

人参茎叶总皂苷酶水解产物成分研究

李有海^{1,2}, 韩文敬¹, 陆仕坤³, 罗倩荣¹, 唐双焱³, 金建明^{1,2*}

¹北京工商大学植物资源研究开发北京市重点实验室, 北京 100048; ²云南民族大学民族药资源化学国家民委-教育部重点实验室, 昆明 650500; ³中国科学院微生物研究所中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室, 北京 100101

摘要: 人参茎叶提取物经 β -糖苷酶催化水解后, 经硅胶柱和 RP-18 柱反复层析纯化得 8 个化合物。通过波谱图分析及结合文献数据, 分别鉴定为 20(S)-达玛烷-3 β , 6 α , 12 β , 20, 25-五醇(**1**)、人参皂苷 compound K(**2**)、人参皂苷 F₁(**3**)、人参皂苷 Rh₁₃(**4**)、人参皂苷 Rg₂(**5**)、3 β , 20(S)-二羟基达玛烷-24-烯-12 β , 23 β -环氧-20-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(**6**)、人参皂苷 Rg₁(**7**) 和人参皂苷 Re(**8**)。其中化合物 **1** 为新的达玛烷皂苷元。化合物 **2** 为分离到仅有的原人参二醇型皂苷, 表明该 β -糖苷酶高效转化人参茎叶的原人参二醇型皂苷为人参皂苷 compound K。

关键词: 人参茎叶; β -糖苷酶; 原人参二醇型皂苷; 人参皂苷 compound K

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.5.003

Chemical Constituents of Enzymatic Hydrolysate of Total Ginsenoside from Stems and Leaves of *Panax ginseng*

LI You-hai^{1,2}, HAN Wen-jing¹, LU Shi-kun³, LUO Qian-rong¹, TANG Shuang-yan³, JIN Jian-ming^{1,2*}

¹Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; ²Key Laboratory of Ethnic Medicine Resource Chemistry, State Ethnic Affairs Commission & Ministry of Education, Yunnan University of Nationalities, Kunming 650500, China; ³CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: The total ginsenoside was extracted from the stems and leaves of *Panax ginseng* and then hydrolyzed with β -glycosidase. Eight compounds were isolated from the hydrolysate, and identified as 20(S)-dammarane-3 β , 6 α , 12 β , 20, 25-pentol(**1**), ginsenoside compound K(**2**), ginsenoside F₁(**3**), ginsenoside Rh₁₃(**4**), ginsenoside Rg₂(**5**), 3 β , 20(S)-dihydroxydammar-24-en-12 β , 23 β -epoxy-20-O- β -D-glucopyranoside(**6**), ginsenoside Rg₁(**7**) and ginsenoside Re(**8**), respectively. Among them, compound **1** is an unknown dammarane sapogenin. Compound **2** was the only protopanaxadiol-type ginsenoside, suggesting that the protopanaxadiol-type ginsenosides in the total extract from the stems and leaves of *P. ginseng* was converted into ginsenoside compound K by β -glycosidase.

Key words: stems and leaves of *Panax ginseng*; β -glycosidase; protopanaxadiol-type ginsenoside; ginsenoside compound K

人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)是我国传统名贵中药材。人参茎叶总皂苷也是最新出版的 2015 年《中国药典》收录的中药提取物品种之一^[1]。2000 年后对稀有人参皂苷如 compound K、Rg₃、Rh₂ 和 Rh₃ 等的各种研究倍受关注。如何高效制备稀有人参皂苷是人参皂苷研发的重要课题之一^[2,3]。食用人参、三七或其总皂苷后, 药物代谢实验表明, 原人参二醇型皂苷在血液和肝脏中检测到的主要是人

参皂苷 compound K。这是因为生成的人参皂苷 compound K 分子量小, 更容易透过细胞膜进而被人体吸收^[4,5], 且人参皂苷 compound K 的活性也更好^[3,6]。目前研究制备稀有人参皂苷 compound K 的方法通常是采用酶解法和微生物发酵法而不采用化学法^[2,3]。在我国东北地区种植了大量的人参, 因此人参茎叶资源十分丰富。为了进一步开发和利用人参茎叶资源合成高活性的稀有人参皂苷, 本实验研究了获得的 β -糖苷酶完全催化水解人参茎叶提取物后的人参皂苷成分组成, 为酶法醇解人参茎叶代替人参等合成人参皂苷 compound K 提供研究基础。

