DOI:10.12441/spyswjs.20251120003 [文章编号] 1673-1689(2026)01-0088-12

黑参皂苷超声波-酶法转化及免疫功效研究

王 阔[1] 钟 宝[2,3*] 栾茗然[2,3] 李凤林[2,3] 卢忠魁[2,3] 王冠然[2] 姚 坤[2]

(1. 长春大学食品科学与工程学院,吉林 长春 130022; 2. 吉林农业科技学院食品科学与营养工程学院,吉林 吉林 132101; 3. 吉林农业科技学院烹饪营养与预制菜研发工程研究中心,吉林 吉林 132101)

摘要:【目的】阐明黑参皂苷的转化工艺及其免疫调节机制。**【方法】**以黑参为原料,采用超声波-酶法对黑参皂苷组分进行转化,并测定黑参皂苷质量浓度;同时通过动物试验探究黑参皂苷的免疫调节功效。**【结果】**在酶解温度 40 ℃、酶添加质量分数 8%、酶解时间 60 min、超声时间 25 min 的条件下,黑参皂苷质量浓度由 1 615.40 μg/mL 提高至 3 351.38 μg/mL,增幅达 107.47%。动物试验结果表明,黑参皂苷能够显著提高小鼠体质量、脾脏指数及胸腺指数,并显著提升血清中免疫球蛋白 IgM、IgG 和 IgA 的水平。Western blot 分析进一步揭示,黑参皂苷可显著上调蛋白质 NOD1、NOD2、RIP2、TAK1、IKKα/β 及 NF-κB 的表达。**【结论】**该研究可为超声波-酶法转化黑参皂苷及其免疫功效研究提供理论参考。

关键词:黑参;黑参皂苷;免疫调节;转化

Ultrasound-assisted Enzymatic Transformation and Immune Efficacy of Black Ginseng Saponins

WANG Kuo[1] *ZHONG Bao*[2,3*] *LUAN Mingran*[2,3] *LI Fenglin*[2,3] *LU Zhongkui*[2,3] *WANG Guanran*[2] *YAO Kun*[2]

(1. College of Food Science and Engineering, Changchun University, Changchun 130022, China; 2. College of Food Science and Nutrition Engineering, Jilin Agricultural Science and Technology College, Jilin 132101, China; 3. Research Center for Culinary Nutrition and Pre-prepared Dishes Engineering, Jilin Agricultural Science and Technology College, Jilin 132101, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to elucidate the transformation process of black ginseng saponins and their immunomodulatory mechanisms. [**Method**] An ultrasound-assisted enzymatic method was employed for the transformation of black ginseng saponins, and the mass concentration of black ginseng saponins was determined. Furthermore, the immunomodulatory effects of black ginseng saponins were investigated through animal experiments. [**Result**] Under the conditions of an enzymatic hydrolysis temperature of 40 ℃, an enzyme mass fraction of 8%, enzymatic hydrolysis time of 60 min, and ultrasonic treatment time of 25 min, the mass concentration of black ginseng saponins increased from 1 615.40 μg/mL to 3 351.38 μg/mL, which represented an increase of 107.47%. The results of animal experiments showed that black ginseng saponins significantly increased the body mass, spleen index, and thymus index of mice, and significantly elevated the serum levels of immunoglobulins IgM, IgG, and IgA. Western blot analysis further revealed that black ginseng saponins significantly upregulated the expression of NOD1, NOD2, RIP2, TAK1, IKKα/β, and NF-κB. [**Conclusion**] This

基金项目:吉林省科技厅项目(20240303045);国家“十四五”重点研发计划项目(2021YFD1600903);吉林市科技创新发展计划项目(20240503011)。

通信作者:钟宝(1989—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事功能性食品开发及成分分析研究。E-mail:zhongbao19870626@163.com

收稿日期:2025-11-20 **修回日期:**2026-01-01

study provides a theoretical reference for the ultrasound-assisted enzymatic transformation of black ginseng saponins and the research on their immunomodulatory effects.

Keywords: black ginseng; black ginseng saponin; immunomodulation; transformation

黑参是以鲜人参（*Panax ginseng* C.A.Mey.）为原料，经过反复蒸制、干燥使其发生美拉德反应，进而加工成的黑色或深褐色人参制品[1-2]。黑参中稀有皂苷质量浓度高于红参和人参，近年来关于黑参的炮制工艺、化学成分、生物活性的研究受到广泛关注[3]。且黑参在抗氧化、抗疲劳、提高免疫力等方面呈现出良好的功效[4]。目前将人参皂苷转化为稀有皂苷常见的方法有物理法、化学法和生物转化法。生物转化法具有反应条件温和、专一性强、绿色环保的优点，且可定向水解原型皂苷糖基生成所需的稀有皂苷[5]；但酶法转化效率常受限于皂苷底物从植物细胞壁中的溶出率以及酶与底物的接触效率。超声波技术作为一种物理辅助手段，其空化效应能够有效破碎植物细胞壁，增大传质面积，同时可能改变酶的空间构象，从而提高酶解反应的效率[6]。

免疫功能的紊乱不仅会增加感染性疾病和肿瘤的发生风险，也与自身免疫性疾病、慢性炎症等现代高发疾病密切相关[7]。人参作为传统名贵中药，以其扶正固本的功效著称，现代研究证实人参具有显著的免疫调节活性，人参皂苷是发挥该活性的关键物质基础[8]。有研究显示，采用“九蒸九曝”工艺加工的黑参水提物可以通过修复由免疫低下造成的肠黏膜上皮屏障损伤，促进肠道菌群平衡，修复肠道免疫屏障，进而起到免疫调节功效[9]。

本研究通过单因素试验和响应面法系统优化黑参皂苷转化工艺参数，以期最大限度地提高稀有皂苷的产率。并通过建立免疫抑制小鼠模型，初步探讨其对免疫的调节作用机制，旨在为开发具有增强免疫力功能的黑参新型深加工产品提供理论依据和技术支持。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

黑参：吉林省长白山林下资源综合利用校企联合技术创新实验室；果胶酶（50 000 U/g）、牛血清白蛋白：上海源叶生物科技有限公司；纤维素酶（10 000 U/g）：上海易恩化学技术有限公司；无水乙醇、甲醇、正丁醇、石油醚：分析纯，天津市恒兴化学试剂制造有限公司；人参皂苷Rg1、Re、Rb1、Rc、Rb2、S-Rg2、R-Rg2、Rh1、Rd、S-Rg3、R-Rg3、Rk1、Rg5、Ck、Rh2标准品（纯度≥98%）：成都植标化纯生物技术有限公司；ICR小鼠：长春亿斯实验动物技术有限责任公司；环磷酰胺（纯度97%）：江苏恒瑞医药股份有限公司；转移因子口服液：长春精优药业股份有限公司；二抗：武汉三鹰生物技术有限公司；NOD1、NOD2、RIP2、TAK1、IKKα/β、NF-κB、β-actin：美国Immunoway生物技术公司；PVDF膜：无锡药科美生物科技有限公司；IgM、IgG、IgA：江苏晶美生物科技有限公司。

