发酵三七中的皂苷成分研究

李国红¹, 沈月毛², 王启方¹, 张克勤^{1*}

(1. 云南大学云南省生物资源利用与保护重点实验室, 云南 昆明 650091; 2. 中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用重点实验室, 云南 昆明 650204)

微生物发酵中药将成为中药研究的新内容^[1]。微生物与中药相结合, 通过微生物发酵传统中药, 使微生物中丰富的酶系与中药中复杂的化学成分反应, 可能会产生一些中药中不具有的成分或改变一些成分含量的变化, 从而可能为活性化合物的筛选提供一种新的途径。三七皂苷是三七的主要活性成分, 具有多方面的药理作用, 本实验用枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn 对三七须根进行发酵, 对发酵后三七中的皂苷成分进行分离得到 5 个化合物, 其中化合物人参皂苷 Rh₄ 在三七中未见报道, 也未在三七原料药中检测到该化合物, 说明该化合物是通过发酵产生的。

1 仪器和材料

材料: 三七须根采购于云南省药材市场; 枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 保存于云南省生物资源保护与利用重点实验室。试剂: 正相柱色谱硅胶: 200~300 目, 青岛海洋化工厂; 反相柱色谱硅胶(中压柱色谱): RP-18, 40~63 μM, Merck 公司; 柱色谱凝胶: Sephadex LH-20, Amersham 公司; 薄层色谱: 硅胶 G 板, 青岛海洋化工厂; 分离所用溶剂均为重蒸工业纯试剂。仪器: FAB-MS, VG Auto Spec-3000 质谱仪; Bruker AM-400 超导核磁共振仪。

2 三七的枯草芽孢杆菌发酵

固体发酵, 三七须根磨碎成粉状, 与水同等比例混合拌匀, 每 500 g 分装入菌袋内, 121 °C 灭菌 40 min。每袋接入 80 mL 培养了 72 h 的枯草芽孢杆菌菌液, 将菌种和三七须根充分混匀后培养。7~10 d 后培养物为黑褐色, 干燥后装入袋内, 4 °C 冰箱保存。

3 提取与分离

2 kg 三七须根发酵产物, 80% 乙醇提取 3 次, 浓缩后用正丁醇萃取乙醇提取物, 回收溶剂后, 萃取物浓缩得浸膏 61 g, 经硅胶柱色谱(250 g), 用氯仿-甲醇溶剂系统梯度洗脱, 根据 TLC 合并得 6 个组

分。各组分再经反复硅胶、反相和凝胶柱色谱, 得到化合物 I (16 mg)、II (350 mg)、III (78 mg)、IV (2 g) 和 V (70 mg)。

4 鉴定

化合物 I: 白色粉末, 负离子 FAB-MS m/z : 619 ($[M - H]^-$, 100), 600 ($M - H - 18$, 20); ¹H-NMR (C₅D₅N, 400 MHz) δ: 0.83 (3H, s, H-19), 1.02 (3H, s, H-18), 1.22 (3H, s, H-28), 1.57 (6H, s, H-26, 27), 1.62 (3H, s, H-21), 2.03 (3H, s, H-29), 2.77 (3H, m, H-23), 3.92 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 8$ Hz, H-2), 4.23 (1H, m, H-6), 4.97 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-6-glc-1'), 4.99 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-24), 5.47 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-22); ¹³C-NMR (C₅D₅N, 100 MHz) 数据见表 1 和 2。参照文献[2]鉴定化合物 I 为人参皂苷 Rh₄ (ginsenoside Rh₄)。

