

九蒸九晒熟地黄中的一个新生物碱

吕锦锦^{1,2}, 张靖柯^{1,2}, 张贝贝^{1,2}, 刘娟娟^{1,2}, 李孟^{1,2}, 石静亚^{1,2}, 朱登辉^{1,2},
杨航¹, 郑晓珂^{1,2}, 冯卫生^{1,2*}

(1. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046; 2. 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450046)

摘要: 采用多种色谱技术从九蒸九晒熟地黄 70% 丙酮提取物中分离得到 6 个生物碱, 根据化合物的理化性质及波谱特征对其结构进行鉴定, 分别为地黄新碱 A (4-[[5-*O*- α -D-galactopyranosyloxy)methyl]-1*H*-pyrrole-2-carbaldehyde-1-yl]butyric acid methyl ester) (1)、baimantuoluamide B (2)、capparisine C (3)、harman-3-carboxylic acid (4)、(2*S*)-1-[2-(furan-2-yl)-2-oxoethyl]-5-oxopyrrolidine-2-carboxylate (5) 和 1-[2-(furan-2-yl)-2-oxoethyl]pyrrolidin-2-one (6)。其中, 化合物 1 为新化合物, 化合物 2~6 均首次从地黄中分离得到。采用细胞实时监控检测方法 (RTCA) 探究 6 个化合物对脂多糖 (LPS) 诱导的 NRK-52e 细胞损伤的干预作用, 结果表明, 化合物 1~3 对 LPS 诱导的 NRK-52e 细胞损伤均具有保护作用。

关键词: 熟地黄; 化学成分; 生物碱; NRK-52e 细胞; RTCA

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)02-0289-05

A new alkaloid from *Rehmanniae Radix Preparata*

LÜ Jin-jin^{1,2}, ZHANG Jing-ke^{1,2}, ZHANG Bei-bei^{1,2}, LIU Juan-juan^{1,2}, LI Meng^{1,2}, SHI Jing-ya^{1,2},
ZHU Deng-hui^{1,2}, YANG Hang¹, ZHENG Xiao-ke^{1,2}, FENG Wei-sheng^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Disease Diagnosis by Henan and Education Ministry of P. R. China, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: The chemical constituents of *Rehmanniae Radix Preparata* were prepared according to the traditional method of "jiu zheng jiu shai" and investigated using multiple chromatographic methods. Six alkaloids were isolated and their structures were elucidated from spectral data and physicochemical properties, as follows: rehmanniae alkaloid A (4-[[5-*O*- α -D-galactopyranosyloxy)methyl]-1*H*-pyrrole-2-carbaldehyde-1-yl]butyric acidmethyl ester) (1), baimantuoluamide B (2), capparisine C (3), harman-3-carboxylic acid (4), (2*S*)-1-[2-(furan-2-yl)-2-oxoethyl]-5-oxopyrrolidine-2-carboxylate (5), and 1-[2-(furan-2-yl)-2-oxoethyl]pyrrolidin-2-one (6). Among them, compound 1 is a new alkaloid. Compounds 2–6 were newly isolated from *Rehmannia glutinosa* Libosch. The effect of compounds 1–6 on NRK-52e cell injury induced by LPS was investigated. The results show that compounds 1–3 exhibit protective effects against LPS-induced damage to NRK-52e cells.

Key words: *Rehmanniae Radix Preparata*; chemical compositions; alkaloids; NRK-52e cells; RTCA

地黄是玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根, 主产于河南、山东、山西

等地, 以河南焦作作为道地产区, 素有“怀地黄”之称, 与怀山药、怀牛膝、怀菊花, 并称“四大怀药”。熟地黄 *Rehmanniae Radix Preparata* 为生地黄的炮制加工品, 据 2015 版药典记载, 熟地黄味甘, 性微温, 归肝肾经, 具有补血滋阴, 益精填髓之功效^[1,2]。现代药理研究表明, 熟地黄具有抗氧化与抗衰老、抗肿瘤、抗突变、抗焦

收稿日期: 2019-09-04; 修回日期: 2019-10-12.

