

· 化学成分 ·

丹参中的一个新化合物及其抗 HIV 活性

秦德华, 陈鸿珊*, 彭宗根, 郭志敏*

(中国医学科学院 协和医科大学医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要:目的 研究甘西鼠尾草 *Salvia przewalskii* 根的化学成分, 检测抗 HIV 活性。方法 用溶媒法、色谱法提取分离单体, 光谱法分析鉴定结构。用艾滋病病毒 1 型整合酶(HIV-1 N)和艾滋病病毒 1 型逆转录酶(HIV-1 RT)测定抗 HIV 活性。结果 分离得到 4 个化合物, 分别鉴别为 8-[[7-(3', 4'-二羟基-苯基)-9'-氧代-7'-丙烯基]氧]-3-(1'-O-βD-葡萄糖基)-4-羟基-[R-(E)]-苯丙酸(I), 迷迭香酸(II), 紫草酸(III)和紫草酸B(IV)。结论 I 为新化合物, II~IV 为已知化合物。均具有抗 HIV 活性。

关键词: 甘西鼠尾草; 酚酸; 丹酚酸糖苷; 抗 HIV 活性

中图分类号: R 284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)07-0725-04

A new compound from *Salvia przewalskii* and its anti-HIV effect

Q N De-hua, CHEN Hong-shan, PENG Zong-gen, GUO Zhim in

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: **Object** To study chemical constituents in the root of *Salvia przewalskii* Maxim. and examine their inhibitory activity on HIV-N and HIV-RT. **Methods** Compounds were isolated and purified by chromatography. Their structures were determined by spectral analysis and chemical evidence. Anti-HIV activities of the compounds were observed *in vitro*. **Results** Four compounds were obtained. Their structures were identified as benzenepropanoic acid, 8-[[7-(3', 4'-dihydroxyphenyl)-9'-oxo-7'-propenyl]oxy]-3-(1'-O-βD-glucopyranosyl)-4-hydroxy-[R-(E)] (I), rosmarinic acid (II), lithospermic acid (III), and lithospermic acid B (IV). **Conclusion** Compound I is a new one, II-IV are the known compounds with the anti-HIV effects.

Key words: *Salvia przewalskii* Maxim.; phenolic acid; salviaflavones; anti-HIV activity

丹参是我国传统医药学中广泛使用药物之一, 作为治疗心脑血管疾病的药物, 疗效显著, 临床应用历史悠久。现代药理学研究证明丹参的药理活性主要是对心脑血管系统的作用, 包括扩张血管、加快血流、改善微循环、改变血液黏滞性、抗氧化、抗凝血、增加心肌供血、供氧量, 且能降低心肌耗氧量、抗肝纤维化等。主要用于心绞痛、心肌梗死和肝纤维化、肾衰等疾病的治疗。1996年, 陈鸿珊等发现丹参提取物具有抗艾滋病和乙型肝炎活性^[1], 同时, 新的化合物不断被发现^[2]; 一些丹酚酸苷类(salviaflavones)的化合物也相继报道^[3, 4]。本实验研究从丹参水溶性部位分离得到 4 个化合物, 鉴定为 8-[[7-(3', 4'-二羟基-苯基)-9'-氧代-7'-丙烯基]氧]-3-(1'-O-βD-

葡萄糖基)-4-羟基-[R-(E)]-苯丙酸(I), 迷迭香酸(II), 紫草酸(III)和紫草酸B(IV)。经在国家知识产权局查新(编号: G031400), I 为新化合物, 已经申请了中国专利^[5], II~IV 鉴别数据与迷迭香酸、紫草酸和紫草酸B 相一致^[6], 均具有抗 HIV 活性^[2, 7]。

化合物 I 为棕黄色粉末, FeCl₃ 呈阳性; 熔点: 129~132℃。FAB 质谱分析表明, 其相对分子质量为 522, HRFAB-MS 分析其钠盐分子离子峰实际值: $m/z = 545.1259$ (理论值: $m/z = 545.4514$), 分子式为 C₂₄H₂₆O₁₃N_a, 分子不饱和度为 12。I 溶于水、稀碱溶液、低级醇、酮和酯等。其溶液用氨水中和, 经处理得深黄色粉末, FAB-MS 分析获得弱的分子离子峰, $m/z = 541$; IR 图谱中, 在 1601 cm⁻¹ 出现了强

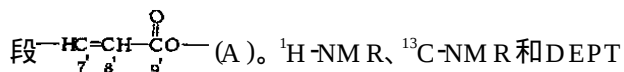
* 收稿日期: 2003-12-20

基金项目: 国家“十五”重大专题创新药物中药现代化(2004A A 223342)

