



УДК 547.925:593.793:593.93

СТЕРОИДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ИЗ ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ МОРСКИХ ЗВЕЗД *Henricia aspera* И *H. tumida*

© 2005 г. Э. В. Левина[#], А. И. Калиновский, В. А. Стоник,
П. С. Дмитренко, П. В. Андриященко

Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН,
690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159

Поступила в редакцию 01.12.2004 г. Принята к печати 07.02.2005 г.

Из двух видов дальневосточных морских звезд *Henricia aspera* и *H. tumida*, собранных в Охотском море, выделены шесть новых природных соединений, в том числе из *H. aspera* два новых гликозилированных полиола: асперозид **A**, строение которого установлено как (20*R*,24*R*,25*S*)-3-*O*-(2,3-ди-*O*-метил-β-*D*-ксилопиранозил)-24-метил-5α-холест-4-ен-3β,6β,8,15α,16β,26-гексаол, и асперозид **B**, имеющий структуру (20*R*,24*R*,25*S*)-(22*E*)-3-*O*-(2,4-ди-*O*-метил-β-*D*-ксилопиранозил)-24-метил-5α-холест-22-ен-3β,4β,6β,8,15α,26-гексаола. Два других гликозилированных полиола: тумидозид **A**, структурно идентифицированный как (20*R*)-(22*E*)-3-*O*-(2,4-ди-*O*-метил-β-*D*-ксилопиранозил)-26,27-динор-24-метил-5α-холест-22-ен-3β,4β,6β,8,15α,25-гексаол, и тумидозид **B**, имеющий строение (20*R*,24*S*)-3-*O*-(2,3-ди-*O*-метил-β-*D*-ксилопиранозил)-5α-холестан-3β,4β,6β,8,15α,24-гексаола, выделены из обеих видов звезд, а два новых стероидных полиола: (20*R*,24*S*)-5α-холестан-3β,6β,15α,24-тетраол и (20*R*,24*S*)-5α-холестан-3β,6β,8,15α,24-пентаол идентифицированы только в *H. tumida*. Кроме того, в экстрактах из обоих видов идентифицированы известные моногликозиды хенрициозид H_1 и левисулозиды H и G .

Ключевые слова: *Henricia aspera*, *H. tumida*; полигидроксистероиды; гликозиды; агликоны; масс-спектры, MALDI-TOF; 1H - и ^{13}C -ЯМР-спектры.

ВВЕДЕНИЕ

Морские звезды являются богатым источником новых полярных стероидов, обладающих широким спектром биологической активности [1]. Продолжая изучение физиологически активных полигидроксильированных стероидов и их производных из разных видов морских звезд семейства Echinasteridae [2–4], в данной работе мы выделили из экстрактов дальневосточных морских звезд *Henricia tumida* и *H. aspera* четыре новых гликозида, имеющих полигидроксильированные стероидные фрагменты и присоединенные по их C3-положению 2,3-ди-*O*-метил- или 2,4-ди-*O*-метил-*D*-ксилозильные остатки. В этих же видах морских

звезд были найдены два новых стероидных полиола и идентифицированы три ранее известных стероидных гликозида.

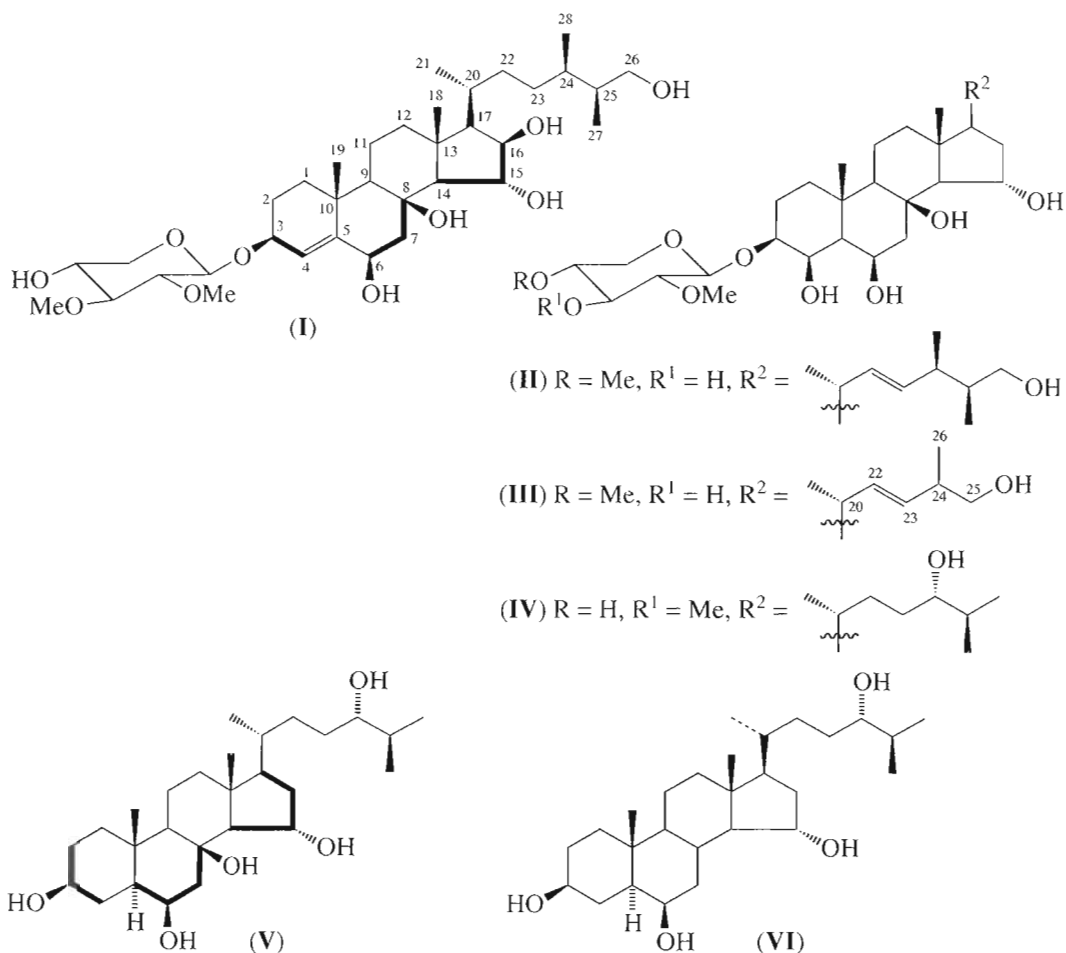
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Новые стероидные соединения (I)–(VI) были выделены из этанольных экстрактов морских звезд *H. aspera* и *H. tumida* хроматографией на амберлите XAD-2, сефадексе LH-60, флоризиле и силикагеле с последующей ВЭЖХ на колонках ODS-A и Силасорб C_{18} как описано в работе [4]. Установление строения (I)–(VI) проводилось в основном спектральными методами (ЯМР, MALDI-TOF- и EI-масс-спектрометрия) (табл. 1–4, “Эксперимент. часть”).

