

广藿香中一个新的杜松烷型倍半萜和一个新天然产物

冯玉梅, 唐建贤, 刘致远, 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 (Sephadex LH-20), ODS 柱和高效液相色谱等色谱分离技术从广藿香 (*Pogostemon cablin*) 地上部分的乙酸乙酯相中分离得到了一个新的杜松烷型倍半萜 pogocablene P (**1**) 和一个具有环己酮结构的新天然产物 pogocablone A (**2**), 并通过质谱和核磁共振等波谱学方法确定了这两个化合物的结构。同时, 借助计算 ECD 的方法确定了化合物 **2** 的绝对构型。另外, 对化合物 **1** 和 **2** 进行了抗流感病毒和抗炎活性评价。

关键词: 广藿香; 唇形科; 化学成分; 杜松烷型倍半萜; 新天然产物

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)08-2295-05

A new cadinane-type sesquiterpenoid and a new natural product from the aerial parts of *Pogostemon cablin*

FENG Yu-mei, TANG Jian-xian, LIU Zhi-yuan, LI Rong-tao, LI Hong-mei*

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

Abstract: A new cadinane-type sesquiterpenoid, pogocablene P (**1**), and a new natural product with cyclohexanone skeleton, pogocablone A (**2**), were isolated from the EtOAc soluble fraction of the aerial parts of *Pogostemon cablin* by several chromatographic methods, such as silica gel, Sephadex LH-20, ODS and high performance liquid chromatography (HPLC), and so on. Their structures were identified by means of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. In addition, the absolute configuration of compound **2** was determined by electronic circular dichroism (ECD) calculation. Furthermore, the anti-influenza virus and anti-inflammatory activities of compounds **1** and **2** were evaluated.

Key words: *Pogostemon cablin*; Lamiaceae; chemical constituent; cadinane-type sesquiterpenoid; new natural product

广藿香 [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] 为唇形科 (Lamiaceae) 刺蕊草属 (*Pogostemon*) 植物, 原产于南亚和东南亚, 如印度尼西亚、马来西亚、菲律宾和印度等, 并于 9 世纪作为香料引入中国^[1]。广藿香味辛、性微温, 常以其干燥地上部分入药, 为历代医家防治瘟疫之要药, 更是现代常用的抗流感病毒中药, 具有芳香化浊、和中止呕、发表解暑等功效, 临床上广泛用于治疗中暑、胸闷、腹痛、呕吐和腹泻等^[2-4], 是藿香正

气口服液 (水、胶囊、丸)、抗病毒口服液和连花清瘟颗粒 (胶囊) 等中成药的重要原料^[5], 在我国临床常用中药中占有重要地位。然而, 前人对广藿香的抗流感病毒活性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^[6]。

植物化学研究表明, 广藿香的化学成分主要有萜类、黄酮、苯丙素、类固醇和生物碱等^[7]。其中, 倍半萜是广藿香的代表性成分^[8,9], 主要包括广藿香醇型、广藿香烯型和愈创木烷型倍半萜^[10]。此外, 还包含为数不多的桉烷型^[2,11,12]、杜松烷型^[5,11]和香木榄型^[13]倍半萜。为了进一步寻找广藿香中的抗流感病毒活性成分, 本文从广藿香地上部分的乙酸乙酯相中分离得到

收稿日期: 2023-12-30; 修回日期: 2024-03-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32060106, 22207048).

*通讯作者 Tel: 86-871-65920569, E-mail: lihongmei0823@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0004

一个新的杜松烷型倍半萜 pogocablene P (**1**) 和一个新的天然产物 pogocablone A (**2**, 图 1), 并对其进行了抗流感病毒活性评价。

