

长棘海星中含氮类化学成分研究

蔡健^{1,2,3}, 梁曼颖¹, 王健娇^{1,2}, 周雪峰^{1,2,3*}

(1. 中国科学院南海海洋研究所 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东省海洋药物重点实验室, 广东 广州 510301; 2. 中国科学院大学 地球与行星科学学院, 北京 100049; 3. 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州), 广东 广州 511458)

摘要: 目的 研究长棘海星 (*Acanthaster planci*) 含氮类化学成分及其对乙酰胆碱酯酶的抑制活性。方法 综合运用硅胶柱色谱、中压反相 ODS 柱色谱、半制备高效液相色谱 (HPLC) 等方法对化学成分进行分离和纯化, 根据核磁数据和文献对比进行化合物结构鉴定, 并对化合物进行乙酰胆碱酯酶抑制活性的评价。结果 从长棘海星 (*Acanthaster planci*) 中分离鉴定了 8 个化合物, 分别为胸腺嘧啶 (thymine, **1**)、尿嘧啶 (uracil, **2**)、脱氧胸腺嘧啶核苷 (thymidine, **3**)、脱氧尿嘧啶核苷 (2'-deoxyuridine, **4**)、苏-脯环二肽 [cyclo (Pro-Thr), **5**]、吲哚甲醛 (1*H*-indole-3-carbaldehyde, **6**)、L-苯丙氨酸 (L-phenylalanine, **7**)、异戊胺 (isopentylamine, **8**)。化合物 **5**、**6** 和 **8** 为首次从长棘海星中分离得到。其中化合物 **2**、**5**、**6** 和 **8** 表现为较弱的乙酰胆碱酯酶抑制活性。

关键词: 长棘海星; 化学成分; 吲哚甲醛; 苏-脯环二肽

中图分类号: R931.77&284

文献标志码: A

文章编号: 1002-3461(2021)04-045-05

Nitrogenous chemical constituents from *Acanthaster planci*

CAI Jian^{1,2,3}, LIANG Man-ying¹, WANG Jian-jiao^{1,2}, ZHOU Xue-feng^{1,2,3*}

(1. CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, College of Earth and Planetary Sciences, Beijing 100049, China; 3. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou), Guangzhou 511458, China)

Abstract: Objective To study the nitrogenous chemical components of *Acanthaster planci* and their inhibitory activity against acetylcholinesterase. **Methods** The compounds were isolated and purified by comprehensive chromatography methods of silica gel column, ODS column, and semi-preparative HPLC, and their structures were determined by the NMR data and comparison with literature data. All compounds were evaluated for inhibitory activity against acetylcholinesterase. **Results** Eight compounds (**1**~**8**) were isolated from *Acanthaster planci*, and identified as thymine (**1**), uracil (**2**), thymidine (**3**), 2'-deoxyuridine (**4**), cyclo (Pro-Thr) (**5**), 1*H*-indole-3-carbaldehyde (**6**), L-phenylalanine (**7**) and isopentylamine (**8**). Compounds **5**, **6** and **8** were isolated from *Acanthaster planci* for the first time. Compounds **2**, **5**, **6** and **8** showed weak inhibitory activity against acetylcholinesterase.

Key words: *Acanthaster planci*; chemical constituents; 1*H*-indole-3-carbaldehyde; cyclo (Pro-Thr)

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金 - 杰出青年项目 (2019B151502042); 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州)人才团队引进重大专项 (GML2019ZD0406) 资助

作者简介: 蔡健 (1995-), 男, 硕士研究生。

* **通讯作者:** 周雪峰, 男, 研究员, 博士生导师。E-mail: xfzhou@scsio.ac.cn

收稿日期: 2020-11-02

长棘海星 (*Acanthaster planci*) 属长棘海星科长棘海星属, 多栖息于亚热带珊瑚礁附近, 广泛分布于印度太平洋—印度洋的热带区域。长棘海星表层上有毒棘刺, 毒棘中含有神经毒素, 其以珊瑚为食, 故被称为“珊瑚杀手”, 对珊瑚礁生态系统造成严重破坏。长棘海星能产生具有多种不同生物活性且新颖复杂的次生代谢产物。迄今为止, 研究人员已从长棘海星体内获得多种化学物质, 如海星皂苷、脂肪酸、多肽、甾醇、神经酰胺、萜醌、生物碱等^[1]。长棘海星来源的化合物往往具有良好的生物活性, 如抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗炎等。研究表明其体内的毒素对哺乳动物神经

