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

于兆慧^{1,2}, 刘其媛^{1,2}, 崔莉¹, 贾晓斌^{1,2*}, 张振海¹, 金鑫¹

1. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药释药系统重点实验室, 江苏 南京 210028

2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 制备微球固定化蜗牛酶, 并优选出微球固定化蜗牛酶转化人参皂苷 Rb₁ (Rb₁) 制备人参稀有皂苷 Compound K (CK) 的最佳制备工艺。**方法** 采用交联-包埋法制备微球固定化蜗牛酶, 以酶活力回收率为考察指标, 通过正交试验优选出最佳制备工艺; 考察了最适反应温度、最适反应 pH 值、热稳定性、pH 稳定性和储存稳定性等酶学性质, 并通过单因素考察转化温度、底物浓度、转化时间和固定化蜗牛酶使用次数对转化率的影响, 优化制备工艺。**结果** 固定化蜗牛酶的最佳制备工艺: 海藻酸钠质量浓度 2%, CaCl₂ 质量浓度 2%, SiO₂ 与蜗牛酶质量比 1:1, 在此条件下固定化蜗牛酶的酶活回收率为 81.94%; 固定化蜗牛酶与游离蜗牛酶在热稳定性与 pH 值稳定性方面显示出不同的性质, 其中固定化蜗牛酶的最适反应温度为 60 °C, 最适反应 pH 值为 5.0。固定化蜗牛酶在 15 °C 环境下保存 30 d 后, 酶活回收率为 55.17%。固定化蜗牛酶转化 Rb₁ 制备人参稀有皂苷 CK 的转化条件: 转化温度为 55 °C, 底物质量浓度为 1.0 mg/mL, 转化时间为 36 h, 转化次数为 5 次, 平均转化率为 36.79%。**结论** 蜗牛酶的固定化增强了其稳定性和使用寿命, 且人参稀有皂苷 CK 的转化率提高, 工艺简单, 适合工业化生产。

关键词: 微球; 固定化蜗牛酶; 人参皂苷 Rb₁; 人参稀有皂苷 Compound K; 交联-包埋法; 正交试验

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)21-3092-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.21.011

Transformation of rare ginsenoside Compound K from ginsenoside Rb₁ catalyzed by snailase immobilization onto microspheres

YU Zhao-hui^{1,2}, LIU Qi-yuan^{1,2}, CUI Li¹, JIA Xiao-bin^{1,2}, ZHANG Zhen-hai¹, JIN Xin¹

1. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Meteria Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To prepare snailase immobilization onto microspheres and to optimize the process conditions for the transformation of rare ginsenoside Compound K (CK) from ginsenoside Rb₁ (Rb₁) catalyzed by snailase immobilization onto microspheres. **Methods** Considering the recovery rate of enzyme activity as the target, crosslink-embedding method was used for preparing the snailase immobilization onto microspheres and optimizing the preparation technology by orthogonal test. Furthermore, the enzyme characterization of temperature, enzymatic properties of pH value, thermal stability, pH stability, and storage stability was studied, and the effectiveness of temperature, concentration reaction time, and transformational times on the bioconversion rate was studied to optimize the preparation conditions. **Results** The best process was achieved at 2% sodium alginate, 2% CaCl₂, SiO₂ and snail enzyme mass ratio of 1:1, with the above conditions, the enzyme activity recovery rate was 81.94%, immobilization snailase and free snailase exhibit different properties about thermal stability and pH stability, the optimum temperature was 60 °C, and the optimum pH was 5.0. Under these conditions, the snailase immobilization onto microspheres remained 55.17% enzyme activity when stored at 15 °C for 30 d. The best process was achieved at 55 °C, the substrate concentration was 1.0 mg/mL, the conversion time was 36 h, the effective continuous transformational times were five rounds and the average transformational ratio for rare ginsenoside CK was up to 36.79%. **Conclusion** The results concluded from the experiments indicate that the immobilization procedure could promote the

收稿日期: 2014-05-13

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划 (2008BA151B03); “国家中医药管理局中药口服制剂释药系统重点实验室”开放基金课题 (2011NDDCM01002)

作者简介: 于兆慧, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂研究。Tel: (025)85608672 E-mail: yuzhaohui0415@126.com

*通信作者 贾晓斌 Tel/Fax: (025)85637809 E-mail: jiaxiaobinpharmacy@126.com

resistance of enzyme against temperature, pH shift, and some other tough reaction conditions, meanwhile prolong the enzymatic lifetime for storage. The bioconversion rate is improved and it is feasible to prepare rare ginsenoside CK by enzymolysis with snailase immobilization onto microspheres. Besides, the condition is moderate and it is suitable for industrialization.

