DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201407005
羊学荣,卢凤来,王磊,等. 酶水解百分之五十罗汉果皂苷 V 方法学研究[J]. 广西植物, 2015, 35(6):812－816
Yang XR, Lu FL, Wang L, *et al*. Methodology of enzymic hydrolysis of fifty percent mogroside V [J]. Guihaia, 2015, 35(6):812－816

# 酶水解百分之五十罗汉果皂苷 V 方法学研究

羊学荣[1,2], 卢凤来[2], 王 磊[2], 陈 兵[1,2], 徐 风[3], 蔡少青[3], 李典鹏[2*]
(1. 广西中医药大学 药学院, 南宁 530001; 2. 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西植物研究所, 广西 桂林 541006; 3. 北京大学 药学院, 北京 100191)

**摘 要**: 罗汉果是我国常用的一种中药,用于治疗干咳、口腔溃疡及便秘等,罗汉果皂苷是罗汉果果实中的主要药效物质,为一类葫芦烷三萜皂苷类化合物。由于个别罗汉果低糖皂苷在罗汉果中含量较低,因而难以对这些皂苷有效地进一步进行代谢或药理等研究。该研究采用 RP-HPLC 监测 50%罗汉果皂苷 V 的水解过程,并对其水解条件进行正交实验优化其组合,建立了酶水解 50%罗汉果皂苷 V 以获取罗汉果次级皂苷的方法。结果表明:酶水解 50%罗汉果皂苷 V 获得罗汉果皂苷 IIIE、III、IVE 和赛门苷 I 等次级皂苷的最佳水解条件是 pH 值为 5.6 的乙酸－乙酸钠缓冲体系,反应温度为 55 ℃,β-葡聚糖酶活性浓度为 40 万 U·$L^{-1}$,罗汉果皂苷 V 的反应浓度为 0.2 g·$L^{-1}$,水解时间为 10 h。经多次验证,该水解条件重现性好,可用于从 50%罗汉果皂苷 V 中水解制备罗汉果皂苷 IIIE、III、IVE 和赛门苷 I 等罗汉果皂苷。该研究结果为进一步水解其他罗汉果次级皂苷提供了依据。

**关键词**: 酶水解; 罗汉果皂苷 IIIE; 罗汉果皂苷 III; 罗汉果皂苷 IVE; 赛门苷 I; 方法学
**中图分类号**: Q946.5 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-3142(2015)06-0812-05

# Methodology of enzymic hydrolysis of fifty percent mogroside V

YANG Xue-Rong[1,2], LU Feng-Lai[2], WANG Lei[2], CHEN Bing[1,2], XU Feng[3], CAI Shao-Qing[3], LI Dian-Peng[2*]
(1. *School of Pharmaceutical Sciences, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine*, Nanning 530001, China; 2. *Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany*, Guilin 541006, China; 3. *School of Pharmaceutical Sciences, Peking University*, Beijing 100191, China)

**Abstract**: Luo Han Guo, the dried fruits of *Siraitia grosvenorii*, is a kind of traditional Chinese medicine and used for the treatment of dry cough, sore throat, and constipation etc. Previous chemical investigations revealed that the major valid compounds of *S. grosvenorii* were mogrosides, belonging to cucurbitane-type triterpenes. Due to the fact that some mogrosides are low content in *S. grosvenorii*, it is hard to achieve enough amount of these compounds to further study their metabolism and pharmacology etc. So a methodology was established in this paper to obtain enough mogrosides of low content (such as mogroside IIIE, III, IVE, and siamenoside I) by enzymic hydrolysis of 50% mogroside V. The hydrolysis was monitored by RP-HPLC and orthogonal experiments was applied to optimize the reaction conditions. The experiment result indicated the optimal reaction conditions were: in pH 5.6 acetic acid-sodium acetate buffer solution, reaction temperature was 55 ℃, β-dextranase concentration was 400 kU·$L^{-1}$, reac-

