

· 综 述 ·

生物酶解技术在中药提取中的应用

于 敬, 周 晶

(天津医科大学药学院, 天津 300070)

摘 要: 生物酶解技术是基于酶解作用能选择性地破坏植物细胞壁, 从而使植物细胞内的成分更容易溶解、扩散的原理而应用于中药有效成分提取的新技术, 具有成分浸出率高、减少热敏成分降解、成本低廉、无需特殊设备就能完成等优势, 且有大规模工业化生产的潜力。该技术已经广泛用于多糖、生物碱、黄酮、皂苷、蛋白质、有机酸等中药有效成分的提取中, 与传统提取技术相比具有明显的优势。综述了近年来生物酶解技术在多糖、生物碱、黄酮类、皂苷类、有机酸类、蛋白质及肽类等中药成分提取中的应用。

关键词: 生物酶; 生物酶解技术; 提取; 中药; 纤维素酶; 果胶酶

中图分类号: R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2010)05 - 0000 - 05

Application of biological enzymatic hydrolysis technology to extraction of traditional Chinese medicine

YU Jing, ZHOU Jing

(Pharmaceutical College, Tianjin Medicine University, Tianjin 300070, China)

Abstract: Enzymolysis can selectively destroy plant cell walls, thus components in the plant cells can be dissolved easily. So biological enzymatic hydrolysis technology has been used to extract active constituents of traditional Chinese medicine. Biological enzymatic hydrolysis technology has many advantages, such as high extraction efficiency, less thermal decomposition of components, low cost, conventional extraction machinery and potential for large industrialized production. Biological enzymatic hydrolysis technology has been used in the extraction of polysaccharides, alkaloids, flavonoids, saponins, proteins, organic acids and so on. Compared with traditional extraction technology, it has more obvious advantages. This article sums up the application of biological enzymolysis technology in extraction of traditional Chinese medicine.

Key words: biological enzyme; biological enzymatic hydrolysis technology; extraction; traditional Chinese medicine; cellulase; pectinase

酶的作用具有高度专一性、极强的催化活性以及作用条件温和等特点。20世纪中叶, 酶化学与多学科的相互渗透得到了迅速发展, 在医药与食品领域发挥作用, 国内外学者将蛋白酶等应用到动物药以及水产品的加工与生产中, 使蛋白质水解成人体容易吸收的肽类与氨基酸, 并取得了丰硕的成果。如, 日本的 Hiroyuki 等从鳀鱼 (bonito) 的蛋白质水解物中提取出一种具有血管紧张素转化酶 (ACE)

抑制作用的多肽, 其 ACE 抑制效果非常明显。法国的 Rozenn 等从鳕鱼 (cod) 的蛋白质水解物中提取出一种具有促进动物生长的多肽物质^[1]。Taylor 等^[2]将制革过程中产生的含铬的胶原蛋白废弃物经过除铬处理后, 用多种酶水解得到胶原多肽, 提高了制革厂的利润。自 20 世纪 90 年代开始, 国内许多学者将酶的特性与生物细胞的结构联系起来, 陆续开展了将生物酶用于天然药物及中药的辅助提取

基金项目 天津市科技攻关项目 (06YFGPSH02900)

* 通讯作者 周晶, Tel: 13920680193, E-mail: zhoujing@tjmu.edu.cn

中,以期达到提高有效成分浸出率的目的^[3]。综述了生物酶解辅助提取中药成分的机制、近年来该技术在多糖、生物碱、黄酮类、皂苷类、有机酸类、蛋白质及肽类等中药成分提取中的应用。

1 生物酶解辅助提取中药成分的机制

植物药中大多生物活性成分存在于细胞内,少量存在于细胞间隙。植物细胞壁主要是由纤维素、半纤维素、果胶质等大分子组成,植物中小分子化学成分渗透到溶液中,必须穿透植物细胞壁的障碍。新鲜药材经干燥后,组织内的水分蒸发,细胞逐渐萎缩。这时,在细胞液泡中溶解的活性成分等物质呈结晶或无定形状态沉积于细胞内,使细胞形成空腔,细胞质膜的半透性丧失,导致了细胞内的成分溶出障碍。