Key words: microspheres; immobilized snailase; ginsenoside Rb₁; rare ginsenoside Compound K; cross-linking and embedding method; orthogonal test

人参稀有皂苷 Compound K (CK) 是五加科人参属植物人参的一种二醇型稀有皂苷, 被世界各国国家广泛用于疾病的预防和治疗^[1-5]。最早发现于原人参二醇型皂苷在肠道中的代谢产物, 近年来发现在人参的花蕾和果实中也能检测到 CK^[6], 但是因其量极低, 且极性相似的成分较多, 分离纯化困难, 难以满足应用的需求。目前制备 CK 的方法主要有酸水解法和酶解法^[7-8]。酸水解效率很高, 但是副产物较多, 专一性差, 环境污染严重, 不易进行工业化生产, 而酶解法具有工艺条件温和、选择性高、无污染等特点。但天然酶稳定性差、不可回收、生产成本低, 而采用固定化酶可以改善此现状。研究表明, 固定化技术在连续使用或重复使用工业酶等方面应用广泛, 它大大提高了酶的活性和稳定性, 使其即使在 pH 值和温度都较低或较高等粗放型的条件下也能正常反应^[9-11]。另外, 固定化酶易于与产物分离, 且不污染产物, 便于对整个反应过程的自动化控制。因此, 通过酶的固定化可以高效地获得更多的人参稀有皂苷 CK, 具有极其重要的药用价值和经济意义。

由文献报道可知, 多孔二氧化硅具有粒径小、比表面积大、吸附力强、安全性高、多孔和孔容量大等特点, 且其内部结构含有大量的羟基, 可为酶的固定化提供良好的条件; 同时它还具有机械强度高、稳定性好、耐酸碱、寿命长及绿色环保等优点, 因此常被用于生物酶的固定化^[12-13]。海藻酸钠是一种带阴离子的聚电解质多糖, 可利用二价金属离子交联其羧基形成凝胶微球^[14], 被广泛地用作生物医药材料^[15]。本实验采用交联-包埋法利用多孔二氧化硅吸附固定化蜗牛酶, 再利用氯化钙与海藻酸钠交联制备成微球, 通过正交试验设计优化制备工艺, 考察酶学性质, 并单因素考察固定化蜗牛酶转化人参皂苷 Rb₁ (Rb₁) 制备 CK 的工艺条件, 以制备出优质的固定化酶及优化出最佳的制备工艺, 从而为人参稀有皂苷 CK 的绿色产业化生产提供实验基础。

1 仪器与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; 数显气浴恒温振荡器, 金坛市双捷实验仪器厂;

WFZ—UV—2000 型紫外-可见分光光度计, 上海优尼科仪器有限公司; Mettler AL204 十万分之一天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; 精密 pH 计, 上海精密科学仪器有限公司。

人参皂苷 Rb₁, 批号 110704-200921, 质量分数 98%, 南京泽朗医药科技有限公司; 人参稀有皂苷 CK (自制, 质量分数 >98%); 蜗牛酶, 北京拜尔迪生物技术有限公司; 海藻酸钠, 青岛明月海藻集团有限公司, 黏度系数 340 cps, 批号 20131120011; 多孔二氧化硅, SYLOID[®] 244FP, 美国 GRACE 公司, 批号 1000202378; 无水乙醇和无水 CaCl₂ 等试剂均购自国药集团化学试剂有限公司; 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为高纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 DNS 法测定蜗牛酶活力^[16]

取蜗牛酶 (固定化酶) 溶液 1.0 mL, 加入 5% 的 Rb₁ 4.0 mL (用 0.2 mol/L pH 5.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液配制), 60 °C 水浴反应 80 min 后, 分别加入 1.0 mL 2 mol/L 氢氧化钠溶液和 2.0 mL 6.5 mg/mL DNS 指示剂溶液, 使反应终止。将试管置于沸水浴中, 5 min 后用流动水冷却。用分光光度计于 490 nm 处以空白为参比测吸光度, 以测得的吸光度计算酶活力。

