

舟叶橐吾中具有植物毒活性的佛术烷类倍半萜

陈佳¹,李明明¹,邢海晶²,郑国伟^{2*},浦仕彪^{2*}¹云南中医药大学 云南省傣医药与彝医药重点实验室;²云南中医药大学,昆明 650500

摘要:倍半萜类化合物是橐吾属植物中主要的化感活性成分,常常表现出植物毒活性。为寻找更多潜在化感物质,用于筛选生态友好型天然除草剂的先导化合物,对舟叶橐吾根95%甲醇部位中具有植物毒活性的佛术烷类倍半萜进行研究。利用多种色谱分离方法从舟叶橐吾根部分离纯化到13个佛术烷类倍半萜,根据理化性质和波谱技术鉴定这些化合物分别为 ligulacymlactam A (**1**)、3 β -angeloyloxy-8 β -hydroxyeremophil-7(11)-ene-12,8 α (14 β ,6 α)-diolide (**2**)、8 β -hydroxyeremophil-7(11)-en-12,8 α -olide (**3**)、10 β -hydroxy-8 β -methoxyeremophilenolide (**4**)、6 β ,8 β -dihydroxyeremophil-7(11)-en-12,8 α -olide (**5**)、8 β -H-eremophil-3,7(11)-dien-12,8 α ;15,6 α -diolide (**6**)、8 β -hydroxyeremophil-3,7(11)-diene-8 α ,12(6 α ,15)-diolide (**7**)、8 β -methoxyeremophil-3,7(11)-diene-8 α ,12(6 α ,15)-diolide (**8**)、eremophil-7(11)-ene-12,8 α ,14 β ,6 α -diolide (**9**)、8 β -hydroeremophil-7(11)-en-12 β ,8 α (14 β ,6 α)-diolide (**10**)、3-(methacryloyloxy) furanoeremophilan-15,6 α -olide (**11**)、furaneremophilan-14,6 α -olide (**12**)、10 β -hydroxy-6 β -isobutyrylfuraneremophilane (**13**),其中化合物**1**为新化合物。采用琼脂萌发法测试化合物**1**~**13**对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的植物毒活性,所有化合物均未表现出对种子萌发的抑制活性,但能使种子全部萌发的时间较空白对照组提前大约1~2天;同时所有化合物均表现出一定的根生长抑制活性,其中化合物**13**的抑制作用最强(EC₅₀ = 44.15 \pm 5.21 μ g/mL)。构效关系分析提示,含有10位羟基和6位侧链取代的furaneremophilane型佛术烷类倍半萜具有作为生态友好型天然除草剂先导化合物的潜力。

关键词:舟叶橐吾;佛术烷类倍半萜;植物毒活性;构效关系

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)4-0570-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.4.004

Phytotoxic eremophilane sesquiterpenes isolated from *Ligularia cymbulifera*CHEN Jia¹, LI Ming-ming¹, XIN Hai-jing², ZHENG Guo-wei^{2*}, PU Shi-biao^{2*}¹Yunnan Key Laboratory of Dai and Yi Medicines, Yunnan University of Chinese Medicine;²Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

Abstract: Sesquiterpenes were the main allelopathic active ingredients in *Ligularia* plants and often exhibit phytotoxic activity. In order to find the major compounds from allelochemicals for developing the eco-friendly natural herbicides, the phytotoxic eremophilane sesquiterpenes in *Ligularia cymbulifera* were studied. Thirteen eremophilane sesquiterpenes were isolated and purified by several chromatographic techniques from the root of *L. cymbulifera*. Their structures were identified by physico-chemical property and analysis of spectroscopic data, including a new eremophilane sesquiterpenes, ligulacymlactam A (**1**), together with twelve known ones, 3 β -angeloyloxy-8 β -hydroxyeremophil-7(11)-ene-12,8 α (14 β ,6 α)-diolide (**2**), 8 β -hydroxyeremophil-7(11)-en-12,8 α -olide (**3**), 10 β -hydroxy-8 β -methoxyeremophilenolide (**4**), 6 β ,8 β -dihydroxyeremophil-7(11)-en-12,8 α -olide (**5**), 8 β -H-eremophil-3,7(11)-dien-12,8 α ;15,6 α -diolide (**6**), 8 β -hydroxyeremophil-3,7(11)-diene-8 α ,12(6 α ,15)-diolide (**7**), 8 β -methoxyeremophil-3,7(11)-diene-8 α ,12(6 α ,15)-diolide (**8**), eremophil-7(11)-ene-12,8 α ,14 β ,6 α -diolide (**9**), 8 β -hydroeremophil-7(11)-en-12 β ,8 α (14 β ,6 α)-diolide (**10**), 3-(methacryloyloxy) furanoeremophilan-15,6 α -olide (**11**), furanoeremophilan-14,6 α -olide (**12**), 10 β -hydroxy-6 β -isobutyrylfuraneremophilane (**13**). The phytotoxic activities against *A. thaliana* of compounds **1-13** were measured by agar germination method. None of them showed inhibitory

收稿日期:2021-03-26 接受日期:2021-07-08

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金(82060785);云南省教育厅科学研究基金教师类项目(2019J1064);云南中医药大学高层次人才项目(2019YZG07)

* 通信作者 E-mail: gwzheng@ynutcm.edu.cn, pushi511@126.com

activities on seed germination, but some of them could promote the germinate time earlier than blank about 1-2 days. As well as, all compounds showed weak root growth inhibitory activity, and compound **13** was the most active compound ($EC_{50} = 44.15 \pm 5.21 \mu\text{g/mL}$). Further structure-activity relationship analysis suggests that the furanermophilane sesquiterpenes which containing the 10-position hydroxyl group and the 6-position side chain substitution have potential to be the lead compound for eco-friendly natural herbicides.

