



# Purification and Chemical Transformation of Leojaponin, a Diterpene from *Leonurus japonicus*

Hankui Wu<sup>1,\*</sup>, Yuanping Wang<sup>1</sup>, Yuhua Su<sup>1</sup>, Zhen Su<sup>1</sup>, Kunpeng Zhang<sup>1,\*</sup>, Shanshan Sun<sup>2</sup>, Shihan Cai<sup>2</sup>, Linlin Hou<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>School of Biotechnology and Food Engineering, Anyang Institute of Technology, Anyang, China

<sup>2</sup>School of Chemistry and Chemical Engineering, Anyang Normal University, Anyang, China

## Email address:

wuhankui222@126.com (Hankui Wu), 1095557379@qq.com (Kunpeng Zhang), linlin9918@163.com (Linlin Hou)

\*Corresponding author

## To cite this article:

Hankui Wu, Yuanping Wang, Yuhua Su, Zhen Su, Kunpeng Zhang, Shanshan Sun, Shihan Cai, Linlin Hou. Purification and Chemical Transformation of Leojaponin, a Diterpene from *Leonurus japonicus*. *Asia-Pacific Journal of Chemistry*. Vol. 3, No. 1, 2021, pp. 1-6.

Received: July 28, 2021; Accepted: August 12, 2021; Published: August 26, 2021

**Abstract:** Leojaponin is a typical diterpene isolated and identified from the leaves of the traditional Chinese medicine Yimucao (*Leonurus japonicus*). It has a unique chemical structure bearing a furan moiety and a cross  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated carbonyl, which is a pharmacophore for many drugs, and it can be chemically transformed into a series of derivatives. Also, some so called natural products isolated from *L. japonicus* might be artifacts transformed from leojaponin during the process of purification. Although leojaponin is not active against acetylcholinesterase, a similar compound isolated from the herb displayed moderate inhibitory activity on acetylcholinesterase. Therefore, establishment of the process of preparing leojaponin and derivation of this compound are of great importance in utilization of this medicinal plant. In this paper, the purification and chemical transformation of leojaponin are reported. The raw material was extracted with 95% ethyl alcohol, and then the solvent was evaporated to dryness by using a rotary evaporator. After that, the residue was dissolved in water and extracted with ethyl acetate, and fractionated by column chromatography on AB-8 macroporous resin. The collected fraction was separated and purified by semi-preparative HPLC. As a result, the purity of the product quantitated by HPLC normality was over 98%. And then three new derivatives have been synthesized by transformation of leojaponin through oxidation and Mannich reactions. All the chemical structures of the new compounds have been elucidated by using 1D and 2D NMR spectroscopic analysis. The *in silico* interactions between the four compounds and acetylcholinesterase have been performed, and the results showed that compound **2** had the best binding activity (-9.6 kcal/mol).

**Keywords:** *Leonurus japonicus*, Leojaponin, Oxidation, Mannich Reaction

## 益母草中一个二萜益母草素的纯化和化学转化

吴汉夔<sup>1\*</sup>, 王圆萍<sup>1</sup>, 苏玉华<sup>1</sup>, 宿珍<sup>1</sup>, 张坤朋<sup>1\*</sup>, 孙山山<sup>2</sup>, 蔡诗韩<sup>2</sup>, 侯琳琳<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>安阳工学院生物与食品工程学院, 安阳, 中国

<sup>2</sup>安阳师范学院化学化工学院, 安阳, 中国

## 邮箱

wuhankui222@126.com (吴汉夔), 1095557379@qq.com (张坤朋), linlin9918@163.com (侯琳琳)

**摘要:** 益母草素是从中药益母草叶中分离鉴定的典型二萜。它具有独特的化学结构, 带有呋喃部分和交叉 $\alpha$ ,  $\beta$ -不饱和羰基, 这是许多药物的药效基因, 它可以化学转化为一类衍生物。此外, 从益母草中分离出的一些所谓的天然产物可能是在纯化过程中从益母草素转化而来的人工产物。虽然益母草素对乙酰胆碱酯酶没有活性, 但从该植物中分离出的一种类似化合物对乙酰胆碱酯酶显示出中等抑制活性。因此, 建立益母草素的制备工艺和该化合物的衍生

