

壮药“国虾薄”(绞股蓝)热处理产物中 人参皂苷 Rg₃ 的分离与鉴定

邢韶芳,陈道金,刘慧敏,朴香兰*

(中央民族大学中国少数民族传统医学研究院,北京 100081)

[摘要] **目的:**分离、鉴定国虾薄(绞股蓝)热处理产物中皂苷类化合物。**方法:**国虾薄在温度 125 ℃、压力 0.24 MPa 的条件下,加热处理 3 h,用 80% 乙醇加热回流提取 3 h,通过大孔树脂 HP-20、硅胶柱及反相柱色谱等分离手段对其热处理产物进行分离,并用离子阱飞行时间质谱(LCMS-IT-TOF)、核磁共振波谱(NMR)等数据鉴定其成分。**结果:**从壮药国虾薄热处理产物中首次分离获得 20(S)-人参皂苷 Rg₃ 和 20(R)-人参皂苷 Rg₃ 两种不同构型的稀有人参皂苷。**结论:**通过热处理的方法能从国虾薄中分离得到人参皂苷 Rg₃,这为人参皂苷 Rg₃ 的制备提供了一个新思路。

[关键词] 国虾薄(绞股蓝);热处理;人参皂苷 Rg₃
[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)09-0120-05
[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014090120
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfix.000049.html>
[网络出版时间] 2014-02-25 11:27

[收稿日期] 20131119(024)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274186)
[第一作者] 邢韶芳,在读硕士,从事有效成分及其分子机制研究,Tel:13261594150, E-mail:123225452@qq.com
[通讯作者] *朴香兰,博士,副研究员,博士生导师,从事天然药物化学研究,Tel:13126602088, Fax:010-68939905, E-mail: xlpiao@163.com

分总生物碱含量比逐渐下降,在平贝母野生品中结果相同。但本次实验的样本量较少,要真正了解平贝母总生物碱动态变化过程需通过加大样本量进行数理统计分析,寻找各生长部位总生物碱与生长发育期的内在关联。平贝母地下部分生物碱种类无太多变化,而栽培品果期地上部分生物碱种类要多于其他各时期的各生长部位。

[参考文献]

[1] 李兴斌,高燕飞,李吉良.平贝母化学成分及药理活性研究进展[J].中药研究与信息,2004,21(4):28.
[2] 于晓琳,季晖,王长礼,等.贝母的药理作用研究状况[J].中草药,2000,31(4):313.
[3] 中华人民共和国药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:化学工业出版社,2010:90.
[4] 王艳红,吴晓民,郑友兰,等.不同产地和采收期的平贝母总生物碱含量[J].中药材,2006,29(1):8.
[5] 李萍,曾令杰,李松林.无紫外吸收的贝母总生物碱定量分析方法研究[J].中国药学杂志,2002,37(8):614.
[6] Ding K, Lin G, Ho Y P. Prederivatization and high-performance liquid chromatographic analysis of bulbous of

Fritillaria[J]. J Pharm Sci, 1996, 85(11):1174.
[7] 李松林,李萍,曾令杰.伊犁贝母中西贝素和西贝素苷的高效液相色谱-蒸发光散射检测法[J].药学学报,2001,36(4):300.
[8] Li S L, Chan S W, Li P. Pre-column derivatization and gas chromatographic determination of alkaloids in bulbous of Fritillaria[J]. J Chromatogr A, 1999, 859(2):183.
[9] 乐大勇,王琼,张隽,等.复方贝母散超微粉体、细粉的化学性质与药效学对比[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(14):69.
[10] 陈茂,刘美艳,胡翠兰. TLC 法测定翁沥通片中贝母素乙的含量[J].中国药房,2008,19(12):936.
[11] Kitajima J, Komori T, Kawasaki T, et al. Basic steroid saponins from aerial parts of Fritillaria Thunbergii [J]. Phytochemistry, 1982, 21(1):187.
[12] 王振月,侯素云,王志林,等.不同产地不同物候期平贝母的贝母乙素研究[J].中药材,2006,29(11):1135.
[13] 侯立波,陈延宝.平贝母化学成分的含量测定方法学研究进展[J].黑龙江医药,2007,20(2):158.

