

连钱草中1个具有13 α ,27-环丙烷结构的新六环三萜

张倩^{1,2}, 陆美龙^{1,2}, 刘天资^{1,2}, 张悦婷^{1,2}, 朱傲^{1,2}, 丁丽丽^{1,2}, 韩竹箴^{1,2*},
谷丽华^{1,2*}, 王峥涛^{1,2}

(1. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 国家中医药管理局中药新资源与质量评价重点实验室, 上海 201203; 2. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203)

摘要: 为研究连钱草 *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr. 中的化学成分, 探讨其活血化瘀物质基础, 采用 MCI、硅胶、凝胶、ODS 柱色谱及制备薄层等色谱技术对连钱草醇提物进行系统分离, 通过 MS、1D NMR、2D NMR 等波谱数据分析鉴定化合物结构。从连钱草醇提物的二氯甲烷萃取部位分离得到 8 个三萜类化合物, 分别鉴定为 2 α ,3 α ,16 β -trihydroxy-13 α ,27-cyclours-11-en-28-oic acid (**1**)、28-norurs-12-ene-3 β ,17 β -diol (**2**)、28-norolean-12-ene-3 β ,17 β -diol (**3**)、齐墩果酮酸 (**4**)、3 β ,13 β -dihydroxyurs-11-en-28-oic acid (**5**)、熊果醇 (**6**)、齐墩果酸 (**7**) 和熊果酸 (**8**)。化合物 **1** 为罕见的具有 13 α ,27-环丙烷结构的新六环三萜, 命名为 euscaphic acid H, 化合物 **2**、**3** 为首次从唇形科中分离得到, 化合物 **4**、**5** 为首次从活血丹属中分离得到。以凝血四项指标 (APTT、PT、TT、FIB) 对三萜类成分进行体外抗凝血活性评价, 化合物 **1**~**7** 均显示一定的抗凝血趋势, 其中化合物 **1** 和 **6** 表现出较明显的体外抗凝活性。

关键词: 连钱草; 活血丹; 六环三萜; 化学成分; 抗凝血

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1334-07

A new hexacyclic triterpenoid with 13 α ,27-cyclopropane ring from *Glechoma longituba*

ZHANG Qian^{1,2}, LU Mei-long^{1,2}, LIU Tian-zi^{1,2}, ZHANG Yue-ting^{1,2}, ZHU Ao^{1,2}, DING Li-li^{1,2},
HAN Zhu-zhen^{1,2*}, GU Li-hua^{1,2*}, WANG Zheng-tao^{1,2}

(1. The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and the SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai R&D Center for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201203, China)

Abstract: In order to study the compounds from *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr. and explore the substance bases of its dissipating blood stasis, MCI, silica gel, Sephadex LH-20, ODS column chromatography and preparative thin layer chromatography were used to isolate and purify the compounds. The structures were identified by MS, 1D NMR, and 2D NMR spectra analysis, etc. Eight triterpenoids were isolated from dichloromethane fraction of ethanol extract from *G. longituba* and identified as 2 α ,3 α ,16 β -trihydroxy-13 α ,27-cyclours-11-en-28-oic acid (**1**), 28-norurs-12-ene-3 β ,17 β -diol (**2**), 28-norolean-12-ene-3 β ,17 β -diol (**3**), oleanonic acid (**4**), 3 β ,13 β -dihydroxyurs-11-en-28-oic acid (**5**), uvaol (**6**), oleanolic acid (**7**), ursolic acid (**8**). Compound **1** is a new hexacyclic triterpene with 13 α ,27-cyclopropane structure, named euscaphic acid H; compounds **2** and **3** were isolated from Lamiaceae for the first time while compounds **4** and **5** were isolated from this genus. The *in vitro* anticoagulant activity of triterpenoids

收稿日期: 2023-10-31; 修回日期: 2023-12-28.

基金项目: 国家药典委标准项目 (2018Z003); 上海市技术标准项目 (21DZ2202100).

*通讯作者: Tel: 86-21-52322505, E-mail: lhgu@shutcm.edu.cn; hlhtang@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1225

was evaluated by four coagulation indexes (activated partial thromboplastin time, APTT; thrombin time, TT; prothrombin time, PT; fibrinogen, FIB). Among them, compounds **1** and **6** showed obvious anticoagulant effects.

Key words: Glechomae Herba; *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr.; hexacyclic triterpene; chemical composition; anticoagulation

连钱草为唇形科 (Lamiaceae) 活血丹属多年生草本活血丹 *G. longituba* (Nakai) Kupr. 的干燥地上部分^[1]。唇形科分类一直颇具争议, 近年来部分研究表明, 化学成分种类差异是唇形科植物种属分类的主要依据, 连钱草在分类研究中被划分唇形科下支亚级中的荆芥亚科 (Nepetoideae), 非挥发性萜类, 特别是二萜和三萜类成分是其分类特征之一^[2,3]。