收稿日期: 2016-01-04 接受日期: 2016-04-15

基金项目: 国家自然科学基金(31160017); 北京市自然科学基金(2142012); 大学生科研与创业行动计划(2014SJJ2014 02050)

* 通讯作者 Tel: 86-10-68984917; E-mail: jinjianming@btbu.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

人参茎叶于2013年10月采自吉林省长白山地区种植的四年生人参(购自集安市昌盛参业有限公司)。β-糖苷酶菌株是以人参皂苷 Rb₁ 为底物经高通量筛选获得。

NMR 和 HR-MS 波谱数据分别采用布鲁克 Avance III 400 MHz 型核磁共振波谱仪和安捷伦 6520 QTOF MS 质谱仪测定获得。离心机为 Thermo Sorvall ST 16R 台式冷冻离心机。反向 C₁₈ 硅胶层析填料和高效薄层层析反向 C₁₈ 硅胶板以及硅胶和薄层硅胶板 H 分别购自德国默克公司和青岛海洋化工有限公司;人参皂苷 Rb₁ (批号 20110526)、Rb₂ (批号 20120311) 和 Rc (批号 20120617) 来自宝鸡辰光生物科技有限公司;其他所用试剂均为分析纯。

1.2 提取

称取 2 kg 干燥的人参茎叶,粉碎,过筛,后用约三倍体积的 75% 乙醇-水溶液室温浸提 3 次。乙醇浸提液全部合在一起真空 65 °C 浓缩,浓缩液通过 4 层纱布过滤,滤液慢慢倒入 AB-8 柱。取 85% 乙醇洗脱液在真空、恒温 65 °C 条件下进行浓缩,待干燥后称重,约 100 g。

1.3 β-糖苷酶液制备

获得的 β-糖苷酶菌株按接种量 1% 转接到含 1% 100 mmol/L 卡那霉素的 LB 培养液中,在 37 °C 摇床中 280 rpm 培养大约 12 h。在超净台中向灭菌的 1000 mL 自诱导培养液中加入 1 mL 该培养液,在恒温 30 °C、280 rpm 的摇床中培养 21 h。离心诱导培养的菌液以获得菌体沉淀,加入 100 mL Mc 缓冲液 (pH = 6.0) 重新悬浮菌体,在冰浴中超声波超声 30 s,共间歇破碎细胞 2 h。然后 12000 rpm 离心 10 min,取上清液在 60 °C 水浴中恒温静置 10 min,然后 12000 rpm 离心 10 min,上清液为制备的 β-糖苷酶液。

1.4 酶水解反应

先加 900 mL Mc 缓冲液到提取的 100 g 人参茎叶总皂苷,在 70 °C 搅拌完全溶解,然后再加入新鲜制备的 100 mL β-糖苷酶液,搅拌混合均匀后在 70 °C 恒温水浴反应过夜 (20 h)。

1.5 HPLC 检测分析

分别称取真空浓缩干燥的 3.0 mg 人参茎叶总皂苷和 3.0 mg 皂苷水解产物,均加 1 mL 甲醇 (色谱纯),超声溶解膜过滤后用于 HPLC (样品浓度为 3

mg/mL)。HPLC 运行在 Shimadzu Lc-20A HPLC 仪器上。HPLC 检测进样量为 10 μL,分析型色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm),柱温箱温度设定为 35 °C, HPLC 流速设定为 0.7 mL/min, DAD 检测器波长设定为 203 nm,检测扫描时间为 55 min。流动性梯度洗脱程序:0 ~ 2.5 min, 20% 乙腈水溶液;2.5 ~ 5.0 min, 20% ~ 25% 乙腈水溶液;5.0 ~ 10.0 min, 25% 乙腈水溶液;10.0 ~ 30.0 min, 25% ~ 40% 乙腈水溶液;30.0 ~ 45.0 min, 40% ~ 70% 乙腈水溶液;45.0 ~ 55.0 min, 70% 乙腈水溶液。

