

瘤状软骨凹顶藻化学成分研究

苏 华^{1,2}, 朱校斌¹, 袁兆慧¹, 李 敬^{1,2}, 郭书举^{1,2}, 韩丽君¹, 史大永¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

摘要:采用硅胶柱色谱以及 Sephadex LH-20 凝胶色谱手段,对海洋红藻瘤状软骨凹顶藻(*Chondrophycus papillous* Garbary et Harper)进行化学成分研究,分离得到 5 个化合物。通过 MS、NMR 等方法对得到的化合物进行结构确证,分别鉴定为邻苯二甲酸二丁酯(I),邻苯二甲酸二异辛酯(II),胆甾醇(III),植醇(IV)和 4-羟基苯甲醛(V)。所有化合物均为首次从该种海藻中分离得到。通过 MTT 法对得到的单体化合物进行细胞毒性筛选,结果显示所有化合物在 10 mg/L 浓度下均无明显活性。

关键词:瘤状软骨凹顶藻(*Chondrophycus papillous* Garbary et Harper); 化学成分; 细胞毒性

中图分类号: Q501

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)05-0033-03

20 世纪 60 年代以来的化学和药理研究表明,海洋红藻凹顶藻属海藻中含有大量结构新颖、生理活性独特的次生代谢产物^[1~4],主要包括倍半萜、二萜、三萜以及 C₁₅ 聚乙酰类化合物^[5],其中萜类衍生物的结构多样性与生物活性多样性尤其引人注目。瘤状软骨凹顶藻(*Chondrophycus papillous* Garbary et Harper)属红藻门(Rhodophyta)、仙菜目(Ceramiales)、松节藻科(Rhodomalaceae)、凹顶藻属(*Laurencia*),在我国广东、海南等海域分布广泛,尚未见对其化学成分的研究报道。作者对采自海南大东海海域的瘤状软骨凹顶藻的化学成分进行了初步研究,从中已分离得到 5 个化合物,分别鉴定为邻苯二甲酸二丁酯(I)、邻苯二甲酸二异辛酯(II)、胆甾醇(III)、植醇(IV)、4-羟基苯甲醛(V)。这些化合物均为首次从该种海藻中分离得到。另外,对得到的单体化合物进行了人肿瘤细胞毒活性测试。

1 仪器与材料

Boetius 显微熔点测定仪(温度未校正);Bruker Avance-500 MHz 核磁共振仪(TMS 内标),Auto-specUltima-Tof 质谱仪。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;所用溶剂均为分析纯或色谱纯。

瘤状软骨凹顶藻(*Chondrophycus papillous* Garbary et Harper)于 2006 年 3 月采自海南大东海海域,由中国科学院海洋研究所丁兰平博士鉴定,标本现存于中国科学院海洋研究所海藻化学研究室,标本编号为 2006012。

2 提取分离

常温风干的瘤状软骨凹顶藻样品(4 kg),粉碎后用 95%乙醇室温下提取 3 次,每次浸泡 6 d。合并提取液,减压浓缩(温度低于 45℃)得浸膏 87.0 g。浓缩物混悬于蒸馏水中,用乙酸乙酯进行萃取,减压浓缩得浸膏 26.7 g。乙酸乙酯萃取部位进行硅胶柱色谱,以石油醚:丙酮(体积比 100:0~0:100)梯度洗脱,薄层色谱检查,合并相似组分,减压浓缩得 10 个部分 F₁~F₁₀。F₅ 部分(1.4 g)[石油醚-丙酮(体积比 20:1)]经凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱[石油醚-氯仿-甲醇,体积比 5:5:1]分离纯化得化合物 I(7.3 mg)和化合物 II(10.2 mg);F₆ 部分(1.3 g)[石油醚-丙酮(体积比 15:1)]经凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱脱色后用正相硅胶柱色谱反复分离纯化重结晶后得化合物 III(9.4 mg);F₇ 部分(0.9 g)[石油醚-丙酮(体积比 10:1)]经正相硅胶柱色谱分离后用凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱[石油醚-氯仿-甲醇,5:5:1]纯化得化合物 IV(8.2 mg);F₁₀ 部分(2.7 g)[石油醚-丙酮(体积比 3:1)]经凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱[石油醚-氯仿-甲醇,体积比 5:5:1]分离纯化得化合物 V(12.1 mg)。

