

# 铁皮石斛叶中黄酮碳苷类成分分离、鉴定及抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性研究<sup>Δ</sup>

冯海林<sup>\*</sup>, 彭崇胜<sup>#a</sup>, 李晓波<sup>#b</sup>(上海交通大学药学院, 上海 200240)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)18-2187-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.18.03



**摘要** 目的 分离、鉴定铁皮石斛叶中的黄酮碳苷类成分,并评价其体外抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性。方法 采用大孔吸附树脂和制备型高效液相色谱法对铁皮石斛叶中的黄酮碳苷类成分进行分离和纯化,通过紫外光谱、核磁共振、高分辨电喷雾离子化质谱等波谱方法对化合物进行推导和鉴定。考察黄酮碳苷类成分与阳性对照(阿卡波糖)的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶体外抑制活性。结果 从铁皮石斛叶中分离得到5个芹菜素-6,8-C-二糖苷,鉴定为芹菜素-6-C- $\alpha$ -L-鼠李糖-8-C- $\beta$ -D-异鼠李糖(1)、夏佛塔苷(2)、异夏佛塔苷(3)、异佛莱心苷(4)和佛莱心苷(5)。化合物1~5和阿卡波糖抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的半数抑制浓度分别为(1.79 $\pm$ 1.27)、(2.05 $\pm$ 0.72)、(1.93 $\pm$ 0.67)、(1.09 $\pm$ 0.46)、(1.36 $\pm$ 0.58)、(18.69 $\pm$ 1.24) $\mu$ mol/L。结论 从铁皮石斛叶中分离得到5个具有 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的芹菜素-6,8-C-二糖苷类成分,其中化合物1为新化合物,化合物2首次从该植物中分离得到。

**关键词** 铁皮石斛叶;黄酮碳苷类;芹菜素-6-C- $\alpha$ -L-鼠李糖-8-C- $\beta$ -D-异鼠李糖; $\alpha$ -葡萄糖苷酶

## Study on the separation and identification of flavone C-glycosides from the leaves of *Dendrobium officinale* and their inhibitory activities to $\alpha$ -glucosidase

FENG Hailin, PENG Chongsheng, LI Xiaobo (School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To separate and identify the flavone C-glycosides from the leaves of *Dendrobium officinale*, and to evaluate their *in vitro* inhibitory activities to  $\alpha$ -glucosidase. **METHODS** The flavone C-glycosides from the leaves of *D. officinale* were separated and purified by macroporous adsorption resin and preparative high-performance liquid chromatography. The structure of obtained compound was elucidated and identified by spectroscopic methods, such as ultraviolet spectrum, nuclear magnetic resonance, high-resolution electrospray ionization mass spectrometry, etc. The *in vitro* inhibitory activities of flavone C-glycosides and positive control (acarbose) to  $\alpha$ -glucosidase were investigated. **RESULTS** Five apigenin-6,8-di-C-glycosides were isolated and purified from the leaves of *D. officinale*, and identified as apigenin-6-C- $\alpha$ -L-rhamnosyl-8-C- $\beta$ -D-quinovoside(1), schaftoside(2), isoschaftoside(3), isoviolanthin(4) and violanthin(5). Half inhibitory concentration of compound 1-5 and acarbose inhibiting  $\alpha$ -glucosidase were (1.79 $\pm$ 1.27), (2.05 $\pm$ 0.72), (1.93 $\pm$ 0.67), (1.09 $\pm$ 0.46), (1.36 $\pm$ 0.58), (18.69 $\pm$ 1.24)  $\mu$ mol/L, respectively. **CONCLUSIONS** Five apigenin-6,8-di-C-glycosides with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity are isolated from the leaves of *D. officinale*, of which compound 1 is a new compound and compound 2 is isolated from this plant for the first time.

