

- gracum*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 29 (1): 655-657.
- [3] Nobutoshi T, Takao M, Yasuhisa S, *et al*. Chemical and chemotaxonomical studies of ferns. XXXVII. Chemical studies on the constituents of *Costa Rican* ferns (2) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1981, 29(12): 3455-3463.

- [4] Duc D K, Sung T V, Angela M C, *et al*. Ellagic compounds from *Diplazanax stachyanthus* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29 (1): 251.
- [5] Ye L, Yang J S. Ducheside A, a new ellagic glycoside from *Duchesnea indica* Focke [J]. *Chin Chem Lett*, 1996, 7(4): 335-336.

胡芦巴中皂苷成分的研究 II. 新皂苷 B 和 C 的分离纯化及化学结构测定

徐学民, 王 旻, 杨 红, 黄卫平, 袁崇军*

(四川省中药研究所, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 对胡芦巴 *Trigonella foenum-graecum* 种子所含的皂苷成分作深入研究。方法 采用硅胶 H 柱色谱, 干柱色谱等方法从总皂苷中分离纯化皂苷成分并通过¹³C-NMR, FAB-MS, DEPT 等波谱法及部分水解获得次生苷的方法测定了化学结构。结果 从总皂苷中分出两个新皂苷 B 和 C, 均为薯蓣皂苷元的四糖苷。经测定皂苷 B 的化学结构为: 薯蓣皂苷元-3-O- α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-葡萄糖吡喃糖(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷; 皂苷 C 的结构为薯蓣皂苷元-3-O- β -D-葡萄糖吡喃糖(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-葡萄糖吡喃糖(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷。结论 皂苷 B 和 C 是两个新的四糖皂苷。

关键词: 胡芦巴; 皂苷 B; 皂苷 C

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)02-0127-04

Studies on saponins from seeds of *Trigonella foenum-graecum*

II. Isolation and structural elucidation for two new saponins B and C

XU Xue-min, WANG Jia, YANG Hong, HUANG Wei-ping, YUAN Chong-jun

(Sichuan Institute of Chinese Materia Medica, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Object** To do detail investigation of the saponins from the Chinese materia medica Huluba (the seeds of *Trigonella foenum-graecum* L.). **Methods** The pure saponins from the total saponins were isolated by employing the column chromatography and dry column chromatography of silica gel H. Their chemical structures were elucidated by ¹³C-NMR, FAB-MS, DEPT spectroscopic evidence and the results of the fraction-hydrolysis of acquiring their secondary glucosides were obtained. **Results** Two new saponins B and C were isolated and both were the glucosides consisted by four molecules of sugar with diosgenin. The chemical structure of B is: diosgenin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3)- α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranoside. And saponin C is: diosgenin-3-O- β -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)- α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranoside. **Conclusion** Saponins B and C are two new ones with four molecules of sugar respectively.

Key words: *Trigonella foenum-graecum* L.; saponin B, saponin C

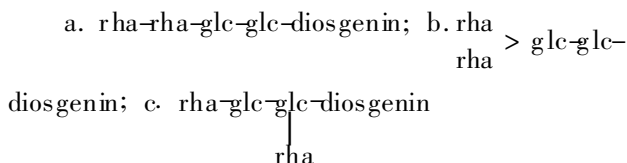
上文^[1]详述了从中药胡芦巴 *Trigonella foenum-graecum* L. 中分出一种新皂苷 A, 并通过将 A 部份水解获得次生苷 I (单糖苷) 与次生苷 II (双糖苷), 运用光谱及化学方法对次生苷及皂苷 A 的结构测定, 证明了皂苷 A 的化学结构为: rha $\xrightarrow{1\rightarrow4}$ glc $\xrightarrow{1\rightarrow4}$ glc $\xrightarrow{1\rightarrow3}$ diosgenin; 次生苷 I 为 glc $\xrightarrow{1\rightarrow3}$

diosgenin; 次生苷 II 为 glc $\xrightarrow{1\rightarrow4}$ glc $\xrightarrow{1\rightarrow3}$ diosgenin。此 3 个皂苷的化学结构测定结果为两个四糖皂苷 B、C 的结构测定奠定了良好的基础并成为确定它们结构的参考依据。本研究将详述新皂苷 B、C 分离纯化及化学结构测定。

