

• 化学成分 •

益母草中的 1 个新二萜苷

卜 兰^{1,2}, 彭 成^{1,2}, 刘 菲^{1,2}, 蒙春旺^{1,2}, 郭 力^{1,2}, 周勤梅^{1,2,3*}, 熊 亮^{1,2*}

1. 成都中医药大学药学院, 省部共建西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

2. 成都中医药大学, 西南特色药材创新药物成分研究所, 四川 成都 611137

3. 成都中医药大学中医药创新研究院, 四川 成都 611137

摘要: 目的 研究益母草 *Leonurus japonicus* 化学成分及其活性。方法 采用硅胶、ODS、凝胶等色谱填料, 半制备高效液相色谱等方法进行分离纯化, 根据化合物的理化性质、MS、1D-NMR 和 2D-NMR 等波谱数据鉴定结构。采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导 RAW264.7 细胞产生一氧化氮 (NO) 的模型评价化合物活性。结果 从益母草中分离得到 6 个化合物, 分别鉴定为 (-)-3 β ,15-二羟基-16-丁香酰氧基-半日花烷-8(9),13(Z)-二烯-7-酮-3-O- β -D-葡萄糖苷 (1)、环-(L-脯氨酸-L-脯氨酸) (2)、2,3-二氢-4(1H)-喹诺酮 (3)、3,4,5-三甲氧基苯甲酰胺 (4)、水苏碱 (5)、蔗糖 (6)。化合物 1 可抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生 NO。结论 化合物 1 为 1 个新化合物, 命名为益丁香酰益母草二萜苷, 其对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 NO 有抑制活性。化合物 2~4、6 为首次从益母草中分离得到。

关键词: 益母草; 二萜苷; 半日花烷型二萜; 益丁香酰益母草二萜苷; 3,4,5-三甲氧基苯甲酰胺

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)01-0008-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.01.002

A novel diterpene glycoside from *Leonurus japonicus*

BU Lan^{1,2}, PENG Cheng^{1,2}, LIU Fei^{1,2}, MENG Chun-wang^{1,2}, GUO Li^{1,2}, ZHOU Qin-mei^{1,2,3}, XIONG Liang^{1,2}

1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Institute of Innovative Medicine Ingredients of Southwest Specialty Medicinal Materials, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

3. Innovation Institute of Chinese Medicine and Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective This paper aims to investigate chemical constituents and bioactivity from the ariel parts of *Leonurus japonicus*. **Methods** Chromatography using silica gel columns, ODS columns and semi-preparative high performance liquid chromatography were mainly applied to isolation and purification of compounds. The structures were elucidated by their physicochemical properties, MS, 1D-NMR and 2D-NMR spectral data. Bioactivity was evaluated by a model of LPS-induced NO production in RAW264.7 cells. **Results** Six compounds were isolated and identified as (-)-3 β ,15-dihydroxy-16-syringyloxy-labda-8(9),13(Z)-dien-7-one-3-O- β -D-glucoside (1), cyclo-(L-Pro-L-Pro) (2), 2,3-dihydro-4(1H)-quinolone (3), 3,4,5-trimethoxybenzamide (4), stachydrine (5), and sucrose (6). Compound 1 inhibited LPS-induced NO production in RAW264.7 cells. **Conclusion** Compound 1 has a new structure, named syringylleojaposide, which showed inhibitory activity against NO production in LPS-induced RAW264.7 cells. The compounds 2—4, and 6 are isolated from *L. japonicus* for the first time.

Key words: *Leonurus japonicus* Houtt.; diterpene glycoside; labdane-type diterpene; syringylleojaposide; 3,4,5-trimethoxybenzamide

收稿日期: 2021-09-22

基金项目: 国家优秀青年基金资助项目 (82022072); 国家自然科学基金面上项目 (81872991); 国家自然科学基金联合基金重点支持项目 (U19A2010); 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81303209)

作者简介: 卜 兰 (1997—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药药效物质基础研究。E-mail: bulanchengdu@163.com

*通信作者: 周勤梅, 博士, 高级实验师, 研究方向为中药药效物质基础研究。E-mail: zhqmyx@sina.cn

熊 亮, 博士, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础研究。E-mail: xiling0505@126.com

