

新疆紫草羟基萘醌类化学成分的研究及对 PDE₄ 的抑制作用

赵海青¹, 刘军锋², 刘珂^{1, 2*}

(1. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264005; 2. 山东靶点药物研究有限公司, 山东 烟台 264006)

[摘要] 目的: 研究新疆紫草羟基萘醌的主要成分及对 PDE₄ 酶的抑制作用。方法: 用硅胶柱层析、制备 HPLC 和制备 TLC 等方法分离纯化新疆紫草中羟基萘醌化合物, 通过理化性质和光谱数据进行结构鉴定。HPLC 方法测定主要羟基萘醌类化合物对 PDE₄ 酶的抑制活性。结果: 分离鉴定了 7 个化合物, 分别为去氧阿卡宁(1)、阿卡宁(2)、乙酰阿卡宁(3)、, -二甲基丙烯酰阿卡宁(4)、-甲基丁酰阿卡宁(5)、异丁酰阿卡宁(6)和 -乙酰氧基异戊酰阿卡宁(7)。结论: 化合物 2, 5, 6 为首次从新疆紫草中分离得到。首次评价了新疆紫草羟基萘醌类成分对 PDE₄ 酶的抑制作用。

[关键词] 新疆紫草; 羟基萘醌; 阿卡宁; PDE₄

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0096-04

Hydroxynaphthoquinone Compounds From *Arnebia euchroma* and Their Inhibitory Activities of Phosphodiesterase4

ZHAO Hai-qing¹, LIU Jun-feng², LIU Ke^{1, 2*}

(1. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China; 2. Shandong Target Drugs Research Co. Ltd., Yantai 264006, China)

[Abstract] Objective: To investigate the Hydroxynaphthoquinone of *Arnebia euchroma*(Royle) Johnst and their inhibitory activities on phosphodiesterase 4. **Method:** Hydroxynaphthoquinones were isolated and purified by chromatographic methods. Their chemical structures were elucidated on the basis of physicochemical properties and spectral data and their inhibitory activity on phosphodiesterase 4 were detected by HPLC. **Result:** 7 Hydroxynaphthoquinones were isolated and identified as: deoxyalkannin 1, alkannin 2, acetylalkannin 3, , -dimethylacrylalkannin 4, -methybutyrylalkannin 5, isobutyrylalkannin 6, -acetoxisovalerylalkannin 7. **Conclusion:** Compounds 2, 5, 6 were isolated from *Arnebia euchroma* first time. Their inhibitory activities on phosphodiesterase 4 were evaluated by HPLC method for first time.

[Key words] *Arnebia euchroma*; hydroxynaphthoquinone; alkannin; phosphodiesterase 4

紫草是我国的传统中药, 2005 年版《中国药典》
收载的紫草为紫草科植物新疆紫草 *Arnebia euchroma*
(Royle) Johnst. 和内蒙古紫草 *A. guttata* Bunge. 的
根, 具有凉血活血, 解毒透疹之功能。用于血热毒

盛, 斑疹紫黑, 麻疹不透, 疮疡, 湿疹, 水火烫伤^[1]。
近代药理学研究证明紫草有抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗
凝血以及促伤口愈合等作用^[2]。

PDE₄ 属于磷酸二酯酶家族, 其同工酶主要分布
于各种炎性细胞内, 包括肥大细胞、巨噬细胞
(M₂)、嗜酸粒细胞(EOS)、淋巴细胞和上皮细胞
等^[3], 在炎症和免疫调节细胞中发挥重要作用。在
研究炎症反应机制时发现, 在炎症阶段, 炎症白细胞
(AC), 腺苷酸环化酶 cAMP, 磷酸二酯酶(PDE) 系统
发生明显的改变: AC 活性增加 1.5 倍, cAMP 浓度减
少 4.0 倍, PDE 活性增加 5.3 倍。而 AC 活性升高可

[收稿日期] 20100317(007)

[第一作者] 赵海青, Tel: 0535-6372088-24, E-mail: qhz0823@163.com

[通讯作者] * 刘珂, 教授, 主要从事源于传统中药的先导化合物的研究与开发, Tel: 0535-6372066, E-mail: liuke@ytu.edu.cn