中药的生物酶辅助提取法是在传统提取方法的基础上,根据植物药材细胞壁的构成,利用酶反应所具有的极高催化活性和高度专一性等特点,选择相应的生物酶,将细胞壁的组成成分纤维素、半纤维素、果胶质等水解,从而使植物细胞内有效成分更容易溶解、扩散的一种提取方法。

2 生物酶解辅助技术在提取中药成分中的应用

目前,在生物酶法辅助提取中药方面,研究较多的是纤维素酶、果胶酶以及各种蛋白酶等,这些酶可以选择性地破坏植物细胞壁,有利于多糖、生物碱、皂苷、黄酮、萜类、挥发油、蛋白质及有机

酸等多种生物活性成分的提取,实验表明酶法不失为一种最大限度地从植物体内提取有效成分的方法之一。

2.1 多糖

多糖在植物中存在非常普遍,近年来的研究发现多糖具有增强机体免疫力、降血糖、抗肿瘤等多方面的生物活性,目前提取多糖大多采用水提醇沉的方法。通过增加生物酶解的步骤,可以大大提高多糖的浸出率,与传统方法相比显示出酶解技术的优势。表1为酶解法在植物多糖提取中的应用实例^[4-10]。

2.2 生物碱

生物碱的提取一般多采用酸水法、乙醇提取法等。目前已利用生物酶解辅助提取技术提取黄连、黄柏、贝母、山豆根等中药中的生物碱,而且由于大多数生物碱结构中无苷键的存在,不存在被酶水解的问题。如,采用由黑曲霉菌株产生的纤维素酶辅助提取贝母总生物碱,比较未加酶和加酶两种工艺的有效成分提取率,发现贝母总生物碱收率由原来的0.0765%上升到0.1065%,提高了39.2%^[11]。长春碱是从夹竹桃科植物长春花中提取的一种具有显著抗癌活性的二聚吲哚类生物碱,是合成其他长春碱类抗肿瘤药物的主要原料。张福维等^[12]采用加入药材量1.5%纤维素酶、1%果胶酶,8倍量水,在pH为4.5、50℃条件下,酶解4h,可使长春碱的提取率达到0.48%。梁柏林等^[13]采用30mg/g纤维素酶,在40℃、pH4.0的条件下酶解黄连90min,对酶法提取小檗碱与传统乙醇浸提法进行比较。结果表明,酶法提取工艺比传统乙醇浸提法小檗碱产量提高了49%。

表1 酶解法在植物多糖提取中的应用

植物多糖	酶种类	未加酶法提取率/%	酶解法提取率/%
南瓜多糖 ^[4]	纤维素酶 + 果胶酶	16.73	25.94
袖珍菇多糖 ^[5]	木瓜蛋白酶	0.80	1.56
香菇多糖 ^[6]	纤维素酶 + 木瓜蛋白酶	6.64	12.90
党参多糖 ^[7]	纤维素酶 + 果胶酶	—	26.47
黄芪多糖 ^[8]	纤维素酶	3~4	9.78
乌龙茶多糖 ^[9]	纤维素酶	4.7	6.2
玉米须多糖 ^[10]	纤维素酶	2.9	5.7