酶活力定义为在 60 °C, pH 5.0 条件下, 1 mg 酶 (或 1 g 固定化酶) 每 1 min 水解 Rb₁ 反应生成 1 mg 葡萄糖醛酸的酶活力为 1 个酶活力单位。

固定化酶活力回收率 = 固定化酶活力 / 用于固定化的酶活力

相对酶活力 = 酶活力 / 最高酶活力

2.2 固定化蜗牛酶的制备及工艺优化

2.2.1 固定化蜗牛酶的制备 将 30.00 mg 蜗牛酶溶于 1 mL 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液中, 加入一定量的多孔二氧化硅, 置于多功能制剂试验机搅拌槽中, 于转速 200 r/min 条件下搅拌 5 min, 加入到一定质量浓度的海藻酸钠溶液中并搅拌使其充分混匀。用 1.0 mL 注射器吸取混悬液缓慢滴入一定质量浓度的 CaCl₂ 溶液中 (滴入过程中固定滴距为 6 cm, 滴速为 30 滴/min), 小球瞬时形成, 滴制完毕后包埋

2 h, 滤过, 用醋酸缓冲液洗涤 3 次, 40 °C 干燥, 即得浅棕色微球固定化酶。

2.2.2 固定化蜗牛酶制备工艺的优化 在单因素试验的基础上, 选择海藻酸钠用量 (A)、CaCl₂ 用量 (B)、多孔二氧化硅与蜗牛酶质量比 (C) 作为考察因素, 以酶活回收率为考察指标进行评价。采用 L₉(3⁴) 正交表进行试验, 因素水平及实验结果见表 1。不考虑交互作用, 进行方差分析, 结果见表 2。经极差分析结果表明, 影响微球固定化蜗牛酶活力回收率的因素大小依次为海藻酸钠用量 > CaCl₂ 用量 > 多孔二氧化硅与蜗牛酶质量比。固定化蜗牛酶制备工艺最佳组合为 A₃B₂C₂, 即海藻酸钠用量为 2%, CaCl₂ 用量为 1.5%, 多孔二氧化硅与蜗牛酶质量比为 1 : 1。

2.2.3 优化条件下微球固定化蜗牛酶制备工艺验证 分别取 1.0 g 蜗牛酶, 3 份, 分别按上述工艺制备 3 批样品, 按“2.1”项下方法测定固定化蜗牛酶酶活力回收率, 结果分别为 (81.96 ± 0.22) %、(82.61 ±

0.18) %、(82.97 ± 0.19) % (n=3)。由结果可知该工艺稳定性、重复性良好。

2.3 蜗牛酶酶学性质的考察

2.3.1 固定化蜗牛酶最适反应温度测定 取适量固定化蜗牛酶及游离蜗牛酶, 分别在 25、37、50、60、70、80 °C 温度下按“2.1”项方法测定固定化蜗牛酶及游离蜗牛酶的酶活力, 结果见表 3。温度为 60 °C 时, 固定化蜗牛酶和游离蜗牛酶水解 Rb₁ 的活力同时达到最高, 但是在 25~80 °C 固定化蜗牛酶的相对酶活力明显高于游离蜗牛酶的相对酶活力, 并且温度变化对固定化蜗牛酶的相对酶活力影响程度显著小于对游离蜗牛酶的影响, 可以证明蜗牛酶的固定化能有效地提高其耐热性能, 更好地适应温度的变化。

表 3 反应温度对酶活力的影响

Table 3 Effect of reaction temperature on enzyme activity

反应温度 / °C	相对酶活力 / %	
	游离蜗牛酶	固定化蜗牛酶
25	16.39	20.21
37	18.12	31.50
50	29.84	69.27
60	100.00	100.00
70	59.16	84.75
80	32.10	80.43

