

# 柳珊瑚 *Leptogorgia rigida* 中甾体类成分研究

肖细姬, 邓芸, 谢路凤, 张琪, 韦霞, 于鑫, 张翠仙

广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

**摘要:** 首次对南海柳珊瑚 *Leptogorgia rigida* 中甾体类次生代谢产物进行研究。采用硅胶柱柱层析、十八烷基硅烷键合硅胶填料、Sephadex LH-20、高效液相色谱(HPLC)及薄层色谱(TLC)等多种方法进行分离纯化, 通过核磁共振波谱(NMR)、质谱(MS)等现代波谱分析及物理常数对照等方法进行结构鉴定。从南海柳珊瑚 *Leptogorgia rigida* 次生代谢产物中分离得到 8 个甾体化合物, 结构依次为:  $3\beta$ ,  $6\beta$ , 11-trihydroxy-9, 11-seco-5 $\alpha$ -cholest-7-en-9-one (1);  $3\beta$ ,  $6\alpha$ , 11-trihydroxy-9, 11-seco-5 $\alpha$ -cholest-7-en-9-one (2);  $3\beta$ ,  $6\alpha$ , 11-trihydroxy-5 $\alpha$ -cholest-7, 22(*E*)-dien-9-one (3); pregnan-4-en-3, 20-dione (4); 5 $\alpha$ -pregnan-3, 20-dione (5);  $3\beta$ -hydroxy-pregnan-5-en-20-dione (6);  $3\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one (7); 和  $3\beta$ ,  $6\alpha$ , 11-trihydroxy-9, 11-seco-5 $\alpha$ -gorgosterol (8)。所有化合物均首次从 *Leptogorgia* 属中得到。

**关键词:** 南海柳珊瑚 *Leptogorgia rigida*; 甾体化合物; 断甾醇; 结构鉴定

中图分类号: O629.7; P735 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2019)04-0064-6

## Research on Sterols from *Leptogorgia rigida*

XIAO Xiji, DENG Yun, XIE Lufeng, ZHANG Qi, WEI Xia, YU Xin, ZHANG Cuixian

School of Pharmaceutical Science, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, 510006, China

**Abstract:** Research was carried out on novel secondary metabolites from *Leptogorgia rigida* collected from the South China Sea. The secondary metabolites were isolated by silica gel column chromatography, ODS, Sephadex LH-20, thin layer chromatography, and high performance liquid chromatography (HPLC). The structures of compounds were identified by nuclear magnetic resonance spectrum (NMR), mass spectrum (MS), and literature analysis. Eight sterols were obtained and elucidated as follows:  $3\beta$ ,  $6\beta$ , 11-trihydroxy-24-methyl-5 $\alpha$ -cholest-9, 11-seco-7-en-9-one (1);  $3\beta$ ,  $6\alpha$ , 11-trihydroxy-24-methyl-5 $\alpha$ -cholest-9, 11-seco-7-en-9-one (2);  $3\beta$ ,  $6\alpha$ , 11-tri-hydroxy-5 $\alpha$ -cholest-9, 11-seco-7, 22(*E*)-dien-9-one (3); pregnan-4-en-3, 20-dione (4); 5 $\alpha$ -pregnan-3, 20-dione (5);  $3\beta$ -hydroxy-pregnan-5-en-20-dione (6);  $3\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one (7); and Gorgosterol (8). All the sterols were first obtained from *Leptogorgia rigida*.

**Key words:** *Leptogorgia rigida*; secondary metabolites; secosterols; identification

海洋生物由于其高压、高盐、低温、寡营养、无光照等特殊的海洋生境, 使得其次生代谢产物与陆生物相比在化学结构类型上更丰富, 其药理活

性更多样, 因此引发化学、医药类学者的广泛关注 (Blunt et al, 2014-2018)。目前报道的柳珊瑚化学成分主要有三大类: 萜类、甾醇和生物碱, 且以二萜为

收稿日期: 2018-11-21; 修订日期: 2019-01-04。孙淑杰编辑

基金项目: 国家自然科学基金项目(81741160); 广东省科技计划(2015A020216017、2017A020217008); 广州中医药大学“薪火计划”重点项目(XH20170110); 海南大学南海海洋资源利用国家重点实验室开放课题(2016003); 广东省自然科学基金项目(2014A030313411)

作者简介: 肖细姬(1983—), 女, 助理实验师, 研究方向: 药效物质基础研究。E-Mail: xiaoxiji@gzucm.edu.cn

通信作者: 张翠仙(1975—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 天然药物化学。E-Mail: zhangcuixian@aliyun.com

Received date: 2018-11-21; Revised date: 2019-01-04. Editor: SUN Shujie

**Foundation item:** National Natural Science Foundation (81741160); Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2015A020216017, 2017A020217008); The Fire Plan Project of the Guangzhou University of Chinese Medicine (XH20170110); Open Subject of State Key Laboratory of Marine Resources Utilization in the South China Sea of Hainan University (2016003); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2014A030313411)

**Corresponding author:** ZHANG Cuixian. E-mail: zhangcuixian@aliyun.com

主(柴兴云 等, 2012; 高程海 等, 2013; Blunt et al, 2014-2018)。SciFinder 检索发现, 目前对 *Leptogorgia* 属柳珊瑚次生代谢产物的研究较少, 仅有 *L. setacea* (Ksebati et al, 1984)、*L. sarmentosa* (Cimino et al, 1984; Garrido et al, 2000; Boonananwong et al, 2008)、*L. virgulata* (Kingsley et al, 2001)、*L. alba* (Gutiérrez et al, 2005)、*L. rigida* (Gutiérrez et al, 2005)、*L. gilchristi* (Keyzers et al, 2006)、*L. laxa* (Ortega et al, 2008)、*L. punicea* (Moritz et al, 2014)和 *L. piccola* (Mirallès et al, 1995)等柳珊瑚的相关报道, 其化学成分主要涉及西松烷二萜类和甾体两大类。

