

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01479

多棘海盘车的化学成分

程萍¹, 汤华², 朴淑娟¹, 陆祎¹, 王增蕾², 林厚文^{1*}

1. 第二军医大学长征医院药学部, 上海 200003

2. 第二军医大学药学院海洋药物研究室, 上海 200433

[摘要] **目的:**研究多棘海盘车正丁醇萃取部位的化学成分。**方法:**利用溶媒萃取和多种色谱法,对多棘海盘车的正丁醇萃取部位化学成分进行分离,根据理化性质和现代波谱技术鉴定化合物的化学结构,并测试了其中5个化合物的生物活性。**结果:**分离并鉴定了5个化合物,分别为多羟基甾体皂苷 amurensoside D (I)、色氨酸(II)和3个硫酸甾醇,包括3 β -O-硫酸酯化-6 α ,23 β -二羟基-胆甾-9(11)-23-羰基-硫酸盐(III)、3 β -O-硫酸酯化-6 α -羟基-胆甾-9(11),20(22)-二双键-23-羰基-硫酸盐(IV)和3 β -O-硫酸酯化-6 α -羟基-麦角甾-9(11)-双键-23-羰基-硫酸盐(V)。**结论:**化合物II是首次从多棘海盘车中得到,化合物III和V对稻瘟病菌 P-2b 显示较强的药理活性。

[关键词] 多棘海盘车;皂苷;硫酸甾醇

[中图分类号] R 284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2008)12-1479-04

Study on chemical constituents of *Starfish Asterias amurensis*

CHENG Ping¹, TANG Hua², PIAO Shu-juan¹, LU Yi¹, WANG Zeng-lei², LIN Hou-wen^{1*}

1. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Department of Marine Drugs, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the chemical constituents in the BuOH extract of *Asterias amurensis*. **Methods:** The compounds were obtained by a combination of extraction and purification with suitable solvent and multiple column chromatographies; their structures were determined based on spectral analysis and physicochemical properties. The bioactivities of 5 compounds were tested. **Results:** Five compounds were isolated and identified, and they were amurensoside D (I), tryptophan II, and 3 sulfated sterols, including 3 β -O-sulfated-6 α , 20 β -diol-cholest-9(11)-en-23-one sodium salt (III), 3 β -O-sulfated-6 α -ol-cholesta-9(11), 20(22)-dien-23-one sodium salt (IV), and 3 β -O-sulfated-6 α -ol-ergost-9(11)-en-23-one sodium salt (V). **Conclusion:** Tryptophan II is obtained from this species for the first time; compound III and compound V exhibit potent inhibitory activity against *Pyricularia oryzae* P-2b.

[KEY WORDS] *Asterias amurensis*; saponin; sulfated sterols

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(12):1479-1482]

多棘海盘车(*Asterias amurensis*)是棘皮动物门(Echinodermata)海星纲(Asteroidea)的一种海洋无脊椎动物,在我国资源量丰富,但是国内仅有1篇研究其化学成分硫酸甾体的文章,为了进一步对我国多棘海盘车化学成分进行系统的研究,探索我国北海海域海洋生物中次生代谢产物的化学结构特征,我们对产自青岛海域的多棘海盘车进行了化学成分研究。从多棘海盘车95%醇提物的正丁醇萃取部

位分离得到了10个化合物,鉴定了其中5个化合物结构,即 amurensoside D (I), 色氨酸(II), 3 β -O-硫酸酯化-6 α ,23 β -二羟基-胆甾-9(11)-23-羰基-硫酸盐(III), 3 β -O-硫酸酯化-6 α -羟基-胆甾-9(11),20(22)-二双键-23-羰基-硫酸盐(IV), 3 β -O-硫酸酯化-6 α -羟基-麦角甾-9(11)-双键-23-羰基-硫酸盐(V)。其中化合物II为首次从多棘海盘车中分离得到。

[收稿日期] 2008-05-05

[接受日期] 2008-07-31

[基金项目] 国家高新技术研究发展计划("863"计划)(2006AA09Z423);长征医院"三重三优"学科人才建设计划。Supported by National High-tech R&D Program (863 Program)(2006AA09Z423) and Key Superior Program of Changcheng Hospital.

