

**МОНОСУЛЬФАТИРОВАННЫЕ ТРИТЕРПЕНОВЫЕ ГЛИКОЗИДЫ
Cucumaria okhotensis LEVIN ET STEPANOV – НОВОГО ВИДА
ГОЛОТУРИЙ ИЗ ОХОТСКОГО МОРЯ**

© 2007 г. А. С. Сильченко*, С. А. Авилов*, В. И. Калинин**, В. А. Стоник*,
А. И. Калиновский*, П. С. Дмитренко*, В. Г. Степанов**

*Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159;

**Камчатский филиал Тихоокеанского института географии ДВО РАН

Поступила в редакцию 07.04.2006 г. Принята к печати 10.04.2006 г.

Изучена подфракция моносультфатированных тритерпеновых гликозидов нового вида голотурии *Cucumaria okhotensis*. Выделено три соединения: охотозид A_1-1 – новый гликозид с тетрасахаридной углеводной цепью, охотозид A_2-1 – новый пентаозид, содержащий глюкозу во втором положении углеводной цепи (такая структурная особенность впервые обнаружена для гликозидов голотурий рода *Cucumaria*), а также кукумариозид A_0-1 , выделенный ранее из дальневосточной голотурии *Cucumaria japonica*. Показана видоспецифичность состава моносультфатированных тритерпеновых гликозидов голотурии *C. okhotensis*, что подтверждает правомерность ее описания как нового вида.

Ключевые слова: *Cucumaria okhotensis*, тритерпеновые гликозиды, хемотаксономические маркеры.

ВВЕДЕНИЕ

Голотурии или морские огурцы являются представителями одного из пяти ныне живущих классов морских организмов, относящихся к типу иглокожих (Echinodermata). Некоторые виды голотурий, в том числе принадлежащие к роду *Cucumaria*, являются объектами промысла. Кроме этого, в Азии высоко ценятся целебные (лечебные) свойства продуктов из голотурий. К настоящему времени установлено, что биологическое действие экстрактов голотурий во многом обусловлено наличием в них тритерпеновых гликозидов – низкомолекулярных биорегуляторов, обладающих широким спектром физиологической активности [1].

Структурные исследования тритерпеновых гликозидов голотурий рода *Cucumaria* были начаты в 80-х годах прошлого века [2, 3], и за это время был изучен гликозидный состав семи видов этого рода [4]. Например, исследования гликозидного состава таких массовых промысловых видов голотурий, как дальневосточная *Cucumaria japonica* и североатлантическая *C. frondosa* [5] показали, что каждый из них имеет специфический набор тритерпеновых

гликозидов. Использование полученных данных помогло разрешить существовавшую в то время проблему их таксономических отношений [6].

До недавнего времени считалось, что *C. japonica* распространена от Берингова моря до южных островов Японии. Однако в последние годы было описано несколько новых видов этого рода: *C. djakonovi*, *C. savelyjevae* [7], *C. conicospermium* [8], *C. levini* [9], а также *C. okhotensis* [10]. Новые данные по систематике дальневосточных кукумарий позволили заключить, что вид *C. japonica* сборный (так как голотурий недавно описанных видов ранее классифицировали как *C. japonica*), и в действительности ареал его распространения значительно уже, чем считалось ранее.

Трудность видового определения голотурий рода *Cucumaria* объясняется высокой степенью вариабельности формы спикул, являющейся основной характеристикой видовой принадлежности голотурии. В такой ситуации становится очевидной ценность и перспективность использования структурного анализа тритерпеновых гликозидов в разрешении спорных вопросов таксономии. Например, исследования тритерпеновых гликозидов голотурии *C. conicospermium* выявили значительные структурные отличия от гликозидов *C. japonica* и подтвердили обоснованность выведения этой голотурии в новый вид [11].

Другим важным аспектом изучения гликозидного состава промысловых видов голотурий является возможность прикладного использования

Сокращения: HSQC – гетероядерная одноквантовая корреляция; HMBC – гетероядерная многополосная корреляция; COSY – корреляционная спектроскопия; NOESY – спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера и обмена; TOCSY – полная корреляционная спектроскопия; MALDI-TOF-MS – масс-спектрометрия с лазерной десорбцией/ионизацией усиленной матрицей.

*Автор для связи (тел.: (4232) 31-11-68; факс: (4232) 31-40-50; эл. почта: kalinin@piboc.dvo.ru).

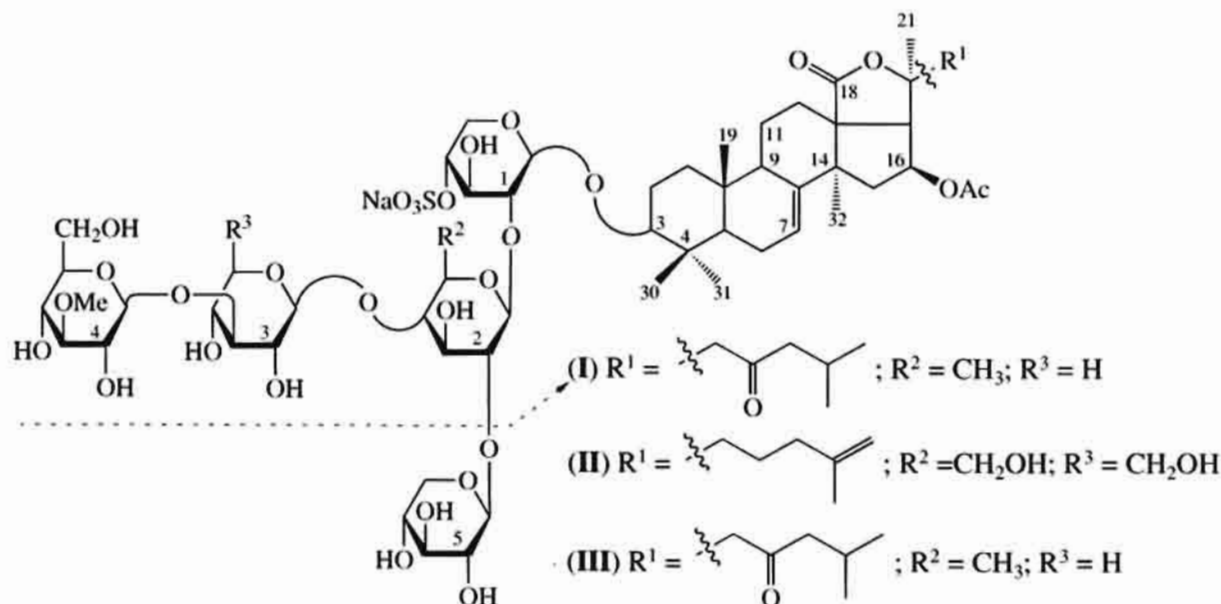
полученных данных. Накопленные данные о структурах тритерпеновых гликозидов и проявляемой ими биологической активности положили начало разработкам лекарственных препаратов и биологически активных пищевых добавок на основе гликозидных фракций голотурий *C. japonica* [12, 13] и *C. frondosa* [14]. В связи с описанием новых дальневосточных видов голотурий рода *Cucumaria* (ранее все добываемые в промысловых масштабах на Дальнем Востоке кукумарии считались принадлежащими к одному виду – кукумария японская), становится актуальным вопрос стандартизации сырья при изготовлении медицинских и ветеринарных препаратов, а также выяснение возможности использования разных видов рода *Cucumaria* в качестве источника гликозидов для создания новых лекарственных средств.

