

二步法制备稀有人参皂苷 Rh1 组异构体

金豆豆¹, 刘春莹², 徐龙权¹, 宋建国¹, 鱼红闪^{1,*}

(1.大连工业大学生物工程学院, 辽宁大连 116034;

2.大连大学生命科学与技术学院, 辽宁大连 116622)

摘要: 本论文以制备人参皂苷 Rh1 为目标, 选择三醇类人参皂苷 Re 为底物, 采用酶转化和金属离子催化联用的二步法催化转化, 研究了各步骤中的催化反应条件, 并对产物进行了纯化和组成分析。结果表明: *Absidia* sp.P39r 菌株产酶能催化转化 Re 生成 Rg1, 确定其最佳反应条件为: 缓冲液 pH5.0, 反应温度 40 °C, 底物浓度 1.2%, 反应时间 16 h, 乙醇浓度 10%, 在此反应条件下得到的 Rg1 质量分数最高, 为 70.5%。然后以 Rg1 为底物, 确定在乙醇-水体系下 Fe^{3+} 的催化反应产物 20(S,R)-Rh1 的质量分数最高, 催化反应条件优化结果为: 乙醇浓度 50%, 反应温度 50 °C, 底物浓度 1.7%, Fe^{3+} 溶液反应浓度 1.4 mol/L, 反应时间 14 h, 20(S,R)-Rh1 的质量分数高达 61.83%, Rk3、Rh4 的质量分数之和为 27.34%。在上述条件下将 20 g 人参皂苷 Re 与酶液反应, 反应结束后用 AB-8 大孔吸附树脂分离干燥得到含有 Rg1 的产物 14.1 g。再取 10.2 g 反应得到的 Rg1 与 Fe^{3+} 溶液反应, 干燥后最终得到的人参皂苷 Rh1 组异构体质量为 8.18 g, 得率为 80.2%, 其中 20(S)-Rh1, 20(R)-Rh1, Rk3 和 Rh4 的含量分别为 37.71%, 24.12%, 7.27%, 20.07%。

关键词: 酶催化法, Fe^{3+} 催化法, 人参皂苷 Rh1, 异构体

Preparation of Rare Ginsenoside Rh1 Group Isomers by Two-step Method

JIN Dou-dou¹, LIU Chun-ying², XU Long-quan¹, SONG Jian-guo¹, YU Hong-shan^{1,*}

(1.College of Bioengineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China;

2.College of Life sciences and Technology, Dalian University, Dalian 116622, China)

Abstract: The aim of this thesis was to prepare ginsenoside Rh1 by catalytic transformation of protopanaxatriol type saponin Re with two-step method including enzymatic conversion and metal ion catalysis. The catalytic reaction conditions in each step were researched, and the products were purified and analyzed. The results showed that, *Absidia* sp.P39r strain could catalyze Re to Rg1, the optimum reaction conditions were determined as: Buffer pH5.0, reaction temperature 40 °C, substrate concentration 1.2%, reaction time 16 h, ethanol concentration 10%. Under these conditions, the mass fraction of Rg1 obtained was the highest, up to 70.5%. Next, Rg1 was used as the substrate, the mass fraction of 20(S,R)-Rh1 was determined to be the highest in reaction conditions under metallic ion Fe^{3+} catalysis. The optimum reaction conditions were as follows: Ethanol concentration 50%, reaction temperature 50 °C, substrate concentration 1.7%, Fe^{3+} solution concentration 1.4 mol/L, reaction time 14 h, the mass fraction of 20(S,R)-Rh1 was 61.83%, and the sum mass fractions of Rk3 and Rh4 were 27.34%. Under the above conditions, 20 g ginsenoside Re was reacted with the enzyme solution. And after the reaction was completed, 14.1 g Rg1-containing product was obtained by separation with AB-8 macroporous adsorption resin and dried. Then, 10.2 g Rg1 obtained by the reaction was reacted with Fe^{3+} solution. After drying, the mass of the final ginsenoside Rh1 group isomers was 8.18 g, with a conversion rate of 80.2%, in which the contents of 20(S)-Rh1 was 37.71%, 20(R)-Rh1 was 24.12%, Rk3 was 7.27%, Rh4 was 20.07%.

Key words: enzymatic method; Fe^{3+} catalysis; ginsenoside Rh1; isomer

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2019)16-0156-07

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.16.026

引文格式: 金豆豆, 刘春莹, 徐龙权, 等. 二步法制备稀有人参皂苷 Rh1 组异构体[J]. 食品工业科技, 2019, 40(16): 156-162.

人参 (*Panax ginseng* C.A. Meyer) 属五加科 (Araliaceae) 多年生草本植物^[1], 是一种名贵中药, 分

布于中国东北, 俄罗斯东部, 朝鲜等地^[2]。人参皂苷 Re, Rg1 和 Rh1 是三醇类皂苷^[3-5], 现代药理学研究

收稿日期: 2019-01-28

作者简介: 金豆豆 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物的催化转化, E-mail: 13478591905@163.com。

* 通讯作者: 鱼红闪 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物的催化转化, E-mail: hongshan@dlpu.edu.cn。

基金项目: 国家高端外国专家项目 (GDT20152100019)。

表明,人参皂苷 Re 具有抗溶血作用^[6-7];人参皂苷 Rg1 具有抗疲劳作用,可以调节中枢神经兴奋度并能改善记忆力^[8-9];人参皂苷 Rh1 属于稀有皂苷,具有抑制癌细胞增殖的作用,但在人参植物中含量极少,与 Rg1 相比更易被人体吸收,并且具有更好的生理活性^[10-11],如何高利用低廉的皂苷有效地制备人参皂苷 Rh1 是近年来的研究目标。