[作者简介] 程萍,硕士生。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-65585154, E-mail: franklin67@126.com

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 Yamato MP-21 型熔点测定仪(温度计未校正,天津分析仪器厂); Varian INOVA-400 型、Bruker AVANCE-600 型核磁共振仪; MAT-212 型质谱仪; Quattro 质谱仪(Micromass 公司); HSGF₂₅₄ 高效薄层色谱板(烟台市芝罘黄务硅胶开发试验厂); RP C₁₈ 高效薄层色谱板(Merck 公司); 柱色谱硅胶(200~300 目, 300~400 目, 烟台市芝罘黄务硅胶开发试验厂); 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20(Pharmacia 公司); 反相硅胶 ODS-A(50 μm YMC 公司); VSP3050 中压泵(EYELA 公司); LiChroprep Si60(40~63 μm) Lobar 柱(Merck 公司); Waters 1525 泵 PDA 2996 检测器(Waters 公司); SymmetryPrep C₁₈, 7.8 mm×300 mm(Waters 公司); 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 多棘海盘车样品于 2006 年 8 月采于中国青岛附近海域, 其生物种属由中国科学院海洋研究所廖玉林教授鉴定。样品保存于第二军医大学药学院海洋药物研究室, 编号 DJHPC-0608。

1.3 提取和分离 多棘海盘车样本湿质量 14 kg, 剪碎后用 95% 乙醇 10 L 渗漉提取 2 周, 再用 10 L 甲醇回流提取 24 h, 合并 2 次浸提液浓缩至浸膏状后用蒸馏水混悬, 再依次用 3 500 ml 乙酸乙酯萃取 8 次, 3 000 ml 饱和正丁醇萃取 7 次。浓缩得乙酸乙酯部分 201 g, 正丁醇部分 28 g。正丁醇部分(28 g) 经大孔树脂柱 Amberlite XAD-2 色谱, 乙醇-水(0%, 10%, 30%, 50%, 70%, 95%) 梯度洗脱得到 6 个流分。乙醇-水 30% 洗脱流分经 Sephadex LH-20 及 ODS 快速反相柱层析, 得到化合物 II(90 mg), 50% 乙醇-水洗脱流分、70% 乙醇-水洗脱流分, 经 Sephadex LH-20 及 ODS 快速反相柱层析, HPLC-C₁₈ 流动相为 55% 甲醇-水和 65% 甲醇-水洗脱, 得化合物 I(5.2 mg) 和 III(3.5 mg)、IV(4.2 mg)、V(5.5 mg)。

1.4 生物活性测定 稻瘟霉(*Pyricularia oryzae*) P-2b 菌株(日本东京大学分子细胞生物学研究所提供), 接种于土豆培养基斜面上, 26~28℃ 培养 8~14 d, 镜检使用。将化合物 I~V 分别取 2.0 mg 超声溶解于 1.0 ml 水中。每一菌株斜面加蒸馏水 8~10 ml, 刮下孢子, 振摇片刻, 四层纱布过滤, 滤液加

入 2%~3% 沙氏液体培养基, 镜检调整至孢子数为 40 000 个/ml, 用连续加样枪加入 96 孔培养液中, 每孔加孢子液 50 μl, 再用微量加样枪在第一行孔中分别加入 50 μl 样品溶液, 依次倍半稀释为 1 000、500、250、125、63、31、16、8 μg/ml 浓度。每块板均做阴性对照(水溶液)、空白对照(不加入样品试液)和阳性对照(Rhizoxin 或 5-FU)。然后置于 26~28℃ 培养箱中培养 17 h, 于倒置显微镜下观察孢子和菌丝形态, 确定活性结果。

2 结果

2.1 化合物 I 的结构鉴定 白色无定型粉末, Libermann-Burchard 反应阳性。SIPI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 607 [M+Na]⁺, 583 [M-H]⁻, 得到相对分子质量为 584, 结合¹³CNMR 推测分子式为 C₃₂H₅₆O₉。SIPI-MS 中有 m/z : 451 [M-H-132], 推测该化合物连有五碳糖。¹HNMR(600 MHz, MeOH-d₆): 0.93(3 H, s, 18-H₃), 0.87(3 H, s, 19-H₃), 0.93(6 H, d, $J=6$ Hz, 26-H₃, 27-H₃), 0.92(3 H, d, $J=9$ Hz, 21-H₃), 3.5(1 H, m, H-3), 4.02(1 H, t, $J=2.4$ Hz, H-3), 4.30(1 H, m, H-7), 4.23(1 H, d, $J=7.2$ Hz, 1'-H), 推测化合物 I 为连有 1 个木糖的胆甾醇结构。糖上其他氢的信号为: 3.50(1 H, m, 3'-H), 3.82(1 H, dd, 5'eq-H), 3.16(1 H, t, $J=9$ Hz, 5'ax-H), 2'-H 和 3'-H 被溶剂峰掩盖; ¹³CNMR(600 MHz, MeOH-d₆): 38.5(C-1), 31.9(C-2), 72.1(C-3), 32.8(C-4), 44.5(C-5), 72.5(C-6), 70.5(C-7), 35.7(C-8), 46.4(C-9), 37.3(C-10), 22.0(C-11), 42.3(C-12), 43.3(C-13), 55.7(C-14), 71.8(C-15), 42.5(C-16), 57.7(C-17), 15.0(C-18), 12.8(C-19), 37.0(C-20), 19.3(C-21), 32.8(C-22), 28.6(C-23), 86.2(C-24), 32.0(C-25), 18.3(C-26), 18.3(C-27), 105.0(C-1'), 75.4(C-2'), 78.1(C-3'), 71.4(C-4'), 66.8(C-5')。化合物 I 的波谱数据与文献^[1]报道的 amurensoside D 数据基本一致, 因此鉴定化合物 I 为 amurensoside D(图 1)。

