

椴叶鼠尾草中 1 个新的克罗烷型二萜化合物

范 敏, 段宝忠, 夏从龙, 王 双

大理大学药学院, 云南 大理 671000

摘要: 目的 研究椴叶鼠尾草 *Salvia tiliifolia* 地上部分的化学成分。方法 采用硅胶、ODS、Sephadex LH-20、HPLC 等各种现代色谱分离技术进行系统地分离纯化, 根据波谱数据对化合物进行结构鉴定。结果 从椴叶鼠尾草地上部分丙酮提取物中分离得到了 2 个化合物, 分别鉴定为 1-(3-呋喃基)-8-(2-酮-2,5-二氢呋喃基)-1,7,8,9-四氢萘并[1,2-c]呋喃-3,6-二酮 (1) 和 dugesin B (2)。结论 化合物 1 为 1 个新的克罗烷型二萜化合物, 命名为椴叶鼠尾酮 A, 活性测试结果表明化合物 1 无明显细胞毒性。

关键词: 椴叶鼠尾草; 克罗烷型二萜; 椴叶鼠尾酮 A; 细胞毒活性; dugesin B

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)18-4610-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.18.002

A new neo-clerodane diterpenoid from *Salvia tiliifolia*

FAN Min, DUAN Bao-zhong, XIA Cong-long, WANG Shuang

College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents of the aerial parts of *Salvia tiliifolia*. **Methods** The compounds were isolated and purified by various modern chromatographies, and their structures were identified by spectroscopic data. **Results** Two compounds were isolated from the acetone extract of the aerial parts of *S. tiliifolia*, which were elucidated as 1-(furan-3-yl)-8-(2-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)-1,7,8,9-tetrahydronaphtho[1,2-c]furan-3,6-dione (1) and dugesin B (2). **Conclusion** Compound 1 is a new clerodane diterpene with no cytotoxicity, named as 1-keto-tilifodioidide.

Key words: *Salvia tiliifolia* Vahl; neo-clerodane diterpenoid; 1-keto-tilifodioidide; cytotoxicity; dugesin B

唇形科 (Lamiaceae) 鼠尾草属 *Salvia* Linn. 植物全球有 1 000 多种, 中国分布 78 种, 尤以西南地区为多。鼠尾草属植物富含二萜类化合物, 包括松香烷型、克罗烷型、海松烷型和半日花烷型等^[1]。该类成分结构多变且具有广泛而显著的生物活性, 引起了学者们的关注, 如丹参酮 II_A^[2]、neo-tanshinlactone^[3]、丹酚 A (salvinorin A)^[4]等。椴叶鼠尾草 *Salvia tiliifolia* Vahl 为外来入侵植物, 原产南美洲和墨西哥^[5-6]。国内外对该植物的化学成分研究报道较少, 截止目前, 从中共分离得到 12 个新的克罗烷型二萜化合物^[7-9], 其中 dugesin F 具有抗流感病毒 FM1 的活性^[8], tiliifolin E 具有神经营养活性^[7]。为了进一步从椴叶鼠尾草中寻找活性成分, 本实验对其地上部分的丙酮提取物开展了化学成分研究, 从中分离得到了 2 个化合物, 分别鉴定为 1-(3-

呋喃基)-8-(2-酮-2,5-二氢呋喃基)-1,7,8,9-四氢萘并[1,2-c]呋喃-3,6-二酮 (1-(furan-3-yl)-8-(2-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)-1,7,8,9-tetrahydronaphtho[1,2-c]furan-3,6-dione, 1) 和 dugesin B (2), 其中化合物 1 为新的克罗烷型二萜化合物, 命名为椴叶鼠尾酮 A, 化合物 1 和 2 结构见图 1。