1.6 分离纯化

反应过夜的水解液先冷至室温,然后加入 1000 mL 正丁醇萃取,共萃取三次。正丁醇萃取液真空浓缩干燥,称重后硅胶拌样,采用硅胶柱层析先用水饱和的二氯甲烷:甲醇 50:1、20:1、10:1、10:1.5、8:2 梯度洗脱,洗脱液经 TLC 检测后分为四个部分 (FrI-IV)。FrI (3.0 g) 用 5 g 硅胶拌样,上硅胶柱,用二氯甲烷、二氯甲烷:甲醇 (50:1) 混合溶液依次洗脱,洗脱液经 TLC 检测后合并后再经 RP-C₁₈ 柱层析纯化,用 45% 甲醇-水溶液洗脱,收集得到化合物 1 (210 mg)。FrII 16.2 g 先经硅胶柱层析,以二氯甲烷:甲醇梯度洗脱 (20:1 至 10:1),经 TLC 检测分为 2 个部分 (FrIIa 和 FrIIb),FrIIa 经 RP-C₁₈ 柱层析,75% 甲醇洗脱,得化合物 2 (5.3 g);FrIIb 也经 RP-C₁₈ 柱层析,50% 甲醇洗脱先获得 3 (3.0 g),进而改用 60% 甲醇洗脱获得 4 (830 mg)。FrIII 26.2 g 再经硅胶柱层析采用水饱和的二氯甲烷:甲醇 10:1 至 10:2 梯度洗脱分成 2 个部分 (FrIIIa 和 FrIIIb),FrIIIa 经 RP-C₁₈ 柱层析用 45% 甲醇洗脱,得化合物 5 (4.4 g);FrIIIa 经 RP-C₁₈ 柱层析,用 65% 甲醇洗脱,得 6 (330 mg)。FrIV 25.0 g 经硅胶柱层析采用水饱和的二氯甲烷:甲醇 10:1.5 至 8:2 梯度洗脱也分成 2 个部分 (FrIVa 和 FrIVb),FrIVa 经 RP-C₁₈ 柱层析,采用 35% 甲醇洗脱得化合物 7 (2.2 g);FrIVa 经 RP-C₁₈ 柱层析纯化,40% 甲醇洗脱,最后收集得到化合物 8 (5.2 g)。

2 实验结果

2.1 酶水解产物的成分分析

在人参茎叶提取的总皂苷中,通过 HPLC 分析检测,主要得到 4 种原人参三醇型皂苷:Rg₁、Re、Rg₂ 和 F₁;而原人参二醇型皂苷 Rb₁ (9)、Rb₂ (10) 和 Rc (11) 在人参茎叶中的含量较低 (图 1A)。这

与文献报道的结果一致^[7,8]。提取的人参茎叶总皂苷用 β -糖苷酶液催化水解,并放置过夜。酶催化水解期间间隔一定时间取样,采用 TLC 方法检测水解产物直到主要原人参二醇型皂苷 Rb₁、Rb₂ 和 Rc 完全水解。采用 HPLC 检测分析也表明催化水解反应过夜后没有检测到原人参二醇型皂苷 Rb₁、Rb₂ 和 Rc (图 1B),表示人参茎叶总皂苷已完全被催化水解。另外,分离纯化的实验结果亦表明人参茎叶总皂苷经糖苷酶完全催化水解后,从水解产物中获得

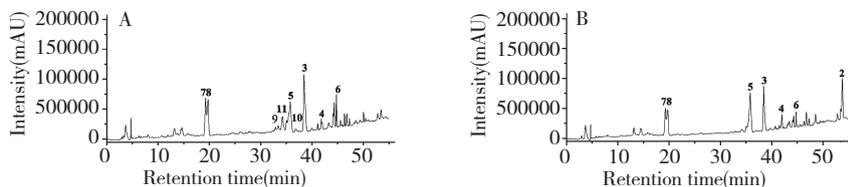


图 1 人参茎叶总皂苷(A)和酶水解产物(B)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of the total ginsenoside from the stems and leaves of *P. ginseng* (A) and its hydrolysate (B)

