

雷公藤倍半萜生物碱的研究

林 绥^{1*}, 李援朝², 樱井信子³, 林建峰¹, 金静君¹

(1. 福建省医学科学研究所, 福建 福州 350001; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 200031;

3. 日本星药科大学, 东京 1142)

摘要: 目的 研究雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook.f.)的化学成分。方法 应用各种色谱技术进行分离纯化,用 UV, IR, MS, HRMS, ¹H NMR, ¹³C NMR (COM 和 OFR), ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C COSY, 2D-NOESY, ¹H-¹³C COLOC 鉴定化合物。并进行初步的药理实验。结果 分离并鉴定了 2 个生物碱: euonine (I) 和雷公藤康碱 (II wilfordconine)。结论 II 为一种新的倍半萜生物碱, 药理实验证明该生物碱有免疫抑制活性, 并对白血病细胞有抑制作用。

关键词: 雷公藤; 倍半萜生物碱; euonine; 雷公藤康碱; 免疫抑制

中图分类号: R284.1; R284.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2001)02-0116-04

雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook.f.)系卫矛科雷公藤属植物, 该植物在治疗类风湿性关节炎、慢性肾炎、红斑狼疮、接触性皮炎等自身免疫性疾病均有显著的疗效。前文^[1]报道了我们从雷公藤中分得新的倍半萜生物碱, 本文继续报道从其乙醇提取物中分离到的 2 个倍半萜生物碱。

Euonine (I) 无色棱柱状结晶 (CH₂Cl₂: MeOH), mp 155 - 157 °C, HRMS (m/z): 805.28238 (M⁺), 分子式为 C₃₈H₄₇NO₈ (计算值 805.28218)。分子量与 euonine^[2], euonymine^[3], peritassine A^[4] 相同。紫外光谱示有雷公藤倍半萜生物碱的类似吸收 (225, 269 nm)。红外光谱示有羟基 (3560 cm⁻¹), 酯基 (1750 cm⁻¹) 及吡啶环 (1585, 1570, 720 cm⁻¹) 的特征吸收。¹H NMR 示有 6 个乙酰基 (δ: 1.68, 1.82, 1.98, 2.13, 2.21, 2.30), δ: 5.06 示有 1 个羟基, 重水交换消失。从¹H NMR 谱中可看到吡啶环上 2, 3, 4 碳上氢之间有邻位偶合, 表明碱 I 的吡啶环与大环连接是在 5 位与 6 位碳上, 这种连接方式与 euonine 及 euonymine 相同, 而与 peritassine A 不同。从碱 I 的¹H NMR 谱中还可看到 I 有 3 个甲基, 两个甲基 (δ: 1.65, 1.56) 为单峰, δ: 1.18 处甲基呈双峰, 表明为 -CH-CH₃, 而 euonymine 有两个呈双峰甲

基。I 的¹³C NMR 谱示有相应的 8 个羰基碳, 5 个吡啶环碳, 4 个季碳。从¹H-¹H COSY 和¹H-¹³C COSY 可见甲基双重峰是 C-18 位上甲基。¹H NMR 谱示 δ 5.06 羟基位移与 4-OH 的类似^[5], 这在 2D-NOESY 中得到证实, δ 1.65 即 C-4 位上甲基与 4-OH 有 NOE 相关, 根据¹H-¹H COSY 和¹H-¹³C COSY 谱中碳氢的归属, 确定 I 与 euonine 的结构相同。

雷公藤康碱 (II) 无色柱状结晶 (CH₂Cl₂: MeOH), mp 192 - 193 °C。HRMS (m/z): 873.2713 (M⁺) 分子式 C₄₁H₄₇O₂₀N (计算值 873.2691), 紫外光谱 (228, 258 nm) 与文献^[6]报道的雷公藤倍半萜生物碱有类似吸收, 红外光谱示有羟基 (3550, 3460 cm⁻¹), 酯基 (1750 cm⁻¹), 吡啶环 (1590, 1570 cm⁻¹) 和咪喃环 (3150, 870 cm⁻¹) 的特征吸收。¹H NMR 谱示有 5 个乙酰基 (δ: 1.78, 1.90, 1.93, 2.15, 2.28), 羟基 (δ: 3.40, 3.43, 重水交换消失), 4 个甲基 (δ: 1.61, 1.36, 1.20, 1.65)。¹³C NMR 示有 8 个酯羰基碳, 9 个烯碳, 基中 6 个烯碳带有氢原子, 5 个季碳, 8 个 CH, 2 个 CH₂, 9 个 CH₃。

