

## • 化学成分 •

## 华南忍冬花蕾中 1 个新的单萜苷类化合物

王团委<sup>1,2,3</sup>, 王振中<sup>2,3</sup>, 王秋红<sup>1</sup>, 耿剑亮<sup>1,2,3,4\*</sup>

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006
2. 江苏康缘药业股份有限公司, 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001
3. 江苏康缘药业股份有限公司, 中药提取精制新技术重点实验室, 江苏 连云港 222001
4. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

**摘要:** 目的 研究华南忍冬 *Lonicera confusa* 干燥花蕾(山银花)的化学成分。方法 综合应用 HP-20、硅胶、ODS、Sephadex LH-20 和半制备液相等多种色谱学方法进行分离纯化, 并根据化合物的理化性质和核磁共振波谱数据进行结构鉴定。采用 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 模型, 以抑制炎症细胞因子一氧化氮(NO)的分泌为评价指标对分离得到的化合物进行体外抗炎活性评价。结果 从华南忍冬干燥花蕾 70% 乙醇提取物中分离鉴定了 5 个化合物, 分别为 8-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 6')- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-2,6-dimethyloct-1,2''-lactone (1)、天师酸(2)、黄麻脂肪酸 F(3)、天师酸甲酯(4)和黄麻脂肪酸 F 甲酯(5)。结论 化合物 1 为新的单萜苷类化合物, 命名为忍冬单萜 A, 化合物 2~5 为首次从忍冬属植物中分离得到。化合物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NO 的分泌均无显著的抑制作用。

**关键词:** 华南忍冬; 山银花; 一氧化氮; 8-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 6')- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-2,6-dimethyloct-1,2''-lactone; 忍冬单萜 A; 天师酸; 黄麻脂肪酸 F; 天师酸甲酯

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)23-7317-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.23.001

A new monoterpene glycoside from *Lonicera confusa*WANG Tuan-wei<sup>1,2,3</sup>, WANG Zhen-zhong<sup>2,3</sup>, WANG Qiu-hong<sup>1</sup>, GENG Jian-liang<sup>1,2,3,4</sup>

1. School of Traditional Chinese Medicine Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China
2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China
3. Key Laboratory for the New Technique Research of TCM Extraction and Purification, Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China
4. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

**Abstract: Objective** To study the constituents from the dried flower buds of *Lonicera confusa*. **Methods** The compounds were isolated and purified by column chromatography of HP-20 macroporous resin, silica gel, ODS, Sephadex LH-20, and semi-preparative RP-HPLC. Their structures were elucidated by physicochemical properties and spectral analyses. Taking NO as the evaluating indicator, the model of LPS-induced RAW264.7 cells was used to evaluate the *in vitro* anti-inflammatory activity of isolates. **Results** Five compounds were isolated and identified from the 70% ethanol extract of *L. confusa*, including 8-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 6')- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-2,6-dimethyloct-1,2''-lactone (1), tianshic acid (2), corchorifatty acid F (3), tianshic acid methyl ester (4) and corchorifatty acid F methyl ester (5), respectively. **Conclusion** Compound 1 is a new monoterpene glycoside, named comfusanoside A. Compounds 2—5 are identified from *Lonicera* for the first time. All the isolates had no significant inhibitory effect on NO secretion in RAW264.7 cells stimulated by LPS.

**Key words:** *Lonicera confusa* DC.; *Lonicerae Flos*; NO; tianshic acid; 8-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 6')- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-2,6-dimethyloct-1,2''-lactone; comfusanoside A; tianshic acid; corchorifatty acid F; tianshic acid methyl ester

收稿日期: 2022-07-23

基金项目: 国家中医药管理局中央财政转移支付地方项目: 基于重点研究室研究领域的中医药多学科研究能力提升项目-中药提取精制新技术

作者简介: 王团委, 男, 本科, 研究方向为中药及天然药物的活性成分研究。E-mail: wtwang007@126.com

\*通信作者: 耿剑亮, 博士, 研究方向为中药及天然药物活性成分研究、代谢组学研究。E-mail: gengjianliang8521@126.com

山银花 *Lonicerae Flos* 又名山花、南银花、土忍冬、土银花等,为忍冬科 (Caprifoliaceae) 忍冬属 *Lonicera* Linn. 植物灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.、红腺忍冬 *L. hypoglauca* Miq.、华南忍冬 *L. confusa* DC. 或黄褐毛忍冬 *L. fulvotomentosa* Hsu et S. C. Cheng 的干燥花蕾或带初开的花,具有清热解毒、疏散风热的功效,临床上主要用于治疗用于痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热<sup>[1]</sup>。主要分布于我国四川、广东、广西、湖南等南方各地。山银花的化学成分多样,主要含有皂苷类<sup>[2-8]</sup>、有机酸类<sup>[9-15]</sup>、黄酮类<sup>[16-17]</sup>、环烯醚萜苷<sup>[18-20]</sup>、挥发油<sup>[21-22]</sup>等,现代药理学研究表明山银花提取物及其化学成分具有抗菌抗病毒<sup>[23-26]</sup>、抗氧化<sup>[27-29]</sup>、解热抗炎<sup>[30-32]</sup>、抗肿瘤<sup>[33-34]</sup>和保肝<sup>[35-38]</sup>等多种药理活性。金银花和山银花作为我国清热解毒常用中药,《中国药典》2005 年版之前均将金银花和山银花收载为金银花使用,直至《中国药典》2005 年版才将二者分别收载。而山银花的产量高、花期长、价格低廉,种植规模大,资源丰富。但目前关于山银花的药理学研究主要集中于粗提物或有效部位的药效评价,缺乏对山银花中所含化学成分及药理作用的系统深入研究。为了给山银花在医药、化工、食品、饮料工业等方面的应用价值和安全性作出科学的评价和提供质控标准,合理开发和利用这一丰富的自然资源,故对山银花中的化学成分进行系统研究,为制定山银花药材及相关中成药质量标准的提升奠定物质基础。

