

胆甾醇硫酸酯钠及其类似物的合成研究*

The Syntheses of Sodium 3 β -hydroxy-Cholestane 3-Sulfate and Its Analogues黄上峰^{1,2}, 王 辉¹, 黄燕敏¹, 钟振国³, 崔建国^{1*}HUANG Shang-feng^{1,2}, WANG Hui¹, HUANG Yan-min¹, ZHONG Zhen-guo³, CUI Jian-guo^{1*}

(1. 广西师范学院化学系, 广西南宁 530001; 2. 右江民族医学院, 广西百色 533000; 3. 广西中医学院, 广西南宁 530001)

(1. Department of Chemistry, Guangxi Teachers Education University, Nanning, Guangxi, 530001, China; 2. Youjiang Medical College for Nationalities, Baise, Guangxi, 533000, China; 3. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning, Guangxi, 530001, China)

摘要: 以天然存在的胆甾醇硫酸酯钠 (3) 的合成作为研究对象, 从胆甾醇出发, 经过硫酸酯化、钠离子交换两步反应合成出具有抗肿瘤活性天然存在的胆甾醇硫酸酯钠, 以及它的 4 个类似物: β -谷甾醇硫酸酯钠 (3a)、 β -豆甾醇硫酸酯钠 (3b)、 β -孕甾醇-20-氧代硫酸酯钠 (3c)、 β -去氢表雄酮硫酸酯钠 (3d), 并对化合物进行抗肿瘤活性试验。结果是化合物 3b 在体外对肝癌、宫颈癌、人胃癌细胞株的生长具有一定的抑制作用, 化合物 (3) 对肝癌细胞株的生长有一定的抑制作用。

关键词: 胆甾醇 胆甾醇硫酸酯钠 合成

中图分类号: O629.29 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2008)04-0414-05

Abstract The sodium cholesterol sulfate (3), a natural steroid from marine echinoderms, was synthesized from Cholesterol by sulfation and transformation of sodium ion. Four analogues (3a, 3b, 3c, 3d) of (3) were synthesized and characterized by IR, ¹H and ¹³C NMR. Their biological activity was investigated and the results showed that the compound 3b and (3) displayed a moderate cytotoxic activity against liver carcinoma cells (7404), human gastric carcinoma cells (SGC7901) and cervical carcinoma cells (HELA).

Key words cholesterol, sodium cholesterol sulfate, synthesis

从海洋生物中寻找新的对人类疾病显著有效的药物, 是近年来化学家和药学家的研究热点之一。近年来, 人们从海绵及一些海洋棘皮动物中分离得到不少的多羟基甾醇硫酸酯钠类化合物, 在对它们进行生理活性研究时发现, 大多数的多羟基甾醇硫酸酯钠化合物都具有显著的细胞毒性、抗病毒活性或抗炎作用^[1-3]。例如, 从海绵 *Petrosia weinbergi* 中分离得到的多羟基甾醇硫酸酯钠化合物 (1) 和多羟

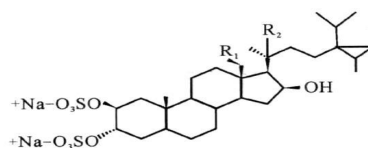
基甾醇硫酸酯钠化合物 (2) 对猫科动物白血病和人体免疫缺乏 (Immunodeficiency) 病毒 (HIV) 具有显著生理活性, EC₅₀ 值分别为 4.0 μg/ml 和 5.2 μg/ml^[4]。从北部湾海域中采集的锥疣星蔓蛇尾 (*Astroclarus coniferus*) 中分离得到胆甾醇硫酸酯钠 (3), 它对 HeLa (宫颈癌)、Bgc (胃癌)、Cne (鼻咽癌)、95-D (高转移肺癌) 等 4 种肿瘤细胞具有明显的细胞毒性^[5]。

收稿日期: 2008-01-27

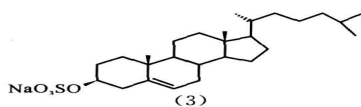
作者简介: 崔建国 (1954-), 男, 博士, 教授, 主要从事有机合成反应, 天然产物化学及药物合成的研究。

