

小棒短指软珊瑚 *Sinularia microclavata* 中的生物活性氧化甾醇^{*}

张翠仙¹, 苏镜娱¹, 曾陇梅¹, 梁永钜², 杨小平²

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州510275;

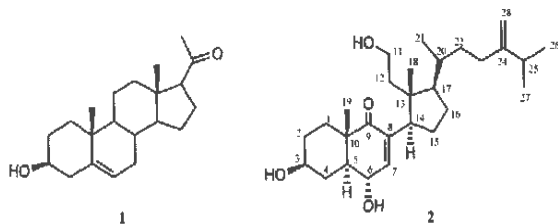
2. 中山大学肿瘤研究所, 广东 广州510060)

摘要: 从南中国海采集的小棒短指软珊瑚 *Sinularia microclavata* Tix-Dur 中首次分离得2个氧化甾醇。通过各种近代波谱分析方法, 鉴定出它们分别为孕甾-5烯-3醇-20酮 (pregnenolone) (1) 和 9, 11-开环-24-亚甲基-5 α -胆甾-7烯-3 β , 6 α , 11-三羟基-9酮 (2)。1和2均有较强的细胞毒性。

关键词: 软珊瑚; 小棒短指软珊瑚 *Sinularia microclavata* Tix-Dur; 氧化甾醇; 抗炎; 细胞毒

中图分类号: O629.61 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 02-0125-03

在过去的研究中, 曾从海绵和珊瑚中发现不少结构新颖且有强细胞毒活性的氧化甾醇^[1-3]。最近在对南海软珊瑚的系列研究工作中, 又首次从采自海南三亚的小棒短指软珊瑚 *Sinularia microclavata* Tix-Dur 中分离得2个有显著生理活性的氧化甾醇。通过近代波谱方法鉴定它们分别为孕甾-5烯-3醇-20酮(1)和9, 11-开环-24-亚甲基-5 α -胆甾-7烯-3 β , 6 α , 11-三羟基-9酮(2)。



1 实验部分

1.1 样品 小棒短指软珊瑚 *Sinularia microclavata* Tix-Dur 于1998年采自海南三亚海域, 由中国科学院南海海洋研究所李楚璞教授进行样品种属鉴定。

1.2 仪器与试剂 熔点由北京泰克光学仪器公司X6型显微熔点测定仪(温度未校正); 质谱由VGZAB HS质谱仪测定; 核磁共振谱用Varian Unity INOVA-500核磁共振仪测定。高效液相色谱 HPLC: Perkin-Elmer series 200, 色谱柱: Reverse phase Symmetry Prep C₁₈ (7 μ m, 7.8 mm $\times$ 300 mm)。

1.3 提取与分离 将新鲜的软珊瑚(干质量1.4 kg)用 $\varphi=95\%$ 的乙醇在室温下浸提, 合并提取液, 减压浓缩得到深褐色浸膏84 g。此浸膏用 $\varphi=50\%$ 的甲醇水溶液溶解后, 依次用乙酸乙酯、正丁醇各萃取。将乙酸乙酯提取液减压浓缩得棕褐色浸

膏39 g。后者在硅胶柱上减压层析, 用逐渐增加极性的石油醚/乙酸乙酯溶剂体系进行梯度洗脱, 从石油醚/乙酸乙酯(体积比为75:25)和(体积比为20:80)的洗脱剂中依次得到纯化合物1和化合物2, 后者经HPLC分离、纯化得纯化合物2。

1.4 物理常数

化合物1 C₂₁H₃₂O₂, 无色粗针状结晶, θ_{mp} 191~192 $^{\circ}$ C (EtOAc); FAB MS m/z 317 (10%) [$M+H$]⁺;

¹H NMR (CDCl₃) δ_H : 5.35 (1H, m, H-6), 3.54 (1H, m, H-3), 2.53 (1H, m, H-17), 2.13 (3H, s, H-21), 1.07 (3H, s, H-19), 0.64 (3H, s, H-18);