皂苷 B: 白色粒状结晶, mp 196 °C~197 °C(分

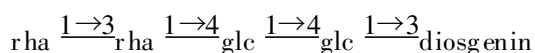
解), $[\alpha]_D^{20} - 78.92$ (c, 0.937 6, MeOH)。红外光谱显示有 25R-螺甾烷和缔合多羟基特征吸收。将其酸水解后苷元的熔点, 薄层色谱的 Rf 值以及红外光谱与薯蓣皂苷元对照品比较证明为同一物质。水解液在硅胶 H 板上检出 D-葡萄糖和 L-鼠李糖。FAB 质谱测得分子离子峰 m/z 为 1 031 (MH^+), 符合分子式 $C_{51}H_{82}O_{21}$, 此应为薯蓣皂苷元的四糖苷, D-葡萄糖与 L-鼠李糖的比例恰为 2:2。DEPT 实验显示皂苷 B 存在 6 个 CH_3 , 12 个 CH_2 , 29 个 CH 及 4 个季碳, 此与薯蓣皂苷元和两分子葡萄糖、两分子鼠李糖所形成的皂苷所含的伯、仲、叔、季碳数目完全一致。皂苷 B 的部分水解产物检出 3 个次生苷, 将其分离纯化后经前述结构测定为次生苷 I (trillin), 次生苷 II 以及皂苷 A, 此表明皂苷 B 均含有此 3 个苷的结构部分。

皂苷 B 的 FAB 质谱有强烈的端基鼠李糖裂片峰 m/z 147 (72%), 而未出现端基葡萄糖的裂片 (m/z 145), 证明分子中只含有末端鼠李糖, 葡萄糖均不处于糖链末端。鉴于此苷 B 只能有以下 3 种糖链的连接方式:



根据前述部分水解产物只有 3 个次生苷的结果分析, C 那样的连接方式不存在, 如果存在, 部分水解应出现以下 4 个次生苷 (1 个三糖苷, 2 个双糖苷, 1 个单糖苷), 同理, 如果 b 连接方式成立, 部分水解应产生 1 个单糖苷, 1 个双糖苷, 2 个三糖苷, 共 4 个次生苷, 且 ^{13}C -NMR 谱应出现 2 个端基鼠李糖的 δ_c 值。但实际情况只有 1 个端基鼠李糖各碳原子的 δ_c 值存在, 而另 1 个鼠李糖的 δ_c 值与表 3a-甲基-L-鼠李糖苷比较, 其 C_2 位 δ_c 值大大移向低场 ($\delta_{72.6} \rightarrow 78.6$), 证明此位置和另一个糖相连。根据苷 B 的 ^{13}C -NMR 谱中各糖的 δ_c 值分析, B 只能是 a 方式连接, 此因 2 个未处于末端的葡萄糖的 δ_c 值通过与 β -甲基-D-葡萄糖苷的 δ_c 值比较^[3], 它们的 C_4 位分别均移向低场 ($\delta_{71.6} \rightarrow 76.9$, $\delta_{71.6} \rightarrow 75.3$), 这些结果均证明分子内部的前 2 个糖的糖链均是以 1 $\rightarrow$ 4 连接方式, 而末端鼠李糖与第三糖 (鼠李糖) 是 1 $\rightarrow$ 3 连接。根据 B 的 HMQC 谱, 非端基鼠李糖在 $C_3\delta_c$ 值为 77.6, 相应的氢质子化学位移 δ_1 为 4.38 (t); 其邻位 $C_4\delta_c$ 值为 73.5, 相应的氢质子的 δ_1 为 4.31 (t); 而另 邻位 C_2 δ_c 值为 72.5, 相应的氢质子