益母草为唇形科植物益母草 *Leonurus japonicus* Houtt. 的干燥地上部分, 是最常用的中药材之一, 其煎剂和膏剂等临床上用于治疗痛经、血瘀、产后出血、子宫复旧不全等妇科疾病及动脉粥样硬化、心肌梗死等心血管疾病^[1-4]。益母草化学成分及其药理活性的研究报道较多, 主要集中于萜类和生物碱类成分及其与活血化瘀相关的活性^[5-9], 如本课题组前期发现的具有舒张血管活性的新颖骨架二萜^[10], 以及具有促血管生成活性生物碱^[8]。为较深入地揭示益母草的药效物质基础, 在前期基础上, 本课题组继续开展了研究, 从益母草中分离得到 6 个化合物, 分别鉴定为 (-)-3 β ,15-二羟基-16-丁香酰氧基-半日花烷-8(9),13(Z)-二烯-7-酮-3-O- β -D-葡萄糖苷 [(-)-3 β ,15-dihydroxy-16-syringyloxy-labda-8(9),13(Z)-dien-7-one-3-O- β -D-glucoside, **1**]、环-(L-脯氨酸-L-脯氨酸) [cyclo-(L-Pro-L-Pro), **2**]、2,3-二氢-4(1H)-喹诺酮 [2,3-dihydro-4(1H)-quinolone, **3**]、3,4,5-三甲氧基苯甲酰胺 (3,4,5-trimethoxybenzamide, **4**)、水苏碱 (stachydrine, **5**)、蔗糖 (sucrose, **6**)。化合物 **1** 为 1 个新化合物, 命名为益丁香酰益母草二萜苷; 化合物 **2~4**、**6** 为首次从益母草中分离得到。化合物 **1** 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导 RAW264.7 细胞释放一氧化氮 (NO) 有抑制活性。

1 材料与仪器

1.1 仪器

RE-52A 型旋转蒸发仪(上海亚荣仪器生化厂); Shimadzu UV-260 型紫外分析仪(上海嘉鹏科技有限公司); GZX-GF101 型电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司); Milli-Q 超纯水仪(Milli-pore 公司, 美国); Agilent 1220 型高效液相色谱仪(安捷伦公司, 美国); Bruker-600 核磁共振波谱仪(布鲁克公司, 德国); 布鲁克高分辨质谱仪(布鲁克公司, 美国); Rudolph 高精度旋光仪(鲁道夫公司, 美国), Chirascan CD 光谱仪(应用光物理公司, 英国), Agilent Cary 600 系列红外光谱仪(安捷伦公司, 美国); Allegra X-12R 型离心机(Beckman Coulter 公司, 美国); SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台(苏州净化设备有限公司); Series II Water Jacket CO₂ 孵箱(Thermo 公司, 美国); Varioskan Flash Multiskan MK3 酶标仪(Thermo 公司, 美国); AE 200 电子显微镜(厦门麦克奥迪光学公司)。

1.2 材料

柱色谱硅胶(青岛海洋化工厂, H 硅胶, 200~

300 目); 薄层色谱硅胶(青岛海洋化工厂, GF₂₅₄); Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia 公司); 色谱甲醇(Sigma 公司, 美国); 所用常规试剂均为分析纯, 购自成都科隆化学品有限公司; 一氧化氮检测试剂盒(南京碧云天生物技术有限公司); LPS, 美国 SIGMA-ALDRICH 公司; RAW264.6 (小鼠巨噬细胞) 购自美国 ATCC。

1.3 药材

益母草饮片于 2019 年在四川新荷花中药饮片股份有限公司购买, 经成都中医药大学高继海副教授鉴定为益母草 *L. japonicus* Houtt. 的干燥地上部分, 凭证标本(LJ-20190517) 存放于成都中医药大学西南特色药材创新药物成分研究所。

