

## 金银花黄酮苷类化学成分研究

魏晓芳<sup>1,2</sup>, 沈婉莹<sup>1,2</sup>, 李阳芳<sup>2</sup>, 谢秋杰<sup>2</sup>, 唐旭东<sup>1,4\*</sup>, 葛岚岚<sup>2,3\*</sup>

1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000

2. 暨南大学第二临床学院深圳市人民医院龙华分院 中心实验室, 广东 深圳 518120

3. 暨南大学第二临床学院深圳市人民医院龙华分院 病理科, 广东 深圳 518120

4. 深圳清华大学研究院 创新中药及天然药物研究重点实验室, 广东 深圳 518000

**摘要:** 目的 研究金银花(忍冬 *Lonicera japonica* 的干燥花蕾)的黄酮苷类成分。方法 采用溶剂提取法, 结合硅胶、ODS、Sephadex LH-20 等柱色谱和半制备高效液相法进行分离和纯化, 并通过显色及 NMR 等波谱学方法进行鉴定。结果 从金银花中分离到了 9 个黄酮苷类化合物, 分别鉴定为 3,5-二羟基-3'-甲氧基黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷(1)、槲皮素-3-O-葡萄糖苷(2)、3,5,3'-三羟基黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷(3)、棉花苷(4)、烟花苷(5)、水仙苷(6)、芦丁(7)、槲皮素-5-O-葡萄糖苷(8)、木犀草素-7-O-新橙皮糖苷(9)。结论 化合物 1 和 3 为新化合物, 分别命名为金银花黄酮 F 和金银花黄酮 E; 化合物 2、4~6、8、9 为首次从该属植物中分离得到。化合物 1 对人肝癌 HuH7 细胞的生长具有显著的抑制作用, 其半数抑制浓度(median inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)为(43.4±1.1) μmol/L。

**关键词:** 金银花; 黄酮苷; 抗肝癌; 金银花黄酮 F; 金银花黄酮 E; 棉花苷; 烟花苷; 水仙苷

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)11-3424-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.11.004

## Flavonoid glycosides of *Lonicera japonica* flower buds

WEI Xiao-fang<sup>1,2</sup>, SHEN Wan-ying<sup>1,2</sup>, LI Yang-fang<sup>2</sup>, XIE Qiu-jie<sup>2</sup>, TANG Xu-dong<sup>1,4</sup>, GE Lan-lan<sup>2,3</sup>

1. College of pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Center Lab of Longhua Branch and Department of Infectious Disease, Shenzhen People's Hospital (The Second Clinical Medical College, Jinan University), Shenzhen 518020, China

3. Department of pathology (Longhua Branch), Shenzhen People's Hospital (The Second Clinical Medical College, Jinan University), Shenzhen 518120, China

4. Key Laboratory of innovative traditional Chinese medicine and natural medicine, Research Institute of Tsinghua University, Shenzhen 518000, China

**Abstract: Objective** To study flavonoid glycosides from the flower buds of Rendong (*Lonicera japonica* Thunb.) (*Lonicera*, Caprifoliaceae). **Methods** All flavonoid glycosides were systematically isolated and purified by solvent extraction, silica gel, ODS, Sephadex LH-20 column chromatography and semi-preparative high-performance liquid chromatography (HPLC), and identified by color reaction and NMR spectroscopy. **Results** A total of nine flavonoid glycosides were obtained from *L. japonica* flower buds, and identified as 3,5-dihydroxy-3'-methoxyflavone-7-O-β-D-glucopyranoside (1), quercetin-3-O-glucopyranoside (2), 3,5,3'-trihydroxyflavone-7-O-β-D-glucopyranoside (3), quercimeritrin (4), nicotinflorin (5), narcissin (6), rutin (7), quercetin-5-O-glucoside (8), and luteolin-7-O-neohesperidoside (9). **Conclusion** Compounds 1 and 3 are new compounds. Compounds 2, 4-6, 8-9 were isolated in the genus *Lonicera* for the first time. Compound 1 showed inhibitory effect on HuH7 cells with IC<sub>50</sub> of (43.4 ± 1.1) μmol/L.