2.2 化合物 II 的结构鉴定 白色无定型粉末。m. p. 288~289℃。ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 205 [M+H]⁺, 得相对分子质量为 204, 结合¹³CNMR 推测分子式为 C₁₁H₁₂N₂O₂, ¹HNMR(600 MHz, DMSO-d₆): 10.65(1 H, s, COOH), 7.59(1 H, m, H-4), 7.33(1 H, m, H-7), 7.15(1 H, m, H-2), 7.06(1 H, m, H-6), 6.97(1 H, m, H-5), 3.58(1

H, dd, $J = 9.0, 4.0$ Hz, H-2'), 3.30 (1 H, dd, $J = 15.2, 4.0$ Hz, H-1'), 2.75 (1 H, dd, $J = 15.2, 9.0$ Hz, H-1'). ^{13}C NMR (600 MHz, DMSO- d_6): 125.11 (C-2), 109.40 (C-3), 119.31 (C-4), 119.61 (C-5),

122.19 (C-6), 112.31 (C-7), 137.14 (C-8), 127.82 (C-9), 27.57 (C-1'), 55.59 (C-2'), 172.33 (C-3'). 以上数据与文献^[2]报道的色氨酸数据基本一致。因此鉴定化合物 II 为色氨酸(图 1)。

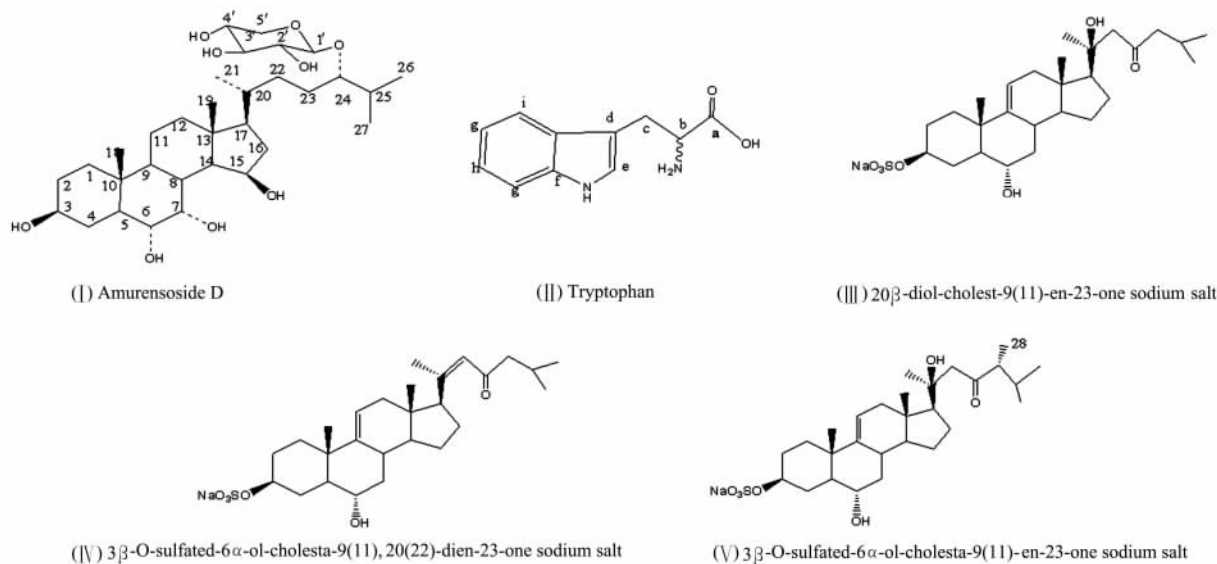


图 1 化合物 I ~ V 结构式

Fig 1 Chemical structure of compounds I - V

2.3 化合物 III 的结构鉴定 白色无定型粉末, Libermann-Burchard 反应阳性。SIPI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 557 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 和 511 $[\text{M}-\text{Na}]^-$, 得相对分子质量为 534, 结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 推测分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{O}_7\text{SNa}$ 。 ^1H NMR (600 MHz, MeOH- d_6): 4.88 (m, H-3), 5.24 (1 H, br, d, $J = 5.4$ Hz, H-11), 1.00 (3 H, s, H-18), 0.93 (3 H, s, H-19), 1.58 (3 H, s, H-21), 2.62 (1 H, d, $J = 15$ Hz, H-22), 2.79 (1 H, d, $J = 15$ Hz, H-22), 0.86 (3 H, d, $J = 2.4$ Hz, 3 H-26), 0.87 (3 H, d, $J = 2.4$ Hz, 3 H-27); ^{13}C NMR (600 MHz, MeOH- d_6): 36.2 (C-1), 29.5 (C-2), 78.0 (C-3), 31.2 (C-4), 50.7 (C-5), 68.4 (C-6), 43.4 (C-7), 35.7 (C-8), 146.2 (C-9), 38.3 (C-10), 116.5 (C-11), 42.6 (C-12), 41.7 (C-13), 54.1 (C-14), 23.3 (C-15), 25.2 (C-16), 59.6 (C-17), 13.6 (C-18), 19.3 (C-19), 73.8 (C-20), 27.1 (C-21), 55.0 (C-22), 211.7 (C-23), 54.0 (C-24), 24.4 (C-25), 22.5 (C-26), 22.7 (C-27)。