为进一步探索山银花的有效成分,本实验综合应用 HP-20、硅胶、ODS、Sephadex LH-20 和半制备液相等多种色谱学方法,对华南忍冬干燥花蕾 70% 乙醇提取物经石油醚、醋酸乙酯和正丁醇萃取得到的醋酸乙酯部位的化学成分进行研究,从中分离得到 5 个化合物,分别鉴定为 8-[ $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 6')- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-2,6-dimethyloct-1,2''-lactone (**1**)、天师酸 (tianshic acid, **2**)、黄麻脂肪酸 F (corchorifatty acid F, **3**)、天师酸甲酯 (tianshic acid methyl ester, **4**) 和黄麻脂肪酸 F 甲酯 (corchorifatty acid F methyl ester, **5**)。化合物 **1** 为新的单萜苷类化合物,命名为忍冬单萜 A; 化合物 **2**~**5** 均为首次从忍冬属植物中分离得到。采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 模型,以抑制炎症细胞因子一氧化氮 (NO) 的分泌为评价指标对分

离得到的化合物进行体外抗炎活性评价。

## 1 仪器与材料

Brucker AVANCE 600 型核磁共振仪 (德国 Bruker 公司), Finnigan LCQ Advantage MAX 质谱仪, Waters Snapt G2 mass spectrometer 高分辨质谱仪, Shimadzu 分析高效液相色谱 (Shimadzu LC-6AD series pump equipped with a UV detector), Shimadzu 制备型高效液相色谱, P2000 旋光测定仪、FT/IR-480 plus 红外光谱仪 (KBr 压片)、JASCOV-550 紫外-可见光谱仪 (日本 Jasco 公司)。分析高效液相色谱柱为 Phenomenex Gemini ( $C_{18}$ , 250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m), 制备高效液相色谱柱为  $C_{18}$  柱 (250 mm $\times$ 20 mm, 5  $\mu$ m, Nacalai tesque Inc., 日本)。TS100 型倒置显微镜 (日本尼康公司); A10051560 型超净工作台 (AIRTECH 公司); ZW-A 型微量振荡器 (常州国华仪器有限公司); L530 型离心机 (湘仪集团); S25 型小舞灵旋涡混合器 (德国 IKA 公司); EDP3-plus 电动多道移液器 (美国 RAININ 公司); 1000、200、20、10  $\mu$ L 单道移液器 (Brand 公司)。

薄层硅胶 GF<sub>254</sub> 和柱色谱硅胶 (青岛海洋化工厂), HP-20 大孔树脂 (Mitsubishi-Chemical, 日本), 反相 ODS 填料 (Merck 公司), Sephadex LH-20 填料 (Amersham Biosciences 公司), Toyo-pearl HW-40 填料 (Toyo Soda MFG); 95% 乙醇 (食用级, 连云港长和酒业有限公司), 水 (三蒸水, 自制), 分析纯试剂 (南京化学试剂有限公司)。DMEM 高糖细胞培养基 (Hyclone), 胎牛血清 (Lonsera), LPS (南京大治生物科技有限公司), 二甲基亚砜 (DMSO, 阿拉丁试剂), 24 孔细胞培养板 (JET 公司), 96 孔细胞培养板 (JET 公司), 0.25% 胰酶细胞消化液 (Gibco), NO 检测试剂盒: NaNO<sub>2</sub>, Griess 试剂 II+Griess 试剂 II (上海碧云天); 亚硝酸钠 (南京化学试剂股份有限公司)。单糖标准品 D-Glc (批号 C10911131, 质量分数 99%, Macklin 公司)、L-Glc (批号 E1506024, 质量分数 98%, Aladdin 公司)、D-Ara (批号 C14635692; 质量分数 98%, Macklin 公司)、L-Ara (批号 J24M10R89091; 质量分数 98%, 上海源叶生物有限公司)。

山银花药材于 2021 年购自安徽亳州 (产地湖南溆浦), 药材经南京中医药大学吴启楠教授鉴定为忍冬科植物华南忍冬 *L. confusa* DC. 的干燥花蕾, 样品标本 (20210506) 现保存于江苏康缘药业股份有限公司标本室。

