

苦杏仁酶转化人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和 Rb<sub>1</sub> 制备稀有人参皂苷李瑞<sup>1</sup>, 黄丽<sup>1</sup>, 邹澄<sup>1\*</sup>, 陈晨<sup>1</sup>, 赵庆<sup>2</sup>, 周金娜<sup>1</sup>, 杜如男<sup>1</sup>, 杨为民<sup>1</sup><sup>1</sup>昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室; <sup>2</sup>云南中医学院中药学院, 昆明 650500

**摘要:**本研究以人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和 Rb<sub>1</sub> 为原料,通过苦杏仁酶水解的方法,采用核磁共振、质谱鉴定酶解产物的结构,分别为人参皂苷 Rh<sub>1</sub>、人参皂苷 Rd、人参皂苷 C-K。苦杏仁酶水解 Rg<sub>1</sub> 的途径为 Rg<sub>1</sub>→Rh<sub>1</sub>,在室温下搅拌反应 5 天, Rg<sub>1</sub> 几乎不发生反应;在温度为 50 °C 条件下搅拌反应 5 天,得到唯一产物 Rh<sub>1</sub>;苦杏仁酶水解 Rb<sub>1</sub> 的途径为 Rb<sub>1</sub>→Rd→C-K,反应在室温下搅拌反应 5 天得到唯一产物 Rd,在温度为 50 °C 条件下搅拌反应 5 天,得到 Rd 与 C-K 的混合物。杏仁酶水解人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和 Rb<sub>1</sub> 反应条件温和,副产物少。

**关键词:**人参皂苷 Rg<sub>1</sub>; 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>; 稀有人参皂苷 Rh<sub>1</sub>; 稀有人参皂苷 Rd; 稀有人参皂苷 C-K; 苦杏仁酶

中图分类号:R284.3;Q965.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.033

## The Preparation of Rare Ginsenoside by Enzymolysis of Ginsenoside Rg<sub>1</sub> and Rb<sub>1</sub> with Emulsin

LI Rui<sup>1</sup>, HUANG Li<sup>1</sup>, ZOU Cheng<sup>1\*</sup>, CHEN Chen<sup>1</sup>, ZHAO Qing<sup>2</sup>, ZHOU Jin-na<sup>1</sup>, DU Ru-nan<sup>1</sup>, YANG Wei-min<sup>1</sup><sup>1</sup>School of Pharmaceutical Sciences & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University;<sup>2</sup>Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China.

**Abstract:** In this paper, emulsin could convert ginsenoside Rg<sub>1</sub> to the single product of rare ginsenoside Rh<sub>1</sub>. The pathway of the transformation was Rg<sub>1</sub>→Rh<sub>1</sub>. The reaction did not take place at room temperature for 5 days, while the reaction happened at 50 °C for 5 days and Rh<sub>1</sub> was obtained. And emulsin could transform ginsenoside Rb<sub>1</sub> to the mixture of Rd and rare ginsenoside C-K. The transformation pathway of ginsenoside Rb<sub>1</sub> to C-K was Rb<sub>1</sub>→Rd→C-K. Rd was obtained after treated with emulsin at room temperature for 5 days, Rd and C-K was obtained while treated with emulsin at 50 °C for 5 days. The products were separated and purified by silica gel column chromatography. The structures of the hydrolyzates were identified with <sup>13</sup>C NMR, <sup>1</sup>H NMR and MS spectra. The reaction conditions of emulsin transform ginsenoside Rg<sub>1</sub> and Rb<sub>1</sub> are mild and the byproducts are rare.

