

雷酚内酯的波谱学数据与结构确证

王菲菲^{1,2#}, 张聿梅^{1#}, 何 轶¹, 戴 忠^{1*}, 马双成¹, 刘 斌²

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100029

摘要: 对雷酚内酯对照品的紫外吸收光谱 (UV)、红外吸收光谱 (IR)、质谱 (MS)、核磁共振 (NMR) 谱 (包括 ¹H NMR、¹³C NMR、DEPT、¹H-¹H COSY、NOE、¹H-¹³C HSQC 和 ¹H-¹³C HMBC 谱图) 进行了分析, 对其 ¹H 和 ¹³C NMR 谱峰进行了全归属, 纠正了文献[5]的归属错误, 确证了雷酚内酯对照品的化学结构。

关键词: 核磁共振 (NMR); 归属; 化学位移; 雷酚内酯; 结构确证

中图分类号: O482.53 文献标识码: A

Spectral Analysis and Structural Elucidation of *Triptophnolide*WANG Fei-fei^{1,2#}, ZHANG Yu-mei^{1#}, HE Yi¹, DAI Zhong^{1*}, MA Shuang-cheng¹, LIU Bin²

1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Ultraviolet (UV) spectrum, infrared (IR) spectrum, mass (MS) spectra and nuclear magnetic resonance (NMR) spectra (i.e., ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT, ¹H-¹H COSY, NOE, ¹H-¹³C HSQC and ¹H-¹³C HMBC) of *Triptophnolide* were collected and interpreted. All ¹H and ¹³C NMR signals were assigned. Base on the data, the structure of reference standard *Triptophnolide* was determined.

Key words: nuclear magnetic resonance (NMR), assignment, chemical shift, *Triptophnolide*, structural elucidation

收稿日期: 2015-11-21; 收修改稿日期: 2017-01-04

基金项目: 十二五“重大新药创制”专项课题“中药质量安全检测及风险控制平台”资助项目(2014ZX09304307-002).

通讯联系人(Corresponding author): #共同第一作者. *Tel: 010-67095876, E-mail: daizhong@nifdc.org.cn.

引言

雷酚内酯 (*Triptophenolide*, 化学式为 $C_{20}H_{24}O_3$) 由邓福孝等人^[1]于 1982 年首次从福建泰宁县产雷公藤 (*Tripterygium Wilfordii* Hook.f.) 分离得到, 是一种具有较强抑制肿瘤活性的二萜类化合物 [见图 1(a)]^[2]. 雷公藤, 又称山砒霜、断肠草或南蛇藤, 最早记载于《神农本草经》, 是卫矛科雷公藤属木质藤本植物, 主要分布于我国长江流域以南山区和东北长白山区. 雷公藤制剂具有多种药理作用, 可用于治疗炎症、癌症、麻风病、慢性肾炎、系统性红斑狼疮等疾病^[3]. 雷酚内酯是从雷公藤中分离得到的主要成分之一, 中国食品药品检定研究院拟发行雷酚内酯对照品, 为日后该类药物检验提供对照品支持.

