

## 南海小束格海绵 *Clathria fasciculata* 中的新神经酰胺

肖定军<sup>1</sup>, 邓松之<sup>2</sup>, 曾陇梅<sup>1</sup>

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;

2. 中国科学院广州化学研究所, 广东 广州 510650)

**摘要:** 从中国南海小束格海绵 *Clathria fasciculata* 中分离得到一系列新神经酰胺化合物, 它们的结构是通过 FAB-MS, IR, NMR, DQFCOSY, HMQC, HMBC, GC, GC-MS 和化学转变等方法确定的。这些神经酰胺的长链碱部分具有独特的异丙或反异末端, 脂肪酸部分则主要由 (4E)-2-羟基-4-二十二, 二十三, 二十四和二十五碳烯酸组成。

**关键词:** 小束格海绵 *Clathria fasciculata*; 神经酰胺; 长链碱;  $\alpha$ -羟基脂肪酸

**中图分类号:** Q959.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 05-0111-04

神经酰胺 (ceramide) 是构成神经鞘脂类 (sphingolipids) 的母体结构, 它由一分子鞘氨醇和一分子长链脂肪酸以鞘氨醇第 2 个碳上的氨基与脂肪酸羧基形成的酰胺键相连而成。神经酰胺具有调节细胞生长、变异, 引起细胞凋亡, 调节蛋白质分泌, 参与免疫过程等功能<sup>[1]</sup>。神经酰胺与糖结合形成的神经鞘苷 (或称脑甙, cerabroside) 广泛分布于动植物体内, 特别是中枢神经系统、肝、脾和血细胞中, 它是组成动、植物组织细胞膜的成分之一。作为膜抗原和病毒、细菌及其毒素的受体, 它们在细胞识别、细胞黏合、调节细胞免疫和决定血型等方面起非常重要的作用<sup>[2,3]</sup>。近年来, 对神经酰胺和神经鞘苷的深入研究, 引起了人们广泛的重视。各国学者不断从海洋生物中分离得到此类化合物, 并合成了大量的类似物, 发现其具有抗肿瘤、抗病毒、抗肝毒和免疫促进等作用<sup>[4-6]</sup>。

我们在研究南海小束格海绵 *Clathria fasciculata* 的过程中, 从其乙酸乙酯可溶部分分离得到一系列新的神经酰胺化合物 (CF-2), 通过 FABMS, IR, NMR, DQFCOSY, HMQC, HMBC, GC, GC-MS 和化学转变等方法确定它们的结构为: (2S, 3S, 4R)-2-[(2R, 4E)-2-羟基-4-脂肪烯酰氨基]-16-甲基-1, 3, 4-十八烷三醇(1), (2S, 3S, 4R)-2-[(2R, 4E)-2-羟基-4-脂肪烯酰氨基]-17-甲基-1, 3, 4-十八烷三醇(2), 其中脂肪酸链长分别为二十二, 二十三, 二十四和二十五碳。

