

## 三七总皂苷酶水解产物成分研究

文海丽<sup>1</sup>,许 丽<sup>1</sup>,李有海<sup>2</sup>,韩文敬<sup>1</sup>,金建明<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>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;<sup>2</sup>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

**摘要:**为了研究葡萄糖苷酶催化三七提取物的水解产物中主要皂苷成分。采用色谱法从三七提取物水解产物中分离纯化得到 11 个皂苷成分。利用波谱解析确定了它们的结构,分别鉴定为 20(S)-原人参二醇-20-O-β-D-吡喃木糖基-(1→6)-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→6)-β-D-吡喃葡萄糖苷(1),以及 10 个已知的皂苷成分分别为:人参皂苷 compound K(2)、3β,12β,20(S),25-四羟基达玛-23-烯-20-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(3)、3β,20(S)-二羟基达玛-24-烯-12β,23β-环氧-20-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(4)、3β,12β,20(S)-三羟基-25-过氧羟基达玛-23-烯-20-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(5)、人参皂苷 F1(6)、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>(7)、人参皂苷 Rg<sub>2</sub>(8)、人参皂苷 Mc(9)、20(S)-原人参二醇-3-O-β-D-吡喃木糖基-(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖基-20-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(10)和人参皂苷 Re(11)。其中化合物 1 为新化合物,化合物 3~5 和 10 为首次从三七中被分离得到。

**关键词:**三七;人参皂苷;葡萄糖苷酶

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.9.016

## Chemical Constituents from Enzymatic Hydrolysate of Total Saponins of *Panax notoginseng*

WEN Hai-li<sup>1</sup>, XU Li<sup>1</sup>, LI You-hai<sup>2</sup>, HAN Wen-jin<sup>1</sup>, JIN Jian-ming<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;<sup>2</sup>Key Laboratory of Ethnic Medicine Resource Chemistry, State Ethnic Affairs Commission & Ministry of Education, Yunnan Minzu University, Kunming 650500, China

**Abstract:** This paper presents the saponin constituents from the enzymatic hydrolysate of *Panax notoginseng* by glucosidase. Eleven saponins were isolated from the hydrolysate of *P. notoginseng*. On the basis of spectroscopic analysis, their structures were elucidated as 20(S)-protopanaxadiol-20-O-β-D-xylopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside (1), ginsenoside compound K (2), 3β,12β,20(S),25-tetrahydroxydammar-23-en-20-O-β-D-glucopyranoside (3), 3β,20(S)-dihydroxydammar-24-en-12β,23β-epoxy-20-O-β-D-glucopyranoside (4), 3β,12β,20(S)-trihydroxy-25-hydroperoxydammar-23-en-20-O-β-D-glucopyranoside (5), ginsenoside F1 (6), ginsenoside Rg<sub>1</sub> (7), ginsenoside Rg<sub>2</sub> (8), ginsenoside Mc (9), 20(S)-protopanaxadiol-3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl-20-O-β-D-glucopyranoside (10) and ginsenoside Re (11), respectively. Among them, compound 1 was a new saponin. In addition, compounds 3-5 and 10 were isolated from *P. notoginseng* for the first time.

**Key words:** *Panax notoginseng*; ginsenosides; glucosidase

三七 [*Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen] 属五加科人参属植物,又称为田七、田三七和金不换等,为我国南方特有的名贵中药材。三七是我国 360 多种中成药制剂如云南白药、片仔癀的重要原

料。由于对三七的需求不断增大,除了传统的种植地区如云南省和广西省,现已在周边省份如广东、贵州和四川的一些地区也存在大规模种植的三七。三七的主要功效为止血活血,其主要活性成分是达玛烷四环三萜类人参皂苷<sup>[1,2]</sup>。在三七中原人参三醇型皂苷的含量高于原人参二醇型皂苷。而三七三醇型皂苷为新版中国药典的提取物品种之一(2015 版药典第一部, P392),其对治疗缺血性脑卒有一定的疗

收稿日期:2017-09-18 接受日期:2018-04-08

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(201710011115)

