

# NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA LOÀI HẢI MIÊN *XESTOSPONGIA TESTUDINARIA* THU THẬP TẠI VIỆT NAM

NGUYỄN XUÂN CƯỜNG, TRẦN ANH TUẤN, NGUYỄN THU PHƯƠNG,  
VŨ VĂN THÀNH, PHAN VĂN KIÊM, CHÂU VĂN MINH

## I. MỞ ĐẦU

Đại dương là một nguồn tài nguyên vô cùng lớn, nơi chiếm tới 70% diện tích bề mặt trái đất. Đại dương cũng là nơi sinh sống của 34 trong 36 ngành sinh vật trên trái đất với hơn 300.000 loài thực động vật đã được biết đến [1]. Ngày nay, các hợp chất thiên nhiên biển ngày càng thu hút được nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học trên toàn thế giới bởi sự đa dạng về cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học của chúng. Trong các loài sinh vật biển, hải miên đã được biết đến như một nguồn nguyên liệu dồi dào của các hợp chất có cấu trúc mới và có hoạt tính sinh học đáng quan tâm.

Trong khuôn khổ đề tài KC09.09/06-10, hàng trăm mẫu dịch chiết metanol của các loài sinh vật biển đã được tiến hành thử nghiệm sàng lọc hoạt tính gây độc tế bào *in vitro*. Trong đó, mẫu dịch chiết metanol của loài hải miên *Xestospongia testudinaria* thể hiện hoạt tính gây độc tế bào cao. Từ đó, loài này đã được lựa chọn tiến hành thu thập lượng lớn phục vụ cho các nghiên cứu về thành phần hóa học. Theo các tài liệu đã công bố [2 - 4], hai thành phần hóa học chủ yếu của loài hải miên này là các axit béo không no (đa nối đôi và nối ba) và các hợp chất steroid. Trong đó đặc biệt đáng quan tâm là sự có mặt của các hợp chất axit béo không no bị brom hóa. Các hợp chất này thể hiện nhiều hoạt tính quý báu như: kháng vi sinh vật, gây độc tế bào, một số hợp chất còn ức chế enzym HIV protease, một enzym thiết yếu cho sự tái bản của HIV [5].

Trong bài báo này, chúng tôi công bố sự phân lập và xác định cấu trúc của 8 hợp chất đó là saringosterol (1), 5,8-epidioxycholest-6-en-3-ol (2), cholest-7-en-3-one (3), cholesterol (4), thymidine (5), thymine (6), batilol (7) và chimyl alcohol (8). Hoạt tính sinh học của các hợp chất cũng như các thành phần hóa học khác vẫn đang được chúng tôi tiếp tục nghiên cứu và sẽ công bố trong các công trình tiếp theo.

## II. THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Mẫu sinh vật

Mẫu hải miên *X. testudinaria* được thu thập tại Nam Yết, quần đảo Trường Sa, tỉnh Khánh Hòa vào tháng 03 năm 2007. Sau khi thu thập, mẫu được ướp đá trong quá trình vận chuyển sau đó lưu giữ trong tủ lạnh âm sâu cho tới khi sử dụng nghiên cứu. Tên khoa học được TS. Đỗ Công Hưng, Viện Tài nguyên Môi trường Biển, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam giám định. Mẫu tiêu bản số 20070303 được lưu giữ tại Viện Hóa học Các hợp chất thiên nhiên và Viện Tài nguyên môi trường Biển, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.



