

· 论著 ·

花刺参中三个新的三萜皂苷类化合物

王 强, 王晓华 (解放军 202 医院药剂科, 辽宁 沈阳 110000)

[摘要] 目的 研究花刺参体内的活性皂苷类成分。方法 运用硅胶、Sephadex LH-20 柱色谱等方法进行分离纯化, 利用 IR, ^1H 、 ^{13}C NMR, MS 等光谱技术鉴定其化学结构。结果 从花刺参中分离并鉴定出 3 个化合物, 分别为 3-*O*-[3-*O*-甲基- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 3)- β -D-吡喃木糖-(1 \rightarrow 3)- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃木糖]-海参烷-7,24-二烯-3 β ,23S-二醇, 命名为 variegatuside C; 3-*O*-{3-*O*-甲基- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 3)- β -D-吡喃木糖-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 2)-[β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 4)]- β -D-吡喃木糖}-海参烷-8-烯-3 β ,23S-二醇, 命名为 variegatuside D; 3-*O*-{3-*O*-甲基- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 3)- β -D-吡喃木糖-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 2)-[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-吡喃木糖}-海参烷-9-烯-3 β ,23S-二醇, 命名为 variegatuside E。结论 3 个化合物均为新化合物。

[关键词] 花刺参; 海参; 三萜皂苷

[中图分类号] R284

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2016)05-0431-07

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.05.013

Three new triterpene glycosides from *Stichopus variegatus*

WANG Qiang, WANG Xiaohua (Department of Pharmacy, No. 202 Hospital of PLA, Shengyang 110000, China)

[Abstract] **Objective** To study the chemical constituents from the *Stichopus variegatus*. **Method** The compounds were isolated and purified by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 gel filtration and recrystallization. The structures of these compounds were identified through chemical reactions and spectral analyses, such as IR, ^1H , ^{13}C NMR, MS. **Results** Three compounds were identified as 3-*O*-[3-*O*-methyl- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-holosta-7,24-diene-3 β ,23S-diol, named as variegatuside C; 3-*O*-{3-*O*-methyl- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 4)]- β -D-xylopyranosyl-holosta-8-ene-3 β ,23S-diol, named as variegatuside D; 3-*O*-{3-*O*-methyl- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2)-[3-*O*-methyl- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 4)]- β -D-xylopyranosyl]-holosta-9-ene-3 β ,23S-diol, named as variegatuside E. **Conclusion** All three compounds are new compounds.

[Key words] *Stichopus variegatus* Semper; sea cucumber; triterpene glycoside

海洋生物资源是一个十分巨大的有待深入开发新型药物的重要资源, 众多学者预言, 最有前途的抗癌药物将来自海洋, 发掘新的海洋生物资源已成为海洋药物研究的一个重要发展趋势^[1,2]。近年来, 对海参生物活性成分及其药理作用研究已成为海洋药物研究领域的一个热点^[3]。

花刺参 (*Stichopus variegatus* Semper) 属楯手目刺参科海洋动物, 是南海重要的食用海参之一, 当地渔民称它为“方参”或“黄肉”。文献记载最大体长达 900 mm, 一般体长 200 mm。体稍呈四方柱状, 背部散布许多小疣足, 排列不规则, 口偏于腹面。该

物种盛产于我国南海, 在我国台湾、广东及广西海域均有分布。此外西从马达加斯加、桑给巴尔和红海, 向东可到加罗林群岛, 北到日本南部, 南到澳大利亚洛德豪岛的海域亦有分布^[4]。已有人提取和分离过其体内的酸性黏多糖以及研究其复方制剂的抗凝血机制^[5-7], 但有关海参体内三萜皂苷类化合物的研究报道较少^[8,9]。作者对花刺参体内的皂苷类成分进行研究, 从花刺参中分离得到 3 个新的三萜皂苷类化合物, 命名为 variegatuside C、variegatuside D、variegatuside E。

1 实验部分

1.1 仪器和材料 XT5 显微熔点测定仪 (北京市科仪电光仪器厂); Bruker vector 22 型红外光谱仪; Inova-600 核磁共振仪; Quattro 质谱仪 (Micromass 公司); HSGF254 硅胶预制板 (烟台芝罘黄务硅胶开

[作者简介] 王 强, 本科, 主任药师, 研究方向: 药物化学 (海洋药物)。Tel: (024)28853817; E-mail: wangq202@126.com

[通讯作者] 王晓华, 硕士, 主管药师, 研究方向: 药物化学 (海洋药物)。Tel: (024)28853800; E-mail: wangxiaohua737@sina.com

发试验厂);RP-C18 高效薄层层析板(Merk 公司);Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶(Pharmacia 公司);Aglient 1100, RID 检测器(Aglient 公司);Zorbax 300 SB-C₁₈ (9.4 mm × 250 mm, 5 μm, Aglient 公司);HPLC 使用的甲醇流动相为色谱纯,其他的试剂均为分析纯。

花刺参样品采于海南三亚,由中国科学院海洋研究所廖玉麟教授鉴定为刺参科(Stichopodidae)刺参属(*Stichopus*)动物花刺参(*Stichopus variegatus* Semper)。