肌肉的传递有阻断作用, 对肿瘤细胞和病毒有抑制作用, 此外, 还具有抗炎、止痛、降血压、引起血小板和白血球减少等作用^[2-5]。

目前国内对长棘海星的化学成分研究较少, 本研究从长棘海星中分离得到 8 个含氮类化合物, 包括胸腺嘧啶 (thymine, **1**)、尿嘧啶 (uracil, **2**)、脱氧胸腺嘧啶核苷 (thymidine, **3**)、脱氧尿嘧啶核苷 (2'-deoxyuridine, **4**)、苏-脯环二肽 [cyclo (Pro-Thr), **5**]、吲哚甲醛 (1*H*-indole-3-carbaldehyde, **6**)、L-苯丙氨酸 (L-phenylalanine, **7**)、异戊胺 (isopentylamine, **8**), 化学结构式见图 1。其中化合物 **5**、**6** 和 **8** 为首次从长棘海星体内分离得到。

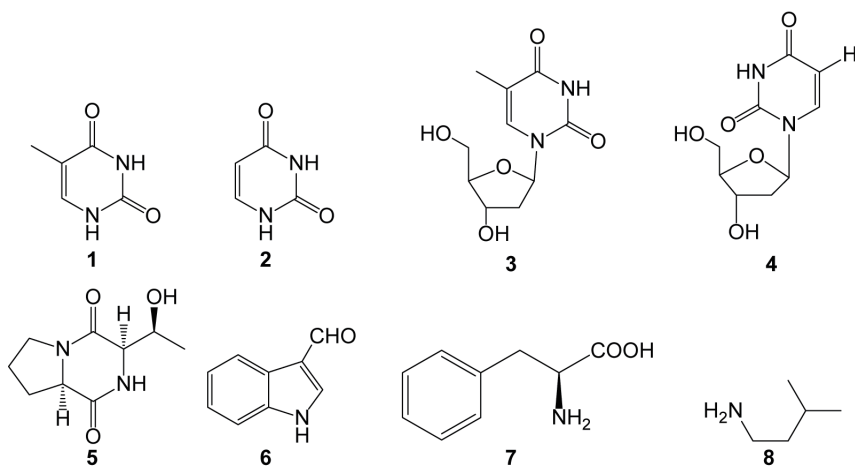


图 1 长棘海星来源化合物 1~8 的结构

Fig.1 The structures of compounds 1~8 from *Acanthaster planci*

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

长棘海星于 2019 年 8 月从南海永兴岛附近岛礁采集, 由中国科学院南海海洋研究所刘永宏研究员鉴定为长棘海星 (*Acanthaster planci*)。标本 (LMB-HX201908003) 保存于中国科学院南海海洋研究所热带海洋生物资源与生态重点实验室 (-20°C)。

Brucker Avance 700 核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); 中压色谱仪 (瑞士 Buchi 公司); 高效液相色谱仪 (日本 Hitachi 公司); 高效液相色谱半制备柱 (YMC-Pack ODS-A, 250 mm \times 10 mm, 5 μm , 日本 YMC 公司); 高效液相检测器 D₂ 灯, 监测波长 250 nm (型号 892-2550, Hitachi 公司); 硅胶柱色谱和薄层硅胶板 (青岛海洋化工有

限公司); EYELAN-1001 型旋转蒸发器 (上海爱朗仪器有限公司); 96 孔细胞培养板 (美国 Corning 公司); 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 (美国 Pharmacia 公司); 他克林 (批号 Lot # 07220AV, 美国 Aldrich 公司); 提取分离所用试剂石油醚、正丁醇、二氯甲烷、甲醇等为化学纯 (广州化学试剂厂); 液相色谱乙腈、甲醇为色谱纯 (上海星可高纯溶剂有限公司)。

1.2 提取和分离

长棘海星 (湿质量 18 kg), 切碎, 75% 乙醇提取 2 次, 合并浸膏, 以水复溶混悬。依次使用石油醚和正丁醇进行萃取, 经减压浓缩得到石油醚部位 (117 g) 和正丁醇部位 (156 g) 浸膏。正丁醇部位通过中压柱色谱 (200~300 目硅胶) 分离, 经纯石油醚以及 CH_2Cl_2 -MeOH 体系 (100:0、

