

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

化合物	淋转抑制率/%		
	80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
I	86.3 Δ	83.1 Δ	42.3 Δ
II	89.3 Δ	89.3 Δ	42.9 Δ
III	84.3 Δ	85.8 Δ	83.3 Δ
IV	74.3 Δ	22.8 Δ	9.4 Δ
V	62.5 Δ	48.3 Δ	20.3 Δ
VI	82.1 Δ	54.6 Δ	3.5

地塞米松(50 $\mu\text{g/mL}$)抑制率=74.8%

与对照组比较: $\Delta P<0.01$ ($n=6$)

Inhibitory rate of Dexamethasone (50 $\mu\text{g/mL}$)=74.8%

$\Delta P<0.01$ vs control group ($n=6$)

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Li K H, Duan H Q, Kazuyoshi K, et al. Terpenoids from *Tripterigium 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 *Tripterigium hypoglaucum* [J]. *Phytochemistry*, 2000, 53(6): 715-722.
- [6] Duan H Q, Takaishi Y, Momota H, et al. Immunosuppressive diterpenoids from *Tripterigium 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 *Tripterigium 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 *Tripterigium 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* (现代药理学实验方法) [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]环己烷-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(II)、海兔阿普里素(III)、6 α -羟基-紫罗-4,7-二烯-3,9-二酮(IV)、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(VI)。结论 所有化合物均为首次从本属植物中分得, 其中 IV、V 为首次从绿藻中分离得到, VI 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

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

(1. Center of Bioengineering and Technology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Department of Natural Products, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Key words: green alga; *Chaetomorpha basiretorsa* Setchell; sesquiterpene; norisoprenoid

海洋生物生活在特殊的海水环境中,与陆生环境迥异;许多海洋生物代谢产物具有新颖独特的化学结构和生源途径,同时具有显著的生物活性。作为海洋初级生产力的海藻,日渐受到药物化学研究者的重视。基根硬毛藻 *Chaetomorpha basiretorsa* Setchell 属绿藻门 (*Chlorophyta*)、刚毛藻目 (*Cladophorales*)、刚毛藻科 (*Cladophoraceae*),主要分布于热带和亚热带海域低潮间带,我国南海海域分布普遍^[1]。尚未见其化学成分研究的相关报道,仅 Aliya^[2]等曾从卡拉奇海域的同属硬毛藻 *C. antennina* (Bory) Kütz. 中分离得到2个链状二萜。笔者对采自我国南海海域的基根硬毛藻化学成分进行了初步研究,从中分离得到3个倍半萜类化合物和3个降碳倍半萜类化合物,分别鉴定为2-(1,2-二甲基-双环[3.1.0]环己烷-2-基)-5-甲基-苯酚 (debro-molaurinterol, I)、4-溴-2-(1,2-二甲基-双环[3.1.0]环己烷-2-基)-5-甲基-苯酚 (异枝凹顶藻酚 laurinterol, II)、海兔阿普里素 (aplysin, III)、6 α -羟基-紫罗-4,7-二烯-3,9-二酮 (6 α -hydroxy-4,7-megastigmadien-3,9-dione, IV)、3 β -羟基-5 α ,6 α -环氧- β -紫罗烯酮 (3 β -hydroxy-5 α ,6 α -epoxy-7-megastigmene-9-one, V)、(3*R*,6*R*,7*E*)-3 α -羟基-紫罗-4,7-二烯-9-酮 [(3*R*,6*R*,7*E*)-3-hydroxy-4,7-megastigmadien-9-one, VI]。所有化合物均为首次从本属植物中分离得到,其中IV和V为首次从绿藻中分离得到,VI为首次从海洋生物中分离得到。所有单体化合物在人肿瘤细胞 KB、Bel-7402、PC-3M、Ketr 3 和 MCF-7 模型上均未表现出细胞毒活性 (IC₅₀>10 μ g/mL)。

1 仪器和材料

Boetius 显微熔点测定仪 (温度未校正); Nicolet impact-400 型傅里叶变换红外光谱仪; Inova 500M 核磁共振仪; Autospec Ultima-Tof 质谱仪; Waters 600 高效液相色谱仪 (Alltech 公司 Ecnosphere C₁₈ 制备柱, 250 mm $\times$ 22 mm, 10 μ m, Waters 2478 型检测器); Sephadex LH-20 凝胶为 Pharmacia 公司产品; 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。

