

· 药性菌质专题 ·

编者按:以酶学、细胞学、发酵工程等现代生物技术为依托,将传统中药的优势与现代生物技术相结合,以具有区域特色的中药材大品种的深度开发为靶向,重点开展中药生物转化技术体系的研究。中药的生物转化产物是定向转化的结果,必须要找到具有特定的酶系的菌种才能够对具有特定结构的底物(中药材药效部分)作用从而进行定向转化。本课题采用接种不同的药用真菌或益生菌去定向转化单味名贵中药或经典复方的方法,获得不同"药性菌质",并研究定向转化产物的增效作用。目前已对人参、三七等进行生物转化,经菌种扩繁、培养基优化、发酵温度选择、含水量影响等发酵工艺的优化,以"药性菌质"中主要的化学成分的含量作为判断发酵终点的指标。利用生物转化技术优化名贵中药材,增加其药效成分,提高其疗效,扩大其应用范围,促进名贵中药材的合理使用与开发。将生物转化技术应用于中医经典方剂及中药大品种二次开发的研究中,能够优化原有方剂的物质基础,提高其生物利用度,增强疗效及扩大适应症。能够实现提高中药资源的附加值和利用率,培育发展新"大中药"产业的目标,建立有区域特色的中药研发共性技术平台。

三七药性菌质正丁醇部位化学成分研究(I)

王新闻, 刘晓莉, 丁彩凤, 邱智东, 徐伟*
(长春中医药大学, 长春 130117)

[摘要] **目的:**对三七药性菌质中正丁醇部位的化学成分进行研究。**方法:**采用系统溶剂萃取、D101 大孔吸附树脂、硅胶柱色谱、开放式 ODS 柱色谱、半制备液相等方法进行分离纯化,通过化学性质和波谱数据确定化合物的结构。**结果:**从三七药性菌质正丁醇部位分离得到 6 个化合物,分别为人参皂苷 Rk₃(**1**),拟人参皂苷 RT₂(**2**),人参皂苷 Rg₃(**3**),24(*R*)-拟人参皂苷 GQ(**4**),人参皂苷 Rd(**5**),绞股蓝皂苷 LXIX(**6**)。 **结论:**化合物 **2** 和化合物 **4** 为首次从三七植物中分离得到,所有化合物均为首次从三七药性菌质中分离得到。

[关键词] 三七药性菌质; 正丁醇部位; 拟人参皂苷 RT₂; 24 (*R*)-拟人参皂苷 GQ

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)07-0089-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016070089

Chemical Constituents of *n*-butanol Fraction of Notoginseng Medicinal Fungal Substance (I)

WANG Xin-wen, LIU Xiao-li, DING Cai-feng, QIU Zhi-dong, XU Wei*
(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the chemical constituents of *n*-butanol fraction of notoginseng medicinal fungal substance. **Method:** The compounds were separated and purified through the system solvent extraction, D101 macroporous adsorbent resin, silica gel column chromatography, open ODS column chromatography, and semi-preparative liquid chromatography. The structures of the compound were identified by chemical properties and spectroscopic data. **Result:** Six compounds were separated from *n*-butanol fraction of notoginseng medicinal fungal substance and identified as ginsenoside Rk₃ (**1**), pseudoginsenoside RT₂ (**2**), ginsenoside Rg₃ (**3**), 24 (*R*)-pseudoginsenoside GQ (**4**), ginsenoside Rd (**5**), and gypenoside LXIX (**6**). **Conclusion:** Compound **2** and compound **4** were isolated from notoginseng for the first time, and all compounds

[收稿日期] 20150824(001)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2012BAI29B00)

[第一作者] 王新闻,在读硕士,从事中药药效物质基础研究,Tel:0431-86172786,E-mail:xinwen1020@qq.com

[通讯作者] *徐伟,博士,副教授,从事中药药效物质基础研究,Tel:0431-86172786,E-mail:xuwei1980_2006@126.com

were isolated from notoginseng medicinal fungal substance for the first time.

