

NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC LOÀI HẢI MIỀN *Amorphinopsis excavans*

Hoàng Lê Tuấn Anh¹, Đan Thị Thúy Hằng¹, Nguyễn Thị Cúc¹, Dương Thị Hải Yến¹,
Dương Thị Dung¹, Nguyễn Xuân Nhiệm¹, Bùi Hữu Tài, Ngô Văn Quang^{1,2}, Trần Hồng Quang¹,
Nguyễn Hoài Nam¹, Phạm Hải Yến¹, Châu Văn Minh¹, Phan Văn Kiệm^{1*}

¹Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Đến Tòa soạn 24-3-2014

Abstract

From the methanol extract of Vietnamese marine sponge *Amorphinopsis excavans*, five known compounds, 24-methylcholestane-3 β ,5 α ,6 β ,25-tetrol 25-monoacetate (**1**), 24-methylcholestane-1 β ,3 β , 5 α , 6 β ,25-pentol 25-monoacetate (**2**), (2*S*)-1-*O*-(2',3',4',5'-tetrahydroxycyclopentyl)-3-*O*-(10''-methylhexadecyl)glycerol (**3**), thymine (**4**), and cholesterol (**5**) were isolated. Their structures were identified by various spectroscopic methods in comparison with the literature values. Compounds **1** and **2** were isolated from soft corals but from this genus for the first time.

Keywords: *Amorphinopsis excavans*, Vietnamese marine sponge, polyhydroxysterol.

1. MỞ ĐẦU

Các hợp chất polyhydroxysterol có nguồn gốc từ sinh vật biển được biết đến với nhiều hoạt tính sinh học đáng quan tâm, đặc biệt là hoạt tính gây độc tế bào với các dòng tế bào ung thư người [1]. Kết quả nghiên cứu cho thấy hợp chất 23,24-dimethylcholest-16(17)-*E*-en-3 β , 5 α , 6 β ,20(*S*)-tetraol ức chế tốt sự sinh trưởng của các dòng tế bào ung thư người HL60, M14, MCF7 với giá trị EC₅₀ tương ứng là 2,8, 4,3 và 4,9 μ g/ml và giá trị độc thấp với các tế bào lympho máu ngoại vi thường [2]. Kết quả nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào của 10 hợp chất polyhydroxysterol glycoside mới, anthenoside B-K, phân lập từ loài sao biển *Anthenea chinensis* cho thấy các hợp chất anthenoside F, anthenoside H, hỗn hợp 2 chất anthenoside I, J, hỗn hợp 2 chất anthenoside H, K có khả năng ức chế tốt 2 dòng tế bào ung thư K-562 và BEL-7402 [3]. Ba hợp chất polyhydroxysterol mới, stylisterol A-C, và một hợp chất polyhydroxysterol có khung mới, hatomasterol, được thông báo phân lập từ loài hải miên *Stylissa* sp. Các hợp chất này có hoạt tính gây độc tế bào trung bình đối với dòng tế bào HeLa [4].

Cho đến nay chưa có nghiên cứu nào về loài hải miên *Amorphinopsis excavans* ở trong nước được tiến hành, thậm chí các tạp chí quốc tế cũng hiếm có công bố về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học

của loài này. Bài báo này thông báo kết quả phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 5 hợp chất là 24-methylcholestane-3 β ,5 α ,6 β ,25-tetrol 25-monoacetate (**1**), 24-methylcholestane-1 β , 3 β , 5 α , 6 β , 25-pentol 25-monoacetate (**2**), (2*S*)-1-*O*-(2',3',4',5'-tetrahydroxycyclopentyl)-3-*O*-(10''-methylhexadecyl)glycerol (**3**), thymine (**4**) và cholesterol (**5**).

2. THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Phương pháp tách chiết

Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F₂₅₄ và RP₁₈ F₂₅₄ (Merck-Đức). Các vết chất được phát hiện bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10 % phun đều lên bản mỏng rồi sấy ở nhiệt độ cao cho đến khi hiện màu.

Sắc ký cột (CC) được tiến hành với chất hấp phụ pha thường (Silica gel 240-430 mesh, Merck) hoặc pha đảo (ODS-60-14/63, Fujisilisa-Nhật Bản).