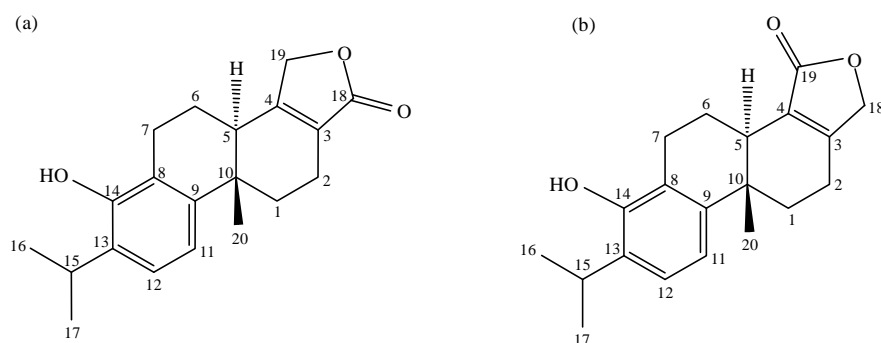


图 1 已报道的雷酚内酯的结构式

Fig. 1 The structure of *Triptophenolide* in references

关于雷酚内酯的结构目前已有多篇报道, 于东防等人^[4]于 1990 年用 X-ray 单晶衍射的方法修改了雷酚内酯的结构 [见图 1(b)], 但自此以后再没有相关文献分离得到图 1(b)所示的结构. 樊希望等人^[3]于 2011 年从雷公藤植物提取分离化合物并用 X-ray 单晶衍射方法确定结构, 也得到了图 1(a)所示的雷酚内酯结构. 通过文献查阅或利用化学物质登记号 (CAS number) 对化合物检索, 一般也认为雷酚内酯的结构为图 1(a)所示. 已经发表的文献中^[1,4,5]仅报道了雷酚内酯的一维核磁共振氢谱 (1H NMR) 和碳谱 (^{13}C NMR) 数据, 对结构中的仲氢信号没有给予归属或归属有误, ^{13}C NMR 主要信号的归属也有错误. 我们参照已有文献^[1,4,5], 对雷酚内酯对照品的紫外吸收光谱 (UV)、红外吸收光谱 (IR)、质谱 (MS)、NMR 谱图 (包括 1H NMR、 ^{13}C NMR、DEPT、 1H - 1H COSY、NOE、 1H - ^{13}C HSQC 和 1H - ^{13}C HMBC 谱图) 进行了分析, 对其 1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据进行了全归属, 确证了雷酚内酯对照品的化学结构.

1 实验部分

雷酚内酯对照品原料由中国食品药品检定研究院提供, 经高效液相色谱 (HPLC) 法测试纯度为 99.92%. 实验中其它所有试剂均为分析纯, 购自上海国药集团化学试剂有限公司.

紫外光谱采用 Agilent 8453 紫外-可见分光光度计 (美国 Agilent) 测定, 红外光谱采用 Nicolet 8700 傅立叶变换红外光谱仪 (美国 Nicolet 公司) 测定, KBr 压片. 质谱用 Agilent Technologies 7000C GC/MS Triple Quad (美国 Agilent 公司) 测定, 配备电子轰击离子源 (EI 源).

^1H NMR、 ^{13}C NMR、DEPT、 ^1H - ^1H COSY、NOE、 ^1H - ^{13}C HSQC 和 ^1H - ^{13}C HMBC 谱均用 Bruker AVIII HD 600 型 NMR 谱仪 (瑞士 Bruker 公司) 测定, 配备 5 mm 探头。 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 的工作频率分别为 600.25 MHz 和 150.81 MHz, 谱宽分别为 12 019.23 Hz 和 36 057.69 Hz。DEPT-135 谱宽与 ^{13}C NMR 谱图相同, NOE 谱宽为 10 775.91 Hz。2D NMR 实验包括 ^1H - ^1H COSY、 ^1H - ^{13}C HSQC 和 ^1H - ^{13}C HMBC 实验, 均采用标准脉冲程序。 ^1H - ^1H COSY 的 F_2 (^1H) 和 F_1 (^1H) 维谱宽均为 5 319.10 Hz, 采样数据点阵 $t_2 \times t_1 = 1\,024 \times 1\,024$; ^1H - ^{13}C HSQC 的 F_2 (^1H) 和 F_1 (^{13}C) 维谱宽分别为 5 319.10 Hz 和 30 154.52 Hz, 采样数据点阵 $t_2 \times t_1 = 1\,024 \times 1\,024$; ^1H - ^{13}C HMBC 的 F_2 (^1H) 和 F_1 (^{13}C) 维谱宽分别为 8 417.51 Hz 和 36 231.91 Hz, 采样数据点阵 $t_2 \times t_1 = 1\,024 \times 1\,024$ 。

2 结果与讨论

2.1 UV 谱图分析

化合物在甲醇中的最大紫外吸收波长 $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm)/吸收峰强度 (AU) 为 203.0/0.85、218.0/0.42、273.0/ 3.0×10^{-2} 和 279.0/ 3.0×10^{-2} , 分别为 E_2 、 E_2 、B 和 B 吸收带。

2.2 IR 谱图分析

采用 KBr 压片法, 化合物在 IR 吸收光谱中, $3\,520\text{ cm}^{-1}$ 和 $3\,483\text{ cm}^{-1}$ 处峰为缔合羟基 O-H 伸缩振动强吸收峰; $2\,996\text{ cm}^{-1}$ 、 $2\,875\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\,453\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,373\text{ cm}^{-1}$ 处中强峰为甲基 C-H 的吸收峰;

$2\,932\text{ cm}^{-1}$ 、 726 cm^{-1} 处为亚甲基 C-H 的吸收峰; $1\,754\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,739\text{ cm}^{-1}$ 处为酯键 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}\text{—O—}$ 的强伸缩振动吸收峰; $1\,677\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\,567\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\,489\text{ cm}^{-1}$ 和 801 cm^{-1} 处为苯环的骨架吸收峰。

