

酶水解柴胡皂苷 B_I 制备稀有前柴胡皂苷 A 的研究

徐天真^{1,2}, 吴梦茹³, 邵佳丽³, 常悦^{1,2}, 朱烨婷³, 陈季璇³, 陈璐阳³, 陈登艳³, 杨欢³, 夏国华^{3*}

(1. 如皋市人民医院药剂科, 江苏 如皋 226500; 2. 南通大学附属如皋医院药剂科, 江苏 如皋 226500; 3. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: **目的** 通过酶水解柴胡皂苷 B_I 获取中药活性成分前柴胡皂苷 A, 并构建关键技术。**方法** 以单因素试验考察水解酶、缓冲液 pH 值、酶/底物质量比、反应温度和反应时间等影响因素, 并通过响应面实验设计对酶水解条件进行优化; 此后, 利用 LC-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 确定产物的化学结构。**结果** 柴胡皂苷 B_I 的最佳水解酶为蜗牛酶, 在 0.20 mol/L HAc-NaAC 缓冲液 (pH 4.5) 中, 当酶与柴胡皂苷 B_I 的质量比为 30 : 1 时, 于 56 ℃ 下反应 33 h 后, 水解率高达 99.1%, 产物经鉴定为前柴胡皂苷 A。**结论** 本研究构建的酶水解关键技术获取前柴胡皂苷 A 更便捷, 不产生柴胡皂苷元副产物, 反应过程中不使用无机酸, 清洁环保, 可为大量制备前柴胡皂苷 A 以开展药理药效研究奠定基础。

关键词: 柴胡; 柴胡皂苷 B_I; 前柴胡皂苷 A; 酶水解

中图分类号: R284.3 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)12-4156-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.12.052

中药柴胡是伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinese* DC. 或狭叶柴胡 *B. scorzonifolium* Willd. 的干燥根, 分别习称“北柴胡”和“南柴胡”^[1], 用药历史悠久, 始载于《神农本草经》, 性辛、苦, 微寒, 具有疏散退热, 疏肝解郁, 升举阳气等功效。柴胡皂苷是柴胡的主要有效成分, 具有抗肿瘤、抗炎等药理作用^[2-5], 其齐墩果烷型分子结构较大, 限制了其通过口服吸收进入体循环。前柴胡皂苷 A 是柴胡皂苷 B_I 脱除一分子葡萄糖基后的次级苷^[6-8]。现代药理研究表明, 前柴胡皂苷的药理活性高于其原生苷^[9], 且更易被小肠吸收, 因此研究者围绕该类中药活性成分的制备技术开展了一些研究, 主要有化学法、微生物转化法^[10-12]。但是由于其在原植物中的含量很低, 传统色谱分离手段难以大量制备; 化学法的副产物较多且废水污染严重; 微生物转化法亦存在副产物较多、反应条件难以控制等不足; 而酶水解法反应条件温和, 特异性强, 已被广泛地应用于多种中药苷类活性成分的转化反应^[13-16]。因此, 本文通过酶水解柴胡皂苷 B_I 获取前柴胡皂苷 A, 进而采用单因素和响应面实验对水解条件进行考察及优化, 建立了关键技术, 从而为大量制备前柴胡皂苷系列成分以开展药理药效研究奠定基础。

1 材料

HP1100 型高效液相色谱仪 (HPLC, 美国 Agilent 公

司); HRQ-3110 型涡旋混匀器 (美国 Silentshake 公司); 85-2 型控温磁力搅拌仪 (江苏金怡仪器科技有限公司); AL-104 型电子分析天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); LXQ 型电喷雾质谱 (ESI-MS, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Advance II 型核磁共振仪 (NMR, 400 MHz, 德国 Bruker 公司)。

柴胡皂苷 B_I (纯度 ≥ 98.0%, 批号 18041708) 由成都普非德生物技术有限公司提供。乙腈为色谱纯 (美国 Omni 公司); 甲醇、乙酸、乙酸钠均为分析纯 (国药集团上海化学试剂有限公司)。β-葡聚糖苷酶 (活力 ≥ 20 000 U/g) 购自江苏金穗生物科技有限公司; β-葡萄糖苷酶 (活力 100 U/g) 购自江苏锐阳生物科技有限公司; 纤维素酶 (活力 ≥ 15 000 U/g, 批号 20190719) 购自国药化学试剂有限公司; 柚苷酶 (活力 100 000 U/g, 批号 208008) 由河南百康化工产品有限公司提供; 蜗牛酶 (批号 S20200421) 购自合肥博美生物科技有限责任公司。