**Key words:** ginsenoside Rg<sub>1</sub>; ginsenoside Rb<sub>1</sub>; rare ginsenoside Rh<sub>1</sub>; rare ginsenoside Rd; rare ginsenoside C-K; emulsin

三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 是国际瞩目的明星药用植物<sup>[1-2]</sup>,从三七的不同部位分离得到七十余种单体达玛烷型皂苷<sup>[3]</sup>。现代药理研究证明三七总皂苷对抗肿瘤、心血管系统、脑血管系统、泌尿生殖系统、免疫系统具有很好的疗效,其中稀有人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 和 C-K 都具有很强的抗肿瘤等活性<sup>[4-6]</sup>。人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 白参中仅含 0.015%,三七参中仅含 0.01%<sup>[7]</sup>,而人参皂苷 C-K 为达玛烷型二醇组人参皂苷的生物体内代谢产物<sup>[8,9]</sup>。三七总

皂苷中含量最多的单体皂苷为 Rg<sub>1</sub> 和 Rb<sub>1</sub>,目前可通过水解人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和 Rb<sub>1</sub> 得到抗肿瘤等活性较强的稀有人参皂苷,但人参皂苷 Rh<sub>1</sub> 等结构特殊,很难用酸水解的方式获得,碱水解反应条件太激烈。<sup>[10]</sup>因此利用苦杏仁酶水解的方法,能高效的得到稀有人参皂苷 Rh<sub>1</sub>、Rd、C-K,酶解途径为: Rg<sub>1</sub>→Rh<sub>1</sub>、Rb<sub>1</sub>→Rd→C-K,酶解条件温和,副产物少。

### 1 仪器与材料

Bruker DRX-500 核磁共振仪,以 CDCl<sub>3</sub> 为溶剂;上海申光 WRS-1 数字熔点仪;柱层析硅胶(300-400)为青岛海洋化工厂集团公司;RP-18(12 nm S-50 μm)为 YMC \* GEL ODS-A-HG;TLC 检测板为德国默克的 HX116198;显色剂为 15% 的硫酸乙醇溶液;实验中所用的溶剂为 AR 和重蒸工业纯;人参皂

收稿日期:2018-08-28 接受日期:2018-09-04

基金项目:国家自然科学基金项目(81160388);云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项重点项目(2017FE468(-001));云南省天然药物药理重点实验室开放研究基金资助项目(2017KPO-04);昆明医科大学 2017 年研究生创新基金(2017S070)

\* 通信作者 E-mail: zouchengkm@126.com, ywmbessie@yeah.net

苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 和 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 为昆明仁科商贸有限公司购置的三七总皂苷中分离提纯得到;苦杏仁购于市场。用来对照的人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 和 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 的纯品由实验室前期分离得到。

## 2 实验方法

### 2.1 苦杏仁酶的制备

取苦杏仁种子 1 kg,捣碎后用乙醚浸泡两次(每次约 1 L)。去除油脂,倾去乙醚,将苦杏仁子晾干,去皮。加 0.1 N 氨水 2.5 L 及 1.5 L 水浸泡过夜,次日过滤。滤渣再用上述同样比例的氨水溶液浸提一次,体积为上述体积的 2/3,两次浸提液合并,于浸提液中加入乙酸至 pH 4,滤去析出的蛋白质沉淀,滤液加酒精 2 L,滤去析出的沉淀,于滤液内再加入四倍量的酒精,放置冰箱,次日滤取析出的苦杏仁酶沉淀,酒精洗一次后即置干燥箱中干燥,备用(约得 5 g)。

### 2.2 人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 和 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 的分离纯化

粗分:三七总皂苷 1 Kg,正相硅胶 200~300 目装柱,100~200 目拌样,洗脱剂为乙酸乙酯:甲醇,分别用 9:1,85:15,8:2 的比例洗脱。展开剂为氯仿:甲醇:水(5:1:0.1,4:1:0.1,7:3:0.1)。

纯化:取用 9:1 的比例洗脱的中间部分 34 g,反向 RP-18 硅胶 250 g,湿法上样进行柱层析分离,洗脱剂为乙醇:水(4:6,5:5,7:3),反复柱层析 2~3 次。展开剂氯仿:甲醇:水(5:1:0.1),10% 的硫酸乙醇显色。与 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 纯品进行硅胶薄层板展开显色对照,得到纯的人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>;取用 8:2 的比例洗脱收集的中间部分 60 g,反向 RP-18 硅胶 450 g,湿法上样进行柱层析分离,洗脱剂为甲醇:水(5:5,6:4,7:3)。收集中间较纯的部分浓缩得 50 g,正相硅胶 300~400 目 300 g,干法上样进行柱层析分离,洗脱剂二氯甲烷:甲醇:水(85:15:0.1,35:15:0.1),展开剂氯仿:甲醇:水(4:1:0.1),10% 的硫酸乙醇显色。与 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 纯品进行硅胶薄层板展开显色对照,得到纯的人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub>。

