

转基因西洋参冠瘿组织培养基中人参皂苷类成分的分离鉴定

张爱丰¹, 朱建华², 于荣敏²

(暨南大学 1. 药学院实验技术中心; 2. 中药学系, 广东 广州 510632)

[摘要] 西洋参冠瘿组织是本研究组利用植物转基因技术将根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)中Ti质粒上的一段DNA(Transferred DNA, T-DNA)插入西洋参植物细胞核基因组而得到的转基因植物组织。本试验在前期工作的基础上,从西洋参冠瘿组织培养基中分离得到5个化合物。经波谱解析,将其鉴定为:20-(R)拟人参皂苷PF₁₁、人参皂苷Re、人参皂苷Rb₁、人参皂苷Rb₃和胡萝卜苷。上述化合物均为首次从转基因西洋参冠瘿组织培养基中分离得到。

[关键词] 转基因; 西洋参; 冠瘿组织; 培养基; 人参皂苷; 结构鉴定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2008)03-0286-04

Isolation and structural elucidation of ginsenosides from the medium of transgenic crown gall of *Panax quinquefolium*

ZHANG Ai-feng¹, ZHU Jian-hua², YU Rong-min²

(1. Experimental Pharmacy Center;

2. Department of Chinese Materia Medica, Jinan University; Guangzhou 510632, China)

[Abstract] The crown galls were induced by the direct infection of sterile stems of *P. quinquefolium* L. with *Agrobacterium tumefaciens* C58. Based on our previous work, five ginsenosides were obtained from the medium of transgenic crown gall cultures of *Panax quinquefolium*. Their structures were elucidated as pseudoginsenoside FII (I), ginsenoside Re (II), ginsenoside Rb₁ (III), ginsenoside Rb₃ (IV) and β -daucosterol (V) with assistance of the spectra datas of ¹H-NMR, ¹³C-NMR and MS. All five compounds were firstly isolated from the medium of transgenic crown gall cultures of *Panax quinquefolium*.

[Key words] transgenic tissue; *Panax quinquefolium* L.; crown gall; medium; ginsenosides; structural elucidation

西洋参(*Panax quinquefolium*)是五加科(araliaceae)人参属植物,属名贵药材。其主要活性成分是人参皂苷类化合物^[1]。由于西洋参生长期较长,且易受病虫害、气候、环境及栽培技术等多种不利因

[收稿日期] 2007-12-12

[基金项目] 国家教育部科技计划重点项目(104180);广东省自然科学基金项目(31891);广东省中医药局科研项目(103041)

[作者简介] 张爱丰(1978-)女,硕士,助理实验师;研究方向:中药及天然药物分析研究。通讯作者:于荣敏教授;Tel: 020-85220386; E-mail: tyrm@jnu.edu.cn

素的影响,故产品紧俏且价格昂贵. 本课题组利用植物转基因技术将根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 中 Ti 质粒上的一段 DNA (transferred DNA, T-DNA) 插入西洋参植物细胞核基因组而得到其表现型——冠瘿组织 (crown gall). 冠瘿组织具有生长迅速、无需加入外源激素、次生代谢物含量高、遗传性状稳定等特点. 本课题组在对转基因西洋参冠瘿组织化学成分进行系统研究的同时对其培养基中的化学成分也进行了研究. 本文报道从转基因西洋参冠瘿组织培养基中分离得到 5 个单体化合物,利用理化性质及谱学方法分别将其鉴定为 20-(R) 拟人参皂苷 PF₁₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rb₃ 和胡萝卜苷.

1 仪器与材料

熔点用 SGW X-4 型显微熔点仪测定 (温度计未校正). ESI-MS 用 Bruker esquire 2000 mass spectrometer 测定; NMR 用 Bruker AV2400 (400 MHz for ¹H, 100 MHz for ¹³C) NMR spectrometer 测定 (TMS 为内标); 柱层析硅胶系青岛化工厂产品, TLC 用青岛化工厂生产的硅胶 H 预制薄板和 Merck HP RP-8F254 预制薄板, 大孔树脂 D101 从安徽三星大孔树脂有限公司购买, 其余有机溶剂均为天津化工厂的分析纯试剂.

