

## 酶转化三七叶总皂苷制备人参皂苷 C-K 的工艺优化

姜彬慧<sup>1</sup>, 韩颖<sup>1</sup>, 赵余庆<sup>2\*</sup>, 胡筱敏<sup>1</sup>, 郑龙熙<sup>\*</sup>

(1. 东北大学 资源与土木工程学院, 辽宁 沈阳 110004; 2. 辽宁中医学院, 辽宁 沈阳 110032)

**摘要:** 目的 研究以三七叶总皂苷制备人参皂苷 C-K 的酶转化工艺。方法 利用 4 种工业酶制剂对三七叶总皂苷进行转化, 筛选出最佳酶制剂; 以人参皂苷 C-K 的含量为指标, 采用正交试验法进行酶转化工艺的优化; 采用 TLC 及 HPLC 法检测酶转化产物。结果 酶转化三七叶皂苷的最佳工艺条件为: 20%  $\beta$  葡聚糖苷酶, pH 5.4, 反应温度 55<sup>°</sup>, 反应时间 48 h。反应时间的影响最大, 其次是酶的体积分数。结论  $\beta$  葡聚糖苷酶对三七叶总皂苷的转化作用最强。

**关键词:** 三七叶总皂苷; 人参皂苷 C-K; 酶转化工艺; 正交试验

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2004)09-0986-03

### Optimization of enzymatic translation for preparation ginsenoside compound K in total saponins of *Panax notoginseng*

JIANGB in-hui<sup>1</sup>, HAN Ying<sup>1</sup>, ZHAO Yu-qing<sup>2</sup>, HU Xiaomin<sup>1</sup>, ZHENG Long-xi<sup>1</sup>

(1. College of Resources and Civil Engineering, Northeast University, Shenyang 110004, China;

2. Liaoning College of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

**Abstract:** **Object** To study the enzymatic translation of the saponins of *Panax notoginseng* leaves (SPNL) for preparation of ginsenoside compound K. **Methods** Four industrial enzymes were used to screen their ability of enzymatic translation of SPNL for preparation of ginsenoside compound K. Under the condition of orthogonal test, the affecting factors of enzymatic translation were studied and optimized with the content of ginsenoside compound K, then analyzed by TLC and HPLC. **Results** The best optimal condition was obtained as following: 20% for  $\beta$ glucanase concentration, pH 5.4, 55<sup>°</sup> as reaction temperature, 48 h as the reaction time. The reaction time was the greatest affecting factors among the four ones, and enzyme concentration was the second. **Conclusion**  $\beta$ Glucanase was the best of four industrial enzymes for this enzymatic translation technics.

**Key words:** the saponins of *Panax notoginseng* leaves (SPNL); ginsenoside compound K; enzymatic translation technics; orthogonal test

三七叶皂苷是从五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 茎叶中提取的总皂苷, 即三七茎叶总皂苷, 简称三七叶皂苷 (the leaves saponins of *Panax notoginseng*, L SPN)。近年研究表明, L SPN 与三七根皂苷具有相同的药理作用, 而且其毒性较低, 安全范围大<sup>[1]</sup>。目前已从三七叶中分离鉴定出人参皂苷 Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rb<sub>3</sub>, Rc, Rg<sub>3</sub>, Mc, 三七皂苷 Fa, Fc, Fe 和绞股蓝皂苷 IX 等, 主要以二醇组皂苷为主<sup>[2]</sup>。国内外学者对人参皂苷单体与抗肿瘤活性的构效关系研究表明: 低糖链的皂苷及苷元具有较强的抗肿瘤作用, 其规律: 原人参二醇型 > 原人参三醇型; 苷元 > 单糖苷 > 二糖苷 >