收稿日期: 2008-05-30; 修回日期: 2008-07-09

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30530080); 国家 863 计划项目(2007AA09Z410); 中国科学院知识创新项目(KZCX2-YW-209)

作者简介: 苏华(1978-),男,博士研究生,研究方向为海洋天然产物, E-mail: suhua@ms.qdio.ac.cn; 朱校斌,通信作者,电话: 0532-82898512; E-mail: xbzhu@ms.qdio.ac.cn; 史大永,通信作者, 82898719, E-mail: shidayong@ms.qdio.ac.cn

3 结构鉴定

化合物 I $C_{16}H_{22}O_4$, 无色油状物。IR (film) cm^{-1} : 2 960, 2 935, 2 873 (C-H), 1 732 (C=O), 1 601, 1 466 (苯环), 1 286, 1 122, 1 074 (C-O-C), 744。¹H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ : 0.97 (6H, m, H_3-11 和 H_3-11'), 1.44 (4H, m, H_2-10 和 H_2-10'), 1.72 (4H, m, H_2-9 和 H_2-9'), 4.29 (4H, t, $J = 6.8$ Hz, H_2-8 和 H_2-8'), 7.52 (2H, dd, $J = 3.4$, 5.6 Hz, H-4 和 H-5), 7.71 (2H, dd, $J = 3.4$, 5.6 Hz, H-3 和 H-6)。¹³C-NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ : 13.7 (C-11 和 C-11'), 19.2 (C-10 和 C-10'), 30.6 (C-9 和 C-9'), 65.6 (C-8 和 C-8'), 128.8 (C-3 和 C-6), 130.9 (C-4 和 C-5), 132.4 (C-1 和 C-2), 167.7 (C-7 和 C-7')。EI-MS m/z (%): 278 [M]⁺ (13), 223 (15), 205 (10), 149 (100), 104 (8), 76 (7), 57 (7), 41 (8)。以上数据与文献[6]报道一致, 因此确定化合物 I 的结构为邻苯二甲酸二丁酯。

化合物 II $C_{24}H_{38}O_4$, 无色油状物。¹H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ : 0.91 (12H, m, H_3-14 , H_3-14' 和 H_3-15 , H_3-15'), 1.49 (16H, m, H_2-9 , H_2-9' , H_2-10 , H_2-10' , H_2-11 , H_2-11' , 和 H_2-12 , H_2-12'), 1.69 (2H, m, H-13 和 H-13'), 4.22 (4H, m, H_2-8 和 H_2-8'), 7.52 (2H, dd, $J = 5.7$, 3.3 Hz, H-4 和 H-5), 7.70 (2H, dd, $J = 5.7$, 3.3 Hz, H-3 和 H-6)。¹³C-NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ : 10.9 (C-14 和 C-14'), 14.0 (C-15 和 C-15'), 23.0 (C-12 和 C-12'), 23.9 (C-11 和 C-11'), 29.0 (C-10 和 C-10'), 30.4 (C-9 和 C-9'), 38.8 (C-13 和 C-13'), 68.1 (C-8 和 C-8'), 128.8 (C-3 和 C-6), 130.8 (C-4 和 C-5), 132.5 (C-1 和 C-2), 167.7 (C-7 和 C-7')。以上数据与文献[7]中的数据一致, 因此确定化合物 II 的结构为邻苯二甲酸二异辛酯。