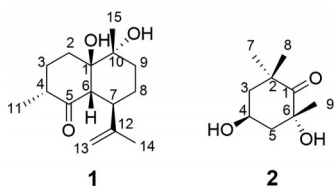


Figure 1 Chemical structures of compounds **1** and **2**

结果与讨论

1 结构鉴定

化合物 **1** 为无色油状物, 通过 HR-ESI-MS 的准分子离子峰 m/z 275.161 6 $[M+Na]^+$ (计算值 275.161 8, $C_{15}H_{24}O_3Na$) 确定其分子式为 $C_{15}H_{24}O_3$, 不饱和度为 4。化合物 **1** 的 1H NMR 谱 (表 1) 显示了末端双键的 2 个氢信号 [δ_H 4.65 和 4.56 (各 1H, s, H₂-13)] 和 3 个甲基信号 [δ_H 1.57 (3H, s, Me-14)、1.18 (3H, s, Me-15) 和 0.83 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, Me-11)]。化合物 **1** 的 ^{13}C NMR 谱 (表 1) 显示了 15 个碳信号, 包括 3 个甲基碳信号 [δ_C 14.7 (C-11)、17.6 (C-14) 和 22.6 (C-15)], 4 个脂肪族亚甲基碳信号 [δ_C 27.3 (C-2)、31.6 (C-3)、29.5 (C-8) 和 37.7 (C-9)]; 3 个次甲基碳信号 [δ_C 40.9 (C-4)、61.3 (C-6) 和 49.6 (C-7)], 2 个含氧叔碳 [δ_C 81.9 (C-1) 和 75.6 (C-10)], 以及末端双键的 1 对碳信号 [δ_C 147.2 (C-12) 和 112.8 (C-13)] 和 1 个酮羰基碳信号 [δ_C 216.2 (C-5)]。化合物 **1** 的上述数据与杜松烷型倍半萜 (+)-(1*S*,4*R*,6*S*,7*R*,10*S*)-1-hydro-xycadinan-12-ene-5-one^[11] 的数据非常相似, 两个化合物的区别在于化合物 **1** 中 10 位上羟基的出现, 这导致了化合物 **1** 中 C-1 (δ_C 77.8→81.9)、C-6 (δ_C 57.9→61.3)、C-8 (δ_C 25.9→29.5)、C-9 (δ_C 30.0→37.7)、C-10 (δ_C 39.9→75.6) 和 C-15 (δ_C 14.0→22.6) 位的显著低场位移。HMBC 谱 (图 2) 中, H-8 与 C-6、C-7、C-9 和 C-10, H-9 与 C-1、C-7、C-8、C-10 和 C-15, 以及 Me-15 与 C-1、C-9 和 C-10 的相关进一步证实了 10-OH 的存在。另外, 化合物 **1** 的 1H - 1H COSY 谱 (图 2) 中, H₂-2/H₂-3/H-4/Me-11 和 H-6/H-7/H₂-8/H₂-9 的质子自旋系统充分确定了化合物 **1** 的杜松烷型倍半萜母核以及平面结构。此外, 化合物 **1** 的相对构型是通过 ROESY 实验 (图 3) 确定的, H-4/H-6 和 H-6/Me-15 的 NOE 相关, 说明其共面并确定为 β 构型; 同时, H-7/Me-11 存在 NOE 相关, 说明二者共面且为 α 构型。为了确定 1-OH 的构型, 重新用 CD_3COCD_3 作为氘代试剂测定了化合物 **1** 的 ROESY 谱, 发现 1-OH (δ_H 3.21) 与 H-6 (δ_H 2.26)

存在 NOE 相关, 所以 1-OH 为 β 构型, 化合物 **1** 的结构得以确定, 并命名为 pogocablene P。

Table 1 1H (600 MHz) and ^{13}C NMR (150 MHz) data of compounds **1** and **2** in CD_3OD

No.	1		2	
	δ_H (J in Hz)	δ_C , mult.	δ_H (J in Hz)	δ_C , mult.
1		81.9 (s)		215.1 (s)
2	1.87 m 2.17 td (14.2 4.7)	27.3 (t)		44.7 (s)
3	1.60 m 1.89 m	31.6 (t)	1.50 overlap 1.92 dt (12.8, 3.7)	49.6 (t)
4	2.58 m	40.9 (d)	4.32 m	63.5 (d)
5		216.2 (s)	1.54 overlap 2.18 dt (13.5, 3.7)	49.4 (t)
6	2.35 br d (12.5) 2.70 m	61.3 (d)		75.6 (s)
7		49.6 (d)	1.28 s	28.1 (q)
8	1.50 m (2H)	29.5 (t)	0.99 s	28.0 (q)
9	1.58 m 1.81 m	37.7 (t)	1.16 s	25.9 (q)
10		75.6 (s)		
11	0.83 d (6.4)	14.7 (q)		
12		147.2 (s)		
13	4.56 s 4.65 s	112.8 (t)		
14	1.57 s	17.6 (q)		
15	1.18 s	22.6 (q)		

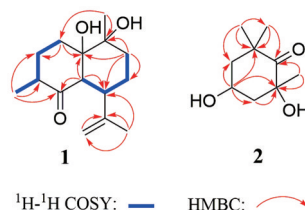


Figure 2 1H - 1H COSY correlations of compound **1** and key HMBC correlations of compounds **1** and **2**

