

鲜地黄化学成分的分离鉴定及活性作用初探

王宏洁^{1,2}, 刘 婷², 梁爱华^{1,2}, 边宝林²

(1. 澳门科技大学; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 对鲜地黄的化学成分进行分离、鉴定, 寻找药效活性强的化合物。方法: 采用化学分离手段, 从鲜地黄新鲜的根茎中分离得到6个化合物。结果: 分离得到6个化合物, 通过波普鉴定谱分别为: 毛蕊花糖苷(1)、梓醇(2)、桃叶珊瑚苷(3)、水苏糖(4)、胡萝卜苷(5)、 β -谷甾醇(6)。并观察了体外毛蕊花糖苷对RAW细胞的作用。结论: 毛蕊花糖苷对LPS诱导RAW细胞增殖具有一定的抑制作用。

[关键词] 鲜地黄; 化学成分; 鉴定; 活性

[中图分类号] R **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)01-0015-02

中药地黄在中医临床用药上可分为3种入药饮片, 鲜地黄、生地黄及熟地黄。鲜地黄味甘苦、性大寒, 临床以清热生津、凉血、止血为主;《别录》以鲜地黄治妇人崩中血不止及产后血上薄心, 胎动下血、鼻衄、吐血”。国内大量文献报道有关生地黄及熟地黄的化学成分、药理作用和临床应用, 而对于鲜地黄的研究报道较少, 特别是鲜地黄的化学成分研究, 河南中医药研究中药研究所王慧森、刘明等从中分离得到了地黄苷A、D、E、梓醇等化合物的报道^{1,2}。

日本学者北川勲等, 先后从地黄中提取了多种化学成分^{3,4}。我们通过化学的分离手段, 从新鲜的地黄里分离得到6个化合物, 并通过核磁等光谱测定分析, 鉴定了6种化合物分别为: 毛蕊花糖苷(1)、梓醇(2)、桃叶珊瑚苷(3)、水苏糖(4)、胡萝卜苷(5)、 β -谷甾醇(6)。另有研究报道鲜地黄水煎液对醋酸强的松龙诱导的免疫低下小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能有明显的促进作用⁵。我们首次通过体外试验发现, 毛蕊花糖苷对LPS诱导RAW细胞增殖具有一定的抑制作用, 从而为地黄免疫抑制活性的深入探讨, 提供了良好的可能性。

1 仪器与药材

仪器: 核磁共振谱: JEOL公司型号AL-300; 质谱: 美国finnigan公司TRACE MS联用仪; 酶标仪: 美国BIO-RED450。

药材: 2005年9月采用河南省武陟县。经中国

中医科学院中药研究所何希荣主管药师鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 新鲜的块根。

细胞株: 小鼠巨噬细胞(RAW), 购自中国医学科学院基础研究所细胞中心。

2 提取和分离

鲜地黄20 kg切片, 经药用酒精回流提取, 过滤, 浓缩回流液至膏状, 以乙酸乙酯、正丁醇萃取。正丁醇部分, 乙酸乙酯部分经硅胶柱, 用石油醚、氯仿、甲醇不同溶剂比例反复洗脱, 分离得到化合物5(20 mg)、6(34 mg)。正丁醇部分经硅胶柱及Sephadex LH-20, 经氯仿、乙酸乙酯、甲醇不同比例洗脱。从20%甲醇-氯仿及40%甲醇-氯仿洗脱部分, 再反复经硅胶柱及Sephadex LH-20层析柱分离, 反复重结晶得到化合物1(265 mg), 2(500 mg), 3(15 mg), 水萃取部分经结晶得化合物4(1.32 g)。

3 化合物鉴定

3.1 化合物1 白色无定形粉末, mp: 151~153 °C; UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 208(4.30), 217(4.45), 292(4.10), 329(4.25), IR ν_{\max}^{Br} (cm^{-1}): 3424, 2931, 1701, 1629, 1604, 1523; FAB-MS(m/z): 623[M]⁻; ¹H-NMR(500M DMSO-d₆, TMS) δ : 0.966(d, J=6 Hz, 3H, Rha-CH₃), 2.699(t, J=8.5 Hz, 2H, 苯乙醇H _{β), 4.356(d, J=8 Hz, 1H, Glc. H₁), 4.722(t, J=9.5 Hz, 1H, Glc. H₄), 5.024(s, 1H, Rha. H₁), 6.201(d, J=16 Hz, 1H, 咖啡酸H _{α), 6.484~7.028(6H, 芳环质子信号), 7.460(d, J=15.5 Hz, 1H, 咖啡酸H _{β), 8.688, 8.751, 9.187, 9.623(4×OH), 数据与毛蕊花糖苷NMR数据一致。此化合物为毛}}}