化对该药用植物的利用具有重要意义。本文报道了益母草素的纯化和化学转化。原料用95%乙醇提取，然后用旋转蒸发器将溶剂蒸发至干。之后，将残余物溶于水并用乙酸乙酯萃取，并通过使AB-8大孔树脂吸附分离。进一步通过半制备型高效液相色谱进行分离和纯化得到产物。结果表明，用正相高效液相色谱定量的产品纯度大于98%。然后通过氧化和曼尼希反应转化益母草素合成了三个新的衍生物。最后通过一维和二维核磁共振波谱分析阐明了其化学结构。通过计算机软件研究了四个化合物与乙酰胆碱酯酶的相互作用，结果表明化合物2具有最好的结合活性(-9.6 kcal/mol)。

**关键词：**益母草，益母草素，氧化，曼尼希反应

## 1. 引言

益母草为唇形科植物 *Leonurus japonicus* 的全草，是一种一年生或两年生的草本植物，夏季开花。常见于山野荒地、田埂及草地等。全国大部分地区均有分布，广泛种植[1]。益母草药材能用于传统中药，其性味辛苦凉，具有活血、法瘀、调经、消水的功效，可以治疗各种疾病，特别是治月经不调、浮肿下水、尿血、泻血、痢疾等[2]。近年来，人们对益母草植物化学成分的研究已大量报道[3-11]，肖伟烈、熊亮等研究人员对益母草的化学成分研究较为深入。本课题组前期对两种唇形科植物化学成分开展了系统研究，我们分离鉴定了一系列新半日花烷型二萜类化合物[12-18]。其中，在我们研究益母草属植物具有精

神活性的天然产物过程中，分离鉴定了一个二萜类化合物益母草素，但目前尚未有对益母草素对照品进行制备性分离的报道。而且市场无益母草素对照品出售。因此，为了对益母草药材及其成药进行药物质量控制，本实验采用常规色谱及高效液相色谱结合的方法制备益母草素对照品。此方法简洁快速，益母草素纯度达到98%。在前期的研究中本课题组分离鉴定了益母草中具有抗乙酰胆碱酯酶活性的二萜类化合物[18]。为了获得结构多样的衍生物进行活性筛选，我们对益母草素进行结构改造，通过氧化反应及曼尼希反应合成了三个新的衍生物。



图1 益母草植物图片及益母草素 (leojaponin)。

## 2. 方法

### 2.1. 仪器、试剂和样品

#### 2.1.1. 仪器

高效液相色谱仪 (Waters 2767样品管理器、Waters 2489紫外可见检测器、Waters2545二元梯度泵)；AVANCEIII 400 MHz核磁共振仪 (瑞士Bruker公司)；ZF-20C暗箱式紫外分析仪 (上海宝山顾村光电仪器厂)；KQ3200B型超声波清洗机 (昆山市超声仪器有限公司)；RE52CS-1旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂)；AB-8型大孔树脂 (天津南大树脂科技有限公司)；SHZ-DIII循环水真空泵 (郑州欧卡仪器设备有限公司)；B-260恒温水浴锅 (上海亚荣生化仪器厂)；FA2004B电子天平 (上海佑科仪器仪表有限公司)；YB-1500A型高速多功能粉碎机 (永康市速峰工贸有限公司)。

#### 2.1.2. 试剂

甲醇、乙腈为色谱纯试剂 (国药集团化学试剂有限公司)。磷酸、醋酸、二乙胺、甲醛、二氯甲烷、无水乙醇、盐酸等试剂均为分析纯 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

#### 2.1.3. 提取分离

益母草购于中国甘肃省张掖，通过形态及理化鉴定该植物为唇形科益母草的全草 (*Leonurus japonicus*)。取益母草85 Kg, 粉碎，以95%乙醇室温浸泡提取3次，每次3天，然后合并提取液，减压浓缩回收溶剂得浸膏状提取物，将浸膏溶解于蒸馏水，用乙酸乙酯萃取3次，浓缩得到乙酸乙酯部位。取693 g乙酸乙酯部位吸附于5 kg大孔树脂 (AB-8型)，以30%，60%，90%的乙醇水溶液洗脱，每个梯度洗脱5倍柱体积。90%乙醇洗脱部位浓缩至干后通

