

杜虹花叶中的两个新半日花烷型二萜

高盼盼, 任雅婷, 马洁, 臧应达, 杨敬芝, 张丹, 李创军*, 张东明*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 采用硅胶柱色谱、MCI柱色谱、ODS柱色谱及高效液相色谱等色谱技术, 从杜虹花叶95%乙醇提取物中分离得到2个新半日花烷型二萜类化合物, 并通过质谱、核磁共振和ECD等波谱数据鉴定其结构, 分别为13E-6 β -hydroxylabda-8(17),13-dien-15-oic acid (**1**) 和13E-7 α -hydroxylabda-8(17),13-dien-15-oic acid (**2**)。对化合物**1**和**2**进行了抗氧化活性测试, 均无明显活性。

关键词: 杜虹花; 化学成分; 半日花烷型二萜

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2022)05-1448-04

Two new labdane diterpenoids from the leaves of *Callicarpa formosana* Rolfe

GAO Pan-pan, REN Ya-ting, MA Jie, ZANG Ying-da, YANG Jing-zhi, ZHANG Dan, LI Chuang-jun*, ZHANG Dong-ming*

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Two new labdane diterpenoids were isolated from 95% ethanol extract of the leaves of *Callicarpa formosana* Rolfe by using silica gel column, MCI column, ODS column and HPLC. Their structures were elucidated by HR-ESI-MS, NMR and ECD spectral data. All of them are new compounds, named 13E-6 β -hydroxylabda-8(17), 13-dien-15-oic acid (**1**) and 13E-7 α -hydroxylabda-8(17), 13-dien-15-oic acid (**2**). Compounds **1** and **2** were tested for antioxidant activity, and none of them had obvious activity.

Key words: *Callicarpa formosana* Rolfe; chemical composition; labdane diterpenoids

杜虹花 (*Callicarpa formosana* Rolfe) 是马鞭草科 (Verbenaceae) 紫珠属灌木。在我国江西、浙江、台湾、福建、云南等地均有分布。其叶入药, 有散瘀消肿, 止血镇痛的功效^[1], 是紫珠叶的基源植物, 收载于2020版中国药典一部^[2]。临床上常用来治疗喉炎、结膜炎等炎症^[1]以及各种出血症^[3]。杜虹花主要含有黄酮、萜类以及苯丙素类化学成分^[4,5], 具有镇痛、止血、抑

菌、抗肿瘤、抗炎等活性^[6-9]。二萜类成分是紫珠属植物的特征性化学成分之一, 表现了广泛的生物活性, 如抗炎活性^[10]、抗结核活性^[11]、抗癌活性^[12]和免疫调节活性^[13]。杜虹花二萜类成分的研究报道相对较少, 为了进一步明确杜虹花的药效物质基础, 本研究对杜虹花叶萜类富集部位展开研究, 利用多种色谱分离手段从杜虹花叶的95%乙醇提取物中分离得到2个新的半日花烷型二萜, 分别为13E-6 β -hydroxylabda-8(17), 13-dien-15-oic acid (**1**) 和13E-7 α -hydroxylabda-8(17), 13-dien-15-oic acid (**2**), 结构见图1。并对化合物**1**和**2**进行了抗氧化活性测试, 实验结果显示均无明显活性。

收稿日期: 2021-12-28; 修回日期: 2022-02-17.

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (2019YFC1711000); 国家自然科学基金资助项目 (81730093).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165702, E-mail: lichuangjun@imm.ac.cn;

Tel: 86-10-63165227, E-mail: zhangdm@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1856