能主要是由于炎症反应引起肾上腺素能受体系统激活。PDE 活性增加可能主要与炎症白细胞胞内游离钙浓度增加有关^[4]。据此推测 PDE₄ 与炎症疾病密切相关。

文献报道,紫草有抗炎作用,尤其是对一些慢性自身免疫性疾病如关节炎、炎性肠病(IBD) 等疾病有治疗作用^[5],有关紫草的抗炎作用的物质基础普遍认为羟基萘醌化合物。实验证明羟基萘醌化合物乙酰紫草素对炎症急性渗出期的血管通透性亢进、渗出和水肿有明显的拮抗作用^[6]。皮下注射紫草素 10 mg · kg⁻¹,对小鼠巴豆油耳炎症和大鼠酵母性足趾肿有明显抑制作用^[7]。有文章报道该类化合物抗炎的分子作用机制可能与其对前炎症细胞因子的抑制作用有关,但是有关紫草羟基萘醌对 PDE₄ 的抑制作用尚未见报道。为了进一步了解紫草的抗炎作用,本文从新疆紫草中分离得到羟基萘醌类化合物,并测定了其中 4 个化合物对 PDE₄ 的抑制活性。

1 材料

高效液相色谱仪(Agilent 1200, 安捷伦公司); Varian Unity BRUKER400 型核磁共振仪;薄层色谱硅胶(GF₂₅₄)和柱色谱硅胶(200 ~300 目)均为烟台市化学工业研究所产品;PDE₄ 酶从猪血中性粒细胞中分离得到;新疆紫草购自烟台医药商城,由烟台大学药学院生药室赵燕燕博士鉴定,标本存于烟台大学药学院。

2 提取分离

取新疆紫草 5 kg,粉碎,过三号筛,用 50 L 石油醚(60 ~90)室温渗漉。收集渗漉液,回收石油醚得紫草总萘醌浸膏约 0.25 kg。该浸膏经硅胶柱层析,以石油醚-乙酸乙酯(100 1 100 9)为溶剂梯度洗脱,得到 Fr. 1(2.1 g),Fr. 2(8.3 g),Fr. 3(4.5 g),Fr. 4(5.0 g),Fr. 5(1.3 g)。其中 Fr. 1 经石油醚重结晶得化合物 1(1.3 g);Fr. 2 经石油醚重结晶得化合物 3(4.9 g);Fr. 3 经重结晶(石油醚-乙酸乙酯-甲醇体积比为 0.9 0.1 10)得化合物 4(1.5 g);Fr. 4(0.3 g)经制备液相得化合物 5(20 mg)和 6(30 mg);Fr. 5 经反复硅胶柱层析和制备薄层(石油醚-丙酮 8 1)展开,乙酸乙酯洗脱得化合物 2(63 mg)和化合物 7(16.4 mg)。制备液相条件为:流动相四氢呋喃-水 45 55,流速 3.6 mL · min⁻¹,色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈, (9.4 mm × 250 mm, 5 μm);检测

波长 515 nm。

3 结构鉴定

3.1 化合物 1 鲜红色鳞片状结晶, mp 90 ~92 ; ESI-MS m/z 271.00 [M-H]⁻¹,符合分子式 C₁₆H₁₆O₄; ¹H-NMR 谱(CDCl₃, 400 MHz): δ 2.63(1 H, s), 12.47(1 H, s), 7.26(2 H, s), 6.85(1 H, s), 5.14(1 H, t, $J=7.1$ Hz), 2.64(2 H, t, $J=7.5$ Hz), 2.30(2 H, m), 1.70(3 H, s), 1.60(3 H, s); ¹³C-NMR 谱数据见表 1。以上数据与文献报道的去氧阿卡宁(deoxyalkannin) 基本一致^[8,11]。

3.2 化合物 2 红褐色针状结晶, mp 145 ~147 ; ESI-MS m/z 286.99 [M-H]⁻¹,符合分子式 C₁₆H₁₆O₅; ¹H-NMR 谱(CDCl₃, 400 MHz): δ 2.60(1 H, s), 12.49(1 H, s), 7.19(2 H, d, $J=2.4$ Hz), 7.16(1 H, s), 5.21(1 H, t, $J=6.9$ Hz), 4.92(1 H, br. m), 2.64(1 H, m), 2.36(2 H, m), 1.76(3 H, s), 1.66(3 H, s); ¹³C-NMR 谱数据见表 1。以上数据与文献报道的阿卡宁(alkannin) 基本一致^[8,9]。

3.3 化合物 3 红褐色颗粒状结晶, mp 106 ~107 ; ESI-MS m/z 329.00 [M-H]⁻¹,符合分子式 C₁₈H₁₈O₆; ¹H-NMR 谱(CDCl₃, 400 MHz): δ 2.58(1 H, s), 12.43(1 H, s), 7.19(2 H, s), 6.99(1 H, s), 6.02(1 H, dd, $J=4.8, 6.7$ Hz), 5.12(1 H, t, $J=7.3$ Hz), 2.62, 2.47(2 H, m), 2.14(3 H, s), 1.69(3 H, s), 1.60(3 H, s); ¹³C-NMR 谱数据见表 1。以上数据与文献报道的乙酰阿卡宁(acetylalkannin) 基本一致^[8-10]。