### 2.3 水解产物的制备<sup>[11-15]</sup>

人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 的酶解:精密称取人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 500 mg 溶于 10% EtOH 35 mL,加入制备得到的苦杏仁酶 300 mg,在 50 °C 水浴搅拌下反应 5 d,采用硅胶薄层板进行监测,展开剂为二氯甲烷:甲醇:水(50:10:1),反相 RP-18 板,展开剂为乙醇:水(7:3),10% 的硫酸乙醇显色。

分离纯化:将酶水解样品液利用大孔吸附树脂

富集,用蒸馏水冲洗至无色后,用 70% 的乙醇洗脱,浓缩得到粗产物 300 mg。将粗产物进行反相 RP-18 硅胶柱层析,洗脱剂为乙醇:水(5:5,7:3),得到化合物 1(40.5 mg)。

人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 的酶解及分离同 R<sub>g<sub>1</sub></sub>。得到化合物 2(64.78 mg)、化合物 3(15.02 mg)。

### 2.4 温度对反应速率的影响

其他酶解反应条件相同,将加热改为室温,设为对照组,利用薄层板进行监测反应情况。

## 3 结果

### 3.1 酶解产物的 NMR 谱数据

化合物 1 白色无定型粉末(CHCl<sub>3</sub>);产率 8.1%;mp:200~203;<sup>1</sup>H NMR(MeOD,500 MHz) δ:0.84(3H,s,H-19),0.96(3H,s,H-30),0.93(3H,s,H-18),1.07(3H,s,H-29),1.24(3H,s,H-28),1.55(6H,s,H-26,H-27),1.61(3H,s,H-21),4.86[1H,d,J=7.6 Hz,H-6-glc-1H];<sup>13</sup>C NMR(MeOD,125 MHz) δ:39.4(t,C-1),27.9(t,C-2),78.6(d,C-3),40.3(s,C-4),60.4(d,C-5),77.6(d,C-6),45.2(t,C-7),41.1(s,C-8),50.2(d,C-9),39.6(s,C-10),32.0(t,C-11),71.0(d,C-12),48.2(d,C-13),51.6(s,C-14),31.1(t,C-15),26.8(t,C-16),54.7(d,C-17),17.4(q,C-18),17.4(q,C-19),73.0(s,C-20),26.8(q,C-21),35.8(t,C-22),23.0(t,C-23),126.1(d,C-24),131.9(s,C-25),25.8(q,C-26),17.6(q,C-27),31.7(q,C-28),16.4(q,C-29),16.8(q,C-30),6-O-Glc δ:105.5(d,C-1),75.4(d,C-2),80.9(d,C-3),71.8(d,C-4),79.5(d,C-5),63.1(t,C-6)。ESI-MS(m/s):639.44[M+H]<sup>+</sup>。与文献<sup>[16]</sup>报道的人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 数据相同。经分析,化合物 1 确定为人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub>。

化合物 2 白色无定型粉末(CHCl<sub>3</sub>);产率 12.9%;mp:203~206;<sup>1</sup>H NMR(MeOD,500 MHz) δ:0.84(3H,s,H-19),0.88(3H,s,H-30),0.89(3H,s,H-18),1.06(3H,s,H-29),1.23(3H,s,H-28),1.56(6H,s,H-26,H-27),1.61(3H,s,H-21),4.67[1H,d,J=7.6 Hz,H-3-glc(inner)-1H],5.10[1H,d,J=7.6 Hz,H-20-glc-1H],5.34[1H,d,J=7.6 Hz,H-3-glc(outer)-1H];<sup>13</sup>C NMR(MeOD,125 MHz) δ:39.1(t,C-1),26.7(t,C-2),88.9(d,C-3),39.6(s,C-4),56.4(d,C-5),18.5(d,C-6),

