

血人参乙酸乙酯部位保肝活性化学成分分离鉴定

雷钟, 朱新宇, 杨宇莎, 周威, 梁妍*, 郝小燕*
(贵州医科大学药学院, 贵阳 550025)

[摘要] **目的:**系统开展血人参乙酸乙酯部位保肝活性化学成分的研究工作。**方法:**将血人参的乙醇提取浸膏,依次进行萃取得到乙酸乙酯、正丁醇部位。开展在小鼠体内的保肝活性筛选试验,设立正常组、四氯化碳模型组、联苯双酯组、乙酸乙酯灌胃组和皮下组、正丁醇灌胃组和皮下组,检测不同组小鼠血清中谷丙转氨酶(ALT)活性,评价待测药物保肝活性。针对保肝活性部位,利用硅胶柱,Sephadex LH-20,反相 C_{18} 色谱柱等手段进行活性单体化合物的分离,并进行结构鉴定。在四氯化碳诱导人肝HL-7702细胞株损伤模型下,对分离出来的化合物进行体外保肝活性筛选。**结果:**皮下给予血人参乙酸乙酯提取物对四氯化碳造成的小鼠肝损伤具有显著保护作用($P < 0.05$)。从血人参乙酸乙酯部分分离得到了11个化合物,经结构鉴定,确定为豆甾醇(化合物1),L-高丽槐素(化合物2),medicarpin(化合物3),豆甾4-烯-3-酮(化合物4),豆甾烷-3-酮(化合物5),3-hydroxy-8,9-dimethoxypterocarpan(化合物6),表儿茶素(化合物7), $2\alpha,3\alpha$ -epoxyflavan-5,7,3',4-tetraol-($4\beta \rightarrow 8$)-flavan-5(化合物8), $2\alpha,3\alpha$ -epoxy-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavan-($4\beta \rightarrow 8$)-epicatechin(化合物9),表儿茶素(化合物10)和schizandriside(化合物11)。其中化合物2首次从血人参中分离得到,化合物3,化合物6首次从木蓝属植物中分离得到。化合物8,化合物9和化合物11对四氯化碳诱导的人肝HL-7702细胞损伤有一定程度的保护作用($P < 0.05$),HL-7702细胞存活率明显升高,提示化合物8,化合物9和化合物11在体外对肝细胞损伤有保护作用。**结论:**该研究确定血人参乙酸乙酯部位是该药材保肝活性的主要部位,而从中分离出的化合物8,化合物9和化合物11是血人参保肝活性的有效化合物。

[关键词] 血人参; 化学成分; 保肝活性; 中药

[中图分类号] R284.2; R282.6; R2-03; R22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)07-0056-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180609

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171226.1424.030.html>

[网络出版时间] 2017-12-27 13:49

Hepatoprotective Chemical Constituents from Thylacetate Extract of *Indigofera stachyoides* Radix

LEI Zhong, ZHU Xin-yu, YANG Yu-sha, ZHOU Wei, LIANG Yan*, HAO Xiao-yan*
(School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

[Abstract] **Objective:** To systematically screen the hepatoprotective compounds from ethyl acetate extract of the roots of *Indigofera stachyoides*. **Method:** The roots of *I. stachyoides* were extracted by ethanol, and then its extract was further divided into ethyl acetate fraction and n-butanol fraction. The hepatoprotective activity screening was performed in mice in the normal control group, carbon tetrachloride (CCl_4) model group, bifendate (DDB) group, intragastric administration group and subcutaneous group of ethyl acetate fraction, intragastric administration group and subcutaneous group of the n-butanol fraction. Glutamic pyruvic transaminase (ALT) level was detected in miceto evaluate the hepatoprotective activity of different samples. Then effective compounds of the hepatoprotective sample had been isolated and their structures were identified by silica gel column chromatography,

[收稿日期] 20170730(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460640)

[第一作者] 雷钟,在读硕士,从事天然产物化学研究,E-mail: 260696425@qq.com

[通信作者] *梁妍,副教授,从事药品质量标准研究,E-mail: soroly7775@sina.com;

*郝小燕,教授,从事天然产物化学及质量标准研究,E-mail:2604084238@qq.com

Sephadex LH-20, RP-18 column chromatography and other means. Screening of hepatoprotective activity of isolated chemical compounds was performed *in vitro* in CCl₄-induced human HL-7702 cell damage model. **Result:** Subcutaneous group of ethyl acetate fraction showed significant hepatoprotective effect on mice liver injury model ($P < 0.05$). Total 11 compounds were isolated from this ethyl acetate fraction of *I. stachyoides*, which had been identified as stigmasterol (compound **1**), *L*-maackiain (compound **2**), medicarpin (compound **3**), stigmast-4-en-3-one (compound **4**), stigmastan-3-one (compound **5**), 3-hydroxy-8, 9-dimethoxypterocarpan (compound **6**), (+)-epicatechin (compound **7**), 2 α , 3 α -epoxyflavan-5, 7, 3', 4'-tetraol- (4 β →8) -flavan-5'', 7'', 4'''-triol (compound **8**), 2 α , 3 α -epoxy-5, 7, 3', 4'-tetrahydroxyflavan- (4 β →8) -epicatechin (compound **9**), (-)-epicatechin (compound **10**) and schizandriside (compound **11**). Compound **2** was isolated from this plant for the first time. Compounds **3** and **6** were isolated from *Indigofera* for the first time. Compounds **8**, **9** and **11** had a certain degree of protective effect on CCl₄-induced human HL-7702 cell damage model ($P < 0.05$). The survival rate of HL-7702 was significantly increased, suggesting that compound **8**, compound **9** and compound **11** had protective effects on hepatocyte injury *in vitro*. **Conclusion:** In this study, ethyl acetate fraction of *I. stachyoides* was the main effective part of the hepatoprotective effect, and compound **8**, **9** and **11** from this fraction were the main effective compounds.

