

## 苦杏仁中苦杏仁酶的闪式提取工艺研究

韩冰<sup>1</sup>, 郑礼胜<sup>2</sup>, 刘向前<sup>3,4\*</sup>, 邹亲朋<sup>4</sup>

1. 上海市闵行区中心医院, 上海 201100

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 湖南中医药大学 药学院, 湖南 长沙 410208

4. 中南大学 化学化工学院, 湖南 长沙 410083

**摘要:** **目的** 建立苦杏仁中苦杏仁酶的闪式提取工艺, 并对其工艺条件进行优化。 **方法** 以苦杏仁酶总活力为指标, 考察了氨水浓度、提取液用量、提取时间、中和终点 pH 值和沉淀时乙醇体积分数对闪式提取工艺的影响; 采用二硝基水杨酸(DNS)法测定苦杏仁酶的比活力, 并计算其总活力。 **结果** 苦杏仁酶的最佳提取工艺条件为: 取 50.0 g 脱脂苦杏仁粉, 使用 500 mL 62.5 mmol/L 预冷氨水提取 120 s 后, 残渣再使用 450 mL 提取液提取 90 s, 滤过, 滤液用 36% 醋酸调 pH 4.0, 滤去杂蛋白后加入 4 倍量乙醇, 沉淀苦杏仁酶。 **结论** 采用闪式提取法改进了苦杏仁酶的提取工艺, 并对该工艺进行了优化, 得出了较优的闪式提取条件。该工艺具有周期短、操作简便、酶活力高等优点, 提取效果优于传统方法。

**关键词:** 苦杏仁; 苦杏仁酶; 酶活力; 闪式提取; 二硝基水杨酸法; 工艺优化

中图分类号: R282.71 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2011)02-0134-05

## Smashing tissue extraction technology of emulsin from *Armeniacae Amarum Semen*

HAN Bing<sup>1</sup>, ZHENG Li-sheng<sup>2</sup>, LIU Xiang-qian<sup>3,4</sup>, ZOU Qin-peng<sup>4</sup>

1. Minhang District Central Hospital, Shanghai 201100, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

4. College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China

**Abstract:** **Objective** To establish and optimize the extraction technology of emulsin from *Armeniacae Amarum Semen* using smashing tissue extraction method. **Methods** These factors, such as ammonia concentration, the amount of extract, extraction time, terminal point pH value of counteraction, and the volume fraction of ethanol for precipitation influencing on the extraction process of smashing tissue extraction were investigated by using total enzymatic activity of emulsin as index. The specific enzymatic activity of emulsin was determined by dinitrosalicylic acid (DNS) method, and the total enzymatic activity was calculated. **Results** The optimum extraction conditions were as following: 50.0 g powder of defatted *Armeniacae Amarum Semen* was extracted with 500 mL 0.062 5 mol/L pre-cooling ammonia for 120 s. The mixture was filtrated by gauzes and the residue was extracted with 450 mL extract for 90 s again. Collected the filtrate, adjusted its pH value to 4.0 by acetic acid, filtered hybrid protein, and precipitated the emulsin by four times the amount of ethanol. **Conclusion** The smashing tissue extraction is used to improve the extraction technology of emulsin from *Armeniacae Amarum Semen* for the first time, and the conditions of the new technology are optimized by determining the specific activity of emulsin. The results show that smashing tissue extraction has the advantages of short time, simple operation, and higher enzymatic activity, which is better than traditional extraction method.