过硅胶柱色谱分离,以石油醚(30-60℃)-乙酸乙酯(50:1,体积比)洗脱,减压浓缩得到油状物80 g。

## 2.2. 制备液相色谱分离

制备型高效液相色谱条件: YMC-Pack ODS-A柱(150 mm×19 mm, 5 μm); 柱温: 25℃; 检测波长: 259 nm; 流动相: 90%甲醇; 流速: 20 mL/min; 进样量: 200 μL。

益母草素的制备: 取50 g粗产品溶于甲醇溶液, 超声溶解后过滤, 用高效液相色谱纯化。进样量200 μL, 收集保留时间为2.8-3.2 min的组分, 如图1所示, 经多次进样和收集, 合并收集组分, 将其用旋转蒸发仪在50℃下减压浓缩, 冷却至室温, 最后得到油状物13.9 mg。

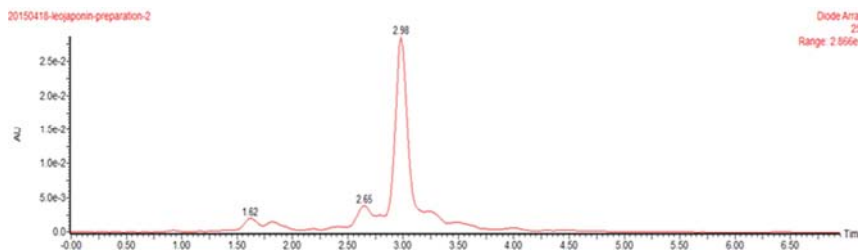


图2 益母草素的制备液相色谱图。

## 2.3. 产物纯度检验

薄层色谱分析: 取自制对照品与粗品进行薄层色谱分析, 以石油醚-乙酸乙酯(50: 1)展开, 在紫外分析仪中观察, 对照品的比移值 $R_f$ 为0.82, 粗品对应化合物的比移值 $R_f$ 为0.82, 在254 nm紫外光下可观察到对照品有一个蓝紫色斑点, 而粗品有蓝紫色斑点, 尚有较多有杂质点。

高效液相色谱分析, 色谱条件: YMC-Pack ODS-A柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温: 25℃; 检测波长: 259 nm; 流动相: 90%甲醇; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL。分离得到的化合物通过高效液相色谱分析(图2), 通过面积归一化法计算, 样品纯度为98.36%。

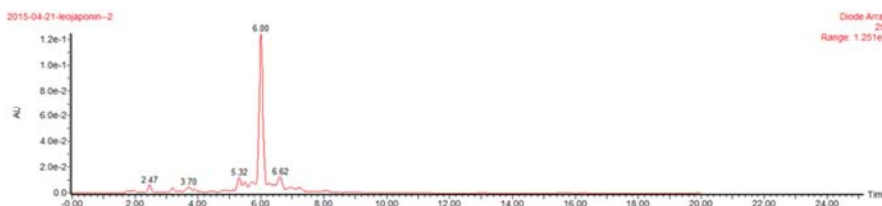


图3 益母草素纯度分析。

## 2.4. 结构改造

### 2.4.1. 氧化反应

取2 g益母草素置于50 mL圆底烧瓶, 加入甲醇溶解, 随后分批加入高锰酸钾1.0 g, 超声0.5 h使其充分溶解后, 加入盐酸1 mL常温反应两天。反应结束后, 加入10 mL水稀释,

用乙酸乙酯萃取2次, 转移至100 mL圆底烧瓶, 于旋转蒸发仪蒸干后得到0.379 g产物。该产物成分复杂, 进一步采用高效液相色谱分离。以甲醇-水洗脱(6 min内从甲醇75%升到90%, 流速15 mL/min, 进样量100 μL, 检测波长210 nm和254 nm), 收集主要峰, 得到化合物2, 23 mg)。