比较 I 和 II 的¹H NMR (表 1), 吡啶环上氢的信号有明显的不同。I 的吡啶环连接部分已阐明。II 的¹H-¹³C COSY 中, C-5' δ 127.50, 5'-H δ 7.82, C-6' δ 151.21, 6'-H δ 8.69, 2'-H δ 8.98, C-2' δ 152.58, 而在¹H-¹H COSY 中 5'-H 与 6'-H 有相关, 而 2'-H 与 5'-H, 6'-H 无相关点, 显然, 在 II 中吡啶环与大环连接是在 3 位和 4 位碳上。从表 1 可见 II 中 6-H δ 2.82, 7-H δ 5.68, 8-H δ 5.48 明显比 I 向

收稿日期: 2000-07-29

基金项目: 福建省科委重点项目 (99-Z-16)

作者简介: 林绥, 女, 副研究员。

* Tel: 13605948318, Fax: (0591) 7517981,

E-mail: sty.y. @ 21cn.com

低场位移,说明咪喃环甲酰基是连在 C-7 碳上,而且从 δ 8.53 和 δ 149.25 的化学位移值证明取代基为咪喃环 β 位甲酰基^[7]。在 ¹H NMR 谱中,II 有 3 个甲基是单峰,1 个甲基是双重峰即 $-\text{CH}-\text{CH}_3$,在 2D-NOESY 谱中, δ 3.43(OH)与 δ 1.36 处的 CH_3 有 NOE 相关。在 ¹H ¹³C COLOC 谱中,可见到 δ 1.36 与 C-16, C-18 和 C-20 有远程相关,表明 δ 1.36 处的 CH_3 是连接在 C-18 上,而 C-18 上的 CH_3 (δ 1.36)是单峰,且与 OH 有远程相关,证明 C-18 上连有 1 个 CH_3 和 1 个 OH。以上连接方式在 2D-NOESY 中得到证实, δ 5'-C 上氢与 C-18 上 CH_3 有 NOE 相关,同样, δ 5'-C 上氢与 δ 1.20($-\text{CH}-\text{CH}_3$)亦有 NOE

相关,从而证明 δ 1.20 处的甲基是连在 C-16 上。另外,由于 δ 1.65 处的甲基与 δ 3.40 处 OH 及 2-H 和 3-H 有 NOE 相关,推断 δ 1.65 处的 CH_3 连接在 C-4 上,同时在 C-4 上连有羟基。从 NOESY 谱中可见 C-5 和 C-7 上氢与 δ 1.61 处的甲基有 NOE 相关,推断 δ 1.61 处的甲基是连接在 C-13 上。

II 的倍半萜醇部分的质子化学位移与 I 比较,无明显差异,说明二者该部分的结构是一样的,参照文献^[8]报道的有关数据,推断 II 的结构如下图所示,为一种新的生物碱,命名为雷公藤康碱(wilfordconine),并对 I 和 II 的 ¹H, ¹³C NMR 信号作了归属(表 1, 2)。

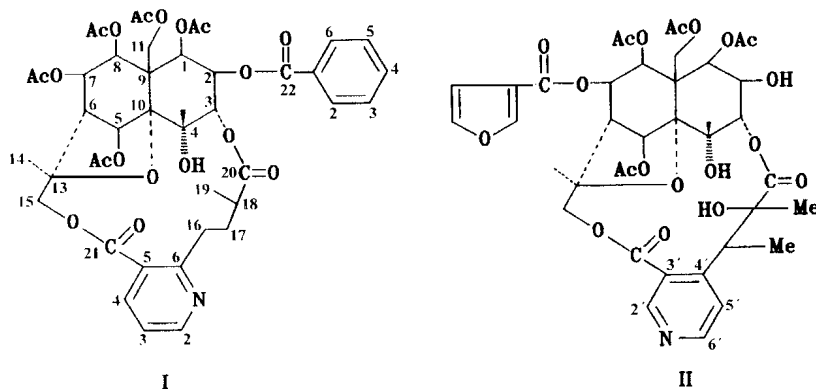


Fig 1 Structures of euonine (I) and wilfordconine (II)

