

广藿香中的两个 caryolane 型倍半萜

李淑仪, 冯玉梅, 宿露, 刘丹, 李蓉涛*, 李洪梅*

(昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500)

摘要: 采用硅胶、凝胶和高效液相色谱等色谱分离技术, 从广藿香 [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] 干燥地上部分的石油醚萃取部位中分离得到两个 caryolane 型倍半萜。通过核磁共振和质谱等波谱学方法, 化合物 **1** 和 **2** 的结构分别被鉴定为 caryolanol A (**1**) 和 1 α -ethoxy-9 α -hydroxy-senecrassane (**2**), 其中化合物 **1** 为新化合物, 与化合物 **2** 互为 C₅ 差向异构体。此外, 对化合物 **1** 和 **2** 进行了体外抗流感病毒活性评价。

关键词: 广藿香; 唇形科; 倍半萜; caryolane; 抗流感病毒

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)11-3361-04

Two caryolane-type sesquiterpenoids from *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.

LI Shu-yi, FENG Yu-mei, SU Lu, LIU Dan, LI Rong-tao*, LI Hong-mei*

(Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: By means of several chromatographic techniques, such as silica gel, Sephadex LH-20 and semi-preparative high performance liquid chromatography (HPLC), two caryolane-type sesquiterpenoids were isolated from the petroleum ether soluble fraction of the aerial parts of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth., and their structures were identified as caryolanol A (**1**) and 1 α -ethoxy-9 α -hydroxy-senecrassane (**2**) by various spectroscopic methods, including NMR and HR-ESI-MS. Compounds **1** and **2** were a pair of C₅ epimers, and compound **1** was a new compound. In addition, the anti-influenza virus activity of compounds **1** and **2** was evaluated.

Key words: *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.; Lamiaceae; sesquiterpenoid; caryolane; anti-influenza virus

广藿香 [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] 为唇形科 (Lamiaceae) 刺蕊草属 (*Pogostemon*) 植物, 其原产地是菲律宾等热带地区, 国内主要分布在广东 (广州和湛江)、广西、福建和海南等地, 是“十大南药”之一^[1], 具有芳香化浊、和中止呕、发表解暑等功效^[2]。《中国植物志》^[3]记载“梗、叶或叶供药用, 主用于孕娠呕吐、胃气痛及预防流感, 为芳香健胃、解热、镇吐剂。”据

报道, 广藿香叶的甲醇提取物对流感病毒 PR8 具有显著的抑制作用, 在 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时抑制率达到 99.8%^[4]。然而, 前人对广藿香的抗流感病毒活性评价和作用机制研究仅局限于其主要成分——广藿香醇, 不能全面阐明广藿香抗流感病毒作用的药效物质基础。

广藿香的化学成分种类多样, 主要有倍半萜、三萜、黄酮类和甾体等, 其中, 倍半萜类型较多, 包括愈创木烷型、广藿香醇型、桉烷型、杜松烷型、丁香烷型和 caryolane 型等^[5-12]。为了探明广藿香中发挥抗流感病毒活性的药效物质, 本实验从广藿香地上部分石油醚萃取相中分离得到 2 个 caryolane 型倍半萜 (图 1), 互为 C₅ 差向异构体, 其中化合物 **1** 是新化合物。然而, 化合物 **1** 和 **2** 均未表现出抗流感病毒活性。

收稿日期: 2022-06-28; 修回日期: 2022-08-19.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32060106); 云南省应用基础研究计划项目 (2019FB025); 昆明理工大学新型抗流感药物研发省创新团队 (2019HC018).

