

• 化学成分 •

花刺参中两个新的四环三萜化合物

张佳佳

浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315200

摘要: 目的 从花刺参 *Stichopus variegatus* 中分离活性皂苷类成分。方法 将花刺参体内得到的总皂苷溶于吡啶-2-二氧六环 (1:1) 的混合液中, 130 °C 加热 2.5 h, 应用多种色谱技术对回流产物进行分离纯化, 得到 2 个三萜皂苷类化合物。结果 应用现代光谱技术 (2D-NMR 和 ESI-MS) 和化学方法鉴定其结构, 分别为 3-O-[β -D-吡喃木糖(1 $\rightarrow$ 2)-4'-O-磺酸钠- β -D-吡喃木糖]-海参烷-9-烯-3 β ,12 α ,17 α ,25 β -四醇, 命名为花刺参苷 A (variegatuside A, **1**); 3-O- β -D-吡喃木糖-16 β -乙酰氧基-海参烷-9-烯-22,25-环氧-3 β ,12 α ,17 α -三醇, 命名为花刺参苷 B (variegatuside B, **2**)。结论 化合物 **1** 和 **2** 均为新化合物。

关键词: 花刺参; 海参; 三萜皂苷; 花刺参苷 A; 花刺参苷 B

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)01-0010-05

Two new triterpene glycosides from *Stichopus variegatus*

ZHANG Jia-jia

Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315200, China

Abstract: Objective To study the constituents from the sea cucumber, *Stichopus variegatus*. **Methods** The crude saponins of *S. variegatus* 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, these two compounds were identified as 3-O-[β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4'-O-sulfate- β -D-xylopyranosyl]-holosta-9-ene-3 β ,12 α ,17 α ,25 β -tetraol sodium salt, named as variegatuside A (**1**) and 16 β -acetoxy-3-O- β -D-xylopyranosyl-holosta-22,25-epoxy-9-ene-3 β ,12 α ,17 α -triol, named as variegatuside B (**2**). **Conclusion** Compounds **1** and **2** are new compounds.

Key words: *Stichopus variegatus* Semper; sea cucumber; triterpene glycoside; variegatuside A; variegatuside B

花刺参 *Stichopus variegatus* Semper 属楯手目刺参科海洋动物, 俗名方参、黄肉。一般体长 200 mm, 稍呈四方柱形, 背部散布小疣足, 口偏于腹部。盛产于我国南海, 包括北部湾、海南岛和西沙群岛沿岸浅海。此外东非、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, 可作为药物开发的有效资源^[1]。已有人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^[2], 但有关该种海参体内小分子化学成分的研究报道较少。本课题组采用稻瘟霉模型生物活性和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^[3], 从花刺参中得到 2 个新的三萜皂苷类化合物, 命名为花刺参苷 A (variegatuside A) 和花刺参苷 B (variegatuside B)。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

XT 5 显微熔点仪 (北京市科仪电光仪器厂); Bruker Vector 22 型红外光谱仪; Varian Inova—600 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: Aglient 1100 Series, RID 检测器, Aglient 公司; 反相柱为 Zobrax 300 SB C₁₈ (250 mm $\times$ 9.4 mm, 5 μ m, Zorbax 公司); HPLC 洗脱剂为色谱纯甲醇; 其余试剂均为分析纯。

1.2 实验材料

花刺参 2007 年 9 月采于海南, 由中国海洋大学廖玉麟教授鉴定为花刺参 *Stichopus variegatus*

收稿日期: 2010-06-23

基金项目: 宁波市自然科学基金资助项目 (2007A610083); 浙江省医药卫生科学研究基金 (2008B163); 浙江省高校科研基金 (Y200805910)

作者简介: 张佳佳 (1975—), 女, 硕士, 副教授, 主要从事海洋药物研发。E-mail: zjj@zjbt.net.cn

Semper, 标本现存于浙江医药高等专科学校。

1.3 提取和分离

新鲜花刺参材料(约 15 kg),洗净、切碎后,用 85%乙醇冷浸提取,回收乙醇得浸膏。将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花刺参粗皂苷。取粗皂苷 16.4 g,溶于 120 mL 吡啶-二氧六环(1:1)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柱色谱纯化,色谱柱为 Zobax SB C₁₈ 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,其中化合物 1 (18.7 mg),化合物 2 (24.6 mg)。应用现代光谱技术和化学方法鉴定以上 2 个化合物为花刺参苷 A (variegatuside A) 和花刺参苷 B (variegatuside B)。

