

雷公藤中二萜内酯类成分的研究 (II)

林 绥^{1*}, 阙慧卿¹, 彭华毅¹, 钱丽萍¹, 郭舜民¹, 李援朝²

(1. 福建省医学科学研究院, 福建 福州 350001; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要: 为对雷公藤 (*Tripterygium willfordii* Hook.f) 进行植物化学和药理的研究, 应用现代色谱技术对雷公藤植物的化学成分进行了提取分离, 应用 UV、IR、MS、HR-MS、¹H NMR、¹³C NMR、¹H-¹H COSY、¹H-¹³C COSY 和 NOESY 技术对分离得到的 4 个化合物进行结构确证。4 个化合物分别归属为: 化合物 **1** 为雷公藤内酯酮 (triptonide)、化合物 **2** 为新雷公藤内酯四醇 (neo-triptetraolide)、化合物 **3** 命名为 2 α -羟基雷公藤内酯酮 (2 α -hydroxytriptonide) 和化合物 **4** 命名为 15-羟基雷公藤内酯酮 (15-hydroxytriptonide)。其中化合物 **3**、**4** 为新的二萜内酯并对 K562 细胞 (慢性粒细胞白血病细胞) 及 HL60 细胞 (急性髓性白血病细胞) 具有显著抑制作用。

关键词: 雷公藤; 二萜内酯; 2 α -羟基雷公藤内酯酮; 15-羟基雷公藤内酯酮

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 08-0942-04

Diterpene constituents of *Tripterygium willfordii* (II)LIN Sui^{1*}, QUE Hui-qing¹, PENG Hua-yi¹, QIAN Li-ping¹, GUO Shun-min¹, LI Yuan-chao²

(1. Fujian Institute of Medical Sciences, Fuzhou 350001, China;

2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: In order to study the constituents and pharmacology of *Tripterygium* plants (*Tripterygium willfordii* Hook.f), a variety of chromatography methods were used. Four compounds were isolated from *Tripterygium* plant and their structures were elucidated by UV, IR, MS, HR-MS, ¹H NMR, ¹³C NMR and 2D-NMR techniques. The isolated compounds were named as triptonide (**1**), neo-triptetraolide (**2**), 2 α -hydroxytriptonide (**3**), and 15-hydroxytriptonide (**4**), separately. Compounds **3**, **4** belong to new diterpenoids, which can inhibit the growth of K562 cells (leukemia cells) and HL60 cells (acute myeloid leukemia cells).

Key words: *Tripterygium willfordii*; diterpenoid; 2 α -hydroxytriptonide; 15-hydroxytriptonide

雷公藤 (*Tripterygium willfordii* Hook.f) 系卫矛科雷公藤属植物, 该植物在抗肿瘤方面有抗急性白血病和慢性粒细胞白血病的研究; 在免疫抑制方面有器官移植中抗排斥的研究和在自身免疫性疾病方面有治疗类风湿性关节炎、慢性肾炎、红斑狼疮、银屑病等方面的研究, 均报道疗效显著。因此, 作者对雷公藤的化学成分进行了较详细的研究。前文^[1]报道了从雷公藤根皮中分离到 4 个雷公藤二萜内酯类化

合物, 本文继续报道从雷公藤根皮的乙醇提取物中分离得到的 4 个二萜内酯类化合物。根据理化性质和光谱分析 (UV, IR, NMR, HR-MS, 2D-NMR), 鉴定化合物分别为雷公藤内酯酮 (**1**, triptonide)、新雷公藤内酯四醇 (**2**, neo-triptetraolide)、2 α -羟基雷公藤内酯酮 (2 α -hydroxytriptonide, **3**) 和 15-羟基雷公藤内酯酮 (15-hydroxytriptonide, **4**), 化合物 **3** 和 **4** 为新的二萜内酯。2 α -羟基雷公藤内酯酮、15-羟基雷公藤内酯酮对 K562 细胞 (慢性粒细胞白血病细胞) 及 HL60 细胞 (急性髓性白血病细胞) 具有抑制作用。

化合物 **3** 无色针状结晶, mp 233~235 °C, HR-MS [M+H]⁺: 375.145 5, 分子式 C₂₀H₂₃O₇ (计算

收稿日期: 2011-03-22.