Key words: *Ligularia cymbulifera*; eremophilane sesquiterpenes; phytotoxic activity; structure-activity relationship

植物化感作用是指一种植物向环境释放化学物质, 从而对另一种植物产生直接或间接的有害或有益的作用^[1]。释放化感物质是物种在特殊生境下为获得生态学优势而进化产生的生存策略, 其可能影响同一栖息地上其他植物的生长和植物群落的演替, 甚至影响该区域植物居群的分布格局和生物多样性^[2]。以化感物质为先导化合物开发生态友好型的天然除草剂是当前的研究热点, 其中倍半萜类化合物颇具潜力^[3]。

菊科 (Compositae) 橐吾属 (*Ligularia*) 的多种植物, 如黄帚橐吾 (*L. virgaurea*), 大叶橐吾 (*L. macrophylla*) 和箭叶橐吾 (*L. sagitta*) 等表现出明显的化感作用, 倍半萜类化合物被认为是这些植物中主要的化感活性成分, 常表现出植物毒活性^[4-6]。该属植物舟叶橐吾 (*L. cymbulifera*) 广泛分布于横断山脉, 在云南省香格里拉地区 2 000 ~ 4 000 m 的高山草甸上密集生长, 是当地高山牧场的优势物种^[7,8]。舟叶橐吾的主要次生代谢产物为佛术烷类倍半萜、降碳倍半萜^[9,10]、bisabolane 倍半萜^[11,12] 和 pyrrolizidine 生物碱^[13] 等, 课题组前期从其根部及根际土壤中分离检测到多种具有植物毒活性的佛术烷类倍半萜。试验结果提示, 佛术烷类倍半萜很可能被舟叶橐吾合成并释放到根际周围土壤中, 作为潜在化感物质协同干扰其他植物种子的萌发和生长, 从而帮助舟叶橐吾获得在横断山脉的生态学优势^[14]。为寻找更多潜在化感物质并深入研究其作用机制, 筛选用于开发生态友好型天然除草剂的先导化合物, 本文继续研究舟叶橐吾中具有植物毒活性的佛术烷类倍半萜。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Jasco P-1020 旋光仪 (日本 Jasco 公司); Shimadzu UV-2401PC 紫外光谱仪 (日本 Shimadzu 公司); Bruker Tensor 27 傅里叶变换红外光谱仪 (KBr 压片, 德国 Bruker 公司); X-4 数字显示显微熔点测定仪 (北京泰克仪器有限公司); Waters Xevo TQS mass spectrometer 质谱仪 (美国 Waters 公司); Bruker

AVANCE III 800 MHz 型和 Bruker DRX-500 MHz 型核磁共振仪 (TMS 为内标, 德国 Bruker 公司); Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); SW-CJ-2FD 净化工作台 (SW-CJ-2FD, 苏州博莱尔净化设备有限公司); 电子天平 (JA2103, 上海明桥精密科学仪器有限公司); 灭菌锅 (LDZX-75KB, 上海申安); TYXH-1 漩涡混合器 (上海乔跃电子有限公司); Milli-Q A10 型纯水仪 (美国 Millipore 公司); BCD-480WLLSSD0C9 型冰箱 (青岛海尔股份有限公司); 人工气候室 (LT/ACR-2002, 北京易盛泰和科技有限公司); XSELECT CSH Prep C₁₈ 色谱柱 (19 mm × 150 mm, 5 μm; 爱尔兰 Waters 公司); MCI GEL 树脂 (CHP-20P, 70 ~ 150 μm, 日本三菱化工); Sephadex LH-20 羟丙基葡聚糖凝胶 (40 ~ 70 μm, 瑞典 Amersham 公司); 薄层色谱硅胶板 (GF254, 青岛海洋化工厂); 柱层析硅胶 (60 ~ 80、100 ~ 200、200 ~ 300 目, 青岛海洋化工厂); 有机试剂如乙醇、甲醇、二氯甲烷、丙酮、次氯酸钠、二甲基亚砜等均为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司); 色谱纯甲醇、乙腈 (阿拉丁试剂有限公司); 显色剂为 10% H₂SO₄ 的乙醇溶液。固体 MS 培养基 (M5524, 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司)。

1.2 植物材料

舟叶橐吾 (*Ligularia cymbulifera*) 于 2015 年 8 月采集自云南省香格里拉地区, 植物标本由昆明植物研究所牛洋副研究员鉴定, 凭证标本 (KIB H20150913) 存放在中科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。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 种子为 Columbia 野生型。

1.3 化合物的提取分离方法

舟叶橐吾的干燥根 15.0 kg 粉碎, 经 95% 甲醇 (MeOH) 回流提取, 减压浓缩得浸膏 1.3 kg。浸膏用水悬浮后用乙酸乙酯萃取得 800 g, 100 ~ 200 目硅胶拌样后进行常压硅胶柱层析, 分别用 PE, CH₂Cl₂: Me₂CO (1:0, 9:1, 1:1, 0:1, V/V) 和 MeOH 梯度洗脱, 采用 TLC 对各馏分进行检测, 合并相同部分得五个馏分 (Fr. A ~ E)。Fr. A (CH₂Cl₂, 145 g)

经中压制备 MCI 柱层析 (MeOH: H₂O, 20: 80→100: 0, V/V), 合并 30% ~ 80% 洗脱部位后经硅胶柱层析 (PE: Me₂CO, 100: 1→20: 1, V/V), TLC 检测合并得八个馏分 Fr. A1 ~ A8。Fr. A3 (1.4 g) 分别经硅胶柱层析 (CH₂Cl₂: Me₂CO, 1: 0, 9: 1, 1: 1, 0: 1, V/V) 和 HPLC (MeOH: H₂O, 65: 35→80: 20, V/V) 纯化得化合物 **1** (6.2 mg)、**2** (9.0 mg)、**7** (7.1 mg) 和 **8** (8.5 mg)。Fr. B (127 g) 经中压制备 MCI 柱层析 (MeOH: H₂O, 20: 80→100: 0, V/V), TLC 检测合并得八个馏分 Fr. B1 ~ B8。Fr. B2 (4.3 g) 经凝胶柱层析 (MeOH) 和 HPLC (MeOH: H₂O, 65: 35→80: 20, V/V) 纯化得化合物 **5** (6.7 mg)、**10** (19.1 mg)、**11** (6.3 mg) 和 **12** (127 mg)。Fr. B3 (12.0 g) 分别经硅胶柱层析 (CH₂Cl₂: Me₂CO, 50: 1→2: 1, V/V), 凝胶柱层析 (MeOH) 和 HPLC (CH₃CN: H₂O, 50: 50→80: 20, V/V) 纯化得化合物 **3** (7.6 mg)、**4** (12 mg)、**6** (8.5 mg)、**9** (6.2 mg) 和 **13** (680 mg)。