三糖苷 > 四糖苷; 20(R)-人参皂苷 > 20(S)-人参皂苷<sup>[3]</sup>。低糖链的皂苷及苷元在植物中含量甚少, 如人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 在人参中含量甚微, 在红参中仅为十万分之一; 而人参皂苷 C-K (ginsenoside compound K) 则一直被认为是二醇组人参皂苷在动物体内的代谢产物<sup>[4]</sup>。因此, 从人参属植物中制备低糖链皂苷如人参皂苷 Rh<sub>1</sub>, Rh<sub>2</sub>, C-K 等成分的工作倍受关注。目前, 主要的制备方法有酸、碱水解及生物转化<sup>[5-7]</sup>。由于酸、碱水解方法产生大量的废酸和废碱, 对环境造成较大的危害, 因此寻找一条无污染的生产途径势在必行。

以往国内外学者对人参皂苷 C-K 的制备主要

\* 收稿日期: 2004-05-18

基金项目: 留学归国博士科研启动基金资助项目 (教外司留[2001]498); “辽宁省中药现代化工程技术中心”建设基金资助项目 (2002403004)

作者简介: 姜彬慧(1962—), 女, 副教授, 在读博士, 研究方向为资源与微生物技术。

\* 通讯作者 Tel: (024) 86224725 E-mail: Zhaoyuqingtcn@163.com

通过单体人参皂苷的体内肠道菌代谢与体外的微生物转化来完成,转化过程复杂,反应副产物多。利用商品酶制剂,操作简便,但价格昂贵,应用具有一定的局限性<sup>[8-11]</sup>。工业酶制剂价格低廉,操作过程简单、方便,便于工业放大,已被广泛地应用在各个领域,因此探讨工业酶制剂对中药活性成分的转化具有重大意义。本实验利用 4 种工业酶制剂对 LSPN 进行转化,制备人参皂苷 C-K。

### 1 材料与仪器

三七叶皂苷(LSPN)购于云南永昌(含总皂苷大于 80%), $\beta$ 葡聚糖苷酶( $\beta$ glucanase)、纤维二糖酶(cellobiase)、糖化酶(glucoamylase)均由北京诺唯信公司提供,纤维素酶(cellulase)由上海丽珠东风生物技术有限公司提供。人参皂苷 C-K 对照品(纯度均大于 95%)由辽宁中医学院新药研制中心提供;乙腈、甲醇为色谱纯,硅胶 G(青岛海洋化工厂),其他试剂均为分析纯。

日立 L-7100 高效液相色谱仪, N 2000 双通道色谱工作站(浙江大学); TG332A 微量分析天平; RE-52A 型旋转蒸发仪; AS-3120A 超声仪。

### 2 方法与结果

2.1 LSPN 供试品溶液的制备:精密称取 LSPN 200 mg,置 10 mL 量瓶中,加 HAc-NaAc 缓冲液(pH 5.8)溶解并加至刻度,制成 20 mg/mL 溶液,置冰箱待用。

2.2 酶溶液的制备:分别精密量取  $\beta$ 葡聚糖苷酶、纤维二糖酶、糖化酶原液各 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加蒸馏水至刻度,即得 10% 酶反应液。精密称取纤维素酶 200 mg,置 10 mL 量瓶中,加蒸馏水溶解并加至刻度,即得 20 mg/mL 纤维素酶反应液。

2.3 最佳转化酶的筛选:4 种酶反应液各取 1 mL,分别加入 1 mL 供试品溶液于试管中,在 50 (糖化酶的反应液在 25 )恒温 48 h,终止反应。分别加入 0.5 mL 水饱和正丁醇进行萃取,静置。另取 1 mL 蒸馏水作为对照组,同法操作。用定量毛细管各吸取 5  $\mu$ L 上述水饱和正丁醇萃取液,点板,以  $\text{CHCl}_3\text{:MeOH:H}_2\text{O}$  (40:10:1)为展开剂展开至同样距离,取出,挥干溶剂,喷 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  乙醇溶液后 105 加热 10 min 显色。根据显色斑点的颜色深浅和大小来确定酶转化作用的强弱。结果显示:酶对 LSPN 的转化作用大小依次为  $\beta$ 葡聚糖苷酶 > 纤维素酶 > 糖化酶 > 纤维二糖酶。因此确定 LSPN 的最佳转化酶为  $\beta$ 葡聚糖苷酶。