基根硬毛藻 *Chaetomorpha basiretorsa* Setchell

万方数据

采自广东省湛江市硇洲岛,由中国科学院海洋研究所夏邦美教授鉴定,标本现存于中国科学院海洋研究所海藻化学研究室,标本号为 2003050。

2 提取与分离

风干的基根硬毛藻样品 (14.3 kg) 粉碎后用 95% 乙醇提取,提取液减压浓缩得膏状物 574 g; 提取物用蒸馏水悬浮后,用醋酸乙酯萃取,醋酸乙酯相减压浓缩得浸膏 370 g。醋酸乙酯萃取部位进行硅胶柱色谱,以石油醚-醋酸乙酯梯度洗脱,薄层色谱检查,合并成分相似的洗脱液,减压浓缩得 7 个馏分 A₁~A₇。A₂ [石油醚-醋酸乙酯 (50:1) 洗脱部分] 经过碱性氧化铝色谱 (丙酮)、Sephadex LH-20 色谱 [石油醚-氯仿-甲醇 (5:5:1)]、硅胶色谱 [石油醚-丙酮 (40:1)] 及 HPLC (95% 甲醇) 纯化得到化合物 I (31 mg)、II (38 mg)、III (78 mg); A₄ [石油醚-醋酸乙酯 (5:1) 洗脱部分] 经过 Sephadex LH-20 色谱 [石油醚-氯仿-甲醇 (5:5:1)]、硅胶色谱 [石油醚-丙酮 (8:1)] 及 HPLC (65% 甲醇) 纯化得到化合物 IV (25 mg)、V (14 mg) 和 VI (15 mg)。

3 结构鉴定

化合物 I: 无色油状物, C₁₅H₂₀O, [α]_D²⁰-12.2° (c 0.15, CHCl₃)。EI-MS *m/z* (%): 216 [M]⁺ (62), 201 (100), 187 (14), 175 (40), 160 (29), 159 (38), 133 (17), 148 (85), 121 (26), 115 (10), 91 (11), 85 (62), 83 (98), 77 (8), 57 (18), 47 (21), 44 (18)。IR_{film} (cm⁻¹): 3 521 (O-H), 2 995, 2 954, 2 972, 2 864 (C-H), 1 616, 1 576, 1 516, 1 452, 1 414 (苯环), 1 369, 1 294, 1 232, 1 186, 1 169, 1 126, 1 059, 1 022, 951, 854, 814。¹H-NMR (CD₃COCD₃, 500 MHz) δ : 0.47 (2H, d, *J*=5.5 Hz, H-6'a, 6'b), 1.05 (1H, dd, *J*=12.0, 5.5 Hz, H-3'), 1.21 (1H, dd, *J*=12.0, 8.0 Hz, H-5'a), 1.30 (3H, s, H₃-2'), 1.42 (3H, s, H₃-1'), 1.58 (1H, dd, *J*=12.0, 7.5 Hz, H-4'a), 1.91 (1H, ddd, *J*=12.0, 7.5, 5.5 Hz, H-4'b), 2.19 (3H, s, H₃-3'), 2.31 (1H, dd, *J*=12.0, 8.0 Hz, H-5'b), 6.57 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-4), 6.64 (1H, s, H-6), 7.36 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-3), 7.93 (1H, brs, OH-1); ¹³C-NMR (CD₃COCD₃, 125 MHz) δ : 16.7 (t, C-6'), 19.2 (q, CH₃-2'), 20.8 (q, CH₃-5), 23.0 (q, CH₃-

1'), 24.4 (d, C-3'), 25.8 (t, C-4'), 30.5 (d, C-2'), 36.0 (t, C-5'), 48.8 (s, C-1'), 117.6 (d, C-6), 120.3 (d, C-4), 128.8 (d, C-3), 132.6 (s, C-2), 136.6 (s, C-5), 156.7 (s, C-1)。以上数据与文献中 2-(1,2-二甲基-双环[3.1.0]环己烷-2-基)-5-甲基-苯酚的数据一致^[3]。

化合物 I: 白色针晶, mp 54 ~ 55 °C, C₁₅H₂₀OBr, $[\alpha]_D^{20} + 13.3^\circ$ (c 0.15, CHCl₃)。EI-MS、IR、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献报道 4-溴-2-(1,2-二甲基-双环[3.1.0]环己烷-2-基)-5-甲基-苯酚的数据一致^[3]。

化合物 II: 白色针晶, mp 85 ~ 86 °C, C₁₅H₁₉OBr, $[\alpha]_D^{20} + 83.2^\circ$ (c 0.15, CHCl₃)。EI-MS、IR、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献报道海兔阿普里素的数据一致^[3~5]。

