

原人参二醇类皂苷(PPD)在酶反应中转化动态及其产物稀有皂苷的制备

彭 婕, 刘春莹, 陈 双, 鱼红闪*, 金凤燮*

大连工业大学生物工程学院, 辽宁 大连 116034

摘 要: 目的 为了生物转化低成本制备人参稀有皂苷, 利用 *Aspergillus* g.848 菌的粗酶与市售的原人参二醇类皂苷(PPD)混合皂苷反应, 制备人参稀有皂苷 C-K、C-Mc、F₂ 单体和 4 种异构体的 Rh₂ 组皂苷。方法 酶与 PPD 皂苷反应, 生成稀有皂苷; 用 HPLC 法测定 PPD 皂苷原料和产物皂苷的组成, 用硅胶柱法分离产物中的单体皂苷, 用 NMR 法确认产物单体皂苷结构; 用 UPLC-MS 法确认产物 Rh₂ 组。结果 原料 PPD 中含有人参皂苷 Rb₁、Rd、Rb₂、Rc 和 4 种异构体的人参皂苷 Rg₃ 组; 酶反应时, 若生产以 F₂ 为主的皂苷时, 最佳反应时间为 1.5~2.0 h; 若生产以 C-K 为主的皂苷时, 反应时间为 24.0~30.0 h; 若生产以 Rh₂ 组为主的皂苷时, 反应 6.0~12.0 h 时, Rg₃ 组产量低而 Rh₂ 组产量高。以 C-K 为主的皂苷生产中, 从 30 g 的 PPD 皂苷酶反应得到 20 g 产物, 经硅胶柱分离, 得到 8.16 g 的 C-K、1.01 g 的 C-Mc、0.45 g 的 F₂ 单体和 0.19 g 的 Rh₂ 组皂苷, 并以 NMR 和 UPLC-MS 法核对了其结构。结论 PPD 皂苷经酶转化成功地制备了高活性 C-K、C-Mc、F₂ 和 Rh₂ 组皂苷。

关键词: 原人参二醇类皂苷; 酶转化动态; 人参稀有皂苷 C-K; 人参稀有皂苷 C-Mc; 人参稀有皂苷 F₂; Rh₂ 组皂苷; 硅胶柱分离; 核磁共振

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)01-0085-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.01.012

Protopanaxadiol ginsenosides dynamics in enzymatic reaction and preparation of rare ginsenosides

PENG Jie, LIU Chun-ying, CHEN Shuang, YU Hong-shan, JIN Feng-xie

College of Biotechnology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China

Abstract: Objective To cheaply prepare the rare ginsenosides by biotransformation, ginsenosides C-K, C-Mc, F₂, and Rh₂ from commercially available Protopanaxadiol (PPD) ginsenoside mixture were prepared using a crude enzyme of *Aspergillus* g.848 strain. **Methods** The rare ginsenosides were obtained from PPD ginsenosides by enzyme reaction; The composition of PPD raw materials and ginsenoside products was measured by HPLC. The monomer ginsenosides and Rh₂ group of enzyme reaction product were separated by a silica gel column; The produced monomer ginsenosides were identified by NMR; Rh₂ group was identified by UPLC-MS. **Results** The raw material of PPD ginsenosides was consisted of ginsenoside Rb₁, Rd, Rb₂, Rc, and Rg₃ groups with four kinds of isomers. During the reaction of enzyme, the best reaction time for the ginsenoside F₂ production was 1.5 h to 2 h; The best reaction time for the ginsenoside C-K production was 24 h to 30 h; If producing the Rh₂ group, when reacted to 6 h to 12 h, the content of Rg₃ group was low, and Rh₂ group was high. In the production of C-K, 20 g of crude products were obtained from 30 g of PPD ginsenosides by enzyme reaction, and 8.16 g of C-K, 1.01 g of C-Mc, 0.45 g of F₂, and 0.19 g of Rh₂ group were separated using silica gel column. The rare ginsenosides were identified by NMR, and the Rh₂ group was identified using UPLC-MS method. **Conclusion** The high activity of monomer ginsenoside C-K, C-Mc, F₂, and Rh₂ group are successfully prepared from the PPD ginsenosides by enzymatic conversion.

Key words: PPD type ginsenosides; enzymatic conversion; rare ginsenosides C-K, C-Mc, F₂; ginsenoside Rh₂ group; silica gel column; NMR

收稿日期: 2016-08-21

基金项目: 国家高端外国专家项目(GDT20152100019); “重大新药创新”科技重大专项(2012ZX09503001-003)

作者简介: 彭 婕, 女, 研究方向为中草药生物转化。Tel: 13998528120 E-mail: 253713751@qq.com

*通讯作者: 鱼红闪, 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为中草药生物转化。Tel: 13909849970 E-mail: hongshan@dlpu.edu.cn
金凤燮, 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为中草药生物转化。Tel: 13704099261 E-mail: fxjin@dlpu.edu.cn

人参 *Panax ginseng* C. A. Meryer 属五加科人参属草本植物,是驰名中外的贵重中药。中医认为,人参具有大补元气、生津安神等作用^[1]。人参皂苷是人参主要的活性成分,具有滋补强壮、延缓衰老、抗肿瘤、调节内分泌系统,增加免疫功能等独特功效^[2-4]。人参皂苷属于三萜类皂苷,可分为3类:原人参二醇类皂苷(PPD)、原人参三醇类皂苷(PPT)和齐墩果烷类皂苷,已知的人参皂苷有180余种^[5];但人参中80%~90%的皂苷为人参皂苷 Rb₁(Rb₁)、人参皂苷 Rb₂(Rb₂)、人参皂苷 Rc(Rc)、人参皂苷 Rd(Rd)、人参皂苷 Re(Re)、人参皂苷 Rg₁(Rg₁)和人参皂苷 Rf(Rf)等^[6],其主要皂苷的人体吸收率较低、活性低^[7-8];而人参稀有皂苷 C-K(C-K)、人参稀有皂苷 C-Mc(C-Mc)、人参稀有皂苷 C-Y(C-Y)、人参稀有皂苷 F₂(F₂)、人参稀有皂苷 Rh₂(Rh₂)等,吸收率高、活性高,除了具有安神补脑、抗疲劳、抗肿瘤等功效,还具有促进毛发生长、抗皮肤老化等作用^[9-14]。

为了得到高活性人参稀有皂苷,本实验室发现了4种人参皂苷酶:即水解PPD中Rb₁、Rb₂、Rc和Rd的第3(碳)-O-和20(碳)-O-多种糖基的人参皂苷酶I型^[15];水解PPD的20-O-多种糖基的人参皂苷酶II型^[16];还有一种克隆在*E. coli* C41(DE3)菌种中表达的人参皂苷酶III型,能水解PPD的3-O-多种糖基^[17];水解PPT中Re、三七皂苷R₁(R₁)、Rg₁皂苷6-O-多种糖基的人参皂苷酶IV型^[18];利用上述4种酶可以生物转化人参皂苷,制备各种人参稀有皂苷。