\* 通信作者 Tel:86-10-68984937; E-mail: jinjianming@btbu.edu.cn

效<sup>[3]</sup>。而对三七中的原人参二醇型皂苷应用的研究报道相对并不是很多。

而稀有人参皂苷如 Rg<sub>3</sub>、Rh<sub>2</sub> 和 compound K 属于原人参二醇型皂苷。利用三七中的原人参二醇型皂苷可制备这些稀有人参皂苷。本研究以云南文山的三七为实验材料,采用乙醇水溶液提取三七总皂苷,并利用制备的葡萄糖苷酶催化水解三七总皂苷。在研究该葡萄糖苷酶催化水解三七总皂苷后的成分时,从中分离纯化和鉴定了一个新的原人参二醇型皂苷。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

Bruker Avance 400 MHz 型核磁共振波谱仪;Agilent 6520 LC/MS 质谱仪。柱层析硅胶(60~100目)和薄层层析硅胶板 H(青岛海洋化工有限公司);RP-C<sub>18</sub> 反相层析材料和 RP-C<sub>18</sub> 高效薄层板(Merck 公司);D4006 大孔吸附树脂(天津兴南允能高分子技术有限公司);甲醇和二氯甲烷均为分析纯(天津市致远化学试剂有限公司);乙醇为 95% 工业级。

三年生三七芦头购自云南省文山三七国际交易市场。

### 1.2 提取

1 kg 三七芦头,经粉碎机粉碎,过筛,倒入约三倍体积的 70% 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,浓缩液经 4 层纱布漏斗过滤,滤液慢慢倒入 D4006 大孔吸附柱。水洗后再用 80% 乙醇洗脱。80% 乙醇洗脱液在真空、恒温 65 °C 条件下进行浓缩。干燥后称重,得 81 g 三七总皂苷。

### 1.3 酶液制备

将产生  $\beta$ -糖苷酶的菌株接种到 10 mL 含抗生素的 LB 培养液中,接种量为 1%。接着在 37 °C、280 rpm 摇床中培养 12 h 后将种子液转接到 1 000 mL 的诱导培养液中,再在 30 °C、280 rpm 的摇床中振荡培养 21 h。培养液经 10 000 rpm 离心 10 min,加 100 mL Mc 缓冲液至沉淀的菌体,振荡重悬,冰浴低温超声破细胞,然后 4 °C、12 000 rpm 离心 10 min,上清液即为  $\beta$ -糖苷酶液<sup>[4]</sup>。

### 1.4 酶水解反应

约 100 mL 制备的  $\beta$ -糖苷酶溶液加入到 900 mL 含 81 g 三七总皂苷的 Mc 缓冲液中,水浴恒温 70 °C

反应过夜(20 h)<sup>[4]</sup>。

### 1.5 分离提取

1 L 酶催化水解的反应液经纱布过滤后倒入 D4006 大孔吸附树脂,水洗后再经 80% 乙醇洗脱。过滤的沉淀加 80% 乙醇溶解。合并洗脱液和沉淀溶解液,经减压浓缩干燥后进行硅胶柱层析,用二氯甲烷-甲醇进行梯度洗脱,分为四个部分(Fr I~Fr IV)。Fr I 部分 9.0 g 先经 RP-C<sub>18</sub> 柱层析 50%~80% 甲醇水梯度洗脱和硅胶柱层析,分别纯化得到化合物 **2**(5.1 g)、**3**(0.123 g)和 **4**(16 mg);Fr II 部分 3.5 g 先经 RP-C<sub>18</sub> 柱层析 60% 甲醇水洗脱再采用硅胶柱层析,分离纯化得到化合物 **5**(46 mg)和 **6**(0.755 g);Fr III 部分 15.0 g 经 RP-C<sub>18</sub> 柱层析,用 40% 和 70% 甲醇水洗脱分成二部分,再采用硅胶柱层析得到化合物 **7**(8.0 g)、**8**(1.3 g)和 **9**(0.133 g);Fr IV 部分 2.8 g 经 RP-C<sub>18</sub> 柱和硅胶柱反复层析得到化合物 **1**(0.152 g)、**10**(0.655 g)和 **11**(70 mg)。