Целью данной работы является изучение гликозидов голотурии *C. okhotensis* для подтверждения ее

видовой обособленности и выяснения возможности использования *C. okhotensis* в качестве источника гликозидов для новых лекарственных препаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из гликозидной фракции голотурии *C. okhotensis*, собранной у западного побережья Камчатки, было выделено несколько подфракций гликозидов различной полярности: моно-, ди- и трисульфатированные соединения, характерные и для других исследованных видов рода *Cucumaria* [4, 11]. В ходе данной работы была изучена подфракция моносulfатированных гликозидов, из которой было выделено три соединения: новые гликозиды – охотозид A_1-1 (I) с тетрасахаридной линейной углеводной цепью и охотозид A_2-1 (II) с новой пентасахаридной разветвленной углеводной цепью, а также идентифицирован известный кукумаризид A_0-1 (III).



Спиртовой экстракт голотурии *C. okhotensis*, обессоленный на колонке с Полихромом-1, подвергался многократной колоночной хроматографии на силикагеле. В результате были получены подфракции моно-, ди- и трисульфатированных гликозидов. Подфракция моносulfатированных гликозидов разделялась с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на индивидуальные компоненты. Структуры выделенных соединений были установлены на основе комплексного анализа их ЯМР-и масс-спектров, а также с помощью химических трансформаций.

Сравнение части спектра ^{13}C -ЯМР охотозид A_1-1 (I), относящейся к углеводному фрагменту, с

соответствующей частью спектра фрондозид A_1 , выделенного ранее из *C. frondosa* [15], показало практически полное совпадение их сигналов. Это позволило сделать вывод об идентичности углеводных цепей этих соединений, включая наличие *O*-сульфата в положении 4 первого остатка ксилозы (связанного с агликоном). Действительно, в спектре ^{13}C -ЯМР охотозид A_1-1 (I) (табл. 1) наблюдалось два двойных сигнала в области δ 104.96 и 105.26 м.д., которые были скоррелированы с сигналами четырех аномерных протонов при 4.75 (д, J 7.1 Гц), 5.09, 4.86 (д, J 7.7 Гц), 5.35 м.д. (д, J 7.8 Гц) с помощью HSQC-спектра, что свидетельствовало о наличии четырех моносахарид-

Таблица 1. ЯМР-спектры углеводной цепи охотозиды A₁-1 (I)[#]. C₅D₅N

Остаток	Атом	δ_C , DEPT	δ_H (мульти., J, Гц)	HMBC	NOESY
Xyl (1)	C ¹ -1	104.96	4.75 (д, 7.1)	C: 3	H: 3, 31, H ¹ -3, H ¹ -5
	C ¹ -2	83.25	4.03 (м)	C ¹ -3, C ² -1	H ² -1
	C ¹ -3	75.56	4.34 (т, 9.2)	C ¹ -2, C ¹ -4	H ¹ -1, H ¹ -5
	C ¹ -4	75.56	5.17 (дт, 9.0, 5.1)		
	C ¹ -5	64.21	4.81 (дд, 5.3, 11.6)	C ¹ -4	
Qui (2)			3.77 (м)	C ¹ -4	H ¹ -1, H ¹ -3
	C ² -1	105.26	5.09*		
	C ² -2	76.17	4.00 (м)	C ² -3, C ² -4	
	C ² -3	75.18	4.07 (м)	C ² -2	H ² -1
	C ² -4	85.78	3.63 (т, 8.9)	C ³ -1, C ² -3, C ² -5	H ³ -1, H ² -6
	C ² -5	71.60	3.74 (м)		H ² -1
Xyl (3)	C ² -6	17.82	1.73 (д, 5.9)	C ² -4, C ² -5	H ³ -1
	C ³ -1	104.96	4.86 (д, 7.7)	C ² -4	H ² -4, H ³ -3, H ² -6
	C ³ -2	73.44	4.01 (м)	C ³ -3	
	C ³ -3	87.14	4.19 (т, 8.7)	C ⁴ -1, C ³ -4, C ³ -2	H ³ -1
	C ³ -4	68.86	4.08 (м)		
3MeGlc (4)	C ³ -5	66.39	3.67 (т, 11.0), 4.23 (м)		
	C ⁴ -1	105.26	5.35 (д, 7.8)	C ³ -3	H ³ -3, H ⁴ -3, H ⁴ -5
	C ⁴ -2	74.89	4.02 (м)		
	C ⁴ -3	87.83	3.72 (т, 8.9)	OMe, C ⁴ -2, C ⁴ -4	H ⁴ -1
	C ⁴ -4	70.50	4.12 (м)		
	C ⁴ -5	78.08	3.98 (м)		
	C ⁴ -6	61.99	4.26 (дд, 5.5, 11.5)		
	OMe	60.60	4.49 (дд, 2.3, 11.3)		
			3.87 (с)		

[#] Верхний индекс в обозначении атомов – порядковый номер моносахаридного остатка в углеводной цепи, цифра после черточки – номер атома в моносахаридном остатке; * область закрыта сигналами растворителя.

