

中华疣海星的化学成分及其抗菌活性研究

彭燕^{1,2}, 黄日明³, 郑建仙², 周雪峰¹, 杨献文¹, 刘永宏^{1*}

1. 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301

2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510641

3. 中国科学院华南植物园, 广东 广州 510650

摘要: 目的 研究中华疣海星 *Pentacaster chinensis* 的化学成分及其抗菌活性。方法 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、重结晶、薄层制备色谱等方法对中华疣海星的化学成分进行分离纯化, 根据理化性质和波谱数据进行结构鉴定; 纸片琼脂扩散法对结构确定的化合物进行抗菌 (大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌 T/O) 活性筛选。结果 从中华疣海星体内分离得到 8 个化合物, 分别为 1-*O*-十六烷酰基-3-*O*- β -D-吡喃半乳糖基-丙三醇 (1)、1-*O*-十八烷酰基-3-*O*- β -D-吡喃半乳糖基-丙三醇 (2)、3 β -羟基-(22*E*, 24*R*)-麦角甾-7, 9, 22-三烯 (3)、3-吲哚甲酸 (4)、胆甾-5-烯-3 β -硫酸钠 (5)、胆甾-7-烯-3 β -硫酸钠 (6)、尿嘧啶 (7)、胸腺嘧啶 (8)。化合物 1、3、4 对大肠杆菌的 MIC 值分别为 0.5、1.0、0.5 mg/mL; 化合物 2、3、5、6 对金黄色葡萄球菌的 MIC 值分别为 0.5、1.0、1.0、1.0 mg/mL。结论 化合物 1~8 为首次从中华疣海星中分离得到, 化合物 1~6 具有一定的抗菌活性。

关键词: 中华疣海星; 抗菌活性; 1-*O*-十六烷酰基-3-*O*- β -D-吡喃半乳糖基-丙三醇; 3-吲哚甲酸; 胆甾-7-烯-3 β -硫酸钠

中图分类号: R282.77

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)10-1913-03

Chemical constituents from *Pentacaster chinensis* and their antibacterial activity

PENG Yan^{1,2}, HUANG Ri-ming³, ZHENG Jian-xian², ZHOU Xue-feng¹, YANG Xian-wen¹, LIU Yong-hong¹

1. Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China

2. School of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China

3. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China

Key words: *Pentacaster chinensis* Müller et Troschel; antibacterial activity; 1-*O*-hexadecanoyl-3-*O*- β -D-galactopyranosyl-glycerol; 3-indoleformic acid; 3 β -*O*-sulfated-cholesta-7-en-sodium salt

中华疣海星 *Pentacaster chinensis* Müller et Troschel 属海星纲显带目瘤海星科疣海星属 *Pentacaster* 动物, 主要分布于西太平洋和孟加拉湾以东的印度洋海域, 资源丰富^[1]。在民间, 中华疣海星常被用来预防或治疗胃溃疡、腹泻、炎症、咳嗽等疾病, 具有较高的药用价值。目前, 关于疣海星属动物的化学成分及其活性研究的报道较少^[2,3-8], 而对中华疣海星的化学成分及其抗菌活性研究尚未见报道。本实验从南海中华疣海星体内分离得到 8 个化合物, 分别鉴定为 1-*O*-十六烷酰基-3-*O*- β -D-吡喃半乳糖基-丙三醇 (1-*O*-hexadecanoyl-3-*O*- β -D-galactopyranosyl-glycerol, 1)、1-*O*-十八烷酰基-3-*O*- β -D-吡喃半乳糖基-丙三醇 (1-*O*-octadecanoyl-3-*O*- β -D-galactopyranosyl-glycerol, 2)、3 β -羟基-(22*E*,

24*R*)-麦角甾-7, 9, 22-三烯 (22*E*, 24*R*-ergosta-7, 9, 22-trien-3 β -ol, 3)、3-吲哚甲酸 (3-indoleformic acid, 4)、胆甾-7-烯-3 β -硫酸钠 (3 β -*O*-sulfated-cholesta-5-en-sodium salt, 5)、胆甾-7-烯-3 β -硫酸钠 (3 β -*O*-sulfated-cholesta-7-en-sodium salt, 6)、尿嘧啶 (uracil, 7)、胸腺嘧啶 (thymine, 8)。化合物 1~8 为首次从中华疣海星体内分离得到, 化合物 1~6 对大肠杆菌或金黄色葡萄球菌显示出明显的抗菌活性, MIC 值为 0.5~1.0 mg/mL。

