

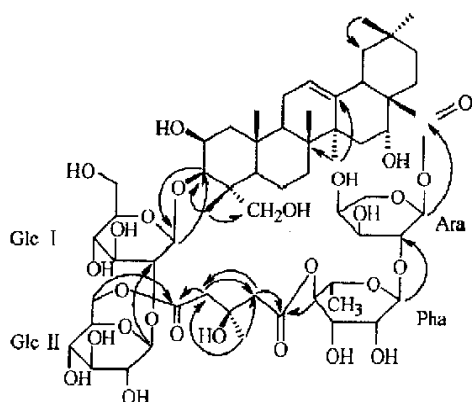


Fig. 1 Structure and main HMBC of compound I (H→C)

and the carbon signal at δ 84.8 due to the C-2 of Glc I, the anomeric proton signal at δ 5.86 (H-1 of Ara) and the carbon signal at δ 175.6 due to the C-28 of aglycone, the anomeric proton signal at δ 6.33 (H-1 of Rha) and the carbon signal at δ 76.4

due to the C-2 of Ara, the carbon signal at δ 171.6 (C-1 of HMG) and the proton signals at δ 4.63 and δ 4.11 (H-6a and 6b of Glc I), the carbon signal at δ 171.8 (C-5 of HMG) and the proton signal at δ 5.83 (H-4 of Rha). From these data, the structure of compound I was elucidated as dextrosyltubeimoside II.

References:

- [1] Kong F H, Zhu D Y, Xu R S, *et al.* Structural study of tubeimoside I, a constituent of Tu-Bei-Mu [J]. *Tetrahedron Lett*, 1986, 27(47): 5765-5768.
- [2] Kasai R, Miyakoshi M, Matsumoto K, *et al.* Tubeimoside I, a new cyclic bisdesmoside from Chinese cucurbitaceous folk medicine "Tu Bei Mu" [J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34(9): 3974-3977.
- [3] Kasai R, Miyakoshi M, Nie R L, *et al.* Saponins from *Bolbostemma paniculatum*: cyclic bisdesmosides, Tubeimosides I and II [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(5): 1439-1446.
- [4] Liu W Y, Zhang W D, Chen H S, *et al.* New triterpenoid saponins from bulbs of *Bolbostemma paniculatum* [J]. *Planta Med*, 2004, 70: 458-464.

三列凹顶藻中倍半萜成分的研究

孙杰^{1,3}, 韩丽君^{1*}, 史大水^{1,3}, 范晓¹, 王素娟², 李帅², 杨永春², 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 中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:目的 从三列凹顶藻 *Laurencia tristicha* 中寻找具有多样性结构的倍半萜化学成分, 供药理学筛选。方法 采用凝胶柱色谱、硅胶柱色谱、重结晶和高效液相色谱等方法进行分离; 借助包括一维和二维 NMR 等波谱方法和 X-单晶衍射鉴定化合物的结构; 用 MTT 法对得到的化合物进行细胞毒性评价。结果 分离得到 5 个倍半萜类化合物, 分别鉴定为海兔阿普里素 (aplysin, I)、海兔阿普里醇 (aplysinol, II)、去溴海兔阿普里醇 (debromoaplysinol, III)、凹顶藻聚苯 (laurebiphenyl, IV)、约翰斯顿醇 (johnstonol, V); 在人肿瘤细胞株 HCT-8、Bel-7402、BGC-823、A549 和 HeLa 模型上, 化合物 IV 对所有细胞株均显示毒性, 化合物 II 对 HeLa 细胞显示中等强度的细胞毒性, 其他化合物对所有细胞株均无明显毒性, IC_{50} 均大于 $10.0 \mu\text{g/mL}$ 。结论 化合物 I ~ V 均为首次从三列凹顶藻中得到, 化合物 II 对 HeLa 细胞具有中等强度的选择性细胞毒性, 化合物 IV 对所有细胞株均显示毒性。