1.4 植物毒性试验

采用琼脂法萌发法分别测试化合物 **1** ~ **13** 在 6.25、12.5、25、50、100、200、400 μg/mL 浓度下对拟南芥种子萌发和根生长的影响。取近期收获的萌发活力良好的拟南芥 (*A. thaliana*) 种子, 置于 1.5 mL 离心管中 (不超过 2/3 处), 加入 1 mL 75% (V/V) 的乙醇溶液, 置于涡旋仪上震荡 2 min, 弃上清液; 加入 1 mL 5% 次氯酸钠溶液, 置于涡旋仪上震荡 2 min, 弃上清液; 加入 1 mL 无菌水蒸馏水, 涡旋洗涤种子 2 min, 弃上清液, 重复此漂洗步骤 3 次。向装有表面消毒好的种子的离心管中加入 1 mL 无菌水, 将离心管置于 4 °C 冰箱中冷冻 3 天 (春化)。将直径 9 cm 的玻璃培养皿灭菌并烘干。分离得到的待试化合物利用 HPLC 纯化至纯度 > 98%, 精确称量后用 DMSO 完成溶解, 再用无菌蒸馏水配制成 100 mg/mL 的母液 (DMSO 浓度 < 0.8%), 放置于 -20 °C 冰箱中备用。固体 MS 培养基灭菌, 冷却至 50 °C 后分别加入各个待试化合物, 稀释至不同浓度 (400、200、100、50、25、12.5、6.25 μg/mL)。培养皿中加入 5 mL 含上述不同浓度待试化合物的固体 MS 培养基作为处理组; 培养皿中加入 5 mL 含 0.8% DMSO 的固体 MS 培养基作为空白对照组。待固体 MS 培养基冷却后, 用移液器将灭菌春化后的拟南芥种子均匀等距点播至培养基上, 每皿点播 20 粒种子。用封口膜封口防止水分蒸发, 放入人工气候室中, 白天温度 23 °C, 夜晚温度 18 °C, 光照 12/12 h (白天/

黑夜), 光强 150 μm·m⁻²·s⁻¹, 相对湿度 65%。垂直放置培养, 每隔 24 h 统计并按公式计算种子萌发率: $G = \text{种子的萌发数} / 20 \times 100\%$ 。依照胚根伸长 ≥ 1 mm 的标准统计萌发, > 95% 的种子胚根伸长 ≥ 1 mm 为全部萌发。空白对照组 95% 的种子萌发时全部取出, 按公式计算萌发抑制率: $I_G = (1 - \text{处理后种子的萌发数} / 20) \times 100\%$ 。按公式计算根长抑制率: $I_R = (1 - \text{处理的平均根长} / \text{对照的平均根长}) \times 100\%$, 胚根伸出但未生长的记为零。每一浓度处理各配制 3 皿, 每个处理以完全随机设计的三次重复进行。关于种子萌发和根伸长的抑制的数据表示为平均值 \pm 标准偏差 ($\bar{x} \pm s$)。使用 SPSS 计算 50% 有效抑制浓度 (EC₅₀) 的值。

2 实验结果

2.1 化合物结构鉴定

化合物 **1** 白色无定型粉末; mp. 192 ~ 194 °C, 比旋光度 $[\alpha]_D^{20} + 132.67$ (c 0.10, CH₃OH)。根据高分辨质谱 HR-EI-MS: m/z 280.1906 [M + H]⁺ (calcd for C₁₆H₂₆NO₃, 280.1907) 推断其分子式为 C₁₆H₂₅NO₃, 不饱和度为 5。IR 光谱显示分子中存在 α, β -不饱和内酰胺 (1 718 cm⁻¹)、胺基和羟基 (3 500 cm⁻¹ 和 3 238 cm⁻¹) 官能团。¹H NMR 谱数据 (见表 1) 显示化合物 **1** 有 1 个双峰甲基、2 个单峰甲基 (其中一个连接不饱和碳)、1 个连氧甲基、1 个羟基和 1 个连 N 的 H 信号。¹³C NMR (见表 1) 显示出 16 个碳信号, 结合 DEPT 谱可归属为 4 个甲基 (其中 1 个为连氧甲基 δ_c 48.9)、5 个亚甲基、1 个次甲基、2 个连氧季碳 (δ_c 89.5, C-8; 72.5, C-10)、4 个季碳 (包含 1 个羰基 δ_c 172.4, C-12 和 1 个四取代双键信号 δ_c 149.6, C-7; 128.9, C-11)。结合前期研究^[14], ¹H NMR 谱中 0.91 (3H, s, 5-Me) 和 0.79 (3H, d, $J = 8.0$ Hz, 4-Me) 处的两个甲基信号, 以及 2.47 (1H, d, $J = 14.4$ Hz, H-6 α) 和 2.09 (1H, d, $J = 14.4$ Hz) 处的 6 位 H 信号, 提示该化合物可能为佛术烷类倍半萜。¹³C NMR 谱中 δ_c 128.9 (s, C-11), 和 149.6 (s, C-7) 处的 2 个季碳信号和 ¹H NMR 谱中 δ_H 1.69 (3H, s, 11-Me) 处的甲基信号提示有 1 个四取代双键的存在; 进一步结合 ¹³C NMR 谱中 δ_c 172.4 (s, C-12) 处的羰基信号以及不饱和度分析, 该化合物符合 eremophilane-12, 8-lactam 型倍半萜的基本骨架。仔细分析化合物 **1** 的 ¹H 和 ¹³C NMR 谱, 发现其与已知化合物 **4** 具有相同的 C 原子数和类型, 不饱和度也相同。不同在于, 化合物 **1** 的 8 位和 7 位碳信号

向高场移动 δ_C 89.5 (s, C-8), δ_C 149.6 (s, C-7), 取代在 8 位的 OCH_3 碳信号和氢信号也向高场移动, 结合分子式(化合物 **1** 为 $C_{16}H_{25}NO_3$, 化合物 **4** 为 $C_{16}H_{24}O_4$) 推测化合物 **4** 中 C 环上的 O 原子在化合物 **1** 中被 NH 基团取代(见图 1), 该结构从 2D 谱图信号中得到进一步证实。 1H - 1H COSY、HMBC 和 ROESY 的关键谱图信号如图 2 所示。 1H - 1H COSY 谱图给出 H-1/H-2/H-3 的相关信号。HMBC 谱图中 δ_{NH} 8.42 (s) 与 C-7、8、11、12 相关; δ_{OH} 4.18 (s) 与 C-1、2、9、10 相关; 8-OMe 信号 δ_H 2.91 (s) 与 C-8 相关; 11 位

甲基与 C-7、11、12 相关; 5 位甲基与 C-4、5、6 相关; 4 位甲基则与 C-3、4、5 相关。ROESY 谱图中 H-14 和 H-1 β 、6 β 相关; H-15 和 H-3 β 、6 α 、H-14 相关; 10-OH 和 8-OMe、H-14、H-6 β 、H-9 β 相关, 由此确定该化合物具有典型的 eremophilane-12,8-lactam 型倍半萜相对构型(见图 1)。综上所述, 该化合物是一个新的 eremophilane-12,8-lactam 型倍半萜生物碱, 被命名为 ligulacymlactam A。化合物 **1** 的详细结构鉴定数据原始图谱可从本刊官网免费下载 (www.trcw.ac.cn)。