1.2 提取分离 新鲜花刺参(约 15 kg),洗净切成小块,绞碎,用 70% 乙醇室温浸泡提取 3 次,每次 7 d,减压回收乙醇提取液得流浸膏。用甲醇反复多

次溶解,过滤除去不溶物,甲醇组分减压回收至浸膏状。再将其均匀分散在水中,依次用石油醚和水饱和正丁醇萃取,分别得到石油醚部分和正丁醇部分。海参皂苷主要集中在正丁醇部分。将正丁醇部分减压回收得粗总皂苷 37.6 g。取总皂苷 17.6 g 采用反复低压硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶过滤、ODS 反相柱色谱纯化,RP-HPLC 制备,流速为 1.5 ml/min,流动相为 65% 甲醇时,得到化合物 I (9 mg),流动相为 76% 甲醇时,得到化合物 II (16.8 mg)、化合物 III (3 mg)(图 1)。应用现代光谱技术和化学方法鉴定以上 3 个化合物均为新化合物,分别命名为 variegatuside C、variegatuside D 和 variegatuside E。

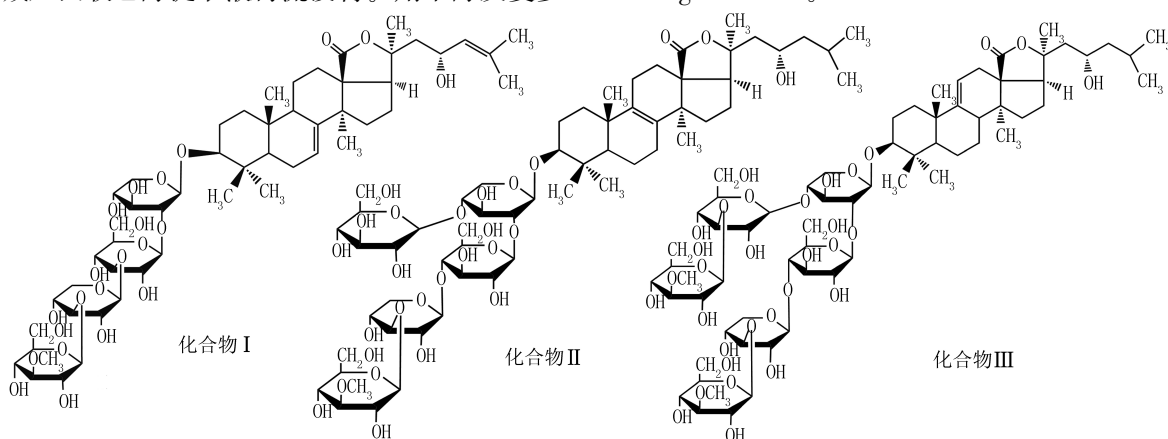


图 1 化合物 I、II、III 的结构式

2 结构鉴定

化合物 I:白色粉末,mp 235~237 °C, Liebermann-Burchard 和 Molish 反应阳性。ESI-MS⁺ m/z 1 095 [M + Na]⁺ 和 ESI-MS⁻ m/z 1 071 [M - H]⁻, 推测化合物 I 的相对分子质量为 1 072。结合¹H、¹³C NMR 谱和 DEPT 谱确定该化合物的分子式为 C₅₃H₈₄O₂₂。IR(KBr, cm⁻¹) 显示有 3 417(OH), 1 761(C=O), 1 652(C=C) 等主要吸收峰。根据化合物 I 的¹H、¹³C NMR 谱和 HMQC 谱,对化合物的各个碳及其所连的质子的化学位移值进行归属(表 1 和表 2)。化合物的¹H 和¹³C NMR 谱的高场区有 7 个甲基信号,在 TOCSY 谱上没有甲基质子与糖环质子形成的相关峰,推断这 7 个甲基信号都是苷元上的甲基信号。在¹H NMR 高场区有苷元质子信号,在 δ_H 3.5~5.5 区域有糖环质子信号,相应的在¹³C NMR 高场有苷元的碳信号,在 δ_C 60~80 区域有糖环上的碳信号,在 δ_C 105 左右有单糖端基碳信号,这些表明化合物 I 为三萜皂苷类化合物。

从化合物 I 的 HMBC 上可以看到下列一组相关峰: δ_H 5.01/δ_C 26.4 (H-24/C-26)、δ_H 5.01/δ_C 19.3 (H-24/C-27), 为 1 个烯氢和 2 个甲基碳形成的一组碳氢远程相关信号; δ_H 0.96/δ_C 123.1 (H-26/C-24) δ_H 0.96/δ_C 131.1 (H-26/C-25)、δ_H 1.30/δ_C 123.2 (H-27/C-24)、δ_H 1.30/δ_C 131.2 (H-27/C-25), 为 2 个甲基的氢和 2 个烯碳形成一组碳氢远程相关信号。这些表明了化合物 I 的苷元侧链上的 2 个甲基连接在 1 个烯碳上,侧链上的双键为链内双键。HMBC 谱中显示以下远程 C-H 相关峰: δ_H 1.67/δ_C 52.7 (H-21/C-17), δ_H 1.67/δ_C 83.7 (H-21/C-20), δ_H 1.70/δ_C 48.9 (H-21/C-22), δ_H 2.34/δ_C 52.7 (H-22/C-17), δ_H 2.34/δ_C 83.7 (H-22/C-20), δ_H 2.34/δ_C 27.4 (H-22/C-21), 说明苷元的侧链与 C-20 位相连。相对构型可以通过核奥沃豪斯效应谱(Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy, NOESY) 确定(图 2 所示)。综上所述,苷元部分确定为 3β,23S-二羟基-7(8),24(25)-二烯-海参烷。化合物 I 糖链部分的结构解析:在¹³C NMR 谱中可找到 4 个糖的

