

毛蚶正丁醇相抗卤虫化学成分分析*

Bioactivity Evaluation and Constituent Analysis of the *n*-butanol Fractions from *Scapharca Subcrenata* Lischke孙雪萍¹, 徐艳^{1**}, 宋成芝², 童万平¹SUN Xue-ping¹, XU Yan¹, SONG Cheng-zhi², TONG Wan-ping¹

(1. 广西海洋研究所海洋生物技术重点实验室, 广西北海 536000; 2. 昭通师范高等专科学校化学系, 云南昭通 657000)

(1. Guangxi Institute of Oceanology, Guangxi Key Laboratory of Marine Biotechnology, Beihai, Guangxi, 536000, China; 2. Zhaotong Teacher's College, Department of Chemistry, Zhaotong, Yunnan, 657000, China)

摘要:应用抗卤虫 (*Artemia salina*) 生物活性筛选模型, 分析南海毛蚶 (*Scapharca subcrenata*) 乙醇浸膏和正丁醇相的生物活性成分。从毛蚶 (*S. subcrenata*) 正丁醇萃取相中共分得 4 个化合物, 包括 3 个甾体类化合物 5-烯-胆甾醇 (1), 胆甾醇 (2), 3-酮-20-烯孕甾烷 (3) 和 1 个吲哚类化合物 3-carboxy-indole (4), 化合物 (1)~(3) 在 50 μg/mL 时对卤虫的致死率分别为 65.0%, 60.0% 和 58.3%。

关键词:毛蚶 甾体 生物活性

中图分类号: P714⁺.5, R914 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2013)04-0272-04

Abstract: The bioactivities of ethanolic extract and *n*-butanol fractions of *Scapharca subcrenata* from the South China Sea were evaluated by the model of lethality to brine shrimp *Artemia salina*. The ethanolic extract and *n*-butanol fractions showed lethality. The compounds in the *n*-butanol were separated, and four compounds were identified as cholest-5-en-3-ol (1), Cholesterol (2), 5 α -pregn-20-en-3-one (3) and 3-carboxy-indole (4). The compounds 1~3 belong to sterols and their lethal rate was 65.0%, 60.0% and 58.3% in 50 μg/mL, respectively, suggesting that these steroids should be the bioactive substances of *S. Subcrenata* lischke.

Key words: *Scapharca subcrenata* lischke, steroids, bioactivity

毛蚶 (*Scapharca subcrenata*) 为蚶科动物, 产于我国南北沿海, 是我国重要的海产经济埋栖型贝类。毛蚶药用历史悠久, 《神农本草经》及历代主要本草中均有记载, 其以壳入药, 名瓦楞子, 具有消痰化瘀、软坚散结、制酸止痛功效^[1,2]。蚶肉为海产食品, 据《随息居饮食谱》记载, 能“补血, 润肠, 生津, 健胃”,

民间用于抗肿瘤、抗贫血和抗炎等, 有很好的药用和保健价值。目前国内对毛蚶的研究多集中于生物学和养殖方面, 以粗提取物和营养成分分析为主, 也有少数关于毛蚶提取物的酶活性和免疫活性的报道^[3-5]。陈守国等^[6]在申请的专利中报道, 毛蚶提取物具有显著的抗肿瘤活性。本文以毛蚶 (*S. subcrenata*) 为研究对象, 运用天然产物化学的方法, 以抗卤虫 (*Artemia salina*) 活性为指导, 从毛蚶次级代谢产物中筛选发现具有生物活性的化合物, 为海洋药物的研究和开发提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 仪器

核磁共振波谱仪 JEOL Eclips-600 (日本电子); 质谱仪 ESI-MS Q-TOF Ultima Global GAA076 (美

收稿日期: 2013-07-30

修回日期: 2013-08-26

作者简介: 孙雪萍 (1982-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事海洋天然产物研究。

* 广西科学研究与技术开发计划项目 (桂科攻 11107011-8); 广西科学院基本科研业务费项目 (13YJ22HYS15); 广西科学研究与技术开发计划项目 (桂科攻 11107011-6) 资助。

** 通讯作者: 徐艳 (1981-), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事海洋天然产物研究。E-mail: 286864218@qq.com。

国 Waters 公司); 旋转蒸发仪 Eyela NE-1101 (日本 Rikakikai 公司); 凝胶 Sephadex LH-20 (Amersham 公司); 柱层析硅胶 (青岛海洋化工厂); 高效液相色谱仪 D-2000 Elite (Hitachi 公司); 制备柱 CNW Athena C18 (250 mm×10 mm, 5 μm); 卤虫致死活性采用卤虫 *A. salina*; HPLC 用色谱纯甲醇 (天津四友生物医学公司)。