2.3 MS 谱图分析

化合物质谱采用 EI 电离源, 得到本品的分子离子质荷比 (m/z) 为 312, 与理论值 (312) 一致。

2.4 NMR 谱图分析

化合物的 ^1H NMR 谱显示有 13 组质子信号。结合 ^1H - ^1H COSY (图 2)、 ^1H - ^{13}C HSQC (图 3) 和 ^1H - ^{13}C HMBC (图 4) 谱图分析和文献^[4,5]比对, 可归属高场区的 3 个甲基信号。其中, $\delta_{\text{H}} 1.27$ (6H, d, $J = 7.0\text{ Hz}$) 为与次甲基相连的 2 个甲基质子信号 H-16 和 H-17, $\delta_{\text{H}} 1.03$ (3H, s) 为与季碳相连的甲基质子信号 H-20。在 HSQC 谱中, $\delta_{\text{C}} 22.4$ 与 H-20 相关, 被归属为 C-20。在 HMBC 谱中, C-20 与 $\delta_{\text{H}} 1.70$ 和 $\delta_{\text{H}} 2.52$ 远程相关; 而在 HSQC 谱中, $\delta_{\text{H}} 1.70$ 和 $\delta_{\text{H}} 2.52$ 同时与 $\delta_{\text{C}} 32.6$ 相关, 因此 $\delta_{\text{H}} 1.70$ 和 $\delta_{\text{H}} 2.52$ 分别被归属为 H-1a 和 H-1b, $\delta_{\text{C}} 32.6$ 被归属为 C-1。在 COSY 谱中, $\delta_{\text{H}} 2.40$ 与 H-1a、H-1b 有偶合关系, 被归属为 H-2a。在 HSQC 谱中, $\delta_{\text{H}} 2.40$ 和 $\delta_{\text{H}} 2.52$ 同时与 $\delta_{\text{C}} 18.2$ 相关, 因此 $\delta_{\text{H}} 2.52$ 被归属为 H-2b, $\delta_{\text{C}} 18.2$ 被归属为 C-2。在 NOE 差谱 (图 5) 中, 当照射 H-1a ($\delta_{\text{H}} 1.70$) 时, $\delta_{\text{H}} 2.52$ (H-1b 或 H-2b) 和 $\delta_{\text{H}} 2.70$ 信号增强。在 HMBC 谱中, H-1a 与 $\delta_{\text{C}} 22.4$ (C-20)、 $\delta_{\text{C}} 36.2$ 和 $\delta_{\text{C}} 40.9$ 远程相关; DEPT 谱中显示 $\delta_{\text{C}} 36.2$ 为季碳, 而且通过和文献^[4,5]比对, 我们判断 $\delta_{\text{C}} 36.2$ 为 C-10, 因此 $\delta_{\text{C}} 40.9$ 被归属为 C-5。在 HSQC 谱, $\delta_{\text{H}} 2.70$ 与 C-5 相关, 被归属为 H-5。在 COSY 谱中, $\delta_{\text{H}} 1.90$ 和 $\delta_{\text{H}} 2.01$ 与 H-5 相关, 被分别归属为 H-6a 和 H-6b。在 NOE 谱中, 当照射 H-6b 时, $\delta_{\text{H}} 2.70$ (H-5)、 $\delta_{\text{H}} 2.90$ 、 $\delta_{\text{H}} 2.93$ 信号增强; 而且在 COSY 谱中, H-6a、H-6b 分别与 $\delta_{\text{H}} 2.70$ (H-5)、 $\delta_{\text{H}} 2.90$ 和 $\delta_{\text{H}} 2.93$ 有偶合关系, 因此 $\delta_{\text{H}} 2.90$ 和 $\delta_{\text{H}} 2.93$ 被归属为 H-7a 和 H-7b。在 COSY 谱中, $\delta_{\text{H}} 3.11$ 与

H-16 和 H-17 相关, 被归属为 H-15. 在 HSQC 谱中, $\delta_{\text{C}} 27.0$ 与 $\delta_{\text{H}} 3.11$ 直接相关, 被归属为 C-15, 在 HMBC 谱中, $\delta_{\text{H}} 7.10$ (d, $J = 8.0$ Hz) 与 C-15 远程相关, 归属为 H-12. 在 COSY 谱中, $\delta_{\text{H}} 6.96$ (d, $J = 8.0$ Hz) 与 H-12 耦合, 被归属为 H-11.