表 1 正交试验结果及极差分析

Table 1 Results and range analysis of orthogonal test

样品	A / %	B / %	C	酶活力回收率 / %
1	1 (1)	1 (1)	0.5 : 1 (1)	30.21
2	1 (1)	1.5 (2)	1 : 1 (2)	60.14
3	1 (1)	2 (3)	1.5 : 1 (3)	48.10
4	1.5 (2)	1 (1)	1 : 1 (2)	67.84
5	1.5 (2)	1.5 (2)	1.5 : 1 (3)	78.40
6	1.5 (2)	2 (3)	0.5 : 1 (1)	71.63
7	2 (3)	1 (1)	1.5 : 1 (3)	63.20
8	2 (3)	1.5 (2)	0.5 : 1 (1)	76.89
9	2 (3)	2 (3)	1 : 1 (2)	82.94
K ₁	46.150	53.750	59.577	
K ₂	72.623	71.810	70.307	
K ₃	74.343	67.557	63.223	
R	28.193	18.060	10.730	

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	1 498.660	2	753.095	P < 0.01
B	534.878	2	268.783	P < 0.01
C	178.536	2	89.717	P < 0.05
D (误差)	1.990	2		

F_{0.05}(2, 2) = 19.00 F_{0.01}(2, 2) = 99.00

2.3.2 固定化蜗牛酶最适反应 pH 值测定 取适量固定化蜗牛酶及游离蜗牛酶, 分别用 pH 为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.5、7.0、7.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液按“2.1”项方法测定固定化蜗牛酶及游离蜗牛酶的酶活力, 结果见表 4。参考文献报道可知, 海藻酸钠是 β-D-甘露糖醛酸的醛基以苷键形成的高聚糖醛酸, 在酸性条件下易形成凝胶, 在碱性条件下黏性增加, 对蜗牛酶的固定化作用降低, 因此本实验只考察了 pH 4.0~7.5 对固定化蜗牛酶酶活力的影响。由表 4 可知, 固定化蜗牛酶和游离蜗牛酶的最适反应 pH 值分别为 5.0、5.5, 且在整个 pH 值考察范围内 pH 值发生变化时固定化蜗牛酶的相对酶活力高于游离蜗牛酶, 可见通过蜗牛酶的固定化使其在一定范围内对 pH 的耐受力增大, 提高了其在不同 pH 值条件下的稳定性。

2.3.3 固定化蜗牛酶热稳定性测定 取适量固定化蜗牛酶及游离蜗牛酶, 将其分别置于不同温度 (40、50、60、70、80、90、100 °C) 水浴中保温 1 h, 然

表 4 反应 pH 值对酶活力的影响

Table 4 Effect of reaction pH values on enzyme activity

反应 pH 值	相对酶活力 / %	
	游离蜗牛酶	固定化蜗牛酶
4.0	7.30	27.55
4.5	31.19	69.32
5.0	85.10	100.00
5.5	100.00	91.01
6.0	84.27	84.10
6.5	71.01	78.35
7.0	60.79	65.90
7.5	36.74	55.14

后按“2.1”项方法测定固定化蜗牛酶及游离蜗牛酶的酶活力,结果见表 5。由表 5 可知,固定化蜗牛酶和游离蜗牛酶在不同温度下的稳定性变化呈一致性的趋势,但与游离蜗牛酶相比,固定化蜗牛酶的热稳定性有了一定的提高,可见固定化作用使蜗牛酶的耐热性有了一定的提高。这可能因为蜗牛酶的固定化可以保护其结构完整且不受热交换等作用的损害,因此即使在较高温度下反应其固定化蜗牛酶仍可以保持一定的活性。

表 5 蜗牛酶的热稳定性

Table 5 Thermal stability of snailase

温度 / °C	相对酶活力 / %	
	游离蜗牛酶	固定化蜗牛酶
40	100.00	100.00
50	84.51	92.10
60	61.42	75.23
70	49.36	50.11
80	15.10	25.72
90	5.12	10.60
100	1.96	2.19

2.3.4 固定化蜗牛酶 pH 值稳定性测定 取适量固定化蜗牛酶及游离蜗牛酶,将其分别置于 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液中,在最适反应温度条件下水浴保温 1 h,然后按“2.1”项方法测定固定化蜗牛酶及游离蜗牛酶的酶活力,结果见表 6。可知固定化蜗牛酶在不同 pH 变化范围内的酶活力与游离蜗牛酶相比保持了较高的活性。并且在 pH 7.0~10.0,固定化蜗牛酶的酶活力下降的比较缓慢,而游离蜗牛酶的

