

## 海藻 MGMG 型甘油糖脂的研究

王梦雪, 蒋盈, 詹娜, 何美佳, 刘红兵\*

中国海洋大学医药学院, 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋药物与生物制品功能实验室, 山东 青岛 266003

**摘要:** 目的 鉴定中药海藻(羊栖菜 *Sargassum fusiforme*) 中的单半乳糖基单酰基甘油酯(monogalactosylmonoacylglycerol, MGMG), 分析 *sn*-1 型和 *sn*-2 型位置异构体的化学特征。方法 利用多种色谱手段分离得到 MGMG, 采用 NMR、HR-ESI-MS 等谱学方法鉴定结构, 采用 HPLC、HPLC-ESI-MS/MS 分析位置异构体的互变及其色谱-质谱特征。结果 分离到并鉴定 5 个 MGMG, 酰基分别为十八碳四烯酰基、十八碳三烯酰基、二十碳四烯酰基、十八碳二烯酰基和十八碳单烯酰基; *sn*-1 型和 *sn*-2 型 MGMG 单体均不稳定, 会相互迅速转变直至 *sn*-1 型为主(相对峰面积 85:15)的平衡状态。*sn*-2 型在反相色谱柱上的保留时间较 *sn*-1 型小, 先被洗脱; 两者二级质谱碎片离子丰度有较大差异, 以  $[M+Na-Gal]^+$  为基峰(100%), *sn*-2 型的  $[M+Na-RCOOH]^+$  丰度 >50%, *sn*-1 型的  $[M+Na-RCOOH]^+$  丰度 <20%。结论 首次从褐藻门中分离鉴定上述 5 个 MGMG, 阐明了 *sn*-1 型和 *sn*-2 型 MGMG 之间的互变过程, 首次报道这 2 种位置异构体的色谱-质谱特征, 可用于 MGMG 类化合物酰基取代位置的鉴定。

**关键词:** 海藻; 羊栖菜; 单半乳糖基单酰基甘油酯; 甘油糖脂; 结构鉴定; 位置异构

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)21-4398-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.21.006

## Study on monogalactosylmonoacylglycerol in marine algae (*Sargassum fusiforme*)

WANG Meng-xue, JIANG Ying, ZHAN Na, HE Mei-jia, LIU Hong-bing

Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts of Qingdao, National Laboratory for Marine Science and Technology, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

**Abstract: Objective** To identify monogalactosylmonoacylglycerol (MGMG) and analyze the chemical characteristics of *sn*-1 and *sn*-2 type isomers in Marine TCM *Sargassum fusiforme*. **Methods** The MGMG compounds were isolated by multiple chromatography methods and their structures were determined by spectroscopic methods such as NMR and HRESI-MS. The interconversion and chromatography-mass spectrometry feature of MGMG positional isomers were analyzed through HPLC and HPLC-ESI-MS/MS. **Results** Five MGMGs were isolated from *Sargassum fusiforme*, and the fatty acyl compositions were stearidonoyl, linolenoyl, arachidoyl, linoleyl, and oleyl. The *sn*-1 and *sn*-2 type of MGMG were unstable. The interconversion tended to be *sn*-1 type rapidly, and kept balanced content at 85:15. The relative retention time of *sn*-2 type was less than *sn*-1 type on  $C_{18}$  reverse phase chromatography. The abundant fragment ions of MS/MS were significantly differences. The base peak was  $[M+Na-Gal]^+$  (100%), and the peak intensity of  $[M+Na-RCOOH]^+$  was always more than 50% from *sn*-2 type while less than 20% from *sn*-1 type. **Conclusion** Five MGMGs were isolated from brown algae for the first time. This was the first report about the interconversion and chromatography-mass spectrometry feature of *sn*-1 and *sn*-2 type. It can use to determine the fatty acyl attachment in each MGMG.