100:1、50:1、25:1、15:1、10:1、5:1、2:1、1:1、0:100, 体积比)洗脱,通过薄层层析分析,最终合并成10个馏分Fr1~Fr10。Fr.2(6.2 g)经半制备HPLC(MeOH-H₂O, 体积比50:50, 2.0 mL/min)得到化合物6(1.5 mg, t_R = 19.1 min); Fr.5(8.9 g)经半制备HPLC(MeOH-H₂O, 体积比10:90, 2.0 mL/min)得到化合物1(2.6 mg, t_R = 15.2 min)和5(3.4 mg, t_R = 17.0 min); Fr.6(4.6 g)经半制备HPLC(MeOH-H₂O, 体积比10:90, 2.0 mL/min)得到化合物2(2.5 mg, t_R = 8.1 min); Fr.8(10.5 g)经半制备HPLC(MeOH-H₂O, 体积比10:90, 2.0 mL/min)得到化合物3(17.4 mg, t_R = 13.5 min)和化合物4(4.6 mg, t_R = 8.4 min); Fr.9(4.9 g)经反复硅胶柱色谱及半制备HPLC(MeOH-H₂O, 体积比10:90, 2.0 mL/min)得到化合物8(11.7 mg, t_R = 6.5 min); Fr.10(3.5 g)经过ODS中压反相柱色谱(MeOH-H₂O, 体积比5:95~100:0)分离得到6个组分Fr.10-1~10-6, Fr.10-2经葡聚糖凝胶柱(甲醇)和半制备HPLC(MeOH-H₂O, 体积比15:85, 2.0 mL/min)分离得到化合物7(3.9 mg, t_R = 18.2 min)。

1.3 乙酰胆碱酯酶抑制活性测试

使用Ellman法^[6]对化合物的乙酰胆碱酯酶抑制活性评价。以pH = 8.0、0.1 mol/L磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲溶液(PBS溶液)作为反应溶液。待测样品的配制:1 mg待测化合物溶解于20 μ L二甲基亚砜(DMSO),取2 μ L该溶液加至98 μ L的PBS溶液中,配制成质量浓度1 mg/mL的待测化合物溶液。将以下各溶液混匀于96孔板后置于酶标仪中:(1)实验组:10 μ L待测样品溶液+110 μ L PBS溶液+40 μ L PBS溶液溶解的0.1 U/mL乙酰胆碱酯酶溶液(A);(2)阴性对照:10 μ L 2% DMSO-PBS溶液+110 μ L PBS溶液+40 μ L PBS溶液溶解的0.1 U/mL乙酰胆碱酯酶溶液(B);(3)阳性对照:10 μ L 6.66 μ mol/L他克林溶液+110 μ L PBS溶液+40 μ L PBS溶液溶解的0.1 U/mL乙酰胆碱酯酶溶液;(4)背景对照:10 μ L待测样品溶液+150 μ L PBS溶液(A₀);(5)空白对照:10 μ L 2% DMSO-PBS溶液+150 μ L PBS溶液(B₀)。

将96孔板于30 $^{\circ}$ C放置20 min后,各组均加入等体积混合的6.25 mmol/L的5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)溶液与6.25 mmol/L的硫代乙酰胆碱溶液40 μ L;将96孔板于30 $^{\circ}$ C放置30 min后,于405 nm波长下测量每孔的光密度(OD值)并计算化合物对乙酰胆碱酯酶的抑制活性,计算公式为:抑制率 = [(OD_B - OD_{B₀}) - (OD_A - OD_{A₀})] / (OD_B - OD_{B₀}) \times 100%。

2 结果

2.1 化合物结构鉴定

化合物1:白色粉末;¹H NMR(700 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H 11.00(1H, s, NH), 10.59(1H, s, NH), 7.25(1H, s, H-6), 1.72(3H, s, H-7);¹³C NMR(175 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C 164.9(C-4), 151.5(C-2), 137.8(C-6), 107.7(C-5), 11.8(C-7)。以上数据和文献[7]报道的胸腺嘧啶数据对比一致,确认该化合物为胸腺嘧啶。

化合物2:白色粉末;¹H NMR(700 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H 10.93(1H, s, H-3), 7.39(1H, d, J = 7.4 Hz), 5.44(1H, d, J = 5.4 Hz, H-5)。以上数据和文献[2]数据对比基本一致,确认该化合物为尿嘧啶。

化合物3:白色固体, $[\alpha]_D^{25} +15.6^{\circ}$ (c 0.1, MeOH);¹H NMR(700 MHz, CD₃OD) δ_H 7.82(1H, s, H-4), 6.29(1H, t, J = 6.5, H-1'), 4.40(1H, m, H-3'), 3.91(1H, m, H-4'), 3.76(2H, m, H-5'), 2.23(2H, m, H-2'), 1.89(3H, s);¹³C NMR(175 MHz, CD₃OD) δ_C 166.4(C-2), 152.4(C-1), 138.2(C-4), 111.5(C-3), 88.8(C-4'), 86.2(C-1'), 72.2(C-3'), 62.8(C-5'), 41.1(C-2'), 12.4(C-5)。以上数据与文献[8]报道的脱氧胸腺嘧啶核苷一致,确认化合物3为脱氧胸腺嘧啶核苷。