的 δ_1 为 4.62 (t), 从 1H - 1H -COSY 谱中可见, C_3 位的氢质子与两个邻位 (C_2 与 C_4) 上的氢质子有相当强烈的交互作用信号, 而与 C_1 上的氢质子 (δ_1 5.77) 无任何交互作用信号。只有 C_2 上的氢质子 δ_1 4.66 与 5.77 (C_1 -H) 有强烈的交互作用信号。此充分证明了端基鼠李糖与非端基鼠李糖是以 1 $\rightarrow$ 3 相连的连接方式, 若此连接发生在非端基鼠李糖的 C_2 位上, 其氢质子 δ_1 4.38 全与 C_1 的氢质子信号 5.77 应有强烈的交互作用信号。由于分离得到了次生苷为葡萄糖的单糖苷 (苷 I) 和双糖苷 (次生苷 II), 这就证明了分子中葡萄糖直接和苷元相连, 且直链的第二分子糖也是葡萄糖。故 B 的糖链相连顺序和方式应为:

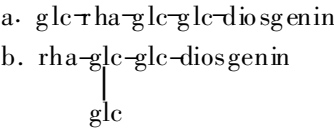


皂苷 B 的 ^{13}C -NMR 谱 δ_c 值详见表 1, 2, 和已知物数据比较, 完全符合上述结构。皂苷 B 的 FAB 质谱的裂解碎片也强烈支持上述结论。

皂苷 B 糖链中 C_1 的 δ_c 值与 β -甲基葡萄糖苷及 α -甲基鼠李糖苷 $C_1\delta_c$ 值比较^[2,3], 苷 B 的结构应为薯蓣皂苷元-3-O- α -L-鼠李吡喃糖 (1 $\rightarrow$ 3)- α -L-鼠李吡喃糖 (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-葡萄糖吡喃糖 (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷。

皂苷 C: 白色粉末状结晶, 熔点 229 $^{\circ}C \sim 233$ $^{\circ}C$ (分解), $[\alpha]_D^{20} - 70.42$ (c, 0.738 4 MeOH)。红外光谱有 25R-螺甾烷和缔合多羟基特征吸收。酸水解所得苷元的熔点, 薄层色谱 Rf 值, 红外光谱与薯蓣皂苷元对照品完全一致。水解液在硅胶 H 板上检出鼠李糖和葡萄糖。FAB 质谱其分子离子峰为 m/z 1 047 (MH^+), 相对分子质量为 1 046, 符合分子式 $C_{51}H_{82}O_{22}$, 其中 ^{13}C -NMR 谱也呈现 4 个六碳糖的谱线, 故苷 C 应为薯蓣皂苷元的四糖苷。根据前述相对分子质量计算分子中葡萄糖与鼠李糖比例恰为 3:1。苷 C 的 DEPT 实验显示分子中存在 5 个 CH_3 , 13 个 CH_2 , 29 个 CH 及 4 个季碳, 此与薯蓣皂苷元和 3 分子葡萄糖、1 分子鼠李糖所形成的皂苷所含的伯、仲、叔、季、碳数目完全一致。苷 C 在温和条件下部分水解, 产物在硅胶 H 板上检出 3 个次生苷, 与对照品比较 Rf 值分别证明它们为次生苷 I (单糖苷), 次生苷 II (双糖苷), 以及皂苷 A (三糖苷), 此表明苷 C 分子中存在有此 3 种苷的结构部分, 且证明葡萄糖直接和皂苷元相连 (1 $\rightarrow$ 3 连接方式), 第二分子葡萄糖和此糖 1 $\rightarrow$ 4 连接, 因为部分水解产物检出了双葡萄糖苷 (苷) 为部分水解产物检 了 苷 A (糖

苷), 因此苷 C 糖链只能有下列连接顺序:



若 b 连接顺序, 部分水解时会产生 4 个次生苷, 即 1 个单葡萄糖苷, 1 个双葡萄糖苷, 1 个三葡萄糖苷与皂苷 A, 但实验结果并未出现三葡萄糖苷, 故苷 C 的连接顺序只能是 a。FAB 质谱也支持此结论, 因其没有末端鼠李糖裂片峰存在(m/z 147), 而只有末端葡萄糖糖裂片峰 m/z 145(65%, 端基葡萄糖 m/z 163- H₂O)。