### 1 结果与讨论

CF-2, (1) 和 (2) 的混和体, 白色无定形粉

末,  $\theta_{mp}$  137~140 °C, 在高效 TLC 板上两者显示 1 个圆点, 用正反相硅胶柱层析和凝胶层析已无法将它们分开。FAB MS 给出一系列  $[M+1]^+$  峰  $m/z$ : 668, 682, 696, 710, 相邻离子峰间相差 14 amu, 说明 CF-1 由一系列同系物组成, 差别仅在于链的长短。IR 谱显示有酰胺 (1 625, 1 544  $cm^{-1}$ ), 羟基 (3 382  $cm^{-1}$ ) 及长链脂肪烷基 (721  $cm^{-1}$ ) 吸收峰。<sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 数据经 HMQC 和 HMBC 谱分析进行归属, 结果见表 1。信号 1.10~1.51 强的质子信号及 0.87~0.82 (m) 的甲基多重信号推测分子含脂肪长链, 且末端存在支链; 信号 8.55 (d,  $J=9.0$  Hz, 1H, NH) 和 174.6 (CONH), 5.08 (m, 1H) 和 53.0 (CH-NH) 及连氧碳信号 62.0, 76.8, 73.0, 72.4 显示有酰胺键和多羟基存在, 以上数据明确显示该成分为神经酰胺类化合物<sup>[7]</sup>。然而, DQFCOSY 和 HMBC 都显示 CF-2 的脂肪酸部分存在  $\gamma$  位双键, 这在已知的天然神经酰胺中还未发现过。从氢谱或 DQFCOSY 可计算出两烯氢间的耦合常数为 18 Hz, 说明该双键为反式构型。<sup>13</sup>C NMR 和 DEPT 还显示该神经酰胺的长链末端存在支链, 经查文献, 发现海洋生物中的神经酰胺或脑甙类化合物常常含有反异 (anteiso) 末端和异丙 (isopropyl) 末端<sup>[8,9]</sup>, 比较它们的末端碳谱数据, 可以得知 CF-2 皆含这两种末端结构。

在 HMQC 谱中, 碳信号 72.4 (C2') 与质子信号 4.66 (dd,  $J=7.2, 3.6$  Hz) 相关, 后者在 HMBC 谱中与碳信号 174.6, 32.9, 126.3 有远程相关, 表明酰基部分为  $\alpha$ -OH 脂肪烯酰链。CF-2 经水解所得的羟基

\* 收稿日期: 2002-01-22

基金项目: 国家自然科学基金重点基金资助项目 (29932030)

作者简介: 肖定军 (1970 年生) 男, 博士生, 助理研究员; 通讯联系人: 曾陇梅; E-mail: ceszm@zsu.edu.cn

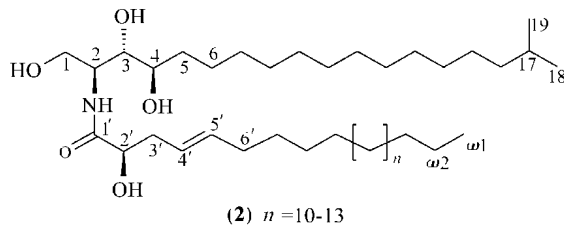
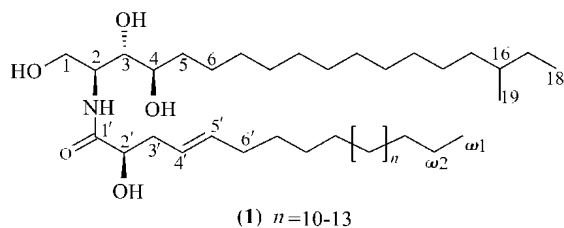
表 1 化合物(1)和(2)的 NMR 数据(C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, TMS)Tab 1 NMR data(C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, TMS) of compound (1) and (2)

C 编号	$\delta_c$ (DEPT)	$\delta_H$ (J/Hz)	HMBC	DQFCOSY
1	62.0 (t)	4.50 (dd, 4.8, 10.8) 4.40 (dd, 4.8, 10.8)	NH <sup>c</sup> , H2, H3	H2
2	53.0 (d)	5.08 (m)	NH, H1, H3, H4	H1, NH, H3
3	76.8 (d)	4.33 (dd, 6, 4.8)	NH, H2, H1, H4, H5	H2, H4
4	73.0 (d)	4.26 (m)	H3, H5, H6	H3, H5
5	34.2 (t)	2.24 (m), 1.92 (m)	H3, H6	H4, H6
6	26.6 (t)	1.90 (m), 1.68 (m)	H4, H5	H5, H7
16	34.6 <sup>a</sup> (d)	1.50~1.46 (m)		
17	28.2 <sup>b</sup> (d)	1.50~1.46 (m)		
18	19.4 <sup>a</sup> (q), 22.8 <sup>b</sup> (q)	0.87~0.82 (m)		
19	11.6 <sup>a</sup> (q), 22.8 <sup>b</sup> (q)	0.87~0.82 (m)		
1'	174.6 (s)	/	H2, H2', H3'	
2'	72.4 (d)	4.66 (dd, 3.6, 7.2)	H3', H4'	H3'
3'	32.9 (t)	3.05 (m), 2.88 (m)	H2', H4', H5', H6'	H2', H4'
4'	126.3 (d)	5.93 (dd, 7.2, 18)	H2', H3', H6'	H3', H5'
5'	132.4 (d)	5.62 (dd, 7.8, 18)	H3',	H4', H6'
6'	27.9 (t)	2.19 (m)	H4', H5'	H5', H7'
(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	29.6~30.3 (t)	1.10~1.51		
$\omega_2$	22.9 (t)	1.10~1.51		
$\omega_1$	14.2 (q)	0.87~0.82 (m)		