## 2 提取与分离

山银花干燥花蕾 10 kg, 8 倍量 70% 乙醇加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压浓缩之后, 得流浸膏 7 L。总浸膏用适量水分散均匀后, 1 次用石油醚、醋酸乙酯和正丁醇进行萃取, 分别得到石油醚部位 (151 g, LC-1)、醋酸乙酯部位 (283 g, LC-2) 和正丁醇部位 (246 g, LC-3)。取醋酸乙酯部位 LC-2 (240 g) 进行硅胶柱色谱 ( $\phi$  8.5 cm  $\times$  100.0 cm) 分离, 二氯甲烷-甲醇 (100 : 0、98 : 2、95 : 5、90 : 10、85 : 15、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50.0 : 100) 梯度洗脱得到共 11 个馏份 Fr. 2A~2K。Fr. 2H (11.9 g) 经 ODS 柱色谱 ( $\phi$  80.0 cm  $\times$  5.0 cm) 分离, 甲醇-水 (2 : 8、4 : 6、6 : 4、7 : 3、10 : 0) 梯度洗脱得到 Fr. 2H1~2H9, 2H6 (3.2 g) 经制备液相 (50% 乙腈-酸水, 体积流量 8 mL/min, 示差检测器 RID) 纯化得到化合物 2 (101.2 mg,  $t_R$  = 21 min)、3 (93.2 mg,  $t_R$  = 14 min)、4 (23.0 mg,  $t_R$  = 23 min) 和 5 (50.3 mg,  $t_R$  = 17 min)。2I (12.8 g) 经

ODS 柱色谱 ( $\phi$  5.0 cm  $\times$  80.0 cm) 分离, 甲醇-水 (2 : 8、4 : 6、6 : 4、7 : 3、10 : 0) 梯度洗脱得到 Fr. 2I1~2I11, 2I8 (4.2 g) 经硅胶柱色谱 ( $\phi$  80.0 cm  $\times$  5.0 cm) 分离, 氯仿-甲醇 (100 : 0、98 : 2、95 : 5、90 : 10、85 : 15、80 : 20、70 : 30、60 : 40、50 : 50、0 : 100) 梯度洗脱得到 Fr. 2I1~2I9, 2I5 经半制备液相 (25% 乙腈-酸水, 体积流量 4 mL/min, 208 nm) 纯化得到化合物 1 (11.8 mg,  $t_R$  = 15 min)。

## 3 糖的绝对构型的鉴定

### 3.1 单糖标准品的衍生化实验

参考文献的方法<sup>[39]</sup>, 对单糖标准品进行衍生化反应, 反应过程见图 1。取单糖标准品混合物 (*D*-Glc、*L*-Glc、*D*-Ara、*L*-Ara, 各 0.5 mg), 加入左旋半胱氨酸甲酯 (*L*-cysteine methyl ester, 1 mg) 和吡啶 (1 mL), 置于 60 °C 下反应 1 h。再加入邻甲苯异硫氰酸酯 (*o*-tolyl isothiocyanate, 1  $\mu$ L), 继续在 60 °C 下反应 1 h。反应完成后, 混合物直接作为供试品, 以进行 HPLC 分析。

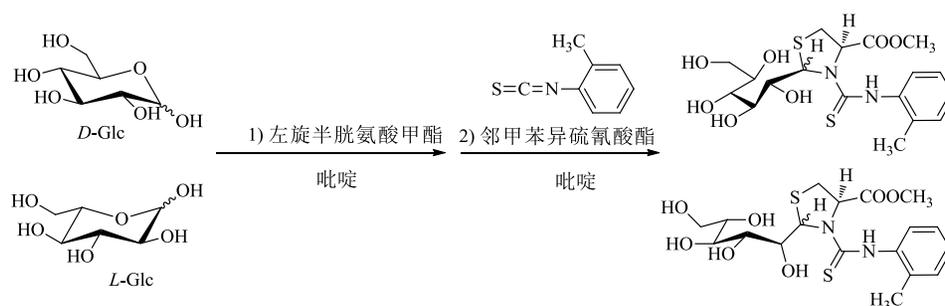


图 1 醛糖与左旋半胱氨酸甲酯和邻异硫氰酸酯的反应

Fig.1 Reaction of aldoses with *L*-cysteine methyl ester and *o*-tolyl isothiocyanate

### 3.2 化合物的水解及衍生化反应

取化合物 (约 1 mg), 加入 2 mol/L HCl (2 mL), 置于 80~90 °C 水浴中反应 1 h。将混合物蒸干, 加入 1 mL 水混悬, 再加入等体积的水饱和的氯仿萃取。取水层, 蒸干, 用与单糖对照品一样的方法进行衍生化反应, 得到 HPLC 供试品。

HPLC 分析条件: 色谱柱 Phenomenex Gemini ( $C_{18}$ , 250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相为 25% 乙腈 (0.1% 甲酸); 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 35 °C; 进样量 10  $\mu$ L; 检测波长 250 nm; 检测时间 40 min。

### 3.3 结果

通过对比化合物水解得到的糖基衍生物和单糖标准品衍生物在 HPLC 图谱中的保留时间确定化合物结构中所含有的糖基类型, 结果见图 2。化合物 1 所含糖基类型为 *D*-Glc 和 *L*-Ara。