本实验室研究了来自*Aspergillus* g.848菌的人参皂苷酶I型,酶相对分子质量为75 000,能水解Rb₁、Rb₂、Rc、Rd和Rg₃的3-O-和20-O-位置的多种糖基。该酶先水解Rb₁的20-O-末端Glc变成Rd,然后再水解3-O-末端Glc至F₂,最后水解F₂的3-O-Glc得到C-K,其水解途径为Rb₁→Rd→F₂→C-K;该酶先水解Rb₂和Rc的3-O-Glc,其水解途径为Rb₂→C-O→C-Y→C-K, Rc→C-Mc1→C-Mc→C-K;根据米氏常数计算,酶水解皂苷糖基速度为Rb₁的20-O-Glc>Rb₂的3-O-Glc>Rc的3-O-Glc>Rd的3-O-Glc;利用该酶,控制酶反应时间、酶反应温度和底物浓度,从PPD中Rb₁、Rb₂、Rc、Rd可制备C-K、C-Y、C-Mc和F₂等^[19-20]。

由于纯酶和人参皂苷单体价格昂贵,因此本实验利用廉价的*Aspergillus* g.848菌人参皂苷酶I型粗

酶液与市售的PPD混合物反应,低成本制备高活性人参稀有皂苷;研究了PPD混合皂苷中的各种皂苷,在不同反应时间的变化动态和产物的生成机制,为大量制备人参稀有皂苷提供基础依据。

1 仪器与材料

Waters 2695 高效液相色谱分析仪, Waters 2996 二极管阵列检测器及 Empower 色谱工作站, 美国 Waters 公司; Unitary C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 华谱创新科技有限公司。核磁共振仪 Bruke AVANCE 600、NMR spectrometer, 瑞士 Bruke 公司。Waters UPLC-Q-TOF-MS PremierTM 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱联用仪, 美国 Waters 公司。

Aspergillus g.848 菌, 本实验室提供; PPD 原料、4 种异构体的 Rg₃ 组和 Rh₂ 组, 天乐集团产品; 人参皂苷对照品 C-K、C-Y、C-Mc、F₂、20(S)-Rh₂、20(R)-Rh₂、人参皂苷 Rh₃(Rh₃)、人参皂苷 Rk₂(Rk₂) 等, 本实验室自制, 经中国科学院长春应用化学研究所国家电化学和光谱分析中心核对结构, 质量分数均在95%以上。薄层色谱(TLC)板 Silica gel 60-F254, 德国 Merck 公司; AB-8 大孔树脂、D-280 大孔树脂、硅胶, 天津南开大学试剂厂。

2 方法与结果

2.1 人参皂苷、PPD 原料分析方法

2.1.1 TLC 法 用毛细管吸取对照品或样品溶液, 在 TLC 板上点样、吹干, 放入盛装有展开剂的层析缸中封口展开, 展开剂为氯仿-甲醇-水(7:3:0.5)。展开结束后, 用10%硫酸加热显色。

2.1.2 HPLC 法 Unitary C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水; 洗脱程序: 0~20 min, 20%乙腈(等度); 20~31 min, 20%~32%乙腈(线性梯度); 31~40 min, 32%~43%乙腈(线性梯度); 40~70 min, 43%~100%乙腈(线性梯度); 进样量 10 μL; 柱温 35 ℃; 体积流量 0.6 mL/min; 检测波长 203 nm; 柱效为 78 000 塔板/m。

2.1.3 样品检测 将待测人参皂苷样品用色谱甲醇溶解, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 即为检测样品。分别按“2.1.1”“2.1.2”项条件进行检测。

2.2 PPD 原料的成分分析

为了解 PPD 中各种皂苷量及其比例, 称取 4 mg PPD, 溶于 1 mL 色谱纯甲醇中, 经 HPLC 检测, 与人参皂苷对照品相比较, 结果见图 1。对图 1 中的 HPLC 图谱进行分析, PPD 中各种皂苷量见表 1。

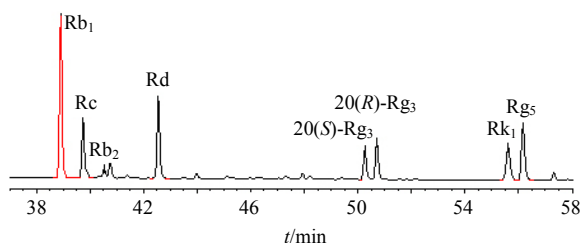


图 1 原料 PPD 皂苷 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of raw material PPD

表 1 原料 PPD 皂苷的 HPLC 分析
Table 1 Ginsenoside content of PPD

皂苷	出峰时间/min	峰面积	峰面积比/%
Rb ₁	38.910	1 366 983	30.60
Rc	39.742	530 283	11.87
Rb ₂	40.755	143 909	3.22
Rd	42.555	712 247	15.94
20(S)-Rg ₃	50.261	288 793	6.46
20(R)-Rg ₃	50.706	369 244	8.27
Rk ₁	55.614	445 512	9.97
Rg ₅	56.163	610 574	13.67

从图 1 和表 1 可以看到, 根据其出峰时间, PPD 原料中含有 Rb₁、Rd、Rc、Rb₂ 和 4 种异构体 Rg₃ 组皂苷{即由 20(S)-人参皂苷 Rg₃[20(S)-Rg₃]、20(R)-人参皂苷 Rg₃[20(R)-Rg₃]、人参皂苷 Rk₁(Rk₁)、人参皂苷 Rg₅(Rg₅) 组成}; 为了计算方便, 将峰面积比视为皂苷量比, 根据其峰面积比可知, PPD 原料中主要含有 30.60% 的 Rb₁、15.94% 的 Rd、11.87% 的 Rc、3.22% 的 Rb₂; 6.46% 的 20(S)-Rg₃、8.27% 的 20(R)-Rg₃、9.97% 的 Rk₁、13.67% 的 Rg₅。因此原料中 Rb₁ 和 Rd 总量为 46.54%; Rg₃ 组量为近 38%。

2.3 酶的准备

选用产人参皂苷酶 I 型的 *Aspergillus* g.848 菌, 发酵得到人参皂苷粗酶。在 4% 麦芽汁中含有 1% 人参提取液的培养基中, 30 °C 搅拌培养 5~6 d, 离心除菌, 加入 3 倍体积的甲醇, 过夜沉淀酶蛋白, 离心收集酶蛋白沉淀, 溶解于 1/10 培养液体积的 0.02 mol/L、pH 5.0 醋酸缓冲溶液, 离心除渣, 即为酶液。