植物药中三萜类成分被证明具有广泛的药理活性, 如齐墩果酸具有良好的抗病毒、抗 HIV、抗菌、抗癌、降糖、抗炎、保肝、胃保护、降血脂和抗动脉粥样硬化作用^[4], 课题组前期也从同一亚科中药夏枯草中分离得到具有抗甲状腺肿瘤活性的三萜类化合物^[5]。三萜成分在连钱草中种类丰富, 同时也是连钱草药材质量评价研究中的热门研究对象^[6-10], 提示该类成分可能是连钱草的药效物质基础, 然而目前对连钱草中三萜成分的活性评价研究较少。

连钱草的基原植物名为活血丹, 活血散瘀是其主要功效之一, 相关专利中不少中药组方体现了连钱草的活血作用, 如用于治疗外科跌打损伤以及妇科淤血所致的阴虚型产后恶露不绝、痛经等症^[11]。有学者对连钱草的提取物和分离的三萜皂苷单体进行体外抗凝血试验以探索其活血散瘀物质基础, 结果发现连钱草提取物具有明显的抗凝作用, 但受试的三萜皂苷单体并未显示出明显的抗凝血活性^[12]。因此有必要对连钱草的化学成分进行进一步深入研究。

本研究对连钱草中的三萜类成分进行分离及结构鉴定, 同时为探讨其活血散瘀传统功效的物质基础, 采

用凝血四项试验包括活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶原时间 (prothrombin time, PT)、凝血酶时间 (thrombin time, TT) 以及纤维蛋白原水平 (fibrinogen, FIB) 评价连钱草中三萜类成分的体外抗凝效果。从连钱草中共分离得到 8 个三萜类成分 (图 1), 分别鉴定为一个新的六环三萜类成分 2 α ,3 α ,16 β -trihydroxy-13 α ,27-cyclours-11-en-28-oic acid (**1**), 以及七个已知化合物 28-norurs-12-ene-3 β ,17 β -diol (**2**)、28-norolean-12-ene-3 β ,17 β -diol (**3**)、齐墩果酮酸 (**4**)、3 β ,13 β -dihydroxyurs-11-en-28-oic acid (**5**)、熊果醇 (**6**)、齐墩果酸 (**7**)、熊果酸 (**8**)。其中化合物 **2** 和 **3** 为首次从唇形科中分离得到, 化合物 **4** 和 **5** 为首次从活血丹属中分离得到。凝血四项指标评价结果显示化合物 **1**~**7** 均有抗凝血趋势, 其中化合物 **1** 与化合物 **6** 最为显著。

结果与讨论

1 结构鉴定

化合物 **1**, 白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 485.327 0 [M-H]⁻ 给出分子式为 C₃₀H₄₆O₅ (计算值 485.327 2, C₃₀H₄₅O₅⁻), 不饱和度为 8。IR 光谱显示其含有羟基 (2 924 cm⁻¹)、羰基 (1 674 cm⁻¹) 吸收峰。¹³C NMR 结合 DEPT-135 进一步确定化合物共含有 30 个碳原子, 归属为 6 个甲基, 7 个亚甲基, 10 个次甲基以及 7 个季碳。通过 ¹H NMR、¹³C NMR (表 1) 和 HSQC 谱对化合物进行信号归属后, 进一步确认化合物分子结构中含有 6 个甲基 [δ_{H} 0.85(s) / δ_{C} 21.5, CH₃-24; δ_{H} 0.95 (s) / δ_{C}