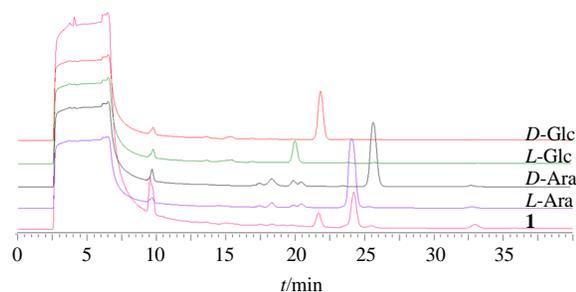


图 2 化合物 1 的糖基衍生物与单糖标准品衍生物 HPLC 对比图

Fig. 2 HPLC chromatograph for derivatives of compound 1 and monosaccharide standards

## 4 结构鉴定

化合物 1: 白色无定形粉末,  $[\alpha]_D^{29}$  -36.8 ( $c$  0.50,  $CH_3OH$ )。HR-ESI-MS 给出  $m/z$  465.233 9  $[M+H]^+$

(计算值为 465.233 6), 确定分子式为  $C_{21}H_{36}O_{11}$ , 计算不饱和度为 4。UV (甲醇) 图谱可见  $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$ : 204 (3.6), 230 (3.3)。IR (KBr) 光谱给出  $\nu_{\max}$ : 3418, 2929, 2358, 1715, 1064  $cm^{-1}$ 。

$^1H$ -NMR (600 MHz,  $CD_3OD$ ) 图谱, 低场区显示 2 个糖端基质子信号 [ $\delta_H$  4.50 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz), 4.21 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz)], 高场区可见 2 个甲基氢信号 [ $\delta_H$  1.15 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, 9- $CH_3$ ), 0.91 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, 10- $CH_3$ )]。  $^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $CD_3OD$ ) 结合 DEPT-135 谱共显示 21 个碳信号, 包括 11 个糖残基的碳信号、1 个季碳信号 ( $\delta_C$  178.3)、2 个次甲基 ( $\delta_C$  40.4, 29.7)、5 个亚甲基 ( $\delta_C$  68.9, 37.4, 37.1, 35.5, 24.9)、2 个甲基 ( $\delta_C$  21.5, 18.4), 推测结构中可能存在单萜结构片段。由  $^1H$ - $^1H$  COSY 谱 (图 3), 可观察到 H-9/H-2/H-3/H-4/H-5/H-6/H-10 以及 H-6/H-7/H-8 之间存在明显相关, 结合 H<sub>3</sub>-9 ( $\delta_H$  1.15)/C-1 ( $\delta_C$  178.3), C-2 ( $\delta_C$  40.4), C-3 ( $\delta_C$  35.5) 的 HMBC 相关, 进一步确证了结构中存在单萜结构片段。

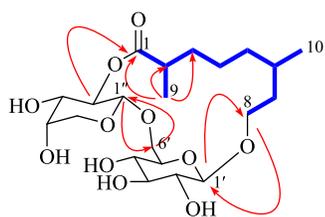


图 3 化合物 1 的主要  $^1H$ - $^1H$  COSY (—) 和 HMBC (→) 相关

Fig. 3 Key  $^1H$ - $^1H$  COSY (—) and HMBC (→) correlations of compound 1

化合物的 1D 核磁图谱中显示结构中含有 2 分子糖残基, 对其进行糖水水解衍生化实验, 结果表明化合物 1 所含 2 个糖基分别为 *D*-Glc 和 *L*-Ara (图 2), 结合糖端基质子信号 [ $\delta_H$  4.50 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz), 4.21 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz)] 中的偶合常数提示葡萄糖端基碳构型为  $\beta$  构型, 阿拉伯糖端基碳为  $\alpha$  构型。在 HMBC 谱中, 可见 H-1'' ( $\delta_H$  4.50)/C-6' ( $\delta_C$  68.5) 和 H-6' ( $\delta_H$  4.15, 3.65)/C-1'' ( $\delta_C$  101.5) 相关, 提示阿拉伯糖基和葡萄糖基为 1 $\rightarrow$ 6 连接, 此外, 可见相关峰 H-2'' ( $\delta_H$  5.03)/C-1 ( $\delta_C$  178.3) 和 H-8 ( $\delta_H$  3.76, 3.71)/C-1' ( $\delta_C$  104.4) (图 3), 提示单萜结构片段分别连接在阿拉伯糖基的 2 位和葡萄糖基的 1 位。

综合 NMR 图谱信息, 归属了化合物 1 的碳氢信号 (表 1)。鉴定化合物 1 的结构为 8-[ $\alpha$ -*L*-arabinopyranosyl-(1'' $\rightarrow$ 6')- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl]-2,6-dimethyloct-1,2''-lactone; 经 SciFinder Scholar 网络检索, 未发现相关报道, 表明化合物 1 为 1 个新的单萜苷类化合物, 命名为忍冬单萜 A (图 4)。化合物的绝对构型有待进一步确定。

