

文章编号: 1000-5013(2011)06-0668-04

# 酶法转化二醇型人参皂甙 Rd 及 制备稀有人参皂甙 C-K

张阳, 林毅

(华侨大学 化工学院, 福建 泉州 362021)

**摘要:** 利用蜗牛酶酶法对二醇型人参皂甙 Rd 进行转化, 并制备稀有人参皂甙 C-K. 采用薄层色谱和高效液相色谱法, 对转化产物及酶反应相关影响因素进行检测. 结果发现: 在酶量为  $166.7 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$ , pH 值为 5.0, 温度为  $40^\circ\text{C}$  的恒温水浴 9 h 的条件下, 酶解人参皂甙 Rd 可得稀有人参皂甙 C-K. 在此基础上, 研究得到酶反应的最适条件范围: 酶量为  $500.1 \sim 833.5 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$ , pH 值为 3~5, 温度为  $40 \sim 50^\circ\text{C}$ , 反应时间为 6~24 h.

**关键词:** 酶法转化; 二醇型人参皂甙 Rd; 稀有人参皂甙 C-K; 蜗牛酶

**中图分类号:** Q 541

**文献标志码:** A

人参皂甙作为人参的主要有效成分, 具有广泛的药理作用<sup>[1]</sup>. 稀有人参皂甙 C-K 是二醇型人参皂甙在人体肠道内经肠道菌的去糖基化后的主要代谢产物和最终吸收形式. 它在许多方面都体现了良好的生物活性, 尤其在抗肿瘤方面, 在体内外均具有良好的抑制癌细胞生长、转移、诱导细胞凋亡等作用<sup>[2-3]</sup>, 现已成为人参皂甙研究的新热点. 1996 年, Hasegawa 等<sup>[4-5]</sup>运用体外厌氧培养人肠道菌群技术, 对人参皂甙的肠道菌代谢过程进行了系统研究, 提出了  $\text{Rb}_1$ ,  $\text{Rb}_2$  和  $\text{Rc}$  降解到 C-K 的具体代谢途径, 尤其是深入研究  $\text{Rb}_1$  的代谢途径. 目前, 利用二醇型人参皂甙  $\text{Rb}_1$  通过酶转化法制取 C-K 已有很多相关报道, 但对于二醇型人参皂甙 Rd 的研究大多集中在人参皂甙 Rd 提取、含量测定及药理药效等方面的研究<sup>[6]</sup>, 并未见以人参皂甙 Rd 为直接底物酶法转化制备稀有人参皂 C-K 的报道. 鉴于此, 本文将利用蜗牛酶对人参皂甙 Rd 进行转化, 并制备人参皂甙 C-K.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人参皂甙 C-K 标品(纯度大于 98.8%, 吉林长春三和参业科技有限公司); 蜗牛酶粗酶(福建漳州金田生物科技公司); 乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司); 高效硅胶板(山东青岛裕民源硅胶试剂厂); 其他试剂均为分析纯.

### 1.2 实验方法

**1.2.1 酶活的测定** 取  $500 \mu\text{L}$  酶溶液于离心管中,  $40^\circ\text{C}$  恒温水浴中预热 3 min; 然后, 加入  $1 \text{ mL}$ ,  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的人参皂甙 Rd, 及  $4.0 \text{ mL}$ , pH=5.0 的磷酸柠檬酸缓冲液, 于  $40^\circ\text{C}$  反应 10 min, 再加入  $4.5 \text{ mL}$  色谱级甲醇终止反应, 经高效液相色谱(HPLC)测定稀有人参皂甙 C-K 的含量.

酶活力单位(kat): 在  $40^\circ\text{C}$ , pH=5.0 的条件下, 每分钟生成  $1 \mu\text{mol}$  稀有人参皂甙 C-K 所需酶量定义为 1 个酶活力单位. 经测定, 蜗牛酶的  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活为  $309.56 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ .

**1.2.2 蜗牛酶酶解人参皂甙 Rd 的酶转化反应** 取  $5 \text{ mg}$  人参皂甙 Rd, 加入  $1 \text{ mL}$ , pH=5.0 的磷酸柠檬酸缓冲液溶解, 按  $166.7 \mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$  的量加入蜗牛酶, 混匀; 于  $40^\circ\text{C}$  下恒温水浴 9 h. 终止反应后, 进

收稿日期: 2011-03-23

通信作者: 林毅(1976-), 男, 副教授, 主要从事 Bt 伴孢晶体蛋白以及稀有人参皂甙的研究. E-mail: lyhzm@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划(2006 年度)

行薄层层析色谱(TLC)检测.