化合物 N: 无色油状物, C₁₃H₁₈O₃, $[\alpha]_D^{20} + 160^\circ$ (c 0.15, MeOH)。EI-MS m/z (%): 222[M]⁺ (30), 156(80), 136(30), 106(55), 43(75)。IR_{max}^{film} (cm⁻¹): 3 450, 2 966, 2 875, 1 765, 1 667, 1 427, 1 365, 1 254, 1 128, 991, 916。¹H-NMR (CD₃COCD₃, 500 MHz) δ : 1.02 (3H, s, H₃-12), 1.07 (3H, s, H₃-11), 1.87 (3H, s, H₃-13), 2.22 (1H, d, $J=17$ Hz, H-2a), 2.27 (3H, s, H₃-10), 2.58 (1H, dd, $J=17$ Hz, H-2b), 4.52 (1H, s, OH-6), 5.85 (1H, s, H-4), 6.41 (1H, d, $J=11$ Hz, H-8), 7.02 (1H, d, $J=11$ Hz, H-7); ¹³C-NMR (CD₃COCD₃, 125 MHz) δ : 18.8 (s, CH₃-5), 23.4 (q, CH₃-12), 24.6 (q, CH₃-10), 27.4 (q, CH₃-11), 42.0 (s, C-1), 50.2 (t, C-2), 79.6 (d, C-6), 127.9 (d, C-4), 128.0 (d, C-8), 144.4 (d, C-7), 146.9 (s, C-5), 196.9 (s, C-3), 197.8 (s, C-9)。以上数据与文献报道 6 α -羟基-紫罗-4,7-二烯-3,9-二酮的数据一致^[6~9]。

化合物 V: 无色油状物, C₁₃H₂₀O₃, EI-MS、IR、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献报道 3 β -羟基-5 α , 6 α -环氧- β -紫罗烯酮的数据一致^[9~12]。

化合物 VI: 淡黄色油状物, C₁₃H₂₀O₂, EI-MS、IR、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献报道 (3R, 6R, 7E)-3 α -羟基-紫罗-4,7-二烯-9-酮的数据一致^[13,14]。

4 人肿瘤细胞毒活性筛选

用 MTT 法^[15]对 6 个化合物在人肿瘤细胞 KB、Bel-7402、PC-3M、Ketr 3 和 MCF-7 上进行细胞毒

活性测试,结果表明均无活性(IC₅₀>10 μ g/mL)。

References:

- [1] Tseng C K. *Common Seaweeds of China* (中国海藻) [M]. Beijing: Science Press, 1983.
- [2] Aliya R, Shameel M. Phycochemical evaluation of four coenocytic green seaweeds from the coast of Karachi [J]. *Pak J Mar Biol*, 1999, 5(1): 65-76.
- [3] Irie T, Suzuki M, Kurosawa E, et al. Laurinterol, debromolaurinterol and isolaurinterol, constituents of *Laurencia intermedia* Yamada [J]. *Tetrahedron*, 1970, 26: 3271-3277.
- [4] Nemoto H, Nagamochi M, Ishibashi H, et al. A remarkable substituents effect on the enantioselectivity of tandem asymmetric epoxidation and enantiospecific ring expansion of cyclopropylidene alcohols; a new enantiocontrol-controlled synthesis of (-)-debromopaplysin and (-)-aplysin [J]. *J Org Chem*, 1994, 59: 74-79.
- [5] Laronze J Y, Rachida E B and Dominique P. The rearrangement of some cyclopentanone-aryloximes; synthesis of ($\pm$)-aplysin, ($\pm$)-filiformin and of their debromo analogues [J]. *Tetrahedron*, 1991, 47(48): 10003-10014.
- [6] Netting A G, Milborrow B B, Dufield A M. Determination of abscisic acid in *Calceolarius haemastoma* leaves using gas chromatography/mass spectrometry and deuterated internal standards [J]. *Phytochemistry*, 1982, 21(2): 385-389.
- [7] Kato T, Tsunakawa M, Sasaki N, et al. Growth and germination inhibitors in rice husks [J]. *Phytochemistry*, 1977, 16: 45-48.
- [8] Mpro K. Synthesis of the optically active grasshopper ketone and dehydrovomifoliol as a synthetic support for the revised absolute configuration of (+)-abscisic acid [J]. *Tetrahedron*, 1974, 30: 1065-1072.
- [9] Mitsuo T, Masaki A, Nobukatsu K, et al. The occurrence of vomifoliol, dehydrovomifoliol and dihydrophaseic acid in the hoots of 'Kidney bean' [J]. *Chem Lett*, 1973(3): 245-248.
- [10] Mori K. Synthesis of the optically active dehydrovomifoliol. A synthetic proof of the absolute configuration of (+)-abscisic acid [J]. *Tetrahedron Lett*, 1973, 14(28): 2635.
- [11] Taylor H F, Burden R S. Identification of plant growth inhibitors produced by photolysis of violaxanthin [J]. *Phytochemistry*, 1970, 9: 2217-2223.
- [12] Duan H, Takaishi Y, Momota H, et al. Immunosuppressive constituents from *Saussurea medusa* [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59(1): 85-90.
- [13] Machida K, Kikuchi M. Norisoprenoids from *Viburnum dilatatum* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(5): 1333-1336.
- [14] Hartman D A, Pontones M E, Kloss V F, et al. Models of retinoid metabolism; microbial biotransformation of α -ionone and β -ionone [J]. *J Nat Prod*, 1988, 51(5): 947-953.
- [15] 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.