在 Rg1 的制备方面,金赞敏等^[12]发现微生物 sp.G9(即为本文的 *Absidia* sp.P39r 菌种)产皂甙 α -鼠李糖苷酶具有专一性,能够水解人参皂甙 Re 的 C-6 位末端上的一个 α -鼠李糖基制备人参皂甙 Rg1,且酶反应的最佳温度是 40℃,最适 pH 为 5.0。在稀有人参皂苷 Rh1 的制备方面,Cao 等^[13]以原人参三醇组皂苷为底物,采用弱酸(冰醋酸)水解法制备出 Rh1,由于该方法副产物较多,后续采用硅胶柱层析法才能进一步制备出纯度达 90% 的 Rh1。目前关于转化人参皂苷的文献报告很多,大多数情况下使用酸、碱水解法转化人参皂苷,但这种方法反应剧烈,产生的产物复杂,并且强酸和强碱会对环境造成严重污染^[14-15]。

在前期研究中发现,酶法催化转化人参皂苷反应条件温和,反应过程容易控制,在常温下即可进行,底物特异性强且产物单一,对环境没有污染^[16-18]。在人参皂苷的催化转化研究中也发现,过渡态金属离子如 Fe^{3+} 可以催化人参皂苷的糖基水解,反应具有定向性,且产物分离相对容易并能够将金属离子进行回收,从而有效地降低其对环境的污染。

本文采用二步法,首先以 Re 为底物通过酶催化反应制备 Rg1,再以制备出的 Rg1 为底物, Fe^{3+} 为催化剂进行反应,以得到包含 20(S)-Rh1 和 20(R)-Rh1 在内的异构体组合物为目的,实现用廉价人参皂苷制备稀有人参皂苷的目标,为其进一步的开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

Absidia sp.P39r(犁头霉)菌株 大连工业大学生物工程学院菌种保藏所;人参皂苷 Re、Rg1 样品以及 Re、Rg1、20(S)-Rh1、20(R)-Rh1、Rk3 和 Rh4 对照品 实验室自制,HPLC 纯度达到 95% 以上;AB-8 大孔吸附树脂 南开大学化工厂;人参粉 北京同仁堂大连分店;麦芽汁 实验室自制;透析袋(0.1~0.5 kDa) 上海新睿生物科技有限公司;硫酸铵、无水乙酸钠、冰醋酸、无水乙醇、乙二醇、甲醇、正丁醇、异丁醇、正丙醇、1,2-丙二醇、异丙醇、异戊醇、聚乙二醇、正戊醇、正己醇、正庚醇、环己醇、丙三醇、环戊醇、苯甲醇、1,3-丙二醇 Sigma-Aldrich;娃哈哈纯净水 大连娃哈哈饮用水有限公司;HPLC 试剂 色谱纯;实验所用其他试剂 均为国产分析纯。

Waters 2695-2424 高效液相色谱仪 美国 Waters 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的液体培养 固体斜面培养基:采用麦芽汁培养基,此培养基配方为:5°麦芽汁+2%琼脂。将 *Absidia* sp.P39r 菌株接种在此培养基上,在 29℃

条件下培养 6 d,之后用牛皮纸包好,放在 4℃ 下保藏备用。

人参浸出液的制备:将 100 g 人参粉与 600 mL 水在烧杯中混合均匀,小火煎煮 7 h,(煎煮的过程中注意补水和搅拌,防止糊化);冷却,用四层纱布过滤掉残渣的滤液,将滤液在 8000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液,即是诱导物浸出液,补水至 300 mL,高压灭菌,于 4℃ 保藏备用。

液体发酵培养基:取 12 mL 的人参浸出液加入 48 mL 的麦芽汁,再加入 40 mL 自来水补齐至 100 mL,配制成液体发酵培养基(麦芽汁的最终浓度为 5°)。蒸汽灭菌(121℃,1 MPa)21 min,冷却至室温。

1.2.2 酶液的制备 根据李明华等^[19]研究的霉菌液体菌种的方法培养菌种,取活化好的 *Absidia* sp.P39r 菌株斜面,用移液枪取 5 mL 菌种接种到液体发酵培养基后置于振荡培养箱中。再将发酵培养好的 100 mL 发酵液进行高速离心,转速为 8000 r/min,时间是 15 min(去除菌体),取上清液。在上清液中缓慢加入硫酸铵粉末(在磁力搅拌条件下)进行盐析,直至加入的硫酸铵饱和度为 85%,之后在 4℃ 下静置、过夜。再在 13000 r/min 条件下离心 20 min,收集沉淀,即为酶蛋白。用 10 mL 0.02 mol/L pH5.0 醋酸钠-醋酸缓冲液将酶蛋白沉淀溶解,转入透析袋用相同的缓冲溶液进行透析 48 h,透析过程中每隔 2 h 换一次透析袋。透析结束后,用高速冷冻离心机在 13000 r/min 下离心 10 min,除去不溶性杂蛋白^[20]。所得上清液即为酶液。

1.2.3 酶转化生成 Rg1 最佳反应条件的确定 底物 Re 的配制:取 1 mg Re 对照品加入到 200 μ L 无水乙醇和 800 μ L pH5.0 醋酸钠-醋酸缓冲液中完全溶解,取 1 mL 底物 Re 溶液加入 1 mL 酶液进行酶反应。对 *Absidia* sp.P39r 菌产酶液催化转化 Re 的最佳反应条件进行确定(表 2),固定反应条件为:反应温度 40℃,底物浓度 1 mg/mL,乙醇浓度 10%,反应时间 20 h,考察不同缓冲液 pH(3.4、3.8、4.2、4.6、5.0、5.4、5.8、6.2)对产物中 Rg1 质量分数的影响;固定反应条件为:缓冲液 pH5.0,底物浓度 1 mg/mL,乙醇浓度 10%,反应时间 20 h,考察不同反应温度(25、30、35、40、45、50、55、60℃)对产物中 Rg1 质量分数的影响;固定反应条件为:缓冲液 pH5.0,反应温度 40℃,乙醇浓度 10%,反应时间 20 h,考察不同底物浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 mg/mL)对产物中 Rg1 质量分数的影响;固定反应条件为:缓冲液 pH5.0,反应温度 40℃,底物浓度 1 mg/mL,反应时间 20 h,考察不同乙醇浓度(0.2%、4%、6%、8%、10%、12%、14%、16%、18%、20%)对产物中 Rg1 质量分数的影响;固定反应条件为:缓冲液 pH5.0,反应温度 40℃,底物浓度 1 mg/mL,乙醇浓度 10%,考察不同反应时间(6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26 h)对产物中 Rg1 质量分数的影响。进行单因素实验,分别对每个反应取样,加入 2 BV 水饱和和正丁醇终止酶反应,振荡,分层,吸走下层液体,将上层液体蒸干得到粉末样品。粉末样品用色谱纯甲醇溶解,通过 HPLC-PDA 检测分析,根据催化反应得到的 Rg1 的