[责任编辑 邹晓翠]

Isolation and Identification of Ginsenoside Rg₃ from Heat-processed Gocaekmbaw of Zhuang-medicine

XING Shao-fang, CHEN Dao-jin, LIU Hui-min, PIAO Xiang-lan*

(Institute of Chinese Minority Traditional Medicine, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

[Abstract] **Objective:** To isolate and identify saponins from Zhuang-medicine Gocaekmbaw (*Gynostemma pentaphyllum*) after heat-processing. **Method:** The leaves of gocaekmbaw were steam-heated at 125 °C and 0.24 MPa for 3 h, then extracted with 80% ethanol for 3 h. The extracts were isolated with chromatography using HP-20, silica gel and reversed ODS column. The constituents isolated from gocaekmbaw after heat-processing were identified with ¹H-NMR, ¹³C-NMR and LCMS-IT-TOF spectra. **Result:** Two different configurations of saponins were obtained from the heat-processed Gocaekmbaw. They were identified as 20 (*R*)-ginsenoside Rg₃ and 20 (*S*)-ginsenoside Rg₃ and there was no data reported before the present study. **Conclusion:** Through the method of heat-processing, ginsenoside Rg₃ can be gained from Gocaekmbaw. This may offer a new direction to the preparation of ginsenoside Rg₃.

[Key words] Gocaekmbaw (*Gynostemma pentaphyllum*); heat-processing; ginsenoside Rg₃

壮药“国虾薄”即绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino, 又名甘茶蔓、神仙草、遍地生根等,是葫芦科绞股蓝属的多年生草质藤本植物,在我国主要生长在秦岭及长江以南的地区。其始载于明代的《救荒本草》,作野菜使用,《本草纲目》中开始将其以“乌莓”之名入药^[1]。《中国壮药学》:“通调三道两路,清热解毒,止咳祛痰。用于慢性气管炎,病毒性肝炎,肾盂肾炎,胃肠炎,泄泻,高血压,动脉硬化症,高血脂,痈疮肿毒,蛇咬伤”^[2]。国虾薄中主要化学成分为皂苷和多糖,另外还含有少量的黄酮类化合物、萜类、有机酸、蛋白质、维生素、脂肪、纤维等成分以及锌、铜、镁、铁、锰、硒等微量元素。国虾薄具有抗肿瘤^[3]、降血糖^[4]、抗衰老^[5]、抗肝纤维化^[6]等药理作用。其主要有效成分绞股蓝皂苷(gypenoside 或 gynosaponin, Gyp)过量服用亦无副作用,因而在保健食品和新型药品研发上都有巨大的应用前景,是一种新的药食两用植物资源^[7-8]。

作为五加科之外含有人参皂苷类化学成分的植物之一,近40余年,国内外学者已从国虾薄中分离得到140多个Gyp,其中包含了Rb₁, Rb₃, Re, Rd等人参皂苷类成分^[9]。有研究发现,人参属植物中药用有效成分作用活性直接与低极性、稀有或微量人参皂苷直接相关,如稀有人参皂苷Rh₂, Rg₃, Rb₃等药效更为珍贵,在某些疑难杂症治疗方面显示独特的疗效^[10]。高温处理可使人参中的部分皂苷转化

成活性更强的成分^[11],并采用热加工转化技术已获取结构新颖的化合物,为新药的研制提供极为有价值的先导化合物,用此方法开发人参加工品,并创造出巨大的经济效益^[12-13]。Gauhar等^[14]研究发现绞股蓝热处理产物的醇提物具有更好的激活AMPK活性。因此,热加工可作为一种方法,从国虾薄中获得更多的活性成分。前期实验发现,通过高温高压的处理方法,不仅获得了4种稀有绞股蓝活性皂苷^[15-16],且其含量明显增加。本文利用大孔树脂HP-20、硅胶柱及反相色谱方法,继续对国虾薄热处理产物中的皂苷类化合物进行分离、鉴定,以期获得新的更有价值的先导化合物,为新型抗肿瘤药物的制备提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与药材 大孔树脂(日本三菱化学),氘代甲醇(Aldrich Chemical公司,美国),色谱纯乙腈(Fisher公司,美国),水为超纯水(Heal Force,香港),其余化学试剂均为分析纯,购自北京化工厂。国虾薄购于同仁堂药店(北京),留样于中央民族大学中国少数民族传统医学研究院民族药物研究所实验室,并设样品号(GP2011-01)。