a: 化合物(1)的末端  $\delta_c$  值; b: 化合物(2)的末端  $\delta_c$  值; c: NH 的  $\delta_H$  & 55

脂肪酸再甲基化得 CF-21( $\alpha$ -甲氧基脂肪酸甲酯), 经 GC-MS 分析, 主要由 4 个脂肪酸甲酯同系物组成, 链长分别为 22, 23, 24, 25 个碳原子(比例 1.7:5.3:5.5:1)。CF-21 的 <sup>13</sup>C NMR 中只显示一种甲基信号(14.3), 这是正常直链的末端甲基信号, 说明这些脂肪酸长链无分支, 由此肯定 CF-2 的末端支链存在于鞘氨醇部分。CF-21 的旋光度为 +12.5°, 确定 2' 位为 R 构型<sup>[10]</sup>。DQFCOSY 和 HMBC (见表 1) 显示碱基链部分为 1, 3, 4-三羟基鞘氨醇, 碱水解所得长链碱经乙酰化后得 CF-22(四乙酰化鞘氨醇), 其 GC-MS 谱给出 2 个同分异构体(1.5:1.3), 相对分子质量为 500, 表明碱基链含 19 碳。CF-22 的 <sup>13</sup>C NMR 明确指出分子含 2 种长链末端, 第 1 种是反异末端(anteiso), 在碳链的第 16 位有 1 个甲基(19.2), 使 C16 的  $\delta_c$  值变为 34.4, 末端甲基变为 11.3, 此结构数据与文献值一致<sup>[9]</sup>; 第 2 种是异丙末端(isopropyl), 次甲基的  $\delta_c$  为 27.9, 2 个端甲基皆为 22.6, 此数据也与文献值一致<sup>[8]</sup>。再结合质谱碎片峰, 2 个同分异构体的结构就确定了下来。CF-22 的立体化学是由其旋光值和 1-4 位质子的化学位移值共同确定的。CF-22 比旋光  $[\alpha]_D^{18} + 24.7^\circ$ , 文献值为 +26.2°; 1-4 位质子的化学位移值也与文献一致<sup>[11]</sup>, 因此确定鞘氨醇部分的绝对构型为(2S, 3S, 4R)。

根据以上分析, 可以确定 CF-2 是由(2S, 3S, 4R)-2-[(2R, 4E)-2-羟基-4-脂肪烯酰氨基]-16-甲基-1, 3, 4-十八烷三醇(1)和(2S, 3S, 4R)-2-[(2R, 4E)-2-羟基-4-脂肪烯酰氨基]-17-甲基-1, 3, 4-十八烷三醇(2)组成的, 其中脂肪酸链长分别为二十二, 二十三, 二十四和二十五碳。



## 2 实验部分

2.1 仪器和试剂 所用仪器为 ENH-Imbruck Hostage 型显微熔点仪(温度计未校正), Perkin-

Elmer 241MC 型旋光仪 (Na 灯 589 nm), WQF-410FT 红外光谱仪 (KBr 压片), Bruker DRX 400 和 INOVA 600 型核磁共振仪 (内标 TMS), Voyager 台式质谱仪。层析硅胶: 300~400 目, 青岛海洋化工有限公司; 其他试剂均为广州化学试剂厂产品。