表1 化合物I、II、III苷元的¹³C和¹H NMR相关谱
(在吡啶-d₅:D₂O=4:1中,150/600 MHz)

编号	化合物I		化合物II		化合物III	
	δ _C	δ _H (m, J in Hz)	δ _C	δ _H (m, J in Hz)	δ _C	δ _H (m, J in Hz)
1	36.2	1.20(1H,m),1.70(1H,m)	36.2	1.17(1H,m),1.72(1H,m)	36.1	1.21(1H,m),1.67(1H,m)
2	27.2	1.94(1H,m),2.21(1H,m)	27.1	1.90(1H,m),2.10(1H,m)	26.6	1.95(2H,m)
3	88.8	3.31(1H,dd,4.8,9.6)	88.7	3.23(1H,dd,4.8,10.4)	88.4	3.24(1H,dd,6.0,12)
4	39.7	...	39.6	...	39.5	...
5	51.1	1.26(1H,m)	51.1	1.13(1H,m)	52.6	0.90(1H,m)
6	22.1	1.65(1H,m),1.86(1H,m)	18.4	1.67(2H,m)	20.8	1.20(1H,m),1.40(1H,m)
7	120.3	5.62(1H,m)	27.1	2.14(1H,m),2.20(1H,m)	27.8	1.26(2H,m)
8	143.6	...	131.1	...	39.71	3.24(2H,m)
9	48.7	3.72(1H,m)	135.6	...	151.2	...
10	37.2	...	37.1	...	39.2	...
11	23.3	1.32(1H,m),1.46(1H,m)	21.8	2.22(1H,m),2.34(1H,m)	111.0	5.60(1H,brd,4.8)
12	33.2	2.05(2H,m)	28.2	2.12(1H,m),2.19(1H,m)	29.2	2.04(2H,m)
13	58.9	...	58.9	...	57.9	...
14	51.1	...	48.9	...	47.2	...
15	33.6	1.80(2H,m)	33.2	1.48(1H,m),1.60(1H,m)	35.3	1.33(1H,m),1.67(1H,m)
16	28.2	1.62(1H,m),1.74(1H,m)	25.1	1.96(1H,m),2.10(1H,m)	24.5	1.90(2H,m)
17	52.7	2.48(1H,m)	51.4	2.41(1H,m)	51.7	2.50(1H,dd,4.8,10.8)
18	177.6	...	177.4	...	178.9	...
19	22.2	1.11(3H,s)	19.2	1.26(3H,s)	21.7	1.38(3H,s)
20	83.7	...	84.0	...	84.5	...
21	27.3	1.67(3H,s)	28.5	1.81(3H,s)	28.3	1.80(3H,s)
22	48.9	1.64(1H,m),2.34(1H,m)	47.9	2.02(1H,m),2.15(1H,m)	46.9	2.02(1H,m),2.19(1H,m)
23	66.0	4.20(1H,m)	65.7	4.02(1H,m)	65.0	4.08(1H,m)
24	123.2	5.01(1H,d,7.8)	49.2	1.34(1H,m),1.68(1H,m)	48.8	1.26(1H,m),1.63(1H,m)
25	131.2	...	24.7	2.04(1H,m)	24.3	2.03(1H,m)
26	26.4	0.96(3H,d,6.6)	23.7	1.00(3H,d,6.8)	23.5	1.02(3H,s)
27	19.4	1.30(3H,d,6.0)	22.1	1.01(3H,d,6.8)	21.9	0.98(3H,s)
30	16.7	1.10(3H,s)	16.5	1.07(3H,s)	16.4	1.07(3H,s)
31	28.2	1.26(3H,s)	28.0	1.23(3H,s)	27.8	1.22(3H,s)
32	28.3	1.04(3H,s)	25.4	1.05(3H,s)	19.6	0.87(3H,s)

端基碳信号(δ_C 105.8,105.9,105.0,105.6),通过HMQC归属了氢谱中相对应的4个端基氢信号[δ_H 4.83(d, J=7.2 Hz),5.28(d, J=7.8 Hz),5.11(d, J=7.8 Hz),5.25(d, J=7.2 Hz)],从而表明化合物I的寡糖链是由4个糖基组成,且根据端基氢的偶合常数都在7.2~7.8 Hz,可推断糖苷键均为β-构型。糖基间的连接顺序和位置由HMBC谱及NOESY谱确定(图2所示)。

化合物I以2 mol/L CF₃COOH水解皂苷后得到组成皂苷糖链的单糖,将其制备成糖腈乙酸酯衍生物,进行GC-MS分析,经与标准糖的糖腈乙酸酯衍生物对照,确定化合物I的糖链由D-木糖、D-葡萄糖、D-3-O-甲基葡萄糖组成,比例为2:1:1,进一步证实了单糖的类型。