35.2 (t, C-7), 40.0 (s, C-8), 50.2 (d, C-9), 39.6 (s, C-10), 30.8 (t, C-11), 70.2 (d, C-12), 49.4 (d, C-13), 51.4 (s, C-14), 30.8 (t, C-15), 26.7 (t, C-16), 51.7 (d, C-17), 16.3 (q, C-18), 15.9 (q, C-19), 83.3 (s, C-20), 22.4 (q, C-21), 36.0 (t, C-22), 23.2 (t, C-23), 125.9 (d, C-24), 130.9 (s, C-25), 25.8 (q, C-26), 17.8 (q, C-27), 28.1 (q, C-28), 16.5 (q, C-29), 17.3 (q, C-30), 3-O-inner-Glc  $\delta$ : 105.0 (d, C-1), 83.3 (d, C-2), 78.1 (d, C-3), 71.6 (d, C-4), 78.1 (d, C-5), 62.7 (t, C-6), 3-O-outer-Glc  $\delta$ : 105.9 (d, C-1), 77.0 (d, C-2), 79.1 (d, C-3), 71.6 (d, C-4), 78.1 (d, C-5), 62.7 (t, C-6), 20-O--Glc  $\delta$ : 98.2 (d, C-1), 75.0 (d, C-2), 78.1 (d, C-3), 71.6 (d, C-4), 78.1 (d, C-5), 62.7 (t, C-6)。ESI-MS( $m/s$ ): 947.55 [M + H]<sup>+</sup>。与文献<sup>[17]</sup>报道的人参皂苷 Rd 数据相同。经分析, 化合物 **2** 确定为人参皂苷 Rd。

**化合物 3** 白色无定型粉末 (CHCl<sub>3</sub>); 产率 3.0%; mp: 220 ~ 224; <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 500 MHz)  $\delta$ : 0.83 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, s, H-18), 0.93 (3H, s, H-30), 1.03 (3H, s, H-29), 1.20 (3H, s, H-28), 1.57 (6H, s, H-26, H-27), 1.59 (3H, s, H-21), 5.14 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-20-glc-1); <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 125 MHz)  $\delta$ : 39.4 (t, C-1), 28.3 (t, C-2), 78.0 (d, C-3), 39.6 (s, C-4), 56.4 (d, C-5), 18.8 (d, C-6), 35.2 (t, C-7), 40.1 (s, C-8), 50.3 (d, C-9), 37.4 (s, C-10), 30.8 (t, C-11), 70.4 (d, C-12), 49.5 (d, C-13), 51.4 (s, C-14), 30.8 (t, C-15), 26.6 (t, C-16), 51.7 (d, C-17), 16.4 (q, C-18), 16.1 (q, C-19), 83.3 (s, C-20), 22.5 (q, C-21), 36.2 (t, C-22), 23.4 (t, C-23), 125.9 (d, C-24), 130.9 (s, C-25), 25.8 (q, C-26), 17.9 (q, C-27), 28.8 (q, C-28), 16.4 (q, C-29), 17.4 (q, C-30), 20-O-Glc  $\delta$ : 98.3 (d, C-1), 75.2 (d, C-2), 79.3 (d, C-3), 71.6 (d, C-4), 78.3 (d, C-5), 62.8 (t, C-6)。ESI-MS ( $m/s$ ): 1261.89 [M + H]<sup>+</sup>。与文献<sup>[17,18]</sup>报道的人参皂苷 C-K 数据相同。经分析, 化合物 **3** 为人参皂苷 C-K。

## 4 讨论

### 4.1 酶解产物的富集

酶解过程由于是在 10% EtOH 溶液中进行, 浓缩时大量的水不易蒸干, 若温度太高可能对产物有

影响, 而酶解产物吸附在 D101 大孔吸附树脂上, 10% EtOH 溶液几乎不能洗脱, 用 70% EtOH 溶液几乎能完全洗脱, 且洗脱剂易于蒸干, 所以利用 D101 大孔吸附树脂富集反应液, 解决反应中大量的水难蒸干的问题, 且避免温度过高对产物的影响。