**收稿日期**: 2014-10-03 **修回日期**: 2015-04-06
**基金项目**: 国家自然科学基金(81160392,81160518);国家科技支撑计划项目(2011BAI01B03); 桂林市科学研究与技术开发项目(20120118-6)。
**作者简介**: 羊学荣(1990-),男,海南儋州市人,硕士研究生,主要从事天然药物资源开发与利用研究,(E-mail)yxrxl@sina.cn。
* **通讯作者**: 李典鹏,博士,研究员,主要从事药物化学成分研究,(E-mail)ldp@gxib.cn。

tion concentration of mogroside V was 0.2 g·L$^{-1}$, reaction time was 10 h. It had been verified that the method was repeatable, which could be applied to hydrolyze 50% mogroside V to obtain mogroside IIIE, III, IVE, and siamenoside I. This result also could be a guide for hydrolyzing others secondary-mogrosides.

**Key words**: enzymic hydrolysis; mogroside IIIE; mogroside III; mogroside IVE; siamenoside I; methodology

中药罗汉果为葫芦科植物罗汉果(*Siraitia grosvenorii*)的干燥果实,性凉、味甘,具有清热润肺、利咽开音、滑肠通便等功效,适用于肺热燥咳、咽痛失音、肠燥便秘等症(国家药典委员会,2010)。罗汉果的主要有效成分为罗汉果皂苷类(mogrosides)化合物,具有降血糖、抗癌、抗氧化、辅助降血压等功效。罗汉果皂苷类成分的苷元为葫芦烷型四环三萜罗汉果醇(mogrol)。目前,根据苷元上的糖基的连接位置及数目的不同,在罗汉果生长的不同时期已分离鉴定出罗汉果皂苷 V、IVE、III、IIIE、IIE 和赛门苷 I 等皂苷类化合物(李典鹏等,2000)。在这些皂苷类化合物中,罗汉果皂苷 V(mogroside V)是成熟果实的主要成分,罗汉果皂苷 IIE 是未成熟果实中含量高的成分,它们均容易通过选择合适生长期的果实从而进行大量的提取、分离和制备,但赛门苷 I、罗汉果皂苷 IVE、罗汉果皂苷 IIIE 等次级苷在罗汉果果实中的含量较低,难以从原料中大量获取以满足代谢和药理等实验研究的需要。

本研究通过酶水解罗汉果皂苷 V 的方法来获取富含罗汉果次级皂苷的混合物,并通过制备高效液相法从混合物中大量制备赛门苷 I、罗汉果皂苷 IVE 和皂苷 IIIE 等单体。目前见诸报道的皂苷类化合物的水解方法主要有酸水解法(郭秀洁等,2010)、碱水解法(季秀美等,2013)、酶水解法(金东史等,2001)等。此外,还有乙酰解法、过碘酸裂解法和糖醛酸苷选择性水解反应等水解方法(吴立军等,2007)。在这些水解方法中,除酶水解法外,其他方法有的反应条件过于强烈,不易控制反应进度;有的易导致苷元降解和糖异构化等副反应,因此都难于获得高得率的次级苷。相比较而言,酶水解反应条件温和,反应过程易调控,常被运用于水解获得次级苷的工作。因而,本研究拟通过探索酶水解粗罗汉果皂苷 V 的最佳反应条件,从而解决大量制备罗汉果皂苷 V 的次级皂苷的问题。