表 6 蜗牛酶的 pH 值稳定性

Table 6 Stability of snailase pH values

pH 值	相对酶活力 / %	
	游离蜗牛酶	固定化蜗牛酶
3	5.02	10.33
4	55.91	67.82
5	100.00	81.89
6	82.13	100.00
7	65.43	80.17
8	19.07	30.24
9	2.37	15.01
10	0	10.21

酶活力下降的比较迅速直至失活。因此蜗牛酶的固定化可以显著提高其在 pH 值发生变化时的耐受性。

2.3.5 固定化蜗牛酶储存稳定性考察 取适量的固定化蜗牛酶保存于 4、15 °C 和室温 (25 °C) 条件下,在 1~30 d 内,每 5 天取样,按“2.1”项方法测定固定化蜗牛酶酶活力回收率,结果见表 7。可知随着储存时间的延长,在 4、15 °C 和室温 (25 °C) 保存条件下的固定化蜗牛酶酶活力都逐渐降低。30 d 后,在 4 °C 条件下保存的固定化蜗牛酶的酶活力回收率为 40.10%;在室温 (25 °C) 条件下保存的固定化蜗牛酶的酶活回收率为 29.19%;在 15 °C 条件下保存的固定化蜗牛酶的酶活力回收率为 55.17%,并且固定化蜗牛酶的物理形态没有明显变化。因此,选择 15 °C 保存固定化蜗牛酶。

表 7 固定化蜗牛酶在不同储存温度下的储存稳定性

Table 7 Storage stability of snailase immobilization onto microspheres at different temperatures

储存时间 / d	相对酶活力 / %		
	4 °C	15 °C	室温 (25 °C)
1	92.16	93.85	90.08
5	81.58	86.01	78.37
10	70.49	78.40	65.48
15	65.00	72.32	56.18
20	51.78	65.96	42.90
25	43.98	62.20	36.47
30	40.10	55.17	29.19

2.4 固定化蜗牛酶转化 Rb₁ 制备人参稀有皂苷 CK 的工艺考察

2.4.1 人参稀有皂苷 CK 的制备工艺 称取 Rb₁ 100.0 mg 及适量的固定化蜗牛酶加入 100.0 mL 醋

酸-醋酸钠缓冲液,于实验条件下反应一定时间,将转化后的混悬液离心,弃去上清液,沉淀用10倍量高纯水洗3次,再用无水乙醇溶解,滤过,滤过后得到的固定化蜗牛酶用醋酸-醋酸钠缓冲液冲洗3次,40℃烘干待用,滤液水浴挥干,即得人参稀有皂苷CK。

2.4.2 人参稀有皂苷CK转化率的测定 色谱条件^[17-18]: Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(A:B), 梯度洗脱: 0~8 min, 40%乙腈; 8~35 min, 64.3%乙腈; 35~40 min, 40%乙腈; 40~45 min, 40%乙腈; 检测波长203 nm; 体积流量1.0 mL/min; 柱温30℃; 进样量20 μL。

精密量取0.1 mL转化后的混悬液,加无水乙醇定容至10 mL,摇匀后用0.45 μm的微孔滤膜滤过,高效液相色谱仪检测,计算转化率。

$$\text{转化率} = CV / (m \times Mr_1 / Mr_2)$$

C为人参稀有皂苷CK的质量浓度,V为体积,m为加入Rb₁的质量,Mr₁为人参稀有皂苷CK的相对分子质量,Mr₂为Rb₁的相对分子质量

2.4.3 反应温度对转化率的影响 按“2.4.1”项下方法酶解Rb₁。在其他条件不变的情况下,反应温度分别为25、37、45、50、55℃,结果人参稀有皂苷CK的转化率分别为5.01%、11.37%、24.81%、37.96%、42.50%。在固定化蜗牛酶酶学性质考察中,该固定化蜗牛酶最适反应温度是60℃,但是实际应用中,高温不利于固定化蜗牛酶的循环利用,会导致固定化蜗牛酶结构变得松散,从而使包裹的蜗牛酶严重流失,因此需要根据具体的转化底物来考察反应温度。结果表明,人参稀有皂苷CK的转化率随反应温度的升高而增加,当温度达到55℃时,转化率达到最大值。