质量分数来确定最佳反应条件。

1.2.4 Fe^{3+} 催化生成 Rh1 组异构体最适有机溶剂体系的确定 底物 Rg1 的配制:取 1 mg Rg1 对照品加入到 500 μL 不同的有机醇试剂(选用无水乙醇、乙二醇、甲醇、正丁醇、异丁醇、正丙醇、1,2-丙二醇、异丙醇、异戊醇、聚乙二醇 400、正戊醇、正己醇、正庚醇、环己醇、丙三醇、环戊醇、苯甲醇、和 1,3-丙二醇)和 500 μL 去离子水中完全溶解,再选取纯净水为对照组。分别取 1 mL 底物 Rg1 溶液加入 1 mL 1.5 mol/L FeCl_3 溶液进行金属离子催化反应,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 15 h 后,2 BV 水饱和正丁醇萃取,取正丁醇层加 3 BV 水继续萃取以除去 Fe^{3+} ,水洗正丁醇层 3 遍,蒸干正丁醇层得到粉末样品。用色谱纯甲醇溶解,经 HPLC-PDA 检测分析,通过催化反应得到的 20(S,R)-Rh1 的质量分数来确定最佳有机溶剂体系。

1.2.5 Fe^{3+} 催化生成 Rh1 组异构体最佳反应条件的确定 底物 Rg1 的配制:取 1 mg Rg1 对照品加入到 500 μL 无水乙醇和 500 μL 去离子水中完全溶解,取 1 mL 底物 Rg1 溶液加入 1 mL FeCl_3 溶液进行金属离子催化反应。用 Fe^{3+} 作为催化反应中的金属离子,以酶反应得到的 Rg1 为底物(表 3),反应条件为:固定反应条件为反应温度 50 $^{\circ}\text{C}$,底物浓度 1 mg/mL, FeCl_3 溶液浓度 1.5 mol/L,反应时间 15 h,考察不同乙醇浓度(30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%)对产物中 20(S,R)-Rh1 质量分数的影响;固定反应条件为乙醇浓度 50%,底物浓度 1 mol/L, FeCl_3 溶液浓度 1.5 mol/L,反应时间 15 h,考察不同反应温度(25、30、35、40、45、50、55、60、65 $^{\circ}\text{C}$)对产物中 20(S,R)-Rh1 质量分数的影响;固定反应条件为乙醇浓度 50%,反应温度 50 $^{\circ}\text{C}$, FeCl_3 溶液浓度 1.5 mol/L,反应时间 15 h,考察不同底物浓度(0.2、0.5、0.8、1.1、1.4、1.7、2.0、2.3、2.6、3.0 mg/mL)对产物中 20(S,R)-Rh1 质量分数的影响;固定反应条件为乙醇浓度 50%,反应温度 50 $^{\circ}\text{C}$,底物浓度 1 mol/L,反应时间 15 h,考察不同 FeCl_3 溶液浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 mol/L)对产物中 20(S,R)-Rh1 质量分数的影响;固定反应条件为乙醇浓度 50%,反应温度 50 $^{\circ}\text{C}$,底物浓度 1 mol/L, FeCl_3 溶液浓度 1.5 mol/L,考察不同反应时间(2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28 h)对产物中 20(S,R)-Rh1 质量分数的影响。进行单因素实验,分别对每个反应取样,分别加入 2 BV 水饱和正丁醇萃取,取正丁醇层加 3 BV 水继续萃取以除去 Fe^{3+} ,水洗正丁醇层 3 遍,蒸干正丁醇层得到粉末样品。用色谱纯甲醇溶解,经 HPLC-PDA 检测分析,通过催化反应得到的 20(S,R)-Rh1 的质量分数来确定 Fe^{3+} 催化的最佳反应条件。

1.2.6 酶转化产物和 Fe^{3+} 催化反应产物的 HPLC-PDA 检测 色谱柱:中汇达 C18 色谱柱($\varphi 250\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$, 5 μm);柱温 35 $^{\circ}\text{C}$;进样量 10 μL ;流速 1.0 mL/min;载气压力 30 psi;漂移管温度 80 $^{\circ}\text{C}$;流动相为乙腈(A)和水(B);流动相洗脱梯度:0~20 min,

20% A;20~31 min,20%~32% A;31~40 min,32%~43% A;40~70 min,43%~100% A^[21]。

对照品溶液的制备:精密称取人参皂苷 Rg1,20(S)-Rh1,20(R)-Rh1,Rk3 和 Rh4 对照品 10 mg 溶于 5 mL 色谱甲醇中,配成浓度为 2 mg/mL 的对照品溶液,然后分别取 1 mL 加入色谱甲醇稀释成浓度 2.0、1.6、1.2、0.8、0.4 mg/mL 的对照品溶液,过膜备用。分别取上述制备的不同浓度对照品溶液 10 μL 按上述色谱条件进样分析,以测得的峰面积的自然对数对进样浓度的自然对数绘制标准曲线,用最小二乘法进行线性回归,得到各个成分的回归方程^[22],结果见表 1。