基金项目: 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项“地黄特色中药材产业链关键技术研究”(2017YFC1702800).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-371-60190296; E-mail: dffwsh@hactcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0716

虑、抗疲劳、增强免疫力以及促进造血等方面的作用^[3-5]。此外,查阅文献发现地黄炮制后,化学成分发生变化,其中,环烯醚萜类化合物,如梓醇;苯乙醇苷类化合物,如毛蕊花糖苷,以及紫罗兰酮类化合物等均发生了很大程度的降解。而还有一些成分,如5-HMF、DDMP等含量却显著提高^[6,7],但是目前对熟地黄的化学成分尚缺乏系统的研究。为了明确熟地黄的化学成分,本实验采用硅胶、ODS、Diaion HP-20、MCI Gel CHP-20、Sephadex LH-20、Toyopearl HW-40、薄层色谱以及半制备高效液相等多种色谱方法,从熟地黄70%丙酮提取物中分离得到6个生物碱。利用MS、IR、UV、1D和2D NMR等波谱技术对其结构进行鉴定,分别为地黄新碱A (4-[(5-*O*- α -*D*-galactopyranosyloxy)methyl]-1*H*-pyrrole-2-carbaldehyde-1-yl]butyric acid methyl ester) (**1**)、baimantuoluamide B (**2**)、capparisine C (**3**)、harman-3-carboxylic acid (**4**)、(2*S*)-1-[2-(furan-2-yl)-2-oxoethyl]-5-oxopyrrolidine-2-carboxylate (**5**)和1-[2-(furan-2-yl)-2-oxoethyl]pyrrolidin-2-one (**6**)。其中化合物**1**为新化合物,化合物**2**~**6**均首次从地黄中分离得到,化合物结构见图1。采用RTCA法探究6个化合物对脂多糖(LPS)诱导的NRK-52e细胞损伤的干预作用,结果表明化合物**1**~**3**对LPS诱导的NRK-52e细胞损伤均具有保护作用。

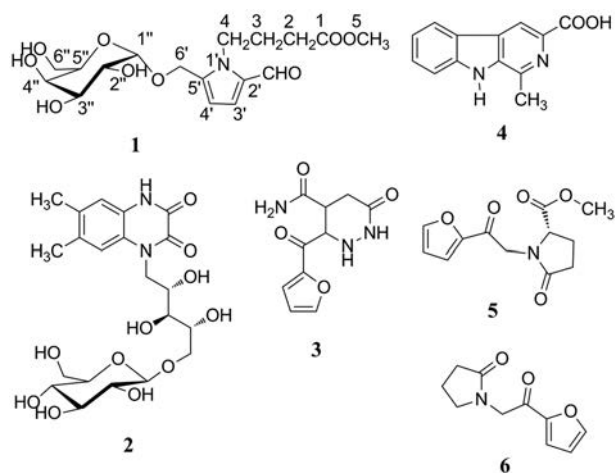


Figure 1 Structures of compounds 1–6

结果与讨论

1 结构鉴定

化合物**1** 白色油状物, $[\alpha]_D^{20}$ 126.373 (*c* 0.017 1, CH₃OH), ESI-MS *m/z*: 410.141 1 [M+Na]⁺ (calcd. for C₁₇H₂₅NO₉Na, 410.142 1), 提示化合物的分子式为C₁₇H₂₅NO₉。UV λ_{\max} (CH₃OH)/nm (log ϵ): 203 (1.40)、292 (1.68)。IR 谱显示该化合物结构中含有羟基

