

褐藻小粘膜藻的化学成分*

徐秀丽 范晓¹⁾ 宋福行 杨永春²⁾ 韩丽君 石建功^{2) 1)}

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 中国科学院研究生院 北京 100039)

¹⁾(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

²⁾(中国医学科学院暨中国协和医科大学药物研究所 北京 100050)

提要 应用正相硅胶、生物胶 Bio-Beads、凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱和反相 HPLC 等层析方法,从小粘膜藻(*Leathesia nana*)中分离得到7个化合物,通过 IR、MS、1D 和 2D NMR 等波谱技术鉴定为4-羟基苯甲酸(1)、3-羟乙酰基吡啶(2)、2,3-二溴-4,5-二羟基苯甲醛(3)、3-溴-4,5-二羟基苯甲醛(4)、2,3-二溴-4,5-二羟基苯甲基乙醚(5)、双-(2,3-二溴-4,5-二羟基-卞基)-醚(6)和3-溴-4-(2,3-二溴-4,5-二羟基苯甲基)-5-甲氧基苯二酚(7)。

关键词 褐藻,小粘膜藻,化学成分,结构鉴定

中图分类号 R931.77

近年来,有关海藻活性物质的研究越来越多(李宪瑾等,2002;牛荣丽等,2003;田超等,2004;徐秀丽等,2004),但关于海藻化学成分的研究报道不多(Kurihara *et al.*, 1999),对小粘膜藻化学成分和结构的研究尚未见报道。小粘膜藻(*Leathesia nana*)系粘膜藻属褐藻,广泛分布于黄渤海海域。在对山东沿海海藻活性筛选中,作者发现小粘膜藻乙醇提取物具有较好的选择性细胞毒活性(徐年军等,2001;徐秀丽等,2004),对人口腔上皮癌 KB 细胞的 LD₅₀(medial lethal dose)为 12.65 μg/ml,对人大肠腺癌细胞 HIF-29 的 LD₅₀为 40.60 μg/ml,但对正常细胞 NIH-3T3 的 LD₅₀> 50 μg/ml,无明显毒性。薄层色谱分析表明,小粘膜藻乙酸乙酯相存在三氯化铁显色的物质,因此对其化学成分进行了初步研究。

1 实验部分

1.1 生物样品

小粘膜藻(*Leathesia nana*)于2002年5月采自山东威海海域,标本保存在中国科学院海洋研究所标本馆。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 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 μm 色谱柱(22 mm × 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。

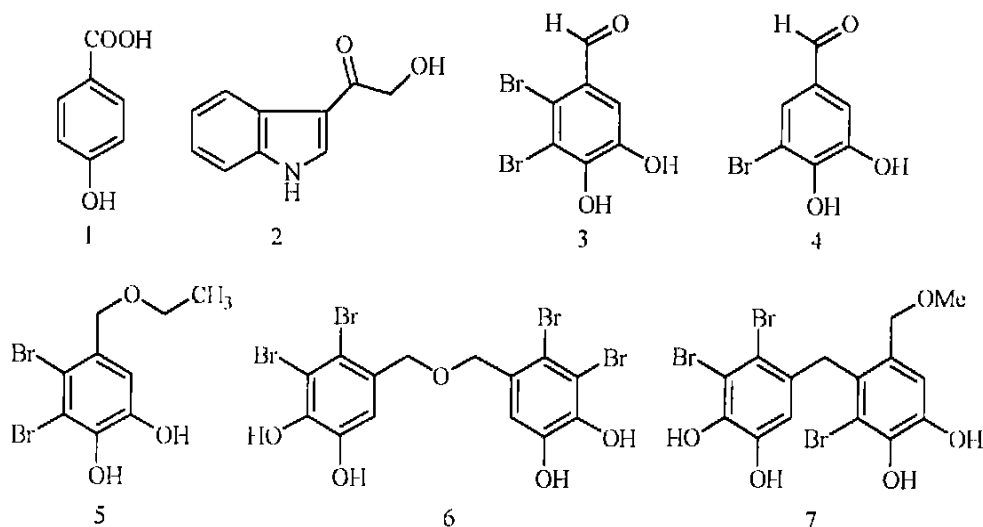
1.2.2 提取与分离 常温风干的海藻样品 8.25 kg,用 95% 的乙醇室温浸泡 3 天,提取 3 次,提取液减压浓缩(温度低于 40℃)得乙醇提取物 710 g;然后将乙醇提取物悬浮于蒸馏水中,用乙酸乙酯萃取,有机相回收溶剂得萃取物 125 g。取乙酸乙酯萃取物,干法上样,进行正相硅胶柱色谱分离,用石油醚:丙酮(100:0—1:1)和氯仿:甲醇(100:0—0:100)梯度洗脱,薄层色谱检查,合并相同部分。石油醚:丙酮(3:1)洗脱部分经过正相硅