2.2. Phương pháp phổ

Phổ cộng hưởng từ nhân (NMR) được đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3. Mẫu sinh vật biển

Mẫu hải miên *Amorphinopsis excavans* được thu vào tháng 3 năm 2011 tại Cát Bà, Quảng Ninh. Tên khoa học được PGS. TS. Đỗ Công Thung và cộng sự, Viện Tài nguyên và Môi trường Biển giám định. Mẫu tiêu bản được lưu trữ tại Viện Tài nguyên và Môi trường biển và Viện Hóa sinh biển.

2.4. Phân lập các hợp chất

Mẫu Hải miên *Amorphinopsis excavans* tươi (~50 kg) được thái nhỏ, phơi khô, nghiền vụn và chiết siêu âm 3 lần bằng metanol (ở 50 °C, mỗi lần 3 giờ). Các dịch chiết được lọc qua phễu hút chân không, loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được 280 g cặn chiết metanol. Cặn chiết này được hòa tan vào 1 lít nước cất và tiến hành chiết phân bố với dung môi có độ phân cực tăng dần hexan, clorofoc, etyl axetat và butanol (3 lần × 1l). Lớp dung môi hữu cơ thu được sau 3 lần chiết được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được 50 g cặn hexan, 120 g cặn clorofoc, 60 g cặn etyl axetat và 20 g cặn butanol.

Cặn clorofoc (30 g) được hòa tan, bổ sung silica gel pha thường (tỉ lệ 1/1,5), cất loại dung môi đến khô rồi nghiền mịn. Hỗn hợp này được phân tách thô trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel pha thường, sử dụng hệ dung môi rửa giải có độ phân cực tăng dần, hexan/etyl axetat, (gradient từ 100/0–0/100, rửa axeton, rửa metanol v/v) thu được 8 phân đoạn (AE1-AE8). Phân đoạn AE7 (1,5 g) tiếp tục được tiến hành sắc ký trên cột pha thường với hệ dung môi rửa giải clorofoc/axeton (1/2, v/v) kết hợp với sắc ký cột pha đảo với hệ dung môi axeton/nước (2/1, v/v) thu được hợp chất **1** (8 mg) và **5** (20 mg). Hợp chất **3** (10 mg) thu được sau khi tinh chế phân đoạn AE8 (0,8 g) trên cột sắc ký pha thường với hệ dung môi rửa giải clorofoc/metanol (6/1, v/v) kết hợp với sắc ký lớp mỏng điều chế, sử dụng hệ dung môi triển khai clorofoc/metanol (5/1, v/v).

Cặn butanol (5 g) được hòa tan, bổ sung silica gel pha thường (tỉ lệ 1/1,2), loại dung môi đến khô rồi nghiền mịn. Hỗn hợp được phân tách thành 3 phân đoạn AE9-AE11 trên cột sắc ký pha thường với hệ dung môi rửa giải clorofoc/metanol (10/1, v/v). Phân đoạn AE11 (0,7 g) được tinh chế trên cột sắc ký pha đảo với hệ dung môi rửa giải metanol/nước (1/1, v/v) kết hợp với sắc ký cột pha thường với hệ dung môi rửa giải clorofoc/metanol (5/1, v/v) thu được hợp chất **4** (6 mg). Hợp chất **2** (3 mg) thu được sau khi tiến hành tinh chế phân đoạn AE9 (1,2 g) trên cột sắc ký pha đảo với hệ dung môi

rửa giải axeton/nước (2/1, v/v) kết hợp với sắc ký cột pha thường etyl axetat/metanol (9/1, v/v).

24-metylcholestane-3 β ,5 α ,6 β ,25-tetrol

25-monoaxetat (1): Bột vô định hình, màu trắng.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) và ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃), xem bảng 1.

24-metylcholestane-1 β ,3 β ,5 α ,6 β ,25-pentol

25-monoaxetat (2): Bột vô định hình, màu trắng.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) và ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD), xem bảng 1.

(2S)-1-O-(2',3',4',5'-tetrahydroxycyclopentyl)-3-O-(10''-methylhexadecyl)glycerol (3): Chất dầu, màu vàng.