化合物 II: 白色粉末, 负离子 FAB-MS m/z : 783 ($[M - 1]^-$, 100), 621 ($M - H - 162$, 6); ¹H-NMR (C₅D₅N, 400 MHz) δ: 0.78 (3H, s, H-19), 0.81 (3H, s, H-30), 0.94 (3H, s, H-18), 1.10 (3H, s, H-29), 1.34 (3H, s, H-28), 1.41 (3H, s, H-26), 1.64 (3H, s, H-21), 1.65 (3H, s, H-27), 4.93 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-6-glc (inner)-1'), 5.38 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-6-glc (terminal)-1''); ¹³C-NMR (C₅D₅N, 100 MHz) 数据见表 1 和 2。参照文献[3]鉴定化合物 II 为人参皂苷 Rg₃ (ginsenoside Rg₃)。

化合物 III: 白色粉末, 负离子 FAB-MS m/z : 769 ($[M - 1]^-$, 100), 637 ($M - H - 132$, 6), 475 ($M - H - 132 - 162$, 7); ¹H-NMR (C₅D₅N, 400 MHz) δ: 0.78 (3H, s, H-30), 0.95 (3H, s, H-19), 1.10 (3H, s, H-18), 1.38 (3H, s, H-29), 1.45 (3H, s, H-28), 1.61 (3H, s, H-26), 2.07 (3H, s, H-21), 4.94 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-6-glc (inner)-1'), 5.77 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-6-xyl (terminal)-1''); ¹³C-NMR

收稿日期: 2004-07-20

作者简介: 李国红(1974-), 女, 贵州人, 云南大学生物资源利用与保护重点实验室博士研究生, 主要从事中药的微生物发酵和微生物代谢产物的研究。 Tel: (0871) 5033805 E-mail: Lghrlx@163.net

* 通讯作者

(C₅D₅N, 100 MHz)数据见表1和2。参照文献[4]鉴定化合物Ⅲ为三七皂苷 R₂(notoginsenoside R₂)。

化合物Ⅳ:白色粉末,负离子 FAB-MS *m/z*: 637 ([M-1]⁻, 100), 619 (M-H-18, 13), 475 (M-H-162, 20); ¹H-NMR (C₅D₅N, 400 MHz) δ: 0.80(3H, s, H-30), 1.01(3H, s, H-19), 1.59(3H, s,

H-29), 1.62(3H, s, H-28), 1.67(6H, s, H-26, 27), 2.06(3H, s, H-21), 5.01(1H, d, *J*=7.7 Hz, H-6-glc-1'); ¹³C-NMR (C₅D₅N, 100 MHz)数据见表1和2。参照文献[4]可鉴定化合物Ⅳ为人参皂苷 Rh₁(ginsenoside Rh₁)。

化合物Ⅴ:白色粉末,负离子 FAB-MS *m/z*:

表1 化合物Ⅰ~Ⅴ的¹³C-NMR数据(苷元部分)

Table 1 ¹³C-NMR data of compounds I-V (glycoside part)

碳位	I	II	III	IV	V	碳位	I	II	III	IV	V
1	39.7	39.2	39.7	39.5	39.7	16	27.3	26.8	26.9	27.1	27.1
2	27.6	26.9	27.8	28.0	27.8	17	50.8	54.8	54.8	54.8	54.7
3	79.7	89.0	78.1	78.2	78.5	18	17.0	16.4	17.7	17.5	17.7
4	39.9	39.7	41.1	40.4	40.1	19	17.5	15.9	17.4	17.7	17.6
5	61.6	56.4	61.4	61.5	61.0	20	140.2	73.0	73.0	73.1	73.0
6	78.2	18.5	79.5	80.1	74.6	21	13.3	27.1	27.1	26.9	26.9
7	45.4	35.2	45.0	45.3	46.0	22	123.6	35.8	35.9	35.9	35.9
8	40.5	40.0	39.7	41.2	41.3	23	29.0	23.0	23.0	23.1	23.0
9	50.6	50.4	50.2	50.3	49.9	24	124.0	126.4	126.4	126.4	126.4
10	39.3	36.9	39.5	39.7	39.5	25	131.4	130.8	130.8	130.9	130.8
11	31.8	32.1	31.8	32.1	32.2	26	25.9	25.9	25.9	25.9	25.8
12	71.9	71.1	71.1	71.1	72.3	27	17.5	17.8	17.7	17.8	17.6
13	50.5	48.6	48.3	48.3	48.3	28	31.9	28.2	32.1	31.7	31.8
14	50.8	51.8	51.7	51.7	51.8	29	17.0	16.6	17.7	16.5	17.2
15	32.4	31.4	31.3	31.8	31.4	30	16.5	17.3	16.7	16.5	17.0