Tab 1 ¹H NMR spectral data of compounds I and II (CDCl₃)

No	I	II	No	I	II
1	5.60(1 H, d, J = 4 Hz)	5.58(1 H, d, J = 4 Hz)	12-CH ₃	1.65(3 H, s)	1.65(3 H, s)
2	5.18(1 H, t, J = 3.4 Hz)	5.20(1 H, t, J = 3.3 Hz)	18-OH		3.43(1 H, s)
3	4.92(1 H, d, J = 3.5 Hz)	4.95(1 H, d, J = 3.6 Hz)	14-CH ₃	1.56(3 H, s)	1.61(3 H, s)
5	6.90(1 H, s)	7.18(1 H, s)	17-CH ₃		1.20(3 H, d, J = 7.3 Hz)
6	2.35(1 H, d, J = 3.8 Hz)	2.82(1 H, d, J = 3.8 Hz)	19-CH ₃	1.18(3 H, d, J = 6.8 Hz)	1.36(3 H, s)
7	5.54(1 H, dd, J = 4.6 Hz)	5.68(1 H, dd, J = 4.6 Hz)	CH ₃ COO	1.68, 1.82, 1.98, 2.13, 2.21, 2.30	1.78, 1.90, 1.93, 2.15, 2.28
8	5.34(1 H, d, J = 5.8 Hz)	5.48(1 H, d, J = 5.9 Hz)	2'	8.72(1 H, dd, J _{2',3'}} = 4.6 Hz, J _{2',4'}} = 1.8 Hz)	8.98(1 H, s)
11	4.45, 5.23(2 H, ABq, J = 13.5 Hz)	4.24, 5.20(2 H, ABq, J = 13.4 Hz)	3'	7.41(1 H, dd, J _{4',3'}} = 7.9 Hz, J _{4',2'}} = 1.8 Hz)	
15	3.76, 5.74(2 H, ABq, J = 11.7 Hz)	5.01, 5.05(2 H, ABq, J = 12.0 Hz)	4'	8.33(1 H, dd, J _{3',4'}} = 7.9 Hz, J _{3',2'}} = 4.6 Hz)	
16	4.23(2 H, m)	4.23(1 H, q, J = 7.3 Hz)	5'		7.82(1 H, d, J = 5.5 Hz)
17	2.35, 2.47(each 1 H, m)		6'		8.69(1 H, d, J = 5.5 Hz)
18	2.48(1 H, m)		2''		7.50(1 H, d, J = 5.5 Hz)
4-OH	5.06(1 H, s)	3.40(1 H, s)	3''		6.99(1 H, d, J = 1.8 Hz)
			5''		8.53(1 H, s)

Tab 2 ¹³CNMR spectral data of compounds I and II (CDCl₃)

No.	I	II	No.	I	II
1	69.37(d)	72.10(d)	20	175.21(s)	175.10(s)
2	69.08(d)	68.30(d)	21	166.80(s)	167.66(s)
3	73.60(d)	75.80(d)	22		163.10(s)
4	69.90(s)	69.73(s)	2'	153.16(d)	152.58(d)
5	71.10(d)	74.70(d)	3'	121.40(d)	123.47(s)
6	51.20(d)	52.58(d)	4'	138.74(d)	151.63(s)
7	73.78(d)	65.60(d)	5'	124.43(s)	127.50(d)
8	75.90(d)	76.10(d)	6'	164.10(s)	151.21(d)
9	52.20(s)	52.88(s)	2''	144.08(d)	
10	98.79(s)	98.28(s)	3''		110.10(d)
11	60.20(t)	59.88(t)	4''		119.07(s)
12	22.90(q)	20.69(q)	5''		149.25(s)
13	84.50(s)	83.50(s)	C=O	166.85(s)	168.64(s)
14	21.38(q)	23.80(q)		166.80(s)	168.94(s)
15	70.35(t)	70.41(t)		169.03(s)	169.49(s)
16	33.30(t)	41.75(d)		169.84(s)	169.72(s)
17	33.30(t)	17.11(q)		170.09(s)	170.26(s)
18	38.44(d)	77.22(s)		170.20(s)	
19	20.68(q)	23.98(q)	CH ₃	20.66(q)	20.39(q)
CH ₃	20.48(q)	20.29(q)	(AC among	20.98(q)	21.08(q)
(AC among	20.78(q)	20.50(q)	CH ₃)	21.55(q)	
CH ₃)	21.28(q)	21.71(q)			