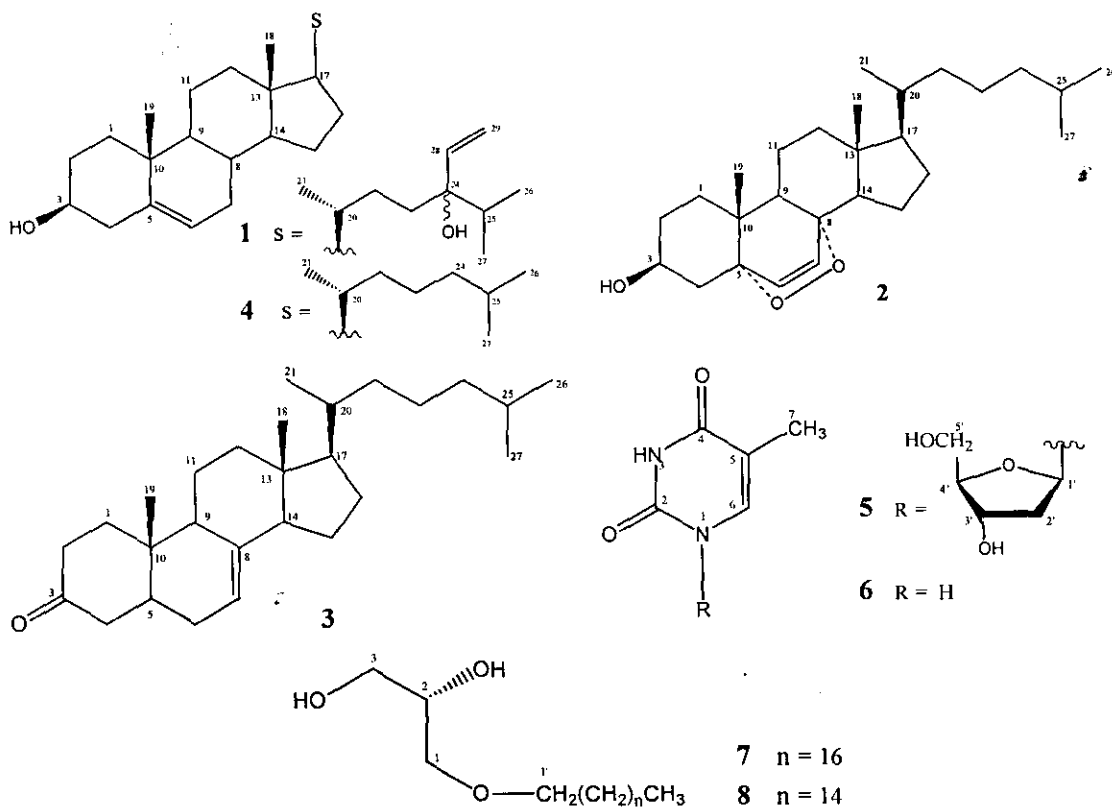
Loài hải miên *Xestospongia testudinaria*

## 2. Phân lập các chất

Hải miên *X. testudinaria* (20 kg tươi) được rửa sạch, xay nhỏ và chiết bằng metanol (3 lần) bằng thiết bị chiết siêu âm. Dịch metanol của các lần chiết được lọc, gom lại và cất loại dung môi ở nhiệt độ không quá 60°C dưới áp suất giảm thu được 120 g dịch cặn dịch metanol. Cặn dịch này được hòa vào nước và chiết phân bố lần lượt với các dung môi clorofoc và butanol theo tỷ lệ 1/1 (3 lần, mỗi lần 6 lít) thu được các cặn dịch tương ứng là clorofoc 60 g, butanol 40 g và nước 20 g. Cặn chiết clorofoc được tiến hành sắc kí cột lặp lại trên silica gel pha thường và pha đảo, kết hợp với sắc kí lớp mỏng điều chế thu được các hợp chất **1** (35 mg), **2** (20 mg), **3** (80 mg), **4** (1200 mg), **6** (100 mg), **7** (400 mg) và **8** (75 mg). Bằng các phương pháp tương tự, hợp chất **5** (130 mg) được phân lập từ cặn dịch butanol.

**Saringosterol (1):** Tinh thể hình kim màu trắng; điểm chảy 160°C - 161°C; phổ khối lượng ESI-MS:  $m/z$  411,1  $[M-H_2O+H]^+$ , 393,0  $[M-2H_2O+H]^+$  ( $C_{29}H_{49}O_2$ ,  $M = 428$ ); phổ  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ) và  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ ) xem bảng 1.