关键词: 三列凹顶藻; 倍半萜; 细胞毒性

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)03-0329-04

Sesquiterpene components of *Laurencia tristicha*

SUN Jie^{1,3}, HAN Li-jun¹, SHI Da-yong^{1,3}, FAN Xiao¹, WANG Su-juan², LI Shuai²

YANG Yong-chun², SHI Jian-gong²

(1. Center of Bioengineering and Biotechnology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College,

收稿日期: 2005-05-03

基金项目: 国家 863 计划 (2004AA625030; 2001AA620503); 国家自然科学基金资助项目 (20432030); 中国科学院方向性创新 (KZCX3-SW-215); 青岛市科技发展计划项目 (04-2-NN-26)

作者简介: 孙杰 (1974-), 女, 山东省烟台市人, 在读博士生, 研究方向为海藻和海洋药物。E-mail: sunjie@ms.qdio.ac.cn

* 通讯作者 韩丽君 Tel: (0532) 2898641 (010) 83154789 E-mail: lijunhan2001@yahoo.com

Beijing 100050, China; 3. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Objective To search for sesquiterpene components with structural diversity from *Laurencia tristicha* to supply for pharmacological activity screen. **Methods** Compounds were isolated by means of column chromatography over normal phase silica gel and Sephadex LH-20, recrystallization, and HPLC. Structures were identified by spectroscopic methods including 1D and 2D NMR, IR, X-ray, and MS. Cytotoxicities of the purified compounds were evaluated by MTT method. **Results** Five sesquiterpenes, aplysin (I), aplysinol (II), debromoaplysinol (III), laurebiphenyl (IV), and johnstonol (V) have been isolated and identified. In the cytotoxic assay compound IV was active against human cancer cell lines, HCT-8, Bel-7402, BGC-823, A549, and HeLa with IC_{50} values of 1.77, 1.91, 1.22, 1.68, and 1.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Compound III showed cytotoxicity against HeLa with IC_{50} value of 3.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ while other compounds were inactive ($IC_{50} > 10 \mu\text{g}/\text{mL}$). **Conclusion** Compounds I—V are isolated from *L. tristicha* for the first time. Compound III shows moderate selective cytotoxicity against HeLa cell line and compound IV is cytotoxicity against several human cancer cell lines.

Key words: *Laurencia tristicha* Tseng, Chang, E. Z. et B. M. Xia; sesquiterpenes; cytotoxic activity

20 世纪 60 年代以来,国外对凹顶藻属 45 种海藻的化学成分进行了较广泛的研究,从中分离鉴定了大量结构新颖独特的无环、单环、双环和三环卤代倍半萜类化合物^[1~3],其中以溴和氯倍半萜为主,同时发现部分化合物具有显著的生理活性^[3,4]。三列凹顶藻 *Laurencia tristicha* Tseng, Chang, E. Z. et B. M. Xia 为凹顶藻属红藻,是我国的特有红藻品种之一,广泛分布于南海海域。为了从我国沿海海洋生物中寻找结构多样的天然产物,通过药理活性筛选从海洋生物代谢产物中寻找具有强活性的化合物,笔者对采自湛江硇洲岛海域的三列凹顶藻 *L. tristicha* 进行了化学成分研究,并对得到的单体化合物在多种人肿瘤细胞模型上进行了细胞毒活性测定评价,已从其 95% 乙醇提取物的醋酸乙酯部位中分离得到 5 个倍半萜类化合物,分别鉴定为 aplysin (I)、aplysinol (II)、debromoaplysinol (III)、laurebiphenyl (IV)、johnstonol (V);在人肿瘤细胞株 HCT-8、Bel-7402、BGC-823、A549 和 HeLa 模型上,发现化合物 IV 对所有细胞株均显示毒性, IC_{50} 分别为 1.77、1.91、1.22、1.68 和 1.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$,化合物 III 对 HeLa 细胞显示中等强度的细胞毒活性(IC_{50} 为 3.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$),其他化合物对所有细胞株均无明显毒性, IC_{50} 均大于 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1 材料、仪器及试剂