[**Key words**] *Indigofera stachyoides*; chemical constituents; hepatoprotective effect; traditional Chinese medicine

血人参又名铁刷子(《贵州民间方药集》^[1]),山红花,红苦刺(《云南中草药》^[2])。在我国主要分布于云南,贵州,福建,广西等地^[3]。血人参味辛微苦,性温,入肺脾经,民间多用于治疗伤风发热、小儿痰哮、妇女瘀血腹痛、血崩、肝硬化及跌打损伤等^[4],研究表明血人参富含含有黄酮类、挥发油类、甾醇类、酚酸类、木质素苷类化合物^[5-9],具有抗氧化、降血糖血脂、保肝、抗肿瘤等作用^[10-15]。目前,血人参的开发利用程度较低,除民间验方外,其他典籍鲜有记载。国内学者使用仪器分析手段如 HPLC-MS, GC-MS 等对茸毛木蓝挥发性成分及水溶性成分进行研究,取得了一定的研究进展。文献报道在一定程度上对血人参的化学成分进行揭示。然而,国内外学者对于血人参的报道仍然较少,尤其是其化学成分的研究不够全面,且药理研究多集中于抗菌、细胞增殖抑制、抗肿瘤等活性上,保肝活性研究尚属少见^[16-18]。因此,明确血人参的化学成分并对之进行保肝活性筛选具有十分重要的意义,也为其进一步的药理学研究奠定物质基础。因此本实验拟对血人参药材的化学成分进行系统研究,找到其保肝活性的有效单体化合物。

1 材料

AV-600 MHz, DRX-500, AM-400 型核磁共振仪(美国 Bruker 公司,内标为 TMS); Autospec Premier P776 型质谱仪(美国 Waters 公司); R-210 型旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司); UV-2000 型紫外-可见分光

光度计(上海尤尼科); Epoch 型荧光酶标仪(美国 Biotek 公司); TS-100 型倒置相差显微镜(日本尼康公司); HH-S2 数显恒温水浴锅(普天仪器); L-600 型台式低速离心机(湖南湘仪); Forma Series II 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司)。

LH-20 羟丙基葡聚糖凝胶凝胶(Sephadex LH-20, 瑞典 Pharmacia 公司), 高效硅胶板(德国 Merck 公司), 硅胶和薄层色谱硅胶(青岛海洋化工), 反相材料 Lichroprep RP-18 凝胶(德国 Merck 公司), 四氯化碳(分析纯, 开封化学试剂), 联苯双酯滴丸(批号 20150708, 浙江万邦药业), 谷丙转氨酶试剂盒(GPT, 批号 20160104, 南京建成生物工程研究所); 清洁级雄性昆明种小鼠 75 只, 体质量(20 ± 2) g, 动物许可证号 SCXK(渝)20015-0008, 重庆腾鑫比尔实验动物, 实验过程中动物处理严格按照“实验动物照顾和使用指南(中国科技部, 2006)”进行, 并获得贵州医科大学动物伦理委员会批准。

四甲基偶氮唑盐(MTT, 批号 M8180, 华美公司), 无水乙醇(AR, 重庆北碚精细化工), HL-7702 细胞株(人肝正常细胞, 批号 20160401, 中国科学院上海生命科学研究院), RPMI-1640 培养基(批号 356308, 美国 HyClone 公司), 无支原体胎牛血清(美国 Gibco 公司), 青链霉素混合液、胰酶(批号均为 16000-044, 美国 HyClone 公司)。血人参于 2014 年 10 月采自六枝特区, 经贵阳中医学院陈德媛研究员鉴定为豆科蝶形花亚科植物茸毛木蓝 *Indigofera*

stachyoides 的根,标本存放于贵州医科大学药学院。

2 方法与结果

2.1 血人参保肝活性部位的筛选 待测药物的制备:血人参干燥药材 40.0 kg,经粉碎成粗品(80 目)后,用 95% 乙醇回流提取 3 次(4,4,3 h)后,用 50% 乙醇回流 2 h,合并提取液,回收乙醇得浓稠浸膏。用适量水分散,依次用乙酸乙酯,正丁醇进行系统萃取,得到乙酸乙酯萃取部位、正丁醇萃取部位。

谷丙转氨酶(ALT)活性测定:健康小鼠随机分为正常组,模型组,联苯双酯组(100 mg·kg⁻¹),乙酸乙酯灌胃组(200 mg·kg⁻¹),乙酸乙酯皮下组(200 mg·kg⁻¹),正丁醇灌胃组(500 mg·kg⁻¹),正丁醇皮下组(500 mg·kg⁻¹),连续给药 4 d,末次给药 8 h 后腹腔注射 0.1% CCl₄-菜油 10 mL·kg⁻¹ 禁食 16 h 后处死。取小鼠颈动脉血,室温静置 30 min,待血清析出后离心 10 min(转速 2 000 r·min⁻¹),取出血清,按照 ALT 测试盒说明书测定 ALT 水平。所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 统计软件单因素方差分析进行统计学处理, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。结果见表 1。与正常组比较,模型组小鼠血清中 ALT 水平显著升高小鼠肝损伤模型建立成功,乙酸乙酯皮下给药组可以显著降低四氯化碳引起的 ALT 水平,与模型组相比具有显著差异,因此,乙酸乙酯部位是血人参的保肝活性部位。