**5,8-Epidioxycholest-6-en-3-ol (2):** Tinh thể hình kim màu trắng; điểm chảy 102°C - 105°C; phổ khối lượng ESI-MS:  $m/z$  439,2  $[M+Na]^+$ , ( $C_{27}H_{44}O_3$ ,  $M = 416$ );  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 3,80 (1H, m, H-3), 6,30 (1H, d,  $J = 8,5$  Hz, H-6), 6,55 (1H, d,  $J = 8,5$  Hz, H-7), 1,52 (1H, H-9), 0,86 (3H, s, H-18), 0,92 (3H, s, H-19), 0,96 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-21), 0,90 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-26) và 0,90 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-27);  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ ) xem bảng 1.



Hình 1. Cấu trúc hóa học của các hợp chất 1 - 8

**Cholest-7-en-3-one (3):** Tinh thể màu trắng, điểm chảy 147°C - 148°C, phổ khối lượng ESI-MS:  $m/z$  385,3  $[M+H]^+$ , ( $C_{27}H_{44}O$ ,  $M = 384$ ).  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1,47 (1H, m,  $H_a-1$ ), 2,15 (1H, ddd,  $J = 4,5, 9,2, 13,6$  Hz,  $H_b-1$ ), 2,28 (1H, br d,  $J = 14,5$  Hz,  $H_a-2$ ), 2,42 (1H, dt,  $J = 14,5, 6,0$  Hz,  $H_b-2$ ), 5,18 (1H, br s, H-7), 0,57 (3H, s, H-18), 1,03 (3H, s, H-19), 1,39 (1H, m, H-20), 0,93 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-21), 0,86 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-26) và 0,87 (3H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-27).  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ ) xem bảng 1.

**Cholesterol (4):** Tinh thể hình kim màu trắng, điểm chảy 148°C - 149°C,  $C_{27}H_{46}O$ ,  $M = 386$ ;  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 3,52 (1H, m, H-3), 5,35 (1H, br d,  $J = 5,0$  Hz, H-6), 1,00 (3H, s, H-19), 0,91 (3H, s, H-21), 0,86 (6H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-26 và H-27) và 0,68 (3H, s, H-18);  $^{13}C$ -NMR (125MHz,  $CDCl_3$ ) xem bảng 1.

**Thymidine (5):** Tinh thể màu trắng, điểm chảy 186°C - 187°C, phổ khối lượng ESI-MS:  $m/z$  264,7  $[M+Na]^+$ , 240,8  $[M-H]^-$  ( $C_{10}H_{14}N_2O_5$ ,  $M = 242$ );  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  (ppm): 7,82 (1H, d,  $J = 1,0$  Hz, H-6), 1,90 (3H, d,  $J = 1,0$  Hz, H-7), 4,41 (1H, m, H-1'), 2,24 (1H, m, H-2'), 3,92 (1H, dd,  $J = 3,5, 6,5$  Hz, H-3'), 6,29 (1H, m, H-4'), 3,75 (2H, m, H-5');  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  (ppm): 152,4 (C-2), 166,4 (C-4), 111,5 (C-5), 138,2 (C-6), 12,4 (C-7), 86,3 (C-1'), 41,2 (C-2'), 72,2 (C-3'), 88,8 (C-4') và 62,8 (C-5').

**Thymine (6):** Tinh thể màu trắng, điểm chảy 326°C, phổ khối lượng ESI-MS:  $m/z$  126,8  $[M+H]^+$ , 148,7  $[M+Na]^+$ , 124,7  $[M-H]^-$  ( $C_5H_6N_2O_2$ ,  $M = 126$ );  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 10,56 (1H, br s, H-1), 10,97 (1H, br s, H-3), 7,24 (1H, d,  $J = 1,0$  Hz, H-6) và 1,72 (3H, d,  $J = 1,0$  Hz, H-7).

**Batilol (7):** Tinh thể màu trắng; điểm chảy 70-71°C; phổ khối lượng ESI-MS  $m/z$ : 345,1  $[M+H]^+$ , ( $C_{21}H_{44}O_3$ ,  $M = 344$ ),  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 3,62 (1H, dd,  $J = 3,0$  và 11,0 Hz,  $H_a-1$ ), 3,71 (1H, dd,  $J = 11,0$  và 5,0 Hz,  $H_b-1$ ), 3,86 (1H, m, H-2), 3,52 (2H, m, H-3), 3,45 (2H, m, H-1'), 1,57 (2H, m, H-2'), 1,26 (30H, br s, H-3' đến H-17') và 0,88 (3H, t,  $J = 7,0$  Hz, H-18').