实 验 部 分

熔点测定用 X₄ 显微熔点测定仪, 温度未校正。紫外光谱用 UV-300 紫外分光光度计, 红外光谱用 Perkin Elmer TE599D 红外光谱仪, 核磁共振谱用 Bruker AM400, TNM GX-400 核磁共振仪, 质谱用 MAT-95, JEOL JMS-SX102 质谱仪。雷公藤原料由福建师范大学生物系林来官教授鉴定。

1 提取和分离

取福建泰宁县产雷公藤根皮 20 kg, 粉碎, 用 EtOH 提取, 提取液浓缩, 加水分成沉淀和水溶液。沉淀干燥后, 加 10% NH₄OH 湿润, 用 Et₂O 提取, Et₂O 提取液浓缩, 再用 2% H₂SO₄ 萃取, H₂SO₄ 萃取液用 10% NaHCO₃ 溶液调至 pH 8 - 9, 滤出沉淀即为总碱(190 g), 总碱在 MeOH 中进行沉淀过滤, 沉淀干后为纯度较好的总碱约 100 g。将总碱进行分配色谱, 固定相为 2% HCl, 流动相为 Et₂O, 收集流份, 20 - 18 流份含 I, 再进行吸附色谱, 洗脱剂为 CHCl₃- Me₂CO (4: 5: 0.5), 在 CH₂Cl₂- MeOH 中重结晶, 得 I 290 mg, 另外在分配色谱中, 31 - 35 流份为 II, 再行吸附色谱, 流动相为 CHCl₃- Me₂CO (4: 1), 在 CH₂Cl₂- MeOH 中重结晶, 得 II 210 mg。

2 雷公藤康碱对溶血素的影响

体重 22 ± 1 g ICR δ 小鼠 24 只, 均分为 4 组, ip 5% 绵羊红细胞 (SRBC) 0.2 mL 作为抗原, 于致敏后 2 h 开始给药, 两组分别 ip 雷公藤康碱 40 mg 及 80 mg·kg⁻¹ qd × 4 d。另设环磷酰胺组 ip 环磷酰胺 10 mg·kg⁻¹ qd × 4 d。对照组 ip 20% 的丙二醇 (因雷公藤康碱配药中有用 20% 丙二醇)。停药后次日行眼球摘除取血, 分离血清, 并于 56 °C 水浴放置 30 min, 以灭活补体成分。取灭活小鼠血清 0.2 mL, 用生理盐水成倍稀释 (1: 2 - 1: 2048), 每管加入 1: 30 SRBC 0.2 mL 及 1: 5 豚鼠血清 0.2 mL, 摇匀, 置 37 °C 温箱中孵育 30 min, 观察溶血反应^[8], 结果如下: 与丙二醇对照组 1: 2048 比较, t 检验 P < 0.01, 环磷酰胺为 1: 256, 雷公藤康碱 40 mg·kg⁻¹ 为 1: 512, 80 mg·kg⁻¹ 为 1: 256。

3 雷公藤康碱对白血病细胞的影响

用 MTT 法检测雷公藤康碱在体外对 K₅₆₂ 细胞 (红白血病细胞) 及 HL₆₀ 细胞 (急性髓性白血病细胞) 的杀伤作用。在 3.00 ug·mL⁻¹ 浓度时, 对 K₅₆₂ 细胞的抑制率为 87%, 对 HL₆₀ 细胞的抑制率为 90%。Student t 检验, 与对照组相比, P < 0.001。

4 鉴定

euonine (I) 无色棱柱状结晶, mp 155 - 157 °C, 与碘化铯钾试剂呈阳性反应, UV_{max}^{EtOH} nm: 225 (17950), 269 (6918); IR_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3560, 3470, 3070, 1750 (br), 1640, 1585, 1570, 1450, 1370, 1320, 1265, 1230 (br), 1160, 1135, 1095, 1070, 1045, 1010, 940, 880, 770, 720; MS m/z: 805, 732, 702, 689, 688, 686, 674, 572, 262, 218, 207, 206, 179, 178, 162, 161, 160, 150, 137, 134, 133, 131, 107, 106, 93。¹H 和 ¹³CNMR 见表 1 和表 2。