2 方法

2.1 提取与分离

益母草饮片(100 kg) 粉碎后用 95%乙醇回流提取 3 次, 每次 3 h, 减压浓缩后将浸膏分散于 1%盐酸水中用醋酸乙酯萃取, 得到浸膏(660 g)。将浸膏用硅胶柱色谱分离, 以醋酸乙酯-甲醇-氨水(100:7:5~0:7:5) 梯度洗脱得到 11 个洗脱部分(A~K)。E 组分经反相中压液相色谱, 以 10%~100%甲醇梯度洗脱, 得到 6 个馏份(Fr. 1~6), 其中 Fr. 5 经过硅胶柱色谱, 醋酸乙酯-甲醇-氨水(100:5:5~0:5:5) 梯度洗脱得到 9 个馏份(Fr. 5-1~5-9), 其中 Fr. 5-3 经反相半制备液相色谱, 以 65%甲醇为流动相, 体积流量 1 mL/min, 分离得到化合物 **1** (7.7 mg, $t_R=47$ min)。F 组分经反相中压液相色谱, 以 10%~100%甲醇梯度洗脱, 得到 5 个馏份(Fr. 1~5), Fr. 4 中析出结晶得到化合物 **6** (10 mg), Fr. 2 经过凝胶柱色谱, 二氯甲烷-甲醇(1:1) 等度洗脱得到 4 个馏份(Fr. 2-1~2-4), Fr. 2-2 经制备薄层色谱二氯甲烷-甲醇-氨水(9:1:0.1) 后得到 3 个馏份(Fr. 2-2-a~2-2-c), Fr. 2-2-a 经反相半制备液相色谱, 以 40%甲醇为流动相, 体积流量 1 mL/min, 分离得到化合物 **2** (3 mg, $t_R=20$ min); Fr. 2-2-b 经反相半制备液相色谱, 以 35%甲醇为流动相, 体积流量 1 mL/min, 分离得到化合物 **3** (4 mg, $t_R=32$ min); Fr. 3 经过凝胶柱色谱, 二氯甲烷-甲醇(1:1) 等度洗脱得到 4 个馏份(Fr. 3-1~3-4), Fr. 3-3 中析出结晶得到化合物 **4** (6 mg)。J 组分中析出大量结晶得到化合物 **5** (1 g)。

2.2 化合物 **1** 对 RAW264.7 细胞活力的影响

取培养的第 5~8 代且长至 80%的细胞进行实

验,以 5×10^4 个/孔均匀接种于96孔板,每孔100 μL ,置 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养24 h。实验分为对照组、给药组(含药物浓度分别为1.56、3.13、6.25、12.50、25.00、50.00 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物1),每个浓度设3个复孔,给药后继续孵育24 h,每孔避光加入10 μL CCK-8,继续孵育1 h后,于酶标仪450 nm处测其吸光度(A)值,记录结果并计算细胞存活率^[11]。

细胞存活率=给药组平均 A 值/对照组平均 A 值

2.3 化合物1对LPS诱导的RAW264.7细胞释放NO的影响

取对数生长期的RAW264.7巨噬细胞,以 5×10^4 孔均匀接种至96孔板中,待细胞贴壁后,将其随机分为对照组、LPS模型组(1 $\mu\text{g/mL}$)、给药组(含药浓度分别为1.56、3.13、6.25、12.50、25.00、50.00 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物1),给药1 h后再给LPS刺激,在培养箱中培养24 h,再按照NO试剂盒说明书,于酶标仪540 nm处测定 A 值并计算NO含量,进而通过NO含量计算NO释放抑制率^[11]。

NO释放抑制率=(模型组NO平均含量-给药组NO平均含量)/(模型组NO平均含量-对照组NO平均含量)

