

Fusarium sacchari 转化三七茎叶皂苷中新化合物的分离和鉴定

张德东¹, 曹家庆², 赵余庆^{2*}

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110032; 2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 利用甘蔗镰孢 *Fusarium sacchari* 对三七茎叶皂苷进行生物转化, 以发现新的稀有抗肿瘤活性成分。**方法** 转化产物通过硅胶、凝胶及液相色谱进行分离, 得到化合物结构经波谱鉴定。**结果** 分离得到了1个单体化合物, 命名为三七皂苷-LZ(notoginsenoside-LZ), 鉴定其化学结构为 20(S)-3 β -hydroxy-12 β , 23-epoxy-dammar-24-ene-20-O- β -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside。**结论** 三七皂苷-LZ(notoginsenoside-LZ)为一新化合物。**关键词:**甘蔗镰孢; 生物转化; 三七茎叶皂苷**中图分类号:** R284.1**文献标识码:** A**文章编号:** 0253-2670(2009)12-1863-03

Isolation and identification of a new biotransformation compound by *Fusarium sacchari* from saponin of *Panax notoginseng* leaves

ZHANG De-dong¹, CAO Jia-qing², ZHAO Yu-qing²

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China;

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To study the chemical constituents of transformed products by *Fusarium sacchari* and to find the rare ginsenosides with anti-tumor effects from the leaves of *Panax notoginseng*.**Methods** The compound isolated was separated by repeated silica gel, Sephadex LH-20, and HPLC chromatography. The structure was identified by analysis of its spectral data. **Results** A dammarane-type triterpene, notoginsenoside-LZ, 20(S)-3 β -hydroxy-12 β , 23-epoxy-dammar-24-ene-20-O- β -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside, was isolated from the transformed products. **Conclusion** Notoginsenoside-LZ is a new compound.**Key words:** *Fusarium sacchari*; biotransformation; saponin in *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen leaves

三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 是我国名贵药材, 归五加科人参属, 为多年生宿根草本植物, 产于我国云南、广西等地。三七主要活性成分为人参皂苷, 其具有多种生理活性和药理作用, 尤其是其具有较强的抗肿瘤活性。近几年的研究证明, 降解人参皂苷的糖链, 可使其抗肿瘤生物活性大大提高。韩颖等^[1] 利用甘蔗镰孢 *Fusarium sacchari* 对三七茎叶皂苷进行了生物转化降解, 分离鉴定了4个化合物, 笔者在其基础上又分离得到1个单体化合物, 并通过理化性质及 MS、IR、UV、1D-NMR、2D-NMR 等波谱手段鉴定其化学结构为 20(S)-3 β -hydroxy-12 β , 23-epoxy-dammar-24-ene-20-O- β -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside, 为一新化合物, 命名为三七皂苷-LZ(notogin-

senoside-LZ)。

1 实验材料

1.1 菌株: 从辽宁省新宾市人参栽培基地种植人参的土壤中分离获得, 经中国科学院微生物所刘英昊鉴定为甘蔗镰孢(*Fusarium sacchari*)。

1.2 药品及试剂: 三七茎叶皂苷(质量分数>80%); 薄层色谱硅胶 G 和柱色谱硅胶(青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech); 其他所用试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 转化产物的制备: 250 mL 的三角瓶中加入 100 mL PDA 培养基, 灭菌后加入 *Fusarium sacchari* 于 160 r/min、28~30 °C 气浴振荡器中培养 3 d, 再加入 5 mL 150 mg/mL 无菌三七茎叶皂苷水溶

收稿日期: 2009-05-11

基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目(20062069)

* 通讯作者 赵余庆 Tel: (024)23986522 E-mail: zyq4885@126.com

液同样条件下继续培养,7 d 后取出培养液滤过菌体,滤出液用水饱和正丁醇进行萃取,萃取液减压回收、浓缩,得到总转化产物。

2.2 转化产物的分离:在产物分离过程中,用薄层色谱法(TLC)进行检测。将样品点于薄层板上在展开剂中展开后,挥干溶剂,喷 10% H₂SO₄-乙醇溶液于 105 ℃ 显色。将总转化产物(50 g)先用硅胶柱色谱法进行分离,合并的流份 36~60 经硅胶和凝胶分离纯化后,再用制备液相进行分离[检测波长:203 nm;体积流量:3.0 mL/min;流动相:甲醇-水(88 : 22)],得到化合物 notoginsenoside-LZ(15 mg)。

3 结构与分析

化合物 notoginsenoside-LZ:白色粉末(乙醇-正丁醇),mp 197~200 ℃, [α]_D²⁵ -14.67°(c 1.0, 甲醇)。Liebermann-Burchard 反应、Molsih 反应均呈阳性。HR-TOF-MS *m/z*: 775.471 6 [M + Na]⁺ (calcd 775.471 1),故推断该化合物的分子式为 C₄₁H₆₈O₁₂。

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 414 (OH), 1 630 (C = C), 1 383 (CH₃); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm: 205 nm(log ε: 2.3)。