## 2 结果与分析

### 2.1 化合物 1 结构鉴定

化合物 **1** 为白色粉末,易溶于甲醇;HR-ESI-MS 谱图显示化合物 **1** 的分子离子峰为  $m/z$  939.5288  $[M + Na]^+$  (calcd for C<sub>47</sub>H<sub>80</sub>NaO<sub>17</sub>, 939.5288),结合化合物的 <sup>13</sup>C DEPT 谱图,化合物 **1** 的分子式被确定为 C<sub>47</sub>H<sub>80</sub>O<sub>17</sub>。化合物 **1** 的 <sup>1</sup>H NMR 谱图的高场区显示有 8 个特征的达玛烷人参皂苷元的甲基质子信号: $\delta_H$  0.88 (3H, s)、0.95 (3H, s)、0.98 (3H, s)、1.03 (3H, s)、1.22 (3H, s)、1.59 (3H, s)、1.63 (3H, s)和 1.65 (3H, s)。在低场区显示有 3 个糖基的端基质子信号  $\delta_H$  4.95 (1H, d,  $J=7.2$  Hz)、5.03 (1H, d,  $J=7.6$  Hz)和 5.13 (1H, d,  $J=8.0$  Hz)。J 值表明化合物 **1** 的 3 个糖基都是  $\beta$  取向的吡喃糖基。

化合物 **1** 的 <sup>13</sup>C DEPT NMR 谱图的高场区也显示有 8 个特征的达玛烷人参皂苷元的甲基碳信号: $\delta_C$  16.4、16.7、16.7、17.8、18.3、22.7、26.2 和 29.0。低场区显示有一对双键的叔碳和季碳信号: $\delta_C$  126.3 和 131.4,与人参皂苷元的 C-24 和 C-25 化学位移一致。化合物 **1** 的 <sup>13</sup>C NMR 谱图在  $\delta_C$  89.0 附近没有出现碳信号,表明该化合物的苷元的 C-3 羟基上没有糖基连接。化合物 **1** 的 <sup>13</sup>C NMR 谱图的季碳信号  $\delta_C$  83.8 归属为人参皂苷 C-20 的化学位移,也表明糖基连接在人参皂苷元 C-20 的羟基上。叔碳信号  $\delta_C$  70.5 为人参皂苷元 C-12 的特征信号。而仲碳信

号  $\delta_c$ 67.5 推断为木糖基的 C-5 信号;仲碳信号  $\delta_c$ 70.2 和 70.7 推断为 2 个葡萄糖基的 C-6 信号,也表明木糖基的端基碳连接在葡萄糖基的 C-6 羟基上,外侧的葡萄糖基的端基碳与内侧的葡萄糖 C-6 羟基相连接(图 1)。

仔细分析化合物 **1** 的 1D 和 2D NMR 谱图,归属了化合物 **1** 的  $^{13}\text{C}$  和  $^1\text{H}$  化学位移(表 1)。比较化合物 **1** 和 Qiu L 等报道的  $3\beta,6\alpha,12\beta,20(S)$ -四羟基