¹³C NMR (CDCl₃) δ_C : 37.3 (t, C-1), 31.8 (t, C-2), 71.7 (d, C-3), 42.2 (t, C-4), 140.8 (s, C-5), 121.4 (d, C-6), 31.6 (t, C-7), 31.5 (d, C-8), 50.0 (d, C-9), 36.5 (s, C-10), 21.1 (t, C-11), 38.8 (t, C-12), 44.0 (s, C-13), 57.0 (d, C-14), 22.8 (t, C-15), 24.5 (t, C-16), 63.7 (d, C-17), 13.2 (q, C-18), 19.4 (q, C-19), 209.3 (s, C-20), 31.9 (q, C-21)。

化合物2 C₂₈H₄₆O₄, 无色细针状结晶, θ_{mp} 153.0~153.5 $^{\circ}$ C (EtOAc); FAB MS m/z 447 (45%) [$M+H$]⁺;

¹H NMR (Pyridine-*d*₅) δ_H : 6.57 (1H, br s, H-7), 4.72, 4.67 (each 1H, d, $J=14.0$ Hz, H-28), 4.28 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-6), 3.67, 3.89 (each 1H, m, H-12), 3.60 (1H, m, H-3 α), 3.43 (1H, t, $J=10.0$ Hz, H-14), 2.30 (1H, br d, $J=12.0$ Hz, H-4 α),

* 收稿日期: 2004-09-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29934030), 国家高科技发展(863)资助项目(2001AA620403)

作者简介: 张翠仙(1975年生), 女, 博士研究生; 通讯联系人: 曾陇梅, E-mail: ceszm@zsu.edu.cn

1.78 (1H, m, H-5), 1.09, (3H, s, 19-Me), 1.04 (6H, d, $J=9.0$ Hz, 26, 27-Me), 0.99 (3H, d, $J=6.5$ Hz, 21-Me), 0.61 (3H, s, 18-Me);

^{13}C NMR (Pyridine- d_5) δ : 205.2 (s, C-9), 156.6 (s, C-24), 147.2 (d, C-7), 137.1 (s, C-8), 106.2 (t, C-28), 70.1 (d, C-3), 69.5 (d, C-6), 59.4 (t, C-11), 49.6 (d, C-17), 48.6 (d, C-5), 46.2 (s, C-13), 44.9 (s, C-10), 42.6 (t, C-12), 41.0 (t, C-14), 34.8 (d, C-25), 34.2 (t, C-4), 33.8 (t, C-22), 35.8 (d, C-20), 31.9 (t, C-1), 31.6 (t, C-23), 30.5 (t, C-2), 26.6 (t, C-16), 26.3 (t, C-15), 22.0 (q, C-27), 21.8 (q, C-26), 18.8 (q, C-21), 17.4 (q, C-18), 16.2 (q, C-19).

2 结果与讨论

化合物 **1** θ_{mp} 191~192 °C (EtOAc); 从 FAB MS m/z 317 $[\text{M}+1]^+$ 和 ^{13}C NMR DEPT 推算出其分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_2$, 不饱和度 6. Liebermann-Burchard 反应颜色呈墨绿色, 结合 ^1H NMR 谱中 2 个特征的甾醇角甲基信号 [δ 0.64 (3H, s, 18-Me), 1.07 (3H, s, 19-Me)], 表明 **1** 可能是甾体类化合物。由 NMR δ 3.54 (1H, m), 5.35 (1H, m); 71.7 (C-3), 140.8 (s), 121.4 (d) 可知分子中具有 Δ^5 3 β -OH 的结构单元; δ 209.3 (s) 表明有 1 个酮羰基存在; δ 2.13 (3H, s); δ 31.9 (q) 表明有 1 个与羰基连接的甲基。按以上波谱分析和分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_2$ 推定出 **1** 可能是孕甾酮类化合物。化合物 **1** 的 ^{13}C NMR 数据和文献中孕甾-5 烯-3 醇-20 酮 (pregnenolone) 的一致, 鉴定 **1** 即为孕甾-5 烯-3 醇-20 酮。