**Key words:** *Lonicera japonica* Thunb.; flavonoid glycoside; anti-hepatoma; japo flavone F; japo flavone E; quercimeritrin; nicotinflorin; narcissin

收稿日期: 2023-01-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81903760); 深圳市基础研究面上项目(JCYJ20190806151816859, JCYJ20190806153401647)

作者简介: 魏晓芳(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药活性成分的研究。

\*通信作者: 唐旭东(1970—), 男, 研究员, 研究方向为基因工程药物、中药及天然药物作用机制研究。E-mail: tangxd@tshinghua-sz.org

葛岚岚(1987—), 女, 助理研究员, 研究方向为中药药效物质基础及功能活性评价。E-mail: gelanlan4710@163.com

忍冬科 (Caprifoliaceae) 忍冬属在全世界约有 200 种植物, 主要分布在非洲北部、北美、欧洲和亚洲<sup>[1]</sup>。我国有 98 种, 以西南部分布最多<sup>[2]</sup>。金银花是忍冬属植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花, 又名双花、忍冬花等, 分布在我国各省, 尤其以河南、山东的野生资源最为丰富<sup>[3]</sup>。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, 药用历史悠久, 有“中药中的抗生素”之称<sup>[3-4]</sup>。作为清热解毒的良药, 金银花在新型冠状病毒肺炎的防治中应用广泛, 表现优异<sup>[1,5-6]</sup>。首载于梁代陶弘景的《名医别录》, 既可入药, 亦可做食疗<sup>[7-8]</sup>。现代药理作用显示金银花具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗病毒、抗癌以及肝保护等活性<sup>[9-13]</sup>。迄今为止, 从金银花中分离鉴定的化合物主要为黄酮类、有机酸类、环烯醚萜以及三萜皂苷类化合物<sup>[7,14-16]</sup>。现代药理学研究认为, 金银花功效成分可能是其黄酮类活性成分<sup>[17-18]</sup>。为了更好地阐述金银花的物质基础, 本课题组在前期的研究基础<sup>[17,19-21]</sup>上对金银花

的化学成分进行了进一步的分离和纯化, 从中分离鉴定了 9 个黄酮苷类化合物, 分别为 3,5-二羟基-3'-甲氧基黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷 (3,5-dihydroxy-3'-methoxyflavone-7-O-β-D-glucopyranoside, **1**)、槲皮素-3-O-葡萄糖苷 (quercetin-3-O-glucopyranoside, **2**)、3,5,3'-三羟基黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷 (3,5,3'-trihydroxyflavone-7-O-β-D-glucopyranoside, **3**)、棉花苷 (quercimeritrin, **4**)、烟花苷 (nicotinflorin, **5**)、水仙苷 (narcissin, **6**)、芦丁 (rutin, **7**)、槲皮素-5-O-葡萄糖苷 (quercetin-5-O-glucoside, **8**)、木犀草素-7-O-新橙皮糖苷 (luteolin-7-O-neoheesperidoside, **9**), 结构见图 1。其中, 化合物 **1** 和 **3** 为新化合物, 分别命名为金银花黄酮 F (japoflavone F, **1**) 和金银花黄酮 E (japoflavone E, **3**); 化合物 **2**、**4**~**6**、**8**、**9** 为首次从该属植物中分离得到。为进一步探究金银花的有效成分, 本实验对化合物 **1**~**9** 进行了抗肿瘤活性筛选, 结果显示, 化合物 **1** 对人肝癌 HuH7 细胞表现出显著的抑制活性, 其半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>) 为 (43.4±1.1) μmol/L。