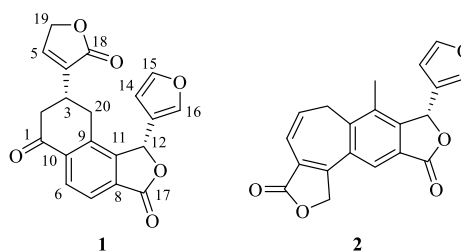


图 1 化合物 1~2 结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—2

收稿日期: 2020-03-22

基金项目: 大理大学博士科研启动项目 (KY1819212210); 大理大学中药资源与民族药创新团队 (ZKLX2019318); 大理州科技计划重大项目 (D2019NA03)

作者简介: 范 敏 (1988—), 女, 硕士生导师, 讲师, 博士, 从事中药资源化学研究。Tel: (0872)2257411 E-mail: fanmin@dali.edu.cn

1 仪器与材料

Bio-Rad FTS-135 型红外光谱仪测定 (Brucker Co., 瑞士), KBr 压片; VG AUTO Spec-3000 (Shimadzu Co., 日本) 或 API Qstar Pulsar 质谱仪 (Applied Biosystems Co., 美国); MCI 填充材料为 MCI-gel CHP-20P (Mitsubishi Co., 日本); MPLC 采用 EZBiosystems Co., 美国); UV-2401PC 型紫外光谱仪 (Shimadzu Co., 日本); DIP-370 型数字式旋光仪 (Jasco Co., 日本); Bruker AM-600 或 Bruker AM-800 核磁共振仪 (Bruker Co., 美国); Sephadex LH-20 Purifier System 液相色谱仪 (利德科技有限公司); 拌样及柱色谱用硅胶 (100~200、200~300 目, 青岛海洋化工厂); HPLC 分析仪器为安捷伦 1200 型高效液相色谱仪 (Agilent Co., 美国), 分析色谱柱为 Agilent 公司的 Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm×10 mm, 5 μm), 半制备色谱柱为 Agilent 公司的 Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm×9.4 mm, 5 μm); 显色剂为 10% 浓硫酸的乙醇溶液, 喷洒后适当加热。

样品椴叶鼠尾草地上部分于 2015 年 9 月采自昆明植物园, 由中国科学院昆明植物研究所成晓研究员鉴定为椴叶鼠尾草 *Salvia tiliifolia* Vahl. 植物标本 (2015-09A-5B) 存放于大理大学生药学教研室。

2 提取与分离

椴叶鼠尾草地上部分样品 (9 kg) 干燥粉碎, 用 8 倍量丙酮在室温下冷浸 3 次, 每次浸泡 24 h, 提取浓缩后得浸膏 (230 g), 浸膏经丙酮溶解后, 采用聚酰胺拌样, 以甲醇-水系统 (5:5、6:4、7:3、8:2、9:1) 为洗脱剂经中压液相色谱 (MPLC, MCI) 进行梯度洗脱, 用 TLC 检测, 合并相同组分

