

黑乳海参中两个新的三萜皂苷

巫 军^{1,2}, 易杨华^{1*}, 邹峥嵘³, 吴厚铭⁴, 汤海峰¹

(1. 第二军医大学药学院 海洋药物研究中心, 上海 200433; 2. 宁波医药技术研究所, 浙江 宁波 315201; 3. 江西师范大学 生命科学院, 江西 南昌 330022; 4. 中国科学院上海有机化学研究所 生命有机化学国家重点实验室, 上海 200032)

摘要:目的 从黑乳海参中分离活性皂苷类成分。方法 从黑乳海参体内得到的总皂苷溶于吡啶-二氧六环(1:1)的混合液中, 120℃加热2.5 h, 应用多种色谱技术对回流产物进行分离纯化, 分离得到2个三萜皂苷类化合物。结果 应用现代光谱技术(尤其是2D-NMR和ESI-MS技术)和化学方法鉴定其结构: 3-O-[3"-O-甲基-β-D-吡喃葡萄糖(1→3)-β-D-吡喃奎诺糖(1→4)-β-D-吡喃奎诺糖(1→2)-β-D-吡喃木糖]-海参烷-9-烯-3β, 12α, 17α, 25β-四醇(I), 命名为黑乳海参皂苷1a; 3-O-[3"-O-甲基-β-D-吡喃葡萄糖(1→3)-β-D-吡喃葡萄糖(1→4)-β-D-吡喃奎诺糖(1→2)-β-D-吡喃木糖]-海参烷-22, 25-环氧-9-烯-3β, 12α, 17α-三醇(II), 命名为黑乳海参皂苷2a。结论 2个化合物均为新化合物。

关键词: 黑乳海参; 三萜皂苷; 黑乳海参皂苷1a; 黑乳海参皂苷2a

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)04-0497-04

Two new triterpene glycosides from sea cucumber *Holothuria nobilis*WU Jun^{1,2}, YI Yang-hua¹, ZOU Zheng-rong³, WU Hou-ming⁴, TANG Hai-feng¹

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

2. Ningbo Medical Research Institute, Ningbo 315201, China; 3. School of Life Sciences, Jiangxi Normal University,

Nanchang 330022, China; 4. State Key Laboratory of Bioorganic and Natural Products Chemistry, Shanghai

Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: **Objective** Triterpene glycosides were expected to be isolated from the sea cucumber *Holothuria nobilis*. **Methods** The crude saponins of sea cucumber were desulfated with pyridine-dioxane (1:1), the desulfated products were separated by multi-chromatography to afford two compounds. **Results** On the basis of chemical methods and spectral evidences, especially 2D NMR and ESI-MS technologies, these two compounds were identified as 3-O-[3"-O-methyl-β-D-glucopyranosyl (1→3)-β-D-quinovopyranosyl (1→4)-β-D-quinovopyranosyl (1→2)-β-D-xylopyranosyl]-holosta-9-ene-3β, 12α, 17α, 25β-tetraol (I), named as nobiliside 1a; 3-O-[3"-O-methyl-β-D-glucopyranosyl (1→3)-β-D-xylopyranosyl (1→4)-β-D-quinovopyranosyl (1→2)-4'-O-sulfate-β-D-xylopyranosyl]-holosta-22, 25-epoxy-9-ene-3β, 12α, 17α, 25β-triol (II), named as nobiliside 2a. **Conclusion** Two compounds are new triterpene glycosides.

Key words: *Holothuria nobilis* Selenka; triterpene glycosides; nobiliside 1a; nobiliside 2a

黑乳海参 *Holothuria nobilis* Selenka 属棘皮动物门(Echinodermata)海参纲(Holothuroidea)楯手目(Aspidochirota)海参科(Holothuriidae)动物。体形较大,一般长为300 mm,宽约60 mm。体宽而厚,两端钝圆。口小,偏于腹面,具触手20个。肛门稍偏于背面,周围有5个钙化疣,各疣周围有一圈小疣。背面有分散的小疣足,两侧各有几个大的乳房状突起。