生理活性研究显示, 化合物 **1** 对人体结肠癌 (HT-29) 细胞株具有强细胞毒性, ED_{50} 值为 $0.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。另外, **1** 对小鼠淋巴增多性白血病 (P388)、人体腺癌 (A549) 和 Hepa 59T NGH 细胞株生长也具有较强的细胞毒性, ED_{50} 值依次为 $7.8^{[4]}$, $8.6^{[4]}$ 和 $6.8 \mu\text{g}/\text{mL}^{[5]}$ 。

化合物 **2** 无色细针状结晶, θ_{mp} 153.0~153.5 °C; FAB MS m/z 447 $[\text{M}+1]^+$, 结合 ^{13}C NMR DEPT 谱确定其分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_4$, $U=6$ 。化合物 **2** 对 Liebermann-Burchard 试剂呈墨绿色颜色反应, 提示化合物 **2** 可能是甾体类化合物。NMR 显示 **2** 的分子中含有 1 个酮基 [δ 205.2 (s)]; 1 个三取代双键 [δ 147.2 (d), 137.1 (s)] 和 1 个末端双键 [δ 156.6 (s), 106.2 (t)]。

从以上波谱分析和分子式 $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_4$ 推算, 只剩 3 个不饱和度, 推断 **2** 应属开环甾体类化合物。 δ

70.0 (d), 69.5 (d) 和 59.4 (t) 表明分子中有 2 个仲羟基和 1 个伯羟基。从 ^1H - ^1H COSY 相关关系 δ 3.60 (H-3) / 3.30 (H-4 α) / 1.78 (H-5) / 4.28 (H-6) / 6.57 (H-7), 可推知 2 个仲羟基分别连在 C-3 和 C-6 上。根据 9, 11 氧化开环的规律, 推测伯羟基应在甾核开环后的 C-11 位上。化合物 **2** 的 ^1H 和 ^{13}C NMR 显示有 5 个甲基, 从化学位移值和裂分情况可知它们分别属于 18-Me (δ 0.61, s, 3H; δ 17.4, q), 19-Me (δ 1.09, s, 3H; δ 16.2, q), 21-Me (0.99, d, $J=6.5$ Hz, 3H; δ 18.8 q), 26-Me 和 27-Me (1.04, d, $J=9.0$ Hz, $2\times 3\text{H}$; δ 21.8 q, 22.0 q)。将 **2** 的 ^{13}C NMR 数据与文献[6]中的数据对比, 鉴定出 **2** 为 9, 11-开环-24-亚甲基-5 α -胆甾-7 烯-3 β , 6 α , 11-三羟基-9 酮。

文献报道, 9, 11 开环的多羟基甾醇具有抗炎活性和显著的细胞毒活性, 对艾氏腹水瘤和人体白血病 (erythroleukemia) K 562 肿瘤细胞的 ED_{50} 值依次为 $1.0, 3.0 \mu\text{g}/\text{mL}^{[7,8]}$ 。

参考文献:

- [1] 刘虹, 苏镜娒, 曾陇梅, 等. 肉芝软珊瑚 *Sarcophyton* sp. 中次生代谢产物的研究[J]. 分析测试学报, 2004, 23 (3): 13.
- [2] 张广文, 马祥全, 苏镜娒, 等. 扁窦形短指软珊瑚 *Sinularia depressa* 的甾醇和甾醇甙[J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2003, 42(2): 51.
- [3] 蓝文健, 林翠梧, 苏镜娒, 等. 圆裂短足软珊瑚 *Cladiella krempfi* 中的甾醇苷[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(11): 2019.
- [4] SHEU J H, CHANG K C, DUH C Y. A cytotoxic 5 β -epidioxysterol from soft coral *Sinularia* species[J]. J Nat Prod, 2000, 61: 149-151.
- [5] AHMED A F, DAI C F, KUO Y H, et al. 1 α , 3 β , 5 β -trihydroxy-24-methylenecholestan-6-one: a novel steroid from a soft coral *Sinularia gibberosa*[J]. Steroids, 2003, 68: 377-381.
- [6] MIGLIUOLO A, PICCIAIOLI V, SICA D. Two new 9, 11-secosterols from the marine sponge *Spongia officinalis*[J]. Steroids, 1992, 57: 344-347.
- [7] HE H, KULANTHAIVEL P, BAKENRR B J, et al. New antiproliferative and antiinflammatory 9, 11-secosterols from the gorgonian *Pseudopterogorgia* sp.[J]. Tetrahedron, 1995, 51: 51-58.
- [8] KOIJAK R, PEHK T, JARVING I, et al. New anti-proliferative 9, 11-secosterol from soft coral *Gessemia fruticosa* [J]. Tetrahedron Lett, 1993, 34: 1985-1986.

