

乌绿草虫软珊瑚的次生代谢物研究 (II)*

何细新^{1,2}, 闫素君¹, 苏镜娱¹, 曾陇梅¹

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;

2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510405)

摘要: 从中国南海海域采集的乌绿草虫软珊瑚 *Cespitularia cocerulea* May 中分离到 3 个化合物。经波谱分析, 确定它们的化学结构为: (2S, 3R, 2R, 4E, 8E)-N-(2-羟基正二十碳酰基)-9-甲基-4, 8-二烯-1, 3-二羟基-2-氨基十九烷 (1), $\Delta^{4,5}(E), \Delta^{8,9}(E)$ 鞘胺醇正十六碳酰胺 (2) 和麦角甾-3 β , 5 α , 6 β 三醇 (3), 其中 1 为新化合物。

关键词: 乌绿草虫软珊瑚 *Cespitularia cocerulea* May; 软珊瑚; 神经酰胺

中图分类号: O629.421 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579(2007)04-0116-03

海洋天然产物因其具有新颖的结构和独特的生理活性而受到广泛的关注。对于海洋软珊瑚的化学成分研究一直是海洋天然产物研究中非常活跃的领域。*Cespitularia* 属软珊瑚化学成分研究始于 20 世纪 70 年代中后期^[1-2]。30 年来, 从中发现了大量具有抗肿瘤活性的萜类化合物。最近报道, 从 *Cespitularia* 属软珊瑚中发现了一些新颖碳骨架的非萜类化合物^[3-4]。另外, 作者曾从采自海南岛三亚附近海域的乌绿草虫软珊瑚 *Cespitularia cocerulea* May 中分离到甾体皂苷^[5], 并首次发现它对人体鼻咽癌 (Cne2) 和肝癌 (Hep-G2) 细胞有抑制作用^[6], IC_{50} 依次为 14.3×10^{-6} 、 27.9×10^{-6} g/mL。对乌绿草虫软珊瑚的进一步研究, 又从中分到 3 个化合物。经结构分析, 将这些化合物的化学结构定为: (2S, 3R, 2R, 4E, 8E)-N-(2-羟基正二十碳酰基)-9-甲基-4, 8-二烯-1, 3-二羟基-2-氨基十九烷 (1), $\Delta^{4,5}(E), \Delta^{8,9}(E)$ 鞘胺醇正十六碳酰胺 (2) 和麦角甾-3 β , 5 α , 6 β 三醇 (3), 结构如图 1, 其中 1 为新化合物。

1 试验部分

1.1 样品 乌绿草虫软珊瑚 *Cespitularia cocerulea* May 于 1998 年 6 月采自南中国海海域。种属由中国科学院南海海洋研究所李楚璞教授鉴定。样品编号为 98-SY-24 标本储藏于中山大学化学与化学工程学院天然有机化学研究室。

1.2 仪器与试剂 国产 5X 型显微熔点仪 (温度未经校正); EQUINOX-55 红外光谱仪 (KBr 压片); Varian Unity NOVA 500 MHz 核磁共振仪, 1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱的工作频率分别为: 500 MHz

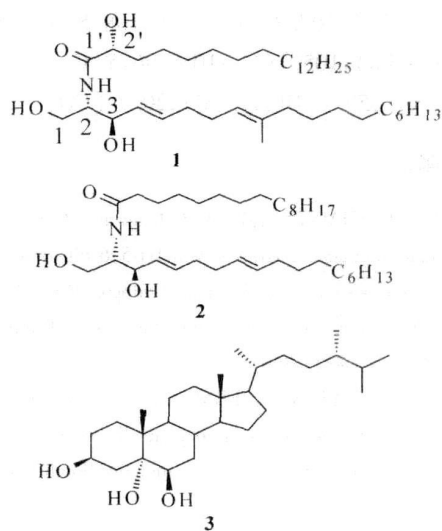


图 1 化合物 1, 2, 3 结构

Fig 1 Structures of compounds 1, 2 and 3

和 125 MHz, TMS 作内标; VG-ZAB-HS 质谱仪; 柱层析硅胶 (200~300 目, 60H 型), 青岛海洋化工厂产; 所用试剂均为分析纯。