2 结构鉴定

这两个化合物均为新的三萜皂苷类化合物,化合物 1 命名为花刺参苷 A (variegatuside A),化合物 2 命名为花刺参苷 B (variegatuside B)。结构式见图 1。

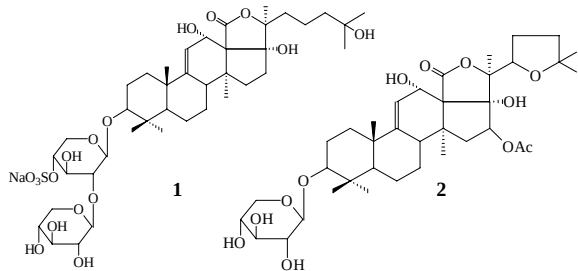


图 1 化合物 1 和 2 的结构式

Fig. 1 Structures of compounds 1 and 2

化合物 1: C₄₀H₆₁O₁₇Na, 无色结晶性粉末, mp 212.4~214.4 °C (MeOH-H₂O), [α]_D²⁰ -22.3° (c 0.4, MeOH), Liebermann-Burchard 反应和 Molish 反应均呈阳性。由 ESI-MS⁺提供的准分子离子峰 m/z : 893.357 8 [M+Na]⁺ 和 ESI-MS⁻提供的准分子离子峰 m/z : 847 [M-Na]⁻, 推测化合物 1 的相对分子质量为 870。由 HR-ESI-MS⁺中准分子离子峰提供的精确相对分子质量 m/z : 891.422 0 [M+Na]⁺ (计算值 891.422 3), 结合 ¹³C-NMR、¹H-NMR 谱和 DEPT 谱, 确定该化合物分子式 C₄₀H₆₁O₁₇Na。IR ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹): 3 416 (羟基), 1 747 (羰基), 1 636 (双键), 1 253, 1 069 (磺酸基)。磺酸基的推断还

由正离子质谱碎片峰 m/z : 791 [M-SO₃Na+H+Na]⁺的存在得以支持。

化合物 1 的 ¹H-NMR 谱高场区显示苷元上的 7 个角甲基质子信号, 在 δ_H 3.5~5.5 区域内有糖环质子信号, 相应地在 ¹³C-NMR 谱的高场区有苷元和角甲基上的碳信号, 在 δ_C 60~90 区域内有糖环上的碳信号, 在 δ_C 105 附近有两个糖基端基碳信号。在 Δ⁹⁽¹¹⁾位有双键信号 [δ_C 153.9 (C-9), δ_C 115.6 (C-11)/δ_H 5.62 (1H, d, 4.8, β, H-11)]。C-3, C-12, C-17, C-20, C-25 均有较大的低场位移 δ 88.8 (C-3), 71.6 (C-12), 89.8 (C-17), 86.7 (C-20), 81.4 (C-25), 说明这 5 个碳原子均为连氧碳。以上特征表明化合物 1 为三萜皂苷类化合物。化合物 1 主要的 HMBC 和 NOESY 相关信号见图 2。

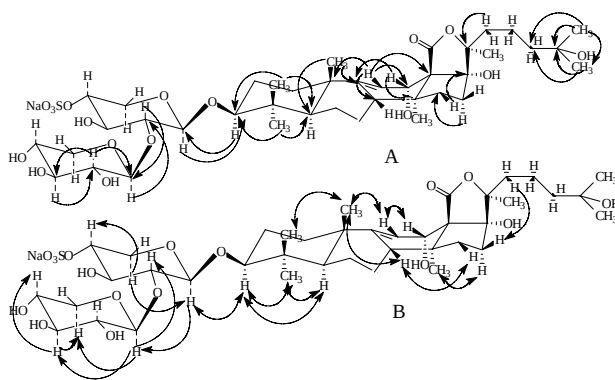


图 2 化合物 1 的 HMBC (A) 和 NOESY (B) 相关谱

Fig. 2 Key HMBC (A) and NOESY (B) correlations of compound 1

根据化合物 1 的 ¹H-NMR、¹³C-NMR、DEPT 谱和 HMQC 谱, 对化合物的各个碳及其连接氢质子的化学位移进行归属, 借助 DQFCOSY 和 TOCSY 谱确定各个碳原子的连接顺序, 结果见表 1。

化合物 1 的 ¹³C-NMR、¹H-NMR、DEPT 谱和 HMQC 谱显示有 2 个糖基的端基氢质子和端基碳信号 [δ_H 4.71 (1H, d, 7.2)/δ_C 105.3, δ_H 4.83 (1H, d, 7.2)/δ_C 105.9], 表明化合物 1 的寡糖链由 2 个糖基组成, 根据端基氢质子有较大的偶合常数 (7.2 Hz), 推断 2 个糖基的端基均为 β 构型。