2.2 结构鉴定

化合物 1 白色粉末,易溶于二氯甲烷。化合物 1 的 HR-ESI-MS 正离子模式给出准分子离子峰 m/z 517.3866 [$M + Na$]⁺ (理论值 517.3863, C₃₀H₅₄O₅Na)。结合化合物 1 的¹³C NMR 和 DEPT 谱图,确定化合物的分子式为 C₃₀H₅₄O₅。由以上图谱分析推断化合物 1 可能为一种三萜类化合物。化合物 1 的¹H NMR 谱图的高场区显示达玛烷型人参皂苷元特征的 8 个甲基质子信号峰: δ_H 2.01 (3H, s)、1.47 (3H, s)、1.44 (3H, s)、1.41 (3H, s)、1.41 (3H, s)、1.18 (3H, s)、1.04 (3H, s) 和 0.98 (3H, s)。化合物 1 的¹³C NMR 和 DEPT 谱图显示无碳烯信号,有 5 个羟基碳信号 δ 78.8 (CH)、73.7 (C)、71.4 (CH)、70.0 (C) 和 68.1 (CH)。

综合分析化合物 1 的 2D NMR 谱图,对化合物 1 的¹³C 和¹H 的化学位移进行全归属(表 1)。在化合物 1 的 HMBC 谱图中,观察到 δ_H 1.18 (3H, s, H-18) 与 δ 52.0 (C-14)、50.5 (C-9)、47.9 (C-7) 和 41.6 (C-8) 相关; δ_H 1.04 (3H, s, H-19) 与 δ 62.1 (C-5)、50.5 (C-9)、39.7 (C-1) 和 39.7 (C-10) 相关; δ_H 2.01 (3H, s, H-28) 与 δ 78.8 (C-3)、62.1 (C-5)、40.7 (C-4) 和 16.9 (C-29) 相关; δ_H 1.47 (3H, s, H-29) 与 δ 78.8 (C-3)、62.1 (C-5)、40.7 (C-4) 和 32.3 (C-28) 相关; δ_H 0.98 (3H, s, H-30) 与 δ 52.0 (C-14)、48.6 (C-13)、41.6 (C-8) 和 31.8 (C-15) 相关。另外, δ_H 1.44 (3H, s, H-21) 与 δ 73.7 (C)、55.1 (CH) 和 36.8

的原人参二醇型皂苷总体含量较少,而原人参三醇型皂苷的总体含量较多。

从酶水解产物中,仅得到人参皂苷 compound K (2) 这一种原人参二醇型皂苷;原人参三醇型皂苷得到 4 种:人参皂苷 F₁ (3)、Rg₂ (5)、Rg₁ (7) 和 Re (8);另外纯化得到 20(S)-达玛烷-3 β ,6 α ,12 β ,20,25-五醇(1)、人参皂苷 Rh₁₃ (4) 和 3 β ,20(S)-二羟基达玛烷-24-烯-12 β ,23 β -环氧-20-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(6)。

(CH₂) 相关,分别归属为 C-20、C-17 和 C-22; δ_H 1.41 (6H, s, H-26, H-27) 与 δ 70.0 (C)、46.1 (CH₂)、30.6 (CH₃) 和 30.3 (CH₃) 相关,分别归属为 C-25、C-24、C-26 和 C-27;这也提示 C-25 有羟基。

比较化合物 1 与 20(R)-达玛烷-3 β ,6 α ,12 β ,20,25-五醇的¹³C NMR 化学位移,除了 C-17、C-21 和 C-22 的化学位移,两者的其他碳的化学位移基本一致^[9],推断化合物 1 的 C-20 可能为 S 构型。日本学者田中治 (Osamu Tanaka) 和我国学者杨崇仁都曾对人参皂苷元和人参皂苷的 C-20 的差向异构体的¹³C 化学位移进行了研究和总结^[10,11]:它们的最主要不同点是 C-17、C-21 和 C-22 的¹³C 化学位移差别较大。20(S) 和 20(R) 构型的人参皂苷元和人参皂苷的 C-17、C-21 和 C-22 的¹³C 的化学位移分别是 54.8 (50.9)、27.3 (22.8) 和 36.5 (44.1)。由于化合物 1 的 C-17、C-21 和 C-22 的化学位移分别为 δ 55.1、27.6 和 36.8,也推断 C-20 为 S 构型而不是 R 构型。因此,化合物 1 的结构鉴定为 20(S)-达玛烷-3 β ,6 α ,12 β ,20,25-五醇(图 2)。化合物 1 为一种 20(S)-新构型的人参皂苷元。