表 1 血人参各部位对四氯化碳诱导的肝损伤的保护作用($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Protective effects of different parts of extracts of *Indigofera stachyoides* radix to carbon tetrachloride-induced liver injury($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分组	剂量/mg·kg ⁻¹	给药方式	ALT/g·L ⁻¹
正常	-	-	0.31 ± 0.02 ¹⁾
模型	-	-	0.53 ± 0.10
联苯双酯	100	灌胃	0.37 ± 0.06 ¹⁾
乙酸乙酯	200	灌胃	0.46 ± 0.10
正丁醇	500	灌胃	0.50 ± 0.10
乙酸乙酯	200	皮下	0.33 ± 0.07 ¹⁾
正丁醇	500	皮下	0.49 ± 0.06

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

2.2 血人参保肝活性部位化学成分分离 取乙酸乙酯萃取物(1 009 g)采用正相硅胶柱色谱,用三氯甲烷-甲醇(95:5~50:50)梯度洗脱,共接收 280 个流分。将洗脱得到的各流分点板合并后得 5 个组分

(A~E) 其中,组分 A 为棕黄色固体,经正相柱色谱石油醚-乙酸乙酯(50:1~1:1)洗脱得 AM₁~AM₁₀。AM₂ 为白色粉末状固体,采用高效制备硅胶板将主点与杂质分离,再经过重结晶纯化得化合物 1(805.1 mg)。AM₃ 为浅黄色油状物,经凝胶色谱 Sephadex LH-20(三氯甲烷-甲醇 1:1)洗脱,半制备 HPLC(80% 甲醇)将其分离,得化合物 4(60.1 mg)。AM₆ 为红棕色黏稠的膏状固体,用正相硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯 5:1)进一步分离纯化后用半制备 HPLC(55% 甲醇)将其分开,得到化合物 2(19.2 mg)和化合物 3(21.4 mg)。AM₈ 经凝胶色谱 Sephadex LH-20(丙酮)洗脱,经 ODS 高压制备液相(95% 甲醇)得到化合物 5(80.6 mg)。组分 B 经反复正相柱色谱(三氯甲烷-丙酮 20:1~1:1)洗脱得 BM₁~BM₅,BM₃ 经 ODS 高压制备液相(25% 甲醇)得化合物 6(15.1 mg),BM₅ 经凝胶色谱 Sephadex LH-20(三氯甲烷-甲醇 1:1)洗脱及反复正相柱色谱得到化合物 7(800.1 mg)。组分 C 与 D 点板后合并,经中压反相柱色谱(10%,15%,20%,30%,40% 甲醇)洗脱,再经 ODS 高压制备液相(15% 甲醇)得到化合物 8(710.1 mg),化合物 9(211.0 mg),化合物 10(10.1 mg),化合物 11(30.5 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1 无色针状结晶(三氯甲烷),EI-MS m/z 412 [M]⁺; ¹H-NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ : 5.32(1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-6), 3.52(1H, m, H-3), 0.70(3H, s, 18-CH₃); ¹³C-NMR(CDCl₃, 100 MHz) δ : 37.1(C-1), 31.3(C-2), 71.5(C-3), 42.1(C-4), 140.5(C-5), 121.5(C-6), 32.0(C-7), 32.1(C-8), 50.2(C-9), 36.5(C-10), 21.1(C-11), 39.9(C-12), 42.2(C-13), 56.9(C-14), 24.5(C-15), 28.9(C-16), 55.9(C-17), 12.0(C-18), 19.4(C-19), 40.5(C-20), 21.2(C-21), 138.3(C-22), 129.3(C-23), 51.1(C-24), 31.8(C-25), 21.1(C-26), 19.0(C-27), 25.4(C-28), 12.3(C-29)。同文献[19]核对基本一致,确定该化合物为豆甾醇(stigmasterol)。

化合物 2 无色针状结晶(三氯甲烷),ESI-MS(-) m/z 283, [M-H]⁺, 100%; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 7.36(1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-1), 6.55(1H, dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz, H-2), 6.41(1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-4), 4.22(1H, dd, $J = 10.0, 4.0$ Hz, H-6a), 3.63(1H, t, $J = 10.0$ Hz, H-6 β), 6.71(1H, s, H-7), 6.43(1H, s, H-10), 5.92(2H, each d, $J = 11.0$ Hz, OCH₂O), 3.47(1H, m, H-6a), 5.47(1H, d,

$J = 6.8$ Hz, H-11a); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 132.2 (C-1), 109.7 (C-2), 156.6 (C-3), 103.6 (C-4), 157.0 (C-4a), 66.4 (C-6), 40.1 (C-6a), 117.9 (C-6b), 104.7 (C-7), 141.7 (C-8), 148.1 (C-9), 93.8 (C-10), 154.2 (C-10a), 78.4 (C-11a), 112.7 (C-11b), 101.3 (OCH_2O)。ESI-MS 负离子模式显示分子离子为 283, 提示相对分子量为 284, $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) 显示该化合物共有 16 个 C 信号, 结合 DEPT 谱可以看出这些 C 信号中有 6 个季碳, 2 个亚甲基。其中芳环区有 12 个 C 信号。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) 中 δ 5.47, 3.47, 3.63, 4.22 共 4 个质子信号推测为紫檀素类化合物 C 环 4 个氢, 综合以上信息推测该化合物为一紫檀素类化合物, 芳香质子区显示存在一个 ABX 耦合系统, 推测 A 环为 3-OH 取代结构, δ 6.71 和 6.43 有 2 个单峰, 推测 B 环存在对位氢, 为 AB 耦合系统。 δ 5.92 为典型的 OCH_2O 取代基信号。推测为 8, 9 位的 OCH_2O 取代, $^1\text{H-NMR}$ 及 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据同文献[20]核对基本一致, 确定该化合物为 *L*-高丽槐素 (*L*-maackiain)。