展开剂或洗脱剂: A: V(氯仿): V(甲醇): V(水) = 6.5:3.5:0.9 (下相); B: V(正丁醇): V(乙酸乙酯): V(水) = 1:1:2 (上相); C: V(正丁醇): V(乙酸乙酯): V(水) = 4:1:5 (上相).

液体培养基为培养了 20 d 的转基因西洋参冠瘿组织过滤所得. 培养条件为 MS 液体培养基, 25 °C 暗培养.

2 提取与分离

将悬浮培养了 20 d 的西洋参冠瘿组织滤过, 得到液体培养基. 将培养基通过预先处理好的 D101 大孔树脂柱, 用水洗脱以除去培养基中的糖及无机盐类物质, 然后再用体积分数为 95% 的乙醇洗脱, 回收乙醇得深黄色浸膏. 将此浸膏悬浮于水中, 先用乙酸乙酯萃取, 再用水饱和的正丁醇萃取. 回收乙酸乙酯萃取液和正丁醇萃取液, 分别得到浸膏 G₁ (0.95 g) 和浸膏 G₂ (1.5 g).

将浸膏 G₂ 上硅胶柱层析 (200 ~ 300 目), 用流

动相 C 洗脱, 通过薄层点板, 合并相同流分, 得 3 个组分 P₁、P₂ 和 P₃. 组分 P₂ 上硅胶柱层析, 用流动相 B 洗脱, 得化合物 I 和 II. 组分 P₃ 上硅胶柱层析用流动相 C 洗脱, 得化合物 III 和 IV.

将浸膏 G₁ 上硅胶柱层析 (200 ~ 300 目), 用流动相 A 洗脱, TLC 点板追踪, 合并相同的流分, 得组分 P₄、P₅ 和 P₆. 其中组分 P₅ 经甲醇重结晶后得化合物 V.

3 结构鉴定

3.1 化合物 I

化合物 I 为无色针状结晶, m. p. 为 203 ~ 205 °C.

¹H-NMR (400 MHz, pyridine-d₅) δ: 0.89、0.91、1.15、1.23、1.26、1.29、1.44、2.09 共 8 个甲基的信号. 86.48, 85.24 (1H, d, J = 6.8 Hz) 分别为鼠李糖和葡萄糖端基质子的化学位移.

¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-d₅) 中 C-24 位的化学位移较低 (δ 85.5), 根据 Tanaka 等^[2] 总结的阿克提罗型三萜 C-24 位差向异构体化学位移差别经验规律: 即 C-24 位化学位移在较高场 (δ 85 左右) 为 R 构型, 在较低场 (δ 88 左右) 为 S 构型. 因此, C-24 为 R 构型. 以上数据及碳谱 (见表 1) 与文献 [3] 对照, 鉴定化合物 I 为 20-(R) 拟人参皂苷 PF₁₁. 见图 1.

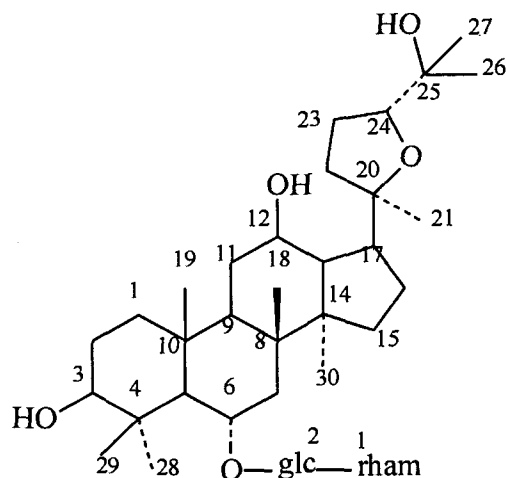


图 1 20-(R) 拟人参皂苷 PF₁₁ 结构图

3.2 化合物 II

化合物 II 为白色粉末, m. p. 为 207 ~ 210 °C.