该物种在我国从福建东山到海南岛的海域均有广泛分布;东非、马尔代夫群岛、印度尼西亚、日本琉球群岛和澳大利亚北部海域也有分布。资源丰富,有可能作为药物开发的有效资源^[1]。有研究机构对该种海参体内多糖和糖蛋白的分离纯化、化学特征和药理活性进行了研究,但有关该种海参体内小分子化学成分的研究较少报道。本课题组采用稻瘟霉模型生物活性和

收稿日期:2005-08-10

基金项目:上海科技发展攻关项目(02DZ19101)

作者简介:巫 军,男,博士研究生,主管药师。Tel:(0574)86695983 Fax:(0574)86694308 E-mail:wu919067@126.com

* 通讯作者 易杨华

体外细胞毒活性追踪方法,对其体内的三萜皂苷类成分进行了系统研究^[2]。本研究报道从黑乳海参中得到的 2 个新的三萜皂苷类化合物。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂:XT5 显微熔点仪(温度未校正),北京市科仪电光仪器厂;Bruker Vector 22 型红外光谱仪;Varian Inova-400 核磁共振仪;Quattro 质谱仪,Micromass 公司;Sephadex LH-20 为 Pharmacia 公司产品;色谱用硅胶和 HSGF₂₅₄ 硅胶预制板,烟台芝罘黄务硅胶开发试验厂;HPLC:Agilent 1100 Series, RID 检测器 Agilent 公司;反相柱为 Zorbax 300 SB-C18, 250 mm × 9.4 mm Zorbax 公司;洗脱剂为色谱纯甲醇;其余试剂均为分析纯。

1.2 实验材料:黑乳海参于 2003 年 5 月采自福建东山,经厦门国家海洋三所易瑞灶研究员鉴定,标本现存放于第二军医大学药学院海洋药物研究中心,样品编号 HYSC 2003-02。

1.3 提取和分离:新鲜黑乳海参材料洗净、切碎后,用 85% 乙醇冷浸提取,回收乙醇得流浸膏。将流浸膏均匀分散在水中,用二氯甲烷萃取,待二氯甲烷萃取液颜色变得极浅后,再用正丁醇萃取。回收正丁醇即可得到黑乳海参粗皂苷。取粗皂苷 60 mg,溶于 120 mL 由吡啶-二氧六环等体积混合的溶剂中,120 °C 加热 2.5 h。反应物冷却后,回收溶剂,所得浸膏用硅胶低压柱色谱处理,氯仿-甲醇-水(7.5:2.5:1,下层)洗脱,得到的主成分再进行高效液相色谱纯化,色谱柱为 Zorbax SB C-18 型 ODS 反相柱,洗脱剂为 80% 甲醇,体积流量为 1.5 mL/min,得到 2 个化合物,应用现代光谱技术和化学方法鉴定以上 2 个化合物的结构。

2 结构鉴定

这两个化合物均为新的三萜皂苷类化合物,分别命名为:黑乳海参皂苷 1a 和黑乳海参皂苷 2a。结构式见图 1。

化合物 I: C₅₄H₈₈O₂₃, 无色结晶性粉末, mp 206~207 °C (MeOH-H₂O), $[\alpha]_D^{20}$ -25.6° (c=0.2, MeOH), Liebermann-Burchard 反应呈阳性。由电喷雾-正离子质谱 ESI-MS⁺ 提供的准分子离子峰 m/z 1127 [M+Na]⁺ 和电喷雾-负离子质谱 ESI-MS⁻ 提供的准分子离子峰 m/z 1103 [M-H]⁻, 推测化合物 I 的相对分子质量为 1104。结合 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 谱, 确定该化合物的分子式 C₅₄H₈₈O₂₃。

根据化合物 I 的 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 和 HMQC 谱, 对化合物各个碳原子及其所连接的质子的化学