ных остатков в углеводной цепи соединения (I). Значения КССВ аномерных протонов свидетельствовали о β -конфигурации гликозидных связей [16]. Кроме того, в спектрах ¹³C- и ¹H-ЯМР охотозиды A₁-1 наблюдался характерный сигнал O-метильной группы (δ_C 60.60 м.д., δ_H 3.87 м.д.), что подтверждало наличие остатка 3-O-метилглюкозы в углеводной цепи данного гликозида. Последовательность моносахаридных звеньев в углеводной цепи гликозида (I) была установлена на основе анализа NOESY-спектра (табл. 1), в котором наблюдались корреляции между: H3 агликона и H1 первого остатка ксилозы, H2 первого остатка ксилозы и H1 остатка хиновозы, H4 остатка хиновозы и H1 второго остатка ксилозы, H1 остатка 3-O-метилглюкозы и H3 второго остатка ксилозы. Аналогичные кросс-пики наблюдались также в HMBC-спектре охотозиды A₁-1 (I) (табл. 1).

Кислотный гидролиз нативного гликозида (I), последующий алкоголиз смеси моносахаридов

действием (R)-(-)-2-октанола, ацетилирование и анализ с помощью ГЖХ с использованием заведомых соединений позволили определить абсолютную D-конфигурацию всех моносахаридных остатков в углеводной цепи охотозиды A₁-1 (I): ксилозы, хиновозы и 3-O-метилглюкозы, присутствовавших в соотношении 2 : 1 : 1.

Сигналы части спектра ¹³C-ЯМР гликозида (I), относящейся к агликону, совпадали с сигналами соответствующей части спектра кукумариозида A₀-1, выделенного ранее из *C. japonica* [17, 18], что свидетельствовало о наличии в этих соединениях одинаковых агликонов голостанового типа с 7(8)-двойной связью в полициклической системе и двумя функциональными группами: кето-группой в боковой цепи и O-ацетатной группой в ядре агликона (табл. 2). Действительно, сигналы в области слабого поля ЯМР ¹³C-спектра охотозиды A₁-1 (I) при δ 145.50 (C8) и 120.31 (C7) м.д. свидетельствовали о наличии 7(8)-двойной связи, сиг-

Таблица 2. ЯМР-спектры агликоновой части охотозиды A₁-I (I), C₅D₅N

Номер атома	δ_C , DEPT	δ_H (мульти., J, Гц)	HMBC	NOESY
1	35.94	1.44 (м)		
2	26.97	1.91 (м), 2.11 (м)		
3	88.99	3.27 (дд, 3.6, 11.5)		H: 1, 5, 31
4	39.43			
5	47.80	1.02 (т, 8.1)		H: 3, 31
6	23.20	2.06 (м)		
7	120.31	5.64 (м)		H: 15, 32
8	145.50			
9	47.01	3.44 (уш. д, 12.3)		H: 1, 19
10	35.46			
11	22.38	1.50 (м), 1.79 (м)		
12	30.99	1.98 (м), 2.12 (м)		
13	57.68			
14	47.46			
15	43.57	1.63 (м)		
		2.70 (дд, 8.0, 12.1)	C: 13, 14, 17, 32	H: 7, 32
16	76.17	5.81 (уш. к, 8.7)		H: 32
17	55.08	3.25 (д, 9.2)	C: 13, 18, 21	H: 32, 21, 12
18	179.23			
19	23.85	1.23 (с)	C: 1, 5, 9, 10	H: 9
20	82.03			
21	29.48	1.59 (с)	C: 17, 20, 22	H: 17, 22
22	52.66	3.17 (д, 18.3)	C: 17, 20, 21, 23	
		3.93 (уш. д, 18.3)	C: 23	
23	207.67			
24	51.47	2.23 (м)		
		2.38 (дд, 5.9, 16.1)		
25	24.26	2.18 (м)		
26	22.38	0.88 (д, 6.5)	C: 24, 25, 27	
27	22.20	0.88 (д, 6.5)	C: 24, 25, 26	
30	17.18	1.13 (с)	C: 3, 4, 5, 31	
31	28.53	1.29 (с)	C: 3, 4, 5, 30	H: 3, 5, H1A
32	32.00	1.08 (с)	C: 8, 13, 14, 15	H: 7, 15, 16, 17
ОСОСН ₃	21.11	2.02 (с)		
ОСОСН ₃	169.02			

нал атома углерода, не связанный с протонами, при δ 207.67 м.д. (C23) наблюдался из-за присутствия кето-группы, положение которой при C23 подтверждалось наличием кросс-пика (H22)/C23 в HMBC-спектре, а также наличием сигналов изолированной спиновой системы CH₃(27)–CH₃(26)–CH(25)–CH₂(24) в спектре COSY. Сигнал атома углерода СОО-группы при δ 169.02 м.д., а также химический сдвиг сигнала C16 (δ 76.17 м.д.) в спектрах ¹³C-ЯМР и DEPT свидетельствовали о

наличии ацетокси-группы при C16, что подтверждалось присутствием кросс-пика H16/H32 в NOESY-спектре. β -Конфигурация ацетокси-группы подтверждалась значениями КССВ.

Брутто-формула охотозиды A₁-I (I) была определена как C₅₅H₈₅NaO₂₆S по данным ¹³C-ЯМР-спектра и по наличию пика псевдомолекулярного иона [M_{Na} + Na]⁺ при m/z 1239 в MALDI-TOF(+)-масс-спектре, а также пика [M_{Na} – Na][–] при m/z 1193 в MALDI-TOF(–)-масс-спектре. В

Таблица 3. ЯМР-спектры углеводной цепи охотозидов A₂-1 (II), C₅D₅N/D₂O (4/1)