**KEYWORDS** the leaves of *Dendrobium officinale*; flavone C-glycoside; apigenin-6-C- $\alpha$ -L-rhamnosyl-8-C- $\beta$ -D-quinovoside;  $\alpha$ -glucosidase

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 是兰科石斛属多年生草本植物,药用历史悠久,是石斛药材来源的主要品种之一<sup>[1]</sup>。铁皮石斛的传统药用部位是茎,具有益胃生津、滋阴清热的功效,可用于治疗热病津

伤、口干烦渴、阴虚火旺、骨蒸劳热等证<sup>[2]</sup>。铁皮石斛叶与茎的化学成分相似<sup>[3]</sup>,具有良好的降血糖<sup>[3]</sup>、抗氧化<sup>[4]</sup>等功效,但其降血糖的活性成分还未完全阐明。有研究发现,石斛属植物是小分子 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的重要来源,例如:美花石斛茎中的菲类和芪类成分(loddigesinols G~J)<sup>[5]</sup>、曲轴石斛中的新型苜-二氢菲类(dendrogibsol)和二氢菲成分(lusianthridin)<sup>[6]</sup>、铁皮石斛茎中的菲类成分(3,4-二羟基-4',5-二甲氧基联苯和 dendrocandin U)<sup>[7]</sup>,提示石斛属植物中小分子成分可能通过抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性发挥降血糖作用。然而,铁皮石斛叶中含量丰

<sup>Δ</sup>基金项目 国家重点研发计划项目(No.2017YFC1701904-6)

<sup>\*</sup> 第一作者 硕士研究生。研究方向:中药药效物质。E-mail: 1246353552@qq.com

<sup>#a</sup> 通信作者 副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药药效物质及作用机制。电话:021-34207064。E-mail: cspeng@sjtu.edu.cn

<sup>#b</sup> 通信作者 教授,博士生导师,博士。研究方向:中药药效物质及作用机制。电话:021-34204806。E-mail: xbli@sjtu.edu.cn

富的黄酮碳苷类成分<sup>[3]</sup>对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性尚未见报道。为了解铁皮石斛叶中黄酮碳苷类成分对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的影响,本研究采用大孔吸附树脂和制备型高效液相色谱(HPLC)法对铁皮石斛叶中的黄酮碳苷类成分进行分离和纯化,通过紫外光谱(UV)、核磁共振(NMR)、高分辨电喷雾离子质谱(HR-ESI-MS)等波谱方法对化合物结构进行推导和鉴定;通过体外实验方法评价各化合物的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有 Bruker AVANCE 600 型 NMR 波谱仪(美国 Bruker BioSpin 公司), 6545 型四极杆-飞行时间质谱仪、1200 型 HPLC 仪、1260 Infinity II 制备型 HPLC 仪(美国 Agilent 公司), Nicolet 6700 型红外光谱(IR)仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), UV-1102 型紫外可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司), P-2000 型旋光仪、J-1500 型圆二色光谱仪(日本 JASCO 公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

铁皮石斛叶由浙江铁枫堂生物科技股份有限公司提供,经上海交通大学药学院彭崇胜副教授鉴定为兰科石斛属植物铁皮石斛 *D. officinale* Kimura et Migo 的叶。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(来源于酿酒酵母)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;对-硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(*p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, pNPG)购自上海麦克林生化科技有限公司;D101 型大孔吸附树脂(规格 0.3~1.2 mm)购自国药集团化学试剂有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS, pH6.81)购自北京雷根生物技术有限公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自上海易恩化学技术有限公司;阿卡波糖片(批号 BJ60665, 规格 50 mg)购自拜耳医药保健有限公司;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 提取分离

取干燥的铁皮石斛叶 250 g,粉碎,加 20 倍量(mL/g)纯水,加热回流提取 2 次,每次 2 h。水提物趁热过滤后减压浓缩至 800 mL,再用无水乙醇室温醇沉 24 h;将醇沉后的上清液抽滤,滤液减压浓缩至 250 mL,经 D101 型大孔吸附树脂吸附,以甲醇-水(0:10、1:9、1:4、3:7、3:2、19:1, *V/V*)梯度洗脱,减压浓缩并真空干燥得 6 个主流分(Fr.1~Fr.6)。Fr.2~Fr.3 采用制备型 HPLC 仪纯化得到以下化合物:化合物 1[45 mg,由 Fr.2 经甲醇-水(50:50, *V/V*)洗脱所得]、化合物 2[13 mg,由 Fr.2 经甲醇-水(50:50, *V/V*)洗脱所得]、化合物 3[14 mg,由 Fr.3 经甲醇-

水(50:50, *V/V*)洗脱所得]、化合物 4[25 mg,由 Fr.3 经甲醇-水(50:50, *V/V*)洗脱所得]、化合物 5[11 mg,由 Fr.3 经甲醇-水(50:50, *V/V*)洗脱所得]。