Псевдомолекулярный пик $[M + Na]^+$ с m/z 663 в масс-спектре MALDI-TOF (регистрация катионов) и данные ^{13}C - и 1H -ЯМР для соединения (I) отвечают молекулярной формуле $C_{35}H_{60}O_{10}$. Так, спектры ^{13}C -ЯМР и DEPT свидетельствуют о наличии в его молекуле 35 атомов углерода, в том числе 7 метильных, 9 метиленовых, 15 метиновых групп и 4 четвертичных атома C. Химический сдвиг (ХС) аномерного атома углерода (δ 104.5 м.д.) и константа спин-спинового взаимодействия (КССВ) аномерного протона (J 7.4 Гц) в спектре 1H -ЯМР (CD_3OD) указывают на β-конфигурацию глико-

Сокращения: MALDI-TOF – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry – масс-спектрометрия с лазерной десорбцией/ионизацией, усиленной матрицей; DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer – неискаженное усиление переносом поляризации; HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Connectivity – гетероядерная многополосная (многоквантовая) корреляция; HSQC – Heteronuclear One Quantum Connectivity – гетероядерная одноквантовая корреляция; HMQC – Heteronuclear Multiple Quantum Connectivity – гетероядерная многоквантовая корреляция; 1H - 1H -COSY – Correlated Spectroscopy – корреляционная спектроскопия; EIMS – Electron Ionization Mass Spectrometry – масс-спектрометрия с ионизацией электронами.

[#] Автор для переписки (факс: (4232) 31-40-50; эл. почта: levina@piboc.dvo.ru).



зидной связи. При кислотном гидролизе гликозида (I) получена 2,3-ди-*O*-Me-*D*-ксилоза, идентифицированная методами ТСХ и ГЖХ (перацетаты альдононитрилов) при сравнении со стандартным соединением.

Значения ХС С1–С22, С1'–С5' и Н3–Н22, Н1'–Н5' в ЯМР-спектрах (CD₃OD), так же как КССВ соответствующих протонов гликозида (I) (табл. 1, 3), совпадают с таковыми в спектрах описанного ранее хенрициозида Н₃ (Ia) из морской звезды *Henricia* sp. [5]. Это свидетельствует об идентичности полициклической части и углеводных остатков, локализованных у С3 в этих соединениях. Близость других сигналов позволила предположить, что соединения (I) и (Ia) являются изомерами, различающимися только стереохимией асимметрических центров в 26-гидроксиэргостанового типа боковой цепи. 20*R*-Конфигурация была приписана асимметрическому центру С20 гликозида (I) на основании величины ХС Н21-атомов СН₃-группы при С20 (δ 0.93 м.д.). Проведено сравнение спектров ЯМР стероидов (I) и (Ia) (у которого стереохимия боковой цепи не была определена) со спектрами модельных 24-метил-26-гидроксистероидов с установленной стереохимией асимметрических цент-

ров боковой цепи, а именно: (24*R*,25*S*)-24-метил-5α-холеста-3β,4β,6β,7α,8,15β,16β,26-октаола (Ib) и (24*R*,25*S*)-24-метил-5α-холеста-3β,5,6β,15α,16β,26-гексаол 26-сульфата (Iв) из морских звезд *Solaster borealis* [6] и *Luidia clathrata* [7] (табл. 2).

Полученное хорошее совпадение ХС протонов и атомов С в боковых цепях для (I) и (Ib), (Iв) дает основание считать, что соединение (I), названное нами асперозидом А, имеет 24*R*,25*S* стереохимию, наиболее распространенную в полиолах подобного строения из морских звезд [8].

С помощью двумерной спектроскопии ЯМР, включая ¹H–¹H-COSY и эксперименты HSQC и HMBC, мы выполнили отнесение сигналов всех атомов С и Н боковой цепи в гликозиде (I) и подтвердили вывод о том, что этот гликозид имеет строение (20*R*,24*R*,25*S*)-3-*O*-(2,3-ди-*O*-метил-β-*D*-ксилопиранозил)-24-метил-холест-4-ен-3β,6β,8,15α,16β,26-гексаола.

В MALDI-TOF-масс-спектре (с регистрацией положительно заряженных ионов) гликозида (II) наблюдается псевдомолекулярный пик с *m/z* 663 [M + Na]⁺, отвечающий молекулярной формуле C₃₅H₆₀O₁₀. При сравнении спектральных характеристик стероида (II) и выделенного нами ранее из

Henricia sanguinolenta сангуинозида С (20R,24R,25S)-(22E)-3-О-(2,3,4-три-О-метил-β-D-ксилопиранозил)-24-метил-5α-холест-22-ен-3β,4β,6β,8,15α,24-гексаола (IIa) [4] получено полное совпадение ХС протонов и атомов С агликоновой части и различие в сигналах моносахаридного остатка. Из спектров следовало также, что стереохимия асимметрических центров и конфигурация двойной связи в боковой цепи для этих соединений аналогичны.

При кислотном гидролизе гликозида (II) получили 2,4-ди-О-метил-D-ксилозу, идентифицированную методами ТСХ и ГЖХ (перацетаты альдононитрилов) сравнением со стандартным образцом. В то же время сигналы протонов и атомов С моносахаридного остатка C1'-C5' были идентичны соответствующим сигналам в спектре форбезида I (IIb) из *Asterias forbesi* (табл. 3) [9], что подтверждает наличие 2,4-ди-О-метил-D-ксилозного остатка в гликозиде (II). На основании всех полученных данных гликозиду, названному нами асперозидом В, было приписано строение (20R,24R,25S)-(22E)-3-О-(2,4-ди-О-метил-β-D-ксилопиранозил)-24-метил-5α-холест-22-ен-3β,4β,6β,8,15α,26-гексаола (II).