GC 条件: HP6890 气相色谱仪, 色谱柱 SE-54 (30 m×0.25 mm), 程序升温 150 °C (10 min), 280 °C (20 min); 载气 H<sub>2</sub>, 线速 1.8 mL/min, 进样器温度 (汽化温度) 320 °C, 检测器温度 300 °C。

GC MS 条件: SATURN 2000 色质联用仪, 色谱柱 CPSIL-8 (30 m×0.25 mm), 柱温 180 °C, 载气 He, 线速 1 mL/min, 进样器温度 280 °C, 检测器温度 300 °C; MS 条件: EI 电离源, 离子源温度 200 °C, 电子能量 70 eV。

2.2 提取和分离 海绵样品采集后挤干水分 (湿重 15 kg) 直接浸泡于 φ=95% 的工业酒精储存。用该浓度酒精浸提 3 次后, 将浓缩物分散于 1 500 mL 的水中, 分别以等体积的乙酸乙酯/正丁醇萃取 3 次, 合并萃取液并浓缩, 得乙酸乙酯可溶物 17.6 g。此可溶物经硅胶柱层析 (石油醚/乙酸乙酯梯度淋洗, φ (石油醚) 分别为 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 60%, 80%, 100%) 得 7 个组分, 第 6 组分 (3.5 g) 经反复硅胶柱层析 (V(氯仿):V(丙酮)=6:4) 和葡聚糖凝胶 LH 20 层析 (V(氯仿):V(甲醇)=3:7) 得 CF-2 (白色固体, 23 mg)。

2.3 CF-2 的水解 将 12.5 mg 的 CF-2 样品加入到 15 mL (1 mol/L) KOH 的 MeOH/H<sub>2</sub>O (体积比为 9:1) 溶液中, 反应液在 N<sub>2</sub> 保护下 80 °C 左右回流 24 h。用水稀释反应液, 再用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 萃取 3 次, 合并有机层, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 减压浓缩得长链碱。水层用 φ=2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 酸化, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 萃取 3 次, 合并有机层, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 减压浓缩得, 所得 α-羟基脂肪酸再与 NaH 和 CH<sub>3</sub>I 反应得 α-甲氧基脂肪酸甲酯, 即 CF-21; 长链碱用乙酐/吡啶体系乙酰化得四乙酰化产物 CF-22。

#### 2.4 主要实验数据

CF-2, [α]<sub>D</sub><sup>18</sup>+23.9° (c=0.1914 mol/L, CH<sub>3</sub>OH); FAB MS m/z 668, 682, 696, 710; IR ν/cm<sup>-1</sup> (KBr): 3 382, 2 921, 2 852, 1 625, 1 544, 1 467, 1 378, 1 270, 1 132, 1 072, 1 025, 721, 607; EIMS m/z: 408, 395, 372, 354, 339, 324, 308, 283, 265, 240, 226, 179, 150, 124, 111, 97, 83, 69, 60(100%), 43; <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, TMS) 见表 1。

CF-21: [α]<sub>D</sub><sup>18</sup>+12.5° (c=0.104 mol/L, AcOEt); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 5.95 (dd, 7.2, 16.7, 1H), 5.35

(dd, 7.3, 16.7, 1H), 4.94 (dd, 3.4, 7.0, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.39 (s, 3H), 3.05 (m), 2.88 (m), 2.05 (m, 2H), 1.25 (s, nCH<sub>2</sub>), 0.87 (t, 6.3, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 173.5, 135.7, 124.3, 80.6, 58.1, 51.7, 32.8, 31.9, 29.7~29.3, 25.1, 22.6, 14.1; GC EIMS: [M+1]<sup>+</sup> m/z: 382, 396, 410, 424。