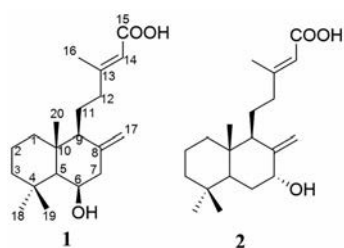


Figure 1 Structures of compounds **1** and **2**

结果与讨论

1 结构鉴定

13E-6β-hydroxylabda-8(17),13-dien-15-oic acid

(1) 白色无定型粉末, 易溶于甲醇, $[\alpha]^{20} +23$ (c 0.1 MeOH)。高分辨质谱 HR-ESI-MS m/z 319.227 7 $[M-H]^-$ ($C_{20}H_{31}O_3$, 计算值 319.227 9) 提示其分子式为 $C_{20}H_{32}O_3$, 不饱和度为 5。化合物 **1** 的氢谱显示出 4 个甲基、1 个环外双键和 1 个连氧氢信号, 初步表明化合物 **1** 可能是半日花烷型二萜类化合物^[14]。通过化合物 **1** 的 1H NMR、 ^{13}C NMR、DEPT 和 HSQC 谱对化合物 **1** 的碳氢信号进行归属 (表 1)。通过分析化合物 **1** 的 HMBC 以及 1H - 1H COSY 谱确定了 **1** 的平面结构。在 HMBC 谱 (图 2) 中 H-19 与 C-18、C-4、C-3、C-5 相关, H-20 与 C-10、C-9、C-5、C-1 相关, 以及 H-17 与 C-9、C-7 的相关, 揭示了化合物 **1** 中半日花烷双环母核以及 C-8 和 C-17 环外双键的存在。HMBC 谱中 H-16 与 C-12、C-14、C-13、C-15 相关, H-14 与 C-15、C-16、C-12 相关, 结合 1H - 1H COSY 谱 (图 2) 中 H-11/H-12 的相关, 提示结构中存在 $-CH_2-CH_2-C(CH_3)=CH-COOH$ 侧链。该侧链 C-9-C-11 的连接方式是通过 H-9 与 C-11、C-12 的 HMBC 相关, 以及 1H - 1H COSY 谱中 H-9/H-11 的相关确定的。此外, HMBC 谱中 H-6 与 C-8、C-10 的相关, 以及 1H - 1H COSY 谱中 H-5/H-6/H-7 的相关, 说明羟基连接在 C-6 位, 从而化合物 **1** 的平面结构得以确定。NOESY 谱显示 6-OH 与 H-19 相关, H-5 和 H-6 相关表明 6-OH 为 β 取向, H-14 和 H-12 相关, 表明侧链双键为 E 构型, 因此确定该化合物的构型为 **1a** (5*S*,6*R*,9*S*,10*R*) 或 **1b** (5*R*,6*S*,9*R*,10*S*)。经过文献^[15]数据比对, 化合物 **1** 与 ent-labd-6 α -ol-8(17), 13-dien-15-oic acid 结构相似, 区别仅为 6-OH 构型不

同。为了进一步确定化合物 **1** 的绝对构型, 采取量子化学计算的方法 [B3LYP/6-311G (d, p), MeOH] 计算了 **1a** 和 **1b** 的 ECD 谱, 结果表明 **1a** 的计算 ECD 曲线与化合物 **1** 的实验曲线吻合较好 (图 3), 因此确定化合物 **1** 的构型为 5*S*,6*R*,9*S*,10*R*, 结构如图 1 所示。

13E-7 α -hydroxylabda-8(17),13-dien-15-oic acid

(2) 白色无定型粉末, 易溶于甲醇, $[\alpha]^{20} -2$ (c 0.045 MeOH)。高分辨质谱 HR-ESI-MS: m/z 343.223 8 $[M+$

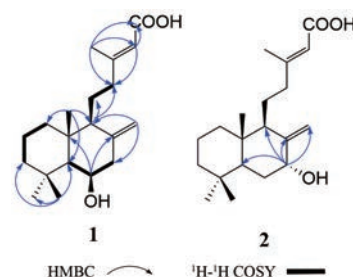


Figure 2 Key HMBC and 1H - 1H COSY correlations for compounds **1** and **2**

Table 1 NMR spectral data of compounds **1** and **2** (1H NMR, 500 MHz in $DMSO-d_6$ and ^{13}C NMR, 100 MHz in $DMSO-d_6$, J in Hz)