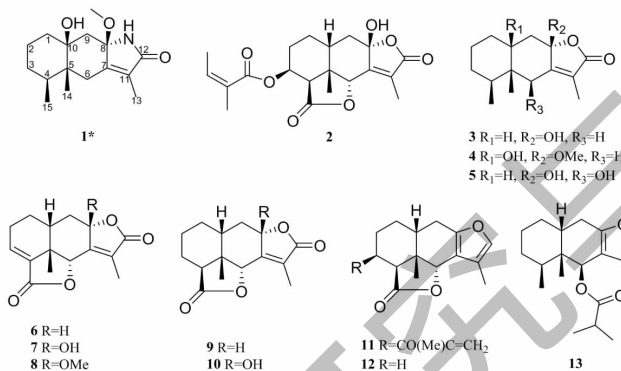


图 1 化合物 **1**~**13** 的化学结构 (* 新化合物)

Fig. 1 Structures of compounds **1**-**13** (* new compound)

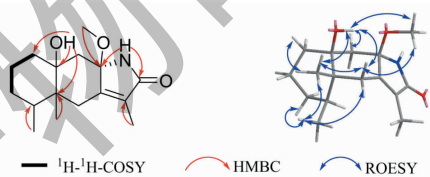


图 2 化合物 **1** 的关键 1H - 1H COSY (—)、HMBC (→) 和 ROESY (↔) 相关

Fig. 2 Key 1H - 1H COSY (—), HMBC (→) and ROESY (↔) correlations of compound **1**

表 1 化合物 **1** 的核磁数据 (1H NMR; 800 MHz; ^{13}C NMR; 200 MHz, $DMSO-d_6$)

Table 1 NMR data of compound **1** (1H NMR; 800 MHz; ^{13}C NMR; 200 MHz, $DMSO-d_6$)

| Position | δ_C (δ in ppm) | δ_H (δ in ppm, J in Hz) |
|----------|----------------------------------|---|
| 1 | 34.7 (t) | α 1.20 ~ 1.23 (d, 15.2) β 1.55 ~ 1.60 (td, 13.6, 4.8) |
| 2 | 22.0 (t) | α 1.43 (br d, 12.8) β 1.24 ~ 1.25 (m) ^c |
| 3 | 29.8 (t) | α 1.14 ~ 1.19 (m) β 1.27 ~ 1.31 (m) ^c |
| 4 | 33.1 (d) | α 1.25 ~ 1.27 (m) ^c |

续表 1 (Continued Tab. 1)

| Position | δ_c (δ in ppm) | δ_H (δ in ppm, J in Hz) |
|----------|----------------------------------|---|
| 5 | 45.7(s) | |
| 6 | 29.6(t) | α 2.47(d, 14.4) β 2.09(d, 14.4) |
| 7 | 149.6(s) | |
| 8 | 89.5(s) | |
| 9 | 43.6(t) | α 2.12(d, 14.4) β 1.85(d, 14.4) |
| 10 | 72.5(s) | |
| 11 | 128.9(s) | |
| 12 | 172.4(s) | |
| 13 | 8.4(q) | 1.69(s) |
| 14 | 15.1(q) | 0.91(s) |
| 15 | 16.6(q) | 0.79(d, 8.0) |
| NH | | 8.42(s) |
| 8-OMe | 48.9(q) | 2.91(s) |
| 10-OH | | 4.18(s) |

注:“谱图信号重叠。”

Note:“Signals are overlapped.”

化合物 2 白色块状晶体;ESI-MS: m/z 377 [$M + H$]⁺, 分子式为 C₂₀H₂₄O₇。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.03 (1H, dq, $J = 7.8$ Hz, H-3'), 5.40 (1H, br s, H-3 α), 5.00 (1H, br s, H-6 β), 2.54 (1H, br s, H-4 α), 2.30 (1H, m, H-10 β), 2.24 (1H, m, H-9 α), 1.97 (3H, dq, $J = 8.5$ Hz, H-4'), 1.96 (3H, s, H-13), 1.90 (1H, m, H-1 β), 1.85 (3H, br s, H-5'), 1.76 (1H, m, H-1 α), 1.60 (1H, m, H-9 β), 1.44 (1H, m, H-2a), 1.40 (3H, s, H-14), 1.39 (1H, m, H-2b); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 20.5 (t, C-1), 25.0 (t, C-2), 64.7 (d, C-3), 42.4 (d, C-4), 44.2 (s, C-5), 83.4 (d, C-6), 152.5 (s, C-7), 103.6 (s, C-8), 35.4 (t, C-9), 34.8 (d, C-10), 127.0 (s, C-11), 171.6 (s, C-12), 8.8 (q, C-13), 23.0 (q, C-14), 172.2 (s, C-15), 166.8 (s, C-1'), 139.5 (s, C-2'), 127.4 (d, C-3'), 20.6 (q, C-4'), 15.7 (q, C-5')。经与文献^[15]对比, 鉴定该化合物为 3 β -angeloyloxy-8 β -hydroxyremophil-7(11)-ene-12,8 α (14 β ,6 α)-diolide。

化合物 3 无色颗粒状结晶;ESI-MS: m/z 251 [$M + H$]⁺, 分子式为 C₁₅H₂₂O₃。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 2.81 (1H, d, $J = 13.5$ Hz, H-6 α), 2.28 (1H, d, $J = 13.5$ Hz, H-6 β), 2.19 (1H, d, $J = 13.5$ Hz, H-9 β), 2.04 (1H, d, $J = 13.5$ Hz, H-9 α), 1.81 (3H, d, $J = 1.5$ Hz, H-13), 1.75 (1H, m, H-1 β),

1.57 ~ 1.45 (1H, m, H-2 α), 1.41 ~ 1.24 (3H, overlap, H-2 β , 3 β , 4 α), 1.20 (2H, overlap, H-1 α , 3 α), 1.03 (3H, s, H-14), 0.82 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-15); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 26.4 (t, C-1), 21.6 (t, C-2), 29.5 (t, C-3), 31.1 (d, C-4), 45.6 (s, C-5), 72.2 (t, C-6), 160.7 (s, C-7), 104.0 (s, C-8), 40.8 (t, C-9), 35.4 (d, C-10), 123.4 (s, C-11), 174.1 (s, C-12), 8.3 (q, C-13), 21.4 (q, C-14), 16.1 (q, C-15)。经与文献^[16]对比, 鉴定该化合物为 8 β -hydroxyremophil-7(11)-en-12,8 α -olide。

