

β -葡萄糖苷酶水解黄芪甲苷的研究

夏广萍^{1,2}, 刘 鹏², 赵娜夏², 付晓丽², 韩英梅^{2*}, 王润玲¹

1. 天津医科大学药学院, 天津 300070

2. 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 采用 β -葡萄糖苷酶水解黄芪甲苷, 并对其酶水动力学进行初步研究。方法 以 HPLC-ELSD 法检测水解液中黄芪甲苷及水解产物环黄芪醇-6-*O*- β -D-葡萄糖苷 (CMG) 的量, 以黄芪甲苷的水解转化率为指标, 考察各反应因素对转化率的影响, 并对该反应进行动力学研究。结果 最佳反应条件为反应温度 50 °C, 溶液 pH 值 5.0, 酶浓度 460 U/mL, 底物初始浓度 0.1 mmol/L, 反应时间 48 h; 在此条件下, 水解转化率达到 90% 以上。在最佳反应条件下, 该水解反应过程符合单底物 Michaelis Menten 方程, 其中最大反应速率 (V_m) 值为 0.037 mmol/(L·min), 米氏常数 (K_m) 值为 5.8 mmol/L。结论 采用 β -葡萄糖苷酶水解黄芪甲苷制备 CMG 可行; 商品化的 β -葡萄糖苷酶并非黄芪甲苷的特异性水解酶。

关键词: 黄芪甲苷; 环黄芪醇-6-*O*- β -D-葡萄糖苷 (CMG); β -葡萄糖苷酶; 水解; 酶动力学

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)06-1112-03

Study on hydrolyzing of astragaloside IV with β -glucosidase

XIA Guang-ping^{1,2}, LIU Peng², ZHAO Na-xia², FU Xiao-li², HAN Ying-mei², WANG Run-ling¹

1. College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Key words: astragaloside IV; cycloastragenol-6-*O*- β -D-glucoside (CMG); β -glucosidase; hydrolysis; enzyme kinetics

黄芪甲苷 (astragaloside IV) 是常用中药黄芪中环黄芪醇皂苷类的代表性成分^[1], 具有强心、降压、心肌保护等多种心血管药理作用。黄芪甲苷属于溶解惰性物质, 口服吸收差, 而黄芪传统上多为口服用药。研究表明大部分糖苷类天然产物口服后经肠道菌群的代谢转化, 其代谢产物吸收入血发挥药理作用^[2]。在黄芪甲苷活性体内代谢产物的研究过程中发现环黄芪醇-6-*O*- β -D-葡萄糖苷 (CMG) 为黄芪甲苷的主要代谢产物之一。使用商品化的 β -葡萄糖苷酶可以将黄芪甲苷水解为 CMG。本实验以黄芪甲苷的水解转化率为考察指标, 对 β -葡萄糖苷酶水解黄芪甲苷的反应过程进行了研究, 对商品化酶制剂应用于天然药物体内代谢产物制备的可行性研究进行了初探。

1 仪器与材料

黄芪甲苷对照品 (自制, 经 NMR 确证结构,

HPLC-ELSD 测定质量分数 > 98%); CMG 对照品 (自制, 经 NMR 确证结构, HPLC-ELSD 测定质量分数 > 99.5%)。 β -葡萄糖苷酶 (活力 230 000 U/g, 上海宝丰生化有限公司); 甲醇 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司); 重蒸水 (自制)。

HH—S 型恒温水浴锅 (巩义市予华仪器有限责任公司); Waters 515 泵、Waters 717 自动进样器 (美国 Waters 公司); Alltech 2000 蒸发光散射检测器 (美国 Alltech 公司); WYK—2 无音无油空压机 (天津市蓝珂科技实业公司)。

2 方法与结果

2.1 黄芪甲苷酶水解产物的定量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇-水 (8 : 2), 体积流量 1.0 mL/min, ELSD 漂移管温度 80 °C, ELSD 气流量 2.1 L/min, 色谱图见图 1。

