

· 化学与分析 ·

山东产忍冬藤乙酸乙酯部位化学成分分离鉴定

贾献慧¹, 唐文照¹, 李佳², 王岱杰³, 张永清^{2*}

(1. 山东省医学科学院 药物研究所, 国家卫生部生物技术药物重点实验室, 山东省罕见病重点实验室, 济南 250062; 2. 山东中医药大学 药学院, 济南 250355; 3. 山东省分析测试中心, 济南 250014)

[摘要] 目的:对山东道地药材忍冬藤的乙酸乙酯部位进行系统的化学成分研究。方法:将山东产忍冬藤药材 50 kg 粉碎成粗粉,加 70% 乙醇室温提取 3 次,合并提取液,滤过,将滤液减压浓缩得到忍冬藤浸膏,将浸膏加水分散,通过石油醚、乙酸乙酯、正丁醇分步萃取,得到其石油醚部位、乙酸乙酯部位和正丁醇部位。对其乙酸乙酯部分通过反复硅胶柱色谱, MCI-gel 树脂柱色谱, Sephadex LH-20 柱色谱等多种柱色谱技术进行化学成分的分离纯化,应用 TLC, HPLC 跟踪检测,结合重结晶技术,分离得到单体化合物。依据各化合物的理化性质和谱学数据鉴定其化学结构。结果:从山东产忍冬藤的乙酸乙酯部位中共分离得到并鉴定了 10 种化合物,分别为丁香酸(1), 乌苏酸(2), 松脂素(3), 齐墩果酸(4), 香叶木素(5), β -谷甾醇(6), 肉桂酸(7), 芹菜素(8), 木犀草素(9), 槲皮素(10)。结论:化合物 1~3 系首次从忍冬植物中分离得到,化合物 4~5 系首次从忍冬藤中分离得到。

[关键词] 忍冬藤; 乙酸乙酯部位; 丁香酸; 乌苏酸; 松脂素

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)04-0062-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017040062

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161129.1039.006.html>

[网络出版时间] 2016-11-29 10:39

Chemical Constituents from Ethyl Acetate Extract of *Lonicerae Japonicae Caulis*

JIA Xian-hui¹, TANG Wen-zhao¹, LI Jia², WANG Dai-jie³, ZHANG Yong-qing^{2*}

(1. Key Laboratory for Biotech-Drugs, Ministry of Health, Key Laboratory for Rare Diseases of Shandong Province, Institute of Materia Medica, Shandong Academy of Medical Sciences, Ji'nan 250062, China;
2. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;
3. Shandong Analysis and Test Center, Ji'nan 250014, China)

[Abstract] **Objective:** To study the chemical constituents of the ethyl acetate extract of *Lonicerae Japonicae Caulis* made in Shandong. **Method:** *Lonicerae Japonicae Caulis* made in Shandong was crushed into coarse powder, extracted by 70% ethanol, concentrated under reduced pressure, and then its ethyl acetate extract was gained by fractional extraction. Chemical compounds were isolated and purified by using repeated column chromatographies such as silica gel, MCI-gel resin, and Sephadex LH-20. Their structures were elucidated by spectral data and physicochemical properties. **Result:** Ten compounds were obtained and identified as syringic acid (1), ursolic acid (2), pinoresinol (3), oleanolic acid (4), diosmetin (5), β -sitosterol (6), cinnamic acid (7), apigenin (8), luteolin (9), and quercetin (10). **Conclusion:** Compounds 1-3 were isolated from *Lonicera*

[收稿日期] 20160628(014)

[基金项目] 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAI06B01);山东省医学科学院院级科技计划(2015-23);山东省医学科学院医药卫生科技创新工程项目

[第一作者] 贾献慧,博士,助理研究员,从事中药新药与质量研究, E-mail: imjxh@163.com

[通讯作者] * 张永清,博士,教授,博士生导师,从事中药资源及其质量控制研究, E-mail: zyzq622003@126.com

for the first time, and compounds **4-5** were isolated from *Lonicerae Japonicae Caulis* for the first time.

