

转基因西洋参冠瘿组织化学成分研究 (II)

石效健, 朱建华, 杨 丽, 于荣敏*

暨南大学药学院, 广东 广州 510632

摘要: 目的 研究转基因西洋参 *Panax quinquefolium* 冠瘿组织中的化学成分。方法 采用大孔吸附树脂、硅胶柱等色谱技术对西洋参冠瘿组织乙醇提取物进行分离纯化, 并根据理化性质及波谱数据对分离所得的化合物进行结构鉴定。结果 从西洋参冠瘿组织乙醇提取物中分离得到 10 个化合物, 分别鉴定为: 尿嘧啶核苷 (1)、 α -D-呋喃果糖甲苷 (2)、1-O- β -D-吡喃葡萄糖-(2S,3S,4R,8E)-2-[(2'R)-2'-羟基棕榈酰胺]-8-十八烯-1,3,4-三醇 (3, 脑苷脂)、豆甾醇 (4)、奎酸 (5)、奎酸乙酯 (6)、十三碳-6-烯 (7)、二十四烷醇 (8)、邻苯二甲酸二异辛酯 (9)、十六酸甲酯 (10)。结论 化合物 3 为首次从人参属植物中分离得到, 10 个化合物均为首次从转基因西洋参冠瘿组织中分离得到。

关键词: 西洋参; 转基因; 冠瘿组织; 脑苷脂; 奎酸

中图分类号: 284.1/R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)05-0870-04

Chemical constituents from crown gall of transgenic *Panax quinquefolium* (II)

SHI Xiao-jian, ZHU Jian-hua, YANG Li, YU Rong-min

College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Key words: *Panax quinquefolium* L.; transgene; crown galls; cerebroside; decanoic acid

冠瘿组织 (crown gall) 是由根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 感染植株受伤组织而形成。在根瘤农杆菌感染植物的过程中, 该菌所含 Ti 质粒上的一段转移 DNA (Transferred DNA, T-DNA) 被整合到植物细胞核基因组中, 其中的生长素和细胞分裂素基因过量表达植物激素而形成冠瘿组织。冠瘿组织具有生长迅速、激素自主等优点^[1]。本课题组利用植物转基因技术将根瘤农杆菌中 Ti 质粒上的一段 DNA 插入西洋参植物细胞核基因组而得到其表现型——冠瘿组织。

本实验在前期工作基础上^[2-6], 又从西洋参冠瘿组织培养物中分离得到一个脑苷脂类化合物及其他 9 个化合物。经理化性质测试、谱学解析等方法, 分别鉴定为: 尿嘧啶核苷 (1)、 α -D-呋喃果糖甲苷 (2)、1-O- β -D-吡喃葡萄糖-(2S,3S,4R,8E)-2-[(2'R)-2'-羟基棕榈酰胺]-8-十八烯-1,3,4-三醇 (3, 脑苷脂)、豆甾醇 (4)、奎酸 (5)、奎酸乙酯 (6)、十三碳-6-烯 (7)、二十四烷醇 (8)、邻苯二甲酸二异辛酯 (9)、十六酸

甲酯 (10)。化合物 3 为首次从人参属植物中分离得到; 10 个化合物均为首次从转基因西洋参冠瘿组织中分离得到。

1 仪器与材料

熔点用 SGW X-4 型显微熔点仪测定, NMR 用 Bruker AV2400 测定 (TMS 为内标); ESI-MS 用 Bruker esquire 2000 mass spectrometer 测定, 大孔吸附树脂 D-101 (安徽三星大孔树脂有限公司), TRACE METM 型气相色谱-质谱联用仪 (美国菲尼根公司), 柱色谱硅胶 (青岛化工厂硅胶), 硅胶 H 预制薄板 (青岛化工厂), RP-8F254 预制薄板 (Merck HP), 其他试剂均为国产分析纯。

西洋参冠瘿组织为本课题组转导和培养所得, 系由胭脂碱型根瘤农杆菌 C₅₈ 菌株感染诱导西洋参茎, 获得冠瘿组织, 并经多年筛选驯化形成稳定、优良的培养体系。培养条件为 MS 固体培养基, 25 °C 培养 28 d, 采收后于 55 °C 烘干, 备用。

2 实验方法

2.1 提取与分离

收稿日期: 2010-12-24

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目 (104180); 广东省自然科学基金项目 (31891)