化合物 4 白色颗粒状结晶;ESI-MS: m/z 281 [$M + H$]⁺, 分子式为 C₁₆H₂₄O₄。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 2.59 (1H, d, $J = 13.0$ Hz, H-6 α), 2.47 (1H, d, $J = 13.0$ Hz, H-6 β), 2.39 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-9 α), 2.35 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-9 β), 1.86 ~ 1.83 (1H, m, H-1 α), 1.81 (3H, d, $J = 1.0$ Hz, H-13), 1.69 ~ 1.65 (1H, m, H-2 α), 1.52 ~ 1.39 (5H, overlap, H-1 β , 2 β , 3, 4), 1.06 (3H, s, H-14), 0.83 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-15), 3.34 (3H, s, 8-OMe); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 35.4 (t, C-1), 23.2 (t, C-2), 31.6 (t, C-3), 34.7 (d, C-4), 47.6 (s, C-5), 31.0 (t, C-6), 158.4 (s, C-7), 107.5 (s, C-8), 44.1 (t, C-9), 75.5 (s, C-10), 126.8 (s, C-11), 174.2 (s, C-12), 8.4 (q, H-13), 15.3 (q, H-14), 17.0 (q, H-

15), 53.1 (q, 8-OMe)。经与文献^[17]对比, 鉴定该化合物为 10 β -hydroxy-8 β -methoxyeremophilanolide。

化合物 5 白色颗粒状结晶; ESI-MS: m/z 267 [M + H]⁺, 分子式为 C₁₅H₂₂O₄。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 4.50 (1H, s, H-6), 2.25 (1H, d, J = 14.0 Hz, H-9 β), 2.01 (1H, d, J = 14.0 Hz, H-9 α), 1.82 (1H, br d, J = 11.0 Hz, H-10), 1.79 (3H, d, J = 1.0 Hz, H-13), 1.63 (1H, m, H-1 β), 1.57 ~ 1.24 (6H, overlap, H-1 α , 2, 3, 4 α), 0.99 (3H, s, H-14), 0.80 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-15); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 25.8 (t, C-1), 20.4 (t, C-2), 31.0 (t, C-3), 29.2 (d, C-4), 43.1 (s, C-5), 69.0 (d, C-6), 160.4 (s, C-7), 105.6 (s, C-8), 39.3 (t, C-9), 33.9 (d, C-10), 121.6 (s, C-11), 171.4 (s, C-12), 8.4 (q, C-13), 16.8 (q, C-14), 15.2 (q, C-15)。经与文献^[16]对比, 鉴定该化合物为 6 β , 8 β -dihydroxyeremophil-7(11)-en-12, 8 α -olide。

化合物 6 无色块状结晶; ESI-MS: m/z 261 [M + H]⁺, 分子式为 C₁₅H₁₆O₄。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.81 (1H, t, J = 3.2 Hz, H-3), 5.14 (1H, br s, H-6 β), 4.65 (1H, dd, J = 9.0, 3.0 Hz, H-8 β), 2.40 (1H, m, H-2 α), 2.20 (1H, m, H-9 β), 2.16 (1H, m, H-2 β), 2.10 (1H, m, H-10 β), 2.04 (1H, m, H-1 β), 1.99 (3H, d, J = 2.5 Hz, H-13), 1.74 (1H, m, H-1 α), 1.41 (3H, s, H-14), 1.02 (1H, m, H-9 α); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 21.6 (t, C-1), 21.9 (t, C-2), 137.0 (d, C-3), 130.4 (s, C-4), 43.7 (s, C-5), 82.4 (d, C-6), 160.2 (s, C-7), 81.9 (d, C-8), 33.0 (t, C-9), 33.4 (d, C-10), 125.5 (s, C-11), 174.5 (s, C-12), 9.7 (q, C-13), 26.7 (q, C-14), 168.5 (s, C-15)。经与文献^[18]对比, 鉴定该化合物为 8 β -H-eremophil-3, 7(11)-dien-12, 8 α ; 15, 6 α -diolide。

化合物 7 白色颗粒状结晶; ESI-MS: m/z 277 [M + H]⁺, 分子式为 C₁₅H₁₆O₅。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 6.85 (1H, t, J = 3.5 Hz, H-3), 5.28 (1H, dd, J = 2.0 Hz, H-6 β), 2.32 ~ 2.37 (1H, m, H-2 β), 2.26 ~ 2.30 (1H, m, H-2 α), 2.19 ~ 2.22 (1H, m, H-1 β), 2.13 ~ 2.17 (1H, dd, J = 13.0, 5.0 Hz, H-9 β), 2.03 ~ 2.08 (1H, m, H-10 β), 1.87 (3H, d, J = 2.0 Hz, H-13), 1.65 (1H, m, H-1 α), 1.40 (3H, s, H-14), 1.35 (1H, t, J = 13.0 Hz, H-9 α); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 22.5 (t, C-1), 22.8 (t, C-2), 139.0 (d, C-3), 130.9 (s, C-4), 45.2 (s, C-5), 83.9 (d, C-

6), 156.3 (s, C-7), 104.7 (s, C-8), 37.5 (t, C-9), 34.9 (d, C-10), 126.7 (s, C-11), 173.0 (s, C-12), 9.0 (q, C-13), 27.1 (q, C-14), 170.8 (s, C-15)。经与文献^[19]对比, 鉴定该化合物为 8 β -hydroxyeremophil-3, 7(11)-diene-8 α , 12(6 α , 15)-diolide。

化合物 8 白色颗粒状结晶; ESI-MS: m/z 291 [M + H]⁺, 分子式为 C₁₆H₁₈O₅。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 6.83 (1H, t, J = 3.5 Hz, H-3), 5.08 (1H, dd, J = 2.0 Hz, H-6 β), 2.37 ~ 2.42 (1H, m, H-2 β), 2.30 ~ 2.33 (1H, m, H-2 α), 2.20 ~ 2.23 (1H, m, H-1 β), 2.19 (1H, dd, J = 13.0, 5.0 Hz, H-9 β), 2.07 (1H, m, H-10 β), 1.90 (3H, d, J = 2.0 Hz, H-13), 1.69 ~ 1.73 (1H, m, H-1 α), 1.40 (3H, s, H-14), 1.34 (1H, t, J = 13.0 Hz, H-9 α), 3.35 (3H, s, 8-OMe); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 22.4 (t, C-1), 22.7 (t, C-2), 138.0 (d, C-3), 130.0 (s, C-4), 45.0 (s, C-5), 83.2 (d, C-6), 155.6 (s, C-7), 105.6 (s, C-8), 36.5 (t, C-9), 33.4 (d, C-10), 128.6 (s, C-11), 172.8 (s, C-12), 9.3 (q, C-13), 26.9 (q, C-14), 169.8 (s, C-15), 51.6 (q, 8-OMe)。经与文献^[19]对比, 鉴定该化合物为 8 β -methoxyeremophil-3, 7(11)-diene-8 α , 12(6 α , 15)-diolide。

