

- (中国药学杂志), 1994, 19(4): 234-235.
- [8] Yu J, Elix J, Iskander M. Lactiflorin, a monoterpene glycoside from paeony root [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(12): 3859-3863.
- [9] Lang H Y, Li S Z, Liang X T. Study on chemical constituents of *Paeonia lactiflora* Pall. [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1983, 18(7): 551-552.
- [10] Mineo S, Toshimitsu H, Naokata M, et al. The structure of paeoniflorigenone, a new monoterpene isolated from *Paeoniae Radix* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1983, 31(2): 577-583.
- [11] Lang H Y, Li S Z, Terrence M, et al. A new monoterpene glycoside of *Paeonia lactiflora* [J]. *Planta Med*, 1984, 50(60): 501-504.
- [12] Hayashi T, Shinbo T, Shimizu M, et al. Paeonilactone-A, -B and -C, new monoterpenoids from paeony root [J]. *Tetrahedron Lett*, 1985, 26(31): 3699-3702.
- [13] Zhang X Y, Gao C K, Wang J H, et al. A new monoterpene glycoside from *Paeonia lactiflora* Pall [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(9): 305-308.
- [14] Patricia Y H, Reg L, Kerry P, et al. Sodium paeoniflorin sulfonate, a process derived artifact from paeoniflorin [J]. *Tetrahedron Lett*, 2005, 46: 2615-2618.

空心莲子草抗病毒活性成分研究

方进波^{1,3}, 刘焱文², 张彦文³, 滕杰³, 段宏泉^{3*}

(1. 华中科技大学同济医学院药学院, 湖北 武汉 430030; 2. 湖北中医学院, 湖北 武汉 430061;

3. 天津医科大学药学院, 天津 300070)

摘要:目的 研究空心莲子草 *Alternanthera philoxeroides* 中抗 HBV 活性成分。方法 以硅胶柱、凝胶柱色谱分离, 制备 HPLC 纯化, 采用 MS、NMR 等波谱方法进行结构鉴定; 用 ELISA 法对各化合物进行抗 HBV 活性检测。结果 从空心莲子草中分离鉴定了 10 个化合物, 分别为齐墩果酸(oleanolic acid, I), 3-O-β-D-吡喃葡萄糖醛基齐墩果酸苷(oleanolic acid 3-O-β-D-glucuronopyranoside, II), 齐墩果酸-28-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(oleanolic acid 28-O-β-D-glucopyranoside, III), 竹节参苷 N 甲酯(chikusetsusaponin N a methyl ester, IV), 4, 5-dihydroblumenol (V), N-trans-feruloyl 3-methyldopamine (VI), N-trans-feruloyl tyramine (VII), 3β-羟基豆甾-5-烯-7-酮(3β-hydroxystigmast-5-en-7-one, VIII), 二十四亚甲基环阿尔廷醇(24-methylenecycloartanol, IX), 环桉烯醇(cycloeucalenol, X)。抗 HBV 活性筛选表明, 化合物 I ~ III, V ~ VII 具有明显的抗 HBV 活性, 化合物 II 和 V 在 50 μg/mL 给药剂量时对 HBV-DNA 克隆转染的人肝癌细胞 HepG₂-2. 2. 15 的抑制率分别为 85. 38% 和 87. 37%。结论 化合物 IV ~ VII 首次从该植物中分得, 阿魏酰胺类化合物为首次从该属植物中分得的结构类型, 化合物 II 和 V 具有较强的抗 HBV 活性。

关键词:空心莲子草; 3-O-β-D-吡喃葡萄糖醛基齐墩果酸苷; 4, 5-dihydroblumenol; 抗 HBV 活性

中图分类号:R284. 1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)07-0976-04

Antivirus constituents from *Alternanthera philoxeroides*

FANG Jin-bo^{1,3}, LIU Yan-wen², ZHANG Yan-wen³, TENG Jie³, DUAN Hong-quan³

(1. College of Pharmaceuticals and Biotechnology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China; 3. College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract: Objective To investigate the anti-HBV constituents from *Alternanthera philoxeroides*.

