

• 化学成分 •

胡芦巴中皂苷成分的研究

Ⅲ. 新皂苷 D 的分离纯化及化学结构测定

徐学民, 王 茹, 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做深入研究。方法 采用硅胶 H 柱色谱、干柱色谱等从总皂苷中分离纯化单一皂苷成分, 并应用¹³C-NMR、FAB-MS、DEPT 等光谱及部分水解获得的次生苷的方法测定其化学结构。结果 从总皂苷中分离出的一个新皂苷 D 为六分子糖与薯蓣皂苷元构成的六糖苷, 经测定皂苷 D 的结构为: 薯蓣皂苷元-3-O- α -L-鼠李吡喃糖(1 \rightarrow 3)- β -D-葡萄糖吡喃糖(1 \rightarrow 4)- 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。结论 皂苷 D 是一个新的六糖皂苷。

关键词: 胡芦巴; 皂苷 D; 薯蓣皂苷元

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)06-0805-04

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

Ⅲ. Isolation and structural elucidation for a new saponin D

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

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

Abstract: Objective To investigate the saponins from the Chinese materia medica Huluba (the seeds of *Trigonella foenum-graecum* L.). **Methods** To isolate and purify the single saponin by the column chromatography and dry column chromatography of silica gel H. The structural elucidation was carried on by spectroscopic evidence of ¹³C-NMR, FAB-MS, DEPT and the results of the fraction-hydrolysis of acquiring the secondary glucosides. **Results** The newly isolated saponin D was consisted by six molecules of sugar with diosgenin. The chemical structure of saponin D is: diosgenin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl [(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl] (1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside. **Conclusion** Saponin D is a new one consisted of six molecules of sugar with diosgenin.

Key words: Huluba (the seed of *Trigonella foenum-graecum* L.); saponin D; diosgenin

本研究 I、II 部分报道了从胡芦巴 *Trigonella foenum-graecum* L. 中分出 3 种新皂苷 A、B、C^[1,2]。从生源学的角度考虑, 搞清楚皂苷 A、B、C 及次生苷的化学结构为皂苷 D 的结构测定提供了重要的参考依据, 尤其对皂苷 D 糖部分相互连接顺序的证明将起到非常重要的作用。

皂苷 D, 白色粉末状结晶, mp 229~230 °C (分解), [α]_D²⁵ -51.21° (c, 0.5468, MeOH)。红外光谱显示有 25R-螺甾烷和缔合多羟基、甲基、次甲基、亚甲基、双键及环氧结构吸收特征。将其酸水解后所得苷元与薯蓣皂苷元比较红外光谱、熔点、TLC Rf 值

完全一致, 证明为同一物质。酸水解液经处理后在硅胶 H 板上检出 D-葡萄糖和 L-鼠李糖 (与对照品平行操作比较), 证明皂苷 D 为薯蓣皂苷元 (diosgenin) 与葡萄糖、鼠李糖组成的皂苷。FAB-MS 测得皂苷 D 的分子离子峰 m/z 为 1339 (MH⁺), 其相对分子质量为 1338。皂苷 D 的 ¹³C-NMR 谱 (见表 1, 2) 清晰显示低场 δ_c 值 100~105 有 6 条谱线, 此为 6 个糖 C₁ (成苷键) 的 δ_c 值 (105.5、105.4、104.9、101.6、100.2、104.6) 且在高场有 δ_c 值 16.5、17.5、18.7 谱线, 此为 3 个鼠李糖 C₆ (甲基) 信号, 而在 δ_c 值 61.8、62.8、62.9 出现 3 条谱线, 此为 3 个葡萄糖

表 1 皂苷 D 的苷元部分¹³C-NMR化学位移值(δ_c)

Table 1 ¹³C-NMR chemical shift of diosgenin in saponin D (δ_c)