将化合物 1 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 1 中的糖基为 D-木糖。从 2 个糖基的端基氢质子出发, 通过 TOCSY 和 DQFCOSY 谱可以对各个糖基质子的信号进行归属, 结果见表 1。由 ¹³C-NMR 谱数据比较

表 1 化合物 1 的 ^{13}C -NMR、 ^1H -NMR、NOESY、HMBC 相关谱 (在吡啶- d_5 - D_2O , 4:1 中, 600/150 MHz)Table 1 ^{13}C -NMR and ^1H -NMR chemical shifts and NOESY and HMBC correlations of compound 1 (in pyridine- d_5 - D_2O , 4:1, 600/150 MHz)

位置	δ_{C}	δ_{H} (m, J in Hz)	NOESY	HMBC
1	36.4	1.38 (1H, m, α), 1.86 (1H, m, β)		
2	27.4	1.76 (1H, m, α), 2.02 (1H, m, β)	H-3 α , H ₃ -30, H ₃ -19	
3	88.8	3.14 (1H, dd, 4.2, 12.0, α)	H-Xyl ₁ , H-5 α , H ₃ -31	C: Xyl ₁
4	40.1			
5	52.8	1.00 (1H, d, 10.2, α)	H-3 α , H ₃ -31	
6	28.4	2.02 (2H, m)		
7	21.2	1.49 (1H, m, α), 1.74 (1H, m, β)		
8	41.0	3.36 (1H, t, 9.6, β)	H-7 β , H-6 β , H-15 β , H ₃ -19	
9	153.9			
10	39.8			
11	115.6	5.62 (1H, d, 4.2, β)	H-12 β , H-1 β , H ₃ -19	C: 10, 8, 13, 12
12	71.6	4.99 (1H, dd, 5.4, 12.0, β)	H-11 β	C: 14, 9
13	58.9			
14	46.0			
15	36.9	1.82 (1H, m, α), 1.40 (1H, m, β)	H-8 β	C: 17
16	35.6	2.41 (1H, ddd, α), 2.97 (1H, dd, 6.0, 14.4, β)	H-15 α , H ₃ -32, H-15 β	C: 14, 17
17	89.8			
18	174.6			
19	22.7	1.40 (3H, s)	H-1 β , H-2 β , H ₃ -30, H-8 β , H-11 β	C: 1, 10, 5, 9
20	86.7			
21	18.9	1.76 (3H, s)		C: 22, 17, 20
22	80.7	4.32 (1H, m, α)	H-16 β	C: 21, 20, 17
23	28.0	1.45 (2H, m)		C: 24, 25
24	38.5	1.64 (2H, m)		C: 25, 27
25	81.4			
26	28.7	1.20 (3H, s)		C: 27, 25, 24
27	27.1	1.19 (3H, s)		C: 26, 24, 25
30	16.8	1.13 (3H, s)	H ₃ -19	C: 31, 3, 4, 5
31	28.2	1.28 (3H, s)	H-3 α , H-5	C: 30, 3, 4, 5
32	20.4	1.65 (3H, s)	H-16 α	C: 13, 14, 8, 15
Xyl				
1	105.3	4.71 (1H, d, 7.2)	H-3, H-3', H-5', H-1''	C-3, C-1''
2	83.4	4.04 (1H, m)		C-1', C-3', C-1''
3	75.4	4.28 (1H, m)		C-2', C-4'
4	76.0	5.10 (1H, m)		C-2', C-3'
5	64.2	3.73 (1H, m, α), 4.75 (1H, dd, 4.8, 11.4, β)	H-1', H-4'	C-4', C-1', C-4'
1	105.9	4.83 (1H, d, 7.2)	H-3'', H-5'', H-2'	C-2'
2	76.8	4.02 (1H, m)		C-3'', C-1''
3	77.7	4.22 (1H, m)		C-2''
4	69.9	3.68 (1H, m)		
5	65.2	3.74 (1H, m, α), 4.55 (1H, dd, 4.2, 10.8, β)		

发现, C-4' (70.0~76.0) 向低场位移 δ 6.0, 提示在该位置有磺酸基 (-SO₃Na) 取代。另外, δ_{C} 83.4 (C-2') 与相应单糖比较有较大的低场位移, 提示相应位置应是糖基相连的位置。将化合物 1 甲基化后酸水解及衍生, 采用 GC-MS 分析形成的部分甲基化糖醇醋酸酯, 表明糖链中存在 2 位连接的木糖。这一实验结果支持了以上推断。

