

## 三七细胞大量培养物中主要 药用成分皂甙的分离和鉴定\*

周立刚 郑光植 甘烦远 王世林 杨崇仁 徐 纯

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 6560204)

植物细胞大量培养技术工业化生产次级代谢产物, 与栽培植物比较, 具有不占用良田, 不受地区、季节、气候的影响, 无农药残留、不影响出口及药用, 很少受市场波动的影响, 有利于提高生产率降低成本, 提高有效成分含量和获得新的有用物质等优点<sup>(1)</sup>。三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen 为云南特产的名贵中药, 但它在栽培中却存在着生产周期长、栽培技术复杂、产量低且不稳定等问题。其有效成分主要为达玛烷型四环三萜皂甙<sup>(2)</sup>, 本文报道三七细胞培养物中主要药用成分皂甙的提取分离和鉴定。

以有机溶剂从三七细胞培养物中提取总皂甙, 通过硅胶柱层析分离到 R-A, R-B, R-C, R-D, R-E 和 R-F 等六种皂甙。经理化常数和波谱分析, 前五种均为已知成分, 分别为皂甙 Rb<sub>1</sub>, Re, R1, Rg<sub>1</sub> 和 Rh<sub>1</sub>, 结构式如图 1 所示。皂甙 R-F 尚在鉴定中。

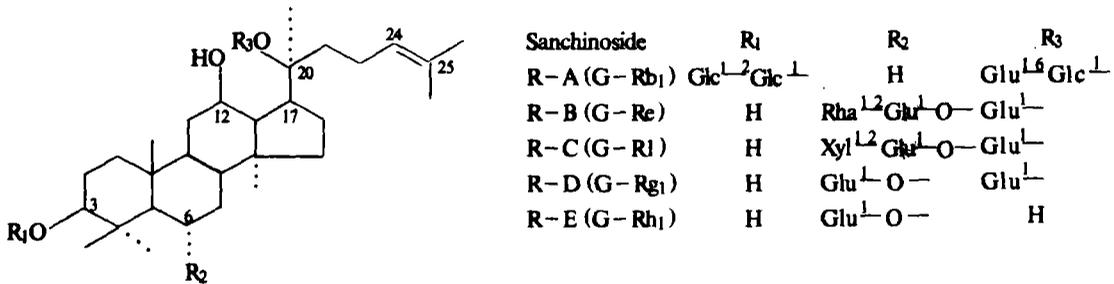


Fig. 1 Chemical structural formulae of sanchinoside  
R-A, R-B, R-C, R-D and R-E from the cell cultures.

### 实 验 部 分

WC-型显微熔点测定仪, 温度计未校正; Perkin-Elmer 577 型红外光谱仪; Bruker AM-400 MHz 型超导核磁共振仪; Finnigan-4510 型质谱仪, 70 eV; Waters 990 型高效液相色谱仪, 色谱柱为氨基柱, 流动相; MeOH-H<sub>2</sub>O (90:10), 检测波长 202 nm。柱层析用硅胶(10~40 μm)为青岛海洋化工厂产品和 Merck RP-8 反相硅胶(40~63 μm)。薄层层析用硅胶 G 板为青岛海洋化工厂产品和 Merck RP-8 反相硅胶板。薄层层析展开剂: (1) *n*-BuOH-AcOEt-H<sub>2</sub>O (4:1:5, 上层), (2) CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (7:3:0.5); 反相薄层层析展开剂; (3) 70~80%, 10% 硫酸乙醇液显色。D-101 型和 Diaion

本文于 1990 年 9 月 3 日收到。

\* 本课题为国家自然科学基金资助项目。

HP-20型大孔吸附树脂。文中所用各种试剂均为分析纯(A.R.)。

### 一. 实验材料

供试材料为经筛选后的优良三七培养细胞无性系<sup>(3)</sup>, 通过大量培养收获得细胞培养物, 经冰冻干燥至恒重。

### 二. 总皂甙的提取和分离

经冰冻干燥后的三七细胞培养物 200 g, 研磨成粉, 过 80 目筛。参考三七生药的皂甙提取方法<sup>(4)</sup>, 并考虑到细胞培养物与生药之间的差异, 样品磨碎后用  $n$ -BuOH 冷浸 2~3 d (样品与  $n$ -BuOH 重量比为 1:10), 过滤,  $n$ -BuOH 冷浸提取 2 次; 滤渣混以  $n$ -BuOH, 经超声波低温处理 10 min, 过滤; 以上滤液在 60 °C 以下蒸干 (为了避免皂甙的降解, 在提取、分离尤其在浓缩过程中, 要求温度在 60 °C 以下, 提取液保持中性), 回收  $n$ -BuOH; 提取物用水溶解后过滤, Et<sub>2</sub>O 脱脂; 浓缩水液, 过大孔吸附树脂柱, 先用水洗脱, 然后用 20% MeOH 洗脱, 再用 70% MeOH 洗脱。蒸干 70% MeOH 洗脱液, 得总皂甙 12.5 g。