* 国家自然科学基金项目 (批准号: 20562001) 和广西科学基金项目 (批准号: 桂科基 057554) 资助

* * 通讯作者。

(1) R₁ = H, R₂ = OH (2) R₁ = OH, R₂ = H

Guangxi Sciences, Vol 15 No. 4, November 2008



对此类化合物开展合成研究,并对其进行生理活性试验、药理研究及构效关系研究,这对于发现抗肿瘤和抗病毒新药无论在理论或实践上都具有重要的意义。这里,我们从胆甾醇出发,探讨胆甾醇硫酸酯钠(3)的合成方法。同时,采用类似的合成方法,合成了4个与胆甾醇硫酸酯钠相类似的化合物:β-谷甾醇硫酸酯钠(3a)、β-豆甾醇硫酸酯钠(3b)、β-孕甾醇-20-氧代硫酸酯钠(3c)、β-去氢表雄酮硫酸酯钠(3d),并对合成物进行抗肿瘤活性试验。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

合成所用试剂均为分析纯试剂,溶剂按常规方法进行处理,干燥。红外光谱测定采用美国 Nicolet FT 360红外光谱仪, KBr压片;¹H和¹³C核磁共振谱测定采用德国布鲁克公司 Bruker AV-500 (500MHz)型超导高分辨核磁共振仪;熔点测定采用 X-6显微熔点测定仪,温度计未经校正。

1.2 实验方法

1.2.1 吡啶-三氧化硫复合物的制备

29g(0.25mol)氯磺酸溶解于40ml四氯化碳中,在冰盐冷却下缓慢滴加37g(0.5mol)吡啶,约0.5h加完,此时有大量的白色沉淀产生,继续反应15min,过滤,并用少量冰水洗涤沉淀,以除去附着的酸和生成的吡啶盐酸盐,真空干燥备用。

1.2.2 三乙胺-三氧化硫复合物的制备

三乙胺-三氧化硫复合物参考文献[6]的合成方法进行制备。

1.2.3 胆甾醇硫酸酯钠(3)的合成

方法1 于50ml干燥的二口烧瓶中,加入100mg(0.26mmol)胆甾醇和188mg(1.04mmol)三乙胺-三氧化硫复合物,氩气保护下加入1ml干燥的吡啶,溶解完全后,于105℃左右反应3h,停止反应,减压除去吡啶,用一硅胶短柱将过量的三乙胺-三氧化硫络合物和其它副产物除去(流动相:二氯甲烷:石油醚=1:1),然后用50ml甲醇冲洗,洗液浓缩至15ml左右,加入8g烯丙基型阳离子(Na⁺)交换树脂,反应5h,过滤,滤液浓缩至5ml左右,结晶,过滤干燥后得到白色固体化合物(3)120mg,产率95%。m.p 204~205℃; IR(KBr)ν/cm⁻¹: 2958, 2865, 1457,

1381, 1249, 1063, 980, 860, 800; ¹H NMR(DMSO, 500MHz) δ 0.653(3H, s, 18-H), 0.841(3H, d, J=2.4Hz, 26或27-CH₃), 0.854(3H, d, J=2.4Hz, 26或27-CH₃), 0.898(3H, d, J=6.4Hz, 21-CH₃), 0.948(s, 3H, 19-CH₃), 2.140(1H, t, J=12.0Hz, C4-βH), 2.357(1H, dd, J=1.8 and 4.7Hz, C4αH), 3.832(1H, m, C3αH), 5.286(1H, s, C6-H)。化合物(3)的¹³C NMR^[5]与天然产物(3)的¹³C NMR对比结果(表1)是两者数据基本一致。

表1 化合物(3)的与天然产物(3)的¹³C NMR对比

Table 1 ¹³C NMR data comparison of synthetic compound (3) and natural compound (3)

C	合成物 Synthesis	天然产物 Natural	C	合成物 Synthesis	天然产物 Natural
1	37.37	36.8	15	24.34	23.7
2	29.28	28.7	16	28.26	27.5
3	75.70	75.1	17	56.06	55.5
4	39.52	39.2	18	12.16	11.5
5	141.21	140.7	19	19.53	18.9
6	121.54	120.8	20	35.67	35.0
7	31.93	31.3	21	19.04	18.4
8	31.86	31.2	22	36.13	35.5
9	50.04	49.5	23	23.67	23.0
10	36.56	35.9	24	39.41	38.8
11	21.06	20.4	25	27.86	27.2
12	39.68	39.3	26	22.87	22.2
13	42.34	41.7	27	23.15	22.4
14	56.62	56.0			

