·基础研究·

# 人参皂苷化合物 K 乙酰化衍生物的合成及分析△

吕静[1]，李珂珂[2]，李争宁[1]，弓晓杰[2*]，陈丽荣[1]，魏汉莲[3]
（1. 大连大学 环境与化学工程学院，辽宁　大连　116622；2. 大连大学 医学院，辽宁　大连　116622；
3. 辽宁政法职业学院　食品药品安全系，辽宁　沈阳　110161）

［摘要］ **目的**：研究人参皂苷化合物 K 乙酰化衍生物的合成及产物结构，建立其高效液相分析方法。**方法**：采用对葡萄糖基 6-位保护-去保护的方法，得到除糖基 6-位未乙酰化的化合物 K 衍生物 1c；利用一维核磁（1D NMR）、二维核磁（2D NMR）及质谱（MS）方法对合成产物 1c 进行结构鉴定；利用反相高效液相色谱，建立了人参皂苷化合物 K 乙酰化衍生物 1c 的分析方法。**结果**：人参皂苷化合物 K 乙酰化产物 1c 的得率为 46.4%，在高效液相色谱中与其他杂质的分离度较好，分析时间在 45 min 以内。**结论**：首次采用人参皂苷化合物 K 葡萄糖基 6-羟基保护的路线，合成其乙酰化衍生物 1c，并归属了衍生物的 NMR 数据。采用 HPLC 可以快速高效地进行人参皂苷化合物 K 乙酰化衍生物的分析。

［关键词］ 人参皂苷化合物 K；乙酰化；高效液相

## Synthesis of ginsenoside compound K acetylated derivative and HPLC analysis

LYU Jing[1], LI Keke[2], LI Zhengning[1], GONG Xiaojie[2*], CHEN Lirong[1], WEI Hanlian[3]
(1. *College of Environmental and Chemical Engineering*, *Dalian University*, *Dalian* 116622, *China*;
2. *College of Medical*, *Dalian University*, *Dalian* 116622, *China*;
3. Department of food and drug safty, Liaoning vocational college of political science and law, *Shenyang* 110161, *China*)

［**Abstract**］ **Objective**: To synthesize and structural analyze ginsenoside compound K acetylated derivative, and establish a HPLC method for the derivative. **Methods**: Using the protection-deprotection strategy on the 6-OH of glucosyl, ginsenoside compound K derivatives 1c was synthesized with acetylated except 6-OH of glucosyl, and the structure of 1c was identified by 1D NMR, 2D NMR and MS. The analysis method of the end-product was established by RP-HPLC-DAD, and optimized. **Results**: Taking all the three steps of the synthesis of 1c into account, the yield was 46.4%. In the end-product, 1c showed good separation with other impurity substances, the analysis time of 1c was less than 45 minutes. **Conclusion**: Using the protection strategy on the 6-OH of glucosyl, we synthesized compound K acetylated derivatives for the first time, and provided the comprehensive NMR data. The HPLC method can provide a rapid and efficient method to determination of the end-product.

［**Keywords**］ Ginsenoside compound K; acetylated; HPLC
**doi**:10.13313/j.issn.1673-4890.2015.5.005

人参作为一种传统中药，在中国、韩国、日本等被广泛应用，其主要活性成分是人参皂苷。人参皂苷具有广泛的药理活性，如抗肿瘤、抗炎、抗糖尿病等[1-2]。近年来，人参皂苷化合物 K 由于独特的生物活性引起了广泛关注，其为口服人参后肠道菌群代谢的主要产物之一，能够抑制人结肠癌及肝癌细胞增殖，并诱导其凋亡[3-4]，具有较好的抗炎作用[5]。20 世纪日本学者研究发现，肠道菌群的代谢物化合物 K 及其脂肪酸酯类化合物是人参发挥实际药效的成分[6-8]。众多学者针对这一理论，开展了合成人参皂苷衍生物的研究[9-10]，从而改善分子结构，提高其活性作用。目前，通过选择性保护策略，合

△［基金项目］ 国家自然科学基金（81172949）；辽宁省教育厅科学技术研究一般研究项目（L2012439）；辽宁省优秀人才支持计划（LR2013058）；辽宁省科技厅科学技术计划项目（2014204007）；大连市科技局科技计划项目（2014E12SF071）