作者简介: 秦德华(1952-), 陕西人, 副研究员, 从事天然产物研究。Tel: (010) 63022900 E-mail: qindehua163@tom.com

* 通讯作者 Tel: (010) 63010984 E-mail: Chens-10@163.com

的羧酸盐特征宽峰,表明为 I 的铵盐,推测其分子式为 $C_{24}H_{30}NO_{13}$ 。 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 谱分析表明:化合物 I 的结构中有 2 个组成偶合常数 $J = 16\text{ Hz}$ 的 AB 系统的烯氢,化学位移 $\delta_{\text{H}} = 7.49$ 和 $\delta_{\text{H}} = 6.26$ 。HMQC 和 DEPT 谱分析表明它们相应的 C-13 信号为次甲基碳,化学位移为 $\delta_{\text{C}} = 148.48$, $\delta_{\text{C}} = 117.77$ 。在 HMBC 中该 AB 系统质子与位于低场羧基季碳 $\delta_{\text{C}} = 171.58$ 相关,构成如下结构片段



谱分析表明:化合物 I 结构中有 12 个芳香碳信号,分别为 4 个连氧季碳,2 个连碳季碳和 6 个次甲基碳。化学位移分别为: $\delta_{\text{C}} = 146.64$, $\delta_{\text{C}} = 145.48$, $\delta_{\text{C}} = 147.63$, $\delta_{\text{C}} = 151.07$; $\delta_{\text{C}} = 133.07$, $\delta_{\text{C}} = 129.86$; $\delta_{\text{CH}} = 120.06$, $\delta_{\text{CH}} = 119.49$, $\delta_{\text{CH}} = 124.58$, $\delta_{\text{CH}} = 118.74$, $\delta_{\text{CH}} = 119.02$, $\delta_{\text{CH}} = 128.17$ 。其中 $\delta_{\text{C}} = 129.86$ 处的季碳在 HMBC 中与 AB 系统的烯氢明显相关,表明含该碳的芳环与结构片段 A 相连接。与该碳(C-1)相关的除 $\delta_{\text{H}} = 7.33$ 次甲基氢外,还有化学位移在 $\delta_{\text{H}} = 6.91$ 的 H-5 和 $\delta_{\text{H}} = 6.09$ 的 H-6;相应的次甲基碳化学位移为 $\delta_{\text{CH}} = 119.02$ 和 $\delta_{\text{CH}} = 128.17$ 。H-5 和 H-6 相互偶合, $J = 8\text{ Hz}$,表明 H-5 和 H-6 为邻位取代。经详细分析表明结构中苯烯基的存在,且在 $\delta_{\text{C}} = 147.63$ 的 C-3 和 $\delta_{\text{C}} = 151.07$ 的 C-4 上连有氧。其余的 6 个芳香碳信号,经 1H -NMR、 ^{13}C -NMR、HMBC、DEPT、GCOSY 和 HMQC 谱分析表明亦有 1,3,4 取代的现象,但不同的是 1 位芳香碳与化学位移为 3.01 的 H_a -7 和 3.13 的 H_b -7 的亚甲基氢相关,在 HMBC 中这 2 个亚甲基氢与另一最低场的羧基季碳 $\delta_{\text{C}} = 179.99$ 明显相关, 1H -NMR 中与 $\delta_{\text{H}} = 5.05$ 的 H-8 亦明显相关,同时在 HMBC 中可见 H-8 与 9 位羧基季碳存在弱的相关;经 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 的数据比较,结合与 FeCl_3 呈阳性反应,成盐和 FAB 碎片离子峰 $m/z = 163$,表明化合物 I 分子中存在从丹参中分离出的已知成分迷迭香酸相似部分^[6];在 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 和 DEPT 谱中 $\delta_{\text{CH}} = 104.08$, $\delta_{\text{CH}} = 78.36$, $\delta_{\text{CH}} = 75.76$, $\delta_{\text{CH}} = 72.38$, $\delta_{\text{CH}} = 79.19$ 的次甲基碳和 $\delta_{\text{CH}_2} = 63.43$ 亚甲基碳信号及相应的 5.03、3.65、3.65、3.63、3.64、3.96 和 3.77 的氢信号表明结构中有一个葡萄糖基,它的端基碳 $\delta_{\text{CH}} = 104.08$ 化学位移表明为 βD -葡萄糖基^[8];且在 HMBC 中, $\delta_{\text{C}} =$