化合物的 ^{13}C NMR 谱显示 20 个信号峰, 结合 DEPT 谱 (图 6), 显示化合物结构中存在 8 个季碳、4 个叔碳、5 个仲碳和 3 个伯碳. 其中, 上文已归属了 C-1、C-2、C-5、C-10、C-15 和 C-20. 在 HSQC 谱 (图 3) 中, $\delta_{\text{C}} 22.5$ 与 $\delta_{\text{H}} 1.27$ (H-16, 17) 相关, 被归属为 C-16 和 C-17. DEPT 谱显示 5 个仲碳的化学位移分别为 $\delta_{\text{C}} 18.2$ (C-2), $\delta_{\text{C}} 19.6$, $\delta_{\text{C}} 22.7$, $\delta_{\text{C}} 32.6$ (C-1) 和 $\delta_{\text{C}} 70.5$. 在 HSQC 谱中, $\delta_{\text{C}} 19.6$ 与 $\delta_{\text{H}} 1.90$ (H-6a) 和 $\delta_{\text{H}} 2.01$ (H-6b) 相关, 被归属为 C-6; $\delta_{\text{C}} 22.7$ 与 $\delta_{\text{H}} 2.90$ (H-7a) 和 $\delta_{\text{H}} 2.93$ (H-7b) 相关, 被归属为 C-7; 所以剩余的 $\delta_{\text{C}} 70.5$ 被归属为 C-19. 在 ^1H NMR 谱中, $\delta_{\text{H}} 4.8$ 处有 2 组质子信号, 一组与 $\delta_{\text{C}} 70.5$ (C-19) 直接相关 (见 HSQC 谱), 归属为 H-19; 另一组宽单峰归属于羟基质子 (-OH) 信号.

在 HMBC 谱中, $\delta_{\text{C}} 174.2$ 与 $\delta_{\text{H}} 2.52$ (H-2b) 远程相关, 被归属为 C-18, 该碳为季碳, 表明化合物雷酚内酯的结构与图 1(a)相符. 在 HSQC 谱中, $\delta_{\text{C}} 116.3$ 、 $\delta_{\text{C}} 123.4$ 分别与 $\delta_{\text{H}} 6.96$ (H-11) 和 $\delta_{\text{H}} 7.10$ (H-12) 相关, 被分别归属为 C-11 和 C-12. 在 HMBC 谱中, $\delta_{\text{C}} 120.5$ (季碳) 与 $\delta_{\text{H}} 4.80$ (-OH) 和 $\delta_{\text{H}} 6.96$ (H-11) 远程相关, 被归属为 C-8; $\delta_{\text{C}} 131.0$ (季碳) 与 $\delta_{\text{H}} 1.27$ (H-16, 17) 和 $\delta_{\text{H}} 4.80$ (-OH) 和 $\delta_{\text{H}} 6.96$ (H-11) 远程相关, 被归属为 C-13; $\delta_{\text{C}} 143.9$ (季碳) 与 $\delta_{\text{H}} 1.03$ (H-20) 和 $\delta_{\text{H}} 2.52$ (H-1b) 和 $\delta_{\text{H}} 2.90$ (H-7a) 和 $\delta_{\text{H}} 2.93$ (H-7b) 和 $\delta_{\text{H}} 7.10$ (H-12) 相关, 被归属为 C-9; $\delta_{\text{C}} 150.8$ (季碳) 与 $\delta_{\text{H}} 2.90$ (H-7a) 和 $\delta_{\text{H}} 2.93$ (H-7b) 和 $\delta_{\text{H}} 7.10$ (H-12) 远程相关, 被归属为 C-14; $\delta_{\text{C}} 162.9$ (季碳) 与 $\delta_{\text{H}} 2.52$ (H-1b) 和 $\delta_{\text{H}} 4.80$ (H-19) 远程相关, 被归属为 C-3; 因此 $\delta_{\text{C}} 125.2$ 被归属为 C-4.