¹H-NMR (500 MHz, Pyridin-*d*₅) δ (ppm): 3,74 (1H, dd, $J = 5,0, 10,0$ Hz, H_a-1), 4,20 (1H, dd, $J = 4,0; 10,0$ Hz, H_b-1), 4,40 (1H, m, H-2), 3,70 (1H, dd, $J = 6,0; 9,5$ Hz, H_a-3), 4,08 (1H, dd, $J = 6,0; 10,0$ Hz, H_b-3), 4,32 (1H, t, $J = 6,0$ Hz, H-1'), 4,83 (1H, t, $J = 7,0$ Hz, H-2'), 4,69 (1H, t, $J = 5,5$ Hz, H-3'), 4,58 (1H, t, $J = 6,5$ Hz, H-4'), 4,76 (1H, t, $J = 6,0$ Hz, H-5'), 3,43 (1H, t, $J = 6,0$ Hz, H-1''), 1,56 (2H, m, H-2''), 1,23-1,36 (26H, m, H-3'''-H-15'''), 0,86 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, H-16''') và 0,83 (3H, m, H-17'''). ¹³C-NMR (125 MHz, Pyridin-*d*₅) δ (ppm): 73,57 (C-1), 70,34 (C-2), 73,43 (C-3), 84,94 (C-1'), 75,42 (C-2'), 82,68 (C-3'), 82,02 (C-4'), 80,31 (C-5'), 71,72 (C-1''), 27,29-37,33 (14C, C-2''' đến C-15'''), 14,24 (C-16''') và 19,88 (C-17''').

Thymine (4): Chất bột, màu trắng.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7,23 (1H, d, $J = 1,0$ Hz, H-6), 1,71 (3H, d, $J = 1,0$ Hz, H-7).

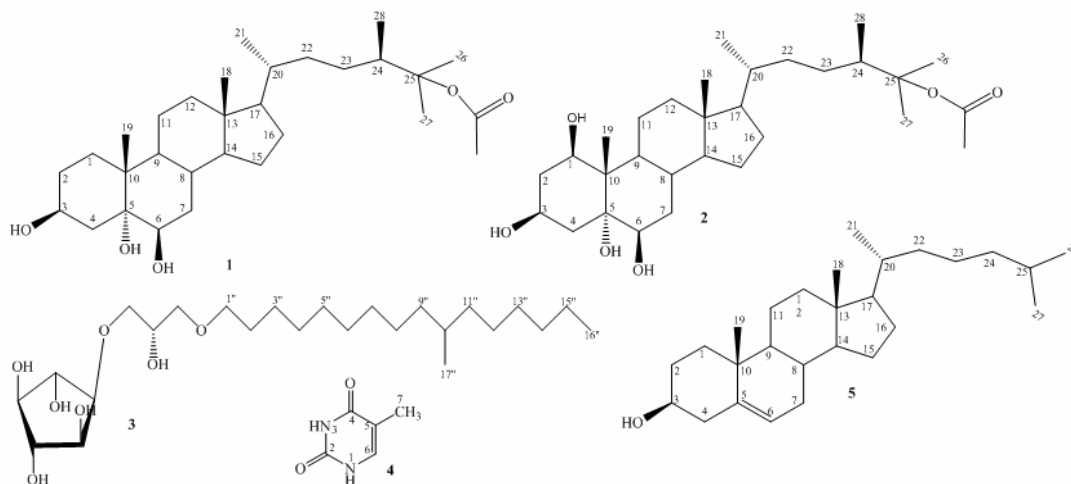
¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 151,45 (C-2), 164,89 (C-4), 107,65 (C-5), 137,67 (C-6), 11,75 (C-7).

Cholesterol (5): Chất kết tinh màu trắng.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 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, 27) và 0,68 (3H, s, H-18). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 37,2 (C-1), 31,6 (C-2), 71,8 (C-3), 42,2 (C-4), 140,7 (C-5), 121,7 (C-6), 31,8 (C-7), 31,8 (C-8), 50,1 (C-9), 36,5 (C-10), 21,1 (C-11), 39,8 (C-12), 42,3 (C-13), 56,7 (C-14), 24,3 (C-15), 28,3 (C-16), 56,1 (C-17), 11,9 (C-18), 19,4 (C-19), 35,7 (C-20), 18,7 (C-21), 36,1 (C-22), 23,8 (C-23), 39,5 (C-24), 28,0 (C-25), 22,5 (C-26) và 22,8 (C-27).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất **1** phân lập dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Kết quả phân tích phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR và DEPT cho thấy đây là một chất dạng polyhydroxy sterol. Trên phổ proton xuất hiện 7 tín



