

川西獐牙菜中两个新的链状单萜类化合物

曹团武^{a,b} 何康^a 耿长安^a 张雪梅^a 周俊^a 陈纪军^{*,a}^(a)中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室 昆明 650201)^(b)长江师范学院化学化工学院 武陵山天然药物研究与开发实验室 涪陵 408100)

摘要 利用多种色谱分离方法对川西獐牙菜的化学成分进行研究, 从其全草的乙醇提取物中分离得到四个化合物, 应用 HR-ESIMS, 1D 和 2D NMR, IR, UV 等多种现代波谱技术确定了这些化合物的化学结构, 经鉴定分别为(*S*,*2E*,*6E*)-2,6-二甲基-4,8-二羟基辛烷-2,6-二烯酸(**1**), (*S*,*2E*,*6E*)-2,6-二甲基-4-羟基-8-甲酰氧基辛烷-2,6-二烯酸(**2**), swerimilegenins B 和 C (**3** 和 **4**)。化合物 **1** 和 **2** 为两个新的链状单萜类化合物, 分别命名为川西獐牙菜酸 C 和 D, 化合物 **3** 和 **4** 是两个不常见的 C₉ 骨架的环烯醚萜, 为首次从该植物中分离得到。

关键词 龙胆科; 川西獐牙菜; 链状单萜; 川西獐牙菜酸 C 和 D

Two New Linear Monoterpenoids from *Swertia mussotii*Cao, Tuanwu^{a,b} He, Kang^a Geng, Chang'an^a Zhang, Xuemei^a
Zhou, Jun^a Chen, Jijun^{*,a}^(a) State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201)^(b) Laboratory of Natural Medicine Research and Development in Wuling Mountain, School of Chemistry and Chemical Engineering, Yangtze Normal University, Fuling 408100)

Abstract Investigation on *Swertia mussotii* resulted in four compounds by means of various chromatographic techniques (silica gel, Sephadex LH-20, RP-LC and Pre-HPLC). Their structures were determined as (*S*,*2E*,*6E*)-4,8-dihydroxy-2,6-dimethylocta-2,6-dienoic acid (**1**), (*S*,*2E*,*6E*)-8-(formyloxy)-4-hydroxy-2,6-dimethylocta-2,6-dienoic acid (**2**), swerimilegenins B and C (**3** and **4**) on the basis of extensive spectroscopic analyses including MS, IR, UV, 1D- and 2D-NMR. Among them, compounds **1** and **2** are two new linear monoterpenoids named as swerimusic acids C (**1**) and D (**2**), compounds **3** and **4** are two unusual known secoiridoid aglycones of C₉-skeleton obtained for the first time from this plant. Compounds **1**~**4** were evaluated for their anti-Hepatitis B Virus (HBV) activities on HepG2.2.15 cells line *in vitro*, but these compounds showed no anti-HBV activity at the maximal testing concentration. Herin, we only report the isolation and structure elucidation of these compounds.

Keywords *Gentianaceae*; *Swertia mussotii*; linear monoterpenoid; swerimusic acids C and D

川西獐牙菜(*Swertia mussotii* Franch)为龙胆科(*Gentianaceae*)獐牙菜属植物, 一年生草本, 主要分布于中国西藏、云南和四川西北部及青海南部, 在治疗黄疸型肝炎上有显著疗效, 是一种我国特有的高原药用植物^[1]。该植物为著名藏药“藏茵陈”的原植物之一, 属于藏药“蒂达”类, 具有清肝利胆、退黄、利水消肿等功效, 主治急性黄疸型和非黄疸型肝炎、胆囊炎、尿路感染和水肿等^[2,3]。近年来, 以川西獐牙菜为主要原料, 在

传统方剂基础上经现代工艺加工而成的新药制剂, 如晶珠肝泰胶囊、急肝宁片、乙肝宁片、藏茵陈片、八味藏茵陈散、十三味藏茵陈散等被广泛用于临床治疗肝胆类疾病。现代研究表明, 川西獐牙菜提取物具有促进肝损伤细胞修复、抑制转氨酶升高、抗乙肝病毒、抗炎、保肝等作用, 其含有的化学成分主要为环烯醚萜类、口山酮类、黄酮类、三萜类、简单酚类等类型化合物^[4-7]。本课题组利用 HepG2.2.15 细胞模型, 通过体外抗乙肝病

* E-mail: chenjj@mail.kib.ac.cn

Received March 23, 2016; revised April 29, 2016; published online June 1, 2016.