*通讯作者 Tel: 86-871-65920569,

E-mail: lihongmei0823@163.com; rongtaolikm@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0785

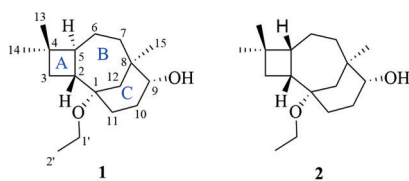


Figure 1 Chemical structures of compounds **1** and **2**

结果与讨论

1 结构鉴定

Caryolanol A (**1**) 为白色粉末。通过高分辨质谱 HR-ESI-MS 的准分子离子峰 m/z 289.213 7 $[M+Na]^+$ (计算值 289.213 8, $C_{17}H_{30}O_2Na$) 确定其分子式为 $C_{17}H_{30}O_2$, 不饱和度为 3。红外光谱中 $3\ 395\ cm^{-1}$ 的吸收峰表明该化合物结构中存在羟基。化合物 **1** 的 1H NMR 谱 (表 1) 中可以观察到 3 个甲基单峰信号 [δ_H 0.97 (3H, s, Me-13), 0.99 (3H, s, Me-14), 0.90 (3H, s, Me-15)]。另外, 1 个甲基三重峰 [δ_H 1.14 (3H, t, $J = 7.0\ Hz$, Me-2')] 和一对氧化的亚甲基信号 [δ_H 3.22 (dq, $J = 14.5, 7.0\ Hz$, H_a-1'); 3.46 (dq, $J = 14.5, 7.0\ Hz$, H_b-1')] 的出现, 说明结构中存在 1 个乙氧基, $H_2-1'/Me-2'$ 之间的 $^1H-^1H$ COSY 相关 (图 2) 充分证明了这一点。除了乙氧基信号 [δ_C 57.4 (t, C-1') 和 16.1 (q, C-2')] 外, 化合物 **1** 的碳谱 (表 1) 中可以观察到 15 个碳信号, 包括 3 个甲基, 6 个亚甲基, 3 个次甲基 [包括 1 个含氧取代的次甲基 δ_C 72.5 (d, C-9)], 1 个含氧取代的叔碳 [δ_C 75.4 (s, C-1)], 以及 2 个季碳。仔细对比发现, 化合物 **1** 的上述数据与一个 caryolane 型倍半萜 caryolane-1,9 β -diol^[13,14] 的数据非常相似。二者的区别在于化合物 **1** 中乙氧基的出现, 以及 C-1 位 (δ_C 70.7 \rightarrow 75.4) 和 C-11 位 (δ_C 33.3 \rightarrow 29.3) 化学位移的变化, 这说明化合物 **1** 中乙氧基取代在 C-1 位。HMBC 谱 (图 2) 中, $H_2-1'/C-1$ 之间的相关峰充分证明了这一连接。另外, 低场次甲基 H-9 (δ_H 3.44) 与 C-11 (δ_C 29.3) 和 C-12 (δ_C 41.3) 之间的 HMBC 相关, 说明 C-9 被羟基取代。此外, $^1H-^1H$ COSY 谱中两组质子自旋偶合系统 $H_2-3/H-2/H-5/H_2-6/H_2-7$ 和 $H-9/H_2-10/H_2-11$ 进一步证实了结构的正确性。化合物 **1** 的相对构型是通过 ROESY 实验确定的。ROESY 谱 (图 2) 中, H-2/Me-13, H-5/Me-14, H-5/ H_2-12 , H-2/ $H_\beta-7$ (δ_H 1.39), 以及 H-9/ $H_\beta-7$ 之间的 NOE 相关, 说明化合物 **1** 与 caryolane-1,9 β -diol 具有一致的相对构型。此外, H-2 与 H-5 之间的偶合常数 ($J = 12.1\ Hz$) 也充分证实了 A/B 环反式耦合^[14]。

化合物 **2** 的碳谱数据 (表 1) 与相同溶剂 ($CDCl_3$) 中测得的 1 α -ethoxy-9 α -hydroxy-senecrassane^[15] 碳谱数据几乎完全一致, 故化合物 **2** 的结构得以确定。因此, 化合物 **1** 和 **2** 是一对 C_5 差向异构体。由于文献^[15] 中仅

Table 1 1H (600 MHz) and ^{13}C NMR (150 MHz) data of compounds **1** and **2** ($CDCl_3$)