综上所述,化合物I的结构为3-O-[3-O-甲基-β-D-吡喃葡萄糖-(1→3)-β-D-吡喃木糖-(1→3)-β-D-吡

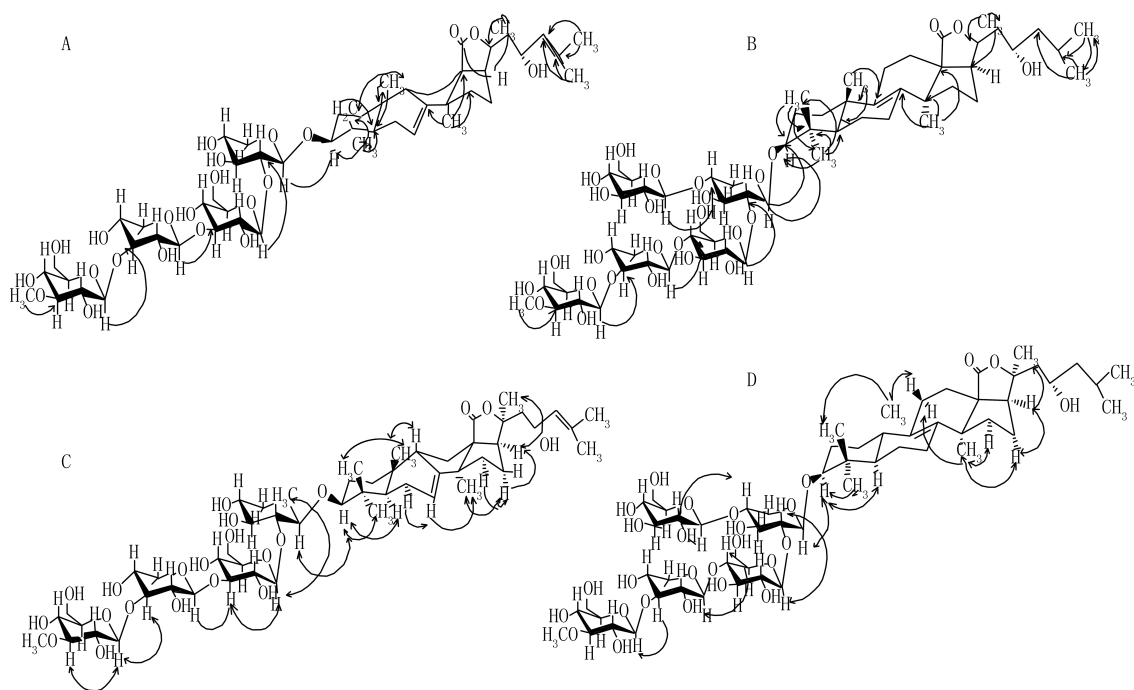
喃葡萄糖-(1→2)-β-D-吡喃木糖]海参烷-7,24-二烯-3β,23S-二醇,经查阅文献,未见其公开发表,故化合物I为一个新的三萜皂苷类化合物,命名为variegatuside C。

化合物II:白色粉末,mp 200~203 °C(MeOH-H₂O),Liebermann-Burchard和Molish反应阳性。ESI-MS⁺ m/z 1 259 [M+Na]⁺和ESI-MS⁻ m/z 1 235 [M-H]⁻,推测化合物II的相对分子质量为1 236。根据HRESI-MS⁺ m/z 1 259.603 1 [M+Na]⁺,结合¹H、¹³C NMR谱和DEPT谱确定该化合物的分子式C₅₉H₉₆O₂₇。IR(KBr, cm⁻¹): 3 355(OH),1 760(C=O),1 683(C=C)等主要吸收峰。根据化合物II的¹H、¹³C NMR谱和HMQC谱,对化合物的各个碳及其所连的质子的化学位移值进行归属(表1和表3)。化合物II在¹H和¹³C NMR谱的高场区有7个甲基信号,在TOCSY谱上没有甲

表 2 化合物 I 糖链的¹³C 和¹H NMR 相关谱
 (在吡啶-d₅: D₂O=4:1 中, 150/600 MHz)

位置	δ _C	δ _H (m, J in Hz)
xyl1		
1	105.8	4.83(1H, d, 7.2)
2	83.7	4.17(1H, m)
3	78.0	4.10(1H, m)
4	71.0	3.99(1H, m)
5	66.6	3.70(1H, m), 4.34(1H, m)
glc		
1	105.9	5.28(1H, d, 7.8)
2	76.8	3.94(1H, m)
3	80.4	4.41(1H, m)
4	69.2	3.74(1H, m)
5	78.4	4.21(1H, m)
6	62.2	4.26(1H, m), 4.44(1H, m)
xyl2		
1	105.0	5.11(1H, d, 7.8)
2	73.8	3.83(1H, m)
3	87.6	4.07(1H, m)
4	70.6	4.17(1H, m)
5	66.8	3.58(1H, m), 4.16(1H, m)
OMe-glc		
1	105.6	5.25(1H, d, 7.2)
2	76.8	4.05(1H, m)
3	88.1	3.73(1H, m)
4	75.2	4.14(1H, m)
5	75.7	3.82(1H, m)
6	61.2	4.42(1H, m), 4.60(1H, m)
OMe	60.9	3.87(3H, s)

