

文章编号:1001-6880(2014)10-1602-04

平颈海蛇的化学成分研究

姚海萍,梁振纲,杨先会,邓世明*

¹海南大学热带生物资源教育部重点实验室;²海南大学海洋学院,海口 570228

摘要:本文主要研究平颈海蛇干体的化学成分及其抗氧化活性。采用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、重结晶等方法进行分离纯化,从平颈海蛇干体中分离得到7个化合物,根据理化性质和波谱数据鉴定化合物的结构分别为:胆甾醇(**1**)、 $5,6\beta$ -Epoxysitosteryl oleate (**2**)、9-Octadecenoic acid (9Z)-,(2R)-2,3-bis[(1-oxooctadecyl)oxy] propyl ester (**3**)、1-甲基海因(**4**)、 α -棕榈酸甘油酯(**5**)、鲛肝醇(**6**)、7 α -甲氧基- β -谷甾醇(**7**)。其中化合物**2**、**3**、**5**、**6**、**7**为首次从平颈海蛇中分离得到。采用DPPH自由基清除试验评价化合物的抗氧化活性,结果表明7个化合物几乎无抗氧化活性。

关键词:平颈海蛇;海洋生物;化学成分;抗氧化活性

中图分类号:0629

文献标识码:A

Studies on the Chemical Constituents of *Lapemis curtus*

YAO Hai-ping, LIANG Zhen-gang, YANG Xian-hui, DENG Shi-ming*

¹Key Laboratory of Tropic Biological Resources, MOE, Hainan University, China;²College of Ocean, Hainan University, Haikou 570228, China

Abstract: To study the chemical constituents of the dry *Lapemis curtus*, and the antioxidant activity of the isolated compounds. The seven compounds were isolated and purified from the dry *Lapemis curtus* using different kinds of column chromatography. Their structures were determined as cholesterol (**1**), $5,6\beta$ -Epoxysitosteryl oleate (**2**), 9-Octadecenoic acid (9Z)-,(2R)-2,3-bis[(1-oxooctadecyl)oxy] propyl ester (**3**), 1-methylhydantoin (**4**), α -palmitoyl glycerin ether (**5**), Chimyl alcohol (**6**), 7 α -methoxyl- β -sitosterol (**7**) on the basis of the physicochemical properties and spectral analysis. Compounds **2**, **3**, **5**, **6** and **7** were isolated from the dry *Lapemis curtus* for the first time. All compounds show weak antioxidant activity by DPPH method.

Key words: *Lapemis curtus*; marine organism; chemical constituents; antioxidant activity

平颈海蛇(*Lapemis curtus*)为眼镜蛇科平颈海蛇属的爬行动物,俗名棘海蛇,国内主要分布于海南、福建、台湾、山东、香港、广西^[1],已被广西中药材标准收载,具有祛风除湿、舒筋活络作用^[2]。海南民间常用于泡酒、煲汤治疗各类风湿疾病,效果显著。关于平颈海蛇的化学成分,我国学者雷羽等以青环海蛇和平颈海蛇的混合干体为研究对象,从中提取分离得到胆甾醇、1-甲基海因等4个化合物。为了研究海蛇药用功效的物质基础及扩大药源,本实验对平颈海蛇干体的化学成分进行了研究,共分离得到7个化合物,根据理化性质和波谱学方法对其进行结构鉴定。并利用DPPH自由基清除实验

测定了所得到的单体化合物的抗氧化活性。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

¹H NMR 和 ¹³C NMR 由 Bruker AM-400型(TMS为内标)核磁共振谱仪测定。熔点由数字显示显微熔点测定仪测定(X-4,北京泰克仪器有限公司,温度未校正)。Sephadex LH-20 是 Pharmacia 公司产品。柱层析硅胶(200~300目)和薄层色谱硅胶板是青岛海洋化工厂产品,所有试剂均为分析纯。

1.2 样品

平颈海蛇干体4.7 kg,购于海口市东门市场,经海南大学邓世明教授参考中国动物志和广西中药材标准鉴定,凭证标本存放于海南大学海洋学院。

1.3 提取与分离

取平颈海蛇干体(全体)4.7 kg 粉粹,用75%乙

收稿日期:2013-09-12 接受日期:2013-11-21

基金项目:十二五国家科技支撑计划课题项目(2013BA01B04);海南省科技兴海专项项目(XH201309)