表 1 人参皂苷 Rg1 和 Rh1 组的线性回归方程

Table 1 Regression equation of ginsenoside Rg1 and Rh1 components

人参皂苷种类	标准曲线	R^2
Rg1	$y = 0.489x + 0.013$	0.9994
20(S)-Rh1	$y = 0.537x + 0.005$	0.9997
20(R)-Rh1	$y = 0.546x + 0.022$	0.9994
Rk3	$y = 0.613x + 0.017$	0.9992
Rh4	$y = 0.609x + 0.012$	0.9993

表 2 酶催化转化 Re 生成 Rg1 反应条件

Table 2 Reaction condition for enzymatic conversion of Re to Rg1

水平	因素				
	A pH	B 反应温度($^{\circ}\text{C}$)	C 底物浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	D 乙醇浓度(%)	E 反应时间(h)
1	3.4	25	0.2	0	6
2	3.8	30	0.4	2	8
3	4.2	35	0.6	4	10
4	4.6	40	0.8	6	12
5	5.0	45	1.0	8	14
6	5.4	50	1.2	10	16
7	5.8	55	1.4	12	18
8	6.2	60	1.6	14	20
9			1.8	16	22
10			2.0	18	24
11				20	26

1.2.7 催化反应产物的质量分数计算 催化反应产物经 HPLC-PDA 测定后,参照上述回归方程分别计算 Rg1,20(S)-Rh1,20(R)-Rh1,Rk3 和 Rh4 的质量。将 Rg1 归为一组,20(S)-Rh1 + 20(R)-Rh1 归为一组称为 20(S,R)-Rh1,由于 Rk3、Rh4 与 20(S)-Rh1,20(R)-Rh1 类似,均为一组手性对称三醇类人参皂苷,相对分子质量相同,故将 Rk3 + Rh4 归为一组,Rg1 的质量分数(ω_1)计算方法如下:

$$\omega_1(\%) = \frac{m_{\text{Rg1}}}{m_1} \times 100$$

20(S,R)-Rh1 的质量分数(ω_2):

$$\omega_2(\%) = \frac{m_{20(\text{S})-\text{Rh1}} + m_{20(\text{R})-\text{Rh1}}}{m_2} \times 100$$

表3 Fe³⁺催化转化 Rg1 生成 Rh1 组异构体反应条件

水平	因素				
	A 乙醇浓度 (%)	B 反应温度 (℃)	C 底物浓度 (mg·mL ⁻¹)	D Fe ³⁺ 浓度 (%)	E 反应时间 (h)
1	30	25	0.2	0.2	2
2	35	30	0.5	0.4	4
3	40	35	0.8	0.6	6
4	45	40	1.1	0.8	8
5	50	45	1.4	1.0	10
6	55	50	1.7	1.2	12
7	60	55	2.0	1.4	14
8	65	60	2.3	1.6	16
9	70	65	2.6	1.8	18
10	75		3.0	2.0	20
11	80				22
12					24
13					26
14					28

Rk3 和 Rh4 的质量分数(ω₃):

ω₃ (%) = $\frac{m_{Rk3} + m_{Rh4}}{m_2} \times 100$

式中:m₁ 指酶催化反应得到的粉末状样品 1 的质量,m₂ 指金属离子催化反应得到的粉末状样品 2 的质量。

1.3 数据处理

实验数据数据通过 HPLC 检测器得到的峰型图谱分析,分别将 Rg1、20(S)-Rh1、20(R)-Rh1、Rk3 和 Rh4 出峰的保留时间代入对应的标准曲线中,得到对应的 area 和 area%,计算相应的质量,以 $\bar{X} \pm SD$ 表示,SPSS Statistics17.0 进行方差分析,采用 Origin9 软件作图。

2 结果与分析

2.1 酶转化法制备 Rg1 的催化反应条件选择

采用 1.2.3 的方法对 *Absidia* sp.P39r 菌产粗酶液催化 Re 的反应条件进行优化,得到人参皂苷 Rg1 的质量分数折线图。图 1A 表明,随着 pH 的增加,Rg1 的量先增加再减少,pH 为 4.6 时,Rg1 的质量分数最大为 68.5%^[23];图 1B 表明,随着温度的增加,Rg1 的量先增加再减少,当温度为 40℃ 时,Rg1 的质量分数最大为 71.5%;图 1C 表明,底物浓度为 1.2% 时,Rg1

