

黑乳海参三萜皂苷的提取分离及其结构鉴定

张佳佳

浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315000

摘要: **目的** 研究黑乳海参 *Holothuria nobilis* 的化学成分。**方法** 应用多种色谱技术对黑乳海参的化学成分进行分离纯化, 根据化合物的理化性质和波谱数据鉴定结构。**结果** 分离得到了2个三萜皂苷元类化合物, 应用化学方法和各种光谱技术鉴定其结构为 3-*O*-{3'''-*O*-甲基- β -D-吡喃葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-吡喃葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-吡喃奎诺糖-(1 $\rightarrow$ 2)-4'-*O*-磺酸钠- β -D-吡喃木糖}-海参烷-22, 25-环氧-9-烯-3 β , 12 α , 17 α , 25 β -四醇 (1) 和 3-*O*-{ β -D-吡喃奎诺糖-(1 $\rightarrow$ 2)-4'-*O*-磺酸钠- β -D-吡喃木糖}-海参烷-9-烯-18, 16-内酯环-22, 25-环氧-3 β , 12 α , 17 α -三醇 (2)。**结论** 2个化合物均为新化合物, 命名为黑乳海参苷 I (nobiliside I, 1) 和黑乳海参苷 II (nobiliside II, 2)。

关键词: 黑乳海参; 黑乳海参苷 I; 黑乳海参苷 II; 三萜皂苷元; 海参科

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)08-1467-06

Extraction, isolation, and structure elucidation of two new triterpene glycosides from sea cucumber *Holothuria nobilis*

ZHANG Jia-jia

Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315000, China

Abstract: **Objective** To study the constituents from the sea cucumber *Holothuria nobilis*. **Methods** The compounds of the sea cucumber were separated by multi-chromatography and their structures were elucidated by physico-chemical and spectral analyses.

Results Two new triterpene glycosides were isolated and their structures have been deduced by extensive spectral analysis (IR, 2D-NMR, and ESI-MS) and chemical structures as 3-*O*-{3'''-*O*-methyl- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-quinovopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4'-*O*-sulfate- β -D-xylopyranosyl}-holosta-22, 25-epoxy-9-ene-3 β , 12 α , 17 α , 25 β -tetraol-sodium salt (nobiliside I, 1) and 3-*O*-{ β -D-quinovopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-4'-*O*-sulfate- β -D-xylopyranosyl}-holoshillaside 18 (16)-lactone-22, 25-epoxy-9-ene-3 β , 12 α , 17 α -triol sodium (nobiliside II, 2). **Conclusion** Two aglycons are both new compounds named nobiliside I and nobiliside II.

Key words: *Holothuria nobilis* Selenka; nobiliside I; nobiliside II; triterpene glycoside; Holothuriidae

黑乳海参 *Holothuria nobilis* Selenka 属棘皮动物门 (Echinodermata) 海参纲 (Holothuroidea) 楯手目 (Aspidochirotida) 海参科 (Holothuriidae) 动物。体形较大, 长一般为 300 mm, 体宽而厚, 两端钝圆。该物种在我国从福建东山到西沙群岛的海域均有广泛分布^[1]。海参药用历史悠久, 具有补肾精、益精髓、消痰涎、摄小便、壮阳、生百脉血、治溃疡等功效。民间用其治疗癌症, 可改善体质, 使瘤体缩小。黑乳海参居维氏器和体壁均能分泌出毒素和活性很强的物质——海参皂苷 (holostane), 研究表明, 海参皂苷能与生物膜上甾醇分子结合形成复合物, 在膜

上形成单一离子通道和大的水孔, 导致生物膜溶解。因此具有一系列良好的抗肿瘤、抗真菌、抗病毒活性。目前国内外尚未见对黑乳海参化学成分研究的报道。笔者对其皂苷类成分进行了研究, 本研究报道从黑乳海参中分离得到了2个新的三萜皂苷元类化合物, 鉴定为 3-*O*-{3'''-*O*-甲基- β -D-吡喃葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-吡喃葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-吡喃奎诺糖-(1 $\rightarrow$ 2)-4'-*O*-磺酸钠- β -D-吡喃木糖}-海参烷-22, 25-环氧-9-烯-3 β , 12 α , 17 α , 25 β -四醇 (1) 和 3-*O*-{ β -D-吡喃奎诺糖-(1 $\rightarrow$ 2)-4'-*O*-磺酸钠- β -D-吡喃木糖}-海参烷-9-烯-18, 16-内酯环-22, 25-环氧-3 β , 12 α , 17 α -三醇