本文首次对产自我国南海海域的 *L. rigida* 属柳珊瑚的次生代谢产物进行研究, 共分离得到 8 个甾体类化合物, 经过现代波谱分析(核磁、MS 等)及物理常数对照等方法确定其结构依次为:  $3\beta$ ,  $6\beta$ , 11-trihydroxy-9, 11-seco-5 $\alpha$ -cholest-7-en-9-one (1);  $3\beta$ ,  $6\alpha$ , 11-trihydroxy-9, 11-seco-5 $\alpha$ -cholest-7-en-9-one (2);  $3\beta$ ,  $6\alpha$ , 11-trihydroxy-9, 11-seco-5 $\alpha$ -cholest-7, 22 (*E*)-dien-9-one (3); pregnan-4-en-3, 20-dione (4); 5 $\alpha$ -pregnan-3, 20-dione (5);  $3\beta$ -hydroxy-pregnan-5-en-20-dione (6);  $3\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one (7); 柳珊瑚甾醇 (8)。所有化合物均首次从 *Leptogorgia* 属柳珊瑚中得到。

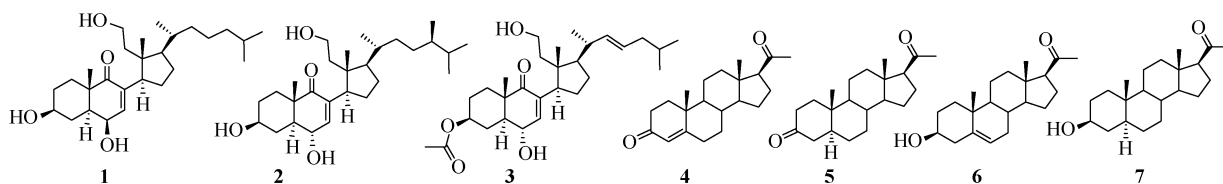


图 1 来源于柳珊瑚 *Leptogorgia rigida* 的断甾醇(1~3)和孕甾醇(4~7)

Fig. 1 Seco-steroids (1-3) and pregnanes (4-7) from *Leptogorgia rigida*

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

**仪器:** 超导核磁共振仪 AVANCE AV 400 MHz(瑞士 Bruker 公司)、Bruker AVANCE IIIT 600 MHz(瑞士 Bruker BioSpin 公司); 质谱仪 VG ZABHS(ESI, 美国 Finnigan 公司)、质谱仪 DSQ(EI, 美国 Thermo 公司); 超声波清洗机 KQ-500DB(巩义市予华仪器有限责任公司); 分析电子天平 ER-120A(日本 A&D 公司); 恒温水油浴锅 RE-2010(巩义市予华仪器有限责任公司); 高效液相色谱仪 QuikSep(北京慧德易科技有限责任公司); MCP200 数字式旋光仪(上海桑戈生物科技有限责任公司)。

**试剂及材料:** 石油醚、乙酸乙酯、氯仿、甲醇、乙醇、正丁醇(分析纯 AR, 天津市致远精细化工有限公司); ODS(60 $\mu$ m, 日本 YMC 公司)、葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20(60 $\mu$ m, 日本 YMC 公司); 柱层析硅胶(200~300 目)和硅胶 GF<sub>254</sub>(均为青岛海洋化工厂分厂)、HPLC 半制备色谱柱 Kromasil 100-5-C18 5 $\mu$ m, 10 $\times$ 250mm(瑞士 Kromasil 公司)。

### 1.2 样品来源

柳珊瑚 *Leptogorgia rigida* SYDLD-7 于 2004 年采自中国南海三亚附近海域, 经中国科学院南海海洋研究所李秀保博士对其进行种属鉴定, 确定其为 *Leptogorgia rigida*; 样品标本(编号: SYDLD-7)保存

于广州中医药大学中药学院海洋天然产物实验室。

### 1.3 提取分离

将柳珊瑚 *Leptogorgia rigida* (2.6kg, 干重)用工业酒精在室温下浸泡提取(10 L $\times$ 4 次/7 天), 将浸提液减压浓缩得到粗浸膏。用水将该浸膏捏溶, 并且依次用等体积的乙酸乙酯(EtOAc)和正丁醇(n-BuOH)先后萃取, 分别萃取至萃取液无色, 得到乙酸乙酯部位浸膏 48.5g 和正丁醇部位浸膏 150g。

取乙酸乙酯部位(48.5g)浸膏经正相硅胶(200~300 目, 500g; 柱子直径 $\phi$ =12cm, 柱长  $l$ =60cm)柱粗分, 以石油醚-乙酸乙酯体系(100%、15%、25%、35%、50%、65%、80%、0%)梯度依次洗脱, 经过 TLC 薄层追踪合并得到 10 个极性不同的组分(标号为 Fr1—Fr10)。Fr4(4.5g)硅胶柱色谱(200~300 目, 80g; 柱子 $\phi$ =3.0cm,  $l$ =60cm), 石油醚-乙酸乙酯体系洗脱(85%、80%、75%、70%), TLC 追踪合并, 得 Fr4-1—Fr4-9。Fr4-4(108 mg)乙酸乙酯重结晶得化合物 8(40mg)。Fr4-6(45mg)经 Pre-HPLC 纯化(Kromasil 色谱柱, 5 $\mu$ m, 10 $\times$ 250mm), 甲醇水体系( $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=8:2$ )等度洗脱, 依次得化合物 4 (4mg, 保留时间  $\tau_R=12.5\text{min}$ )、6 (3mg,  $\tau_R=14.3\text{min}$ )和 7 (8mg,  $\tau_R=15.5\text{min}$ )。Fr4-8(506mg)经开放 Sephadex LH-20 (40~60 $\mu$ m, 100g; 层析柱 $\phi$ =2cm,  $l$ =1.8m)柱层析, 氯仿甲醇( $V_{\text{氯仿}}:V_{\text{甲醇}}=1:1$ )等度洗脱, 得 3 个流份 Fr4-8-1—Fr4-8-3。Fr4-8-2(50mg)经 Pre-HPLC 纯化(Kromasil