2.4 统计学方法

采用SPSS19.0软件进行统计学分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 化合物鉴定

化合物1:无色胶状物。HR-ESI-MS给出准分子离子峰 m/z 701.313 7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$,提示分子式为 $\text{C}_{35}\text{H}_{50}\text{O}_{13}$ (计算值701.314 9 $[\text{M}+\text{Na}]^+$),不饱和度为11。 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -2.5^\circ$ (c 0.01, MeOH); ECD (MeCN) λ_{max} ($\Delta\epsilon$): 208 (+3.4), 247 (-0.4), 274 (+0.3), 310 (-0.1), 346 (+0.3) nm; UV (MeCN) λ_{max} ($\log\epsilon$): 196 (1.5), 217 (1.4), 250 (1.0), 270 (0.9) nm; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3366, 1700, 1644, 1516, 1460, 1336, 1217, 1113, 1078, 1016。紫外谱数据提示该化合物结构中有 α,β -不饱和酮或者共轭双键,红外谱数据提示存在羟基、羰基、双键等官能团。化合物1的 $^1\text{H-NMR}$ 谱(表1)显示4个单峰甲基信号 δ_{H} 0.94 (3H, s, H₃-19), 1.05 (3H, s, H₃-18), 1.09 (3H, s, H₃-20), 1.74 (1H, s, H₃-17); 2个芳香甲氧基信号 δ_{H} 3.89 (6H, s, 3', 5'-OMe); 3个连氧亚甲基信号 δ_{H} 4.28 (2H, d, $J = 6.6$ Hz, H₂-15), 4.95 (2H, brs, H₂-16), 3.82 (1H, dd, $J =$

12.0, 2.4 Hz, H-6''a), 3.68 (1H, dd, $J = 12.0, 4.8$ Hz, H-6''b); 6个连氧次甲基信号 δ_{H} 3.22 (1H, dd, $J = 12.0, 4.2$ Hz, H-3), 3.24 (1H, m), 3.30 (1H, m), 3.33 (1H, m), 3.18 (1H, t, $J = 8.4$ Hz), 4.29 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-1''); 1个烯键质子信号 δ_{H} 5.76 (1H, t, $J = 6.6$ Hz, H-14); 2个芳香质子信号 δ_{H} 7.32 (2H, s, H-2', 6')。此外,在 δ_{H} 1.56~2.46之间显示多个部分重叠的脂肪族亚甲基和次甲基信号。化合物1的 $^{13}\text{C-NMR}$ 和DEPT谱显示35个碳信号(表1),包括与上述质子信号对应的6个甲基、8个亚甲基、10个次甲基。此外,还显示11个季碳信号,含1个酮羰基碳信号 δ_{C} 202.3 (C-7), 1个酯羰基碳信号 δ_{C} 167.7 (C-7'), 7个芳香或烯烃季碳信号 δ_{C} 131.2~169.6, 以及2个脂肪季碳信号。以上波谱数据表明该化合物为1个二萜苷。结合特征性的 β -D-葡萄糖端基质子信号 δ_{H} 4.29 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)、端基碳信号 δ_{C} 106.6, 以及多个位于 δ_{H} 3.18~3.82的质子信号和特征性的碳信号 δ_{C} 78.2, 77.6, 75.6, 71.5, 62.7, 推测化合物含有1个 β -D-葡萄糖单元。根据上述芳香质子信号和碳信号推测化合物含有1个对称的1',3',4',5'-四取代苯环,进一步结合酯羰基信号和芳香甲氧基信号推测化合物中有丁香酰基取代。剩余的20个碳信号可归属于1个半日花烷型二萜单元^[12-13]。

为进一步确定化合物1的结构,进行了2D-NMR实验,根据HSQC谱推断氢与碳原子之间的直接连接关系。在化合物1的 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY谱中, H₂-1/H₂-2/H-3依次相关, H-5/H₂-6相关, H₂-11/H₂-12相关, H-14/H₂-15相关(图1),由此确定了结构中质子之间相互耦合的单元。HMBC谱中 H₃-17与C-7(δ_{C} 202.3)、C-8(δ_{C} 131.2)、C-9(δ_{C} 169.6)相关; H₃-20与C-1、C-5、C-9、C-10相关, H₃-18和H₃-19同时与C-3(δ_{C} 89.3)、C-4、C-5相关(图1),表明C-3位有含氧基团取代, C-7、C-8、C-9为 α,β -不饱和酮单元。此外, H₂-15与C-13、C-14相关; H₂-16与C-12、C-13相关,确定了C-13与C-14之间存在双键。H₂-16与C-7'相关说明丁香酰基片段取代在C-16位上, H-1''与C-3相关说明 β -D-葡萄糖基取代在C-3位,从而确定该化合物的平面结构。化合物1的相对构型通过分析耦合常数和NOESY谱图确定。根据H-3的耦合常数($J_{2,3} = 12.0, 4.2$ Hz)可以推断H-3位于 α -直立键^[14-15],且进一步得到了NOESY数据的证实。在NOESY谱中, H-3、H-5均与H₃-18相关, H₃-20与H₃-19相关,说明H-3