碳位	薯蓣皂苷元	皂苷 D	碳位	薯蓣皂苷元	皂苷 D
1	37.2	37.2	15	31.8	32.5
2	31.6	31.6	16	80.7	81.6
3	71.5	78.2	17	62.1	61.7
4	42.2	40.9	18	16.3	16.4
5	140.8	140.9	19	19.4	19.5
6	121.3	121.7	20	41.6	40.8
7	32.0	32.3	21	14.5	16.5
8	31.4	30.3	22	109.1	112.8
9	50.1	50.5	23	31.4	32.6
10	36.6	37.6	24	28.8	28.3
11	20.9	21.2	25	30.3	34.4
12	39.8	39.1	26	66.7	67.4
13	40.2	40.6	27	17.1	17.3
14	56.5	56.7			

表 2 皂苷 D 的糖部分¹³C-NMR化学位移值(δ_c)

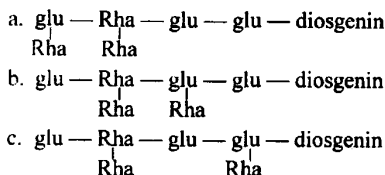
Table 2 ¹³C-NMR chemical shift of sugar fractions in saponin D (δ_c)

各糖碳位	皂苷 D	各糖碳位	皂苷 D
葡萄糖 1	105.5	葡萄糖 1	104.9
2	75.2	2	75.3
3	78.7	3	88.3
4	76.3	4	70.7
5	78.4	5	72.4
6	61.8	6	62.9
葡萄糖 1	105.4	鼠李糖 1	100.2
2	75.3	2	72.8
3	77.9	3	71.2
4	75.4	4	74.2
5	77.7	5	69.3
6	62.8	6	17.5
鼠李糖 1	101.6	鼠李糖 1	104.6
2	72.4	2	71.2
3	76.2	3	71.7
4	80.2	4	73.3
5	69.5	5	68.5
6	18.7	6	16.5

的 C₆ 信号(CH₂OH)。在 δ_c68~88 出现 24 条谱线(详见表 2),此为 6 个糖 C₂、C₃、C₄、C₅ 的碳信号,充分证明皂苷 D 为薯蓣皂苷元与 6 个六碳糖,即 3 分子葡萄糖与 3 个鼠李糖构成的皂苷(两种糖比例为 3:3)。因此,相对分子质量 1338 符合分子式 C₆₃H₁₀₂O₃₀。计算其不饱和度 Ω 为 13(分子内环及双键数),此完全符合薯蓣皂苷元与 6 个环状糖的环及双键情况(6 个糖为 6 个环为 6,薯蓣皂苷元 6 个环加 1 个双键为 7,共计 13)。皂苷 D 的 DEPT 实验证明其存在 7 个 CH₃、13 个 CH₂、39 个 CH 及 4 个季碳,此与薯蓣皂苷元和 3 分子葡萄糖、3 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。

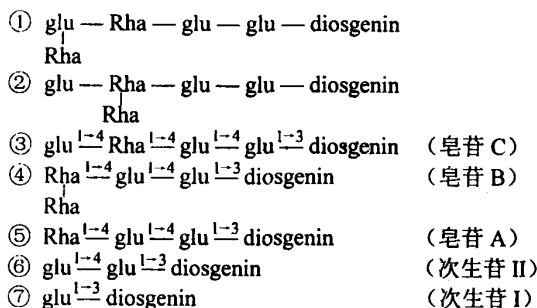
皂苷 D 的部分水解(温和条件下)共获得 7 个

次生苷。在硅胶 H 板上用前述的次生苷 I、次生苷 II、皂苷 A、B、C 与其平行点样作比较,发现 7 个次生苷中有 5 个与这 5 个化合物的 R_f 值完全一致(3 种展开剂展开),而不一一致的 2 个次生苷恰是 7 个中极性最大的(R_f 值最小的),理论上推测应为 2 个五糖苷。由此表明:皂苷 D 的结构中包含有次生苷 I、II,皂苷 A、B、C 的结构部分;其糖的连接顺序只有下列的 3 种方式才能满足含有前述 5 个已知苷结构的条件。