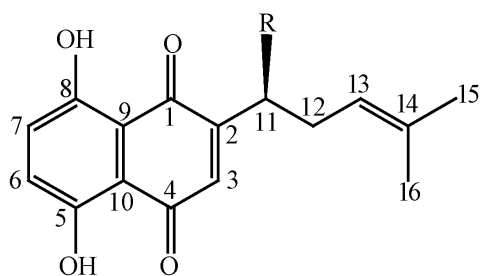
3.4 化合物 4 红褐色片状结晶, mp 116 ~117 ; ESI-MS m/z 369.04 [M-H]⁻¹,符合分子式 C₂₁H₂₂O₆; ¹H-NMR 谱(CDCl₃, 400 MHz): δ 2.60(1 H, s), 12.44(1 H, s), 7.18(2 H, s), 6.98(1 H, s), 6.01(1 H, dd, $J=4.6, 6.7$ Hz), 5.78(1 H, s), 5.15(1 H, t, $J=7.3$ Hz), 2.48, 2.63(2 H, m), 2.16(3 H, s), 1.94(3 H, s), 1.69(3 H, s), 1.58(3 H, s); ¹³C-NMR 谱数据见表 1。以上数据与文献报道的, -二甲基丙烯酰阿卡宁(, -dimethylacrylalkannin) 基本一致^[9-10]。

3.5 化合物 5 红色黏稠物, ESI-MS m/z 371.06 [M-H]⁻¹,符合分子式 C₂₁H₂₄O₆; ¹H-NMR 谱(CDCl₃, 400MHz): δ 2.59(1 H, s), 12.42(1 H, s), 7.18(2 H, s), 7.00(1 H, s), 6.03(1 H, dd, $J=4.5, 7.2$ Hz), 5.13(1 H, t, $J=7.3$ Hz), 2.62, 2.48(2 H,

m), 2.44(1 H, m), 1.49(2 H, m), 1.69(3 H, s), 1.57(3 H, s), 1.17(3 H, d, $J=7.0$ Hz), 0.95(3 H, t, $J=7.5$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ 谱数据见表 1。以上数据与文献报道的 α -甲基丁酰阿卡宁 (α -methybutyrylalkannin) 基本一致^[10]。

3.6 化合物 6 红色黏稠物, ESI-MS m/z 371.04 [M-H]⁻¹, 符合分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_6$; $^1\text{H-NMR}$ 谱 (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.59(1 H, s), 12.43(1 H, s), 7.19(2 H, s), 6.99(1 H, s), 6.14(1 H, dd, $J=4.5, 7.2$ Hz), 5.13(1 H, t, $J=7.2$ Hz), 2.62, 2.48(2 H, m), 2.26(2 H, m), 2.13(1 H, m), 1.69(3 H, s), 1.58(3 H, s), 0.98(6 H, d, $J=1.2$ Hz)。 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱数据见表 1。以上数据与文献报道的异戊酰阿卡宁 (isobutyrylshikonin) 基本一致^[11]。

3.7 化合物 7 色黏稠物, ESI-MS m/z 429.06 [M-H]⁻¹, 符合分子式 $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_8$; $^1\text{H-NMR}$ 谱 (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.59(1 H, s), 12.42(1 H, s), 7.18(2 H, s), 7.01(1 H, s), 6.04(1 H, dd, $J=4.6, 7.1$ Hz), 5.13(1 H, t, $J=7.2$ Hz), 2.98(2 H, q, $J=14.4$ Hz), 2.62, 2.47(2 H, m), 2.00(3 H, s), 1.69(3 H, s), 1.59(3 H, s), 1.56(3 H, s), 1.54(3 H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ 谱数据见表 1。以上数据与文献报道 α -乙酰氧基异戊酰阿卡宁 (α -acetoxyisovalerylshikonin) 基本一致^[12]。