基金项目: 福建省科技重大专项 (2009YZ0001-1-3); 福建省医学创新项目 (2009-CX-16).

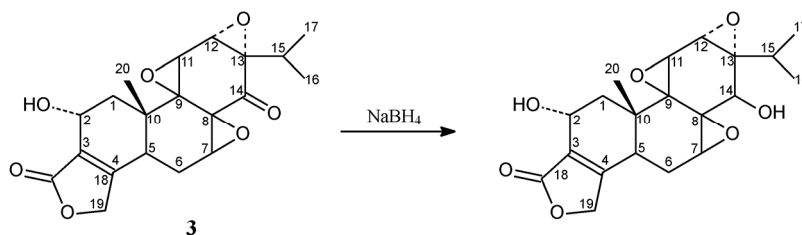
*通讯作者 Tel: 13605948318, Fax: 86-519-87517981,

E-mail: linsui_syy@sina.com.cn

值: 375.144 2)。与 Kedde 试剂显紫红色反应。紫外光谱示有 α, β 不饱和五元环内酯 (218 nm), IR 谱示有羟基 ($3\ 560\text{ cm}^{-1}$)、 α, β 不饱和五元环内酯 ($1\ 780$ 和 $1\ 750\text{ cm}^{-1}$)、 $\text{C}=\text{O}$ ($1\ 720\text{ cm}^{-1}$) 和环氧基 (908 cm^{-1})。与化合物 **1** (雷公藤内酯酮)^[2]比较, 在 ^1H NMR 谱中, 有 1 个加 D_2O 消失的羟基峰 ($\delta\ 3.18$), 即比化合物 **1** 多 1 个羟基。在异丙基部分甲基是对称双峰 ($\delta\ 1.16, 0.93$), 与化合物 **1** 的异丙基部分相同。仔细比较化合物 **1** 和化合物 **3** 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱, 发现在 C-1、C-2 和 C-3 位存在不同之处, 在化合物 **1** 中为 C-1 ($\delta\ 30.8$)、C-2 ($\delta\ 17.3$) 和 C-3 ($\delta\ 125.8$), 而在化合物 **3** 中为 C-1 ($\delta\ 38.3$)、C-2 ($\delta\ 61.4$) 和 C-3 ($\delta\ 127.9$), 显然化合物 **3** 的 C-1、C-2、C-3 都明显向低场位移。同时 C-2 位氢也明显向低场位移 ($\delta\ 4.58$), 推测化合物 **3** 在 2 位连有 α 位羟基。处于 2- α 位羟基的氢与 α, β 不饱和五元环内酯羰基上的氧 ($\text{C}=\text{O}$) 形成氢键而产生的远程共轭使 C-1、C-2、C-3 向低场位移。这在 NOESY 谱中也得到证实, 从 NOESY 谱中可见 $\delta\ 4.58$ 处的氢与 $\delta\ 1.19$ 处的甲基有增益, 证实了 2-OH 是 α 位羟基, 在 ^1H NMR 谱中, 化合物 **3** 的 1 位碳上氢在 $\delta\ 1.22$ 处, 在 NOESY 谱中可见到该峰与 $\delta\ 1.19$ 处的甲基峰 ($\text{C}_{20}\text{-CH}_3$) 有 NOE 增益, 证明 $\delta\ 1.22$ 处的峰是 1-H (β 位), 在 $\delta\ 1.95$ 处的峰, 由于受 2 位羟基氢形成氢键的影响而向低场位移, 同时也说明 $\delta\ 1.95$ 处的峰是 1-H (α 位), 2 位羟基是 α 位。在 ^{13}C NMR 谱中, 与化合物 **1** 相同的是在 $\delta\ 196.8$ 处有相同的羰基季碳信号, 即碳 14 位连有羰基。在 ^1H NMR 谱中, 化合物 **1** 中的碳 12 位氢 ($\delta\ 3.80, \text{d}, J = 3\text{ Hz}$), 化合物