2 方法

2.1 色谱条件 Kromasil-C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A) -水 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 35%~50% A; 10~20 min, 50%~60% A; 20~25 min, 60%~35% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 250 nm; 进样量 20 μL。

收稿日期: 2022-07-27

基金项目: 江苏省博士后科研资助计划项目 (1601163B); 江苏省大学生创新实践项目 (19A423); 常州市科技计划项目 (CJ20220161)

作者简介: 徐天真 (1996—), 女, 研究方向为天然药物化学。Tel: (0513) 87312683, E-mail: 1411813426@qq.com

* **通信作者:** 夏国华 (1977—), 男, 博士, 高级实验师, 研究方向为天然药物化学。Tel: (025) 85637809, E-mail: xgh-78131@yeah.net

2.2 标准曲线 精密称取柴胡皂苷 B₁ 对照品 9.840 mg，置于 10 mL 量瓶中，甲醇溶解并稀释至刻度，得到质量浓度 0.984 0 mg/mL 的对照品储备液。按照二倍稀释法制备得到一系列对照品溶液，0.20 μm PTFE 微孔滤膜过滤，取续滤液，在“2.1”项色谱条件下测定。以柴胡皂苷 B₁ 质量浓度为横坐标（X），以峰面积为纵坐标（Y）进行回归，得方程为 $Y = 42.343X + 8.6159$ ($R^2 = 0.9991$)，在 0.120 1~123.0 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.3 酶水解柴胡皂苷 B₁ 分别吸取柴胡皂苷 B₁ 溶液和酶溶液（0.20 mol/L HAc-NaAc 缓冲液）置于离心管中，在一定温度下孵育一段时间。待反应结束后，向水解液中加入等体积甲醇，涡旋混匀。12 000 r/min 高速离心 10 min，0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液用于 HPLC 分析，以不加酶的反应体系为空白对照。

2.4 单因素试验 以柴胡皂苷 B₁ 转化率为指标，采用单因素实验考察了水解酶（β-葡萄糖苷酶、β-葡聚糖苷酶、纤维素酶、蜗牛酶）、缓冲液 pH（3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5）、酶-底物质量比（0.5：1、1：1、2：1、3：1、4：1、5：1、10：1、15：1、20：1、30：1、40：1、50：1、60：1）、反应温度（30、40、50、60、70℃）和反应时间（12、24、36、48、60、72 h）对酶水解柴胡皂苷 B₁ 转化率的影响。

2.5 Box-Behnken 响应面法 在单因素试验的基础上，以柴胡皂苷 B₁ 转化率为响应值，进行响应面实验设计（Design-Expert v8.0.6.1）；此外，对预测所得最佳反应条件进行验证，并考察实际值与预测值的相对误差。响应面实验设计因素及水平见表 1，模型回归方程为 $Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k (\beta_i X_i) + \sum_{i=1}^k (\beta_{ii} X_i^2) + \sum_{i < j} (\beta_{ij} X_i X_j)$ 。式中 Y 为柴胡皂苷的转化率，β₀ 为拦截系数，β_i 为线性项，β_{ii} 为二次项，β_{ij} 为交互项，X_i、X_j 为自变量编码值（i≠j，i，j=1，2，3，……，k）。