1.3 提取与分离 将乌绿草虫软珊瑚 (干质量 170 g) 切碎, 用 $\varphi=95\%$ 的乙醇室温浸提 3 次。减压浓缩提取液, 得棕褐色浓缩物约 60 g。依次用乙酸乙酯, 正丁醇萃取。乙酸乙酯提取相 (40 g) 用 200~300 目层析硅胶进行柱层析分离, 以石油醚/乙酸乙酯为梯度洗脱剂。从 $\varphi=30\%$ 的乙酸乙酯洗脱液中得 1 (25 mg); 从 $\varphi=40\%$ 的乙酸乙酯洗脱液中得 2 (60 mg); 从 $\varphi=60\%$ 的乙酸乙酯洗脱液中得 3 (8 mg)。

* 收稿日期: 2007-02-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29932030); 国家“863”计划资助项目 (2001AAA620403)

作者简介: 何细新 (1972 年生), 男, 博士; 通讯联系人: 曾陇梅, E-mail: ceszn@mail.sysu.edu.cn

1.4 物理常数与波谱数据

化合物 **1** 白色无定型固体, θ_{mp} 67 ~ 69 °C (丙酮), IR(KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3 352 3 274 2 961, 2 851, 1 650 1 538 1 467 1 077 1 052 967 721; $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃/TMS) δ 7.31 (1H, br d, $J=10.0$ Hz, N—H), 5.76 (1H, dt, $J=15.5$ 5.0 Hz, H—5), 5.50 (1H, $J=15.0$ 6.0 Hz, H—4), 5.09 (1H, brs, H—8), 4.25 (1H, br d, $J=5.0$ Hz, H—3), 4.10 (1H, dd, $J=11.5$ 3.5 Hz, H—2), 3.91 (1H, m, H—2), 3.86 (1H, br dd, $J=11.5$ 3.5 Hz, H—1), 3.75 (1H, m, 1—H), 2.08 (2H, m, H—7), 2.08 (2H, m, H—6), 1.93 (m, 2H), 1.79 (m, 2H), 1.62 (2H, m), 1.59 (3H, s), 1.26 (m, 多个 H), 0.88 (6H, t, $J=7.0$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃/TMS) δ 175.5 (s), 136.6 (s), 134.1 (d), 128.6 (d), 123.1 (d), 74.2 (d), 72.5 (d), 62.1 (t), 54.5 (d), 39.7 (t), 34.7 (t), 32.5 (t), 32.1 (t), 31.91 (2C, t), 29.7 (nC, t), 29.61 (nC, t), 29.57 (nC, t), 29.46 (nC, t), 29.35 (nC, t), 28.0 (t), 27.5 (t), 25.2 (t), 22.7 (2C, t), 16.0 (q), 14.1 (2C, q); FABMS m/z 636 [M+H]⁺.

化合物 **2** 白色无定形固体, θ_{mp} 89 ~ 91 °C (丙酮), IR(KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3 295 3 080 2 961, 2 920 2 851, 1 640 1 547 1 467 1 377 1 351, 1 284 1 204 1 172 1 041 967 895 721; $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃/TMS) δ 6.23 (1H, br d, $J=7.5$ Hz, N—H), 5.79 (1H, dt, $J=15.5$ 5.0 Hz, H—5), 5.54 (1H, dd, $J=15.5$ 6.5 Hz, H—4), 5.43 (1H, dt, $J=15.5$ 6.5 Hz, H—9), 5.36 (1H, dt, $J=15.5$ 6.5 Hz, H—8), 4.32 (1H, br d, $J=5.0$ Hz, H—3), 3.96 (1H, dd, $J=11.5$ 3.5 Hz, H—1), 3.91 (m, 1H, H—2), 3.71 (1H, dd, $J=11.5$ 3.5 Hz, H—1), 2.23 (2H, m, 2'—H), 2.12 (2H, m, 6—H), 2.07 (2H, m, 7—H), 1.97 (2H, m, 10—H), 1.63 (2H, m, 3—H), 1.26 (多个 H, m), 0.88 (6H, t, $J=7.0$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃/TMS) δ 173.9 (s), 133.6 (d), 131.4 (d), 129.2 (d), 128.9 (d), 74.7 (d), 62.5 (t), 54.5 (d), 36.8 (t), 32.6 (t), 32.3 (t), 32.1 (t), 31.91 (2C, t), 29.69 (nC, t), 29.65 (nC, t), 29.50 (nC, t), 29.36 (nC, t), 29.29 (nC, t), 29.21 (t), 25.8 (t), 22.7 (2C, t), 14.0 (2C, q).