*通讯作者 E-mail:dsm701@126.com

醇(15 L)回流提取4次,经薄层层析检测基本提取完全。提取液减压浓缩(低于55℃)回收乙醇得浸膏,将浸膏用适量水溶解后,依次用石油醚、乙酸乙酯萃取,分别减压回收溶剂后,得石油醚部分浸膏约136.5 g和乙酸乙酯部分浸膏约78.0 g,本实验主要对石油醚部分浸膏进行分离纯化。

取石油醚部分浸膏(130 g),经硅胶干柱层析,石油醚:氯仿:乙酸乙酯(2:2:1)洗脱,分为5个组分:A-E。取A段,经反复硅胶层析和重结晶得化合物**1**;B段经反复硅胶柱层析和Sepadex LH-20(氯仿:甲醇1:1),得化合物**2~3**;E段经反复硅胶柱层析和Sepadex LH-20(氯仿:甲醇1:1),得化合物**4~7**。

1.4 DPPH 自由基清除试验

用无水乙醇将DPPH配制成 1×10^{-4} mol/L的溶液,置于冰箱中冷藏备用。实验共分3组,每组总体积为3 mL,第1组在试管中加入1.0 mL DPPH溶液(1×10^{-4} mol/L)和2 mL无水乙醇,混匀后在517 nm波长处测吸光度值,记为 A_0 ;第2组加入1.0 mL DPPH溶液(1×10^{-4} mol/L)和2.0 mL试样,摇匀,在室温下避光反应30 min后测吸光度值,记为 A_i ;第3组加入1.0 mL无水乙醇和2.0 mL试样混匀,测定吸光度值记为 A_j 。每个化合物样品均设置6个质量浓度:2.0, 1.5, 1.0, 0.8, 0.6, 0.4 mg/mL, 每一吸光度值平行测3次,取其平均值,按公式: 清除率% = $(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}) \times 100\%$ 计算自由基清除率;并求出清除率为50%时样品的质量浓度(SC_{50}),样品的活性结果即以半数清除质量浓度(SC_{50})表示。

2 结构鉴定

化合物1 白色粉末,mp. 130~132℃,硫酸-乙醇显紫色,易溶于氯仿;¹H NMR (CDCl₃, 400.13 MHz) δ: 0.65 (3H, s, H-18), 0.83 (6H, d, J = 6.6 Hz, H-26, 27), 0.88 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-21), 0.98 (3H, s, H-19), 3.49 (1H, m, H-3), 5.35 (1H, brs, H-6);¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ: 37.3 (C-1), 31.7 (C-2), 71.8 (C-3), 42.4 (C-4), 140.8 (C-5), 121.7 (C-6), 31.9 (C-7), 31.9 (C-8), 50.2 (C-9), 36.5 (C-10), 21.1 (C-11), 39.8 (C-12), 42.4 (C-13), 56.8 (C-14), 24.3 (C-15), 28.2 (C-16), 56.2 (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), 22.6 (C-26), 22.8 (C-27)。结合NMR数据及分子量可确定其分子式为:C₂₇H₄₆O;其理化性质、波谱数据与相关文献^[3,6]报道的基本一致,故鉴定该化合物为胆甾醇(cholesterol)。

化合物2 白色膏状物,硫酸-乙醇显梅红色,易溶于氯仿;¹H NMR (CDCl₃, 400.13 MHz) δ: 5.35 ~ 5.32 (2H, m), 4.81 ~ 4.73 (1H, m), 3.07 (1H, d, J = 1.8 Hz), 2.25 (2H, t, J = 7.56 Hz), 2.13 ~ 1.59 (9H, m), 1.59 ~ 1.29 (48H, m), 1.03 (3H, s), 0.85 ~ 0.90 (15H, m), 0.64 (3H, s);¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ: 173.46, 129.99, 129.73, 71.05, 63.57, 62.53, 56.21, 56.21, 51.00, 42.30, 39.81, 39.50, 38.07, 36.70, 36.15, 35.73, 35.05, 34.60, 32.50, 31.92, 29.76, 29.69, 29.59, 29.52, 29.45, 29.36, 29.31, 29.14, 29.09, 28.14, 28.00, 27.26, 27.22, 27.16, 25.01, 24.19, 23.82, 22.79, 22.68, 22.55, 21.94, 18.68, 17.03, 14.10, 11.76, 11.76。结合NMR数据及分子量可确定其分子式为:C₄₇H₈₂O₃;其理化性质、波谱数据与相关文献^[4,5]报道的基本一致,故鉴定该化合物为5,6β-Epoxyisosteryl oleate。