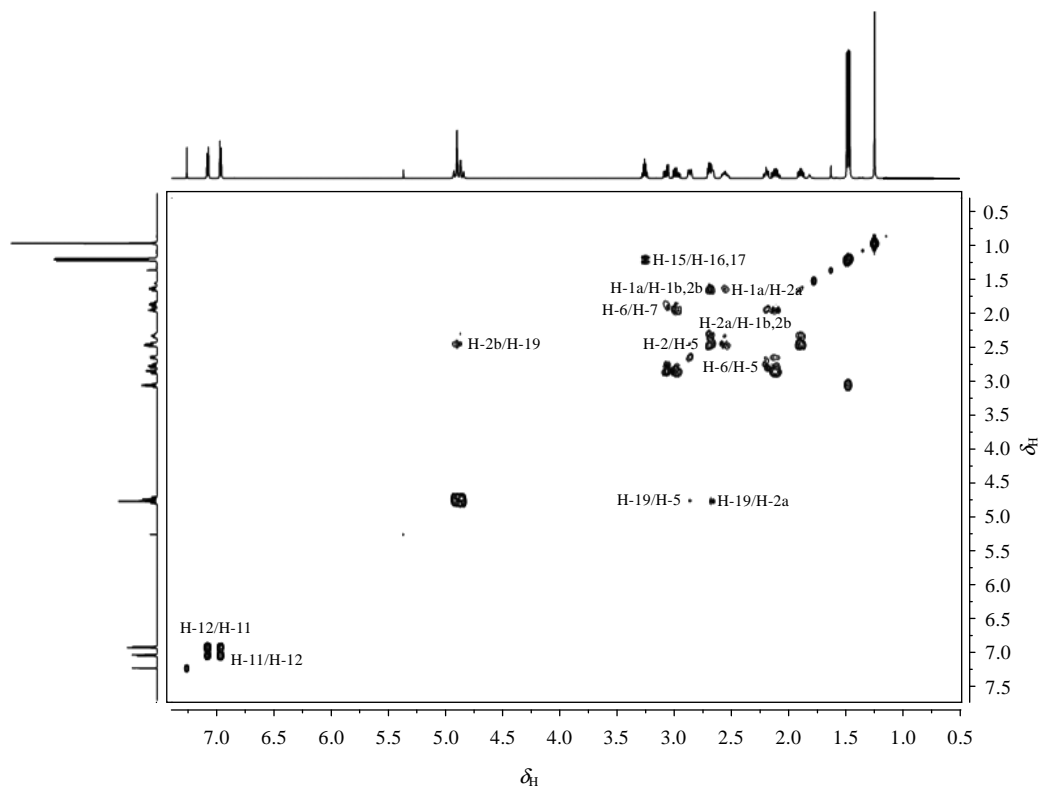
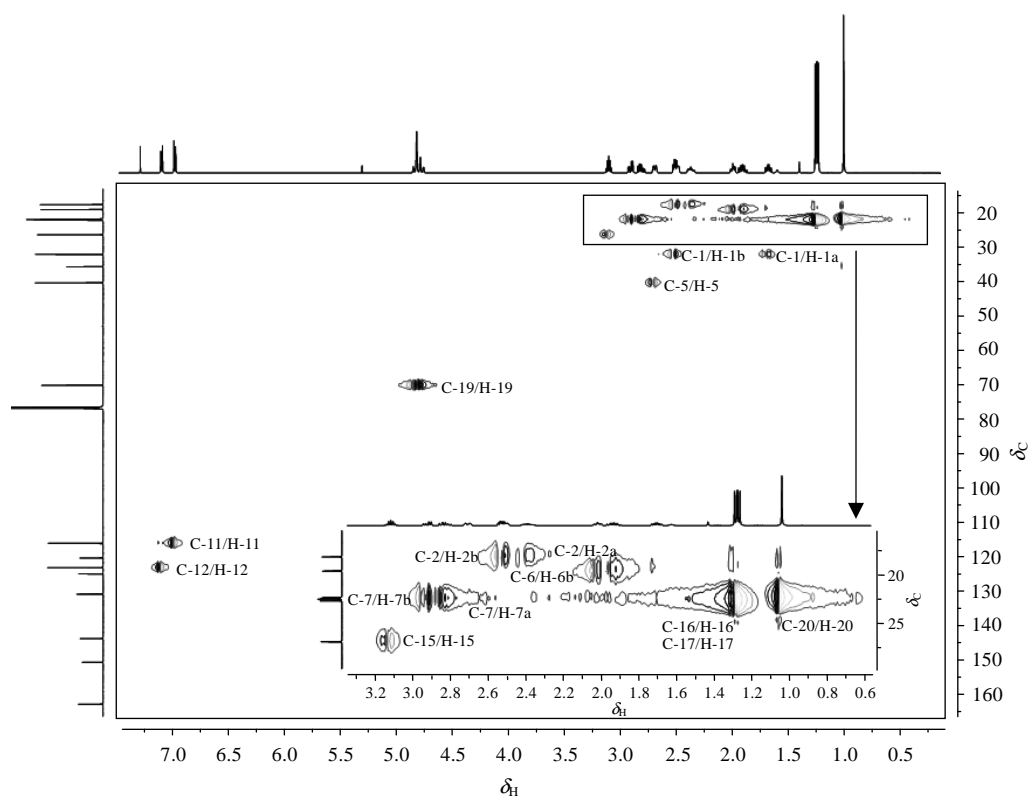