2.3 黄酮类

黄酮类化合物提取多采用煎煮、浸渍、回流等方法,如果在传统提取方法之前,通过生物酶解处理,能达到提高提取率、缩短周期、降低成本的效果。表

2为酶解法在黄酮类化合物提取中的应用^[14-20]。

2.4 皂苷类

生物酶解技术在人参、三七、黄芪、甘草、麦冬、知母、山茱萸、薯蓣、酸枣仁、苦瓜、葫芦巴、

穿山龙等中药的皂苷提取中均有应用。

宋宏新等^[21]采用半仿生- α -淀粉酶酶解法提取三七总皂苷的最佳提取条件为 70 °C、提取 2.5 h, 料液比为 1:10。三七总皂苷的得率达 11.96%, 比乙醇回流法提高了 42.7%。王颖莉等^[22]利用 SPE-001 植物复合酶强化回流提取远志总皂苷, 加入药材量 0.4% 复合酶、55 °C 酶解 0.5 h, 然后回流提取 1 h, 远志总皂苷的提取率可达 2.06%。而 75% 的乙醇连续索氏提取 3 h, 远志总皂苷提取率为 1.75%。张黎明^[23]采用酶解法提取薯蓣皂苷元, 料液比为 1:14, 纤维素酶(每克原料用酶 10 U、pH

为 4.6、45 °C) 酶解 6 h 为最佳工艺条件。在此基础上考察了酶解结合水浸提法对皂苷元提取率的影响, 发现酶解后升温至 90~100 °C, 保温水浸提 70 min, 与水浸提法相比可使薯蓣皂苷元的提取率由 83.8% 提高到 92.9%。吕立华等^[24]以甾体菝葜皂苷元的提取率为指标, 应用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计优化了知母中甾体皂苷元的纤维素酶法提取工艺, 得到影响酶法提取甾体皂苷元的主次因素为: 酶用量 > 提取温度 > 固液比 > 水解时间; 加酶后甾体皂苷元提取率的平均值为 84.6%, 而未加酶的结果则为 58.1%。

表 2 酶解法在黄酮提取中的应用

黄酮	酶种类	未加酶法提取率/%	酶解法提取率/%
槐米总黄酮 ^[14]	内生青霉菌纤维素酶	8.8	12.2
白菊黄酮 ^[15]	纤维素酶	1.56	1.86
黄芪总黄酮 ^[16]	纤维素酶	—	0.40
银杏叶总黄酮 ^[17]	纤维素酶	1.62	2.51
红景天总黄酮 ^[18]	复合纤维素酶	15.5	29.0
银杏黄酮 ^[19]	纤维素酶	—	3.26
沙枣果肉黄酮 ^[20]	纤维素酶 + 果胶酶	0.11	0.15

2.5 有机酸类

绿原酸具有抗菌、降压、利尿、镇静、安眠等功效, 很多中药都含有绿原酸。张凌裳等^[25]用生物酶解和超声波提取相结合的方法得到杜仲叶中绿原酸提取的最佳工艺条件为: 溶剂 pH 为 5.0、酶解温度为 40 °C、料液比为 1:10、超声时间为 30 min, 在此条件下绿原酸提取率可达 3.05%。酶法和超声波法结合提取, 其绿原酸提取率比单一酶解高出 5.54%, 比超声波提取高出 16.68%。林丹等^[26]分别采用水提法、水提醇沉法、酶解法、醇提法提取金银花中的绿原酸, 发现醇提法较好, 绿原酸的量可达到 15.28%; 以提取物的得率作为指标来考察, 以酶解法为最好, 提取物的得率可达 37.91%。陈永胜等^[27]优化葵花粕中绿原酸的提取工艺, 得出最合适的工艺参数为 6 mL 纤维素酶、1.5 mL 蛋白酶、50 °C 酶解 1 h, 绿原酸提取率达到 1.90%。

2.6 蛋白质、肽类

生物酶解技术用于蛋白质的研究最早应用于食品行业。在动植物组织内蛋白质与多糖结合, 难于提取, 尤其在强酸、强碱及高温条件下, 蛋白质容易变性, 所以提取蛋白质多是在温和条件下, 若采用酶解技术, 可在温和的条件下提高蛋白质的浸

出率。

蜂花粉壁可分为外壁和内壁, 外壁主要为纤维素、孢粉素等, 内壁则由果胶质、纤维素、半纤维素等组成^[28]。未经破壁的花粉结构致密, 内含的生物活性物质释放慢且不完全。采用 1% 纤维素酶、0.2% 果胶酶、1% 木聚糖酶、加水量为蜂花粉质量的 2 倍、pH 为 5、50 °C 酶解 6 h。实验测得蜂花粉平均破壁率为 94.5%, 粗蛋白平均提取率为 47.6%。