1.2　仪器与设备

高效液相色谱仪：Agilent 1260型，美国安捷伦公司；高速冷冻离心机：H3-16KR型，湖南可成仪器设备有限公司；台式冻干机：BTP-QEGEOX型，美国德祥科技有限公司；电泳仪：PowerPac Basic型，美国伯乐生命医学产品有限公司。

1.3　方法

1.3.1　黑参皂苷转化工艺流程

黑参→粉碎→过筛→酶解转化→灭酶→离心→超声→离心→上清液冷冻干燥→萃取→定容→测量。

1.3.2　操作要点

1）黑参粉末的制备：取黑参粉碎，过100目筛网，石油醚浸泡除去油脂后蒸干[10]，得到黑参粉末。

2）酶解转化：称取5 g黑参粉末，按料液比1 g∶20 mL加入体积分数60%的乙醇，按体积分数添加纤维素酶与果胶酶复合酶制剂（质量比2∶1）。调节体系pH，酶解转化黑参皂苷。完成后，90 ℃水浴10 min灭酶，8 000 r/min离心15 min，收集上清液。

3）超声处理：按料液比1 g∶20 mL加入体积分数60%乙醇复溶沉淀物，于400 W、40 ℃条件下超声处理，再次离心后合并2次上清液，冷冻干燥得到粗皂苷。

4）黑参皂苷的萃取：取粗皂苷样品，加水溶解

后用水饱和的正丁醇溶液进行萃取，每次 20 mL，萃取 3 次，合并 3 次有机相，于 45 ℃减压蒸干。用甲醇将残渣定容至 10 mL，溶液经 0.22 μm 滤膜过滤，得到精制皂苷溶液，于 4 ℃避光保存备用。

1.3.3 黑参皂苷质量浓度的测定

1）标准品的制备：精确称取人参皂苷标准品 Rg1、Re、Rb1、Rc、Rb2、S-Rg2、R-Rg2、Rh1、Rd、S-Rg3、R-Rg3、Rk1、Rg5、Ck、Rh2 各 2 000 μg，用 4 mL 色谱级甲醇溶解，制成质量浓度为 500 μg/mL 的标准品储备液，经 0.22 μm 滤膜过滤。将配制好的 500 μg/mL 的人参皂苷标准品储备液进行稀释，制备成工作液待用。

2）高效液相色谱条件：采用高效液相色谱法测定黑参皂苷质量浓度。采用 Eclipse plus rapid resolution HT C18 色谱柱（4.6 mm×150 mm×1.8 μm），紫外检测器，检测波长 203 nm，以体积分数 0.05% 磷酸溶液-乙腈为流动相，流量为 0.3 mL/min，进样量为 10 μL[11]。

3）质量浓度的测定：通过对比标准品分析黑参皂苷成分，以 1 mL 甲醇溶解残渣中含有黑参皂苷的质量（μg）计[11]。

1.3.4 单因素试验

固定酶解温度 40 ℃、酶添加质量分数 8%、酶解时间 60 min、超声时间 25 min。分别以酶解温度（20、30、40、50、60 ℃）、酶添加质量分数（4%、6%、8%、10%、12%）、酶解时间（40、50、60、70、80 min）、超声时间（15、20、25、30、35 min）为影响因素，探究各影响因素对黑参皂苷质量浓度的影响。

1.3.5 响应面试验

采用四因素三水平 Box-Behnken 试验，考察酶解温度（*A*）、酶添加质量分数（*B*）、酶解时间（*C*）、超声时间（*D*）对黑参皂苷转化的影响。以黑参皂苷质量浓度为响应值，分析最佳转化条件。

1.3.6 动物试验

选取 24 只 SPF 级雄性 ICR 小鼠，小鼠初始体质量为（20±2）g，饲养在温度为（24±3）℃，湿度为（55±5）%的环境中，并采用 12 h 明暗交替的照明周期，自由进水和食物，适应性喂养 7 d[12]，试验方案经吉林农业科技学院实验动物伦理委员会批准（LLSC202405002）。将 24 只小鼠随机分为 4 组，每组 6 只，分别为空白对照（NC）组、模型对照（MC）组、阳性对照（PC）组和黑参对照（BG）组。除 NC 组外，MC 组、PC 组及 BG 组均连续 3 d 注射环磷酰胺（80 mg/kg），以建立免疫抑制模型[13]；NC 组同期注射等体积的生理盐水。造模成功后，开始灌胃干预 28 d：NC 组与 MC 组每日灌服生理盐水，PC 组灌服转移因子口服液，BG 组灌服黑参皂苷提取液（120 mg/kg），1 次/d。干预结束后解剖，收集血液、肝脏、脾脏、胸腺进行后续分析。

1.3.7 免疫指标测定

脏器（脾脏或胸腺）指数[14]按式（1）计算。

$$R=\frac{M_1}{M_2} \tag{1}$$

式中：

R——小鼠脏器（脾脏或胸腺）指数，mg/g；

M_1——小鼠脏器（脾脏或胸腺）质量，mg；

M_2——小鼠体质量，g。

采用 ELISA 试剂盒测定血液免疫指标 IgM、IgG 及 IgA 的质量浓度[15]。

1.3.8 免疫蛋白质表达水平的测定

提取肝脏组织中的蛋白质，用 BCA 法测定其质量浓度。进行 SDS-PAGE 电泳后转膜。用 BSA 封闭 160 min，用 TBST 洗膜，加入一抗（β-actin 与封闭液体积比为 1∶5 000，其余抗体与封闭液体积比为 1∶2 000）于 4 ℃孵育过夜。随后加入二抗（二抗与 TBST 体积比为 1∶10 000）室温孵育 1 h，经 ECL 显影。采用 ImageJ 软件分析灰度值。

1.4 统计分析

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示。使用 IBM SPSS Statistics 27 进行统计分析，$P<0.05$ 说明差异具有统计学意义。

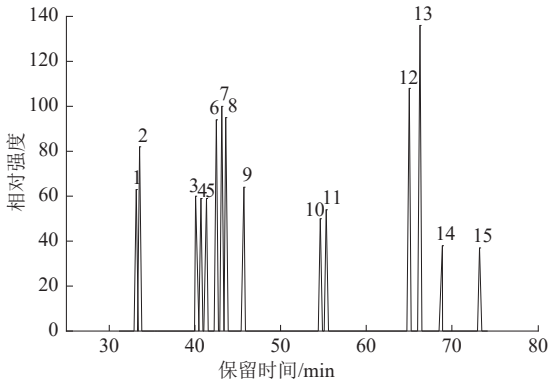
2 结果与讨论

2.1 标准曲线的绘制

如图 1 所示。将 15 种人参皂苷的色谱峰面积进行线性回归分析，各标准曲线线性方程及相关系数见表 1，结果表明，峰面积和人参皂苷质量浓度呈良好的线性关系，相关系数均大于 0.99。

2.2 单因素试验结果

酶解温度对黑参皂苷质量浓度的影响见图 2（a）。在酶解温度为 20~40 ℃时，随着酶解温度的升高，黑参皂苷质量浓度也随之升高，其原因是酶解温度升高至复合酶的最适温度，黑参皂苷在 C_3 位、C_6 位和 C_{21} 位上发生糖基水解和加糖成苷[16]。在酶解温度为 40~60 ℃时，酶解温度高于最适酶解温



