

三叉仙菜中 4 种化学成分的分离鉴定

柳全文^{1,2,4}, 范晓¹, 张婷², 韩丽君¹, 朱大元³

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071; 2. 烟台师范学院化学与材料科学学院, 山东烟台 264025; 3. 中国科学院上海生命科学研究院上海药物研究所新药研究国家重点实验室, 上海 201203; 4. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 为了进一步提取三叉仙菜(*Ceramium rubrum*)生物活性成分的化学物质, 对其进行了较为系统的化学成分研究。从三叉仙菜的乙醇提取物中, 运用硅胶柱色谱和 Sephadex LH 20 凝胶柱色谱层析分离得到 4 个化合物, 经 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 MS 波谱分析, 确定其结构分别为 (1) 3, 7, 11, 15-tetramethyl hexadec-2-ene-1-ol; (2) cholest-5-ene-3 β -ol; (3) 3-palmitoyloxy propane 1,2-diol; (4) adenosine, 这 4 个化合物均为首次从该科植物中分离得到。

关键词: 三叉仙菜(*Ceramium rubrum*); 红藻(Rhodophyta); 二萜; 甾醇; 腺苷

中图分类号: Q501 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2006)10-0004-03

红藻中含有不同结构类型的、丰富的次生代谢产物, 具有多种生物活性, 从而引起了化学家和药理学家们的兴趣。近 30 年来, 科学工作者从世界不同海域的红藻中发现大量结构新颖、有较强生理活性的化合物^[1]。为了寻找有重要生物活性和药用前景的海洋天然产物, 开发和利用中国的海洋生物资源, 作者对中国黄淮海域采集到的红藻三叉仙菜的化学成分进行了研究。

三叉仙菜(*Ceramium rubrum*)属仙菜科(Ceramiales), 红藻门(Rhodophyta), 在山东半岛有着广泛的分布, 为了开发其应用价值, 作者对三叉仙菜进行过系统的活性筛选, 其甲醇提取物在 1 mg/L 的质量浓度下, 能促进 B 淋巴细胞的增殖, 活性增强(抑制率 53%)^[2], 有一定的抗炎活性; 甲醇提取物 25 mg/L 对 HLE 的抑制率为 30.1%^[3], 有较好的抗肿瘤活性。采用人肺腺癌 A-549 和白血病细胞 HL-60 肿瘤细胞系, 通过 MTT 法观察到三叉仙菜甲醇提取物对其的抑制率优于其它 37 种海藻, 超过 90%^[4]。

有关三叉仙菜科次级代谢产物的研究很少, 仅有几篇文献报道了其氨基酸的组成^[5-7]。为了进一步研究山东沿海三叉仙菜产生活性作用的物质基础, 作者在以前活性筛选研究的基础上, 进一步系统地研究了青岛沿海的三叉仙菜的化学成分。

1 材料与 方法

1.1 材料

三叉仙菜于 2002 年 5 月采自山东青岛崂山沿海潮间带的礁石上, 由作者所在的研究室进行了品种鉴定, 样品标本保存于中国科学院海洋研究所海藻化学研究室。采集后除净杂藻, 并用干净的海水洗去其它附着的物质, 阴干后剪成小段备用。

1.2 仪器与试剂

熔点(mp.)测定用 Fisher-Johns 型显微熔点仪(温度计未校正)。核磁共振(NMR)用 Bruker AM-400 型核磁共振仪测定, TMS 为内标。质谱(MS)用 MAT-95 型质谱仪测定。

柱层析硅胶(100~200 目, 200~300 目), 硅胶 H

收稿日期: 2004-09-28; 修回日期: 2005-02-18

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2004AA625030, 2001AA620503); 中国科学院方向性创新项目(KZCX3-SW-215)

作者简介: 柳全文(1974), 男, 博士研究生, 山东烟台人, 研究方向: 海洋天然产物, E-mail: qwliu2001@yahoo.com.cn; 韩丽君, 朱大元, 通讯作者, ljhan@ms.qdio.ac.cn, 0532-82898641(韩丽君); dyzhu@mail.shenc.ac.cn, 021-50806728(朱大元)

和薄层层析用硅胶板均由青岛海洋化工厂生产,所有试剂均为分析纯。薄层层析定位用 5% 硫酸香草醛溶液喷雾显色。

1.3 方法

新鲜的三叉仙菜 3.2 kg 用约 94% 的食用酒精室温浸泡提取,共提取 3 次,滤过后,合并提取液,40℃ 减压浓缩为浸膏,浸膏混悬在水中用乙酸乙酯萃取 5 次,然后用水饱和和正丁醇萃取 5 次,乙酸乙酯和正丁醇萃取液分别合并,减压浓缩后上硅胶柱层析,乙酸乙酯部位用氯仿-丙酮进行梯度洗脱,共分为 A~I 共 9 个部分。B 部分经反复硅胶柱,以石油醚-丙酮洗脱,得到化合物 1 和 2, F 部分用氯仿-丙酮洗脱,得到化合物 3。正丁醇部位上硅胶柱,经氯仿-甲醇梯度洗脱后,分为 J~M 共 4 个部分, K 部分经硅胶柱,用二氯甲烷-甲醇 10:1 洗脱后,得到一个结晶,为化合物 4。采用现代波谱技术对上述 4 种化合物进行结构鉴定。

