

金银花中酚酸类成分及其抗炎活性研究

宋亚玲^{1,2}, 王红梅^{1,2}, 倪付勇^{1,2}, 王雪晶^{1,2}, 赵祎武^{1,2}, 黄文哲^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222000

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222000

摘要: 目的 研究金银花 *Lonicerae Japonicae Flos* 中酚酸类成分及其抗炎活性。方法 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱等方法分离纯化, 根据理化性质和波谱数据进行结构鉴定; 采用脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 炎症反应模型, 考察金银花中酚酸类成分对巨噬细胞经 LPS 刺激后产生的炎症因子 [NO、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及白细胞介素-6 (IL-6)] 的影响, 评价其抗炎活性。结果 从金银花醋酸乙酯部位中分离得到 12 个化合物, 包括 8 个酚酸、3 个环烯醚萜苷和 1 个黄酮类成分, 分别鉴定为新绿原酸 (1)、隐绿原酸 (2)、3,5-二咖啡酰奎宁酸 (3)、3,4-二咖啡酰奎宁酸 (4)、4,5-二咖啡酰奎宁酸 (5)、绿原酸 (6)、咖啡酸 (7)、咖啡酸甲酯 (8)、断氧化马钱子苷 (9)、裂环马钱子苷 (10)、獐芽菜苷 (11) 和木犀草素 (12)。对其中的酚酸类化合物 1~8 进行了体外抗炎活性实验, 结果表明, 化合物 1~8 对 LPS 刺激的巨噬细胞炎症因子均具有不同程度的抑制作用。结论 酚酸类成分是金银花的主要抗炎活性成分之一, 其中化合物 7 活性最强。

关键词: 金银花; 酚酸类; 抗炎活性; 3,5-二咖啡酰奎宁酸; 绿原酸; 咖啡酸; 裂环马钱子苷

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)04-0490-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.04.006

Study on anti-inflammatory activities of phenolic acids from *Lonicerae Japonicae Flos*

SONG Ya-ling^{1,2}, WANG Hong-mei^{1,2}, NI Fu-yong^{1,2}, WANG Xue-jing^{1,2}, ZHAO Yi-wu^{1,2}, HUANG Wen-zhe^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222000, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222000, China

Abstract: Objective To study the anti-inflammatory of phenolic acids from *Lonicerae Japonicae Flos*. **Methods** The compounds in the EtOAc fraction were isolated and purified by silica gel and Sephadex LH-20 column chromatographies, and preparative HPLC as well. The structures were identified by various spectroscopic data such as ESI-MS, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR data. The anti-inflammatory effects were evaluated by a *in vitro* model of LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. **Results** Eight phenolic acids, three iridoids, and one flavonoid were isolated from the extracts of *Lonicerae Japonicae Flos* and identified as 5-*O*-caffeoylquinic acid (1), 4-*O*-caffeoylquinic acid (2), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (3), 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid (4), 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (5), chlorogenic acid (6), caffeic acid (7), methyl caffeate acid (8), secoxyloganin (9), secologanoside (10), sweroside (11), and luteolin (12). Compounds 1~8 showed the anti-inflammatory activity in different degrees. **Conclusion** Phenolic acids are the main anti-inflammatory constituents in *Lonicerae Japonicae Flos*. Caffeic acid shows the strongest activity *in vitro*.

Key words: *Lonicerae Japonicae Flos*; phenolic acids; anti-inflammatory activity; 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid; chlorogenic acid; caffeic acid; secologanoside

金银花 *Lonicerae Japonicae Flos* 为忍冬科 (Caprifoliaceae) 植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或初开的花, 药用历史悠久, 为常用中药之一。金银花味甘, 性寒, 归肺、心、胃经, 具

有清热解毒、疏散风热之功效, 用于治疗痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热等症^[1], 主要含有挥发油类、有机酸类、黄酮类、三萜皂苷类和环烯醚萜类等多种成分^[2-5]。据报道, 金银花具

收稿日期: 2014-12-11

基金项目: 科技部重大新药创制项目: 现代中药创新集群与数字制药技术平台 (2013ZX09402203)

作者简介: 宋亚玲, 女, 工程师, 从事天然产物化学研究。Tel: (0518)81152323 E-mail: songyaling@yeah.net

*通信作者 萧伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: (0518)81152367 E-mail: kanionlunwen@163.com