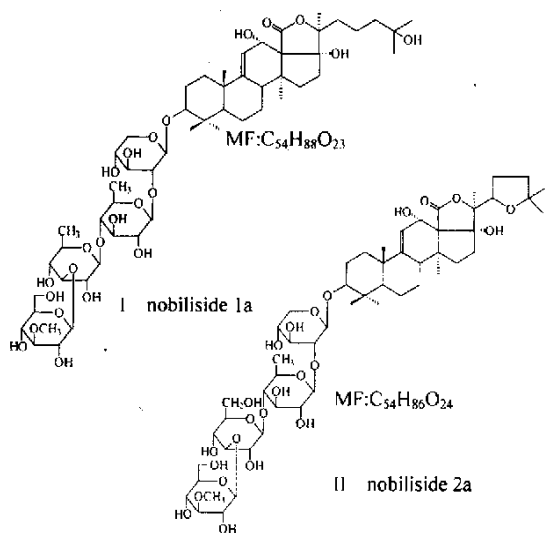


图 1 化合物 I 和 II 的化学结构

Fig. 1 Structures of compounds 1 and 2

位移进行归属(表 1)。结果表明:化合物 I 为三萜皂苷类成分,与化合物黑乳海参皂苷 A 的结构极为相似^[2],只是组成皂苷糖链的个别单糖化学位移值有明显不同。化合物 I 中与苷元直接相加的木糖 C-4' (76.4, 69.9) 化学位移向高场移动 δ 6.5, 而 C-3' (75.7, 77.9) 和 C-5' (62.3, 64.4) 分别向低场移动 δ 2.2 和 δ 2.1。比较黑乳海参皂苷 A 和化合物 I 的 ESI-MS 数据发现,化合物 I 的相对分子质量为 1104, 比黑乳海参皂苷 A 少 102。综合以上数据推测, I 为黑乳海参皂苷 A 的脱硫衍生物。

将化合物 I 用三氟乙酸水解后,衍生得到糖脂乙酸酯衍生物,采用 GC-MS 分析,经与标准糖的糖脂乙酸酯衍生物对照,表明化合物 I 中存在 D-木糖, D-奎诺糖, 3-甲氧基-D-葡萄糖, 比例为 1:2:1。

ESI-MS 中的碎片离子峰 m/z 1103 [M-H]⁻, 927 [M-H-3-OMe-glc]⁻, 781 [M-H-3-OMe-glc-qui]⁻, 635 [M-H-3-OMe-glc-qui-qui]⁻, 493 [M-H-3-OMe-glc-xyl-qui-xyl]⁻, 进一步表明化合物 I 中糖链的组成,同时也证实了其单糖连接顺序与化合物黑乳海参皂苷 A 完全一致。

综上所述, I 的结构为 3-O-[3''-O-甲基- β -D-吡喃葡萄糖(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-吡喃奎诺糖(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-吡喃奎诺糖(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃木糖]-海参甾-9-烯-3 β , 12 α , 17 α , 25 β -四醇, 现有资料表明化合物 I 尚未有公开报道,为一新化合物,命名为黑乳海参皂苷 1a。

化合物 II: C₅₄H₈₈O₂₄, 无色结晶性粉末, mp 194~195 °C (MeOH-H₂O), $[\alpha]_D^{20}$ 22.1° (c=0.2,

表 1 黑乳海参皂苷 1a 的苷元和糖部分的¹³C-NMR和¹H-NMR的化学位移Table 1 ¹³C-NMR and ¹H-NMR Chemical shifts for aglycon and sugar moieties of nobiliside 1a

