

中国南海隋氏蒂壳海绵 *Theonellaswinhoei* 的化学成分研究甘建红^{1,2}, 席 达³, 于豪冰², 闵 倩¹, 苟 了¹, 谢 晶^{1*}¹上海海洋大学食品学院, 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306; ²第二军医大学附属长征医院海洋药物研究室, 上海 200433; ³第二军医大学附属东方肝胆医院 微创外科 2 室, 上海 200438

摘要: 利用 Sephadex LH-20 凝胶柱层析、硅胶柱层析、HPLC 等多种柱色谱手段对中国南海隋氏蒂壳海绵 *Theonellaswinhoei* 化学成分进行分离提纯; 通过波谱解析结合文献对照, 鉴定化合物的结构。从其正丁醇萃取部位首次分离鉴定了 6 个化合物: thymidine (1), thymidine-5'-carboxylic acidmethyl ester (2), thymidine-5'-carboxylic acid butyl ester (3), uracil (4), thymine (5), 7,8-Dimethyl-iso-alloxazine (6)。

关键词: 海绵; 化学成分; 结构鉴定

中图分类号: Q939.11+2; R931.77

文献标识码: A

Studies on Chemical Constituents of *Theonellaswinhoei* from the South China Sea

GAN Jian-hong^{1,2}, XI Da³, YU Hao-bing², MIN Qian¹, GOU Liao¹, XIE Jing^{1*}

¹College of food science & technology, shanghai ocean university, Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China; ²Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; ³Department of Minimal Invasion, Ward 2, Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

Abstract: Sephadex LH-20 column chromatography, silica column chromatography and HPLC methods were used to isolate and refine compounds from sponge *Theonellaswinhoei* from the South China Sea. The structures were identified by spectroscopic analysis and comparison with the literatures. From the *n*-BuOH soluble extract of *Theonellaswinhoei*, six compounds were isolated for the first time and their structures were determined as thymidine (1), thymidine-5'-carboxylic acid methyl ester (2), thymidine-5'-carboxylic acid butyl ester (3), uracil (4), thymine (5), 7,8-Dimethyl-iso-alloxazine (6).

Key words: sponge; chemical constituents; structural identification

海绵属动物界多孔动物门(Porifera), 是最原始的低等多细胞动物, 可分为钙质海绵纲(Calcarea)、六放海绵纲(Hexamastix)和寻常海绵纲(Demospongiae)三个纲。*Theonella* 属海绵属寻常纲(Demospongiae)、石海绵目(Lithistida)、蒂壳海绵科(Theonellidae)海绵。目前, 已从该属海绵中获得了环肽、大环内酯、甾体、聚酮、生物碱、糖脂等成分。其中的甾体类化合物多为独特的 4-亚甲基结构^[1,2]; 从中分离得到的环肽类化合物富含非常见氨基酸残基, 具有良好的抗肿瘤活性^[3,4]。我们对采自西沙永兴岛和七连屿附近的隋氏蒂壳海绵 *T. swinhoei* 的

化学成分进行了研究, 从其正丁醇萃取部位首次分离鉴定了 6 个化合物(1~6)(图 1), 包括 5 个嘧啶类化合物以及 1 个咯嗪类化合物。

1 实验部分

1.1 样品

隋氏蒂壳海绵(*Theonellaswinhoei* Gray, 1868)样品于 2007 年 5~6 月采自中国南海西沙永兴岛(Woody Island)和七连屿(Seven connected islets)。种属名称由青岛海洋研究所李锦和研究员鉴定。标本(No. DS-TS01)存放于第二军医大学长征医院海洋药物实验室。

1.2 仪器与试剂

MS 谱用 Q-ToF micro YA019 型液质联用仪测定; NMR 由 Bruker AV-600 型核磁共振仪测定;

收稿日期: 2013-04-10 接受日期: 2013-09-05

基金项目: 上海市科委工程中心建设; 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心(11DZ2280300)