化合物 **3** 无色片状结晶, θ_{mp} 246 ~ 248 °C (甲醇), $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃/TMS) δ 4.11 (1H, brs, 6 α —H), 3.55 (1H, m, 3 α —H), 1.18 (3H, s, 19—Me), 0.90 (3H, d, $J=6.5$ Hz, 21—Me), 0.85 (3H, d, $J=7.0$ Hz, 28—Me), 0.78 (3H, d, $J=4.0$ Hz, 26—Me), 0.76 (3H, d, $J=4.0$ Hz, 27—Me), 0.67 (3H, s,

18—Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃) δ 30.8 (t), 32.4 (t), 67.6 (d), 40.7 (t), 76.0 (s), 76.0 (d), 34.5 (t), 30.0 (d), 45.8 (d), 38.3 (s), 21.1 (t), 40.0 (t), 42.7 (s), 56.0 (d), 24.1 (t), 28.2 (t), 55.8 (d), 12.2 (q), 16.9 (q), 36.2 (d), 18.9 (q), 33.6 (t), 30.6 (t), 39.0 (d), 31.4 (d), 20.5 (q), 17.6 (q), 15.5 (q), FABMS m/z 435 [M+H]⁺.

2 结果与讨论

化合物 **1** IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 在 1 650 1 538 cm^{-1} 处有特征吸收峰, 结合 $^1\text{H NMR}$ δ 7.31 (1H, d, $J=10.0$ Hz, NH) 和 $^{13}\text{C NMR}$ δ 175.5 (s) 表明分子中存在酰胺片段 —CO—NH—。 $^{13}\text{C NMR}$ δ 74.2 (d), 72.5 (d), 62.1 (t) 表明分子中存在一个伯羟基和两个仲羟基, 并具有典型的神经鞘胺醇的结构特征。 $^1\text{H NMR}$ δ 5.76 (1H, dt, $J=15.5$ 5.0 Hz), 5.50 (1H, dd, $J=15.0$ 6.0 Hz), 5.09 (1H, brs) 有 3 个氢信号, 结合 $^{13}\text{C NMR}$ δ 136.6 (s), 134.1 (d), 128.6 (d), 123.1 (d) 有 4 个碳信号, 表明分子中有 2 个双键, 其中一个双键中的一个碳是季碳。同时氢谱中 δ 1.59 (3H, s) 有一个未裂分的甲基, 而整个碳谱中除 δ 175.5 (s) 羰基季碳外, 只有 δ 136.6 (s) 一个季碳。因此, 推断该甲基连在 δ 136.6 (s) 的双键碳上。

化合物的两条碳链的链长由质谱来确定 FABMS 的高质量区出现 m/z 636 [M+H]⁺ 的峰, 表明化合物的相对分子质量为 635。结构分析表明化合物只有一个酰胺羰基, 而无其它不饱和因素, 总不饱和度为 1。结合分子中有 4 个氧原子, 1 个氮原子。由此可推断分子式为 C₄₀H₇₇N O₄。

将化合物在 1 mol/L HCl 甲醇中进行醇解, 然后用石油醚进行萃取。石油醚萃取物经 GC/MS 分析, 实验表明萃取物中只有单一组分, 其分子离子峰为 342。经联机检索分析该化合物是 2 羟基正二十酸甲酯。由此推断分子中存在 2 羟基正二十碳酰胺的结构片段。结合分子式, 推断另一条长链为有二十个碳。

化合物 **1** 的 ^1H - ^1H COSY 有 3.75 (H—1) ... 3.86 (H—1) ... 3.91 (H—2) ... 4.25 (H—3) ... 5.50 (H—5) ... 2.08 (H—6) ... 2.08 (H—7) ... 5.05 (H—8) 的相关关系, 表明分子中双键位于 4 位和 8 位。HMBC 存在 δ 175.5 (s) 与 δ 4.10 (2'—H) 的相关关系, 推断 2 位上连有一个羟基。H—4 和 H—5 的耦合常数较大 (15.5 Hz), 可以确定 4—5 位双键为 E 构型。另外, $^{13}\text{C NMR}$ 中与双键相连的甲基的化学位移值为 16.0 小于 20 推断 8—9 位双键的几何构型为 E 型。2 位, 3 位和 2' 位的立体化学

通过比较文献数据确定^[7]。

综合分析, 鉴定化合物的化学结构为 (2S, 3R, 2R, 4E, 8E)-N-(2-羟基-正二十碳酰基)-9-甲基-4, 8-二烯-1, 3-二羟基-2-氨基-十九烷。文献检索表明 **1** 为新化合物。