(下转第 129 页)

何, 感受野有多大, 则需要使用神经追踪的技术进一步探究。

革胡子鲇的迷走叶是 3 种中构造较复杂的, 其相对体积最大, 神经分支最多, 这些分支对研究迷走叶的细致分区有一定的参考价值, 而且双极神经元比例最多, 估计这些双极神经元与迷走神经或次级味觉通路有联系, 或者参与迷走叶内的局部神经回路。

参考文献:

[1] 龙天澄. 革胡子鲇触须和口腔黏膜上味觉器官[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 1994, 19(2): 175—180.

[2] 杨桂枝, 张耀光. 南方鲇皮肤、唇瓣和须结构的研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 1997, 22(3): 296—301.

[3] 栾雅文, 邢自力, 刘伟靖, 等. 胡子鲇(*Claris fuscus* Lacepede) 味觉器官的数量、分布与功能之间关系的研究[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2003, 34(4): 432

—435.

[4] CHARLES F. Taste and tactile responsiveness of neurons in the posterior diencephalon of the channel catfish [J]. J Comp Neurol, 1993, 337: 419—430.

[5] CHARLES F. Axonal projection patterns of neurons in the secondary gustatory nucleus of channel catfish [J]. J Comp Neurol, 1996, 365: 585—593.

[6] CHARLES F. Convergence of oral and extraoral information in the superior secondary gustatory nucleus of channel catfish [J]. Brain Res, 2000, 588: 201—211.

[7] KIYOHARA S. Peripheral and central distribution of major branches of the facial taste nerve in the carp[J]. Brain Res, 1998, 325: 57—69.

[8] TAKAYUKI M. Topographical organization of taste and tactile neurons in the facial lobe of the sea catfish, *Lotosus lineatus* [J]. Brain Res, 1998, 446: 178—182.

[9] FINGER T. Ascending spinal system in the fish, *Prionotus carolinus*[J]. J Comp Neurol, 2000, 422: 106—122.

Comparing Research on the Primary Taste Central System of Catfish

ZHAO Lei, LIANG Jian xian, LONG Tian chen

(School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The histological comparison of facial lobe and vagal lobe of three kinds of catfish — *Silurus soldatovi meridionalis* Chen, *Clarias gariepinus*, *Siluris asotus* L. showed that the difference of the conformation in the three kinds of catfish is obvious. Moreover, cell morphology and nuclear distribution of facial lobe and vagal lobe in the three kinds of catfishes are different significantly. The differences of their organization, structure, cell morphology, and nuclear distribution maybe correlate to the food category and the extent of disliking or liking.

Key words: *Silurus soldatovi meridionalis* Chen; *Clarias gariepinus*; *Siluris asotus* Linnaeus; facial lobe; vagal lobe; taste bud

(上接第 126 页)

Bioactive Oxygenated Sterols from the Soft Coral *Sinularia microclavata* Tix-Dur

ZHANG Cui xian¹, SU Jing yu¹, ZENG Long mei¹, LIU Yong ju², YANG Xiao ping²

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;
2. Cancer Research Center, Sun Yat sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: Two oxygenated sterols have been isolated from soft coral *Sinularia microclavata* Tix-Dur, collected from Sanya bay, Hainan. On the basis of the spectroscopic analyses, their structures were identified to be pregnenolone (1) and 9, 11-*sec*-3 β , 6 α , 11-tridrox-24-methylene-5 α -cholest-7-en-9-one (2). Bioassays showed that compounds 1 and 2 exhibited antiinflammatory activity and significant cytotoxicity toward Ehrlich carcinoma and human erythroleukemia cell lines.

Key words: soft coral; *Sinularia microclavata*; oxygenated sterol; anti-inflammatory activity; cytotoxic activity