有较强的抗炎作用^[6-8]，然而，这些研究的主要对象大部分都是金银花提取物，涉及金银花单体化合物的只有少数，根据文献报道，金银花三萜皂苷忍冬苦苷 A、忍冬苦苷 C 均具有抗炎作用，效果与阿司匹林相当^[9]；金银花挥发油也具有显著的抗炎活性^[10]。本实验从金银花醇提物的醋酸乙酯部位中分离鉴定了 8 个酚酸、3 个环烯醚萜苷和 1 个黄酮类成分，分别为新绿原酸 (5-*O*-caffeoylquinic acid, **1**)、隐绿原酸 (4-*O*-caffeoylquinic acid, **2**)、3,5-二咖啡酰奎宁酸 (3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, **3**)、3,4-二咖啡酰奎宁酸 (3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid, **4**)、4,5-二咖啡酰奎宁酸 (4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, **5**)、绿原酸 (chlorogenic acid, **6**)、咖啡酸 (caffeic acid, **7**)、咖啡酸甲酯 (methyl caffeate acid, **8**)、断氧化马钱子苷 (secoxyloganin, **9**)、裂环马钱苷 (secologanoside, **10**)、獐芽菜苷 (sweroside, **11**) 和木犀草素 (luteolin, **12**)。采用脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 炎症反应模型，对其中的酚酸类化合物 **1**~**8** 进行了抗炎活性测定，化合物对 LPS 刺激的巨噬细胞炎症因子均具有不同程度的抑制作用，化合物 **7** 活性最高。并对活性成分的构效关系进行了初步探讨，为进一步研究其抗炎作用机制以及金银花的临床应用提供依据。

1 仪器与材料

Reveleris 中低压制备色谱仪 (美国 GRACE 公司)，配四元泵、UV、ELSD 检测器；Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司)，配自动进样器、四元泵、MWD 检测器；Bruker-AV-400 型核磁共振光谱仪 (德国布鲁克公司)；AE240 电子分析天平 (瑞士 Mettler 公司)；SW-CJ-2F 型超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司)；CO₂ 培养箱 (Thermo scientific 3100)；倒置显微镜 (OLYPMUS, CKX41SF)；96 孔细胞培养板、细胞培养瓶 (美国 Costar)；FlexStation 3 钙流工作站 (美谷分子仪器)；移液枪 (Eppendorf)；BXM-30R 立式压力蒸气灭菌锅 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂)；LD4-2A 离心机 (北京众益中和生物技术有限公司)；细胞自动计数仪 (Invitrogen, C1028)。

柱色谱硅胶 (200~300 目)、薄层色谱硅胶 G (青岛海洋化工厂)，Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司)，乙腈 (色谱纯，Oceanpak 公司，瑞典)，95% 乙醇 (食用级，连云港长和酒业有限公司)，水 (双蒸水，自制)，甲酸、醋酸乙酯 (分析纯，南京化学

试剂有限公司)；DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS, Gibco 公司)，LPS、DMSO (Sigma 公司)，CCK-8 试剂盒 (上海贝博生物公司)；NO 检测试剂盒 (碧云天生物技术研究)；多因子检测试剂盒 (BIO-RAD 公司)。

金银花药材购自安徽亳州药材市场，经南京中医药大学吴启南教授鉴定为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花；小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞株购于中国科学院典型培养物保藏中心上海细胞库。

2 方法

2.1 提取与分离

取金银花药材 10.0 kg，依次用 10、8 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次，每次 2 h，合并提取液，滤过，滤液减压浓缩得流浸膏 3.5 kg，浸膏加水悬浮，依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取，分别得到石油醚部位 (121 g)、醋酸乙酯部位 (254 g)、正丁醇部位 (380 g)。取醋酸乙酯部位经硅胶柱色谱，以二氯甲烷-甲醇 (100:0→0:1) 进行梯度洗脱，经 TLC 检识合并得到 8 个部位 Fr. 1~8。Fr. 3 经 Sephadex LH-20、制备液相色谱分离得到化合物 **2** (1.6 g)、**8** (20 mg)、**9** (17 mg)、**10** (0.8 g)；Fr. 5 采用 Sephadex LH-20、制备液相色谱纯化，得到化合物 **1** (21 mg)、**3** (14 mg)、**4** (19 mg)、**5** (23 mg)；Fr. 7 经硅胶柱色谱、RP₁₈ 和 Sephadex LH-20 色谱纯化后得化合物 **6** (32 mg)、**7** (17 mg)、**11** (26 mg)、**12** (9 mg)。