2.4 PPD 皂苷酶反应动态

以 PPD 作为酶反应底物, 取 5 g PPD 将其溶于 20 mL 的甲醇中, 并加入 80 mL 0.02 mol/L 醋酸缓冲溶液 (pH 5.0), 与等体积的酶液混合, 放入 45 °C

的摇床中反应。在酶反应过程中, 分别在 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、6.0、12.0、24.0、30.0、36.0 h 时, 取酶反应液 1 mL。对每一样品进行萃取、脱糖除杂、蒸干。蒸干后溶于 3 mL 色谱甲醇中, 进行 HPLC 检测。其中 0.5、2.0、30.0、36.0 h 的色谱图, 如图 2 所示。按不同时间 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、6.0、12.0、24.0、30.0、36.0 h, 共取 11 个样品的 HPLC 色谱图, 进行数据分析, 见表 2。

由图 2 和表 2 可知, 酶先水解 Rb₁ 的 20-O-末端 Glc 变成 Rd, 然后水解 Rd 的 3-O-末端 Glc 变成 F₂, 继续水解 F₂ 的 3-O-Glc 变成 C-K; 底物 Rb₁、Rd 在 0~1.0 h 时皂苷量几乎没有变化, 1.5 h 时被

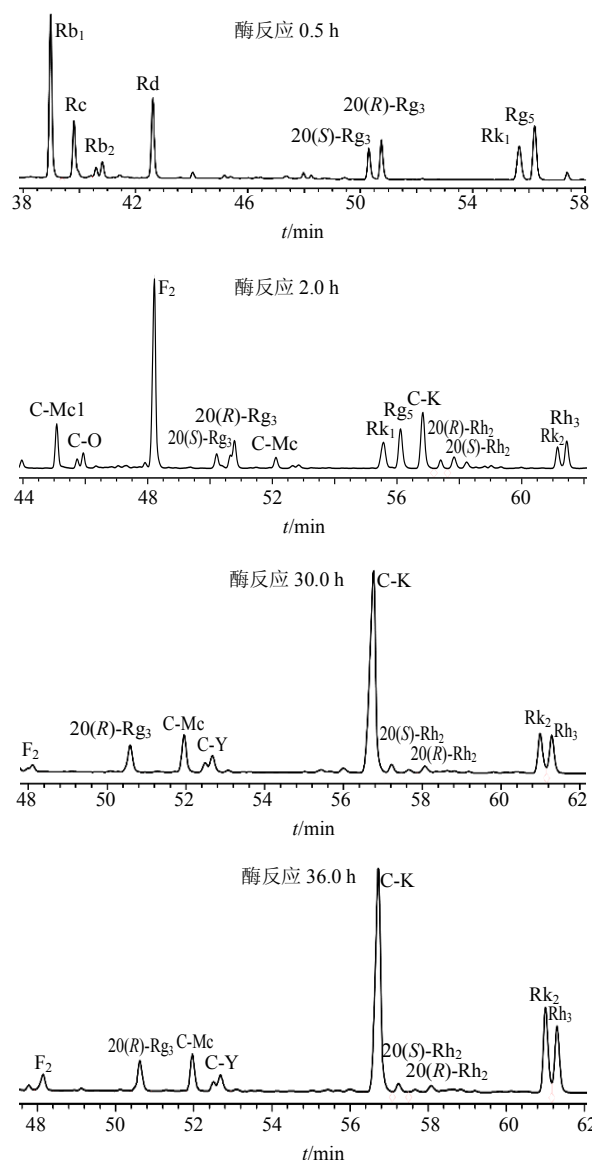


图 2 酶反应 0.5、2.0、30.0、36.0 h 时的样品 HPLC 图
Fig. 2 HPLC of reaction product for 0.5, 2.0, 30.0, and 36.0 h in enzyme reaction

表 2 PPD 中各皂苷在酶反应过程中的动态变化

Table 2 Dynamics of PPD enzymatic conversion

酶反应时间/h	原料中各皂苷质量分数/%							
	Rb ₁	Rd	Rc	Rb ₂	20(S)-Rg ₃	20(R)-Rg ₃	Rk ₁	Rg ₅
0.5	30.60	15.94	11.87	3.20	6.46	8.27	9.91	13.55
1.0	30.60	15.91	11.79	3.20	6.44	8.27	9.87	13.47
1.5	—	—	—	—	2.99	2.36	6.26	8.47
2.0	—	—	—	—	2.40	5.43	7.05	9.16
2.5	—	—	—	—	1.69	6.72	5.91	7.29
3.0	—	—	—	—	1.79	7.04	5.98	7.83
6.0	—	—	—	—	0.61	6.69	4.39	6.70
12.0	—	—	—	—	—	6.77	1.47	2.11
24.0	—	—	—	—	—	6.56	—	—
30.0	—	—	—	—	—	6.31	—	—
36.0	—	—	—	—	—	6.05	—	—

酶反应时间/h	酶反应所生成的皂苷质量分数/%									
	F ₂	C-Mc1	C-Mc	C-O	C-Y	C-K	20(S)-Rh ₂	20(R)-Rh ₂	Rk ₂	Rh ₃
0.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1.5	32.50	7.53	4.55	2.62	—	8.10	1.42	2.15	8.11	9.35
2.0	35.37	7.86	2.21	1.75	—	13.05	1.64	2.70	5.39	5.91
2.5	30.17	5.71	2.32	1.66	—	16.15	1.49	2.53	9.80	8.46
3.0	28.02	5.50	3.10	1.54	—	20.90	1.36	2.49	7.35	7.02
6.0	13.01	2.59	6.81	0.85	3.15	38.86	1.53	2.44	6.57	5.78
12.0	8.48	—	8.67	—	3.41	49.10	1.79	1.86	7.03	7.08
24.0	1.45	—	8.49	—	3.56	54.00	1.81	1.56	9.10	8.90
30.0	2.35	—	8.49	—	4.09	57.25	1.94	1.16	9.32	8.96
36.0	3.51	—	6.93	—	3.37	48.90	2.86	1.08	14.10	12.90

完全水解生成中间产物 F₂, 在 1.5~2.0 h 时 F₂ 的量为 32.50%~35.37%, 从 2.5 h 后 F₂ 的量逐渐减少, 至 6.0 h 后 F₂ 皂苷量从 13.01% 逐渐减少到 1.45%。

酶先水解 Rb₂ 和 Rc 的 3-O-Glc 变成 C-O 和 C-Mc1; 进一步水解 C-O 和 C-Mc1 的 3-O-Glc 变成 C-Y 和 C-Mc, 最终变成 C-K。Rb₂ 与酶反应生成中间产物 C-O, 再逐渐生成 C-Y 和 C-K; 底物 Rb₂ 在 0~1.0 h 时皂苷量几乎没变化, 1.5 h 时被水解生成中间产物 C-O, C-O 在 1.5 h 的量为 2.62%, 随着酶反应时间的增加, C-O 的量从 2.62% 减少到 0.85%, C-O 在 6.0 h 后被全部水解成 C-Y; 在 6.0 h 时开始有 C-Y 生成, 其皂苷量为 3.15%, 在酶反应 30.0 h 时 C-Y 量最大, 其量为 4.09%。