В молекуле стероидного гликозида (III), названного тумидозидом А (выделен из *H. tumida* и *H. aspera*) по данным спектров ¹³С-ЯМР имеется 33 атома С, в том числе атомы 6 метильных, 8 метиленовых, 16 метиновых групп и 3 четвертичных атома. В MALDI-TOF-масс-спектре (с регистрацией положительно заряженных ионов) наблюдается псевдомолекулярный пик с *m/z* 635 [*M* + Na]⁺, указывающий на молекулярную формулу C₃₃H₅₆O₁₀. При сравнении спектров ¹³С- и ¹Н-ЯМР (CD₃OD) асперозида В (II) и тумидозида А (III) получено полное совпадение ХС сигналов C1-C19, а также H3(CH), H4(CH), H6(CH) (см. формулу), H15(CH), C18-H₃, C19-H₃ и КССВ соответствующих протонов агликоновой части молекул. ХС сигналы моносахаридных остатков этих соединений также полностью совпадают (см. табл. 3), а при гидролизе гликозида (III) получена 2,4-ди-О-Ме-D-ксилоза, что подтверждает различие только боковых цепей их агликонов. ХС сигналов С-атомов боковой цепи C20-C25, C26, а также ХС и КССВ протонов C21-H₃-H25(CH₂), H26(CH₃) совпадают с соответствующими значениями в ЯМР-спектрах известного (20R)-(22E)-26,27-динор-24-метил-5α-холест-22-ен-3β,4β,6α,8,15β,25-гексаола (IIIa) из *Acodontaster conspicuus* [10] ("Эксперимент. часть"). На основании полученных данных тумидозиду А приписано строение (20R)-(22E)-3-О-(2,4-ди-О-метил-β-D-ксилопиранозил)-26,27-динор-24-метил-5α-холест-22-ен-3β,4β,6β,8,15α,25-гексаола (III).

Так как морские 24-метил-26,27-динорстероиды ранее были найдены в фитопланктоне [11], то обнаружение полярных стероидов, подобных соединению (III), с укороченными окисленными боковыми цепями свидетельствует о возможности

окисления пищевых стероидов в некоторых видах морских звезд.

При сравнении спектральных характеристик стероидного производного (IV) и (20R,24S)-3-О-(2,4-ди-О-метил-β-D-ксилопиранозил)-5α-холестан-3β,4β,6β,8,15α,24-гексаола, форбезида I (II) из морской звезды *A. forbesi* [9] получено полное совпадение ХС и КССВ протонов и атомов С агликоновой части и различие в сигналах моносахаридного остатка. Гликозид (IV), выделенный из морских звезд *H. tumida* и *H. aspera* и названный тумидозидом В, при кислотном гидролизе давал 2,3-ди-О-метил-D-ксилозу, идентифицированную сравнением со стандартным образцом. ХС атомов С и протонов моносахаридного остатка в спектре соединения (IV) совпадали с соответствующими значениями в спектрах асперозида А (I) (табл. 1, 3).

В MALDI-TOF-масс-спектре гликозида (IV) (с регистрацией положительно заряженных ионов) наблюдается псевдомолекулярный пик с *m/z* 651 [*M* + Na]⁺, подтверждающий молекулярную формулу C₃₄H₆₀O₁₀. Согласно данным спектров ЯМР, относительная стереохимия асимметрических центров боковой цепи аналогична установленной ранее для форбезида I [9]. На основании изложенных результатов тумидозиду В (IV) приписано строение (20R,24S)-3-О-(2,3-ди-О-метил-β-D-ксилопиранозил)-5α-холестан-3β,4β,6β,8,15α,24-гексаола.

Псевдомолекулярные ионы с *m/z* 475 [*M* + Na]⁺ и 491 [*M* + K]⁺ в MALDI-TOF-масс-спектре положительных ионов стероида (V), выделенного из *H. tumida*, а также данные спектроскопии ¹³С- и ¹Н-ЯМР указывают на молекулярную формулу C₂₇H₄₈O₅. Спектры ¹³С-ЯМР и DEPT (табл. 4) свидетельствуют о наличии в молекуле (V) 27 атомов С, включая атомы 5 метильных, 9 метиленовых, 10 метиновых групп и 3 четвертичных атома С. Исходя из этих данных, мы предположили для соединения (V) насыщенную пентагидроксихолестановую структуру. Строение стероида (V) установлено с помощью двумерной спектроскопии ЯМР, включая ¹Н-¹Н-COSY-спектроскопию и эксперименты HSQC и HMBC (табл. 4).

Химические сдвиги и соответствующие КССВ протонов H3 (δ 3.59 м.д., м), H6 (3.86 м.д., кв., J 3.0), H15 (δ 4.28 м. д., дт, J 3.4; 9.6), а также ХС C1-C12 и C19 в спектрах ЯМР стероида (V) (CD₃OD) совпадают с сигналами аналогичных атомов в спектрах (22E)-5α-холест-22-ен-3β,6β,8,15α,24-пентаола (Va) и его 15-сульфатированного производного (Vb) из морских звезд семейства Echinasteridae [12] и *Coscinasterias tenuispina* [13], что указывает на 3β,6β,8,15α-тетрагидроксилированное ядро в стероиде (V). В то же время ХС протонов и атомов C13-C27 и C18-H₃ совпадают с сигналами аналогичных атомов в спектре тумидозида В (IV), что подтверждает идентичность боковых цепей соединений (IV) и (V). На 15α-положение четвер-