1.2 仪器与设备 岛津LC-6AD型半制备液相色谱系统(Shimadzu公司,日本),DPBRUKER DPX 300型核磁共振仪(布鲁克公司,瑞士),LDZM-60KCS型立式压力蒸气灭菌器(上海申安医疗器械厂),半制备柱使用Shim-pack PREP-ODS(H)KIT柱

(10 mm × 250 mm, 5 μm) (Shimadzu 公司, 日本) 和 BDS HYPERSIL C₁₈ 柱 (10 mm × 250 mm, 5 μm) (Thermo 公司, 美国)。液相色谱离子阱飞行时间串联质谱 (LCMS-IT-TOF) (Shimadzu 公司, 日本), 配有 LC-20AD 泵、SPD-M20A 紫外检测器、CBM-20A 控制器、SIL-20A 自动进样器、CTO-10AS vp 控温箱及 LCsolution 软件。质谱条件: ESI 离子源, 负离子扫描; 扫描范围 m/z 100 ~ 1 500; 加热模块温度 200 ℃, CDL 温度 200 ℃, 雾化气流速 1.5 L·min⁻¹, 干燥气体压力 103.0 kPa, IT 真空度 1.8×10^{-2} Pa, TOF 真空度 1.9×10^{-4} Pa, 检测器电压 1.57 kV, 离子源电压 3.5 kV。

1.3 方法

1.3.1 国虾薄的热加工处理 国虾薄 (6 kg) 在温度 125 ℃、压力 0.24 MPa 条件下加热 3 h, 用 8 倍量的 80% 乙醇加热回流提取 3 次, 每次提取 3 h, 得到 0.81 kg 的国虾薄热处理产物的乙醇提取物。

1.3.2 国虾薄热处理产物成分的分离 取 0.5 kg 的国虾薄热处理产物的乙醇提取物, 加入适当的水混悬, 上样于大孔树脂 HP-20, 分别用 0%, 25%, 50%, 75%, 95% 乙醇溶液洗脱。取国虾薄热处理产物的 95% 乙醇洗脱物 (200 g) 进行硅胶柱色谱, 以二氯甲烷-乙醇 (10:1~4:1) 梯度洗脱, 薄层色谱配合检识, 得到 10 个组分。第 8 个组分再经 YMC 反相柱色谱, 50%~90% 的乙醇溶液洗脱, 得到 6 个组分 (HGP-95%-8-1 ~ HGP-95%-8-6)。对组分 HGP-95%-8-3, 利用岛津 LC-6AD 半制备液相系统, 以 46% 乙腈-水作为流动相, 流速 5 mL·min⁻¹, 通过色谱柱 Shim-pack PREP-ODS (H)。KIT 柱 (20 mm × 250 mm, 5 μm) 分离得到化合物 1 (35 mg) 和化合物 2 (48 mg)。

2 结构鉴定

2.1 化合物 1 白色针状晶体。LC-MS-IT-TOF 负离子模式给出 m/z 783.490 5 [M-H]⁻, 针对 m/z 783.490 5 进行 MS-MS 分析结果, 结构碎片分别为 m/z 621.433 9 [M-H-glc]⁻, 459.382 8 [M-H-glc-glc]⁻ 和 375.290 0 [M-H-glc-glc-84]⁻, 表明化合物 1 中含有 2 个葡萄糖基, 结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 确定分子式为 C₄₂H₇₂O₁₃。通过对 MS (图 1) 和 ¹H-NMR (表 1)、¹³C-NMR 谱 (表 2) 的分析及与已知皂苷的对照品相比较, 化合物 1 鉴定为 20 (S)-人参皂苷 Rg₃^[17]。