(3 364 cm⁻¹)和羰基(1 640 cm⁻¹)。在¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) 谱中, δ_H 9.44 (1H, s)为一尖锐的单峰信号,结合该处氢质子的化学位移值,可以确定为醛基氢信号; δ_H 6.98 (1H, d, *J* = 4.0 Hz, H-3'), 6.36 (1H, d, *J* = 4.0 Hz, H-4')提示该化合物结构中,可能存在一个吡咯环; δ_H 4.43 (2H, m, H-4)、2.04 (2H, m, H-3)、2.38 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-2)提示结构中有3个-CH₂-; δ_H 4.92 (1H, d, *J* = 3.8 Hz, H-1'')以及 δ_H 3.69~3.88 (6H, m),推测该结构中可能有糖的结构片段,且通过计算糖端基氢的耦合常数为3.8 Hz,可确定该糖为 α 构型; δ_H 3.65 (3H, s, H-5)提示结构中有一个-OCH₃存在。在¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) 谱中,共给出17个碳信号,结合DEPT 135谱可知,共有3个季碳信号 [δ_C 175.2、140.7、133.9,其中 δ_C 175.2为羰基的碳信号],8个叔碳信号 [δ_C 181.1、126.3、113.3、99.8、73.0、71.4、71.1、70.1,其中 δ_C 181.1为一个-CHO的特征碳信号],5个仲碳信号 [δ_C 62.9、61.4、45.9、31.7、27.6]和1个伯碳信号 [δ_C 52.2,为-OCH₃的碳信号,结合 δ_C 175.2处的羰基碳信号,确定该化合物中含有羧酸甲酯的结构片段];结合该化合物的氢谱, δ_C 140.7 (C-5'), 133.9 (C-2'), 126.0 (C-3'), 113.3 (C-4')为吡咯环上的4个碳信号; δ_C 99.8 (C-1''), 73.0 (C-5''), 71.4 (C-3''), 71.1 (C-4''), 70.1 (C-2''), 62.9 (C-6'')推测为半乳糖的一组碳信号,通过酸水解确定该糖为 α -*D*-半乳糖。

¹H-¹H COSY 谱中, δ_H 2.04 (2H, m, H-3)同时与 δ_H 2.38 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-2)、4.43 (2H, m, H-4)相关,确定了-CH₂CH₂CH₂-的结构片段(图2)。通过HSQC谱,进一步将化合物的C-H数据予以归属(表1)。HMBC谱中, δ_H 2.38 (H-2)与 δ_C 175.2 (C-1)相关,可以确定-CH₂CH₂CH₂COOCH₃结构片段,且由 δ_H 4.43 (H-4)与 δ_C 140.7 (C-5'), 133.9 (C-2')均具有远程相关,说明-CH₂CH₂CH₂COOCH₃连在吡咯环1'位N原子上; δ_H 4.60 (H-6'a)与 δ_C 113.3 (C-4'), 140.7 (C-5')相关, δ_H 9.44 (-CHO)与 δ_C 133.9 (C-2')相关,说明-CH₂O-和-CHO分别连在吡咯环的C-5'位和C-2'位上;糖的端基氢 δ_H 4.92 (H-1'')与 δ_C 61.4 (C-6')相关,说明半乳糖连在C-6'位上;根据以上解析,结合参考文献^[8,9],确定该化合物为(4-[(5-*O*- α -*D*-galactopyranosyloxy)methyl]-

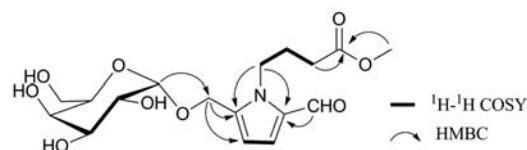


Figure 2 Key ¹H-¹H COSY and HMBC correlations of compound 1

Table 1 ^1H NMR (500 MHz in CD_3OD) and ^{13}C NMR (125 MHz in CD_3OD) spectral data of compound **1**

NO.	δ_{H}	δ_{C}	NO.	δ_{H}	δ_{C}
1	-	175.2	6'	4.60 (1H, d, $J = 12.6$ Hz)	61.4
2	2.38 (2H, t, $J = 7.2$ Hz)	31.7		4.80 (1H, d, $J = 12.6$ Hz)	
3	2.04 (2H, m)	27.6	-CHO	9.44 (1H, s)	181.1
4	4.43 (2H, m)	45.9	1''	4.92 (1H, d, $J = 3.8$ Hz)	99.8
5	3.65 (3H, s)	52.2	2''	3.78 (1H, m)	70.1
1'	-	-	3''	3.71 (1H, m)	71.4
2'	-	133.9	4''	3.88 (1H, m)	71.1
3'	6.98 (1H, d, $J = 4.0$ Hz)	126.3	5''	3.80 (1H, m)	73.0
4'	6.36 (1H, d, $J = 4.0$ Hz)	113.3	6''	3.69 (1H, m)	62.9
5'	-	140.7		3.73 (1H, m)	