Таблица 1. ЯМР-спектры гликозидов (I) и (IV) (CD₃OD; δ , м.д., J , Гц)

| Номер атома | (I) | | | (IV) | |
|-------------|----------------------|--|--------------------|----------------------|---------------------------------------|
| | δ_C , DEPT | δ_H (J) | HMBC | δ_C , DEPT | δ_H (J) |
| 1 | 39.7 CH ₂ | 1.78 м | | 40.9 CH ₂ | |
| 2 | 27.9 CH ₂ | 1.75 м (<i>a</i>), 1.97 м (<i>e</i>) | | 25.2 CH ₂ | |
| 3 | 77.5 CH | 4.18 м | | 80.5 CH | 3.63 м |
| 4 | 127.0 CH | 5.64 уш. с (1.6) | C2, C3, C10 | 74.6 CH | 4.27 м |
| 5 | 148.5 C | | | 50.4 CH | |
| 6 | 76.4 CH | 4.31 т (3.0) | C8 | 76.1 CH | 4.27 м |
| 7 | 44.4 CH ₂ | 2.57 дд (3.0; 14.4); 1.49 м | C8, C9 | 45.2 CH ₂ | |
| 8 | 76.2 C | | | 76.7 C | |
| 9 | 57.9 CH | 1.03 м | | 57.6 CH | |
| 10 | 37.7 C | | | 36.8 C | |
| 11 | 19.5 CH ₂ | 1.47 м; 1.87 м | | 19.3 CH ₂ | |
| 12 | 43.0 CH ₂ | 1.19 м; 1.97 м | | 42.7 CH ₂ | |
| 13 | 45.1 C | | | 45.5 C | |
| 14 | 63.7 CH | 1.02 д (10.5) | | 66.5 CH | |
| 15 | 81.0 CH | 4.14 дд (2.6; 10.7) | C16 | 70.1 CH | 4.27 м |
| 16 | 82.9 CH | 3.97 дд (2.7; 7.6) | C15 | 41.6 CH ₂ | |
| 17 | 60.5 CH | 1.21 дд (8.0; 12.0) | | 55.9 CH | |
| 18 | 16.8 CH ₃ | 1.13 с | C12, C13, C14, C17 | 15.3 CH ₃ | 0.95 с |
| 19 | 22.7 CH ₃ | 1.28 с | C1, C5, C9, C10 | 18.6 CH ₃ | 1.43 с |
| 20 | 30.4 CH | 1.85 м | | 36.3 CH | |
| 21 | 18.5 CH ₃ | 0.93 д (6.7) | C17, C20, C22 | 19.0 CH ₃ | 0.94 д (5.6) |
| 22 | 34.7 CH ₂ | 1.47 м | | 33.3 CH ₂ | |
| 23 | 32.7 CH ₂ | 1.27 м | | 31.5 CH ₂ | |
| 24 | 35.0 CH | 1.55 м | | 78.1 CH | 3.20 м |
| 25 | 41.2 CH | 1.62 м | | 34.6 CH | |
| 26 | 66.9 CH ₂ | 3.35 м; 3.47 м | | 17.5 CH ₃ | 0.91 д (6.7) |
| 27 | 12.0 CH ₃ | 0.81 д (7.0) | C24, C25, C26 | 19.5 CH ₃ | 0.93 д (6.7) |
| 28 | 14.7 CH ₃ | 0.79 д (7.0) | C23, C24, C25 | | |
| 2' (OMe) | 60.9 CH ₃ | 3.55 с | | 60.9 CH ₃ | 3.60 с |
| 3' (OMe) | 61.1 CH ₃ | 3.60 с | | 60.8 CH ₃ | 3.61 с |
| 1' | 104.6 CH | 4.42 д (7.6) | C3 | 104.6 CH | 4.44 д (7.0) |
| 2' | 84.8 CH | 2.86 дд (7.6; 9.1) | C1', C3', 2' (OMe) | 84.8 CH | 2.86 дд (7.6; 9.1) |
| 3' | 87.3 CH | 3.03 т (8.9) | C2', C4', 3' (OMe) | 87.3 CH | 3.03 т (8.9) |
| 4' | 70.9 CH | 3.51 м | | 70.9 CH | 3.53 м |
| 5' | 66.6 CH ₂ | 3.16 т (10.0); 3.78 дд (5.5; 11.0) | C1', C4', C3' | 66.6 CH ₂ | 3.16 т (10.0); 3.78 дд (5.5; 11.0) |

той гидроксильной группы в ядре указывает величина ХС С14 при δ_C 66.6 м.д. и сдвиг в сильное поле сигналов С18-Н₃ (δ_H 0.96 и δ_C 15.3 м.д.) и С17 (δ_C 55.9 м.д.) в сравнении со спектрами 8,15 β -дигидроксистероидов [13]. Мультиплетность сигнала Н15(СН) и КССВ Н15 и Н14 ($J_{14,15}$ 9.6 Гц) (табл. 4) также подтверждает α -конфигурацию гидроксильной группы, поскольку в 15 β -гидроксистероидов

роидах значение КССВ находится в пределах 5.3–6.5 Гц [14].

Строение полиола (V) подтверждено спектрами COSY-90 и HSQC, позволившими выполнить отнесение всех атомов С и Н в спектрах ЯМР. На формуле полиола (V) выделены линии, указывающие фрагменты, в которых последовательно-

Таблица 2. ХС сигналов боковой цепи асперозида А (I) и полиолов (Iб), (Iв) (δ , м. д., J, DPX-300, AC-250, CD₃OD)

| Атом | (I) | | (Iб) [6] | | (Iв) [7] | |
|------|----------------|-----------------|---|-----------------|---|-----------------|
| | ¹ H | ¹³ C | ¹ H | ¹³ C | ¹ H | ¹³ C |
| 20 | | 30.4 | | 34.8 | | 30.9 |
| 21 | 0.93 д (6.7) | 18.5 | 0.99 д (7.0) | 17.5 | 0.98 д (7.0) | 18.5 |
| 22 | | 34.7 | | 34.3 | | 34.9 |
| 23 | | 32.7 | | 32.5 | | 32.3 |
| 24 | | 35.0 | | 34.8 | | 35.1 |
| 25 | | 41.2 | | 40.9 | | 38.3 |
| 26 | 3.35 м; 3.47 м | 66.9 | 3.38 дд (10.5, 7); 3.52 дд (10.5, 5.2) | 66.7 | 3.38 дд (10.5, 7.0); 3.51 дд (10.5, 5.2) | 72.5 |
| 27 | 0.81 д (7.0) | 12.0 | 0.85 д (7.0) | 14.5 | 0.83 д (6.8) | 14.8 |
| 28 | 0.79 д (7.0) | 14.7 | 0.84 д (7.0) | 11.8 | 0.84 д (6.8) | 12.0 |