化合物3 白色膏状物,硫酸-乙醇显紫色,易溶于氯仿;¹H NMR (CDCl₃, 400.13 MHz) δ: 5.34 (2H, m, H-9', 10'), 5.26 (1H, m, H-2), 4.13 (2H, dd, J = 11.9, 5.9 Hz, H-3), 4.29 (2H, dd, J = 11.9, 4.3 Hz, H-1), 2.30 (6H, td, J = 7.6, 2.3 Hz, H-2', 2'', 2'''), 2.00 (4H, m, H-8', 11'), 1.60 (6H, m, H-3', 3'', 3'''), 1.25 ~ 1.29 (76H, m, H-4' ~ 7', H-12' ~ 17', H-4'' ~ 17'', H-4''' ~ 17'''), 0.88 (9H, t, J = 7.0 Hz, H-18', 18'', 18''');¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ: 173.26 (C-1', 1'''), 173.22 (C-1''), 68.86 (C-2), 62.08 (C-1, 3), 34.21 (C-2''), 34.05 (C-2', 2'''), 31.92 (C-8', 11'), 29.76 ~ 22.68 (nCH₂), 14.10 (3CH₃)。结合NMR数据及分子量可确定其分子式为:C₅₇H₁₀₈O₆;其理化性质、波谱数据与相关文献^[3,6-8]报道的基本一致,故鉴定该化合物为9-Octadecenoic acid (9Z)-, (2R)-2,3-bis[(1-oxooctadecyl)oxy] propyl ester。

化合物4 白色片状晶体,mp. 157~159℃,硫酸-乙醇显橙黄色,易溶于氯仿;¹H NMR (CDCl₃, 400.13 MHz) δ: 2.91 (3H, s, -CH₃), 3.96 (2H, s, -CH₂);¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 MHz) δ: 159.4 (C-

2), 173.8(C-4), 53.9(C-5), 29.3(C-6)。结合NMR数据及分子量可确定其分子式为: $C_4H_6N_2O_2$;其理化性质、波谱数据与相关文献^[9]报道的基本一致,故鉴定该化合物为1-甲基海因(1-methylhydantoin)。

化合物5 白色膏状物,硫酸-乙醇显紫色,易溶于氯仿;¹H NMR(CDCl₃, 400.13 MHz) δ: 4.22(1H, dd, *J* = 11.6, 4.6 Hz, H-1'a), 4.19(1H, dd, *J* = 11.6, 6.1 Hz, H-1'b), 3.94(1H, m, H-2'), 3.70(1H, dd, *J* = 11.1, 4.0 Hz, H-3'a), 3.60(1H, dd, *J* = 11.5, 5.8 Hz, H-3'b), 2.35(2H, t, *J* = 7.4 Hz, H-2), 1.63(2H, m, H-3), 1.25(24H, m, H-4 ~ H-15), 0.87(3H, t, *J* = 6.6 Hz, H-16);¹³C NMR(CDCl₃, 100.6 MHz) δ: 70.3(C-2'), 65.2(C-1'), 63.3(C-3'), 34.2(C-2), 31.9(C-14), 29.7 ~ 29.1(C-4 ~ C-13), 24.9(C-3), 22.7(C-15), 14.1(C-16)。结合NMR数据及分子量可确定其分子式为: $C_{19}H_{38}O_4$;以上数据与文献^[3,13]报道的基本一致,故鉴定该化合物为α-棕榈酸甘油酯(α-palmityl glycerin ester)。

化合物6 白色粉末,mp. 59 ~ 62 °C,硫酸-乙醇显梅红色,易溶于氯仿;¹H NMR(CDCl₃, 400.13 MHz) δ: 0.88(3H, t, *J* = 7.0 Hz), 1.25(28H, m, H-2 ~ H-15), 1.57(2H, m), 1.96(brs, -OH), 3.44 ~ 3.56(4H, m), 3.65(1H, dd, *J* = 11.39, 5.09 Hz), 3.72(1H, dd, *J* = 11.39, 3.87 Hz), 3.85(1H, brs);¹³C NMR(CDCl₃, 100.6 MHz) δ: 72.54, 71.87, 70.39, 64.34, 31.93, 29.69 ~ 29.35, 26.09, 22.69, 14.11。结合NMR数据及分子量可确定其分子式为: $C_{19}H_{40}O_3$;其理化性质、波谱数据与相关文献^[5,12,14-16]报道的基本一致,故鉴定该化合物为鲛肝醇(Chimyl alcohol)。