[Key words] notoginseng medicinal fungal substance; *n*-butanol fraction; pseudoginsenoside RT₂; 24 (*R*)-pseudoginsenoside GQ

三七被称为“参中之王”，为多年生草本植物，干燥根及根茎入药，是中国特有的药用植物，明代著名药学家李时珍称其为“金不换”。三七具有滋补、强壮、补血、消肿镇痛、止血散癖等功效，特别是在心脑血管、保护肝脏及免疫系统方面，具有良好的应用价值与前景^[1-3]。

微生物转化技术在创新药物的研究上发挥着越来越重要的作用，目前已成为国际天然药物研究的热点之一^[4]。本研究是在固体发酵基础上拓展出的药用真菌双向性固体发酵技术，是采用具有一定活性成分的中药材或药渣作为药性基质来代替传统的营养型基质与发酵菌种构成发酵组合，其产品即为药性菌质^[5]。本实验中直接采用三七药材干粉与大型担子菌进行固体“双向发酵”获得三七药性菌质，在微生物中丰富酶系的参与下，三七药材将会产生一系列的生理活动和生化效应，可使其化学成分进行生物转化和结构修饰，使不同成分之间的比例出现增减以及产生新的化合物，从而改变药物的作用强度或作用机制，为活性化合物的筛选提供一种新途径^[6-7]。因此对三七药性菌质的化学成分进行研究，对于阐明其生物转化机制及药理活性物质基础具有重要的意义。

本课题在确定了三七药性菌质发酵工艺的基础上，对三七药性菌质的正丁醇萃取部位进行了系统的化学成分研究，分离得到 6 个化合物，分别为人参皂苷 Rk₃ (**1**)，拟人参皂苷 RT₂ (**2**)，人参皂苷 Rg₃ (**3**)，24(*R*)-拟人参皂苷 GQ (**4**)，人参皂苷 Rd (**5**)，绞股蓝皂苷 LXIX (**6**)。根据文献报道，所分得的皂苷在保护心肌细胞、抗心律失常、抗血栓、降血脂、镇痛、止血、延缓衰老等方面具有很好的作用^[8-9]。

1 材料

AVANCEIII-500 型傅立叶变换核磁共振仪(四甲基硅烷 TMS 为内标,德国 Bruker),PACK ODS-AM 型半制备型色谱柱(日本 YMC),LC-2130 型高效液相色谱仪(上海天美科学仪器有限公司),DIF-6050 型真空干燥箱(上海一恒实验仪器总厂),TG328A(S)型分析天平(上海精科分析仪器厂),ROTAVAPOR R-220 型旋转蒸发仪(BUCHI 公司),R201 型旋转蒸发器(上海申顺生物科技有限公司),D101 型大孔吸附树脂(沧州宝恩树脂有限公