### 2.2 化合物 1~5 的结构式

采用 HR-ESI-MS、UV、IR,一维/二维 NMR 谱和圆二色光谱等方法推导了化合物 1 的结构式;通过测定 HR-ESI-MS 和 NMR 氢谱、碳谱(<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR),并与文献比较,鉴定了化合物 2~5 的结构。化合物 1~5 的结构式见图 1。

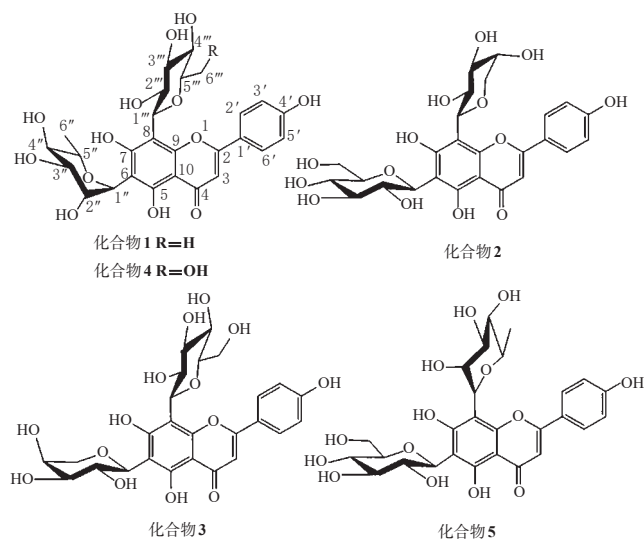


图 1 化合物 1~5 的结构式

**2.2.1 化合物 1** 化合物 1 为淡黄色无定形粉末,易溶于甲醇, $[\alpha]_D^{25}$ -15.82(c 0.01, MeOH);UV 在波长 270、335 nm 处有最大吸收;IR 提示含有羟基(3 385  $\text{cm}^{-1}$ )、芳香环(1 629、1 575、836  $\text{cm}^{-1}$ )和芳香酮(1 648  $\text{cm}^{-1}$ )。推测化合物 1 为黄酮碳苷。HR-ESI-MS 显示质荷比(*m/z*)为 561.161 1[ $\text{M}-\text{H}$ ]<sup>-</sup>(计算值 561.161 4),可推出该化合物的分子式为  $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{13}$ 。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz)谱(表 1)在低场区显示出 5 组信号: $\delta_{\text{H}}$  14.04(1H, s, D<sub>2</sub>O 交换)为黄酮母核 5-OH 的特征信号; $\delta_{\text{H}}$  8.32(2H, d, *J*=8.8 Hz, H-2'/6')和  $\delta_{\text{H}}$  6.89(2H, d, *J*=8.8 Hz, H-3'/5')为 1 组 AA'BB' 耦合系统信号,提示结构中有对位取代苯环; $\delta_{\text{H}}$  6.81(1H, s)可归属黄酮母核上 H-3 的信号; $\delta_{\text{H}}$  10.25、6.08(各 1H, s, D<sub>2</sub>O 交换)提示黄酮母核上另有 2 个羟基取代; $\delta_{\text{H}}$  4.67、5.02(各 1H)是糖端基氢信号。上述数据提示化合物 1 为芹菜素 6,8-C-二糖苷,该化合物在 ESI-MS/MS 负离子模式下存在 1 组诊断离子(*m/z* 为 353.066 2、325.071 7、311.056 1、297.076 6),进一步确证了芹菜素 6,8-C-二糖苷的推断<sup>[8]</sup>。<sup>13</sup>C-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 150 MHz)谱(表 1)显示出 2 组糖基碳信号(10 个次甲基信号: $\delta_{\text{C}}$  67.8, 71.7, 71.8, 72.2, 73.8, 74.1, 74.5, 75.1, 75.8, 77.3; 2 个甲基信号: $\delta_{\text{C}}$  17.2, 18.3),提示结构中存在鼠李