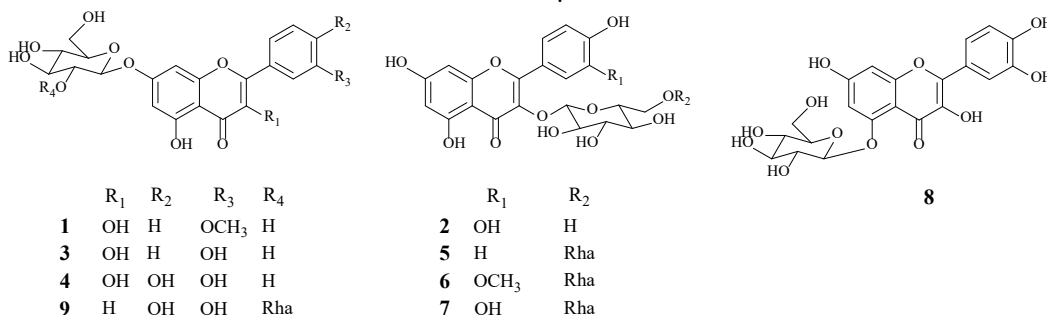


图 1 化合物 1~9 的化学结构  
Fig. 1 Structure of compounds 1—9

### 1 仪器与材料

Bruker DPX-400 核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); Bruker microTOF-QII 液相色谱质谱联用仪 (德国 Bruker 公司); 半制备高效液相色谱仪 (泵 LC-20A, 检测器 SPD-20A, 广州睿柏公司); 分析高效液相色谱仪 (Essentia LC-16, 日本岛津公司), Cosmosil C<sub>18</sub> 反相制备柱 (250 mm×20 mm, 5 μm, 日本); YMC-Pack ODS C<sub>18</sub> 分析柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 日本); Sephadex LH-20 (北京 GE 公司); 薄层硅胶 G 和色谱柱硅胶 (青岛海洋化工厂); 色谱级甲醇购自 Sigma-Aldrich 公司 (美国 St. Louis 公司); D-葡萄糖 (批号 20171023, 质量分数大于 99%) 购自广东光华科技股份有限公司; 其余试剂

皆为分析纯, 购自上海国药集团化学试剂公司。

金银花购自山东省临沂市平邑县, 经甘肃中医药大学唐旭东教授鉴定为忍冬 *L. japonica* Thunb. 的花蕾, 凭证标本 (20170930) 保藏于深圳市人民医院龙华分院中心实验室标本馆。采摘回来的新鲜样品先在 60 °C 干燥箱中烘干, 后阴避保存待用。

人肝癌 SMCC 7721 细胞和人肝癌 HuH7 细胞购自美国菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)。

### 2 提取与分离

取干燥后的金银花 (6.5 kg) 粉碎, 用 75% 乙醇在室温下进行多次冷浸、渗漉提取, 合并提取液, 减压浓缩得到浸膏 (1.5 kg)。将总浸膏混悬于水,

依次进行萃取，减压浓缩后分别得到环己烷部位(130.3 g)、醋酸乙酯部位(93.7 g)和正丁醇部位(199.8 g)。正丁醇部位(180 g)经正相硅胶柱色谱，以二氯甲烷-甲醇系统(0:1~1:0)梯度洗脱，合并后得到40个流分。

Fr. 13 (13.1 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱分离，二氯甲烷-甲醇(50:50)等度洗脱，薄层分析合并后得到3个组分。Fr. 13-3 经半制备高效液相色谱(46%甲醇)分离得到化合物 **1** (1.03 mg,  $t_R=13.5$  min) 和 **2** (4.34 mg,  $t_R=19.6$  min)。Fr. 20 (5.7 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱分离，二氯甲烷-甲醇(70:30)等度洗脱，合并后得到6个组分。Fr. 20-5 经半制备高效液相色谱(43%甲醇)分离得到化合物 **3** (5.2 mg,  $t_R=20.1$  min)。Fr. 23 (2.6 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱分离，二氯甲烷-甲醇(50:50)等度洗脱，得到10个组分。Fr. 23-5 经半制备高效液相色谱(55%甲醇)分离得到化合物 **4** (1.6 mg,  $t_R=16.4$  min)。Fr. 23-6 经半制备高效液相色谱(43%甲醇)分离得到化合物 **5** (5.25 mg,  $t_R=10.1$  min) 和 **6** (1.24 mg,  $t_R=20.6$  min)。Fr. 25 (18.5 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱分离，二氯甲烷-甲醇(50:50)等度洗脱，得到3个组分。Fr. 25-3 经半制备高效液相色谱(43%甲醇)分离得到化合物 **7** (17.7 mg,  $t_R=11.6$  min) 和 **8** (6.7 mg,  $t_R=23.8$  min)。Fr. 33 (9.6 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱分离，二氯甲烷-甲醇(50:50)等度洗脱，得到3个组分。Fr. 33-3 经半制备高效液相色谱(43%甲醇)分离得到化合物 **9** (3.52 mg,  $t_R=13.1$  min)。