* 通讯作者 Tel: 86-0156921613; E-mail: jxie@shou.edu.cn

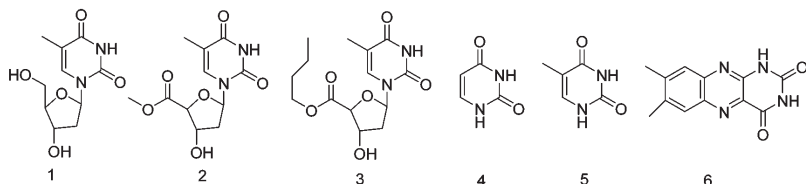


图1 化合物1~6的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1-6

HPLC 在 Agilent 1200 高效液相色谱仪上完成;Sephadex-LH20 为 Pharmacia 公司产品;层析硅胶(200 ~ 300、300 ~ 400 目)为烟台江友硅胶开发有限公司产品;常用有机溶剂均为国产分析纯。

1.3 提取与分离

将冷冻的隋氏蒂壳海绵 (*T. swinhoei*, 干重 1.2 kg) 切碎成小块,用 95% 乙醇(8 × 15 L) 室温渗滤,合并提取液,减压浓缩得到总浸膏。将总浸膏混悬分散于水中,用乙酸乙酯萃取 4 次,浓缩萃取液得到脂溶性浸膏。将脂溶性浸膏混悬于 90% 的甲醇水溶液中,用石油醚萃取 3 次,浓缩萃取液得到石油醚部位浸膏 56 g;加水将混悬液的甲醇浓度调整至 60%,用二氯甲烷萃取 3 次,浓缩萃取液得二氯甲烷部位浸膏 5 g;余下的 60% 甲醇部分浓缩至干得浸膏 1 g。将最初的水相用正丁醇萃取 3 次,浓缩得正丁醇部位浸膏 36 g。将正丁醇部位浸膏 36 g 进行减压柱色谱,以二氯甲烷-甲醇(50:1,20:1,15:1,10:1,5:1,2:1)梯度洗脱成 50 个流份,根据 HPTLC 显色合并相似流份得到 8 个组分。对第五组分进行反相硅胶柱色谱、凝胶柱色谱以及高效液相制备得到化合物 1~6。

2 结果与讨论

2.1 结构鉴定

从海绵正丁醇萃取部位分离鉴定了 6 个化合物(1~6)(图 1),包括 5 个嘧啶类化合物以及 1 个咯嗪类化合物。

化合物 1 白色粉末,易溶于甲醇;mp. 184 ~ 185 °C; $[\alpha]_D^{25} + 30.6^\circ$ (c 1.029, H_2O)。ESI-MS 显示有 $[M + Na]^+$ 峰 m/z 265.15 及 $[2M + Na]^+$ 峰 m/z 507.22, 确定其分子量为 242; IR (KBr) ν_{max} 3312, 1700, 1659 cm^{-1} ; 结合 ^{13}C NMR 谱, 确定其分子式为 $C_{10}H_{14}N_2O_5$ 。 1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$): δ 11.24 (1H, brs, NH-3), 7.68 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-6), 6.16 (1H, dd, $J = 7.6, 6.2$ Hz, HO-5'), 5.21 (1H, brd, $J = 3.2$ Hz, HO-3'), 5.00 (1H, t, $J = 5.6$ Hz, H-

1'), 4.23 (1H, m, H-3'), 3.76 (1H, m, H-4'), 3.56 (2H, m, H-5'), 2.07 (2H, m, H-2'), 1.77 (3H, d, $J = 1.1$ Hz, CH_3)。 ^{13}C NMR (150 MHz, $DMSO-d_6$): δ 163.7 (C-4), 150.5 (C-2), 136.1 (C-6), 109.4 (C-5), 87.3 (C-1'), 83.8 (C-4'), 70.4 (C-3'), 61.3 (C-5'), 39.3 (C-2'), 12.2 (5- CH_3)。以上数据与文献^[6]报道一致, 鉴定化合物 1 为 thymidine。