2.2 抗炎活性研究

2.2.1 供试品配制 取化合物 **1**~**8**，分别用 DMSO 配制成 50 mg/mL 储存液，加药时用无血清 DMEM 培养基稀释成 50 μg/mL 的供试品药液。

2.2.2 细胞培养 RAW264.7 细胞用含 10% FBS DMEM 培养，置 5% CO₂、37 °C、饱和湿度的细胞培养箱中培养。待细胞生长至对数生长期进行传代，2~3 d 传代 1 次。取至少 3 代后的细胞用于实验。

2.2.3 化合物对 RAW264.7 细胞生长的影响 取对数生长期的 RAW264.7 细胞 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化约 2 min 后，弃胰酶，用 10% FBS DMEM 培养基中和胰酶作用，轻轻吹打成单细胞悬液，离心弃上清，用完全培养基重悬细胞并计数后，调整细胞悬液至 3×10⁵/mL，按每孔 100 μL 接种至 96 孔培养板，37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养 24 h，吸尽每孔上清，每孔加入 100 μL 无血清 DMEM 培养基，随机分为对照组、化合物 **1**~**8** 组

(50 $\mu\text{g/mL}$)，加入相应药物后，每组设3个复孔，5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 、饱和湿度条件下培养24 h后，提前4 h按每孔10 μL 加入CCK-8，4 h后酶标仪检测450 nm处吸光度值(A_{450})。

2.2.4 炎症因子检测 取对数生长期的RAW264.7细胞0.25%胰酶-0.02% EDTA消化约2 min后，弃胰酶，用10% FBS DMEM培养基中和胰酶作用，轻轻吹打成单细胞悬液，离心弃上清液，用完全培养基重悬细胞并计数后，调整细胞悬液至 $3 \times 10^5/\text{mL}$ ，按每孔100 μL 接种至96孔培养板，37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养24 h，吸尽每孔上清液，每孔加入100 μL 无血清DMEM培养基，随机分为对照组、LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)组、LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) + 化合物1~8 (50 $\mu\text{g/mL}$)组，加入相应药物后，每组设3个复孔，5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 、饱和湿度条件下培养24 h后，取上清液用于NO、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6)等炎症因子的检测。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物1: 白色粉末，mp 193~195 $^\circ\text{C}$ ，ESI-MS m/z : 353 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.86~2.01 (4H, m, H-2, 6), 3.78 (1H, m, H-4), 4.12 (1H, m, H-3), 5.21 (1H, m, H-5), 6.26 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8'), 6.77 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.95 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6'), 7.05 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.50 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7'); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 35.1 (C-2), 38.6 (C-6), 70.3 (C-3), 70.6 (C-4), 67.3 (C-5), 72.6 (C-1), 114.5 (C-2'), 114.9 (C-8'), 115.8 (C-5'), 121.1 (C-6'), 125.7 (C-1'), 144.3 (C-3'), 144.7 (C-7'), 145.7 (C-4'), 166.3 (C-9'), 175.4 (-COOH)。以上数据与文献报道基本一致^[11]，故鉴定化合物1为新绿原酸。

化合物2: 白色粉末，ESI-MS m/z : 353 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.60 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-3'), 7.04 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-5'), 6.95 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-9'), 6.77 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-8'), 6.30 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-2'), 4.90 (1H, m, H-4), 2.40 (2H, m, H-6), 2.14 (2H, m, H-2); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 177.3 (C-7), 165.6 (C-1'), 148.6 (C-7'), 145.8 (C-6'), 145.6 (C-3'), 125.5 (C-4'), 121.6 (C-9'), 115.9 (C-8'), 114.9 (C-2'), 113.9 (C-5'), 75.8 (C-1), 71.5 (C-5), 68.6 (C-4), 62.9 (C-3), 36.6 (C-2), 35.8 (C-6)。以上数据与文献报道基本一