化合物4:白色固体, $[\alpha]_D^{25} +30.2^{\circ}$ (c 0.1, MeOH);¹H NMR(700 MHz, CD₃OD) δ_H 7.98(1H, d, J = 8.1 Hz, H-6), 6.26(1H, dd, J = 7.3, 6.1 Hz, H-1'), 5.69(1H, d, J = 8.1 Hz, H-5), 4.38(1H, dt, J = 6.4, 3.3 Hz, H-3'), 3.92(1H, m, H-4'), 3.77(1H, dd, J = 12.0, 3.3 Hz, H-5'a), 3.71(1H,

dd, $J = 12.0, 3.7$ Hz, H-5'b), 2.20~2.28 (2H, m, H-2'); ^{13}C NMR (175 MHz, CD_3OD) δ_{C} 166.3 (C-4), 152.2 (C-2), 142.5 (C-6), 102.6 (C-5), 89.0 (C-4'), 86.6 (C-1'), 72.3 (C-3'), 62.8 (C-5'), 41.4 (C-2')。以上数据与文献 [9] 数据对比, 确认该化合物为脱氧尿嘧啶核苷。

化合物 **5**: 无色油状, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -104.7^\circ$ (c 0.1, MeOH); ^1H NMR (700 MHz, CD_3OD) δ_{H} 4.29 (1H, d, $J = 6.6, 3.8$ Hz, H-9), 4.22 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-6), 3.98 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-10), 3.63 (1H, m, H-3a), 3.47 (1H, m, H-3b), 2.31 (1H, m, H-5a), 2.01 (1H, m, H-5b), 1.90~1.98 (1H, m, H-4), 1.33 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-11); ^{13}C NMR (175 MHz, CD_3OD) δ_{C} 171.9 (C-7), 166.9 (C-1), 66.9 (C-9), 61.3 (C-10), 60.1 (C-6), 46.2 (C-3), 29.5 (C-5), 23.2 (C-4), 20.2 (C-11)。以上数据与文献 [10] 报道的苏-脯环二肽一致, 确认该化合物为苏-脯环二肽。

化合物 **6**: 白色粉末; ^1H NMR (700 MHz, CD_3OD) δ_{H} 9.89 (1H, s, H-8), 8.16 (1H, dd, $J = 7.9, 1.1$ Hz, H-4), 8.10 (1H, s, H-2), 7.48 (1H, dd, $J = 8.1, 1.0$ Hz, H-7), 7.23~7.29 (2H, m, H-5, H-6); ^{13}C NMR (175 MHz, CD_3OD) δ_{C} 187.4 (C-8), 139.7 (C-2), 138.9 (C-7'), 125.7 (C-3'), 125.0 (C-6), 123.6 (C-4), 122.4 (C-5), 120.1 (C-3), 113.1 (C-7)。以上数据与文献 [11] 报道的吡啶甲醛一致, 确认该化合物为吡啶甲醛。

化合物 **7**: 白色固体, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -20.4^\circ$ (c 0.31, H_2O); ^1H NMR (700 MHz, D_2O) δ_{H} 7.41 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-3', 5'), 7.36 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-4'), 7.31 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-2', 6'), 3.98 (1H, dd, $J = 8.0, 5.2$ Hz, H-2), 3.27 (1H, dd, $J = 14.6, 5.2$ Hz, H-3a), 3.11 (1H, dd, $J = 14.6, 8.1$ Hz, H-3b); ^{13}C NMR (175 MHz, D_2O) δ_{C} 173.9 (C-1), 135.0 (C-1'), 129.3 (C-2', 6'), 129.1 (C-3', 5'), 127.7 (C-4'), 56.0 (C-2), 36.3 (C-3)。以上数据和文献 [12] 数据对比鉴定该化合物为 L-苯丙氨酸。

化合物 **8**: 无色油状; ^1H NMR (700 MHz,

CD_3OD) δ_{H} 2.92 (2H, t, $J = 7.9$ Hz, H-1), 1.66 (1H, m, H-3), 1.52 (2H, m, H-2), 0.93 (6H, d, $J = 6.5$ Hz, H-4); ^{13}C NMR (175 MHz, CD_3OD) δ_{C} 39.2 (C-1), 37.3 (C-3), 26.8 (C-2), 22.5 (C-4)。以上数据和文献 [13] 数据对照鉴定该化合物为异戊胺。