1.2 试剂

毛蚶 (*S. subcrenata*) 样品于 2010 年 4 月采自广西北海, 由重庆文理学院生命科学与技术学院徐敬明老师鉴定; 卤虫 (*A. salina*) 卵购于海风集团有限公司。

甲醇、正丁醇、石油醚、乙酸乙酯等均为国产分析纯; 显色剂为硫酸甲醇溶液, 喷洒后加热显色。

1.3 试验方法

1.3.1 提取和分离

鲜毛蚶 (15.0 kg) 洗净、去壳、取肉, 于组织捣碎机中匀浆, 经 95% 乙醇 (提取 4 次, 每次 1 d, 浓缩提取液得浸膏 71.2 g, 浸膏分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 得正丁醇层 17.3 g, 然后对正丁醇相用 CHCl₃/MeOH 进行洗脱 (CHCl₃: MeOH=95:5, 90:10, 80:20, 50:50), 得到 4 个组分 Fr. 1~Fr. 4, 其中 Fr. 2 组分依次经过反相硅胶柱层析 (MeOH:H₂O=80:20)、凝胶柱层析 (Sephadex LH-20, CHCl₃: MeOH=1:1) 和 HPLC (MeOH:H₂O=90:10) 分离制备获得纯化合物 1 (8.5 mg), 2 (11.9 mg) 和 3 (5.2 mg)。Fr. 4 经过凝胶柱层析 (Sephadex LH-20, MeOH) 和反相硅胶柱层析 (MeOH:H₂O=50:50) 的分离之后, 再用硅胶柱层析 (CHCl₃: EtOAc=2:1) 纯化, 获得纯化合物 4 (3.0 mg)。

1.3.2 卤虫致死活性测试

依照 Solis 改良法^[7~9], 取 24 孔培养板, 每孔加 1 mL 含卤虫幼体的溶液 (每孔 20 个卤虫), 每个粗提物及各相浸膏样品设置 100 μg/mL, 50 μg/mL, 10 μg/mL 3 个终浓度, 各化合物设置 50 μg/mL, 25 μg/mL, 10 μg/mL 3 个终浓度, 同时设置空白对照组 (加处理过的海水 1 mL) 和 DMSO 对照组 (含与测试样品相当浓度的 DMSO), 每个浓度的样品设 3 个平行样, 制成测试培养板, 培养 24 h 后, 记录卤虫死亡个体数目。

结果评定: 死亡率 (%) = 死亡个体平均数 / 个体总数 × 100 %。

2 结果与分析

2.1 化合物结构鉴定

对化合物的理化性质和波谱数据进行分析, 并参考文献对照, 4 个化合物分别鉴定为: 5-烯-胆甾醇 (1), 胆甾醇 (2), 3-酮-20-烯孕甾烷 (3), 3-carboxy-indole (4), 结构如图 1 所示。

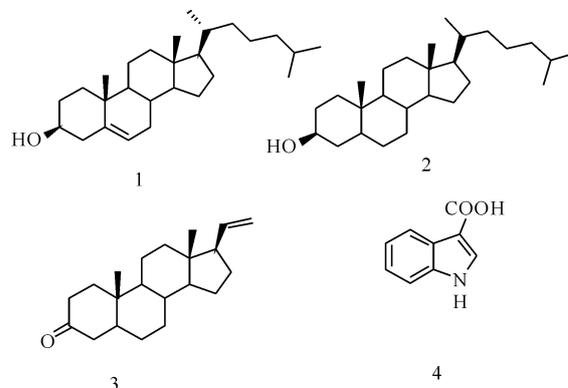


图 1 化合物 1~4 的结构式

Fig. 1 Structures of compounds 1~4

2.2 波谱数据

5-烯-胆甾醇^[10,11] (1): 无色针状结晶; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz): 5.35 (1H, d, *J* = 5.5 Hz, H-6), 3.52 (1H, m, H-3), 1.00 (3H, s, H-19), 0.95 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-21), 0.87 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-27), 0.86 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-26), 0.68 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (CD₃COCD₃, 150 MHz): 38.2 (CH₂, C-1), 32.4 (CH₂, C-2), 71.6 (CH, C-3), 43.3 (CH₂, C-4), 142.3 (C, C-5), 121.5 (CH, C-6), 32.5 (CH₂, C-7), 32.5 (CH, C-8), 51.8 (CH, C-9), 37.2 (C, C-10), 21.3 (CH₂, C-11), 40.5 (CH₂, C-12), 43.3 (C, C-13), 57.0 (CH, C-14), 24.9 (CH₂, C-15), 28.9 (CH₂, C-16), 57.6 (CH, C-17), 12.2 (CH₃, C-18), 19.8 (CH₃, C-19), 36.6 (CH, C-20), 19.1 (CH₃, C-21), 36.2 (CH₂, C-22), 24.5 (CH₂, C-23), 40.2 (CH₂, C-24), 28.6 (CH, C-25), 23.0 (CH₃, C-26), 22.8 (CH₃, C-27); ESI-MS *m/z* 387 [M + H]⁺。