3 中碳 12 位氢 ($\delta\ 3.88, \text{d}, J = 3\text{ Hz}$), 这两个化合物的碳 12 位氢的化学位移和耦合常数是相同的。在 ^{13}C NMR 谱中, 见到 C-14 位 $\text{C}=\text{O}$ 峰 ($\delta\ 197.03$), C-7 ($\delta\ 59.89, \text{d}$), C-8 ($\delta\ 60.8, \text{s}$), C-9 ($\delta\ 65.8, \text{s}$), C-11 ($\delta\ 56.3, \text{d}$), C-12 ($\delta\ 58.89, \text{d}$), C-13 ($\delta\ 66.3, \text{s}$) 三环氧基处的特征峰, 证明化合物 **1**、**3** 在此处的结构是相同的, 即典型的雷公藤二萜内酯三环氧酮的结构。将化合物 **3** 按反应式 1 进行转化。将得到的 2-表雷公藤乙素 (2 α -epitriptidiolide) 即 2 α -羟基雷公藤内酯醇进行 UV、IR、 ^1H NMR 检测并与已知的比较, 完全相同^[1]; 综上分析, 对化合物 **3** 的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、 ^1H - ^1H COSY、 ^1H - ^{13}C COSY 和 NOESY 进行了归属, 确认了化合物 **3** 的结构 (图 1) 并命名为 2 α -羟基雷公藤内酯酮 (2 α -hydroxytriptonide)。

化合物 **4** 无色针状结晶, mp $217\sim 219\text{ }^\circ\text{C}$, HR-MS $[\text{M}+1]^+$: 375.145 9, 分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_7$ (计算值: 375.144 2)。与 Kedde 试剂显紫红色反应。紫外光谱示有 α, β 不饱和五元环内酯 (218 nm) 的特征吸收峰。IR 谱示有羟基 ($3\ 550\text{ cm}^{-1}$)、 α, β 不饱和五元环内酯 ($1\ 780$ 和 $1\ 760\text{ cm}^{-1}$)、 $\text{C}=\text{O}$ ($1\ 720\text{ cm}^{-1}$) 和环氧基 (908 cm^{-1})。其相对分子质量与分子式与化合物 **3** 相同。但从 ^1H NMR 及 ^{13}C NMR 谱中 C-1、C-2 的碳和氢 C-1 ($\delta\ 30.9$), C-2 ($\delta\ 17.3$), H-1 ($\delta\ 1.32, 1.59$), H-2 ($\delta\ 2.33, 2.15$) 表明该处的结构与化合物 **1** 相同, 而与化合物 **3** 不同。在 ^1H NMR 谱中 11-H, 12-H 偶合常数 $J = 3\text{ Hz}$; 在 ^{13}C NMR 谱中 C-7 ($\delta\ 60.29$), C-8 ($\delta\ 60.99$), C-9 ($\delta\ 65.39$), C-11 ($\delta\ 56.38$), C-12 ($\delta\ 59.99$), C-13 ($\delta\ 66.80$), 这同时证明了是雷公藤二萜内酯类典