后得到 6 个部分 Fr. 1~6。

Fr. 2 (9.8 g) 经反复 Sephadex LH-20 凝胶柱 (甲醇) 色谱分离后, 再经正相硅胶柱色谱以石油醚-氯仿-异丙醇 (10:80:2) 为洗脱剂等度洗脱得到 3 部分, Fr. 2.1~2.3。Fr. 2.1 (3.0 g) 经正相硅胶柱色谱以石油醚-氯仿-异丙醇 (10:85:5) 为洗脱剂等度洗脱, 经 Sephadex LH-20 凝胶柱 (甲醇) 纯化后, 再经过半制备 HPLC (33% 乙腈) 纯化得到化合物 **1** (9 mg, $t_R=26$ min)。Fr. 2.3 (1.6 g) 经正相硅胶柱色谱以氯仿-丙酮 (9:1) 为洗脱剂等度洗脱, 再经半制备 HPLC (47% 甲醇) 分离, 最后经正相硅胶柱色谱, 以石油醚-氯仿-醋酸乙酯 (2:2:1) 为洗脱剂纯化, 得到化合物 **2** (8 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末, $[\alpha]_D^{22} -93.7$ (c 0.90, MeOH)。HR-ESI-MS m/z : 373.068 8 $[M+Na]^+$ (计算值 373.068 3, C₂₀H₁₄O₆Na)。IR ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹): 3 420, 2 927, 1 755, 1 653, 1 278, 1 079, 602。UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 207 (4.49), 254 (4.07), 298 (3.40)。化合物 **1** 的 ¹³C-NMR 和 DEPT 谱 (表 1) 显示具有 20 个碳, 包括 3 个亚甲基 [1 个含氧亚甲基 δ_C 71.2 (C-19)], 8 个次甲基 [1 个含氧次甲基 δ_C 75.3 (C-12) 和 6 个烯碳] 和 9 个季碳 (6 个烯碳、2 个酯羰基碳信号和 1 个酮基碳信号)。分析 ¹H-NMR 谱 (表 1) 显示结构中含有 1 个呋喃环结构 [δ_H 6.30 (t, $J=1.5$ Hz, H-14), 7.61 (t, $J=1.5$ Hz, H-15), 7.90 (s, H-16)], 以上信号说明化合物 **1** 为重排类型克罗烷型二萜^[10]。将化合物 **1** 的 1D NMR 数据与 tilifodioidide^[11] 进行对比, 发现二者数据相似, 区别在于化合物 **1** 比

表 1 化合物 **1** 的 ¹H- 和 ¹³C-NMR (800/200 MHz, acetone-*d*₆) 数据
Table 1 ¹H- and ¹³C-NMR data for compound **1** (800/200 MHz, acetone-*d*₆)

碳位	δ_H	δ_C	碳位	δ_H	δ_C
1		195.8	11		148.7
2a	2.98 (ddd, $J=16.6, 3.9, 1.4$ Hz)	42.9	12	6.83 (s)	75.3
2b	2.90 (dd, $J=16.6, 11.8$ Hz)		13		122.0
3	3.30 (m)	32.4	14	6.30 (t, $J=1.5$ Hz)	109.5
4		134.9	15	7.61 (t, $J=1.5$ Hz)	145.5
5	7.42 (dd, $J=3.0, 1.7$ Hz)	147.6	16	7.90 (s)	143.9
6	8.24 (d, $J=8.0$ Hz)	129.2	17		169.6
7	7.89 (d, $J=8.0$ Hz)	123.9	18		173.5
8		130.7	19	4.84 (dd, $J=3.0, 1.7$ Hz)	71.2
9		139.2	20a	3.26 (ddd, $J=14.4, 4.0, 1.4$ Hz)	30.6
10		137.2	20b	2.79 (dd, $J=14.4, 8.5$ Hz)	

tilifodioidide 多 1 个酮基信号, 少 1 个亚甲基信号, 且化合物 **1** 中的 C-2 向低场位移, 说明 **1** 为 tilifodioidide 的 C-1 位亚甲基氧化为酮基的产物。进一步, 在 HMBC 谱中清楚地观察到 H-2 (δ_{H} 2.98, 2.90), H-3 (δ_{H} 3.30), H-6 (δ_{H} 8.24) 与 C-1 (δ_{C} 195.8) 相关, 结合 ^1H - ^1H COSY 谱中 H₂-2/H-3/H₂-20 的自旋系统, 可将羰基归属为 C-1 位。由此, 化合物 **1** 的平面结构得到了确证 (图 1)。从 ROESY 谱 (图 2) 中观察到 H-12 与 H-20a 的相关信号, 说明 H-20a 为 β 构型, 则 H-20b 为 α 。从 ^1H -NMR 数据可知, H-20b/H-3 和 H-2b/H-3 的偶合常数分别为 8.5 Hz 和 11.8 Hz 的大偶合, 依照 Karplus 规则^[12], 3D 模拟图显示了 H-3、H-20b 应该为反式直立键 (图 2), 由此确定 H-3 为 β 构型。综上所述, 化合物 **1** 的结构如图 1 所示, 命名为椴叶鼠尾酮 A, 为 1 个新的克罗烷型二萜化合物。