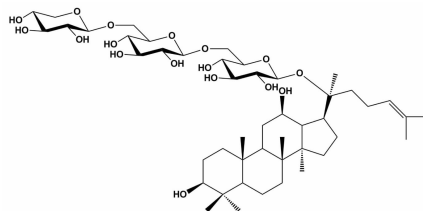


图 1 化合物 **1** 的结构

Fig. 1 Chemical structure of compound **1**

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

No.	$\delta_c$	$\delta_H$	No.	$\delta_c$	$\delta_H$
1	39.7 (t)	1.70 (m), 0.86 (m)	Glc1	98.4 (d)	5.13 (8.0, d)
2	28.6 (t)	1.84 (m), 1.80 (m)	2	75.5 (d)	3.95 (m)
3	78.4 (d)	3.42 (10.8 br d)	3	78.5 (d)	4.27 (m)
4	39.9 (s)		4	71.8 (d)	4.08 (m)
5	56.7 (d)	0.79 (4.4, 6.4 td)	5	77.3 (d)	4.07 (m)
6	19.1 (t)	1.48 (m), 1.44 (m)	6	70.7 (t)	4.79 (m), 4.34 (m)
7	35.5 (t)	1.46 (m), 1.24 (m)	Glc1'	105.8 (d)	5.03 (7.6, d)
8	40.4 (s)		2'	75.4 (d)	3.93 (m)
9	50.7 (d)	1.45 (m)	3'	78.6 (d)	4.25 (m)
10	37.7 (s)		4'	71.8 (d)	4.06 (m)
11	31.1 (t)	2.05 (m), 1.42 (m)	5'	77.3 (d)	4.07 (m)
12	70.5 (d)	3.90 (m)	6'	70.2 (t)	4.83 (m), 4.32 (m)
13	49.9 (d)	2.00 (m)	Xyll	106.3 (d)	4.95 (7.2, d)
14	51.7 (s)		2	75.2 (d)	3.90 (m)
15	31.2 (t)	1.58 (m), 1.03 (m)	3	79.7 (d)	4.19 (m)
16	27.0 (t)	1.84 (m), 1.45 (m)	4	71.5 (d)	4.25 (m)
17	51.9 (d)	2.60 (5.6, 5.6 td)	5	67.5 (t)	4.33 (m), 3.67 (m)
18	16.4 (q)	0.98 (s)			
19	16.7 (q)	0.88 (s)			
20	83.8 (s)				
21	22.7 (q)	1.65 (s)			
22	36.6 (t)	2.41 (m), 1.83 (m)			
23	23.5 (t)	2.63 (m), 2.39 (m)			
24	126.3 (d)	5.31 (8.0 t)			
25	131.4 (s)				
26	26.2 (q)	1.59 (s)			
27	18.3 (q)	1.63 (s)			
28	29.0 (q)	1.22 (s)			
29	16.7 (q)	1.03 (s)			
30	17.8 (q)	0.95 (s)			

注:氢谱和碳谱在氘代吡啶中分别采用 100 MHz 和 400 MHz 测定。

Note: Spectra were measured at 100 MHz for  $^{13}\text{C}$  and 400 MHz for  $^1\text{H}$  in pyridine- $d_5$ .

达玛-24-烯-20-*O*- $\beta$ -D-吡喃木糖基-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷的<sup>13</sup>C NMR 谱图<sup>[5]</sup>,除了苷元的 C-5、C-6 和 C-7 外,化合物 **1** 与文献报道的该皂苷的其它碳的化学位移基本一致,表明化合物 **1** 与文献报道的该皂苷的区别在于化合物 **1** 在苷元的 C-6 没有羟基,即化合物 **1** 的皂苷元为 20(*S*)-达玛-24-烯-3 $\beta$ ,12 $\beta$ ,20-三醇。同时也进一步验证了先前对化合物 **1** 的糖基连接方式的推断,以及吡喃木糖基和吡喃葡萄糖基的绝对构型为 D-型。由于文献报道的从三七中分离纯化得到的皂苷的木糖基和葡萄糖基的绝对构型全部都为 D-吡喃木糖基和 D-吡喃葡萄糖基<sup>[6]</sup>,因此化合物 **1** 中木糖基和葡萄糖基的绝对构型为 D-型。另外,比较化合物 **1** 和人参皂苷 CK 的<sup>13</sup>C NMR 谱图<sup>[4]</sup>,除了糖基部分的<sup>13</sup>C 化学位移,化合物 **1** 和人参皂苷 CK 的苷元部分的<sup>13</sup>C 化学位移基本一致,也表明化合物 **1** 的皂苷元是 20(*S*)-达玛-24-烯-3 $\beta$ ,12 $\beta$ ,20-三醇。

HMBC 谱图进一步确定了化合物 **1** 中糖基的连接方式。HMBC 谱图显示一个葡萄糖基的端基质子信号  $\delta_{\text{H}}$  5.13 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz) 与苷元的 20 位碳信号  $\delta_{\text{C}}$  83.8 相关,另外一个葡萄糖基的端基质子信号  $\delta_{\text{H}}$  5.03 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz) 与葡萄糖基的 6 位碳信号  $\delta_{\text{C}}$  70.7 相关。木糖基的端基质子信号  $\delta_{\text{H}}$  4.95 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz) 与葡萄糖基的 6 位碳信号  $\delta_{\text{C}}$  70.2 相关。因此,化合物 **1** 的结构鉴定为 3 $\beta$ ,12 $\beta$ ,20(*S*)-三羟基达玛-24-烯-20-*O*- $\beta$ -D-吡喃木糖基-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷。