色谱柱, 5 $\mu$ m, 10 $\times$ 250mm), 甲醇水体系(V<sub>甲醇</sub>:V<sub>水</sub>=65:35)等度洗脱, 依次得化合物 7 (5.5mg,  $\tau_R$ =12.5min)。Fr9(0.86mg)经开放的 ODS 柱层析(60 $\mu$ m, 100g; 层析柱 $\phi$ =2.5cm,  $l$ =65cm)等度甲醇水体系(V<sub>甲醇</sub>:V<sub>水</sub>=7:3)洗脱得 Fr9-1 和 Fr9-2。Fr9-2(38mg)经 Pre-HPLC 纯化(Kromasil 色谱柱, 5 $\mu$ m, 10 $\times$ 250mm), 甲醇水体系(V<sub>甲醇</sub>:V<sub>水</sub>=6:4)等度洗脱, 依次得化合物 1(8.0mg,  $\tau_R$ =13.5min)、2(2.0mg,  $\tau_R$ =13.0min)、3(2.0mg,  $\tau_R$ =14.5min)。

#### 1.4 物理常数和波谱数据

化合物 1: 白色固体, UV 254nm 下有暗斑。 $[\alpha]_D^{26}$ -10.00° ( $c$  0.04, MeOH), ESI-MS  $m/z$  435 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_H$  ppm 6.61 (s, 1H), 4.23 (d, 1H, 4.0 Hz), 3.76 (m, 1H), 3.63 (m, 1H), 3.50 (m, 1H), 3.29 (m, 1H), 1.91 (s, 2H), 1.17 (s, 3H), 1.04 (d, 3H, 4.0 Hz), 0.92 (d, 3H, 4.0 Hz), 0.90 (d, 3H, 4.0 Hz), 0.74 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_C$  ppm 206.2 (s), 149.3 (s), 137.4 (d), 70.8 (d), 69.7 (d), 59.2 (t), 51.6 (d), 49.9 (d), 49.8 (d), 47.2 (t), 46.1 (t), 43.6 (d), 42.2 (t), 40.6 (t), 36.5 (t), 36.0 (d), 33.7 (t), 33.2 (t), 31.3 (t), 29.1 (d), 28.0 (t), 27.1 (t), 25.6 (t), 23.1 (s), 22.9 (s), 19.4 (s), 17.6 (s), 16.5 (s)。

化合物 2: 白色固体, UV 254nm 下有暗斑。 $[\alpha]_D^{26}$ +20.00° ( $c$  0.02, MeOH), ESI-MS  $m/z$  449 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_H$  ppm 6.59 (d, 1H, 1.2Hz), 4.28 (t, 1H, 4.0Hz), 4.21 (dd, 1H, 4.0Hz), 3.84 (s, 1H), 3.42 (m, 1H), 3.19 (m, 1H), 1.90 (m, 2H), 1.16 (s, 3H), 1.05 (d, 3H, 1.2Hz), 1.04 (d, 3H, 4.0Hz), 1.04 (d, 3H, 4.0Hz), 1.03 (d, 3H, 4.0Hz), 0.72 (s, 3H)。

化合物 3: 白色固体, UV 254nm 下有暗斑。 $[\alpha]_D^{26}$ -40.00° ( $c$  0.02, MeOH), ESI-MS  $m/z$  470 [M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_H$  ppm 6.57 (d, 1H, 1.6Hz), 5.28~5.30 (m, 2H), 4.20 (m, 1H), 3.74 (m, 1H), 3.62(m, 1H), 3.42 (m, 1H), 3.19 (m, 1H), 1.89 (s, 2H), 1.14 (s, 3H), 1.07 (d, 3H, 4.0Hz), 0.95 (d, 3H, 4.0Hz), 0.88 (d, 3H, 4.0Hz), 0.72 (s, 3H)。

化合物 4: 白色固体, UV 254nm 下有暗斑, 香草醛浓硫酸加热显墨绿色。 $[\alpha]_D^{26}$ +13.33° ( $c$  0.03, MeOH), mp. 129~132 °C, EI MS  $m/z$  314 [M]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  ppm 5.74 (s, 1H), 2.53 (t, 1H, 4.0 Hz), 0.67 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 2.12 (s, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (100MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_C$  ppm 35.7 (t), 33.9 (t), 199.5 (s), 124.0 (d), 171.0 (s), 32.8 (t), 31.9 (t), 35.6 (d), 53.7 (d), 38.6 (s), 21.0 (t), 38.7 (t), 43.9 (s), 56.0 (d), 24.4 (t), 22.9 (t), 63.5 (d), 17.4 (q), 13.3 (q), 209.3 (s), 31.5 (s)。