No.	1		2	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	1.67 (m), 0.98 (m)	40.7	1.68 (m), 1.02 (m)	38.4
2	1.57 (m), 1.43 (m)	19.1	1.52 (m), 1.46 (m)	19.00
3	1.27 (m), 1.12 (m)	43.7	1.35 (m), 1.17 (m)	41.8
4	--	34.1	--	32.8
5	1.00 (brs)	56.6	1.57 (m)	46.8
6	4.26 (m)	67.3	1.71 (m), 1.38 (m)	31.3
7	2.26 (m), 2.14 (m)	47.4	4.18 (brs)	71.9
8	--	144.7	--	150.4
9	1.55 (m)	56.1	2.10 (m)	49.6
10	--	40.4	--	39.0
11	1.60 (m), 1.50 (m)	21.3	1.60 (m), 1.41 (m)	20.8
12	2.20 (m), 1.94 (m)	39.0	2.17 (m), 1.90 (m)	38.8
13	--	159.4	--	159.4
14	5.53 (s)	115.9	5.57 (s)	115.8
15	11.87 (s)	167.4	--	167.5
16	2.07 (3H, s)	18.2	2.07 (3H, s)	18.4
17a	4.83 (brs)	108.2	4.95 (brs)	107.5
17b	4.63 (brs)	--	4.51 (brs)	--
18	0.94 (3H, s)	33.3	0.81 (3H, s)	33.2
19	1.15 (3H, s)	23.5	0.75 (3H, s)	21.5
20	0.94 (3H, s)	16.6	0.61 (3H, s)	13.4
OH	3.99 (d, 3.2)	--	--	--

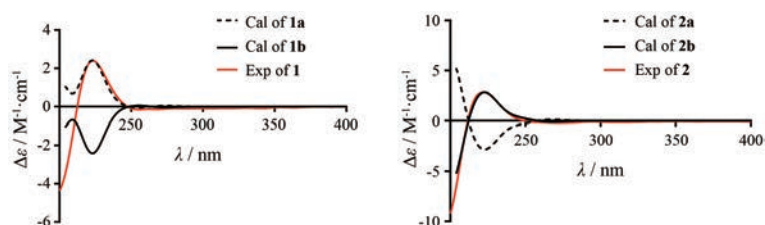


Figure 3 Experimental and calculated ECD spectra of **1** and **2**

Na^+ ($\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3\text{Na}$, 计算值 343.224 4) 提示其分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$, 不饱和度为 5。化合物 **2** 与化合物 **1** 的核磁数据相似, 表明其为结构相似的半日花烷型二萜类化合物。化合物 **2** 与化合物 **1** 核磁数据的主要不同是连氧次甲基的化学位移, 提示结构中羟基的取代位置可能不同。在 HMBC 谱中 H-7 与 C-5、C-8、C-9、C-17 相关, 说明化合物 **2** 的羟基连接在 C-7 位。化合物 **2** 的 NOESY 谱显示, H-7 与 H-17b 相关, H-17a 与 H-20 相关, 表明 H-7 与 H-20 同侧为 β 取向, H-14 和 H-12 相关, 表明侧链双键为 *E* 构型, 因此化合物 **2** 的构型为 **2a** (5*R*, 7*S*, 9*S*, 10*R*) 或 **2b** (5*S*, 7*R*, 9*R*, 10*S*)。为了进一步确定化合物 **2** 的绝对构型, 采取量子化学计算的方法 [B3LYP/6-311G (d, p), MeOH] 计算了 **2a** 和 **2b** 的 ECD 谱, 结果表明 **2b** 的计算 ECD 曲线与化合物 **2** 的实验曲线吻合较好 (图 3), 确定化合物 **2** 的绝对构型为 5*S*, 7*R*, 9*R*, 10*S*, 结构如图 1 所示。

2 化合物活性检测

通过测试化合物在肝微粒体氧化抑制模型中对丙二醛 (MDA) 释放量的抑制作用进行化合物的抗氧化活性评价, 药理结果显示化合物 **1** 和 **2** 均未表现出明显的 MDA 抑制活性。