图中1~15分别为人参皂苷标准品Rg1、Re、Rb1、Rc、Rb2、S-Rg2、R-Rg2、Rh1、Rd、S-Rg3、R-Rg3、Rk1、Rg5、Ck、Rh2。

图1　人参皂苷标准品的高效液相色谱图

Fig. 1　HPLC chromatogram of ginsenoside standards

度，导致黑参皂苷的转化并不完全[17]，黑参皂苷质量浓度减少。

酶添加质量分数对黑参皂苷质量浓度的影响见图2（b）。当酶添加质量分数为4%~8%时，随着酶添加质量分数的升高，黑参皂苷质量浓度也随之升高，说明酶添加质量分数的增加能促进黑参皂苷的转化。当酶添加质量分数为8%~12%时，酶的过量添加会导致底物不足，不能使酶饱和，从而抑制酶的作用[18]，造成黑参皂苷的质量浓度呈下降趋势。

酶解时间对黑参皂苷质量浓度的影响见图2（c）。当酶解时间为40~60 min时，随着酶解时间的延长，黑参皂苷质量浓度也随之升高，说明常规黑参皂苷再发生转化[16]。当酶解时间为60~80 min时，继续延长酶解时间，部分黑参皂苷糖苷键断裂，导致黑参皂苷质量浓度下降。

超声时间对黑参皂苷质量浓度的影响见图2（d）。当超声时间为15~25 min时，随着超声时间的延长，黑参皂苷质量浓度也随之升高。当超声时间为25~35 min时，继续延长超声时间，黑参皂苷质量浓度呈现下降趋势，说明随着超声时间的继续延长，黑参皂苷结构被破坏，使其发生分解[19]。

表1　人参皂苷线性回归方程

Table 1　Linear regression equations of ginsenosides

序号	物质名称	回归方程	相关系数	线性范围/（μg/mL）
1	Rg1	y=1.028 98x+5.296	0.997 41	90.46~541.25
2	Re	y=0.845 76x+2.177	0.994 79	89.67~462.56
3	Rb1	y=0.646 92x+2.693	0.996 05	127.81~755.41
4	Rc	y=0.870 10x−2.151	0.992 75	87.62~615.52
5	Rb2	y=1.011 35x+0.694	0.998 65	42.34~569.51
6	S-Rg2	y=0.601 89x+1.080	0.995 12	56.51~295.96
7	R-Rg2	y=0.724 43x+1.521	0.995 32	68.52~356.67
8	Rh1	y=1.350 76x+3.950	0.993 65	127.03~663.04
9	Rd	y=1.054 41x+4.372	0.990 96	96.59~515.19
10	S-Rg3	y=1.192 96x+1.016	0.995 07	109.91~588.62
11	R-Rg3	y=0.983 34x+0.779	0.994 88	90.85~482.62
12	Rk1	y=1.569 04x+3.784	0.994 67	147.58~771.53
13	Rg5	y=3.545 34x+3.412	0.995 37	329.59~1 741.23
14	Ck	y=1.903 48x−1.500	0.996 19	175.12~933.92
15	Rh2	y=1.289 33x+5.429	0.995 29	124.11~636.98

2.3　响应面优化试验结果

2.3.1　响应面多元回归方程的建立

通过单因素试验确定响应面试验因素水平表，见表2。根据Box-Behnken的中心组合试验设计原理，选取酶解温度、酶添加质量分数、酶解时间、超声时间4个因素，采用四因素三水平响应面分析法进行试验设计，结果见表3。采用Design Expert 13软件对试验数据进行多元回归拟合，得到以黑参皂苷质量浓度为目标函数的二次回归方程：Y=3 330.50+6.06A−22.92B−7.60C−11.76D−13.56AB−12.28AC−10.10AD+3.53BC+3.72BD+7.45CD−91.18A^2−82.02B^2−117.42C^2−72.24D^2。

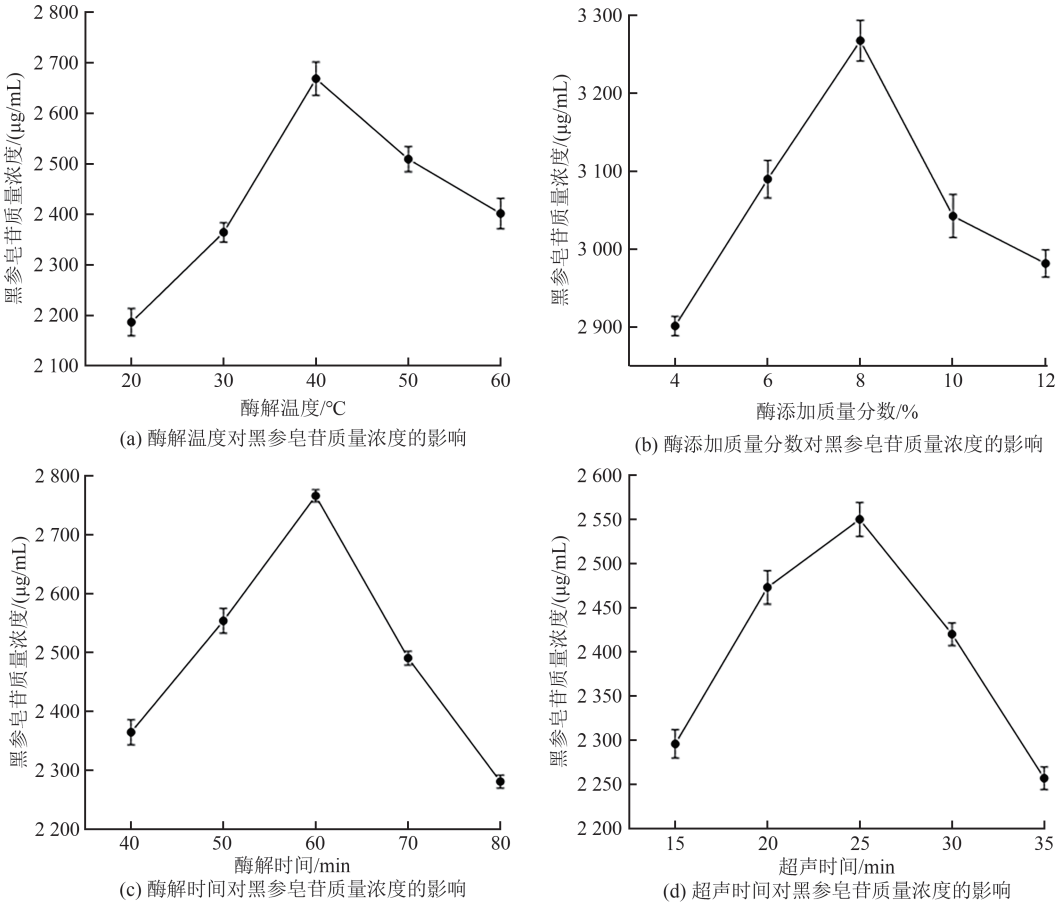


图 2　不同因素对黑参皂苷转化的影响

Fig. 2　Influences of different factors on the transformation of black ginseng saponins