Project supported by the National Science Foundation of China for Distinguished Young Scholar (No. 81025023).

国家杰出青年科学基金(No. 81025023)资助项目。

毒活性追踪法,对川西獐牙菜抗乙型肝炎病毒活性成分进行了研究,在已报道的65个化合物中,发现口山酮类、黄酮类和简单酚类等18个化合物显示了明显的抗乙型肝炎病毒活性^[8].为了进一步阐明其化学成分,通过多种色谱分离技术,还从川西獐牙菜乙醇提取物中还得到4个化合物(图1),运用HR-ESIMS,1D和2D NMR等多种波谱手段鉴定其结构分别为(*S*,2*E*,6*E*)-2,6-二甲基-4,8-二羟基辛烷-2,6-二烯酸(**1**)、(*S*,2*E*,6*E*)-2,6-二甲基-4-羟基-8-甲酰氧基辛烷-2,6-二烯酸(**2**)、swerimilegenins B和C(**3**和**4**).化合物**1**和**2**分别命名为川西獐牙菜酸C和D,这是两个新的月香叶烷型单萜化合物.单萜类化合物是植物挥发油的主要成分,獐牙菜属植物也存在挥发油成分,但以不饱和脂肪酸形式存在于该属植物的链状单萜类化合物还没有被报道,该类型化合物在其它植物中也鲜有报道.化合物**3**和**4**是两个不常见的C₉骨架的环烯醚萜,仅在青叶胆(*Swertia mileensis*)中报道过^[9],是首次从川西獐牙菜中分离得到.本课题组利用HepG2.2.15细胞模型对化合物**1**~**4**进行了体外抗乙型肝炎病毒活性测试,结果表明这四个化合物没有显示抗乙型肝炎病毒活性.本工作仅对化合物**1**~**4**的提取分离及结构鉴定进行详细报道.

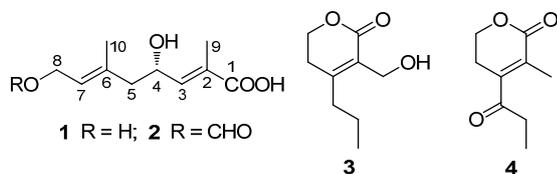


图1 化合物结构

Figure 1 Structures of compounds

1 结果与讨论

化合物**1**为无色油状物,高分辨质谱(HR-ESIMS)

显示该化合物准分子离子峰为223.0915 $[M+Na]^+$ (calcd for C₁₀H₁₆O₄Na 223.0941),推断其分子式为C₁₀H₁₆O₄,不饱和度为3.红外光谱(KBr)显示该化合物的结构中存在羟基(3425 cm⁻¹)、 α,β -不饱和羰基(1695和1648 cm⁻¹)和双键(1648 cm⁻¹).化合物**1**的¹H NMR(表1)谱中在 δ_H 6.64 (d, $J=8.6$ Hz, 1H, H-3)和5.43 (d, $J=6.4$ Hz, 1H, H-7)处显示两个烯烃质子信号,在 δ_H 2.31 (dd, $J=13.4, 7.7$ Hz, 1H, H-5a)和2.18 (dd, $J=13.4, 5.8$ Hz, 1H, H-5b)有两个同碳亚甲基质子,在 δ_H 1.83 (s, 3H, H-9)和1.72 (s, 3H, H-10)处显示两个单峰甲基信号.¹³C NMR (DEPT)谱中观测到10个碳信号分别为2个季碳、1个羰基碳、3个次甲基、2个亚甲基和2个甲基,其中包括2个三取代双键 [δ_C 144.7 (d, C-3), 135.2 (s, C-6), 129.3 (s, C-2), 128.4 (d, C-7)].该化合物不饱和度为3,IR和NMR谱显示结构中含有1个羰基和2个双键,表明其应为链状结构.

通过HSQC谱将所有的氢明确地归属到其对应的碳(图2).在COSY谱中,H-4 [δ_H 4.59 (td, $J=7.8, 5.9$ Hz, 1H)]与H-3以及H-5相关,H-7与H-8 [δ_H 4.08 (dd, $J=6.4, 3.1$ Hz, 2H)]相关,推断其结构中含有CH(3)CH(4)-CH₂(5)和CH(7)CH₂(8)两个结构片段.HMBC图谱中观测到H-4和H-8与C-6相关,H-5与C-7相关,以及H-7与C-5相关,表明以上两个结构片段均连接在C-6位(图2).在HMBC图谱中还观测到H-3与C-1 (δ_C 171.4)相关,进一步证明 α,β -不饱和羰基结构片段的的存在,即COOH与C-2相连;H-9与C-1和C-3相关,H-10与C-7和C-5 (δ_C 47.6)相关,推断两个甲基分别与C-2和C-6相连.在ROESY图谱中观测到 δ_H 1.83 (H-9)与4.59 (H-4)相关, δ_H 1.72 (H-10)与4.08 (H-8)相关,可推测C(2)=C(3)和C(6)=C(7)均为*E*型(图3).