三列凹顶藻于 2003 年 4 月采自广东湛江硇洲岛海域,由中国科学院海洋研究所丁兰平博士鉴定,标本保存在中国科学院海洋研究所海藻化学研究室,标本编号为 2003052。

XT-4 显微熔点测定仪;Nicolet IMPAC-400

型傅里叶变换红外光谱仪;INOVA-500 核磁共振谱仪(TMS 为内标);Autospec Ultima-Tof 质谱仪;Waters 600 高效液相色谱仪(Waters 2487 检测器,Alltech 公司 Ecnosphere C_{18} 制备柱 250 mm $\times$ 22 mm, 10 μm);凝胶 Sephadex-LH20(Pharmacia 公司);柱色谱硅胶(160~200 目)和薄层色谱硅胶 GF₂₅₄(60 型)均为青岛海洋化工厂产品;所用溶剂均为分析纯或色谱纯,由北京化工厂生产。

2 提取和分离

海藻样品采集后,风干并粉碎(干重 10.5 g),用 95% 乙醇室温浸泡提取 3 次,每次 72 h,提取液合并后减压浓缩(温度低于 45 $^{\circ}\text{C}$),浓缩物混悬于蒸馏水中,用醋酸乙酯进行萃取。醋酸乙酯经减压浓缩后得到浸膏 550 g,将其进行正相硅胶柱色谱分离,以石油醚-醋酸乙酯梯度洗脱,薄层色谱检查合并相似组分。石油醚洗脱部分浓缩后有沉淀析出,滤过后在石油醚中反复重结晶得到大量化合物 I (45.7 g);石油醚-醋酸乙酯(50:1)洗脱部分浓缩后用石油醚重结晶得到化合物 II (8.3 g);石油醚-醋酸乙酯(30:1)洗脱部分经反复硅胶柱色谱、凝胶柱色谱和重结晶得到化合物 III (11.2 mg)和化合物 V (5.1 mg);石油醚-醋酸乙酯(20:1)洗脱部分经反复硅胶柱色谱和凝胶柱色谱分离,并经高效液相色谱进一步纯化得到化合物 IV (12.3 mg)。

3 结构鉴定

化合物 I: $C_{15}H_{19}BrO$;无色针晶(石油醚),mp 96~98 $^{\circ}\text{C}$;IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 2 952, 2 864, 1 577, 1 487, 1 460, 1 375, 1 308, 1 267, 1 234, 1 192, 1 007, 904, 881, 862;EI-MS m/z (%): 296 [$M(^{81}\text{Br})$]⁺ (100),

294 $[M(^{79}\text{Br})]^+$ (100), 281 $[M(^{81}\text{Br})-\text{CH}_3]^+$ (95), 279 $[M(^{79}\text{Br})-\text{CH}_3]^+$ (95), 239 (45), 237 (45), 200 $[M-\text{Br}]^+$ (35), 160 (16), 115 (12), 109 (10), 69 (5); $^1\text{H-NMR}$ (CD_3COCD_3 , 500 MHz) δ : 1.06 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-9), 1.04~1.08 (1H, m, H-2a), 1.27 (3H, s, H-10), 1.33 (3H, s, H-12), 1.60~1.68 (2H, m, H-2b, 1a), 1.81~1.86 (2H, m, H-1b, 3), 2.26 (3H, s, H-11), 6.60 (1H, s, H-5), 7.2 (1H, s, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3COCD_3 , 125 MHz) δ : 43.0 (C-1), 31.9 (C-2), 46.6 (C-3), 100.4 (C-3a), 159.4 (C-4a), 110.5 (C-5), 137.5 (C-6), 114.3 (C-7), 127.3 (C-8), 137.4 (C-8a), 55.1 (C-8b), 13.3 (C-9), 23.1 (C-10), 23.4 (C-11), 20.1 (C-12)。以上数据与文献报道^[5,6]一致, 因此确定化合物 I 为 aplysin。