**Key words:** marine algae; *Sargassum fusiforme* (Harvey.) Setchell; monogalactosylmonoacylglycerol (MGMG); glyceroglycolipid; structure identification; positional isomers

单半乳糖基单酰基甘油酯(monogalactosyl monoacylglycerol, MGMG)是甘油糖脂(glyceroglycolipid)的一种,具有抗菌<sup>[1]</sup>、抗肿瘤<sup>[2]</sup>、抗炎<sup>[3]</sup>、抗血小板凝集<sup>[4]</sup>、抑制脂质蓄积<sup>[5]</sup>等作用。

根据酰基在甘油骨架上的取代位置, MGMG 有 *sn*-1 型和 *sn*-2 型 2 种位置异构体(图 1)。已有研究表明, 已知天然 MGMGs 基本为 *sn*-1 型<sup>[1-9]</sup>, 仅 Al-Fadhli 等<sup>[10]</sup>和 Luyen 等<sup>[5]</sup>分离到 *sn*-2 型。目前, 尚未见有

收稿日期: 2017-05-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31271845); 青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02)

作者简介: 王梦雪(1992—), 女, 在读硕士, 研究方向为海洋中药。E-mail: mengxuew92@163.com

\*通信作者 刘红兵(1971—), 女, 教授。Tel: (0532)82031823 E-mail: liuhongb@ouc.edu.cn

*sn*-1 型和 *sn*-2 型单体化合物稳定性、色谱-质谱特征的研究。

羊栖菜 *Sargassum fusiforme* (Harvey.) Setchell 是中药海藻的传统正品基原植物, 富含甘油糖脂类成分, 但未见对 MGMG 的化学和生物活性研究的报道。本研究从羊栖菜中分离鉴定 MGMG, 弄清 *sn*-1/*sn*-2 型位置异构体的转变过程, 比较两者色谱-二级质谱特征, 为阐明海藻化学成分提供科学依据。

## 1 仪器与材料

Agilent-DD2-500 型核磁共振仪 (美国 Agilent 公司, TMS 为内标); Agilent 1290 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), LTQ Orbitrap XL 型高分辨质谱仪 (美国 Thermo Fisher 公司); LC-6AD 高效液相色谱仪 (日本岛津公司, 配 SCL-10AV 系统控制器, SPD-M20AVP 检测器, YMC C<sub>18</sub> 柱: 250 mm×10 mm, 5 μm); Agilent 1100 高效液相色谱仪 [美国 Agilent 公司, YMC C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)]。Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司); 硅胶 H (10~40 μm, 青岛海洋化工厂)。液相用甲醇为美国 Honeywell 公司色谱纯; 实验用水为超纯水; 其他常用有机溶剂均为国产分析纯。

海藻采于浙江温州洞头县, 经中国海洋大学医药学院刘红兵教授鉴定为马尾藻科植物羊栖菜 *Sargassum fusiforme* (Harvey.) Setchell 的干燥藻体。标本 (YXC201409) 存放于中国海洋大学医药学院海洋中药研究室。

## 2 方法

### 2.1 提取与分离

取海藻干燥藻体, 用 75%乙醇提取, 得乙醇浸膏。将该浸膏在水和醋酸乙酯中分配, 得醋酸乙酯提取物。从醋酸乙酯提取物中, 经反复正相硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱, 得 TLC 检查为单一斑点 (3 种展开体系) 的 MGMG 型甘油糖脂混合物 SFMM; SFMM 经半制备 HPLC 分离, 甲醇-水 (84:16) 洗脱, 体积流量 4.0 mL/min, 检测波长 210 nm, 得化合物 **1** ( $t_R=9.4$  min)、**2** ( $t_R=10.3$  min)、**3** ( $t_R=11.8$  min)、**4** ( $t_R=13.1$  min)、**5** ( $t_R=16.9$  min)、**6** ( $t_R=17.5$  min) 和 **7** ( $t_R=25.1$  min)。化合物 **1**~**7** 结构见图 1。

### 2.2 HPLC-ESI-MS/MS 条件

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱为 YMC-Pack ODS-A C<sub>18</sub> 分析柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 流动相甲醇-水 (84:16), 体积流量 1.0 mL/min,