**Key words:** *Armeniacae Amarum Semen*; emulsin; enzymatic activity; smashing tissue extraction; dinitrosalicylic acid (DNS) method; technology optimization

苦杏仁酶又称苦杏仁苷酶, 是从植物中得到的主要含  $\beta$ -葡萄糖苷酶、 $\beta$ -D-半乳糖苷酶等糖苷酶的

粗酶制剂的总称<sup>[1-2]</sup>, 主要用于水解苦杏仁苷。目前苦杏仁酶的制备主要采用氨水冷浸乙醇沉淀法<sup>[3]</sup>,

收稿日期: 2010-11-07

作者简介: 韩冰 (1967—), 男, 山东临沂人, 副主任医师, 1990年毕业于山东医科大学药理学系, 先后工作于上海市闵行区药品检验所、上海市闵行区中心医院药剂科, 研究方向: 临床药学、中药制剂与药理。Tel: 18918169079 E-mail: xiangenh@163.com

\*通讯作者 刘向前, 男, 教授, 研究方向为中药和天然产物的活性成分。Tel: (0731)88995848 E-mail: lxq0001cn@163.com

但是耗时长,溶剂使用量大。近年来,闪式提取技术对氨基酸、蛋白质、萜类、脂肪酸、皂苷类和黄酮类成分的提取研究表明其具有缩短提取时间、提高提取效率、简化操作步骤的特点<sup>[4-11]</sup>。因此本实验采用闪式提取技术制备苦杏仁酶,考察氨水浓度、提取液用量、提取时间、pH值、乙醇体积分数等对提取工艺的影响,采用紫外-可见分光光度法作为检测手段,使用二硝基水杨酸(DNS)法测定苦杏仁酶的比活力,并以此为评价指标,确定最佳工艺条件。

## 1 仪器与材料

JHBE—20A型闪式提取器(北京金鼐科技有限公司);752型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);PHS—3C型精密pH计(上海精密科学仪器有限公司);AS 3120A型超声波清洗机(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);FZ102中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);HH—S4型电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司);SC—208A立式冷藏展示柜(河南新飞电器有限公司);TG 328A光学读数分析天平(湘仪天平仪器厂)。

苦杏仁(含皮,未炮制)由长沙高新技术产业开发区博海生物科技有限公司代购(批号20081219),经湖南中医药大学刘向前教授鉴定为蔷薇科植物山杏 *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. 的干燥成熟种子;醋酸钠等均为分析纯,DNS为化学纯;水为重蒸水。

## 2 方法

### 2.1 脱脂苦杏仁粉的制备

将苦杏仁粉碎,过20目筛,加适量乙醚后,放入立式冷藏展示柜中,低温浸泡脱脂,12h后低温纱布滤过,重复脱脂1次,滤渣于通风厨中晾干,备用。

### 2.2 苦杏仁酶的闪式提取工艺

称取干燥脱脂苦杏仁粉50.0g,加入一定体积分数的预冷氨水适量,苦杏仁粉完全浸湿后,闪式提取一定时间,纱布滤过,滤渣再用适量预冷氨水闪式提取1次;合并滤液,缓缓加入36%醋酸中和至一定pH值,边加边搅拌;静置片刻,上层澄清液抽滤,下层混悬液3600r/min离心5min,收集滤液,合并两部分滤液并测定体积;加入乙醇适量,立式冷藏展示柜中静置过夜;抽滤,收集沉淀,用乙醇洗涤沉淀表面,冷藏干燥后,即得苦杏仁酶。

### 2.3 苦杏仁酶比活力的测定

黄色的DNS溶液与还原糖溶液共热后被还原成棕红色的3-氨基-5-硝基水杨酸,在一定范围内,还原糖的量与棕红色物质颜色深浅的程度成比例关系,可用于比色测定。苦杏仁酶活力的大小与其水解产生的还原糖的量呈正比,将每小时由底物生成1μmol葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位(U),每毫克苦杏仁酶具有的酶活力定义为比活力(U/mg),则可使用比色法测定苦杏仁酶作用于水杨苷后生成的葡萄糖的量,根据葡萄糖量、酶的加入量和反应时间即可计算出酶的比活力。

**2.3.1 葡萄糖溶液的配制** 精密称取经100~105℃干燥至恒定质量的分析纯葡萄糖498.4mg,置500mL量瓶中,用0.05mol/L醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.0)定容,即得质量浓度为996.8μg/mL葡萄糖溶液。