阿卡宁衍生物

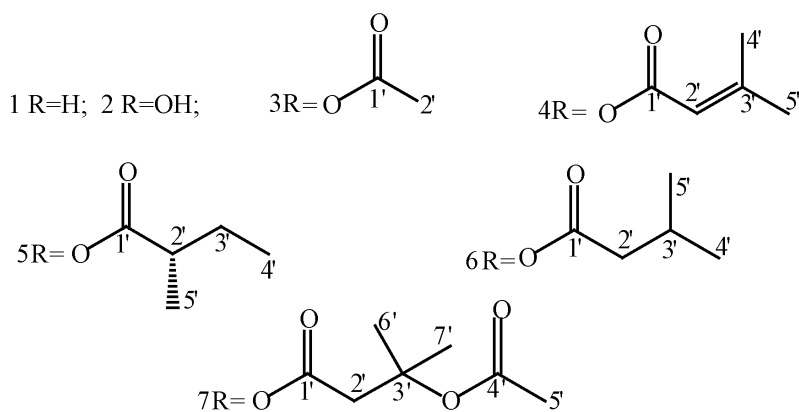


图 1 化合物 1~7 的结构式

4 羟基萘醌类成分对 PDE₄ 的抑制活性测定

4.1 PDE₄ 活性测定 参考文献方法^[3,13], cAMP 用 Ca/Mg PBS 配成 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 酶样设 4 个取样

量, 用 Ca/Mg PBS 定容至 $100 \mu\text{L}$, 加样过程在冰浴中进行, 加样量见表 2。加样后各管置 35°C 中恒温孵育 30 min, 然后于 100°C 水浴中 2~3 min 终止反应, 各管于 4°C 温度下离心 30 min ($15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 取上清液 $70 \mu\text{L}$, 用超纯水稀释 5 倍 (加入 $280 \mu\text{L}$ 双蒸水), HPLC 进样 $20 \mu\text{L}$, 254 nm 波长检测, 流动相由甲醇与 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 (组成 / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): KH_2PO_4 4.0827 g, Na_2HPO_4 2.8392 g, pH 6.6) 组成, 容积比为 10:90。PDE 活性以底物的水解百分率表示: $\text{PDE}_4 \text{ 活性} = (\text{对照管底物浓度} - \text{测定管底物浓度}) / \text{对照管底物浓度} \times 100\%$ 。

表 1 化合物 1~7 的 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱数据 (溶剂 CDCl_3 , 100 Hz)

C 位	化合物 1	化合物 2	化合物 3	化合物 4	化合物 5	化合物 6	化合物 7
1	182.9	179.7	176.7	177.5	176.8	176.7	176.0
2	151.5	151.4	148.2	149.1	148.6	148.5	148.0
3	130.9	131.7	131.5	131.6	131.4	131.5	131.3
4	183.0	180.5	178.2	179.0	178.3	178.2	177.5
5	162.4	165.0	167.0	165.3	166.9	166.9	168.1
6	133.6	132.4	132.9	132.6	132.8	132.9	133.1
7	131.2	132.3	132.7	132.5	132.7	132.7	132.9
8	163.0	165.6	167.5	166.3	167.5	167.5	167.6
9	112.0	112.0	111.8	111.9	111.9	111.9	111.8
10	111.7	111.5	111.6	111.6	111.6	111.6	111.6
11	29.7	68.4	69.5	68.6	69.0	69.2	69.7
12	26.6	35.7	32.8	32.9	33.1	33.0	32.9
13	122.4	118.5	117.7	118.0	117.9	117.9	117.8
14	134.5	137.3	136.1	135.8	135.9	136.0	136.1
15	25.6	25.9	20.9	20.4	25.7	25.8	25.7
16	17.8	18.1	17.9	17.9	17.9	17.9	17.9
1	-	-	169.7	169.9	175.4	171.8	169.0
2	-	-	25.7	115.3	41.0	43.4	44.3
3	-	-	-	158.9	26.7	25.8	79.3
4	-	-	-	27.5	11.5	22.3	170.4
5	-	-	-	25.7	16.4	22.4	22.3
6	-	-	-	-	-	-	26.6
7	-	-	-	-	-	-	26.7

表 2 酶加样量与活性的关系

管号	cAMP / μL	钙镁 PBS / μL	酶样 / μL	PDE ₄ 活性 / %
对照	50	50	0	0
1	50	40	10	25
2	50	30	20	42
3	50	20	30	57
4	50	10	40	72
5	50	0	50	80

以 PDE₄ 的加样量为横坐标, PDE₄ 活性为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归方程为 $Y = 1.4X + 13.2$, $r = 0.99$ 。结果表明, PDE₄ 样品量在 10 ~ 50 μL 之间与活性呈良好的线性关系, 因此可选择中间范围 30 μL 作为每次试验中酶的加样量。