Таблица 3. Некоторые данные спектров ¹H- и ¹³C-ЯМР моносахаридной части гликозидов (I)–(IV) из *H. aspera* и *H. tumida* (δ , м. д., J, DPX-300, AC-250, CD₃OD)

| Соединение | H1' | | H2' | | H3' | | H4' | | H5' | | OCH ₃ | |
|----------------|-----------------|------------|-----------------------|------------|-----------------|------------|------------|------------|--|------------|-------------------|-----------------|
| | δ_H | δ_C | δ_H | δ_C | δ_H | δ_C | δ_H | δ_C | δ_H | δ_C | δ_H | Δ_C |
| (I) | 4.42д (6.0) | 106.5 | 2.87 дд (6.0; 9.0) | 84.8 | 3.03 т (9.0) | 87.3 | 3.51 м | 70.9 | 3.79 дд (5.5; 11.0); 3.17 т (10.3) | 66.6 | 3.55 с; 3.69 с | 60.9; 61.1 |
| (Ia) | 4.42 д (7.5) | 104.3 | 2.87 дд (7.5; 9.0) | 84.7 | 3.03 т (9.0) | 87.2 | 3.50 м | 70.8 | 3.79 дд (5.5; 11.0); 3.16 т (11.0) | 66.6 | 3.55 с; 3.60 с | 60.7; 60.7 |
| (II), (III) | 4.44 д (7.5) | 102.5 | 2.90 дд (7.6; 9.0) | 84.7 | 3.42т (9) | 76.7 | 3.20 м | 80.9 | 3.14 т; 4.00 дд (11.1; 3.7) | 64.2 | 3.56 с; 3.59 с | 59.0; 61.0 |
| (Iб) | 4.45 д (7.4) | 102.61 | 2.95 т (8.0) | 84.75 | 3.45 т (8.9) | 76.75 | 3.20 м | 80.98 | 3.16 дд (11.2; 10.7); 4.02 дд (11.2; 5.0) | 64.25 | 3.46 с; 3.62 с | 59.07; 61.11 |
| (IV) | 4.42 д (7.5) | 104.5 | 2.87 дд (6.0; 9.0) | 84.8 | 3.03 т (9.0) | 87.3 | 3.50 м | 70.9 | 3.79 дд (5.5; 11.0); 3.17 т (10.3) | 66.6 | 3.56 с; 3.59 с | 60.8; 61.0 |

ти протонов установлены этими экспериментами. На основании всех полученных данных полиолоу (V) приписано строение (20R,24S)-5 α -холестан-3 β ,6 β ,8,15 α ,24-пентаола.

Спектры ¹³C-ЯМР и DEPT (табл. 4) стероида (VI) свидетельствуют о наличии в молекуле 27 атомов С, включая 5 метильных групп, 9 метиленовых, 11 метиновых и 3 четвертичных атома С. Из этих данных следует, что полиол (VI) имеет насыщенную тетрагидроксихолестановую структуру. Данные масс-спектров ("Эксперимент. часть"), так же как данные ¹³C- и ¹H-ЯМР-спектроскопии, указывают на молекулярную формулу C₂₇H₄₈O₄.

Предположения о положениях функциональных групп в циклической части молекулы были сделаны в результате сравнения ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектров (CD₃OD) стероида (VI) и известного 5 α -холестан-3 β ,6 β ,15 α ,16 β ,26-пентаола (VIa) из морской звезды *Halocia attenuata* [15]. Хорошее совпадение значений ХС атомов С1–С12, С19–Н₃, а также ХС сигналов протонов Н3 (3.54 м.д., м), Н6 (3.74 м.д., кв,

2.7 Гц) и С19–Н₃ (1.03 м.д., с) указывали на наличие 3 β ,6 β -диольной группировки в стероиде (VI).

Величина ХС (табл. 4) и мультиплетность соответствующего сигнала Н15 в спектре соединения (VI) (δ_H 3.88 м.д., дт, J 3.2; 9.3) совпадали с соответствующими значениями в спектре 24-O- β -D-ксилопиранозил-5 α -холестан-3 β ,6 β ,15 α ,24 ξ ,26-пентаола (VIб) из морской звезды *Solaster dawsoni* [16]. Кроме того, ХС сигналов С13–С21 в ¹³C-ЯМР-спектре полиола (VI) были близки соответствующим значениям для гликозида (VIб), что предполагало идентичность строения этой части молекулы в обоих соединениях. Строение (VI) было установлено с помощью двумерной спектроскопии ЯМР, включающей ¹H–¹H-COSY, HMBC- и HSQC-эксперименты. Эксперименты показали последовательность протонов от Н2(СН) до Н9(СН) и далее до Н11(СН₂) и Н8(СН)–Н14(СН), и далее до Н17(СН), подтвердив таким образом строение циклической части молекулы (VI). Сигналы протонов боковой цепи образуют интенсивные кросс-пики в

Таблица 4. Данные ЯМР-спектров полиоксистероидов (V) и (VI) (δ , м.д., CD₃OD, DPX-300, DRX-500; AC-250)

