HCl); 'H-NMR(CDCl₃) δ : 7.90(2H,d,J=9.0 Hz, H-2',6'), 7.03(2H,d,J=9.0 Hz,H-3',5'),6.58 (1H,s,H-6),6.41(1H,s,H-3),3.89~3.94(9H,OCH₃×3)。 ¹³C-NMR(CDCl₃) δ :163.9(C-2),103.8 (C-3),182.7(C-4),157.5(C-5),95.7(C-6),158.5 (C-7),128.9(C-8),149.4(C-9),104.7(C-10),123.5(C-1'),128.1(C-2'),114.5(C-3'),162.6(C-4'),114.5(C-5'),128.1(C-6'),55.5(4'-OCH₃),56.3(7-OCH₃),61.7(8-OCH₃)。经与文献数据对照^[4],鉴定此化合物为5-羟基-4',7,8-三甲氧基黄酮。

化合物 V:黄色粉末,HCl-Mg 粉反应阳性,Fe-Cl₃ 反应阳性;UV、¹H-NMR和¹³C-NMR与文献数据 对照^[5],鉴定此化合物为 5-羟基-3',4',7,8-四甲氧基黄酮。

化合物 VI:黄色粉末,HCl-Mg 粉反应阳性,Fe-Cl₃ 反应阳性;UV、¹H-NMR和¹³C-NMR与文献数据对照^[6],鉴定此化合物为 5,3'-二羟基,-4',7,8-三甲氧基黄酮。

化合物 W: 无色针晶, mp141~143℃; EI-MS (m/z):414「M+7,400「M-CH₂]; ¹H-NMR(CDCl₃)

δ:5.35(1H,H-6),3.53(1H,m,H-3),与 β-谷甾醇 对照品混合熔点不下降,TLC上的斑点位置及显色 行为亦相同,鉴定此合物为 β-谷甾醇。

化合物 W: 白色粉末, mp 56~59 °C, EI-MS (m/z):256[M+],227,213,185,171,157,143,129,115,呈长链脂肪酸的特征裂解; H-NMR(CDCl₃)δ:0.88(3H,t,J=6.8 Hz,H-16),1.27,1.63,2.35 (CH₂),鉴定化合物为正十六酸。

References:

- [1] Agendea Academine Sinicae Edita. Flora Reipublicae Popularis Sinince: (中国植物志:第 20 卷第 1 分册) [M]. Tomus 20(1). Beijing: Science Press, 1982.
- [2] Wu J L, Li N, Toshiaki H, et al. Bioactive tetrahydrofuran lignans from Peperomia dindygulensis [J]. J Nat Prod, 2005, 68(11): 1656-1660.
- [3] Chen C M, Jan F Y, Chen M T, et al. Peperomins A, B, and C, novel secolignans from Peperomia japonica [J]. Heterocycles, 1989, 29(3): 411-414.
- [4] Tokunaru H, Yoshizumi O, Kenichi S, et al. ¹³C-NMR Spectral assignment of the A-ring of polyoxygenated flavones [J]. Phytochemistry, 1998, 47(5): 865-874.
- [5] Shaw S C, Azad R, Mandal S P, et al. Synthesis of 6-hy-droxyluteolin and sinensetin by wessely-moser rearrangement
 [J]. J Indian Chem Soc, 1988, 25(2): 107-109.
- [6] Forkas L, Strelisky J, Vermes B. Synthesis of eupatorin, a flavone from Eupatorium semiserratum [J]. Chem Ber, 1969, 102(1): 112-117.

