

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00021

## 中国南海硬棘软珊瑚 *Scleronephthya* sp. 的活性成分研究

霍娟, 汤华, 李玲, 刘宝姝, 孙鹏, 易杨华\*, 张文\*

第二军医大学药学院海洋药物研究中心, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 研究中国南海硬棘软珊瑚 *Scleronephthya* sp. 生物活性成分。**方法** 利用正、反相硅胶柱层析、Sephadex LH-20 以及 HPLC 等层析手段对一种硬棘软珊瑚中的生物活性成分进行分离。应用波谱分析技术并结合文献数据, 对所得的化合物进行结构鉴定。采用琼脂扩散试验对分离得到的化合物进行体外抗微生物活性测试。**结果和结论** 从该种硬棘软珊瑚中分离得到 3 个过氧化麦角甾醇(1~3)、鲛肝醇(4)、鲨肝醇(5)和 1,2-O-十八烷基甘油缩醛(6)。初步体外抗微生物活性筛选发现这些化合物均有不同程度的抗菌活性。化合物 5 对大肠杆菌和巨大芽孢杆菌具有一定的抑制活性, 化合物 6 对花药黑粉菌具有很强的抑制活性。化合物 1~4 仅显示微弱的抗微生物活性。

**[关键词]** 硬棘软珊瑚; 分离和提纯; 分子结构; 抗真菌药

**[中图分类号]** R 931.77 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)01-0021-04

### Study on bioactive constituents of the South China Sea soft coral *Scleronephthya* sp.

HUO Juan, TANG Hua, LI Ling, LIU Bao-shu, SUN Peng, YI Yang-hua\*, ZHANG Wen\*

Research Center for Marine Drugs, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the bioactive constituents of coral *Scleronephthya* sp. collected from the South China Sea. **Methods** The compounds were isolated and purified using repeated column chromatographies on Sephadex LH-20, normal- and reversed-phase silica gels, and RP-HPLC. The structures of the compounds were elucidated based on the detailed spectroscopic analysis in combination with reported data. The *in vitro* antimicrobial activity of these compounds were assessed by an agar diffusion test. **Results and conclusion** Three  $5\alpha$ ,  $8\alpha$ -epidioxysterols, two alkyl glycerol ethers and 1,2-O-alkyl glycerol were isolated from *Scleronephthya* sp.; these compounds displayed different levels of antifungal and antibacterial activities in bioassay *in vitro*. Compound 5 inhibited the growth of Gram-negative bacterium *Escherichia coli* and the Gram-positive bacterium *Bacillus megaterium*. Compound 6 showed marked antifungal activity against *Microbotryum violaceum*. Compounds 1-4 demonstrated a weak antimicrobial activity.

**[Key words]** *Scleronephthya* sp.; isolation & purification; molecular structure; antifungal agents

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(1): 21-24]

软珊瑚是海洋无脊椎动物, 属于腔肠动物门珊瑚虫纲。对软珊瑚的化学和药理学研究多年来一直是海洋天然产物研究的热点。近年来, 众多学者从软珊瑚中发现了许多令人感兴趣的生物活性物质, 这些活性物质的潜在药用价值也越来越引起人们的重视。甾醇是生物膜的重要组成部分和一些激素的前体, 海洋有机体已经成为甾体化合物的一个重要来源, 许多新颖的骨架和活性化合物已经从海洋有机体中分离出来。

硬棘软珊瑚 (*Scleronephthya* sp.) 是软珊瑚目

(Alcyonacea) 棘软珊瑚科 (Nephtheidae) 动物。严小红等<sup>[1]</sup>曾报道从中国南海硬棘软珊瑚 *Scleronephthya* sp. 中分离得到一系列孕甾烷及其衍生物, 部分化合物对肝癌细胞 (BEL74020) 和人白血病细胞 (HL-60) 显示有一定的抑制活性, 对 COX-2 显示有强烈的抑制活性。在从我国南海珊瑚寻找新活性物质的过程中, 我们已经从块花柳珊瑚中分离得到一系列侧链氧化程度不同的甾醇类化合物<sup>[2]</sup>, 从短指软珊瑚中分离得到一系列多羟基甾醇<sup>[3]</sup>。最近我们课题组对采自我国广西北海附近的硬棘软珊瑚活性

**[收稿日期]** 2010-06-18 **[接受日期]** 2010-12-02

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(30873200), 上海市重点基础研究项目(08JC1405600), 上海市重点学科建设项目(B906), 上海市浦江人才项目(PJ2008). Supported by Natural Science Foundation of China (30873200), Key Basis Research Project of Shanghai (08JC1405600), Shanghai Leading Academic Discipline Project (B906), and Shanghai Pujiang Talent Project (PJ2008).

