

(C-10''), 164.8 (C-12''), 158.3 (C-7a), 157.2 (C-16'', 18''), 156.7 (C-2), 156.5 (C-3', 5'), 155.3 (C-6), 134.2 (C-1''), 133.9 (C-20''), 130.6 (C-14'', 1'), 125.1 (C-2''), 122.5 (C-15''), 121.8 (C-4, 3a), 117.3 (C-9''), 115.9 (C-4'), 113.1 (C-5), 107.7 (C-13''), 107.4 (C-19''), 104.7 (C-17''), 103.8 (C-2', 6'), 102.8 (C-3), 101.7 (C-11''), 98.3 (C-7), 46.7 (C-4''), 38.8 (C-3'', 5'', 6''), 23.4 (C-7''). 因其旋光值为负值, 且 H-3'' 的偶合常数为 10.0 Hz, 依照文献总结的规律^[1], 该化合物为全反型加合物, 其绝对构型为 3''R, 4''R, 5''S。以上数据与文献报道的基本一致^[7], 故确定为桑叶呋喃 J (mulberrofuran J)。

化合物 VI: 棕色无定形粉末, $[\alpha]_D^{25} + 82.4^\circ$ (EtOH)。IR、¹H-NMR、¹³C-NMR 光谱与文献报道的基本一致^[8], 故确定为桑叶呋喃 Q (mulberrofuran Q)。

4 药理活性

对所得的 6 个化合物进行体外抗氧化活性筛选 (Fe²⁺-半胱氨酸诱导的肝微粒体脂质过氧化模型), 浓度为 1×10^5 mol/L 时, 化合物 IV ~ VI 有不同程度的抑

制脂质过氧化产物生成作用, 抑制率分别为 43.3%、91.2%、85.6%。阳性对照 VE 抑制率为 66.7%。

References:

- [1] Hano Y, Suzuki S, Nomura T, et al. Absolute configuration of natural Diels-Alder type adducts from the *Morus* root bark [J]. *Heterocycles*, 1988, 27(10): 2315-2325.
- [2] Takasugi M, Ishikawa S I, Nagao S, et al. Albinans F and G, natural Diels-Alder adducts from mulberry [J]. *Chem Lett*, 1980, 108(12): 1577-1580.
- [3] Nomura T, Fukai T, Kuwanon G. A new flavone derivative from the root barks of the cultivated mulberry tree (*Morus alba* L.) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1980, 28(8): 2548-2552.
- [4] Nomura T, Fukai T, Hano Y, et al. Constituents of cultivated mulberry tree [J]. *Planta Med*, 1983, 47(3): 151-156.
- [5] Takasugi M, Nagao S, Masamune T. Structure of dimoracin, a new natural Diels-Alder adduct from diseased mulberry [J]. *Chem Lett*, 1982, 128(8): 1217-1220.
- [6] Ueda S, Nomura T, Fukai T, et al. Kuwanon J, a new Diels-Alder adduct and chalconoracin from callus culture of *Morus alba* L. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30(8): 3042-3045.
- [7] Hirakura K, Hano Y, Fukai T, et al. Structures of three new natural Diels-Alder type adducts, kuwanons P and X, and mulberrofuran J, from the cultivated mulberry tree (*Morus lhou* Koidz.) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(3): 1088-1096.
- [8] Hano Y, Tsubura H, Nomura T, et al. Structure of mulberrofuran Q, a novel 2-arylbenzofuran derivative from the cultivated mulberry tree (*Morus alba* L.) [J]. *Heterocycles*, 1986, 24(7): 1807-1813.

