

雷公藤中 16-羟基雷公藤内酯醇的分离与鉴定*

马鹏程 吕燮余 杨晶晶** 郑启泰**

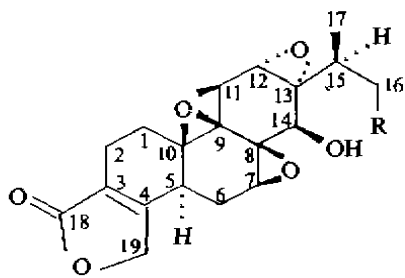
(中国医学科学院皮肤病研究所, 南京 210042; ** 中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

提要 从雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) 叶及根中分离出 16-羟基雷公藤内酯醇 (16-hydroxytriptolide, L_2)。根据光谱 (UV, IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, 2d-NMR 及 MS 等) 数据分析, 推定其化学结构为 L_2 , 并通过 X-射线晶体分析确定了其结构和构型, 该物是一个新化合物, 具有较强的抗炎、免疫抑制和雄性抗生育作用。

关键词 雷公藤; 二萜内酯; 16-羟基雷公藤内酯醇

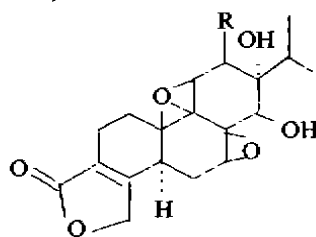
我们曾报告从雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) 中分离得到两个单体雷公藤内酯醇 (tripchlorolide, T_4)⁽¹⁾ 和雷公藤内酯三醇 (triptriolide, T_{11})⁽²⁾。在进一步研究中, 从雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) 叶和根中又获得一个新二萜内酯化合物, 命名为 16-羟基雷公藤内酯醇 (16-hydroxytriptolide, L_2)。该化合物具有较强的抗炎、免疫抑制和雄性抗生育作用。本文报告它的分离与结构测定。

化合物 L_2 为白色簇状结晶, mp 232 ~ 233.5 °C。MS (M^+) m/z 376。结合元素分析, 确定分子式为 $C_{20}H_{24}O_7$ 。Kedde 反应为紫红色, UV 218 nm⁽³⁾ 及 IR (1735, 1676 cm^{-1}) 吸收峰均表明 α, β 不饱和 γ -内酯的存在。IR 还表明羟基的存在 (3456, 3420 cm^{-1})。 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱显示 20 个碳信号, 结合偏共振谱和门控去偶碳谱, 确定有 2 个伯碳原子、5 个仲碳原子, 6 个叔碳原子和 7 个季碳原子。其中 δ 173.05, 162.32, 123.02 ppm 为分子中存在 α, β 不饱和 γ -内酯信号^(1, 2, 4), 与化学反应及 UV, IR 中不饱和五元内酯的特征相一致。根据分子式该化合物除 α, β 不饱和 γ -内酯外, 尚有 5 个氧原子。由于 $^1\text{H-NMR}$ 谱中 δ 4.58 及 4.67 ppm 两个信号可被重水交换而消失, 说明存在两个羟基, 再结合不饱和和



L_2 : R=OH

T_{13} : R=H



T_4 : R=Cl

T_{11} : R=OH

本文于 1990 年 10 月 9 日收到。

国家七·五攻关和国家自然科学基金资助课题

* Ma P.C., et al. 16-Hydroxytriptolide, a novel diterpene triepoxide from *Tripterygium wilfordii* (correspondence) Proc Chin Acad Me Sci Peking Union Med Col 1990; 5(2). 中国专利申请号 89105432.4

度推知该化合物应有 3 个环氧基。提示 L_2 是具有两个羟基的三环氧内酯化合物。结合其生源关系, L_2 可能与 T_4 , T_{11} 及早期报道的雷公藤内酯醇 (triptolide, T_{13})⁽⁵⁾ 为同一类化合物。根据 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY 谱和 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ COSY 谱归属了所有质子及相连碳信号, 并利用选择性 DEPTNMR 技术⁽⁷⁾, 归属了所有季碳信号(见表 1, 表 2)。通过表 1 及表 2 中四个化