收稿日期: 2011-01-14

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (Y2110082); 浙江省科技厅公益项目 (2010C33136); 宁波市自然科学基金资助项目 (2007A610083, 2010A610020); 浙江省医药卫生科学研究基金资助项目 (2008B163); 浙江省高校科研基金资助项目 (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。Tel: (0574)87291876 E-mail: zjj@zjbt.net.cn

(2), 分别命名为黑乳海参苷 I (nobiliside I) 和黑乳海参苷 II (nobiliside II)。

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 (Pharmacia 公司); 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 Zobrax300 SB C₁₈ 柱 (250 mm × 9.4 mm, 5 μm, 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

黑乳海参 2009 年 10 月采于福建, 由青岛海洋大学廖玉麟教授鉴定为黑乳海参 *Holothuria nobilis* Selenka, 标本现存于浙江医药高等专科学校。

1.3 提取和分离

新鲜黑乳海参 (约 7.5 kg), 洗净切碎, 以 85% 乙醇室温浸泡提取 3 次, 每次 7 d。提取液回收乙醇, 得浸膏 1.2 kg。将浸膏均匀分散在 2 000 mL 蒸馏水中, 用石油醚萃取, 每次 1 000 mL, 至石油醚部分颜色变得极淡。再用水饱和正丁醇萃取 4 次, 每次 800 mL。将石油醚层、正丁醇层分别减压回收溶剂得浸膏: 石油醚部分和正丁醇部分。

将正丁醇部分用硅胶低压柱色谱处理, 氯仿-甲醇-水 (7.5 : 2.5 : 1) 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 1.0 mL/min, 得到 2 个化合物, 化合物 1 (23.4 mg) 和化合物 2 (31.6 mg)。这两个化合物均为新的三萜皂苷类化合物, 化合物 1 命名为黑乳海参苷 I, 化合物 2 命名为黑乳海参苷 II。结构式见图 1。

2 结构鉴定

化合物 1: 无色结晶粉末, mp 213~214 °C, $[\alpha]_D^{20} -15.6^\circ$ (c 0.2, MeOH), Liebermann-Burchard 和 Molish 反应均呈阳性。由 ESI-MS⁺ 提供的准分子离子峰 m/z 1 243 [M+Na]⁺ 和 ESI-MS⁻ 提供的准分子离子峰 m/z 1 197 [M-Na]⁻, 推测化合物 1 的相对分子质量为 1 220。由 HR-ESI-MS⁺ 中准分子离子峰提供的精确相对分子质量 m/z 1 243.480 5 [M+Na]⁺ (计算值 1 243.479 4), 结合 ¹³C-NMR 谱, 确定该化合物的分子式 C₅₄H₈₅O₂₇SNa。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹):