### 4.2 酶解反应途径

苦杏仁酶水解人参皂苷 Rg<sub>1</sub>, 在室温下搅拌反应 5 d, 硅胶薄层板监测结果显示 Rg<sub>1</sub> 几乎不发生反应; 在温度为 50 °C 条件下搅拌反应 5 d, 薄层板监测得到唯一产物, 分离纯化后, 得化合物 **1**, 其结构经 NMR 和 ESI-MS 鉴定, 确证为 Rh<sub>1</sub>, 由此推测出人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 的酶解途径如图 1。苦杏仁酶水解人参皂苷 Rb<sub>1</sub>, 在室温下搅拌反应 5 d, 硅胶薄层板监测结果显示 Rb<sub>1</sub> 反应得到唯一产物, 分离纯化后, 得化合物 **2**; 在温度为 50 °C 条件下搅拌反应 5 d, 薄层板监测得到两个产物, 分离纯化后, 得化合物 **2** 和化合物 **3**, 其结构经 NMR 和 ESI-MS 鉴定, 确证为 Rd 和 C-K, 由此推测出人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的酶解途径如图 2。

## 5 结论

### 5.1 稀有人参皂苷的临床意义

稀有人参皂苷 Rh<sub>1</sub>、Rd、C-K 在人参中含量较少, 体内实验研究证明, C-K 是小肠吸收的主要形式, 一些脱糖基的稀有人参皂苷在体内作为主要的活性形式, 更容易吸收入血液系统发挥活性作用。提示, 稀有人参皂苷或苷元成为了皂苷中重要的药物待选分子。

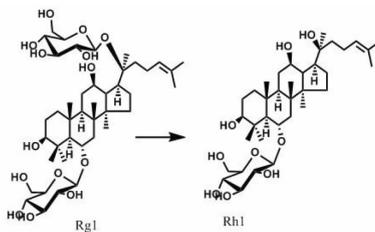


图 1 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 的酶解途径

Fig. 1 The enzymatic pathways of ginsenoside Rg<sub>1</sub>

### 5.2 苦杏仁酶酶解的意义

在本实验的酶水解条件下, 化合物 **1** 和化合物 **3** 的产率都比较低, 产率分别为 8.1%、3.0%, 提示苦杏仁酶对 Rg<sub>1</sub> 转化成 Rh<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub> 转化成 C-K 的转化率便不理想。有待进一步寻找新的反应条件或新的水解酶代替苦杏仁酶。人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的化学结构上糖之间的连接方式主要有  $\beta$ -1,6-葡萄糖苷键,

$\beta$ -1,2-葡萄糖苷键,由结果可知杏仁酶水解  $\beta$ -1,6-葡萄糖苷键的能力强于水解  $\beta$ -1,2-葡萄糖苷键,这为苦杏仁酶水解苷键的研究提供了理论依据。