**2.3.2 DNS溶液的配制** 称取DNS 4.0g、亚硫酸钠1.5g、苯酚2.0g、NaOH 10g、酒石酸钾钠100g,加适量蒸馏水,超声溶解,冷却后定容于500mL棕色量瓶中,即得DNS溶液。立式冷藏展示柜中放置1周后使用。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 取闪式提取样品适量,精密称定,分别加入0.05mol/L醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.0)适量,超声溶解,配制成1.0mg/mL溶液,抽滤去除杂质和不溶蛋白,即得。

**2.3.4 线性关系考察** 分别吸取996.8μg/mL葡萄糖溶液0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7mL于10mL量瓶中,各加0.05mol/L醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.0)至1.0mL,再各加入1.0mL DNS溶液,混匀后沸水浴5min,冷却后定容,于540nm波长测定吸光度值。以吸光度值为纵坐标,质量浓度为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=0.01638X-0.09686$ , $R^2=0.9998$ ,表明葡萄糖在9.968~69.776μg/mL线性关系良好。

**2.3.5 精密度试验** 取996.8μg/mL葡萄糖溶液0.5mL,置10mL量瓶中,加0.05mol/L醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.0)至1.0mL,再加入1.0mL DNS溶液,混匀后沸水浴5min,冷却后定容,于540nm波长下测定吸光度值,连续测定6次,结果RSD为1.21%。

**2.3.6 稳定性试验** 取996.8μg/mL葡萄糖溶液0.5mL,置10mL量瓶中,加0.05mol/L醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.0)至1.0mL,再加入1.0mL DNS溶液,混匀后沸水浴5min,冷却后定容,分别于0、

10、20、30、40、60 min 测定 540 nm 波长下吸光度值, 结果 RSD 为 1.87%。

**2.3.7 重现性试验** 取样品 6 份, 制备供试品溶液, 在 540 nm 波长下测定吸光度值, 计算样品中苦杏仁酶的比活力, 结果其 RSD 为 1.45%。

**2.3.8 加样回收率试验** 取同一样品 9 份, 精密称定, 平均分为 3 组, 向各组分别加入 996.8  $\mu\text{g/mL}$  葡萄糖溶液 8、10、12 mL, 制备供试品溶液, 计算苦杏仁酶的比活力, 结果平均回收率为 98.26%, RSD 为 1.37%。

**2.3.9 样品测定** 取各样品适量, 精密称定, 分别加入 0.05 mol/L 醋酸 - 醋酸钠缓冲液 (pH 5.0) 适量, 超声溶解, 配制成 1.0 mg/mL 溶液, 抽滤去除杂质和不溶蛋白。以 0.05 mol/L 醋酸 - 醋酸钠缓冲液 (pH 5.0) 作为空白对照, 分别吸取供试品溶液适量, 用缓冲液补充至 0.5 mL, 加入 DNS 溶液 0.5 mL, 混匀后在 50  $^{\circ}\text{C}$  水浴箱中保温 30 min, 立即取出, 加入 1.0 mL DNS 溶液, 混匀后沸水浴 5 min, 冷却后定容至 10 mL, 在 540 nm 波长下测定吸光度值, 并由回归方程求出葡萄糖的量, 根据酶比活力 = (葡萄糖质量  $\times$  1 000) / (反应中加入酶质量  $\times$  时间  $\times$  180.154 8) 计算样品中苦杏仁酶的比活力。由苦杏仁酶提取量及其比活力, 根据酶总活力 = (酶比活力  $\times$  酶提取质量) 计算出样品中苦杏仁酶的总活力。

## 2.4 闪式提取工艺的优化

**2.4.1 氨水浓度的确定** 在干燥脱脂苦杏仁粉 50.0 g、使用 400 mL 提取液提取 120 s、滤渣再用 350 mL 提取液提取 90 s、中和终点 pH 4.0、醇沉时乙醇体积分数为 80% 的条件下, 按 2.2 项操作, 分别考察氨水浓度为 50.0、62.5、75.0、90.0、100.0 mmol/L 时苦杏仁酶的比活力和总活力, 结果见表 1。