马立芹等^[29]研究了用木瓜蛋白酶与中性蛋白酶水解马鹿茸血制备活性肽的条件, 并初步探讨了此活性肽的免疫活性与对 DPPH 自由基清除能力之间的关系。实验结果表明: 当 [E/S] 为 9 000 U/g 时, 中性蛋白酶和木瓜蛋白酶的水解温度分别为 50、45 °C, pH 分别为 7.1、6.8, 分别水解 2、1.5 h 可以获得最佳的酶解效果。在相同蛋白量的情况下, 两酶复合水解物的淋巴细胞增殖率比单酶水解增加了 20.8%; 免疫活性与 DPPH 自由基清除能力之间存在一定的相关性 ($r=0.957$, $P<0.01$)。

2.7 挥发油

提取挥发油的方法有水蒸气蒸馏法、超临界流体萃取法、微波协助提取法等, 由于后两种提取方法对仪器设备有特殊要求, 限制了它们在生产中的

应用。目前,将生物酶解辅助提取与常规的水蒸气蒸馏法结合,从鱼腥草、益母草、菊花、没药、卷柏、松针等药材中提取挥发油,得到较高的挥发油收率。

回瑞华等^[30]利用气相色谱-质谱法(GC-MS)分析卷柏提取物,并比较了酶解法与常规法提取的挥发油收率及组分比例。其中酶解-水蒸气蒸馏法提取挥发油的收率是水蒸气蒸馏法的2.04倍。陈华等^[31]采用纤维素酶提取法(CE)和水蒸气蒸馏提取法(DSE)对没药挥发油成分进行比较研究,实验测得水蒸气蒸馏-萃取法提取没药挥发油1.1g,产率为2.2%,分离鉴定出38种成分,占挥发油总量的69.75%;经纤维素酶提取的没药挥发油2.1g,产率为6%,分离鉴定出34种成分,占挥发油总量的70.05%。纤维素酶提取所得的没药油收率比未经酶处理所得的没药油收率提高近3倍,由此可见,通过纤维素酶破坏植物细胞壁,有利于挥发油的提取与分离。

2.8 萜类

萜类物质是在自然界中分布最多的一类天然产物,而且许多萜类物质表现出较显著的生物活性,除了三萜皂苷类用到生物酶解辅助提取之外,该技术在其他萜类,如杜仲叶、栀子中的环烯醚萜、穿心莲及甜叶菊中的二萜类物质也有应用,而且有的在生产中获得了比较好的应用效果。

马桔云等^[32]探索以纤维素酶提取穿心莲内酯,结果表明加酶法穿心莲内酯提取率为0.321%,未加酶法提取率为0.252%,纤维素酶法使穿心莲内酯的提取率提高了27.4%。

综上,中药的生物酶解辅助提取法比起传统溶剂提取方法,具有下列显著优点:1)较大幅度提高了药材中有效成分的浸出率;2)减少对热敏性成分的破坏,对中药成分影响小;3)生物酶可降解淀粉、果胶、半纤维素、木质素等植物中高聚物成分,便于中药提取液的滤过,使其液体制剂质量更稳定;4)生物酶解法用于中药的提取分离,操作简便、耗能低、降低生产成本,并具备大规模生产的可行性。

3 小结

生物酶解技术在中药的提取中虽然已经取得了较快的进展,但是国内大多数的研究主要集中在利用市场上已有的酶进行工艺条件的探索,缺少针对中药提取用酶以及酶的生产技术方面的研究,对酶