*［通信作者］ 弓晓杰，教授，硕士生导师，研究方向：中药新药开发；E-mail：gxjclr@163.com

成了多种化合物 K 的酯化产物，与底物相比，其抗肿瘤作用显著提高[11-13]。

本文采用选择性保护-去保护的策略，合成了除葡萄糖基 6-位外的全乙酰化产物，利用 NMR 对其结构做了详细表征，并通过反相高效液相色谱法，定性分析了终产物的构成，为化合物 K 的结构修饰和产物分析提供了新思路。

## 1　仪器、试剂和材料

### 1.1 仪器

高效液相色谱仪(分析型 Agilent 1260)；制备型 LC 3000(北京创新通恒科技有限公司)；电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)；ETS-D4 加热磁力搅拌器(德国 IKA 公司)；核磁共振仪 Bruker AVANCE DRX-500 型(Bruke 公司，$^{1}$H-NMR 400 MHz/$^{13}$ C-NMR 100 MHz，TMS 内标)；LC-MS-2010EV 电喷雾离子肼质谱仪(日本 Shimadzu)。

### 1.2 试剂

甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚、三乙胺、氯化铵、乙酸酐、四氢呋喃、碳酸氢钠、无水亚硫酸钠、叔丁基二苯基氯硅烷、四丁基氟化铵(分析纯，中国化工集团)；甲醇(色谱纯，美国 TEDIA)；水为超纯水。

### 1.3 材料

人参皂苷化合物 K(大连富生天然药物有限公司，批号：20100321)经 NMR 及 MS 测定纯度为 98%；硅胶(200-300 目，青岛海洋化工厂)。

## 2　方法和结果

### 2.1 衍生物的合成

2.1.1 化合物 K 葡萄糖基 6-羟基的保护　在装有电磁搅拌器的 25 mL 休良克瓶中，加入化合物 K 100 mg(0.160 5 mmol)(**1**)，用 1 mL 三乙胺溶解，氮气保护，冰水浴下加入叔丁基二苯基氯硅烷(TBDPSCl) 210 μL(0.802 7 mmol)，反应 10 min 后，升至室温，薄层色谱法监测反应进程。12 h 反应完毕后，加入饱和氯化铵溶液停止反应。反应产物用二氯甲烷萃取(每次 5 mL，共 3 次)，Brine 洗有机相，无水硫酸钠($Na_2SO_4$)干燥，浓缩溶剂，柱层析纯化(甲醇-二氯甲烷洗脱)后得到产物 **1a** 125 mg。

2.1.2 化合物 K 羟基乙酰化　在装有电磁搅拌器的 25 mL 休良克瓶中，加入 100 mg(0.116 1 mmol)化合物 K 的葡萄糖基 6-羟基的保护产物 **1a** 和 0.7 mg(0.005 8 mmol)4-二甲氨基吡啶，用 2 mL 三乙胺溶解，氮气保护，冰水浴下加入乙酸酐 219 μL(2.322 mmol)，反应 10 min 后，升至室温，薄层色谱法监测反应进程，24 h 反应完毕后，加入饱和碳酸氢钠($NaHCO_3$)溶液停止反应。反应产物用二氯甲烷萃取(每次5 mL，共 3 次)，Brine 洗有机相，无水 $Na_2SO_4$ 干燥，浓缩溶剂，柱色谱纯化(乙酸乙酯-石油醚洗脱)后得到产物 **1b** 101 mg。

