

雷公藤化学成分及其黄烷醇抗氧化活性研究

黎曼欣, 崔夏莲, 黄冬冬, 纪瑞锋, 杨继*, 何新*

广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 研究雷公藤 *Tripterygium wilfordii* 的化学成分及其黄烷醇类化合物抗氧化活性。方法 利用硅胶色谱柱、中压制备液相、半制备液相等色谱技术进行分离纯化, 通过 NMR 光谱并结合文献报道的数据对化合物进行鉴定, 并通过 DPPH 自由基的清除能力为评价指标对其黄烷醇类单体化合物体外抗氧化活性进行评估。结果 从雷公藤的干燥根茎中分离得到 12 个化合物, 分别鉴定为右旋儿茶素 (1)、左旋儿茶素 (2)、左旋表阿福豆素 (3)、右旋阿福豆素 (4)、雷酚二萜酸 (5)、雷藤二萜醌 A (6)、壬二酸 (7)、整合素 A (8)、(S)-5-(3,4-二羟基苯基)- γ -缬草内酯 (9)、茶曲霉酚 (10)、雷藤二萜醌 F (11)、冬青卫矛倍半萜 4 (12)。化合物 1~4 对 DPPH 自由基的半数清除率 (half inhibitory concentration, IC₅₀) 分别为 1.29、0.75、0.81、1.49 mmol/L。结论 化合物 3~4、7~10 为首次从该植物中分离得到。化合物 1~4 清除 DPPH 自由基能力较强, 具有良好的抗氧化活性。

关键词: 雷公藤; 黄烷醇类; 抗氧化活性; 右旋儿茶素; 右旋阿福豆素; (S)-5-(3,4-二羟基苯基)- γ -缬草内酯; 茶曲霉酚

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)19-6220-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.19.004

Chemical constituents from *Tripterygium wilfordii* and antioxidant activities of flavanols

LI Man-xin, CUI Xia-lian, HUANG Dong-dong, JI Rui-feng, YANG Ji, HE Xin

School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents and the antioxidant activities of flavanols from the roots of *Tripterygium wilfordii*. **Methods** The ethonal extracts of *T. wilfordii* were purified by comprehensive chromatography, such as silica gels, medium pressure liquid chromatography (MPLC), semi-preparative HPLC, and the structures of purified compounds were identified based on spectroscopic and compared with data from the literatures. The antioxidant activities of the flavanol monomeric compounds from polar extracts were evaluated by DPPH-scavenging assay. **Results** Twelve compounds were isolated and identified as (+)-catechin (1), (-)-catechin (2), (-)-*epi*-afzelechin (3), (+)-afzelechin (4), triptonoditerpenic acid (5), triptoquinone A (6), azelaic acid (7), integracin A (8), (S)-5-(3,4-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone (9), teasperol (10), triptoquinone F (11) and ejaap 4 (12). Among them, compounds 1—4 had stronger DPPH free radicals scavenging ability, with IC₅₀ values of 1.29, 0.75, 0.81, 1.49 mmol/L, respectively. **Conclusion** Compounds 3—4, 7—10 are isolated from *T. wilfordii* for the first time. *In vitro* analyses indicated that compounds 1—4 possess high free radical scavenging ability and effective anti-oxidant activity.

Key words: *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; flavanols; anti-oxidative activity; (+)-catechin; (+)-afzelechin; (S)-5-(3,4-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone; teasperol

雷公藤为卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的干燥根及根茎, 又名黄藤木、红柴根、菜虫药、断肠草等^[1], 主产于福建、浙江、安徽、湖南等地。其味苦、辛, 性寒, 具有祛风除

湿、杀虫、解毒的功效, 临床多用于治疗类风湿性关节炎、肾小球肾炎、肾病综合征、红斑狼疮、白塞病、湿疹、银屑病等炎症性疾病^[2-3]。现代药理学研究表明, 生物碱类成分是雷公藤主要活性成分

收稿日期: 2023-02-12

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2020A1515010156); 国家自然科学基金资助项目 (82174209); 广东省重点学科科研项目 (2019-GDXK-0014)

作者简介: 黎曼欣, 硕士研究生。E-mail: Riemannstar@163.com

*通信作者: 何新, 博士生导师, 教授, 主要从事中药药理学和中药药动学研究。E-mail: hexintn@gdpu.edu.cn

杨继, 博士, 讲师, 主要从事天然产物研究。E-mail: yangji@gdpu.edu.cn

之一^[4-5]，由于其显著的生物活性及复杂的化学结构受到广泛的关注^[6-7]。目前已从雷公藤中报道超过 160 余个生物碱类成分^[8]，其中雷公藤碱 (wilfordsuine)、雷公藤新碱 (wilformine)、雷公藤次碱 (wilforine)、雷公藤碱乙 (wilforgine) 等二萜内酯类生物碱被认为是雷公藤质控成分^[9-10]。该类生物碱主要通过抑制核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、受体相互作用蛋白 3 (receptor-interacting protein 3, RIP3)/混合谱系激酶结构域样蛋白 (mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL) 坏死性凋亡、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 等多个信号通路活化发挥抗炎作用^[11-14]。

研究报道，氧化应激与炎症有着密切的关系^[15-16]。氧化应激表现为自由基和活性代谢产物如氧化剂或活性氧类 (reactive oxygen species, ROS) 的产生与通过保护机制消除它们之间的不平衡。炎症发生的关键涉及 ROS 介导的组织损伤，抗氧化剂能够抑制 ROS 的形成^[17]，并可以通过活化核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 信号通路或抑制 NF- κ B 信号通路的活化来减轻氧化应激^[18-19]。文献调研表明^[13-14,20-21]，雷公藤中生物碱类化合物通过氧化应激发挥抗炎作用的报道较少。