### 3 糖构型鉴定

取化合物 **3** (1 mg)，溶于4 mL 三氟乙酸(4 mol/L)溶液中，95 °C 条件反应4 h，待反应完成后，冷却至室温，用等体积的二氯甲烷(2 mL)萃取3次，水层减压蒸干，即为单糖酸水解产物，二氯甲烷层为苷元部分。取 *D*-葡萄糖(1 mg)的对照品及上述酸水解产物分别加入0.5 mL的无水吡啶和2 mg的 *L*-半胱氨酸甲酯盐酸盐，60 °C 条件下加热1 h，冷却至室温，分别加入10  $\mu$ L 邻甲苯异硫氰酸酯，60 °C 加热1 h后冷却，将反应液稀释1倍后进行 HPLC(乙腈-0.1%甲酸水溶液 25:75, 1 mL/min, 10  $\mu$ L, 分析波长为250 nm)分析，化合物 **3** 的酸水解产物和 *D*-葡萄糖的保留时间均为18.1 min。

## 4 结构鉴定

### 4.1 新化合物结构鉴定

化合物 **3**: 黄色粉末，TLC 薄层展开 UV 下为亮黄色，盐酸-镁粉显色反应为紫红色，故推断为黄酮类化合物，HR-ESI-MS  $m/z$ : 471.089 8 [M+Na]<sup>+</sup> (计算值为 471.090 3)。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.42 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-4'), 7.37 (1H, s, H-2'), 6.79 (1H, t,  $J=8.0$  Hz, H-5'), 6.78 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-6'), 6.69 (1H, s, H-8), 6.42 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-6), 5.06 (1H, d,  $J=7.4$  Hz, H-1''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 146.1 (C-2), 120.0 (C-3), 181.8 (C-4), 162.9 (C-5), 99.5 (C-6), 164.7 (C-7), 94.8 (C-8), 161.2 (C-9), 102.7 (C-10), 127.3 (C-1'), 105.3 (C-2'), 157.0 (C-3'), 115.9 (C-4'), 124.8 (C-5'), 113.0 (C-6'), 100.0 (C-1''), 73.2 (C-2''), 76.4 (C-3''), 69.6 (C-4''), 77.2 (C-5''), 60.7 (C-6'')。根据以上数据，判断该黄酮类化合物含有1个四元取代A环和1个1,3-二取代B环。糖端基信号  $\delta_H$  5.06 (1H, d,  $J=7.4$  Hz, H-1') 以及  $\delta_C$  100.0 (C-1') 提示该化合物还含有一个连氧糖苷。通过与已知文献葡萄糖的信号对比<sup>[22]</sup>，并根据糖端基氢的偶合常数 ( $J=7.4$  Hz)，以及水解后糖残基的 HPLC 分析 ( $t_R=18.1$  min)，最终判断该糖为  $\beta$ -*D*-葡萄糖。HMBC 信号(图2)显示，H-6/8 与 C-10 相关，H-8 与 C-7 相关，H-6' 与 C-2/3 相关，H-5' 与 C-3' 相关，H-2' 与 C-3'/4' 相关，H-4' 与 C-6' 相关，H-1'' 与 C-7 相关。综合以上结果，最终鉴定化合物 **3** 为 3,5,3'-三羟基黄酮-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷，经 SciFinder 数据库检索，为1个新化合物，命名为金银花黄酮 E。

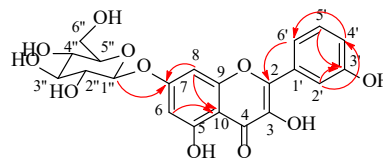


图2 化合物 **3** 的重要 HMBC 相关

Fig. 2 Key HMBC of compound **3**

化合物 **1**: 黄色粉末，TLC 薄层展开 UV 下为亮黄色，盐酸-镁粉显色反应为紫红色，故推断为黄酮类化合物，HR-ESI-MS  $m/z$ : 485.142 0 [M+Na]<sup>+</sup> (计算值为 485.106 0)，<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.57 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-4'), 7.56 (1H, s, H-2'), 6.93 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-6'), 6.92 (1H, t,  $J=8.0$  Hz, H-5'), 6.85 (1H, s, H-8), 6.43 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-6), 5.04 (1H, d,  $J=7.4$  Hz, H-1''), 3.87 (3H, s,