**[作者简介]** 霍娟, 硕士生. E-mail: huojuandc316@163.com

\* 通讯作者 (Corresponding authors). Tel: 021-65384988, E-mail: yiyanghua@hotmail.com; Tel: 021-81871257, E-mail: zhangwen68@hotmail.com

成分进行了研究,从中分离鉴定了6个化合物:(22*E*,24*S*)-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -过氧化麦角甾-6,22-二烯-3 $\beta$ -醇(1),(22*E*,24*R*)-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -过氧化麦角甾-6,22-二烯-3 $\beta$ -醇(2),(24*R*)-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -过氧化麦角甾-6-烯-3 $\beta$ -醇(3),鲛肝醇(4),鲨肝醇(5)和1,2-O-十八烷基甘油缩醛(6),结构式见图1。鲨肝醇是目前临床用于增高人体白血球的药物,我们课题组首次对鲨肝醇进行体外抗菌活性测试,发现该化合物对大肠杆菌和巨大芽孢杆菌具有一定的抑制活性。化合物6对花药黑粉菌具有很强的抑制活性。

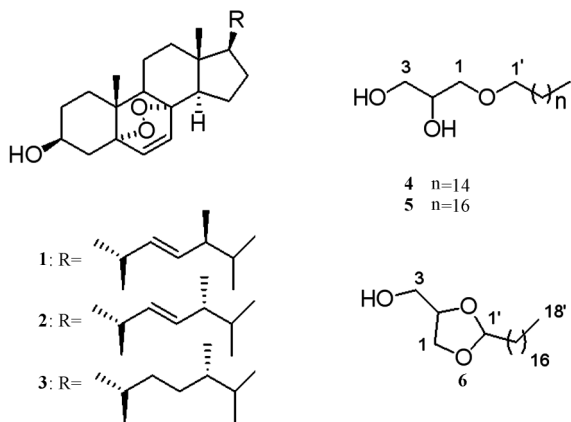


图1 化合物1~6的结构

Fig 1 Structures of compounds 1-6

### 1 材料和方法

1.1 材料和仪器 硬棘软珊瑚(*Scleronephthya* sp.)采自中国广西涠洲岛附近海域,种属由中国科学院南海海洋研究所李秀保助理研究员鉴定。样品标本保存于第二军医大学药学院海洋药物研究中心,编号为ZS-38。

EI-MS用MAT 212质谱仪;NMR用Varian Inova-400、Inova-600核磁共振仪(TMS作内标);HPLC:Agilent 1100 HPLC仪,示差折光(RID)检测器,Zorbax 300-C<sub>18</sub>柱(250 mm×9.4 mm);层析用硅胶(200~300目);试剂均为分析纯。

1.2 提取与分离 将新鲜软珊瑚(湿质量1.20 kg)剪碎,依次用质量比为5倍的甲醇、丙酮分别超声提取6次至提取液无色,减压浓缩除去有机溶剂,将浓缩物悬浮于1 L的水中,用等体积的氯仿萃取5次,有机相萃取液经减压浓缩得总浸膏5.60 g。氯仿总浸膏经硅胶柱层析(n-Hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100:1~1:10;CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100%;CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 100:1~1:5;100% MeOH)梯度洗脱,TLC检测合并得Fr. A

(300 mg)。Fr. A再经硅胶柱层析(n-Hexane/CHCl<sub>3</sub> 50:1~1:10;CHCl<sub>3</sub> 100%;CHCl<sub>3</sub>/MeOH 50:1~1:5;100% MeOH)梯度洗脱得4个流分(Fr. A<sub>1</sub>~Fr. A<sub>4</sub>),Fr. A<sub>3</sub>(80 mg)经Sephadex LH-20凝胶柱纯化(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 1:1洗脱),最后经半制备HPLC纯化制备(MeOH 100%),得化合物1(2.0 mg)、2(1.0 mg)、3(1.0 mg)、4(2.8 mg)、5(4.6 mg)和6(3.0 mg)。

