

• 实验研究 •

娑罗子提取物酶解产物的化学成分研究

赵娜夏, 夏广萍, 韩英梅*

天津药物研究院 天津市分子设计与药物发现重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 制备新的七叶皂苷衍生物。方法 采用 β -葡萄糖苷酶对娑罗子提取物进行生物转化, 采用大孔吸附树脂、反相硅胶柱色谱等分离方法对酶解产物进行分离纯化, 根据 MS、NMR 数据, 对得到的单体化合物进行了结构鉴定。结果 4 个化合物分别鉴定为 21 β -*O*-巴豆酰基-22 α -*O*-乙酰基原七叶皂苷元-3 β -*O*-[β -*D*-葡萄糖基(1 \rightarrow 2)]- β -*D*-葡萄糖醛酸苷(1)、21 β -*O*-当归酰基-22 α -*O*-乙酰基原七叶皂苷元-3 β -*O*-[β -*D*-葡萄糖基(1 \rightarrow 2)]- β -*D*-葡萄糖醛酸苷(2)、21 β -*O*-巴豆酰基-28-*O*-乙酰基原七叶皂苷元-3 β -*O*-[β -*D*-葡萄糖基(1 \rightarrow 2)]- β -*D*-葡萄糖醛酸苷(3)、21 β -*O*-当归酰基-28-*O*-乙酰基原七叶皂苷元-3 β -*O*-[β -*D*-葡萄糖基(1 \rightarrow 2)]- β -*D*-葡萄糖醛酸苷(4)。分别命名为七叶皂苷 Ie、七叶皂苷 If、异七叶皂苷 Ie 和异七叶皂苷 If。结论 4 个化合物均为新化合物。

关键词: 娑罗子; 七叶皂苷; 酶解; 七叶皂苷 Ie; 七叶皂苷 If; 异七叶皂苷 Ie; 异七叶皂苷 If

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2012)05 - 0442 - 04

Chemical constituents in zymolyte of *Aesculi Semen* extract

ZHAO Na-xia, XIA Guang-ping, HAN Ying-mei

Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To prepare new derivatives of aescine. **Methods** The biotransformation of *Aesculi Semen* extract was conducted with β -glucosidase. The macroporous adsorption resin and reverse phase silica gel column chromatography were used to isolate the zymolyte, and the structures of the monomer compounds were elucidated by MS and NMR. **Results** Four compounds were identified as 21 β -*O*-tigloyl-22 α -*O*-acetylprotoaescigenin-3 β -*O*-[β -*D*-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -*D*-glucopyranosiduronic acid (1), 21 β -*O*-angeloyl-22 α -*O*-acetylprotoaescigenin-3 β -*O*-[β -*D*-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -*D*-glucopyranosiduronic acid (2), 21 β -*O*-tigloyl-28-*O*-acetylprotoaescigenin-3 β -*O*-[β -*D*-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -*D*-glucopyranosiduronic acid (3), and 21 β -*O*-angeloyl-28-*O*-acetylprotoaescigenin-3 β -*O*-[β -*D*-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -*D*-glucopyranosiduronic acid (4), and named escin Ie, escin If, isoescin Ie, and isoescin If, respectively. **Conclusion** Compound 1-4 are new products.

Key words: *Aesculi Semen*; aescine; zymolyte; escin Ie; escin If; isoescin Ie; isoescin If

七叶皂苷是从七叶树科植物七叶树 *Aesculus chinensis* Bunge 或天师栗 *A. wilsonii* Rehd. 干燥成熟种子娑罗子中提取得到的主要有效成分, 属于三萜皂苷类结构。七叶皂苷主要组成为七叶皂苷 A、B、C 和 D, 是一组同分异构体, 结构上仅 C-22、C-28、C-21 位酰化取代基不同^[1]。七叶皂苷以钠盐的形式应用于临床, 具有抗炎症、抗渗出、消水肿、提高静脉张力等作用, 对于脑水肿、创伤或手术引起的