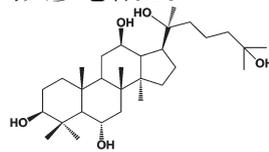


图 2 化合物 1 的化学结构

Fig. 2 Chemical structure of compound 1

表 1 化合物 1 的 ^{13}C 和 ^1H 数据
Table 1 ^{13}C and ^1H NMR data of compound 1

位置 Position	δ_{C}	δ_{H}	HMBC
1	39.7	1.69(1H, m), 1.05(1H, m)	
2	28.5	3.55(1H, m), 1.86(1H, m)	
3	78.8	3.55(1H, m)	
4	40.7		
5	62.1	1.25(1H, d, $J = 10.5$ Hz)	C-6, C-4, C-10
6	68.1	4.44(1H, m)	
7	47.9	1.98(2H, m)	
8	41.6		
9	50.5	1.62(1H, s)	
10	39.7		
11	32.4	2.19(1H, m), 1.66(1H, m)	
12	71.4	3.96(1H, m)	
13	48.6	2.11(1H, d, $J = 10.7$ Hz)	C-12, C-17, C-14
14	52.0		
15	31.8	1.61(1H, m), 1.08(1H, m)	
16	27.2	1.88(1H, m), 1.40(1H, m)	
17	55.1	2.35(1H, m)	C-20, C-16
18	17.9	1.18(3H, s)	C-14, C-9, C-7, C-8
19	17.8	1.04(3H, s)	C-5, C-9, C-1, C-10
20	73.7		
21	27.6	1.44(3H, s)	C-20, C-17, C-22
22	36.8	2.05(1H, m), 1.71(1H, m)	
23	19.5	2.19(1H, m), 1.74(1H, m)	
24	46.1	1.75(2H, m)	
25	70.0		
26	30.6	1.41(3H, s)	C-25, C-24, C-27
27	30.3	1.41(3H, s)	C-25, C-24, C-26
28	32.3	2.01(3H, s)	C-3, C-5, C-4, C-29
29	16.9	1.47(3H, s)	C-3, C-5, C-4, C-28
30	17.4	0.98(3H, s)	C-14, C-13, C-8, C-15

注:碳谱和氢谱分别用 400 MHz 和 100 MHz 在氘代吡啶- d_5 中测定。

Note: NMR spectra were measured at 100 MHz for ^{13}C and 400 MHz for ^1H in pyridine- d_5 .

化合物 2 白色粉末,易溶于甲醇。 ^1H NMR (400 MHz, pyridine- d_5) δ_{H} 5.17(1H, d, $J = 7.6$ Hz, Glc-H-1), 1.62(3H, s, H-21), 1.59(6H, s, H-26, 27), 1.22(3H, s, H-28), 1.00(3H, s, H-29), 0.98(3H, s, H-30), 0.94(3H, s, H-18), 0.88(3H, s, H-19); ^{13}C NMR δ_{C} 39.7(C-1), 28.6(C-2), 78.4(C-

3), 39.9(C-4), 56.7(C-5), 18.1(C-6), 35.5(C-7), 40.4(C-8), 50.6(C-9), 37.7(C-10), 31.1(C-11), 70.5(C-12), 49.8(C-13), 51.7(C-14), 31.2(C-15), 27.0(C-16), 52.0(C-17), 16.7(C-18), 16.3(C-19), 83.6(C-20), 22.7(C-21), 36.5(C-22), 23.5(C-23), 126.3(C-24), 131.2(C-25), 26.1(C-

26), 18.1 (C-27), 28.0 (C-28), 16.7 (C-29), 17.7 (C-30), 98.6 (C-20-Glc-1), 75.4 (C-20-Glc-2), 79.6 (C-20-Glc-3), 71.9 (C-20-Glc-4), 78.6 (C-20-Glc-5), 63.2 (C-20-Glc-6)。根据以上 NMR 数据, 鉴定化合物 **2** 为人参皂苷 compound K^[12]。