黄烷醇类化合物为一类常见的天然植物多酚类化合物，该类化合物通常具有较好的抗氧化活性^[22]。黄烷醇类化合物能够清除 ROS、螯合金属离子，同时诱导抗氧化酶、抑制亲氧化酶，产生 II 期解毒酶和抗氧化酶，从而减轻氧化应激^[23]。例如，Bernatoniene 等^[24]发现儿茶素的酚羟基可与活性氧和活性氮发生终止反应，从而打破新自由基产生的循环；Aron 等^[25]发现黄烷-3-醇能够与这些二价过渡金属结合并有效地降低这些阳离子的浓度，从而减弱其氧化活性的程度。

基于“黄烷醇类化合物-氧化应激-炎症”之间的关系，本课题组推测雷公藤中黄烷醇类成分可能是其治疗炎症的重要活性成分之一，而关于雷公藤中黄烷醇类化合物的研究报道相对较少。本实验从雷公藤干燥根茎 80%乙醇提取物中分离得到 12 个化合物，分别鉴定为儿茶素 [(+)-catechin, 1]、儿茶素 [(-)-catechin, 2]、表阿福豆素 [(-)-epi-afzelechin, 3]、阿福豆素 [(+)-afzelechin, 4]、雷酚二萜酸 (triptonoditerpenic acid, 5)、雷藤二萜

醌 A (triptoquinone A, 6)、壬二酸 (azelaic acid, 7)、整合素 A (integracin A, 8)、(S)-5-(3,4-二羟基苯基)- γ -缬草内酯 [(S)-5-(3,4-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone, 9]、茶曲霉酚 (teasperol, 10)、雷藤二萜醌 F (triptoquinone F, 11)、冬青卫矛倍半萜 4 (ejap 4, 12)，其中化合物 3~4 和 7~10 为首次从该植物中分离得到。为研究雷公藤中黄烷醇类成分的抗氧化活性，本实验对 4 个黄烷醇类单体化合物 (1~4) 的 DPPH 自由基清除能力进行了评价。结果显示，化合物 1~3 的 DPPH 自由基清除能力强于阳性对照药维生素 C，4 个黄烷醇类化合物 (1~4) 均具有较好的抗氧化活性。

1 仪器与材料

1.1 仪器

AVANCE III HD 600MHz 核磁共振波谱仪 (瑞士 Bruker 公司)；十万分之一电子天平 (德国 Sartorius 公司)；HZ-TNG 型多功能热回流提取浓缩机组 (上海辉展实验设备有限公司)；CHEETAH 中压快速纯化制备色谱 (天津博纳艾杰尔科技有限公司)；LC-20AT 高效液相色谱仪、LC-16P 半制备液相 Essentia Prep (日本岛津公司)；Elx800 型自动多功能酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司)。

1.2 材料

正相柱色谱硅胶 (80~100 目) 和薄层色谱硅胶 H 板购于青岛海洋化工厂有限公司，Diamonsil Plus C₁₈-A (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 为天津迪马科技有限公司产品，Shim-pack GIST C₁₈ (250 mm×20 mm, 5 μ m) 为日本岛津公司产品，十八烷基硅烷键合硅胶 (ODS-A-HG, 50 μ m) 为 YMC 公司，DPPH 自由基清除能力检测试剂盒 (BC4750) 为北京索莱宝科技有限公司产品，甲酸、石油醚、醋酸乙酯、乙醇为分析纯 (大茂化学试剂有限公司)，甲醇、乙腈为色谱纯 (Thermo Fisher Scientific 公司)，水为超纯水。

雷公藤购自安徽亳州，经广东药科大学中药学院杨继鉴定为卫矛科植物雷公藤 *T. wilfordii* Hook. f. 的干燥根及根茎。

2 方法

2.1 提取与分离

雷公藤干燥根茎 30 kg，以 5 倍体积的 80%乙醇水溶液提取加热回流 (3 次，每次 1 h) 合并滤液减压回收至无醇味，依次用等体积石油醚、醋酸乙酯溶液各萃取 3 次，得到醋酸乙酯萃取部位 (404.7

g) 和石油醚萃取部位 (101.3 g)。

醋酸乙酯萃取部位 (404.7 g) 经硅胶柱色谱, 石油醚-醋酸乙酯 (100:0→0:100) 梯度洗脱, 经 TLC 检测合并相同部分, 得到 8 个流分 (Fr. A~H)。流分 Fr. R (29.0 g) 经中压制备色谱 (MPLC), 水-甲醇 (95:5→60:40) 梯度洗脱, 得到 7 个流分 (Fr. E-a~E-g), 流分 Fr. R-b、E-e、E-g 分别经甲醇重结晶得到化合物 **1** (209.7 mg)、**2** (174.3 mg)、**3** (41.1 mg), 流分 Fr. E-f 经半制备液相色谱 (甲醇-水 80:20), 分离得到化合物 **4** (8.1 mg); 流分 Fr. B (3.70 g) 经半制备液相色谱 (0.1% 甲酸水-乙腈 45:55), 分离得到化合物 **5** (2.3 mg) 和 **6** (6.3 mg); 流分 Fr. C (18.5 g) 经 MPLC, 水-甲醇 (70:30→0:100) 梯度洗脱, 得到 6 个流分 (Fr. C-a~C-n), 流分 Fr. C-c 经甲醇重结晶得到化合物 **7** (8.2 mg); 流分 Fr. C-l 经半制备液相色谱 (0.1% 甲酸水-乙腈 25:75), 分离得到化合物 **8** (7.0 mg)。流分 Fr. D (20.1 g) 经 MPLC, 水-甲醇 (70:30→0:100) 梯度洗脱, 得到 10 个流分 (Fr. D-a~D-j), 流分 Fr. D-c 经半制备液相色谱 (乙腈-水 18:82), 分离得到化合物 **9** (18.0 mg) 和 **10** (10.1 mg)。