化合物 5: 白色固体, mp. 200~203 °C, UV 254nm 下有暗斑, 香草醛浓硫酸显棕黄色。 $[\alpha]_D^{20}$ +84.35° ( $c$  0.147, CHCl<sub>3</sub>), EI MS 316 [M]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  ppm 3.53 (m, 1H), 2.53 (t,

1H, 4.0Hz), 0.64 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 2.12 (s,3H); <sup>13</sup>C NMR (100MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_C$  ppm 38.5 (t), 38.1 (t), 211.9 (s), 44.6 (t), 46.7 (d), 28.8 (t), 31.6 (t), 35.4 (d), 53.7 (d), 35.7 (s), 21.4 (t), 38.9 (t), 44.6 (s), 56.5 (d), 24.4 (t), 22.9 (t), 63.8 (d), 11.4 (q), 13.4 (q), 209.6 (s), 31.5 (q)。

化合物 6: 白色固体, UV 254nm 下有暗斑, 香草醛浓硫酸加热显墨绿色。 $[\alpha]_D^{26}$ +45.95° ( $c$  0.037, CHCl<sub>3</sub>), EI MS  $m/z$  316 [M]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  ppm 5.35 (t, 1H, 4.0Hz), 2.53 (t, 1H), 0.64 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 2.11 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_C$  ppm 38.9 (t), 31.6 (t), 71.7 (d), 37.3 (t), 140.8 (s), 121.4 (d), 31.8 (t), 31.9 (d), 54.2 (d), 36.5 (s), 21.2 (t), 38.8 (t), 44.0 (s), 56.9 (d), 24.5 (t), 22.8 (t), 63.7 (d), 19.4 (q), 13.2 (q), 209.5 (s), 31.6 (q)。

化合物 7: 白色固体, UV 254nm 下有暗斑, 香草醛浓硫酸加热显墨绿色。 $[\alpha]_D^{26}$ +12.00° ( $c$  0.05, MeOH), mp. 194~196 °C, EI MS  $m/z$  318 [M]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  ppm 3.59 (m, 1H), 2.52 (t, 1H, 4.0Hz), 0.60 (s, 3H), 0.81 (s, 3H), 2.11 (s,3H); <sup>13</sup>C NMR (100MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_C$  ppm 37.0 (t), 32.0 (t), 71.2 (d), 39.1 (t), 44.8 (d), 28.6 (t), 32.0 (t), 31.4 (d), 50.0 (d), 35.5 (s), 21.2 (t), 39.1 (t), 44.2 (s), 56.7 (d), 24.4 (t), 22.8 (t), 63.8 (d), 12.3 (q), 13.4 (q), 209.6 (s), 31.4 (q)。

化合物 8: 无色针状晶体, 香草醛浓硫酸加热显紫红色。mp. 179~180 °C,  $[\alpha]_D^{25}$ -45.00° ( $c$  1.0, C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>N)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_H$  ppm -0.13 (1H, dd, 4.0Hz, 4.0Hz), 0.17 (m, 1H), 0.23 (1H, dd, 8.0Hz, 8.0Hz), 0.45 (dd, 1H, 4.0Hz, 4.0Hz), 0.66 (s, 3H), 0.85 (d, 3H, 6.0Hz), 0.90 (s, 3H), 0.94 (d, 3H, 6.0Hz), 0.95 (d, 3H, H-21, 6.0Hz), 0.95 (d, 3H, 6.0Hz), 1.01 (s, 3H), 1.06 (m, 1H), 1.07 (m, 1H), 1.08 (m, 1H), 1.12 (m, 1H), 1.22 (m, 1H), 1.26 (m, 1H), 1.43 (m, 1H), 1.45 (m, 1H), 1.48 (m, 1H), 1.50 (m, 1H), 1.59 (s, 1H), 1.61 (m, 1H), 1.83 (m, 1H), 1.86 (m, 1H), 1.96 (m, 1H), 1.99 (m, 1H), 2.00 (m, 1H), 2.03 (m, 1H), 2.23 (m, 1H), 2.28 (m, 1H), 3.52 (m, 1H), 5.34 (br d, 4.0Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_C$  ppm 140.8 (s), 121.7 (d), 71.9 (d), 58.0 (d), 56.8 (d), 50.8 (d), 50.2 (d), 42.8 (s), 42.4 (t), 39.9 (t), 37.3 (t), 36.6 (s), 35.3 (d), 32.2 (d), 32.0 (d), 32.0 (t), 31.7 (t), 28.3 (t), 25.8 (s), 24.6 (t), 23.9 (t), 22.6 (t), 22.2 (t), 21.5 (t), 21.3 (t), 21.2 (q), 21.1 (q), 19.4 (q), 15.4 (q), 14.3 (q), 11.9 (q)。

## 2 结构鉴定

化合物 1: 白色固体, 紫外 254nm 下有暗斑。 $[\alpha]_D^{26}$ -10.00° ( $c$  0.04, MeOH)(Aiello et al, 2003), ESI-MS  $m/z$  435 [M+H]<sup>+</sup>, 分子量 434。结合 NMR(27 个碳: 4 个季碳, 8 个 CH, 10 个 CH<sub>2</sub>, 5 个 CH<sub>3</sub>), 确定