### 2 结果和讨论

2.1 化合物结构鉴定 化合物1:白色结晶,EI-MS给出*m/z* 429[M+H]<sup>+</sup>,确定其相对分子质量为428。<sup>1</sup>HNMR谱在低场区有2对相互耦合的烯氢信号6.50(1H, d, *J*=8.5 Hz)、6.24(1H, d, *J*=8.5 Hz)、5.22(1H, dd, *J*=15.3, 7.4 Hz)、5.14(1H, dd, *J*=15.3, 8.1 Hz),在高场区有6组甲基氢1.00(3H, d, *J*=6.6 Hz)、0.91(3H, d, *J*=6.8 Hz)、0.88(3H, s)、0.83(3H, d, *J*=6.6 Hz)、0.82(3H, d, *J*=6.6 Hz)、0.82(3H, s)及亚甲基氢和次甲基氢信号,提示为甾醇类化合物。<sup>13</sup>CNMR(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)谱共有28个碳信号,结合DEPT谱,发现低场区存在4个sp<sup>2</sup>杂化叔碳,高场区有6个甲基、7个亚甲基、7个次甲基和4个饱和季碳。通过2D-NMR并与文献<sup>[4-7]</sup>对照,确定化合物1为(22*E*,24*S*)-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -过氧化麦角甾-6,22-二烯-3 $\beta$ -醇。

化合物2:白色结晶,EI-MS给出*m/z* 429[M+H]<sup>+</sup>,确定其相对分子质量为428。<sup>1</sup>HNMR谱在5.11(*J*=8.0, 15.3 Hz)和5.19(*J*=7.5, 15.1 Hz)处两组双二重峰及IR中985 cm<sup>-1</sup>、970 cm<sup>-1</sup>中强峰,说明C-22立体构型为*E*式;C-28甲基的17.6±0.1是诊断不饱和侧链甾醇24*R*构型的特征值,且甾醇ABC环系的结构改变对其侧链碳位移值几乎不产生影响,化合物2的C-28( $\delta$  17.6)在此特征范围内,确定其立体构型应为*R*。通过上述特征分析及同文献<sup>[8-9]</sup>比较,确定化合物2的结构为(22*E*,24*R*)-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -过氧化麦角甾-6,22-二烯-3 $\beta$ -醇。

化合物3:白色粉末,EI-MS给出*m/z* 430[M]<sup>+</sup>,确定其相对分子质量为430。<sup>1</sup>HNMR谱在低场区有相互耦合的烯氢信号6.50(1H, d, *J*=8.5 Hz)、6.24(1H, d, *J*=8.5 Hz),无烯氢信号5.22(1H, dd, *J*=15.3, 7.4 Hz)、5.14(1H, dd, *J*=15.3, 8.1 Hz),高场区6组甲基氢信号与化合物2

相同,查阅文献确定化合物 **3** 为(24*R*)-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -过氧化麦角甾-6-烯-3 $\beta$ -醇<sup>[5,8]</sup>。

化合物 **4**: 白色鳞片状晶体,分子式 C<sub>19</sub>H<sub>40</sub>O<sub>3</sub>; EI-MS 给出  $m/z$  316[M]<sup>+</sup>, 285[M-CH<sub>2</sub>OH]<sup>+</sup>, 255[M-CH<sub>2</sub>OH-CHOH]<sup>+</sup>, 确定其相对分子质量为 316。该化合物的<sup>1</sup>H NMR 谱图特征与鲨肝醇的谱图特征基本相同,说明其是甘油醚类化合物,经与文献<sup>[9]</sup>数据对照,确定化合物 **4** 为 1-十六碳烷基甘油醚(鲛肝醇)。

化合物 **5**: 白色鳞片状晶体,分子式 C<sub>21</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub>; EI-MS 给出  $m/z$  344[M]<sup>+</sup>, 313[M-CH<sub>2</sub>OH]<sup>+</sup>, 283[M-CH<sub>2</sub>OH-CHOH]<sup>+</sup>, 269[M-O(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 253[M-(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 确定其相对分子质量为 344。根据<sup>1</sup>H NMR 同时显示出长直链化合物的特征: 1 个 CH<sub>3</sub>(0.88)信号, 1 个由多个 CH<sub>2</sub>(1.57)组成的信号。<sup>13</sup>C NMR(DEPT)表明该化合物中存在 3 个 CH<sub>2</sub>O(72.6, 71.9, 64.4)信号、1 个 CH-O(70.4)信号及 1 个 CH<sub>3</sub>(14.1)信号。经查阅文献<sup>[10]</sup>该化合物波谱数据与 1-十八碳烷基甘油醚(鲨肝醇)相吻合,确定化合物 **5** 为鲨肝醇。核磁数据见表 1。