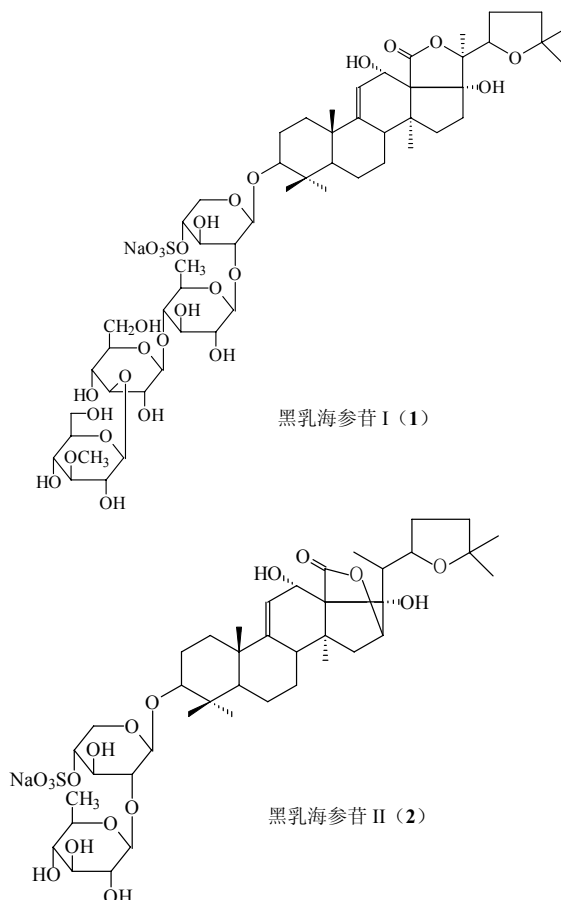


图 1 化合物 1 和 2 的结构式

Fig. 1 Structures of compounds 1 and 2

3 417 (羟基), 1 761 (羰基), 1 638 (双键), 1 223, 1 071 (磺酸基)。磺酸基的推断还由质谱碎片峰 m/z 1 141 [M-SO₃Na+H+Na]⁺ 的存在得以支持。

根据化合物 1 的 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 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 ¹H-NMR 谱高场区显示有 8 个角甲基质子信号及苷元质子信号, 在 δ 3.5~5.5 区域内有糖环质子信号, 相应于 ¹³C-NMR 谱的高场区有苷元和角甲基上的碳信号, 在 δ 60~90 区域内有糖环上的碳信号, 在 δ 105 附近有糖基端基碳信号。在 Δ⁹⁽¹¹⁾ 位有双键信号 [δ_C 154.0 (C-9), δ_C 115.6 (C-11)/δ_H 5.60 (1H, d, 4.2, β, H-11)]。C-3, C-12, C-17, C-20, C-22, C-25 均有较大的低场位移 δ_C 88.7 (C-3), 71.4 (C-12), 89.3 (C-17), 87.2 (C-20), 78.2 (C-22), 83.3 (C-25), 说明这 6 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。

表 1 黑乳海参苷 I 苷元及糖部分的 ^{13}C -NMR (400 MHz) 和 ^1H -NMR (100 MHz) 化学位移 (吡啶- d_5 : D_2O , 4 : 1)
 Table 1 ^{13}C -NMR (400 MHz) and ^1H -NMR (100 MHz) chemical shifts for aglycon and sugar moieties
 of nobiliside I (in pyridine- d_5 : D_2O , 4 : 1)

碳位	δ_{C}	δ_{H}	糖	δ_{C}	δ_{H}
1	36.3	1.39 (1H, m, α), 1.84 (1H, m, β)	Xyl		
2	27.0	1.92 (1H, m, α)	1	104.8	4.66 (1H, d, $J = 7.2$ Hz)
3	88.7	3.12 (1H, dd, $J = 3.9, 11.8$ Hz, α)	2	83.4	4.02 (1H, m)
4	40.0		3	75.5	4.26 (1H, m)
5	52.7	0.98 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, α)	4	75.7	5.10 (1H, m)
6	28.3	1.72 (1H, m, α)	5	64.3	3.70 (1H, m, α)
7	21.2	1.50 (1H, m, α)	Qui		
8	40.9	3.36 (1H, dd, $J = 4.2, 11.8$ Hz, β)	1	105.4	5.02 (1H, d, $J = 7.2$ Hz)
9	154.0		2	76.3	3.96 (1H, m)
10	39.7		3	74.0	4.08 (1H, m)
11	115.6	5.60 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, β)	4	86.8	3.64 (1H, m)
12	71.4	4.98 (1H, d, $J = 4.6$ Hz, β)	5	71.9	3.74 (1H, m)
13	58.6		6	18.0	1.70 (3H, d, $J = 5.9$ Hz)
14	46.4		Glc		
15	36.7	1.86 (1H, m, α), 1.40 (1H, m, β)	1	105.2	4.96 (1H, d, $J = 7.9$ Hz)
16	35.9	2.33 (1H, m, α), 2.66 (1H, m, β)	2	75.4	4.09 (1H, m)
17	89.3		3	88.0	4.24 (1H, m)
18	174.8		4	69.5	4.10 (1H, m)
19	22.2	1.37 (3H, s)	5	77.7	4.00 (1H, m)
20	87.2		6	61.8	4.45 (1H, m)
21	23.0	1.75 (3H, s)			4.42 (1H, m)
22	78.2	4.27 (1H, m, α)	3-OMeGlc		
23	28.0	1.46	1	105.8	5.31 (1H, d, $J = 7.8$ Hz)
24	38.5	1.15 (2H, dd, $J = 7.8, 15.0$ Hz)	2	75.0	4.03 (1H, m)
25	83.3		3	88.0	3.68 (1H, m)
26	22.7	0.85 (3H, s)	4	70.6	4.07 (1H, m)
27	22.6	0.84 (3H, s)	5	78.3	3.97 (1H, m)
30	16.7	1.03 (3H, s)	6	62.1	4.20 (1H, m, α)
31	28.1	1.23 (3H, s)	OCH ₃	60.8	3.84 (3H, s)
32	20.1	1.66 (3H, s)			

