

· 论 著 ·

中国南海紫柳珊瑚中倍半萜成分的研究

刘桃芳, 汤 华, 巩 伟, 孙 鹏, 刘宝妹, 李 玲, 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 研究南海紫柳珊瑚 *Muriceopsis flavida* 的化学成分。方法 应用正相硅胶、Sephadex LH-20 凝胶、半制备 RP-HPLC 等多种色谱手段进行分离纯化, 根据化合物的理化性质及波谱数据对化合物结构进行鉴定。采用琼脂扩散试验方法对化合物进行体外抗微生物活性测试。结果 从南海紫柳珊瑚中分离得到 2 个愈创木烷内酯型倍半萜, 分别鉴定为 menverins C(1) 及 D(2)。体外活性测试表明这两个化合物有不同程度的抗微生物活性, 它们对巨大芽孢杆菌及微藻分别显示相当强的生长抑制作用。结论 化合物 1, 2 为首次从该属珊瑚中分离得到。Menverins C 及 D 所表现出来的抗微生物作用, 说明这些化合物在紫柳珊瑚的化学生态防御过程中可能具有重要的生态学功能。

[关键词] 紫柳珊瑚; 化学成分; 倍半萜; 结构鉴定

[中图分类号] R282.77 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)02-0100-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.02.006

Sesquiterpenes from the South China Sea gorgonian *Muriceopsis flavida*

LIU Tao-fang, TANG Hua, GONG Wei, SUN Peng, LIU Bao-shu, LI Ling, ZHANG Wen (Research Center for Marine Drugs, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To study the chemical constituents of the South China Sea gorgonian *Muriceopsis flavida*. **Methods** The compounds were isolated and purified by repeated column chromatographies including normal-phase silica gel, Sephadex LH-20 and semi-preparative RP-HPLC. The structures were elucidated by the physicochemical evidences and spectra data. The in vitro bioactivities of the compounds were assessed by an agar diffusion test. **Results** Two sesquiterpenes were isolated and indentified as menverins C (1) and D (2). The two compounds showed different levels of antimicrobial activity in bioassay in vitro. In particular, compounds 1 and 2 displayed considerable growth inhibition toward bacterium *Bacillus migaterium* and the alga *Chlorella fusca*, respectively. **Conclusions** This was the first report of menverins C (1) and D (2) from the genus *Muriceopsis*. The antimicrobial activity of both compounds suggested a possible ecological role of these metabolites in the chemical defensive strategy of the gorgonian.

[Key words] *Muriceopsis flavida*; chemical constituents; sesquiterpene; structure elucidation

柳珊瑚俗称海扇、海鞭或海柳, 系海洋无脊椎低等动物, 我国海洋中分布有 7 科, 78 种, 主要分布在福建、广东沿海及南海海域^[1]。国际上对柳珊瑚化学成分的研究始于 20 世纪 60 年代。1969 年, 美国学者 Weinheimer 等从柳珊瑚中发现了具有独特结构及生理活性的前列腺素前体^[2], 这一重要发现引起了天然产物化学家的广泛关注, 并直接导致了第一次海洋天然产物研究的热潮。到目前为止, 已从柳珊瑚中分离得到了众多结构新颖且具有良好生物学活性的化合物, 包括脂类、萜类、甾体类、生物碱、鲨

肝醇、核苷酸类等^[3-5]。

紫柳珊瑚 *Muriceopsis flavida* 俗称紫海柏, 属腔肠动物门 (Coelenterata) 珊瑚虫纲 (Anthozoa) 八放珊瑚亚纲 (Octocorallia) 柳珊瑚目 (Gorgonacea) 丛柳珊瑚科 (Plexauridae) 动物, 主要分布在太平洋东部及加勒比海海域。文献检索发现仅 1 篇对该种柳珊瑚化学成分的研究报道, 从中分离得到 5 个 4-甲基化甾醇^[6]。为开发利用我国的海洋生物资源, 研究海洋生物的生态活性物质、寻找具有生物活性及药用前景的海洋天然产物, 我们多年来一直对南海柳珊瑚的化学成分进行系统研究, 并发现了一系列结构各异的次级代谢产物^[7-11]。作为课题组对南海柳珊瑚化学成分系统研究的一部分, 本实验对南海紫柳珊瑚的化学成分进行了研究, 从中分离得到 5 个过氧化甾醇^[12]。对该珊瑚化学成分的进一步研究, 我们又从中分离得到两