收稿日期: 2011-10-17

基金项目: 国家重大新药创制专项 (2011ZX09401-009); 国家科技重大专项项目 (2009ZX09102-028); 天津市科技计划项目 (08ZCKFSH04000)

作者简介: 夏广萍 (1976—), 女, 天津人, 副研究员, 硕士在读, 主要研究方向为基于中药及天然产物的新药开发。

Tel/Fax: (022)23006959 E-mail: guangpingx@163.com

*通讯作者 韩英梅 Tel/Fax: (022)23006959 E-mail: tcmch405@163.com

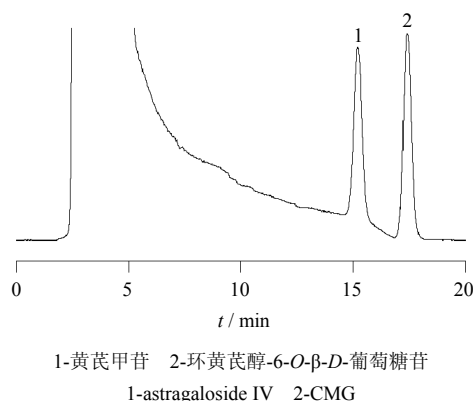


图 1 β-葡萄糖苷酶水解黄芪甲苷 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of hydrolyzing of astragaloside IV with β-glucosidase

2.1.2 黄芪甲苷对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品适量,加流动相制成 0.5 mg/mL 的溶液。

2.1.3 CMG 对照品溶液的制备 精密称取 CMG 对照品适量,加流动相制成 0.5 mg/mL 的溶液。

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取 CMG 对照品储备液 5、10、15、20、25 μL,注入液相色谱仪,测定峰面积,以峰面积的对数值为纵坐标 (Y),以进样量的对数值为横坐标 (X) 进行线性回归,得回归方程 $Y=5.756\ 13+1.527\ 29\ X$, $r=0.999\ 9$,结果表明,CMG 在 2.5~12.5 μg 进样量的对数值与峰面积的对数值呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 取 CMG 对照品溶液 20 μL 注入液相色谱仪,连续 5 次进样,测定峰面积,结果峰面积基本不变, RSD 为 0.53%。

2.1.6 稳定性考察 黄芪甲苷酶水解液在室温下保存,分别于 0、3、6、9、12 h 进样 100 μL,测定 CMG 峰面积,结果峰面积基本不变, RSD 为 0.43%。

2.1.7 重复性试验 取黄芪甲苷 6 份,分别进行酶水解,制备得到酶水解液,分别注入液相色谱仪进行测定,结果 RSD 为 0.31%。

2.1.8 测定法 精密吸取黄芪甲苷对照品溶液及 CMG 对照品溶液各 10、20 μL,黄芪甲苷酶水解液 (0.45 μm 微孔滤膜滤过) 适量,注入液相色谱仪,测定,以外标两点法对数方程计算,即得。

2.2 水解工艺优化

取适量水解液,以 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,按 HPLC-ELSD 法测定其中 CMG 的量,计算黄芪甲苷的水解转化率。以黄芪甲苷的水解转化率为指标,考察了 pH 值、温度、酶浓度、底物浓度等对水解转化率的影响。

$$\text{黄芪甲苷水解转化率} = m_2 \times M_1 / (m_1 \times M_2)$$

m_1 为黄芪甲苷的实际投料量, m_2 为 CMG 的实际测得量, M_1 为黄芪甲苷的相对分子质量, M_2 为 CMG 的相对分子质量

2.2.1 反应液 pH 值对水解转化率的影响 分别以 pH 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液配制 100 mL 0.1 mmol/L 黄芪甲苷溶液,加入 β-葡萄糖苷酶使其在溶液中的浓度为 460 U/mL,于 50 °C 恒温水浴中水解 48 h,结果黄芪甲苷水解转化率分别为 54.6%、80.4%、91.8%、70.8%、53.8%。在 pH 4.5~5.5 黄芪甲苷水解转化率可以达到 70% 以上,反应最佳 pH 值为 5.0。

