

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)化学成分的研究

冯 强¹, 魏玉西¹, 齐 君², 王长云², 吴同飞¹

(1. 青岛大学 医学院 生物系, 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学 医药学院, 海洋药物教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 利用硅胶色谱、Sephadex LH-20 凝胶色谱、HPLC 等技术, 从坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)乙醇提取物首次分离纯化得到了 7 个化合物, 通过质谱(MS)及核磁共振波谱(¹H NMR、¹³C NMR)等现代波谱技术鉴定为: 1,8-二羟基-9,10-蒽醌(1)、邻苯二甲酸二正丁酯(2)、邻苯二甲酸二异丁酯(3)、β-谷甾醇(4)、鲨肝醇(5)、(E)-N-2(1,3-二羟基-4-十八烯基)-十六酰胺(6)、胆甾醇(7)。其中, 化合物 1 对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的最低抑菌浓度(MIC)为 80 μg/mL。

关键词: 坛紫菜(*Porphyra haitanensis*); 化学成分; 结构解析; 抑菌活性

中图分类号: Q959.12,R917 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)05-0015-04

紫菜是红藻门红毛菜科紫菜属(*Porphyra*)海藻的总称, 广布于寒带到亚热带海域潮间带。其中, 坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)是我国特有的一种可人工栽培的海藻, 主要产于福建、浙江等沿海地区。坛紫菜味美价廉, 资源丰富, 且含有大量人体必需氨基酸、矿物质和维生素, 是理想的营养保健食品^[1]。据《本草纲目》记载, 紫菜具有清热、解毒、减肥、防便秘、降血压、抗癌等功效, 长期食用对人身健康有益^[2-5]。目前, 国内外学者对紫菜的研究主要集中在养殖和在食品中的应用以及有关其多糖的研究, 而对紫菜化学物质的研究报道较少。实验表明, 紫菜多糖有抗凝血、降血脂、抗突变、抗衰老和抗放射等多种生物活性^[6-8]。为了寻找结构新颖的海藻活性成分, 本文对坛紫菜进行了初步的化学成分研究。

1 实验部分

1.1 样品

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)采集于福建晋江沿海, 由中国科学院海洋研究所段德麟研究员鉴定。新鲜紫菜剔杂、洗涤除去泥沙, 粉碎备用。

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)由青岛大学生物系微生物实验室提供。

1.2 仪器与试剂

Micromass Q-TOF 质谱仪; JEOL JEM-ECP600

核磁共振波谱仪; Waters1525 高效液相色谱仪; 色谱柱: Kromasil C18, 7 μm, 10×250 mm; 北京泰克 X-6 型显微熔点仪; 德国 Heidolph 公司旋转蒸发器; 上海沪西分析仪器有限公司 BSZ-100 自动部分收集器。

Sephadex LH-20 为 Pharmacia 公司产品; 薄层硅胶和柱层析硅胶为青岛海洋化工厂生产; 有机试剂均为国产分析纯。

1.3 提取与分离

将粉碎后的坛紫菜(2.5 kg)用 95%乙醇室温浸泡 3 次, 每次 7 d, 合并提取液, 减压回收溶剂后, 将浸膏分散于 200 mL 蒸馏水中, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇 400 mL 萃取 3 次。萃取液分别减压蒸馏得到石油醚浸膏(13.1 g), 乙酸乙酯浸膏(2.4 g), 正丁醇浸膏(0.9 g)。经薄层层析检测, 石油醚相和乙酸乙酯相成分大致相同, 故合并作为下步实验材料。将合并后的浸膏经 200~300 目硅胶柱层析, 石油醚/乙酸乙酯, 氯仿/甲醇梯度洗脱, 分为 9 个组分(Fr.1 ~ Fr.9)。经反复正、反相硅胶柱层析、Sephadex LH-20 柱层析和高效液相色谱分离纯化, 分别从 Fr.2

收稿日期: 2012-10-08; 修回日期: 2012-12-11

基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2012DM014)