该化合物的¹H-NMR中显示 8 个呈单峰的甲基信号 δ: 0.87(3H, s), 0.95(3H, s), 1.49(3H, s), 1.80(3H, s), 1.65(3H, s), 1.20(3H, s), 1.02(3H, s), 1.05(3H, s)和一个三取代烯键的氢信号 δ: 5.54(1H, d,

7.8)。氢谱还给出 2 个糖的端基氢信号 δ: 4.97(1H, d, 7.8), 5.09(1H, d, 7.8), ¹³C-NMR中也给出一组烯碳信号 δ: 129.3 和 131.1, 3 个连氧的碳信号 δ: 77.9、79.6 和 72.5。 ¹³C-NMR中 δ 99.0(C-1')和 105.9(C-1'')为吡喃葡萄糖和吡喃木糖的端基碳信号,糖的其余信号分别为 δ 75.3(C-2'), 78.9(C-3'), 71.7(C-4'), 76.8(C-5'), 70.8(C-6'), 74.8(C-2''), 78.2(C-3''), 71.1(C-4''), 67.2(C-5''),与文献报道的 Compound-Mx(C-Mx)糖链数据^[2]基本一致,说明该化合物中含有吡喃葡萄糖并吡喃木糖的结构片段。葡萄糖为内侧糖,6 位连接吡喃木糖。

根据二维核磁共振 HSQC 和 HMBC 谱对化合物的碳氢数据进行了全归属(表 1),而主要的碳氢长程相关信息可见图 1。归属结构显示化合物的苷元侧链部分的核磁共振数据与文献中人参皂苷-La^[3]以及人参皂苷-RH₉^[4]的报道数据一致。此外¹³C-NMR中 C-20 位显著向低磁场位移至 δ 82.0,而在 HMBC中糖链的端基氢 H-1'(δ 5.09)与 C-20(δ 82.0)有远程相关,说明糖链的结构片段连接 C-20 上。

在 ROESY 谱中,可观察到 H-12(δ 3.64)与 H-23(δ 4.83)相关;H-23(δ 4.83)、H-1'(δ 5.09)都与 H-22α(δ 2.82)相关;H-22β(δ 2.27)分别与 H₃-21(δ 1.49)及 H-24(δ 5.54)相关,因此可推断 H-12 与 H-23 在七元环的同一侧,甲基 H₃-21 在另一侧。根

表 1 Notoginsenoside-LZ 的¹H-NMR(600 MHz)及¹³C-NMR(150 MHz)数据(C₅D₅N, J in Hz)
Table 1 ¹H-NMR (600 MHz) and ¹³C-NMR (150 MHz) spectral data of notoginsenoside-LZ (C₅D₅N, J in Hz)

碳位	δ _C	δ _H	碳位	δ _C	δ _H
1	39.8	1.62 (1H, m), 0.95 (1H, m)	22	51.3	2.82 (1H, d, 15.6), 2.27 (1H, m)
2	28.3	1.82 (2H, m)	23	72.5	4.83 (1H, t, 8.4)
3	77.9	3.39 (1H, dd, 10.8, 5.4)	24	129.3	5.54 (1H, d, 7.8)
4	39.6		25	131.1	
5	56.4	0.8 (1H, m)	26	18.9	1.80 (3H, s)
6	18.8	1.42 (1H, m), 1.52 (1H, m)	27	25.5	1.65 (3H, s)
7	35.2	1.20 (1H, m), 1.41 (1H, m)	28	28.6	1.20 (3H, s)
8	39.6		29	16.3	1.02 (3H, s)
9	50.7	1.52 (1H, m)	30	16.9	1.05 (3H, s)
10	37.5		sugar moieties		
11	30.1	1.98 (1H, m), 1.38 (1H, m)	1'	99.0	5.09 (1H, d, 7.8)
12	79.6	3.64 (1H, m)	2'	75.3	3.91 (1H, t, 8.4)
13	49.8	1.57 (1H, m)	3'	78.9	4.20 (1H, m)
14	52.1		4'	71.7	4.17 (1H, m)
15	32.6	1.48 (1H, m), 1.06 (1H, m)	5'	76.8	4.10 (1H, m)
16	25.7	2.28 (1H, m), 2.10 (1H, m)	6'	70.8	4.74 (1H, d, 9.6), 4.38 (1H, m)
17	46.6	3.19 (1H, t)	1''	105.9	4.97 (1H, d, 7.8)
18	16.6	0.87 (3H, s)	2''	74.8	4.06 (1H, t, 8.4)
19	15.6	0.95 (3H, s)	3''	28.2	4.12 (1H, m)
20	82.0		4''	71.1	4.24 (1H, m)
21	24.6	1.49 (3H, s)	5''	67.2	4.73 (1H, m), 3.69 (1H, m)