Rc 与酶反应生成中间产物 C-Mc1, 再逐渐水解

生成 C-Mc 和 C-K; 底物 Rc 在 0~1.0 h 时皂苷量几乎无变化, 在 1.5 h 时被完全水解生成中间产物 C-Mc1, 其皂苷量为 7.53%, 随着酶反应时间的增加, C-Mc1 的皂苷量在 2.0 h 时最大, 为 7.86%, 随后皂苷量逐渐减少, 6.0 h 后 C-Mc1 完全被水解成 C-Mc; C-Mc 在 1.5 h 时就被水解生成, 其量为 4.55%; 在 2.0 h 时 C-Mc 的皂苷量减少到 2.21%; 在 2.0 h 后 C-Mc 的皂苷量逐渐增加, 12.0 h 时其皂苷量最大, 为 8.67%; 12.0 h 后 C-Mc 的皂苷量逐渐减少。产物 C-K 在 1.5 h 时被水解生成, 其皂苷量为 8.10%, 随着酶反应时间的增加, C-K 的量在增加, 在 30.0 h 时 C-K 的皂苷量为 57.25%, 由于反应时间过长, 在 36.0 h 时 C-K 的皂苷量减少, 会生成少量苷元; 如果需要制备稀有皂苷 C-K, 就在反

应进行 30.0 h 时终止反应。

Rg₃ 组的 20(*S*)-Rg₃、20(*R*)-Rg₃、Rk₁ 和 Rg₅ 在酶反应过程中分别转化为 Rh₂ 组的 20(*S*)-Rh₂、20(*R*)-Rh₂、Rk₂ 和 Rh₃。

20(*S*)-Rg₃ 随着反应逐渐生成 20(*S*)-Rh₂；20(*S*)-Rg₃ 在 0~1.0 h 时皂苷量几乎没有变化，在 2.0 h 后皂苷量逐渐减少，6.0 h 后被完全水解；而产物 20(*S*)-Rh₂ 在 1.5 h 时生成，其皂苷量为 1.42%；随着酶反应的增加，20(*S*)-Rh₂ 的皂苷量缓慢增加。

20(*R*)-Rg₃ 与酶反应逐渐生成 20(*R*)-Rh₂；底物 20(*R*)-Rg₃ 不容易被水解，在酶反应 36.0 h，从 8% 左右降到 6.05%；其产物 20(*R*)-Rh₂ 为 2.70%。

Rk₁ 与酶反应逐渐生成 Rk₂；底物 Rk₁ 在 12.0 h 后被完全水解，产物 Rk₂ 在 1.5 h 时开始生成，反应 36.0 h 时其皂苷量最大，为 14.10%。Rg₅ 与酶反应逐渐生成 Rh₃；底物 Rg₅ 在 12.0 h 后被完全水解，产物 Rh₃ 在 1.5 h 时开始生成，反应 36.0 h 时其皂苷量最大，为 12.90%。反应时间长，可能增加 Rh₂ 组转化为苷元组的量。

由此可见，生产 C-K 为主皂苷时，最佳反应时间为 24.0~30.0 h；生产 Rh₂ 组为主的皂苷时，反应 6.0~12.0 h 时 Rg₃ 组量低而 Rh₂ 组量高；生产以 F₂ 为主的皂苷时，最佳反应时间为 1.5~2.0 h。

2.5 稀有皂苷的制备

生产稀有皂苷 C-K 为主的皂苷时，将 PPD 皂苷酶反应进行 24.0~30.0 h 时，C-K 的生成量最多；故酶反应进行 30.0 h，生产 C-K 皂苷。

以 PPD 作为酶反应底物，取 30 g PPD 将其溶于 60 mL 的甲醇中，并加入 540 mL 0.02 mol/L 醋酸缓冲溶液 (pH 5.0)，与等体积的酶液混合，45 °C 条件下在反应釜中搅拌反应，反应时间为 30.0 h。反应后加入 3 倍反应液体积的甲醇沉淀酶蛋白，其上清液经 AB-8 柱脱糖除杂、D-280 柱脱色、浓缩，得到 20 g 含有 C-K 等皂苷的酶反应产物粗品。经 HPLC 检测，其产物皂苷量比为 57.25% 的 C-K，2.35% 的 F₂，8.49% 的 C-Mc，4.09% 的 C-Y，9.32% 的 Rk₂，8.96% 的 Rh₃，1.94% 的 20(*S*)-Rh₂，1.16% 的 20(*R*)-Rh₂，6.31% 的 20(*R*)-Rg₃ (表 2)。

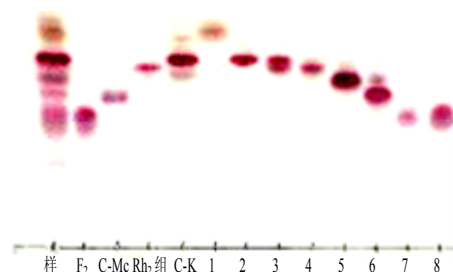
将上述 20 g 的反应产物与 50 g 的 80~100 目硅胶混合 (样品胶)，装到装有 400 g 的 300~400 目硅胶柱的上面，即成硅胶柱。先用纯氯仿通柱，用体积比为氯仿-甲醇 (9:1) 的洗脱剂洗脱，每瓶收集 200 mL，共收集 108 瓶；经 TLC 检测，把含有

相同皂苷的洗脱液合并，分别浓缩、干燥，得到 8 种分离物，如表 3 所示。表 3 中的皂苷，经 TLC 检测，如图 3 所示。

表 3 硅胶柱分离人参皂苷

Table 3 Separation of ginsenosides by silica gel column

样品号	收集瓶	主要成分	质量/g
1	1~11	苷元	1.98
2	12~19	C-K	8.16
3	20~23	C-K 与 Rk ₂ 、Rh ₃ 混合物	0.73
4	24~26	Rh ₂ 组	0.19
5	28~48	混合物	2.13
6	59~70	C-Mc	1.01
7	81~86	F ₂	0.45
8	87~108	F ₂ 与其他皂苷混合物	1.65



样-C-K 粗品 F₂、C-Mc、Rh₂ 组、C-K-人参皂苷对照品 1~8-分离得到的表 3 的样品号

sample-C-K crude F₂, C-Mc, Rh₂ group, C-K-ginsenoside reference substance 1—8-the sample numbers of the obtained Table 3 were separated