化合物 3 白色粉末, 易溶于甲醇。¹H NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ_H: 5.23 (1H, d, *J* = 6.8 Hz, Glc-H-1), 1.94 (3H, s, H-21), 1.57 (9H, s, H-26, 27, 29), 1.41 (3H, s, H-28), 1.05 (3H, s, H-18), 0.96 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, s, H-30); ¹³C NMR δ_C: 39.6 (C-1), 28.3 (C-2), 78.5 (C-3), 40.5 (C-4), 61.9 (C-5), 67.9 (C-6), 47.6 (C-7), 41.4 (C-8), 49.9 (C-9), 39.5 (C-10), 31.0 (C-11), 70.5 (C-12), 49.2 (C-13), 51.6 (C-14), 31.8 (C-15), 26.8 (C-16), 51.9 (C-17), 17.9 (C-18), 18.0 (C-19), 83.5 (C-20), 22.6 (C-21), 36.2 (C-22), 23.5 (C-23), 126.1 (C-24), 131.2 (C-25), 26.1 (C-26), 17.6 (C-27), 32.2 (C-28), 16.6 (C-29), 17.8 (C-30), 98.4 (C-20-Glc-1), 75.3 (C-20-Glc-2), 78.7 (C-20-Glc-3), 71.7 (C-20-Glc-4), 78.4 (C-20-Glc-5), 62.9 (C-20-Glc-6)。根据以上 NMR 数据, 鉴定化合物 **3** 为人参皂苷 F₁^[12]。

化合物 4 白色粉末, 易溶于甲醇。¹H NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ_H: 6.02 (1H, m, H-23), 5.70 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-24), 5.22 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, Glc-H-1), 1.60 (3H, s, H-21), 1.55 (3H, s, H-27), 1.55 (3H, s, H-26), 1.24 (3H, s, H-28), 1.06 (3H, s, H-29), 1.04 (3H, s, H-30), 0.89 (3H, s, H-19), 0.98 (3H, s, H-18); ¹³C NMR δ_C: 39.8 (C-1), 28.6 (C-2), 79.3 (C-3), 40.4 (C-4), 56.7 (C-5), 19.1 (C-6), 35.5 (C-7), 40.5 (C-8), 50.6 (C-9), 37.7 (C-10), 31.0 (C-11), 70.7 (C-12), 49.9 (C-13), 51.9 (C-14), 31.5 (C-15), 26.8 (C-16), 52.8 (C-17), 16.7 (C-18), 16.4 (C-19), 83.6 (C-20), 23.2 (C-21), 39.9 (C-22), 123.2 (C-23), 142.4 (C-24), 70.9 (C-25), 31.2 (C-26), 31.4 (C-27), 29.1 (C-28), 16.7 (C-29), 17.5 (C-30), 98.6 (C-20-Glc-1), 75.6 (C-20-Glc-2), 78.7 (C-20-Glc-3), 72.1 (C-20-Glc-4), 78.4 (C-20-Glc-5), 63.3 (C-20-Glc-6)。根据以上 NMR 数据, 鉴定化合物 **4** 为人参皂苷 Rh₁₃^[13]。

化合物 5 白色粉末, 易溶于甲醇。¹H NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ_H: 6.51 (1H, s, Rha-H-1), 5.27 (1H, d, *J* = 6.4 Hz, Glc-H-1), 2.13 (3H, s, H-

28), 1.79 (3H, d, *J* = 6.0, Rha-H-6), 1.68 (3H, s, H-26), 1.63 (3H, s, H-27), 1.39 (3H, s, H-30), 1.35 (3H, s, H-21), 1.19 (3H, s, H-19), 0.95 (3H, s, H-18), 0.94 (3H, s, H-29); ¹³C NMR δ_C: 39.8 (C-1), 27.7 (C-2), 78.8 (C-3), 40.3 (C-4), 61.1 (C-5), 74.6 (C-6), 46.4 (C-7), 41.5 (C-8), 50.1 (C-9), 41.4 (C-10), 32.5 (C-11), 71.3 (C-12), 48.5 (C-13), 52.0 (C-14), 32.6 (C-15), 27.3 (C-16), 55.0 (C-17), 18.4 (C-18), 18.2 (C-19), 73.5 (C-20), 27.5 (C-21), 36.1 (C-22), 23.5 (C-23), 126.7 (C-24), 131.1 (C-25), 26.3 (C-26), 18.1 (C-27), 32.7 (C-28), 17.4 (C-29), 17.6 (C-30), 102.1 (C-6-Glc-1), 79.7 (C-6-Glc-2), 78.7 (C-6-Glc-3), 73.3 (C-6-Glc-4), 78.6 (C-6-Glc-5), 63.4 (C-6-Glc-6), 102.3 (C-Rha-1), 72.6 (C-Rha-2), 72.9 (C-Rha-3), 74.5 (C-Rha-4), 69.8 (C-Rha-5), 19.3 (C-Rha-6)。根据以上 NMR 数据, 鉴定化合物 **5** 为人参皂苷 Rg₂^[12]。