胆甾醇^[12] (2): 白色无定型粉末, 经与标准品 TLC 对照得以确定。

3-酮-20-烯孕甾烷^[12,13] (3): 白色无定型粉末; ¹H

NMR(CDCl₃, 600 MHz): 5.79 (1H, m, H-20), 4.97 (1H, s, H-21), 4.96 (1H, m, H-21), 1.02 (3H, s, H-19), 0.61 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz): 38.2 (CH₂, C-1), 38.0 (CH₂, C-2), 211.9 (C, C-3), 44.7 (CH₂, C-4), 28.2 (CH₂, C-5), 31.9 (CH₂, C-6), 35.8 (CH, C-7), 53.1 (CH, C-8), 35.5 (C, C-9), 46.8 (CH, C-10), 21.5 (CH₂, C-11), 38.7 (CH₂, C-12), 42.2 (C, C-13), 55.8 (CH, C-14), 24.5 (CH₂, C-15), 27.2 (CH₂, C-16), 54.3 (CH, C-17), 13.3 (CH₃, C-18), 11.5 (CH₃, C-19), 139.7 (CH₂, C-20), 114.3 (CH₂, C-21); ESI-MS *m/z* 301 [M+H]⁺。

3-Carboxy-indole [12] (4): 白色无定型粉末;

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): 8.08 (1H, br d, *J* = 7.2 Hz, H-7), 7.86 (1H, s, H-2), 7.42 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-4), 7.10 (2H, m, H-5, 6); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆): 168.3 (C, C-1), 137.2 (CH, C-2), 128.8 (C, C-3), 112.6 (CH, C-4), 120.8 (CH, C-5), 121.7 (CH, C-6), 122.2 (CH, C-7), 131.8 (C, C-8), 111.2 (C, C-9); ESI-MS *m/z* 160 [M-H]⁻。

2.3 活性测试结果

通过卤虫致死活性检测表明,毛蚶的乙醇浸膏和正丁醇层在浓度为 100 μg/mL 都具有明显的卤虫致死活性(表 1),追踪分离到的 3 个化合物也全部显示了较强的卤虫致死活性(表 2),并呈浓度依赖性,化合物 1,2 和 3 在 50 μg/mL 时对卤虫的致死率分别为 65.0%, 58.3% 和 60.0%,并且毛蚶的乙醇浸膏对卤虫有明显的致死活性,在浓度为 100 μg/mL 时的致死率为 28.3%,而正丁醇层的致死率为 33.3%,且比 DMSO 溶剂对照高出 13.3%。

表 1 毛蚶乙醇提取物和正丁醇相的卤虫致死活性

Table 1 Lethal effects on brine shrimp *A. salina* of the ethanolic extract and *n*-butanol fractions

| 样品 Sample | 致死率 Fatality(%) | | |
|--------------------------------------|-----------------|----------|-----------|
| | 20 μg/mL | 50 μg/mL | 100 μg/mL |
| 海水 Seawater | 15.0 | 11.6 | 15.0 |
| DMSO | 15.0 | 15.0 | 20.0 |
| 毛蚶乙醇提取物 Ethanolic extract | 8.3 | 11.6 | 28.3 |
| 毛蚶正丁醇相 <i>n</i> -butanol fractios | 10.0 | 15.0 | 33.3 |

表 2 单体化合物的卤虫致死活性

Table 2 Lethal effects of the compounds on brine shrimp *A. salina*

| 化合物 Compound | 致死率 Fatality(%) | | |
|-----------------|-----------------|----------|----------|
| | 10 μg/mL | 25 μg/mL | 50 μg/mL |
| 海水 Seawater | 15.0 | 11.6 | 15.0 |
| DMSO | 15.0 | 15.0 | 15.0 |
| 1 | 21.6 | 30.0 | 65.0 |
| 2 | 15.0 | 23.3 | 58.3 |
| 3 | 20.0 | 30.0 | 60.0 |

3 结论

研究通过综合运用正相硅胶柱层析、凝胶柱层析以及半制备 HPLC 等手段,对毛蚶正丁醇层进行化学成分分析,从毛蚶的正丁醇层中分离鉴定出 4 个化合物,包括 3 个甾体类化合物(1~3)和 1 个吲哚类化合物(4),经抗卤虫活性检测,3 个甾体具有很强的抗虫活性,化合物 1,2 和 3 在 50 μg/mL 时对卤虫的致死率分别为 65.0%, 58.3% 和 60.0%,为 DMSO 对照的 3 倍左右,是毛蚶抗虫活性的有效成分之一。据文献[14~16]报道,海绵和珊瑚中的甾体类化合物,在生物间相生相克或生态交感中起着十分重要的作用,因此,甾醇类化合物可能是毛蚶中的克生活性物质,在其生境中起化学防御作用。本研究结果对药理活性化合物的追踪分离及化学防御作用的研究具有借鉴意义。