昆明山海棠中具有免疫抑制活性的二萜化合物

张彦文1,范云双2,王晓东2,高文远2,段宏泉1*

(1. 天津医科大学药学院,天津 300070; 2. 天津大学药物与科学技术学院,天津 300072)

摘 要:目的 研究雷公藤属植物昆明山海棠的免疫抑制活性成分。方法 运用各种硅胶柱色谱、凝胶渗透色谱以及制备高效液相色谱等手段对昆明山海棠氯仿提取物进行分离纯化,以各种有机波谱法鉴定化学单体结构,并通过体外淋巴细胞转化实验进行化学成分的免疫抑制活性研究。 结果 从中分离鉴定出 6 个二萜类化合物,分别为雷酚萜酸(triptobenzene H, I)、雷藤二萜醌 A (triptoquinone A, I)、雷藤二萜醌 B (triptoquinone B, II)、雷藤二萜醌 H (triptoquinone H, II)、雷酚萜醇(triptonediol, V)、雷酚萜(triptonoterpene, VI)。 结论 化合物 I ~ II 为首次从该植物中分离得到,化合物 I ~ VI 均具有较强的免疫抑制活性。

关键词:昆明山海棠;根心部;二萜类化合物;免疫抑制活性

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)04-0493-04

Diterpenoids possessed immunosuppressive activity from Tripterygium hypoglaucum

ZHANG Yan-wen¹, FAN Yun-shuang², WANG Xiao-dong², GAO Wen-yuan², DUAN Hong-quan¹

(1. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. College of Pharmaceuticals and Biotechnology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Objective To study the diterpenoids possessed immunosuppressive activity from *Triptery*-

收稿日期:2006-07-07

基金项目:天津医科大学校重点学科建设项目资助(2004xk32)

^{*} 通讯作者 段宏泉 Tel:(022)23542838 Fax:(022)23528891 E-mail:duanhq@tijmu.edu.cn

gium hypoglaucum. Methods The chemical constituents were isolated from the CHCl₃ extracts of T. hypoglaucum by repeated column chromatography, including silica gel, Sephadex LH-20, and preparative HPLC. Their structures were elucidated on the basis of spectroscopic studies. The immunosuppressive activity of these compounds was tested using the lymphocyte transformation test. Results Compounds I — \mathbb{N} were identified as triptobenzene H (I), triptoquinone A (I), triptoquinone B (I), triptoquinone H (N), triptonediol (V), triptonoterpene (N). Conclusion Compound I — I are isolated from this medicinal plant for the first time and all the compounds show the significant immunosuppressive activity.

Key words: Tripterygium hypoglaucum (Level.) Hutch; xylem; diterpenoids; immunosuppressive activity

昆明山海棠 Tripterygium hypoglaucum (Level.) Hutch 系卫矛科雷公藤属植物,产于云南、贵 州、四川等地。2000年版和2005年版《中国药典》一 部均收载昆明山海棠片剂,功能与主治为"祛风除 湿,舒筋活络,清热解毒,用于治疗类风湿性关节炎, 红斑狼疮。"[1]目前研究认为其有效成分为生物碱、 二萜和三萜类化合物。为了进一步阐明昆明山海棠 中的免疫抑制活性成分,本实验对免疫抑制活性最 强的昆明山海棠氯仿提取物进行了化学成分研究, 共分离鉴定出6个单体化合物,并以有机波谱法结 合文献数据对比鉴定其结构,分别为雷酚萜酸(triptobenzene H, I)、雷藤二萜醌 A(triptoquinone A, I)、雷藤二萜醌 B(triptoquinone B, I)、雷藤二萜 醌 H(triptoquinone H, N)、雷酚萜醇(triptonediol, V)、雷酚萜(triptonoterpene, VI)。其中化合物 I ~ Ⅱ为首次从该植物中分离得到,药理实验结果显示 化合物 I ~ II 的免疫抑制活性最强。

1 仪器和材料

昆明山海棠(去皮根部)购于昆明植物药业公司,经天津大学药物科学与技术学院中药系高文远教授鉴定。

¹H-NMR(300 MHz), ¹³C-NMR(75 MHz)采用Bruker AVANCE 300 型仪器测定, TMS 为内标。质谱仪为日本电子 JMSO-300 型。制备 HPLC 为JASCO Gulliver Series, PU-1580(泵), 检测器为RI-1530 和 UV-1575。制备色谱柱包括 GPC(Shodex, Asahipak GC-310, 20G, MeOH), Si-HPLC(YMC-pack, 250 mm×20 mm, SIL-06, SH-043-5-06)。凝胶柱色谱包括 Sephadex LH-20(Amersham Pharmacia Biotech)和 Toyoperal HW-40(Tosoh)。

