

小粘膜藻 4 种化合物的分离和结构鉴定

徐秀丽^{1,3}, 范晓¹, 宋福行^{1,3}, 石建功²

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071; 2. 中国医学科学院中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:利用正相硅胶、生物胶 Bio-beads、Sephadex LH-20 柱色谱、反相 HPLC 及重结晶等分离手段, 从小粘膜藻 (*Leathesia nana*) 中分离得到 4 个化合物, 通过 IR、MS、1D 和 2D NMR 等现代波谱技术鉴定结构为: 吲哚-3-甲酸 (1)、3,5-二羟基-4-甲氧基苯甲醇 (2)、1-O-十六烷酰基甘油酯 (3) 和岩藻甾醇 (4)。以上化合物均为首次从该属海藻中分离鉴定。

关键词:小粘膜藻 (*Leathesia nana*); 化学成分; 结构鉴定

中图分类号:Q58 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3096(2004)05-0040-04

海藻能产生丰富多样的生物活性物质^[1,2], 有些低等海洋动物体内的活性物质也是通过生物链直接或间接来自于海藻。随着现代分离手段和结构鉴定技术的发展, 从海藻中寻找活性化合物, 越来越引起关注^[3,4]。

小粘膜藻 (*Leathesia nana*) 系褐藻门粘膜藻科粘膜藻属 (*Leathesia*) 海藻, 在黄海海域广泛分布^[5], 关于

收稿日期: 2003-10-14; 修回日期: 2004-02-26

基金项目: 国家自然科学基金重点基金 (B20001702); 国家高技术发展计划 (863 计划) 专项 (2001AA620403)

作者简介: 徐秀丽 (1976-), 女, 河北卢龙人, 博士, 从事海洋天然产物研究, E-mail: xiulixu@eyou.com; 范晓, 通讯作者, 电话: 0532-2893549; 石建功, 通讯作者, 电话: 010-83154789

其化学成分的研究未见报道。作者对其化学成分进行了研究,利用正相硅胶、生物胶 Bio-beads、Sephadex LH-20 柱色谱、反相 HPLC 及重结晶等分离纯化手段,已分离得到 4 个化合物,通过 IR、MS、1D 和 2D NMR 等波谱技术,鉴定其结构分别为吲哚-3-甲酸(1)、3,5-二羟基-4-甲氧基苯甲醇(2)、1-O-十六烷酰基甘油酯(3)和岩藻甾醇(4),它们的结构式如图 1 所示。以上化合物均为首次从该属海藻中发现。