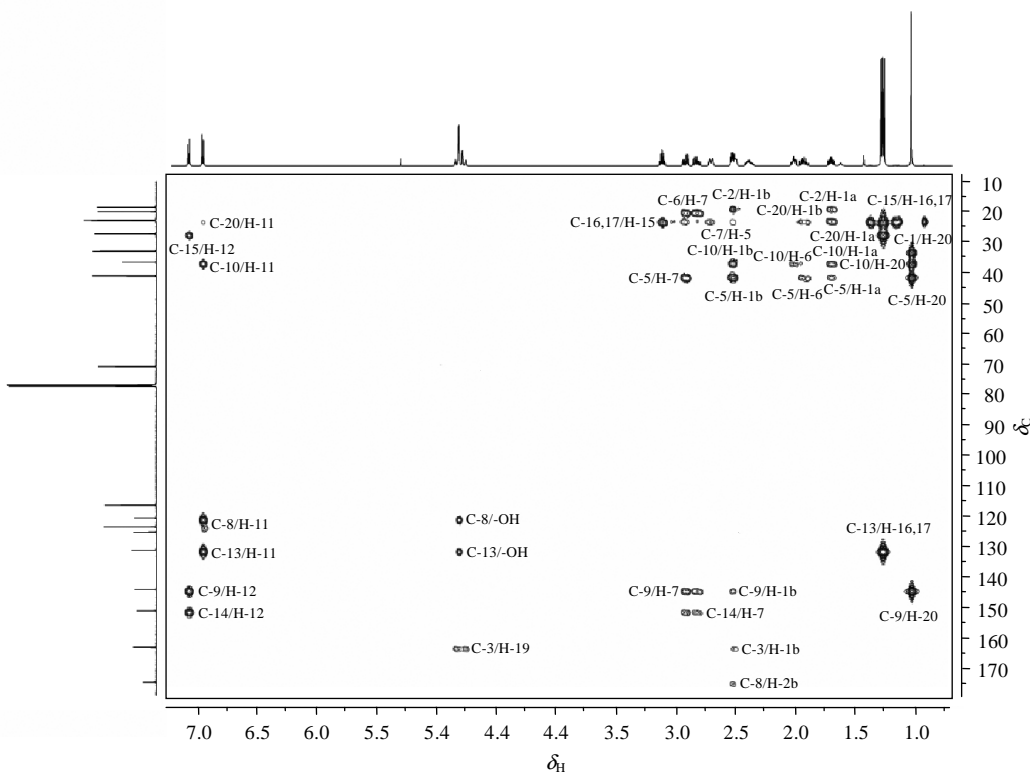