致^[12]，故鉴定化合物2为隐绿原酸。

化合物3: 白色无定形粉末，ESI-MS m/z : 515 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 2.13~2.34 (4H, m, H-2, 6), 3.98 (1H, dd, $J = 3.4, 7.6$ Hz, H-4), 5.39 (1H, ddd, $J = 4.5, 8.2, 10.8$ Hz, H-5), 5.43 (1H, m, H-3), 6.26 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8'), 6.33 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8''), 6.77 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.78 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5''), 6.96 (1H, dd, $J = 2.0, 8.2$ Hz, H-6'), 6.97 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6''), 7.06 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.07 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2''), 7.56 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7'), 7.60 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7''); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 36.3 (C-2), 37.5 (C-6), 70.6 (C-4), 72.4 (C-3), 72.8 (C-5), 74.8 (C-1), 115.4 (C-8'), 115.6 (C-8''), 115.8 (C-2', 2''), 116.7 (C-5', 5''), 123.1 (C-6', 6''), 127.9 (C-1', 1''), 146.8 (C-3', 3''), 147.4 (C-7'), 147.6 (C-7''), 149.8 (C-4', 4''), 168.5 (C-9'), 168.9 (C-9''), 175.8 (-COOH)。以上数据与文献报道基本一致^[13]，故鉴定化合物3为3,5-二咖啡酰奎宁酸。

化合物4: 白色粉末，ESI-MS m/z : 515 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 2.15~2.30 (4H, m, H-2, 6), 4.39 (1H, m, H-5), 5.13 (1H, dd, $J = 3.1, 9.0$ Hz, H-4), 5.63 (1H, m, H-3), 6.17 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8'), 6.27 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8''), 6.74 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.76 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5''), 6.90 (1H, dd, $J = 2.0, 8.2$ Hz, H-6'), 6.91 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6''), 7.01 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.02 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2''), 7.53 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7'), 7.58 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7''); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 38.4 (C-6), 39.4 (C-2), 68.9 (C-3), 69.4 (C-5), 75.8 (C-4), 76.1 (C-1), 114.7 (C-8'), 114.8 (C-8''), 115.2 (C-2', 2''), 116.5 (C-5', 5''), 123.1 (C-6', 6''), 127.7 (C-1', 1''), 146.8 (C-3', 3''), 147.6 (C-7'), 147.9 (C-7''), 149.7 (C-4', 4''), 168.2 (C-9'), 168.6 (C-9''), 176.8 (-COOH)。以上数据与文献报道基本一致^[14]，故鉴定化合物4为3,4-二咖啡酰奎宁酸。

化合物5: 淡黄色粉末，ESI-MS m/z : 515 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 1.94~2.34 (2H, m, H-2), 4.35 (1H, m, H-3), 5.02 (1H, dd, $J = 3.2, 8.2$ Hz, H-4), 5.63 (1H, ddd, $J = 4.5, 8.2, 10.8$ Hz, H-5), 1.94~2.34 (2H, m, H-6), 7.02 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.74 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.88 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6'), 7.53 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7'),

6.24 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'), 7.04 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2''), 6.76 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5''), 6.89 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6''), 7.59 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7''), 6.28 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8''); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 38.6 (C-2), 39.5 (C-6), 69.4 (C-3), 69.5 (C-5), 75.9 (C-4), 76.2 (C-1), 114.8 (C-8''), 114.9 (C-8'), 115.4 (C-2', 2''), 116.7 (C-5', 5''), 123.1 (C-6', 6''), 127.6 (C-1', 1''), 146.8 (C-3', 3''), 147.8 (C-7'), 147.9 (C-7''), 149.8 (C-4', 4''), 168.5 (C-9'), 168.9 (C-9''), 175.8 (-COOH)。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **5** 为 4,5-二咖啡酰奎宁酸。

化合物 **6**: 白色粉末, mp 207~209 °C, ESI-MS m/z : 353 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.55 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7'), 7.04 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.96 (1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, H-6'), 6.77 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.25 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8'), 5.32 (1H, m, H-3), 4.15 (1H, m, H-5), 3.72 (1H, dd, $J = 8.4, 3.2$ Hz, H-4), 2.23~2.04 (4H, m, H-2, 6); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 177.8 (COOH), 169.4 (C-9'), 150.4 (C-4'), 147.9 (C-7'), 147.6 (C-3'), 128.6 (C-1'), 123.8 (C-6'), 117.2 (C-5', 8'), 116.0 (C-2'), 76.9 (C-1), 74.3 (C-4), 72.8 (C-5), 72.1 (C-3), 39.6 (C-2), 39.0 (C-6)。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **6** 为绿原酸。

化合物 **7**: 浅黄色粉末, ESI-MS m/z : 179 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.18 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 6.76 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.92 (1H, dd, $J = 2.1, 8.4$ Hz, H-6), 7.01 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 7.52 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 127.9 (C-1), 115.6 (C-2), 146.8 (C-3), 149.3 (C-4), 116.6 (C-5), 122.8 (C-6), 147.0 (C-7), 115.0 (C-8), 171.2 (C-9)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **7** 为咖啡酸。