化合物 **1** 的 ^{13}C -NMR、 ^1H -NMR、HMQC 谱显示有 4 个糖基的端基氢质子和端基碳信号 [δ_{H} 4.66 (1H, d, 7.0)/ δ_{C} 105.2, δ_{H} 5.04 (1H, d, 7.6)/ δ_{C} 105.4, δ_{H} 4.93 (1H, d, 8.3)/ δ_{C} 104.9, δ_{H} 5.25 (1H, d, 7.6)/ δ_{C} 105.7], 表明化合物 **1** 的寡糖链由 4 个糖基组成, 根据端基氢质子有较大的耦合常数 (7.0~8.3 Hz) 推断 4 个糖基的端基均为 β 构型。另外 δ_{C} 18.0 处的甲基碳信号和 δ_{H} 1.70 (3H, d, 5.9) 处的甲基双重峰质子信号, 提示化合物 **1** 的糖链上有 1 个 6-去氧糖。

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。糖基的绝对构型为 *D*, 目前为止从海参皂苷中发现的糖基均为 *D* 型。

从 4 个糖基的端基氢质子或甲氧基质子出发, 通过 TOCSY 和 DQF-COSY 谱可以对各个糖基质子的信号进行归属, 例如, 在 TOCSY 谱中, δ_{H} 4.66

(1H, d, 7.0) 处的端基氢信号 (*D*-木糖) 与 δ_{H} 4.02, 4.26, 5.10 及 3.70, 4.69 处的质子信号形成一个自旋耦合体系, 再通过 DQFCOSY 可依次将以上信号归属为 *D*-木糖的 H-2, H-3, H-4 及 H-5, 从而确定 *D*-木糖的所有氢质子信号, 氢质子信号确定后, 糖基的各个碳信号经由 HMQC 谱分析得到归属。结果见表 1。由 ^{13}C -NMR 谱数据与其脱硫衍生物 2a 及已知化合物^[2]比较发现, C-4' (70 到 75.7) 向低场位移 5.7, 提示在该位置有磺酸基 (-SO₃Na) 取代。HMBC 谱中还可以观察 δ_{H} 3.84 (3H, s, -OCH₃) 处氢质子与 *D*-葡萄糖中的 δ_{C} 88.0 (C-3'''), 70.6 (C-4''') 有很强 C-H 远程相关信号, 说明 -OCH₃ 是连接在 *D*-葡萄糖上的 C-3''' 位上。另外, δ_{C} 83.4 (C-2'), 86.8 (C-4'), 88.0 (C-3'') 与相应单糖对比有较大的低场位移, 提示相应位置应是苷化的位置。将化合物 1 甲基化后酸水解及衍生化, 采用 GC-MS 分析形成的部分甲基化糖醇乙酸酯, 表明糖链中存在 2 位连接的木糖, 4 位连接的奎诺糖, 3 位连接的葡萄糖, 以及末端 3-甲氧基-葡萄糖。这一实验结果支持了以上推断。