化合物 3 棕色粒状固体 (甲醇)。ESI-MS (-) m/z 269 [M - 1]; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CH_3OD) δ : 7.28 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-1), 7.16 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-7), 6.48 (1H, dd, $J = 8.5, 2.5$ Hz, H-2), 6.43 (1H, dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz, H-8), 6.37 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-10), 6.29 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-4), 5.45 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-11a), 4.21 (1H, dd, $J = 10.5, 4.5$ Hz, H-6a), 3.73 (3H, s, 9- OCH_3), 3.51 (2H, m, H-6 α , H-6 β); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CH_3OD) δ : 162.6 (C-10a), 162.0 (C-9), 160.1 (C-3), 158.0 (C-4a), 133.2 (C-1), 125.9 (C-7), 120.9 (C-6b), 112.9 (C-11b), 110.7 (C-2), 107.2 (C-8), 104.1 (C-4), 97.5 (C-10), 80.1 (C-11a), 67.6 (C-6), 55.9 (9- OCH_3), 40.9 (C-6a)。ESI-MS 负离子模式显示准分子离子为 269, 提示相对分子量为 270。 $^{13}\text{C-NMR}$ (600 MHz, CH_3OD) 显示该化合物有 16 个 C 信号, 从 DEPT 谱可以看出, 与化合物 2 相比, 化合物 3 碳骨架除了 1 个亚甲基, δ 40.9 显示有甲氧基取代外, 和化合物 2 基本一致。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CH_3OD) 中 δ 5.45, 4.21, 3.51, 3.51 共 4 个质子信号推测为紫檀素类化合物 C 环 4 个氢, 推测该化合物为一紫檀素类化合物, 芳香质子区显示存在 2 个 ABX 耦合系统, δ 3.74 (s, 3H) 为甲氧基信号, 初步判断 A 环为 OH 取代, B 环为 OCH_3 取代, $^1\text{H-NMR}$ 数据同文献[21]核对基本一致, 确定该化合物为 medicarpi。

化合物 4 白色粉末; EI-MS m/z 412 [M]⁺, $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.71 (1H, s, H-4), 1.21 (3H, s, CH_3 -19), 0.93 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, CH_3 -21), 0.87 (3H, t, $J = 8.0$ Hz, CH_3 -29), 0.86 (3H, d, $J = 8.0$ Hz, CH_3 -26), 0.83 (3H, d, $J = 8.0$ Hz, CH_3 -27), 0.73 (3H, s, CH_3 -18); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 199.6 (C-3), 171.7 (C-5), 123.5 (C-4), 56.0 (C-17), 55.8 (C-14), 53.6 (C-9), 45.8 (C-24), 42.3 (C-13), 39.6 (C-12), 38.5 (C-10), 36.1 (C-20), 35.7 (C-1), 5.6 (C-8), 34.0 (C-2), 33.8 (C-22), 33.2 (C-6), 32.0 (C-7), 29.1 (C-25), 28.2 (C-16), 26.0 (C-23), 21.0 (C-11), 24.2 (C-15), 23.0 (C-28), 19.8 (C-26), 19.0 (C-27), 18.7 (C-21), 17.4 (C-19), 12.0 (C-29), 11.9 (C-18)。从 $^1\text{H-NMR}$ δ 5.71 (1H, s, H-4) 为环上双键氢的信号, 且为单峰, 说明其周围没有其他氢与它耦合。 δ 1.21, 0.93, 0.87, 0.86, 0.83, 0.73 位于高场, 说明有 6 个甲基质子信号。从 $^{13}\text{C-NMR}$ 中, 总共有 29 个 C 信号, δ 199.6 (C-3) 为酮羰基的碳信号, δ 123.5 和 171.7 为环上 C-4 和 C-5 位上的双键特征吸收峰。以上数据与文献[22]报道的数据一致, 故鉴定为豆甾-4-烯-3-酮 (stigmast-4-en-3-one)。

化合物 5 白色无定型粉末; ESI-MS m/z 414 [M]⁺ (60%), 231 (100%), 232 (50%), 217 (30%), 123 (20%), 163 (20%); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 0.97 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-21), 0.83 (3H, t, $J = 8.4$ Hz, H-29), 0.82 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-26), 0.79 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-27), 0.65 (3H, s, H-18); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 212.2 (C-3), 56.2 (C-17), 56.1 (C-14), 53.8 (C-9), 46.6 (C-5), 45.8 (C-24), 44.7 (C-4), 42.6 (C-13), 39.9 (C-12), 38.5 (C-1), 38.2 (C-2), 36.1 (C-20), 35.5 (C-10), 35.4 (C-8), 33.9 (C-22), 31.7 (C-7), 29.1 (C-25), 28.9 (C-6), 28.2 (C-16), 26.0 (C-23), 24.2 (C-15), 23.0 (C-28), 21.3 (C-11), 19.8 (C-26), 19.0 (C-27), 18.7 (C-21), 12.0 (C-18), 11.9 (C-29), 11.4 (C-19)。从 $^{13}\text{C-NMR}$ 上看, 总共给出 29 个 C 信号, δ 212.2 (C-3) 为酮羰基的 C 信号, 对比化合物 4 发现只是在 A 环的 4, 5 位上少了 1 个双键, 其他数据基本吻合, 以上数据与文献[23]一致, 故鉴定为豆甾烷-3-酮 (stigmastan-3-one)。