碳位	δ_c	$\delta_H(m, J \text{ in Hz})$	糖	位置	δ_c	$\delta_H(m, J \text{ in Hz})$
1	36.4	1.34 (1H, m, α), 1.76 (1H, m, β)	Xyl	1	105.5	4.67 (1H, d, 7.6)
2	27.1	1.80 (1H, m, α), 2.13 (1H, dd, 3.6, 13.2, β)		2	84.2	3.96 (1H, m)
3	88.7	3.13 (1H, dd, 3.6, 11.6, α)		3	77.9	4.21 (1H, m)
				4	69.9	4.89 (1H, m)
4	39.7		Qui	5	62.3	3.72 (1H, m, α), 4.32 (1H, m, β)
5	52.8	0.98 (1H, m, α)		1	105.6	5.03 (1H, d, 7.2)
6	27.9	1.72 (1H, m, α), 1.46 (1H, m, β)		2	75.0	3.95 (1H, m)
7	21.2	1.50 (1H, m, α), 1.74 (1H, m, β)		3	76.4	4.00 (1H, m)
8	40.9	3.28 (1H, m, β)	Qui	4	87.4	3.56 (1H, m)
9	154.1			5	70.7	3.86 (1H, m)
10	40.1			6	18.2	1.63 (3H, s)
11	115.5	5.52 (1H, d, 4.8, β)		1	104.9	4.82 (1H, d, 7.2)
12	71.6	4.88 (1H, d, 4.8, β)	3-OMeGlc	2	73.7	3.98 (1H, m)
13	58.6			3	76.0	4.02 (1H, m)
14	46.4			4	87.9	4.21 (1H, m)
15	38.8	1.78 (1H, m, α), 1.39 (1H, m, β)		5	70.8	4.04 (1H, m)
16	35.8	2.20 (1H, m, α), 2.58 (1H, dd, 9.6, 14.4, β)	OCH ₃	6	20.0	1.65 (3H, s)
17	89.3			1	105.6	5.10 (1H, d, 7.6)
18	174.6			2	78.1	3.92 (1H, m)
19	22.5	1.36 (3H, s)		3	88.0	3.60 (1H, m)
20	87.1			4	71.4	4.09 (1H, m)
21	18.2	1.66 (3H, s)		5	78.2	3.93 (1H, m)
22	36.6	1.70		6	66.6	3.52 (1H, m, α), 4.18 (1H, m, β)
23	28.0	2.03			60.6	3.83 (3H, s)
24	38.8	1.62				
25	81.4					
26	22.5	0.78 (3H, s)				
27	22.2	0.76 (3H, s)				
30	16.7	1.04 (3H, s)				
31	28.1	1.23 (3H, s)				
32	20.0	1.57 (3H, s)				

MeOH), Liebermann-Burchard 反应呈阳性。由电喷雾-正离子质谱 ESI-MS⁺ 提供的准分子离子峰 m/z 1141 [M+Na]⁺ 和电喷雾-负离子质谱 ESI-MS⁻ 提供的准分子离子峰 m/z 1117 [M-H]⁻, 推测化合物 I 的相对分子质量为 1118。结合 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 谱, 确定该化合物的分子式 C₅₄H₈₆O₂₄。

根据化合物 I 的 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 和 HMQC 谱, 对化合物各个碳原子及其所连接的质子的化学位移进行归属(见表 2)。结果表明: 化合物 I 为三萜皂苷类成分, 与化合物海参素 A (holothurin A) 的结构极为相似^[2], 只是组成皂苷糖链的单糖化学位移有明显不同。化合物 I 中与苷元直接相连的木糖 C-4' (75.7, 70.7) 化学位移各高场移动 δ 5.0, 而 C-

3' (75.5, 78.1) 和 C-5' (64.3, 66.7) 分别向低场移动 δ 2.6 和 δ 2.4。比较海参素 A 和化合物 I 的 ESI-MS 数据发现, 化合物 I 的相对分子质量为 1118, 比化合物海参素 A 少 102, 这是由于海参素 A 失去硫酸酯基引起的。

将化合物 I 用三氟乙酸水解后, 衍生得到糖腈乙酸酯衍生物, 采用 GC-MS 分析, 经与标准糖的糖腈乙酸酯衍生物对照, 表明化合物 I 中存在 D-木糖, D-奎诺糖, D-葡萄糖, 3-甲氧基-D-葡萄糖, 比例为 1:1:1:1。

ESI-MS⁻ 中的碎片离子峰 m/z 1117 [M-H]⁻, 941 [M-H-3-OMe-glc]⁻, 781 [M-H-3-OMe-glc-glc]⁻, 635 [M-H-3-OMe-glc-glc-qui]⁻, 493 [M-H-3-OMe-glc-

表 2 黑乳海参皂苷 2a 的苷元和糖部分的¹³C-NMR和¹H-NMR的化学位移Table 2 ¹³C-NMR and ¹H-NMR Chemical shifts for aglycon and sugar moieties of nobilisde 2a