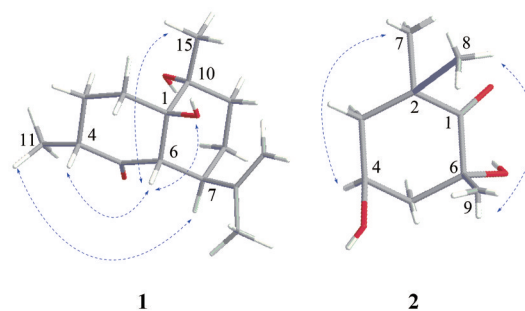


Figure 3 Key ROESY correlations of compounds **1** and **2**

化合物 **2** 为白色无定形粉末, 通过 HR-ESI-MS 的准分子离子峰 m/z 195.099 0 $[M+Na]^+$ (计算值 195.099 2, $C_9H_{16}O_3Na$) 确定其分子式为 $C_9H_{16}O_3$, 不饱和度为 2。化合物 **2** 的 IR 光谱说明结构中存在羟基 (3 423 cm^{-1}) 和羰基 (1 709 cm^{-1})。化合物 **2** 的 1H NMR 谱 (表 1) 显

示了一个含氧次甲基信号 [δ_{H} 4.32 (1H, m, H-4)] 和 3 个甲基信号 [δ_{H} 1.28 (3H, s, Me-7)、1.16 (3H, s, Me-9) 和 0.99 (3H, s, Me-8)]。化合物 **2** 的 ^{13}C NMR 谱 (表 1) 显示了 9 个碳信号, 包括 3 个甲基信号 [δ_{C} 28.1 (C-7)、28.0 (C-8) 和 25.9 (C-9)], 2 个亚甲基碳信号 [δ_{C} 49.6 (C-3) 和 49.4 (C-5)], 1 个含氧次甲基碳信号 [δ_{C} 63.5 (C-4)], 1 个含氧叔碳信号 [δ_{C} 75.6 (C-6)], 1 个季碳信号 [δ_{C} 44.7 (C-2)] 和 1 个羰基碳信号 [δ_{C} 215.1 (C-1)]。HMBC 谱 (图 2) 中, Me-7 (Me-8) 与 C-1、C-2、C-3 和 C-8 (C-7), Me-9 与 C-1、C-5 和 C-6, H-4 与 C-2、C-5 和 C-6, H-3 与 C-1、C-2、C-4、C-5、C-7 和 C-8, 以及 H-5 与 C-1、C-3、C-4、C-6 和 C-9 的一系列相关, 确定了化合物 **2** 的平面结构。在化合物 **2** 的 ROESY 谱 (图 3) 中, H-4/Me-7 存在 NOE 相关, 说明二者共面并确定为 α 构型, Me-8/Me-9 存在 NOE 相关, 则二者共面且为 β 构型。因此, 4-OH 和 6-OH 分别为 β 和 α 构型。通过对比化合物 **2** 的实验和计算 ECD 曲线 (图 4), 确定了其绝对构型为 4*S* 和 6*R*, 并命名为 pogocablone A。化合物 **2** 是一个环己酮衍生物, 曾作为合成产物被报道^[14], 且仅报道了部分 ^1H NMR 数据。本文首次对化合物 **2** 的 ^1H 和 ^{13}C NMR 数据进行了详尽的报道。

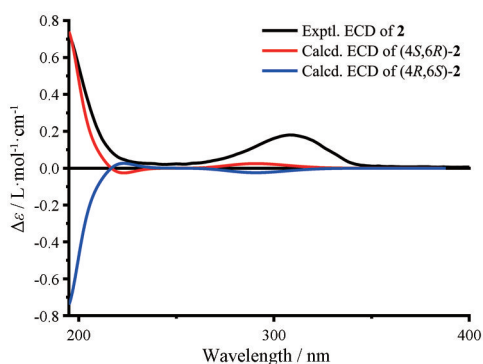


Figure 4 Calculated and experimental ECD spectra of compound **2**

2 化合物的活性评价

采用流感病毒 A/WSN/1933 (H1N1) 感染犬肾 (Madin-Darby canine kidney, MDCK) 细胞建立病毒感染模型, 以 nucleozin 作为阳性对照, 对化合物 **1** 和 **2** 进行抗流感病毒活性评价。结果, 化合物 **1** 和 **2** 均未表现出抗流感病毒活性。

此外, 采用 Griess 法检测化合物 **1** 和 **2** 的抗炎活性。结果表明, 化合物 **1** 和 **2** 对脂多糖诱导的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 中一氧化氮生成并无明显的抑制作用。