石油醚部位 (101.3 g) 经硅胶柱色谱, 石油醚-醋酸乙酯 (100:0→0:100) 梯度洗脱, 得到 13 个流分 (Fr. I~U), 流分 Fr. N 及 Fr. R 分别经甲醇重结晶得到化合物 **11** (64.3 mg) 和 **12** (65.2 mg)。

2.2 DPPH 自由基清除能力测定

DPPH 实验操作参照 Solarbio 试剂盒的说明书和文献报道^[26]的方法并加以改进进行: 将 4 个单体化合物 (**1**~**4**) 进行梯度稀释, 得到不同浓度的样品溶液。取不同浓度的样品溶液及阳性对照维生素 C 溶液 25 μ L, 分别加入配制好的 DPPH 溶液 975 μ L, 涡旋, 充分混匀, 避光在室温下静置 30 min 后精密吸取 100 μ L 反应液于 96 孔板中 ($n=3$), 并在 515 nm 处测定吸光度 (A) 值。按照公式计算样品对 DPPH 自由基的清除率。以 DPPH 自由基清除率为纵坐标 (Y), 化合物浓度为横坐标 (X), 维生素 C 为阳性对照, 采用 Graphpad prism 8 拟合曲线, 计算半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC_{50})。

$$\text{清除率} = [A_{\text{空白}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})] / A_{\text{空白}}$$

$A_{\text{空白}}$ 为 25 μ L 无水乙醇+975 μ L DPPH 溶液的 A 值, $A_{\text{测定}}$ 为 25 μ L 样品溶液+975 μ L DPPH 溶液的 A 值, $A_{\text{对照}}$ 为 25 μ L 样

品+975 μ L 无水乙醇的 A 值

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末, 分子式为 $C_{15}H_{14}O_6$ 。¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.72 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2'), 6.69 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-5'), 6.60 (1H, dd, $J=8.1, 2.1$ Hz, H-6'), 5.89 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-8), 5.69 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-6), 4.48 (1H, d, $J=7.4$ Hz, H-2), 3.82 (1H, q, $J=7.1$ Hz, H-3), 2.66 (1H, dd, $J=16.0, 5.4$ Hz, H-4a), 2.35 (1H, dd, $J=16.0, 8.0$ Hz, H-4b); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 156.5 (C-7), 156.3 (C-5), 155.4 (C-9), 144.9 (C-3', 4'), 130.7 (C-1'), 118.5 (C-6'), 115.2 (C-5'), 114.6 (C-2'), 99.1 (C-10), 95.2 (C-8), 93.9 (C-6), 81.1 (C-2), 66.4 (C-3), 27.9 (C-4)。上述光谱数据推断该化合物可能为黄烷醇类化合物, δ 5.89, 5.69 为 A 环间位偶合的 2 个氢质子信号, δ 6.72, 6.69, 5.89 为 B 环上的 ABX 偶合系统, H-2 的耦合常数 ($J=7.4$ Hz) 与参考文献一致^[27], 根据二面角原理, 可推断 H-2 与 H-3 为反式, 经文献对比, 该数据与文献报道一致, 推断化合物 **1** 为右旋儿茶素。

化合物 **2**: 白色粉末, 分子式为 $C_{15}H_{14}O_6$ 。¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.78 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 6.55 (1H, s, H-5'), 6.54 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6'), 5.78 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-6), 5.61 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-8), 4.58 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-2), 3.90 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-3), 2.57 (1H, dd, $J=16.4, 4.6$ Hz, H-4eq), 2.37 (1H, dd, $J=16.2, 3.4$ Hz, H-4ax); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 156.6 (C-7), 156.3 (C-5), 155.9 (C-9), 144.6 (C-3', 4'), 130.7 (C-1'), 118.1 (C-6'), 115.0 (C-5'), 114.9 (C-2'), 98.6 (C-10), 95.2 (C-8), 94.2 (C-6), 78.2 (C-2), 65.0 (C-3), 28.3 (C-4)。化合物 **2** 与化合物 **1** 具有相似的化学结构, 明显差异为化合物 **1** 和 **2** 的 C-2 位化学位移值分别为 81.1 和 78.2, 经文献对比, 上述数据与文献报道一致^[28], 推断化合物 **2** 为左旋儿茶素。

化合物 **3**: 白色粉末, 分子式为 $C_{15}H_{14}O_5$ 。¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.22 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-2', 6'), 6.71 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-3', 5'), 5.90 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-8), 5.66 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-6), 4.80 (1H, d, $J=4.6$ Hz, H-2), 4.02 (1H, td, $J=4.1, 1.8$ Hz, H-3), 2.69 (1H, dd, $J=16.4, 4.6$ Hz, H-4), 2.47 (1H, d, $J=3.5$ Hz, H-4); ¹³C-NMR (150 MHz,