表1 化合物1的¹H-NMR及¹³C-NMR数据(600/150MHz, CD₃OD)

Table 1 ¹H-NMR and ¹³C-NMR data for compound 1 (600/150MHz, CD₃OD)

碳位	δ _c	δ _H	碳位	δ _c	δ _H
1	35.2	1.95 (1H, d, <i>J</i> = 13.2 Hz), 1.56 (1H, t, <i>J</i> = 13.2 Hz)	19	16.4	0.94 (3H, s)
2	27.1	2.00 (1H, dd, <i>J</i> = 13.8, 3.6 Hz), 1.76 (1H, overlapped)	20	18.4	1.09 (3H, s)
3	89.3	3.22 (1H, dd, <i>J</i> = 12.0, 4.2 Hz)	1'	121.2	
4	40.0		2'	108.2	7.32 (1H, s)
5	50.7	1.69 (1H, dd, <i>J</i> = 12.0, 6.0 Hz)	3'	149.0	
6	35.6	2.44 (2H, m)	4'	142.2	
7	202.3		5'	149.0	
8	131.2		6'	108.2	7.32 (1H, s)
9	169.6		7'	167.7	
10	41.8		1''	106.6	4.29 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz)
11	30.0	2.46 (2H, m)	2''	75.6	3.18 (1H, t, <i>J</i> = 8.4 Hz)
12	35.2	2.34 (2H, m)	3''	78.2	3.33 (1H, m)
13	137.6		4''	71.5	3.30 (1H, m)
14	131.2	5.76 (1H, t, <i>J</i> = 6.6 Hz)	5''	77.6	3.24 (1H, m)
15	58.8	4.28 (2H, d, <i>J</i> = 6.6 Hz)	6''	62.7	3.82 (dd, <i>J</i> = 12.0, 2.4 Hz)
16	62.8	4.95 (2H, brs)			3.68 (dd, <i>J</i> = 12.0, 4.8 Hz)
17	11.7	1.74 (3H, s)	3', 5'-OMe	56.9	3.89 (6H, s)
18	27.8	1.05 (3H, s)			

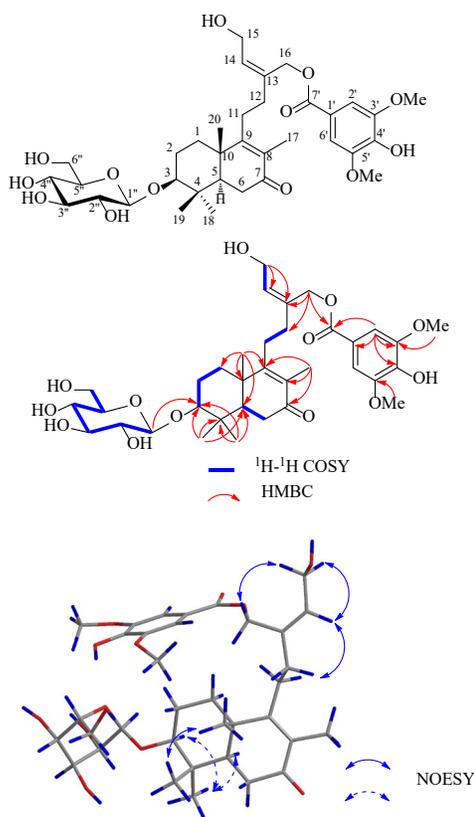


图1 化合物1的结构及主要的¹H-¹H COSY、HMBC和NOESY信号

Fig. 1 Structure and key correlations of ¹H-¹H COSY, HMBC and NOESY of compound 1