表 1 氨水浓度对苦杏仁酶比活力和总活力的影响

Table 1 Effect of ammonia concentration on specific enzymatic activity and total enzymatic activity of emulsin

氨水浓度/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	酶提取 量/g	比活力/ (U·mg <sup>-1</sup> )	总活力/U
50.0	0.876 1	57.425	50 310.0
62.5	1.527 5	59.885	91 474.3
75.0	1.143 9	56.744	64 909.5
90.0	1.671 1	48.292	80 700.8
100.0	1.385 3	43.965	60 904.7

**2.4.2 提取液用量的确定** 由于闪式提取装置的限制, 提取液用量不能太少, 故考察 2 次提取液氨水加入量分别为 300、300 mL, 400、350 mL, 500、450 mL, 600、550 mL。取干燥脱脂苦杏仁粉 50.0 g, 氨水浓度为 62.5 mmol/L, 提取时间第 1 次为 120 s, 第 2 次为 90 s, 中和终点 pH 4.0, 醇沉时乙醇体积分数 80%, 按 2.2 项下操作, 结果见表 2。

表 2 提取液用量对苦杏仁酶比活力和总活力的影响

Table 2 Effect of amount of extract on specific enzymatic activity and total enzymatic activity of emulsin

提取液用量/mL		酶提取 量/g	比活力 (U·mg <sup>-1</sup> )	总活力/U
第 1 次	第 2 次			
300	300	1.277 4	58.993	75 357.7
400	350	1.527 5	59.885	91 474.3
500	450	1.600 7	62.007	99 254.6
600	550	1.594 4	59.046	94 142.9

**2.4.3 提取时间的确定** 在称取干燥脱脂苦杏仁粉 50.0 g、氨水浓度为 62.5 mmol/L、两次提取液用量分别为 400、350 mL、中和终点 pH 4.0、醇沉时乙醇体积分数为 80% 的条件下, 按 2.2 项操作, 分别考察两次提取时间为 90、60 s, 120、90 s, 150、120 s, 180、150 s 时苦杏仁酶的比活力和总活力, 结果见表 3。

表 3 提取时间对苦杏仁酶比活力和总活力的影响

Table 3 Effect of extracting time on specific enzymatic activity and total enzymatic activity of emulsin

提取时间/s		酶提取量 /g	比活力 (U·mg <sup>-1</sup> )	总活力 /U
第 1 次	第 2 次			
90	60	0.993 8	52.776	52 448.8
120	90	1.527 5	59.885	91 474.3
150	120	1.497 5	47.544	71 197.1
180	150	1.703 2	42.317	72 074.3

**2.4.4 中和终点的确定** 在称取干燥脱脂苦杏仁粉 50.0 g、氨水浓度为 62.5 mmol/L、使用 400 mL 提取液提取 120 s、再使用 350 mL 提取液提取 90 s、醇沉时乙醇体积分数为 80% 的条件下, 按 2.2 项操作, 分别考察醋酸中和到 pH 3.6、3.8、4.0、4.2、4.4 时苦杏仁酶的比活力和总活力, 结果见表 4。

**2.4.5 醇沉时乙醇体积分数的确定** 在干燥脱脂苦杏仁粉 50.0 g、氨水浓度为 62.5 mmol/L、使用 400 mL 提取液提取 120 s、再使用 350 mL 提取液提取

90 s、中和终点 pH 4.0 的条件下,按 2.2 项操作,考察乙醇体积分数分别为 50%、60%、70%、80%、85%时苦杏仁酶总活力,结果见表 5。

表 4 中和终点 pH 对苦杏仁酶比活力和总活力的影响

Table 4 Effect of terminal point pH value on specific enzymatic activity and total enzymatic activity of emulsin

中和终点pH	酶提取量/g	比活力/ (U·mg <sup>-1</sup> )	总活力/U
3.6	0.571 2	50.299	28 730.8
3.8	0.963 4	55.828	53 784.7
4.0	1.527 5	59.885	91 474.3
4.2	1.145 1	54.001	61 836.5
4.4	1.921 0	45.269	86 961.7