### 三. 单体皂甙的纯化与精制

总皂甙 12.5 g 硅胶柱层析, CHCl<sub>3</sub>—MeOH—H<sub>2</sub>O (65:35:10 下层) 洗脱, 粗分得流份 I, II, III, IV 和 V, 重量分别为 0.52 g, 1.57 g, 2.75 g, 3.00 g 和 1.30 g。

流份 II 1.57 g 硅胶柱层析, 用  $n$ -BuOH—MeOH—H<sub>2</sub>O (40:10:20 上层) 洗脱, 得皂甙 R-A 粗品, 最后用 RP-8 反相硅胶柱层析, MeOH—H<sub>2</sub>O (70:30) 洗脱, 得 R-A 纯品 0.32 g, 为白色粉末。

流份 III 2.75 g 硅胶柱层析, CHCl<sub>3</sub>—MeOH—AcOEt—H<sub>2</sub>O (20:20:40:10 下层) 洗脱, 反复分离, 得 R-B 和 R-C 的混合物。然后用 RP-8 反相硅胶柱层析, MeOH—H<sub>2</sub>O (60:50) 洗脱, 得皂甙 R-B 0.36 g 和 R-C 0.18 g。R-B 为无色针晶, R-C 为白色粉末。

流份 IV 3.00 g 硅胶柱层析, CHCl<sub>3</sub>—MeOH—AcOEt—H<sub>2</sub>O (20:20:40:10 下层) 洗脱, 反复分离, 得皂甙 R-D 和 R-E 粗品。分别用 RP-8 反相硅胶柱层析, MeOH—H<sub>2</sub>O (60:40) 洗脱, 精制得皂甙 R-D 0.33 g 和 R-E 0.27 g, 均为白色粉末。

流份 I 和 V 正在分离中。

将所分得的各单体皂甙称重, 计算在总皂甙中的比例, 为了与生药进行比较, 同时计算生药 (栽培根) 中各单体皂甙在已分纯的单体皂甙之和中的比例, 结果如表 I 所示。

Tab 1. Comparison on the content (%) of main single saponins in total saponins between the cell cultures and the cultivated root of *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen

Saponins	R-A (Rb <sub>1</sub> )	R-B (Re)	R-C (Rl)	R-D (Rg <sub>1</sub> )	R-E (Rh <sub>1</sub> )	Others
Cell cultures	12.53	14.61	7.29	13.75	11.01	40.80
Cultivated root	41.08	3.42	3.65	43.36	0.22	8.26

### 四. 鉴定

R-A TLC 检查为单一斑点 [系统 (1) Rf 0.23; (2) Rf 0.22; (3) Rf 0.61]。HPLC 保留时间为 5.30 min。mp 197~199 °C, 与皂甙 Rb<sub>1</sub> 混合 mp 为 198~200 °C。IR (KBr) cm<sup>-1</sup> 3400, 1620。乙酰化合物 MS m/z 331, 229, 169, 109。常规 HCl—MeOH 水解, TLC 检查和甙元分别为 β-D-葡萄糖和人参二醇。<sup>13</sup>CNMR 数据与文献报道皂甙 Rb<sub>1</sub> 一致<sup>(2,5)</sup>, 其皂甙元部分化学位移值见表 2。

Tab 2.  $^{13}\text{C}$ NMR chemical shifts of aglycone moieties of saponins from *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen cell cultures (in  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )<sup>\*</sup>

