 6(1): 47-48.
- [3] 周勤梅, 彭成, 刘娟, 等. 益母草属二萜类化合物的研究进展 [J]. 中药材, 2014, 37(9): 1691-1696.
- [4] Xiong L, Zhou Q M, Peng C, et al. Sesquiterpenoids from the herb of *Leonurus japonicus* [J]. *Molecules*, 2013, 18(5): 5051-5058.
- [5] Cong Y, Wang J H, Li X. A new flavonoside from *Leonurus heterophyllus* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2005, 7(3): 273-277.
- [6] Zhou Q M, Peng C, Li X H, et al. Aromatic compounds from *Leonurus japonicus* Houtt. [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2013, 51: 101-103.
- [7] Jonasson C, Horváth A, Bäckvall J E. Intramolecular palladium (II) -catalyzed 1,2-addition to allenes [J]. *J Am Chem Soc*, 2000, 122(40): 9600-9609.
- [8] Mikolajczak K L, Rogers M F, Smith C R, et al. An octadecatrienoic acid from *Lamium purpureum* L. seed oil containing 5,6-allenic and trans-16-olefinic unsaturation [J]. *Biochem J*, 1967, 105(3): 1245-1249.
- [9] Caplar V, Frkanec L, Sijaković Vujčić N, et al. Positionally isomeric organic gelators: Structure-gelation study, racemic versus enantiomeric gelators, and solvation effects [J]. *Chemistry*, 2010, 16(10): 3066-3082.
- [10] Lee J, Chung I, Lim J, et al. New aliphatic glycoside constituent from the fruits of *lycium chinense* miller [J]. *Asian J Chem*, 2013, 25(8): 4664-4666.
- [11] Negi S, Shukla V, Rawat, et al. A new aliphatic ester from the aerial parts of *Polygonum polystachyum* [J]. *J Indian Chem Soc*, 2005, 82(8): 757-758.
- [12] Iwasaki T, Higashikawa K, Reddy V P, et al. Nickel-butadiene catalytic system for the cross-coupling of bromoalkanoic acids with alkyl grignard reagents: A practical and versatile method for preparing fatty acids

- [J]. *Chemistry*, 2013, 19(9): 2956-2960.
- [13] 杨 槐, 周勤梅, 彭 成, 等. 益母草香豆素类化学成分与抗血小板聚集活性 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(22): 4356-4359.
- [14] 张 雪, 宋玉琴, 杨雨婷, 等. 益母草活血化瘀化学成分与药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(2): 214-217.
- [15] 周 兴, 林成仁. n-3 多烯脂肪酸对血小板聚集, 血栓形成, 6-keto-PGF_{1α}/TXB₂ 比值的影响 [J]. 中药药理与临床, 1997, 13(1): 27-30.
- [16] 晏四平, 苏德森. 不饱和脂肪酸抗肿瘤作用研究进展 [J]. 辽宁药物与临床, 2000, 3(1): 36-39.
- [17] Liu J, Peng C, He C J, *et al.* New amino butenolides from the bulbs of *Fritillaria unibracteata* [J]. *Fitoterapia*, 2014, 98: 53-58.
- [18] Liu X H, Pan L L, Chen P F, *et al.* Leonurine improves ischemia-induced myocardial injury through antioxidative activity [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(10): 753-759.
- [19] Qi J, Hong Z Y, Xin H, *et al.* Neuroprotective effects of leonurine on ischemia/reperfusion-induced mitochondrial dysfunctions in rat cerebral cortex [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(2): 1958-1964.
- [20] Agnihotri V K, Elsohly H N, Smillie T J, *et al.* New labdane diterpenes from *Leonurus cardiaca* [J]. *Planta Med*, 2008, 74(10): 1288-1290.
- [21] Moon H T, Jin Q, Shin J E, *et al.* Bis-spirolabdanetype diterpenoids from *Leonurus sibiricus* [J]. *J Nat Prod*, 2010, 73(2): 123-126.