肿胀及静脉回流障碍性疾病都有明确的疗效。采用生物转化法对中药化学成分进行结构修饰是目前获得新结构化合物的一个有效途径^[2]。其中工业酶制剂具有选择性强、操作过程简便、引入杂质少等优势, 日益广泛地应用于中药活性成分的转化。为获得不同糖苷取代的七叶皂苷衍生物, 以开展构效关系研究, 笔者采用 β -葡萄糖苷酶对七叶皂苷进行了生物转化, 制得其衍生物组分, 本文报道了从中分

收稿日期: 2012-08-06

基金项目: 国家重大新药创制专项 (2011ZX09401-009)

作者简介: 赵娜夏 (1979—), 女, 主要从事天然产物化学研究。Tel:(022)23006959 E-mail: farfarns@163.com

*通讯作者 韩英梅, 研究员, 研究方向为天然药物化学。Tel:(022)23006959 E-mail: hanyingmei@163.com

离得到的 4 个新化合物。本实验从娑罗子提取物中分离得到的 4 个化合物, 根据波谱学数据分析以及七叶皂苷 A、B、C、D 的 ^1H 、 ^{13}C -NMR 谱比较确定为 4 个新产物, 分别为 21 β -*O*-巴豆酰基-22 α -*O*-乙酰基原七叶皂苷元-3 β -*O*-[β -*D*-葡萄糖基(1 \rightarrow 2)]- β -*D*-葡萄糖醛酸苷 (1)、21 β -*O*-当归酰基-22 α -*O*-乙酰基原七叶皂苷元-3 β -*O*-[β -*D*-葡萄糖基(1 \rightarrow 2)]- β -*D*-葡萄糖醛酸苷 (2)、21 β -*O*-巴豆酰基-28-*O*-乙酰基原七叶皂苷元-3 β -*O*-[β -*D*-葡萄糖基(1 \rightarrow 2)]- β -*D*-葡萄糖醛酸苷 (3) 和 21 β -*O*-当归酰基-28-*O*-乙酰基原七叶皂苷元-3 β -*O*-[β -*D*-葡萄糖基(1 \rightarrow 2)]- β -*D*-葡萄糖醛酸苷 (4), 分别命名为七叶皂苷 Ie (escin Ie)、七叶皂苷 If (escin If)、异七叶皂苷 Ie (isoescin Ie) 和异七叶皂苷 If (isoescin If)。

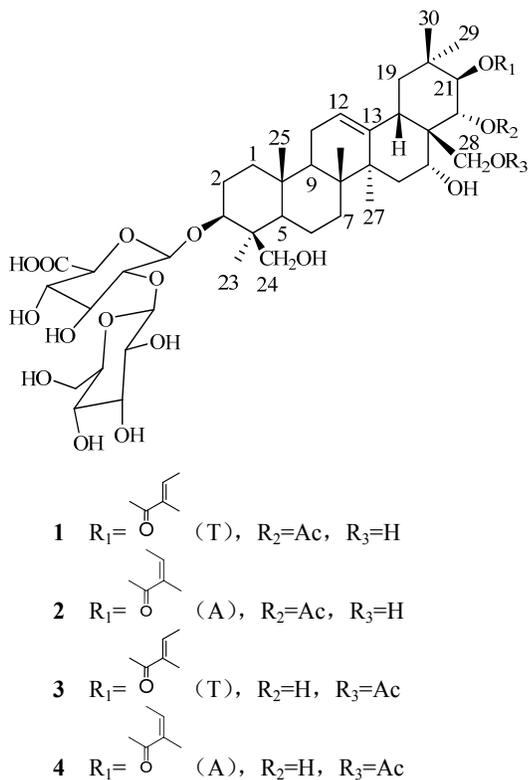


图 1 化合物 1~4 的结构式
 Fig. 1 Structures of compounds 1—4

1 材料和仪器

娑罗子提取物 (自制); β -葡萄糖苷酶 (活力 $2.3 \times 10^5 \text{ U/g}$, 上海宝丰生化有限公司); Bruker AV-400 型核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); G6520 型 Q-TOF-LC/MS 质谱仪 (Agilent 公司); SP8800 型制备型高效液相色谱仪、SP100 型紫外检测器 (美国 SP 公司), 反相 SP-120-30/50-ODS-B 填料 (Daisogel); 所用正相柱色谱 (200~300 目)、薄层