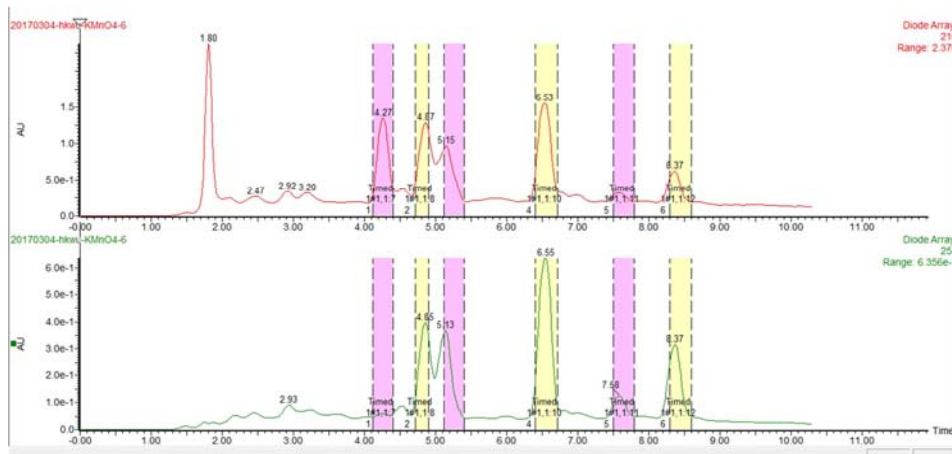


图4 氧化产物的分离色谱图(中间黄色峰为已鉴定产物)。



### 2.4.2. 曼尼希反应

取益母草素0.9018 g, 置于100 mL圆底烧瓶, 加入2.0 mL醋酸, 0.26 mL甲醛, 二乙氨0.30 mL, 再加入3.0 mL醋酸, 加热到100°C, 维持1个小时。通过TLC检测。待原料反应结束后冷却至室温, 取少量氨水滴加入反应液中以中和过量的醋酸, 将pH调节至7。中和完毕后将其转移到分液漏斗中, 加入10 mL的二氯甲烷进行萃取, 重复3次, 合并有机相。产物以制备薄层色谱进行分离, 以二氯甲烷: 甲醇(20:1)为展开剂展开纯化, 得到化合物3(31 mg)和化合物4(19 mg)。

### 2.5. 分子对接

将化合物1-4的分子结构分别用ChemBioOffice 2010软件进行准备, 转为为三维结构后通过MM2进行能量优化, 导出为pdb格式。乙酰胆碱酯酶的三位结构(1vot)通过<https://www.rcsb.org/>网站下载, 通过PyMOL软件进行去水、除去原配体石杉碱甲、添加氢。准备好的小分子和蛋白分子在AutoDock Vina进行对接分析[19]。结果通过Discovery Studio软件进行分析和绘制。

## 3. 结果与讨论

化合物1,  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.55 (1H, m, H-1), 2.06 (1H, m, H-1), 1.70 (1H, m, H-2), 1.88 (1H, m, H-2), 1.42 (1H, m, H-3), 1.87 (1H, m, H-3), 2.57 (1H, m, H-11), 2.66 (1H, m, H-11), 2.57 (1H, m, H-12), 6.34 (1H, d,  $J=1.6$  Hz, H-14), 7.40 (1H, d,  $J=1.6$  Hz, H-15), 7.30 (1H, m, H-16), 1.94 (3H, s, H-17), 1.35 (3H, s, H-18), 1.36 (3H, s, H-19), 1.32 (3H, s, H-20), 7.02 (1H, s, 6-OH)。  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  29.4 (C-1), 17.2 (C-2), 37.2 (C-3), 35.6 (C-4), 138.6 (C-5), 143.1 (C-6), 181.6 (C-7), 127.3 (C-8), 43.8 (C-9), 165.8 (C-10), 31.5 (C-11), 23.7 (C-12), 124.3 (C-13), 110.5 (C-14), 143.1 (C-15), 138.6 (C-16), 11.5 (C-17), 28.0 (C-18), 27.9 (C-19), 27.6 (C-20)。以上数据与参考文献[3, 20]的氢谱和碳谱数据对照基本一致, 鉴定该化合物为leojaponin, 译为益母草素。