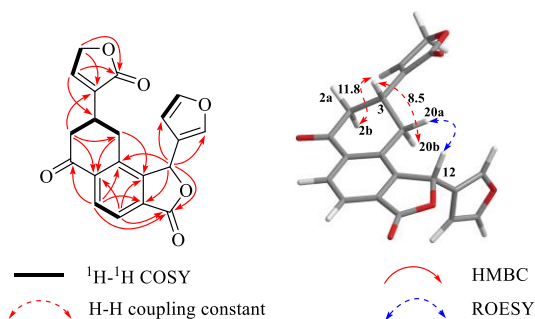


图2 化合物 **1** 的 ^1H - ^1H COSY、HMBC、ROESY 相关信号
Fig. 2 ^1H - ^1H COSY, HMBC and ROESY correlations of compound **1**

化合物 **2**: 白色粉末, 分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_5$, ^1H -NMR (600 MHz, acetone- d_6) δ : 3.17 (1H, dd, $J = 13.5, 7.0$ Hz, H-1a), 3.07 (1H, dd, $J = 13.5, 7.0$ Hz, H-1b), 5.95 (1H, td, $J = 9.5, 7.0$ Hz, H-2), 6.51 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 7.79 (1H, s, H-7), 6.41 (1H, brs, H-12), 6.06 (1H, brs, H-14), 7.36 (1H, brs, H-15), 7.52 (1H, brs, H-16), 5.38 (1H, d, $J = 17.4$ Hz, H-19a), 5.35 (1H, d, $J = 17.4$ Hz, H-19b), 2.24 (3H, s, 20-Me); ^{13}C -NMR (150 MHz, acetone- d_6) δ : 29.5 (t, C-1), 128.6 (d, C-2), 119.3 (d, C-3), 126.5 (s, C-4), 155.7 (s, C-5), 132.2 (s, C-6), 124.3 (d, C-7), 122.2 (s, C-8), 131.3 (s, C-9), 141.8 (s, C-10), 150.9 (s, C-11), 75.1 (d, C-12), 120.8 (s, C-13), 108.8 (d, C-14), 144.4 (d, C-15), 142.5 (d, C-16), 169.8 (s, C-17), 172.2 (s, C-18), 69.9 (t, C-19), 15.6 (q, C-20)。以上数据与文献对照一致^[9], 故鉴定化合物 **2** 为 dugesin B。

4 生物活性测试

测定化合物 **1** 对 5 种人肿瘤细胞 HL-60、A549、MCF-7、SW480 和 SMMC-7721 的细胞毒活性。用含 10% 胎牛血清的培养液 (DMEM 或者 RPMI 1640) 配成单个细胞悬液, 以每孔 3 000~15 000 个细胞接种到 96 孔板, 每孔体积 100 μL , 贴壁细胞提前 12~24 h 接种培养。化合物 **1** 用 DMSO 溶解, 以 40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度初筛, 每孔终体积 200 μL , 每种处理均设 3 个复孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后, 贴壁细胞弃孔内培养液, 每孔加 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) 溶液 20 μL 和培养液 100 μL ; 悬浮细胞弃 100 μL 培养上清液, 每孔加 20 μL MTS 溶液; 设 3 个空白复孔 (MTS 溶液 20 μL 和培养液 100 μL 的混合液), 继续孵育 2~4 h, 使反应充分进行后测定吸光度。选择 492 nm 波长, 多功能酶标仪 (MULTISKAN FC) 读取各孔吸光度值, 记录结果, 数据处理后以化合物编号为横坐标, 细胞抑制率为纵坐标, 绘制 5 株细胞的抑制作用图 (图 3)。实验设顺铂 (DDP) 为阳性对照, 以浓度为横坐标, 细胞存活率为纵坐标绘制细胞生长曲线, 应用两点法 (Reed and Muench 法)^[13] 计算化合物的半数抑制浓度 (IC_{50}) 值。结果表明化合物 **1** 对以上 5 种细胞均无细胞毒活性。