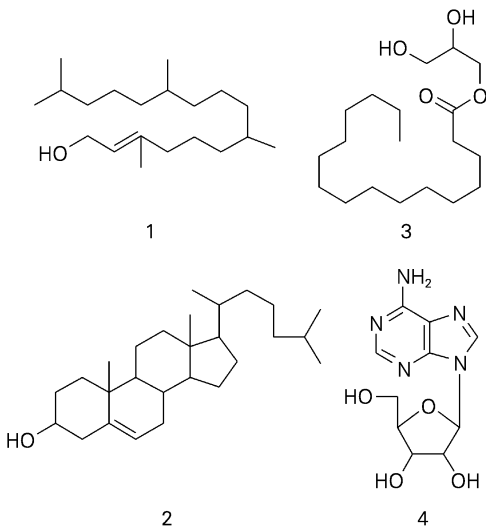


图 1 4 种化合物的结构

Fig. 1 The structures of four kinds of compounds

2 结果与讨论

化合物 1。无色油状物, $C_{20}H_{40}O$, EFMS 给出分子离子峰为 $m/z: 296[M]^+$, 根据其 1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据可以确定此化合物为含有一个不饱和键的长链二萜醇。 1H NMR 中 $\delta 5.41(1H, t, J = 6.8 Hz)$, $\delta 4.16(2H, d, J = 6.8 Hz)$ 的低场信号显示分子中含有一个双键, 三取代, 只有一个质子, 且与其相邻的两个质子为连氧的质子。 $\delta 1.65(3H, s)$ 信号提示双键上含有一个甲基。 ^{13}C NMR 数据 140.1(s), 123.1

(d), 59.3(t) 验证了这一推断。 $\delta 0.87(9H, d, J = 6.5 Hz)$, $\delta 0.84(3H, d, J = 6.5 Hz)$ 推断分子中还有 4 个甲基, 结合分子式, 推断结构为长链二萜醇。化合物 1 的实验数据为: 1H NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 5.41(1H, t, $J = 6.8 Hz$), 4.16(2H, d, $J = 6.8 Hz$), 1.98(2H, t, $J = 7.7 Hz$), 1.56-0.99(19H, m), 0.87(9H, d, $J = 6.5 Hz$), 0.84(3H, d, $J = 6.5 Hz$)。 ^{13}C NMR($CDCl_3$, 100MHz): 140.1(s), 123.1(d), 59.3(t), 39.8(t), 39.3(t), 37.4(t), 37.3(t), 37.2(t), 36.6(t), 32.7(d), 32.6(d), 27.9(d), 25.1(t), 24.8(t), 24.4(t), 22.7(q), 22.6(q), 19.7(q), 19.7(q), 16.1(q)。以上 ^{13}C NMR 数据与文献报道基本一致, 所以化合物 1 鉴定为 3, 7, 11, 15-tetramethylhexadec-2-er-1-ol^[8]。

化合物 2。白色片状结晶, 熔点 148.5~149.5℃, 分子式 $C_{27}H_{46}O$, EFMS 显示其分子量为 $m/z 386[M]^+$ 。 1H NMR 显示其为甾醇类化合物, $\delta 5.35(1H, d, H-5)$, $\delta 3.52(1H, m, H-3)$, $\delta 1.00(3H, s, 19-CH_3)$, $\delta 0.62(3H, m, 18-CH_3)$, $\delta 0.78-2.41(38H, br)$, 此复杂的系列共振信号, 是甾醇骨架上为数众多的亚甲基和次甲基信号相互重叠的结果。 ^{13}C NMR($CDCl_3$, 100MHz): 140.6(s), 121.6(d), 71.8(d), 56.8(d), 56.2(d), 50.2(d), 42.4(t), 42.4(t), 39.9(t), 39.6(t), 37.4(t), 36.6(t), 35.9(d), 32.0(d), 32.0(t), 31.8(t), 28.4(d), 28.1(d), 24.4(t), 24.0(t), 23.0(q), 22.7(q), 21.2(t), 19.6(q), 18.9(q), 12.0(q), 其中 140.6 和 121.6 分别为 5 位和 6 位烯碳, 71.8 为 3 位与羟基相连的碳。此 ^{13}C NMR 数据与文献报道的数据基本一致^[9], 可以确定此化合物为 cholest-5-er-3 β -ol。