作者简介: 石效健 (1985—), 硕士研究生, 现从事天然药物化学与中药生物技术领域研究工作。E-mail: 512421955@qq.com

*通讯作者 于荣敏 Tel: (020)85220386 E-mail: tyrm@jnu.edu.cn

取转基因西洋参冠瘿组织 1 100 g, 用 70%乙醇超声提取 3 次, 每次 30 min。提取液浓缩至干, 用水溶解, 过大孔吸附树脂 D101 柱, 分别用水, 20%、40%、60%、80%、95%乙醇洗脱。回收 60%、80%、95%乙醇洗脱部分, 分别得样品 A、B 和 C。样品 A 经硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱分离, 得化合物 1 和 2。样品 B 经硅胶柱色谱, 以不同比例的氯仿-甲醇洗脱, 得 3 个组分, 组分 3 经硅胶柱色谱, 用展开剂乙醚-醋酸乙酯-甲醇-水 (6:20:1:5 上层) 洗脱, 得化合物 3; 样品 C 反复经硅胶柱色谱分离, 以不同比例的石油醚-醋酸乙酯洗脱, 得化合物 4~10。

2.2 化合物 3 的甲醇解

取 3 mg 化合物 3 溶解于甲醇中, 加入盐酸适量, 回流, 反应液处理后用于 GC-MS 分析。

2.3 化合物 3 高锰酸钾氧化

化合物 3 甲醇溶解产物加入 KMnO_4 适量, 再加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (5%) 终止反应, 挥干, 用石油醚萃取, 所得样品用于 GC-MS 分析。

3 结构鉴定

化合物 1: 白色针状结晶, mp 166~168 °C。ESI-MS m/z : 245 为 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰, 267 为 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 峰, 因此推断化合物 1 的相对分子质量为 244。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5) δ : 8.2 (1H, d, $J = 6.1$ Hz), 6.68 (1H, d, $J = 5.8$ Hz), 5.47 (1H, t, H-3), 4.43 (1H, dd, $J = 12.28, 2.50$ Hz), 4.13 (1H, dd, $J = 12.20, 2.34$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, pyridine- d_5) δ : 164.8 (C-6), 153.2 (C-4), 140.4 (C-2), 103.1 (C-1), 90.7 (C-1'), 87.7 (C-4'), 75.4 (C-2'), 72.3 (C-3'), 62.9 (C-5')。综合上述氢谱、碳谱数据, 并与文献中的尿嘧啶核苷 NMR 数据^[7]对照基本一致, 故将化合物 1 鉴定为尿嘧啶核苷。

化合物 2: 白色粉状结晶。ESI-MS m/z : 193 为 $[\text{M}-\text{H}]^+$ 峰, 217 为 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 峰, 因此推断化合物 2 的相对分子质量为 194。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5) δ : 4.57 (1H, m, H-5), 4.36 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-1), 4.35 (1H, dd, $J = 9.4, 3.3$ Hz, H-6), 4.29 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-1), 4.24 (1H, dd, $J = 9.4, 3.5$ Hz, H-6), 3.57 (3H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, pyridine- d_5) δ : 109.3 (C-2), 84.9 (C-5), 83.2 (C-3), 78.8 (C-4), 62.9 (C-6), 61.8 (C-1), 49.2 (C-7)。综合上述氢谱、碳谱数据, 并与文献中的 α -D-呋喃果糖甲苷 NMR 数据^[8-9]对照基本一致, 故将化合物 2 鉴定为 α -D-呋喃果糖

甲苷。

化合物 3: 白色无定形粉末, mp: 185~187 °C。ESI-MS m/z : 754 为 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 峰, 766 为 $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ 峰, 570 为 $[\text{M}-162-\text{H}]^+$ 峰, 因此, 推断化合物 3 的相对分子质量为 731。由 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据和 HMBC 谱分析可知: δ 1.22~1.32 的强质子信号及 δ 0.83 (6H, t, $J = 16.2$ Hz) 提示有 2 个脂肪烷基链; 信号 δ 8.54 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, NH) 和 δ 176.28 (CONH), δ 5.27 (1H, m) 和 δ 52.4 (CH-NH) 及连氧碳信号 δ 76.54, 75.79, 73.08, 71.10 显示有酰胺键和多羟基存在。以上数据表明, 化合物 3 系神经酰胺类化合物^[10]。双键质子信号 δ 5.43, 5.50 为多重峰, 表明双键构型为 *E* 型^[11]。化合物 3 甲醇解产物经 GC-MS 分析为羟基棕榈酸甲酯, 证明脂肪酸长链为 α -羟基-十六碳酸, 并由此推出另外一条链的长度为十八碳。高锰酸钾氧化产物经 GC-MS 分析为正十碳酸, 由此推测双键的位置在 8 位。化合物 3 中 H-2 的化学位移 5.27, $^{13}\text{C-NMR}$ 谱中 δ 71.1 (C-1), 52.4 (C-2), 76.5 (C-3), 73.0 (C-4), 176.2 (C-1') 和 73.0 (C-2') 和文献报道的 (2*S*, 3*S*, 4*R*)-神经酰胺苷元的数据一致^[12]。因此, C-1, C-3, C-4 的构型定为 (2*S*, 3*S*, 4*R*); C-2' 的构型为 *R*。 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据及碳谱数据与文献^[12]一致。综合化合物 3 的理化性质和谱学数据, 将其鉴定为脑苷脂类化合物, 其化学名称为: 1-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-(2*S*, 3*S*, 4*R*, 8*E*)-2-[(2'*R*)-2'-羟基棕榈酰胺]-8-十八烯-1, 3, 4-三醇, 结构式见图 1。