3 讨论

本实验从广藿香地上部分的乙酸乙酯萃取物中分

离得到了一个新的杜松烷型倍半萜 pogocablone P (**1**) 和一个具有环己酮结构的新天然产物 pogocablone A (**2**)。杜松烷型倍半萜在广藿香中报道较少, 这说明该类型倍半萜在广藿香中含量较低。另外, 文献中仅报道了化合物 **2** 的部分 ^1H NMR 数据, 本文首次对化合物 **2** 的理化数据 (^1H NMR、 ^{13}C NMR、HR-ESI-MS、旋光、紫外和红外) 进行了详尽的报道, 并通过计算 ECD 的方法确定了化合物 **2** 的绝对构型。

化合物 **1** 和 **2** 的抗流感病毒和抗炎活性结果表明, 杜松烷型倍半萜和环己酮衍生物可能并不是广藿香发挥抗流感病毒和抗炎活性的物质基础。

实验部分

高精度旋光仪 (Autopo VI 全自动控温型, Rudolph Research Analytical 公司, 美国); 核磁共振波谱仪 (Bruker AVANCE-III 600 MHz) 和红外光谱仪 (Bruker Tensor-27, Bruker 公司, 德国); 超高效液相色谱-高分辨质谱联用仪 (Q Exactive 型, Thermo 公司, 美国); 紫外分光光度计 (UV-8000 型, 上海元析仪器有限公司); 圆二色光谱仪 (Chirascan V100 型, 应用光物理有限公司, 英国); 高效液相色谱仪 (Agilent 1260), 配备 ZORBAX SB-C18 反相柱 (分析型: 250 mm × 4.6 mm, 1 mL·min⁻¹; 半制备型: 250 mm × 9.4 mm, 3 mL·min⁻¹) 和二极管阵列检测器 (Agilent 科技有限公司, 美国); 旋转蒸发器 (EYELA N-1200A 型) 和 ODS-C₁₈ 反相填充材料 (75 μm) (东京理化器械株式会社, 日本); 薄层层析硅胶板 (GF₂₅₄) 和硅胶柱色谱填料 (80~100 目, 200~300 目, 青岛海洋化工有限公司); MTT 和 DMSO (北京索莱宝科技有限公司); nucleozin (MedChemExpress 公司, 美国)。

广藿香药材于 2021 年 4 月购自云南省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教授鉴定为广藿香的茎和叶, 凭证标本 (KUST20210401) 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, 在室温下用 95% 乙醇浸渍提取 3 次, 将提取液合并, 减压浓缩得到浸膏。然后, 浸膏依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 分别得到石油醚相 (650 g)、乙酸乙酯相 (160 g) 和正丁醇相 (215 g)。乙酸乙酯萃取相 (160 g) 使用聚酰胺拌样, 通过中压液相色谱 (MPLC/ODS-C₁₈), 以甲醇-水系统 (1:5、1:2、4:5、1:1, 每个梯度 8 L) 为流动相进行梯度洗脱, 经过 TLC 监测, 合并相同馏分, 得到 7 段 (A1~A7)。

A1段(5.02 g)经过硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯 20:1)分离,得到5个组分,A1-1~A1-5。A1-1段(637.7 mg)先后经过Sephadex LH-20柱(甲醇)和硅胶柱(二氯甲烷-乙酸乙酯 20:1)洗脱,最后经半制备HPLC(25%甲醇水)纯化,得到化合物**2**(3.3 mg, $t_R = 17.6$ min)。

A2段(28.59 g)经过硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯 15:1→二氯甲烷-甲醇 15:1)分离,得到3个组分,A2-1~A2-3。A2-3段(1.31 g)先后经过四次硅胶柱色谱(流动相分别为二氯甲烷-异丙醇 60:1,石油醚-丙酮 6:1,三氯甲烷-甲醇 150:1和石油醚-乙酸乙酯 1:1)洗脱后,得到化合物**1**(2.1 mg)。

2 结构鉴定

化合物**1** 无色油状物, $[\alpha]_D^{20.2} + 45.71$ (c 0.07, MeOH); HR-ESI-MS (+): m/z 275.161 6 $[M+Na]^+$ (计算值 275.161 8, $C_{15}H_{24}O_3Na$); 1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) 和 ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) 见表1。