参考文献:

- [1] 姜凤吾,张玉顺. 中国海洋药物辞典[M]. 北京:海洋出版社,1994:50.
- [2] 海军后勤部卫生部,上海医药工业研究院. 中国药用海洋药物[M]. 上海:上海人民出版社,1977:67.
- [3] 肖湘,高文丽,俞丽君. 毛蚶超氧化物歧化酶的纯化、部分性质与修饰[J]. 中国海洋药物,2001,20(3):43.
- [4] 何赞绵,陈宇星,刘纯慧,等. 毛蚶多糖的分离纯化和免疫活性测定[J]. 中国海洋药物,2007,26(2):23.
- [5] 李谦,李泰明,王香琴,等. 毛蚶提取物生化性质初步分析[J]. 药物生物技术,1998,5(4):245.
- [6] 陈守国,王春波,姚如永,等. 一种毛蚶抗癌肽类提取物及其制备方法:中国,200510043797 [P]. 2006-11-08.
- [7] Solis P N, Wright C W, Anderson M M, et al. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp)[J]. Plants Med, 1993, 59 (3):250-252.
- [8] Meyer B N, Ferrigni N R, Putnam J E, et al. Brine

- shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents[J]. *Planta Med*, 1982, 45 (1): 31-34.
- [9] 杰利·L·麦克劳林, 顾哲明. 两种简易的抗肿瘤活性初筛方法[J]. *中国中药杂志*, 1997, 22 (10): 617-619.
- [10] Xiao D J, Deng S Z, Zeng L M. Studies on the chemical constituents of the marine sponge *Clathria fasciculata* from the South China Sea[J]. *Chin Mar Pharm*, 2002, 2: 1-3.
- [11] Yang R L, Wang H Z, Zheng G L, et al. Studies on chemical constituents of *Meretrix meretrix* [J]. *Chin Mar Pharm*, 2003, 2: 31-32.
- [12] 石瑛, 田黎, 王婧, 等. 海洋放线菌 *Micromonospora* sp. 与细菌 *Oceanospirillum* sp. 发酵液中化学成分的研究[J]. *中国海洋药物*, 2006, 25 (1): 6-10.
- [13] Higgs M D, Faulkner D J. 5 α -Pregna-1, 20-dien-3-one and related compounds from a soft coral[J]. *Steroids*, 30 (3): 379-388.
- [14] 高程海, 易湘茜, 何碧娟, 等. 广西红树植物化学成分及生物活性研究进展 [J]. *广西科学院学报*, 2011, 27(3): 251-256.
- [15] 徐艳, 冯涛, 童万平. 海芒果属红树植物的化学成分及其生物活性研究概述 [J]. *广西科学院学报*, 2011, 27(1): 55-61.
- [16] Epifanio R de A, Maia L F, Pawlik J R, et al. Antipredatory secosterols from the octocoral *Pseudopterogorgia americana* [J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 2007, 329: 307-310.

(责任编辑: 尹 闯)

(上接第 271 页 Continue from page 271)

- [7] Solis P N, Wright C W, Anderson M M, et al. A microwell cytotoxicity assay using *Artimia salina* (brine shrimp)[J]. *Plants Med*, 1993, 59(3): 250-252.
- [8] Meyer B N, Ferrigni N R, Putnam J E, et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents[J]. *Planta Med*, 1982, 45(1): 31-34.
- [9] D'Ambrosio M, Fabbri D, Guerriero A, et al. Coralloidolide A and coralloidolide B, the first cembranoids from a Mediterranean organism, the alcyonacean *Alcyonium coralloides* [J]. *Helv Chim Acta*, 1987, 70(1): 63-70.
- [10] Bowden B F, Coll J C, Mitchell S J, et al. Studies of Australian soft corals XXIV two cembranoid diterpenes from the soft coral *Sinularia facile* [J]. *Aust J Chem*, 1981, 34(7): 1551-1556.
- [11] D'Ambrosio M, Guerriero A, Pietra F. Novel cembranoides (coralloidolide D and E) and a 3,7-cyclized cembranolide (coralloidolide C) from the Mediterranean coral *Alcyonium coralloides* [J]. *Helv Chim Acta*, 1989, 72(7): 1590-1596.

(责任编辑: 尹 闯)