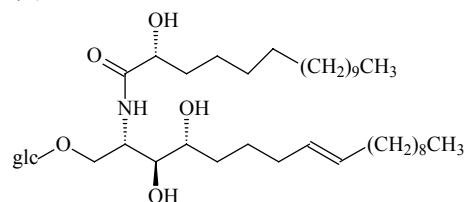


图 1 化合物 3 的化学结构式

Fig. 1 Structure of compound 3

化合物 3 的理化性质和谱学数据: 白色无定形粉末, mp 185~187 °C。ESI-MS m/z : 754 为 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 峰, 766 为 $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ 峰, 570 为 $[\text{M}-162-\text{H}]^+$ 峰。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5) δ : 0.85 (6H, t-like, $J = 6.8$ Hz, $2 \times \text{CH}_3$), 1.22 [s, $(\text{CH}_2)_n$], 4.17 (2H, m, H-4, 3''), 4.27 (1H, m, H-3), 4.50 (1H, dd, $J = 6.2, 7.1$ Hz, H-1), 4.56 (1H, m, H-2'), 4.69 (1H, dd, $J = 6.6, 6.6$ Hz, H-1), 5.26 (1H, m, H-2), 5.47 (1H, dt, $J =$

5.8, 15.6 Hz, H-8), 5.52 (1H, dt, $J = 5.6, 15.6$ Hz, H-9), 8.52 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, N-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, pyridine- d_5) δ : 14.9 (CH₃), 23.0, 26.4, 27.2, 30.1~30.6, 32.7 (C-7), 32.7 (C-10), 33.6, 33.9, 34.5, 36.2 (all CH₂), 52.4 (C-2), 63.2 (C-6''), 71.1 (C-1), 72.1 (C-4''), 73.0 (C-4, 2'), 75.7 (C-2''), 76.5 (C-3), 79.0 (C-3''), 79.1 (C-5''), 106.2 (C-1''), 130.6 (C-9), 130.8 (C-8), 176.2 (C-1').

化合物 4: 无色针状结晶, mp 147~149 °C。ESI-MS m/z : 411 为[M-H]⁺峰, 435 为[M+Na]⁺峰。因此, 推断化合物 4 的相对分子质量为 412。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.52 (m, H-3), 5.35 (m, H-6), 5.15 (dd, $J = 8.5, 15.1$ Hz, H-22), 5.02 (dd, $J = 8.6, 15.2$ Hz, H-23)。 $^1\text{H-NMR}$ 高场区的 δ 1.01 (3H, s, H-19)和 δ 0.68 (3H, s, H-18)为 2 个角甲基信号。根据以上数据, 推测化合物 4 可能为甾醇类化合物。化合物 4 的 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl₃) 数据如下: δ : 37.2 (C-1), 31.8 (C-2), 71.8 (C-3), 42.3 (C-4), 140.8 (C-5), 121.7 (C-6), 31.9 (C-7), 31.7 (C-8), 51.2 (C-9), 36.5 (C-10), 21.0 (C-11), 39.7 (C-12), 42.2 (C-13), 56.8 (C-14), 24.4 (C-15), 29.2 (C-16), 56.0 (C-17), 12.0 (C-18), 19.3 (C-19), 40.4 (C-20), 21.0 (C-21), 138.3 (C-22), 129.3 (C-23), 50.2 (C-24), 31.9 (C-25), 21.1 (C-26), 21.2 (C-27), 25.4 (C-28), 12.2 (C-29)。综合上述氢谱、碳谱数据, 并与文献中的豆甾醇 NMR 数据^[13]对照基本一致, 故将化合物 4 鉴定为豆甾醇。