Hình 1: Cấu trúc hóa học của các hợp chất 1-5

Bảng 1: Số liệu phổ NMR của hợp chất 1-2 và chất tham khảo

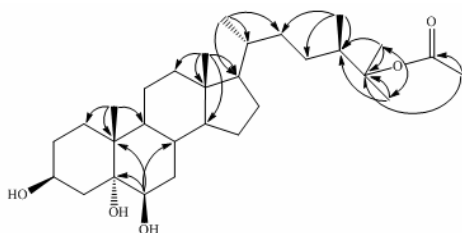
1				2			
C	$^s\delta_C$	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (J, Hz)	$^{\#}\delta_C$	$\delta_C^{d,b}$	DEPT	$\delta_H^{d,c}$ (J, Hz)
1	32,6	32,39	-	73,7	74,32	CH	3,95 dd (11,5; 5,0)
2	33,9	34,56**	-	44,0	42,48	CH ₂	-
3	67,5	67,62	4,08 m	65,4	65,98	CH	4,06 m
4	41,8	39,95	-	43,1	41,97	CH ₂	-
5	75,9	76,07*	-	77,0	77,51	C	-
6	76,6	76,09*	3,53 brs	76,9	77,09	CH	4,09 brs
7	34,9	34,68**	-	35,8	36,01	CH ₂	-
8	31,3	30,24	-	32,0	32,12	CH	-
9	46,8	45,87	-	47,1	47,38	CH	-
10	39,8	38,32	-	44,9	44,89	C	-
11	20,9	21,19	-	24,9	25,02	CH ₂	-
12	41,6	40,77	-	41,4	41,56	CH ₂	-
13	43,7	42,76	-	42,8	44,89	C	-
14	56,4	55,94	-	56,7	57,54	CH	-
15	24,6	24,14	-	25,1	25,55	CH ₂	-
16	29,4	28,12	-	28,5	29,05	CH ₂	-
17	56,4	55,98	-	56,8	55,74	CH	-
18	12,4	12,17	0,67 s	12,6	12,61	CH ₃	0,73 s
19	17,8	16,86	1,17 s	10,8	10,17	CH ₃	1,14 s
20	36,1	36,22	-	36,7	37,53	CH	-
21	19,4	18,94	0,90 d (6,5)	19,2	19,49	CH ₃	0,96 d (6,5)
22	35,6	34,68**	-	35,2	36,01	CH ₂	-
23	27,9	27,78	-	28,1	28,77	CH ₂	-
24	42,4	41,98	-	42,4	43,34	CH	-
25	85,5	85,95	-	85,6	87,42	C	-
26	23,1	22,92	1,38 s	23,6	23,19	CH ₃	1,42 s
27	23,5	23,34	1,38 s	23,2	23,82	CH ₃	1,40 s
28	14,9	14,49	0,84 d (7,0)	14,8	14,88	CH ₃	0,92 d (7,0)
CO	170,0	170,46	-	-	172,45	C	-
CH ₃	22,3	22,53	1,96 s	-	22,43	CH ₃	1,97 s

^aĐo trong CDCl₃, ^b125 MHz, ^c500 MHz, ^dđo trong CD₃OD; ^s δ_C của 24-methylcholestan-3 β ,5 α ,6 β ,25-tetrol-25-monoacetat [5];

[#] δ_C của 24-methylcholestan-1 β , 3 β , 5 α , 6 β , 25-pentol 25-monoacetat [6]; *, ** các tín hiệu có thể hoán đổi.

hiệu đặc trưng cho nhóm methyl tại δ_H 0,67 (3H, s), 0,85 (3H, d, $J = 7,0$ Hz), 0,91 (3H, d, $J = 6,5$ Hz), 1,17 (3H, s), 1,38 (6H, s) và 1,96 (3H, s).