图 2 雷酚内酯的 ^1H - ^1H COSY 谱

Fig. 2 ^1H - ^1H COSY spectrum of *Triptophenolide*

图 3 雷酚内酯的 ^1H - ^{13}C HSQC 谱Fig. 3 ^1H - ^{13}C HSQC spectrum of *Tryptophenolide*图 4 雷酚内酯的 ^1H - ^{13}C HMBC 谱Fig. 4 ^1H - ^{13}C HMBC spectrum of *Tryptophenolide*

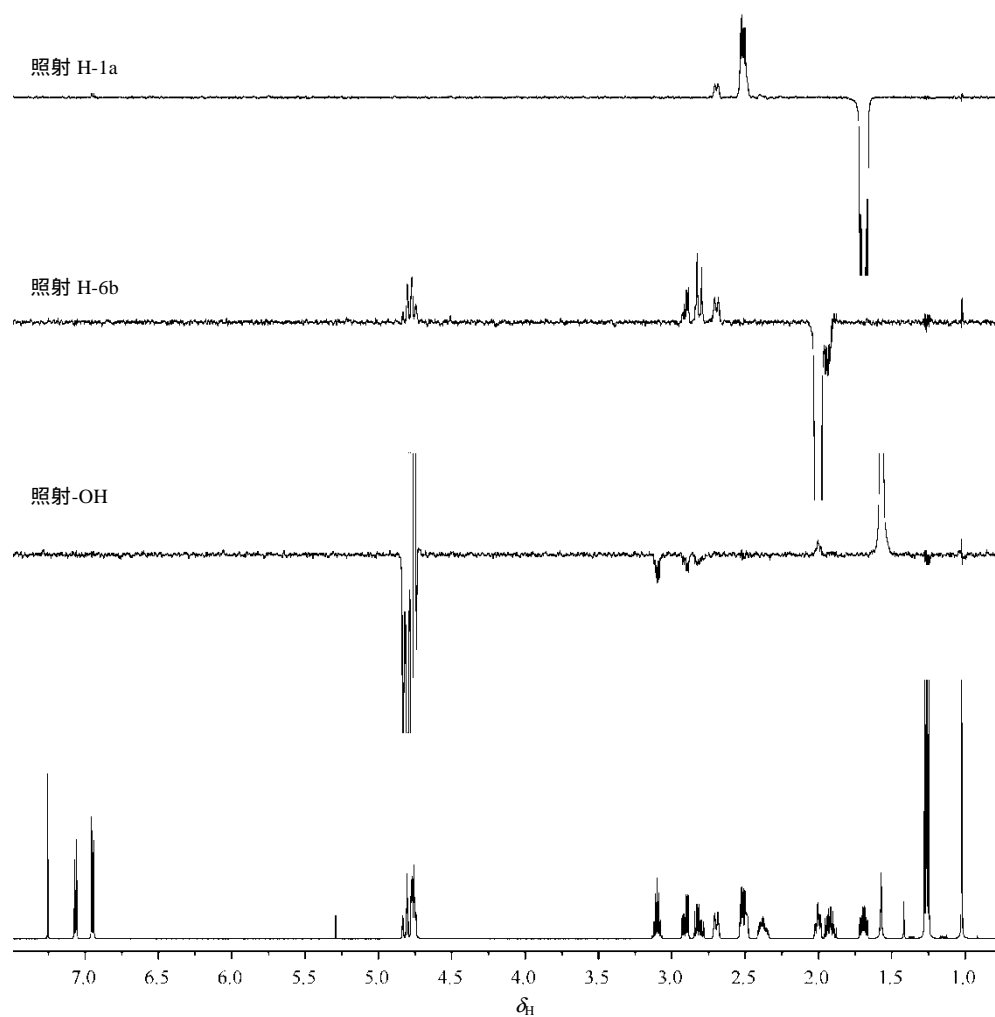


图 5 雷酚内酯的 NOE 谱

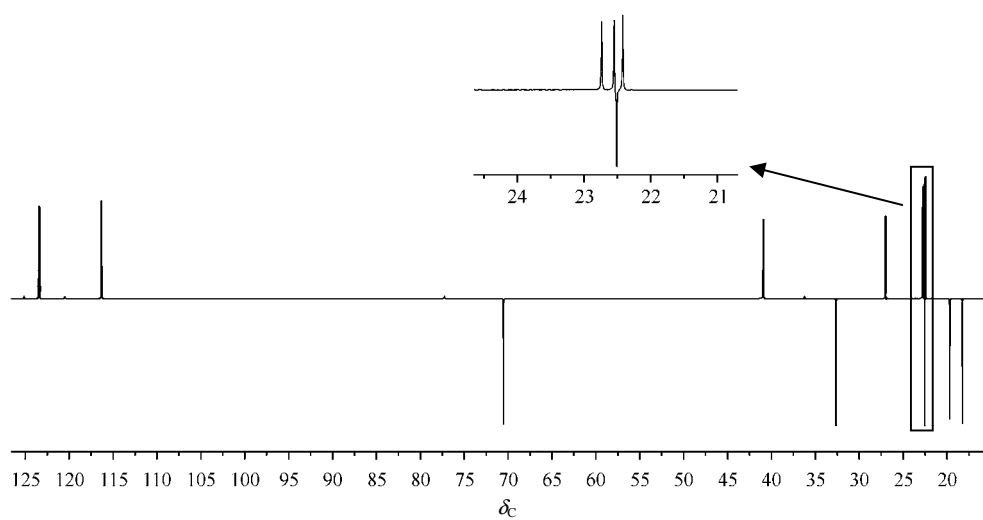
Fig. 5 NOE spectra of *Triptophenolide*

图 6 雷酚内酯的 DEPT-135 谱

Fig. 6 DEPT-135 spectra of *Triptophenolide*

在已发表的有关雷酚内酯结构鉴定的文献中, H-1a、H-1b、H-5 和 H-6b 质子信号文献^[1,4,5]未归属, H-2a、H-7a 和 H-7b 文献^[4,5]归属有误. C-2、C-4、C-5、C-6、C-7、C-8、C-9、C-13、C-15、C-18 和 C-19 碳原子信号文献^[4,5]归属有误. 雷酚内酯的 ^1H NMR、 ^1H - ^1H COSY 和 NOE 数据归属见表 1. ^{13}C NMR、DEPT、HSQC 和 HMBC 数据归属见表 2.

表 1 雷酚内酯 ^1H NMR 数据分析Table 1 ^1H NMR data analysis of *Triptophenolide*

Position	δ_{H}	$\delta_{\text{H}}^{[5]}$	Multiplicity	Proton number	^1H - ^1H COSY	NOE
1a [*]	1.70		m	1H	H-1b, H-2a, H-2b	H-1b, H-2b, H-5
1b [*]	2.52		m	1H	H-1a, H-2a	
2a ^{**}	2.40	2.53	m	1H	H-1a, H-1b, H-2b, H-19	
2b	2.52	2.53	m	1H	H-1a, H-2a, H-19	
5 [*]	2.70		m	1H	H-2a, H-2b, H-6a, H-6b, H-19	
6a [*]	1.90		m	1H	H-7a, H-7b, H-5	
6b [*]	2.01		m	1H	H-7a, H-7b, H-5	H-5, H-7a, H-7b, H-19
7a ^{**}	2.90	2.86	m	1H	H-6a, H-6b	
7b ^{**}	2.93	2.86	m	1H	H-6a, H-6b	
11	6.96	6.96	d, $J=8.0$ Hz	1H	H-12	
12	7.10	7.07	d, $J=8.0$ Hz	1H	H-11	
15	3.11	3.10	m	1H	H-16, H-17	
16, 17	1.27	1.27	d, $J=7.0$ Hz	6H	H-15	
19	4.80	4.80	m	2H	H-2a, H-2b, H-5	
20	1.03	1.03	s	3H		
-OH	4.80	4.80	m	1H		