基质子与糖环质子形成的相关峰, 据此可以推断化合物 II 的这 7 个甲基信号都是苷元上的甲基信号。在¹H NMR 高场区有苷元质子信号, 在 δ_H 3.5~5.5 区域有糖环质子信号, 相应的在¹³C NMR 高场有苷元的碳信号, 在 δ_C 60~80 区域有糖环上的碳信号, 在 δ_C 105 左右有单糖端基碳信号, 这些信号表明化合物 II 为三萜皂苷类化合物。¹³C NMR 谱显示苷元有一个双键 Δ⁸⁽⁹⁾ (δ_C 131.00 C-8; 135.60 C-9), DEPT 谱显示都为季碳, TOCSY 谱显示 δ_H 2.14 (1H, α, H-7); 2.20 (1H, β, H-7); 1.67 (2H, m, H-6); 1.13 (1H, m, H-5) 形成一个自旋偶合系统, δ_H 2.22 (2H, m, H-11), 2.12 (1H, m, α, H-12), 2.19 (1H, m, β, H-12) 形成一个自旋偶合系统, 推测苷元上的双键在 8(9) 位, 同时从 HMBC 中可以看到以下远程 C-H 相关: δ_H 1.05/δ_C 131.00 (H-32/C-8), δ_H 1.3/δ_C 135.6 (H-19/C-9), δ_H 2.2/δ_C 135.6 (H-11/C-9) 验证了化合物 II 的双键位置。¹³C NMR 和 DEPT 谱中 δ_C 177.4 (C-18) 是羰基的季碳信号, HMBC 谱中可见到 2.12 (1H, m, α, H-12), 2.41 (1H, m, H-17) 均与 177.38 (C-18) 有明显碳氢远程相关信号, 印证了羰基碳位于苷元的 18 位。δ_C 84.0 (C-20) 的季碳信号为连氧季碳, 因此可以确定化合物 II 中存在 18(20) 内酯结构。HMBC 谱中显示以下远程 C-H 相关峰: δ_H 1.81/δ_C 51.3 (H-21/C-17), δ_H 1.81/δ_C 84.0 (H-21/C-20), δ_H 1.83/δ_C


图 2 化合物 I, II 的 HMBC 和 NOESY 相关谱

(A, B 为化合物 I, II 的 HMBC 相关谱; C, D 为化合物 I, II 的 NOESY 相关谱)

47.9 (H-21/C-22), $\delta_{\text{H}} 2.02/\delta_{\text{C}} 51.4$ (H-22/C-17), $\delta_{\text{H}} 2.02/\delta_{\text{C}} 84.0$ (H-22/C-20), $\delta_{\text{H}} 2.02/\delta_{\text{C}} 28.5$ (H-22/C-21), 说明苷元的侧链与 C-20 位相连。在 ^1H 、 ^{13}C NMR 和各种 2D-NMR 谱显示苷元的侧链无双键存在, 但 C-23, C-22, C-24 都有较大的低场位移 $\delta_{\text{C}} 65.7$ 、 $\delta_{\text{C}} 47.9$ 和 $\delta_{\text{C}} 49.2$, 结合分子式说明 C-23 位连着一个羟基。同时在 HMBC 谱中也能找到 $\delta_{\text{H}} 1.68/\delta_{\text{C}} 23.8$ (H-24/C-26), $\delta_{\text{H}} 1.00/\delta_{\text{C}} 49.2$ (H-26/C-24), $\delta_{\text{H}} 1.01/\delta_{\text{C}} 49.2$ (H-27/C-24) 的碳氢远程相关信号, 推测侧链上有异丙烷基团存在。即 C-25 连着两个甲基: $\delta_{\text{C}} 23.8$ (C-26)/ $\delta_{\text{H}} 1.00$ (H-26), $\delta_{\text{C}} 22.1$ (C-27)/ $\delta_{\text{H}} 1.01$ (H-27)。将 ^1H NMR 谱的甲基质子信号通过 HMQC 谱找到相应的碳信号后, 在 HMBC 谱中可发现 $\delta_{\text{H}} 1.07$ (H₃-30), $\delta_{\text{H}} 1.23$ (H₃-31) 分别与 $\delta_{\text{C}} 88.7$ (C-3)、 $\delta_{\text{C}} 39.6$ (C-4)、 $\delta_{\text{C}} 51.1$ (C-5) 有碳氢远程相关信号, 使得 CH₃-30、CH₃-31 两个甲基信号得以确认。 $\delta_{\text{H}} 1.26$ (H-19) 与 $\delta_{\text{C}} 36.15$ (C-1)、 $\delta_{\text{C}} 51.1$ (C-5)、 $\delta_{\text{C}} 135.6$ (C-9)、 $\delta_{\text{C}} 37.1$ (C-10) 有碳氢远程相关信号; $\delta_{\text{H}} 1.05$ (H-32) 与 $\delta_{\text{C}} 58.9$ (C-13)、 $\delta_{\text{C}} 48.9$ (C-14)、 $\delta_{\text{C}} 33.2$ (C-15)、 $\delta_{\text{C}} 131.0$ (C-8) 有碳氢远程相关信号; $\delta_{\text{H}} 1.81$ (H-21) 与 $\delta_{\text{C}} 51.4$ (C-17)、 $\delta_{\text{C}} 84.0$ (C-20)、 $\delta_{\text{C}} 47.9$ (C-22) 有碳氢远程相关信号; $\delta_{\text{H}} 1.00$ (H-26) 与 $\delta_{\text{C}} 49.2$ (C-24)、 $\delta_{\text{C}} 24.7$ (C-25)、 $\delta_{\text{C}} 22.1$ (C-27) 有碳氢远程相关信号; $\delta_{\text{H}} 1.01$ (H-27) 与 $\delta_{\text{C}} 49.2$ (C-24)、 $\delta_{\text{C}} 24.7$ (C-25)、 $\delta_{\text{C}} 23.8$ (C-26) 有碳氢远程相关信号; 这些重要相关信号分别归属了 CH₃-19、CH₃-32、CH₃-21、CH₃-26、CH₃-27 的碳氢化学位移。其空间相对构型可以通过 NOESY 确定(图 2 所示)。在 ^1H NMR 谱上, $\delta_{\text{H}} 3.23$ (1H, dd, $J=4.8, 10.4$ Hz, H-3) 与 H-2 β (axial 型) 之间有较大的偶合常数(10.4 Hz), 说明 H-3 处于 α 位, 而连接于 C-3 位的羟基处于 β 位。在 NOESY 上 $\delta_{\text{H}} 1.23$ (H₃-31), $\delta_{\text{H}} 1.13$ (H-5) 与 $\delta_{\text{H}} 3.23$ (1H, dd, $J=4.8, 10.4$ Hz, H-3) 的 NOE 相关, 说明 H-5, H₃-31 处于 α 位, 而 H₃-30 处于 β 位。 $\delta_{\text{H}} 1.11$ (H₃-32)、 $\delta_{\text{H}} 2.41$ (1H, trd, H-17) 与 $\delta_{\text{H}} 1.96$ (1H, m, H-16 α) 的 NOE 相关, 说明 H₃-32、H-17 都处于 α 位。两个甲基质子信号 $\delta_{\text{H}} 1.26$ (H₃-19) 与 $\delta_{\text{H}} 1.07$ (H₃-30) 在 NOESY 谱上表现出明显的 NOE 相关, 说明 H₃-19 与 H₃-30 都是 β 构型。综上所述, 苷元部分确定为 3 β , 23S-二羟基-8(9)-烯-海参烷。在 ^{13}C NMR 谱中可找到 5 个糖的端基碳信号 ($\delta_{\text{C}} 104.9, 105.6, 105.2, 105.4, 102.8$), 通过 HMQC 归属了氢谱中相对应的 5 个端基氢信号 [$\delta_{\text{H}} 4.72$ (d, $J=7.6$ Hz), 5.20 (d, $J=8.4$ Hz), 5.05 (d, $J=6.8$ Hz), 5.18 (d,