图 3 硅胶柱分离人参皂苷的 TLC 图

Fig. 3 Ginsenoside TLC from silica gel column

从表 3 和图 3 得知，利用硅胶柱分离法，从 20 g C-K 粗品中，成功地分离得到 8.16 g 质量分数为 95% 的 C-K 单体，1.01 g 质量分数为 90% 的 C-Mc 单体，0.45 g 质量分数为 90% 的 F₂ 单体，0.19 g 皂苷量为 90% 的 Rh₂ 组；上述硅胶柱分离得到的皂苷，经 HPLC 检测，与各皂苷对照品的出峰时间一致，可以认定为 C-K、C-Mc、F₂ 和 Rh₂ 组皂苷。

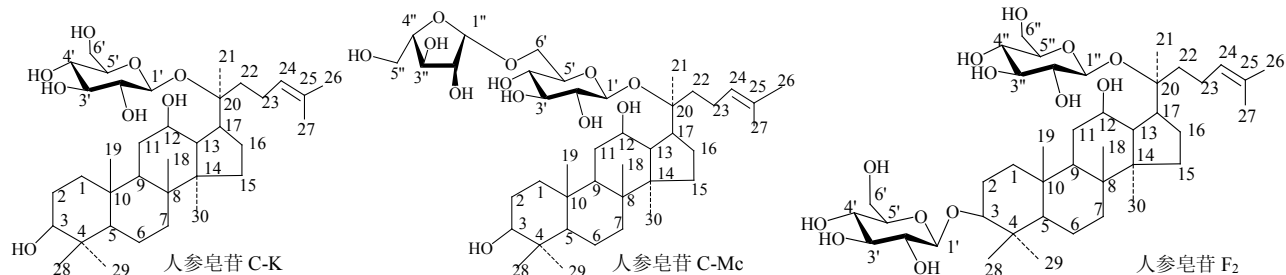
C-K、C-Mc、F₂ 单体皂苷，用 NMR 法核对结构；Rh₂ 组制品，利用 UPLC-MS 法核对其组成。还得到 1.98 g 苷元组，其苷元组有待于今后确定。

2.6 酶反应产物 C-Mc、F₂ 和 C-K 的结构核对

将 C-K、C-Mc、F₂ 单体皂苷，用 NMR 法核对结构。将样品溶解在 Pyridine-d₅，用 Bruke AVANCE 600 (¹H: 600 MHz; ¹³C: 150 MHz) 核磁共振仪检测，确认结构。

通过对 ^1H -、 ^{13}C -NMR 图谱的分析, 与参考文献^[21]中人参皂苷核磁数据比对, 确认了酶反应产物

分离的人参皂苷化学结构, 其 ^{13}C -NMR 数据及其结构归属如图 4 所示, 证明了分离得到的产物为人参



碳位	F ₂	C-Mc	C-K	碳位	F ₂	C-Mc	C-K
苷元				3-O-Glc			
C-1	23.39	39.60	39.72	C-1'	107.10	—	—
C-2	26.93	28.41	28.41	C-2'	75.93	—	—
C-3	88.98	79.40	79.43	C-3'	79.43	—	—
C-4	39.37	39.75	39.58	C-4'	71.80	—	—
C-5	56.56	56.57	56.53	C-5'	78.50	—	—
C-6	18.63	18.97	18.93	C-6'	63.26	—	—
C-7	35.30	35.37	35.34	20-O-Glc			
C-8	40.22	40.26	40.24	C-1''	98.42	98.25	98.40
C-9	50.37	50.49	50.47	C-2''	75.28	75.19	75.27
C-10	37.13	37.55	37.52	C-3''	78.90	78.29	78.40
C-11	31.06	31.00	31.10	C-4''	72.05	72.28	71.80
C-12	70.35	70.46	70.35	C-5''	78.43	76.69	78.22
C-13	49.65	49.62	49.65	C-6''	63.04	68.67	63.04
C-14	51.60	51.62	51.59	20-Ara (f)			
C-15	30.95	60.94	30.95	1''	—	110.28	—
C-16	26.82	26.84	26.81	2''	—	83.47	—
C-17	51.81	51.86	51.79	3''	—	79.01	—
C-18	16.98	16.55	16.53	4''	—	86.19	—
C-19	16.47	16.55	16.50	5''	—	62.84	—
C-20	83.48	83.61	83.46				
C-21	25.95	26.02	25.94				
C-22	36.31	36.36	36.32				
C-23	23.39	23.35	23.37				
C-24	126.12	126.22	126.12				
C-25	131.09	131.23	131.07				
C-26	22.56	22.53	22.52				
C-27	17.95	18.10	17.94				
C-28	28.33	28.91	28.86				
C-29	16.16	16.25	16.19				
C-30	17.56	17.60	17.56				

图 4 酶反应产物 F₂、C-Mc、C-K 结构核磁共振光谱的 ^{13}C -NMR 数据与结构图

Fig. 4 ^{13}C -NMR spectroscopic data and structures of enzyme reaction products F₂, C-Mc, and C-K

皂苷 C-K、C-Mc、F₂ 单体；人参皂苷 C-Mc 结构的系统名称为 20-*O*-[α -L-阿拉伯呋喃糖基-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-葡萄糖吡喃糖基]-20(*S*)-人参二醇苷元；F₂ 皂苷结构的系统名称为 3-*O*- β -D-葡萄糖吡喃糖基-20-*O*- β -D-葡萄糖吡喃糖基-20(*S*)-人参二醇苷元；C-K，20-*O*- β -D-葡萄糖吡喃糖基-20(*S*)-人参二醇苷元。

2.7 酶反应产物 Rh₂ 组 UPLC-MS^[22-25] 的确认

UPLC-MS 法检测产物 Rh₂ 组在 UPLC-Q-TOF-MS PremierTM 上进行，ESI 源，正、负离子模式下，“V” 模式下进行检测。

UPLC 检测条件：色谱柱为 BEH Shield RP₁₈ (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m, Waters)；流动相为 0.1% 甲酸乙腈溶液 (A) -0.1% 甲酸水溶液 (B)；梯度洗脱条件：0~5 min, 5%~95% A (线性梯度)；5~10 min, 95% A (等度)；进样量 10 μ L；体积流量 0.5 mL/min；柱温 30 $^{\circ}$ C；检测波长 203 nm。

四级杆时间飞行串联质谱 (Q-TOF-MS) 检测条件：毛细管电压 2.5 kV；样品孔电压 35 V；离子源温度 100 $^{\circ}$ C，脱溶剂气温度 350 $^{\circ}$ C；锥孔气体流量 50 L/h，脱溶剂气体流量 1 000 L/h；质量扫描范围： m/z 100~1 000。