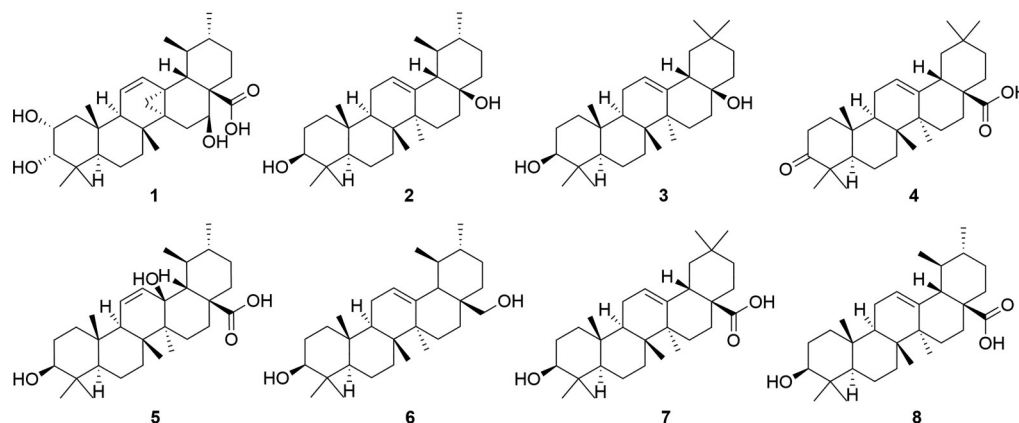


Figure 1 The structures of compounds 1-8

18.4, CH₃-25; δ_{H} 0.97 (d, $J = 6.5$ Hz) / δ_{C} 20.7, CH₃-30; δ_{H} 1.04 (s) / δ_{C} 16.1, CH₃-26; δ_{H} 1.19 (d, $J = 6.0$ Hz) / δ_{C} 18.5, CH₃-29; δ_{H} 1.20 (s) / δ_{C} 29.0, CH₃-23]; 一组顺式双键 [δ_{H} 5.51 (dd, $J = 10.2, 2.3$ Hz) / δ_{C} 119.2, CH-11; δ_{H} 6.29 (dd, $J = 10.2, 2.7$ Hz) / δ_{C} 141.0, CH-12]; 三个连氧区次甲基 [δ_{H} 3.75, (d, $J = 2.8$ Hz) / δ_{C} 79.1, CHOH-3; δ_{H} 4.33 (dt, $J = 12.1, 4.0$ Hz) / δ_{C} 65.6, CHOH-2; δ_{H} 5.03 / δ_{C} 74.2, CHOH-16] 以及一个羧基 [δ_{C} 177.7 (C-28)]。其中的两个双峰甲基氢信号以及羧基碳信号提示该化合物母核类似于乌苏烷型三萜, 不同之处在于高场区少一个甲基信号, 多一个亚甲基信号 (δ_{C} 17.1, CH₂-27)。此外, 高场区出现的一个额外的季碳信号 (δ_{C} 28.4, C-13), 其化学位移提示结构中存在取代环丙烷片段。根据上述信号并结合 Scifinder^a 信息, 发现与连钱草中已报道的含有 13 α , 27-环丙烷乌苏烷母核结构的 euscaphic acid G 非常相似^[13]。不同之处在于 euscaphic acid G 中的羟基位置为 2, 3, 23 位, 而化合物 **1** 的羟基为 2, 3, 16。C-16 羟基取代可由 δ_{H} 5.03 在 ¹H-¹H COSY 谱中与 H-15 [δ_{H} 2.74 (dd, $J = 14.6, 5.1$ Hz); δ_{H} 2.07, (d, $J = 14.6$ Hz)] 的相关峰以及 HMBC 谱中 H-18 [δ_{H} 2.87 (d, $J = 11.2$ Hz)] / C-16 得到证实。通过综合解析化合物 ¹H-¹H COSY 和 HMBC 谱中的相关信号 (图 2), 确定化合物 **1** 的平面结构为 2,3,16-trihydroxy-13,27-cyclours-11-en-28-oic acid。

化合物 **1** 的立体结构由 NOESY 谱 (图 3) 结合关键位置质子偶合常数分析获得。H-2 与 CH₃-24 和 CH₃-25 的 NOE 相关信号, 结合 H-2 与 H-1b 之间显示的轴向邻位质子间偶合常数 ($J = 12.4$), 证明 H-2 处于 A 环 C-2 位处的 β 直立键。H-3 与 H-2/CH₃-24 的 NOESY 相关信号以及 ²³J (2.8 Hz) 提示 H-3 处于 A 环 C-2 位处的 β 平伏键, 从而确定 2-OH、3-OH 均为 α 构型。NOESY 谱

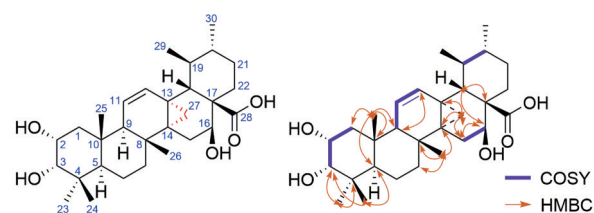


Figure 2 Key HMBC and ¹H-¹H COSY correlations of compound **1**

上 H-27 与 H-9 (α) 之间存在的相关信号, 证实了化合物 **1** 与前述文献^[13]报道的 euscaphic acid G 母核的取代环丙烷片段具有相同的立体结构。H-15/H-16 之间较小的偶合常数, 结合 H-16/H-27 的 NOE 相关说明 H-16 处于平伏键而 16-OH 为 β 构型。由此, 化合物 **1** 的结构最终鉴定为 2 α , 3 α , 16 β -trihydroxy-13 α , 27-cyclours-11-en-28-oic acid, 命名为 euscaphic acid H。

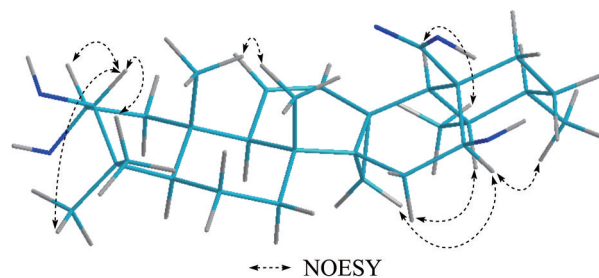


Figure 3 Major NOESY correlations compound **1**

2 体外抗凝血活性评价

以 10 mg·mL⁻¹ 云南白药和 2 mg·mL⁻¹ 阿司匹林为阳性药, DMSO 为空白组, 测定化合物 **1**~**8** 在 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下对凝血因子的影响。由图 4 可知, 与空白组比较, 化合物 **1**~**7** 在体外均能显著延长 APTT ($P < 0.01$),