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (30873200, 41076082)。上海市科委生物医药重点项目 (10431902400)。上海市浦江人才项目 (PJ2008)。

[作者简介] 刘桃芳 (1984-), 男, 硕士研究生。E-mail: liu5012004008@sian.com.cn。

[通讯作者] 张 文。Tel: (021) 81871257, E-mail: wenzhang1968@136.com。

个高度氧化的不饱和愈创木烷内酯型倍半萜(1, 2)^[13,14],其化合物的结构见图1。

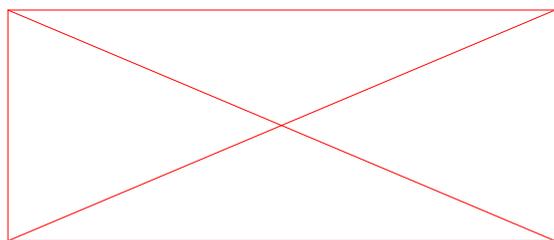


图1 化合物1,2的结构

1 材料和方法

1.1 样品 实验样品于2008年7月采自广西北海海域水下10 m处,立即冷冻备用。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ZS-17。

1.2 主要仪器和试剂 NMR(Bruker Avance-400); MAT-212 质谱仪;柱色谱硅胶(200~300目、400~600目)和TLC薄层板均由烟台黄务芝罘硅胶开发试验厂提供;Sephadex LH-20葡聚糖凝胶由Pharmacia公司提供;HPLC [Agilent 1100, RID检测器, Zorbax 300-C₁₈柱(250 mm×9.4 mm)],开放柱色谱所用试剂均为分析纯,HPLC所用试剂为色谱纯,均由中国医药集团上海化学试剂公司生产。

1.3 化合物的提取分离 将湿重1.4 kg的紫柳珊瑚样品切碎,用丙酮超声提取,每次2 L,提取6次至无色,合并提取液并减压浓缩至干,得丙酮粗提物10.2 g,将粗提物用1 L蒸馏水混悬,依次用等体积乙醚和正丁醇萃取4次,合并萃取液并减压浓缩至干,分别得乙醚层浸膏7.3 g及正丁醇层浸膏1.8 g。乙醚层浸膏(7.3 g)经硅胶柱色谱梯度洗脱(石油醚:乙酸乙酯99:1~100%乙酸乙酯),将其分成14个部分(Fr.1~Fr.14)。Fr.9(600 mg)再经过正相硅胶柱色谱(400~600目硅胶;正己烷:丙酮=6:1,4:1,3:1,2:1梯度洗脱)、Sephadex LH-20凝胶柱色谱(CHCl₃:MeOH=2:1)、RP-HPLC(C₁₈柱,流动相:92%甲醇-水;流速:1.5 ml/min;柱温:30℃)进一步纯化,收集保留时间为27 min时的流份,减压回收至干,得化合物1(5.0 mg),收集保留时间为31 min时的流份,减压回收至干,得化合物2(4.0 mg)。

2 结果

2.1 化合物的结构鉴定

2.1.1 化合物1的结构 无色油状,硫酸-香草醛显紫红色,ESI-MS(*m/z*)准分子离子峰为263.3([M+H]⁺),结合¹H-NMR、¹³C-NMR、DEPT推测其分子式为C₁₅H₁₈O₄。化合物1的波谱数据如下:¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) δ: 1.72(1H, ddd, *J*=1.6, 8.3, 13.2 Hz, H_α-2), 2.38(1H, ddd, *J*=3.0, 9.1, 13.2 Hz, H_β-2), 2.58(1H, m, H_α-3), 2.48(1H, m, H_β-3), 3.13(1H, brs, H-5), 2.71(1H, ddd, *J*=1.9, 12.2, 18.5 Hz, H_α-6), 2.91(1H, dd, *J*=3.9, 18.5 Hz, H_β-6), 5.65(1H, s, H-9), 1.93(3H, d, *J*=1.9 Hz, H-13), 5.05(1H, d, *J*=1.6 Hz, H_α-14), 4.89(1H, d, *J*=1.6 Hz, H_β-14), 1.55(3H, s, H-15)。¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ: 85.2(s, C-1), 34.2(t, C-2), 29.8(t, C-3), 154.2(s, C-4), 42.8(d, C-5), 26.4(t, C-6), 148.3(s, C-7), 149.2(s, C-8), 116.3(d, C-9), 73.5(s, C-10), 127.6(s, C-11), 169.9(s, C-12), 8.9(q, C-13), 107.1(t, C-14), 26.1(q, C-15)。结合文献^[13,14],确定化合物1的结构为menverin C。