表 1 因素水平			
因素	水平		
	-1	0	1
缓冲液 pH	4.0	4.5	5.0
反应温度/℃	50	60	70
反应时间/h	12	24	36

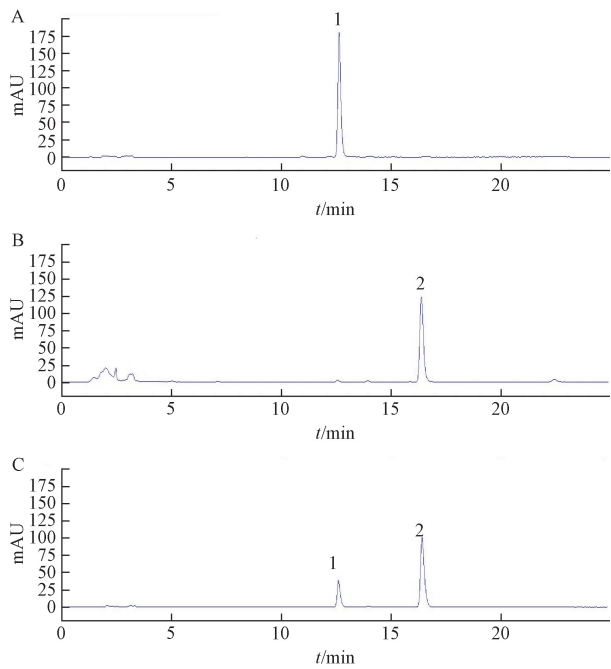
2.6 酶解产物的结构鉴定 酶水解结束后，通过反相柱层析对酶解产物进行纯化，并采用 LC-MS、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 对其化学结构进行鉴定。

3 结果

3.1 HPLC 色谱图 按“2.1”项下 HPLC 分析条件对前柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 B₁ 及其酶解液进行分析。如图 1 所示，柴胡皂苷 B₁ 及其水解产物前柴胡皂苷 A 均能得到较好地分离（R_f>1.5）。

3.2 单因素试验结果

3.2.1 水解酶 如图 2 所示，4 种酶均可以选择性地脱去柴胡皂苷 B₁ 末端的葡萄糖，生成前柴胡皂苷 A，其中蜗牛



1. 柴胡皂苷 B₁ 2. 前柴胡皂苷 A
图 1 柴胡皂苷 B₁ 对照品 (A)、前柴胡皂苷 A 对照品 (B) 和柴胡皂苷 B₁ 酶解液 (C) 的 HPLC 色谱图 (250 nm)

酶所得的转化率远高于其他 3 种酶。这可能是由于蜗牛酶含有纤维素酶、β-D-葡萄糖苷酶、淀粉酶、蛋白酶等 20 多种酶，其中的一些酶对葡萄糖苷键具有较强的水解作用。相比单一酶来说，蜗牛酶这种复合酶对于葡萄糖苷键的水解更有优势。因此，在后续实验中选择了蜗牛酶。

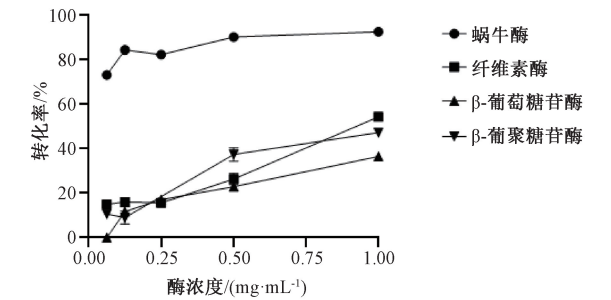


图 2 不同浓度水解酶对柴胡皂苷 B₁ 转化率的影响

3.2.2 酶/底物质量比 如图 3A 所示，当质量比由 4：1 提高到 30：1 时，转化率从 94% 增加至 99%，继续提高质量比，则转化率变化不明显。因此，最佳酶/底物质量比为 30：1。

3.2.3 缓冲液 pH 如图 3B 所示，在 pH3.0~4.5 范围内，随着缓冲液 pH 升高，转化率逐渐升高，并在 pH4.5 时达到最高值 99.5%，但是将 pH 进一步提高至 5.5 后，转化率明显下降，当 pH 为 6.5 时，转化率仅为 81.2%。因此，最佳缓冲液 pH 值为 4.5。