实验部分

紫外可见分光光度仪 (JASCO V-650 型); 旋光测定仪 (JASCO P-2000 型, 日本); 质谱仪 (Agilent1100 LC/MSD)、高效液相色谱仪 (Agilent1100) (安捷伦科技有限公司); 核磁共振仪 (Bruker AV-400、Bruker AV-500); 中压制备液相色谱系统 (Büchi Gradient Former B-687, RP C18), 制备液相色谱仪 (LC-6AD, 日本岛津公司); 反相填料 (YMC-ODS C18 50 μm , 日本 YMC 公司); MCI 填料 (CHP20/P120, 日本三菱公司); 制备色谱柱 (YMC-pack, ODS-A C18, 250 mm \times 20 mm, 日本 YMC 公司); 薄层色谱用硅胶 GF₂₅₄ 和柱色谱用硅胶 (100~200 目, 200~300 目, 青岛海洋化工有限公司)。

杜虹花叶购于河北安国药材批发市场, 经中国医学科学院药物研究所马林教授鉴定为杜虹花 *Callicarpa formosana* Rolfe 的叶, 标本 (ID-S-2985) 现存放于中国医学科学院药物研究所的植物标本室。

1 提取分离

杜虹花 (10 kg) 用 95% 乙醇加热回流提取 2 次, 减压回收乙醇, 得到乙醇提取物 (8.53 kg)。将提取物加水混悬, 用体积为 1/2 的二氯甲烷萃取, 得到二氯甲烷层和水层。将二氯甲烷层减压回收溶剂, 得到 1.075 kg 浸膏, 该浸膏溶解后用等量的 100~200 目硅胶拌样,

通过硅胶柱色谱进行初步分离, 用石油醚-乙酸乙酯 (5:1~1:1)、乙酸乙酯、乙酸乙酯-甲醇 (9:1~7:3)、甲醇梯度洗脱, 得到 43 个洗脱部 A1~A43。将流分 A4~A8 合并得 45 g, 与 MCI 拌样, 进行 MCI 柱色谱分离, 用 50%~100% 的甲醇梯度洗脱, 得到 28 个洗脱部分 (B1~B28)。将流分 B8、B9 合并 (7 g), 进行中压液相色谱分离, 用 75%~100% 的甲醇梯度洗脱, 得到 26 个洗脱部分: C1~C26。流分 C15 通过反相 HPLC 制备 (55% 乙腈水溶液洗脱, 0~120 min) 进行纯化, 得到化合物 **1** ($t_{\text{R}} = 83.5 \text{ min}$, 17 mg)。流分 C18 通过反相 HPLC 制备 (55% 乙腈水溶液洗脱, 0~100 min) 进行纯化, 得到化合物 **2** ($t_{\text{R}} = 42.7 \text{ min}$, 8 mg)。

2 结构鉴定

化合物 **1** 白色无定形粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +23$ (*c* 0.1 MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$)/nm: 205 (4.18)、220 (4.01)、280 (2.79); IR/ cm^{-1} : 3 521、2 927、1 705、1 158、858; HR-ESI-MS: m/z 319.227 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_3$, 计算值 319.227 9), 确定其分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$; ^1H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) 和 ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) 数据见表 1。

化合物 **2** 白色无定形粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -2$ (*c* 0.045 MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$)/nm: 204 (5.85)、218 (5.89); IR/ cm^{-1} : 3 339、2 926、1 688、1 205、802; HR-ESI-MS: m/z 343.223 8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3\text{Na}$, 计算值 343.224 4), 确定其分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$; ^1H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) 和 ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) 数据见表 1。