## 1　材料与仪器

50%罗汉果皂苷Ⅴ粉末(桂林莱茵生物科技股份有限公司);β-葡聚糖酶(5 000 U·mg$^{-1}$,上海源叶生物有限公司,批号 YY10598);罗汉果皂苷 V(纯度>98%,成都曼斯特生物科技有限公司,批号 MUST-13082904),罗汉果皂苷 IVE 对照品(纯度>98%,成都曼斯特生物科技有限公司,批号 MUST-13020208)、罗汉果皂苷 III 对照品(纯度>98%,成都曼斯特生物科技有限公司,批号 MUST-13010703)、罗汉果皂苷 IIIE 对照品(纯度>98%,成都曼斯特生物科技有限公司,批号 MUST-13010706)、赛门苷 I 对照品对照品(纯度>98%,成都曼斯特生物科技有限公司,批号 MUST-1209206);恒温水浴锅(湖北远东数控仪器厂);高效液相色谱仪 LC-20A(日本岛津公司,HPLC-DAD-ELSD),BS124S 型电子天平(赛多利斯北京科学有限公司);分析纯甲醇、乙酸钠、乙酸等(北京化工厂);色谱纯甲醇、乙腈(色谱纯,Fisher 公司);Milli-Q Integral 3 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

## 2　色谱条件

分析柱为 ODS Inertsil© 5 μm 4.6×250 mm C/N5020-01732,柱温 35 ℃,流动相为 A(纯水)、B(乙腈),流速为 1.000 0 mL·min$^{-1}$,检测波长为 203 nm,进样量 10 μL。梯度如表 1。

**表 1　梯度洗脱程序**

Table 1　Procedure of the gradient elution

| 时间 Time (min) | 0.01 | 10 | 20 | 35 | 60 | 70 | 80 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 梯度 B Gradient B (%) | 10 | 18 | 28 | 45 | 90 | 100 | 100 |

## 3　溶液的制备

### 3.1 罗汉果皂苷对照品溶液的配制

精密称取罗汉果皂苷 V、罗汉果皂苷 IVE、罗汉果皂苷 III、罗汉果皂苷 IIIE、赛门苷 I 对照品适量,用色谱纯甲醇配制成 1.0 mg·mL$^{-1}$的溶液备用。

### 3.2 乙酸-乙酸钠缓冲液

用电子天平称取 32.812 g 乙酸钠,用水溶解得 1 L 乙酸钠溶液,最后用乙酸水溶液调配至 pH 为

5.6，即得乙酸-乙酸钠缓冲液，备用。

### 3.3 罗汉果皂苷 V 反应液

分别准确称取 10 g 50%罗汉果皂苷 V，加入 10 mL 缓冲液润湿，再加入 800 mL 缓冲液，同时缓慢加热直至粗罗汉果皂苷 V 完全溶解，冷却至室温，用缓冲液定容至 1 000 mL，配制成 5 g·$L^{-1}$的罗汉果皂苷 V 反应液，在 4 ℃下保存，2 d 内用完。

### 3.4 罗汉果皂苷 V 反应产物供试液处理

取 1 mL 反应前、后的罗汉果皂苷 V 反应液，加入 3 倍量甲醇沉淀蛋白终止反应，并使用微孔滤膜进行过滤，最后使用前面的色谱条件进行分析。

## 4 酶水解条件研究

### 4.1 酶的最适活性浓度考察

酶因其具有饱和性，且在水中溶解度不是很高，所以在水解反应中过多的酶会造成浪费，而过低则无法满足反应需要。取 3.3 中的罗汉果皂苷 V 反应液加 5 倍水配制得 1 g·$L^{-1}$罗汉果皂苷 V 反应液，加进 6 个预先称量好，含有 β-葡聚糖酶的 100 mL 锥形瓶中，配制成 20 万、40 万、60 万、80 万、100 万、120 万 U·$L^{-1}$等不同酶活性浓度的 1 g·$L^{-1}$罗汉果皂苷 V 酶水解反应液，并在酶最佳活性的条件下(丁鑫等，2009)，即在 pH 值为 5.6 的乙酸-乙酸钠缓冲体系中，在 55 ℃进行反应，最后用 3.4 步骤中的方法处理、检测不同酶活性浓度下反应 8 h 后罗汉果皂苷 V 的含量(%)(在 203 nm 下按面积归一化法进行计算，下同)。以酶活性浓度为横坐标，以反应底物罗汉果皂苷 V 的含量(%)为纵坐标，绘制曲线(图 1)。从图 1 可见，随酶活性浓度增大，罗汉果皂苷 V 的含量(%)一直下降，在 60 万 U·$L^{-1}$之前，下降速度较快，大于 60 万 U·$L^{-1}$后，β-葡聚糖酶的活性浓度对罗汉果皂苷 V 的含量影响不大。考虑到水解酶的成本，可以基本判断该酶水解反应的最佳酶活性浓度范围为 20 万～60 万 U·$L^{-1}$。