Table 1 NMR data of compound **1** (δ in ppm, J in Hz, pyridine-*d*₅). ^aThe proton signal was submerged under the water peak

Position	13C	1H	Position	13C	1H
1	42.9	2.11, overlapped; 1.72, overlapped	16	74.2	5.03 ^a
2	65.6	4.33, dt (12.1, 4.0)	17	49.0	
3	79.1	3.75, d (2.8)	18	46.4	2.87, d (11.2)
4	38.6		19	40.8	2.11, overlapped
5	48.2	1.69, dd (11.4, 1.6)	20	38.3	1.26, overlapped
6	18.3	1.51, overlapped; 1.35, o	21	32.4	2.24, qd (12.2, 3.7); 1.54, overlapped
7	37.2	1.84, d-like (11.3); 1.32, o	22	37.5	2.48, dt (13.6, 3.6); 2.07, overlapped
8	34.8		23	29.0	1.20, s
9	52.5	2.03, t-like (2.4)	24	21.5	0.85, s
10	37.8		25	18.4	0.95, s
11	119.2	5.51, dd (10.2, 2.3)	26	16.1	1.04, s
12	141.0	6.29, dd (10.2, 2.7)	27	17.1	1.72, overlapped 1.48, overlapped
13	28.4		28	177.7	
14	34.4		29	18.5	1.19, d (6.0)
15	30.9	2.74, dd (14.6, 5.1); 2.07, d (14.6)	30	20.7	0.97, d (6.5)

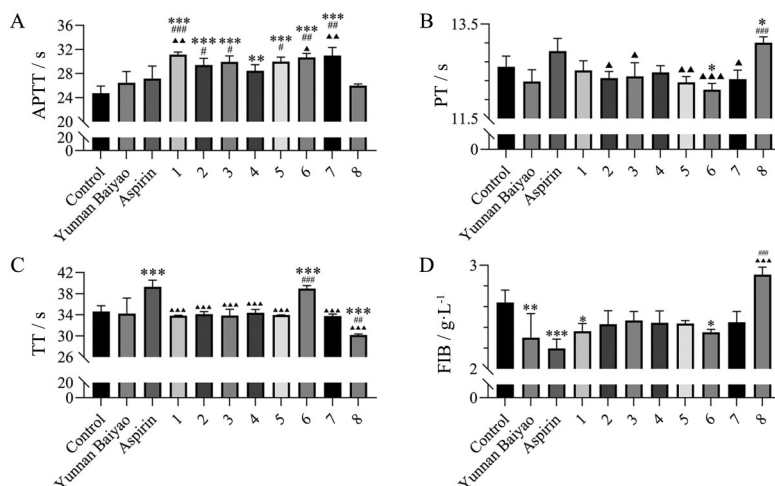


Figure 4 The effects of compounds 1–8 ($250 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$), Yunnan Baiyao ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and aspirin ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) on *in vitro* anticoagulation experiment. A: Activated partial thromboplastin time (APTT); B: Thrombin time (TT); C: Prothrombin time (PT); D: Fibrinogen (FIB). $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$ vs Yunnan Baiyao; ^ $P < 0.05$, ^^ $P < 0.01$, ^^ $P < 0.001$ vs aspirin

说明可以影响内源性凝血系统的凝血因子以达抗凝效果; 化合物 6 能显著延长 TT ($P < 0.001$), 显示化合物 6 能通过影响纤维蛋白原形成途径发挥抗凝作用; 化合物 1~7 均有降低 FIB 的趋势, 化合物 1 和 6 有较显著趋势 ($P < 0.05$)。综上结果表明化合物 1~7 均有不同程度的抗凝血作用, 其中化合物 1 和 6 具有较显著的抗凝作用。化合物 8 能显著延长 PT ($P < 0.001$), 表明化合物 8 可能通过影响外源性凝血途径影响抗凝系统, 然而化合物 8 能显著缩短 TT ($P < 0.001$), 升高 FIB ($P < 0.001$) 影响纤溶系统发挥促凝作用, 表明化合物 8 可能对整个凝血系统具有双向调节作用。有研究显示三萜及三萜皂苷对血细胞的溶血活性与 C-28 位上的 COOH 基团有关^[14], 一些溶血皂苷的抗血栓作用与抑制血小板聚集和改善凝血系统有关^[15], 提示三萜中的 COOH 和 OH 基团对凝血系统可能也存在相似的影响。化合物 6 和 8 的结构相似度较高, 不同在于 C-20 位的 OH 和 C-28 位的 COOH 基团, 可能是造成其抗凝活性不同的关键因素。有机酸是一类来源丰富且安全的天然抗血栓因子, 其中三萜酸成分齐墩果酸 (7) 的抗凝血作用已被广泛报道^[16], 但三萜酸结构差异对凝血系统影响的研究较少, 其构效关系及不同于齐墩果酸的作用机制值得深入研究。

实验部分

Bruker Avance III 型 400, 600 MHz 核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); Triple TOF 5600 型高分辨质谱仪 (美国 AB Sciex 公司); EYELA N-1300 型旋转蒸发器 (日本 EYELA 公司); SHB-1000 型循环水式多用真空泵 (上