将化合物**1**与(-)-rosiridol [$[\alpha]_D^{20} = -14.2$ (c 0.42,

表1 化合物**1**和**2**的NMR数据
Table 1 NMR data of compounds **1** and **2**

No.	1		2	
	δ_H (J/Hz)	δ_C	δ_H (J/Hz)	δ_C (J/Hz)
1		171.4 (s)		
2		129.3 (s)		
3	6.64 (d, 8.5)	144.7 (d)	6.78 (d, 8.2)	6.78 (d, 8.2)
4	4.59 (td, 8.5, 5.9)	67.8 (d)	4.63 (td, 8.2, 4.8)	4.63 (td, 8.2, 4.8)
5	2.31 (dd, 13.4, 7.7), 2.18 (dd, 13.4, 5.9)	47.6 (t)	2.33 (dd, 13.6, 8.4), 2.25 (dd, 13.4, 4.8)	2.33 (dd, 13.6, 8.4), 2.25 (dd, 13.4, 4.8)
6		135.2 (s)		138.0 (s)
7	5.43 (t, 6.4)	128.4 (d)	5.48 (t, 6.8)	122.2 (d)
8	4.08 (dd, 6.4, 3.1)	59.3 (t)	4.70 (d, 6.8)	60.4 (t)
9	1.83 (s)	13.0 (q)	1.87 (s)	12.5 (q)
10	1.72 (s)	16.7 (q)	1.79 (s)	16.8 (q)
CHO			8.05 (s)	161.0 (d)

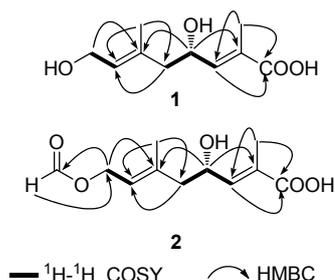


图2 化合物1和2的关键 ^1H - ^1H COSY和HMBC相关
Figure 2 Key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compounds 1 and 2

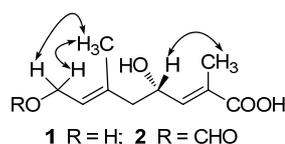


图3 化合物1和2的关键ROESY相关
Figure 3 Key ROESY correlations of compounds 1 and 2

CHCl_3]和(2*E*,6*S*)-6-hydroxy-7(9)-dehydro-6,7-dihydrogeranyl acetate [$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -26.3$ (c 0.6, CHCl_3)]的比旋光值进行对照,三者非常相似,由此推断C-4位羟基为*S*构型^[10-12].根据以上分析推断,确定化合物1的结构为(2*S*,2*E*,6*E*)-2,6-二甲基-4,8-二羟基辛烷-2,6-二烯酸,命名为川西獐牙菜酸C (swerimusic acid C).

化合物2为无色油状物,HR-ESIMS显示其分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_5$ (calcd. 251.0890, found 251.0860 $[\text{M}+\text{Na}]^+$),不饱和度为4.化合物2与化合物1的 ^1H NMR和 ^{13}C NMR数据非常相似,主要不同是化合物2有一个甲酰基信号 $[\delta_{\text{H}} 8.05$ (s, 1H, $\text{HC}=\text{O}$), $\delta_{\text{C}} 161.0$ (d, $\text{HC}=\text{O}$)],且C-7明显地向高场位移, H-8明显地向低场位移.在HMBC图谱中观测到 $\delta_{\text{H}} 8.05$ 与 $\delta_{\text{C}} 60.4$ (C-8)相关, $\delta_{\text{H}} 4.70$ (2H, $=6.8$ Hz, H-8)与 $\delta_{\text{C}} 161.0$ 相关(图2),结合化合物2的HR-ESIMS及 ^1H NMR和 ^{13}C NMR数据,推测化合物2的C-8位连接1个甲酰氧基.化合物2与化合物1不但2D-NMR图谱中有高度一致的H-H和C-H相关,而且有非常相似的比旋光值,表明这两个化合物有相同的构型.由此推断化合物2的结构为(2*S*,2*E*,6*E*)-2,6-二甲基-4-羟基-8-甲酰氧基辛烷-2,6-二烯酸,命名为川西獐牙菜酸D (swerimusic acid D).