由表 4 可知，该回归模型的决定系数 R^2=99.91%，校正决定系数 R^2_{Adj}=99.81%，两者数值相近且均接近 1，表明该回归模型拟合程度良好。一次项 *A*（酶解温度）、*B*（酶添加质量分数）、*C*（酶解时间）、*D*（超声时间）和二次项 *AB*、*AC*、*AD*、*BC*、*BD*、*CD*、A^2、B^2、C^2、D^2 均对黑参皂苷质量浓度有显著影响（P<0.05）。综合 F 来看，在所取因素水平范围内，各因素对超声波-酶法转化黑参皂苷质量浓度的影响顺序为：酶添加质量分数>超声时间>酶解时间>酶解温度。

表 2　Box-Behnken 试验因素水平表

Table 2　Factors and levels of Box-Behnken test

水平	因素			
	酶解温度/℃	酶添加质量分数/%	酶解时间/min	超声时间/min
−1	30	6	50	20
0	40	8	60	25
1	50	10	70	30

2.3.2　各因素交互作用对黑参皂苷质量浓度的影响

如图 3 所示，各响应因子间交互作用的等高线接近椭圆形，表明交互作用显著。经 Design Expert 13.0 分析，黑参皂苷质量浓度最高的工艺组合为：酶解温度 41 ℃、酶添加质量分数 8%、酶解时间 60 min、超声时间 25 min，黑参皂苷质量浓度理论值为 3 333.03 μg/mL。结合实际操作，将最佳参数调整为酶解温度 40 ℃、酶添加质量分数 8%、酶解时间 60 min、超声时间 25 min。经 3 次平行验证，黑参皂苷平均质量浓度为 3 351.38 μg/mL，与理论值接近，表明模型拟合良好，预测结果准确。

2.4　超声波-酶法转化处理前后黑参皂苷的变化

如图 4 和表 5 所示，超声波-酶法转化处理前的质量浓度为 1 615.40 μg/mL，超声波-酶法转化处理后的质量浓度达到 3 351.38 μg/mL，黑参皂苷质量浓度增加了 107.47%，其中 Rg1、Re、Rb1、Rc、Rb2 为大分子原型皂苷，S-Rg2、R-Rg2、Rh1、Rd、

表3　设计方案与结果

Table 3　Design scheme and results

序号	酶解温度/℃	酶添加质量分数/%	酶解时间/min	超声时间/min	黑参皂苷质量浓度/（μg/mL）
1	30	6	60	25	3 163.21
2	30	10	60	25	3 145.41
3	30	8	60	20	3 159.07
4	30	8	60	30	3 158.37
5	30	8	50	25	3 110.54
6	30	8	70	25	3 119.62
7	40	8	50	20	3 172.41
8	40	8	70	20	3 139.35
9	40	8	50	30	3 132.42
10	40	8	70	30	3 129.18
11	40	6	50	25	3 162.20
12	40	10	50	25	3 108.19
13	40	6	70	25	3 143.15
14	40	10	70	25	3 103.26
15	40	6	60	20	3 214.41
16	40	10	60	20	3 161.35
17	40	6	60	30	3 182.41
18	40	10	60	30	3 144.23
19	40	8	60	25	3 334.35
20	40	8	60	25	3 332.41
21	40	8	60	25	3 328.63
22	40	8	60	25	3 329.87
23	40	8	60	25	3 327.26
24	50	6	60	25	3 201.32
25	50	10	60	25	3 129.26
26	50	8	60	20	3 192.21
27	50	8	60	30	3 151.18
28	50	8	50	25	3 147.45
29	50	8	70	25	3 107.42

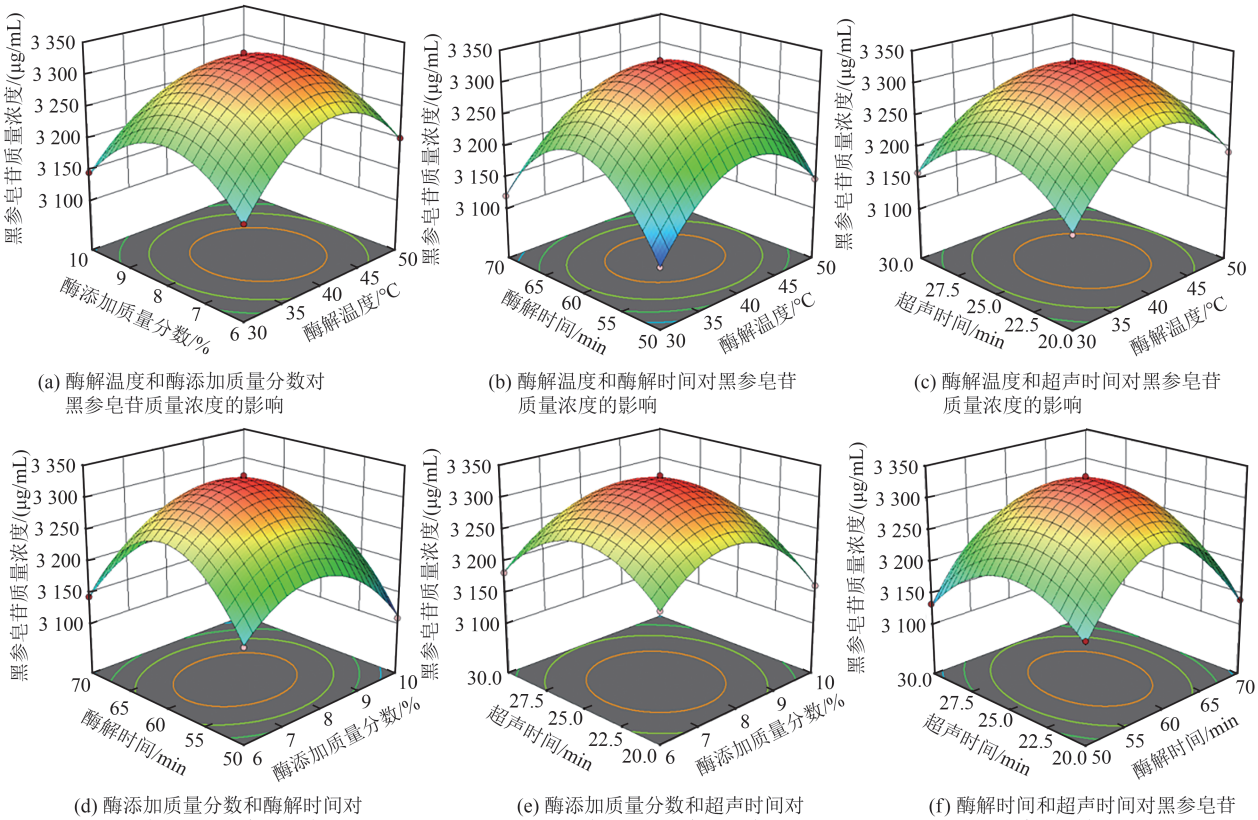
S-Rg3、R-Rg3、Rk1、Rg5、Ck、Rh2为小分子稀有皂苷，其中稀有皂苷S-Rg2、R-Rg2、Rh1、S-Rg3、R-Rg3、Rk1、Rg5在超声波-酶法转化处理后其质量浓度分别增加193.27%、216.02%、114.01%、88.07%、104.96%、187.02%、56.64%，并新检测出稀有皂苷Rd、Rh2。原型皂苷Rg1、Rc质量浓度下降表明在超声波-酶法转化处理过程中原型皂苷被降解或转化为其他人参皂苷[20]；Re、Rb1、Rb2、S-Rg2、R-Rg2、Rh1、S-Rg3、R-Rg3、Rk1、Rg5质量浓度上升，其中Rb1、Rb2、S-Rg2、R-Rg2、S-Rg3、R-Rg3、Rk1、Rg5等的质量浓度大幅增加，表明它们可能是超声波-酶法转化的主要产物，而小分子稀有皂苷S-Rg3、R-Rg3、Rk1、Rg5质量浓度的增加说明超声波-酶法转化有效促进了原型皂苷向活性更高的稀有皂苷的转化[21]；稀有皂苷Rd、Rh2从无到有，更能说明黑参皂苷的进一步转化，在人参皂苷代谢路径中，稀有皂苷Rd常作为中间体，由Rb1、Rb2、Rc等原型皂苷酶解产生，并进一步转化为稀有皂苷Rg3、Rh2等[22]。稀有皂苷Rh2的出现表明超声波-酶法转化过程中存在糖苷键的断裂，生成相对分子质量更小的稀有皂苷，这些稀有皂苷通常具有更强的细胞渗透性和生物活性[23]；稀有皂苷Ck在超声波-酶法转化前后均未检测出，表明稀有皂苷Ck未生成或未达检测限，未被转化可能与酶的类型或反应条件有关。

