

芹菜根中一种具有抗癌活性的双氨基甲酸酯

杨晓军^{1*}, 高霞², 赵敏¹, 李文惠¹, 张越诚¹, 汤江江³

¹延安大学化学与化工学院; ²延安大学附属医院, 延安 716000; ³西北农林科技大学, 杨凌 712100

摘要:研究芹菜根(*Apium graveolens* L.)乙醇提取物的化学成分及其体外抗肿瘤活性。利用多种色谱方法进行分离纯化,现代波谱技术对分离得到的化合物进行结构鉴定;采用 MTT 法对分离出的单体化合物进行抗肿瘤实验。从芹菜根的乙醇提取物中分离得到 3 个单体化合物,它们的结构分别为双氨基甲酸酯 AG-01 (1)佛手柑内酯(2)芹菜素(3)。化合物 1 为一新化合物,MTT 细胞毒活性显示其对人体胃癌细胞 SGC-7901 和肝癌细胞 BEL-7402 的 IC₅₀ 分别为 29.6 μM 和 32.4 μM。

关键词:芹菜根;化学成分;双氨基甲酸酯 AG-01;细胞毒活性

中图分类号:R284.1;R961

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)2-0261-04

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.2.012

A dicarbamate from the roots of *Apium graveolens* L. and its anti-cancer activities

YANG Xiao-jun^{1*}, GAO Xia², ZHAO Ming¹, LI Wen-hui¹, ZHANG Yue-chen¹, TANG Jiang-jiang³

¹College of Chemistry and Chemical Engineering, Yan'an University Shanxi, Yan'an 716000, China;

²The Affiliated hospital of Yan'an medical College, Yan'an University, Shanxi;

³Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China

Abstract: To study the chemical constituents and the anti-cancer activities from the EtOH extract of *Apium graveolens* L. Several chromatographic methods were used to separate the chemical constituents, of which structures were identified by IR, MS and NMR. Anti-cancer activities experiments were performed with the monomer compound using the MTT method. Three compounds were isolated from the EtOH extract of *Apium graveolens* L and their structures were identified as dicarbamate AG-01 (1), bergapten (2) and apigenin (3). Compound 1 was a new compound. All the compounds were tested for their cytotoxicities against Bel-7402 and SGC7901 cells using the MTT method, and compound 1 exhibited significant cytotoxic effect to Bel-7402 and SGC7901. The IC₅₀ of compound 1 to SGC7901 is 29.6 μM and to Bel-7402 is 32.4 μM.

Key words: *Apium graveolens* L.; chemical constituents; dicarbamate AG-01; cytotoxicity

芹菜 *Apium* L. 为伞形科植物,是食药同源品种,全世界各地均有栽培^[1]。芹菜中富含黄酮、氨基酸、香豆素等多种物质^[2],具有抗菌、抗肿瘤和抗心血管等疾病的作用^[3,4]。目前对芹菜化学成分的研究主要集中在其茎、叶和籽上,对其根部化学成分的研究较少。为挖掘芹菜根中的抗肿瘤活性成分。本实验通过采用多种色谱分离技术,对陕西蒲城县种植的旱芹根乙醇提取物进行了分离纯化,得到 3 个单体化合物,利用其光谱数据及其文献对比

法确定 3 个单体化合物的结构分别为:双氨基甲酸酯 AG-01 (1)、佛手柑内酯 (2) 和芹菜素 (3)。同时采用 MTT 法对化合物 1 进行了体外抗肿瘤细胞实验,结果表明化合物 1 对肝癌细胞 BEL-7402 和胃癌细胞 SGC7901 均具有较好的细胞毒活性。

1 仪器与材料

1.1 仪器

X-4 型显微熔点仪(上海科学仪器有限公司); IR Prestige-21 红外光谱仪(日本岛津公司); AV-500 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司), TMS 为内标; MAT-711 型质谱仪(美国 Thermo 公司); Vario EL 有机元素分析仪(德国 Elementar 公司); JP600 型超声波提取器(武汉嘉鹏电子有限公司)。

收稿日期:2018-08-27 接受日期:2018-12-18

基金项目:国家自然科学基金(31860089);延安市科技局项目(2017KS-18);国家级大学生创新项目(201810719032)

* 通信作者 Tel:86-911-2332037; E-mail: yangxiaojun2002@126.com

1.2 材料

Sephadex LH-20 (Pharmacia 产品); 柱层析色谱和薄层色谱用硅胶 (青岛海洋化工厂产品); 四甲基偶氮唑盐溶液 (MTT) 试剂 (Sigma 公司); 阳性对照品紫杉醇 (紫杉醇江苏红豆杉药业有限公司); 人肝癌细胞株 BEL-7402 (上海美轩生物科技有限公司)、人肺癌细胞株 A549 (上海继和生物科技有限公司)、人胃癌细胞株 SGC-7901 (上海研生生化试剂有限公司); 旱芹根于 2017 年 11 月采集自陕西省蒲城县, 经延安大学生命科学院白重炎研究员鉴定为伞形科芹属 *Apium* L. 的根, 标本存放于延安大学天然产物化学实验室, 标本编号为 YD20171109。