碳位	δ _c	δ _H (m, J in Hz)	糖	位置	δ _c	δ _H (m, J in Hz)
1	36.5	1.38 (1H, m, α), 1.85 (1H, m, β)	Xyl	1	104.9	4.67 (1H, d, 7.6)
2	27.2	1.92 (1H, m, α), 2.10 (1H, m, β)		2	84.2	4.04 (1H, m)
3	88.8	3.15 (1H, dd, 4.0, 11.6, α)		3	78.1	4.26 (1H, m)
4	40.1			4	70.7	4.00 (1H, m)
5	52.8		Qui	5	66.7	3.65 (1H, m, α), 4.22 (1H, m, β)
6	28.3	1.68 (1H, m, α), 1.46 (1H, m, β)		1	105.5	5.02 (1H, d, 7.6)
7	21.2	1.44 (1H, m, α), 1.70 (1H, m, β)		2	76.4	3.95 (1H, m)
8	41.0	3.27 (1H, d, 11.6, β)	Glc	3	73.7	4.02 (1H, m)
9	153.9			4	86.6	3.62 (1H, m)
10	39.8			5	71.7	3.70 (1H, m)
11	115.5	5.54 (1H, d, 4.4, β)		6	18.2	1.62 (3H, d, 6.0)
12	71.7	4.86 (1H, d, 4.8, β)		1	105.6	4.82 (1H, d, 7.6)
13	58.9			2	76.0	4.10 (1H, m)
14	45.9			3	88.2	4.24 (1H, m)
15	36.8	1.86 (1H, m, α), 1.44 (1H, m, β)	3-OMeGlc	4	69.9	4.08 (1H, m)
16	35.6	2.30 (1H, dd, 6.8, 8.4, α), 2.88 (1H, dd, 8.8, 14.4, β)		5	77.9	4.00 (1H, m)
17	89.7			6	62.3	4.50 (1H, m)
18	174.4					4.34 (1H, m)
19	22.5	1.30 (3H, s)		1	105.6	5.10 (1H, d, 7.6)
20	87.4			2	75.0	4.04 (1H, m)
21	22.5	1.65 (3H, s)		3	88.0	3.68 (1H, m)
22	80.7	4.22		4	70.8	4.11 (1H, m)
23	28.1	1.43		5	78.3	3.94 (1H, m)
24	38.4	1.56		6	62.3	4.24 (1H, m, α), 4.45 (1H, m, β)
25	81.3			OCH ₃	60.6	3.74 (3H, s)
26	28.6	1.10 (3H, s)				
27	27.4	1.08 (3H, s)				
30	16.7	1.04 (3H, s)				
31	28.0	1.22 (3H, s)				
32	20.3	1.57 (3H, s)				

xyl-qui-xyl]⁻,进一步表明化合物Ⅱ中糖链的组成,同时也证实了其单糖连接顺序与化合物海参素A的顺序是完全一致的。

综上所述,化合物Ⅱ的结构为 3-O-[3"-O-甲基-β-D-吡喃葡萄糖(1→3)-β-D-吡喃葡萄糖(1→4)-β-D-吡喃奎诺糖(1→2)-β-D-吡喃木糖]-海参烷-22,25-环氧-9-烯-3β,12α,17α-三醇。现有资料表明化合物Ⅱ尚未有公开报道,为一新化合物,命名为黑乳海参皂苷 2a。

3 讨论

对黑乳海参活性皂苷类成分的研究结果表明,黑乳海参体内的抗肿瘤活性成分主要为三萜皂苷,

作为海参体内主要的有毒物质和化学防御物质,其具有较强的抗肿瘤和抗真菌活性,是一类很有前景的抗肿瘤药物的先导化合物,对其进行深入的构效关系研究,将有助于抗肿瘤新药的研究与开发。本研究报道的两个化合物均为新化合物,有可能作为抗肿瘤药物的先导化合物。

References:

- [1] Liao Y L. *Fauna sinica, Echinodermata, Holothurioidae* (中国动物志,棘皮动物门,海参纲) [M]. Beijing: Science Press, 1997.
- [2] Kitagawa I, Nishino T, Kobayashi M, et al. Marine natural products. VI. Bioactive triterpene-oligoglycosides from the sea cucumber *Holothuria leucospilota* Brandt (1) Structure of holothurin B [J]. *Chem Pharm Bull*, 1981, 29(7): 1942-1950.