表 4　回归方程各项的方差分析

Table 4　Variance analysis of regression equations

方差来源	平方和	自由度	均方	*F*	*P*	显著性
模型	1.56×10^5	14	11 173.23	1 059.94	<0.000 1	**
A	440.08	1	440.08	41.75	<0.000 1	**
B	6 302.08	1	6 302.08	597.84	<0.000 1	**
C	693.58	1	693.58	65.80	<0.000 1	**
D	1 658.16	1	1 658.16	157.30	<0.000 1	**
AB	736.04	1	736.04	69.82	<0.000 1	**
AC	602.95	1	602.95	57.20	<0.000 1	**
AD	407.64	1	407.64	38.67	<0.000 1	**
BC	49.84	1	49.84	4.73	0.047 3	*
BD	55.35	1	55.35	5.25	0.038 0	*
CD	222.31	1	222.31	21.09	0.000 4	**
A^2	53 930.65	1	53 930.65	5 116.08	<0.000 1	**
B^2	43 638.10	1	43 638.10	4 139.68	<0.000 1	**
C^2	89 436.47	1	89 436.47	8 484.30	<0.000 1	**
D^2	33 851.98	1	33 851.98	3 211.33	<0.000 1	**
残差	147.58	14	10.54			
失拟项	114.72	10	11.47	1.40	0.400 2	
纯误差	32.86	4	8.22			
总离差	1.57×10^5	28				

注：“*”表示差异显著（*P*<0.05）；“**”表示差异极显著（*P*<0.01）。



(a) 酶解温度和酶添加质量分数对黑参皂苷质量浓度的影响

(b) 酶解温度和酶解时间对黑参皂苷质量浓度的影响

(c) 酶解温度和超声时间对黑参皂苷质量浓度的影响

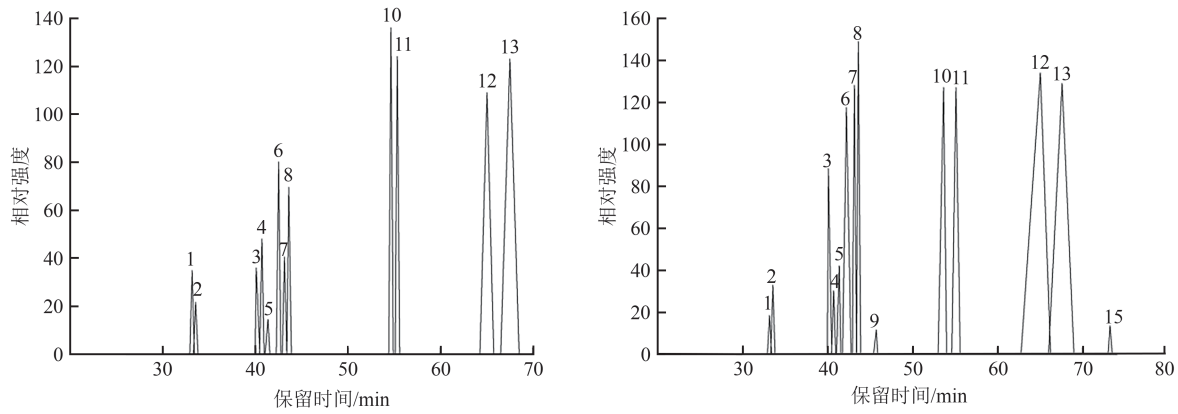
(d) 酶添加质量分数和酶解时间对黑参皂苷质量浓度的影响

(e) 酶添加质量分数和超声时间对黑参皂苷质量浓度的影响

(f) 酶解时间和超声时间对黑参皂苷质量浓度的影响

图 3　不同因素交互作用对黑参皂苷质量浓度的影响

Fig. 3　Influences of interactions between different factors on the mass concentration of black ginseng saponins



(a) 超声波-酶法转化处理前黑参皂苷的高效液相色谱图　　(b) 超声波-酶法转化处理后黑参皂苷的高效液相色谱图

图中1~15分别为人参皂苷Rg1、Re、Rb1、Rc、Rb2、S-Rg2、R-Rg2、Rh1、Rd、S-Rg3、R-Rg3、Rk1、Rg5、Ck、Rh2。

图4　超声波-酶法转化处理前后黑参皂苷高效液相色谱图

Fig. 4　HPLC chromatograms of black ginseng saponins before and after ultrasound-assisted enzymatic transformation

表5　超声波-酶法转化处理前后的黑参皂苷质量浓度

Table 5　Mass concentrations of black ginseng saponins before and after ultrasound-assisted enzymatic transformation

序号	皂苷成分	超声波-酶法转化处理前黑参皂苷质量浓度/(μg/mL)	超声波-酶法转化处理后黑参皂苷质量浓度/(μg/mL)
1	Rg1	55.42	29.42
2	Re	26.43	40.14
3	Rb1	59.94	147.35
4	Rc	81.43	51.26
5	Rb2	24.65	71.38
6	S-Rg2	85.26	250.04
7	R-Rg2	40.52	128.05
8	Rh1	73.21	156.68
9	Rd	—	18.12
10	S-Rg3	272.10	511.75
11	R-Rg3	229.79	470.98
12	Rk1	303.11	869.99
13	Rg5	363.48	569.35
14	Ck	—	—
15	Rh2	—	36.80
总黑参皂苷		1 615.40	3 351.38