146.64 的 C-3 与 $\delta_{\text{CH}} = 104.08$ 的 $\delta_{\text{H}} = 5.03$ 的 H-1 相关,同时,也排除了葡萄糖基连接在 4 位氧上的可能性,这是因为 $\delta_{\text{C}} = 146.64$ 的 C-3 除与上述 $\delta_{\text{CH}} = 104.08$ 的 H-1 偶合外还与 $\delta_{\text{CH}} = 119.49$ 的相应质子 $\delta_{\text{H}} = 6.86$ 的 H-5 偶合。而 4 位碳和 2,6 位碳上的氢偶合,2,6 位碳又和 7 位碳上的氢偶合。质谱中, $m/z = 163$ 和 $m/z = 359$ 的碎片离子峰,也表明葡萄糖基连接在无双键的羟基苯丙酸上,反之,碎片离子峰则应为 $m/z = 196$ 和 $m/z = 326$ 。余下的还有 C-8 位的构型,如前所述迷迭香酸为一已知化合物^[3,6],与迷迭香酸苷不同处只是后者在 C-3 位氧上连接一个葡萄糖基,因此,推测化合物 I 的结构见图 1。

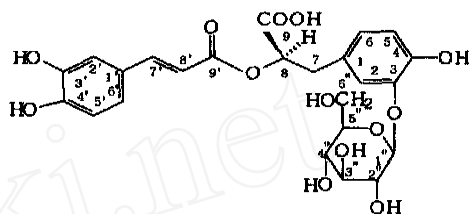


图1 化合物 I 的结构

Fig. 1 Structure of compound I

化学名为 8-[[7-(3,4-二羟基-苯基)-9-氧代-7-丙烯基]氧]-3-(1-O- βD -葡萄糖基)-4-羟基-[R-(E)]-苯丙酸(I),命名为迷迭香酸苷,具体数据见表 1,裂解示意图见图 2(DEPT, HMQC 和 COSY 谱略)。

1 仪器和材料

熔点用北京光电科学仪器厂 XTR-1 显微熔点测定仪测定;质谱用 Autospec-Ultima ETOF FAB 测定;核磁共振用 NOVA-500 Varian 公司核磁共振仪测定;IR 用 Inlet FT 红外仪测定;TLC 板用青岛海洋化工厂分厂生产的硅胶高效板 G;大孔树脂 X-5 为天津南开大学化工厂产品;LH20 为法玛希亚公司产品。丹参根 1997 年购于云南昆明,由中国医学科学院药用植物研究所、药物研究所连文琰、童玉懿研究员先后鉴定为唇形科丹参属甘西鼠尾草 *Salvia przewalskii* Maxim., 样品存于本室。

艾滋病病毒 I 型整合酶系由本室克隆表达制备并纯化。COVAL NK NH 酶标板为丹麦 Nunc 公司产品。EDC[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide] 美国 Sigma 化学公司产品;甲基咪唑为 ACROS 公司产品,pNPP 为 Roche 公司产品;HM-1 RT P66/P51 为本室制备并纯化;poly(A)(dT)₁₅ 为 Boehringer Mannheim GmbH 公司产品;

表 1 化合物 I 的核磁共振光谱数据(在重水中)

Table 1 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, and HMBC data of compound I (in D_2O)

No	^{13}C -NMR	^1H -NMR	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	133.07		5, 7, 8
2	120.06	6.91 (s)	6, 7
3	146.64		5, 1''
4	145.48		2, 6
5	119.49	6.86 (s, $J = 8$)	6
6	124.58	6.79 (s, $J = 8$)	2, 5, 7
7	39.71	3.13 (d, a, $J =$), 3.007 (t, b, $J = 12$, $J = 9$)	2, 6, 8
8	79.333	5.05 (m, $J = 9$)	7
9	179.99		7, 8
1'	129.86		2', 5', 7', 8'
2'	118.74	7.33 (s)	6', 7'
3'	147.63		2', 5'
4'	151.07		2', 5', 6'
5'	119.02	6.91 (s, $J = 8$)	6'
6'	128.17	7.09 (d, $J = 8$)	2', 5', 7', 8'
7'	148.48	7.49 (d, $J = 16$)	2', 6', 8'
8'	117.77	6.26 (d, $J = 16$)	7'
9'	171.58		7', 8'
1''	104.08	5.03 (m)	2'', 3'', 5''
2''	78.36	3.65 (m)	1'', 3'', 4''
3''	75.76	3.65 (m)	1'', 2'', 4'', 5''
4''	72.38	3.53 (m)	1'', 2'', 5'', 6''
5''	79.19	3.64 (m)	3'', 4'', 6''
6''	63.43	3.96, 3.77 (d, $J = 12$)	1'', 4'', 5''