Aglycone moiety carbon	R-A	R-B	R-C	R-D	R-E
C-1	39.37	40.03	39.76	40.45	39.52
C-2	26.86	27.81	27.84	27.98	27.95
C-3	89.14	79.16	78.19	79.00	78.07
C-4	39.79	39.54	40.25	39.91	40.38
C-5	56.58	60.92	61.42	61.61	61.51
C-6	18.56	74.81	79.54	78.05	78.71
C-7	35.28	45.96	45.03	45.34	45.35
C-8	40.18	41.31	41.24	41.36	41.23
C-9	50.35	49.67	50.03	50.20	50.30
C-10	37.05	39.77	36.17	39.70	39.78
C-11	30.85	30.86	30.61	31.05	32.16
C-12	70.31	70.27	70.33	70.65	71.10
C-13	49.61	49.20	49.25	49.26	48.39
C-14	51.80	51.81	51.74	51.64	51.73
C-15	30.95	31.06	31.03	30.96	31.33
C-16	26.74	26.72	26.72	26.85	26.90
C-17	51.52	51.51	51.51	52.06	54.81
C-18	16.33	17.80	17.84	17.72	17.21
C-19	16.13	17.80	17.59	17.72	17.67
C-20	83.59	83.37	83.42	83.67	73.07
C-21	22.53	22.40	22.45	22.68	27.12
C-22	36.31	36.14	36.17	36.25	35.90
C-23	23.31	23.29	23.32	23.55	23.06
C-24	126.05	126.04	126.05	126.10	126.40
C-25	131.12	130.96	131.02	131.25	130.78
C-26	26.82	25.76	25.80	25.95	25.81
C-27	18.01	18.73	17.59	18.02	17.47
C-28	28.21	32.24	31.78	31.88	31.75
C-29	16.68	17.57	17.59	16.51	16.40
C-30	17.52	17.57	16.75	17.37	16.93

\* Spectra of all compounds were measured at 100MHz. Chemical shift values are given in  $\delta$  (ppm)

R-B TLC 检查为单一斑点 [系统 (1) Rf 0.43; (2) Rf 0.51; (3) Rf 0.48]。HPLC 保留时间为 4.48 min。mp 201~203 °C, 与皂甙 Re 混合 mp 为 201~203 °C。IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  3380, 1620。乙酰化合物 MS m/z: 331, 273, 269, 187。常规 HCl—MeOH 水解, TLC 检查糖和甙元分别为  $\beta$ -D-葡萄糖、 $\beta$ -D-鼠李糖和人参三醇。 $^{13}\text{C}$ NMR 数据与文献报道皂甙 Re 一致<sup>(2,5)</sup>, 其皂甙元部分化学位移值见表 2。

R-C TLC 检查为单一斑点 [系统 (1) Rf 0.43; (2) Rf 0.51; (3) Rf 0.41]。HPLC 保留时间为 4.20 min。mp 223~226 °C, 与皂甙 R1 混合 mp 为 223~225 °C。IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  3400, 1620。乙酰化产物 MS m/z 331, 259。常规 HCl—MeOH 水解, TLC 检查糖和甙元分别为  $\beta$ -D-葡萄糖、 $\beta$ -D-木糖和人参三醇。 $^{13}\text{C}$ NMR 数据与文献报道皂甙 R1

一致<sup>(2,5)</sup>, 其皂甙元部分化学位移值见表 2。

R-D TLC 检查为单一斑点 [系统(1) Rf 0.60; (2) Rf 0.54; (3) Rf 0.31]。HPLC 保留时间为 3.80 min。mp 215~216 °C, 与皂甙 Rg<sub>1</sub> 混合 mp 为 215~216 °C。IR (KBr) cm<sup>-1</sup> 3400, 1620。乙酰化产物 MS m/z 331, 229, 169。常规 HCl—MeOH 水解, TLC 检查糖和甙元分别为 β-D-葡萄糖和人参三醇。<sup>13</sup>CNMR 数据与文献报道皂甙 Rg<sub>1</sub> 一致<sup>(2,5)</sup>, 其皂甙元部分化学位移值见表 2。

R-E TLC 检查为单一斑点 [系统(1) Rf 0.72; (2) Rf 0.62; (3) Rf 0.24]。HPLC 保留时间为 3.50 min。mp 192~194 °C, 与皂甙 Rh<sub>1</sub> 混合 mp 为 192~194 °C。IR (KBr) cm<sup>-1</sup> 3400, 1620。乙酰化产物 MS m/z 331, 169。常规 HCl—MeOH 水解, TLC 检查糖和甙元分别为 β-D-葡萄糖和人参三醇。<sup>13</sup>CNMR 数据与文献报道皂甙 Rh<sub>1</sub> 一致<sup>(2,5)</sup>, 其皂甙元部分化学位移值见表 2。