糖和(或)异鼠李糖。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz)谱(表1)显示出1组信号[ $\delta_{\text{H}}$  8.32(2H, d,  $J=8.8$  Hz, H-2'/6'), 6.89(2H, d,  $J=8.8$  Hz, H-3'/5'), 6.81(1H, s, H-3), 5.02(1H, s, H-1''), 1.25(3H, d,  $J=5.5$  Hz, H-6'')],与文献[9]报告的芹菜素-6-*C*- $\alpha$ -L-鼠李糖一致,提示结构中具有6-*C*- $\alpha$ -L-鼠李糖基取代。与6-*C*- $\alpha$ -L-鼠李糖基芹菜素<sup>[6]</sup>比较,化合物1的<sup>1</sup>H-NMR数据多出1组脱氧己糖信号[ $\delta_{\text{H}}$  4.67(1H, d,  $J=9.8$  Hz, H-1'''), 1.18(3H, d,  $J=6.2$  Hz, H-6''')],而无H-8信号。因此,化合物1的结构可能是芹菜素-6-*C*- $\alpha$ -L-鼠李糖-8-*C*- $\alpha$ -L-鼠李糖或芹菜素-6-*C*- $\alpha$ -L-鼠李糖-8-*C*- $\alpha$ -L-异鼠李糖。二级质谱中观察到化合物1连续脱去C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>和C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>中性碎片而产生 *m/z* 分别为487.124 5和457.113 7的离子<sup>[8]</sup>;碎片离子 *m/z* 457.113 7继续脱去C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O、C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>和C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>中性碎片分别产生 *m/z* 分别为413.087 7、383.077 1和353.066 2的离子,确证该化合物为6,8-*C*-二糖苷的推断。进一步分析化合物1的<sup>1</sup>H-NMR数据发现,8位糖基的端基氢信号[ $\delta_{\text{H}}$  4.67(1H, 9.8 Hz)]与abyssionside A的8-*C*- $\beta$ -D-异鼠李糖基<sup>[10]</sup>一致,而与香叶木素的8-*C*- $\alpha$ -L-鼠李糖基[ $\delta_{\text{H}}$  5.43(2H, br s)]显著不同<sup>[11]</sup>。因此,推测化合物1的结构为芹菜素-6-*C*- $\alpha$ -L-鼠李糖-8-*C*- $\beta$ -D-异鼠李糖。

表1 化合物1的<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz)和<sup>13</sup>C-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 150 MHz)数据

C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ mult. (J/Hz)	C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ mult. (J/Hz)
2	164.4		C <sub>6</sub> -Quin/Glc		
3	101.8	6.81, 1H, s	1'''	73.8	4.67, 1H, d, (9.8)
4	182.3		2'''	67.8	4.18, 1H, t, (9.8) <sup>a</sup>
5	157.2		3'''	75.8	3.42, 1H, dd, (9.8, 4.0) <sup>a</sup>
6	107.0		4'''	71.7	3.65, 1H, br d, (4.0) <sup>a</sup>
7	162.2		5'''	75.1	3.64, 1H, br t, (6.2) <sup>a</sup>
8	105.1		6'''	17.2	1.18, 3H, d, (6.2)
9	155.2		5-OH		14.04, 1H, s
10	103.3		7/4'-OH		10.25, 6.08各1H, s
1'	121.1		3'-OH		4.98, 1H, br s
2'/6'	129.9	8.32, 2H, d, (8.8)	4'-OH		4.95, 1H, br d, (3.9)
3'/5'	116.1	6.89, 2H, d, (8.8)	2''-OH		4.53, 1H, br s
4'	161.3		3''-OH		4.69, 1H, br d, (6.2)
C <sub>6</sub> -Rha			4''-OH		4.78, 1H, br s
1''	74.5	5.02, 1H, s			
2''	72.2	3.81, 1H, d, (3.0) <sup>a</sup>			
3''	74.1	3.45, 1H, dd, (8.8, 3.0) <sup>a</sup>			
4''	71.8	3.30, 1H, m			
5''	77.3	3.31, 1H, m			
6''	18.3	1.25, 3H, d, (5.5)			

a: D<sub>2</sub>O交换后在DMSO-*d*<sub>6</sub>中检测到的信号

异核多键相关(heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy, HMBC)谱中观察到5-OH的氢信号与C-5、C-6、C-7和6-*C*- $\alpha$ -L-鼠李糖基的C-1''相关;而6-*C*- $\alpha$ -L-鼠李糖基的端基氢H-1''与C-5、C-6、C-7及6-*C*- $\alpha$ -L-鼠李糖基的C-2''、C-5''相关;8-*C*- $\beta$ -D-异鼠李糖基的端