化合物 2 白色粉末, mp. 244 ~ 246 °C, 易溶于甲醇。ESI-MS 显示有 $[M + Na]^+$ 峰 m/z 293.10 及 $[2M + Na]^+$ 峰 m/z 563.20, 确定其分子量为 312; 结合 ^{13}C NMR 谱, 确定其分子式为 $C_{11}H_{14}N_2O_6$ 。 1H NMR (600 MHz, C_5D_5N): δ 13.19 (1H, brs, NH-3), 8.33 (1H, brs, H-6), 7.18 (ov, H-1'), 4.95 (m, H-3'), 4.94 (brs, H-4'), 2.63 (1H, dd, $J = 13.4, 5.4$ Hz, H_a-2'), 2.28 (1H, m, H_b-2'), 2.01 (3H, brs, H- CH_3), 3.68 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, H-1'')。 ^{13}C NMR (150 MHz, C_5D_5N): δ 172.3 (C-5'), 164.6 (C-4), 151.7 (C-2), 136.2 (C-6), 110.7 (C-5), 86.7 (C-1'), 85.6 (C-4'), 74.7 (C-3'), 52.0 (C-1''), 39.3 (C-2'), 12.7 (5- CH_3)。以上数据与文献^[7]报道一致, 鉴定化合物 2 为 thymidine-5'-carboxylic acidmethyl ester。

化合物 3 白色粉末, 易溶于甲醇, mp. 208 ~ 214 °C。ESI-MS 显示有 $[M + Na]^+$ 峰 m/z 355.14 及 $[2M + Na]^+$ 峰 m/z 647.26, 确定其分子量为 312; 结合 ^{13}C NMR 谱, 确定其分子式为 $C_{14}H_{20}N_2O_6$ 。 1H NMR (600 MHz, C_5D_5N): δ 13.20 (1H, brs, NH-3), 8.38 (1H, brs, H-6), 7.20 (dd, $J = 13.4, 5.4$ Hz, H-1'), 4.98 (m, H-3'), 4.97 (brs, H-4'), 4.17 (2H, t, $J = 6.6$ Hz, H-1''), 2.66 (1H, dd, $J = 9.2, 5.4$ Hz, H_a-2'), 2.31 (1H, m, H_b-2'), 2.03 (3H, brs, H- CH_3), 1.49 (2H, m, H-2''), 1.21 (2H, m, H-3''), 0.76 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-14'')。 ^{13}C NMR (150 MHz, C_5D_5N): δ 172.0 (C-5'), 164.6 (C-4), 151.7 (C-2), 136.2 (C-6), 110.7 (C-5), 86.8 (C-1'), 85.9 (C-4'), 74.8 (C-3'), 65.2 (C-1''), 39.3 (C-2'), 30.5 (C-2''), 19.0 (C-3''), 13.4 (C-4'), 12.7 (5- CH_3)。以上数据与文

献^[6] 比对, 鉴定化合物 **3** 为 thymidine-5'-carboxylic acid butyl ester。

化合物 4 淡黄色针晶, EI/MS 显示有 $[M]^+$ 峰 m/z 112; 结合 ^{13}C NMR 谱, 确定其分子式为 $C_4H_4N_2O_2$ 。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 10.98 (1H, brs), 10.80 (1H, brs), 7.36 (1H, dd, $J = 7.6$, 5.7 Hz), 5.46 (1H, dd, $J = 7.6$, 1.2 Hz)。 ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6): δ 164.6 (C-4), 151.6 (C-2), 142.5 (C-6), 100.4 (C-5)。以上数据与文献^[8,9] 报道一致, 鉴定化合物 **4** 为 uracil。

化合物 5 白色针状结晶, EI/MS 显示有 $[M]^+$ 峰 m/z 126; 结合 ^{13}C NMR 谱, 确定其分子式为 $C_5H_6N_2O_2$ 。 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 10.87 (1H, s), 10.46 (1H, s), 7.26 (1H, s), 1.72 (3H, s)。 ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6): δ 166.8 (C-4), 153.4 (C-2), 109.1 (C-5), 138.7 (C-6), 13.1 (5-CH₃)。以上数据与文献^[8,10] 报道一致, 鉴定化合物 **5** 为 thymine。