化合物 2: 白色无定形粉末, HR-ESI-MS 给出  $m/z$  331.248 3 [ $M+H$ ]<sup>+</sup> (计算值为 331.248 4), 确定分子式为  $C_{18}H_{34}O_5$ , 计算不饱和度为 2。  $^1H$ -NMR (600 MHz,  $C_5D_5N$ )  $\delta$ : 2.46 (2H, m, H-2), 1.60 (2H, m, H-3), 1.26~1.34 (6H, m, H-4~6), 1.46 (2H, m, H-7), 4.47 (1H, m, H-8), 6.27 (1H, dd,  $J = 15.6, 5.5$  Hz, H-9), 6.32 (1H, dd,  $J = 15.6, 5.8$  Hz, H-10), 4.44 (1H, m, H-11), 3.88 (1H, m, H-12), 1.78 (2H, m, H-13), 1.53~1.76 (8H, m, H-14~17), 0.81 (3H, m,  $CH_3$ -18);

表 1 化合物 1 的核磁数据 (600/150 MHz,  $CD_3OD$ )

Table 1 NMR data of compound 1 (600/150 MHz,  $CD_3OD$ )

碳位	$\delta_C$	$\delta_H$	碳位	$\delta_C$	$\delta_H$
1	178.3		2'	75.1	3.13 (overlapped)
2	40.4	2.53 (ddd, $J = 10.4, 6.9, 3.4$ Hz)	3'	77.9	3.32 (overlapped)
3	35.5	1.61 (m), 1.42 (m)	4'	72.1	3.12 (overlapped)
4	24.9	1.37 (m), 1.27 (m)	5'	77.2	3.42 (ddd, $J = 9.3, 7.4, 1.7$ Hz)
5	37.1	1.33 (m), 1.17 (m)	6'	68.5	4.14 (dd, $J = 10.7, 1.7$ Hz), 3.64 (dd, $J = 10.7, 7.4$ Hz)
6	29.7	1.76 (qd, $J = 6.9, 6.4, 3.3$ Hz)	1''	101.5	4.51 (d, $J = 6.8$ Hz)
7	37.4	1.53 (overlapped), 1.51 (overlapped)	2''	72.9	5.04 (dd, $J = 8.8, 7.0$ Hz)
8	68.9	3.76 (ddd, $J = 10.1, 8.3, 5.1$ Hz), 3.71 (dt, $J = 10.1, 5.6$ Hz)	3''	72.7	3.67 (dd, $J = 8.8, 3.5$ Hz)
9	18.4	1.15 (d, $J = 7.0$ Hz)	4''	69.7	3.82 (td, $J = 3.4, 1.8$ Hz)
10	21.5	0.91 (d, $J = 6.6$ Hz)	5''	66.5	3.90 (dd, $J = 12.4, 3.4$ Hz), 3.58 (dd, $J = 12.4, 1.9$ Hz)
1'	104.4	4.21 (d, $J = 8.0$ Hz)			

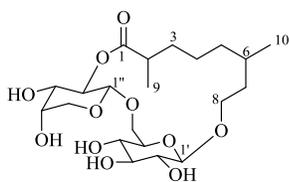


图 4 化合物 1 的结构

Fig. 4 Structure of compound 1

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )  $\delta$ : 176.2 (C-1), 35.0 (C-2), 25.8 (C-3), 26.3 (C-4), 29.9 (C-5), 26.3 (C-6), 38.6 (C-7), 72.1 (C-8), 136.8 (C-9), 131.0 (C-10), 75.4 (C-11), 76.3 (C-12), 33.8 (C-13), 30.1 (C-14), 29.6 (C-15), 32.5 (C-16), 23.2 (C-17), 14.5 (C-18)。氢谱、碳谱数据与文献报道的数据一致<sup>[40]</sup>, 故鉴定化合物 2 为天师酸。

化合物 3: 白色无定形粉末, HR-ESI-MS 给出  $m/z$  329.232 6  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (计算值为 329.232 8), 确定分子式为  $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_5$ , 计算不饱和度为 3。 $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )  $\delta$ : 2.28 (2H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-2), 1.59 (2H, m, H-3), 1.33 (8H, m, H-4~7), 1.50 (2H, m, H-8), 4.48 (1H, m, H-9), 6.31 (1H, dd,  $J = 15.6, 5.6$  Hz, H-10), 6.38 (1H, dd,  $J = 15.5, 6.0$  Hz, H-11), 4.54 (1H, t,  $J = 5.8$  Hz, H-12), 4.00 (1H, m, H-13), 2.34 (1H, m, H-14a), 2.10 (3H, overlapped, H-14b, 17), 5.85 (1H, m, H-15), 5.50 (1H, m, H-16), 0.93 (3H, t,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ -18);  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )  $\delta$ : 176.3 (C-1), 35.1 (C-2), 26.0 (C-3), 26.3 (C-4), 30.0 (C-5), 29.8 (C-6), 30.2 (C-7), 38.7 (C-8), 72.1 (C-9), 136.9 (C-10), 131.1 (C-11), 75.6 (C-12), 75.7 (C-13), 31.9 (C-14), 133.2 (C-15), 127.3 (C-16), 21.3 (C-17), 14.7 (C-18)。氢谱、碳谱数据与文献报道的数据一致<sup>[41]</sup>, 故鉴定化合物 3 为黄麻脂肪酸 F。