3.2.4 反应温度 如图 3C 所示，蜗牛酶对柴胡皂苷 B₁ 的转化效果随着温度的升高呈现先增加后减弱的趋势，并在

60 ℃时达到最大值；当温度继续升高时，酶蛋白开始变性失活，导致转化率下降。因此，最佳反应温度为 60 ℃。

3.2.5 反应时间 如图 3D 所示，柴胡皂苷 B₁ 被蜗牛酶水解 12 h 之后，转化率可达 95%，延长水解时间至 24 h，转

化率可进一步提高到 99%；此后，转化率保持平稳。综合考虑柴胡皂苷 B₁ 转化率和节约时间，选择 24 h 作为最佳酶水解时间。

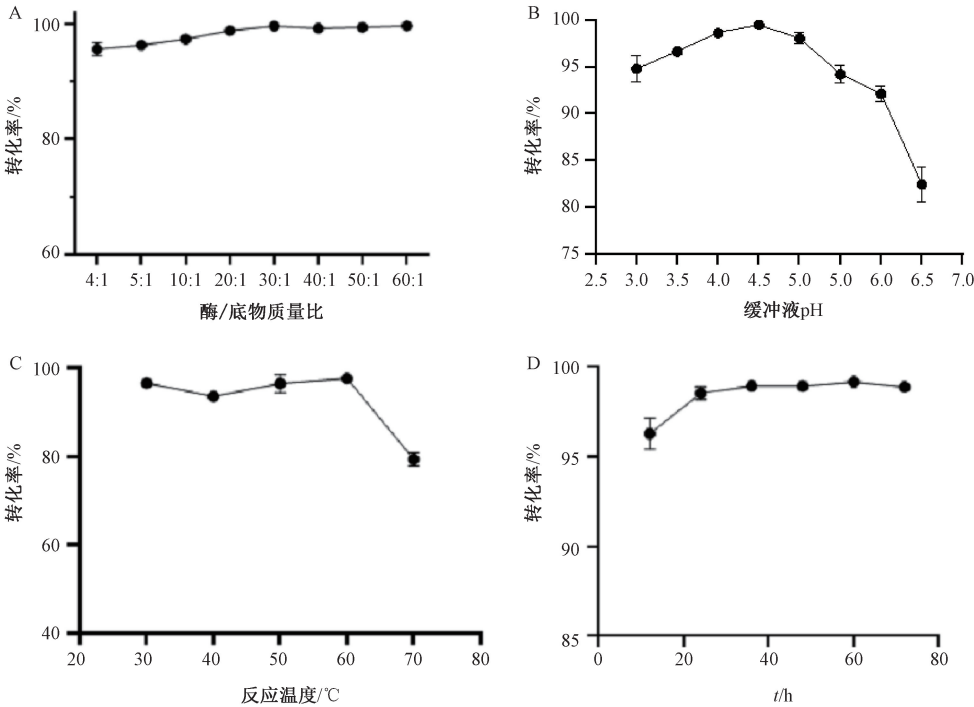


图 3 单因素对柴胡皂苷 B₁ 转化率的影响

3.3 响应面试验结果

3.3.1 回归方程及显著性分析 通过 Box-Behnken 响应面实验设计考察了缓冲液 pH (X_1)、反应温度 (X_2) 和反应时间 (X_3) 对柴胡皂苷 B₁ 转化率的影响，实验结果见表 2。

表 2 响应面实验设计与结果

编号	X_1 缓冲液 pH	X_2 反应温度/℃	X_3 反应时间/h	转化率/%	
				实验值	预测值
1	4.5	70	36	96.74	97.99
2	5.0	60	36	97.94	87.68
3	5.0	50	24	88.13	82.57
4	5.0	70	24	93.57	94.32
5	4.5	50	36	98.15	94.94
6	4.5	60	24	98.67	95.99
7	4.5	60	24	97.76	97.52
8	4.0	60	12	94.90	97.90
9	4.5	70	12	92.47	98.18
10	4.0	60	36	97.26	91.99
11	4.0	50	24	98.74	98.63
12	4.5	60	24	96.84	96.03
13	4.5	50	12	97.47	97.76
14	4.0	70	24	82.13	97.76
15	4.5	60	24	98.61	97.76
16	4.5	60	24	96.90	97.76
17	5.0	60	12	96.25	97.76

$97.76 + 0.36X_1 - 2.20X_2 + 1.12X_3 + 5.51X_1X_2 - 0.17X_1X_3 + 0.90X_2X_3 - 3.37X_1^2 - 3.75X_2^2 + 2.20X_3^2$ 。此外，以转化率为响应值对各因素的显著性进行分析(表 3)， $P<0.0001$ 且失拟项不显著，可见所得模型能准确分析和解释模型中各因素对响应值的影响；同时，反应温度的升高不利于转化率的增加，而较长的反应时间和较高的缓冲液 pH 则有利于提升柴胡皂苷 B₁ 转化率。从二次项的 P 值分析可知， X_1^2 ($P=0.0002$)、 X_2^2 ($P<0.0001$)、 X_3^2 ($P=0.0020$) 均小于 0.05，三者对柴胡皂苷 B₁ 的转化率具有显著性影响。