结构式为  $C_{27}H_{46}O_4$ , 不饱和度为 5。NMR 中给出了 1 个酮羰基信号( $\delta_C$  206.2, s)和一个三取代的双键氢信号( $\delta_H$  6.61, d, 1.2Hz, 1H 与  $\delta_C$  149.3, s, 137.4, d), 除此外无任何不饱和信息, 故而确定 **1** 含有 3 个环。NMR 的高场部分给出甾体典型 18 和 19 角甲基信息:  $\delta_H$  1.17 (s, 3H) 和 0.74 (s, 3H) 和 3 个与次甲基相连的甲基:  $\delta_H$  1.04 (d, 3H, 6.4Hz)、0.92 (d, 3H, 6.0Hz) 和 0.90 (d, 3H, 6.0Hz)。同时还连有两个连氧次甲基 [ $\delta_H$  3.63 (m, 1H)、3.50 (m, 1H) 和  $\delta_C$  69.7 (d)、70.8 (d)] 和一个羟甲基 [ $\delta_H$  3.50 (m, 1H) 和  $\delta_C$  59.2 (t)]。以上信息表明此 **1** 可能为断甾醇类化合物。将 **1** 的 NMR 数据与  $3\beta$ ,  $6\beta$ , 11-三羟基- $5\alpha$ -7-烯-9-酮-9, 11-断甾醇对比(Macnevin et al, 2009), 二者基本一致, 确定其结构为  $3\beta$ ,  $6\beta$ , 11-trihydroxy- $5\alpha$ -cholest-9, 11-seco-7-en-9-one

化合物 **2** 为白色固体, 紫外 254nm 下有暗斑。 $[\alpha]_D^{26}+20.00^\circ$  ( $c$  0.02, MeOH)(Liu et al, 2014), ESI-MS  $m/z$  449  $[M+H]^+$ , 分子量 448。与 **1** 相比, **2** 的  $^1H$  NMR 与其极其相似, 低场有相同的双键信息: 6.59 (d, 1H, 1.2Hz), 4.21 (dd, 1H, 4.0Hz)。不同的是高场有 6 个甲基信号:  $\delta_H$  1.16 (s, 3H), 1.05 (d, 3H, 1.2Hz), 1.04 (d, 3H, 1.2Hz), 1.04 (d, 3H, 4.0Hz), 1.03 (d, 3H, 4.0Hz) 和 0.72 (s, 3H)。比化合物 **1** 多了一个与次甲基相连的甲基。将 **2** 的 NMR 数据与  $3\beta$ ,  $6\alpha$ , 11-三羟基- $5\alpha$ -7-烯-9-酮-9, 11-断甾醇数据对照(Aiello et al, 2003), 二者基本一致, 故而确定 **2** 为  $3\beta$ ,  $6\alpha$ , 11-trihydroxy- $5\alpha$ -cholest-9, 11-seco-7-en-9-one

化合物 **3** 为白色固体, 紫外 254nm 下有暗斑。 $[\alpha]_D^{26}-40.00^\circ$  ( $c$  0.02, MeOH), ESI-MS  $m/z$  470  $[M+H]^+$ , 分子量 469。与 **1** 相比, 二者极为相似, 在  $\delta_H$  6.57 (d, 1H) 和 4.20 (m, 1H) 处有相似的双键氢信号, 可见其母核是同样的 6 位含羟基取代、7 位含双键、9 位含酮羰基的断甾醇。而  $\delta_H$  5.28~5.30 (m, 2H) 显示 **3** 还具有一个双键, 而  $\delta_H$  1.90 (s, 3H) 显示该化合物具有一个乙酰基。将 **3** 的  $^1H$ -NMR 数据与  $3\beta$ ,  $6\alpha$ , 11-三羟基-7, 22(*E*)-二烯-9-酮-9, 11 断甾醇对照(Aiello et al, 2003), 二者基本一致, 故而确定其结构为  $3\beta$ ,  $6\alpha$ , 11-trihydroxy-9, 11-seco- $5\alpha$ -cholest-7, 22(*E*)-dien-9-one

化合物 **4** 为白色固体, 紫外 254nm 下有暗斑, 香草醛浓硫酸加热显墨绿色。 $[\alpha]_D^{26}+13.33^\circ$  ( $c$  0.03, MeOH)(Pauli et al, 2010), EI MS 给出分子量 314( $m/z$  314  $[M]^+$ ), 结合  $^{13}C$  NMR (21 个碳: 5 个季碳, 5 个 CH, 8 个  $CH_2$  和 3 个  $CH_3$ ), 确定其分子式为  $C_{21}H_{30}O_2$ ,

不饱和度 7。NMR 给出 **4** 具有一个孤立的酮羰基( $\delta_C$  209.3, s)、一个共轭酮羰基( $\delta_C$  199.5, s)和一个三取代双键( $\delta_H$  5.74, s, 1H 与  $\delta_C$  171.0, s; 124.0, d), 除此外无任何不饱和度信息, 说明其含有 4 个环。同时 NMR 给出甾体类典型的 18, 19 角甲基信息 [ $\delta_H$  0.67 (s, 3H) 和 1.19 (s, 3H)]。暗示化合物 **4** 为孕甾烷类化合物。A 环中 4-, 5-位双键( $\delta_H$  5.74, s, 1H 与  $\delta_C$  171.0, s; 124.0, d) 由于其与酮羰基共轭, 故而向低场移动 23 ppm。NMR 中  $\delta_H$  6.01 (s, 1H) 和  $\delta_C$  130.0 (d)、147.2 (s) 为甾体  $3\beta$ -OH 和  $\Delta^{4,5}$  类型特征吸收(刘虹等, 2004)。将 **4** 的 NMR 数据与 4-烯-3, 20-二酮孕甾烷对照(温燕梅等, 2007; Qi et al, 2008; 柴兴云等, 2011), 二者基本一致, 故而鉴定 **4** 结构为 pregnan-4-en-3, 20-dione。