1*H*-pyrrole-2-carbaldehyde-1-yl}butyric acid methyl ester), 命名为地黄新碱 A, 其 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据见表 1。

2 化合物活性检测

采用细胞实时监控检测的方法 (RTCA) 探究 6 个化合物对脂多糖 (LPS) 诱导的 NRK-52e 细胞损伤的干预作用。结果表明, 化合物 **1**~**3** 对 LPS 诱导的 NRK-52e 细胞损伤均具有保护作用 (表 2)。

Table 2 The effect of compounds **1**~**6** on NRK-52e cell injury induced by LPS. Note: The Cell Index ratio is (experimental group-control group)/control group, and all groups are compared with the model group. *Cell Index ratio of >10% indicates a significant difference

Group	Cell Index	Cell Index ratio/%
CON	1.26 ± 0.058	41.91*
LPS	0.89 ± 0.10	0
1	1.67 ± 0.014	87.49*
2	1.20 ± 0.14	34.93*
3	1.07 ± 0.47	20.46*
4	0.84 ± 0.41	-5.21
5	0.73 ± 0.030	-18.18
6	0.79 ± 0.096	-11.47

实验部分

Bruker AVANCE III 500 核磁共振仪 (TMS 内标) (Bruker); Bruker maxis HD mass spectrometer, Shimadzu UV-2401PC apparatus; Waters Alliance 系列 2695 高效液相系统, Empower3 色谱数据工作站; Thermo Nicolet IS10 红外光谱仪 (Thermo Scientific, USA); Rudolph AP-IV 型旋光仪 (Rudolph, USA); Thermo EVO300 紫外分光光度计 (Thermo Scientific, USA); LC-52 型高压制备液相色谱仪 [赛普锐思 (北京) 科技有限公司], UV200 型紫外检测器, repositil-Pur120 C18-AQ 色谱柱 (德国 Dr. Maisch GmbH); CHIRALPAK AD-H 色谱柱 (大赛璐药物手性技术有限公司); OSB-2000 型旋转蒸发仪、N-1111 型冷冻水循环装置、NVP-1000 型隔膜真空泵 (上海爱朗仪器有限公司); 二氧化碳培养箱 (上海

STIK); 超净工作台 (苏净集团); Arium 611 VF 超级组合型超纯水器 (SARTORIUS); 倒置显微镜 (Nikon); 细胞实时监控仪 (ACEA, 美国)。

柱色谱填料 Diaion HP-20、MCI Gel CHP-20 (日本三菱化学公司); Toyopearl HW-40 (日本 TOSOH 公司); Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech 公司); 柱色谱用硅胶 H (100~200 目, 200~300 目, 青岛海洋化工厂); 制备型薄层色谱硅胶板 (烟台江友硅胶开发有限公司); 甲醇 (色谱纯, 天津四友精细化学品有限公司); 乙腈 (色谱纯, 美国天地有限公司 TEDIA); 所用分析纯试剂均为天津市富宇精细化工有限公司及天津市致远化学试剂有限公司生产; *D*-半乳糖、*L*-半乳糖标准品 (上海源叶生物科技有限公司); 培养皿、E-Plate 板 (ID725602, ACEA, 美国); NRK-52e 细胞 (中国科学院上海细胞库); 胰蛋白酶、DMEM 高糖培养基 (Gibco); 胎牛血清 (浙江天杭生物科技有限公司), DMSO (Solarbio); LPS (Sigma, 美国); 水为超纯水, PBS 缓冲液等为自配。

药材: 熟地黄购自河南省禹州市青山药业有限公司 (经九蒸九晒方法炮制), 留样标本存放于河南中医药大学药物化学实验室。

1 提取与分离

干燥熟地黄 10 kg, 加 10 倍量 70% 的含水丙酮回流提取 3 次, 提取液过滤, 合并滤液进行减压浓缩, 真空干燥, 得到熟地黄总提取物浸膏 (4.4 kg)。将总提取物浸膏加 3 L 水溶解分散, 加 95% 乙醇调节至醇浓度 80% 进行醇沉, 静置 24 h 后, 取上清液, 减压浓缩得到总浸膏 (2.7 kg)。浸膏加 8 L 水溶解, 上 Diaion HP-20 大孔吸附树脂柱, 按照极性由大到小依次用水、10% EtOH、20% EtOH、30% EtOH、50% EtOH、70% EtOH、95% EtOH 进行梯度洗脱, 得到 7 个洗脱组分, 即 Fr.1~Fr.7。