苷 C 的¹³C-NMR 谱 δ_c 值见表 1, 2, 与表 3 2 个甲基苷的 δ_c 值比较, 分子中未处于末端葡萄糖的 C₄ 位 δ_c 值均大大移向低场(δ 71. 6 $\rightarrow$ 76. 3, 71. 6 $\rightarrow$ 75. 2), 证明其均为 1 $\rightarrow$ 4 连接方式, 且未处于末端的鼠李糖的 C₄ 位 δ_c 值大大移向低场(δ 73. 7 $\rightarrow$ 81. 4), 表明末端葡萄糖与其连接也是 1 $\rightarrow$ 4 方式。故苷 C 的连接顺序与方式应为:

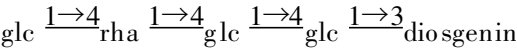


表 1 皂苷元¹³C-NMR 化学位移值

Table 1 ¹³ C-NMR chemical shift of saponin			
碳位	薯蓣皂苷配基	皂苷 B	皂苷 C
1	37. 2	37. 2	37. 5
2	31. 6	30. 9	31. 7
3	71. 5	77. 8	78. 1
4	42. 2	40. 9	40. 8
5	140. 8	140. 9	140. 8
6	121. 3	121. 9	121. 8
7	32. 0	32. 4	32. 2
8	31. 4	31. 7	30. 8
9	50. 1	50. 3	50. 4
10	36. 6	37. 6	37. 1
11	20. 9	21. 2	21. 1
12	39. 8	39. 9	40. 5
13	40. 2	40. 6	40. 5
14	56. 5	56. 7	56. 6
15	31. 8	32. 3	30. 2
16	80. 7	81. 4	82. 1
17	62. 1	62. 9	62. 1
18	16. 3	16. 4	16. 3
19	19. 4	19. 5	19. 4
20	41. 6	39. 1	39. 0
21	14. 5	16. 4	16. 4
22	109. 1	112. 8	112. 7
23	31. 4	32. 3	34. 2
24	28. 8	28. 3	28. 2
25	30. 3	30. 7	34. 5
26	66. 7	64. 3	64. 2

表 2 皂苷的糖部分¹³C-NMR 化学位移值

Table 2 ¹³ C-NMR chemical shift of sugar fraction in saponin		
各糖碳位	皂苷 B	皂苷 C
glc 1	105. 1	105. 0
	74. 2	74. 2
	78. 3	78. 6
	76. 9	76. 3
	78. 5	78. 7
	62. 9	61. 9
glc 2	102. 9	100. 0
	73. 9	72. 8
	78. 7	77. 3
	75. 3	75. 2
	78. 0	78. 3
	61. 4	62. 9
rha 1	100. 4	101. 8
	72. 5	71. 8
	77. 6	72. 5
	73. 5	81. 4
	70. 5	69. 5
	18. 8	18. 7
glc 3	102. 1	105. 3
	72. 8	74. 9
	rha 72. 6	78. 3
	72. 9	71. 2
	69. 6	78. 2
	18. 6	62. 9

表 3 二种糖苷的¹³C-NMR 谱化学移值^[3]

Table 3 ¹³ C-NMR chemical shift of two glucosides						
糖苷名称	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
β -甲基-D-葡萄糖苷	105. 5	73. 9	78. 3	71. 6	78. 3	62. 3
α -甲基-L-鼠李糖苷	102. 4	72. 6	72. 0	73. 7	69. 4	18. 6

FAB 质谱的主要裂片峰也证实了此结论。

皂苷 C 糖链中 C₁ 的 δ_c 值与 β -甲基葡萄糖苷及 α -甲基鼠李糖苷 C₁ 的 δ_c 值比较^[2, 3], 苷 C 的结构为薯蓣皂苷元-3-O- β -D-葡萄糖吡喃糖(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-鼠李吡喃糖(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-葡萄糖吡喃糖(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-葡萄糖吡喃糖苷。