Tab 1. ^1H NMR spectral data of compounds L_2 , T_{13} , T_4 and T_{11} *

Proton	L_2 (in $\text{DMSO}-d_6$)	T_{13} (in CDCl_3)	T_4 (in CDCl_3)	T_{11} (in $\text{DMSO}-d_6$)
1-H ₂	1.29 (m)		1.16, 1.27	1.25, 1.38
2-H _α	2.08 (m)	}	2.17, 2.32	2.13 (m)
2-H _β	1.97 (m)			1.97 (m)
5-H	2.59 (br, d)			2.75 (dd)
6-H _α	2.20 (dd d, $J_{6\alpha, 6\beta}=15$, $J_{5, 6\alpha}=6$, $J_{7, 6\alpha}=5$)		2.20 (m)	2.17 (m)
6-H _β	1.82 (dd, $J=15$)		1.98 (m)	1.84 (t, $J=14$)
7-H	3.36 (d, $J=5$)	3.46 (d, $J_{7, 6\alpha}=5$)	3.45 (d, $J_{7, 6\alpha}=5.86$)	3.32 (d, $J_{7, 6\alpha}=6$)
11-H	3.90 (d, $J_{11, 12}=3$)	4.00 (d, $J_{11, 12}=3$)	3.90 (d, $J_{11, 12}=5.13$)	3.69 (d, $J_{11, 12}=5$)
12-H	3.65 (d, $J=3$)	3.60 (dd, $J=3$, $J_{12, 14}=1$)	4.26 (dd, $J=5.13$, $J_{12, 14}=1.46$)	3.82 (d, $J=5$)
14-H	3.34 (s)	3.52 (dd, $J=11$, $J=1$)	3.12 (d, $J=1.46$)	2.93 (s)
15-H	2.11 (m)		2.56 (sept)	2.26 (sept, $J=7$)
16-H _a	3.15 (dd, $J_{16a, b}=11$, $J_{15, 16a}=6$)			
16-H _b	3.26 (dd, $J=11$, $J_{15, 16b}=8$)			
16-H ₃		0.91 (d, $J=7$)	0.89 (d, $J=6.97$)	0.76 (d, $J=7$)
17-H ₃	0.81 (d, $J=7$)	1.10 (d, $J=7$)	1.00 (d, $J=6.60$)	0.88 (d, $J=7$)
19-H ₂	4.81 (AB _q , $J=18$)	5.22 (m)	4.74 (m)	4.84 (q)
20-H ₃	0.96 (s)	1.22 (s)	1.12 (s)	0.95 (s)
14-OH	4.58 (br, s)			
16-OH	4.67 (br, d)			

* All chemical shifts are given in ppm and coupling constants in Hz

Tab 2. ^{13}C NMR spectral data of compounds L_2 , T_4 and T_{11} *

C	L_2	T_4	T_{11}	C	L_2	T_4	T_{11}
1	28.96 t	30.41 t	32.21 t	10	35.17 s	35.74 s	37.32 s
2	16.55 t	17.01 t	18.76 t	11	55.23 d	57.66 d	60.59 d
3	123.02 s	125.27 s	126.32 s	12	54.46 d	59.08 d	70.51 d
4	162.32 s	161.20 s	165.10 s	14	71.56 d	76.24 d	78.41 d
5	39.93 d	39.88 d	41.86 d	15	35.72 d	28.98 d	29.60 d
6	22.60 t	23.26 t	24.86 t	16	61.59 t	15.17 q	16.58 q
7	59.70 d	61.31 d	63.51 d	17	12.73 q	15.38 q	16.79 q
8	60.73 s	[60.50 s 70.02 s 76.58 s	63.23 s	18	173.05 s	174.19 s	177.01 s
9	64.34 s		67.93 s	19	70.12 t	70.74 t	72.92 t
13	62.90 s		77.15 s	20	13.64 q	13.27 q	15.25 q

* Compounds L_2 and T_4 in $\text{DMSO}-d_6$; T_{11} in CD_3OD .

合物数据比较分析^(1, 2, 5), 可看到 L_2 大多数碳及质子的化学位移、裂分类型及偶合关系与雷公藤内酯醇及其类似物一致。提示 L_2 具有雷公藤内酯醇的基本结构, 两者的主要区别在于

异丙基部份。雷公藤内酯醇在 δ 0.91 和 1.10 处有两个异丙基甲基的双峰信号，而 L_2 只有一个异丙基甲基双峰 (0.81, 3H)，在较低场处则出现两组 dd 峰 (δ 3.51, 1H, dd; δ 3.26, 1H, dd)。在 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY 谱中可清楚地看到， $\text{C}_{15}-\text{H}$ (δ 2.11 ppm) 峰除与 $\text{C}_{17}-\text{H}$ (δ 0.81 ppm) 峰相耦合外，还与上述两组 dd 峰偶合相关；同时，这两组 dd 峰相互间也出现偶合关系，说明此两组 dd 峰分别为 $16-\text{H}_a$ 和 $16-\text{H}_b$ 的信号。此外，这两个质子信号向低场位移至 δ 3.15 和 3.26 ppm 及 C_{16} 向低场位移至 δ 61.59，则表明 C_{16} 上连有羟基⁽⁷⁾。MS 碎片峰 m/z 59 ($\text{CH}_3\text{CHCH}_2\text{OH}$) 也证明了有羟基取代的异丙基存在。综上分析，可推断 L_2 为 16-羟基雷公藤内酯醇 (16-hydroxytriptolide)。