以上数据与文献^[3]报道的数据基本一致, 因此鉴定化合物 III 为 3 β -O-硫酸酯化-6 α , 23 β -二羟基-胆甾-9(11)-双键-23-羰基-硫酸盐(图 1)。

2.4 化合物 IV 的结构鉴定 白色无定型粉末,

Libermann-Burchard 反应阳性。SIPI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 539 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 493 $[\text{M}-\text{Na}]^-$, 得相对分子质量为 516, 结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 推测分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{O}_6\text{SNa}$ 。 ^1H NMR (600 MHz, pyridina- d_6): 0.52 (3 H, s, H-18), 0.99 (3 H, d, $J = 4.2$ Hz, H-26), 0.91 (3 H, s, H-19), 1.74 (3 H, s, H-27), 2.27 (3 H, s, H-21), 3.78 (1 H, m, H-3), 5.65 (1 H, s, H-11), 6.13 (1 H, s, H-22); ^{13}C NMR (600 MHz, pyridina- d_6): 36.2 (C-1), 29.5 (C-2), 77.7 (C-3), 31.2 (C-4), 50.6 (C-5), 68.4 (C-6), 41.9 (C-7), 36.0 (C-8), 146.3 (C-9), 38.3 (C-10), 116.3 (C-11), 43.4 (C-12), 42.3 (C-13), 53.8 (C-14), 25.4 (C-15), 28.7 (C-16), 56.6 (C-17), 11.7 (C-18), 20.5 (C-19), 154.0 (C-20), 27.2 (C-21), 124.9 (C-22), 200.7 (C-23), 51.6 (C-24), 33.1 (C-25), 19.3 (C-26), 19.6 (C-27)。以上数据与文献^[3]报道的数据基本一致, 因此鉴定化合物 IV 为 3 β -O-硫酸酯化-6 α -羟基-胆甾-9(11)-双键-23-羰基-硫酸盐(图 1)。

2.5 化合物 V 的结构鉴定 白色无定型粉末, Libermann-Burchard 反应阳性。SIPI-MS 给出准分子离子峰 m/z : 571 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 525 $[\text{M}-\text{Na}]^-$, 得相对分子质量为 548, 结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 推测分