化合物2, 黄色固体。其  $^{13}\text{C-NMR}$  谱显示该化合物有20个碳, 由DEPT90谱推出有3个叔碳( $\delta_{\text{C}}$  143.2, 138.7, 110.3), 由DEPT135谱推出有4个伯碳( $\delta_{\text{C}}$  26.9, 22.9, 18.0, 12.0)和5个仲碳( $\delta_{\text{C}}$  37.8, 31.7, 28.8, 19.5, 17.4), 一共有8个季碳( $\delta_{\text{C}}$  35.1, 91.8, 189.0, 147.4, 124.7, 90.6, 59.2)其中包含四个连接在季碳上的甲基。结合文献数据[13], 在HMBC谱中, H-3与C-2, C-4, C-5, C-18相关; H-20与C-1, C-10, C-9相关。由此可推出A片段(图5a)。由C-7(147.4)和C-8(124.7)在175-225之间, 可知为一个 $\text{sp}^2$ 杂化的碳碳双键[20]。由C-6(189.0)在175-225之间, 可知为一个羰基[20]。由C-5(189.0)、C-9(90.6)在70-85附近, 推出为一个醚键[20]。  $^1\text{H-NMR}$  (图5)中有一个可与 $\text{D}_2\text{O}$ 交换的质子( $\delta$  6.29), 但在HMQC谱上找不到相对应的C信号, 根据它的氢谱化学位移值推测为羟基。在远程相关谱HMBC中, 这个羟基的质子与双键上的C-6, C-7, C-8相关, 可得知B片段(图5b)。结合文献数据[13-20], 推出C-13(124.0)、C-14(110.3)、

C-15(143.2)、C-16(138.7)这四个碳信号为一个呋喃环的特征。在HMBC谱中, H-11与C-12, C-9, C-10, C-8, C-7相关; H-12与C-13, C-14, C-16相关, 可得知C片段(图5c)。综合以上信息, 把上述A、B、C片段组合起来, 可推出化合物2的化学结构(如图5所示)。

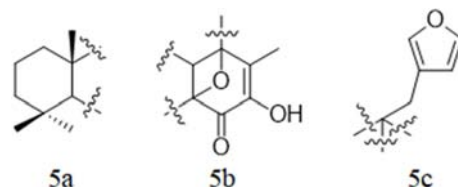


图5 化合物2的部分结构。

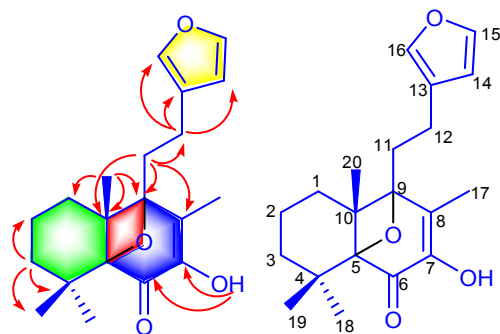


图6 化合物2的HMBC相关谱。

化合物3, 橘黄色油状物,  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  7.33 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 5.30 (s, 1H), 3.83 (s, 1H), 2.76 – 2.54 (m, 4H), 2.01 (s, 2H), 1.46 – 1.31 (m), 1.18 (d,  $J=6.9$  Hz, 4H), 0.88 (d,  $J=3.7$  Hz, 1H)。  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  181.6 (C-7), 165.6 (C-9), 143.1 (C-6), 142.3 (C-15), 140.6 (C-5), 127.4 (C-16), 111.0 (C-14), 46.9 (C-3''), 43.9 (C-1'), 37.2 (C-3), 35.7 (C-4), 31.7 (C-11), 29.4 (C-1), 28.1 (C-18), 28.0 (C-19), 27.6 (C-20), 23.6 (C-12), 17.2 (C-2), 11.7 (C-2'), 10.9 (C-17)。通过与leojaponin的  $^{13}\text{C}$  NMR谱进行对比, 再结合化合物3的二维HMQC谱, 看出只有C-14(111.0)与C-15(142.3)有相关信息, 在HMQC谱中无与C-16(138.6)相关的氢信息, 说明了呋喃环上的C-16上的氢被取代了, 综合化合物3的HMBC谱图, 可以推出化合物3的化学结构(如图7左)。