综上所述, 化合物 1 的结构为 3-O-[β -D-吡喃木

糖(1 $\rightarrow$ 2)-4'-O-磺酸钠- β -D-吡喃木糖]-海参烷-9-烯-3 β ,12 α ,17 α ,25 β -四醇。现有文献资料表明化合物 1 尚未公开报道, 为一新化合物, 命名为花刺参苷 A (variegatuside A)。

化合物 2: C₃₇H₅₆O₁₂, 无色结晶性粉末, mp 218~221 °C (MeOH-H₂O), $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -27.3° (c 0.2, MeOH), Liebermann-Burchard 反应和 Molish 反应均呈阳性。由 ESI-MS⁺提供的准分子离子峰 m/z 715

$[M+Na]^+$ 和ESI-MS⁻提供的准分子离子峰 m/z 671 $[M-Na]^-$, 推测化合物 2 的相对分子质量为 692。由高分辨质谱 HR-ESI-MS⁺中准分子离子峰提供的精确分子量 m/z 715.366 4 $[M+Na]^+$ (计算值 715.366 9), 583 $[M-Xyl+Na+H]^+$, 656 $[M-OAc+Na]^+$; 结合 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 谱和 DEPT 谱, 确定该化合物的分子式 $C_{37}H_{56}O_{12}$ 。IR ν_{max}^{KBr} (cm^{-1}):

3 417 (羟基), 1 741 (羰基), 1 637 (双键)。

根据化合物 2 的 1H -NMR、 ^{13}C -NMR、DEPT 谱、HMQC 谱, 对化合物的各个碳以及其连接氢质子的化学位移进行归属, 借助 DQF-COSY 谱和 TOCSY 谱确定各个碳原子的连接顺序, 结果见表 2。

化合物 2 的 1H -NMR 谱高场区显示 7 个角甲基质子信号及苷元质子信号, 在 δ_H 3.5~5.5 区域内有

表 2 化合物 2 的 ^{13}C -NMR、 1H -NMR 和 NOESY、HMBC 相关谱 (在吡啶- d_5 - D_2O , 4:1 中, 600/150 MHz)

Table 2 ^{13}C -NMR and 1H -NMR chemical shifts and NOESY and HMBC correlations of compound 2 (in pyridine- d_5 - D_2O , 4:1, 600/150 MHz)

位置	δ_C	δ_H (m, J in Hz)	NOESY	HMBC
1	36.4	1.39 (1H, m, α), 1.86 (1H, m, β)		
2	27.0	1.92 (1H, m, α), 2.00 (1H, m, β)	H-3 α H ₃ -30, H ₃ -19	
3	88.6	3.04 (1H, d, 10.8, α)	H-Xyl ₁ , H-5 α , H ₃ -31	C: Xyl ₁
4	38.5			
5	52.8	1.00 (1H, d, 10.4, α)	H-3 α , H ₃ -31	
6	28.3	1.72 (1H, m, α), 1.54 (1H, m, β)		
7	20.7	1.50 (1H, m, α), 1.75 (1H, m, β)		
8	40.9	3.34 (1H, m, β)	H-7 β , H-6 β , H-15 β , H ₃ -19	
9	150.2			
10	32.4			
11	123.7	5.60 (1H, m, β)	H-12 β , H-1 β , H ₃ -19	C: 10, 8, 13, 12
12	71.4	4.96 (1H, m, β)	H-11 β	C: 14, 9
13	58.5			
14	47.1			
15	36.7	1.92 (1H, m, α), 1.43 (1H, m, β)	H-8 β	C: 17
16	73.4	6.26 (1H, m, α)	H-15 α , H ₃ -32	C: 14, 17 CH ₃ COO
17	87.9			
18	173.8			
19	22.5	1.75 (3H, s)	H-1 β , H-2 β , H ₃ -30, H-8 β , H-11 β	C: 1, 10, 5, 9
20	87.2			
21	18.5	1.96 (3H, s)		C: 22, 17, 20
22	75.3	4.24		C: 21, 20, 17
23	28.1	1.45		C: 24, 25
24	34.3	1.16		C: 25, 27
25	77.5			
26	22.8	0.77 (3H, s)		C: 27, 25, 24
27	22.5	0.76 (3H, s)		C: 26, 24, 25
30	16.7	1.05 (3H, s)	H ₃ -19	C: 31, 3, 4, 5
31	29.5	1.27 (3H, s)	H-3 α , H-5	C: 30, 3, 4, 5
32	20.7	1.65 (3H, s)	H-16 α	C: 13, 14, 8, 15
CH ₃ COO	170.4			
CH ₃ COO	20.7	2.00		
Xyl				
1	105.1	4.68 (1H, d, 7.2)	H-3, H-3', H-5', H-1''	C-3
2	76.7	3.98 (1H, d, 8.8)		C-1', C-3'
3	73.7	4.20 (1H, d, 8.4)		C-2', C-4'
4	69.9	5.09 (1H, m)		C-2', C-3'
5	66.3	3.73 (1H, m, α), 4.62 (1H, m, β)	H-1', H-4'	C-4', C-1', C-4'