糖基间的连接顺序和位置经由 HMBC 谱, NOESY 谱并结合 ESI-MS 确定。在 HMBC 谱中可以观察到以下重要的 C-H 远程相关信号: δ_{H} 4.66/ δ_{C} 88.7 (H-1'/C-3), δ_{H} 4.66/ δ_{C} 105.4 (H-1'/C-1''), δ_{H} 4.02/ δ_{C} 105.4 (H-2'/C-1''), δ_{H} 5.02/ δ_{C} 83.4 (H-1''/C-2'), δ_{H} 5.31/ δ_{C} 88.0 (H-1'''/C-3'''), δ_{H} 4.96/ δ_{C} 86.8 (H-1'''/C-4'')。相应的 NOESY 谱中也可找到重要的具 NOE 相关的氢质子相关信号: δ_{H} 4.66/ δ_{H} 3.12 (H-1'/H-3), δ_{H} 5.02/ δ_{H} 4.02 (H-1''/H-2'), δ_{H} 4.96/ δ_{H} 3.64 (H-1'''/H-4''), δ_{H} 5.31/ δ_{H} 4.24 (H-1'''/H-3'')。

从 ESI-MS 和 MS-MS 中除发现脱磺酸基碎片 m/z 1 141 [$\text{M}-\text{SO}_3\text{Na}+\text{H}+\text{Na}$]⁺ 外, 特别是 MS-MS 中 m/z 948 [$1\ 141-3-\text{OMe}-\text{Glc}$]⁺, m/z 786 [$1\ 141-3-\text{OMe}-\text{Glc}-\text{Glc}$]⁺, m/z 639 [$1\ 141-3-\text{OMe}-\text{Glc}-\text{Glc}-\text{Qui}$]⁺, m/z 507 [$1\ 141-3-\text{OMe}-\text{Glc}-\text{Glc}-\text{Qui}-\text{Xyl}$]⁺ 等糖基依次从末端脱去的一系列碎片, 进一步证明寡糖链的糖基组成及糖基之间的连接顺序的推断。

综上所述, 化合物 1 的结构为 3-*O*-{3'''-*O*-甲基- β -*D*-吡喃葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 3)- β -*D*-吡喃葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 4)- β -*D*-吡喃奎诺糖-(1 $\rightarrow$ 2)-4'-*O*-磺酸钠- β -*D*-吡喃木糖}-海参烷-22, 25-环氧-9-烯-3 β , 12 α , 17 α , 25 β -四醇。现有文献资料表明化合物 1 尚未有公开报道,

为一新化合物, 命名为黑乳海参苷 I。

化合物 2: 无色结晶性粉末, mp 185~187 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ 21.3° (c 0.2, MeOH), Liebermann-Burchard 反应和 Molish 反应均呈阳性。由 HR-ESI-MS⁺ 中准分子离子峰提供的精确相对分子质量 m/z 905.271 1 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺ (计算值 905.271 5) 和 ESI-MS⁻ 提供的准分子离子峰 m/z 859 [$\text{M}-\text{Na}$]⁻, 推测化合物 2 的相对分子质量为 882。结合 ^{13}C -NMR 谱, 确定该化合物的分子式 C₄₁H₆₃O₁₇SN₂。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 423 (羟基), 1 764 (羰基), 1 637 (双键), 1 257, 1 072 (磺酸基)。磺酸基的推断还由质谱碎片峰 m/z 757 [$\text{M}-\text{SO}_3\text{Na}+\text{H}-\text{Na}$]⁻ 的存在得以支持。

根据化合物 2 的 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、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 2。

化合物 2 的 ^1H -NMR 谱高场区显示有 8 个角甲基质子信号及苷元质子信号, 在 δ_{H} 3.5~5.5 区域内有糖环氢质子信号, 相应 ^{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} 153.8 (C-9), δ_{C} 115.6 (C-11)/ δ_{H} 5.51 (1H, m, β , H-11)]。C-3, C-12, C-16, C-17, C-22, C-25 均有较大的低场位移 δ_{C} 88.7 (C-3), 71.6 (C-12), 76.5 (C-16), 89.7 (C-17), 80.7 (C-22), 86.6 (C-25), 说明这 5 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。