ESI-MS *m/z*: 969 [M + Na]⁺ 峰和 945 [M - H]⁻ 峰可知其相对分子质量为 946.637. [M - 46 -

162 - H]⁻ 为失去一分子鼠李糖和一分子葡萄糖的碎片峰, 475 [M - 146 - 162 - 162 - H]⁻ 为失去一分子鼠李糖和两分子葡萄糖的碎片峰。

¹H-NMR (400 MHz, pyridine-d₅) δ: 0.94、0.96、1.17、1.43、1.59、1.59、1.60、2.05 为原人参醇 8 个甲基的化学位移。5.14 (1H, d, J = 8.0 Hz), 5.25 (1H, d, J = 8.0 Hz), 6.46 (1H, d, J = 1.6 Hz, 6-rha 1-H) 提示有两分子葡萄糖和一分子鼠李糖。

以上数据及碳谱(见表 1)与文献[4]对照基本一致。因此, 将化合物 II 鉴定为人参皂苷 Re。见图 2。

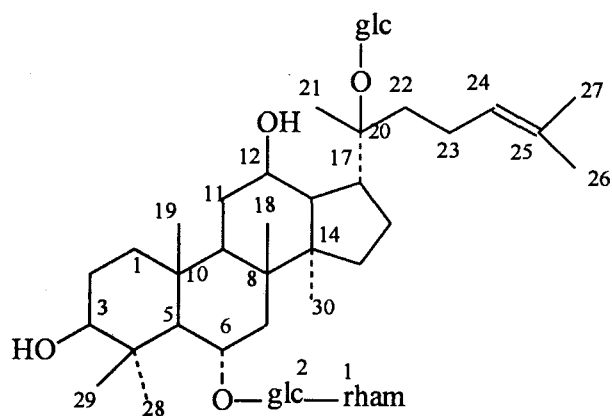


图 2 人参皂苷 Re 结构图

3.3 化合物 III

化合物 III 为白色粉末, m. p. 为 195 ~ 197 °C。

¹H-NMR (400 MHz, pyridine-d₅) δ: 4.53 (1H, d, J = 11.2 Hz)、4.71 (1H, d, J = 8 Hz)、5.18 (1H, d, J = 7.2 Hz) 和 5.34 (1H, d, J = 7.6 Hz) 提示有 4 个葡萄糖残基。见图 3。

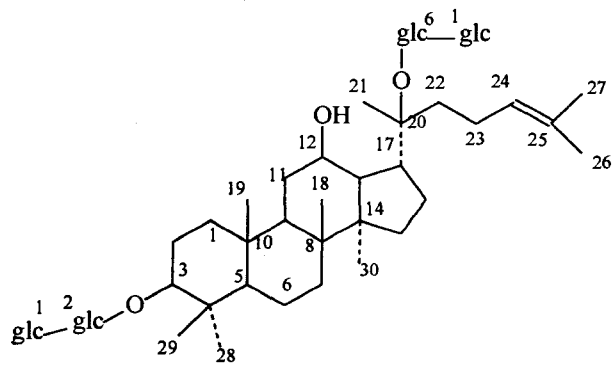


图 3 人参皂苷 Rb₁ 结构图

化合物 III 与人参皂苷标准品 Rb₁ 共薄层, 分别用展开剂 A、B、C 系统展开, 均呈均一斑点。与人参

皂苷标准品 Rb₁ 的混合熔点不下降, 碳谱数据(见表 1)与文献[4]对照一致。因此, 鉴定化合物 III 为人参皂苷 Rb₁。

3.4 化合物 IV

化合物 IV 为白色粉末, m. p. 为 197 ~ 199 °C。

¹H-NMR (400 MHz, pyridine-d₅) δ: 4.71 (1H, d, J = 7.2 Hz)、4.78 (1H, d, J = 6.8 Hz)、5.18 (1H, d, J = 8.0 Hz) 和 5.34 (1H, d, J = 7.2 Hz) 提示化合物 IV 中有 4 个糖残基。