$J=7.6$ Hz), 4.96 (d, $J=7.6$ Hz)], 从而表明化合物 II 的寡糖链是由 5 个糖基组成, 且根据端基氢的偶合常数都在 6.8~8.4 Hz, 可推断糖苷键均为 β 构型。

化合物 II 同化合物 I 做相同处理后, 确定化合物 II 的糖链由 D-木糖、D-葡萄糖、D-3-O-甲基葡萄糖组成, 比例为 2:2:1。解析糖链时从 5 个糖基的端基氢信号出发, 通过 DQCOSY 和 TOCSY 谱可以对各个糖基质子的信号进行归属。以 D-木糖为例, 在 TOCSY 谱中 $\delta_{\text{H}} 4.72$ (d, $J=7.6$ Hz) 与 $\delta_{\text{H}} 4.08, 4.18, 4.95, 3.66, 4.40$ 处的质子信号形成一个自旋偶合体系, 通过 DQCOSY 可将以上信号依次归属为 D-木糖的 H-2, H-3, H-4 和 H-5。从而可根据 HMQC 谱将相应的碳信号得以归属。在 HMBC 谱中发现 -OCH₃ (3.85, s) 与葡萄糖的 C-3 (87.76) 有很强的相关点, 证明 -OCH₃ 连接在 D-葡萄糖上的 C-3 位上。同时还观察到 4.96 (1-H) 与 77.43 (C-4), 5.18 (1-H) 与 87.67 (C-3), 5.05 (1-H) 与 80.53 (C-4), 5.20 (1-H) 与 83.18 (C-2), 4.72 (1-H) 与 88.70 (C-3) 有强的相关点, 说明化合物 II 糖链间的连接顺序为 3-O-甲- β -D-葡萄糖-(1 \rightarrow 3)- β -D-木糖-(1 \rightarrow 4)- β -D-葡萄糖-(1 \rightarrow 2)[β -D-葡萄糖-(1 \rightarrow 4)]- β -D-木糖-(1 \rightarrow 3)-苷元。相应的在 NOESY 中也可以找到重要的 NOE 相关信号, 验证了这种连接的存在(图 2 所示)。

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 \rightarrow 3)- β -D-吡喃木糖-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 2)[β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 4)]- β -D-吡喃木糖}-海参烷-8-烯-3 β , 23S-二醇, 经查阅文献没有公开报道, 为新化合物, 命名为 variegatuside D。

化合物 III: 白色粉末, mp 250~253 °C (MeOH-H₂O), Liebermann-Burchard 和 Molish 反应阳性。ESI-MS⁺ m/z 1435 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺ 和 ESI-MS⁻ m/z 1411 [$\text{M} - \text{H}$]⁻, 推测化合物 7 的相对分子质量为 1412。结合 ^1H 、 ^{13}C NMR 谱和 DEPT 谱确定该化合物的分子式 C₆₆H₁₀₈O₃₂。IR (KBr, cm⁻¹): 3438(OH), 1743(C=O), 1649(C=C) 等主要吸收峰。根据化合物 III 的 ^1H 、 ^{13}C NMR 谱和 HMQC 谱, 对化合物的各个碳及其所连的质子的化学位移值进行归属(表 1 和表 4)。化合物的 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱的高场区有 7 个甲基信号, 在 TOCSY 谱上没有甲基质子与糖环质子形成的相关峰, 据此可以推断这 7 个甲基信号都是苷元上的甲基信号。在 ^1H NMR 高场区有苷元质子信号, 在 $\delta_{\text{H}} 3.5\sim 5.5$ 区域有糖环质子信号, 相应的在 ^{13}C NMR 高场