在 TOCSY 谱中可以观察到多个自旋耦合体系, δ_{H} 1.35 (1H, m, α , H-1), 1.79 (1H, m, β , H-1), 1.82 (1H, m, α , H-2), 1.96 (1H, m, β , H-2), 3.05 (1H, d, 8.4, α , H-3) 构成一个自旋耦合体系, δ_{H} 0.91 (1H, d, 10.4, α , H-5), 1.46 (1H, m), 1.51 (1H, m, α , H-7), 1.72 (1H, m, β , H-7), 3.24 (1H, m, β , H-8) 及 δ_{H} 5.51 (1H, m, β , H-11), 4.86 (1H, d, 4.0, β , H-12) 构成两个自旋耦合体系, 证实了 $\Delta^{9(11)}$ 三萜母核构型。 δ_{H} 4.21 (1H, m, α , H-22), 1.94 (1H, m, H-23), 1.54 (1H, m, H-24) 所构成的自旋耦合体系中的质子信号为苷元侧链上所含氢质子信号。

在 HMBC 谱中可以观察到 δ_{H} 1.10/ δ_{C} 38.5 (H-26/C-24), δ_{H} 1.08/ δ_{C} 38.5 (H-27/C-24) 等 C-H 远程相关信号, 推测化合物 2 的苷元侧链有异丙烷基存在, 即 C-25 位上连有两个甲基: δ_{C} 28.6 (C-26)/ δ_{H} 1.10 (3H, s, H-26), δ_{C} 27.9 (C-27)/ δ_{H} 1.08 (3H, s, H-27)。另外在 HMBC 谱中还可以观察到 δ_{H} 4.21/ δ_{C} 86.6

表 2 黑乳海参苷 II 苷元及糖部分的 ^{13}C -NMR (400 MHz) 和 ^1H -NMR (100 MHz) 化学位移 (吡啶- d_5 : D_2O , 4:1)
 Table 2 ^{13}C -NMR (400 MHz) and ^1H -NMR (100 MHz) chemical shifts for aglycon and sugar moieties of nobiliside II
 (in pyridine- d_5 : D_2O , 4:1)

碳位	δ_{C}	δ_{H}	糖	δ_{C}	δ_{H}
1	36.4	1.35 (1H, m, α), 1.79 (1H, m, β)	Xyl		
2	27.0	1.82 (1H, m, α)	1	105.1	4.59 (1H, d, $J = 6.4$ Hz)
3	88.7	3.05 (1H, dd, $J = 3.6, 11.4$ Hz, α)	2	83.3	3.94 (1H, m)
4	40.0		3	75.2	4.18 (1H, m)
5	52.8	0.91 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, α)	4	75.9	4.95 (1H, m)
6	28.6	1.51 (1H, m, α)	5	64.0	3.60 (1H, m, α),
7	21.2	1.46 (2H, m)	Qui		
8	40.9	3.24 (1H, dd, $J = 4.4, 11.6$ Hz, β)	1	105.7	5.00 (1H, d, $J = 7.2$ Hz)
9	153.8		2	76.7	3.90 (1H, m)
10	39.7		3	77.6	4.00 (1H, m)
11	115.6	5.52 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, β)	4	73.4	3.63 (1H, m)
12	71.6	4.86 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, β)	5	71.9	3.74 (1H, m)
13	58.9		6	20.2	1.52 (3H, s)
14	45.9				
15	36.8	1.82 (1H, m, α), 1.39 (1H, m, β)			
16	76.5	4.58 (1H, m, α)			
17	89.7				
18	174.4				
19	21.2	1.28 (3H, s)			
20	35.6	2.28 (1H, m, α)			
21	18.8	1.65 (3H, s)			
22	80.7	4.21 (1H, m, α)			
23	28.6	1.94			
24	38.5	1.54 (1H, m)			
25	86.6				
26	28.6	1.10 (3H, s)			
27	27.9	1.08 (3H, s)			
30	16.7	1.02 (3H, s)			
31	28.1	1.16 (3H, s)			
32	20.3	1.56 (3H, s)			