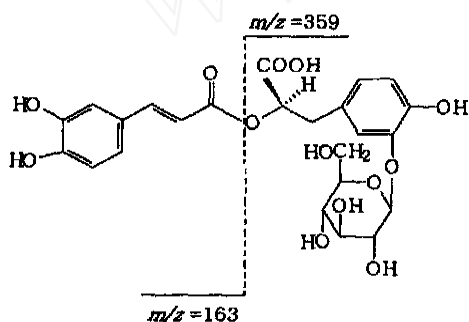


图 2 裂解示意图

Fig. 2 Fragmentation illustration

^3H -dTTP 为 NEN 公司产品; 牛血清白蛋白 DTT 为天象人公司产品; 磷酸钠(PFA), 常州第一制药厂生产; 阳性对照奈韦拉平(nevirapine, NVP) 购自南京泽众医化信息研究中心(批号 0301001); 其余试剂均为国产分析纯产品。

2 提取和分离

丹参粗粉 2 kg, 60% 丙酮液提取 3 次, 减压浓缩回收丙酮液得 4 L 水液, 加入 4 L 氯仿, 振摇提取, 出现乳化, 沉淀、静置过夜。分出氯仿液、水液, 弃沉淀。水液调 pH 3.0~3.5 加入 4 L 醋酸乙酯, 分出水液。醋酸乙酯提取液减压浓缩回收得固体, 用 LH20 分离, 70% 乙醇洗脱, 得到化合物 II、III 和 IV。水液调

pH 到酸性, 再加入 4 L 醋酸乙酯提取, 醋酸乙酯提取液于 40 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至干, 得固体。该固体用少量稀氨水溶解近中性, 上 X-5 大孔树脂柱, 用水洗脱, 分份收集, 合并含迷迭香酸苷部分。合并水液调 pH 值到酸性, 用醋酸乙酯提取, 提取液同上浓缩至干。样品用少量稀氨水溶解近中性, 用 LH20 分离, 水洗脱, 合并迷迭香酸苷部分浓缩至干(整个过程用 TLC 检查、酶测活跟踪), 得到化合物 I。

2 结构鉴定

化合物 I: 为棕黄色粉末, FeCl_3 呈阳性反应; 熔点: 129~132 $^{\circ}\text{C}$ (温度计未校正); (+) FAB-MS: $m/z = 523$ 为分子离子峰 $[\text{M} + 1]$, HR FAB-MS 给出其钠盐相对分子质量实际值: $m/z = 545.1259$ (理论值: $m/z = 545.4514$), 分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_{13}\text{Na}$, 分子不饱和度为 12。化合物 I 溶于水、稀碱溶液、低级醇、酮和酯等。 ^1H -NMR 谱、 ^{13}C -NMR、HMBC 谱和质谱裂解示意图数据见表 1 和图 2。

3 抗 HIV 活性测定

3.1 HIV-1 逆转录酶抑制活性 ^3H 标记检测方法: 将标定浓度的基因工程 HIV-1 逆转录酶(p66/51)、不同浓度的药液、反应缓冲液和 ^3H -dTTP 加入后, 混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 0 终止反应。反应液滴加滤纸片上, 冷三氯乙酸洗 3 次, 乙醇脱水后烤干。液闪仪测定 cpm 值, 同时设酶对照和空白对照和药物对照, 计算 IC_{50} 。活性见表 2。

表 2 药物抑制 HIV-RT 和 HIV-IN 活性的测定结果($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Results of HIV-RT and HIV-IN inhibited by drug in vitro ($\bar{x} \pm s$)

化合物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	
	HIV-RT	HIV-IN
I	239.64	$9.23 \pm 8.02 (n=3)$
II	> 200	$24.95 \pm 17.68 (n=4)$
III	> 200	$9.33 \pm 3.51 (n=3)$
IV	> 200	$16.84 \pm 9.74 (n=5)$

3.2 HIV-1 整合酶抑制活性 ELISA 检测方法^[9]: 将供体底物包被试验板, 洗板后加入反应缓冲液、不同浓度药液和标定浓度的基因 HIV 整合酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h。加入靶底物, 混合 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h。洗板, 加入 BSA (牛血清蛋白), 室温 30 min。洗板, 加入碱性磷酸酶标记的亲和素, 室温反应 1 h。洗板, 加显色底物显色 30 min, 加 0.1 mol/L NaOH 终止显色反应。酶标仪 405 nm 测定吸光度值。同时设酶对照和空白对照, 计算 IC_{50} 。活性见表 2。