化合物 6 白色粉末, 易溶于甲醇。¹H NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ_H: 5.48 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-24), 5.06 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, Glc-H-1), 4.76 (1H, t, *J* = 8.4 Hz, 8.4 Hz, H-23), 1.76 (3H, s, H-27), 1.62 (3H, s, H-26), 1.47 (3H, s, H-21), 1.18 (3H, s, H-28), 1.00 (3H, s, H-30), 1.00 (3H, s, H-18), 0.96 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, s, H-29); ¹³C NMR δ_C: 39.9 (C-1), 28.4 (C-2), 78.2 (C-3), 39.8 (C-4), 56.6 (C-5), 19.0 (C-6), 35.5 (C-7), 40.1 (C-8), 50.9 (C-9), 37.7 (C-10), 30.3 (C-11), 80.0 (C-12), 49.9 (C-13), 51.5 (C-14), 32.7 (C-15), 25.7 (C-16), 47.1 (C-17), 15.8 (C-18), 16.5 (C-19), 82.1 (C-20), 24.8 (C-21), 52.0 (C-22), 72.6 (C-23), 129.4 (C-24), 131.5 (C-25), 25.9 (C-26), 19.1 (C-27), 28.9 (C-28), 17.0 (C-29), 16.8 (C-30), 99.4 (C-20-Glc-1), 75.5 (C-20-Glc-2), 79.1 (C-20-Glc-3), 72.1 (C-20-Glc-4), 78.4 (C-20-Glc-5), 63.2 (C-20-Glc-6)。根据以上 NMR 数据, 鉴定化合物 **6** 为 3β,20(S)-二羟基达玛烷-24-烯-12β,20β-环氧-20-O-β-D-吡喃葡萄糖苷^[14]。

化合物 7 白色粉末, 易溶于甲醇。¹H NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ_H: 5.17 (1H, d, *J* = 6.8 Hz, 20-Glc-H-1), 5.02 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, 6-Glc-H-1), 2.07 (3H, s, H-21), 1.62 (3H, s, H-26), 1.58 (6H, s, H-27, 29), 1.51 (3H, s, H-28), 1.13 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 0.79 (3H, s, H-30); ¹³C NMR

δ_c : 39.7 (C-1), 28.2 (C-2), 78.8 (C-3), 40.7 (C-4), 61.9 (C-5), 78.7 (C-6), 45.4 (C-7), 41.4 (C-8), 50.3 (C-9), 39.9 (C-10), 30.9 (C-11), 70.7 (C-12), 49.4 (C-13), 51.7 (C-14), 31.2 (C-15), 26.9 (C-16), 51.6 (C-17), 18.1 (C-18), 18.1 (C-19), 83.6 (C-20), 22.6 (C-21), 36.3 (C-22), 23.5 (C-23), 126.2 (C-24), 131.2 (C-25), 26.1 (C-26), 17.6 (C-27), 32.0 (C-28), 16.9 (C-29), 18.0 (C-30), 98.5 (C-20-Glc-1), 76.0 (C-20-Glc-2), 79.6 (C-20-Glc-3), 72.3 (C-20-Glc-4), 79.1 (C-20-Glc-5), 63.3 (C-20-Glc-6), 106.2 (C-6-Glc-1), 75.6 (C-6-Glc-2), 80.4 (C-6-Glc-3), 72.1 (C-6-Glc-4), 79.9 (C-6-Glc-5), 63.5 (C-6-Glc-6)。根据以上 NMR 数据, 鉴定化合物 **7** 为人参皂苷 Rg₁ [12]。