3'-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 148.2 (C-2), 120.6 (C-3), 174.1 (C-4), 164.2 (C-5), 99.5 (C-6), 165.4 (C-7), 95.0 (C-8), 162.6 (C-9), 103.2 (C-10), 132.2 (C-1'), 110.3 (C-2'), 156.9 (C-3'), 115.9 (C-4'), 122.4 (C-5'), 111.3 (C-6'), 56.0 (3'-OCH<sub>3</sub>), 100.1 (C-1''), 73.1 (C-2''), 76.5 (C-3''), 69.6 (C-4''), 77.3 (C-5''), 60.6 (C-6'')。结合 <sup>1</sup>H-NMR 与 <sup>13</sup>C-NMR 信号, 该化合物与化合物 **3** 信号相似, 仅多了 1 个甲氧基的信号, 通过比对黄酮母核环上氢信号, 发现 H-2' 和 H-4' 的信号向低场位移了 δ 0.15 左右, 说明该甲氧基连在 B 环的 3' 位, 最终鉴定化合物 **1** 为 3,5-二羟基-3'-甲氧基黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷, 经 SciFinder 数据库检索, 为 1 个新化合物, 命名为金银花黄酮 F。

#### 4.2 已知化合物结构鉴定

化合物 **2**: 黄色粉末, TLC 薄层展开 UV 下为亮黄色, 盐酸-镁粉显色反应为紫红色, 故推断为黄酮类化合物, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.58 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6'), 7.57 (1H, s, H-2'), 6.84 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.39 (1H, s, H-8), 6.19 (1H, s, H-6), 5.46 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-1''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 156.3 (C-2), 133.3 (C-3), 177.4 (C-4), 161.2 (C-5), 98.7 (C-6), 164.3 (C-7), 93.5 (C-8), 156.1 (C-9), 103.9 (C-10), 121.2 (C-1'), 116.2 (C-2'), 144.8 (C-3'), 148.2 (C-4'), 115.2 (C-5'), 121.6 (C-6'), 100.9 (C-1''), 74.1 (C-2''), 76.5 (C-3''), 69.9 (C-4''), 77.6 (C-5''), 61.0 (C-6'')。以上数据与文献数据<sup>[23]</sup>进行对比, 鉴定化合物 **2** 为槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷。

化合物 **4**: 黄色粉末, TLC 薄层展开 UV 下为亮黄色, 盐酸-镁粉显色反应为紫红色, 故推断为黄酮类化合物, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.72 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.55 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.0 Hz, H-6'), 6.90 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.77 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.42 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 5.08 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-1''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 147.6 (C-2), 136.1 (C-3), 176.0 (C-4), 160.4 (C-5), 98.8 (C-6), 162.7 (C-7), 94.3 (C-8), 155.7 (C-9), 104.7 (C-10), 120.0 (C-1'), 115.6 (C-2'), 145.1 (C-3'), 147.9 (C-4'), 115.4 (C-5'), 121.8 (C-6'), 99.9 (C-1''), 73.1 (C-2''), 76.4 (C-3''), 69.6 (C-4''), 77.2 (C-5''), 60.6 (C-6'')。以上数据与文献数据<sup>[22]</sup>进行对比, 鉴定化合物 **4** 为棉花苷。

化合物 **5**: 黄色粉末, TLC 薄层展开 UV 下为亮黄色, 盐酸-镁粉显色反应为紫红色, 故推断为黄酮类化合物, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.98 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-2', 6'), 6.88 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-3', 5'), 6.41 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 5.31 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-1''), 4.37 (1H, s, H-1'''), 0.98 (3H, d, *J* = 6.2 Hz, H-6'''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 156.5 (C-2), 133.2 (C-3), 177.4 (C-4), 161.2 (C-5), 98.8 (C-6), 164.2 (C-7), 93.8 (C-8), 156.8 (C-9), 104.0 (C-10), 120.9 (C-1'), 130.9 (C-2'), 115.1 (C-3'), 159.9 (C-4'), 115.1 (C-5'), 130.9 (C-6'), 100.8 (C-1''), 74.2 (C-2''), 75.7 (C-3''), 69.9 (C-4''), 76.4 (C-5''), 66.9 (C-6''), 101.3 (C-1'''), 70.3 (C-2'''), 70.3 (C-3'''), 71.8 (C-4'''), 68.2 (C-5'''), 17.7 (C-6''')。以上数据与文献数据<sup>[24]</sup>进行对比, 鉴定化合物 **5** 为烟花苷。