2.2 乙酰胆碱酯酶抑制活性结果

乙酰胆碱酯酶抑制实验结果显示, 化合物 **2**、**5**、**6** 和 **8** 在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的质量浓度下对乙酰胆碱酯酶的抑制率分别为 14.97%、15.84%、10.48% 和 13.42% (阳性药为他克林, 其在 0.33 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的浓度下抑制率为 96.88%)。结果表明化合物 **2**、**5**、**6** 和 **8** 表现为低抑制活性, 其余化合物未表现出明显活性。

3 讨论

长棘海星中不仅含有毒素, 还具有多种活性成分, 但目前长棘海星来源的化学成分的报道较少。本研究从长棘海星中分离鉴定的化合物多为核苷、嘧啶、嘌呤以及环二肽, 其中分离鉴定的苏-脯环二肽 (**5**)、吡啶甲醛 (**6**) 和异戊胺 (**8**) 为首次从长棘海星中分离得到。在酶抑制活性实验中, 化合物 **2**、**5**、**6** 和 **8** 表现出对乙酰胆碱酯酶有一定的抑制作用, 特别是苏-脯环二肽 (**5**)。环二肽类化合物的来源广泛, 常可从真菌、放线菌、植物等物种中分离得到, 且多数具有明显的生物活性, 如抗菌、抗癌、抗病毒等, 由此可见, 环二肽类化合物是 1 种潜在的药物先导化合物。吡啶甲醛是 1 种生物活性代谢产物, 具有一定的抗菌、抗炎等生物活性^[14-15], 同时也是 1 种重要的医药和有机中间体, 可用于合成具有生理和药理活性的化合物, 主要来源于化学合成和植物提取。故此化合物在长棘海星中可能具有促进其免疫调节的作用。本研究为挖掘长棘海星中的活性成分以及探索含氮化合物的乙酰胆碱酯酶抑制活性提供了一定的参考意义。

参考文献

- [1] 李淑青. 长棘海星及其共生真菌 *Basidiomycete* sp. 代谢产物的研究 [D]. 广州: 中山大学, 2009.
- [2] 刘宝生. 海洋中药多棘海盘车化学物质基础研究 [D]. 山东: 中

- 国海洋大学, 2016.
- [3] 李厚金, 李淑青, 王丰, 等. 长棘海星的体内脂肪酸成分及其生物学意义分析 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2009, 48(5): 55-60.
- [4] XIA J M, MIAO Z, XIE C L, et al. Chemical constituents and bioactivities of starfishes: An Update[J]. Chem Biodivers, 2020, 17(1): e1900638.
- [5] DONG G, XU T H, YANG B, et al. Chemical constituents and bioactivities of starfish[J]. Chem Biodivers, 2011, 8(5): 740-791.
- [6] ELLMAN G L, COURTNEY K D, ANDRES V, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. Biochem Pharmacol, 1961, 7(2): 88-95.
- [7] 史大永, 韩丽君, 孙杰, 等. 海藻基根硬毛藻的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(5): 347-350.
- [8] HAMMODA H M, BADR J M, YOUSSEF D T A. Three antioxidant compounds of the red alga *Liagora farinose*[J]. Nat Prod Sci, 2007, 13(2): 140-143.
- [9] 吴旭东, 梅文莉, 邵长伦, 等. 中国南海蜂海绵 *Haliclona cymaeformis* 的化学成分研究 [J]. 中国海洋药物, 2011, 30(5): 12-17.
- [10] 彭燕, 刘永宏. 黄海海燕的化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(24): 1883-1885.
- [11] YANG Q, YE G. A new C-glucoside from *Commelina communis*[J]. Chem Nat Comp, 2009, 45(1): 59-60.
- [12] 洪奎, 谢雪, 王雪晶, 等. 红花中含氮类化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3071-3073.
- [13] 李云秋, 王宾, 杨斌, 等. 南海海绵 *Haliclona* sp. 的化学成分研究 [J]. 热带海洋学报, 2011, 30(1): 124-126.
- [14] ZHANG L S, DAVIES S S. Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: opportunities for new therapeutic interventions[J]. Genome Med, 2016, 8(1): 1-18.
- [15] ZELANTE T, IANNITTI R G, CUNHA C, et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22[J]. Immunity, 2013, 39(2): 372-385.