与 H₃-18、H-5 位于环系的同侧，为α构型；H₃-20 和 H₃-19 位于环系的另一侧，为β构型。H₂-12 与 H-14 相关，H₂-15 与 H-14 相关，H₂-16 与 H₂-15 相关，H₂-16 不与 H-14 相关，说明双键构型为顺式^[16-19]。因此，化合物 1 的结构为 (-)-3β,15-二羟基-16-丁香酰氧基-半日花烷-8(9),13(Z)-二烯-7-酮-3-O-β-D-葡萄糖苷，该化合物为新化合物，命名为益丁香酰益母草二萜苷，结构见图 1。

化合物 2: 白色粉末。HR-ESI-MS *m/z*: 217.095 0 [M+Na]⁺，分子式为 C₁₀H₁₄N₂O₂，不饱和度为 5。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 4.35 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-6, 12), 2.30 (2H, m, H-5, 11), 1.97 (2H, m, H-5, 11), 2.06 (2H×2, m, H-4, 10), 3.51 (2H×2, m, H-3, 9); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 61.7 (CH×2, α-C Pro), 28.7 (CH₂×2, β-C Pro), 24.2 (CH₂×2, γ-C Pro), 46.2 (CH₂×2, δ-C Pro), 168.6 (CO×2)。以上数据与文献报道基本一致^[20]，故鉴定化合物 2 为环-(L-脯氨酸-L-脯氨酸)。

化合物 3: 黄色油状物。HR-ESI-MS *m/z*: 168.040 5 [M+Na]⁺，分子式为 C₉H₇NO，不饱和度为 7。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 7.98 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-2), 6.35 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-3), 8.26 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, H-5), 7.43 (1H, dt, *J* = 7.8, 1.2 Hz,

H-6), 7.72 (1H, dt, $J = 7.2, 1.8$ Hz, H-7), 7.59 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 141.6 (C-2), 109.8 (C-3), 180.8 (C-4), 126.8 (C-5), 125.3 (C-6), 133.5 (C-7), 119.5 (C-8), 141.6 (C-9), 126.2 (C-10)。以上数据与文献报道基本一致^[21], 故鉴定化合物 **3** 为 2,3-二氢-4(1H)-喹诺酮。

化合物 **4**: 无色油状物。HR-ESI-MS m/z : 234.073 8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_4$, 不饱和度为 5。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.24 (1H, s, H-2), 7.24 (1H, s, H-6), 3.89 (3H, s, 3-OCH₃), 3.89 (3H, s, 5-OCH₃), 3.81 (3H, s, 4-OCH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 171.7 (C=O), 142.3 (C-4), 154.3 (C-3), 154.3 (C-5), 130.2 (C-1), 106.3 (C-2), 106.3 (C-6), 61.1 (4-OCH₃), 56.7 (3-OCH₃), 56.7 (5-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[22], 故鉴定化合物 **4** 为 3,4,5-三甲氧基苯甲酰胺。

化合物 **5**: 白色针状结晶 (丙酮)。HR-ESI-MS m/z : 166.084 4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_2$, 不饱和度为 2。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 4.07 (1H, dd, $J = 10.2, 8.4$ Hz, H-2), 3.70 (1H, m, H-5a), 3.53 (1H, m, H-5b), 3.33 (3H, s, Me \times 2), 3.16 (3H, s, Me \times 2), 2.51 (1H, m, H-3a), 2.32 (1H, m, H-3b), 2.14 (2H, m, H₂-4); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 170.7 (C-6), 77.5 (C-2), 68.1 (C-5), 52.8 (8-Me), 46.4 (7-Me), 26.6 (C-3), 19.8 (C-4)。以上数据与文献报道基本一致^[23], 故鉴定化合物 **5** 为水苏碱。

化合物 **6**: 无色结晶 (甲醇)。HR-ESI-MS m/z : 365.105 4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, 不饱和度为 2。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O) δ : 5.41 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-1), 4.21 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3'), 3.85 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 3.46 (1H, t, $J = 9.6$ Hz, H-2), 3.81~3.85 (5H, m, H-3~5, 6'a, 6'b), 3.76 (1H, t, $J = 9.6$ Hz, H-6), 3.67 (2H, m, H-1', 2'), 4.04 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, H-4'); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, D_2O) δ : 103.6 (C-2'), 92.1 (C-1), 81.3 (C-5'), 76.3 (C-3'), 73.9 (C-3), 73.9 (C-4'), 72.3 (C-5), 71.0 (C-2), 69.1 (C-4), 62.3 (C-6), 61.3 (C-6'), 60.0 (C-1')。以上数据与文献报道基本一致^[24], 故鉴定化合物 **6** 为蔗糖。