1 仪器与材料

中华疣海星样品于 2009 年 6 月购于湛江市霞山区东风市场, 由中国科学院青岛海洋研究所廖玉麟教授鉴定为 *Pentacaster chinensis* Müller et Troschel, 标本 (Pc200906) 存放于中国科学院南海

收稿日期: 2011-12-18

作者简介: 彭燕 (1976—), 女, 讲师, 博士, 主要从事天然产物及活性研究。Tel: 13533370086 E-mail: py00_2006@126.com

*通讯作者 刘永宏 E-mail: yonghongliu@scsio.ac.cn

海洋研究所广东省海洋药物重点实验室。

金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、大肠杆菌 ATCC 8739、枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 和副溶血性弧菌 ATCC 17802 购买于上海复祥生物公司,溶藻弧菌 T/O 由中国科学院南海海洋研究所海洋生物研究室提供。

Brucker Avance 500 型核磁共振波谱仪(美国 Bruker 公司), XT5 显微熔点测定仪(北京科仪电光仪器厂), Bruker Vector 33 型红外光谱仪(德国 Bruker 公司), Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech 瑞典), HPX-9162 MBE 数显电热培养箱(上海三发科学仪器公司), YSQ-LS-SII 立式蒸汽灭菌箱(合肥华泰医疗设备有限公司)。柱色谱用硅胶(100~200、200~300 目)和 TLC 及 PTLC 用 GF254 硅胶板为烟台江友硅胶开发有限公司生产,蛋白胨、酵母膏、琼脂、牛肉膏等生化试剂购买于北京奥星生物技术有限公司,其他试剂为天津富宇精细化工有限公司生产的分析纯产品。

2 实验方法

2.1 提取与分离

中华疣海星 10 kg, 煎碎, 用 65%乙醇浸提 3 次, 每次 50 L, 滤过浓缩, 依次用氯仿、醋酸乙酯和正丁醇进行萃取, 萃取液减压浓缩得氯仿层(38.0 g)、醋酸乙酯层(5.0 g)和正丁醇层(10.0 g) 3 部分浸膏。合并醋酸乙酯和正丁醇部分(15.0 g), 经硅胶柱色谱分离, 氯仿-甲醇-水梯度洗脱(9:1:0.1→0:10:0), TLC 检测, 合并 R_f 值相同的部分, 得到 10 个流分。第 5 流分经过反复硅胶柱色谱, 得到化合物 **1**(6 mg)、**2**(5 mg)、**4**(10 mg)、**7**(8 mg)、**8**(6 mg), 第 8 流分经反复硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱、重结晶和薄层制备色谱纯化得到化合物 **3**(10 mg)、**5**(12 mg)、**6**(14 mg)。

2.2 抗菌活性实验

2.2.1 样品液的制备 分别取各待测样品 2.0 mg 超声溶解于 1.0 mL 的无菌水中, 配成 2.0 mg/mL 待测溶液供实验用。

2.2.2 菌混悬液制备 分别加入 4 mL 无菌水到培养好的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、副溶血弧菌和溶藻弧菌 T/O 的试管中, 用经酒精灯灭菌的接种环将菌苔轻轻刮下, 小心震荡, 制成均匀的菌悬液, 浓度大约为 10⁶ cfu/mL。

2.2.3 含药滤纸片的制备 用打孔器将定性滤纸片打成孔径为 5 mm 的小圆片, 置于培养皿内高压灭菌后, 分别浸于不同供试液中, 备用。阴性对照浸

泡无菌水, 阳性对照浸泡黄连素溶液。

2.2.4 抗菌实验(纸片琼脂扩散法) 在超净工作台上, 用移液枪吸取 2 mL 菌混悬液到琼脂培养基上, 用已灭菌的三角玻璃棒涂抹, 使菌液均匀致密地分散于表面皿培养基表面, 然后将镊子在酒精灯火焰上灭菌略停, 夹取浸泡于样品液中的滤纸片, 取出纸片待其不渗样品液后贴到表面皿培养基表面, 在表面皿中央贴一片, 外围等距离贴若干片, 各纸片中心距离大于 24 mm, 纸片距平板内缘大于 15 mm, 贴完纸片后将表面皿倒置于 37 °C 恒温箱中培养 24 h 后, 用毫米刻度尺测量抑菌圈直径。