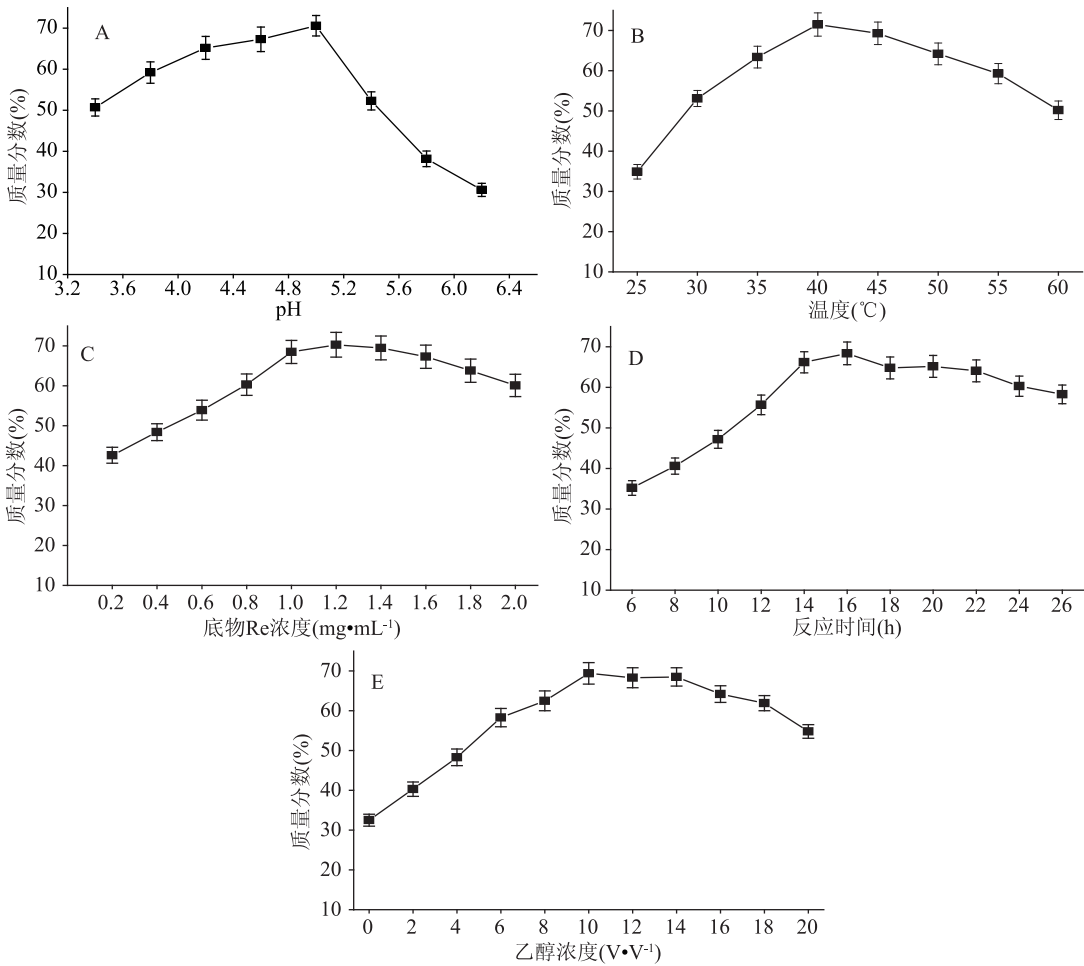


图1 不同反应条件下 Rg1 的质量分数折线图

Fig.1 Mass fraction line chart of Rg1 under different reaction conditions

注:(A)反应 pH;(B)反应温度;(C)底物浓度;(D)反应时间;(E)乙醇浓度。

的质量分数最大为 70.3% ;图 1D 表明,随着时间的增加,反应时间为 16 h 时,Rg1 的质量分数最大为 68.4%。图 1E 表明,乙醇浓度为 0% 时 Re 仍有剩余,随着乙醇浓度的增加,Rg1 的质量分数先增加后缓慢减少,当乙醇浓度在 10% 时 Rg1 的质量分数最大为 69.4%。最终确定最佳反应条件为:缓冲液 pH5.0,反应温度 40 ℃,底物浓度 1.2%,反应时间 16 h,乙醇浓度 10%。

2.2 Fe^{3+} 催化法制备 Rh1 组异构体的最佳有机溶剂体系

采用 1.2.4 的方法得到的结果如图 2 所示,在 19 种有机醇体系中,均有 20(S,R)-Rh1 生成,但质量分数不同,由于人参皂苷 Rg1 和 Rh1 是低极性化合物^[24],水溶性不好,醇溶性较好,并且在乙醇体系中 Fe^{3+} 催化人参皂苷 Rg1 生成的 20(S,R)-Rh1 含量最多,因此选择乙醇-水作为溶剂体系考察其对催化反应的影响。

2.3 Fe^{3+} 催化法制备 Rh1 组异构体的最佳反应条件的优化

根据 1.2.5 的试验条件对 Fe^{3+} 催化 Rg1 生成 Rh1 组异构体的反应条件进行优化,得到 20(S,R)-Rh1,

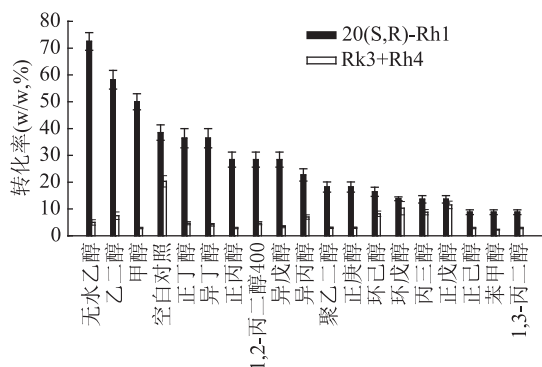


图2 不同有机醇体系下 Rh1 组各组分质量分数

Fig.2 Mass fraction of Rh1 group components in different organic alcohol systems

Rk3 和 Rh4 的质量分数折线图。图 3A 表明,随着乙醇浓度的增加,20(S,R)-Rh1 的量先增加再减少,乙醇浓度为 50% 时,20(S,R)-Rh1 的质量分数达到最大为 52.7%^[25];图 3B 表明,当反应温度为 30 ℃ 时,Rg1 有较多剩余,50 ℃ 时 Rg1 基本都催化转化为 Rh1 组异构体,其中 20(S,R)-Rh1 的质量分数高达 63.2%;图 3C 表明,底物 Rg1 浓度为 1.7% 时,20(S,R)-Rh1 的质量分数最大为 60.3%;图 3D 表明,随着