## 讨 论

三七细胞大量培养的后处理加工是将来工业化生产皂甙整个工艺流程中的一个不可少的部分。从大量培养的性质来看, 后处理有多种多样的细节需要考虑, 皂甙的分离纯化又是其中一个重要方面。由于三七培养细胞与三七生药存在一定的差异, 因此其主要有效成分皂甙的提取分离过程以及各皂甙的组成等都有所不同。提取皂甙的样品(细胞培养物)采用冰冻干燥, 比直接在 60 °C 下烘干效果要好。因为样品在烘干过程中会形成许多带色的杂质, 且皂甙成分易破坏, 这样导致提取过程中, 会有更多的杂质混入皂甙, 增加了以后除去杂质的麻烦。另外冰冻干燥样品较直接烘干样品疏松且易磨碎, 便于皂甙的提取。章观德等<sup>(6)</sup>提取皂甙是采用甲醇加热(60 °C)回流, 我们曾采用过此法, 但由于细胞培养物杂质较多, 后改用正丁醇冷浸和超声波低温破碎处理, 这样使提取物杂质(尤其是带色杂质)较少, 易于层析。经正丁醇冷浸和超声波破碎处理后的细胞培养物残渣, 再用甲醇回流提取, 将提取物进行薄层层析, 检测不到皂甙。三七生药的皂甙提取过程中, 一般采用正丁醇脱糖<sup>(4)</sup>, 常常因为糖脱不完全而影响皂甙的分离。我们采用大孔吸附树脂 D101 和 Diaion 脱糖, 不仅能最大限度脱去糖, 还能除去相当部分的带色杂质。大孔吸附树脂不仅使三七皂甙吸附快, 解吸也快, 而且吸附容量也相当可观, 该法简便有效, 对于分离纯化皂甙有一定的价值。采用普通的硅胶柱层析往往只能去掉部分带色杂质, 我们采用 Sep-Pak 预处理柱和 RP-8 反相柱以后, 除各单体皂甙的分离有明显效果外, 还能脱去大量的色素杂质。因此正相柱(用于粗分)和反相柱(用于细分)交互使用, 能更有效地分离细胞培养物皂甙。

从三七细胞培养物中分离得 5 个单体皂甙, 从各单体皂甙的得率和 HPLC 及 TLC 结果看, 细胞培养中皂甙组成几乎与原植物一致, 但在比例上又有一定的差异, 有些组分在细胞培养物中含量很多, 但在原植物中含量却很少; 有些成分在细胞培养物中含量很少, 但在原植物中含量却很多。以上研究结果足以证明, 培养的三七细胞具有产生次级代谢产物皂甙的全能性<sup>(7)</sup>, 但全能性的表达又依细胞的生长、发育和培养的环境条件等不同而呈现一定的差异。

致谢 本所植化室仪器组代测 EI-MS 和 <sup>13</sup>CNMR。

关键词 三七; 细胞培养物; 皂甙

## 参 考 文 献

1. 郑光植. 药用植物组织培养及其在工业生产上应用研究的进展. 见: 罗士韦, 许智宏主编. 经济植物组织培养. 北京: 科学出版社, 1986: 116 ~ 132.
2. 大蒲彦吉, 他编. 人参の化学. 见: 兼用人参 - その研究与進展. 日本共立出版社株式会社, 1981: 80 ~ 213.
3. 郑光植, 王世林. 三七愈伤组织培养. 云南植物研究 1989; 11: 255.
4. 杨崇仁, 等. 生三七和熟三七皂甙成分的分离和鉴定. 中药通报 1985; 10: 33.
5. Shibata S, et al. Chemistry and pharmacology of *Panax*. In: Wagner H, et al. eds. *Economic and Medicinal Plant Research* Vol. 1. INC (London) Ltd.: Academic Press, 1984: 217 ~ 284.
6. 章观德, 等. 人参的分析 II. 人参皂甙的测定. 药学报 1980; 15: 175.
7. Cheng KC and Liang Z. Callus cultures of the three well-known Chinese herbs and their medicinal contents. *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*. Peking: Science Press, 1978: 469 ~ 479.

## SEPARATION AND IDENTIFICATION OF MAIN MEDICINAL SAPONIN COMPONENTS FROM MASS CELL CULTURES OF *PANAX NOTOGINSENG* (BURK) F. H. CHEN

LG Zhou, GZ Zheng, FY Gan, SL Wang, CR Yang and C Xu

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204)

**ABSTRACT** Five main saponins were separated from the cell cultures of *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen. They were sanchinoside Rb<sub>1</sub>, Re, R1, Rg<sub>1</sub> and Rh<sub>1</sub> identified by TLC, HPLC, IR, M. P., <sup>13</sup>CNMR and EI-MS. Saponin components of the cell cultures were almost the same as those of the cultivated plants. But the content of saponins was different between the cell cultures and the cultivated plants. Saponin extraction and separation procedure suitable for the cell cultures has to be different from that for the cultivated plants.

**Key words** *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen; Cell cultures; Saponin