[**Key words**] *Lonicerae Japonicae Caulis*; ethyl acetate extract; syringic acid; ursolic acid; pinosresinol

忍冬藤^[1]属于临床常用中药,具有清热解毒、疏风通络的功效,常用于温病发热、热毒血痢、痈肿疮疡、风湿热痹、关节红肿热痛。目前对忍冬藤的研究主要集中在化学成分和药理活性上。根据查阅文献,发现忍冬藤与忍冬的花(金银花)具有相近的化学成分和药理活性,忍冬藤的化学成分^[2]主要包括有机酸类、环烯醚萜类、三萜类、黄酮类、挥发油类等,药理方面能解热、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、调节机体免疫等^[2-3]。另一方面,忍冬藤药材资源较金银花更为丰富,却不如金银花临床使用和开发利用广泛,价格也较为低廉。为进一步开发利用山东地区的忍冬藤药材资源,本实验前期对山东产忍冬植物的不同药用部位进行了抗氧化活性研究^[4],发现其不同药用部位、不同极性提取物均具有较好的抗氧化能力,乙酸乙酯萃取物清除能力最强,正丁醇萃取物次之。从忍冬藤中分离得到了对羟基肉桂酸甲酯、咖啡酸乙酯、咖啡酸甲酯、阿魏酸、咖啡酸、绿原酸^[5],进一步的体外抗氧化活性研究,发现这些化合物具有较强的抗氧化活性。

本文对忍冬藤抗氧化活性较强的乙酸乙酯部位进行了系统的化学成分分离,从中分离并鉴定了 10 个化合物,分别为丁香酸(**1**),乌苏酸(**2**),松脂素(**3**),齐墩果酸(**4**),香叶木素(**5**), β -谷甾醇(**6**),肉桂酸(**7**),芹菜素(**8**),木犀草素(**9**),槲皮素(**10**),其中化合物 **1~3** 系首次从忍冬植物中分离得到,**4~5** 系首次从忍冬藤中分离得到。其中化合物 **4** 已从忍冬的花中分离得到^[6],化合物 **5** 已从忍冬叶中分离得到^[7]。两者均未见自忍冬藤中分离得到。

1 材料

AVANCE 500 型超导核磁共振仪和 Esquire 3000 plus 型质谱仪(德国 Bruker 公司),1100LC-MSD 型液相色谱-质谱联用仪和 1100 系列高效液相分析仪(美国 Agilent 公司),N-2100 型旋转蒸发仪(日本东京理化器械株式会社),U-3000 型紫外-可见分光光度计(日本 Hitachi 公司),Scientz-10N 型真空冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司),ZF-2 型三用紫外分析仪(上海市安亭电子仪器厂)。

95% 乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、二氯甲烷、甲醇、无水硫酸钠、冰乙酸均为分析纯,甲醇、乙腈色谱纯,Methanol-*d*₄(氘代试剂,青岛腾龙微波科

技公司),DMSO-*d*₆(氘代试剂,青岛腾龙微波科技公司)。柱色谱用硅胶(200 ~ 300,300 ~ 400 目),G₂₅₄ 硅胶薄层板(青岛海洋化工厂),LH-20 型羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20,Amersham Biosciences 公司)。

忍冬藤采自山东双花制药公司金银花规范化种植基地,经山东中医药大学张永清教授鉴定为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* 的茎藤,标本存放于山东省医学科学院药物研究所。