2.2.2 反应温度对水解转化率的影响 在 100 mL pH 5.0 的 0.1 mmol/L 黄芪甲苷溶液中,加入 β-葡萄糖苷酶使其在溶液中的浓度为 460 U/mL,分别于 40、45、50、55、60 °C 恒温水浴中水解 48 h,结果黄芪甲苷水解转化率分别为 52.3%、74.6%、89.6%、70.0%、34.2%。当温度低于 50 °C 时,随着温度的升高,转化率逐渐增加;但当温度超过 50 °C 后,随温度的升高,酶活性逐渐降低,水解转化率也随之降低。因此,β-葡萄糖苷酶水解黄芪甲苷的最佳反应温度为 50 °C。

2.2.3 酶浓度对水解转化率的影响 在 100 mL pH 5.0 的 0.1 mmol/L 黄芪甲苷溶液中,加入 β-葡萄糖苷酶使其在溶液中的浓度分别为 230、345、460、690、920、1 150 U/mL,于 50 °C 恒温水浴中水解 48 h,结果黄芪甲苷水解转化率分别为 69.8%、77.1%、89.9%、93.6%、94.3%、95.6%。随着酶用量的增加,黄芪甲苷的水解转化率逐渐提高,但当酶浓度在 460 U/mL 以上,水解转化率的增幅不显著,故选择 460 U/mL 为水解酶浓度。

2.2.4 底物初始浓度对水解转化率的影响 分别配制 0.1、0.125、0.167、0.20、0.25、0.33 mmol/L pH 5.0 的黄芪甲苷溶液各 100 mL,加入 β-葡萄糖苷酶使其在溶液中的浓度为 460 U/mL,于 50 °C 恒温水浴中水解 48 h,结果黄芪甲苷水解转化率分别为 90.5%、88.5%、86.6%、85.2%、84.7%、75.2%。随着底物初始浓度的降低,水解转化率逐渐提高。故选择 0.1 mmol/L 为底物初始浓度。

2.2.5 反应时间对水解转化率的影响

在 pH 5.0 的 100 mL 0.128 mmol/L 黄芪甲苷溶液中,加入 β-葡萄糖苷酶使其在溶液中的浓度为 460 U/mL,于 50 °C 恒温水浴中保温放置。每隔一定时间取样 1 次,以 HPLC-ELSD 检测水解液中黄

芪甲苷和 CMG 的变化情况。结果见图 2。在 24 h 内黄芪甲苷的水解转化率增加较快,此后增速渐缓。48 h 后反应基本达到平衡。

通过以上优化最终得到了 β -葡萄糖苷酶水解黄芪甲苷的最佳反应条件,即反应液 pH 值 5.0,水解温度 50 $^{\circ}\text{C}$,酶浓度 460 U/mL,底物初始浓度 0.10 mmol/L,反应时间 48 h。