1 仪器和材料

熔点按《中华人民共和国药典》2000 年版一部附录 VII C 要求测定; 温度计已经校正。比旋度用 WZX-型旋光仪测定; 红外光谱用岛津 FTIR-8300 型仪测定, 快速原子轰击质谱(FAB) 用 Zabsoec T ofspec Platform-ESI 质谱仪测定, ¹³C-NMR 谱与 ¹H-NMR 谱及 DEPT 实验用 JNM-GX 400 型核磁共振仪测定, 氘代吡啶为溶剂, TMS 为内标。

薄层色谱用 0. 7% 羧甲基纤维素钠硅胶 H 板(80 $^{\circ}$ C 活化 30 min)。展开剂: ①正丁醇-乙醇-水(10 : 2 : 5 上相); ②氯仿-甲醇-水-醋酸(25 : 12 : 2 2); ③醋酸 酯-醋酸-水(8 2 1); ④氯仿-丙

酮(9:1); ⑤氯仿-丙酮(85:15)。显色剂: ①10% H_2SO_4 乙醇溶液, 100 °C加热 3 min 显色; ②25% 磷酸乙酸溶液, 100 °C加热 5 min 显色; ⑥ 氯仿-甲醇-水(15:6:2); 显色剂: ④苯胺-邻苯二甲酸溶液喷雾, 加热至 100 °C显色。干柱色谱使用薄层色谱用硅胶 H(青岛海洋化工厂出品)。

2 提取和分离

按上文^[1]的实验部分制备总皂苷和纯总皂苷 30.7 g。取纯总皂苷 12 g, 用 200 mL 甲醇加热溶解后滤过, 滤液回收溶液剂至残余物呈糖浆状, 拌入 20 g 硅胶 H, 挥去溶液后研细备用。另取硅胶 H 800 g, 用氯仿-甲醇-水(25:6:0.7)湿法装柱(120 cm×5.5 cm), 平衡 12 h 后将前述吸样硅胶 H 上于柱顶, 用氯仿-甲醇-水(25:9:1.5)洗脱, 用薄层色谱监控洗脱物(展开剂①, 显色剂①)。获得皂苷 B 2.83 g(甲醇中析出)。继用氯仿-甲醇-水(25:15:3)洗脱, 得皂苷 C 1.91 g(甲醇中析出, TLC 监控用展开剂①, 显色剂①)。最后用甲醇洗脱得到 3.6 g 洗脱物。皂苷 B、C 在硅胶 H 板(展开剂①②③)上均呈单一斑点。

3 结构测定

皂苷 B: 白色无定形粉末(MeOH-丙酮), mp 196 °C~197 °C, $[\alpha]_D^{25} - 78.92$ (c, 0.937 6, MeOH)。元素分析 $\text{C}_{51}\text{H}_{82}\text{O}_{21} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 计算值(%): C 56.51, H 8.00; 实验值(%): C 56.64, H 8.11。IR $\text{KBr } \nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3 409(br. 缩合 OH), 2 935, 2 906, 2 848 ($\text{S} \cdot \text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2$), 1 647(苷元双键), 1 456, 1 379, 1 230, 1 043(br. 缩合 OH), 910, 837, 812。FAB-MS: m/z 1 031 (MH^+), 869 ($\text{MH}^+ - \text{rha} - \text{OH}$, 10%), 577 ($\text{MH}^+ - 2\text{glc} - \text{rha}$, 17%), 599 ($\text{MH}^+ - 2\text{glc} - \text{rha} - \text{H}_2\text{O}$, 15%), 397 ($\text{diosgenin} - \text{OH}$, 24%), 147(末端鼠李糖基, $\text{MH}^+ - \text{diosgenin} - 2\text{glc} - \text{rha}$, 72%)。