表2 化合物Ⅰ~Ⅴ的¹³C-NMR数据(糖链部分)

Table 2 ¹³C-NMR data of compounds I-V (sugar part)

碳位	I	II	III	IV	V	碳位	I	II	III	IV	V
中间的	6-glc	3-glc	6-glc	6-glc	6-glc	末端		3-glc	6-xyl		6-rha
1	106.1	105.2	103.6	106.1	101.8	1		106.1	104.9		101.8
2	75.5	83.5	79.9	75.5	78.9	2		77.2	75.9		72.4
3	80.2	78.4	78.8	79.9	79.4	3		79.9	78.8		72.3
4	72.8	71.6	71.8	71.9	72.8	4		71.1	71.3		74.3
5	78.7	78.2	79.4	78.7	78.3	5		78.0	67.3		69.5
6	63.1	62.7	63.0	63.1	63.3	6		62.9			18.7

784 ([M]⁻, 100), 638 ([M-H-146]⁻, 9), 475 (M-H-146-162, 20); ¹H-NMR (C₅D₅N, 400 MHz) δ: 0.95(3H, s, H-6-rha-6''), 0.98(3H, s, H-30), 1.27(3H, s, H-19), 1.31(3H, s, H-18), 1.39(3H, s, H-29), 1.49(3H, s, H-21), 1.63(3H, s, H-26), 1.68(3H, s, H-27), 2.08(3H, s, H-28), 5.25(1H, d, *J*=8.0 Hz, H-6-glc-1'), 6.43(1H, d, *J*=1.8 Hz, H-6-rha-1''); ¹³C-NMR (C₅D₅N, 100 MHz)数据见表1和2。参照文献[5]鉴定化合物Ⅴ为人参皂苷 Rg₂(ginsenoside Rg₂)。

5 讨论

化合物Ⅰ鉴定为人参皂苷 Rh₄,该化合物对一些癌细胞具有细胞毒作用^[2],在三七中还未见报道。本实验从三七须根的枯草芽孢杆菌发酵物中分离到该化合物,说明在三七的微生物发酵过程中,产生了该化合物,或至少是提高了该化合物的量,因为经

TLC 检测在未发酵的三七须根提取物中没有明显的人参皂苷 Rh₄ 的点,而发酵三七中有明显的该点,说明发酵过程中,三七须根中的某些皂苷被微生物转化为人参皂苷 Rh₄,其来源需进一步研究。

References:

- [1] Wang X H, Li Q D, Cao Q E. New field for study of TCM through fermentation by microbe [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(3): 267-268.
- [2] Baek N I, Kim D S, Lee Y H, et al. Ginsenoside Rh₄, a genuine dammarane glycoside from Korean red ginseng [J]. *Planta Med*, 1996, 62(1): 86-87.
- [3] Yang T R, Kasai R, Zhou J, et al. Dammarane saponins of leaves and seeds of *Panax notoginseng* [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(6): 1473-1478.
- [4] Zhou J, Wu M Z, Taniyasu S, et al. Dammarane-saponins of sanqi-ginseng, roots of *Panax notoginseng*: structures of new saponins, notoginsenosides-R₁ and -R₂, and identification of ginsenoside-Rg₂ and Rh₁ [J]. *Chem Pharm Bull*, 1981, 29(10): 2844-2850.
- [5] Sanada S, Konda N, Shoji J, et al. Studies on the saponins of ginseng. I structure of ginsenoside-Re, -Rf and Rg₂ [J]. *Chem Pharm Bull*, 1974, 22(8): 2407-2412.