海诚献仪器设备有限公司); DHG-9053A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海恒一科技有限公司); Milli-Q 超纯水仪 (德国 Merck 公司); BCE2241-1CCN 型电子天平 (德国 Sartorius 公司); Buchi C-680 中压 (瑞士 BUCHI Labortechnik AG); LC-3000 型制备液相 (北京创新通恒科技有限公司); PerkinElmer FT-IR 型红外光谱仪 (美国 PerkinElmer 公司); Mindray C3000 型全自动凝血分析仪 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司); HUANGHAI/黄海薄层层析硅胶 HGF254 制备板 (上海泰坦科技股份有限公司); 200-300 目柱层析硅胶 (青岛海洋化工有限公司); Sephadex LH-20 凝胶 (瑞典 GE Healthcare BioSciences AB); 十八烷基硅烷键合硅胶 ODS (日本 YMC); Xbridge C18 制备柱 ($250 \text{ mm} \times 20 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, 美国 Fisher Wharton 公司); 石油醚、乙酸乙酯等分析纯试剂和沃凯 HPLC 级甲醇、乙腈 (国药集团化学试剂有限公司); 氘代试剂 (美国 Cambridge Isotope Laboratories); 凝血四项试剂盒 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)。

连钱草药材购自安徽省亳州市, 经上海中医药大学谷丽华研究员鉴定为唇形科植物活血丹 [*G. longituba* (Nakai) Kupr.] 的干燥地上部分, 干燥标本保存于上海中医药大学中药研究所。

1 提取与分离

干燥连钱草药材 (20 kg), 95% 乙醇回流提取 (240 L, $2 \times 2 \text{ h}$), 滤过, 药渣使用 50% 乙醇回流提取 (240 L, $1 \times 2 \text{ h}$), 合并提取液并减压浓缩至无醇味后, 使用二氯甲烷 (dichloromethane, DCM) 萃取, 再使用 MCI 柱色谱 ($\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 100:1$) 除去大部分色素和大分子胶质

物后得到二氯甲烷部位 (306.6 g)。由石油醚-乙酸乙酯 (PE:EA=50:1~0:1) 硅胶柱色谱洗脱后, 得到 8 个子馏分 (Fr.A~Fr.H)。Fr.C 经过中压制备色谱 (MPLC-ODS, MeOH:H₂O = 40:60~100:0), 进一步得到 19 个子馏分 (Fr.C₁~Fr.C₁₉)。Fr.C₁₇ 经过硅胶柱色谱 (DCM:EA = 20:1) 纯化后再通过薄层制备色谱 (PE:EA = 10:1), 最后通过制备液相分离 (ACN:H₂O = 95:5) 得到化合物 **2** (3 mg, 16 mL·min⁻¹, *t_R* = 17.0 min) 和 **3** (2 mg, 16 mL·min⁻¹, *t_R* = 14.5 min); Fr.C₁₈ 经过甲醇凝胶柱色谱纯化得到化合物 **4** (19 mg); Fr.E 经中压制备色谱 (MPLC-ODS, MeOH:H₂O = 40:60~100:0) 分离得到 18 个子馏分 (Fr.E₁~Fr.E₁₈), Fr.E₁₂ 经凝胶柱色谱 (PE:DCM:MeOH = 5:5:1) 洗脱再使用甲醇凝胶柱色谱纯化后得到化合物 **5** (14 mg); Fr.E₁₄~Fr.E₁₇ 经过凝胶柱色谱 (PE:DCM:MeOH = 5:5:1) 分离后再合并得到 8 个亚馏分 (Fr.E_{T1}~Fr.E_{T8}), Fr.E_{T1} 经过薄层制备 (PE:EA = 10:1) 纯化后再经制备液相纯化 (MeOH:H₂O = 92:8) 得到化合物 **6** (12 mg, 16 mL·min⁻¹, *t_R* = 12.0 min); Fr.E₁₈ 经过结晶漏斗洗脱得到化合物 **7** (60 mg); Fr.F 为大量析出, 经过结晶漏斗不断洗脱得到化合物 **8** (20 g); Fr.G 经过四次中压制备色谱 (MPLC-ODS, MeOH:H₂O = 40:60~100:0), 合并后得到 9 个子馏分 (Fr.G₁~Fr.G₉), Fr.G₇ 经过凝胶柱色谱 (PE:DCM:MeOH = 5:5:1) 以及薄层制备 (DCM:EA = 2:1) 纯化后得到化合物 **1** (7 mg)。

2 结构鉴定

化合物 **1** 白色粉末; [α]_D²⁰ -16.3 (c 0.1, MeOH); IR ν_{\max} (cm⁻¹): 2 924, 2 161, 1 674, 1 451, 1 280, 1 040; HR-ESI-MS *m/z*: 485.327 0 [M-H]⁻ ([C₃₀H₄₅O₅]⁻ 计算值 485.327 2)。¹H NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) 和 ¹³C NMR (101 MHz, pyridine-*d*₅) 数据见表 1, 鉴定为化合物 2 α , 3 α , 16 β -trihydroxy-13 α , 27-cyclours-11-en-28-oic acid, 命名为 euscaphic acid H。