Остаток	Атом	δ _C , DEPT	δ _H (мульти., J, Гц)	HMBC	NOESY
Xyl (1)	C ¹ -1	104.71	4.84 (д, 7.3)	C: 3	H: 3, H ¹ -3, H ¹ -5
	C ¹ -2	79.64	4.31 (т, 7.9)	C ¹ -1, C ² -1	H ² -1
	C ¹ -3	75.55	4.46 (т, 8.9)	C ¹ -2	H ¹ -1, H ¹ -5
	C ¹ -4	76.08	5.11 (м)	C ¹ -3	
	C ¹ -5	64.26	4.91 (дд, 6.1, 11.2)	C ¹ -1, C ¹ -3	
Glc (2)			3.90 (т, 11.5)		H ¹ -1, H ¹ -3
	C ² -1	101.46	5.52 (д, 7.7)	C ¹ -2	H ¹ -2, H ² -3, H ² -5
	C ² -2	82.27	4.09 (т, 8.0)	C ² -1, C ² -3	
	C ² -3	75.61	4.19 (т, 8.9)	C ² -2, C ² -4	H ² -1, H ² -5
	C ² -4	80.55	4.14 (т, 9.1)	C ³ -1, C ² -3	
	C ² -5	75.85	3.79 (м)		H ² -1, H ² -3
Glc (3)	C ² -6	61.06	4.47 (м)	C ² -5	
			4.38 (м)		
	C ³ -1	103.61	5.08 (д, 8.0)	C ² -4	H ² -4, H ³ -3, H ³ -5
	C ³ -2	73.60	4.04 (т, 8.4)	C ³ -1, C ³ -3	
	C ³ -3	86.74	4.29 (т, 8.6)	C ³ -4, C ³ -2	H ³ -1
	C ³ -4	69.20	3.99 (т, 8.7)	C ³ -5, C ³ -6	
3MeGlc (4)	C ³ -5	77.11	3.98 (м)		H ³ -1
	C ³ -6	61.45	4.36 (уш. д, 11.1)		
			4.11 (дд, 5.2, 12.0)		
	C ⁴ -1	104.56	5.30 (д, 7.6)	C ³ -3	H ³ -3, H ⁴ -3, H ⁴ -5
	C ⁴ -2	74.59	3.97 (т, 8.3)	C ⁴ -1, C ⁴ -3	
	C ⁴ -3	86.99	3.79 (т, 8.7)	OMe, C ⁴ -2, C ⁴ -4	H ⁴ -1
Xyl (5)	C ⁴ -4	70.39	3.99 (т, 9.4)		
	C ⁴ -5	77.55	4.04 (м)		H ⁴ -1
	C ⁴ -6	61.75	4.16 (м), 4.49 (м)		
	OMe	60.79	3.92 (с)	C ⁴ -3	
	C ⁵ -1	105.30	5.32 (д, 7.1)	C ² -2	H ² -2, H ⁵ -3, H ⁵ -5
	C ⁵ -2	74.76	4.07 (т, 7.7)	C ⁵ -1, C ⁵ -3	
	C ⁵ -3	76.44	4.17 (т, 8.6)	C ⁵ -4, C ⁵ -2	H ⁵ -1
	C ⁵ -4	70.15	4.22 (м)	C ⁵ -3	
	C ⁵ -5	66.39	4.42 (дд, 5.0, 11.5)	C ⁵ -1, C ⁵ -4, C ⁵ -3	
			3.71 (дд, 9.0, 11.4)	C ⁵ -1, C ⁵ -4, C ⁵ -3	H ⁵ -1

MALDI-TOF(+)-масс-спектре присутствовал пик фрагментарного иона [$M_{Na} + Na - SO_3Na + H$]⁺ при m/z 1137, соответствующий отрыву сульфатной группы, а в MALDI-TOF(-)-масс-спектре – пик фрагментарного иона при m/z 1017, соответствующий отрыву терминального остатка 3-*O*-метилглюкозы.

Таким образом, охотозид A₁-1 (I) представляет собой 16β-ацетокси-3-β-гидрокси-3-*O*-[3-*O*-метил-β-*D*-глюкопиранозил-(1 → 3)-β-*D*-ксилопиранозил-(1 → 4)-β-*D*-хиновопиранозил-(1 → 2)-4-*O*-натрийсульфонато-β-*D*-ксилопиранозил]-голост-7-ен-23-он.

В части спектра ¹³C-ЯМР охотозидов A₂-1 (II), относящейся к углеводному фрагменту, наблюдалось пять сигналов аномерных атомов углерода в области δ 101.43–105.28 м.д., которые были скоррелированы с помощью HSQC-спектра с пятью сигналами соответствующих протонов при 4.84 (д, *J* 7.3 Гц), 5.52 (д, *J* 7.7 Гц), 5.08 (д, *J* 8.0 Гц), 5.30 (д, *J* 7.6 Гц), 5.32 м.д. (д, *J* 7.1 Гц), что свидетельствовало о наличии пяти моносакхаридных остатков в углеводной цепи гликозида (II). Значения КССВ аномерных протонов указывали на присутствие β-гликозидных связей (табл. 3) [16].

Таблица 4. ЯМР-спектры агликоновой части охотозидов А₂-1 (II), C₅D₅N/D₂O (4/1)

Номер атома агликона	δ_C , DEPT	δ_H (мульт., J, Гц)	HMBC	NOESY
1	35.90	1.40 (м)	C: 4, 10, 19, 30	H: 5, 11, 19
2	26.70	1.95 (м), 2.03 (м)		H: 5, 31, H ¹ -1
3	89.22	3.31 (дд, 4.2, 11.6)		
4	39.43			
5	47.80	1.00 (дд, 5.0, 10.0)		H: 1, 3
6	23.08	2.00 (м)		H: 30, 31
7	120.23	5.69 (м)		H: 15, 32
8	145.59			H: 19
9	47.01	3.40 (уш. д, 14.0)		
10	35.34			
11	22.45	1.59 (м), 1.81 (м)		H: 1
12	31.24	2.21 (м)		H: 17, 21
13	59.31			H: 7
14	47.29			
15	43.52	1.71 (м)		
16	75.29	2.66 (дд, 7.4, 12.2)	C: 12, 13, 18, 21	H: 32
17	54.46	5.93 (уш. к, 8.7)		H: 32, 21, 12
18	180.25	2.78 (д, 9.0)		H: 1, 9
19	23.80	1.16 (с)	C: 1, 5, 9, 10	
20	85.58		C: 17, 20, 22	
21	28.09	1.62 (с)	H: 17, 22	
22	38.27	2.35 (м), 1.91 (м)		
23	22.90	1.56 (м), 1.44 (м)	C: 24, 27	H: 6
24	38.18	2.01 (м)		
25	145.43			
26	110.87	4.83 (уш. с)	C: 3, 4, 5, 31	H: 3, 6
		4.84 (уш. с)		
27	22.08	1.75 (с)		
30	17.27	1.15 (с)	C: 8, 13, 14, 15	H: 7, 16, 17
31	28.57	1.28 (с)		
32	32.20	1.27 (с)		
ОСОСН ₃	21.30	2.12 (с)		
ОСОСН ₃	170.76			