1.2.3 薄层层析色谱检测 用微量点样器吸取标品及酶解产物溶液,分别点样于薄层板的起始线上,点样次数依据样品浓度确定,每次点样后需用电吹风迅速吹干.将薄层板浸入展开剂( $\text{CHCl}_3$ -AcOEt-MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ =15:40:30:20),液下层的深度为距薄层板底边1.0 cm左右.展开后,取出,吹干,均匀喷以10%的硫酸-乙醇显色剂,于110℃下显色10 min,经凝胶成像系统检测结果.

1.2.4 高效液相色谱检测 在酶解产物中加入反应物1/2体积的正丁醇萃取3次,合并萃取液,挥干;然后,置于10 mL容量瓶中,加色谱纯甲醇至刻度,过膜,做高效液相色谱(HPLC)检测.色谱条件:色谱柱选用C18柱Dimension(150 mm×4.6 mm);UV检测器;检测波长为203 nm;柱温为35℃;流动相为乙腈-水(48:52);流速为1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量为20 μL.

## 2 结果与分析

### 2.1 人参皂甙Rd酶解产物的TLC检测

人参皂甙Rd酶解产物的TLC检测,结果如图1所示.图1中:编号1~4样品分别为人参皂甙C-K标品,人参皂甙Rd,酶解产物,酶解产物和人参皂甙C-K标品的混合物.

从图1可看出,酶解产物与人参皂甙C-K标品有相同 $R_f$ 值点,与人参皂甙Rd无相同 $R_f$ 值点.比较酶解产物、酶解产物与人参皂甙C-K标品混合物的图谱可知,混合物中无新 $R_f$ 值点出现,且混合物与人参皂甙C-K标品同 $R_f$ 值点的深浅与大小增加.这表明,在酶量为166.7 μkat·g<sup>-1</sup>,pH=5.0,40℃恒温水浴9 h的酶解条件下,酶解产物中不存在人参皂甙Rd,即已为蜗牛酶水解.该酶水解人参皂甙Rd的糖基,主要转化为目标产物人参皂甙C-K,还有少量中间产物,转化率较高.

### 2.2 人参皂甙Rd酶解产物的HPLC检测

人参皂甙Rd酶解产物的HPLC检测,结果如图2所示.样品的保留时间为21.005 min,与文献上的人参皂甙C-K数据一致<sup>[7]</sup>.由于所用流动相为乙腈和水,而溶剂为甲醇所以存在前端杂峰,除溶剂峰之外另有其他杂质峰,说明人参皂甙Rd在本文所述条件下的产物并不单一,与TLC分析结果相符合.

### 2.3 反应条件对酶转化反应的影响

2.3.1 不同酶加入量的酶转化反应 取5份2 mg的人参皂甙Rd,加入1 mL,pH=5.0的磷酸柠檬酸缓冲液,分别加入不同酶量的蜗牛酶,混匀,于40℃恒温水浴9 h,终止反应后进行TLC检测,结果如图3(a)所示.图3(a)中:编号1为人参皂甙C-K标品;2~6样品的蜗牛酶量分别为166.7,333.4,500.1,666.8,833.5 μkat·g<sup>-1</sup>.从图3(a)可以看出,当酶量为166.7,333.4

μkat·g<sup>-1</sup>时,由于酶量不足,故斑点大小与深浅较之酶量为500.1,666.8,833.5 μkat·g<sup>-1</sup>的斑点略小且浅.酶量增加,产物浓度随之增加,但当酶量为500.1,666.8,833.5 μkat·g<sup>-1</sup>时,这三者的斑点并无较大变化,即此基础上酶量的增加对酶转化反应影响不大,说明酶降解的速度和数量与底物及酶的量有直接关系,结果与酶促反应动力学结论一致.在pH=5.0,40℃的恒温水浴9 h酶解条件下,500.1~833.5 μkat·g<sup>-1</sup>的酶量应为该反应最适酶量范围.