化合物 **8**: 白色针晶 (甲醇), ESI-MS m/z : 193 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.44 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 7.03 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.98 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6), 6.77 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.25 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8), 3.67 (3H, s, -OCH₃); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 125.9 (C-1), 116.5 (C-2), 146.4 (C-3), 149.3 (C-4), 121.6 (C-5), 115.3 (C-6), 145.6 (C-7), 114.0 (C-8), 167.6 (C-9), 51.6 (-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **8** 为咖啡酸甲酯。

化合物 **9**: 白色粉末, ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.47 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-3), 5.49 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-1), 4.66 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1'), 3.68 (3H, s, -OCH₃), 5.65 (1H, ddd, $J = 10.1, 9.9, 17.1$ Hz, H-8), 2.95 (1H, dd, $J = 16.5, 4.9$ Hz, H-6), 2.27 (1H, dd, $J = 9.0, 16.5$ Hz, H-6), 2.82 (1H, m, H-9); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 176.7 (C-7), 169.4 (C-11), 154.1 (C-3), 135.0 (C-8), 121.0 (C-10), 110.6 (C-4), 100.5 (C-1'), 98.1 (C-1), 78.9 (C-5'), 78.5 (C-3'), 75.1 (C-2'), 72.0 (C-4'), 63.2 (C-6'), 52.1 (-OCH₃), 45.8 (C-9), 35.6 (C-6), 29.1 (C-5)。以上数据与文献报道基本一致^[18], 故鉴定化合物 **9** 为断氧化马钱子苷。

化合物 **10**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 389 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.31 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-1), 7.32 (1H, s, H-3), 3.05 (1H, m, H-5), 2.89 (1H, dd, $J = 16.6, 5.0$ Hz, H-6a), 2.10 (1H, dd, $J = 16.8, 9.6$ Hz, H-6b), 5.49 (1H, m, H-8), 2.67 (1H, m, H-9), 5.12 (1H, s, H-10a), 5.08 (1H, m, H-10b), 4.50 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 97.5 (C-1), 153.3 (C-3), 110.1 (C-4), 28.4 (C-5), 34.9 (C-6), 176.4 (C-7), 134.5 (C-8), 45.2 (C-9), 120.3 (C-10), 170.5 (C-11), 99.8 (C-1'), 74.5 (C-2'), 78.5 (C-3'), 71.5 (C-4'), 78.3 (C-5'), 62.9 (C-6')。以上数据与文献报道基本一致^[18], 故鉴定化合物 **10** 为裂环马钱苷。

化合物 **11**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 357 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.56 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1), 7.60 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-3), 3.14 (1H, m, H-5), 1.75 (1H, m, H-6a), 1.69 (1H, m, H-6b), 4.40 (1H, m, H-7a), 4.30 (1H, m, H-7b), 5.56 (1H, m, H-8), 2.70 (1H, ddd, $J = 1.6, 5.6, 9.4$ Hz, H-9), 5.30 (1H, m, H-10a), 5.26 (1H, m, H-10b), 4.68 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 98.1 (C-1), 154.2 (C-3), 106.1 (C-4), 28.4 (C-5), 25.9 (C-6), 69.7 (C-7), 133.5 (C-8), 43.9 (C-9), 120.6 (C-10), 168.5 (C-11), 99.5 (C-1'), 75.0 (C-2'), 77.9 (C-3'), 71.4 (C-4'), 78.5 (C-5'), 62.9 (C-6')。以上数据与文献报道基本一致^[18], 故鉴定化合物 **11** 为獐芽菜苷。

化合物 **12**: 淡黄色粉末, ESI-MS m/z : 285 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.98 (1H, s, 5-OH), 7.43 (1H, dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz, H-6'), 7.41 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.90 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.67 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d,

$J = 2.0$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 94.3 (C-8), 99.3 (C-6), 103.3 (C-3), 104.2 (C-10), 113.8 (C-5'), 116.5 (C-2'), 119.5 (C-6'), 122.0 (C-1'), 146.2 (C-4'), 150.2 (C-2'), 157.8 (C-3'), 161.9 (C-9), 164.4 (C-5), 164.6 (C-7), 182.1 (C-4)。以上数据与文献报道基本一致^[19], 故鉴定化合物 **12** 为木犀草素。