2.2 化合物 2 白色无定型粉末。在与化合物完全相同的 LCMS-IT-TOF 的条件下, 化合物 2 的质谱

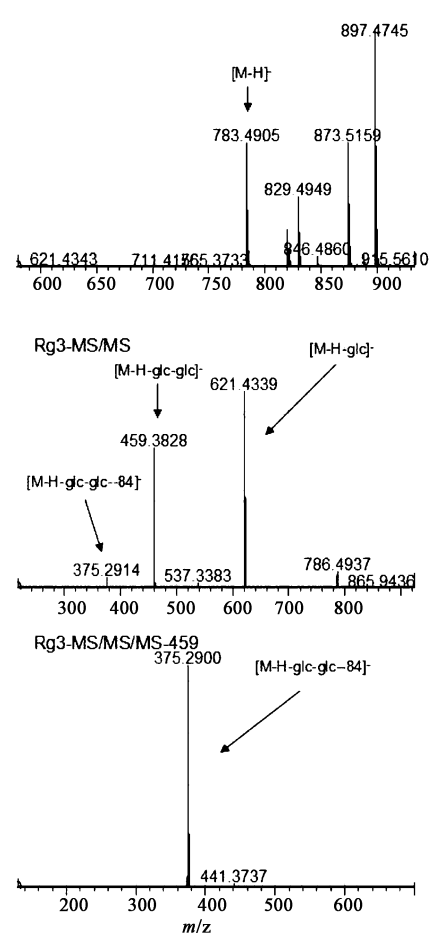


图 1 化合物 1, 2 的一级、二级和三级质谱

数据与化合物 1 的质谱数据相同, 初步推测化合物 2 为 20 (S)-人参皂苷 Rg₃ 的对应异构体, 即为 20 (R)-人参皂苷-Rg₃。为进一步鉴定化合物 2 的结构, 应用核磁共振技术, 得到化合物 2 的 ¹H-NMR (表 1), ¹³C-NMR 谱 (表 2), 经分析发现, 化合物 2 的 ¹³C-NMR 谱数据与化合物 1 的非常相似, 仅 C-17 (δ 50.6), C-21 (δ 22.7), C-22 (δ 43.2) 的化学位移有明显的差异, 在化合物 1 中, 它们分别为 δ 54.6, 26.5, 39.5。此数据差异符合 Tanaka 总结的原人参二醇 C-20 位差向异构体的位移规律^[18-19]: 在吡啶溶液中, 原人参二醇 20 (R)-和 20 (S)-差向异构体的 C-17, C-21 和 C-22 化学位移之差分别为 -4.0, -4.2, 7.3。同时, 由二者的 ¹H-NMR 谱数据, 可发现化合物 2 的 ¹H-NMR 谱数据与化合物 1 的 ¹H-NMR 谱数据的差别在 H-22a 和 H-23b 位质子以及 H-16 和 H-17 位质子以及 H-18, H-26, H-27 和 H-30 位甲基的共振信号, 如表 1, 这与文献 [20] 报道一致。由此确定化合物 2 为 20 (R)-人参皂苷 Rg₃。

3 结果与讨论

人参皂苷 Rg₃ 是从红参和三七叶中提取分离得

表 1 化合物 1,2 的核磁共振氢谱数据(600 MHz, 吡啶-*d*₅) Hz

¹ H	化合物 1	化合物 2	¹ H	化合物 1	化合物 2
1 α	0.76	0.76	21	1.43(s)	1.41(s)
1 β	1.52	1.51	22	2.06,1.69	1.79,1.71
2 α	2.18(dd,4.5,13.6)	2.19(dd,3.6,10.5)	23	2.38,2.29	2.37,2.49
2 β	1.83	1.82	24	5.31(t,7.2)	5.30(t,7.4)
3	3.28(dd,4.2,11.2)	3.29(dd,4.8,11.4)	26	1.65(s)	1.71(s)
5	0.68	0.69	27	1.62(s)	1.67(s)
6 α	1.50	1.50	28	1.30(s)	1.32(s)
6 β	1.36	1.37	29	1.11(s)	1.12(s)
7 α	1.22	1.24	30	0.95(s)	0.99(s)
7 β	1.47	1.48	3-O-inner-Glc-1	4.93(d,7.2)	4.95(d,7.4)
9	1.41	1.42	2	4.24	4.24
11 α	2.01	2.00	3	4.16	4.17
11 β	1.54	1.54	4	4.13(t,7.6)	4.15(t,7.8)
12	3.93	3.94	5	3.92	3.92
13	2.03	2.03	6	4.56(dd,2.6,11.8),4.36	4.57(dd,2.8,11.8),4.36
15 α	1.04	1.04	Outer-Glc-1	5.37(d,7.6)	5.39(d,7.8)
15 β	1.59	1.59	2	4.15(t,7.8)	4.16(t,9.6)
16 α	1.90	1.95	3	4.26	4.27
16 β	1.41	1.37	4	4.34	4.35
17	2.37(dd,7.2,10.2)	2.43	5	3.94	3.96
18	0.97(s)	1.03(s)	6	4.49(dd,3.6,11.8), 4.42(dd,4.5,11.4)	4.50(dd,3.8,11.6), 4.43(dd,3.6,11.6)
19	0.80(s)	0.82(s)			