化合物 6 白色针状结晶 (丙酮)。ESI-MS (+) m/z 301.1 [M + 1]⁺; $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz,

CDCl_3), δ : 7.38 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1), 6.82 (1H, s, H-7), 6.55 (1H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, H-2), 6.51 (1H, s, H-10), 6.41 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-4), 5.48 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-11a), 4.25 (1H, dd, $J = 10.5, 4.5$ Hz, H-6a), 3.85 (3H, s, 9-OCH₃), 3.83 (3H, s, 8-OCH₃), 3.60 (2H, m, H-6 α , H-6 β); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 156.9 (C-3), 156.6 (C-4a), 153.7 (C-10a), 150.1 (C-9), 143.6 (C-8), 132.1 (C-1), 116.7 (C-6b), 112.8 (C-11b), 109.7 (C-2), 108.6 (C-7), 103.6 (C-4), 95.5 (C-10), 78.1 (C-11a), 66.5 (C-6), 56.9 (8-OCH₃), 56.0 (9-OCH₃), 40.4 (C-6a)。ESI-MS 正离子模式显示准分子离子 [M + H]⁺ 为 301.1, 提示相对分子质量为 300。¹H-NMR (600 MHz, CDCl_3) 中 δ 5.48, 4.25, 3.60, 3.60 共 4 个质子信号推测为紫檀素类化合物 C 环四个氢, 推测为该化合物为一紫檀素类化合物, 芳环区显示存在一个 ABX 耦合系统 (δ 7.38, 6.55, 6.41) 和 2 个苯环上对位的质子信号 (δ 6.82, s, 6.51, s), δ 3.85 (s, 3H) 和 3.83 (s, 3H) 为 2 个甲氧基信号,¹H-NMR 数据同文献[24]核对基本一致, 确定该化合物为 3-hydroxy-8,9-dimethoxypterocarpan。

化合物 7 淡黄色粉末 (甲醇); ESI-MS m/z 313 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 4.81 (1H, s, H-2), 4.16 (1H, dd, $J = 4.6, 2.8$ Hz, H-3), 2.85 (1H, dd, $J = 16.8, 4.6$ Hz, H-4a), 2.72 (1H, dd, $J = 16.8, 2.8$ Hz, H-4b), 5.93 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 5.90 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 6.96 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2'), 6.75 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.79 (1H, dd, $J = 8.2, 1.6$ Hz, H-6')。 ¹³C-NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 79.9 (C-2), 67.5 (C-3), 29.3 (C-4), 157.7 (C-5), 96.3 (C-6), 158.0 (C-7), 95.8 (C-8), 157.4 (C-9), 100.0 (C-10), 132.3 (C-1'), 115.3 (C-2'), 145.8 (C-3'), 145.9 (C-4'), 119.4 (C-5'), 115.8 (C-6')。从¹H-NMR 可以看出, δ 5.93 (1H, d, $J = 2.3$ Hz) 和 5.90 (1H, d, $J = 2.3$ Hz) 为非常典型的黄酮类化合物 H-6 和 H-8, 并说明 A 环为 5,7-二羟基取代。苯环质子 δ 6.96 (1H, d, $J = 1.6$ Hz), 6.75 (1H, d, $J = 8.2$ Hz) 及 6.79 (1H, dd, $J = 8.2, 1.6$ Hz) 构成了 B 环 ABX 系统, 说明其为 3',4'二羟基取代。与文献[25]核对基本一致, 确定该化合物为表儿茶素。

化合物 8 粉红色无定型粉末, ESI-MS m/z 583 [M + Na]⁺; ¹H-NMR (500 MHz, CH_3OD) δ : 7.51 (1H, dd, $J = 8.6, 1.9$ Hz, H-2'''), 7.51 (1H, dd, $J =$

8.6, 1.9 Hz, H-6'''), 7.13 (1H, d, $J = 2.0, 2.0$ Hz, H-2'), 7.01 (1H, dd, $J = 8.3, 2.2$ Hz, H-6'), 6.84 (1H, dd, $J = 8.6, 1.9$ Hz, H-3'''), 6.84 (1H, dd, $J = 8.6, 1.9$ Hz, H-5'''), 6.81 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 6.07 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 6.01 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 4.99 (1H, s, H-2''), 4.41 (1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-4), 4.23 (1H, s, H-3''), 4.05 (1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-3), 2.77 (1H, m, H-4''), 2.96 (1H, dd, $J = 17.0, 4.9$ Hz, H-4''); ¹³C-NMR (125 MHz, CH_3OH) δ : 158.2 (C-4'''), 158.1 (C-7), 157.0 (C-9), 156.7 (C-7''), 154.2 (C-5''), 152.3 (C-5), 152.2 (C-9''), 146.8 (C-4'), 145.6 (C-3'), 132.4 (C-1'), 130.9 (C-1'''), 130.1 (C-2'''), 130.1 (C-6'''), 116.3 (C-3'''), 116.0 (C-5'''), 119.8 (C-6'), 116.0 (C-5'), 115.9 (C-2'), 107.2 (C-10), 104.2 (C-8''), 102.8 (C-10''), 100.4 (C-2), 96.5 (C-6), 98.3 (C-8), 96.6 (C-6''), 81.8 (C-2''), 68.3 (C-3), 67.7 (C-3''), 30.1 (C-4''), 29.4 (C-4)。从¹³C-NMR 和 DEPT 谱可以看出, 该化合物共有 30 个碳信号, 其中包括 14 个次甲基, 15 个季碳, 而芳环区有 24 个碳信号, 提示有 4 个苯环。结合¹H-NMR 可以看出, 其结构中有 1 个 1,2,3,5 四取代苯环 [6.01 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 6.07 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6)], 1 个 1,3,4 取代的芳香苯环 [7.01 (1H, dd, $J = 8.3, 2.2$ Hz, H-6'), 7.13 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 6.81 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5')], 1 个 1,4 取代的芳香苯环 [6.84 (2H, dd, $J = 8.6, 1.9$ Hz, H-3'''), 7.51 (2H, dd, $J = 8.6, 1.9$ Hz, H-6''')] 和 1 个五取代的芳香苯环 [6.09 (1H, s, H-6'')], 以上这些表明化合物化合物 8 是一个黄酮二聚体。同文献[26]核对数据基本一致, 确定该化合物为 2 α , 3 α -epoxyflavan-5, 7, 3', 4'-tetraol-(4 β →8)-flavan-5'', 7'', 4'''-triol。