化合物**2** 白色无定形粉末, $[\alpha]_D^{20.3} + 25.23$ (c 0.13, MeOH), UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 195 (1.65) nm; ECD (MeOH) λ_{max} ($\Delta\epsilon$): 195 (0.74) nm, 308 (0.18) nm; IR (KBr) ν_{max} : 3 423、1 709、1 457、1 383、1 316 cm^{-1} ; HR-ESI-MS (+): m/z 195.099 0 $[M+Na]^+$ (计算值 195.099 2, $C_9H_{16}O_3Na$); 1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) 和 ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) 见表1。

3 计算ECD

ECD计算的方法与本课题组发表的文章^[15]描述一致。

4 化合物的活性评价

4.1 抗流感病毒活性评价 用流感病毒 A/WSN/1933 (H1N1) 感染 MDCK 细胞建立体外抗流感病毒筛选模型。MDCK 细胞以 1.0×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板,置于培养箱中培养 24 h 后开始给药。含有与药物等体积 DMSO 的病毒维持液设置为空白对照组,只含有 100TCID₅₀ (引起半数细胞病变所需的病毒量) 病毒的维持液设置为阴性对照组, nucleozin 给药组设置为阳性对照组。实验组为化合物**1**和**2**,化合物终浓度为 $50 \mu mol \cdot L^{-1}$,给药后继续在 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO₂ 的培养条件下培养 48 h 后采用 MTT 法检测细胞活性。若化合物的保护率大于 50%,则设置不同浓度梯度重复实验,通过 IBM SPSS Statistics 计算得到 EC₅₀ (半数有效浓度)。

4.2 抗炎活性评价 抗炎活性评价方法与课题组之前发表的文章^[16]中描述一致。

作者贡献: 冯玉梅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;唐建贤和刘致远在实验操作和结构鉴定过程中给予指导;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] Peng XJ, Ang S, Zhang YZ, et al. Chemical constituents with antiproliferative activity from *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth [J]. Front Chem, 2022, 10: 938851.
- [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: 46-47.
- [3] Zaim M, Ali A, Joseph J, et al. Serological and molecular studies of a novel virus isolate causing yellow mosaic of patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth] [J]. PLoS One, 2013, 8: e83790.
- [4] Chien JH, Lee SC, Chang KF, et al. Extract of *Pogostemon cablin* possesses potent anticancer activity against colorectal cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 9758156.
- [5] Li C, Jing WG, Mo XL, et al. Research progress in chemical constituents and pharmacological effects of *Pogostemon cabin* and predictive analysis of quality marker [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2023, 58: 954-965.
- [6] Li SY, Feng YM, Su L, et al. Two caryolane-type sesquiterpenoids from *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 3361-3364.
- [7] Chen MW, Zhang JM, Lai YF, et al. Analysis of *Pogostemon cablin* from pharmaceutical research to market performances [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2013, 22: 245-257.
- [8] Sundaresan V, Singh SP, Mishra AN, et al. Composition and comparison of essential oils of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. (Patchouli) and *Pogostemon travancoricus* Bedd. var. *travancoricus* [J]. J Essent Oil Res, 2009, 21: 220-222.
- [9] Zhou QM, Chen MH, Li XH, et al. Absolute configurations and bioactivities of guaiane-type sesquiterpenoids isolated from *Pogostemon cablin* [J]. J Nat Prod, 2018, 81: 1919-1927.
- [10] Xu FF, Cai WN, Ma T, et al. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, quality control, industrial application, pharmacokinetics and network pharmacology of *Pogostemon cablin*: a comprehensive review [J]. Am J Chin Med, 2022, 50: 691-721.
- [11] Dai O, Li XH, Zhou QM, et al. Sesquiterpenoids from the aerial parts of *Pogostemon cablin* [J]. Phytochem Lett, 2018, 24: 56-59.
- [12] 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.
- [13] Tsubaki N, Nishimura K, Hirose Y. Hydrocarbons in patchouli

- oil [J]. Bull Chem Soc Jpn, 1967, 40: 597-600.
- [14] Meinwald J, Hendry L. Defense mechanisms of arthropods. XXV. Stereospecific synthesis of an allenic sesquiterpenoid from the grasshopper *Romalea microptera* [J]. Tetrahedron Lett, 1969, 10: 1657-1660.
- [15] Liu JJ, Hao JJ, Tan M, et al. Iridoids and other constituents from the leaves and stems of *Valeriana officinalis* var. *latifolia* [J]. Phytochemistry, 2024, 218: 113934.
- [16] Shi DQ, Wang Y, Rao KR, et al. Sesquiterpenoids and iridoids from *Valeriana jatamansi* with anti-inflammatory and anti-influenza virus properties [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 428-432.