化合物3和4为已知的 C_9 骨架的环烯醚萜类化合物,经波谱分析与文献中相应化合物波谱数据进行对照,经鉴定分别为swerimilegenins B (3)和C (4)^[9].

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Bruker AM-400型核磁共振谱仪(TMS为内标);岛

津LCMS-IT-TOF质谱仪;Horiba Jasco model 1020旋光仪;Bio-Rad FTS-135型红外光谱仪;岛津UV-2401A型分光光度仪;Waters 600半制备型高效液相色谱仪(Waters 2996检测器);Agilent Eclipse XDB-ODS半制备型色谱柱(5 μm , 9.4 mm \times 250 mm);上海利穗(Dr Flash-II)中低压液相色谱仪;Rp-18 (40~75 μm , Merck);Sephadex LH-20 (Pharmacia);柱层析硅胶(200~300目)和薄层层析硅胶板(青岛海洋化工厂).其余所用试剂均为分析纯.

2.2 实验样品

植物样品于2008年9月在青海省玉树地区采集,经中国科学院西北生物研究所陶燕铎研究员鉴定为川西獐牙菜(*Swertia mussotii* Franch).标本存放在中国科学院昆明植物研究所抗病毒与天然药物化学研究组,标本号为No. 20081128.

2.3 提取与分离

川西獐牙菜全草6.0 kg,粉碎后用50 L 90%乙醇室温下提取2次,提取液减压浓缩回收后的1.47 kg黄褐色胶状提取物.提取物溶于6 L水中,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇各5 L,分别提取4次.回收后得乙酸乙酯部位(A, 300 g),并将其用氯仿-甲醇溶解,吸附于550 g硅胶,经硅胶柱层析(18 cm \times 28 cm, 2500 g)用氯仿-甲醇-水($V:V:V=100:0:0$, 95:5:0, 90:10:1, 80:20:2, 60:40:4)依次洗脱,得到6个组分(Fr.A1~Fr.A6). Fr.A2 (68 g)再经硅胶柱层析(9 cm \times 40 cm, 1000 g)用石油醚-丙酮($V:V=90:10$, 80:20, 70:30)依次洗脱,得到3个组分(Fr.A2-1~Fr.A2-3). Fr.2-1 (18.4 g)以氯仿-丙酮($V:V=95:5\sim 80:20$)作为流动相梯度洗脱经硅胶柱层析(9 cm \times 30 cm, 750 g)得到Fr.A2-1-2 (1.18 g),再用硅胶柱层析(2.5 cm \times 36 cm, 50 g)经石油醚-丙酮($V:V=80:20$)洗脱进行纯化,得到化合物4 (468 mg).正丁醇部位(B, 230 g)溶解后吸附于410 g硅胶,经硅胶柱层析(18 cm \times 23 cm, 2000 g)用氯仿-甲醇-水($V:V:V=95:5:0$, 90:10:1, 80:20:2, 60:40:4)依次洗脱,得到5个部分(Fr.B1~Fr.B5). Fr.B1 (3.28 g)用中低压色谱仪经Rp-18色谱柱(3.81 cm \times 50 cm, 300 g)以甲醇-水($V:V=10:90\sim 100:0$)进行连续梯度洗脱,得到4个部分(Fr.B1-1~Fr.B1-4). Fr.B1-4 (243 mg)用硅胶柱层析并以石油醚-乙酸乙酯-甲酸($V:V:V=70:30:1$ 和 $50:50:1$)洗脱进行纯化,得到化合物1 (24 mg)和2 (13 mg). Fr.B2 (12.1 g)用Rp-18柱层析(3.81 cm \times 50 cm, 300 g)以甲醇-水($V:V=10:90\sim 100:0$)为洗脱剂进行连续梯度洗脱,得到3个部分(Fr.B2-1~Fr.B2-3). Fr.B2-2 (1.76 g)先用硅胶柱层析(1.6 cm \times 35 cm, 30 g)经氯仿-甲醇($V:$

$V=95:5$ 和 $90:10$)洗脱, 再用 Sephadex LH-20 柱色谱 (1.32 cm×135 cm, 53 g) 甲醇洗脱纯化, 得到化合物 **3** (23 mg).