可疑翼手参中 4 个脑苷脂

张永娟^{1,2}, 易杨华^{2*}

(1. 广东医学院 生理学教研室, 广东 湛江 524023; 2. 第二军医大学药学院 海洋药物研究中心, 上海 200433)

摘要:目的 研究可疑翼手参体内的活性成分。方法 对乙醇提取物的极性较小部分采用反复硅胶柱色谱方法分离纯化, 并根据化合物的理化特性和光谱数据确定其结构。结果 分离并鉴定了 4 个脑苷脂类化合物: 1-O-β-D-吡喃葡萄糖-(2S, 3R, 4E, 8E)-2-正二十二烷酰氨基-13-甲基-4, 8-十六烷二烯-1, 3-二醇(I)、1-O-β-D-吡喃葡萄糖-(2S, 3R, 4E, 8E)-2-[(2R)-2-羟基-二十二烷酰氨基]-13-甲基-4, 8-十六烷二烯-1, 3-二醇(II)、1-O-β-D-吡喃葡萄糖-(2S, 3R, 4E, 8E)-2-[(2R)-2-羟基-二十三烷酰氨基]-13-甲基-4, 8-十六烷二烯-1, 3-二醇(III)、1-O-β-D-吡喃葡萄糖-(2S, 3R, 4E, 8E)-2-[(2R)-2-羟基-二十四烷酰氨基]-13-甲基-4, 8-十六烷二烯-1, 3-二醇(IV)。结论 4 个脑苷脂化合物均为首次从此种海参体内分得。

关键词:可疑翼手参; 海参; 脑苷脂; 甲醇分解; 乙酰化

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)05-0979-04

Four new cerebrosides from sea cucumber *Colochirus anceps*

ZHANG Yong-juan^{1,2}, YI Yang-hua²

(1. Department of Physiology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; 2. Research Center for Marine Drugs, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To study the active compounds of the sea cucumber *Colochirus anceps*. **Methods** The compounds were isolated and purified from the low-polarity part of EtOH extract of the sea cucumber,

and their structures were established by a combination of spectroscopic analysis, chemical transformation, and other chemical evidence. **Results** Four compounds were isolated and their structures were established as 1-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-(2*S*, 3*R*, 4*E*, 8*E*)-2-docosanoylamino-13-methyl-4, 8-hexadecadiene-1, 3-diol (I), 1-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-(2*S*, 3*R*, 4*E*, 8*E*)-2-[(2*R*)-2-hydroxydocosa-noylamino]-13-methyl-4, 8-hexadecadiene-1, 3-diol (II), 1-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-(2*S*, 3*R*, 4*E*, 8*E*)-2-[(2*R*)-2-hydroxy-tricosanoylamido]-13-methyl-4, 8-hexadecadiene-1, 3-diol (III), and 1-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-(2*S*, 3*R*, 4*E*, 8*E*)-2-[(2*R*)-2-hydroxy-tetracosanoylamino]-13-methyl-4, 8-hexadecadiene-1, 3-diol (IV). **Conclusion** Four new cerebrosides are isolated from the sea cucumber *C. anceps* for the first time.

Key words: *Colochirus anceps*; sea cucumber; cerebroside; methanolysis; acetylate

可疑翼手参 *Colochirus anceps* 为枝手目瓜参科海参, 体长约 10 cm, 直径约 4 cm, 两端细, 中央圆钝。背面有许多瘤状疣足, 瘤足中央有一个管足。体壁粗糙坚硬。动物活时颜色鲜艳, 干体灰白色带有粉红色或黄色斑点, 酒精标本坚硬, 且颜色褪为乳白色。一般生活在距水面深约 100 m 的泥沙中, 以海底的有机碎屑为食。在我国主要分布在福建、广东、广西、海南与香港等海域。笔者首次对可疑翼手参干体内的化学成分进行了研究, 从其乙醇提取物的较低极性部分分得了 4 个脑苷脂类化合物, 经理化和光谱分析确定了化合物的化学结构。查阅相关文献, 证实 4 个化合物均为首次从此种海参体内分得。