(H-22/C-25) C-H 远程相关信号, 且 C-22, C-25 均为连氧碳, 化合物 **2** 不饱和度为 10, 推测苷元侧链为环氧结构。同时 6 个 C-H 远程相关信号 δ_{H} 1.65/ δ_{C} 89.7 (H-21/C-17), δ_{H} 1.65/ δ_{C} 35.6 (H-21/ C-20), δ_{H} 1.65/ δ_{C} 80.7 (H-21/C-22), δ_{H} 4.21/ δ_{C} 35.6 (H-22/C-20), δ_{H} 4.21/ δ_{C} 18.8 (H-22/C-21), δ_{H} 4.21/ δ_{C} 89.7 (H-22/C-17), 说明苷元的侧链与 C-20 位相连; NOESY 谱中, H-22 与 H-16 表现出很强的 NOE 相关, 也证实了这种连接关系。HMBC 谱显示 δ_{H} 4.86 (1H, m, β , H-12)与 δ_{C}

174.4 (C-18) 均有明显 C-H 远程相关信号, 推测羰基碳位于苷元 C-18 位。在 HMBC 谱中还观察到 δ_{H} 4.58 (1H, m, α , H-16)与 δ_{C} 174.4 (C-18)的 C-H 远程相关信号, 故推测化合物 **2** 应为 18 (16) 内酯环结构。

借助 HMBC 谱, 各甲基的碳氢信号归属得以完成。 δ_{H} 1.28/ δ_{C} 52.8 (H_3 -19/C-5), δ_{H} 1.28/ δ_{C} 39.7 (H_3 -19/C-10), δ_{H} 1.28/ δ_{C} 36.4 (H_3 -19/C-1) 的 C-H 远程相关信号; δ_{H} 1.56/ δ_{C} 58.9 (H_3 -32/C-13), δ_{H} 1.56/ δ_{C} 45.9 (H_3 -32/C-14), δ_{H} 1.56/ δ_{C} 40.9 (H_3 -32/C-8), δ_{H}

1.56/ δ_C 36.8 (H₃-32/C-15) 的 C-H 远程相关信号; 以及 δ_H 1.65/ δ_C 89.7 (H-21/C-17), δ_H 1.65/ δ_C 35.6 (H-21/C-20), δ_H 1.65/ δ_C 80.7 (H-21/C-22) 的 C-H 远程相关信号; 分别归属了 CH₃-19, CH₃-32, CH₃-21 的碳氢化学位移。 δ_H 1.02 (H₃-30), 1.16 (H₃-31) 分别与 δ_C 88.7 (C-3), 40.0 (C-4), 52.8 (C-5) 均有 C-H 远程相关信号, 归属了 CH₃-30, CH₃-31 的碳氢化学位移。 δ_H 1.10 (H₃-26), 1.08 (H₃-27) 分别与 δ_C 28.6 (C-23), 38.5 (C-24), 86.6 (C-25) 均有 C-H 远程相关信号, 归属了 CH₃-26, CH₃-27 的碳氢化学位移。它们的空间相对构型则可以通过 NOESY 谱的解析确定, δ_H 1.16 (H₃-31) 与 3.05 (1H, d, 10.4, α , H-3), 0.91 (1H, d, 10.4, α , H-5) 的 NOE 相关, δ_H 1.56 (H₃-32) 与 4.58 (1H, m, α , H-16) 的 NOE 相关, 说明 H₃-31, H₃-32 均为 α 构型; 而 δ_H 1.28 (H₃-19) 与 1.79 (1H, m, β , H-1), 1.96 (1H, d, 9.8, β , H-2), 3.24 (1H, m, β , H-8), 5.51 (1H, m, β , H-11) 的 NOE 相关, 以及 δ_H 1.02 (H₃-30) 与 1.28 (3H, s, H₃-19) 的 NOE 相关, 说明 H₃-19, H₃-30 均为 β 构型。由 δ_H 4.86 (1H, m, H-12) 与 5.51 (1H, m, β , H-11) 的 NOE 相关推断 C-12 上所连接的氢质子为 β 构型, 所以 C-12 位所连接的 -OH 则应为 α 构型。