化合物 9 从粉红色无定型粉末, ESI-MS m/z 577 [M + H]⁺; ¹H-NMR (500 MHz, CH_3OD) δ : 7.51 (1H, dd, $J = 8.6, 1.9$ Hz, H-2'''), 7.51 (1H, dd, $J = 8.6, 1.9$ Hz, H-6'''), 7.13 (1H, d, $J = 2.0, 2.0$ Hz, H-2'), 7.01 (1H, dd, $J = 8.3, 2.2$ Hz, H-6'), 6.84 (1H, dd, $J = 8.6, 1.9$ Hz, H-3'''), 6.84 (1H, dd, $J = 8.6, 1.9$ Hz, H-5'''), 6.81 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 6.07 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 6.01 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 4.99 (1H, s, H-2''), 4.41 (1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-4), 4.23 (1H, s, H-3''), 4.05 (1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-3), 2.77 (1H, m, H-4''), 2.96 (1H, dd, $J = 17.0, 4.9$ Hz, H-4''); ¹³C-NMR (125 MHz, CH_3OH) δ :

158.5 (C-4^{'''}), 158.3 (C-7), 157.3 (C-9), 156.8 (C-7^{''}), 154.4 (C-5^{''}), 152.5 (C-5), 152.4 (C-9^{''}), 146.9 (C-4[']), 145.8 (C-3[']), 132.6 (C-1[']), 130.8 (C-1^{''}), 130.1 (C-2^{'''}), 130.1 (C-6^{'''}), 116.0 (C-3^{'''}), 116.0 (C-5^{'''}), 119.9 (C-6[']), 116.0 (C-5[']), 115.6 (C-2[']), 107.4 (C-10), 104.3 (C-8^{''}), 102.5 (C-10^{''}), 100.3 (C-2), 96.6 (C-6), 98.3 (C-8), 96.7 (C-6^{''}), 81.8 (C-2^{''}), 68.3 (C-3), 67.2 (C-3^{''}), 30.1 (C-4^{''}), 29.4 (C-4)。从¹H-NMR谱可以看出,该化合物除了比化合物**8**多了一个OH-3^{'''},其他数据基本一致。同时¹³C-NMR中C-3^{'''}从化合物**8**的 δ 116.0变为145.9,提示3^{'''}可能有羟基取代,与文献[27-28]核对数据基本一致。

化合物**10** 白色针状结晶(甲醇),EI-MS显示 m/z 290 [M]⁺, 分子式 C₁₅H₁₄O₆。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD), δ : 6.76 (1H, d, J = 1.5 Hz, H-2[']), 6.72 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5[']), 6.64 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-6[']), 5.87 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-8), 5.80 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 4.51 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-2), 3.88 (1H, m, H-3), 2.79 (1H, dd, J = 5.5, 16.5 Hz, H-4 β), 2.44 (1H, dd, J = 8.0, 16.0 Hz, H-4 α)。¹³C-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 85.0 (C-2), 68.9 (C-3), 28.6 (C-4), 157.9 (C-5), 157.5 (C-7), 157.1 (C-9), 146.4 (C-4[']), 132.1 (C-1[']), 120.2 (C-6[']), 116.2 (C-2[']), 115.2 (C-5[']), 100.9 (C-10), 96.4 (C-6), 95.5 (C-8)。以上数据与文献[29]一致,故鉴定该化合物为表儿茶素(-)-epicatechin。

化合物**11** 白色针状结晶(甲醇);ESI-MS m/z 491 [M-H]⁻; ¹H-NMR (500 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 7.31 (1H, d, J = 1.3 Hz, H-2), 7.19 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5), 7.01 (1H, dd, J = 8.1, 1.3 Hz, H-6), 4.56 (1H, m, H-7), 2.38 (1H, m, H-8), 4.22 ~ 4.29 (1H, m, H-9a), 3.13 (1H, dd, J = 15.6, 4.4 Hz, H-9b), 6.85 (1H, s, H-2[']), 6.83 (1H, s, H-5[']), 3.58 ~ 3.64 (2H, m, H-7[']), 2.35 ~ 2.51 (1H, m, H-8[']), 4.03 ~ 4.15 (2H, m, H-9[']), 3.70 (3H, s, 3-OCH₃), 3.77 (3H, s, 3'-OCH₃), 4.62 (1H, d, J = 7.3 Hz, H-1^{''}), 4.05 (1H, m, H-2^{''}), 4.12 (1H, m, H-3^{''}), 4.18 ~ 4.21 (1H, m, H-4^{''}), 4.58 (1H, m, H-5^{''}a), 3.33 (1H, dd, J = 16.0, 11.4 Hz, H-5^{''}b)。¹³C-NMR (125 MHz) δ : 138.0 (C-1), 114.4 (C-2), 148.6 (C-3), 146.5 (C-4), 116.6 (C-5), 122.6 (C-6), 47.4 (C-7), 45.5 (C-8), 68.6 (C-9), 128.2 (C-1[']), 112.6 (C-2[']), 147.0 (C-3[']), 146.1 (C-