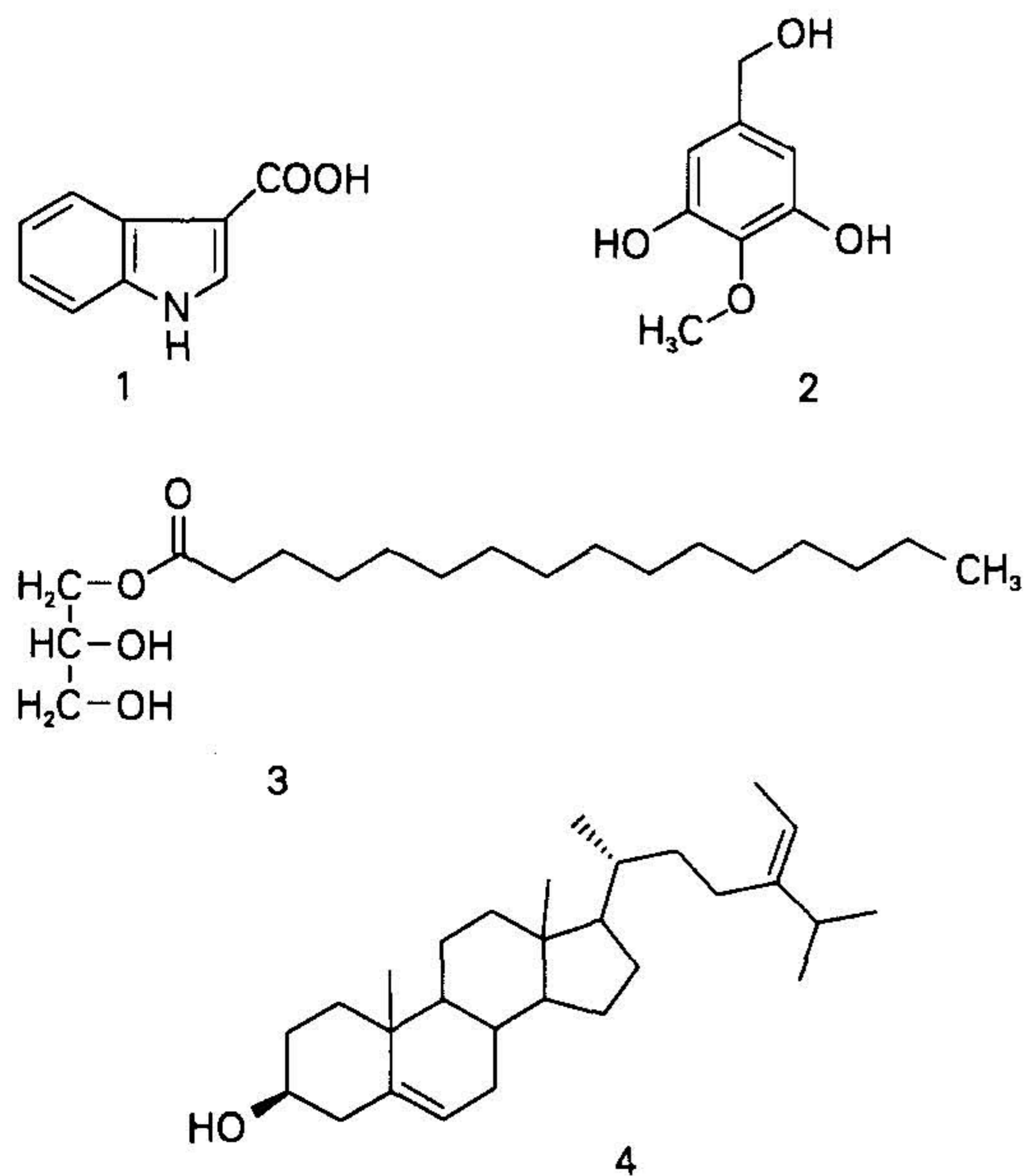


图 1 化合物 1~4 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1~4

1 材料与方 法

1.1 生物样品

小粘膜藻于 2002 年 5 月采自山东威海海域,由中国科学院海洋研究所鉴定,标本保存在中国科学院海洋研究所。

1.2 仪器与试剂

XT-4 显微熔点测定仪(温度计未校正); Nicolet impact 400 型傅立叶变换红外光谱仪; Inova 500 型核磁共振仪; Autospec-Ultima ETOF 型质谱仪; Waters 600 型高效液相色谱仪 [2487 型紫外检测器, Alltima C18 10 μ 色谱柱 (22 \times 250 mm)]; 薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ 和柱色谱硅胶 (160-200 目) 均为青岛海洋化工厂产品; 生物胶 Bio-beads SX3(200-400 目) 为 BioRad Laboratories 产品; 凝胶 Sephadex LH-20 为 Amersham Pharmacia Biotech AB 生产; 显色剂为 5% 硫酸乙醇溶