10% EtOH (Fr.2) 洗脱组分 (100 g) 加水溶解, 进行 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离, 用不同比例的甲醇-水 (甲醇:水=0:1→1:0) 梯度洗脱, 洗脱组分经薄

层硅胶检识, 合并相同组分, 得到6个组分, 即Fr.2-1~Fr.2-6。其中Fr.2-3反复经过Sephadex LH-20、Toyopearl HW-40凝胶柱色谱分离, 结合半制备高效液相色谱(乙腈-水=11:89)等度洗脱, 最终得到化合物**2**(3.75 mg)和化合物**5**(11.47 mg); 20% EtOH (Fr.3)洗脱组分(71 g)加水溶解, 同样进行Sephadex LH-20凝胶柱色谱分离, 按照与Fr.2相同的洗脱方法, 得到4个洗脱组分, 即Fr.3-1~Fr.3-4。Fr.3-2组分, 经Toyopearl HW-40凝胶柱色谱, 用70%含水甲醇等度洗脱, 得到3个洗脱组分, 即Fr.3-2-1~Fr.3-2-3。Fr.3-2-1使用半制备高效液相色谱(乙腈-水=10:90)等度洗脱, 最终得到化合物**3**(10.34 mg); 50% EtOH (Fr.5)洗脱组分(92 g)加水溶解, 经离心后取上清液, 进行MCI柱色谱分离, 用不同比例的甲醇-水(甲醇:水=0:1~1:0)梯度洗脱, 最终得到5个洗脱组分, 即Fr.5-1~Fr.5-5, Fr.5-2加5%甲醇溶解后, 进行中压制备(ODS)柱色谱分离, 以甲醇-水(甲醇:水=5:95~1:0)梯度洗脱, 得到2个洗脱组分, 即Fr.5-2-1~Fr.5-2-2, Fr.5-2-1进行制备薄层分离纯化, 以二氯甲烷-甲醇-水系统为展开剂(二氯甲烷:甲醇:水=8:1:0.1), 最终得到化合物**4**(3.50 mg)和化合物**6**(15.34 mg)。Fr.5-2-2加甲醇溶解, 硅胶拌样后(样品:拌样硅胶=1:1)进行硅胶柱色谱分离, 用二氯甲烷-甲醇系统(二氯甲烷:甲醇=20:1)等度洗脱, 最终得到化合物**1**(1.71 mg)。

2 酸水解和糖的绝对构型确定

取化合物**1**(1 mg), 加入1 mL三氟乙酸溶液(2 mol·L⁻¹), 加热回流3 h, 所得水解液用乙酸乙酯萃取3次, 将水层浓缩至干^[9]。加少量乙醇溶解, 经HPLC分析, 采用蒸发光散射检测器, 色谱柱为CHIRALPAK AD-H(250 mm×4.6 mm), 流动相为正己烷-乙醇-三氟乙酸(750:250:0.25), 流速0.5 mL·min⁻¹。通过比较样品的保留时间与半乳糖标准品的保留时间, 鉴定化合物**1**中半乳糖的绝对构型为D-半乳糖(D-半乳糖和L-半乳糖的保留时间分别为17.0 min和20.8 min)。

3 结构鉴定

化合物**1** 白色油状物, $[\alpha]_D^{20}$ 126.373 (c 0.017 1, CH₃OH); UV λ_{\max} (CH₃OH)/nm (log ϵ): 203 (1.40)、292 (1.68); IR (MeOH) ν_{\max} : 3 364、1 640、706 cm⁻¹; ESI-MS给出分子离子峰 m/z : 410.141 1 [M+Na]⁺ (calcd. for C₁₇H₂₅NO₉Na, 410.142 1); ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD)和¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD)数据见表1。

化合物**2** 黄色无定型粉末。ESI-MS m/z : 509.174 4 [M+Na]⁺。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 11.86 (1H, s, -NH), 7.30 (1H, s, H-5), 6.91 (1H, s, H-8), 4.49 (1H, m, H-1'b), 4.16 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1''), 4.01~4.04