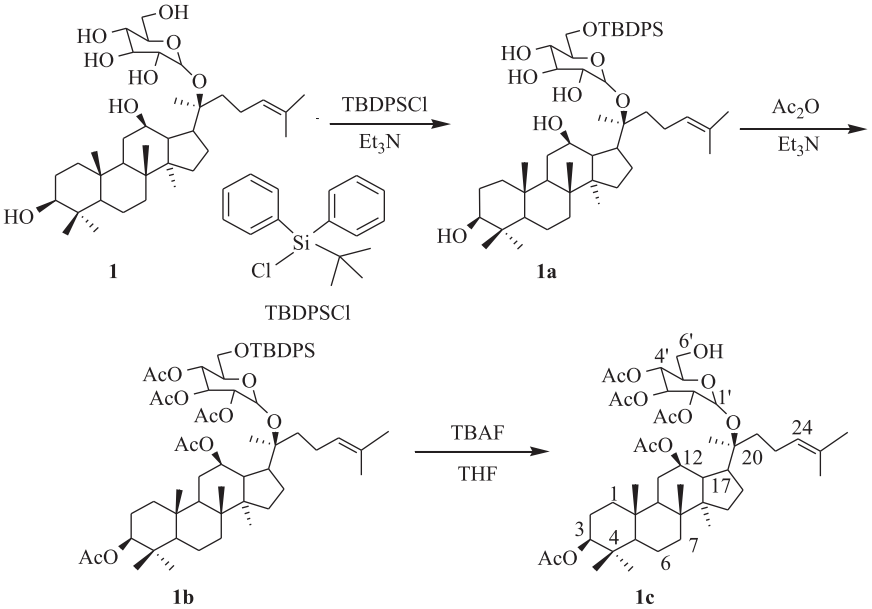


**图 1　人参皂苷化合物 K 乙酰化衍生物的合成路线**

2.1.3 化合物 K 乙酰化衍生物的合成　将 65 mg 上述人参皂苷化合物 K 的硅醚全乙酰化产物 **1b** 65 mg (0.060 7 mmol)，加入到 50 mL 的圆底烧瓶中，用 2 mL 无水四氢呋喃溶解，冰水浴下加入四丁基氟化铵 (TBAF)18 μL(0.060 7 mmol)，反应 30 min 后升至室温，薄层色谱检测反应进程。反应 8 h 后完成，减压浓缩除掉四氢呋喃，加入等体积乙酸乙酯和水共 2 mL 溶解。反应产物用乙酸乙酯萃取(每次5 mL，共 3 次)，Brine 洗有机相，无水 $Na_2SO_4$ 干燥，浓缩溶剂，柱色谱纯化(乙酸乙酯-石油醚洗脱)后得到化合物 K 乙酰化衍生物 **1c** 32 mg。合成路线图见图 1。

**2.2** 化合物 K 乙酰化衍生物的结构解析

**1a**：乳白色粉末。ESI-MS：*m/z* 883.5501 ($C_{52}H_{80}NaO_8Si$ [M + Na]$^+$；计算值 883.5520)。$^1$H-NMR ($CDCl_3$，400 MHz) $\delta$：7.68 (4H，m)，7.39 (6H，m)，4.53 (1H，d，*J* = 6.1 Hz，H-glc-1)，5.11 (1H，t，*J* = 5.7 Hz，H-24)；$^{13}$C-NMR ($CDCl_3$，100 MHz) $\delta$：苯环上碳，135.5 (2 个 C)、133.1 (4 个 C)、129.6 (4 个 C)、127.7 (2 个 C)；131.2 (C-25)；124.7 (C-24)；96.9 (C-glc-1)；73.4 (C-glc-2)；78.8 (C-glc-3)；71.1 (C-glc-4)；75.6 (C-glc-5)；64.3 (C-glc-6)。

**1b**：乳白色粉末。ESI-MS：*m/z* 1093.6042 ($C_{62}H_{90}NaO_{13}Si$ [M + Na]$^+$；计算值 1093.6048)。$^1$H-NMR ($CDCl_3$，400 MHz) $\delta$：4.50 (1H，d，*J* = 7.8 Hz，H-glc-1)，5.14 (1H，t，*J* = 7.7 Hz，H-24)，7.66 (4H，m)，7.37 (6H，m)；$^{13}$C-NMR ($CDCl_3$，100 MHz) $\delta$：苯环上碳，135.7 (2 个 C)、133.2 (4 个 C)、129.7 (4 个 C)、127.7 (2 个 C)；131.3 (C-25)；124.6 (C-24)；94.7 (C-glc-1)；73.8 (C-glc-2)；75.3 (C-glc-3)；68.8 (C-glc-4)；74.4 (C-glc-5)；62.8 (C-glc-6)。

**1c**：乳白色粉末。ESI-MS：*m/z* 855.4864 ($C_{46}H_{72}NaO_{13}$ [M + Na]$^+$；计算值 855.4871)。$^1$H-NMR ($CDCl_3$，400 MHz) 和$^{13}$C-NMR ($CDCl_3$，100 MHz)。见表 1。