* 国家自然科学基金重点基金资助项目,29932030 号;国家“863”高技术发展计划专项,2001AA620403 号。徐秀丽,博士, E-mail: xiuli@eyou.com

1) 通讯作者; fxiao@ms.qdio.ac.cn; shijg@imm.ac.cn

收稿日期: 2003-03-12, 收修改稿日期: 2004-05-18

胶、生物胶 Bio-Beads、凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱和反相 HPLC 分离纯化, 现已分离纯化并鉴定了 7 个化合物, 结构分别为: 4-羟基苯甲酸 (1)、3-羟基乙酰基吲哚 (2)、2,3-二溴-4,5-二羟基苯甲醛 (3)、3-溴-4,5-二羟基苯甲醛 (4)、2,3-二溴-4,5-二羟基苯甲醚 (5)、双-(2,3-二溴-4,5-二羟基苯基)-醚 (6) 和 3-溴-4-(2,3-二溴-4,5-二羟基苯基)-5-甲氧基苯二酚 (7), 其化合物结构式如下:



2 结果与讨论

化合物 (1) IR 谱显示有羟基 (3388 cm^{-1})、羰基 (1676 cm^{-1}) 和苯环 (1608 cm^{-1} 和 1595 cm^{-1}); EMS 谱给出分子离子峰 m/z 138 $[M]^+$ 以及失去羟基的碎片 m/z 121; ^1H NMR 显示两个积分相等的双峰 δ 7.92 (2H, d, $J = 8.5\text{ Hz}$) 和 6.91 (2H, d, $J = 8.5\text{ Hz}$) 为 1,4 取代的苯环质子信号。综上所述, 推测化合物 1 为 4-羟基苯甲酸。化合物 1 的理化数据与 4-羟基苯甲酸的文献数据一致 (曾志等, 1995)。

化合物 (2) IR 谱显示有羟基 (3207 cm^{-1})、羰基 (1641 cm^{-1}) 和苯环 (1579 、 1520 和 1425 cm^{-1}); EMS 谱给出分子离子峰 m/z 175 $[M]^+$, 表明含有奇数氮原子; 在 ^1H NMR 谱芳香质子区显示两个双峰 δ 8.15 (1H, d, $J = 7.0\text{ Hz}$) 和 7.38 (1H, d, $J = 7.0\text{ Hz}$) 以及两个三重峰 δ 7.12 (1H, t, $J = 7.5\text{ Hz}$) 和 7.10 (1H, t, $J = 7.5\text{ Hz}$), 由此推断结构中存在 1 个邻二取代的苯环片段; ^{13}C NMR 和 DEPT 谱显示, 4 个 sp^2 杂化的次甲基碳 δ 134.0 (d, G-2)、124.4 (d, G-5)、123.3 (d, G-6) 和 122.6 (d, G-7) 以及两个 sp^2 杂化的季碳 δ 138.2 (s, G-8) 和 126.9 (s, G-9), 结合 HMQC 和 HMBC 实验, 确定化合物 2 为 3-羟基乙酰基吲哚。化合物 2 的理化常数与文献报道的 3-羟基乙酰基吲哚的相关数据一致 (Tsujii *et al.*, 1988)。

溴-4,5-二羟基苯甲醛 (4)、2,3-二溴-4,5-二羟基苯甲醚 (5)、双-(2,3-二溴-4,5-二羟基苯基)-醚 (6) 和 3-溴-4-(2,3-二溴-4,5-二羟基苯基)-5-甲氧基苯二酚 (7), 其化合物结构式如下:

化合物 (3) IR 谱显示有羟基 (3298 cm^{-1})、羰基 (1641 cm^{-1}) 和苯环 (1593 和 1570 cm^{-1}); EMS 谱给出典型二溴化合物的分子离子峰簇 m/z 298/296/294 $[M]^+$ (1:2:1); ^1H NMR 谱显示醛基质子 δ 10.14 (1H, s, H-7) 和苯环质子 δ 7.42 (1H, s, H-6); ^{13}C NMR 和 DEPT 谱显示 7 个碳信号, 分别为 1 个醛基碳 δ 191.2 (d, G-7), 1 个苯环次甲基碳 δ 114.6 (d, G-6) 和 5 个苯环季碳 δ 151.3 (s, G-4)、145.8 (s, G-5)、128.4 (s, G-1)、121.6 (s, G-3) 和 114.4 (s, G-2)。根据以上数据推断化合物 3 为 2,3-二溴-4,5-二羟基苯甲醛。化合物 3 的理化常数与文献报道的 2,3-二溴-4,5-二羟基苯甲醛的相关数据一致 (Katsui *et al.*, 1967; Weinstein *et al.*, 1975)。

化合物 (4) IR 谱显示有羟基 (3427 cm^{-1})、羰基 (1641 cm^{-1}) 和苯环 (1577 和 1498 cm^{-1}); EMS 谱给出典型单溴取代化合物的特征分子离子峰 m/z 218/216 $[M]^+$ (1:1); ^1H NMR 谱显示醛基质子 δ 9.76 (1H, s) 以及两个间位偶合的苯环质子双峰 δ 7.61 (1H, d, $J = 2.0\text{ Hz}$) 和 7.35 (1H, d, $J = 2.0\text{ Hz}$); ^{13}C NMR 和 DEPT 谱显示 1 个醛基碳 δ 190.3 (d, G-7), 2 个连氧季碳 δ 150.0 (s, G-4) 和 146.9 (s, G-5), 2 个苯环次甲基碳 δ 128.3 (d, G-6)、113.9 (d, G-2) 和 1 个连溴季碳 δ 110.0 (s, G-3)。综上所述, 初步推断化合物

4 为 3-溴-4,5-二羟基苯甲醛。化合物 4 的理化常数与文献报道的 3-溴-4,5-二羟基苯甲醛的相关数据一致(Kurata *et al.*, 1980)。

化合物(5) IR 谱显示有羟基(3423 cm^{-1})和苯环(1577 和 1469 cm^{-1}); EIMS 谱给出二溴化物的典型分子离子峰簇 m/z 328/326/324 $[M]^+$ (1:2:1); ^1H NMR 谱显示 1 个苯环质子单峰 δ 7.07(1H, s)、1 个亚甲基质子单峰 δ 4.44(2H, s)、1 个亚甲基质子四重峰 δ 3.55(2H, q, $J = 7.0\text{ Hz}$) 和 1 个甲基三重峰 δ 1.20(3H, t, $J = 7.0\text{ Hz}$); ^{13}C NMR 和 DEPT 谱显示 1 个苯环上的次甲基碳 δ 115.3(d, G-6)、5 个苯环季碳 δ 145.6(s, G-5)、144.4(s, G-4)、131.9(s, G-1)、114.3(s, G-2) 和 113.6(s, G-3)、2 个亚甲基碳 δ 73.2(t, G-7) 和 66.5(t, G-8) 及 1 个甲基碳 δ 15.5(q, G-9)。结合 HMBC 实验, 确定化合物 5 为 2,3-二溴-4,5-二羟基苯甲基乙醚。化合物 5 的理化常数与文献报道的 2,3-二溴-4,5-二羟基苯甲基乙醚的相关数据一致(Lennart *et al.*, 1979)。