| АТОМ | (V) | | | (VI) | | |
|------|----------------------|--|--------------------|-----------------------|--------------------------------|--------------------|
| | δ_C , мульт.* | δ_H (J, Гц) | HMBC | δ_C , мульт.** | δ_H (J, Гц) | HMBC |
| 1 | 41.4 CH ₂ | 1.70 м (e); 1.94 м (a) | | 39.9 CH ₂ | 0.97 м; 2.13 м | |
| 2 | 31.7 CH ₂ | 1.20 м* (e); 1.75 м* (a) (1.48–1.59)* | | 32.2 CH ₂ | 1.40 м; 1.74 м | |
| 3 | 72.4 CH | 3.59 м | | 72.4 CH | 3.54 м | |
| 4 | 36.3 CH ₂ | 1.58 м, 1.83 м | | 36.4 CH ₂ | 1.55 м; 1.75 м | |
| 5 | * * * | 1.23 м | | 48.7 CH | 1.14 м | |
| 6 | 74.2 CH | 3.86 кв (3.0) | | 72.5 CH | 3.74 кв (2.7) | |
| 7 | 45.4 CH ₂ | 1.57 м (a); 2.38 дд (3.0; 14.0) | | 40.8 CH ₂ | 1.31 м; 2.13 дт (3.2; 14.5) | |
| 8 | 77.2 C | | | 31.4 CH | 1.95 м | |
| 9 | 57.2 CH | 0.96 м | | 55.8 CH | 1.73 м | |
| 10 | 36.7 C | | | 36.6 C | | |
| 11 | 19.8 CH ₂ | 1.54 м; 1.83 м | | 22.1 CH ₂ | 1.39 м; 1.53 м | |
| 12 | 42.9 CH ₂ | 1.23 м; 1.97 м | | 41.6 CH ₂ | 1.23 м; 1.97 м | |
| 13 | 45.5 C | | | 44.9 C | | |
| 14 | 66.6 CH | 1.20 м | C8, C15, C16, C18 | 63.8 CH | 1.07 м | |
| 15 | 70.0 CH | 4.28 тд (3.4; 9.6) | | 74.2 CH | 3.88 тд (3.2; 9.3) | |
| 16 | 41.6 CH ₂ | 1.70 м; 1.92 м | C13, C15, C17 | 41.8 CH ₂ | 1.73 м; 1.92 м | |
| 17 | 55.9 CH | 1.36 м | | 55.0 CH | 1.40 м | |
| 18 | 15.3 CH ₃ | 0.96 с | C12, C13, C14, C17 | 13.8 CH ₃ | 0.75 с | C12, C13, C14, C17 |
| 19 | 15.9 CH ₃ | 1.16 с | C1, C5, C9, C10 | 16.3 CH ₃ | 1.03 с | C1, C5, C9, C10 |
| 20 | 36.3 CH | 1.36 м | | 36.9 CH | 1.40 м | |
| 21 | 19.0 CH ₃ | 0.92 д (5.7) | C17, C22 | 19.2 CH ₃ | 0.95 д (5.5) | C17, C20, C22 |
| 22 | 33.3 CH ₂ | 0.98 м; 1.61 м | | 33.6 CH ₂ | 1.65 м | |
| 23 | 31.6 CH ₂ | 1.20 м*; 1.75 м* (1.48–1.59)* | | 31.5 CH ₂ | 1.21 м; 1.56 м | |
| 24 | 78.1 CH | 3.20 м | | 78.1 CH | 3.20 м | |
| 25 | 34.6 CH | 1.61 м | | 34.6 CH | 1.62 м | |
| 26 | 17.5 CH ₃ | 0.91 д (6.9) | C24, C25, C27 | 17.5 CH ₃ | 0.89 д (7.0) | C24, C25, C27 |
| 27 | 19.5 CH ₃ | 0.88 д (6.9) | C24, C25, C26 | 19.5 CH ₃ | 0.91 д (7.0) | C24, C25, C27 |

* Отнесение неоднозначное.

** Мультиплетность измерена при DEPT.

*** Сигнал под растворителем.

HMBC-спектрах: C26-H₃ (δ_H 0.89 м.д.) и H27(CH₃) (δ_H 0.91 м.д.)/H25(CH) (δ_H 1.62 м.д.) и H25(CH)/H24(CH) (δ_H 3.20 м.д.), что подтверждает наличие 24-гидроксистероидного типа боковой цепи в (VI). На основании полученных данных стероиду (VI) приписано строение (20R,24S)-5 α -холестан-3 β ,6 β ,15 α ,24-тетраола. Это соединение отличается только конфигурацией гидроксильной группы у C15 от выделенного нами ранее полиола из *H. sanguinolenta* [17], но поскольку их спектры ЯМР

были определены в разных растворителях, то прямого сравнения этих спектров не проводилось.

Найденные нами новые полярные стероиды (V) и (VI) с 3 β ,6 β ,15 α -гидроксилированием увеличивают серию ранее известных полигидроксилированных соединений из морских звезд. Идентификация известных гликозидов левискулозидов I, H, G в изученных нами видах морских звезд выполнена благодаря совпадению их физических констант, а также MALDI-TOF- и ЯМР-спектров с

такowymi для гликозидов, выделенных ранее нами и итальянскими авторами из *H. leviuscula* [2, 3, 17].

Для выделенных соединений мы определили минимальные концентрации (C_{\min}), останавливающие деление оплодотворенных яйцеклеток на стадии первого дробления, а также вызывающие обездвиживание спермий морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. На яйцеклетках гликозиды (I)–(IV) показали умеренную цитостатическую активность: C_{\min} (M) = 7.8×10^{-8} (I) и (II); 8.2×10^{-8} (III) и 4.0×10^{-8} (IV). Для стероидов (V) и (VI) эти значения составили 1.14×10^{-7} и 1.16×10^{-7} M. Полное обездвиживание спермий морского ежа (OD_{50} ч⁻¹) наблюдалось при вдвое больших концентрациях выделенных соединений. Полученные данные согласуются с описанными ранее [4] для стероидных производных из морских звезд.

Таким образом, настоящее и предшествующие исследования указывают на большое разнообразие полярных стероидов из морских звезд рода *Henricia*. Оно в какой-то мере соответствует широкой биологической вариабельности изученных к настоящему времени видов этого рода. Известный специалист по систематике морских звезд В. Фишер еще в 1911 году писал: “Будучи хорошо знаком с изменчивостью морских звезд, я никогда раньше не встречался с такими крайними примерами, которые присутствуют у видов этого рода” [18].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ¹H- и ¹³C-ЯМР регистрировали на спектрометрах Bruker AC-250 (¹H – 250, ¹³C – 62.9 МГц), Bruker DPX-300 (¹H – 300, ¹³C – 75.5 МГц) и Bruker DRX-500 (¹H – 500, ¹³C – 125.7 МГц, внутренний стандарт – тетраметилсилан, 22°C). Оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin-Elmer 141 в MeOH. MALDI-TOF-масс-спектры получали на масс-спектрометре Biflex III (Bruker, Германия) с лазерной ионизацией/десорбцией (N₂-лазер 337 нм) с помощью матрицы. Образец растворяли в метаноле (10 мг/мл) и анализировали аликвоту 1 мкл, используя в качестве матрицы α-цианогидроксикоричную кислоту. ВЭЖХ проводили на хроматографе Du Pont Model 8800, используя рефрактометрический детектор и колонки, заполненные Диасфер-110-C₁₈ (5 мкм, 4 × 250 мм) и YMC-Pack ODS-A (5 мкм, 12 нм, 10 × 250 мм). Температуры плавления определяли на столике Leica Galen II. ТСХ выполняли на пластинках Sorbfil с закрепленным на фольге слоем силикагеля СТХ-1А (5–17 мкм, Россия, Краснодар). Колоночную препаративную хроматографию проводили на силикагеле L (80–100 и 200–250 меш, Chemapol, Чехия) и флоризиле (60–100 и 200–250 меш, Merck, Германия).