2.2.5 最小抑菌浓度(MIC)测定 取“2.2.1”项中具有较好抑菌效果的化合物稀释成生药浓度 2、1、0.5、0.25 mg/mL 的试液, 移取 100 μL 药液到 800 μL 的液体培养基中, 再加入 100 μL 的菌悬液, 摇匀, 置于 37 °C 恒温箱中培养 24 h, 观察培养基中菌的生长情况, 如液体培养基完全清亮, 表示无菌生长, 此时最小浓度即为 MIC。

3 实验结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末(甲醇), mp 111~113 °C, IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 543 提示有羟基存在, 1 745 提示有酯羰基存在, 根据碳谱数据 105.3, 72.6, 74.9, 69.6, 76.8, 62.5 和氢谱数据分析有半乳糖存在。此外, ¹³C-NMR (CD₃OD) 谱上还显示了丙三醇和长链脂肪酸结构的特征信号, 其理化性质和波谱数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 **1** 为 1-*O*-十六烷酰基-3-*O*-β-*D*-吡喃半乳糖基-丙三醇。

化合物 **2**: 白色粉末(氯仿-甲醇), mp 93~94 °C, IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 542 提示有羟基存在, 1 748 提示有酯羰基存在, 波谱数据与化合物 **1** 相似, 碳数比化合物 **1** 多 2 个。其理化性质和波谱数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **2** 为 1-*O*-十八烷酰基-3-*O*-β-*D*-吡喃半乳糖基-丙三醇。

化合物 **3**: 白色固体(氯仿), 2%硫酸-香草醛溶液反应显紫红色, Libermann-Burchard 反应呈阳性。¹H-NMR 谱显示了甾体母核的特征信号, 其中 δ_H 5.16~5.18 (4H, m) 提示有 Δ^{7(8), 9(11), 22(23)}甾体结构, ¹³C-NMR 谱有 3 位羟基化甾体的结构信号。其理化性质和波谱数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **3** 为 3β-羟基-(22*E*, 24*R*)-麦角甾-7, 9, 22-三烯。

化合物 **4**: 淡黄色粉末(甲醇)。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 7.96 (1H, s, H-3), 7.46 (1H, m, H-5),

7.20 (2H, m, H-6, 7), 8.09 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-8); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 169.3 (C-1), 138.3 (C-9), 133.4 (C-4), 127.6 (C-2), 123.6 (C-7), 122.4 (C-5), 122.1 (C-6), 112.9 (C-8), 108.9 (C-3)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 4 为 3-吡啶甲酸。

化合物 5: 白色无定形粉末 (氯仿-甲醇), 2% 硫酸-香草醛反应显紫色, Libermann-Burchard 反应呈阳性。 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 谱显示了甾体母核的特征信号, 其中 δ_{C} 140.6, 121.1 和 δ_{H} 5.28 (1H, d, $J = 6.5$ Hz) 表明有 $\Delta^{5(6)}$ 甾体结构存在, 对应的 ^1H -NMR 谱中有 3 位硫酸化甾体的结构信号。 ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 36.6 (C-1), 29.1 (C-2), 75.2 (C-3), 36.83 (C-4), 140.6 (C-5), 121.0 (C-6), 41.8 (C-7), 36.8 (C-8), 53.6 (C-9), 39.2 (C-10), 23.7 (C-11), 42.1 (C-12), 44.4 (C-13), 55.5 (C-14), 23.8 (C-15), 27.3 (C-16), 56.1 (C-17), 18.5 (C-18), 19.0 (C-19), 40.6 (C-20), 20.7 (C-21), 55.7 (C-22), 135.9 (C-23), 43.3 (C-24), 33.6 (C-25), 22.4 (C-26), 23.8 (C-27)。其理化性质和波谱数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 5 为胆甾-5-烯-3 β -硫酸钠。

化合物 6: 白色无定形粉末 (氯仿-甲醇), 2% 硫酸-香草醛反应显紫色, Libermann-Burchard 反应呈阳性。 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 谱数据表明存在甾体母核, 其中 δ_{C} 117.1, 140.6 和 δ_{H} 5.11 (1H, brs) 提示有 $\Delta^{7(8)}$ 甾体结构, 对应的 ^1H -NMR 谱中有 3 位硫酸化甾体的结构信号。其波谱数据与文献报道一致^[14], 故鉴定化合物 6 为胆甾-7-烯-3 β -硫酸钠。