化合物 4: 白色无定形粉末, HR-ESI-MS 给出  $m/z$  345.263 9  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (计算值为 345.264 1), 确定分子式为  $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_5$ , 计算不饱和度为 2。 $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) 显示 1 组反式双键信号  $\delta_{\text{H}}$  6.32 (1H, d,  $J = 15.6, 5.8$  Hz), 6.27 (1H, dd,  $J = 15.5, 5.5$  Hz), 1 个甲氧基信号  $\delta_{\text{H}}$  3.62 (3H, s), 1 个甲基信号  $\delta_{\text{H}}$  0.81 (3H, m), 3 个羟基偌氢  $\delta_{\text{H}}$  4.47 (1H, m), 4.44 (1H, m), 3.88 (1H, m)。 $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) 图谱共显示 19 个碳信号, 结合 DEPT 135 图谱, 发现共含有 1 个季碳信号 ( $\delta_{\text{C}}$  176.2)、5 个次甲基碳信号 ( $\delta_{\text{C}}$  136.8, 131.1, 76.4, 75.4, 72.0)、11 个亚甲基碳信号 ( $\delta_{\text{C}}$  38.6, 35.0, 33.8, 32.5, 30.1, 29.9, 29.7, 26.4, 26.2, 25.8, 23.2)、1 个甲氧基碳信号 ( $\delta_{\text{C}}$  51.5)、1 个甲基碳信号

( $\delta_{\text{C}}$  14.5)。将化合物 4 的核磁数据与 2 对比发现 4 仅多出 1 个甲氧基信号 [ $\delta_{\text{H}}$  3.62 (3H, s);  $\delta_{\text{C}}$  51.5], 其他数据一致<sup>[40]</sup>, 故鉴定化合物 4 为天师酸甲酯。

化合物 5: 白色无定形粉末, HR-ESI-MS 给出  $m/z$  343.248 0  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (计算值为 343.248 1), 确定分子式为  $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_5$ , 计算不饱和度为 3。 $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) 显示 2 组双键信号  $\delta_{\text{H}}$  6.38 (1H, dd,  $J = 15.5, 6.0$  Hz, H-11), 6.31 (1H, dd,  $J = 15.6, 5.6$  Hz, H-10), 5.85 (1H, m, H-15), 5.50 (1H, m, H-16), 1 个甲基信号  $\delta_{\text{H}}$  0.93 (3H, t,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ -18), 1 个甲氧基信号  $\delta_{\text{H}}$  3.62 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 3 个羟基偌氢  $\delta_{\text{H}}$  4.54 (1H, t,  $J = 5.8$  Hz, H-12), 4.48 (1H, m, H-9), 4.00 (1H, m, H-13)。 $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) 图谱共显示 19 根碳信号, 结合 DEPT-135 图谱, 发现共含有 1 个季碳信号 ( $\delta_{\text{C}}$  176.3), 7 个次甲基碳信号 ( $\delta_{\text{C}}$  136.9, 133.2, 131.1, 127.3, 75.7, 75.6, 72.1), 9 个亚甲基碳信号 ( $\delta_{\text{C}}$  38.7, 35.1, 31.9, 30.2, 30.0, 29.8, 26.3, 25.9, 21.3), 1 个甲基碳信号 ( $\delta_{\text{C}}$  14.7), 1 个甲氧基碳信号 ( $\delta_{\text{C}}$  51.6)。将化合物 5 的  $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$  数据与 3 对比发现 5 仅多出 1 个甲氧基信号 [ $\delta_{\text{H}}$  3.62 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ),  $\delta_{\text{C}}$  51.6], 其他数据一致<sup>[41]</sup>, 故鉴定化合物 5 为黄麻脂肪酸 F 甲酯。

## 5 化合物体外抑制 NO 释放活性

### 5.1 细胞活力测试

RAW 264.7 细胞在 37 °C 的培养箱中以含有 10% FBS 和 1% PS 的 DMEM 培养基为基质培养至细胞密度为  $2 \times 10^5$  个/mL。取对数生长期细胞均匀接种于 96 孔板中 (每孔 400  $\mu\text{L}$ ), 样品组中加入分别加入 50、20、10  $\mu\text{mol/L}$  药物, 对照组加入等量无血清的 DMEM 培养基。继续培养 24 h 后, 于多功能酶标仪测定 490 nm 吸光度 (A) 值。

### 5.2 炎症因子 NO 测试

取 RAW 264.7 细胞均匀接种于 96 孔板中 (终密度  $2.5 \times 10^5$  个/mL), 继续培养 24 h 后吸去上清液。模型组和样品组中加入 LPS (终质量浓度为 1  $\mu\text{g/mL}$ ), 对照组中加入等量无血清的 DMEM 培养基, 样品组中药物的终浓度为 50、20、10  $\mu\text{mol/L}$ 。24 h 后取 50  $\mu\text{L}$  上清液, 加入 Griess A 试剂和 Griess B 试剂各 50  $\mu\text{L}$ 。在酶标仪上 540 nm 处测定最终产物的 A 值, 根据标准曲线计算亚硝酸盐浓度并按公式计算抑制率。

