

· 化学成分 ·

一个新颖的人参皂苷元衍生物及其抗 HL-60 肿瘤细胞活性

李辉峰¹, 郭洪祝^{1,2}, 果德安¹

(1. 北京大学药学院 生物技术室, 北京 100083; 2. 北京市药品检验所, 北京 100035)

摘要:目的 研究人参皂苷元衍生物及其抗 HL-60 肿瘤细胞活性。方法 利用 Smith 降解处理人参总皂苷, 采用硅胶柱色谱、制备型高效液相色谱技术分离、纯化人参皂苷元等产物。通过波谱数据分析产物结构。采用 MTT 法测试产物抗 HL-60 肿瘤细胞活性。结果 分离鉴定了原人参二醇(PD)、原人参三醇(PT)和 24, 25-烯-3 β , 6 α -二羟基-12, 20-(1⁴羟基)双氧乙基-达玛烷(1), 化合物 1 为新化合物命名为 1⁴羟基双氧乙基原人参三醇。结论 化合物 1 为新型人参皂苷元衍生物, 其抑制 HL-60 细胞增殖的作用强于 PD 和 PT。

关键词: 1⁴羟基双氧乙基原人参三醇; 人参皂苷元衍生物; HL-60 细胞

中图分类号: R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2010)01-0006-03

A novel derivative of ginsenoside sapogenin and its activity against HL-60 cells

LI Hui-feng¹, GUO Hong-zhu^{1,2}, GUO De-an¹

(1. Department of Biotechnology, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China;

2. Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China)

Abstract: **Objective** To investigate the derivatives of ginsenoside sapogenins and their activities against HL-60 cells. **Methods** The total ginsenoside extract was treated by Smith degradation. All products were isolated by silica gel chromatography and purified by preparative HPLC. On the basis of 1D and 2D NMR data, structures were elucidated. The activity against HL-60 cells was measured by MTT method. **Results** Three compounds were isolated and identified as 20(S)-protopanaxadiol (PD), 20(S)-protopanaxatriol (PT), and 24, 25-en-3 β , 6 α -dihydroxy-12, 20-(1⁴hydroxy) ethanedioxy-dammarane (1). **Conclusion** Compound 1, named 1⁴hydroxy ethanedioxy PT, is a novel derivate of sapogenin with higher inhibitory activity against HL-60 cells than PD and PT.

Key words: 1⁴hydroxy ethanedioxy protopanaxatriol; ginsenoside sapogenin derivative; HL-60 cells

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 是常用名贵中药, 现代应用和研究证实人参具有抗衰老、抗肿瘤、增强免疫功能、降血糖、降血脂、抗血栓和抗动脉硬化等作用。近年来, 针对人参中主要活性成分人参皂苷的研究发现, 无论是体外细胞实验, 还是流行病学调查, 结果均表明此类化合物具有明确的抗肿瘤活性^[1], 体外试验发现人参皂苷元的抗肿瘤作用优于人参皂苷^[2]。为了更好地研究人参皂苷类化合物的抗肿瘤作用机制及其构效关系, 对人参皂苷元-原人参二醇、原人参三醇及其衍生物进行了抗肿瘤作用研究, 对原人参三醇进行了系统的生物转化研究, 发现了大量结构新颖的转化产物, 并初步阐明

了抗肿瘤构效关系^[3,4]。近来, 在对人参总皂苷采用 Smith 水解^[5]过程中, 发现了一个结构新颖的人参皂苷元衍生物, 其抗 HL-60 肿瘤细胞活性优于原人参二醇、原人参三醇, 该产物产量仅次于原人参二醇和原人参三醇。通过一维、二维核磁共振波谱解析, 结合高分辨质谱分析, 确定此化合物结构为 24, 25-烯-3 β , 6 α -二羟基-12, 20-(1⁴羟基)双氧乙基-达玛烷。通过查阅文献未见报道, 为新化合物, 命名为 1⁴羟基双氧乙基原人参三醇。结构式见图 1。

1 仪器与材料

旋光用 Perkin-Elmer-243B 测定; 熔点用 X4 型显微熔点仪测定 (温度计未校正); 红外光谱用

收稿日期: 2009-06-12

基金项目: 教育部博士点基金课题 (20040001136)