2 分离与纯化

取山东产忍冬藤药材 50 kg,粉碎成粗粉,加 70% 乙醇提取 3 次,合并提取液,减压回收溶剂得浸膏。取浸膏加适量水分散,分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇分步萃取,得到石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物。取忍冬藤乙酸乙酯萃取物(391 g),加适量乙酸乙酯溶解后上硅胶柱色谱,以二氯甲烷-甲醇(100:0 ~ 1:1)梯度洗脱,以硅胶薄层色谱指导合并相同组分,得到 10 个流分 Fr. 1 ~ Fr. 10。组分 Fr. 4 上硅胶柱色谱,以二氯甲烷-甲醇(100:0 ~ 1:1)梯度洗脱,以硅胶薄层色谱合并相同组分,得到 176 个小瓶,对第 51,81,94,98 小瓶中粗析出物进行重结晶,得到化合物 **6**(8 mg),**7**(5 mg),**2**(50 mg),**4**(6 mg);对第 176 个小瓶组分进行反复硅胶柱色谱及 Sephadex LH-20 柱色谱,分离得到化合物 **1**(5 mg),**3**(4 mg),**5**(6 mg);组分 B6 经反复硅胶柱洗脱(石油醚-乙酸乙酯、二氯甲烷-甲醇系统),MCI 柱色谱,Sephadex LH-20 等,TLC,HPLC 跟踪检测,结合重结晶,分离得到化合物 **8**(7 mg),**9**(12 mg),**10**(6 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1** 白色羽状结晶(甲醇)。¹H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.52(1H, -COOH), 9.21(1H, s, 4-OH), 7.20(2H, s, H-2,6), 3.82(6H, s, 3,5-OCH₃)。 ¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 167.72(-COOH), 147.91(C-3,5), 140.65(C-4), 120.94(C-1), 107.36(C-2,6), 56.45(3,5-OCH₃),与文献[8]报道的丁香酸数据基本一致,故鉴定化合物为丁香酸(syringic acid)。

化合物 **2** 白色粉末。ESI-MS 457.3 [M + H]⁺。¹H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 5.76(1H, br s, H-12), 2.10(1H, d, *J* = 10.8 Hz, H-18),

0.67 (3H, s), 0.75 (3H, s), 0.87 (3H, s), 0.90 (3H, s), 0.91 (3H, s), 0.98 (3H, s), 1.04 (3H, s)。¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 38.7 (C-1), 27.5 (C-2), 77.3 (C-3), 38.9 (C-4), 55.3 (C-5), 18.5 (C-6), 33.2 (C-7), 38.9 (C-8), 47.3 (C-9), 36.8 (C-10), 23.3 (C-11), 125.1 (C-12), 138.7 (C-13), 41.8 (C-14), 28.0 (C-15), 24.3 (C-16), 42.1 (C-17), 52.9 (C-18), 39.0 (C-19), 39.4 (C-20), 30.7 (C-21), 37.0 (C-22), 28.7 (C-23), 15.7 (C-24), 16.6 (C-25), 17.4 (C-26), 23.8 (C-27), 178.7 (C-28), 17.5 (C-29), 21.5 (C-30), 以上波谱数据与文献[9]报道的乌苏酸的核磁数据基本一致,故鉴定化合物为乌苏酸(ursolic acid)。

化合物 3 无色油状物(甲醇), C₂₀H₃₂O₆。ESI-MS *m/z* 359.6 [M + H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.94 (2H, br s, H-2, 2'), 6.80 (2H, dd, *J* = 1.2, 8.3 Hz, H-6, 6'), 6.77 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, H-5, 5'), 4.70 (2H, d, *J* = 4.1 Hz, H-7, 7'), 4.22 (2H, m, H-9, 9'), 3.84 (6H, s, 3, 3'-OCH₃), 3.12 (2H, m, H-8, 8')。¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 148.51 (C-3, 3'), 146.39 (C-4, 4'), 132.72 (C-1, 1'), 120.84 (C-6, 6'), 115.62 (C-5, 5'), 110.70 (C-2, 2'), 85.63 (C-7, 7'), 71.37 (C-9, 9'), 56.45 (3, 3'-OCH₃), 54.06 (C-8, 8'), 与参考文献[10]报道的松脂素数据基本一致,故鉴定化合物为松脂素(pinoresinol)。