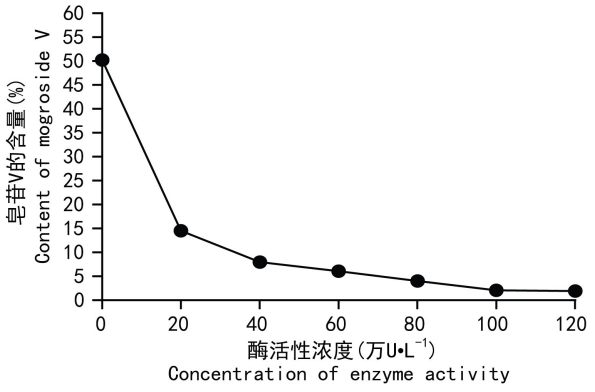


图 1 酶活性浓度对罗汉果皂苷 V 水解进程的影响

Fig. 1 Effects of enzyme concentration on enzymic hydrolyis of 50% mogroside V

### 4.2 罗汉果皂苷 V 的反应浓度考察

由于过大浓度的罗汉果皂苷 V 会相互形成干扰，不利于酶发挥水解作用，所以底物浓度是决定酶解反应速度的重要因素。将 3.3 步骤中预先配制好的罗汉果皂苷 V 溶液稀释成 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 g·$L^{-1}$等 6 个不同浓度各 50 mL 的实验组溶液，每个实验组分别添加 3 万 U β-葡聚糖酶，使得酶活性浓度均为 60 万 U·$L^{-1}$的最适酶活性浓度，最后在 55 ℃下进行反应。反应 6 h 后，最后用 3.4 步骤中的方法处理、检测罗汉果皂苷 V 的含量(%)。以底物罗汉果皂苷 V 的反应浓度为横坐标，以反应结束时罗汉果皂苷 V 的含量(%)为纵坐标，绘制曲线(图 2)。从图 2 可见，从 0.2～0.7 g·$L^{-1}$，随着反应底物罗汉果皂苷 V 浓度的增加，反应 6 h 后罗汉果皂苷 V 的含量(%)也逐渐增加，可知底物浓度越大反应越不完全。但是，0.2～0.3 g·$L^{-1}$之间的差异并不大，由此基本确定罗汉果皂苷 V 的较佳反应浓度区间为0.2～0.3 g·$L^{-1}$。

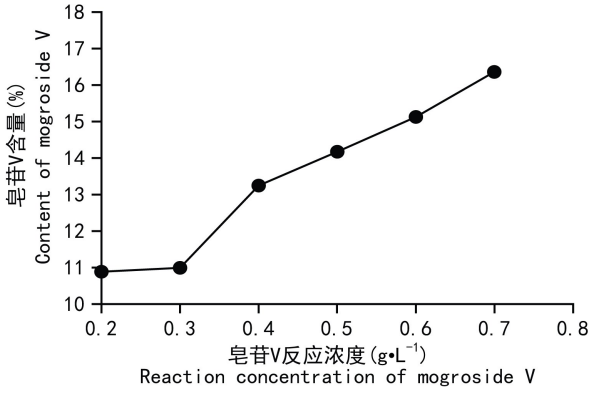


图 2 起始反应浓度对罗汉果皂苷 V 水解进程的影响

Fig. 2 Effects of mogroside V initial concentration on enzymic hydrolyis of 50% mogroside V