分离得到的酶反应产物 Rh₂ 组，经 HPLC 检测，由 20(*S*)-Rh₂、20(*R*)-Rh₂、Rk₂、Rh₃ 4 种异构体组成 (图 5)。其 Rh₂ 组的 4 种异构体在 HPLC 中出峰时间，与 Rh₂ 组市售产品一致，可以确认为 Rh₂ 组皂苷。利用 UPLC-MS 法进一步确定 Rh₂ 组。20(*S*)-Rh₂ 和 20(*R*)-Rh₂ 的相对分子质量为 622，Rk₂ 和 Rh₃ 的相对分子质量为 604。Rh₂ 组的 UPLC 图如图 6 图所示。

从图 6 中可以看出，有 4 个明显的紫外吸收峰和 Rh₂ 组的 HPLC 检测图谱一致，20(*S*)-Rh₂、20(*R*)-Rh₂、Rk₂、Rh₃ 的紫外吸收峰出峰时间依次为 4.62、4.66、5.33、5.38 min。其 Rh₂ 组通过负离子模式下的串联质谱 (Q-TOF) 检测，其总离子流图如图 7

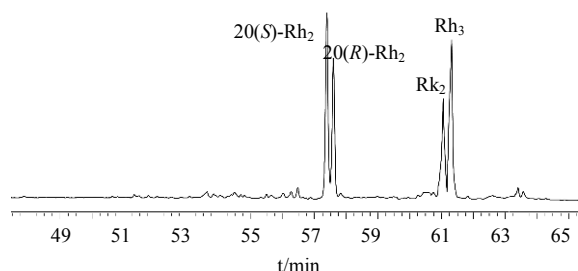


图 5 酶反应产物 Rh₂ 组的 HPLC 图
Fig. 5 HPLC of products Rh₂ group

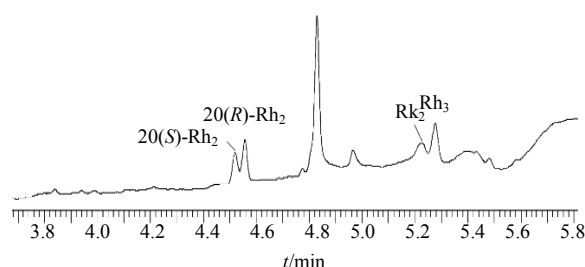


图 6 Rh₂ 组样品的 UPLC 图谱
Fig. 6 UPLC of sample in Rh₂ group

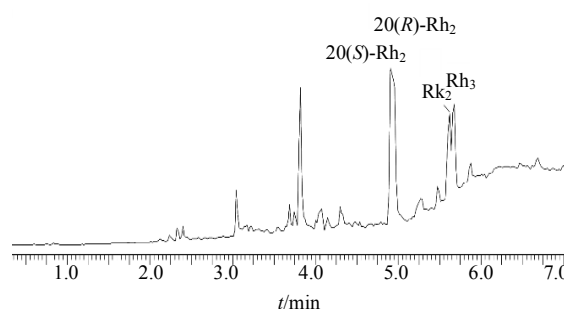


图 7 ESI⁻模式下 Rh₂ 组样品总离子流图谱
Fig. 7 Total ion beam of sample Rh₂ group in ESI⁻ mode by MS

所示。从图 7 中可以看出，总离子流图中的 20(*S*)-Rh₂、20(*R*)-Rh₂、Rk₂、Rh₃ 的出峰时间依次为 4.62、4.71、5.36、5.41 min，与 UPLC 图谱中各组分的出峰时间相匹配。再通过对总离子流峰进行一级质谱分析，确定样品中各物质的相对分子质量。

首先对 Rh₂ 组人参稀有皂苷中 20(*S*)-Rh₂、20(*R*)-Rh₂ 的离子峰在 ESI⁻ 模式下进行一级质谱分析，得到的一级质谱如图 8、9 所示。从图 8 和 9 中可以看出，Rh₂ 的相对分子质量为 622，在 ESI⁻ 模式下形成 [Rh₂+HCOOH]⁻ 离子峰，而负离子模式下又减少 1 个 H，所以样品 Rh₂ 得到的离子峰 m/z 667。故可判断，样品中含有 20(*S*)-Rh₂ 和 20(*R*)-Rh₂，其相对分子质量为 622。

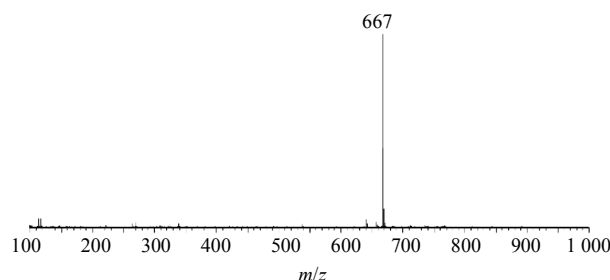


图 8 20(*S*)-Rh₂ 在 ESI⁻ 模式下的一级质谱图
Fig. 8 Level 1 MS of 20(*S*)-Rh₂ in ESI⁻ mode

再对 Rh₂ 组人参稀有皂苷中 Rk₂、Rh₃ 的离子峰在 ESI⁻ 模式下进行一级质谱分析, 得到的一级质谱如图 10、11 所示。从图 10 和 11 中可以看出, Rk₂ 或 Rh₃ 的相对分子质量为 604, 在 ES⁻ 模式下形成 [Rh₂+HCOOH]⁻ 离子峰, 而负离子模式下又减少 1 个 H, 所以 Rk₂ 或 Rh₃ 得到的离子峰 m/z 649。故可判断, 样品中含有 Rk₂ 和 Rh₃, 其相对分子质量为 604。