2.3.2 不同pH值的酶转化反应 取7份2 mg的人参皂甙Rd,分别加入1 mL不同pH值的磷酸柠

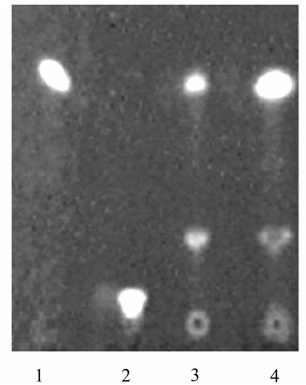


图1 人参皂甙Rd酶解产物的TCL图

Fig.1 TLC map of products from enzymatic transformation of protopanaxadiol ginsenoside Rd

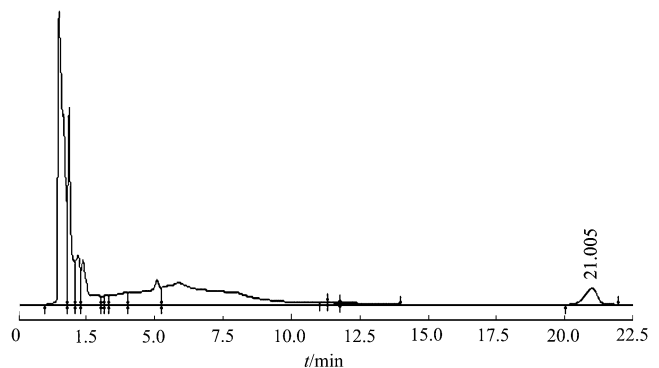


图2 人参皂甙Rd酶解产物的HPLC图

Fig.2 HPLC map of products from enzymatic transformation of protopanaxadiol ginsenoside Rd

檬酸缓冲液,按  $166.7\ \mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$  加入蜗牛酶,混匀,于  $40\ ^\circ\text{C}$  恒温水浴  $9\ \text{h}$ ,终止反应后进行 TLC 检测,结果如图 3(b)所示.图 3(b)中:编号 1 为人参皂甙 C-K 标品;2~8 样品的 pH 值分别为 2.6,3.2,3.8,4.4,5.0,5.6,6.2.从图 3(b)可以看出,当反应 pH 值大于 5.6 或 pH 值小于 3.2 时,对酶转化反应影响较大.究其原因可能是过高或过低的 pH 值影响了酶蛋白的结构和功能,导致了酶催化活性的下降.检测结果说明:蜗牛酶在  $\text{pH}=3\sim 5$  稳定,高于或低于此范围,酶活力明显降低,对酶解反应影响较大.这表明,酶量为  $166.7\ \mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$ ,于  $40\ ^\circ\text{C}$  恒温水浴  $9\ \text{h}$  的酶解条件下,该反应最适 pH 范围为  $3\sim 5$ .

2.3.3 不同反应温度的酶转化反应 取 5 份  $2\ \text{mg}$  的人参皂甙 Rd,分别加入  $1\ \text{mL}$ , $\text{pH}=5.0$  的磷酸柠檬酸缓冲液,按  $166.7\ \mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$  加入蜗牛酶,混匀,于不同温度条件下恒温水浴  $9\ \text{h}$ ,终止反应后进行 TLC 检测,结果如图 3(c)所示.图 3(c)中:编号 1 为人参皂甙 C-K 标品;2~6 样品的反应温度分别为  $30,35,40,45,50\ ^\circ\text{C}$ .从图 3(b)可以看出,当反应温度为  $30,35\ ^\circ\text{C}$  时,温度较低,导致酶活力降低,使得酶反应速度较慢,目标产物较少,对酶解反应影响较大;随着温度的升高酶活力增大,但在  $40\sim 50\ ^\circ\text{C}$  温度范围内,温度对酶解反应无较大影响.这表明,在酶量为  $166.7\ \mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$ , $\text{pH}=5.0$ ,恒温水浴  $9\ \text{h}$  酶解条件下,该酶解反应最适温度范围为  $40\sim 50\ ^\circ\text{C}$ .

