

## • 中药现代化论坛 •

## 生化过程工程与中药现代化

顾 铭<sup>1</sup>, 欧阳藩\*

(中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

**摘 要:** 在生化工程 20 余年的研究工作基础上, 结合中药现代化开展了一些技术、材料与设备的研究开发工作。研究植物细胞、组织、器官大规模培养增殖技术, 应用于细胞代谢产物、生物转化和人工育种及发根, 实现了工厂化生产, 并成功研制多种类型的生物反应器; 在原有化学工程提取分离技术的基础上, 发展了反应分耦合、微波辅助提取等新技术, 实现了高效浸出, 并且节能、节水; 此外, 又发展了包括反胶团萃取、一步三相萃取青霉素、泡沫分级分离、膜分离、高速逆流色谱分离纯化等新技术。高速逆流色谱技术是一种没有固相载体的液-液多级逆流萃取技术, 避免了不可逆吸附, 已成功用于多种天然产物的分析和分离, 作为研究中草药指纹图谱的新方法具有很好的精密度和重视性, 高效液相色谱、气相色谱、毛细管电泳、质谱等技术在指纹图谱研究中发挥了重要作用。与此同时, 还研制了多种分离介质, 并在药物的修饰与包埋方面做了大量工作。另外, 在海洋药物研究领域, 创造了连续培养连续采收的新流程、新技术, 进行了转基因藻的培养, 用于生产基因工程产品

**关键词:** 植物细胞培养; 分离纯化技术; 中药指纹图谱; 分离介质; 药物修饰; 药物包埋; 海洋药物

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)08-0841-04

## Biochemical process engineering and modernization of Chinese materia medica

GU Ming, OUYANG Fan

(State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering,  
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract:** Some studies corresponding modernization of Chinese materia medica (CMM) were performed in the institute for the new technologies, materials, and facilities based on the achievements and experiences gotten in the past two decades. The technologies of large-scale propagation of plant cell, tissue, and organ were applied to the products of cell metabolism, biotransformation, and artificial breeding and rooting. Many new types of large-scale bioreactors were designed and used not only for laboratory but also for manufactory. Reaction/separation integration technology, microwave-assisted extraction, and the other new extraction technologies were studied to realize high efficiency and low energy. Besides traditional separation and purification methods, new technologies, including extraction in reversed micelles, one step three-phase extraction on Penicillin, foam fractionation, membrane separation, and high-speed counter-current chromatography (HSCCC), were developed. HSCCC is a kind of liquid-liquid partition chromatography without any solid matrix, which eliminates irreversible adsorption of samples on solid support in the conventional chromatographic column. It has been successfully applied to the analysis and separation of various natural products. At the same time, many types of microsphere and microencapsules for controlled release and separation media were prepared and lots of attention was paid on drug modifying and embedding techniques. HSCCC was also applied as a new method to the study of CMM fingerprint and showed good precision and repeatability. High performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC), high performance capillary electrophoresis (HPCE), and mass spectrometer (MS) played a very important role in fingerprinting. Continuous propagation-continuous collection technological process was set for large-scale propagation of microalgae in the study of marine drugs. Transgenic algae were cultured to produce genetically engineered products.

\* 收稿日期: 2003-11-28

作者简介: 顾 铭 (1972—), 女, 江苏无锡人, 助理研究员, 2004 年获中国科学院过程工程研究所生物化工专业博士学位, 主要从事天然产物分离纯化及指纹图谱的研究。Tel: (010) 82627061 E-mail: guming@home.ipe.ac.cn

**Key words:** plant cell propagation; separation and purification technology; Chinese materia medica fingerprint; separation medium; drug modifying; drug embedding; marine drug

工业生产可分为过程工业和产品工业两大类,生物技术工业和医药工业是属于过程工业,其工程科学和技术的研究是属于过程工程学的研究范畴<sup>[1]</sup>。五千年文明创造的中医药体系,无论传统作坊式生产还是现代工业化生产,其过程是相同的,即原料采集→按药方、单方配料→煎煮→提取→制剂。中药现代化也包括生产过程现代化,过程工程在中医药现代化中有不可推辞的责任和义务。因此我所在生化工程20余年来的研究、开发工作基础上,结合中药现代化开展了一些过程工程研究及开发工作,简述如下。

### 1 中药原料药材实行 GAP 生产

中药材生产规范化及质量标准化是中药产业的基础和关键。为保证中药材或天然产物的优质、安全、无公害并具可控性,国际上正积极探索药材生产管理规范(GAP)的实施,即为保证提供高质量、稳定可控的中药原料,应在天然药材研究的基础上,选择优良品种并在最适宜生长条件的地域种植或饲养,研究、制订及推行规范化种植、养殖技术,建立科学合理的采收、加工制度,使药效基础物质的含量稳定,以满足严格的质量标准,并严格控制药材原料无污染,无残药和重金属超标,以保证用药的安全。