化合物(6) IR 谱显示有羟基(3419 cm^{-1})、苯环(1583 和 1473 cm^{-1}); EIMS 谱给出四溴化物的典型分子离子峰簇 m/z 582/580/578/576/574 $[M]^+$ (1:4:6:4:1); ^1H NMR 谱显示苯环质子单峰 δ 7.15(2H, s) 和亚甲基单峰 δ 4.59(4H, s); ^{13}C NMR 和 DEPT 谱显示 1 个苯环次甲基碳 δ 115.1(d, G-6, 6'), 1 个亚甲基碳 δ 72.8(t, G-7, 7') 以及 5 个苯环季碳 δ 145.1(s, G-4, 4'), 144.2(s, G-5, 5'), 133.3(s, G-1, 1'), 115.1(s, G-3, 3') 和 114.3(s, G-2, 2')。结合 EIMS 谱, 推测化合物 6 为 1 个具有对称结构的二聚体, 即双(2,3-二溴-4,5-二羟基苯基)-醚。化合物 6 的理化常数与文献报道的双(2,3-二溴-4,5-二羟基苯基)-醚的相关数据一致(Kurihara *et al.*, 1999; Minoru *et al.*, 1980)。

化合物(7) IR 谱显示有羟基(3415 cm^{-1})和苯环(1589 和 1489 cm^{-1}); EIMS 谱给出三溴取代化合物的典型分子离子峰簇 m/z 516/514/512/510 $[M]^+$ (1:3:3:1); ^1H NMR 谱显示两个苯环质子单峰 δ 6.98(1H, s) 和 6.07(1H, s)、两个亚甲基单峰 δ 4.20(2H, s) 和 4.12(2H, s) 以及 1 个甲基单峰 δ 3.23(3H, s); ^{13}C NMR 和 DEPT 谱显示, 两个苯环上的次甲基碳 δ 116.2(d, G-6) 和 114.8(d, G-6'), 10 个苯环季碳 δ 145.4(s, G-1)、144.8(s, G-5'), 143.5(s, G-4'), 143.5(s, G-2)、

132.3(s, G-5)、130.7(s, G-1)、129.5(s, G-4)、116.2(s, G-2)、114.8(s, G-3) 和 113.6(s, G-3'), 两个亚甲基碳 δ 73.2(t, G-8) 和 58.0(t, G-7) 以及 1 个甲基碳 δ 39.3(q, G-9)。通过以上数据提供的结构信息, 推断化合物 7 为 3-溴-4(2,3-二溴-4,5-二羟基苯甲基)-5-甲氧甲基苯二酚。化合物 7 的理化常数与文献中报道 3-溴-4(2,3-二溴-4,5-二羟基苯甲基)-5-甲氧甲基苯二酚的相关数据一致(Kurata *et al.*, 1977)。

3 物理常数和波谱数据

化合物(1) 淡黄色粉末, mp: 211—213 $^{\circ}\text{C}$ (CH_3COCH_3)。EIMS m/z 138 $[M]^+$ (75)、121(100)、93(25)、65(21)、53(7)、39(18); IR (KBr) $\nu_{\max}$ 3388、2831、2548、1676、1608、1595、1423、1317、1244、1169、1101、931、854、769、619、546 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3COCD_3 , 500 MHz) δ 7.92(2H, d, $J = 8.5\text{ Hz}$, H-2, 6)、6.91(2H, d, $J = 8.5\text{ Hz}$, H-3, 5)。

化合物(2) 淡黄色粉末, mp: 158—160 $^{\circ}\text{C}$ (CH_3COCH_3); EIMS m/z 175 $[M]^+$ (23)、144(100)、116(21)、89(14)、44(11); IR (KBr) $\nu_{\max}$ 3207、2397、1641、1579、1520、1425、1367、1308、1238、1161、1076、924、744 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ 8.15(1H, d, $J = 7.0\text{ Hz}$, H-5'), 8.12(1H, s, H-2)、7.38(1H, d, $J = 7.0\text{ Hz}$, H-4)、7.15(1H, t, $J = 7.0\text{ Hz}$, H-5)、7.14(1H, t, $J = 7.0\text{ Hz}$, H-6)、4.66(2H, s, H-11); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ 196.0(s, G-10)、138.2(s, G-8)、134.0(d, G-2)、126.9(s, G-9)、124.4(d, G-5)、123.3(d, G-6)、122.6(d, G-7)、114.8(s, G-3)、112.9(d, G-4)、66.3(t, G-11)。