作者简介: 冯强(1989-), 男, 山东济宁人, 硕士研究生, 研究方向为海洋天然产物的提取与分离, E-mail: fqy88@163.com; 魏玉西, 通信作者, 电话: 0532-85953227, E-mail: yuxiw729@163.com; 王长云, 通信作者, E-mail: changyun@ouc.edu.cn

中得到化合物 2(4.8 mg), 3(5.1 mg), 4(8.1 mg); 从 Fr.3 中得到化合物 7(6.3 mg); 从 Fr.4 中得到化合物 1(9.8 mg); 从 Fr.6 中得到化合物 5(4.2 mg), 6(5.3 mg)。

1.4 抑菌活性实验

采用滤纸片法测定化合物抑菌活性^[9]。取已灭菌滤纸片(直径 6 mm), 用微量进样器滴加不同浓度的坛紫菜化学成分 1(1,8-二羟基-9,10-蒽醌)10 μ L, 晾干待用。无菌吸管加入 100 μ L 金黄色葡萄球菌悬液于无菌培养基表面, 用涂布器涂布均匀, 制成含菌平板, 静置 15 min。最后用无菌镊子镊取滤纸片贴在含菌平板上, 以同浓度茶多酚溶液做阳性对照, 2% DMSO 为阴性对照。把平板倒置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h, 观察并用游标卡尺测量抑菌圈的直径。结果表明其最小抑菌浓度(MIC)为 80 μ g/mL, 而阳性对照茶多酚 MIC 为 250 μ g/mL。

2 结构鉴定

化合物 1: 橙色粉末。ESI-MS 测得[M+H]⁺ 为 m/z 240, 结合 ¹³C-NMR 推测分子式为 C₁₄H₈O₄。¹H-NMR(600 MHz, CDCl₃)光谱显示 2 个与羰基共轭的氢信号 δ_{H} 12.11 (2H, s, 1,8-OH); 6 个裂分比较复杂的芳香质子信号 7.89 (2H, m, H-4,5), 7.74 (2H, m, H-3,6), 7.35 (1H, m, H-2,7)。¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) 谱给出 14 个碳信号。其中 2 个为羰基碳信号 δ_{C} 193.0(C-9), 181.5 (C-10), 2 个苯环上的连有羟基的碳信号 δ_{C} 162.6(C-1, C-8); 4 个芳香碳原子 δ_{C} 115.9(C-1a), 115.9(C-8a), 133.7(C-4a), 133.7(C-5a), 6 个未取代芳香碳信号 δ_{C} 124.6 (d, C-2,7), 137.3 (d, C-3,6) 和 120.0 (d, C-4,5)。其 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献^[10]对照一致, 确定化合物 1 的结构为 1,8-二羟基-9,10-蒽醌。

化合物 2: 无色油状物。¹H NMR(600 MHz, CDCl₃) : δ_{H} 7.72 (2H, dd, $J=5.5, 3.2$ Hz, H-3,6), 7.53 (2H, dd, $J=5.5, 3.2$ Hz, H-4,5), 4.30 (4H, t, $J=6.8$ Hz, H-1', 1''), 1.73 (4H, m, H-2', 2''), 1.44 (4H, m, H-3', 3''), 0.96 (6H, t, $J=7.3$ Hz, H-4', 4'') 以上数据与文献^[11]一致。故确认其结构为邻苯二甲酸二正丁酯。

化合物 3: 无色油状物。¹H NMR(600 MHz, CDCl₃) : δ_{H} 7.73 (2H, dd, $J=5.5, 3.2$ Hz, H-3,6), 7.54 (2H, dd, $J=5.5, 3.2$ Hz, H-4,5), 4.09 (4H, d, $J=6.9$ Hz, H-1', 1''), 2.04 (2H, m, H-2'', 2''), 0.99 (12H, d, $J=6.9$ Hz, H-3', 3', 4', 4'')。以上数据与文献^[12]一致。故确认其结构为邻苯二甲酸二异丁酯。

化合物 4: 白色针晶(丙酮), mp . 140 ~ 142 $^{\circ}$ C :