DMSO- d_6) δ : 156.8 (C-7), 156.3 (C-5), 155.8 (C-4'), 130.1 (C-9), 128.6 (C-1'), 128.3 (C-2, 6'), 114.5 (C-3', 5'), 98.5 (C-10), 95.2 (C-6), 94.2 (C-8), 78.1 (C-2), 64.9 (C-3), 28.3 (C-4)。上述光谱数据推断该化合物可能为黄烷醇类化合物, 不同于化合物 **1** 和 **2**, 化合物 **3** 的 H-2 的 J 值为 4.6 Hz, 与参考文献一致^[29], 可推断 H-2 与 H-3 为顺式, 推断化合物 **3** 为左旋表阿福豆素。

化合物 **4**: 淡黄色粉末, 分子式 $C_{15}H_{14}O_5$ 。¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.14 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 6.73 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 5.89 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 5.68 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 4.52 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-2), 3.82 (1H, m, H-3), 2.70 (1H, dd, $J = 16.0, 5.5$ Hz, H-4eq), 2.36 (1H, dd, $J = 16.0, 8.4$ Hz, H-4ax); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 157.0 (C-4'), 156.5 (C-7), 156.2 (C-5), 155.4 (C-9), 129.9 (C-1'), 128.6 (C-2', 6'), 114.8 (C-3', 5'), 99.1 (C-10), 95.2 (C-6), 93.8 (C-8), 81.0 (C-2), 66.3 (C-3), 28.3 (C-4)。上述光谱数据推断该化合物可能为黄烷醇类化合物, 化合物 **4** 的 H-2 的 J 值为 7.8 Hz, 可推断 H-2 与 H-3 为反式, 经与文献报道^[30] 对比, 该数据与文献报道一致, 推断化合物 **4** 为右旋阿福豆素。

化合物 **5**: 无定形白色粉末, 分子式为 $C_{21}H_{28}O_4$ 。¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.50 (1H, s, 11-OH), 3.56 (3H, s, 12-OCH₃), 3.13 (2H, hept, $J = 6.9$ Hz, H-15), 1.96 (3H, s, CH₃-19), 1.23 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, CH₃-17), 1.11 (3H, s, CH₃-20), 1.07 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, CH₃-6); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.3 (C-18), 152.3 (C-4), 147.2 (C-14), 143.9 (C-12), 138.0 (C-13), 130.7 (C-9), 130.1 (C-8), 122.4 (C-3), 110.8 (C-11), 60.2 (C-21), 47.6 (C-5), 36.5 (C-10), 31.7 (C-2), 25.9 (C-7), 25.5 (C-15), 25.0 (C-1), 23.8 (C-16), 23.8 (C-17), 19.4 (C-19), 18.0 (C-6), 17.5 (C-20)。以上数据与文献报道一致^[31], 推断化合物 **5** 为雷酚二萜酸。

化合物 **6**: 无定形粉末, 分子式为 $C_{20}H_{24}O_4$ 。¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.44 (1H, s, H-12), 2.89 (1H, hept, $J = 6.9$ Hz, H-15), 2.81 (1H, dd, $J = 16.6, 5.5$ Hz, H-7), 2.65 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-1), 2.62 (1H, d, $J = 6.2$ Hz, H-2), 2.36~2.29 (2H, m, H-7), 2.22~2.16 (1H, m, H-5, 6), 1.91 (3H, s, Me-19), 1.55~1.42 (1H, m, H-6), 1.39~1.34 (2H, m,

H-1), 1.23 (3H, s, Me-20), 1.10~1.06 (6H, m, Me-16, 17); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 187.6 (C-11), 187.2 (C-14), 171.1 (C-18), 152.6 (C-13), 147.9 (C-9), 146.7 (C-4), 142.6 (C-8), 131.5 (C-12), 122.7 (C-3), 45.6 (C-5), 36.0 (C-10), 31.3 (C-1), 26.0 (C-15), 24.8 (C-7), 24.6 (C-2), 21.2 (C-16), 21.1 (C-17), 19.2 (C-2), 18.6 (C-6), 18.3 (C-19)。以上数据与文献报道一致^[32], 推断化合物 **6** 为雷藤二萜酮 A。

化合物 **7**: 白色粉末, 分子式为 $C_9H_{16}O_4$ 。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 2.38 (4H, d, $J = 7.12$ Hz, H-2, 8), 1.53 (4H, m, H-3, 7), 1.38 (6H, m, H-4, 5, 6); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 179.0 (C-1, 9), 33.8 (C-2, 8), 28.7 (C-4, 5, 6), 24.6 (C-3, 7)。以上数据与文献报道一致^[33], 推断化合物 **7** 为壬二酸。

化合物 **8**: 黄色油状物, 分子式为 $C_{37}H_{56}O_8$ 。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.33~6.26 (1H, brs, H-1, 3, 5), 6.23 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-4' α), 6.20 (1H, s, H-6' α), 5.24 (1H, td, $J = 7.4, 3.7$ Hz, H-14), 4.92 (1H, td, $J = 7.6, 5.0$ Hz, H-15'), 2.82 (1H, qdd, $J = 12.8, 8.5, 6.7$ Hz, H-8' β), 2.43 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H-7 α), 1.70~1.58 (1H, m, H-13, 15), 1.56~1.47 (8H, m, H-9' β , 14'), 1.43~1.35 (1H, m, H-16), 1.37~1.33 (1H, m, H-17), 1.32~1.24 (4H, m, H-9~12, H-10'~13'), 0.93 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-18' α), 0.90 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-17); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 172.4 (C-1'), 171.7 (C-1''), 165.5 (C-3'), 160.7 (C-5'), 157.0 (C-2, 4), 148.8 (C-7'), 145.9 (C-6), 111.1 (C-6'), 108.0 (C-1, 5), 105.3 (C-2'), 101.7 (C-4'), 100.4 (C-3), 75.9 (C-14), 75.0 (C-15'), 36.7 (C-8'), 36.6 (C-16'), 36.5 (C-15), 35.9 (C-7'), 34.3 (C-13), 34.3 (C-14), 31.9 (C-9'), 31.0 (C-8), 29.5 (C-10'), 29.4 (C-11'), 29.4 (C-12'), 29.3 (C-10), 29.3 (C-11), 29.0 (C-9), 25.5 (C-13'), 25.5 (C-12), 21.5 (C-2''), 18.9 (C-16), 18.7 (C-17'), 14.1 (C-18'), 14.1 (C-17)。以上数据与文献报道一致^[34], 推断化合物 **8** 为整合素 A。