### 4.3 反应时间考察

选择 0.3 g·$L^{-1}$的罗汉果皂苷 V 反应浓度，酶活性浓度为 60 万 U·$L^{-1}$，溶液为 pH 值 5.6 的乙酸-乙酸钠缓冲液，在 55 ℃下进行反应，每过 1 h，用 3.4 步骤中的方法处理、测定反应体系中罗汉果皂苷 V 的含量(%)。图 3 显示，随着反应的进行，罗

汉果皂苷 V 快速被水解，8 h 后，水解速度变缓慢，到 10 h 时，罗汉果皂苷 V 剩 2%左右，水解基本完成。考虑到时间成本问题，可以确定罗汉果皂苷 V 的最佳酶水解时间为 8～10 h。

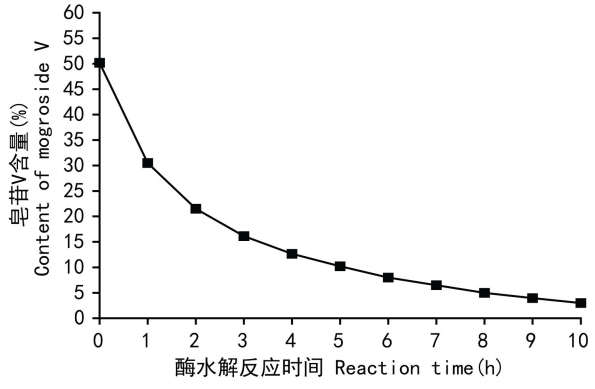


图 3　水解反应时间对罗汉果皂苷 V 水解进程的影响
Fig. 3　Effects of reaction time on enzymic hydrolyis of 50% mogroside V

**表 2　因素水平表**

Table 2　Factors and levels of orthogonal experiment

| 水平 Level | 因素 Factor | | |
|---|---|---|---|
| | 酶活性浓度 Concentration of enzyme activity (万 U·L$^{-1}$) | 罗汉果皂苷 V 浓度 Mogroside V initial concentration (g·L$^{-1}$) | 反应时间 Reaction time (h) |
| 1 | 20 | 0.2 | 8 |
| 2 | 40 | 0.3 | 9 |
| 3 | 60 | 0.4 | 10 |

### 4.4 正交设计

用正交试验法优选最佳的酶水解 50%罗汉果皂苷 V 的工艺。根据单因素实验结果，选用影响水解效果的三个主要因素，即 β-葡聚糖酶活性浓度(A)、罗汉果皂苷 V 反应浓度(B)、反应时间(C)，按正交表 $L_9(3^4)$进行三因素三水平正交试验，共进行 9 次，因素水平设计见表 2，考察指标为罗汉果皂苷 V 含量减少值(计算方法为罗汉果皂苷 V 的初始含量 50%减去反应结束时罗汉果皂苷 V 的含量)，用 3.4 步骤中的方法处理、测定样品中罗汉果皂苷 V 含量(%)，正交试验结果见表 3，方差分析见表 4。

通过比较各因素的极差(R)可以看出，影响 50%罗汉果皂苷 V 水解效果的因素顺序为罗汉果皂苷 V 浓度(B)＞ 酶活性浓度(A)＞反应时间(C)。比较各水平的均值 K1、K2、K3，得出 50%罗汉果皂苷 V 酶水解的最佳条件为在保证酶最佳活性条件下，采用 A2B1C3 组合进行酶水解反应，即采用 pH 值为 5.6 的乙酸-乙酸钠缓冲体系，55 ℃恒温反应，酶活性浓度为 40 万 U·L$^{-1}$，罗汉果皂苷 V 反应浓度为 0.2 g·L$^{-1}$，水解 10 h。