**表 1　人参皂苷化合物 K 乙酰化衍生物 1c 的$^1$H 和$^{13}$C-NMR 数据(400 MHz in $CDCl_3$)**

| No | $\delta_H$ | $\delta_c$ | No | $\delta_H$ | $\delta_c$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1.11(1H, m), 1.64(1H, m) | 38.5 | 22 | 1.84(1H, m), 1.53(1H, m) | 39.1 |
| 2 | 1.59(1H, m), 1.65(1H, m) | 23.6 | 23 | 1.98(1H, m), 1.90(1H, m) | 22.8 |
| 3 | 4.48(1H, dd, 8.7, 3.8) | 80.7 | 24 | 5.02(1H, t, 7.4) | 124.6 |
| 4 | - | 37.9 | 25 | - | 131.4 |
| 5 | 0.85, 0.83(1H, d, 9.0) | 55.9 | 26 | 1.65(3H, s) | 25.6 |
| 6 | 1.55(2H, m) | 18.2 | 27 | 1.59(3H, s) | 17.7 |
| 7 | 1.44(1H, m), 1.30(1H, m) | 34.5 | 28 | 0.87(3H, s) | 28.0 |
| 8 | - | 39.6 | 29 | 0.85(3H, s) | 16.5 |
| 9 | 1.52(1H, m) | 49.9 | 30 | 0.92(3H, s) | 18.0 |
| 10 | - | 37.0 | 1′ | 4.65(1H, d, 6.6) | 94.7 |
| 11 | 1.17(1H, m), 1.84(1H, m) | 29.1 | 2′ | 4.86(1H, ddd, 9.9, 5.5, 3.2) | 71.9 |
| 12 | 4.82(1H, td, 10.2, 4.8) | 75.2 | 3′ | 5.00(1H, t, 7.2) | 76.3 |
| 13 | 1.92(2H, m) | 45.6 | 4′ | 3.56(1H, dd, 9.7, 7.2) | 69.4 |
| 14 | - | 53.1 | 5′ | 3.49(1H, dd, 9.8, 7.4) | 73.8 |
| 15 | 1.52(1H, m), 1.02(1H, m) | 31.7 | 6′ | 4.32(2H, dd, 9.6, 2.4) | 63.5 |
| 16 | 1.77(2H, m) | 26.4 | 2′-$COOCH_3$ | | 169.2[a] |
| 17 | 2.07(1H, m) | 47.8 | 3′-$COOCH_3$ | | 171.5[a] |
| 18 | 0.96(3H, s) | 15.5 | 4′-$COOCH_3$ | | 171.4[a] |
| 19 | 0.85(3H, s) | 16.2 | 3-$COOCH_3$ | | 170.9[a] |
| 20 | - | 83.1 | 12-$COOCH_3$ | | 170.3[a] |
| 21 | 1.17(3H, s) | 21.9 | | | |

注：$COOCH_3$ 中甲基的$^1$H 和$^{13}$C-NMR 信号重叠严重，较难归属连接位置，$\delta_C$ 20.7 ($\delta_H$2.08)，$\delta_C$ 20.8 ($\delta_H$2.07)，$\delta_C$ 20.8 ($\delta_H$2.05)，$\delta_C$ 21.3 ($\delta_H$2.03)，$\delta_C$ 21.8 ($\delta_H$1.97)。

**2.3** 化合物 K 乙酰化衍生物 **1c** 高效液相色谱条件的确定

2.3.1 色谱柱的选择　分别采用 Agilent $C_{18}$ 不同长度及型号的色谱柱进行合成产物的分离试验。综合结果，本试验选用 Zorbax Eclipse XDB-C18（250 mm × 4.6 mm，5 μm）色谱柱，可以达到较好的色谱分离效果。

2.3.2 检测波长的选择　产物 **1c** 采用 DAD 检测器进行，190 ~ 400 nm 检测时，发现在 203 nm 下有最大吸收[14]。因而采用 203 nm 作为检测波长。

2.3.3 流动相的选择　根据产物 **1c** 的结构特征，在乙腈-水体系和甲醇-水体系之间进行了筛选。从分离度和峰形来看，70% 乙腈-水体系较适合作为分离含有 **1c** 的合成产物的流动相。