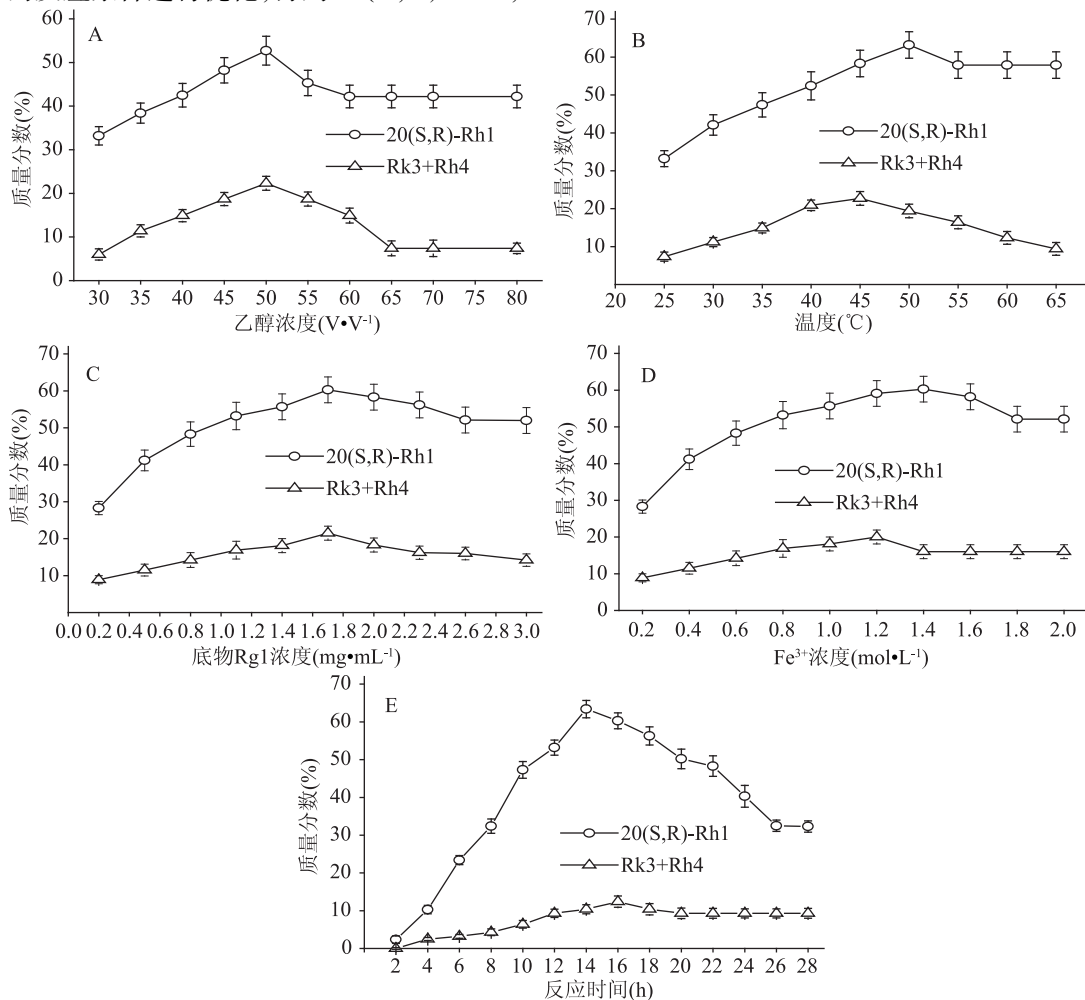


图3 不同反应条件下 Rh1 组化合物的质量分数折线图

Fig.3 Mass fraction line chart of Rh1 group components under different reaction conditions

注:(A)乙醇浓度;(B)反应温度;(C)底物浓度;(D) Fe^{3+} 浓度;(E)反应时间。

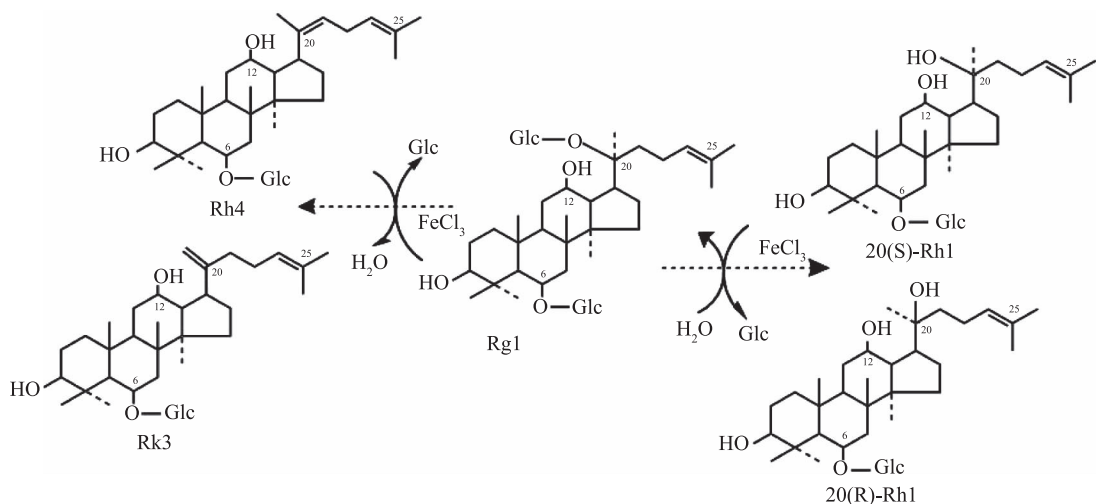


图4 Fe^{3+} 催化人参皂苷 Rg1 的反应过程

Fig.4 Reaction pathway of ginsenoside Rg1 by Fe^{3+}

Fe^{3+} 浓度的增加,20(S,R)-Rh1 的质量分数先增加后减少, FeCl_3 溶液浓度为 1.4 mol/L 时,20(S,R)-Rh1 的质量分数高达 60.3%。

图 3E 表明,在乙醇-水体系下, Fe^{3+} 催化人参皂苷 Rg1 的反应发生的很快,在 2 min 时就已经有 20(S,R)-Rh1、Rk3 和 Rh4 的生成,说明在 C-20 糖苷键裂解的同时进行脱水反应;当反应进行到 14 h 和 16 h 时,20(S,R)-Rh1、Rk3 和 Rh4 的含量相继达到最高,分别为 63.4% 和 14.5%。随后 20(S,R)-Rh1 的质量分数开始下降,Rk3 和 Rh4 趋于平衡。从上述结果可以看出, Fe^{3+} 直接催化裂解了人参皂苷 Rg1 C-20 上的葡萄糖苷键,在生成 20(S)-Rh1 和 20(R)-Rh1 的同时发生脱水反应生成 Rk3 和 Rh4。由此得出 Fe^{3+} 催化转化人参皂苷 Rg1 的反应过程,结果如图 4 所示。最终确定最佳反应条件为:乙醇浓度 50%, Fe^{3+} 溶液的反应浓度 1.4 mol/L,反应温度 50℃,底物浓度 1.7%,反应时间 14 h。