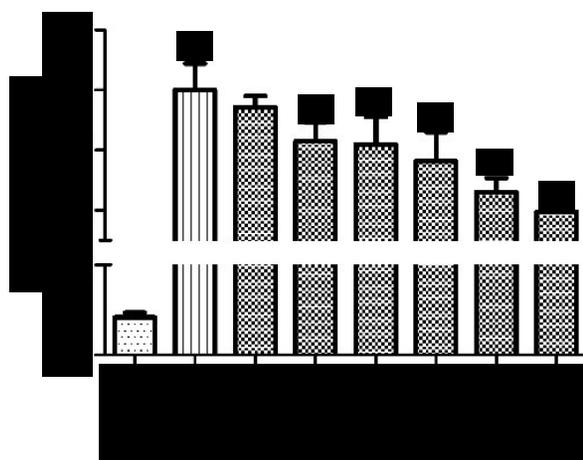
3.2 化合物 1 对 RAW264.7 细胞活力的影响

不同浓度的化合物 **1** 作用 RAW264.7 细胞 24 h 后, 各浓度给药用细胞存活率大约在 90% 以上, 表明化合物 **1** 在 50 $\mu\text{mol/L}$ 及以下浓度对 RAW264.7

细胞无明显细胞毒性。

3.3 化合物 1 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 NO 含量的影响

如图 2 所示, 与对照组相比, 模型组可显著增加 RAW264.7 细胞 NO 的释放 ($P < 0.01$), 化合物 **1** 在 3.13~50.00 $\mu\text{mol/L}$ 显示出显著的 NO 抑制活性 ($P < 0.01$), 在 50.00 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制率为 (43.83 \pm 5.05) %。



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

图 2 化合物 1 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 含量的影响

Fig. 2 Effects of compound 1 on content of NO in LPS-induced RAW264.7 cells

4 讨论

益母草作为应用历史悠久的大宗药材, 对妇科疾病及心血管疾病具有显著的疗效, 因此, 本实验研究了益母草饮片的化学成分及其药理活性, 分离鉴定了 6 个化合物, 主要有生物碱类和萜类。萜类化合物是目前从益母草中分离报道化合物数量最多的一类化合物, 共计 150 余个^[1], 其中尤以二萜类研究最为丰富, 结构多样, 活性明显。益母草二萜的类型以半日花烷型为主, 根据 C-9 位侧链环合的方式可分为 C-9 侧链链状型、呋喃环型、单螺环型、双螺环型 4 类^[6]。本研究采用现代分离手段及波谱学技术从益母草中分离得到 1 个新的 C-9 侧链链状型半日花烷型二萜苷类。值得一提的是, 以往的研究中报道的是从益母草中发现的二萜苷元类化合物, 本研究首次发现了益母草中的二萜苷类化合物, 丰富了益母草的化学成分研究, 也提示该类型成分可能是被忽视的药效物质基础。