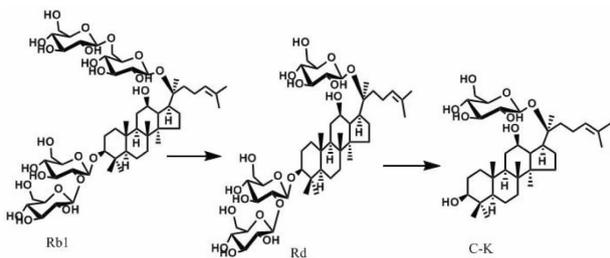


图2 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的酶解途径

Fig.2 The enzymatic pathways of ginsenoside Rb<sub>1</sub>

### 参考文献

- Han BH, Park MH, Han YN, *et al.* Degradation of ginsenoside sapogenin under mild acidic condition[J]. *J Med Plant Res*, 1982, 44: 146-149.
- Pu H(蒲洪), Dong CM(董成梅), Zou C(邹澄), *et al.* Synthesis and anti-tumor activity of sulfonamide derivatives of panaxadiol sapogenin[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2014, 26: 1739-1744.
- Pu H(蒲洪), Dong CM(董成梅), Zou C(邹澄), *et al.* Synthesis and anti-tumor activity of derivatives of oxidation degradation products from panaxadiol Sapogenin [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2016, 28: 749-753.
- Su P(苏萍), Wang L(王蕾), Du SJ(杜仕静), *et al.* Panax notoginseng saponin on neurological diseases pharmacological mechanism of progress[J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2014, 39: 4516-4521.
- Leng J(冷静), Fu CM(傅超美), Wang F(万方). The progress of chemical constituents and pharmacological effects of saponins from Panax notoginseng [J]. *West Chin J Phar Sci*(华西药学杂志), 2011, 26(1): 83-86.
- Chen SW(陈声武), Wang Y(王岩), Wang Y(王毅), *et al.* Anti-tumor effect of ginsenoside Rg<sub>1</sub> and Rh<sub>1</sub>[J]. *J Jilin Univ Medi Edit*(吉林大学学报), 2003, 1: 25-28.
- Sun SY(孙斯宜), Song JG(宋建国), Yu SH(鱼红闪), *et al.* Transformation of ginsenoside Rg<sub>1</sub> to ginsenoside Rh<sub>1</sub> by the enzyme from *Arthrobacter* sp. No. 3 bacterium[J]. *Dalian Poly Univ*(大连工业大学学报), 2011, 30(1): 1-4.

- Zhang WY(张伟云), Chen QC(陈全成), Zheng YN(郑毅男), *et al.* RP-HPLC determination of ginsenoside compound K in various parts of panax ginseng[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2007, 1: 1-3.
- Li XP(李相鹏), Wang P(王鹏), Li YX(李英霞). Advances in pharmacological activities of active ketones of ginsenoside dioside saponins[J]. *China Pharm Toxi*(中国药理学与毒理学杂志), 2011, 25(1): 97-101.
- Li XW(李绪文). Study on ginsenoside degradation and chemical constituents of degradation products [D]. Changchun: Jilin University(吉林大学), 2006.
- Zhang CZ(张春枝). Ginsenoside glycosidases from panax ginseng [D]. Dalian: Dalian University of Technology(大连理工大学), 2002.
- Yu ZH(于兆慧), Liu QY(刘其媛), Cui L(崔莉), *et al.* Study on the preparation of rare ginsenoside compound K by enzymolysis of ginsenoside Rb<sub>1</sub> with snailase [J]. *Chin J Trad Chin Med*(中华中医药杂志), 2015, 30(2): 412-416.
- Teruaki A, Matao K, Kyoichi K. Appearance of compound K, a major metabolite of ginsenoside Rb<sub>1</sub> by intestinal bacteria in Rat plasma after Oral administration-measurement of compound K by enzyme immunoassay [J]. *Biol pharm Bull*. 1998, 21: 245-249.
- Sun XY(孙晓雨). Progress in the study of glycosylase conversion of ginsenosides [J]. *Biot World*(生物技术世界), 2013, 9: 75.
- Gao J(高娟). Study on biotransformation of ginsenoside by glycosidase hydrolases [D]. Shenyang: Northeastern University(东北师范大学), 2012.
- Heejung Y, Jeom YK, Sun OK, *et al.* Complete 1H-NMR and 13C-NMR spectral analysis of the pairs of 20(S) and 20(R) ginsenosides [J]. *J Gins Res*, 2014, 38: 194-202.
- Cheng LQ, Myung KK, Lee JW, *et al.* Conversion of major ginsenoside Rb<sub>1</sub> to ginsenoside F<sub>2</sub> by *Caulobacter leidyia* [J]. *Biot Lett* 2006, 28: 1121-1127.
- Jiang BH(姜彬慧), Zhao YQ(赵余庆), Han L(韩凌), *et al.* Extraction and isolation of the hydrolyzate of Panax notoginseng saponins [J]. *Chin J Nat Med*(中国天然药物), 2004, 4: 12-14.