化合物 III $C_{27}H_{46}O$, 无色针晶(甲醇), mp 146~147°C。¹H-NMR (CD_3COCD_3 , 500 MHz) δ : 5.35 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, H-6), 3.60 (1H, d, $J = 4.6$ Hz, 3-OH), 3.38 (1H, m, H-3), 1.08 (3H, s, H-19), 0.99 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 0.90 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-27), 0.8 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-26), 0.72 (3H, s, H-18)。¹³C-NMR (CD_3COCD_3 , 125 MHz) δ : 38.2 (C-1), 32.4 (C-2), 71.6 (C-3), 43.3 (C-4), 142.3 (C-5), 121.3 (C-6), 32.5 (C-7), 32.7 (C-8), 51.8 (C-9), 37.2 (C-10), 21.3 (C-11), 40.5 (C-12), 43.5 (C-13), 57.0 (C-14), 24.9 (C-15), 28.9 (C-16), 57.6 (C-17), 12.4 (C-18), 19.8 (C-19), 36.7 (C-20), 19.0 (C-21), 36.4 (C-22), 24.5 (C-23), 40.2 (C-24), 28.6 (C-25),

23.0 (C-26), 22.8 (C-27)。EIMS m/z (%): 386 [M]⁺ (100), 368 [$M-H_2O$]⁺ (45), 353 [$M-H_2O - Me$]⁺ (35), 301 (36), 275 (55), 273 [M -side chain]⁺ (17), 255 (22), 247 (12), 231 (16), 213 (30), 199 (10), 173 (12), 159 (23), 145 (31), 133 (21), 107 (32), 95 (21), 81 (11)。以上数据与文献[8,9]中的数据基本一致, 因此确定化合物 III 的结构为胆甾醇。

化合物 IV $C_{20}H_{40}O$, 无色油状物。¹H-NMR (CD_3COCD_3 , 500 MHz) δ : 5.36 (1H, t, $J = 6.5$ Hz, H-2), 4.04 (2H, br. s, H-1), 3.36 (1H, s, OH-1), 1.95 (2H, m, H-4), 1.61 (3H, s, H-17), 1.53 (1H, m, H-15), 1.43 (2H, m, H-5), 1.40 (1H, m, H-6a), 1.37 (2H, m, H-7, H-11), 1.33 (1H, m, H-6b), 1.26 (4H, m, H-9, H-13), 1.25 (3H, m, H-8a, H-10a, H-12a), 1.14 (2H, m, H-14), 1.08 (3H, m, H-8b, H-10b, H-12b), 0.88 (6H, d, $J = 6.5$ Hz, H-16, H-20), 0.88 (6H, d, $J = 7.0$ Hz, H-18, H-19)。¹³C-NMR (CD_3COCD_3 , 125 MHz) δ : 59.2 (C-1), 126.0 (C-2), 137.6 (C-3), 40.5 (C-4), 25.7 (C-5), 37.3 (C-6), 33.4 (C-7), 38.3 (C-8), 25.1 (C-9), 38.1 (C-10), 33.5 (C-11), 38.4 (C-12), 25.5 (C-13), 40.1 (C-14), 28.4 (C-15), 22.9 (C-16), 16.1 (C-17), 20.1 (C-18), 20.2 (C-19), 23.0 (C-20)。EIMS m/z (%): 296 [M]⁺ (24), 278 [$M-H_2O$]⁺ (9), 263 (6), 196 (5), 126 (16), 123 (49), 111 (14), 97 (20), 81 (42), 71 (100)。以上波谱数据与文献[10~12]中数据基本一致, 因此确定化合物 IV 的结构为 3,7,11,15-tetramethyl-hexadec-2-en-1-ol 即植醇。

化合物 V $C_7H_6O_2$, 白色粉末。¹H-NMR (CD_3COCD_3 , 500 MHz) δ : 9.85 (1H, s, CHO-1), 9.36 (1H, s, OH-4), 7.79 (2H, dd, $J = 6.5$, 2.0 Hz, H-2, 6), 6.99 (2H, dd, $J = 6.5$, 2.0 Hz, H-3, 5)。EIMS m/z (%): 122 [M]⁺ (100), 121 (96), 111 (10), 93 (42), 65 (28)。以上波谱数据与文献[13]中的数据基本一致, 因此确定化合物 V 的结构为 4-羟基苯甲醛。