方法2 操作与方法类似,但是采用吡啶-三氧化硫复合物代替三乙胺-三氧化硫复合物,105mg(0.27mmol)胆甾醇溶于3ml干燥的吡啶中,加入216mg(1.36mmol)干燥的吡啶-三氧化硫复合物,得到化合物(3)115mg,产率87%。

方法3 在50ml反应瓶中加入吡啶5ml,冰浴冷却至0℃,在氩气保护下缓慢加入氯磺酸0.2g,加完后继续搅拌10min,然后加入胆甾醇0.22g,在105℃搅拌反应3.5h,得到棕红色胶状物。用20ml蒸馏水稀释,滴加30% NaOH溶液至pH值为9,继续搅拌30min,停止反应,抽滤。固体分别用3×10ml蒸馏水、5ml乙醚和5ml丙酮洗涤,干燥,得到暗黄色固体粗产品0.27g,用50%甲醇重结晶,得到化合物(3)0.22g,产率79%。

1.2.4 β-谷甾醇硫酸酯钠(3a)的合成

合成方法参照上述胆甾醇硫酸酯钠的合成方法1产率95%。m.p 189~190℃; IR(KBr)ν/cm⁻¹: 2739, 1466, 1380, 1249, 1209, 1053, 996, 800,

616¹HNMR(DMSO, 500MHz) δ 0.655(3H, s, 18-CH₃), 0.801(3H, d, J= 7.0Hz, 26 or 27-CH₃), 0.813(3H, t, J= 9.5Hz, 29-CH₃), 0.834(3H, d, J= 7.0Hz, 26 or 27-CH₃), 0.908(3H, d, J= 6.5Hz, 21-CH₃), 0.951(3H, s, 19-CH₃), 2.143(1H, t, J= 12.0, C7-α H), 2.377(1H, dd, J= 3.0和13.5Hz, C4β H), 2.557(1H, t, J= 4.5Hz, C4-α H), 3.849(1H, m, C3-α H), 5.284(1H, bs, C6-H); ¹³C NMR(DMSO, 125MHz) δ 141.20(5-C), 121.53(6-C), 75.78(3-C), 56.65(14-C), 55.96(17-C), 50.09(9-C), 45.68(24-C), 42.35(13-C), 39.88(12-C), 39.55(4-C), 37.38(1-C), 36.56(10-C), 35.97(20-C), 33.88(22-C), 31.93(7-C), 31.87(8-C), 29.26(25-C), 29.23(2-C), 28.26(16-C), 26.05(23-C), 24.33(15-C), 23.13(28-C), 21.07(11-C), 20.16(19-C), 19.51(26-C or 27-C), 19.43(26-C or 27-C), 19.09(21-C), 12.26(29-C), 12.14(18-C)

1.2.5 β-甾醇硫酸酯钠(3b)的合成

合成方法参照上述胆甾醇硫酸酯钠的合成方法1产率为75%。m.p 188~190°C; IR(KBr)ν/cm⁻¹: 2958, 2865, 1638, 1457, 1380, 1249, 1063, 980, 860, 800, 624; ¹HNMR(DMSO, 500MHz) δ 0.678(3H, s, 18-CH₃), 0.780(3H, d, J= 6.3Hz, 26 or 27-CH₃), 0.785(3H, t, J= 7.0Hz, 29-CH₃), 0.833(3H, d, J= 6.3Hz, 26 or 27-CH₃), 0.956(3H, s, 19-CH₃), 1.004(3H, d, J= 6.5Hz, 21-CH₃), 2.032(1H, m, C7-α H), 2.142(1H, t, J= 12.0 Hz, C4-β H), 2.374(1H, m, C4-α H), 3.842(1H, m, C3-α H), 5.031(1H, dd, J= 8.6和15.1Hz, C23-H), 5.164(1H, dd, J= 8.6和15.1Hz, C22-H), 5.287(1H, d, J= 4.5Hz, C6-H)

1.2.6 β-孕甾醇-20-氧代硫酸酯钠(3c)的合成

合成方法参照上述胆甾醇硫酸酯钠的合成方法1产率为88%。m.p 191~192°C; IR(KBr)ν/cm⁻¹: 2937, 2896, 1703, 1446, 1384, 1254, 1066, 984, 800; ¹H NMR(DMSO, 500MHz) δ 0.542(3H, s, 18-CH₃), 0.954(3H, s, 19-CH₃), 2.072(3H, s, 21-CH₃), 2.51(1H, m, C4-H), 2.573(1H, t, J= 9.0 H), 3.848(1H, m, C3-α H), 5.297(1H, bs, C6-H); ¹³C NMR(DMSO, 125MHz) δ 208.99(20-C), 141.77(5-C), 120.72(6-C), 70.46(3-C), 63.07(17-C), 56.58(14-C), 49.99(9-C), 43.74(13-C), 42.67(12-C), 40.45(4-C), 39.52(10-C), 38.44(1-