基氢H-1'''与C-7、C-8、C-9及8-*C*- $\alpha$ -L-异鼠李糖基的C-2'''、C-3'''相关(图2)。图2给出了糖基部分氢原子相关光谱(<sup>1</sup>H correlation spectroscopy, <sup>1</sup>H COSY)信号,确认了氢信号归属。核欧沃豪斯效应谱(nuclear Overhauser effect spectroscopy, NOESY)中,H-2'/6'与8-*C*- $\beta$ -D-异鼠李糖基的H-1'''、H-2'''相关,进一步确证了8-*C*- $\beta$ -D-异鼠李糖基位置;而H-4'''与H-6'''相关,结合端基氢H-1'''与H-2'''之间的耦合常数( $J=9.8$  Hz)进一步确证了相对构型(图3)。化合物1的圆二色光谱结果显示,在波长275 nm处呈现负Cotton效应,与芹菜素-6-*C*- $\alpha$ -L-鼠李糖-8-*C*- $\beta$ -D-异鼠李糖的计算结果一致,支持8-*C*- $\beta$ -D-异鼠李糖的构型。二维NMR谱和圆二色光谱支持化合物1的结构为芹菜素-6-*C*- $\alpha$ -L-鼠李糖-8-*C*- $\beta$ -D-异鼠李糖。

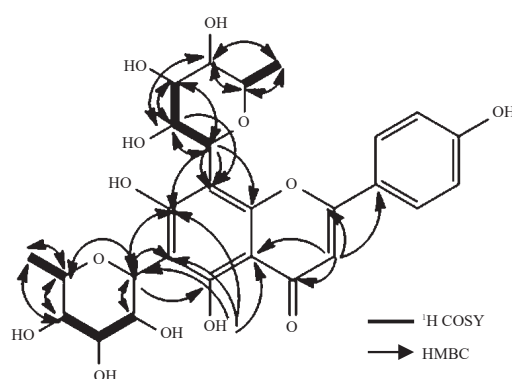


图2 化合物1的主要<sup>1</sup>H COSY和HMBC相关信号

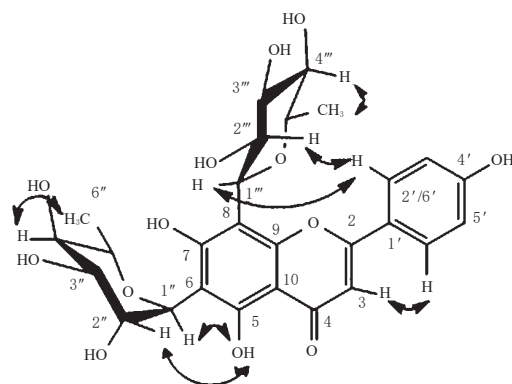


图3 化合物1的主要NOESY相关信号

2.2.2 化合物2 化合物2为淡黄色无定形粉末,UV在波长270、335 nm处有最大吸收,HR-ESI-MS显示 *m/z* 为563.141 1[M-H]<sup>-</sup>(计算值563.140 6),推测化合物的分子式为C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>O<sub>14</sub>。二级质谱给出1组诊断离子(*m/z* 为353.067 0、325.072 0、311.056 9、297.077 2),说明该化合物具有芹菜素-6,8-*C*-二糖苷结构<sup>[8]</sup>。碎片离子 *m/z* 353.067 0脱去1个C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>和1个C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>,未出现同时脱去2个C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>的情况,说明结构中存在1个六碳糖基和1个五碳糖基<sup>[5]</sup>。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz) $\delta_{\text{H}}$ : 13.74(1H, s, 加D<sub>2</sub>O后消失, 5-OH), 7.99(2H, d,  $J=8.8$  Hz, H-

2'/6'), 6.90(2H, d,  $J=8.8$  Hz, H-3'/5'), 6.75(1H, s, H-3), 5.01(1H, d,  $J=10.0$  Hz, H-1'''), 4.58(1H, d,  $J=9.7$  Hz, H-1'')。  $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 150 MHz) $\delta_{\text{c}}$ : 163.6(s, C-2), 102.6(d, C-3), 182.2(s, C-4), 159.2(s, C-5), 108.2(s, C-6), 161.2(s, C-7), 105.1(s, C-8), 155.2(s, C-9), 103.1(s, C-10), 121.7(s, C-1'), 128.8(d, C-2'/6'), 115.9(d, C-3'/5'), 160.0(s, C-4'), 73.8(d, C-1''), 70.4(d, C-2''), 78.9(d, C-3''), 71.1(d, C-4''), 81.9(d, C-5''), 61.3(d, C-6''), 75.0(d, C-1'''), 69.8(d, C-2'''), 73.9(d, C-3'''), 68.8(d, C-4'''), 70.6(d, C-5''')。以上数据与文献[12—13]基本一致,故鉴定化合物**2**为夏佛塔苷(schaftoside)。