表3 化合物Ⅱ糖链的¹³C和¹H NMR相关谱

(在吡啶-d₅: D₂O=4:1中, 150/600 MHz)

位置	δ _c	δ _H (m, J in Hz)
xy1		
1	104.9	4.72(1H, d, 7.6)
2	82.9	4.08(1H, m)
3	75.5	4.18(1H, m)
4	77.4	3.95(1H, m)
5	63.6	3.66(1H, m), 4.40(1H, m)
glc1		
1	105.6	5.20(1H, d, 6.8)
2	76.6	4.02(1H, m)
3	69.1	4.04(1H, m)
4	80.5	4.32(1H, m)
5	75.7	3.98(1H, m)
6	62.3	4.20(1H, m), 4.44(1H, m)
xy2		
1	105.2	5.05(1H, d, 6.8)
2	73.1	3.96(1H, m)
3	87.7	4.02(1H, m)
4	69.8	4.06(1H, m)
5	66.5	3.55(1H, m), 4.15(1H, m)
OMe-glc		
1	105.4	5.18(1H, d, 7.6)
2	73.6	3.98(1H, m)
3	87.8	3.68(1H, m)
4	70.7	4.09(1H, m)
5	76.6	3.82(1H, m)
6	61.3	4.38(1H, m), 4.54(1H, m)
OMe		
	60.6	3.85(3H, s)
glc2		
1	102.8	4.96(1H, d, 7.6)
2	75.0	3.98(1H, m)
3	78.2	3.94(1H, m)
4	70.7	4.10(1H, m)
5	77.7	4.20(1H, m)
6	62.3	4.22(1H, m), 4.42(1H, m)

区有苷元的碳信号,在 δ_c60~80 区域有糖环上的碳信号,在 δ_c105 左右有 6 个单糖端基碳信号,这些信号表明化合物Ⅲ是六糖三萜皂苷类化合物。经查阅文献,化合物Ⅲ与化合物 desacety-stichloroside B1 苷元结构极为相似^[10],只是苷元部分双键位置不一样。¹³C NMR谱显示化合物Ⅲ的苷元有一个双键 Δ⁹⁽¹¹⁾ (δ_c 151.23 C-9; 111.04 C-11), 化合物 desacety-stichloroside B1 的双键位置在 7(8)位。它们其余位置的 NMR 数据、质子偶合和偶合常数也基本一致,其结构为 3β,23S-二羟基-9(11)-烯-海参烷。借助¹H、¹³C NMR谱和 HMBC 谱,根据 6 个端基质子信号,通过 TOCSY 和 DQCOSY 谱对各个单糖的质子信号进行了归属,比较化合物Ⅲ和化合物 desacety-stichloroside B1 的糖链部分数据可以发现两者的寡糖链的组成和连接顺序是完全一

致的。

综上所述,化合物Ⅲ的结构为 3-O-{3-O-甲基-β-D-吡喃葡萄糖-(1→3)-β-D-吡喃木糖-(1→4)-β-D-吡喃葡萄糖-(1→2)[3-O-甲基-β-D-吡喃葡萄糖-(1→3)-β-D-吡喃葡萄糖-(1→4)]-β-D-吡喃木糖}-海参烷-9-烯-3β,23S-二醇,经查阅文献表明尚未公开发表,为一新化合物,命名为 variegatuside E。

表4 化合物Ⅲ糖链的¹³C和¹H NMR相关谱

(在吡啶-d₅: D₂O=4:1中, 150/600 MHz)

位置	δ _c	δ _H (m, J in Hz)
xy1		
1	104.9	4.65(1H, d, 7.2)
2	82.0	4.06(1H, m)
3	75.3	4.12(1H, m)
4	77.2	3.95(1H, m)
5	64.6	3.60(1H, m), 4.12(1H, m)
glc1		
1	105.0	5.11(1H, d, 7.8)
2	73.2	3.96(1H, m)
3	68.8	3.99(1H, m)
4	80.2	4.20(1H, m)
5	75.4	4.18(1H, m)
6	61.8	4.11(1H, m), 4.43(1H, m)
xy2		
1	104.5	4.95(1H, d, 7.2)
2	73.5	3.95(1H, m)
3	87.4	4.12(1H, m)
4	69.2	4.00(1H, m)
5	66.1	3.56(1H, m), 4.10(1H, m)
OMe-glc1		
1	103.1	5.26(1H, d, 7.8)
2	76.2	4.01(1H, m)
3	87.6	3.73(1H, m)
4	70.4	3.95(1H, m)
5	77.9	3.90(1H, m)
6	61.9	4.10(1H, m), 4.32(1H, m)
OMe		
	60.5	3.87(3H, s)
glc2		
1	102.3	4.88(1H, d, 7.2)
2	75.9	3.93(1H, m)
3	87.0	4.08(1H, m)
4	70.4	4.03(1H, m)
5	77.6	3.94(1H, m)
6	60.9	4.10(1H, m), 4.40(1H, m)
OMe-glc2		
1	105.2	5.28(1H, d, 7.2)
2	76.1	4.02(1H, m)
3	87.5	3.72(1H, m)
4	71.0	4.05(1H, m)
5	77.9	3.80(1H, m)
6	61.9	4.10(1H, m), 4.44(1H, m)
OMe		
	60.5	3.86(3H, s)