表 2 化合物 1,2 的核磁共振碳谱数据
(150 MHz, 吡啶-*d*₅)

¹³ C	化合物 1	化合物 2	¹³ C	化合物 1	化合物 2
1	39.1	38.9	22	39.5	43.2
2	26.6	26.6	23	22.8	22.6
3	88.7	88.9	24	126.1	126.0
4	39.5	39.7	25	130.6	130.8
5	56.1	56.3	26	25.6	25.8
6	18.2	18.4	27	16.8	17.7
7	35.6	35.2	28	28.0	28.1
8	39.8	40.0	29	16.6	16.6
9	50.2	50.4	30	17.4	17.3
10	36.7	36.9	3-O-inner-Glc-1	104.9	105.1
11	31.8	32.2	2	83.3	83.5
12	70.8	70.8	3	77.8	78.0
13	48.6	49.2	4	71.4	71.7
14	51.5	51.8	5	78	78.1
15	31.1	31.6	6	62.6	62.8
16	26.9	26.7	Outer-Glc-1	105.9	106.1
17	54.6	50.6	2	77.0	77.2
18	15.6	15.8	3	78.2	78.3
19	16.2	16.5	4	71.4	71.7
20	72.7	73.0	5	77.9	78.3
21	26.5	22.7	6	62.5	62.7

到的四环三萜类二醇型皂苷,存在 S, R 型异构

体^[21]。由 20(*R*)-人参皂苷 R_{g₃} 有效成分制备的参一胶囊,属于国家一类抗癌新药,具有诱导肿瘤细胞凋亡、选择性抑制肿瘤细胞黏附和浸润、抑制肿瘤新生血管形成及调节机体免疫功能等作用^[22]。赵文杰等^[23]研究发现,20(*S*)-人参皂苷-R_{g₃} 对前列腺癌 PC-3M 细胞有显著的诱导其凋亡的作用。可见,两种构型的人参皂苷 R_{g₃} 均在肿瘤治疗中发挥着极其重要的作用。在靶向药物治疗中,由于其可以改善患者食欲,具有明显的免疫增强及放化疗增敏作用^[24],在综合治疗模式中,已被广泛用作辅助药物。

在高温高压的条件下,人参中的部分皂苷能转化成活性更强的成分^[25-26],这与人参皂苷的糖键水解断裂有关^[27-28]。由此推测,国虾薄热处理产物中人参皂苷-R_{g₃} 是由国虾薄原药材中的人参皂苷糖键水解断裂生成的,因人参皂苷 R_{g₃} 属原人参二醇型皂苷,其极可能是由国虾薄原药材中人参皂苷 Rb₁,Rd 等原人参二醇型皂苷 C-20 位糖键水解断裂而成的,下一步拟对国虾薄热处理产物人参皂苷 R_{g₃} 的转化机制作进一步的研究与探讨。

[参考文献]

[1] 史琳,赵红,张璐雅,等. 绞股蓝药理作用的研究进展[J]. 药物评价研究, 2011, 34(2):125.
[2] 崔箭,唐丽. 中国少数民族传统医学概论[M]. 北

京:中央民族大学出版社,2007.

[3] 刘华,司履生. 绞股蓝总皂甙对体外培养肺癌细胞的抑制作用[J]. 西安医科大学学报:医学版,1994,15(4):346.

[4] 杜小燕,侯颖,覃华,等. 绞股蓝多糖对 2 型糖尿病大鼠血糖的影响及其机制初步研究[J]. 科学技术与工程,2011,11(24):5754.

[5] 刘青青,吴景东. 绞股蓝提取液对自然衰老影响的实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2008,10(6):203.

[6] 冯琴,李雪梅,彭景华,等. 绞股蓝总皂苷对二甲基亚硝胺诱导的大鼠肝纤维化的防治作用[J]. 中国中药杂志,2012,37(4):505.