4[']), 118.0 (C-5[']), 134.1 (C-6[']), 33.9 (C-7[']), 39.2 (C-8[']), 64.3 (C-9[']), 56.1 (3-OCH₃), 55.9 (3'-OCH₃), 106.1 (C-1^{''}), 75.2 (C-2^{''}), 78.6 (C-3^{''}), 71.2 (C-4^{''}), 67.3 (C-5^{''})。波谱数据与文献[30]对照一致,故鉴定为 schizandriside。

4 血人参保肝活性成分的筛选

将HL-7702细胞株按照 7.0×10^4 个/mL接种于96孔板,每孔容积100 μ L,培养24 h后,吸出原培养基,模型组添加含最佳损伤浓度的CCl₄培养基,给药组分别加入待测化合物不同质量浓度(0.8, 0.4, 0.2 g·L⁻¹)的药液50 μ L,阳性组加入0.2 g·L⁻¹联苯双酯滴丸50 μ L,同时加入CCl₄,使CCl₄终浓度为最佳损伤浓度。正常组加入含有相对浓度乙醇的RPMI-1640培养基溶液100 μ L,每组6个复孔。继续培养24 h之后,向96孔培养板中每孔中加入5 g·L⁻¹的MTT溶液20 μ L,放入孵箱孵育4 h后,弃掉原培养上清液,每孔中加入DMSO 150 μ L,在摇床上振荡10 min以溶解紫色结晶,迅速用酶标仪570 nm波长处读取各孔吸光度A,按下式计算细胞存活率,筛选待测药物的保肝活性。细胞存活率 = 实验组 $A_{570\text{ nm}}$ / 正常组 $A_{570\text{ nm}} \times 100\%$ 。见表2。MTT法测定结果表明,CCl₄损伤后的模型组细胞活性明显下降仅为正常组的55.98%,联苯双酯组的0.2 g·L⁻¹联苯双酯对细胞的效果显著。化合物**8,9,11**对CCl₄诱导的肝损伤细胞具有明显的保护作用($P < 0.05$)。

表2 血人参中各化合物体外保肝活性

Table 2 *In vitro* screening results of hepatoprotective effect of compounds of *Indigofera stachyoides* Radix

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	细胞平均存活率/%
正常	-	100
模型	-	55.98 ³⁾
联苯双酯	0.2	94.96 ²⁾
化合物 8	0.8	78.56 ²⁾
	0.4	65.20 ¹⁾
化合物 9	0.2	56.75
	0.8	76.92 ²⁾
	0.4	63.93 ¹⁾
化合物 11	0.2	59.77
	0.8	84.62 ²⁾
	0.4	83.86 ²⁾
	0.2	61.79 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与正常组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

5 讨论

本实验从血人参乙酸乙酯部分分离得到了 11 个化合物,其中化合物 2 首次从血人参中分离得到,化合物 3,化合物 6 首次从木蓝属中得到,丰富和完善了血人参的化学成分研究。通过 CCl_4 诱导的体外人肝 HL-7702 细胞损伤模型对血人参乙酸乙酯部位分离得到的部分化合物进行保肝活性筛选,发现化合物 8,化合物 9 和化合物 11 具有一定的保肝活性。

药物浓度剂量选择通过将细胞数调整至最佳接种数,然后接种于 96 孔培养板中,培养 24 h 后,吸出原培养基,分别加入上述已配制的 3 种化合物质量浓度 $0.8 \sim 0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的药液 $50 \mu\text{L}$,同时加入 CCl_4 培养基,使 CCl_4 培养基终浓度为最佳损伤浓度,每组 6 个复孔。继续培养 24 h,MTT 法检测各组细胞的存活率,结果发现高剂量保肝活性较好而且在该剂量下没有出现细胞毒性而低剂量组没有发现明显的保肝活性而低剂量组没有发现明显的保肝活性,故最终选择待测化合物终质量浓度 $0.8, 0.4, 0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 开展后续研究工作。

试验中以 CCl_4 浓度 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为细胞损伤模型的浓度,因为在 CCl_4 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞形态改变不明显,检查结果显示细胞存活率为 94.37%,随着浓度的增加,细胞的存活率逐渐下降,当浓度达到 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞存活率仅为 10.28%,HL-7702 细胞出现细胞核溶解,细胞膜破损,细胞结构不清楚等现象,出现大量的凋亡细胞。当 CCl_4 浓度为 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,有一定量的凋亡细胞存在,但还是存在一定量形态保持正常的细胞,MTT 法检测细胞存活率为 55.98%,最为接近 HL-7702 细胞的半数抑制浓度。据相关文献报道,当乙醇浓度较低时 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),其对肝细胞并不表现出抑制作用,为了消除乙醇作为溶剂对肝损伤模型所带来的影响,试验中通过 MTT 法测定细胞存活率来说明乙醇作为溶剂对肝损伤模型所带来的干扰,实验结果表明,本实验中所用乙醇浓度对细胞的影响无统计学意义,实验中药物用乙醇溶解是可行的。本次实验阐明了血人参保肝活性成分,为血人参更深入的药学及相关研究奠定物质基础。

【参考文献】

[1] 杨济秋,杨济中. 贵州民间方药集[M]. 贵阳: 贵州人民出版社,1978: 465-466.
[2] 云南省卫生局革命编委会. 云南中草药[M]. 昆明:

云南人民出版社,1971:147-148.