作者简介: 李辉峰 (1983—), 女, 河南人, 北京大学药学院 2006 级药学研究生, 研究方向为天然产物生物转化。

*通讯作者: 郭洪祝 Tel: (010) 83226434 E-mail: guohz@bjmu.edu.cn

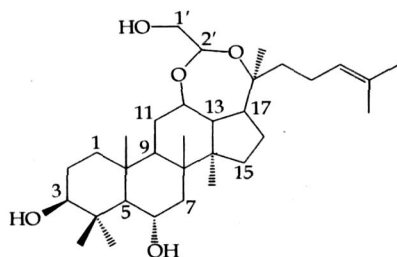


图 1 化合物 1 的化学结构

Fig 1 Structure of compound 1

Nicolet Avatar 红外光谱仪测定;质谱用 ABI Qstar 型质谱仪测定,核磁共振用 Varian INOVA 500 型核磁共振仪测定,高效液相色谱仪(分析型)为 Agilent 1100,配有二极管阵列检测器、柱温箱及四元梯度泵。分析用色谱柱为 YMC-PACK, ODS-A 填料, $5\text{ }\mu\text{m}$, $150\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$, 串以 YMC 预柱 ODS-A 填料, $5\text{ }\mu\text{m}$, $30\text{ mm} \times 10\text{ mm}$ 。制备所用色谱柱为 YMC-PACK, 填料为 ODS-A, $5\text{ }\mu\text{m}$, $250\text{ mm} \times 10\text{ mm}$ 。所有样品分析或制备前以 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过。

柱色谱用硅胶(200~300 目)、预制薄层硅胶板 GF₂₅₄ 购自青岛海洋化工集团公司;NaOH 为北京化工厂生产,NaBH₄ 为北京东方龙顺化学合成技术开发中心生产,NaIO₄ 为北京化学试剂公司生产,均为分析纯;所用化学试剂均为北京化工厂生产的分析纯试剂;液相分析用甲醇、乙腈为色谱纯(J. T. BAKER, USA);超纯水由本校毒理学教研室生产。人参总皂苷由湖南九汇现代中药公司提供,人参总皂苷的质量分数大于 80%。

2 提取与分离

将 50 g 人参总皂苷溶于 4 000 mL 水中,加入 217 g NaIO₄,置于室温下搅拌 5 h,滤除液体,收集沉淀,分别用稀 H₂SO₄ 和水将沉淀洗至中性。将沉淀溶解在 750 mL 75%乙醇溶液中,加入 17 g NaBH₄,在室温下放置 17 h。然后加入 750 mL 的水将反应液稀释一倍,并用 1 mol/L H₂SO₄ 将反应液的 pH 值调至 1.8~2.0。继续在室温下放置 24 h。反应液以醋酸乙酯等体积萃取 3 次,萃取液用水洗至中性,减压蒸干,得到粗产物约。

将产物进行硅胶柱色谱分离,以氯仿-醋酸乙酯-无水乙醇(5 1 3~1 1 3)系统梯度洗脱,得到衍生物粗品,再用制备 HPLC 纯化,洗脱剂为 60%的 CH₃CN-H₂O 系统,得到化合物(1)0.4 g(产率为 0.8%),原人参三醇(PT)2.1 g(产率为 4.2%)和原人参二醇(PD)1.0 g(产率为 2%)。

3 结构鉴定

化合物 1:白色无定形粉末, $[\alpha]_D^{25} + 40.0$ (c 0.2, MeOH), mp 234~236。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3 370, 2 964, 2 930, 1 677, 1 384。HR-ESI-MS 高分辨质谱在 541.386 0 显示 $[M + Na]^+$ 峰,提示其分子式为 C₃₂H₅₄O₅。通过与已知的人参三醇的 ¹³C-NMR 数据进行比对发现(表 1),除 12, 17, 20 位数据差异大以及多出的 1', 2' 位外,其余位置数据与原人参三醇(PT)基本一致,由此推断该化合物为原人参三醇的衍生物,同时也提示变化可能发生在 12, 17, 20 这些位点上。与原人参三醇相比,该化合物 ¹³C-NMR 和 DEPT 谱中,多了一个 δ 96.3 的连氧叔碳和 δ 65.6 的连氧次甲基。联合分析 HSQC 谱, ¹H-¹H COSY 谱中观察到这两个碳上质子之间存在相关关系,提示他们自成一偶合体系,存在含氧乙基结构片段,该结构片段可能以含氧取代形式与骨架

表 1 化合物 1 的核磁共振波谱数据

Table 1 NMR Data for compound 1

碳位	¹³ C-NMR	¹ H-NMR	PT
1	39.7	1.04, 1.63	39.3
2	28.1	1.88 m	28.0
3	78.5	3.54 m	78.3
4	40.5		40.3
5	61.9	1.23	61.7
6	67.7	4.40	67.6
7	47.5	1.90	47.4
8	41.1		41.1
9	50.3	1.60	50.0
10	39.5		39.3
11	29.3	1.98	31.9
12	78.7	3.52	71.0
13	48.7	2.08 (t, 10.8)	48.2
14	50.8		51.6
15	33.1	1.07	31.3
16	25.2	1.52	26.8
17	48.7	2.52	54.7
18	17.2	1.05 s	17.5
19	17.7	0.97 s	17.4
20	78.8		72.9
21	26.7	1.31 s	27.0
22	37.1	1.62, 1.84	35.8
23	22.9	2.38, 2.56	22.9
24	126.2	5.24 m	126.2
25	131.1		130.7
26	25.9	1.66 s	25.8
27	17.8	1.58 s	17.6
28	31.9	2.13 s	31.9
29	16.6	1.43 s	16.4
30	16.5	0.92 s	17.0
1'	65.6	4.02 (dd)	
2'	96.3	5.26 (t, 5.2)	