Сравнение части спектра ¹³C-ЯМР, соответствующей углеводной цепи охотозидов А₂-1 (II) с соответствующей частью спектра моносульфатированного пентаозидов кукумариозидов А₂-2, выделенного ранее из голотурии *C. japonica* [19], показало совпадение сигналов четырех моносахаридных остатков этих соединений, лишь сигналы остатка хиновозы, находящегося во втором положении углеводной цепи кукумариозидов А₂-2, не соответствовали сигналам в спектре охотозидов А₂-1 (II). Так, в области $\delta \sim 18$ м.д. спектра ¹³C-ЯМР и в

области $\delta \sim 1.7$ м.д. спектра ¹H-ЯМР охотозидов А₂-1 (II), характерной для метильной группы 6-дезоксигексоз, отсутствовали сигналы метильной группы остатка хиновозы, присутствующей в углеводных цепях подавляющего большинства тритерпеновых гликозидов голотурий. В то же время в ¹³C-ЯМР-спектре гликозидов (II) по сравнению со спектром кукумариозидов А₂-2 имелся дополнительный сигнал в области δ 61.06 (СН₂) м.д., характерной для С6-атомов остатков глюкозы и 3-О-метилглюкозы, типичных для гликозидов голотурий моноса-

харидов. Эти данные позволяли предположить присутствие остатка глюкозы во втором положении углеводной цепи охотозидов A_2-1 (II), вместо остатка хиновозы в углеводной цепи кукумариозидов A_2-2 [19].

Анализ ID-TOCSY- и COSY-спектров гликозида (II) позволил определить сигналы протонов изолированных спиновых систем каждого моносахаридного остатка, которые в свою очередь по HSQC-спектру были скоррелированы с сигналами соответствующих атомов углерода. Последовательность моносахаридных звеньев в углеводной цепи охотозидов A_2-1 (II) была определена по наличию в НМБС-спектре кросс-пиков между: H1 остатка ксилозы (первый моносахаридный остаток) и C3 агликона, H1 остатка глюкозы (второй моносахаридный остаток) и C2 остатка ксилозы (первый моносахаридный остаток), H1 остатка глюкозы (третий моносахаридный остаток) и C4 глюкозы (второй моносахаридный остаток), H1 терминальной 3-О-метилглюкозы (четвертый моносахаридный остаток) и C3 остатка глюкозы (третий моносахаридный остаток), H1 терминального остатка ксилозы (пятый моносахаридный остаток) и C2 глюкозы (второй моносахаридный остаток). Структура пентасахаридной углеводной цепи охотозидов A_2-1 (II) подтверждалась также спектрами NOESY (табл. 3).

В части ^{13}C -ЯМР-спектра охотозидов A_2-1 (II), относящейся к агликону, наблюдались сигналы голостанового агликона (сигнал четвертичного атома углерода C18 при 180.25 м.д.), содержащего 7(8)-двойную связь в ядре (сигналы при 120.23 (C7) и 145.59 (C8) м.д.), терминальную 25(26)-двойную связь в боковой цепи (сигналы при 145.43 (C25) и 110.9 (C26) м.д.) и О-ацетатную группу при C16 (сигналы при 75.29 (C16), 170.76 ($\text{O}=\text{C}-\text{OCH}_3$) и 21.30 м.д. ($\text{O}-\text{C}(\text{OCH}_3)$)) (табл. 4). Таким образом, агликон охотозидов A_2-1 (II) отличался от агликона охотозидов A_1-1 (I) строением боковой цепи, в которой отсутствовала кетогруппа при C23, но имелась терминальная двойная связь.

Брутто-формула охотозидов A_2-1 (II) была определена как $\text{C}_{61}\text{H}_{95}\text{O}_{31}\text{SNa}$ по данным ^{13}C -ЯМР-спектра и по наличию пиков псевдомолекулярных ионов $[M_{\text{Na}} + \text{Na}]^+$ при m/z 1401.5 и $[M_{\text{Na}} + \text{K}]^+$ при m/z 1417.5 в MALDI-TOF (+)-масс-спектре, где также присутствовали пики фрагментарных ионов $[M_{\text{Na}} + \text{Na} - \text{SO}_3\text{Na} + \text{H}]^+$ при m/z 1299.4 (соответствует отрыву сульфатной группы) и при m/z 1225.4 (соответствует отрыву терминального остатка 3-О-метилглюкозы).

Все полученные данные свидетельствовали о том, что охотозид A_2-1 (II) представляет собой 16 β -ацетокси-3 β -гидрокси-3-О-{3-О-метил- β -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-глюко-

пиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-4-О-натрийсульфонато- β -D-ксилопиранозил}-голост-7,25-диен.

Агликон с такой структурой достаточно широко распространен в гликозидах голотурий, так как известно еще четыре гликозида, содержащих идентичные агликоны: кукумариозид A_0-2 из голотурии *C. japonica* [17, 18], неотиионидозид С из голотурии *Neothyonidium magnum* [20], тионозиды А и В из голотурии *Thyone aurea* [21]. В то время как углеводная цепь охотозидов A_2-1 (II) является новой и ранее не была обнаружена в гликозидах голотурий, более того, гликозид с остатком глюкозы, занимающим второе положение в углеводной цепи, выделен из голотурии рода *Cucumaria* впервые.