化合物 9 无色颗粒状结晶; ESI-MS: m/z 263 [M + H]⁺, 分子式为 C₁₅H₁₈O₄。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 4.97 (1H, br d, J = 1.2 Hz, H-6 β), 4.69 (1H, m, H-8 β), 2.27 (2H, overlap, H-9 β , 4 α), 2.03 (1H, m, H-10 β), 1.91 (3H, d, J = 2.0 Hz, H-13), 1.85 (2H, overlap, H-3 β , 1 α), 1.68 (1H, br d, J = 2.0 Hz, H-1 β), 1.51 (1H, dd, J = 13.0, 5.0 Hz, H-9 α), 1.41 ~ 1.48 (2H, overlap, H-2 α , 3 α), 1.32 (1H, m, H-2 β), 1.27 (3H, s, H-14); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 19.3 (t, C-1), 20.8 (t, C-2), 24.7 (t, C-3), 40.7 (d, C-4), 44.7 (s, C-5), 82.1 (d, C-6), 154.6 (s, C-7), 77.5 (d, C-8), 33.0 (t, C-9), 35.2 (d, C-10), 126.0 (s, C-11), 173.5 (s, C-12), 9.2 (q, C-13), 20.1 (q, C-14), 174.5 (s, C-15)。经与文献^[5]对比, 鉴定该化合物为 eremophil-7(11)-ene-12, 8 α , 14 β , 6 α -diolide。

化合物 10 无色颗粒状结晶; ESI-MS: m/z 279 [M + H]⁺, 分子式为 C₁₅H₁₈O₅。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.08 (1H, br s, H-6 β), 2.28 (1H, m, H-10 β), 2.27 (2H, overlap, H-4 α , 9 β), 1.95 (3H, s, H-13), 1.91 (1H, m, H-1 α), 1.82 (2H, overlap, H-9 α ,

3 α), 1.73 (1H, br d, $J = 11.7$ Hz, H-2 α), 1.47 (2H, overlap, H-3 β , 1 β), 1.31 (1H, m, H-2 β), 1.32 (3H, s, H-14); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 19.2 (t, C-1), 21.0 (t, C-2), 24.2 (t, C-3), 40.7 (d, C-4), 44.6 (s, C-5), 82.4 (d, C-6), 152.8 (s, C-7), 103.2 (s, C-8), 36.5 (t, C-9), 35.0 (d, C-10), 127.5 (s, C-11), 171.1 (s, C-12), 9.0 (q, C-13), 20.3 (q, C-14), 175.1 (s, C-15)。经与文献^[20]对比, 鉴定该化合物为 8 β -hydroeremophil-7(11)-en-12 β , 8 α (14 β , 6 α)-diolide。

化合物 11 白色颗粒状结晶; ESI-MS: m/z 353 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_5$ 。 ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.16 (1H, br s, H-12), 6.07, 5.64 (各 1H, br s, H-3'), 5.48 (1H, br s, H-3), 5.18 (1H, br s, H-6 β), 2.72 (1H, br s, H-4 α), 2.72 (2H, m, H-9), 2.41 (1H, m, H-10 β), 2.13 (1H, m, H-1b), 2.02 (3H, s, H-13), 1.94 (3H, s, H-4'), 1.89 (1H, m, H-2b), 1.86 (1H, m, H-2a), 1.51 (3H, s, H-14), 1.53 (1H, m, H-1a); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 23.1 (t, C-1), 23.4 (t, C-2), 67.8 (d, C-3), 44.6 (d, C-4), 42.2 (s, C-5), 84.3 (d, C-6), 121.0 (s, C-7), 152.8 (s, C-8), 25.8 (t, C-9), 38.2 (d, C-10), 115.3 (s, C-11), 140.1 (d, C-12), 8.3 (q, C-13), 23.7 (q, C-14), 175.6 (s, C-15), 168.0 (s, C-1'), 137.8 (s, C-2'), 126.4 (t, C-3'), 18.6 (q, C-4')。经与文献^[9]对比, 鉴定该化合物为 3-(methacryloyloxy) furanoeremophilan-15, 6 α -olide。

化合物 12 白色颗粒状结晶; ESI-MS: m/z 269 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_3$ 。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.11 (1H, s, H-12), 6.80 (2H, t, $J = 3.6$ Hz, H-3), 5.33 (1H, br s, H-6 β), 2.72 (1H, m, H-4 α), 2.52 (1H, dd, $J = 15.0, 3.0$ Hz, H-9 β), 2.42 (2H, m, H-2), 2.30 (2H, m, H-9 α , 10 β), 2.16 (1H, m, H-1 β), 2.02 (3H, d, $J = 1.5$ Hz, H-13), 1.76 (1H, m, H-1 α), 1.41 (3H, s, H-14); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 20.7 (t, C-1), 19.0 (t, C-2), 23.4 (t, C-3), 41.6 (d, C-4), 41.7 (s, C-5), 82.4 (d, C-6), 120.3 (s, C-7), 151.4 (s, C-8), 25.3 (t, C-9), 37.2 (d, C-10), 114.7 (s, C-11), 138.5 (d, C-12), 8.7 (q, C-13), 19.0 (q, C-14), 177.3 (s, C-15)。经与文献^[5]对比, 鉴定该化合物为 furanoeremophilan-14, 6 α -olide。

化合物 13 白色颗粒状结晶; ESI-MS: m/z 305 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_3$ 。 ^1H NMR (500 MHz,

CD_3OD) δ : 6.69 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-12), 6.42 (1H, s, H-6 β), 2.55 (1H, dd, $J = 17.0, 6.5$ Hz, H-9 β), 2.43 (1H, m, H-2'), 2.35 (1H, dd, $J = 17.0, 6.5$ Hz, H-9 α), 1.98-1.90 (1H, m, H-10 β), 1.96 (3H, s, H-13), 1.46 ~ 1.36 (3H, overlap, H-3 α , 4 α , 1 α), 1.36 ~ 1.10 (3H, overlap, H-2, 3 β , 1 β), 1.09 (6H, d, $J = 7.5$ Hz, H-3', 4'), 0.95 (3H, s, H-14), 0.78 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-15); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 27.1 (t, C-1), 20.4 (t, C-2), 29.7 (t, C-3), 31.7 (d, C-4), 40.8 (s, C-5), 69.5 (d, C-6), 116.4 (s, C-7), 152.4 (s, C-8), 26.0 (t, C-9), 36.5 (d, C-10), 119.9 (s, C-11), 138.5 (s, C-12), 8.3 (q, C-13), 17.7 (q, C-14), 15.4 (q, C-15), 176.2 (s, C-1'), 34.6 (s, C-2'), 19.4 (q, C-3'), 19.0 (q, C-4')。经与文献^[21]对比, 鉴定该化合物为 10 β -hydroxy-6 β -isobutyrylfuranoeremophilane。