化合物 **2** 白色粉末; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 5.32 (1H, t, *J* = 3.7 Hz, H-12), 3.25 (1H, dd, *J* = 10.9, 4.9 Hz, H-3), 2.05 (2H, o, H-15, 16), 1.97 (2H, o, H-11, 16), 1.10 (3H, s, H₃-27), 1.02 (3H, s, H₃-23), 1.01 (3H, s, H₃-26), 0.97 (3H, s, H₃-25), 0.95 (3H, d, *J* = 5.9 Hz, H₃-30), 0.85 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H₃-29), 0.82 (3H, s, H₃-24); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 137.9 (C-13), 127.9 (C-12), 79.0 (C-3), 72.1 (C-12), 60.6 (C-18), 55.2 (C-5), 47.6 (C-9), 41.9 (C-14), 41.6 (C-20), 40.4 (C-22), 39.8 (C-8), 39.3 (C-19), 38.8 (C-1), 38.7 (C-4), 37.0 (C-10), 33.0 (C-7), 32.3 (C-21), 28.4 (C-16), 28.2 (C-23), 27.2 (C-2), 26.0 (C-15), 23.6 (C-11), 23.0 (C-27), 20.7 (C-

25), 18.3 (C-6), 17.3 (C-29), 17.1 (C-26), 15.6 (C-24), 15.5 (C-30), 以上数据对照文献^[17], 鉴定 **2** 化合物为 28-norurs-12-ene-3 β , 17 β -diol。

化合物 **3** 白色粉末; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 5.33 (1H, t, *J* = 3.6 Hz, H-12), 3.25 (1H, dd, *J* = 11.2, 4.8 Hz, H-3), 2.28~2.22 (1H, m, H-15), 1.16 (3H, s, H₃-27), 1.02 (3H, s, H₃-23), 0.99 (3H, s, H₃-26), 0.98 (3H, s, H₃-25), 0.95 (3H, s, H₃-29), 0.92 (3H, s, H₃-30), 0.82 (3H, s, H₃-24); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 143.2 (C-13), 124.4 (C-12), 79.0 (C-3), 72.2 (C-17), 55.2 (C-5), 48.8 (C-18), 48.3 (C-19), 47.6 (C-9), 41.5 (C-14), 39.6 (C-8), 38.8 (C-4), 38.5 (C-1), 37.0 (C-22), 36.8 (C-10), 36.5 (C-21), 32.7 (C-7, 29), 31.0 (C-20), 28.1 (C-23), 27.3 (C-15), 27.2 (C-2), 25.5 (C-16), 25.5 (C-27), 24.0 (C-30), 23.6 (C-11), 18.4 (C-6), 17.1 (C-26), 15.6 (C-25), 15.3 (C-24), 以上数据对照文献^[18], 鉴定化合物 **3** 为 28-norolean-12-ene-3 β , 17 β -diol。

化合物 **4** 白色粉末; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 5.32 (1H, t, *J* = 3.6 Hz, H-12), 2.85 (1H, dd, *J* = 13.7, 4.6 Hz, H-18), 1.16 (3H, s, H₃-27), 1.10 (3H, s, H₃-23), 1.06 (3H, s, H₃-26), 1.05 (3H, s, H₃-25), 0.95 (3H, s, H₃-29), 0.92 (3H, s, H₃-30), 0.82 (3H, s, H₃-24); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 217.8 (C-3), 184.0 (C-28), 143.7 (C-13), 122.4 (C-12), 55.3 (C-5), 47.4 (C-4), 46.9 (C-9), 46.6 (C-17), 45.8 (C-19), 41.7 (C-14), 41.0 (C-18), 39.3 (C-8), 39.1 (C-1), 36.8 (C-10), 34.2 (C-2), 33.8 (C-21), 33.1 (C-22), 32.4 (C-29), 32.1 (C-7), 30.7 (C-20), 27.7 (C-15), 26.4 (C-23), 25.8 (C-27), 23.6 (C-30), 23.5 (C-16), 22.9 (C-11), 21.4 (C-24), 19.5 (C-6), 17.0 (C-27), 15.0 (C-25), 以上数据对照文献^[19], 鉴定化合物 **4** 为齐墩果酮酸。

化合物 **5** 白色粉末; ¹H NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ_{H} : 6.02 (1H, d, *J* = 10.3 Hz, H-12), 5.65 (1H, dd, *J* = 10.3, 3.0 Hz, H-11), 3.43 (1H, dd, *J* = 9.8, 6.3 Hz, H-3), 1.22 (3H, s, H₃-27), 1.20 (3H, s, H₃-26), 1.18 (3H, s, H₃-25), 1.01 (3H, s, H₃-24), 0.98 (3H, d, *J* = 6.1 Hz, H₃-29), 0.89 (3H, s, H₃-23), 0.84 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, H₃-30); ¹³C NMR (101 MHz, pyridine-*d*₅) δ_{C} : 179.1 (C-28), 133.5 (C-11), 129.1 (C-12), 89.2 (C-13), 77.7 (C-3), 60.3 (C-18), 54.9 (C-5), 53.2 (C-9), 45.0 (C-17), 42.0 (C-14), 41.8 (C-8), 40.1 (C-20), 39.3 (C-4), 38.4 (C-1), 38.0 (C-19), 36.4 (C-10), 31.7 (C-22), 31.3 (C-21), 30.8 (C-7), 28.1 (C-23), 27.6 (C-15), 25.6 (C-16), 22.9 (C-26), 19.1 (C-30), 18.9 (C-26), 18.0 (C-27), 17.9 (C-29), 17.7 (C-6), 15.9 (C-25), 15.6 (C-24), 以上数据对照文献^[20], 鉴