2.4 二步法催化转化制备 Rh1 组异构体

根据 2.1~2.3 得出的最佳反应条件,以 Re 为底物,*Absidia* sp.P39r 菌株产酶液为催化剂进行反应,采用 10% 乙醇作为溶剂体系,称取 20.0 g Re 溶于 200 mL 无水乙醇,待底物完全溶解后,加入 0.02 mol/L pH 为 5.0 的醋酸钠-醋酸缓冲液,定容至 1 L,加入 1 L 酶液,在 40℃ 下反应 14 h 后,将反应液用去离子水稀释 5 倍,并快速经提前处理好的 AB-8 大孔吸附树脂^[24]进行脱糖处理,并将溶液进行旋转蒸发至粉末状。最终得到催化产物粗品质量 14.1 g,得率为 70.5%。制备得到的粗品经 HPLC-PDA 测定,结果如图 5 所示。发现粗品中含有 1 种催化反应产物 Rg1 纯度达 94% 以上。

然后以 Rg1 为底物, FeCl_3 为金属离子催化剂进行反应,采用 50% 乙醇作为溶剂体系,称取 10.2 g Rg1 和 68.12 g FeCl_3 溶剂于 300 mL 体积分数为 50% 的乙醇中,在 50℃ 下反应 14 h 后,将反应液用去离子水稀释 5 倍,并快速经提前处理好的 AB-8 大孔吸附树脂进行脱铁脱糖处理^[25-26],并将溶液进行旋转蒸发至粉末状。最终得到催化产物粗品质量 8.18 g,得

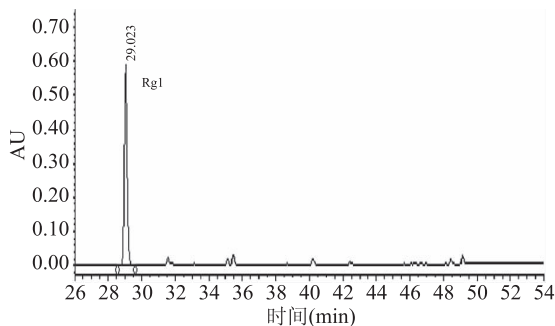


图5 Rg1 的 HPLC 检测图

Fig.5 HPLC of ginsenoside Rg1

率为 80.2%。制备得到的粗品经 HPLC-PDA 测定,结果如图 6 所示。发现粗品中含有 4 种催化反应产物,分别为 20(S)-Rh1、20(R)-Rh1、Rk3 和 Rh4。其中 20(S,R)-Rh1 的含量为 61.83%,Rk3、Rh4 的含量总和为 27.34%。其中 20(S)-Rh1 的含量为 37.71%,20(R)-Rh1 的含量为 24.12%,Rk3 的含量为 7.27%,Rh4 的含量为 20.07%。20(S,R)-Rh1、Rk3 和 Rh4 的含量之比为 62:27。

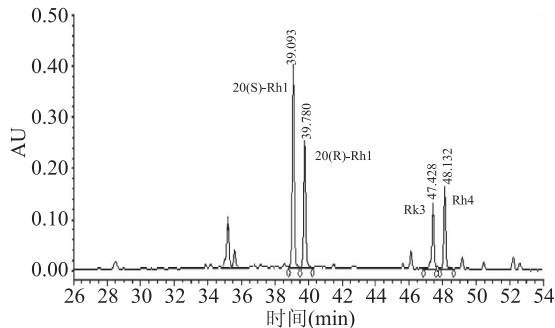


图6 Rh1 组化合物的 HPLC 检测图

Fig.6 HPLC of ginsenoside Rh1 group components

3 结论

Absidia sp.P39r 菌株产酶可催化 Re 转化为 Rg1,在缓冲液 pH5.0,底物浓度 1.2%,反应时间 16 h,乙醇浓度 10%,反应温度 40℃ 下 Rg1 的产率最高。以 20 g Re 为底物,在最佳条件下制备 Rg1,得率为

70.5% ;在乙醇-水体系中, Fe^{3+} 催化人参皂苷 Rg1 生成的 20(S,R)-Rh1 含量最多,该溶媒体系下催化反应条件的优化结果为:乙醇浓度 50%,反应温度 50℃,底物浓度 1.7%, Fe^{3+} 溶液反应浓度 1.4 mol/L,反应时间 14 h。在乙醇-水体系的最佳条件下考察 Fe^{3+} 催化反应产物随时间的变化,发现在 C-20 葡萄糖苷键裂解生成 20(S,R)-Rh1 的同时,脱水反应生成 Rk3 和 Rh4。以 10.2 g Rg1 为底物,50% 乙醇-水体系中催化反应 14 h 制备得到粗品,得率为 80.2%,其中 20(S)-Rh1 的含量为 37.71%,20(R)-Rh1 的含量为 24.12%,Rk3 的含量为 7.27%,Rh4 的含量为 20.07%。20(S,R)-Rh1、Rk3 和 Rh4 的含量之比为 62:27。

酶转化法和金属离子催化法均具有条件温和,产物单一,对环境没有污染;反应特异性强,目标产物质量分数高,周期短的特点,易于工业化放大生产。本论文通过两种方法联用,为稀有人参皂苷 Rh1 组异构体的催化制备提供了新方法。