抑制率 = (模型组 NO 平均含量 - 样品组 NO 平均含量) / (模型组 NO 平均含量 - 对照组 NO 平均含量)

### 5.3 实验结果

实验结果表明, 各化合物在其测试浓度下对 RAW 264.7 细胞均无细胞毒性。各化合物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 的分泌均无显著抑制作用, 抑制率均低于 2.05%。

### 6 讨论

金银花和山银花作为我国清热解毒常用中药, 其功能主治相同、化学成分相似, 但目前的研究多集中于金银花, 而山银花的药理学研究主要集中于粗提物或有效部位的药效评价, 缺乏对山银花中所含化学成分及其药理作用的系统深入研究, 不利于明确和区分二者的临床应用价值以及山银花自然资源的合理开发利用。另一方面山银花与金银花的主要差异性成分, 是三萜及皂苷类成分, 其在山银花药材中的含量也相对较大, 但目前市售来自山银花的三萜皂苷类化学对照品种单一(仅有灰毡毛忍冬皂苷甲、乙和川续断皂苷乙), 因而本实验整体研究思路是对山银花中三萜及皂苷类富集部位进行系统的化学成分研究, 首先进行采用溶剂萃取法进行粗分离得到水部位、醋酸乙酯部位和正丁醇部位。经过 HPLC 及 UPLC-Q/TOF-MS 分析, 山银花中三萜及皂苷类成分主要富集在醋酸乙酯部位, 因此本研究首先对醋酸乙酯部位进行系统的研究, 为山银花质量标准的提升提供标准品。后续本课题组将继续对山银花中的主要成分(三萜及皂苷类成分)进行规模化制备, 并结合山银花的功能主治建立合理的药效评价模型对分离得到的化合物进行活性评价, 建立山银花与功效相关联的指纹图谱, 提供山银花鉴别用指标成分标准品的制备方法, 为山银花药材及相关中成药质量标准的提升奠定物质基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 32-33.
- [2] Liu J, Zhang J, Wang F, *et al.* Isolation and characterization of new minor triterpenoid saponins from the buds of *Lonicera macranthoides* [J]. *Carbohydr Res*, 2013, 370: 76-81.
- [3] 柴兴云, 李萍, 窦静, 等. 山银花中皂苷类成分研究 [J]. *中国天然药物*, 2004, 2(2): 339-340.
- [4] Chen Y, Feng X, Jia X D, *et al.* Triterpene glycosides from *Lonicera*. Isolation and structural determination of seven glycosides from flower buds of *Lonicera macranthoides* [J]. *Chem Nat Compd*, 2008, 44(1): 39-43.
- [5] Chen Y, Shan Y, Zhao Y Y, *et al.* Two new triterpenoid saponins from *Lonicera macranthoides* [J]. *Chin Chem Lett*, 2012, 23(3): 325-328.
- [6] Chen Y, Zhao Y Y, Wang M, *et al.* The first chlorogenic acid ester saponin from *Lonicera macranthoides* [J]. *Chem Nat Compd*, 2012, 47(6): 940-943.
- [7] Chen Y, Zhao Y Y, Wang M, *et al.* A new lupane-type triterpenoid saponin from *Lonicera macranthoides* [J]. *Chem Nat Compd*, 2014, 49(6): 1087-1090.
- [8] Mei Y D, Zhang N, Zhang W Y, *et al.* Two new ursane-type nortriterpenes from *Lonicera macranthoides* and their iNOS-inhibitory activities [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(1): 27-32.
- [9] 柴兴云, 窦静, 贺清辉, 等. 山银花中酚酸类成分研究 [J]. *中国天然药物*, 2004, 2(6): 339-340.
- [10] 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]. *中国药学杂志*, 2007, 42(20): 1537-1539.
- [11] 许小方, 李会军, 李萍, 等. 灰毡毛忍冬花蕾中的化学成分 [J]. *中国天然药物*, 2006, 4(1): 45-48.
- [12] Liu J, Zhang J, Wang F, *et al.* Chemical constituents from the buds of *Lonicera macranthoides* in Sichuan, China [J]. *Biochemical System Ecol*, 2014, 54: 68-70.
- [13] 陈雨, 赵友谊, 吴双, 等. 灰毡毛忍冬花蕾水溶性化学成分研究 [J]. *中药材*, 2012, 35(2): 231-234.
- [14] 姚彩云, 宋志军, 李汉浠, 等. 红腺忍冬基源山银花的化学成分 [J]. *天水师范学院学报*, 2014, 34(5): 10-12.
- [15] Mei Y D, Pan D B, Jiang Y N, *et al.* Target discovery of chlorogenic acid derivatives from the flower buds of *Lonicera macranthoides* and their MAO B inhibitory mechanism [J]. *Fitoterapia*, 2019, 134: 297-304.
- [16] 柴兴云, 王林, 宋越, 等. 山银花中黄酮类成分的研究 [J]. *中国药科大学学报*, 2004, 35(4): 299-302.
- [17] 温建辉, 倪付勇, 赵祎武, 等. 山银花化学成分研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(13): 1883-1886.
- [18] Liu J, Zhang J, Wang F, *et al.* New secoiridoid glycosides from the buds of *Lonicera macranthoides* [J]. *Nat Prod Commun*, 2012, 12(7): 1561-1562.
- [19] Mei Y D, Li H B, Liu L X, *et al.* A new nitrogen-containing iridoid glycoside from *Lonicera macranthoides* [J]. *Nat Prod Res*, 2021, 35(20): 3432-3438.
- [20] Mei Y D, Li H B, Pang Q Q, *et al.* Lonimacranalides A-C, three iridoids with novel skeletons from *Lonicera macranthoides* [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(38): 22011-22016.
- [21] 黄丽华, 王道平, 詹尚明, 等. 黄褐毛忍冬花蕾挥发油化学成分分析 [J]. *贵州科学*, 2011, 29(2): 44-47.
- [22] 唐丽君, 周日宝, 刘芙蓉, 等. 超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取法与水蒸气蒸馏法提取灰毡毛忍冬中挥发油的 GC-MS