液和 1% 三氯化铁乙醇溶液,其余试剂为分析纯或色谱纯。

1.3 提取与分离

常温风干的海藻样品 (8.25 kg), 用 95% 的乙醇室温浸泡 3 天, 提取 3 次, 提取液减压浓缩(温度低于 40 $^{\circ}$ C) 得乙醇提取物 710 g; 然后将乙醇提取物悬浮于蒸馏水中, 用乙酸乙酯萃取, 有机相回收溶剂得萃取物 125 g。取乙酸乙酯萃取物, 干法上样, 进行正相硅胶柱色谱分离, 用石油醚-丙酮 [φ (石油醚): φ (丙酮)] 为 100:0-1:1) 和氯仿-甲醇 [φ (氯仿): φ (甲醇)] 为 100:0-0:100 梯度洗脱, 薄层色谱检查, 合并相同部分。石油醚-丙酮 [φ (石油醚): φ (丙酮)] 为 10:1 洗脱部分经过反复正相硅胶、生物胶 Bio-beads、凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱和反相 HPLC 分离纯化, 得到化合物 1~4。

2 物理常数与波谱数据

化合物 1: 白色针状结晶; mp 206~208 $^{\circ}$ C (Me₂CO); EIMS m/z 161.3 [M]⁺ (41), 144.3 (36), 116.2 (100), 89.2 (31), 63.1 (12), 45.1 (23); IR V_{max}^{KBr} cm⁻¹ 3419, 2463, 1684, 1633, 1558, 1522, 1437, 1317, 787, 754, 741, 669 cm⁻¹; ¹H-NMR (MeOH-d₄, 500 MHz) δ 8.02 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-4), 7.85 (1H, s, H-2), 7.35 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-7), 7.12 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-6), 7.08 (1H, t, J = 7.5 Hz, H-5); ¹³C-NMR (MeOH-d₄, 125 MHz) δ (170.3 (s, C-10), 138.2 (s, C-8), 133.0 (d, C-2), 127.7 (s, C-9), 123.4 (d, C-6), 122.1 (d, C-4, 5), 112.8 (d, C-7), 109.5 (s, C-3)。

化合物 2: 淡黄色粉末; mp 165~167 $^{\circ}$ C (Me₂CO); EIMS m/z 170.2 [M]⁺ (100), 153.1 (19), 141.1 (10), 127.1 (36), 109.1 (79), 81.1 (63); IR V_{max}^{KBr} cm⁻¹ 3298, 2831, 2546, 2449, 2322, 1601, 1529, 1446, 1360, 1194, 1140, 1005, 839, 769, 675, 592, 472 cm⁻¹; ¹H-NMR (Me₂CO-d₆, 500 MHz) δ 7.83 (2H, s, OH-3, 5), 6.40 (2H, s, H-2, 6), 4.42 (2H, d, J = 5.5 Hz, H-7), 3.95 (1H, t, J = 5.5 Hz, OH-7), 3.76 (3H, s, H-8); ¹³C-NMR (Me₂CO-d₆, 125 MHz) δ (151.1 (s, C-3, 5), 139.3 (s, C-4), 135.0 (s, C-1), 106.5 (d, C-2, 6), 64.5 (t, C-7), 60.6 (q, C-8)。

化合物 3: 白色粉末; mp 48~50 $^{\circ}$ C (CHCl₃); EIMS m/z 330.4 [M]⁺ (16), 299.4 (12), 239.3 (77), 134.1 (48), 112.1 (33), 98.1 (100), 84.1

(65), 74.1 (76); $^1\text{H-NMR}$ (CHCl_3-d , 500 MHz) δ 4.20 (1H, dd, $J = 4.5, 12.0$ Hz, H-1a), 4.14 (1H, dd, $J = 6.0, 12.0$ Hz, H-1b), 3.93 (1H, m, H-2), 3.69 (1H, dd, $J = 4.0, 11.0$ Hz, H-3a), 3.61 (1H, dd, $J = 6.0, 11.0$ Hz, H-3b), 2.35 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-2'), 1.63 (2H, m, H-3'), 1.29-1.25 (24H, br, H-4'~15'), 0.88 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-16').