与 -谷甾醇标准品混合点样, 经多个展开系统 TLC 对照分析, RF 值相同且经熔点测定混合物熔点未下降, 确定化合物为 -谷甾醇。

化合物 5: 无色片状晶体, mp 69 $^{\circ}$ C。

¹H-NMR(600 MHz, CDCl₃): δ_{H} 3.86 (1H, m), 3.72 (1H, dd, $J=3.5, 11.5$ Hz), 3.65 (1H, dd, $J=5.5, 11.5$ Hz), 3.55 (1H, m), 3.52 (1H, m), 3.46 (2H, m), 1.58 (2H, m), 1.26 (30H, br s), 0.88 (3H, t, $J=7.0$ Hz); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) : δ_{C} 72.0 (t, C-1), 72.5 (t, C-2), 64.4 (t, C-3), 71.0 (t, C-1'), 32.0 (t, C-2'), 26.4 (t, C-3'), 29.1 ~ 29.7 (t, C-5' ~ 15'), 22.6 (t, C-16'), 31.8 (t, C-17'), 14.0 (t, C-18')。以上数据与文献^[13]一致, 故确认其结构为鲨肝醇。

化合物 6: 白色粉末。ESI-MS m/z 538.2 [M+H]⁺。¹H NMR(600 MHz, CDCl₃): 0.88 (6H, t, $J=7.14, 14.3$ Hz, H-18, H-6'), 2.06 (2H, m, H-6), 2.23 (2H, m, H-2'), 3.72 (1H, m, H-1b), 3.90 (1H, m, H-2), 3.96 (1H, dd, $J=7.5, 4.0$ Hz, H-1a), 4.32 (1H, t, $J=4.3$ Hz, H-3), 5.54 (1H, dd, $J=15.9, 6.6$ Hz, H-4), 5.78 (1H, m, H-5), 6.24 (1H, N-H)。以上数据与文献^[14]一致, 故确认其结构为(E)-N-2(1, 3-二羟基-4-十八烯基)-十六酰胺。

化合物 7: 白色晶体, mp: 142 ~ 144 $^{\circ}$ C。¹H-NMR:(CDCl₃, 600 MHz): δ_{H} 3.53 (1H, br, H-3), 5.37 (1H, br, H-6), 0.68 (3H, s, H-18), 1.05 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d, H-21), 0.87 (3H, d, H-26), 0.86 (3H, d, H-27); ¹³C-NMR: δ_{C} 37.2 (C-1), 31.6 (C-2), 71.8 (C-3), 42.3 (C-4), 140.8 (C-5), 121.7 (C-6), 31.9 (C-7), 31.9 (C-8), 50.1 (C-9), 36.5 (C-10), 21.1 (C-11), 39.8 (C-12), 42.3 (C-13), 56.8 (C-14), 24.3 (C-15), 28.2 (C-16), 6.2 (C-17), 11.8 (C-18), 19.4 (C-19), 35.8 (C-20), 18.7 (C-21), 36.2 (C-22), 23.8 (C-23), 39.5 (C-24), 28.0 (C-25), 22.5 (C-26), 22.8 (C-27)。以上数据与文献^[15]一致, 故确认其结构为胆甾醇。

化合物 1~7 的结构如图 1 所示。

3 讨论

目前, 我国已成为世界上三个紫菜资源生产加工及利用的大国之一, 主要栽培品种有坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)和条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)两种, 年产紫菜干品近 10 万 t。其中, 坛紫菜是我国特有的栽培品种和重要经济海藻, 其养殖产量占全国紫菜养殖量的 80%之多。尽管其资源非常丰富、营养价值极高, 但国内外对其进行的研究主要针对其多糖成分。本文对坛紫菜进行了初步的化学成分研究, 从其乙醇提取物中分离出 7 个化合物, 而且经文献检索可知这 7 个化合物均为首次从坛紫菜中分离得到。对化合物 1 用滤纸片抑菌法进行的抑菌