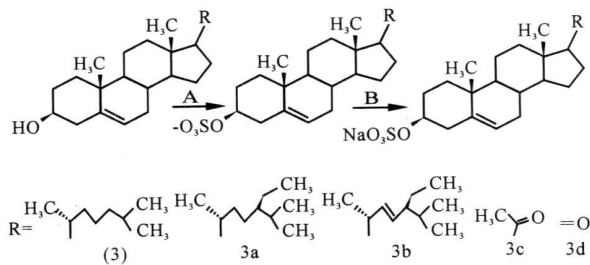
C), 37.41(7-C), 36.58(21-C), 31.88(8-C), 31.73(2-C), 31.65(16-C), 24.50(15-C), 22.73(11-C), 21.09(19-C), 19.60(18-C)

1.2.7 β-氢表雄酮硫酸酯钠(3d)的合成

合成方法参照上述胆甾醇硫酸酯钠的合成方法1产率为98%。m.p 189~191°C; IR(KBr)ν/cm⁻¹: 2937, 2896, 1740, 1454, 1372, 1249, 1066, 980, 800; ¹H NMR(DMSO, 500MHz) δ 0.803(3H, s, 18-CH₃), 0.964(3H, s, 19-CH₃), 2.161(1H, t, J= 12.8Hz, C4β H), 2.39(1H, m, C4-α H), 2.42(1H, m, C16β H), 3.842(1H, m, C3-α H), 5.331(1H, bs, C6-H); ¹³C NMR(DMSO, 125MHz) δ 220.17(17-C), 141.39(5-C), 121.15(6-C), 75.66(3-C), 51.33(14-C), 50.20(9-C), 47.30(13-C), 46.14(10-C), 37.32(16-C), 36.73(4-C), 35.79(1-C), 31.64(7-C), 31.45(8-C), 30.72(12-C), 29.27(2-C), 21.91(15-C), 20.40(11-C), 19.54(19-C), 13.67(18-C)

2 结果与分析

硫酸酯衍生物的制备方法有多种,常用的有氯磺酸吡啶法,氯磺酸二甲基甲酰胺法,吡啶-N磺酸二甲基亚砷法,吡啶三氧化硫法^[7],三乙胺三氧化硫法^[8]等。我们结合前人的工作^[9,10],采用合成路线:



A 吡啶三氧化硫 吡啶或三乙胺三氧化硫 吡啶(DMF);
B 10% NaOH溶液或阳离子交换树脂。

合成了甾醇硫酸酯钠化合物。这种合成方法更加简便通用。

2.1 硫酸酯化试剂的影响因素

对甾醇进行硫酸酯化的关键是选择良好的磺酸酯化试剂,直接采用氯磺酸时由于酸性较难控制,会导致硫酸酯基发生消除等副反应,产率不高。吡啶-三氧化硫复合物活性不高,需要在较高的温度才有很好的酯化度,而且该复合物易吸潮,不易保存。三乙胺-三氧化硫复合物活性比前两者高,而且相对稳定,操作简便、易行。因此,三乙胺-三氧化硫复合物是合成甾醇硫酸酯钠良好的磺酸酯化试剂(表2)

2.2 硫酸酯化试剂用量对化合物(3)收率的影响

不同的底物比会对甾醇酯化度有一定的影响,酯化过程是一个可逆反应,提高底物比可以使平衡往右进行,但是量过多也会增加副反应的发生。表3结果显示,当底物比为1:3~1:4时,其酯化度最佳。

表2 硫酸酯化试剂对化合物(3)产率的影响*

硫酸酯化试剂 Sulfating agents	Na ⁺ 的来源 Source of Na ⁺	化合物(3)的产率 Yield of compound (3)(%)
氯磺酸-吡啶 Chlorosulfonic acid-pyridine	阳离子交换树脂 Cation exchange resin	68
吡啶-三氧化硫 Pyridine-sulfur trioxide	阳离子交换树脂 Cation exchange resin	87
三乙胺-三氧化硫 Triethylamine-sulfur trioxide	阳离子交换树脂 Cation exchange resin	95

* 反应温度 105℃, 反应时间 3h。 Reaction temperature is 105℃, reaction time is 3h.