化合物 4 白色粉末, C₃₀H₄₈O₃。ESI-MS *m/z* 457.3 [M + H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.0 (OH), 5.15 (1H, br s, H-12), 3.17 (1H, br s, H-3), 0.72 (3H, s), 0.81 (3H, s), 0.82 (3H, s), 0.87 (3H, s), 0.90 (3H, s), 0.91 (3H, s), 1.09 (3H, s)。¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 37.0 (C-1), 27.5 (C-2), 77.3 (C-3), 38.6 (C-4), 55.3 (C-5), 16.6 (C-6), 32.6 (C-7), 41.3 (C-8), 49.1 (C-9), 36.8 (C-10), 23.8 (C-11), 122.0 (C-12), 144.3 (C-13), 42.1 (C-14), 27.7 (C-15), 23.1 (C-16), 47.5 (C-17), 41.8 (C-18), 45.9 (C-19), 28.7 (C-20), 33.3 (C-21), 32.9 (C-22), 28.0 (C-23), 15.7 (C-24), 15.6 (C-25), 16.5 (C-26), 26.1 (C-27), 179.0 (C-28), 30.9 (C-29), 17.32 (C-30), 以上波谱数据与文献[6,11]报道的齐墩果酸的核磁数据基本一致,故鉴定化合物为齐墩果酸(oleanolic acid)。

化合物 5 淡黄色粉末, C₁₆H₁₂O₆。ESI-MS *m/z* 299.0 [M - H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.98 (1H, s, 5-OH), 7.57 (1H, d, H-6'), 7.42 (1H, br s, H-2'), 7.07 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 6.53 (1H, br s, H-8), 6.21 (1H, br s, H-6), 3.84 (4'-OCH₃)。¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 182.28 (C-4), 164.64 (C-2), 164.15 (C-7), 161.91 (C-5), 157.81 (C-9), 151.22 (C-3'), 148.00 (C-4'), 121.99 (C-1'), 119.11 (C-6'), 116.26 (C-5'), 110.91 (C-2'), 104.18 (C-10), 103.69 (C-3), 99.31 (C-6), 94.53 (C-8), 56.09 (4'-OCH₃), 与文献[7]报道的香叶木素数据基本一致,故鉴定化合物为香叶木素(diosmetin)。

化合物 6, 7 均为白色粉末。分别与 β-谷甾醇、肉桂酸已知对照品同一薄层色谱分析,经石油醚-乙酸乙酯、石油醚-丙酮、环己烷-丙酮 3 种溶剂系统展开、检测,色谱行为及 R_f 值均与对照品一致,故分别鉴定化合物 6, 7 为 β-谷甾醇(β-sitosterol), 肉桂酸(cinnamic acid)。

化合物 8 淡黄色粉末, Mg-HCl 反应阳性。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.97 (1H, s, 5-OH), 10.83 (1H, s, 7-OH), 10.36 (1H, s, 4'-OH), 7.93 (2H, d, *J* = 7.6 Hz, H-2', 6'), 6.93 (2H, d, *J* = 7.6 Hz, H-3', 5'), 6.79 (1H, s, 3-H), 6.49 (1H, s, H-8), 6.20 (1H, s, H-6)。¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 182.22 (C-4), 164.59 (C-7), 164.21 (C-2), 161.92 (C-5), 161.64 (C-9), 157.78 (C-4'), 128.94 (C-2', 6'), 121.65 (C-1'), 116.43 (C-3', 5'), 104.17 (C-3), 103.32 (C-10), 99.30 (C-6), 94.43 (C-8)。以上数据与文献[12]报道的芹菜素数据基本一致,故鉴定化合物为芹菜素(apigenin)。

化合物 9 淡黄色粉末, Mg-HCl 反应阳性。ESI-MS *m/z* 285.2 [M - H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.98 (1H, s, OH-5), 10.80 (1H, br s, OH-3'), 9.52 (2H, br s, OH-7, 4'), 7.41 (1H, s, H-6'), 7.41 (1H, s, H-2'), 6.90 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-5'), 6.68 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, s, H-8), 6.20 (1H, s, H-6)。¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 182.11 (C-4), 164.60 (C-7), 164.35 (C-5), 161.94 (C-9), 157.75 (C-3'), 150.16 (C-2), 146.20 (C-4'), 121.97 (C-1'), 119.44 (C-6'), 116.48 (C-2'), 113.84 (C-5'), 104.16 (C-10), 103.33 (C-3), 99.29 (C-6),