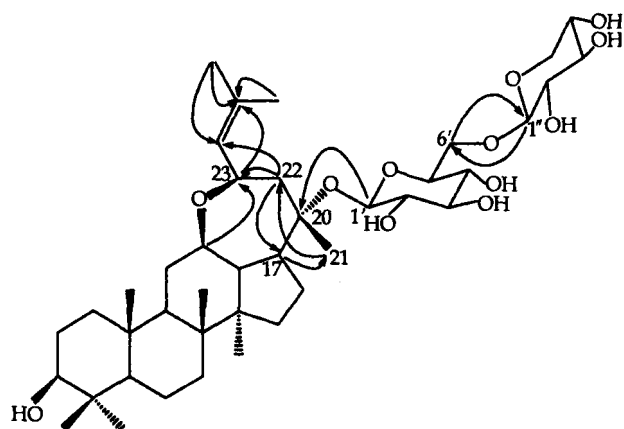


图 1 notoginsenoside-LZ 的化学结构及主要的 HMBC 相关
Fig. 1 Chemical structure and key HMBC correlations of notoginsenoside-LZ

据文献^[4]中所定 H-12 位于 α 位,所以化合物的 H-23 也位于 α 位,而甲基 H₃-12 位于 β 位。由于其 C-17、20、21、22、23、24、25 数据, H-12、22、23 数据及偶合裂分情况与文献中化合物的数据^[4]几乎一致,

说明它们侧链上碳的立体构型应该也是一致的,可知化合物的 20 位手性为 S 构型。

综上所述,根据理化性质及波谱手段解析,推断化合物 notoginsenoside-LZ 的结构为 20(S)-3 β -hydroxy-12 β , 23-epoxy-dammar-24-ene-20-O- β -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside,是未见文献报道的新化合物,命名为三七皂苷-LZ。

参考文献:

- [1] 韩颖,姜彬慧,胡筱敏,等. *Fusarium sacchari* 转化三七茎叶皂苷的稀有抗肿瘤成分 [J]. 中草药, 2007, 38(6): 830-832.
- [2] Kejiang H E, Liu Y, Yang Y, et al. A dammarane glycoside derived from ginsenoside Rb₃ [J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(2): 177-179.
- [3] 陈英杰,张绍林,王站星,等. 人参叶中微量新皂甙 La 的分离与鉴定 [J]. 药学学报, 1990, 25(5): 379-381.
- [4] Dou D Q, Chen Y J, Liang L H, et al. Six new dammarane-type triterpene saponins from the leave of *Panax ginseng* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2001, 49(4): 442-446.

黄芪多糖 MAPS-5 的化学结构及其体外淋巴细胞增殖活性

林梦感,杨义芳*,许海燕

(上海医药工业研究院 中药研究室,上海 200040)

摘要:目的 研究黄芪多糖 MAPS-5 的化学结构及其体外淋巴细胞增殖活性。方法 联用微波辅助提取和膜过滤富集黄芪粗多糖,经 DEAE-Cellulose 弱阴离子交换树脂及 Sephacryl S-400HR 凝胶柱色谱纯化得到一个黄芪均一多糖 MAPS-5。采用酸水解、GC、IR、高碘酸氧化、Smith 降解、甲基化、NMR、刚果红反应、原子力显微镜、电镜扫描等方法对其化学结构进行研究。并利用对刀豆蛋白(Con A)和脂多糖(LPS)诱导小鼠脾脏淋巴细胞增殖的影响,研究 MAPS-5 的免疫调节活性。结果 MAPS-5 是由 α -D-(1-4)GlcP 连接构成主链,且平均约每 15 个糖残基中有 2 个糖残基的 C-6 位被末端葡萄糖取代,其相对分子质量为 1.32×10^4 ;构象研究表明 MAPS-5 的糖链在水溶液中不具备三股螺旋结构。MAPS-5 体外可促进由 Con A 诱导的 T 淋巴细胞增殖($P < 0.01, 0.001$),但对 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖没有显著影响($P > 0.05$)。结论 MAPS-5 是黄芪中首次分离到的均一葡聚糖,具有促进由 Con A 诱导的 T 淋巴细胞增殖的活性。

关键词:黄芪多糖;黄芪多糖 MAPS-5;淋巴细胞;增殖

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)12-1865-04

黄芪是豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 或蒙古黄芪 *Amembranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 的干燥根,是重要的益气中药^[1]。黄芪多糖(*Astragalus polysaccharide*, APS)是黄芪的主要成分之一,自 1982 年以来^[2],从中分离了 10 余个多糖成分,药理研究也表明黄芪多糖具有多种明显的生

物活性,有免疫调节、抗肿瘤、抗辐射、抗缺氧、以及对肝脏和心血管系统的保护作用等功效^[3],但是微波辅助提取的黄芪多糖在化学和免疫活性方面的研究尚未见报道。微波辅助提取可能对多糖的结构和活性造成影响,通过不同工艺的黄芪多糖对环磷酰胺治疗后的 H₂₂ 荷瘤小鼠的免疫功能的影响试验发现:微波提取的黄芪多糖给药组比回流提取的黄芪

收稿日期:2009-03-26

基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项资助(项目编号 2009ZY09301-007)

作者简介:林梦感(1984—),男,硕士,专业方向为生药学。

* 通讯作者 杨义芳 Tel:(021)62473018 E-mail:yangyf4912@163.com