2.4 HPLC 法测定酶转化产物中人参皂苷 C-K

2.4.1 色谱条件:色谱柱:Kromasil ODS 柱(150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m);柱温:室温;检测波长:203 nm;体积流量:1 mL/min;流动相:乙腈-水(60:40)。

2.4.2 标准曲线及线性范围:准确称取人参皂苷 C-K 对照品 1.57 mg,置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并加至刻度。吸取该溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12  $\mu$ L 进样,按上述色谱条件测定。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标作标准曲线,得回归方程:  $Y = 41\,413.49X - 1\,908.93$ ,  $r = 0.9997$ 。结果表明,人参皂苷 C-K 在 0.314~1.884  $\mu$ g 时峰面积与进样量线性关系良好。

2.4.3 酶转化产物中人参皂苷 C-K 的测定:取酶转化液经 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜,进样 5  $\mu$ L,测定峰面积,由回归方程计算人参皂苷 C-K 含量。

2.5  $\beta$ 葡聚糖苷酶转化 LSPN 最佳条件的确定:筛选了  $\beta$ 葡聚糖苷酶作为 LSPN 的转化酶后,选定反应时间、反应温度、酶体积分数及反应缓冲液的 pH 值作为考察的 4 个因素,每个因素各取 3 个水平,见表 1。取 9 份 1 mL LSPN 供试品溶液,80 加热 30 min 后(去除其他酶的影响),冷却至室温,分别加入 1 mL 不同体积分数的  $\beta$ 葡聚糖苷酶溶液,在一定温度、pH 条件下反应一定时间后,终止反应。分别用水饱和正丁醇萃取 3 次,合并萃取液,挥干,置 1 mL 量瓶中,加色谱纯甲醇至刻度,测定人参皂苷 C-K 含量,结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels

水 平	因 素			
	A 酶体积分数/%	B 时间/h	C 温度/	D pH 值
1	20	12	45	5.0
2	10	24	50	5.4
3	5	48	55	5.8

可见各因素对酶转化作用的影响程度依次为  $B > A > C > D$ ,即反应时间对酶转化作用的影响最大,其次是酶的体积分数。同时,可以确定该试验的最佳因素选择应该是  $A_1B_3C_3D_2$ ,即反应条件为 20% 酶溶液,在 pH 为 5.4 的缓冲液中,55 恒温水浴反应 48 h 为最佳试验条件。在上述条件下利用  $\beta$ 葡聚糖苷酶对 LSPN 转化 3 批样品,结果人参皂苷 C-K 的质量浓度为 0.883 mg/mL, RSD 为 4.3%。

### 3 讨论

3.1 利用生物体系包括微生物和动物、植物细胞或酶对天然产物(外源性底物)进行生物转化或结构修饰,是当今研究的热点<sup>[12]</sup>。本研究结果表明,利用合

表 2  $L_9(3^4)$  正交试验设计及结果Table 2 Design and result of  $L_9(3^4)$  orthogonal test

试验号	A	B	C	D	人参皂苷 C-K /(mg · mL <sup>-1</sup> )
1	1	1	1	1	0.405 5
2	1	2	2	2	0.649 8
3	1	3	3	3	0.864 3
4	2	1	2	3	0.332 8
5	2	2	3	1	0.619 0
6	2	3	1	2	0.750 0
7	3	1	3	2	0.376 3
8	3	2	1	3	0.324 8
9	3	3	2	1	0.654 8
$k_1$	0.639 9	0.371 5	0.493 4	0.559 8	
$k_2$	0.567 3	0.531 2	0.545 8	0.592 0	
$k_3$	0.451 9	0.756 4	0.619 9	0.507 3	
R	0.188 0	0.384 9	0.126 5	0.084 7	

表 3 方差分析

Table 3 Variance analysis

方差来源	方差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	0.054	2	0.027	4.91	
B	0.224	2	0.112	20.44	$P < 0.05$
C	0.024	2	0.012	2.21	
D(误差)	0.011	2	0.005		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.0 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.0$$