化合物 4: 白色粉末; mp 132~134 $^{\circ}\text{C}$ (Me_2CO); IR $V_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} 3419, 2958, 2935, 2866, 1668, 1466, 1379, 1194, 1049, 1022, 958, 822 cm^{-1} ; 在紫外灯 UV_{254} 下无暗斑, 与岩藻甾醇标准品混合熔点不下降。

3 结果与讨论

化合物 1 为白色针状结晶, mp 206~208 $^{\circ}\text{C}$ 。EIMS 显示其分子离子峰 m/z 161.3 $[\text{M}]^+$, 表明含有奇数个氮; 失去一个羟基后的碎片离子 m/z 144.3, 失去一个羧基后的碎片离子 m/z 116.2。IR 光谱 (KBr) 显示分子中存在羟基 (3419 cm^{-1}), 苯环 (1522 cm^{-1})。 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) 谱芳香质子区显示两个苯环质子双峰信号 δ 8.02 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-4), 7.35 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-7), 以及两个三重峰 δ 7.12 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-6), 7.08 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-5), 由此推断结构中可能存在一个邻二取代的苯环片段。除此之外, 芳香区还给出一个芳香质子单峰信号 δ 7.85 (1H, s, H-2)。 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 DEPT 谱显示分子中存在 9 个碳原子, 分别为 5 个 sp^2 杂化的次甲基碳 [δ 133.0 (d, C-2), 123.4 (d, C-6), 122.1 (d, C-4, 5), 112.8 (d, C-7)], 4 个 sp^2 杂化的季碳 [δ 170.3 (s, C-10), 138.2 (s, C-8), 127.7 (s, C-9), 109.5 (s, C-3)], 其中一个羧基碳 [δ 170.3 (s, C-10)]。根据以上信息, 推定化合物 1 的结构为羧基取代的吲哚。通过 HMBC 实验, 结合碳谱和氢谱中的化学位移, 确定了羧基的取代位置。在化合物 1 的 HMBC 图谱中, H-2 与 C-8、C-9 和 C-10 存在远程相关 (图 2), 除此之外, 在 HMBC 谱中, H-4 与 C-6 和 C-8; H-5 与 C-7 和 C-9; H-6 与 C-4 和 C-8 以及 H-7 与 C-5 和 C-9 存在远程相关, 进一步证实了苯环的邻二取代结构单元的存在。因此, 确定化合物 1 为吲哚-3-甲酸。化合物 1 的理化常数和波谱数据与文献 [6] 中报道吲哚-3-甲酸的相关数据一致。