化合物 **5** 白色固体, 香草醛浓硫酸显棕黄色,  $[\alpha]_D^{20}+84.35^\circ$  ( $c$  0.147,  $CHCl_3$ ), mp. 200~203  $^\circ C$ 。EI MS  $m/z$  316  $[M]^+$ 。结合 NMR (21 个碳: 4 个季碳, 5 个 CH, 9 个  $CH_2$ , 3 个  $CH_3$ ) 确定其分子式为  $C_{21}H_{32}O_2$ , 不饱和度 6。NMR 给出了 2 个孤立酮羰基:  $\delta_C$  209.6 (s) 和 211.9 (s), 除此之外无任何不饱和信息, 故而确定该化合物具有 4 个环。同时 NMR 给出甾体类典型的 18 和 19 角甲基信息: ( $\delta_H$  0.64, s, 3H; 1.01, s, 3H)。暗示化合物 **5** 也为孕甾烷类化合物。将化合物 **5** 与 **4** 对比, 发现其极为相似。只是比 **4** 少了一个三取代双键信号 [ $\delta_H$  5.74 (s, 1H)  $\delta_C$  171.0 (s)、124.0 (d)], 同时其中一个酮羰基的化学位移值明显向高场移动了 12 ppm (**5**:  $\delta_C$  211.9, s; **4**:  $\delta_C$  199.5, s), 说明其为孤立酮羰基。将 **5** 的 NMR 数据与  $5\alpha$ -3, 20-二酮孕甾烷对照(Macnevin et al, 2009), 二者基本一致, 故而鉴定化合物 **5** 结构为  $5\alpha$ -pregnan-3, 20-dione。

化合物 **6** 亦为白色固体, 紫外 254 nm 下有暗斑, 香草醛浓硫酸加热显墨绿色。 $[\alpha]_D^{26}+45.95^\circ$  ( $c$  0.037,  $CHCl_3$ ), EI MS 给出分子量 316( $m/z$  316  $[M]^+$ ), 结合 NMR (21 个碳: 4 个季碳, 6 个 CH, 8 个  $CH_2$  和 3 个  $CH_3$ ), 确定其分子式为  $C_{21}H_{32}O_2$ , 不饱和度 6。将化合物 **6** 的 NMR 数据与 **4** 和 **5** 对照发现, 三者十分相似。与 **5** 对照只是多了一个三取代双键信息( $\delta_H$  5.35, t, 4.0, 1H;  $\delta_C$  121.4, d; 140.8, s)。而与 **4** 对比发现二者的差异在于少了一个共轭酮羰基信息( $\delta_C$  199.5, s), 同时双键的化学位移值有所变化(**4**:  $\delta_H$  5.74, s, 1H;  $\delta_C$  124.0, d; 171.0, s; **6**:  $\delta_H$  5.35, t, 4.0, 1H;  $\delta_C$  121.4, d; 140.8, s)。文献调研显示(Qi et al, 2008),  $3\beta$ -OH,  $\Delta^{5,6}$  类型的甾体类化合物的 NMR 数据为( $\delta_H$  5.35, s; 1H;  $\delta_C$  121.8, d; 140.7, s)。故确定 **6** 的双键应该为  $\Delta^{5,6}$  类

型。将 **6** 的 NMR 数据与 20-酮孕甾烷对照(温燕梅 等, 2007; Qi et al, 2008; 柴兴云 等, 2011), 二者基本一致, 故确定 **6** 为  $3\beta$ -pregnan-hydroxy-5-en-20-one。

化合物 **7** 白色固体, 紫外 254nm 下有暗斑, 香草醛浓硫酸加热显墨绿色。 $[\alpha]_D^{26} + 12.00^\circ$  ( $c$  0.05, MeOH)(Shingate et al. 2011), EI MS 给出分子量 318( $m/z$  318  $[M]^+$ ), 结合 NMR(21 个碳: 3 个季碳, 6 个  $CH$ , 9 个  $CH_2$  和 3 个  $CH_3$ )确定其分子式为  $C_{21}H_{34}O_2$ , 不饱和度 5。将化合物 **7** 的 NMR 数据与 **6** 对比, 发现二者相似。只是比 **6** 少了一个双键( $\delta_H$  5.35, t, 4.0, 1H;  $\delta_C$  121.4, d; 14.8, s), 多了一个连氧次甲基信息( $\delta_H$  3.59, m, 1H;  $\delta_C$  71.2, d)。将 **7** 的 NMR 数据与  $3\beta$ -羟基-5 $\alpha$ -20-酮孕甾烷对照(温燕梅 等, 2007; Qi et al, 2008; 柴兴云 等, 2011), 二者基本一致, 故而鉴定 **7** 为  $3\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one。

化合物 **8**: 无色针状晶体, mp. 179~180 $^\circ C$ ,  $[\alpha]_D^{25} - 45.00^\circ$  ( $c$  1.0,  $C_5H_5N$ )(Van Minh et al, 2007)。结合 NMR(3 个季碳, 10 个  $CH$ , 9 个  $CH_2$ , 7 个  $CH_3$ ), 确定分子式为  $C_{30}H_{50}O$ , 不饱和度 6。NMR 中给出双键信号( $\delta_H$  5.34, br d, 4.0 Hz, 1H 与  $\delta_C$  140.8, s; 121.7, d), 这是 5, 6 位双键的典型特征;  $^1H$ -NMR 高场数据中( $\delta_H$  0.13, 1H, dd, 4.0Hz, 4.0Hz; 0.17, m, 1H; 0.23, 1H, dd, 8.0Hz, 8.0Hz; 0.45, dd, 1H, 4.0Hz, 4.0Hz), 是环丙烷边链的信号峰。除此外并无其它任何不饱和信息, 由此确定该化合物具有 4 个环。且  $^1H$ -NMR 中给出 7 个甲基信号: 3 个连在季碳上的角甲基( $\delta_H$  0.66, s, 3H; 0.90, s, 3H; 1.01, s, 3H), 4 个与次甲基相连的甲基(0.85, d, 3H, 6.0 Hz; 0.94, d, 3H, 6.0Hz; 0.95, d, 3H, 6.0Hz; 0.95, d, 3H, 6.0Hz)。将 **8** NMR 数据与柳珊瑚甾醇对比(Ortega et al, 2008), 二者基本一致, 故确定 **8** 结构为柳珊瑚甾醇。