注：“—”表示检测过而未发现。

2.5　黑参皂苷对小鼠脏器指数的影响

胸腺和脾脏是重要的免疫器官，脏器指数能反映受试药物刺激免疫系统的程度[24]。由表6可知，与NC组相比，MC组体质量、脾脏指数以及胸腺指数均显著降低，说明环磷酰胺破坏了小鼠的免疫功能，导致小鼠生长减缓，脾脏、胸腺严重萎缩，表明环磷酰胺成功诱导了免疫力抑制模型；与MC组相比，PC组体质量、脾脏指数以及胸腺指数均极显著增加（$P<0.01$），说明药物符合预期，可以增强小鼠的免疫功能；与MC组相比，BG组体质量、脾脏指数及胸腺指数均极显著增加（$P<0.01$），说明黑参皂苷中的稀有皂苷成分S-Rg3、R-Rg3、Rk1、Rg5能够有效逆转免疫抑制状态，保护并修复免疫器官的结构与功能[25]。

表 6 各组小鼠的体质量、脾脏指数、胸腺指数对比

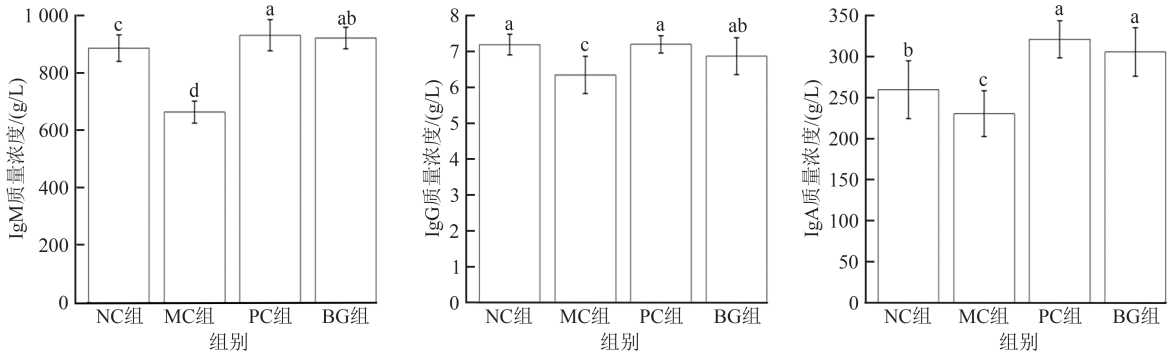
Table 6 Comparison of body mass, spleen index, and thymus index of mice between groups

组别	体质量/g	脾脏指数/(mg/g)	胸腺指数/(mg/g)
NC组	34.84±1.87	3.47±0.49	1.82±0.19
MC组	31.65±1.88#	2.86±0.60#	1.08±0.41##
PC组	35.80±2.24**	4.05±0.85**	2.24±0.18**
BG组	35.71±2.41**	3.95±0.85**	1.94±0.35**

注：与NC组相比，“#”表示差异显著（P<0.05），“##”表示差异极显著（P<0.01）；与MC组相比，“**”表示差异极显著（P<0.01）。

2.6 黑参皂苷对血清中免疫球蛋白质量浓度的影响

由图5可知，与NC组相比，MC组的IgM、IgG、IgA质量浓度均显著降低（P<0.05）；与MC组相比，PC组的IgM、IgG、IgA质量浓度均显著增加（P<0.05）；与MC组相比，BG组的IgM、IgG、IgA质量浓度均显著增加（P<0.05），说明黑参皂苷具有增强和恢复机体体液免疫能力的功效；PC组与BG组之间无显著差异（P>0.05）。进一步分析MC组和BG组，结果表明，黑参皂苷中的稀有皂苷成分S-Rg3、Rg5、Rk1、Rh2可显著提高IgM水平，说明其能激活B细胞的初始免疫应答[26-27]；同时显著提升IgG水平，表明其可强化长期特异性免疫记忆，增强机体对重复感染的抵抗能力[28]；此外，黑参皂苷中Rd、Rg1成分还能提高IgA水平，增强黏膜免疫屏障功能[29]。



(a) 黑参皂苷对小鼠免疫球蛋白IgM质量浓度的影响　(b) 黑参皂苷对小鼠免疫球蛋白IgG质量浓度的影响　(c) 黑参皂苷对小鼠免疫球蛋白IgA质量浓度的影响

不同小写字母表示组间差异显著（P<0.05）。

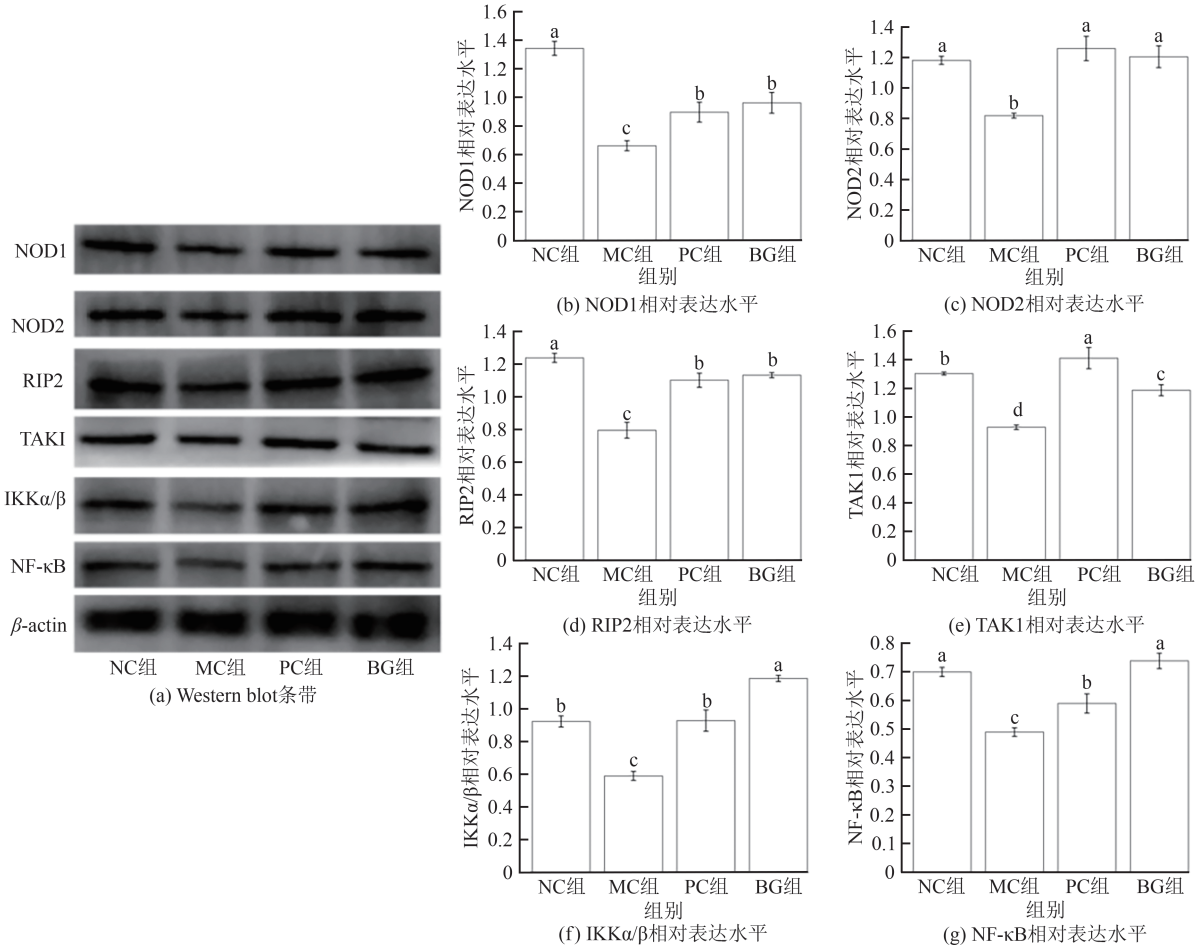
图5 黑参皂苷对小鼠免疫球蛋白质量浓度的影响

Fig. 5 Influences of black ginseng saponins on the mass concentrations of immunoglobulins in mice