1 样品、仪器与试剂

1.1 样品: 可疑翼手参干品采自福建沿海海域, 种属由国家海洋局第三海洋研究所易瑞灶研究员鉴定, 标本现存放于第二军医大学药学院海洋药物研究中心。

1.2 仪器与试剂: 北京市科仪电光仪器厂 XT5 显微熔点测定仪; Bruker vector 22 型红外光谱仪; Varian Inova-400、Inova-600 磁共振仪; Micro-mass 公司 Quattro 质谱仪, 柱色谱硅胶 (100~200 目, 200~300 目) 为烟台芝罘黄务硅胶开发试验厂生产, 试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取与分离: 可疑翼手参干品, 粉碎成粉末状, 称量共 17 kg, 用 80% 乙醇室温浸泡 7 d, 滤过, 共浸泡 3 次, 所得滤液减压回收溶剂至干, 得流浸膏; 然后继续用 60% 乙醇室温浸泡滤渣 7 d 并滤过, 共浸泡 2 次, 滤液减压回收溶剂至干, 得流浸膏。合并流浸膏得到总流浸膏。将总流浸膏用甲醇溶解后滤过, 共溶解、滤过 3 次, 合并所有的滤液并减压回收溶剂至干, 得粗浸膏。将粗浸膏分散在适量蒸馏水中, 用 CH_2Cl_2 萃取 3 次, CH_2Cl_2 层减压回收溶剂得浸膏, 后对此部分浸膏主要用硅胶柱进行反复纯化,

依次用 CHCl_3 -MeOH- H_2O (100:1:1~9:2:1) 最终分得白色结晶性粉末 CR 共 750 mg。

2.2 化合物 CR 的甲醇分解

2.2.1 CR 的甲醇分解: 取化合物 CR 样品 20.0 mg, 溶解于 6 mL 5% HCl-MeOH 溶液中, 加热回流 24 h, 冷却至室温, 用正己烷萃取 3 次, 正己烷层减压回收溶剂至原体积的 1/3, 得到脂肪酸甲酯 (FAM) 溶液, 进行 GC-MS 分析以确定脂肪酸链的长度与结构。

2.2.2 FAM 的 GC-MS 分析: Finnigan Voyager GC/MS 联用仪配 DB-5 石英毛细管色谱柱 (30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μm)。柱温: 150 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min; 升温至 300 $^{\circ}\text{C}$ (15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$), 保持 10 min。气化温度: 250 $^{\circ}\text{C}$ 。进样量 1 μL 。载气 (流量): N_2 (1 mL/min), 分流比: 30:1, 延迟: 2 min。MS 检测器: EI 电源, 电离电压 70 eV, 源温: 200 $^{\circ}\text{C}$ 。MS 标准库: NBS, NIST 库。

2.3 长链碱基 (LCB) 的乙酰化: CR 甲醇解所得反应物经正己烷萃取后得到甲醇层, 减压条件下除去 HCl, 得到糖与 LCB 的水溶液, 后用醋酸乙酯萃取 3 次, 醋酸乙酯层减压回收溶剂至干得到 LCB, 加入吡啶 1 mL 溶解, 再加入醋酐 1.5 mL, 70 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1.5 h, 反应完毕, 加入适量蒸馏水, 用醋酸乙酯萃取 3 次, 醋酸乙酯层回收溶剂至原体积的 1/3, 得到 LCB 的乙酰化物溶液, 并进行 GC-MS 分析 (方法如 FAM 的 GC-MS 分析)。

2.4 LCB 的乙酰化物的二甲基二硫化物 (DMDS) 的衍生化: LCB 的乙酰化物样品溶于 0.5 mL 二硫化碳中, 加入 0.5 mL DMDS, 2 mg 碘, 置于安瓿瓶中, 封好瓶口, 65 $^{\circ}\text{C}$ 反应 40 h, 反应完毕后, 加入 5% 硫代硫酸钠溶液终止反应, 加入石油醚, 石油醚溶液减压回收溶剂至干, 后用硅胶柱纯化。

2.5 结构鉴定

化合物 CR 为白色无定形粉末 (MeOH), mp 195~197 $^{\circ}\text{C}$ 。Liebermann-Burchard 和 Molish 反应