No.	1		2	
	δ_H (J in Hz)	δ_C , mult.	δ_H (J in Hz)	δ_C , mult.
1		75.4 s		75.7 s
2	2.11 (ddd, 12.2, 10.4, 7.7)	38.7 d	2.61 (dt, 11.4, 7.2)	38.9 d
3	1.67 (m) 1.49 (m)	36.4 t	1.86 (t, 11.3) 1.51 (m)	35.3 t
4		35.4 s		34.0 s
5	1.92 (ddd, 12.1, 7.8, 4.3)	44.9 d	1.80 (m)	49.7 d
6	1.51 (m) 1.34 (m)	21.0 t	1.80 (m) 1.42 (m)	22.2 t
7	1.41 (m) 1.13 (m)	36.0 t	1.51 (m) 0.97 (m)	36.1 t
8		39.1 s		37.4 s
9	3.44 (overlap)	72.5 d	3.32 (br s)	74.4 d
10	1.99 (m) 1.78 (m)	28.1 t	1.74 (m) 1.71 (m)	26.5 t
11	1.70 (m) 1.63 (m)	29.3 t	1.80 (m) 1.62 (m)	31.5 t
12	1.47 (m, 2H)	41.3 t	1.80 (m) 1.31 (br d, 14.0)	36.6 t
13	0.97 (s)	20.8 q	1.17 (s)	28.9 q
14	0.99 (s)	30.6 q	0.91 (s)	24.5 q
15	0.90 (s)	26.8 q	0.98 (s)	30.2 q
1'	3.46 (dq, 14.5, 7.0) 3.22 (dq, 14.5, 7.0)	57.4 t	3.46 (dq, 14.4, 7.0) 3.23 (dq, 14.4, 7.0)	55.7 t
2'	1.14 (t, 7.0)	16.1 q	1.07 (t, 7.0)	16.2 q

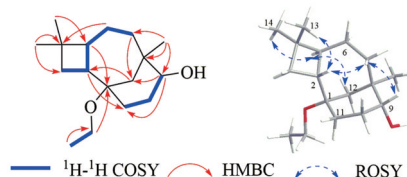


Figure 2 $^1H-^1H$ COSY, key HMBC and ROESY correlations of compound **1**

报道了 1 α -ethoxy-9 α -hydroxy-senecrassane 的几个典型氢谱数据, 故本文对该化合物的氢谱数据进行了系统归属 (表 1)。

2 抗流感病毒活性评价

本实验采用流感病毒 A/WSN/33/2009 (H1N1) 感染的 MDCK 细胞模型, 对化合物 **1** 和 **2** 进行抗流感病毒活性评价, 以 nucleozin 作为阳性对照。然而, 化合物 **1** 和 **2** 均未表现出明显的抗流感病毒活性。

3 讨论

本实验从广藿香地上部分的石油醚萃取相中分离鉴定了 2 个 caryolane 型倍半萜, 二者互为 C_5 差向异构体, 其中化合物 **1** 为新化合物。抗流感病毒活性评价结果表明, 化合物 **1** 和 **2** 均未表现出明显的抗病毒活性, 这提示 caryolane 型倍半萜可能不是广藿香发挥抗流感病毒活性的药效物质。

Caryolane 型倍半萜可能是由丁香烷 (caryophyllane) 型倍半萜重排形成甲基桥而得到的^[16-18], 但是丁香烯等丁香烷型倍半萜在广藿香油中的含量并不高^[10,11], 这可能是导致 caryolane 型倍半萜在广藿香中含量较低的原因。