4 肿瘤细胞毒活性测试

用 MTT 法^[14]对上述 5 个化合物在人肿瘤细胞 HCT-8, BEL-7402, BGC-823, A549 和 HELA 模型上进行了细胞毒活性测试, 结果表明所有化合物对以上细胞株均无明显细胞毒活性 ($IC_{50} > 10$ mg/L)。

参考文献:

- [1] Ayyad S N, Jakupovic J, Abdel-Mogib M. A Sesquiterpene ether from *Laurencia obtuse* [J]. *Phytochemis-*

- try, 1994, 36: 1 077-1 078.
- [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: 6 749-6 755.
- [4] Erickson K L, Scheuer P J. Marine Natural Products [M]. Vol. 5, New York: Academic Press, 1983. 131.
- [5] 史大永, 贺娟, 许凤, 等. 凹顶藻属海藻化学成分研究进展 [J]. 海洋科学, 2007, 31(4): 81-91.
- [6] Shuichi H, Yoshinori A, Takashi I, *et al.* Phthalate esters of cryptotaenia Canadensis DC. VAR. *Japonica makino* (Umbelliferae) [J]. **Tetrahedron Lett**, 1967, 50: 5 601-5 603.
- [7] Kim Y J, Jonas J. Dynamics of complex phthalate liquids. 2. Structural effects of side chains [J]. **J Phys Chem**, A 1998, 102: 2 778-2 784.
- [8] 肖定军, 邓松之, 曾陇梅. 南海海绵 *Clathria fasciculata* 化学成分的研究(I) [J]. 中国海洋药物, 2002, 2: 1-3.
- [9] 王奇志, 梁敬钰, 陈军. 吴茱萸化学成分研究(II) [J]. 中国药科大学学报, 2005, 36(6): 520-522.
- [10] James J S and John A P. Isolation of free cis and trans- phytol from the red alga *Gracilaria andersoniana* [J]. **Phytochemistry**, 1976, 15: 1 076-1 077.
- [11] Geoffrey D B, Liang G Y, Lai-King Sy. Terpenoids form the seeds of *Artemisia annua* [J]. **Phytochemistry**, 2003, 64: 303-323.
- [12] Roy A G, Eric O, Adam A. Assignments in the natural-abundance carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrum of chlorophyll a and a study of segmental motion in neat phytol [J]. **J Amer Chem Soc**, 1973, 95(23): 7 553 -7 558.
- [13] Zhou S M, Ma W J, Xiao D J, *et al.* Studies on the chemical constituents of the marine sponge *Topsentia* sp. from the South China Sea [J]. **Chin J Mar Drugs**, 2004, 23(5): 18-20.
- [14] Carmichael J, Degraff W G, Gazdar A F, *et al.* Evaluation of atetozolium based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing [J]. **Cancer Res**, 1987, 47(4): 936-942.

Studies on chemical constituents of *Chondrophycus papillous*

SU Hua^{1,2}, ZHU Xiao-bin¹, YUAN Zhao-hui¹, LI Jing^{1,2}, GUO Shu-ju^{1,2}, HAN Li-jun¹, SHI Da-yong¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: May, 30, 2008

Key words: *Chondrophycus papillous* Garbary *et Harper*; chemical constituents; MTT assay

Abstract: In order to search for bioactive natural products from marine algae, the chemical constituents of red alga *Chondrophycus papillous* was investigated by the combination of normal phase silica gel and Sephadex LH-20 column chromatography. Five compounds, Dibutyl orthophthalates(I), 1,2-benzenedicarboxylic acid, diisooctylester(II), cholesterol(III), Phytol(IV), p-hydroxy phenyl aldehyde(V), were isolated and their structures were elucidated by spectroscopic methods including NMR and MS techniques. All these compounds were isolated from the *C. papillous* for the first time. Cytotoxicities of the purified compounds were evaluated by MTT methods, however, all of them were found inactive($IC_{50} > 10$ mg/L).

(本文编辑:张培新)