以此最佳工艺参数条件下,分别进行了 3 批验证试验,结果黄芪甲苷的水解转化率分别为 91.5%、90.9%、91.9%。

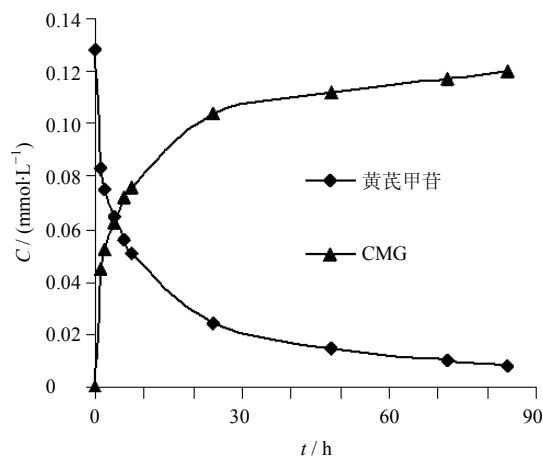


图 2 黄芪甲苷和 CMG 随反应进程的变化曲线

Fig. 2 Concentration-time curves of astragaloside IV and CMG

2.3 反应动力学研究

2.3.1 反应初速率 (V) 的定义 反应初速度定义为摩尔产率在 1% 以内时,每分钟每升溶液中黄芪甲苷水解生成 CMG 的毫摩尔数。

2.3.2 米氏常数 (K_m) 和最大反应速率 ($V_{\max}$) 的计算 分别配制 0.10、0.125、0.167、0.20 mmol/L pH 5.0 的黄芪甲苷溶液,加入 β -葡萄糖苷酶使其在溶液中的浓度为 460 U/mL,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中反应,以 HPLC-ELSD 法测定并计算得到相应反应初速率。利用 Lineweaver-Burk 的双倒数作图法,即以 $1/V$ 对 $1/[S]$ 作图,得到 Michaelis Menten 方程。

$$1/V = K_m / (V_{\max} [S]) + 1/V_{\max}$$

V 为某一底物浓度时的反应初速率, $V_{\max}$ 为该酶促反应的最大反应速率, K_m 为米氏常数, $[S]$ 为底物浓度

由该直线的斜率 $K_m/V_{\max}$ 和纵轴截距 $1/V_{\max}$ 即可求出 $V_{\max}$ 和 K_m 。线性关系方程为 $Y = 154.67948X - 26.86737172$, 经计算 $V_{\max} = 0.037 \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{min})$, $K_m = 5.8 \text{ mmol/L}$ 。

3 讨论

由于黄芪甲苷和 CMG 均在 200 nm 左右有微弱的末端吸收,采用紫外检测器进行检测干扰较大,且灵敏度低。蒸发光散射检测器 (ELSD) 对无紫外吸收的化合物具有较高的检测灵敏度,因此选用 HPLC-ELSD 检测的方法。

CMG 由 Kitakawa 等^[1]于 1983 年首次报道,是在对黄芪甲苷的结构研究过程中,用橙皮苷酶水解黄芪甲苷获得的。阮鸣^[3]在以不同药(食)用真菌对黄芪药材进行固体发酵所得发酵物中也检测到了 CMG 的存在。而该化合物在国产黄芪药材中未见有分离报道,也未见国内有人采用商品酶对黄芪甲苷进行生物转化的研究报道。

K_m 是酶的重要特征常数之一,是酶对底物亲和力的量度。对于大多数酶来说, K_m 的值变化很大,但数量级一般在 $10^{-7} \sim 10^{-1} \text{ mol/L}$ ^[4]。 K_m 值越低表示酶对底物的亲和力越高。本实验测得最佳条件下 β -葡萄糖苷酶水解黄芪甲苷的 K_m 为 5.8 mmol/L,即 $5.8 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。由此可以推断 β -葡萄糖苷酶对底物黄芪甲苷的亲和力并不高,说明商品化的 β -葡萄糖苷酶并非黄芪甲苷的特异性水解酶。

此外, K_m 的值等于反应达到最大反应速率一半时的底物浓度,由于这种关系,米氏动力学研究中的底物浓度应选择在米氏常数范围内,最好是从低于 K_m 的一个数量级到高于 K_m 的一个数量级^[5]。但由于黄芪甲苷在水中较低的溶解度,很难满足该条件。因此 $V_{\max}$ 的估计值与其真实值之间可能存在有误差。

参考文献

- [1] Kitagawa I, Wang H K, Saito M, *et al.* Saponin and sapogenol. XXXV.¹⁾ Chemical constituents of *Astragalus Radix*, the root of *Astragalus membranaceus* Bunge. (2). astragalosides I, II and IV, acetylastragaloside I and isoastragalosides I and II [J]. *Chem Pharm Bull*, 1983, 31(2): 698-708.
- [2] 小桥恭一. 中药有效成分与肠道细菌的关系 [J]. *医学与哲学*, 1995, 16(11): 598.
- [3] 阮 鸣. 不同药(食)用真菌固体发酵对黄芪中黄芪甲苷的影响 [J]. *中草药*, 2011, 42(7): 1421-1424.
- [4] Marangoni A G 著, 赵裕蓉, 张 鹏译. 酶催化动力学——方法与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [5] Bisswanger H 著, 刘晓晴译. 酶学实验手册 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.