化合物 **9**: 白色粉末, 分子式为 $C_{11}H_{11}O_4$ 。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 6.71 (2H, m, H-11, 12), 6.58 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-8), 4.62 (1H, m, H-5), 2.89 (1H, dd, $J = 6.0, 14.0$ Hz, H-3), 2.81 (1H, dd, $J = 6.0, 14.0$ Hz, H-3), 2.52 (1H, m, H-4), 2.35 (1H, m, H-4), 2.26 (1H, overlapped, H-6), 1.97 (1H, overlapped, H-6); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ :

180.4 (C-2), 146.4 (C-9), 145.3 (C-10), 129.1 (C-7), 122.0 (C-8), 117.7 (C-11), 116.4 (C-12), 83.3 (C-5), 41.5 (C-3), 29.5 (C-4), 27.9 (C-6)。以上数据与文献报道一致^[35], 推断化合物 **9** 为 (*S*)-5-(3,4-二羟基苯基)- γ -缬草内酯。

化合物 **10**: 白色粉末, 分子式为 $C_{14}H_{14}O_6$ 。¹H-NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 5.96 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-6), 5.83 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 4.59 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-3), 4.75 (1H, s, H-2), 3.08 (2H, dd, $J = 18.5, 16.1$ Hz, H-11, 12), 2.90 (1H, s, H-4), 2.76 (1H, dd, $J = 18.1, 5.3$ Hz, H-4), 2.71 (1H, d, $J = 4.4$ Hz, H-12), 1.62 (3H, s, H-17); ¹³C-NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 177.3 (C-13), 157.8 (C-7), 157.6 (C-5), 155.6 (C-9), 118.2 (C-15), 98.7 (C-10), 96.7 (C-8), 95.7 (C-6), 81.2 (C-2), 75.2 (C-3), 52.5 (C-11), 32.6 (C-12), 25.1 (C-17), 21.3 (C-4)。以上数据与文献报道一致^[36], 推断化合物 **10** 为茶曲霉酚。

化合物 **11**: 黄色结晶 (甲醇), 分子式为 $C_{20}H_{26}O_4$ 。¹H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 6.35 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-15), 3.01 (1H, heptd, $J = 6.8, 1.2$ Hz, H-15), 2.77 (1H, m, H-7), 2.71 (1H, m, H-1), 2.31~2.23 (3H, m, H-3, 6, 7), 1.99 (1H, qt, $J = 13.8, 3.8$ Hz, H-2), 1.80 (1H, dtd, $J = 13.9, 12.0, 5.2$ Hz, H-6), 1.57 (1H, m, H-2), 1.27 (1H, s, H-5), 1.33 (3H, s, H-18), 1.23 (3H, s, H-20), 1.13 (3H \times 2, m, H-16, 17); ¹³C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 187.9 (C-14), 187.8 (C-11), 183.6 (C-19), 152.9 (C-13), 149.1 (C-9), 143.2 (C-8), 132.1 (C-12), 53.3 (C-5), 43.6 (C-4), 39.1 (C-10), 37.2 (C-3), 36.5 (C-1), 28.8 (C-18), 26.9 (C-7), 26.5 (C-15), 21.4 (C-16), 21.3 (C-17), 19.4 (C-2), 19.1 (C-6), 17.8 (C-20)。以上数据与文献报道一致^[37], 推断化合物 **11** 为雷藤二萜醌 F。

化合物 **12**: 白色结晶 (甲醇), 分子式为 $C_{32}H_{40}O_{13}$ 。¹H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.02 (2H, m, H-4'), 7.46 (2H, m, H-3', 5'), 6.40 (1H, d, $J = 1.0$ Hz, H-6), 2.38 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-7), 5.73 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-1), 5.62 (1H, td, $J = 3.9, 2.5$ Hz, H-2), 5.54 (1H, s, H-9), 5.30 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-8), 5.12 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-15a), 4.56 (1H, s, H-9), 2.72 (3H, s, H-8), 2.51 (1H, ddd, $J = 4.0, 6.4, 10.4$ Hz, H-3ax), 2.37~2.44 (1H, overlapped, H-4), 2.22 (3H, s, 15-OAc), 2.11 (3H, d, $J = 15.8$ Hz, 6-OAc), 1.19 (3H, s, 2-OAc), 1.79 (1H, ddd, $J = 15.3, 2.7, 1.4$ Hz