参考文献

- [1] 何永明. 人参本草史考源[J]. 中成药, 2001, 23(5): 384-386.
- [2] 龚胜生, 蔡俊青. 中国野生人参产地的分布变迁[J]. 国外医学医学地理分册, 2013, 34(2): 71-79.
- [3] Wang Y, Choi H K, Brinckmann J A, et al. Chemical analysis of *Panax quinquefolius* (North American ginseng): A review[J]. Journal of Chromatography A, 2015, 1426: 1-15.
- [4] Qu C, Bai Y, Jin X, et al. Study on ginsenosides in different parts and ages of *Panax quinquefolius* L [J]. Food Chemistry, 2009, 115(1): 340-346.
- [5] 包文芳, 李红兵, 杨宝云. 西洋参化学成分的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报 1998(2): 149-153.
- [6] 宋志斌, 朱成琳, 师方园, 等. 人参皂苷 Re 体外抗氧化能力及其对血清剥夺神经细胞作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 225-228.
- [7] Peng L, Sun S, Xie L H, et al. Ginsenoside Re: Pharmacological effects on cardiovascular system [J]. Cardiovascular Therapeutics, 2012, 30(4): e183-e188.
- [8] 金建生, 赵朝晖, 陈晓春, 等. 人参皂苷 Rg1 抗衰老作用可能与改变 p16、cyclin D、CDK4 的表达有关[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(1): 29-34.
- [9] 赵朝晖, 陈晓春, 朱元贵, 等. 人参皂苷 Rg1 延缓细胞衰老过程中端粒长度和端粒酶活性的变化[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(1): 61-66.
- [10] 马文彬. 人参皂苷 Rh1, Rh2 对小鼠 S180 肉瘤细胞的分化诱导作用[J]. 白求恩医科大学学报, 1993, 17(6): 57.
- [11] Lee S Y, Jeong J J, Eun S H, et al. Anti-inflammatory effects of ginsenoside Rg1 and its metabolites ginsenoside Rh1 and 20(S)-protopanaxatriol in mice with TNBS-induced colitis [J].

European Journal of Pharmacology, 2015, 762: 333-343.

- [12] 金敏赞, 鱼红闪, 金凤燮. 人善皂甙 α -鼠李糖苷酶分离提纯及其酶性质[J]. 大连工业大学学报, 2013, 22(2): 103-106.
- [13] Cao J, Liu C, Wang Q, et al. A novel catalytic application of heteropolyacids: chemical transformation of major ginsenosides into rare ginsenosides exemplified by Rg1 [J]. Chinese Science Chemistry, 2017, 60(6): 1-6.
- [14] Sun C, Gao W, Zhao B, et al. Optimization of the selective preparation of 20(R)-ginsenoside Rg3 catalyzed by d,l-tartaric acid using response surface methodology [J]. Fitoterapia, 2013, 84(3): 213-221.
- [15] Ko S R, Choi K J, Uchida K, et al. Enzymatic preparation of ginsenosides Rg2, Rh1, and F1 from protopanaxatriol-type ginseng saponin mixture [J]. Planta Medica, 2003, 69(3): 285-286.
- [16] Nakajima V M, Jr M J, Macedo G A, et al. Biotransformation effects on anti lipogenic activity of citrus extracts [J]. Food Chemistry, 2016, 197: 1046-1053.
- [17] 郑长龙. 酶转化法制备人参皂苷 C-K 及其分离提取 [D]. 大连: 大连工业大学, 2004.
- [18] 曹体爽, 刘廷强, 王东明, 等. 生物转化法制备白头翁皂苷 A3 [J]. 大连工业大学学报, 2014, 33(1): 18-20.
- [19] 李明华, 孟秀梅, 陆正清, 等. 用于摇瓶发酵对比实验的霉菌液体菌种的制备方法: 中国, 103966106A [P]. 2014-08-06.
- [20] 王姣. 人参皂苷对毁灭柱孢菌的作用及机制研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2018.
- [21] 唐露, 李希, 冯建安, 等. HPLC-ELSD 法测定舒络颗粒中黄芪甲苷、三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1 和人参皂苷 Rb1 的含量 [J]. 实用中医药杂志, 2012, 28(11): 964-967.
- [22] 胡杰, 秦雪梅, 郭小青, 等. HPLC-ELSD 法测定人参茎叶中人参皂苷 Rg1、Re、Rd 的含量 [J]. 山西医科大学学报, 2008, 39(12): 1095-1098.
- [23] 袁婷. 三醇类人参皂苷催化转化人参皂苷 Rh1 的研究 [D]. 大连: 大连工业大学, 2018.
- [24] Murphy, Brian M M P, Letterio B X. Catalytic dehydration of methyl lactate: Reaction mechanism and selectivity control [J]. Journal of Catalysis, 2016: 339.
- [25] 王宇. 有机醇体系下离子催化 Re 生成 25-OH-Rg2 的反应 [D]. 大连: 大连工业大学, 2017.
- [26] 王一敏, 任晓蕾. 大孔树脂的应用研究 [J]. 中医药信息, 2008, 25(4): 26-28.
- [27] 刘桦, 赵鑫, 齐天, 等. 人参总皂苷大孔树脂分离纯化工艺的红外光谱在线监测模型及其含量测定 [J]. 光谱学及光谱分析, 2013, 33(12): 3226-3230.
- [28] Wu S, Wang Y, Gong G, et al. Adsorption and desorption properties of macroporous resins for flavonoids from the extract of Chinese wolfberry (*Lycium barbarum* L.) [J]. Food and Bioprocess Technology, 2013, 93: 148-155.
- [29] 程及搅拌槽放大规律 [J]. 现代化工, 2001, 21(1): 29-31.
- [21] Que F, Mao L C, Fang X H, et al. Comparison of hot air-drying and freeze-drying on the physicochemical properties and antioxidant activities of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) flours [J]. Ecological Indicators, 2015, 124(4): A685-A685.

(上接第 155 页)

Food Research International, 2009, 42: 1351-1354.

- [19] Chi-Cheng L, Shu-Han Y, Shih-Min Hsia, et al. Inhibitory effects of *Phyllanthus emblica* L. on hepatic steatosis and liver fibrosis *in vitro* [J]. Journal of Functional Foods, 2016, 20: 20-30.
- [20] 车红荣, 苟小锋, 郭笃信, 等. 茶多酚乙醇水溶液提取过