在中药材人工栽培生产过程中,利用植物细胞、组织、器官大规模培养增殖,可为濒临灭绝、难于种子繁殖、培养环境特殊的植物的快速繁殖提供有效的方法。植物细胞培养可实现工厂化生产,目前植物细胞培养主要应用于三方面:细胞代谢产物,生物转化和人工种子、种球、发根等。

代谢产物主要用于一些价格高、产量低、需求大的化合物(如长春碱、紫草宁等),其次是油料(如小豆蔻油、春黄菊油等)、食品添加剂(如生姜、洋葱、香子兰等)、色素(如番红花、姜黄等)、调味剂(胡椒、海兰香等)、饮料(咖啡、可可等)、橡胶(如阿拉伯树胶等)等。

生物转化是利用植物细胞分泌实现的,可实现一些重要的药用化合物如吡啶生物碱、黄酮类以及苯丙酮酸的生物合成,生物酶催化将发展成生物化工的一个重大领域。

人工种子外层为有机薄膜包裹,保护水分和营养免于丧失和防治外部的物理冲击,中间含有培养物(胚状体等)所需的营养成分和某些植物激素,以

作为胚状体萌发时的能量和刺激因素,最内侧是被包埋的胚状体或芽,组成一种和天然种子相似的结构。优点是繁殖速度快,结构完整、种皮和培养液可根据需要来设计,是无性繁殖,可固定杂种优势,育种过程简单。

无性繁殖种苗还可采用反应器培育种球、毛根转化种苗等。因此植物细胞大规模培养,在中药材的 GAP 育种方面可发挥巨大作用,我所积累了近20年植物细胞培养的研究成果与经验,主要在三方面:(1)植物细胞培养生物反应器包括各种类型的气升式反应器、光合反应器、半浸没式反应器、雾化反应器、多层塔板式反应器,培养成功紫杉醇、紫草宁、青蒿素、麻黄碱、雪莲、藏红花等10余种药用植物及代谢产物,还在微型薯、青蒿发根转化苗反应器培养方面获得了成功。(2)植物组织培养的细胞株建立和代谢调控,我所自主建立系列的可用于反应器大规模培养的细胞、组织和器官的细胞系,在放大培养中研究了多种条件下的生长、代谢凋亡的原理和条件,为提高有效成分的含量和传代性能的稳定性取得了良好的进展,有些项目已推向工业化生产。(3)建立了一些有效成分的分析 and 植株成分鉴定方法,进行和建立了部分药物计算机辅助筛选和分子及细胞水平的药物筛选模型,对有效成分进行初筛。

### 2 有效成分的提取

在原有化学工程提取分离的技术基础上又发展了反应分离耦合技术、循环气升超声破碎分离分级方法、微波浸出技术、流态化多级逆流浸出等新技术,实现浸出效率高、节能、节水。

### 3 分离纯化

除传统的分离方法外,又发展了一些新技术,包括反胶团萃取分离技术、共聚物胶团萃取技术、一步三相萃取毒霉素技术、泡沫分级分离技术、膜分离及膜污染控制技术、微波萃取天然产物等萃取技术,以及固体载体液相分离及蛋白质复性技术、高速逆流色谱分离纯化技术等。

反胶团萃取主要是分离蛋白质,各类反胶团(阴离子反胶团、阳离子反胶团、亲合反胶团、混合反胶团)萃取,利用多种反胶团从发酵液中分离纯化 $\alpha$ 淀粉酶,用亲合和混合反胶团分离纯化乙醇脱氢酶等,并研发出自吸式搅拌萃取器和滚筒式填料筛板塔萃取器。

利用双亲嵌段共聚物如聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯的高分子链聚合物胶团在界面的吸附特性,并利用其胶团的形成与解离对温度的敏感性,正在探索应用于分离纯化。

一步法三相萃取青霉素是利用与水不相溶或极少相溶的有机溶剂与双水相体系,共同组成三相体系,一次完成对复杂混合物的分离,将原来需要多步完成的萃取过程集中在一个萃取过程中完成,并研制了三相连续萃取装置,可应用于中草药等其他复杂体系的萃取分离过程。

微波萃取是在将微波炉进行技术改造,增加温度测量控制、搅拌、热回流、时间控制等装置,在微波辅助下进行了甘草中的甘草酸,茶叶中的茶多酚和咖啡碱,丹参中的丹参酮的提取等。