本实验对分离到的化合物 **1** 进行了活性测试,

结果其在 50.00 $\mu\text{mol/L}$ 时对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NO 释放的抑制率为 (43.83 \pm 5.05) %，表明药物具有一定的抗炎活性，为益母草的现代药理及其物质基础研究提供思路与支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Miao L L, Zhou Q M, Peng C, *et al.* *Leonurus japonicus* (Chinese motherwort), an excellent traditional medicine for obstetrical and gynecological diseases: A comprehensive overview [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109060.
- [2] Liu X H, Pan L L, Zhu Y Z. Active chemical compounds of traditional Chinese medicine Herba Leonuri: Implications for cardiovascular diseases [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39(3): 274-282.
- [3] Huang L, Xu D Q, Chen Y Y, *et al.* Leonurine, a potential drug for the treatment of cardiovascular system and central nervous system diseases [J]. *Brain Behav*, 2021, 11(2): e01995.
- [4] Zhu Y Z, Wu W, Zhu Q, *et al.* Discovery of Leonuri and therapeutical applications: From bench to bedside [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 188: 26-35.
- [5] 乔晶晶, 吴放南, 薛敏, 等. 益母草化学成分与药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49(23): 5691-5704.
- [6] 卜兰, 刘菲, 熊亮, 等. 益母草属萜类化学成分及其药理作用研究进展 [J]. *世界中医药*, 2020, 15(9): 1237-1246.
- [7] Zhou F, Liu F, Liu J, *et al.* Stachydrine promotes angiogenesis by regulating the VEGFR2/MEK/ERK and mitochondrial-mediated apoptosis signaling pathways in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110724.
- [8] He Y L, Shi J Y, Peng C, *et al.* Angiogenic effect of motherwort (*Leonurus japonicus*) alkaloids and toxicity of motherwort essential oil on zebrafish embryos [J]. *Fitoterapia*, 2018, 128: 36-42.
- [9] Liu J, Peng C, Zhou Q M, *et al.* Alkaloids and flavonoid glycosides from the aerial parts of *Leonurus japonicus* and their opposite effects on uterine smooth muscle [J]. *Phytochemistry*, 2018, 145: 128-136.
- [10] Xiong L, Zhou Q M, Zou Y K, *et al.* Leonuketal, a spiroketal diterpenoid from *Leonurus japonicus* [J]. *Org Lett*, 2015, 17(24): 6238-6241.
- [11] 张云封, 咎妮利, 朱枝祥, 等. 苗药血人参中黄酮类化学成分研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(12): 3485-3492.
- [12] Lai K Y, Hu H C, Chiang H M, *et al.* New diterpenes leojaponins G-L from *Leonurus japonicus* [J]. *Fitoterapia*, 2018, 130: 125-133.
- [13] Hung T M, Luan T C, Vinh B T, *et al.* Labdane-type diterpenoids from *Leonurus heterophyllus* and their cholinesterase inhibitory activity [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(4): 611-614.
- [14] Su H G, Zhou Q M, Guo L, *et al.* Lanostane triterpenoids from *Ganoderma luteomarginatum* and their cytotoxicity against four human cancer cell lines [J]. *Phytochemistry*, 2018, 156: 89-95.
- [15] Zhou Q M, Zhu H, Feng R, *et al.* New triterpenoids from *Leonurus japonicus* (Lamiaceae) [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2019, 82: 27-30.
- [16] Lai K Y, Hu H C, Chiang H M, *et al.* New diterpenes leojaponins G-L from *Leonurus japonicus* [J]. *Fitoterapia*, 2018, 130: 125-133.
- [17] Peng F, Xiong L, Zhao X M. A bicyclic diterpenoid with a new 15, 16-dinorlabdane carbon skeleton from *Leonurus japonicus* and its coagulant bioactivity [J]. *Mol Basel Switz*, 2013, 18(11): 13904-13909.
- [18] Zhong W M, Cui Z M, Liu Z K, *et al.* Three minor new compounds from the aerial parts of *Leonurus japonicus* [J]. *Chin Chemical Lett*, 2015, 26(8): 1000-1003.
- [19] Hung T M, Luan T C, Vinh B T, *et al.* Labdane-type diterpenoids from *Leonurus heterophyllus* and their cholinesterase inhibitory activity [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(4): 611-614.
- [20] 宫俊, 汤华, 耿婉丽, 等. 仿刺参共附生放线菌 *Brevibacterium* sp. 中的环二肽成分的分离和鉴定 [J]. *第二军医大学学报*, 2012, 33(12): 1284-1287.
- [21] 李丹丹, 丁丽琴, 杨灵, 等. 海蒿子含氮有机化学成分研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(9): 1735-1739.
- [22] He Z L, Yang L, Chen Y G. Alkaloids from the twigs of *Catharanthus roseus* [J]. *Chem Nat Compd*, 2021, 57(2): 398-400.
- [23] 何成军. 附子化学成分研究及益母草注射液化学成分研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.
- [24] Chen Y G, Yang J H, Zhang Y, *et al.* A new alloside from *Neocheiropteris palmatopedata* [J]. *Chem Nat Compd*, 2010, 46(2): 173-175.

[责任编辑 王文倩]