H-3eq), 1.57 (3H, s, Me-12), 1.46 (3H, d, $J = 16.9$ Hz, Me-12), 1.19 (3H, d, $J = 7.6$ Hz, Me-14); ¹³C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 170.5 (CH_3CO_2 -15), 169.9 (CH_3CO_2 -2), 169.7 (CH_3CO_2 -6), 169.6 (CH_3CO_2 -8), 169.3 (CH_3CO_2 -1), 164.6 ($C_6H_5CO_2$ -5), 133.8 (C-4'), 130.2 (C-2', 6'), 128.5 (C-1'), 128.4 (C-3', 5'), 89.8 (C-5), 81.5 (C-11), 76.8 (C-8), 74.9 (C-6), 74.0 (C-9), 71.6 (C-1), 69.2 (C-2), 65.6 (C-15), 53.1 (C-7), 52.6 (C-10), 32.7 (C-4), 31.0 (C-3), 30.3 (C-13), 25.8 (C-12), 21.3 (CH_3CO_2 -8, 15, 6), 21.2 (CH_3CO_2 -2), 20.5 (CH_3CO_2 -1), 16.9 (C-14)。以上数据与文献报道一致^[38], 推断化合物 **12** 为冬青卫矛倍半萜 4。

3.2 抗氧化活性评价

黄烷醇类单体化合物 **1~4** 的 DPPH 自由基活性检测结果如表 1 和图 1 所示, 化合物 **1~4** 均具有良好的抗氧化能力, 在 0.2~0.8 mmol/L 4 个化合物对 DPPH 自由基的清除能力, 随着浓度的增加而增加, 呈明显量效关系, IC_{50} 分别为 1.29、0.75、0.81、1.49 mmol/mL, 抗氧化能力为 $2 > 3 > 1 > V_C > 4$ 。

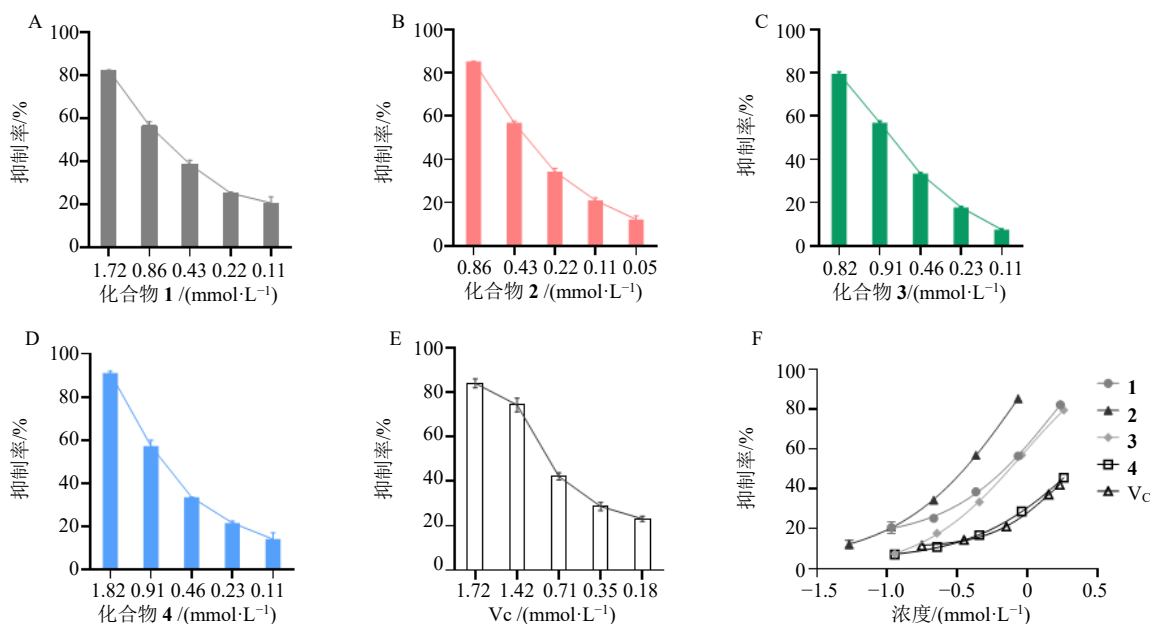
表 1 化合物 **1~4** 和 V_C 体外 DPPH 自由基清除能力结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 *In vitro* DPPH free radical scavenging activities of compounds **1—4** and V_C ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	$IC_{50}/(\mu mol \cdot L^{-1})$
1	1.29 ± 0.24
2	0.75 ± 0.08
3	0.81 ± 0.02
4	1.49 ± 0.17
V_C	1.48 ± 0.03

4 讨论

雷公藤作为传统中药在临床中常用于治疗风湿性关节炎、皮肤发痒等炎症相关疾病, 前期研究发现雷公藤中的生物碱主要通过免疫抑制发挥抗炎作用。雷公藤生物碱可抑制其抗型胶原特异性抗体产生, 并可抑制单核细胞对 II 型胶原的特异性增殖反应和迟发型超敏反应^[39]。此外, 其生物碱对体液中多种炎症相关因子的产生也具有显著的免疫抑制作用^[40-44]。大量研究表明, 抗氧化、氧化应激和炎症三者之间有着密切关系, 氧化应激下导致的风湿性疾病、慢性肾病、自身免疫性疾病等^[45-47]。不同于免疫抑制机制, 抗氧化成分主要通过清除自由基进而减少细胞损伤发挥抗炎作用^[48]。然而, 雷公



A~E-化合物 1~4 及 Vc 对 DPPH 自由基的清除率; F-化合物 1~4 及 Vc 对 DPPH 自由基的清除率对比

A—E—Scavenging rate of DPPH free radical by compounds 1—4 and Vc; F—comparison of scavenging rates of DPPH free radicals by compounds 1—4 and Vc

图 1 化合物 1~4 对 DPPH 自由基的清除情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 DPPH scavenging rate of compounds 1—4 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