定化合物**5**为3 β ,13 β -dihydroxyurs-11-en-28-oic acid。

化合物**6** 白色粉末; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5) δ_{H} : 5.21 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-12), 3.91 (1H, d, $J = 10.6$ Hz, H-28a), 3.50~3.41 (2H, m, H-3,28b), 1.24 (3H, s, H₃-27), 1.21 (3H, s, H₃-26), 1.04 (3H, s, H₃-23), 1.01 (3H, s, H₃-25), 0.94 (9H, o, H₃-24,29,30); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, pyridine- d_5) δ_{C} : 139.4 (C-13), 125.6 (C-12), 77.2 (C-3), 68.92 (C-28), 55.5 (C-5), 54.41 (C-18), 47.9 (C-9), 42.1 (C-10), 40.1 (C-14), 39.6 (C-19), 39.5 (C-20), 39.2 (C-8), 39.00 (C-1), 38.5 (C-4), 36.9 (C-17), 36.0 (C-21), 33.0 (C-7), 31.0 (C-22), 28.6 (C-23), 27.9 (C-2), 26.3 (C-15), 23.6 (C-16), 23.4 (C-11), 23.4 (C-27), 21.4 (C-30), 18.5 (C-6), 17.6 (C-29), 16.8 (C-26), 16.4 (C-25), 15.7 (C-24), 以上数据对照文献^[21], 鉴定化合物**6**为熊果醇。

化合物**7** 白色粉末; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5) δ_{H} : 5.52~5.46 (1H, m, H-12), 3.43 (1H, dd, $J = 10.4, 5.8$ Hz, H-3), 3.30 (1H, dd, $J = 14.1, 4.6$ Hz, H-18), 1.27 (3H, s, H₃-27), 1.23 (3H, s, H₃-23), 1.01 (6H, s, H₃-25,26), 0.99 (3H, s, H₃-29), 0.94 (3H, s, H₃-30), 0.88 (3H, s, H₃-24); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, pyridine- d_5) δ_{C} : 179.9 (C-28), 144.6 (C-13), 122.3 (C-12), 77.8 (C-3), 55.6 (C-5), 47.9 (C-9), 46.4 (C-17), 46.2 (C-19), 41.9 (C-14), 41.8 (C-18), 39.5 (C-8), 39.2 (C-4), 38.7 (C-1), 37.1 (C-10), 34.0 (C-21), 33.0 (C-7), 33.0 (C-22), 30.7 (C-20), 28.6 (C-23), 28.1 (C-15), 27.9 (C-2), 25.9 (C-27), 23.6 (C-30), 23.5 (C-16), 23.5 (C-11), 18.6 (C-6), 17.2 (C-26), 16.3 (C-24), 15.3 (C-25), 以上数据对照文献^[22], 鉴定化合物**7**为齐墩果酸。

化合物**8** 白色粉末; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5) δ_{H} : 5.48 (1H, t, $J = 3.5$ Hz, H-12), 3.45 (1H, dd, $J = 10.1, 6.0$ Hz, H-3), 2.63 (1H, dd, $J = 11.4, 1.6$ Hz, H-18), 1.23 (6H, s, H₃-23,26), 1.04 (3H, s, H₃-27), 1.01 (3H, s, H₃-25), 0.99 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H₃-29), 0.94 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H₃-30), 0.88 (3H, s, H₃-24); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, pyridine- d_5) δ_{C} : 178.9 (C-28), 139.0 (C-11), 126.7 (C-11), 78.5 (C-3), 56.2 (C-11), 53.3 (C-18), 47.8 (C-9,17), 43.1 (C-14), 39.7 (C-20), 39.3 (C-8), 39.2 (C-19), 38.8 (C-1), 37.2 (C-22), 37.1 (C-10), 33.3 (C-7), 30.8 (C-21), 28.6 (C-15), 28.5 (C-24), 27.9 (C-2), 24.7 (C-29), 23.7 (C-16), 23.4 (C-27), 21.2 (C-30), 18.6 (C-6), 17.3 (C-11), 17.2 (C-26), 16.4 (C-24), 15.5 (C-25), 以上数据对照文献^[23], 鉴定化合物**8**为熊果酸。

3 体外凝血活性评价

采用全自动凝血分析仪对含化合物终浓度为250 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆进行凝血四项分析, 以10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