化合物 7: 淡黄色固体 (氯仿-甲醇), mp 333~335 $^{\circ}\text{C}$, ^1H -NMR 谱数据与文献报道一致^[15], 与尿嘧啶对照品对照, 理化性质和 TLC 的 R_f 值一致, 故鉴定化合物 7 为尿嘧啶。

化合物 8: 白色粉末 (氯仿-甲醇), mp 315~316 $^{\circ}\text{C}$, 波谱数据与文献报道一致^[15], 与胸腺嘧啶对照品共薄层 R_f 值一致, 故鉴定化合物 8 为胸腺嘧啶。

3.2 抗菌实验结果

实验结果表明, 化合物 1、3、4 对大肠杆菌显示出抗菌活性, MIC 值分别为 0.5、1.0、0.5 mg/mL; 化合物 2、3、5、6 对金黄色葡萄球菌显示出抗菌活性, MIC 值分别为 0.5、1.0、1.0、1.0 mg/mL。化合物 1~8 对枯草杆菌、副溶血弧菌和溶藻弧菌 O/T 均未显示出抗菌活性。

4 讨论

本研究从中华疣海星的醋酸乙酯和正丁醇部分

分离得到 8 个化合物。其中, 化合物 1~6 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌表现出一定的抗菌活性, MIC 值范围为 0.5~1.0 mg/mL。化合物 1 和 2 中的羟基可以氧化提供电荷, 化合物 3 中的双键可以获得质子, 化合物 4 可以解离出羧基和氢离子, 化合物 5 和 6 的甾体母核中含有双键和硫酸酯基, 有研究表明, 甾体母核中的成盐硫酸基具有活性^[13], 因此, 化合物 1~6 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌表现出的抗菌活性很可能与其结构中的羟基、双键、羧基、硫酸酯基等基团密切相关, 具体作用机制有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 黄宗国. 中国海洋生物种类与分布 [M]. 北京: 海洋出版社, 1990.
- [2] 潘敏翔. 疣海星生物活性成分研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2007.
- [3] 潘敏翔, 吴久鸿, 易杨华, 等. 疣海星中一个新的多羟基甾醇皂苷 [J]. 中国天然药物, 2006, 4(5): 344-346.
- [4] Venkannababu U, Bhandari S P S, Garg H S. Regulosides A—C. Glycosphingolipids from the starfish *Pentaceraster regulus* [J]. *Liebigs Ann Rec*, 1997, (6): 1245-1247.
- [5] Anjaneyulu A S R, Gopal M J R V V, Rao N S K. A novel dimeric dipeptide from the Indian Ocean starfish *Pentaceraster regulus* [J]. *J Chem Res*, 1996(1): 50-51.
- [6] Zollo F, Finamore E, Minale L, et al. Starfish saponins. 29. A novel steroidal glycoside from the starfish *Pentaceraster alveolatus* [J]. *J Nat Prod*, 1986, 49(5): 919-921.
- [7] Riccio R, Zollo F, Finamore E, et al. Starfish saponins. 19. A novel steroidal glycoside sulfate from the starfishes *Protoreaster nodosus* and *Pentaceraster alveolatus* [J]. *J Nat Prod*, 1985, 48(2): 266-272.
- [8] Gupta A, Lakshmi V, Jain G K, et al. Wound healing in guinea pigs after topical application of starfish *Pentaceraster regulus* extract [J]. *J Wound Care*, 2008, 17(10): 441-444.
- [9] 吴博, 马跃平, 袁久志, 等. 土茯苓化学成分分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(2): 116-119.
- [10] 孙杰. 两种海藻提取物的化学成分和生物活性的研究及应用 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2006.
- [11] 李冬利, 李晓明, 催传明, 等. 鸭毛藻内生真菌 *Hypocreales* sp. 的化学成分研究 [J]. 海洋科学, 2008, 32(11): 51-55.
- [12] 李文林, 毛土龙, 易杨华, 等. 丰头皮海绵化学成分研究 [J]. 中国海洋药物, 2000(3): 1-4.
- [13] 程萍. 多棘海盘车化学成分的研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2008.
- [14] Liu H W, Li J K, Wang N L, et al. Sulfated sterols isolated from starfish *Asterias amurensis* Lutken [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2006, 15(1): 1-5.
- [15] 李芳, 陈佩东, 丁安伟. 蒲黄化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 667-669.