[3] 陈田全,文纲,魏升华. 贵州苗药血人参野生资源源调查研究[J]. 安徽农业科学,2014,42(11):3235-3237.
[4] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第四卷[M]. 上海:科学技术出版社,1999: 3233-3234.
[5] 裘璐,梁妍,唐贵华,等. 茸毛木蓝根的化学成分研究[J]. 中成药,2013,35(2): 320-323.
[6] Rehman A U, Malik A, Riaz N, et al. Lipoygenase inhibiting Riazconstituents from *Indigofera hetrantha* [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2005, 53 (3): 263-266.
[7] 吕敏,苏艳芳,高媛,等. 苏木蓝和花木蓝的化学成分研究[J]. 中草药,2009,40(3): 356-360.
[8] Selvam C, Jachak M S, Oli G R, et al. A new cyclooxygenase (COX) inhibitory pterocarpan from *Indigofera aspalathoides*: structure elucidation and determination of binding orientations in the active sites of the enzyme by molecular docking [J]. Tetrahedron Lett,2004,45(22): 4311-4314.
[9] 苏艳芳,张新鑫,杨静,等. 苏木蓝化学成分的研究[J]. 中草药,2004,35(6):608-611.
[10] LI Y Y, LI C Q, XU Q T, et al. Antioxidant, α -glucosidase inhibitory activities *in vitro* and alloxan-induced diabetic rats' protective effect of *Indigofera stachyodes* Lindl. root [J]. J Med Plants Res,2012,6(9): 3321-3328.
[11] Bakasso S, Lamien-Meda A, Lamien C E, et al. Polyphenol contents and antioxidant activities of five *Indigofera* species (Fabaceae) from Burkina Faso [J]. Pak J Biol Sci,2008,11(11): 1429-1435.
[12] Farias-Silva E, Cola M, Calvo T R, et al. Antioxidant activity of indigo and its preventive effect against ethanol-induced DNA damage in rat gastric mucosa [J]. Planta Med,2007,73(12):1241-1246.
[13] Rajkapoor B, Jayakar B, Kavimani S, et al. Protective effect of *Indigofera aspalathoides* against CCl_4 -induced hepatic damage in rats [J]. J Herb Pharmacother,2006,6(1): 49-54.
[14] Shahjahan M, Vani G, Devi C S S. Protective effect of *Indigofera oblongifolia* in CCl_4 -induced hepatotoxicity [J]. J Med Food,2005,8(3): 261-265.
[15] Flávia C M Lopes a, Tamara R Calvo b, Lucas L Colombo, et al. Immunostimulatory and cytotoxicactivities of *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae) [J]. Nat Prod Res,2011,25(19): 1796-1806.
[16] 田璞玉,顾雪竹,王金梅,等. HS-SPME-GC-MS 分析茸毛木蓝地上部分和根挥发性成分 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6): 86-88.

- [17] 王小果,张汝国,张弘,等. 茸毛木蓝挥发性成分的全自动热脱附-气相色谱-质谱分析[J]. 云南大学学报:自然科学版,2013,35(S2):336-338.
- [18] 杨雅欣,廖尚高,王永林,等. 血人参水溶性化学成分UHPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(23):63-67.
- [19] 董玉,王宏伟,陈朝军,等. 文冠木化学成分的研究[J]. 北京中医药大学学报,2008,31(12):844-846.
- [20] Gisho Honda, Mamoru Tabata. Antidermatophytic substance from *Sophora angustifolia* [J]. *Planta Med*, 1982,46(2):122-123.
- [21] 李伟东,阚毓铭. 刺果甘草化学成分的研究[J]. 中国药学杂志,1999,34(1):11-13.
- [22] Gaspar E M M, das Neves H J C. Steroidal constituents from mature wheat straw [J]. *Phytochemistry*, 1993,34(2):523-527.
- [23] 赵友兴,李承森,罗晓东,等. 上新世华山松化石中的甾体化合物[J]. 有机化学,2005,25(9):1100-1102.
- [24] Piccinelli A L, Fernandez M C, Cuesta-Rubio O, et al. Isoflavonoides isolated from *Cuban propolis* [J]. *Agric Food Chem*, 2005,53(23):9010-9016.
- [25] 胡婷,李军,屠鹏飞. 布渣叶的化学成分研究[J]. 中草药,2012,43(5):844-846.
- [26] QIU L, LIANG Y, TANG G H, et al. Two new flavonols including one flavan dimer from the roots of *Indigofera stachyodes* [J]. *Phytochem Lett*, 2013,6(3):368-371.
- [27] MA X M, LIU Y, SHI Y P. Phenolic derivatives with free-radical-scavenging activities from *Ixeridium gracile* (DC.) Shih [J]. *Chem Biodivers*, 2007,4(9):2172-2181.
- [28] WANG L J, LOU G D, MA Z J, et al. Chemical constituents with antioxidant activities from *Litchi (Litchi chinensis* Sonn.) seeds [J]. *Food Chem*, 2011,126(3):1081-1087.
- [29] 周志宏,杨崇仁. 云南普洱茶原料晒青毛茶的化学成分[J]. 云南植物研究,2000,22(3):343-350.
- [30] Sadhu S, Khatun A, Phattanawasin P, et al. Lignan glycosides and flavonoids from *Saraca asoca* with antioxidant activity [J]. *J Nat Med*, 2007,61(4):480-482.

[责任编辑 顾雪竹]