**2.2.3 化合物3** 化合物**3**为淡黄色无定形粉末,UV在波长270、335 nm处有最大吸收,HR-ESI-MS显示  $m/z$  为563.141 1[M-H]<sup>-</sup>(计算值563.140 6),推测化合物的分子式为C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>O<sub>14</sub>,可能为化合物**2**的同分异构体。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) $\delta_{\text{H}}$ : 14.04(1H, s, 加D<sub>2</sub>O后消失, 5-OH), 10.29(1H, br s, 加D<sub>2</sub>O后消失, 7-OH), 8.32(2H, d,  $J=8.8$  Hz, H-2'/6'), 6.91(2H, d,  $J=8.8$  Hz, H-3'/5'), 6.83(1H, s, H-3), 4.76(1H, d,  $J=10.0$  Hz, H-1'''), 4.67(1H, d,  $J=9.8$  Hz, H-1'')。  $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 150 MHz) $\delta_{\text{c}}$ : 163.9(s, C-2), 102.8(d, C-3), 182.4(s, C-4), 159.0(s, C-5), 107.7(s, C-6), 161.3(s, C-7), 102.8(s, C-8), 154.9(s, C-9), 103.7(s, C-10), 121.5(s, C-1'), 128.7(d, C-2'/6'), 116.0(d, C-3'/5'), 161.3(s, C-4'), 74.0(d, C-1''), 69.2(d, C-2''), 78.9(d, C-3''), 71.1(d, C-4''), 81.2(d, C-5''), 60.1(d, C-6''), 74.0(d, C-1'''), 70.6(d, C-2'''), 78.1(d, C-3'''), 70.2(d, C-4'''), 81.2(d, C-5''')。以上数据与文献[12—13]基本一致,故鉴定化合物**3**为异夏佛塔苷(isoschaftoside)。

**2.2.4 化合物4** 化合物**4**为淡黄色无定形粉末,UV在波长270、335 nm处有最大吸收,HR-ESI-MS显示  $m/z$  为577.157 3[M-H]<sup>-</sup>(计算值577.156 3),推测化合物的分子式为C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub>。二级质谱给出1组诊断离子( $m/z$ 分别为297.077 8、325.073 0、353.067 9、383.078 8),说明该化合物具有芹菜素-6, 8-C-二糖苷结构<sup>[5]</sup>。碎片离子  $m/z$  473.110 6、457.115 7分别为母离子脱去1个C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>和1个C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>,说明结构中存在1个葡萄糖基和1个鼠李糖基<sup>[5]</sup>。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) $\delta_{\text{H}}$ : 13.91(1H, s, 加D<sub>2</sub>O后消失, 5-OH), 8.03(2H, d,  $J=8.8$  Hz, H-2'/6'), 6.90(2H, d,  $J=8.8$  Hz, H-3'/5'), 6.81(1H, s, H-3), 5.05(1H, s, H-1''), 4.73(1H, d,  $J=9.9$  Hz, H-1'''), 1.26(3H, d,  $J=5.2$  Hz, CH<sub>3</sub>-6'')。  $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 150 MHz) $\delta_{\text{c}}$ : 164.2(s, C-2), 102.5(s, C-3), 182.3(s, C-4), 157.3(s, C-5), 107.2(s, C-6), 162.1(s, C-7), 105.1(s, C-8),

155.2(s, C-9), 103.3(s, C-10), 121.6(s, C-1'), 129.1(d, C-2'/6'), 116.0(d, C-3'/5'), 161.3(s, C-4'), 74.5(s, C-1''), 72.3(d, C-2''), 74.2(d, C-3''), 71.8(d, C-4''), 77.4(d, C-5''), 18.3(d, C-6''), 73.4(d, C-1'''), 70.9(d, C-2'''), 78.8(d, C-3'''), 70.7(d, C-4'''), 82.0(d, C-5'''), 61.5(d, C-6''')。以上数据与文献[14—15]的基本一致,故鉴定化合物**4**为异佛莱心苷(isoviolanthin)。