2.2 植物毒活性结果

每隔 24 h 统计种子萌发率, 结果表明化合物 1 ~ 13 在低浓度时均能够使种子全部萌发的时间提前。化合物 2 在处理浓度 ≤ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 化合物 9、10、13 在处理浓度 ≤ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 化合物 3、5 在处理浓度 ≤ 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 种子全部萌发的时间较空白对照组提前大约 1 ~ 2 天。以 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理浓度为例, 化合物 2、3、5、9、10、13 处理后的种子萌发全部时间比空白对照组均有不同程度的提前 (见图 3)。

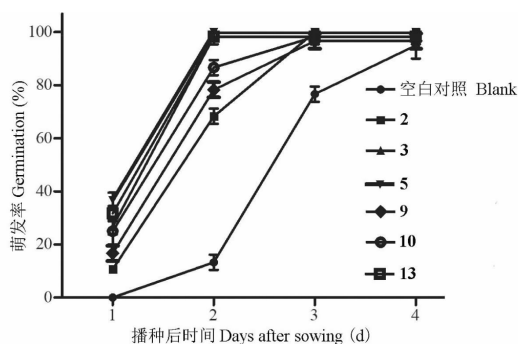


图 3 化合物 2、3、5、9、10、13 对拟南芥种子萌发的促进作用

Fig. 3 Promoting effect of compounds 2, 3, 5, 9, 10, 13 on *A. thaliana* seed germination

空白对照组种子全部萌发后计算萌发抑制率, 结果表明所有化合物对拟南芥种子萌发均无抑制活性。空白对照组种子完全萌发 3 天后, 考察各化合物对根生长的抑制活性。化合物 1 ~ 13 均表现出一定的抑制活性, 其中, 化合物 13 的活性最好 ($\text{EC}_{50} =$

44.15 ± 5.21 μg/mL), 化合物 1、2、5、8、10、11 的 EC_{50} 小于 150 μg/mL(见图 4)。

EC_{50} 小于 100 μg/mL, 化合物 3、4、6、7、8、9 的 EC_{50}

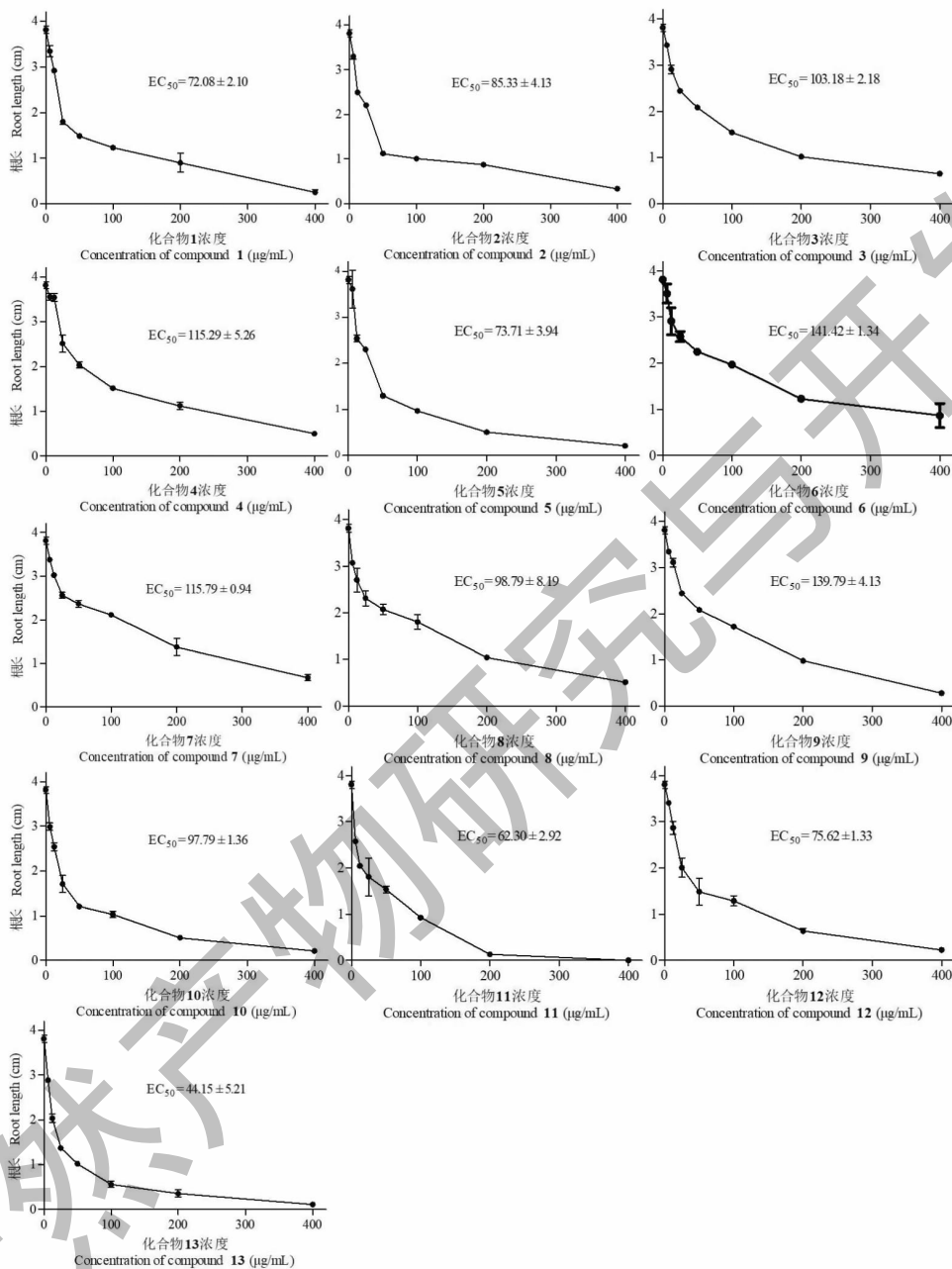


图 4 化合物 1~13 对拟南芥种子根生长的抑制活性

Fig. 4 Inhibitory effects of compounds 1-13 against seed growth of *A. thaliana*

3 讨论与结论

本文从舟叶橐吾根 95% 甲醇部位中共分离得到的 13 个佛术烷类倍半萜, 包括化合物 1 为新的 eremophilane-12,8-lactam 型佛术烷类倍半萜生物碱; 化合物 2~5 为 eremophilane-12,8-olides 型佛术烷类倍半萜; 化合物 6~10 为 eremophilane-14,6(-olides 型佛术烷类倍半萜; 化合物 11、12、13 为

furanermophilane 型佛术烷类倍半萜(见图 1)。考察上述化合物的植物毒活性, 结果显示化合物 1~13 对拟南芥种子萌发无抑制活性, 但均表现出一定的对拟南芥种子根生长的抑制活性, 并且部分化合物在低浓度时能够使种子萌发时间较空白对照组提前 1~2 天。此结果与文献所述一致: 倍半萜类化合物抑制根生长的活性比抑制种子萌发的活性更强, 并