2.4.4 底物质量浓度对转化率的影响 按“2.4.1”项下方法酶解Rb₁。在其他条件不变的情况下,底物质量浓度分别为0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mg/mL,结果人参稀有皂苷CK的转化率分别为33.19%、37.21%、43.51%、30.04%、21.72%。当底物质量浓度为1.0 mg/mL时,人参稀有皂苷CK的转化率达到最大,为43.51%。底物质量浓度过低不能充分发挥固定化酶的高效性能,且提高了人参稀有皂苷CK的转化成本;但底物质量浓度过高时,底物不能充分被转化,不利于产物的分离纯化。

2.4.5 反应时间对转化率的影响 按“2.4.1”项下

方法酶解Rb₁。在其他条件不变的情况下,反应时间分别为12、24、36、48、60、72 h。结果人参稀有皂苷CK的转化率分别为11.36%、23.84%、45.01%、45.37%、46.18%、46.76%。随着反应时间的延长,人参稀有皂苷CK的转化率逐渐增大,但从36 h开始增大的幅度逐渐变得缓慢,几乎趋向于水平,考虑到实际生产的需要,将36 h定为最佳反应时间。

2.4.6 固定化蜗牛酶使用次数的考察 固定化蜗牛酶的循环使用是其最大的优点,能够节省资源,绿色生产,因此固定化蜗牛酶使用次数为其性能考察的重要指标。按“2.4.1”项下方法酶解Rb₁,连续进行6轮转化,每轮转化36 h,每轮分别取样,高效液相色谱测定人参稀有皂苷CK的量,计算其转化率。结果1~6轮转化时人参稀有皂苷CK的转化率分别为47.61%、45.25%、39.02%、31.13%、20.92%、5.38%。由上述结果可知,固定化蜗牛酶的使用次数越多,人参稀有皂苷CK的转化率越低。在实验过程中观察到在第6次转化的时候,固定化蜗牛酶的形态已经发生了变化,推测可能是因为固定化蜗牛酶长期在高温下反应和浸泡在水中的缘故。因此确定该固定化蜗牛酶的使用次数为5次,经过5次转化后人参稀有皂苷CK的平均转化率为36.79%。

2.4.7 优化条件下人参稀有皂苷CK制备工艺验证 分别取Rb₁ 1.0 g,3份,分别按筛选出的最佳工艺条件:转化温度为55℃,底物质量浓度为1.0 mg/mL,转化时间为36 h,转化次数为5次,制备3批样品,按“2.4.2”项下方法测定人参稀有皂苷CK的转化率,结果平均转化率分别为(36.58±0.17)%、(36.80±0.19)%、(36.67±0.15)% (n=3)。由结果可知该工艺稳定性、重复性良好。

2.5 人参稀有皂苷CK的纯化和结构鉴定

取酶解产物通过C₁₈硅胶柱,用不同体积分数的乙醇进行梯度洗脱,收集相应梯度的乙醇洗脱液,减压回收溶剂得CK,样品用HPLC测定,采用峰面积归一化法计算,质量分数>98%。结合MS、¹H-NMR、¹³C-NMR谱分析,与文献报道结果一致^[19],由此确定该化合物为人参稀有皂苷CK。

3 讨论

多孔二氧化硅被广泛用作药物载体,平均粒径2.5~3.7 μm,是一种内部多孔的高孔隙粒子,内部比表面积较大,具有较强的吸附能力,本实验

尝试了将其用于制备微球固定化蜗牛酶, 可以增加固定化酶负荷的酶量, 增强固定化酶的机械强度, 且能使固定化酶在多次循环利用后仍保持较完整的形态。

本实验进行了微球固定化蜗牛酶制备人参稀有皂苷 CK 的研究, 将固定化蜗牛酶和游离蜗牛酶的酶学性质进行了考察和比较, 可知虽然固定化蜗牛酶的活性稍有降低, 但热稳定性、pH 值稳定性和固定化蜗牛酶的贮存寿命都得到了有效的改善; 同时, 蜗牛酶的固定化可以保护酶的结构而不受酶解环境的变化而变化; 而且可以通过离心或滤过等简单的方法分离固定化酶, 然后进行回收利用。因此, 本研究为提高固定化蜗牛酶的转化效率, 扩大应用范围提供了实践经验和理论基础。

