

海绵 *Haliclona oculata* 化学成分的研究

陈建涛, 杨帆, 张红军, 朴淑娟, 林厚文 (第二军医大学长征医院药学部, 上海 200003)

[摘要] 目的 研究海绵 *Haliclona oculata* 中的化学成分。方法 运用正反相硅胶、凝胶 (Sephadex LH-20) 等多种柱色谱和 HPLC 进行分离纯化, 根据理化性质和波谱数据进行结构鉴定。结果 从海绵 *Haliclona oculata* 的二氯甲烷萃取部分分离得到 4 个化合物, 分别鉴定为胆甾醇 (I), 胆甾-4, 22-二烯-6 α -羟基-3-酮 (II), 胆甾-4-烯-6 α -羟基-3-酮 (III), 麦角甾-4, 24(28)-二烯-6-羟基-3-酮 (IV)。结论 化合物 II, III, IV 均为首次从该种海绵中分离得到。

[关键词] 海绵; *Haliclona oculata*; 化学成分; 结构鉴定

[中图分类号] R284 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)01-0052-03

海绵属于最原始的多细胞动物, 与其他一些微生物存在共生关系, 化学成分复杂多样, 其中许多化合物具有显著的抗菌、抗肿瘤、抗病毒等活性^[1]。*Haliclona* 同一属的海绵中含有许多具有生物活性的化合物, 比如: haliclonacyclamines 具有很好的细胞毒活性^[2], haliclonadiamine 具有很好的抗真菌活性^[3]; haliclamines 和 manzamines 具有很好的抗菌活性^[4, 5]。*Haliclona oculata* 该种海绵也含有许多具有生物活性的化合物, 比如: oculatol, oculatolide 和 A-nor Sterols 等^[6]。

作者对海绵 *Haliclona oculata* 进行了化学成分研究, 从中分离得到了 4 个化合物, 分别为: 胆甾醇 (I), 胆甾-4, 22-二烯-6 α -羟基-3-酮 (II), 胆甾-4-烯-6 α -羟基-3-酮 (III), 麦角甾-4, 24(28)-二烯-6-羟基-3-酮 (IV)。化合物 II, III, IV 均为首次从该种海绵中分离得到。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 Yamato MP-21 显微熔点仪 (温度未校正); Varian Inova-400 型核磁共振仪 (TMS 内标); EIMS 谱用 MAT 212 质谱仪测定; ESIMS 谱用 Q-ToF micro 质谱仪测定; 硅胶 H 及柱色谱硅胶 (300-400 目, 青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司产品); 反相硅胶 ODS-A (50 μ m YMC 公司); VSP3050 中压泵 (EYELA 公司); Waters 1525 泵 PDA 2996 检测器 (Waters 公司); Symmetry Prep C₁₈, 78 mm \times 300 mm (Waters 公司); 石油醚、乙酸乙酯、丙酮、二氯甲烷、甲醇均为分析纯

(上海化学试剂公司); 液相甲醇为色谱纯 (Merck 公司)。

1.2 样品 海绵样品于 2007 年 5 月采集于中国西沙永兴岛海域, 其生物种属由中科院青岛海洋研究所李锦和研究员鉴定为 *Haliclona oculata*, 样品保存于第二军医大学长征医院药学部海洋药物研究室, 编号 TNH-1。

1.3 提取和分离 将海绵 *Haliclona oculata* (6.5 kg 湿重) 用清水洗净, 切碎后用 95% 乙醇冷浸 3 次, 每次 10 d。合并提取液并减压回收乙醇, 得提取物水悬液。水悬液加水至 3 000 ml, 用等体积二氯甲烷萃取 3 次, 合并萃取液, 浓缩得到流状总浸膏 130 g (H21), 水层另置 (H20)。H21 混悬分散于 90% 甲醇溶液中, 用等体积石油醚萃取 3 次, 合并回收得石油醚萃取物 70 g (H22); 将甲醇溶液加水稀释至 60%, 用等体积二氯甲烷萃取 3 次, 得二氯甲烷萃取物 53 g (H23)。将 H21, H22, H23 进行体外抗肿瘤活性筛选, 发现 H23 具有较好的活性。对 H23 进行硅胶 (200~300 目) 柱色谱, 以 CH₂Cl₂/MeOH 梯度洗脱进行粗分, 经 TLC 薄层检测, 相同组分合并后, 二氯甲烷/甲醇 (100:1) 部分反复重结晶得到化合物 I (200 mg), 二氯甲烷/甲醇 (20:1) 部分经多次 Sephadex LH-20 凝胶色谱分离, 以 n-Hexane-CH₂Cl₂-MeOH (4:5:1) 为流动相, 所得组分再进行 HPLC 制备色谱分离 (甲醇:水 = 99:1), 得到化合物 II (9 mg), 化合物 III (10 mg), 化合物 IV (13 mg)。