化合物 **6**: 黄色粉末, TLC 薄层展开 UV 下为亮黄色, 盐酸-镁粉显色反应为紫红色, 故推断为黄酮类化合物, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.83 (1H, s, H-2'), 7.49 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.34 (1H, s, H-8), 6.12 (1H, s, H-6), 5.39 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-1''), 4.40 (1H, s, H-1'''), 3.81 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 0.96 (3H, d, *J* = 6.1 Hz, H-6'''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 156.6 (C-2), 132.9 (C-3), 177.2 (C-4), 161.1 (C-5), 100.9 (C-6), 166.3 (C-7), 94.0 (C-8), 156.2 (C-9), 103.5 (C-10), 121.1 (C-1'), 113.3 (C-2'), 146.9 (C-3'), 149.4 (C-4'), 115.3 (C-5'), 122.2 (C-6'), 55.7 (3'-OCH<sub>3</sub>), 101.4 (C-1''), 74.3 (C-2''), 76.4 (C-3''), 70.1 (C-4''), 75.9 (C-5''), 66.9 (C-6''), 100.9 (C-1'''), 70.3 (C-2'''), 70.6 (C-3'''), 71.8 (C-4'''), 68.3 (C-5'''), 17.7 (C-6''')。以上数据与文献数据<sup>[25]</sup>进行对比, 鉴定化合物 **6** 为水仙苷。

化合物 **7**: 黄色粉末, TLC 薄层展开 UV 下为亮黄色, 盐酸-镁粉显色反应为紫红色, 故推断为黄酮类化合物, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.53 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6'), 7.52 (1H, s, H-2'), 6.83 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.38 (1H, s, H-8), 6.18 (1H, s, H-6), 5.33 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-1''), 4.37 (1H, s, H-1'''), 0.98 (1H, d, *J* = 6.2 Hz, H-6'''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 156.6 (C-2), 133.3 (C-3), 177.4 (C-4), 161.2 (C-5), 98.7 (C-6), 164.1 (C-7), 93.6 (C-8), 156.4 (C-9), 104.0 (C-10), 121.2 (C-1'), 116.3

(C-2'), 144.8 (C-3'), 148.4 (C-4'), 115.2 (C-5'), 121.6 (C-6'), 100.7 (C-1''), 74.1 (C-2''), 75.9 (C-3''), 70.0 (C-4''), 76.5 (C-5''), 67.0 (C-6''), 101.2 (C-1'''), 70.6 (C-2'''), 70.4 (C-3'''), 71.9 (C-4'''), 68.2 (C-5'''), 17.7 (C-6'''). 以上数据与文献数据<sup>[26]</sup>进行对比, 鉴定化合物 **7** 为芦丁。

化合物 **8**: 黄色粉末, TLC 薄层展开 UV 下为亮黄色, 盐酸-镁粉显色反应为紫红色, 故推断为黄酮类化合物, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.56 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6'), 7.55 (1H, s, H-2'), 6.77 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.20 (1H, s, H-8), 6.01 (1H, s, H-6), 5.39 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-1''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 142.3 (C-2), 133.2 (C-3), 175.0 (C-4), 156.6 (C-5), 99.5 (C-6), 161.1 (C-7), 94.0 (C-8), 158.7 (C-9), 109.6 (C-10), 121.7 (C-1'), 115.2 (C-2'), 145.0 (C-3'), 145.0 (C-4'), 115.3 (C-5'), 116.0 (C-6'), 101.3 (C-1''), 74.2 (C-2''), 76.6 (C-3''), 70.0 (C-4''), 77.5 (C-5''), 61.0 (C-6''). 以上数据与文献数据<sup>[27]</sup>进行对比, 鉴定化合物 **8** 为槲皮素-5-*O*-葡萄糖苷。

化合物 **9**: 黄色粉末, TLC 薄层展开 UV 下为亮黄色, 盐酸-镁粉显色反应为紫红色, 故推断为黄酮类化合物, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.41 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6'), 7.37 (1H, s, H-2'), 6.85 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.72 (2H, s, H-3, 8), 6.35 (1H, s, H-6), 5.23 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, H-1''), 5.11 (1H, s, H-1'''), 1.19 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, H-6'''); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 164.6 (C-2), 103.0 (C-3), 181.8 (C-4), 162.5 (C-5), 99.3 (C-6), 161.2 (C-7), 94.4 (C-8), 157.0 (C-9), 105.4 (C-10), 120.7 (C-1'), 113.2 (C-2'), 146.0 (C-3'), 150.7 (C-4'), 116.0 (C-5'), 119.3 (C-6'), 97.8 (C-1''), 77.0 (C-2''), 76.3 (C-3''), 70.4 (C-4''), 77.2 (C-5''), 60.5 (C-6''), 100.5 (C-1'''), 69.7 (C-2'''), 70.5 (C-3'''), 71.9 (C-4'''), 68.4 (C-5'''), 18.1 (C-6'''). 以上数据与文献数据<sup>[28]</sup>进行对比, 鉴定化合物 **9** 为木犀草素-7-*O*-新橙皮糖苷。