糖环质子信号,相应在 ^{13}C -NMR 谱的高场区有苷元和角甲基上的碳信号,在 δ_{C} 60~90 区域内有糖环上的碳信号,在 δ_{C} 105 附近有糖基端基碳信号。在 $\Delta^{9(11)}$ 位有双键信号 [δ_{C} 150.2 (C-9), δ_{C} 123.7 (C-11)/ δ_{H} 5.51 (1H, m, H-11)]。C-3, C-12, C-16, C-17, C-20, C-25 均有较大的低场位移 δ 88.6 (C-3), 71.4 (C-12), 73.4 (C-16), 87.9 (C-17), 87.2 (C-20), 77.5 (C-25), 说明这 6 个碳原子均为连氧碳。以上特征表明化合物 **2** 为三萜皂苷类化合物。

化合物 **2** 的 16 位碳、氢均发生较大的低场位移 [δ_{C} 73.4 (C-16)/ δ_{H} 6.26 (1H, m, H-16)], 推测 16 位碳上连有含氧基团, 而其 HMBC 谱 (图 3) 上的碳氢远程相关信号 2.00/170.4 (H-CH₃COO/C-CH₃COO), 说明化合物中含氧基团为乙酰氧基 (-CH₃COO), 6.26 (1H, m, H-16)/170.4 (C-CH₃COO), 证明乙酰基连在苷元 16 位碳上。在 NOESY 谱上 1.92 (1H, m, H-15 α) 与 6.26 (1H, m, H-16 α) 有明显的相关峰, 存在 NOE 相关, 说明 16 位的氢为 α -H, 而乙酰基则处于 16 位的 β 位。

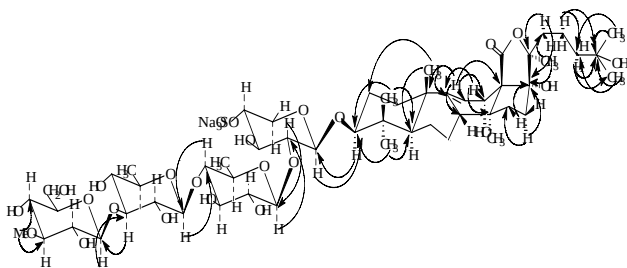


图 3 化合物 **2** 的 HMBC 相关谱

Fig. 3 Key HMBC correlations of compound **2**

化合物 **2** 的 ^{13}C -NMR、 ^1H -NMR、DEPT 谱、HMQC 谱显示有 1 个糖基的端基氢质子和端基碳信号 [δ_{H} 4.68 (1H, d, 7.2)/ δ_{C} 105.1], 表明化合物 **2** 的

寡糖链由 1 个糖基组成, 根据端基氢质子有较大的偶合常数 (7.2 Hz) 推断糖基的端基为 β 构型。将化合物 **2** 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 **2** 中的糖基为 *D*-木糖。从该糖基的端基氢质子出发, 通过 TOCSY 和 DQFCOSY 谱可以对各个糖基质子的信号进行归属, 见表 2。

综上所述, 化合物 **2** 的结构为 3-*O*- β -*D*-吡喃木糖-16 β -乙酰氧基-海参烷-9-烯-22,25-环氧-3 β ,12 α ,17 α -三醇。现有文献资料表明化合物 **2** 尚未公开报道, 为一新化合物, 命名为花刺参苷 B (variegatuside B)。

3 讨论

对花刺参活性皂苷类成分的研究结果表明, 花刺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。本研究所报道的 2 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。

参考文献

- [1] 廖玉麟. 中国动物志棘皮动物门海参纲 [M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] 姚成芳, 蔡生业, 王 丽. 复方花刺参制剂抗凝血机制的实验研究 [J]. 中国海洋药物, 2000, 19(1): 332-351.
- [3] Kitagawa I, Nishino T, Kobayashi M, et al. Marine natural products VII. Bioactive triterpene-oligoglycosides from the sea cucumber *Holothuria leucospilota* BRANDT (1). Structure of holothurin B [J]. Chem Pharm Bull, 1981, 29(7): 1942-1950.