**Chimyl alcohol (8):** Tinh thể màu trắng, điểm chảy 64°C - 65°C; phổ khối lượng ESI-MS  $m/z$ : 317,1  $[M+H]^+$ , ( $C_{19}H_{40}O_3$ ,  $M=316$ );  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 3,64 (1H, dd,  $J = 11,0$  và 3,0 Hz,  $H_a-1$ ), 3,71 (1H, dd,  $J = 5,0$  và 11,0 Hz,  $H_b-1$ ), 3,86 (1H, m, H-2), 3,52 (2H, m, H-3), 3,45 (2H, m, H-1'), 1,58 (2H, m, H-2'), 1,26 (26H, br s, H-3' đến H-15') và 0,88 (3H, t,  $J = 7,0$  Hz, H-16');  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 72,5 (C-1), 70,4 (d, C-2), 64,3 (C-3), 71,9 (C-1A), 29,3 - 29,7 (C-2'), 26,1 (C-3'), 29,3 - 29,7 (C-4' đến C-13'), 31,9 (C-14'), 22,7 (C-15') và 14,2 (C-16').

### 3. Hóa chất thiết bị

**Sắc kí lớp mỏng (TLC):** Sắc kí lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F254 (Merck 1,05715), RP18 F254s (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 368 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch  $H_2SO_4$  10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơ nóng trên bếp điện từ từ đến khi hiện màu.

**Sắc kí lớp mỏng điều chế (PTLC):** Sắc kí lớp mỏng điều chế thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn Silica gel 60G F254 (Merck, kí hiệu 105875), phát hiện vết chất bằng đèn tử ngoại hai bước sóng 254 nm và 368 nm, hoặc cắt rìa bản mỏng để phun thuốc thử là dung dịch  $H_2SO_4$  10%, hơ nóng để phát hiện vết chất, ghép lại bản mỏng như cũ để xác định vùng chất, sau đó cạo lớp Silica gel có chất, giải hấp phụ thu được chất cần tinh chế.

**Sắc kí cột (CC):** Sắc kí cột được tiến hành với chất hấp phụ là Silica gel pha thường và pha đảo. Silica gel pha thường có cỡ hạt là 0,040-0,063 mm (240-430 mesh). Silica gel pha đảo ODS hoặc YMC (30-50  $\mu m$ , FujiSilica Chemical Ltd.).

*Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR):* Được đo trên máy Bruker DRX500 của Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

*Phổ khối lượng (ESI-MS):* Được đo trên máy LC-MSD Agilent 1200 Series (USA) của Viện Hóa học các Hợp chất Thiên nhiên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất 4 nhận được dưới dạng tinh thể hình kim với giá trị  $R_f = 0,3$  trên sắc kí lớp mỏng pha thường với hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/axeton 7/1. Phổ  $^1\text{H}$  và  $^{13}\text{C}$ -NMR của 4 đặc trưng cho một hợp chất steroid có 27 cacbon. Trong đó một nhóm oximetin được khẳng định tại  $\delta_C$  71,8/ $\delta_H$  3,52 (1H, m). Độ chuyển dịch hóa học và tính đa vạch của proton này đặc trưng cho proton H-3 với cấu hình  $\alpha$  của các hợp chất sterol [6]. Các tín hiệu tại  $\delta_C$  121,7/ $\delta_H$  5,35 (br d,  $J = 5,0$  Hz) và  $\delta_C$  140,7 khẳng định sự tồn tại của một nối đôi nội vòng bị thế 3 vị trí. Năm nhóm methyl được khẳng định bởi các tín hiệu cộng hưởng tại  $\delta_C$  11,9/ $\delta_H$  0,68 (3H, s),  $\delta_C$  19,4/ $\delta_H$  1,00 (3H, s),  $\delta_C$  18,7/ $\delta_H$  0,91 (3H, s),  $\delta_C$  22,5/ $\delta_H$  0,86 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz) và  $\delta_C$  22,8/ $\delta_H$  0,86 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz). Các phân tích nêu trên, cùng với sự phù hợp hoàn toàn về các dữ kiện phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR và các tính chất vật lý của 4 so với số liệu đã được công bố [7] cho phép xác định cấu trúc hóa học của nó là cholest-5-en-3-ol hay cholesterol.