表 3 二阶多项回归方程方差分析

源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	301.15	9	33.46	37.45	< 0.0001
X_1	1.03	1	1.03	1.15	0.3195
X_2	38.59	1	38.59	43.19	0.0003
X_3	10.12	1	10.12	11.33	0.0120
X_1X_2	121.60	1	121.60	136.12	< 0.0001
X_1X_3	0.11	1	0.11	0.13	0.7336
X_2X_3	3.21	1	3.21	3.59	0.0998
X_1^2	47.74	1	47.74	53.44	0.0002
X_2^2	59.08	1	59.08	66.13	< 0.0001
X_3^2	20.35	1	20.35	22.78	0.0020
残差	6.25	7	0.89	—	—
失拟	3.11	3	1.04	1.32	0.3850
误差	3.14	4	0.79	—	—
总计	307.41	16	—	—	—

将以上所得数据进行多元回归分析，得到拟合方程 $Y=$
4158

3.3.2 反应时间和缓冲液 pH 对柴胡皂苷 B₁ 转化率的影响 反应时间和缓冲液 pH 的交互作用见图 4。当体系中 pH 为 4.5 时，随着反应时间的增加，柴胡皂苷 B₁ 转化率缓慢上升后趋于稳定；当反应时间为 24 h 时，转化率随着 pH 值的增加呈现先增加后降低的趋势，pH 偏高或偏低时会影响蜗牛酶与底物的结合，降低反应速率。

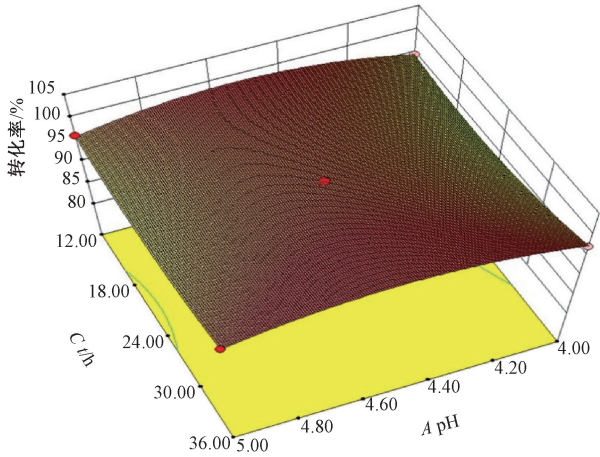


图 4 交互项（反应时间和缓冲液 pH）对柴胡皂苷 B₁ 转化率的影响

3.3.3 反应温度和缓冲液 pH 对柴胡皂苷 B₁ 转化率的影响 反应温度和缓冲液 pH 的交互作用见图 5。当反应温度为 60 ℃ 时，随着体系中 pH 升高，柴胡皂苷 B₁ 转化率先上升后下降；当 pH 4.5 时，转化率随着温度的升高呈现出相同的趋势，即先增加后降低，表明反应温度和缓冲液 pH 过高或过低均不利于酶水解反应的进行。

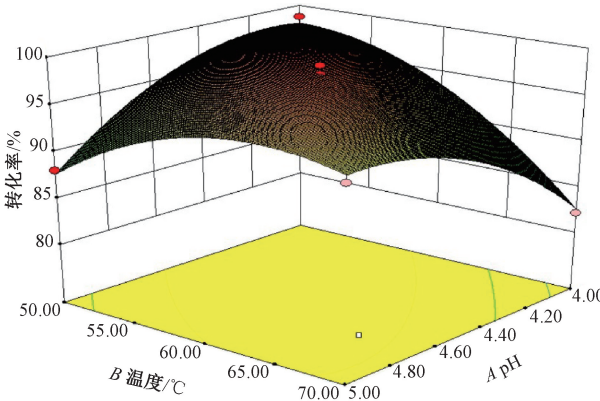


图 5 交互项（反应温度和缓冲液 pH）对柴胡皂苷 B₁ 转化率的影响

3.3.4 反应温度和反应时间对柴胡皂苷 B₁ 转化率的影响 反应温度和反应时间的交互作用见图 6。当反应温度为 60 ℃ 时，随着反应时间的增加，柴胡皂苷 B₁ 转化率先上升后趋于稳定；当反应时间为 24 h 时，转化率随着温度的升高先增加后迅速降低。