由此, 可以证明酶反应得到的 Rh₂ 组是由 20(S)-Rh₂、20(R)-Rh₂、Rk₂、Rh₃ 4 种异构体组成。

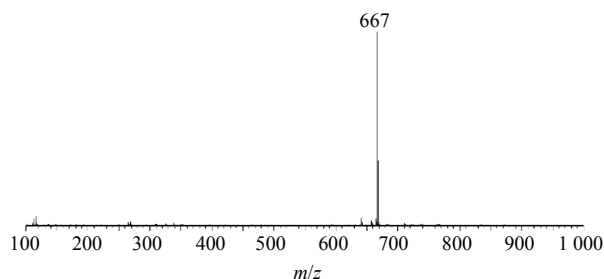


图 9 20(R)-Rh₂ 在 ESI⁻ 模式下的一级质谱图
Fig. 9 Level 1 MS of 20(R)-Rh₂ in ESI⁻ mode

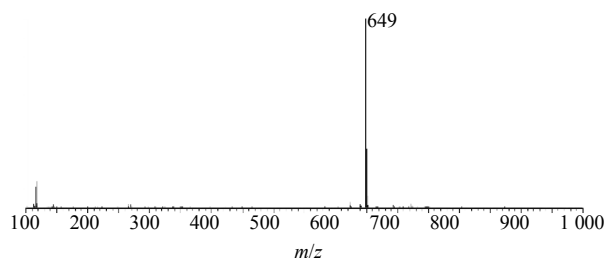


图 10 Rk₂ 在 ESI⁻ 模式下的一级质谱图
Fig. 10 Level 1 MS of Rk₂ in ESI⁻ mode

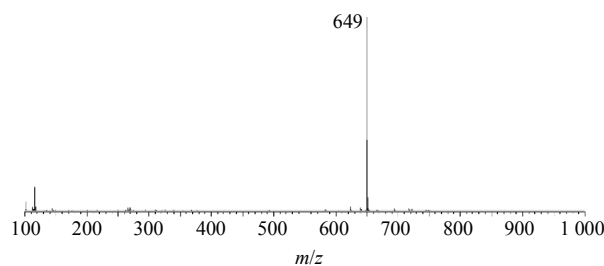


图 11 Rh₃ 在 ESI⁻ 模式下的一级质谱图
Fig. 11 Level 1 MS of Rh₃ in ESI⁻ mode

3 讨论

PPD 原料中主要含有 30.60% 的 Rb₁、15.94% 的 Rd、11.87% 的 Rc、3.22% 的 Rb₂; 还含有 6.46% 的

20(S)-Rg₃、8.27% 的 20(R)-Rg₃、9.97% 的 Rk₁、13.67% 的 Rg₅ 等 Rg₃ 组皂苷; 与 *Aspergillus* g.848 菌所产的人参皂苷粗酶液反应, PPD 皂苷转化途径, 如图 12 所示。但是, 酶与 Rg₃ 组皂苷反应中所产生的苷元结构, 有待于进一步分析确定。

酶水解 PPD 复合皂苷水解动态:

酶水解 Rb₁ 时, 先水解的 20-O-末端 Glc 变成 Rd, 然后水解 Rd 变成 F₂ 和 C-K; 底物 Rb₁、Rd 在 1.5 h 时被完全水解生成中间产物 F₂, 生成 C-K 速度快。酶水解 Rb₂ 和 Rc 时, 先水解 3-O-Glc 变成 C-O 和 C-Mc1; 进一步水解 C-O 和 C-Mc1 的 3-O-Glc 变成 C-Y 和 C-Mc, 最终变成 C-K。Rb₂ 和 Rc 的分解速度快; 但是, C-Y 和 C-Mc 变成 C-K 速度慢。

Rg₃ 组的 20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、Rk₁ 和 Rg₅ 在酶反应过程中分别转化为 Rh₂ 组的 20(S)-Rh₂、20(R)-Rh₂、Rk₂ 和 Rh₃。其中 20(S)-Rg₃、Rk₁ 和 Rg₅, 分别转化为 20(S)-Rh₂、Rk₂ 和 Rh₃ 速度相对快; 但 20(R)-Rg₃ 转化速度慢。

由此可见, 生产以 C-K 为主的皂苷时, 最佳反应时间为 24.0~30.0 h; 生产以 Rh₂ 组为主的皂苷时, 反应 6.0~12.0 h 时 Rg₃ 组产量低而 Rh₂ 组产量高; 生产以 F₂ 为主的皂苷时, 最佳反应时间为 1.5~2.0 h。

为了从 PPD 原料皂苷制备高活性皂苷 C-K, 取 30 g PPD 皂苷, 经酶反应、脱糖脱色、浓缩, 得到以 C-K 为主的等稀有皂苷产物粗干品 20 g; 经 HPLC 检测, 其产物皂苷量比例为 57.25% 的 C-K、2.35% 的 F₂、8.49% 的 C-Mc、4.09% 的 C-Y、9.32% 的 Rk₂、8.96% 的 Rh₃、1.94% 的 20(S)-Rh₂、1.16% 的 20(R)-Rh₂、6.31% 的 20(R)-Rg₃。其稀有皂苷混合物, 可直接用于人参制品、化妆品和药物开发, 也可以用于分离单体皂苷。

为了得到人参皂苷单体, 将其混合皂苷, 经硅胶柱分离, 最终得到 8.16 g 的 C-K 单体, 酶反应产物得率为 40.80%; Rh₂ 组 0.19 g, 得率为 0.95%; C-Mc 单体 1.01 g, 得率为 5.05%; F₂ 单体 0.45 g, 得率为 2.25%。但是, 本方法只得到 0.19 g Rh₂ 组, 得率仅为 0.95%; 而 PPD 原料中 Rg₃ 组其量为 38%, 如果酶转化生产 Rh₂ 组, 有待于今后的研究。

经 NMR 核对, 产物人参皂苷单体是 C-K、C-Mc、F₂ 稀有皂苷; 经 UPLC-MS 核对, Rh₂ 组是由 20(S)-Rh₂、20(R)-Rh₂、Rk₂、Rh₃ 4 种异构体组成。