化合物4, 淡黄色固体,  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  6.47 (s, 1H), 4.58 (s, 1H), 4.12 (s), 3.67 (s, 2H), 3.00 (d,  $J=6.7$  Hz), 2.64 (s, 4H), 2.60 – 2.01 (m), 2.00 (s), 1.46 – 1.20 (m)。  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  181.6 (C-7), 165.5 (C-9), 143.1 (C-6), 127.5 (C-8), 46.8 (C-3''), 43.9 (C-10), 41.8 (C-1'), 37.2 (C-3), 37.0 (C-3), 35.7 (C-4), 33.7, 32.0 (C-11), 29.4 (C-1), 28.1 (C-18), 27.9 (C-20), 27.6 (C-19), 24.5, 23.5 (C-12), 17.2 (C-2), 13.5 (C-1'), 11.6 (C-17), 10.6 (C-2'), 9.7 (C-2')。在化合物4的HMQC谱图中只与(6.40, 114.1)相关, 而且无其余的呋喃环上碳氢相关信息, 说明了呋喃环上的C-15和C-16上的两个氢都被取代, 结合化合物4的HMBC谱图, 可以推出化合物4的化学结构为呋喃环上双曼尼希反应产物(如图7右)。

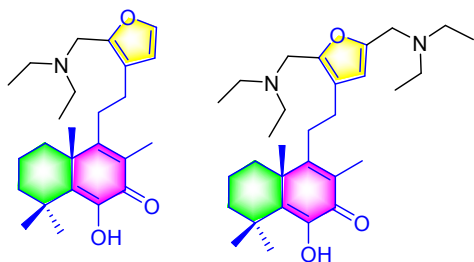


图7 化合物3和4的化学结构。

通过计算机分子对接分析, 化合物1-4与乙酰胆碱酯酶的亲和能分别为-8.9、-9.6、-9.5、-8.1 kcal/mol, 相比原配体石杉碱甲的亲和能为-11.6 kcal/mol, 说明四个化合物对乙酰胆碱酯酶有一定的抑制活性, 有开发为抗老年痴呆药物的潜力。化合物1-4与酶相互作用如图8-11所示。活性相比原化合物提高的化合物2和酶的相互作用主要有化合物2的6位羰基与PHE288形成氢键、7位羟基与SER286和ARG289形成氢键、呋喃环与TRP279形成pi-pi相互作用、疏水侧链分别与TYR121、LEU282、PHE290、PHE331、TYR334形成疏水相互作用(图9)。