Bảng 1. Kết quả phổ NMR của các hợp chất 1 - 4

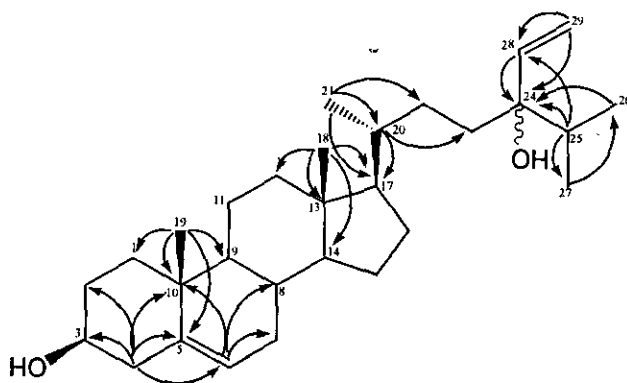
C	2		3		4		1		HMBC (H → C)
	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$		
1	39,5	38,8	37,2	37,3	1,07 m/1,85 m				
2	30,1	38,1	31,6	31,7	1,50 m/1,82m				
3	66,5	211,8	71,8	71,8	3,52 m				
4	36,8	44,2	42,2	42,3	2,27 m			2, 3, 5, 10	
5	82,1	42,9	140,7	140,8	-				
6	135,4	30,1	121,7	121,7	5,35 t, (3,0)			4, 7, 8, 10	
7	130,8	116,9	31,8	31,9	1,52 m/1,97 m			5, 6	
8	79,5	139,5	31,8	31,9	1,45 m				
9	51,1	48,9	50,1	50,1	0,95 m				
10	36,9	34,4	36,5	36,5	-				
11	20,6	21,7	21,1	21,1	1,49 m				
12	39,5	39,5	39,8	39,7	1,18 m/2,20 m				
13	44,7	43,4	42,3	42,34/42,31	-				
14	51,6	54,9	56,7	56,8	0,99 m				
15	23,4	22,9	24,3	24,3	1,05 m/1,58 m				
16	28,2	27,9	28,3	28,22/28,17	1,26 m/1,82 m				
17	56,4	56,2	56,1	55,8	1,15 m				
18	12,6	11,9	11,9	11,8	0,68 s			12, 13, 14, 17	
19	18,6	12,4	19,4	19,4	1,00 s			1, 5, 9, 10	
20	35,2	36,2	35,7	36,14/36,09	1,39 m			17, 23	
21	18,1	18,9	18,7	18,8	0,92 d (7,0)			17, 20, 22	
22	35,9	36,1	36,1	29,11/29,07	1,03 m/1,41 m				
23	23,8	23,9	23,8	34,79/34,57	1,58 m/1,62 m				
24	39,5	39,5	39,5	77,7	-				

25	28,0	28,1	28,0	35,9	1,73 m	24, 26, 27, 28
26	22,5	22,5	22,5	16,4	0,90 d (7,0)	24, 25, 27
27	22,8	22,8	22,8	16,5	0,87 d (7,0)	24, 25, 26
28	-	-	-	142.57/142.49	5,80 dd (10,5 và 17,5)	24
29	-	-	-	112.95/112.86	5,13 dd (1,5 và 10,5)/5,18 dd (1,5 và 17,5)	24, 28

<sup>a</sup>đo trong dung môi CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup>125 MHz, <sup>c</sup>500 MHz, độ chuyển dịch hóa học được thể hiện bằng ppm, hàng số tương tác (trong ngoặc đơn) bằng Hz.