化合物 5: 无色油状液体, EI-MS m/z : 172, 143, 129, 87, 73, 60, 符合奎酸裂解规律。经 NIST98 标准谱库的检索, 确定化合物 5 为奎酸。

化合物 6: 无色油状液体, EI-MS m/z : 200, 157, 155, 101, 88, 70, 61, 29, 符合奎酸乙酯裂解规律。经 NIST98 标准谱库的检索, 确定化合物 6 为奎酸乙酯。

化合物 7: 白色无定形粉末, EI-MS m/z : 182, 159, 138, 111, 97, 82, 57, 符合十三碳-6-烯裂解规律。经 NIST98 标准谱库的检索, 确定化合物 7 为十三碳-6-烯。

化合物 8: 白色无定形粉末, EI-MS m/z : 354, 336, 308, 278, 250, 222, 195, 167, 139, 125, 111, 97, 83, 69, 57, 43, 符合二十四烷醇裂解规律。经 NIST98 标准谱库的检索, 确定化合物 8 为二十四烷醇。

化合物 9: 白色无定形粉末, EI-MS m/z : 280, 279, 168, 167, 149, 113, 83, 70, 57, 符合邻苯二甲酸

二异辛脂裂解规律。经 NIST98 标准谱库的检索, 确定化合物 9 为邻苯二甲酸二异辛酯。

化合物 10: 无色油状物, EI-MS m/z : 270, 227, 185, 171, 143, 129, 101, 87, 74, 43。化合物 10 符合十六酸甲酯裂解规律。经 NIST98 标准谱库的检索, 确定化合物 10 为十六酸甲酯。

4 讨论

化合物 3 属脑苷脂类活性成分, 本实验首次从人参属植物中分离得到。脑苷脂类为细胞膜的结构成分, 主要存在于哺乳动物的脑组织、表皮、心脏、肝脏、红细胞的膜组织中, 在高等植物中也有零星分布^[14-15]。近代研究表明, 脑苷脂类化合物具有多种生物活性, 因而愈来愈受到科学家们的高度关注。我国学者先后从灵芝、雪莲等名贵药材中分离得到了几种神经鞘脂类化合物^[14-15]。

脑苷脂类药物临床上主要用于治疗神经系统疾病, 改善老年性脑功能衰退等病症。此外, 脑苷脂类化合物在抗肿瘤方面也显示出一定的应用前景。鞘糖脂可作为肿瘤标记物, 临床应用鞘糖脂合成抑制剂通过阻断肿瘤转移途径和肿瘤细胞膜鞘糖脂合成来促使患者产生抗体和活化 T 细胞, 从而杀灭肿瘤细胞; 鞘糖脂介导的黏附和信号转导可作为肿瘤治疗的分子靶点, 直接运用抗鞘糖脂的单抗或将其作为载体可用于肿瘤导向治疗; 肿瘤相关鞘糖脂抗原用于构建肿瘤疫苗, 应用这些抗原辅以佐剂构建的疫苗在某些肿瘤治疗中取得了成功; 降低神经酰胺水平的代谢酶拮抗剂具有潜在的抗肿瘤活性, 可能成为将来的抗肿瘤制剂等^[16-17]。

本研究首次从人参属的转基因西洋参冠瘿组织中分离得到重要天然活性的脑苷脂类化合物, 从而为该类生物活性成分的新资源开发和利用提供了新的科学资料。

参考文献:

- [1] Zhang L H, Li J M. Advance of growth modulation and genesis gene of plant crown gall [J]. *Acta Bot Boreali-Occidentalia Sin*, 2002, 22(5): 1282-1288.
- [2] Yu R M, Jin Q X, Sun H, et al. The growth characteristics and ginsenosides isolation of suspension-cultured crown gall of *Panax quinquefolium* [J]. *Chin J Biotechnol*, 2005, 21(5): 754-758.
- [3] 朱建华, 于荣敏, 严春艳, 等. 转基因西洋参冠瘿组织中人参皂苷类成分分离鉴定 [J]. *中国药学杂志*, 2008, 43(6): 412-415.