化合物 IV 与人参皂苷标准品 Rb₃ 共薄层, 分别以展开剂 A、B、C 系统展开, 均呈单一斑点。与人参皂苷标准品 Rb₃ 的混合熔点不下降, 碳谱数据(见表 1)与文献[5]对照一致。因此, 鉴定化合物 IV 为人参皂苷 Rb₃。见图 4。

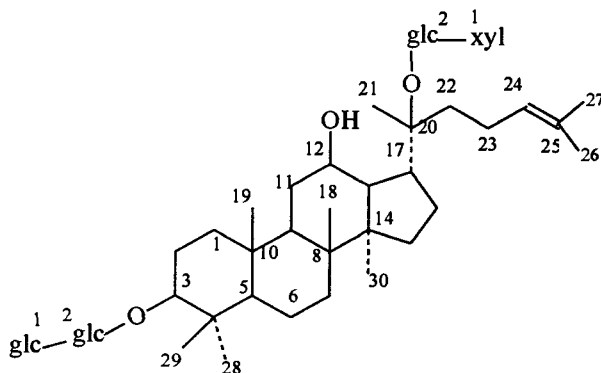


图 4 人参皂苷 Rb₃ 结构图

3.5 化合物 V

化合物 V 为白色无定形粉末, m. p. 为 298 ~ 300 °C。

¹H-NMR (pyridine-d₅, 400 MHz) δ: 5.0 (1H, d, J = 7.6) 提示可能有一个 β-D-葡萄糖残基。见图 5。

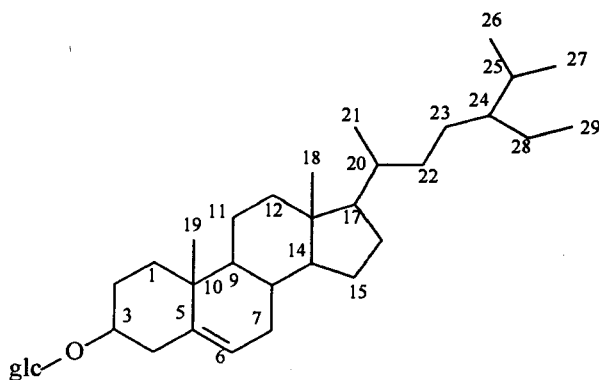


图 5 胡萝卜苷结构图

表1 化合物 I-V 的¹³C-NMR 数据表(100 MHz, pyridine-d₅)