Scheme 1 The transformation of compound **3**

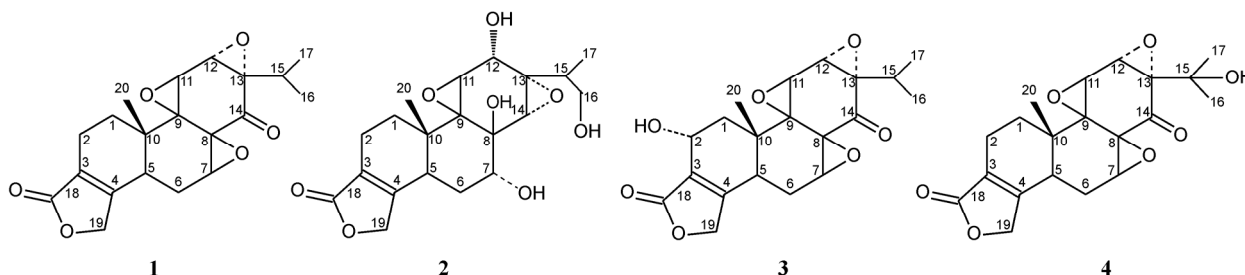


Figure 1 Structures of compounds **1**–**4**

型的三环氧结构。在 ^{13}C NMR 谱中可见到 $\text{C}=\text{O}$ (δ 198.00) 即 14 位碳是羰基碳。比较化合物 **1** 和化合物 **4** 的 ^1H NMR 谱, 异丙基中的甲基不同, 该化合物的异丙基中两个甲基是对称单峰, 且明显向低场位移 (δ 1.39, 1.43), 化合物 **4** 的 ^1H NMR 谱中有一个加 D_2O 后消失的羟基峰 (δ 5.39)。推测存在异丙基羟基。这在 NOESY 谱中得到证实, 在 NOESY 谱中可见到羟基峰 (δ 5.39) 与甲基 (δ 1.39, 1.43) 有 NOE 相关, 证明该化合物连有异丙基羟基。将化合物 **4** 按反应式 2 进行转化, 产物为化合物 **1**, 将产物进行 UV、IR、 ^1H NMR 检测并与化合物 **1** 比较, 完全相同。综上分析, 对化合物 **4** 的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR, ^1H - ^1H COSY, NOESY 谱进行了归属, 确认该化合物为新化合物 (图 1), 命名为 15-羟基雷公藤内酯酮 (15-hydroxytriptonide)。

实验部分

熔点用 APAII 自动探针熔点分析仪测定, 温度未校正。紫外光谱用 UV-300 紫外分光光度计测定, 红外光谱用 Perkin-Elmer 683 型红外光谱仪测定, 核磁共振用 UNITY-500 型核磁共振仪测定, 质谱用 Finnigan-MAT-312 型质谱仪测定。色谱用硅胶为青岛海洋化工厂产品。卫矛科雷公藤属植物雷公藤采自福建省泰宁县。生药由福建师范大学生物系林来官教授鉴定。

1 提取与分离

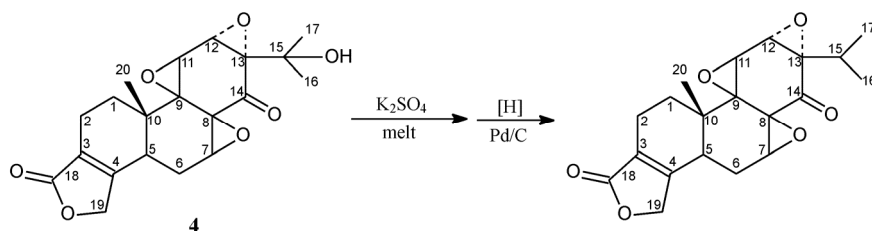
取福建泰宁县产雷公藤 (*Tripterygium willfordii* Hook.f) 根皮 195 kg, 粉碎, 用乙醇进行提取, 得乙醇浸膏, 加水热溶, 水溶液部分用乙酸乙酯萃取 5 次, 得乙酸乙酯部位, 经硅胶柱色谱分离, 用三氯甲烷-甲醇梯度洗脱, 用 TLC 检测, 合并相同的流分, 再经反复硅胶柱色谱分离, 得化合物 **1** (1 850 mg)、化合物 **2** (88 mg)、化合物 **3** (58 mg) 和化合物 **4** (55 mg)。