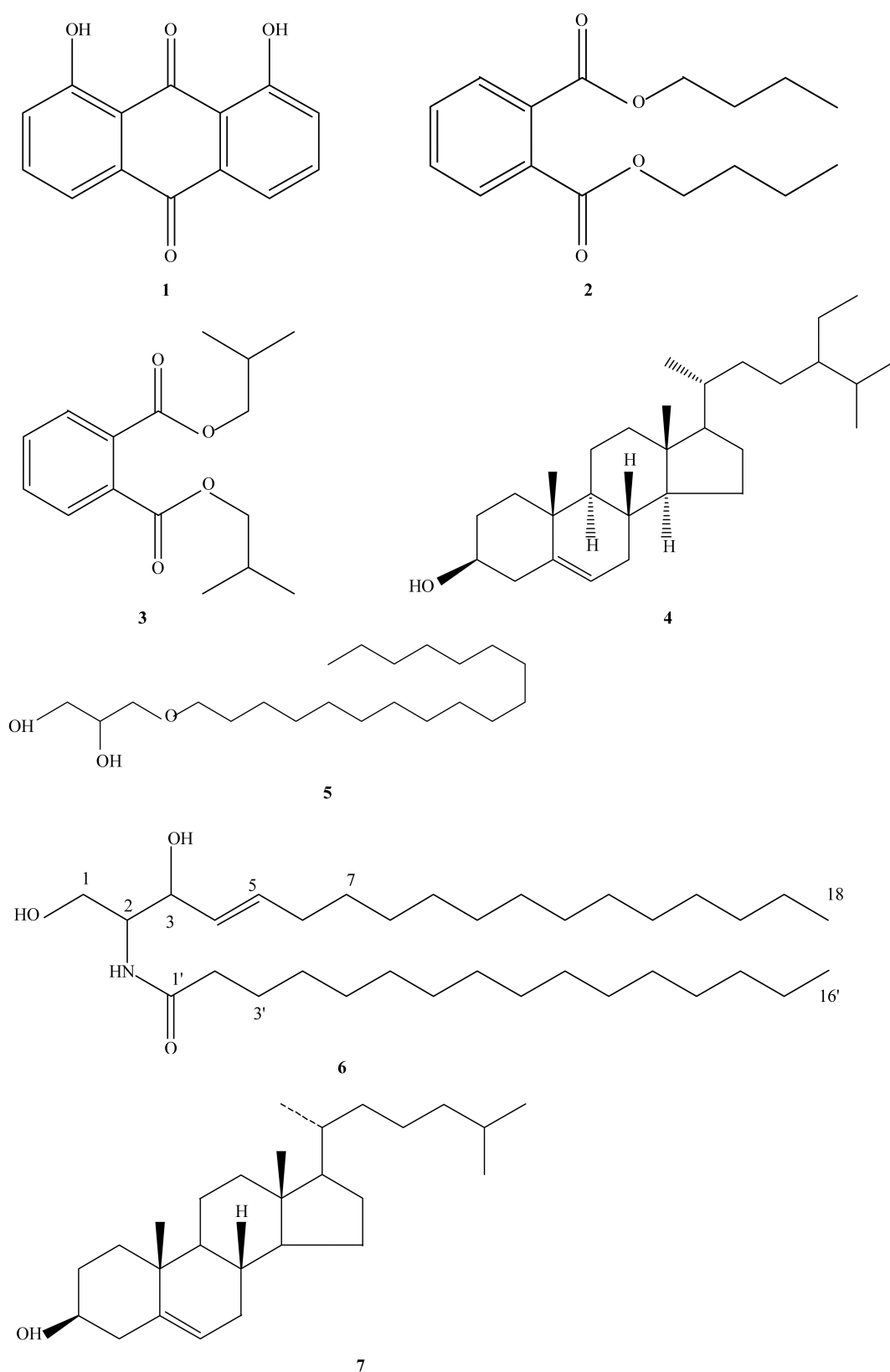


图1 化合物 1~7 的结构

Fig.1 Structures of compounds 1 ~ 7

活性测定结果表明, 该化合物对金黄色葡萄球菌具有较强抑菌活性, 另有文献记载它还有利便、抑菌、抗病毒和抗肿瘤等作用^[16]。本文研究结果为坛紫菜中活性化合物的进一步研究提供了基础资料, 也为阐明坛紫菜的药效物质基础提供了一定依据。