实验部分

Autopo VI 全自动控温型高精度旋光仪 (美国 Rudolph Research Analytical 公司); BrukerAvance III HD 600 MHz 核磁共振波谱仪和 Bruker Tensor-27 红外光谱仪 (德国 Bruker 公司); Q Exactive 液相色谱超高分辨质谱联用仪 (美国 Thermo 公司); Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 配备 ZORBAX SB-C-18 反相柱 (分析型: 4.6 mm × 150 mm, 1 mL·min⁻¹; 半制备型: 9.4 mm × 250 mm, 3 mL·min⁻¹) 和二极管阵列检测器 (美国 Agilent 公司); Hei-VAP Value G3 型旋转蒸发仪 (德国 Heidolph 公司); 3111 型 CO₂ 恒温培养箱 (美国 ThermoFisher 公司); CKX41 型倒置相差显微镜 (日本 OLYMPUS 公司); Spectra Max M2 多功能读板机 (美国 Molecular Devices 公司); 薄层析硅胶 GF₂₅₄、柱层析硅胶 (青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 (瑞典 GE Healthcare Biosciences 公司); ODS-C₁₈ (75 μm) 反相填充材料 (日本 YMC 公司); MTT、DMSO (北京 Solarbio 公司); 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); 胰蛋白酶 (瑞士 Roche 公司); DMEM 细胞培养基 (美国 Invitrogen 公司); nucleozin (美国 MedChemExpress 公司)。

药材样品于 2021 年 4 月购自昆明市新螺蛳湾药材市场, 并由昆明理工大学生命科学与技术学院陈宣钦副教授鉴定为广藿香的茎和叶, 凭证标本 (KUMST20210401) 存放于昆明理工大学生命科学与技术学院资源药物化学重点实验室。

1 提取与分离

干燥的广藿香地上部分 (25 kg) 经适当粉碎后, 在室温下用 95% 乙醇浸渍提取 3 次 (每次 24 h), 合并提取液, 减压浓缩回收乙醇得到浸膏。将浸膏与适量水混悬后, 依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇进行萃取, 获得相应的石油醚相 (650 g)、乙酸乙酯相 (160 g) 和正丁醇相 (215 g)。石油醚相 (650 g) 利用硅胶柱色谱 (80~100 目硅胶 715 g 拌样, 200~300 目硅胶 3 kg 装柱) 进行粗划段, 使用石油醚-丙酮梯度洗脱 (10→0:1), 经薄层色谱 (TLC) 检识合并得到 6 段, Frs. 1~6。Fr.3 (34.11 g) 利用硅胶柱色谱, 石油醚-乙酸乙酯 (100:1→10:1) 作为流动相进行梯度洗脱, 得到 3 个组分, Frs.3-1~3-3。Fr.3-3 (3.12 g) 依次经过 Sephadex LH-20 柱 (石油醚/氯仿/甲醇 5:5:1)、硅胶柱 (石油醚/二氯甲烷 2:1→0:1)

和 Sephadex LH-20 柱 (石油醚/氯仿/甲醇 5:5:1) 洗脱, 最后通过半制备 HPLC (70% 甲醇/水, 3 mL·min⁻¹) 纯化, 得到化合物 1 (6.5 mg) 和 2 (8.2 mg)。

2 结构鉴定

化合物 1 白色粉末, $[\alpha]_D^{21} +4.44$ (*c* 0.18, MeOH); HR-ESI-MS (pos.): *m/z* 289.213 7 [M+Na]⁺ (C₁₇H₃₀O₂Na, 计算值 289.213 8); IR (KBr) ν_{\max} : 3 395, 2 972, 2 936, 2 882, 1 629, 1 470, 1 388, 1 322, 1 095, 1 077, 1 040, 1 011, 966, 945, 637, 580 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) 和 ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) 见表 1。

化合物 2 白色粉末, $[\alpha]_D^{25} -34.00$ (*c* 0.13, MeOH); ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) 和 ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) 见表 1。

3 抗流感病毒活性评价

MDCK 细胞使用 DMEM 培养基 (含有 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素双抗溶液), 于 35 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。MDCK 细胞以 1.0×10⁵ 个/孔接种于 96 孔板, 化合物 1 和 2 分别使用病毒 A/WSN/33/2009 (H1N1) 感染的 MDCK 细胞, 48 h 后进行抗流感病毒活性评价。以 nucleozin 作为阳性对照, Cell Titer-Glo 法测定其各自的荧光值。