2.3.4 柱温的选择　考查了不同温度下的衍生物分离度，结果发现，柱温为 25 ℃时分离效果较好。

**2.4** 化合物 K 乙酰化衍生物 **1c** 高效液相色谱分析

将上述 2.1.3 合成的终产物，在未经硅胶柱色谱纯化时制备成质量浓度为 5.0 mg·mL$^{-1}$ 的甲醇溶液，利用高效液相色谱分析其产物情况。终产物经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后，采用 **2.3** 的色谱条件，进样 10 μL，得到了含 **1c** 合成产物色谱图，见图 2。

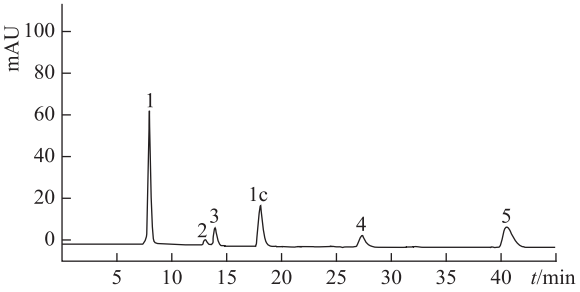


**图 2　人参皂苷化合物 K 乙酰化衍生物的液相色谱图**

从色谱图中可以看出，脱保护基后的产物有 6 个，其中第 4 号出峰即为目标产物 **1c**。根据峰面积百分比计算法，其占产物含量的 23.5%。见表 2。

**2.5** 化合物 K 乙酰化衍生物 **1c** 合成产率的计算

投入人参皂苷化合物 K 100 mg，分离纯化后得到 **1a** 125 mg，可以得出第一步反应的产率为 90.4%。第二步乙酰化反应投入 **1a** 100 mg，分离纯化后得到目标产物 **1b** 101 mg，产率为 81.4%。最后脱保护基的反应投入 **1b** 65 mg，分离纯化后得到乙酰化产物 **1c** 32 mg，脱保护反应产率为 63%。综合以上 3 步反应，合成化合物 K 乙酰化衍生物 **1c** 的总得率为 46.4%。

**表 2　人参皂苷化合物 K 乙酰化衍生物合成产物的出峰时间及相应峰面积百分比**

| 组分编号 | 出峰时间/min | 峰面积(%) |
|---|---|---|
| 1 | 7.9 | 32.8 |
| 2 | 13.0 | 2.3 |
| 3 | 13.9 | 7.3 |
| 1c | 18.1 | 23.5 |
| 4 | 27.3 | 9.3 |
| 5 | 40.5 | 24.7 |

## 3　讨论

本论文为了达到选择性保护伯羟基的目的，设计了使用硅烷保护基保护的方案，流程为保护-全乙酰化-脱保护。该方法反应条件温和，选择性好，反应底物无毒性，大大地降低了分离的难度，为后续试验提供方法和依据。

产物 **1c** 的 5 个乙酰基中各个甲基的氢谱和碳谱数据通过异核单量子相干相关谱（HSQC）得到了较好的指认，但其取代位置由于信号重叠严重，在异核多键相关谱（HMBC）中较难归属清楚，因此未指定具体连接位置。

综上，本文通过对葡萄糖基 6-位选择性保护的策略，首次高效率地合成了化合物 K 乙酰化衍生物，并通过 NMR 详细归属了其氢谱和碳谱数据。利用 HPLC 对终产物的组成进行了定性分析，建立的分析方法可以用于目标产物的分离纯化。本文在终产物的纯化中利用了硅胶柱色谱，在今后大量制备中，为减小损失量并提高纯度，可以参考此方法用于 HPLC 制备分离。

## 参考文献

[1] Choi K T. Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean Panax ginseng C. A. Meyer [J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 29(9): 1109-1118.

[2] Sathishkumar N, Sathiyamoorthy S, Ramya M, et al. Molecular docking studies of anti-apoptotic BCL-2, BCL-XL, and MCL-1proteins with ginsenosides from Panax ginseng [J]. J Enzyme Inhib and Med Chem, 2012, 27(5): 685-692.

[3] Oh S H, Lee B H. A ginseng saponin metabolite-induced apoptosis in HepG2 cells involves a mitochondria-mediated

（下转第 439 页）

2010,132(10):483-490.

[4] Dias T, Liu B, Jones P, et al. Cytoprotective effect of *Coreopsis tinctoria* extracts and flavonoids on tBH Pand cytokine-induced cell injury in pancreatic MIN6 cells [J]. J Ethnopharmacol,2012,139(23):485-492.