Сравнение ^{13}C -ЯМР-спектра соединения (III) со спектром кукумариозидов A_0-1 , выделенного ранее из *C. japonica* [18], позволило сделать вывод об идентичности их структур. Таким образом, новый охотозид A_1-1 (I) отличался от кукумариозидов A_0-1 (III) только отсутствием терминального остатка ксилозы. Это подтверждалось сравнением ^{13}C -ЯМР-спектров этих соединений. В ^{13}C -ЯМР-спектре кукумариозидов A_0-1 (III) по сравнению со спектром охотозидов A_1-1 (I) присутствовали сигналы дополнительного остатка ксилозы. Положение данного остатка при C2 остатка хиновозы подтверждалось сдвигом сигнала C2 хиновозы в слабое поле на 5.83 м.д. по сравнению с сигналом C2 хиновозы в спектре гликозида (I), а сигнала C3 того же остатка – на 0.26 м.д., соответственно, в сильное поле, благодаря эффектам гликозирования. Гликозид (III) был идентифицирован как выделенный ранее кукумариозид A_0-1 [18] – 16 β -ацетокси-3 β -гидрокси-3-О-{3-О-метил- β -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-ксилопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-хинопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-4-О-натрий-сульфонато- β -D-ксилопиранозил}-голост-7-ен-23-он – по результатам сравнения ^{13}C -ЯМР-спектров этих соединений. Дополнительным подтверждением идентичности этих веществ служило совпадение их физических констант.

Полученные нами данные показали, что структуры гликозидов из голотурий различных видов, относящихся к роду *Cucumaria*, с одной стороны, отличаются друг от друга, т.е. обладают видовой специфичностью, а с другой стороны, характеризуются рядом общих черт (наличие групп моно-, ди- и трисульфатированных гликозидов, пентаозидные углеводные цепи, разветвленные по остатку, находящемуся во втором положении углеводных цепей), позволяющих судить о принадлежности вида к данному роду [4, 5]. Голотурия *C. okhotensis* [10], как и большинство других видов рода *Cucumaria*, содержит сложную сумму тритерпеновых гликозидов различных групп. Охотозиды A_1-1 (I) и A_2-1 (II) являются новыми

соединениями, при этом гликозид (II) характеризуется наличием углеводной цепи с остатком глюкозы во втором положении; такие структуры ранее не обнаруживали в гликозидах голотурий рода *Cucumaria*. Это свидетельствует о существенном структурном отличии моносульфатированных гликозидов *C. okhotensis* от гликозидов аналогичных групп других видов рода *Cucumaria* и позволяет уже на данном этапе работы говорить о видоспецифичности гликозидов *C. okhotensis*, а полученные данные подтверждают обоснованность выделения нового вида *C. okhotensis* в составе рода *Cucumaria*.

Вместе с тем, углеводная цепь нового охотозида A_1 -I (I) идентична углеводной цепи фрондозида A_1 , выделенного ранее из *C. frondosa* [15], а углеводная цепь кукумариозида A_0 -I (III) – цепи фрондозида A [22]. Таким образом, пары гликозидов охотозид A_1 -I (I), кукумариозид A_0 -I (III) из *C. okhotensis* и фрондозид A_1 , фрондозид A из *C. frondosa* можно считать структурными аналогами, подтверждающими принадлежность голотурии *C. okhotensis* к роду *Cucumaria*. Кроме того, охотозид A_1 -I (I) очевидно является биосинтетическим предшественником кукумариозида A_0 -I (III).

Все это предъявляет жесткие требования к стандартизации сырья, используемого для изготовления лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище из так называемой "*Cucumaria japonica*". Поэтому при практическом использовании гликозидных фракций из разных видов дальневосточных кукумарий необходим их тщательный анализ, так как свойства препаратов могут изменяться из-за вариаций гликозидного состава.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Биологический материал. Голотурия *C. okhotensis* была собрана при промысловом драгировании у западного побережья Камчатки осенью 2001 г. с глубины 28 м. Видовое определение выполнил д.б.н. Левин В.С.

Приборы и материалы. Температуры плавления гликозидов определяли с помощью Kofler-Thermogenerate apparatus. Оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin-Elmer 343. Спектры ^{13}C - и ^1H -ЯМР получали на спектрометрах Bruker AMX 500 и Bruker DPX 300. Химические сдвиги в ЯМР-спектрах приведены в δ -шкале в миллионных долях относительно тетраметилсилана как внутреннего стандарта ($\delta_{\text{TMS}} = 0$). MALDI-TOF-масс-спектры получали на масс-спектрометре BIFLEX III (Bruker) с импульсной экстракцией ионов. В качестве матрицы использовали α -циано-4-гидроксикоричную кислоту. ВЭЖХ проводили на хроматографе Agilent 1100 со встроенным дифференциальным рефрактометром. Для гидрофоб-

ной колоночной хроматографии использовали тефлоновый порошок Полихром-1 (НПО "Биолар", Латвия). Буфер А – раствор соли $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (540 мг) в 100 мл воды.

Выделение тритерпеновых гликозидов. Измельченную голотурию экстрагировали горячим этанолом при кипячении с обратным холодильником (вес сухого остатка после экстракции 1385 г). Экстракт сливали и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в воде и хроматографировали на колонке с тефлоновым порошком Полихром-1. Колонку заполняли в спирте, промывали водой, вещества загружали в воде и промывали водой до отрицательной реакции на хлорид-анион с нитратом серебра. Сумму гликозидов элюировали с колонки 50% этанолом. Гликозидную фракцию подвергали многократной колоночной хроматографии на силикагеле в системах хлороформ–этанол–вода (100 : 75 : 10) и (100 : 100 : 17), (100 : 125 : 25), добиваясь разделения на подфракции моно-, ди- и трисульфатированных соединений. Контроль за разделением моносульфатированных гликозидов на группы A , A_1 и A_2 проводили методом ТСХ, в качестве стандартов использовали гликозиды аналогичных групп из голотурии *C. frondosa*. Подфракции моносульфатированных охотозидов групп A_1 (74 мг) и A (130 мг) дополнительно очищали на колонке с сефадексом LH-20, элюируя гликозиды 40% этанолом, в результате получили 45 мг подфракции охотозидов группы A_1 и 85 мг подфракции охотозидов группы A. Подфракция охотозидов группы A_2 (94 мг) была получена после многократной колоночной хроматографии на силикагеле.