¹H-NMR (500 MHz) 和 ¹³C-NMR (125 MHz) 在 pyridine-*d*₅ 中

¹H-NMR (500 MHz) and ¹³C-NMR (125 MHz) in pyridine-*d*₅

连接。碳谱中 12、20 位置碳的位移较原人参三醇相比发生了明显的变化,向低场位移 δ 6~7,提示连接位置可能在 12、20 位。HMBC 谱中观察到该片段端基质子 δ 5.25 与骨架上的 12、20 位碳之间存在远程相关信号,证实了含氧取代发生在这两个位置上。综上分析,推测该化合物结构为 24,25-烯- β ,6 α -二羟基-12,20-(1⁴羟基)双氧乙基-达玛烷,由于该化合物不易生成晶体,2 位的绝对构型暂未确定。经文献检索,为一新化合物。

原人参三醇(PT)和原人参二醇(PD),均为白色无定形粉末。核磁共振波谱数据与文献一致^[6]。

采用 MTT 法^[7],对 HL-60 白血病细胞的抑制作用测试结果见表 2,该化合物的抑制作用明显强

表 2 抗 HL-60 细胞抑制试验结果

Table 2 Inhibition against HL-60 cells

化合物	IC ₅₀ / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	18.66
PD	33.02
PT	37.45
多西他塞	0.25

于原人参二醇和原人参三醇。

参考文献:

- [1] Chang Y S, Seo E K, Gyllenhaal C, et al. Panax ginseng: a role in cancer therapy [J]. *Integr Cancer Ther*, 2003, 2: 13-33.
- [2] Popovich D G, Kitts D D. Structure-function relationship exists for ginsenosides in reducing cell proliferation and inducing apoptosis in the human leukemia (THP-1) cell line [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 406(1): 1-8.
- [3] Tian Y, Guo H, Han J, et al. Microbial transformation of 20(S)-protopanaxatriol by *Mucor spinosus* [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68: 678-680.
- [4] Zhang J, Guo H, Tian Y, et al. Biotransformation of 20(S)-protopanaxatriol by *Mucor spinosus* and the cytotoxic structure activity relationships of the transformed products [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68: 2523-2530.
- [5] Nagai M, Ando T, Tanaka N, et al. Chemical studies on the Oriental plant drugs. XXVIII. Saponins and sapogenins of Ginseng. Stereochemistry of the sapogenin of ginsenosides-Rb1, Rb2, and Rc [J]. *Chem Pharm Bull*, 1972, 20: 1212-1216.
- [6] Asakawa J, Kasai R, Yamasaki K, et al. ¹³C-NMR study of Ginseng sapogenins and their related dammarane type triterpenes [J]. *Tetrahedron*, 1977, 33: 1935-1939.
- [7] Sargent J M, Taylor C G. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukaemia [J]. *Br J Cancer*, 1989, 60: 206-210.

紫芝中的一个新三萜

刘超,陈若芸

(中国医学科学院北京协和医学院 药物研究所 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室,北京 100050)

摘要:目的 研究紫芝 *Ganoderma sinense* 子实体的化学成分。方法 通过反复硅胶、凝胶柱色谱进行分离纯化,利用多种波谱技术鉴定化合物的结构。结果 分离鉴定了 4 个化合物,分别为紫芝酸(sinensoic acid, 1)、cerebroside D(2)、pokeweed cerebroside(3)、泥湖鞘酰胺(hemisceramide, 4)。结论 化合物 1 为新化合物,命名为紫芝酸(sinensoic acid),其余化合物均为首次从灵芝属真菌中分离得到。

关键词:紫芝;三萜;sinensoic acid;脑苷

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)01-0008-04

A new triterpene from fungal fruiting bodies of *Ganoderma sinense*

LIU Chao, CHEN Ruoyun

(Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract : Objective To study the chemical constituents from the fungal fruiting bodies of *Ganoderma sinense*. **Methods** Individual constituents, isolated and repeatedly purified on silica gel and Sephadex LH-20 column chromatography, were identified by physicochemical constants and structurally elucidated by spectral methods. **Results** Four compounds were isolated and identified as: sinensoic acid (1), cerebro-

收稿日期:2009-07-15

基金项目:科技部科技基础性工作专项(2007FY130100)

作者简介:刘超(1979—),男,助理研究员,硕士,从事天然产物研究方面的工作。

*通讯作者 陈若芸 Tel: (010) 83161622 E-mail: rych@imm.ac.cn