法提取中药的研究主要还是停留在实验室水平上,且主要针对某些单味药进行简单的工艺条件试验,还没有将酶提取技术推广到工业化生产以及在复方制剂的应用中。

因此,要将酶工程技术广泛应用于中药以及复方制剂提取中需要在以下5个方面重点加强其基础和应用研究:1)研究适于中药提取的产酶微生物的筛选技术,筛选更多品种的产酶微生物,扩大酶的应用范围。2)建立中药提取过程的酶功能的快速评价技术,探索适于中药提取用酶的精制、固定化生产等技术,降低生物酶法提取成本。3)需进一步研究不同中药选择生物酶类的依据,开发出新型的生物酶解反应装置,严格准确地控制酶解反应条件,最大限度地提高中药成分的浸出率和有效成分的转化率。4)建立药液中的残留酶以及细胞壁酶解产物的除去方法与检测指标,以保证提取液与中药制剂的稳定性与质量。5)加强生物酶处理的工业化生产技术和生物酶解技术在复方制剂提取工艺中的应用研究。

通过这些研究的开展,建立强化中药提取高效率的生物酶制剂的最适利用途径和生产方法,从而实现中药材的高效酶辅助提取,降低生产成本,实现工业化生产。因此,酶工程技术对中药有效成分的提取中具有潜在的工业应用价值,在中药现代化的研究中具有广阔的应用前景和发展潜力。

参考文献

- [1] 林伟锋,赵谋明,姚额才.应用酶技术开发利用海洋食品资源[J].分析检测,2002,24(3):1-3.
- [2] Taylor M M, Cabeza L F, Marmer W N, et al. Preparation of high molecular weight products by crosslinking protein isolated from the enzymatic processing of chromium containing collagenous waste [J]. Leather Sci Eng, 2005, 15(2): 3-7.
- [3] 刘明言,王帮臣.用于中药提取的新技术进展[J].中草药,2010,41(2):169-175.
- [4] 赵玉,徐雅琴,崔崇士.超声波协同复合酶法提取南瓜多糖最佳条件的研究[J].农产品加工学刊,2009(7):13-15.
- [5] 刘青娥.酶法提取袖珍菇多糖工艺的研究[J].食品研究与开发,2008,29(2):53-57.
- [6] 刘宁,李健.香菇多糖的提取工艺比较[J].食品科学,2007,28(9):199-201.
- [7] 周大寨,朱玉昌,黄卫,等.复合酶法提取板党多糖的研究[J].时珍国医国药,2009,20(8):1928-1929.
- [8] 陈学伟,马书林.酶法提取黄芪多糖的研究[J].上海中医药