Methods The constituents were isolated with silica gel and gel permeation chromatography, and purified by HPLC. Their structures were elucidated by spectroscopy. The antivirus effects of the isolated compounds were tested by ELISA method *in vitro*. **Results** Ten compounds were isolated and elucidated as followings: oleanolic acid (I), oleanolic acid 3-O-β-D-glucuronopyranoside (II), oleanolic acid 28-O-β-D-glucopyranoside (III), chikusetsusaponin N a methyl ester (IV), 4, 5-dihydroblumenol (V), N-trans-feruloyl 3-methyldopamine (VI), N-trans-feruloyl tyramine (VII), 3β-hydroxystigmast-5-en-7-one (VIII), 24-methylenecycloartanol (IX), and cycloeucalenol (X). The values of inhibition percent of compounds I - III, V - VII revealed a significant distinction compared to the control group. Compounds II and V

收稿日期: 2006-11-30

基金项目: 天津医科大学科研基金资助项目(2004xk32)

* 通讯作者 段宏泉 Tel: (022)23542838 E-mail: duanhq@tjmu.edu.cn

showed significant inhibition against HepG2 cells transected with cloned hepatitis B virus DNA, their inhibitive ratios were 85.38% and 87.37% at 50 $\mu\text{g/mL}$, respectively. **Conclusion** Compounds IV—VII are isolated from this plant for the first time and phenolic amides have been determined as the new structure type from the plants of *Alternanthera* Forsk. Compounds I and V from *A. philoxeroides* show the more significant anti-HBV activities.

Key words: *Alternanthera philoxeroides* Griseb.; oleanolic acid 3-*O*- β -*D*-glucuronopyranoside; 4, 5-dihydroblumenol; anti-HBV

空心莲子草又名螃蜞菊、空心苋、水花生等,为苋科莲子草属植物空心莲子草 *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. 的干燥全草,性寒、味苦,具有清热、凉血、解毒等功效,临床上用于治疗麻疹、流行性感、乙型脑炎、流行性出血热等病毒性疾患^[1,2]。空心莲子草提取物体外具有抗病毒^[3~8]、保肝^[9]、免疫调节^[10]等作用。但对其抗HBV (Hepatitis B virus)活性研究未见报道。因此本实验从空心莲子草中分离鉴定了10个化合物,分别为齐墩果酸(oleanolic acid, I)、3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖醛基齐墩果酸苷(oleanolic acid 3-*O*- β -*D*-glucuronopyranoside, II)、齐墩果酸-28-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(oleanolic acid 28-*O*- β -*D*-glucopyranoside, III)、竹节参苷IV a 甲酯(chikusetsusaponin IV a methyl ester, IV)、4, 5-dihydroblumenol (V)、*N*-*trans*-feruloyl 3-methyldopamine (VI)、*N*-*trans*-feruloyl tyramine (VII)、 β -羟基豆甾-5-烯-7-酮(β -hydroxystigmast-5-en-7-one, VIII)、二十四亚甲基环阿尔廷醇(24-methylenecycloartanol, IX)、环桉烯醇(cycloeucalenol, X)。抗HBV活性筛选表明,化合物I~III, V~VII具有明显的抗HBV活性,化合物II和V在10 $\mu\text{g/mL}$ 给药剂量时对HBV-DNA克隆转染的人肝癌细胞HepG₂-2. 2. 15的抑制率分别为85.38%和87.37%。

1 仪器、试剂与材料

核磁共振仪: Bruker AVANCE 300 instrument; 制备高效液相色谱仪: 日本分光公司(JASCO), PU-1580 泵, RI-1530 和 UV-1575 检测器; 制备色谱柱: Econosphere (250 mm $\times$ 20 mm, 7 μm), (Alltech), YMC-Pack SIL-06 (250 mm $\times$ 20 mm, 5 μm) (YMC), YMC-Pack ODS-A (250 mm $\times$ 20 mm, 5 μm) (YMC); Toyopearl HW-40C (Tosoh); 质谱仪: JEOL JMS-SX102A (EI, FAB MS); 液质联用色谱仪: Alliance 2695, Quattro Micro TM ESI (Waters); 薄层色谱和柱色谱用硅胶均为青岛海洋化工厂生产, 所用试剂均为分析纯。

美国 Bio-Rad 550 酶标仪; 美国 REVCO CO₂ 培养箱。胎牛血清为杭州四季青公司产品; DMEM 培养基为 Gibco 公司产品; HBeAg 检测试剂盒由上海科华生物工程股份有限公司生产。HBV-DNA 克隆转染的人肝癌细胞 HepG₂-2. 2. 15 细胞株, 由武汉大学生命科学院病毒学教育部重点实验室提供。空心莲子草于2004年11月采集于湖北省武汉市武昌区南湖, 经中南民族大学生命科学学院万定荣教授鉴定为空心莲子草 *A. philoxeroides* (Mart.) Griseb., 标本(D20040803)存放于天津医科大学药学院。