化合物 **2** 的 ¹³C-NMR、¹H-NMR 和 HMQC 谱显示有 2 个糖基的端基氢质子和端基碳信号 [δ_H 4.59 (1H, d, 6.4)/ δ_C 105.1, δ_H 5.00 (1H, d, 7.2)/ δ_C 105.7], 表明化合物 **2** 的寡糖链由 2 个糖基组成, 根据端基氢质子有较大的耦合常数 (6.4, 7.2 Hz) 推断 2 个糖基的端基均为 β 构型^[3]。另外 δ_C 20.2 处的甲基碳信号和 δ_H 1.52 (3H, d, 6.0) 处的甲基双重峰质子信号, 提示化合物 **2** 的糖链上有 1 个 6-去氧糖。

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** 中存在 D-木糖和 D-奎诺糖, 比例为 1 : 1。

从 2 个糖基的端基氢质子或甲基质子出发, 通过 TOCSY 和 DQF-COSY 谱可以对各个糖基质子的信号进行归属, 例如, 在 TOCSY 谱中, δ_H 4.59 (1H, d, 6.4) 处的端基氢质子信号 (D-木糖) 与 3.94, 4.18, 4.95 及 3.60, 4.56 处的氢质子信号形成一个自旋耦合体系, 再通过 DQF-COSY 可依次将以上信号归属

为 D-木糖的 H-2, H-3, H-4 及 H-5, 从而确定 D-木糖的所有氢质子信号, 氢质子信号确定后, 糖基的各个碳信号经由 HMQC 谱分析得到归属, 结果见表 2。由 ¹³C-NMR 谱数据比较发现, C-4' (70 到 75.9) 向低场位移 5.9, 提示在该位置有磺酸基 (-SO₃Na) 取代^[2]。另外, δ_C 83.3 (C-2') 与相应单糖对比有较大的低场位移, 提示相应位置应是苷化的位置。将化合物 **2** 甲基化后酸水解及衍生化, 采用 GC-MS 分析形成的部分甲基化糖醇乙酸酯, 表明糖链中存在 2 位连接的木糖和末端的奎诺糖。这一实验结果支持了以上推断。

综上所述, 化合物 **2** 的结构为 3-O-{ β -D-吡喃奎诺糖 (1 $\rightarrow$ 2)-4'-O-磺酸钠- β -D-吡喃木糖}-海参烷-9-烯-18, 16-内酯环-22, 25 环氧-3 β , 12 α , 17 α -三醇。现有文献资料表明化合物 **2** 尚未有公开报道, 为一新化合物, 命名为黑乳海参苷 II。

3 讨论

研究发现, 对皂苷化学结构修饰得到的衍生物如脱硫衍生物保留了与原皂苷基本相同的活性, 但是水解所得的苷元活性则显著降低, 说明化合物中硫酸酯基对其活性影响不大, 但糖链结构与其活性存在一定的关系^[4]。而且从黑乳海参中分离得到的一系列分别含有 1 个糖基、2 个糖基以及 4 个糖基的三萜皂苷类化合物, 其抗真菌及抗肿瘤活性与糖链长短呈正比关系, 进一步说明了化合物中的糖链结构与其活性之间存在一定的关系。如果能够找到海参皂苷药理活性的作用靶点, 进而研究化学结构不同的海参皂苷与作用靶点之间的相互关系, 就有可能找到活性强、不良反应小的化合物, 这部分工作有待于今后进一步深入研究。

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] Kalinin V I, Avilov S A, Kalinina E Y. Structure of eximisoside A, a novel triterpene glycoside from the far-eastern sea cucumber *Psolus eximius* [J]. *J Nat Prod*, 1997, 60(5): 817-819.
- [3] 于德泉, 杨峻山. 分析化学手册 [M]. 第 2 版. 北京: 化学工业出版社, 1999.
- [4] 张佳佳. 花刺参中两个新的四环三萜化合物 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 10-14.