2 实验方法

2.1 提取和分离

称取芹菜根 2.0 kg (干重), 用粉碎机粉碎成粉末, 将此粉末在超声波辅助提取下, 用 50% 的乙醇提取 3 次, 每次 1 h, 将所得提取液减压浓缩后得黄色浸膏, 将此浸膏混悬于水中后, 用石油醚萃取, 将石油醚萃取液减压浓缩后得石油醚萃取物 21 g。将此萃取物首先经硅胶柱层析分离, 以氯仿-丙酮梯度洗脱 (100:0 → 1:1), 洗脱馏分根据薄层板点板情况进行合并, 共分得 3 段 (P1-3)。第 1 段硅胶柱色谱 (石油醚: 氯仿 = 20:1) 分得化合物 **1** (13 mg)。第 2 段硅胶柱色谱 (石油醚: 氯仿 = 15:1), 再根据薄层板点板情况合并相同部分, 将此合并部分再经 Sephadex LH-20 纯化得化合物 **2** (105 mg)。第 3 段硅胶柱色谱 (石油醚: 氯仿 = 9:1) 分得化合物 **3** (51 mg)。

2.2 化合物 1 的体外细胞毒活性

采用 MTT 法对化合物 **1** 进行体外细胞毒活性测定。取处于对数生长期的 3 株人体肿瘤细胞 (人肝癌细胞 BEL-7402、人肺癌细胞 A549 和人胃癌细胞 SGC-7901), 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 细胞培养液调整细胞浓度, 以 3 000 ~ 4 000 个/孔接种于 96 孔板上, 置手 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培育 24 h 后加药。设阴性对照组 (DMSO 溶剂对照组)、阳性对照组 (紫杉醇) 和化合物 **1** 实验组, 每组设立 3 个复孔, 受试化合物 **1** 的终浓度分别为 75.83、37.91、18.96、9.48、4.74 μM, 培育 48 h 后, 每孔加入 10 μL MTT 溶液 (0.012 M), 继续孵育反应 4 h, 弃去上清液, 加入 DMSO 100 μL/孔, 振荡均匀后用酶标仪在 570 nm 处测定每孔光密度值 (OD 值), 计算对细胞增殖抑制率, 并用 Origin 7.0 软件计算其 IC₅₀ 值。细胞增殖抑制率 (%) = [(对照组 OD

平均值 - 给药组 OD 平均值) ÷ 对照组 OD 平均值] × 100%

3 结果与分析

3.1 结构鉴定

化合物 **1** 浅灰色粉末固体 (丙酮), mp. 222.1 ~ 223.4 °C; 与三氯化铁反应呈阳性, 提示含有酚羟基; HR-ESI-MS: m/z 221.1431 [M]⁺ (C₁₀H₇NO₅, 计算值 221.1423), 确定相对分子质量为 221, 不饱和度为 8。IR (KBr) ν_{\max} 3327 ~ 3485 cm⁻¹ (酚 OH), 3014 cm⁻¹ 苯环 C-H 伸缩振动吸收峰, 1683 cm⁻¹ (酰胺羰基 C=O 伸缩振动吸收峰), 2962 cm⁻¹ 和 2835 cm⁻¹ 处有强吸收峰为亚甲基 C-H 不对称伸缩振动和对称伸缩振动吸收峰, 1604、1576、1492 cm⁻¹ 为苯环的骨架伸缩振动吸收峰; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) 共显示 6 条谱线, DEPT 谱显示有 1 条芳香次甲基碳信号 δ_c : 110.6 (d), 1 条 sp³ 杂化亚甲基碳信号 δ_c : 67.8 (t), 4 条季碳信号 δ_c : 165.8 (s, 酰胺 C=O), 145.3 (s, 芳香季碳), 130.1 (s, 芳香季碳), 154.6 (s, 连接氧原子芳香季碳); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 共显示有 3 种类型氢, 由各类型氢的积分面积和分子式可以确定该化合物为一对称分子, δ_H : 6.76 (2H, s, 2 个芳香 CH), 5.19 (4H, s, 2 个 sp³ 杂化-CH₂), 9.51 (1H, br s, -OH); 在 HMBC 相关谱图中观察到 δ : 5.19 的亚甲基氢分别与酰胺羰基季碳 δ_c : 165.8、芳香季碳 δ_c : 130.1 以及芳香次甲基 δ_c : 110.6 相关。该化合物的其它 C-H 相关及其所有 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据见表 1 所示。综合以上的分析化合物 **1** 可被推定为一新的双氨基甲酸酯化合物。