表 1 化合物 **5** 的核磁数据  
(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz/125 MHz)

Tab 1 NMR data of compound **5** in CDCl<sub>3</sub>

No.	$\delta_H, m, J$ in Hz	$\delta_C, m$	COSY	HMBC(H $\rightarrow$ C)
1	3.52, m	72.6, t	2', 2	3, 1'
2	3.71, m	70.4, d	1, 2-OH, 3	
2-OH	2.58, d, 4.5		2	3
3	3.65, m	64.4, t		
	3.66, m		3-OH	
3-OH	2.15, brs		3	
1'	3.46, m	71.9, t		1, 2
2'	1.57, m	29.5, t	1'	1'
16'		22.7, t		
17'		31.9, t		
18'	0.88, t, 6.5	14.1, q		16', 17'

化合物 **6**: 白色粉末,分子式 C<sub>21</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub>; EI-MS 给出  $m/z$  342[M]<sup>+</sup>, 确定其相对分子质量为 342。根据<sup>1</sup>H NMR 显示出长直链化合物的特征: 1 个 CH<sub>3</sub>(0.88, 3H, t,  $J=6.5$  Hz) 信号, 1 个由多个 CH<sub>2</sub>(1.64, 4H, m; 1.41, 2H, m; 1.35-1.20, 26H, m)组成的信号。<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR (DEPT) 显示有 1 个缩醛信号 [ $\delta_C$  104.9 (d),  $\delta_H$  5.00 (1H,

t,  $J=5.0$  Hz)]及 3 个连氧碳信号 [ $\delta_C$  62.8 (C-3), 66.5 (C-1), 76.1 (C-2),  $\delta_H$  3.65 (1H, dd,  $J=6.5$ , 12.0 Hz, H-3a), 3.72 (1H, dd,  $J=3.5$ , 12.0 Hz, H-3b), 3.65 (1H, dd,  $J=6.5$ , 8.0 Hz, H-1a), 4.10 (1H, dd,  $J=6.5$ , 8.0 Hz, H-1b), 4.20 (1H, m, H-2)]。结合 COSY、HMBC 二维谱的相关信号: H-1' 与 H-2', H-2' 与 H-3', H-2 与 H-1a, H-3a, H-1a 与 H-1b, H-2, H-3a 与 H-3b, H-2 有 COSY 相关信号; H-1a, H-3a 与 C-2, H-1b 与 C-2, C-1', H-2' 与 C-1', H-2 与 C-1 有 HMBC 相关信号。经与文献<sup>[11-12]</sup>数据对照,确定该化合物 **6** 是 1,2-O-十八烷基甘油缩醛。该化合物主要作为合成血小板凝集素及乳化剂<sup>[12]</sup>的中间体,核磁数据见表 2。

表 2 化合物 **6** 的核磁数据  
(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz/125 MHz)

Tab 2 NMR data of compound **6** in CDCl<sub>3</sub>

No.	$\delta_H, m, J$ in Hz	$\delta_C, m$	COSY	HMBC(H $\rightarrow$ C)
1a	3.65, dd, 6.5, 8.0	66.5, t	1b, 2	2
1b	4.10, dd, 6.5, 8.0		1a, 2	3a, 1'
2	4.20, m	76.1, d	1a, 3a	1a
3a	3.65, dd, 6.5, 12.0	62.8, t	2, 3b	2
3b	3.72, dd, 3.5, 12.0		3a	
1'	5.00, t, 5.0	104.9, d	2'	2'
2'	1.64, m	34.2, t	1', 3'	1'
3'	1.41, m	24.0, t	2'	
16'		22.7, t		
17'		31.9, t		
18'	0.88, t, 6.5	14.1, q		16', 17'

2.2 体外抗菌试验 本实验采用琼脂扩散试验法,以青霉素(penicillin)、链霉素(streptomycin)为阳性对照品,溶剂丙酮(acetone)为阴性对照品,测定了化合物 **1~6** 对花药黑粉菌(*Microbotryum violaceum*)、灰霉菌(*Botrytis cinerea*)、壳针孢叶枯病菌(*Septoria tritici*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)和小球藻(*Chlorella fusca*)的抑制活性,按时测量抑菌圈的大小(半径),平行实验 3 次。结果显示这些化合物均有不同程度的抗菌活性,其中化合物 **5** 对大肠杆菌和巨大芽孢杆菌具有一定的抑制活性,化合物 **6** 对花药黑粉菌具有很强的抑制活性(表 3)。