## 5 体外抗肿瘤活性

将 SMCC 7721 细胞和 HuH7 细胞接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 200 μL (含有 1×10<sup>5</sup> 个肿瘤细胞), 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中, 并且在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中, 培养 24 h, 加入不同质量浓度 (100、75、50、25、0 mg/mL) 的黄酮苷类化合物, 继续培养 48 h; 实验结束前 4 h 加 20 μL 的 MTT (5 mg/mL), 继续在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件

下孵育 4 h, 吸取培养液后加入二甲基亚砷 150 μL, 振荡至结晶完全溶解, 然后于酶标仪检测其吸光度 (*A*) 值, 检测波长 570 nm, 参考波长 630 nm, 根据吸光值计算黄酮苷类化合物对 SMCC 7721 和 HuH7 细胞的抑制率及 IC<sub>50</sub>。

$$\text{抑制率} = 1 - A/A_0$$

*A*<sub>0</sub> 为空白组 *A* 值; *A* 为样品组 *A* 值

共检测了 12 个金银花黄酮苷类化合物的抗肝癌活性, 包括此前从金银花中分离的 3 个黄酮苷类化合物, 分别为紫云英苷、槲皮素-3-*O*-(6-香豆酰基)-β-*D*-葡萄糖苷和异鼠李素-3-*O*-(6-香豆酰基)-β-*D*-葡萄糖苷<sup>[17,19]</sup>。实验结果发现, 紫云英苷和槲皮素-3-*O*-(6-香豆酰基)-β-*D*-葡萄糖苷对 SMCC 7721 细胞有显著的抑制活性, IC<sub>50</sub> 值分别为 (66.4±2.9)、(73.5±4.8) μmol/L, 其他 10 个化合物的 IC<sub>50</sub> 值均大于 100 μmol/L。而对 HuH7 细胞, 槲皮素-3-*O*-(6-香豆酰基)-β-*D*-葡萄糖苷和 3,5-二羟基-3'-甲氧基黄酮-7-*O*-葡萄糖苷 (**1**) 显示出优异的抗肝癌活性, IC<sub>50</sub> 值分别为 (75.7±2.7)、(43.4±1.1) μmol/L, 其余 10 个化合物的 IC<sub>50</sub> 值均大于 100 μmol/L。

## 6 讨论

本研究从金银花正丁醇部位分离鉴定了 9 个黄酮苷类化合物, 其中化合物 **1** 和 **3** 为新化合物, 其他化合物 (除化合物 **7** 以外) 均为首次从该属植物中分离得到。在此前的研究中, 课题组已经从金银花中分离鉴定了 18 个黄酮类化合物, 包括 3 个黄酮苷类<sup>[17,19]</sup>, 并验证了金银花黄酮类化合物具有较好的抗肝癌活性, 其中 japo flavone D 可通过诱导细胞发生凋亡发挥抗肝癌活性<sup>[21]</sup>。而本研究的结果进一步证明了黄酮类化合物的抗肝癌活性。金银花自古就有治疗“肝积”“肿毒”的记载<sup>[29]</sup>, 因此加强从金银花中分离鉴定药理活性显著的黄酮类成分研究是非常有意义的。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Ge L L, Xie Q J, Jiang Y Y, et al. Genus *Lonicera*: New drug discovery from traditional usage to modern chemical and pharmacological research [J]. *Phytomedicine*, 2022, 96: 153889.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 39 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1988: 236.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 230.
- [4] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草-9 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.