**表 3　$L_9(3^4)$正交试验结果**

Table 3　$L_9(3^4)$ orthogonal experiment results

| 实验号 No. | A | B | C | 空 | 罗汉果皂苷 V 含量减少值 Decrease of mogroside V (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 40.89 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 43.92 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 32.71 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 45.78 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 47.33 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 36.31 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 47.23 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 41.39 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 35.03 |
| 均值 K1 Average K1 | 39.173 | 44.633 | 39.530 | 41.083 | |
| 均值 K2 Average K2 | 43.140 | 44.213 | 41.577 | 42.487 | |
| 均值 K3 Average K3 | 41.217 | 34.683 | 42.423 | 39.960 | |
| 极差 R Range | 3.967 | 9.950 | 2.893 | 2.527 | |

**表 4　方差分析表**

Table 4　Analysis of variance table

| 方差来源 Sources of variance | 偏差平方和 $S^2$ | 自由度 Degree of freedom | $F$ 检验 $F$ test | 单侧临界值 $F_{0.05(2,2)}$ | 显著性 Significance |
|---|---|---|---|---|---|
| A 酶活性浓度 A Concentration of enzyme activity | 23.609 | 2 | 2.455 | 19.000 | |
| B 底物浓度 B Mogroside V initial concentration | 190.000 | 2 | 19.761 | 19.000 | * |
| C 反应时间 C Reaction time | 13.277 | 2 | 1.381 | 19.000 | |
| 误差 Error | 9.62 | 2 | 4.82 | | |

由表 4 可知，在 95%的置信水平下，底物浓度对水解效果有显著性影响，但酶活性浓度和反应时间均无显著性影响。这可能与实验中设计的这两个因素的三个考察水平之间的差异较小有关。

### 4.5 酶水解方法的重复性考察

用上述研究所得的最优方法平行水解 3 份粗罗汉果皂苷 V 样品，用 3.4 步骤中的方法处理、测定样品中罗汉果皂苷 V 含量(%)，其平均值为 1.78%，RSD 为 1.93%。反应终止后，反应液中水解产物的典型高效液相色谱图见图 4，观察反应液前、后的化合物峰的保留时间及峰面积变化大小，并采用罗汉

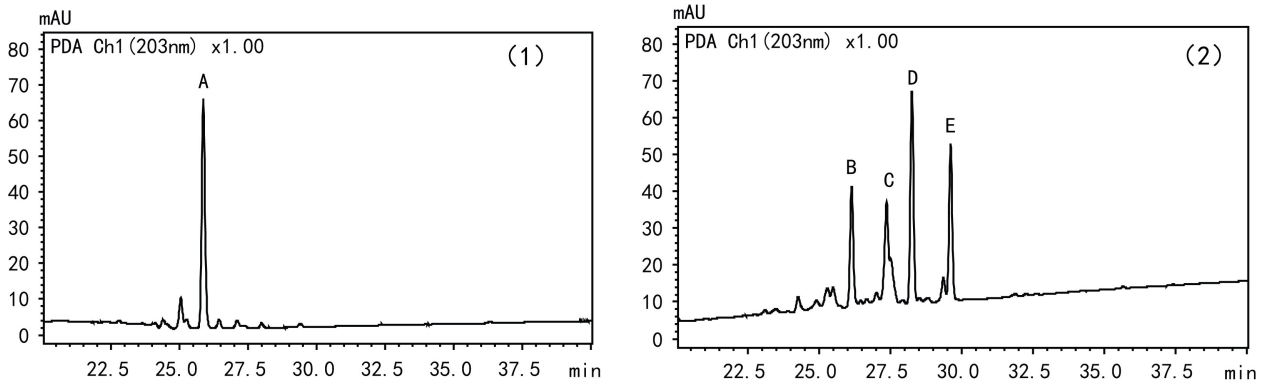


图 4 50%罗汉果皂苷 V 酶水解前后的液相色谱图（203 nm） (**1**)酶水解前，(**2**)酶水解后；**A**. 罗汉果皂苷 V；**B**. 赛门苷 I；**C**. 罗汉果皂苷 IVE；**D**. 罗汉果皂苷 III；**E**. 罗汉果皂苷 IIIE。下同。

Fig. 4 HPLC chromatograms of 50% mogroside V detected under 203 nm before and after enzymic hydrolyis

(**1**) Before enzymatic hydrolysis, (**2**) After enzymatic hydrolysis; **A**. Mogroside V; **B**. Siamenoside I; **C**. Mogroside IVE; **D**. Mogroside III; **E**. Mogroside IIIE. The same below.