子式为 $C_{28}H_{45}O_7SNa$ 。 1H NMR(600 MHz, pyridina- d_6): 0.79(3 H, d, $J=7.2$ Hz, H-26), 0.89(3 H, d, $J=7.2$ Hz, H-27), 0.98(3 H, d, $J=7.2$ Hz, H-28), 0.94(3 H, s, H-18), 1.01(3 H, s, H-19), 1.58(3 H, s, H-21), 3.81(1 H, m, H-3), 5.24(1 H, br d, $J=6$ Hz, H-11), 2.69(1 H, d, $J=15.6$ Hz, H-22), 2.89(1H, d, $J=15.6$ Hz, H-22); ^{13}C NMR(600 MHz, pyridina- d_6): 36.3(C-1), 29.6(C-2), 77.7(C-3), 31.3(C-4), 50.8(C-5), 68.4(C-6), 42.6(C-7), 35.7(C-8), 146.2(C-9), 38.4(C-10), 116.5(C-11), 43.4(C-12), 41.7(C-13), 54.2(C-14), 23.3(C-15), 25.5(C-16), 59.4(C-17), 13.6(C-18), 19.4(C-19), 73.8(C-20), 27.1(C-21), 53.8(C-22), 215.8(C-23), 53.8(C-24), 30.0(C-25), 18.5(C-26), 21.4(C-27), 11.99(C-28)。以上数据与 3β -O-硫酸酯化-6 α -羟基-麦角甾-9(11),20(22)-二双键-23-羰基-硫酸盐数据一致^[3]。结构式见图1。而参考文献^[3]中的分子式 $C_{27}H_{43}O_7SNa$ 与波谱数据 6.16(1H, br, s, H-22)有误^[1]。

3 讨论

多棘海盘车功效为平肝和胃、止痛及镇惊^[4]。在沿海地区常被食用或作为肥料,国内较多报道它的食用价值、营养成分^[5-7]和抗菌活性研究^[8]。我们对其95%乙醇提取物有抗菌和抗癌活性的正丁醇部分进行系统研究,并分离鉴定了其中5个化合物,

稻瘟霉菌生物活性实验显示化合物Ⅲ和Ⅴ的最小抑菌浓度小于 $7.9 \mu\text{g/ml}$, 化合物Ⅰ和Ⅳ的最小抑菌浓度分别为大于 1 mg/ml 和 0.5 mg/ml , 而化合物Ⅱ无抑菌效果。抗癌成分初步推测为皂苷类成分, 需要结合抗癌生物活性实验才能进一步证实抗癌成分。

[参考文献]

- [1] Riccio R, Iorizzi M, Minale L, Oshima Y, Yasumoto T. Starfish sponins. Part 34. Novel steroidal glycoside sulphates from the starfish *Asterias amurensis* [J]. J Chem Soc Perkin Trans I, 1988, (6): 1337-1347.
- [2] 李莉娅, 邓志威, 李 军, 付宏征, 林文翰. 中国南海海绵 *Cinchyrella australiensis* 化学成分研究[J]. 北京大学学报: 医学版, 2004, 36: 12-17.
- [3] Liu H W, Li J K, Wang N L, Yao X S, Cai G P. Sulfated sterols isolated from starfish *Asterias amurensis* Lutken [J]. J Chin Pharm Sci, 2006, 15: 1-5.
- [4] 常丽影, 高淑华, 李静辉, 石向荣. 多棘海盘车的生药学研究[J]. 吉林中医药, 2001: 60.
- [5] 郝林华, 李八方. 多棘海盘车体壁胶原蛋白的研究[J]. 中国水产科学, 1999, 6: 19-21.
- [6] 王长云, 顾谦群, 周 鹏. 多棘海盘车用作新型海洋食品原料的可行性研究[J]. 中国水产科学, 1999, 6: 67-71.
- [7] 郝林华, 李八方. 多棘海盘车营养成分的研究[J]. 水产学报, 1998, 22: 385-388.
- [8] 刘文杰, 周培根. 多棘海盘车皂甙抗菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17: 283-286.

[本文编辑] 尹 茶

· 消 息 ·

第26届世界腔道泌尿外科学术大会首次在上海隆重召开

由第二军医大学长海医院具体承办的第26届世界腔道泌尿外科学术大会于2008年11月30日在上海国际会议中心隆重举行。这是首次由我国举办的高规格、高水平的国际泌尿外科学术大会。第二军医大学长海医院副院长、泌尿外科主任孙颖浩教授任大会执行主席。来自近60个国家和地区的1500名国际知名专家出席了会议。第二军医大学曹国庆政委、王建仁副政委参会。会议期间,大会组织了多项学术交流,除特邀报告、专题讲座、病例讨论、腔内泌尿外科模拟器训练等传统的交流方式外,会议还安排了多台精彩的卫星直播手术,包括最先进的NOTES、单孔腹腔镜、机器人腹腔镜等技术。

此次会议不仅为国内外学者提供了良好的交流平台,同时也向全世界泌尿外科学界展示了我校、乃至我国泌尿外科的学术水平,对提升我校的学术地位,扩大我校的学术影响,推动我国泌尿外科事业有着重大意义。