4.2 样品对 PDE₄ 活性抑制率^[3,13] 酶反应在 Ca/Mg PBS 中进行。cAMP 用缓冲液配成 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 反应时取 cAMP 65 μL , 酶样量 30 μL , 药物设 6 个不同浓度, 用量为 1 μL , 对照管和样品管均加入提取的 PDE₄ 酶样, 空白对照管加入灭活的酶样, 用缓冲液定容至 100 μL 。用 PDE₄ 特异性抑制剂 Rolipram 做阳性对照, DMSO 溶解。各样品的加样顺序及处理方法与测定 PDE₄ 酶活性方法相同。根据不同浓度下各化合物的抑制率, 计算其 IC₅₀ 值。去氧阿卡宁、阿卡宁、乙酰阿卡宁、, -二甲基丙烯酰阿卡宁抑制 PDE₄ 活性的 IC₅₀ 值分别为 1.04, 3.62, 22.58, 38.40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。各化合物对 PDE₄ 酶都有抑制活性, 但其 IC₅₀ 差别较大。去氧阿卡宁 IC₅₀ 最小, 为 1.04, , -二甲基丙烯酰阿卡宁最大, 为 38.40。因此去氧阿卡对 PDE₄ 酶的抑制活性最强, 其次是阿卡宁, 乙酰阿卡宁, 而 , -二甲基丙烯酰阿卡宁对 PDE₄ 酶的抑制活性最弱。

5 结果与讨论

从新疆紫草中分离鉴定出 7 个化合物, 其中异丁酰阿卡宁、-甲基丁酰阿卡宁和阿卡宁系首次从该植物中分离得到。对其中的 4 个化合物做了活性测定, 结果表明, 各化合物对 PDE₄ 都有抑制活性, 且抑制强度不尽相同。其中去氧阿卡宁的抑制活性最强, 几乎和阳性药 Rolipram 相当。

研究表明 PDE₄ 抑制剂对一些慢性炎病如炎性肠病 (IBD), 急性肺损伤、败血症、关节炎、皮肤疾病、全身性红斑狼疮等有很好的治疗作用, 它能阻止前炎症介质的释放, 提高抗炎介质的释放, 从而起到抗炎作用。本文体外实验证明新疆紫草羟基萘醌类化合物对 PDE₄ 酶有一定的抑制活性。因此新疆紫草羟基萘醌类化合物有可能作为一种新的治疗药物用于治疗慢性炎病。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北

京: 化学工业出版社, 2005: 239.

- [2] Vassilios P Papageorgiou, Andreana N Assimopoulou, Elias A Couladouros, et al. The chemistry and biology of alkannin, shikonin, and related naphthazarin natural products[J]. *Angew Chem Int Ed*, 1999, 38: 270.
- [3] Su nanda G Dastidar, Deepa Rajagopal, Abhijit Ray. Therapeutic benefits of PDE₄ inhibitors in inflammatory diseases[J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2007, 8 (5): 364.
- [4] 郑绪阳. 大鼠急性肺损伤模型中磷酸二酯酶 4 的活性变化及选择磷酸二酯酶 4 抑制剂的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [5] Vassilios P Papageorgiou, Andreana N Assimopoulou, V F Samanidou, et al. Recent advances in chemistry, biology and biotechnology of alkannins and shikonins [J]. *Curr Org Chem*, 2006, 10: 2123.
- [6] 林志彬, 柴宝玲, 王珮, 等. 紫草化学成分抗炎症作用的研究[J]. *北京医学院学报*, 1980, 12(2): 101.
- [7] 张秀娟, 刘佰华, 穆坤, 等. 紫草及其提取物生物学活性研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2007, 19(6): 578.
- [8] Man Ho Cho, Young Sook Paik, Tae Ryong Hahn. Physical Stability of Shikonin Derivatives from the Roots of *Lithospermum erythrorhizon* cultivated in Korea[J]. *Agric Food Chem*, 1999, 47: 4117.
- [9] Weng X C, Xiang G Q, Jiang A L, et al. Antioxidant properties of components extracted from puccoon (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.) [J]. *Food Chem*, 2000, 69: 143.
- [10] Chien Chang Shen, Wan Jr Syu, Shyh Yuan Li, et al. Antimicrobial activities of naphthazarins from *Arnebia euchroma*[J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(12): 1857.
- [11] Afzal, Mohammad, A_L-Oriqat Galib. Shikonin derivatives chemical investigations of *Arnebia decumbens*[J]. *Agric Biol Chem*, 1986, 50: 759.
- [12] 朱汝幸, 曹日强, 王曼丝, 等. 滇紫草愈伤组织中的紫草色素[J]. *植物学报*, 1990, 32(10): 749.
- [13] 姜代勋, 陈武, 于同泉, 等. 中草药对磷酸二酯酶活性影响的初步研究[J]. *北京农学院学报*, 2006, 21(1): 7.

[责任编辑 邹晓翠]