Sự chuyển dịch về phía trường yếu của tín hiệu methyl tại δ_H 1,96 gợi ý đây là nhóm methyl của nhóm axetyl (COCH_3). Hai tín hiệu proton cộng hưởng tại δ_H 4,08 (1H, m) và 3,53 (1H, brs), cho phép dự đoán đây là 2 tín hiệu proton oximetin. Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT xuất hiện 30 tín hiệu cacbon gồm 5 tín hiệu cacbon bậc 4, 8 tín hiệu cacbon metin, 10 tín hiệu cacbon metilen, và 7 tín hiệu nhóm methyl. Hai tín hiệu cacbon bậc 3 liên kết trực tiếp với nguyên tử oxi và hai tín hiệu cacbon oximetin xuất hiện lần lượt tại δ_C 76,07, 85,95, 67,62 và 76,09. Bên cạnh đó, tín hiệu của 7 nhóm methyl lần lượt được xác định tại δ_C 23,34, 22,91, 22,53, 18,94, 16,86, 14,49 và 12,17. Ngoài ra, còn xuất hiện 1 tín hiệu đặc trưng của một nhóm cacbonyl tương ứng với độ dịch chuyển hóa học δ_C 170,46. So sánh với số liệu phổ cacbon của hợp chất 24-methylcholestane-3 β ,5 α ,6 β ,25-tetraol-25-monoacetate [5] thấy hoàn toàn phù hợp tại các vị trí tương ứng cho phép dự đoán hợp chất 1 chính là 24-methylcholestane-3 β ,5 α ,6 β ,25-tetraol-25-monoacetate. Cấu trúc hóa học của hợp chất 1 còn được khẳng định thêm dựa vào kết quả phân tích phổ 2 chiều HSQC và HMBC. Các tín hiệu proton được gán với các tín hiệu cacbon tương ứng dựa vào phổ HSQC (bảng 1). Trên phổ HMBC ($\text{H} \rightarrow \text{C}$) xuất hiện tương tác của nhóm methyl tại δ_H 0,67 (3H, s, H-18) với các tín hiệu cacbon δ_C 40,77 (C-12), 42,76 (C-13), 55,94 (C-14) và 55,98 (C-17); proton methyl tại δ_H 1,17 (3H, s, H-19) tương tác với các tín hiệu cacbon δ_C 32,39 (C-1), 76,09 (C-5), 45,87 (C-9) và 38,22 (C-10); proton methyl tại δ_H 0,90 (6H, d, H-21) với các tín hiệu cacbon δ_C 55,98 (C-17), 36,22 (C-20) và 34,68 (C-22) cho phép khẳng định vị trí 3



Hình 2: Các tương tác HMBC chính của hợp chất 1

nhóm methyl lần lượt tại C-18, C-19 và C-21. Tương tác giữa proton methyl δ_H 0,84 (d, H-28) tương tác HMBC với các tín hiệu cacbon δ_C 27,78 (C-23), 41,98 (C-24) và C-25; kết hợp với tương tác giữa tín hiệu proton methyl δ_H 1,38 (6H, s, H-26, H-27) các tín hiệu cacbon δ_C 41,98 (C-24), 85,98 (C-25) cho phép khẳng định sự có mặt của nguyên tử oxi tại vị

trí C-25 và 1 tín hiệu methyl (C-28) liên kết với cacbon C-24. Bên cạnh đó, vị trí của nhóm axetyl liên kết với tín hiệu oxi tại vị trí C-25 được khẳng định dựa vào tương tác giữa tín hiệu proton methyl δ_H 1,96 (3H, s, COCH_3) với các tín hiệu cacbon δ_C 85,98 (C-25) và cacbon cacbonyl 170,46 (CO). Nhóm hydroxyl còn lại được khẳng định tại vị trí C-6 dựa vào tương tác giữa proton δ_H 3,54 (H-6) với các tín hiệu cacbon δ_C 76,07 (C-5), 30,24 (C-8) và 38,32 (C-10). Kết quả phân tích trên cho phép khẳng định hợp chất 1 chính là 24-methylcholestane-3 β ,5 α ,6 β ,25-tetraol-25-monoacetate [5].