表 5 乙醇体积分数对苦杏仁酶比活力和总活力的影响

Table 5 Effect of volume fraction of ethanol on specific enzymatic activity and total enzymatic activity of emulsin

乙醇体积 分数/%	酶提取量 /g	比活力 /(U·mg <sup>-1</sup> )	总活力/U
50	0.414 4	56.699	23 496.1
60	0.866 3	54.991	47 638.7
70	1.434 3	58.126	83 370.1
80	1.557 7	57.577	89 687.7
85	1.299 4	55.009	71 478.7

**2.4.6 最佳提取工艺确定** 从比活力测定结果看,当氨水浓度超过 75.0 mmol/L 时,苦杏仁酶的比活力呈下降趋势,浓度为 62.5 mmol/L 时酶比活力较高;提取液用量对酶比活力没有明显影响;与两次提取时间分别为 120、90 s 组相比,90、60 s 组酶比活力要低,可能是提取时间不够,而 150、120 s 组与 180、150 s 组酶比活力却明显呈下降趋势,可能与闪式提取时的高速搅拌破碎可使溶液温度迅速升高有关;中和终点偏离 pH 4.0,酶的比活力均降低;沉淀时的乙醇体积分数对酶比活力没有明显影响,但超过 80%时,酶总活力却下降。因此,优化出的苦杏仁酶最佳提取工艺为:干燥脱脂苦杏仁粉 50.0 g,加入 500 mL 62.5 mmol/L 预冷氨水,苦杏仁粉完全浸湿后,闪式提取 120 s;纱布滤过,收集滤液,滤渣再用 450 mL 62.5 mmol/L 预冷氨水闪式提取 90 s;合并两次滤液,缓缓加入 36%醋酸中和到 pH 4.0,边加边搅拌,静置片刻,上层澄清液抽

滤,下层混悬液 3 600 r/min 离心 5 min,收集滤液,合并两部分滤液并测定体积,加入乙醇适量,使乙醇体积分数达到 80%,立式冷藏展示柜中静置过夜;抽滤,收集沉淀,用乙醇洗涤沉淀表面,冷藏干燥。

### 2.5 工艺验证试验

按上述最佳工艺操作,提取 3 份苦杏仁酶,测定其质量和比活力,并计算总活力。结果显示苦杏仁酶的提取量为 1.585 1 g, RSD 为 4.90%;苦杏仁酶的平均比活力为 60.090 U/mg,总活力为 95 154.6 U, RSD 为 1.93%,说明此提取工艺较好。

### 2.6 与传统提取法的比较

苦杏仁酶的传统提取法为:取干燥脱脂苦杏仁粉 50.0 g,加入 400 mL 62.5 mmol/L 预冷氨水,立式冷藏展示柜冷浸 24 h,滤过,收集滤液,滤渣再用 62.5 mmol/L 预冷氨水 350 mL 冷浸 24 h,弃去药渣,合并滤液;缓缓加入醋酸中和到 pH 4.0,边加边搅拌,静置片刻,上层澄清液抽滤,下层混悬液用离心机 3 600 r/min 离心 5 min,收集滤液,合并两次滤液并测量体积;加入 4 倍量体积乙醇,立式冷藏展示柜中静置过夜;抽滤,收集沉淀,用乙醇洗涤沉淀表面,冷藏干燥后得苦杏仁酶<sup>[3]</sup>。传统方法与本实验优化出的闪式提取工艺的比较见表 6,结果显示闪式提取法的酶提取量和总活力均比传统提取法要高。

表 6 苦杏仁酶的闪式提取与传统提取方法比较

Table 6 Comparison of the smashing tissue extraction and traditional methods of emulsin

提取方法	酶提取量/g	比活力/(U·mg <sup>-1</sup> )	总活力/U
传统提取	1.092 1	60.469	66 038.2
闪式提取	1.527 5	59.885	91 474.3