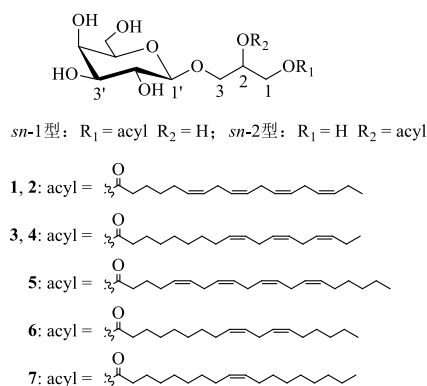


图 1 7 个 MGMGs (1~7) 的结构式

Fig. 1 Structures of seven MGMGs (1—7)

进样量 10 μL, 检测波长 210 nm。

**2.2.2 质谱条件** 电喷雾离子源, 正离子检测模式, 喷雾电压 3.70 kV, 鞘气体积流量 40 psi (1 psi = 6.895 kPa), 毛细管温度 325.00 °C, 二级质谱采用高能诱导裂解模式 (HCD)。

## 3 结果与分析

### 3.1 化合物的结构鉴定

化合物 **1**: 白色固体。HR-ESI-MS 数据见表 1, 结合核磁数据, 确定分子式为 C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>9</sub>。<sup>1</sup>H- 和 <sup>13</sup>C-NMR 谱显示典型的 MGMG 特征信号峰, 但均包含 2 组数据 (表 2), 提示可能是 *sn*-1 型和 *sn*-2 型 MGMG 混合物。经与文献报道比对<sup>[11]</sup>, 结合质谱数据, 鉴定 **1** 为 1-*O*-十八碳四烯酰基-3-*O*-β-*D*-吡喃半乳糖基甘油 (*sn*-1 型) 和 2-*O*-十八碳四烯酰基-3-*O*-β-*D*-吡喃半乳糖基甘油 (*sn*-2 型) 的混合物。

化合物 **2**: 白色固体。HR-ESI-MS 数据见表 1, 确定分子式为 C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>9</sub>, 酰基组成为十八碳四烯酰基 (18:4), 与 **1** 相同。怀疑单体不稳定, 故在 HPLC 制备后立即测试 NMR 谱。经与 **1** 比较, 鉴定 **2** 是与 **1** 组成相同的混合物, 主要含有 1-*O*-十八碳四烯酰基-3-*O*-β-*D*-吡喃半乳糖基甘油 (*sn*-1 型)。

同上, 鉴定 **3**~**7** 是单半乳糖基单酰基甘油酯, 酰基组成分别为十八碳三烯酰基 (**3** 和 **4** 相同)、二十碳四烯酰基 (**5**)、十八碳二烯酰基 (**6**) 和十八碳单烯酰基 (**7**), 均为 *sn*-1 型和 *sn*-2 型的混合物。以往报道的 MGMG 通常为 *sn*-1 型或 *sn*-2 型单体<sup>[1-10]</sup>, 实际上是混合物。本实验首次以天然 MGMG 为混合物的形式报道。

### 3.2 MGMG 2 种位置异构体 *sn*-1 型与 *sn*-2 型的互变反应

以上结果提示, 在分到 MGMG 单体以后 (例

表 1 化合物 1~7 的 HR-ESI-MS 数据  
Table 1 HR-ESI-MS data of compounds 1—7

MGMG	[M+Na] <sup>+</sup> (m/z)		[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> (m/z)		相对分子质量	酰基组成
	实测值	计算值	实测值	计算值		
1	535.288 0	535.287 8	530.332 9	530.332 4	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>9</sub>	18 : 4
2	535.287 7	535.287 8	530.333 3	530.332 4	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>9</sub>	18 : 4
3	537.303 6	537.303 4	532.349 0	532.348 0	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>9</sub>	18 : 3
4	537.303 1	537.303 4	532.348 4	532.348 0	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>9</sub>	18 : 3
5	563.319 6	563.319 1	558.364 4	558.363 7	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O <sub>9</sub>	20 : 4
6	539.318 7	539.319 1	534.364 5	534.363 7	C <sub>27</sub> H <sub>48</sub> O <sub>9</sub>	18 : 2
7	541.333 8	541.334 7	536.379 8	536.379 3	C <sub>27</sub> H <sub>50</sub> O <sub>9</sub>	18 : 1