为确证 L_2 的结构和立体化学，进行了 x-衍射晶体分析。晶体呈无色透明柱状，属单斜晶系，空间群 $P2_1$ ，晶胞参数 $a=11.573(6)$ ， $b=6.313(2)$ ， $c=13.331(6)$ Å， $\beta=115.97(3)^\circ$ ，晶胞内分子数 $Z=2$ 。计算晶体密度 $D_x=1.43\text{ g cm}^{-3}$ 。使用 R3m/E 四园衍射仪收集衍射强度数据， $\text{CuK}\alpha$ 辐射，石墨单色器单色， θ 范围为 $0\sim 57^\circ$ 。独立衍射点为 1307 个，可观察点 [$I\geq 3\sigma(I)$] 为 1295 个。以直接法 (SHELXTL 程序) 测定分子结构，E 图上显示 25 个非氢原子位置，经最小二乘法与 Fourier 综合交迭使用，最终获得正确的分子结构 (见图 1)。母核由 A, B, C 三个六元环与一个五元 D 环组成，A/B 呈反式，B/C 为顺式联接，B, C 环上有三个含氧三元环，呈等边三角形，平均键长为 1.463 Å，键角为 59.98° 。

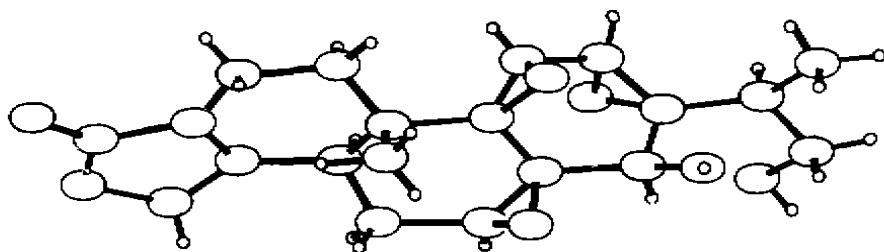


Fig 1. The stereoscopic view of 16-hydroxytriptolide.

药理实验结果表明， L_2 具有较强的抗炎、免疫抑制和明确可逆的雄性抗生育作用。小鼠巴豆油致耳肿胀试验求出抗炎半数有效剂量 (ED_{50}) 为 0.12 mg/kg，99% 有效剂量 (ED_{99}) 为 0.39 mg/kg。小鼠溶血素抗体生成试验求出免疫抑制 ED_{50} 为 0.05 mg/kg， ED_{99} 为 0.14 mg/kg。雄性抗生育 (昆明种小鼠口服) 最低有效剂量为 0.027 mg/kg \times 33 d (药理结果由本所郑家润药理研究组提供，论文另行发表)。

实 验 部 分

熔点用 Yanaco 显微熔点仪测定，温度计未校正。紫外光谱用 Shimadzu UV-200 型紫外光谱仪测定。红外光谱用 170-FX 红外光谱仪测定。元素分析用 Perkin-Elmer 240C 型元素分析仪测定。质谱用 MTA711 型质谱仪测定。核磁共振谱用 JNM-GX400 型核磁共振仪测定，以 $\text{DMSO}-d_6$ 为溶剂，TMS 为内标。X-射线单晶衍射使用 Nicolet

R3m/E X-衍射仪及 ECLIPSE S140 计算机。薄层层析和柱层析用硅胶 G 和硅胶 H 均为青岛海洋化工厂出品, 显色剂为 Kedde 试剂 [2% 3, 5-二硝基苯甲酸 MeOH 溶液—10% KOH 的 MeOH 溶液 (1:1) 混合液]。

一. 提取分离

取雷公藤叶 10 kg, 水煮, 过滤, 浓缩滤液并加 EtOH 使其浓度为 70% 左右, 滤去沉淀, 减压浓缩后以 CHCl_3 萃取, 分出 CHCl_3 液并浓缩。将浓缩液进行硅胶柱层析, 以 EtOH— CHCl_3 梯度洗脱 (1% → 10%), TLC 检查, Kedde 试剂显色, 合并含 L_2 部分。对上述合并物进行低压柱层析分离 (N_2 , 1.0 kg/cm²), 环己烷— Me_2CO 为洗脱剂, 收集并浓缩含 L_2 部分, 以 MeOH 重结晶, 得白色簇状结晶 105 mg。