### 3 结果与讨论

所有化合物均首次从 *Leptogorgia* 属柳珊瑚中得到。此研究结果为南海 *Leptogorgia rigida* 的进一步开发提供了物质结构基础, 丰富了柳珊瑚的化学成分多样性。化合物 **1~3** 属于甾醇类化合物, 大多具有体外细胞毒活性(如 K562, HL-60, A549, HCT-116 和 HeLa)(Liu et al, 2014)。**2** 在  $3.00\mu g \cdot mL^{-1}$

条件下具有增加成骨细胞 MC3T3-E1 的生长、诊断碱性磷酸酶和矿化结节的活性(Van Minh et al, 2007)。构效关系研究发现(Liu et al, 2014), 此系列化合物在  $IC_{50}$  值为  $1.09 \sim 8.12\mu g \cdot mL^{-1}$  时, 对人体白血病 K562 细胞具有细胞毒活性; 3-位的羟基是其细胞毒活性的基础, 6-位、11-位的羟基乙酰化能使细胞毒活性增强。化合物 **4~7** 从化学结构讲均属于孕甾酮类, 为天然来源的孕甾酮类化合物。此类化合物具有抗污损和抗菌(对海洋来源的 15 株细菌菌株具有抑制其生长的作用)等生态和生物活性(Qi et al, 2008)。临床和临床前研究(Ortega et al, 2008)表明, 外伤性脑损伤在荷尔蒙孕酮类物质急性给药时, 能极大的减小其导致的脑水肿、炎症、组织坏死、编程性细胞死亡等不良后果, 然而其水溶性不佳成为限制其发挥治疗作用的障碍; 而天然得到的孕甾酮解决了其溶解性问题, 并在外伤性脑损伤(TBI)中发挥了重要的治疗作用。柳珊瑚甾醇生理活性实验(欧云付 等, 2011)表明其具有明显的抗心律失常和减慢心率等作用。尽管文献报道此类化合物具有抗肿瘤、抗菌和抗污活性, 但在浓度为  $50.00\mu g \cdot mL^{-1}$  时, 所有单体化合物在克服非小细胞肺癌肿瘤耐药(NCI-H1975/GR)方面未表现出任何活性。目前生物污染给全球海运业带来巨大经济损失, 大多海洋生物附着在轮船、舰艇水体表面(如藤壶, 贻贝, 管虫和海藻等)给海运业上造成严重生物污染问题(Aiello et al, 2003)。目前常见防污剂中三丁基锡(TBT)最有效但同时也具有高毒性, 非选择性地杀死海洋生物和伤害非目标生物。有研究表明(Li et al, 2013)海洋生物可以产生自身去污成分, 如从柳珊瑚分离的萜类、类固醇和聚酮等是一种极好的来源无毒防污化合物。初步构效关系研究表明呋喃环部分对防污活性都很重要, 同时羟基的存在增强了它们的抗沉降活性(Li et al, 2013)。许多海洋生物(如柳珊瑚, 软珊瑚, 海绵和海藻)能有效地抵御掠食者, 竞争者和潜在病原体(Moritz et al, 2014), 能抑制海洋细菌的生长和藤壶幼虫的沉降(Qi et al, 2008)。总之, 在这项研究中我们首次从柳珊瑚 *Leptogorgia rigida* 中分离鉴定具有一系列生物活性的化合物, 值得进一步探索无毒天然防污化合物。

### 参考文献 References

柴兴云, 胡静, 黄晖, 等, 2011. 小月柳珊瑚中孕甾烷类的化学成分研究[J]. 热带海洋学报, 30(1): 127-130. CHAI XINGYUN, HU JING, HUANG HUI, et al, 2011. Pregnane steroids from a gorgonian *Menella* sp. in South China Sea[J].

Journal of Tropical Oceanography, 30(1): 127-130 (in Chinese with English abstract).