Hợp chất **1** cũng được phân lập dưới dạng tinh thể hình kim màu trắng ở giá trị  $R_f = 0,3$  trên sắc kí lớp mỏng pha thường với hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/axeton 5/1. Phổ <sup>1</sup>H- và <sup>13</sup>C-NMR hoàn toàn tương tự như của **4** gợi ý rằng hai hợp chất này có cấu trúc tương tự nhau. Hợp chất này nhận được dưới dạng một vết tròn trên TLC và giá trị tích phân trên phổ <sup>1</sup>H-NMR rất chẵn. Tuy nhiên tại một vài tín hiệu trên phổ <sup>13</sup>C-NMR (bảng 1) có sự tách vạch rất sát nhau với tỷ lệ 1/1 về cường độ tín hiệu. Điều này cho thấy đây là một hỗn hợp đồng phân có độ tương đồng về cấu trúc hóa học rất cao. Chúng tôi đã cố gắng phân tách hỗn hợp này bằng nhiều phương pháp sắc kí khác nhau nhưng không đạt kết quả mong muốn.

Sự trùng khớp hoàn toàn về các giá trị phổ <sup>13</sup>C-NMR tại các vị trí tương ứng từ C-1 đến C-21 (Bảng 1) giữa **1** và **4** cho phép khẳng định hai hợp chất này có cùng cấu trúc bộ khung steroid và chỉ khác nhau về cấu trúc mạch nhánh. Sự khác biệt dễ nhận thấy nhất ở **1** so với **4** là sự xuất hiện thêm các tín hiệu cộng hưởng của một nối đôi ngoại vòng, ở đầu mạch tại  $\delta_C$  142 (d) và  $\delta_C$  112 (CH<sub>2</sub>) (được gán với các tín hiệu proton tương ứng tại  $\delta_H$  5,80 (1H, dd,  $J = 10,5$  và  $17,5$  Hz) và  $\delta_H$  5,13 (1H, dd,  $J = 1,5$  và  $10,5$  Hz)/ $\delta_H$  5,18 (1H, dd,  $J = 1,5$  và  $17,5$  Hz) thông qua phổ HSQC). Tín hiệu metilen C-24 mất đi và thay vào đó là sự xuất hiện của tín hiệu cacbon bậc bốn gắn với nguyên tử oxy tại  $\delta_C$  77,7 (s). Phân tích chi tiết các tương tác trên phổ HSQC và HMBC (Bảng 1 và Hình 2) cùng với kết quả phổ khối lượng ESI-MS (tại  $m/z$  411,1 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 393,0 [M-2H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>) cho phép xác định cấu trúc của mạch nhánh cũng như toàn bộ phân tử như đã được chỉ ra trên hình 1.



Hình 2. Các tương tác HMBC(H→C) chính của **1**

Điều này một lần nữa được khẳng định bởi sự phù hợp hoàn toàn tại các giá trị tương ứng về các tính chất vật lý và số liệu phổ của **1** so với tài liệu đã được công bố cho saringosterol [8]. Như vậy, cấu trúc hóa học của **1** được xác định là saringosterol (dưới dạng hỗn hợp đồng phân

epimer 24*S*/24*R* với tỷ lệ 1/1). Hợp chất này lần đầu tiên được phân lập từ loài rong nâu *Sargassum ringgoldianum* (sau đó tiếp tục được tìm thấy ở nhiều loài rong nâu khác), từ loài hải miên *Xestospongia muta* và cả ở thực vật (loài *Lesonia nigrescens*). Một điều đáng quan tâm là hợp chất này thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* rất mạnh với giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là 0,25 µg/ml và đây là giá trị MIC nhỏ nhất cho các hợp chất thiên nhiên được chiết tách từ thực vật tính đến năm 2001 [9]. Theo tác giả Brent R. C. [10], với lớp chất steroid tính đến năm 2003, chỉ có 3 hợp chất là axit fusidic, saringosterol và endoperoxide có hoạt tính kháng vi khuẩn lao với giá trị MIC ≤ 4 µg/ml.