表 2 化合物 1 的 <sup>1</sup>H-NMR 和 <sup>13</sup>C-NMR 数据 (500/125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  
Table 2 <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectral data of compound 1 (500/125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

碳位	δ <sub>C</sub>		δ <sub>H</sub>	
	sn-1 型	sn-2 型	sn-1 型	sn-2 型
1	66.6 (t)	61.7 (t)	4.16 (2H, brd, J = 2.0 Hz)	3.74 (1H, m), 3.99 (1H, m)
2	69.6 (d)	74.7 (d)	3.99 (1H, m)	5.05 (1H, m)
3	71.9 (t)	68.8 (t)	3.66 (1H, dd, J = 10.8, 4.5 Hz) 3.91 (1H, dd, J = 10.8, 5.3 Hz)	3.91 (1H, dd, J = 10.8, 5.3 Hz) 3.74 (1H, m)
1'	105.3 (d)	105.3 (d)	4.23 (1H, d, J = 7.2 Hz)	4.23 (1H, d, J = 7.2 Hz)
2'	72.5 (d)	72.4 (d)	3.51 (1H, m)	3.51 (1H, m)
3'	74.9 (d)	74.8 (d)	3.51 (1H, m)	3.51 (1H, m)
4'	70.3 (d)	70.3 (d)	3.83 (1H, brs)	3.83 (1H, brs)
5'	76.8 (d)	76.8 (d)	3.51 (1H, m)	3.51 (1H, m)
6'	62.5 (t)	62.5 (t)	3.74 (2H, m)	3.74 (2H, m)

如 1 和 2、3 和 4), 酰基可能会在 C-1 位与 C-2 位迅速转移, 最终生成 sn-1 型与 sn-2 型混合物。从理论上讲, 这种互变过程是可能的 (图 2), 由于 sn-1 型 MGMG 更稳定, 因此最终更偏向于生成该结构。为证实推测, 取 30 mg SFMM 再次拆分, 收集 t<sub>R</sub> = 9.4 min (1) 和 t<sub>R</sub> = 10.3 min (2) 洗脱液, 低温减压浓缩后于 4 °C 避光放置, 分别在 1 d、1 周、2 周、4 周和 6 周后进行 HPLC-DAD 分析。结果表明 (图 3), 确实存在 MGMG 2 种位置异构体 sn-1/sn-2 型的互变迅速转变现象, 1 周后可达平衡至两者相对峰面积为

