

# 人参毛状根生物合成熊果苷的分离与鉴定

栗建明, 赵明强, 丁家宜

(中国药科大学中药生物技术研究室, 江苏 南京 210038)

**Isolation and identification of arbutin biosynthesis by hairy roots of *Panax ginseng* C. A. Mey.** LI Jian-ming, ZHAO Ming-qiang, DING Jia-yi (Research Department of Herb Biotechnology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2004, 13(1): 60-61

**Abstract:** Using ginseng (*Panax ginseng* C. A. Mey.) hairy roots as a bioreactor, exogenous hydroquinone (HQ) was added aseptically to suspension of hairy roots on 22 d. Twenty-four hours after the addition of HQ, the hairy roots were separated from the medium. Through identification of TLC and HPLC, it was proved that hydroquinone has been bioconverted into arbutin, and arbutin from hairy root of *P. ginseng* was isolated and identified.

**关键词:** 人参毛状根; 氢醌; 生物转化; 熊果苷

**Key words:** hairy root of *Panax ginseng* C. A. Mey.; hydroquinone; biotransformation; arbutin

中图分类号: Q943; S567.5+1 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2004)01-0060-02

熊果苷(arbutin), 化学名称为对-羟基苯- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷, 能够竞争性抑制酪氨酸酶的活性从而抑制黑色素的形成, 被国际公认为高效祛斑美白剂, 是化妆品中理想的添加成分。人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.) 自古以来就是名贵药材, 由于人参在栽培过程中存在着栽培困难、周期过长、地域限制等难题, 人参的组织培养受到了广泛的重视。本实验室已建立了人参细胞大量培养体系<sup>[1]</sup>和人参毛状根培养体系<sup>[2]</sup>, 并把熊果苷与人参细胞配伍应用到化妆品生产中, 产品深受广大消费者青睐。用植物培养物对外源底物进行生物转化, 从而对其结构进行修饰, 以获得更有意义的产物的研究报道很多<sup>[3-9]</sup>, 也是当今研究的热点。本实验室已对人参生物转化熊果苷的基本条件进行了初步探讨<sup>[10]</sup>, 本文在此基础上, 对转化产物进行了分离鉴定。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

人参毛状根 E4 株系由本实验室提供。在 B<sub>5</sub> 培养基上悬浮培养, 每 25 天继代 1 次, 培养温度(25 ± 1) °C, 暗培养, 摇床转速为 100 r·min<sup>-1</sup>。

### 1.2 仪器与试剂

日本岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪; 日本岛津 SPD-10A<sub>UV</sub> UV-VIS 检测器; C<sub>18</sub> shim-pack VP-ODS 色谱柱 150 mm × 4.6 mm I.D.; HW 色谱工作站; X4 型双目显微熔点测定仪(未校正); Nicolet Impact-410 型红外分光光度计(KBr 压片); Bruker ADRX-400 型核磁共振波谱仪; HP 5989A 质谱仪; Shimadzu UV-2501 PC 型紫外分光光度计; 柱层析硅胶和薄层用硅胶 G 为青岛海洋化工厂产品。乙腈(色谱纯), 水(二次重蒸水), 熊果苷标准品(SIGMA 公司), 其余试剂均为分析纯。

### 1.3 转化方法

在 150 mL 三角瓶中加入 75 mL B<sub>5</sub> 培养基, 调节 pH 至 5.8, 灭菌后, 每瓶接种 150 mg 毛状根嫩根, 培养 22 d, 无菌加入氢醌水溶液, 使底物的加入浓度为 2 mmol·L<sup>-1</sup>, 转化 24 h, 收获毛状根, 用蒸馏水洗涤 3 次, 吸干表面水分, -50 °C 冻干, 研磨, 过 60 目筛。