雷公藤康碱 (Wilfordconine) (II) 无色柱状结晶, mp 192 - 193 °C, 与碘化铯钾试剂呈阳性反应, UV_{max}^{EtOH} nm: 228 (8760), 258 (48010); IR_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3550, 3460, 3150, 3060, 1750 (br), 1680, 1590, 1570, 1510, 1410, 1370, 1310, 1230 (br), 1160, 1120, 1095, 1050, 870, 760。MS m/z: 873, 858, 830, 814, 784, 748, 729, 711, 668, 259, 250, 222, 208, 194, 176, 151, 150, 133, 108, 107, 96, 83, 76, 45, 44。¹H, ¹³CNMR 数据见表 1 和表 2。

REFERENCES:

[1] Lin S, Yuanchao L, Sakurai N, et al. Isolation and structure of sesquiterpene alkaloids from *Tripterygium wilfordii* Hook. f [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese),

- 1995, **30**(7) :513 - 516 .
- [2] Ishiwate H, Shizuri Y, Yamada R. Three sesquiterpene alkaloids from *Euonymus alatus* forma striatus [J]. *Phytochemistry*, 1983, **22**(12) :2839 - 2841 .
- [3] Yamada K, Shizuri Y, Hirata Y. Isolation and structures of a new alkaloid alata mine and an insecticidal alkaloid wilfordine from *Euonymus alatus* forma striatus (Thunb) makino [J]. *Tetrahedron*, 1978, **34** :1915 - 1920 .
- [4] Joy K, Winston F. Tinto, *et al.* Peritassines A and B, new sesquiterpane alkaloids from *Peritassa compta* [J]. *J Nat Prod*, 1993, **56**(6) :946 - 948 .
- [5] He ZS, Hong SH, Li Y, *et al.* Structure of wilforgine, wilforzine and wilformine [J]. *Acta Chem Sin* (in Chinese), 1987, **45**(5) :510 - 513 .
- [6] Beroza M. Alkaloids from *Tripterygium wilfordii* Hook. The structure of wilforine, wilfordine, wilforgine and wilfortrine [J]. *J Am Chem Soc*, 1953, **75** :44 - 46 .
- [7] Baxter RL, Crombie WML, Crombie L, *et al.* Alkaloids of *Catha Edulis* Part 4. Structures of Cathedulins E3, E4, E5, E6 and K12, Novel sesquiterpene alkaloids with mono and bis macrolide bridges [J]. *J Chem Soc Perkin Trans I Org Chem*, 1979. 2982 - 2989 .
- [8] Crombie L, Crombie WML, Whiting DA, *et al.* Alkaloids of *Catha edulis*. Part 3. Structures of cathedulins K1, K2, K6 and K15: new macrolide bridged polyesters of euonginol [J]. *J Chem Soc Perkin Trans I Org Chem*, 1979. 2976 - 2978 .
- [9] Zhang TM, *et al.* Antitumor activity and mouse immune effect of triptolide [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1981, **2**(2) :128 - 130 .

STUDY OF SESQUITERPENE ALKALOIDS FROM *TRIPTERYGIUM WILFORDII* HOOK.F.

LIN Sui¹, LI Yuan-chao², N Sakurai³, LIN Jian-feng¹, JIN Jing-jun¹

(1. Fujian Institute of Medical Sciences, Fuzhou 350001, China; 2. Shanghai Institute of Materia Medica, Academia Sinica, Shanghai 200031, China; 3. Hoshi University, Tokyo 142, Japan)

ABSTRACT: AIM To study the chemical composition of *Tripterygium wilfordii* Hook.f. **METHODS** Column chromatography was used to separate the chemical constituents. UV, IR, MS, HRMS, ¹H NMR, ¹³C NMR (COM and OFR), ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C COSY, 2D NOESY and ¹H-¹³C COLOC were used to determine the structures of the isolated constituents. **RESULTS** Two sesquiterpene alkaloids were isolated and their structures were elucidated as euonine and wilfordconine on the basis of spectral evidence. **CONCLUSION** Wilfordconine, a new sesquiterpene alkaloid, was shown to be immunosuppressive.

KEY WORDS: *Tripterygium wilfordii*; sesquiterpene alkaloids; euonine; wilfordconine; immunosuppressive