Hợp chất 2 thu được dưới dạng bột vô định hình, màu trắng. Phổ proton, cacbon và DPET của hợp chất 2 tương tự như của hợp chất 1, cho thấy đây cũng là một hợp chất dạng polyhydroxysterol. Sự khác nhau dễ nhận biết nhất là sự xuất hiện thêm 1 tín hiệu proton oximetin trên phổ hợp chất 2 tại vị trí cộng δ_H hưởng 3,95 (1H, dd, $J = 5,0; 11,5$ Hz), gợi ý sự xuất hiện thêm 1 nhóm hydroxy. Trên phổ cacbon và DEPT thấy có sự xuất hiện thêm 1 tín hiệu cacbon oximetin tại δ_C 74,32 cùng với sự chuyển dịch về phía trường mạnh của tín hiệu methyl tại δ_C 10,17 (C-19) và sự chuyển dịch về phía trường yếu của tín hiệu cacbon bậc 4 tại δ_C 44,89 (C-10). Bên cạnh đó là sự mất tín hiệu cacbon metilen C-1 tại δ_C 32,39 so với của hợp chất 1. Các dữ kiện trên cho phép khẳng định sự có mặt của một nhóm hydroxy tại C-1 trong hợp chất 2. Kết hợp so sánh với số liệu phổ [6] có thể khẳng định hợp chất 2 chính là 24-methylcholestan-1 β ,3 β ,5 α ,6 β ,25-pentol-25-monoacetate.

Các hợp chất 3, 4 và 5 được xác định lần lượt là (2S)-1-O-(2',3',4',5'-tetrahydroxycyclopentyl)-3-O-(10''-methylhexadecyl)glycerol [7], thymine [8], và cholesterol [9] bằng cách phân tích chi tiết các số liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân kết hợp so sánh với số liệu đã được công bố trong tài liệu tham khảo.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí của Nhiệm vụ nghiên cứu cơ bản định hướng ứng dụng (02/2011/HĐ-NCCBUD).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Q. Lin, Cui Jianguo, C. Gan et al. *Polyhydroxysterols with bioactivities from marine organisms*, Chinese Journal of Organic Chemistry, **32(12)**, 2214-2222 (2012).
2. H. Dong, Y. L. Gou, R. M. Kini, H. X. Xu, S. X. Chen, S. L. Teo, and P. P. But. *A new cytotoxic polyhydroxysterol from soft coral Sarcophyton trocheliophorum*, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, **48(7)**, 1087-1089 (2000).

3. M. Ning, F. T. Hai, Q. Feng, W. L. Hou, R. T. Xiang, and N. Y. Min. *Polyhydroxysteroidal glycosides from the starfish *Anthenea chinensis**, *Journal of Natural Products*, **73(4)**, 590-597 (2010).
4. M. Hidemichi, S. Nao, H. Ayako, M. Hiroaki, Y. Yasuji, W. M. V. S. Rob. *New polyhydroxysterol stylisterols A-C and a novel 5,19-cyclosterol hatomasterol from the Okinawan marine sponge *Stylissa* sp.*, *Steroids*, **70**, 63-70 (2005).
5. Nguyen H. T., Chau V. M., Phan V. K., Hoang T. H., Nguyen H. N., Nguyen X. C., Tran H. Q., Nguyen X. N., Jae H. H., Hee K. K., and Young H. K., *Chemical components from the Vietnamese soft coral *Lobophytum* sp.*, *Archives of Pharmacal Research* **33(4)**, 503-508 (2010).
6. K. Masaru, H. Takaaki, H. Koji, T. Masato, N. Takashi, and M. Hiroshi. *Marine Sterols. XI. Polyhydroxysterols of the soft coral *Sarcophyton glaucum*: Isolation and Synthesis of 5 α -Cholestane-1 β ,3 β ,5,6 β -tetrol*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **31(6)**, 1848-1855 (1983).
7. D. K. Kim, J. Y. Lim, S. J. Kim, H. J. Park, D. N. Kim, S. K. Im, K. J. Hong, and H. J. Jung. *A cyclitol derivatives as a replication inhibitor from the marine sponge *Petrosia* sp.*, *Journal of Natural Products*, **62**, 773-776 (1999).
8. M. Elisabeth, B. Ewa, S. Peter. *Synthesis and enzymatic digestion of an RNA nonamer in both enantiomeric forms*, *Tetrahedron.*, **56(11)**, 75-1484 (2000).
9. Goad L. J. and Akihisa, T., *Analysis of sterols*, Academic Press, 1st edition, 363 (1997).

Liên hệ: Phan Văn Kiệm

Viện Hóa sinh biển,
 Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội
 Email: phankiem@vast.ac.vn.