[5] 明婷,孙玉华,胡梦颖,等. 金鸡菊提取物降压及体内抗氧化作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):249-252.

[6] 梁淑红,哈木拉提,庞市宾,等. 金鸡菊提取物降血压化学成分实验研究[J]. 时珍国医国药,2011,21(7):1619-1621.

[7] 梁淑红,庞市宾,刘晓燕,等. 金鸡菊提取物降血脂作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,31(8):495-498.

[8] 曹燕,庞市宾,徐磊,等. 金鸡菊提取物体外抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):144-147.

[9] Zălaru C, Crişan C C, Călinescu I, et al. Polyphenols in *Coreopsis tinctoria* Nutt. fruits and the plant extracts antioxidant capacity evaluation [J]. Central Eur J Chem, 2014,12(8):858-867.

[10] Zhang Y, Shi S P, Zhao M B, et al. A novel chalcone from *Coreopsis tinctoria* Nutt. [J]. Biochem Syst Ecol, 2006, 34(10):766-769.

[11] 赵军,孙玉华,徐芳,等. 昆仑雪菊黄酮类成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2013,25(3):50-52.

[12] 张兰兰,孙玉华,哈木拉提,等. HPLC 测定金鸡菊中金鸡菊查尔酮含量[J]. 中国中医药信息杂志,2012,19(7):48-49.

[13] 李帅,匡海学,冈田嘉仁,等. 鬼针草有效成分的研究(Ⅱ)[J]. 中草药,2004,35(9):972-975.

[14] Sun Y, Yuan H, Hao L, et al. Enrichment and antioxidant properties of flavone *C*-glycosides from trollflowers using macroporous resin [J]. Food Chem, 2013, 141(1):533-541.

(收稿日期　2014-08-07)

(上接第 434 页)

pathway and its downstream caspase-8 activation and Bid cleavage [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2004, 194(3):221-229.

[4] Zhang Z, Du G J, Wang C Z, et al. Compound K, a ginsenoside metabolite, inhibits colon cancer growth via multiple pathways including p53-p21 interactions [J]. Inter J Mol Sci,2013,14(2):2980-2995.

[5] Joh E H, Lee I A, Jung I H, et al. Ginsenoside $Rb_1$ and its metabolite compound K inhibit IRAK-1 activation-The key ste Pof inflammation [J]. Biochem Pharmacol, 2011, 82(3):278-286.

[6] Hasegawa H, Lee K S, Nagaoga T, et al. Pharmacokinetics of ginsenoside deglycosylated by intestinal bacterial and its transformation to biologically active fatty esters [J]. Biol Pharm Bull,2000,23(3):298-304.

[7] Hasegawa H, Suzuki R, Nagaoka T, et al. Prevention of growth and metastasis of murine melanoma through enhanced natural-killer cytotoxicity by fatty acid-conjugate of protopanaxatriol [J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25(7):861-866.

[8] 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]. J Pharmacol Sci,2004,95(2):153-157.

[9] Liu J H, Chen D K, Liu P, et al. Discovery, synthesis, and structure-activity relationships of 20(S)-protopanaxadiol (PPD) derivatives as a novel class of AMPK$\alpha 2\beta 1\gamma 1$ activators [J]. Eur J Med Chem,2014,79:340-349.

[10] Mathiyalagan R, Subramaniyam S, Kim Y J, et al. Ginsenoside compound K-bearing glycol chitosan conjugates: Synthesis, physicochemical characterization and in vitro biologicalstudies [J]. Carbohydr Polym,2014,112:359-366.

[11] Li W F, Li Z N, Chen L R, et al. Synthesis and structural analysis of mono-dodecanoic acid esters of ginsenoside M1 [J]. Chin J Nat Med,2011,9(3):199-203.

[12] Li W F, Chen L R, Gong X J, et al. Synthesis of esters of ginsenoside metabolite M1 and their cytotoxicity on MGC80-3 cells[J]. Molecules,2013,18(4):3689- 3702.

[13] 肖景楠,李珂珂,李争宁,等. 人参皂苷 M1 异丁酸酯衍生物的合成及高效液相分析和制备[J]. 中国现代中药,2014,16(5):368-372.

[14] 郑长龙,鱼红闪,金凤燮. 人参稀有皂苷 C-K 的分离与纯化[J]. 大连工业大学学报,2003,22(3):167-169.

(收稿日期　2015-04-10)