**2.2.5 化合物5** 化合物**5**为淡黄色无定形粉末,UV在波长270、335 nm处有最大吸收,HR-ESI-MS显示  $m/z$  为577.156 8[M-H]<sup>-</sup>(计算值577.156 3),推测化合物的分子式为C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub>,可能为化合物**4**的同分异构体。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) $\delta_{\text{H}}$ : 13.67(1H, s, 加D<sub>2</sub>O后消失, 5-OH), 7.82(2H, d,  $J=8.0$  Hz, H-2'/6'), 6.91(各2H, d,  $J=8.0$  Hz, H-3'/5'), 6.60(1H, s, H-3), 4.77(1H, s, H-1'''), 4.62(1H, d,  $J=8.5$  Hz, H-1''), 1.14(3H, d,  $J=6.0$  Hz, H-6'')。  $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- $d_6$ , 150 MHz) $\delta_{\text{c}}$ : 163.1(s, C-2), 102.6(d, C-3), 181.9(s, C-4), 161.1(s, C-5), 109.2(s, C-6), 161.1(s, C-7), 102.6(s, C-8), 152.9(s, C-9), 102.6(s, C-10), 121.4(s, C-1'), 128.4(d, C-2'/6'), 116.0(d, C-3'/5'), 160.1(s, C-4'), 73.2(d, C-1''), 70.1(d, C-2''), 79.1(d, C-3''), 70.8(d, C-4''), 81.6(d, C-5''), 61.5(d, C-6''), 74.9(d, C-1'''), 72.3(d, C-2'''), 74.4(d, C-3'''), 71.9(d, C-4'''), 77.2(d, C-5'''), 18.2(d, C-6''')。以上数据与文献[14, 16]基本一致,故鉴定化合物**5**为佛莱心苷(violanthin)。

### 2.3 化合物1~5的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性研究

$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性测定实验参考文献[17]的方法。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(0.1 U/mL)及其底物pNPG(1.0 mmol/L)、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液(0.1 mol/L)均用PBS配制。反应在96孔板中进行:取30  $\mu\text{L}$  PBS,加入5  $\mu\text{L}$  DMSO、10  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -葡萄糖苷酶和45  $\mu\text{L}$  待测样品[化合物**1**~**5**用DMSO溶解,加样时用PBS稀释;阿卡波糖(阳性对照)用超纯水溶解,加样时用PBS稀释。给药浓度均为1~500  $\mu\text{mol/L}$ ],置于微孔板恒温振荡器中,于37  $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应10 min;然后加入10  $\mu\text{L}$  pNPG,反应15 min;加入45  $\mu\text{L}$  Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液终止反应,混匀后,于405 nm波长下测定吸光度( $A$ ),每个待测样品设置3个平行。按下列公式计算 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率,并用Origin软件计算半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率(%)=[1-( $A_{\text{样品}}-A_{\text{背景}}$ )/( $A_{\text{阳性}}-A_{\text{空白}}$ )] $\times 100\%$ (式中, $A_{\text{样品}}$ 为酶、待测样品和底物反应后测得的 $A$ ; $A_{\text{背景}}$ 为上述过程只加待测样品反应后测得的 $A$ ; $A_{\text{阳性}}$ 为上述过程只加酶和底物反应后测得的 $A$ ; $A_{\text{空白}}$ 为上述过程只加PBS反应后测得的 $A$ )。结果显示,化合物**1**~**5**和阿卡波糖抑制 $\alpha$ -葡萄

糖苷酶活性的IC<sub>50</sub>分别为(1.79±1.27)、(2.05±0.72)、(1.93±0.67)、(1.09±0.46)、(1.36±0.58)、(18.69±1.24)μmol/L(n=3)。