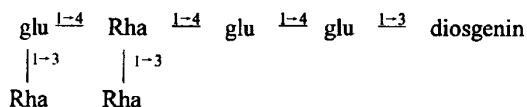


但 b、c 连接顺序的情况是不可能的,若为 b、c 方式,部分水解均会产生 10 个次生苷(3 个五糖苷、3 个四糖苷、2 个三糖苷、1 个双糖苷及 1 个单糖苷)。皂苷 D 的部分水解仅产生了 7 个次生苷,此与 a 连接方式完全相符。D 部分水解完全,得到的是如下 7 个次生苷(2 个五糖苷、2 个四糖苷、1 个三糖苷、1 个双糖苷与 1 个单糖苷)。

由上述 TLC 比较结果可知,次生苷③、④、⑤、⑥、⑦恰为已知结构,即为皂苷 C、B、A 与次生苷 II、I^[1,2]。



如此可得到皂苷 D 的连接顺序和各糖相互连接位置如下。



确定第 4 糖(D-吡喃葡萄糖)与末端鼠李糖(第 6 糖)以 1~3 位置连接是依据皂苷 D¹³C-NMR 谱中的 δ_c 88.3 碳信号,文献报道 3β-D-葡萄糖苷的 C₃ δ_c 值为 78.3^[3],当其与其他糖相连形成苷键时,会受到去屏蔽效应移向低场 6~10,因此,该碳原子上羟基与鼠李糖连接形成苷键时,其 δ_c 值 78.3 移向

88.3 以下。文献报道,3-*O*-甲基-β-*D*-吡喃葡萄糖苷的 C₃ 位 δ_c 值为 86.7,而 2-*O*-甲基-β-*D*-吡喃葡萄糖苷的 C₂ 位 δ_c 值为 85.2;4-*O*-甲基-β-*D*-吡喃葡萄糖苷的 C₄ 位 δ_c 值为 80.5。从皂苷 D 的¹³C-NMR 谱 6 个糖,36 个糖碳原子的 δ_c 值,以上述糖相互间连接位置的解释是合理的,(即只能是此种解释,没有第 2 种解释)。FAB-MS 主要裂片也给予皂苷 D 的连接顺序以一致结论^[3]。皂苷 D 的化学结构见图 1。

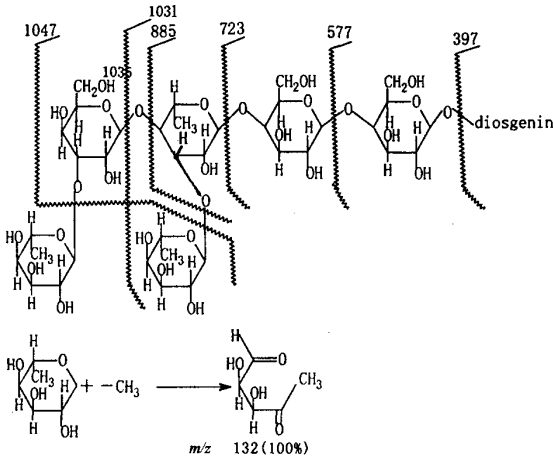


图 1 皂苷 D 的化学结构式和 FAB-MS 主要裂片
Fig. 1 Chemical structure and FAB-MS main fission product of saponin D

皂苷 D 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 δ_c 值比较^[2,3],皂苷 D 的结构为薯蓣皂苷元-3-*O*-α-*L*-鼠李吡喃糖(1→3)-β-*D*-葡萄糖吡喃糖(1→4)-α-*L*-鼠李吡喃糖[(1→3)-α-*L*-鼠李吡喃糖](1→4)-β-*D*-葡萄糖吡喃糖(1→4)-β-*D*-葡萄糖吡喃糖。