(3H, m, H-1'a, H-2', H-5'b), 3.75 (1H, m, H-4'), 3.64~3.67 (2H, m, H-3', H-6''b), 3.40~3.44 (2H, m, H-5'a, H-6''a), 3.00~3.16 (4H, m, H-2''-H-5''), 2.22 (3H, s, 6-CH₃), 2.18 (3H, s, 7-CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ : 155.7 (C-2), 153.7 (C-3), 131.2 (C-6), 130.9 (C-7), 124.9 (C-9), 123.3 (C-10), 116.5 (C-5), 116.0 (C-8), 103.7 (C-1''), 76.8 (C-5''), 76.3 (C-3''), 73.6 (C-2''/C-3'), 72.1 (C-5'), 70.8 (C-4'), 70.0 (C-4''), 67.9 (C-2'), 60.9 (C-6''), 44.6 (C-1'), 19.3 (6-CH₃), 18.7 (7-CH₃)。根据以上数据, 结合参考文献^[10], 鉴定该化合物为baimantuoluamide B。

化合物**3** 无色油状物。ESI-MS m/z : 260.064 3 [M+Na]⁺。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ : 7.80 (1H, s, H-13), 7.41 (1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-11), 6.66 (1H, dd, $J = 1.5, 3.4$ Hz, H-12), 5.01 (1H, d, $J = 18.0$ Hz, H-1), 4.40 (1H, d, $J = 18.0$ Hz, H-2), 4.40 (1H, m, H-3), 2.49 (2H, m, H-4, H-5a), 2.16 (1H, m, H-5b); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ : 184.3 (C-9), 178.7 (C-7), 174.7 (C-6), 152.3 (C-10), 149.0 (C-13), 119.6 (C-11), 113.6 (C-12), 61.6 (C-3), 30.1 (C-4), 24.0 (C-5)。根据以上数据, 结合参考文献^[11], 鉴定该化合物为capparisine C。

化合物**4** 白色无定形粉末。ESI-MS m/z : 249.064 2 [M+Na]⁺。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 12.02 (1H, s, -COOH), 8.75 (1H, s, H-4), 8.35 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5), 7.65 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-8), 7.59 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-7), 7.30 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-6), 2.82 (3H, s, -CH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ : 166.7 (-COOH), 141.7 (C-3), 140.8 (C-8a), 136.1 (C-1/C-9a), 128.3 (C-7), 127.1 (C-4a), 122.1 (C-5), 121.3 (C-4b), 120.1 (C-6), 115.4 (C-4), 112.2 (C-8), 20.2 (-CH₃)。根据以上数据, 结合参考文献^[12], 鉴定该化合物为harman-3-carboxylic acid。

化合物**5** 浅黄色油状物。ESI-MS m/z : 274.069 0 [M+Na]⁺。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ : 7.81 (1H, s, H-5), 7.42 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-3), 6.66 (1H, m, H-4), 4.97 (1H, d, $J = 18.1$ Hz, H-7a), 4.43 (1H, d, $J = 18.1$ Hz, H-7b), 4.41~4.44 (1H, m, H-12), 3.73 (3H, s, H-15), 2.44~2.53 (2H, m, H-10, H-11a), 2.15~2.21 (1H, m, H-11b); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ : 184.2 (C-6), 178.6 (C-9), 173.4 (C-13), 152.3 (C-2), 149.0 (C-5), 119.9 (C-3), 113.6 (C-4), 61.6 (C-12), 53.0 (C-15), 48.0 (C-7), 30.0 (C-10), 23.8 (C-11)。根据以上数据, 结合参考文献^[13], 鉴定该化合物为(2*S*)-1-[2-(furan-2-yl)-2-oxoethyl]-5-oxopyrrolidine-2-carboxylate。

化合物**6** 浅棕色油状物。ESI-MS m/z : 216.063 4 [M+Na]⁺。¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ : 7.82 (1H, s, H-5), 7.42 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-3), 6.67 (1H, t, H-4),