Животные. Образцы морских звезд *H. aspera* и *H. tumida* собраны в августе 1999 г. (Охотское море,

Курильские о-ва) в 22-м рейсе НИС “Академик Опарин” тралом с глубины 100–200 м и идентифицированы проф. В.С. Левиным (Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН).

Биоиспытания. Цитостатическая активность соединений (I)–(VI) по отношению к оплодотворенным яйцеклеткам морского ежа *St. intermedius* определена по описанному ранее методу [4].

Экстракция и выделение суммарных фракций. Измельченные морские звезды *H. aspera* (масса животных 0.32 кг) исчерпывающе экстрагировали 95% этанолом при комнатной температуре. Объединенный спиртовый экстракт упарили в вакууме до сырого смолообразного остатка (30 г), который хроматографировали на колонке (6 × 25 см) с силикагелем (80–100 меш) в системе хлороформ–этанол (100 : 0 → 45 : 55). Получили две фракции полиоксистероидов – менее полярную I (0.83 г), состоящую из гликозидов (I)–(IV), и полярную фракцию II (4.5 г), состоящую из известных хенрициозида H₁, левискулозидов H и G.

Из 52 г сухого этанольного остатка морских звезд *H. tumida* (масса животных 0.23 кг) выделено по такой же схеме 0.72 г фракции I и 3 г фракции II.

Выделение соединений (I)–(VI). Фракцию I (*H. aspera*) растворили в воде и пропустили через колонку с полихромом (3 × 12 см), промывая колонку водой и 50% водным этанолом. Водно-этанольный элюат концентрировали в вакууме до коричневого смолистого остатка (0.1 г), который последовательно хроматографировали на колонках с сефадексом LH-60 (40 × 1.5 см) в системе CHCl₃–EtOH (4 : 1) и с флоризилом (1.5 × 20 см, 60–100 меш) в системе CHCl₃–EtOH (6 : 1 → 5 : 1). Получили фракцию, содержащую гликозиды (I)–(IV) (6.5 мг), окончательную очистку которой проводили методом ВЭЖХ на колонке с Диасфер-110-C₁₈ (5 мкм, 4 × 250 мм) с последующей рехроматографией на колонке YMC-Pack ODS-A (5 мкм, 12 нм, 10 × 250 мм). Получили 2 мг гликозида (I) (0.0006% от веса животных), 2.4 мг (II) (0.0007%), 3 мг (III) (0.0009%) и 1.2 мг (IV) (0.0003%). Из фракции II выделили 2.3 мг (0.0007%) хенрициозида H₁, 4 мг (0.0004%) левискулозида G и 6 мг (0.001%) левискулозида H.

При разделении фракции I из морской звезды *H. tumida* по описанной выше схеме получили 5 мг гликозида (III) (0.002% от веса животных), 3 мг гликозида (IV) (0.001%), 2.5 мг стероида (V) (0.001%) и 3.6 мг стероида (VI) (0.001%). Из фракции II выделили 5.3 мг (0.002%) левискулозида H и 5 мг (0.002%) левискулозида G.

Асперозид А, (20R,24R,25S)-3-O-(2,3-ди-O-метил-β-D-ксилопиранозил)-24-метил-5α-холест-4-ен-3β,6β,8,15α,16β,26-гексаол (I), C₃₅H₅₈O₁₀, бесцветные кристаллы (MeOH), т. пл. 98–99.5°C;

$[\alpha]_D^{20} -14$ (с 0.1). (+)-MALDI-TOF-масс-спектр ($I_{\text{отн}}$, %): псевдомолекулярный пик с m/z 663 $[M + Na]^+$ (100). Данные спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР (CD_3OD) приведены в табл. 1–3 и в тексте.

Асперозид В, (20R,24R,25S)-(22E)-3-O-(2,4-ди-O-метил- β -D-ксилопиранозил)-24-метил-5 α -холест-22-ен-3 β ,4 β ,6 β ,8,15 α ,26-гексаол (II), $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{O}_{10}$, выделен с выходом 0.0007% (*H. aspera*), аморфный, $[\alpha]_D^{20} -16$ (с 0.1). MALDI-TOF-масс-спектр: m/z 663 $[M + Na]^+$ (100). Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР (CD_3OD) углеводной части (II) приведены в табл. 3.

Тумидозид А, (20R)-(22E)-3-O-(2,4-ди-O-метил- β -D-ксилопиранозил)-26,27-динор-24-метил-5 α -холест-22-ен-3 β ,4 β ,6 β ,8,15 α ,25-гексаол (III), $\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{O}_{10}$, выделен с выходом 0.002% (*H. tumida*) и 0.0008% (*H. aspera*); аморфный, $[\alpha]_D^{20} -5.3$ (с 0.13). MALDI-TOF-масс-спектр: m/z 635 $[M + Na]^+$ (100). Спектры ^1H -ЯМР (CD_3OD): 0.98 (1 H, д, J 6.8, C21-H₃); 5.26 (2 H, дд, взаимно перекрываются, H22, H23); 3.40 (1 H, дд, J 10.5; 6.0, H25); 3.26 (1 H, дд, H²⁵); 0.97 (1 H, д, J 6.7, C26-H₃); ^{13}C -ЯМР: 20.7 (C21), 137.7 (C22), 131.5 (C23), 40.5 (C24), 68.4 (C25), 17.2 (C26).

Тумидозид В, (20R,24S)-3-O-(2,3-ди-O-метил- β -D-ксилопиранозил)-5 α -холестан-3 β ,4 β ,6 β ,8,15 α ,24-гексаол (IV), $\text{C}_{34}\text{H}_{60}\text{O}_{10}$, выделен из двух видов звезд: *H. tumida* с выходом (0.001%), *H. aspera* (0.0003%), аморфный, $[\alpha]_D^{20} -7$ (с 0.1). MALDI-TOF-масс-спектр: m/z 651 $[M + Na]^+$ (100). Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР (CD_3OD) даны в табл. 1, 3.

(20R,24S)-5 α -Холестан-3 β ,6 β ,8,15 α ,24-пентаол (V), $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}_5$, выделен с выходом 0.001% (*H. tumida*), бесцветные кристаллы, т. пл. 98–100°C (из MeOH), $[\alpha]_D^{20} +4$ (с 0.1). MALDI-TOF-масс-спектр: m/z 475 $[M + Na]^+$ и 491 $[M + K]^+$ (30). Данные спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР (CD_3OD) приведены в тексте и в табл. 4.