- [5] 郑依玲, 欧阳勇, 梅全喜, 等. 金银花在新型冠状病毒肺炎防治中的应用探析 [J]. 亚太传统医药, 2021, 17(7): 180-184.
- [6] 马青云, 刘辰, 杜海涛, 等. 基于高通量分子对接虚拟筛选 SARS-CoV-23CL 水解酶中药小分子抑制剂及抗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的中药及其复方预测 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1397-1405.
- [7] Lee E J, Kim J S, Kim H P, *et al.* Phenolic constituents from the flower buds of *Lonicera japonica* and their 5-lipoxygenase inhibitory activities [J]. *Food Chem*, 2010, 120(1): 134-139.
- [8] Wang Z, Clifford M N, Sharp P. Analysis of chlorogenic acids in beverages prepared from Chinese health foods and investigation, *in vitro*, of effects on glucose absorption in cultured Caco-2 cells [J]. *Food Chem*, 2008, 108(1): 369-373.
- [9] Lee S Y, Hwang E J, Kim G H, *et al.* Antifungal and antioxidant activities of extracts from leaves and flowers of *Camellia japonica* L [J]. *Korean J Med Crop Sci*, 2005, 13(3): 93-100.
- [10] Shang X, Pan H, Li M X, *et al.* *Lonicera japonica* Thunb.: Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 138(1): 1-21.
- [11] Tae J, Han S W, Yoo J Y, *et al.* Anti-inflammatory effect of *Lonicera japonica* in proteinase-activated receptor 2-mediated paw edema [J]. *Clin Chim Acta*, 2003, 330(1/2): 165-171.
- [12] Xiong J, Li S, Wang W, *et al.* Screening and identification of the antibacterial bioactive compounds from *Lonicera japonica* Thunb. leaves [J]. *Food Chem*, 2013, 138(1): 327-333.
- [13] Yoo H J, Kang H J, Song Y S, *et al.* Anti-angiogenic, antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Lonicera japonica* extract [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 60(6): 779-786.
- [14] Kumar N, Singh B, Bhandari P, *et al.* Biflavonoids from *Lonicera japonica* [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(23): 2740-2744.
- [15] Kuroda M, Shizume T, Mimaki Y. Triterpene glycosides from the stems and leaves of *Lonicera japonica* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2014, 62(1): 92-96.
- [16] Yu Y, Zhu C G, Wang S J, *et al.* Homosecoiridoid alkaloids with amino acid units from the flower buds of *Lonicera japonica* [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(12): 2226-2233.
- [17] Ge L L, Li J M, Wan H Q, *et al.* Novel flavonoids from *Lonicera japonica* flower buds and validation of their anti-hepatoma and hepatoprotective activity *in vitro* studies [J]. *Ind Crops Prod*, 2018, 125: 114-122.
- [18] Han M H, Lee W S, Nagappan A, *et al.* Flavonoids isolated from flowers of *Lonicera japonica* Thunb. inhibit inflammatory responses in BV2 microglial cells by suppressing TNF- $\alpha$  and IL- $\beta$  through PI3K/Akt/NF-kb signaling pathways [J]. *Phytother Res*, 2016, 30(11): 1824-1832.
- [19] Ge L L, Xiao L Y, Wan H Q, *et al.* Chemical constituents from *Lonicera japonica* flower buds and their anti-hepatoma and anti-HBV activities [J]. *Bioorg Chem*, 2019, 92: 103198.
- [20] Ge L L, Wan H Q, Tang S M, *et al.* Novel caffeoylquinic acid derivatives from *Lonicera japonica* Thunb. flower buds exert pronounced anti-HBV activities [J]. *RSC Adv*, 2018, 8(62): 35374-35385.
- [21] Wan H Q, Ge L L, Li J M, *et al.* Effects of a novel biflavonoid of *Lonicera japonica* flower buds on modulating apoptosis under different oxidative conditions in hepatoma cells [J]. *Phytomedicine*, 2019, 57: 282-291.
- [22] 戴忠, 王钢力, 刘燕, 等. 思茅蛇菰的化学成分研究 II [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(14): 1131-1132.
- [23] Kauffmann A C, Sousa M C, Ribeiro T A N, *et al.* Compounds from the root bark of *Bowdichia virgilioides* [J]. *Chem Nat Compd*, 2021, 57(5): 927-928.
- [24] 崔莹. 寸节七化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(8): 1498-1501.
- [25] 杨茵, 李硕果, 叶文才, 等. 布渣叶的化学成分研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 2790-2792.
- [26] 吴琼, 华会明, 李占林. 仙人掌化学成分的分离与鉴定 [J]. 中国药物化学杂志, 2013, 23(2): 120-126.
- [27] 程卫强, 隋长惠, 袁久志, 等. 羽叶千里光黄酮类成分的研究 [J]. 中草药, 1999, 30(10): 727-729.
- [28] Gao B B, She G M, She D M. Chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Ligustrum* [J]. *Chem Biodivers*, 2013, 10(1): 96-128.
- [29] 清·顾世澄. 《疡医大全》(卷七) [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1994: 172.

[责任编辑 王文倩]