藤通过抗氧化发挥抗炎作用的报道相对较少, 黄烷醇类化合物作为天然抗氧化剂, 雷公藤中黄烷醇类成分及其抗氧化活性研究具有潜在的研究价值。

本研究从雷公藤中共分离得到 12 个化合物, 包括 4 个黄酮醇类、3 个酚类、3 个二萜类、1 个倍半萜类及 1 个有机酸类化合物, 化合物 3~4 和 7~10 为首次从该植物中分离得到。进一步, 本实验对分离得到的 4 个黄烷醇类化合物进行了抗氧化活性评估, 结果显示化合物 1~4 具有良好的清除 DPPH 自由基的活性, 相较于阳性对照 Vc, 化合物 1~3 对 DPPH 自由基的清除率分别高 13.07%、49.29%、45.41%。分析化合物结构与抗氧化活性之间的构效关系发现, 雷公藤中 4 个黄烷醇类化合物的抗氧化活性与黄烷醇分子结构中所含酚羟基的数量和取代位置有关^[49-50]: 以酚酸作为母核结构的情况下, 取代的酚羟基数目越多, 其抗氧化活性越强, 且黄酮 B 环上具有邻二酚羟基的黄酮类化合物表现为较强的清除自由基能力, 因此化合物 1~4 均表现出良好的抗氧化活性^[19], 而右旋儿茶素、左旋儿茶素因 B 环被邻二酚羟基所取代, 抗氧化活性明显更强。黄烷醇类化合物作为良好的抗氧化剂, 在抗炎上也发挥着重要的作用^[51]。本研究结果丰富了雷公藤的化学成分以及抗氧化活性研究,

为雷公藤黄烷醇类抗氧化的药效物质基础及开发奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 肖治均, 刘传鑫, 杨欣欣, 等. 雷公藤研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4752-4768.
- [2] 刘雪梅, 刘志宏, 张晶, 等. 雷公藤临床应用及不良反应的研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2015, 33(2): 110-113.
- [3] 李波, 金伶佳, 吴美兰. 雷公藤临床应用、毒性及减毒增效研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(7): 3539-3541.
- [4] 闫建功, 王一竹, 吴先富, 等. 雷公藤中倍半萜生物碱类化学成分的研究 [J]. 中草药, 2022, 53(7): 1933-1938.
- [5] Gao X, Du X, An L J, et al. Wilforine, the Q-marker and PK-maker of *Tripterygium* glycosides tablet: Based on preparation quantitative analysis and PK-PD study [J]. *Phytomedicine*, 2019, 54: 357-364.
- [6] Chen J R, Xue Y P, Shuai X Y, et al. Effect of major components of *Tripterygium wilfordii* Hook. f on the uptake function of organic anion transporting polypeptide 1B1 [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2022, 435: 115848.
- [7] Xiu M X, Meng X, Li N, et al. Two new sesquiterpenes

- from the stems of *Tripterygium wilfordii* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2021, 23(5): 423-428.
- [8] 刘莉, 闫君, 舒积成, 等. 雷公藤生物碱类成分及其药理活性研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31(12): 2170-2181.
- [9] 谷升盼, 付淑军, Mussa A, 等. 雷公藤片中 5 种有效成分同时测定及其质量评价研究 [J]. *天津中医药*, 2015, 32(1): 38-41.
- [10] Du X, He X, Huang Y H, *et al.* Simultaneous determination of seven effective components of *Tripterygium* glycosides in human biological matrices by ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2019, 1113: 1-13.
- [11] Qian Q, Gao Y H, Xun G, *et al.* Synchronous investigation of the mechanism and substance basis of *Tripterygium* glycosides tablets on anti-rheumatoid arthritis and hepatotoxicity [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2022, 194(11): 5333-5352.
- [12] Lv H W, Jiang L P, Zhu M D, *et al.* The genus *Tripterygium*: A phytochemistry and pharmacological review [J]. *Fitoterapia*, 2019, 137: 104190.
- [13] Gao C, Huang X X, Bai M, *et al.* Anti-inflammatory sesquiterpene pyridine alkaloids from *Tripterygium wilfordii* [J]. *Fitoterapia*, 2015, 105: 49-54.
- [14] Zhang Y Q, Xu W, Li H, *et al.* Therapeutic effects of total alkaloids of *Tripterygium wilfordii* Hook f. on collagen-induced arthritis in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(3): 699-705.
- [15] Ohl K, Tenbrock K, Kipp M. Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action [J]. *Exp Neurol*, 2016, 277: 58-67.
- [16] Novak E A, Mollen K P. Mitochondrial dysfunction in inflammatory bowel disease [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2015, 3: 62.
- [17] Gerardo Yanowsky-Escatell F, Andrade-Sierra J, Pazarín-Villaseñor L, *et al.* The role of dietary antioxidants on oxidative stress in diabetic nephropathy [J]. *Iran J Kidney Dis*, 2020, 14(2): 81-94.
- [18] Li Q X, Ao X, Du Y H, *et al.* Effects of aminoguanidine and vitamin C on collagen type IV in diabetic nephropathy rats [J]. *Endocrine*, 2011, 39(3): 251-258.
- [19] Kim S R, Ha Y M, Kim Y M, *et al.* Ascorbic acid reduces HMGB1 secretion in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells and improves survival rate in septic mice by activation of Nrf2/HO-1 signals [J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 95(4): 279-289.
- [20] Wong K F, Yuan Y, Luk J M. *Tripterygium wilfordii* bioactive compounds as anticancer and anti-inflammatory agents [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39(3): 311-320.
- [21] Wang C, Li C J, Yang J Z, *et al.* Anti-inflammatory sesquiterpene derivatives from the leaves of *Tripterygium wilfordii* [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(1): 85-90.
- [22] Vrhovsek U, Rigo A, Tonon D, *et al.* Quantitation of polyphenols in different apple varieties [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(21): 6532-6538.
- [23] Youn H S, Lee J Y, Saitoh S I, *et al.* Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of Toll-like receptor by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72(7): 850-859.
- [24] Bernatoniene J, Kopustinskiene D M. The role of catechins in cellular responses to oxidative stress [J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 965.
- [25] Aron P M, Kennedy J A. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52(1): 79-104.
- [26] Chen J H, Zhang X, Fu M Y, *et al.* Ultrasound-assisted covalent reaction of myofibrillar protein: The improvement of functional properties and its potential mechanism [J]. *Ultrason Sonochem*, 2021, 76: 105652.
- [27] 陈丽楠, 付辉政, 王兰欣, 等. 覆盆子茎中 1 个新的半日花烷型二萜昔 [J]. *中草药*, 2022, 53(10): 2941-2948.
- [28] Nechepurenko I V, Polovinka M P, Komarova N I, *et al.* Low-molecular-weight phenolic compounds from *Hedysarum theinum* roots [J]. *Chem Nat Compd*, 2008, 44(1): 31-34.
- [29] 吴新安, 赵毅民. 骨碎补化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(6): 443-444.
- [30] Ninh P T, Hoai L T T, Ha C T T, *et al.* Study on the chemical constituents of *Magnolia insignis* collected in Tuyen Quang Province, Vietnam [J]. *Vietnam J Chem*, 2020, 58(1): 133-137.
- [31] 张亮, 张正行, 安登魁, 等. 昆明山海棠化学成分的研究 [J]. *药学学报*, 1991, 26(7): 515-518.
- [32] 张彦文, 范云双, 王晓东, 等. 昆明山海棠中具有免疫抑制活性的二萜化合物 [J]. *中草药*, 2007, 38(4): 493-496.
- [33] Gu X J, Ren K, Yao N, *et al.* Chemical constituents from endophytic fungus *Plectosphaerella cucumerina* YCTA2Z1 of *Cynanchum auriculatum* [J]. *Chin Herb Med*, 2018, 10(1): 95-98.
- [34] 杨龄, 肖春贵, 金亚菊, 等. 倒挂金钩茎枝的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(10): 2365-2371.
- [35] 和东阳, 王利勤. 神黄豆果实化学成分的研究 [J]. 中