3.3.5 最佳水解条件及验证试验 通过 Design-expert 8.0.6.1 软件优化后得到蜗牛酶水解柴胡皂苷 B₁ 的最佳反应条件为反应温度 55.78 ℃，反应时间 33.24 h，缓冲液 pH

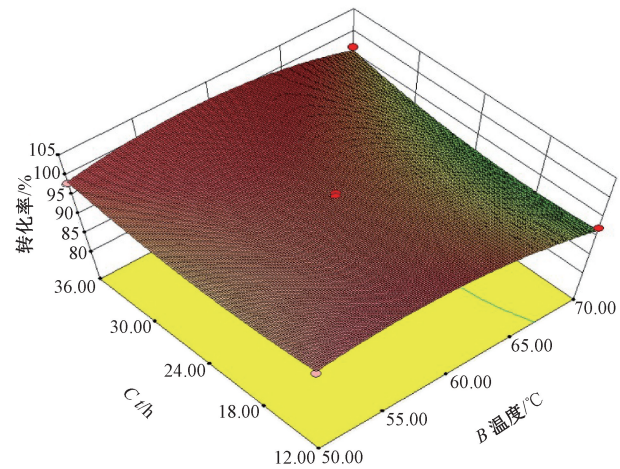


图 6 交互项（反应温度和反应时间）对柴胡皂苷 B₁ 转化率的影响

4.36，并对其进行验证，考虑到实验的实际可操作性，将水解条件调整为反应温度 56 ℃，反应时间 33 h，缓冲液 pH 4.5；在此条件下，3 次平行实验所得的柴胡皂苷 B₁ 转化率为 99.1%，与预测值 100.2% 基本相符，表明优化得到的酶水解条件与实际拟合度较好。

3.4 酶解产物的结构鉴定 ESI-MS m/z : 641 $[M+Na]^+$. 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.58 (s, 24-CH₃), 0.66 (s, 26-CH₃), 0.73 (s, 29-CH₃), 0.84 (s, 25-CH₃), 0.90 (s, 30-CH₃), 0.93 (s, 27-CH₃), 1.22 (d, H-6'), 4.33 (d, H-1'), 5.55 (dd, H-11), 6.35 (dd, H-12); ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 38.0 (C-1, 19), 25.5 (C-2), 80.3 (C-3), 43.0 (C-4), 46.6 (C-5), 18.7 (C-6), 32.0 (C-7), 40.4 (C-8), 54.0 (C-9), 36.1 (C-10), 126.8 (C-11), 125.4 (C-12), 135.7 (C-13), 43.8 (C-14), 34.2 (C-15), 75.4 (C-16), 43.7 (C-17), 133.2 (C-18), 32.6 (C-20), 34.8 (C-21), 29.7 (C-22), 63.1 (C-23), 12.9 (C-24), 17.7 (C-25), 17.2 (C-26), 21.9 (C-27), 62.8 (C-28), 24.9 (C-29), 32.4 (C-30), 105.2 (3-O-Fuc-C-1'), 74.1 (C-3'), 71.6 (C-2'), 71.4 (C-4'), 70.2 (C-5'), 17.0 (C-6'). 以上数据与文献 [17-18] 报道基本一致，故鉴定该化合物为前柴胡皂苷 A。

4 结论与讨论

本研究基于酶水解构建了从柴胡皂苷 B₁ 制备稀有前柴胡皂苷 A 的关键技术。与传统酸水解相比，该方法可方便地获取柴胡次级苷，而不产生柴胡皂苷元副产物；而且在反应过程中不使用无机酸，因此是一种清洁的水解技术。本文所建立的酶水解关键技术，可为大量制备前柴胡皂苷 A 以开展药理药效研究奠定基础。

采用单因素和响应面相结合的方法对酶水解条件进行优化，并利用 LC-MS、NMR 确定产物的化学结构。结果表明，柴胡皂苷 B₁ 的最佳水解酶为蜗牛酶，当酶/底物质量比为 30 : 1、酶解反应时间 33 h、酶解反应温度 56 ℃、缓

冲液 pH 4.5 时, 柴胡皂苷 B₁ 转化率高达 99.1%, 产物为前柴胡皂苷 A。

中药活性成分包括三萜类、黄酮类、蒽醌类、甾体类、生物碱类等, 是中医药在临床实践中发挥防病治病作用的重要物质基础, 同时也是现代医药产业中备受关注的药用分子实体, 其新型制备技术是近年来较为活跃的研究领域。本文所构建的酶水解法具有效率高和操作方便等优点, 利用该技术从天然产物中获取生物活性化合物 (包括次级苷或苷元) 具有良好的发展潜力。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部 [S]. 北京, 人民卫生出版社, 2020.