2.3.4 不同反应时间的酶转化反应 取 7 份  $2\ \text{mg}$  的人参皂甙 Rd,分别加入  $1\ \text{mL}$ , $\text{pH}=5.0$  的磷酸柠檬酸缓冲液,按  $166.7\ \mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$  加入蜗牛酶,混匀,于  $40\ ^\circ\text{C}$  恒温下水浴反应不同时间,终止反应后进行 TLC 检测,结果如图 3(d)所示.图 3(d)中:编号 1 为人参皂甙 C-K 标品;2~8 样品的反应时间分别为  $6,9,12,15,18,21,24\ \text{h}$ .从图 3(d)可以看出,当反应时间在  $6\sim 24\ \text{h}$  范围内,不同的反应时间对酶转化反应影响不大,且酶解反应在此时间范围内均有较高转化率,说明蜗牛酶酶解时间短,转化效率高.在酶量  $166.7\ \mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$ , $\text{pH}=5.0$ , $40\ ^\circ\text{C}$  酶解条件下,该酶解反应最适时间范围为  $6\sim 24\ \text{h}$ .

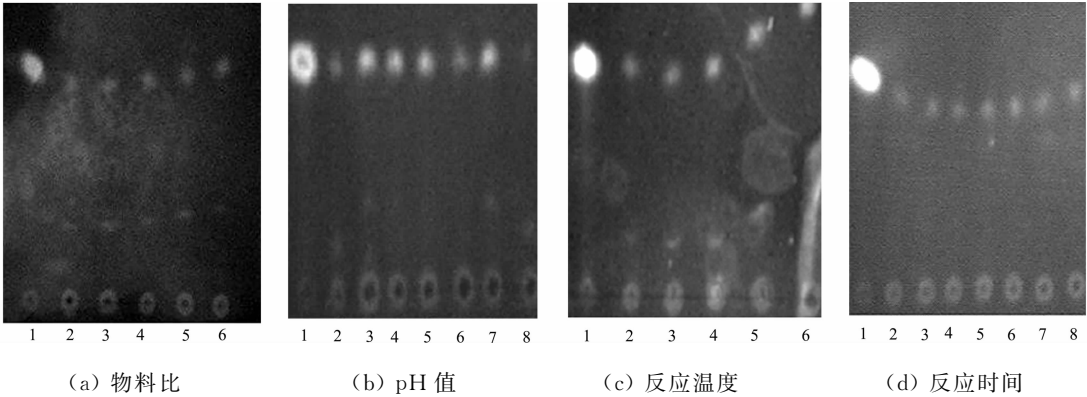


图 3 不同反应条件对酶转化反应影响的 TLC 图

Fig. 3 TLC map of enzymatic transformation under different reaction conditions

3 讨论

利用生物转化法对天然产物进行生物转化或结构修饰,是当今研究的热点.文中研究表明:利用蜗牛酶粗酶可将含量较高的天然皂甙人参皂甙 Rd 转化为经济价值更大、更具生物活性的稀有人参皂甙 C-K.所用蜗牛酶粗酶转化效果良好,价格低廉,约为精制蜗牛酶制剂价格的  $1/5$ ,蜗牛酶粗酶的选用大大降低了酶在生产成本中的比例.工业酶制剂转化法既可以减少制备工艺的繁琐,又可避免过多副产物的生成,便于产物的分离纯化.

明艳林<sup>[7]</sup>曾选用果胶酶、纤维素酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶、蜗牛酶、柚皮苷酶和木聚糖酶等 6 种酶酶解转化二醇型皂甙  $\text{Rb}_1$  获取稀有人参皂甙 C-K. 研究结果发现:在同等条件下,蜗牛酶是 6 种酶中转化效率最高的酶,且中间产物少,酶解转化完全.这 6 种酶为酶解转化皂甙类物质常用酶,基于蜗牛酶酶解特点,文中选用蜗牛酶来进行酶解转化.