适的酶制剂可以实现将含量较高的天然皂苷转化为具有特殊活性的、价值更大的次级皂苷, 并使其含量提高数百倍, 为新药(原料)的开发奠定了基础。

3.2 工业酶制剂代替生物转化既可以减少许多繁琐的制备工艺, 又可以消除多种副产物的生成, 便于转化产物的分离与纯化, 这是由酶的专一性所决定的。本实验利用工业酶制剂  $\beta$ -葡聚糖苷酶转化三七叶皂苷可制备 0.883 mg/mL 的抗肿瘤活性产物人参皂苷 C-K, 为进一步研究其药理活性创造了条件。

#### References

[1] Huang G K, Hu X L, Qin Q, *et al.* Microscale experiment of

isolation and purification of total saponins from the stalk and leaves of *Panax ginseng* [J]. *J Guangxi Normal Univ* (广西师范大学学报), 2000, 18(2): 106-107.

- [2] Chen Y G, Zhan E Y, Chen H F, *et al.* Saponins with low sugar chain from the leaves of *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2002, 25(3): 176-178.
- [3] Dou D Q, Jin L, Chen Y J. Advances and prospects of the study on chemical constituents and pharmacological activities of *Panax ginseng* [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1999, 16(2): 151-156.
- [4] Liu K. Preparation and antitumor activities of rare ginsenoside [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 43 (Suppl): 57-59.
- [5] Akao T, Kanaoka M, Kobashi 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(3): 245-249.
- [6] Kim D S, Cue Y S, Yu H S, *et al.* Ginsenoside Rh<sub>2</sub> prepared from enzyme reaction [J]. *J Dalian Inst Light Ind* (大连轻工业学院学报), 2001, 20(2): 99-104.
- [7] Chen Y G, Lü Y P, Gui S H, *et al.* Preparation of protopanaxadiol and its epimer 20(R) protopanaxadiol from leaf saponins of *Panax notoginseng* [J]. *Fine Chem* (精细化工), 2003, 20(7): 425-426.
- [8] Wang L P. *In vitro* metabolism of ginseng saponins [J]. *J Strait Pharm* (海峡药学), 2000, 12(4): 4-6.
- [9] Ma J S, Zhou Q L, Fei X F, *et al.* Metabolism of ginsenoside Rb<sub>1</sub> and panaxadiol saponins by fungi [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2001, 36(8): 603-605.
- [10] Koizumi H, Sanada S, Ida Y, *et al.* Studies on the ginseng. 1) On the structure and enzymatic hydrolysis of ginsenoside-Ra<sub>1</sub> [J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30(7): 2393-2398.
- [11] Hasegawa H, Sung J H, Matsumiya S, *et al.* Main ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria [J]. *Plant Med*, 1996, 62: 453-457.
- [12] Wu S J, Yang Z J, Zhu L H, *et al.* Study on biotransformation of glycyrrhizin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(6): 516-518.

## 柱前衍生 HPLC 法测定鸦胆子油中的脂肪酸含量

丁 怡, 唐 星\*

(沈阳药科大学 药剂教研室, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要:** 目的 建立 HPLC 法测定鸦胆子油中的脂肪酸的方法。方法 以 2,4-二溴苯乙酮为衍生化试剂, 18-冠-6 醚为相转移催化剂, 采用 Kromasil C<sub>8</sub>(250 mm × 4 mm, 5 μm) 反相柱, 波长 254 nm, 以乙腈-水(80:20)为流动相等度洗脱, 柱温室温, 体积流量为 1.3 mL/min, 正十七烷酸为内标, 一次基线分离 5 种脂肪酸。结果 亚油酸的线性

\* 收稿日期: 2003-11-22

基金项目: 辽宁省重大课题项目(2002226005)

作者简介: 丁 怡(1978—), 女, 河北人, 沈阳药科大学 2001 级在读研究生, 主要从事静脉注射用微乳剂和缓控释制剂的研究。

Tel: (024) 23843711-3923 E-mail: dingyisue@21cn.com