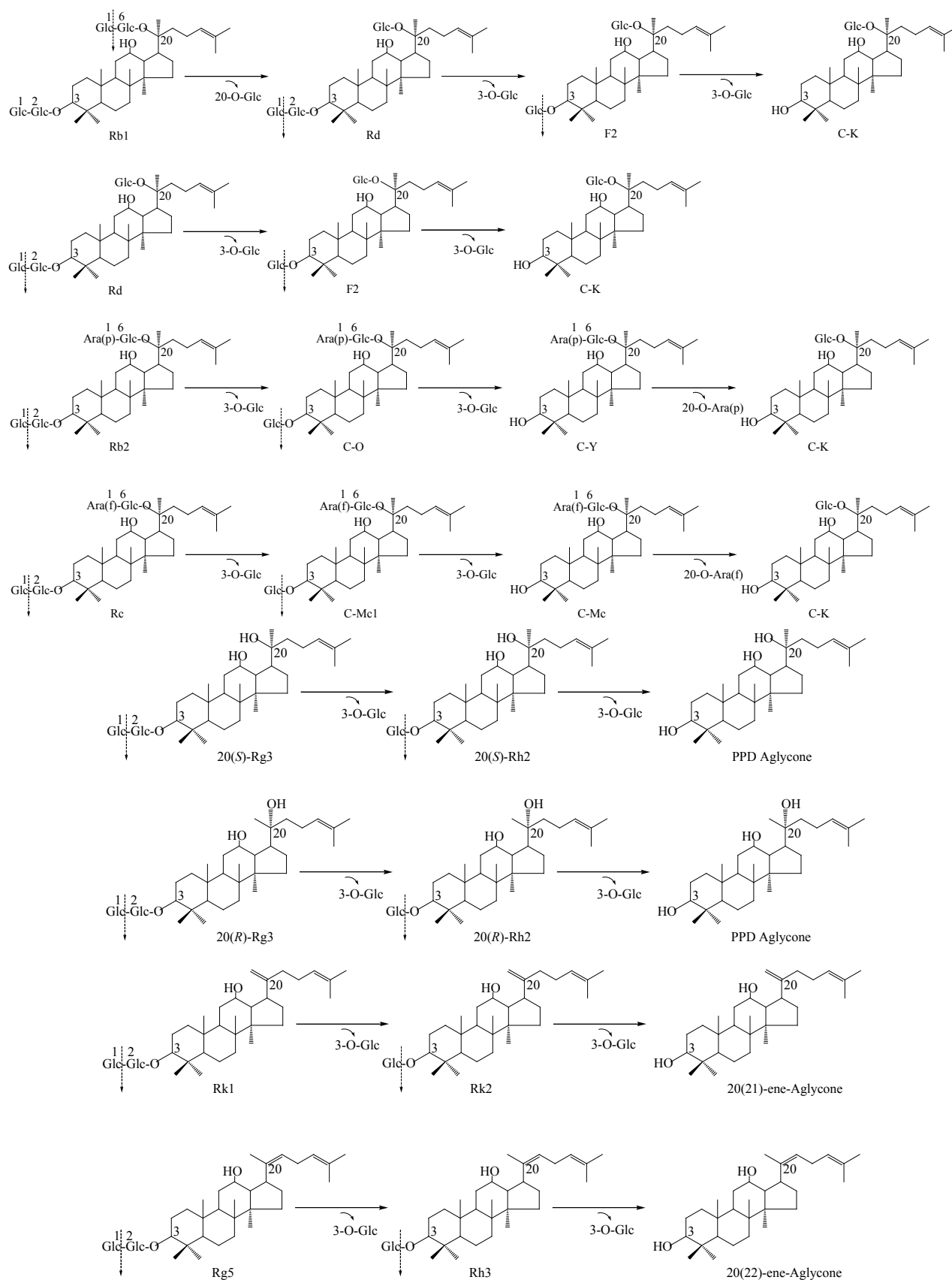


图 12 PPD 皂苷生物转化途径

Fig. 12 Biotransformation pathway of PPD ginsenosides

本研究结果为产业化提供廉价生产人参稀有皂苷 C-K、C-Mc、F₂ 和 Rh₂ 组的理论方法。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 张 彩, 史 磊. 人参化学成分和药理作用研究进展 [J]. 食品与药品, 2016, 18(4): 300-304.
- [3] 金凤燮. 天然产物生物转化 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [4] 张均田. 人参冠百草——人参化学、生物学活性和药代动力学研究进展 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [5] Christensen L P. *Ginsenosides: Chemistry, Biosynthesis, Analysis, and Potential Health Effects* [M/OL]. *Adv Food Nutrition Res*, 2008, 55: 1-99. doi: 10.1016/S1043-4526(08)00401-4.
- [6] 刘春莹, 宋建国, 李鹏飞, 等. 3 种人参中的皂苷的组成 [J]. 大连工业大学学报, 2011, 30(2): 79-82.
- [7] Tawab M A, Bahr U, Karas M, *et al.* Degradation of ginsenosides in humans after oral administration [J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31(8): 1065-1071.
- [8] 周武喜, 杨 宁, 赵余庆. 人参皂苷类化合物水溶性提升方法的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 322-327.
- [9] 刘春莹. 酶转化法制备高活性人参稀有皂苷及低聚丹酚酸的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [10] 李永淳, 刘春莹, 鱼红闪, 等. 酶反应产物中人参稀有皂苷 F₂ 与 C-Mc 的分离 [J]. 大连工业大学学报, 2014, 33(6): 420-422.
- [11] 于兆慧, 刘其媛, 崔 莉, 等. 微球固定化蜗牛酶转化人参皂苷 Rb1 制备人参稀有皂苷 Compound K 研究 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3092-3097.
- [12] 周 伟, 周 颢. 稀有人参皂苷 Compound-K 研究进展 [J]. 药学学报, 2007, 42(9): 917-923.
- [13] He D, Sun J, Zhu X, *et al.* Compound K increases type I procollagen level and decreases matrix metalloproteinase-1 activity and level in ultraviolet-A-irradiated fibroblasts [J]. *Formos Med Assoc*, 2011, 110(3): 153-160.
- [14] 于兆慧. 人参稀有皂苷 Compound K 的酶法制备及其混合胶束的研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2015.
- [15] Yu H, Zhang C, Lu M, *et al.* Purification and characterization of new special ginsenosidase hydrolyzing multi-glycosides of protopanaxadiol ginsenosides, ginsenosidase type I [J]. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55(2): 231-235.
- [16] Yu H, Liu Q, Zhang C, *et al.* A new ginsenosidase from *Aspergillus* strain hydrolyzing 20-O-multi-glycoside of PPD ginsenoside [J]. *Process Biochem*, 2009, 44(7): 772-775.
- [17] Jin F X, Yu H S, Wang D M, *et al.* Kinetics of a cloned special ginsenosidase hydrolyzing 3-O-glucoside of multi-protopanaxadiol-type ginsenosides, named ginsenosidase type III [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2012, 22(3): 343-351.
- [18] Wang D M, Yu H S, Song J G, *et al.* A novel ginsenosidase from an *Aspergillus* strain hydrolyzing 6-O-multi-glycosides of protopanaxatriol-type ginsenosides, named ginsenosidase type IV [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2011, 21(10): 1057-1063.
- [19] Liu C Y, Zhou R X, Sun C K, *et al.* Preparation of minor ginsenosides C-Mc, C-Y, F₂, and C-K from American ginseng PPD-ginsenoside using special ginsenosidase type-I from *Aspergillus niger* g. 848 [J]. *J Ginseng Res*, 2014, 58(3): 221-229.
- [20] 李翠翠, 刘廷强, 王 颖, 等. 酶转化人参皂苷 C-K 的提取工艺 [J]. 大连工业大学学报, 2009, 28(2): 87-89.
- [21] Tanaka O, Kasai R. Saponins of ginseng and related plants [A] // Fujita E, John S, Kasai R, *et al.* *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* [M]. *Springer Vienna*, 1984, 46: 1-76.
- [22] 张建锋, 刘 文, 侯晓杰, 等. 戊己丸 UPLC-MS/MS 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2016, 47(11): 1897-1902.
- [23] 张 莹. 新人参二醇的血浆药代动力学研究与初步安全性评价 [D]. 长春: 吉林大学, 2012.
- [24] 任中楠. 西洋参中人参皂苷标准物质的研制及皂苷类成分的 UPLC-MS 法快速测定 [D]. 北京: 北京化工大学, 2011.
- [25] 李瑞宏, 房桂珍, 安 娜, 等. UPLC-MS/MS 方法同时测定百咳宁颗粒中 6 种主要有效成分 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 76-80.