2 提取与分离

干燥的空心莲子草(地上部分)9.0 kg, 切段, 95%乙醇回流提取, 减压浓缩得稠浸膏, 加水混悬, 依次用水饱和的石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$)、醋酸乙酯和正丁醇萃取, 分别得到石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$)提取物77 g、醋酸乙酯提取物53 g、正丁醇提取物271.5 g。取石油醚提取物(77 g)、醋酸乙酯部位提取物(53 g)分别经硅胶柱和凝胶柱(Toyopearl HW-40C)反复分离, 制备HPLC纯化得到化合物I~X。

3 结构鉴定

化合物I: 白色无定形粉末。EI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR波谱数据与文献报道^[11]基本一致, 故鉴定为齐墩果酸。

化合物II: 白色无定形粉末。ESI-MS m/z : 631 [M-H]⁻, 推出分子式为C₃₆H₅₆O₉。¹H-NMR (CD₃OD) δ : 0.81, 0.85, 0.91, 0.94, 0.95, 1.06, 1.16 (21H, s, 7 $\times$ CH₃), 5.24 (1H, br s, H-12), 4.35 (1H, d, J =7.7 Hz, Glc UA H-1), 3.18 (1H, dd, J =4.6, 11.5 Hz, H-3)。¹³C-NMR (CD₃OD) δ : 39.9 (C-1), 29.0 (C-2), 91.0 (C-3), 40.3 (C-4), 57.1 (C-5), 19.44 (C-6), 34.0 (C-7), 40.7 (C-8), 48.7 (C-9), 38.0 (C-10), 24.7 (C-11), 123.8 (C-12), 145.3 (C-13), 42.9 (C-14), 28.6 (C-15), 24.2 (C-16), 47.4 (C-17), 43.0 (C-18), 47.8 (C-19), 31.7 (C-20), 35.0 (C-21), 34.1 (C-22), 26.5 (C-23), 17.1 (C-

24), 16.1 (C-25), 17.9 (C-26), 27.0 (C-27), 182.1 (C-28), 33.7 (C-29), 24.1 (C-30); GlcUA: 106.9 (C-1), 75.6 (C-2), 78.0 (C-3), 73.8 (C-4), 76.8 (C-5), 176.5 (C-6)。以上波谱数据与文献报道^[12]基本一致,故鉴定为 3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖醛基齐墩果酸苷。

化合物 II: 白色无定形粉末。ESI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 波谱数据与文献报道^[12]基本一致,故鉴定为齐墩果酸-28-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷。

化合物 IV: 白色针状结晶 (MeOH)。ESI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 波谱数据与文献报道^[13]基本一致,故鉴定为竹节参苷 IVa 甲酯。

化合物 V: 白色无定形粉末。EI-MS m/z (%): 224 [M]⁺, 推出分子式为 C₁₃H₂₀O₃。¹H-NMR (CD₃OD) δ : 2.48 (1H, d, J = 16.9 Hz, H-2a), 2.16 (1H, d, J = 16.9 Hz, H-2b), 5.88 (1H, br s, H-4), 5.52 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-7), 6.06 (1H, dd, J = 5.0, 15.7 Hz, H-8), 4.32 (1H, m, H-9), 1.24 (3H, d, J = 6.5 Hz, Me-10), 1.02 (3H, s, Me-11), 1.04 (3H, s, Me-12), 1.91 (3H, br s, Me-13)。¹³C-NMR (CD₃OD) δ : 42.5 (C-1), 50.9 (C-2), 201.3 (C-3), 127.2 (C-4), 167.5 (C-5), 80.2 (C-6), 137.1 (C-7), 130.1 (C-8), 68.7 (C-9), 24.6 (C-10), 23.6 (C-11), 23.9 (C-12), 19.6 (C-13)。以上波谱数据经 HSQC、HMBC 验证并与文献报道^[14]比较,基本一致,故鉴定为 4,5-dihydroblumenol。

化合物 VI: 白色无定形粉末。¹H-NMR、¹³C-NMR 波谱数据经 HSQC、HMBC、NOESY 验证并与文献报道^[15]一致,故鉴定为 *N*-*trans*-feruloyl 3-methyldopamine。

化合物 VII: 白色无定形粉末。ESI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 波谱数据与文献报道^[15]一致,故鉴定为 *N*-*trans*-feruloyl tyramine。

化合物 VIII: 白色无定形粉末。FAB-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 波谱数据与文献报道^[16]一致,故鉴定为 3 β -羟基豆甾-5-烯-7-酮。

化合物 IX: 白色无定形粉末。FAB-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 波谱数据与文献报道^[17]一致,故鉴定为二十四亚甲基环阿尔廷醇。

化合物 X: 白色无定形粉末。FAB-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 波谱数据与文献报道^[18]一致,故鉴定为环桉烯醇。