2.1.2 化合物2的结构 无色油状,硫酸-香草醛显紫红色,ESI-MS(*m/z*)准分子离子峰为263.3([M+H]⁺),结合¹H-NMR、¹³C-NMR、DEPT推测其分子式为C₁₅H₁₈O₄。观察碳谱氢谱核磁数据可知化合物2与化合物1结构非常相似,对照文献^[13]可知化合物2是化合物1的异构体,区别仅在于两个化合物的C-1上的羟基构型不同,化合物2的结构命名为menverin D。其波谱数据为:¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) δ: 1.76(1H, ddd, *J*=1.6, 7.7, 13.3 Hz, H_α-2), 2.01(1H, ddd, *J*=7.7, 7.9, 13.3 Hz, H_β-2), 2.35(1H, dd, *J*=7.9, 15.2 Hz, H_α-3), 2.60(1H, m, H_β-3), 2.72(1H, brs, H-5), 2.86(1H, dd, *J*=4.5, 16.0 Hz, H_α-6), 3.11(1H, dd, *J*=7.1, 16.0 Hz, H_β-6), 5.85(1H, s, H-9), 1.92(3H, s, H-13), 5.02(1H, s, H_α-14), 4.86(1H, s, H_β-14), 1.62(3H, s, H-15)。¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ: 89.2(s, C-1), 35.0(t, C-2), 31.3(t, C-3), 153.9(s, C-4), 51.6(d, C-5), 27.6(t, C-6), 148.0(s, C-7), 150.7(s, C-8), 117.6(d, C-9), 75.3(s, C-10), 126.4(s, C-11), 170.3(s, C-12), 8.6(q, C-13), 105.9(t, C-14), 26.5(q, C-15)。结合文献^[13,14],确定化合物1的结构为menverin D。

2.2 体外活性测试 本实验采用琼脂扩散试验法,以青霉素、链霉素、酮康唑为阳性对照,丙酮为阴性

对照,测定了化合物 1,2 对革兰阳性菌(巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*),革兰阴性菌(大肠杆菌 *Escherichia coli*),两种真菌(壳针孢叶枯病菌 *Septoria tritici*、花药黑粉菌 *Microbotryum violaceum*),藻类(小球藻 *Chlorella fusca*)的抑制活性。按时观察结果,并测量抑菌圈大小(直径大小)。测量 3 次,取平均值。

结果显示,这些化合物对受试微生物的生长均显示不同程度的抑制活性,化合物 1 对巨大芽孢杆菌的抑制作用强于链霉素和酮康唑,化合物 2 对小球藻的抑制活性强于 3 个阳性对照药。测试结果见表 1。

表 1 琼脂扩散法抗菌、抗真菌及抗微藻活性筛选实验

化合物/ 药物	真菌		细菌		藻
	花药 黑粉菌	小麦 壳针孢	大肠 杆菌	巨大芽 孢杆菌	小球藻
化合物 1	1.3	1.7	1.7	1.9	1.3
化合物 2	1.4	1.2	1.7	1.3	1.5
青霉素	2.0	1.6	2.2	2.6	1.5
链霉素	1.8	1.2	1.8	1.2	1.3
酮康唑	3.0	3.0	1.8	1.7	1.1
丙酮	0	0	0	0	0

注:受试样品量为 0.5 μg,以抑菌圈直径为作用判定指标(单位:cm)。

3 讨论

柳珊瑚作为一种海洋无脊椎低等动物,自身缺乏有效的物理防御能力,却能分泌有效的化学防御物质,用于抵抗病原菌及其他生物侵扰,这些化学防御物质新颖复杂的化学结构及其表现出来的生物活性引起了化学、药理学及分子生物学领域的广泛关注。