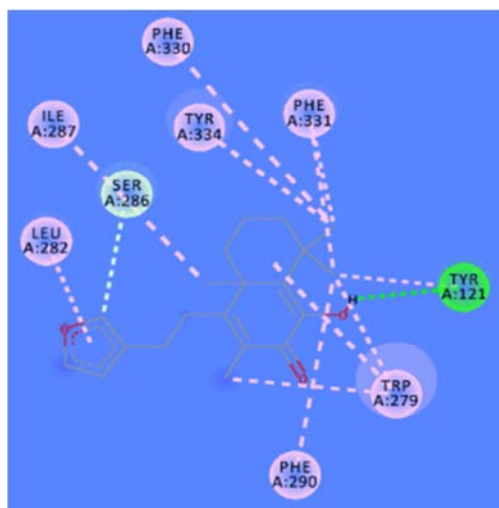


图8 化合物1与乙酰胆碱酯酶作用模式。

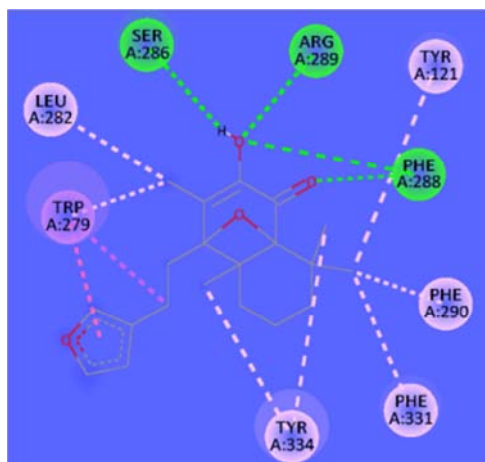


图9 化合物2与乙酰胆碱酯酶作用模式。

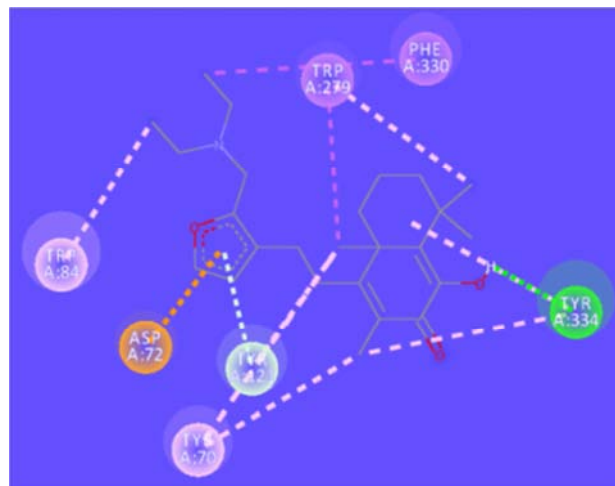


图10 化合物3与乙酰胆碱酯酶作用模式。

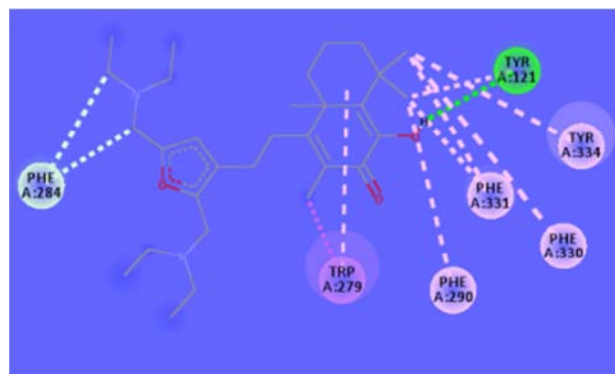


图11 化合物4与乙酰胆碱酯酶作用模式。

## 4. 结论

益母草素是益母草次生代谢产物中代表性二萜类化合物。通过研究, 我们建立采用大孔树脂富集与分离, 结合制备液相色谱分离益母草素的方法, 该方法制备速度快, 可得纯度大于98%的对照品, 可用于控制益母草药材的质量。通过高锰酸钾氧化反应, 成功实现了益母草素的结构转变, 转化为含内醚键的重排化合物2。含氮化合物往往具有较强的生物活性, 该研究中通过曼尼希反应, 成功地在益母草素的呋喃环上引入了含氮官能团, 通过二维核磁共振波谱分析鉴定了两个含氮衍生物的化学结构(化合物3和4), 采用计算机软件研究了化合物与乙酰胆碱酯酶的相互作用, 计算了亲和能, 结果表明改造得到的化合物2和3比原化合物亲和能强, 为进一步研究益母草素衍生物抑制乙酰胆碱酯酶活性, 发现抗老年痴呆先导化合物奠定了基础。

## 基金项目

该项目研究得到了国家自然科学基金项目(21302004, U1304825), 河南省科技攻关项目(212102311024), 安阳工学院博士科研启动基金项目(BSJ2021031)的资助。