司),色谱用硅胶(青岛海洋化工有限公司),所用化学试剂均为分析纯,三七药性菌质是三七经过生物转化技术所获得的产物。

2 提取分离

取三七药性菌质干品 5.0 kg,以 70% 乙醇加热回流提取 4 次(3,2,2,2 h),过滤,合并提取液,减压浓缩得稠膏。用适量水混悬,依次用等体积石油醚、乙酸乙酯、水饱和和正丁醇萃取,得石油醚部分 14 g,乙酸乙酯部分 50 g,水饱和和正丁醇部分 400 g。取正丁醇层部分以水及不同体积分数乙醇(30%,50%,70%,95%)经 D101 大孔吸附树脂进行梯度洗脱,将 50% 乙醇和 70% 乙醇洗脱部分合并,经硅胶柱色谱以二氯甲烷-甲醇梯度洗脱,再利用开放式 ODS 柱色谱,得到 5 个流分(Fr. 1 ~ Fr. 5)。Fr. 1 经半制备液相(70% 甲醇)分离纯化得到化合物 **1**(3.6 mg),化合物 **2**(8.7 mg);Fr. 2 经半制备液相(55% 甲醇)分离纯化得到化合物 **3**(2.8 mg);Fr. 3 经半制备液相(80% 甲醇)分离纯化得到化合物 **4**(69.8 mg);Fr. 4 经半制备液相(60% 甲醇)分离纯化得到化合物 **5**(28.9 mg);Fr. 5 经半制备液相(85% 甲醇)分离纯化得到化合物 **6**(77.5 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1** 白色结晶粉末(甲醇),10% 硫酸乙醇溶液显紫红色, Molish 反应阳性, Liebermann-Burchard 反应阳性,提示其为三萜皂苷类化合物。¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ: 40.0 (C-1), 27.3 (C-2), 79.5 (C-3), 40.2 (C-4), 61.5 (C-5), 80.6 (C-6), 45.2 (C-7), 41.7 (C-8), 50.1 (C-9), 40.1 (C-10), 32.9 (C-11), 73.5 (C-12), 52.4 (C-13), 51.9 (C-14), 32.4 (C-15), 31.1 (C-16), 49.5 (C-17), 17.6 (C-18), 17.6 (C-19), 155.6 (C-20), 108.3 (C-21), 34.1 (C-22), 27.0 (C-23), 126.6 (C-24), 131.6 (C-25), 25.6 (C-26), 17.2 (C-27), 31.3 (C-28), 15.8 (C-29), 16.7 (C-30); 6-*O*-Glc: 105.3 (C-1), 75.2 (C-2), 78.8 (C-3), 71.4 (C-4), 77.4 (C-5), 62.6 (C-6)。以上数据与文献[10]报道的基本一致,故鉴定化合物 **1** 为人参皂苷 Rk₃。

化合物 **2** 白色结晶粉末(甲醇),10% 硫酸乙醇溶液显紫红色, Molish 反应阳性, Liebermann-Burchard 反应阳性,提示其为三萜皂苷类化合物。

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ : 40.0 (C-1), 27.3 (C-2), 78.8 (C-3), 40.2 (C-4), 61.6 (C-5), 79.5 (C-6), 45.0 (C-7), 41.6 (C-8), 51.1 (C-9), 40.0 (C-10), 32.6 (C-11), 71.4 (C-12), 49.3 (C-13), 52.1 (C-14), 31.0 (C-15), 25.7 (C-16), 49.4 (C-17), 17.8 (C-18), 17.0 (C-19), 87.6 (C-20), 26.7 (C-21), 33.3 (C-22), 29.4 (C-23), 85.7 (C-24), 71.6 (C-25), 26.3 (C-26), 26.4 (C-27), 31.4 (C-28), 15.8 (C-29), 18.1 (C-30); 6-*O*-inner-Glc: 103.3 (C-1), 79.5 (C-2), 78.8 (C-3), 71.7 (C-4), 80.6 (C-5), 62.6 (C-6); 6-*O*-outer-Xyl: 105.2 (C-1), 75.2 (C-2), 77.4 (C-3), 72.0 (C-4), 66.4 (C-5)。以上波谱数据与文献[11]报道的基本一致,故鉴定化合物 2 为拟人参皂苷 RT_2 。

化合物 3 白色结晶粉末(甲醇),10% 硫酸乙醇溶液显紫红色, Molish 反应阳性, Liebermann-Burchard 反应阳性,提示其为三萜皂苷类化合物。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ : 40.0 (C-1), 26.2 (C-2), 91.0 (C-3), 40.3 (C-4), 57.2 (C-5), 18.9 (C-6), 35.6 (C-7), 40.6 (C-8), 51.0 (C-9), 37.6 (C-10), 31.7 (C-11), 71.2 (C-12), 48.6 (C-13), 52.3 (C-14), 31.7 (C-15), 27.0 (C-16), 54.8 (C-17), 16.4 (C-18), 15.9 (C-19), 74.1 (C-20), 26.8 (C-21), 35.7 (C-22), 23.0 (C-23), 125.9 (C-24), 131.7 (C-25), 25.6 (C-26), 16.5 (C-27), 28.1 (C-28), 16.9 (C-29), 17.4 (C-30); 3-*O*-inner-Glc: 104.2 (C-1), 80.8 (C-2), 77.5 (C-3), 71.8 (C-4), 77.7 (C-5), 62.6 (C-6); 3-*O*-outer-Glc: 105.5 (C-1), 76.0 (C-2), 77.7 (C-3), 71.4 (C-4), 77.8 (C-5), 62.9 (C-6)。以上波谱数据与文献[12]报道的基本一致,故鉴定化合物 3 为人参皂苷 Rg_3 。