表3 硫酸酯化试剂用量对化合物(3)收率的影响*

Table 3 Influence of amount of sulfating agents to yield of compound(3)

底物比 Proportion of substrate	硫酸酯化试剂 Sulfating agents	化合物(3)的产率 Yield of compound (3)(%)
1:1	三乙胺-三氧化硫 Triethylamine-sulfur trioxide	76
1:2	三乙胺-三氧化硫 Triethylamine-sulfur trioxide	81
1:3	三乙胺-三氧化硫 Triethylamine-sulfur trioxide	94
1:4	三乙胺-三氧化硫 Triethylamine-sulfur trioxide	95
1:5	三乙胺-三氧化硫 Triethylamine-sulfur trioxide	87

* 反应温度 105℃, 反应时间 3h, 底物比为底物与三乙胺-三氧化硫的物质的量之比。 Reaction temperature is 105℃, reaction time is 3h, the substrat ratio is the amount of material of the substrat to that of the Triethylamine-Tri oxide sulfur.

2.3 反应温度和时间对化合物(3)收率的影响

由表4结果可知,提高反应温度有利于加快酯化反应速率和平衡移动,当磺酸酯化反应温度为105℃左右时酯化度最高,温度过高和反应时间过长都会发生较多的副反应,因此,最佳的反应温度为100~105℃,最佳的反应时间为3h。

2.4 Na⁺ 离子的来源对反应的影响

反应中 Na⁺ 的交换可以采取不同的试剂,我们尝试采用 10% NaOH 溶液、饱和 NaHCO₃ 溶液和阳离子(钠型)交换树脂,它们都能够交换得到产物,使用 NaOH 溶液时,浓度太大会导致发生消除反应。阳离子(钠型)交换树脂是较好的 Na⁺ 离子来源,而

且后处理也很简便,详见表5。

表4 反应温度和时间对化合物(3)收率的影响*

Table 4 Influence of reaction temperature and reaction time to yield of compound(3)

反应温度 Reaction temperature(°C)	反应时间 Reaction time (h)	化合物(3)的产率 Yield of compound(3)(%)
25	16	88
50	6	86
105	3	95
120	3	88

* TCL跟踪反应,原料消失反应结束,底物比 1:4。 TCL tracking reaction, the reaction was over when the raw materials disappeared, the substrat ratio is 1:4.

表5 Na⁺ 离子来源对化合物(3)收率的影响

Table 5 Influence of different Na⁺ exchange agents to yield of compound(3)

Na ⁺ 离子交换试剂 Na ⁺ exchange agents	反应时间 Reaction time(h)	化合物(3)的产率 Yield of compound (3)(%)
10% NaOH溶液 10% NaOH solution	0.5	68
饱和 NaHCO ₃ 溶液 NaHCO ₃ saturated solution	0.5	60
阳离子(钠型)交换树脂 Cations (Na) exchange resin	5	95

2.5 化合物(3)及其类似物生理活性试验

采用 MTT 法对合成的胆甾醇硫酸酯钠(3)及其类似物进行了抗肿瘤试验,结果(表6)表明,化合物 3b 对肝癌、宫颈癌、人胃癌细胞株的生长具有中等程度的抑制作用,化合物(3)对肝癌细胞株的生长有一定的抑制作用,而 3a 和 3d 在所试验的浓度范围内对上述肿瘤细胞没有表现出显著的细胞毒性。

表6 化合物(3)及其类似物生理活性试验结果*

Table 6 In Vitro Antitumor Activities of compound(3) and its analogues(3a~3d)

化合物 Compound	浓度 Concentration (μg/ml)	肿瘤细胞抑制率 Inhibition rate of tumor cell(%)			
		p388	7404	HELA	SGC7901
(3)	50	55.62	29.47	31.27	
3a	50	22.24	40.76	21.63	
3b	50	73.43	81.49	72.09	
	100	55.92			
3c	50	46.96	42.62	41.43	
3d	50	16.65	9.44	29.29	

* 化合物对肿瘤细胞的抑制活性测试由广西中医学院完成; p388 为白血病细胞株, 7404 为肝癌细胞株, HELA 为宫颈癌细胞株, SGC7901 为人胃癌细胞株。

The inhibiting activity test of the compounds to the tumor cells was completed by Guangxi College of Traditional Chinese Medicine. P388 is the leukemia cells, 7404 is the liver cancer cells, HELA is the cervical cancer cells, SGC7901 is human gastric cancer cells.