色谱硅胶 H 及硅胶 G 为青岛海洋化工厂生产; 试剂为药用级或分析级。

2 分离纯化

称取娑罗子提取物 2.0 g, 以 pH 4.8 醋酸-醋酸铵缓冲液溶解, 加入 β -葡萄糖苷酶适量, 于 50°C 恒温水浴中水解 48 h, 水解液经 D_{101} 型大孔吸附树脂柱, 依次以水、20%乙醇、80%乙醇洗脱, 收集 80%乙醇洗脱部分, 减压浓缩得粗总皂苷。取粗总皂苷 1.0 g 经反相低压柱色谱分离, 以甲醇-0.1 mmol/L 醋酸铵-醋酸 (6:4:0.5) 进行洗脱, 合并相近组分, 共得 8 个组分。以半制备高效液相色谱分别对组分 2、4、6、7 进行分离纯化, 色谱柱: Kromasil C_{18} 烷基相硅胶制备柱 (200 mm \times 20 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-水-冰醋酸 (35:65:1), 检测波长: 240 nm, 体积流量: 16 mL/min, 得到单体化合物 1~4, 分别为 123.5、82.5、43.0、38.5 mg。

3 结构鉴定

化合物 1: 白色无定形粉末, HR-ESI-MS m/z : 969.505 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{49}\text{H}_{76}\text{O}_{19}$, ^1H -NMR (400 MHz, $\text{C}_3\text{D}_5\text{N}$) δ : 0.60 (3H, s, CH_3 -25), 0.77 (3H, s, CH_3 -26), 1.05 (3H, s, CH_3 -29), 1.27 (3H, s, CH_3 -30), 1.38 (3H, s, CH_3 -23), 1.64 (3H, d, $J=7.2 \text{ Hz}$, T-4), 1.78 (3H, s, CH_3 -27), 1.90 (3H, s, CH_3 -Acetyl), 1.95 (3H, s, T-5), 3.03 (1H, s, H-18), 3.35 (2H, m, H-24), 3.36 (1H, dd, H-3), 4.89 (1H, d, $J=8.0 \text{ Hz}$, Glc A-1'), 5.38 (1H, s, H-12), 5.58 (1H, d, $J=7.6 \text{ Hz}$, Glc-1''), 6.20 (1H, d, $J=10.0 \text{ Hz}$, H-22), 6.39 (1H, d, $J=10.4 \text{ Hz}$, H-21), 7.40 (1H, q-like, T-3)。 ^{13}C -NMR 谱数据见表 1。苷元部分 ^1H 、 ^{13}C -NMR 数据与七叶皂苷 Ia 的波谱数据^[3-4]一致, 说明二者具有相同母核, 主要区别在于糖链部分。 ^1H -NMR 谱中 δ 4.89、5.58 的 2 个端基氢信号表明该化合物为双糖苷。 ^{13}C -NMR 谱中 δ 172.4 处的羧基碳信号表明了葡萄糖醛酸的存在, 且与其对应的端基碳 δ 104.8 信号与苷元母核 C-3 位碳 δ 90.8 存在 HMBC 相关, 表明仍为葡萄糖醛酸与母核 3 位形成糖苷键。在 HMBC 谱中另外一个糖基的端基氢 δ 5.58 (1H, d, $J=7.6 \text{ Hz}$, Glc-1'') 与 Glc A 的 C-2' (δ 81.8) 存在相关, 故确定该化合物为 21 β -*O*-巴豆酰基-22 α -*O*-乙酰基原七叶皂苷元-3 β -*O*-[β -*D*-葡萄糖基(1 \rightarrow 2)]- β -*D*-葡萄糖醛酸苷。化合物 1 为新化合物, 命名为七叶皂苷 Ie。

化合物 2: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z :

表 1 化合物 1~4 的 ^{13}C -NMR 谱数据 (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)Table 1 ^{13}C -NMR data of compounds 1—4 (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