化合物(3) 白色粉末, mp: 202—204 $^{\circ}\text{C}$ (CH_3COCH_3)。EIMS m/z 298/296/294 $[M]^+$ (49/96/54)、267(8)、217/215(70/68)、189(11)、107(17)、77(15)、51(21)、44(90); IR (KBr) $\nu_{\max}$ 3298、1641、1593、1570、1392、1340、1294、1165、1036、868、827、735、696 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3COCD_3 , 500 MHz) δ 10.14(1H, s, H-7)、7.42(1H, s, H-6); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3 , 125 MHz) δ 191.2(d, G-7)、151.3(s, G-4)、145.8(s, G-5)、128.4(s, G-1)、121.6(s, G-3)、114.6(d, G-6)、114.4(s, G-2)。

化合物(4) 淡黄色粉末, mp: 228—230 $^{\circ}\text{C}$ (CH_3COCH_3)。EIMS m/z 218/216 $[M]^+$ (79/77)、

217/215(100/89)、187(17)、107(16)、79(15)、53(18)、51(28); IR (KBr) $\nu_{\max}$ 3427、3074、2875、2540、2227、2029、1653、1577、1498、1441、1410、1340、1309、1255、1184、1138、1030、1005、947、858 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3COCD_3 , 500 MHz) δ 9.76(1H, s, H-7)、7.61(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2)、7.35(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3 , 125 MHz) δ 190.3(d, G-7)、150.0(s, G-4)、146.9(s, G-5)、130.9(s, G-1)、128.3(d, G-6)、113.9(d, G-2)、110.0(s, G-3)。

化合物(5) 白色结晶, mp: 90—92 $^{\circ}$ C (CH_3COCH_3)。EIMS m/z 328/326/324[M] $^{+}$ (24/52/26)、295(9)、283/281/279(42/89/41)、255(40)、247(8)、201(52)、188(18)、110(26)、63(18)、58(100); IR (KBr) $\nu_{\max}$ 3423、2976、2877、1577、1469、1408、1277、1169、1078、858 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3COCD_3 , 500 MHz) δ 7.07(1H, s, H-6)、4.44(2H, s, H-7)、3.55(2H, q, $J = 7.0$ Hz, H-8)、1.20(3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-9); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3 , 125 MHz) δ 145.6(s, G-5)、144.4(s, G-4)、131.9(s, G-1)、115.3(d, G-6)、114.3(s, G-2)、113.6(s, G-3)、73.2(t, G-7)、66.5(t, G-8)、15.5(q, G-9)。

化合物(6) 淡黄色粉末, mp: 180—182 $^{\circ}$ C (CH_3COCH_3)。EIMS m/z 582/580/578/576/574[M] $^{+}$ (2/8/12/8/2)、562(27)、546(17)、402(48)、388(16)、300/298/296(44/100/66)、280(60)、252(37)、217(40)、188(30)、110(100)、63(22); IR (KBr) $\nu_{\max}$ 3552、3419、3194、1583、1473、1387、1363、1321、1284、1192、1157、1072、928、868、856、802 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3COCD_3 , 500 MHz) δ 7.15(2H, s, H-6, 6'), 4.59(4H, s, H-7, 7'); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3 , 125 MHz) δ 145.1(s, G-4, 4'), 144.2(s, G-5, 5'), 133.3(s, G-1, 1'), 130.8(d, G-6, 6'), 115.1(s, G-3, 3'), 114.3(s, G-2, 2'), 72.8(t, G-7, 7')。

化合物(7) 白色粉末, mp: 222—224 $^{\circ}$ C (CH_3COCH_3)。EIMS m/z 516/514/512/510[M] $^{+}$ (2/6/6/2)、482(50)、463(45)、433(9)、402(70)、384(32)、355(20)、322(100)、305(14)、275(16)、242(42)、213(29)、197(11)、160(18)、121(17)、92(9)、80(28)、63(13)、45(17); IR (KBr) $\nu_{\max}$ 3529、3415、2925、1589、1566、1489、1471、1373、1304、1271、