## 2.2 三七提取物酶解产物的已知皂苷成分

三七提取物的酶解产物经硅胶柱和反相硅胶柱反复层析分离纯化和鉴定了 11 个化合物,其中已知的 10 个皂苷成分分别鉴定为:人参皂苷 compound K(**2**)<sup>[1,4]</sup>、3 $\beta$ ,12 $\beta$ ,20(*S*),25-四羟基达玛-23-烯-20-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(**3**)<sup>[7]</sup>、3 $\beta$ ,20(*S*)-二羟基达玛-24-烯-12 $\beta$ ,23 $\beta$ -环氧-20-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(**4**)<sup>[1,8]</sup>、3 $\beta$ ,12 $\beta$ ,20(*S*)-三羟基-25-过氧羟基达玛-23-烯-20-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(**5**)<sup>[9]</sup>、人参皂苷 F<sub>1</sub>(**6**)<sup>[1,4]</sup>、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>(**7**)<sup>[1,4]</sup>、人参皂苷 Rg<sub>2</sub>(**8**)<sup>[1,4]</sup>、人参皂苷 Mc(**9**)<sup>[4,10]</sup>、20(*S*)-达玛-24-烯-3 $\beta$ ,12 $\beta$ ,20-三醇-3-*O*- $\beta$ -D-吡喃木糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-20-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(**10**)和人参皂苷 Re(**11**)<sup>[1,4,11]</sup>。其中,化合物 **3**~**5** 和 **10** 为首

次从三七中分离得到。

## 参考文献

- 1 Wang T, Guo R, Zhou G, *et al.* Traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen: A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 188: 234-258.
- 2 State Administration of Traditional Chinese Medicine (People's Republic of China) (国家中医药管理局). *Zhong Hua Ben Cao Jin Xuan Ben*: Vol. 1 (中华本草精选本) [M]. Shanghai Science and Technology Publishers: Shanghai, 1996; 34-38.
- 3 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*: Vol 1 (中华人民共和国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 392-393.
- 4 Jin JM (金建明), Li YH (李有海), Zhang HL (张海伦), *et al.* Chemical constituents of enzymatic hydrolysate of total ginsenoside extract of *Panax quinquefolium* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 1552-1556.
- 5 Liu L, Jiao Y, Huang GK, *et al.* New dammarane-type saponins from the roots of *Panax notoginseng* [J]. *Helv Chim Acta*, 2014, 97: 102-111.
- 6 Li YH (李有海), Han WJ (韩文敬), Lu SK (陆仕坤), *et al.* Chemical constituents of enzymatic hydrolysate of total ginsenoside from stems and leaves of *Panax ginseng* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28: 655-660.
- 7 Yahara S, Kaji K, Tanaka O. Further study on dammarane-type saponins of roots, leaves, flower-buds, and fruits of *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Chem Pharm Bull*, 1979, 27: 88-92.
- 8 Tran TL, Kim YR, Yang JL, *et al.* Dammarane triterpenes from the leaves of *Panax ginseng* enhance cellular immunity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22: 499-504.
- 9 Xing Q, Liang T, Shen G, *et al.* Comprehensive HILIC  $\times$  RPLC with mass spectrometry detection for the analysis of saponins in *Panax notoginseng* [J]. *Analyst*, 2012, 137: 2239-2249.
- 10 Bae EA, Choo MK, Park EK, *et al.* Metabolism of ginsenoside Rc by human intestinal bacteria and its related antiallergic activity [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25: 743-747.
- 11 Duc NM, Kasai R, Yamasaki K *et al.* New dammarane saponins from *Vietnamese ginseng* [J]. *Stud Plant Sci*, 1999, 6: 77-82.