化合物 8 白色粉末, 易溶于甲醇。¹H NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅) δ_H : 6.51 (1H, s, Rha-H-1), 5.26 (1H, d, *J* = 6.8 Hz, 6-Glc-H-1), 5.17 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, 20-Glc-H-1), 2.12 (3H, s, H-21), 1.78 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, Rha-H-6), 1.59 (6H, s, H-26, 27), 1.49 (3H, s, H-29), 1.35 (3H, s, H-28), 1.16 (3H, s, H-18), 0.94 (3H, s, H-19), 0.94 (3H, s, H-30); ¹³C NMR δ_c : 39.9 (C-1), 28.0 (C-2), 78.6 (C-3), 39.6 (C-4), 61.0 (C-5), 74.8 (C-6), 46.2 (C-7), 41.4 (C-8), 49.8 (C-9), 40.3 (C-10), 31.0 (C-11), 70.5 (C-12), 49.3 (C-13), 51.7 (C-14), 31.2 (C-15), 26.9 (C-16), 52.0 (C-17), 17.5 (C-18), 17.5 (C-19), 83.5 (C-20), 22.6 (C-21), 36.3 (C-22), 23.5 (C-23), 126.2 (C-24), 131.2 (C-25), 26.1 (C-26), 18.0 (C-27), 32.5 (C-28), 17.8 (C-29), 18.0 (C-30), 98.6 (C-20-Glc-1), 75.4 (C-20-Glc-2), 79.5 (C-20-Glc-3), 71.8 (C-20-Glc-4), 78.6 (C-20-Glc-5), 61.1 (C-20-Glc-6), 102.1 (C-6-Glc-1), 79.7 (C-6-Glc-2), 78.8 (C-6-Glc-3), 72.6 (C-6-Glc-4), 78.5 (C-6-Glc-5), 63.3 (C-6-Glc-6), 102.2 (C-Rha-1), 72.7 (C-Rha-2), 72.8 (C-Rha-3), 74.4 (C-Rha-4), 70.5 (C-Rha-5), 19.1 (C-Rha-6)。根据以上 NMR 数据, 鉴定化合物 **8** 为人参皂苷 Re [12]。

3 讨论

现已从人参属药材中分离纯化和鉴定了许多苷元, 如原人参二醇、人参三醇、原人参三醇、20(*S*)-达玛烷-3 β , 12 β , 20, 25-四醇、20(*R*)-达玛烷-3 β , 12 β , 20, 25-四醇和 20(*R*)-达玛烷-3 β , 6 α , 12 β , 20, 25-五

醇等等。本研究从人参茎叶总皂苷水解产物中纯化和鉴定了一个新的未曾报道的 C-20 构型不同的人参皂苷元, 即 20(*S*)-达玛烷-3 β , 6 α , 12 β , 20, 25-五醇 (**1**)。而 20(*R*)-达玛烷-3 β , 6 α , 12 β , 20, 25-五醇已由胡晗绯等从三七茎叶的水解产物中得到 [11]。新化合物 **1** 的结构不同之处在于是其 C-20 构型为 *S* 型而不是 *R* 型。

另外, 该研究表明, 人参茎叶总皂苷经 β -糖苷酶水解, 水解产物中纯化后仅获得一种原人参二醇型皂苷, 即人参皂苷 compound K。因此, 利用东北地区丰富的人参茎叶资源代替人参根生产人参皂苷 compound K 是比较经济和可行的。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 389-391.
- 2 Li X (李学), Zang P (臧埔), Zhang LX (张连学), et al. Research progress on ginsenoside CK production by microbial transformation. *Food Sci* (食品科学), 2012, 33: 323-327.
- 3 Zhou W (周伟), Zhou P (周珮). Advances in the study of ginsenoside compound K. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2007, 42: 917-923.
- 4 Hasegawa H. Proof of the mysterious efficacy of ginseng basic and clinical trials metabolic activation of ginsenoside deglycosylation by intestinal bacteria and esterification with fatty acid. *J Pharmacol Sci*, 2004, 95: 153-157.
- 5 Hu Z, Yang J, Cheng C, et al. Combinatorial metabolism notably affects human systemic exposure to ginsenosides from orally administered extract of *Panax notoginseng* roots (Sanqi). *Drug Metab Dispos*, 2014, 41: 1457-1469.
- 6 Li XP (李相鹏), Wang P (王鹏), Li YX (李英霞). Progress in pharmacological actions of ginsenoside compound K, an active metabolite of protopanaxadiol type saponins. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学), 2011, 25: 97-101.
- 7 Li KK (李珂珂), Yang XW (杨秀伟). Chemical constituents of the stems and leaves of *Panax ginseng*. *Mod Chin Med* (中国现代医药), 2012, 14: 47-50.
- 8 Li PF (李鹏飞), Liu CY (刘春莹), Guo JY (郭俊莹), et al. Comparison of the saponin composition in the stem and leaf of different type of Ginseng. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2010, 24: 13077-13079.