- 杂志, 2005, 39 (1): 56-58.
- [9] 张元, 林强, 崔玉梅, 等. 乌龙茶多糖的酶法提取及降血糖活性初步研究[J]. 中国现代应用药学杂志, 2008, 25 (4): 286-288.
- [10] 魏静娜, 林强, 朱宏吉. 玉米须多糖提取方法的比较研究[J]. 中药材, 2007, 30 (1): 92-94.
- [11] 魏金莹, 朱宏吉, 魏静娜, 等. 酶法提取贝母中总生物碱的工艺研究[J]. 中草药, 2007, 38 (9): 1344-1346.
- [12] 张福维, 关崇新, 李学成, 等. 酶浸提取法对北豆根生物碱产率的影响[J]. 中成药, 2006, 28 (10): 1420-1422.
- [13] 梁柏林, 周民杰. 酶法提取小檗碱工艺研究[J]. 应用化工, 2006, 35 (5): 373-375.
- [14] 许云峰, 周建芹, 陈晶磊, 等. 内生青霉菌纤维素酶辅助提取槐米总黄酮[J]. 生物加工过程, 2009, 7 (2): 18-22.
- [15] 项雷文, 陈文韬. 纤维素酶法提取杭白菊中总黄酮工艺优化[J]. 化学工程与装备, 2009, 5: 26-29.
- [16] 贲永光, 丘泰球, 李坤平, 等. 纤维素酶法提取黄芪总黄酮的工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20 (10): 2478-2480.
- [17] 丁兴红, 孙杰, 喻治霞, 等. 纤维素酶辅助提取银杏叶总黄酮的工艺条件[J]. 林业科技开发, 2009, 23 (4): 66-68.
- [18] 毕会敏, 张守勤, 刘长姣. 纤维素酶提取红景天总黄酮的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 818-821.
- [19] 欧阳娜娜, 李湘洲. 酶解-溶剂联合提取银杏黄酮的工艺研究[J]. 中药材, 2009, 2: 279-283.
- [20] 孙萍, 马彦梅, 廉宜君, 等. 正交试验优化沙枣果肉中黄酮的酶辅助提取研究[J]. 中草药, 2009, 40 (增刊): 165-167.
- [21] 宋宏新, 刘静, 张彦娟. 半仿生酶法提取三七皂苷工艺研究[J]. 中草药, 2009, 40 (6): 905-907.
- [22] 王颖莉, 张丹丹. 复合酶法提取远志总皂苷的工艺研究[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2009, 11 (6): 885-888.
- [23] 张黎明, 张露亿, 杜连祥. 酶解法提取胡芦巴种子中薯蓣皂苷元的工艺研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21 (2): 161-164.
- [24] 吕立华, 周效思, 彭艳梅. 纤维素酶法提取知母甙体总皂苷元工艺研究[J]. 中医药导报, 2007, 13 (10): 73-75.
- [25] 张凌裳, 王红连, 杜郭君, 等. 杜仲叶粉提取绿原酸工艺的优化[J]. 安徽农业科学, 2009, 37 (17): 8162-8164.
- [26] 林丹, 赵国玲, 刘佳佳. 金银花不同提取方法的绿原酸比较研究[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15 (2): 124-126.
- [27] 陈永胜, 李志光, 董建国. 酶解法提取葵花粕绿原酸工艺研究[J]. 食品科学, 2008, 29 (2): 202-204.
- [28] 杨义雄, 王宫. 多酶体破壁提取蜂花粉中活性蛋白的工艺研究[J]. 福建中医学院学报, 2009, 19 (3): 24-26.
- [29] 马立芹, 乐国伟, 钱佳, 等. 马鹿茸血免疫活性肽的制备及其活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21 (1): 125-128, 182.
- [30] 回瑞华, 侯冬岩, 刘晓媛, 等. 卷柏中挥发性组分的酶提取及气相色谱-质谱分析[J]. 质谱学报, 2006, 27 (1): 17-21.
- [31] 陈华, 辛广, 张兰杰, 等. 没药中挥发性成分的酶提取及GC/MS分析[J]. 质谱学报, 2007, 28 (3): 153-158.
- [32] 马桔云, 吕芳, 于喜水, 等. 纤维素酶用于中药穿心莲提取的初步研究[J]. 黑龙江医药, 2000, 13 (1): 16-17.

(收稿日期 2010-07-22)

(上接第332页)

5 小结

综上所述, 药品中的杂质是否能被全面准确地控制, 直接关系到药品的质量可控与安全性。杂质研究应关注杂质检测方法的选择与验证, 注意对研究过程中所有批次样品, 包括安全性试验或临床试验样品、各种生产规模的样品中的杂质进行完整的记录, 这些数据是制订杂质限度的重要依据。杂质限度的确定要综合考虑杂质的安全性、生产过程的可行性、合理性与产品的稳定性。仿制药品的杂质研究要注意与已上市产品进行质量对比研究, 以求证与上市产品物质基础的一致性, 充分保证药品的安全性。

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局. 化学药物杂质研究的技术指导原则[S]. 2005: 17-27.
- [2] ICH. Harmonized Tripartite Guideline: Impurities in New drug substances, Q3A (R). 2002: 1-10.
- [3] ICH. Harmonized Tripartite Guideline: Impurities in New drug substances, Q3B (R). 2003: 1-11.
- [4] FDA. Guidance for Industry Drug Product Chemistry, Manufacturing, and Controls Information [J/OL]. [2007-05-30]. <http://www.fda.gov/cder/guidance>.
- [5] EMEA. Guideline on the limits of genotoxic impurities [S/OL]. [2009-11-17]. <http://www.emea.eu.int>. TGA. Guidelines for the Registration of Drugs [S]. Vol.1, Appendix 10, 1994: 5-24.

(收稿日期 2010-08-25)