化合物 II: $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{BrO}_2$; 白色片状晶体 (石油醚), mp 154~156 °C; EI-MS m/z (%): 312 $[M(^{81}\text{Br})]^+$ (100), 310 $[M(^{79}\text{Br})]^+$ (100), 297 $[M(^{81}\text{Br})-\text{CH}_3]^+$ (10), 295 $[M(^{79}\text{Br})]^+$ (10), 279 (60), 277 (35), 239 (75), 237 (75), 200 (25), 160 (35), 115 (25), 91 (12), 77 (12), 71 (10), 55 (10); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 1.08 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-9), 1.11~1.19 (1H, m, H-2a), 1.48 (3H, s, H-12), 1.60~1.70 (3H, m, H-3, 2b, 1a), 1.80~1.90 (2H, m, H-1b, -OH), 2.32 (3H, s, H-11), 3.71 (1H, d, $J=12.0$ Hz, H-10a), 3.85 (1H, d, $J=12.5$ Hz, H-10b), 6.66 (1H, s, H-5), 7.16 (1H, s, H-8); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 42.5 (C-1), 31.7 (C-2), 42.4 (C-3), 100.3 (C-3a), 158.4 (C-4a), 110.7 (C-5), 137.1 (C-6), 114.7 (C-7), 126.4 (C-8), 136.3 (C-8a), 54.6 (C-8b), 13.8 (C-9), 63.9 (C-10), 23.1 (C-11), 22.9 (C-12)。以上数据与文献报道^[7]一致, 因此确定化合物 II 为 aplysinol。文献报道^[6]中 C-4a 的化学位移为 δ 174.2, 认为有误。

化合物 III: $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$; 白色片状晶体 (石油醚), mp 103~105 °C; EI-MS m/z (%): 232 $[M]^+$ (90), 137 (35), 159 (100), 135 (10), 115 (15), 91 (14), 77 (14), 55 (14); $^1\text{H-NMR}$ (CD_3COCD_3 , 500 MHz) δ : 1.06 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-9), 1.04~1.11 (1H, m), 1.50 (3H, s, H-12), 1.65~1.71 (2H, m), 1.83~1.87 (1H, m), 2.11~2.16 (1H, m), 2.25 (3H, s, H-11), 3.69~3.79 (2H, m, H-10), 6.48 (1H, s, H-5), 6.63 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-7), 6.96 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-8), $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3COCD_3 ,

125 MHz) δ : 41.8 (C-1), 32.2 (C-2), 43.0 (C-3), 99.9 (C-3a), 160.5 (C-4a), 109.6 (C-5), 134.7 (C-6), 121.6 (C-7), 123.1 (C-8), 138.1 (C-8a), 55.0 (C-8b), 13.9 (C-9), 63.0 (C-10), 21.4 (C-11), 23.3 (C-12)。以上数据与文献报道^[6,7]一致, 因此确定化合物 III 为 debromoaplysinol。

化合物 IV: $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{O}_2$; 白色粉末, mp 232~233 °C; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3 494, 1 608, 1 502, 1 452, 1 394, 1 367, 1 257, 1 188, 1 155, EI-MS m/z (%): 430.8 $[M]^+$ (100), 415.8 $[M-\text{CH}_3]^+$ (45), 373.6 (15), 347.6 (15), 109.2 (15)。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 0.47 (2H, t, $J=3.5$ Hz, H-12a, 12'a), 0.59 (2H, d, $J=2.6$ Hz, H-12b, 12'b), 1.10 (2H, s, H-10, 10'), 1.28 (6H, s, H-15, 15'), 1.37 (2H, m, H-8a, 8'a), 1.45 (6H, s, H-14, 14'), 1.66 (2H, m, H-9a, 9'a), 1.95 (2H, m, H-9b, 9'b), 2.01 (6H, s, H-13, 13'), 2.12 (2H, m, H-8b, 8b'), 5.16 (2H, s, H-OH), 6.63 (2H, s, H-2, 2'), 7.23 (1H, s, H-5), 7.25 (1H, s, H-5'), $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 152.6 (C-1, 1'), 117.6 (C-2, 2'), 134.8 (C-3, 3'), 133.4 (C-4, 4'), 130.8 (C-5, 5'), 130.9 (C-6, 6'), 47.9 (C-7, 7'), 36.3 (C-8, 8'), 25.3 (C-9, 9'), 24.3 (C-10, 10'), 29.6 (C-11, 11'), 16.2 (C-12, 12'), 19.5 (C-13, 13'), 23.8 (C-14, 14'), 18.8 (C-15, 15'), 以上数据与文献报道^[8]一致, 因此确定化合物 IV 为 laurebiphenyl。