编号	化合物 I	化合物 II	化合物 III	化合物 IV	化合物 V
1	39.4	39.6	39.1	39.9	37.4
2	27.5	27.7	26.5	26.6	32.1
3	78.2	78.6	90.0	88.9	78.0
4	39.9	39.9	39.5	39.5	39.8
5	60.8	60.8	56.2	56.2	140.5
6	74.1	75.1	18.3	18.3	121.5
7	45.9	45.9	35.0	35.0	32.0
8	41.0	41.2	39.9	39.9	30.2
9	50.0	49.5	50.1	50.1	50.2
10	39.4	39.4	36.8	36.7	36.8
11	32.0	30.9	30.7	30.6	21.2
12	71.0	70.2	70.0	70.0	39.2
13	48.2	49.1	49.4	49.3	42.4
14	52.0	51.4	51.2	51.5	56.7
15	31.6	30.7	30.7	30.6	24.4
16	25.3	26.6	26.5	26.6	28.4
17	49.3	51.6	51.5	51.5	56.1
18	17.7	17.4	16.2	15.9	11.9
19	17.4	17.2	15.9	16.1	19.1
20	86.5	83.2	83.3	83.3	36.3
21	26.8	22.3	22.3	22.1	18.9
22	32.6	35.7	36.0	36.0	34.1
23	28.6	23.2	23.1	23.0	26.3
24	85.5	125.9	125.8	125.9	45.9
25	70.2	130.8	130.9	130.9	29.4
26	27.0	25.7	25.6	25.6	19.9
27	27.5	17.7	17.8	17.8	18.9
28	32.0	32.1	27.9	27.9	23.3
29	16.8	17.5	16.5	16.4	12.0
30	18.6	17.2	17.3	17.8	
3-Inner-G-1			105.2	104.9	101.8
2			83.3	83.2	75.2
3			77.8	77.8	78.4
4			71.5	71.5	78.5
5			78.1	77.0	71.6
6			62.7	62.6	62.7
3-Outer-G-1			105.8	105.7	
2			76.9	76.8	
3			79.1	78.2	
4			71.5	71.5	
5			78.1	78.0	
6			62.7	62.7	
6-Inner-G-1	101.8	101.8			
2	79.3	79.1			
3	78.3	78.2			
4	72.2	72.2			
5	78.4	78.1			
6	63.0	62.8			
6-Outer-R-1	101.7	101.8			
2	72.5	72.4			
3	72.3	72.6			
4	74.1	74.1			
5	69.3	69.4			
6	18.6	18.7			
20-Inner-G-1			97.9	97.9	
2			74.6	75.1	88.9
3			79.3	78.1	78.0
4			71.6	71.4	71.5
5			78.6	76.9	76.8
6			63.1	71.5	70.0
20-Outer-G-1			105.0		
2			74.7		
3			78.0		
4			71.5		
5			78.0		
6			62.1		
20-Outer-X-1				105.8	
2				74.7	
3				79.1	
4				70.9	
5				65.5	

¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-d₅) δ: 101.8 为糖上的端基碳原子. 苷元部分碳信号与 β-谷甾醇比较基本相同, 只是 C₃ 由于苷化而向低场移动. β-谷甾醇 C₃ 的化学位移为 71.2, 化合物 V 的 C₃ 的化学位移为 78.0. 根据苷化位移规律、碳谱数据(见表 1)并与文献[6]对照基本一致, 因此, 化合物 V 鉴定为胡萝卜苷.

由本实验结果结合本研究组前期报道[7]可知, 转基因西洋参冠瘿组织培养物及培养基中均含有多活性皂苷成分, 尤其培养基中含有的活性成分具有提取分离工艺简单, 成本低下等优点, 故本研究为利用转基因西洋参冠瘿组织培养方法生产人参皂苷提供了有价值的科学资料.

[参考文献]

- [1] 路安民, 王美林. 关于中药现代化中的物种鉴定问题 - 基于枸杞分类和生产问题的讨论 [J]. 西北植物学报, 2003, 23(7): 1077 - 1083.
- [2] TANAKA O, YAHARA S. Dammarane saponins of leaves of *Panax pseudo-ginseng* subsp. *himalaicus* [J]. Phytochemistry, 1978, 17: 1353 - 1358.
- [3] 王金辉, 李 锐. 加拿大产西洋参茎叶的化学研究 (I) 十一一种三萜皂苷的分离与鉴定 [J]. 中国药物化学杂志, 1997, 7(2): 130 - 132.
- [4] 孟祥颖, 李向高, 于 洋. 国产西洋参花蕾化学成分的研究 I. 人参皂苷的分离、鉴定及含量测定 [J]. 吉林农业大学学报, 2000, 22(3): 1 - 8.
- [5] 唐纪琳, 李 静, 卫永弟. 西洋参花蕾皂苷的分离与鉴定 [J]. 中草药, 2000, 31(7): 496 - 498.
- [6] 陈封政, 赵卫权, 何永华, 等. 川滇蔷薇和多苞蔷薇化学成分的研究 [J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(4): 334 - 336.
- [7] YU Rong-min, JIN Qian-xing, SUN Hui, et al. The growth characteristics and ginsenosides isolation of suspension-cultured crown gall of *Panax quinquefolium* (in English) [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2005, 21(5): 754 - 758.

[责任编辑: 黄建军]