### 1.4 对照品、供试样品和空白溶液的制备

**标准品溶液:** 取熊果苷标准品 1.00 mg, 用甲醇溶解并定容至 1 mL。

**样品溶液:** 取转化后的人参毛状根粉末适量, 加蒸馏水冷浸过夜, 超声提取 20 min, 分成 2 部分, 一部分水浴蒸干, 加甲醇溶解, 作为 TLC 鉴别的样品溶液; 一部分用 0.2 μm 微孔滤膜过滤, 作为 HPLC 鉴别的样品溶液。

**空白溶液:** 取未加氢醌处理的人参毛状根粉末适量, 同“样品溶液”方法操作, 制备 2 种空白溶液。

### 1.5 薄层层析(TLC)鉴定

取样品液 50 μL 点样于硅胶 G 薄层板上, 以 V(氯仿): V(甲醇): V(水) = 7:3:0.4 为展开剂展开, 晾干, 碘蒸汽显色。

### 1.6 HPLC 鉴定

流动相: V(乙腈): V(水) = 2:98; 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 25 °C; 检测波长: 280 nm; 进样量: 25 μL。

### 1.7 转化产物的提取分离

取生物转化后的人参毛状根粉末 150 g, 乙醚脱脂 2 h, 甲醇回流提取 6 h, 提取液减压蒸干甲醇, 残渣加少量水溶解, 上 D101 大孔树脂, 以蒸馏水、10% 乙醇、95% 乙醇梯度洗脱, 合并水及 10% 乙醇部分, 减压浓缩, 浓缩液用乙酸乙酯萃取

收稿日期: 2003-08-25

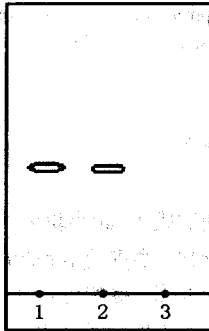
作者简介: 栗建明(1974-), 男, 山西原平人, 硕士, 主要从事药用植物生物技术的研究。

4~5次,合并萃取液,减压浓缩后,加适量硅胶(100~200目)拌样,上硅胶(200~300目)柱, $V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇}):V(\text{水})=80:18:27$ 洗脱,洗脱液浓缩上C18反向柱, $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=9:1$ 洗脱,经乙醇重结晶,得到转化产物。

## 2 结果与分析

### 2.1 TLC鉴别

人参毛状根样品与标准品的TLC图谱见图1。转化后的人参毛状根(样品溶液)在与熊果苷相对应的位置上有相同颜色的斑点,而未转化的人参毛状根(空白溶液)却没有该斑点,说明人参毛状根已将氢醌转化为熊果苷。



1. 熊果苷标准品 Arbutin standard; 2. 人参毛状根样品溶液 Sample solution from hairy root of *P. ginseng*; 3. 空白溶液 Control

图1 人参毛状根生物合成熊果苷 TLC图谱

Fig.1 TLC chromatogram of arbutin biosynthesis by hairy roots of *Panax ginseng* C. A. Mey.

### 2.2 HPLC鉴别

将熊果苷标准品溶液、样品溶液和空白溶液分别进行HPLC检测,结果显示:熊果苷标准品在保留时间为5.878 min处出现1个峰,样品溶液在与熊果苷标准品相同的保留时间(5.849 min)处出现1个新峰,而空白溶液没有此出峰。

### 2.3 转化产物的结构鉴定

白色针晶,mp198~200℃,Molish反应呈阳性,与 $\alpha$ -萘酚浓 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 反应在溶液界面出现紫色环,与 $\text{FeCl}_3$ 试剂反应呈淡蓝绿色。将结晶溶于无水乙醇中,加碱性KOH出现白色沉淀。以上化学反应提示此化合物为酚苷类。

IR(KBr) $V_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 1212(C—O—C), 1442, 1512(苯环), 2895, 2910(CH), 3834(—OH)。

MS  $m/z$ : 311[M+K]<sup>+</sup>, 295[M+Na]<sup>+</sup>。由UV、IR及MS等光谱可知该化合物基本母核为苯环,分子量272。