- [4] 朱建华, 李卫民, 于荣敏. 转基因西洋参冠瘿组织化学成分研究 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1461-1463.
- [5] 张爱丰, 朱建华, 于荣敏. 转基因西洋参冠瘿组织培养基中人参皂苷类成分的分离鉴定 [J]. 暨南大学学报: 自然科学版, 2008, 29(3): 286-289.
- [6] Zhu J H, Yu R M, Yang L, *et al.* Two new compounds from transgenic *Panax quinquefolium* [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(5): 339-342.
- [7] 彭 燕, 郑建仙, 黄月明, 等. 海燕中含氮化合物的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 208-210.
- [8] 龙志敏, 吴立军, 孙博航, 等. 板栗种仁的化学成分 (IV) [J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(8): 614-616.
- [9] 袁久志, 吴立军, 陈英杰, 等. 土茯苓化学成分分离与鉴定 [J]. 中国药物化学杂志, 2004, 14(5): 291-293.
- [10] Sugiyama S, Honda M, Higuchi R. Biologically active glycosides from asteroidea. XXVI. Stereochemistry of the four diastereomers of ceramide and ceramide lactoside [J]. *Liebigs Ann Chem*, 1991(4): 349-356.
- [11] 华会明, 程卯生, 李 锐. 柳穿鱼中神经酰胺类成分的结构鉴定 [J]. 中国药物化学杂志, 2000, 10(1): 57-59.
- [12] Kang S S, Kim J S, Xu Y N, *et al.* Isolation of a new cerebroside from the root bark of *Aralia elata* [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62: 1059-1060.
- [13] 蒋 璘, 丁怀伟, 宋少江. 腺梗豨莶化学成分分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(6): 444-446.
- [14] 于能江, 王春兰, 郭顺星. 灵芝-共生真菌的脑苷类成分研究 [J]. 中草药, 2003, 34(3): 206-209.
- [15] 任玉琳, 杨峻山, 陈建民. 雪莲鞘胺醇的结构鉴定 [J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(6): 413-415.
- [16] 陈 颖, 吕洁丽, 段金殿, 等. 从生物进化看脑苷脂类化合物的分布及其生物活性研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2009, 36(2): 121-126.
- [17] 王秀敏, 邓英杰. 神经酰胺的抗肿瘤特性 [J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(2): 150-155.

欢迎订阅

Chinese Herbal Medicines (CHM)

我国第一份中药专业的英文期刊——*Chinese Herbal Medicines* (CHM) (中草药英文版) 经国家新闻出版总署 (新出综合[2008]1343 号文件) 批准, 国内统一连续出版号为: CN12—1410/R, 已于 2009 年 10 月正式创刊。

CHM 由天津药物研究院和中国医学科学院药用植物研究所主办, 天津中草药杂志社出版。中国工程院院士、中国医学科学院药用植物研究所名誉所长肖培根教授担任主编; 中国工程院院士、天津药物研究院刘昌孝研究员, 天津药物研究院院长汤立达研究员, 中国医学科学院药用植物研究所所长陈士林研究员共同担任副主编; 天津药物研究院医药信息中心主任、《中草药》杂志执行主编陈常青研究员担任编辑部主任。

办刊宗旨 以高起点、国际化为特点, 继承和发扬祖国医药学遗产, 报道和反映中草药研究最新进展, 宣扬我国中草药的传统特色, 加强与世界各国在传统药物研究的经验交流, 在中医和西医、传统与现代、东方与西方之间架起一座理解和沟通的桥梁, 促进中药现代化、国际化。

主要栏目 综述与述评、论著、快报、简报、文摘、信息和国际动态、人物介绍、来信、书评等栏目。

读者对象 国内外从事中医药研究、管理、监督、检验和临床的专业技术人员。

CHM 邀请相关领域的院士和国内外知名专家加盟, 组建一支国际化、高水平、精干的编委会队伍 (第一届编辑委员会由 49 位专家组成, 其中院士 10 名, 国外编委 19 名)。吸引国内外高质量的稿件, 提高期刊的学术质量; 坚持按照国际标准编排, 加强刊物规范化和标准化, 充分利用计算机、网络技术和英语, 加强与国际知名科技期刊的交流合作; 充分发挥中医药特色, 争取在较短时间内进入国际最著名的检索系统——美国科学引文索引 (SCI), 把 CHM 办成国际知名期刊之一。

欢迎广大作者踊跃投稿! 欢迎广大读者积极订阅! 自办发行, 直接与编辑部订阅!
本刊已正式开通网上在线投稿系统。欢迎投稿、欢迎订阅! 网址: www.tiprpress.com

Chinese Herbal Medicines (CHM)编辑部

天津编辑部

地址: 天津市南开区鞍山西道 308 号

邮编: 300193

E-mail: chm@tiprpress.com

Tel: (022)27474913

Fax: (022)23006821

北京编辑部

地址: 北京市海淀区马连洼北路 151 号

邮编: 100193

E-mail: chm@tiprpress.com

Tel: (010)62894436

Fax: (010)62894436

开户银行: 兴业银行天津南开支行

账号: 44114010010081504

户名: 天津中草药杂志社