- 比较研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(9): 109-113.
- [23] 陈丽娜. 山银花的抗菌作用初步研究 [J]. 临床医学工程, 2009, 16(10): 46-47.
- [24] 刘岚, 李荣. 山银花药用成分的提取及抑菌活性研究 [J]. 中南医学科学杂志, 2012, 40(3): 298-300.
- [25] 盛卸晔, 刘文谦, 薛霞, 等. 绿原酸体外抗单纯疱疹病毒作用 [J]. 中国天然药物, 2008, 6(3): 232-234.
- [26] 华桦, 鄢良春, 吴诗惠, 等. 山银花、金银花微毒测试 (Microtox) 与安全性研究 [J]. 世界中医药, 2020, 15(2): 219-224.
- [27] 张伟敏, 魏静, 胡振, 等. 灰毡毛忍冬提取纯化抗氧化性研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(3): 109-112.
- [28] 徐望龙, 李云贵, 孙林军, 等. 山银花黄酮粗提物抗氧化活性的体外观察 [J]. 中成药, 2014, 36(6): 1292-1294.
- [29] 管福琴, 刘敏, 单宇, 等. 灰毡毛忍冬中五环三萜类化合物的抗氧化活性研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(6): 1315-1317.
- [30] 胡扬帆, 李胜华. 灰毡毛忍冬花挥发性有机物的抗炎作用及机理研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(12): 3031-3035.
- [31] 白仲杰, 任群利, 俸婷婷, 等. 基于炎症细胞模型的灰毡毛忍冬抗炎活性研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2015, 29(5): 35-39.
- [32] Guan F Q, Wang H T, Shan Y, *et al.* Inhibition of COX-2 and PGE2 in LPS-stimulated RAW264.7 cells by lonimacranthoide VI, a chlorogenic acid ester saponin [J]. *Biomed Rep*, 2014, 2(5): 760-764.
- [33] Wang J, Zhao X Z, Qi Q, *et al.* Macranthoside B, a hederagenin saponin extracted from *Lonicera macranthoides* and its anti-tumor activities *in vitro* and *in vivo* [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(7): 1716-1721.
- [34] Shan Y, Guan F Q, Zhao X Z, *et al.* Macranthoside B induces apoptosis and autophagy via reactive oxygen species accumulation in human ovarian cancer A2780 cells [J]. *Nutr Cancer*, 2016, 68(2): 280-289.
- [35] 时京珍, 宛蕾, 陈秀芬. 黄褐毛忍冬总皂甙对几种化学毒物致小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 中药药理与临床, 1990, 6(1): 33-34.
- [36] 时京珍, 刘耕陶. 黄褐毛忍冬皂甙对对乙酰氨基酚致小鼠肝脏毒性的保护作用 [J]. 药科学报, 1995, 30(4): 311-314.
- [37] 时京珍, 刘耕陶.  $\alpha$ -常春藤皂甙和无患子皂甙 B 对小鼠肝微粒体细胞色素 P-450 的作用 [J]. 中国药理学报, 1996, 17(3): 264-266.
- [38] 李熠, 匡稳定, 周容容, 等. 山银花黄酮类提取物对人肝 L-02 细胞甘油三酯蓄积及 SREBP-1c 表达的影响 [J]. 中南医学科学杂志, 2015, 43(2): 145-149.
- [39] Tanaka T, Nakashima T, Ueda T, *et al.* Facile discrimination of aldose enantiomers by reversed-phase HPLC [J]. *Chem Pharma Bull*, 2007, 55(6): 899-901.
- [40] 陈雪松, 陈迪华, 斯建勇, 等. 天师栗化学成分的研究 [J]. 药科学报, 2000, 35(3): 198-200.
- [41] 李帅, 匡海学, 冈田嘉仁, 等. 鬼针草化学成分的研究 (I) [J]. 中草药, 2003, 34(9): 782-785.

[责任编辑 王文倩]