作者贡献: 李淑仪负责广藿香化学成分的提取分离、化合物结构鉴定和文章的撰写; 冯玉梅协助进行广藿香化学成分的分离纯化; 宿露负责抗流感病毒活性评价; 刘丹、李蓉涛和李洪梅负责实验的设计和论文框架的构建; 李洪梅负责稿件的修改。

利益冲突: 本研究不存在研究者、伦理委员会成员、受试者监护人以及公开研究成果有关的利益冲突。

References

- [1] Chen YS. Research progress of rare southern medicine *Pogostemon cablin* [J]. Guangdong Agric Sci (广东农业科学), 2007, 1: 109-112.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 Ed. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 46.
- [3] Flora of China Editorial Committee of the Academy of Sciences of China. Flora of China (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1997: 370-371.
- [4] Kiyohara H, Ichino C, Kawamura Y, et al. Patchouli alcohol: *in vitro* direct anti-influenza virus sesquiterpene in *Pogostemon cablin* Benth. [J]. J Nat Med, 2012, 66: 55-61.
- [5] Tsubaki N, Nishimura K, Hirose Y. Hydrocarbons in patchouli oil [J]. Bull Chem Soc Jpn, 1967, 40: 597-600.
- [6] Zhou L, Xu M, Yang CR, et al. New patchoulol-type sesquiterpenoids from *Pogostemon cablin* [J]. Helv Chim Acta, 2011, 94:

- 218-223.
- [7] Zhou XQ, Zhou XQ, Ma JY, et al. Anti-influenza patchoulol-type sesquiterpenoids from *Pogostemon cablin* [J]. *Phytochem Lett*, 2022, 48: 34-39.
- [8] Ma GH, Chen JY, Wang LM, et al. Eighteen structurally diversified sesquiterpenes isolated from *Pogostemon cablin* and their inhibitory effects on nitric oxide production [J]. *Fitoterapia*, 2022, 156: 105098.
- [9] Dai O, Li XH, Zhou QM, et al. Sesquiterpenoids from the aerial parts of *Pogostemon cablin* [J]. *Phytochem Lett*, 2018, 24: 56-59.
- [10] Su JY, Zhang GW, Li H, et al. Chemical constituents and antibacterial activity of essential oil of *Pogostemon cablin* (I) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2001, 32: 204-205.
- [11] Zhang GW, Lan WJ, Su JY, et al. Chemical constituents and antibacterial activity of essential oil of *Pogostemon cablin* (II) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2002, 33: 210-212.
- [12] Zhang TH, Peng C, Zuo J, et al. A new patchoulane-type sesquiterpenoid from patchouli oil and its anti-inflammatory activity [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 3163-3167.
- [13] Heymann H, Tezuka Y, Kikuchi T, et al. Constituents of *Sindora sumatrana* MIQ. I. isolation and NMR spectral analysis of sesquiterpenes from the dried pods [J]. *Chem Pharm Bull*, 1994, 42: 138-146.
- [14] Sun P, Wu JQ, Zhu YQ, et al. Micaryolanes A and B, two new caryolane-type sesquiterpenoids from marine *Streptomyces* sp. AH25 [J]. *Chem Biodivers*, 2020, 17: e2000769.
- [15] Fraga BM, Diaz CE, Amador LJ, et al. Bioactive compounds from transformed root cultures and aerial parts of *Bethencourtia hermosae* [J]. *Phytochemistry*, 2014, 108: 220-228.
- [16] Abraham WR, Ernst L, Arfmann HA. Rearranged caryophyllenes by biotransformation with *Chaetomium cochliodes* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29: 757-763.
- [17] Fitjer L, Malich A, Paschke C, et al. Rearrangement of (-)- β -caryophyllene: a product analysis and force field study [J]. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 9180-9189.
- [18] Duran R, Corrales E, Hernandez-Galan R, et al. Biotransformation of caryophyllene oxide by *Botrytis cinerea* [J]. *J Nat Prod*, 1992, 62: 41-44.