2.7 黑参皂苷对小鼠肝脏蛋白质表达的影响

由图6可知，与NC组相比，MC组的NOD1、NOD2、RIP2、TAK1、IKKα/β、NF-κB相对表达水平均显著下调（P<0.05）；与MC组相比，PC组的NOD1、NOD2、RIP2、TAK1、IKKα/β、NF-κB相对表达水平均显著上调（P<0.05）；与MC组相比，BG组的NOD1、NOD2、RIP2、TAK1、IKKα/β、NF-κB相对表达水平均显著上调（P<0.05）。

当黑参皂苷进入小鼠体内时，会特异性上调免疫细胞内NOD1、NOD2受体的表达。上调的NOD1、NOD2受体被激活后会发生寡聚化，并与下游含有相同CARD结构域的接头蛋白RIPK2形成NOD-RIPK2信号复合物。NOD-RIPK2信号复合物通过泛素化链激活TAK1，TAK1进一步磷酸化并激活IKK复合物，活化的IKK复合物使IκB蛋白发生磷酸化，磷酸化的IκB被泛素化，随后被蛋白酶体途径降解，从而解除磷酸化的IκB对NF-κB的核定位信号遮蔽作用。释放的NF-κB转位进入细胞核，启动下游靶基因的转录，包括促炎性细胞因子、趋化因子及免疫调节分子等的表达[30-34]。与MC组相比，PC组和BG组通过显著上调NOD1和NOD2的相对表达水平（P<0.05）激活了下游信号通路，从而促进RIP2、TAK1、IKKα/β、NF-κB相对表达水平的显著增加（P<0.05），最终发挥免疫增强作用[35]。



不同小写字母表示组间差异显著（$P<0.05$）。

图 6　黑参皂苷对小鼠肝脏蛋白质的相对表达水平的影响

Fig. 6　Effect of black ginseng saponins on relative expression levels of proteins in the liver of mice

3　结论

本研究通过单因素和响应面试验确定最佳提取工艺为酶解温度 40 ℃、酶添加质量分数 8%、酶解时间 60 min、超声时间 25 min，在该条件下共检测出 14 种皂苷成分，黑参皂苷总质量浓度达到 3 351.38 μg/mL，相较于超声波-酶法转化前新检测出稀有皂苷 Rd、Rh2，且稀有皂苷 S-Rg2、R-Rg2、Rh1、S-Rg3、R-Rg3、Rk1、Rg5 质量浓度分别增加了 193.27%、216.02%、114.01%、88.07%、104.96%、187.02%、56.64%，黑参皂苷总质量浓度提高了 107.47%。通过建立环磷酰胺诱导的小鼠免疫抑制模型，分析小鼠脏器指数，发现黑参皂苷能够有效逆转环磷酰胺诱导的免疫抑制状态，保护并修复免疫器官。同时黑参皂苷可以促进免疫球蛋白 IgM、IgG 与 IgA 的分泌，发挥其免疫调节作用，恢复机体免疫能力。肝脏蛋白质的表达水平分析结果表明，黑参皂苷可通过上调 NOD1/NOD2-RIP2-TAK1-IKKα/β-NF-κB 信号通路关键分子的表达，修复免疫抑制的天然免疫识别与信号传导功能，刺激下游免疫效应分子的产生。

参考文献

[1] 王孟缘. 黑参粉制备关键技术研究[D]. 长春：长春中医药大学，2024.

[2] 向思敏，台雪月，卢忠魁，等. 黑参炮制工艺优化及成分变化分析[J]. 农产品加工，2024(5)：41-46.
XIANG S M，TAI X Y，LU Z K，et al. Optimization of black ginseng processing technology and analysis of composition changes[J]. Farm Products Processing，2024(5)：41-46.（in Chinese）

[3] 蒋常鹏. 黑参炮制关键技术及体外抗氧化活性研究

[D]. 长春:长春中医药大学,2022.

[4] CHEN G L, LI H J, GAO Y G, et al. Flavored black ginseng exhibited antitumor activity *via* improving immune function and inducing apoptosis[J]. Food & Function, 2017,8(5):1880-1889.

[5] 郭枫,刘焕焕,邱智东,等. 稀有人参皂苷的酶转化研究进展[J]. 生物技术进展,2017,7(4):279-283.
GUO F,LIU H H,QIU Z D,et al. Advances in enzymatic transformation of rare ginsenosides[J]. Current Biotechnology, 2017,7(4):279-283.(in Chinese)

[6] 陈先强. 超声波辅助提取文冠果叶皂苷及其起泡和乳化特性研究[D]. 南京:南京林业大学,2023.

[7] 徐慧,冉靖,王丹,等. 人参调节免疫系统疾病研究进展及质量标志物预测分析[J]. 中华中医药学刊,2025,43(5):129-138.
XU H, RAN J, WANG D, et al. Research progress on Renshen (Ginseng Radix et Rhizoma) regulating immune system diseases and quality marker prediction analysis[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2025, 43(5):129-138.(in Chinese)

[8] 马传贵,张志秀,王琦. 人参皂苷抗肿瘤及免疫调节作用的研究应用进展[J]. 特种经济动植物,2024,27(3):182-185.
MA C G, ZHANG Z X, WANG Q. Research and application progress on the anti-tumor and immune regulatory effects of ginsenosides[J]. Special Economic Animals and Plants,2024,27(3):182-185.(in Chinese)

[9] 綦占文,綦特,李卓俏,等. 黑参水提物化学成分分析及其调节血脂作用研究[J]. 特产研究,2023,45(4):18-26,31.
QI Z W, QI T, LI Z Q, et al. Study on the chemical composition and blood lipid-regulation effect of black ginseng aqueous etract[J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research,2023,45(4):18-26,31.(in Chinese)

[10] 魏婷,郭晓萌,张焱. 黑参多糖的抗氧化和抗肿瘤活性[J]. 现代食品科技,2023,39(3):55-65.
WEI T, GUO X M, ZHANG Y. Antioxidant and antitumor activity of black ginseng polysaccharides[J]. Modern Food Science & Technology,2023,39(3):55-65.(in Chinese)

[11] 台雪月,卢忠魁,刘超,等. 保加利亚乳杆菌发酵转化人参皂苷工艺研究[J]. 食品安全质量检测学报,2024,15(6):1-9.
TAI X Y,LU Z K,LIU C,et al. Study on the process of fermentation and transformation of ginsenosides by *Lactobacillus bulgaricus*[J]. Journal of Food Safety & Quality,2024,15(6):1-9.(in Chinese)

[12] GE S J, LI J T, TAI X Y, et al. Ginsenoside-enriched extract from black ginseng anti-fatigue effects by improving antioxidant capacity and mitochondrial function [J]. Life,2024,14(11):1467.