化合物 **2** 由 IR (KBr) $\nu_{\max}$ 1 640, 1 547 cm^{-1} , ^1H NMR δ 6.23 (1H, d, $J=7.5$ Hz, NH) 结合 ^{13}C NMR δ 173.9 (s) 可推知分子中含有酰胺—CO—NH 结构片段。 ^{13}C NMR δ 74.7 (d), δ 62.5 (t) 表明分子中含有一个仲羟基和一个伯羟基, 以上波谱数据表明 **2** 是神经鞘胺醇类化合物。将化合物的 NMR、MS 等波谱数据与文献 [8] 数据比较, 两者基本一致。鉴定该化合物结构为 $\Delta^{4,5}$ (E), $\Delta^{8,9}$ (E) 鞘胺醇-正十六碳酰胺。

化合物 **3** 该化合物对 Liebermann-Burchard 反应颜色呈墨绿色, 表明它是甾体类化合物。 ^{13}C NMR δ 76.0 (d) 是甾体 3-C 信号, 它明显高于普通的胆甾醇, 预示在它的周围有取代。 δ 0.67 (3H, s), 1.18 (3H, s) 分别是甾体的 18-Me 和 19-Me 的氢信号, 与胆甾醇相比, 该化合物的 19-甲基明显的偏低场。很显然, 它受到一定的去屏蔽作用。 δ 76.0 (s) 是连氧季碳信号。由此推断 5 位取代的可能性很大。化合物的碳谱数据与文献 [9] 一致, 鉴定该化合物的化学结构为: 麦角甾-3 β , 5 α , 6 β -三醇。

参考文献:

- [1] CHEER C J, SMITH D H, DJERASSI C et al. Applications of artificial intelligence for chemical inference. X. Chemical studies of marine invertebrates. X VII. The computer assisted identification of (+)-Palustrol in

the marine organism *Cespitularia* sp., aff. subviridis [J]. Tetrahedron, 1976, 32(14): 1807—1810

- [2] BRAEKMAN J C, DALOZE D, OTTINGER R et al. Chemical studies of marine invertebrates. X. VII. On the absolute configuration of armadendrane sesquiterpenes from the soft coral *Cespitularia* aff. subviridis [J]. Experientia, 1977, 33(8): 993
- [3] DUH C Y, LI C H, WANG S K et al. Diterpenoids, nor diterpenoids and secosteroids from the Formosan soft coral *Cespitularia hypotenaculæ* [J]. J Nat Prod, 2006, 69(8): 1188—1192
- [4] SHEN Y C, LIN J H, WU Y R et al. New noxiterpenoids on *Cespitularia hypotenaculæ* [J]. Tetrahedron Lett, 2006, 47(37): 6651—6655
- [5] 何细新, 苏镜娉, 曾陇梅, 等. 乌绿草虫软珊瑚的化学成分研究 [J]. 中国海洋药物, 2001, 81(3): 1—3
- [6] 何细新, 苏镜娉, 曾陇梅, 等. 豆荚软珊瑚 *Lobophytum* sp. 次生代谢产物研究 [J]. 化学学报, 2002, 60(2): 334—337
- [7] MORIKI FUNAKI Y. Synthesis of sphingosine relatives. II. Synthesis of (4E, 8E, 2S, 3R, 2R)-N-2'-hydroxyhexadecanoyl-9-methyl-8-sphingadienine, the ceramide portion of the fruiting inducing cerebroside in a basidiomycete *Schizophyllum commune* and its (2R, 3S)-isomer [J]. Tetrahedron, 1985, 41(12): 2369—2377
- [8] 何细新, 杨若林, 苏镜娉, 等. 鹿角短指软珊瑚的次生代谢产物的研究 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2002, 41(2): 114—116
- [9] PRUNA L B, HENRIQUES R D, HUNNERCK S et al. Chemical studies of Cuban gorgonians. Part 10. Di- and trihydroxysteroids from *Plexaurella grisea* [J]. Pharmacazie, 1984, 39(2): 117—120

The Secondary Metabolite of the Soft Coral *Cespitularia cocerulea* May (II)

HE Xi-xin², YAN Su-jun¹, SU Jing-yu¹, ZENG Long-mei¹

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

Abstract: (2S, 3R, 2R, 4E, 8E)-N-(2'-hydroxyicosanoyl)-9-methyl-3-dihydroxy-2-amino-4, 8-nonadecadiene (**1**), a new ceramide together with two known compounds $\Delta^{4,5}$ (E), $\Delta^{8,9}$ (E)-sphingol-n-hexadecamide (**2**) and ergost-3 β , 5 α , 6 β -triol (**3**) were isolated from the soft coral *Cespitularia cocerulea* May in the South Sea of China. Their chemical structures were determined by spectroscopic methods.

Key words: *Cespitularia cocerulea* May; soft coral; ceramide