参考文献

- [1] Chae S, Kang K A, Chang W Y, *et al.* Effect of compound K, a metabolite of ginseng saponin, combined with γ -ray radiation in human lung cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Agric Food Chem*, 2009, 57(13): 5777-5778.
- [2] Hasegawa H, Sung J H, Huh J H, *et al.* Ginseng intestinal bacterial metabolite IH 901 as a new anti-metastatic agent [J]. *Arch Pharm Res*, 1997, 20(6): 539-544.
- [3] Yang C S, Ko S R, Cho B G, *et al.* The ginsenoside metabolite compound K, a novel agonist of glucocorticoid receptor, induces tolerance to endotoxin-induced lethal shock [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(5a): 1739-1753.
- [4] Lee I K, Kang K A, Lim C M, *et al.* Compound K, a metabolite of ginseng saponin, induces mitochondria-dependent and caspase-dependent apoptosis via the generation of reactive oxygen species in human colon cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(12): 4916-4931.
- [5] Tsutsumi Y M, Tsutsumi R, Mawatari K, *et al.* Compound K, a metabolite of ginsenosides, induces cardiac protection mediated nitric oxide via Akt/PI3K pathway [J]. *Life Sci*, 2011, 88(15): 725-729.
- [6] 张伟云, 陈全成, 郑毅男, 等. RP-HPLC 测定人参各部位人参皂苷 Compound K 的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2007, 27(1): 1-3.
- [7] Lee G W, Yoo M H, Shin K C, *et al.* β -Glucosidase from *Penicillium aculeatum* hydrolyzes exo-, 3-O-, and 6-O- β -glucosides but not 20-O- β -glucoside and other glycosides of ginsenosides [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(14): 6315-6324.
- [8] Quan L H, Min J W, Jin Y, *et al.* Enzymatic biotransformation of ginsenoside Rb₁ to compound K by recombinant β -glucosidase from *Microbacterium esteraromaticum* [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(14): 3776-3781.
- [9] Wu S, Liu B, Li S. Behaviors of enzyme immobilization onto functional microspheres [J]. *Int J Biol Macromol*, 2005, 37(5): 263-267.
- [10] Solís S, Paniagua J, Martínez J C, *et al.* Immobilization of papain on mesoporous silica: pH effect [J]. *J Sol-Gel Sci Technol*, 2006, 37(2): 125-127.
- [11] Liu Q, Rauth A M, Wu X Y. Immobilization and bioactivity of glucose oxidase in hydrogel microspheres formulated by an emulsification-internal gelatin-adsorption-polyelectrolyte coating method [J]. *Int J Pharm*, 2007, 339(1): 148-156.
- [12] 蒋艳荣, 张振海, 胡绍英, 等. 胶态二氧化硅 SY-LOID244FP 固化肉桂挥发油的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(1): 53-56.
- [13] Zhao J, Wang Y, Luo G, *et al.* Immobilization of penicillin G acylase on macro-mesoporous silica spheres [J]. *Biores Technol*, 2011, 102(2): 529-535.
- [14] 肖莉, 张韵慧, 许建辰, 等. 芦丁壳聚糖-海藻酸钠漂浮微囊的制备研究 [J]. *中草药*, 2008, 39(2): 209-212.
- [15] 李思阳, 郑健, 骆沙曼, 等. 10-羟基喜树碱的聚赖氨酸/海藻酸钠微胶囊的制备及其体外释药特性研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(9): 1724-1727.
- [16] 黄月文, 罗宣干. 蜗牛酶在聚(N-异丙基丙烯酰胺)中的固定化及应用 [J]. *功能高分子学报*, 1996, 9(4): 523-531.
- [17] 周伟, 罗振时, 周珮. 反相高效液相色谱法测定人参皂甙 Compound-K 的含量 [J]. *色谱*, 2005, 23(3): 270-272.
- [18] 张伟云, 陈全成, 郑毅男, 等. RP-HPLC 测定人参各部位人参皂苷 compound K 的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2007, 27(1): 1-3.
- [19] Karikura M, Miyase T, Tanizawa H, *et al.* Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponin VII comparison of the decomposition models of ginsenoside Rb₁ and Rb₂ in the digestive tract of rats [J]. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39(9): 2357-2361.