淋巴细胞转化实验所用动物为纯系 Balb/c 小鼠,雄性,清洁级,6~8 周龄,天津医科大学实验动物中心提供。实验材料主要包括:RPMI-1640 培养

液,Hank's 液(天津鼎天生物制品公司);刀豆蛋白(ConA)、四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)(Sigma公司);地塞米松磷酸钠注射液(5mg/mL)(天津氨基酸公司),胎牛血清(Hyclone公司)。实验仪器:BIO-RAD 550型全自动酶标板分析仪(RAPIM Group),Olympus CK2型倒置显微镜(Olympus Optical Co. Ltd.),B600型低速自动平衡离心机(白洋离心机厂)。

2 方法与结果

2.1 提取和分离:昆明山海棠(16.5 kg)粉碎后用 95%乙醇回流提取 3 次,每次 5 h,减压浓缩得浸膏 928 g。浸膏用氯仿/水混悬,氯仿萃取数次,减压浓 缩得氯仿提取物 280 g。取氯仿提取物 140 g 以硅胶 柱色谱法分离,石油醚-醋酸乙酯-甲醇梯度洗脱得 到 10 个组分。组分 4(9.2 g)分别经硅胶柱(氯仿-甲 醇梯度洗脱),Toyopearl HW-40(氯仿-甲醇 2:1) 和制备 HPLC(Si-HPLC,正己烷-醋酸乙酯 4:1), 得到化合物 N(21.0 mg)和化合物 N(8.5 mg)。组 分 8(1.9 g)经过 Sephadex LH-20 分离,再以制备 HPLC(Si-HPLC,正已烷-醋酸乙酯 3:1)分离,得 到化合物 I (8.0 mg)。组分 10(15.9 g)经硅胶柱 (氯仿-甲醇梯度洗脱)得到7个组分,组分5以 Sephadex LH-20 分离,再依次通过制备 HPLC (GPC 和 Si-HPLC)得到化合物 I (90.0 mg)、Ⅱ (50.0 mg), V (21.0 mg).

2.2 结构鉴定

化合物 I:无定形白色粉末, 1 H-NMR(CDCl₃) δ :1.17(3H,d,J=6.8 Hz,16-Me),1.20(3H,d,J=6.8 Hz,17-Me),1.19(3H,s,20-Me),1.58(1H,m,H-6),1.62(1H,m,H-1),2.17(3H,br s,19-Me),2.21(1H,m,H-6),2.38(1H,br d,J=11.8 Hz,H-5),2.63(1H,m,H-2),2.68(1H,m,H-7),3.01(1H,m,H-1),3.10(1H,dd,J=17.5,3.9 Hz,H-7),3.25(1H,sept.,J=6.8 Hz,H-15),3.69(3H,s,

表 1 化合物 I ~ VI 的碳谱数据

Table 1 ¹³C-NMR Spectral data of compounds I - VI

碳位	I	ī	I	IV	V	VI
1	32.6	31.8	34.3	34.9	35.4	35. 4
2	24.8	24.5	34.1	34.2	34.7	34.7
3	124.5	124.6	220.2	217.4	223.8	217.5
4	150.9	148.3	50.4	47.2	50.1	47.4
5	49.0	47.2	51.6	51.0	52.7	49.9
6	19.9	18.6	17.8	18.8	19.2	19.6
7	26.4	25.1	25.4	25.7	26.6	24.6
8	131.0	142.7	142.5	143.0	130.5	120.8
9	131.1	148.7	147.8	148.4	130.7	146.4
10	37.3	36.5	37.0	37.7	37.7	37.1
11	151.0	187.9	187.6	187.7	150.4	117.2
12	111.9	131.7	131.8	132.1	112.1	123.5
13	139.3	153.3	153.2	153.5	139.7	130.4
14	148.9	187.7	187.3	188.0	148.8	150.7
15	26.1	26.3	26.3	26.5	26.2	26.8
16	23.8	21.3	21.2	21.5	23.7	22.5
17	24.0	21.3	21.2	21.3	23.8	22.7
18	174.3	174.7	22.3	20.9	22.9	24.5
19	18.7	18.4	65.4	20.9	66.1	26.6
20	18.6	19.2	20.9	20.4	21.1	21.1