2 结果

2.1 化合物 I 的结构鉴定 无色针晶, Liebermann-Burchard 反应呈阳性, 提示可能为甾体类化合物。根据 EIMS (m/z): 386 (M^+) 确定其分子量为 386 结合 ¹³CNMR 可以推测分子式为 C₂₇H₄₆O, ¹HNMR

[基金项目] 国家高技术研究发展计划“863”资助课题 (2006AA09Z423); 国家自然科学基金资助课题 (20772154)。

[作者简介] 陈建涛 (1984-), 男, 硕士研究生。E-mail: cjt19840921@yahoo.com.cn。

[通讯作者] 林厚文。Tel (021) 65585154, E-mail franklin67@126.com。

(500 MHz, CDCl₃) δ 5.33 (1H, t, J = 2.5 Hz, H-6), 3.50 (1H, m, H-3), 0.98 (3H, s, H-19), 0.90~0.78 (9H, m), 0.66 (3H, s, H-18)。与胆

甾醇标准品对照, R_f值、显色行为以及波谱数据完全相同, 因而确定化合物 I 为胆甾醇 (图 1)。

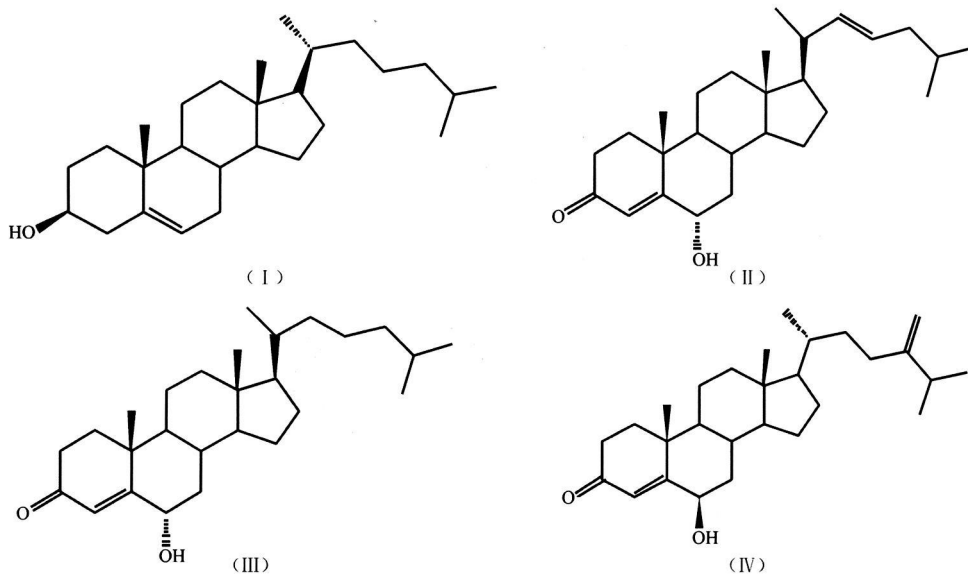


图 1 *Haliclona oculata* 中化合物 I ~ IV 的结构式

2.2 化合物 II 的结构鉴定 白色粉末, Libermann-Burchard 反应呈阳性, 提示可能为甾体类化合物。根据 ESI-MS(*m/z*) 给出准分子离子峰 *m/z* 421 [M + Na]⁺, 示相对分子质量为 398。结合¹³CNMR 推测分子式为 C₂₇H₄₂O₂, ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.75-2.01 (2H, m, H-1), 2.35-2.48 (2H, m, H-2), 5.80 (1H, m, H-4), 4.33 (1H, m, H-6), 1.22-1.98 (2H, m, H-7), 1.93 (2H, m, H-8), 0.91 (1H, m, H-9), 1.50 (2H, m, H-11), 1.12 (2H, m, H-12), 1.02 (1H, m, H-14), 1.24 (2H, m, H-15), 1.30 (2H, m, H-16), 1.12 (1H, m, H-17), 0.73 (3H, m, H-18), 1.35 (3H, m, H-19), 1.98 (1H, m, H-20), 1.02 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-21), 5.20 (1H, dd, J = 8.2, 14.8 Hz, H-22), 5.26 (1H, m, H-23), 1.83 (2H, m, H-24), 1.53 (1H, m, H-25), 0.84 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-26), 0.85 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-27)。¹³CNMR (125 MHz, CDCl₃) δ 37.09 (C-1), 34.28 (C-2), 200.44 (C-3), 126.33 (C-4), 168.47 (C-5), 27.0 (C-6), 38.51 (C-7), 29.71 (C-8), 53.62 (C-9), 38.00 (C-10), 20.97 (C-11), 39.50 (C-12), 42.41 (C-13), 55.91 (C-14), 24.14 (C-15), 28.56 (C-16), 55.96 (C-17), 12.20 (C-18), 19.52 (C-19), 40.12 (C-20), 20.83 (C-21), 137.9