云南白药和2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 阿司匹林为阳性药以及1% DMSO为空白对照。实验简要流程如下: 取实验室制备的健康大鼠新鲜冰冻血浆 (FFP), 提前于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻储存, 将分离得到的化合物使用DMSO配制成浓度为25 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品溶解, 混匀。取适当化冻后的贫血小板血浆 (PPP), 加入相应体积化合物使药物终浓度为250 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$, 孵育10 min后上机检测, 所有实验均需在6 h内完成以保证凝血因子活性。

实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 数值统计和柱状图绘制采用GraphPad Prism 9软件处理。

作者贡献: 谷丽华、韩竹箴、张倩负责实验设计; 张倩负责实验实施及文章撰写; 陆美龙、刘天资、张悦婷、朱傲负责凝血实验动物取血; 丁丽丽给予凝血试验指导; 韩竹箴负责指导分离鉴定实验; 张倩、韩竹箴、谷丽华和王峥涛负责文章修改; 王峥涛负责总体指导。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 177.
- [2] Claudio F, Alessandro V, Mauro S, et al. Studies in natural products chemistry: chapter 4-phytochemistry, chemotaxonomy, ethnopharmacology, and nutraceuticals of Lamiaceae [M]. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2019: 125-178.
- [3] Zhao F, Chen YP, Salmaki Y, et al. An updated tribal classification of Lamiaceae based on plastome phylogenomics [J]. BMC Biol, 2021, 19: 2.
- [4] José MC, Sara RR, Javier SP. Oleanolic acid: extraction, characterization and biological activity [J]. Nutrients, 2022, 14: 623.
- [5] Zheng XQ, Song LX, Han ZZ, et al. Pentacyclic triterpenoids from spikes of *Prunella vulgaris* L. with thyroid tumour cell cytostatic bioactivities [J]. Nat Prod Res, 2023, 37: 1518-1526.
- [6] Zhang QJ, Yang XS, Zhu HY, et al. Triterpenoid in *Glechoma longituba* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2006, 37: 1780-1781.
- [7] Yang NY, Duan JA, Li P, et al. Chemical constituents of *Glechoma longituba* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2006, 41: 431-434.
- [8] Zhou J, Liu L, Guo QS, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of triterpene acids from *Glechoma longituba* using response surface methodology [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2018, 41: 2153-2157.
- [9] Wang Q, Duan JA, Qian DW, et al. Analysis and comparison of triterpene acids and flavonoids in *Glechoma longituba* from different habitats [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med (南京中医药大学学报), 2006, 22: 44-46.
- [10] Zhou LG, Ma YS, Yu HY, et al. Improvement in quality stan-

- dards of *Glechomae Herba* [J]. Drug Eval (药品评价), 2023, 20: 672-675.
- [11] Zhang Q, Han ZZ, Gu LH, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Glechomae Herba* and prediction of its Q-markers [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2023, 48: 2041-2158.
- [12] Ouyang XL, Mao WH, Wang CG, et al. Five 11 α , 12 α -epoxy pentacyclic triterpenoid saponins with antithrombus activities from *Glechoma longituba* [J]. Fitoterapia, 2019, 138: 43-45.
- [13] Ouyang XL, Qin F, Huang RZ, et al. NF- κ B inhibitory and cytotoxic activities of hexacyclic triterpene acid constituents from *Glechoma longituba* [J]. Phytomedicine, 2019, 63: 30-37.
- [14] Vo NNQ, Fukushima EO, Muranaka T. Structure and hemolytic activity relationships of triterpenoid saponins and saponinins [J]. J Nat Med, 2017, 71: 50-58.
- [15] Fang W, Liao SP, Zhong H, et al. Effects of gleditsia saponin on thrombosis and microcirculation disturbance in rats [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床), 2009, 25: 76-79.
- [16] Ning YW, Li MR, Chen Y, et al. Progress in research on the anti-thrombotic mechanism of food-derived organic acids and their derivatives [J]. Food Sci (食品科学), 2022, 43: 292-301.
- [17] Samira B, Samir B, Fadila B, et al. Cladocalol, a pentacyclic 28-nor-triterpene from *Eucalyptus cladocalyx* with cytotoxic activity [J]. Phytochemistry, 2005, 66: 627-632.
- [18] Hermann L. On constituents of the pericarps of *Sapindus mukorossi* Gaertn. [J]. Arch Pharm, 1979, 312: 416-425.
- [19] Fan WD, Mai LT, Li YJ, et al. Studies on the chemical constituents of the leaves of *Lantana Camara* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1993, 28: 35-39.
- [20] Huang H, Sun HD, Zhao SX. Triterpenoids of *Isodon loxothyrus* [J]. Phytochemistry, 1996, 42: 1665-1666.
- [21] Liang J, Li SH, Chen CQ. Chemical constituents in *Swertia davidi* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2014, 45: 919-923.
- [22] Yi YH, Gu JQ, Xiao K, et al. Triterpenoids of *Aralia dasyphylla* Miq. [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1997, 32: 769-772.
- [23] Li WF, Zhou J, Li JX, et al. Chemical constituents from *Pteris deltonia* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 1278-1281.