[13] JIAO L N, JIN H Y, SONG Z C, et al. The effect of lentinan on dexamethasone-induced immunosuppression in mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules,2024,264:130621.

[14] LIU H Y, PEI X L, WANG J, et al. Effect of loach paste on the liver and immune organs of *D*-galactose-induced ageing mice[J]. Food and Agricultural Immunology, 2018,29(1):316-331.

[15] ALHARBI K S, ALENEZI S K, ALSAHLI T, et al. Effect of sakuranetin against cyclophosphamide-induced immunodeficiency mice: role of IFN-γ/TNF-α/IgG/IgM/interleukins [J]. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology,2025,398(8):10951-10962.

[16] 袁松竹,王斌,周旋,等. 稀有人参皂苷生物转化的研究进展[J]. 食品工业科技,2023,44(12):480-489.
YUAN S Z, WANG B, ZHOU X, et al. Research progress on the biotransformation of rare ginsenosides[J]. Science and Technology of Food Industry,2023,44(12):480-489.(in Chinese)

[17] 何天竺,邹睿,王伟楠. 基于酶催化与代谢工程策略的稀有人参皂苷高效制备研究进展[J]. 广东医科大学学报,2025,43(1):1-18.
HE T Z,ZOU R,WANG W N. Research progress on the efficient preparation of rare ginsenosides based on enzymatic catalysis and metabolic engineering strategies [J]. Journal of Guangdong Medical College, 2025, 43(1):1-18.(in Chinese)

[18] 李德海,朱晓冉,王路,等. 盐析辅助酶提取龙牙楤木皂苷及其抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技,2018,34(12):129-136,25.
LI D H, ZHU X R, WANG L, et al. Extraction and antioxidant activity of saponins from *Aralia elata* by salting-out assisted enzymatically hydrolysis[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(12): 129-136, 25.(in Chinese)

[19] 雷秋茹,王晓军,洪一楠,等. 人参总皂苷超声辅助低共熔溶剂提取工艺优化[J]. 中成药,2024,46(10):3426-3430.
LEI Q R, WANG X J, HONG Y N, et al. Ultrasonic-assisted eutectic solvent extraction process optimization of total ginsenosides from ginseng[J]. Chinese Traditional Patent Medicine,2024,46(10):3426-3430.(in Chinese)

[20] 李飞,黄秋婷,隋新,等. 蛹虫草产*β*-葡萄糖苷酶与*α*-*L*-阿拉伯呋喃糖苷酶活性分析及转化人参皂苷Rg1与Rc应用[J]. 食品科学,2023,44(8):152-161.
LI F, HUANG Q T, SUI X, et al. Activities of

β-glucosidase and *α*-*L*-arabinofuranosidase from *Cordyceps militaris* and their applications in the transformation of ginsenoside Rg1 and Rc[J]. Food Science,2023,44(8):152-161.(in Chinese)

[21] HE Y, HU Z Y, LI A R, et al. Recent advances in biotransformation of saponins[J]. Molecules, 2019, 24(13):2365.

[22] 窦文雨,吴宗展,赖树生,等. 酶法转化三七总皂苷副产物制备人参皂苷Rd[J]. 上海中医药大学学报,2025,39(6):44-51.
DOU W Y,WU Z Z,LAI S S,et al. Enzymatic conversion of total saponin by-products from *Panax notoginseng* to prepare ginsenoside Rd[J]. Acta Universitatis Traditionis Medicalis Sinensis Pharmacologiaeque Shanghai, 2025, 39(6):44-51.(in Chinese)

[23] ZHANG W Z,ZHANG J L,ZHAO X M,et al. Efficient production of ginsenoside Rh2 from xylose by remodeling metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chemical Engineering Journal,2024,494:153120.

[24] MA W W,WU Y N,SUN H,et al. An *in vivo* study of the ameliorative effect of supplementation with *Lacticaseibacillus paracasei* Glory LP16 in immunocompromised mice[J]. Scientific Reports,2025,15(1):14932.

[25] ZHANG H,SUN Y,FAN M L,et al. Prevention effect of total ginsenosides and ginseng extract from *Panax ginseng* on cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice[J]. Phytotherapy Research,2023,37(8):3583-3601.

[26] LEE S J,CHINEN J,KAVANAUGH A. Immunomodulator therapy: monoclonal antibodies, fusion proteins, cytokines, and immunoglobulins[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology,2010,125(2):S314-S323.

[27] WATSON M J,MUNDORFF C C,LYNCH E M,et al. Defining the features of complement-active IgM[J]. Journal of Molecular Biology,2025,437(12):169104.

[28] SHKUNNIKOVA S,MIJAKOVAC A,SIRONIC L,et al. IgG glycans in health and disease: prediction, intervention, prognosis, and therapy[J]. Biotechnology Advances,2023,67:108169.

[29] PERŠE M,VEČERIĆ-HALER Ž. The role of IgA in the pathogenesis of IgA nephropathy[J]. International Journal of Molecular Sciences,2019,20(24):6199.

[30] MA B, HUA K X, ZHOU S S, et al. *Haemophilus parasuis* infection activates NOD1/2-RIP2 signaling pathway in PK-15 cells[J]. Developmental & Comparative Immunology,2018,79:158-165.

[31] JUN J C,COMINELLI F,ABBOTT D W. RIP2 activity in inflammatory disease and implications for novel therapeutics[J]. Journal of Leukocyte Biology,2013,94(5):927-932.

[32] PARK J H,KIM Y G,MCDONALD C,et al. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs[J]. Journal of Immunology, 2007,178(4):2380-2386.

[33] HITOTSUMATSU O,AHMAD R C,TAVARES R,et al. The ubiquitin-editing enzyme A20 restricts nucleotide-binding oligomerization domain containing 2-triggered signals[J]. Immunity,2008,28(3):381-390.

[34] 张玲,董婧媛,陈永德,等. 海参废渣皂苷通过核苷酸结合寡聚化结构域样受体信号通路抵抗环磷酰胺诱导小鼠的免疫抑制[J]. 食品科学,2022,43(21):191-202.
ZHANG L,DONG J Y,CHEN Y D,et al. Saponins from sea cucumber residues protect against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice *via* the nucleotide binding and oligomerization domain-like receptor signaling pathway[J]. Food Science,2022,43(21):191-202.(in Chinese)

[35] MUKHERJEE T,HOVINGH E S,FOERSTER E G,et al. NOD1 and NOD2 in inflammation, immunity and disease[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2019, 670:69-81.