<sup>1</sup>H NMR( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 Hz)  $\delta$ : 3.21~3.82(m, 6H, m), 4.82(1H, d, J=7.42 Hz, H-1'), 6.91(2H, d, J=5.91 Hz, 2.24 Hz), 6.94(2H, d, J=5.87 Hz, 3.71 Hz)。

<sup>13</sup>C NMR( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 Hz)  $\delta$ : 150(C-1), 116(C-2, C-6), 118(C-3, C-5), 151(C-4), 101(C-1'), 73(C-2'), 76(C-3'), 69(C-4'), 75(C-5'), 60(C-6')。由<sup>1</sup>H NMR和<sup>13</sup>C NMR光谱可知该化合物的苯环上存在 $A_2B_2$ 系统的4个质子,苯环

为对位取代,母核上有1个葡萄糖基取代。

综上所述,此化合物为对-羟基苯- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷,与文献报道<sup>[11]</sup>完全一致。

## 3 讨论

1) 氢醌是酪氨酸酶活性抑制剂,但其刺激性强、副作用大,仅在临床中限量使用,被转化为熊果苷后,水溶性增强,毒性降低,扩大了其使用范围。

2) 天然熊果苷主要来自乌饭树(*Vaccinium bractum* Thunb.)、越桔(*V. vitisidaea* L.)、虎耳草[*Saxifraga stolonifera* (L.) Meerb.]等,由于含量较低,从植物中提取熊果苷成本很高,因此目前市场上所用的熊果苷大多通过有机合成途径获得。通过植物组织培养的方法生物合成熊果苷,是生产天然熊果苷的另一种有效途径。通过人参毛状根来转化氢醌,生物合成熊果苷,氢醌转化率最高达到89%,熊果苷占人参毛状根干重的13%<sup>[10]</sup>,高含量熊果苷与人参毛状根原有的人参皂苷、多糖、维生素及各种微量元素等结合起来,是理想的化妆品添加剂。

### 参考文献:

- [1] Ding J Y, Chen Q, Xiang D J, et al. Studies on Medicinal Products from *Panax ginseng* Cell Culture [M]. Beijing: China Science and Technology Press, 1992. 361.
- [2] 刘峻,丁家宜,徐红,等. Ri质粒人参转化系统的建立及鉴定[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(2): 94-97.
- [3] Ushiyama M, Asada Y, Yoshikawa T, et al. Biotransformation of aromatic carboxylic acids by root culture of *Panax ginseng* [J]. Phytochemistry, 1989, 28(7): 1859-1869.
- [4] Ushiyama M, Furuya T. Glycosylation of phenolic compounds by root culture of *Panax ginseng* [J]. Phytochemistry, 1989, 28(11): 3009-3013.
- [5] Asada Y, Saito H, Yoshikawa T, et al. Biotransformation of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid by ginseng hairy root culture [J]. Phytochemistry, 1993, 34(4): 1049-1052.
- [6] Kawaguchi K, Watanabe T, Hirokuni M, et al. Biotransformation of digitoxigenin by culture ginseng cells [J]. Phytochemistry, 1996, 42(3): 667-669.
- [7] 戴均贵,鲁丹丹,崔亚军,等. 桔梗悬浮培养对细胞天麻素的生物转化[J]. 药学学报, 2001, 36(12): 942-943.
- [8] 李欣,苏艳芳,刘晓峰,等. 大黄毛状根对青蒿素的生物转化研究[J]. 中国药理学杂志, 2002, 11(4): 122-123.
- [9] 韩健,戴均贵,崔亚军,等. 长春花及银杏植物细胞对青蒿素的生物转化研究 [J]. 中草药, 2003, 34(2): 166-168.
- [10] 赵明强,丁家宜,刘峻,等. 人参毛状根生物合成熊果苷的研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(12): 819-820.
- [11] 马美丽,田振坤,郭桂彬,等. 越桔叶中熊果苷的分离与鉴定 [J]. 中草药, 1995, 26(9): 472-485.