[2] 王 冰, 孙 涛. 柴胡皂苷 D 对人乳腺癌 SK-BR-3 细胞株增殖与凋亡的影响 [J]. 河南中医, 2020, 40 (5): 735-737.

[3] Zhao Y, Feng L M, Liu L J, *et al.* Saikosaponin B₂ enhances the hepatotargeting effect of anticancer drugs through inhibition of multidrug resistance-associated drug transporters[J]. *Life Sci*, 2019, 231: 116557.

[4] Zhao H Y, Li S P, Zhang H S, *et al.* Saikosaponin A protects against experimental sepsis *via* inhibition of NOD2-mediated NF- κ B activation[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(2): 823-827.

[5] Sun J C, Han X M, Ren X G, *et al.* Saikosaponin A alleviates symptoms of attention deficit hyperactivity disorder through downregulation of DAT and enhancing BDNF expression in spontaneous hypertensive rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 2695903.

[6] Kida H, Akao T, Meselhy M R, *et al.* Metabolism and pharmacokinetics of orally administered saikosaponin B₁ in conventional, germ-free and *Eubacterium* sp. A-44-infected gnotobiot rats[J]. *Biol Pharm Bull*, 1998, 21(6): 588-593.

[7] Kida H, Akao T, Meselhy M R, *et al.* Enzymes responsible for

the metabolism of saikosaponins from *Eubacterium* sp. A-44, a human intestinal anaerobe [J]. *Biol Pharm Bull*, 1997, 20 (12): 1274-1278.

[8] Meselhy R M. Human intestinal bacteria responsible for the metabolism of saikosaponins[J]. *J Transl Med*, 2000, 17(1): 1-11.

[9] Nose M, Amagaya S, Ogihara Y. Effects of saikosaponin metabolites on the hemolysis of red blood cells and their adsorbability on the cell membrane [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1989, 37(12): 3306-3310.

[10] Yu P, Qiu H C, Wang M, *et al.* *In vitro* metabolism study of saikosaponin d and its derivatives in rat liver microsomes[J]. *Xenobiotica*, 2017, 47(1): 11-19.

[11] Wang Z Q, Wei B C, Mu T, *et al.* Facile synthesis of saikosaponins[J]. *Molecules*, 2021, 26(7): 1941.

[12] 于蓓蓓, 王 亮, 尹利顺, 等. 基于 HPLC-DAD-MSⁿ 的柴胡皂苷 A 的体外生物转化研究[J]. 中草药, 2017, 48(2): 333-338.

[13] 彭 静, 马益华, 陈 彦, 等. 固定化 β -葡萄糖苷酶和蜗牛酶生物转化淫羊藿苷效率的比较研究 [J]. 药学报, 2015, 50(12): 1652-1659.

[14] 汪 燕, 张小溪, 邵建兵, 等. 新型双相酶水解体系制备宝藿苷 I[J]. 中成药, 2018, 40(12): 2775-2778.

[15] 朱 铃, 王雨辰, 赵江源, 等. 重组 β -木糖苷酶转化人参皂苷 Rb₃ 及 C-Mx[J]. 高等学校化学学报, 2020, 41(5): 1010-1017.

[16] 武伦鹏, 白龙律, 韩春峰, 等. 微生物转化人参主要皂苷 Rb₁ 为 C-K 的研究[J]. 人参研究, 2016, 28(2): 7-11.

[17] Shimizu K, Amagaya S, Ogihara Y. New derivatives of saikosaponins [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33 (8): 3349-3355.

[18] 宋爱华, 沙 沂, 徐晓雪, 等. 基于¹HNMR 技术的锥叶柴胡与北柴胡鉴别研究 [J]. 波谱学杂志, 2014, 31 (2): 214-221.