(C-22), 126.44 (C-23), 41.9 (C-24), 28.1 (C-25), 22.37 (C-26), 22.53 (C-27)。以上数据与文献^[7]报道的数据基本一致, 因此鉴定化合物 II 为胆甾-4, 22-二烯-6 α -羟基-3-酮 (图 1)。

2.3 化合物 III 的结构鉴定 白色粉末, Libermann-Burchard 反应呈阳性, 提示为甾体类化合物。ESI-MS(*m/z*) 给出准分子离子峰 *m/z* 423 [M + Na]⁺, 示相对分子质量为 400。结合¹³CNMR 推测分子式为 C₂₇H₄₄O₂, ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.75-2.01 (2H, m, H-1), 2.35-2.48 (2H, m, H-2), 5.80 (1H, m, H-4), 4.33 (1H, m, H-6), 1.22-1.98 (2H, m, H-7), 1.93 (2H, m, H-8), 0.91 (1H, m, H-9), 1.50 (2H, m, H-11), 1.12 (2H, m, H-12), 1.02 (1H, m, H-14), 1.24 (2H, m, H-15), 1.29 (2H, m, H-16), 1.12 (1H, m, H-17), 0.68 (3H, m, H-18), 1.35 (3H, m, H-19), 1.36 (1H, m, H-20), 0.80 (3H, d, H-21), 1.25 (2H, m, H-22), 1.17 (2H, m, H-23), 1.03 (2H, m, H-24), 1.52 (1H, m, H-25), 0.84 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-26), 0.85 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-27)。¹³CNMR (125 MHz, CDCl₃) δ 37.09 (C-1), 34.28 (C-2), 200.44 (C-3), 126.33 (C-4), 168.47 (C-5), 27.0 (C-6), 38.51 (C-7), 29.71 (C-8), 53.62 (C-9), 38.00 (C-10), 20.97 (C-11), 39.50 (C-

12), 42.41 (C-13), 55.91 (C-14), 24.14 (C-15), 28.56 (C-16), 55.96 (C-17), 12.10 (C-18), 19.52 (C-19), 32.70 (C-20), 19.00 (C-21), 37.5 (C-22), 24.6 (C-23), 39.2 (C-24), 28.1 (C-25), 22.37 (C-26), 22.53 (C-27)。以上数据与文献^[8]报道的数据基本一致,因此鉴定化合物 II 为胆甾-4 烯-6 α 羟基-3 酮(图 1)。

2.4 化合物 IV 的结构鉴定 白色粉末, Libermann-Burchard 反应呈阳性, 提示为甾体类化合物。ES/MS(m/z) 给出准分子离子峰 m/z 411 $[M-H]^+$, 示相对分子质量为 412。结合 ^{13}C NMR 推测分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_2$, ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 1.75-2.01 (2H, m, H-1), 2.35-2.48 (2H, m, H-2), 5.83 (1H, m, H-4), 4.35 (1H, m, H-6), 1.22-1.98 (2H, m, H-7), 1.93 (2H, m, H-8), 0.91 (1H, m, H-9), 1.50 (2H, m, H-11), 1.12 (2H, m, H-12), 1.02 (1H, m, H-14), 1.24 (2H, m, H-15), 1.29 (2H, m, H-16), 1.12 (1H, m, H-17), 0.68 (3H, m, H-18), 1.35 (3H, m, H-19), 1.36 (1H, m, H-20), 0.80 (3H, d, H-21), 1.25 (2H, m, H-22), 1.17 (2H, m, H-23), 1.03 (2H, m, H-24), 1.52 (1H, m, H-25), 1.06 (3H, d, $J=6.6\text{ Hz}$, H-26), 1.05 (3H, d, $J=6.6\text{ Hz}$, H-27), 4.67 (1H, br, H-28a), 4.75 (1H, br, H-28b)。 ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) 37.09 (C-1), 34.28 (C-2), 200.44 (C-3), 126.33 (C-4), 168.47 (C-5), 27.0 (C-6), 38.51 (C-7), 29.71 (C-8), 53.62 (C-9), 38.00 (C-10), 20.97 (C-11), 39.50 (C-12), 42.41 (C-13), 55.91 (C-14), 24.14 (C-15), 28.56 (C-16), 55.96 (C-17), 12.10 (C-