阴性。遇硫酸显深红色。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}(\text{cm}^{-1})$: 1 644、1 536 为仲酰胺吸收峰, 3 363 为多个-OH 吸收峰, 721 为长链脂肪烷基的吸收峰。EI-MS 表明有脂肪链碎片峰 m/z 57, 83, 97。 $^1\text{H-NMR}$ 中出现两组强的质子信号: $n\text{CH}_2(\delta_{\text{H}} 1.22 \sim 1.42, \text{brs}, 41.26 \text{ H})$ 强而集中的质子信号, 与甲基多重质子峰信号 ($\delta_{\text{H}} 0.82 \sim 0.857, \text{m}, 6.44 \text{ H}$)。在 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 DEPT 谱中出现 $\delta_{\text{C}} 19.2, 14.1, 11.4$ 三个甲基碳信号, 推测此化合物含有两个脂肪烷基长链, 且其中一个长脂肪链带有支甲基。信号 $\delta_{\text{H}} 7.39 (1\text{H}, \text{NH})$ 和 $\delta_{\text{C}} 176.3 (\text{CONH})$, $\delta_{\text{H}} 4.13 (1\text{H}, \text{m})$ 和 $\delta_{\text{C}} 53.6 (\text{CH-NH})$, 表明此化合物中有酰胺键存在; $\delta_{\text{C}} 72.5$ 和 $\delta_{\text{H}} 4.13 (\text{mH}, \text{m})$ 表明有-OH 存在。 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱中 $\delta_{\text{C}} 80 \sim 120$ 之间只有一个碳信号: $\delta_{\text{C}} 103.1$ 为糖上的端基碳信号, $\delta_{\text{C}} 73.1, 77.3, 70.1, 76.3, 61.3$ 为糖上的连氧碳信号, 表明化合物中有一个六碳单糖存在, 将此六碳糖的 $^{13}\text{C-NMR}$ 波谱数据与相关文献报道对照^[1~4], 确定其为 $\beta\text{-D-吡喃葡萄糖}$ 。根据以上信息推测该化合物为脑苷脂类化合物, 查阅相关文献并与之对照, 证实了以上推测。

通过对 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 $^1\text{H-NMR}$ 数据 (表 1) 仔细分析发现, 在 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱中 $\delta_{\text{C}} 134.9, 129.9, 128.6$ 处有 3 个双键碳信号, 而 $^1\text{H-NMR}$ 谱在双键区域有相当于不到 3 个烯烃质子的信号: $\delta_{\text{H}} 5.70 (0.81 \text{ H}, \text{m})$, $\delta_{\text{H}} 5.44 (0.93 \text{ H}, \text{m})$, $\delta_{\text{H}} 5.36 (0.48 \text{ H}, \text{m})$, 与碳谱中的碳信号无法吻合, H 面积计数很不规范, 结合整个化合物的谱图特点, 参照相关文献: 脑苷脂类化合物, 因存在同分异构体等原因, 相互之间仅有很细微的差别, 常以混合物的形式存在, 又因为它们的极性不大, 不适合用 HPLC 将它们分开, 所以很难将它们分离纯化为单体。最终确定化合物 CR 为一类结构相似的脑苷脂类化合物的混合物, 参照文献首先对化合物 CR 进行甲醇解, 得到 FAM 与 LCB 部分, 对 FAM 部分进行 GC-MS 分析结果表明: FAM 部分含有 4 种成分, FAM-B: 正二十三烷酸甲酯 ($\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{O}_2$ m/z 354); FAM-C: 2-羟基-二十三烷酸甲酯 ($\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{O}_3$ m/z 370); FAM-D: 2-羟基-二十四烷酸甲酯 ($\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}_3$ m/z 384); FAM-E: 2-羟基-二十五烷酸甲酯 ($\text{C}_{25}\text{H}_{50}\text{O}_3$ m/z 398)。它们在混合物中占有的比例 FAM-B : FAM-C : FAM-D : FAM-E 为 2 : 58 : 29 : 11。FAM 部分的旋光度为 $+12.4^\circ$, 确定 2' 位为 R 构型^[5]。4 个 FAM 化合物的结构中并不含有双键, 由此推测 2 个双键肯定存在

于 LCB 部分。

表 1 化合物 CR 的 NMR 数据 (in CDCl_3 , 100/400 Hz)