## 3 讨论

苦杏仁酶是从植物体中得到的主要含 β-葡萄糖苷酶、β-D-半乳糖苷酶等糖苷酶的粗酶制剂,可广泛用于栀子苷、桃叶珊瑚苷等糖苷类物质的水解。从资源丰富的苦杏仁、桃仁等天然产物中提取苦杏仁酶,具有便宜易得、方法简单、酶产品的水解效率高等优点,若以冷榨法提取苦杏仁油的下脚料为原料,提取苦杏仁酶,还可以更充分地利用苦杏仁资源。

苦杏仁酶稳定性相对较差,为防止化学脱皮过程中高温、酸碱等外部因素破坏酶的活性,提取苦杏仁酶的原料最好是当年产的未炮制的带皮苦杏仁

生品。同时,提取工艺对保持苦杏仁酶的活性至关重要,除提取过程中的冷浸、抽滤、缓冲液等条件对苦杏仁酶活性的影响外,提取方法是影响苦杏仁酶活性中极为重要的因素。闪式提取法是中药提取领域的一项新技术,其所用时间短,而且避免了不耐热成分的破坏,收率高,操作简便,节约溶剂和能源。本研究把闪式提取应用于苦杏仁酶的制备工艺中,并对该工艺进行了优化,得出了较优提取条件。采用闪式提取法代替预冷氨水中长时间浸泡的传统提取法,节省了大量时间,且可以避免使苦杏仁酶长期处在碱性环境中,有利于酶活力的保持。

参考文献

[1] 李贵海,刘青,孙付军,等.不同炮制方法对苦杏仁主要药效作用的影响[J].中成药,2007,29(7):1031-1034.

[2] 李杨,王敏娟,赵晔,等.苦杏仁酶法转化桃叶珊瑚苷为桃叶珊瑚苷元的分析[J].药物分析杂志,2008,28(12):2001-2004.

[3] 孙文基.天然药物成分提取分离与制备[M].第3版.

北京:中国医药科技出版社,2006:146.

[4] 刘振洋,刘延泽,刘改岚,等.绞股蓝总皂苷的闪式提取和纯化工艺研究[J].中草药,2009,40(7):1071-1073.

[5] 王平,陈丹龙,朱兴一,等.闪式提取银杏叶中萜类内酯的工艺研究[J].时珍国医国药,2009,20(11):2825-2826.

[6] 汪中博,赵余庆.积雪草总皂苷闪式提取(STE)工艺研究[J].中国现代中药,2009,11(2):36-38.

[7] 郑礼胜.京尼平苷的酶解工艺及其产物的降糖活性研究[D].长沙:中南大学,2010.

[8] 吴冬梅.闪式提取器在中药研究中的应用[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(7):34-37.

[9] 刘延泽.植物组织破碎提取法及闪式提取器的创制与实践[J].中国天然药物,2007,6(5):401.

[10] Sun Y L, Liu Y Z, Xiao H, et al. Smashing tissue extraction and GC analysis of active fatty acids from oil cake of Perilla seeds[J]. Chin Herb Med, 2011, 3(1): 75-78.

[11] 汤芳玲,袁波,蔡光明,等.小叶黑柴胡中柴胡皂苷的闪式提取工艺的研究[J].中草药,2009,40(增刊):160-162.

经集中程序获得共同体上市授权的新药

商品名	活性成分	开发公司	获批时间	适应证
Leflunomide Ratiopharm	leflunomide	Ratiopharm GmbH	2010-11-29	类风湿性关节炎
AFLUNOV	Prepandemic Influenza vaccine (H5N1) (surface antigen, inactivated, adjuvanted)	Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l.	2010-11-29	H5N1 型甲型流感
Prepandemic Influenza vaccine (H5N1) (surface antigen, inactivated, adjuvanted) Novartis Vaccines and Diagnostics	Prepandemic Influenza vaccine (H5N1) (surface antigen, inactivated, adjuvanted)	Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l.	2010-11-29	H5N1 型甲型流感

(2011-01-07 公布, 数据来源: EMA、Dialog 数据库和 Pharmaprojects 数据库)