开展对紫柳珊瑚的化学成分研究有利于我国海洋生物资源开发,从中寻找具有生物活性及药用前景的海洋天然产物。本研究从紫柳珊瑚中分离得到了 2 个高度不饱和的愈创木烷内酯型倍半萜 menverins C 及 D (1, 2),这种高度不饱和的愈创木烷内酯倍半萜之前只在类尖柳珊瑚科的 3 种动物中 *Menella verrucosa*, *Menella*, *Echinogorgia sassapo reticulate* 分离得到过^[13-15],这是首次从类尖柳珊瑚科之外的珊瑚中分离得到该类物质。

对化合物 1,2 的抗真菌、细菌和微藻的体外活性测试表明,这两个化合物对受试微生物均有一定程度的抗菌和抗藻活性,化合物 1 对巨大芽孢杆菌的抑制活性比阳性对照药链霉素和酮康唑的活性强,对小麦壳针孢叶枯病菌的抑制活性要比青霉素和链霉素强,化合物 2 对小球藻的抑制

活性要强于阳性对照药链霉素和酮康唑,与阳性对照药青霉素相当,因此,化合物 1 和 2 在抗微生物活性方面,具有进一步研究的价值。Menverins C 及 D 所表现出来的抗微生物作用,说明这些化合物在珊瑚的化学生态防御过程中可能具有重要的生态学功能。

【参考文献】

- [1] 黄宗国. 中国海洋生物种类与分布[M]. 北京:海洋出版社, 2008: 300.
- [2] 邱蕴绮, 漆淑华, 张 德. 柳珊瑚中甾醇类化合物及其生物活性研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(6): 985.
- [3] 张 文, 郭跃伟. 海洋生物柳珊瑚的化学成分及生物活性研究进展[J]. 中国天然药物, 2003, 1(2): 69.
- [4] Blunt JW, Copp BR, Hu WP, et al. Marine natural products [J]. Nat Prod Rep, 2011, 28(2): 196.
- [5] Zhang W, Guo YW, Gu YC. Secondary metabolites from the South China Sea invertebrates: chemistry and biological activity [J]. CurrMed Chem, 2006, 13 (17): 2041.
- [6] Kokke WCMC, Bihlin L, Fenical W, et al. Novel dinoflagellate 4 α -methylated sterols from four Caribbean gorgonians[J]. Phytochemistry, 1982, 21 (4): 881.
- [7] Zhang W, Guo YW, Mollo E, et al. Juncellonoids A and B, two new briarane diterpenoids from the Chinese gorgonian *Juncella fragilis* ridley[J]. Helv Chim Acta, 2004, 87(9): 2341.
- [8] Zhang W, Huang H, Ding Y, et al. Three new polyoxygenated steroids from the species of the South China Sea gorgonian *Muricella flexuosa* and *Menella verrucosa* brunclini[J]. Helv Chim Acta, 2006, 89(4): 813.
- [9] Zhang W, Guo YW, Mollo E, et al. Acanthogasteroids A-D, four new 19-hydroxylated steroids from the South China Sea gorgonian *Acanthogorgia vagae* aurivilliusi[J]. J Nat Prod, 2004, 67 (12): 2083.
- [10] Zhang W, Guo YW, Gavagnin M, et al. Suberoretisteroids A-E, five new uncommon polyoxygenated steroid 24-ketals from the Hainan gorgonian *Suberogorgia reticulata*[J]. Helv Chim Acta, 2005, 88 (1): 87.
- [11] 徐圆缘, 李 玲, 易杨华, 等. 块花柳珊瑚化学成分的研究 [J]. 第二军医大学学报, 2010, 31 (4): 421.
- [12] 刘桃芳, 汤 华, 李 玲, 等. 中国南海紫柳珊瑚中过氧化甾醇类化学成分的研究 [J]. 第二军医大学学报, 2011, 32 (5): 469.
- [13] Zhang W, Guo YW, Ernesto M, et al. Menverins A-D, new highly oxygenated guaiane lactones from Hainan gorgonian *Menella verrucosa*[J]. Helv Chim Acta, 2004, 87: 2919.
- [14] Li L, Wang CY, Mollo H, et al. Further highly oxygenated guaiane lactones from the South China Sea gorgonian *Menella* sp[J]. Helv Chim Acta, 2008, 91(1): 111.
- [15] 郭 奇, 魏玉西, 王长云, 等. 枝网刺柳珊瑚 *Echinogorgia sassapo reticulate* (Esper) 的化学成分研究 [J]. 中国海洋药物杂志, 2010, 29 (1): 32.

[收稿日期]2011-05-27

[修回日期]2012-01-01