[7] 丁树利,朱兆仪,李勇. 绞股蓝及同属植物的生药学研究[J]. 中国药学杂志,1994,29(2):79.

[8] 周建华,张兴亚. 绞股蓝开发研究新进展及应用[J]. 食品科技,2010,35(2):74.

[9] 史琳. 绞股蓝的化学成分研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2010:8.

[10] Wang C Z, Xie J T, Fishbein A, et al. Antiproliferative effects of different plant parts of *Panax notoginseng* on SW480 human colorectal cancer cells [J]. *Phytother Res*, 2009, 23(1):6.

[11] Kim E J, Jung I H, Van Le T K, et al. Ginsenosides Rg₅ and Rh₃ protect scopolamine-induced memory deficits in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 146(1):294.

[12] Lee Y J, Kim H Y, Kang K S, et al. The chemical and hydroxyl radical scavenging activity changes of ginsenoside-Rb1 by heat-processing [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(16):4515.

[13] Lee W H, Choi J S, Kim H Y, et al. Heat-processed neoginseng, KG-135, down-regulates G1 Cyclin-dependent kinase through the proteasome-mediated pathway in HeLa cells [J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(2):467.

[14] Gauhar R, Hwang S L, Jeong S S, et al. Heat-processed *Gynostemma pentaphyllum* extract improves obesity in ob/ob mice by activating AMP-activated protein kinase [J]. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(9):1607.

[15] 刘慧敏,陈道金,朴香兰. 热处理前后壮药“国虾薄”中皂苷类化合物研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(15):106.

[16] 朴香兰,吴倩,杨静,等. 绞股蓝热处理产物对 A549 细胞的抑制活性[J]. 中央民族大学学报:自然科学版,2012,21(1):49.

[17] Yang C R, Kasai R, Zhou J, et al. Dammarane saponins of leaves and seeds of *panax-notoginseng* [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(6):1473.

[18] Asakawa J, Kasai R, Yamasakai K, et al. ¹³C-NMR study of ginseng sapogenins and their related dammarane type triterpenes [J]. *Tetrahedron*, 1977, 33(15):1935.

[19] Tanaka O. Application of ¹³C-nuclear magnetic resonance spectrometry to structural studies on glycosides; Saponins of *panax* spp. and natural sweet glycosides [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1985, 105(4):323.

[20] 滕荣伟,李海舟,王德祖,等. 三个原人参二醇型单糖链配糖体的 NMR 信号全指定[J]. 波谱学杂志,2000,17(6):461.

[21] Xie H T, Wang G J, Sun J G, et al. High performance liquid chromatographic-mass spectrometric determination of ginsenoside Rg₃ and its metabolites in rat plasma using solid-phase extraction for pharmacokinetic studies [J]. *J Chromatogr B, Analyt technol in Biomed Life Sci*, 2005, 818(2):167.

[22] Iishi H, Tatsuta M, Baba M, et al. Inhibition by ginsenoside Rg₃ of bombesin-enhanced peritoneal metastasis of intestinal adenocarcinomas induced by azoxymethane in Wistar rats [J]. *Clin Exp Metastasis*, 1997, 15(6):603.

[23] 赵文杰,陈迪,倪劲松,等. 20(S)-人参皂苷 Rg₃ 对前列腺癌 PC-3M 细胞的诱导凋亡作用[J]. 中国药理学通报,2009,25(2):235.

[24] 王喜,凌昌全. 中药有效成分抗肿瘤转移的研究进展[J]. 中国中西医结合杂志,2004,24(2):178.

[25] Park I H, Kim N Y, Han S B, et al. Three new dammarane glycosides from heat processed ginseng [J]. *Arch Pharm Res*, 2002, 25(4):428.

[26] Park I H, Han S B, Kim J M, et al. Four new acetylated ginsenosides from processed ginseng (sun ginseng) [J]. *Arch Pharm Res*, 2002, 25(6):837.

[27] Kim W Y, Kim J M, Han S B, et al. Steaming of ginseng at high temperature enhances biological activity [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(12):1702.

[28] Yoo H H, Kwon S W, Park J H. The cytotoxic saponin from heat-processed *Achyranthes fauriei* roots [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(5):1053.

[责任编辑 邹晓翠]