3.2 抗炎活性

在 LPS 刺激 RAW264.7 细胞的炎症反应中, 与对照组比较, 化合物 **1~8** 在 50 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度

下对 RAW264.7 细胞生长均无明显影响。在筛选结果中, 化合物 **1~8** 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞释放 NO、TNF- α 和 IL-6 均具有不同程度的抑制作用, 显示了较好的体外抗炎活性, 其中化合物 **7** 对炎症因子的抑制作用最强, 结果见表 1。

4 讨论

炎症是人体对感染、体内抗原抗体结合以及机械损伤的一种自身反应, 众多种类的细胞以及活性成分参与了这个过程。适度的炎症反应对人体是有

表 1 化合物 **1~8** 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞产生 NO、TNF- α 和 IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of different compounds **1~8** on production of NO, TNF- α , and IL-6 in LPS-stimulated RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	NO/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1})$	TNF- α / $(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	IL-6/ $(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$
对照	—	0.604 5 $\pm$ 0.009 8	0.017 3 $\pm$ 0.002 5	0.000 5 $\pm$ 0.000 0
模型 (LPS)	—	6.745 8 $\pm$ 0.342 8 ^{##}	45.363 3 $\pm$ 0.255 9 ^{##}	0.604 6 $\pm$ 0.004 5 ^{##}
LPS+ 1	50	4.090 4 $\pm$ 0.442 4 ^{**}	29.813 0 $\pm$ 0.165 8 ^{**}	0.523 2 $\pm$ 0.003 0 ^{**}
LPS+ 2	50	5.056 5 $\pm$ 0.245 2 ^{**}	27.566 3 $\pm$ 0.112 2 ^{**}	0.304 7 $\pm$ 0.004 0 ^{**}
LPS+ 3	50	3.666 7 $\pm$ 0.230 1 ^{**}	30.860 3 $\pm$ 0.100 0 ^{**}	0.277 1 $\pm$ 0.005 0 ^{**}
LPS+ 4	50	4.288 1 $\pm$ 0.269 1 ^{**}	32.413 3 $\pm$ 0.057 7 ^{**}	0.288 1 $\pm$ 0.006 6 ^{**}
LPS+ 5	50	3.028 2 $\pm$ 0.420 8 ^{**}	28.565 6 $\pm$ 0.100 0 ^{**}	0.216 6 $\pm$ 0.003 5 ^{**}
LPS+ 6	50	2.045 2 $\pm$ 0.332 7 ^{**}	31.853 6 $\pm$ 0.100 0 ^{**}	0.313 6 $\pm$ 0.002 5 ^{**}
LPS+ 7	50	0.124 3 $\pm$ 0.146 1 ^{**}	22.666 1 $\pm$ 0.152 8 ^{**}	0.206 5 $\pm$ 0.002 1 ^{**}
LPS+ 8	50	0.175 1 $\pm$ 0.035 3 ^{**}	26.025 0 $\pm$ 0.200 0 ^{**}	0.214 4 $\pm$ 0.002 6 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

益的, 而过度的或持续的炎症反应却会引起组织损伤和诱发疾病。诱发炎症的因素有很多, 如烧伤、化学刺激、物理损伤以及毒素等。其中, LPS 是细菌感染性炎症反应中最主要的促炎因子, LPS 可诱导单核巨噬细胞等炎症细胞合成并释放多种炎症因子, 诸如 NO、TNF- α 、IL-6 等炎症介质和炎症因子, 导致机体出现一系列的病理生理反应, 严重时可引起感染性休克、全身炎症反应综合征、多器官功能衰竭甚至死亡^[20-22]。

金银花作为常用清热解毒中药, 具有很好的抗炎作用^[8]。本研究结果表明金银花中酚酸类成分对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 NO、TNF- α 和 IL-6 均具有不同程度的抑制作用, 进一步证实了酚酸类成分是金银花抗炎作用的有效成分之一, 其中, 在 50 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度下, 化合物 **7** 对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞释放 NO、TNF- α 和 IL-6 的抑制作用最强, 其次是化合物 **8**, 说明游离的咖啡酸及其酯类化合物的抗炎活性最强; 其次, 二咖啡酰奎宁酸类化合物对 IL-6 的抑制作用强弱为化合物 **5** > 化