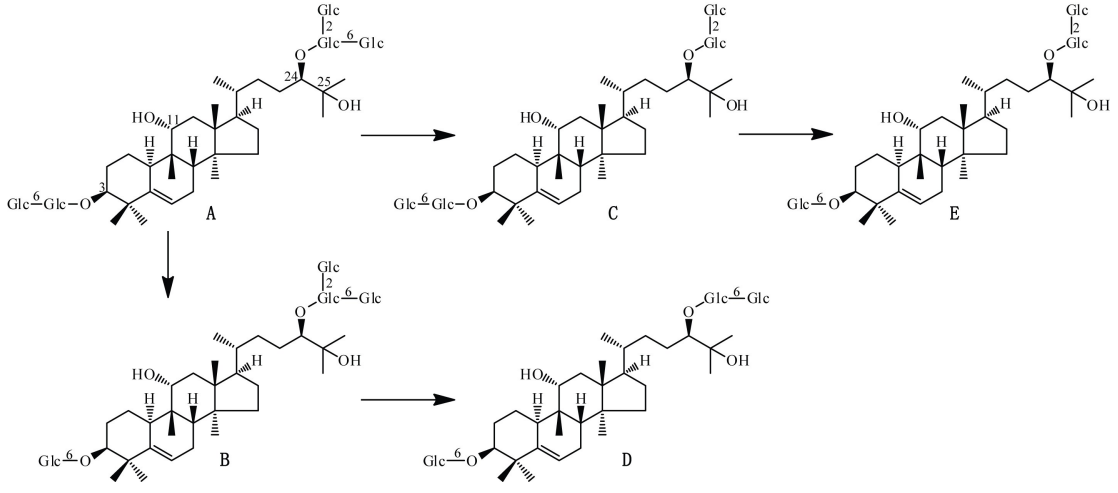


图 5 罗汉果皂苷 V 酶水解可能反应途径

Fig. 5 Proposed enzymic hydrolysis reaction pathways of mogroside V

果皂苷对照品对比保留时间进行定性分析，确定水解产物主要为赛门苷 I(B)、罗汉果皂苷 IVE(C)、罗汉果皂苷 III(D)、罗汉果皂苷 IIIE(E)等。推测酶水解反应途径如图 5 所示。

## 5 结论

通过对 50%罗汉果皂苷 V 酶水解条件的研究，确定各因素对水解反应的影响，并通过正交设计实验，确定酶水解 50%罗汉果皂苷 V 的最佳反应条件是 pH 值为 5.6 的乙酸-乙酸钠缓冲体系，反应温度 55 ℃，底物浓度为 0.2 g·$L^{-1}$，β-葡聚糖酶活性浓度为 40 万 U·$L^{-1}$，水解 10 h 后罗汉果皂苷 V 含量为 1.78%。以往文献采用酶水解或酸水解方法制备罗汉果皂苷类化合物，通常仅得到 1 种皂苷，而采用本文方法则可以同时制备得到 4 种次级皂苷，效率更高。经过和罗汉果皂苷的对照品对比，可以确定通过本水解方法主要得到罗汉果皂苷 IIIE、罗汉果皂苷 IVE、赛门苷 I、罗汉果皂苷 III 等次级皂苷。该方法的重复性良好，可用于获取上述几种罗汉果次级皂苷类成分，为相关的代谢和药理学研究提供物质基础。

## 参考文献：

Ding X(丁鑫), Wang DP(王德培), Xu TB(徐同宝), *et al*. 2009. Study on β-glucan enzyme activity determination conditions

(下转第 898 页 Continue on page 898 )