Table 1 NMR Data of compound CR (in CDCl_3 , 100/400 Hz)

碳 位	δ_{C}	$\delta_{\text{H}} (J \text{ in Hz})$
鞘氨醇		
1	69.5	4.7 d (7.2)
2	53.6	3.94 m
3	72.5	4.28 dd
4	134.9	5.04 m
5	129.9	H α 3.8m, H β 4.67 m
13	34.5	1.18 m
15	19.2	0.82 m
16	11.4	0.84 m
脂肪酸长链		
1'	176.3	5.3 d
2'	72.5	3.9 dd
CH ₃	14.2	0.86 m
六碳糖		
1''	103.1	1.8 d
2''	73.1	3.95
3''	77.3	4.22 m
4''	70.1	3.84
5''	76.3	4.26
6''	61.3	

化合物 CR 的 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 DEPT 中的 3 个甲基碳信号 $\delta_{\text{C}} 19.2, 14.2, 11.4$ 显示, 该脑苷脂类化合物的脂肪链中存在支链。经查阅文献, 发现海洋生物中的神经酰胺或脑苷脂类化合物的脂肪酸长链常常含有反异 (anteiso) 末端和异丙 (isopropyl) 末端^[6,7], 两种末端的示意图见图 1。两种脂肪酸长链末端碳信号数据与文献报道^[6] 比较, 见表 2。

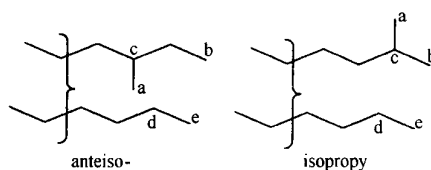


图 1 海洋神经酰胺和脑苷脂类化合物脂肪酸长链的反异末端和异丙末端

Fig. 1 Anteiso- or isopropyl of fatty acid long-chain in ceramide and cerebroside from halobios

表 2 神经酰胺和脑苷脂类化合物脂肪酸长链反异末端和异丙末端碳信号比较

Table 2 Comparison of anteiso- and isopropyl of fatty acid longchain in ceramide and cerebroside

	反异末端/ δ_{C}	异丙末端/ δ_{C}		反异末端/ δ_{C}	异丙末端/ δ_{C}
a	11.4	22.8	d	22.7	22.9
b	19.2	22.8	e	14.2	14.2
c	34.5	28.2			

结合以上化合物 CR 的 $^{13}\text{C-NMR}$ 、DEPT 谱和表 2 中的碳信号数据, 可确定化合物 CR 中只含有反异

末端;又因为甲醇解后的FAM中4个成分只含直链结构,所以反异末端结构肯定存在于LCB部分。

化合物CR的 ^{13}C -NMR、 ^1H -NMR和DEPT谱中 δ_{C} 72.5、 δ_{H} 3.99信号表明,长链碱基部分C-3位上连有-OH,所以长链碱基部分为1,3-二羟基鞘氨醇。 δ_{C} 134.9、129.9表明化合物有一个双键存在与C-4与C-5之间^[1],双键的构型是根据双键的偶合常数和峰形来判断的,质子信号($J=14.8\text{ Hz}$)为多重峰,双键为E型。为了进一步确定长链碱基部分的结构,对此部分进行乙酰化。得到LCB的乙酰化物溶液并进行GC-MS分析,测知LCB的乙酰化物溶液中只含有一个乙酰化物成分,其相对分子质量为399,所以可以确定LCB部分共有16个碳,为含有2个双键的1,3-二羟基-十六碳二烯鞘氨醇,即4种脂肪酸甲酯具有相同的LCB部分。LCB的立体化学是由其旋光值和质子的化学位移共同确定的。

为了进一步确定LCB部分中另外一个双键的位置,对LCB部分的铕物进行二甲基二硫化物的衍生化。所得产物测定EI-MS,给出特征碎片峰 m/z 187($\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{S}$),表明双键位于长链碱基的C-8、C-9位。双键的构型,是根据双键上2个质子的偶合常数和峰形来确定的,质子信号($J=15\text{ Hz}$)为多重峰,故双键为E型。综合以上信息,长链碱基部分的结构为(2S,3R,4E,8E)-4,5(8,9)-二烯鞘氨醇。