Hợp chất 2 được phân lập dưới dạng tinh thể hình kim không màu ở giá trị  $R_f = 0,33$  trên TLC pha thường hệ dung môi *n*-hexan/etyl axetat 6,5/1. Phổ  $^1\text{H}$ - và  $^{13}\text{C}$ -NMR của 2 tương tự như của 4 cho thấy hai hợp chất này có cấu trúc tương đối giống nhau. Sự khác biệt chỉ được nhận thấy tại các vị trí từ C-3 đến C-8 với sự xuất hiện các tín hiệu cộng hưởng của một nối đôi nội vòng bị thế 2 vị trí tại  $\delta_{\text{C}} 130,8/\delta_{\text{H}} 6,65$  (1H, d,  $J = 8,5$  Hz) và  $\delta_{\text{C}} 135,4/\delta_{\text{H}} 6,30$  (1H, d,  $J = 8,5$  Hz) và hai cacbon bậc bốn nối với nguyên tử ôxy tại  $\delta 75,5$  (s) và 82,1 (s). Sự chuyển dịch mạnh về vùng trường thấp của các tín hiệu cacbon bậc bốn nối với nguyên tử ôxy này gợi ý tới sự có mặt của một cầu peroxide. Từ các phân tích nêu trên, số liệu phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR được so sánh trực tiếp với số liệu đã được công bố của hợp chất 5,8-epidioxycholest-6-*en*-3-ol [11]. Sự trùng khớp hoàn toàn tại các giá trị tương ứng giữa hai hợp chất cùng với kết quả phổ khối lượng ESI-MS tại  $m/z 349,2$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  cho phép khẳng định cấu trúc hóa học của 2 là 5,8-epidioxycholest-6-*en*-3-ol. Hợp chất này trước đó đã được chúng tôi phân lập từ loài cầu gai *Diadema setosum* [11] và nó thể hiện hoạt tính gây độc tế bào cao với nhiều dòng tế bào ung thư người như dòng KB (tế bào ung thư biểu mô,  $\text{IC}_{50} = 2,0\mu\text{g/ml}$ ), FL (tế bào ung thư màng tử cung,  $\text{IC}_{50} = 3,93\mu\text{g/ml}$ ) và Hep-2 (tế bào ung thư gan,  $\text{IC}_{50} = 2,4\mu\text{g/ml}$ ).

Hợp chất 3 phân lập được dưới dạng tinh thể màu trắng với giá trị  $R_f = 0,35$  trên TLC pha thường hệ dung môi *n*-hexan/etyl axetat 6,5/1. Phổ  $^1\text{H}$ - và  $^{13}\text{C}$ -NMR của 3 tương tự như của 4 cho thấy hai hợp chất này có cấu trúc tương đối giống nhau. Sự trùng khớp hoàn toàn về giá trị phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR tại các vị trí tương ứng từ C-11 đến C-27 cho phép khẳng định phần cấu trúc này của 3 và 4 là giống nhau. Sự khác biệt dễ nhận thấy nhất về giá trị phổ giữa hai hợp chất này là tín hiệu cộng hưởng của nhóm oximetin C-3 tại  $\delta 71,8$  (d) đã bị mất và thay vào đó là sự xuất hiện của nhóm cacbonyl tại  $\delta_{\text{C}} 211,8$ . Ngoài ra, giá trị độ chuyển dịch hóa học của nối đôi đã thay đổi từ  $\delta_{\text{C}} 140,7$  (s, C-5)/121,7 (d, C-6) thành  $\delta_{\text{C}} 116,9$  (d)/139,5 (s) cho thấy vị trí nối đôi đã bị thay đổi. Vị trí nối đôi tại C-7/C-8 và nhóm cacbonyl tại vị trí C-3 được xác định bởi sự trùng khớp hoàn toàn về các số liệu ở phần khung steroid của 3 với hợp chất có cấu trúc tương tự [12]. Từ các phân tích nêu trên cùng với kết quả phổ khối lượng ESI-MS tại  $m/z 385,3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  cho phép khẳng định cấu trúc hóa học của 3 là cholest-7-*en*-3-one.

Bằng cách so sánh các hằng số vật lý và số liệu phổ với các số liệu đã được công bố, các hợp chất 5 - 8 được xác định lần lượt là thymidine, thymine [13], batilol và chimyl alcohol [14].