人参皂甙 Rd 分子中糖基的连接键是  $\beta$ -糖苷键,酶解过程中,蜗牛酶中所含  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解人参皂甙 Rd 分子上的 C-20 位和 C-3 位糖苷键,主要产物为稀有人参皂甙 C-K. 迄今,二醇型人参皂甙代谢成 C-K 的途径已基本明了,尤其对于  $\text{Rb}_1$  代谢到 C-K 的具体途径研究的较为清楚.依据文献<sup>[7-8]</sup>,推

测人参皂甙 Rd 代谢至 C-K 途径如下: 人参皂甙 Rd C-3 位末端糖苷键断裂, 失去一份子葡萄糖, 形成 F2; 然后, F2 进一步代谢, C-3 位末端糖苷键断裂, 失去一分子葡萄糖, 形成稀有人参皂甙 C-K。人参皂甙 Rd 代谢成 C-K 的具体过程, 有待进一步验证。

1976 年, 日本学者 Nagai 等从绞股蓝中分离出 84 种皂甙类物质。其中Ⅲ,Ⅳ,Ⅷ,,Ⅻ分别与人参皂甙 Rb<sub>1</sub>,Rb<sub>3</sub>,Rd,F2 化学结构完全相同<sup>[9-10]</sup>。绞股蓝中的总皂甙含量是人参皂甙的 3 倍, 其人参皂甙 Rd 含量是人参的 8 倍<sup>[11]</sup>, 理论上可利用绞股蓝制取 C-K。我国绞股蓝资源丰富, 且绞股蓝相对人参价格要廉价很多, 以绞股蓝作为原料可以大大降低成本, 更适于工业化生产。目前, 仅有少量文献报道有利用酸法水解绞股蓝皂甙<sup>[12]</sup>获得抗癌药物, 但酸法水解副产物多, 难于分离纯化并且污染环境。除此之外, 绞股蓝的研究更多的仅仅体现在对绞股蓝总皂甙基础研究和简单的开发利用层面, 并没有太多深层次的开发产品问世。本实验利用蜗牛酶粗酶转化二醇型人参皂甙 Rd 并制取稀有人参皂甙 C-K, 为绞股蓝的深度利用奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] 王本祥. 人参的研究[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1985: 107.
- [2] 弓晓杰. 人参皂苷酶代谢产物化学修饰及其抗癌活性研究[D]. 吉林: 吉林农业大学, 2004.
- [3] 周伟, 周珮. 稀有人参皂苷 Compound K 研究进展[J]. 药学报, 2007, 42(9): 917-923.
- [4] HASEGAWA H, SUNG J H, MATSUMIYA S, et al. Main ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria[J]. Planta Med, 1996, 62(5): 453-457.
- [5] HASEGAWA H, SUNG J H, BENNO Y. Role of human intestinal prevotella oris in hydrolyzing ginseng saponins [J]. Planta Med, 1997, 63(5): 436-440.
- [6] 周超群. 人参皂甙 Rd 的研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(5): 832-836.
- [7] 明艳林. 人参皂甙肠道代谢物 IH-901 抗肝癌分子靶点研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2007.
- [8] 周伟. 稀有人参皂甙 Compound-K 的制备和活性研究[D]. 上海: 复旦大学, 2008.
- [9] 朴香兰, 吴倩. 绞股蓝研究进展[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7): 1758-1760.
- [10] 刘欣, 叶文才, 萧文鸾, 等. 绞股蓝的化学成分研究[J]. 中国药科大学学报, 2003, 34(1): 21-23.
- [11] 岳琳娜, 高学玲, 岳鹏翔. 绞股蓝有效成分的研究进展[J]. 饮料工业, 2008, 11(6): 9-12.
- [12] 许志超, 韩凌, 赵余庆. 绞股蓝总皂苷水解产物中稀有抗肿瘤活性成分的化学[J]. 亚太传统医药, 2008, 4(11): 41-43.

# Enzymatic Transformation from Protopanaxadiol Ginsenoside Rd into Rare Ginsenoside C-K

ZHANG Yang, LIN Yi

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

**Abstract:** Rare ginsenoside C-K was prepared using enzymatic transformation with snailase from protopanaxadiol ginsenoside Rd. Products and influencing factors of enzymatic transformation were examined by TLC and HPLC. The results showed that rare ginsenoside C-K could be obtained at the following conditions: enzyme amount 166.7  $\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$ , pH 5.0, thermostatic water bath at 40  $^{\circ}\text{C}$  for 9 h. Based on that, the optimum ranges of enzyme amount, pH value, temperature and reaction time were further determined as 500.1~833.5  $\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$ , pH 3~5, 40~50  $^{\circ}\text{C}$ , 6~24 h, respectively.

**Keywords:** enzymatic transformation; protopanaxadiol ginsenoside Rd; rare ginsenoside C-K; snailase

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)