4.63 (2H, s, H-7), 3.52 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-12), 2.44 (2H, t, $J = 8.0$ Hz, H-10), 2.08~2.14 (2H, m, H-11); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ : 184.3 (C-6), 178.6 (C-9), 152.3 (C-2), 149.0 (C-5), 119.5 (C-3), 113.6 (C-4), 49.6 (C-7), 49.0 (C-12), 31.4 (C-10), 19.0 (C-11)。根据以上数据, 结合参考文献^[13], 鉴定该化合物为 1-[2-(furan-2-yl)-2-oxoethyl]pyrrolidin-2-one。

4 化合物 1~6 对 LPS 诱导的 NRK-52e 细胞损伤的干预作用

采用细胞实时监控检测的方法 (RTCA) 探究化合物对脂多糖 (LPS) 诱导的 NRK-52e 细胞损伤的干预作用^[14]。将 NRK-52e 细胞置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养至对数生长期, 按照细胞密度为每毫升 2×10^4 个, 每孔 2 000 个细胞接种于 E-Plate 板 (ID725596) 中, 24 h 后, 实验分为正常对照组 (空白培养基)、模型组 (LPS) 和给药组, LPS ($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 与 6 个生物碱类化合物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 刺激 NRK-52e 细胞 48 h, 细胞实时监控仪检测细胞活力, 与模型组相比, Cell Index 比率 [(给药组-模型组)/模型组] 大于 10% 则表示化合物对 LPS 诱导的 NRK-52e 细胞损伤具有保护作用。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 125.
- [2] Liu MY, Zhang YZ, Yang J, et al. Status quo of protection of *Rehmannia glutinosa* germplasm resources and countermeasures for sustainable development [J]. Agric Henan (河南农业), 2017, 28: 14-15.
- [3] Li GS, Yu Z, Wang HS, et al. Advances in chemical constituents and pharmacology of *Rehmannia glutinosa* [J]. Int J Tradit Chin Med (国际中医中药杂志), 2004, 26: 74-78.
- [4] Zheng XK, Hou WW, Duan PF, et al. Immunomodulatory effect of prepared Radix Rehmanniae Extract *in vitro* [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 2012, 47: 1995-2000.
- [5] Li X, He R, Wang HY, et al. The decline of EPO in brain of aging rats induced by *D*-galactose effect and the reverse of the water [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 2016, 51: 1562-1568.
- [6] Zhang BY, Jiang ZZ, Wang YF, et al. Analysis of chemical constituents in fresh, dried and prepared Rehmanniae Radix by UPLC/ESI-Q-TOF MS [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2016, 38: 1104-1108.
- [7] Song ZQ, Zeng LY, Wang C, et al. Content changes of chemical constituents produced in fresh Radix Rehmanniae after processing [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med (世界科学技术-中医药现代化), 2014, 16: 346-351.
- [8] Liu WY, Zhang WD, Chen HS, et al. Pyrrole alkaloids from *Bolbostemma paniculatum* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2003, 5: 159-163.
- [9] Kikuchi T, Ikedaya A, Toda A, et al. Pyrazole alkaloids from watermelon (*Citrullus lanatus*) seeds [J]. Phytochem Lett, 2015, 12: 94-97.
- [10] Yang BY, Xia YG, Wang QH, et al. Two new amide alkaloids from the flower of *Datura metel* L. [J]. Fitoterapia, 2010, 81: 1003-1005.
- [11] Yang T, Wang CH, Chou GX, et al. New alkaloids from *Capparis spinosa*: structure and X-ray crystallographic analysis [J]. Food Chem, 2010, 123: 705-710.
- [12] Cardoso CL, Castro-Gamboa I, Silva DHS, et al. Indole glucoalkaloids from *Chimarrhis turbinata* and their evaluation as antioxidant agents and acetylcholinesterase inhibitors [J]. J Nat Prod, 2004, 67: 1882-1885.
- [13] Wang YC, Zhang YW, Zheng LH, et al. Four New Alkaloids from the Fermentation Broth of *Armillaria mellea* [J]. Helv Chim Acta, 2013, 96: 330-337.
- [14] Zhou WQ. RTCA monitors the inhibitory effect on proliferation of breast cancer MCF-7 cells with SAHA treatment [J]. J Shenyang Med Coll (沈阳医学院学报), 2017, 19: 193-195.