超顺磁性分离载体是利用磁性材料将亲和配基偶联在其表面,在外加磁场的定向控制下,通过亲和吸附、清洗和解吸等操作,可从复杂的生物分子体系中分离出目标生物分子。

高速逆流色谱技术(HSCCC)近10年来其设备和应用都有了很大发展<sup>[2,3]</sup>。该色谱是20世纪80年代在螺旋行星式逆流色谱的基础上发展起来的,是一种无固体载体,利用分子在液液两相的连续分配实现连续分离纯化的技术。在重力场和离心力场作用下,建立流体动力学平衡,塔板数高,分离效率高,操作简单,能从极复杂的混合物中分离出特定的组份。应用于天然产物的分离可实现:(1)制备高纯度的药用成分对照品或参照物和必需控制的杂质成分;(2)配合活性跟踪与人药部位的设计,逐级分离制备活性部位或活性成分;(3)中药材和中药方剂指纹的建立,提供更丰富或准确的信息和数据;(4)利用逆流色谱进行中试批量生产和工业生产。

国内于20世纪末成立了专门的公司(同田生物技术公司)批量生产分析、制备和工业应用的HSC-CC设备,并开发出从数十种常用中草药植物分离纯化制备100多种纯度在98%以上的单体,提供国内外使用。

本所与同田公司合作开展了天然产物的分离工艺和有效成分分离纯化的制备研究工作。进行了丹参脂溶性化合物、雪莲黄酮类化合物和蚯蚓毒素等的分离纯化,并探索了利用HSCCC制订中药指纹图谱的方法,以丹参原药材为模式植物,初步建立了丹参的HSCCC指纹图谱。

#### 4 固体介质与药物新剂型

医药生物技术中除了在分离纯化方面使用各种

物质和形状的固体介质,我所在近20年中主要研制固定化细胞和固定化酶的固体介质。重点探索了以下固体介质:(1)动物贴壁细胞用的微载体;(2)分离纯化天然产物用的树脂;(3)修饰生物药用亲水性高分子介质;(4)分离纯化基因工程蛋白质的微球介质;(5)酶、细胞固定化载体;(6)包埋生物药物的微囊。

生物药物的修饰和包埋技术在增强药效、有效施用和剂型多样化(包括皮渗、缓释、控释等)起着显著的作用。本所已在介质制备方面建立了尺寸均一、可控的微球制备技术,孔径可控的大孔微球制备技术,表面修饰改性技术等。在药物的修饰方面正进行大规模定点技术的完善,以达到精确的控制释放和靶向性。已对不同的生物药设计不同的修饰包埋工艺。

#### 5 分析与质控

随着天然产物的培养、分离纯化品种的增加与积累,我所建立了一系列的分析、检测和质控技术,同时也开展了有效成分的筛选工作。随着仪器分析技术及计算机信息处理技术的迅猛发展,中药指纹图谱技术应运而生。应用指纹图谱监控中药材、中成药的质量以达到稳定,将成为国内发展趋势,国际上FDA及欧共体药审委(EMA)对进口植物药物产品也要求采用指纹图谱技术来保证质量一致。指纹图谱评价中药质量的方法如图1所示。为了中药现代化从原料GAP到复方、单方中药的质控提供技术,还用HSC-CC等进行中药指纹图谱建立的研究工作。

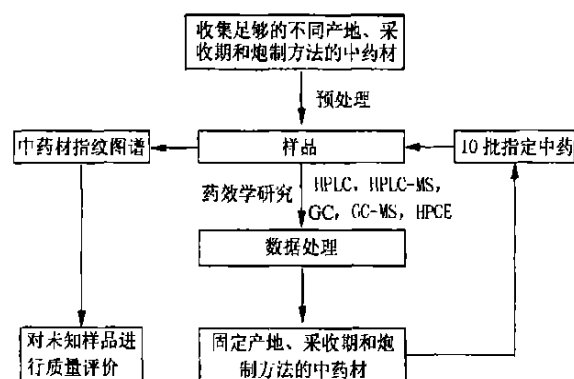


图1 指纹图谱评价中药质量的方法学框图

Fig. 1 Methodology frame of fingerprint for evaluation of CMM quality

指纹图谱的建立是通过一种或多种分析方法得到药材或成药的化学信息,然后制定一组图谱来评估原料或产品质量和进行质控。分析手段有色谱(薄层色谱扫描、高效液相色谱和气相色谱)和光(波)谱(紫外光谱、红外光谱、质谱和核磁共振)。色谱指纹图谱为首选方法,HPLC精密度高,重现性好,适用

范围较广,但需要严格的样品预处理,易造成样品在固定相的吸附,且高黏度样品分离困难。

中药指纹图谱要求系统性、特征性和重现性。HSCCC 可以分析、分离黄酮、生物碱、醌类、类脂等多种化合物,在分析、分离黏度较高和易被固定相吸附的样品方面具有明显优势,HSCCC 的分辨率高、重现性好,所以我们探索将 HSCCC 用于中药指纹图谱的制订。