化合物 V: $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{Br}_2\text{ClO}_3$; 白色颗粒状晶体 (丙酮), mp 178 °C; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3 512, 1 452, 1 383, 1 238, 1 109, 1 082, 1 014, 920, 正离子模式 ESI-MS 给出准分子离子峰簇 m/z : 443/445/447/449 (3 : 7 : 5 : 1) ($M^+ + H$), $^1\text{H-NMR}$ (CD_3COCD_3 , 500 MHz) δ : 1.21 (3H, s, H-13), 1.32 (3H, s, H-14), 1.48 (3H, s, H-15), 1.79 (3H, s, H-7), 2.33 (2H, m, H-6), 2.47 (2H, m, H-3), 3.2 (1H, s, H-10), 3.97 (1H, d, $J=5.5$ Hz, H-9), 4.32 (1H, dd, $J=11.0$, 4.5 Hz, H-1), 4.59 (1H, dd, $J=13.0$, 5.0 Hz, H-4), 5.02 (1H, d, $J=5.0$ Hz, H-OH), $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3COCD_3 , 125 MHz) δ : 60.1 (C-1), 70.8 (C-2), 46.1 (C-3), 75.2 (C-4), 51.7 (C-5), 34.5 (C-6), 31.4 (C-7), 113.0 (C-8), 75.3 (C-9), 62.0 (C-10), 62.1 (C-11), 50.3 (C-12), 18.7 (C-13), 25.2 (C-14), 21.8 (C-15)。经 2D-NMR 分析证明其平面结构与文献报道中仅由 X-射线单晶衍射确定的 john-

stonol 相同^[9],最后通过 X-射线单晶衍射确证了其结构,晶体结构投影图见图 1。实验所用晶体呈无色透明块状,大小为 0.1 mm×0.2 mm×0.2 mm,属正交晶系,空间群为 $P2_12_12_1$,晶胞参数: $a=0.9458(1)$, $b=1.3161(1)$, $c=1.3481(1)$ nm。晶胞体积 $V=167.81(1)$ nm³,晶胞内分子数 $Z=4$ 。用 MAC DIP-2030K 面扫描仪收集衍射强度数据,MoK α 辐射,石墨单色器。获得独立衍射点 2 055 个,可观察点 ($|F|^2 \geq 3\sigma|F|^2$) 为 1 665 个。用直接法解析结构,从 E 图上获得 20 个非氢原子位置,迭使用最小二乘法法和差值 Fourier 法获得其他非氢原子位置,使用最小二乘法修正结构参数和判别原子种类,使用几何计算法和差值 Fourier 法获得全部氢原子位置,最终可靠因子 $R_f=0.041$, $R_w=0.043$ ($w=1/\sigma|F|^2$)。

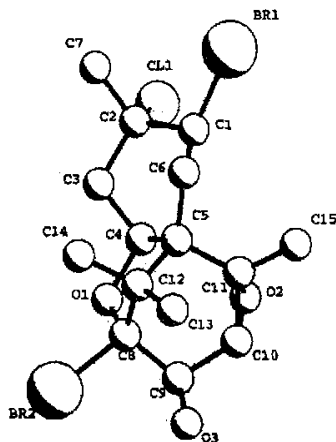


图 1 化合物 V 的 X-射线单晶衍射图
Fig. 1 Single-crystal X-ray diffraction analysis of compound V