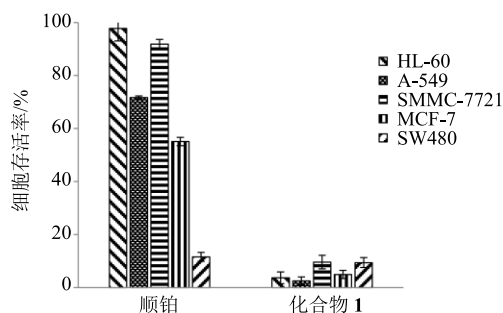


图3 化合物 **1** 对 5 株肿瘤细胞的抑制作用

Fig. 3 Inhibitory effect of compound **1** on five tumor cells

文献报道化合物 **1** 的类似物 tilifodioidide 具有较强的抗糖尿病活性^[14], 基于此, 本课题组后续将对化合物 **1** 的体外降血糖活性进行研究。

参考文献

- [1] Wu Y B, Ni Z Y, Shi Q W, *et al.* Constituents from *Salvia* species and their biological activities [J]. *Chem Rev*, 2012, 112(11): 5967-6026.
- [2] Fu J J, Huang H Q, Liu J J, *et al.* Tanshinone II_A protects

- cardiac myocytes against oxidative stress-triggered damage and apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 568(1/3): 213-221.
- [3] Wang X, Nakagawa-Goto K, Bastow K F, *et al.* Antitumor agents. 254. Synthesis and biological evaluation of novel *neo*-tanshinlactone analogues as potent anti-breast cancer agents [J]. *J Med Chem*, 2006, 49(18): 5631-5634.
- [4] Roth B L, Baner K, Westkaemper R, *et al.* Salvinorin A: A potent naturally occurring nonnitrogenous kappa opioid selective agonist [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99(18): 11934-11939.
- [5] Hu G X, Xiang C L, Liu E D. Invasion status and risk assessment for *Salvia tiliifolia*, a recently recognised introduction to China [J]. *Weed Res*, 2013, 53(5): 355-361.
- [6] 郑庆伟. 中科院发现外来入侵植物——椴叶鼠尾草 [J]. 农药市场信息, 2014(3): 54.
- [7] Fan M, Bao Y, Zhang Z J, *et al.* New neo-clerodane diterpenoids with neurotrophic activity from the aerial parts of *Salvia tiliifolia* [J]. *Fitoterapia*, 2017, 123: 44-50.
- [8] Gang X, Fang Z, Yang X W, *et al.* neo-Clerodane diterpenoids from *Salvia dugesii* and their bioactive studies [J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2011, 1(2): 81-86.
- [9] Xu G, Peng L, Niu X, *et al.* Novel diterpenoids from *Salvia dugesii* [J]. *Helv Chim Acta*, 2004, 87(4): 949-955.
- [10] Li R T, Morris-Natschke S L, Lee K H. Clerodane diterpenes: sources, structures, and biological activities [J]. *Nat Prod Rep*, 2016, 33(10): 1166-1226.
- [11] Rodriguez-Hahn L, O'Reilly R, Esquivel B, *et al.* Tilifodiolide, tetraline-type diterpenoid of clerodanic origin from *Salvia tiliaefolia* [J]. *J Org Chem*, 1990, 55(11): 3522-3525.
- [12] Karplus M. Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments [J]. *J Chem Phys*, 1959, 30(1): 11-15.
- [13] Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoint [J]. *Am J Hyg*, 1938, 27(3): 493-497.
- [14] 赵勤实, 樊献俄, 张人伟, 等. Tilifodiolide 及其衍生物在制备治疗或预防 II 型糖尿病药物中的应用: 中国, CN106955285A [P] 2017-07-18.