化合物 6 淡黄色粉末, mp. 279 ~ 281 °C。ESI-MS 显示有 $[M + H]^+$ 峰 m/z 243; $[M + H]^+$, 265 $[M + Na]^+$ and 507 $[2M + Na]^+$; 结合 ^{13}C NMR 谱, 确定其分子式为 $C_{12}H_{10}N_4O_2$ 。 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 11.85 (1H, brs, 1-NH), 11.77 (1H, brs, 3-NH), 7.85 (1H, s, H-6), 7.68 (1H, s, H-9), 2.46 (3H, s, 8-CH₃), 2.43 (3H, s, 7-CH₃)。 ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ 161.1 (C-4), 150.3 (C-2), 146.5 (C-4a), 145.4 (C-10a), 141.4 (C-5a), 139.3 (C-8), 138.3 (C-7), 130.2 (C-6), 129.1 (C-9a), 125.8 (C-9), 20.7 (8-CH₃), 20.1 (7-CH₃)。以上数据与文献^[11,12] 报道一致, 鉴定化合物 **6** 为 7,8-Dimethyl-isoalloxazine。

2.2 讨论

在日本海域和我国台湾省都分布有隋氏蒂壳海绵 *T. swinhoei*。从台湾南部垦丁的该种海绵中已发现含有环肽 theonellapeptolides Ia, Id, IId 以及大环内酯 swinholid A 等成分^[13]。本文尚未从西沙此种海绵中分离到相同的成分, 主要获得了 5 个嘧啶类化合物和 1 个咯嗪类化合物, 进一步表明了西沙隋氏蒂壳海绵 *T. swinhoei* 的活性化学成分多样性。本文的研究结果丰富了我国南海海洋天然产物结构, 为进一步研究和开发我国南海海洋生物资源提供了参考资料。

参考文献

- 1 Sugo Y, Inouye Y, Nakayama N. Structures of nine oxygenated 4-methylene sterols from Hachijome sponge *Theonellaswinhoei*. *Steroids*, 1995, 60:738-742.
- 2 Kho E, Magawa DK, Rohmer M, et al. Sterols in marine invertebrates. 22. Isolation and structure elucidation of conicasterol and theonellasterol, two new 4-methylene sterols from the Red Sea sponges *Theonellaconica* and *Theonellaswinhoei*. *J Organ Chem*, 1981, 46:1836-1839.
- 3 Aneiros A, Garateix A. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *J Chromatography*, 2004, 803:41-53.
- 4 Fusetani N, Matsunaga S. Bioactive sponge peptides. *Chemical Reviews*, 1993, 93:1793-1806.
- 5 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1-2):55.
- 6 Mortdewa T, Xie H, Matsuda H, et al. Bioactive Constituents from Chinese Natural Medicines. XVII. Constituents with Radical Scavenging Effect and New Glucosyloxybenzyl 2-Isobutylmalates from *Gymnadeniaconopsea*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2006, 54:506-513.
- 7 Dematte N, Guerriero A, Lafargue F, et al. 2'-deoxynucleoside uronic acids from the ascidian *Aplidium* (= *Amaroucium*) *fuscum* (Drasche, 1 = 883). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochem Mol Biol*, 1986, 84(1):11-13.
- 8 Goldstein J H, Tarpley A R. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of uracil, thymine, and the 5-halouracils. *J Amer Chem Soc*, 1971, 93:3573-3578.
- 9 Li WL (李文林), Mao SL (毛士龙), Yi YH (易杨华), et al. Studies on the chemical constituents of the sponge *phakelliafusca*. *Chia J Mar Drugs* (中国海洋药物), 2001, 20:9-11.
- 10 Meng QH (孟艳辉), Su JY (苏镜娱), Zeng LM (曾陇梅). Studies on the chemical constituents from the South China Sea soft coral *sarcophytonmolle*. *Chia J Mar Drugs* (中国海洋药物), 1999, 18(3):1-3.
- 11 Zhang QH (张起辉), Zhou LD (周莲娣), Lu X (卢轩), et al. Chemical constituents from the marine *Nigrospora sphaerica*. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2010, 27:615-622.
- 12 Wang FW, Hou ZM, Wang CR, et al. Bioactive metabolites from *Penicillium* sp., an endophytic fungus residing in *Hopea hainanensis*. *J Microbio Bio Tech*, 2008, 24:2143-2147.
- 13 Chen QY (陈清雨). Studies on bioactive constituents from Taiwan sponges. National Sun Yat-sen University, PhD. 2001.