4 人肿瘤细胞毒活性测试

用 MTT 法^[10]对上述 5 个化合物在 HCT-8、

Bel-7402、BGC-823、A549 和 HeLa 细胞上进行了人肿瘤细胞毒活性测试,结果表明发现化合物 N 对所有测试细胞均具有毒性,IC₅₀分别为 1.77、1.91、1.22、1.68 和 1.61 $\mu\text{g/mL}$ 。化合物 III 对 HeLa 细胞显示中等强度的细胞毒活性(IC₅₀为 3.6 $\mu\text{g/mL}$),其它化合物对所有细胞株均无明显毒性(IC₅₀>10.0 $\mu\text{g/mL}$)。

References:

- [1] Ayyad S N, Jakupovic J, Abdel-Mogib M. A sesquiterpene ether from *Laurencia obtusa* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 36: 1077-1078.
- [2] Suzuki M, Daitoh M, Vairappan C S, et al. Novel halogenated metabolites from the Malaysian *Laurencia pannosa* [J]. *J Nat Prod*, 2001, 64: 597-602.
- [3] Iliopoulou D, Roussis V, Pannecouque C, et al. Halogenated sesquiterpenes from the Malaysian *Laurencia pannosa* [J]. *Tetrahedron*, 2002, 58: 6749-6755.
- [4] Vairappan C S, Suzuki M, Ave T, et al. Halogenated metabolites with antibacterial activity from the Okinawan *Laurencia* species [J]. *Phytochemistry*, 2001, 58: 517-523.
- [5] Laronze Y, Boukili R E, Patigny D, et al. The rearrangement of some cyclopentanone-aryloximes; synthesis of ($\pm$)-aplysins, ($\pm$)-filiformin and of their debromo analogues [J]. *Tetrahedron*, 1991, 47(48): 10003-10014.
- [6] Harrowven D C, Lucas M C, Howes P D. The synthesis of natural product family: from debromoisolaurineterol to aplysins [J]. *Tetrahedron*, 2001, 57: 791-804.
- [7] Suzuki M, Kurosawa E. Halogenated and non-halogenated aromatic sesquiterpenes from the red algae *Laurencia okamuraiyamada* [J]. *Bull Chem Soc Jpn*, 1979, 52(11): 3352-3354.
- [8] Shizuri Y, Yamada K. Laurebiphenyl, a dimeric sesquiterpene of the cyclolaurane-type from the red alga *Laurencia nidifica* [J]. *Phytochemistry*, 1985, 24(6): 1385-1386.
- [9] Sims J J, William F. Marine natural product III johnstonoi, an unusual halogenated epoxide from the red alga *Laurencia johnstonii* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1972, (3): 195-198.
- [10] Carmichael J, Degraff W G, Gazdar A F, et al. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing [J]. *Cancer Res*, 1987, 47(4): 936-942.

新型含异噁唑的甘草次酸酰胺类衍生物的合成研究

汤立达^{1,2},王建武^{1*},张士俊²,雍建平³,刘利军³,王玉丽²,吴楠²,徐为人²

(1. 山东大学化学与化工学院,山东 济南 250100; 2. 天津药物研究院,天津 300193;

3. 宁夏大学化学学院,宁夏 银川 750021)

摘要:目的 合成甘草次酸酰胺的异噁唑衍生物,寻找活性好的抗炎药物。方法 以甘草次酸为原料,与 3-取代苯基-5-异噁唑甲胺进行偶联,合成了 6 个新型甘草次酸酰胺类衍生物,采用 IR、¹H-NMR、¹³C-NMR、MS 等方法确

收稿日期:2005-10-20

作者简介:汤立达(1963—),男,福建人,山东大学博士生,天津药物研究院研究员,主要从事新药的研究和评价工作。

* 通讯作者 王建武 E-mail: jwwang@sdu.edu.cn