I :60. 8 OMe, V :60. 7 OMe

化合物 \mathbb{I} : 无定形粉末, 1 H-NMR (CDCl₃) δ : 1. 13(6H, d, J = 6. 8 Hz, 16, 17-Me), 1. 18(3H, s, 20-Me), 1. 46 (1H, m, H-1), 1. 55 (1H, m, H-6), 2. 12(3H, s, 19-Me), 2. 22 ~ 2. 26(2H, m, H-5, 6), 2. 38(1H, m, H-7), 2. 52(2H, m, H-2), 2. 77(1H, m, H-1), 2. 80(1H, m, H-7), 3. 02(1H, sept. , J = 6. 8 Hz, H-15), 6. 38 (1H, d, J = 1. 0 Hz, H-12); 13 C-NMR (CDCl₃), 见表 1; EI-MS m/z: 328[M] $^+$ 。上述数据与文献报道一致 $^{[3]}$,故鉴定为雷藤二萜醌 A。

化合物 II: 无定形粉末, 1 H-NMR (CDCl₃) δ : 1.11(6H,d,J=6.8 Hz,16,17-Me),1.28(3H,s,20-Me),1.35(3H,s,18-Me),1.45(1H,m,H-1),1.83(1H,m,H-7),1.87(1H,m,H-6),2.01(1H,dd,J=13.0,2.1 Hz,H-5),2.29(1H,m,H-7),2.48(1H,ddd,J=16.1,10.7,5.9 Hz,H-2),2.70(1H,m,H-2),2.81(1H,m,H-1),2.86(1H,m,H-7),3.00(1H,sept,d,J=6.8,1.5 Hz,H-15),3.46,4.05(各 1H,d,J=11.3 Hz,H-19),6.38(1H,d,J=1.5 Hz,H-12); 13 C-NMR (CDCl₃),见表 1;EI-MS m/z:330[M] $^+$ 。上述数据与文献报道一致 $^{[4]}$,故鉴定为雷藤二萜醌 B。

化合物 N:淡黄色油状物,¹H-NMR(CDCl₃)δ:

 $1.00(3H,s,19-Me),1.03(6H,d,J=7.0~Hz,16,17-Me),1.05(3H,s,18-Me),1.23(3H,s,20-Me),1.42(1H,m,H-6),1.51(1H,m,H-2),1.67(1H,m,H-5),1.74(1H,m,H-6),2.21(1H,m,H-7),2.50(2H,m,H-1),2.73(1H,m,H-7),2.78(1H,m,H-2),2.94(1H,sept.,J=7.0~Hz,H-15),6.30(1H,s,H-12); $^{13}C-NMR(CDCl_3),见表1;EI-MS m/z:314[M]^+。上述数据与文献报道一致[5],故鉴定为雷藤二萜醌 H。$

化合物 V:无定形粉末, 1 H-NMR (CDCl₃) δ : 1.17(3H,d,J=6.8 Hz,16-Me),1.18(3H,d,J=6.8 Hz,17-Me),1.30(3H,s,20-Me),1.42(3H,s,18-Me),1.46(1H,dd,J=12.8,4.8 Hz,H-6),1.85(1H,m,H-6),2.07(1H,m,H-1),2.21(1H,br d,J=12.8 Hz,H-5),2.39(1H,m,H-2),2.55(1H,m,H-7),2.76(1H,dd,J=10.6,4.1 Hz,H-2),3.08(1H,m,H-1),3.10(1H,br d,J=4.8 Hz,H-7),3.24(1H,sept.,J=6.8 Hz,H-15),3.44(1H,d,J=11.4 Hz,H-19),3.67(3H,s,14-OMe),4.18(1H,d,J=11.4 Hz,H-19),6.38(1H,s,H-12); 13 C-NMR (CDCl₃),见表1;EI-MS m/z:346[M] ${}^{+}$ 。上述数据与文献报道一致[6],故鉴定为雷酚萜醇。