化合物 4 白色结晶粉末(甲醇),10% 硫酸乙醇溶液显紫红色, Molish 反应阳性, Liebermann-Burchard 反应阳性,提示其为三萜皂苷类化合物。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ : 39.4 (C-1), 27.0 (C-2), 89.2 (C-3), 40.4 (C-4), 57.2 (C-5), 18.8 (C-6), 35.5 (C-7), 39.6 (C-8), 51.1 (C-9), 37.8 (C-10), 31.9 (C-11), 70.5 (C-12), 48.7 (C-13), 52.5 (C-14), 32.7 (C-15), 28.2 (C-16), 48.8 (C-17), 15.8 (C-18), 16.3 (C-19), 85.9 (C-20), 28.9 (C-21), 32.7 (C-22), 27.0 (C-23), 88.9 (C-24), 70.6 (C-25), 25.7 (C-26), 28.4 (C-27), 28.2 (C-28), 15.8 (C-29), 17.9 (C-30), 3-*O*-inner-Glc: 105.1 (C-1), 82.7 (C-2), 78.3 (C-3), 71.6 (C-

4), 78.0 (C-5), 62.5 (C-6); 3-*O*-outer-Glc: 105.7 (C-1), 76.9 (C-2), 78.4 (C-3), 71.6 (C-4), 77.9 (C-5), 62.8 (C-6)。以上波谱数据与文献[12]报道的基本一致,专利[13]中将其命名 24(*R*)-拟人参皂苷 GQ,故鉴定化合物 4 为 24(*R*)-拟人参皂苷 GQ。

化合物 5 白色结晶粉末(甲醇),10% 硫酸乙醇溶液显紫红色, Molish 反应阳性, Liebermann-Burchard 反应阳性,提示其为三萜皂苷类化合物。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ : 40.0 (C-1), 26.9 (C-2), 91.0 (C-3), 40.3 (C-4), 57.3 (C-5), 18.9 (C-6), 35.6 (C-7), 40.7 (C-8), 50.7 (C-9), 37.6 (C-10), 30.7 (C-11), 70.9 (C-12), 49.6 (C-13), 52.2 (C-14), 28.1 (C-15), 25.6 (C-16), 52.8 (C-17), 16.0 (C-18), 16.4 (C-19), 84.6 (C-20), 26.9 (C-21), 36.4 (C-22), 22.6 (C-23), 125.5 (C-24), 132.0 (C-25), 23.9 (C-26), 17.6 (C-27), 31.3 (C-28), 16.4 (C-29), 17.0 (C-30); 3-*O*-inner-Glc: 104.2 (C-1), 80.9 (C-2), 77.6 (C-3), 71.3 (C-4), 78.0 (C-5), 62.2 (C-6); 3-*O*-outer-Glc: 105.1 (C-1), 76.0 (C-2), 78.2 (C-3), 71.6 (C-4), 77.4 (C-5), 62.5 (C-6); 20-*O*-inner-Glc: 98.0 (C-1), 75.1 (C-2), 78.0 (C-3), 71.6 (C-4), 77.6 (C-5), 62.8 (C-6)。以上波谱数据与文献[14]报道的基本一致,故鉴定化合物 5 为人参皂苷 Rd。