### 3 讨论

α-葡萄糖苷酶抑制剂是临床降低患者餐后血糖水平的常用药物。然而,自阿卡波糖问世以来,迄今为止只有阿卡波糖等少数几种α-葡萄糖苷酶抑制剂可用于临床,从天然药物中寻找新的α-葡萄糖苷酶抑制剂有望推动降血糖新药研发<sup>[18]</sup>。本研究以α-葡萄糖苷酶活性为引导,从铁皮石斛叶中分离得到5个芹菜素-6,8-C-二糖苷类成分,均具有显著的α-葡萄糖苷酶抑制活性,系首次报告该类成分的α-葡萄糖苷酶抑制活性。因此,芹菜素-6,8-C-二糖苷可能为铁皮石斛叶降血糖活性成分,有望作为先导化合物进行降血糖药物研究。本研究采用波谱学技术对化合物1~5的化学结构进行了解析,其中化合物1为新化合物,是首个同时具有鼠李糖和异鼠李糖取代的黄酮碳苷类成分,通过二维NMR谱和圆二色光谱确定了其立体构型,并对其波谱数据进行了详细归属;化合物2首次从该植物中分离得到。

### 参考文献

[1] 斯金平,张媛,罗毅波,等. 石斛与铁皮石斛关系的本草考证[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(10): 2001-2005.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版. 北京:中国医药科技出版社, 2020:94-97,295-296.

[3] WANG Y H. Traditional uses, chemical constituents, pharmacological activities, and toxicological effects of *Dendrobium* leaves: a review[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 270: 113851.

[4] 李晓波,彭崇胜,高蓓蓓. 石斛叶抗氧化应用:中国, CN105901733B[P]. 2020-06-09.

[5] LU Y, KUANG M, HU G P, et al. Loddigesiinols G-J: α-glucosidase inhibitors from *Dendrobium loddigesii*[J]. Molecules, 2014, 19(6): 8544-8555.

[6] THANT M T, CHATSUMPUN N, MEKBOONSONGLARP W, et al. New fluorene derivatives from *Dendrobium gibsonii* and their α-glucosidase inhibitory activity[J]. Molecules, 2020, 25(21): E4931.

[7] CHU C, LI T, PEDERSEN H A, et al. Antidiabetic constituents of *Dendrobium officinale* as determined by high-resolution profiling of radical scavenging and α-glucosidase and α-amylase inhibition combined with HPLC-

PDA-HRMS-SPE-NMR analysis[J]. Phytochem Lett, 2019, 31: 47-52.

[8] 王璇璇,李晓波,彭崇胜. 2种黄酮-6,8-C-二糖苷正、负离子模式下高分辨电喷雾质谱综合分析及其应用[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(22): 4880-4887.

[9] 袁红娥,周兴栋,孟令杰,等. 鸭跖草的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(19): 3304-3308.

[10] PÉREZA J, M HASSAN E, PECIO L, et al. Triterpenoid saponins and C-glycosyl flavones from stem bark of *Erythrina abyssinica* Lam and their cytotoxic effects[J]. Phytochem Lett, 2015, 13: 59-67.

[11] SHAFIK N H, SHAFEK R E, MICHAEL H N. Antimicrobial activity of different extracts of *Daucus carota* canopy[J]. Int J Pharm, 2015, 5(2): 352-356.

[12] FERNANDO W I T, ATTANAYAKEA M K C, PERERAH K I, et al. Isolation, identification and characterization of pancreatic lipase inhibitors from *Trigonella foenum-graecum* seeds[J]. S Afr J Bot, 2019, 121: 418-421.

[13] XIE C, VEITCH N C, HOUGHTON P J, et al. Flavone C-glycosides from *Viola yedoensis* makino[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2003, 51(10): 1204-1207.

[14] 张小凤,周春花,张龙开,等. 丹霞种、云南广南种铁皮石斛中主要黄酮苷的分离鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(1): 29-34.

[15] XING S P, YU W X, ZHANG X F, et al. Isoviolanthin extracted from *Dendrobium officinale* reverses TGF-β-mediated epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells via deactivating the TGF-β/smad and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(6): E1556.

[16] CARNAT A P, CARNAT A, FRAISSE D, et al. Violarvensin, a new flavone di-C-glycoside from *Viola arvensis* [J]. J Nat Prod, 1998, 61(2): 272-274.

[17] 马家麟,陈涛,谭亮,等. 藏药材诃子中3种α-葡萄糖苷酶抑制剂的分离与鉴定[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(8): 1357-1362, 1356.

[18] BEELDERS T, BRAND D J, DEBEER D, et al. Benzophenone C- and O-glucosides from *Cyclopia genistoides* (Honeybush) inhibit mammalian α-glucosidase[J]. J Nat Prod, 2014, 77(12): 2694-2699.

(收稿日期:2022-04-05 修回日期:2022-06-05)

(编辑:曾海蓉)