(20R,24S)-5 α -Холестан-3 β ,6 β ,15 α ,24-тетраол (VI), $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}_4$, выделен с выходом 0.001% (*H. tumida*), аморфный, $[\alpha]_D^{20} +6.4$ (с 0.1). Данные спектров ЯМР ^1H и ^{13}C (CD_3OD) приведены в табл. 4. Поскольку в масс-спектре (+)-MALDI-TOF наблюдаемая интенсивность пика с m/z 459 $(M + Na)^+$ очень мала (1–2%), мы получили масс-спектры FAB(+) и ЭУ (70 эВ). В спектре FAB(+) содержится квазимолекулярный ион с m/z 459 $(M + Na)^+$, а в спектре электронного удара – фрагментационные пики, соответствующие отщеплению молекул H_2O , с m/z 418 $(M - \text{H}_2\text{O})^+$ и 400 $(M - 2 \text{H}_2\text{O})^+$.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Евтушенко Е.В. за образец стандартного соединения β -метил-2,4-ди-O-Ме-D-ксилопиранозид, использованный в работе и Левину В.С. (оба – ТИБОХ ДВО РАН) за видовую идентификацию морских звезд.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 05-04-48246), гранта Президента России НШ-725.2003.4, а также программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” (грант № 05-1-05-005).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Стоник В.А. // Успехи химии. 2001. V. 70. С. 673–715.
2. Калиновский А.И., Левина Э.В., Стоник В.А., Дмитренко П.С., Андриященко П.В. // Биоорганическая химия. 2004. V. 30. С. 215–220.
3. D Auria M.V., Fontana A., Minale L., Riccio R. // Gazz. Chim. Ital. 1990. V. 120. P. 155–163.
4. Левина Э.В., Калиновский А.И., Стоник В.А., Дмитренко П.С. // Изв. АН. Сер. хим. 2003. № 7. С. 1539–1543.
5. Кича А.А., Калиновский А.И., Горбач Н.В., Стоник В.А. // Химия природ. соед. 1993. № 2. С. 249–253.
6. Iorizzi M., Minale L., Riccio R., Yasumoto T. // J. Nat. Prod. 1992. V. 55. P. 866–877.
7. Iorizzi M., Bryan P., McClintock J., Minale L., Palagiano E., Maurelli S., Riccio R., Zollo F. // J. Nat. Prod. 1995. V. 58. P. 653–671.
8. D Auria M.V., De Riccardis F., Minale L., Riccio R. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1990. P. 2889–2893.
9. Findlay J.A., He Zheng-Quan. // J. Nat. Prod. 1991. V. 54. P. 428–435.
10. De Marino S., Iorizzi M., Zollo F., Minale L., Amsler C.D., Baker B.J., McClintock J.B. // J. Nat. Prod. 1997. V. 60. P. 959–966.
11. Ferezou J.P., Devys M., Allais J.P., Barbier M. // Phytochemistry. 1974. V. 13. P. 593–598.
12. Iorizzi M., De Marino S., Minale L., Zollo F., Le Bert V., Roussakis C. // Tetrahedron. 1996. V. 52. P. 10997–11012.
13. Riccio R., Iorizzi M., Minale L. // Bull. Soc. Chim. Belg. 1986. V. 95. P. 869–893.
14. Kicha A.A., Kalinovsky A.I., Levina E.V., Stonik V.A., Elyakov G.B. // Tetrahedron Lett. 1983. V. 24. P. 3893–3896.
15. Minale L., Pizza C., Zollo F., Riccio R. // Tetrahedron Lett. 1982. V. 23. P. 1841–1844.
16. Кича А.А., Калиновский А.И., Иванчина Н.В., Стоник В.А. // Изв. АН. Сер. хим. 1993. № 5. С. 980–982.
17. Левина Э.В., Калиновский А.И., Андриященко П.В., Стоник В.А., Дмитренко П.В. // Изв. АН. Сер. хим. 2002. № 12. С. 2132–2134.
18. Fisher W.K. Asteroidea of the North Pacific and Adjacent Waters. Part I. Phanerozoia and Spinulosa. Washington, D.C.: Smithsonian Institution, U.S. National Museum, 1911. 420 p.

Steroid Compounds from Far Eastern Starfishes *Henricia aspera* and *H. tumida*

E. V. Levina[#], A. I. Kalinovsky, V. A. Stonik, P. S. Dmitrenok, and P. V. Andriyashchenko

[#]Fax: (4232) 31-4050; e-mail: levina@piboc.dvo.ru

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

Six new natural compounds were isolated from two Far Eastern starfish species, *Henricia aspera* and *H. tumida*, collected in the Sea of Okhotsk. Two new glycosylated steroid polyols were obtained from *H. aspera*: asperoside **A** and asperoside **B**, which were shown to be (20*R*,24*R*,25*S*)-3-*O*-(2,3-di-*O*-methyl-β-*D*-xylopyranosyl)-24-methyl-5α-cholest-4-ene-3β,6β,8,15α,16β,26-hexaol and (20*R*,24*R*,25*S*,22*E*)-3-*O*-(2,4-di-*O*-methyl-β-*D*-xylopyranosyl)-24-methyl-5α-cholest-22-ene-3β,4β,6β,8,15α,26-hexaol, respectively. Two other glycosylated polyols, tumidoside **A**, with the structure elucidated as (20*R*,22*E*)-3-*O*-(2,4-di-*O*-methyl-β-*D*-xylopyranosyl)-26,27-dinor-24-methyl-5α-cholest-22-ene-3β,4β,6β,8,15α,25-hexaol, and tumidoside **B**, whose structure was elucidated as (20*R*,24*S*)-3-*O*-(2,3-di-*O*-methyl-β-*D*-xylopyranosyl)-5α-cholestan-3β,4β,6β,8,15α,24-hexaol, were isolated from the two starfish species. (20*R*,24*S*)-5α-Cholestan-3β,6β,15α,24-tetraol and (20*R*,24*S*)-5α-cholestan-3β,6β,8,15α,24-pentaol were identified only in *H. tumida*. The known monoglycosides henricioside **H**₁ and laeviuscolosides **H** and **G** were also identified in both species. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: aglycones, glycosides, *Henricia aspera*, *H. tumida*, ¹H and ¹³C NMR spectra, MALDI TOF mass spectra, polyhydroxysteroids