化合物 3。白色固体, 分子式 $C_{19}H_{38}O_4$, EFMS 给出其分子离子峰 $m/z 330[M]^+$ 。由 1H NMR 可知分子是由一长链饱和脂肪酸和甘油形成的甘油单脂。EFMS 中的最强的碎片离子峰为 239, 正是一个十六碳脂肪酸 $[M-OH]^+$ 的碎片质量, $330-239 = 91$, 是甘油 $[M-H]^+$ 碎片质量。 ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100MHz): 174.4(s), 70.2(d), 65.1(t), 63.3(t), 34.1(t), 31.9(t), 29.6(t, $6CH_2$), 29.4(t), 29.3(t), 29.2(t), 29.1(t), 24.9(t), 22.7(t), 14.1(q)。 ^{13}C NMR 数据进一步证明其为甘油单脂。所以化合物 3 鉴定为 3-palmitoyl-glycerol 1, 2-diol。

化合物 4。白色针晶, 分子式 $C_{10}H_{13}N_5O_4$, 熔点 229~231℃(MeOH), Molish 反应阳性, 有荧光吸收。EFMS $m/z: 268[M+1]^+$, $267[M]^+$, $250[M-NH_3]^+$, $237[M-CH_2O]^+$, $136[腺嘌呤核苷元(B)+$

2]⁺, 135[B+ 1]⁺。与腺苷的质谱数据一致^[10]。¹³C NMR 和 DEPT(100MHz, DMSO-d₆) 数据(δ): 156.1 (s), 152.3(d), 149.1(s), 140.0(d), 119.4(s), 88.0(d), 86.0(d), 73.5(d), 70.7(d), 61.7(t)。所以化合物 4 鉴定为 adenosine。

三叉仙菜在中国黄渤海资源较为丰富, 文献调研未发现对其化学成分的研究报道。本实验是对其次生代谢产物的首次报道。化合物 1~4 亦为首次从该科植物中分离得到。作者对上述化合物进行了初步的生物活性测试, 发现化合物 1 和 4 有一定的抗菌活性。其中化合物 4 的药理作用近年受到注意, 其扩张冠状动脉、松弛平滑肌、心肌保护作用均具有临床意义^[11]。进一步的其它方面的生物活性筛选实验研究正在进行中, 其它化学成分的研究也正在进行中。这些数据将为进一步开发利用这种生物资源, 寻找新的活性化合物奠定基础。

参考文献:

[1] Blunt J W, Copp B R, Munro M H G, *et al.* Marine natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2003, 20: F 48.
 [2] 徐秀丽, 范晓, 宋福行. 中国经济海藻提取物生物活性 [J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(1): 55-63.
 [3] 牛荣丽, 范晓, 韩丽君. 海藻提取物抗炎活性的筛选

[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(2): 150-154.
 [4] 牛荣丽, 范晓, 韩丽君, 等. 海藻抗 A-549 和 HL-60 肿瘤细胞及抗菌活性研究 [J]. 中国海洋药物, 2003, 22(4): F 4.
 [5] Sciuto S, Piattelli M, Impellizzeri G. β-L-Aspartylglycine from the red alga *Ceramium rubrum* [J]. *Phytochemistry*, 1978, 17: 1 659-1 660.
 [6] Impellizzeri G, Piattelli M, Sciuto S, *et al.* Pyrrolidine 2, 4 dicarboxylic acid, A new naturally occurring Imino acid [J]. *Phytochemistry*, 1977, 16: 1 60F-1 602.
 [7] Barrow K D, Karsten U, King R J. Isethionic acid from the marine red alga *Ceramium flaccidum* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 34: 1 429-1 430.
 [8] Brown G D. Phytene 1, 2 diol from *Artemisia annua* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 36(6): 1 553-1 554.
 [9] 于德泉, 杨峻山. 分析化学手册-核磁共振波谱分析(第二版) [M]. 北京: 化学工业出版社, 1999. 892-893.
 [10] 徐文豪, 薛智, 马建民, 等. 冬虫夏草的水溶性成分-核苷类化合物的研究 [J]. 中药通报, 1988, 13(4): 226-228.
 [11] 吴镜湘, 徐美英. 腺苷心肌保护作用研究进展 [J]. 中国心血管杂志, 2002, 7(5): 364-366.

The separation and identification of four compounds of *Ceramium rubrum*

LIU Quanywen^{1,2,4}, FAN Xiao¹, ZHANG Ting², HAN Lirjun¹, ZHU Dayuan³

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. School of Chemistry and Material Science, Yantai Normal University, Yantai 264025, China; 3. State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 4. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received: Sep., 28, 2004

Key words: *Ceramium rubrum*; red algae; diterpene; sterol; adenosine

Abstract: A systematic study on the chemical constituents of *Ceramium rubrum* was carried out in order to reveal the active components for their further development. By repeated silica gel and Sephadex LH20 separation and by interpretation of spectral data of ¹H NMR, ¹³C NMR and EIMS, four compounds were isolated and identified as 3, 7, 11, 15 tetramethyl hexadec 2-ene-1-ol (1), cholest-5-ene-3β-ol(2), 3-palmitoyloxy propane 1, 2-diol(3), and adenosine(4). These four compounds were obtained from the family Ceramiaceae for the first time.

(本文编辑: 张培新)