1 仪器与材料

熔点按《中华人民共和国药典》2000 版附录 VII C 要求测定;温度计已经校正。比旋度用 WZX-1 型旋光仪测定;红外光谱用日本岛津 FTIR-8300 型仪测定,快速原子轰击质谱(FAB)用 Zabsoec Tof-spec 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 °C 活化 20 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醋酸乙酯-醋酸-水(8:2:1);④氯仿-丙酮(9:1);⑤氯仿-丙酮(85:15)。显色剂:①10% H₂SO₄ 乙醇溶液,100 °C 加热 3 min 显色;②25% 磷钼酸乙醇液,100 °C 加热 5 min 显色;③碘蒸气。

糖部分的薄层色谱使用 0.5% 羟甲基纤维素硅胶 H 板(不活化)。展开剂: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 提取与分离

从原生药中提取纯化总皂苷及分离出新皂苷 A、B、C 如本研究中 I、I 实验部分^[1,2]。

将柱色谱分离皂苷 A、B、C 后的甲醇洗脱物及上述总皂苷在甲醇中滤出的不溶物合并共约 6 g,用 50 mL 80% 乙醇溶解,挥去乙醇至残留物呈糖浆状,用 15 g 硅胶(100 目)拌样,挥干溶剂研细置于装填有 400 g 硅胶 H(TLC 用)的玻璃柱(100 cm×4 cm)顶端,用氯仿-甲醇-水(25:18:4)先脱至柱底时,轻轻将柱内硅胶 H 柱床抖出,切割成 10 段,分段取少量硅胶 H 用甲醇洗脱,洗脱液点样于硅胶 H 板上,用展开剂②展开后用显色剂①检查,合并呈单一斑点的硅胶 H 节段,在 G₃ 玻沙漏斗上用 90% 甲醇洗脱,滤液回收溶剂后得到残余物 4 g。此残余物用冷甲醇 50 mL 溶解,滤过。不溶物反复用甲醇洗涤多次,直至滤出液无色为度。将不溶物溶解于 30 mL 70% 甲醇中,G₃ 玻沙漏斗滤过,滤液中冲入 50 mL 丙酮,摇匀,析出白色粉末状沉淀,抽滤。滤出物减压干燥(60 °C),得皂苷 D 2.1 g,为一白色结晶粉末。

3 结构测定

皂苷 D:白色结晶性粉末,mp 229~230 °C(分解)。 $[\alpha]_D^{25} - 51.21^\circ(c, 0.5468, MeOH)$ 。元素分析 C₆₃H₁₀₂O₃₀·6H₂O,计算值(%):C 52.28, H 7.88;实验值(%):C 52.04, H 7.59。IR $\nu_{max}^{KBr}(cm^{-1})$:3 400 (br. 缔合羟基),2 902(CH₃、CH₂),1 643(苷元双键),1 454,1 379,1 319,1 259,1 043(s)(环氧结构),894,812。FAB-MS m/z :1 339(MH⁺, 4%),1 047(6%,MH⁺-2×葡萄糖),1 031(2%,MH⁺-鼠李糖-葡萄糖),885(17%,MH⁺-2×鼠李糖-葡萄糖),723(15%,MH⁺-3×鼠李糖-葡萄糖),577(68%,MH⁺-2×葡萄糖-3×鼠李糖),559(55%,577-H₂O),397(42%,MH⁺-3×鼠李糖-3×葡萄糖,薯蓣皂苷元),132(100%,端基鼠李糖-Me,147-15)详见前述裂解图 1。

皂苷 D 的酸水解:取皂苷 D 25 mg 溶于 40 mL 1 mol/L HCl 溶液中,置沸水浴上回流水解 8 h,取出放冷后抽滤,沉淀用蒸馏水洗涤至滤液呈中性,60

℃减压干燥后用无水乙醇重结晶,得白色针状结晶 5 mg。将此针晶与薯蓣皂苷元对照品进行 TLC 分析,Rf 值完全一致。将此再同做 IR 谱,图谱完全重叠,证明皂苷元为薯蓣皂苷元。

将上述酸水解液用 1 mol/L NaOH 液中和,浓缩后进行 TLC 分析,用展开剂⑥展开,显色剂⑤显色,*D*-葡萄糖与 *L*-鼠李糖作对照品,从水解液中检出葡萄糖与鼠李糖。