[收稿日期] 2006-06-26

[通讯作者] * 边宝林, Tel: (010) 84041249

蕊花糖苷。

3.2 化合物 2 白色粉末, mp: 202~ 205 °C; ESFTOF 测得 $[M]^+$ 362; IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3356, 2932, 1662, 1467, 1386, 1313, 1238, 1105, 1088, 1053, 1038 等; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) 4. 90(1-H), 5. 25(3-H), 5. 11(4-H), 2. 11(5-H), 3. 84(6-H), 3. 75(7-H), 2. 29(9-H), 4. 16(10-H), 4. 55(1'-H), 3. 13(2'-H), 3. 03(3'-H), 3. 13(4'-H), 3. 03(5'-H), 6. 36(6'-H) 与文献报道数据一致, 此化合物为梓醇。

3.3 化合物 3 白色粉末, mp: 180~ 182 °C; ESFTOF 测得 $[M]^+$ 346; IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3283, 2915, 2883, 1707, 1651, 1481, 1358, 1104, 1085, 1046, 1018 等与桃叶珊瑚苷对照品光谱完全一致。

3.4 化合物 4 白色粉末, mp: 166~ 168 °C; Molish 反应阳性, 香草醛-浓硫酸显紫色, ESFTOF 测得 $[M]^+$ 666; IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3386, 2920, 1642, 1063, 1026, 988 等与水苏糖文献报道数据一致。

3.5 化合物 5 白色粉末, mp: 285~ 287 °C; IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3420, 2931, 2869, 1634, 1462, 1374, 1073, 1025 等及薄层色谱与胡萝卜苷对照品完全一致。

3.6 化合物 6 白色粉末, mp: 138~ 140 °C; ESFTOF 测得 $[M]^-$: 413; IR 光谱图、薄层色谱与 β -谷甾醇对照品完全一致。

4 毛蕊花糖苷(ACT)对 LPS 诱导 RAW 细胞分泌 TNF- α 的影响

4.1 试验方法

用含 15% 小牛血清的 DMEM 低糖培养液调整细胞数为 10^5 个/mL 100 μL /孔接种于 96 孔板中, 细胞培养 48 h 后加药, 共设空白对照组、LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组及 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 毛蕊花糖苷 5, 0.5, 0.05, 0.005 mg/mL 4 个浓度组, LPS 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组及 LPS 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 毛蕊花糖苷 5, 0.5, 0.05, 0.005 mg/mL 4 个浓度组。37 °C, 5% CO_2 培养箱中培育 24 h, 取出, 收集上清液 200 μL , ELISA 法测定 IL-6、TNF- α 含量; 板中细胞 MTT 检测细胞增殖。资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm$

s) 表示, 组间 T 检验统计。

4.2 试验结果 表中结果显示: 当 LPS (Lipopolysaccharides, 脂多糖) 终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 能明显刺激小鼠巨噬细胞(RAW)分泌 TNF- α (肿瘤坏死因子), 与空白组比较明显升高($P < 0.05$)。毛蕊花糖苷终浓度为 5 mg/mL 、0.5 mg/mL 时, 对 LPS 诱导 RAW 分泌 TNF- α 的升高具有明显抑制作用。

表 1 毛蕊花糖苷对 LPS 诱导 RAW 细胞分泌 TNF- α 的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量(mg/mL)	TNF- α (pg/mL)
空白对照	—	115.67 \pm 32.83 ¹⁾
LPS 组	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	268.44 \pm 15.03
LPS+ ACT 组	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 5	77.89 \pm 16.69 ²⁾
	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 0.5	107.89 \pm 39.10 ¹⁾
	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 0.05	278.44 \pm 38.63 ¹⁾
	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 0.005	258.44 \pm 64.46
LPS 组	0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	212.89 \pm 34.65
LPS+ ACT 组	0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 5	87.33 \pm 18.56 ¹⁾
	0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 0.5	109.00 \pm 34.03 ¹⁾
	0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 0.05	237.33 \pm 28.48
	0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 0.005	347.33 \pm 55.25 ²⁾

注: 与 LPS 组相比 T 检验, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.001$ 。

[参考文献]

[1] 王慧牛, 李更生, 刘明, 等. 鲜地黄中环烯醚萜苷成分的分 离鉴定[J]. 中医研究, 2005, 18(4): 19.

[2] 刘明, 李更生. 鲜地黄中梓醇提取工艺[J]. 时珍国医国 药, 2000, 11(4): 301.

[3] 北川勲, 西村正, 古林安见子, 等. 懷慶地黄根茎成分 [J]. 药学杂志, 1971, 91(5): 593-596.

[4] Masami Matsumoto, Yukihiko Shoyama, Itsuo Nishioka, *et al.* Constituents of Regegerated Shoot and Cultured Root Tissue of Rehmannia Glutinoso[J]. Phytochemistry, 1989, 28(9): 2331-2332.

[5] 梁爱华, 薛宝云, 王金华, 等. 鲜地黄与干地黄止血和免疫作用比较研究[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(11): 663-666.