1171、1099、1074、1007、933、883、858、808 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3COCD_3 , 500 MHz) δ 6.98(1H, s, H-6)、6.07(1H, s, H-6'), 4.20(2H, s, H-8)、4.12(2H, s, H-7)、3.23(3H, s, H-9); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3 , 125 MHz) δ 145.4(s, G-1)、144.8(s, G-5'), 143.5(s, G-4'), 143.5(s, G-2)、132.3(s, G-5)、130.7(s, G-1'), 129.5(s, G-4)、116.2(s, G-2'), 116.2(d, G-6)、114.8(s, G-3)、114.8(d, G-6'), 113.6(s, G-3'), 73.2(t, G-8)、58.0(t, G-7)、39.3(q, G-9)。

致谢 小粘膜藻样品由中国科学院海洋研究所邵魁双博士鉴定, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 田超, 张炎, 王广策等, 2004. 藓羽藻 (*Bryopsis hypnoides*) 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶的分离与活性测定. 海洋与湖沼, 35(4): 371—375 [Tian C, Zhang Y, Wang G C, 2004. Isolation and activity assay of Ribulose 1, 5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from marine alga *Bryopsis hypnoides*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 35(4): 371—375]
- 牛荣丽, 范晓, 韩丽君, 2003. 海藻提取物抗炎活性的筛选. 海洋与湖沼, 34(2): 150—154 [Niu R L, Fan X, Han L j, 2003. A screening for the anti-inflammatory effect of algal extracts. Oceanologia et Limnologia Sinica, 34(2): 150—154]
- 李宪瑾, 范晓, 韩丽君等, 2002. 中国黄、东海常见大型海藻的极性脂肪酸组成. 海洋与湖沼, 33(2): 215—224 [Li X C, Fan X, Han L j et al, 2002. Fatty acids of common marine macrophytes from the Yellow and Bohai seas. Oceanologia et Limnologia Sinica, 33(2): 215—224]
- 徐年军, 范晓, 韩丽君等, 2001. 山东沿海海藻抗肿瘤活性的筛选. 海洋与湖沼, 32(4): 408—413 [Xu N j, Fan X, Han L j et al, 2001. Screening marine algae from Shandong coast for antitumor activity. Oceanologia et Limnologia Sinica, 32(4): 408—413]
- 徐秀丽, 范晓, 宋福行, 2004. 中国经济海藻提取物的生物活性. 海洋与湖沼, 35(1): 55—63 [Xu X L, Fan X, Song F H, 2004. Bioactivity of chinese marine alga extracts. Oceanologia et Limnologia Sinica, 35(1): 55—63]
- Katsui N, Suzuki Y, Kitamura S et al, 1967. 5,6-dibromopretocatechualdehyde and 2,3-dibromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether. Tetrahedron, 23: 1185—1188
- Kurata K, Amiya T, 1977. Two new bromophenols from the red alga *Rhodomela larix*. Chemistry Letters, 12: 1435—1438
- Kurata K, Amiya T, 1980. A new bromophenol from the red al-

- ga *Polysiphonia urceolata*. Bull Chem Soc Jpn, 53: 2020—2022
- Kurihara H, Mitani T, Kawabata J *et al*, 1999. Inhibitory potencies of bromophenols from Rhodomelaceae algae against (α -glucosidase activity. Fisheries Science, 65(2): 300—303
- Lennart L, Kjell O, Olof T, 1979. Synthesis of some bromophenols present in red algae. Acta Chem Scand Ser B, 33(2): 105—108
- Minoru S, Nobuhiko K, Eisuro K, 1980. Bromophenols from the red alga *Rhodomela larix*. Bull Chem Soc Jpn, 53(7): 2099—2100
- Tsujii S, Rinehart K L, Gunasekera S P *et al*, 1988. Topsentin, bromotopsentin, and dihydrodeoxybromotopsentin: antiviral and antitumor bis(indolyl)imidazoles from caribbean deep-sea sponges of the family *Halichondriidae*. Structural and Synthetic Studies. Journal of Organic Chemistry, 53: 5446—5453
- Weinstein B, Rold T L, Harrell C E *et al*, 1975. Reexamination of the bromophenols in the red alga *Rhodomela Larix*. Phytochemistry, 14: 2667—2670

CHEMICAL CONSTITUENTS OF BROWN ALGA *LEATHESIA NANA*

XU Xi-Li, FAN Xiao, SONG Fei-Hang, YANG Yong-Chun, HAN Li-Jun, SHI Jian-Gong

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039)