2 结构鉴定

化合物 **1** 无色鳞片状结晶, mp 250~252 $^{\circ}\text{C}$,

HR-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: 359.148 5 (计算值: 359.149 3), 分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_6$ 。与 Kedde 试剂显紫红色反应, $\text{UV}_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm: 218 nm。IR $\lambda_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3 050, 3 010, 2 985, 1 780, 1 720, 1 680, 1 435, 1 390, 1 295, 939, 908, MS m/z : 358, 343, 330, 329, 315, 301, 297, 259, 255, 206, 149, 105, 79, 55。 ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.87 (d, J = 7 Hz, 16- CH_3), 0.96 (d, J = 7 Hz, 17- CH_3), 1.08 (s, 20- CH_3), 1.28 (dd, J = 12, 6 Hz, 1-H α), 1.55 (dd, J = 12, 4 Hz, 1-H β), 1.99 (dd, J = 15, 4 Hz, 6-H β), 2.13 (m, 2-H β), 2.19 (m, 6-H α), 2.33 (br d, 2-H α), 2.39 (sept, J = 7 Hz, 15-H), 2.80 (br d, 5-H), 3.39 (d, J = 15 Hz, 7-H), 3.80 (d, J = 3 Hz, 12-H), 4.09 (d, J = 3 Hz, 11-H), 4.79, 4.69 (dd, J = 19 Hz, 19-2H)。 ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 30.8 (1-C), 17.3 (2-C), 125.8 (3-C), 159.5 (4-C), 40.8 (5-C), 23.3 (6-C), 60.5 (7-C), 60.9 (8-C), 65.3 (9-C), 35.3 (10-C), 56.18 (11-C), 58.89 (12-C), 66.6 (13-C), 196.80 (14-C), 26.0 (15-C), 16.5 (16-C), 18.0 (17-C), 173.1 (18-C), 69.9 (19-C), 13.3 (20-C)。对化合物 **1** 的 ^1H NMR 谱、 ^{13}C NMR 谱及 ^1H - ^1H COSY 谱与标准品比较, 推断化合物 **1** 为雷公藤内酯酮 (triptonide)^[2]。

化合物 **2** 无色针状结晶, mp 237~239 $^{\circ}\text{C}$, HR-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: 395.171 9 (计算值: 395.170 6), 分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{O}_8$ 。与 Kedde 试剂显紫红色反应, $\text{UV}_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm: 218 nm。IR $\lambda_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3 550, 3 525, 3 465, 3 380, 3 080, 2 690, 1 745, 1 680, 1 435, 1 050, 1 020, 965, 933, 915, 826。MS m/z : 394, 379, 376, 359, 358, 340, 277, 247, 235, 219, 218, 217, 193, 165, 151, 121, 115, 77, 71, 59, 55, 43, 41。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.99 (d, J = 7 Hz, 17- CH_3), 1.09 (s, 20- CH_3), 1.29 (m, 1-H α , β), 1.63 (br dd, J = 14, 2 Hz, 6-H β), 1.99 (m, 2-H β), 2.05 (m, 6-H α), 2.10 (m, 2-H α), 2.19 (m, 15-H), 2.89 (s, 14-H), 3.03 (br, 5-H), 3.33 (d, J = 1.5 Hz, 11-H), 3.43 (m, 16-H α), 3.73 (m, 16-H β), 3.79 (dd, J = 4, 2 Hz, 7-H), 4.16 (dd, J = 9, 1.5 Hz, 12-H), 4.63 (t, 16-OH), 4.78 (d, J = 9 Hz, 12-OH), 4.85 (m, 19-2H), 5.33 (s, 8-OH), 5.49 (d, J = 4 Hz, 7-OH)。 ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 29.09 (1-C), 17.23 (2-C), 125.03 (3-C), 159.98 (4-C), 36.59 (5-C), 26.33 (6-C), 71.78 (7-C), 71.86 (8-C),



Scheme 2 The transformation of compound **4**

63.87 (9-C), 35.00 (10-C), 59.66 (11-C), 63.00 (12-C), 63.68 (13-C), 63.98 (14-C), 36.08 (15-C), 64.18 (16-C), 12.39 (17-C), 173.88 (18-C), 70.30 (19-C), 14.59 (20-C)。对化合物 **2** 的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 谱、 ^1H - ^1H COSY、 ^1H - ^{13}C COSY 及 NOESY 谱进行分析与归属, 确定了化合物 **2** 的结构与新雷公藤内酯四醇^[3]的结构相同。