Подфракцию охотозидов группы A_1 (45 мг) разделяли с помощью ВЭЖХ на колонке Диасфер-110 C-18 (4 × 250), подвижная фаза $\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$ -буфер А (60 : 38 : 2). Выделенные индивидуальные соединения обессоливали на Полихроме-1 как описано выше. Получили 6 мг индивидуального гликозида (I). При ВЭЖХ-разделении подфракции охотозидов группы A_2 (94 мг) на колонке Диасфер-110 C-18 в системе $\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$ -буфер А (64 : 33 : 3) получили 6 мг (после обессоливания на колонке с Полихромом-1 по методике, описанной выше) индивидуального гликозида (II). Подфракцию охотозидов группы A (85 мг) разделяли с помощью ВЭЖХ на колонках Zorbax ODS (10 × 250), подвижная фаза $\text{EtOH}-\text{H}_2\text{O}$ -буфер А (50 : 48 : 2) и Диасфер-110 C-18, подвижная фаза $\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$ -буфер А (60 : 38 : 2) соответственно. Получили 10 мг (после обессоливания на колонке с Полихромом-1 по методике, описанной выше) индивидуального соединения (III).

Охотозид A_1 -I (I): т. пл. 268–269°C, $[\alpha]_D^{20} -8^\circ$ (с 0.1; пиридин). ЯМР-спектры – табл. 1 и 2, MALDI-TOF-масс-спектр: m/z 1239 $[M_{\text{Na}} + \text{Na}]^+$ (брутто-

формула $C_{55}H_{85}O_{26}SNa$), 1137 [$M_{Na} + Na - SO_3Na + H$]⁺, 1193 [$M_{Na} - Na$]⁻, 1017 [$M_{Na} - Na - 3MeGlc + H$]⁻.

Охотозид A_2-1 (II): т. пл. 209–210°C, $[\alpha]_D^{20} -19^\circ$ (с 0.1; пиридин). ЯМР-спектры – табл. 3 и 4, MALDI-TOF-масс-спектр: m/z 1401.5 [$M_{Na} + Na$]⁺ (брутто-формула $C_{61}H_{95}O_{31}SNa$), 1417.5 [$M_{Na} + K$]⁺, 1299.4 [$M_{Na} + Na - SO_3Na + H$]⁺, 1225.4 [$M_{Na} + Na - 3MeGlc + H$]⁺, 1123.4 [$M_{Na} + Na - SO_3Na - 3MeGlc + H$]⁺, 1355.4 [$M_{Na} - Na$]⁻, 1179.4 [$M_{Na} - Na - 3MeGlc$]⁻.

Кукумариозид A_0-1 (III): т. пл. 220–222°C, $[\alpha]_D^{20} -12^\circ$ (с 0.1; пиридин), ЯМР-спектр – табл. 5.

Определение абсолютной конфигурации моносахаридов. Кислотный гидролиз охотозидов A_1-1 (I) (3 мг) проводили в растворе 0.2 М трифторуксусной кислоты (TFA) (0.3 мл) в запаянной ампуле на водяной бане при 100°C в течение 30 мин. Образовавшийся осадок агликона экстрагировали хлороформом, водный раствор сахаров упаривали в вакууме. К сухому остатку добавляли 1 каплю TFA и 0.2 мл (–)-2-октанола (Aldrich), запаянную ампулу нагревали на глицериновой бане до 130°C на магнитной мешалке в течение 6 ч. Полученную смесь упаривали в вакууме и обрабатывали смесью пиридин–уксусный ангидрид (1 : 1, 0.6 мл) в течение 24 ч при комнатной температуре. Ацетилированные производные (–)-2-октилглюкозидов анализировали с помощью ГЖХ в присутствии стандартов соответствующих моносахаридов. Температурный режим: 100°C (0.5 мин) – 5°C/мин – 250°C (10 мин), температура инжектора 150°C, детектора – 280°C. При ГЖХ-анализе гликозида (I) были идентифицированы пики с временами удерживания: 24.48, 24.73, 25.02 мин (*D*-ксилоза); 23.02, 24.18, 24.60 мин (*D*-хиновоза); 28.23, 28.55, 28.85, 29.09 мин (3-*O*-метил-*D*-глюкоза). Времена удерживания стандартов моносахаридов в смеси: 24.48, 24.73, 25.02 мин (*D*-ксилоза); 23.02, 24.18, 24.60 мин (*D*-хиновоза); 28.23, 28.55, 28.85, 29.09 мин (3-*O*-метил-*D*-глюкоза). Пики для *L*-изомеров моносахаридов были идентифицированы при: 24.24, 24.30, 24.83, 27.97 мин (*L*-ксилоза); 27.41, 27.86 мин (3-*O*-метил-*L*-глюкоза). Времена удерживания для *L*-изомеров были определены для “виртуальных производных” *L*-ряда – (+)-2-октилглюкозидов соответствующих сахаров *D*-ряда [22].

Таблица 5. ^{13}C -ЯМР-спектр кукумариозидов A_0-1 (III), C_5D_5N

Номер атома агликона	δ_C , DEPT	Остаток	Атом	δ_C , DEPT
1	35.88	Xyl (1)	C ¹ -1	104.91
2	26.82		C ¹ -2	81.62
3	89.04		C ¹ -3	76.43
4	39.44		C ¹ -4	75.30
5	47.71		C ¹ -5	64.26
6	23.18			
7	120.32	Qui (2)	C ² -1	102.49
8	145.43		C ² -2	82.00
9	46.94		C ² -3	74.92
10	35.41		C ² -4	85.18
11	22.35		C ² -5	71.10
12	30.95		C ² -6	17.80
13	57.62	Xyl (3)		
14	47.43		C ³ -1	104.72
15	43.53		C ³ -2	73.29
16	75.61		C ³ -3	87.17
17	55.02		C ³ -4	68.93
18	179.22		C ³ -5	66.38
19	23.81	3MeGlc (4)		
20	82.03		C ⁴ -1	105.54
21	29.44		C ⁴ -2	74.92
22	52.64		C ⁴ -3	87.88
23	207.64		C ⁴ -4	70.44
24	51.40		C ⁴ -5	78.16
25	24.22	Xyl (5)	C ⁴ -6	61.97
26	22.36		OMe	60.64
27	22.17			
30	17.29		C ⁵ -1	105.28
31	28.55		C ⁵ -2	75.29
32	31.98		C ⁵ -3	76.10
OSOCH ₃	21.10		C ⁵ -4	70.26
O ₂ COCH ₃	169.02		C ⁵ -5	66.40