烷基甘油醛类衍生物是我国南海软珊瑚中常见的代谢产物,但目前未见其抗菌活性的相关报道。

本实验对从硬棘软珊瑚中分离得到的这类化合物进行体外抗菌活性测试,结果显示化合物 6 对花药黑

粉菌具有显著的抑制作用,其抑制效果强于阳性对照药青霉素和链霉素,具有进一步开发的潜力。

表 3 琼脂扩散试验活性筛选<sup>a</sup>

Tab 3 Agar diffusion assays for antibacterial, antifungal and antialgal activities of 6 compounds<sup>a</sup>

No.	(d/mm)					
	Fungus			Bacteria		Alga
	<i>Microbotryum violaceum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Septoria tritici</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Chlorella fusca</i>
Compound 1	7.0	6.0	8.0	6.0	-	-
Compound 2	7.0	6.0	7.0	7.0	-	-
Compound 3	-	6.0	7.0	6.0	-	-
Compound 4	6.0	6.0	6.0	6.0	-	-
Compound 5	6.0	-	7.5	10.0	12.0	-
Compound 6	15.0	-	6.0	-	6.0	-
Penicillin	6.0	-	8.0	10.0	26.0	-
Streptomycin	7.5	-	6.0	-	13.0	-
Acetone	-	-	6.0	-	7.0	-

<sup>a</sup>: 0.05 mg of the test or control substances dissolved in acetone were applied to a filter disc and sprayed with the respective test organism;  
“-”: No activities in agar diffusion assays

[参考文献]

[1] 严小红,郭跃伟,朱兴族, Mollo E, Cimino G. 中国南海软珊瑚 *Scleronephthya* sp. 化学成分的研究[J]. 有机化学, 2004, 24: 1233-1238.  
 [2] 徐圆缘,李玲,易杨华,张文. 块花柳珊瑚化学成分的研究[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31: 421-424.  
 Xu Y Y, Li L, Yi Y H, Zhang W. Studies on chemical constituents of *Anthogoria* SP. [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31: 421-424.  
 [3] 孟丽媛,李秀保,张文,李玲,孙鹏,汤华. 短指软珊瑚中的生态活性物质[J]. 药学实践杂志, 2010, 28: 274-278.  
 [4] 姜北,赵勤实,彭丽艳,林中文,孙汉董. 雪茶化学成分研究[J]. 云南植物研究, 2002, 24: 525-530.  
 [5] 高锦明,董泽军,刘吉开. 蓝黄红菇的化学成分[J]. 云南植物研究, 2000, 22: 85-89.  
 [6] 马伟光,李兴从,王德祖,杨崇仁. 松橄榄中的麦角甾醇类过氧化物[J]. 云南植物研究, 1994, 16: 196-200.  
 [7] Efstathia I, Ayman F R, Maria Z, Dimitrios C, Xanthippi A,

Constantinos V, et al. 5 $\alpha$ , 8 $\alpha$ -Epidioxysterols from the gorgonian *Eunicella cavolini* and the ascidian *Trididemnum inarmatum*: Isolation and evaluation of their antiproliferative activity [J]. Steroids, 2009, 74: 73-80.  
 [8] Anna M, Vincenzo P, Donato S. New polyhydroxysterols from the dictyoceratid sponges *Hippospongia communis*, *Spongia officinalis*, *Ircinia variabilis*, and *Spongionella gracilis* [J]. J Nat Prod, 1989, 52: 952-961.  
 [9] 王超杰,苏镜娉,曾陇梅. 冠瘤海鞘 *Styela canopus* 的化学成份研究[J]. 中国海洋药物, 2000, 1: 1-3.  
 [10] 何细新,苏镜娉,曾陇梅,钟洪茂,赵迪. 辛氏短指软珊瑚的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 13: 14-15.  
 [11] Qi S H, Zhang S, Xiao Z H, Huang J S, Wu J, Li Q X. Study on the chemical constituents of the south china sea gorgonian *Juncella juncea* [J]. Chem Pharm Bull, 2004, 52: 1476-1478.  
 [12] Takano S, Ogasawara K. Glycerin derivatives: Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 60163834[P]. 1985-08-26.

[本文编辑] 尹茶