化合物 3 无色针状结晶, mp 233~235 °C, HR-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: 375.145 5 (计算值: 375.144 2), 分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_7$ 。 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +165$ (c 0.05, CHCl_3)。与 Kedde 试剂显紫红色反应, $\text{UV}_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm: 218 nm。 $\text{IR}_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3 560, 3 010, 2 980, 1 780, 1 750, 1 720, 1 435, 1 390, 939, 908。 MS m/z : 374, 358, 343, 330, 315, 301, 296, 255, 175, 105, 55。 ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.93 (d, $J = 7$ Hz, 17- CH_3), 1.16 (d, $J = 7$ Hz, 16- CH_3), 1.19 (s, 20- CH_3), 1.22, 1.95 (m, 1-H), 2.39 (*Sept*, $J = 7$ Hz, 15-H), 2.08, 2.69 (dd, $J = 5$, 15 Hz, 6-H), 2.88 (br, 5-H), 3.18 (s, 2-OH), 3.49 (d, $J = 5$ Hz, 7-H), 3.88 (d, $J = 3$ Hz, 12-H), 4.16 (d, $J = 3$ Hz, 11-H), 4.58 (t, $J = 13.6$ Hz, 2-H), 5.03 (d, 19-2H)。 ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 38.3 (1-C), 61.4 (2-C), 127.9 (3-C), 163.03 (4-C), 40.9 (5-C), 23.5 (6-C), 59.89 (7-C), 60.8 (8-C), 65.8 (9-C), 36.0 (10-C), 56.3 (11-C), 58.89 (12-C), 66.3 (13-C), 197.03 (14-C), 29.23 (15-C), 18.30 (16-C), 17.3 (17-C), 173.3 (18-C), 69.5 (19-C), 16.09 (20-C)。

化合物 4 无色针状结晶, mp 217~219 °C, HR-MS $[\text{M}+1]^+$: 375.145 9, 分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_7$ (计算值: 375.144 2)。 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +123$ (c 0.05, CHCl_3)。与 Kedde 试剂显紫红色反应, $\text{UV}_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm: 218 nm。 $\text{IR}_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3 550, 3 010, 2 980, 1 780, 1 760, 1 720, 1 430, 1 430, 1 295, 1 250, 908。 MS m/z : 374, 358, 343, 330, 315, 301, 259, 255, 206, 149, 105, 55。 ^1H NMR (CDCl_3)

δ : 1.13 (s, 20- CH_3), 1.32, 1.59 (m, 1-H α , β), 1.39 (s, 16- CH_3), 1.43 (s, 17- CH_3), 2.15 (m, 2-H β), 2.19, 1.98 (m, 6-H α , β), 2.33 (br, 2-H α), 2.78 (br, 5-H), 3.38 (d, $J = 5$ Hz, 7-H), 3.85 (d, $J = 3$ Hz, 12-H), 4.03 (d, $J = 3$ Hz, 11-H), 4.89 (m, 19- H_2), 5.39 (s, 1H, 15-OH)。 ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 30.9 (1-C), 17.3 (2-C), 125.39 (3-C), 159.3 (4-C), 40.3 (5-C), 23.5 (6-C), 60.29 (7-C), 60.99 (8-C), 65.39 (9-C), 36.0 (10-C), 56.38 (11-C), 59.99 (12-C), 66.8 (13-C), 198.0 (14-C), 63.39 (15-C), 18.3 (16-C), 19.80 (17-C), 173.30 (18-C), 70.3 (19-C), 13.69 (20-C)。

3 2 α -羟基雷公藤内酯酮、15-羟基雷公藤内酯酮对白血病细胞的影响

用 MTT 法检测 2 α -羟基雷公藤内酯酮、15-羟基雷公藤内酯酮在体外对 K562 细胞 (慢性粒细胞白血病细胞) 及 HL60 细胞 (急性髓性白血病细胞) 的杀伤作用。在浓度为 $1.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 对 K562 细胞的抑制率分别为 93% 和 91%, 对 HL60 细胞的抑制率为 96% 和 93%。Student's t 检验, 与对照组相比, $P < 0.001$ 。

References

- [1] Lin S, Li YC, Que HQ, et al. Diterpene constituents of *Tripterygium wilfordii* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2005, 40: 632-635.
- [2] Kupchan SM, Court WA, Dalley RG Jr, et al. Triptolide and triptolide, novel antileukemic diterpenoid triepoxides from *Tripterygium wilfordii* [J]. J Am Chem Soc, 1972, 94: 7194-7195.
- [3] Ma PC, Yan W, Lu Y, et al. Studies on neotriptetraolide isolated from *Tripterygium wilfordii* Hook.f [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1995, 37: 822-828.