## 参考文献

- [1] 汪娇梅,余丽丽,许玲玉,黄锁义.广西益母草中总碱的提取研究[J].微量元素与健康研究,2014,31(2):38-39.
- [2] Liu, Z. K., Wu, D. R., Shi, Y. M., Zeng, T., Liu, S. H., Du, X., Dang, Y. J., Xiao, W. L., Sun, H. D. Three new diterpenoids from *Leonurus japonicus* [J]. Chin. Chem. Lett., 2014, 25: 677-679.
- [3] Romero-González, R. R., Avila-Núñez, J. L., Aubert, L., Alonso-Amelot, M. E. Labdane diterpenes from *Leonurus japonicus* leaves [J]. Phytochemistry, 2006, 67: 965-970.
- [4] Ye, M., Xiong, J., Zhu, J. J., Hong, J. L., Zhao, Y., Fan, H., Yang, G. X., Xia, G., Hu, J. F. Leonurusoleanolides E-J, minor spirocyclic triterpenoids from *Leonurus japonicus* fruits [J]. J. Nat. Prod., 2014, 77: 178-182.
- [5] Fuchino, H., Daikonya, A., Kumagai, T., Goda, Y., Takahashi, Y., Kawahara, N. Two new labdane diterpenes from fresh leaves of *Leonurus japonicus* and their degradation during drying [J]. Chem. Pharm. Bull., 2013, 61: 497-503.
- [6] Chang, J. M., Shen, C. C., Huang, Y. L., Shieh, B. J., Chen, C. C. Two new glycosides from *Leonurus japonicus* [J]. J. Asian Nat. Prod. Res., 2010, 12: 740-744.
- [7] Moon, H. I. Three diterpenes from *Leonurus japonicus* Houtt protect primary cultured rat cortical cells from glutamate-induced toxicity [J]. Phytother. Res., 2010, 24: 1256-1259.
- [8] Xiong, L., Peng, C., Zhou, Q.-M., Wan, F., Xie, X.-F., Guo, L., Li, X.-H., He, C.-J., Dai, O. Chemical Composition and antibacterial activity of essential oils from different parts of *Leonurus japonicas* Houtt. [J] Molecules, 2013, 18: 963-973.
- [9] Zhang, Y., Deng, S., Qu, L., An, Y.-T., Wu, C.-H., Han, L.-F., Gao, X.-M., Wang, T. Rare syringyl acylated flavonol glycosides from the aerial parts of *Leonurus japonicas* Houtt [J]. Molecules, 2013, 18: 2967-2977.
- [10] Xiong, L., Zhou, Q.-M., Peng, C., Xie, X.-F., Guo, L., Li, X.-H., Liu, J., Liu, Z.-H., Dai, O. Sesquiterpenoids from the herb of *Leonurus japonicus* [J]. Molecules, 2013, 18: 5051-5058.
- [11] Peng, F., Xiong, L., Zhao, X.-M. A bicyclic diterpenoid with a new 15,16-dinorlabdane carbon skeleton from *Leonurus japonicas* and its coagulant bioactivity [J]. Molecules, 2013, 18: 13904-13909.
- [12] Wu, H., Li, J., Fronczek, F. R., Ferreira, D., Burandt, C. L., Jr., Setola, V., Roth, B. L., Zjawiony, J. K. Labdane diterpenoids from *Leonotis leonurus* [J]. Phytochemistry 2013, 91: 229-235.
- [13] Wu, H., Fronczek, F. R., Ferreira, D., Burandt, C. L., Jr., Zjawiony, J. K. Labdane diterpenoids from *Leonurus sibiricus* [J]. J. Nat. Prod., 2011, 74: 831-836.
- [14] Wu, H., Wang, S., Xu, Z. Y., Sun, S., Liu, R., Wang, J. E., Y., Lv, Y., Dong, X., Li, G., Zhang, L., Shi, Y. Isoleojaponin, a New Halimane Diterpene Isolated from *Leonurus japonicas* [J]. Molecules, 2015, 20: 839-845.
- [15] Wu, H. K., Mao, Y. J., Sun S. S., Xu Z. Y., Ma Y., Cao, J. X., Qi, H., Wu, Z. F., Li, G., Yang, W. H. Leojaponic acids A and B, two new homologous terpenoids isolated from *Leonurus japonicus* [J]. Chin. J. Nat. Med., 2016, 14 (4): 303-307.
- [16] Wu, H. K., Wang, S. S., Liu, H. J. E., Y., Li, Y., Liu, R. J., Wang, J. J., Xu, Z. Y., Lv, Y. Y., Sun, S. S., Li, G., Shi, Y. Two new diterpenoids from *Leonurus japonicus* [J]. Revista Brasileira de Farmacognosia 2015, 25 (2):180-182.
- [17] Wu, H., Wang, S., Liu, H., E, Y., Wang, J., Wang, X. Wei, W., Xu, Z., Sun, S., Li, Y., Liu, R., Li, G., and Shi, Y. Diterpenoids from *Leonurus japonicus* [J]. J. Korean Chem. Soc., 2015, 59 (2): 179-182.
- [18] Wu, H. K., Sun, T., Zhao, F., Zhang, L. P., Li, G., Zhang, J. New diterpenoids from *Leonurus japonicus* and their acetylcholinesterase inhibitory activity [J]. Chin. J. Nat. Med., 2017, 15 (11): 860-864.
- [19] Trott, O., Olson, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading [J]. J. Comput. Chem. 2010, 31: 455-461.
- [20] 张娴,彭国平.益母草化学成分研究[J].天然产物研究与开发. 2004,16 (2):104-106.