合物 **3** > 化合物 **4**, 说明咖啡酰基取代位置和空间位阻对其活性有很大的影响。综上可知, 咖啡酰基是金银花中酚酸类成分发挥抗炎活性的重要基团, 而且取代基的位置及空间构型也会对其活性产生一定的影响, 但是抗炎作用的强弱与剂量之间的关系还需要进一步的研究。

我国金银花植物资源丰富, 金银花化学成分复杂、药理作用多样, 临床上已有很多形式的金银花制剂^[23], 另外, 近年来金银花还被用于保健饮料、牙膏以及化妆品等^[24]中, 这些大都与其清热解毒、抗菌消炎等功效有关, 而本实验结果也证实酚酸类成分是金银花发挥抗炎作用的有效成分。因此, 加强对金银花化学成分及其各类成分的药理活性研究, 为金银花的进一步开发及临床应用提供参考。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 夏 远, 李弟灶, 裴振昭, 等. 金银花化学成分的研究

- 进展 [J]. 中国现代中药, 2012, 14(4): 26-32.
- [3] 陈 奇, 邓雁如, 夏 娜. 金银花多酚类物质的纯化研究 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(3): 185-189.
- [4] Yu Y, Song W X, Zhu C G. Hemosecoiridoids from the flower buds of *Lonicera japonica* [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(10): 2151-2160.
- [5] 纪瑞锋, 刘素香, 王文倩, 等. 忍冬属植物环烯醚萜类成分研究概况 [J]. 中草药, 2012, 43(6): 1226-1232.
- [6] 王林青, 催保安, 张红英, 等. 中药金银花提取物抗炎作用研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(8): 82-84.
- [7] 崔晓燕, 王素霞, 侯永利. 金银花提取物的抗炎机制研究 [J]. 中国药房, 2007, 18(24): 1861-863.
- [8] 宋建华. 金银花解热抗炎作用的实验研究 [J]. 重庆医学, 2011, 40(25): 2552-2553.
- [9] Kwak W J, Han C K, Chang H W, et al. Loniceroside C an antiinflammatory saponin from *Lonicera japonica* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(3): 333-335.
- [10] 苏香萍, 宋必卫, 陈振华, 等. CO² 超临界萃取金银花挥发油工艺及抗炎活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(4): 663-666.
- [11] 卢张伟, 郑 军, 汪 豪, 等. 山牡荆年树干心材的化学成分 [J]. 药学与临床, 2009, 17(4): 287-289.
- [12] 徐小芳, 李会军, 李 萍, 等. 灰毡毛忍冬花蕾中的化学成分研究 [J]. 中国天然药物, 2004, 4(1): 45-47.
- [13] Zhu X F, Zhang H X, Lo R. Phenolic compounds from the leaf extract Artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(24): 7272-7278.
- [14] 汤 丹, 李会军, 钱正明, 等. 黄褐毛忍冬花蕾咖啡酰奎宁酸类成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 2007, 42(20): 1537-1539.
- [15] Zhu X F, Zhang H X, Lo R. Three di-*O*-caffeoylquinic acid derivatives from the heads of *Cynara scolymus* L. [J]. *Nat Prod Res*, 2009, 23(6): 527-532.
- [16] 孙燕荣, 董俊兴, 吴曙光. 杜仲化学成分研究 [J]. 中药材, 2004, 27(5): 341-343.
- [17] 张 翠, 刘占云, 於洪建, 等. 黑豆种皮的酚酸类成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(24): 3440-3443.
- [18] 李 畅, 戴 毅, 张金博, 等. 金银花中 1 个新的环烯醚萜苷类化合物 [J]. 中草药, 2013, 44(21): 2951-2954.
- [19] 邢俊波, 李会军, 李 萍, 等. 忍冬花蕾化学成分研究 [J]. 中国新药杂志, 2002, 11(11): 856-859.
- [20] 喻鹏久. 白花前胡素类化合物抗炎活性以及分子作用机制的研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2010.
- [21] 郎玉英, 张 琦. 紫苏总黄酮的抗炎作用研究 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 791-794.
- [22] 狄建彬, 顾振纶, 赵笑东, 等. 姜黄素的抗氧化和抗炎作用研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 附 18-附 21.
- [23] 贺 伟. 金银花的化学成分及药理作用研究 [J]. 中国医药导报, 2007, 4(24): 8.
- [24] 谢碧秀, 孙智达. 金银花中主要有机酸的研究进展 [J]. 现代食品科技, 2007, 23(9): 93-97.