皂苷 D 的部分水解:取约 150 mg 皂苷 D 于 10 mL 试管中,加 3 mL 1 mol/L HCl 溶液溶解。置此试管于沸水浴中加热 20 min,冷却。滤出沉淀,用 1 mL 甲醇溶解,与皂苷 A、B、C 和次生苷 I、II 同做硅胶 H、TLC 分析,用展开剂②展开,显色剂①显色。水解物呈现 7 个斑点,其中极性小的 5 个斑点的 Rf 值均与皂苷 A、B、C 和次生苷 I、II 完全一致,另换两种展开剂①、③展开,作相同对照操作,仍得到完全相同结果。取硅胶 H 制备色谱板(20 cm×10 cm×0.1 cm)一块,用微量注射器吸取上述沉淀溶解的甲醇液 500 μL,成条状(2 cm)点样于板底部,挥去溶剂后于层析缸中用展开剂②展开。展开完全后取出,挥干溶剂再展开 1 次,取出晾干,置碘缸中

碘蒸气显色 3~5 min,取出立即用铅等划出极性小的 5 条色带的边界。挥去碘用刮刀刮下各色带的吸附剂,分别置于 G₃ 玻沙漏斗中用 5 mL 甲醇洗脱,抽滤。滤液置 10 mL 蒸发皿内蒸干溶剂,刮下各残留物以 KBr 压片分别做 IR 光谱。所得的 IR 谱分别与次生苷 I、II,皂苷 A、B、C 的 IR 谱完全重合。此确定了皂苷 D 部分水解所得的 7 个次生苷中有 5 个分别为次生苷 I、II,皂苷 A、B、C。

致谢:¹³C-NMR、DEPT 及 FAB-MS 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。

References:

- [1] Xu X M, Wang J, Yang H, et al. Studies on the saponin constituents from the seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. (I) — Isolation and structural elucidation for a new saponin A and its secondary glucosides I, II [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(8): 678-682.
- [2] Xu X M, Wang J, Yang H, et al. Studies on the saponin constituents from the seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. (I) — Isolation and structural elucidation for two new saponins B and C [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(2): 127-130.
- [3] Breitmaier E, Haas G, Voeleer W, et al. *Atlas of Carbon-13NMR Data* [M]. Vol 1. Philadelphia: Heyolen and Son Ltd, 1979.

Two compounds from *Drymaria diandra*

YANG Xue-qiong, LI Mei-hong, YANG Ya-bin, DING Zhong-tao

(Department of Chemistry, Center for Advanced Studies of Medicinal and Organic Chemistry, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: **Objective** To investigate the chemical constituents from *Drymaria diandra*. **Methods** Compounds were separated and purified by repeated column chromatographies on macroporous resin D-101, silica gel, and RP-18. Two compounds were identified by spectral analysis. **Results** Two compounds were isolated from *D. diandra*. Their structures were identified as 6-carboxymethyl-5, 7, 4'-trihydroxyflavone (I) and 1-O-β-D-glucopyranosyl-(2S, 3R, 4E, 8E)-Z-N-(2'-hydroxypalmitoyl) octadecaphinga-4, 8-dienine (soya cerebroside I, II). **Conclusion** Compound I is a new compound. Compound II is obtained from this plant for the first time.

Key words: *Drymaria diandra* Blume; Caryophyllaceae; flavone

二蕊荷莲豆中的两个化合物

杨雪琼,李美红,杨亚滨,丁中涛*

(云南大学 化学系生物制药创新人才培养基地,云南 昆明 650091)

收稿日期:2004-09-10

基金项目:国家自然科学基金(30260014);云南省中青年学术和技术带头人后备人才培养基金资助(YP0024)

作者简介:杨雪琼,女,助教,主要从事天然产物化学方面的研究。

* 通讯作者 丁中涛 Tel:(0871)5033726 E-mail:ztding@ynu.edu.cn