化合物 W:无定形粉末,¹H-NMR(CDCl₃)δ:
1.14(3H,s,20-Me),1.17(3H,s,19-Me),1.15,
1.26(各 3H,d,J=6.8 Hz,16,17-Me),1.32(3H,s,
18-Me),1.81(1H,m),1.91(1H,m),2.62(1H,m),
2.92(1H,m),3.12(1H,sep t,J=6.8 Hz,H-15),
6.85(1H,d,J=8.2 Hz,H-11),7.04(1H,d,J=8.2 Hz,H-12)。¹³C-NMR(CDCl₃),见表1;EI-MS m/z:
300[M]+。上述数据与文献报道一致[^{7.8]},故鉴定为雷酚萜。

2.3 淋巴细胞转化实验^[9.10]:本实验以药物对体外 淋巴细胞转化的抑制作用来衡量单体化合物的免疫 抑制活性的强弱。

将化合物溶于 $10~\mu$ L DMSO,用 Hank's 液分别 稀释至质量浓度为 $80,20,5~\mu$ g/mL。在 96 孔板中,每孔中加入淋巴细胞悬液(最终浓度 5×10^6 /mL) $180~\mu$ L,ConA($20~\mu$ g/mL) $20~\mu$ L 和试药 $20~\mu$ L,空白孔用 RPMI-1640~培养液(加 10%胎牛血清)补齐。一次实验 6 复孔。置于 37~C、5%~CO $_2~$ 培养箱内培养 72~h $^{[8,9]}$ 。采用 MTT 法,选择 490~nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A)值,记录结果。数据统计及方差分析工作采用 SPSS 11.5~软件完成。

刺激指数(SI)=试验组 A 值/对照组 A 值×100%

淋转抑制率=1-SI

2.4 药理实验结果:研究结果(见表 2)表明,在实验剂量下,各化学单体与对照组(空白+ConA)比较呈现显著性差异(P<0.01),说明具有明确的免疫抑制活性。其中化合物 I~Ⅲ的药理作用最强,与地塞米松抑制淋巴细胞转化的作用强度相当,有必要进一步深入研究其药理作用机制。以上实验结果说明昆明山海棠中除雷公藤甲素之外,松香烷型二萜类化合物也是其抗炎免疫抑制有效成分之一,这对于昆明山海棠制剂的质量控制具有重要的指导意义。

表 2 化合物 I ~ VI 的淋转抑制率

Table 2 Inhibitory rates of compounds I - VI

/I. A.Me	淋转抑制率/%				
化合物	80 μg • mL ⁻¹	20 μg • mL ⁻¹	5 μg • mL ⁻¹		
I	86. 3▲	83. 1▲	42. 3▲		
ľ	89. 3▲	89.3▲	42.9▲		
I	84.3▲	85. 8▲	83. 3▲		
IV	74. 3▲	22.8▲	9. 4▲		
V	62.5▲	48. 3▲	20. 3▲		
VI	82. 1▲	54.6▲	3.5		

地塞米松(50 μg/mL)抑制率=74.8%

与对照组比较;▲P<0.01 (n=6)