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing, 100050)

Abstract *Leathesia nana* is a brown alga of Leathesiaceae family and widely distributed in gulf of the Yellow Sea, China. The ethanolic extract of *Leathesia nana* showed selective cytotoxicity in our *in vitro* biological screening against several human cancer cell lines, including KB and HT-29 cell lines with LD₅₀ 12.65 and 40.60 $\mu\text{g/ml}$, respectively. It showed indistinct cytotoxicity to normal cell NIH-3T3 with LD₅₀ > 50 $\mu\text{g/ml}$. Thin layer chromatography indicated the presence of compounds positive to ferric chloride spray reagent. In order to searching for new bioactive lead compounds, we investigated the chemical constituents of the brown alga *Leathesia nana*.

Leathesia nana was collected in Weihai of Shandong Province, China in May 2002. The specimen was identified by Dr. Ku-Shuang Shao (Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, China). A voucher specimen (No. 200216) is deposited at the Herbarium of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, China. Brown alga *Leathesia nana* (8.25 kg, dry weight) was extracted with 95% EtOH at room temperature for 3 $\times$ 72 h. After the solvent was removed under reduced pressure at < 40°C, a dark residue (710 g) was obtained. The residue was suspended in water and then partitioned with EtOAc. The EtOAc soluble fraction (125g) was chromatographed over silica gel eluting with a gradual increasing Me₂CO (0%—100%) in petroleum ether. The fraction eluted by 33% Me₂CO in petroleum ether was decolorized by column chromatography over Bio-Beads SX3 using CHCl₃-EtOAc (1:2) and re-chromatographed over Sephadex LH-20 using petroleum ether-CHCl₃-MeOH (5:5:1) to afford three subfractions. Separation of the subfractions yielded compounds 1—7 by reverse phase preparative HPLC using MeOH-H₂O-AcOH (75:25:0.1) as mobile phase. Column chromatography was performed with silica gel (160—200 mesh, Qingdao Marine Chemical Inc. China) and Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala Sweden). HPLC separation was performed on a chromatograph consisting of Waters 600 Controller, WatersTM 600 Pump and Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector with an Alltima 250 cm $\times$ 2.2 cm preparative column packed with C₁₈ (10 μm). TLC was carried out with glass precoated silica gel GF254 plates. Spots were visualized under UV light and by spraying with 2% FeCl₃ in 95% EtOH. All solvents used were either analytical grade or spectral grade, or were distilled prior to use.

Melting points (uncorrected) were determined on an XT-4 micro melting point apparatus. IR spectra were recorded as KBr disks on a Nicolet Impact 400 FT-IR Spectrophotometer. NMR spectra were recorded on a Varian Inova 500 MHz spectrometer at 500.103 MHz for ^1H and 125.762 MHz for ^{13}C in acetone- d_6 with TMS as internal standard. EIMS and HREIMS data were measured with Micromass Autospec-Ultima ETOF spectrometer. By spectroscopic methods including IR, EIMS, 1D and 2D NMR experiments, their structures were identified as 3-(hydroxyacetyl)-1H-indole (1), 4-hydroxybenzoic acid (2), 2,3-dibromo-4,5-dihydroxybenzaldehyde (3), 3-bromo-4,5-dihydroxybenzaldehyde (4), 2,3-dibromo-4,5-dihydroxybenzyl ethyl ether (5), bis(2,3-dibromo-4,5-dihydroxybenzyl) ether (6) and 3-bromo-4-(2,3-dibromo-4,5-dihydroxybenzyl)-5-methoxymethylpyrocatechol (7). This paper deals with the structural elucidation of 1—7.

A variety of bromophenols have been isolated from marine red algae, a green alga, sponges and ascidians. Many of these compounds are antioxidant, feeding deterrent, α -glucosidase and enzymatic inhibitory and were reported to have effects of antimicrobe and anticancer. However, to the best of our knowledge, this is the first known brown alga containing bromophenols. Compounds 1—7 were isolated from this species for the first time.

Key words Brown alga, *Leathesia nana*, Chemical constituents, Structural elucidation