化合物 **2** 白色针晶 (甲醇); mp. 189.6 ~ 190.3 °C。EI-MS: m/z 217 [M + H]⁺, 239 [M + Na]⁺, 元素分析得知碳、氢的百分含量分别为: 66.39 和 4.11; 质谱和元素分析提示该化合物的分子式为 C₁₂H₈O₄。IR (KBr) ν_{\max} 1728, 1637, 1612, 1472, 1408 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 6.31 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-3), 8.06 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-4), 7.14

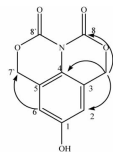


图 1 化合物 1 的主要 HMBC 相关
Fig. 1 The key HMBC of compound 1

表1 化合物1的¹H NMR、¹³C NMR和HMBC(500和125 MHz,溶剂为CDCl₃)Table 1 ¹H, ¹³C NMR and HMBC of compound 1 (500/125 MHz, CDCl₃)

Position	δ _H (mult., J _{HH} Hz)	δ _C	¹ H- ¹ H COSY	HMBC
1		154.6 (s)		
2,6	6.76 (CH, s)	110.6 (d)		C-7, C-4
3,5		145.3 (s)		
4		130.1 (s)		
7,7'	5.19 (s)	67.8 (t)		C-2, C-4, C-8, 8'
8,8'		165.8 (s)		
1-OH	9.51 (br s)			

(1H, s, H-8), 7.58 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-12), 6.97 (1H, d, J = 8.6 Hz, 0.8 Hz, H-13), 4.46 (3H, s, 5-OCH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ: 164.2 (C-2), 113.2 (C-3), 139.6 (C-4), 151.2 (C-5), 112.9 (C-6), 156.3 (C-7), 94.7 (C-8), 153.3 (C-9), 105.8 (C-10), 144.6 (C-12), 106.2 (C-13), 61.7 (5-OCH₃)。以上数据与文献^[5,6]对照,确定该化合物为佛手柑内酯。

化合物3浅黄色针状结晶(甲醇); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 6.83 (1H, s, H-3), 6.24 (1H, s, H-6), 6.52 (1H, s, H-8), 7.79 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2', 6'), 6.91 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3', 5'),

12.04 (1H, br. s, 5-OH), 10.67 (1H, br. s, 7-OH), 10.43 (1H, br. s, 4'-OH); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ: 164.8 (C-2), 104.7 (C-3), 181.9 (C-4), 161.3 (C-5), 98.7 (C-6), 165.1 (C-7), 94.1 (C-8), 161.7 (C-9), 102.9 (C-10), 121.5 (C-1'), 128.6 (C-2', 6'), 117.1 (C-3', 5'), 157.6 (C-4')。以上数据与文献^[7,8]对照,确定该化合物为芹菜素。

3.2 化合物1的体外细胞毒性

采用MTT法对化合物1进行体外细胞毒性测试,结果表明化合物1对人胃癌细胞SGC-7901和人肝癌细胞BEL-7402均具有较强的细胞毒性,具体活性结果见2。

表2 化合物1的细胞毒性

Table 2 IC₅₀ values for cytotoxicity activity of compound 1

化合物 Compound	IC ₅₀ (μM)		
	SGC-7901	A549	BEL-7402
1	29.6 ± 0.37	-	32.4 ± 0.49
紫杉醇 Taxol	1.31 ± 0.53	1.85 ± 0.61	0.69 ± 0.05

4 结论

目前从芹菜根中分离得到具有较强抑制肿瘤细胞生长的化学成分主要为芹菜素和佛手柑内酯^[9,10]。本文首次报道从陕西产旱芹根中分离得到一个新的双氨基甲酸酯化合物,并研究了该化合物对人体肿瘤细胞的体外毒性,研究表明该化合物对人胃癌细胞SGC-7901和人肝癌细胞BEL-7402具有较强的细胞毒性,IC₅₀分别为29.6和32.4 μM。这一研究结果为进一步对陕西产旱芹根的开发利用提供了科学依据。

参考文献

1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia Commission of Sanitary Ministry of People's Republic of

China. Chinese pharmacopoeia, Uigur pharmacopoeia fascicule(中华人民共和国卫生部药品标准维吾尔药分册)[M]. Xinjiang: Urumqi: Xinjiang Science, Technology and Hygiene Press, 1998:141.

- Zhou H, Lou XY, Tian Y, et al. Advances in studies on chemical constituents and pharmacological activities of *Apium graveolens* L. [J]. Amino Acids Biotic Res (氨基酸和生物资源), 2006, 28: 6-9.
- Momin RA, Nair MG. Mosquitocidal, nematicidal, and anti-fungal compounds from *Apium graveolens* L. seeds [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49: 142-145.
- Li Y, Wu LY, Chen Y, et al. The recent research of *Apium graveolens* L. [J]. Chin Wild Plant Res (中国野生植物资源), 2010, 29: 15-16.