化合物 2 为淡黄色粉末, mp 165~167 $^{\circ}\text{C}$

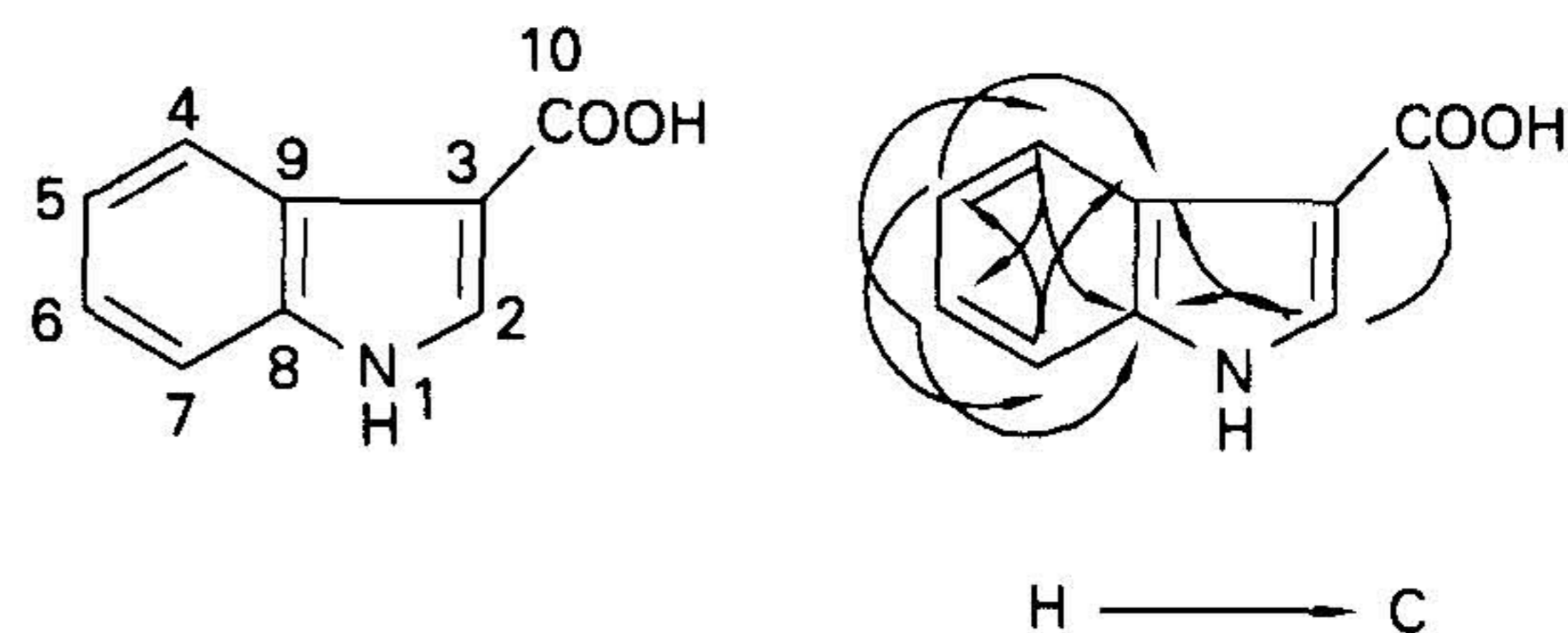


图 2 化合物 1 的结构及 HMBC 谱中关键相关信号

Fig. 2 Structure and key HMBC correlations of compound 1

(Me_2CO)。EIMS 给出分子离子峰 m/z 170.2 $[\text{M}]^+$ 。IR 光谱 (KBr) 显示分子中存在羟基 (3444, 3298 cm^{-1}) 和苯环 (1529 cm^{-1})。 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{Me}_2\text{CO}-d_6$) 谱中低场区给出两个羟基质子单峰信号 δ 7.83 (2H, s, OH-3, 5) 和两个苯环质子单峰信号 δ 6.40 (2H, s, H-2, 6), 以及一对互相耦合的亚甲基质子和羟基质子信号 δ 4.42 (2H, d, $J = 5.5$ Hz, H-7) 和 3.95 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, OH-7), 一个甲基质子单峰信号 δ 3.76 (3H, s, H-8)。 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 DEPT 谱显示分子中存在 8 个碳原子, 分别为 4 个 sp^2 杂化的季碳 [δ 151.1 (s, C-3, 5), 139.3 (s, C-4) 和 135.0 (s, C-1)], 两个 sp^2 杂化的次甲基碳 [δ 106.5 (d, C-2, 6)], 一个亚甲基碳 [δ 64.5 (t, C-7)] 和一个甲基碳 [δ 60.6 (q, C-8)]。根据以上数据提供的信息, 推测化合物 2 的结构为 3, 5-二羟基-4-甲氧基苯甲醇。化合物 2 的理化常数与文献 [7] 中报道 3, 5-二羟基-4-甲氧基苯甲醇的相关数据一致。

化合物 3 为白色粉末, mp 48~50 $^{\circ}\text{C}$ (CHCl_3)。EIMS 给出分子离子峰 m/z 330.4 $[\text{M}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CHCl_3-d) 给出典型甘油醇结构单元质子信号 δ 4.20 (1H, dd, $J = 4.5, 12.0$ Hz, H-1a), 4.14 (1H, dd, $J = 6.0, 12.0$ Hz, H-1b), 3.93 (1H, m, H-2), 3.69 (1H, dd, $J = 4.0, 11.0$ Hz, H-3a) 和 3.61 (1H, dd, $J = 6.0, 11.0$ Hz, H-3b), 以及长链脂肪酸结构单元质子信号 δ 2.35 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-2'), 1.63 (2H, m, H-3'), 1.29-1.25 (24H, br, H-4'~15') 和 0.88 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-16')。根据 $^1\text{H-NMR}$ 推测化合物 3 为单取代的长链脂肪酸甘油酯类化合物, 结合 EIMS 给出的相对分子质量 m/z 330.4 $[\text{M}]^+$, 确定其分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_4$, 计算不饱和度为 1。综合以上数据, 推测化合物 3 的结构为 1-O-十六烷酰基甘油酯。化合物 3 的理化性质和光谱数据与文献 [8] 中报道的 1-O-十六烷酰基