以丹参为模式物,利用半制备型 HSCCC 有效地分离了脂溶性化合物,得到 12 个洗脱组份(图 2)。比较各洗脱组份在反相色谱中的保留时间和吸收光谱(900~200 nm),判定 3 条 HSCCC 洗脱曲线中各组份依次对应,3 条洗脱曲线中不存在非共有峰;且各指纹峰保留时间的 RSD 均小于 3%,精密度较好。若用分析型 HSCCC,并对温度进行控制,HSCCC 指纹图谱的精密度可望进一步提高。

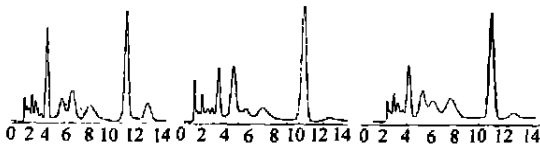


图 2 3 个产地丹参样品高速逆流色谱图

Fig. 2 Chromatograms of crude samples of *S. miltiorrhiza* from three different habitats by HSCCC separation

## 6 海洋资源药物

6.1 光合反应器与清洁低耗的微藻培养过程:微藻的生长需要光照,如何提高光利用率是光反应器设计的关键,我们研制、设计、制造了系列光生物反应器,并已生产商品批量供应国内外的研究与生产藻种的需求。同时创造了连续培养连续采收的新流程新技术。这一流程是利用  $\text{CO}_2$  和空气混合气通过加压饱和气使  $\text{CO}_2$  溶解,使饱和器中的水(或来自补碳培养分离装置的稀藻液)达到饱和(以下简称溶气水),该溶气水经过释水器进入常压的补碳培养分离装置(泡载分离器),与装置内的循环藻液充分混合,发生湍流扩散接触,向藻液快速传质(属液-液传质,传质阻力小),实现高效补碳;与此同时,由于湍流扩散以及物理化学效应,另以部分溶剂化的气体降压后形成大量的微气泡,这些微气泡与藻细胞相黏附,上浮,达到细胞浓缩分离的目的。装置内上升的气泡经过气-水分离器后可以重新加压循环使用(图 3)。此外, $\text{CO}_2$  在藻液中溶解度比空气大,释压时空气

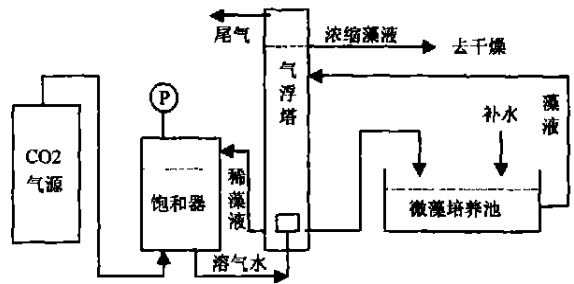


图 3 连续培养——连续采收示意图

Fig. 3 Sketch of continuous propagation——continuous collection

将优先解吸形成微气泡,实施细胞分离而溶剂化的  $\text{CO}_2$  主要作用是补碳,因此,过程实现了合理和经济。

干燥采用载体流态化干燥器,可实现囊状进料,含水量低,干燥热损失少,设备体积小,可连续操作,控制方便。干燥气中的  $\text{CO}_2$  又可取回到前面饱和塔作为  $\text{CO}_2$  源,使整个流程清洁低耗。

6.2 转基因藻的培养:我所进行了转肿瘤坏死因子 TNF- $\alpha$  基因藻的培养,生产基因工程产品,研究了有机碳、通气量、温度、pH 值等对细胞生长速率、光合放氧速率、外源基因表达水平的影响。

采用基因工程的手段将光合效率较高的高等植物中与固定  $\text{CO}_2$  密切相关的几个关键酶转入蓝藻中提高其固定  $\text{CO}_2$  效率,使之能在较高浓度  $\text{CO}_2$  条件下通过强化的光合作用合成较多的生物物质。不仅在蓝藻的光合作用机制研究中有重要的理论意义,而且能够将相关的研究成果应用于高等植物和农作物中。

## 7 结语

我所围绕着中药现代化,在生化过程工程 20 多年的研究工作基础上,在中药原料药的 GAP 生产、有效成分提取及分离纯化、分离介质、药物修饰与新剂型、药物分析与质量控制、海洋资源药物研发等方面开展了技术、材料和设备的研究开发工作。将现代高新技术与中药传统精华相结合,充分发挥我所的工程技术优势,为中药现代化做些力所能及的工作。

## References:

- [1] Ouyang F. Feature and frontier of biochemical process engineering [J]. *Chin J Process Eng* (过程工程学报), 2001, 1 (3): 230-238.
- [2] Ito Y. Recent advances in counter-current chromatography [J]. *Chromatography*, 1991, 538: 3-25.
- [3] Zhang T Y. Horizontal flow-through coil planet centrifuge: some practical applications of countercurrent chromatography [J]. *Chromatography*, 1984, 315: 287-297.