*为文献^[5]中未明确归属的质子信号; **为文献^[5]中归属错误的质子信号

表 2 雷酚内酯 ^{13}C NMR 数据分析Table 2 ^{13}C NMR data analysis of *Triptophenolide*

Position	δ_{C}	$\delta_{\text{C}}^{[5]}$	DEPT	HSQC	HMBC
1	32.6	32.7	CH_2	+	H-20
2 ^{**}	18.2	19.7	CH_2	+	H-1a
3	162.9	162.7	C		H-1b, H-19
4 ^{**}	125.2	120.5	C		-
5 ^{**}	40.9	27.0	CH	+	H-1a, H-1b, H-6, H-7, H-20
6 ^{**}	19.6	22.7	CH_2	+	-
7 ^{**}	22.7	18.2	CH_2	+	H-5
8 ^{**}	120.5	143.9	C		H-11, -OH
9 ^{**}	143.9	130.9	C		H-1b, H-7, H-12, H-20
10	36.2	36.2	C		H-1a, H-1b, H-6, H-11, H-20
11	116.3	116.3	CH	+	-
12	123.4	123.4	CH	+	-
13 ^{**}	131.0	125.2	C		H-16, H-17, H-11, -OH
14	150.8	150.7	C		H-12, H-7
15 ^{**}	27.0	40.9	CH	+	H-12, H-16, H-17
16	22.5	22.5	CH_3	+	H-15
17	22.5	22.5	CH_3	+	H-15
18 ^{**}	174.2	70.5	C		H-2b
19 ^{**}	70.5	174.1	CH_2	+	-
20	22.4	22.3	CH_3	+	H-1a, H-1b, H-11

**为文献^[5]中归属错误的 ^{13}C NMR 信号

3 结论

通过 NMR 谱图分析确定了雷酚内酯对照品结构为图 1(a)所示,与文献^[1-3,5]报道结构一致。由 DEPT、¹H-¹³C HSQC 和 ¹H-¹³C HMBC 谱修正和补充了文献^[1,4,5]中雷酚内酯 ¹H 和 ¹³C NMR 数据。以上分析结果确证了雷酚内酯对照品的化学结构,为含雷酚内酯药物的质量控制奠定了基础。

参考文献:

- [1] DENG F X, ZHOU B N, SONG G Q, et al. Research from *Tripterygium Wilfordii Hook. F.* [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 1982, 17(2): 146-150.
邓福孝, 周炳南, 宋国强, 等. 雷公藤化学成分的研究 . 两种新二萜内酯——雷酚内酯甲醚和雷酚新内酯的分离及结构[J]. 药学学报, 1982, 17(2): 146-150.
- [2] XU B, DU J O. Study on polarographic catalytic wave of triptophenolide[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2005, 24(4): 49-52.
徐斌, 杜俊鸥. 雷酚内酯的极谱催化波研究[J]. 分析试验室, 2005, 24(4): 49-52.
- [3] FAN X W, LIU L H, WEI W X, et al. One stereoisomer of triptophenolide isolated from *Tripterygium Wilfordii Hook. F.* by high-speed countercurrent chromatography[J]. Natural Product Research and Development, 2011, 23(6): 1049-1051.
樊希望, 刘力恒, 韦万兴, 等. 高速逆流色谱分离雷公藤中的雷酚内酯异构体[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(6): 1049-1051.
- [4] YU D F, HU B H, CHEN G P, et al. Structure cture revision of *Triptophenolide*[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 1990, 25(12): 929-931.
于东防, 胡邦豪, 陈国平, 等. 雷酚内酯的结构修正[J]. 药学学报, 1990, 25(12): 929-931.
- [5] LIU Z Z, ZHAO R H, ZOU Z M. Chemical constituent root bark of *Tripterygium hypoglaucum*[J]. China J Chinese Materia Medica, 2011, 36(18): 2503-2506.
刘珍珍, 赵荣华, 邹忠梅. 昆明山海棠根皮化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(18): 2503-2506.
- [6] XUE J, JIA X B, CHEN Y, et al. Chemical constituents of *Tripterygium wilfordii Hook.f* and its toxicity[J]. China J Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2010, 25(5): 726-733.
薛璟, 贾晓斌, 陈彦, 等. 雷公藤化学成分及其毒性研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(5): 726-733.