以雷公藤去皮的根、根皮及制剂“雷公藤多甙”为原料 均能获得 L_2 , 其中以叶中含量最高。

二. 鉴定

L_2 白色簇状结晶, mp 232 ~ 233.5 °C, Kedde 反应呈紫红色; 元素分析 $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_7$, 实测值 %: C 63.78, H 6.37; 计算值 %: C 63.83, H 6.41。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 218 nm。IR (KBr) cm^{-1} 3456, 3420, 3013, 1735, 1676, 1247, 934, 907, 843。MS m/z 376.0 (M^+ , 0.9%), 359, 358, 345, 340, 329, 327, 317, 311, 59, 43, 41 (100%)。¹H NMR 谱及 ¹³C NMR 谱数据分别见表 1 和表 2。SL-DEPT NMR ($\text{DMSO}-d_6$) 谱: 当分别照射 δ 0.81 (17-H); 3.65 (12-H); 1.29 (1-H₂); 1.82 (6-βH); 2.59 (5-H); 0.96 (20-H₃) 时, 各自相应的 SL-¹³C DEPT NMR 谱依次分别为 δ 62.90 s (C_{13}), 35.72 d (C_{15}) ppm; δ 64.34 s (C_1), 62.90 s (C_{13}), 55.23 d (C_{11}) ppm; δ 123.02 s (C_1), 64.34 s (C_9), 35.17 s (C_{10}), 13.64 q (C_{20}) ppm; δ 162.32 s (C_4), 60.73 s (C_8), 59.70 d (C_7), 39.93 d (C_5) ppm; δ 173.05 s (C_{17}), 162.32 s (C_4), 123.02 s (C_3), 64.34 s (C_9), 35.17 s (C_{10}), 22.60 t (C_6), 13.64 q (C_{20}) ppm; δ 64.34 s (C_9), 39.93 d (C_5), 35.17 s (C_{10}), 28.97 t (C_1) ppm。

致谢 本文承徐文严研究员审阅; 植物样品承中国药科大学杨永康教授鉴定; 质谱和核磁共振谱由中国军事医学科学院仪器测试中心代测。

参 考 文 献

1. 吕斐余, 等. 雷公藤中雷藤素内酯醇 (T_4) 的分离与结构测定. 中国医学科学院学报 1990; 12: 157.
2. 马鹏程, 等. 雷藤内酯三醇的分离与结构研究. 植物学报 1991; 33: 370.
3. 黄量, 于德泉编著. 紫外光谱在有机化学中的应用 (上册). 第 1 版. 北京: 科学出版社, 1988: 82.
4. Manchand PS, et al. X-ray structure and absolute stereochemistry of stemolide, a novel diterpene bisepoxide. *Tetrahedron Lett* 1976, 29: 2489.
5. Kupchan SM, et al. Triptolide and triptidiolide, novel antileukemic diterpenoid triepoxide from *Tripterygium wilfordii*. *J Am Chem Soc* 1972, 94: 7194.
6. 缪振春, 冯锐. 选择性远程 DEPT NMR 及其应用于甾体化合物的结构研究. 药学期刊 待发表.
7. 于德泉, 等编. 分析化学手册, 第 5 分册. 核磁共振谱分析. 第 1 版. 北京: 化学工业出版社, 1989: 17, 476.

16-HYDROXYTRIPTOLIDE, A NEW ACTIVE DITERPENE ISOLATED FROM *TRIPTERYGIUM WILFORDII*

PC Ma, XY Lu, JJ Yang^{*} and QT Zheng^{*}

(*Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences, Nanjing 210042; ^{*}Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050*)

ABSTRACT A new diterpene triepoxide, 16-hydroxytriptolide was isolated from the root and leaves of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 16-Hydroxytriptolide was obtained as white cluster crystal, mp 232~233.5 °C. Its molecular formula is C₂₀H₂₄O₇. The structure and stereochemistry of 16-hydroxytriptolide was established as L₂ (Fig. 1) on the basis of spectral data (IR, MS, UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2d-NMR, NOE) and X-ray crystallographic analysis.

In the pharmacologic screening, 16-hydroxytriptolide showed definite antiinflammatory actions and strong immunosuppressive and antifertile activities. In antiinflammatory action, its half effective dose (ED₅₀) was 0.12mg/kg with the model of croton oil induced ear swelling of mice. In immunosuppressive action, its ED₅₀ was 0.05mg/kg with the model of the formation of haemolysin antibody of mice. Its lowest effective dose (po) was 0.027mg/kg × 33d in antifertile action.

Key words *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; Diterpenoidlactone; 16-Hydroxytriptolide