化合物7 白色粉末,硫酸-乙醇显蓝色,易溶于氯仿;¹H NMR(CDCl₃, 400.13 MHz) δ: 5.73(1H, brd, *J* = 4.83 Hz, H-6), 3.62(1H, m, H-3), 0.66(3H, s, CH₃-18), 0.98(3H, s, CH₃-19), 0.92(3H, d, *J* = 6.49 Hz, CH₃-21), 0.87(3H, d, *J* = 1.66 Hz, CH₃-26), 0.86(3H, d, *J* = 1.66 Hz, CH₃-27), 0.91(3H, t, *J* = 6.49 Hz, CH₃-29), 3.54(3H, s, OMe), 3.28(1H, brt, H-7);¹³C NMR(CDCl₃, 100.6 MHz) δ: 36.7(C-1), 39.5(C-2), 71.5(C-3), 42.3(C-4), 146.1(C-5), 120.8(C-6), 73.9(C-7), 37.3(C-8), 42.7(d, C-9), 37.5(C-10), 20.8(C-11), 39.1(C-12), 42.1(C-13), 49.1(C-14), 24.3(C-15), 28.2(C-16), 55.9(C-17), 11.5(C-18),

18.3(C-19), 35.8(C-20), 18.8(C-21), 31.5(C-22), 36.2(C-23), 35.7(C-24), 28.0(C-25), 22.5(C-26), 22.8(C-27), 23.8(C-28), 11.9(C-29), 56.8(OMe)。结合NMR数据及分子量可确定其分子式为: $C_{30}H_{52}O_2$;其理化性质、波谱数据与相关文献^[11,12]报道的基本一致,故鉴定该化合物为7α-甲氧基-β-谷甾醇(7α-methoxyl-β-sitosterol)。

3 化合物的抗氧化活性

利用DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)自由基清除实验^[17],对从平头海蛇中分离得到的单体化合物进行抗氧化活性测试,其中化合物**1**有极微弱抗氧化活性,SC₅₀值为0.777 mg/mL,阳性对照BHT(2,6-二叔丁基对甲苯酚)的SC₅₀值为0.0217 mg/mL,其他化合物无抗氧化活性,故结果表明各化合物几乎无抗氧化活性。

参考文献

- Zhao EM(赵尔宓), Huang MH(黄美华), Zong Y(宗渝), et al. Fauna Sinica, Reptilia, vol. 3, Squamata, Serpentes(中国动物志·爬行纲第三卷·有鳞目·蛇亚目). Beijing: Science Press, 1998. 375-376.
- Guangxi Municipal Health Bureau(广西壮族自治区卫生厅). Guangxi Chinese Medicine Standard(广西中药材标准). Beijing: Chinese Science and Technology Press, 1996. 201.
- Yu JT(于建婷), Lin JM(林均明), Zou XN(邹晓楠), et al. Isolation and identification of chemical constituents from the marine organism Artemia cysts. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2012, 29: 348-351.
- Diane JD, Philippe G, Eric M, et al. Michel Miesch Synthesis of highly pure oxyphytosterols and (oxy) phytosterol esters Part II. (Oxy)-sitosterol esters derived from oleic acid and from 9, 10-dihydroxystearic acid. *Steroids*, 2008, 73: 1098-1109.
- Xiong L(熊亮). Research on material basis for efficacy of sea snake. Chengdu: Chengdu University of Chinese medicine(成都中医药大学), 2008.
- Cai CK(蔡程科), Lei HM(雷海民), Ren TC(任天池), et al. Studies on the chemical constituents of the *Styela clava*. *Chin J Marine Drugs*(中国海洋药物), 2003, 2: 22-23.
- Hu BH(胡邦豪), Yuan HZ(袁汉珍), Guo JX(郭建新), et al. Determination of plant oils by ¹H and ¹³C NMR. *Chin J Magnetic Resonance*(波谱学杂志), 1993, 10: 251-258.

(下转第1643页)