碳位	化合物 1	化合物 2	化合物 3	化合物 4	碳位	化合物 1	化合物 2	化合物 3	化合物 4
1	38.6	38.6	38.7	38.7	26	16.8	16.8	16.9	16.9
2	26.7	26.7	26.6	26.6	27	27.5	27.5	27.5	27.5
3	90.8	90.8	90.8	90.9	28	63.8	63.9	66.5	66.5
4	43.8	43.8	43.8	43.8	29	29.6	29.5	29.8	29.7
5	56.2	56.2	56.3	56.3	30	20.2	20.3	20.2	20.2
6	18.6	18.6	18.6	18.6	T or A-1	168.1	167.9	168.7	168.8
7	33.3	33.3	33.3	33.3	T or A-2	129.5	129.0	129.9	129.5
8	40.0	40.0	40.0	40.0	T or A-3	136.9	137.2	136.5	136.4
9	46.8	46.8	46.8	46.8	T or A-4	14.3	16.0	14.2	15.7
10	36.5	36.5	36.5	36.5	T or A-5	12.5	21.1	12.5	21.1
11	24.1	24.1	24.2	24.1	Acetyl-1	171.1	171.0	170.8	170.7
12	123.6	123.6	123.6	123.6	Acetyl-2	20.9	20.9	20.8	20.7
13	142.9	142.9	142.8	142.7	1'	104.8	104.9	104.6	104.7
14	41.7	41.7	41.9	41.8	2'	81.8	81.8	81.9	81.9
15	34.7	34.7	34.7	34.7	3'	78.3	78.3	78.3	78.2
16	68.1	68.1	67.7	67.6	4'	73.0	73.0	73.2	73.1
17	48.0	48.1	47.1	47.1	5'	77.8	77.8	77.1	77.1
18	40.1	40.2	40.6	40.5	6'	172.4	172.4	170.8	170.7
19	47.3	47.3	47.3	47.3	1''	105.2	105.2	105.1	105.1
20	36.4	36.3	36.3	36.1	2''	75.9	75.9	75.8	75.8
21	79.4	79.0	81.7	81.3	3''	78.3	78.3	78.3	78.4
22	74.4	74.4	71.3	71.2	4''	69.9	69.9	70.0	70.0
23	22.6	22.6	22.7	22.6	5''	78.5	78.5	78.5	78.5
24	63.4	63.4	63.4	63.4	6''	61.6	61.7	61.7	61.7
25	15.6	15.6	15.7	15.9					

T 代表巴豆酰基, A 代表当归酰基

T represents tigloyl and A represents angeloyl

969.505 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{49}\text{H}_{76}\text{O}_{19}$, ^1H -NMR (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 0.60 (3H, s, CH_3 -25), 0.75 (3H, s, CH_3 -26), 1.05 (3H, s, CH_3 -29), 1.28 (3H, s, CH_3 -30), 1.37 (3H, s, CH_3 -23), 1.79 (3H, s, CH_3 -27), 1.92 (3H, s, CH_3 -Acetyl), 2.01 (3H, s, A-5), 2.09 (3H, d, $J=7.4$ Hz, A-4), 3.00 (1H, s, H-18), 3.34 (2H, m, H-24), 3.36 (1H, dd, H-3), 4.86 (1H, d, $J=7.6$ Hz, Glc A-1'), 5.37 (1H, s, H-12), 5.56 (1H, d, $J=7.6$ Hz, Glc-1''), 5.97 (1H, q-like, A-3), 6.19 (1H, d, $J=10.0$ Hz, H-22), 6.40 (1H, d, $J=10.4$ Hz, H-21)。 ^{13}C -NMR 谱数据见表 1。与七叶皂苷 Ib 的波谱数据^[3-4]相对比, 经二

维核磁共振谱验证, 确定该化合物为 21 β -O-当归酰基-22 α -O-乙酰基原七叶皂苷元-3 β -O-[β -D-葡萄糖基(1 \rightarrow 2)]- β -D-葡萄糖醛酸苷。化合物 2 为新化合物, 命名为七叶皂苷 If。