(下转第 454 页)

好(表3)。

表3 不同提取溶剂考察结果

提取溶剂	称样量 (m/g)	含量 (mg/g)	平均含量 (mg/g)
100% 甲醇	1.000 72	0.053 9	0.0539
	1.000 72	0.053 9	
70% 甲醇	1.000 71	0.252 1	0.251 8
	1.000 71	0.251 6	
50% 甲醇	1.000 46	0.355 4	0.354 3
	1.000 46	0.353 3	
30% 甲醇	1.000 78	0.360 5	0.360 2
	1.000 78	0.359 9	
10% 甲醇	1.000 32	0.324 9	0.325 1
	1.000 32	0.325 3	
水	1.000 29	0.326 4	0.327 2
	1.000 29	0.328 0	

通过对3批样品的检测,结果发现不同批次间绿原酸含量差异较大,推测与原药材质量有关,为此,有必要采用本法对清热败毒颗粒中绿原酸含量进行检测,为评价和控制清热败毒颗粒的质量提供科学依据。

【参考文献】

[1] 汤迎爽,李富军. 浅议军队医院制剂发展方向[J]. 中医药导

报,2012,18(7):120-121.
 [2] 周苏萍,夏晓东,傅小英. 军队药品制剂抽验质量分析与建议[J]. 解放军药学学报,2010,26(2):176-177.
 [3] 黄立峰,宋洪涛. 目前形势下医院制剂在大型军队医院中的存在与发展[J]. 解放军药学学报,2006,22(1):77-79.
 [4] 李霞,杨颖博,李君丽,等. HPLC法同时测定皱皮木瓜中原儿茶酸和绿原酸的含量[J]. 中国医药导报,2012,9(34):110-112.
 [5] 赵金娟,戴雪梅,曲永胜,等. 绿原酸药效学研究进展[J]. 中国野生植物资源,2013,32(4):1-5.
 [6] 吴卫华,康楨,欧阳冬生,等. 绿原酸的药理学研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2006,18:691-694.
 [7] 王丽萍,郭栋,王果,等. 中药绿原酸的研究进展[J]. 时珍国医国药,2011,22(4):961-963.
 [8] Cai Y, Zhang ZH, Jiang SS, et al. Chlorogenic acid increased acrylamide formation through promotion of HMF formation and 3-aminopropionamide deamination [J]. J Hazard Mater, 2014, 268:1-5.
 [9] Francisco V, Costa G, Figueirinha A, et al. Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor-κB pathway inhibition; contribution of chlorogenic acid [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(1):126-134.

[收稿日期] 2015-03-06 [修回日期] 2015-06-28
 [本文编辑] 顾文华

(上接第436页)

3 讨论

海参是重要的海洋食物和药物资源,具有抗肿瘤、抗凝血、抗真菌、降低血黏度等作用^[11]。本文通过提取分离发现花刺参中3个新三萜皂苷类化合物,并对化合物I、II进行初步的抗肿瘤及抗真菌活性实验,化合物II的稻瘟霉活性筛选模型结果显示其具有一定的抗稻瘟霉活性,化合物I、II对白色念珠菌、近平滑念珠菌和新生隐球菌均具有一定抗真菌活性(MIC值分别为12.5、3.4 μg/ml;25、3.4 μg/ml;50、6.8 μg/ml),化合物II对人肝癌细胞株(BEL-7402)有一定的抑制作用。对该2个化合物的抗肿瘤、抗真菌活性机制有待进一步研究。

【参考文献】

[1] 姚新生. 海洋抗肿瘤药物研究展望[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(3): 233-235.
 [2] Hawa IJr, Zulaikah M, Jamaludin M, et al. The potential of the coelomic fluid in sea cucumber as an antioxidant [J]. Malays J Nutr, 1999, 5(1): 55-59.
 [3] 李茵,梁承红,张勇. 海参中有毒有害物质的分析研究

进展[J]. 化学研究与应用,2014,26(1):1-5.
 [4] 廖玉麟. 中国动物志棘皮动物门海参纲[M]. 北京:科学出版社,1997:154-155.
 [5] 王利民,蔡生业,姚成芳,等. 花刺参粘多糖对大鼠血管平滑肌细胞粘附分子表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(7):565-568.
 [6] 王华亭,魏芳,左希宏,等. 复方花刺参粘多糖对血管损伤后再狭窄家兔血管内膜增殖与凋亡的影响[J]. 疑难病杂志, 2013, 12(4): 293-296.
 [7] 姚成芳,蔡生业. 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):33-35.
 [8] 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.
 [9] 卢霞,刘爱芹,孙怀玉. 花刺参酸性粘多糖的提取及鉴定[J]. 齐鲁药事,2004,23(2):41-42.
 [10] Kitagawa I, Kobayashi M, Inamoto T, et al. The structures of six antifungal oligoglycosides, stichlorosides A1, A2, B1, B2, C1, and C2, from the sea cucumber *Stichopus chloronotus* (BRANDT) [J]. Chem Pharm Bull, 1981, 29(8): 2387-2391.
 [11] 姜健,杨宝灵,郇阳. 海参资源及其生物活性物质的研究[J]. 生物技术通讯,2004,15(5):537-540.

[收稿日期] 2015-03-13 [修回日期] 2016-07-01
 [本文编辑] 顾文华