皂苷 B 的酸水解: 苷 B 60 mg, 按皂苷 A 方法进行酸水解, 得皂苷元 14.7 mg, mp 202 °C(无乙水醇)。按皂苷 A 薄层检查法及做 IR 谱, 与平行操作的薯蓣皂苷元的数据完全一致。

皂苷 B 的部分水解: 苷 B 500 mg, 按皂苷 A 的方法进行部分水解, 得水解产物 317 mg。将此用硅胶 H TLC 检查(展开剂②、③, 显色剂①), 只发现 3 个次生苷斑点, R_f 值分别与前述的次生苷 I、次生

苷 II 和皂苷 A 完全一致。按前述皂苷 A 部分水解产物的分离方法将水解产物进行分离纯化, 分别得次生苷 B₁ 31 mg、B₂ 68 mg、B₃ 28 mg, 将其分别做红外光谱, B₁ 与次生苷 I 完全重叠, B₂ 与次生苷 II 完全重叠, 而 B₃ 与皂苷 A 完全重叠。

皂苷 C: 白色粉末状结晶(MeOH-aceton), mp 229 °C~233 °C(分解), $[\alpha]_D^{25} - 70.42$ (c, 0.738 4, MeOH), 元素分析 $\text{C}_{51}\text{H}_{82}\text{O}_{22} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 计算值(%): C 56.56, H 7.95; 实验值(%): C 56.48, H 8.13。IR $\text{KBr } \nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3 404(br. 缩合羟基), 2 935, 2 902, 2 848 ($\text{CH}_3 \cdot \text{CH}_2$), 1 614(苷元双键), 1 454, 1 379, 1 055(多羟基), 894, 939, 813。FAB-MS: m/z 1 047 (MH^+ , 25%), 885 ($\text{MH}^+ - \text{glc}$, 4%), 723 ($\text{MH}^+ - \text{glc} - \text{rha}$, 2%), 577 ($\text{MH}^+ - 2\text{glc} - \text{rha}$, 15%), 559 ($\text{MH}^+ - 2\text{glc} - \text{rha} - \text{H}_2\text{O}$, 12%), 145(末端葡萄糖基, $\text{MH}^+ - \text{diosgenin} - 2\text{glc} - \text{H}_2\text{O}$, 66%)。

皂苷 C 的酸水解: 苷 C 160 mg, 用 1 mol/L 盐酸 50% 乙醇 40 mL 回流水解 3 h, 用 2 倍量冰水稀释后抽滤。沉淀干燥后用无水乙醇结晶, 得白色针状结晶 42.5 mg。按皂苷 B 的薄层检查方法与 IR 谱比较, 证明苷元为薯蓣皂苷元。水解液去醇后按皂苷 A 水解液处理方法进行处理, 并如苷 B 水解液的薄层色谱法进行检查, 检出葡萄糖与鼠李糖。

皂苷 C 的部分水解: 皂苷 C 100 mg, 用 0.5 mol/L 盐酸乙醇溶液 40 mL 回流水解 15 min, 按皂苷 B 部分水解方法进行操作。苷 C 的部份水解产物中只有 3 个次生苷, 即 C₁、C₂、C₃, 它们在硅胶 H 板上(展开剂①、②、③, 显色剂①) R_f 值分别与次生苷 I、次生苷 II 和皂苷 A 全一致(C₁ 与次生苷 I 一致; C₂ 与次生苷 II 一致; C₃ 与皂苷 A 一致)。

致谢: ^{13}C -NMR、DEPT 及 FABMS 谱由军事医学科学院仪器中心代测, IR 谱由本所仪器室代做, 一并致谢。

References:

- [1] Xu X M, Wang J, Yang H, et al. Studies on the saponin constituents in the seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. (I) - Isolation and structural elucidation for a new saponin A and its second glucosides I, II [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(8): 678-682.
- [2] Xu R S. *The Chemistry of Natural Product* (天然产物化学) [M]. Beijing: Science Press, 1997.
- [3] Breitmaier E. *Atlas of Carbon-13 NMR Data* [M]. Vol I. New York: Heyolen and Son Ltd, 1979.