参考文献:

- [1] 管华诗, 王曙光. 中华海洋本草(第 2 卷)[J]. 上海:上海科学技术出版社, 2010: 55-58.
- [2] 郭雷, 王淑军, 郝倩, 等. 紫菜多糖和藻红蛋白生物活性的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(6): 182-185.
- [3] 刘宇峰, 徐力敏, 张成武, 等. 红藻藻蓝蛋白对 HL-60 细胞生长的抑制作用[J]. 中国海洋药物, 2000, 19(1): 17-20.
- [4] 西泽一俊. 海藻の生活活性物质[J]. 食品と科学, 1989, 24(2): 54-57.
- [5] 刘蕾, 魏玉西, 刘淇, 等. 坛紫菜中抑菌活性肽的制备与初步纯化[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(3): 476-481.
- [6] Nicolas A B, Juliet A B, Arthur C G, et al. *Porphyra*: a marine crop shaped by stress [J]. Trends in Plant Science, 2011, 16(1): 29-37.
- [7] 闫建忠, 吕昌龙, 李胜军, 等. 紫菜多糖的免疫功能增强作用[J]. 中国海洋药物, 2005, 24(4): 36-38.
- [8] Yoshizawa Y, Ametani A, Tsunehiro J, et al. Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*): structure-function relationships and improved solubility [J]. Biosci Biotech Bioch, 1995, 59(10):1933-1937.
- [9] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 56-73.
- [10] 沈云修, 荣先国, 高宗华. 竹黄的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(9): 674-676.
- [11] 韦松, 梁鸿, 赵玉英, 等. 怀牛膝中化合物的分离鉴定[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(5): 293-295.
- [12] 王栋, 杨欢, 戴衍鹏, 等. 镰形棘豆的化学成分研究 () [J]. 中国药学杂志, 2008, 43(17):1292-1294.
- [13] Povchert T C, Behnke J. The Aldrich Library of ¹³C and ¹H-FT-NMR Spectra, 3rd ED [M]. USA:Aldrich Chemical Co., 1993: 55-56
- [14] 温燕梅, 漆淑华, 张德. 南海脆灯蕊柳珊瑚化学成分的研究[J]. 热带海洋学报, 2007, 26(1): 73-77.
- [15] Akiyama T, Ueoka R, Van Soest R W M, et al. Ceratodictyols, 1-glyceryl ethers from the red Alga-sponge association *Ceratodictyon spongiosum/ Haliclona cymaeformis* [J]. J Nat Prod, 2009, 72(8): 55-56.
- [16] Avila H, Rivero J, Hervera F, et al. Cytotoxicity of a low molecular weight fraction from aloe vera (*Aloes barbadensis Miller*)gel [J]. Toxicol, 1997, 35(9): 1423-1430.

Studies on chemical constituents of *Porphyra haitanensis*

FENG Qiang¹, WEI Yu-xi¹, QI Jun², WANG Chang-yun², WU Tong-fei¹

(1. Biological Department of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266071, China; 2. School of Medicine and Pharmacy, Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Oct., 8, 2012

Key words: *Porphyra haitanensis*; chemical constituents; structural identification; bacteriostatic activity

Abstract: Compounds 1~7 were isolated from *Porphyra haitanensis* by normal phase silica gel, Sephadex LH-20 chromatography, and reverse phase HPLC techniques. Their structures were identified as 1,8-dihydroxy-anthraquinone(1), dibutyl-O-phthalate(2), dibutyl phthalate(3), sitosterol(4), batyl alcohol(5), (*E*)-*N*-2-(1,3-dihydroxy octadecan-4-en)-hexadecamide(6) and cholesterol (7) using MS and NMR. The MIC of compound 1 towards *Staphylococcus aureus* is 80 μg.mL⁻¹. Compounds 1~7 were found in *Porphyra* for the first time.

(本文编辑: 康亦兼)