Inhibitory rate of Dexamethasone (50 μ g/mL)=74.8%

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol I. 2005.
- [2] Li K H, Duan H Q, Kazuyoshi K, et al. Terpenoids from Tripterygium wilfordii [J]. Phytochemistry, 1997, 45(4): 791-796.
- [3] Shishido K, Nakano K, Wariishi N, et al. Diterpene quinoides from Tripterigium wilfordii var regelii which are interleukin-1 inhibitors [J]. Phytochemistry, 1994, 35(3): 731-737.
- [4] Ayhan U, Topcu G, Candan B J. Norditerpenoids and diterpenoids from Salvia multicaulis with antituberculous activity
 [J]. J Nat Prod, 1997, 60: 1275-1280.
- [5] Fujita R, Duan H Q, Takaishi Y, et al. Terpenoids from Tripterigyum hypoglaucum [J]. Phytochemistry, 2000, 53 (6): 715-722.
- [6] Duan H Q, Takaishi Y, Momota H, et al. Immunosuppressive diterpenoids from Tripterygium wilfordii [J]. J Nat Prod, 1999, 62(11): 1522-1525.
- [7] Deng F X, Xia Z L, Huang S Q, et al. Studies on the sesquiterpene alkaloids from Tirpterygium wilfordii Hook f. [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 1985, 27(5); 516-519.
- [8] Fu M M, Zhou X X, Xie D L, et al. Study of 2D-NMR of two diterpenes from Tripterygium wilfordii Hook f. [J]. Chin J Magn Resonance (波谱学杂志), 1994, 11(2): 165-172.
- [9] Fletcher M A, Klimas N, Morgan R. Manual of Clinical Laboratory Immunology [M]. Washington: American Society for Microbiology, 1992.
- [10] Zhang J T. Modern Pharmacological Experimental Methods (現代药理学实验方法) [M]. Beijing; Peking Union Medical College Press, 1998.

基根硬毛藻中的倍半萜及其衍生物

史大永1,韩丽君1,孙 杰1,杨永春2,范 晓1*,石建功2*

(1. 中国科学院海洋研究所 生物工程与技术中心,山东 青岛 266071; 2. 中国医学科学院 协和医科大学 药物研究所 天然产物化学研究室,北京 100050)

摘 要:目的 研究绿藻基根硬毛藻 Chaetomorpha basiretorsa 的化学成分,从中寻找结构特殊的化合物供活性筛选。方法 利用正相和反相柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱以及反相 HPLC 等技术进行分离纯化,借助 MS、IR 和 NMR 等方法鉴定结构;通过 MTT 法对单体化合物进行细胞毒活性筛选。结果 从基根硬毛藻中分离鉴定了 3 个倍半萜类化合物和 3 个降碳倍半萜类化合物,分别为 2-(1,2-二甲基-双环[3.1.0]环已烷-2-基)-5-甲基-苯酚(I)、4-溴-2-(1,2-二甲基-双环[3.1.0]环己烷-2-基)-5-甲基-苯酚(I)、海兔阿普里素(II)、6 α -羟基-紫罗-4,7-二烯-3,9-二酮(N)、3 β -羟基-5 α ,6 α -环氧- β -紫罗烯酮(V)、(3R,6R,7E)-3 α -羟基-紫罗-4,7-二烯-9-酮(N)。结论 所有化合物均为首次从本属植物中分得,其中 N、V 为首次从绿藻中分离得到,V 为首次从海洋生物中分离得到。

关键词:绿藻;基根硬毛藻;倍半萜;降碳倍半萜

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)04-0496-03

Sesquiterpenes and their derivatives from marine green alga Chaetomorpha basiretorsa

SHI Da-yong¹, HAN Li-jun¹, SUN Jie¹, YANG Yong-chun², FAN Xiao¹, SHI Jian-gong²

 $[\]triangle P < 0.01$ vs control group (n=6)

收稿日期:2006-10-09

基金项目:国家自然科学基金重点项目(30530080)

作者简介:史大永(1977—),男,山东省烟台市人,博士,研究方向为海洋天然产物。 E-mail;shidayong@ms.qdio.ac.cn * 通讯作者 范 晓 石建功 Tel;(0532)2898641 (010)83154789 E-mail;fxiao@ms.qdio.ac.cn;shijg@imm.ac.cn