化合物 3: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 969.505 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{49}\text{H}_{76}\text{O}_{19}$, ^1H -NMR (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 0.62 (3H, s, CH_3 -25), 0.91 (3H, s, CH_3 -26), 1.07 (3H, s, CH_3 -29), 1.27 (3H, s, CH_3 -23), 1.30 (3H, s, CH_3 -30), 1.59 (3H, d, $J=7.2$ Hz, T-4), 1.81 (3H, s, CH_3 -27), 1.84 (3H, s, T-5), 2.02 (3H, s, CH_3 -Acetyl), 2.83 (1H, d, $J=11.5$ Hz, H-18), 3.29 (1H, m, H-24), 3.33 (1H,

d-like, H-3), 4.74 (1H, br s, H-16), 4.80 (1H, d, $J=8.0$ Hz, Glc A-1'), 5.45 (1H, br s, H-12), 5.55 (1H, d, $J=7.6$ Hz, Glc-1''), 6.41 (1H, d, $J=9.6$ Hz, H-21), 7.01 (1H, q-like, T-3)。 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱数据见表 1。与异七叶皂苷 Ia 的波谱数据^[5]相对比, 经二维核磁共振谱验证, 确定该化合物为 21 β -O-巴豆酰基-28-O-乙酰基原七叶皂苷元-3 β -O-[β -D-葡萄糖基(1 \rightarrow 2)]- β -D-葡萄糖醛酸苷。化合物 3 为新化合物, 命名为异七叶皂苷 Ie。

化合物 4: 白色无定形粉末, ESI-MS m/z : 969.505 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{49}\text{H}_{76}\text{O}_{19}$, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 0.58 (3H, s, CH_3 -25), 0.86 (3H, s, CH_3 -26), 1.07 (3H, s, CH_3 -29), 1.25 (3H, s, CH_3 -23), 1.26 (3H, s, CH_3 -30), 1.80 (3H, s, CH_3 -27), 1.93 (3H, s, CH_3 -Acetyl), 1.95 (3H, s, A-5), 2.01 (3H, d, $J=6.0$ Hz, A-4), 2.81 (1H, d-like, H-18), 3.25 (2H, d-like, H-24), 3.34 (1H, d-like, H-3), 4.69 (1H, br s, H-16), 4.76 (1H, d, $J=7.2$ Hz, Glc A-1'), 5.41 (1H, br s, H-12), 5.50 (1H, d, $J=7.2$ Hz, Glc-1''), 5.87 (1H, q-like, A-3), 6.42 (1H, d, $J=9.6$ Hz, H-21)。 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱数据见表 1。与异七叶皂苷 Ib 的波谱数据^[5]相对比, 经二维核磁共振谱验证, 确定该化合物为 21 β -O-当归酰基-28-O-乙酰基原七叶皂苷元-3 β -O-[β -D-葡萄糖基(1 \rightarrow 2)]- β -D-葡萄糖醛酸苷。化合物 4 为新化合物, 命名为异七叶皂苷 If。

4 讨论

七叶皂苷元母核结构中 C-22 位乙酰基在受热或酸性条件下易转移至 C-28 位而发生结构改变, 常规的化学方法处理较难得到保有原苷元母核的衍生物。 β -葡萄糖苷酶可以定向水解七叶皂苷 A~D, 产生相应的双糖苷, 转化率高, 副产物少, 显示出相对于常规水解方法的优势。

所得 4 个七叶皂苷衍生物同样存在不稳定、受热易发生结构变化的特性, 因此单体制备过程中应注意控制温度及 pH 值条件。进一步的活性评价尚在进行中。

参考文献

- [1] Deutsches-Arzneim-Codex (DAC) [S]. Aescin. A-030. 1997.
- [2] 吕斯琦, 马琳, 孙静, 等. 中药微生物转化的现状及前景 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(6): 447-451.
- [3] 赵静, 杨秀伟. 日本七叶树化学成分的研究 I. 七叶皂苷 Ia 和 Ib 的分离和鉴定 [J]. 中草药, 1999, 30 (5): 327-332.
- [4] Yoshikawa M, Murakami T, Matsuda H, *et al.* Bioactive saponins and glycosides. III. Horse chestnut. (1): The structures, inhibitory effects on ethanol absorption, and hypoglycemic activity of escins Ia, Ib, IIa, IIb, and IIIa from the seeds of *Aesculus hippocastanum* L. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1996, 44(8): 1454-1464.
- [5] 杨秀伟, 赵静, 服部征雄. 日本七叶树化学成分的研究 II. 七叶树皂苷 IVc 和异七叶树皂苷 Ia、Ib 的分离和鉴定 [J]. 中草药, 2000, 31(9): 648-651.