结合以上分析,化合物CR是4种脑苷脂类化合物的混合物,结构确定如下,CR-1:1-O- β -D-吡喃

葡萄糖-(2S,3R,4E,8E)-2-正二十二烷酰氨基-13-甲基-4,8-十六烷二烯-1,3-二醇;CR-2:1-O- β -D-吡喃葡萄糖-(2S,3R,4E,8E)-2-[(2R)-2-羟基-二十二烷酰氨基]-13-甲基-4,8-十六烷二烯-1,3-二醇;CR-3:1-O- β -D-吡喃葡萄糖-(2S,3R,4E,8E)-2-[(2R)-2-羟基-二十三烷酰氨基]-13-甲基-4,8-十六烷二烯-1,3-二醇;CR-4:1-O- β -D-吡喃葡萄糖-(2S,3R,4E,8E)-2-[(2R)-2-羟基-二十四烷酰氨基]-13-甲基-4,8-十六烷二烯-1,3-二醇。查阅文献,此4个化合物均为首次从该种海参体内分得。

References:

- [1] Heodore A W K, Lewis W C, Li S C, et al. Carbon-13C NMR spectroscopy of a cerebroside, proof of the β -pyranosyl structure of D-glucosylceramide [J]. *J Bio Chem*, 1979, 254(7): 2326-2328.
- [2] Jung E H, Lee C O, Kim Y C, et al. New bioactive cerebroside from *Arisaema amurense* [J]. *J Nat Prod*, 1996, 59(3): 319-322.
- [3] Falk K E, Karlsson K A, Samuelsson B E. Proton nuclear magnetic resonance analysis of anomeric structure of glycosphingolipids [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1979, 192: 164-176.
- [4] Kim S Y, Choe Y H, Huh H, et al. New antihepatotoxic cerebroside from *Lycium chinense* fruits [J]. *J Nat Prod*, 1997, 60: 274-276.
- [5] Loukaci A, Bulter-Ponce V, Longeon A, et al. New lipids from the tunicate cystodytes ef. Dellechiaiei, as PLA2 inhibitors [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(6): 799-802.
- [6] Yamada K, Hara E, Miyamoto T, et al. Isolation and structure of biologically active glycosphingolipids from the sea cucumber *Cucumaria echinate* [J]. *J Org Chem*, 1998(1): 371-378.
- [7] Inagaki M, Ispte B, Kanano Y, et al. Isolation and structure of three new ceramides from the starfish *Acanthaster planci* [J]. *J Org Chem*, 1998(1): 129-131.

姜黄挥发油抗癌活性成分研究

孙秀燕^{1*}, 李秀琴², 王金辉², 赵春超², 刘珂¹

(1. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264005; 2. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

姜黄挥发油为姜黄 *Curcuma longa* L. 的有效部位,经生物学实验表明,对肿瘤有明显的抑制作用和增强免疫功能^[1]。为了揭示该制剂抗癌活性作用的物质基础,本研究采用多种色谱和波谱方法对姜黄组分进行分离和结构鉴定。分离得到3个化合物,约占姜黄挥发油总量的80%,分别鉴定为芳姜黄酮(ar-turmerone)、 α -姜黄酮(α -turmerone, (1'R,6S)-2-methyl-6-(4-methylenecyclohexa-2,4-dienyl)

hept-2-en-4-one]和 β -姜黄酮(β -turmerone, (1'R,6S)-2-methyl-6-(4-methylenecyclohexa-2-enyl)hept-2-en-4-one]。其中 β -姜黄酮国内未见报道。

1 仪器与材料

瑞士Bruker Atex II型傅立叶变换离子回旋共振质谱仪;英国Micro Mass GCT型GC-MS联用高分辨质谱仪;日本岛津GC-2010气相色谱仪;日本岛津GC-MS QP 5050 A型气相色谱-质谱联用