94.30 (C-8)。以上数据与文献[13]报道的木犀草素数据基本一致,故鉴定化合物为木犀草素(luteolin)。

化合物 **10** 黄色粉末, Mg-HCl 反应阳性。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.50 (1H, s, OH-5), 7.68 (1H, br s, H-2'), 7.68 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6'), 6.89 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 6.41 (1H, br s, H-8), 6.19 (1H, br s, H-6)。¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 176.30 (C-4), 164.35 (C-7), 161.18 (C-9), 156.60 (C-5), 148.16 (C-3'), 147.27 (C-2), 145.52 (C-4'), 136.19 (C-1'), 122.42 (C-3), 120.43 (C-6'), 116.06 (C-2'), 115.53 (C-5'), 103.47 (C-10), 98.64 (C-6), 93.81 (C-8)。以上数据与文献[14]报道的槲皮素数据基本一致,故鉴定化合物为槲皮素(queracetin)。

4 讨论

为充分开发利用山东地区丰富的忍冬藤药材资源,本实验对山东产忍冬藤乙酸乙酯部分进行了化学成分研究和抗氧化活性初步研究,共分离得到 10 个化合物,其中 3 个化合物系首次从本植物中分离得到,2 个化合物系首次从忍冬藤中分离得到。以维生素 C 为阳性,利用 DPPH 比色法对忍冬藤乙酸乙酯粗提物和分离得到的单体化合物进行体外抗氧化活性研究,发现忍冬藤乙酸乙酯粗提物以及单体化合物丁香酸、肉桂酸、香叶木素、芹菜素、木犀草素、槲皮素的抗氧化能力较强,而乌苏酸、齐墩果酸和 β-谷甾醇的抗氧化能力较弱,可以看出其中的黄酮类成分和有机酸类成分抗氧化活性较强,推测忍冬藤化学成分的抗氧化活性应该与其含有的活泼酚羟基有关。本研究将为忍冬藤的进一步开发利用和临床应用提供科学依据,同时表明忍冬藤是一种

具有进一步开发利用和研究价值的天然抗氧化剂。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:193,221.

[2] 鲁思爱. 忍冬藤的化学成分及其药理应用研究进展[J]. 临沂大学学报,2012,34(3): 132-134.

[3] 庄丽,张超,阿里穆斯. 金银花的药理作用与临床应用研究进展[J]. 辽宁中医杂志,2013,40(2): 378-380.

[4] 贾献慧,张永清,李佳. 山东产忍冬不同药用部位挥发油成分分析及抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(20):59-62.

[5] 贾献慧,王晓,张永清. 忍冬藤酚酸类化学成分分离[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(5):69-71.

[6] 王琦. 金银花的化学成分研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2008.

[7] 王岱杰. 忍冬叶化学成分及其抗 H5 亚型禽流感病毒研究[D]. 济南:山东农业大学,2013.

[8] 毕跃峰,郑晓珂,冯卫生,等. 卷柏中化学成分的分离与结构鉴定[J]. 药学学报,2004,39(1):41-45.

[9] 路芳,巴晓雨,何永志. 仙鹤草的化学成分研究[J]. 中草药,2012,43(5):851-855.

[10] 郭晓宇,王乃利,姚新生. 云南石仙桃的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报,2006,23(4):205-207.

[11] 曹百一,刘润祥,王晶,等. 梔子根化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2011,28(10):784-787.

[12] 何枢衡,张伟,葛丹丹,等. 中药半枝莲黄酮类成分的分离与结构鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2011,28(3):171-174.

[13] 刘伟,白素平,梁会娟,等. 小叶忍冬藤的化学成分研究[J]. 中草药,2010,41(7):1065-1067.

[14] 殷志琦,叶文才,赵守训. 国产贯叶连翘化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报,2002,33(4):277-279.

[责任编辑 顾雪竹]