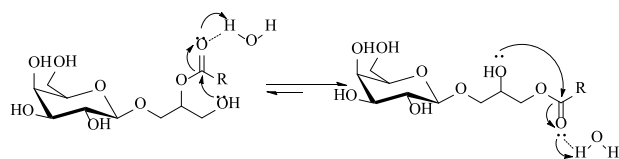


图 2 sn-1/sn-2 型 MGMG 互变的电子转移示意图

Fig. 2 Electron transfer mechanism between sn-1 and sn-2 MGMG isomers

85 : 15。检查制备 2 周后的 3~7, sn-1/sn-2 型相对峰面积均约为 85 : 15, 与上述结果一致 (表 3)。

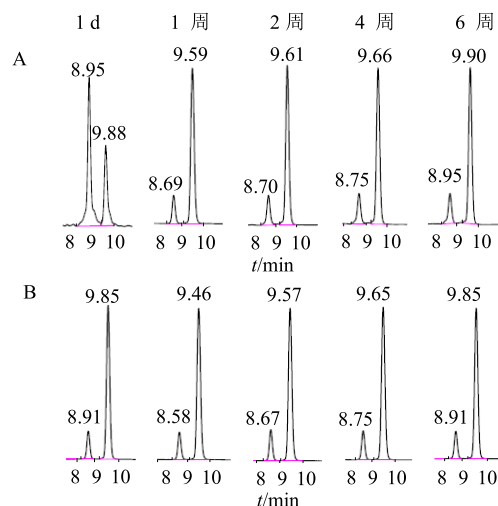


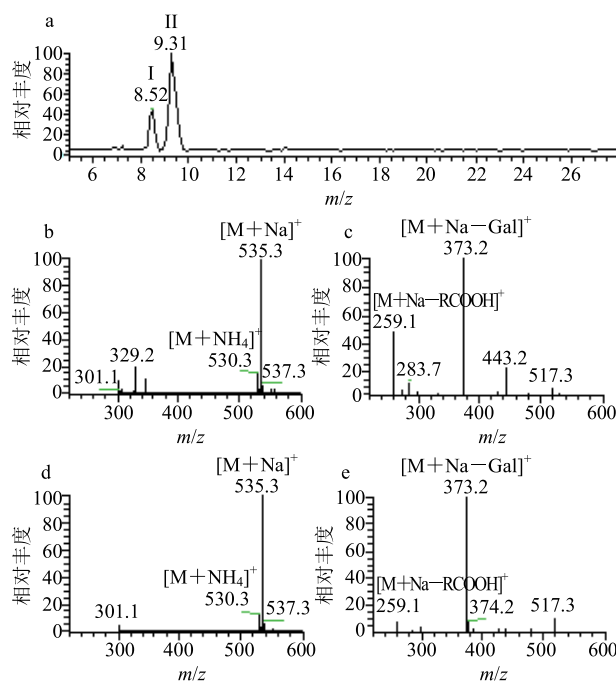
图 3 放置不同时间后的化合物 1 (A) 和 2 (B) 的 HPLC 图  
Fig. 3 HPLC analysis of 1 (A) and 2 (B) at different time

表 3 化合物 1~7 的 HPLC-ESI-MS/MS 数据  
Table 3 HPLC-ESI-MS/MS analysis of compounds 1—7

编号	峰号	HPLC		MS	MS/MS			MGMG 类型
		$t_R$ /min	相对峰面积/%	( $[M+Na]^+$ )	$[M+Na-Gal]^+$	$[M+Na-RCOOH]^+$	丰度比	
1	I	8.4	15.4	535	373	259	100 : 50	<i>sn-2</i>
	II	9.2	84.6	535	373	259	100 : 9	<i>sn-1</i>
2	I	8.4	15.3	535	373	259	100 : 53	<i>sn-2</i>
	II	9.2	84.7	535	373	259	100 : 10	<i>sn-1</i>
3	I	10.7	15.6	537	375	259	100 : 63	<i>sn-2</i>
	II	11.9	84.4	537	375	259	100 : 12	<i>sn-1</i>
4	I	10.7	14.7	537	375	259	100 : 57	<i>sn-2</i>
	II	11.9	85.3	537	375	259	100 : 13	<i>sn-1</i>
5	I	14.1	14.3	563	401	259	100 : 53	<i>sn-2</i>
	II	15.7	85.7	563	401	259	100 : 11	<i>sn-1</i>
6	I	14.3	15.7	539	377	259	100 : 83	<i>sn-2</i>
	II	16.1	84.3	539	377	259	100 : 13	<i>sn-1</i>
7	I	20.7	14.4	541	379	259	100 : 99	<i>sn-2</i>
	II	23.5	85.6	541	379	259	100 : 17	<i>sn-1</i>

3.3 MGMG 2 种位置异构体 *sn-1* 与 *sn-2* 型的二级质谱特征

利用 HPLC-ESI-MS/MS 分析存放 2 周后的 1~7。以 1 为例，BPC 图给出 2 个峰（图 4-a），两者



a-BPC 图 b、c-峰 I d、e-峰 II  
a-BPC chromatogram b and c-peak I d and e-peak II

图 4 化合物 1 的 HPLC-ESI-MS/MS 图谱

Fig. 4 HPLC-ESI-MS/MS spectrum of compound 1

一级质谱均给出准分子离子  $[M+Na]^+$  峰  $m/z$  535 (图 4-b、d)；二级质谱 HCD 模式下， $[M+Na]^+$  峰发生裂解，分别丢失糖基或是酰基，生成 2 个碎片离子  $[M+Na-Gal]^+$  和  $[M+Na-RCOOH]^+$ 。 $[M+Na-Gal]^+$  的丰度均为 100%，但  $[M+Na-RCOOH]^+$  的丰度在 *sn-2* 型（峰 I）与 *sn-1* 型（峰 II）中不同，前者是 50%（图 4-c），后者是 9%（图 4-e）。2~7 给出基本相同的二级质谱特征（表 3），即  $[M+Na-Gal]^+$  为基峰（100%），*sn-2* 型的  $[M+Na-RCOOH]^+$  丰度 > 50%，*sn-1* 型的  $[M+Na-RCOOH]^+$  丰度 < 20%。