致谢: 中国医学科学院药物研究所仪器分析室梁峰测定质谱, 王映红、贺文艺测定核磁共振谱, 于

德泉院士在结构核定中给予指导, 中国科学院化学研究所仪器分析室测定离分辨质谱。

References

- [1] Chen H S, Yan X G, Zhang X Q, *et al.* The use of anti-H V and HBV by Danshen [P]. CN: 95105902. 5, 1996-09-06.
- [2] Han M K, Li P. Compounds obtained from *Salvia* species having antiviral activity [P]. CN: 9980977. 6, 2001-06-02.
- [3] Yasuhiro T, Rena K, Jian X L, *et al.* Constituents of roots of *Salvia deserta* Schang. (Xin-jiang-Danshen) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1998, 46(1): 107-112.
- [4] Rena K, Ken T, Yasuhiro T, *et al.* Comparative study of seventeen *Salvia* plants: aldose reductase inhibitory activity of water and MeOH extracts and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis of water extracts [J]. *Chem Pharm Bull*, 1998(3): 500-504.
- [5] Qin D H, Chen H S, Peng Z G, *et al.* Isolation and preparation of rosmarinic acid-glucopyranoside and application in anti-AIDS [P]. CN: 200310117349. 5, 2003-12-11.
- [6] Wu Z J, Ouyang M A, Yang C R. Polyphenolic constituents of *Salvia sonchifolia* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1999, 21(3): 393-398.
- [7] Abd-Elazem I S, Chen H S, Bates R B, *et al.* Isolation of two highly potent and non-toxic inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integrase from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Antiviral Res*, 2002, 55(1): 91-106.
- [8] Yao X S. *Natural Drugs Chemistry* (天然药物化学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1999.
- [9] Guo Z M, Chen H S. HIV-1 integrase enzyme-linked immunosorbent assay and inhibitors [J]. *Chin J Exp Clin Virol* (中华实验和临床病毒学杂志), 2002, 16(2): 119-123.

广西血竭化学成分的研究

申秀民¹, 王竹红¹, 陈程¹, 何兰^{1*}, 屠鹏飞^{2*}

(1. 北京师范大学 化学系, 北京 100875; 2. 北京大学医学部药学院, 北京 100083)

摘要:目的 对广西血竭 *Dracaena cochinchinensis* 脂溶性成分进行研究。方法 采用硅胶柱层色谱, 制备 TLC, 重结晶进行分离纯化, 运用现代波谱技术鉴定化合物的结构。结果 从广西血竭中分离并鉴定了 6 个脂溶性化合物, 分别为: 1, 2, 4, 5-四氯-3, 6-二甲氧基苯 (I)、胆甾-4 α -甲基-7-烯-3 β -醇 (II)、胆甾-4 α -甲基-7-烯-3-酮 (III)、正二十六烷 (IV)、胆甾-7-烯-3 β -醇 (V)、胆甾-7-烯-3-酮 (VI)。结论 化合物 IV~VI 为首次从该植物中得到。

关键词: 广西血竭; 正二十六烷; 胆甾-7-烯-3 β -醇; 胆甾-7-烯-3-酮

中图分类号: R 284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)07-0728-03

Chemical constituents from resin of *Dracaena cochinchinensis*

SHEN Xiu-min¹, WANG Zhu-hong¹, CHEN Cheng¹, HE Lan¹, TU Peng-fei²

(1. Department of Chemistry, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 2. College of Pharmacy, Medical Academy of Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Object** To study the chemical constituents of *D. cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen. **Methods** The constituents were isolated on silica gel chromatography, preparative TLC, and spectral data. **Results** Six compounds were isolated and identified from the resin of *D. cochinchinensis* as: 1, 2, 4, 5-tetrachloro-3, 6-dimethoxybenzene (I), cholest-4 α -methyl-7-en-3 β -ol (II), cholest-4 α -methyl-7-en-3-one (III), hexacosane (IV), cholest-7-en-3 β -ol (V), cholest-7-en-3-one (VI). **Conclusion** Compounds IV-VI were isolated from *D. cochinchinensis* for the first time.

Key words: *D. cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen; hexacosane; cholest-7-en-3 β -ol; cholest-7-en-3-one

广西血竭 *D. cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen 为百合科龙血树属植物, 其含脂木材的乙

醇提取物称为广西血竭, 是卫生部于 1991 年批准的一类新药材。内服具有活血化瘀、止痛的作用, 外用

* 收稿日期: 2003-09-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070088)

作者简介: 何兰 (1961-), 女, 浙江绍兴人, 副教授, 博士, 研究方向为天然产物化学。

Tel: (010) 62206222 E-mail: helan1961@hotmail.com

* 通讯作者