18), 19.82 (C-19), 36.12 (C-20), 19.03 (C-21), 35.06 (C-22), 31.38 (C-23), 157.20 (C-24), 34.1 (C-25), 22.37 (C-26), 22.53 (C-27), 106.38 (C-28)。以上数据与文献^[9]报道的数据基本一致,因此鉴定化合物 IV 为麦角甾-4,24(28)-二烯-6 羟基-3 酮(图 1)。

【参考文献】

- [1] Blunt W, Copp BR, Hua WP, et al. Marine natural products [J]. Nat Prod Rep 2009, 26: 170
- [2] Charan RD, Garson MJ, Breton M, et al. Haliclonaclonamines A and B, cytotoxic alkaloids from the *Tropical Marine Sponge Haliclona* sp [J]. Tetrahedron, 1996, 52: 9111
- [3] Baker BJ, Scheuer PJ, Shoolery JN. Papuanine: An antifungal pentacyclic alkaloid from a marine sponge *Haliclona* sp [J]. J Am Chem Soc 1988, 110: 965.
- [4] Fusetani N, Yasumuro K, Matsunaga S. Haliclonaclonamines A and B: cytotoxic macrocyclic alkaloids from a sponge of the genus *Haliclona* [J]. Tetrahedron Lett 1989, 30: 6891
- [5] Sakai R, Kohmoto S, Higa T. Manzamine B and C: two novel alkaloids from the sponge *Haliclona* sp [J]. Tetrahedron Lett 1987, 28: 5493
- [6] Yu S J, Deng Z W, Proksch P, et al. Oculob[oculob]oculitolide and A-norSterols from the *Sponge Haliclona oculata* [J]. J Nat Prod 2006, 69 (9): 1330
- [7] Sakai R, Higa T, Jefford CW, et al. Manzamine A, a novel antitumor alkaloid from a sponge [J]. J Am Chem Soc 1986, 108: 6404.
- [8] Bulte-Ponce V, Etahiri S, Guyot M. New ketosteroids from the red alga *Hypnea musciformis* [J]. Bioorg Med Chem Lett 2002, 12: 1715.
- [9] Li LY, Deng ZW, Fu HZ, et al. 6-Hydroxy-4- α -erythro-sterols from the marine sponge *Iotrochota birotulata* [J]. J Asia Nat Prod Res 2005, 7(2): 115.

[收稿日期] 2009-03-26

[修回日期] 2009-08-01

(上接第 51 页)

29.0, 27.1, 25.6, 24.8, 22.6, 22.5, 14.0。综合分析并结合文献报道^[8], 化合物 6 鉴定为 9-十八碳烯酸甘油三酯。

【参考文献】

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 第七十九卷, 北京: 科学出版社, 1996: 23.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 1410, 1433.
- [3] 章小丽, 余正文, 郭芳琴, 等. 大驳骨化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(2): 131.
- [4] Zhang W D, Kong D Y, Li H T, et al. A new glycoside from *Eri-*

eron breviscapus [J]. Chin Chem Lett 1999, 10(2): 125

- [5] 赵友兴, 李承森, 罗晓东, 等. 上新世云南铁杉木化石的化学成分 [J]. 云南植物研究, 2007, 29(3): 367
- [6] 刘睿, 顾谦群, 崔承彬, 等. 密脉鹅掌柴的化学成分及其抗肿瘤活性 [J]. 中草药, 2005, 36(3): 328
- [7] 杨倩, 王四旺, 王剑波, 等. 椒目中 α -亚麻酸的提取与鉴定 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(4): 318
- [8] Marcel SF, Li K J, Lam CC. ^1H -Nuclear magnetic resonance spectroscopic studies of saturated acetylenic and ethylenic triglycerols [J]. Chemistry and Physics of Lipids 1995, 77: 151.

[收稿日期] 2009-06-26

[修回日期] 2009-07-28