化合物 6 白色结晶粉末(甲醇),10% 硫酸乙醇溶液显紫红色, Molish 反应阳性, Liebermann-Burchard 反应阳性,提示其为三萜皂苷类化合物。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ : 39.9 (C-1), 26.7 (C-2), 91.0 (C-3), 40.3 (C-4), 57.3 (C-5), 18.9 (C-6), 35.6 (C-7), 40.7 (C-8), 50.7 (C-9), 37.6 (C-10), 30.7 (C-11), 71.5 (C-12), 49.6 (C-13), 52.2 (C-14), 31.4 (C-15), 26.9 (C-16), 52.9 (C-17), 16.4 (C-18), 16.4 (C-19), 84.3 (C-20), 23.3 (C-21), 39.8 (C-22), 123.5 (C-23), 141.7 (C-24), 71.5 (C-25), 29.9 (C-26), 29.6 (C-27), 28.1 (C-28), 16.7 (C-29), 17.0 (C-30); 3-*O*-inner-Glc: 105.1 (C-1), 80.9 (C-2), 77.8 (C-3), 71.6 (C-4), 77.6 (C-5), 62.8 (C-6); 3-*O*-outer-Glc: 104.3 (C-1), 76.0 (C-2), 77.4 (C-3), 71.5 (C-4), 77.7 (C-5), 62.5 (C-6); 20-*O*-inner-Glc: 97.8 (C-1), 75.0 (C-2), 78.2 (C-3), 71.3 (C-4), 76.7 (C-5), 69.8 (C-6); 20-*O*-outer-Xyl: 104.2 (C-1), 74.8 (C-2), 78.0 (C-3), 71.3 (C-4), 66.8 (C-5)。以上波

谱数据与文献[15]报道的基本一致,故鉴定化合物6为绞股蓝皂苷 LXIX。

[参考文献]

[1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上册. 上海:上海科学技术出版社,1986;2090.
[2] 孙小玲. 三七的研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2005,26(6):44-46.
[3] 马伟光,黄之镡,范培红,等. 整体固态生物转化后三七化学成分变化的初步研究[J]. 中华中医药杂志, 2010,25(10):1683-1686.
[4] 马骁驰,果德安. 中药活性成分生物转化的研究思路与方法[J]. 中国天然药物,2007,5(3):162-168.
[5] 庄毅,洪净. 药用真菌双向性固体发酵工程与中成药药渣再开发[J]. 中国中药杂志,2006,31(22):1918-1919.
[6] 王旭,徐威,游松. 微生物转化在药学中的应用[J]. 沈阳药科大学学报,2006,23(7):477-482.
[7] 李国红,沈月毛,王启方,等. 发酵三七中的皂苷成分研究[J]. 中草药,2005,36(4):499-501.
[8] 朴春花. 三七的药理作用研究进展概述[J]. 中国医药指南,2011,9(13):209-210.
[9] 丁彩凤,王明蛟,邱智东,等. 三七药性菌质乙酸乙酯

部分化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(7):45-46.

[10] Park H, Kim N Y, Han S B, et al. Three new dammarane glycosides from heat processed ginseng[J]. Arch Pharm Res, 2002,25(4):428-432.
[11] Tanaka O, Morita T, Kasai R, et al. Study on saponins of Rhizomes of *Panax pseudo-ginseng* subsp. *Himalaicus* collected at tzatogang and pari-la, bhutan-himalaya[J]. Chem Pharm Bull, 1985,33(6):2323-2330.
[12] Bi Y, Tian J W, Ji C M, et al. Ocotillol-type derivatives (II) synthesis and protective effects on cultured anoxia/reoxygen injury myocytes [J]. J Med Pl Res, 2011,5(31):6731-6737.
[13] 李平亚. 24(R)-拟人参皂苷-GQ 及其半合成方法和其药物用途:中国,101880304. A[P]. 2010-11-10.
[14] Zhao X S, Wang J, Li J, et al. Highly selective biotransformation of ginsenoside Rb₁ to Rd by the phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum*[J]. J Ind Microbiol Biotech, 2009,36(5):721-726.
[15] Wang J R, Yuko Y, Takashi T, et al. Dammarane-type triterpene saponins from the flowers of *Panax notoginseng* [J]. Mol, 2009,14(6):2087-2094.

[责任编辑 顾雪竹]