甘油酯一致。

化合物 4 为白色粉末, mp 132 ~ 134 °C (Me₂CO)。在紫外灯 UV₂₅₄ 下无暗斑, 遇硫酸乙醇溶液加热呈紫红色, 与岩藻甾醇标准品对照, 用两种不同展开剂展开, 进行 TLC 实验, 其显色情况及 R_f 值均相同。化合物 4 的 IR 光谱与文献[9]中报道的岩藻甾醇一致, 因此确定化合物 4 的结构为岩藻甾醇。

作者在对小粘膜藻的生物活性筛选中, 发现了它的抗肿瘤等生物活性, 关于其化学成分的研究尚待进行。

参考文献:

- [1] Wiemer D F, Idler D D, Fenical W, Vidalols A and B, new anti-inflammatory bromophenols from the Caribbean marine red alga *Vidalia obtusiloba* [J]. *Experientia*, 1991, 47(8): 851 - 853.
- [2] König G M, Wright A D. Sesquiterpene contents of the antibacterial dichloromethane extract of the marine red alga *Laurencia obtusa* [J]. *Planta Medica*, 1997, 63(2): 186 - 187.
- [3] 汤海峰, 易杨华, 姚新生, 等. 褐藻铁钉菜化学成分的研究(II)[J]. *中国海洋药物*, 2003, 94(4): 8 - 12.
- [4] Choi J S, Park H J, Jung H A, et al. A Cyclohexanonyl Bromophenol from the Red Alga *Symphyclocladia latiuscula* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(12): 1705 - 1706.
- [5] 黄宗国. 中国海洋生物种类与分布[M]. 北京: 海洋出版社, 1994. 15 - 233.
- [6] Matthew B, William H G. 3 - (hydroxyacetyl)indole, a plant growth regulator from the oregon red alga *Prionitis lanceolata* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(12): 3697 - 3698.
- [7] Patrick T G, Peter A P. Gadusol, a metabolite from fish eggs [J]. *Tetrahedron Letters*, 1980, 21: 4043 - 4044.
- [8] 俎成立, 顾谦群, 方玉春, 等. 柄海鞘 *Styela clava* 化学成分的研究(II) [J]. *青岛海洋大学学报*, 2000, 30(2): 255 - 258.
- [9] Sheu J H, Wang G H, Sung P J, et al. Cytotoxic sterols from the brown alga *Turbinaria ornatea* [J]. *Planta Medica*, 1997, 63(6): 571 - 572.

Isolation and structure elucidation of four compounds from brown alga *Leathesia nana*

XU Xiu-li^{1,3}, FAN xiao¹, SONG Fu-hang^{1,3}, SHI Jian-gong²

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received: Oct., 14, 2003

Key words: *Leathesia nana*; chemical constituents; structure elucidation

Abstract: Four compounds, 1H-indole-3-carboxylic acid (1), 3,5-dihydroxy-4-methoxyl benzyl alcohol (2), 1-O-hexanoyl-glycerol ester (3) and fucosterol (4), were isolated from the brown alga *Leathesia nana*. Compounds 1-4 were obtained by normal phase silica gel, Bio-beads SX3, Sephadex LH-20 chromatography and reverse phase HPLC techniques. Their structures were identified by spectroscopic methods including IR, EIMS, 1D and 2D NMR. Compounds 1~4 were isolated from this species for the first time.

(本文编辑:张培新)