РАН № 06-III-B-05-126, ДВО-УрО РАН № 06-2У-0-05-009, NATO LST.NR.CLG. 981098.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят д.х.н. Евтушенко Е.В. за предоставление стандартов моносахаридов. Работа выполнена при поддержке грантов Президента РФ на поддержку ведущих научных школ НШ-6491.2006.4, программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”, РФФИ № 06-04-96016, ДВО РАН № 06-III-B-05-128, ДВО

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kalinin V.I., Anisimov M.M., Prokofieva N.G., Avilov S.A., Afyattullov Sh.Sh., Stonik V.A. // *Echinoderm Studies* / Eds Jangoux M., Lawrence J.M.A.A. Balkema, Rotterdam: Brookfield, 1996. P. 139–184.
- Еляков Г.Б., Стоник В.А., Афиятуллоев Ш.Ш., Калиновский А.И., Шарыпов В.Ф., Коротких Л.Я. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 259. С. 1367–1369.

3. Chludil H.D., Murray A.P., Seldes A.M., Maier M.S. // *Studies Nat. Prod. Chem.* 2003. V. 28. P. 587–615.
4. Avilov S.A., Kalinin V.I., Smirnov A.V. // *Biochem. Syst. Ecol.* 2004. V. 32. P. 715–733.
5. Stonik V.A., Kalinin V.I., Avilov S.A. // *J. Nat. Toxins.* 1999. V. 8. P. 235–248.
6. Левин В.С., Гудимова Е.Н. // *Зоол. журн.* 1997. Т. 76. С. 575–584.
7. Баранова З.И. Новое в систематике морских беспозвоночных. Л.: ЗИН АН СССР, 1980. С. 109–120.
8. Левин В.С., Степанов В.Г. // *Биология моря.* 2002. Т. 28. С. 66–69.
9. Степанов В.Г., Пингальчук О.А. // *Зоол. журн.* 2002. Т. 81. С. 1392–1397.
10. Левин В.С. // *Биология моря.* 2003. Т. 29. С. 202–205.
11. Avilov S.A., Antonov A.S., Silchenko A.S., Kalinin V.I., Kalinovskiy A.I., Dmitrenok P.S., Stonik V.A., Riguera R., Jimenes C. // *J. Nat. Prod.* 2003. V. 66. P. 910–916.
12. Гришин Ю.И., Ковалевская А.М., Стоник В.А., Авиллов С.А., Влазнев В.П., Слугин В.С. // *Новости звероводства.* 1991. № 2. С. 19–23.
13. Гришин Ю.И., Ковалевская А.М., Стоник В.А., Авиллов С.А., Влазнев В.П., Слугин В.С. Средство для профилактики и лечения алеутской болезни норки / Патент № 2036654 РФ, МКИ6 А 61 К 35/7811 (А 61 К 35/78, 31100). Владивосток:
- ТИБОХ. № 4891144/15; Заявлено 13.12.1990; Опубл. 09.06.95. Бюл. № 16.
14. Avilov S.A., Kalinin V.I., Silchenko A.S., Aminin D.L., Agafonova I.G., Stonik V.A., Woodward C., Collin P.D. Process for isolating sea cucumber saponin frondoside A, and immunomodulatory methods of use. USPTO No. 60/579,355, priority from June 14, 2004, PCT/RU 2005/000306.
15. Авиллов С.А., Калинин В.И., Дроздова О., Калиновский А.И., Стоник В.А., Гудимова Е.Н. // *Химия природ. соед.* 1993. № 2. С. 260–263.
16. Шаиков А.С., Чижов О.С. // *Биоорг. химия.* 1976. Т. 2. С. 437–497.
17. Дроздова О.А., Авиллов С.А., Калиновский А.И., Стоник В.А. // *Химия природ. соед.* 1992. № 5. С. 590–591.
18. Дроздова О.А., Авиллов С.А., Калиновский А.И., Стоник В.А. // *Химия природ. соед.* 1992. № 5. С. 593.
19. Авиллов С.А., Тищенко Л.Я., Стоник В.А. // *Химия природ. соед.* 1984. № 6. С. 799–800.
20. Авиллов С.А., Калиновский А.И., Стоник В.А. // *Химия природ. соед.* 1990. № 1. С. 53–57.
21. Bonnard I., Rinehart K.L. // *Tetrahedron.* 2004. V. 60. P. 2987–2992.
22. Leontein K., Lindberg B., Lönngren J. // *Carbohydrate Research.* 1978. V. 62. P. 359–362.

Monosulfated Triterpene Glycosides from *Cucumaria okhotensis* Levin et Stepanov, a New Species of Sea Cucumbers from Sea of Okhotsk

A. S. Silchenko^a, S. A. Avilov^a, V. I. Kalinin^{a, #}, V. A. Stonik^a, A. I. Kalinovskiy^a,
P. S. Dmitrenok^a, and V. G. Stepanov^b

[#] Phone: (4232) 311-168; fax: (4232) 31-4050; e-mail: kalininv@piboc.dvo.ru

^a Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences, pr. 100-letya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia

^b Pacific Institute of Geography (Kamchatka Branch), Far East Division, Russian Academy of Sciences, ul. Partizanskaya 6, Petropavlovsk-Kamchatski, 683000 Russia

Three compounds were isolated from the fraction of monosulfated triterpene glycosides from *Cucumaria okhotensis*, a new sea cucumber species, and their structures were elucidated. First of them, okhotoside A₁-1, is a new glycoside containing tetrasaccharide sugar moiety; the second, okhotoside A₂-1, is a new pentaoside with a glucose residue in the second position of sugar moiety (such a structural peculiarity has been found in holothurians of the genus *Cucumaria* for the first time); and the third is a previously known pentaoside cucumarioside A₀-1 from *C. japonica*. The species-specificity of the triterpene glycosides from *C. okhotensis* was revealed, which justifies the description of this sea cucumber as a new species. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2007, vol. 33, no. 1; see also <http://www.maik.ru>

Key words: chemotaxonomic markers, *Cucumaria okhotensis*, triterpene glycosides