且有化感潜力的植物毒化合物在低浓度下对种子萌发常常表现出促进作用^[22,23]。最近的研究显示,植物在对抗寄生植物中进化出“自杀式萌发”又称“蜜罐策略”的新策略:宿主植物释放的化感物质如独脚金内酯类(strigolactones, SLs)可诱导刺激寄生植物如独脚金属(*Striga* spp.)、列当属(*Orobanch* spp.)的种子萌发,如果是在无宿主植物的环境中,这些萌发的种子会因为得不到营养供给而加速死亡,从而减少寄生植物种子在土壤中的储备^[24]。为面对复杂的环境压力,化感物质往往发挥多重生态学作用^[25]。本次实验结果提示,舟叶囊吾中的佛术烷类倍半萜除直接抑制其他植物种子的萌发和生长外,也可能采取与上述“自杀性萌发”类似的策略,即诱导促进其他植物种子的萌发,随后通过某种方式诱导根尖细胞死亡,抑制其营养吸收并加速其死亡,从而减少这些植物对周围土壤中养分的消耗。目前尚未见类似的研究报道,此推测需要实验的进一步验证。

比较化合物**3**、**5**、**13**与其余化合物对促进种子提前萌发的作用,结果提示6位取代基与15位形成内酯环会影响促进作用的发挥;存在3位侧链以及10位羟基被取代则可能产生抑制的效果;6位侧链的存在却可能产生促进的效果。另一方面,化合物**1**~**13**对拟南芥根生长的抑制活性与化合物浓度和结构相关(见表4)。结合前期实验结果,舟叶囊吾中佛术烷类倍半萜对拟南芥根生长的抑制活性存在以下规律: *furanermophilane*型佛术烷类倍半萜的植物毒活性较好,且 *furanermophilane*型 > *eremophilane-14, 6 α -olides*型 > *eremophilane-12, 8-olides*型 > *modified eremophilane*型。比较化合物**11**、**12**和**13**对拟南芥根生长的抑制活性,化合物**13**的 EC_{50} 为 $44.15 \pm 5.21 \mu\text{g/mL}$, 化合物**11**、**12**的 EC_{50} 分别为 62.30 ± 2.92 和 $75.62 \pm 1.33 \mu\text{g/mL}$, 提示 *furanermophilane*型佛术烷类倍半萜的6位取代基与15位不成内酯环时活性更好。比较化合物**6**~**10**对拟南芥根生长的抑制活性,化合物**6**和**9**活性相似,提示 *eremophilane-14, 6 α -olides*型佛术烷类倍半萜A环上的双键对植物毒活性影响不大。比较化合物**2**~**5**对拟南芥根生长的抑制活性,化合物**2**和**5**活性相差不大,提示 *eremophilane-12, 8-olides*佛术烷类倍半萜的6位和15位形成内酯环,以及3位有取代基都对活性影响不大。分别比较化合物**1**和**3**、**3**、**5**和**4**、**6**和**7**、**9**和**10**对拟南芥根生长的抑制活

性,发现10位上有羟基取代时植物毒活性增强,该结果与前期研究结果一致^[15]。化合物**13**在本次实验中表现出最好的植物毒活性,从上述构效分析中可知,含有10位羟基和6位侧链取代的 *furanermophilane*型佛术烷类倍半萜具有作为生态友好型天然除草剂先导化合物的潜力。因此,下一步将从舟叶囊吾中寻找更多此类型的化合物,筛选用于开发生态友好型天然除草剂的前导化合物。

参考文献

- Macías FA, Durán AG, Molinillo JMG. Allelopathy: the chemical language of plants [J]. *Prog Chem Org Nat Prod*, 2020, 112:1-84.
- Uddin MN, Asaeda T, Shampa SH, et al. Allelopathy and its coevolutionary implications between native and non-native neighbors of invasive *Cynara cardunculus* L. [J]. *Ecol Evol*, 2020, 10:7463-7475.
- Zorrilla JG, Cala A, Rial C, et al. Synthesis of active strigolactone analogues based on eudesmane- and guaiane-type sesquiterpene lactones [J]. *J Agr Food Chem*, 2020, 68: 9636-9645.
- Ma RJ, Wang ML, Zhu XT, et al. Allelopathy and chemical constituents of *Ligularia virgaurea* volatile [J]. *Chin J Appl Ecol(应用生态学报)*, 2005, 16:1826-1829.
- Cantrell CL, Duke SO, Fronczek FR, et al. Phytotoxic eremophilanes from *Ligularia macrophylla* [J]. *J Agr Food Chem*, 2007, 55:10656-10663.
- LI G. Allelopathy of the dominant noxious weed *Ligularia sagitta* in psychro-grasslands [D]. Lanzhou: Northwest Normal University(西北师范大学), 2007.
- Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences. *Flora Yunnanica: Vol 13(云南植物志:第13卷)* [M]. Beijing: Science Press, 2004:466-515.
- Flora of China Editorial Committee of Chinese Academy of Sciences. *Flora of China: Vol 77(2)(中国植物志:第77(2)卷)* [M]. Beijing: Science Press, 1989:44.
- Hanai R, Gong X, Tori M, et al. Chemical and genetic study of *Ligularia tongolensis*, *Ligularia cymbulifera*, and *Ligularia atroviolacea* in the Hengduan Mountains of China [J]. *Bull Chem Soc Jpn*, 2005, 78:1302-1308.
- Shimizu A, Hanai R, Okamoto Y, et al. Chemical constituents in hybrids of *Ligularia tongolensis* and *L. cymbulifera*: chemical introgression in *L. tongolensis* [J]. *Chem Biodivers*, 2016, 13:837-844.