柴兴云, 唐力英, 雷辉, 等, 2012. 柳珊瑚化学成分与生物活性研究新进展[J]. 中国中药杂志, 37(5): 667-685. CHAI

- XINGYUN, TANG LIYING, LEI HUI, et al, 2012. Most advance on chemical and biological investigations of gorgonian octocorals[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 37(5): 667–685 (in Chinese with English abstract).
- 高程海, 方燕, 易湘茜, 等, 2013. 中国柳珊瑚萜类化合物研究新进展[J]. 广西科学院学报, 29(2): 108–113. GAO CHENGHAI, FANG YAN, YI XIANGXI, et al, 2013. Advances in studies on terpenoids and their bioactivities from Gorgonian[J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 29(2): 108–113 (in Chinese with English abstract).
- 刘虹, 苏镜娉, 曾陇梅, 2004. 豆英软珊瑚 *Lobophyton* sp. 中的次生代谢产物研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 43(1): 122–124. LIU HONG, SU JINGYU, ZENG LONGMEI, 2004. Studies on the secondary metabolites of the soft coral *Lobophyton* sp.[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 43(1): 122–124 (in Chinese with English abstract).
- 欧云付, 尹平河, 徐石海, 等, 2011. 南海圆形短指软珊瑚 *Simularia Brassica* 的化学成分[J]. 光谱实验室, 28(6): 3293–3297. OU YUNFU, YIN PINGHE, XU SHIHAI, et al, 2011. Chemical constituents in round short refers to soft coral *Simularia brassica* from South China Sea[J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 28(6): 3293–3297 (in Chinese with English abstract).
- 温燕梅, 漆淑华, 张偲, 2007. 南海脆灯蕊柳珊瑚化学成分的研究[J]. 热带海洋学报, 26(1): 73–77. WEN YANMEI, QI SHUHUA, ZHANG SI, 2007. Studies on chemical constituents of gorgonian *Junceella fragilis* from South China Sea[J]. Journal of Tropical Oceanography, 26(1): 73–77 (in Chinese with English abstract).
- AIELLO A, ESPOSITO G, FATTORUSSO E, et al, 2003. Aplidiasterols A and B, two new cytotoxic 9,11-secoesters from the mediterranean ascidian *Aplidium conicum*[J]. Steroids, 68(9): 719–723.
- BLUNT J W, COPP B R, KEYZERS R A, et al, 2014–2018. Marine natural products[J]. Natural Product Reports, 31(2): 160–258, 32(2): 116–211, 33(3): 382–431, 34(3): 235–294, 35(1): 8–53.
- BOONANANWONG S, KONGKATHIP B, KONGKATHIP N, 2008. First synthesis of 3,16,20-polyoxygenated cholestanes, new cytotoxic steroids from the gorgonian *Leptogorgia sarmentosa*[J]. Steroids, 73(11): 1123–1127.
- CIMINO G, DE ROSA S, DE STEFANO S, et al, 1984. C-18 Hydroxy steroids from the Mediterranean gorgonian *Leptogorgia sarmentosa*[J]. Experientia, 40(3): 246–248.
- GARRIDO L, ZUBÍA E, ORTEGA M J, et al, 2000. Isolation and structure elucidation of new cytotoxic steroids from the gorgonian *Leptogorgia sarmentosa*[J]. Steroids, 65(2): 85–88.
- GUTIÉRREZ M, CAPSON T L, GUZMÁN H M, et al, 2005. Leptolide, a new furanocembranolide diterpene from *Leptogorgia alba*[J]. Journal of Natural Products, 68(4): 614–616.
- KEYZERS R A, GRAY C A, SCHLEYER M H, et al, 2006. Malonganenones A-C, novel tetraprenylated alkaloids from the Mozambique gorgonian *Leptogorgia gilchristi*[J]. Tetrahedron, 62(10): 2200–2206.
- KINGSLEY R J, CORCORAN M L, KRIDER K L, et al, 2001. Thyroxine and vitamin D in the gorgonian *Leptogorgia virgulata*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 129(4): 897–907.
- KSEBATI M B, CIERESZKO L S, SCHMITZ F J. 1984. 11 $\beta$ , 12 $\beta$ -Epoxypukalide, a furanocembranolide from the gorgonian *Leptogorgia setacea*[J]. Journal of Natural Products, 47(6): 1009–1012.
- LI YONGXIN, WU HUIXIAN, XU YING, et al, 2013. Antifouling activity of secondary metabolites isolated from Chinese marine organisms[J]. Marine Biotechnology, 15(5): 552–558.
- LIU MIN, SHAO CHANGLUN, CHEN MIN, et al, 2014. Bioactive 9,11-secoesters from gorgonian *Subergorgia suberosa* collected from the South China Sea[J]. Chemistry & Biodiversity, 11(7): 1109–1120.
- MACNEVIN C J, ATIF F, SAYEED I, et al, 2009. Development and screening of water-soluble analogues of progesterone and allopregnanolone in models of brain injury [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 52(19): 6012–6023.
- MIRALLÈS J, BARNATHAN G, GALONNIER R, et al, 1995. New branched-chain fatty acids from the Senegalese gorgonian *Leptogorgia piccola* (white and yellow morphs)[J]. Lipids, 30(5): 459–466.
- MORITZ M I G, MAROSTICA L L, BIANCO É M, et al, 2014. Polyoxygenated steroids from the octocoral *Leptogorgia punicea* and *in vitro* evaluation of their cytotoxic activity[J]. Marine Drugs, 12(12): 5864–5880.
- ORTEGA M J, ZUBÍA E, SÁNCHEZ M C, et al, 2008. Cembrane diterpenes from the gorgonian *Leptogorgia laxa*[J]. Journal of Natural Products, 71(9): 1637–1639.
- PAULI G F, FRIESEN J B, GÖDECKE T, et al, 2010. Occurrence of progesterone and related animal steroids in two higher plants[J]. Journal of Natural Products, 73(3): 338–345.
- QI S H, ZHANG S, YANG L H, et al, 2008. Antifouling and antibacterial compounds from the gorgonians *Subergorgia suberosa* and *Scripearia gracillis*[J]. Natural Product Research, 22(2): 154–166.
- SHINGATE B B, HAZRA B G, SALUNKE D B, et al, 2011. Stereoselective synthesis and antimicrobial activity of steroidal C-20 tertiary alcohols with thiazole/pyridine side chain[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 46(9): 3681–3689.
- VAN MINH C, CUONG N X, TUAN T A, et al, 2007. A new 9,11-secoesterol from the Vietnamese sea soft coral, *Sarcophyton mililatensis*, increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells[J]. Natural Product Communications, 2(11): 1095–1100.