3 结论

本次试验合成出具有抗肿瘤活性的天然胆甾醇硫酸酯钠,及其类似化合物: β -谷甾醇硫酸酯钠、 β -豆甾醇硫酸酯钠、 β -孕甾醇-20-氧代硫酸酯钠、 β -去氢表雄酮硫酸酯钠。合成胆甾醇硫酸酯钠的最佳工艺条件是:以三乙胺-三氧化硫复合物作为酯化试剂,阳离子(钠型)交换树脂为 Na^+ 离子来源,反应底物比为 1:3~1:4,反应温度为 100~105 $^{\circ}\text{C}$,反应时间为 3h。合成的 β -豆甾醇硫酸酯钠对肝癌、宫颈癌、人胃癌细胞株的生长具有中等程度的抑制作用,化合物胆甾醇硫酸酯钠对肝癌细胞株的生长有一定的抑制作用,而 β -谷甾醇硫酸酯钠和 β -去氢表雄酮硫酸酯钠在所试验的浓度范围内对肝癌、宫颈癌、人胃癌细胞没有表现出显著的细胞毒性。

参考文献:

- [1] 冯瑞,崔建国.海洋生物中的不同结构多羟基甾醇[J].化学通报,2005,68(8):881-888
- [2] 韩莉娟,崔建国,黄初升.海洋生物中具有生物活性的多羟基甾醇及甾体皂苷[J].有机化学,2003,23(3):305-311.
- [3] 崔建国,王屹,林翠梧,等.海洋生物中具有生理活性的多羟基甾醇[J].天然产物研究与开发,2000,12(6):94-100.
- [4] Sun H H, Cross S S. Weinbersterol disulfates A and B, antiviral steroid sulfates from the sponge petrosia

weinbergi [J]. Gunasekeram, Koehn F E Tetrahedron, 1991, 47: 1185.

- [5] 林翠梧,苏镜娉,曾隴梅,等.锥疣星蔓蛇尾的化学成分[J].分析测试学报,2002,21(4):59-61.
- [6] Nair V, Bernstein S. A convenient procedure for the preparation of triethylamine-sulfur trioxide [J]. Oppi Briefs, 1987, 19: 466-467.
- [7] Katsuraya K, Nakashima H, Yamamoto N, et al. Synthesis of sulfated oligosaccharide glycosides having high anti-HIV activity and the relationship between activity and chemical structure [J]. Carbohydr Res, 1999, 315: 234-242.
- [8] Maria J C, Marta S M, Alejandro J R. Evaluation of the antiviral activity of natural sulfated polyhydroxysteroids and their synthetic derivatives and analogs [J]. Steroids, 1999, 64: 335-340.
- [9] Gustavo A G, Ana P M, Marta S M, et al. Synthesis and antiviral activity of sulfated and acetylated derivatives of β , β -dihydroxy- β -cholestane [J]. Steroids, 2003, 68: 125-132.
- [10] Tohru O, Hiroshi T, Michio M, et al. Synthesis and identification of an endogenous sperm activating and attracting factor isolated from eggs of the ascidian *Ciona intestinalis*; an example of nanomolar-level structure elucidation of novel natural compound [J]. Tetrahedron, 2004, 60: 6971-6980.

(责任编辑: 邓大玉)

美国科学家记录到胚胎细胞迁移路径

在成长的早期阶段,包括人类在内的所有的动物胚胎,都要经历一个名为“原肠胚形成”的阶段,涉及大规模的细胞迁移和发育中的组织的结构调整和重组。这一阶段细胞活动之复杂,使得科学家很难了解究竟发生了什么。最近,美国加州理工学院的研究人员,借助双光子激发荧光显微术,用绿色荧光蛋白对果蝇胚胎处于“原肠胚形成”阶段的细胞作了标记,并对 1500 多个细胞进行了长达 2h 的实时追踪,用录像动态记录下了细胞的“华尔兹舞蹈”,揭开了胚胎发育过程的神秘面纱。这解释了关键的基因突变如何影响胚胎的正常发育,为科学家进一步了解人类胚胎的形成提供了帮助。

(据科学网)