4 体外抗 HBV 活性实验

HepG₂-2.2.15 细胞培养于含 10% 胎牛血清及双抗 (100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素) 的

DMEM 培养液中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养。取对数生长期的癌细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液稀释成 5 $\times$ 10⁷/mL 单细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μ L,贴壁培养 24 h 后弃去上清液,加入不同体积药物,样品用 DMSO 溶解 (DMSO 浓度 $\leq$ 5%,实验证实该浓度对细胞生长无影响) 配制成 1 mg/mL 的母液,补加 DMEM 培养液至终体积为 200 μ L。每个浓度平行 6 孔,对照组加入等体积的 DMEM 培养液。吸取培养板上清液 5 μ L,按 HBeAg 检测试剂盒方法检测 e 抗原的吸光度 (A) 值,计算细胞增殖抑制率 [细胞抑制率 = (1 - 加药细胞的 A 值 / 对照细胞的 A 值) $\times$ 100%],采用 t 检验统计,结果见表 1。

表 1 化合物 I ~ X 对 HepG₂-2.2.15 细胞生长的抑制率

Table 1 Inhibitory rate of compounds I - X on HepG₂-2.2.15 cell growth

化合物	抑制率 / % ($n=6$)		
	10 μ g	2 μ g	0.2 μ g
I	57.79**	1.15	-6.62
II	85.38***	19.48	4.10
III	54.29**	17.32	3.65
IV	24.36*	23.01	2.72
V	87.37***	8.17	-5.21
VI	59.54**	17.39	-7.18
VII	53.63**	18.65	-9.94
VIII	35.82*	31.47	-1.22
IX	-14.80	-1.94	-2.60
X	31.15*	18.83	-10.41

与对照组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01 *** P < 0.001

* P < 0.05 ** P < 0.01 *** P < 0.001 vs control group

结果显示,化合物 II、V 具有较强的抗 HBV 作用,与不加药物仅加等体积 DMEM 培养液的对照组比较,两化合物 10 μ g/mL 的药物浓度均显示出显著差异 (P < 0.001)。化合物 I、III、VI、VII 则显示明确的抗 HBV 作用,与空白对照比较具有显著性差异 (P < 0.01)。化合物 IV、VIII、X 也有一定的抗 HBV 作用。

5 讨论

HBV-DNA 克隆转染的人肝癌细胞 HepG₂-2.2.15 细胞系,能转录、翻译 HBV 基因,并产生 HBsAg、HbeAg 颗粒,是目前体外抗 HBV 药物筛选和评价较好的细胞模型^[19]。

空心莲子草对病毒的灭活作用及临床实验治疗效果显著^[2],其曾被制成注射剂用于治疗病毒性感染疾患,但其抗病毒作用物质基础并不明确,其抗病毒作用分子细胞药理学研究欠缺。本实验报道从该植物中分离鉴定的阿魏酰胺和皂苷类化合物具有较强

的抗 HBV 活性。从化合物单体水平证明药用植物空心莲子草具有抗 HBV 活性,同时,为了进一步阐明该药用植物的药效作用物质基础,还需对其进行系统的化学成分研究和体内作用机制的深入探讨。

致谢:武汉大学生命科学院病毒学教育部重点实验室测试化合物的抗 HBV 活性。

References:

- [1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1977.
- [2] Wuhan Research Collaboration Group on *Alternanthera philoxeroides*. Experimental study and clinical application of *Alternanthera philoxeroides* preparations [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1978, 2: 28-33.
- [3] Yang Z Q, Zhang M Y, Liu J J, et al. Extraction of effective parts of *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. and its antiviral effect [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1989, 14(8): 488-490, 511-512.
- [4] Qu C F, Yang Z Q, Xiang J M. *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb protection against fetal epidemic hemorrhagic fever virus infection in suckling mice [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1993, 18(5): 304-305, 320.
- [5] Zhang S M, He Y S, Tabba H D, et al. Inhibitor against the human immunodeficiency virus in aqueous extracts of *Alternanthera philoxeroides* [J]. *Chin Med J*, 1988, 101(11): 861-866.
- [6] Hou W, Li J J, Wang X, et al. Griseb therapy for Hantaan virus infection in suckling mice [J]. *Med J Wuhan Univ* (武汉大学学报:医学版), 2005, 26(1): 111-113.
- [7] Jiang W L, Luo X L, Kuang S J. Effects of *Alternanthera philoxeroides* Griseb against Dengue virus *in vitro* [J]. *J Military Med Univ* (第一军医大学学报), 2005, 25(4): 454-456.
- [8] Deng R L, Zhu J Y, Xu H T, et al. Study of inhibitory effect of *Alternanthera philoxeroides* on influenza viruses [J]. *Chin J Microbiol Immun* (中华微生物学和免疫学杂志), 1984, 4(3): 173-176.
- [9] Fan Y Q, Wu Q H, Wang X M, et al. An experimental study of protective effect of *Alternanthera philoxeroides* on hepatic injury induced by CCl₄ [J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2004, 28(1): 36-38.
- [10] Lin Q H. Immunopharmacological investigation of *Alternanthera philoxeroides* [J]. *Chin J Exp Clin Immunol* (中国实验临床免疫学杂志), 1991, 3(3): 39-42.
- [11] Wang J Z, Wang F P. Chemical study of *Rabdosia 'goetsa'* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1998, 10(3): 15.
- [12] Lin Y P, Qiu M H, Li Z R, et al. New triterpenoid glycosides from *Hemsleya penxianensis* var. *gulinensis* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物学报), 2003, 25(2): 235-240.
- [13] Qi N X, Jia S P, Hao Z F, et al. Isolation and identification of the chemical constituents of radix from *Achyranthes bidentata* [J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2005, 15(3): 162-166.
- [14] Antonio G G, José A G, Angel G R, et al. 4, 5-dihydroblumenol A, a new nor-isoprenoid from *Perrottetia multiflora* [J]. *J Nat Prod*, 1994, 57(3): 400-402.
- [15] Hitoshi T, Takeshi N, Kazuhiko I, et al. A phenolic amide from *Actinodaphne longifolia* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(9): 2516-2517.
- [16] Slatkin D, Knapp J, Schiff P, et al. Steroids of *Cannabis sativa* root [J]. *Phytochemistry*, 1975, 14(2): 580.
- [17] Fu G M, Yu B Y, Zhu D N. Studies on the chemical constituents of *Euphorbia ebracteolata* [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2003, 34(4): 377-379.
- [18] Wang N, Wang J H, Cheng J, et al. Chemical constituents of *Pyrrosia petiolosa* (Christ) Ching [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2003, 20(6): 425-427, 438.
- [19] Sells M A, Chen M L, Acs G, et al. Production of hepatitis B virus particles in HepG₂ cells transected with cloned hepatitis B virus DNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(4): 1005-1006.

云南红豆杉心木的化学成分研究

陈雪英^{1,2}, 梁敬钰^{1*}

(1. 中国药科大学 天然药物化学教研室, 江苏 南京 210009; 2. 杭州民生药业集团有限公司, 浙江 杭州 310011)

摘要:目的 进一步了解云南红豆杉心木部位的化学成分。方法 云南红豆杉心木的乙醇提取物,经用萃取、硅胶柱色谱、凝胶柱色谱等方法分离,从其氯仿萃取部位分离鉴定得 18 个化合物,采用波谱解析(UV、IR、ESI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR)等方法确定其结构。结果 这 18 个化合物分别为 12 个紫杉烷:2 α ,5 α ,7 β ,9 α ,10 β ,13 α -六乙酰氧基-4(20),11-紫杉二烯(I)、紫杉素(II)、紫杉-4(20),11-二烯-2 α ,5 α ,10 β -三乙酰氧基-14 β ,2-甲基丁基(III)、10 β -羟基-2 α ,5 α ,14 β -三乙酰氧基-4(20),11-紫杉二烯(IV)、1-去羟基巴卡亭 V(V)、巴卡亭 V(VI)、巴卡亭 VI(VII)、7,9-去乙酰基巴卡亭 VI(VIII)、10-去乙酰基云南红豆杉素(IX)、1 β -乙酰氧基-5-去乙酰基巴卡亭 I(X)、巴卡亭 I(XI)、taxuchin A(XII);4 个木脂素:开环异落叶松树脂素(XIII)、 α -conidendrin(XIV)、异紫杉脂素(XV)、落叶松树脂素(XVI);2 个其它化合物:肌醇甲醚(XVII)、 β -谷甾醇(XVIII)。其中化合物 I、V、VI、XI、XII、XVI 为心木部位首次分得的成分。结论 云南红豆杉心木部位的化学成分同云南红豆杉其他部位有一定的差异,但就红豆杉属而言没有什么差异。

关键词:云南红豆杉;心木;二萜;木脂素

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)07-0979-04

收稿日期:2006-10-15

作者简介:陈雪英(1974-),女,福建福州人,博士,主要从事天然活性成分研究和新药开发。E-mail:xueyingc2001@yahoo.com.cn

* 通讯作者 梁敬钰 Tel:(025)85391289 Fax:(025)83353855 E-mail:lyliang@plublicl.ppt.js.cn