化合物 **1**: 无色油状物; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -26.3$ (c 0.10, CH₃OH); UV (CH₃OH) λ_{max} [$\log \epsilon$ /(L·mol⁻¹·cm⁻¹): 205 (4.01) nm]; ¹H NMR 和 ¹³C NMR (CD₃OD, 400/100 MHz) 数据见表 1; IR (KBr) ν_{max} : 3425, 2934, 1695, 1648, 1439, 1412, 1385, 1246, 1197, 1136, 1045, 1028, 992, 752 cm⁻¹; HRESIMS calcd for C₁₀H₁₆O₄Na [M+Na]⁺ 223.0915, found 223.0941.

化合物 **2**: 无色油状物; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -30.3$ (c 0.12, CH₃OH); UV (MeOH) λ_{max} [$\log \epsilon$ /(L·mol⁻¹·cm⁻¹): 205 (4.07) nm]; ¹H NMR 和 ¹³C NMR (CDCl₃, 400/100 MHz) 数据见表 1; IR (KBr) ν_{max} : 3418, 2933, 1695, 1649, 1439, 1415, 1387, 1247, 1197, 1137, 1047, 1028, 992, 752 cm⁻¹; HR-ESIMS calcd for C₁₁H₁₆O₃Na [M+Na]⁺ 251.0860, found 251.0890.

辅助材料(Supporting Information) 新化合物 **1** 和 **2** 的 ¹H NMR, ¹³C NMR (DEPT), HSQC, HMBC, ¹H-¹H CO-SY, ROESY, HR-ESIMS, UV, IR 和 $[\alpha]_{\text{D}}$, 以及化合物 **2** 为非人工产物的说明. 这些材料可以免费从本刊网站 (<http://sioc-journal.cn/>) 上下载.

References

[1] Flora Reipublicae Popularis Sinicae Editorial Board *Flora*

Reipublicae Popularis Sinicae, Vol. 62, Science Press, Beijing, **1988**, p. 400 (in Chinese).

(中国科学院中国植物志编委会, 中国植物志, 62 卷, 科学出版社, 北京, **1988**, p. 400.)

- [2] Yang, Y.-C. *Tibetan Medicine Records*, People of Qinghai Press, Xining, **1992**, p. 111 (in Chinese).
(杨永昌, 藏药志, 青海人民出版社, 西宁, **1992**, p. 111.)
- [3] Nanjing University of Chinese Medicine *Dictionary of Traditional Chinese Medicine*, Shanghai Science and Technology Press, Shanghai, **2006**, p. 3768 (in Chinese).
(南京中医药大学, 中药大辞典, 上海科学技术出版社, 上海, **2006**, p. 3786.)
- [4] Meng, X.-H.; Chen, D.-D.; Zhang, Y.-S.; Chen, G.-P. *Drugs Clin.* **2012**, 27, 176 (in Chinese).
(孟宪华, 陈德道, 张樱山, 陈根平, 现代药物与临床, **2012**, 27, 176.)
- [5] Luo, C.-T.; Zheng, H.-H.; Mao, S.-S.; Yang, M.-X.; Luo, C.; Chen, H. *Planta Med.* **2014**, 80, 201.
- [6] Luo, C.-T.; Mao, S.-S.; Liu, F.-L.; Yang, M.-X.; Chen, H.; Kurihara, H.; Li, Y. *Fitoterapia* **2013**, 91, 140.
- [7] Cao, T.-W. *Ph.D. Dissertation*, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Science, Kunming, **2013** (in Chinese).
(曹团武, 博士论文, 中国科学院昆明植物研究所, 昆明, **2013**.)
- [8] (a) Cao, T.-W.; Geng, C.-A.; Ma, Y.-B.; He, K.; Wang, H.-L.; Zhou, N.-J.; Zhang, X.-M.; Tao, Y.-D.; Chen, J.-J. *Planta Med.* **2013**, 79, 697.
(b) Cao, T.-W.; Geng, C.-A.; Ma, Y.-B.; Zhang, X.-M.; Zhou, J.; Tao, Y.-D.; Chen, J.-J. *Fitoterapia* **2015**, 102, 15.
- [9] Geng, C.-A.; Zhang, X.-M.; Ma, Y.-B.; Huang, X.-Y.; Chen, J.-J. *Nat. Prod. Bioprospect.* **2013**, 3, 243.
- [10] Yoshikawa, M.; Nakamura, S.; Li, X.-Z.; Matsuda, H. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, 56, 695.
- [11] Li, W.; Du, D.-Q.; Koike, K. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, 56, 1047.
- [12] Liu, Z.-S.; Lan, J.; Li, Y.-L. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 3755.

(Zhao, C.)