4 讨论

本实验首次从中药海藻（羊栖菜）中分到并鉴定 5 个 MGMG，酰基组成分别为十八碳四烯酰基、十八碳三烯酰基、二十碳四烯酰基、十八碳二烯酰基和十八碳单烯酰基。以上 MGMG 均以 *sn-1* 型和 *sn-2* 型的混合物形式存在，这是由于这 2 种位置异构体在溶液状态下会发生电子转移，相互迅即转变直至 *sn-1* 型为主（相对峰面积 85 : 15）的平衡状态。RP-HPLC-MS/MS 分析得到 *sn-1* 型和 *sn-2* 型 MGMG 的色谱-质谱特征，即：*sn-2* 型 MGMG 在反相色谱柱上的保留时间较 *sn-1* 型小，先被洗脱；两者二级质谱碎片离子丰度有较大差异，以  $[M+Na-Gal]^+$  为基峰（100%），*sn-2* 型的  $[M+Na-RCOOH]^+$  丰度 > 50%，*sn-1* 型的  $[M+Na-RCOOH]^+$  丰度 < 20%。

RCOOH]<sup>+</sup> 丰度 < 20%, 可用于 MGMG 类化合物酰基取代位置的鉴定。

#### 参考文献

- [1] 彭 燕, 黄日明, 郑建仙, 等. 中华疣海星的化学成分及其抗菌活性研究 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 1913-1915.
- [2] Pettit G R, Bond T J, Herald D L, *et al.* Isolation and structure of spongilipid from the republic of Singapore marine *Porifera Spongia cf. Hispida* [J]. *Canadian J Chem*, 1997, 75(6): 920-925.
- [3] Cateni F, Falsone G, Zilic J, *et al.* Glyceroglycolipids from *Euphorbia nicaeensis* All. with antiinflammatory activity [J]. *Arkivoc*, 2004, 37(3): 54-65.
- [4] Rho M C, Matsunaga K, Yasuda K, *et al.* A novel monogalactosylacylglycerol with inhibitory effect on platelet aggregation from the cyanophyceae *Oscillatoria rosea* [J]. *J Nat Prod*, 1996, 59(3): 308-309.
- [5] Luyen B T T, Thao N P, Tai B H, *et al.* Chemical constituents of *Triticum aestivum* and their effects on adipogenic differentiation of 3T3-L1 preadipocytes [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(6): 1011-1018.
- [6] 彭 燕, 刘永宏. 黄海海燕的化学成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(24): 1883-1885.
- [7] Fang Z, Yang J S, Ah J H, *et al.* Capsosulvesins A-C, cholinesterase inhibitors from *Capsosiphon fulvescens* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2012, 60(11): 1351-1358.
- [8] Hiraga Y, Shikano T, Widiyanti T, *et al.* Three new glycolipids with cytolytic activity from cultured marine dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* [J]. *Nat Prod Res*, 2008, 22(8): 649-657.
- [9] 王广树, 王凌燕, 杨晓虹, 等. 石蒜科植物朱顶红中非生物碱类成分的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2006, 43(18): 1374-1375.
- [10] Al-Fadhli A, Wahidulla S, D'Souza L. Glycolipids from the red alga *Chondria armata* (Kütz.) Okamura [J]. *Glycobiology*, 2006, 16(10): 902-915.
- [11] Murakami N, Morimoto T, Imamura H, *et al.* Enzymatic transformation of glyceroglycolipids into *sn*-1 and *sn*-2 lysoglyceroglycolipids by use of *Rhizopus arrhizus* Lipase [J]. *Tetrahedron*, 1994, 50(7): 1993-2002.