CF-22: [α]<sub>D</sub><sup>18</sup>+24.7° (c=0.154 mol/L, AcOEt); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 5.94 (d, 9.2, 1H), 5.10 (dd, 8.0, 3.3, 1H), 4.94 (ddd, 3.3, 4.2, 8.9, 1H), 4.47 (dddd, 9.2, 3.3, 4.8, 8.0, 1H), 4.29 (dd, 11.7, 4.8, 1H), 4.00 (dd, 11.7, 3.3, 1H), 2.07 (s, 3H), 2.05 (s, 6H), 2.02 (s, 3H), 1.64 (m, 2H), 1.25 (s, mCH<sub>2</sub>), 0.89~0.82 (m, nCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 172.6, 172.0, 170.8, 170.2, 72.9, 72.1, 62.8, 47.6, 39.1, 36.6, 34.4, 27.9, 27.1, 25.4, 23.3, 22.6, 21.0, 20.73, 20.70, 19.2, 11.3; GC EIMS: [M+1]<sup>+</sup> m/z: 500。

#### 参考文献:

- [1] HANNUM Y A. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide[J]. J Bio Chem, 1994, 269(5): 3125-3128.
- [2] BRUZIK K S, NYHOLM P G. NMR study of the conformation of galactocerebroside in bilayers and solution; Galactose reorientation during the metastable-stable gel transition[J]. Biochemistry, 1997, 36(3): 566-575.
- [3] HAKOMORI S, IGARASHI Y. Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling[J]. J Biochem, 1995, 118(6): 1091-1103.
- [4] NATORI T, MORITA M, AKIMOTO K, et al. Agelasphins, novel antitumor and immunostimulatory cerebroside from the marine sponge *Agelas auritiannus*[J]. Tetrahedron, 1994, 50(9): 2771-2784.
- [5] MOTOKI K, MORITA M, KOBAYASHI E, et al. Immunostimulatory and antitumor activities of monoglycosylceramides having various sugar moieties[J]. Biol Pharm Bull, 1995, 18(11): 1487-1491.
- [6] KIM SY, CHOI Y H, HAH H, et al. New antihepatotoxic cerebroside from *Lycium chinense* fruits[J]. J Nat Prod, 1997, 60(3): 274-276.
- [7] INAGAKI M, ISOBE R, KANANO Y, MIYAMOTO T, et al. Isolation and structure of three new ceramides from the starfish *Acanthaster planci*[J]. J Org Chem, 1998(1): 129-131.
- [8] LOUKACI A, BULTEL-PONCE V, LONGEON A, GUYOT M. New lipids from the tunicate *Cystodytes cf. dellechiaiei*, as PLA2 inhibitors[J]. J Nat Prod, 2000, 63(6): 799-802.

- [ 9 ] YAMADA K, HARA E, MIYAMOTO T, HIGUCHI R, et al. Isolation and structure of biologically active glycosphingolipids from the sea cucumber *Cucumaria echinata*[ J ]. J Org Chem, 1998, 1: 371—378.
- [ 10 ] PROSTENIK M. The sphingolipid series VII. The configuration of  $\alpha$ -hydroxy-n-hexacosanoic acid of yeast cerebrin[ J ]. Croat Chem Acta, 1956, 28: 287—289.
- [ 11 ] LOURENCO ANA, LOBO ANA M, RODRIGUEZ B, et al. Ceramides from the fungus *Phellinus pini*[ J ]. Phytochemistry, 1996, 43( 3): 617—620.

## New Ceramides from the Marine Sponge *Clathria fasciculata*

XIAO Ding jun<sup>1</sup>, DENG Song zhi<sup>2</sup>, ZENG Long mei<sup>1</sup>

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering,

Sun Yat sen(Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China;

2. Guangzhou Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

**Abstract:** New ceramide homologs, possessing *iso*- and anteiso long chain, were isolated from the marine sponge *Clathria fasciculata* collected from the South China Sea near Hainan Island, China. Their structures were determined by FABMS, IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, HMQC, HMBC, GC, GC-MS and chemical transformations. The fatty acid part of ceramides were mainly composed of (4*E*)-2-hydroxy-4-docosenic, tricosenic, tetracosenic and pentacosenic acid.

**Key words:** *Clathria fasciculata*; sponge; ceramide; hydroxy fatty acid; long chain base