#### IV. KẾT LUẬN

Bằng các phương pháp sắc kí cột lặp lại với chất hấp phụ là silicagel pha thường và pha đảo, kết hợp với phương pháp sắc kí lớp mỏng điều chế, đã phân lập được 8 hợp chất là saringosterol (1), 5,8-epidioxycholest-6-*en*-3-ol (2), cholest-7-*en*-3-one (3), cholesterol (4), thymidine (5), thymine (6), batilol (7) và chimyl alcohol (8) từ cặn chiết metatnol của loài hải miên *Xestospongia testudinaria*. Trong đó hợp chất 1, 2 và 3 lần đầu tiên được phân lập từ loài hải miên này. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được xác định bằng các phương pháp phổ hiện

đại như: phổ khối lượng ESI-MS, phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (1D NMR:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR và các phổ DEPT 90, DEPT 135) và hai chiều (2D-NMR: HSQC và HMBC).

*Lời cảm ơn:* Công trình này được hoàn thành dưới sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài KC09.09/06-10. Các tác giả xin chân thành cảm ơn TS Đỗ Công Thung, Viện Tài nguyên Môi trường Biển, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp thu thập mẫu hải miên và giám định tên khoa học.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. M. Donia and M. T. Hamann - Marine Natural Products and Their Potential Applications as Anti-infective Agents, *The Lancet Infect. Dis.* **3** (2003) 338-348.
2. J. Q. Ronald and J. T. David - A brominated bisacetylenic acid from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*, *Tetrahedron Letters* **26** (113) (1985) 1671-1672.
3. J. Q. Ronald and J. T. David - Further acetylenic acids from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*, *Journal of Natural Products* **54** (1) (1991) 290-294.
4. P. B. Ngoc, S. B. Mark, N. A. H. John, W. M. Roger, and J. Q. Ronald - Isolation of xestosterol esters of brominated acetylenic fatty acids from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*, *Journal of Natural Products* **62** (1999) 1439-1442.
5. D. P. Ashok, C. K. Wilhemus, C. Sally, A. F. Terry, T. Thaddeus, and W. W. John - Brominated polyacetylenic acids from the marine sponge *Xestospongia muta*: Inhibitors of HIV protease, *Journal of Natural Products* **55** (9) (1992) 1170-1177.
6. M. Kobayashi, F. Kanda, S. R. Damarla, D. V. Rao, and C. B. Rao - Marine sterols. XVII, Polyhydroxy sterols of the soft coral of the Andaman and Nicobar coasts, (2). Isolation and structures of three  $16\beta$ -hydroxy steroidal glycosides from an *Alcyonium* sp. soft coral, *Chem. Pharm. Bull.* **38** (1990) 2400-2403.
7. L. J. Goad and T. Akihisa - Analysis of sterols, Academic Press, 1<sup>st</sup> edition, 1997, 363.
8. A. N. C. Sesar, W. C. M. C. Kokke, D. Carmenza, and D. Carl - Synthesis of (24R)- and (24S)-5,28-stigmastadien- $3\beta$ -ol and determination of the stereochemistry of their 24-hydroxy analogues, the saringosterols, *Journal of Organic Chemistry* **48** (26) (1983) 5207-5214.
9. A. W. Gerald, G. F. Scott, M. Gloria, J. H. Joseph, M. M. William, and N. T. Barbara - Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* growth by Saringosterol from *Lessonia nigrescens*, *Journal of Natural Products* **64** (2001) 1463-1464.
10. R. C. Brent - Antimycobacterial natural products, *Natural Products Report* **20** (2003) 535-557.
11. C. V. Minh, P. V. Kiem, L. M. Huong, and Y. H. Kim - Cytotoxic constituents of *Diadema setosum*, *Archives of Pharmacal Research* **27** (7) (2004) 734-737.
12. R. Joachim and A. K. Wilfried - Constituents of various wood-rotting basidiomycetes, *Phytochemistry* **54** (2000) 603-610.
13. T. R. Krugh - Tautomerism of the nucleoside antibiotic Formycin, as studied by carbon-13 nuclear magnetic resonance, *Journal of the American Chemical Society* **95** (14) (1973) 4761-4762.