3 抗氧化活性测定

设置空白组 (C 组)、模型组 (M 组)、阳性药组 (J1、J2) 和加药组, 每组设置 3 个复孔 (即平行 3 次)。每管各加 PBS 缓冲液 155 μL 、肝微粒体 30 μL 、半胱氨酸 50 μL , 即混合体系每管共 235 μL 。C 组和 M 组每管加 DMSO 2.5 μL , 阳性药组每管加姜黄素 ($1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2.5 μL (终浓度 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 加药组每管加待筛化合物 ($1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2.5 μL (终浓度 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴震荡 15 min。阳性药组、M 组和加药组每管加 $1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FeSO_4 溶液 13 μL , C 组加 PBS 缓冲液 13 μL 。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴震荡 15 min。每管各加 TCA 溶液 250 μL 、TBA 溶液 500 μL 。于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min。每管取 600 μL 于 1.5 mL EP 管中, 8 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取上清液 200 μL 于 96 孔板中, 于 532 nm 处 (选择 MDA) 测吸光度 (OD)。MDA 浓度 $C = (\text{OD}_{\text{测}} - 0.006) / 0.07 \times 10 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。抑制率 (IR) (%) = $(C_{\text{模型}} - C_{\text{化合物}}) / (C_{\text{模型}} - C_{\text{空白}}) \times 100\%$

作者贡献: 高盼盼是本文的第一作者, 负责成分分离、结构鉴定和论文撰写; 任雅婷、臧应达、马洁、杨敬芝协助提取分离工作; 张丹进行化合物抗氧化活性的测定; 李创军和张东明是本文的通讯作者, 设计和组织了整个研究, 并对论文进行了修改。

利益冲突: 所有作者声明不存在任何利益冲突。

References

- [1] Flora of China Editorial Committee of Chinese Academy of Sciences. Flora of China (中国植物志) [M]. Vol 65. Beijing: Science Press, 1982: 43.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 一部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 1088.
- [3] Wang YM, Wang F, Xiao H. Chemical constituents of *Callicarpa formosana* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2011, 42: 1696-1698.
- [4] Hu YM, Shen YM, Gan FY, et al. Four diterpenes from *Callicarpa pedunculata* [J]. Biochem Syst Ecol, 2002, 30: 999-1001.
- [5] Lu CH, Shen YM. Water-soluble constituents from *Callicarpa pedunculata* [J]. Chin J Nat Med (中国天然药物), 2008, 6: 176-178.
- [6] Ren FZ, Qu HH, Luan XH, et al. Studies on the chemical constituents of *Callicarpa bodinieri* Levl. [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2001, 13: 33-34.
- [7] Li DY, Yuan HD. Comparison of composition, toxicity and bacteriostasis of *Callicarpa cathayana* C. H. Chang and *Callicarpa formosana* [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 1992, 9: 13-15.
- [8] Lin CZ, Zhu CC, Zhang CX. Chemical constituents and antioxidant activity of the essential oils from the leaves of *Callicarpa formosana*. [J]. J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报), 2009, 17: 401-405.
- [9] Gao XL. Inhibitory effect of extracts from the fruit of *Callicarpa formosana* on HEP-2 cell line [J]. J Guiyang Med Coll (贵阳医学院学报), 2001, 26: 523.
- [10] Sun XC. Studies on the Chemical Constituents and Anti-inflammatory Activities from *Callicarpa nudiflora* and *Ligularia fischeri* (裸花紫珠和山紫菀植物化学成分及抗炎活性研究) [D]. Tianjin: Nankai University, 2017.
- [11] Chen JJ, Wu HM, Peng CF, et al. Seco-abietane diterpenoids, a phenylethanoid derivative, and antitubercular constituents from *Callicarpa pilosissima* [J]. J Nat Prod, 2009, 72: 223-228.
- [12] Jones WP, Lobocheverri T, Mi Q, et al. Cytotoxic constituents from the fruiting branches of *Callicarpa americana* collected in southern Florida [J]. J Nat Prod, 70: 372-377.
- [13] Gao JB, Yang SJ, Yan ZR, et al. Isolation, characterization, and structure-activity relationship analysis of abietane diterpenoids from *Callicarpa bodinieri* as spleen tyrosine kinase inhibitors [J]. J Nat Prod, 2018, 81: 998-1006.
- [14] Corlay N, Lecso-Bornet M, Leborgne E, et al. Antibacterial labdane diterpenoids from *Vitex vestita* [J]. J Nat Prod, 2015, 78: 1348-1356.
- [15] Lopes L, Bolzani V. Lignans and diterpenes of three *Aristolochia* species [J]. Phytochemistry, 1988, 27: 2265-2268.