- 国现代应用药理学, 2014, 31(11): 1355-1359.
- [36] 王国凯, 郑娟, 郁阳, 等. 黄药子乙酸酯部位化学成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(21): 1815-1820.
- [37] Shishido K, Nakano K, Wariishi N, *et al.* *Tripterygium wilfordii* var. *regelii* which are interleukin-1 inhibitors [J]. *Phytochemistry*, 1994, 35(3): 731-737.
- [38] Lv C, Zheng Z L, Miao F, *et al.* New dihydro- β -agarofuran sesquiterpenes from *Parnassia wightiana* Wall: Isolation, identification and cytotoxicity against cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(6): 11111-11125.
- [39] 张绍伦, 崔新江. 东北雷公藤对胶原诱导实验性关节炎抑制作用的免疫学研究 III. 雷公藤给药对模型动物一般免疫功能状态的影响 [J]. 白求恩医科大学学报, 1990, 16(3): 216-218.
- [40] 张文娟. 雷公藤多苷联合甲氨蝶呤治疗类风湿性关节炎短期疗效及对患者外周血炎症因子的影响 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(51): 129-130.
- [41] 周红. 雷公藤多苷与甲氨蝶呤联合治疗类风湿性关节炎的疗效分析 [J]. 中国医药指南, 2017, 15(6): 191.
- [42] 于得泓, 战艺, 石红. 雷公藤多苷片联合甲氨蝶呤治疗对类风湿关节炎患者红细胞沉降率、C 反应蛋白及风湿因子的影响 [J]. 中国医药科学, 2019, 9(16): 90-92.
- [43] 李冬华, 刘宇, 王文娜. 基于免疫相关细胞因子研究理冲汤对子宫肌瘤细胞凋亡和增殖的影响 [J]. 世界中医药, 2022, 17(12): 1692-1696.
- [44] 庄铭城, 王小燕, 陈培嘉. 雷公藤多甙片联合甲氨蝶呤治疗类风湿性关节炎的临床疗效及对炎症因子的影响分析 [J]. 中国医药科学, 2018, 8(18): 46-49.
- [45] Şerban C, Drăgan S. The relationship between inflammatory and oxidative stress biomarkers, atherosclerosis and rheumatic diseases [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(4): 585-600.
- [46] Cachofeiro V, Goicochea M, de Vinuesa S G, *et al.* Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease [J]. *Kidney Int Suppl*, 2008(111): S4-S9.
- [47] Tucker P S, Scanlan A T, Dalbo V J. Chronic kidney disease influences multiple systems: Describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 806358.
- [48] Jones D P. Redefining oxidative stress [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(9/10): 1865-1879.
- [49] Ng T B, Liu F, Wang Z T. Antioxidative activity of natural products from plants [J]. *Life Sci*, 2000, 66(8): 709-723.
- [50] 谭楹新, 叶涛, 刘湘新, 等. 植物提取物抗氧化成分及机理研究进展 [J]. 食品科学, 2010, 31(15): 288-292.
- [51] Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, *et al.* The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols [J]. *Nutrients*, 2018, 10(11): 1618.

[责任编辑 王文倩]